



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

DIFÚZE BARVIV V BIOPOLYMERNÍCH HYDROGELECH

DIFFUSION OF DYES IN BIOPOLYMERIC HYDROGELS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. David Vyroubal

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1421/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Bc. David Vyroubal**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Difúze barviv v biopolymerních hydrogelech

Zadání diplomové práce:

1. Rešerše na téma biopolymery, hydrogely, difúze.
2. Příprava hydrogelů a výběr difuzních sond.
3. Realizace difuzních experimentů.
4. Zpracování výsledků, charakterizace difúze v připravených hydrogelech.
5. Závěr.

Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2020:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. David Vyroubal
student(ka)

prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá studiem difuze barviv v biopolymerních hydrogelech. Tyto hydrogely jsou založeny na interakci biopolymerních elektrolytů a opačně nabitých tenzidů. Při interakci polyelektrolytů s opačně nabitými tenzidy můžou vznikat micelám podobné nano-kontejnery, které jsou schopné vázat hydrofobní sloučeniny. V této studii byla pro přípravu gelů použita kombinace modifikovaného dextranu (diethylaminoethyl dextran) s kladným nábojem a dodecylsírany sodného jako opačně nabitého tenzidu. Další typ gelu byl založen na hyaluronanu a kladně nabitým tenzidu Septonexu (karbethopendecinium bromid). Jako sondy pro studium difuze byla použita barviva nilská červeň a ATTO 488. Difuze těchto barviv z vodných roztoků NaCl nebo tenzidů do gelů byla sledována v závislosti na čase. Transport barviv do struktury gelu byl následně charakterizován difuzními koeficienty a strukturními parametry hydrogelů.

KLÍČOVÁ SLOVA

difuze, difuzní koeficient, dextran, hyaluronan, tenzid, SDS, Septonex, hydrogel, barvivo, nilská červeň, ATTO 488

ABSTRACT

This thesis is focused on diffusion of dyes in biopolymer-based hydrogels. These hydrogels are based on interaction between biopolymer-like electrolytes with oppositely charged surfactants. When polyelectrolytes interact with oppositely charged surfactants, micelle-like nano-containers can be formed. These nano-containers are able of binding hydrophobic compounds. In this study, combination of modified dextran (diethylaminoethyl dextran) with positive charge and oppositely charged sodium dodecylsulphate as surfactant was used for preparation of hydrogels. Next type of hydrogel was based on hyaluronan and positive charged surfactant Septonex (carbethoxypendecinium bromide). As a diffusion probes in hydrogels dyes Nile red and ATTO 488 were used. The diffusion of these dyes from aqueous solutions of NaCl or surfactants into hydrogels was monitored in time. Transport of dyes into structure of hydrogels was characterized by diffusion coefficients and structural parameters of hydrogels.

KEYWORDS

diffusion, diffusion coefficient, dextran, hyaluronan, surfactant, SDS, Septonex, hydrogel, dye, nile red, ATTO 488

VYROUBAL, David. Difúze barviv v biopolymerních hydrogelech. Brno, 2020, 82 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické, Fakulta chemická. Vedoucí práce prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.

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:

Na tomto místě bych mile rád poděkoval vedoucí mé diplomové práce prof. Ing. Martině Klučákové, PhD. za její odborné vedení, ochotu, vstřícnost a za velmi cenný čas. V neposlední řadě bych chtěl velmi poděkovat své přítelkyni, celé rodině a přátelům za jejich podporu v nelehkých dobách nejen při studiu.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1. Využití biopolymerů ve farmacii a kosmetice.....	9
2.1.1. Biopolymery jako nosiče léčiv	10
2.1.2. Polymléčná kyselina (PLA).....	12
2.1.3. Chitin a chitosan	13
2.1.4. Škrob.....	14
2.1.5. Kolagen a želatina	16
2.2. Dextran	18
2.2.1. Struktura a základní vlastnosti dextranu.....	18
2.2.2. Biosyntéza a výroba dextranu.....	21
2.2.3. Využití dextranu	22
2.2.4. DEAE-dextran	23
2.3. Kyselina hyaluronová	24
2.3.1. Struktura a vlastnosti kyseliny hyaluronové.....	24
2.3.2. Biosyntéza a výroba hyaluronanu, degradace	26
2.3.3. Využití kyseliny hyaluronové.....	27
2.4. Hydrogely	27
2.4.1. Využití hydrogelů	29
2.4.2. Hydrogelové nosiče léčiv	30
2.5. Tenzidy	31
2.5.1. Dodecylsírán sodný	31
2.5.2. Septonex	32
2.6. Difuze	32
2.6.1. První Fickův zákon	33
2.6.2. Druhý Fickův zákon	34
3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	34
3.1. Hydrogelové nosiče aktivních látek a jejich uvolňování.....	34
3.2. Využití sond ATTO 488 a nilské červeně	36
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
4.1. Použité látky	38
4.2. Použité přístroje a programy	38
4.3. Příprava sond a hydrogelů	39
4.3.1. Příprava kalibračních roztoků sond	39
4.3.2. Příprava zásobních roztoků	39

4.3.3. Příprava hydrogelů	40
4.4. Provedené difuzní experimenty	41
4.4.1. Studium difuze sondy do dextranových hydrogelů	41
4.4.2. Studium difuze sondy do hyaluronanových hydrogelů	41
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	42
5.1. Dextranové hydrogely se sondou ATTO 488 v roztoku NaCl	43
5.1.1. Dextranové hydrogely D1 s ATTO 488 v NaCl	43
5.1.2. Dextranové hydrogely D2 s ATTO 488 v NaCl	44
5.1.3. Srovnání gelů D1 a D2 se sondou ATTO 488 v roztoku NaCl	45
5.2. Dextranové hydrogely se sondou nilská červeň v roztoku SDS	47
5.2.1. Dextranové hydrogely D1 s nilskou červení v SDS	47
5.2.2. Dextranové hydrogely D2 s nilskou červení v SDS	47
5.2.3. Srovnání gelů D1 a D2 se sondou nilská červeň v roztoku SDS	48
5.3. Hyaluronanové hydrogely se sondou ATTO 488 v roztoku NaCl	50
5.4. Hyaluronanové hydrogely se sondou ATTO 488 v Septonexu	56
5.5. Hyaluronanové hydrogely se sondou nilská červeň v Septonexu	62
5.6. Srovnání s uvolňováním barviva z hydrogelu	67
6. ZÁVĚR	70
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	73
8. SEZNAM ZKRATEK A POUŽITÝCH SYMBOLŮ	82
8.1. Seznam zkratk	82
8.2. Seznam použitých symbolů	82

1. ÚVOD

Hydrogely mají pro své výjimečné vlastnosti široké uplatnění v mnoha oborech. Jednou z vlastností je schopnost zadržovat velké množství vody. Díky schopnosti zadržovat vysoké množství vody a fyzikálně-chemické podobnosti s extracelulární matrix jsou vysoce biokompatibilní. Vzhledem ke svým unikátním vlastnostem jsou hydrogely velmi rozšířené v biomedicině a zdravotnictví. Hojné zastoupení mají i v tkáňovém inženýrství, kde se používají například jako scaffoldy. Tyto scaffoldy slouží jako opěrný či nosný materiál pro růst a proliferaci buněk. Ve farmacii se hydrogely používají jako nosiče léčiv, které mohou mít cílené a kontrolovatelné uvolňování léčiva. Studium vlastností těchto nosičů se zabývá farmakokinetika. Studium vlastností hydrogelových nosičů léčiv umožňuje jejich vytváření na míru. Nosiče mohou být navrženy tak, aby docházelo k pomalému uvolňování léčiva, popřípadě k jeho zakoncentrování v okolní tkáni nebo doručení léčivého přípravku do požadované tkáně či orgánu. Jako modelový mechanismus uvolňování léčiva z hydrogelů je jeho difuze způsobená koncentračním gradientem. Hydrofilní povaha hydrogelů mechanismus difuze značně ovlivňuje. Mnohé modelové studie zaměřené na uvolňování aktivní látky z hydrogelové matrice ukazují, že uvolňovací mechanismy jsou závislé nejen na difuzi, ale i na struktuře, nabobtnání hydrogelu a na fyzikálně-chemických vlastnostech aktivní látky i matrice.

Hydrogely, které ze své podstaty obsahují vysoké množství vody však nejsou vhodné pro solubilizaci hydrofobních sloučenin. Tato nekompatibilita může být překonána začleněním hydrofobních domén do struktury hydrogelu. Tyto domény pak umožní navázání hydrofobních sloučenin do struktury gelu, zatímco si hydrofilní síť gelu a jeho vnitřní vodná fáze zachová svoji biokompatibilitu. Pro přípravu těchto gelů je možné použít kombinaci polyelektrolytu s opačně nabitými ionty tenzidu. V této práci byly jako polyelektrolyty použity kladně nabitý modifikovaný dextran (konkrétně DEAE-dextran) a hyaluronan jako záporně nabitý polyelektrolyt. Pro zesíťování dextranu byl použitý opačně, tedy záporně nabitý tenzid dodecylsírán sodný (SDS). Hyaluronan byl zesíťován kladně nabitým tenzidem karbethependecinium-bromidem (Septonex). Tyto biopolymery jsou netoxické, dobře rozpustné ve vodě, biokompatibilní, biodegradabilní a obsahují vysoké množství funkčních skupin použitelných k zesíťování.

Pro studium difuzních charakteristik těchto hydrogelů bylo použito dvě rozdílná barviva označovaná jako nilská červeň (NR) a ATTO 488. Nilská červeň byla vybrána jako modelový zástupce hydrofobních sond. ATTO 488 pak představuje zástupce hydrofilních sond. Pro posouzení potenciálu hydrogelů při použití ve vývoji nových systémů nosičů léčiv je nutné popsat jejich vlastnosti z hlediska propustnosti a difuzních charakteristik v závislosti na různých prostředích. Cílem této práce je tedy popsat difuzní charakteristiky a transportní vlastnosti hydrogelů na bázi dextran-SDS a hyaluronan-Septonex. Od každého typu hydrogelu bylo připraveno několik jeho různých variant. Dextranové hydrogely se mezi sebou lišily v koncentraci použitého tenzidu SDS při zesíťování. Tyto tenzidy byly použity v koncentraci 100 mM a 400 mM. Hyaluronanové hydrogely byly připravovány ze zásobních roztoků nízkomolekulárního (LMW) a vysokomolekulárního (HMW) hyaluronanu. Hyaluronanové hydrogely byly připravovány smísením zásobního roztoku hyaluronanu a tenzidu Septonexu

o 100 mM a 200 mM koncentraci roztoku. Detailní příprava hydrogelů a jejich složení popisuje kapitola 4.3. Vzniklé hydrogely byly ponechány k ustálení a usazení na dně vialky a následně byl přebytečný supernatant odlit. Místo supernatantu byl ke gelu přidán roztok obsahující barvivo v různých koncentracích. Pro zkoumání vlivu prostředí na difuzní charakteristiky, byla barviva obsažena v různých roztocích. Barviva byla studována v 0,15 M vodném roztoku NaCl, v roztocích 100 mM a 200 mM tenzidu Septonexu a v roztocích 100 mM a 400 mM SDS. Následně byla zkoumána absorbance těchto roztoků pomocí UV-VIS spektrofotometrie. Z naměřených absorbancí byla vypočítána koncentrace barviva v roztocích i v gelech a z nich potom další difuzní charakteristiky jako jsou difuzní koeficienty a koeficienty α , představující koeficient mezi počáteční koncentrací sondy a koncentrací na rozhraní gelu a roztoku (bráno ze strany gelu, viz. kapitola 5).

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Využití biopolymerů ve farmacii a kosmetice

Jako polymery obecně označujeme molekuly skládající se z jednotlivých opakujících se jednotek nazývaných monomery, které jsou spojené kovalentní vazbou. Syntéza mnoha polymerů probíhá spojením jednotlivých monomerů dohromady za vzniku řetězců z těchto opakujících se základních jednotek. Počet opakujících se jednotek potřebných pro splnění definice polymeru není přesně určený. Obecně je stanoveno, že počet monomerů, označovaných písmenem n označuje i polymerační stupeň. Číslo n je u polymerů dostatečně vysoké tak, že přidáním dalších monomerních jednotek se nijak výrazně nemění fyzikálně-chemické vlastnosti celé molekuly [1]. Polymery se dělí na mnoho druhů a skupin. Jedno z mnoha možných dělení může být na polymery biologicky neodbouratelné a polymery biodegradabilní. Termín biodegradabilní v medicíně označuje ty polymery, které jsou organismem postupně přeměněny na produkty netoxické pro organismus. Dalším termínem pro označování polymerů či jejich dělení je biokompatibilita. Biokompatibilní polymery jsou ty, které při kontaktu s organismem nevykazují imunitní reakci. Termínem biopolymery se pak obecně označují polymery přírodního původu, které jsou produkovány rostlinami, živočichy či mikroorganismy. Opakem jsou potom syntetické polymery, jejichž původcem jsou nejčastěji fosilní paliva [2].

Tabulka 1: Základní rozdělení biopolymerů [3].

Klasifikace	Producent	Polymer
Protein		Elastin, kolagen-želatina, kasein, gluten, sójový protein, albumin, hedvábí, polyaminokyseliny, resilin, gluten
Polyester		Polymléčná kyselina (PLA), polyhydroxyalkanoáty (PHA)
Speciální polymer		Přírodní kaučuk, nylon z ricinového oleje, polyglutamová kyselina, šelak, syntetické polymery z přírodních tuků a olejů
Polysacharid	Živočichové	Kyselina hyaluronová, chitin, chitosan
	Bakterie	Dextran, celulóza (bakteriální), xanthan, levan, kurdlan, polygalaktosamin
	Rostliny, řasy	Celulóza, škrob, agar, pektin, karagenan, alginát, guma guar a další gumy
	Houby	Glukany, pullulan, elsinan

Biodegradabilní polymery se v medicíně začaly používat v 60. letech minulého století, kdy byly vytvořeny první absorbovatelné šicí materiály a sutury. Od této doby je používání biomateriálů v medicíně neustále se vyvíjejícím oborem. Biopolymery se v medicíně využívají jako kryty na rány, tělní implantáty, materiály pro tkáňové inženýrství, in vivo senzory a v neposlední řadě také nosiče léčiv, kterým je v posledních pár letech věnováno mnoho pozornosti. Stále více se v medicíně, farmacii i kosmetice používají i syntetické polymery,

kteřé jsou však biokompatibilní a biodegradabilní. Právě biodegradabilita syntetických polymerů či biopolymerů je z ekologického hlediska a ochrany životního prostředí v popředí zájmu [2].

Kosmetika často obsahuje polymery získané z fosilních zdrojů a nejsou biodegradabilní. Nejčastěji se používají polymery jako je polyethylen, polypropylen a polystyren, které se přidávají do čistících, líčících a opalovacích produktů. Mikročástice těchto kosmetických produktů po použití končí v odpadních vodách a vstupují do vodních zdrojů, kde se akumulují. Trendem proto je nahradit tyto materiály biodegradabilními polymery. Pro náhradu polyethylenu v exfoliačních produktech se používají materiály z přírodních zdrojů jako jsou ulity, zrna, bambus, rýže, přírodní vosky, mikrokrytalická celulóza nebo polymléčná kyselina (PLA). Nejčastěji se tedy používají škroby, chitin a chitosan [2].

Při používání syntetických polymerů v medicínských aplikacích, zejména jako různé implantáty či jako nosiče léčiv, může docházet vlivem jejich degradace a následnému vzniku jejich degradačních produktů k nežádoucím imunologickým reakcím. Degradační proces syntetických polymerů často probíhá hydrolýzou, při které vzniká oxid uhličitý, který snižuje lokální pH a tím dochází k buněčné a tkáňové nekróze. Vzhledem k tomuto faktu jsou biopolymery díky jinému mechanismu odbourávání pro organismus lépe přijatelné. Polymery, nevyvolávající imunologickou reakci, což mohou být i některé syntetické polymery, mají největší potenciál pro vývoj zdravotnických materiálů jako jsou dočasné protézy, 3D-porézní struktury zvané scaffoldy pro tkáňové inženýrství, nebo kontrolovatelné systémy pro uvolňování léčiv [3].

2.1.1. Biopolymery jako nosiče léčiv

V současné době se do popředí zájmu dostávají nanomateriály jako takzvané inteligentní nosiče léčiv. Nanomateriály mají široké spektrum využití díky jejich unikátním fyzikálním, mechanickým elektrickým, magnetickým, chemickým a biologickým vlastnostem. Inteligentní nosiče léčiv a systémy, nejen ty nanomateriálové, mají vylepšenou farmakokinetiku tím, že řídí dodávání zakomponované látky na požadované místo účinku, zvyšuje proces uvolňování a absorbování léčiva nebo mohou tyto nosiče reagovat na vnější stimul například v podobě magnetického pole. Dále mohou upravovat profil uvolňování léčiva, tím že se doba uvolňování zpozdí či prodlouží. Nemodifikovaný povrch nanočástic má však nevýhodu v tom, že tyto nanočástice jsou rychle rozpoznány imunitním systémem a následně jsou fagocyty vyčištěny. Nanočástice mají obecně velký povrch v poměru k objemu částice, což umožňuje modifikaci povrchu a navázání velkého množství funkčních skupin. Pro zabránění imunitní reakce se proto používají modifikace pomocí přírodních nebo syntetických polymerů, což může zároveň zvyšovat odolnost těchto nosičů proti gastrointestinálním tekutinám a tím i lépe zacílit léčivo tam, kde je potřeba. Nejčastěji se pro modifikaci používají právě polymery na bázi proteinů a polysacharidů opět z důvodu jejich biodegradability, biokompatibility a nízké imunitní odezvy. Funkce mikro- a nano-inkapsulace pro modifikování povrchu uvádí Tabulka 2 [4].

Polysacharidy jsou přírodní polymery skládající se z monosacharidů, které jsou spojené glykosidovou vazbou a hojně se vyskytují v rostlinách, živočiších, houbách, ale i v mikroorganismech. Polysacharidy mají široké rozmezí vlastností a odlišují

se v rozpustnosti, ve schopnosti emulgace, vstřebatelnosti či ve schopnosti zadržovat vodu [5]. Díky přítomnosti velkého množství funkčních skupin na molekulárním řetězci jsou polysacharidy snadno chemicky a biochemicky modifikovatelné, což vede k mnoha druhů různých polysacharidových derivátů. Jako přírodní materiály jsou polysacharidy velmi stálé, bezpečné, netoxické, hydrofilní a biodegradabilní. Polysacharidy obsahují množství hydroxylových, karboxylových a amino skupin, které mohou tvořit nekovalentní vazby s biologickými tkáněmi, můžeme mluvit o tzv. bioadhezi [6].

Například chitosan, škrob a alginát jsou dobré bioadhezivní materiály. Nosiče léčiv vytvořené z těchto bioadhezivních materiálů mohou prodloužit dobu setrvání nosiče na místě působení a zvýšit množství navázaného léčiva. Při aplikaci nosičů léčiv z těchto přirozeně se vyskytujících polysacharidů se zjednodušují otázky ohledně bezpečnosti, toxicity a dostupnosti [6].

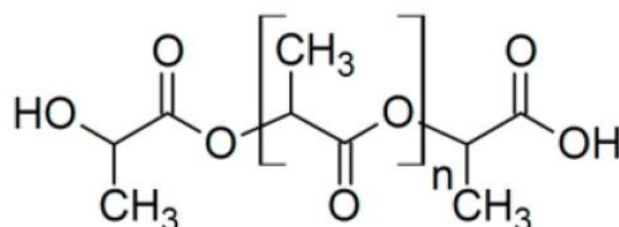
Tabulka 2: Funkce mikro- a nano-enkapsulace pro modifikování povrchu [5].

Funkce mikroenkapsulace	Funkce nanoenkapsulace
Ochrana bioaktivních látek	Redukce velikosti částic a zúžení profilu distribuce částic
Kontrolovaný profil uvolňování	Zvětšení velikosti povrchu
Úprava organoleptických vlastností	Zvýšení bioaktivní ochrany
Zlepšení tokových vlastností	Zlepšení biokompatibility
Zvýšení doby skladovatelnosti	Vylepšení fyzikální stability a prodloužení doby skladovatelnosti
Obohacení o specifické živiny	Lepší zacílení nosiče a zlepšení průchodnosti organismem
	Zlepšení reaktivity mezi jednotlivými složkami nosiče
	Zlepšení absorpce uvnitř buněk

Proteiny jsou sloučeniny s vysokou molekulovou hmotností, které se skládají z aminokyselin. V kyselém prostředí jsou proteiny nerozpustné, v alkalickém prostředí jsou lehce rozpustné. Proteiny mají vynikající vlastnosti pro tvorbu filmů, gelovatění, emulzifikaci a zadržování vody. Běžně se používají k přípravě systémů na uvolňování léčiv. Slouží jako efektivní nosič pro přenos bioaktivních sloučenin, tuků, olejů a mastných kyselin. Nejčastěji se pro nosičové systémy používají proteiny živočišného původu jako je fibroin obsažený v přírodním hedvábí, kolagen, želatina, kasein a albumin [4]. Rostlinné proteiny mají v porovnání s živočišnými proteiny excelentní hydrofobní vlastnosti. Jsou také považovány za méně alergenní a cenově dostupnější než živočišné proteiny. Jako proteiny rostlinného původu se používá sójový protein, zein (kukuřičný protein) a gliadin [5].

2.1.2. Polymléčná kyselina (PLA)

PLA je jedním z nejslibnějších biologicky rozložitelných polymerů současnosti. Lze ji získat z přírodních surovin jako je kukuřičný škrob, cukr, rýže, brambory a další přírodní zdroje. Jejím potenciálem je nahrazení konvenčních petrochemických polymerů v průmyslu nebo se může stát důležitým biomateriálem pro nespočet medicínských aplikací. PLA je alifatický polyester, který má mechanické vlastnosti podobné syntetickým polymerům jako je třeba polypropylen. Vysokomolekulární PLA se nejčastěji vyrábí polykondenzací nebo polymerací za otevření kruhu laktidu (ROP) [7]. Biokompatibilita PLA je pro medicínské užití důležitým aspektem. Řetězec PLA se rozkládá v organismu hydrolýzou nejprve na menší oligomery, čímž se snižuje i molekulová hmotnost, nakonec se řetězec rozloží až na kyselinu mléčnou. Kyselina mléčná je následně odbourána v cyklu trikarboxylových kyselin [8].



Obr. 1: Kyselina polymléčná (PLA) [3].

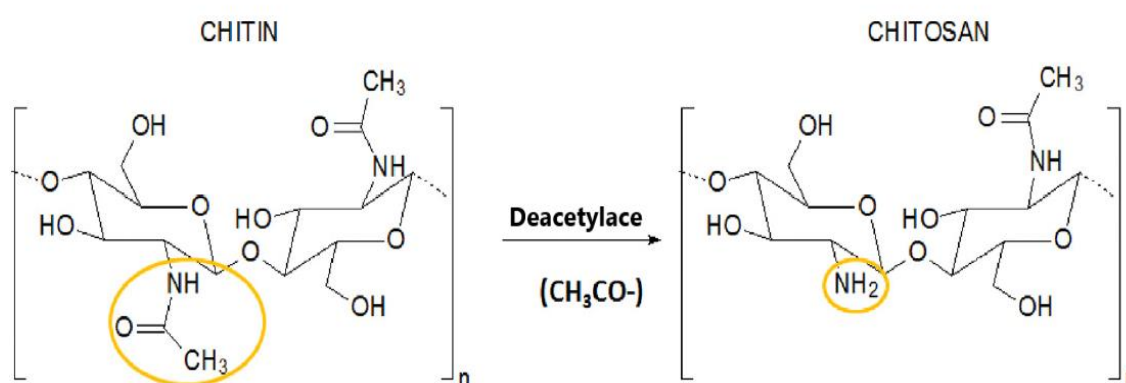
Přes pozitivní vlastnosti má PLA také nevýhody, které limitují její možnosti použití. Jednou z nevýhod je nízká odolnost a tvrdost. PLA je velmi křehký materiál, u kterého už při natažení o necelých 10 % dochází k prasknutí. Přestože je jeho pevnost v tahu a modul pružnosti srovnatelný s polyethylentereftalátem (PET), nízká houževnatost omezuje jeho použití v aplikacích, které vyžadují plastickou deformaci při vyšších úrovních napětí. Další možnou nevýhodou může být její pomalá degradace, obzvláště při využití jako možný nosič léčiv, kdy pomalá degradace vede k dlouhému výskytu v organismu. Avšak na druhou stranu může být nízká rychlost degradace i výhodou, například při použití PLA jako scaffoldů či různých implantátů, které se rozloží až po nárůstu nových buněk. Jak již bylo zmíněno výše, PLA se rozkládá hydrolýzou a rychlost degradace závisí na krystalinitě, molekulové hmotnosti a jejím rozložení, morfologii, difuzi vody do polymeru a obsahu stereoizomerů. Dále je PLA hydrofobní, což opět pro použití v biomedicíně představuje problém. Kyselina polymléčná neobsahuje boční řetězce s reaktivními funkčními skupinami, takže její modifikace není zcela jednoduchá [8].

V medicíně se PLA používá už od 60. let 20. století jako implantáty a zdravotnické prostředky např. pro šití ran v chirurgii. Ze začátku se však kvůli vysoké ceně PLA nesetkala se širokým využitím. To se změnilo v 80. letech, kdy se prekurzor PLA kyselina mléčná začala vyrábět fermentačním způsobem. Současně se PLA v medicíně používá jako implantáty, které umožňují tkáňový růst, dále jako náhrady kostí a jejich fixátory. PLA je často používána

v kombinaci s dalšími polymery či proteiny, jako například s kyselinou polyglykolovou (PGA), skelnými vlákny, kolagenem, uhlíkatými vlákny a hydroxyapatitem. Různými kombinacemi se dá dosáhnout požadovaných vlastností. Další možnou kombinací je komplex PLA-chitosan, kde chitosan slouží jako neutralizační médium, když se při odbourávání PLA tvoří kyselina mléčná, která snižuje lokální pH [7].

2.1.3. Chitin a chitosan

Chitin a chitosan jsou nejvíce hojně dostupné lineární polysacharidy s produkcí více než 10 gigatun chitinu ročně. Chitin je složený z molekul N-acetyl-D-glukosaminu, které jsou spojené β -(1,4)-glykosidickou vazbou. Chitin tvoří hlavní složku exoskeletu členovců a tvoří společně β -polyglukany v buněčnou stěnu hub. Chitosan vzniká deacetylací chitinu a jeho využití je daleko vyšší než u samotného chitinu. Chitosan se skládá z jednotek D-glukosaminu a jednotek N-acetyl-D-glukosaminu (Obr. 2). Dá se říct, že chitosan je označení pro deacetylovaný chitin o různém stupni deacetylce. Stupeň deacetylce může nabývat různých hodnot a může se pohybovat od 60 po 100 %. Nejčastěji je chitosan tvořen z 80 % D-glukosaminem a z 20 % N-acetyl-D-glukosaminem. O molekulové hmotnosti, která může dosahovat i 10^6 Da, rozhodují stupně polymerace a acetylce. Ty také určují viskozitu ve vodném roztoku a od toho se odvíjí i následné farmakologické a biochemické vlastnosti [9]. Největším rozdílem mezi chitinem a chitosanem je jejich rozpustnost ve vodě. Chitin je nerozpustný a chitosan je ve vodě rozpustný. Chitosan má velmi široké rozmezí využití, používá se v potravinářství a ve výživě, v biotechnologiích, materiálovém inženýrství, farmacii, zemědělství i v ochraně životního prostředí. Chitin a chitosan hrají velkou roli při vývoji biomateriálů a v aplikacích tkáňového inženýrství díky jejich univerzálním vlastnostem zahrnujících vysokou biokompatibilitu, vynikající biologickou odbouratelnost, antimikrobiální aktivitu proti gram-pozitivním i gram-negativním bakteriím, hemostatické vlastnosti, adhezivní vlastnosti pro tkáň a v neposlední řadě při procesu hojení ran [10]. Chitosan se používá v nejrůznějších formách jako jsou gely, filmy, částice, membrány nebo scaffoldy [3].



Obr. 2: Chemické struktury chitinu a chitosanu a proces deacetylce [11].

Jedním z mnoha možných využití chitosanu je jeho použití jako kontrolovatelného nosiče léčiv. Řízené dodávání léčiva z implantovaného zařízení nebo orálně podávaných tablet nabízí různé výhody oproti pasivně zaměřeným systémům léčiv první generace, jako je zvýšená účinnost, redukce či eliminace nežádoucích vedlejších účinků a kontrola hladiny léčiva, která je neustále udržována v terapeuticky žádoucím rozmezí. Chitosan disponuje několika unikátními vlastnostmi, které z něj dělají ideální nosič léčiv: in situ gelace, mukoadheze, hydrofilní charakter a zvýšená permeace. Chitosan je navíc jedním z mála kladně nabitých polyelektrolytů. Léčivo se může na chitosan kovalentně nebo nekovalentně vázat, konkrétně na aminoskupiny, ze kterých se pak v kontaktu s tělními tekutinami může uvolňovat [11].

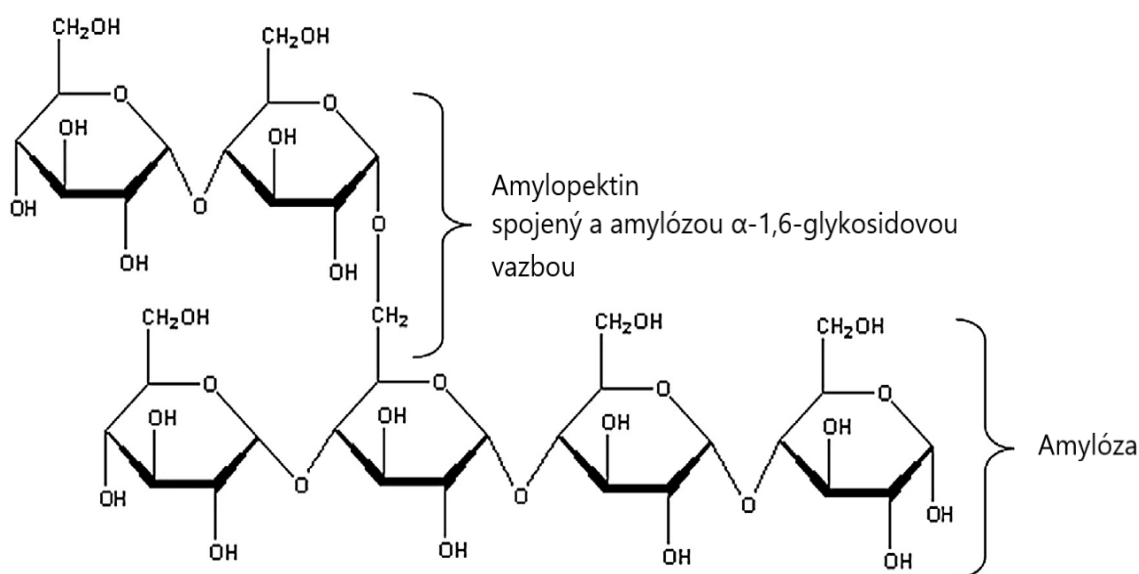
Jako nosič léčiv se chitosan používá i ve formě hydrogelu. Právě hydrogely vykazují schopnost transportovat malé molekuly jako jsou například molekuly léčiva. Plně nabobtnalé hydrogely mají některé vlastnosti velmi podobné živým tkáním, jsou to například gumová a měkká konzistence nebo nízké mezifázové napětí s vodou a biologickými tekutinami. Fyzikální vlastnosti těchto hydrogelů jsou určovány molekulovou hmotností M_w , stupněm zesíťování gelu a náboji. Zvýšením stupně zesíťování vede ke zvýšení tuhosti a modulu pružnosti, což ovlivňuje ochranu enkapsulovaného léčiva, které je lépe chráněno při transportu a migraci hydrogelu. Důležitou vlastností je i velikost pórů hydrogelu a hydrodynamická velikost léčiva, které řídí difuzi enkapsulovaného léčiva. Pro transport léčiva byl zkoumán například pH senzitivní alginát-chitosanový hydrogel, do kterého byl zakomponován nifedipin – léčivo na vysoký tlak. Množství uvolňovaného nifedipinu se zvyšuje se zvyšujícím se pH (42% uvolnění při pH 1,5 a 99% uvolnění při pH 6,8). Takto připravený hydrogel, který zadržuje uvolňování léčiva při nižším pH, může být používán při dodávání léčivých látek do střev [12].

Kosmetické využití mají především deriváty chitinu a chitosanu. Využívá se karboxymethylchitin a částečně naštěpený chitosan jako aktivní ingredience do šamponů na vlasy, do kondicionérů a dalších ošetřujících vlasových přípravků právě díky jeho dobré viskozitě ve vodných roztocích, zadržování vlhkosti, tvorbě filmů. Kombinace těchto vlastností dodává vlasům a pokožce měkkost a poddajnost [13].

2.1.4. Škrob

Škrob je přírodní polymer spadající do skupiny polysacharidů. Škrob byl a je velmi intenzivně studován díky tomu, že je hojně dostupný, levný a biologicky rozložitelný. Škrob je biopolymer, který se nachází hlavně v rostlinách, kde plní zásobní funkci a představuje konečný produkt procesu fotosyntézy. Velmi hojně je zastoupen v pšenici a dalších obilovinách, v kukuřici, rýži, fazolích a bramborách. Škrob tvoří více než 60 % obsahu obilných zrn a je poměrně jednoduché jej od zbytku zrn separovat. V rostlinách se ukládá ve formě škrobových zrn. V závislosti na rostlinném zdroji se škrobová zrna liší tvarem, velikostí, strukturou a chemickým složením. Škrobová zrna se skládají ze dvou základních polysacharidů, a to z amylózy a amylopektinu, které jsou tvořené jednotlivými molekulami glukózy. Sumární vzorec škrobu je tedy $(C_6H_{10}O_5)_n$ [14]. Kromě amylózy a amylopektinu obsahují zrna i malé množství lipidů a proteinů. Amylóza je lineární polymer skládající se z anhydroglukózových jednotek spojených α -(1,4)-glykosidickou vazbou. Může dosahovat molekulové hmotnosti od 20 kg/mol až do 800 kg/mol. Její obsah ve škrobových zrnech

většinou bývá 20–25 %. Amylóza je odpovědná za vlastnosti škrobu spojené s tvořením filmu. Amylopektin je vysoce větvený polymer složený z krátkých jednotek anhydroglukózy spojených α -(1,4)-glykosidickou vazbou, který je větvený α -(1,6)-glykosidickou vazbou, vyskytující se každých 25–30 glukózových jednotek. Amylopektin má vysokou molekulovou hmotnost nabývající hodnot 5 000–30 000 kg/mol. Rozdíly ve struktuře a molekulové hmotností mezi amylosem a amylopektem vedou k odlišnostem jejich molekulárních vlastností a filmotvorných vlastností [15].



Obr. 3: Struktura škrobu zobrazující amylopektin spojený α -(1,4)-glykosidickou vazbou a amylosem větvený se α -(1,6)-glykosidickou vazbou [16].

Farmaceutické aplikace škrobu spočívají hlavně v transportu léčiv a nejčastěji je využíván jako matrice celého léčiva. V tomto způsobu využití je léčivo dispergováno v porézní matricové síti, která může bobtnat ale i nemusí, léčivo je následně uvolňováno v reakci na podnět, kterým může být změna pH, náboje nebo enzymatická reakce. Primárním cílem takového matricového systému je zajištění řízeného uvolňování léčiva a zabránění nebo omezení oscilace koncentrace léčiva v krvi, tím se dosáhne požadovaného terapeutického účinku. Zároveň se tím snižují nežádoucí vedlejší účinky léčiva [16].

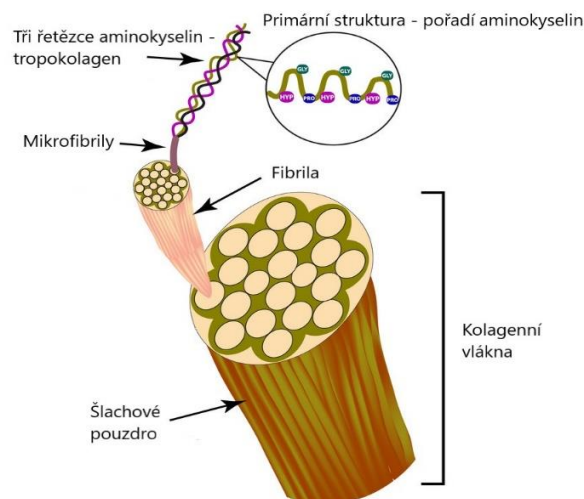
Aby se maximalizovalo využití škrobu v nosičových systémech, ale i v dalších odvětvích, upravují se fyzikálně-chemické a fyzikálně-mechanické vlastnosti přímo na míru pro potřeby těch daných aplikací. Využívají se čtyři základní metody úpravy: chemická, fyzikální, enzymatická a genetická. Všechny tyto metody se zaměřují na tři volné hydroxylové funkční skupiny škrobového polymeru. Chemická modifikace je nejvíce prozkoumanou metodou modifikace díky její nedestruktivní povaze. Hydroxylové skupiny polymeru mohou být chemicky modifikovány pomocí esterifikace, etherifikace a oxidace. Stupeň modifikace závisí na původu škrobu a na reakčních podmínkách [16].

Škrob je převážně používán při řízeném uvolňování léčiv jako nosič a v některých charakteristických aplikacích se používá při opravě nebo náhradě kostí. Pro tyto aplikace jsou důležité vlastnosti jako rozpustnost, enzymatická stravitelnost, reologické a morfologické charakteristiky, bobtnání a mechanické vlastnosti. Škrob se společně s chitosanem a uhlíkovými nanotubicemi používá k přípravě uhlíkových nanokompozitů. Tyto nanokompozity mohou být následně použity pro řízené uvolňování léčiv [17].

2.1.5. Kolagen a želatina

Kolagen je nejvíce zastoupeným vláknitým proteinem v intersticiální tekutině extracelulární matrix v živočiších. Kolagen tvoří až 30 % celkových proteinů v lidském těle a největší zastoupení má kolagen v kůži, ve které je zhruba polovina celkového kolagenu v organismu. Je syntetizován a vylučován v extracelulární matrix fibroblasty. Vyvíjením tlaku na matrix, skládají fibroblasty kolagenní fibrily do listů a vláken. Charakteristickým rysem kolagenu je jeho strukturální uspořádání. Primární strukturu tvoří řetězce složené z aminokyselin glycinu, prolinu a hydroxyprolinu. Hydroxyprolin je výsledkem posttranslačních procesů, kdy se modifikuje prolin za účasti vitamínu C. V řetězcích se opakuje triplet, který můžeme označit jako Gly-X-Y, kde Gly označuje glycin, X a Y označuje místa obsazená prolinem a hydroxyprolinem. Díky tomuto složení se tvoří levotočivá šroubovice. Vodíkové atomy na bočním řetězci glycinu spojují tři jednotlivé řetězce do trojitě šroubovice, kterou nazýváme tropokolagen. V současné době se eviduje 28 rozdílných druhů kolagenů. Například kolagen typu I je hlavní strukturní složkou v tkáních jako je kůže, kosti a šlachy [18].

Kolagen je svými vlastnostmi a přírodním původem ideálním materiálem pro použití v medicíně i kosmetice. Má schopnost podporovat vnitřní růst tkáně, takže může být použit i v aplikacích k hojení ran. Kolagen má však špatné mechanické vlastnosti a podléhá rychlé degradaci, tyto problémy se však dají překonat použitím zesítujících činidel nebo zkombinováním s jinými polymery. Kolagen může být použit v systémech řízeného uvolňování léčiv vytvořením nebo přeměněním v různé tvary a typy zahrnujících například proteinové „klece“, nanočástice, filmy, hydrogely a „minipruty“. Difuze z nabobtnalých kolagenových matric je klíčem k uvolňování léčivých látek, zároveň k uvolňování přispívá enzymatická degradace matrice či hydrofobní interakce léčiva a kolagenu. Chemicky nebo dehydrotermálně zesítované kolagenní matrice mají sníženou absorpci vody a tím se jim prodlužuje uvolňování léčiva. Kolagenní mikročástice mohou být použity jako nosiče glukokortikoidů, antibiotik (např. gentamicin) a chondrocytových transplantátů [4].



Obr. 4: Struktura kolagenního vlákna [19].

Kolagen se velice často používá ve formě tenkých filmů. Jejich hlavním účelem sloužit jako bariérová membrána. Tyto filmy obvykle mívají tloušťku 0,01–0,5 mm. Léčivo může být navázáno na kolagenní membránu pomocí vodíkových můstků nebo kovalentní vazbou. Mohou být sterilizované a po hydrolýze se stávají pružnými a zároveň si zachovávají určitou pevnost při manipulaci. Takovýto kolagenní film byl aplikován do oka a k jeho kompletnímu rozložení došlo po 5–6 hodinách [20]. Kolagen je také velmi často používán jako doplněk stravy a své zastoupení má i v kosmetice. V současné době se na trhu pohybuje obrovské kvantum nejrůznějších doplňků stravy či kosmetiky obsahujících kolagen. Z doplňků stravy se dá pořídit například hydrolyzovaný kolagen, mořský kolagen, nebo kolagen ve směsi třeba s kyselinou hyaluronovou, či vitamínem C. V kosmetice se kolagen používá při výrobě krémů, mastí a balzámů pro ošetření a ochranu pokožky, vlasů a nehtů.

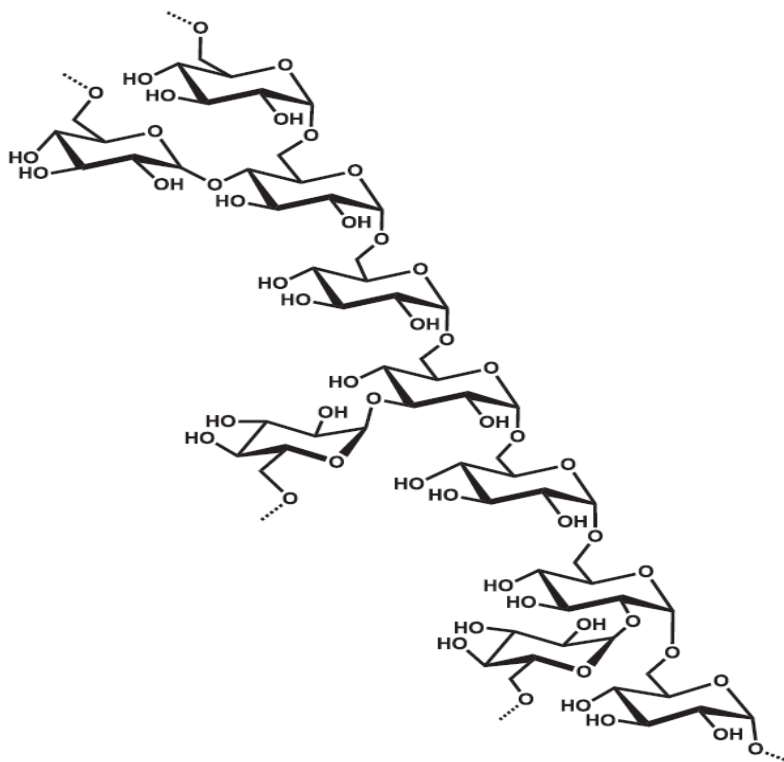
Želatina je vlastně denaturovaný protein, který se získává z živočišného kolagenu jeho částečnou hydrolýzou pomocí kyseliny nebo zásady, nebo strukturními změnami za použití enzymů či termické degradace. Podle způsobu přípravy želatiny se dělí na želatinu A a B. Typ A je získáván z hovězí, vepřové nebo rybí kůže přes kyselou hydrolýzu, zatímco typ B je získáván ze stejných zdrojů, ale alkalickou hydrolýzou. Želatina má dobré funkční vlastnosti, co se týká biologické kompatibility, biologické rozložitelnosti, schopnosti zadržovat vodu, schopnosti tvorby filmu a antikarcinogenity, navíc je to dobrý materiál pro enkapsulaci. Nicméně želatina je velice rychle rozpustitelná ve vodě, což vede k rychlému uvolnění aktivních látek [5]. Rychlé rozpouštění želatiny se podle jedné ze studií dá upravit pomocí enkapsulace kurkuminu, ten má antioxidační a antimikrobiální vlastnosti, avšak v potravinářství, kvůli jeho nerozpustnosti ve vodném prostředí, je jeho užití velmi omezené. Goméz-Estaca a kolektiv využili mikročástice kurkuminu a enkapsulovali je do želatiny, rozpustnost kurkuminu se tak zvýšila téměř 39krát [21].

2.2. Dextran

Dextran poprvé izoloval Louis Pasteur už v roce 1861, když studoval původ jeho přítomnosti ve víně. Dextran působí jako nežádoucí kontaminant nejen ve víně, ale i v mnoha jiných potravinářských výrobcích, které obsahují cukr, a tudíž jej můžeme nalézt i v průmyslu zpracovávajícím či vyrábějícím cukr. Pasteur experimentem s vínem potvrdil, že dextran má mikrobiální původ. Může se vyskytnout prakticky kdekoli, kde se nachází sacharóza, která je pro bakterie jeho prekurzorem. Název dextranu vymyslel a poprvé použil německý chemik Carl Wilhelm Bernhard Scheibler v roce 1874. Zjistil, že dextran patří mezi uhlovodíky a sestavil i empirický vzorec ($C_6H_{10}O_6$). Scheiblerovým předmětem studia bylo získávání cukru z cukrové řepy, konkrétně zkoumal houstnutí šťáv cukrové řepy a cukrové třtiny, které je ovlivňováno právě přítomností dextranu v těchto šťávách. V roce 1878 francouzský botanik Philippe van Thiegem, který pracoval v Pasteurově laboratoři, identifikoval bakterii syntetizující dextran v cukerných šťávách a pojmenoval ji *Leuconostoc mesenteroides* [22].

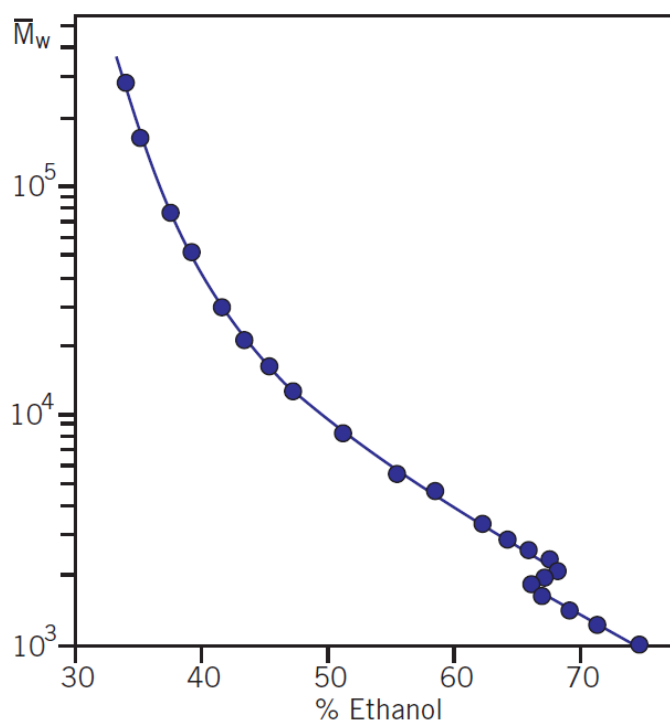
2.2.1. Struktura a základní vlastnosti dextranu

Dextran patří do skupiny neutrálních polysacharidů. Hlavní řetězec polymeru je složený převážně z D-glukózových jednotek spojených α -(1,6)-glykosidickou vazbou. Dextran se řadí do skupiny α -glukanů, kde patří například i glykogen a škrob. Tyto α -(1,6) vazby mohou tvořit 50–97 % všech vazeb v molekule. V závislosti na produkčním procesu, nebo organismu se v různých četnostech objevují vedlejší řetězce spojené α -(1,2), α -(1,3) nebo α -(1,4)-glykosidickými vazbami. Četnost vedlejších řetězců a jejich větvení ovlivňuje molekulovou hmotnost výsledné molekuly, která může nabývat hodnot od 5 až do 500 kDa [23].



Obr. 5: Základní řetězec dextranu spojený α -(1,6)-glykosidickými vazbami se znázorněnými bočními řetězci spojených α -(1,4); α -(1,3) a α -(1,2) vazbami [23].

Dextran je fyziologicky neškodný biopolymer díky jeho vysoké molekulové hmotnosti, biokompatibilitě, biologické rozložitelnosti a neantigenním vlastnostem [24]. Vlastnosti dextranu jsou závislé na způsobu jeho vzniku a mohou se podle producenta nebo způsobu výroby lišit. Záleží také na specifickém typu dextransacharázy. Dextran může mít v závislosti na producentovi rozdílnou strukturu molekuly, s tou souvisí i rozdílná molekulová hmotnost, rozpustnost a viskozita. Tyto modifikace jsou způsobeny různými stupni větvení a četností výskytu bočních řetězců spojených α -(1,2), α -(1,3) a α -(1,4)-glykosidovými vazbami. Boční řetězce se navíc mohou vázat pod různými úhly. Závislá na struktuře je i jeho rozpustnost ve vodě, některé typy nejsou vůbec rozpustné ve vodných roztocích, některé mají velmi špatnou rozpustnost, která se pohybuje okolo 30 mg/ml vody [23]. Rozpustnost dextranu ve směsi ethanolu s vodou závisí na molekulové hmotnosti. Tato závislost je znázorněna na Obr. 6. V dimethylsulfoxidu, glycerolu, ethylenglykolu a formamidu je dobře rozpustný, nerozpustný je v acetonu a alkoholech [25].



Obr. 6: Rozpustnost dextranu ve směsi ethanolu s vodou v závislosti na jeho molekulové hmotnosti, množství ethanolu je vyjádřeno v hmotnostních % [25].

Dextran o nižších molekulových hmotnostech obsahuje daleko méně bočních řetězců a rozvětvení a užší rozsah distribuce molekulové hmotnosti, zatímco dextransy s molekulovou hmotností přesahující 10 000 Da jsou velmi větvené. Se zvyšující se M_w dosahuje molekula dextranu větší symetrie. Ty s M_w nižší než 2 000 Da jsou spíše lineárního charakteru, dextransy s molekulovou hmotností od 2 000 do 10 000 Da se formují do tvaru spirály, potažmo cívky.

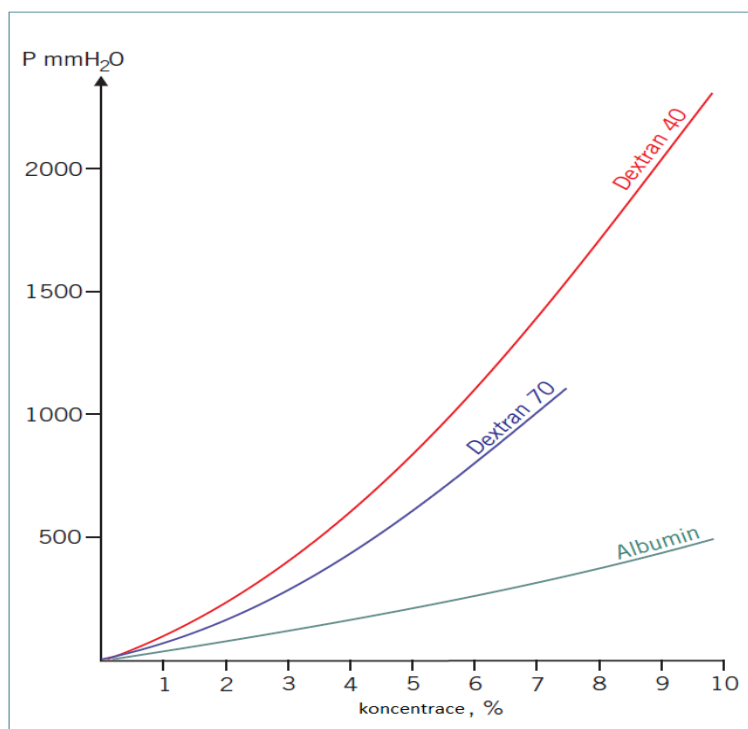
Tvar molekuly vedle molekulové hmotnosti závisí i na zvoleném rozpouštědle a na koncentraci dextranu v tomto rozpouštědle [24]. Při zvyšující se teplotě vodného roztoku dextranu od 20 do 40 °C dochází k vytvoření theta podmínek mezi rozpouštědlem a biopolymerem. Po dalším zahřívání dochází ke snížení interakcí mezi segmenty biopolymeru s molekulami rozpouštědla, polymer zaujímá méně expandovanou konformaci v roztoku. Smršťování spirálové struktury dextranu je způsobeno pravděpodobně snížením interakcí vodíkových vazeb v molekule [23].

Studie zabývající se chemickou stabilitou dextranu pro klinické použití prokázala, že dextran má velmi dobrou stabilitu v roztoku. Sterilizované vodné roztoky dextranu v rozmezí pH od 4,5 do 7 byly skladovány po dobu několika let při teplotě od 4 do 40 °C. Výrazné změny ve struktuře dextranu nebyly zaznamenány i když byly roztoky vystaveny náročným podmínkám. Roztoky byly například vystaveny opakujícím se cyklům zmrazení a rozmrazení beze změn v distribuci molekulové hmotnosti nebo pH [25].

Dextran má pouze hydroxylové funkční skupiny na rozdíl od jiných polysacharidů jako je například chitosan, alginát nebo kyselina hyaluronová. Jeho reaktivitu a možné modifikace umožňují hlavně tyto sekundární hydroxylové skupiny, které jsou ekvatoriálně orientované. Označují se HO-2, HO-3 a HO-4. Primární hydroxylové skupiny představují asi 1,5 % z celé molekuly. Četnost primárních hydroxylových skupin je opět ovlivněna molekulovou hmotností dextranu a zvyšuje se díky neredukujícím koncovým skupinám. Nejvyšší reaktivitu vykazují hydroxylové skupiny HO-2, které se nejvíce uplatňují při alkylaci dextranu. Reaktivita této skupiny je vysvětlena tím, že funkční skupina HO-2 je oproti ostatním skupinám blíže k anomernímu uhlíku a má tak vyšší kyselost. Stejně tak probíhá i sulfonace. Derivatizace hydroxylových skupin methylací, nebo částečnou oxidací kruhů a jejich degradací nám umožňuje zjistit víc informací o struktuře dextranu [25].

Vodné roztoky dextranu používané v medicínských aplikacích obvykle mívají molekulovou hmotnost v rozmezí 40 000–70 000 Da, popřípadě až 100 000 Da. Tyto roztoky mají vysokou odolnost vůči teplotě používané při sterilizaci a zároveň mají, jak již bylo zmíněno, dobré skladovací vlastnosti. Dextran s molekulovou hmotností 40 000 Da zlepšuje průtok krve a zabraňuje agregaci červených krvinek. Hypersensitivní reakce vyvolaná tímto dextranem může být minimalizována předběžným aplikováním injekce s dextranem o nižší molekulové hmotnosti, obvykle 1 000 Da, jako takový haptén [23]. Dextran pohybující se s molekulovou hmotností od 40 000 do 100 000 Da se označuje jako klinický dextran. Klinický dextran se často používá jako náhrada krevní plazmy. U tohoto využití je důležité znát souvislost osmotického tlaku vodného roztoku dextranu a jeho molekulové hmotnosti. Dextran s M_w nad 100 000 Da, už není z medicínského hlediska příliš použitelný, protože vzhledem k vysoké molekulové hmotnosti se mění jeho vlastnosti a tato změna není v těchto aplikacích akceptovatelná. Na následujícím Obr. 7 je znázorněné srovnání osmotického tlaku dextranu v porovnání s albuminem, tvořícím 60 % všech bílkovin v krevní plazmě. Graf ukazuje, že při vyšších koncentracích dextranu, či albuminu v roztoku se zvyšuje osmotický tlak vlivem vyšších interakcí molekuly s rozpouštědlem [25].

V lidském těle se dextran odbourává enzymy dextranázami, které se nacházejí v ledvinách, plicích, slezině a ve střevech. Dextran s molekulovou hmotností kolem 40 000 Da je biologicky degradován na izomaltózu. Vysoký stupeň substituce činí dextran enzymaticky nerozložitelným a degradace závisí na síle vazby konjugovaných skupin. Navázané esterové skupiny mohou být ve fyziologickém prostředí hydrolyzovány, pokud nejsou příliš stericky chráněny. Degradace dextranu v organismu je velmi důležitá pro jeho použití ve farmacii nebo v potravinových výrobcích, které jej obsahují [23]. Mnoho druhů hub, například rody *Aspergillus*, *Fusarium* a *Penicillium* produkují endodextranázy. Tyto enzymy se zaměřují hlavně na α -(1,6) vazby a rozkládají dextran na izomaltózy nebo izomaltotriózy. Dextranázy produkované houbami *Chaetomium gracile* a *Penicillium* se využívají komerčně a jsou používány pro odstranění dextranové kontaminace při výrobě cukru. Endodextranázy se mohou také používat pro enzymatickou produkci dextranu o specifické molekulové hmotnosti [22].



Obr. 7: Závislost osmotického tlaku v mmH₂O na hmotnostní koncentraci dextranu a albuminu ve vodném roztoku. Dextran má M_w 40 kDa a 70 kDa [25].

2.2.2. Biosyntéza a výroba dextranu

Dextran je produkován extracelulárně pomocí bakteriemi sekretovaných enzymů obecně nazývaných glukansacharázy, nebo více specificky označovaných jako dextransacharázy. Tyto enzymy spadají do skupiny glykosyltransferáz, které katalyzují přenos D-glukopyranosylových podjednotek ze sacharózy na dextran. Rozložením sacharózy se uvolní fruktóza, která slouží jako zdroj energie pro bakterie. K této reakci není potřebné ATP nebo jiné kofaktory, enzymy využívají energii uloženou v glykosidické vazbě mezi glukózou a fruktózou. Syntéza

glukansacharáz u kmene *Leuconostoc mesenteroides* je indukována pouze v přítomnosti sacharózy, zatímco rody *Streptococcus* produkují tyto enzymy trvale. Produkce dextransacharáz může být u rodu *L. mesenteroides* ovlivněna pomocí genetických úprav bakterií [22].

Dextran se průmyslově vyrábí pomocí mikroorganismů, které jako prekurzor dextranu zpracovávají sacharózu. Jeden enzym může katalyzovat syntézu až několika typů vazeb, což může vést k různým stupňům větvení. Dextran produkují bakterie z řádu *Lactobacillales*. Nejčastěji používanými kmeny bakterií pro fermentaci dextranu jsou *Leuconostoc mesenteroides* s označením NRRL B-512F a *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. První jmenovaný kmen, tedy NRRL B-512F, poskytuje dextran s 95 % α -(1,6)-glykosidických vazeb a 5 % α -(1,3) vazeb. Druhý jmenovaný kmen poskytuje dextran s 63 % α -(1,6)-glykosidických vazeb, 27 % α -(1,2) vazeb a 8 % α -(1,3) vazeb. Složení dextranu vždy záleží na použitém mikroorganismu, od kterého se odvíjejí i výsledné fyzikální a chemické vlastnosti [23]. Dextran mohou produkovat i některé druhy bakterií *Streptococcus*, které se vyskytují i v ústní dutině a dextran tak produkují jako součást zubního plaku. *L. mesenteroides* se většinou nachází na rostlinných materiálech, zejména na zralých nebo sklizených plodinách a často hraje roli při znehodnocování plodin. Jelikož je, jak již bylo zmíněno, sacharóza přírodním substrátem pro syntézu dextranu, může u potravin obsahujících sacharózu docházet ke kontaminaci dextranem [22].

Komerční produkce dextranu se provádí hlavně pěstováním kultur bakterie *Leuconostoc mesenteroides* v médiu obsahujícím sacharózu, organický zdroj dusíku například ve formě peptonu, růstové faktory, stopové množství určitých minerálů a fosfát. Fermentace probíhá anaerobně, jelikož je *L. mesenteroides* fakultativně anaerobní, popřípadě mikroaerofilní bakterie. Další podmínky fermentace zahrnují určitou hodnotu pH, která by se měla pohybovat od 6,7 do 7,2 a počáteční koncentrace sacharózy je 2 %. Fermentace probíhá při 25°C po dobu 24–48 hodin. Během prvních 20 hodin fermentace klesá pH substrátu na hodnotu 5 vlivem vznikajících organických kyselin. Větvení dextranu může být podpořeno zvýšením teploty média. Dextran je extracelulární produkt. Po proběhnutí fermentaci se z média odstraní buněčné zbytky a vzniklý produkt je z média extrahován alkoholovým srážením a následně je purifikován opakovaným procesem rozpuštěním ve vodě a opět vysrážením alkoholem [26].

Dextran může být také produkován enzymaticky bez nutnosti použití živých buněk. Biosyntézu dextranu katalyzuje enzym dextransacharáza. Tento způsob umožňuje syntézu dextranu za lépe kontrolovatelných, konstantních podmínek a poskytuje čistší produkt. Fermentace probíhá při 23°C, koncentrace sacharózy je udržována v rozmezí 0,5–1,0 %, čímž se zvyšuje aktivita dextransacharázy. Enzymatická syntéza je výhodná i díky tomu, že je lépe kontrolovatelná výsledná molekulová hmotnost a lépe se sleduje i kvalita výsledného produktu a vedlejším produktem je fruktóza. Nicméně enzymatická metoda není tak rozšířená pro komerční výrobu vzhledem k ekonomickým důvodům [26].

2.2.3. Využití dextranu

Dextran, částečně degradovaný dextran a jeho deriváty mají důležité komerční využití. Dextrany s relativně nízkou molekulovou hmotností jsou komerčně produkovány pro užití jako

terapeutické činidlo při náhradě krve po masivním krvácení. Jeden gram dextranu dokáže v krevním oběhu vázat až 20 ml vody. Molekulová hmotnost dextranu používaného jako expandér krevní plazmy se pohybuje od 40 000 do 100 000 Da, označuje se jako klinický dextran. Dextran produkovaný bakteriemi *L. mesenteroides* B-512F má nízkou antigenicitu, výbornou rozpustnost ve vodě a dobrou biologickou stabilitu v krevním řečišti. Díky těmto vlastnostem je vhodný pro použití ve farmacii, medicíně a v potravinářství. Dextran o vyšších molekulových hmotnostech anebo s větším množstvím vazeb jiných, než jsou α -(1,6) vazby může způsobovat alergické reakce jejichž výskyt omezuje rutinní dextranu jako náhrady krevní plazmy. Dextrany nacházejí uplatnění i v mikrochirurgii, kde se používají pro jejich antitrombotický efekt. Parenterálně podávaný dextran společně se železem se využívá pro rychlou léčbu krevní anémie z nedostatku železa. Dextran s navázanými síranovými estery vykazuje antikoagulační vlastnosti a může být potenciální inhibitor ribonukleáz. Další vlastností, která stojí za zmínku je jeho antivirová aktivita, především pak proti viru lidské imunitní nedostatečnosti (HIV), v některých zemích se používá i při léčbě arteriosklerózy. Z environmentálního hlediska představují velký význam merkaptodextrany, které jsou schopné vázat těžké kovy ve vodním prostředí a mohou tak sloužit při čištění odpadních vod od rtuti, stříbra, mědi a dalších těžkých kovů. Merkaptodextran může být použit i jako léčivo na otravu těžkými kovy [27].

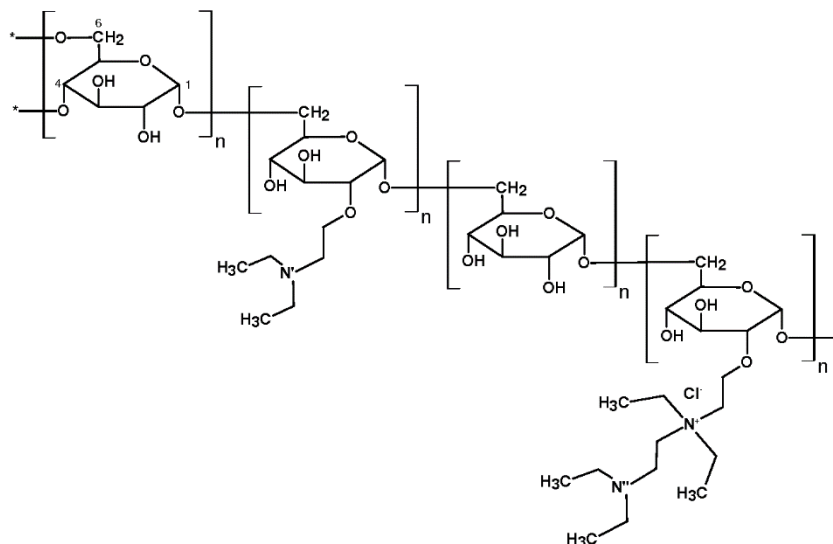
Díky biokompatibilitě, hydratačním schopnostem a vysoké stabilitě se často dextran využívá i v kosmetice a dalších přípravcích pečujících o kůži a zrak. V Evropské unii a v USA není jeho přímé přidávání do potravin povoleno, ale v jiných zemích, například v Japonsku, se používá v potravinářství jako stabilizátor a pojivo. Dále je přidáván do cukrářských výrobků, ve kterých zadržuje vlhkost, inhibuje krystalizaci cukru a zvyšuje viskozitu. Do želé a gumových bonbónů je přidáván jako želírující látka. V Evropě se může používat pouze producent dextranu *Leuconostoc mesenteroides*, a to při výrobě fermentovaných výrobků [24].

Nejrůznější esterové a etherové deriváty dextranu s rozdílnými vlastnostmi a negativním, pozitivním nebo neutrálním nábojem mají velmi široké uplatnění. Asi nejznámější a nejvíce používaný derivát dextranu je označován jako Sephadex[®], jehož název je odvozen ze slov SEparation PHArmacia DEXtran. Ten se začal komerčně vyrábět už v roce 1959 firmou Pharmacia Fine Chemicals. Sephadex je gel, který vzniká reakcí alkalického roztoku dextranu společně s epichlorhydrinem. Je používán jako molekulové síto sloužící k separaci a purifikaci nejrůznějších biologických makromolekul jako jsou nukleové kyseliny, proteiny a polysacharidy. Další možné využití dextranů je v nejrůznějších emulzních a filmotvorných směsích, ve vysoce viskózních gumách, ve výbušninách, při výrobě papíru, v petrochemickém průmyslu a těžbě ropy [24].

2.2.4. DEAE-dextran

DEAE-dextran je jedním z používaných derivátů dextranu. Zkratka DEAE označuje celý název diethylaminoethyl-dextran. Komerčně se vyrábí reakcí dextranu s N-(2-chlorethyl)-N,N-diethylamoniumchloridem v alkalickém prostředí. Touto reakcí vzniká z dextranu polykation obsahující tři různé aminoskupiny. Jedna z těchto aminoskupin je kvartérní a zbylé dvě jsou terciární aminoskupiny. Aminoskupiny se liší hodnotou disociační konstanty. Hodnota pK_a kvartérní aminoskupiny se pohybuje kolem čísla 14 a disociuje tak při všech hodnotách pH.

Zatímco terciární aminoskupiny dosahují hodnot disociačních konstant pK_a 5,5 a 9,2. Pokud DEAE-dextran obsahuje 3,2 % dusíku, potom vychází na tři glukózové jednotky jedna nabitá aminoskupina. DEAE-dextran je ve vodném roztoku při pH pohybujícím se v rozmezí 4–14 a při laboratorní teplotě stabilní. Pokud se v práškové podobě skladuje v chladu je dobře stabilní [28].



Obr. 8: Struktura DEAE-dextranu. Na obrázku jsou znázorněny i dvě terciární aminoskupiny a jedna kvartérní [29].

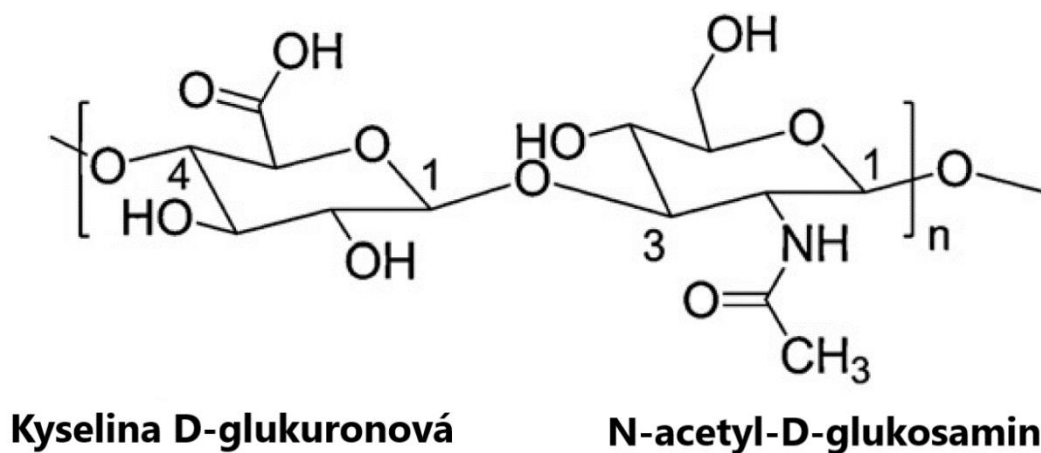
2.3. Kyselina hyaluronová

Karl Meyer a John Palmer v roce 1934 popsali doposud neprostudovanou strukturu polysacharidu s velmi vysokou molekulovou hmotností, kterou izolovali ze sklivce hovězího dobytka. Tuto nově objevenou strukturu poté nazvali kyselinou hyaluronovou [30]. V té době byly polysacharidy, představující jednu z hlavních složek organického materiálu, dobře prostudované a kyselina hyaluronová byla zařazena do skupiny polysacharidů nazývaných mukopolysacharidy, které jsou dnes známé jako glykosaminoglykany [31].

2.3.1. Struktura a vlastnosti kyseliny hyaluronové

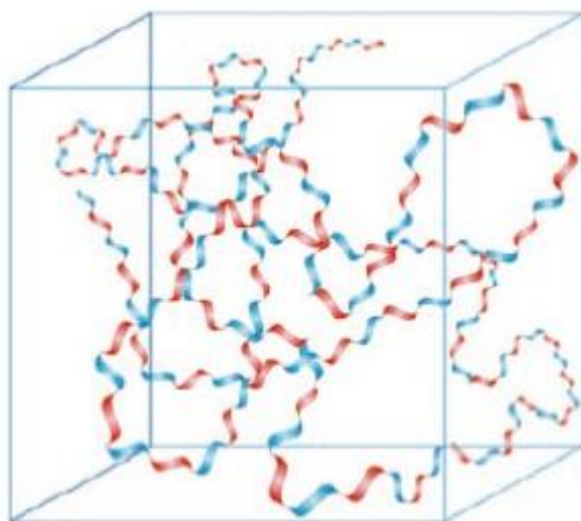
Kyselina hyaluronová (HA) je v organismu obsažena v extracelulární matrix. Je to vysokomolekulární glykosaminoglykan, který se skládá z disacharidových jednotek kyseliny D-glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu. Stavební jednotky jsou spojené střídajícími se vazbami β -(1,4) a β -(1,3). Kyselina hyaluronová může v molekule obsahovat více než 10 000 opakujících se disacharidových jednotek. Energeticky je celá struktura velmi stabilní. Glukuronové jednotky nesou za disociovaného stavu záporný náboj. Záporný náboj je poté kompenzován kladně nabitými kationty, například draselnými kationty K^+ nebo sodnými kationty Na^+ . Kyselina hyaluronová ve formě sodných či jiných solí je nazývána hyaluronan [30]. Ve fyziologickém roztoku je struktura hyaluronanu zpevněná kombinací chemického složení disacharidu, vnitřními vodíkovými vazbami a interakcemi molekuly s rozpouštědlem. Axiální vodíkové atomy tvoří nepolární část molekuly a ekvatoriální boční

řetězce tvoří více polární hydrofilní část, což způsobuje uspořádání celé struktury do tzv. náhodného klubka, anglicky random coil. Tuto strukturu můžete vidět na Obr. 10. Hyaluronan je tedy amfifilní molekulou, protože obsahuje hydrofobní i hydrofilní část [32].



Obr. 9: Struktura kyseliny hyaluronové složené z disacharidových jednotek kyseliny D-glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu spojené β -(1,3) a β -(1,4) glykosidickou vazbou [33].

Molekulová hmotnost hyaluronanu se často může lišit v závislosti na délce řetězců. Hyaluronan proto rozdělujeme na vysokomolekulární a nízkomolekulární. Molekulová hmotnost se může vzhledem k vysokému počtu disacharidových jednotek vyšplhat až na 4 MDa. Průměrná délka jedné disacharidové jednotky je méně než 1 nm, molekula hyaluronanu obsahující 10 000 těchto opakujících se jednotek může dosahovat délky až 10 μ m. Tato velikost je srovnatelná s velikostí lidské červené krvinky [32].



Obr. 10: 3D Model struktury kyseliny hyaluronové ve vodném roztoku. Modré části znázorňují hydrofilní oblasti a červené představují hydrofobní oblasti [34].

Hydrofilní část molekuly hyaluronanu hraje hlavní roli ve vázání vody víc, než tomu tak je u ostatních biopolymerů. Způsobuje to velké množství -OH skupin nacházejících se v molekule. Ve vodném roztoku se vytvářejí vodíkové můstky mezi karboxylovými skupinami, aminoskupinami a molekulami vody. Tyto vodíkové můstky mají hrají významnou roli ve stabilizování struktury hyaluronanu. Díky výborným fyzikálním a biochemickým vlastnostem má hyaluronan významnou roli ve fyziologických procesech. Jeho funkcí je chránit a zvlhčovat jemné tkáně, ve kterých zadržuje vysoké množství vody, což mu umožňuje jeho viskoelastické vlastnosti. Zapojuje se i v procesech buněčné diferenciaci a proliferaci. Uvnitř buňky se podílí na transportu živin a reguluje distribuci proteinů [35].

2.3.2. Biosyntéza a výroba hyaluronanu, degradace

Převážná většina glykosaminoglykanů je na rozdíl od HA produkována v Golgiho aparátu. Ta je biologicky syntetizována třídou membránově vázaných proteinů zvaných hyaluronan syntázy. Obratlovci mají hned tři typy těchto enzymů: HAS1, HAS2 a HAS3. Hyaluronan syntázy produkují dlouhé, lineární polymery hyaluronanu střídavým spojováním jednotek kyseliny glukuronové a N-acetyl-glukosaminu za pomoci aktivovaných nukleotidových sacharidů: UDP-glukuronové kyseliny a UDP-N-acetylglukosaminu jako substrátů [32].

Hyaluronan je možné extrahovat ze tkání obratlovců anebo z bakterií, které hyaluronan vytvářejí v rámci ochranné kapsuly z polysacharidů pomocí mikrobiální fermentace. Extrakce i bakteriální fermentace produkují vysokomolekulární hyaluronan, který se využívá hlavně v biomedicínských a kosmetických aplikacích. Pro extrakci hyaluronanu byly nejčastěji používány hřebínky kohoutů a slepic. Proces extrakce zahrnuje homogenizaci tkání, následuje samotná extrakce, a nakonec purifikace a úprava kyseliny hyaluronové. Konečný produkt může být následně ve formě granulí, prášku, nebo roztoku [31]. Od 80. let 20. století se produkce kyseliny hyaluronové zaměřuje na vývoj fermentačních metod pomocí bakterií, což vedlo k vývinu rozmanitých technologií. K výrobě se používají gram-pozitivní bakterie, protože právě ty produkují ochranný obal z polysacharidů. Na fermentační produkci je kladený velký nárok hlavně z hlediska čistoty výsledného produktu, protože používané bakterie jsou pro člověka patogenní. Produkující bakterie jsou vybírány tak, aby pokud možno nevykazovaly žádnou patogenitu a hemolytickou aktivitu, měly by být schopné syntetizovat hyaluronan v krátkém čase, při skladování by měly být stabilní a vyznačovaly se co nejvyšší účinností přeměny substrátu na produkt, tedy kyselinu hyaluronovou. Nejčastěji se využívají bakterie rodu *Streptococcus*, které jsou geneticky upravené. Genetickou úpravou se bakterie transformuje na nepatogenní. Proces bakteriální fermentace se skládá z kultivace bakterií při vhodných podmínkách a následného vytváření produktu v živném médiu. Následuje odstranění mikroorganismů a nízkomolekulárních produktů pomocí ultrafiltrace nebo precipitace. Purifikací vzniká produkt ve formě prášku nebo 1% roztoku [36].

Kyselina hyaluronová je u savců degradována třemi různými typy enzymů: hyaluronidázami, β -D-glukuronidázami a β -N-acetyl-hexosaminidázami. Tyto enzymy se nacházejí po celém těle v různých formách, intracelulárně a v séru. Hyaluronidázy obecně štěpí vysokomolekulární HA na menší oligosacharidy, zatímco β -D-glukuronidázy a β -N-acetyl-hexosaminidázy dále degradují oligosacharidové fragmenty odstraněním neredukujících konců. Degradací produkty hyaluronanu, konkrétně oligosacharidy a jeho formy o velmi nízké molekulární

hmotnosti vykazují pro-angiogenní vlastnosti. Hyaluronidáza katalyzující hydrolýzu HA, která je hlavní součástí intersticiální tekutiny, tak snižuje viskozitu této tekutiny a tím zvyšuje tkáňovou permeabilitu. Tohoto mechanismu je využíváno ve spojení s léčivými látkami k urychlení jejich disperze a doručení do místa jejich účinku [32].

2.3.3. Využití kyseliny hyaluronové

Kyselina hyaluronová je díky svým výborným viskózním, hygroskopickým a elastickým vlastnostem využívána v biochemických a biomedicínských aplikacích. Její hlavní přednosti jsou biokompatibilita a biodegradabilita. Vyskytuje se přirozeně ve tkáních obratlovců, v kloubech, v synoviální tekutině, očních sklivcích a v pupeční šňůře. Všichni obratlovci mají HA jako hlavní složku extracelulární matrix. Největší podíl kyseliny hyaluronové je v dermis a v epidermis. Díky schopnosti vázat velké množství vody, zajišťuje stálou hydrataci kůže, působí i při hojení ran a má protizánětlivé a dezinfekční účinky [37].

Klíčovou makromolekulou je HA v oftalmologii. Její přípravky slouží k ochraně citlivých očních tkání a poskytují výplň při chirurgických operacích očí. Hlavní využití je jako náhrada oční tekutiny sklivce, ztracené při operacích šedého zákalu nebo při implantaci čoček. V oftalmologii se používá i ve směsi s chondroitin sulfátem. Dále se používá i v oboru ortopedie a revmatologie, kde slouží k viskosuplementaci (dodání viskózní látky) kloubů poškozených artritidou. Molekulová hmotnost HA v synoviální tekutině se u zdravého člověka pohybuje od 2 do 7 MDa, v tomto rozmezí se pohybuje i M_w většiny přípravků obsahujících HA pro viskosuplementaci. Využití nachází i v otorhinolaryngologii, a to hlavně při léčbě poškozených hlasivek, kde se uplatňuje hlavně chemicky, enzymaticky a mechanicky zesíťovaná. Lehce zesíťovaná HA se používá i v dermatologii a plastické chirurgii pro vyplnění obličejových vrásek a léčbu jizev. Ve srovnání s přípravky na bázi kolagenu jsou HA přípravky v kosmetických úpravách efektivnější. Na rozdíl od kolagenních výplní jsou ty s HA velmi pružné a déle trvající. Přípravky s vysokomolekulární HA slouží k topické aplikaci a podporují hojení kožních ran, stejně tak i křečových žil a chronických ran. V kombinaci s dexpanthenolem je užívána jako zvlhčující a kůži opravující přípravek a díky antioxidačním vlastnostem slouží jako protizánětlivý komponent obvazových materiálů. Karboxylové skupiny obsažené ve struktuře kyseliny hyaluronové se používají pro vytvoření zesíťovaného hydrogelu k zachycení molekul DNA a v systémech nosičů léčiv. Léčiva mohou být na HA přímo navázána nebo se využívá procesu mikrokapsulace. HA mikrosféry jsou také používány pro přenos plazmidů DNA a monoklonálních protilátek v genovém inženýrství [38].

2.4. Hydrogely

Hydrogely jsou obecně polymerní síť, zaujímající 3D strukturu, s hydrofilní povahou, která jim umožňuje vázat velké množství vody a dalších biologických tekutin. Hydrogely byly první biomateriály vytvořené pro použití v lidském těle. Základ hydrogelů mohou tvořit homopolymery i kopolymery. Tradičními metodami pro přípravu gelů jsou zesíťující kopolymerizace, zesíťování pomocí reaktivních polymerních prekurzorů, nebo zesíťování reakcí polymer-polymer. Hydrogely rozdělujeme podle typu vazeb na fyzikální a chemické. V gelu se však mohou vyskytovat oba druhy vazeb. Díky fyzikálnímu či chemickému

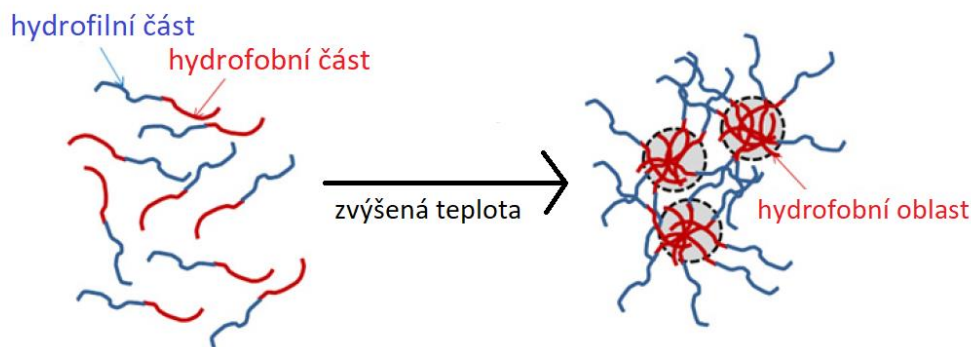
zesíťování jsou odolné vůči rozpouštění ve vodných roztocích. Hydrogely se vytvářejí procesem zvaným gelace [39]. Jiná definice označuje hydrogely jako polymerní síť složenou z ve vodě rozpustných polymerů zesíťovanou do formy nerozpustné ve vodě. Množství zadržené vody v polymerní matici bývá nejméně 20 % a může dosáhnout až 99 % hmotnosti celého hydrogelu. Hydrogely obsahující více než 95 % vody jsou označovány jako superabsorbenty. Díky schopnosti zadržovat vysoké množství vody a fyzikálně-chemické podobnosti s extracelulární matrix, jak kompozičně, tak mechanicky, jsou vysoce biokompatibilní. Hydrogely mohou být rozděleny do skupin podle mnohých kritérií. Možné dělení uvádí následující tabulka [40].

Tabulka 3: Základní možné rozdělení hydrogelů [40].

Fyzikální struktura			
amorfní	semikrystalická	vodíkově vázaná	supramolekulární
Elektrický náboj			
neutrální		s nábojem	
Typ zesít'ování			
fyzikální		chemické	
Odpověď na vnější podnět			
reagující		nereagující	
Původ			
syntetické		přírodní	

Výzkum hydrogelů započal už v 60. letech 20. století vydáním studie Ottou Wichterlem zabývající se poly(2-hydroxyethyl methakrylátem). Od této doby se využití hydrogelů neskutečně zvýšilo. Bylo vyvinuto nepřeberné množství různých technik syntézy a přípravy hydrogelů [40]. Pro dosažení hydrogelů s předem stanovenými a dobře definovatelnými fyzikálně-chemickými parametry a profily uvolňování, hraje zásadní roli syntéza polymerní sítě a její chemické základy, zahrnující kvantitativní a modelové vlastnosti materiálů, interakční parametry, kinetiku rozpadu a uvolňování obsažených látek a transportní jevy. Vysoká afinita hydrogelů vůči vodě je dána přítomností hydrofilních funkčních skupin obsažených v polymerech tvořících hydrogel jako jsou například $-OH$, $-CONH-$, $-CONH_2$ a $-SO_3H$ [41].

Jak už bylo zmíněno, obsah vody hraje důležitou roli při určování celkové charakteristiky polymerní sítě. Hydrofilní hydrogely s velkým množstvím vody ve svých strukturách vykazují výrazně odlišné vlastnosti ve srovnání s hydrofobními polymerními sítěmi. Kromě toho se hydrogely mohou připravovat při výrazně mírnějších podmínkách, za laboratorní teploty a bez nutného použití organických rozpouštědel [41].



Obr. 11: Znárodnění fyzikální gelace řízené hydrofobními interakcemi při zvýšení teploty [42].

Předností přírodních polymerů je to, že nejsou toxické, jsou biodegradabilní, biokompatibilní, dostupné a poměrně levné. Nicméně hydrogely založené na těchto přírodních polymerech mají slabé mechanické vlastnosti. Hydrogely založené na syntetických biopolymerech mají naopak dobré mechanické vlastnosti, ale jsou drahé a biologicky nerozložitelné. Pro získání hydrogelů s vyváženými vlastnostmi se často používá kombinace přírodních polymerů s biokompatibilními syntetickými polymery. Tento způsob kombinace umožňuje navýšení množství navázaného léčiva do cílové oblasti nebo tkáně a následné kontrolované uvolňování po prodloužené dobu. Ve struktuře hydrogelu hraje důležitou roli četnost výskytu pórů a jejich velikost. Ty velmi ovlivňují schopnosti hydrogelu vázat a uvolňovat aktivní látky ve fyziologických tekutinách *in vitro* anebo *in vivo*. Porozita je jednou ze základních charakteristik hydrogelů. Je závislá na afinitě polymeru s vodou a na zesíťování hydrogelu. Afinita hydrogelů k vodě je zase závislá na počtu hydrofilních skupin na polymerním řetězci [43].

2.4.1. Využití hydrogelů

Vzhledem ke svým unikátním vlastnostem jsou hydrogely velmi rozšířené v kosmetice, biomedicině, zdravotnictví i v potravinářství. Hojně zastoupení mají i v tkáňovém inženýrství, kde se používají ve formě scaffoldů. Hydrogelové scaffoldy slouží jako nosný či opěrný materiál pro růst a proliferaci buněk. Ve farmaceutickém odvětví se používají jako cílené nosiče léčiv s kontrolovatelným uvolňováním [44].

V kosmetice je využití hydrogelů v neustálém vývoji. Nejčastěji slouží jako nosiče ingrediencí a aktivních složek kosmetických přípravků a produktů. Tyto gely jsou nejčastěji ze skupiny polysacharidů. Agarové gely v kosmetice slouží k udržení homogenní stálosti výrobku, stabilizují chemické vlastnosti výrobku a slouží jako humektant. Alginátové soli potom hydratují a zjemňují pokožku tím, že na jejím povrchu tvoří film a pomáhají při stabilizaci olejové fáze. Náplasti a obvazy obsahující alginát podporují vlhké hojení a mají antibakteriální účinky. Navíc se hydrogely dobře tvarují a jsou poddajné, což jim umožňuje přizpůsobit se povrchu jejich aplikace. Mají i velmi dobré adhezivní vlastnosti, díky kterým se dokážou udržet na kůži a sliznicích [45].

2.4.2. Hydrogelové nosiče léčiv

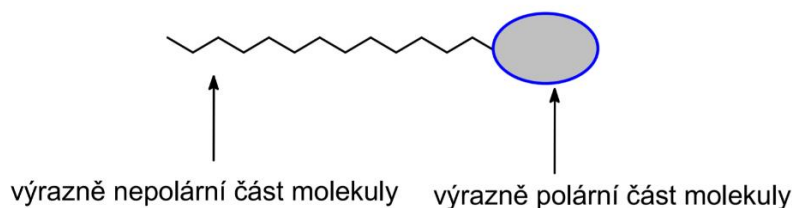
Hydrogely se ve farmacii osvědčili jako cílené nosiče léčiv, které mohou mít kontrolovatelné uvolňování. Jak již bylo zmíněno, jedním z nejdůležitějších aspektů pro toto využití je porozita. Ta umožňuje a ovlivňuje množství začleněné léčivé látky do hydrogelové matrice a má vliv i na rychlost jejího uvolňování společně s difuzním koeficientem. Studium vlastností těchto nosičů se zabývá farmakokinetika, která umožňuje navrhovat nosiče tak, aby například docházelo k pomalému uvolnění léčiva a k jeho lokálnímu zakoncentrování v blízkých tkáních, nebo je nosič navržen tak, že léčivý přípravek doručí až do požadované tkáně či orgánu. Důležitým aspektem při „šití“ nosičů na míru je zohlednění jeho biodegradability hydrolyzou, enzymaticky, změnou teploty a pH [42]. Nejběžnějším modelovým mechanismem uvolňování léčiva z hydrogelů je pasivní difuze, kdy molekuly různých velikostí a charakteristik mohou volně pronikat do hydrogelové matrice a zpátky ven. Hydrofilní povaha hydrogelů však mechanismus pasivní difuze velmi ovlivňuje na rozdíl od nehydrofilních polymerních matic. Z mnohých modelových studií zaměřených na uvolňování aktivní látky z hydrogelové matrice vyplývá, že uvolňovací mechanismy jsou závislé na difuzi, nabobtnání hydrogelu a na chemických vlastnostech aktivní látky i matrice [41].

Hydrogely mají kromě kladných vlastností i jisté záporné vlastnosti, které ovlivňují a omezují použití pro nosičové systémy. Jednou z těchto nevýhod je pevnost v tahu. Její nízká hodnota snižuje schopnosti hydrogelů nést aktivní látky a má vliv i na předčasnou degradaci gelu mimo jiné i tím, že dochází k odplavení gelu z místa jeho účinku. Problém při navázání však představují hydrofobní aktivní látky, jejichž homogenita a navázané množství je značně ovlivněno vysokým obsahem vody v matrici hydrogelu. Pórovitost společně s vysokým obsahem vody může urychlovat uvolňování léčiva, které je nežádoucí. Omezujícím faktorem při používání hydrogelů je i jejich aplikační forma. Většina hydrogelů je velice viskózní a nemůže být tedy aplikována injekčním způsobem a vyžadují tak chirurgického zákroku [41].

Často se hydrogelové nosiče navrhují tak, aby byla aktivní látka uvolňována po aplikování vnějšího stimulu. Tím může být aplikace magnetického nebo elektrického pole, změna teploty prostředí, iontové síly nebo pH. V hydrogelu dochází ke změně v bobtnání, v propustnosti a v síťové struktuře. Například při změně pH dochází u hydrogelů citlivých na pH ke změně disociační konstanty pK_a či pK_b . Dojde ke změně nábojů funkčních skupin a mění se i elektrostatické odpuzivé síly mezi ionizovanými skupinami, které vedou ke kontrakci objemu matrice a vzniká osmotický tok. Hydrogely citlivé na změny teploty bobtnají a smršťují se v závislosti na teplotě. Může mě je rozlišit na pozitivní a negativní. Pozitivně teplotně citlivé hydrogely se označují horní kritickou teplotou rozpustnosti a pod touto teplotou dochází k jejich smršťování a následnému uvolnění obsažené aktivní látky. Tyto změny způsobují vodíkové vazby k jejichž rozrušování dochází při zahřátí nad kritickou teplotu a gel tak začne bobtnat. U negativně citlivých hydrogelů se uvádí dolní kritická teplota rozpustnosti, kdy pod její hodnotou gely bobtnají a nad její hodnotou se gel smršťuje. Zajímavým nosičovým systémem jsou hydrogely reagující na koncentraci glukózy. Ty se používají pro přenos inzulinu pro léčbu diabetu. Oxidací glukózy za pomoci glukózaoxidázy vzniká kyselina glukonová, která snižuje lokální pH okolních tkání a hydrogel začne bobtnat. Glukózaoxidáza je společně s inzulinem navázána v hydrogelovém nosiči [44].

2.5. Tenzidy

Tenzidy, jiným názvem označované jako povrchově aktivní látky či surfaktanty, jsou organické látky se schopností samovolně se hromadit na fázovém rozhraní, čímž snižují mezifázovou energii celé soustavy. Jejich molekula je typická pro svou polární a nepolární část, jinak nazývanou jako amfipatická molekula. Ta se tedy skládá z objemné nepolární – hydrofobní části a z velmi polární – ionizované hydrofilní části. Nepolární části se na fázovém rozhraní orientují do nepolární fáze a polární části směřují do polární fáze [46].

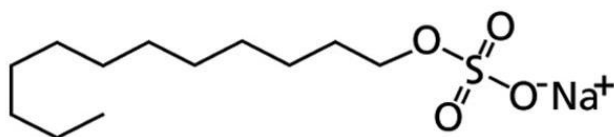


Obr. 12: Zjednodušená struktura tenzidů [46].

Tenzidy dělíme podle polární části na iontové a neiontové, popř. ionogenní a neionogenní. Iontové tenzidy můžeme dále dělit na kationtové a aniontové nebo amfoterní. Aniontové povrchově aktivní látky představují nejpočetnější skupinu tenzidů. Nejznámějšími zástupci jsou soli vyšších mastných kyselin s délkou řetězce obvykle $C_{12} - C_{18}$, což jsou nám známá mýdla. Ke kationtovým tenzidům se řadí kvartérní amoniové soli, jinak též invertní mýdla. Mají mikrobicidní a avivážní účinek, který zajišťuje antistatickou úpravu syntetických textilií po vyprání. Amfoterní tenzidy obsahují v polární části kladný i záporný náboj. Jako přirozeně se vyskytující látky mezi ně patří rozpustné proteiny, fosfatidylseriny, sfingomyeliny a fosfatidylcholin. Mezi neiontové tenzidy patří například estery či ethery polyethylenglykolu, vyšší alkoholy, monoacylglyceroly a rostlinné saponiny [46].

2.5.1. Dodecylsírán sodný

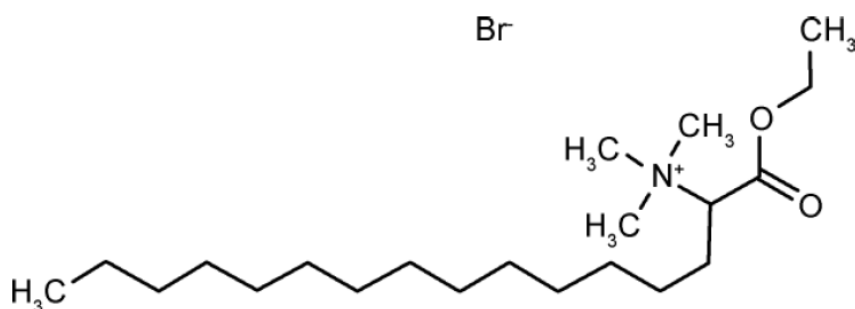
Dodecylsírán sodný je také označován zkratkou SDS, z anglického názvu *Sodium dodecyl sulfate*. Patří do skupiny aniontových povrchově aktivních látek. Z chemického hlediska se jedná o sodnou sůl organosulfátu. Hydrofilní část tvoří záporně nabitá síranová skupina a hydrofobní konec je složený z 12 uhlíků. Běžně se používá v biochemických laboratořích při elektroforéze proteinů, konkrétně u metody SDS-PAGE, kde slouží k denuraci proteinů a k zamaskování jejich náboje, takže jsou všechny proteiny záporně nabitě a separace probíhá na základě molekulové hmotnosti. Jako detergent má výborné vlastnosti k odstraňování mastných skvrn. Používá se tedy do odmašťovacích přípravků a čistících prostředků mytí aut a podlah. V kosmetice se používá v malých koncentracích do šamponů, zubních past a pěn na holení [47].



Obr. 13: Struktura dodecylsíranu sodného [48].

2.5.2. Septonex

Septonex je obchodní název pro molekulu s jiným názvem označovanou jako karbethopendecinium-bromid. Septonex je kvartérní amoniová sůl patřící do skupiny kationtových tenzidů. Ve vodném roztoku nese kladný náboj. Hydrofilní část tenzidu tvoří právě kvartérní amoniová sůl. Hydrofobní část pak tvoří dlouhý uhlíkatý řetězec z 15 uhlíků. Za běžných podmínek je to bílý prášek dobře rozpustný ve vodě i v organických rozpouštědlech, např. v ethanolu a chloroformu. Jelikož se jedná o povrchově aktivní látku, ve vodném roztoku velice silně pění. Využívá se ve farmaceutických výrobcích, jako jsou kapky do očí nebo dezinfekce na rány, pro jeho antiseptické a dezinfekční účinky [49].



Obr. 14: Struktura karbethopendeciniumbromidu [49].

2.6. Difuze

Difuzi je možné jednoduše charakterizovat jako samovolný pohyb molekul v prostoru. Koncentrační gradient popisuje, jak se mění koncentrace se vzdáleností od zvoleného počátku. V takovéto koncentračně nehomogenní soustavě dochází k samovolnému vyrovnání koncentrace. Pro tento proces je charakteristické, že se částice pohybují z prostředí s jejich vyšší koncentrací do prostředí s koncentrací nižší. Difuzní pohyb částic je způsoben nerovnoměrným rozložením chemických potenciálů a celý systém se snaží vyrovnat termodynamické rovnováhy. Difuze probíhá v kapalinách, plynech i v pevných látkách [50]. Pokud do systému nezasahují vnější rušivé vlivy, je výsledkem difuze rovnoměrné rozptýlení látky. Rychlost distribuce částic v systému závisí na jejich velikosti, teplotě prostředí a jeho vlastnostech. Obecně rychlost difuze klesá se zvětšující se velikostí částic. Difuzní změny v systémech popisují Fickovy zákony [51].

Difuze je intenzivně studována v souvislosti s cílenou či řízenou distribucí léčiv. Tyto nosiče v podobě nejrůznějších biopolymerů a biopolymerních hydrogelů slouží při transportu jako kontrolovatelná difuzní bariéra. Stavba a vlastnosti této bariéry se vybírají podle požadovaného způsobu uvolňování aktivní látky. Mezi požadavky na tuto bariéru patří postupné uvolňování látky, zpožděný počátek uvolnění nebo reakce na vnější podnět či uvolňování jen v místě účinku. Difuze v nosičích ovlivňuje struktura polymeru a jeho interakce s biologickými tekutinami. Pro stanovení času a množství uvolněné aktivní látky je tedy nezbytně nutné znát difuzní charakteristiky systému léčivo-polymer. S přihlédnutím k difuzním vlastnostem můžeme vytvářet nosiče léčiv na míru a optimalizovat tak parametry uvolňování [52].

2.6.1. První Fickův zákon

Difuzní koeficient, též označovaný jako koeficient úměrnosti (mezi difuzním tokem a koncentračním gradientem), je základní parametr difuzních procesů a charakterizuje také míru mobility částic v dané látce. Hnací silou difuze je změna chemických potenciálů. Obvykle je difuze popisována jako změna koncentrace složky s polohou v daném místě a čase, přesněji derivace koncentrace podle polohy $\frac{\partial c_i}{\partial y}$. Tuto závislost popisuje I. Fickův zákon:

$$J_i = -D_i \frac{\partial c_i}{\partial y} \quad (1)$$

D_i představuje koeficient úměrnosti (mezi difuzním tokem a koncentračním gradientem) neboli difuzní koeficient, který je roven látkovému množství difundující složky i , jež prochází jednotkovou plochou za jednotku času při jednotkovém koncentračním gradientu. Základní jednotkou difuzního koeficientu v SI soustavě je $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Výsledné J_i představuje difuzní tok. Vztah mezi teplotou, velikostí částic a difuzním koeficientem může být odvozen z termodynamiky. Koncentrační gradient $\frac{\partial c_i}{\partial y}$ je konstantní při tzv. stacionární difuzi. Takovým příkladem stacionární difuze může být měření pomocí difuzní cely. Na jednom konci difuzní cely je udržovaná konstantní koncentrace difundující látky syčením roztoku a na druhém konci dochází k omývání cely čistým rozpouštědlem, čímž se zajistí nulová koncentrace difundující látky [50].

Difuzní koeficient u zředěných roztoků difundující složky i v rozpouštědle j lze také vypočítat pomocí Einsteinova vztahu:

$$D_{ij} = \frac{RT}{6\pi N_A \eta_j r_i} \quad (2)$$

V rovnici představuje η viskozitu rozpouštědla a r_i je efektivní poloměr difundující molekuly i (efektivní poloměr platí pouze pro kulovité částice). Tento vztah platí za podmínky, že poloměr difundujících molekul je mnohem větší, než je poloměr molekul rozpouštědla. Vztah se používá převážně pro difuzi koloidních částic v nízkomolekulárním rozpouštědle [51].

2.6.2. Druhý Fickův zákon

O nestacionární difuzi se jedná, pokud se koncentrační gradient s časem mění. Koncentraci difundující látky v závislosti na čase a poloze při zadaných počátečních a okrajových podmínkách popisuje následující rovnice (3). Rovnice druhého Fickova zákona popisuje tedy rychlost změny koncentrace v určitém místě systému [51].

$$\frac{\partial c_i}{\partial \tau} = D_i \frac{\partial^2 c_i}{\partial y^2} \quad (3)$$

Druhý Fickův zákon je vzhledem k prostorové souřadnici diferenciální rovnice druhého řádu a vzhledem k času se jedná o diferenciální rovnici prvního řádu. Řešením rovnice (3) získáme koncentraci difundující látky jako funkci místa a času [50].

Pro výpočet difuzních koeficientů v gelech byla použita následující rovnice (4) vycházející z rovnic Fickových zákonů. Koncentrace rozpuštěné látky se mění v čase a její tok je opět závislý na čase.

$$m = \frac{2\varepsilon c_0}{1 + \varepsilon \sqrt{D_g/D}} \sqrt{\frac{D_g t}{\pi}} \quad (4)$$

Výpočtem rovnice získáme m , což je tok difundující látky udávaný v $\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$. Symbol ε představuje poměr koncentrace difundující látky (sondy) v roztoku a v gelu po ustavení difuzní rovnováhy, respektive po vyrovnání koncentrací, a tedy ukončení difuze. Počáteční koncentraci rozpuštěné látky představuje c_0 a D je difuzní koeficient sondy v roztoku [53].

3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1. Hydrogelové nosiče aktivních látek a jejich uvolňování

Hydrogely mají vzhledem ke své biokompatibilitě, schopnosti vázat vodu, struktuře a podobnosti s extracelulární matrix velký potenciál k využití v biomedicínských aplikacích, popřípadě v kosmetice. Hydrogely založené na chitosanu jsou biodegradabilní, biokompatibilní, netoxické, antimikrobiální, přilnavé k biologickým tkáním a mají hemostatický účinek. S těmito vlastnostmi jsou předurčené k hojení ran i jako nosiče léčiv. Těmito chitosanovými hydrogely se zabýval **He Liu a kol.** Studoval například hydrogely připravené kombinací chitosanu a kyseliny hyaluronové. Bylo prokázáno, že tyto hydrogely urychlují hojení ran podpořením migrace buněk, proliferace, shlukováním buněk a angiogenezí. Zabýval se i vylepšením vlastností chitosanových hydrogelů pro hojení ran pomocí navázání antibakteriálních látek. Konkrétním příkladem může být navázání antibiotika tigeckylinu, který byl z hydrogelové matrice trvale uvolňován a výrazně snížil růst bakterií. **Sadiya a kol.** využily chitosanové hydrogely v kombinaci s PEG a PVP k navázání tetracyklinů. Chitosan zde podporuje hojení s minimem jizev a tetracykliny zajišťují ochranu před bakteriální infekcí [54].

Vývojem nových cílených hydrogelových nosičů léčiv pro léčbu chronických a zánětlivých onemocnění střev, včetně Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy se zabýval **Sufeng Zhang a kol.** Vytvořili hydrogelová mikrovlákná z askorbylpalmitátu, na která byl navázán protizánětlivý kortikosteroid dexametazon. Přímé cílení léčiva na zanícené střevo může zlepšit terapeutické výsledky a také minimalizovat systémovou toxicitu. Hydrogelová vlákna vykazují vzhledem ke svému negativnímu povrchovému náboji dobrou adhezi na střevní epitel a zapouzdřené hydrofobní léčivo uvolňují až po enzymatickém trávení [55].

Siamak Javanbakht a kol. se zabýval navržením nových hydrogelových nanokompozitních filmů s protirakovinnými účinky začleněním modelového léčiva doxorubicinu pomocí grafenových kvantových teček do hydrogelové matrice z karboxymethylcelulózy. Studie sledovala uvolňování při různých hodnotách pH a účinnost uvolňování byla zkoušena pomocí MTT testů na leukemických buňkách K562. Tato hydrogelová matrice s kvantovými tečkami vykazovala zlepšené bobtnání, degradaci, propustnost vodních par a pH citlivé uvolňování léčiva [56].

Hydrogely na bázi chitosanu společně s hyaluronovou kyselinou a glycerofosfátem jsou aplikovatelné injekčně, reagují na teplotu těla a změny pH a jsou adhezivní na rakovinné buňky. Jejich aplikací jako nosičového systému se zabýval **Wei Zhang a kol.** Jako modelové protirakovinné léčivo použili doxorubicin, jenž je smíchán s hydrogelovým prekurzorem, který může být se svojí nízkou viskozitou aplikován injekčně. K zesíťování hydrogelu, a tedy zvýšení viskozity dochází po zahřátí na tělesnou teplotu. Kyselé prostředí okolo pH 4 může spustit uvolňování léčiva a rakovinné buňky mohou ulpívat na povrchu hydrogelu, což je prospěšné pro přesné zacílení gelu jen v místě nádoru. Mechanická pevnost, teplota gelace a rychlost uvolňování léčiva mohou být vyladěny změnou obsahu kyseliny hyaluronové [57].

Hydrogelový systém na bázi kyseliny hyaluronové a hydroxyethylcelulózy byl zkoumán jako efektivní transdermální nosič protirakovinné a antimikrobiální látky zvané isoliquiritigenin. **Bong Ju Kong a kol.** následně studoval kinetiku uvolňování léčiva. Bylo zjištěno, že hydrogelový systém složený z HA a HEC zlepšuje penetraci léčiva skrze kůži [58].

Chiu a kol. se zabýval studiem pH citlivého dextranového hydrogelu. Ten byl připraven nejprve aktivováním dextranu pomocí 4-nitrofenylchloroformátu, dextran byl následně smíchán s 4-aminomáselnou kyselinou a zesíťován pomocí 1,10-diaminodekanu. Obsah karboxylových skupin zajišťuje bobtnání při vyšším pH, než je 7,4 a ovlivňuje uvolňování léčiva v oblasti tlustého střeva. Kinetiku uvolňování studovali pomocí navázaného hovězího sérového albuminu při pH v rozmezí od 2 do 7,4 za přítomnosti enzymu dextranázy. Podobným nosičovým systémem pro zacílení do střeva je UV zářením zesíťovaný glycidylmethakrylátdextran v kombinaci s polyakrylovou kyselinou. Tento gel je opět citlivý na změnu pH [43].

Niu a kol. se zabývali nosičovým systémem založeným na dextran sulfátu. K tomuto komplexu navázaly dvojvalné kovy ve sloučeninách $MgCl_2$ a $CaCl_2$. Tyto kovy pomáhají zadržet a také prodlužují uvolňování na tento komplex navázaného doxorubicinu. Komplex dextranu s navázanými kovovými ionty a doxorubicinem byl následně enkapsulován pomocí biodegradabilního, biokompatibilního a injekčně aplikovatelného agarózového hydrogelu.

Změnou koncentrací obsažených kationtů Mg^{2+} a Ca^{2+} lze ovlivňovat rychlost uvolňování doxorubicinu z komplexu. Tento nosičový systém je následně aplikovatelný na rakovinné buňky MDA-MB-231, které způsobují rakovinu prsu. Oproti klasické chemoterapii je výhoda tohoto nosiče v tom, že doxorubicin uvolňuje v nižších dávkách a delší dobu, čímž se snižují možné vedlejší účinky [59].

3.2. Využití sond ATTO 488 a nilské červeně

Pro studium difuze barviv v biopolymerních hydrogelech byly zvoleny jako modelové sondy nilská červeně (NR) a ATTO 488. Nílská červeně byla zvolena jako modelový zástupce pro hydrofobní sondy a ATTO 488 je zástupce hydrofilní povahy. Nejčastějším způsobem využití obou barviv je jejich použití jako fluorescenční sondy při nejrůznějších aplikacích.

Nabila Laroui a kol. použili ATTO 488 jako fluorescenční sondu měřenou pomocí konfokální mikroskopie. Ve studii se zabývali účinkem fotodynamické terapie v kombinaci s genovou terapií. Fotodynamická terapie běžně využívá fotosenzitivní látky k léčbě tumorů. Konkrétně se zaměřili na guanidylovaný porfyrin, označený jako H_2 -PG, který by teoreticky mohl sloužit nejen jako fotosenzitivní látka, ale také jako intracelulární přenašeč dvouvláknové RNA ovlivňující expresi určitých genů označovanou jako siRNA. Molekuly siRNA byly zaměřeny na inhibitory apoptických proteinů, které brzdí buněčnou smrt. Pro potvrzení této hypotézy, že se siRNA dostává pomocí H_2 -PG dovnitř buňky, byla na molekuly siRNA navázána právě sonda ATTO 488. Výskyt ATTO 488 navázaného na siRNA v nádorových buňkách byl následně zjišťován pomocí již zmíněné konfokální mikroskopie. Byl tak potvrzen aditivní efekt dvou terapeutických metod, a to fotodynamické a genové terapie [60].

Ve velkém zájmu v oblasti chemie a biologie je měření rovnovážných a rychlostních konstant tvorby molekulárních komplexů. Určením těchto konstant pomocí fluorescenční korelační spektroskopie (FCS), doplněnou dynamickým rozptylem světla (DLS) se zabýval **Xuzhu Zhang a kol.** Jako modelové systémy využily tvorbu komplexů barvivo-micely, s konkrétními barvivy rhodamine 110 a ATTO 488. Barviva interagovala se třemi různě nabitými micelami z povrchově aktivních látek, např. z negativně nabitého dodecylsírany sodného [61].

Dalším možným využitím ATTO 488 může být studium agregačních procesů amyloidogenních peptidů tvořících fibrily. Nízkomolekulárními agregáty Alzheimerových β -amyloidových peptidů, které hrají roli v cytotoxicitě a neuronální apoptóze při onemocněních spojených s jejich agregací se zabývala **Jana Wägele a kol.** Zkoumali jejich oligomerní fáze pomocí fluorescenční spektroskopie za využití fluorescenční sondy ATTO 488. Fluorescenční sonda byla kovalentně navázána na N-konce β -amyloidového peptidu, za předpokladu, že sonda nebude nijak ovlivňovat samouspořádání ani finální fibrilární strukturu. Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie potom měřila označené oligomerní populace při tvorbě fibril ve spojení s dalšími metodami strukturní analýzy jako je transmisní elektronové mikroskopie, mikroskopie atomárních sil a rentgenová difrakce [62].

Andrea Topf a kol. se ve své studii zabývají mikrotermoforézním stanovením aktinové polymerizace. Pomocí termoforetického chování aktinu označeného pomocí ATTO 488 v teplotním gradientu v závislosti na čase sledovali polymeraci aktinu v reálném čase

a objasnili její tři charakteristické fáze: nukleaci, elongaci a ustálený stav. Tato metoda umožňuje zhodnotit vliv proteinů vázajících aktin na výslednou polymeraci. Rychlost prodloužení aktinového vlákna může být následně kvantitativně stanovena. Touto metodou může být měřen i účinek myosinu na polymerizaci aktinu [63].

Keren Delmar a kol. zkoumal kompozitní chitosanový hydrogel stálý ve fyziologických podmínkách určený pro trvalé uvolňování hydrofobních léčiv. Hydrogelová matrice je založena na chitosanu zesíťovaného genipinem, do které je vložena biokompatibilní neiontová mikroemulze. Prodloužená doba uvolňování byla zkoumána pomocí sondy nilské červeně a kurkuminu ve vodě a ve fyziologickém roztoku fosfátového pufru o pH 7,4. Podle prostředí docházelo k odlišnému chování při uvolňování. Ve vodném roztoku hydrogel velice rychle bobtnal, zatímco v roztoku fosfátového pufru vylučoval vodu a smršťoval se. Systém uvolňování uplatňující se v tomto typu nosiče je navíc složitý vzhledem k intermolekulárním vazbám mezi olejovými kapičkami v emulzi a polymerní sítí [64].

Smita Kashyap a kol. se ve své studii zabývali návrhem a vývojem nových teplotně citlivých a amfifilních kopolymerních nanočástic pro transport doxorubicinu do extracelulárních a intracelulárních prostor. Tyto amfifilní kopolymery mají schopnost samouspořádání do sférických micel ve vodném prostředí. Po zahřátí nad nejnižší kritickou teplotu roztoku, což je 37 °C, dochází k agregaci těchto nanočástic. Amfifilní povaha tohoto polymerního scaffoldu umožňuje navázání ve vodě nerozpustných léčiv jako je například doxorubicin. Uvolňovací mechanismus byl zkoumán za pomoci hydrofobního barviva nilská červeně. Bylo odhaleno, že při tělesné teplotě, tedy pod 37 °C, je obsažená hydrofobní látka zadržována uvnitř nosiče. V blízkosti rakovinné tkáně, při teplotě okolo 43 °C, dochází během 2 hodin k uvolnění až 90 % navázané látky [65].

Nilská červeně byla použita jako sonda i při výzkumu micelárního supramolekulárního hydrogelu pro distribuci léčiv do očí. Tento hydrogel byl založen na α -cyklodextrinu a polyethylenglykolu. Tyto hydrogely vykazovaly tixotropní vlastnosti, které jsou prospěšné pro oční podávání léčiva. Studie uvolňování in vitro ukázala, že rychlost uvolňování je ovlivněna koncentrací α -cyklodextrinů. **Zhaoliang Zhang a kol.** hydrogel zkoumal pomocí Draizeova testu, fluorescenčním zabarvením a histologickým pozorováním na králíčích očích, kde nevykazoval žádné známky podráždění. Retenční čas na povrchu rohovky byl zkoumán pomocí na micely navázané nilské červeně. Následná farmakokinetika in vivo ukázala, že tyto hydrogely by mohly výrazně vylepšit biologickou dostupnost léčiva při očním podání [66].

Yong Liu a kol. se ve studii zabývají povrchově adaptivními, triclosanem naplněnými micelárními nanočásticemi, které by mohly efektivně ničit bakteriální biofilmy. Tyto nanočástice vykazují zvýšenou penetraci biofilmu a akumulaci v něm, elektrostatické zacílení na negativně nabitě povrchy bakteriálních buněk a v důsledku degradace jádra micel bakteriálními lipázami dochází k uvolnění antibakteriálního triclosanu. Ověření penetrace a akumulace do těchto bakteriálních biofilmů bylo provedeno konfokální laserovou skenovací mikroskopií za pomoci nilské červeně enkapsulované uvnitř micel [67].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použité látky

DEAE-dextran hydrochlorid

CAS: 9064-91-9, Sigma-Aldrich s.r.o., $M_w = 500$ kDa, čistota $\geq 97,5$ %, č. šarže: BCBM1585

SDS, dodecylsírán sodný

CAS: 151-21-3, Sigma-Aldrich s.r.o., $M_w = 288,38$ g·mol⁻¹, čistota $\geq 98,5$ % (chloridy ≤ 500 ppm, fosfáty ≤ 10 ppm, těžké kovy ≤ 10 ppm, č. šarže: SLBT3991)

Hyaluronan sodný

CAS: 9067-32-7, Contipro a.s.

HMW hyaluronan, $M_w = 1\,540$ kDa, č. šarže: 160218-E1

LMW hyaluronan, $M_w = 340$ kDa, č. šarže: 120218-E1

Septonex

$M_w = 422,48$ g·mol⁻¹, č. šarže: 511SEP003

ATTO 488

Sigma-Aldrich s.r.o., čistota ≥ 90 %, $\lambda_{\max} = 501$ nm, č. šarže: BCBV8900

Nilská červeň

CAS: 7385-67-3, Sigma-Aldrich s.r.o., čistota ≥ 98 %, $\lambda_{\max} = 553$ nm, č. šarže:

Chlorid sodný

NaCl, CAS: 7647-14-5, Penta s.r.o., čistota $\geq 99,9$ %, č. šarže: 19033200314

Deionizovaná voda

H₂O, Purelab: ELGA

4.2. Použité přístroje a programy

Difuze barviv byla měřena pomocí změny koncentrace těchto barviv v roztoku nad gelem, jinak nazývaným supernatant. Koncentrace barviva v supernatantu byla zjišťována výpočtem z naměřené absorbance podle Lambert-Beerova zákona. Nejdříve byla tedy změřena absorbance namíchaných kalibračních roztoků sond ATTO 488 a nilské červeně z nichž byla sestrojena kalibrační přímka. Z kalibrační přímky byly poté vypočítávány skutečné koncentrace v supernatantech vzorků. Absorbance roztoků byla měřena pomocí dvoupaprskového UV-VIS spektrofotometru Hitachi U-3900. Roztoky byly měřeny v křemenných kyvetách s optickou délkou 1 cm. Absorbance byla u sondy ATTO 488 měřena při absorpčním maximu $\lambda_{\max} = 501$ nm, nilská červeň byla měřena při absorpčním maximu $\lambda_{\max} = 553$ nm. Naměřené změny koncentrace byly zpracovány a přepočítány na difuzní koeficienty a difuzní tok v programu Microsoft Word Excel.

4.3. Příprava sond a hydrogelů

4.3.1. Příprava kalibračních roztoků sond

Ze zásobního roztoku nilské červeně v acetonu o známé koncentraci bylo napipetováno příslušné množství do vialek a aceton se ponechal k volnému odpaření. Po odpaření byla zbylá nilská červeně ve vialce doplněna na přesný objem roztokem příslušného tenzidu. Pro kalibrační roztoky sond dextranových hydrogelů byla nilská červeně doplněna 100 nebo 400 mM roztokem SDS a u kalibračních sond pro hyaluronanové hydrogely byla doplněna na objem 100 nebo 200 mM roztokem septonexu.

Kalibrační roztoky sondy ATTO 488 byly připravovány obdobným způsobem. Ze zásobního roztoku ATTO 488 o známé koncentraci rozpuštěného v 0,15M roztoku NaCl bylo do vialek odebráno příslušné množství roztoku. Toto množství bylo následně doplněno na přesný objem 100 nebo 200 mM roztokem septonexu nebo 0,15 M roztokem NaCl. Roztoky kalibračních sond byly vždy ponechány přes noc na třepačce pro úplné rozmíchání. Koncentrace sond použité pro kalibrační roztoky i pro následné studium difuze byly vždy stejné. Tyto koncentrace popisuje následující Tabulka 4.

Tabulka 4: Používané koncentrace sond ATTO 488 a nilské červeně pro studium difuze a měření kalibračních přímek.

Koncentrace kalibračních roztoků a sond ATTO a NR pro studium difuze [mol/dm ³]									
1·10 ⁻⁷	3·10 ⁻⁷	5·10 ⁻⁷	7·10 ⁻⁷	8·10 ⁻⁷	9·10 ⁻⁷	1·10 ⁻⁶	3·10 ⁻⁶	5·10 ⁻⁶	7·10 ⁻⁶
Označení těchto gelů									
a	b	c	d	e	f	g	h	i	j

4.3.2. Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztoky DEAE-dextranu, hyaluronanu i všech tenzidů byly připravovány v prostředí 0,15 M roztoku NaCl v deionizované vodě. Zásobní roztok 0,15 M NaCl byl připraven rozpuštěním 8,766 g NaCl v 1 000 ml deionizované vody. Zásobní roztoky DEAE-dextranu byly připravovány o koncentraci 4 hm. % tak, že 4 g DEAE-dextranu byly rozpuštěny ve 100 ml 0,15 M roztoku NaCl. Roztoky tenzidů SDS byly připraveny rozpuštěním takového množství SDS v 0,15 M roztoku NaCl tak, aby bylo dosaženo požadované koncentrace 100 nebo 400 mM zásobního roztoku SDS. Po odměření a navážení všech komponent zásobních roztoků, byly tyto roztoky přes noc ponechány na magnetické míchačce pro úplné rozpuštění a zhomogenizování směsi.

Zásobní roztoky hyaluronanu byly připravovány ve dvou formách. Jeden zásobní roztok byl z nízkomolekulárního (LMW) hyaluronanu o koncentraci 2 hm. % a druhý zásobní roztok byl z vysokomolekulárního (HMW) hyaluronanu taktéž o koncentraci 2 hm. %. Oba dva roztoky byly připravovány rozpuštěním vždy 2 g LMW nebo HMW hyaluronanu na 100 ml 0,15 M roztoku NaCl. Zásobní roztoky tenzidů pro přípravu hyaluronanových hydrogelů a sond pro tyto hydrogely byly připravovány rozpuštěním septonexu v 0,15 M roztoku NaCl. Zásobní roztoky septonexu byly připravovány o koncentraci 100 mM a 200 mM. Veškeré roztoky byly opět po smíchání všech komponent ponechány přes noc na magnetickém míchadle.

4.3.3. Příprava hydrogelů

Všechny hydrogely byly připravovány tzv. *mokrou cestou*. Dextranové hydrogely byly připravovány tak, že do čistých vialek byly napipetovány 3 ml zásobního roztoku DEAE-dextranu o 4 hm. % a poté byly přidány 3 ml příslušného tenzidu (400 mM SDS pro gely s označením D1 nebo 100 mM SDS pro gely D2, viz. Tabulka 5). Směs vzniklá ve vialce byla hned na vortexu důkladně promíchána a následně byly všechny vzniklé gely ponechány přes noc při laboratorní teplotě na třepače.

Hyaluronanové hydrogely byly připravovány vzhledem k velmi vysoké viskozitě zásobních roztoků hyaluronanu pomocí vah. Do vialky byly naváženy 3 g LMW nebo HMW hyaluronanu a poté byly přidány 3 g zásobního roztoku septonexu o příslušné koncentraci, viz. Tabulka 5 o složení jednotlivých hydrogelů a jejich označení. Vzniklé gely byly opět ihned po namíchání zvortexovány a poté byly ponechány do druhého dne na třepače.

Tabulka 5: Složení jednotlivých hyaluronanových a dextranových hydrogelů a jejich označení.

DEAE-dextran – SDS				
koncentrace zásobních roztoků		koncentrace v připraveném gelu		označení
4 hm. % DEAE	400 mM SDS	2 % DEAE	200 mM SDS	D1
	100 mM SDS		50 mM SDS	D2
Hyaluronan – Septonex				
HMW hyaluronan				
2 hm. % HA	200 mM Septonex	1 hm. % HA	100 mM Septonex	H1
	100 mM Septonex		50 mM Septonex	H2
LMW hyaluronan				
2 hm. % HA	200 mM Septonex	1 hm. % HA	100 mM Septonex	H4
	100 mM Septonex		50 mM Septonex	H5



Obr. 15: Hydrogel H1 (HMW hyaluronan + 200 mM septonex) pousazení gelu na dně vialky.

4.4. Provedené difuzní experimenty

4.4.1. Studium difuze sondy do dextranových hydrogelů

Po vytvoření hydrogelů a jejich následném usazení na dně vialky (příklad usazení můžete vidět na Obr. 15) byl supernatant opatrně odlit tak, že na dně vialky zůstal jen gel. Zbytky supernatantu byly z povrchu gelu odsáty pipetou. Následně byly na gely nality roztoky sond ATTO či NR o různých koncentracích (viz. Tabulka 4). Takto byly připraveny sady dextranových hydrogelů s označením D1 a D2 se sondou ATTO 488 a gely D1, D2 se sondou NR. Po 24 hodinách od přidání sondy ke gelu byla měřena absorbance roztoku nad gelem pomocí UV-VIS spektrometru. Změna absorbance byla dále sledována v různých časových intervalech.

4.4.2. Studium difuze sondy do hyaluronanových hydrogelů

Studium difuze sondy do hyaluronanových hydrogelů probíhalo obdobným způsobem jako u dextranových hydrogelů. Nejprve byl po usazení hydrogelů odlit supernatant a zbytky byly odsáty pipetou. Poté byly na gely nality roztoky sond ATTO a NR o stejných koncentracích jako byly použity u dextranových gelů (Tabulka 4). Vznikly tak systémy hyaluronanových hydrogelů H1, H2, H4 a H5 se sondou ATTO 488 a hydrogely označené H1, H2, H4 a H5 se sondou NR (příklady gelů H1 s ATTO a NR můžete vidět na Obr. 16). U hyaluronanových hydrogelů byla měřena absorbance roztoku sondy opět po 24 hodinách a v dalších časových intervalech.



Obr. 16: Hyaluronanové hydrogely s označením H1 (2 hm. % HMW hyaluronanu a 200 mM Septonex) po výměně supernatantu za roztoky sond o různých koncentracích. ATTO 488 nahore, nilská červeň dole. Zleva doprava se zvyšuje koncentrace sondy v roztoku.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

Následující části popisují chování použitých sond ATTO 488 a nilské červeně v systémech hydrogel-roztok, konkrétně tedy jejich pohyb z roztoku nad gelem do tohoto gelu. Pro pozorování chování sondy byly použity dextranové hydrogely D1 a D2, zesíťované tenzidem SDS a hyaluronanové hydrogely H1, H2, H4 a H5, zesíťované tenzidem Septonex. Jednotlivé gely se liší koncentrací použitého tenzidu k jejich zesíťování, které může také ovlivňovat difuzní chování sond. Pro studium chování sondy ve více různých systémech bylo použito několik základních roztoků těchto sond. Takto byly vytvořeny systémy hydrogel – sonda v tenzidu a hydrogel – sonda ve vodném roztoku NaCl. Konkrétní příprava těchto roztoků a hydrogelových systémů je popsána v kapitole 4.3. Naměřené absorbance sond při studiu difuze byly přepočítávány na koncentrace pomocí Lambert-Beerova zákona a z těchto koncentrací byly následně vypočítávány další hodnoty difuzních charakteristik. Pro klíčový popis chování sond v různých gelových systémech pak byly vypočítány difuzní koeficienty, vycházející z rovnice (4). Pro výpočet difuzních koeficientů barviv v systémech gel-tenzid byly použity jako výchozí hodnoty jejich difuzní koeficienty ve vodě. Pro NR ve vodném prostředí byla použita výchozí hodnota difuzního koeficientu $3,3 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ [68]. Pro ATTO 488 byla použita hodnota difuzního koeficientu $4,0 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ [61].

Jako další srovnávací hodnota byl pro tyto systémy vypočítán koeficient α . Hodnota α udává koeficient mezi počáteční koncentrací sondy a koncentrací na rozhraní gelu a roztoku (bráno ze strany gelu). Předpokladem je, že se hodnota α nemění s časem ani s počáteční koncentrací sondy. Grafy závislosti difuzních toků na počáteční koncentraci mají lineární charakter, což také může znamenat, že se koeficienty α mění lineárně s počáteční koncentrací. Tento koeficient α by měl být jakýmsi parametrem, který charakterizuje systém sondy a vybraného gelu. Koeficient α v sobě ukrývá koncentrační skok sondy na rozhraní gelu a roztoku, který můžeme označit jako rozdělovací koeficient mezi roztokem se sondou a gelem. Při difuzi sondy z roztoku do gelu nejprve dochází k určitému zakoncentrování sondy na rozhraní. Toto zakoncentrování je lehce viditelné i pouhým okem. Až po tomto zakoncentrování dochází k další difuzi barviva do struktury gelu. Výchozí rovnicí pro výpočet koeficientu α je následující rovnice (5) pro výpočet koncentračního profilu:

$$c_{x,t} = c_{g,r} \operatorname{erfc} \left(\frac{x}{2\sqrt{D_g t}} \right) \quad (5)$$

V této rovnici představuje $c_{x,t}$ koncentraci sondy ve vzdálenosti x a v čase t . Hodnota $c_{g,r}$ představuje koncentraci sondy na rozhraní (ze strany gelu), D_g je difuzní koeficient sondy v gelu a erfc je doplňková chybová funkce. Koeficient α vychází z předpokladu, že koncentrace na rozhraní $c_{g,r}$ je úměrná počáteční koncentraci sondy c_0 , získáme tedy závislost $c_{g,r} = \alpha c_0$, potom tedy bude platit:

$$c_{x,t} = \alpha c_0 \operatorname{erfc} \left(\frac{x}{2\sqrt{D_g t}} \right) \quad (6)$$

Při výpočtech naměřených dat se vycházelo i z následující rovnice pro celkový tok difundujícího barviva:

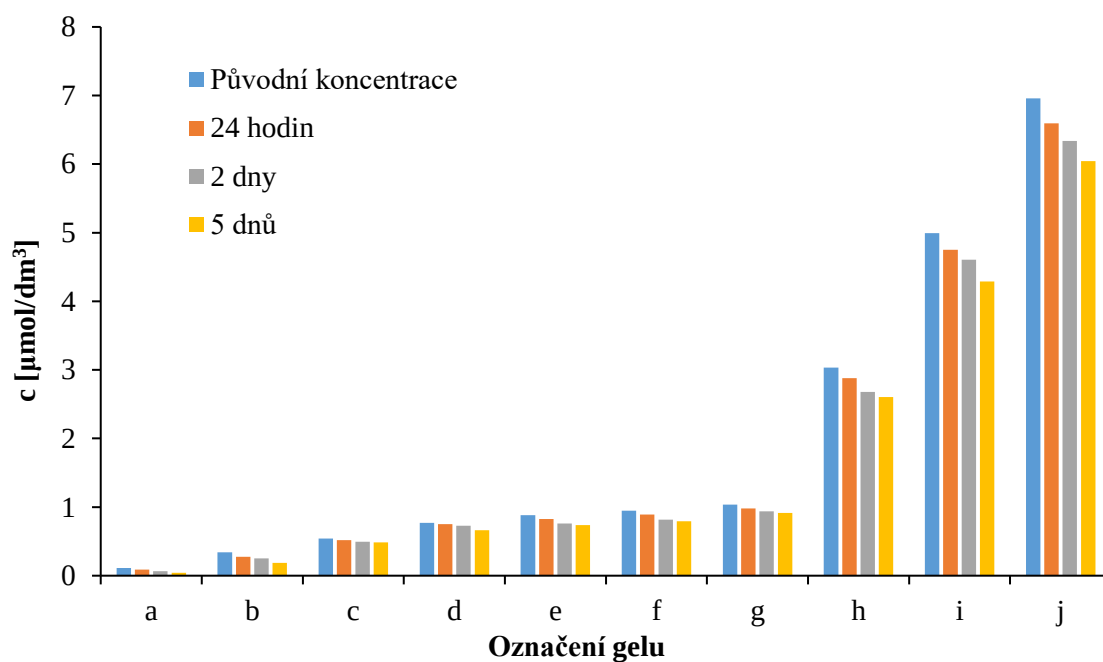
$$m_t = 2c_{g,r} \sqrt{\frac{D_g t}{\pi}} \quad (7)$$

V této rovnici m_t představuje celkový tok v čase t na jednotkovou plochu neboli celkové množství prošlé jednotkovým rozhraním.

5.1. Dextranové hydrogely se sondou ATTO 488 v roztoku NaCl

5.1.1. Dextranové hydrogely D1 s ATTO 488 v NaCl

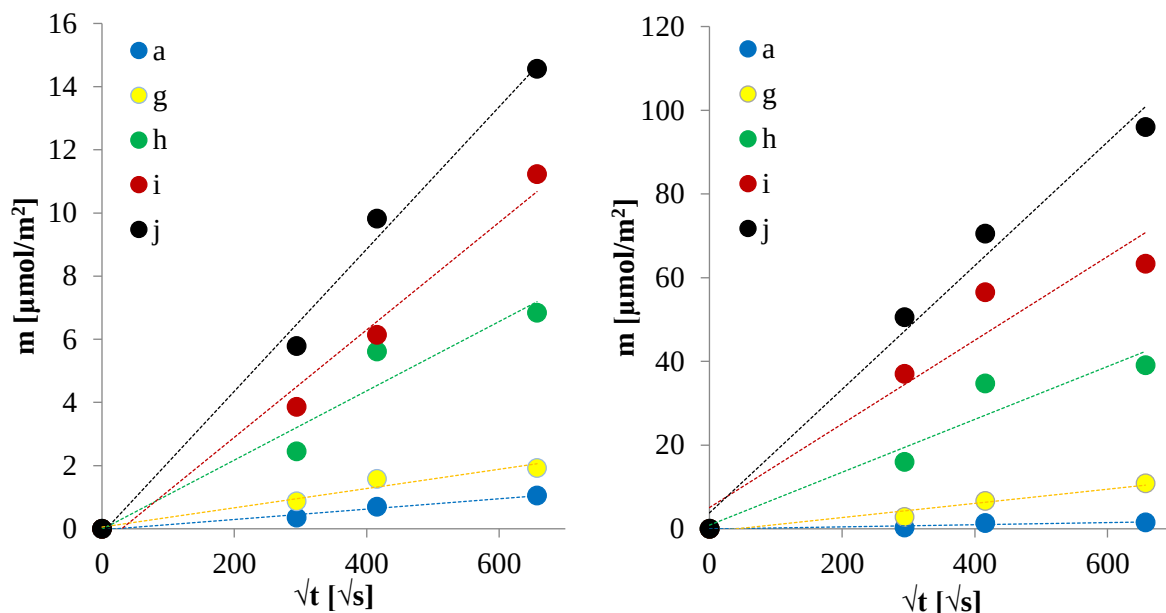
Tyto hydrogely byly připraveny smísením 4 hm. % roztoku DEAE-dextranu a 400 mM SDS. Po usazení gelu na dně vialky byl supernatant odlit a nahrazen roztokem sondy ATTO 488 v 0,15 M roztoku NaCl. Koncentrace sond popisuje Tabulka 4. Absorbance roztoků byla měřena po 24 hodinách, 2 a 5 dnech.



Obr. 17: Změny koncentrace sondy ATTO 488 u gelů D1. Značení gelů a jejich koncentrace popisuje Tabulka 4.

Jak je z Obr. 17 patrné, koncentrace sondy v roztoku nad gelem se neustále s postupem času snižuje. Dochází tedy k difuzi molekul sondy do struktury gelu. K nejvyššímu rozdílu při změně koncentrace sondy dochází hned po prvním dni od výměny supernatantu za sondu. Největší procentuální rozdíl v koncentraci sondy v roztoku před zahájením měření a po 5 dnech je u nejnižší původní koncentrace sondy, což je $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol/dm}^3$. Do gelu se u nejnižší původní

koncentrace sondy naváže už po 5 dnech 60 % sondy, zatímco u nejvyšší původní koncentrace sondy, která je $7 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$, se naváže 13 % této sondy. Z hlediska látkového množství sondy, které se do gelu dostane, je toto množství největší u nejvyšší koncentrace původní sondy. Látkové množství sondy v gelu u koncentrace $7 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$ je 13krát vyšší než u koncentrace $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol/dm}^3$.

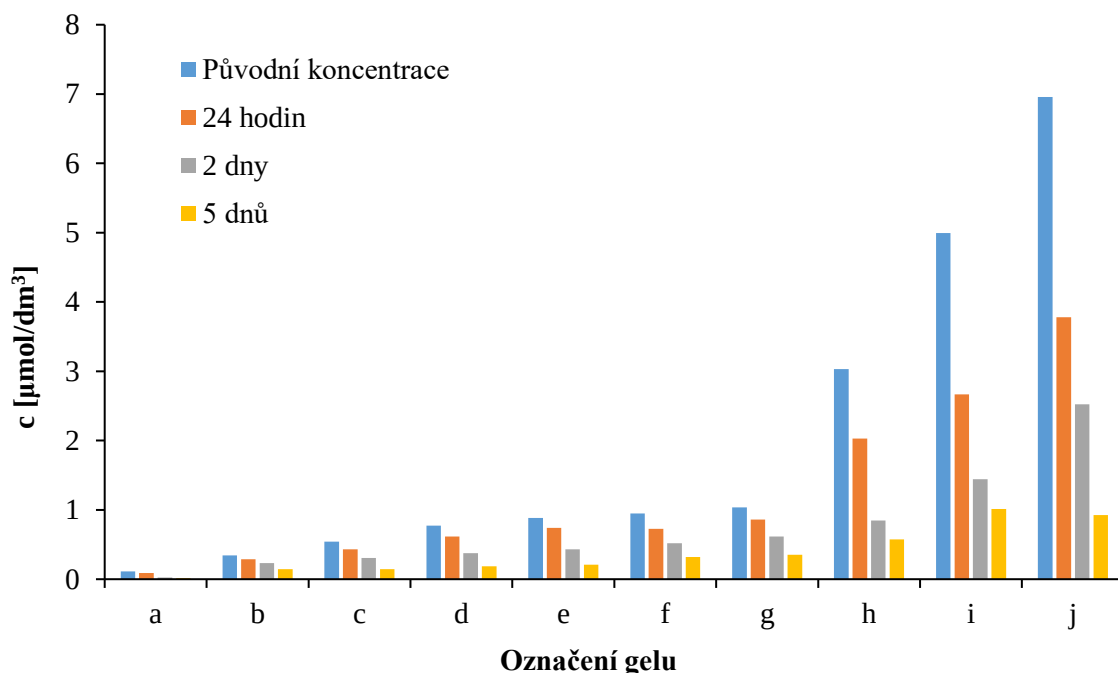


Obr. 18: Ukázka závislosti difuzního toku u sondy ATTO 488 na odmocnině času pro gely D1 (vlevo) a gely D2 (vpravo). Měřeno po 24 hodinách, dvou a pěti dnech.

Se zvyšující se koncentrací sondy v roztoku nad dextranovým hydrogелеm roste i difuzní tok m . Difuzní tok byl vypočítán z látkového množství sondy v gelu naměřeného po jednotlivých časových intervalech vztaženého na plochu povrchu hydrogelu ve vialce. Jak můžete vidět na Obr. 18, difuzní tok se zvyšuje se zvyšující se koncentrací sondy a postupně se zvyšuje s postupem času, kdy sonda difunduje do gelu a zvyšuje se tak množství v gelu navázané. U nízkých koncentrací dochází k postupnému ustálení difuzního toku, když nastává vyrovnaní koncentračního gradientu mezi roztokem a gelem.

5.1.2. Dextranové hydrogely D2 s ATTO 488 v NaCl

Gely s označením D2 byly připraveny smícháním 4% roztoku DEAE-dextranu a 100 mM SDS. Po odlití supernatantu byl gel zalit stejnými roztoky sond ATTO 488 v 0,15 M roztoku NaCl jak tomu bylo u dextranových gelů D1. Následně se měřila absorbance roztoku po 1 dni, 2 a 5 dnech. Úbytek koncentrace sondy v roztoku popisuje následující obrázek.



Obr. 19: Změny koncentrace sondy ATTO 488 v 0,15 M roztoku NaCl u dextranových gelů D2.

U dextranových hydrogelů D2 dochází po 5 dnech od výměny supernatantu k absorpci až 88 % původního množství sondy. K absorpci 88 % došlo u nejnižší koncentrace sondy, tedy $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol/dm}^3$. K velmi vysoké absorpci barviva došlo i u gelu se sondou o nejvyšší koncentraci $7 \cdot 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$, kdy byl rozdíl mezi původní a konečnou koncentrací 87 %.

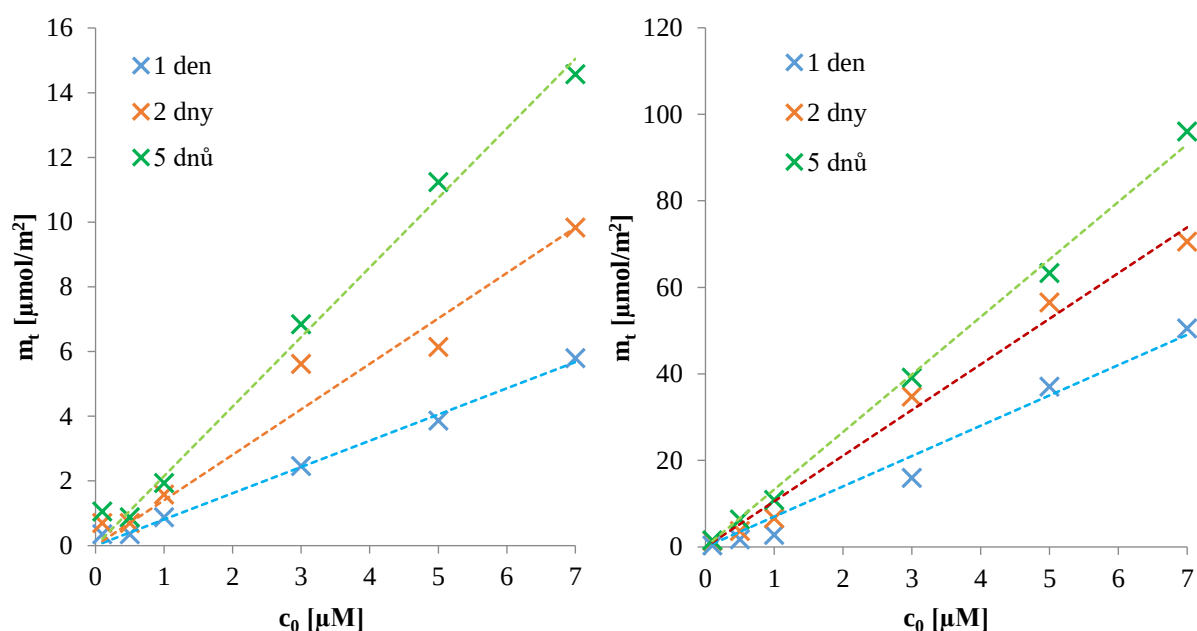
5.1.3. Srovnání gelů D1 a D2 se sondou ATTO 488 v roztoku NaCl

Dextranové gely D1 a D2 se liší v koncentraci použitého tenzidu SDS, kdy u gelů D1 je tenzid 400 mM a u gelů D2 je 100 mM. Z naměřených a vyhodnocených dat je patrné, že koncentrace tenzidu pro zesíťování gelu hraje velkou roli při difuzi použité sondy a ovlivňuje její difuzní charakteristiky. U gelů D2 dochází v průměru k absorpci 75 % původního množství sondy v roztoku, zatímco u gelů D1 se absorbuje v průměru 21 % sondy. Vyšší absorpce gelů D2 se projevuje i v hodnotách difuzního toku (Obr. 18, difuzní tok gelů D1), který je mnohem vyšší než u gelů D1.

Tabulka 6: Zjištěné difuzní koeficienty a koeficienty α pro sondu ATTO 488 v 0,15 M roztoku NaCl u dextranových gelů D1 a D2.

Naměřené difuzní koeficienty ATTO 488 v NaCl [m^2/s]	
D1	$1,55 \cdot 10^{-10}$
D2	$3,92 \cdot 10^{-10}$
Koeficient α [-]	
D1	0,227
D2	0,963

Tabulka 6 ukazuje, že sonda ATTO 488 v roztoku 0,15 M NaCl má u dextranových gelů D2 vyšší difuzní koeficient, takže dochází k rychlejší difuzi sondy do struktury gelu. Koeficient α má u gelů D2 také vyšší hodnotu oproti gelům D1. Vyšší difuzní koeficient je způsoben rozdílnou koncentrací použitého tenzidu SDS při přípravě hydrogelů. Tento rozdíl může být způsoben teoretickým poměrem náboje mezi tenzidem SDS a kladně nabitým DEAE-dextranem, kdy platí, že pro dextran D1 je poměr $\sim 4,6$, zatímco pro dextran D2 je tento poměr $\sim 1,2$. To znamená, že část SDS je spotřebována na tvorbu hydrogelového zesítěvání. U gelů D1 je tato část mnohem menší vzhledem k původní koncentraci 400 mM. U gelů D2 je spotřeba SDS o původní koncentraci 100 mM pro zesítěvání mnohem vyšší a volného SDS tak v roztoku zůstane méně než u D1. Množství volného SDS v pórech hydrogelu je u gelů D2 menší a méně brání difundování barviva do gelu. Tato teorie lze praktikovat i na rozdílné koeficienty α , kdy větší koncentrace volného SDS v pórech hydrogelu D1 brání zakonzentrování barviva na rozhraní gel-roztok.

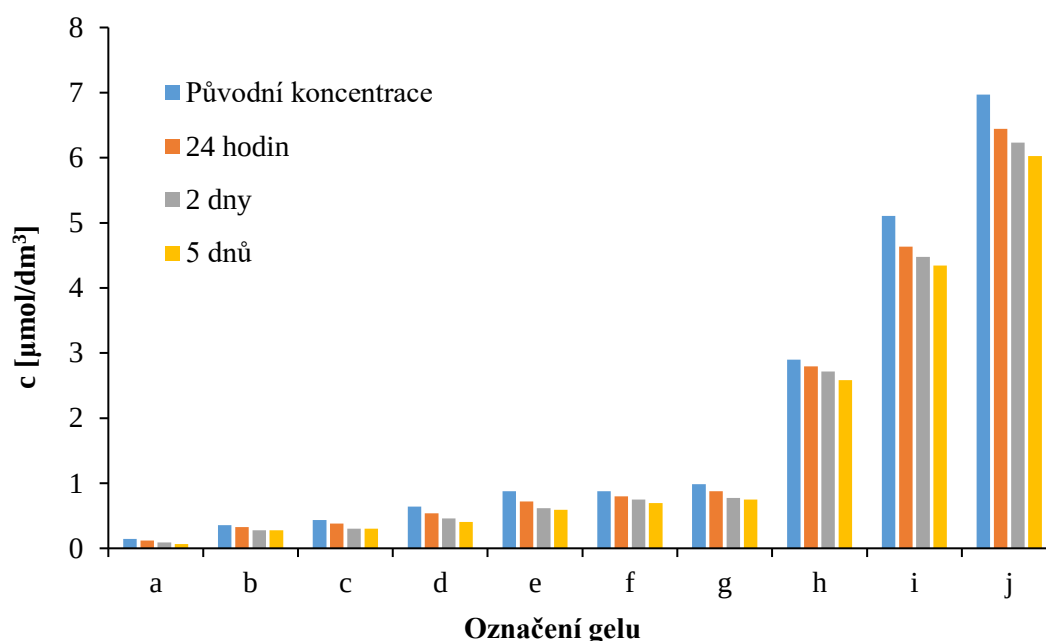


Obr. 20: Závislost difuzního toku na původní koncentraci sondy ATTO 488. Graf vlevo ukazuje závislost gelů D1. Vpravo je závislost gelů D2. Vybrané koncentrace: 0,1; 0,5; 1; 3; 5 a 7 μM .

5.2. Dextranové hydrogely se sondou nilská červeň v roztoku SDS

5.2.1. Dextranové hydrogely D1 s nilskou červení v SDS

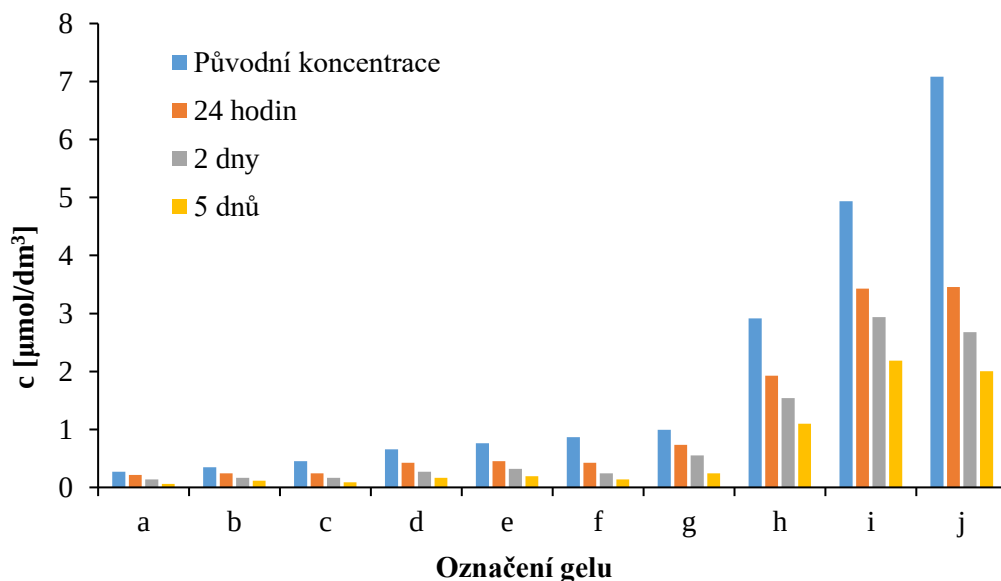
Po odlití supernatantu byly tyto gely D1 zality sondou nilská červeň rozpuštěné v roztoku 400 mM SDS. Absorbance roztoku byla měřena po 24 hodinách, 2 a 5 dnech. Původní koncentrace sondy v roztoku a následné změny této koncentrace popisuje následující obrázek. Gely D1 s nilskou červení v roztoku 400 mM SDS absorbují po 5 dnech 14 až 55 % procent látkového množství původní sondy v roztoku.



Obr. 21: Změny koncentrace sondy NR v roztoku 400 mM SDS u gelů D1.

5.2.2. Dextranové hydrogely D2 s nilskou červení v SDS

Studium difuze u gelů D2 s nilskou červení bylo prováděno tak, že usazený gel na dně vialky byl zbaven supernatantu a místo něj byl gel zalit roztokem sondy ve 100 mM SDS. Měření probíhalo opět po 24 hodinách, 2 a 5 dnech. Během měření absorbance je už pouhým okem viditelné, že u gelů D2 s nilskou červení dochází k rychlejšímu difundování sondy do struktury gelu a dochází tak k viditelnému zabarvení gelu sondou. U těchto gelů dochází k absorpci 56 až 85 % původního množství sondy v roztoku. Oproti gelům D1 je to mnohem větší množství a jak už bylo zmíněno, rozdíl je vidět i pouhým okem. Rozdíly v absorpci těchto gelů jsou patrné při porovnání Obr. 21 a Obr. 22, které popisují úbytek koncentrace sondy v roztoku.



Obr. 22: Změny koncentrace sondy NR v roztoku 100 mM SDS u gelů D2.

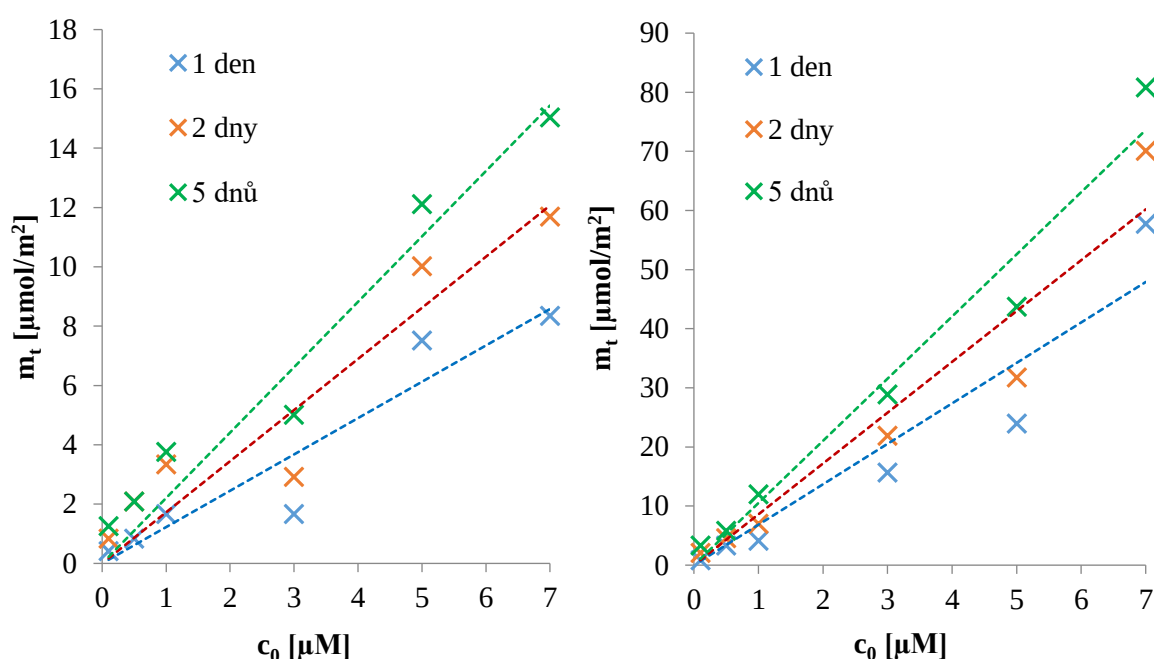
5.2.3. Srovnání gelů D1 a D2 se sondou nilská červeň v roztoku SDS

Gely byly připraveny stejným způsobem za použití 400 mM a 100 mM SDS. Na rozdíl od dextranových gelů se sondou ATTO, kde sonda byla v 0,15 M roztoku NaCl, byla nilská červeň v roztoku tenzidu SDS. Hlavní rozdíl mezi jednotlivými gely je tedy v koncentraci použitého SDS pro zesíťování DEAE-dextranu. Zde se opět uplatňuje teoretický poměr náboje, který je pro gely D1 ~4,6 a pro gely D2 ~1,2. Už při porovnání Obr. 21 a Obr. 22 je jasné, že sonda u gelů D2 bude mít vyšší difuzní koeficient oproti sondě u gelů D1. Konkrétní vypočítané hodnoty difuzních koeficientů zobrazuje Tabulka 7. Oproti difuzním koeficientům sondy ATTO v roztoku NaCl se tyto difuzní koeficienty od sebe příliš neliší. Částečné vyrovnaní rozdílu v difuzních koeficientech může být způsobeno tenzidem, ve kterém je rozpuštěna sonda. Sonda může být obecně v roztoku ve formě volných částic, nebo ve formě micel. V případě sondy ATTO v roztoku NaCl, bude sonda ve formě volných částic. V případě NR v roztoku SDS bude sonda převážně obsažena ve formě micel SDS. Můžeme tak uvažovat vzhledem k tomu, že kritická micelární koncentrace je pro SDS ~8 mM [61] a v našem případě jsou koncentrace 100 mM a 400 mM, tedy několikanásobně vyšší, než je kritická micelární koncentrace. Molekuly SDS budou v roztoku tvořit micely obsahující sondu NR.

Tabulka 7: Zjištěné difuzní koeficienty a koeficienty α pro sondu nilské červeně v roztoku SDS u dextranových gelů D1 a D2.

Naměřené difuzní koeficienty NR v SDS [m ² /s]	
D1	4,22·10⁻¹⁰
D2	4,63·10⁻¹⁰
Koeficient α [-]	
D1	0,218
D2	0,771

Vypočítaný koeficient α pro dextranové gely se sondou NR souvisí s difuzními koeficienty. Pro gely D2 je tento koeficient vyšší vzhledem k jejich vyššímu difuznímu koeficientu. Hodnota obou koeficientů je ovlivněna hlavně rozdílnou skladbou hydrogelů D1 a D2. Při použití vyšší koncentrace SDS při tvorbě gelů D1 může docházet k vyššímu zesíťování a tím ke změně porozity a rozdílné „klikatosti“ pórů gelů. Celkově je koeficient α pro nilskou červeně nižší, než je tomu u ATTO 488. Tento rozdíl může být způsoben nejen tvorbou micel v SDS s nilskou červení, ale i vzhledem k rozdílné povaze či velikostem molekuly použitých sond.

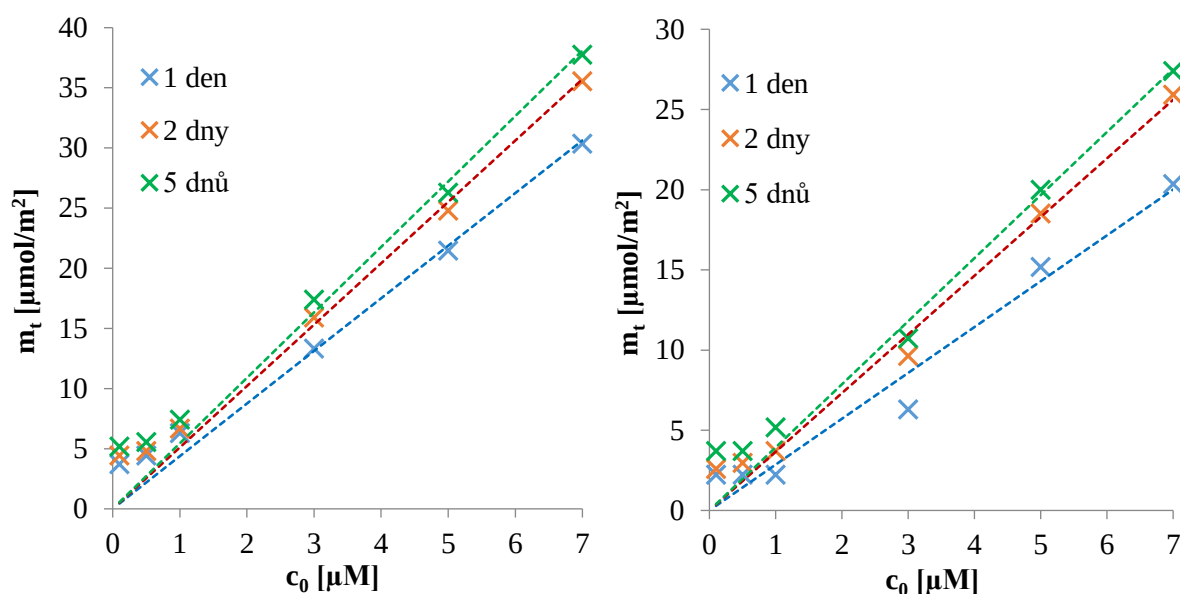


Obr. 23: Závislost difuzního toku na původní koncentraci sondy NR. Graf vlevo ukazuje závislost gelů D1. Vpravo je závislost gelů D2. Vybrané koncentrace: 0,1; 0,5; 1; 3; 5 a 7 μM .

Obr. 23 porovnává závislost difuzního toku na původní koncentraci sondy NR v SDS. Vlevo jsou vybrané koncentrace gelů D1, kdy sonda je v roztoku 400 mM SDS. Vpravo jsou vybrané koncentrace sondy ve 100 mM roztoku tenzidu. U gelů D2 je vlivem použití nižší koncentrace tenzidu při zesíťování tento tok několikanásobně vyšší než u gelů D1. V rozsahu zvolených koncentrací je hodnota difuzního toku lineární. Se zvyšující se počáteční koncentrací se úměrně zvyšuje.

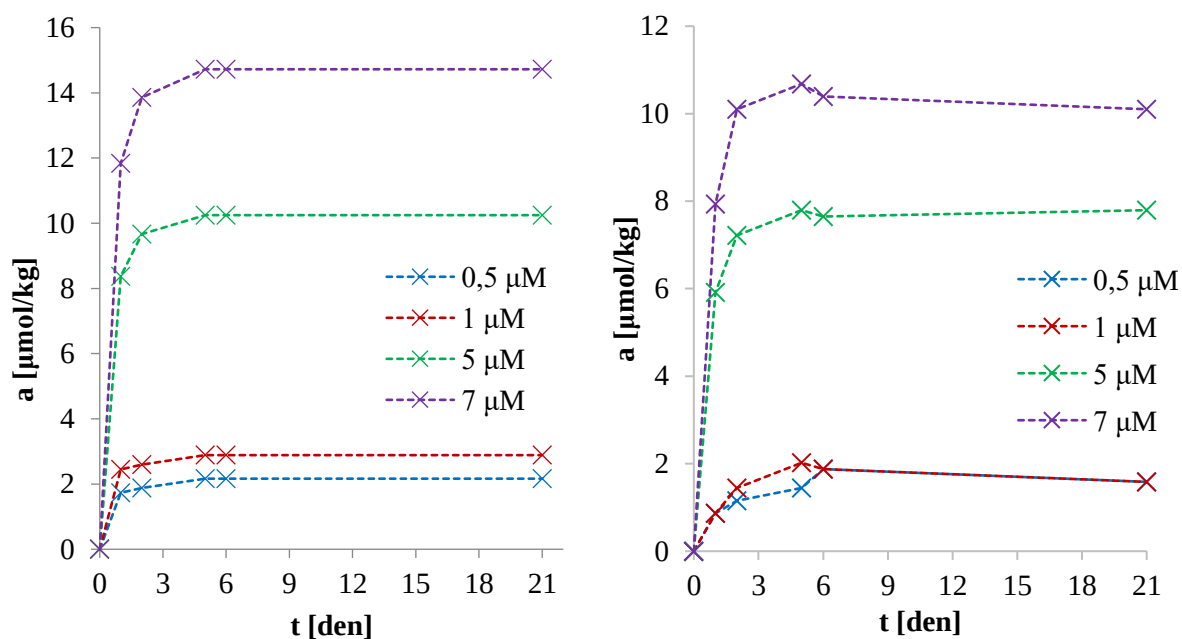
5.3. Hyaluronanové hydrogely se sondou ATTO 488 v roztoku NaCl

Pro studium difuzí v hyaluronových hydrogelech byly použity gely s označením H1, H2, H4 a H5. Gely H1 a H2 se liší v koncentraci použitého tenzidu pro jejich zesíťování. Gely H1 byly zesíťovány 200 mM tenzidem Septonexem, gely H2 potom 100 mM. Gely H4 a H5 byly zesíťovány stejným způsobem jako gely H1 a H2. Dalším hlavním rozdílem mezi gely je použití rozdílného hyaluronanu. Vysokomolekulární hyaluronan (1 540 kDa) byl použit u gelů H1 a H2. Nízkomolekulární hyaluronan (340 kDa) byl použit pro gely H4 a H5. Po usazení gelů na dně vialky byly supernatanty odlity a gely byly přelity roztokem sondy v roztoku 0,15 M NaCl. Absorbance roztoků byla měřena po 24 hodinách, 2, 5, 6 a 21 dnech od výměny supernatantu.

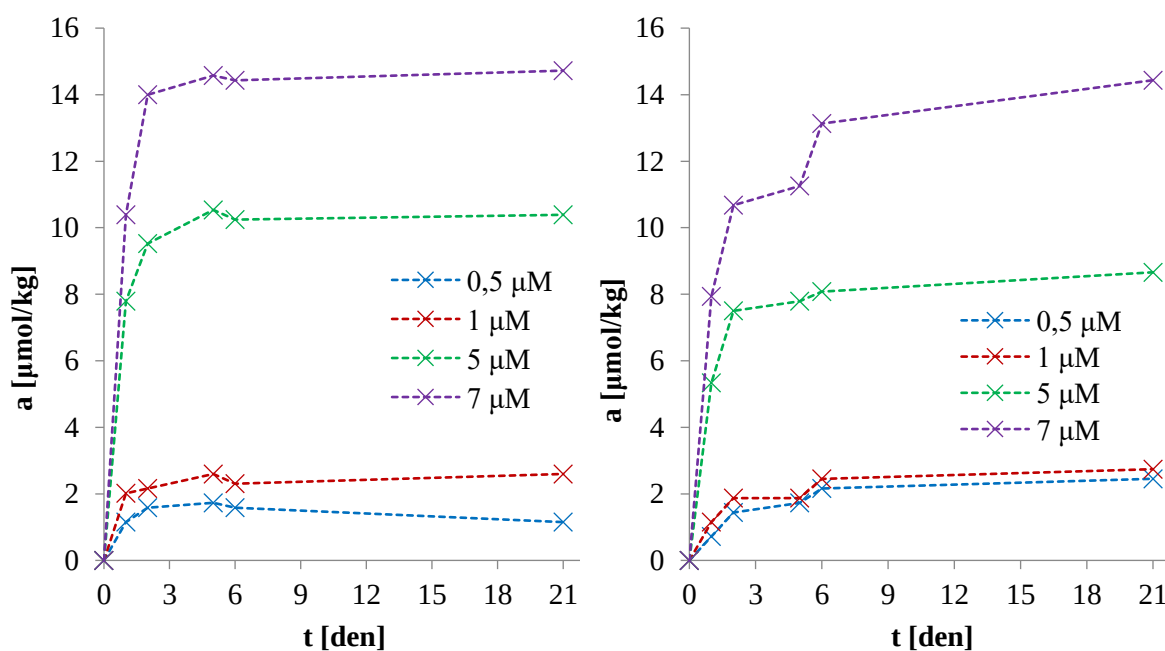


Obr. 24: Závislost difuzního toku na původní koncentraci sondy ATTO 488 v roztoku 0,15 M NaCl. Graf vlevo ukazuje závislost gelů H1. Vpravo je závislost gelů H2. Vybrané koncentrace: 0,1; 0,5; 1; 3; 5 a 7 μM .

V grafu závislosti difuzního toku na počáteční koncentraci (Obr. 24) můžeme vidět, že u gelů H1 jsou difuzní toky o něco vyšší, než je tomu u gelů H2. Jak již bylo zmíněno, měřeno bylo po 24 hodinách, 2, 5, 6 a 21 dnech od výměny supernatantu za sondu. V těchto jsou však hodnoty pouze pro prvních 5 dnů. Po 6 dnech od výměny supernatantu už nedochází ke změnám absorbance, takže nedochází k další difuzi sondy do gelu a difuzní tok se tedy zastaví. Mezi gelem a roztokem se sondou zřejmě dochází k ustavení rovnováhy a ztrácí se koncentrační gradient. U některých gelů H2 dokonce dochází k obrácení toku sondy a po 21 dnech se absorbance roztoku se sondou nepatrně zvyšuje. Dá se tedy říct, že po 5 dnech od výměny supernatantu se u těchto gelů a sondou ATTO 488 v roztoku NaCl ustavuje rovnováha a nedochází k další difuzi. Ustálení rovnováhy mezi sondou v gelu a sondou v roztoku můžeme pozorovat i na Obr. 25.



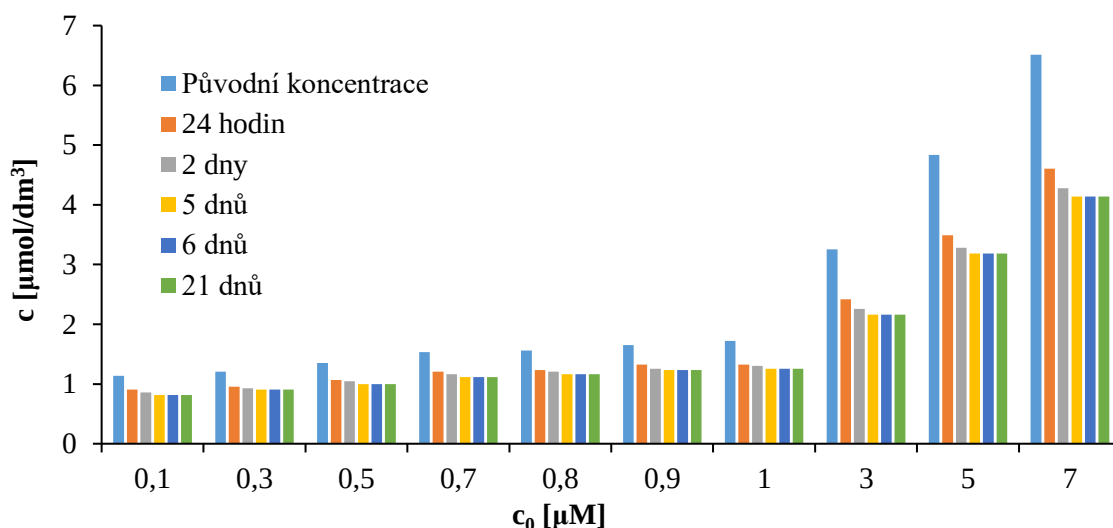
Obr. 25: Srovnání závislosti navázaného množství sondy ATTO v gelu na čase. Vlevo jsou data pro gely H1, vpravo pro H2. Sonda byla původně v 0,15 M roztoku NaCl.



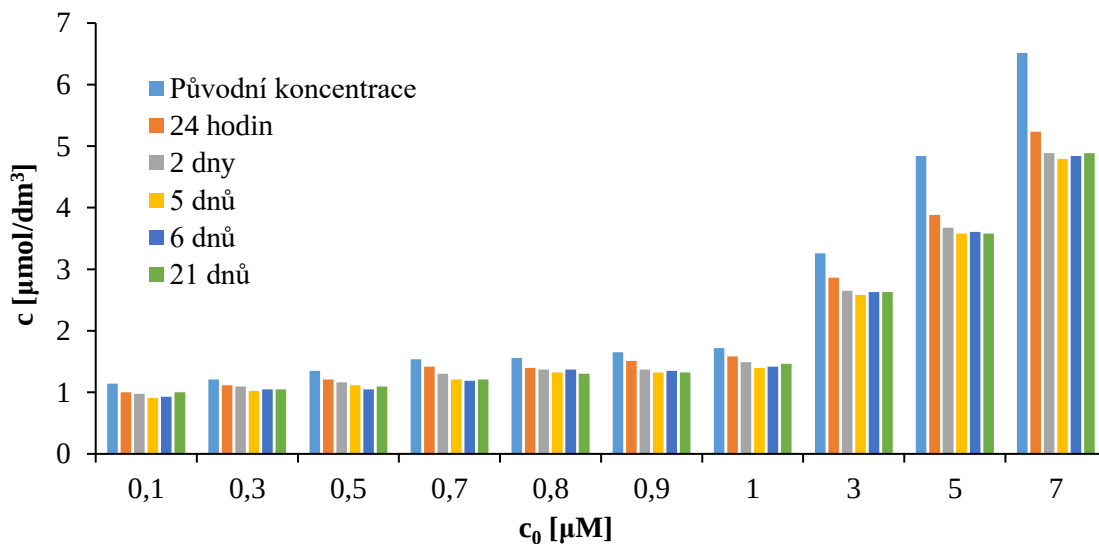
Obr. 26: Srovnání závislosti navázaného množství sondy v gelu na čase. Vlevo jsou data pro gely H4, vpravo pro H5. Sonda byla původně v 0,15 M roztoku NaCl.

Obr. 25 a Obr. 26 zobrazuje množství navázaného množství sondy v μmol na 1 kg gelu v závislosti na čase. Po prvních 24 hodinách od výměny supernatantu za roztok se sondou dochází k vysokému skoku v navázání sondy do gelu. Měření po 2 dnech u gelů H4 potom

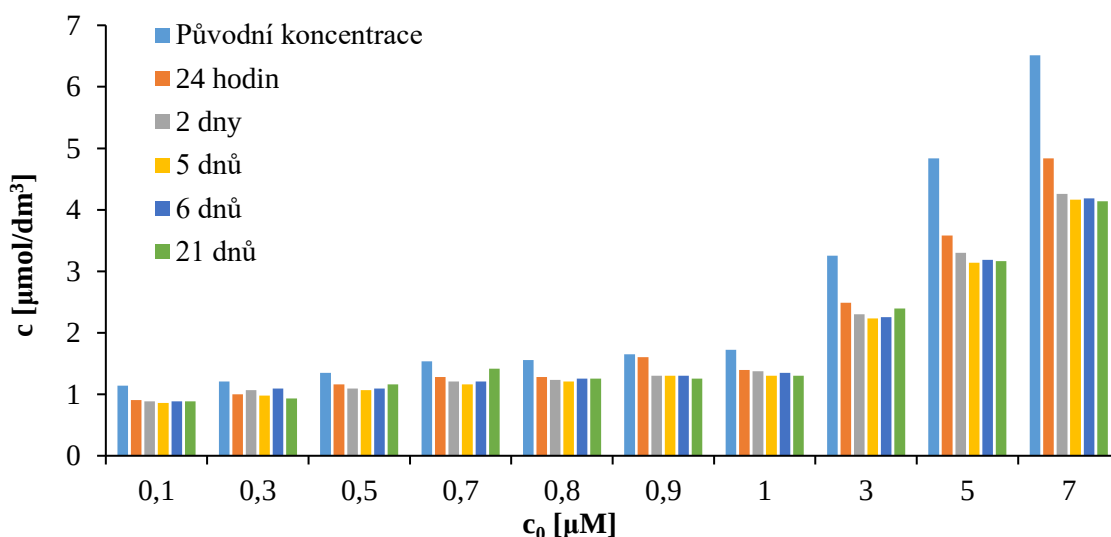
vykazuje menší množství navázané sondy, a tudíž i zpomalení rychlosti difuze. Během dalších dní se množství navázaného barviva příliš nemění a hodnoty zůstávají téměř konstantní. U gelů H5 dojde také ke zpomalení, ale i po 6 dnech dochází na rozdíl od gelů H4 k dalšímu vázání sondy. Až po 21 dnech od začátku měření je navázané množství sondy srovnatelné s navázaným množstvím u gelů H4. Z tohoto měření vyplývá, že sonda ATTO má vyšší difuzní koeficient u gelů H4 než u H5. Gely H4 absorbují sondu z roztoku už během 5 dnů, kdežto gely H5 absorbují sondu v průběhu 21 dnů.



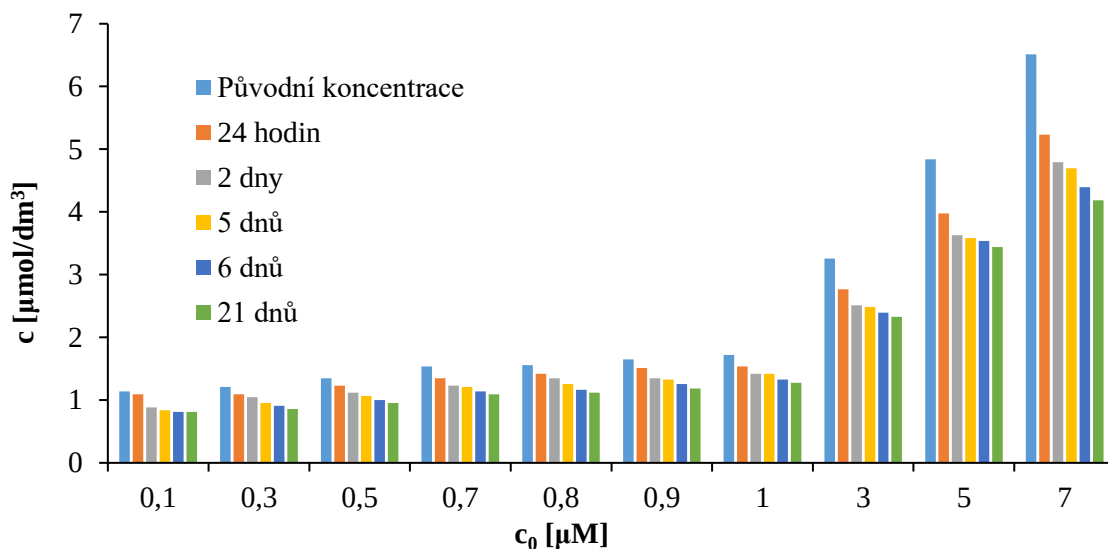
Obr. 27: Přehled změn koncentrací sondy ATTO 488 v roztoku 0,15 M NaCl pro gely H1. Osa x představuje původní koncentrace sondy v roztoku.



Obr. 28: Přehled změn koncentrací sondy ATTO 488 v roztoku 0,15 M NaCl pro gely H2. Osa x představuje původní koncentrace sondy v roztoku.



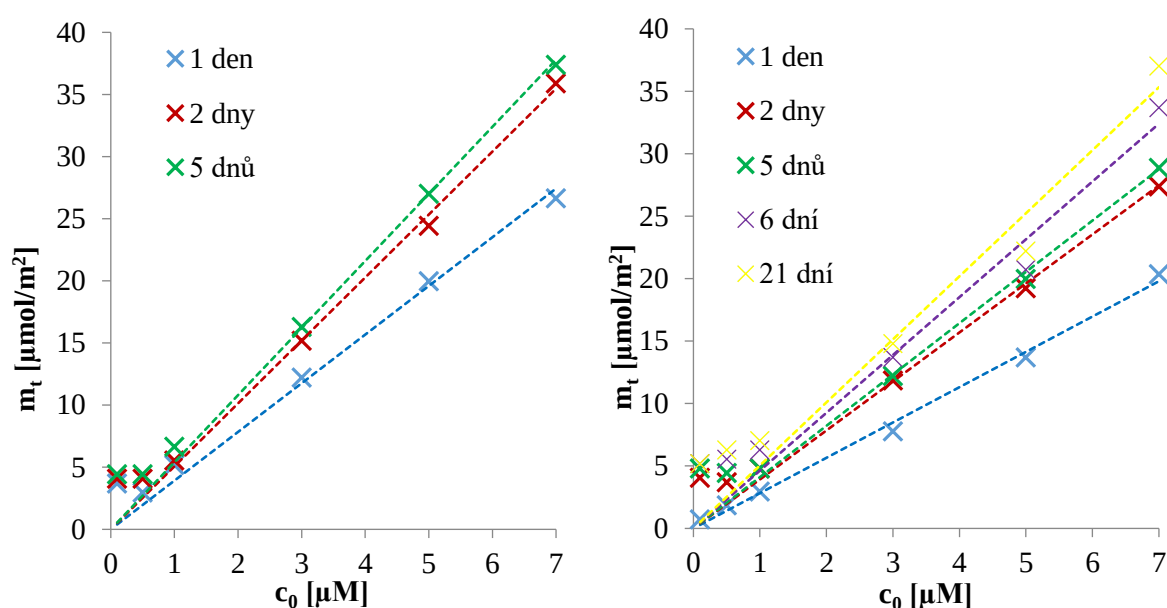
Obr. 29: Přehled změn koncentrací sondy ATTO 488 v roztoku 0,15 M NaCl pro gely H4. Osa x představuje původní koncentrace sondy v roztoku.



Obr. 30: Přehled změn koncentrací sondy ATTO 488 v roztoku 0,15 M NaCl pro gely H5. Osa x představuje původní koncentrace sondy v roztoku.

Hyaluronanové gely s označením H4 a H5 se ve svém chování oproti gelům H1 a H2 liší. Difuzní tok je po 5 dnech od výměny supernatantu za sondu u gelů H4 vyšší než u gelů H5, ale opět dochází po 5 dnech k zastavení difuze a koncentrace sondy v roztoku se dál nemění. Opět zřejmě dochází k vyrovnání či potlačení koncentračního gradientu mezi gelem a roztokem se sondou. K ustavení rovnováhy ale nedochází u gelů H5. U těch probíhá difuze i po 21 dnech od výměny supernatantu a koncentrace sondy v roztoku neustále klesá. Rozdíl mezi gelem H4 a H5 je v koncentraci použitého tenzidu Septonexu, kdy pro gely H4 byl použit o koncentraci 200 mM a pro gely H5 o koncentraci 100 mM. Nižší koncentrace tenzidu může mít stejný vliv na difuzi sondy do gelu jako tomu bylo u dextranových gelů, kdy menší množství tenzidu,

respektive jeho micel pravděpodobně umožňuje navázání většího množství sondy. Sondě je tedy vlivem menšího množství micel obsažených v pórech gelu méně bráněno v pronikání těmito póry a do těchto pórů se jí vleze více. U dextranových gelů se rozdíl v koncentraci použitého tenzidu projevil v difuzních koeficientech. Dextranový gel s nižší koncentrací tenzidu byl teoreticky méně zesíťován, barvivo do něj pronikalo snáze a difuzní koeficient byl vyšší. U hyaluronanových hydrogelů je tomu ovšem naopak. Gel vytvořený tenzidem o nižší koncentraci má difuzní koeficient nižší, stejně tak je tomu i u koeficientu α . Je možné, že u hyaluronanových hydrogelů způsobuje přebytek tenzidu, který nebyl spotřebován na zesíťování, tvorbu micel uvnitř pórů gelu. Tyto micely nebrání navázání sondy do gelu, ale naopak je možné, že dochází k jakémusi vtahování barviva dovnitř těchto micel, pokud toto barvivo již v micelách v roztoku není, což je právě případ ATTO v roztoku NaCl.



Obr. 31: Závislost difuzního toku na původní koncentraci sondy ATTO 488 v roztoku 0,15 M NaCl. Graf vlevo ukazuje závislost gelů H4. Vpravo je závislost gelů H5. Vybrané koncentrace: 0,1; 0,5; 1; 3; 5 a 7 μM .

Tabulka 8 zobrazuje veškeré vypočítané koeficienty pro hyaluronanové gely se sondou ATTO 488 v roztoku NaCl. Více zesíťované hyaluronanové hydrogely obecně vykazují vyšší koeficienty. Gely H1 a H4, které byly zesíťované 200 mM Septonexem mají oproti méně zesíťovaným gelům H2 a H5 difuzní koeficienty a koeficienty α vyšší. U dextranových hydrogelů tomu bylo právě naopak. Jak již bylo zmíněno, u dextranových hydrogelů pravděpodobně platí pravidlo, že volný přebytek tenzidu SDS uvnitř struktury gelu brání navázání dalšího množství sondy. Kdežto Septonex u hyaluronanových gelů toto vázání sondy podporuje a vypadá to, že dochází k jakémusi vtahování sondy z roztoku do těchto prázdných micel. Typ tenzidu tu zřejmě hraje velkou roli nejen svojí počáteční koncentrací k zesíťování biopolymeru na hydrogel. Tenzid SDS má kritickou micelární koncentraci ~ 8 mM [61], [69] a v závislosti na teplotě a iontové síle je jeho agregační číslo 50 až 70 [69], [70]. Na rozdíl

od SDS má Septonex daleko nižší kritickou micelární koncentraci $\sim 0,8$ mM [70], [71],[72] a jeho agregační číslo je ≤ 10 [73]. Velikost jednotlivých micel tenzidů tedy může v difuzi sondy do gelu hrát také velkou roli. Agregáty SDS jsou tvořeny mnohem více molekulami, než je tomu u Septonexu, takže se jich teoreticky do pórů gelu vleze méně a na sondu v roztoku nemají takový vliv. Naopak micely Septonexu jsou tvořeny méně molekulami, takže jich teoreticky může být v pórech gelu více, takže mohou více ovlivňovat difuzní charakteristiky sondy.

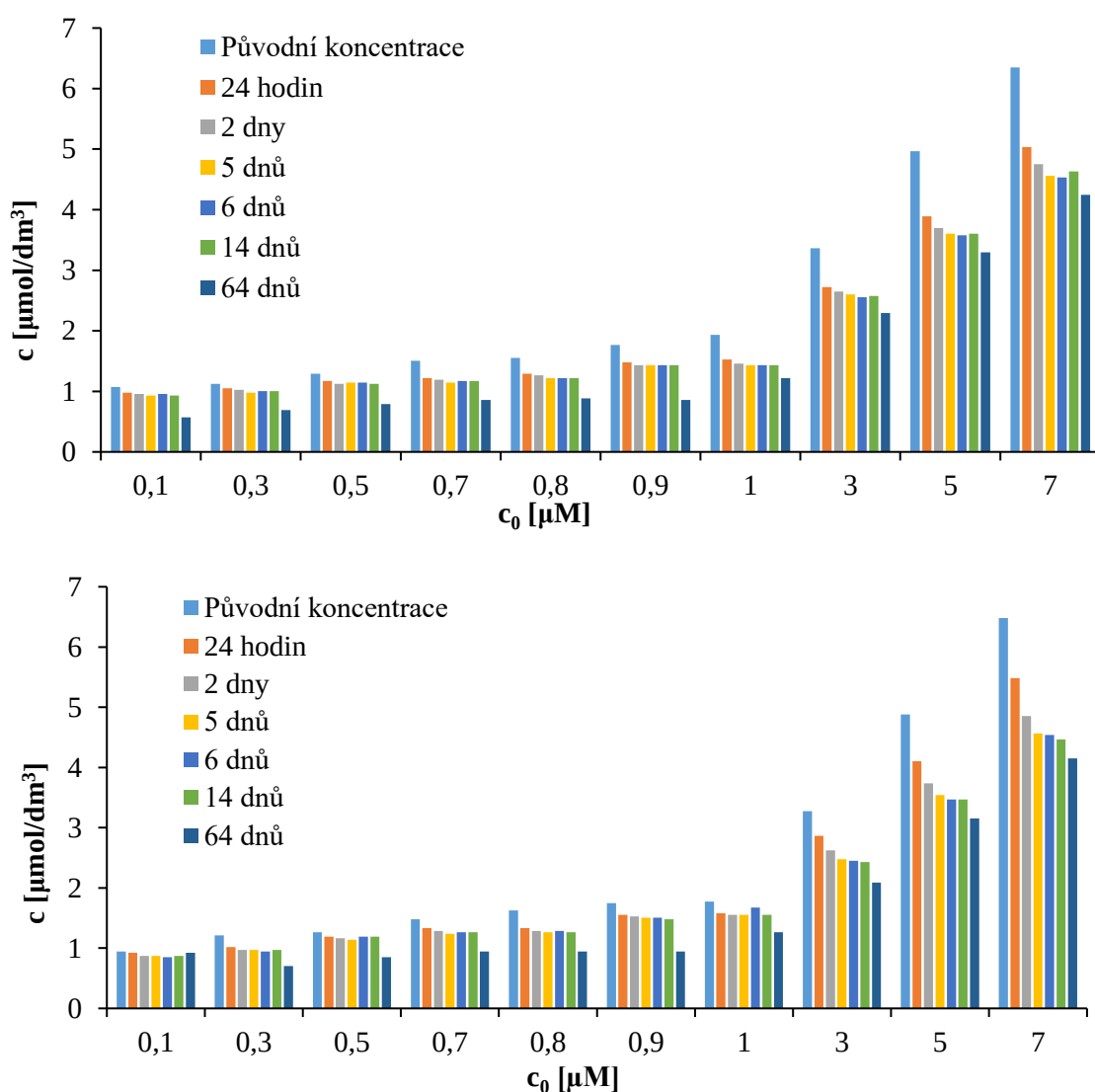
Tabulka 8: Zjištěné difuzní koeficienty a koeficienty α pro sondu ATTO 488 v roztoku 0,15 M NaCl u hyaluronanových gelů H1, H2, H4, H5.

Naměřené difuzní koeficienty ATTO 488 v NaCl [m^2/s]	
H1	$1,21 \cdot 10^{-9}$
H2	$4,14 \cdot 10^{-10}$
H4	$7,17 \cdot 10^{-10}$
H5	$5,26 \cdot 10^{-10}$
Koeficient α [-]	
H1	0,395
H2	0,349
H4	0,417
H5	0,344

Obecně platí, že je difuzní koeficient nepřímo úměrný viskozitě prostředí. Pokud bychom uvažovali to, že čím více zesíťovaný hyaluronanový hydrogel je, tím více by měl být viskóznější a tím pádem by měl snižovat difuzní koeficient. Toto pravidlo se dá aplikovat na výsledky difuzních koeficientů a koeficientů α u dextranových hydrogelů. U nich platí, že čím vyšší je koncentrace použitého tenzidu pro zesíťování, tím nižší jsou difuzní koeficienty. Struktura více zesíťovaných dextranových hydrogelů může být více rigidní, takže klade větší odpor vůči difuzi sondy. Tato teorie se však nedá aplikovat na tyto hyaluronanové hydrogely. Difuzní koeficienty i koeficienty α jsou vyšší u více zesíťovaných hydrogelů (H1, H4). Je možné, že právě přebytek tenzidu, konkrétně Septonexu, který se neúčastní síťování biopolymeru, zůstává ve vytvořených pórech gelu. Místo aby difuzi barviva bránil, dochází pravděpodobně k urychlování difuze do gelu a je možné, že tyto prázdné micely Septonexu barvivo do sebe „vtahují“ a zvyšují tak nejen difuzní koeficient, ale i koeficienty α . Zajímavý je i fakt, že koeficienty α se u rozdílně zesíťovaných dextranových hydrogelů velmi liší (Tabulka 6), kdežto u hyaluronanových hydrogelů se sondou ATTO není tento rozdíl tak vysoký. Rozdíl v těchto koeficientech může být, kromě rozdílného chování tenzidů, pravděpodobně způsoben i rozdílnou strukturou a větvením jednotlivých biopolymerů. Hyaluronan tvoří dlouhé řetězce, které se pomocí tenzidu zesíťují a propojují, zatímco dextran se navíc velmi větví, takže po zesíťování může vykazovat daleko komplikovanější propojení jednotlivých řetězců.

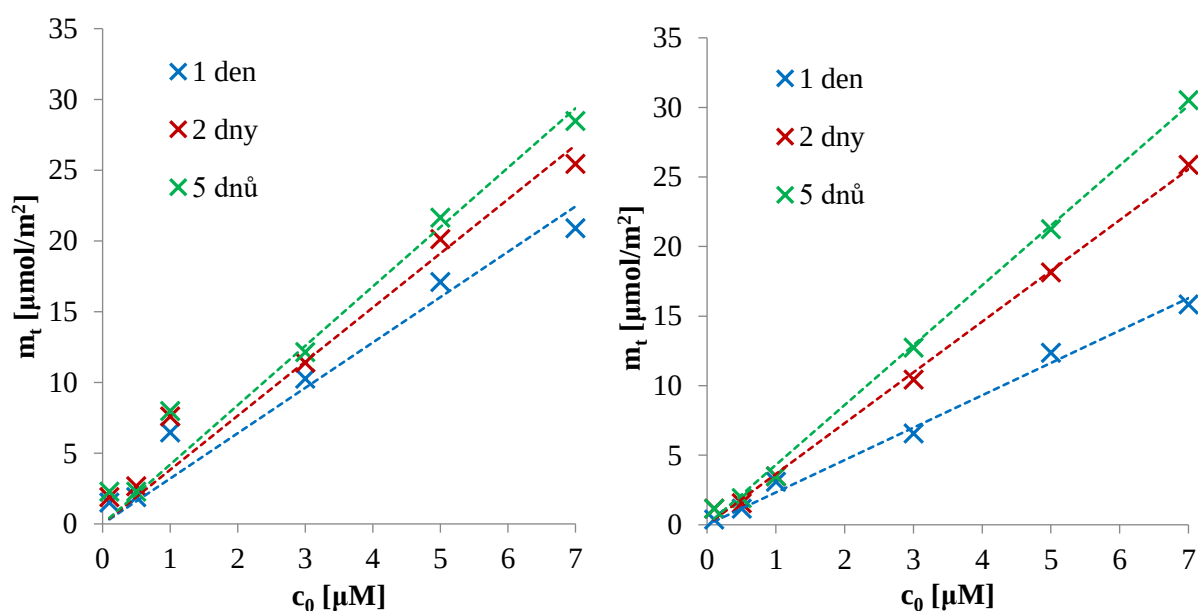
5.4. Hyaluronanové hydrogely se sondou ATTO 488 v Septonexu

Pro širší studium difuzních charakteristik byla sonda ATTO 488 zkoumána v kombinaci s hyaluronanovými hydrogely v několika různých prostředích. Byla zkoumána nejen v 0,15 M roztoku NaCl, ale i v roztocích 200 mM a 100 mM Septonexu. Supernatant byl z usazených hydrogelů odlit a gel se následně zalil roztokem sondy v tenzidu. Gely H1 a H4 byly zality sondou ATTO v 200 mM roztoku Septonexu a gely H2 a H5 byly zality sondou ve 100 mM roztoku tenzidu. Tyto koncentrace byly vybrány z toho důvodu, že gely H1 a H4 jsou síťovány právě 200 mM Septonexem a gely H2 a H5 jsou síťovány 100 mM Septonexem. Absorbance roztoků nad gelem byla následně měřena po 24 hodinách, 2, 5, 6, 14 a 64 dnech. Měření po 64 dnech bylo provedeno pro orientační zjištění, zda v gelech dochází i po tolika dnech k difuzi barviva, popřípadě jestli nedochází k degradaci gelů či sondy vlivem roztoku.



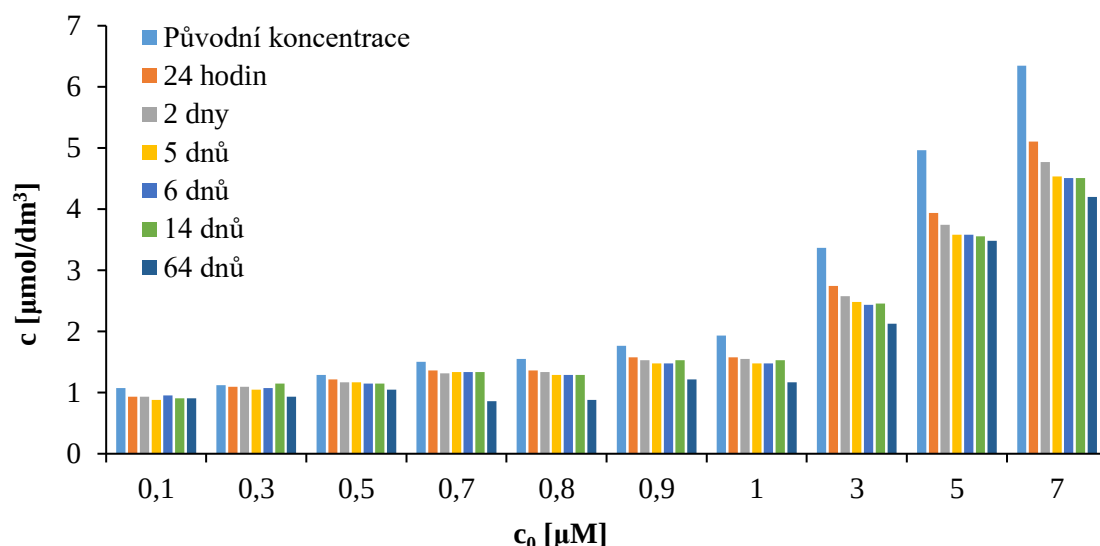
Obr. 32: Přehled změn koncentrací sondy ATTO 488 v roztoku Septonexu. Osa x představuje původní koncentrace sondy v roztoku. Nahoře jsou data pro gely H1 s ATTO v 200 mM roztoku. Dole jsou data pro gely H2 s ATTO ve 100 mM roztoku Septonexu.

U gelů H1 i H2 dochází po 5 dnech k ustavení rovnováhy mezi barvivem v gelu a v roztoku tenzidu. U vyšších počátečních koncentrací sondy u gelů H1 dochází po 5 dnech k navázání v průměru 25 % množství sondy z roztoku do gelu. Následující dny se měřená absorbance, a tedy i množství sondy v roztoku, příliš nemění. Ke změně dochází až po 64 dnech, kdy dochází opět ke snížení absorbance roztoku. Po tolika dnech však není jisté, jestli se nejedná o možnou degradaci barviva, popřípadě pokud nedochází k možné degradaci hydrogelu vlivem dalšího Septonexu v roztoku nad gelem. Podobně je tomu i u gelů H2. Po 5 dnech se pravděpodobně ustaví rovnováha mezi množstvím sondy v gelu a v roztoku. Rozdíl je však v rychlosti absorpce sondy do gelu. U gelů H1 dochází k vázání sondy rychleji než u gelů H2, což potvrzují i vypočítané difuzní koeficienty. Rozdíl v rychlosti navázání však není tak rozdílný jako tomu je u gelů H1 a H2 se sondou ATTO v roztoku 0,15 M NaCl.

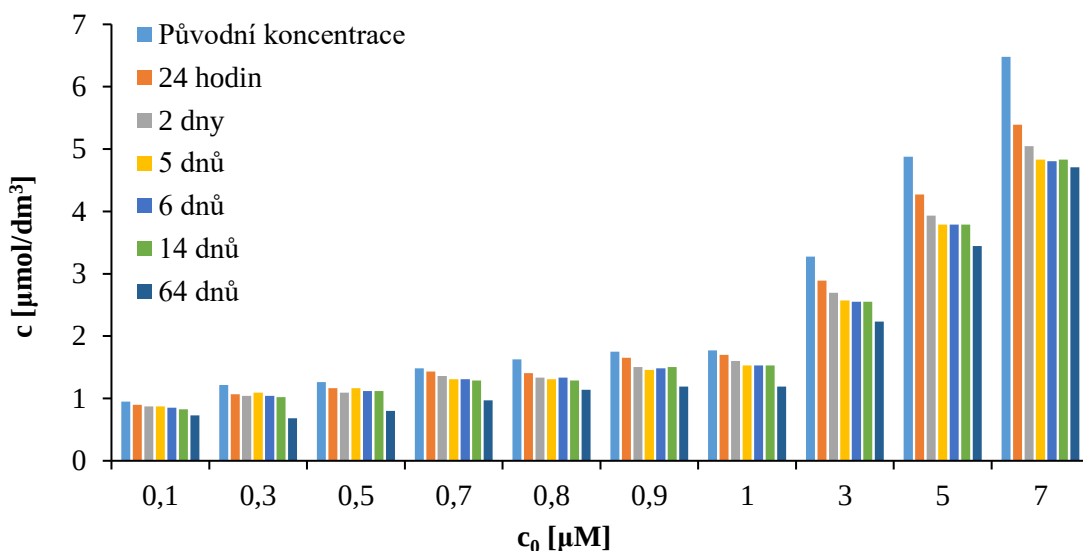


Obr. 33: Závislost difuzního toku na původní koncentraci sondy ATTO 488 v roztoku tenzidu Septonexu. Graf vlevo ukazuje závislost toku sondy u gelů H1. Vpravo je závislost toku sondy u gelů H2. Vybrané koncentrace: 0,1; 0,5; 1; 3; 5 a 7 μM .

Oproti hyaluronanovým hydrogelům se sondou ATTO v NaCl není rozdíl mezi difuzními toky, potažmo difuzními koeficienty mezi gely H1 a H2 tak markantní (viz. Tabulka 9). Je možné, že tento rozdíl je částečně eliminován roztokem Septonexu, ve kterém je rozpuštěná sonda. Jelikož je kritická micelární koncentrace Septonexu ~ 0.8 mM [70], [71], [72], roztoky Septonexu o koncentraci 100 a 200 mM jsou vysoko nad touto koncentrací, tudíž budou molekuly tenzidu tvořit micely. Sonda v tomto roztoku se tak může teoreticky nacházet ve volné rozpuštěné formě, nebo může být obsažena ve vzniklých micelách. Menší množství volné sondy může být vtahováno prázdnými micelami uvnitř pórů gelu, ale větší množství sondy obsažené v roztoku uvnitř micel má omezenou mobilitu, což teoreticky může způsobovat snížení difuzního koeficientu a jejich částečné vyrovnání.

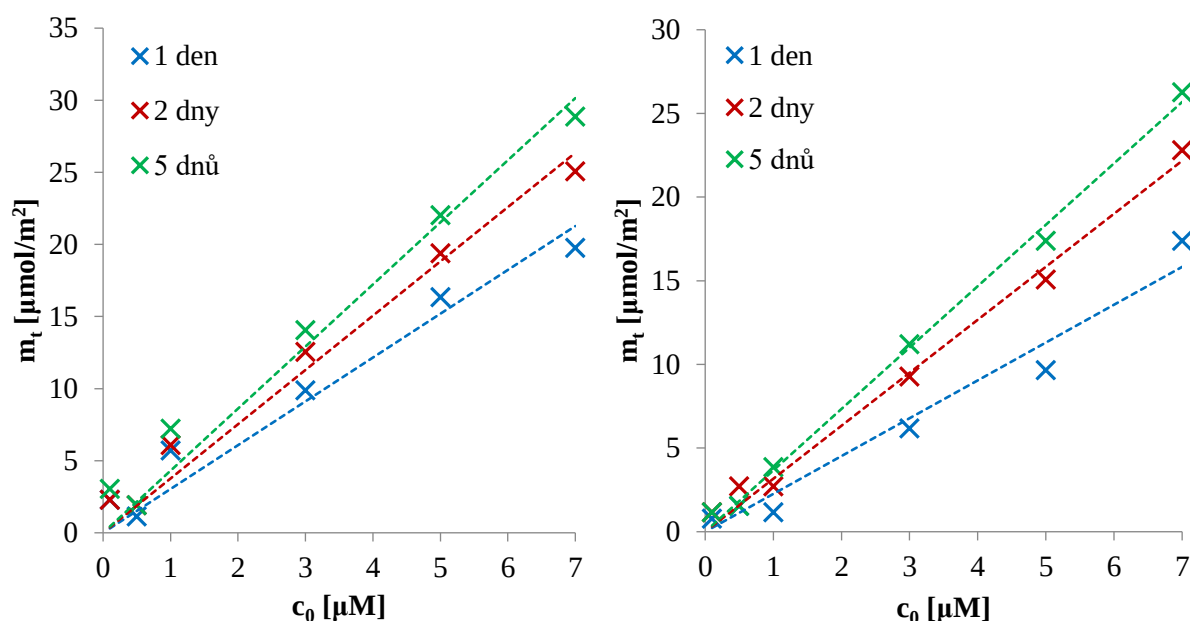


Obr. 34: Přehled změn koncentrací sondy ATTO 488 v roztoku 200 mM Septonexu pro gely H4. Osa x představuje původní koncentrace sondy v roztoku.



Obr. 35: Přehled změn koncentrací sondy ATTO 488 v roztoku 100 mM Septonexu pro gely H5. Osa x představuje původní koncentrace sondy v roztoku.

K ustavení rovnováhy, či zastavení difuze dochází i u gelů H4 a H5 se sondou ATTO v roztoku Septonexu (připravených z LMW hyaluronanu) po 5 dnech od výměny supernatantu stejně jako u gelů H1 a H2 (HMW hyaluronan). Na následujícím Obr. 36 můžeme vidět závislost difuzního toku sondy ATTO pro gely H4 a H5. Gely H4 měly tuto sondu v roztoku 200 mM Septonexu a gely H5 ve 100 mM roztoku tohoto tenzidu. Difuzní tok je opět vyšší u více zesíťovaného gelu H4. Stejně tak je tomu i s koeficientem α , který ale nemá tak velký rozdíl jako gelů H1, H2 s tentýž sondou v tenzidu.



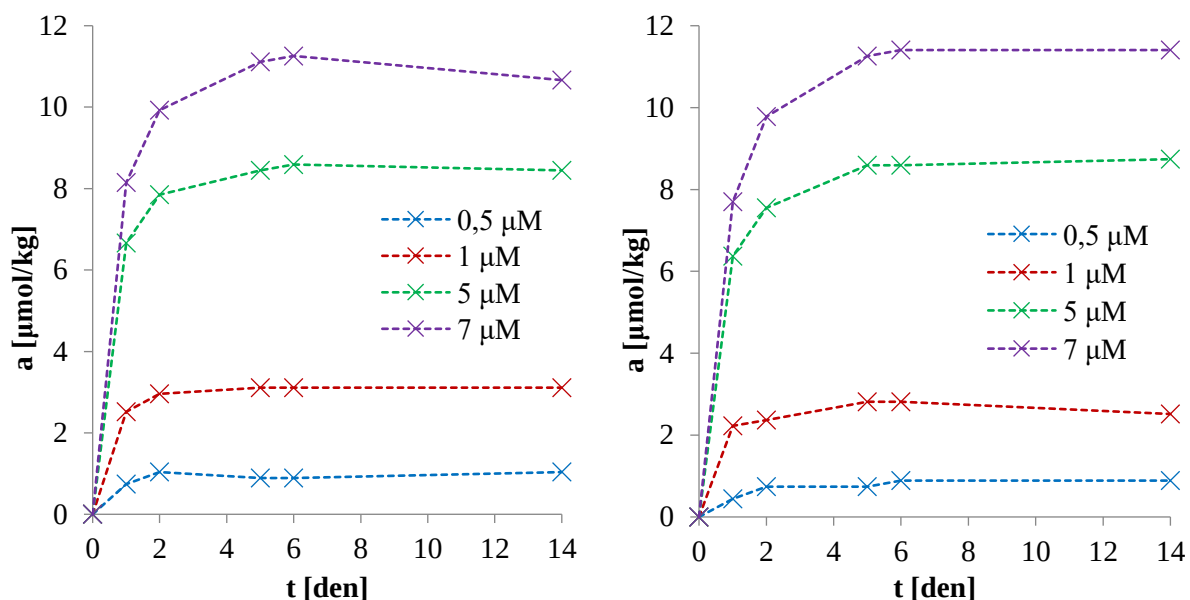
Obr. 36: Závislost difuzního toku na původní koncentraci sondy ATTO 488 v roztoku tenzidu Septonexu. Graf vlevo ukazuje závislost toku sondy u gelů H4. Vpravo je závislost toku sondy u gelů H5. Vybrané koncentrace: 0,1; 0,5; 1; 3; 5 a 7 μM .

Tabulka 9: Zjištěné difuzní koeficienty a koeficienty α pro sondu ATTO 488 v roztoku tenzidu Septonexu u hyaluronanových gelů H1, H2, H4, H5.

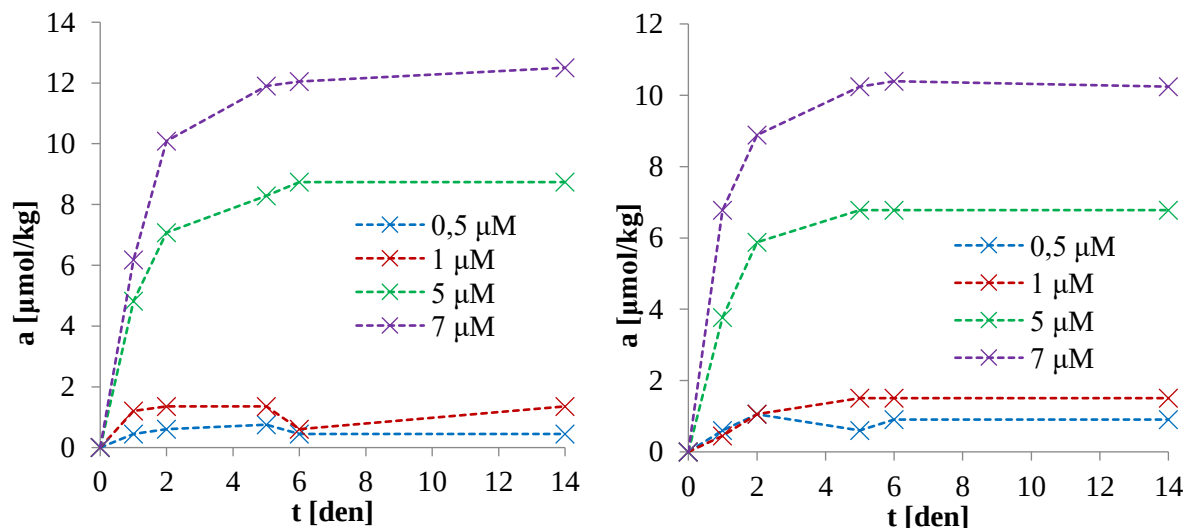
Naměřené difuzní koeficienty ATTO 488 v Septonexu [m^2/s]	
H1	$5,93 \cdot 10^{-10}$
H2	$5,69 \cdot 10^{-10}$
H4	$4,78 \cdot 10^{-10}$
H5	$4,42 \cdot 10^{-10}$
Koeficient α [-]	
H1	0,448
H2	0,320
H4	0,392
H5	0,319

Hyaluronanové hydrogely se sondou ATTO v roztoku tenzidu mají navzájem poměrně podobné difuzní koeficienty na rozdíl od těže sondy, ale v roztoku 0,15 M NaCl. Rozdíl v difuzních koeficientech může vyrovnávat právě přítomnost micel v roztoku tenzidu, ve kterém je rozpuštěná i sonda. V roztoku dojde pravděpodobně k tomu, že přítomné micely do sebe vtáhnou rozpuštěnou sondu a dojde k jejímu zakoncentrování v těchto micelách. Pokud je barvivo rozpuštěné pouze v 0,15 M roztoku NaCl dochází k jeho volnému vtahování do struktury gelu, v roztoku mu prakticky nic nebrání a difuzní koeficienty jsou pro ATTO v NaCl poměrně vysoké. Naopak, pokud je barvivo už v roztoku obsažené v micelách tenzidu jeho difundování do gelu probíhá mnohem pomaleji vzhledem k velkým agregátům micel.

Navíc v pórech gelu jsou pravděpodobně navázány další, prázdné micely tenzidu, které brání vnikání dalších micel tenzidu i s obsahem sondy. Potažmo se dá říct, že tyto póry jsou částečně „obsazené“ prázdnými micelami. I tak ale dochází k difuzi barviva do struktury gelu. Dokonce se tak děje i o trochu rychleji, než je tomu ve vodném prostředí.



Obr. 37: Srovnání závislosti navázaného množství sondy ATTO v gelu na čase. Vlevo jsou data pro gely H1, vpravo pro H2. Sonda byla původně v roztoku 200 mM a 100 mM Septonexu.



Obr. 38: Srovnání závislosti navázaného množství sondy ATTO v gelu na čase. Vlevo jsou data pro gely H4, vpravo pro H5. Sonda byla původně v roztoku 200 mM a 100 mM Septonexu.

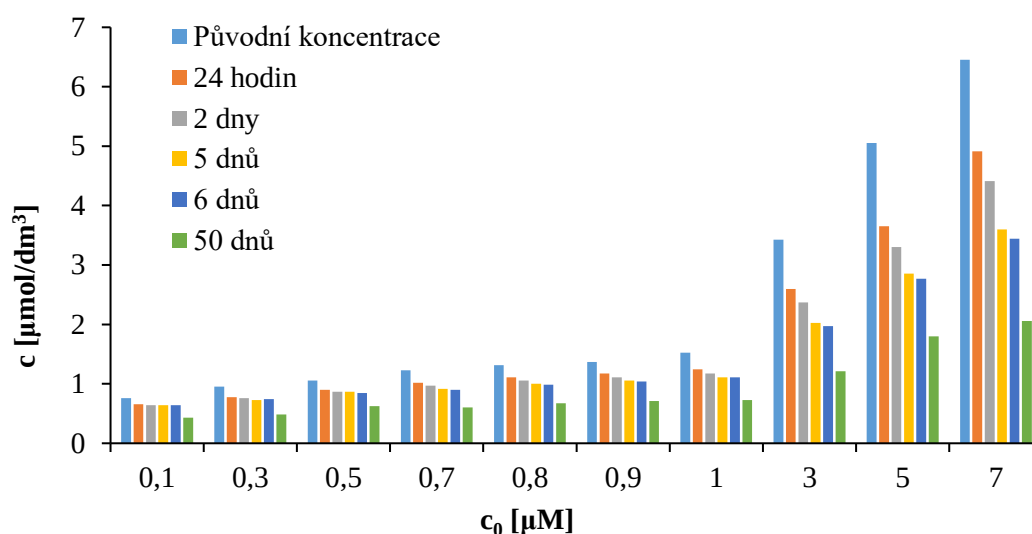
Při porovnání rychlosti difuze sondy ATTO 488 ve vodném prostředí a v systémech hydrogel-roztok, zjistíme, že difuzní koeficient této sondy je ve vodném prostředí nižší. Její naměřená hodnota ve vodném prostředí je $4,0 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ [61]. Experimentálně zjištěné a vypočítané hodnoty difuzních koeficientů při difuzi sondy ATTO do gelu jsou vyšší než ve vodném prostředí. Nejvyšší hodnoty difuzních koeficientů byly zjištěny v systémech gel – ATTO 488 v 0,15 M roztoku NaCl. Hodnoty těchto difuzních koeficientů převyšují i hodnoty sondy v tenzidu. Hodnoty difuzních koeficientů ATTO v NaCl shrnuje Tabulka 8. Sonda se v roztoku NaCl nachází ve volné, rozpuštěné formě. Její difuzi do gelu a tím i difuzní koeficient mohou zvyšovat „prázdné“ micely, které jsou inkorporované do pórovité struktury hydrogelu. Tyto micely mohou pravděpodobně aktivně vázat, či potažmo vtahovat volné barvivo z roztoku. Kromě vtahování barviva do micel může docházet i k samovolnému pronikání rozpuštěných molekul barviva do struktury gelu a tím jsou výsledné difuzní koeficienty oproti ostatním tak vysoké.

Nižší difuzní koeficienty sondy ATTO 488, ale pořád vyšší než ve vodném prostředí, mají systémy se sondou v roztoku tenzidu Septonexu. Difuzní koeficienty sondy ATTO v tenzidu uvádí Tabulka 9. U těchto systémů se v roztoku nevyskytuje sonda ve volné formě v samostatných molekulách, ale je zřejmě součástí vyskytujících se micel tenzidu. Vyšší difuzní koeficient sondy, než je ve vodném roztoku může být způsoben interakcemi micel s gelem. Difuze sondy není hnána jen koncentračním gradientem, ale působí i vliv náboje biopolymeru a tenzidu či jiné interakce mezi sondou a hydrogelem. Tento mechanismus difuze, kdy je barvivo pravděpodobně v micelách a stále je vtahováno do gelu, může být ovlivňován i počtem molekul tenzidu tvořících micelu či poměrem mezi molekulami barviva a počtem micel. Jistou roli může hrát teoretický poměr náboje mezi tenzidem a polymerem, který je u gelů H1 a H4 ~ 4 a u gelů H2 a H5 ~ 2 . Čím je tento poměr nižší, tím více tenzidu je spotřebováno na zesíťování biopolymeru a méně ho zůstává ve struktuře hydrogelu.

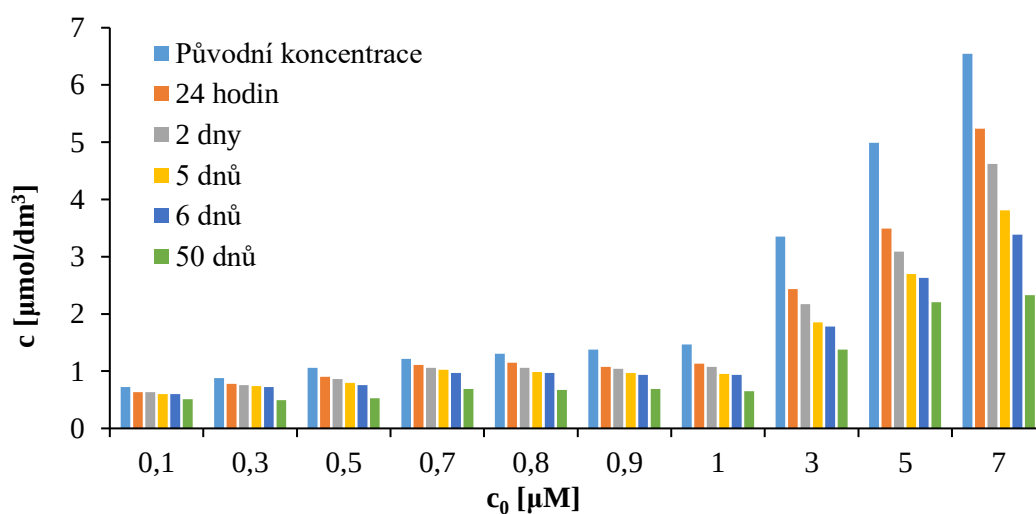
Koeficienty α , které udávají jakýsi poměr mezi počáteční koncentrací sondy v roztoku a její koncentrací na rozhraní gelu a roztoku se odvíjejí od difuzních koeficientů, ale částečně se liší. Koeficienty α vycházejí z rovnice (5) a (6). Předpokladem je, že se α s časem nemění a nemění se ani s počáteční koncentrací sondy. Difuzní toky v závislosti na počáteční koncentraci vycházejí lineárně, z čehož usuzujeme, že se α tedy nemění, může to ale znamenat to, že se tyto koeficienty také mění lineárně s počáteční koncentrací. Bylo zjištěno, že není pravidlem čím vyšší difuzní koeficient, tím vyšší koeficient α . Jednotlivé koeficienty se od sebe lehce liší. Koeficienty α vycházející z naměřených dat jsou zpravidla vyšší u více zesíťovaných hyaluronanových hydrogelů (viz. Tabulka 8 a Tabulka 9), což jsou gely H1 a H4. Koeficient α bude s nejvyšší pravděpodobností nejvíc ovlivňován hlavně samotnou strukturou hydrogelu, tedy typem biopolymeru a jeho větvením a také stupněm zesíťování. U hyaluronanových hydrogelů je možné, že čím víc je biopolymer zesíťován, tím víc obsahuje na rozhraní pórů, které pojmu více sondy a vytvoří tak čelo difuze, ze kterého sonda prostupuje dál do gelu.

5.5. Hyaluronanové hydrogely se sondou nilská červeň v Septonexu

Dalším předmětem studia bylo zjištění difuzních koeficientů sondy nilské červeně v hyaluronanových hydrogelech. Po ustálení hydrogelů na dně vialky byl supernatant odlit a na gely bylo přidáno 5 ml roztoku se sondou NR. U gelů H1 a H4 byla sonda v roztoku 200 mM Septonexu a u gelů H2 a H5 v roztoku 100 mM Septonexu. Koncentrace tenzidu v roztoku sondy byly opět voleny podle koncentrace tenzidu použitého pro zesítěvání hydrogelu. Měření absorbance roztoku probíhalo po 24 hodinách, 2, 5, 6 a 50 dnech. Po 50 dnech od výměny supernatantu byla absorbance roztoku měřena pouze pro orientační zjištění dalších probíhajících dějů v systémech hydrogel – roztok se sondou. Tyto hodnoty nebyly započítávány do celkového difuzního koeficientu.

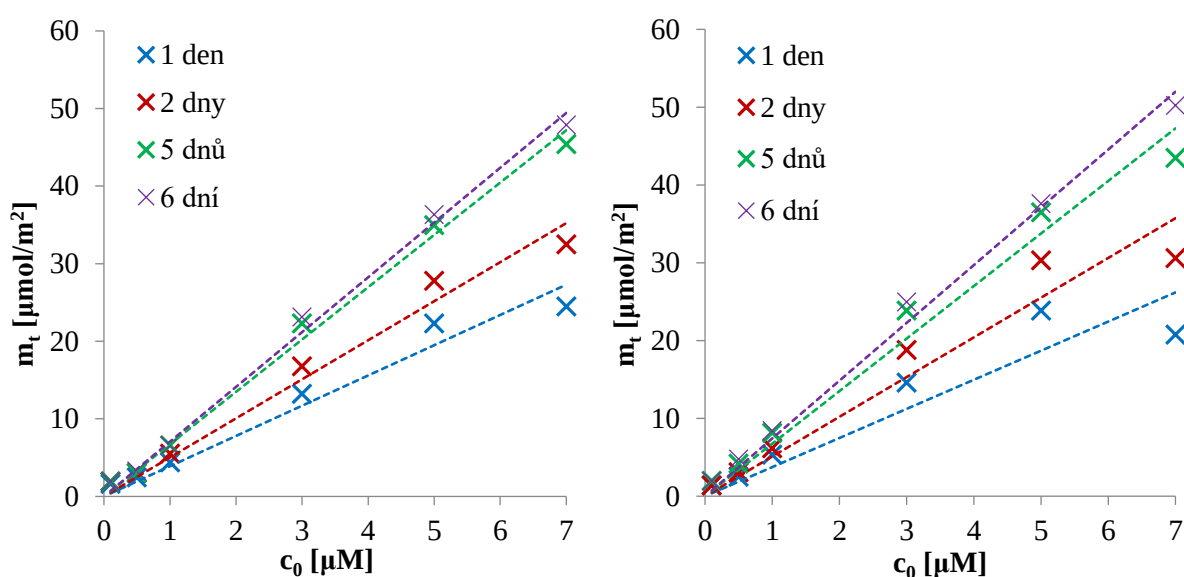


Obr. 39: Přehled změn koncentrací sondy NR v roztoku 200 mM Septonexu pro gely H1. Osa x představuje původní koncentrace sondy v roztoku.



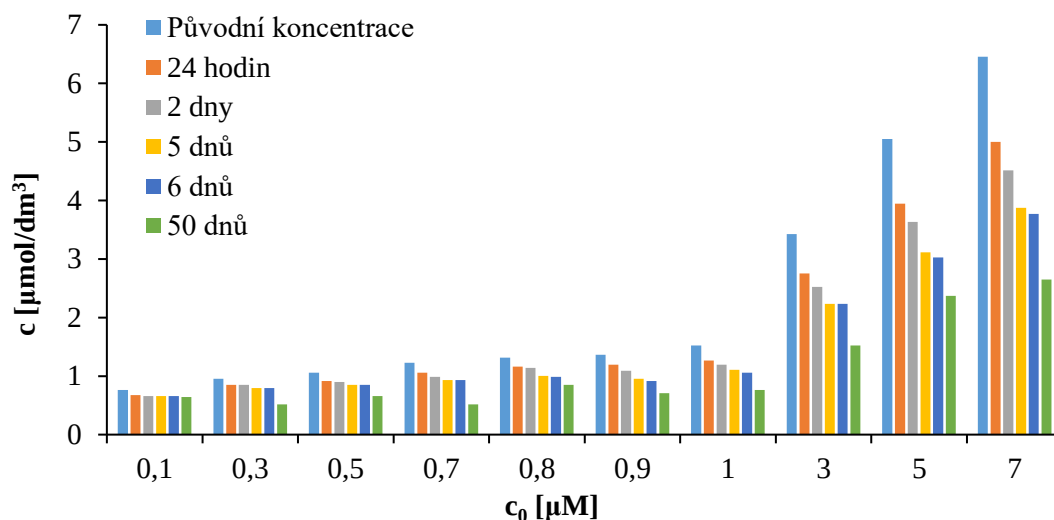
Obr. 40: Přehled změn koncentrací sondy NR v roztoku 100 mM Septonexu pro gely H2. Osa x představuje původní koncentrace sondy v roztoku.

U gelů H1 s nilskou červení v roztoku 200 mM Septonexu dochází po 6 dnech od výměny supernatantu u vyšších počátečních koncentrací k absorpci přes 40 % barviva. Data získaná během prvních 6 dní od výměny supernatantu naznačují svým zpomalením absorpce, že opět dochází k ustavení rovnováhy jako tomu bylo i u hyaluronanových gelů se sondou ATTO. Z technických důvodů bohužel nebylo možné tyto roztoky změřit i během dalších dní pro potvrzení ustálení koncentrace v roztoku a v gelu. Měření po 50 dnech vykazuje další úbytek koncentrace sondy z roztoku, avšak po tolika dnech není jisté, zda se stále uplatňují transportní mechanismy, nebo jestli dochází k degradaci gelu. Obdobná situace nastala i u gelů se sondou ATTO 488 (Obr. 32). Gely H2 se sondou ve 100 mM roztoku Septonexu mají podobnou rychlost absorpce sondy do struktury gelu jako je tomu u gelů H1, což ostatně potvrzují i vypočítané difuzní koeficienty, které se od sebe příliš neliší.

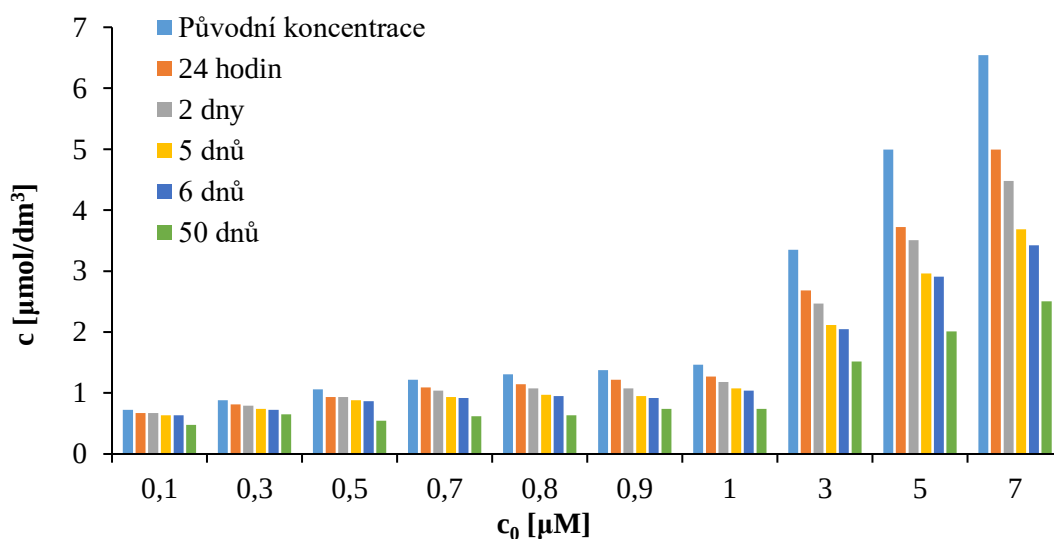


Obr. 41: Závislost difuzního toku na původní koncentraci sondy NR v roztoku tenzidu Septonexu. Graf vlevo ukazuje závislost toku sondy u gelů H1. Vpravo je závislost toku sondy u gelů H2. Vybrané koncentrace: 0,1; 0,5; 1; 3; 5 a 7 μM .

Jak můžeme z Obr. 41 vidět, difuzní toky jednotlivých systémů sondy s gely H1 a H2 jsou si navzájem velmi podobné. Výsledné difuzní koeficienty, které vycházejí i z hodnot difuzních toků se u gelů H1 a H2 s nilskou červení se liší jen minimálně. Minimální rozdíl může být opět způsoben přítomností micel v roztoku se sondou. Koncentrace tenzidu v roztoku sondy je pořád vysoko nad kritickou micelární koncentrací, takže snad naprostá většina Septonexu bude ve formě micel. V těchto micelách pak bude obsažená sonda, která bude do gelu difundovat v rámci celých micel. Rozdíl v difuzních koeficientech pak pravděpodobně tvoří jen rozdílné zesíťování hydrogelu. Se zesíťováním souvisí i teoretický poměr náboje mezi tenzidem a polymerem. Hydrogely H1 zesíťované 200 mM Septonexem mají poměr ~ 4 a hydrogely H2 zesíťované 100 mM Septonexem mají tento poměr ~ 2 .

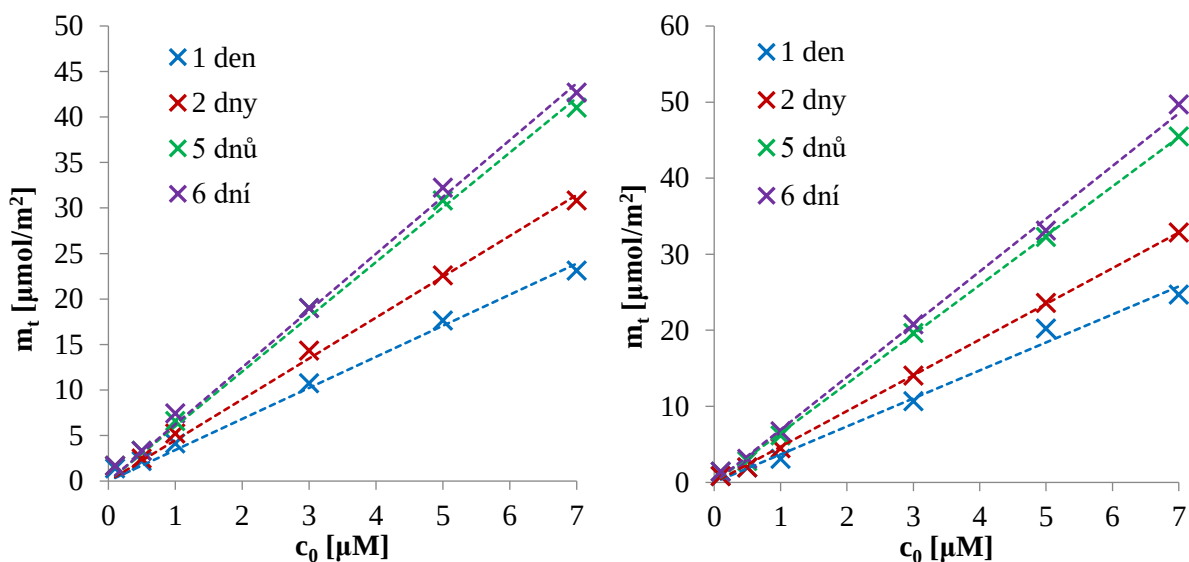


Obr. 42: Přehled změn koncentrací sondy NR v roztoku 200 mM Septonexu pro gely H4. Osa x představuje původní koncentrace sondy v roztoku.



Obr. 43: Přehled změn koncentrací sondy NR v roztoku 100 mM Septonexu pro gely H5. Osa x představuje původní koncentrace sondy v roztoku.

Gely H4 a H5 tvořené nízkomolekulárním hyaluronanem vykazují také mezi 5. a 6. dnem měření zpomalení absorpce a opět to vypadá na ustavení rovnováhy jako u ostatních hyaluronanových gelů. Absorpce sondy u hydrogelů H4 je vyšší oproti gelům H5. Rozdíl v difuzním koeficientu mezi gely H4 a H5 je větší než u H1 a H2. Tento rozdíl může být způsoben odlišnou délkou řetězců vysokomolekulárního a nízkomolekulárního hyaluronanu v souvislosti s teoretickým poměrem náboje mezi tenzidem a polymerem.

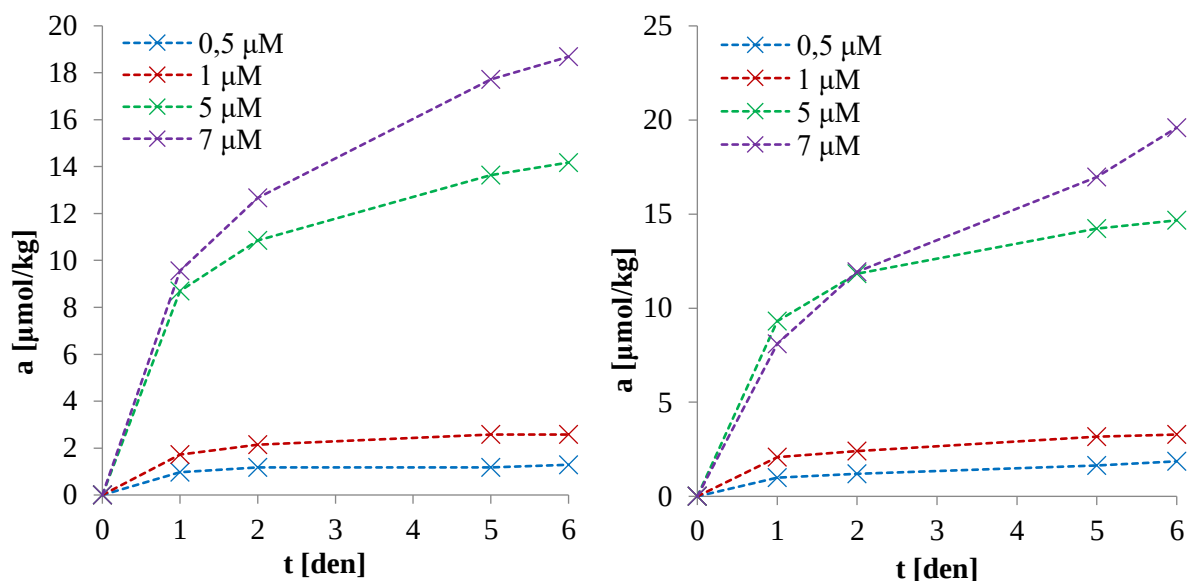


Obr. 44: Závislost difuzního toku na původní koncentraci sondy NR v roztoku tenzidu Septonexu. Graf vlevo ukazuje závislost toku sondy u gelů H4. Vpravo je závislost toku sondy u gelů H5. Vybrané koncentrace: 0,1; 0,5; 1; 3; 5 a 7 μM.

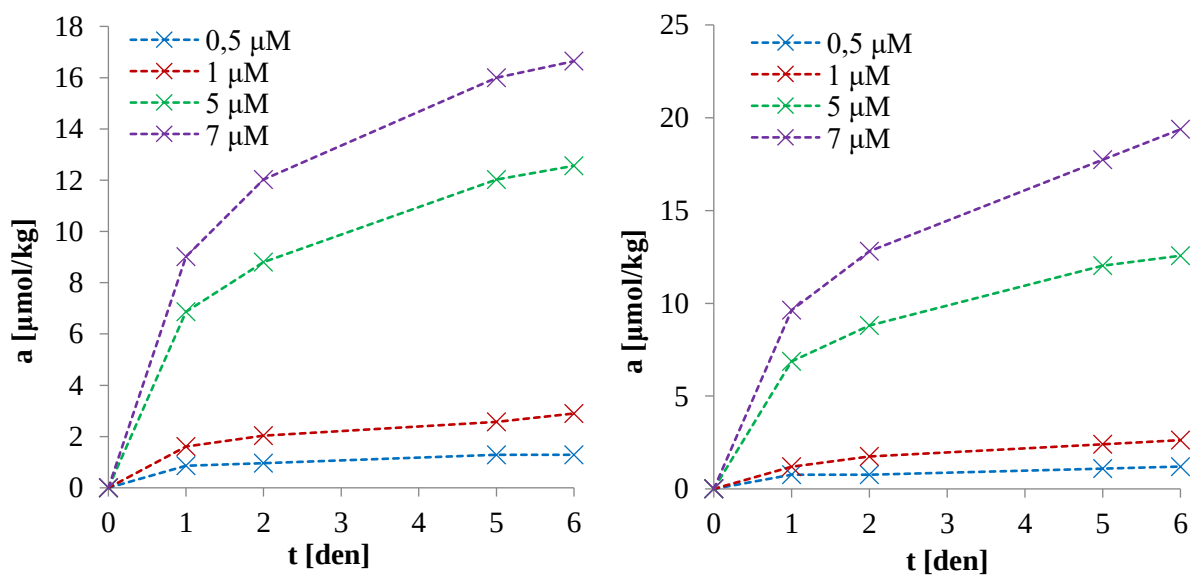
Z Obr. 44 může na první pohled vyplývat, že difuzní toky jsou u gelů H5 vyšší než u gelů H4. Difuzní toky jsou skutečně vyšší než u gelů H4, ale platí to pouze pro 2 nejvyšší koncentrace použité sondy (5 a 7 μM). Difuzní toky ostatních koncentrací jsou pak vyšší u gelů H4. Výsledný difuzní koeficient potom potvrzuje, že rychlost absorpce sondy NR do gelu je vyšší u gelů H4. Největší rozdíl mezi gely H4 a H5 v absorpci barviva je v jednotlivých dnech. H4 absorbuje více sondy během prvních 5 dnů a potom se tok zpomalí. H5 má potom o trochu vyšší difuzní tok po 5. dni, ale jen u vyšších koncentrací sondy.

Tabulka 10: Zjištěné difuzní koeficienty a koeficienty α pro sondu nilská červeň v roztoku tenzidu Septonexu u hyaluronanových gelů H1, H2, H4, H5.

Naměřené difuzní koeficienty NR v Septonexu [m²/s]	
H1	$7,86 \cdot 10^{-10}$
H2	$7,40 \cdot 10^{-10}$
H4	$5,53 \cdot 10^{-10}$
H5	$4,28 \cdot 10^{-10}$
Koeficient α [-]	
H1	0,337
H2	0,321
H4	0,312
H5	0,308



Obr. 45: Srovnání závislosti navázaného množství sondy NR v gelu na čase. Vlevo jsou data pro gely H1, vpravo pro H2. Sonda byla původně v roztoku 200 mM a 100 mM Septonexu.



Obr. 46: Srovnání závislosti navázaného množství sondy NR v gelu na čase. Vlevo jsou data pro gely H4, vpravo pro H5. Sonda byla původně v roztoku 200 mM a 100 mM Septonexu.

Naměřené difuzní koeficienty a koeficienty α pro sondu nilské červeně shrnuje Tabulka 10. Nílská červeně v roztoku tenzidu se chová podobně jako sonda ATTO 488 v roztoku tenzidu. Při srovnání sond ATTO i NR v tenzidech a těch stejných sond v roztoku 0,15 M NaCl, zjistíme, že pokud je sonda v roztoku tenzidu, tak se difuzní koeficienty příliš neliší. Rozdíl u nich tvoří pravděpodobně jen rozdílné teoretické poměry náboje mezi tenzidem a biopolymerem, respektive rozdíl v koncentraci použitého tenzidu pro zesíťování. Vznikající micely v roztoku obsahují přítomné barvivo a vyrovnávají rozdíl v poměrech náboje

a v rozdílně zesíťované struktuře. U sondy pouze v roztoku 0,15 M NaCl se nevyskytují micely a barvivo je volně rozptýlené v roztoku, popřípadě mezi sebou může tvořit agregáty. Oproti micelám jsou tyto molekuly barviva mnohem menší a snáze difundují do struktury hydrogelu. Mohou tedy lépe pronikat póry hydrogelu.

Pokud srovnáme získané difuzní koeficienty NR v Septonexu s jejím difuzním koeficientem ve vodném roztoku, jenž je $3,3 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, zjistíme, že všechny tyto koeficienty jsou vyšší. Ve vodném prostředí difuzi NR popohání koncentrační gradient, kdežto v systémech s hydrogely je tato difuze pravděpodobně popoháněna nejen koncentračním gradientem, ale i interakcemi mezi sondou a gelem a dalšími interakcemi mezi sondou-micelami a gelem-micelami. Všechny tyto interakce urychlují tok sondy do struktury gelu a tím zvyšují celkový difuzní koeficient.

Když se podíváme na zjištěné difuzní koeficienty i koeficienty α pro NR u dextranových hydrogelů (Tabulka 7) a na koeficienty NR u hyaluronanových hydrogelů (Tabulka 10), můžeme vidět, že tyto koeficienty vycházejí opačně. Difuzní koeficienty u hyaluronanových gelů jsou vyšší u více zesíťovaných gelů (H1, H4), čili u gelů, které mají vyšší teoretický poměr náboje mezi tenzidem a polymerem. Naopak dextranové hydrogely mají vyšší difuzní koeficienty u méně zesíťovaných gelů (D2). Stejně tak je tomu i u koeficientů α . Tento rozdíl může být způsoben hlavně rozdílnou strukturou mezi dextranem a hyaluronanem. Strukturu a pórovitost dextranových hydrogelů může ovlivňovat hlavně větvení jeho molekul. Vysokomolekulární hyaluronan tvoří dlouhé řetězce, nízkomolekulární potom kratší, bez bočního větvení. Struktura hydrogelové sítě se mezi těmito biopolymery bude zásadně lišit. Je možné, že když je dextran více rozvětvený, jeho zesíťování nemusí být úplné, ve struktuře mohou zůstat volné, nezesíťované řetězce dextranu a mohou se vytvářet větší póry s menší klikatostí.

5.6. Srovnání s uvolňováním barviva z hydrogelu

V předchozích letech byl prováděn obdobný výzkum transportních vlastností hydrogelových systémů na bázi dextranu a hyaluronanu [74], [75]. Jako sonda byla v těchto systémech použita nilská červeň. Studie zjišťovala difuzní koeficient NR v gelech „opačným“ způsobem, než je tomu v této práci. Hydrogely byly připravovány stejným způsobem jako je popsáno v kapitole 4.3.3. Sonda NR však byla do hydrogelového systému zakomponována hned při gelaci. Konkrétně byla rozpuštěna v zásobním roztoku tenzidu pro přípravu hydrogelu. Po smíchání biopolymeru a tenzidu vznikaly zabarvené gely obsahující sondu. Po usazení gelu na dně vialky byla měřena absorbance supernatantu, který byl po změření odlit. Gel se následně zalil novým roztokem tenzidu bez obsahu barviva nebo roztokem 0,15 M NaCl. Po různých časových intervalech byla měřena absorbance roztoku nad gelem. Z naměřených absorbancí byly následně vypočítány koncentrace sondy v roztoku, ze kterých poté vycházely výsledné difuzní koeficienty. Výsledky těchto studií jsou shrnuty v článku **M. Klučákové a kol.** [76].

Tabulka 11: Srovnání difuzních koeficientů NR zjištěných při difuzi ven z gelu do roztoku a opačně z roztoku do gelu. Hodnoty difuzních koeficientů pro difuze z gelu do roztoku vycházejí ze článku [76].

	Zjištěné difuzní koeficienty NR [m ² /s]		
	Difuze z gelu do roztoku		Difuze do gelu
	Do tenzidu	Do NaCl	Z tenzidu
Hydrogel			
D1	$6,95 \cdot 10^{-11}$	$6,95 \cdot 10^{-11}$	$4,23 \cdot 10^{-10}$
D2	$1,21 \cdot 10^{-11}$	$1,26 \cdot 10^{-11}$	$4,63 \cdot 10^{-10}$
H1	$4,72 \cdot 10^{-11}$	$4,57 \cdot 10^{-11}$	$7,86 \cdot 10^{-10}$
H2	$1,35 \cdot 10^{-11}$	$1,18 \cdot 10^{-11}$	$7,40 \cdot 10^{-10}$
H4	$6,38 \cdot 10^{-11}$	$6,97 \cdot 10^{-11}$	$5,53 \cdot 10^{-10}$
H5	$3,29 \cdot 10^{-11}$	$3,39 \cdot 10^{-11}$	$4,28 \cdot 10^{-10}$

Difuzní koeficienty zjištěné při uvolňování barviva z gelu se pohybují řádově 10^{-11} , kdežto u difuze z roztoku do gelu jsou difuzní koeficienty o řád vyšší, tedy 10^{-10} . Největší rozdíl v difuzních koeficientech budou pravděpodobně způsobovat interakce mezi barvivem a hydrogelem. Pokud vezmeme difuzi barviva do gelu, dochází teprve k započítání interakcí mezi barvivem a gelem. Můžeme říct, že čelo difuzní fronty neustále přichází do čistého gelu a sonda teprve začíná interagovat, proto se bude pohybovat rychleji, než je tomu u uvolňování barviva z gelu. Pokud je barvivo už obsažené ve struktuře gelu, čelo difuzní fronty je prakticky na rozhraní gelu a roztoku a barvivo musí navíc případné vazby s hydrogelem přerušit a následně musí putovat gelem, který už barvivo obsahuje. Největší rozdíl je tedy způsoben tím, jestli barvivo s gelem začíná interagovat nebo už je obsaženo v hydrogelu.

Dalším zajímavým faktem je, že difuzní koeficienty sondy z gelu do roztoku se při změně roztoku od sebe neliší. Koeficienty jsou pro tenzid i roztok NaCl téměř shodné a na prostředí, do kterého sonda difunduje nezáleží. Kdežto u difuze z roztoku do gelu se jednotlivé difuzní koeficienty v závislosti na typu roztoku značně liší. Můžeme uvést konkrétní příklad, a to v rozdílu difuzních koeficientů sondy ATTO 488 v roztoku tenzidu a v 0,15 M roztoku NaCl (Tabulka 8 a Tabulka 9). Pokud difuze probíhá z roztoku NaCl, je mnohem rychlejší, než je tomu u roztoku tenzidu. Micely obsažené v tenzidu zadržují barvivo, které by mohlo difundovat a zpomalují celou rychlost difuze. Míra interakce, či její síla mezi barvivem a gelem převažuje nad vlivem roztoku, do kterého bude difundovat. Nezáleží tedy jestli roztok obsahuje micely, které by mohly sondu aktivně vázat a zrychlovat tak difuzi. Rozdíl mezi různými roztoky nad gelem je tedy eliminován silou interakce mezi barvivem a gelem.

Pokud srovnáme i jednotlivé difuzní koeficienty v závislosti na koncentraci použitého tenzidu pro zesíťování, zjistíme, že při difuzi z gelu do roztoku je difuzní koeficient vždy u více zesíťovaného gelu vyšší (D1, H1, H4). Toto platí i u hyaluronanových hydrogelů při difuzi z roztoku do gelu. U dextranových gelů jsou difuzní koeficienty při difuzi z roztoku do gelu opačné. Sonda NR má u méně zesíťovaného dextranového gelu D2 difuzní koeficient vyšší.

Je velice zajímavé, že zjištěné difuzní koeficienty pro potenciálně méně zesíťované hydrogelové struktury jsou menší než pro hydrogely připravené více koncentrovaným tenzidem. Jedním z předpokladů bylo, že více koncentrovaný roztok tenzidu použitý pro přípravu hydrogelu způsobí více zesíťovanou strukturu, jinými slovy, že „hustota“ zesíťování se zvyšuje se zvyšující se koncentrací tenzidu v zásobním roztoku. Reologické testy hydrogelů na bázi hyaluronanu a Septonexu vykazují zvýšení relaxační doby v závislosti na molekulové hmotnosti hyaluronanu při použití stejné koncentrace tenzidu. Reologické testy dále neodhalily žádnou závislost mezi reologickými vlastnostmi hydrogelů a teoretickým poměrem náboje mezi tenzidem a biopolymerem [77]. Předpokladem je, že stupeň zesíťování se u takto připravených gelů příliš nemění. Pokud jsou náboje na biopolymeru zesíťováním přesně kompenzovány, bude teoretický poměr náboje mezi tenzidem a polymerem roven 1. V našem případě je však tento poměr u gelů D1, H1 a H4 ~ 4 ; u gelů H2, H5 ~ 2 ; a u gelu D2 ~ 1 . Snížení difuzních koeficientů u gelů s nižším poměrem náboje může znamenat, že množství volných micel je také sníženo, tedy méně blokují póry gelu, a tak je větší množství NR navázané v tzv. struktuře „perlového náhrdelníku“ („pearl necklace structure“) s limitovanou mobilitou [76].

Z experimentu uvolňování sondy NR ze struktury gelu do roztoku vyplývá, že difuzní koeficienty jsou ovlivněny mnoha faktory, stejně jako je tomu u difuze z roztoku do gelu. Barvivo (NR) v těchto gelech může být ve formě nanokontejnerů, podobných micelám, které jsou zakomponované ve struktuře „perlového náhrdelníku“ nebo ve formě více mobilních volných micel či jejich agregátů. Difuzní koeficienty NR při difuzi ven ze struktury gelu se zvyšují se zvyšující se molekulovou hmotností polyelektrolytů a zvyšujícím se poměrem náboje mezi surfaktantem a biopolymerem. Nílská červeň u gelů s více koncentrovaným surfaktantem zřejmě difunduje ve formě volných micel a záleží i na velikosti těchto micel v souvislosti s typem surfaktantu. Difuzními experimenty při migraci sondy ven z gelu byla také potvrzena souvislost mezi velikostí micel a zpomalením jejich mobility v hydrogelech. Stejně vlivy se pravděpodobně uplatňují i u difuze z roztoku do gelu, kdy difuzní koeficienty vykazují stejný trend, a to, že u více zesíťovaných gelů jsou vyšší. Jak již bylo zmíněno, jedinou výjimku tvoří dextranové hydrogely jak se sondou ATTO, tak s NR. Možným vysvětlením tohoto výsledku je jiné zesíťování v souvislosti s rozdílnou strukturou dextranu oproti hyaluronanu, kdy dextran tvoří rozvětvené řetězce. Vazby α -(1,2), (1,3) a (1,4), ve kterých se dextran větví, mohou dosahovat až 50 % všech vazeb v molekule. Zatímco molekula hyaluronanu je tvořena jen glykosidickými vazbami β -(1,3) a (1,4) bez větvení a tvoří tedy dlouhé řetězce v závislosti na molekulové hmotnosti. U dextranu může po zesíťování více koncentrovaným tenzidem SDS vzniknout mnohem složitější a komplexnější struktura, do které difunduje sonda pomaleji. Nižší koncentrace tenzidu vytvoří méně kompaktní hydrogelovou strukturu a sonda lépe proniká do struktury.

6. ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývá difuzními charakteristikami vybraných barviv v biopolymerních hydrogelech. Pro studium difuze byla použita barviva nilská červeň a ATTO 488. Nilská červeň byla vybrána jako zástupce hydrofobních barviv a ATTO 488 pro hydrofilní vlastnosti. Biopolymerní hydrogely, ve kterých difuze probíhala, byly na bázi kationtového polyelektrolytu – DEAE-dextranu a aniontového tenzidu SDS a na bázi aniontového polyelektrolytu – hyaluronanu a kationtového tenzidu Septonex. Pro přípravu hyaluronanových hydrogelů byl používán dva typy hyaluronanu – nízkomolekulární (gely s označením H4, H5) a vysokomolekulární (H1, H2). Podrobné složení hydrogelů popisuje Tabulka 5. Zásobní roztoky biopolymerů i tenzidů byly připravovány v prostředí 0,15 M roztoku NaCl rozpuštěného v deionizované vodě. Gely byly připravovány smícháním roztoku polymeru a tenzidu vždy objemově 1:1. Vzniklý gel byl při laboratorní teplotě ponechán k ustálení a usazení na dně vialky. Přebytný supernatant byl po usazení odlit a místo něj bylo přidáno 5 ml roztoku obsahujícího sondu NR nebo ATTO 488 v určité koncentraci. Následně byla po různých časových intervalech měřena absorbance roztoku pomocí UV-VIS spektrofotometru. Z naměřených hodnot absorbance byly poté vypočítány koncentrace barviva v roztoku, difuzní toky, difuzní koeficienty a koeficienty α .

Pro větší variabilitu byla mobilita sond pozorována ve více různých prostředích. Difuze sond byla zkoumána v prostředí 0,15 M roztoku NaCl a v prostředí tenzidů o různých koncentracích. U hyaluronanových hydrogelů byly sondy v roztocích tenzidu Septonexu o koncentraci 200 mM (gely s označením H1, H4) a 100 mM (H2, H5). U dextranových hydrogelů byly sondy ve 400 mM a 100 mM roztoku tenzidu SDS. Nilská červeň nemohla být zkoumána pouze v 0,15 M roztoku NaCl pro její nerozpustnost v tomto prostředí.

Difuzní koeficienty u dextranových hydrogelů se sondou NR i ATTO 488 získané těmito experimenty vycházejí vyšší u méně zesíťovaných gelů. Méně zesíťované gely D2 byly připraveny smísením dextranového zásobního roztoku a tenzidu SDS o koncentraci 100 mM. Jednou z teorií je, že čím více koncentrovaný tenzid se použije při přípravě gelu, tím více zesíťovaný hydrogel vznikne. Více zesíťovaný hydrogel bude následně klást větší odpor proti pohybu barviva při difuzi a bude snižovat difuzní koeficient. Tato teorie se však potvrdila pouze u dextranových hydrogelů, kde byly difuzní koeficienty vždy u více zesíťovaných gelů D1 nižší (Tabulka 6, Tabulka 7). Dextranové gely v závislosti na vyšší koncentraci použitého tenzidu tvoří pravděpodobně více rigidní a složitější strukturu, do které prostupuje barvivo složitěji. Pokud se zaměříme na rozdíl v mobilitě NR a ATTO 488, pak má NR u dextranových hydrogelů vyšší difuzní koeficienty, což je zajímavé vzhledem k tomu, že NR je na rozdíl od ATTO 488 hydrofobní. U dextranových gelů je zajímavý i výsledek koeficientů α , který určuje poměr mezi počáteční koncentrací sondy a její koncentrací na rozhraní gelu a roztoku (ze strany gelu). Čím vyšší je tento koeficient, tím více sondy zůstává na rozhraní gelu a roztoku. Barvivo zachycené na rozhraní dále difunduje do gelu a jeho úbytek je kompenzován dalším barvivem z roztoku. Koncentrace barviva na rozhraní by měla být konstantní. Koeficienty α se mezi gely D1 a D2 velmi lišily. Méně zesíťované gely D2 dosahovaly daleko vyšších výsledků těchto koeficientů, což může také potvrzovat teorii o rozdílné struktuře gelu po použití různě koncentrovaného tenzidu.

Teorie, ze které se vycházelo u dextranových hydrogelů se nepodařila potvrdit u gelů hyaluronanových. Zjištěné difuzní koeficienty vycházejí zcela opačně, než je tomu u dextranových hydrogelů. Difuzní koeficienty u hyaluronanových gelů jsou opačné než u dextranových gelů pro obě sondy i pro jejich různá prostředí. Vyšší difuzní koeficienty tedy mají více zesíťované hydrogely H1 a H4, zesíťované 200 mM roztokem tenzidu Septonexu. U těchto systémů není úplně jistý mechanismus difuze sondy do gelu, jelikož difuzní koeficient je nepřímo úměrný viskozitě prostředí a více zesíťované gely by měly mít vyšší viskozitu. Pravděpodobnou teorií je, že u hyaluronanových gelů se difuze barviva aktivně účastní použitý tenzid při zesíťování polymeru. S jiným stupněm zesíťování úzce souvisí teoretický poměr náboje mezi tenzidem a biopolymerem. Gely H1 a H4 mají tento poměr ~ 4 , kdežto gely H2 a H5 mají ~ 2 . Čím vyšší je tento poměr, tím víc tenzidu zůstane po zesíťování v supernatantu a v pórech gelu „mimo síť“. A jelikož se koncentrace zásobních roztoků tenzidů pohybují vysoko nad kritickou micelární koncentrací, budou tyto tenzidy ve formě micel. Tyto volné micely v pórech pak mohou pravděpodobně barvivo z roztoku vtahovat a difuzi barviva tím urychlovat. Pokud naměřené difuzní koeficienty sond v gelech srovnáme s jejich difuzními koeficienty ve vodném roztoku, pak koeficienty v gelech mají vyšší hodnoty čili difuze barviva v gelech probíhá rychleji než ve vodném prostředí. Vyšší difuzní koeficienty barviva v gelech mohou tedy podporovat teorii o tom, že volné micely v pórech gelu difuzi urychlují. Tuto teorii nejlépe potvrzují zjištěné difuzní koeficienty hyaluronanových hydrogelů pro sondu ATTO 488 v 0,15 M roztoku NaCl (Tabulka 8). Tyto koeficienty ukazují, že difuze sondy ATTO probíhá nejrychleji v roztoku NaCl. V tomto roztoku se sonda vyskytuje ve volné, rozpuštěné formě v samostatných molekulách a může volně difundovat do gelu. U těchto difuzních koeficientů je i největší rozdíl mezi odlišně zesíťovanými hydrogely. Koeficienty gelů H1 a H4 jsou mnohem vyšší než u H2 a H5, což je opět pravděpodobně způsobeno větším výskytem volných micel ve struktuře gelu.

Menší rozdíl mezi jednotlivými difuzními koeficienty je potom u systémů, kdy bylo barvivo v roztoku tenzidu. Jak již bylo zmíněno, veškeré roztoky tenzidů se pohybují vysoko nad kritickou micelární koncentrací, tyto roztoky budou obsahovat tenzid ve formě micel. V těchto micelách pak může být obsažené barvivo. V tomto případě, kdy je barvivo již v micelách obsaženo, není úplně zřejmý mechanismus difuze či interakce barviva s gelem nebo micelami. Je možné, že do struktury gelu jsou vtahovány celé micely, které s gelem interagují. Barvivo v roztocích tenzidu nemusí být jen obsažené v micelách, ale může se vyskytovat i ve volné formě, která je opět aktivně vtahována do struktury hydrogelu, a tak jsou difuzní koeficienty stále vyšší než ve vodném prostředí. Menší rozdíl difuzních koeficientů v rozdílně zesíťovaných gelech může být způsoben právě vyskytujícími se micelami. Tyto micely mohou částečně vyrovnávat rozdílné koncentrace použitého tenzidu při zesíťování a tím i teoretické poměry nábojů mezi tenzidem a biopolymerem, proto se difuzní koeficienty od sebe neliší tak jak je tomu u sondy v roztoku NaCl. Difuzní koeficienty sondy v tenzidu jsou i celkově nižší než sondy v roztoku NaCl. Nižší difuzní koeficient sondy v tenzidu oproti sondě v roztoku NaCl může být způsoben obsahem prázdných micel v pórech gelu, které brání vázání či vnikání dalších micel s obsahem sondy do struktury hydrogelu. Pórovitá struktura hydrogelu je tedy částečně obsazená prázdnými micelami, které brání vnikání dalších micel.

Koeficienty α u hyaluronových hydrogelů částečně korespondují se zjištěnými difuzními koeficienty. Zjištěné koeficienty α ukazují opět na souvislost s koncentrací tenzidu použitého pro zesíťování polymeru. U hydrogelů s použitím koncentrovanějšího tenzidu pro zesíťování biopolymeru jsou vyšší nejen difuzní koeficienty ale i koeficienty α . Nejméně se mezi sebou liší koeficienty u hyaluronových gelů s nilskou červení v roztoku tenzidu (Tabulka 10). Tento menší rozdíl může souviset s vyšší mobilitou NR v hyaluronanových gelech, kterou potvrzují i její výsledné difuzní koeficienty. Vlivem vyšší mobility barvivo difunduje do gelu rychleji a na rozhraní gelu a roztoku se ho příliš nezakonzentruje. Jinými slovy se barvivo pravděpodobně z rozhraní dostává do gelu rychleji než z roztoku do gelu. Koeficienty α budou pravděpodobně ovlivněny nejen stupněm zesíťování a teoretickým poměrem náboje, ale hlavně strukturou biopolymeru, ze kterého je hydrogel připraven.

Studiem difuzních vlastností vybraných barviv v biopolymerních hydrogelech bylo tedy zjištěno, že difuzní koeficienty ovlivňuje hned několik faktorů. Nejvíce difuzní koeficienty ovlivňují počáteční koncentrace použitých tenzidů pro zesíťování hydrogelu a s tím související teoretické poměry nábojů mezi tenzidem a biopolymerem. Dalším možným ovlivňujícím faktorem je samotná struktura biopolymeru, kdy záleží na jeho větvení, které ovlivňuje výslednou pórovitost a křakatost hydrogelu. Difuzi ovlivňuje i forma roztoku a výskyt případných micel v roztocích tenzidů.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KOLTZENBURG, Sebastian, Michael MASKOS a Oskar NUYKEN. Polymer chemistry. Berlin: Springer, [2017]. ISBN 978-3-662-49277-2.
- [2] NIAOUNAKIS, Michael. *Biopolymers: Applications and Trends*. Oxford: Elsevier, 2015. ISBN 978-0-323-35399-1.
- [3] REBELO, Rita, Margarida FERNANDES a Raul FANGUEIRO. Biopolymers in Medical Implants: A Brief Review. *Procedia Engineering*. 2017, 200, 236-243. DOI: 10.1016/j.proeng.2017.07.034. ISSN 18777058. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877705817328679>
- [4] JACOB, Joby, Józef T. HAPONIUK, Sabu THOMAS a Sreeraj GOPI. Biopolymer based nanomaterials in drug delivery systems: A review. *Materials Today Chemistry*. 2018, 9, 43-55. DOI: 10.1016/j.mtchem.2018.05.002. ISSN 24685194. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468519418300880>
- [5] SHISHIR, Mohammad Rezaul Islam, Lianghua XIE, Chongde SUN, Xiaodong ZHENG a Wei CHEN. *Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters*. 2018, **78**, 34-60. DOI: 10.1016/j.tifs.2018.05.018. ISSN 09242244. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092422441730777X>
- [6] LIU, Zonghua, Yanpeng JIAO, Yifei WANG, Changren ZHOU a Ziyong ZHANG. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008, **60**(15), 1650-1662. DOI: 10.1016/j.addr.2008.09.001. ISSN 0169409X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X08002287>
- [7] CASTRO-AGUIRRE, E., F. IÑIGUEZ-FRANCO, H. SAMSUDIN, X. FANG a R. AURAS. Poly(lactic acid)—Mass production, processing, industrial applications, and end of life. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, **107**, 333-366. DOI: 10.1016/j.addr.2016.03.010. ISSN 0169409X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X16300965>
- [8] FARAH, Shady, Daniel G. ANDERSON a Robert LANGER. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, **107**, 367-392. DOI: 10.1016/j.addr.2016.06.012. ISSN 0169409X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X16302058>
- [9] PAL, Kunal, Allan T. PAULSON a Dérick ROUSSEAU. Biopolymers in Controlled-Release Delivery Systems. *Modern biopolymer science: bridging the divide between fundamental treatise and industrial application*. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2009, s. 519-557. ISBN 9780123741950.
- [10] KUMAR, Sathish Sundar Dhilip, Naresh Kumar RAJENDRAN, Nicolette Nadene HOURELD a Heidi ABRAHAMSE. Recent advances on silver nanoparticle and biopolymer-based biomaterials for wound healing applications. *International Journal of*

- Biological Macromolecules*. 2018, **115**, 165-175. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.04.003. ISSN 01418130. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014181301830518X>
- [11] MUXIKA, A., A. ETXABIDE, J. URANGA, P. GUERRERO a K. DE LA CABA. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017, **105**. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087. ISSN 01418130. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017317579>
- [12] ALI, Akbar a Shakeel AHMED. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, 109, 273-286. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.078. ISSN 01418130. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017338928>
- [13] THARANATHAN, Rudrapatnam N. a Farooqahmed S. KITTUR. Chitin — The Undisputed Biomolecule of Great Potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2003, **43**(1), 61-87. DOI: 10.1080/10408690390826455. ISSN 1040-8398. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408690390826455>
- [14] CAZÓN, Patricia, Gonzalo VELAZQUEZ, José A. RAMÍREZ a Manuel VÁZQUEZ. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. *Food Hydrocolloids*. 2017, 68, 136-148. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2016.09.009. ISSN 0268005X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X16304155>
- [15] JIMÉNEZ, Alberto, María José FABRA, Pau TALENS a Amparo CHIRALT. Edible and Biodegradable Starch Films: A Review. *Food and Bioprocess Technology*. 2012, 5(6), 2058-2076. DOI: 10.1007/s11947-012-0835-4. ISSN 1935-5130. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11947-012-0835-4>
- [16] MASINA, Nonhlanhla, Yahya E. CHOONARA, Pradeep KUMAR, Lisa C. DU TOIT, Mershen GOVENDER, Sunaina INDERMUN a Viness PILLAY. A review of the chemical modification techniques of starch. *Carbohydrate Polymers*. 2017, 157, 1226-1236. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.09.094. ISSN 01448617. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861716311237>
- [17] YANG, Jie, Fang LI, Man LI, Shuangling ZHANG, Jing LIU, Caifeng LIANG, Qingjie SUN a Liu XIONG. Fabrication and characterization of hollow starch nanoparticles by gelation process for drug delivery application. *Carbohydrate Polymers*. 2017, 173, 223-232. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.06.006. ISSN 01448617. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861717306331>
- [18] THEOCHARIS, Achilleas D., Spyros S. SKANDALIS, Chrysostomi GIALELI a Nikos K. KARAMANOS. Extracellular matrix structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, 97, 4-27. DOI: 10.1016/j.addr.2015.11.001. ISSN 0169409X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X15002574>

- [19] Collagen structure infographics vector image. In: VectorStock [online]. VectorStock Media, 2020 [cit. 2020-04-16]. Dostupné z: <https://www.vectorstock.com/royalty-free-vector/collagen-structure-infographics-vector-23021005>
- [20] LEE, Chi H., Anuj SINGLA a Yugyung LEE. Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001, 221(1-2), 1-22. DOI: 10.1016/S0378-5173(01)00691-3. ISSN 03785173. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517301006913>
- [21] GÓMEZ-ESTACA, J., M.P. BALAGUER, G. LÓPEZ-CARBALLO, R. GAVARA a P. HERNÁNDEZ-MUÑOZ. Improving antioxidant and antimicrobial properties of curcumin by means of encapsulation in gelatin through electrohydrodynamic atomization. *Food Hydrocolloids*. 2017, 70, 313-320. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2017.04.019. ISSN 0268005X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X16309845>
- [22] STEINBUCHER, Alexander a Timothy D. LEATHERS. *Biopolymers: General Aspects and Special Applications*. Wiley-Blackwell, 2003, 10. ISBN 978-3-527-30229-1.
- [23] NEVES, Nuno M. a Rui L. REIS. *Biomaterials from nature for advanced devices and therapies*. Hoboken, New Jersey: John Wiley, 2016. ISBN 978-111-9178-071.
- [24] LI, Ruo-han, Tao ZENG, Min WU, Hong-bin ZHANG a Xue-qin HU. Effects of esterification on the structural, physicochemical, and flocculation properties of dextran. *Carbohydrate Polymers*. 2017, 174, 1129-1137. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.07.034. ISSN 01448617. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861717308007>
- [25] DE BELDER, Anthony N. *Dextran*. Amersham Biosciences, 2003. ISBN 18-1166-12. Dostupné také z: <https://epdf.pub/dextran.html>
- [26] PHILLIPS, Glyn O. a P. A. WILLIAMS. *Handbook of Hydrocolloids* (2nd Edition). 2nd ed. S.l.: Woodhead Pub, 2009. ISBN 978-184-5694-142.
- [27] NAESSENS, Myriam, An CERDOBBEL, Wim SOETAERT a Erick J VANDAMME. Leuconostoc dextranase and dextran: production, properties and applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2005, 80(8), 845-860. DOI: 10.1002/jctb.1322. ISSN 0268-2575. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.1322>
- [28] DEAE-Dextran. *PHARMACOSMOS* [online]. [cit. 2020-04-03]. Dostupné z: <https://www.dextran.com/about-dextran/dextran-chemistry/deae-dextran>
- [29] RUSSO, Vincenzo, Elisa LIBERATI a Nicola CAZZOLLA. *Glycogen-based cationic polymers*. WO 2013/135471 A1. Uděleno 19. 9. 2013.
- [30] HASCALL, Vincent C., Torvard C. LAURENT a . Hyaluronan Structure and Physical Properties. *Glycoforum* [online]. [cit. 2018-04-13]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>

- [31] KHABAROV, V. N., P. Ya. BOYKOV a M. A. SELYANIN. *Hyaluronic acid: preparation, properties, application in biology and medicine*. Chichester, West Sussex, 2015. ISBN 978-1-118-63379-3.
- [32] NECAS, J., L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER a J. KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinární Medicína*. 2008, 53(8), 397-411. DOI: 10.17221/1930-VETMED. ISSN 03758427.
- [33] SCHANTÉ, Carole E., Guy ZUBER, Corinne HERLIN a Thierry F. VANDAMME. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*. 2011, 85(3), 469-489. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.03.019. ISSN 01448617. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861711002001>
- [34] Structure of Hyaluronan. TRB Chemedica UK [online]. Newcastle under Lyme: TRB Chemedica (UK), 2016 [cit. 2020-04-20]. Dostupné z: <https://vismed.trbchemedica.co.uk/business-professionals/role-and-purpose-of-hyaluronan/structure-of-hyaluronan>
- [35] Function of Hyaluronan. Vismed.trbchemedica [online]. [cit. 2020-02-24]. Dostupné z: <http://vismed.trbchemedica.co.uk/business-professionals/role-and-purpose-of-hyaluronan/function-of-hyaluronan>.
- [36] BOERIU, Carmen G., Jan SPRINGER, Floor K. KOOY, Lambertus A. M. VAN DEN BROEK a Gerrit EGGINK. Production Methods for Hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*. 2013, 2013, 1-14. DOI: 10.1155/2013/624967. ISSN 1687-9341. Dostupné také z: <https://www.hindawi.com/archive/2013/624967/>.
- [37] SCHIRALDI, Chiara, Annalisa LA a Mario DE. Biotechnological Production and Application of Hyaluronan. *Biopolymers*. Sciyo, 2010, 2010-09-28. DOI: 10.5772/10271. ISBN 978-953-307-109-1. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/biopolymers/biotechnological-production-characterization-and-application-of-hyaluronan>
- [38] KOGAN, Grigorij, Ladislav ŠOLTÉS, Robert STERN a Peter GEMEINER. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*. 2006, 29(1), 17-25. DOI: 10.1007/s10529-006-9219-z. ISSN 0141-5492. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-006-9219-z>
- [39] KOPEČEK, Jindřich. Hydrogel biomaterials: A smart future? *Biomaterials*. 2007, 28(34), 5185-5192. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.044. ISSN 01429612. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961207005819>
- [40] DELIGKARIS, Kosmas, Tadele Shiferaw TADELE, Wouter OLTTHUIS a Albert VAN DEN BERG. Hydrogel-based devices for biomedical applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2010, 147(2), 765-774. DOI: 10.1016/j.snb.2010.03.083. ISSN 09254005. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400510003096>

- [41] HAMIDI, Mehrdad, Amir AZADI a Pedram RAFIEI. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008, 60(15), 1638-1649. DOI: 10.1016/j.addr.2008.08.002. ISSN 0169409X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X08002275>
- [42] HOARE, Todd R. a Daniel S. KOHANE. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*. 2008, 49(8), 1993-2007. DOI: 10.1016/j.polymer.2008.01.027. ISSN 00323861. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386108000487>
- [43] RIZWAN, Muhammad, Rosiyah YAHYA, Aziz HASSAN, Muhammad YAR, Ahmad AZZAHARI, Vidhya SELVANATHAN, Faridah SONSUDIN a Cheyma ABOULOULA. PH Sensitive Hydrogels in Drug Delivery: Brief History, Properties, Swelling, and Release Mechanism, Material Selection and Applications. *Polymers*. 2017, 9(12). DOI: 10.3390/polym9040137. ISSN 2073-4360. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2073-4360/9/4/137>
- [44] ULLAH, Faheem, Muhammad Bisyrul Hafi OTHMAN, Fatima JAVED, Zulkifli AHMAD a Hazizan Md. AKIL. Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C*. 2015, 57, 414-433. DOI: 10.1016/j.msec.2015.07.053. ISSN 09284931. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493115302393>
- [45] MODARESIFAR, Khashayar a Howard I. MAIBACH. Plant-Based Hydrogels: Applications in Cosmetics. *Cosmetics & Toiletries* [online]. Allured Business Media, 2018, 133(1), 30-33 [cit. 2020-04-11]. ISSN 0361-4387. Dostupné z: <http://www.cosmeticsandtoiletries.com/research/chemistry/Plant-Based-Hydrogels-Applications-in-Cosmetics-468336043.html>
- [46] Povrchově aktivní látky. *Informační systém Masarykovy Univerzity* [online]. [cit. 2020-04-16]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1411/podzim2014/BLKLC011p/um/Povrchove_aktivni_latky.pdf
- [47] SHARMA, Gaurav, Mu. NAUSHAD, Bharti THAKUR, et al. Sodium Dodecyl Sulphate-Supported Nanocomposite as Drug Carrier System for Controlled Delivery of Ondansetron. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2018, 15(3). DOI: 10.3390/ijerph15030414. ISSN 1660-4601. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1660-4601/15/3/414>
- [48] Sodium Dodecyl Sulfate. *Polysciences* [online]. Warrington: Polysciences, 2020 [cit. 2020-04-22]. Dostupné z: <https://www.polysciences.com/chinese/sodium-dodecyl-sulfate-sds-anionic-surfactant>
- [49] OREMUSOVÁ, Jarmila, Zuzana VITKOVÁ a Petra HERDOVÁ. Influence of Alcohols on Micellar and Release Balances of Cationic Surfactant – Carbethopendecinium Bromide (Septonex). *Tenside Surfactants Detergents*. 2014, 51(4), 339-347. DOI:

- 10.3139/113.110316. ISSN 0932-3414. Dostupné také z: <http://www.hanser-elibrary.com/doi/abs/10.3139/113.110316>
- [50] NOVÁK, Josef. Fyzikální chemie: bakalářský a magisterský kurz [online]. <http://old.vscht.cz/fch/cz/pomucky/FCH4Mgr.view.pdf> [cit. 2020-03-12].
- [51] MALIJEVSKÝ, Anatol. *Breviář z fyzikální chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2000. ISBN 80-708-0403-3.
- [52] SANTOVENA, A., A. DELGADO, C. MONZÓN, C. EVORA, M. LLABRÉS a J. B. FARINA. Development of a standard method for in vitro evaluation of Triamcinolone and BMP-2 diffusion mechanism from thermosensitive and biocompatible composite hyaluronic acid-pluronic hydrogels. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2017 [cit. 2020-04-15]. ISSN 1773-2247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.04.022>
- [53] KLUČÁKOVÁ, Martina a Miloslav PEKAŘ. Physical and chemical kinetics in humic dispersions. GHABBOUR, Elham A. a Geoffrey DAVIES. *Humic substances: molecular details and applications in land and water conservation*. New York: Taylor and Francis, 2005, s. 167-188. ISBN 15-916-9031-5.
- [54] LIU, He, Chenyu WANG, Chen LI, Yanguo QIN, Zhonghan WANG, Fan YANG, Zuhao LI a Jincheng WANG. A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing. *RSC Advances*. 2018, 8(14), 7533-7549. DOI: 10.1039/C7RA13510F. ISSN 2046-2069. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C7RA13510F>
- [55] ZHANG, Sufeng, Joerg ERMANN, Marc D. SUCCI, et al. An inflammation-targeting hydrogel for local drug delivery in inflammatory bowel disease. *Science Translational Medicine*. 2015, 7(300), 300ra128-300ra128. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa5657. ISSN 1946-6234. Dostupné také z: <https://stm.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/scitranslmed.aaa5657>
- [56] JAVANBAKHT, Siamak a Hassan NAMAZI. Doxorubicin loaded carboxymethyl cellulose/graphene quantum dot nanocomposite hydrogel films as a potential anticancer drug delivery system. *Materials Science and Engineering: C*. 2018, 87, 50-59. DOI: 10.1016/j.msec.2018.02.010. ISSN 09284931. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493117332666>
- [57] ZHANG, Wei, Xin JIN, Heng LI, Run-run ZHANG a Cheng-wei WU. Injectable and body temperature sensitive hydrogels based on chitosan and hyaluronic acid for pH sensitive drug release. *Carbohydrate Polymers*. 2018, 186, 82-90. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.01.008. ISSN 01448617. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861718300080>
- [58] KONG, Bong Ju, Ayoung KIM a Soo Nam PARK. Properties and in vitro drug release of hyaluronic acid-hydroxyethyl cellulose hydrogels for transdermal delivery of isoliquiritigenin. *Carbohydrate Polymers*. 2016, 147, 473-481. DOI:

- 10.1016/j.carbpol.2016.04.021. ISSN 01448617. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861716303824>
- [59] NIU, Xiaoyun, Zhiling ZHANG a Yinghui ZHONG. Hydrogel loaded with self-assembled dextran sulfate-doxorubicin complexes as a delivery system for chemotherapy. *Materials Science and Engineering: C*. 2017, 77, 888-894. DOI: 10.1016/j.msec.2017.04.013. ISSN 09284931. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493117307828>
- [60] NABILA, Laroui, Maëva COSTE, Laure LICHON, et al. Combination of photodynamic therapy and gene silencing achieved through the hierarchical self-assembly of porphyrin-siRNA complexes. *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier B.V., 2019, (569). DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118585. ISSN 1873-3476. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517319306301?via%3Dihub>
- [61] ZHANG, Xuzhu, Andrzej PONIEWIERSKI a Aldona JELIŃSKA. Determination of equilibrium and rate constants for complex formation by fluorescence correlation spectroscopy supplemented by dynamic light scattering and Taylor dispersion analysis. *The Royal Society of Chemistry. Soft Matter*, 2016, (12), 8186-8194. DOI: 10.1039/c6sm01791f.
- [62] WÄGELE, Jana, Silvia DE SIO, Bruno VOIGT, Jochen BALBACH a Maria OTT. How Fluorescent Tags Modify Oligomer Size Distributions of the Alzheimer Peptide. *Biophysical Journal*. 2019, 116(2), 227-238. DOI: 10.1016/j.bpj.2018.12.010. ISSN 00063495. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349518345053>
- [63] TOPF, Andrea, Peter FRANZ a Georgios TSIAVALIARIS. MicroScale Thermophoresis (MST) for studying actin polymerization kinetics. *BioTechniques*. 2017, 63(4). DOI: 10.2144/000114599. ISSN 1940-9818. Dostupné také z: <https://www.future-science.com/doi/10.2144/000114599>
- [64] DELMAR, Keren a Havazelet BIANCO-PELED. Composite chitosan hydrogels for extended release of hydrophobic drugs. *Carbohydrate Polymers*. 2016, 136, 570-580. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.09.072. ISSN 01448617. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861715009376>
- [65] KASHYAP, Smita, Nitesh SINGH, Bapurao SURNAR a Manickam JAYAKANNAN. Enzyme and Thermal Dual Responsive Amphiphilic Polymer Core-Shell Nanoparticle for Doxorubicin Delivery to Cancer Cells. *Biomacromolecules*. 2015, 17(1), 384-398. DOI: 10.1021/acs.biomac.5b01545. ISSN 1525-7797. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.biomac.5b01545>
- [66] ZHANG, Zhaoliang, Zhifen HE, Renlong LIANG, et al. Fabrication of a Micellar Supramolecular Hydrogel for Ocular Drug Delivery. *Biomacromolecules*. 2016, 17(3), 798-807. DOI: 10.1021/acs.biomac.5b01526. ISSN 1525-7797. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.biomac.5b01526>

- [67] LIU, Yong, Henk J. BUSSCHER, Bingran ZHAO, Yuanfeng LI, Zhenkun ZHANG, Henny C. VAN DER MEI, Yijin REN a Linqi SHI. Surface-Adaptive, Antimicrobially Loaded, Micellar Nanocarriers with Enhanced Penetration and Killing Efficiency in Staphylococcal Biofilms. *ACS Nano*. 2016, 10(4), 4779-4789. DOI: 10.1021/acsnano.6b01370. ISSN 1936-0851. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.6b01370>
- [68] ZHANG, Li-Xiang, Xiao-Hong CAO, Wei-Peng CAI a Yao-Qun LI. Observations of the Effect of Confined Space on Fluorescence and Diffusion Properties of Molecules in Single Conical Nanopore Channels. *Journal of Fluorescence*. 2011, 21(5), 1865-1870. DOI: 10.1007/s10895-011-0881-8. ISSN 1053-0509. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10895-011-0881-8>
- [69] E., Dutkiewicz a Jakubowska A. Effect of electrolytes on the physicochemical behaviour of sodium dodecyl sulphate micelles. 2002, 280(11), 1009-1014. DOI: 10.1007/s00396-002-0723-y. ISSN 0303-402X. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00396-002-0723-y>
- [70] SHAH, S.S, N.U JAMROZ a Q.M SHARIF. Micellization parameters and electrostatic interactions in micellar solution of sodium dodecyl sulfate (SDS) at different temperatures. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2001, 178(1-3), 199-206. DOI: 10.1016/S0927-7757(00)00697-X. ISSN 09277757. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092777570000697X>
- [71] KARGEROVÁ, A. a M. PEKAŘ. Ultrasonic study of hyaluronan interactions with Septonex—A pharmaceutical cationic surfactant. *Carbohydrate Polymers*. 2019, 204, 17-23. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.09.077. ISSN 01448617. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861718311457>
- [72] FISCHER, J. a P. JANDERA. Chromatographic behaviour in reversed-phase high-performance liquid chromatography with micellar and submicellar mobile phases: effects of the organic modifier. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1996, 681(1), 3-19. DOI: 10.1016/0378-4347(95)00538-2. ISSN 03784347. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0378434795005382>
- [73] KOPECKÝ, F. a M. VOJTEKOVÁ. Micellization of [1-(ethoxycarbonyl)pentadecyl] trimethylammonium bromide studied by conductometry and potentiometry, *Chem. Pap.* 47 (1993) 55-59.
- [74] VYROUBAL, David. Transportní vlastnosti hydrogelových systémů na bázi dextranu. Brno, 2018. Bakalářská práce. Vysoké učení technické, Fakulta chemická. Vedoucí práce Martina Klučáková.
- [75] KÁČERÍKOVÁ, Martina. Transportní vlastnosti hydrogelových systémů na bázi hyaluronanu. Brno, 2018. Bakalářská práce. Vysoké učení technické, Fakulta chemická. Vedoucí práce Martina Klučáková.

- [76] KLUČÁKOVÁ, Martina, Sabina JARÁBKOVÁ, Tomáš VELCER, Michal KALINA a Miloslav PEKAŘ. Transport of a model diffusion probe in polyelectrolyte-surfactant hydrogels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2019, 573, 73-79. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2019.04.042. ISSN 09277757. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775719301700>
- [77] VENEROVÁ, Tereza a Miloslav PEKAŘ. Rheological properties of gels formed by physical interactions between hyaluronan and cationic surfactants. *Carbohydrate Polymers*. 2017, 170, 176-181. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.04.087. ISSN 01448617. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861717304836>

8. SEZNAM ZKRATEK A POUŽITÝCH SYMBOLŮ

8.1. Seznam zkratek

PLA	poly(lactic acid), polymléčná kyselina
ROP	ring opening polymerization, polymerace za otevření kruhu
PGA	polyglycolic acid, kyselina polyglykolová
DEAE	diethylaminoethyl
HA	hyaluronic acid, kyselina hyaluronová
PEG	polyethylenglykol
PVP	polyvinylpyrrolidon
HEC	hydroxyethylcelulóza
NR	nile red, nilská červeň
SDS	dodecylsírán sodný
LMW	low molecular weight, nízkomolekulární
HMW	high molecular weight, vysokomolekulární
D1	označení dextranových hydrogelů zesítovaných 400 mM SDS
D2	označení dextranových hydrogelů zesítovaných 100 mM SDS
H1	HMW hyaluronanové hydrogely zesítované 200 mM Septonexem
H2	HMW hyaluronanové hydrogely zesítované 100 mM Septonexem
H4	LMW hyaluronanové hydrogely zesítované 200 mM Septonexem
H5	LMW hyaluronanové hydrogely zesítované 100 mM Septonexem

8.2. Seznam použitých symbolů

n	polymerační stupeň
M_w	molekulová hmotnost
Da	dalton, atomová hmotní jednotka, 1 Da je $1,66 \cdot 10^{-27}$ kg
m	difuzní tok, vychází z rovnice (4)
D_g	difuzní koeficient sondy v gelu
α	koeficient α , viz. str. 42, rovnice (6)
$\sqrt{t}$	odmocnina času
c	koncentrace