



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

MIKROKALORIMETRICKÁ STUDIE INTERAKCÍ HYALURONANU A KATANIONTOVÝCH VEZIKULÁRNÍCH SYSTÉMŮ

MICROCALORIMETRIC STUDY OF INTERACTIONS BETWEEN HYALURONAN AND CATIONIC
VESICULAR SYSTEMS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Jakub Mach

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jitka Krouská, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1524/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Jakub Mach**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Jitka Krouská, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Mikrokalorimetrická studie interakcí hyaluronanu a kataniontových vezikulárních systémů

Zadání bakalářské práce:

1. Proved'te literární rešerši se zaměřením na problematiku tenzidů a vezikulárních systémů a případně jejich interakce s polyelektrolyty.
2. Na základě poznatků z literatury navrhnete a proved'te experimenty s využitím metody kalorimetrie, které budou charakterizovat výše uvedený systém.
3. Zpracujte, vyhodno'tte a diskutujte získané výsledky.

Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

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

Jakub Mach
student(ka)

Ing. Jitka Krouská, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

S využitím izotermické titrační kalorimetrie byly studovány vlastnosti tenzidů ve vodě, interakce opačně nabitých tenzidů ve vodě a interakce v systému obsahujícím didecyldimethylamoniumchlorid (DDAC), hyaluronan a amfifilní iontový pár (IPA). Pro studium vlastností tenzidů ve vodě a jejich vzájemných interakcí byly vybrány dva kationaktivní tenzidy, a to cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) a karbethodecinium bromid (Septonex), a anionaktivní tenzid dodecylsulfát sodný (SDS). Vybraná molekulová hmotnost hyaluronanu byla 250-450 kDa. Pomocí kalorimetru TAM III byla stanovena kritická micelární koncentrace vybraných tenzidů a entalpie studovaných interakcí. Kalorimetr Microcal PEAQ-ITC byl využit k prokázání interakcí v systému obsahujícím hyaluronan, DDAC a IPA a ke stanovení entalpie těchto interakcí.

KLÍČOVÁ SLOVA

hyaluronan, tenzid, amfifilní iontový pár, kritická micelární koncentrace, izotermická titrační kalorimetrie

ABSTRACT

Properties of surfactants in water, interactions between oppositely charged surfactants and interactions in system containing didecyldimethylammonium chloride (DDAC), hyaluronan and ion pair amphiphile (IPA) have been studied using isothermal titration calorimetry. For the study of properties of surfactants in water and their mutual interactions, two cationic surfactants have been chosen, namely cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) and carbethopendecinium bromide (Septonex), and an anionic surfactant sodium dodecyl sulfate (SDS). For hyaluronan, a molecular weight of 250-450 has been chosen. Critical micelle concentration of the chosen surfactants and enthalpy of the investigated interactions have been determined using the TAM III calorimeter. To prove the interactions in system containing hyaluronan, DDAC and IPA and to determine enthalpy the Microcal PEAQ-ITC calorimeter has been used.

KEYWORDS

hyaluronan, surfactant, ion pair amphiphile, critical micelle concentration, isothermal titration calorimetry

CITACE

MACH, Jakub. Mikrokalorimetrická studie interakcí hyaluronanu a kataniontových vezikulárních systémů. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/122839>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Jitka Krouská.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěl velmi poděkovat své vedoucí Ing. Jitce Krouské, Ph.D. za její ochotu, odborné vedení a věnovaný čas při zpracovávání práce. Také bych rád poděkoval své rodině za podporu během celého studia.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. CÍL PRÁCE	9
3. TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1. Tenzidy.....	10
3.1.1. Anionaktivní tenzidy.....	11
3.1.2. Kationaktivní tenzidy.....	11
3.1.3. Dodecylsulfát sodný.....	11
3.1.4. Cetyltrimethylamonium bromid.....	11
3.1.5. Septonex.....	12
3.1.6. Micely.....	12
3.1.7. Vezikuly.....	13
3.1.8. Kataniontové vezikulární systémy.....	14
3.2. Kyselina hyaluronová.....	15
3.2.1. Chemická struktura hyaluronanu.....	15
3.2.2. Buněčná syntéza hyaluronanu.....	16
3.2.3. Výskyt hyaluronanu a jeho funkce.....	16
3.2.4. Biodegradace hyaluronanu.....	16
3.2.5. Hyaluronan v biotechnologiích.....	17
3.3. Izotermická titrační kalorimetrie.....	18
3.3.1. Instrumentace ITC.....	19
3.3.2. Referenční cela.....	19
3.3.3. Injekční jehla a měrná cela.....	19
3.3.4. Experiment ITC.....	20
4. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	21
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
5.1. Použité chemikálie.....	23
5.2. Použité přístroje.....	23
5.2.1. Kalorimetr TAM III, TA Instruments, USA.....	23
5.2.2. Kalorimetr Microcal PEAQ-ITC, Malvern, UK.....	24
5.3. Příprava zásobních roztoků.....	25
5.3.1. Příprava zásobních roztoků tenzidů.....	25
5.3.2. Příprava zásobního roztoku hyaluronanu.....	25

5.3.3.	Příprava IPA	26
5.3.3.1.	Příprava zásobního prášku IPA.....	26
5.3.3.2.	Příprava zásobních roztoků v chloroformu.....	26
5.3.3.3.	Příprava cIPA + cholesterol (43 mol. %).	26
5.3.4.	Měření na kalorimetru TAM III	26
5.3.5.	Měření na kalorimetru Microcal PEAQ-ITC	27
6.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	28
6.1.	Studie CMC tenzidů a jejich vzájemné interakce.....	28
6.2.	Studie interakcí kataniontových vezikulárních systémů a hyaluronanu.....	34
6.3.	Shrnutí výsledků	35
7.	ZÁVĚR.....	36
8.	POUŽITÁ LITERATURA	37
9.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	41
9.1.	Seznam zkratk.....	41
9.2.	Seznam symbolů.....	42

1. ÚVOD

Vezikulární systémy jsou uzavřené sférické struktury, jejich vnitřní fáze je oddělena od okolí strukturou dvojvrstvy. Vzhledem k tomu, že obsahují jak hydrofilní, tak hydrofobní část, umožňují enkapsulaci hydrofilních i hydrofobních látek. Kataniontové vezikuly, vytvořené z kataniontových povrchově aktivních látek nebo amfifilních iontových párů se aktuálně jeví jako možná náhrada současných nosičů léčiv nebo DNA nosičů.

Hyaluronan je kopolymer, tvořený kyselinou D-glukuronovou a N-acetyl-D-glukosaminem. Je to tělu přirozená látka, interaguje s buněčnými receptory (biologicky aktivní látka) a má jedinečné fyzikálně-chemické vlastnosti, díky kterým je zodpovědná za mnoho funkcí a můžeme ji lokalizovat na úrovni tkání, buněk i molekul. Již od objevení v roce 1934 se stal hyaluronan předmětem nesčetného množství výzkumů, pro svůj obrovský aplikační potenciál.

Téma práce bylo zvoleno na základě projektu s názvem Hyaluronan-kataniontové vezikulární komplexy – interakce, struktura, fyzikální vlastnosti a stabilita, probíhajícím v letech 2019 – 2021, na kterém se podílejí týmy z FCH VUT v Brně a z National Cheng Kung University, Taiwan. Projekt je zaměřen na studium interakcí kataniontových vezikulárních systémů a aniontového polymeru hyaluronanu, jež může mít vliv na stabilitu a vlastnosti těchto systémů, využitím pokročilé ultrazvukové spektroskopie, pokročilé fluorescenční spektroskopie a pokročilých kalorimetrických technik.

Tato bakalářská práce shrnuje výsledky týkající se stanovení kritické micelární koncentrace samotných tenzidů pomocí izotermické titrační kalorimetrie. Následně byla provedena charakterizace interakcí ve složitějším systému (interakce kladně nabitých vezikulárních systémů a záporně nabitého hyaluronanu).

2. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo optimalizovat izotermickou titrační kalorimetrii (ITC) pro charakterizaci vybraných systémů tenzidů a pro ověření existence interakcí v systému obsahujícím IPA, tenzid a záporně nabitý polyelektrolyt HA.

Na základě literární rešerše byly vybrány tenzidy CTAB, SDS a Septonex a metodou ITC byla stanovena jejich CMC ve vodě. Pro následnou studii vzájemných interakcí opačně nabitých tenzidů byly na základě projektu vybrány tenzidy CTAB a SDS ve vhodných koncentracích. Metodou ITC byly sledovány interakce amfifilních komplexů intových párů těchto vybraných tenzidů s kladně nabitým, dvouřetězcovým tenzidem DDAC a záporně nabitým HA.

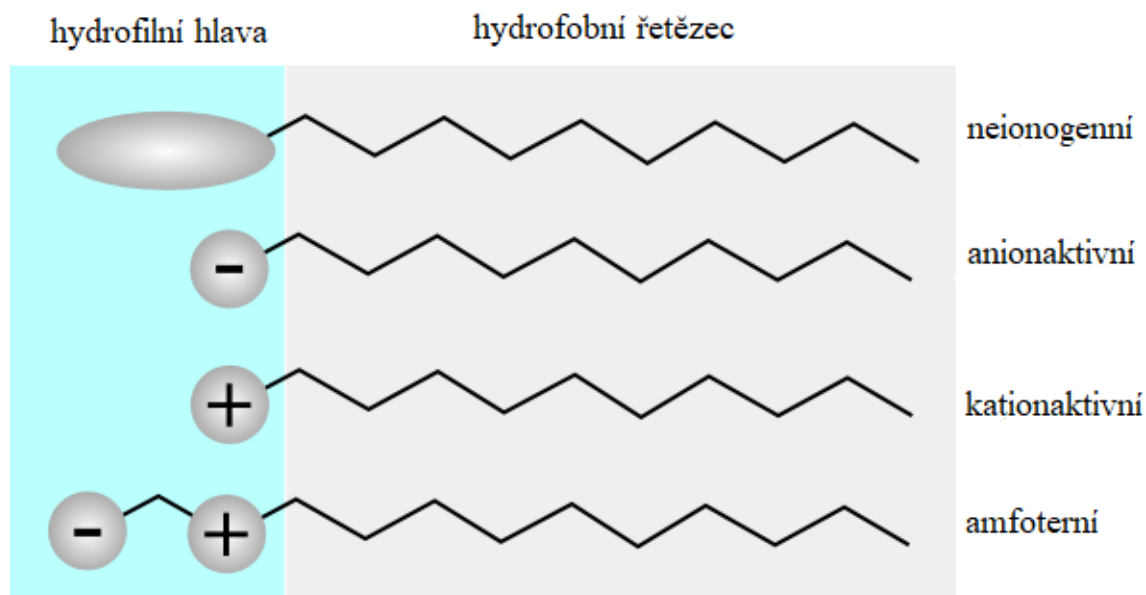
3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Tenzidy

Tenzid neboli povrchově aktivní látka je organická sloučenina, která už při nízké koncentraci snižuje povrchovou, případně mezifázovou energii tím, že se koncentruje na fázovém rozhraní. Molekula tenzidu má amfifilní charakter. Hydrofobní částí molekuly tenzidu je uhlovodíkový řetězec a na něm je navázán polární substituent, například $-\text{COO}^-$ nebo $-\text{NR}_3^+$, představující hydrofilní část molekuly. V kapalině se tenzid hromadí v její povrchové vrstvě. Polární část s hydrofilní skupinou je orientována do polární fáze a nepolární uhlíkatý řetězec do fáze nepolární [1,2].

Tenzidy mají širokou škálu využití – jako detergenty, čisticí prostředky, používají se v kosmetice, pro enkapsulaci a transport léčiv nebo také jako stabilizátory emulzí. Vodné směsi negativně a pozitivně nabitých tenzidů vykazují jedinečné samoagregační vlastnosti způsobené silnými elektrostatickými interakcemi opačně nabitých skupin a hydrofobními silami nepolárních řetězců [3,4].

Podle náboje hydrofilní skupiny můžeme tenzidy dělit na ionogenní a neionogenní, ionogenní můžeme dále rozdělit na anionaktivní, kationaktivní a amfoterní [2,4].



Obrázek 1: Rozdělení tenzidů [5]

3.1.1. Anionaktivní tenzidy

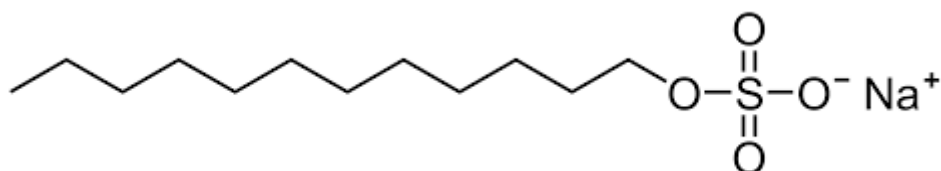
Anionaktivní tenzidy jsou nejrozšířenější skupinou tenzidů. Roční produkce tenzidů je přibližně 15 milionů tun, z toho 60 % jsou tenzidy anionaktivní [4]. Jejich polární skupina nese ve vodném prostředí záporný náboj a jejich aktivita je nejvyšší v mírně alkalickém prostředí, v kyselém prostředí jsou nestabilní. Jedná se o látky běžně používané jako součást mýdel, zubních past nebo pracích prášků. Nejčastěji používanými anionaktivními tenzidy jsou alkylsulfáty a alkylbenzensulfonáty [1,6,7].

3.1.2. Kationaktivní tenzidy

Kationaktivní tenzidy představují necelých 10 % celkové produkce tenzidů [4]. Ve vodném prostředí mají kladný náboj. Mají antistatické, dezinfekční, změkčovací a mikrobicidní účinky, kterých lze využít ve farmaceutickém, textilním a kosmetickém průmyslu. Nejčastěji se používají kvarterní amoniové soli s řetězcem dlouhým 12 až 18 uhlíků, s chloridovým nebo methosulfátovým protiionem. Tyto soli nejsou příliš citlivé na změny pH a lze je využít v širokém rozmezí pH. Kationaktivními tenzidy jsou také soli alkylaminů, ale pouze v kyselém prostředí. V neutrálním a zásaditém pH ztrácejí kationický charakter (sůl aminu přechází na amin a ten se vyloučí z roztoku) [1,6].

3.1.3. Dodecylsulfát sodný

Dodecylsulfát sodný je sodná sůl organosulfátu s 12 uhlíků dlouhým řetězcem a sulfátovou skupinou. Jeho sumární vzorec je $C_{12}H_{25}NaO_4S$, molekulová hmotnost 288,38 g/mol a kritická micelární koncentrace ve vodě $8,3 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ při $25 \text{ }^\circ\text{C}$ [8]. SDS je bílá, krystalická, hořlavá látka, za běžných podmínek stabilní. Není toxická, ale může vyvolat alergickou reakci [9]. Často se využívá v biotechnologiích polymerů a v biochemii, je součástí gelu pro elektroforetickou separaci proteinů [10].

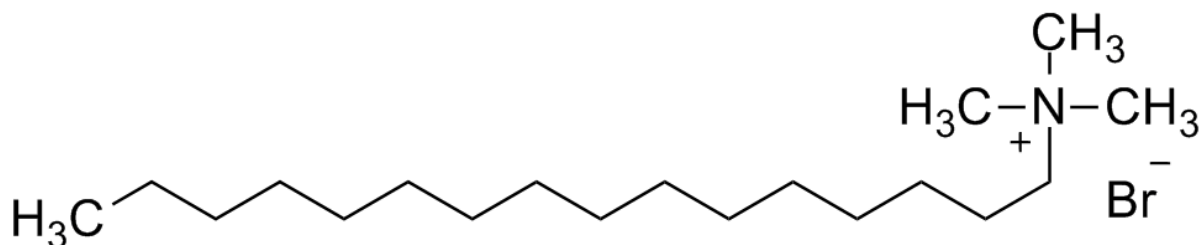


Obrázek 2: Dodecylsulfát sodný [11]

3.1.4. Cetyltrimethylamonium bromid

Cetyltrimethylamonium bromid, též hexadecyltrimethylamonium bromid nebo cetrimonium bromid je kvarterní amoniová sloučenina tvořená 16 uhlíků dlouhým řetězcem a kvarterním dusíkem, který váže další 3 methylové skupiny. Jeho sumární vzorec je $C_{19}H_{42}BrN$, molekulová

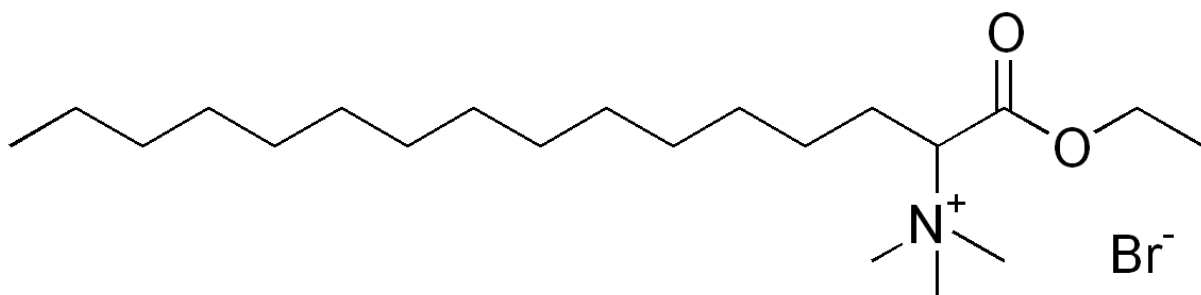
hmotnost je 364,46 g/mol [12]. Kritická micelární koncentrace CTAB ve vodě při 25 °C je 0,9 mmol·dm⁻³ [13]. CTAB je pevná bílá látka s antiseptickými účinky. Používá se při izolaci DNA, určování molekulové hmotnosti proteinů v elektroforetických systémech, určování kritické micelární koncentrace detergentů nebo v kosmetickém průmyslu [14].



Obrázek 3: Cetyltrimethylamonium bromid [15]

3.1.5. Septonex

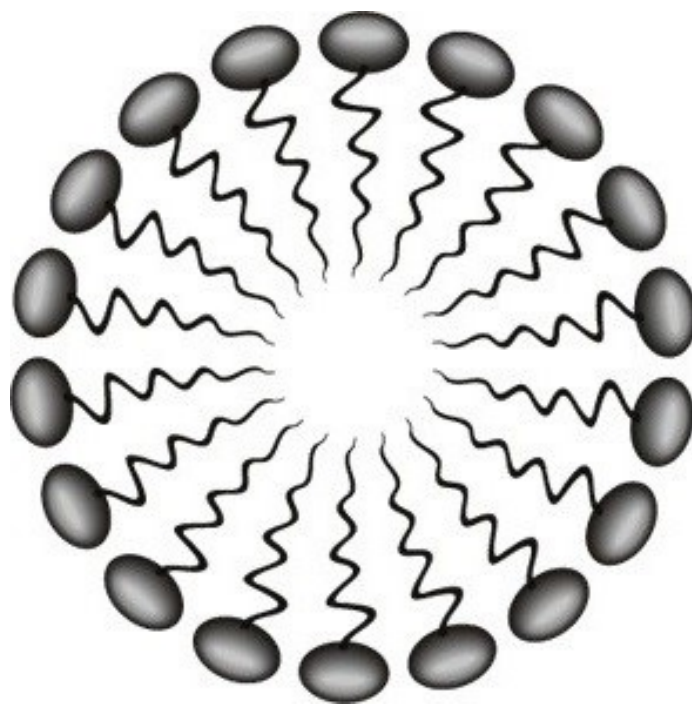
Septonex (systematickým názvem karbethopendecinium bromid), stejně jako CTAB, je tenzid, který nese ve vodném prostředí kladný náboj. Jeho sumární vzorec je C₂₁H₄₄BrNO₂, molekulová hmotnost je 422,5 g/mol [16]. Kritická micelární koncentrace Septonexu ve vodě při 25 °C je 0,8 mmol·dm⁻³ [17].



Obrázek 4: Septonex [18]

3.1.6. Micely

Při malých koncentracích tvoří tenzidy pravé roztoky. Teprve až po dosažení určité koncentrace v systému dojde k agregaci molekul rozpuštěné látky do útvarů koloidních velikostí – micel. Tato koncentrace se nazývá kritická micelární koncentrace a kolísá v rozmezí 10⁻⁵ až 10⁻³ mol·dm⁻³ [19]. CMC je definována jako koncentrace tenzidu při dané teplotě, kdy se vytvoří první micela [20].



Obrázek 5: *Struktura micely ve vodném prostředí [21]*

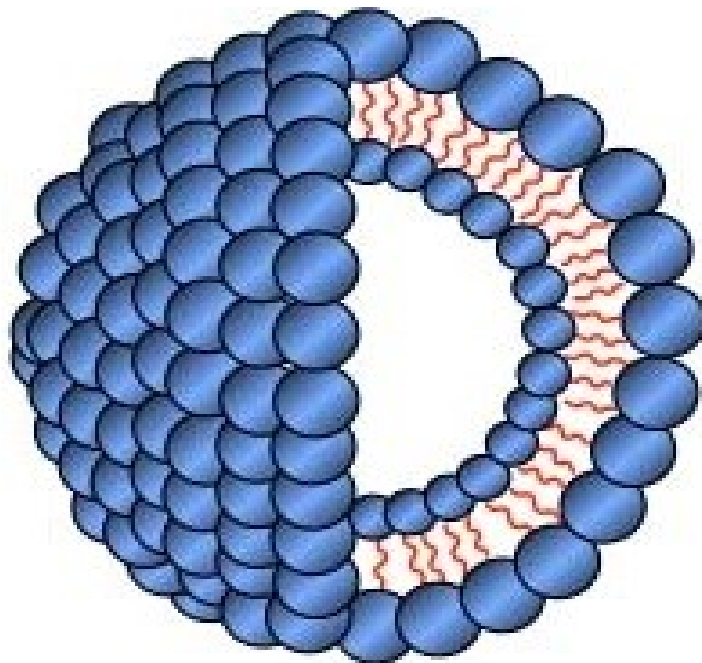
Pro tvorbu micel je zásadní amfifilní povaha molekul tenzidu. Ta zapříčiňuje jejich orientaci podle polaritý prostředí. Neochota molekul tenzidu interagovat s molekulami prostředí je příčinou jejich asociace. Pokud je prostředím voda (polární prostředí), dochází k natočení hydrofilních skupin do ní a hydrofobní řetězce se orientují dovnitř útvaru tak, aby nebyly v kontaktu s polární látkou [19,20]. Tento jev je znázorněn na **obrázku 5**.

Tvorba micel je ovlivňována chemickou strukturou tenzidu. Obecně platí, že s rostoucí délkou uhlíkového řetězce CMC klesá. Pokud nese hydrofilní skupina náboj, je CMC nižší než u neionogenních tenzidů (u neionogenních závisí zejména na rozměrech hydrofilní skupiny). CMC závisí také na náboji protiionu – se zvyšujícím se mocenstvím klesá. Dále je tvorba micel ovlivňována příměsemi, například jednoduchými anorganickými elektrolyty, které snižují CMC, a také teplotou (rostoucí teplota zvyšuje CMC) a nepatrně i tlakem [19].

3.1.7. Vezikuly

Vezikuly jsou duté sférické struktury tvořené PAL, lipidy nebo blokovými kopolymery ve vodném roztoku. Jsou tvořené z jedné nebo více zakřivených dvouvrstvých membrán, které obklopují interní vodnou mikrofázi a oddělují ji od vodného disperzního prostředí. Vnější a vnitřní povrch dvouvrstvy je tvořen hydrofilními skupinami, a tím je téměř zamezeno styku hydrofobních řetězců s vodou. Vezikuly dosahují rozměrů od desítek nanometrů až po stovky mikrometrů. Podle počtu dvouvrstev dělíme vezikuly na unilamelární a multilamelární. Unilamelární vezikula, zobrazená na **obrázku 6**, je tvořena pouze jednou dvouvrstvou, zatímco

multilamelární několika na sebe navrstvenými dvojvrstvami. Vezikuly se uplatňují v medicíně jako nástroj pro dávkování léčiv. Oproti micelám mají výhodu v mnohem vyšší enkapsulační kapacitě hydrofilních látek, které mohou organismem transportovat [22].



Obrázek 6: *Unilamelární vezikula* [23]

3.1.8. Kataniontové vezikulární systémy

Mezi stejně nabitými molekulami PAL působí odpuzivé elektrostatické síly, které vedou ke vzniku micel. Ve směsi kationaktivních a anionaktivních PAL působí přitažlivé elektrostatické síly mezi opačně nabitými polárními skupinami a po odstranění protionů zůstává dvoufázový amfifil (IPA). IPA jsou tedy obecně tvořeny spárováním dvou opačně nabitých PAL a mohou být považovány za PAL se dvěma nepolárními řetězci (každý z nich je ale vázán na jinou skupinu) [24,25].

Ve vodném prostředí jsou kataniontové vezikuly připravené z IPA nestabilní, mohou se snadno slučovat nebo agregovat a nemohou tedy dlouhodobě držet stabilní rozměry. Jedna z možností, jak zlepšit jejich stabilitu, je upravit inter-vezikulární nebo intra-vezikulární interakce. Intra-vezikulární například přidávkem cholesterolu a mastných kyselin – lze dosáhnout změny balení molekul do dvojvrstvy a interakcí ve dvojvrstvě. Inter-vezikulární interakce lze upravit například přidávkem anionaktivní PAL, která zvýší elektrostatickou repulzi mezi jednotlivými vezikulami [24,26].

Problematika vezikulárních systémů získává pozornost zejména jejich potenciálem stát se nosiči léčiv. Vezikuly tvořené lipidy (liposomy) jsou netoxické a biodegradabilní, jejich povrch je možno různě modifikovat a tím omezit vedlejší účinky a vylepšit efekt léčiva. Díky tomu

jsou liposomy využívány jako nosiče léků a DNA, praktické využití ale značně omezuje jejich nákladná produkce. Kataniontové vezikuly, připravené z PAL nebo IPA, jsou mnohem levnější a dostupnější a jeví se jako jejich možná náhrada pro transport léčiv a DNA [24,26].

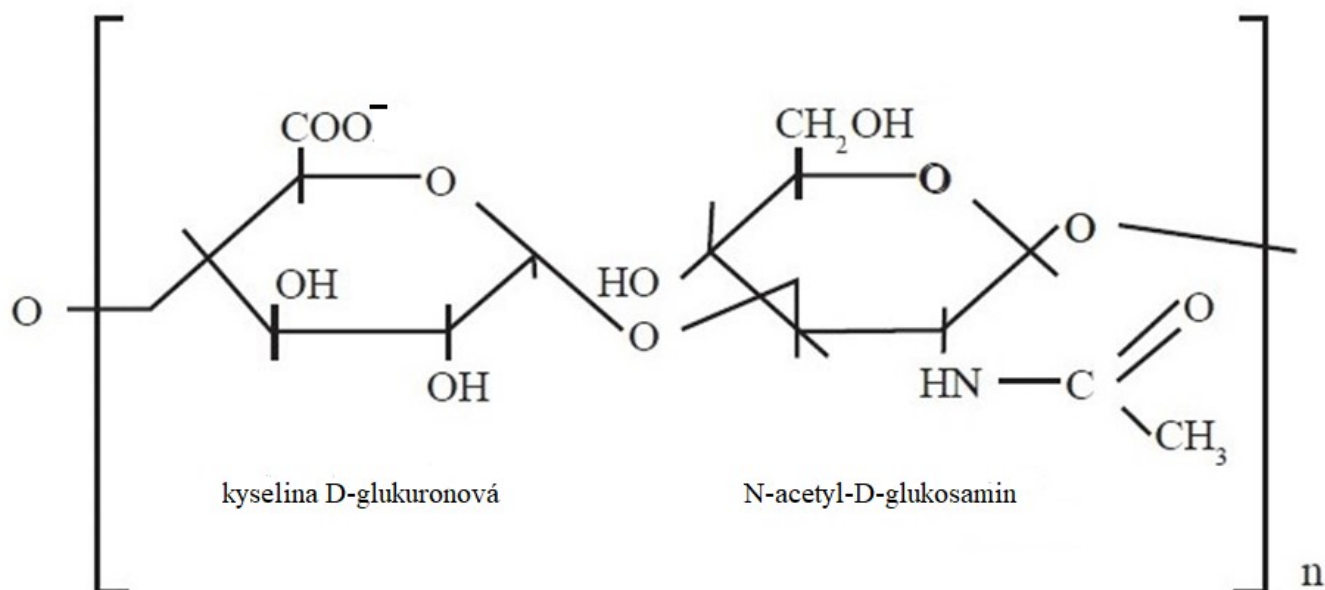
3.2. Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová byla poprvé izolována ve druhé polovině devatenáctého století. Její struktura byla poprvé popsána až v roce 1934 Karlem Meyerem a Johnem Palmerem, kteří ji izolovali z očního sklivce skotu a konstatovali, že obsahuje uronovou kyselinu. Další studie prokázaly, že izolovaná látka je vysokomolekulární, negativně nabitý polysacharid. Název této látky je složenina slov hyalos (řecky sklovitý) a uronová kyselina. Protože v roztoku disociuje a vyskytuje se v iontové podobě, označuje se častěji jako hyaluronan [27,28].

3.2.1. Chemická struktura hyaluronanu

HA je nejjednodušší přirozeně se vyskytující glykosaminoglykan. Je to polysacharid tvořený z disacharidových jednotek. V rámci této jednotky se váže kyselina D-glukuronová s N-acetyl-D-glukosaminem β -(1 \rightarrow 3) glykosidovou vazbou, jednotlivé jednotky jsou na sebe v lineárním řetězci vázány β -(1 \rightarrow 4) glykosidovými vazbami. Počet opakujících se jednotek v jedné molekule může dosahovat až 10 000, to odpovídá molekulové hmotnosti přibližně $4 \cdot 10^9$ g/mol, délka řetězce je pak až 10 μ m [29,30].

Oba tyto monosacharidy opakující se v řetězci HA jsou odvozeny od glukózy v konfiguraci beta. To umožňuje všem objemným skupinám (hydroxylovým, karboxylovým) být ve stericky výhodné ekvatoriální poloze, a díky tomu jsou tyto disacharidové jednotky energeticky velmi stabilní [30].



Obrázek 7: Struktura hyaluronanu [31]

3.2.2. Buněčná syntéza hyaluronanu

Buněčná syntéza HA je unikátní a vysoce kontrolovaný proces. Většina ostatních glykosaminoglykanů je syntetizována v Golgiho komplexu. Syntéza HA na rozdíl od syntéz těchto molekul nevyžaduje vazbu na jaderný protein k zahájení polymerace a probíhá tedy na vnitřní straně cytoplazmatické membrány, odkud je polymerací prodlužující se řetězec okamžitě vytlačován do extracelulárního prostoru nebo může zůstat uvnitř buňky. Tímto procesem vzniká řetězec o velké molekulové hmotnosti. Řetězec narůstá připojováním monosacharidové jednotky z uridindifosfoglukuronové kyseliny a uridindifosfo-N-acetylglukosaminu za uvolnění molekul UDP na redukující konec molekuly. HA vytlačený z buňky se může uvolnit nebo zůstat na jejím povrchu a tvořit pericelulární matrix [30,32,33].

Přirozeně je HA syntetizován třídou integrálních membránových proteinů (IMP) zvanou hyaluronan syntázy, konkrétně u obratlovců rozlišujeme HAS1, HAS2 a HAS3. IMP je molekula proteinu nebo shluk několika molekul, které se většinou rozpínají na povrchu biologických membrán (v případě HAS na povrchu cytoplazmatické membrány), na kterých jsou potřebné při úvodních krocích biochemické purifikace vznikajících molekul. Enzym HAS prodlužuje řetězec HA střídavým napojováním kyseliny D-glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu. Jednotlivé enzymy HAS se od sebe liší katalytickou aktivitou a molekulovou hmotností produktů, které syntetizují [30,33].

3.2.3. Výskyt hyaluronanu a jeho funkce

V lidském těle se HA nachází ve formě soli (důsledkem fyziologického pH), běžně se vyskytuje jako součást mezibuněčné hmoty, je v těle zastoupen i v tekutinách a ve většině tkáních, ale jeho množství v jednotlivých orgánech se výrazně liší. Funkce HA se odvíjí od jeho struktury. HA nese v roztoku záporný náboj, a to mu umožňuje vázat velké množství vody a tvořit viskózní gel, reguluje tedy hydrataci tkání. Dobře hydratovaná extracelulární matrix (ECM) je vhodným prostředím pro migraci a proliferaci buněk. Nejvyšší koncentrace HA je v synoviální tekutině kloubů, kde díky svým viskoelastickým vlastnostem plní lubrikační funkci, v mozku je jeho koncentrace mnohonásobně nižší. Díky svým vlastnostem hraje zásadní roli také v biomechanických vlastnostech mnoha tkání (například zvyšuje viskoelasticitu očního sklivce) [34,35].

HA se také uplatňuje při mnoha fyziologických a patofyziologických dějích. Pokud se objeví v organismu zánět, dochází k výrazné nadprodukci HA, který se váže na membránové receptory zánětlivých buněk. K nadprodukci také dochází při metastázování nádorů nebo při imunitních onemocněních [34].

3.2.4. Biodegradace hyaluronanu

Vzhledem k tomu, že se HA vyskytuje téměř ve všech tkáních a jeho koncentrace v různých tkáních se zásadně liší, je nutné udržovat rovnováhu mezi jeho produkcí a degradací. V ECM

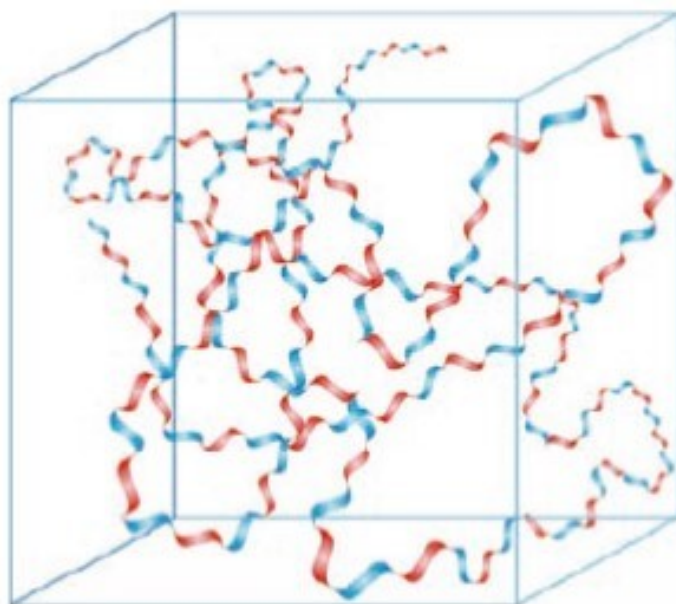
se vyskytuje HA o vysoké molekulové hmotnosti a svými vazbami na další makromolekuly se podílí na vlastnostech mezibuněčné hmoty. Aby se mohla molekula HA uvolnit z těchto vazeb, musí být nejprve degradována. Na degradaci HA ve větší míře se podílejí enzymy zvané hyaluronidázy, u lidí je jich celkem šest: HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4, PH-20 a HYALP1 [32,34].

Největší podíl na degradaci HA v somatických buňkách mají HYAL1 a HYAL2. HYAL2 je enzym nacházející se v plazmatické membráně, který štěpí řetězce velkých hmotností na molekuly o hmotnosti asi 20 kDa (50 disacharidových jednotek). Následně HYAL1 společně s β -D-glukuronidázou a β -hexosaminidázou degradují tyto molekuly na monosacharidy nebo na krátké fragmenty HA. Tento děj probíhá v lysozomech (HYAL1 se ale vyskytuje také v plazmě, synoviální tekutině a v moči). O roli dalších hyaluronidáz je ale známo mnohem méně. Pro HYAL3 existují důkazy prokazující určitou schopnost degradovat HA, SPAM1 je enzym uplatňující se při fertilizaci. Pro HYAL4 důkazy potvrzující jeho katalytickou činnost neexistují [32].

3.2.5. Hyaluronan v biotechnologiích

V posledních letech se začíná výrazně zvyšovat biotechnologické využití HA pro různé účely, od medicínského využití, až po kosmetické přípravky. Široké spektrum aplikací na živé systémy je dáno vysokou hygroskopicitou, viskoelasticitou, značnou biokompatibilitou a dalšími vlastnostmi. Biotechnologické vlastnosti HA se odvíjejí od struktury tohoto polymeru. Všechny objemné funkční skupiny jsou umístěny ve stericky výhodných ekvatoriálních polohách, což umožňuje jeho chemickou modifikaci. V axiálních polohách, které jsou pro derivace nevhodné, jsou umístěny atomy vodíku [34,36].

Na **obrázku 8** jsou zobrazeny pásovité struktury, které HA tvoří ve vodném roztoku. Tyto řetězce se do sebe zaplétají už při velmi nízkých koncentracích (1 mg/ml) a mohou také tvořit dvoušroubovice – tímto jevem jsou vysvětlovány neobvyklé reologické vlastnosti HA. Spirálovitý řetězec HA může vázat až tisícinásobek své hmotnosti vody. Fyzikální vlastnosti předurčují HA gel k využití například jako náhradu za synoviální tekutinu. Viskozita HA roztoku se zvyšuje s rostoucí koncentrací, elasticita s velikostí polymeru [34].



Obrázek 8: *Uspořádání hyaluronanu v roztoku [37]*

3.3. Izotermická titrační kalorimetrie

Izotermická titrační kalorimetrie je technika, kterou je možné s velkou citlivostí a přesností určit termodynamické parametry chemické reakce. Jedná se o titraci, při níž přichází ligand do kontaktu s makromolekulou při konstantní teplotě. Jednou z hlavních výhod techniky je, že pro měření stačí jen malé množství vzorku. Technika je postavena na termodynamickém principu – interakce dvou molekul vede k uvolnění nebo pohlcení tepla, podle toho, jestli je reakce exotermická nebo endotermická. Ze vztahu mezi změnou entalpie (ΔH) a změnou vnitřní energie systému (ΔE) vyplývá, že množství tepla (q) absorbovaného nebo uvolněného odpovídá změně entalpie, za předpokladu, že je v systému konstantní tlak:

$$\Delta H = \Delta E + P\Delta V \quad (1)$$

$$\Delta E = q + W = q - P\Delta V \quad (2)$$

$$\Delta H = q - P\Delta V + P\Delta V = q \quad (3)$$

Výměna tepla je jev doprovázející všechny fyziologické reakce, a proto nachází ITC využití také v této oblasti [38,39,40].

Měřením při izotermickém a izobarickém ději stanovíme vazebnou konstantu (K), reakční stechiometrii (n), změnu volné energie (ΔG°), entalpie (ΔH°) a entropie (ΔS°). Jedinou analýzou můžeme tedy stanovit celkový termodynamický charakter molekulární vazby [41].

3.3.1. Instrumentace ITC

Kalorimetr, ve kterém probíhá ITC, sestává ze dvou cel – referenční a měrné. Cely jsou identické, vyrobené z inertního, vysoce vodivého kovu. Jsou umístěny v adiabatickém plášti a kontakt mezi nimi je zprostředkován termoelektrickým zařízením. Pokud při reakci dojde k uvolnění nebo pohlcení tepla, termoelektrické zařízení dává odezvu ohříváčům, které kompenzují tento teplotní rozdíl a vrací cely na původní teplotu. Termoelektrické zařízení pracuje na základě Peltier-Seebeckova principu – přímo převádí rozdíl teplot na elektrické napětí a obráceně [42,43].

Při experimentu je měřen teplotní rozdíl mezi měrnou a referenční celou – výstupem měření je závislost tepelného toku na čase. Pokud je reakce exotermická, hodnoty tepelného toku se pohybují v záporných hodnotách, což reprezentuje množství energie, které je potřeba ze systému odebrat pro jeho udržení na konstantní teplotě. Naopak při endotermické reakci jsou hodnoty tepelného toku kladné. Když je měrné cele konstantně dodávána energie a termočlánky detekují změnu teploty mezi celami, energie dodávaná měrné cele je snížena nebo zvýšena úměrně změně teploty tak, aby došlo k návratu do rovnovážného stavu [38,39].

3.3.2. Referenční cela

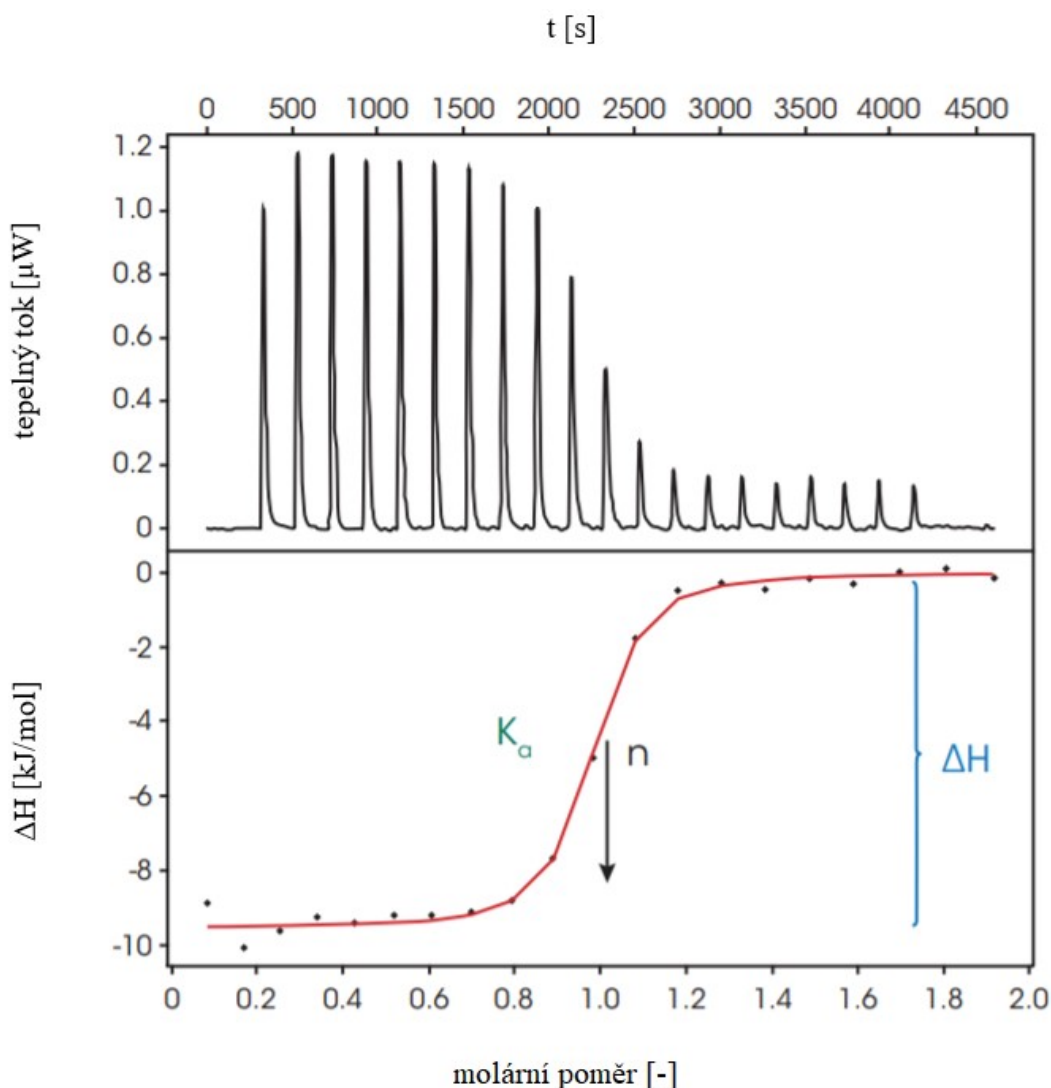
Referenční cela se obvykle plní vodou nebo pufrem. Výsledky měření pro celu s vodou a pufrem bývají často velmi podobné, a proto se pro jednoduchost častěji plní referenční cela vodou. Obecně se postupuje tak, že se referenční cela plní roztokem o stejné tepelné kapacitě jako má rozpouštědlo měřeného vzorku. V každém případě platí, že se do měrné cely dává stejný objem vody nebo pufru jako je objem vzorku v měřicí cele [38].

3.3.3. Injekční jehla a měrná cela

Přídavky titračního činidla jsou do měřicí cely dávkovány stříkačkou s pomocí automaticky řízené pumpy. Jehla stříkačky může sloužit jako míchací mechanismus, ale může být i od míchadla oddělená (záleží na přístroji), titrační činidlo je pak obvykle dodáváno nad horní část lopatek míchadla. Dodávané objemy závisí na objemu cely přístroje a na tepelném toku generovaném při experimentu. Objemy přídavků by měly být nastaveny tak, aby počet přídavků byl dostatečný na to, aby byl z měření dostatečný počet zaznamenaných bodů, zároveň ale musí být dávkovaný objem takový, aby každý přídavek vyprodukoval značnou změnu tepla [38].

3.3.4. Experiment ITC

Titrace mohou probíhat dvěma způsoby (kontinuální nebo přírůstková titrace), přičemž častěji se používá přírůstková titrace. Typickým výstupem této metody je termogram zobrazený na **obrázku 9**. V horní části **obrázku 9** je graf závislosti tepelného toku na čase. Každý pík představuje přidavek titračního činidla do měrné cely. Ve spodní části **obrázku 9** je graf závislosti změny entalpie na molárním poměru, získaný integrací píků. Molární poměr je podíl látkového množství titračního činidla a titrovaného roztoku. Jednotlivými body je proložena křivka a je získán inflexní bod K_a , ze kterého stanovíme reakční stechiometrii, v experimentech provedených pro účely této práce odpovídá kritické micelární koncentraci tenzidů, z rozdílu entalpie na počátku a na konci experimentu stanovíme celkovou entalpii reakce.



Obrázek 9: ITC termogram [38]

4. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Tato kapitola nabízí shrnutí studií a objevů z vědeckých publikací, zaměřených na interakce opačně nabitých tenzidů a interakce tenzidů s polyelektrolyty, zejména pak s hyaluronanem, a protože je tato práce úzce spjata s ITC, bude také věnována pozornost této technice.

Počátky izotermické titrační kalorimetrie spadají do devadesátých let dvacátého století, do doby, kdy začal vývoj vysoce citlivého vybavení pro kalorimetrii. Techniku představili světu v roce 1990 ve svém článku Ernesto Freire a kol. Na vývoj techniky se ve své práci zaměřil R. J. Falconer [44]. Díky komerčně dostupnému vybavení a rozšíření techniky se množství publikací odkazující se na ITC každým rokem zvyšuje. Metoda našla okamžitě uplatnění ve studiu proteinů, lipidů, nukleových kyselin, polysacharidů a syntetických molekul. Prudký vývoj techniky probíhal přibližně do roku 2010. V dnešní době je již ITC rozvinutou technikou, přístroje jsou obsluhovány přes uživatelsky přívětivý software a fungují automaticky.

W. Loh, C. Brinatti a K. C. Tam ve své studii [45] popisují příklady nejdůležitějších aplikací ITC při zkoumání asociací tenzidů. Konstatují, že ITC je jediná technika, kterou lze při studiu agregačního chování koloidních systémů jediným experimentem přímo stanovit termodynamické parametry (kritickou micelární koncentraci a entalpii micelizace), a že využití ITC v této oblasti je nevyhnutelné.

Již dlouhou dobu je známo, že opačně nabitě tenzidy CTAB a SDS mohou tvořit různé typy agregátů. Ve smíšených roztocích mohou tvořit několik typů micel, smíšené monolamelární a multilamelární vezikuly nebo jejich nerozpustné produkty. Na interakce tenzidů CTAB a SDS se ve své práci zaměřili A. Mal, S. Bag, S. Ghosh a S. P. Moulík [3]. Vlastnosti tenzidů byly zkoumány zvláště pro koncentraci nižší, než je jejich CMC, pro koncentraci odpovídající jejich CMC a pro koncentraci vyšší, než jejich CMC. Jejich fázové chování a kritické koncentrace vezikul byly stanoveny turbidimetrií, konduktometrií a kalorimetrií. Tvorba vezikul byla dokázána fluorescenční anizotropií. Rozměry vezikul byly měřeny dynamickým rozptylem světla, zeta potenciál systémů se v závislosti na jejich složení pohyboval v kladných i záporných hodnotách. Zvyšování teploty nahrávalo přechodu vezikul na smíšené micely. Tvorba amfifilních komplexů iontových párů byla dokázána konfokální fluorescenční mikroskopií. V závěrech studie poukazuje na potenciální využitelnost stabilních vezikul k enkapsulaci a transportu léčiv, v biotechnologiích nebo k syntéze nanomateriálů.

Na interakce tenzidů s hyaluronanem se již na konci osmdesátých let dvacátého století zaměřili K. Thalberg a B. Lindman [46]. Jako tenzid použili alkyltrimethylamonium bromid s řetězcem obsahujícím 8 až 16 uhlíků. K charakterizaci interakcí použili separaci fází, vodivostní měření, NMR a solubilizaci barviv. Výzkum prokázal, že hyaluronan interaguje s tenzidy obsahujícími řetězec dlouhý minimálně 10 uhlíků a tvoří s nimi ve vodě nerozpustné komplexy, kdy tenzid tvoří na řetězci hyaluronanu agregáty podobné micelám. Při vysoké koncentraci tenzidu se tvoří sraženina, kterou je možné dalším přídatkem tenzidu opět rozpustit.

Na termodynamiku tvorby micel tenzidů CTAB a TTAB, s přídatkem hyaluronanu a bez něj, se v roce 2016 zaměřili J. Krouská, M. Pekař, M. Klučáková, B. Šarac a

M. Bešter-Rogač [47]. Kalorimetrií a konduktometrií bylo dokázáno, že při vyrovnání náboje hyaluronanu a opačně nabitého tenzidu dochází k makroskopické fázové separaci. Turbidimetrie a potenciometrie odhalila interakce hyaluronan-tenzid při velmi nízkých relativních koncentracích. Z rozdílů interakcí hyaluronanu s CTAB a TTAB lze odvodit, že na systém hyaluronan-tenzid mají mimo elektrostatických interakcí vliv také interakce hydrofobní.

Interakce hyaluronan-tenzid ve velmi zředěných roztocích studovali T. Pilgrová, T. Venerová, F. Mravec a M. Pekař [48]. Bylo pozorováno fázové chování těchto systémů ve vodném prostředí, s koncentrací hyaluronanu 2-100 mg/l. Fluorescenční sonda odhalila tvorbu micelárních struktur tenzidu na hyaluronanu při značně nižších koncentracích, než je CMC. Tato studie, využívající fluorescenci, potvrzuje jeden ze závěrů předchozí zmíněné studie – hlavní parametr, ovlivňující fázové chování těchto systémů, je poměr náboje tenzidu a hyaluronanu. Agregáty byly skladovány 3 měsíce při teplotě 4 °C. V těchto podmínkách byly stabilní. Tyto agregáty byly též podrobeny zahřívání a chlazení v rozmezí 10-50 °C, ředění a přidavku 0,15 mol·dm⁻³ NaCl. Změna teploty v uvedeném teplotním rozsahu stabilitu neovlivnila, ředění a přidavek soli vedli k rozpadu komplexu hyaluronan-tenzid.

Komplexy tenzidů mají potenciál stát se nosiči léčiv a DNA. Překážkou v tomto využití je jejich toxicita pro některé typy buněk. Tento problém je však možné zmírnit začleněním hyaluronanu do komplexu s kationickým tenzidem. Cytotoxicitu systémů hyaluronan-tenzid studovali P. Sauerová, T. Pilgrová, M. Pekař a M. Hubálek Kalbáčová [49]. Pro studii použili komplexy HA-CTAB a HA-Septonex a testovali jejich cytotoxický efekt na lidské osteoblasty, keratinocyty a fibroblasty. Koncentrace obou tenzidů byly 3, 6 a 8 μmol·dm⁻³, koncentrace HA 5 a 500 mg/l. Bylo prokázáno, že hyaluronan skutečně snižuje cytotoxicitu obou tenzidů, a to ve všech kombinacích uvedených koncentrací.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. Použité chemikálie

Tabulka 1: Použité chemikálie

	Výrobce	Molekulová hmotnost	Šarže	CAS
CTAB	Sigma Aldrich	364,45 g·mol ⁻¹	H5882-1KG	57-09-0
SDS	Sigma Aldrich	288,38 g·mol ⁻¹	L3771-100G	151-21-3
Septonex	GNB Chem, a.s.	422,48 g·mol ⁻¹	511SEP003	10567-02-9
Hyaluronan sodný	Contipro, a.s.	250-450 kDa		9067-32-7

5.2. Použité přístroje

5.2.1. Kalorimetr TAM III, TA Instruments, USA

TAM III je vícekanálový mikrokalořimetr společnosti TA Instruments. Poskytuje flexibilní měření s vysokou citlivostí a vysokým výkonem. Do mikrokalořimetru je možné umístit (dle konkrétního dostupného vybavení a příslušenství) různé typy měřicích cel (kalořimetrů) podle typu experimentu (titrace ITC, uzavřené ampule nebo celu pro stanovení rozpouštěcí entalpie). Pokud je přístroj vybaven více pozicemi pro měření, lze provádět všechna měření zároveň. Jediným omezením je to, že všechny kalořimetry jsou řízené jedním termostatem, proto lze měřit najednou jen při jednom teplotním nastavení. Objem měřicí cely pro ITC je v našem případě 1 ml a stříkačky pro dávkování přísadků 250 µl. Vrtulové míchadlo se nasazuje na hřídel, která slouží jako držák měřicí cely.



Obrázek 10: TAM III [50]

5.2.2. Kalorimetr Microcal PEAQ-ITC, Malvern, UK

Microcal PEAQ-ITC je vysoce citlivý kalorimetr, který se hodí k charakterizaci molekulárních interakcí malých molekul, proteinů, nukleových kyselin a dalších biomolekul nebo k měření kinetiky enzymů. Teplotní rozsah je 2-80 °C, objem měrné cely je 200 μ l a objem stříkačky 40 μ l. V tomto případě slouží dávkovací jehla zároveň jako míchadlo.



Obrázek 11: *Microcal PEAQ-ITC* [51]

5.3. Příprava zásobních roztoků

5.3.1. Příprava zásobních roztoků tenzidů

Po převedení navážky do odměrné baňky a doplnění vodou byl vždy roztok tenzidu ponechán 24 hodin na magnetické míchačce. Tímto způsobem byly připraveny zásobní roztoky CTAB o koncentraci $20 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$, Septonexu o koncentraci $20 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a SDS o koncentraci $160 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Pro potřeby jednotlivých měření byly potom tyto zásobní roztoky ředěny tak, abychom po skončení experimentu získali vhodnou titrační křivku pro vyhodnocení micelární nebo agregační koncentrace.

5.3.2. Příprava zásobního roztoku hyaluronanu

Zásobní roztok hyaluronanu o koncentraci $0,1 \text{ g/l}$ s molekulovou hmotností 250-450 kDa (molekulová hmotnost byla zvolena na základě projektu) byl připraven minimálně 24 hodin před měřením. Poté byl skladován v lednici.

5.3.3. Příprava IPA

Zásobní roztok IPA použitý pro účely této práce byl připraven a dodán kolegy z FCH VUT v Brně podílejícími se na projektu. Postup přípravy je uveden v následujících odstavcích.

5.3.3.1. Příprava zásobního prášku IPA

Byly připraveny roztoky CTAB a SDS o koncentracích $20 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$, jež byly následně smíchány v poměru 1:1 a ponechány na míchačce při teplotě $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Roztok byl odstředěn při 3500 otáčkách za minutu, filtrován na Büchnerově nálevce za sníženého tlaku a byl získán zásobní prášek IPA.

5.3.3.2. Příprava zásobních roztoků v chloroformu

Byly připraveny zásobní roztoky IPA v chloroformu a DDAC v chloroformu o koncentracích $2 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a $4 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

5.3.3.3. Příprava cIPA + cholesterol (43 mol. %)

Roztoky cIPA (IPA v chloroformu) byly získány kombinací zásobních roztoků IPA a DDAC v chloroformu v poměru 9:1 (celková koncentrace 2 a $4 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$).

5.3.4. Měření na kalorimetru TAM III

Kalorimetr TAM III byl využit pro studium CMC vybraných tenzidů ve vodě a následně ke studiu interakcí CTAB a SDS, opačně nabitých tenzidů. Referenční cely kalorimetru obsahovala vždy 1 ml vody, všechny experimenty probíhaly při teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a rychlost míchání byla 100 otáček za minutu.

Do měrné cely bylo vždy napipetováno 750 μl titrovaného roztoku, při studiu CMC jednotlivých tenzidů vždy voda a při studiu interakcí opačně nabitých tenzidů vodný roztok CTAB.

Stříkačka s pístem a kapilárou byla pipetou naplněna titračním činidlem, při stanovení CMC tenzidů vždy vodným roztokem daného tenzidu a při studiu interakcí opačně nabitých tenzidů vodným roztokem SDS. Naplněná stříkačka byla následně umístěna do automatické pumpy a její kapilára byla zasunuta skrz hřídel do měřicí cely.

V softwaru byly následně nastaveny parametry titrace. Samotná titrace započala po ustálení elektrického signálu přístroje. V 50 přidávkách titračního činidla po 5 μl přes kapiláru byl tedy objem měrné cely doplněn na konci titrace na celkový objem 1 ml. Intervaly mezi přidávkami byly 20 minut.

Každý přidávek titračního činidla způsobil tepelnou změnu systému, kterou přístroj zaznamenal. Výstupem měření byla závislost tepelného toku na čase a tato surová data byla zpracována a přepočítána na závislost změny entalpie na koncentraci titračního činidla.

5.3.5. Měření na kalorimetru Microcal PEAQ-ITC

Kalorimetr Microcal PEAQ-ITC byl využit pro studium interakcí systému IPA a DDAC v chloroformu o koncentracích $2 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a $4 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ s roztokem HA. Nejprve byl proveden tento experiment s použitím kalorimetru TAM III, ale bylo zjištěno, že tyto interakce jsou velmi slabé a poskytují nízké změny signálu na titrační křivce (nelze rozlišit signál přídavku od šumu). Proto byl pro tento typ experimentů zvolen přístroj s větší citlivostí, což umožnilo získat uspokojivější titrační křivku. Měření probíhalo při teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

6. VÝSLEDKY A DISKUZE

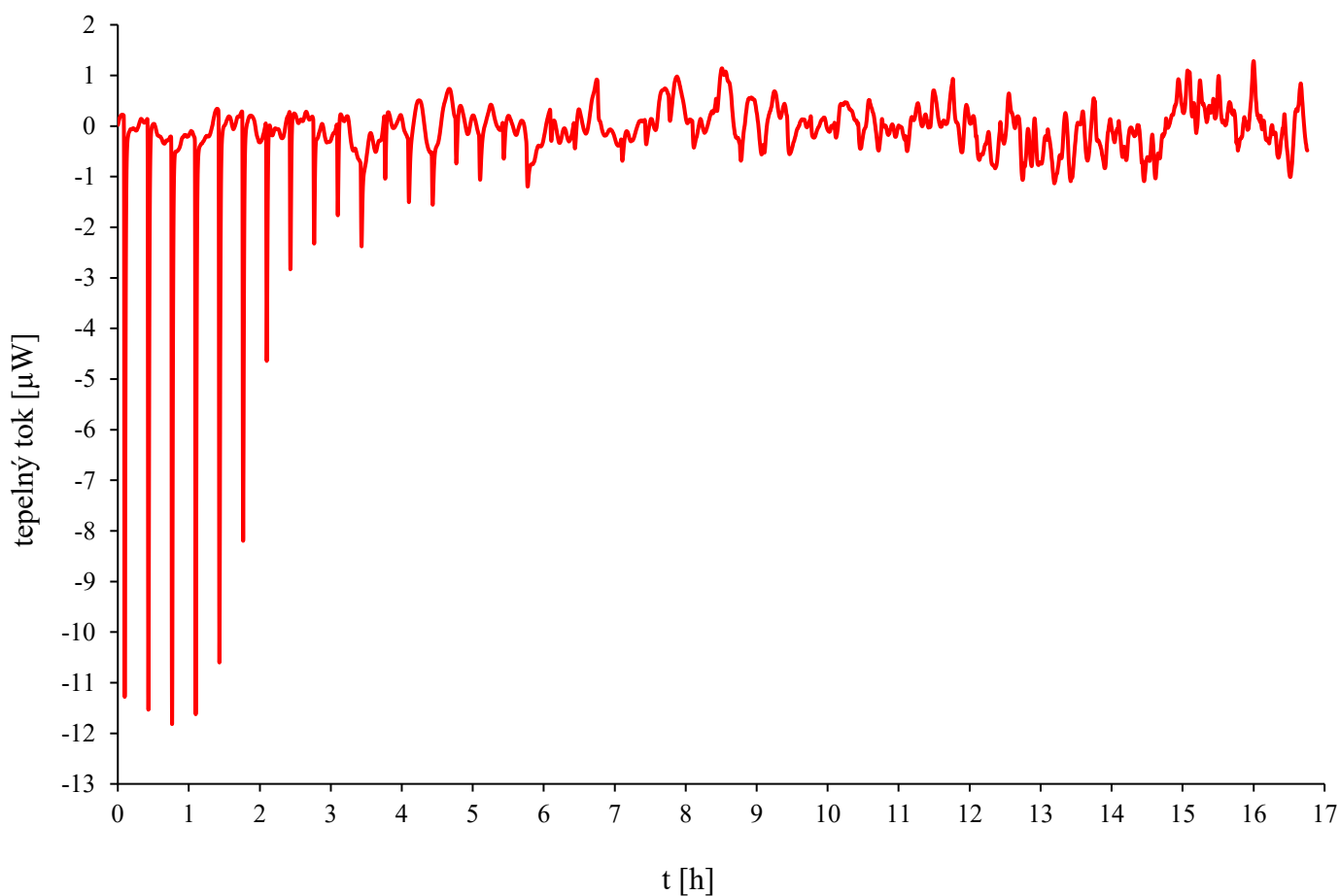
6.1. Studie CMC tenzidů a jejich vzájemné interakce

Tabulka 2: Tabelovaná hodnota CMC tenzidů CTAB [13], SDS [8] a Septonexu [17] při 25 °C

tenzid	CMC [mmol·dm ⁻³]
CTAB	0,9
SDS	8,3
Septonex	0,8

Nejprve byla metoda ITC využita ke stanovení kritické micelární koncentrace tenzidů. Do 750 μl vody bylo titrováno 250 μl vodného roztoku tenzidu a cílem bylo zvolit koncentrace roztoku tenzidu tak, aby bylo CMC dosaženo v průběhu analýzy. Z výstupu takto nastaveného měření je pak možné mimo CMC vyčíst i celkovou entalpii reakce a další parametry.

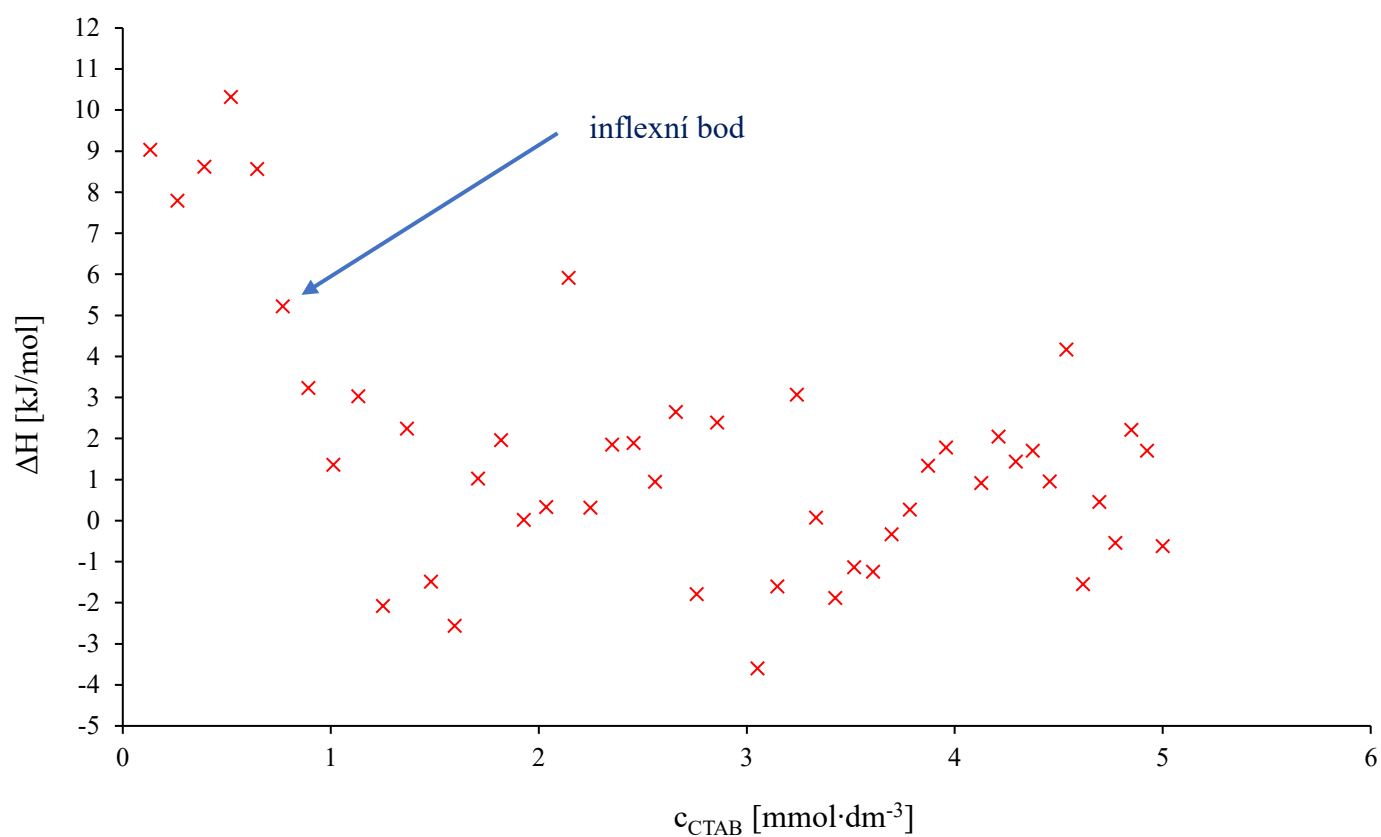
Pro CTAB a Septonex bylo tohoto efektu docíleno volbou 20 mmol·dm⁻³ roztoku. Příkladem výstupu ze správně nastaveného měření je **termogram** zobrazený níže, ze kterého je patrné, že první přídavky tenzidu do vody generují značný tepelný tok. Po několika přídavcích se reakce dostává do inflexního bodu, kdy koncentrace tenzidu odpovídá CMC v daném rozpouštědle, produkovaný tepelný tok se s každým přídavkem snižuje, až je tenzid v nadbytku a další přídavky působí v systému minimální tepelnou změnu. Tepelný tok je energie, kterou je potřeba do systému přidat, nebo ze systému odebrat, pro udržení systému na konstantní teplotě. Z naměřených negativních hodnot tepelného toku můžeme konstatovat, že proběhlý děj byl endotermického charakteru.



Graf 1: Termogram z kalorimetru TAM III; titrace $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ CTAB do vody

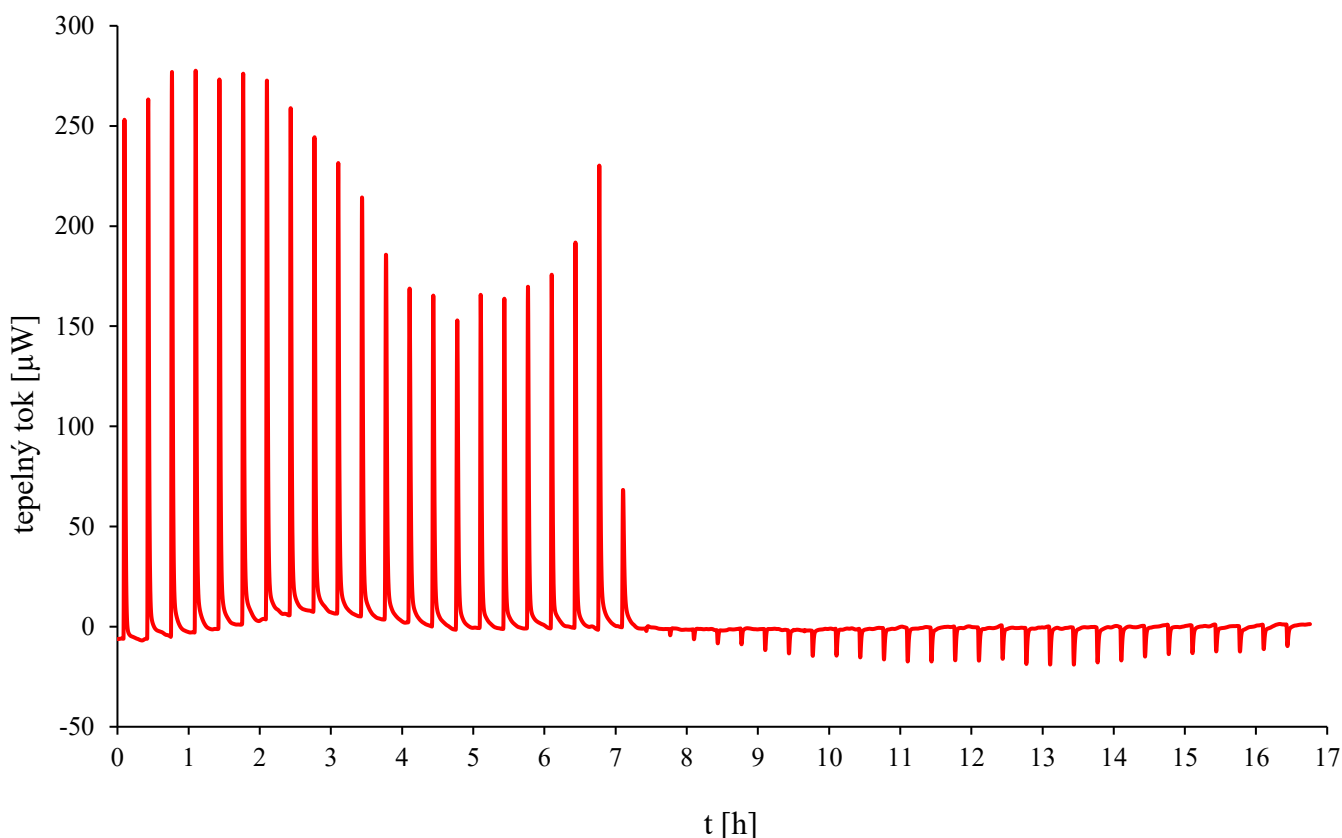
Stejným způsobem by se stanovila i CMC tenzidu SDS, ale experiment se nepodařilo realizovat tak, aby se data dala snadno vyhodnotit. Bylo provedeno několik titrací SDS do vody, které však neměly uspokojivé výsledky z několika důvodů: signál s velkým příspěvkem šumu, nevhodně zvolená koncentrace zásobního roztoku tenzidu, aj., proto se v dalším textu pracuje jen s hodnotami CMC uváděnými v literatuře.

Integrací naměřených surových dat dostaneme závislost změny entalpie na koncentraci titračního činidla, která má tvar S-křivky. Názornou ukázkou je níže zobrazený **graf 2**, který byl tímto způsobem získán z **grafu 1**.



Graf 2: Integrace záznamu titrace $20 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ CTAB do vody

Následovala studie interakcí opačně nabitých tenzidů. Bylo provedeno několik analýz, roztoky kladně nabitých tenzidů CTAB a Septonexu o různých koncentracích byly titrovány různě koncentrovanými roztoky záporně nabitého SDS. Očekávaných výsledků, ze kterých lze jasně popsat průběh titrace, bylo dosaženo titrací 10 mmol·dm⁻³ vodného roztoku CTAB 60 mmol·dm⁻³ vodným roztokem SDS. Kombinace CTAB-SDS je stěžejní v projektu, v jehož rámci práce probíhala, proto byla použita ve všech dalších měřeních.



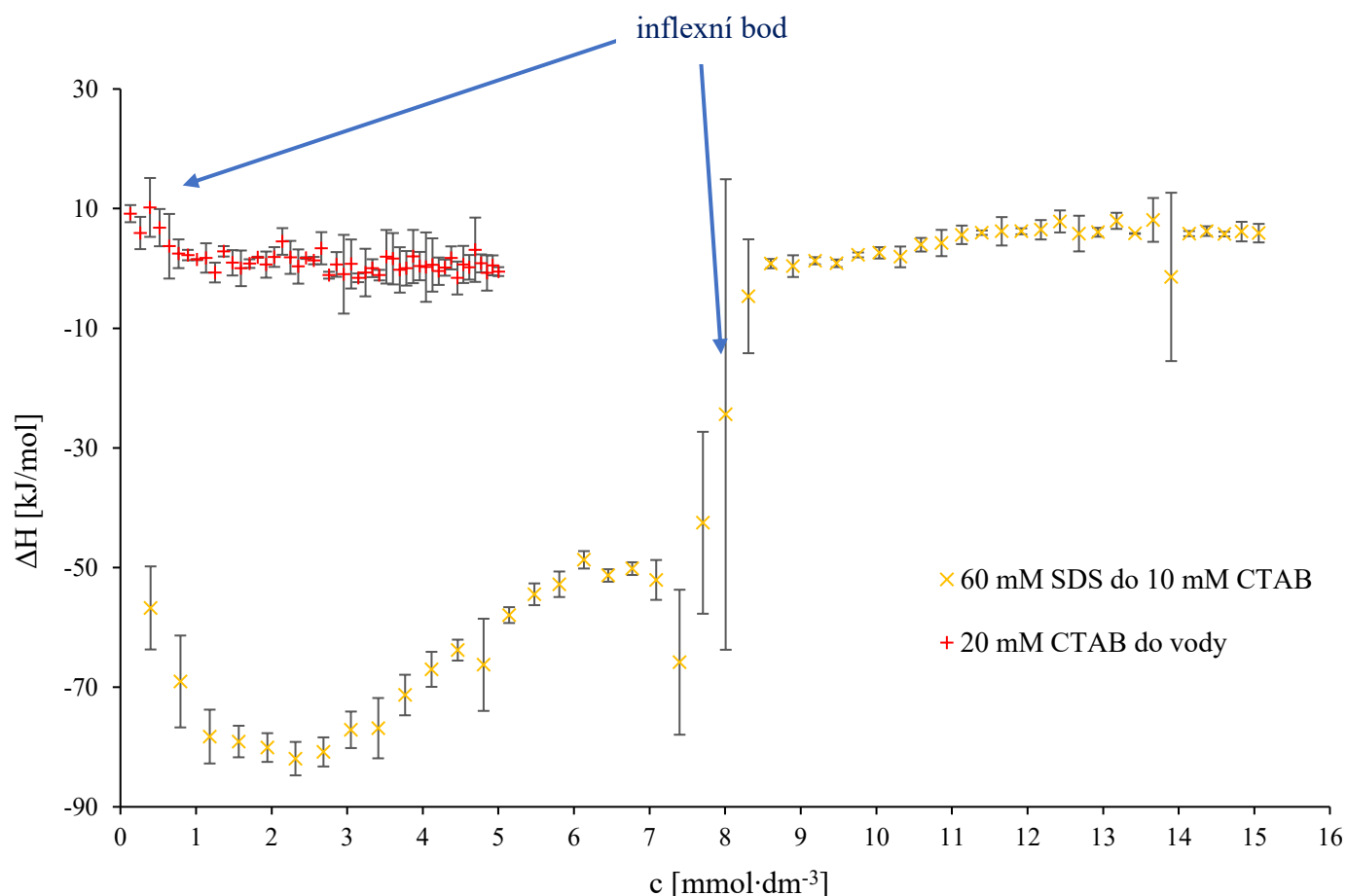
Graf 3: Termogram z kalorimetru TAM III; titrace 60 mmol·dm⁻³ SDS do 10 mmol·dm⁻³ CTAB

První přídatky opět způsobují značné tepelné změny. Tentokrát je patrné, že v systému zpočátku probíhaly exotermické děje.

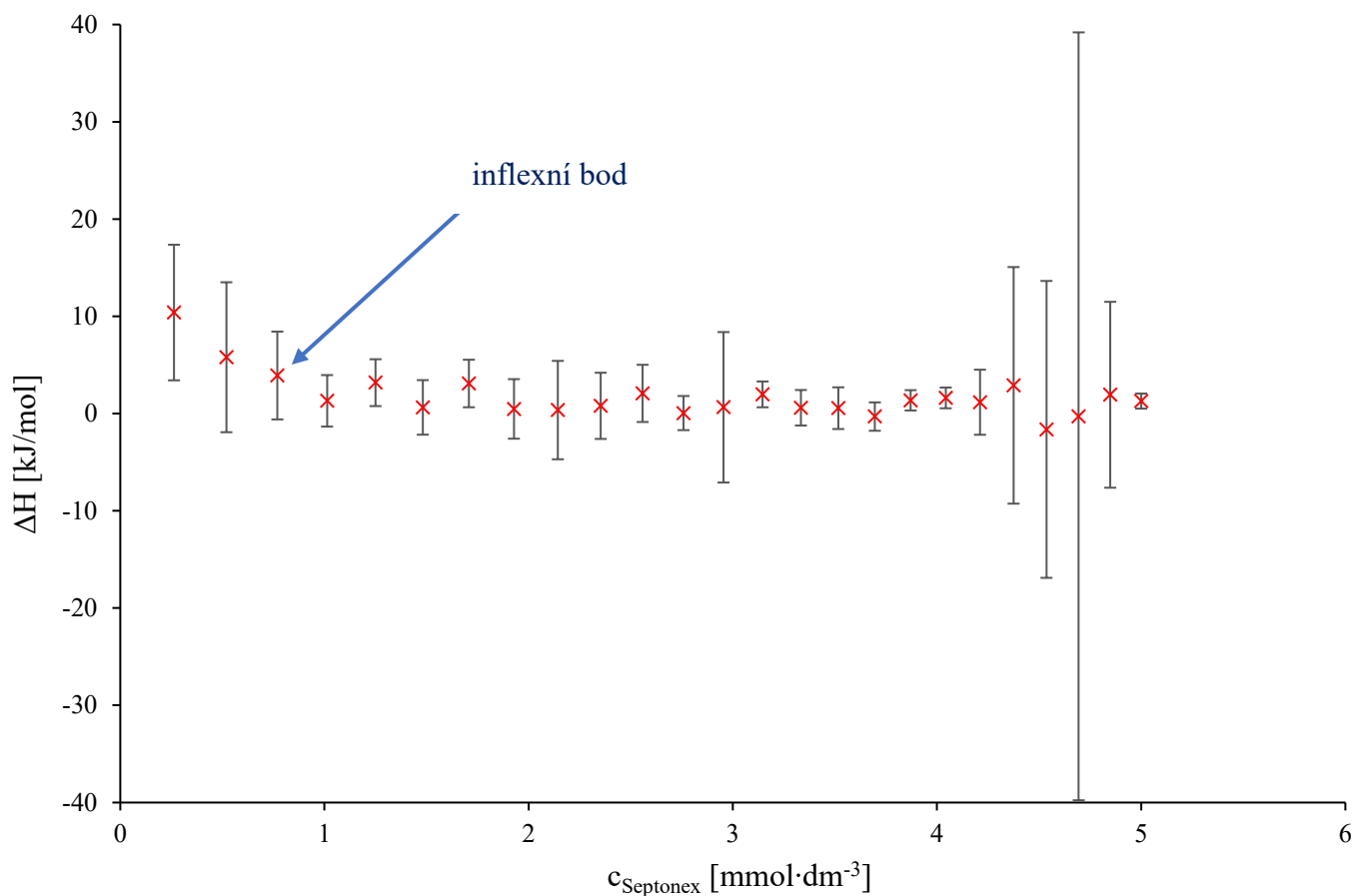
Za povšimnutí stojí porovnání tepelného toku generovaného při titraci roztoku tenzidů do vody a při titraci roztoku tenzidu do roztoku opačně nabitého tenzidu. Zatímco v prvním případě, kdy tenzid interagoval s čistou vodou, absolutní hodnota tepelného toku nepřesáhla 12 μW, při interakci opačně nabitých tenzidů tato hodnota přesahuje 250 μW. Z tohoto jevu můžeme vyvodit závěr, že mezi opačně nabitými tenzidy existují interakce, které jsou mnohem silnější, než interakce tenzidu s molekulami vody. Kvantifikovat, jak přesně se síla těchto interakcí liší, nebylo účelem této práce. Z těchto měření to nelze stanovit, protože byly voleny různé koncentrace tenzidů pro jednotlivé experimenty, a to proto, aby bylo z výstupu měření možné popsat, k jakým dějům z hlediska termodynamiky v průběhu titrace dochází.

Po vytitrování CTAB způsobují další přídavky SDS minimální tepelné výkyvy v systému, děj je endotermický. Důvod těchto tepelných jevů je stejný, jako u úvodních titrací tenzidů do vody – tenzid titrovaný do měrné cely přístroje interaguje s vodou a je pohlceno malé množství tepla. Toto měření bylo zároveň využito ke stanovení kritické micelární koncentrace tenzidu SDS.

Plochy píků byly zintegrovány a získaná hodnota tepla byla použita pro konstrukci diagramu závislosti změny entalpie na koncentraci titračního činidla. Každý systém byl minimálně třikrát proměřen a naměřené hodnoty byly v programu MS Excel zprůměrovány a vyneseny do grafu, včetně směrodatných odchylek v podobě chybových úseček. Stěžejními tenzidy v projektu, v jehož rámci tato práce probíhala, jsou CTAB a SDS, proto jsou měření, ze kterých vyčteme jejich CMC společně v **grafu 4**, a protože CTAB a Septonex mají podobné hodnoty CMC a jejich stanovení probíhalo stejným způsobem, nebylo možné zobrazit výsledky v jednom grafu, aniž by se překrývaly a byly nepřehledné. Výsledná data pro Septonex jsou v **grafu 5**.



Graf 4: Titrace 60 mmol·dm⁻³ SDS do 10 mmol·dm⁻³ CTAB; titrace 20 mmol·dm⁻³ CTAB do vody; na vodorovné ose je vždy koncentrace titračního činidla

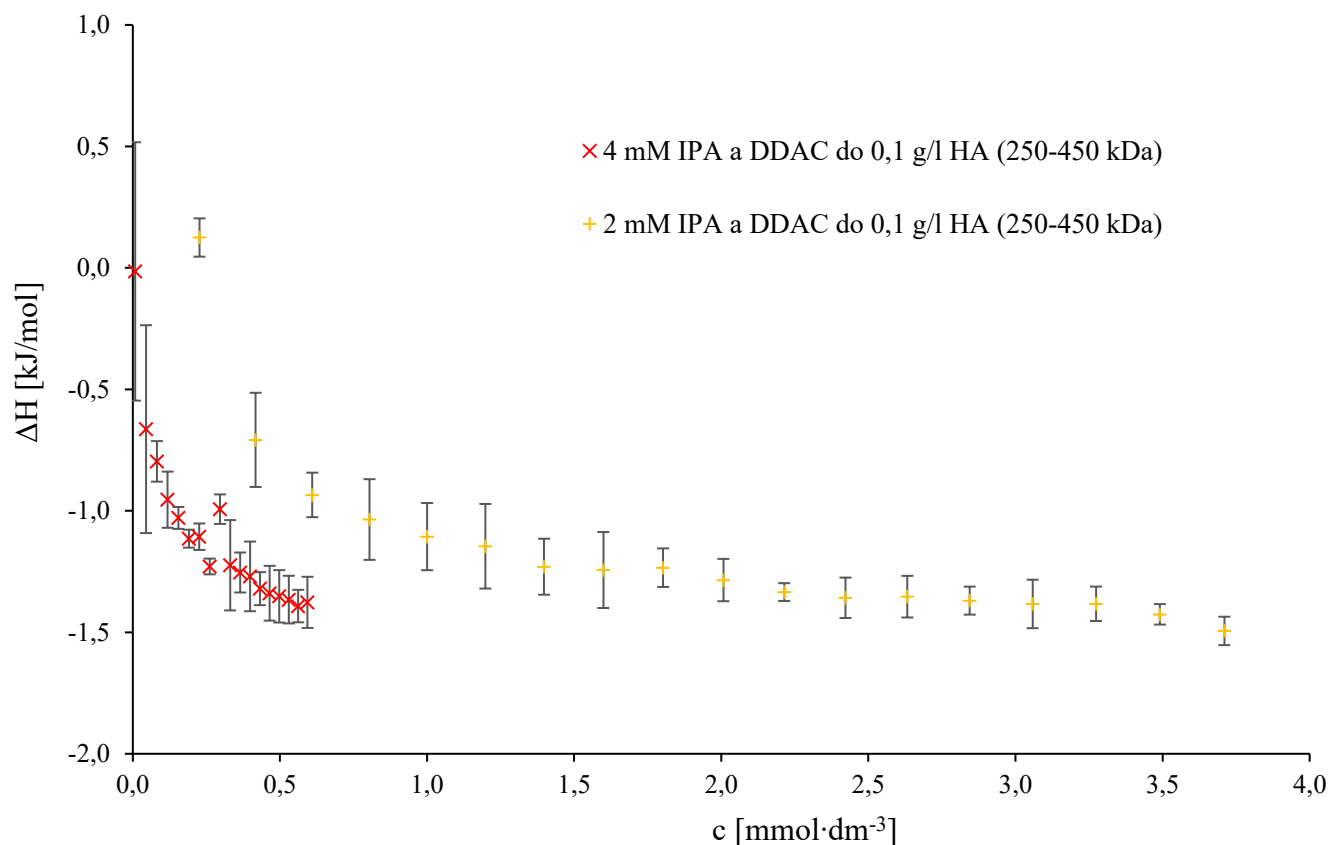


Graf 5: Titrace $20 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ Septonexu do vody

Kritická micelární koncentrace tenzidů CTAB a Septonexu byla stanovena z **grafu 4** a **grafu 5**. CMC tenzidu CTAB je $0,9 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a CMC Septonexu je $0,8 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Tyto stanovené hodnoty CMC odpovídají tabelovaným hodnotám, uvedeným v **tabulce 2**. Naměřená CMC tenzidu SDS je $8,0 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$, o 4 % nižší, než tabelovaná CMC. Odchylka mohla být způsobena kolísáním signálu v přístroji při měření. Výsledky jsou shrnuty v **tabulce 3**.

6.2. Studie interakcí kataniontových vezikulárních systémů a hyaluronanu

Připravený roztok HA o koncentraci 0,1 g/l byl titrován dodaným IPA a DDAC v chloroformu o celkové koncentraci $2 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a $4 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Cílem studie bylo dokázat interakce v tomto systému technikou ITC. Výsledky měření obou koncentrací prokázaly totožný trend.



Graf 6: Titrace 2 a $4 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ IPA a DDAC v chloroformu do $0,1 \text{ g/l}$ HA ($250\text{-}450 \text{ kDa}$); na vodorovné ose je koncentrace IPA a DDAC v chloroformu

Závislost změny entalpie na koncentraci IPA a DDAC v chloroformu, titrovaného do roztoku hyaluronanu, je zobrazena v **grafu 6**. Je patrné, že se entalpie v průběhu analýzy mění. Z toho můžeme usuzovat, že v systému, obsahujícím IPA tvořený SDS a CTAB, kladně nabitý tenzid DDAC a záporně nabitý polyelektrolyt HA, skutečně dochází k interakcím a tyto interakce lze prokázat metodou ITC. Měření bylo nutné provést na kalorimetru Microcal PEAQ-ITC, který je citlivější než TAM III. Zatímco entalpie interakcí opačně nabitých tenzidů se pohybovaly v řádech stovek kJ/mol, interakce IPA a DDAC s hyaluronanem mají entalpii v rozsahu jednotek kJ/mol.

6.3. Shrnutí výsledků

Tabulka 3: *Tabelované a naměřené hodnoty CMC tenzidů*

tenzid	CMC [mmol·dm ⁻³]	
	tabelovaná	naměřená
CTAB	0,9	0,9 ± 0,1
SDS	8,3	8,0 ± 0,3
Septonex	0,8	0,8 ± 0,1

Tabulka 4: *Naměřená reakční entalpie*

system	ΔH [kJ·mol ⁻¹]
CTAB-voda	-10
Septonex-voda	-10
SDS-CTAB	80
IPA-HA	-1,4

Pro účely této práce byla aproximací z grafů stanovena reakční entalpie (odečtením konečné entalpie od entalpie na počátku titrace) a také byly tímto způsobem prokázány a porovnávány síly interakcí v pozorovaných systémech. V navazující práci by mělo být provedeno více měření se zaměřením další parametry, které lze kalorimetrií stanovit.

ZÁVĚR

Interakce tenzidů s vodou, opačně nabitých tenzidů ve vodném prostředí a systémů obsahujících IPA v chloroformu, kladně nabitý tenzid a záporně nabitý hyaluronan byly studovány metodou ITC. Účelem práce bylo optimalizovat metodu pro účely charakterizace agregačního chování tenzidů a tvorby komplexu hyaluronanu a kladně nabitého tenzidu.

Na počátku proběhla kalorimetrická studie chování samotných tenzidů ve vodě s očekáváním, že po optimalizaci použité koncentrace vodného roztoku tenzidu pro titraci do vody bude možné z naměřených výsledků vyhodnotit kritickou micelární koncentraci. Takto byla stanovena CMC Septonexu a CTAB. CMC tenzidu SDS byla stanovena při následném studiu interakcí opačně nabitých tenzidů.

Pro studium chování opačně nabitých tenzidů ve vodném prostředí byly vybrány systémy SDS-CTAB a SDS-Septonex o různých koncentracích. Byla stanovena CMC SDS, a také byly získány poznatky o agregačním chování pozorovaných systémů. Z naměřených hodnot můžeme prohlásit, že interakce mezi opačně nabitými tenzidy jsou mnohem silnější, než interakce tenzidu s molekulami vody – jejich absolutní hodnoty entalpií jsou mnohem vyšší, než absolutní hodnoty entalpie interakcí tenzidů s vodou. Metodou ITC je též možné stanovit další termodynamické parametry těchto systémů, jako jsou změna Gibbsovy energie, změna entropie, vazebná konstanta nebo reakční stechiometrie, to však nebylo hlavním účelem této práce.

Následovala studie systémů sestávajících z kataniontových vezikulárních systémů tvořených tenzidy CTAB a SDS, kladně nabitého tenzidu DDAC a záporně nabitého polyelektrolytu HA. Tyto vezikulární systémy, obsahující jak hydrofobní, tak hydrofilní část, umožňují enkapsulaci hydrofobních i hydrofilních látek a mají potenciální využití v medicíně jako nosiče léčiv a DNA. Stabilitu a vlastnosti těchto systémů je možné ovlivnit přítomností hyaluronanu, který s kladně nabitými tenzidy tvoří komplexy. Tenzidy tvoří micelární struktury na hyaluronanu při mnohem nižších koncentracích, než je jejich CMC ve vodě a hyaluronan zároveň snižuje jejich toxicitu. Účelem této části práce bylo dokázat, že interakce v tomto systému skutečně existují a zároveň využít metodu ITC pro tyto účely. Při titraci IPA a DDAC v chloroformu do vodného roztoku HA byla naměřena změna entalpie, a tím byla dokázána tvorba těchto interakcí metodou ITC. Jejich síla je mnohem menší, než u všech ostatních studovaných systémů, což je důsledkem velmi nízké koncentrace tenzidu, se kterým HA interaguje. Slabá intenzita těchto interakcí z pohledu ITC zde byla očekávána.

Na stanovení zmíněných termodynamických parametrů, kterým se tato práce nevěnuje, by mohla být zaměřena navazující práce. Také by se mohla věnovat vlivu molekulové hmotnosti hyaluronanu na vlastnosti komplexu tenzid-hyaluronan. Pro účely této práce byla použita střední molekulová hmotnost, další práce by mohla být zaměřena na velmi nízkou a velmi vysokou. Tenzidy v komplexu s hyaluronanem jsou vnímány jako potenciální náhrada současných nosičů léčiv, proto by se pro tyto účely navazující práce měla také zaměřit na parametry interakcí tohoto komplexu při tělesné teplotě (všechna měření v této práci probíhala při 25 °C).

7. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] ŠMIDRKAL, Jan. Tenzidy a detergenty dnes. *Chemické listy*. 1999, 93(7), 421-427.
- [2] NIKUNJ, Dave a Joshi TEJAS. A Concise Review on Surfactants and Its Significance. *International Journal of Applied Chemistry*. Research India Publications, 2017, 2017(3), 663-672. ISSN 0973-1792.
- [3] MAL, Arpan, Surajit BAG, Soumen GHOSH a Satya P. MOULIK. Physicochemistry of CTAB-SDS interacted cationic micelle-vesicle forming system: An extended exploration. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2018, 553, 633-644. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2018.05.099. ISSN 09277757.
- [4] SIYAL, Ahmer Ali, Muhammad Rashid SHAMSUDDIN, Aaron LOW a Nurul Ekmi RABAT. A review on recent developments in the adsorption of surfactants from wastewater. *Journal of Environmental Management*. Research India Publications, 2020, 254(3), 663-672. DOI: 10.1016/j.jenvman.2019.109797. ISSN 03014797.
- [5] In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Surfactant>
- [6] TRIPATHY, Divya B., Anuradha MISHRA, James CLARK a Thomas FARMER. Synthesis, chemistry, physicochemical properties and industrial applications of amino acid surfactants: A review. *Comptes Rendus Chimie*. 2018, 21(2), 112-130. DOI: 10.1016/j.crci.2017.11.005. ISSN 16310748.
- [7] SÁNCHEZ, J., M. DEL VALLE, James CLARK a Thomas FARMER. Determination of Anionic Surfactants Employing Potentiometric Sensors—A Review: A review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2005, 35(1), 15-29. DOI: 10.1080/10408340590947899. ISSN 1040-8347.
- [8] Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). Sigma-Aldrich Products - Chemical & Biochemical Product [online]. [cit. 2020-03-23]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/11667289001?lang=en&ion=CZ&gclid=EAIaIQobChMI29nNsPmv6AIVybTtCh2uQgTeEAAYAiAAEgL0lvD_BwE
- [9] Sodium dodecyl sulfate (Compound). *PubChem* [online]. [cit. 2020-03-23]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-dodecyl-sulfate#section=Solubility>
- [10] PRASAD, Niraula Tulasi, Bhattarai AJAYA a Sujeet Kumar CHATTERJEE. Sodium dodecylsulphate : A very useful Surfactant for Scientific Investigations. *The Journal of Knowledge and Innovation*. Department of Chemistry, Mahendra Morang Adarsh Multiple Campus, Tribhuvan University, Biratnagar, Nepal, 2014, 2014(2), 111-113. ISSN 2350-8884(P).
- [11] Sodium dodecyl sulfate. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Sodium_dodecyl_sulfate
- [12] CETYLTRIMETHYLAMMONIUM BROMIDE. Sigma-Aldrich [online]. [cit. 2019- 04-29]. Dostupné z: <http://www.mpbio.com/product.php?pid=02195029>
- [13] KEKICHEFF, P., H. K. CHRISTENSON a B.W. NINHAM. Adsorption of Cetyltrimethylammonium Bromide to Mica Surfaces below the Critical Micellar

- Concentration. *Colloids and Surfaces*,. Department of Applied Mathematics, Research School of Physical Sciences, Australian National University, 1989(40), 31-41.
- [14] MAL, Arpan, Surajit BAG, Soumen GHOSH a Satya P. MOULIK. Physicochemistry of CTAB-SDS interacted cationic micelle-vesicle forming system: An extended exploration. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2018, 553, 633-644. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2018.05.099. ISSN 09277757.
- [15] Cetyltrimethylammonium bromide. *Volochem* [online]. 2019 [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <https://www.volochem.com/products/volo10031>
- [16] Septonex (Compound). PubChem [online]. [cit. 2020-03-23]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Septonex>
- [17] VOJTEKOVÁ, Mária, František KOPECKÝ, Olga GREKSÁKOVÁ a Jarmila OREMUSOVÁ. Effect of Addition of KX Type Electrolytes and Temperature on the Critical Micellar Concentrations of 1-Cetylpyridinium and Carbethopendecinium Bromides. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 1994, 59(1), 99-105. DOI: 10.1135/cccc19940099. ISSN 0010-0765.
- [18] Karbethopendeciniumbromid. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2020-03-23]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Karbethopendeciniumbromid#/media/Soubor:Carbethopendecinium_bromide.png
- [19] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0579-X.
- [20] JOSEPH, Mary, Hoang M. TRINH a Ashim K. MITRA. Peptide and Protein-Based Therapeutic Agents*. *Emerging Nanotechnologies for Diagnostics, Drug Delivery and Medical Devices*. Elsevier, 2017, 2017, , 145-167. DOI: 10.1016/B978-0-323-42978-8.00007-3. ISBN 9780323429788.
- [21] What are micelles. Quora [online]. [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <https://www.quora.com/What-are-micelles>
- [22] POUCHLÝ, Julius. Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [23] Overview of Cationic Vesicles. *SD Nanosciences* [online]. [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <https://www.sdnanosciences.net/cationic-vesicles-1>
- [24] WU, Chih-Jung, An-Tsung KUO, Chen-Hsuan LEE, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Fabrication of positively charged cationic vesicles from ion pair amphiphile with double-chained cationic surfactant. *Colloid and Polymer Science*. 2014, 292(3), 589-597. DOI: 10.1007/s00396-013-3104-9. ISSN 0303-402X
- [25] LASIC, D. Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*. 16(7), 307-321. DOI: 10.1016/S0167-7799(98)01220-7. ISSN 01677799.
- [26] KUO, An-Tsung, Cheng-Lin TU, Yu-Min YANG a Chien-Hsiang CHANG. Enhanced physical stability of positively charged cationic vesicles: Role of cholesterol-adjusted molecular packing. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 2018, 92(7), 29-35. DOI: 10.1016/j.jtice.2018.02.013. ISSN 18761070.

- [27] HARGITTAI, István a Magdolna HARGITTAI. Molecular structure of hyaluronan: an introduction. *Structural Chemistry*. 2008, 19(5), 697-717. DOI: 10.1007/s11224-008-9370-3. ISSN 1040-0400.
- [28] GIRISH, K.S. a K. KEMPARAJU. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sciences*. 2007, 80(21), 1921-1943. DOI: 10.1016/j.lfs.2007.02.037. ISSN 00243205.
- [29] PASSI, Alberto a Davide VIGETTI. Hyaluronan as tunable drug delivery system: A biological overview. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2019, 146(21), 83-96. DOI: 10.1016/j.addr.2019.08.006. ISSN 0169409X.
- [30] NEČAS, J., L. BARTOŠÍKOVÁ, P. BRAUNER a J. KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Vet. Med. (Praha)*, 2008(53), 397-411.
- [31] KEDIGE, SureshD, Samir ANAND a Jyoti BANSAL. Hyaluronic acid: A promising mediator for periodontal regeneration. *Indian Journal of Dental Research*. 2010, 21(4), 83-96. DOI: 10.4103/0970-9290.74232. ISSN 0970-9290.
- [32] BASTOW, E. R., S. BYERS, S. B. GOLUB, C. E. CLARKIN, A. A. PITSILLIDES a A. J. FOSANG. Hyaluronan synthesis and degradation in cartilage and bone: A promising mediator for periodontal regeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008, 65(3), 395-413. DOI: 10.1007/s00018-007-7360-z. ISSN 1420-682X.
- [33] DEANGELIS, Paul L. a Paul H. WEIGEL. Immunochemical Confirmation of the Primary Structure of Streptococcal Hyaluronan Synthase and Synthesis of High Molecular Weight Product by the Recombinant Enzyme. *Biochemistry*. 2002, 33(31), 9033-9039. DOI: 10.1021/bi00197a001. ISSN 0006-2960.
- [34] VIOLA, Manuela, Davide VIGETTI, Evgenia KAROUSOU, Maria Luisa D'ANGELO, Ilaria CAON, Paola MORETTO, Giancarlo DE LUCA a Alberto PASSI. Biology and biotechnology of hyaluronan: A promising mediator for periodontal regeneration. *Glycoconjugate Journal*. 2015, 32(3-4), 93-103. DOI: 10.1007/s10719-015-9586-6. ISSN 0282-0080.
- [35] SZE, Jun Hui, Jeremy C. BROWNLIE a Christopher A. LOVE. Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review. *3 Biotech*. 2016, 6(1). DOI: 10.1007/s13205-016-0379-9. ISSN 2190-572X.
- [36] SCHIRALDI, Chiara, Annalisa LA a Mario DE. Biotechnological Production and Application of Hyaluronan. *Biopolymers*. Sciyo, 2010, 2010-09-28. DOI: 10.5772/10271. ISBN 978-953-307-109-1.
- [37] TRB Chemedica UK: Structure of Hyaluronan [online]. [cit. 2019-04-16]. Dostupné z: <https://vismed.trbchemedica.co.uk/business-professionals/role-and-purpose-of-hyaluronan/structure-of-hyaluronan>
- [38] Quick Start: Isothermal Titration Calorimetry (ITC) [online]. In: . 2016, s. 1-5 [cit. 2019-11-27]. Dostupné z: <http://www.tainstruments.com/pdf/literature/MCAPN-2016-1.pdf>
- [39] ATRI, M., Saboury, A., Ahmad, F. Biological Applications of Isothermal Titration Calorimetry. *Physical Chemistry Research*, 2015; 3(4): 319-330. doi: 10.22036/pcr.2015.11066
- [40] RECHT, Michael I., Vicki NIENABER a Francisco E. TORRES. Fragment-Based Screening for Enzyme Inhibitors Using Calorimetry. *Calorimetry*. Elsevier, 2016, 2016, 61(5), 47-69. *Methods in Enzymology*. DOI: 10.1016/bs.mie.2015.07.023. ISBN 9780128029060. ISSN 0020-4412.

- [41] SRIVASTAVA, Vijay Kumar a Rupali YADAV. Isothermal titration calorimetry. Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources. Elsevier, 2019, , 125-137. DOI: 10.1016/B978-0-12-816548-5.00009-5. ISBN 9780128165485.
- [42] VOLKOV, A. S., A. V. TYAGUNIN a G. D. KOPOSOV. A Calorimeter Based on Peltier Modules. Instruments and Experimental Techniques. 2018, 61(5), 766-768. DOI: 10.1134/S0020441218040267. ISSN 0020-4412.
- [43] KABIRI, Maryam, Larry D. UNSWORTH, Joanna LECKA, Brar Satinder KAUR a Céline VANECKHAUTE. Application of Isothermal Titration Calorimetry for Characterizing Thermodynamic Parameters of Biomolecular Interactions: Peptide Self-Assembly and Protein Adsorption Case Studies. Biomacromolecules. 2014, 15(10), 3463-3473. DOI: 10.1021/bm5004515. ISSN 1525-7797.
- [44] FALCONER, Robert J. Applications of isothermal titration calorimetry - the research and technical developments from 2011 to 2015. Journal of Molecular Recognition. 2016, 29(10), 504-515. DOI: 10.1002/jmr.2550. ISSN 09523499. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jmr.2550>
- [45] LOH, Watson, César BRINATTI a Kam Chiu TAM. Use of isothermal titration calorimetry to study surfactant aggregation in colloidal systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2016, 1860(5), 999-1016. DOI: 10.1016/j.bbagen.2015.10.003. ISSN 03044165.
- [46] THALBERG, K., LINDMAN, B. Interaction between hyaluronan and cationic surfactants. The Journal of physical chemistry, 1989, 93.4: 1478-1483.
- [47] 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. 2017, 157, 1837-1843. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.11.069. ISSN 01448617.
- [48] PILGROVÁ, Tereza, Tereza VENEROVÁ, Filip MRAVEC, Miloslav PEKAŘ a M. BEŠTER-ROGAČ. Interactions of hyaluronan with oppositely charged surfactants in very diluted solutions in water. International Journal of Biological Macromolecules. 2018, 112, 241-249. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.176. ISSN 01418130.
- [49] SAUEROVÁ, Pavla, Tereza PILGROVÁ, Miloslav PEKAŘ, Marie HUBÁLEK KALBÁČOVÁ a M. BEŠTER-ROGAČ. 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. 2017, 103, 1276-1284. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.173. ISSN 01418130.
- [50] TAM III - TA Instruments [online]. [cit. 2020-06-26]. Dostupné z: <https://www.tainstruments.com/tam-iii/>
- [51] MicroCal PEAQ-ITC [online]. [cit. 2020-06-26]. Dostupné z: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/product-range/microcal-range/microcal-itc-range/microcal-peaq-itc#howitworks>

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1. Seznam zkratek

Zkratka	Význam
CMC	kritická micelární koncentrace
ITC	izotermická titrační kalorimetrie
IPA	komplex amfifilních iontových párů
DDAC	didecyldimethylamonium chlorid
HA	hyaluronan
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
SDS	dodecylsulfát sodný
DNA	deoxyribonukleová kyselina
PAL	povrchově aktivní látka
HAS1	hyaluronan syntáza 1
HAS2	hyaluronan syntáza 2
HAS3	hyaluronan syntáza 3
IMP	integrální membránový protein
ECM	extracelulární matrix
HYAL1	hyaluronidáza 1
HYAL2	hyaluronidáza 2
HYAL3	hyaluronidáza 3
HYAL4	hyaluronidáza 4
PH-20	hyaluronidáza PH-20
HYALP1	hyaluronoglukosaminidáza 1
cIPA	komplex amfifilních iontových párů v chloroformu

8.2. Seznam symbolů

Symbol	Název veličiny
g	gram
$\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$	milimol na decimetr krychlový
$^{\circ}\text{C}$	stupeň Celsia
mol	mol
dm^3	decimetr krychlový
μm	mikrometr
mg	miligram
ΔH	změna entalpie
ΔE	změna vnitřní energie
q	teplo
P	tlak
W	práce
K	vazebná konstanta
n	reakční stechiometrie
ΔS	změna entropie
t	čas
s	sekunda
μW	mikrowatt
kJ	kilojoule
kDa	kilodalton
mmol	milimol
h	hodina
l	litr
ml	mililitr
μl	mikrolitr
mM	milimol na decimetr krychlový