



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

VLIV MOLEKULOVÉ HMOTNOSTI POLYMERŮ NA FÁZOVĚ SEPAROVANÉ HYDROGELY

INFLUENCE OF MOLECULAR WEIGHT OF POLYMERS ON PHASE-SEPARATED HYDROGELS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Nikola Kolomá

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1385/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Nikola Kolomá**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Vliv molekulové hmotnosti polymerů na fázově separované hydrogely

Zadání bakalářské práce:

- 1) Literární rešerše na téma formování gelů fyzikální interakcí tenzidů a opačně nabitých polymerů, s přihlédnutím ke kombinaci polymerů s různou molekulovou hmotností.
- 2) Na základě rešerše navrhnout kombinace molekulových hmotností hyaluronanu vhodných pro interakci s kladně nabitým tenzidem Septonexem. Rovněž zvážit možnosti charakterizace takovýchto systémů technikami dostupnými v rámci FCH VUT.
- 3) Připravit a charakterizovat fyzikální gely připravené kombinací Septonexu a různých molekulových hmotností hyaluronanu.
- 4) Zhodnotit aplikovatelnost systému ve farmacii.

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

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

Nikola Kolomá
student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá zkoumáním jednotlivých systémů směsí hyaluronanů. Veškeré směsi hyaluronanů byly připraveny při molekulových hmotnostech 15-30 kDa, 80-150 kDa nebo 1500-1750 kDa. Tyto jednotlivé molekulové hmotnosti byly kombinovány v různých poměrech, nejčastěji však v poměrech 70:30, 50:50 a 30:70. Pro všechny namíchané vzorky byl použit tenzid Septonex s rozdílem posledního experimentu, kdy bylo použito také CTAB. Zpočátku byly vzorky gelů připraveny suchou cestou z jednotlivých prášků, při přesně vypočítaných navážkách. Veškeré roztoky byly ale připraveny mokrou cestou, pomocí zásobních roztoků o přesně vypočítaných koncentracích. Fyzikální gely byly tedy připraveny kombinací Septonexu a různých molekulových hmotností hyaluronanu. Vznikaly nepravidelné tvary, které bychom mohli charakterizovat jako „kuličky“ či „perličky“. Po odstání vzorku se v určitém čase jednotlivé části gelu slévaly do jedné vrstvy gelu. S fyzikálními gely bylo provedeno několik experimentů, při kterých bylo zkoumáno především chování směsí a rozdíly způsobené jinou molekulovou hmotností. Veškeré fyzikální či chemické vlastnosti byly pozorovány především vlastním okem, popsány a na závěr vyfotografovány. Při experimentech bylo použito hydrofobní barvivo olejová červeň, které sloužilo k lepšímu vizuálnímu porovnání vzorků mezi sebou. Posledním experimentem bylo reologické měření, při kterém bylo možné charakterizovat viskozitu jednotlivých vzorků.

ABSTRACT

This work is focused on study of individual systems of hyaluronan mixtures. All mixtures of hyaluronans they were ready at molecular weights of 15-30 kDa, 80-150 kDa, or 1500-1750 kDa. These individual molecular weights were combined in different ratios most often in ratios of 70:30, 50:50 and 30:70. Septonex surfactant was used for all mixed samples and CTAB was used for last experiment too. At first the gel samples were prepared by a dry route of individual powders with accurately calculated batches. All solutions were prepared wet route with stock of exactly calculated concentration. Physical gels were prepared by combinations of Septonex and hyaluronan with the different molecular weights. In solution formed irregular shapes which we could describe as "marbles" or "beads". After the sample was to stand, the individual „marbles“ of the gel were formed whole mass. Was done too many experiments with physical gels, which has been carried out behavior of mixtures hyaluronans with different molecular weights. All physical and chemical properties were observed by the eye, described and in the and were photographed. Was used hydrophil dye in experiments and served for better visualize comparison samples between themselves. The last experiment was rheological measurement with which is possible characterize viscosity od individual samples.

KLÍČOVÁ SLOVA

hyaluronan, tenzid, Septonex, CTAB, molekulová hmotnost, interakce, reologie

KEYWORDS

hyaluronan, tenside, Septonex, CTAB, molecular mass, interaction, rheology

KOLOMÁ, N., *Vliv molekulové hmotnosti polymerů na fázově separované hydrogely*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019 49 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat mému vedoucímu bakalářské práce, panu Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D za jeho odborné rady, čas a vstřícný přístup. Také bych chtěla poděkovat panu Ing. Richardu Hegerovi za čas a vstřícný přístup v laboratoři.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část	8
2.1	Makromolekulární gely	8
2.1.1	Charakterizace gelů	8
2.1.2	Vlastnosti gelů.....	8
2.1.3	Vznik gelů	8
2.1.4	Hydrogely.....	9
2.2	Hyaluronan	9
2.2.1	Velikost polymerů hyaluronanu	10
2.2.2	Aktivita spojená s různou molekulovou hmotností hyaluronanu.....	11
2.2.3	Hydrofobní oblasti v hyaluronanu.....	11
2.2.4	Struktura hyaluronanu v roztoku.....	12
2.3	Tenzidy	13
2.3.1	Charakterizace tenzidů	13
2.3.2	Struktura tenzidů	13
2.3.3	Tvorba micel	13
2.3.4	Dělení tenzidů	14
2.3.4.1	Aniontové tenzidy	14
2.3.4.2	Kationtové tenzidy	15
2.3.4.3	Amfolitické tenzidy.....	15
2.3.4.4	Neionické tenzidy.....	16
2.3.5	Interakce tenzidů s polyelektrolyty	16
2.3.6	Septonex	17
2.4	Reologie.....	17
2.4.1	Charakteristika reologie	17
2.4.2	Rotační testy.....	18
2.4.3	Newtonské kapaliny	18
2.4.4	Nenewtonské kapaliny	18
2.4.5	Měření reologických vlastností hyaluronanu	19
3	Současný stav řešené problematiky	20
3.1	Práce na téma interakce hyaluronan-tenzid	20
3.2	Práce s různými molekulovými hmotnostmi HyA	21

3.3	Práce vytvořené mimo VUT Fakultu chemickou	22
4	Experimentální část.....	24
4.1	Cíl práce.....	24
4.2	Použité chemikálie.....	24
4.3	Použité metody	25
4.3.1	Příprava vzorků	25
4.3.1.1	Interakce nízkomolekulární i vysokomolekulární HyA s tenzidem.....	25
4.3.1.2	Interakce směsí Hya s tenzidem	25
4.3.1.3	Interakce bez vnějšího zásahu	25
4.3.1.4	Zahřívání, vysušování, ultrazvuk a míchání vzorků	25
4.3.1.5	Stabilita v NaCl a EtOH	26
4.3.1.6	Difuze barviva při interakci gelů o různé molekulové hmotnosti	26
4.3.1.7	Reologie	27
5	Výsledky a diskuze	29
5.1	Interakce nízkomolekulární i vysokomolekulární HyA s tenzidem	29
5.2	Interakce směsí HyA s tenzidem	29
5.3	Interakce bez vnějšího zásahu	30
5.4	Zahřívání, vysušování, ultrazvuk a míchání vzorků.....	31
5.5	Stabilita gelu v NaCl a EtOH.....	31
5.6	Difuze barviva při interakci gelů o různé molekulové hmotnosti	32
5.7	Reologie.....	33
5.7.1	Tokové křivky	33
5.7.2	Modulové křivky	35
6	Závěr	37
7	Seznam použitých zdrojů.....	39
8	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	44
8.1	Seznam použitých zkratk	44
8.2	Seznam použitých symbolů	44
9	Seznam příloh	45
10	Přílohy.....	46

1 ÚVOD

V dnešní době se hydrogel studuje převážně kvůli vlastnostem, jako je kompatibilita nebo biodegradace. Avšak jednou z nejdůležitějších schopností hydrogelu je schopnost zadržovat velké množství vody. Díky této schopnosti je slovo „hydro“ základem názvu a druhá část jména tvoří slovo gel, pocházející z latinského slova *gelatus*, v překladu zmrzlý, v jiném případě, nehybný. Jeho doslovný překlad tedy říká „nehybná voda“. Toto označení značí povahu gelu na rozhraní tekuté a pevné fáze.

Jedinečné fyzikální vlastnosti těchto hydrogelů způsobují zájem o jejich využití v mnoha oblastech medicíny. V kosmetologii či dermatologii hrají gely důležitou roli svou značnou hydrofilitou, díky které jsou schopny vysoké hydratace i regenerace pokožky. Gely jsou využívány jako účinná výplň vrásek, k hojení ran, či v plastické chirurgii. Velmi velkým přínosem hydrogelů je také schopnost postupného uvolňování léčiv do těla a s tím související prodloužení délky účinku léčivého přípravku v organismu. Elongací procesu uvolňování léčiva v těle se zároveň snižuje pravděpodobnost výskytu vedlejších a nežádoucích účinků.

Dnes lze za nejznámější a nejdiskutovanější hydrogely považovat vysoce koncentrované roztoky kyseliny hyaluronové, které hrají velmi důležitou roli v živých organismech, což z nich činí biomateriál pro různé lékařské aplikace. Svými vysokými molekulovými hmotnostmi spojenými s viskoelastickými a reologickými vlastnostmi byly k těmto účelům předurčeny. Pro použití kyseliny hyaluronové v aplikacích je velmi důležitá její charakteristika. Hlavními jsou její fyzikální a chemické vlastnosti jako např. rozpustnost, viskozita, molekulová hmotnost nebo reaktivita. Jednou z nejdůležitějších charakteristik je právě molekulová hmotnost, od které se odvíjejí další vlastnosti.

Hlavní myšlenkou mé bakalářské práce bylo kombinování různých molekulových hmotností v různých poměrech a sledování vlastností samotného chování namíchaných směsí vzniklých hyaluronanů. Díky charakterizaci těchto směsí je následně možné upravovat či předpovídat vlastnosti, které by mohly být využity při dalším výzkumu aplikací především pro farmacii.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Makromolekulární gely

2.1.1 Charakterizace gelů

Gel je v podstatě trojrozměrná makromolekulární síť charakteristická svou makroskopickou velikostí a elastickými vlastnostmi. Jestliže dojde k vytvoření dostatečného množství spojů, může se z lineárního polymeru, nebo jeho roztoku, vytvořit síť. Jestliže příčina vzniku uzlů, a tedy i sítě, tkví v mezimolekulárním působení fyzikálních sil (van der Waalsovy, bipolární síly, vodíkové vazby), jedná se o fyzikálně síťované gely. Oproti tomu v kovalentně síťovaných gelech jsou přítomny uzly vytvořené pomocí chemické reakce. Podle toho, zda hydrogel obsahuje rozpouštědlo, dělíme gely na *lyogely* a *xerogely*. V případě vysušení lyogelu vzniká kompaktní xerogel, který zmenší svůj objem přibližně o objem odpařeného rozpouštědla. Pokud je ke xerogelu přidáno rozpouštědlo, dochází k procesu bobtnání a vzniku gelu. Jedná se o vratný proces, k němuž dochází u lyofilních koloidů. Pokud není opět vytvořen gel, tak jde o nevratný proces, jež nastává u lyofobních koloidů. Převod gelu na polymerní roztok není dosažitelný u kovalentně síťovaných gelů. Opětovným zahřátím lze docílit převod gelu na polymerní roztok.

Gely nejsou tekuté, alespoň při menších napětích se nedeformují trvale, nýbrž vratně. Týká se to i lyogelů, kdy je elasticita zajištěna tím, že je lyogel prostoupen spojitou makromolekulární sítí [1].

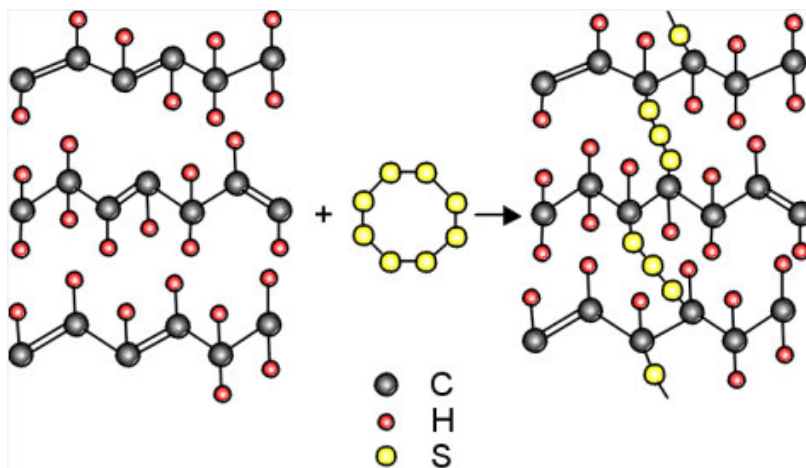
2.1.2 Vlastnosti gelů

Gel je schopen odolávat tečnému napětí až do určité hodnoty, pod kterou se chová jako elastické tuhé těleso. Při menších napětích se nedeformují trvale, ale pouze vratně. Elasticita gelu je zajištěna makromolekulární sítí. Při menších napětích se nedeformují trvale, ale vratně. Některé fyzikální gely, však mohou pomocí mechanického působení, například protřepání, přejít z gelu na koloidní roztok. Je to způsobeno tím, že mechanické síly naruší fyzikální síly, které poutají prostorovou síť. Pokud necháme koloid v klidu stát, opět se obnoví původní struktura gelu. Tento jev se nazývá tixotropie. Gely jsou také, téměř stejně jako původní koloidní roztok, elektricky vodivé. Elektrická vodivost se téměř nemění u hydrogelů obsahujících soli v porovnání s příslušným původním roztokem. Naproti tomu u velkých molekul rozpuštěných v gelu je difuzní i elektroforetická pohyblivost snížena [2], [3].

2.1.3 Vznik gelů

Proces vzniku gelu nazýváme obecně gelace, při které dochází ke spojování molekul lineárního polymeru a jeho roztoku, čímž se vytvoří dostatečné množství spojů, a vzniká prostorová síť. Molekuly mezi sebou mohou být navzájem propojeny, fyzikálně nebo chemicky. Fyzikální gely vznikají na základě fyzikálních interakcí mezi řetězci, jako jsou např. vodíkové můstky, van der Waalsovy síly nebo hydrofobní interakce. Těmto gelům se také říká fyzikálně síťované. Chemické gely vznikají zesíťováním kovalentními vazbami, které jsou mnohem pevnější a odolnější než fyzikální. Takto vzniklým gelům se říká kovalentně síťované.

Na průběh gelace má značný vliv teplota. Zvýšená teplota je nežádoucí, neboť dochází k růstu intenzity tepelného pohybu jednotlivých segmentů a klesá tak počet vazeb mezi makromolekulami společně s dobou trvání. Dalším faktorem, který ovlivňuje průběh gelace, je koncentrace. Zde platí, že vzrůst koncentrace pomáhá k tvorbě gelů, protože tak vzrůstá četnost srážek makromolekul, čímž se zvyšuje počet vazeb. Značný vliv má i pH, z toho důvodu, že gelace probíhá nejlépe při hodnotě pH, která odpovídá izoelektrickému bodu [4].



Obrázek 1: Příklad gelace: Síťování lineárního polymeru – vulkanizace kaučuku [5]

2.1.4 Hydrogely

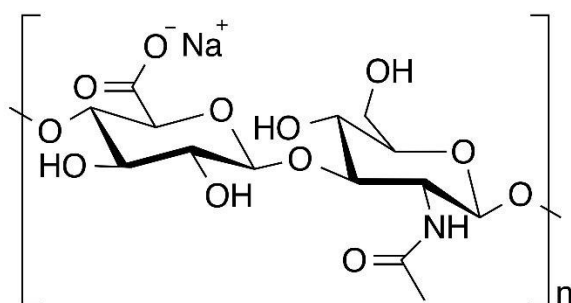
Hydrogel je odborně definován jako dvou nebo více složková soustava prostorové sítě polymerních řetězců a vody, která vyplňuje místo mezi makromolekulami. V závislosti na složení může zadržovat různé množství vody. Přirozeně se vyskytují jako polymerní sítě kolagenu, želatiny, nebo mohou být uměle syntetizovány. Jedná se o biomateriály, které při kontaktu s krví, tělními tekutinami a tkání projevují dobrou biokompatibilitu. Hydrogely mají největší využití v biomedicině. Jsou běžně používány například pro výrobu kontaktních čoček, nosičů léčiv a obvazů. V posledních dvou desetiletích byly přírodně vytvářené hydrogely stále častěji nahrazovány syntetickými, které mají delší životnost a vyšší pevnost. Syntetické polymery mají dobře definovanou strukturu, která se dá upravit tak, aby byl schopný degradovat a fungovat přesně tak, jak je potřeba. Hydrogely mohou být syntetizovány z čistě syntetických složek [6].

Nejdůležitějším a nejdiskutovanějším hydrogelem je hydrogel z kyseliny hyaluronové. Tyto hydrogely na bázi HA jsou velmi slibnými materiály pro obnovu a regeneraci různých tkání. Tradiční hydrogely na bázi HA jsou makroskopické sítě, které se skládají z náhodně propojených řetězců HA. Molekuly léků v síti bez jakékoliv kovalentní vazby nebo jiných specifických interakcí se rychle uvolňují v důsledku relativně velké velikosti pórů. Pokud se síťovací reakce provádí v mikroskopické reakční nádobě, mohou se tvořit částice hydrogelu HA (HGP, mikrogely nebo nanogely) [7].

2.2 Hyaluronan

Hyaluronan je vysokomolekulární bipolysacharid, který byl objeven Meyerem a Palmerem v roce 1934 ve sklivci hovězího dobytka. Hyaluronan je označení pro sůl kyseliny hyaluronové,

nejčastěji sodné nebo draselné. Jedná se o lineární nerozvětvený střídavý polymer složený ze dvou monosacharidů: β (1,4) -N-acetyl-D-glukosamin a β (1,3) -D-glukuronovou kyselina. Délka řetězce HA se pohybuje od 0.200 do 10 MDa, přičemž nejběžnější velikost je v rozmezí 2-5 MDa [8].



Obrázek 2: Struktura hyaluronátu sodného [8]

Mimo jiné se hyaluronan nachází v mnoha dalších substrátech jako je kůže, kloubní tekutina nebo extracelulární matrice. Mezi jeho charakteristické vlastnosti patří schopnost se rozpouštět ve vodě za vzniku viskoelastického roztoku. Důležitá charakteristika je, že se zvyšující se koncentrací se zvyšuje viskozita. Vodíková vazba mezi sousedními sacharidy je velmi významná pro stanovení fyziologických vlastností HyA, avšak dalším důležitým faktorem, který ovlivňuje fyzikální vlastnosti, je iontová síla [9]. Jednou ze zajímavých a efektivních metod při získávání hyaluronanu je bakteriální produkce pomocí kmenů *Streptococcus equi* a *Streptococcus zooepidemicus*. Při této metodě může být produkováno daleko větších výtěžků, než může být pomocí extrakční metody. V současné době však může být k dispozici hyaluronan z různých zdrojů, které nám může poskytnout HyA o různých molekulových hmotnostech při různé vlhkosti nebo čistotě. Nečistoty v hyaluronanu mohou vzniknout při provádění procesu purifikace, kde se mohou objevit i látky, jako jsou nukleové kyseliny, bílkoviny, chlorid sodný nebo těžké kovy [10].

2.2.1 Velikost polymerů hyaluronanu

Charakteristickým znakem pro polymery hyaluronanu je délka řetězců. Pro každou délku (velikost), nebo molekulovou hmotnost, je několik vlastností.

Vysokomolekulární hyaluronan má obvyklou molekulovou hmotnost $4 \cdot 10^2 - 2 \cdot 10^4$ kDa a patří mezi nejdélejší molekuly extracelulární matrice. Jedná se o jednu z nejvíce nabitých molekul a při rozpouštění ve vodě je schopný bobtnat. Tento polymer je schopen přijmout velké množství vody za vzniku hydratovaného polymeru, jenž je schopen vyplňovat prostor a hydratovat tkáň. Obecně je vysokomolekulární hyaluronan schopen podporovat celistvost tkání a potlačovat zánět. Tyto vysokomolekulární polymery jsou tedy extracelulární a mají široké pole různých regulačních a strukturních funkcí.

Naopak malé polymerní fragmenty jsou angiogenní, protizánětlivé a imunostimulační [11], [12].

2.2.2 Aktivita spojená s různou molekulovou hmotností hyaluronanu

Díky jednoduché a primární struktuře mají molekuly hyaluronanu široké využití a častou antagonistickou funkci v závislosti na velikosti molekuly. Obecně řečeno, velké polymery matrixového charakteru vyplňují volné prostory, působí antagonicky a zároveň imunosupresivně. Středně velké polymery s 25-50 disacharidovými jednotkami mají protizánětlivé účinky, jsou angiogenní a imunostimulační. Naopak menší oligosacharidy se vyznačují antiapoptickými účinky a indukují proteiny.

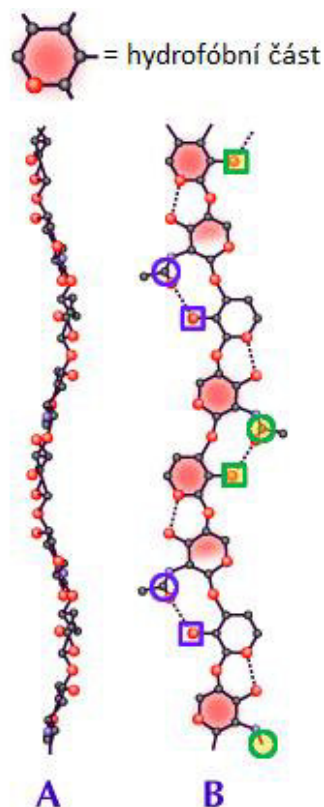
Co se týče molekulových hmotností HA, molekuly o hmotnosti 0,2 MDa jsou zodpovědné za přežívání periferních eozinofilních krevních buněk. HA o velikosti 3-6 MDa vykazují účinky s mechanismem, který zahrnuje zvýšenou expresi faktoru stimulujícího granulocyty a makrofágy. Dalším účinkem může být zvyšování produkce růstového faktoru $\beta 1$ u eozinofilů. U nízkomolekulárních HA jsou účinky stimulační na produkci metaloelastázy v alveolárních makrofázích u myší, a naopak inhibují produkci cytokinů indukovaných nízkomolekulárními fragmenty makrofágů u myších v kostní dřeni.

Velké množství výzkumů vědců naznačují zásadní rozdíly biologické odpovědi na vysokomolekulární a nízkomolekulární hyaluronan. Bohužel není v současné době zřejmé, jaké je vysvětlení pro tyto rozdíly [12], [13].

2.2.3 Hydrofobní oblasti v hyaluronanu

Hyaluronan je látka, která je v nativní formě převážně hydrofilní. To je hlavním limitujícím faktorem pro tvorbu interakcí s hydrofobními látkami. Dříve bylo zaznamenáno, že hyaluronan ve dvojité šroubovici má hydrofobní domény. Ve výsledku to tedy znamená, že hyaluronan ve svojí struktuře obsahuje jak vysoce hydrofilní materiál, tak hydrofobní domény, které mohou být charakteristické např. pro lipidy. Je tedy amfifilní.

Tyto hydrofobní oblasti se ve vodě shlukují k sobě, tím redukuje velikost povrchu interagujícího s vodou. Tento mechanismus řídí vznik membrán a dále přispívá i ke stabilitě struktury dvoušroubovice DNA. Pro popis toho jevu můžeme použít pojem hydrofobní interakce [14], [15].



Obrázek 3: Zobrazení interakce mezi řetězci hyaluronanu. Řetězce A a B znázorňují zobrazení, kde červené oblasti značí hydrofobní místa na střídajících se stranách polymerního řetězce. Kroužky dále reprezentují acetamidovou skupinu a čtverečky karboxylovou skupinu [15].

2.2.4 Struktura hyaluronanu v roztoku

Výsledná struktura hyaluronanu v roztoku je výsledkem kombinace chemické struktury disacharidu a vnitřních vodíkových vazeb, vznikajících interakcemi s rozpouštědlem. Relativně hydrofobní fázi tvoří nepolární axiální vodíkové atomy, zatímco ekvatoriální boční řetězce tvoří spíše hydrofilní, polární fázi připomínající zakroucenou strukturu.

Primární struktura v roztoku tvoří roztáhnuté a náhodně svinuté klubko, které zabírá velkou doménu v roztoku. V této doméně je molekulová hmotnost hyaluronanu ve skutečnosti velmi malá. Domény jednotlivých molekul se v roztoku tedy mohou překrývat pouze v případě, jestliže je koncentrace hyaluronanu vyšší než 1 mg/ml.

Následkem doménové struktury hyaluronanu je, že malé molekuly, jako je voda, spolu s elektrolyty, mohou volně difundovat přes doménu, zatímco větší molekuly, jako jsou například bílkoviny, přes tuto doménu projít již nemohou. Čím jsou tedy molekuly větší, tím obtížněji mohou difundovat přes síť hyaluronanu a tím je jejich koncentrace menší. Volné řetězce hyaluronanu se v roztoku stále pohybují a vytvářejí tak póry různých velikostí. Statisticky mohou existovat póry se všemi velikostmi, avšak s různou pravděpodobností. To znamená, že je v podstatě možné, aby každá molekula difundovala přes doménu hyaluronanu různou rychlostí, která závisí na vlastním hydrodynamickém objemu [16].

2.3 Tenzidy

2.3.1 Charakterizace tenzidů

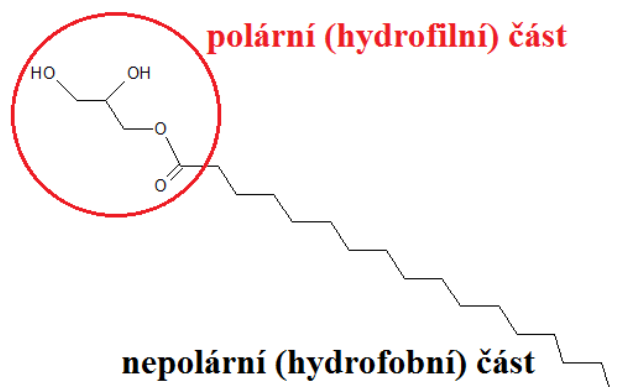
Tenzidy, taktéž povrchově aktivní látky (PAL), se řadí do skupiny organických látek, které se již při nízkých koncentracích hromadí na mezifázovém rozhraní a snižují mezifázovou energii. Tenzidy vykazují povrchovou aktivitu, která se projevuje pěněním roztoků.

Název tenzid je odvozen z latinského slova „*tensio*“ (napětí) a slouží k nahrazení původního dlouhého označení, právě pro povrchově aktivní látky.

Z chemického hlediska dělíme tenzidy na aniontové, kationtové, neionické a amfoterní [17], [18].

2.3.2 Struktura tenzidů

Molekula tenzidu obsahuje dipolární asymetrickou strukturu, která má za následek amfifilní vlastnosti. Tenzid obsahuje rozdílné skupiny. Skupiny s velkou afinitou k rozpouštědлу a naopak skupiny, které rozpouštědlo odpuzují. V případě, že je rozpouštědlem voda, jedna část molekuly je přitahována (hydrofilní část) a odpuzována od organických nepolárních agens. Další část molekuly je od vody odpuzována (hydrofobní část) a k lipidům naopak přitahována. Hydrofilní částí molekuly je v nejčastějším případě polární nebo silně iontová skupina a u lipofilní části je nejčastější uhlovodíkový radikál s rozvětvenou nebo lineární strukturou tvořený 12-18 uhlíkovými atomy [18].



Obrázek 4: Schéma struktury molekuly tenzidu

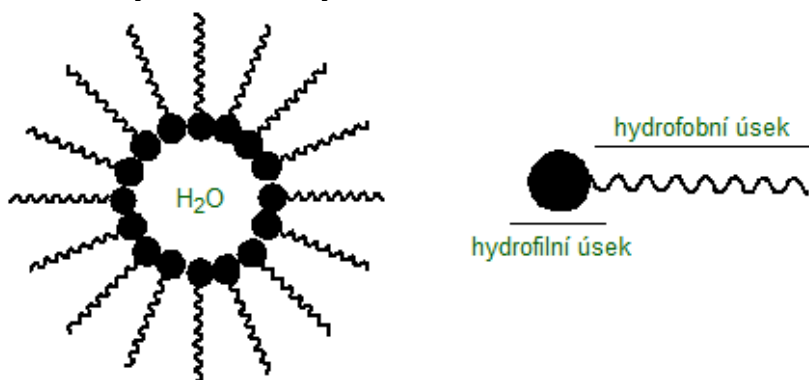
2.3.3 Tvorba micel

Tenzidy v roztoku se formují na agregáty, tzv. micely. K jejich tvorbě dochází při dosažení kritické micelární koncentrace. Kritická koncentrace micel CMC je koncentrace povrchově aktivního činidla, při které a nad kterou se tvoří micely. Pro roztoky povrchově aktivních látek může být stanoveno měřením povrchového napětí při různých koncentracích. Pod CMC klesá povrchové napětí se zvyšující se koncentrací tenzidů, jak se zvyšuje počet povrchově aktivních látek na rozhraní. Na rozdíl od CMC je naopak povrchové napětí roztoku konstantní, protože koncentrace mezifázové povrchově aktivní látky se již nemění.

Tato charakteristika tenzidů je důležitým jevem, jelikož dané molekuly se chovají jinak vázané v micelle a jinak jako volné v roztoku. Proces je umožněn díky struktuře molekuly tenzidu s jedním koncem nepolárním a druhým polárním. Orientace tenzidů v micelách je

závislá na okolním prostředí. V lyofilním (polárním) obvykle vodném prostředí se tenzidy orientují nepolárními řetězci dovnitř micely a polární skupinou vně, která v podstatě tvoří vnější ochranný obal hydrofobního jádra. Micela se v tomto případě stává polárním agregátem s vysokou rozpustností ve vodě. V lyofobním prostředí je tomu naopak.

Schématickou strukturu micely je možné vidět na Obr. 5, kde se micely tvoří už při nízkých koncentracích tenzidu. V tomto případě je na obrázku vyobrazena micela s hydrofilní dutinou. Tato micela vzniká v nepolárním prostředí a typickým znakem jsou hydrofilní hlavy směřující do středu a hydrofobní konce směřující do rozpouštědla. Tyto micely označujeme jako inverzní. Opakem inverzní micely je micela s hydrofobní dutinou, která se tvoří v polárním prostředí. Struktura této micely je naopak jak u inverzní a může připomínat uzavřenou kuličku, kde jsou na povrchu hydrofilní hlavy a ve středu hydrofobní konce [19].



Obrázek 5: Struktura micely s hydrofilní dutinou tvořená v nepolárním prostředí – inverzní micela [20]

2.3.4 Dělení tenzidů

Tenzidy se podle nábojů na polární hlavě dělí na anionaktivní, kationaktivní, amfoterní a neionické. Amfoterní tenzidy obsahují v polární hlavě jak kladný, tak záporný náboj. Jejich výsledný náboj závisí na pH. Tato práce se zaměřuje na kationaktivní tenzidy. Většina kationaktivních tenzidů je založena na dusíkovém atomu, který nese kladný náboj a tvoří aminové a kvarterní amoniové skupiny.

Kvarterní amoniové sloučeniny nejsou pH senzitivní na rozdíl od aminů, které nemohou být použity při vysokém pH. Jejich biologická degradace je oproti anionaktivním tenzidům obecně horší. Nemohou se kombinovat zároveň s anionaktivními tenzidy, protože by se vysrážely. Mají také mikrobicidní účinek, díky kterému našly využití například jako pesticidy. Mimo jiné jsou používány jako složka do aviváží a kondicionérů [21], [22].

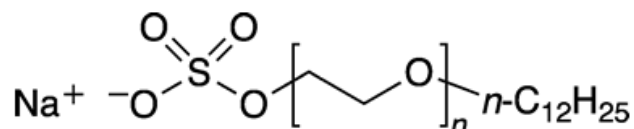
2.3.4.1 Aniontové tenzidy

Aniontové tenzidy patří do největší skupiny povrchově aktivních látek, představují tedy 70–75% celosvětové spotřeby. Do této skupiny lze řadit mýdla, alkylsulfáty, alkylsulfonáty, alkensulfonáty a spoustu dalších. Aniontové tenzidy mají velmi nízký náklad na výrobu, oproti dalším skupinám, proto se tedy užívají ve větším objemu.

Ve vodném prostředí molekuly tenzidu disociují na záporně nabitý organický iont a díky tomu podporují sorpci nečistot, které nesou většinou kladný náboj. Proti-iontem je většinou

sodíkový iont. Mezi kladné vlastnosti aniontových tenzidů patří snižování oxidačních schopností mikroorganismů a při vyšších koncentracích jsou schopny také snižovat činnost nitrifikačních bakterií. Jsou však nestále v kyselém prostředí, ale naopak nejvíce stálé a aktivní v alkalickém prostředí [22], [23].

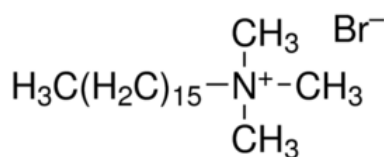
Příkladem může být Laurethsulfonát sodný na Obr.6, který se využívá v mnoha výrobcích pro osobní hygienu. V chemické struktuře se uvádí „n“, které zastupuje příslušné číslo. V případě komerčního produktu, který má heterogenní systém, jak v délce alkylového řetězce, tak v počtu ethoxylových skupin, je „n“ jejich průměr. U těchto komerčních přípravků je obvykle n=3.



Obrázek 6: Příklad aniontového tenzidu-Laurethsulfát sodný (SLES) [24]

2.3.4.2 Kationtové tenzidy

V případě kationtových tenzidů se jedná o sloučeniny s jednou nebo více funkčními skupinami, které ve vodném prostředí disociují. Vznikají kladně nabitě organické ionty vykazující povrchovou aktivitu. Nejvýznamnější z kationtových tenzidů jsou kvartérní amoniové a pyridiniové sloučeniny, které mají v molekule alespoň jeden dlouhý hydrofobní řetězec. Většina kationtových surfaktantů jsou založeny na atomu dusíku, jenž nese kladný náboj. Kvartérní amoniové soli jsou považovány za antistatické prostředky, díky vysoké antistatické účinnosti. Na základě snižování tření mezi vlákny a také mezi vlákny a kůží se spolu s ethoxyláty používají jako běžné aviváže i vlasové kondicionéry. Vykazují také smáčecí, emulgační a dispergační vlastnosti. Oproti anionickým tenzidům mají obecně nižší biologickou rozložitelnost a jsou toxické. Neaktivnější jsou v kyselém a neutrálním prostředí, a naopak nejméně stálé v prostředí alkalickém [22], [25].



Obrázek 7: Příklad kationtového tenzidu-Hexadecyltrimethylamonium bromid (CTAB) [26]

2.3.4.3 Amfolitické tenzidy

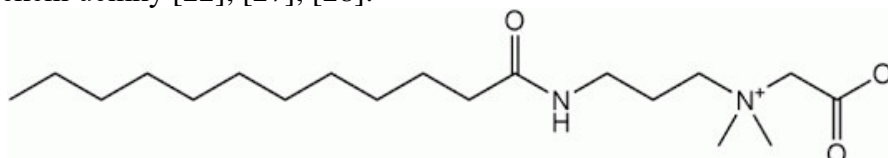
Amfolitické tenzidy jsou charakteristické tím, že ve svojí struktuře obsahují dvě hydrofilní skupiny, kyselou a zásaditou. Tyto dvě skupiny udělují tenzidu právě amfoterní charakter. Kyselý charakter ve struktuře tenzidu má aminoskupina, a naopak zásaditý charakter karboxyskupina. Disociují tedy v závislosti na pH prostředí na záporné nebo kladné ionty. V případě tvorby solí je pH elektroneutrální.

Amfolitické tenzidy mají velmi dobré detergenční i jiné vlastnosti. Jsou dobře biologicky rozložitelné, netoxické a mají mikrobiální účinky. Můžeme je použít v kombinaci s velkou řadou kationických, anionických i neionických tenzidů, se kterými se uplatňují pozitivní

synergické účinky. Díky svým vlastnostem jsou perspektivní, a to i v oboru konzervace a restaurování. Jsou však nejdražšími z tenzidů.

Typickými příklady jsou aminokyseliny, které lze získat z přírodních materiálů, nebo naopak jsou syntetizovány uměle.

Jedním z příkladů amfolytického tenzidu je Kokamidopropyl betain, který je vyobrazený na Obr. 8. Jedná se o velmi významnou látku, která má široké využití především v kosmetice. Jednou z funkcí je schopnost napomáhat tvorbě pěny v šamponech a zároveň pěnu stabilizovat. V kondicionérech a ostatní kosmetice je využívána jako emulgátor. Dále má také hydratační a jemné dezinfekční účinky [22], [27], [28].

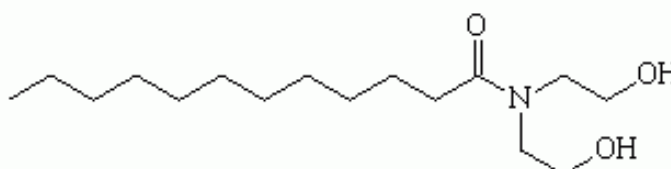


Obrázek 8: Příklad amfolytického tenzidu-Kokamidopropyl betain [29]

2.3.4.4 Neionické tenzidy

Neionické tenzidy obsahují ve své struktuře hydrofilní skupiny, které však ve vodě nedisociují. Tyto skupiny jsou vázány přímo, nebo přes další funkční skupiny na hydrofilní část molekuly. Rozpustnost tenzidů ve vodě náležících do této skupiny je dána přítomností funkční skupiny v molekule, která má k vodě vysokou afinitu. Ve vodě se rozpouští díky svým hydratačním vlastnostem. Hydrofobní část molekuly tvoří alkylový řetězec, nebo alkylem substituovaný aromatický uhlík.

V tomto případě se jedná o nejvíce zastoupenou a nejrozšířenější skupinu povrchově aktivních látek, do které můžeme řadit např. Alifatické alkoholy, alkylfenoly, estery mastných kyselin a polymery. Nejsou však příliš stálými tenzidy v silně kyselém a silně alkalickém prostředí [22], [30].



Obrázek 9: Příklad neionického tenzidu-Kokamid diethanolamin (Cocamide DEA) [31]

2.3.5 Interakce tenzidů s polyelektrolyty

Výzkumem interakce polyelektrolytu a opačně nabitého tenzidu ve vodném roztoku se v posledních desetiletích zabývalo mnoho vědců. Tímto způsobem lze připravit hydrogely, které jsou dnes využívané hodně v průmyslu, potravinářství a ve farmacii. Díky této kombinaci získávají hydrogely speciální vlastnosti, například vylepšenou stabilitu a povrchovou aktivitu. K interakci dochází již při velmi malé koncentraci tenzidu. Je také dokázáno, že se micely v přítomnosti polymeru tvoří již před dosažením kritické micelární koncentrace. Vznik micel v těchto komplexech se dá využít například k rozpouštění hydrofobních látek v hydrogelu. Pro klinické aplikace musí tyto hydrogely být také biokompatibilní a biodegradabilní. Pro toto použití se nabízí právě hyaluronan, neboť má tyto požadované vlastnosti [32].

2.3.6 Septonex

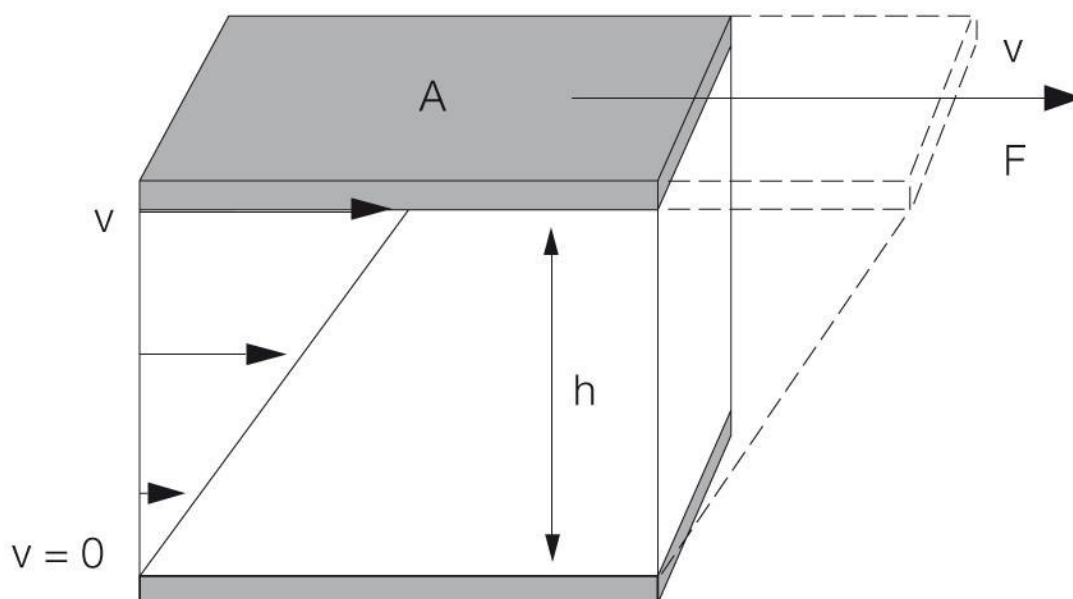
Karbethopendeciniumbromid (systematický název) je účinnou látkou antiseptických a dezinfekčních přípravků prodávaných právě pod značkou Septonex.

Jedná se o kvartérní amoniovou sloučeninu používanou v medicíně především jako antiseptikum a dezinfekční látka. Při běžných podmínkách je Septonex bílý až nažloutlý prášek, ve vodném roztoku po protřepání pění. Dá se dobře rozpustit ve vodě i ethanolu.

2.4 Reologie

2.4.1 Charakteristika reologie

Počátky reologie sahají do roku 1928, kdy byla zkoumána americkým fyzikem E. C. Binghamem a jeho spolupracovníky. Jedná se o vědní disciplínu, která popisuje tok hmoty a deformaci. Její podstatou není charakteristika hmotnostního toku, ale vztahy mezi deformací, rychlostí její změny a napětím. Název je tvořen z řeckých slov „rhein“ a „logos“, což lze přeložit jako nauka o toku. K popisu reologie se využívá modelu dvou planárních paralelních desek. Spodní deska je statická a je na ni nanesen vzorek kapaliny. Horní deska o přesně definované ploše A je naopak pohyblivá. Její pohyb vyvolává síla F a po celou dobu pohybu je v definované výšce h . Viskozita vyvolaná pohybem, který způsobí posun desky, je popsána Newtonovým viskózním zákonem.



Obrázek 10: Výpočet smykového napětí a smykové rychlosti pomocí dvouvrstvého modelu se smykovou plochou A , šířkou mezery h , smykovou silou F a rychlostí v [33]

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$$

Rovnice 1: Newtonův zákon viskozity, kde τ tečné napětí a $\dot{\gamma}$ smyková rychlost

Tečné napětí τ je definované jako nápor, který působí v tečném směru, vyvolaný působící silou F na danou plochu A . Smyková rychlost γ je definována jako podíl konečné délky v (po deformaci) a původní délky h (před deformací). Dalšími matematickými úpravami lze získat další druhy viskozit [33], [34].

2.4.2 Rotační testy

Rotační testy s reometrem lze provádět v jednom ze dvou provozních režimů, které se liší v přednastavených parametrech. První způsob je prezentovat rychlost pomocí rychlosti otáčení nebo smykové rychlosti. To simuluje procesy, které jsou závislé na rychlosti proudění nebo objemovém průtoku, jako je nanášení nátěrů štětcem nebo nátěrů stříkáním nebo prouděním trubkou. Druhým způsobem je přednastavení hnací síly pomocí krouticího momentu nebo smykového napětí. Tyto testy simulují aplikace závislé na síle, jako je síla potřebná k zahájení čerpání materiálu v klidu, k vytlačování těsnicích materiálů z patrony, nebo pasta z trubky. Převod točivého momentu na smykové napětí a rychlost otáčení na smykovou rychlost a naopak [33].

2.4.3 Newtonské kapaliny

Látky, které se chovají podle newtonova viskozitního zákona, se nazývají jako newtonské kapaliny. Jedná se o čisté kapaliny nebo velmi zředěné roztoky nebo pro roztoky polymerů o nízkých molekulových hmotnostech. Roztok vysokomolekulárního hyaluronanu se tak chová při extrémních smykových rychlostech, kdy se viskozita blíží nule příp. nekonečnu (záleží na velikosti smykové rychlosti). Pro newtonské kapaliny platí, že zvyšováním smykové rychlosti lineárně roste tečné napětí. Zároveň platí nezávislost dynamické viskozity na smykové rychlosti. Rychlost růstu deformace při konstantním tečném napětí je závislá na viskozitě [35].

2.4.4 Nenewtonské kapaliny

Všechny ostatní tekutiny, které nesplňují tento ideální tok, se nazývají nenewtonské. Tyto tekutiny nedodrží Newtonův zákon viskozity. Je možné je rozdělit do tří základních skupin. Tyto skupiny jsou pseudoplastické, diletantní a plastické. Pseudoplastické kapaliny vykazují obrovský pokles ve viskozitě v případě, kdy je smyková rychlost zvýšena z nízkých hodnot do vysokých. Při působení určité síly nebo tlaku, může být více látky přinuceno různě téct nebo naopak, musí být více energie redukováno k udržení požadovaného toku. Do této skupiny patří velké množství důležitých sloučenin. Patří zde emulze, suspenze nebo disperze, přesněji roztoky a taveniny polymerů nebo různá mýdla. Diletantní kapaliny vykazují zvýšení viskozity kdykoli je zvýšena smyková rychlost. Diletantní chování je možné nalézt například ve vysoce koncentrovaných suspenzích. Plastické kapaliny se popisují stejně jako pseudoplastické, ale aby u těchto kapalin došlo k toku, je potřeba, aby došlo k překročení prahového smykového napětí neboli meze toku. U těchto kapalin je potřeba dodat dostatečně velkou sílu zvenčí, aby došlo k překročení požadovaného bodu. Plastickými kapalinami jsou například zubní pasty nebo přírodní kaučukové polymery [35], [36].

2.4.5 Měření reologických vlastností hyaluronanu

Hyaluronan je zajímavý svými unikátními mechanickými vlastnostmi. Díky těmto vlastnostem je velmi atraktivní nejen pro lékaře či kosmetiky, ale je velmi oblíbený i v oblasti dalších výzkumů u chemiků. Hyaluronan má velmi vysokou viskozitu a vyznačuje se svým viskoelastickým chováním i při malých koncentracích. Jak tedy tyto vlastnosti měřit a sledovat změny při různých podnětech?

K měření specifických vlastností hyaluronanu se využívá právě obor reologie, nazývána taky jako mechanika tekutin a těles. Zajímají nás vlastnosti jako viskozita, a její proměnlivost v závislosti na mechanickém zatížení vzorku nebo například elasticita. Definice elasticity je schopnost materiálu absorbovat mechanické šoky do své struktury, aniž by došlo k narušení. Viskozita nám charakterizuje schopnost kapaliny téci, nebo jak je materiál „hustý“.

Přístrojem na měření reologických vlastností materiálů se nazývá rotační reometr. Tento přístroj je schopen vzorek hyaluronanu mechanicky deformovat otáčením rotujícího senzoru o různé geometrii různou rychlostí při různých silách. Mechanický podnět může být vyvolán oscilačním pohybem senzoru s různou intenzitou. Výsledkem rotace senzoru jsou informace zejména o viskozitě a tokových vlastnostech hyaluronanu, naopak informaci o elasticitě nám poskytne oscilační pohyb senzoru.

Výstupem rotačních testů může být záznam viskozity v závislosti na intenzitě otáčením senzoru, jedná o tzv. tokovou křivku. Tekutiny, u nichž se viskozita nemění se nazývají newtonské. V případě hyaluronanu však vykazují chování neneutronských kapalin, kdy se viskozita je zprvu konstantní a vysoká při velmi nízkých zátěžích a po zvýšení viskozita rychle klesá.

Tyto vlastnosti hyaluronanu se využívají pro oční kapky, které jsou schopné zůstat déle na povrchu oka a po mrknutí se dobře roztírají po celém povrchu. To tedy zajistí účinné působení léčivého přípravku a jeho distribuci na povrchu oka [37].



Obrázek 11: Reometr ARG2

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

V roce 1934 Karl Meyer a John Palmer objevili polysacharid s extrémně vysokou molekulovou hmotností, který byl izolovaný ze sklivce oka skotu. Jednalo se o kyselinu hyaluronovou, která byla dále v období mezi lety 1948-1951 několika chemiky zkoumána a během druhé poloviny století byla kyselina hyaluronová objevena i v dalších tkáních a tekutinách u zvířat i lidí. Bylo zjištěno, že je velmi vhodná pro klinické aplikace, především pro oční chirurgii, léčbu onemocněných kloubů a také pro estetickou medicínu. Lékařské studie kyseliny hyaluronové zahrnují hlavní roli v oblasti hojení ran, embryogenezi, rozvoj imunitní odpovědi, onkologických a infekčních chorobách, procesech stárnutí [38]. Další vlastností kyseliny hyaluronové je velmi dobrá kompatibilita a biologická odbouratelnost. Dále má schopnost rozpoznávat specifické receptory, které jsou nadměrně exprimovány na povrchu nádorových buněk, tyto léky tak mohou být cíleny přesně na ně. Kyselina hyaluronová proto přitahovala velkou pozornost jako vehiculum, které slouží především pro snadnější přípravu či podávání léčiv [39].

V případě interakcí hyaluronan–tenzid se jedná o systémy, které je možno využít také k přenosu léčiv, a to díky schopnosti rozpuštění hydrofobní látky, v našem případě léčiva, v tenzidu a s pomocí hyaluronanu dopravit na požadované místo účinku. V případě komplexů hyaluronan–tenzid se jedná o systémy, u kterých studie prokázala, že mají různé účinky na různé typy lidských buněk. HyA představuje užitečný modulátor, především se Septonexem nebo CTAB, cytotoxického účinku na různých úrovních. Potenciální aplikace pro tyto komplexy zahrnují systémy právě pro dodání léčiv či nukleových kyselin, nosiče barviv nebo pro výrobu kosmetiky [40].

Původně se o interakce mezi hyaluronanem a kationaktivním tenzidem podrobně zabýval **Kyrre Thalberg a Björn Lindman** a to hnedka z několika možných hledisek [41]. Tato práce zkoumá interakce mezi hyaluronanem ve formě sodné soli s alkytrimethylamonium bromidy, pomocí metody fázové separace, NMR vlastní difúze, vodivosti a solubilizace barviv. Výsledkem poukazují na možnou vazbu povrchově aktivní látky na hyaluronan, jedině v případě tenzidu s deseti nebo více uhlíky v alkylovém řetězci.

3.1 Práce na téma interakce hyaluronan-tenzid

V dizertační práci **Ing. Tereza Halasová** [42] zkoumala interakce hyaluronanu a amfifilních molekul. Tato práce se snaží přispět k vývoji cílených nosičů léčiv zkoumáním jednoho z využitelných systémů. Součástí je nejen výzkum interakcí hyaluronanu a různých amfifilních molekul pomocí metody fluorescenční sondy ale i výzkum kondenzovaných fází, vznikajících na základě interakce mezi hyaluronanem a opačně nabitým tenzidem. Věnovaná pozornost těmto nosičům léčiv, byla zejména proto, že mají řadu výhod, jako například postupné uvolňování látky. Výsledkem této práce byl fakt, který poukazuje na to, že po přidavku hyaluronanu do roztoku tenzidu dojde k překročné interakci mezi oběma komponentami a také k tvorbě dalších agregátů, které difundují pomaleji než volně natažený samostatný řetězec. S časem však dochází k rovnoměrnějšímu rozdělení tenzidových molekul podél řetězce. Díky reologickým testům pak byly zjištěné mechanické a tokové vlastnosti gelů a na základě toho

určené, že se jedná o viskoelastické kapaliny. Vlastnosti těchto viskoelastických kapalin jsou pak do jisté míry laditelné a lze je ovlivnit hlavně použitou molekulovou hmotností hyaluronanu. Čím vyšší totiž bude, tím bude ve výsledné kondenzované fázi posílen její elastický charakter na úkor viskozity. To znamená, že při použití delšího řetězce HyA vzniklé „gely“ hůře tečou, ale jejich mechanická odolnost je vyšší.

V bakalářské práci **Milan Herzog** [43] zkoumal interakce mezi tenzidem a negativně nabitým bioplomyrem hyaluronanem sodným. Zvoleny byly dva kationické tenzidy: cetyltrimethylammonium bromid (CTAB) a tetradecyltrimethylammonium bromid (TTAB). Pro studium těchto interakcí byla zvolena dynamická tenziometrická metoda – metoda maximálního tlaku v bublině. Vliv konstantního přídatku hyaluronanu byl sledován o dvou molekulových hmotnostech, a to 90 a 1400 kDa na změnu hodnoty povrchového napětí při zvyšování doby života bubliny. Získané výsledky o interakci hyaluronan-tenzid sloužily k popisu dynamického chování tenzidů a také v oblasti distribuce léčiv.

Jedna z publikací **Krouské J., Pekaře M. a Klučákové M.** [44] z roku 2017 se zabývá studiem interakcí mezi hyaluronanem a kationovými povrchově aktivními látkami. Byla studována termodynamika tvorby micel kationtových povrchově aktivních látek tetradecyltrimethylammoniumbromidu (TTAB) a cetyltrimethylammoniumbromidu (CTAB) s přídatkem hyaluronanu se dvěma molekulovými hmotnostmi ve vodném roztoku pomocí titrační kalorimetrie. Makroskopická separace fází, která byla detekována kalorimetricky a také vodometricky, nastává v případě, když jsou náboje na povrchově aktivní látce a hyaluronanu vyvážené. V případě turbidimetrie a potenciometrie však ukázaly interakce hyaluronan-tenzid při velmi nízkých koncentracích povrchově aktivních látek. Pozorované rozdíly mezi těmito systémy připravenými s CTAB a TTAB ukazují, že kromě elektrostatických interakcí, které pravděpodobně převažují, hrají hydrofobní účinky také významnou roli v interakcích hyaluronanu s kationtovými povrchově aktivními látkami.

U další publikace se **Kargerová A. s Pekařem M.** [45] zabývali ultrazvukovou studií interakcí hyaluronanu se Septonexem, jako jeden ze zástupců farmaceutického kationtového surfaktantu. Interakce mezi hyaluronanem a kationtovou povrchově aktivní látkou byly studovány za použití ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením. Ve vodném roztoku byly identifikovány čtyři různé oblasti interakce v úzkém intervalu koncentrací povrchově aktivních látek. Naproti tomu v 0,15 mol/l roztoku NaCl byly pozorovány pouze dvě hlavní oblasti. Hyaluronan-Septonex agregáty byly obecně méně stlačitelné než monomery Septonexu nebo micely a jejich tvorba ve vodě nebyla významně ovlivněna molekulovou hmotností hyaluronanu. V přítomnosti NaCl byl vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu hlubší, což lze připsat jeho konformační citlivost na iontovou sílu v kombinaci s jeho úlohou jako protiont povrchově aktivního činidla. Interakce s hyaluronanem-Septonexem byly blíže interakcím s CTAB než s TTAB. Rozdíly ve struktuře nebo Krafftově teplotě (rozpuštěnost) mezi Septonexem a CTAB se tedy v těchto interakcích významně neodrazily. V této práci byly také stanoveny základní charakteristiky povrchově aktivního činidla Septonex.

3.2 Práce s různými molekulovými hmotnostmi HyA

Charakterizace hyaluronanu a jeho interakce s tenzidy byla zkoumána ultrazvukovou spektroskopií a densitometrií v dizertační práci z roku 2014 [46]. Autorka práce **Ing. Andrea**

Kargerová se zaměřila na fyzikálně-chemické interakce hyaluronanu o molekulové hmotnosti od 10 do 1750 kDa s kationickými tenzidy. Práce se zaměřuje se na studium kritické micelární (CMC) a agregační (CAC) koncentrace tenzidů v přítomnosti a nepřítomnosti hyaluronanu o různé molekulové hmotnosti. V naměřených a získaných datech lze pozorovat významné zlomy v ultrazvukové rychlosti, které nám ve výsledku ukazují změny v systému hyaluronan-tenzid.

Diplomová práce **Bc. Jana Trtka** [47] zkoumá interakce hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech se zvoleným tenzidem CAE. Všechna měření v této diplomové práci se provádělo ve vodném prostředí a v prostředí 0,15 M NaCl. Určení molekulové hmotnosti povrchově aktivní látky bylo prováděno technikou SEC–MALS–dRI. Naopak pro určení kritické micelární koncentrace byly zvoleny techniky ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením a jako doplňková metoda byla zvolena technika tenziometrie.

Další práci, která se zajímá o tuto problematiku je dizertační práce **Ing. Jitky Krouské** [48]. V této práci zkoumala vliv hyaluronanu na micelizaci tenzidů různými fyzikálně-chemickými metodami. Pro tuto práci byly zvoleny dva kationaktivní tenzidy, a to tetradecyltrimethylammonium bromid (TTAB) a cetyltrimethylammonium bromid (CTAB). Dále je sledován vliv různé molekulové hmotnosti použitého hyaluronanu a délka alkylového řetězce tenzidu. Výsledkem jsou hodnoty kritické micelární nebo agregační koncentrace tenzidu. V neposlední řadě, tak jako v předešlých pracích, se diskutuje využití agregátů jako možné nosiče pro cílenou distribuci léčiv.

Tato moje bakalářská práce lehce navazuje na práci diplomovou, kde se **Kamila Vašíčková** [49] zaměřuje na interakci směsí hyaluronanů o různé molekulové hmotnosti s tenzidem CTAB. V této práci byly zkoumány systémy o dvou molekulových hmotnostech hyaluronanů 17 kDa a 1,4 MDa s kationativním tenzidem CTAB s hydrofobním barvivem. Při interakci vznikaly částice podobné kuličkám, které měly různé velikosti a plavaly v roztoku. Celá tato diplomová práce se zabývá charakterizací podmínek, za kterých tyto částice vznikají, konkrétně za jakých koncentrací CTAB s použitím různých iontových síly.

3.3 Práce vytvořené mimo VUT Fakultu chemickou

Mimo fakultu byly sepsány další práce a články, které se zabývají podobnou problematikou. Jednou z prací se zabývali **Nicolas Duceppe a Maryam Tabrizian** [50]. Byly zkoumány faktory ovlivňující účinnost transfekce nanočástic chitosanu a kyseliny hyaluronové s velmi nízkou molekulovou hmotností. Tato práce popisuje nanočástice vyrobené z kyseliny hyaluronové jako nových potenciálních nosičů pro dodávání genů. Molekulové hmotnosti HA byly cíleně měněny pro získání částic v rozmezí 100nm. Ve výsledku byla použita molekulová hmotnost HA 64 kDa v poměru 1:4 s chitosanem s molekulovou hmotností 5 kDa. Snímky nanočástic pořízené v suchých podmínkách ukázaly sférické částice. Optimální pH pro transfekci se pohybovalo od 6,4 do 6,8 pro 0,25 µg plazmidu na jamku s inkubační dobou 4 hodiny. Za použití v těchto podmínkách se transferovalo 1 % buněk ve srovnání s 0,7 % získanými pro DNA za stejných podmínek. Ve výsledku lze říci, že tato vysoká transfekční účinnost genového systému může být zapříčiněna synergickým účinkem a nízkou nábojovou hustotou HA řetězce pro snadné uvolnění DNA, což činí vhodný systém pro cílené dodávání genů.

Ve své práci *Účinek různých molekulových hmotností hyaluronanu na fyziologii fagocytů* [51] se **Mgr. Daniela Viačková, PhD.** zabývala studiem účinků vysoce čištěného HA o přesně definované molekulové hmotnosti, které byly testovány na myších peritoneálních a plicních makrofágových buněčných liniích. Další část této práce byla zaměřena na hodnocení účinků různých molekulových hmotností HA na oxidativní vzplanutí lidských fagocytů. Aktivace lidských krevních fagocytů HA o různé molekulové hmotnosti byla detekována na základě produkce reaktivních kyslíkových metabolitů, v přítomnosti nebo nepřítomnosti lidského sérového albuminu nebo kolagenu pomocí metody s luminolem zesílené chemiluminiscence. Ve výsledku této práce bylo zjištěno, že v případě HA o různých molekulových hmotnostech, nemá nijak výrazný vliv na životnost buněk. Všechny testované molekulové hmotnosti HA, však většinou zvýšily spontánní produkci reaktivních kyslíkových metabolitů nezávisle na prostředí, ve kterém byly vzorky inkubovány.

V bakalářské práci, která byla publikovaná na Univerzitě v Pardubicích, se **Eva Příkopová** [52] věnovala spolu se syntézou derivátu kyseliny hyaluronové pomocí anhydridu kyseliny hexanové i studiu vlivu molekulové hmotnosti toho derivátu na jeho fyzikálně chemické vlastnosti pomocí vybraných analytických metod.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

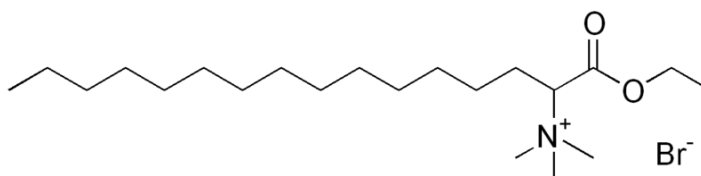
4.1 Cíl práce

Cílem mé bakalářské práce bylo připravit fyzikální gely kombinací roztoku tenzidu a hyaluronanu. Tyto gely namíchat v různých poměrech hyaluronanů při rozdílné molekulové hmotnosti a Septonexu. Na základě různých experimentů jednotlivě připravené fyzikální gely charakterizovat, a nakonec podrobit reologickému měření. Na závěr porovnat vlastnosti gelů s gely vytvořenými s jiným tenzidem (CTAB) a zhodnotit použitelnost či aplikovatelnost těchto systémů pro farmacii.

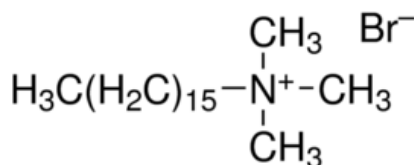
4.2 Použité chemikálie

Hyaluronan HyA $M_w=(15-30)$ kDa CPN spol. s. r. o., šarže 213-6481
HyA $M_w=(80-130)$ kDa CPN spol. s. r. o., šarže 260315-E2
HyA $M_w=(1500-1750)$ kDa CPN spol. s. r. o., šarže 160218-E1

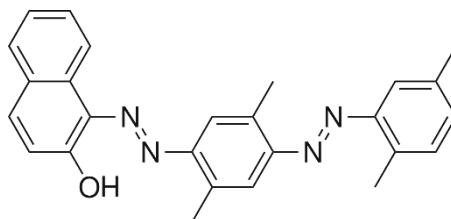
Tenzidy Septonex, karbethodecinium bromid, CAS: 511SEP003



CTAB, hexadecyltrimethylammonium bromid,
CAS: H5882-IKG



Hydrofobní barvivo Olejová červeň, oil red, 1-(2,5-dimethyl-4-/2,5-dimethylfenyl (fenyldiazenyl)azonaftalen-2-olu, CAS: 09755-1006



Rozpouštědla Aceton

Ostatní NaCl, chlorid sodný, ethanol

4.3 Použité metody

4.3.1 Příprava vzorků

4.3.1.1 Interakce nízkomolekulární i vysokomolekulární HyA s tenzidem

Byl připraven zásobní roztok tenzidu o koncentraci 200 mmol/l. Jako vhodný tenzid pro zkoumání interakcí s nízkomolekulární a vysokomolekulární HyA byl zvolen Septonex. Dále byly namíchány 2% zásobní roztoky HyA s molekulovou hmotností 15-30 kDa, 80-130 kDa a 1500-1750 kDa. Všechny zásobní roztoky byly minimálně přes noc ponechány na míchačce pro důkladné rozpuštění a rozmíchání všech roztoků. Po přípravě zásobních roztoků z nich byly namíchané jednotlivé směsi, ve kterých byl vždy použit Septonex v objemu 3 ml a pro další 3 ml 2% HyA se všemi molekulovými hmotnostmi. Jednotlivé namíchané vzorky byly ponechány přes noc na míchačce a byl pozorován vznikající hydrogel. Zásobní roztoky byly vyfotografovány.

4.3.1.2 Interakce směsí HyA s tenzidem

Byly použity zásobní roztoky 2% HyA, které byly namíchány při prvním experimentu. Pro směsi všech vzorků byly použity zásobní roztoky 2% HyA s molekulovou hmotností 15-30 kDa, 80-130 kDa a 1500-1750 kDa, které byly smíchány se zásobním roztokem Septonexu. Septonex byl do vzorku napipetován v objemu 3 ml, zbylé 3 ml vzorku byly napipetovány a namíchány v různých poměrech. Poměry byly následující: 50:50, 70:30, 30:70. Při míchání byl při všech vzorcích použit vysokomolekulární HyA, který byl doplněn HyA s nízkou nebo střední molekulovou hmotností.

Tabulka 1: Hodnoty objemů jednotlivých HyA při přípravě vzorků

	50:50	70:30	30:70
15-30 kDa	1,5 ml	2,1 ml	0,9 ml
1500-1750 kDa	1,5 ml	0,9 ml	2,1 ml
80-130 kDa	1,5 ml	2,1 ml	0,9 ml
1500-1750 kDa	1,5 ml	0,9 ml	2,1 ml

Po napipetování jednotlivých objemů příslušných poměrů do vzorků byly roztoky řádně zhomogenizovány a do druhého dne ponechány na míchačce. Vzorky byly následně popsány a vyfotografovány.

4.3.1.3 Interakce bez vnějšího zásahu

Při tomto experimentu byl postup přípravy stejný, jako při interakci směsí HyA s tenzidem. Podrobný popis je sepsán v odstavci 3.2.1.2. Jediným rozdílem bylo, že při přípravě nebyl použit žádný mechanický zásah. Vzorky tedy nebyly dokonale zhomogenizovány ani ponechány na míchačce. Během následujících hodin byly vzorky vyfotografovány.

4.3.1.4 Zahřívání, vysušování, ultrazvuk a míchání vzorků

Pro tento experiment byly použity vzorky, které jsem si připravila již dříve pro sledování interakcí HyA a Septonexu bez vnějšího zásahu. Pro další pokusy byly vzorky ponechány na míchačce alespoň 12 hodin. Z řady namíchaných vzorků byly dva ponechány v sušárně na 50

°C po dobu 24 hodin. Tyto vzorky byly poté vyfotografovány. Další dva vzorky z řady roztoků byly umístěny do ultrazvukové lázně při 30 °C po dobu 3 hodin a následně popsány. Poslední dva vzorky z řady roztoků byly míchány s různou intenzitou na míchačce, vortexu a při pozorování byly zapisovány změny. Vzorky byly následně vyfotografovány.

4.3.1.5 *Stabilita v NaCl a EtOH*

Byly připraveny vzorky HyA se Septonexem suchou cestou. Při přípravě byly jednotlivě naváženy, předem vypočítané navážky HyA spolu se Septonexem a chemikálie byly dobře zhomogenizovány.

Tabulka 2: Hodnoty navážek jednotlivých prášků HyA a Septonexu

	50:50	70:30	30:70
15-30 kDa	0,0317 g	0,0454 g	0,0194 g
1500-1750 kDa	0,0357 g	0,0184 g	0,0422 g
Septonex	0,2503 g	0,2533 g	0,2690 g
80-130 kDa	0,0294 g	0,0395 g	0,0194 g
1500-1750 kDa	0,0324 g	0,0186 g	0,0431 g
Septonex	0,2620 g	0,2699 g	0,2518 g

Po zhomogenizování jednotlivých prášků byl přidán do vialky roztok NaCl o koncentraci 0,15 M v objemu 6 ml. Tyto vzorky byly ponechány na míchačce po dobu 24 hodin a připraveny tak pro další experiment. Po přípravě těchto vzorků jsem pozorovala stabilitu vzniklého gelu v NaCl a EtOH. Jako nejdříve bylo ze 4 roztoků ve vialkách odlité veškeré množství NaCl a následně dolito novým NaCl o stejné, původní koncentraci. Byly pozorovány a popsány změny gelu v čerstvém NaCl a vzorky vyfotografovány.

U zbylých 2 vzorků byla pozorována stabilita v EtOH, tak, že byl do vialky s gely, byl přidán 1 ml ethanolu. Byly pozorovány změny a vzorky následně vyfotografovány.

4.3.1.6 *Difuze barviva při interakci gelů o různé molekulové hmotnosti*

Byly připraveny 4 vzorky vysokomolekulárního hydrogelu napipetováním přibližně 3 ml 1500-1750 kDa 2% HyA z připraveného zásobního roztoku v předchozím experimentu a 3 ml Septonexu ze zásobního roztoku. Tyto 4 vzorky byly ponechány na míchačce po dobu 24 hodin.

Dále byl připravený zásobní roztok olejové červeně o koncentraci $5 \cdot 10^{-6}$ M. Navážka olejové červeně o hmotnosti 0,1221 g byla převedena do zásobní láhve o velikosti 100 ml a byla doplněna 60 ml Acetonem. Barvivo s rozpouštědlem bylo dokonale zhomogenizováno. Připravený roztok s olejovou červení byl napipetován do vialek po 60 μ l, aby byla výsledná koncentrace $5 \cdot 10^{-6}$ M, tak jako v zásobním roztoku. Z barviva byl odpařen aceton po dobu 1 dne. Po odpaření rozpouštědla zůstalo ve vialce pouze barvivo, ke kterému byl napipetován Septonex o objemu 3 ml. Tyto vzorky byly umístěny do ultrazvukové lázně na 15 min s teplotou 30 °C pro dokonalou solubilizaci barviva do zásobního roztoku tenzidu. Nakonec byla do vzorků napipetována směs HyA v poměrech 70:30 a 30:70, kdy první díl HyA vždy odpovídal molekulové hmotnosti o 15-30 kDa a druhý díl odpovídal HyA o molekulové hmotnosti 1500-1750 kDa. Tyto vzorky byly ponechány na míchačce po dobu minimálně 24 hodin a spolu s neobarvenými vzorky následně vyfotografovány.



Obrázek 12: Připravené neobarvené gely z vysokomolekulární HyA a obarvené gely olejovou červení o konc. $5 \cdot 10^{-6}$ M s různými poměry HyA

Vzniklé gely byly na sebe navrstveny do zkumavek tak, že vždy obarvený gel olejovou červení byl uprostřed mezi vrstvami vysokomolekulárních gelů. Byla pozorována difundace obarvených gelů do gelů neobarvených. Veškeré změny byly zaznamenávány a zkumavky po časovém intervalu jednoho týdne fotografovány.

4.3.1.7 Reologie

Byly připraveny 2 zásobní roztoky tenzidů. Prvním byl zásobní roztok Septonexu o koncentraci 200 mmol/l, který byl připraven smícháním 100 ml 0,15 M NaCl s navázkou 8,45 g prášku Septonexu a druhý byl zásobní roztok CTAB o stejné koncentraci, který vznikl smícháním 100 ml 0,15 M NaCl spolu s navázkou 7,29 g prášku CTAB. Dále byly připraveny zásobní roztoky 2% HyA s molekulovou hmotností 15-30 kDa a 1500-1750 kDa. Tyto všechny zásobní roztoky byly umístěny na míchačku a po dobu 24 hodin intenzivně míchány.

Pomocí těchto zásobních roztoků byly namíchané vzorky vždy o přesném objemu jednotlivých zásobních roztoků zaznamenané do tabulky 3 a 4 a následně vyfotografovány.

Tabulka 3: Hodnoty objemů jednotlivých HyA při přípravě vzorků se Septonexem

	1	2	3	4	5
Poměr HyA			50:50	30:70	70:30
Nízkomolekulární	3 ml	-	1,5 ml	0,9 ml	2,1 ml
Vysokomolekulární	-	3 ml	1,5 ml	2,1 ml	0,9 ml
Septonex	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml

Tabulka 4: Hodnoty objemů jednotlivých HyA při přípravě vzorků s CTAB

	1	2	3	4	5
Poměr HyA			50:50	30:70	70:30
Nízkomolekulární	3 ml	-	1,5 ml	0,9 ml	2,1 ml
Vysokomolekulární	-	3 ml	1,5 ml	2,1 ml	0,9 ml
CTAB	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml



Obrázek 13: Jednotlivé vzorky ze zásobních roztoků Septonexu a CTAB pro reologické měření

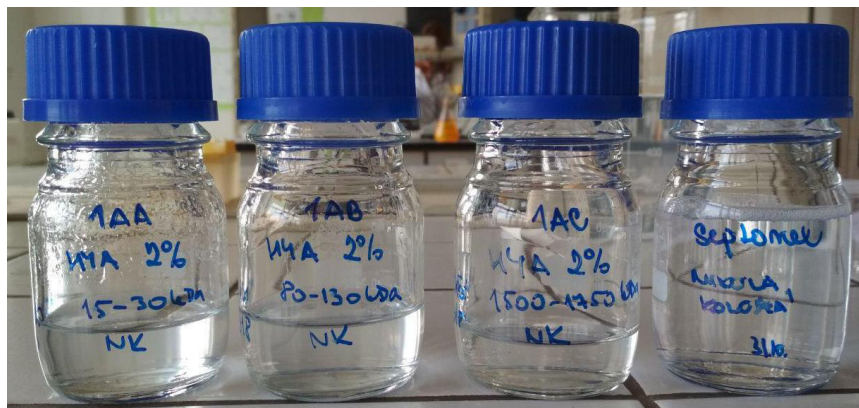
Veškeré namíchané vzorky byly podrobeny reologickému měření.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Interakce nízkomolekulární i vysokomolekulární HyA s tenzidem

Na Obr. 14 jsou vyfotografované zásobní roztoky 2% HyA a Septonexu v roztoku NaCl, které byly dále použity při experimentu, ze kterého vznikal hydrogel. Vzorky vznikly mícháním jednotlivých HyA a Septonexu a to vždy v poměru 1:1 ve výsledném poměru 6 ml.

Zásobní roztoky HyA mají odlišné molekulové hmotnosti (15-30kDa, 80-130kDa a 1500-1700kDa).



Obrázek 14: Jednotlivé zásobní roztoky 2% HyA o různé molekulové hmotnosti a zásobní roztok Septonexu o koncentraci 200mmol/l

5.2 Interakce směsí HyA s tenzidem

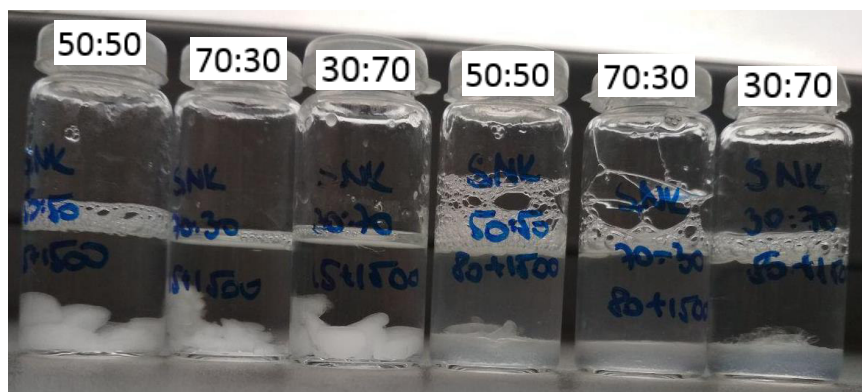
Při interakci směsí HyA s tenzidem byl pozorován vznik hydrogelu. Tyto hydrogely vznikaly mícháním různých poměrů 2% HyA ze zásobních roztoků o různých molekulových hmotnostech. Vznikaly jasně viditelné částice různých tvarů, které se pohybovaly na dně vialky v roztoku. Veškeré vzorky, které vznikly touto interakcí, jsou vyobrazeny na Obr. 15.

Na pohled je zřejmé, že se částice liší nejen svým tvarem ale i svojí velikostí. Tyto odlišnosti jsou založeny na závislosti různých poměrů vysokomolekulární a nízkomolekulární HyA při míchání těchto vzorků. Smícháním vysokomolekulární a nízkomolekulární HyA v poměru 70:30, kde byla převážně zastoupená HyA o molekulové hmotnosti 15-30 kDa, vznikaly částice, které měly dle mého odhadu nejmenší průměr a při pokusu o homogenizaci těchto částic šli tak nejlépe rozmíchat do roztoku. Naopak u opačného poměru 30:70, při převážném zastoupení HyA o molekulové hmotnosti 1500-1750 kDa, vznikaly částice s největším průměrem, které zaujmul největší plochu na dně roztoku, oproti vzorkům s jinými poměry. Při snaze o rozbití částic s větším poměrem to nebylo snadné, avšak při intenzivním míchání a třepání se částice rozbijí na částice o menším poloměru.

V případě interakcí středně molekulární s vysokomolekulární HyA se částice začínají slévat do jedné vrstvy, která je usazená na dně vialky. Není tedy možné dokonale rozeznat jednotlivé částice pouhým okem. Při větší frekvenci míchání se částice postupně uvolňují v malé míře, ale především se vrstva gelu odlepí ode dna vialky a zaujme tvar velké hydrogelové kuličky. Částice vytvořené z jednotlivých HyA 30:70, kde je ve většině zastoupený středně molekulový

HyA, oproti vysokomolekulovému, mají uvolněné částice, při snaze o rozbití, nejmenší průměr. Naopak u poměru 70:30, který obsahuje více vysokomolekulární HyA, nejsou jednotlivé, uvolněné částice příliš viditelné. Nelze tedy s jistotou říci, zda tyto uvolněné částice mají větší průměr, jsou však méně ochotny homogenizovat.

Částice, které se tvoří v jednotlivých vzorcích, by se daly přiřadit ke tvaru kuličky, nebo perličky. Věřím, že by mohly zaujmout i jiné tvary, ale vlivem stálého míchání, při stejných otáčkách, dochází ke tvorbě částic, právě podobné pecičkám či kuličkám.

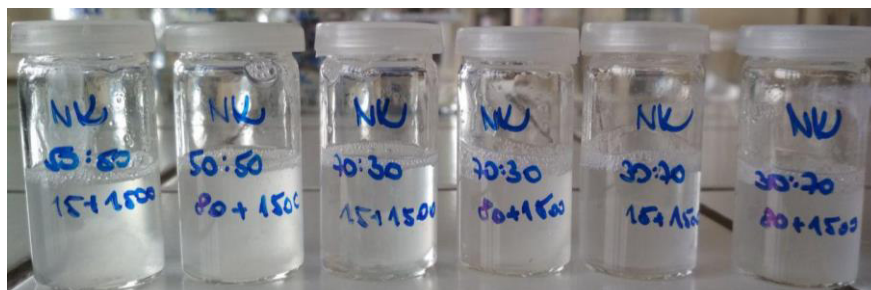


Obrázek 15: Řada vzorků, které byly připraveny mícháním různých poměrů HyA ze zásobních roztoků spolu se Septonexem o koncentraci 200 mmol/l

První tři vialky obsahují 2% HyA s molekulovou hmotností 15-30 kDa s 1500-1750 kDa
 Další tři vialky obsahují 2 % HyA s molekulovou hmotností 80-130 kDa a 1500-1750 kDa

5.3 Interakce bez vnějšího zásahu

Na Obr. 16 je možné vidět experimentální řadu, které byly připravené ze zásobních roztoků při různých poměrech a zároveň z různých molekulových hmotností 2% HyA se zásobním roztokem Septonexu 200mmol/l. Po napipetování přesných dílů roztoků do konečného objemu 6 ml byly tyto vzorky vytografovány. Je tedy možné pozorovat vznikající gel ještě před umístěním na míchačku či jiného mechanického zásahu. Tyto jednotlivé vzorky jsou lehce zakalené a vysokomolekulární hyaluronan s molekulovou hmotnosti 1500-1750 kDa se usazuje na dně vialky. Vznikající hydrogel se tedy pohybuje u dna ve vzorku a tvarem připomíná nepravidelné částice.



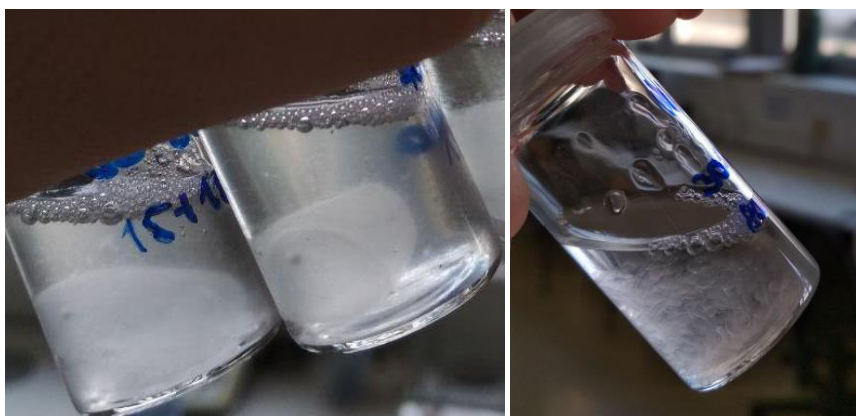
Obrázek 16: Řada vzorků se směsí 2% HyA a Septonexu bez mechanického zásahu

5.4 Zahřívání, vysušování, ultrazvuk a míchání vzorků

Vzorky s hydrogelem připravené pro experiment bez vnějšího zásahu, byly následně ponechány 24 hodin na míchačce a použity pro další experimenty. Jako první byly 2 vzorky umístěny do sušárny při 50 °C po dobu 24 hodin. Vzorky po vytažení ze sušárny změnil viskozitu a staly se tak více tekutými. U těchto stejných vzorků byla slitá kapalina nad hydrogelem a znova umístěny do sušárny při stejných podmínkách. Tyto vzorky byly v sušárně ponechány dalších 24 hodin a po vytažení popsány. Na dně vialky, kde byl původně hydrogel, vznikala vrstva částečně popraskaného xerogelu, který se po přidání roztoku opět změnil na hydrogel.

Při zahřívání další 2 vzorků se roztoky zakonzcentrovali a spolu s tím vznikala i méně tekoucí gel. Tyto vlastnosti měl gel i po zchlazení roztoku.

Další 2 vzorky posloužily k experimentu v ultrazvukové lázni při 30 °C po dobu 3 hodin, po které byly vloženy na míchačku, kde se alespoň po dobu 12 hodin míchaly a homogenizovaly. Po vytažení vzorků z míchačky byly roztoky vyfotografovány. Na Obr. 17 je možné vidět vznikající částice, které byly rozbity právě díky ultrazvuku a intenzivního míchání.



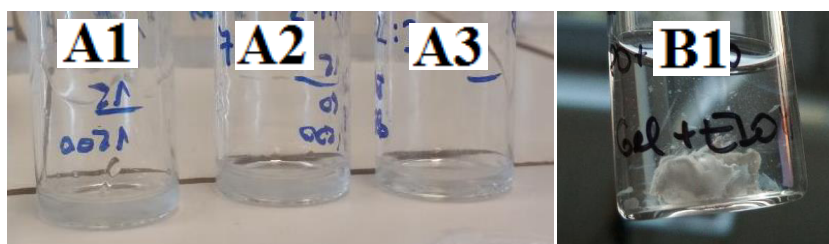
Obrázek 17: Vzorky hydrogelů po 24 hodin v sušárně při 50 °C a vzorek po intenzivním míchání na míchačce

5.5 Stabilita gelu v NaCl a EtOH

Na Obr. 18 je na dně vialky možné vidět gel, který vznikl smícháním zásobního roztoku 2% HyA a Septonexu po 24 hodin na míchačce. Následně byla označena výška hladiny, vzniklý roztok nad gelem byl slit do kádinky a vzorky vyfotografovány. Jako další bylo na vzniklý gel nalit nový roztok NaCl po označenou risku a vzorek byl ponechán 24 hodin na míchačce. Další den byly pozorovány změny gelu v čerstvém roztoku NaCl. Stabilita vzniklého gelu v čerstvém roztoku nebyla nijak zvlášť ovlivněna. Množství gelu odpovídalo objemu před i po přidání čerstvého NaCl. Jediná viditelná změna byla v tuhosti gelu. V případě gelu, ke kterému byl přidán nový roztok NaCl a byl míchán po dobu 24 hodin, byl tužší a více se trhal. Gely jsem pozorovala pouhým okem a na gel, který byl smíchán s čerstvým roztokem NaCl bylo potřeba vynaložit méně síly k tomu, aby došlo k rozthnutí či oddělení menších částic pomocí pinzety.

V další vialce byla provedena zkouška stability gelu v roztoku ethanolu. Nejdříve byla označena hladina roztoku a roztok nad gelem byl slit. Dále byl doplněn ethanol po vyznačenou

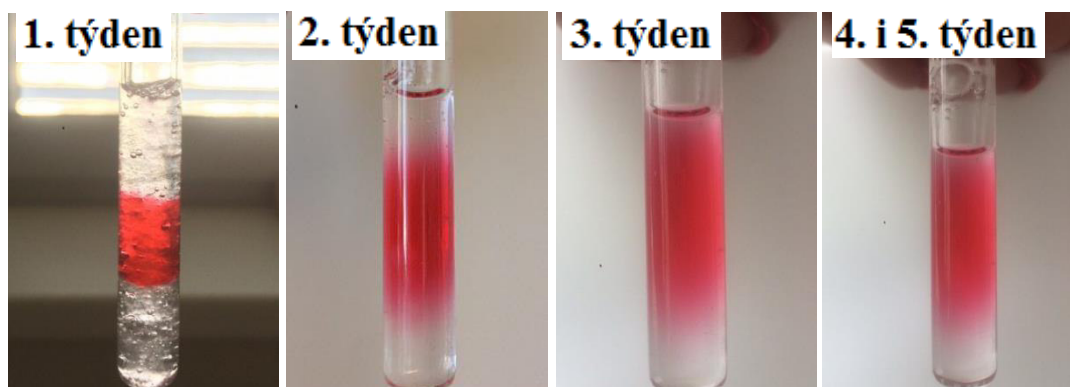
risku a během chvilky se hydrogel srazil a z průhledného gelu byly vytvořeny bílé sraženiny. Tyto sraženiny byly velmi tuhé a viskozitou nepřipomínaly gel ani trošku. V případě snahy o oddělení části sraženiny se naopak hmota velmi táhla.



Obrázek 18: Vzorky označené A1, A2, A3 při experimentu po odlití veškerého roztoku nad gelem a vzorek B1 při experimentu srážení s EtOH

5.6 Difuze barviva při interakci gelů o různé molekulové hmotnosti

Při tomto experimentu byla pozorována difuze barviva v obarveném gelu olejovou červení, který byl připraven smícháním Septonexu a 2% HyA při poměru 70:30, kde byla převážně zastoupena molekulová hmotnost 1500-1750 kDa a zbytek zastoupené molekulové hmotnosti 15-30 kDa. Čirý gel byl připraven pouze z molekulové hmotnosti 1500-1750 kDa. V první části Obr. 19 je možné vidět, jak byly jednotlivé gely na sebe navrstveny do zkumavky o průměru 0,9 cm, kdy přibližná hodnota tloušťky vrstvy obarveného gelu byla 1,5 cm a celková výška všech gelů 5 cm. Zkumavku byla umístěna do stojanu a po dobu pěti týdnů probíhala samovolná difuze. Tato zkumavka byla každý týden fotografována a byly pozorovány její změny, které je možné vidět na dalších částech fotografie.



Obrázek 19: Zkumavka při zkoumání schopnosti difundace jednotlivých gelů fotografována každý týden v průběhu 5ti týdnů.

Jak je možné vidět na první fotografii, pořízené v 1. týdnu, ihned po přenesení gelů do zkumavky, rozhraní mezi jednotlivými gely bylo velmi dobře viditelné. Nežádoucím vlivem byl však fakt, že při dávkování jednotlivých gelů do zkumavky, vznikaly vzduchové bubliny, které mohly experiment znehodnotit a mít tak negativní dopad na difuzi. Jelikož se jedná o experiment, který můžeme zhodnotit pouze vlastním okem, bez jakéhokoliv měření, je z fotografií pořízených v dalších týdnech jasné, že barvivo difundovalo do vysokomolekulárního bezbarvého gelu. K tomuto ději mohly přispět právě vzniklé bubliny, které mohly mít tendenci

vzlína k povrchu a tím tak promíchat jednotlivé gely. Další možnost, jak vysvětlil děj ve zkumavce, mohla být různá hustota gelů. Jelikož byly bezbarvé gely připravené pouze z vysokomolekulárního gelu, jejich hustota mohla být vyšší. Tento bezbarvý gel se proto mohl držet u dna zkumavky, aniž by došlo ke smíchání s barvivem. Naopak vrstva neobarveného gelu, umístěná nad barevným gelem, mohla mít tendenci klesat a proto mohlo dojít k obarvení a rozmíchání barevného gelu.

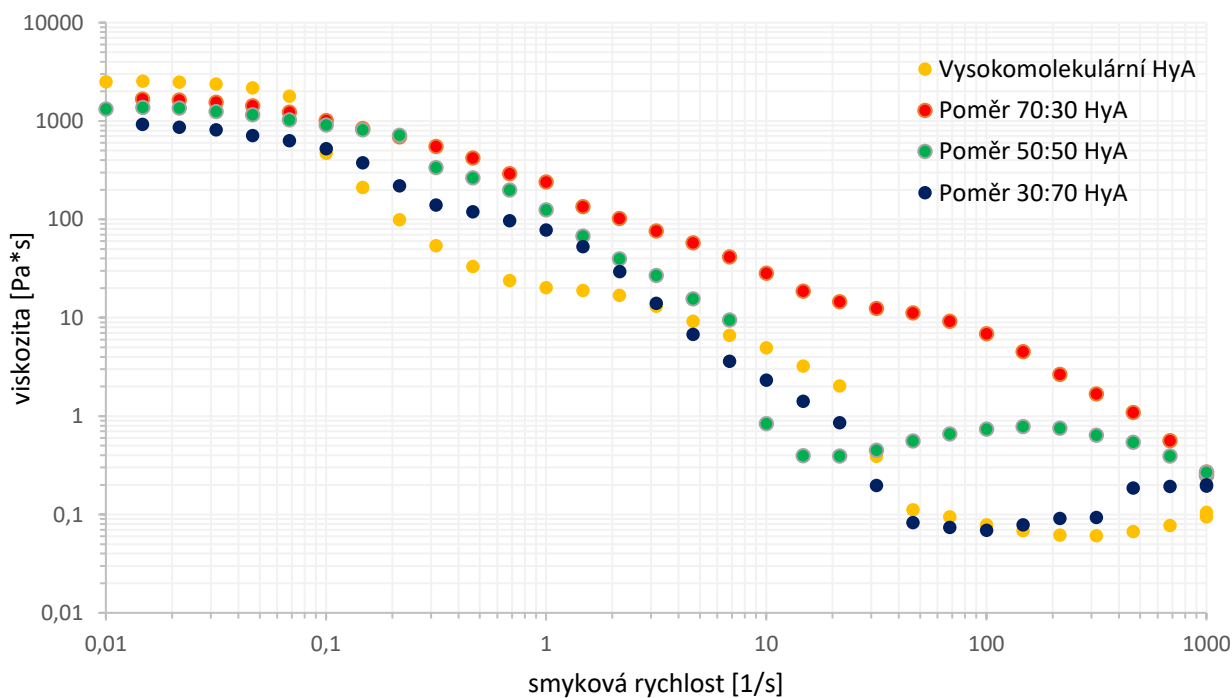
Ve výsledku je možné říci, že při tomto experimentu nelze dokonale zhodnotit difuzi barviva v gelech o různých molekulových hmotnostech. Při dalším experimentu tohoto typu, bych příště doporučila lépe vyřešit dávkování, aby se předešlo velkému množství unikajících vzduchových bublin a následnému promíchání ve zkumavce.

5.7 Reologie

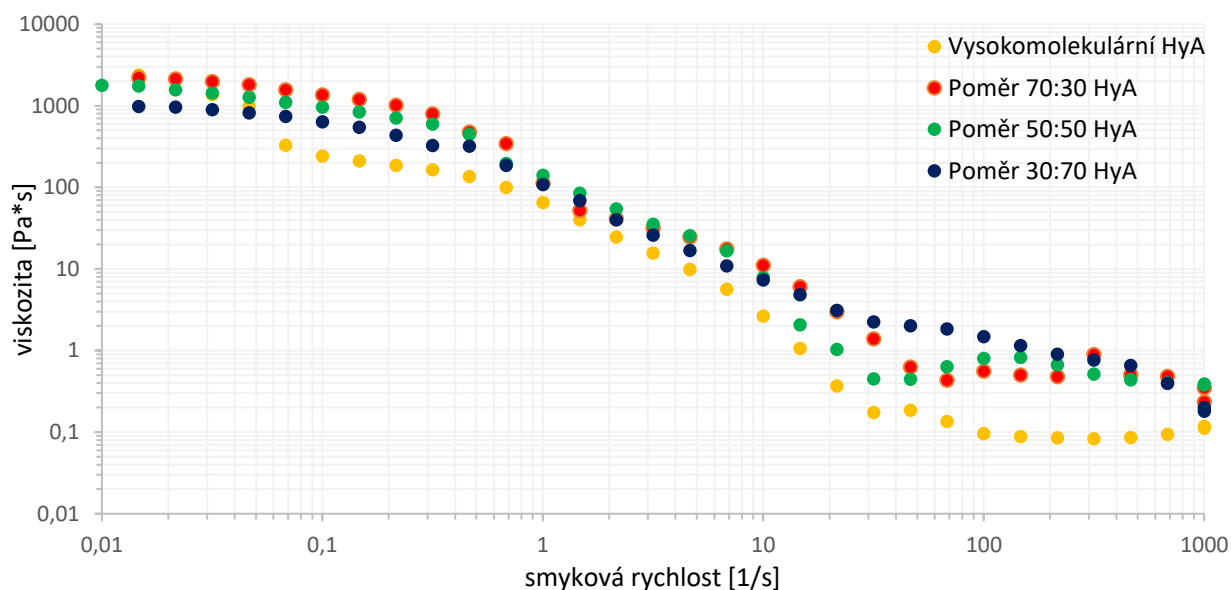
Při reologickém měření byl použitý přístroj reometr ARG2. Reometr obsahuje vhodný otáčející rotující senzor, u kterého je možná volba vhodné geometrie. V mém případě se jednalo o geometrii 8 mm deska-deska. Pomocí této geometrie a nastavené síly, kterou reometr vynaloží, bylo možné změřit specifické vlastnosti vzorků, které byly vyneseny do grafů a následně popsány.

5.7.1 Tokové křivky

V prvním případě byla měřena závislost viskozity na smykové rychlosti. Toto měření bylo nastavené na typ testu „Steady state flow“ v logaritmickém měřítku, při teplotě 25 °C a rozsahu od 0,01 do 1000 příslušných jednotek.



Obrázek 20: Závislost viskozity na smykové rychlosti pro vzorky, které byly připraveny ze zásobního roztoku Septonexu, určitého podílu vysokomolekulární 2% HyA se zvyšujícím se podílem nízkomolekulární 2% HyA



Obrázek 21: Závislost viskozity na smykové rychlosti pro vzorky, které byly připraveny ze zásobního roztoku CTAB, určitého podílu vysokomolekulární 2% HyA se zvyšujícím se podílem nízkomolekulární 2% HyA

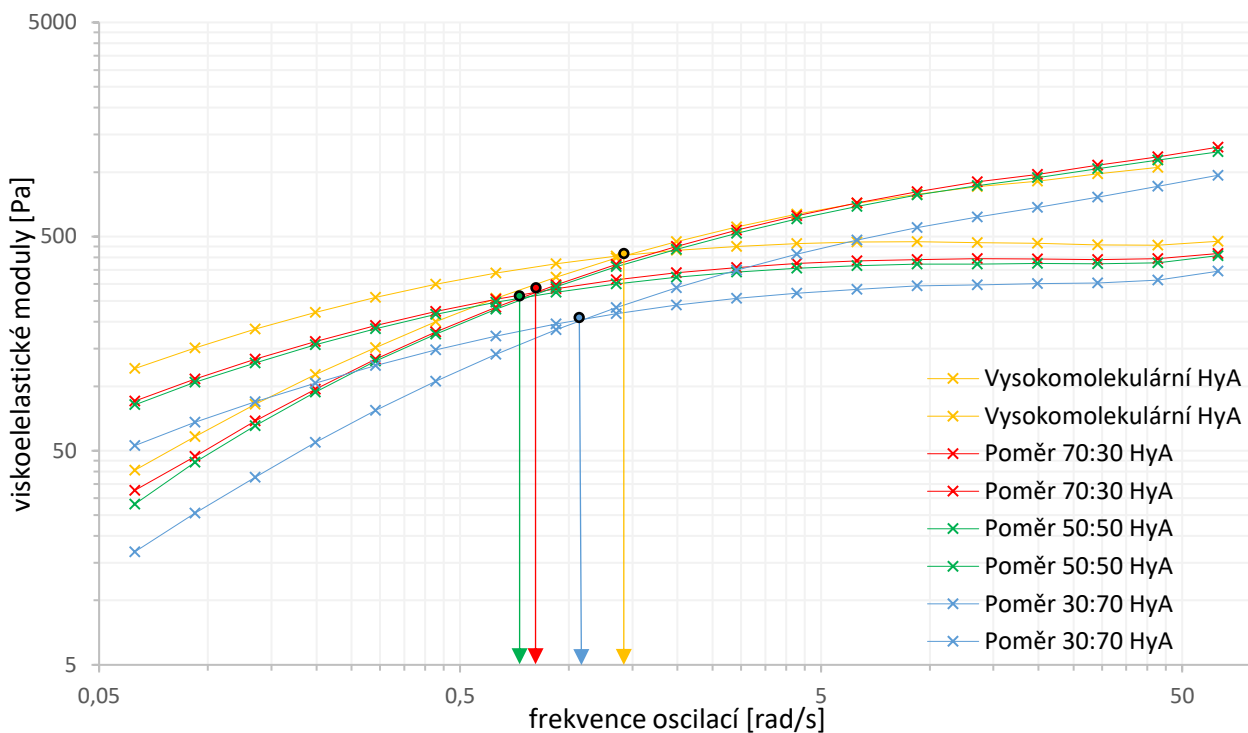
K reologickému měření byly použity vzorky vzniklé smícháním tenzidu a různých molekulových hmotností hyaluronanu. Měřilo se celkem 8 vzorků ve 2 různých řadách. V první řadě byly vzorky připraveny se Septonexem a v druhé řadě, byly totožným postupem připraveny vzorky s CTAB. Vzorky byly připraveny s klesajícím poměrem molekulové hmotnosti 1500-1750 kDa. V prvním měřeném vzorku byl tedy pouze vysokomolekulární gel a poslední vzorek obsahoval poměr 30:70, kde převažovala molekulová hmotnost HyA 15-30 kDa. Ve dvou řadách s tenzidy byl připraven i gel, kde byla zastoupena pouze nízká molekulární hmotnost. V tomto případě však nedošlo k vytvoření gelu a nebylo tak možné ho měřit.

Jednotlivé tokové křivky, v Grafu 1 a 2, znázorňují charakter všech vzorků, především charakterizují viskozitu při určité smykové rychlosti. U změřených vzorků jsou v případě nízkých hodnot smykové rychlosti hodnoty viskozity vysoké a v podstatě lineární. Tyto kapaliny můžeme charakterizovat jako newtonské. Nárůstem smykové rychlosti viskozita značně padá u každého vzorku až do fáze, kdy se hodnoty smykové rychlosti blíží tisíci, kde nastává opět konstantní oblast, při nízké viskozitě. Ke konci tedy také vykazují newtonský charakter.

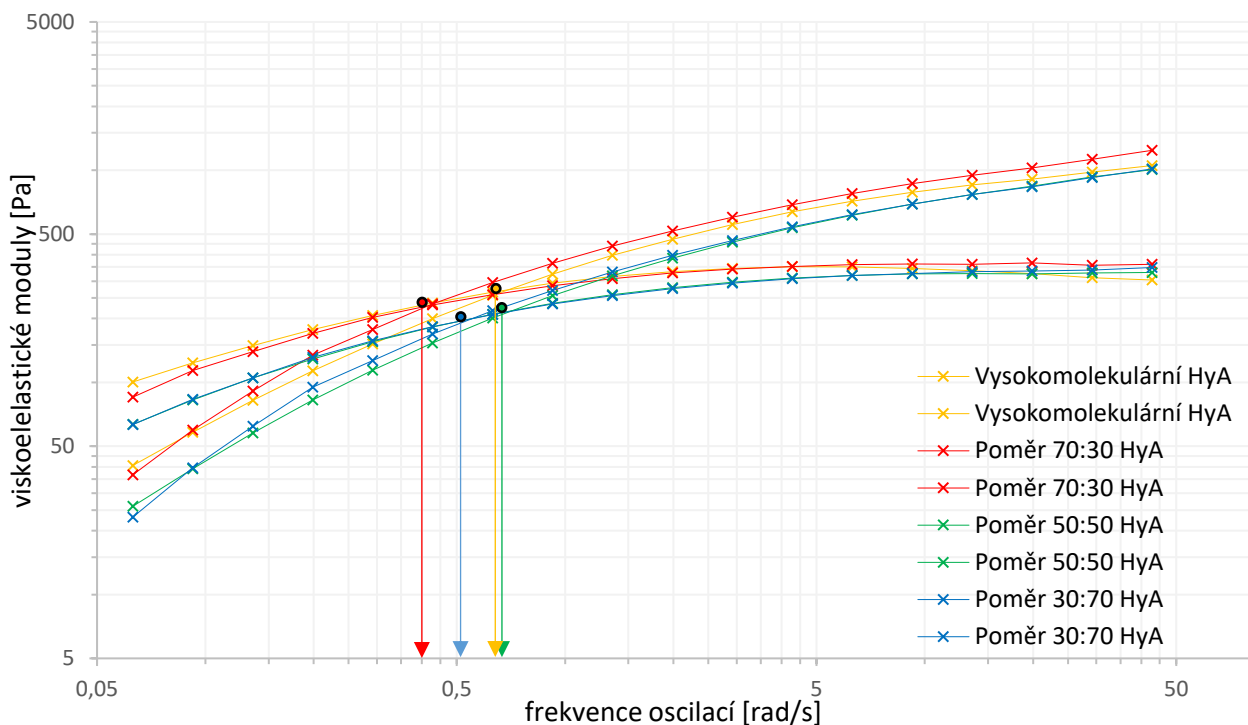
Pro porovnání křivek u vzorků se Septonexem je nepatrná odlišnost a dochází k větším výkyvům oproti vzorkům s CTAB. Vzorky se Septonexem se tedy zdají nápaditější. Z mého pohledu jsou změny velmi nepatrné a mezi vzorky se Septonexem a vzorky s CTAB není velký rozdíl. Avšak výsledky musíme zohlednit z důvodu 1 měření, které nebylo opakováno. Pro větší přesnost výsledků bychom museli vzorky několikrát za sebou přeměřovat, to však nebylo možné, nejen z důvodu časového vytížení reometru na fakultě.

5.7.2 Modulové křivky

Jako další byla změřena závislost viskoelastického modulu na frekvenci oscilací. Toto měření bylo nastavené na typ testu Frequency sweep v logaritmickém měřítku při teplotě 25 °C a rozsahu příslušných jednotek od 0,01 do 100. Jako strain-sweep byla nastavena hodnota 8.



Obrázek 22: Závislost viskoelastických modulů na frekvenci oscilací pro vzorky gelů, které byly připraveny ze zásobního roztoku Septonexu, určitého podílu vysokomolekulární 2% HyA se zvyšujícím se podílem nízkomolekulární 2% HyA



Obrázek 23: Závislost viskoelastických modulů na frekvenci oscilací pro vzorky gelů, které byly připraveny ze zásobního roztoku CTAB, určitého podílu vysokomolekulární 2% HyA se zvyšujícím se podílem nízkomolekulární 2% HyA

Chování látek lze také popsat pomocí modulových křivek. Pro tyto křivky je charakteristický bod, který vzniká překřížením modulů. Tento bod se označuje jako „cross-over“ a vzniká po změření závislosti elastického a viskózního modulu na frekvenci oscilací. Je tedy zřejmé, že tento bod vzniká protnutím křivky viskózního modulu a křivky elastického modulu. Právě v tomto bodě dochází k rovnováze mezi moduly a tento stav lze charakterizovat jako $G''=G'$.

Obecně lze říci, že při nižší frekvenci oscilací se hodnoty modulů pohybují v nižším rozsahu a vykazují viskózní charakter, tedy platí $G''>G'$. Naopak při vyšších hodnotách frekvence oscilace jsou hodnoty viskózního modulu stoupající, vykazují elastický charakter a platí $G''<G'$.

V mém případě lze vzorky charakterizovat podobně. Jsou tedy před cross-over bodem jako viskózní látky, kde se projevuje ztrátový modul, a naopak v další části se projevuje ten elastický. Pro představu, vzorek se Septonexem a vysokomolekulární HyA měl hodnotu cross-overu 0,64 jednotek, vzorek připravený ze Septonexu a poměru 50:50 nízkomolekulárního a vysokomolekulárního Hya, měl hodnotu o něco vyšší: 0,64 jednotek. V případě vzorku Septonexu a poměru 70:30 hyaluronanů byla hodnota nejnižší: 0,41 jednotek. U vzorků připravených z CTAB byly hodnoty cross-overu o něco vyšší. Příkladem je vzorek připravený z CTAB a poměru 50:50 nízkomolekulárního a vysokomolekulárního Hya, jeho hodnota činí 0,72 jednotek. V případě vzorku CTAB a poměru 70:30 hyaluronanů byla hodnota 0,83 jednotek. Vysokomolekulární hyaluronan s CTAB měl naopak ze všech hodnotu nejvyšší, a to 1,4 jednotek. Ve výsledku lze říci, že mezi hodnotami jsou pouze malé rozdíly a je tam možné vidět jistou podobnost.

6 ZÁVĚR

Stanovené cíle této bakalářské práce byly splněny. Cílem práce bylo navrhnout různé kombinace molekulových hmotností hyaluronanu vhodných pro interakce s kladně nabitým Septonexem, na základě interakcí charakterizovat připravené fyzikální gely a zhodnotit jejich využití a aplikovatelnost systému ve farmacii. Nejprve byla provedena literární rešerše na toto téma, kde bylo zjištěno, že v případě problematiky interakce hyaluronan-tenzid se zabývá velké množství prací, avšak u kombinací různých molekulových hmotností hyaluronanu s tenzidy nikoliv. V druhé části jsem se seznámila s veškerou použitou metodikou při této práci.

Jako počáteční experiment byla provedena základní příprava gelů, aniž by byly zkombinovány molekulové hmotnosti hyaluronanu. Byla připravena řada vzorků ze zásobních roztoků Septonexu a HyA mokrou cestou a řada stejných vzorků připravena suchou cestou pomocí Septonexu a HyA v sypkém stavu. Další experimenty byly založené na přípravě vzorků při různých poměrech různých molekulových hmotností. Nejčastěji však byly vzorky namíchané v poměrech 50:50, 70:30, 30:70 z vysokomolekulární a nízkomolekulární HyA. Použité molekulové hmotnosti byly 15-30 kDa, 80-130 kDa a 1500-1750 kDa.

Připravené řady vzorků byly podrobeny různým technikám a experimentům, které sloužily k bližší charakterizaci těchto systémů.

V případě vzorků, vznikajících z různých poměrů při různých molekulových hmotnostech, vznikají částice, které se velmi podobají nepravidelným perličkám či kuličkám, které však neměly stálý tvar a při delším stání se slévaly do jedné gelové vrstvy. Tyto vzniklé částice byly pozorovány a byl zjišťován vliv různých poměrů vysokomolekulární a nízkomolekulární HyA při přípravě.

Jeden z experimentů byla interakce gelů bez vnějšího zásahu, kde byl pozorován především vznik těchto částic a popsán jejich vzhled. U vzorků, které byly připraveny pouze z nízkomolekulární HyA a Septonexu nevznikal žádný gel, ale pouze čirý roztok. Naopak u vzorků s vysokomolekulární HyA vznikal gel, který hůře tekla, netvořil žádné perličky, ale zaujímal prostor po celém dnu vialky. V řadě s HyA o molekulové hmotnosti 15-30 kDa a 1500-1750 kDa vznikaly lépe viditelné perličky, které i po chvilkovém stání byly velmi dobře rozeznatelné a slévaly se až po delší době, opakem však byla řada připravená s HyA o molekulové hmotnosti 80-150 kDa a 1500-1850 kDa. U těchto dvou molekulových hmotností vznikaly též částice podobné perličkám, avšak po chvilkovém stání v klidu se částice slévaly do jedné gelové vrstvy. Takto popsané řady jsou vyfoceny na Obr. 16. Je nutné však podotknout, že perličky, které byly vytvořeny v poměru 70:30, kde byla převážně zastoupena molekulová hmotnost HyA 15-30 kDa oproti 1500-1750 kDa, vznikaly dle mého odhadu s nejmenším průměrem. Naopak perličky v opačném zastoupení se tvořily s největším průměrem.

Při dalších experimentech perliček bylo zkoumáno především jejich chování při různých mechanických a fyzikálních silách, které na ně působily a také jejich stabilita v různých roztocích. Bylo zkoumáno chování gelů a jejich částic při zvyšující se teplotě, v ultrazvuku při 30 °C nebo při různých otáčkách při míchání. Výsledkem těchto zásahů na vytvořené perličky byl pouze fakt, že zahřívání vedlo ke snížení viskozity gelů. Jinak nevznikal žádný viditelný

rozdíl. Co se stability týče, chování gelu v novém roztoku NaCl docházelo pouze k mírnému zvyšování viskozity jednotlivých částic v roztoku a ke zhoršení stavu tuhosti. V případě přidání roztoku EtOH docházelo k úplnému vysrážení gelu a vznikala bílá sraženina.

Jeden z experimentů byl věnován sledování difuze barviva gelů při různých molekulových hmotnostech. Pro lepší viditelnost difuze, byl jeden z gelů namícháním v poměru 70:30 s vysokomolekulární a nízkomolekulární HyA a obarven hydrofilním barvivem, olejovou červení. Spolu s obarveným gelem byl připraven gel smícháním vysokomolekulární HyA se Septonexem. Připravené gely byly na sebe navrstveny tak, že obarvený gel byl uprostřed mezi vrstvami neobarveného gelu. Po dobu pěti týdnů byla sledována samovolná difuze barviva. Po každém týdnu byla zkumavka s gely vyfotografována a popsána u Obr. 19. Výsledkem byla částečná difuze, která mohla být způsobena především vznikem bublin při dávkování jednotlivých vrstev gelů. Vlivem unikání bublin k povrchu však mohl být tento experiment znehodnocen.

Posledním experimentem bylo reologické měření, které sloužilo nejen ke charakterizaci systémů, ale také k porovnání rozdílů mezi vzorky připravené se Septonexem a vzorky připravené s CTAB. Byly připraveny 2 řady roztoků se vzrůstajícím obsahem nízkomolekulární HyA. Jedna řada vzorků byla připravena s tenzidem Septonexem a druhá řada s tenzidem CTAB. Takto připraveným vzorkům gelů za stejných podmínek byla měřena závislost viskozity na smykové rychlosti. Další měřená závislost byla závislost viskoelastického modulu na frekvenci oscilací a závislost viskoelastických modulů na amplitudě deformace. Výsledkem měření byly tokové křivky, které popisují viskozitu při určité smykové rychlosti a lze tak charakterizovat, zda se jedná o newtonské či neneutonské kapaliny. Naopak modulové křivky nám popisují viskózní nebo elastický charakter jednotlivých vzorků a překřížením křivek nám vzniká bod, zvaný cross-over, který značí protnutím křivky viskózního modulu a křivky elastického modulu. Veškeré tyto změřené závislosti byly vyneseny do grafů a v kapitole 5.7. náležitě popsány. Pro porovnání závislostí je ale zřejmé, že se tyto systémy od sebe neliší ve velké míře a lze říci, že si jsou podobné. Během vyhodnocování bylo však nutné zohlednit chybu v měření z důvodu malého počtu opakovaných měření, které nebylo možné provést z důvodu vytížení reometru a také proto, že bylo připraveno menší množství gelu.

Závěrem je možné říct, že se jedná o heterogenní systémy, které jsou velmi složité na charakterizaci. Každý gel vytvořený smícháním různých poměrů různých molekulových hmotností má odlišné vlastnosti. Těmito vlastnostmi může být různá viskozita, tvorba různých velikých částic v roztoku, schopnost částic se slévat do jedné vrstvy, ale i rozdílná vodivost. Je tedy zřejmé, že kombinací různých poměrů a molekulových hmotností se dají ovlivnit fyzikální a chemické vlastnosti vzniklého gelu. Věřím, že tento jev je velmi přínosným pro další výzkum těchto systémů, který by mohl mít příznivé účinky pro aplikovatelnost léčiv pro člověka.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] AKHTAR, Muhammad Faheem, Muhammad HANIF a Nazar Muhammad RANJHA. Methods of synthesis of hydrogels ... A review. *Saudi Pharmaceutical Journal* [online]. 2016, **24**(5), 554-559 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1016/j.jsps.2015.03.022. ISSN 13190164. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1319016415000857>
- [2] WALLEVIK, Olafur H., Dimitri FEYS, Jon E. WALLEVIK a Kamal H. KHAYAT. Avoiding inaccurate interpretations of rheological measurements for cement-based materials. *Cement and Concrete Research* [online]. 2015, **78**, 100-109 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1016/j.cemconres.2015.05.003. ISSN 00088846. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000888461500126X>
- [3] KLOXIN, April M., Christopher J. KLOXIN, Christopher N. BOWMAN a Kristi S. ANSETH. Mechanical Properties of Cellularly Responsive Hydrogels and Their Experimental Determination. *Advanced Materials* [online]. 2010, **22**(31), 3484-3494 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1002/adma.200904179. ISSN 09359648. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/adma.200904179>
- [4] AHMED, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. *Journal of Advanced Research* [online]. 2015, **6**(2), 105-121 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1016/j.jare.2013.07.006. ISSN 20901232. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2090123213000969>
- [5] HABING, Ruud. Vulcanisation of rubber. *Lagersmit* [online]. [cit. 2019-04-17]. Dostupné z: https://www.lagersmit.com/vulcanisation-of-rubber/?fbclid=IwAR3UOBNS6PSIO3DDxRNrV2SU-BvYmd_JvQvcfbxOPuURodZcMOIOEs4Nms
- [6] PEPPAS, Nicholas A. a Allan S. HOFFMAN. Hydrogels. *Biomaterials Science* [online]. Elsevier, 2013, 2013, , 166-179 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1016/B978-0-08-087780-8.00020-6. ISBN 9780123746269. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080877808000206>
- [7] XU, Xian, Amit K. JHA, Daniel A. HARRINGTON, Mary C. FARACH-CARSON a Xinqiao JIA. Hyaluronic acid-based hydrogels. *Soft Matter* [online]. 2012, **8**(12) [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1039/c2sm06463d. ISSN 1744-683X. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2sm06463d>
- [8] Hyaluronic Acid. *The Cosmetic Chemist* [online]. 2016 [cit. 2019-04-17]. Dostupné z: http://www.thecosmeticchemist.com/molecule_of_the_week/hyaluronic_acid.html
- [9] Hyaluronan. *TRB Chemedica-Website by Blackbox Ecom* [online]. 2016 [cit. 2019-04-17]. Dostupné z: <https://vismed.trbchemedica.co.uk/business-professionals/role-and-purpose-of-hyaluronan/introduction-to-hyaluronan>
- [10] ZAKERI, Alireza, Mohammad Javad RASAEI a Navid POURZARDOSHT. Enhanced hyaluronic acid production in *Streptococcus zooepidemicus* by over expressing HasA and molecular weight control with Niscin and glucose. *Biotechnology Reports* [online]. 2017, **16**, 65-70 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1016/j.btre.2017.02.007. ISSN 2215017X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2215017X17300528>

- [11] BURDICK, JASON A. a MOLLY M. STEVENS. Biomedical hydrogels. *Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering* [online]. Elsevier, 2005, 2005, , 107-115 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1533/9781845690861.2.107. ISBN 9781855737372. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781855737372500110>
- [12] CYPHERT, Jaime M., Carol S. TREMPUS a Stavros GARANTZIOTIS. Size Matters: Molecular Weight Specificity of Hyaluronan Effects in Cell Biology. *International Journal of Cell Biology* [online]. 2015, **2015**, 1-8 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1155/2015/563818. ISSN 1687-8876. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ijcb/2015/563818/>
- [13] RAYAHIN, Jamie E., Jason S. BUHRMAN, Yu ZHANG, Timothy J. KOH a Richard A. GEMEINHART. *High and Low Molecular Weight Hyaluronic Acid Differentially Influence Macrophage Activation* [online]. 2015, **1**(7), 481-493 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.5b00181. ISSN 2373-9878. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsbiomaterials.5b00181>
- [14] NUKUI, Masatoshi, Kenneth B. TAYLOR, David T. MCPHERSON, Mark K. SHIGENAGA a Mark J. JEDRZEJAS. The Function of Hydrophobic Residues in the Catalytic Cleft of Streptococcus pneumoniae Hyaluronate Lyase. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2003, **278**(5), 3079-3088 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1074/jbc.M204999200. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M204999200>
- [15] PRESTWICH, Glenn D. Hyaluronic acid-based clinical biomaterials derived for cell and molecule delivery in regenerative medicine. *Journal of Controlled Release* [online]. 2011, **155**(2), 193-199 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.04.007. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365911002227>
- [16] SCOTT, J. E. Secondary Structures in Hyaluronan Solutions: Chemical and Biological Implications. *Ciba Foundation Symposium 143 - The Biology of Hyaluronan* [online]. Chichester, UK, 2007, 2007-09-28, , 6-20 [cit. 2019-04-17]. Novartis Foundation Symposia. DOI: 10.1002/9780470513774.ch2. ISBN 9780470513774. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470513774.ch2>
- [17] Tenside. *The Free Dictionary By Farlex* [online]. 2003-2019 [cit. 2019-04-17]. Dostupné z: <https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/Tenside>
- [18] DI CORCIA, Antonio. Characterization of surfactants and their biointermediates by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 1998, **794**(1-2), 165-185 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1016/S0021-9673(97)00678-X. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196739700678X>
- [19] Surfactants and critical micelle concentration. In: *Dataphysics* [online]. [cit. 2019-04-17]. Dostupné z: <https://www.dataphysics-instruments.com/knowledge/understanding-interfaces/surfactants-cmc/>
- [20] Lipidy. *E-Chembook* [online]. 2019 [cit. 2019-04-17]. Dostupné z: <http://e-chembook.eu/lipidy>
- [21] CROSS, John. *Anionic surfactants: analytical chemistry*. 2nd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker, c1998. ISBN 978-082-4701-666.

- [22] Surfactants. *The Essential Chemical Industry* [online]. [cit. 2019-04-17]. Dostupné z: <http://www.essentialchemicalindustry.org/materials-and-applications/surfactants.html>
- [23] WILLIAMS, Jesse J. Formulation of Carpet Cleaners. *Handbook for Cleaning/Decontamination of Surfaces* [online]. Elsevier, 2007, 2007, , 103-123 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1016/B978-044451664-0/50004-8. ISBN 9780444516640. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444516640500048>
- [24] Sodium laureth sulfate. *American Chemical Society* [online]. 2019 [cit. 2019-04-17]. Dostupné z: <https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/s/sodium-laureth-sulfate.html>
- [25] GELARDI, G., S. MANTELLATO, D. MARCHON, M. PALACIOS, A.B. EBERHARDT a R.J. FLATT. Chemistry of chemical admixtures. *Science and Technology of Concrete Admixtures* [online]. Elsevier, 2016, 2016, , 149-218 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1016/B978-0-08-100693-1.00009-6. ISBN 9780081006931. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081006931000096>
- [26] Hexadecyltrimethylammonium bromide. In: *Sigma Aldrich* [online]. 2019 [cit. 2019-04-17]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h5882?lang=en®ion=SK>
- [27] SHIMOAKI, T. Surfactant. In: *Interfacial Chemistry Laboratory* [online]. [cit. 2019-04-17]. Dostupné z: http://www.ach.nitech.ac.jp/~physchem/taga/1tagag_e.html
- [28] RHEIN, L. Surfactant Action on Skin and Hair: Cleansing and Skin Reactivity Mechanisms. *Handbook for Cleaning/Decontamination of Surfaces* [online]. Elsevier, 2007, 2007, , 305-369 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1016/B978-044451664-0/50009-7. ISBN 9780444516640. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444516640500097>
- [29] Cocamidopropyl betaine. In: *Semanticscholar* [online]. [cit. 2019-04-17]. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/187c/292111ee18d314b9678e70f130bfa2c65852.pdf>
- [30] PENNELL, Kurt D. Nonionic Surfactants: Alkyl Polyglucosides. Surfactant Science Series. Volume 91 Edited by Dieter Balzer (Haltern-Lavesum, Germany) and Harald Lüders (Rohm GmbH, Darmstadt, Germany). Marcel Dekker. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2001, **123**(14), 3404-3404 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1021/ja004831g. ISSN 0002-7863. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja004831g>
- [31] Cocamide DEA. In: *Wikiwand* [online]. [cit. 2019-04-17]. Dostupné z: http://www.wikiwand.com/en/Cocamide_DEA
- [32] WEI, Ya-Chung a Samuel M. HUDSON. The Interaction between Polyelectrolytes and Surfactants of Opposite Charge. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews* [online]. 1995, **35**(1), 15-45 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1080/15321799508014588. ISSN 1532-1797. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15321799508014588>
- [33] Basics of rheology. In: *Anton Paar* [online]. 2019 [cit. 2019-04-17]. Dostupné z: <https://wiki.anton-paar.com/en/basics-of-rheology/>

- [34] Rheology. In: *Chegg Study* [online]. 2003-2019 [cit. 2019-04-17]. Dostupné z: <https://www.chegg.com/homework-help/definitions/rheology-8>
- [35] PETERS, Sara. What are newtonian and non-newtonian fluids?. In: *Crane Engineering* [online]. 2019 [cit. 2019-04-18]. Dostupné z: <https://blog.craneengineering.net/what-are-newtonian-and-non-newtonian-fluids>
- [36] Non-Newtonian Cornstarch Recipe. In: *Steve Spangler Science* [online]. 2018 [cit. 2019-04-17]. Dostupné z: <https://www.stevespanglerscience.com/lab/experiments/non-newtonian-fluid/>
- [37] Měření reologických vlastností hyaluronanu. In: *Chempoint* [online]. [cit. 2019-04-17]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/mereni-reologickych-vlastnosti-hyaluronanu>
- [38] The History of Hyaluronic Acid Discovery, Foundational Research and Initial Use. *Hyaluronic Acid* [online]. Chichester, UK, 2015, 2015-01-09, , 1-8 [cit. 2019-04-18]. DOI: 10.1002/9781118695920.ch1. ISBN 9781118695920. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118695920.ch1>
- [39] HUANG, Gangliang a Hualiang HUANG. Application of hyaluronic acid as carriers in drug delivery. *Drug Delivery* [online]. 2018, **25**(1), 766-772 [cit. 2019-04-18]. DOI: 10.1080/10717544.2018.1450910. ISSN 1071-7544. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10717544.2018.1450910>
- [40] SAUEROVÁ, Pavla, Tereza PILGROVÁ, Miloslav PEKAŘ a Marie HUBÁLEK KALBÁČOVÁ. Hyaluronic acid in complexes with surfactants: The efficient tool for reduction of the cytotoxic effect of surfactants on human cell types. *International Journal of Biological Macromolecules*[online]. 2017, **103**, 1276-1284 [cit. 2019-04-18]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.173. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014181301731317X>
- [41] THALBERG, Kyrre a Bjoern LINDMAN. Interaction between hyaluronan and cationic surfactants. *The Journal of Physical Chemistry*[online]. 1989, **93**(4), 1478-1483 [cit. 2019-04-18]. DOI: 10.1021/j100341a058. ISSN 0022-3654. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100341a058>
- [42] HALASOVÁ, Tereza. *Interakce hyaluronanu a amfifilních molekul* [online]. Brno, 2013 [cit. 2019-05-15]. Dostupné z: <https://dspace.vutbr.cz/bitstream/handle/11012/25105/TEZE%20Halasova.pdf?sequence=10&isAllowed=y>. Dizertační práce.
- [43] HERZOG, Milan. *Interakce hyaluronan tenzid- dynamická tenziometrie* [online]. Brno, 2010 [cit. 2019-05-15]. Dostupné z: <https://dspace.vutbr.cz/bitstream/handle/11012/1318/Herzog%20BP%20Interakce%20hyaluronantenzid.pdf?sequence=2&isAllowed=y>. Bakalářská práce.
- [44] KROUSKÁ, J., M. PEKAŘ, M. KLUČÁKOVÁ, B. ŠARAC a M. BEŠTER-ROGAČ. Study of interactions between hyaluronan and cationic surfactants by means of calorimetry, turbidimetry, potentiometry and conductometry. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2017, **157**, 1837-1843 [cit. 2019-05-15]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.11.069. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861716313315>

- [45] KARGEROVÁ, A. a M. PEKAŘ. Ultrasonic study of hyaluronan interactions with Septonex—A pharmaceutical cationic surfactant. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2019, **204**, 17-23 [cit. 2019-05-15]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.09.077. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861718311457>
- [46] KARGEROVÁ, Andrea. *Charakterizace hyaluronanu a jeho interakcí s tenzidy ultrazvukovou spektroskopií a densitometrií*. Brno, 2014 [cit. 2019-05-15]. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=81207. Dizertační práce.
- [47] TRTEK, Jan. *Interakce hyaluronanu s tenzidem CAE* [online]. Brno, 2018 [cit. 2019-05-15]. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=171006. Diplomová práce.
- [48] KROUSKÁ, Jitka. *Interactions between hyaluronan and surface active substances*. [online]. Brno, 2012 [cit. 2019-04-18]. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=59736. Dizertační práce.
- [49] VAŠÍČKOVÁ, Kamila. *Interakce tenzidů se směsí hyaluronanů o různé molekulové hmotnosti* [online]. Brno, 2012 [cit. 2019-04-18]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/41496>. Diplomová práce.
- [50] DUCEPPE, Nicolas a Maryam TABRIZIAN. Factors influencing the transfection efficiency of ultra low molecular weight chitosan/hyaluronic acid nanoparticles. *Biomaterials* [online]. 2009, **30**(13), 2625-2631 [cit. 2019-05-15]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.01.017. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961209000258>
- [51] VIAČKOVÁ, Daniela. *Účinek různých molekulových hmotností hyaluronanu na fyziologii fagocytů* [online]. Brno, 2010 [cit. 2019-04-18]. Dostupné z: <https://theses.cz/id/lyjurn/?lang=en>
- [52] PŘÍKOPOVÁ, Eva. *Vliv molekulové hmotnosti derivátu hyaluronanu na jeho fyzikálně-chemické vlastnosti* [online]. Pardubice, 2011 [cit. 2019-04-18]. Dostupné z: <https://dk.upce.cz/handle/10195/40987>. Bakalářská práce.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Seznam použitých zkratk

HyA	hyaluronan
HA	kyselina hyaluronová
CTAB	hexadecyltrimethylammonium bromid
EtOH	ethanol
PAL	povrchově aktivní látky
CMC	kritická micelární koncentrace
SEC–MALS	size exclusion chromatography – multi angle laser light scattering

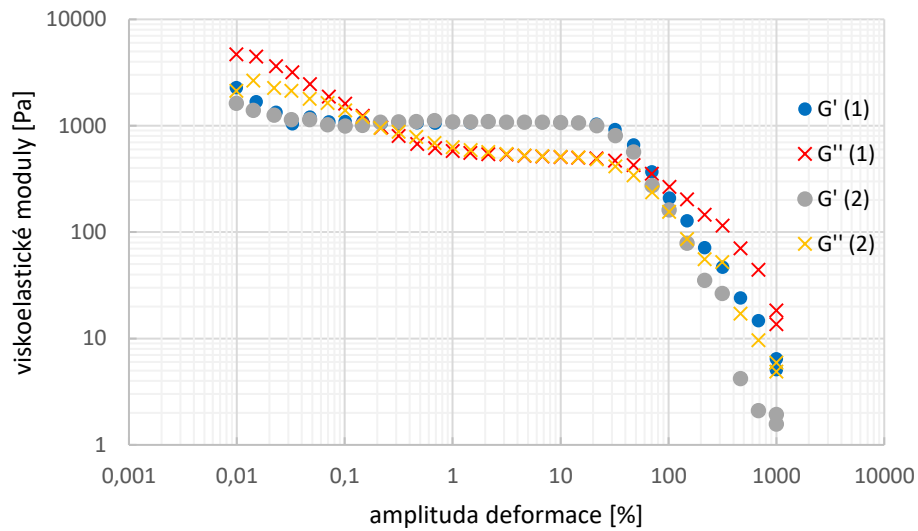
8.2 Seznam použitých symbolů

τ	tečné napětí
γ	smyková rychlost
F	síla
A	plocha
$\dot{\gamma}$	smyková rychlost
h	vzdálenost
G	komplexní modul pružnosti ve smyku
G'	elastický modul
G''	viskózní modul

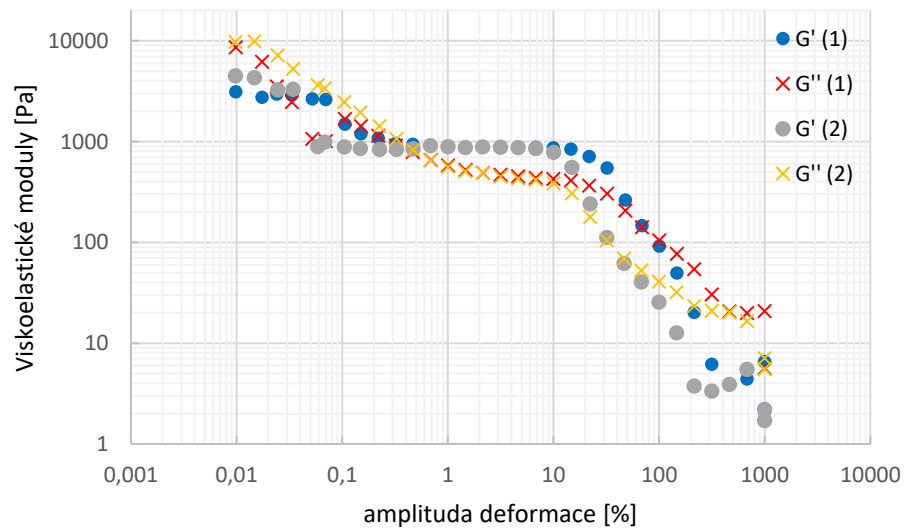
9 SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha 1: Graf závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace pro roztok z vysokomolekulární 2% HyA a Septonexu
- Příloha 2: Graf závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace pro roztok z vysokomolekulární 2% HyA a CTAB
- Příloha 3: Graf závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace pro roztok z vysokomolekulární a nízkomolekulární 2% HyA v poměru 70:30 a Septonexu
- Příloha 4: Graf závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace pro roztok z vysokomolekulární a nízkomolekulární 2% HyA v poměru 70:30 a CTAB
- Příloha 5: Graf závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace pro roztok z vysokomolekulární a nízkomolekulární 2% HyA v poměru 50:50 a Septonexu
- Příloha 6: Graf závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace pro roztok z vysokomolekulární a nízkomolekulární 2% HyA v poměru 50:50 a CTAB
- Příloha 7:
- Příloha 7: Graf závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace pro roztok z vysokomolekulární a nízkomolekulární 2% HyA v poměru 30:70 a Septonexu
- Příloha 8: Graf závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace pro roztok z vysokomolekulární a nízkomolekulární 2% HyA v poměru 30:70 a CTAB

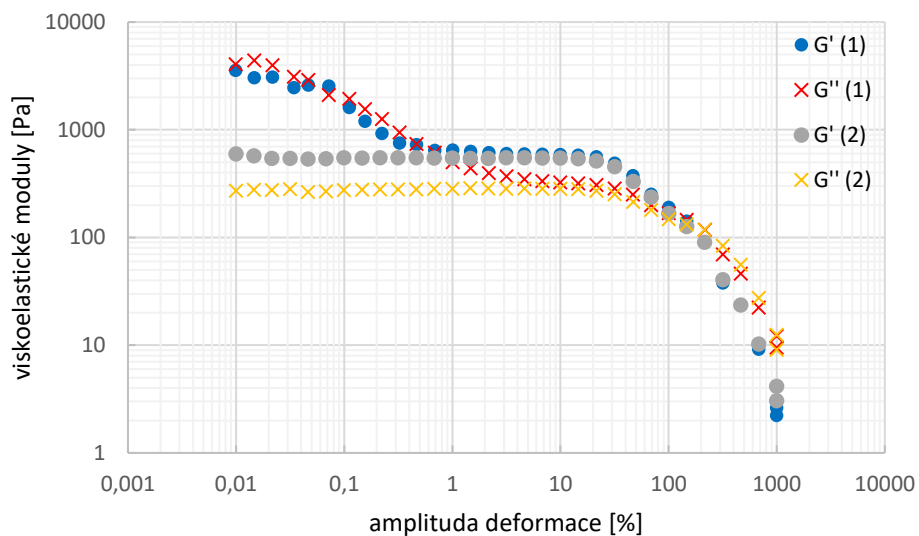
10 PŘÍLOHY



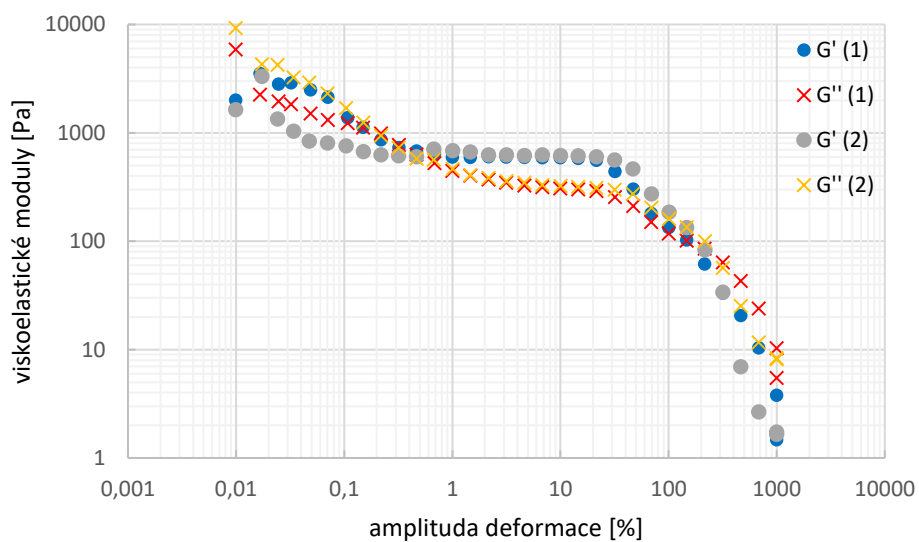
Obrázek 24: Graf závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace pro roztok z vysokomolekulární 2% HyA a Septonexu



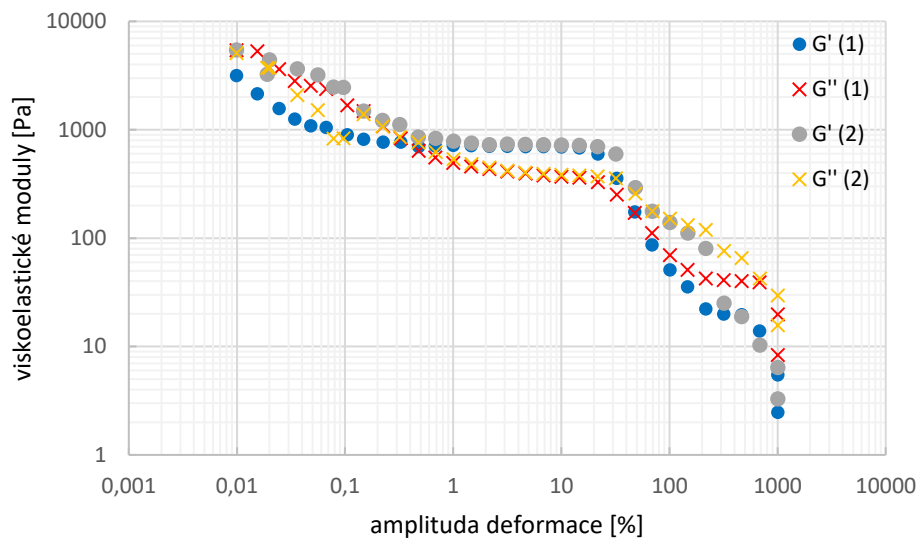
Obrázek 25: Graf závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace pro roztok z vysokomolekulární 2% HyA a CTAB



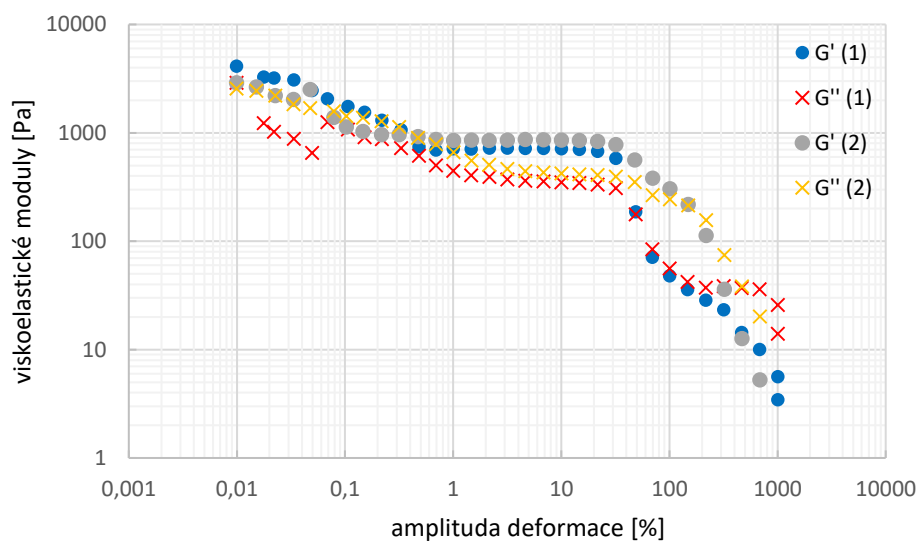
Obrázek 26: Graf závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace pro roztok z vysokomolekulární a nízkomolekulární 2% HyA v poměru 70:30 a Septonexu



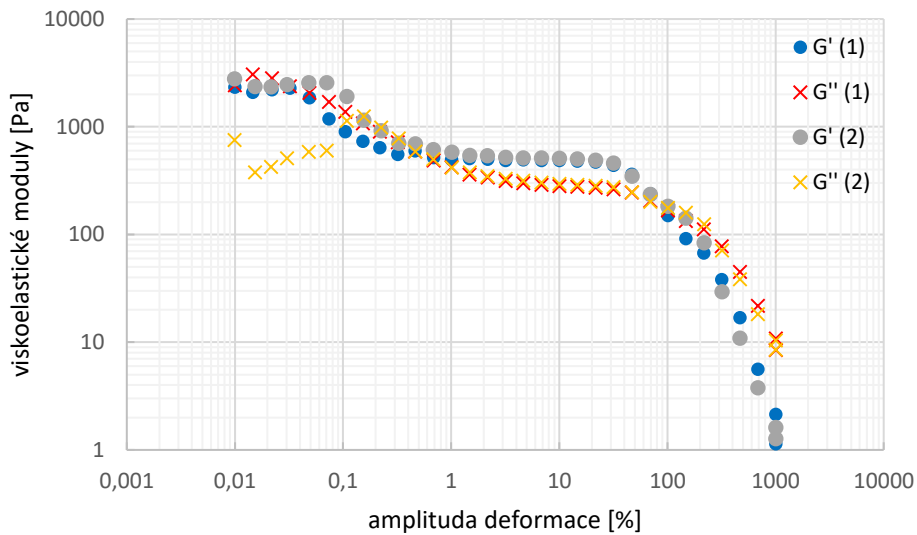
Obrázek 28: Graf závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace pro roztok z vysokomolekulární a nízkomolekulární 2% HyA v poměru 70:30 a CTAB



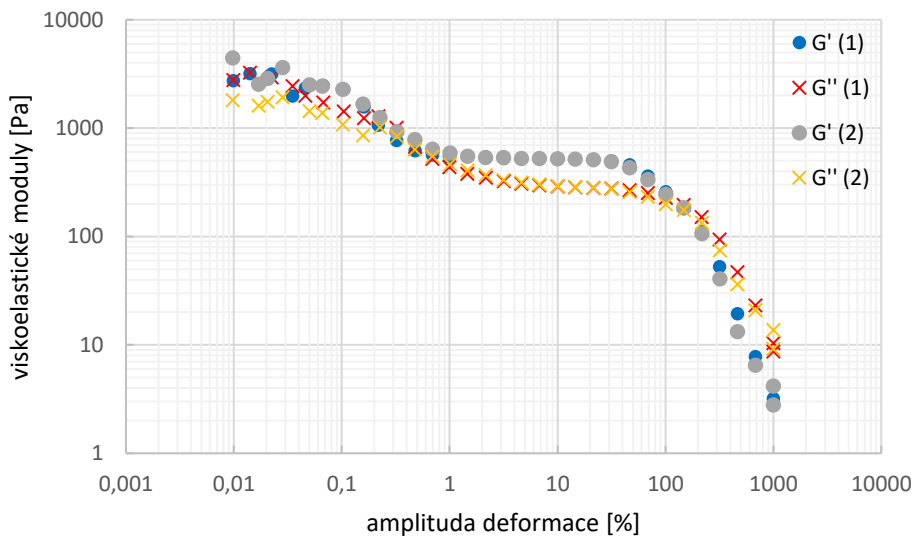
Obrázek 29: Graf závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace pro roztok z vysokomolekulární a nízkomolekulární 2% HyA v poměru 50:50 a Septonexu



Obrázek 30: Graf závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace pro roztok z vysokomolekulární a nízkomolekulární 2% HyA v poměru 50:50 a CTAB



Obrázek 31: Graf závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace pro roztok z vysokomolekulární a nízkomolekulární 2% HyA v poměru 30:70 a Septonexu



Obrázek 32: Graf závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace pro roztok z vysokomolekulární a nízkomolekulární 2% HyA v poměru 30:70 a CTAB