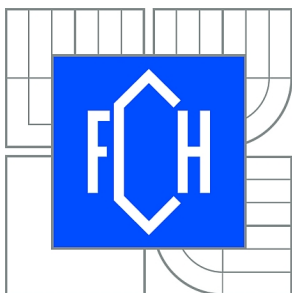


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY

MATERIALS RESEARCH CENTRE

BIOPOLYMEREM ZNAČENÉ KOLOIDNÍ ČÁSTICE

COLLOIDAL PARTICLES MARKED WITH BIOPOLYMER

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. DOMINIKA PIHÍKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. FILIP MRAVEC, Ph.D.

BRNO 2013



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0765/2012	Akademický rok: 2012/2013
Ústav:	Centrum materiálového výzkumu	
Student(ka):	Bc. Dominika Pihíková	
Studijní program:	Spotřební chemie (N2806)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806T002)	
Vedoucí práce	Ing. Filip Mravec, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Tereza Halasová Ing. Jakub Mondek	

Název diplomové práce:

Biopolymerem značené koloidní částice

Zadání diplomové práce:

1. Shromáždit literární poznatky o studiu koloidních částic, zvláště se zaměřením na fluorescenční spektroskopii a micelární systémy.
2. Seznámit se s metodikou měření agregačního procesu pomocí fluorescenční spektroskopie a značení koloidních částic pomocí hydrofobně modifikovaného biopolymeru.
3. Navrhnout a provést základní experimenty k ověření využití uvedené metody ve studiu interakcí modifikovaného biopolymeru s tenzidy. Ověřit především změny v agregaci.
4. Zhodnotit výsledky ve vztahu k formulaci nosičových systémů biologicky aktivních látek na bázi značených koloidních částic.

Termín odevzdání diplomové práce: 3.5.2013

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Dominika Pihíková
Student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2013

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V této diplomové práci byl studován vliv hydrofobně modifikovaného hyaluronanu na agregaci tenzidů. Pomocí fluorescenční spektroskopie byla stanovena hodnota CMC aniontového tenzidu SDBS (dodecylbenzensulfonát sodný), kationtového tenzidu CTAB (cetyltrimethylamonium bromid) a neionogenního tenzidu Triton X-100 (oktylfenolethoxylát) pomocí pyrenu jako fluorescenční sondy. Dále bylo zkoumáno agregační chování jednotlivých tenzidů s přidavkem hydrofobizovaného hyaluronanu o dvou molekulových hmotnostech (17 kDa, 206 kDa) v prostředí vody. Největší vliv hydrofobizovaného hyaluronanu na agregační chování byl zaznamenán u kationaktivního CTAB. V systému obsahující kationtový tenzid a hydrofobizovaný hyaluronan byla pomocí zeta potenciálu zjištěna stabilita. V poslední části diplomové práce byly v tomto systému určeny velikosti částic metodou dynamického rozptylu světla.

ABSTRACT

The effect of hydrophobically modified hyaluronan on surfactants aggregation has been studied in this master's thesis. The value of critical micelle concentration of anionic surfactant SDBS (sodium dodecylbenzensulfonate), cationic surfactant CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) and nonionic surfactant Triton X-100 (octylphenol ethoxylate) was determined by fluorescence spectroscopy using pyrene probe. Aggregation behavior of surfactants was performed with addition of hydrophobically modified hyaluronan of two molecular weights (17 kDa, 206 kDa) in aqueous solution. The greatest influence of hydrophobized hyaluronan on aggregation behavior was observed in system with cationic surfactant CTAB. Stability of system containing cationic surfactant and hydrophobically modified hyaluronan was established through zeta potential. Last part of thesis deals with size determination using dynamic light scattering.

KLÍČOVÁ SLOVA

hydrofobně modifikovaný hyaluronan, fluorescenční spektroskopie, tenzidy, pyren, dynamický rozptyl světla

KEY WORDS

hydrophobically modified hyaluronan, fluorescence spectroscopy, surfactants, pyrene, dynamic light scattering

PIHÍKOVÁ, D. *Biopolymerem značené koloidní částice*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 69 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. za odborný dohled, pomoc a vstřícnost při diskusích. Dále bych chtěla poděkovat konzultantce Ing. Tereze Halasové a konzultantovi Ing. Jakubovi Mondekovi za cenné rady a připomínky v průběhu celé práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým nejbližším za podporu při studiu.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Hyaluronan.....	8
2.1.1	Chemická struktura	8
2.1.2	Chemické modifikace hyaluronanu.....	9
2.1.3	Hydrofobně modifikovaný hyaluronan	10
2.1.4	Kaproyl hyaluronanu sodného	11
2.1.5	Struktura hyaluronanu v roztoku.....	11
2.1.6	Biosyntéza hyaluronanu	12
2.1.7	Metabolismus hyaluronanu	13
2.1.8	Aplikace hyaluronanu	13
2.2	Disperzní soustavy	14
2.2.1	Tenzidy.....	14
2.2.2	Tvorba micel	15
2.2.3	Velikost a tvar micel	16
2.2.4	Výroba a aplikace tenzidů.....	17
2.3	Fluorescenční spektroskopie.....	18
2.3.1	Princip fluorescence	19
2.3.2	Jabloňského diagram.....	19
2.3.3	Emisní a excitační spektrum	20
2.3.4	Fluorescenční sondy.....	21
2.3.5	Zhášení fluorescence	23
2.3.6	Tvorba excimeru	24
2.3.7	Vnitřní filtrační efekt.....	24
2.4	Optické vlastnosti disperzních systémů	24
2.4.1	Dynamický rozptyl světla (DLS)	24
2.4.2	Princip dynamického rozptylu světla	25
2.5	Elektrické vlastnosti koloidů.....	26
2.5.1	Zeta potenciál	27
3	Současný stav řešené problematiky	28
4	Experimentální část.....	31
4.1	Použité materiály	31
4.2	Příprava vzorků.....	33
4.2.1	Příprava zásobních roztoků fluorescenčních sond	33
4.2.2	Příprava zásobních roztoků tenzidů	33
4.2.3	Příprava zásobních roztoků hydrofobizovaného hyaluronanu	33
4.2.4	Příprava vzorků pro stanovení CMC tenzidů.....	33
4.2.5	Agregační chování tenzidů s přídavkem AcHyA.....	33
4.2.6	Příprava vzorků pro DLS	34
4.3	Fluorimetrie.....	34
4.3.1	Měření fluorescenčních spekter pyrenu	34
4.4	Dynamický rozptyl světla	35
4.5	Zeta potenciál.....	36
4.6	Statistika.....	37

5	Výsledky a diskuze	38
5.1	Fluorimetrie.....	38
5.1.1	Studium samoagregace AcHyA	38
5.1.2	Stanovení CMC tenzidů v prostředí vody a 0,15M NaCl	40
5.1.3	SDBS s přidavkem hydrofobizovaného hyaluronanu	42
5.1.4	CTAB s přidavkem hydrofobizovaného hyaluronanu	44
5.1.5	Triton X-100 s přidavkem hydrofobizovaného hyaluronanu	48
5.2	Dynamický rozptyl světla	50
5.2.1	Zeta potenciál (režim <i>ZETA</i>).....	50
5.2.2	Velikost částic (režim <i>SIZE</i>)	53
6	Závěr.....	57
7	Seznam použitých zdrojů.....	59
8	Seznam použitých zkratk a symbolů	65
8.1	Seznam zkratk	65
8.2	Seznam symbolů	65
9	Přílohy	67
9.1	Příloha 1	67
9.2	Příloha 2	68
9.3	Příloha 3	69

1 ÚVOD

Koloidní nosičové systémy pro léčbu onkologických onemocnění jsou v dnešní době předmětem zájmu mnoha vědeckých skupin. Jedná se o polymerní micely o rozměrech 1 – 1000 nm, které vykazují biodegradabilitu, biokompatibilitu, vysokou solubilizační kapacitu a stabilitu. Tyto nosiče by měly umožnit prodlouženou cirkulaci aktivních látek v krevním řečišti, řízenou aktivaci a selektivní účinnost léčivé látky. Nástup koloidních nosičových systémů s cílenou distribucí léčiv by měl především omezit plošný devastující dopad soudobých chemoterapeutik, která jsou sice schopna rakovinnou buňku zničit, ale ničí také zdravé buňky v těle pacienta. Slibným polymerním nosičem by mohla být kyselina hyaluronová [1].

Kyselina hyaluronová je přirozeně se vyskytující polysacharid. I když má jednoduchou strukturu, téměř vše ostatní je neobvyklé. Vyznačuje se vynikajícími viskoelastickými vlastnostmi, biokompatibilitou, biodegradabilitou, ochrannou a lubrikační funkcí v těle. Hraje důležitou roli v hojení ran, morfogenezi a vyznačuje se specifickou interakcí s buněčnými receptory. Je známa vysoká afinita k receptorům CD44 a RHAMM, které jsou součástí mnoha nádorových typů (prsů, tlustého střeva, mozku, prostaty, ledvin, aj.)[2]. Tyto receptory jsou schopny kyselinu hyaluronovou rozpoznat a navázat na sebe. Vzhledem k četnosti funkčních skupin se nabízí možnost chemické modifikace hyaluronanu, která může významně pozměnit fyzikální a chemické vlastnosti. Cílem chemických modifikací kyseliny hyaluronové je především zvýšit afinitu k nepolárním účinným látkám. Tvorba polymerních micel na bázi hydrofobně modifikované kyseliny hyaluronové by mohla být využitelná v cílené distribuci léčiv i v řízeném uvolňování bioaktivních látek. Hydrofobně modifikovaný hyaluronan má široký potenciál i v řadě dalších lékařských aplikací či v tkáňovém inženýrství [3][4].

Následující práce se zaměřuje na výzkum interakcí a agregačního chování hydrofobně modifikovaného hyaluronanu s vybranými tensidy. V první části práce je pomocí fluorescenční spektroskopie studován vliv přídavku hydrofobně modifikovaného hyaluronanu na hodnotu kritické micelární koncentrace a na agregační chování pomocí pyrenu jako fluorescenční sondy. Použitými tensidy byly kationtový tenzid CTAB, aniontový tenzid SDBS a neionogenní tenzid Triton X-100. V další části byly pomocí dynamického rozptylu světla v systému CTAB s přídavkem hydrofobizovaného hyaluronanu studovány velikosti částic a zeta potenciál. Cílem této diplomové práce bylo získat poznatky o uvedených systémech s ohledem na jejich možné využití jako nosičových systémů biologicky aktivních látek.

2 TEORETICKÁ ČÁST

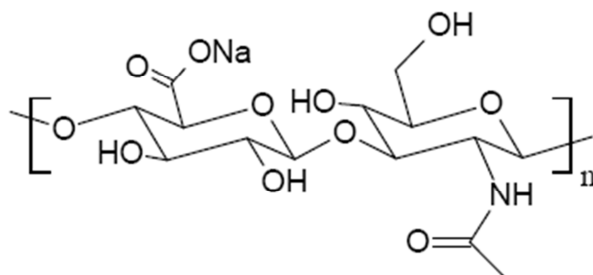
2.1 Hyaluronan

Tělu vlastní hyaluronan (HA) je polysacharid patřící do skupiny glykosaminoglykanů. Je všeobecně známo, že se v živých soustavách vyskytuje ve formě polyanionu, nikoliv v protonované formě kyseliny. V literatuře jsou však pojmy hyaluronan a kyselina hyaluronová považovány za synonyma. Transparentní, viskózní kapalinu objevili v očním sklivci hovězího dobytka Karel Meyer a John Palmer v roce 1934[5].

Výskyt hyaluronanu u obratlovců je velmi četný. HA je nezbytnou součástí extracelulární matrix (ECM), kde působí jako její organizátor. Dále se vyskytuje v očním sklivci, synoviální tekutině, kůži, plicích a ve střevech. Běžná koncentrace v krevní plazmě je mezi 30 – 40 µg/l, ovšem může dosáhnout až 10 – 100 µg/l[7]. Hyaluronan hraje stěžejní roli v hojení ran, v buněčné migraci, buněčné proliferaci a angiogenezi, tedy procesu novotvorby krevních kapilár. HA je biokompatibilní a obnovitelný, což je důležité v průmyslovém měřítku výroby HA. Tento polysacharid se vyznačuje širokým rozsahem molekulové velikosti (1 kDa – 10 MDa), přičemž aktivita a další role hyaluronanu v organismu jsou závislé na molekulové hmotnosti. Vysokomolekulární HA vyskytující se ve volné pojivové tkáni hraje významnou roli při udržování buněčné integrity a obsahu vody v ECM. Dále zde byly prokázány protizánětlivé a antiangiogenní vlastnosti s poměrně nízkou biologickou aktivitou[6]. Naproti tomu nízkomolekulární hyaluronan významně ovlivňuje různé pochody v buňkách a tkáních, jako je endocytosa, degradace a transdukce signálu [8][9][11].

2.1.1 Chemická struktura

Hyaluronan je lineární polysacharid tvořen z monosacharidu kyseliny D-glukoronové a dalšího monosacharidu N-acetylglukosaminu. Tyto opakující se disacharidické jednotky jsou navázány pomocí β 1-3 a β 1-4 střídajících se glykosidických vazeb (Obr. 1). Tato látka má ve srovnání s jinými typy polysacharidů některá specifika. První z nich je enormní velikost. Při běžné velikosti dosahuje délky 2 – 25 µm. Dalším specifikem je schopnost navázat velké množství vody díky hojnosti hydroxylových skupin ve své struktuře. Zajímavá je i možnost chemické modifikace hyaluronanu. Disociovaná karboxylová skupina je ideálním místem, kam se iontovou vazbou budou vázat nejen kationty různých kovů, ale i polymerní kationty. [8]



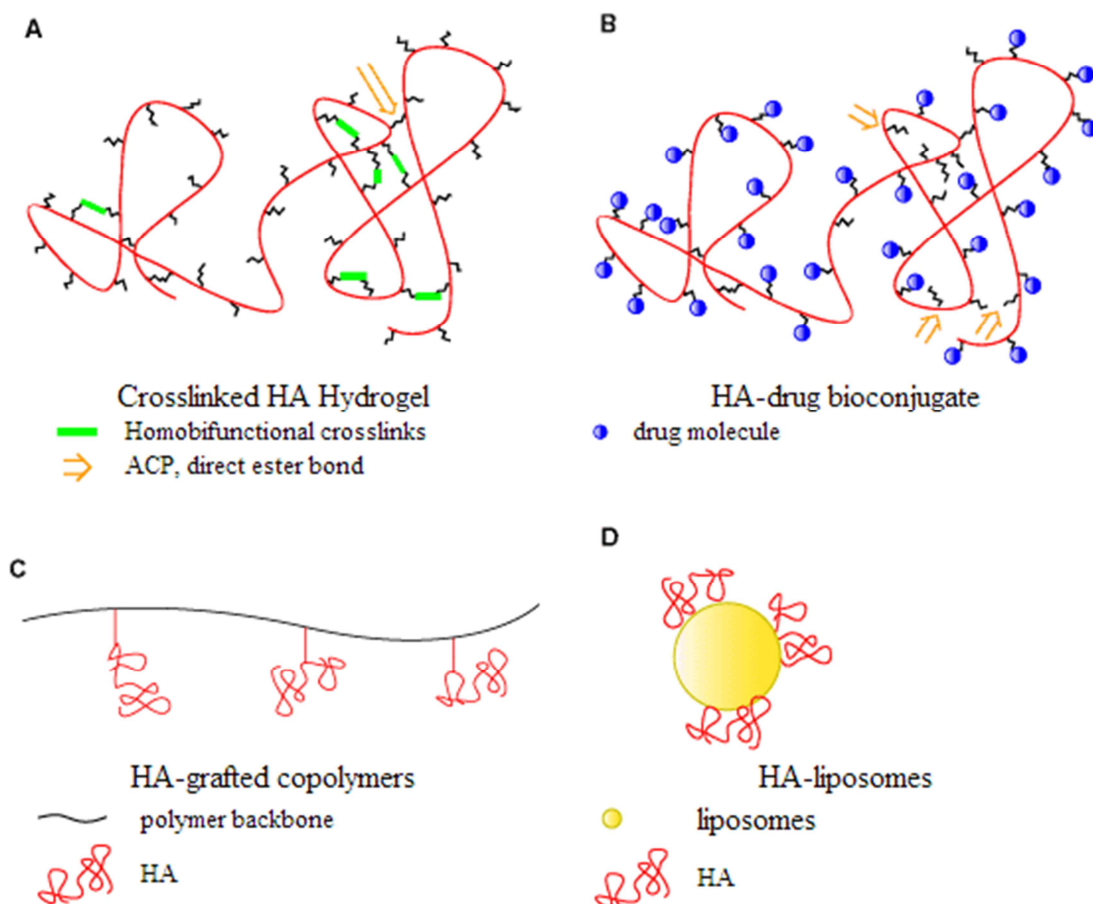
Obr. 1 - Chemická struktura hyaluronanu

2.1.2 Chemické modifikace hyaluronanu

Chemické modifikace hyaluronanu jsou v posledních letech stále více předmětem zájmu mnoha vědeckých skupin[4][9][12]. Z hlediska tkáňového inženýrství je nativní hyaluronan prakticky nepoužitelný, a to především pro snadnou biodegradovatelnost, velmi dobrou rozpustnost ve vodě a nevhodné mechanické vlastnosti. Chemickou modifikací pomocí navázaných ligandů na hyaluronan můžeme docílit trojrozměrných struktur (hydrogelů), ze kterých se mohou vytvářet scaffoldy, kryty ran a popálenin, nosiče léčiv, apod. Kromě vytvoření hydrogelů připadá v úvahu připojení biologicky aktivní látky zabezpečující interakce mezi molekulami [8].

Hyaluronan může být chemicky modifikován následujícími způsoby: chemickou konjugací nebo cross-linkováním. Obě dvě modifikace jsou založeny na stejných chemických reakcích, ale liší se počtem vazeb připojených na řetězec. V případě chemické konjugace je roubovaná sloučenina vázána pouze jednou jednoduchou vazbou, zatímco v druhém případě jsou různé HA řetězce spojeny mezi sebou dvěma nebo více vazbami. Chemické modifikace hyaluronanu mohou být provedeny na dvou dostupných funkčních místech, a to na karboxylové nebo na hydroxylové skupině [6].

Dále jsou známy některé molekulární architektury používané v přípravě hyaluronanu. Přehled těchto modifikací zobrazuje Obr. 2. Typická modifikace, kterou je konverze viskózního solu na hydrogel ukazuje obrázek 2A. Tuto modifikaci lze provést za jak neutrálních, tak za alkalických podmínek. Obrázek 2B vyobrazuje alternativní metodu, která umožňuje připevnění reportérových skupin, tzn. skupin nesoucí náboj. Cílem této úpravy je poskytnout nová činidla pro studium biochemických či fyziologických vlastností. Také by mohla být tato modifikace použita jako prekurzor léčiv pro cílené uvolňování. V posledním desetiletí byla realizována příprava kompozitních materiálů, kde je hyaluronan naroubován na přírodní a syntetické polymery (Obr. 2C). Tyto materiály by měly poskytnout pozměněné biomechanické a fyziologické vlastnosti. V neposlední řadě může být hyaluronan naroubován na povrchu liposomů (Obr. 2D), kde byl hyaluronan zaveden jako alternativa k PEG (polyethylenglykol). Ovšem systém s hyaluronanem poskytuje cílení a maskovací efekt [10].



Obr. 2 – Schematické zobrazení architektur pro deriváty HA: (A) cross-link HA; (B) konjugát HA-léčivo; (C) naroubovaný HA; (4) HA-liposom [10]

2.1.3 Hydrofobně modifikovaný hyaluronan

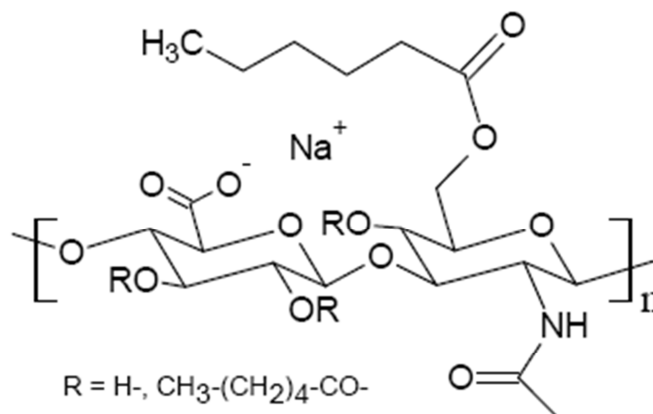
Velmi zajímavou skupinu představují hydrofobně modifikované (HM) polymery. HM polymery jsou amfifilní, ve vodě rozpustné makromolekuly skládající se především z hydrofilní kostry a hydrofobních postranních skupin. Zájem o tuto třídu makromolekul vzrostl asi před 50 lety z důvodu unikátního asociativního chování a potenciálních aplikací v oblasti farmacie, kosmetiky, barev a nátěrů, atd [3].

Hydrofobizované deriváty hyaluronanu by mohly být využitelné jak pro cílenou distribuci, tak pro řízené uvolňování biologicky aktivních látek. K přípravě tohoto produktu lze využít esterifikaci primární nebo sekundární hydroxylové skupiny. Pokud bude k esterifikaci použita vyšší mastná kyselina, naskytuje se možnost připravit deriváty hyaluronanu, jehož molekula bude mít změněnou rozpustnost ve vodě. Lze připravit hyaluronan, který tvoří nadmolekulární útvary podobné micelám, což značí velký potenciál v přípravě nosičů schopných transportovat lipofilní léčiva [8][9].

Další výhodou modifikovaného hyaluronanu je vyšší odolnost proti enzymatické degradaci [14]. Kromě toho mohou hydrofobizované deriváty HA získat fyzikálně-chemické vlastnosti, které mohou být přizpůsobeny požadavkům. Navíc absence kladného náboje na povrchu hyaluronanu může zmírnit problémy s agregací se sérovými proteiny a s cytotoxicitou [9].

2.1.4 Kaproyl hyaluronanu sodného

Kaproyl hyaluronanu sodného (hexanoyl hyaluronanu sodného) zastupuje acylovaný derivát HA, který byl vytvořen chemickou modifikací nativního hyaluronanu sodného (Obr. 3). Deriváty hyaluronanu substituované acyly se sudým počtem atomů uhlíku se využívají pro vývoj nových typů scaffoldů pro náhradu chrupavky a kůže a jako materiály vhodné pro korektivní dermatologii [8][9].



Obr. 3 – Chemická struktura hexanoylu hyaluronanu sodného

Tento modifikovaný sacharid, se v závislosti na stupni substituce, vyznačuje povrchově aktivním chováním a díky jeho unikátní struktuře je schopen samoagregace a formování kavit, které umožňují rozpustit hydrofobní domény ve vodě. Zdá se, že tento systém je vhodný pro výrobu cílených nosičů léčiv. Dále se používá pro vnitřní chirurgii, jelikož je prokázána minimální přilnavost buněk k derivátu. V neposlední řadě je systém příhodný pro nanovlákna či mikrofibrily v tkáňovém inženýrství [14].

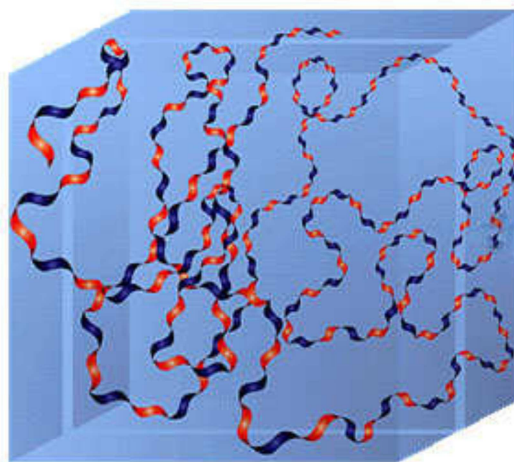
Je známo, že estery sacharidů jsou důležitou třídou biologicky rozložitelných a netoxických tenzidů s širokými aplikacemi v potravinách, kosmetice a farmaceutickém průmyslu (detergenty, péče o dutinu ústní a zdravotnický materiál) [13]. Také bylo zjištěno, že by mohly být použitelné jako antibiotika a protinádorová léčiva. Díky těmto unikátním vlastnostem je pozornost v poslední době zaměřena právě na esterifikaci hyaluronanu [9].

2.1.5 Struktura hyaluronanu v roztoku

Ve fyziologickém roztoku hyaluronanu hraje roli chemická struktura disacharidu, vnitřní vodíkové vazby a interakce s rozpouštědlem. Díky jedinečné struktuře, která je podobná stuze, zaujímá hyaluronan v roztoku nepravidelnou stočenou strukturu, která zabírá rozlehlou doménu. Axiální atomy vodíku tvoří nepolární a relativně hydrofobní část, zatímco ekvatoriální postranní řetězce formují hydrofilní doménu [16].

Doménová struktura hyaluronanu vykazuje zajímavé a důležité důsledky. Malé molekuly, jako je voda, elektrolyty a živiny mohou volně difundovat skrz rozpouštědlo. Ovšem velké molekuly (bílkoviny) jsou částečně vypuzovány z roztoku v důsledku jejich hydrodynamické velikosti v roztoku. Síť molekuly hyaluronanu poskytuje méně prostoru pro velké molekuly, což vede k pomalejší difúzi makromolekul uvnitř sítě. Je pozoruhodné, že síť hyaluronanu je v roztoku neustále v pohybu a velikost efektivních pórů se tedy neustále mění. Z tohoto

důvodu mohou projít sítí hyaluronanu v zásadě všechny molekuly, jsou ovšem zpomalovány v závislosti na jejich hydrodynamickém objemu [16].



Obr. 4 – Struktura hyaluronanu v roztoku (modré části znázorňují hydrofilní oblasti, červené části hydrofobní oblasti)[16]

2.1.6 Biosyntéza hyaluronanu

Glykosaminy, mezi které hyaluronan patří, jsou běžně syntetizovány v Golgiho aparátu a následně kovalentně vázány k jaderným proteinům. Oproti tomu syntéza hyaluronanu probíhá na vnitřní straně plazmatické membrány, přičemž vzniká volný, nevázaný, lineární polymer. Enzymy, které syntetizují hyaluronan se nazývají hyaluronan syntázy (HASs). Po roce 1990 byla popsána trojice enzymů (HAS-1, HAS-2, HAS-3), která je schopna koordinovaně polymerovat a přemístit HA ven z buňky do extracelulární matrix [17].

V současné době známe čtyři druhy bakterií, které produkují hyaluronan a využívají jej při napadání hostitelského organismu. Tyto bakterie se obklopí tenkou vrstvou hyaluronanu a jsou schopny se skrýt před imunitním systémem hostitele. Lidské i zvířecí patogeny jako *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis* a *Pasteurella multocida* (slepíčí patogen) [17] využívají tuhle dovednost při napadání savčích hostitelů, přičemž jsou velmi těžce rozpoznatelné imunitním systémem hostitele. Na základě strukturální a enzymatické podobnosti byly hyaluronan syntázy rozděleny do dvou tříd (Tabulka 1). Mezi třídu I patří příslušníci rodu *Streptococcus* a do třídy II se řadí pouze *Pasteurella multocida*. Hlavní rozdíl mezi třídou I a II tkví ve struktuře, membránové topologii a mechanismu syntézy hyaluronanu [18].

Tabulka 1 – Rozdíly mezi třídami hyaluronan syntáz (HASs) [18]

	Třída I HASs	Třída II HASs
Členové	přes 20 členů (<i>Streptococcus</i> sp., ptáci, obojživelníci, savci)	pouze jeden (<i>Pasteurella multocida</i>)
Počet aminokyselin	417 – 588	972
Vazba membrána-protein	6 – 8 transmembránových domén od N-konce k C-konci	v blízkosti C-konce
Růst HA řetězce	na redukujícím konci	na neredukujícím konci
Schopnost prodloužení primeru	nevidováno rozšíření HA	evidováno rozšíření HA

Katalytická rychlost a způsob regulace je odlišný pro každou hyaluronan syntázu. HAS-1 je nejméně aktivní a řídí syntézu vysokomolekulární HA, což naznačuje nízkou úroveň syntézy. HAS-2 je více katalyticky aktivní a také tvoří vysokomolekulární formu HA. Enzym HASs může zvyšovat syntézu např. při stresu, septikémii, zánětech, masivních poraněních či po velké ztrátě krve. HAS-2 je také zapojen do vývojových a opravných procesů zahrnující růst tkání. HAS-3 je nejaktivnější enzym a řídí syntézu velkého množství nízkomolekulárních řetězců HA. Tyto kratší řetězce mohou vyvolat kaskádovitou reakci přenosu signálu a významné změny v buněčném chování [7].

2.1.7 Metabolismus hyaluronanu

Metabolismus hyaluronanu je velmi dynamický. Metabolická degradace je hlavně intracelulární, přičemž příjem a metabolismus se primárně uskutečňují v játrech a v lymfatických uzlinách. Odbourávání HA z oběhu je velmi efektivní, s poločasem 2 – 6 minut a celkovým úbytkem 10 – 100 mg/den u dospělého člověka [11]. Nedávné studie naznačují, že vyloučení HA z krevního oběhu může být ovlivněno řadou faktorů, jako je například změna průtoku krve vylučujícího orgánu, konkurence ostatních makromolekulárních látek (chondroitin sulfát), aj. Mnohé z těchto faktorů se mohou vyskytovat u chorobných stavů, proto pozorujeme výrazné rozdíly mezi normální a patologickou kinetikou HA [19].

2.1.8 Aplikace hyaluronanu

Kyselina hyaluronová má díky svým unikátním vlastnostem velký potenciál, především v medicíně. První lékařská aplikace hyaluronanu se uskutečnila na konci 50. let minulého století v oftalmologii [16]. V současné době je hyaluronan široce využíván v oční chirurgii, v revmatologii, v léčbě hojení ran a v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu [16].

Dále je hyaluronan považován za ideální materiál pro tkáňové inženýrství. Použití scaffoldu na bázi hyaluronanu v tkáňovém inženýrství nabízí velice slibné výsledky. Hyaluronan splňuje řadu potřebných vlastností, hraje důležitou roli při tvorbě chrupavky a reguluje kondenzaci mezenchymálních buněk. Hyaluronové hydrogely podporují chondrogenní diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk a navíc umožňují lepší tvorbu chrupavčité matrix jak *in vivo*, tak *in vitro* [8][22][23].

Hyaluronan nachází uplatnění také v léčbě osteoartritidy kolenního kloubu [26], popálenin, aj. Z mnoha vědeckých studií, které jsou prováděny po celém světě, lze tvrdit, že HA by mohl být použit pro detekci nádorových buněk [24][25] a jako biomarker pro chod lymfy v těle [20].

2.2 Disperzní soustavy

Disperzní systém je soustava, která obsahuje minimálně dvě chemická individua, přičemž disperzní podíl je rozptýlen ve formě částic v disperzním prostředí. V homogenních systémech tvoří disperzní podíl i disperzní prostředí jednu fázi a jsou to zpravidla pravé roztoky, které vznikají samovolně a jsou stálé. V heterogenních systémech je disperzní podíl od disperzního prostředí oddělen fázovým rozhraním. Ke vzniku heterogenních systémů je potřeba dodat práci, která je tím větší, čím větší je plocha vznikajícího fázového rozhraní [28][29].

Disperzní systémy klasifikujeme podle tvaru částic, podle počtu molekul, podle struktury disperzního podílu, aj. Dále můžeme rozdělovat disperzní soustavy podle stupně disperzity na:

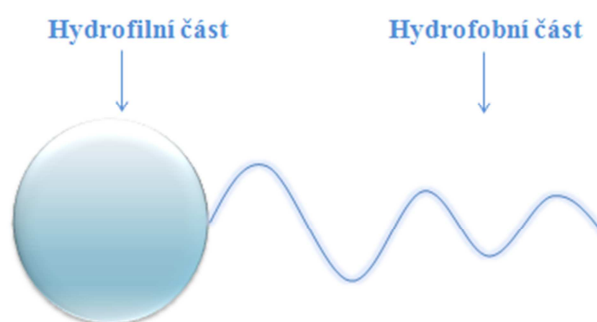
- Hrubé disperze ($d > 10^{-6}$ m)
- Koloidní disperze (10^{-9} m $< d < 10^{-6}$ m)
- Analytické disperze ($d < 10^{-9}$ m)

V této práci se budeme zabývat převážně koloidními disperzními soustavami, jimiž jsou micelární koloidní roztoky, roztoky makromolekulárních látek, lyofobní soly.

2.2.1 Tenzidy

Tenzidy (surfaktanty) jsou povrchově aktivní látky, které mají schopnost samovolně adsorbovat již při nízké koncentraci na mezifázovém rozhraní jako voda-vzduch. V důsledku této adsorpce snižují povrchovou či mezifázovou energii soustavy. Termín surfaktant je odvozen z anglického spojení *surface active agent*, tedy povrchově aktivní látka (PAL). Díky své schopnosti snižovat napětí rozpouštědel mají široké využití, zejména v oblasti čistících a pracích prostředků.

Pro tenzidy je charakteristická amfifilní povaha molekuly. Původem řecké slovo *amphihile* vychází ze slova *amphi*, které znamená, že se v molekule budou vyskytovat minimálně dvě části (jedna hydrofilní a druhá lipofilní) [34]. Budeme-li uvažovat vznikající asociaci ve vodném prostředí, pak hydrofilní část molekuly tenzidu (hlava) vykazuje silnou afinitu pro vodu, kdežto hydrofobní část (chvost) nikoliv (Obr. 5). Polární část musí obsahovat silně polární hydrofilní skupiny, které zajišťují rozpustnost ve vodě. Nepolární konec musí mít dostatečně dlouhý uhlíkový řetězec, aby docházelo k asociaci. Díky své amfipatické (obojetné) povaze mohou tenzidy vytvářet koloidní disperzní systémy – micely [29].



Obr. 5 – Schematické zobrazení tenzidu

Co se týče klasifikace tenzidů, používáme rozdělení podle jejich disociace ve vodě:

- *Aniontové surfaktanty* – disociují za vzniku povrchově aktivních aniontů. Mezi často vyskytující se polární skupiny patří sulfáty, sulfonáty, karboxyláty a fosfáty. Anionaktivní PAL jsou používány ve větší míře ve srovnání s ostatními třídami tenzidů a tvoří 50 – 60 % celosvětové produkce tenzidů [31]. Jeden z hlavních důvodů jejich velké popularity je jejich nízká cena a snadná výroba. U většiny komerčně dostupných tenzidů se alkylové řetězce pohybují v rozsahu $C_8 - C_{18}$ [32]. Mezi nejznámější anionaktivní tenzidy se řadí dodecylsulfát sodný (SDS) a dodecylbenzensulfát sodný (SDBS).
- *Kationtové surfaktanty* – tvoří při disociaci povrchově aktivní kationty, které nesou kladný náboj. Velmi časté jsou sloučeniny na bázi dusíku, např. soli mastných kyselin, kvartérní amoniové soli s jedním nebo několika alkylovými řetězci, často na bázi přírodních mastných kyselin. Aminy jsou citlivé na pH a fungují jako PAL pouze v protonovaném stavu a za vysokého pH, zatímco kvartérní amoniové soli pH senzitivní nejsou [31]. Nejznámějšími kationtovými tenzidy jsou cetyltrimethylamonium chlorid (CTAB) a didodecyldimethylamonium chlorid (DDAC) [33].
- *Neionogenní surfaktanty* – nevykazují ionizaci ve vodném roztoku, jelikož je jejich hydrofilní skupina nedisociačního typu (např. fenol, ether, ester, alkohol). Velká část neionogenních tenzidů je převedena na hydrofilní, díky přítomnosti polyethylenglykolu (PEG), který je získán polykondenzací etylenoxidu. Obvykle se v polární části tenzidů vyskytuje 5 – 10 etylenoxidových jednotek, ačkoliv v některých typech se jich může vyskytnout více [31]. Neiontové povrchově aktivní látky tvoří asi 40 % z celkové průmyslové výroby tenzidů. Mezi neionogenní tenzidy se řadí Triton X-100 či TWEEN [33].
- *Amfoterní (zwitteriontové) surfaktanty* – vykazují aniontovou i kationtovou disociaci. Jsou známy i amfoterní tenzidy, u nichž náboj micely závisí na pH. Mezi zwitteriontové PAL patří jak syntetické produkty (betainy, sulfobetainy), tak přírodní látky (aminokyseliny, fosfolipidy) [29][33].

2.2.2 Tvorba micel

Schopnost vytvářet micely je podmíněna amfifilní strukturou molekul. Při tvorbě kulovitých micel v polárním prostředí se uhlovodíkové řetězce molekul shlukují do kompaktního hydrofobního jádra, zatímco hydratované polární skupiny vytváří hydrofilní obal. Koncentrace, při které dochází k agregaci a vzniku micel, se nazývá kritická micelární koncentrace (z angl. CMC = *Critical Micelle Concentration*). Je to nejvyšší možná koncentrace, při které jsou PAL v roztoku převážně ve formě jednotlivých molekul. Další přídavek tenzidu způsobí vznik micelárních útvarů. Zásadní příčinou vzniku agregátů jsou velké kohezní síly mezi molekulami vody, které jsou větší než vzájemná přitažlivost mezi uhlovodíkovými řetězci. Způsobí to vytvářet micely nemají všechny povrchově aktivní látky, ale pouze ty, které mají optimální vztahy mezi hydrofobní a hydrofilní částí, což je určeno velikostí hydrofobně-lipofilní rovnováhy [27][29]. Hnací silou agregace jsou také tzv. hydrofobní interakce, které jsou založeny na poměrně značném růstu entropie (okolo $140 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$) při přechodu tenzidu do agregovaného stavu. Tento vzrůst entropie je zapříčiněn desolvací hydrofobních alkylových řetězců. Co se týče entalpie, může být

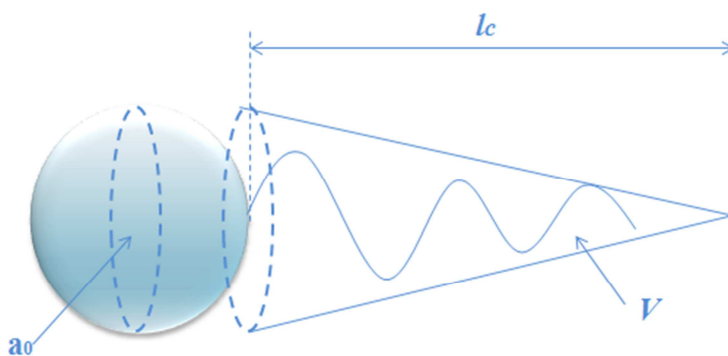
agregace tenzidů procesem exotermním nebo endotermním, v závislosti na povaze tenzidu. U iontových tenzidů se setkáváme s exotermním procesem, v případě neiontových surfaktantů se jedná o endotermní proces. Změna entalpie při agregaci se pohybuje okolo 10 kJ.mol^{-1} [30].

2.2.3 Velikost a tvar micel

Fascinující charakteristikou amfifilů je jejich schopnost samoagregace ve vodném prostředí. Typ vznikajícího agregátu závisí na vzájemném poměru velikosti a tvaru hydrofilní a hydrofobní části molekuly tenzidu. Jednu z nejvíce užitečných koncepcí pro kvantitativní popis vztahu publikoval **Israelachvili et al.** [35] a **Tanford** [36]. Definovali bezrozměrnou veličinu nazvanou kritický "pakovací" parametr (*Critical Packing Parametr*) CPP.

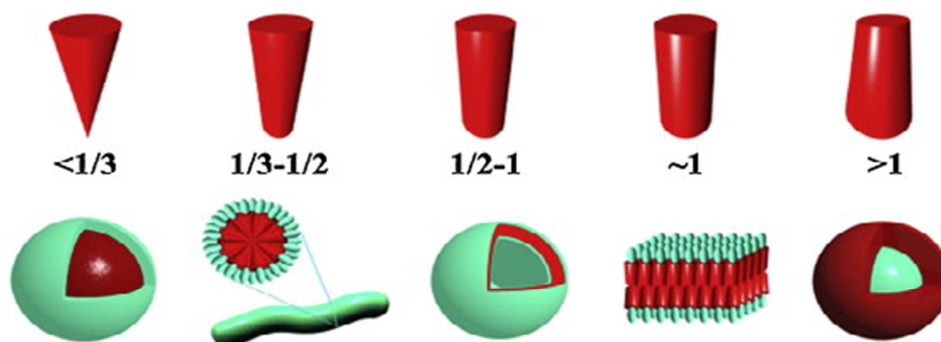
$$p = \frac{V}{a_0 \cdot l_c}, \text{ kde} \quad (1)$$

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



Obr. 6 – Schéma molekuly tenzidu s veličinami popisující CPP

V závislosti na p mohou být vytvořeny různé typy agregátů (Obr. 7). Pokud je $p \ll 1$, jsou tvořeny sférické a cylindrické micely. Nachází-li se v blízkosti 1 ($p \approx 1$), formují se válcovité micely planární dvojvrstvy. V případě, že je p větší jak 1, dochází k tvorbě obrácených micel. [38] Zatímco micely a inverzní micely jsou poměrně málo uspořádané a vysoce dynamické agregáty s průměrnou dobou existence řádově ve zlomcích sekundy, dvojvrstvy v liposomech představují vysoce uspořádané systémy stabilní po dobu týdnů i měsíců [40].



Obr. 7 – Efekt kritického pakovacího parametru na strukturu agregátů [39]

2.2.4 Výroba a aplikace tenzidů

Světová produkce mýdel, detergentů a jiných povrchově aktivních látek má v průběhu let vzrůstající charakter. V roce 1970 bylo vyrobeno 18 milionů tun, v roce 1990 25 milionů tun a v roce 2000 40 milionů tun povrchově aktivních látek [33].

Vývoj tenzidů je velmi dynamický. Po druhé světové válce se začaly vyrábět krátké olefiny, zejména C2–C3 jako vedlejší produkt katalytického krakování. Na začátku 50. let se stal propylen levnou alternativou k přírodním mastným kyselinám, zejména díky své nízké ceně. Nicméně na začátku 60. let mělo používání propylenu za následek ekologické poškození. Mnoho řek a jezer, do kterých ústily odpadní vody z velkých měst, byly pokryty trvalou pěnou. Viníkem bylo větvení alkylové skupiny alkylbenzensulfonátu vyrobeného z propylenu. Bylo zjištěno, že tyto větvené polymery jsou rezistentní vůči biodegradaci. V důsledku toho vznikl ve Spojených státech a v Evropě zákon zakazující používání alkylátů na bázi propylenu. Výrobci tenzidů museli nalézt nové suroviny a metody k výrobě lineárních alkylátů, např. na bázi polymerizace etylenu. Po roce 1970 došlo ke značnému vývoji nových typů a k silnému nárůstu používání povrchově aktivních látek nejen pro domácí účely, ale i pro průmyslové použití. Neiontové PAL se staly součástí mnoha výrobků, kationové a amfoterní tenzidy byly nabízeny několika výrobci, ale zde bylo jejich použití omezovalo vysokou cenou. V letech 1890 – 1990 se tržní podíly jednotlivých výrobků stabilizovaly, ovšem s rychlejší produkcí neionogenních tenzidů oproti aniontovým. Došlo k zavedení nových typů neionogenních PAL, např. alkylpolyglukosidy [33].

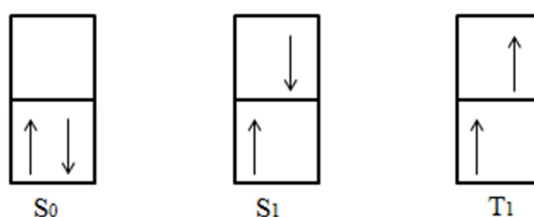
Povrchově aktivní látky nacházejí uplatnění v mnoha oborech, především v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu, jako detergenty, čisticí prášky, aj. Dále se používají v řadě potravinářských technologií, jako stabilizátory pěn, chuti a při výrobě pečárenských výrobků. Mezi další aplikace patří ropný průmysl, zpracování zemědělských produktů, betonová aditiva, apod. V neposlední řadě mají amfifilní molekuly uplatnění i v biologických systémech. Od roku 1990 se používají např. k léčbě respiračních onemocnění. Díky amfifilní povaze nacházejí tyto látky použití v cílené distribuci léčiv. Mezi koloidní nosiče na bázi polymerů patří micely, lipozomy, nano- a mikro-částice a hydrogely. Polymerní micely mohou sloužit jako nosiče špatně rozpustných léků, jelikož jsou schopny rozpouštět aktivní složku v jejich jádře a zároveň chránit před kontaktem s okolním vodním prostředím. Micelární skelet umožňuje stabilizaci ve vodném prostředí a spolupracuje s plasmatickými

proteiny a buněčnými membránami. Povrchově aktivní chování látek pro cílenou distribuci léčiv může selektivně zlepšit řadu vlastností, jako je biokompatibilita, distribuce v organismu a residuální čas [33][36][38].

2.3 Fluorescenční spektroskopie

Během posledních dvaceti let došlo k pozoruhodnému nárůstu v používání fluorescenčních metod. Fluorescenční spektroskopie se stále více používá nejen v biochemickém a biofyzikálním výzkumu, ale i v klinické chemii, genetických analýzách, aj. Byl zaznamenán dramatický růst používání fluorescence pro buněčné a molekulární zobrazování. Tato metoda může odhalit lokalizaci intracelulárních molekul, někdy na úrovni mono-molekulové detekce [55][56].

Fluorescence se spolu s fosforescencí řadí mezi luminiscenční metody. Luminiscence je emise světla z určité látky a nastává z elektronicky excitovaných stavů. Hlavní rozdíl mezi fluorescencí a fosforescencí spočívá ve spinové multiplicitě. Při popisu elektronové struktury přiřazujeme elektronům dvě hodnoty spinu $+1/2$ a $-1/2$. U singletového stavu jsou spiny obou elektronů orientovány antiparalelně, v tripletu jsou spiny elektronů paralelní (Obr. 8). Se změnou multiplicity se setkáváme u fosforescence. Přechody z tripletového stavu do základního stavu jsou v tomto případě zakázány a pomalejší ($10^{-3} - 10^0$ s), takže doba života fosforescence se obvykle pohybuje v řádech milisekund až sekund. V případě fluorescence se spinová multiplicita nemění a zářivé přechody z excitovaného singletového do základního stavu jsou tedy spinově dovolenými [54].



Obr. 8 – Elektronové stavy molekul; základní stav (S_0), excitovaný singletový stav (S_1), excitovaný tripletový stav (T_1)

Speciálním případem luminiscence je zpožděná fluorescence. Zpožděná fluorescence je zářivý přechod ze singletového stavu (S_1) jako při fluorescenci, ale s delší dobou dohasínání danou časem, po který je molekula v metastabilním tripletovém stavu. Doba dohasínání zpožděné fluorescence je přibližně rovna době dohasínání fosforescence měřené za stejných podmínek [56]. K tomuto jevu obvykle nedochází u aromatických uhlovodíků, jelikož vzdálenost mezi excitovaným singletem (S_1) a excitovaným tripletovým stavem (T_1) je poměrně velká. S efektivní opožděnou fluorescencí se můžeme setkat např. u fullerenu [55].

Excitace nezářivým přenosem energie (Försterův rezonanční přenos energie, FRET) nastává, pokud ve směsi molekul dochází k absorpci pouze molekulami donoru, avšak konečným výsledkem jsou excitované molekuly akceptoru, které budící záření neabsorbují. Při tomto přenosu energie donor odevzdá energii akceptoru, jehož emisní spektrum je následně vidět. Rezonanční přenos energie umožňuje stanovit vzdálenosti mezi místy na makromolekule. FRET technologie je jedním z nejslibnějších spektroskopických nástrojů pro studium molekulárních interakcí v živých buňkách. Je-li FRET používán jako kontrastní mechanismus, může poskytnout detailní informace o lokalizaci proteinů a dalších molekul

s prostorovým rozlišením za hranicemi optické mikroskopie. Za tohoto předpokladu může být FRET důležitým doplňkem pro biochemické studie [56][59][62].

2.3.1 Princip fluorescence

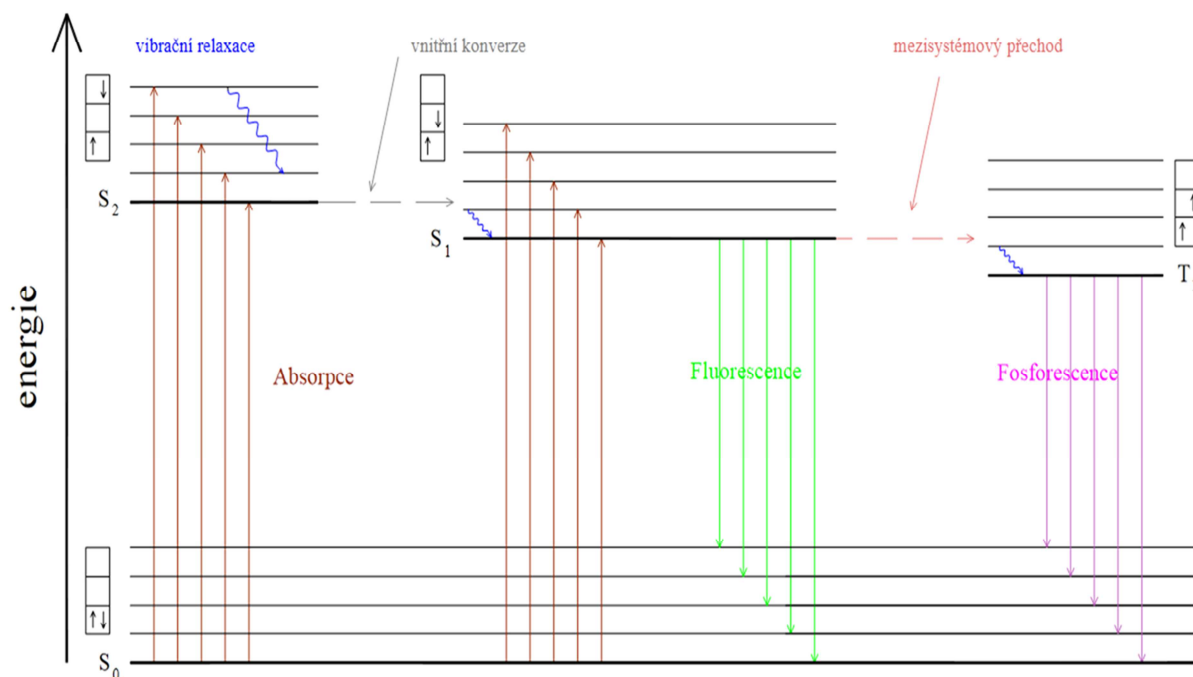
Po absorpci světla organickou molekulou v základním stavu (S_0) dochází k excitaci elektronu, který přejde z původně nízko ležícího orbitalu do nejbližšího neobsazeného orbitalu s vyšší energií. Z kvantově-mechanického hlediska je nejpravděpodobnější vytvoření singletového stavu (S_1), kde jsou spiny obou elektronů antiparalelní (spárované elektrony). S menší pravděpodobností může vznikat tripletový stav (T_1), ve kterém jsou spiny obou elektronů paralelní, mají tedy nespárované elektrony (Obr. 8).

Fluorescenci nazýváme emisi fotonů při zářivém přechodu $S_1 \rightarrow S_0$, přičemž se doba života tohoto rychlého zářivého přechodu pohybuje v řádu nanosekund. U některých molekul byla pozorována fluorescence i z vyššího excitovaného stavu do základního stavu ($S_2 \rightarrow S_0$). S fluorescencí se velmi často setkáváme u aromatických molekul [56].

2.3.2 Jablonského diagram

Jablonského diagram ilustruje procesy, které mohou nastat při absorpci a následné emisi světla. Tento diagram znázorňuje energetické stavy molekuly a přechody mezi nimi a můžeme se setkat s různými formami znázornění.

Jablonského diagram je zobrazen na Obr. 9. Je znázorněn základní stav (S_0), první a druhý excitovaný singletový stav (S_1, S_2) a první triplet (T_1). Po absorpci záření přechází fluorofor do některé z vibračních úrovní singletových excitovaných stavů. Proces absorpce je nejrychlejší, řádově 10^{-15} s. Poté molekula rychle relaxuje a zbavuje se přebytečné energie na nejnižší vibrační úroveň daného elektronového stavu. Tento neradiační proces se nazývá vibrační relaxace (*Vibrational Relaxation, VR*) a trvá přibližně $10^{-12} - 10^{-10}$ s. Nastává-li přechod z excitovaného singletového elektronového stavu (nejčastěji S_1) na některou z vibračních hladin základního elektronového stavu (S_0), hovoříme o fluorescenci. Fluorescence se řídí Stokesovým zákonem, který říká, že vlnová délka fluorescence je větší nebo rovna než vlnová délka excitujícího záření ($\lambda_{em} \geq \lambda_{ex}$). Pokud dochází k nezářivému přechodu mezi elektronovými stavy se stejnou multiplicitou ($10^{-11} - 10^{-9}$ s), nazýváme tento proces vnitřní konverzí (*Internal Conversion, IC*). Mezisystémovým přechodem (*Intersystem crossing, ISC*) označujeme nezářivý proces mezi elektronovými stavy s rozdílnou multiplicitou, trvající $10^{-10} - 10^{-8}$ s [55].



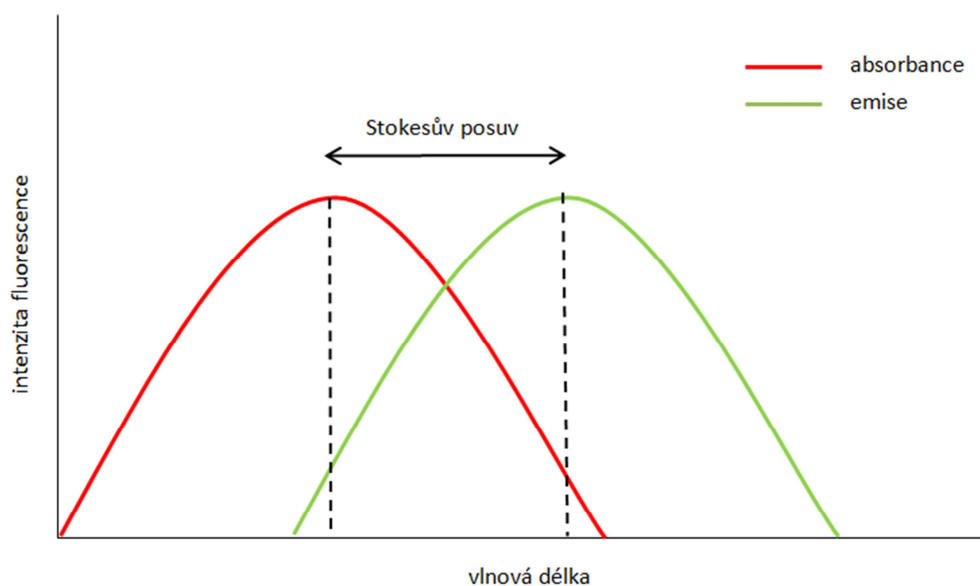
Obr. 9 – Jablonskiho diagram

2.3.3 Emisní a excitační spektrum

Každá molekula vykazující fluorescenci je charakterizována emisním a excitačním spektrem. Emisní spektrum je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní vlnové délce budícího záření a excitační spektrum je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní vlnové délce emitovaného záření.

Mezi absorpčním a fluorescenčním pásem se setkáváme se zrcadlovou symetrií, která je způsobena tím, že absorpce i emise z odpovídajících si vibračních hladin mají stejnou relativní pravděpodobnost. Rozdíl ve vlnových délkách (energiích) mezi maximy absorpčního a emisního pásu se říká Stokesův posuv (Obr. 10).

Excitační a absorpční spektrum se ve skutečnosti liší. Obsahuje totiž jen ty pásy absorpčního spektra, kde dochází k zářivé deexcitaci, tedy vzniku fluorescence [56].



Obr. 10 – Stokesův posuv

2.3.4 Fluorescenční sondy

Jsou známy tisíce sond, které nám mohou poskytnout velké množství informací napříč různými vědními obory. Vzhledem ke specifičnosti a citlivosti fluorescenčních sond jsou v současné době do značné míry používané pro označování živých buněk, pro biomedicínský výzkum, včetně aplikací ve farmakologii a toxikologii [63].

Jedná se o vnější fluorofory, které se ke sledovaným molekulám či iontům váží nekovalentně. Volba fluorescenční sondy je klíčová, neboť její vlastnosti nám umožňují získat rozličné informace o sledované látce. Existují sondy, které nám odhalí informace o polaritě nebo o viskozitě prostředí, dále se uplatňují membránové fluorescenční sondy, fluorescenční sondy pro přenos energie nebo fluorescenční sondy pro nukleové kyseliny [64][65][66].

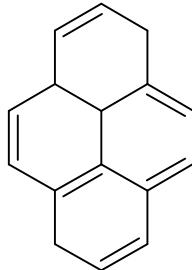
V této práci se budeme zabývat především sondami, které slouží ke stanovení polaritě prostředí, přičemž tento fenomén byl zkoumán od roku 1862 (Berhelot, de Saint-Gilles). V roztoku dochází mezi sondou a molekulami prostředí k různým typům interakcí – van der Waalsovy a některé specifické interakce (vodíkové můstky). Polarita poté vyjadřuje kvalitu interakce mezi molekulou a prostředím. Způsob stanovení tohoto vlivu se opírá z větší části o empirické polaritní škály založené na změnách absorpčního nebo emisního maxima. Polaritní sondy dělíme podle způsobu interakce:

- Foto-indukovaný přenos náboje-relaxace rozpouštědla (ANS, TNS, Prodan)
- Efekt vodíkové vazby (2-anilinonaftalen, 4-aminonaftalimid)
- Inverze typu singletového přechodu (pyrencarboxyaldehyd, 7-alkoxykumarin)
- Změny ve vibračních pásech (Pyren) [57][67]

2.3.4.1 Pyren

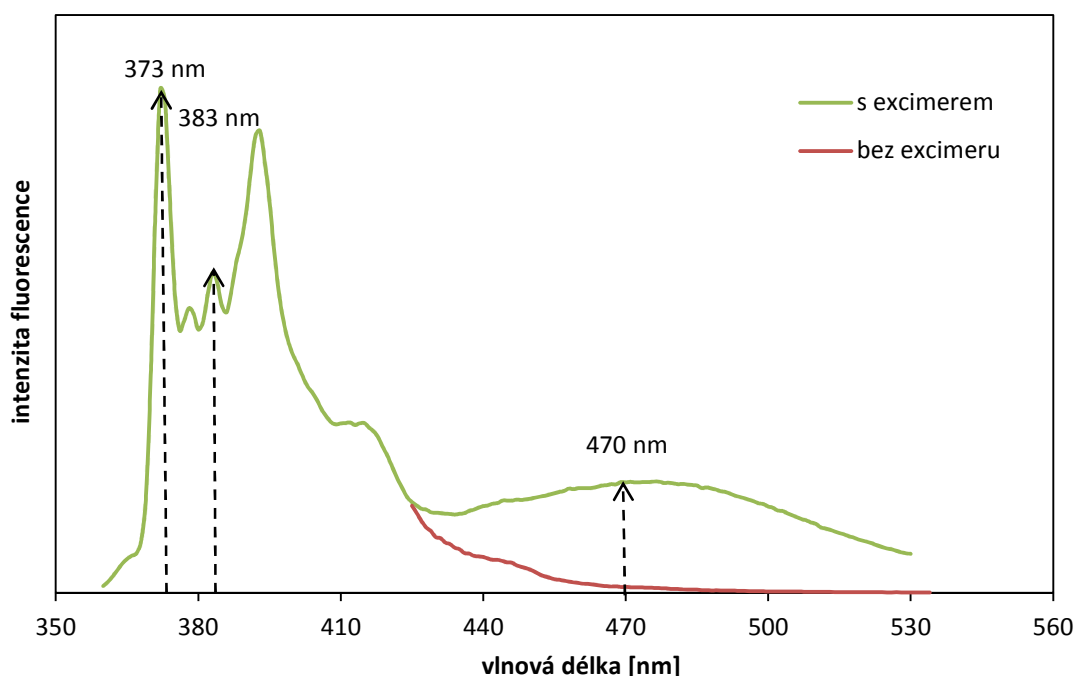
Pyren je polyaromatický uhlovodík s vysokou symetrií a s unikátní reakcí na polaritu prostředí (Obr. 11). Při zjišťování CMC s pyrenem využíváme emisního polaritního indexu (EmPI), který nám udává informace o polaritě v okolí pyrenu. EmPI je polaritní index získaný z poměru intenzit fluorescence z emisního spektra při vlnových délkách prvního (I_1) a třetího (I_3) maxima. $I_1(I_M)$ je hodnota fluorescence prvního vibračního pásu emisního spektra vyskytující se u vlnové délky 373 nm. Hodnota fluorescence třetího vibračního pásu I_3 je

lokalizována u vlnové délky 383 nm. V polárním prostředí dosahuje EmPI hodnot $\approx 1,7$; v nepolárním $\approx 0,5$. Obecně je hranice polárního a nepolárního prostředí brána jako hodnota $\text{EmPI} \approx 1$ [67]. Při vyhodnocování se také používá hodnota excitačního polaritního indexu (ExPI), tedy polaritního indexu získaného z poměru intenzit fluorescence z excitačního spektra při vlnových délkách 333 nm a 338 nm.



Obr. 11 – Schéma pyrenu

Dále se zjišťuje intenzita fluorescence při vlnové délce 470 nm (I_E), což je maximum typické pro excimer. Tvorba excimeru při měření s pyrenem nastává v okamžiku zakoncentrování molekul pyrenu v micelách. Během tvorby micel, tedy v okolí kritické micelární koncentrace, má hodnota intenzity fluorescence emisního spektra při vlnové délce 470 nm nejvyšší hodnotu. Po překročení CMC hodnota I_E klesá z důvodu dalšího nárůstu micel. S rostoucí koncentrací micel v roztoku dochází ke snížení pravděpodobnosti vzniku excimeru, jelikož daná koncentrace pyrenu je již pod úrovní koncentrace micel v roztoku. Poměr intenzity fluorescence excimeru ku intenzitě fluorescence monomeru (I_1) z emisního spektra (Ex:Mo) se proto také využívá při zpracování. Je známo, že tvořící excimer má rozdílné fluorescenční vlastnosti a poměr Ex:Mo je závislý na dynamice hostitele [68].

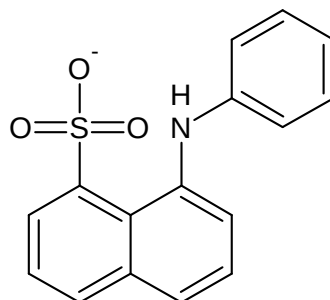


Obr. 12 – Emisní spektrum pyrenu s charakteristickými prvky

2.3.4.2 1-anilinonaftalen-8-sulfonová kyselina (ANS)

ANS je jedna z nejpoužívanějších fluorescenčních sond, reagující především na polaritu prostředí. Tato negativně nabitá hydrofobní sonda v polárním prostředí nevykazuje téměř žádnou fluorescenci, kdežto silně fluoreskuje z prostředí o nízké polaritě. Řadí se mezi sondy, kde dochází k pozitivnímu solvatochromismu (čím nižší polarita, tím nižší vlnová délka). U ANS je to posun z ~550 nm ve vodě k ~ 500 nm v nepolárním prostředí [67][69].

1-anilinonaftalen-8-sulfonová kyselina byla poprvé použita před 30 lety v díle L. S. Stryera, který zkoumal hydrofobicitu nativních proteinů [70]. ANS sonda se široce používá pro studium struktury a dynamiky proteinů, micelárních systémů a buněčných membrán [71]. Dále se dá tímto způsobem studovat struktura a stupeň polárnosti různých vazebných míst na proteinech, např. studium polaritý vazebného místa pro hem v apomyoglobinu a apohemoglobinu [57][71][72].



Obr. 13 – Schéma ANS

2.3.5 Zhášení fluorescence

Zhášení fluorescence je jakýkoliv proces, který vede k snížení fluorescence, tedy ke snížení kvantového výtěžku fluorescence beze změny fluorescenčního spektra.



kde M^* je excitovaný stav, M reprezentuje základní stav a Q je molekula zhášeče.

Ve fluorescenční spektrofotometrii rozlišujeme zhášení dynamické a statické. Dynamické (srážkové) zhášení probíhá v případě deaktivace fluoroforu v excitovaném stavu srážkou s molekulou zhášeče [56]. Při srážkovém zhášení tedy dochází ke kolizním střetům mezi fluoroforem v excitovaném stavu a molekulou zhášeče, přičemž fluorofor se následně navrací do základního stavu. Během kolizního zhášení nedochází u molekul k chemickým změnám. Snížení intenzity fluorescence srážkovým zhášením popisuje Stern-Volmerova rovnice:

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = 1 + K[Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q], \quad (3)$$

kde Φ_0 je kvantový výtěžek bez přítomnosti zhášeče, Φ je kvantový výtěžek v přítomnosti zhášeče, K je Stern-Volmerova konstanta, k_q je bimolekulární zhášecí konstanta, τ_0 je doba života excitovaného stavu bez přítomnosti zhášeče a $[Q]$ je koncentrace zhášeče. Jako kolizní zhášeč funguje velká řada molekul, mezi něž také patří např. molekulární kyslík, akrylamid, halogeny, amidy, aj [54][57].

U *statického* zhášení dochází k navázání molekul fluoroforu na molekuly zhášeče a vytváří se komplex, který nefluoreskuje [56].

Během fluorescence může nastat i samozhášení. Tento typ zhášení je způsoben fluoroforem samotným a nastává při vysokých koncentracích.

Zhášení fluorescence se uplatňuje při studiu micelárních systémů, při analýze penetrace proteinů a peptidů do membrány v biologických systémech [58], při zkoumání dynamiky a struktury proteinů [59], při studiu DNA crosslinku [60] a další.

2.3.6 Tvorba excimeru

Excimer neboli excitovaný dimer vzniká v důsledku srážky mezi excitovanou molekulou a identickou molekulou v základním stavu. V tomto případě přebírá samotná molekula funkci zhášedce a nastává samozhášení. Emise excimeru je charakterizována vlastním emisním pásem, který se nachází ve vyšších vlnových délkách než pás monomeru. Mezi látky, které podléhají tvorbě excimeru se řadí některé aromatické uhlovodíky (např. pyren či naftalen).

Zhášení pyrenu pomocí tvorby excimeru se široce používá pro stanovení agregačního čísla povrchově aktivních systémů. Dále zhášení poskytuje kvantitativní informace nejen o agregačním čísle micelárního systému, ale také informace o vazbě protiiontu a o vlivu přísad na proces micelizace. V neposlední řadě nám zhášení fluorescence může sdělit informace o solubilizačním procesu u amfifilních molekul [55].

2.3.7 Vnitřní filtrační efekt

Intenzita fluorescence je při nižších koncentracích úměrná koncentraci fluoroforu. Ovšem při vyšších koncentracích fluoroforu je značné množství dopadajícího světla absorbováno dříve, než dorazí do prostoru kyvety, odkud je snímán signál. Ten jev se nazývá vnitřní filtrační efekt a může zkreslit přesnost měřených fluorescenčních spekter. Tento efekt se snažíme eliminovat, jelikož může snižovat intenzitu excitačního záření nebo naměřené fluorescence.

Dalším případem snížení intenzity fluorescence je fakt, že některé molekuly neemitují záření směrem k detektoru.

2.4 Optické vlastnosti disperzních systémů

Charakterizace optických vlastností disperzních systémů není jednoduchou záležitostí. Dopadá-li světlo (elektromagnetické záření) na disperzní systém dochází k poklesu intenzity záření v důsledku pravé absorpce a rozptylu světla. Při pravé absorpci pohlcené záření zvýší vnitřní energii molekul systému a přemění se v teplo, zatímco u rozptylu světla je záření opět emitováno ve formě světelné energie. Podle charakteru systému (velikost částic, chemické složení) pak jeden z uvedených jevů převládá. U analyticky disperzních systémů se uplatňuje především pravá absorpce, zatímco u koloidních a větších rozměrů se setkáváme hlavně s rozptylem světla [29][42].

2.4.1 Dynamický rozptyl světla (DLS)

Dynamický rozptyl světla (Dynamic Light Scattering) znám rovněž jako fotonová korelační spektroskopie (PCS) či kvazielastický rozptyl světla (QELS) je v současné době velmi používanou technikou pro měření velikosti částic a charakterizaci distribuce velikosti částic obvykle v submikronové oblasti (nejnovější technologie i nižší než 1 nm). Za zakladatele dynamického rozptylu světla je považován Leon Brillouin, který v roce 1914

publikoval krátký teoretický zápis popisující distribuci rozptylu světla a fluktuace hustot excitovaného isotropického tělesa [43]. Důležitost této techniky spočívá v jeho neinvazivním charakteru.

Průměrná velikost částic získaná touto metodou je vážena podle páté mocniny (tzn. Z-average), takže velké částice jsou v této hodnotě velmi nadhodnoceny a dokonce se může stát, že frakce malých částic se úplně ztratí ve velké intenzitě záření rozptýleného na větších částicích. Dolní hranice se pohybuje okolo 0,5 nm a maximální okolo 3 μm (větší částice již nepodléhají Brownovu pohybu) [44][45].

2.4.2 Princip dynamického rozptylu světla

Principem této metody je sledování fluktuací intenzity světla rozptýleného částicemi v závislosti na čase. V případě, že by byla molekula stacionární, množství rozptýleného světla by bylo konstantní. Ovšem malé částice se v kapalině pohybují Brownovým pohybem, čímž se mění vzdálenost, kterou musí urazit rozptýlené světlo k detektoru. Vznikají tak interference (pozitivní nebo negativní), které způsobují změny intenzity. Rychlost změn intenzity je přímo závislá na pohybu molekuly (čím rychleji se částice pohybují, tím více se mění intenzita světla).

Fluktuace intenzity rozptýleného světla ovlivňují tyto faktory:

- Teplota – čím vyšší teplota, tím větší rychlostí se molekuly pohybují
- Viskozita rozpouštědla – čím viskóznější je rozpouštědla, tím pomaleji se molekuly pohybují
- Velikost molekul – čím větší jsou molekuly, tím pomalejší rychlostí se pohybují. U malých molekul pohybujících se rychle dochází k tomu, že fluktuace vyvolané jejich pohybem rychle zanikají.

Z fluktuace intenzity rozptýleného světla se získá korelační funkce $g(t)$, která je dána vztahem:

$$g(t) = \exp \frac{-t}{\tau_c}, \quad (4)$$

kde τ_c je relaxační čas. Relaxační čas je popisován jako doba potřebná k návratu fluktuace k průměrné hodnotě intenzity rozptýleného světla. Parametr τ_c je přímo úměrný difúznímu koeficientu D částic:

$$\tau_c = \frac{1}{Dq^2}, \quad (5)$$

kde q je rozptylový vektor. Jeho hodnota je funkcí vlnové délky dopadajícího záření, indexu lomu disperzního média a úhlu θ , pod kterým je intenzita rozptýleného světla měřena:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (6)$$

Známe-li tedy teplotu a viskozitu, můžeme jednoduše ze Stokes-Einsteinovy (7) rovnice určit velikost částic. Získáme hodnotu, která se nazývá hydrodynamický průměr (event. poloměr) R_h a odpovídá průměru (poloměru) koule, která by měla za stejných podmínek stejný difúzní koeficient, jaký byl naměřen:

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D}, \quad (7)$$

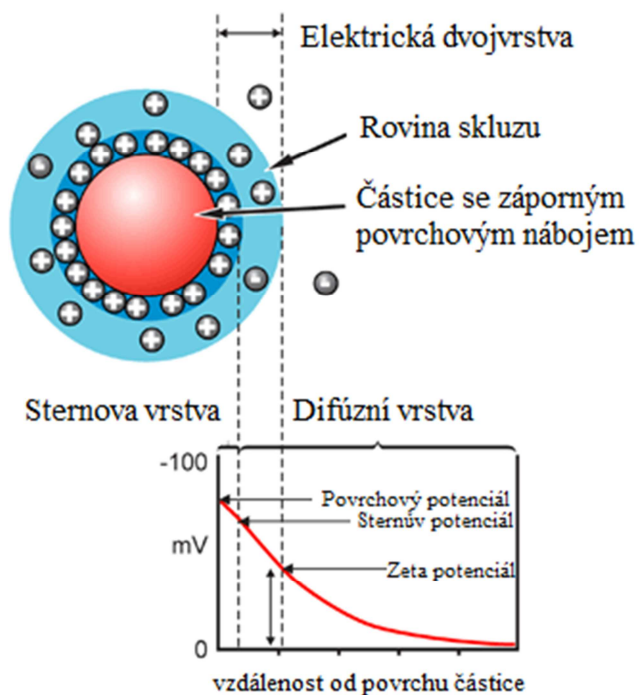
kde η je viskozita disperzního prostředí, k je Boltzmannova konstanta, D je translační difúzní koeficient a T je teplota [45][46][47].

2.5 Elektrické vlastnosti koloidů

Vznik síťového náboje na povrchu částic ovlivňuje distribuce iontů v okolní mezifázové oblasti, což má za následek zvýšenou koncentraci opačných iontů těsně u povrchu. Stejně tak je tomu i u koloidních částic, které okolo sebe seskupují malé ionty opačného znaménka, takže na povrchu této částice vznikají dvě nabitě vrstvy, tzv. elektrická dvojvrstva.

O struktuře elektrické dvojvrstvy byly vytvořeny řady teorií, jejichž věrohodnost byla posuzována dle toho, jak dalece jsou vztahy a závěry vyplývající z modelové představy ve shodě s experimentálními daty. Nejblíže skutečnosti je Sternův model (1924), kde byl zaveden pojem tloušťka adsorbované vrstvy δ , která přibližně odpovídá hodnotě iontových poloměrů [45][49].

V elektrické dvojvrstvě lze vymezit dvě základní části. Ve vnitřní oblasti, nazývané jako Sternova vrstva, jsou ionty silně vázané a působí zde adsorpční síly. U vzdálenější difúzní vrstvy lze adsorpční síly zanedbat, jelikož jsou ionty méně pevně připojené k povrchu. Uvnitř difúzní vrstvy existuje teoretická hranice, uvnitř které ionty a částice tvoří stabilní jednotku. Když se částice pohybuje (např. kvůli gravitaci), ionty uvnitř hranice se pohybují s ní, ale všechny ionty za hranicí s částicí nepatují. Tato hranice se nazývá povrch hydrodynamického smyku, nebo rovina skluzu. Potenciál, který existuje na této hranici, je známý jako elektrokinetický potenciál zeta (ζ potenciál), jímž se rozumí potenciálový rozdíl mezi objemem kapaliny a tenkou vrstvou protiiontů poutanou k povrchu částice [45][48].



Obr. 14 – Grafické znázornění elektrické dvojvrstvy

2.5.1 Zeta potenciál

Zeta potenciál (elektrokinetický potenciál) je jedna z hlavních sil, která zprostředkovává mezičásticové interakce. Velikost zeta potenciálu charakterizuje a zároveň ovlivňuje potenciální stabilitu disperzního systému. Pomocí měření ζ potenciálu můžeme zjistit, zda částice v kapalině budou mít tendenci ke flokulaci (držení pohromadě) či nikoliv. Hraniční potenciál stability je zpravidla 30 mV v absolutní hodnotě. Částice s ζ potenciálem kladnějším než +30 mV nebo zápornějším než -30 mV se považují za stabilní.

Hodnota zeta potenciálu vychází ze znalosti elektroforetické pohyblivosti a aplikace Henryho rovnice:

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(ka)}{3\eta}, \quad (8)$$

kde z je ζ potenciál, U_E představuje elektroforetickou pohyblivost, ε je dielektrická konstanta, η je viskozita a $f(Ka)$ udává Henryovu funkci, která je charakteristická pro dané prostředí. Pro určení $f(Ka)$ se obecně používají jako aproximace dvě hodnoty; buď 1,5 (polární) nebo 1,0 (nepolární).

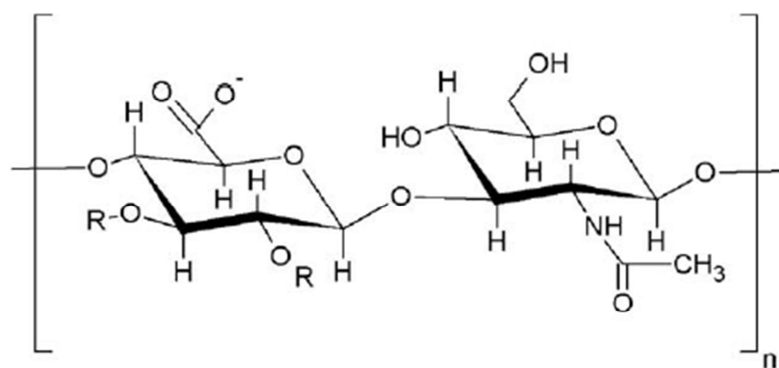
Pro určení elektroforetické pohyblivosti se používá cela s elektrodami, přičemž je na každém konci aplikovaný potenciál. Částice se pohybují směrem k elektrodě s opačným nábojem, měří se jejich rychlosti a vyjádří se v jednotkách intenzity pole jako jejich pohyblivost [47][48].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Celá řada vědeckých týmů se v současné době snaží vyvinout přípravky pro léčbu rakovinových onemocnění, které by minimálně zatěžovaly organismus. U cílené distribuce léčiv se klade velký důraz na biokompatibilitu, biodegradabilitu, selektivitu a řízenou aktivaci systému. Jedním z možných řešení je použití hydrofobně modifikovaných polymerů. Zájem v této třídě makromolekul roste hlavně díky jejich unikátnímu asociativnímu chování a jejich potenciálních aplikací v oblasti farmacie, kosmetiky, barev, těžby ropy, atd. [35]. V případě hyaluronanu by se jednalo o nový typ nosiče, který by mohl být využitelný pro cílenou distribuci léčiv.

Komparativní studii fyzikálně-chemických vlastností hydrofobně modifikovaných derivátů polysacharidu provedli vědci **Henni W. a spol.** [3] v roce 2005. V této práci byl studován hydrofobizovaný karboxymethylpululan (HMCMP) pomocí fluorescenční spektroskopie prostřednictvím pyrenu, jakožto hydrofobní fluorescenční sondy. Ve vodných roztocích modifikované deriváty vykazovaly asociativní charakter, který do značné míry závisí na iontové síle roztoku. Dále bylo zjištěno, že při vzrůstající koncentraci polymeru klesala hodnota poměru I_1/I_3 . Tento jev naznačuje, že hydrofobní intra- a intermolekulové interakce mezi alkylovými skupinami HMCMP vyvolávají tvorbu hydrofobních mikrodomén, ve kterých je solubilizován pyren. Z dalších měření iontové síly roztoků bylo shledáno, že čím vyšší je počet hydrofobních skupin roubovaných na makromolekulu, tím vyšší je schopnost asociace v roztoku. Tento výsledek je typický pro hydrofobně modifikované polymery. Ze všech uvedených experimentů jasně vyplývá, že zvýšení substituce (od 10 % na 35%) indikuje zpevnění hydrofobních interakcí, a tím i tvorbu kompaktnějších a stabilnějších agregátů.

Fyzikálně-chemickými vlastnostmi alkylovaných derivátů hyaluronanu se zabývali **Chytil M. a Pekař M.** [4] v roce 2009. Bylo studováno povrchové napětí, viskozimetrické a reologické vlastnosti nového typu modifikace hyaluronanu. Deriváty byly připraveny navázáním alkylových řetězců o délce 8 a 12 atomů uhlíku na OH- skupiny D-glukoronové kyseliny při nízkém (pod 20%) a vysokém stupni substituce (100%). Vysokomolekulární deriváty vyššího stupně substituce vykazovaly nejúčinnější povrchovou aktivitu s porovnáním s nízkomolekulárními deriváty nižšího stupně substituce. Bylo zjištěno, že asociační chování ovlivňuje délka alkylového řetězce, stupeň substituce i molekulová hmotnost. Systém s delším alkylovým řetězcem (C-12), s nižším stupněm substituce nízkomolekulárního hyaluronanu vykazoval vyšší kritickou agregační koncentraci (CAC) v porovnání s vysokomolekulárním, vysocesubstituovaným hyaluronem s kratším alkylovým řetězcem (C-8). Tento výsledek je v souladu s předchozími pracemi zabývajícími se hydrofobizovanými polysacharidy, které uvádí, že vyšší počet hydrofobních skupin roubovaných na makromolekulu podporuje agregační schopnost ve vodném prostředí.



$R = H, R'$

$R' = -CO-NH-(CH_2)_xCH_3; x = 7, 11$

Obr. 15 - Hydrofobně modifikovaný hyaluronan [4]

Studii agregačního chování derivátů hyaluronanu pomocí fluorescenční spektroskopie provedli **Mravec a spol.** [50] v roce 2008. Byl zkoumán hydrofobně modifikovaný hyaluronan o 5 různých molekulových hmotnostech se stupněm substituce v rozmezí 10 – 70% pomocí pyrenu a perylenu jako fluorescenčních sond. Obě dvě sondy potvrdili agregační chování hydrofobně modifikovaného hyaluronanu v porovnání s nativní HyA. Pro stanovení hydrofobnosti nepolárního jádra byl použit poměr I_1/I_3 v emisním spektru pyrenu. Polaritní stupnice pyrenu (*Pyren Polarity Scale*, PPS) nám udává informace o polaritě v okolí sondy. Výsledky ukazují zvyšující se hydrofobnost se zvyšujícím stupněm substituce. Dále bylo zjištěno, že nejcitlivější na stupeň substituce jsou vzorky s nejkratším alkylovým řetězcem (resp. s nejmenší molekulovou hmotností). Krátké alkylové řetězce se mohou snadněji přeorientovat a deformovat v porovnání s delšími alkylovými řetězci. Výsledky této práce prokazují, že hydrofobně modifikované deriváty hyaluronanu mají vhodné vlastnosti pro potenciální využití v cílené distribuci léčiv.

Efekty hydrofobně modifikovaného polymeru na nano strukturu micel zkoumali **Behjatmanesh-Ardakani R. a spol.** [51] v roce 2009. Tato studie byla založená na počítačové simulaci Monte Carlo, přičemž byly srovnávány dva typy polymerů v přítomnosti neionogenního surfaktantu. Jednalo se o polymer $(H_4T_4)_5$ a hydrofobně modifikovaný polymer $(H_{10}T_{10})_2$, kde H značí head (hlava) a T označuje tail (chvost). Bylo zjištěno, že CAC obou typů polymerů jsou přibližně stejné, ovšem CMC v přítomnosti hydrofobizovaného polymeru je přibližně dvakrát větší. Tato studie tedy ukazuje, že přeskupování struktury polymeru (polohy hlavy a ocasu) může dramaticky snížit stupeň interakce, přestože je celková velikost polymeru stejná. Dále byly zkoumány agregační čísla systémů, přičemž bylo zjištěno, že jsou hodnoty agregačních čísel obou typů polymerů velmi podobné.

V roce 2003 zkoumali **A. N. Lukyanov a V.P. Torchilin** [52] micely z lipidových derivátů ve vodě rozpustných polymerech jako nosiče pro špatně rozpustné léčiva. Zaměřili se na micely připravené z konjugátů ve vodě rozpustných polymerech jako jsou polyethylenglykol (PEG) nebo polyvinylpyrrolidon (PVP) s fosfolipidy. Zjistili, že polymerní micely jsou velmi stabilní, jak z hlediska schopnosti chránit jejich morfologii, tak zejména udržet zapouzdřený materiál. Cytostatika, která jsou zapouzdřena do micel připravených z polymer-lipidových konjugátů, ukazují zvýšenou protinádorovou účinnost *in vitro* a *in vivo*. Vědci zkoumali přípravu cílených imunitních micel (*imunomicel*), které umožňují dosáhnout vyšší efektivity

při léčení rakovinových onemocnění. Imunitní micely jsou založeny na připevnění protinádorové protilátky na povrch micely. Bylo tedy zjištěno, že farmaceutické polymer-lipidové konjugáty na bázi micel a imunomicel mohou být použity pro solubilizaci špatně rozpustných léků, což zvyšuje účinnost mnoha současných léčebných postupů.

Přípravu a charakterizaci polymerních micel pro solubilizaci špatně rozpustných protinádorových léčiv studovali v roce 2006 **Z. Sezgin a spol** [53]. Byly vybrány různé polymery s odlišnou délkou řetězce, přičemž micely byly připraveny pomocí různých poměrů léčivo:polymer. Systémy byly charakterizovány rozhodujícími hodnotami kritické micelární koncentrace (CMC) kopolymerů, velikostmi micel a Zeta potenciálem. Hodnota CMC byla určována pomocí fluorescenční spektroskopie, konkrétně pomocí pyrenu. Zeta potenciál byl měřen pomocí PALS (*Phase analysis light scattering*) Zeta potenciál analyzáru a velikost micel s léčivem a bez léčiva byla určována pomocí dynamického rozptylu světla s přístrojem Coulter N4 Nanosizer. Byly připraveny Pluronic a PEG-DSPE (polyetylen glykol-distearoyl fosfatidylethanolamin) micely, přičemž nízké hodnoty CMC obou polymerů naznačují, že tvoří stabilní micelární formy a jsou schopny udržet svou strukturu během zředění s tělními tekutinami. Tedy jsou schopny ochránit lék až do cílového místa. Velikost micel se pohybovala od 10 nm do 100 nm. Tato malá velikost micel umožňuje cílení léčiva, snížení rizika embolie a podporuje vstřebávání zejména v GI systému. Ukázalo se, že účinnost silně závisí na typu polymeru, typu léčiva a jejich poměru. Výsledky poukazují, že polymerní micely by kromě svých solubilizačních účinků mohly být užitečné jako nové nosiče léčiv pro hydrofobní léčiva.

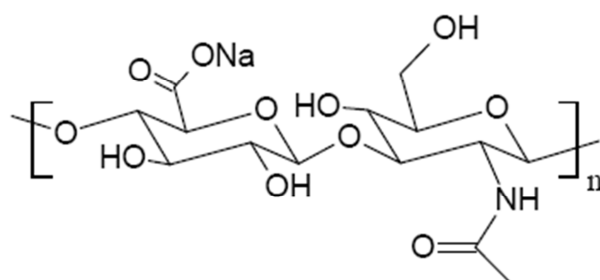
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité materiály

Hyaluronan HyA, Sodium hyaluronate, $M_w = 90 - 130$ kDA, nativní, CPN spol. s.r.o., šarže 212-2494

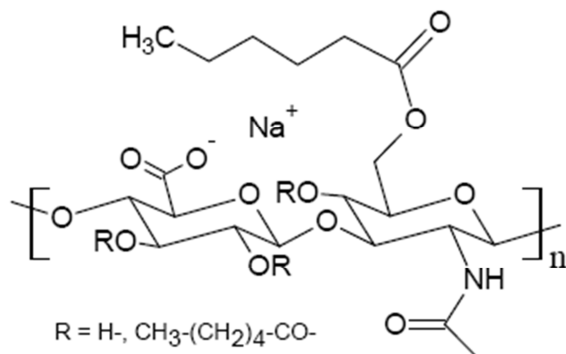
HyActive, $M_w = 17$ kDA, nativní, CPN spol. s.r.o., šarže 190908-E1

HyA, Sodium hyaluronate, $M_w = 200 - 400$ kDA, nativní, Contipro Biotech. s.r.o., šarže 213-3809

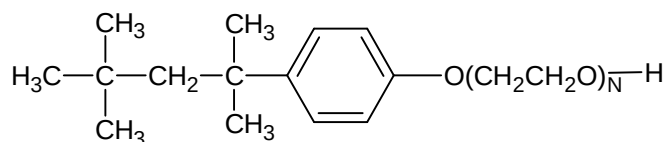


Deriváty Sodium caproyl hyaluronate, $M_w = 17$ kDa, hydrofobizovaný, stupeň substituce 10 – 20 %, Contipro Biotech s.r.o., šarže BO-C6-E1

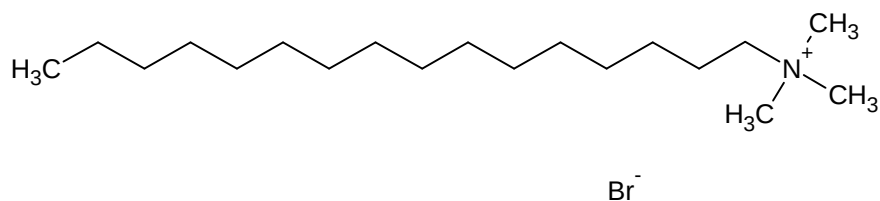
Sodium caproyl hyaluronate, $M_w = 206$ kDa, hydrofobizovaný, stupeň substituce 10 – 20 %, Contipro Biotech s.r.o., šarže BO-C6-E2



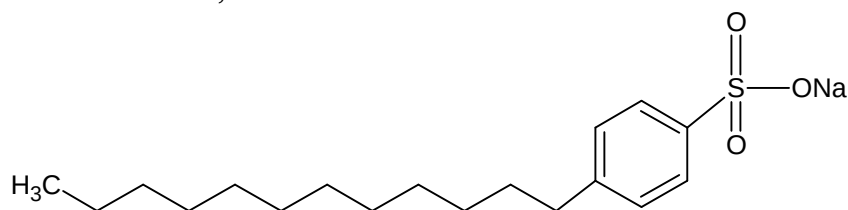
Tenzidy Triton X-100, oktylfenol ethoxylát, Fluka, $M_w = 625$ g.mol⁻¹, šarže 1249005, CAS: 9002-93-1



CTAB, cetyltrimethylamonium bromid, Serva, $M_w = 364,46 \text{ g.mol}^{-1}$,
 šarže 120152, CAS: 57-09-0

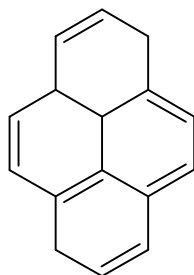


SDBS, dodecylbenzensulfonát sodný, Aldrich, $M_w = 348,48 \text{ g.mol}^{-1}$,
 šarže 246-680-4, CAS: 25155-30-0

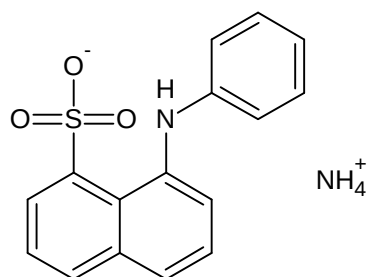


Fluorescenční
 sondy

Pyren, Fluka, puriss p.a. for fluorescence, šarže 2049273, CAS: 129-00-0

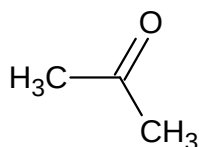


1,8-ANS NH_4^+ , 1-anilinonaftalen-8-sulfát amonný, Sigma Aldrich,
 $M_w = 316,38 \text{ g.mol}^{-1}$, šarže: 1405168, CAS: 28836-03-5



Rozpouštědla

Mili-Q voda (Milipore Academic)
 Aceton – Lachner s.r.o., p.a., Ultra $\geq 99,5 \%$



Ostatní NaCl, chlorid sodný, CAS: 7647-14-5, LachNer s.r.o., p.a.,

4.2 Příprava vzorků

4.2.1 Příprava zásobních roztoků fluorescenčních sond

Po navážení přesné navážky byl připraven zásobní roztok fluorescenčních sond (pyren, ANS NH_4^+) o koncentraci $2 \cdot 10^{-4}$ M rozpuštěním v acetonu. Při přípravě vzorků bylo do vialek pipetováno takové množství, aby byla výsledná koncentrace sondy $1 \cdot 10^{-6}$ M. Zásobní roztok byl ponechán v lednici při teplotě 4°C .

4.2.2 Příprava zásobních roztoků tenzidů

Po rozpuštění dané navážky tenzidu byl roztok kvantitativně přenesen do odměrné baňky a doplněn na požadovaný objem. Zásobní roztoky byly namíchány v Mili-Q vodě a v 0,15 M NaCl. V případě CTAB měly zásobní roztoky koncentraci 4 mM a 0,4 mM; v případě SDBS 8 mM. U Tritonu X-100 byl připraven zásobní roztok o koncentraci 8 mM a dalším ředěním byl připraven roztok o koncentraci 0,08 mM. Všechny zásobní roztoky byly ponechány ve tmě a v laboratorní teplotě.

4.2.3 Příprava zásobních roztoků hydrofobizovaného hyaluronanu

Pro zjištění agregace samotného hydrofobizovaného hyaluronanu byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 1g/l a 5g/l v Mili-Q vodě pro molekulové hmotnosti 17 kDa a 206 kDa.

Dále byly namíchány zásobní roztoky AcHyA pro studium změny agregačního chování tenzidů s přidavkem AcHya. Pro tento účel byly namíchány zásobní roztoky o koncentraci 0,4 g/l v Mili-Q vodě (17 kDa a 206 kDa AcHyA). Všechny zásobní roztoky byly 24 hod. míchány a poté uloženy v lednici při 4°C .

4.2.4 Příprava vzorků pro stanovení CMC tenzidů

U všech tenzidů byly vytvořeny koncentrační řady tak, aby se v koncentračním rozsahu nacházela předpokládaná hodnota CMC. Do vialek bylo pipetováno 20 μl fluorescenční sondy, poté byl ze vzorků odpařen aceton. Dále bylo pipetováno příslušné množství tenzidu, přičemž byl každý vzorek doplněn Mili-Q vodou nebo 0,15 M NaCl na 4 ml. Všechny vzorky byly před samotným měřením po dobu 24 hod. míchány.

4.2.5 Agregační chování tenzidů s přidavkem AcHyA

Do všech vzorků bylo nejdříve napipetováno příslušné množství fluorescenční sondy (pyren). Po odpaření acetonu bylo přidáno dané množství tenzidu dle koncentrační řady a následně bylo do všech vzorků přidáno konstantní množství AcHyA (koncentrace ve vzorku

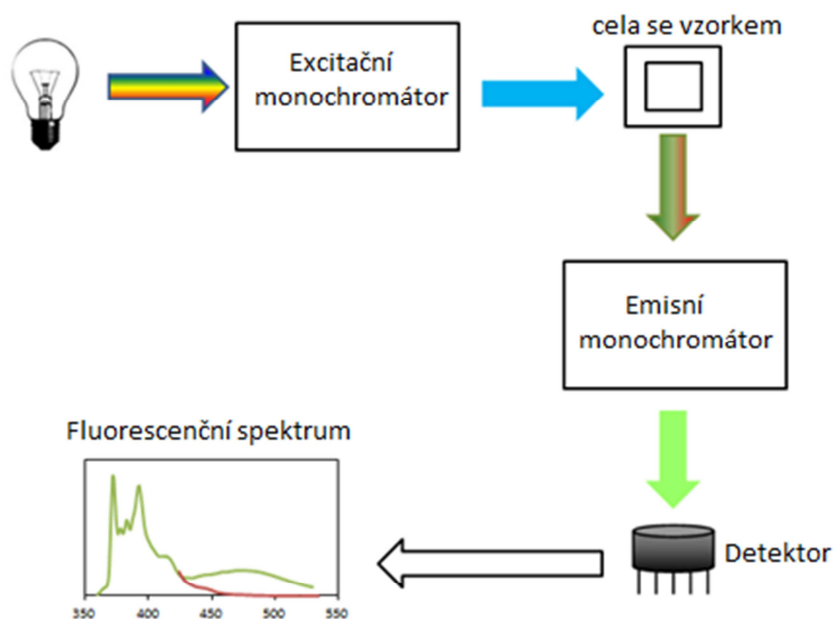
0,1 g/l AcHyA). Nakonec byly všechny vzorky doplněny vodou na 4 ml a míchány po dobu 24 hod.

4.2.6 Příprava vzorků pro DLS

Měření velikosti částic a zeta potenciálu bylo prováděno na vzorcích CTAB s přidavkem hydrofobizovaného hyaluronanu (206 kDa AcHyA). Na základě předchozích fluorescenčních experimentů bylo vybráno 6 koncentrací CTAB s konstantním množstvím AcHya, přičemž výsledná koncentrace AcHya ve vzorku byla 0,1 g/l. Byly namíchány tyto koncentrace CTAB: 0,005 mM; 0,04 mM; 0,15 mM; 0,35 mM; 0,8 mM a 2 mM. Dále byl namíchán referenční vzorek hydrofobizovaného hyaluronanu o koncentraci 0,1 g/l bez CTAB. Vzorky byly doplněny vodou na příslušný objem a míchány po 24 hod.

4.3 Fluorimetrie

Všechna fluorescenční měření byla prováděna na přístroji Fluorolog HORIBA JOBIN YVON s xenonovou výbojkou (450 W) s pomocí programu FluorEssence™. Tento přístroj umožňuje snímat fluorescenci v rozsahu 220 – 2500 nm s možností nastavení rozsahu teplot díky vodní lázni, Peltierově článku a Dewarově nástavci. Instrumentace spektrofleurimetru je znázorněna na Obr. 16. Veškerá fluorescenční měření byla prováděna za konstantní teploty 25°C.



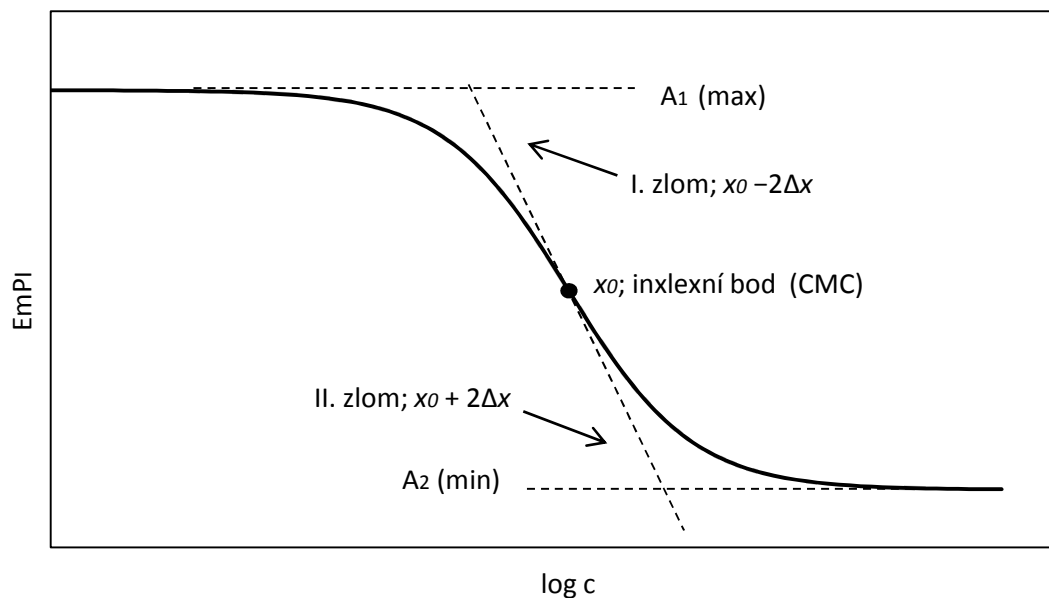
Obr. 16 – Schéma spektrofleurimetru

4.3.1 Měření fluorescenčních spekter pyrenu

Při měření vzorků s pyrenem byl monochromátor excitace nastaven na 335 nm a monochromátor emise na 392 nm. Bylo sledováno emisní i excitační spektrum, přičemž emisní sken byl sledován v rozsahu 360 – 530 nm, s krokem 1 nm. Z emisního skenu byly zaznamenávány hodnoty intenzit při vlnových délkách 373 nm (I_1), 383 nm (I_3) a 470 nm (I_E).

Excitační sken byl měřen v rozsahu 310 – 340 nm, s krokem 2 nm. Z emisního skenu byly zapisovány hodnoty intenzit fluorescence při vlnových délkách 333 nm a 338 nm.

Pro vyhodnocení dat s pyrenem a určení CMC se používá poměr prvního a třetího maxima emisního spektra (EmPI) v závislosti na logaritmu koncentrace. Výsledná závislost má sigmoidní tvar a lze ji popsat Boltzmanovou S-křivkou s charakteristickými parametry (Obr. 17).



Obr. 17 – Boltzmanova závislost s charakteristickými parametry

Rovnice sigmoidní křivky je definována:

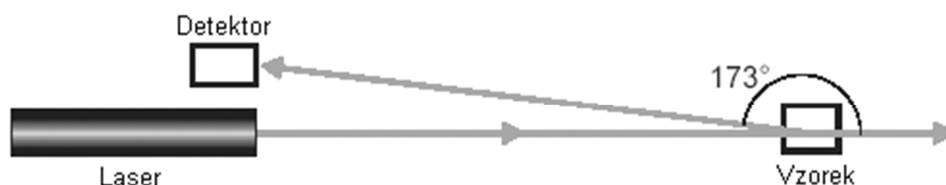
$$y = \frac{A_1(\text{min}) - A_2(\text{max})}{1 + e^{\frac{x - x_0}{\Delta x}}} + A_2(\text{max})$$

kde závisle proměnná y odpovídá EmPI, A_1 je minimum, A_2 maximum, x_0 je inflexní bod křivky a Δx je gradient. Obdobně lze zjistit CMC z excitačního skenu, ze závislosti excitačního polaritního indexu (ExPI) na logaritmu koncentrace [67].

4.4 Dynamický rozptyl světla

Velikost částic ve vzorcích byla měřena pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS od firmy Malvern Instruments. Jako zdroj světla byl použit He-Ne laser o vlnové délce 633 nm. Typický systém DLS se skládá ze šesti hlavních komponent; laser, cela, detektor, zeslabovač, korelátor a samotný PC. U přístrojů řady Zetasizer Nano je poloha detektoru buď v úhlu 173° nebo 90°.

V této diplomové práci bylo provedeno měření tzv. zpětného rozptylu (poloha detektoru v úhlu 173°). Tato metoda nabízí oproti klasické detekci v úhlu 90° několik výhod. Díky tomu, že světlo prochází kratší optickou dráhu vzorku, lze měřit i vyšší koncentrace vzorku. Tímto způsobem je odstraněn tzv. efekt mnohonásobného rozptylu, při kterém je rozptýlené světlo z jedné částice samo rozptýlené jinými částicemi. V neposlední řadě dochází k částečné eliminaci kontaminujících látek (částice prachu), které převážně rozptylují ve směru dopředu [47].

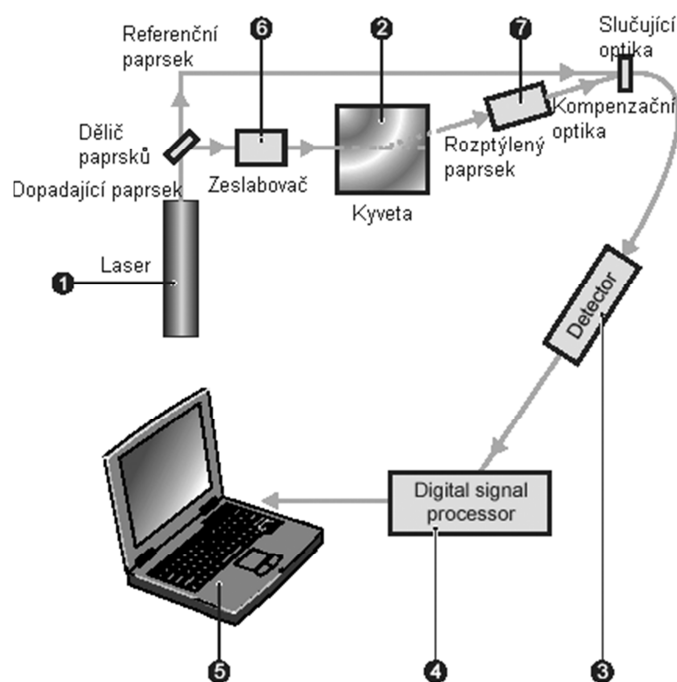


Obr. 18 – Schéma uspořádání tzv. zpětného rozptylu [47]

Všechny vzorky byly měřeny v módu SIZE, při temperované teplotě 25 °C. U všech vzorků byla měřena distribuce velikostí částic a průměrná velikost částic (Z-average). Dalším sledovaným parametrem byly korelogramy, které nám poskytují informace o kvalitě studovaných distribucí. Na přístroji byla využita automatická optika, která sama zvolí optimální nastavení měřící pozice v kyvetě podle koncentrace částic ve vzorku. Získaná data byla exportována a vyhodnocena v programu MS Excel. Experimenty byly prováděny v plastových spektroskopických kyvetách.

4.5 Zeta potenciál

Všechna měření velikosti zeta potenciálu byla prováděna na přístroji Zetasizer Nano ZS od firmy Malvern Instruments. Systém pro měření zeta potenciálu se podobně jako u DLS skládá ze šesti základních komponent. V tomto případě je zdroj světla rozdělený, aby poskytoval dopadající a referenční paprsek. Laserový paprsek prochází středem kyvety se vzorkem a detekuje se rozptýl v úhlu 17°. Detektor odešle tuto informaci na digitální procesor signálu. Tato informace pak přejde do počítače, kde software Zetasizer Nano vytvoří frekvenční spektrum, ze kterého se vypočítá elektroforetická pohyblivost, a tudíž i potenciál zeta. Pro korekci jakýchkoliv rozdílů mezi tloušťkou stěny kyvety a lomem světla dispergovadla je v dráze rozptylovaného paprsku nainstalovaná kompenzační optika, aby udržovala seřízení rozptylovaného paprsku [47].



Obr. 19 – Schéma pro měření zeta potenciálu; 1 – laser, 2 – vzorek, 3 – detektor, 4 – digitální procesor signálu, 5 – PC, 6 – zeslabovač, 7 – kompenzační optika [47]

Všechna měření zeta potenciálu byla prováděna v módu ZETA v ponorné kyvetě (ZEN1002) při temperované teplotě 25 °C. Sledovanými parametry byly zeta potenciál, distribuce zeta potenciálu a *count rate*. Získaná data byla exportována a vyhodnocena v programu MS Excel.

4.6 Statistika

Všechna fluorescenční měření byla prováděna minimálně třikrát. Z těchto hodnot byla do grafů vynesena průměrná hodnota a pomocí programu MS Excel byla k jednotlivým bodům spočítána směrodatná odchylka. V grafech odpovídají jednotlivé směrodatné odchylky chybovým úsečkám.

Měření velikosti částic a zeta potenciálu byly také prováděny minimálně třikrát, přičemž prezentované výsledky jsou průměrem naměřených hodnot.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Fluorimetrie

5.1.1 Studium samoagregace AcHyA

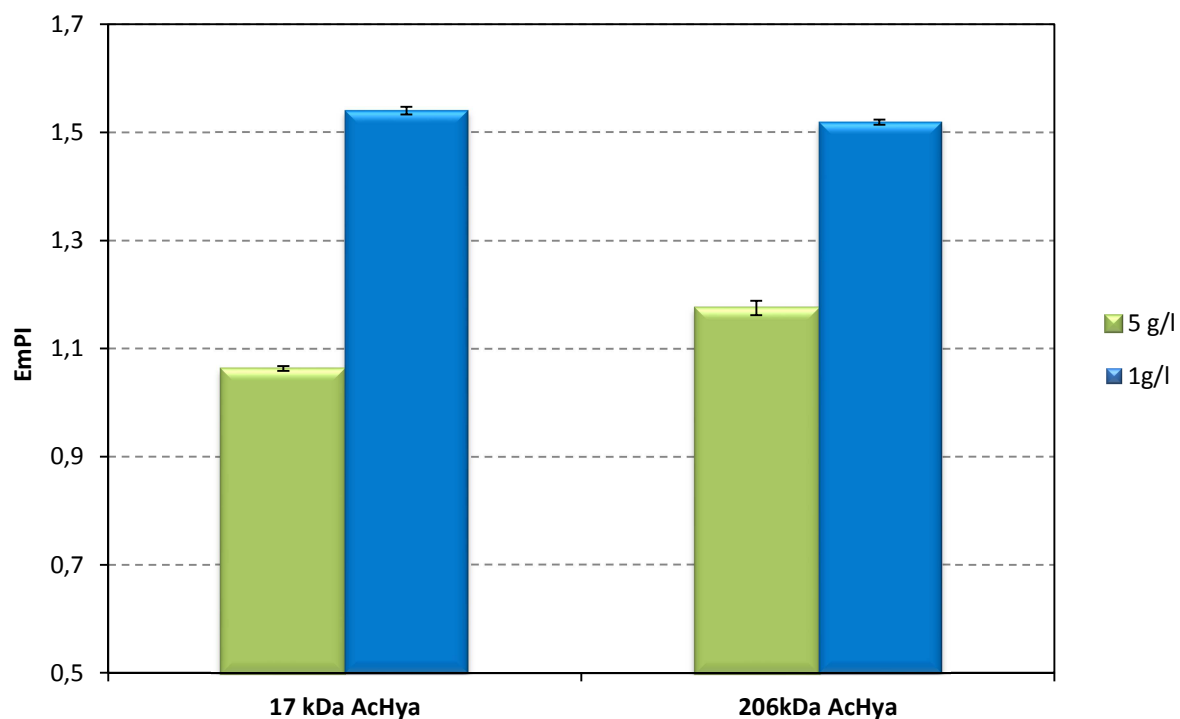
Sloupcový graf na Obr. 20 porovnává rozdílné agregační chování hydrofobně modifikovaného hyaluronanu. Díky unikátnímu chování pyrenu můžeme zjistit informace o polaritě systému. Z grafu je patrné, že na samovolnou tvorbu agregátů má velký vliv koncentrace modifikovaného hyaluronanu. U nižší koncentrace (1 g/l) AcHyA se emisní polaritní index pohybuje okolo hodnoty 1,5. Takto vysoká hodnota EmPI odpovídá polárnímu prostředí a naznačuje, že v systému samovolně nedochází k tvorbě hydrofobních domén. U vyšší koncentrace AcHyA (5 g/l) došlo ke značnému snížení EmPI. Při této koncentraci klesla hodnota EmPI u 17 kDa AcHyA na 1,06 a u 206 kDa AcHyA na 1,18. Tento klesající trend emisního polaritního indexu odpovídá nižší polaritě prostředí a naznačuje, že by se v systému měly samovolně vyskytovat hydrofobní domény. Koncentrovanější modifikovaný hyaluronan je tedy schopen samoagregace, což je široce využitelné pro cílenou distribuci léčiv. V předchozích studiích modifikovaného hyaluronanu bylo zjištěno, že formování hydrofobních kavit úzce souvisí se stupněm disociace.[4] V této diplomové práci byl zkoumán hydrofobizovaný hyaluronan se stupněm substituce 10 – 20 %. U vyššího stupně substituce lze očekávat snížení EmPI také u nižších koncentrací systému.

Dalším zkoumaným parametrem byla molekulová hmotnost. Z grafu je zřejmé, že dostupné molekulové hmotnosti neměly na samoagregaci acylovaného hyaluronanu výrazný vliv. Dá se předpokládat, že za použití rozdílnějších molekulových hmotností dochází k výraznějšímu ovlivnění asociačního chování AcHyA.

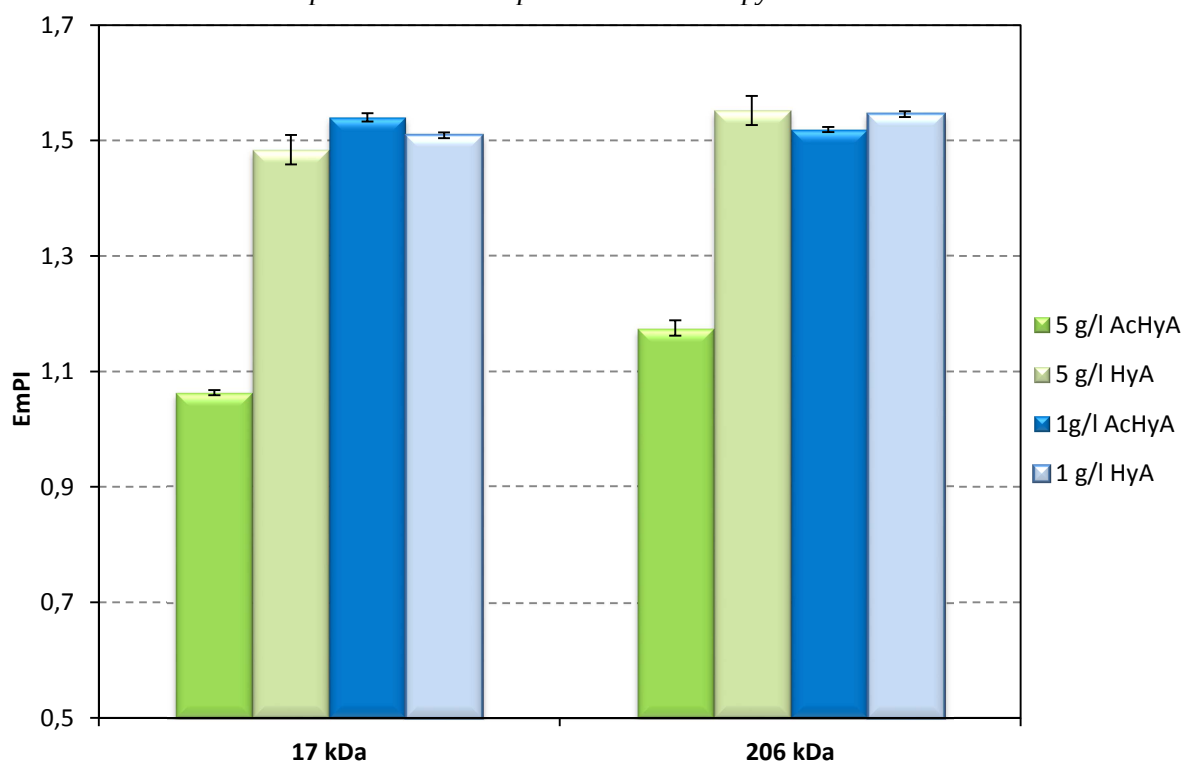
Obr. 21 srovnává agregační chování hydrofobizovaného hyaluronanu s nativním hyaluronanem o stejných molekulových hmotnostech a koncentracích. Z grafu je patrné, že nativní hyaluronan samovolně nepodporuje formování hydrofobních domén v roztoku. I při vyšší koncentraci HyA (5 g/l) nepozorujeme snížení emisního polaritního indexu jako u hydrofobně modifikovaného hyaluronu. Hodnoty emisních polaritních indexů nativního hyaluronanu odpovídají polárnímu prostředí v okolí sondy. V Tabulce 2 jsou uvedeny hodnoty emisních polaritních indexů jak hydrofobně modifikovaného hyaluronanu, tak nativní kyseliny hyaluronové v prostředí vody.

Tabulka 2 – Emisní polaritní indexy hydrofobizovaného hyaluronanu a nativního hyaluronanu (17 kDa, 206 kDa) o koncentracích 1 g/l a 5 g/l v prostředí vody

	17 kDa		206 kDa	
	1 g/l	5 g/l	1 g/l	5 g/l
AcHyA	1,54 ± 0,01	1,06 ± 0,00	1,52 ± 0,00	1,18 ± 0,01
HyA	1,51 ± 0,01	1,48 ± 0,03	1,55 ± 0,00	1,55 ± 0,01



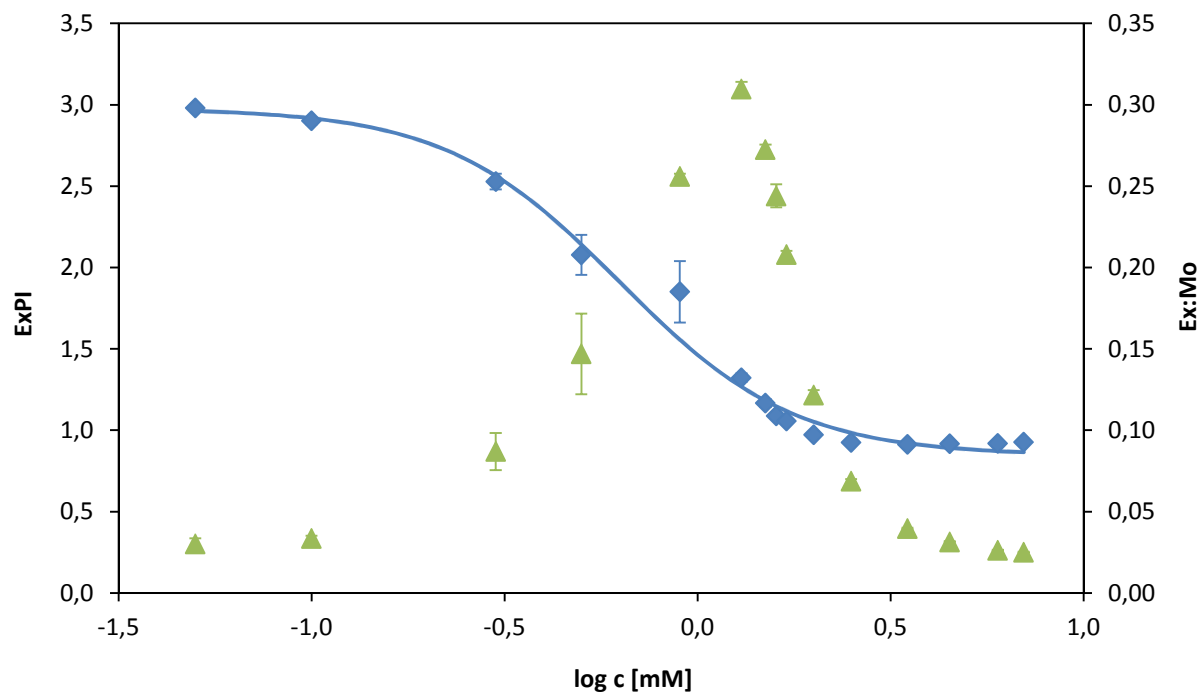
Obr. 20 – Srovnání asociačního chování AcHyA o koncentraci 1 g/l (modře) a 5 g/l (zeleně) pomocí emisního polaritního indexu pyrenu



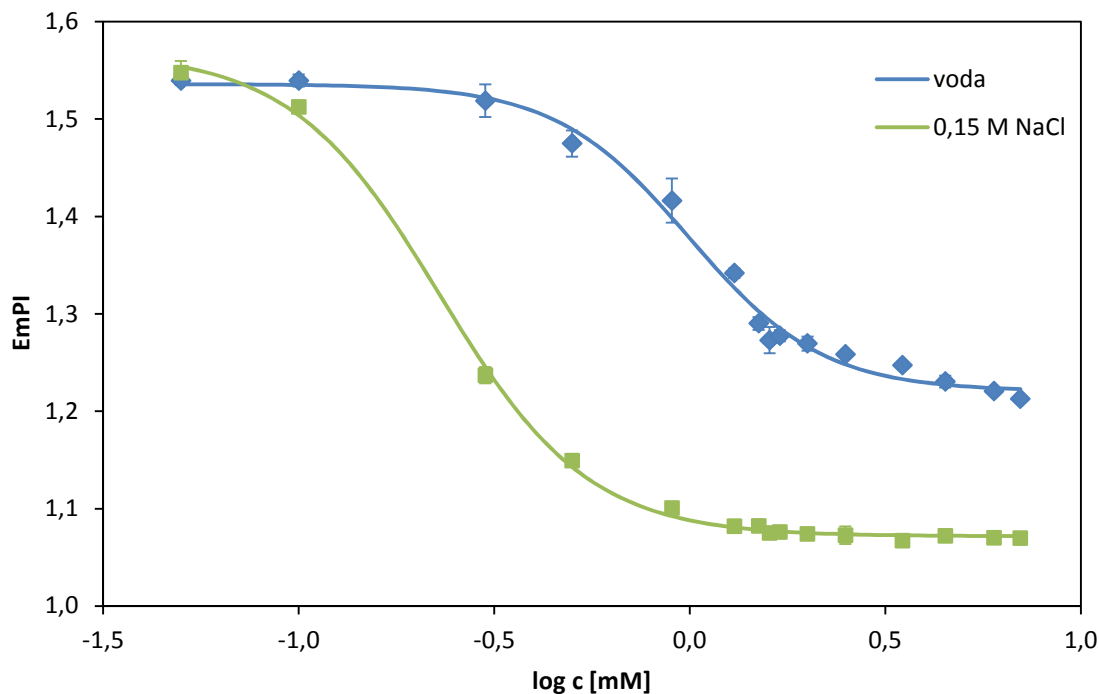
Obr. 21 – Srovnání asociačního chování AcHyA o koncentraci 1 g/l (modře) a 5 g/l (zeleně) s nativní HyA o koncentraci 1 g/l (světle modře) a 5 g/l (světle zeleně)

5.1.2 Stanovení CMC tenzidů v prostředí vody a 0,15M NaCl

V této části diplomové práce byly stanoveny hodnoty CMC kationtového tenzidu (CTAB), aniontového tenzidu (SDBS) a neionogenního tenzidu (Triton X-100) v prostředí Mili-Q vody a 0,15 M NaCl. Pro diskusi rozdílů prostředí byl vybrán aniontový tenzid SDBS.



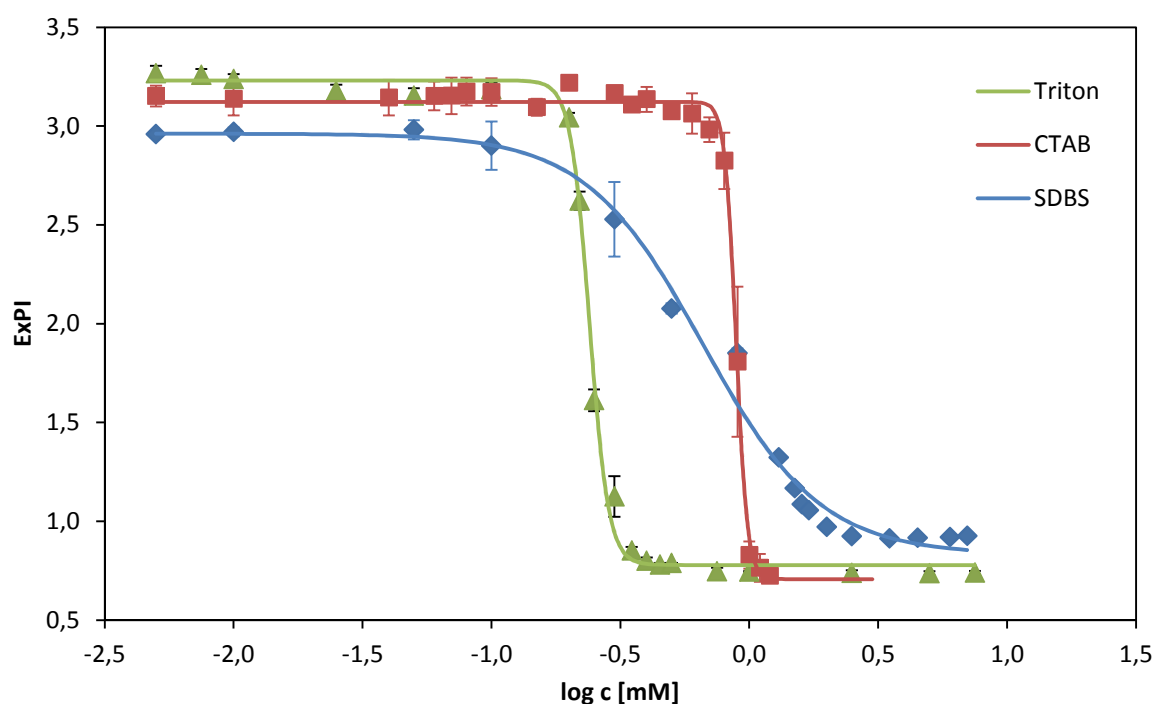
Obr. 22 – Závislost $ExPI$ a $Ex:Mo$ na logaritmu koncentrace tenzidu SDBS v prostředí Mili-Q vody



Obr. 23 – Závislost $EmPI$ na logaritmu koncentrace SDBS v prostředí Mili-Q vody (modře) a 0,15 M NaCl (zeleně)

Závislost excitačního polaritního indexu a poměru Ex:Mo na logaritmu koncentrace SDBS v prostředí vody zobrazuje Obr. 22. Průběh závislosti ExPI na logaritmu koncentrace má typický sigmoidní charakter, přičemž klesající hodnoty excitačního polaritního indexu odpovídají klesající polaritě v okolí sondy. Vzhledem k pozvolnému průběhu křivky lze konstatovat, že tvorba micel v tomto systému byla pomalejší. U závislosti Ex:Mo na logaritmu koncentrace pozorujeme zpočátku konstantní hodnoty a poté následuje prudký vzrůst, což značí nárůst tvorby micel. Koncentrace odpovídající maximu této křivky koresponduje s koncentrací inflexního bodu závislosti ExPI na logaritmu koncentrace, tedy hodnotě kritické micelární koncentrace.

Do grafické závislosti byl vynesena (Obr. 23) emisní polaritní index na logaritmu koncentrace tenzidu SDBS ve dvou různých prostředích. Obě dvě křivky vykazují sigmoidní charakter Boltzmannova typu, přičemž pozorujeme odlišný průběh v prostředí 0,15 M NaCl. Nepatrně se odlišuje i sklon křivek, což odpovídá rozdílným hodnotám Δx (Tabulka 3). Z grafu je patrné, že tvorba micel v prostředí soli je indukována v nižších koncentracích tenzidu. Stejný trend snížení CMC v soli pozorujeme i u dvou zbývajících tenzidů (Tabulka 3). Těmito experimenty bylo ověřeno, že fyziologický roztok (0,15 M NaCl) snižuje hodnoty CMC, nejmarkantněji u kationtového tenzidu CTAB.



Obr. 24 – Porovnání závislostí ExPI na logaritmu koncentrace pro SDBS (modře), Triton X-100 (zeleně), CTAB (červeně) v Mili-Q vodě

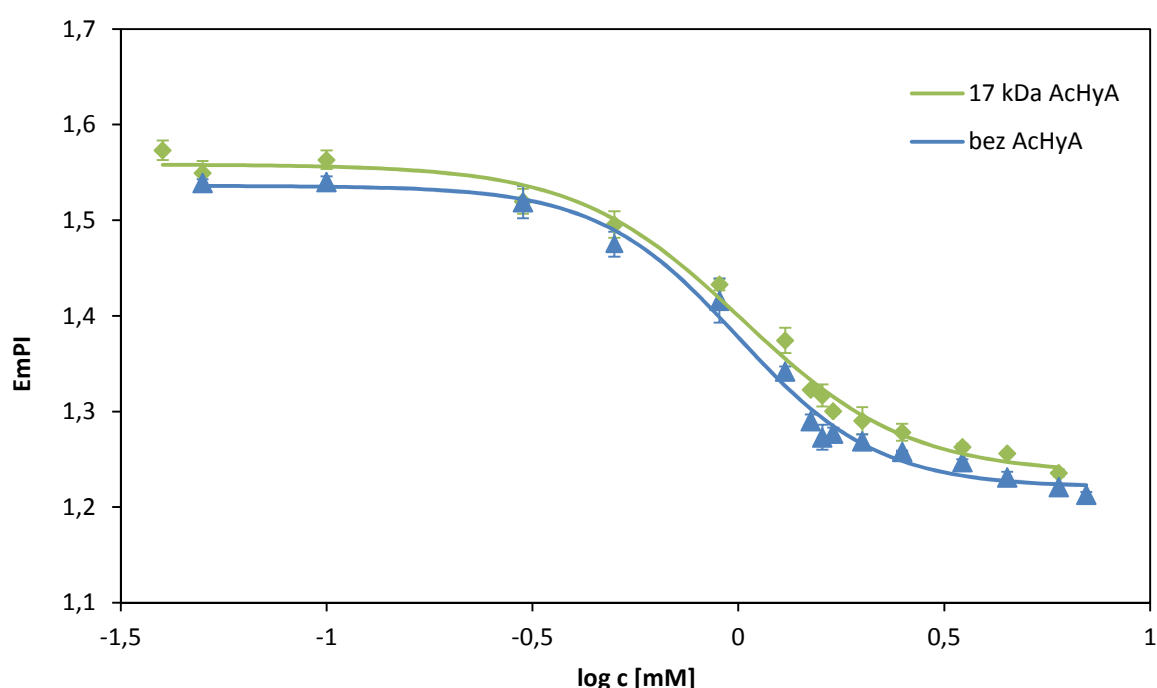
Obr. 24 poukazuje na rozdílné trendy závislostí excitačního polaritního indexu na logaritmu koncentrace. Liší se také sklon křivek (Δx), který nám udává informace o rychlosti vzniku micel. Stojí za povšimnutí velmi strmý charakter křivky u kationtového CTAB a u neionogenního Tritonu X-100, což koresponduje s menší hodnotou Δx v prostředí vody (Tabulka 3). Pozvolnější průběh křivky a větší hodnotu Δx sledujeme u aniontového

tenzidu SDBS. Z grafu lze vyčíst, že u všech tří tenzidů má hodnota ExPI na počátku přibližně stejnou hodnotu, která odpovídá polárnímu prostředí v okolí sondy.

Tabulka 3 – Hodnoty CMC a Δx tenzidů v prostředí vody a 0,15 M NaCl

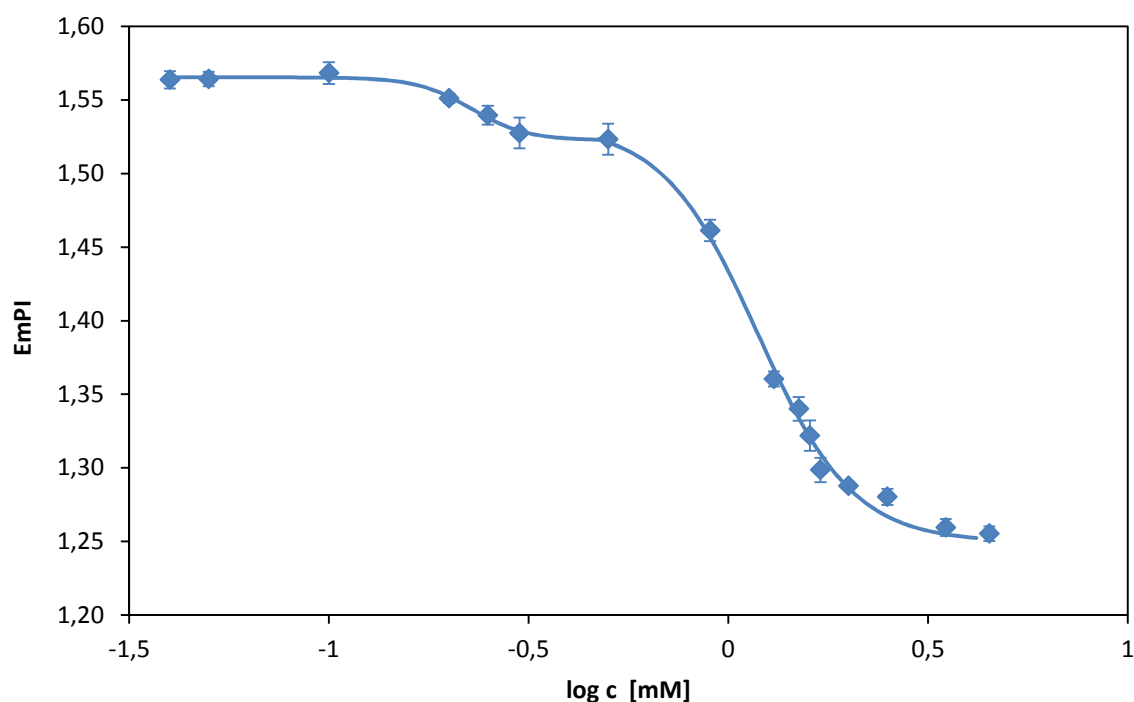
Tenzid	Mili-Q voda		0,15 M NaCl	
	CMC [mM]	Δx	CMC [mM]	Δx
SDBS	$0,997 \pm 0,041$	1,688	$0,229 \pm 0,007$	1,547
CTAB	$0,889 \pm 0,001$	1,051	$0,056 \pm 0,001$	1,145
Triton X-100	$0,240 \pm 0,004$	1,089	$0,234 \pm 0,016$	1,092

5.1.3 SDBS s přidavkem hydrofobizovaného hyaluronanu



Obr. 25 – Porovnání závislostí EmPI na logaritmu koncentrace tenzidu SDBS v Mili-Q vodě bez AcHyA (zeleně) a s přidavkem 17 kDa AcHyA (modře) o koncentraci 0,1 g/l

Obr. 25 znázorňuje závislost emisního polaritního indexu na logaritmu koncentrace tenzidu SDBS v prostředí Mili-Q vody. Z grafického znázornění je patrné, že nízkomolekulární hydrofobizovaný hyaluronan (17 kDa AcHyA) o koncentraci 0,1 g/l nemá významný vliv na agregační chování SDBS. Průběh závislostí a hodnoty CMC jsou v obou případech prakticky totožné, což značí stejnou kvalitu vznikajících agregátů. Velice mírný efekt přidavku 17 kDa AcHyA k SDBS lze vysvětlit díky zápornému náboji obou složek systému.



Obr. 26 – Závislost $EmPI$ na logaritmu koncentrace SDBS s přidavkem 206 kDa AcHyA o koncentraci 0,1 g/l v Mili-Q vodě

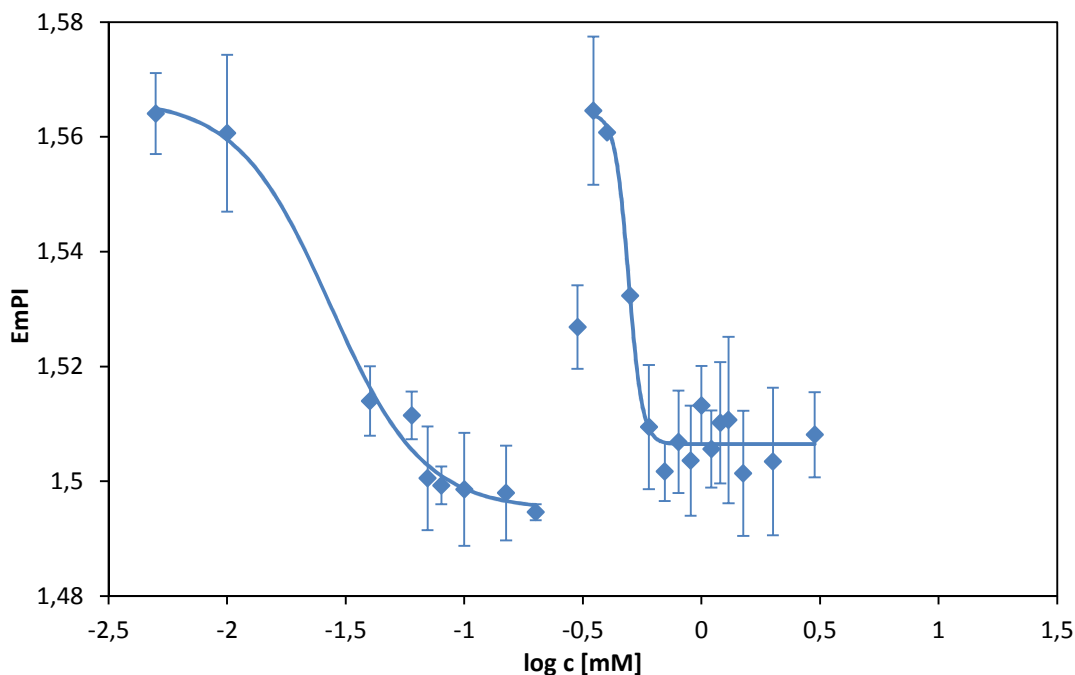
Vliv na hodnotu CMC aniontového tenzidu SDBS a na průběh závislosti ovšem pozorujeme s přidavkem hydrofobizovaného hyaluronanu s vyšší molekulovou hmotností (206 kDa AcHyA) o koncentraci 0,1 g/l. Grafická závislost emisního polaritního indexu na logaritmu koncentrace (Obr. 26) v tomto případě vykazuje dvouzlomový charakter. Tento zajímavý fenomén je nejspíše způsoben hydrofobními interakcemi mezi AcHyA a anionaktivním SDBS. Lze tvrdit, že první zlom odpovídá agregaci mezi AcHyA a SDBS, přičemž je tato interakce založena na hydrofobních vazbách. Koncentrace, při které dochází k agregaci mezi AcHyA a anionaktivním SDBS označujeme jako kritickou agregační koncentraci (CAC). Druhý zlom nejspíše odpovídá tvorbě volných micel v roztoku, takže inflexní bod druhého zlomu lze označit jako CMC. Stojí za povšimnutí, že inflexní bod druhého zlomu se blíží hodnotě CMC bez přidavku hydrofobně modifikovaného hyaluronanu.

Z těchto experimentů bylo shledáno, že molekulová hmotnost hydrofobizovaného hyaluronanu má rozdílný vliv na agregační chování SDBS a kvalitu vznikajících agregátů v systému.

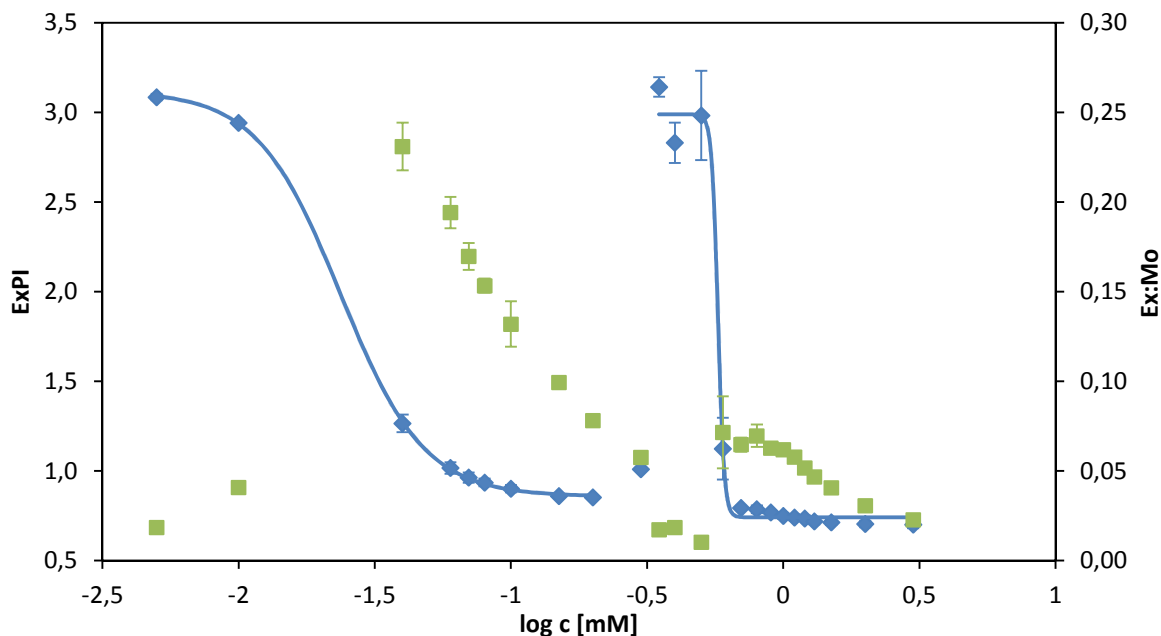
Tabulka 4 – Hodnoty CMC aniontového SDBS s přidavkem AcHyA o koncentraci 0,1 g/l v prostředí vody

Systém	CAC (1. zlom) [mM]	CMC (2. zlom) [mM]
SDBS bez AcHyA	-	$0,997 \pm 0,041$
SDBS + 17 kDa AcHyA	-	$1,020 \pm 0,037$
SDBS + 206 kDa AcHyA	$0,277 \pm 0,019$	$1,185 \pm 0,028$

5.1.4 CTAB s přidavkem hydrofobizovaného hyaluronanu



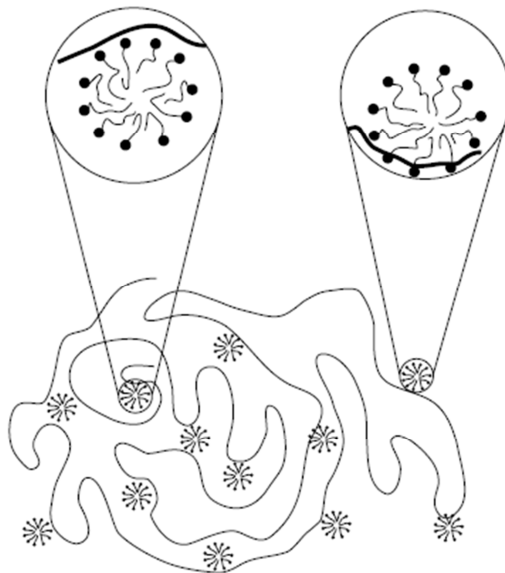
Obr. 27 – Závislost $EmPI$ na logaritmu koncentrace CTAB s přidavkem 17 kDa AcHyA o koncentraci 0,1 g/l



Obrázek 28 – Závislost $ExPI$ a $Ex:Mo$ na logaritmu koncentrace CTAB s přidavkem 17 kDa AcHyA o koncentraci 0,1 g/l

Zajímavé výsledky přináší experimenty CTAB s přidavkem hydrofobně modifikovaného hyaluronanu. Díky kladně nabitému povrchu CTAB lze ve vodném roztoku předpokládat silnou interakci se záporně nabitým řetězcem hyaluronanu. Strukturu systému polymer-tenzid

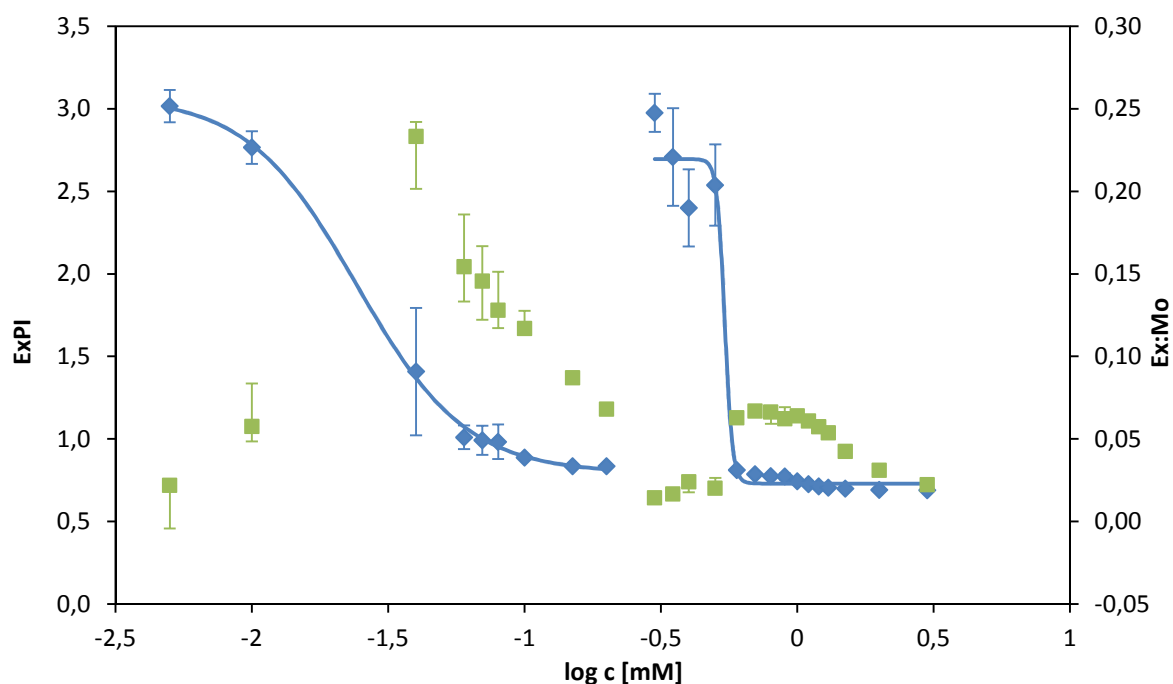
si můžeme modelově představit jako tzv. perlový náhrdelník, který byl popsán v díle **Holmberga K. a spol.** [31]. Tento široce rozšířený model je založen na elektrostatických interakcích systému polymer-tenzid, přičemž agregáty tenzidu jsou formovány podél řetězce polymeru.



Obr. 29 – Model „Pearl-necklace“ při asociaci polymer-tenzid [31]

Podobným způsobem si můžeme představit interakci mezi CTAB a hydrofobizovaným hyaluronanem. Díky hydrofobním místům na řetězci hyaluronanu se ovšem předpokládá silnější interakce v systému a tvorba kompaktnějších domén. Na Obr. 27 je vyobrazena závislost emisního polaritního indexu na logaritmu koncentrace tenzidu s přídavkem 17 kDa AcHyA, která vykazuje dvouzlomový charakter. Během prvního zlomu se s největší pravděpodobností tvoří agregáty molekul hydrofobizovaného hyaluronanu s CTAB. S dalším přídavkem tenzidu pozorujeme na křivce druhý zlom, který nejspíše odpovídá tvorbě micel ve volném roztoku.

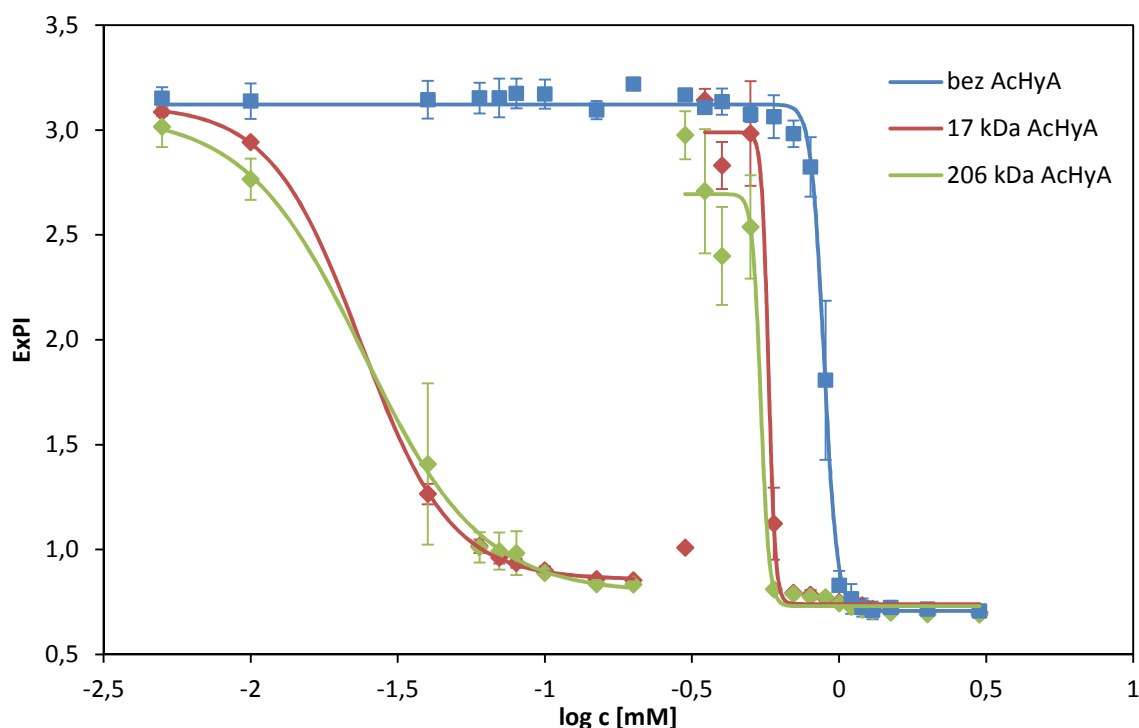
Analogický průběh závislosti excitačního polaritního indexu na logaritmu koncentrace můžeme sledovat na Obr. 28. Zde stojí za povšimnutí dvoufázová tvorba excimeru. Z grafu je patrné, že inflexní bod S-křivky prvního zlomu odpovídá maximální hodnotě $Ex:Mo$. V případě tvorby prvního excimeru je pozoruhodná šířka tohoto maxima čili koncentrační rozsah tvorby excimeru. Ten je v porovnání s druhým excimerem mnohem větší. S tím souvisí i sklon S-křivek (Δx). Mírnější sklon S-křivky prvního zlomu (větší hodnota Δx) naznačuje pozvolnější tvorbu agregátů AcHyA-CTAB. U druhého zlomu má S-křivka velice strmý charakter, což koresponduje s nižší hodnotou Δx a značí mnohem rychlejší tvorbu volných micel v roztoku.



Obr. 30 – Závislost ExPI a Ex:Mo na logaritmu koncentrace CTAB s přidavkem 206 kDa AcHyA

Efekt přidavku hydrofobizovaného hyaluronanu s molekulovou hmotností 206 kDa můžeme pozorovat na Obr. 30. Vyšší molekulová hmotnost AcHyA nevykazuje oproti 17 kDa AcHyA žádné významné změny. Závislost excitačního polaritního indexu na logaritmu koncentrace má také dvouzlomový charakter s analogickým vysvětlením trendů křivek. I v případě 206 kDa AcHyA má S-křivka prvního zlomu pozvolnější průběh, oproti tomu u druhého zlomu pozorujeme velice strmý trend S-křivky.

Během přípravy vzorků bylo po přidavku obou molekulových hmotností hydrofobně modifikovaného hyaluronanu zaznamenáno vytvoření gelových lemů, popř. malých sraženin v roztoku. V první části koncentrační řady (1. zlom) byla zaregistrována tvorba úzkého gelového lemu na vialce, přičemž se lem se zvyšující koncentrací tenzidu mírně rozšiřoval. Za hodnotou inflexního bodu prvního zlomu se v roztoku objevily malé sraženiny, které při dalším přidavku tenzidu přešly na zákal. V druhé části koncentrační řady byl pozorován mírný zákal a při dalším přidavku tenzidu byl roztok již čirý. Sraženiny v roztoku jsou zapříčiněny silnými elektrostatickými interakcemi, které přitáhly k řetězci hyaluronanu tenzid CTAB. Lze konstatovat, že dochází ke shlukování řetězce (tvorba tzv. klastrů), které okem pozorujeme jako malé sraženiny, přičemž kationtový tenzid CTAB se nejspíše naváže na karboxylové skupiny na řetězci hyaluronanu. Karboxylové skupiny u hyaluronanu jsou odpovědné za rozpustnost, a pokud dochází k obsazení karboxylových skupin tenzidem, systém se stává méně rozpustný. Vytvoření zákalu pravděpodobně odráží skutečnost, že dochází k formování velkých útvarů, které ve velké míře rozptylují světlo. Pokud do systému budeme nadále přidávat tenzid, stane se pro samotný tenzid výhodnější tvořit volné micely v roztoku a od řetězce hyaluronanu se odtrhnout. Vytvoření volných micel v roztoku koresponduje v námi pozorovaném systému čirému roztoku. Průběh těchto změn byl nafocen a je k dispozici v Příloze 3.



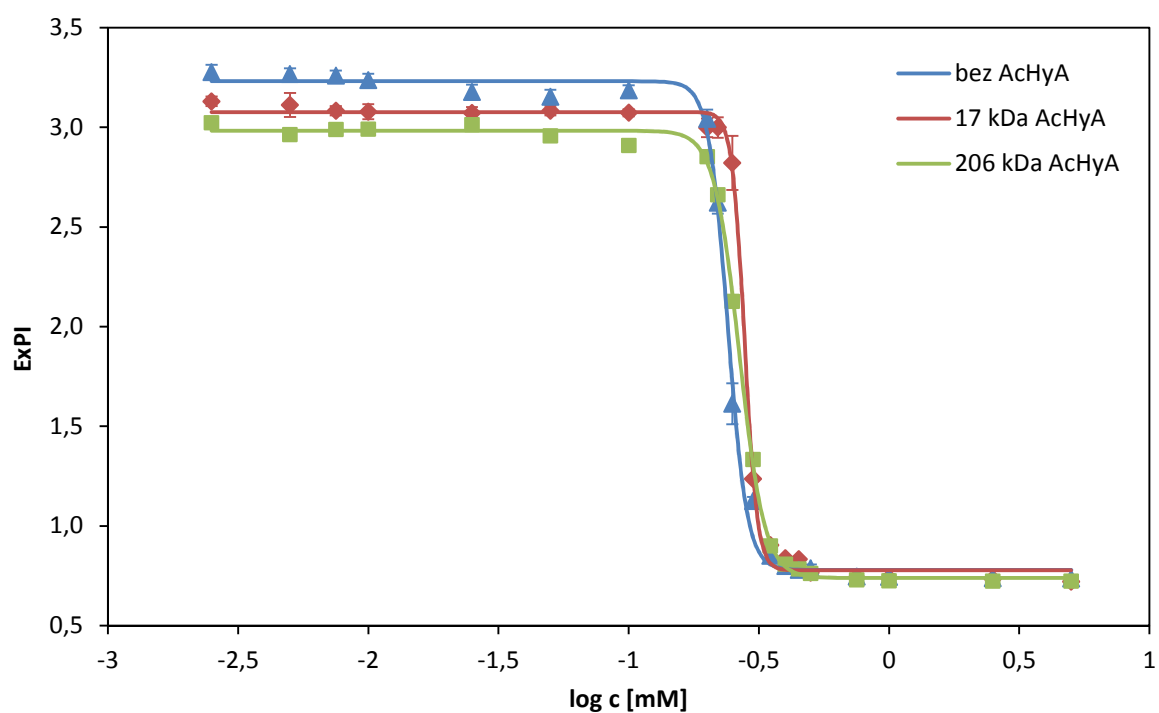
Obr. 31 – Porovnání závislostí ExPI na logaritmu koncentrace CTAB bez AcHyA (modře), s přidavkem 17 kDa AcHyA (červeně), s přidavkem 206 kDa AcHyA (zeleně)

Obr. 31 poukazuje na porovnání závislostí excitačního polaritního indexu na logaritmu koncentrace tenzidu bez AcHyA, s přidavkem 17 kDa AcHyA a s přidavkem 206 kDa AcHyA. Jak je patrné z grafu, přidavek hydrofobizovaného hyaluronanu v systému způsobuje značné změny v agregačním chování a indukuje odlišný typ interakce. Inflexní bod první křivky lze označit jako kritickou agregační koncentraci (CAC), jelikož v systému nejspíše dochází k interakci AcHyA s tenzidem CTAB. Při vyšších koncentracích tenzidu je zřejmě množství surfaktantu tak velké, že dochází k tvorbě volných micel, což odpovídá druhému zlomu. Stojí za povšimnutí, že hodnota infexního bodu S-křivky u druhého zlomu se blíží hodnotě kritické micelární koncentrace bez přidavku hydrofobizovaného hyaluronanu. Dále lze konstatovat, že molekulová hmotnost AcHyA má pouze minimální vliv na agregační chování systému. Je zřejmé, že minimální rozdíl agregačního chování v těchto systémech je zapříčiněn použitím molekulových hmotností, které se příliš nelišily. Dá se předpokládat, že navázáním hydrofobního řetězce na hyaluronan došlo k zakomponování alkylu do struktury tvořícího se agregátu, což způsobilo pokles CMC a tvorbu kompaktnějších agregátů. V neposlední řadě bylo shledáno, že v systému CTAB-AcHyA dochází k silné elektrostatické interakci.

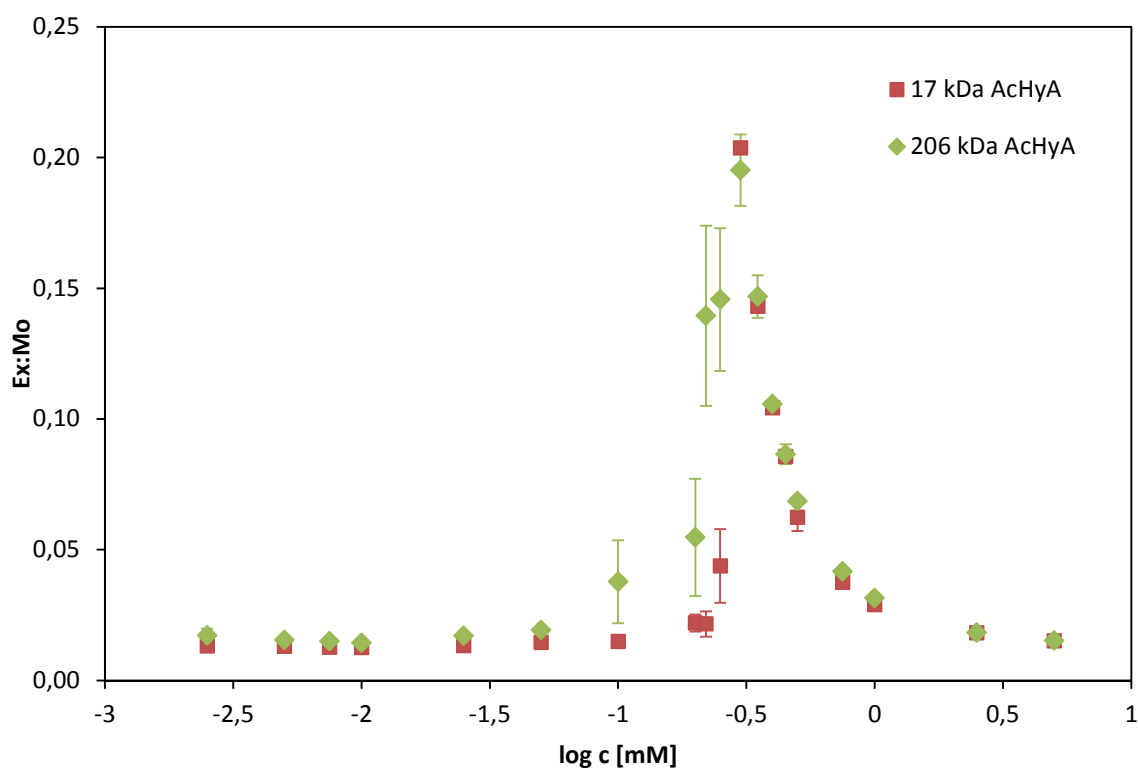
Tabulka 5 – Hodnoty CAC, CMC, Δx kationaktivního CTAB s přidavkem AcHyA v prostředí vody

Systém	CAC (1. zlom) [mM]	Δx	CMC (2. zlom) [mM]	Δx
CTAB bez AcHyA	-		$0,889 \pm 0,001$	1,051
CTAB + 17 kDa Ac HyA	$0,024 \pm 0,001$	1,424	$0,575 \pm 0,010$	1,027
CTAB + 206 kDa AcHyA	$0,024 \pm 0,001$	1,588	$0,542 \pm 0,014$	1,033

5.1.5 Triton X-100 s přidavkem hydrofobizovaného hyaluronanu



Obr. 32 – Porovnání závislosti $ExPI$ na logaritmu koncentrace Tritonu X-100 bez AcHyA (modře), s přidavkem 17 kDa AcHyA (červeně) a s přidavkem 206 kDa AcHyA (zeleně)



Obr. 33 – Porovnání závislosti $Ex:Mo$ na logaritmu koncentrace Tritonu X-100 s přidavkem 17 kDa AcHyA (červeně) a s přidavkem 206 kDa AcHyA (zeleně)

Obr. 32 vyobrazuje závislosti excitačních polaritních indexů na logaritmu koncentrace pro neionogenní Triton X-100 ve vodě, s přídavkem 17 kDa AcHyA a s přídavkem 206 kDa AcHyA o koncentraci 0,1 g/l. Jak je patrné z grafického znázornění, hydrofobně modifikovaný hyaluronan nemá významný vliv na agregační chování neionogenního tenzidu. Uvedené závislosti mají stále stejný tvar i sklon. V Tabulce 6 jsou uvedeny hodnoty CMC, které se s přídavkem AcHyA mírně zvyšují. Posun k vyšším hodnotám CMC je minimální a nejspíše neznačí významnou interakci v systému. Vzhledem k tomu, že u všech tří závislostí klesají excitační polaritní indexy k totožným hodnotám, lze předpokládat stejnou kvalitu vznikajících agregátů. Při důkladném studování si u nejnižších koncentrací tenzidu můžeme všimnout nepatrně rozdílných hodnot excitačního polaritního indexu. Nejvyšší hodnota ExPI odpovídá čistému tenzidu bez přídavku hydrofobně modifikovaného hyaluronanu. Nepatrně nižší hodnota ExPI byla naměřena s přídavkem 17 kDa AcHyA a nejnižší hodnota ExPI odpovídá systému s přídavkem 206 kDa AcHyA. Tento fakt potvrzuje, že přítomnost hydrofobních skupin roubovaných na polymer snižují polaritu systému. V případě tohoto konkrétního systému, není změna polarity až tak citelná, což je nejspíše zapříčiněno nižším stupněm substituce (10 – 20 %) a malým rozdílem použitých molekulových hmotností hydrofobně modifikovaného hyaluronanu.

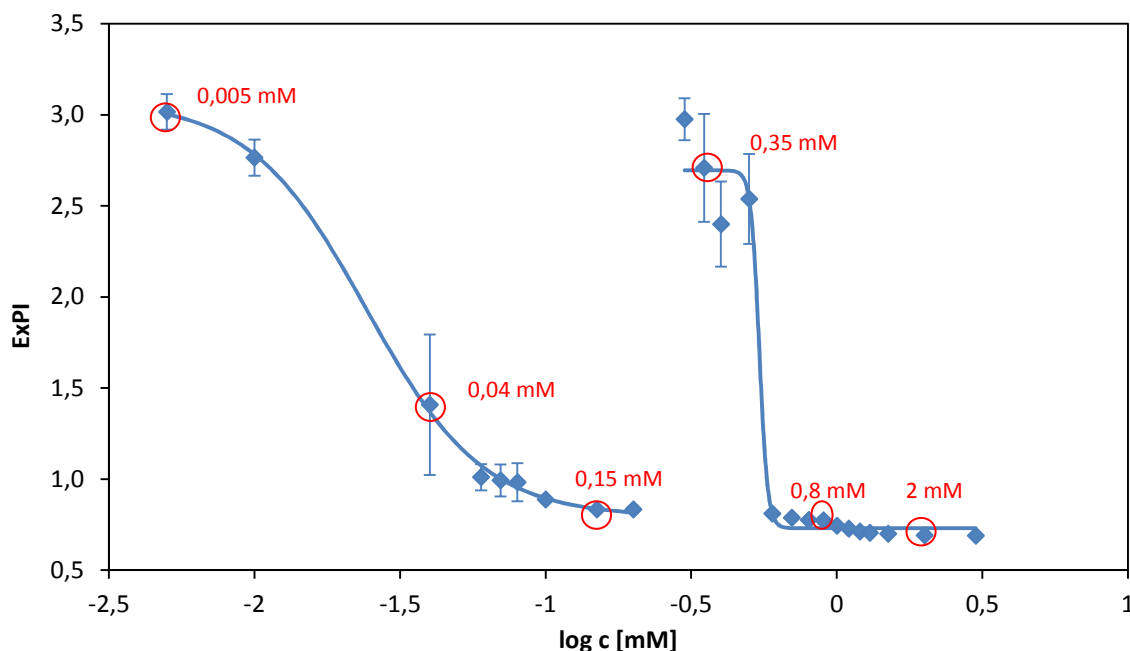
Obr. 33 znázorňuje závislosti poměrů Ex:Mo na logaritmu koncentrace tenzidu. V tomto grafu si můžeme všimnout, že v přítomnosti 206 kDa AcHyA dochází k tvorbě excimeru při nepatrně nižší koncentraci tenzidu. I přes tento minimální efekt lze konstatovat, že v tomto systému nedochází k žádné význačnější interakci mezi hydrofobně modifikovaným hyaluronanem a neionogenním tenzidem.

Tabulka 6 – Hodnoty CMC neionogenního Tritonu X-100 s přídavkem AcHyA o koncentraci 0,1 g/l v prostředí vody

Systém	CMC [mM]
Triton X-100 bez AcHyA	0,240 ± 0,004
Triton X-100 + 17 kDa AchyA	0,279 ± 0,003
Triton X-100 + 206 kDa AcHyA	0,266 ± 0,006

5.2 Dynamický rozptyl světla

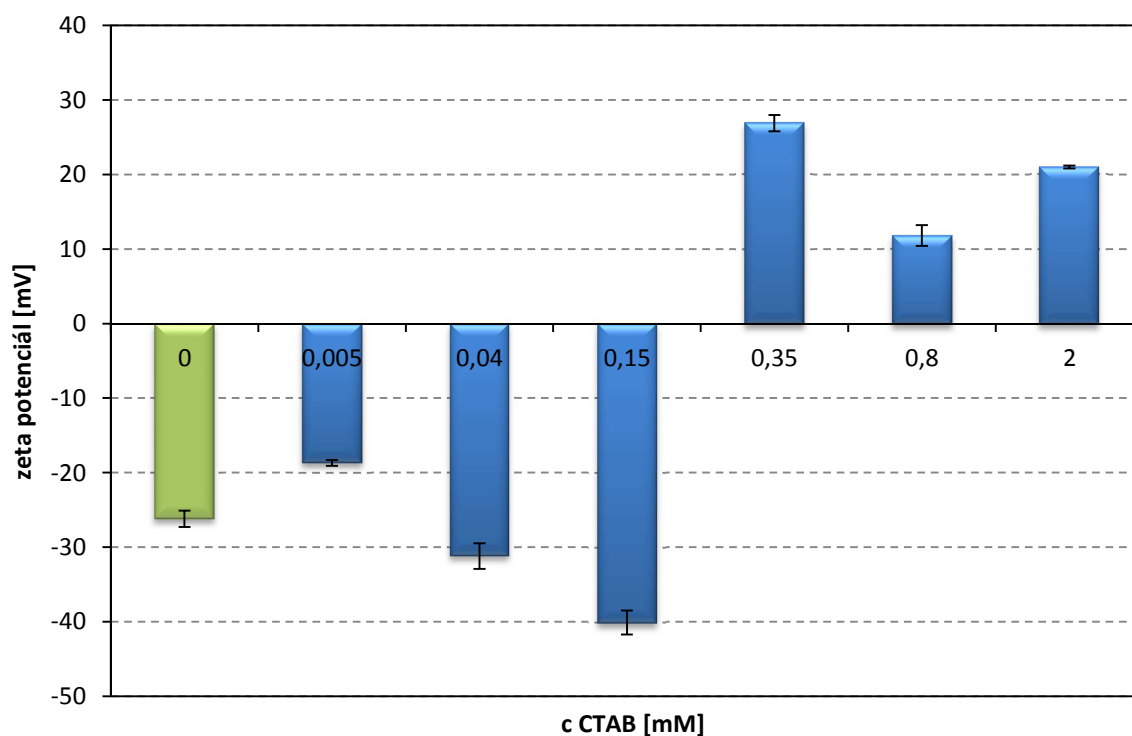
Na základě fluorescenčních měření bylo zjištěno, že přidavek hydrofobizovaného hyaluronanu se nejvíce projevil u kationtového tenzidu CTAB. Pro měření zeta potenciálu a velikosti částic bylo vybráno šest koncentrací, které jsou vyznačeny na Obr. 34. Pro studium velikosti částic a zeta potenciálu byl použit systém s vyšší molekulovou hmotností hydrofobně modifikovaného hyaluronanu o koncentraci 0,1 g/l (CTAB + 206 kDa AcHyA).



Obr. 34 – Výběr koncentrací použitých pro měření zeta potenciálu a velikosti částic v systému CTAB + 206 kDa AcHyA

5.2.1 Zeta potenciál (režim ZETA)

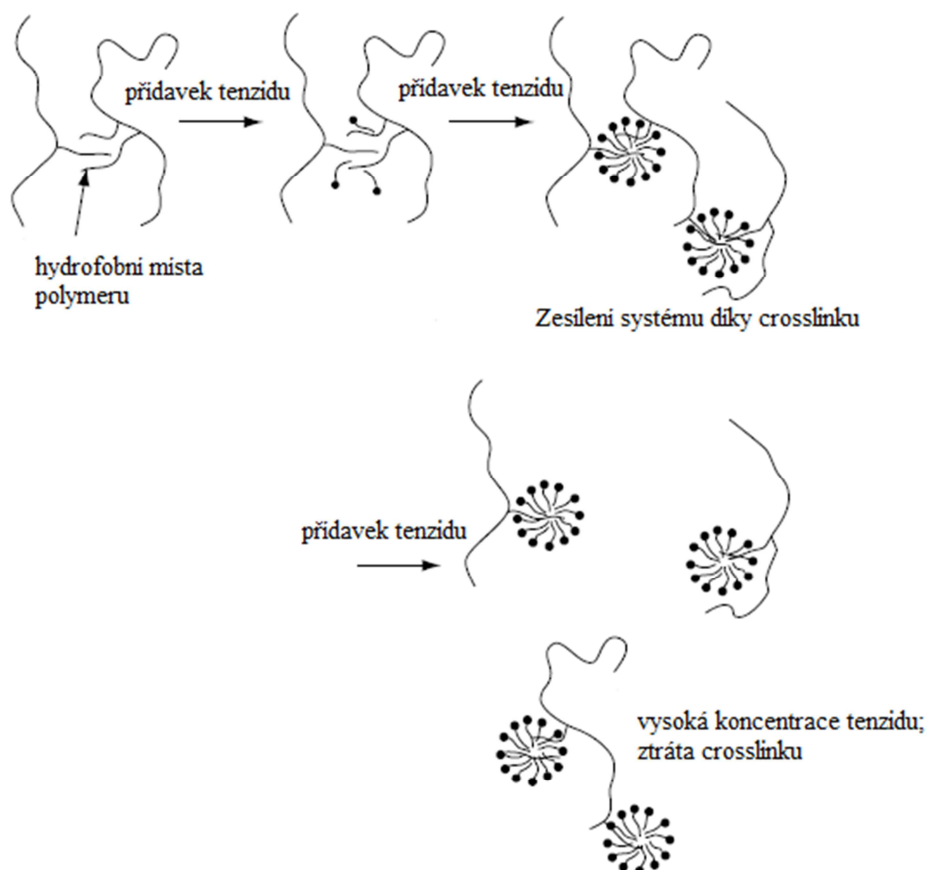
Stabilita systému CTAB-AcHyA byla studována pomocí měření velikosti zeta potenciálu. Jak je patrné z Obr. 35, stabilita systému je velmi proměnlivá a závislá na koncentraci tenzidu. V první řadě stojí za povšimnutí, zdali se zeta potenciál pohybuje v kladných či záporných hodnotách. Kladná resp. záporná hodnota zeta potenciálu nám říká, jaký je celkový náboj systému. Jestliže jsou hodnoty zeta potenciálu kladné, povrchový náboj částice je taktéž kladný a naopak. U nižších koncentrací tenzidu jsou hodnoty zeta potenciálu záporné, což značí, že vytvořené agregáty CTAB-AcHyA jsou z větší části tvořeny hydrofobně modifikovaným hyaluronanem, který nese záporný náboj. Nejspíše se jedná o premicelární agregáty, kde jsou molekuly tenzidu navázány díky elektrostatickým silám na řetězec hydrofobně modifikovaného hyaluronanu (model tzv. perlového náhrdelníku znázorněného na Obr. 29). S rostoucí koncentrací kladně nabitého CTAB se hodnota zeta potenciálu přesunula do kladných hodnot. Lze tedy předpokládat, že takto vysoká koncentrace tenzidu s kladným nábojem zastínila záporný náboj hydrofobně modifikovaného hyaluronanu a dochází k tvorbě volných micel v roztoku. Můžeme konstatovat, že při kladných hodnotách zeta potenciálu není koncentrace hydrofobizovaného hyaluronanu dostatečná na to, aby řetězec AcHyA zcela obklopil micely tenzidu.



Obr. 35 – Zeta potenciál vybraných koncentrací v systému CTAB-206 kDa AcHyA v prostředí Mili-Q vody

Jako hraniční hodnoty stability se obecně považují velikosti zeta potenciálu větší než +30 mV nebo menší než -30 mV. Z grafu (Obr. 35) lze vyčíst, že při nejnižších koncentracích CTAB (koncentrace CTAB 0,005 mM) systém není příliš stabilní, ale při dalším přidavku tenzidu stabilita systému roste. Nárůst zeta potenciálu naznačuje vznikající interakci mezi AcHyA a tenzidem CTAB a tvorbu stabilnějších agregátů. Na zvýšení zeta potenciálu může mít vliv i velikost částic. Zeta potenciál je při měření vypočten z hodnoty elektroforetické mobility, kterou ovlivňuje i velikost částic. Z Henryho rovnice (8) je zřejmé, že elektroforetická pohyblivost je úměrná zeta potenciálu. Výsledky ukazují, že nejstabilnější je systém při koncentraci CTAB 0,15 mM. Při této koncentraci tenzidu jsou v roztoku přítomny agregáty menších velikostí (agregáty se shlukují k sobě), které vykazují vyšší elektroforetickou mobilitu a tedy vyšší zeta potenciál. Z předešlých fluorescenčních měření bylo shledáno, že při této koncentraci by v systému měly být vytvořené agregáty AcHyA-CTAB. Kvalita agregátů při této koncentraci je zapříčiněna velice silnou elektrostatickou interakcí. Záporné hodnoty zeta potenciálu naznačují, že jsou molekuly tenzidu obaleny řetězcem hydrofobně modifikovaného hyaluronanu, který nese záporný náboj. Další přidavek tenzidu (koncentrace CTAB 0,35 mM a 0,8 mM) vyvolal pokles zeta potenciálu pod hranici stability, což značí, že vytvoření volných micel v systému nepodporuje celkovou stabilitu. V souvislosti s elektroforetickou mobilitou částic lze snížení zeta potenciálu vysvětlit vytvořením gelovitých sraženin, které jsou větších průměrů. Je ovšem nutno podotknout, že při koncentracích tenzidu 0,35 mM a 0,8 mM jsou nejspíše v roztoku přítomny dva typy agregátů (volné micely CTAB a agregáty AcHyA+CTAB). Při koncentraci CTAB 2 mM pozorujeme mírné zvýšení zeta potenciálu, což může značit tvorbu pouze volných micel o výrazně menších velikostech. Tuto domněnku o snížení velikosti částic potvrzují i výsledky prezentované v další kapitole.

Jedno z dalších možných objasnění je, že zvyšující koncentrace tenzidu indukuje do jisté míry zesíťování systému (Obr. 36). Stav, kdy je systém už silně zesíťovaný a došlo již k agregaci tenzidu a hydrofobně modifikovaného hyaluronanu, by v našem případě odpovídala koncentrace CTAB 0,15 mM. Po přidavku dostatečně velké koncentrace tenzidu do systému může dojít ke ztrátě zesíťované struktury, podobně jak bylo zjištěno ve studii **Holmberga K.** [31]. Tento fakt by vysvětloval snížení zeta potenciálu při vyšších koncentracích CTAB.



Obr. 36 – Asociace hydrofobně modifikovaného polymeru s přidavkem tenzidu [31]

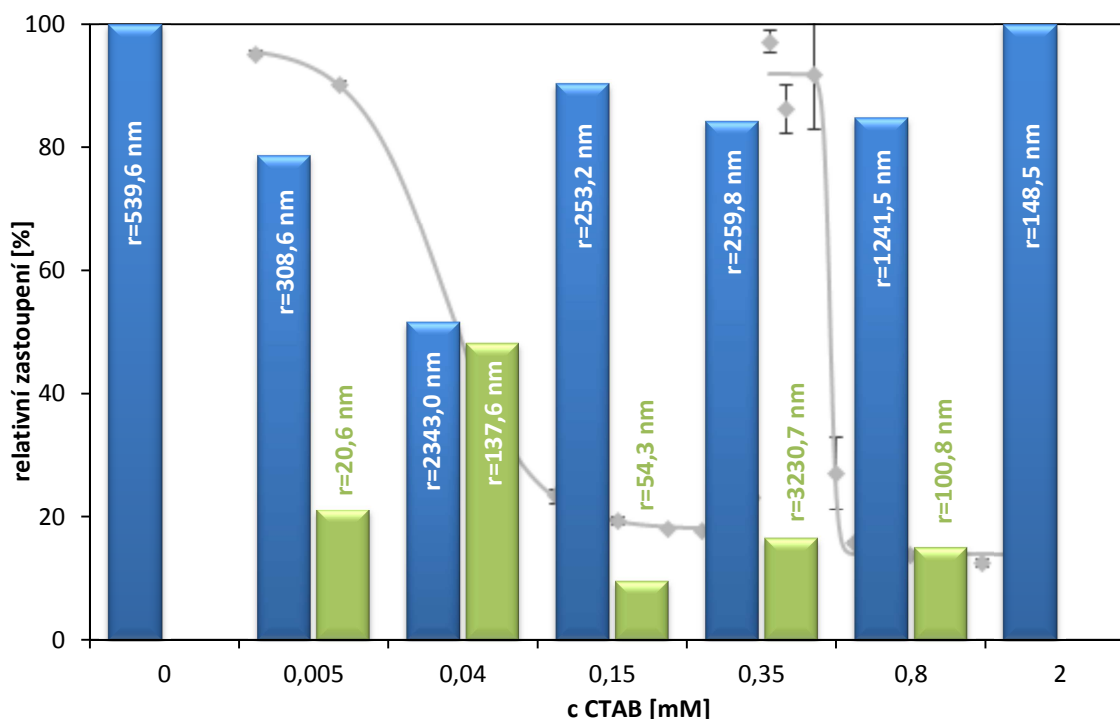
Tabulka 7 shrnuje naměřené výsledky zeta potenciálů v systému CTAB s přidavkem 206 kDA hydrofobně modifikovaného hyaluronanu. Lze konstatovat, že nejstabilnější je systém při koncentraci CTAB 0,15 mM. Referenční vzorek, jímž byl samotný hydrofobně modifikovaný hyaluronan o koncentraci 0,1 g/l, se pohybuje na hranici stability.

Tabulka 7 – Zeta potenciál v systému CTAB + 206 kDa AcHyA v prostředí vody

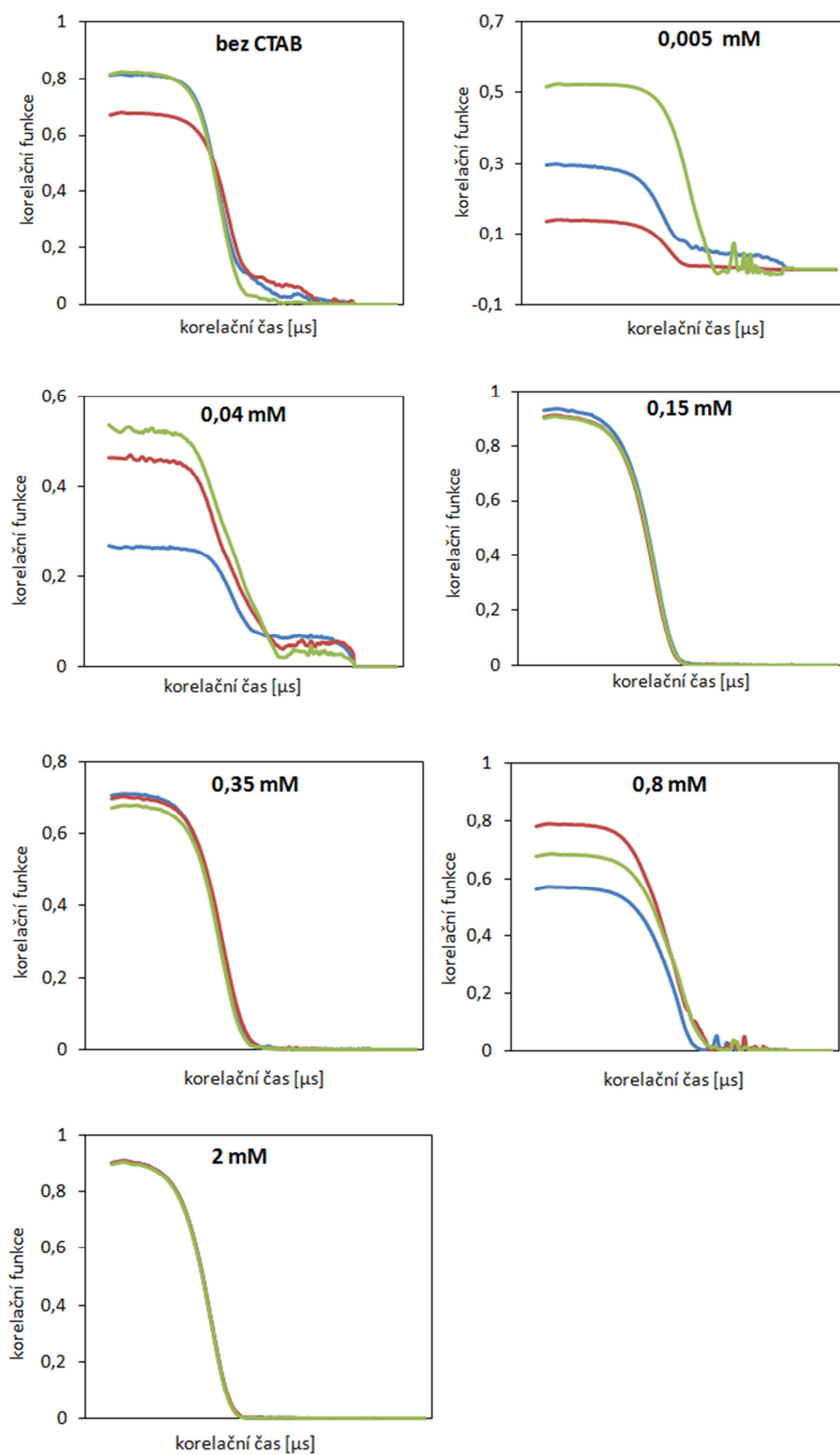
c CTAB [mM] + 206 kDa AcHyA	ζ potenciál [mV]
0	- 26,2 ± 1,1
0,005	- 18,7 ± 0,4
0,04	- 31,1 ± 1,7
0,15	- 40,1 ± 1,6
0,35	26,9 ± 1,1
0,8	11,8 ± 1,4
2	21,0 ± 0,2

5.2.2 Velikost částic (režim SIZE)

V poslední části diplomové práce byla studována velikost částic v systému CTAB + 206 kDa AcHyA v prostředí vody pomocí metody dynamického rozptylu světla. V úvodu je ovšem nutno říct, že studovaný systém vykazoval velkou polydisperzitu. Dále je nezbytné podotknout, že zkoumaný systém je velmi dynamický, v průběhu koncentrační řady dochází k interakcím, konformačním změnám polymeru, atd. Metoda dynamického rozptylu světla ovšem takto konkrétní informace není schopna zachytit, proto lze konstatovat, že experimenty získané pomocí metody DLS jsou pouze pilotními výsledky, které potřebují další měření zaměřené na specifické změny ve zkoumané soustavě (např. mikrореologická měření).



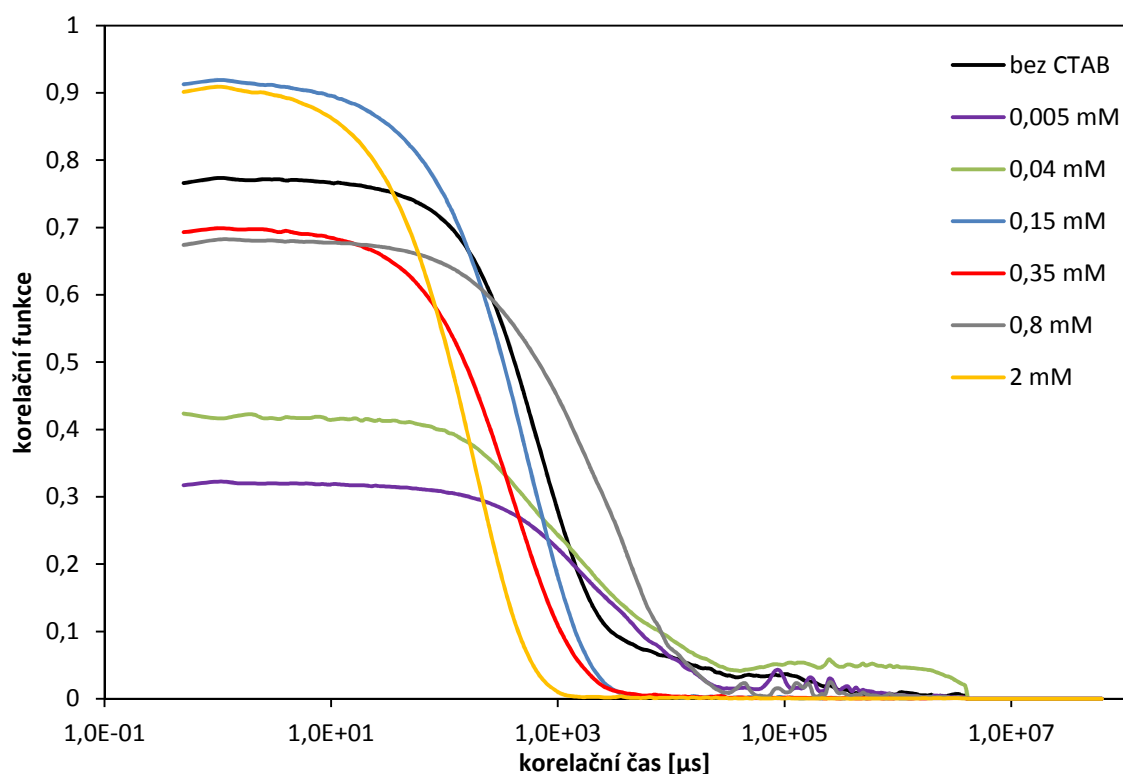
Obr. 37 – Relativní zastoupení velikosti částic v systému CTAB + 206 kDa AcHyA (v pozadí agregační chování získané ze spektrofotometru)



Obr. 38 – Korelogramy jednotlivých koncentrací CTAB ve 3 paralelních řadách;

Sloupcový graf na Obr. 37 zobrazuje relativní zastoupení velikosti částic (v %) v systému CTAB + 206 kDa AcHyA. Z grafu je zřejmé, že studovaný systém je ve většině koncentrací polydisperzní, s monodisperzitou se setkáváme pouze u referenčního vzorku (bez přídavku CTAB) a u vzorku s nejvyšší koncentrací tenzidu (2 mM CTAB). V pozadí grafu je pro porovnání znázorněna křivka, která byla získána předešlými fluorescenčními měřeními. Na Obr. 38 jsou znázorněny korelogramy pro jednotlivé koncentrace tenzidu, které jsou kvalitativním ukazatelem distribucí.

Referenční vzorek, jímž byl samotný hydrofobně modifikovaný hyaluronan o koncentraci 0,1 g/l, vykazuje monodisperzitu se 100 % zastoupením hodnot o průměru 539,6 nm. Vzhledem k tvaru korelogramu a počáteční hodnotě korelační funkce lze naměřené velikosti referenčního vzorku považovat za věrohodné. S přídavkem tenzidu bylo zaznamenáno snížení velikosti částic, což značí počínající interakci s tenzidem a shlukování řetězce. Z Obr. 37 lze vyčíst, že při koncentraci CTAB 0,005 mM byly přítomny přibližně z 20 % i částice jiných velikostí. Ovšem podíváme-li se na korelogramy odpovídající nejnižší koncentraci tenzidu, není vhodné považovat naměřené velikosti za spolehlivé. Počáteční hodnoty korelační funkce u tohoto vzorku jsou velmi nízké, což vypovídá o ne příliš kvalitní distribuci a vhodnosti vzorku. Podobný trend korelogramů pozorujeme také u vyšší koncentrace tenzidu (0,04 mM). Z Obr. 37 vyplývá, že při této koncentraci CTAB byly přítomny agregáty dvou výrazně se lišících velikostí. V systému se vyskytují z 50% agregáty o velikosti nad 2000 nm a z 50% částice s markantně nižšími průměry. Vzhledem ke složitosti systému a k možným konformačním změnám řetězce hyaluronanu je ovšem možné, že systém vyhodnotil jako velké částice ty, které jsou ve skutečnosti mnohem menší. Mohlo by se jednat o postupné shlukování řetězce AcHyA s navázanými molekulami tenzidu, které mají ovšem malou mobilitu, ale ve skutečnosti jsou malé. Jak bylo řečeno v úvodu, tento systém je velmi dynamický a během krátkého časového úseku mohou nastat změny, které pomocí DLS není možné zachytit. S nevěrohodnými výsledky korespondují i korelogramy této koncentrace. Při vyšší koncentraci CTAB (0,15 mM) jsou z ≈ 90 % přítomny agregáty o průměru 253,2 nm. U tohoto vzorku nejspíše dochází k významnému přiblížení řetězců hyaluronanu s navázanými molekulami tenzidu (tzv. perlový náhrdelník) a k tvorbě tzv. klastrů (shluků), které jsou díky silné interakci menší, ale zato stabilnější. Předchozí měření zeta potenciálu koresponduje s touto domněnkou, jelikož byl systém shledán jako nejstabilnější právě při této koncentraci (0,15 mM CTAB). Spolehlivost měření při této koncentraci potvrzují i korelogramy, které tento vzorek vyhodnocují jako ideální. Koncentrace tenzidu 0,35 mM způsobila nárůst polydisperzity a fázovou separaci v systému. Jelikož při těchto koncentracích docházelo ke vzniku malých sraženin, byla provedena filtrace přes 5 μ m filtr. Z Obr. 37 můžeme vyčíst, že se při této koncentraci vyskytovaly z větší části velikosti o průměru 259,8 nm a z menší části velmi velké částice ($r = 3230,7$ nm). Vzhledem k fázové separaci lze usuzovat, že velké částice o průměrech nad 3000 nm odpovídají gelovým sraženinám. U vyšší koncentrace tenzidu (0,8 mM) se ve vzorku vyskytují opět agregáty dvou velikostí, což odráží skutečnost, že jsou v systému v menší míře agregáty AcHyA + tenzid a ve větší míře volné micely tenzidu. U této koncentrace si můžeme opět všimnout snížené počáteční hodnoty na ose y u korelogramů. U nejvyšší koncentrace (2 mM) jsou částice monodisperzní o průměru 148,5 nm, které patrně odpovídají pouze volným micelám CTAB. Vzhledem ke korelogramům, které odpovídají nejvyšší koncentraci tenzidu, lze považovat naměřené velikosti za spolehlivé.



Obr. 39 – Průměrné korelační funkce v systému CTAB + 206 kDa AcHyA v prostředí vody

Na Obr. 39 jsou znázorněny průměrné korelogramy pro jednotlivé koncentrace tenzidu, které uvádíme pouze pro porovnání. Z grafu je patrné, že korelogramy se výrazně odlišují, což značí rozdílné kvality distribucí u jednotlivých vzorků. V Tabulce 8 jsou uvedeny výsledky velikostí částic v systém CTAB s přidavkem 206 kDa AcHyA v prostředí vody

Tabulka 8 – Relativní zastoupení s průměry velikostí částic v systému CTAB + 206 kDa AcHyA v prostředí vody

c CTAB [mM]	Průměr částic 1 [nm]	Relativní zastoupení 1 [%]	Průměr částic 2 [nm]	Relativní zastoupení 2 [%]
0	539,6 ± 68,0	100	-	-
0,005	308,6 ± 43,8	78,8	20,6 ± 10,3	21,2
0,04	2343,0 ± 32,0	51,7	137,6 ± 10,6	48,3
0,15	253,2 ± 6,2	90,4	54,3 ± 25,6	9,6
0,35	259,8 ± 16,5	83,4	3230,7 ± 806,0	16,6
0,8	1241,5 ± 290,8	84,9	20,6 ± 10,3	15,1
2	148,5 ± 3,1	100	-	-

6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo provést literární rešerši, navrhnout, provést a vyhodnotit experimenty ve studiu interakcí modifikovaného biopolymeru s tenzidy. Rešerše byla zaměřena na koloidní systémy hydrofobně modifikovaného biopolymeru s využitím především fluorescenční spektroskopie. Bylo shledáno, že fluorescenční spektroskopie je vhodná metoda pro studium agregačního chování biopolymerem značených koloidních částic. Na základě literární rešerše lze konstatovat, že hydrofobně modifikované biopolymery by mohly být využity jako nosiče léčiv biologicky aktivních látek.

V experimentální části byly vlastnosti daných systémů studovány za použití hydrofobizovaného hyaluronanu o dvou molekulových hmotnostech (17 kDa a 206 kDa) se stupněm substituce 10 – 20 %. Pro zkoumání agregačního chování byl vybrán aniontový tenzid SDBS, kationtový tenzid CTAB a neionogenní tenzid Triton X-100. Na základě rešerše byl pro metodu fluorescenční spektroskopie jako vhodná fluorescenční sonda vybrán pyren.

Nejprve byly u všech tří tenzidů pomocí fluorescenční spektroskopie stanoveny hodnoty kritické micelární koncentrace v prostředí vody a 0,15 M NaCl. Shledali jsme, že fyziologický roztok (0,15 M NaCl) snižuje hodnoty CMC, nejvýrazněji u kationaktivního CTAB.

Pro ověření samoagregačního chování hydrofobně modifikovaného hyaluronanu byly provedeny experimenty s pyrenem, kde nám emisní polaritní index poskytuje informace o polaritě prostředí v okolí sondy. Výsledky naznačují, že nižší koncentrace AcHyA (1 g/l) nepodporuje samoagregační chování. Při použití koncentrovanější AcHyA (5 g/l) ovšem pozorujeme značné snížení EmPI, což koresponduje se samovolnou tvorbou hydrofobních domén. Použité molekulové hmotnosti AcHyA (17 kDa, 206 kDa) neměly na samoagregační chování významný vliv. Dá se předpokládat, že při vyšším stupni substituce hydrofobizovaného hyaluronanu by docházelo k samoagregaci i při nižších koncentracích. Tento výsledek je v souladu se studiemi zabývajícími se hydrofobizovanými deriváty hyaluronanu a prokazuje vhodnost modifikovaných biopolymerů pro nosiče léčiv biologicky aktivních látek [3][4][50].

Dále byl zkoumán vliv hydrofobně modifikovaného hyaluronanu na agregaci tenzidů. U aniontového SDBS jsme při použití 17 kDa AcHyA o koncentraci 0,1 g/l nezaznamenali žádné významné změny v agregačním chování. Výsledky demonstrují, že při vyšší molekulové hmotnosti AcHyA (206 kDa) dochází k ovlivnění agregace, což dokazuje dvouzlomová sigmoidní křivka. Snížení kritické micelární koncentrace v tomto systému je nejspíše způsobeno hydrofobními interakcemi mezi nepolárními řetězci navázanými na hyaluronan a anioaktivním tenzidem SDBS.

Jako zástupce neionogenního tenzidu byl zvolen Triton X-100. Příklad AcHyA o koncentraci 0,1 g/l do systému s neionogenním tenzidem měl minimální efekt na agregační chování a kvalitu vznikajících agregátů. Dále výsledky ukazují, že použité molekulové AcHyA (17 kDa, 206 kDa) neměly na agregaci a hodnotu CMC vliv.

Největší vliv přídatku hydrofobně modifikovaného hyaluronanu byl předpokládán u kationtového CTAB. Tento předpoklad je prezentovanými výsledky potvrzen. Příklad hydrofobizovaného hyaluronanu o koncentraci 0,1 g/l způsobil značné změny v agregaci a je zřejmé, že indukuje jiný typ agregátů. Byla stanovena hodnota CAC, odpovídající interakci hydrofobizovaného hyaluronanu s tenzidem a hodnota CMC, která koresponduje s tvorbou volných micel v roztoku. Lze předpokládat, že došlo k zakomponování alkylového řetězce do vznikajícího agregátu, což způsobilo tvorbu kompaktnějších domén. Dále je z výsledků

patrné, že molekulová hmotnost hydrofobně modifikovaného hyaluronanu nemá na agregační chování a kvalitu agregátů významný vliv.

Vzhledem k výsledkům na spektrofluorimetru byl pro bližší studium vybrán kationtový tenzid CTAB s přídatkem 206 kDa AcHyA v prostředí vody. Jedním z dalších důvodů pro výběr CTAB byl také fakt, že CTAB je doporučován pro použití v systémech zaměřených na nosiče biologicky aktivních látek. Stabilita vybraných koncentrací byla měřena pomocí zeta potenciálu. Výsledky nasvědčují, že je systém nejstabilnější při koncentraci tenzidu 0,15 mM. Lze tvrdit, že při této koncentraci tenzidu dochází k silnému zesíťování řetězců hydrofobizovaného hyaluronanu, na který je navázán kationaktivní CTAB. Další přírdek tenzidu způsobil pokles zeta potenciálu, což může znamenat zánik zesíťované struktury a tvorbu volných micel CTAB v roztoku.

V poslední části diplomové práce bylo metodou dynamického rozptylu světla stanoveno relativní zastoupení velikostí částic v systému CTAB-206 kDa AcHyA v prostředí vody. Je nutno podotknout, že zkoumaná soustava vykazuje značnou polydisperzitu a je velmi dynamická. Metoda DLS ovšem není schopna specifické změny zachytit, proto by bylo vhodné provést v budoucnu další navazující experimenty (např. mikrореologie). Z prezentovaných korelogramů můžeme konstatovat, že spolehlivé výsledky poskytují vzorky o koncentracích tenzidu 0,15 mM; 0,35 mM a 2 mM a dále referenční vzorek bez přídatku CTAB. Bylo shledáno, že monodisperzní chování systém vykazuje pouze ve vzorcích bez přídatku tenzidu a s nejvyšší koncentrací tenzidu (2 mM). Dále výsledky nasvědčují, že při koncentraci tenzidu 0,15 mM dochází k tvorbě malých, velice stabilních agregátů AcHyA-CTAB, kde jsou řetězce hydrofobizovaného hyaluronanu s navázanými molekulami tenzidu velice blízko u sebe. V souladu s touto domněnkou je předchozí měření zeta potenciálu, jelikož jsme systém shledali nejstabilnější právě při této koncentraci.

Závěrem můžeme konstatovat, že zadané cíle byly splněny. Diplomová práce poskytla širší přehled o vlivu hydrofobně modifikovaného hyaluronanu na agregaci tenzidů. Výsledky potvrzují, že hydrofobizované deriváty hyaluronanu samovolně indukují tvorbu hydrofobních domén a při určitých koncentracích vykazují samoagregační chování. Toto unikátní chování hydrofobizovaných derivátů biopolymerů by mohlo být široce využito u nosičových systémů biologicky aktivních látek.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] PITARRESI, Giovanna, Fabio Salvatore PALUMBO, Antonella ALBANESE, Calogero FIORICA, Pasquale PICONE a Gaetano GIAMMONA. Self-assembled amphiphilic hyaluronic acid graft copolymers for targeted release of antitumoral drug. *Journal of Drug Targeting*. 2008, roč. 16, č. 2, s. 91-107. ISSN 1061-186x
- [2] ADAV, Awesh K., P. MISHRA a Govind P. AGRAWAL. An insight on hyaluronic acid in drug targeting and drug delivery. *Journal of Drug Targeting*. 2008, roč. 16, č. 2, s. 91-107. ISSN 1061-186x
- [3] HENNI, Widad, Michel DEYME, Michel STCHAKOVSKY, Didier LECERF, Luc PICTON a Véronique ROSILIO. Aggregation of hydrophobically modified polysaccharides in solution and at the air-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2005, roč. 281, č. 2, s. 316-324. ISSN 00219797
- [4] CHYTIL, Martin, Miloslav PEKAŘ, Michel STCHAKOVSKY, Didier LECERF, Luc PICTON a Véronique ROSILIO. Effect of new hydrophobic modification of hyaluronan on its solution properties: evaluation of self-aggregation. *Carbohydrate Polymers*. 2009-04-09, roč. 76, č. 3, s. 443-448. ISSN 01448617
- [5] TROMMER, Hagen, Reinhard NEUBERT. *Hyaluronsäure. Ein vielseitig pharmazeutisch einsetzbares Biomolekül*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie
- [6] SCHANTÉ, Carole E., Guy ZUBER, Corinne HERLIN, Thierry F. VANDAMME, Jeong-A YANG, Ji-Hyun KONG, Min Young LEE, Allan S. HOFFMAN a Sei Kwang HAHN. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*. 2010-01-04, roč. 141, č. 1, s. 2-12. ISSN 01683659
- [7] STERN, Robert. Hyaluronan metabolism: a major paradox in cancer biology. *Pathologie Biologie*. 2005, roč. 53, č. 7, s. 372-382. ISSN 03698114
- [8] VELEBNÝ, Vladimír. *Hyaluronan – Biopolymer pro tkáňové inženýrství*. Edice habilitační a inaugurační spisy, sv. 412. ISSN 1213-418X
- [9] ŠMEJKALOVÁ, Daniela, Martina HERMANNOVÁ, Romana ŠULÁKOVÁ, Alena PRŮŠOVÁ, Jiří KUČEŘÍK a Vladimír VELEBNÝ. Structural and conformational differences of acylated hyaluronan modified in protic and aprotic solvent system. *Carbohydrate Polymers*. 2012, roč. 87, č. 2, s. 1460-1466. ISSN 01448617
- [10] PRESTWICH, Glen D. Biomaterials from Chemically-Modified Hyaluronan. *Glycoforum*. [online] 2001 [cit 2013-19-02]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- [11] LEBEL, Lena. Clearance of hyaluronan from the circulation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1991, roč. 7, č. 2, s. 221-235. ISSN 0169409x
- [12] CHYTIL, Martin, Sabina STRAND, Bjørn E. CHRISTENSEN a Miloslav PEKAŘ.

- Calorimetric and light scattering study of interactions and macromolecular properties of native and hydrophobically modified hyaluronan. *Carbohydrate Polymers*. 2010, roč. 81, č. 4, s. 855-863. ISSN 01448617
- [13] RUIZ, Cristóbal Carnero. *Sugar-based surfactants: fundamentals and applications*. Boca Raton: CRC Press/Taylor, c2009, xix, 639 p. Surfactant science series, v. 143. ISBN 14-200-5166-0
- [14] ABATANGELO, Giovanni, Rolando BARBUCCI, Paola BRUN a Stefania LAMPONI. Biocompatibility and enzymatic degradation studies on sulphated hyaluronic acid derivatives. *Biomaterials*. 1997, roč. 18, č. 21, s. 1411-1415. ISSN 01429612
- [15] Contipro Group. [online] 2011 [cit. 2013-02-19]. Dostupné z: <http://www.contipro.com/eshop/sodium-caproyl-hyaluronate>
- [16] HASCALL, Vincent C., Torward C. LAURENT. Hyaluronan: Structure and Physical Properties. *Glycoforum* [online] 1997 [cit. 2013-02-19]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- [17] YAMADA, Takashi a Takeru KAWASAKI. Microbial synthesis of hyaluronan and chitin: New approaches. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2005, roč. 99, č. 6, s. 521-528. ISSN 13891723
- [18] WEIGEL, Paul H. Bacterial Hyaluronan Synthases. *Glycoforum* [online] 2004 [cit. 2013-24-02]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- [19] *The biology of hyaluronan*. Chichester [England]: Wiley, 1989. ISBN 978-047-0513-774
- [20] RÖSSLER, Andreas, Martin FINK, Nandu GOSWAMI a Jerry J. BATZEL. Modeling of hyaluronan clearance with application to estimation of lymph flow. *Physiological Measurement*. 2011-08-01, roč. 32, č. 8, s. 1213-1238. ISSN 0967-3334
- [21] OH, Eun Ju, Kitae PARK, Ki Su KIM, Jiseok KIM, Jeong-A YANG, Ji-Hyun KONG, Min Young LEE, Allan S. HOFFMAN a Sei Kwang HAHN. Target specific and long-acting delivery of protein, peptide, and nucleotide therapeutics using hyaluronic acid derivatives. *Journal of Controlled Release*. 2010-01-04, roč. 141, č. 1, s. 2-12. ISSN 01683659
- [22] KIM, Iris L., Robert L. MAUCK a Jason A. BURDICK. Hydrogel design for cartilage tissue engineering: A case study with hyaluronic acid. *Biomaterials*. 2011, roč. 32, č. 34, s. 8771-8782. ISSN 01429612
- [23] COLLINS, Maurice N. a Colin BIRKINSHAW. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering – A review. *Carbohydrate Polymers*. 2013, roč. 92, č. 2, s. 1262-1279. ISSN 01448617
- [24] GOTTE, M., G. W. YIP, Michiel MULIER a Daniel HAVERKAMP. Heparanase, Hyaluronan, and CD44 in Cancers: A Breast Carcinoma Perspective. *BioDrugs*. 2012, roč. 26, č. 4, s. 257-268. ISSN 1173-8804

- [25] CHI, Andrew, Samir P. SHIRODKAR, Diogo O. ESCUDERO, Obi O. EKWENNA, Travis J. YATES, Rajinikanth AYYATHURAI, Michael GARCIA-ROIG, Jeffrey C. GAHAN, Murugesan MANOHARAN, Vincent G. BIRD a Vinata B. LOKESHWAR. Molecular characterization of kidney cancer: A Breast Carcinoma Perspective. *BioDrugs*. 2012, roč. 26, č. 4, s. 257-268. ISSN 1173-8804
- [26] COLEN, Sascha, Michel P.J. VAN DEN BEKEROM, Michiel MULIER a Daniel HAVERKAMP. Hyaluronic Acid in the Treatment of Knee Osteoarthritis. *BioDrugs*. 2012, roč. 26, č. 4, s. 257-268. ISSN 1173-8804
- [27] ŠČUKIN, E. *Koloidní chemie*. Vyd. 1. Praha: Academia, 1990, 484 s. ISBN 80-200-0259-6
- [28] POUCHLÝ, Julius. Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav: Příklady a úlohy. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1998, 198 s. ISBN 80-708-0331-2.
- [29] BARTOVSKÁ, Lidmila. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*: 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1992, 119 s. ISBN 80-708-0158-1
- [30] ATKINS, Peter William. *Atkins' Physical Chemistry*. 7th ed. Oxford: Oxford University Press, 2002, 1149 s. ISBN 01-987-9285-9
- [31] HOLMBERG, Krister. *Surfactants and polymers in aqueous solution*. 2nd ed. Chichester: John Wiley, 2003, xvi, 545 s. ISBN 04-714-9883-1
- [32] STEBER, J., H. Berger. Biodegradability of anionic surfactants. *Biodegradability of surfactants*. Springer Netherlands, 1995, s. 134-182
- [33] SALANGER, Jean-Louis. *Surfactants: Types and Uses*. Mérida - Venezuela, 2002. Universidad de Los Andes
- [34] BLOCK, Seymour Stanton. *Disinfection, sterilization, and preservation*. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams, 2001. ISBN 0683307401
- [35] ISRAELACHVILI, J. N., S. MARČELJA a R. G. HORN. Physical principles of membrane organization. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 1980, roč. 13, č. 02, s. 121-. ISSN 0033-5835
- [36] SCHRAMM, Laurier L., Elaine N. STASIUK a D. Gerrard MARANGONI. Surfactants and their applications. *Annual Reports Section "C" (Physical Chemistry)*. 2003, roč. 99, s. 3-. ISSN 0260-1826
- [37] TANFORD, Charles. *The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes*. 2d ed. New York: Wiley, s. 233. ISBN 04-710-4893-3
- [38] SAGALOWICZ, Laurent a Martin E. LESER. Delivery systems for liquid food products. *Current Opinion in Colloid*. 2010, roč. 15, 1-2, s. 61-72. ISSN 13590294
- [39] ZHANG, Jianxiang, Xiaodong LI a Xiaohui LI. Stimuli-triggered structural engineering of synthetic and biological polymeric assemblies. *Progress in Polymer Science*. 2012, roč. 37, č. 8, s. 1130-1176. ISSN 00796700
- [40] HAMPL, František. Biomimetika – Organizované vrstvy, liposomy. Ústav organické

- chemie VŠCHT Praha. [online] 2005 [cit. 2013-02-24] Dostupné z: http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2005/6_Hampl.pdf
- [41] GLASS, Edward J. *Associative Polymers in Aqueous Media*. American Chemical Society, 2000, č. 765, eISBN 9780841218130
- [42] KVÍTEK, Libor, Aleš PANÁČEK. *Základy koloidní chemie*. [online] Olomouc, 2007 [cit. 2013-02-09]. Dostupné z: <http://fch.upol.cz/skripta/kol/koch.pdf>
- [43] PECORA, Robert. *Dynamic light scattering: applications of photon correlation spectroscopy*. New York: Plenum Press, 1985, 420 p. ISBN 03-064-1790-1
- [44] PECORA, Robert. *Dynamic light scattering: the method and some applications*. Editor Wyn Brown. Oxford [England]: Clarendon Press, 1993, 735 s. Monographs on the physics and chemistry of materials. ISBN 978-0-19-853942-1.
- [45] KVÍTEK, Libor. *Metody studia koloidních soustav*. Katedra fyzikální chemie PřF UP Olomouc, Olomouc 2006
- [46] ŠENKEŘÍKOVÁ, Jana. *Charakterizace emulzí fotonovou korelační spektroskopií*. Zlín. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav technologie tuků, tensidů a kosmetiky, 2010, 71s. Vedoucí práce Ing. Věra Kašpárková, CSc.
- [47] MALVERN INSTRUMENT LTD. *Zetasizer Nano: Příručka pro uživatele*. Worcestershire, United Kingdom, leden 2007
- [48] MALVERN INSTRUMENTS LTD. *Zetasizer Nano Series: User Manual*. Worcestershire, United Kingdom. [online] 2004 [cit. 2013-04-07]. Dostupné z: http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf
- [49] NOVÁK, Josef. *Fyzikální chemie: bakalářský a magisterský kurz*. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-675-3
- [50] MRAVEC, Filip, Miloslav PEKAŘ a Vladimír VELEBNÝ. Aggregation behavior of novel hyaluronan derivatives – a fluorescence probe study. *Colloid and Polymer Science*. 2008, roč. 286, 14-15, s. 1681-1685. ISSN 0303-402x
- [51] BEHJATMANESH-ARDAKANI, Reza, Mohammad Ali KARIMI, Fatemah Ghaderiyeh-Mahmood ABADI, Didier LECERF, Luc PICTON a Véronique ROSILIO. Effects of hydrophobically modified polymer on nano-structure micelles: evaluation of self-aggregation. *Journal of Molecular Liquids*. 2009, roč. 149, 1-2, s. 1-8. ISSN 01677322
- [52] LUKYANOV, Anatoly N., Vladimir P. TORCHILIN, Fatemah Ghaderiyeh-Mahmood ABADI, Didier LECERF, Luc PICTON a Véronique ROSILIO. Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs: evaluation of self-aggregation. *Journal of Molecular Liquids*. 2009, roč. 149, 1-2, s. 1-8. ISSN 01677322
- [53] SEZGIN, Z., N. YUKSEL, T. BAYKARA, Didier LECERF, Luc PICTON a

- Véronique ROSILIO. Preparation and characterization of polymeric micelles for solubilization of poorly soluble anticancer drugs: evaluation of self-aggregation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2006, roč. 64, č. 3, s. 261-268. ISSN 09396411
- [54] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, c2006, xxvi, 954 p. ISBN 03-873-1278-1
- [55] VALEUR, Bernard. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 2002, 387 s. ISBN 35-272-9919-X
- [56] FIŠAR, Z. *Principy fluorescenční spektroskopie*. Praha CUNI, 2006
- [57] FIŠAR, Z. *Nevlastní fluorofory v medicíně*. [online]. 2009, červenec. [cit. 2012-01-11]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/fluorofory.htm#vlastni>
- [58] LADOKHIN, Alexey S. Analysis of Protein and Peptide Penetration into Membranes by Depth-Dependent Fluorescence Quenching: Theoretical Considerations. *Biophysical Journal*. 1999, roč. 76, č. 2, s. 946-955. ISSN 00063495
- [59] LÁSZLÓ, Mátyus, János SZÖLLOSI a Attila JENEI. Steady-state fluorescence quenching applications for studying protein structure and dynamics: Theoretical Considerations. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2006, roč. 83, č. 3, s. 223-236. ISSN 10111344
- [60] SUMMERFIELD, Frank W., Al L. TAPPEL a Attila JENEI. Determination by fluorescence quenching of the environment of DNA crosslinks made by malondialdehyde: Theoretical Considerations. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2006, roč. 83, č. 3, s. 223-236. ISSN 10111344
- [61] HSU, Yueh-Ying, Yu-Ning LIU, Wenyen WANG, Fu-Jen KAO a Szu-Hao KUNG. In vivo dynamics of enterovirus protease revealed by fluorescence resonance emission transfer (FRET) based on a novel FRET pair. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007, roč. 353, č. 4, s. 939-945. ISSN 0006291x
- [62] Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET). *Life Technologies*. [online] 2013 [cit. 2013-03-02]. Dostupné z: <http://www.lifetechnologies.com/global/en/home.html>
- [63] BRAUN-BOUCHER, F., AUBERY, M. Fluorescent Molecular Probes. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. 1999, s. 573-592
- [64] WANG, Xiaochun, Lihong GUO, Huimin MA a Miloslav PEKAŘ. Analysis of local polarity change around Cys34 in bovine serum albumin during N→B transition by a polarity-sensitive fluorescence probe. *Carbohydrate Polymers*. 2010, roč. 81, č. 4, s. 855-863. ISSN 01448617
- [65] HAIDEKKER, M, T LING, M ANGLO, H STEVENS, J FRANGOS a E THEODORAKIS. New fluorescent probes for the measurement of cell membrane viscosity. *Chemistry*. 2001, roč. 8, č. 2, s. 123-131. ISSN 10745521
- [66] ZHOU, Yunyou, Guirong BIAN, Leyu WANG, Ling DONG, Lun WANG a Jian

- KAN. Sensitive determination of nucleic acids using organic nanoparticle fluorescence probes. *Chemistry*. 2001, roč. 8, č. 2, s. 123-131. ISSN 10745521
- [67] MRAVEC, Filip. Fluorescenční spektroskopie ve výzkumu asociativních koloidů. ver. 2. Brno, 2006
- [68] CHAUDHURI, Arunima, Sourav HALDAR a Amitabha CHATTOPADHYAY. Organization and dynamics in micellar structural transition monitored by pyrene fluorescence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009, roč. 390, č. 3, s. 728-732. ISSN 0006291x
- [69] QU, Peng, Hua LU, Shancheng YAN, Dequan ZHOU a Zuhong LU. Investigations of effects of environmental factors in unfolding/refolding pathway of proteins on 8-anilino-1-naphthalene-sulfonic acid (ANS) fluorescence. *Journal of Molecular Structure*. 2009, roč. 936, č. 1-3, s. 187-193
- [70] UVERSKY, Vladimir N., Stefan WINTER a Günter LÖBER. Self-association of 8-anilino-1-naphthalene-sulfonate molecules: spectroscopic characterization and application to the investigation of protein folding. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1998, roč. 1388, č. 1, s. 133-142. ISSN 01674838
- [71] WANG, Gufeng, Yi GAO a M. Lei GENG. Analysis of heterogeneous fluorescence decays in proteins. Using fluorescence lifetime of 8-anilino-1-naphthalenesulfonate to probe apomyoglobin unfolding at equilibrium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2006, roč. 1760, č. 7, s. 1125-1137. ISSN 03044165
- [72] SIRANGELO, Ivana, Ettore BISMUTO, Simona TAVASSI a Gaetano IRACE. Apomyoglobin folding intermediates characterized by the hydrophobic fluorescent probe 8-anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1998, roč. 1385, č. 1, s. 69-77
- [73] Chempoint: Vědci pro průmysl a praxi. *Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně* [online]. 2013 [cit. 2013-04-01]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Seznam zkratek

Zkratka	Význam
AcHyA	hydrofobizovaný hyaluronan
ANS	1-anilinonaftalen-8-sulfonová kyselina
CAC	kritická agregační koncentrace
CMC	kritická micelární koncentrace
CPP	kritický pakovací parametr
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
DDAC	didodecyldimethylamonium chlorid
DLS	dynamický rozptyl světla (Dynamic Light Scattering)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECM	extracelulární matrix
EmPI	emisní polaritní index pyrenu
ExPI	excitační polaritní index pyrenu
Ex:Mo	poměr intenzity fluorescence excimeru (470 nm) ku intenzitě fluorescence monomeru (373 nm)
FRET	Försterův rezonační přenos energie
HA	hyaluronan
HASs	hyaluronan syntázy
HMCMP	hydrofobizovaný karboxymethylpululan
HM polymery	hydrofobně modifikované polymery
HyA	kyselina hyaluronová
NaCl	chlorid sodný
PAL	povrchově aktivní látky
PALS	Phase Analysis Light Scattering
PEG-DSPE	polyetylglykol-distearoylfosfatidylethanolamin
PEG	polyetylglykol
PPS	polaritní stupeň pyrenu
TNS	2-p-toluidinonaftalen-6-sulfonová kyselina
SDBS	dodecylbenzensulfonát sodný
SDS	dodecylsulfonát sodný
Triton X-100	oktylfenol ethoxylát
Tween	polyoxyethylen (20)

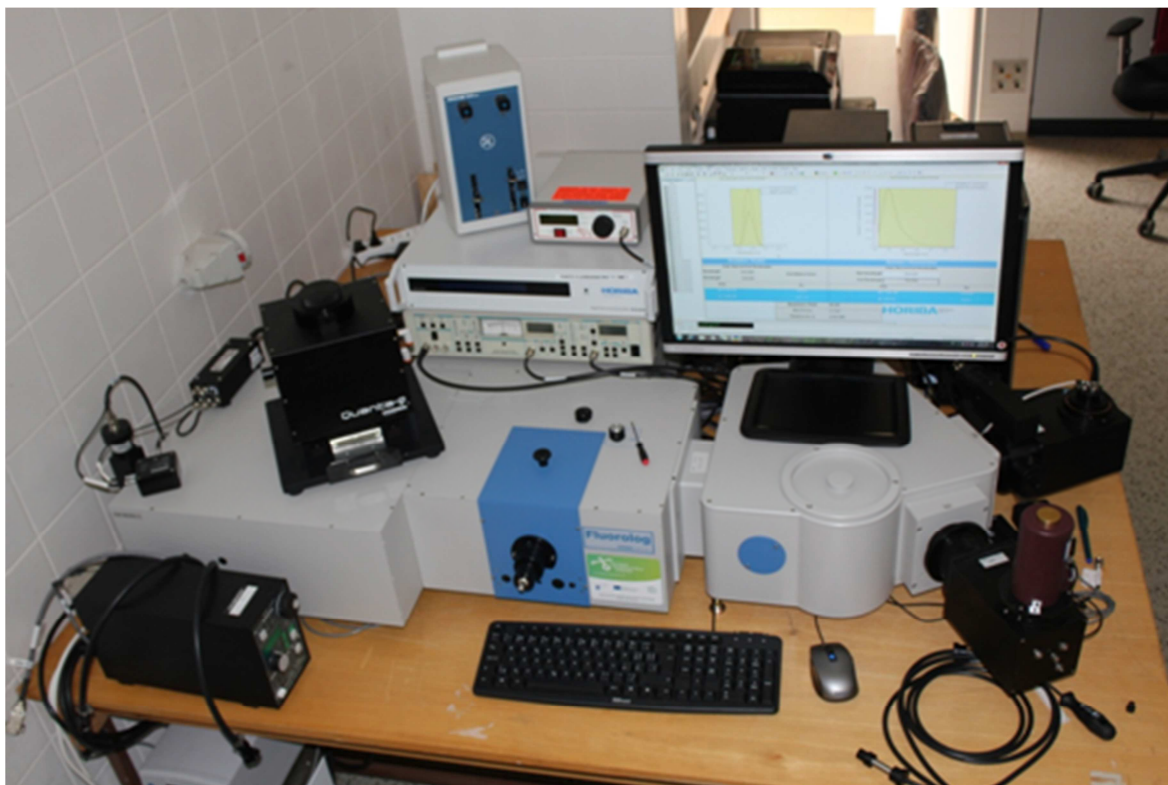
8.2 Seznam symbolů

a_0	účinný průřez polární hlavou skupiny
D	difúzní koeficient
I_1	hodnota intenzity fluorescence prvního maxima emisního spektra pyrenu
I_3	hodnota intenzity fluorescence třetího maxima

	emisního spektra pyrenu
I_E	hodnota intenzity fluorescence excimeru
	emisního spektra pyrenu
k	Boltzmannova konstanta
k_q	bimolekulární zhášecí konstanta
K	Stern-Volmerova konstanta
kDa	kilodalton, 10^3 g.mol^{-1}
l_c	efektivní délka uhlovodíkového řetězce
M	mol.dm^{-3}
M	základní stav molekuly
M^*	excitovaný stav molekuly
M_w	molární hmotnost
q	rozptylový vektor
Q	zhášec
$[Q]$	koncentrace zhášeče
R_h	hydrodynamický průměr
S_0	základní stav molekuly
S_1	první excitovaný singletový stav molekuly
S_2	druhý excitovaný singletový stav molekuly
T_1	první excitovaný tripletový stav molekuly
U_E	elektroforetická pohyblivost
V	molekulární objem hydrofobní části molekuly
ε	dielektrická konstanta
ζ	elektrokinetický potenciál (zeta)
η	viskozita prostředí
τ_0	doba života excitovaného stavu bez přítomnosti zhášeče
τ_c	relaxační čas
Φ	kvantový výtěžek v přítomnosti zhášeče
Φ_0	kvantový výtěžek bez přítomnosti zhášeče

9 PŘÍLOHY

9.1 Příloha 1



Příloha 1 – Fluorog Horiba Jobin Yvon [73]

9.2 Příloha 2



Příloha 2 – Zetasizer Nano ZS [73]

9.3 Příloha 3



Příloha 3 – Koncentrační řada CTAB v přídatku 17 kDa AcHyA