

# **Chování klubek Hyaluronanu v roztocích s přísávkou kvartérních solí**

Bc. Lenka Gřundělová

---

Diplomová práce  
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav fyziky a mater. inženýrství  
akademický rok: 2009/2010

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka GRUNDĚLOVÁ**  
Studijní program: **N 2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Materiálové inženýrství**

Téma práce: **Chování klubek Hyaluronanu v roztocích s přísávkou kvartérních solí**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte rešerši na zadané téma.
2. Připravte vzorky podle pokynů vedoucího DP.
3. Seznamte se s přístroji k charakterizaci vzorků.
4. Proveďte experimenty podle pokynů vedoucího DP.
5. Zpracujte naměřené výsledky a zhodnoťte je.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. **Mezinárodní časopisy: Biophysical Journal, Journal of Biomedical Materials Research, Chemical Reviews, Glycobiology, Carbohydrate Research, Journal of Molecular Biology, Polymer, Biomacromolecules, Annals of Biomedical Engineering, Biopolymers, atd...**

Vedoucí diplomové práce:

**Mgr. Aleš Mráček, Ph.D.**

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání diplomové práce:

**15. února 2010**

Termín odevzdání diplomové práce:

**19. května 2010**

Ve Zlíně dne 15. února 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.  
*děkan*



Mgr. Aleš Mráček, Ph.D.  
*vedoucí katedry*

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně .....

.....

---

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce se zabývá chováním klubek hyaluronanu v roztocích s přidavky kvartérních solí. Kyselina hyaluronová je polymer tvořený opakující se disacharidovou jednotkou N-cetyl-D-glukosamidu a kyseliny D-glukoronové, která reguluje hydrataci a pohyb makrobuněk v tkáních. Jako efektivní léčebný prostředek se uplatňuje v celé řadě medicínských oborů např. oftalmologii, ortopedii či revmatologii. Při použití čisté kyseliny hyaluronové dochází v roztoku časem k degradaci a kontaminaci mikroorganismy, čemuž lze zabránit přidavkem konzervačních látek. Tyto konzervační látky, v tomto případě kvartérní amoniové soli, se určitým způsobem podílejí na strukturních změnách kyseliny hyaluronové.

**Klíčová slova:** Kyselina Hyaluronová, Kvartérní amoniové soli

## **ABSTRACT**

This thesis is focused on the hyaluronan coil properties in the solution with additions quaternary salts. Hyaluronic acid (hyaluronan) is a linear polymer constituted from repeated disaccharide units of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucuronic acid. Hyaluronic acid occurs in almost biological fluids and tissues, for hydration and motion of cells. Hyaluronan is also used as substance for many medical applications (for example in ophthalmology, orthopedics, rheumatology or cosmetics, etc.). Hyaluronic acid degrades in solutions and can be contaminated by microorganism. This problem can be solved by preservatives, in this case quaternary ammonium salts. The structure can be negatively influenced by this salts.

**Keywords:** Hyaluronic acid, Quaternary ammonium salts

Chtěla bych poděkovat mému vedoucímu diplomové práce Mgr. Alešovi Mráčkovi, Ph.D. za jeho vedení, pomoc a podporu při měření a sepisování této práce. Mé díky patří i Ing. Věře Kašpárkové Csc., za poskytnutí konzultací v průběhu experimentu.

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně

Podpis diplomanta

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 KYSELINA HYALURONOVÁ</b> .....	<b>12</b>
1.1 HISTORIE HA .....	12
1.2 STRUKTURNÍ VLASTNOSTI HA.....	13
1.2.1 Chemická struktura .....	16
1.2.1.1 Extracelulární matrix .....	17
1.2.2 Struktura kyseliny hyaluronové v roztoku.....	19
1.3 MOLEKULOVÁ HMOTNOST.....	20
1.4 APLIKACE HA .....	21
1.4.1 Hyaluronový Receptor, CD44 .....	22
1.4.2 Oftalmologie.....	24
1.4.3 Aplikace v ortopedii .....	27
1.4.4 Účinek antiseptik při hojení ran .....	28
1.4.5 Využití Kyseliny hyaluronové v kosmetice.....	29
<b>2 KVARTÉRNÍ AMONIOVÉ SOLI</b> .....	<b>30</b>
2.1 TENZIDY A DETERGENTY .....	30
2.1.1 Mechanismus rozpouštění tenzidů .....	34
2.2 KVARTÉRNÍ AMONIOVÉ SOLI – STRUKTURA, VLASTNOSTI.....	36
2.2.1 Hydrofobicita a kritická micelární koncentrace QAS .....	38
2.2.2 Antibakteriální efekt QAS.....	39
2.3 BENZALKONYUM CHLORID .....	40
2.3.1 BAC v oftalmologii .....	41
2.4 POUŽITÍ QAS .....	42
<b>3 STANOVENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC</b> .....	<b>43</b>
3.1 ZÁKLADNÍ POJMY .....	43
3.1.1 Molekulová hmotnost a polydisperzita .....	45
3.2 ZÁKLADNÍ METODY .....	48
3.2.1 Počátky vzniku metody DLS.....	50
3.2.2 Metoda dynamického rozptylu světla-DLS .....	51
3.2.2.1 Aplikace DLS.....	57
<b>4 SPEKTRÁLNÍ METODY</b> .....	<b>58</b>
4.1 ULTRAFIALOVÁ A VIDITELNÁ SPEKTROSKOPIE.....	58
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>64</b>
<b>5 MATERIÁLY A METODY</b> .....	<b>65</b>
5.1 POUŽITÉ MATERIÁLY A PŘÍPRAVA VZORKŮ.....	65
5.1.1 Materiály .....	65
5.1.2 Příprava vzorků .....	65



5.2	METODY.....	66
5.2.1	Metoda dynamického rozptylu světla.....	67
5.2.2	UV/Vis spektroskopie .....	70
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>71</b>
6.1	MĚŘENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC .....	71
6.2	MĚŘENÍ UV-VIS SPEKTER .....	80
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>87</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>88</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>93</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>95</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>98</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>99</b>

## ÚVOD

Kyselina hyaluronová patří do skupiny polysacharidů, které jsou součástí všech živočichů, např. jako složka synoviální tekutiny v koleni, v extracelulární matrix, ale i jako součást všech spojovacích tkání i pokožky. Molekula HA je složena z opakující se jednotky kyseliny glukoronové a N-acetylglukosaminu. Každá disacharidová jednotka obsahuje jednu karboxylovou, čtyři hydroxylové a acetamidovou skupinu. Díky silným hydrofilním vlastnostem vně řetězce, může kyselina hyaluronová ve vodných roztocích tvořit spirálovou konfiguraci a dosáhnout tak až 1000 násobku svého původního objemu. Molekulová hmotnost kyseliny hyaluronové se pohybuje mezi sto tisíci až několika miliónů Daltonů a závisí na zdroji a metodách, kterými se získává. Další významnou vlastností tohoto biopolymeru je viskoelasticita. Koncentrace kyseliny hyaluronové je velmi vysoká v pokožce a spojovacích tkáních. Při vysokých koncentracích v roztoku tvoří gely. Molekulové uspořádání HA silně závisí na povaze opačných iontů.

Protože, roztoky čisté kyseliny hyaluronové jsou velmi náchylné ke kontaminaci různými mikroorganismy a degradaci, přidávají se do nich konzervační látky. Tyto konzervační látky snižují jejich náchylnost k degradaci a kontaminaci. V této práci, byly jako konzervační látka, zvolena kvartérní amoniová sůl (Benzalkonium chlorid).

Cílem diplomové práce je popsat chování hyaluronových klubek s benzalkoniem chloridu. Mezi metody, použité k charakterizaci chování roztoků HA patří UV/Vis spektroskopie a měření velikosti částic metodou dynamického rozptylu světla.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 KYSELINA HYALURONOVÁ

Kyselina hyaluronová je biomakromolekula polysacharidového typu, která může dosahovat molekulové hmotnosti 4-5mil Daltonů, tvořená opakující se jednotkou N-acetyl glukosaminu a D-glukoronové kyseliny spojená glykosidickou vazbou, jenž se při fyziologickém pH chová anionicky. Vlivem vysokého stupně rozpustnosti ve vodě vytváří sodnou sůl, tzv. Hyaluronát sodný (hyaluronan) [1].

Nachází se v řadě tkání, zvláště v pojivových a tvoří hlavní součást synoviální tekutiny. HA-Na je jednou z hlavních složek synoviálních tekutin, která obsahuje makromolekuly s vysokou molekulovou hmotností  $M_w = 10^6 - 10^7$  g/mol a vysokou koncentrací 2-4mg/ml, srovnatelnou s vysoce viskoelastickými s dobrou mazací schopností při nízkých smykových rychlostech a výbornými tlumivými vlastnostmi při vysokých smykových rychlostech [2]. 70kg vážící lidské tělo obsahuje zhruba 15g této látky [1]. HA může v roztocích vytvářet náhodně spirálovou konfiguraci. Je to dáno částečně hydrofilními a hydrofobními vlastnostmi, které předurčuje její struktura podrobně znázorněna na obr.č.1.

Díky své schopnosti dobře vázat vodu přispívá k optimální hydrataci tkání [1]. Viskoelastický charakter sodné soli kyseliny hyaluronové, dovoluje využívat ji při prevenci u pooperační přilnavosti, a v mnoha oftalmologických a ortopedických aplikacích [2]. Hojně se aplikuje v oční chirurgii, artroskopických operacích, při výplni vrásek v plastické chirurgii, terapii močové inkontinence, intraartikularně při osteoartróze, u endoskopických operací, k prevenci jizvení, k intravezikální instilaci při cystitidách a v neposlední řadě i v očních a nosních kapkách [1].

### 1.1 Historie HA

V roce 1934 se podařilo K. Meyerovi a J. Palmerovi izolovat, v té době neznámou látku, z očních čoček hovězího dobytka, a nazvali ji kyselina hyaluronová. Její první použití v medicíně připadlo na rok 1950, a to v oblasti oční chirurgie [3]. Nejprve se začal používat hyaluronan, který byl izolován z pupeční šňůry, o něco později z kohoutích hřebínků. Byl velmi čistý a jeho molekulová hmotnost dosahovala vysokých hodnot. Chemickou strukturu poprvé podrobně rozebral K. Meyer s kolektivem v roce 1950.

Tedy byla poprvé izolována jako kyselina, i když z fyziologického hlediska odpovídala spíše sodné soli této kyseliny. Termín „hyaluronan“ byl oficiálně zařazen do mezinárodního názvosloví polysacharidů až v roce 1836 zásluhou E. Balazs a kolektivu. Krom toho definovali, že molekula může vytvářet různé formy např. kyselou formu jako je kyselina hyaluronová, ale i její soli - sůl kyseliny hyaluronové. Později se HA získávala z mnoho dalších zdrojů s odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi [4]. V současné době se ke komerční produkci kyselina hyaluronová získává z kohoutích hřebínků, lidské pupeční šňůry nebo je připravena synteticky bakteriálním kvašením bakterie rodu *Streptococcus equi* a *Streptococcus zoopidemicus* [3]. Touto výrobní cestou nedochází k žádné kontaminaci HA různými alergeny a technologie navíc umožňuje přesné přizpůsobení velikosti molekul s optimálními viskoelastickými vlastnostmi, které jsou téměř identické s endogenní HA.

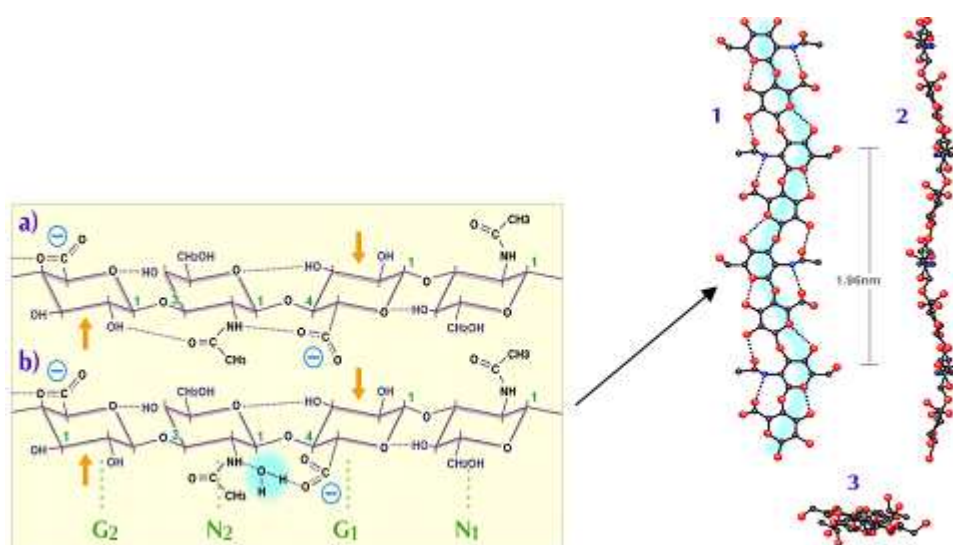
## 1.2 Strukturní vlastnosti HA

Hyaluronan jako složka extracelulární matrix je glykosaminoglykan s velkou molekulovou hmotností [1]. Tato zdánlivě jednoduše složená struktura je součástí všech savců, a potvrzuje tím význam této biomolekuly a propůjčuje ji jedinečné fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti závislé na molekulové hmotnosti. V lidském těle je přítomna ve formě sodné soli této kyseliny. Vysoké koncentrace HA lze najít v měkkých tkáních, ale obsahují ji i kohoutí hřebínky ( $7,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ), pokožka ( $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ), pupeční šňůra ( $3 \text{ mg mL}^{-1}$ ), synoviální tekutina ( $3-4 \text{ mg mL}^{-1}$ ) a sklivec ( $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) [5].

Při extrahování HA z tkání získáme polydisperzní kyselinu hyaluronovou s průměrnou molekulovou hmotností několika milionu. Ve fyziologickém roztoku, se HA zaplétá do zhutňujícího se, nahodile orientovaného klubka s obrysovou délkou kolem 2,5 mm na  $1 \times 10^6$  molekulové hmotnosti řetězce složeného z 2650 disacharidových jednotek.

Sekundární tvar vodíkové vazby podél osy HA, způsobuje neohebnost a vytváří četné hydrofobní komponenty, které ji formují do uspořádané struktury. HA roztoky jsou velmi viskoelastické. Při narůstání smykové rychlosti na hyaluronovém řetězci uspořádaném ve směru toku, způsobuje pokles viskozity roztoku.

Tento efekt smykového poklesu je patrný při protlačování HA injekční stříkačkou. Kyselina hyaluronová je vysoce hydrofilní polymer. Každá jednotka glukoronové kyseliny obsahuje karboxylovou skupinu, která propůjčuje hyaluronanu polyanionický charakter. V přítomnosti vody, se molekuly HA expandují až na tisícinásobek a tvoří rozvolněnou hydratovanou matici (obr.1). V důsledku těchto vlastností zaujímá HA v extracelulární matici několik rolí; prostorová výplň, lubrikant, osmotický tlumič. Vytváří hydratovanou polymerní síť, která funguje jako síť omezující pohyb patogenů, plazmatických proteinů a proteinázy [6].



Obrázek č.1-Složité struktura kyseliny hyaluronové [26]

*Viskozita.* Velmi vysoká viskoelastická koncentrovaných roztoků vysoko-molekulové kyseliny hyaluronové, ale i smyková závislost, má příznivé účinky na kolena a ostatní tkáně.

*Osmotický tlak.* Osmotický tlak hyaluronových roztoků je silně koncentračně závislý. U vyšších koncentrací je koloidní osmotický tlak roztoků hyaluronanu mnohem větší, než u roztoků albumina (bílkovina obsažená v krevní plazmě člověka). Tato vlastnost má obrovský význam pro vodní homeostázu v tkáních.

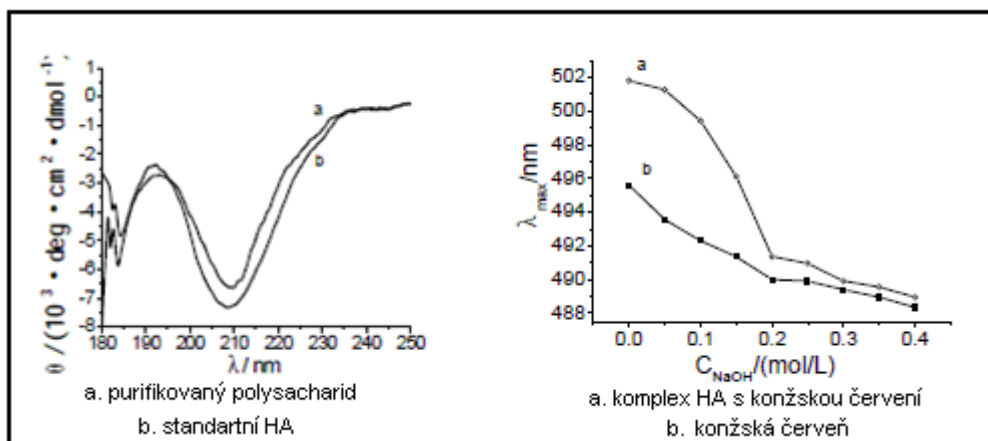
*Nízký odpor.* Pevná síť řetězců s velmi vysokým odporem ve směru vodního toku. Formy této hyaluronové bariéry uvnitř tkání byly prvně vyobrazeny Day-em [7].

Hyaluronová kyselina plní zejména tyto funkce:

1. Expanduje extracelulární prostor navazováním vody a různých solí – hydrofilní vlastnosti přitahují vodu a výsledkem je expanze.
2. Interakce s různými mezibuněčnými molekulami formují extracelulární matrix – obsahující hlavně glykosaminoglykany, hyaluronan EM stabilizuje a dodává ji potřebnou elasticitu.
3. Aktivuje nitrobuněčné cesty působení buněčných receptorů CD44 a RHAMM [8].

Podporuje hojení stimulací angiogeneze, má bakteriostatické a antiseptické vlastnosti a předpokládá se u ní aktivita proti kvasinkám, zabraňuje bakteriální kolonizaci a inhibuje bakteriální aktivitu, chrání tkáň tvořením bariéry proti průchodu látek o vysoké molekulární hmotnosti, například endotoxinů, stimuluje produkci protizánětlivých cytokininů prostřednictvím fibroblastů, reguluje migraci fagocytů do zanícených oblastí, reaguje s fibrinem a stimuluje granulaci tkání a rychlejší hojení ran, stimuluje diferenciaci, růst a vývoj jak mineralizovaných, tak nemineralizovaných tkání a je absorbována místně, nikoliv celkově, pokud je aplikována na tkáň.

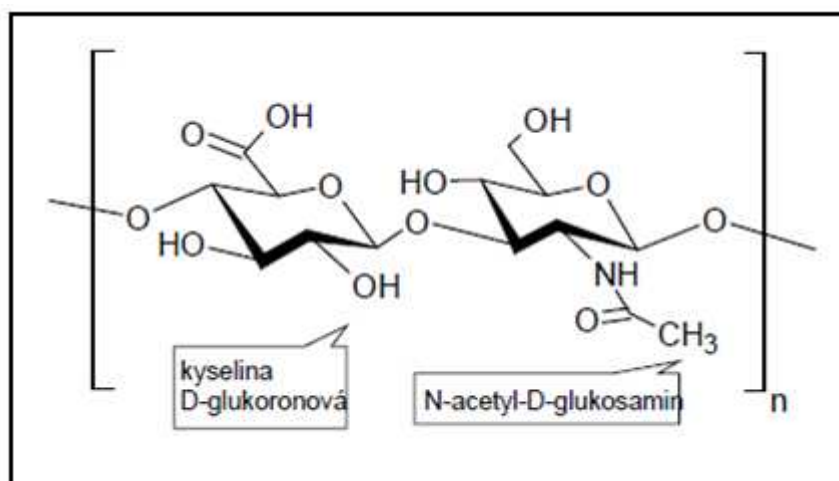
Chemickou mutací lze získat mutaci kmenu bakterií *Streptococcus zooepidemicus* (J18), která umožňuje produkci polysacharidu o vysoké účinnosti. *Streptococcus zooepidemicus* (J18) mutuje působením N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG). Fermentací, která probíhala v souladu s optimálními podmínkami zhruba 24h<sup>3</sup> se podařilo získat 59,65% polysacharidu s méně než 0,1% proteinů. K chemické analýze obsahu D-glukoronové kyseliny byla použita Carbazolovou metoda a u N-acetyl-D-glokosaminu metoda Elson-Morgana [9]. Změřené IR spektrum (obr.2) vyčištěné HA, ukázalo absorpci vazeb 3400(OH,NH); 2900(CH); 1560 ~ 1620(C=O,CN), a 1400 ~ 1320 cm<sup>-1</sup>(C-O,COO-) přesně ve shodě s IR-spektra standardní HA. U výsledků měřeného komplexu HA s konžskou červení z UV/VIS spektrometru je patrný červený posuv zobrazeny na obr.2. Aplikace HA narůstají zejména v oblasti kosmetiky a chirurgie. Využívá se při výrobě léku, ale i implantování orgánů a v oblasti terapeutiky především díky její schopnosti modifikovat buněčné chování [9].



Obrázek č.2- Změřené IR-spektrum a UV/VIS absorpce kde je přítomný červený posun [9].

### 1.2.1 Chemická struktura

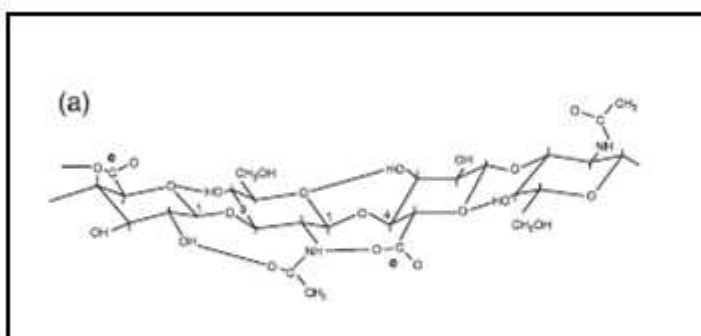
První zmínky o chemické struktuře HA jsou patrné již v 50. letech. HA je přírodně odvozený polymer. Hyaluronová struktura představuje nerozvětvený mukopolysacharid tvořený opakující se jednotkou z  $\beta(1,3)$ -D-glukuronové kyseliny a  $\beta(1,4)$ -N-acetyl- D-glukosaminu (obr.3) v poměru 1:1 [1]. Díky tomu, že HA obsahuje zbytky kyseliny glukuronové, je schopna vázat různé kationy jako je  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  [10].



Obrázek č.3 - opakující se disacharid hyaluronanu [14]



Primární strukturu polysacharidu tvoří nerozvětvený řetězec monosacharidů spojený střídajícími se  $\beta_{1,3}$  a  $\beta_{1,4}$  glykosidickými vazbami (obr.4.). Sekundární struktura HA hydrofobní části je podélně tvořena vodíkovými atomy z osmi CH skupin. Terciální strukturu stabilizují mezimolekulární vodíkové vazby. Hydrofobní chování spolu s vodíkovými vazbami a v kombinaci s elektrostatickým odporem umožňuje spojovat obrovský počet molekul do rozsáhlé molekulové sítě – matrice HA [11].



Obrázek č.4- Primární struktura HA složená z opakující se disacharidové jednotky D-glucoronové kyseliny a N-acetyl-D-glucosaminu

Měření velikosti částic, molekulové hmotnosti a vnitřní viskozity v roce 1950 a 1960 ukázalo, že tuhé HA řetězce jsou v roztoku expandovány do struktury nahodilého klubka. Velikost HA částic se mění s pH a koncentrací soli. Spirálová struktura kyseliny hyaluronové silně závisí na opačně nabitým iontu (protionu), pH, teplotě a rozsahu její hydratace [3].

### 1.2.1.1 Extracelulární matrix

Extracelulární matrix (EM) můžeme popsat jako hmotu, která je uložena vně buněk tzv. mimobuněčná základní hmota. Tato hmota plní mnoho důležitých úkolů a funkcí např. propojování různých tkání a udržování jejich správného tvaru, zajišťování přísunu živin, elektrolytů, vody ale i odvádí produkty metabolismu vně a ven z buněk. EM poskytuje část, na které jsou navázány buňky pojivové tkáně. Fyzikální vlastnosti této hmoty se liší podle funkce a typu příslušné tkáně.

Tak například kosti obsahují velmi tvrdou extracelulární matrix, zatímco šlachy vyplňuje velmi pružná EM. Pórovitou matrix můžeme najít u tkání pojivových a v chrupavce. Extracelulární matrix vytváří fyzickou podporu buněk tkání, a současně působí jako informační

system, ve kterém mohou být buňky detekovány, a koordinovat nebo vytvářet chemické signály.

Tyto signály jsou přenášeny trans-membránovými receptory do nitra buněk [12]. Z chemického hlediska tvoří extracelulární matrix tyto typy makromolekul,

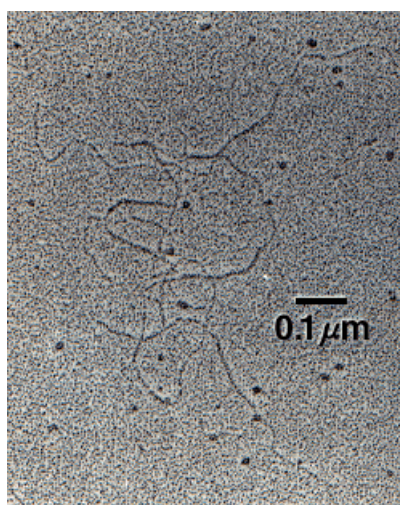
1. glykosaminoglykany a proteoglykany
2. fibrózní proteiny
3. multiadhezní molekuly

*Glykosaminoglykany* - GAG jsou dlouhé, nevětvené polysacharidy obsahující opakující se disacharidy *N*-acetylgalaktosaminu nebo *N*-acetylglukosaminu, a uronovou kyseliny např. glukuronové. Jsou to anionické molekuly tvořící viskózní gely, které mohou být nazývány mukopolysacharidy [13]. Sulfátové a karboxylové skupiny cukerných zbytků poskytují GAG silné negativní náboje, které přitahují osmoticky aktivní kationty  $\text{Na}^+$  a na extracelulární matrix je postupně vázána voda, která způsobuje nabobtnání její struktury [12]. Mezi významné glykosaminoglykany patří hyaluronová kyselina, dermatan sulfát, chondroitin sulfát, heparin, heparan sulfát a keratan sulfát [13].

Kyselina hyaluronová je nejdůležitějším glykosaminoglykanem extracelulární matrix. V embryonálních tkáních obklopuje proliferující a migrující buňky. Hydrofilní místa na jejím povrchu na sebe navazují velké množství vody a již při nízké koncentraci HA tvoří viskózní hydratovaný gel, který je  $10^3$ - $10^4$  větší než samotný hyaluronan. Hyaluronická struktura bobtná, čímž blokuje určité pohyby buněk. HA brání adhezi. Proto je vázaná na povrchu migrujících buněk jako hyaluronový receptor CD44. Ztráta kyseliny hyaluronové případně schopnosti vázat různé komponenty a hydratace přispívá k vzájemnému oddělení jednotlivých buněk a usnadňuje jejich proliferaci a diferenciaci. Vedle HA, je extracelulární matrix tvořenou řadou dalších GAG – polymerů specifických disacharidů. Glykosaminoglykany, s výjimkou hyaluronové kyseliny, se navazují kovalentní vazbou na centrální protein a vytvářejí tak proteoglykany [12].

### 1.2.2 Struktura kyseliny hyaluronové v roztoku

Počet opakujících se disacharidů  $n$ , v molekule hyaluronanu se pohybuje okolo 10.000 a více. Molekulová hmotnost může dosáhnout až 4 milionů Daltonů (každý disacharid zhruba 400Daltonů). Průměrná délka disacharidu se pohybuje kolem 1 nm, tzn. že molekula hyaluronanu, kterou tvoří 10.000 opakujících se jednotek by po rozložení mohla mít 10 $\mu$ m. Tato délka zhruba odpovídá průměru lidské červené krvinky. Na obr.4 je zobrazen snímek z elektronového mikroskopu na kterém jsou vidět propletené hyaluronové molekuly umístěné na rovném povrchu [14].



Obrázek č.5- snímek z elektronového mikroskopu, kde je vidět propletený řetězec HA [14].

Strukturu celé HA molekuly ve fyziologickém roztoku ztužuje chemická struktura disacharidů, vnitřní vodíkové vazby a interakce s rozpouštědly. Osové vodíkové atomy tvoří nepolární, relativně hydrofobní povrch, zatímco vnější strany řetězce mnohem polárnější, hydrofilní povrch. Vytvoří terciální spirálovitou strukturu. Roztoky hyaluronanu vykazují velmi neobvyklé reologické a hydrofilní vlastnosti. Kyselina hyaluronová v roztoku expanduje nahodilá klubka. Tyto řetězce se při nízkých koncentracích navzájem zaplétají a přispívají k neobvyklým reologickým vlastnostem. Při vyšších koncentracích vykazují roztoky s extrémně vysokou smykovou závislostí viskozity [4]. S rostoucí molekulovou hmotností, koncentrací, smykovou rychlostí, vyšší viskoelasticitou vlastního roztoku přechází kyselina hyaluronová, ve vodných roztocích, z newtonského na ne-newtonské chování.

Viskoelastická hyaluronanu je, ve vodném prostředí, závislá na hodnotě pH a ovlivňuje ji iontová síla daného prostředí. Což znamená že, změna pH se projeví ionizací HA řetězců a ve výsledku ovlivní mezimolekulární interakce mezi hyaluronanovými molekulami a dojde ke změně reologických vlastností celé směsi [11]. Hyaluronát se rozpouští ve vodě za vzniku viskoelastického roztoku – obsah 10 mg/ml zvyšuje viskozitu vody přibližně 5 000 násobně [1].

### 1.3 Molekulová hmotnost

Velikost molekulové hmotnosti se liší v závislosti na zdroji, ze kterého byla získána, metodách její izolace i na samotné kvalitě čistícího procesu. Distribuci molekulové hmotnosti HA lze stanovit gelovou permeační chromatografií použitím agar gelu a porézní silikátové výplně. GPC při stanovení využívá změny distribuce molekulové hmotnosti HA v průběhu enzymatické hydrolyzy. Proto nelze určit molekulovou hmotnost a její distribuci precizně. Navíc komerční dostupnost HA standardů molekulových hmotností může významně zlepšit stanovení molekulové hmotnosti a její distribuci metodou GPC [3]. Kromě GPC, lze molekulovou hmotnost určit sedimentací, rozptylem světla, osmometricky, případně kombinací sedimentace a difúzních měření. U stanovování  $M_w$  metodou rozptylu světla je potřeba určit inkrement indexu lomu ( $dn/dc$ ) hyaluronových roztoků. Mnoho autorů uvádí tuto hodnotu ( $dn/dc$ ) jako interval od 0,140 do 0,183. Velký rozptyl uvedených hodnot ( $dn/dc$ ) může být způsoben použitím nečisté HA, chybami při měření HA koncentrací případně špatnou kalibrací použitého refraktometru.

Viskozitní průměr molekulové hmotnosti hyaluronanu  $M_v$  se často stanovuje z vnitřní viskozity Mark-Houwinkovou rovnicí,

$$[\eta] = K \cdot M_v^a \quad (1.)$$

kde  $K, a$  konstanty Mark-Houwinkovy rovnice;  $K = [\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}]$ ,

$M_v$  relativní molekulová hmotnost.

Mark-Houwinkova rovnice popisuje závislost viskozity, tedy limitního viskozitního čísla, na molekulové hmotnosti [15]. Z této rovnice je patrná závislost konstant  $K$  a  $a$  na iontové síle a pH použitých hyaluronových roztoků.

Pro většinu polysacharidů je logaritmická závislost  $[\eta]$  a  $M_v$  nelineární a liší se v závislosti na molekulové hmotnosti HA. Pro  $M_v < 10^6$  je  $K = 0,029$  a  $a = 0,80$ , zatímco pro  $M_v > 10^6$  Da odpovídá  $K = 0,397$  a  $a = 0,601$ . Další studie hovoří o stanovení  $M_w$  hyaluronanu metodami založenými na elektroforéze použitím 0,5% agar. gelu a kationaktivního barviva k detekci HA. Tato metoda je schopná stanovit vysokomolekulové vzorky až  $6 \times 10^6$  Da [3].

#### 1.4 Aplikace HA

HA v oblasti fyzikálně-chemických a biologických vlastností dokazuje, že díky své struktuře je použitelná v mnoha aplikacích klinické léčby, diagnostiky, tkáňového inženýrství [6]. V současné době, kyselina hyaluronová představuje jeden z nejdůležitějších výchozích materiálů pro přípravu nových biokompatibilních a biodegradujících polymerů, jenž nachází uplatnění v mnoha významných oblastech kosmetiky a medicíny. Z lékařského pohledu je HA jako anti-adhezní složka využívána v různých oblastech použití, zejména v oční chirurgii, jako lubrikant při artritidě a plastické chirurgii, při terapii močové inkontinence, intraartikulárně při osteoartróze, při endoskopických operacích k prevenci jizvení, k intra-vezikální instilaci při cystitidách a v očních či nosních kapkách. Aktivně se účastní imunologických procesů jako signální molekula a ovlivňuje mobilitu a adhezivitu buněk v rámci jejich proliferace a diferenciací [1]. Tyto jeho imunomodulační vlastnosti se již nyní využívají při urychlení hojení a epitelizace poranění a zánětů na kůži, v ústní dutině a nově i ve formě poševních čípků a také na vaginální sliznici a epitelu děložního čípku. Jako biomakromolekula je rozpustná ve vodě, modifikace však vyžadují její nerozpustnou formu, využívanou právě v medicíně, například jako matrice v léčivech [10].

### 1.4.1 Hyaluronový Receptor, CD44

Studie s použitím exogenní kyseliny hyaluronové, demonstrují její vliv na migraci fibroblastů k místu poranění. In vitro studie lidských zralých a zárodečných fibroblastů z kůže měla monitorovat úroveň produkce glycosaminoglykanů, zvláště hyaluronanu, a vzájemně dvě různé skupiny vybraných fibroblastů (fibroblastů syntetizovány z kolagenu) porovnat. Výsledky naznačují že, u obou, zralých i zárodečných skupin fibroblastů, nastala zvýšená migrace v důsledku přítomností hyaluronanu a TGF- $\beta$ 1. Čím vyšší hladina HA byla, tím k větší buněčné migraci došlo. Takovýto vliv kyseliny hyaluronové na buněčnou migraci dovoluje interakce s Hyaluronovými receptory – CD44, ICAM-1 a RHAMM. Schopnost HA ovlivnit buněčnou migraci je dána jejími fyzikálně-chemickými vlastnostmi, které hydratují matrici a tím usnadňují buněčný pohyb [8].

Mezi základní funkce receptorů patří, že se účastní všech procesů, během kterých dochází k vazbě mezi buňkami, interakcí buněk s mezibuněčnou hmotou ale i odstranění HA z tkání a krve. Na povrchu různých typů buněk bylo rozpoznáno šest specifických struktur kyseliny hyaluronové, které můžeme označit jako „receptory 3“. Jedná se o tyto typy:

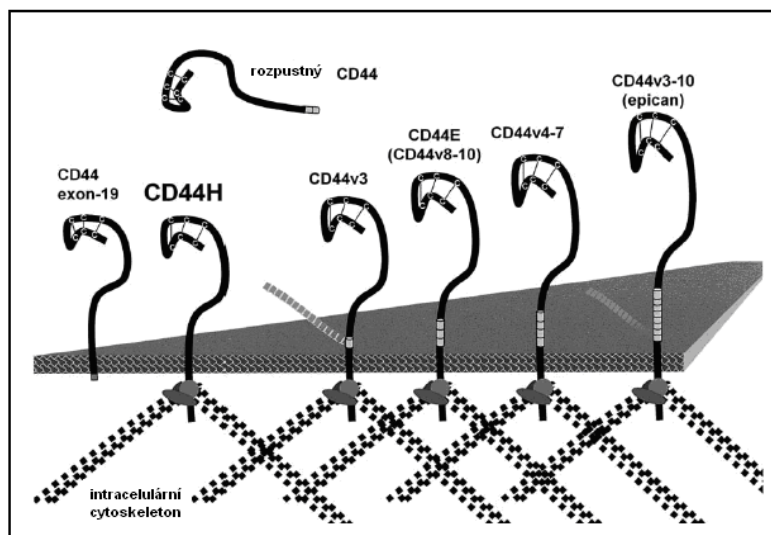
- CD44
- RHAMM (Receptor pro HA zprostředkující buněčnou mobilitu)
- LYVE-1 (Receptor HA nacházející se na endotelu lymfatických cév)
- HARE (hyaluronový receptor pro endocytózu)
- Layilin
- TLR4 (Receptor indukující expresi genů zánětlivé reakce)

Z těchto typů je nejprostudovanější a nejobvyklejší CD44 a RHAMM. Předpokládá se, že oba zasahují do procesu migrace zánětlivých a nádorových buněk a ovlivňují jejich invazivitu, adhezivitu a proliferaci [1].

Pojmenování CD44 z roku 1986 pochází ze zkratky (Klaster rozlišení, CD) definované na mezinárodním Workshopu „Human Leucocyte Differentiation Antigens“ [16].

CD44 je membránová molekula I. typu, která se může vyskytovat v několika různých variantách (obr.6). Bylo prokázáno, že receptor CD44 vytváří nejméně 17 různých izoform. Nomenklatura izoform se řídí podle exonů.

Obecně se označují jako CD44 $v_n$ , kde  $v$  značí variantu,  $n$  koresponduje s variantami přítomných exonů (Př.: CD44 $v_{7-10}$  je označení varianty obsahující exony 7, 8, 9 a 10). Velikost těchto proteinů se může pohybovat mezi ~75-250 KDa [17].



Obrázek č.6-Vyobrazení různých izoforem receptoru CD44 [17]

HA-receptor je trans-membránový glykoprotein, na který se kompetitivně vážou polymery kyseliny hyaluronové. Vyskytuje se na leukocytech, endotelu, parenchymových a epiteliálních buňkách. Receptor CD44 funguje i jako mediátor vyžívání, adheze a přestupu aktivovaných T-lymfocytů z krevního řečiště k místu zánětu [1]. T-lymfocyty jsou buňky imunitního systému, které se podílejí na likvidaci cizorodého materiálu a na řízení imunitních dějů. Vznikají v kostní dřeni bez konkrétního úkolu, jejich učení probíhá později v brzlíku [18]. CD44 koordinuje signály určené buněčnému přežívání a buněčnou smrt. V podobě malého proteoglykanu interkalovaného v membráně, může sloužit k zadržení, aktivaci a vystavení bazických růstových faktorů [17].

Ikdyž je hyaluronan extracelulární glykosaminoglykan, působením pro-zánětlivých cytokinů, které se postupně uvolňují v místě zánětu, infekce nebo poranění, se exprese HA indukuje i na povrchu endoteliálních buněk přilehlých cév, ke kterým je HA přichycena receptorem CD44 [1].

Kyselina hyaluronová shromažďuje leukocyty, bílé krvinky v místě zánětu a tím napomáhá k rychlejšímu hojení postiženého místa. Receptor RHAMM představuje molekulu CD168. Jeho velikost se může pohybovat mezi ~ 59 až 80 KDa v závislosti na typu buňky [17].

Na rozdíl od receptoru CD44, se u něj nejedná o trans-membránový protein, tzn. že, může poměrně snadno interagovat s okolními glykosaminoglykany. Mimo to urychluje některé fáze buněčného cyklu a tvorbu nových cév. Kromě popsanych účinků HA-receptoru, byl zaznamenán příznivý vliv i samotné HA v podobě imunomodulačního účinku, představující velmi důležitý mechanismus již při samotném zahájení imunitní reakce [1].

#### 1.4.2 Oftalmologie

Kyselina hyaluronová je výrazně zastoupena ve sklivci oka, odkud je odvozen i její název (hyalos = sklivec). Společně s kolagenními vlákny tvoří kostru sklivce, kde je uchovávána voda, ta obsahuje HA v nižších koncentracích.

Naopak souvislý film vytváří kyselina hyaluronová na povrchu endotelu rohovky [19]. Na schopnosti vázat nebo zadržovat vodu, na hydratačních a viskoelastických vlastnostech je založen fyziologický účinek kyseliny hyaluronové. V oční chirurgii je pro viskoelastické sloučeniny, kterou je HA, hlavní oblastí aplikace katarová chirurgie. Během chirurgického zákroku nahrazuje nitrooční tekutinu v předním segmentu oka vstříkovaní HA, vytváří protitlak ke sklivci a udržuje tvar přední komory. Použitím kyseliny hyaluronové se zprůhlední prostor, zlepší se vizualizace nitrooční struktury a chrání endotel rohovky [6].

Mimo toho zvyšují hyaluronové roztoky viskozitu očních kapek kam se přidávají a pomáhají obnovovat oční tkáň [6]. Hladina kyseliny hyaluronové v lidském séru kolísá mezi 10 až 100  $\mu\text{l/l}$ . Naopak synoviální tekutina obsahuje zhruba 3g/l [19].

Lze tedy říci, že v oční chirurgii se kyselina hyaluronová používá zejména k ochraně rohovky před ztrátou buněk tím, že se vytvoří tekutá ochranná vrstva, která udržuje velikost a tvar přední komory a správné polohy očních tkání. Slouží také k omezení zánětlivých procesů neutralizováním kladných nábojů na nástrojích a implantátech. Je možné ji využít i ke zmírnění pooperačního edému rohovky.

Při transplantaci rohovky chrání kyselina hyaluronová endotel dárce a usnadňuje adaptaci transplantátu. Jako jediný známý vedlejší účinek použití kyseliny hyaluronové v chirurgii je zvýšení nitroočního tlaku narušením odtoku nitrooční tekutiny.



Proto by měla být takto viskoelastická sloučenina po ukončení operace dokonale odstraněna [19]. Aplikace očních léků je problematická.

Krátký rezidenční čas způsobený mrkáním a slzením s malou nízkou propustností rohovky způsobují špatnou dostupnost používaných léčiv [19]. Vodní oční kapky mají tu nevýhodu, že více jak 75% aplikovaného roztoku se ztrácí v důsledku odvodnění, ke kterému dochází během prvních 2 minut po aplikaci. Proto se do očního prostoru přidávají polymery zvyšující viskozitu, které dodatečně zlepšují stupeň, do jakého se daná látka absorbuje do živého orgánu. Gurny a kol. prokázali, že přírodní HA roztoky mají vynikající schopnost prodloužení tohoto retenčního času pilokarpinu.

Pilokarpin je látka, která se používá v očních kapkách k léčbě glaukomu, zužuje zornici a snižuje nitrooční tlak [20]. Bylo zjištěno že, HA vzájemně interaguje přímo s buněčnou membránou rohovkové tkáně. Tyto závěry potvrdili i Ludwig a kol. a poukázali i nato, že vysokomolekulární HA prodlužuje setrvání fluoresceinu v prekerneální části lidského oka. Porovnáním HA roztoků s hydroxyetylcelulósovými roztoky zjistili, že obě polymerní sloučeniny významně zlepšují setrvání fluoresceinu v slzném filmu [6].

Slzný film je vrstva, která v lidském oku lomí světlo nejvíce. Jeho narušení tak může snížit zrakovou ostrost během dne a následně způsobit světloplachost. V pokročilých stádiích syndromu suchého oka může dojít i ke ztrátě zraku. Slzný film je trojvrstevná struktura složená z vodné vrstvy, ležící mezi tenkou mukózní a povrchovou lipidovou vrstvou [19]. Durrani a kolektiv potvrdili, že vysokomolekulární ( $3,2 \times 10^5$  Da) HA zlepšuje stupeň absorpce pilocarpinu mnohem více než nízkomolekulární HA ( $1,34 \times 10^5$  Da) [3].

Zvýšení prekerneálního rezidenčního času a propustnosti rohovky je možné docílit mukoadhezivními sloučeninami (viskózní hydrogely HA, deriváty HA- hylany). Kyselina hyaluronová stabilizuje oční film a tím se zvyšuje dostupnost používaných očních léků.

Studie, které se zabývají účinkem HA na přístupnost léků jsou stále omezeny na *in vitro* a *in vivo* studie, zejména u králíků. Mezi nejstudovanější léky kde lze HA použít jako matrici patří gentamycin, pilokarpin a trombin [19].

Kyselina hyaluronová má v oblastech oftalmologie vysoké uplatnění, zejména díky vynikajících fyzikálně-chemických vlastnostem a dobré biokompatibilitě. Zvláště významné je její využití v oční chirurgii a při léčbě syndromu suchého oka. V tabulce 1. je uveden celkový přehled jednotlivých aplikací HA v oftalmologii.

Tabulka 1- Jednotlivé aplikace kyseliny hyaluronové v oftalmologii

---

<ul style="list-style-type: none"><li>• všeobecná chirurgie</li></ul> <p>-ochrana epitelu</p> <p>- neutralizace kladných nábojů</p>
<ul style="list-style-type: none"><li>• kataraktová chirurgie</li></ul> <p>- náhrada nitrooční tekutiny</p> <p>- stabilizace přední komory oka</p>
<ul style="list-style-type: none"><li>• transplantace rohovky</li></ul> <p>- ochrana epitelu a endotelu dárce</p> <p>- polštář pro umístění rohovky dárce</p>
<ul style="list-style-type: none"><li>• penetrující oční úraz</li></ul> <p>- oddělení tkání</p>
<ul style="list-style-type: none"><li>• glaukomová chirurgie</li></ul> <p>- omezení ztráty endotelových buněk</p>
<ul style="list-style-type: none"><li>• poleptání chemikáliemi</li></ul> <p>- omezení jizvení</p> <p>- podpora regenerace epitelu</p>
<ul style="list-style-type: none"><li>• farmaceutická technologie</li></ul> <p>- vzrůst dostupnosti a biokompatibility léků</p> <p>- prevence vedlejších účinků způsobených konzervačními činidly</p>
<ul style="list-style-type: none"><li>• syndrom suchého oka</li></ul> <p>- prevence zánětů, stimulace jejich hojení</p> <p>- stabilizace slzného filmu</p> <p>- ochrana epitelu rohovky</p>

---

### 1.4.3 Aplikace v ortopedii

Účinky kyseliny hyaluronové v oblasti ortopedie se využívají již několik desetiletí. Kyselina hyaluronová hraje důležitou roli ve vývoji chrupavky, synoviální tekutiny a u regenerací šlach (Toole, 1997, 2001). Ve vysoké koncentraci lze HA najít v extracelulární matici všech pojivových tkáních. Je jednou ze složek mezibuněčné hmoty chrupavky a tvoří nejvýznamnější složku synoviální tekutiny, která jí obsahuje zhruba 3g/l. V kolením kloubu funguje jako lubrikant a především jako tlumič nárazů [4]. Kyselina hyaluronová nevykazuje významné vedlejší účinky. Potlačuje zánět, urychluje hojivé procesy edémů a hematomů. Podílí se na tvorbě fibrinové sítě, integrací mezi fibrinový prostor matrix čímž urychluje reparační pochody [21]. Dá se říci, že kyselina hyaluronová s vyšší molekulovou hmotností prodlužuje biologický poločas eliminace i rezidenční čas v synoviální tekutině. Farmakodynamický účinek je však u nižších molekulových hmotností (< 1 000 000 daltonů) mnohem významnější v důsledku lepšího pronikání do synoviální tekutiny. Klinická účinnost přípravků na bázi hyaluronanu byla hodnocena ve více než 70 klinických studiích, publikováno bylo již téměř 30 přehledových článků [22].

Zánětlivé a degenerativní kloubní onemocnění, hlavně osteoartritída, jsou citlivé na změny synoviální tekutiny, které se projevuje snížením koncentrace a množstvím molekul vysokomolekulární HA vycpováním. Tyto změny snižují viskoelasticitu synoviální tekutiny a tím i její schopnost chránit kloub. Molekulová hmotnost kyseliny hyaluronové se u zdravého dospělého jedince pohybuje v rozmezí 4 až  $5 \times 10^6$  Da a rozsah její koncentrace v synoviální tekutině je 2,5 až 4mg/ml, což hrubě odpovídá celkovému množství HA, zdravého jedince 4 až 8 mg u kterého je celkový objem synoviální tekutiny 0,5 až 4ml.

Mezi další role použití kyseliny hyaluronové u osteoartritídy je analgetický efekt, který interaguje s nocireceptory citlivých na bolest, podpora tvorby endogenní kyseliny hyaluronové a dalších protizánětlivých účinků [22]. Nocireceptory, aferentní volná nervová vlákna, která reagují na mechanické, chemické i termické podněty (stimuly). U lidí existují nocireceptory prakticky ve všech tkáních. Většinou má ochranný (protektivní) charakter, brání dalšímu poškození [23].

#### 1.4.4 Účinek antiseptik při hojení ran

V dnešní době se při hojení rozsáhlých a chronických ran výhradně používají systémy, které udrží v ráně trvale vlhké prostředí. V otevřené ráně, která je vystavená přístupu vzduchu, nastává dehydratace a tvoří se strup. Proto se hojící procesy přesouvají do hlubších tkání a rekonvalescence je delší [24]. Rozsáhlé akutní rány jsou infikovány. U ran chronických je nutné předpokládat bakteriální kontaminaci a určitý podíl nekrot.  $\beta$ -hemolytické streptokoky nebo pseudomonády, jsou potencionálními patogeny a jejich počet se reguluje vhodnými antiseptiky. Proto by kromě samotného antimikrobiálního účinku měla mít antiseptika vliv na hojivé pochody v ráně. Nejpoužívanějšími materiály jsou u moderních bandáží klasické textilní polymery. Například polyester, polypropylen, polyamid, viskóza, bavlna. Následují vysoce-absorpční polyuretanové pěny, hydrokoloidy (akryláty, algináty, karboxymethylcelulosa) a hydrogely (taktéž algináty, karboxymethylcelulosa atd.). Pro tyto materiály je typická schopnost vytvořit vlhké prostředí, které je příznivé pro hojení rány. Jejich gelová struktura jim brání v případném vysychání. Tyto materiály jsou příznivé na dotek a současně dostatečně flexibilní. Jsou dostatečně inertní a nevyvolávají žádné alergické reakce [24].

Při hojení pooperačních i chronických ran je čteně využívána kyselina hyaluronová. Kromě pasivní role, kdy udržuje příznivé vlhké prostředí díky svým unikátním hygroskopickým, reologickým a viskoelastickým vlastnostem, vstupuje do procesu hojení také aktivně, a komplexně interaguje s buňkami a komponentami extracelulární matrix. Aktivuje keratinocyty k produkty cytokinů, které jsou aktivátory a chemoatraktanty pro řadu buněk bílé řady a které urychlují samovolné vyčištění rány a zahájení tvorby granulační tkáně. V současné době je hyaluronan součástí jednak gelu Ialugen s obsahem sulfadiazinu stříbra nebo produktu Hyiodinu vyráběný firmou CPN, ve kterém je antiseptickou složkou tzv. trijodid [24].

#### 1.4.5 Využití Kyseliny hyaluronové v kosmetice

Viskoelastické vlastností a vynikající biokompatibilita zaručují využití kyseliny hyaluronové v kosmetickém odvětví. Používání kosmetických produktů s obsahem HA na kůži dokazuje, že zvlhčuje a obnovuje pružnost pokožky, ačkoli neexistuje žádný přesný vědecký důkaz, který by zdůvodnil tento její přínos. Kosmetické a opalovací krémy s HA by měly být schopné chránit pokožku proti ultrafialové dávce záření, vlivem kterého dochází k odsávání vlastnosti HA volnými radikály. Kyselina hyaluronová ve vestabilizované formě ale i v kombinaci s dalšími polymery se používá jako komerční kožní plnivo v kosmetické chirurgii. Je prokázáno, že vstříkáním takových produktů do kožní vrstvy může zredukovat obličejové linky a vrásky dlouhodobě s minimálními vedlejšími účinky a s lepší snesitelností ve srovnání s kolagenem. Jako hlavní vedlejší účinek se může projevit alergická reakce způsobená kontaminací bakteriemi, proteiny použité kyseliny hyaluronové. Lin a kol. se zabývali možností použití HA jako alternativu implantátu místo silikonového gelu v plastické chirurgii a zjistili, že použití hyaluronanu do struktury implantovaného orgánu bylo viditelně lepší než používané silikonové gely a solné implantáty. Nevyskytly se ani žádné *in vivo* vedlejší efekty rok po implantaci [11].

## 2 KVARTÉRNÍ AMONIOVÉ SOLI

Jedná se o syntetické deriváty amonium chloridu, ve kterém jsou čtyři vodíky kationtu amonia nahrazeny organickými skupinami. Nejméně jedna z těchto organických skupin představuje zbytek dlouhého alifatického řetězce. Tyto soli se často označují jako kationická smáčedla, protože jejich vodné roztoky snižují povrchové napětí. Nejznámější sloučeninou tohoto typu je laurylbenzyl-dimethylamonium chlorid, tzv. benzalkonium chlorid. Patří sem i skupina sloučenin, v nichž je atom dusíku v heterocyklickém kruhu, např. cetylpyridinium chlorid. Protože jsou nabitě kladně, jejich sloučeniny silně absorbují záporně nabitě povrchy nečistot a usazenin. Kvartérní amoniové soli známe jako povrchově aktivní látky používané jako antibakteriální a proti plísňové dezinfekční prostředky. Představují důležitou skupinu průmyslových chemikálií s širokým spektrem komerčního a spotřebitelského využití. Podle studií, provedených chemickými společnostmi, stoupá celková spotřeba kationických a anionických tenzidů. Většina těchto sloučenin se vyrábí jako chloridy, někdy také jako bromidy, jodidy a nitráty. QAS jsou ve spotřební sféře využívány stejně tak hojně jako biocidy (látka ničící živé organismy), emulgátory, zvlhčující činidla a impregnační přísady. V domácnosti pak spíše jako avivážní prostředky, různé vlasové přípravky, pesticidy, lékařské a veterinární výrobky [25].

### 2.1 Tenzidy a detergenty

Amfifilní látky jsou látky obsahující alespoň jednu polární hydrofilní skupinu (*head*) s vysokou afinitou vůči vodě a jednu nepolární hydrofobní část v podobě alkylového řetězce (*tails*,) pro kterou jsou naopak typické odpudivé interakce vůči vodě. Tato netypická struktura amfifilních sloučenin zaručuje celou řadu pozoruhodných vlastností jejich vodných a nevodných roztoků. Významným makroskopickým projevem přítomnosti těchto sloučenin je výsledné snížení povrchového napětí roztoků, podle které amfifilní látky dostaly název povrchově aktivní látky, tenzidy nebo surfaktanty [25].

Tenzid „povrchově aktivní látka“ je organická látka, která se může vyskytovat na fázovém rozhraní a tím snižovat mezifázovou energii soustavy už při nízké koncentraci.

Detergent je směs tenzidů a dalších látek, která má detergenční vlastnosti tzn. schopnost převést nečistotu z pevného povrchu do objemové fáze roztoku [26].

Saponát je starší název pro syntetické tenzidy. *Syndet* je zkratka názvu syntetický detergent, která se začala používat pro detergenty, které obsahovaly syntetické tenzidy, aby se tyto detergenty odlišily od těch, které obsahovaly jako tenzid sodnou sůl mastných kyselin-mýdlo (obvykle C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>).

Podle charakteru polární hlavy (kation, anion, obojetný ion) se tenzidy rozdělují:

- a. tenzidy Ionické,
  1. *anionické*
  2. *kationické*
  3. *amfoterní*
- b. tenzidy Neionické
  1. *oxyethylenáty*
  2. *polyhydroxysloučeniny*.

Tenzidy používané v praxi pro výrobu detergentů jsou tvořeny směsí mnoha organických i anorganických sloučenin. Všechny typy povrchově aktivních látek mají účinný vliv na fyziologii a životaschopnost mikroorganismů [27].

- **Anionické tenzidy**

Nejrozšířenějším anionickým tenzidem je poměrně dobře biologicky rozložitelný lineární *natrium-sek-alkylbenzensulfonát*, (alkyl C<sub>12</sub>-C<sub>15</sub>, střední délka alkylu je nejčastěji C<sub>12</sub>) LAS, který nahradil do poloviny šedesátých let používaný a velmi špatně biologicky rozložitelný rozvětvený alkylbenzensulfonát (alkyl tvořil tetramer propylenu). Požívá se jako základní tenzid pro výrobu práškových a kapalných pracích prostředků a kapalných mycích prostředků. Dalším zástupcem anionických tenzidů jsou  $\alpha$ -olefinsulfonáty (AOS). Používají se především do kapalných mycích prostředků. Parafinsulfonáty, přesněji sekundární alkansulfonáty. Mají sice nízkou detergenční účinnost, ale zato výborný smáčecí účinek, a proto mezi jejich hlavní oblast použití patří kapalná prací, mycí a smáčecí prostředky. *Natrium-alkylsulfáty* (AS), lze jako další tenzidy použít v práškových pracích prostředcích, zejména pak v kapalných mycích a čisticích prostředcích. *Natrium-alkylpolyglykolsulfáty* mají podobnou chemickou strukturu. Používají se v malém množství do práškových pracích prostředků, ale mezi hlavní oblast jejich použití patří kapalná mycí prostředky (pro ruční mytí nádobí).

Další aplikace použití: kosmetické prostředky, vlasové a tělové šampony, tekutá mýdla a koupelové pěny. Ve většině kosmetických mycích prostředků najdeme *natrium*- nebo méně často *amonium-alkylpolyglykolsulfáty*. Nejstarším a nejdéle používaným anionickým tenzidem je mýdlo, tj. sodná sůl vyšších karboxylových kyselin ( $C_{10}$ - $C_{22}$ ). Tento tenzid tvoří majoritní část receptury toaletních i ostatních kusových mýdel ( $C_{10}$ - $C_{18}$ ) [26]. Mýdlo je obsaženo jako vedlejší tenzid v práškových pracích prostředcích, kde kromě toho působí i jako odpeňovač ( $C_{18}$ - $C_{22}$ ). Mezi další anionické tenzidy patří sulfosukcináty, isothionáty, tauridy a sarkosináty. Anionické tenzidy mají výbornou smáčecí schopnost a proto se používají jako čisticí prostředky. Při použití vyšších koncentrací mohou poškodit buněčné membrány a způsobit tak denaturaci bílkovin a působit biocidně. Dobrá smáčivost spolu s poškozováním membrán zvyšuje účinnost ostatních desinfekčních činidel [27]. Tou nejvýznamnější aplikací anionický tenzidů je dezinfekční aplikace. Princip tohoto účinku lze popsat jako solubilizaci, při které je odstraněna vrstvička špíny starých buněk z epitelu na povrchu lidské pokožky [24].

- **Kationické tenzidy**

Kationické tenzidy obsažené v avivážních prostředcích vykazují kromě avivážního účinku i významný mikrobicidní efekt. Téměř u všech kationických tenzidů je kationtem *kvartérní dusíkový atom*, tj. tyto kationické tenzidy jsou kvartérní amoniové soli, a to chloridy nebo methosulfáty. Soli alkylaminů (např.  $C_{12}$ - $C_{18}$ ) jsou rovněž kationickými tenzidy, ale pouze v kyselé oblasti, jelikož při středních a vyšších hodnotách pH ztrácejí kationický charakter (sůl aminu přechází na amin, který se vyloučí z roztoku) [26]. Kvartérní amoniové soli mají většinou jeden až tři delší alkyly. Bylo zjištěno, že optimální avivážní efekt mají kationické tenzidy se dvěma alkyly *cis* a dvěma krátkými alkyly (methyl), např. *dimethyldis-tearylamonium-chlorid*.

Pro zlepšení biologické rozložitelnosti byly tyto klasické kvartérní amoniové soli nahrazeny v recepturách avivážních prostředků tzv. „esterquaty“, jejichž typickým zástupcem je *hydroxyethyl- methyl-bis (stearoyloxyethyl)amonium-methosulfát*. Koncentrace methosulfátu je v běžných, zvláště levnějších prostředcích okolo 5 %, v koncentrátech až 20 %.

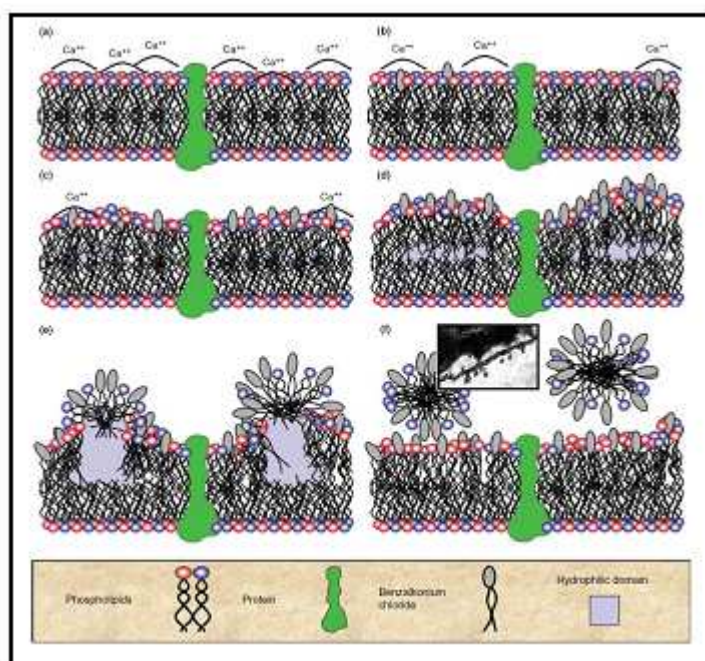
Kationické tenzidy se používají do kondicionálních přípravků pro vlasovou kosmetiku. Jsou to např. kvartérní amoniové soli, jejichž jeden substituent tvoří peptid, např. částečně hydrolyzovaný pšeničný lepek.



Strukturní variabilita kationických tenzidů je vyšší než u anionických tenzidů, např. kvarterní soli heterocyklů, imidazolinu, pyridinu. Podle konkrétní struktury je můžeme rozdělit do několika tříd.

1. monokvarterní amoniové soli (cetrimid, benzalkonium chlorid-BAC)
2. bikvarterní soli
3. biguanidiny (chlorhexidin, hibitan, *Barquat*)
4. polymerní biguanidiny (PHMB, *Vantocil*, *Cosmocil*).

U všech jmenovitých typů se jejich působící účinek řídí velmi podobným mechanismem. Kladně nabitě molekuly se pevně navážou na buněčné stěny a membrány bakterií s opačným záporným nábojem, jehož nositelem jsou teichová kyselina a polysacharidy buněčné stěny u Gram-pozitivních a lipopolysacharidy buněčné stěny u Gram-negativních bakterií. Navázáním amfoterního surfaktantu dojde k ovlivnění permeability těchto buněčných struktur a zániku buňky. Tento mechanismus působení je vyobrazený na obr.7 [24].



Obrázek č.7-reakční mechanismus kvartérních amoniových sloučenin [24].

Anionické tenzidy nelze kombinovat v recepturách s kationickými, protože se vzájemně srážejí za vzniku nerozpustného aglomerátu. Lze zkombinovat jen ty typy, které mají v molekule kromě ionické části i neionickou část, která zajišťuje rozpustnost vzniklého aglomerátu ve vodě [26].

U kationaktivních tenzidů je smáčivost mnohem horší a nejsou proto vhodné jako mycí prostředky. Naopak jejich výhodou je vysoká biocidní schopnost už při malých koncentracích.

Vazbou na membrány způsobují jejich neprůchodnost a také fungují jako inhibitory enzymů. Při použití vyšších koncentracích, podobně jako anionaktivní tenzidy, poškozují membrány. Při vzájemném smíchání kationaktivních a anionaktivních tenzidů se vzájemně vážou a jejich účinnost se tím sníží [27].

- **Amfoterní tenzidy**

Amfoterní tenzidy obsahují v ne-disociovatelné části své molekuly anion i kation, čímž je dána jejich unikátní vlastnost kombinovat je v recepturách s kationickými i s anionickými tenzidy. Nepostradatelnou součástí dnešních šamponů je 1-(3-lauroylaminopropyl)-1,1-dimethylacetobetain. Kombinace alkylnopolglykolsulfátu s betainem tvoří tenzidový základ téměř všech kosmetických mycích prostředků, tzn. vlasových i tělových šamponů, tekutých mýdel a koupelových pěn. Kromě toho se tato kombinace tenzidů používá jako hlavní nebo vedlejší tenzidový systém v mycích prostředcích na nádobí. Betain nejen že snižuje dermální dráždivost a stabilizuje pěnivost, ale působí i jako regulátor viskozity. Tato vlastnost, v kombinaci se zahušňováním chloridem sodným umožňuje vyrábět přípravky o poměrně nízkém obsahu tenzidů, které ale díky vysoké viskozitě vypadají jako koncentráty [26].

### 2.1.1 Mechanismus rozpouštění tenzidů

Při rozpouštění tenzidů ve vodě vznikají při překročení tzv. kritické micelární koncentrace (*critical micelle concentratio*) CMC spontánně agregáty, jejichž charakter, velikost a tvar ovlivňuje celá řada okolností. Tou nejvýznamnější je vliv struktury amfifilu. Zanedbat nelze vliv složení systému ani teploty.

Další nezbytnou podmínkou vzniku micel z aniotových či kationtových tenzidů je, aby teplota systému byla vyšší než tzv. Krafftova teplota (Krafftův bod). Na křivce závislosti pozorované rozpustnosti amfifilu na teplotě se počátek tvorby agregátů projeví zřetelným zlomem (Krafftův bod).

Zatímco pod Krafftovou teplotou je rozpustnost tenzidu ve vodě nepatrná, nad touto teplotou pozorovaná rozpustnost amfifilu ve vodě v důsledku tvorby agregátů výrazně vzrůstá. Krafftova teplota odráží rozdíly mezi energií tenzidu v krystalickém stavu a ve stavu agregátů v roztoku. Proto závisí významně na struktuře tenzidu, zejména na počtu, délce a větvení hydrofobních alkylových řetězců, na přítomnosti dalších polárních segmentů v molekule atd. U neiontových tenzidů je analogií Krafftovy teploty tzv. bod zákalu (*cloud point*) [25].

Hnací silou agregace jsou tzv. hydrofobní interakce. Jejich podstatou je poměrně značný vzrůst entropie (zhruba okolo  $140 \text{ J K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) při přechodu tenzidu z monomerního do agregovaného stavu.

Entropický nárůst je způsoben desolvatací hydrofobních alkylových řetězců. Z hlediska enthalpie může být agregace tenzidů procesem exotermním (většinou v případě iontových tenzidů) nebo endotermním (většinou v případě neiontových tenzidů). Enthalpická změna se při agregaci pohybuje okolo  $10 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Výsledný typ vznikajícího agregátu závisí na vzájemném poměru velikosti a tvaru hydrofilní a hydrofobní části molekuly tenzidu, který se kvantitativně vyjadřuje bezrozměrnou veličinou nazvané kritický „sbalovací“ parametr (*critical packing parametr*) *CPP* (Obr.7) určený dle vztahu (2.) [25,28].

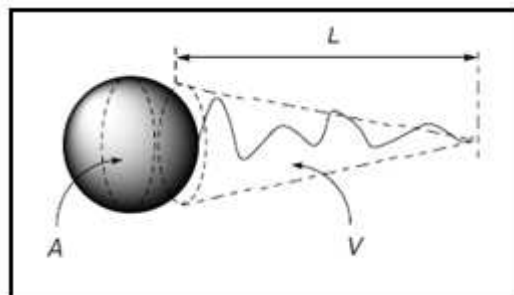
$$CPP = \frac{V}{A \cdot L} \quad (2.)$$

kde,

V ... objem, který v agregátu zaujímá hydrofobní alkylový řetězec

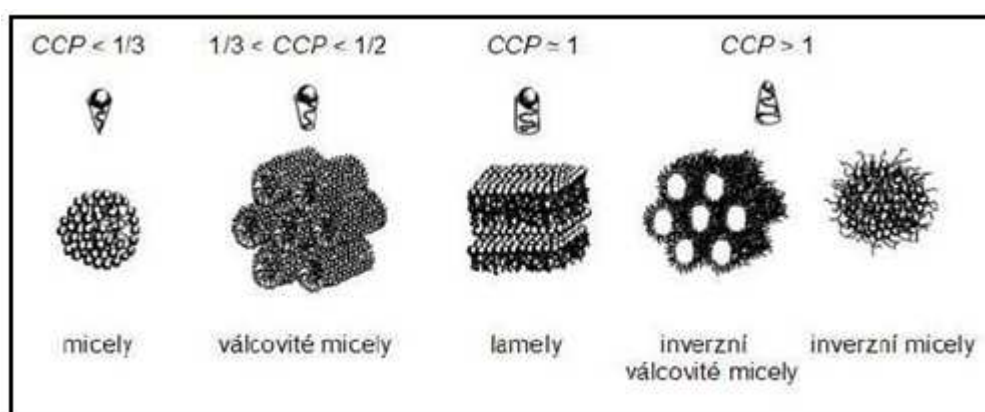
A ... plocha, kterou na fázovém rozhraní agregátu a objemové fáze zaujímá polární hlava tenzidu

L ... efektivní délka alkylového řetězce



Obrázek č.8 - Kritický sbalovací parametr

V závislosti na hodnotě  $CPP$  tak mohou vznikat sférické (elipsoidní) micely, válcovité micely uspořádané do hexagonální fáze (*rod-like micelles*), lamelární fáze, reverzní hexagonální fáze a reverzní micely (obr.8) [25].



Obrázek č.9 – Jednotlivé typy vznikajících agregátů

## 2.2 Kvarterní amoniové soli – struktura, vlastnosti

Kvartérní amoniové složky a jejich kationové detergenty jsou syntetickými deriváty amonium chloridu [29]. Tyto soli se široce využívají jako povrchově aktivní látky. Byly syntetizovány reakcemi aminy případně amidy s halogenovým alkylem.

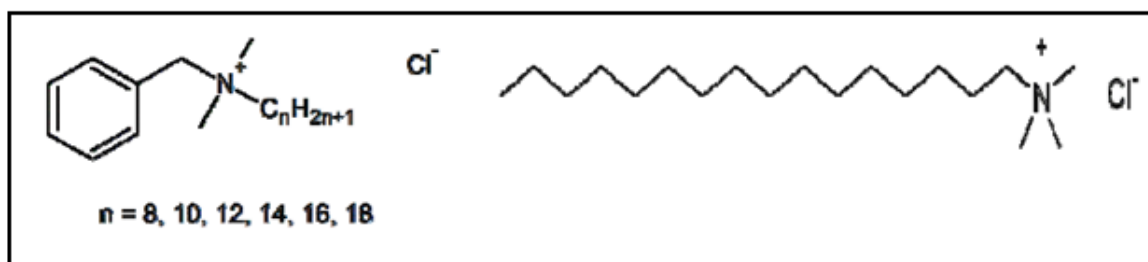
Wang. a kol. definovali metodu syntézy kvartérních amoniových solí řízenou reakcí terciálními aminy s alkoholy přes kyselý zeolit (vodnatý hlinitokřemičitan-Ca, Na, K) jako je H-Y a H-ZSM 5. Ve většině případů, kvartérní amoniové soli jako jsou kvartérní amonium fluorid, dusičnan a uhličitan nemohou být syntetizovány přímo zmíněnými metodami. V těchto případech je proces výměny anionu nezbytný.

Bylo by vhodné najít metodu, která by různé kvartérní amoniové soli s různými aniony mohla syntetizovat přímo jednostupňovou reakcí [30].

Kvartérní amoniové směsi mohou způsobit toxicitu u všech způsobů vystavení jako je inhalace, polknutí, přes kůži i zavoděním tělních dutin. U ředěných roztoků těchto solí, je riziko poloviční. Koncentrované roztoky QAS jsou leptavé a mohou způsobit popáleniny pokožky a sliznice.

Mohou vykazovat systémovou toxicitu díky šípovému jedu, který obsahují. Mohou způsobit i alergické reakce. Kvartérní amoniové soli vykazují různé fyzikální, chemické a biologické vlastnosti a nejvíce se používají s vodou mísitelných roztoků [29].

Kvartérní amoniové směsi (QAS) jsou tvořeny strukturou  $\text{NR}_1\text{R}_2\text{R}_3\text{R}_4^+ \text{X}^-$  s **R**, který znázorňuje uhlíkové atomy, jednoduché alkylové skupiny nebo alkylové skupiny substituované s dalšími funkčními skupinami, X značí aniont. Obr.č.10, zobrazuje benzalkonium chlorid a cetrimonium chlorid jakožto zástupce QAS. V roztoku se kvartérní amoniový kationt mění v závislosti na pH rozpouštědla ve kterém se vyskytuje. Je pro ně typická schopnost snižovat povrchové napětí vody. QAS patří do široké skupiny povrchově aktivních látek, které běžně nazýváme smáčedla, detergenty, emulgátory nebo rozpouštědla. Povrchově aktivní látky se rozdělují na aniontové tenzidy kyselé povahy a kationaktivní tenzidy, kde kvartérní amoniové soli představují ty nejdůležitější [31].



Obrázek č. 10 – Základní struktura benzalkonium a cetrimonium chloridu

První zmínka o antimikrobiologické aktivitě QAS byla uveřejněna v roce 1916, ale využití této skupiny chemických látek nebylo realizováno dříve než po roce 1930. V té době se

podářilo zjistit že, kvartérní amoniové soli, jejichž řetězec obsahuje nejméně čtyři radikály nebo substituované alifatické skupiny s počtem uhlíků C<sub>8</sub>-C<sub>18</sub> vykazují bakteriocidní účinek [31].

### 2.2.1 Hydrofobicita a kritická micelární koncentrace QAS

V řadě uskupených povrchově aktivních látek s podobnou strukturou roste schopnost micelizace a kritická micelární koncentrace ve vodných roztocích celkově klesá s rostoucím hydrofobním charakterem amfifilních tenzidů.

Proto v homologické řadě ionických tenzidů s povrchově aktivními ionty složených z jednoho nerozvětveného alkylového řetězce a s koncovou ionickou skupinou, hodnota kritické micelární koncentrace (*cmc*) pravidelně klesá s rostoucím počtem uhlíkových atomů v alkylovém řetězci. Nejméně v rozmezí C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub>. Empiricky získaný vztah mezi *cmc* a počtem uhlíkových atomů (*m*) nevazebného alkylového řetězce může být vyjádřena touto logaritmickou rovnicí (3.),

$$\log cmc = A - B \cdot m \quad (3.)$$

Kde,

A,B ... konstanty

*cmc* ... kritická micelární koncentrace

*m* ... počet uhlíkových atomů

Rovnice (3.), případně její variace, může být použita v homologické řadě micelizujících QAS jako alkyltrimethylamonium chloridy nebo bromidy zastupující kationické tenzidy s jedním hydrofobním alkylovým řetězcem (CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m-1</sub>-). Budeme-li však uvažovat kationické tenzidy s rozdílnější strukturou, případně tenzidy se dvěma hydrofobními řetězci, nebude tato rovnice (3.) dostačující.

Kationty některých zajímavých QAS jsou charakterizovány dvěma řetězci spojeným kladně nabitým atomem dusíku. Pro benzalkonium chlorid a bromid, benzethonium chlorid a domiphen bromid jsou charakteristické dva nepravidelné hydrofobní řetězce spojené jedním

atomem čtyřvazného dusíku. Příslušné soli jsou navíc známé jako antibakteriostatikum. Kromě toho je benzethonium chlorid typický jako protirakovinné činidlo. Tyto kationické tenzidy se dvěma alkylovými řetězci jsou také proslulé jejich schopností tvořit opačné kationtové micely v nevodných roztocích, stejně tak dobře jako různé koloidní mikroemulze.

Hydrofobicita ovlivňuje další důležité charakteristiky těchto kationických tenzidů s jedním ale i se dvěma alkylovými řetězci, jako je například uskupení složených micel, iontových párů a sorpci [32].

### 2.2.2 Antibakteriální efekt QAS

Kvartérní amoniové sloučeniny vykazují antibakteriální schopnost vůči široké řadě mikroorganismů včetně vegetativních bakterií, kvasinek, plísní, řas a virů. Dokážou utlumit klíčení bakteriálních sporů a růst vegetativních bakterií, plísní atd.

Některé rody bakterií (zejména gram-pozitivní) mají schopnost vytvářet za nepříznivých podmínek odolné útvary, tzv. **spory**. Spora je klidové stádium bakterie s velmi vysokou odolností vůči nepříznivým podmínkám. Má velice nízký obsah vody a je prakticky bez metabolismu. Spora může přežít v nevhodných podmínkách velmi dlouhou dobu. Naopak při vhodných podmínkách spora tzv. **vyklíčí** a přemění se zpět na původní bakterii, která roste a dělí se. Nejdéle známé, nejprozkoumanější a též technicky i lékařsky nejvýznamnější jsou spory rodů *Bacillus*, *Clostridium* a *Desulfotomaculum* [27].

QAC jsou amfoterní surfaktanty, obsahující jeden kvartérní dusík a současně alespoň jeden velký hydrofobní substituent. Jejich aktivita je přibližně parabolickou funkcí jejich lipofility, tj. délky *n*-alkylového řetězce [24]. Kvartérní amoniové sloučeniny působí tlumivě mnohem lépe vůči gram-pozitivním bakteriím a řasám než proti plísním [31]. Gram-pozitivní bakterie jsou bakterie, které mají na konci diagnostického barvení podle Gramovy metody pod mikroskopem modrofialovou barvu. Tento fakt je zapříčiněn vysokým obsahem peptidoglykanu v buněčné stěně a absencí vnější membrány a lipopolysacharidové vrstvy. Gram-pozitivní bakterie obsahují 10 či méně aminokyselin. Tvary jsou tyčinkové nebo kokální. Některé tyčinky jsou schopné pravého větvení. Rozmnožují se příčným dělením a tvoří termorezistentní endospory [32].

Vyšší koncentrace QAS jsou smrtelné pro lipofilické viry, plísně, řasy ale nikoli pro bakteriální zárodky, mykobakterie a hydrofilické viry. Tento smrtelný a tlumící vliv silně závisí na ekologických faktorech.

Efektivita však klesá s vysokou mikrobiální hustotou a za přítomnosti organického materiálu. Antimikrobiální účinek kvartérních amoniových solí vzrůstá s rostoucí teplotou, dobou expozice a s přítomností chelátorů (látky vázající kovy). Tato aktivita také závisí na složení n-alkylového řetězce a lipofilitě.

U gram-positivní bakterie a kvasinek vykazují optimální aktivitu řetězce QAS s  $n = 12-14$  uhlíků, kdežto u gram-negativní bakterie je to  $n = 14-16$  uhlíků. Směsi, u nichž se délka alkylového řetězce pohybuje v rozmezí  $n < 4$   $n > 18$  jsou prakticky neaktivní [31].

U kvartérních amoniových solí a chitinu, resp. chitosanu dochází při kontaktu s mikroorganismy ke změně metabolismu enzymů, což má za následek porušení buněčných stěn a destrukci buněk.

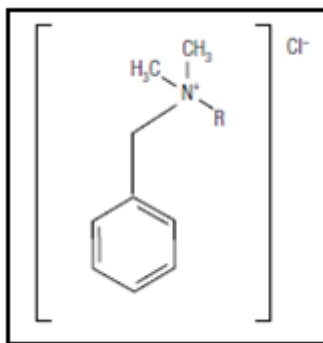
### 2.3 Benzalkonium chlorid

Benzalkonium chlorid je kvartérní amoniová sůl s antiseptickým účinkem, proto se často používá jako antiseptikum podobně jako kationické tenzidy. Obecný vzorec lze psát ve tvaru  $[C_6H_5CH_2N(CH_3)_2R]Cl$ , kde R je  $n-C_8H_{17} - n-C_{18}H_{37}$ . Chemickou strukturu BAC znázorňuje obr.č.11. Mechanismus působení kvartérních amoniových směsí se projevuje v souvislosti s jejich vlivem na cytoplazmatickou membránu, která zabezpečuje propustnost buňky. Největšího účinku lze dosáhnout u koncentrací 0,01-0,1%. Homology  $n-C_{12}$  a  $n-C_{14}$  v BAC, tvoří hlavní část alkylové skupiny. Obecně platí, že homolog  $n-C_{12}$  působí neúčinněji proti kvasinkám a houbám, a homolog  $n-C_{14}$  vůči gram-pozitivním bakteriím. Benzalkonium chlorid proti gram-pozitivní bakterii účinný není [34].

BAC, na bezvodou látku, obsahuje 95,0 % až 104,0 % alkyldenzyldimethylamoniumchloridů, počítaných jako  $C_{22}H_{40}ClN$ . Je to bílý případně nažloutlý prášek nebo nažloutlé želatinové kousky, které jsou hygroskopické, na dotyk mazlavé. Vodný roztok benzalkonia při třepání silně pění. Patří mezi velmi často používané konzervační látky [35].

Je snadno rozpustný ve vodě, v ethanolu a v acetonu. Špatně rozpustný v benzenu a nerozpustný v etheru. Může být přítomen v mnoha výrobcích kosmetického a farmaceutického průmyslu.





Obrázek č.11-Benzalkonium chlorid [34].

V léčivech se nejčastěji používá jako součást,

- oční kapky a masti,
- pastilky na bolesti v krku, kloktadla
- přípravky na popáleniny,
- přípravky na omývání ran,
- nosní kapky a spreje

Přidává se do kosmetických produktů, jako jsou krémové kondicionéry, pěnová tužidla a šampony. Na povrchu vlasů vytvoří tenkou vrstvu a vyhlazuje je.

Vlasy tak získávají lesk, pocit jemnosti a dobře se rozčesávají. Bývá součástí zubních past, ústní vody a deodorantů. Používá se také v roztocích pro čištění a uchovávání kontaktních čoček [35].

### 2.3.1 BAC v oftalmologii

Benzalkonium chlorid je nejčastěji využívaná konzervační látka očních kapek. Množství použitého BAC, určují nežádoucí účinky, které se mohou projevit na oku při užívání očních kapek. Celková toxicita této konzervační látky byla prokázána v řadě studií.

Jeho toxicita se projevuje zejména na epiteliálních buňkách na povrchu rohovky a spojivky kde následně způsobuje apoptózu buněk, neboli programovanou buněčnou smrt, která je zcela fyziologickým dějem [36]. Apoptóza je indukována naprosto cíleně a buňka je usmrcena a následně odstraněna takovým způsobem, že nedojde k poškození okolních buněk.

Je to tedy organizovaný a přísně regulovaný děj [37]. De Saint prokázal, že BAC je pro epiteliální buňky toxickým již při koncentraci 0,0001%. Navíc vysoké koncentrace této konzervační látky 0,1% způsobí okamžitou nekrózu buněk. Mezi další významné toxické projevy této konzervační látky lze zařadit toxicitu k endotelu rohovky, zkrácení potřebné doby k roztržení slzného filmu, vznik poruchy hematookulární bariéry, a možnost případného výskytu alergické reakce [36].

## 2.4 Použití QAS

QAS se hodně používaly do barev, k chemickému ošetření vody a textilií a ve výrobnách potravin pro jejich nízkou toxicitu a široký rozsah antibakteriálního působení. Kvarterní amoniové soli mají význačné bakteriocidní vlastnosti. Nejčastěji se prodávají ve formě prášků, mastí, želé, vodných roztoků a tinktur. Používají se v koncentracích od 0,01 do 0,1 % jako antiseptika, bakteriocida, fungicida, desodorantia, k desinfekci nádob, jídelních příborů, lékařských nástrojů, k desinfekci kůže, očních spojivek, sliznic a zřídka k výplachům dutých tělních orgánů. Lze je použít například k desinfekci půdy i vody, k ochraně vodních živočichů před různými patologickými mikroby a plísněmi, ale i k impregnaci textilií proti molům [29]. Kvarterní amoniové soli se používají k dezinfekci před patogenními bakteriemi, kvasinky a plísněmi v potravinových výrobnách [31].

### 3 STANOVENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC

Jedna z nejdůležitějších vlastností polymeru, která se uplatňuje při disperzi, je velikost částice a distribuce velikosti částic (PSD). Představuje jeden z nejpotřebnějších parametrů materiálové vědy. Tato vlastnost není významnou pouze při syntéze polymeru, během které je silně závislá na vstupním a výstupním radikálovém mechanismu a stabilitě dané disperze, ale také na chemických, fyzikálních a mechanických vlastnostech konečného produktu. Vlastnosti jako jsou rychlost rozpouštění, magnetické, elektrostatické a reologické vlastnosti, nepropustnost, lesk, emulzní stabilita a další, jsou mimo jiné závislé na průměrné velikosti částic a PSD. Měření velikosti částic a její distribuce představuje nejdůležitější úkol poslední doby, kdy je veškeré úsilí věnováno spolehlivému rozvoji, srozumitelnému, levnému a rozsáhlému využití a rozvoji metod měřících velikost částic. Všeobecný přehled o rozvoji různých technik velikosti částic a narůstajícího měření PSD lze najít v monografii Bartha a Provdery [38]. V současné době jsou ty nejdůležitější metody na trhu schopné a jejich silné i slabé stránky jsou snadno reprodukovatelné [39].

#### 3.1 Základní pojmy

Disperzi (disperzní soustavu) tvoří disperzní podíl, rozptýlený ve formě částic ve spojitém disperzním prostředí. Disperzní podíl může tvořit samostatnou fázi a svým chemickým složením se může odlišovat od disperzního prostředí. Řada disperzních soustav patří k vícesložkovým systémům. Mohou to být vícesložkové heterogenní soustavy, kde se disperzní podíl od disperzního prostředí odlišuje složením, nebo mohou tvořit homogenní vícesložkové systémy. Nelze vyloučit ani vznik jednosložkových disperzních systémů, které jsou heterogenní jako např. vlhká pára. Disperzní systém lze ovlivnit mnoha faktory. Především velikostí disperzních částic, počtem fází v systému, tvarem částic, interakcí mezi částicemi a disperzním prostředím, vzájemnými interakcemi mezi částicemi, povrchové a elektrostatické vlastnosti částice.

Podle velikosti částice se disperze rozdělují do tří skupin.

1. *Analyticky disperzní systémy* - systémy částic o rozměru do 1nm. Jsou to roztoky nízkomolekulárních látek, kde disperzní částice vznikají dočasnou asociací několika málo molekul. Velikost částic disperzního podílu je srovnatelná s molekulami disperzního prostředí.
2. *Hrubě disperzní systémy* – jestliže jsou částice rozeznatelné pouhým okem, systémy částic o rozměru od 50 $\mu\text{m}$ , označujeme je jako *makrodisperzní*. Jsou-li viditelné pouze optickým mikroskopem, tzn. systémy o rozměru do 1 $\mu\text{m}$ , značíme je jako *mikrodisperzní*.

Mnoho vlastností, filtrovatelnost, difuzivita, osmotický tlak, sedimentace, rozptyl světla, viskozita, významně závisí na velikosti a tvaru částic disperzního podílu. Velikost částice charakterizuje jemnost, s jakou je disperzní podíl rozptýlen v disperzi. Nejčastěji se vyjadřuje pomocí lineárního rozměru nebo hmotností [40]. Mírou velikosti částice je lineární rozměr, délka (SI jednotka [m]). Velikost je definována pouze pro kulovité částice, o kterých lze říci, že jejich velikost odpovídá průměru resp. poloměru. Pro všechny jiné tvary se musí velikost částic definovat s ohledem na metodu měření. Tyto odvozené průměry určujeme měřením vybrané vlastnosti závislé na velikosti částic. Mezi nejrozšířenější patří *ekvivalentní průměry* (průměry ekvivalentních koulí) [41].

- Stokesův průměr -  $D_s$

Ekvivalentní průměr odpovídající průměru koule se stejnou konečnou rychlostí klesání jako vybraná nepravidelná částice při laminárním toku v tekutině stejné hustoty a viskozity. Je definován Stokesovou rovnicí,

$$D_s = \sqrt{\frac{18 \cdot \eta \cdot v}{(\rho_s - \rho_L) \cdot g}} \quad (4.)$$

kde,

$\eta$  ... viskozita

$\rho_s$  ... hustota pevných částic

$\rho_L$  ... hustota tekutiny

$v$  ... konečná rychlost

$g$  ... gravitační konstanta

- Hydrodynamický ekvivalentní průměr  $D_H$

Průměr koule se stejným koeficientem translační difúze  $D_{translation}$  jako vybraná nepravidelná částice ve stejné tekutině za stejných podmínek. Je definován Stokes-Einsteinovou rovnicí [41],

$$D_H = \frac{k \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta} \quad (5.)$$

kde,

$k_B$  ... Boltzmanova konstanta

T... absolutní teplota

$\eta$  ... viskozita

Tvar částice disperzního podílu ovlivňuje mechanické a optické vlastnosti disperze. Systémy s částicemi, které mají všechny tři rozměry stejné (izometrické částice) nazýváme *systémy globulárně disperzní*. U anizometrických částic převládá buď jeden rozměr – fibrilární disperze, nebo převládají rozměry dva – laminárně disperzní. Při stanovení velikosti částic mikroskopickou nebo obrazovou analýzou mohou být kulovité částice popsány jedním parametrem-lineárním rozměrem.

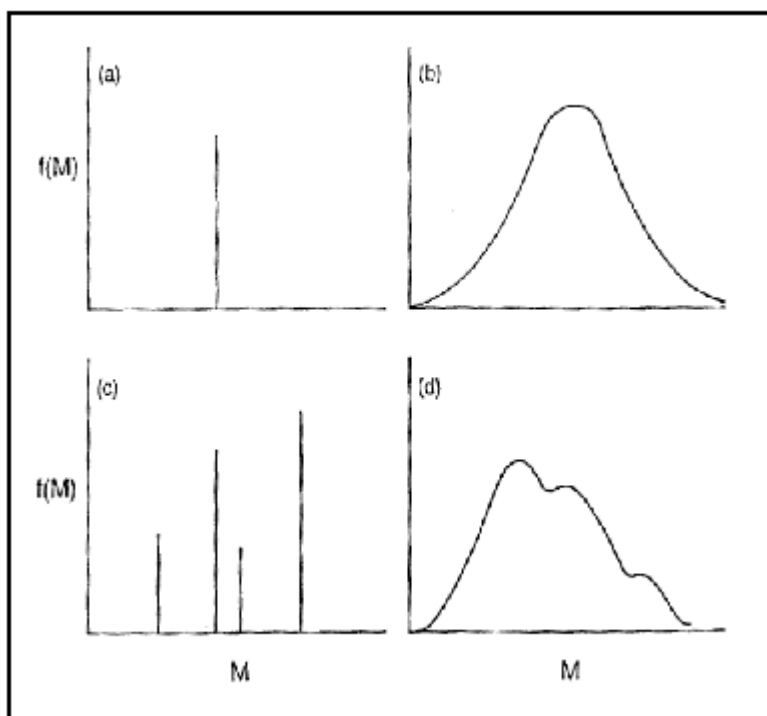
U částic nepravidelného tvaru lze lineární rozměr vyjádřit např. délkou čáry, která pólí plochu průmětu částice tzv. Martinův průměr  $d_M$ , nebo Feretovým průměrem  $d_F$ , definovaný jako vzdálenost tečen na protilehlých stranách průmětu částice. Střední hmotnost nebo poloměr částice lze vypočítat z naměřených fyzikálních vlastností disperzní soustavy např. z difúzního koeficientu, sedimentačního měření, z měření osmotického tlaku, intenzity rozptýleného záření nebo viskozity [40].

### 3.1.1 Molekulová hmotnost a polydisperzita

Jedním ze základních parametrů charakterizujících makromolekuly je molekulová hmotnost nebo „relativní molekulová hmotnost“. Role polysacharidů v dalších aplikacích je ovlivněna jejich molekulovou hmotností. Například v papírenském průmyslu se ke stanovení distribuce molekulové hmotnosti celulózy a celulózových derivátů používá gelová permeační chromatografie. K analýze molekulové váhy polysacharidů se využívá několik metod. Lze je rozdělit na *absolutní*, *relativní* nebo *kombinované*.

Mezi absolutní metody řadíme membránovou osmometrii, statický rozptyl světla nebo sedimentační rovnováhu. Tyto metody nevyžadují předpoklad makromolekulární konformace a kalibraci používaných standardů známé molekulové váhy. Relativní metody jako gelová permeační chromatografie, rychlost sedimentace, dynamický rozptyl světla a viskozimetrie vyžadují znalost makromolekulární konfigurace, případně kalibraci použitých polysacharidových standardů. Absolutní molekulové hmotnosti lze získat i kombinací informací získaných ze dvou nebo i více relativních metod např. sedimentační rychlost s měřením dynamického rozptylu světla nebo rychlostí sedimentace s vnitřní viskozitou [42].

Polysacharidy jsou heterogenní systémy. Heterogenita uvádí odchylku od chování jednoduché molekulové hmotnosti polysacharidů, zobrazena na obr. 12.



Obrázek č.12- Základní typy polydisperzity. a) Monodisperze. b) „primární polydisperzita“ c) „sekundární polydisperzita“ d) Polydisperzní směs [42].

Různorodost molekulové hmotnosti polysacharidů lze charakterizovat několika typy průměrných molekulových hmotností. Mezi hlavní střední molekulové hmotnosti patří *početní střed molární hmotnosti*, *hmotnostně střední molární hmotnost* a *Z-average*.

Pro soubor makromolekul s  $n_i$ , jejichž molární hmotnosti jsou  $M_i$  a koncentrace  $c_i$ . Matematické vyjádření počtu, hmotnosti a z-average přísluší rovnici (6.-8.) [42].

$$M_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i} = \frac{\sum c_i}{\sum c_i / M_i},$$

$$M_w = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i} = \frac{\sum c_i M_i}{\sum c_i},$$

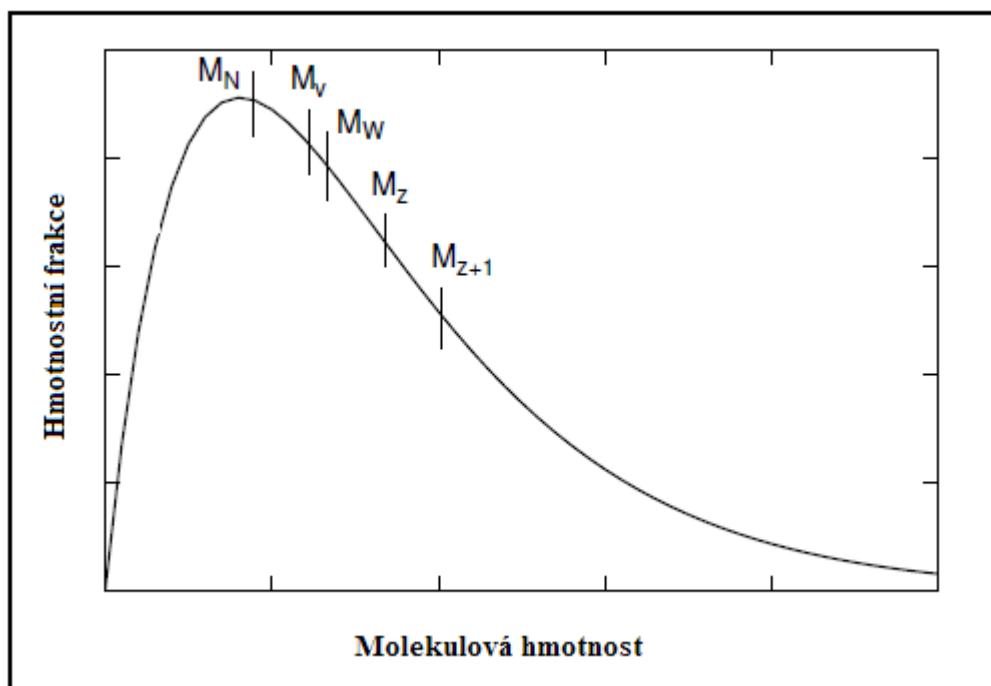
$$M_z = \frac{\sum n_i M_i^3}{\sum n_i M_i^2} = \frac{\sum c_i M_i^2}{\sum c_i M_i} \quad (6., 7., 8.)$$

Membránová osmometrie je koligativní vlastnost, je funkcí počtu molekul zatímco sedimentační rovnováhy a rozptyl světla poskytuje průměry, které jsou principiálně závislé na hmotnostní koncentraci složek. Relativní metody poskytují typy střední molekulové hmotnosti, které závisí na zvoleném uspořádání polysacharidů v roztoku. Lze říci, že rozlišení „potenciální“ molekulové hmotnosti závisí na konfiguraci a specifické relativní metodě stanovení.

Polydisperzity se v mnoha případech uvádí jako poměry  $I_{pn} = M_w / M_n$  nebo  $I_{pw} = M_z / M_w$  a průmyslové podniky je nazývají „polydisperzní indexy“. Jejich hodnoty lze získat odhadem z Gelové permeační chromatografie nebo z absolutních metod pro stanovení molekulové hmotnosti. Tyto poměry mohou osvětlit typy distribucí molekulových hmotností. Pro normální distribuci je  $I_{pn} > I_{pw}$ . Tyto poměry poskytují užitečné orientační pravidlo o tom, zda je materiál „polydisperzní“ ( $I_p \geq 1,6$ ) nebo skoro monodisperzní ( $I_p \leq 1,1$ ), ale nikdy nenahrazuje charakteristiku celé distribuce molekulových hmotností [42].

Molekulová hmotnost polymerů určuje mnoho fyzikálních vlastností a veličin, mezi něž patří například teplota přechodu z kapaliny na pevnou látku, vosk, kaučuk, ale i mechanické vlastnosti jako tuhost, pevnost, viskoelasticita, tvrdost a viskozita. V případě, že je molekulová hmotnost příliš malá, budou teplota přechodu a mechanické vlastnosti polymerního materiálu nízké. Molekulová hmotnost polymerů nepředstavuje specifickou hodnotu. Spíše udává distribuci molekulové hmotnosti daného polymeru. Distribuce závisí na způsobu, jakým je polymer vyroben. U polymeru se ani tak nedá mluvit o molekulové hmotnosti ale spíše o její distribuci, nebo o střední molekulové hmotnosti [43]. Fyzikální vlastnosti polymeru budou funkcí molekulové hmotnosti distribuční funkce.

Na obr 13. je zobrazena distribuce molekulových hmotností, společně s pozicemi středních molekulových hmotností.



Obrázek č.13- Distribuce molekulové hmotnosti [43].

### 3.2 Základní metody

Mezi základní metody používané při určování velikosti a tvaru částic v Tab.2. patří:

#### 1 Absolutní metody

##### – Osmometrie

Pro měření osmotického tlaku, což je tlak roven tlaku, kterého je zapotřebí aby se ustavilo pronikání rozpouštědla do roztoku polopropustnou membránou, která propouští pouze molekuly rozpouštědla, existuje mnoho různě zkonstruovaných přístrojů [40].

Osmometrie umožňuje stanovení (relativní) molární hmotnosti v intervalu 15.000-500.000. U hodnot  $< 10.000$  je obtížné najít vhodnou membránu, pro hodnoty  $> 500.000$  jsou osmotické tlaky tak malé, že jsou prakticky neměřitelné [44].

##### – Metoda rozptylu světla



Laserová difrakce nejrozšířenější metodou používanou k určení velikosti částic. Díky své malé náročnosti na přípravu vzorku, jednoduchosti a vysoké reprodukovatelnosti výsledků postupně nahrazuje sedimentační metody a to ve většině odvětví průmyslu [41].

## 2 Relativní metody

### – Viskozimetrie

Klasická hydrodynamická metoda, která se využívá při stanovení změny molární hmotnosti a velikosti a tvaru makromolekul. Měří se viskozita jako čas potřebný k protečení daného objemu kapaliny kapilárou [44].

### – Sedimentace patří k nejtradičnějším metodám analýzy velikosti částic.

Mezi výhody sedimentačních metod patří jasný princip měření, jednoduchá proveditelnost a fyzikálně jednoznačná interpretace výsledků. Nevýhodami jsou časová náročnost, poměrně úzký rozsah měření a závislost výsledků na přípravě vzorků [40].

Dostatečně velké částice působením gravitačního pole sedimentují a v systému se tak po určité době ustaví rovnovážné rozdělení částic. Působením gravitace se částice zpočátku pohybuje zrychleně. Se zrychlováním pohybu úměrně vzrůstá i třecí síla a v určitém okamžiku se síly vyrovnají. V ustáleném stavu se částice pohybuje konstantní rychlostí. U kulovitých částic je rychlost sedimentace nepřímo úměrná viskozitě prostředí, přímo úměrná rozdílu hustot disperzního podílu a disperzního prostředí a čtverci poloměru částice [45]. U hrubých disperzí lze provést sedimentační analýzu v gravitačním poli a sedimentaci koloidních částic probíhá většinou v centrifuze, protože sedimentace v gravitačním poli by byla příliš pomalá. Příliš velké částice vyvolávají turbulentní proudění, zatímco příliš malé částice jsou ovlivněny Brownovým pohybem → obvyklý rozsah měření 1–100  $\mu\text{m}$  (pouze při použití centrifugálních metod až do oblasti řádově 0.1  $\mu\text{m}$ ) [41].

### – Metoda dynamického rozptylu světla

Principem metody dynamického rozptylu světla (DLS) je měření Brownova pohybu částic pomocí laseru a analýzou fluktuací intenzity v rozptýleném světle.

Základním rozdílem pohybu malé a velké částice je, že menší se pohybují mnohem rychleji.

Základní vztah velikosti částice a její rychlosti v důsledku Brownova pohybu definuje Stokes-Einsteinova rovnice [45]. Podrobněji je tato metoda rozepsána v následujících kapitolách.

Tabulka 2-přehled nepoužívanějších metod k určování velikosti a tvaru částic [45].

Název metody	Zkratka	Princip
Dynamický rozptyl světla	DLS (QELS, PCS)	Elektromagnetická vlnová interakce
Laserová dopplerova anemometrie	LDV (LDA)	Aerodynamika, elektromagnetický rozptyl
Rozptyl rentgenových paprsků – malouhlový, velkouhlový	AXS (U)SAXS, WAXS	Vlnová interakce
Rozptyl neutronů – malouhlový, velkouhlový	ANS (U)SANS, WANS	Vlnová interakce
Diferenciální analýza pohyblivosti	DMA	Elektrostatická klasifikace
Rastrovací elektronová mikroskopie	SEM (FE-SEM)	Snímání svazků elektronů
Transmisní elektronová mikroskopie	TEM	Snímání svazků elektronů
Mikroskopie atomárních sil	AFM	Meziatomová přitažlivost
Odstředivá sedimentace – optická, rentgenová	OCS, XCS	sedimentace
Rentgenová gravitační sedimentace	XGS	sedimentace
Sedimentační frakcionace tokem v poli	SdFFF	sedimentace
Adsorpce plynů – BET metoda	BET	Sorpce, stanovení měrného povrchu
Ultrazvuková mikroskopie	AAS (UAS, US)	Interakce akustických vln
Elektroakustická spektroskopie	ESA	Elektroakustická odezva

### 3.2.1 Počátky vzniku metody DLS

Všechny materiály pohlcující a rozptylující světlo, spolu s prvními metodami světelného rozptylu, popsal jako první Tyndal. Statický rozptyl světla prochází hlavním rozvojem v první polovině 19. století. DLS teorie je postavena na dřívějších základech teorie klasického rozptylu světla, datována Rayleypo studiiemi v r. 1871, kdy je rozptyl malé částice srovnatelný s vlnovou délkou světla. Rozptyl většími částicemi byl rozebrán později a je znám jako Mie-rozptyl, který již umožňuje rozpustnost kulovitých částic jakékoli velikosti.

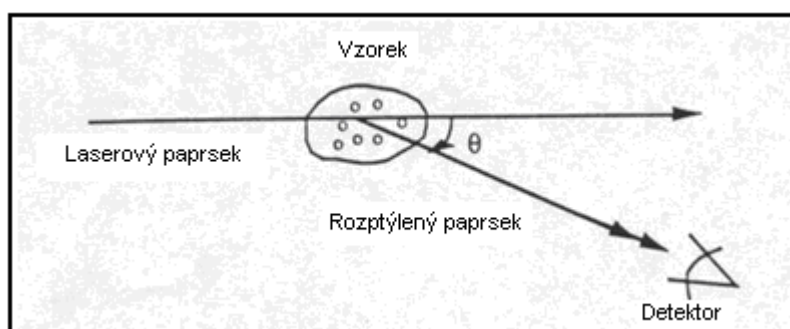
Mieova teorie je jediná teorie, která vysvětluje správnost maxima a minima v diagramu intenzity a úhlu a poskytuje korektní odpověď pro všechny vlnové délky, velikosti a úhly [46]. V r. 1908 byly při pohybu částic zjištěny průměrné fluktuující hodnoty intenzity rozptýleného záření a difúzní koeficienty. Einstein zveřejnil vztah mezi difúzním koeficientem

a velikostí, a otevřel tím cestu vzniku novým metodám velikosti částic. Historicky první měření metodou DLS začalo příchodem laseru.

Na počátku r. 1960 Pecora začal rozvíjet nový druh rozptylu světla tzv. časově proměnný rozptyl světla. Zpočátku se metoda DLS používala k měření difúzních koeficientů makromolekul, z nichž se počítala hydrodynamická velikost. Několik výrobců začalo tuto metodu používat místo transmisní elektronové mikroskopie (TEM) při kontrole kvality. V druhé polovině r. 1970 byl vylepšen digitální korektor a při analýze doby rozpadu distribuce se začali používat algoritmy. Doba experimentu, která se řádově pohybovala v hodinách, byla postupně snižována a v současnosti se délka měření pohybuje v minutách [47].

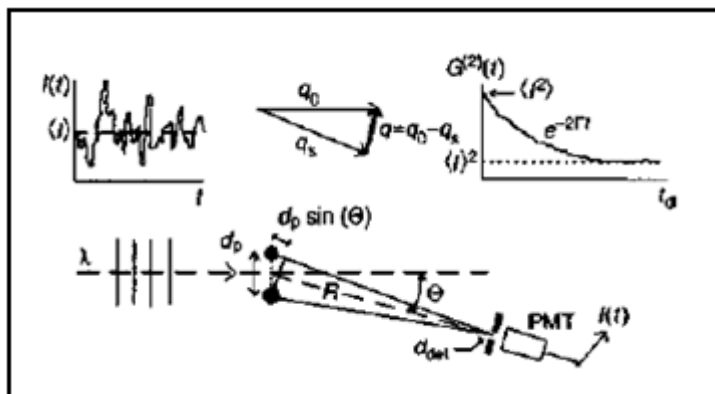
### 3.2.2 Metoda dynamického rozptylu světla-DLS

Dynamický rozptyl světla neboli fotonová korelační spektroskopie je ideální metodou pro měření velikosti sub-mikronových částic ( $< 1 \mu\text{m}$ ). DLS představuje metodu, u které laserový paprsek zaostřený do malého objemu zředěného roztoku koloidních částic, rozptyluje světlo pod úhlem  $90^\circ$ . Základní uspořádání, ke kterému při rozptylu dochází, je patrné na obr. 14. Stupeň a polarizace rozptýleného světla částicí určuje její velikost, tvar a složení. Je sledována časová závislost světla, které rozptylují molekuly měřeného vzorku [39]. Při rozptylu světla molekulou, se rozptýlí část dopadajícího světla.



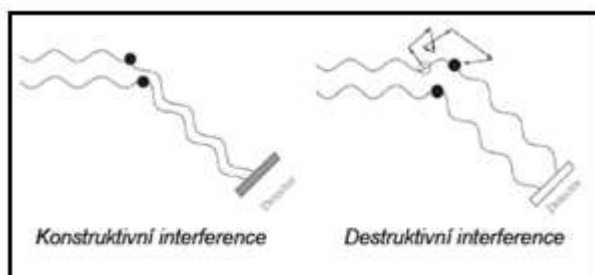
Obrázek č.14 - uspořádání při rozptylu [52].

Nepravidelný Brownův pohyb rozptylu ovlivňuje celkovou intenzitu k detektoru fluktuující v čase. Rychlost Brownova pohybu je dána translačním difúzním koeficientem.



Obrázek č.15- Základy metody dynamického rozptylu světla [47].

V případě stacionární molekuly by množství rozptýleného světla bylo konstantní. Ale vzhledem k tomu, že každá částice koloidního systému se chová jako molekula pravého roztoku, tzn., že vykonává chaotický tepelný pohyb k detektoru, existují interference způsobující změnu intenzity (viz Obr.16) [48].



Obrázek č.16- chaotický pohyb částice [48].

Podle kinetické teorie ideálního plynu, vztažená i na koloidní a hrubé disperzní systémy, lze za fyzikální molekulu považovat každou částici, která podléhá tepelnému pohybu. Každé fyzikální molekule přísluší střední translační kinetická energie určená dle vztahu (9.),

$$\bar{\epsilon} = \frac{1}{2} m \cdot \bar{u}^2 = \frac{3}{2} k_B \cdot T \quad (9.)$$

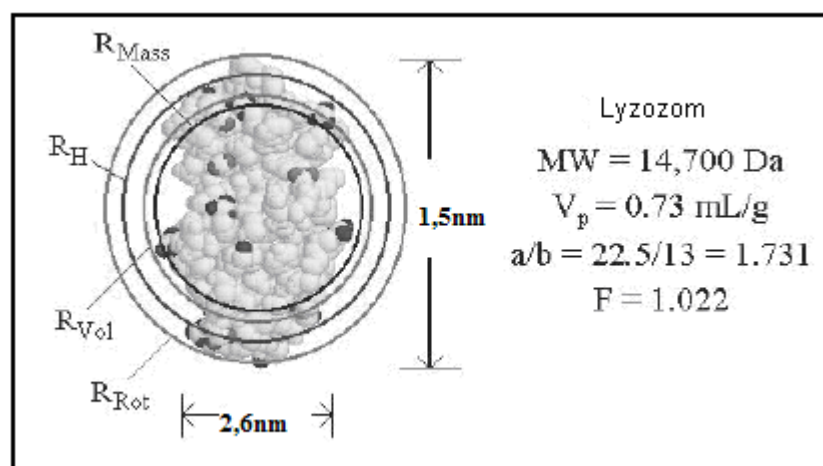
Brownův pohyb mikroheterogenních a koloidních částic, je pohyb který vzniká v důsledku velkého počtu srážek. Tyto srážky způsobí, že molekuly disperzního prostředí se pohybují různými směry po velmi složité dráze.

Mimo tepelného pohybu konají disperzní částice i pohyb rotační. S rostoucí velikostí a hmotností částice roste pravděpodobnost kompenzace těchto nárazů a proto už velké částice pouze vibrují. Pokud je rozměr částice  $> 4\mu\text{m}$ , tepelný pohyb již nelze pozorovat.

Brownův pohyb se v makroskopickém měřítku projevuje jako difuze. Působí-li na částici mimo Brownova pohybu i gravitační a odstředivé pole, dochází k sedimentační rovnováze, která vede např. k osmóze, Donnanově rovnováze [40].

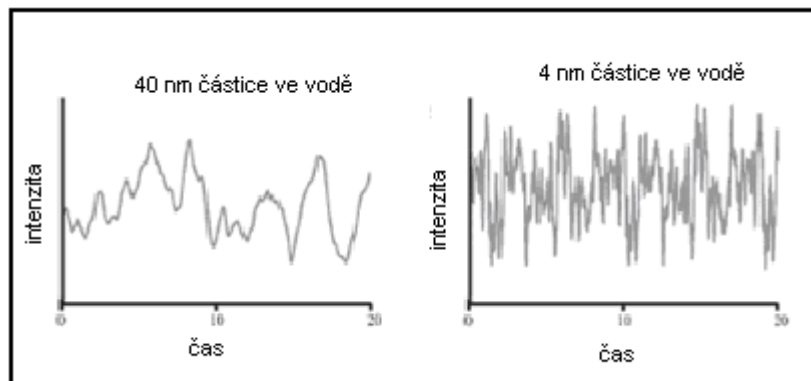
Čím rychleji částice difundují, tím rychleji se intenzita mění. S rostoucí viskozitou a velikostí molekul se molekuly pohybují pomaleji, naopak jejich pohyb se zrychluje s rostoucí teplotou. Jsou-li teplota a rozpouštědlo známy a konstantní, proměnlivost intenzity rozptýleného světla je přímo úměrná velikosti molekuly a takovou veličinu označujeme jako *hydrodynamický průměr*  $-R_h$ .

Hydrodynamický objem je koule definovaná molekulou otáčející se ve všech směrech plus hydratační vrstva, modifikovaná snadností, s jakou rozpouštědlo objemem prochází [40]. Ve skutečnosti je to míra pohybu molekuly v roztoku (viz obr.17).



Obrázek č.17- Definování hydrodynamického poloměru  $R_h$  na molekule [48].

Při měření, je intenzita světla převedena na měření  $R_h$ , porovnáváním změn v průběhu času (viz obr.18).

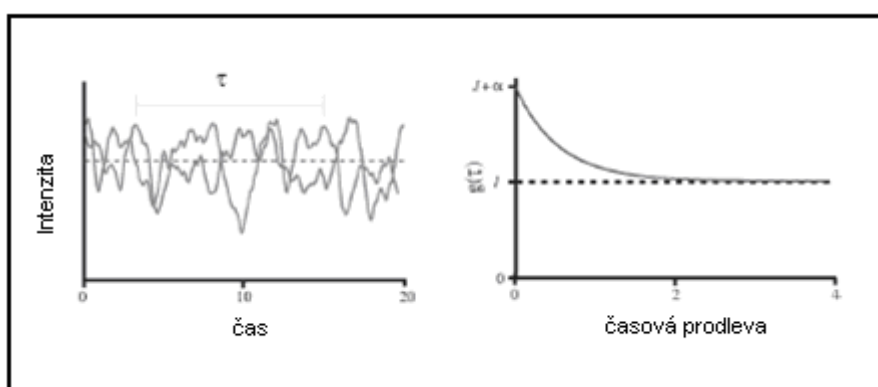


Obrázek č.18- Příklady časové závislosti intenzity při měření částice o rozměru 40nm a 4nm ve vodě [48].

V zásadě se překrývají dva grafy ze stejného data s malou vzájemnou časovou prodlevou (obr.19). Následně je zaznamenávána korelace mezi prvním a druhým grafem.

Tato korelace se počítá pro narůstající časové intervaly, až se dosáhne nulové korelace, kdy intenzitní změny jsou při vzájemném porovnání náhodné.

Čím rychleji se molekuly pohybují, tím rychleji se korelace přiblíží k nule [48]. U metody DLS, je autokorelační funkce odvozená z intenzity rozptýleného světla a je převrácenou funkcí k získání distribuce z difúzního koeficientu nebo velikosti částic aplikovanou přes Stokes-einstenovu rovnici [39].



Obrázek č.19-Znázornění převodu časového záznamu intenzity na korelační funkci [48].

U monodisperzních částic se korelace řídí vztahem (10.),

$$C(t') = A \cdot \exp\left(-\frac{t'}{\tau}\right) + B \quad (10.)$$

kde,

$$A = \langle I_s^2(t) \rangle - \langle I_s(t) \rangle^2$$

$$B = \langle I_s^2(t) \rangle^2$$

a  $\tau$  ... charakteristický čas (pro polydisperzní soustavy celé spektrum těchto časů)

Charakteristický čas souvisí s difúzním koeficientem  $D_t$  dle vztahu [41],

$$D_t = \frac{1}{K^2 \cdot \tau} \quad (11.)$$

kde,

$K$  ... absolutní hodnota vlnového vektoru rozptýleného světla.

$$K = \left(\frac{4 \cdot \pi \cdot n}{\lambda}\right) \cdot \sin \frac{\theta}{2} \quad (12.)$$

kde,

$n$  ... index lomu kapaliny.

Hydrodynamický ekvivalentní průměr  $R_h$  souvisí s difúzním koeficientem, který se počítá ze Stokes-Einsteinovi rovnice pro kulovité částice [41].

$$D_T = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot R_h} \quad (13.)$$

kde,

$k_B$  ... Boltzmanova konstanta

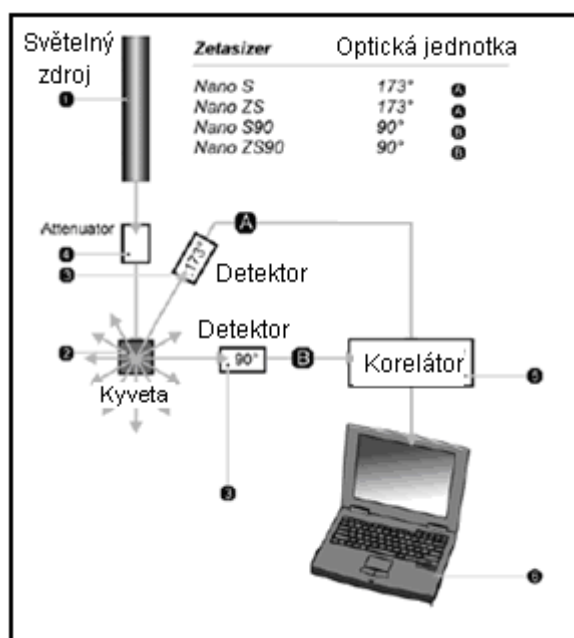
$T$  ... absolutní teplota

$\eta$  ... viskozita kapaliny

Translační difúzní koeficient závisí na velikosti částice ale také na struktuře jejího povrchu stejně tak na koncentraci a typu iontu přítomného v roztoku [46]. Po zakreslení a zahrnutí všech faktorů - teplota, viskozita prostředí, vlnová délka laserového světla a hydrodynamického průměru, se korelační funkce (normálně na logaritmické stupnici) převede na měření velikosti [45].

Koncentrace musí být dostatečně nízká, tak aby v rovnici  $B(c) = 1$  a čteném rozptylu nedošlo k anulaci. Zároveň musí být dostatečně vysoká, aby zamezila případnému zkreslení způsobeného fluktuací.

Počet částic v oblasti rozptylu musí být vždy dostatečně vysoký, aby zůstala zachována konstantní hodnota  $I(q)$ ,  $q$  je rozptylový faktor. DLS se nejčastěji používá u částic v rozsahu od 0,002 do 2 $\mu$ m. Spodní hranici obvykle určuje dosažitelná síla laseru. Horní hranice je dána výsledky sedimentace a počtem fluktuací. Rozsah doby měření je od 1 do 10 minut. Je funkcí  $I(q)$  [47]. Při měření se vzorek s dispergovanými částicemi nadávkuje do kyvety a po vložení kyvety do komory měřícího zařízení a spuštěním vybrané měřící metody bude vzorek automaticky proměřen. Samotné měření je velmi rychlé, podle typu vzorku trvá řádově minuty. Pokud měříme vzorek s nestejnou velikostí částic, je proces o něco komplikovanější [45]. Měřící jednotku (obr.20), kterou tvoří světelný zdroj, optický systém, detektor a digitální korektor [47].



Obrázek č.20 -Optické uspořádání Zetasizer nano série pro měření DLS [46].

Jako každá metoda, má i metoda dynamického rozptylu světla své výhody i nevýhody [47].

#### Výhody DLS

- + měření jsou rychlá (řádově sekundy , minuty)
- + lze proměřit i velmi malé množství vzorku
- + změří jakoukoli kapalnou suspenzi za předpokladu, že není absorpční, je relativně čistá a není příliš viskózní
- + k měření velikosti částic v rozmezí od 0,001 do  $\mu$ m



### *Nevýhody DLS*

- u histogramů nelze dosáhnout vysokého rozlišení
- měření a interpretace výsledků může být silně ovlivněna přítomností prachu
- obtížná specifikace tvaru částice

### **3.2.2.1 Aplikace DLS**

Metoda DLS se používá k velkému počtu aplikací. Tou nejčastější bývá *screening proteinů* před *krystalizací*. Tato aplikace zahrnuje měření proteinu v příslušném pufru a sledování, zda jsou přítomny případné agregáty nebo jestli je signál příslušející hlavnímu monomeru polydisperzní tzn., zda je přítomno víc, než jeden druh, který není rozlišen [48]. Dynamický rozptyl světla je využíván k charakterizaci velikosti částic u latexů, pigmentů, emulzí, micel, lipozomů, rostlinných buněk, siliky ale i biologických vzorků např. virů, bakterií a DNA [47]. Komplexní studium použití metody dynamického rozptylu světla při stanovení průměrné velikosti částic a její distribuce poskytl Finsky a kol. [49-52].

## 4 SPEKTRÁLNÍ METODY

Spektroskopické metody představují metody, které jsou založeny na vzájemném působení atomů a molekul s elektromagnetickým zářením, při kterém dochází k výměně určitého energetického kvanta. Metody, u kterých dochází mezi měřeným vzorkem a zářením k výměně energie. Výměnou energie se mohou obsazovat vyšší energetické hladiny, dochází k absorpci, nebo jsou obsazovány nižší energetické hladiny, mluvíme o emisi záření [53]. Nejčastěji se spektrální metody využívají ke stanovení koncentrace látek v měřeném roztoku. Některé z těchto metod dokážou charakterizovat prostorové uspořádání případně objasnit interakce molekula-makromolekula nebo makromolekula-nízkomolekulární látka. Tou největší výhodou je bezpochyby snadné, rychlé a velmi citlivé měření, které se pohybuje řádově v minutách [54].

### 4.1 Ultrafialová a viditelná spektroskopie

Absorpce světla roztokem je jednou z nejstarších a stále ještě nejužitečnějších instrumentálních metod. Vlnová délka světla, kterou bude sloučenina absorbovat, je charakteristickou pro její chemickou strukturu. Při pokojové teplotě je většina molekul v základních elektronových a vibračních stavech. Specifické oblasti elektromagnetického spektra absorbují specifické typy molekul a atomy přechází na vyšší energetickou hladinu. Absorpce mikrovlnného záření je důsledkem excitace molekulového rotačního pohybu. Infračervená absorpce je spojená s vibračním pohybem molekul [55]. V ultrafialové a viditelné (UV/Vis) spektroskopii, molekuly absorbují světlo a přecházejí do excitovaného energetického stavu. K tomu dochází, je-li při interakci mezi elektromagnetickým zářením a molekulou, energie kvanta záření rovna energetickému rozdílu mezi excitovaným a základním stavem molekul [28].

$$\Delta E = E_f - E_i = \nu h \quad (14.),$$

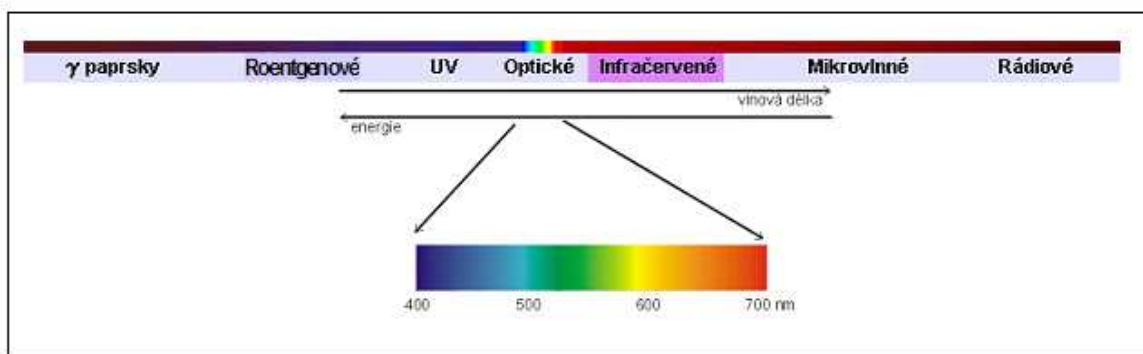
kde,

$h$  ... Planckova konstanta [ $6,626 \cdot 10^{-34}$  Js]

$\nu$  ... frekvence elektromagnetického záření

$E_f, E_i$  ... energie částice na vyšší, nižší energetické hladině.

V molekulách dojde po absorpci světla k excitaci elektronů, ale většina těchto molekul k tomu potřebuje velmi vysoké množství energie záření (ultrafialové vakuum < 200nm). Pro molekuly které obsahují konjugovaný elektronový systém, je světlo v UV-viditelné oblasti dostačující (např. benzen absorbuje v oblasti 260nm).



Obrázek č.21-Elektromagnetické spektrum podle rozsahu vlnový délek [33].

Rostoucí stupeň konjugace posouvá spektrum k nižším energiím, proto naftalen absorbuje světlo při 300nm a antracen při 400nm. Protože absorpční spektra charakterizují molekulovou strukturu, dají se využít při kvalitativní analýze atomových a molekulových druhů [55].

Intenzita světla  $I$ , prošlé roztokem absorbujících látek v průhledném rozpouštědlu, souvisí s koncentrací dle Beerova zákona,

$$-\log \frac{I}{I_0} = A = \epsilon_{\lambda} bc \quad (15.)$$

kde,

$I_0$  ... dopadající intenzita

$A$  ... absorbance

$b$  ... tloušťka [cm]

$c$  ... koncentrace roztoku [mol/l]

$\epsilon_{\lambda}$  ... molární extinkční koeficient (molární pohltivost) [l/mol/cm]

Absorbance je přímo úměrná koncentraci absorbující látky a tloušťce absorbující vrstvy.

Je aditivní veličinou tzn., absorbuje-li záření s určitou vlnovou délkou dvě i více složek, bude celková hodnota absorbance rovna jejímu součtu [55]. Extinkční koeficient je funkcí vlnové délky, což je množství, které představuje spektrum v roztoku.

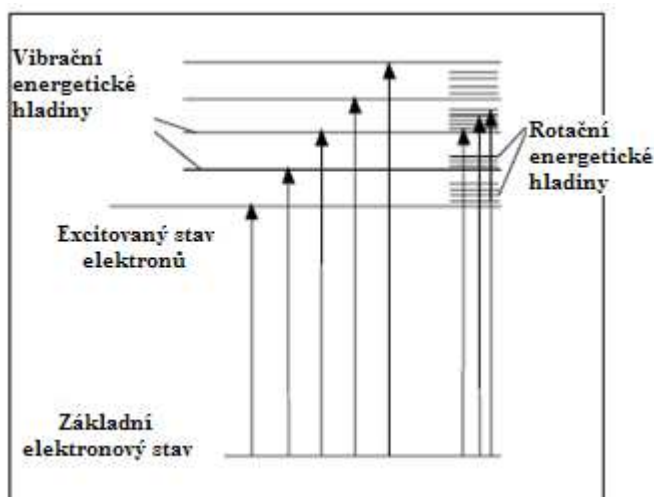
U jeho hodnoty je potřeba uvést, které vlnové délce odpovídá (př.  $\epsilon_{532}$ ). Jedinou výjimkou je, pokud je daná hodnota píku. V takovém případě jí lze vyjádřit jako  $\epsilon_{\max}$ . Pomocí absorpční spektroskopie, lze stanovit množství látek přítomných v neznámém roztoku [55]. Spojením Beerova a Lambertova zákona, získáme velmi důležitý Lambert-Beerův zákon (rce 14.). Tento zákon platí jen pro zředěné roztoky do koncentrací  $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  [56].

$$A = \epsilon \cdot c \cdot b \quad (16.)$$

kde,

$\epsilon$  ...absorbance roztoku o jednotkové koncentraci absorbující látky v kvetě o jednotkové délce [ $\text{délka}^{-1} \cdot \text{koncentrace}^{-1}$ ].

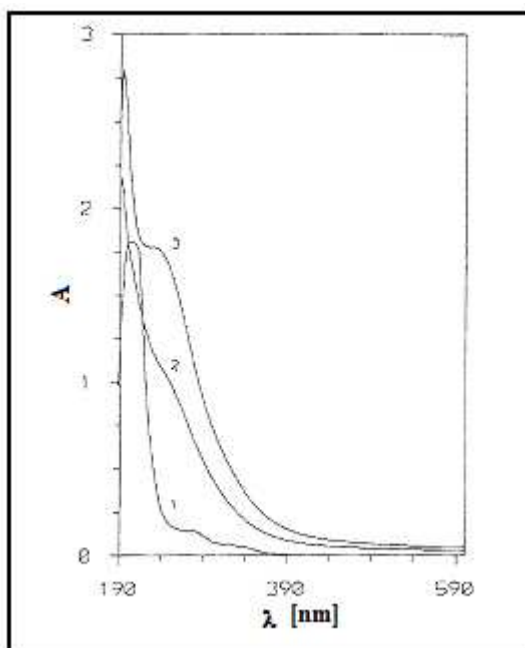
Při absorpci viditelného nebo ultrafialové záření dochází k nárůstu celkové energie a valenční elektrony tak přechází ze základního elektronového stavu na vyšší energetickou hladinu (obr.22). Absorpční spektrum představuje grafické vyjádření závislosti absorbance na vlnové délce [56].



Obrázek č.22- Schéma elektronových přechodů při absorpci záření [59].

Protože je energie kvantovaná, lze předpokládat, že absorpční píky by v UV/Vis oblasti spektra měli mít píky ostré, k tomu ale dochází jen velmi zřídka. Absorpční spektra molekul jsou spojitá, obsahují pásy, které přísluší konkrétní vlnové délce.

Jeden pás ve spektru odpovídá jednomu typu přechodu elektronů v molekule do excitovaného stavu [57]. Na obr.23. je zobrazeno absorpční spektrum roztoku čisté kyseliny hyaluronové [58].



Obrázek č.23-Absorpční spektrum kyseliny hyaluronové (křivka1) [58].

Polohu píku určuje vlnová délka, která s energií absorbovaného záření souvisí podle vztahu (17.)

$$\lambda = hc/\varepsilon \quad (17.)$$

kde,

$\varepsilon$  ... energie absorbovaného fotonu [56].

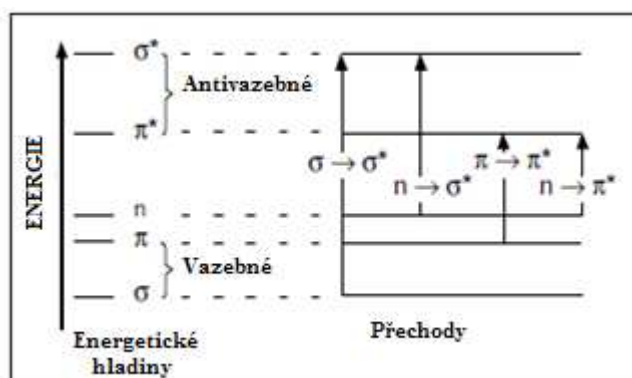
Nejčastěji se používá rozmezí vlnových délek od 190 do 800nm. Vazebné elektrony se mohou nacházet ve třech typech elektronových orbitalů,

- $\sigma$  vazebné orbitaly
- $\pi$  vazebné orbitaly

- Nevazebné orbitaly

$\sigma$  – vazebné orbitaly inklinují k nižším energiím než  $\pi$  orbitaly, které jsou v energetickém pořadí níž než orbitaly nevazebné, tzn.  $\sigma < \pi < n < \sigma^* < \pi^*$ .

Pokud dojde k absorpci záření vhodné frekvence, přechází jeden z těchto orbitalů do neobsazeného orbitalu, obvykle nevazebného orbitalu  $\sigma^*$  nebo  $\pi^*$  (obr.24).



Obrázek č.24- Elektronové přechody v molekule [59].

V ultrafialové a viditelné spektroskopii patří mezi nejčtenější přechody  $\pi \rightarrow \pi^*$  (oblast 200-800nm) a  $n \rightarrow \pi^*$  (blízká UV a viditelná oblast) [59].

- Přechod  $\pi \rightarrow \pi^*$  - tyto  $\pi$ - elektrony jsou součástí molekul obsahující dvojně vazby např. aldehydy, ketony, alkeny, alkyne, areny, karboxylové sloučeniny aj. Při excitaci přechází elektrony do antivazebných molekulových orbitalů  $\pi^*$ . Látky které podporují tuto excitaci absorbováním UV a viditelného záření nazýváme *chromofory*. S rostoucím počtem dvojných vazeb dochází k posunu absorpčního pásu k vyšším hodnotám vlnové délky. Jedná se o tzv. batochromní (červený) posuv.
- Přechod  $n \rightarrow \pi^*$  - nevazebné elektrony mohou při absorpci elektromagnetického záření přecházet do antivazebných molekulových orbitalů  $\pi^*$ . S rostoucí polaritou rozpouštědla a substituentů navázaných na chromoforech dochází k posunu absorpčního pásu do nižších vlnových délek a takový posun nazýváme hypsochromní (modrý) posuv. Jeho příčinou je vyšší solvatace volného elektr. páru a celkové snížení energie n-orbitalu [56].

UV/Vis spektroskopie se používá v chemických a biochemických laboratořích při stanovení neznámého množství kovových, organických ale i anorganických látek. Tato metoda poskytuje při samotné identifikaci omezené množství informací, proto se velmi často používá ve spojení s dalšími měřicími metodami, mezi které patří např. IČ, NMR nebo hmotnostní spektroskopie [56].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**



## 5 MATERIÁLY A METODY

### 5.1 Použité materiály a příprava vzorků

#### 5.1.1 Materiály

V této práci, byly použity tyto materiály:

- Kyselina Hyaluronová, CPN, Dolní Dobrouč
- Benzalkonium chlorid –  $C_{8-16}H_{17-33}ClN$
- Dihydrogenfosforečnan sodný –  $NaH_2PO_4$
- Hydrogenfosforečnan disodný –  $Na_2HPO_4$
- Chlorid sodný -  $NaCl$
- Destilovaná voda –  $H_2O$

#### 5.1.2 Příprava vzorků

Fosfátový pufr, ve kterém byla rozpouštěna HA, byl připraven z Hydrogenfosforečnanu disodného a dihydrogenfosforečnanu sodného. Přesné navážky těchto surovin byly rozpuštěny v destilované vodě. Oba roztoky se smíchaly na konečnou hodnotu  $pH=7,36$  a poté byly ustáleny příslušným přídavkem  $NaCl$ .

Navážka kyseliny hyaluronové s molární hmotností 1,7MDa byla rozpouštěna v připraveném fosfátovém pufru po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě  $25^\circ C$ .

Z kvartérních amoniových solí byl vybrán benzalkonium chlorid. Roztok byl připraven rozpuštěním BAC ve fosfátovém pufru. Jeho přídavek byl do roztoku kyseliny hyaluronové přidáván v pěti různých koncentracích, kdy na jednu molekulu HA připadalo **30**; **97**; **200**; **300** a **400** molekul benzalkonia chloridu určených tímto výpočtem:

$$M_{w(HA)} = 1,7MDa \dots 0,3\% HA, m = 0,075g \text{ na } V = 0,025l \Rightarrow c = 1,7647 \cdot 10^{-6} mol/l$$

$$M_{w(BAC)} = 340 g/mol \dots 0,5\% BAC, m = 0,25g \text{ na } V = 0,05l \Rightarrow c = 14,706 \cdot 10^{-3} mol/l$$

$$M_{w(1meru HA)} = 395,316 g/mol$$

## A. Určení počtu molekul HA

$$\frac{M_{w(HA)}}{M_{w(1\text{meru HA})}} = 1,7 \cdot \frac{10^{-6}}{395,316} = 4300,357 \text{ merů v HA}$$

$$c_{HA} = \frac{n_{HA}}{V} \Rightarrow n = c \cdot V = 1,7647 \cdot 10^{-6} \cdot 0,025 = 44,118 \cdot 10^{-9} \text{ mol}$$

$$n_{HA} = \frac{N_{HA}}{N_A} \Rightarrow N_{HA} = N_A \cdot n_{HA} = 6,023 \cdot 10^{23} \cdot 44,118 \cdot 10^{-9} = \underline{2,657 \cdot 10^{16}} \text{ molekul HA}$$

## B. Výpočet připadajících molekul BAC na 1mer HA pro přídavek 90μl BAC

$$n_{BAC} = c_{\text{přidavku BAC}} \cdot V_{BAC} = 26,471 \cdot 0,05 = 1,324 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$$

$$N_{BAC} = n_{BAC} \cdot N_A = 1,324 \cdot 10^{-6} \cdot 6,023 \cdot 10^{23} = 7,972 \cdot 10^{17} \text{ molekul BAC}$$

$$\frac{N_{BAC}}{N_{HA}} = \frac{7,972 \cdot 10^{17}}{2,657 \cdot 10^{16}} = \underline{30,003} \text{ molekul BAC na 1 molekulu HA}$$

Takto připravené vzorky byly při pokojové teplotě měřeny na UV/Vis spektroskopii a „Zetasizer nano systému“ K měření velikosti části bylo potřeba, připravené vzorky HA s přídavkem BAC, vhodně naředit pufrům, kvůli lepší interpretaci výsledků. Ředilo se 0,0022, 0,0024, 0,003, 0,0031 a 0,0032 ml fosfátového pufru. Po naředění, byl vzorek filtrován přes 0,22 mikro filtr. Při experimentu, bylo dbáno na opakovatelné proměření získaných výsledků.

## 5.2 Metody

V této práci byl k charakterizaci roztoku kyseliny hyaluronové s přídavkem benzalkonia chloridu použit Zetasizer Nano systém ke stanovení velikosti částic ve vzorku využitím dynamického rozptylu světla a UV/vis spektroskopie.

### 5.2.1 Metoda dynamického rozptylu světla

Dynamický rozptyl světla známý i jako Quazi-elastický rozptyl světla, představuje metodu měření velikosti částic o velikosti submikronu. DLS měří Brownův pohyb, který souvisí s velikostí částic. Tento pohyb můžeme popsat jako nahodilý pohyb částic, který je důsledkem jejich srážení s molekulami rozpouštědla. DLS měří částice rozptýlené v kapalině. Velké částice se oproti malým pohybují mnohem pomaleji. Při měření DLS, je potřeba znát přesnou teplotu ale i viskozitu, která na teplotě silně závisí. Je důležité, aby teplota v průběhu měření byla stabilní, protože jinak by mohlo dojít ke vzniku „konvekčního proudu“ ve vzorku, který by negativně ovlivnil přesnost měření a následnou interpretaci výsledků. Rychlost Brownova pohybu charakterizuje Difúzní koeficient-D, ze které se počítá velikost částic přes Stokes-Einsteinovu rovnici [46],

$$R_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} \quad (18.)$$

kde,

$R_H$  ... hydrodynamický průměr

$D$  ... difúzní koeficient

$K_B$  ... Boltzmanova konstanta

$T$  ... absolutní teplota

$\eta$  ... viskozita

Hydrodynamický průměr, který se v DLS měří, je hodnota která popisuje difuzi částic kapalinou. Průměr, který tímto měřením získáme, je průměr koule, která má stejnou hodnotu difúzního koeficientu jako částice. Hodnota difúzního koeficientu  $D$ , nezávisí pouze na velikosti částice, ale také na povrchové struktuře, koncentraci a typu iontu v daném roztoku. Ionty a celková iontová koncentrace může ovlivnit rychlost difúze tím, že dojde k vytvoření tzv. elektrické dvojvrstvy známé jako Debayova délka ( $K^{-1}$ ) [46].

Přesnost měření DLS techniky se ověřuje měřením vhodného polystyrenového latexu. Jakákoli změna povrchu částice ovlivní difúzní rychlost, která souvisí se zdánlivou velikostí částice.

Všechny metody k měření velikosti částic se zabývají podstatným problémem při charakterizaci ne-kulových částic. Různé metody jsou citlivé na různé vlastnosti částic např. na předpokládaný obsah, hustotu, rozptyl intenzity a obvykle odlišné velikosti a distribuce velikosti jakéhokoli vzorku.

Hydrodynamický průměr ne-kulových částic je průměr koule, která má s částicí stejný difúzní koeficient. Pokud se tvar částice změní takovým způsobem, který zároveň ovlivní i difúzní rychlost, změní se i hydrodynamický průměr. Např. malé změny délky tyčinkové částice přímo ovlivní velikost, zatímco změny průměru takovýchto částic ovlivní rychlost difúze jen velmi těžko a bude to jen obtížně zjištělné [46].

Konfigurace proteinů a makromolekul obvykle závisí na přesném původu rozpouštědla. DLS je metodou velmi citlivou na detekci konfiguračních změn, které mohou ovlivnit difúzní rychlost. Pokud je velikost částice ve srovnání s vlnovou délkou použitého laseru malá (obvykle menší než  $d = \lambda/10$ ), bude rozptyl izotropní tj., ve všech směrech stejný.

Rayleighova aproximace definuje, že  $I \propto d^6$  a  $I \propto 1/\lambda^4$ , kde  $I$  je intenzita rozptýleného světla,  $d$  je průměr částice a  $\lambda$  je vlnová délka laseru. Výraz  $d^6$  říká, že částice 50nm rozptýlí  $10^6$  nebo milionkrát tolik světla jako 5nm částice. Proto vzniká riziko, že světlo z větších částic bude zahrnovat i světlo rozptýlené částicemi menšími [46].

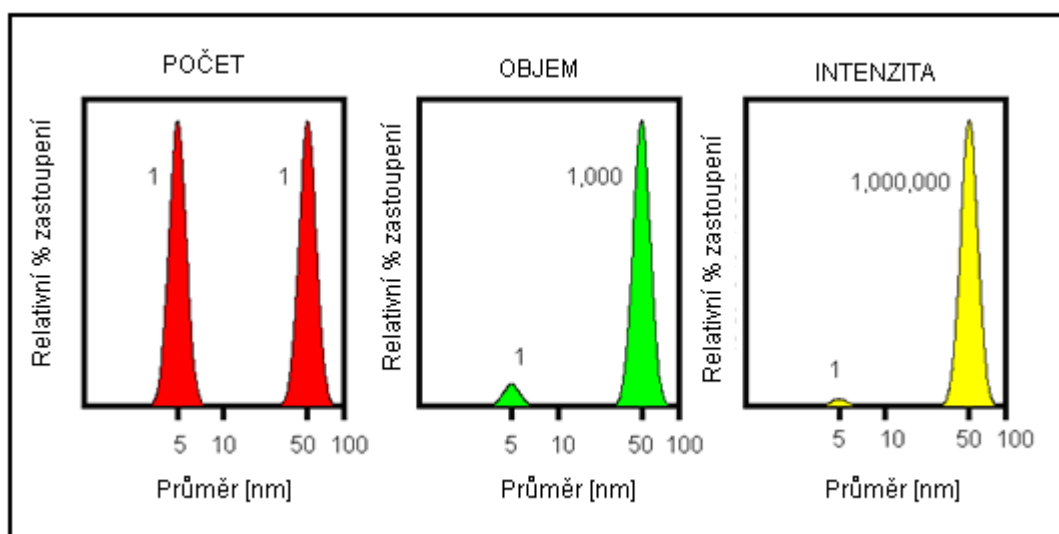
Což znamená, že je velmi obtížné pomocí DLS změřit směs, obsahující částice 1000nm a 10nm, protože příspěvek k celkovému rozptylu malých částic bude zanedbatelný. Inverzní vztah k  $\lambda^4$  říká, že snížením vlnové délky použitého laseru získám vyšší rozptyl intenzity.

Velikost částic je určena korelační funkcí pomocí různých algoritmů. Velikost distribuce je v diagramu zobrazená jako relativní intenzita světla rozptýleného částicemi v různých velikostních třídách a proto se nazývá „intenzita distribuce velikosti“. Pokud je distribuce intenzity tvořena pouze jedním poměrně hladkým píkem, není potřeba ji převádět na distribuci objemu využitím Mieho teorie [46].

Pokud se v diagramu zobrazí velký „tails“ nebo více než jeden pík, mohou distribuci intenzity převést na distribuci objemovou podle Mieovi teorie, za předpokladu použití vstupního parametru vzorku – indexu lomu. Objemová distribuce podá realističtější pohled na přítomný druhý pík. Všeobecně platí, že  $d_{\text{intenzity}} > d_{\text{objemu}} > d_{\text{počet}}$ .

Jednoduchý způsob, kterým lze popsat rozdíl mezi Intenzitní, Objemovou a Početní distribucí, je porovnat 2 populace kulových částic o průměru 50nm a 5nm, zastoupených ve

stejném počtu. Jestliže početní distribuce těchto 2 populací bude graficky vynesena, diagram bude tvořen dvěma píky v poměru 1:1. Pokud bude tato distribuce převedena na distribuci objemu, změní se zobrazení těchto 2 píků v poměru 1:1000, protože objem koule je roven  $(4/3\pi(d/2)^3)$ . Převedu-li dále „objemovou distribuci“ na distribuci intenzity, zobrazí se píky v poměru 1: 1000.000, protože intenzita rozptylu je úměrná  $D^6$  (Rayleighova aproximace) viz obr. 25. [46].



Obrázek č.25-Porovnání distribuce Intenzity, objemu a počtu [46].

Zeta sizer nano systém představuje měřicí techniku, která je schopna změřit velikost částic, Zeta-potenciál a Molekulovou hmotnost částic, molekul a kapalného média.

Před vlastním měřením se nastaví požadované parametry např. typ materiálu, použité rozpouštědlo, teplota typ měřící cely aj.. Připravený vzorek s dispergovanými částicemi se nadávkuje do měřící kyvety, opatří se zátkou, vloží se do komory měřící jednotky a spuštěním vybrané měřící metody se vzorek automaticky proměří.

### 5.2.2 UV/Vis spektroskopie

K měření UV-VIS spekter byl použit dvoupráskový UV-VIS spektrofotometr (Helios Alpha-Thermo Spectronic). Jedná se o spektrofotometr s rozsahem vlnových délek 190-1100nm, šířkou štěrbiny 2nm, fotometrickým šumem  $< 0,0001$ , sedmipolohovým programátorem na 1cm kyvety a s komunikací přes rozhraní RS232, 1.44" HDD. Tento přístroj je vybaven disketovou mechanikou pro ukládání metod, kalibračních křivek a výsledků měření s grafickým LCD [60].

Pro měření byla nachystána koncentrace kyseliny hyaluronové tak, aby došlo k optimální absorpci ( $A = 1-3$ ). Adekvátně k těmto koncentracím byly připraveny roztoky přidávaného benzalkonia chloridu, tak aby byl ponechán poměr molekul BAC ku HA jako u ostatních měření. Touto metodou byly proměřeny 4 různé přídávky 0,5% benzalkonia chloridu 290; 600; 900 a 1200 $\mu$ l v 25 ml HA. Kromě toho byla změřena absorpční spektra čistého roztoku kyseliny hyaluronové a uvedené 4 přídávky BAC v 25ml připraveného fosfátového pufru, které byly použity k porovnání a následnému vyhodnocení získaných spekter. Veškeré měření bylo provedeno při laboratorní teplotě 25°C.

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

V této práci bylo našim cílem charakterizovat, jakým způsobem přídavky kvartérních amoniových solí (BAC) ovlivňují chování klubek hyaluronanu. Kyselina hyaluronová se chová jako záporný elektrolyt, který má ve vodném prostředí schopnost navazovat kladně nabitě ionty. Toto navázání způsobí změnu celkového náboje a tím i její konformaci, velikost a vlastnosti. K analýze změn chování HA s přídavkem kvartérních solí jsme si vybrali Zeta sizer nano systém k měření velikosti částic (metoda DLS) a UV-VIS spektroskopii.

### 6.1 Měření velikosti částic

Z výsledků prezentovaných v literatuře je známo, že hydrofobní interakce mezi uhlovodíkovými částmi molekuly u povrchově aktivních látek, způsobují postupnou tvorbu micel. Kationaktivní tenzidy patřící ke kvartérním amoniovým solím (např. BAC), představují známou skupinu látek, u které lze jejich roztokové vlastnosti a chování odhadnout např. z kritické micelární koncentrace (cmc). Počet agregací a termodynamické vlastnosti, simultánně nebo synergicky ovlivňují povrchově aktivní ionty, které zapříčiňují posílení buď hydrofobní interakce, nebo hydrofilní interakce s rozpouštědlem hydrofobního řetězce s hydrofilními skupinami. Srovnání cmc pro homologické řady kationaktivních kvartérních solí ukazuje, že s rostoucí délkou uhlovodíkového řetězce (důsledek vyšší hydrofobní interakce mezi počtem iontů a micelárním jádrem), nastává pokles koncentrace, při které dochází k degradaci vzhledem k vyšší hydrofobní interakci mezi počtem iontů a micelárním jádrem. Rostoucí délka řetězce zvyšuje i průměrný počet micelárních agregací. Kritická micelární koncentrace je při stejné délce řetězce tenzidů, menší u iontů bromu než u iontů chloru. Tyto ionty se liší svojí velikostí v roztoku. Průměrný počet vázaných molekul na iont bromu je menší než u chloru. Proto je hydratace chloridových iontů větší než bromidových. To vede k většímu elektrostatickému odpuzování mezi hlavní skupinou povrchově aktivní látky [61,62].

Hlavní řídicí silou, která odpovídá za asociaci v systému polymer-surfaktant, jsou elektrostatické a hydrofobní interakce mezi molekulami surfaktanu, polymerními molekulami, molekulami polymer-surfaktant a vzájemné interakce mezi strukturou surfaktanu a nábojovou hustotou polymeru s nábojem (polyelektrolytu) [63].

Hyaluronát sodný je lineární polysacharid, který se ve vodných roztocích chová jako slabý polyelektrolyt. Toto chování vyplývá z přítomnosti zbytku kyseliny glukoronové, která je při neutrálním pH plně disociována [63].

M. Pisárčik a kolektiv [64], se zabývali agregačními vlastnostmi hyaluronátu s různými typy surfaktantů ve vodných roztocích NaCl, s využitím metody statického a dynamického rozptylu světla. Došli k závěru, že v důsledku silné elektrostatické interakce mezi opačně nabitým polymerem a surfaktantem, dochází k mírnému poklesu gyračního poloměru v závislosti na rostoucí koncentraci kationického surfaktantu. Gyrační poloměr klesá ze 102 na 85 nm při použití poměru  $c/c_{mc}$  0,5-5,0. Předmětem této práce je prostudovat chování polymerních klubek HA v roztoku pufru s přídavkem BAC pod kritickou micelární koncentrací BAC, tak aby nebyla překročena povolená koncentrace BAC pro oftalmologické aplikace.

Měření velikosti částic, polymerních klubek HA v roztoku bylo prováděno pro tři střední koncentrace HA:

a)  $5,9 \cdot 10^{-7} \pm 0,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

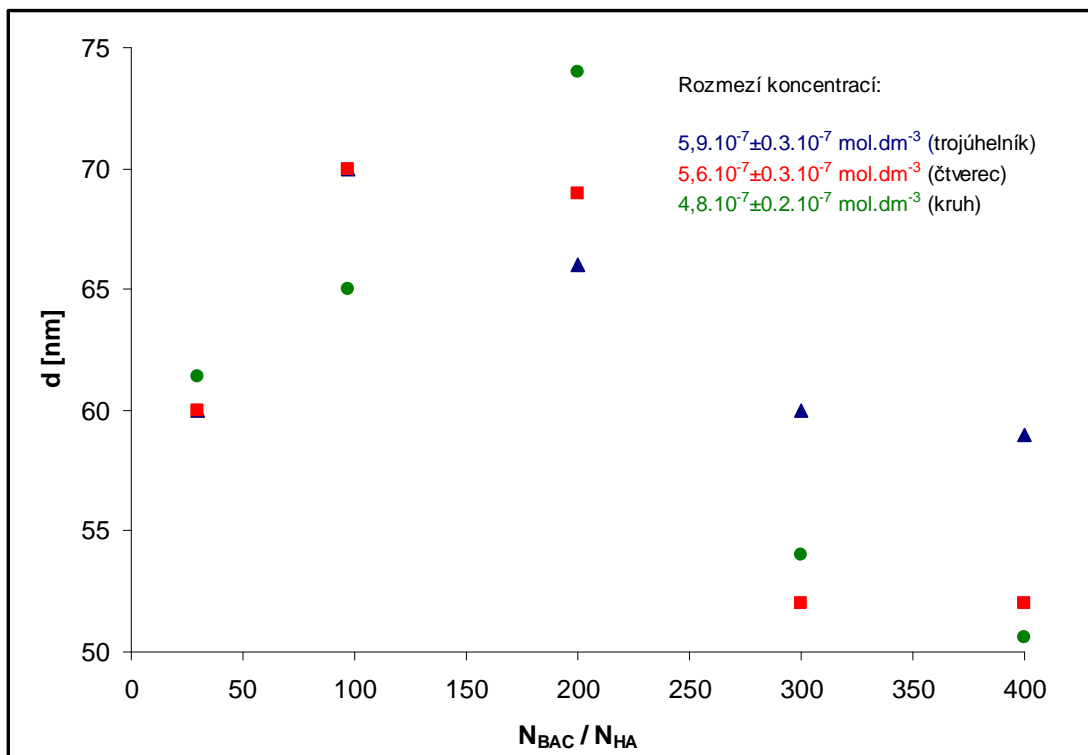
b)  $5,6 \cdot 10^{-7} \pm 0,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

c)  $4,8 \cdot 10^{-7} \pm 0,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

Přídavek BAC (zástupce kationaktivních surfaktantů) do roztoku HA, prokázal mírný trend změny, růstu a následného poklesu velikosti částic vlivem přítomnosti těchto různých koncentrací BAC v rozmezí  $0,3 \cdot 10^{-3}$  až  $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Jak bylo zmíněno výše, nejvyšší použitá koncentrace přidávaného BAC, se pohybovala pod hranicí jeho kritické micelární koncentrace,  $cmc_{BAC} = 8,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  [62].

Koncentrace HA v roztoku, viz. body a) až c) na této stránce, jsou uvedeny záměrně s danou chybou a to z důvodu změny koncentrace HA vzhledem k přídavku BAC. Koncentrace HA se měnila, tak aby ve všech srovnávaných případech na obr. 26, respektive vzhledem k obr. 27 až 29, byl stejný poměr počtu molekul BAC ( $N_{BAC}$ ) k HA ( $N_{HA}$ ). To znamená, že se jednalo o přídavek 30, 97, 200, 300, 400 molekul BAC na jednu makromolekulu HA při libovolném zředění, jemuž odpovídají tyto uvedené rozsahy koncentrací pod body a) až c) na této stránce a rovněž výsledky prezentované na obr. 27 až 29.



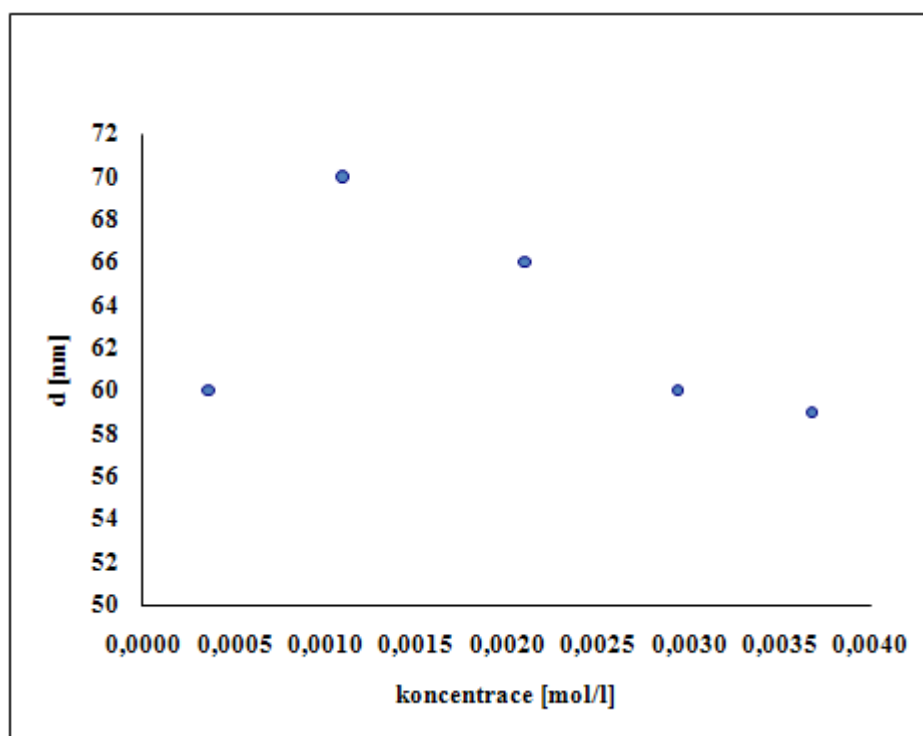


Obrázek č.26-Srovnání různým koncentračních rozmezí HA v roztoku pro daný poměr počtu molekul BAC ( $N_{BAC}$ ) k jedné makromolekule HA ( $N_{HA}$ ).

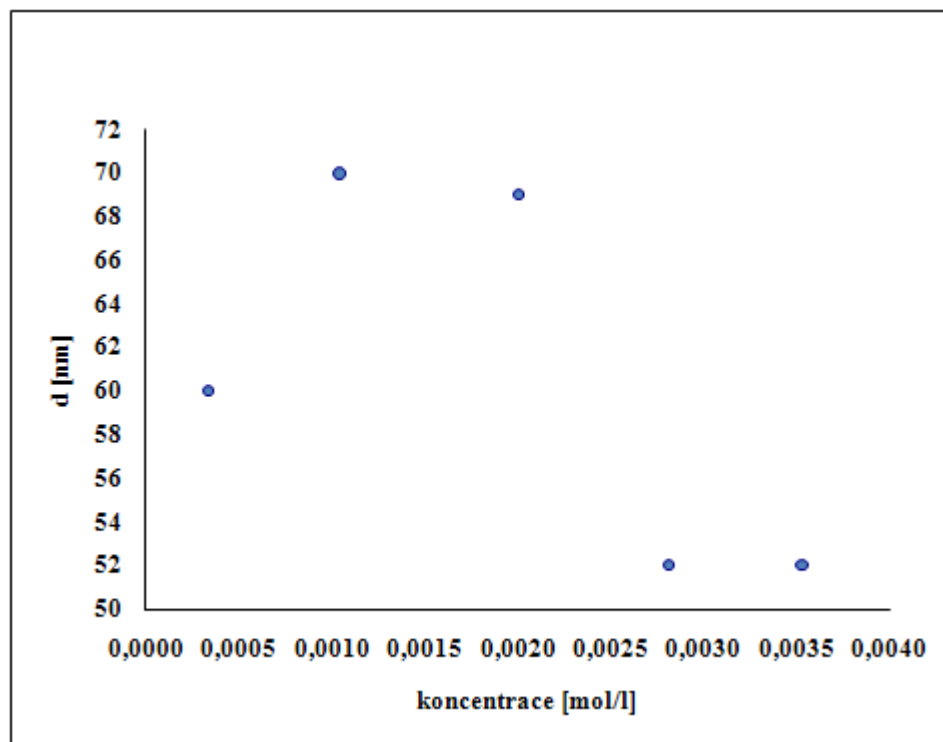
Z naměřených hodnot hydrodynamického průměru částic, viz. obr. 27 až 29, lze proto usoudit, že tyto přísady BAC určitým způsobem ovlivňují strukturní chování roztoků HA. Kyselina hyaluronová zaujímá v roztoku konformaci sbaleného klubka o středním průměru 57 nm, viz. tabulka č. 3. Postupnými přísadky BAC do jejího roztoku, dohází k pozvolné, postupné expanzi řetězce HA, procházející určitým maximem, viz. obr. 27 až 29. Velikost částic roste, od 60 nm pro přidavek 90  $\mu\text{m}$  BAC po 70 nm pro přidavek 290  $\mu\text{m}$ . Po překročení této meze, kritické koncentrace použitého BAC, se hyaluronový řetězec opětovně sbaluje. Hodnota hydrodynamického průměru částice klesá (od 66 nm pro přidavek 600  $\mu\text{m}$  BAC po 59 nm pro přidavek 1200  $\mu\text{m}$ ). Tento trend a teoretické závěry potvrzují naměřená data, která byla opakovaně (3 až 5 krát) proměřena z důvodu vyloučení případné chyby měření, viz. výsledky uveeny na obr. 27 až 29.

Použitá metoda DLS představuje velmi komplikovanou, citlivou a poměrně složitou metodu měření velikosti částic u polysacharidů (HA), vzhledem k optimalizaci podmínek měření, jako je koncentrace polymeru v roztoku. Jinou, velmi přesnou metodu pro charakterizaci chování roztoků HA s přísádky HA, by mohla být metoda gelové permeační chromatografie, na kterou bychom se v budoucnu chtěli zaměřit.

Vybrané výsledky měření pomocí DLS, středních velikostí a distribuce částic jsou součástí této části práce a dále uvedeny v příloze.



Obrázek č.27-Grafické vyjádření střední velikosti polymerních klubek HA na koncentraci BAC, pro střední koncentraci HA v roztoku  $5,9 \cdot 10^{-7} \pm 0,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

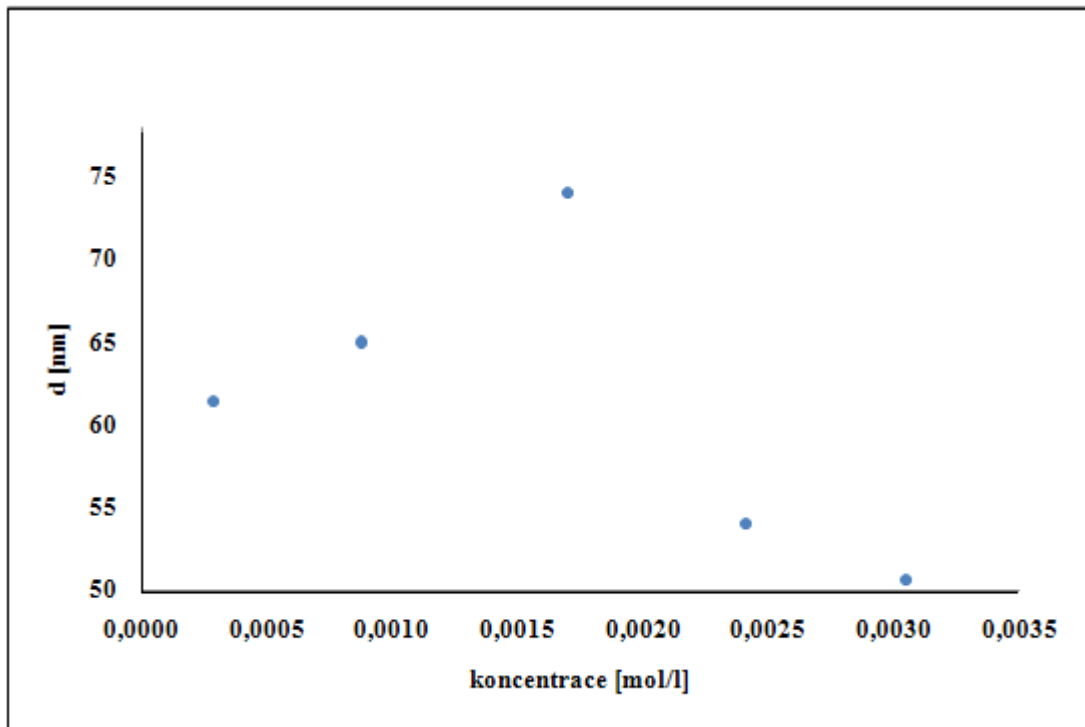


Obrázek č.28-Grafické vyjádření střední velikosti polymerních klubek HA na koncentraci BAC, pro střední koncentraci HA v roztoku  $5,6 \cdot 10^{-7} \pm 0,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Grafické vyjádření závislosti velikosti částic HA na přídavcích BAC pro tři rozdílné koncentrace použité HA, jsou uvedeny na obr. 27 až 29. Tyto rozdílné koncentrace byly voleny záměrně z důvodu objasnění vlivu vzájemného podílu HA / BAC a dále pak z důvodů optimalizace získaných dat měřených pomocí DLS, jak bylo naznačeno výše.

Z průběhu závislosti uvedených na obr. 27 až 29 je patrné, že nad kritickou hodnotou použité koncentrace kvartérní soli (BAC), dochází ke změně (poklesu) velikosti částic, což částečně koresponduje s výsledky uvedenými ve studii M.A.Vilettiho a kolektivu [63], kteří rovněž zjistili, že po určité době střední hydrodynamický průměr částic klesá s rostoucí koncentrací surfaktantu. Nicméně v této práci jsme používali daleko nižší koncentrace BAC, z důvodů požadavků daných oftalmologickými aplikacemi.

Pro názornost jsou střední změny velikosti částice u každého přídavku BAC, ze zásobního roztoku  $c_{\text{BAC}} = 14,706 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , který byl přidáván do roztoku pufru s HA, uvedeny v tabulce č. 3 a 4. Toto ředění probíhalo tak aby byly dodrženy standardní podmínky experimentu, které lze použít pro srovnání výsledků jednotlivých měření.



Obrázek č.29-Grafické vyjádření střední velikosti polymerních klubek HA na koncentraci BAC, pro střední koncentraci HA v roztoku  $4,8 \cdot 10^{-7} \pm 0,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

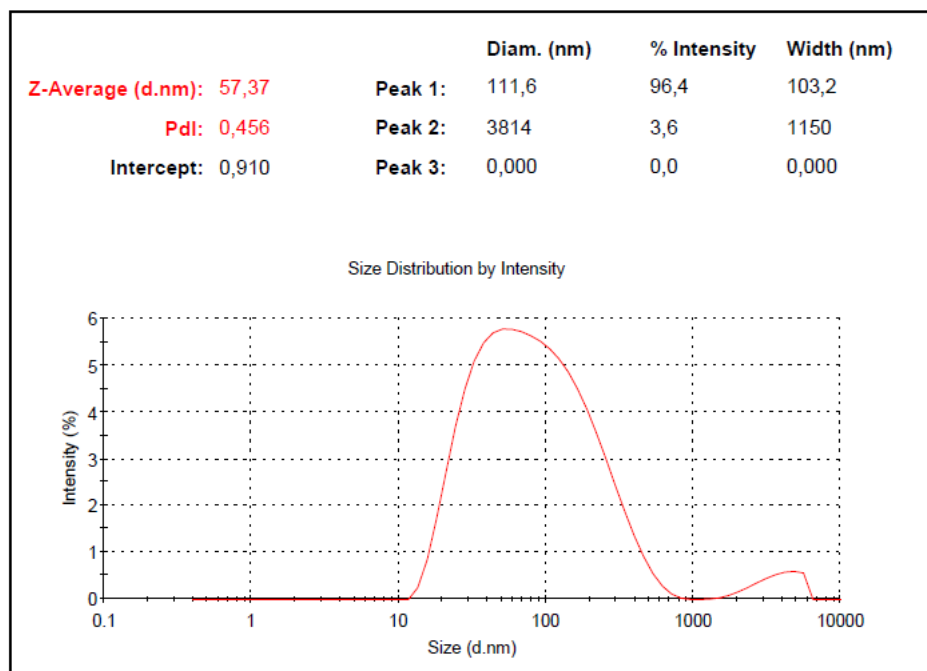
Tabulka č.3- Střední velikost částic HA      Tabulka č.4 – Střední velikost částic HA po přidavku BAC

d [nm]	
čistá HA	57

přídavek BAC	d [nm]
90µl	60
290µl	70
600µl	66
900µl	60
1200µl	59
90µl	60
290µl	70
600µl	69
900µl	52
1200µl	52
90µl	67
290µl	65
600µl	74
900µl	54
1200µl	61

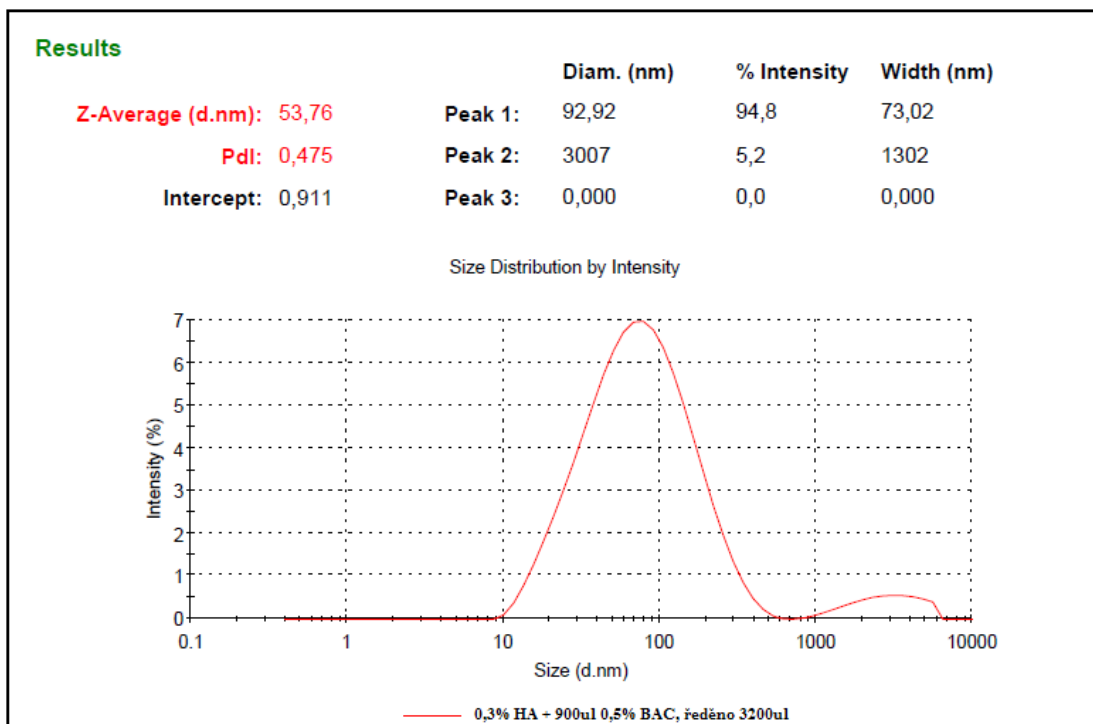
Intenzitní distribuci velikosti částic HA v roztoku připraveného ředěním, můžeme vidět na obr. 30. Bylo použito ředění 1400 $\mu$ l 0,3% roztoku HA pomocí 3100 $\mu$ l fosfátovém pufru.

Na grafickém zobrazení, viz. obr. 30, jsou přítomny bimodální píky. Jeden z těchto píků představuje hydrodynamický průměr HA a druhý pík je pravděpodobně výsledkem agregace některých částic. U vysokomolekulárních látek přítomnost i nepatrného množství agregátu může významně ovlivnit výsledek celého měření. Z křivky této distribuce je zřejmá přítomnost určité frakce, která je na hranici měřitelnosti přístroje a objemově odpovídá asi 6%.



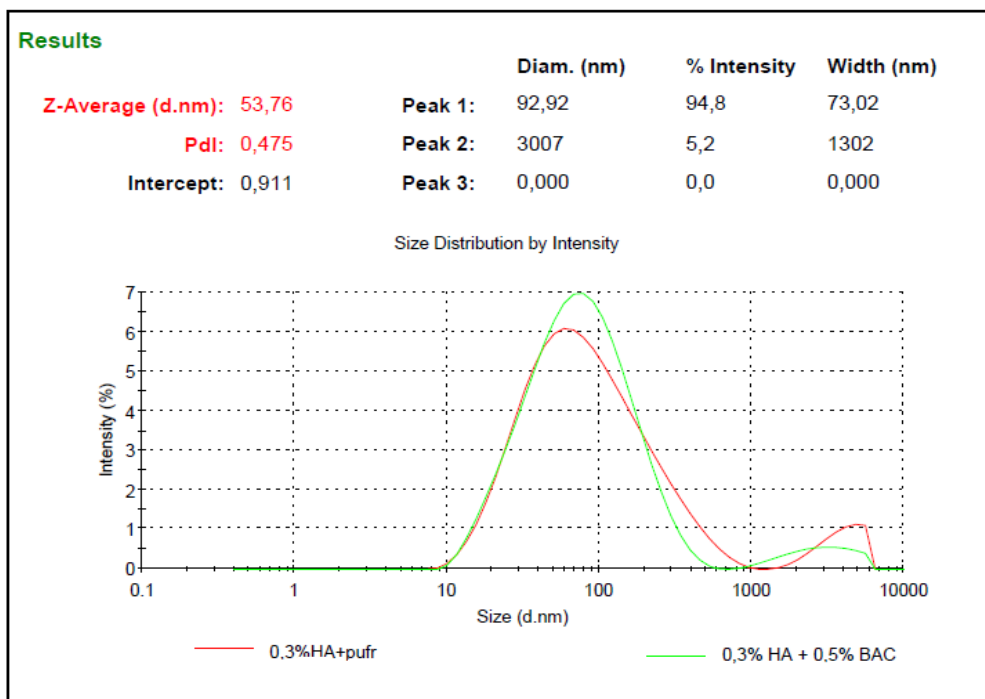
*Obrázek č.30 - Intenzitní distribuce velikosti částic čisté HA*

Na obr. 31 je přiložena intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 900 $\mu$ l zásobního roztoku BAC, pro celkovou koncentraci HA  $4,8 \cdot 10^{-7} \pm 0,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . V grafu se objevuje zřetelný monodální pík, kterému přísluší hodnota Z-average 53 nm.



*Obrázek č.31 – Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 900 $\mu$ l BAC*

Zajímavé je porovnání měřených výsledků pro čistou HA a HA s vyšším přidavkem BAC, kde střední velikost klubek HA dosahuje menších hodnot. Tento rozdíl je vidět na obr.32., kde pro oba dva vzorky byly srovnatelné koncentrace HA v roztoku,  $4,8 \cdot 10^{-7} \pm 0,2 \cdot 10^{-7}$  mol $\cdot$ dm $^{-3}$ .

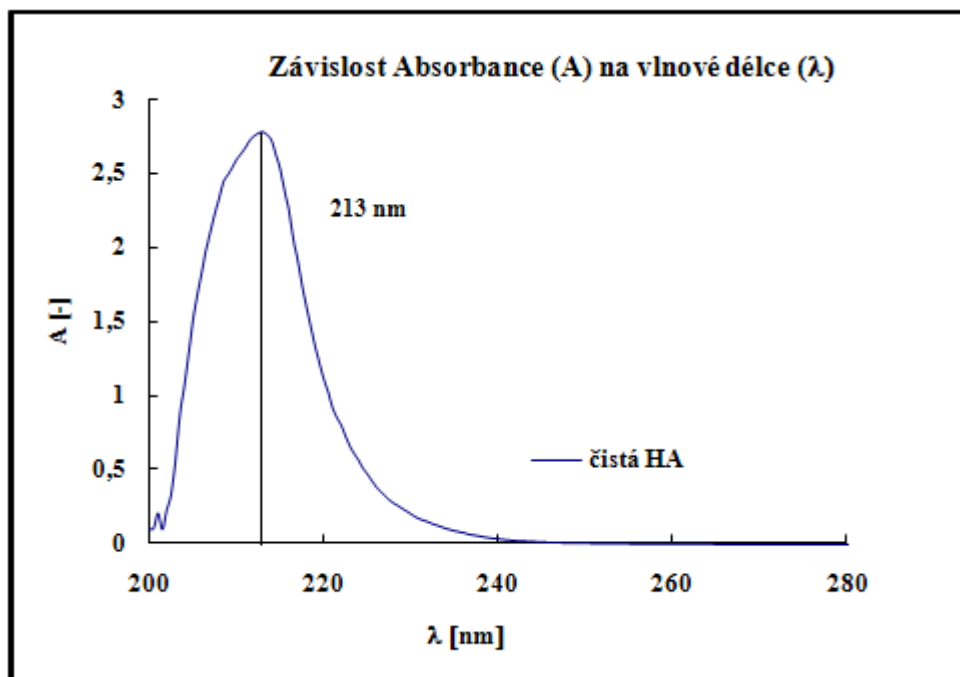


Obrázek č.32 – Grafické srovnání intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 900 $\mu$ l BAC (zelená křivka) s čistou HA (červená křivka)

Zbývající měřené distribuce velikosti částic pro jednotlivé přídavky BAC do daných roztoků HA, jsou vloženy v příloze této diplomové práce.

## 6.2 Měření UV-VIS spekter

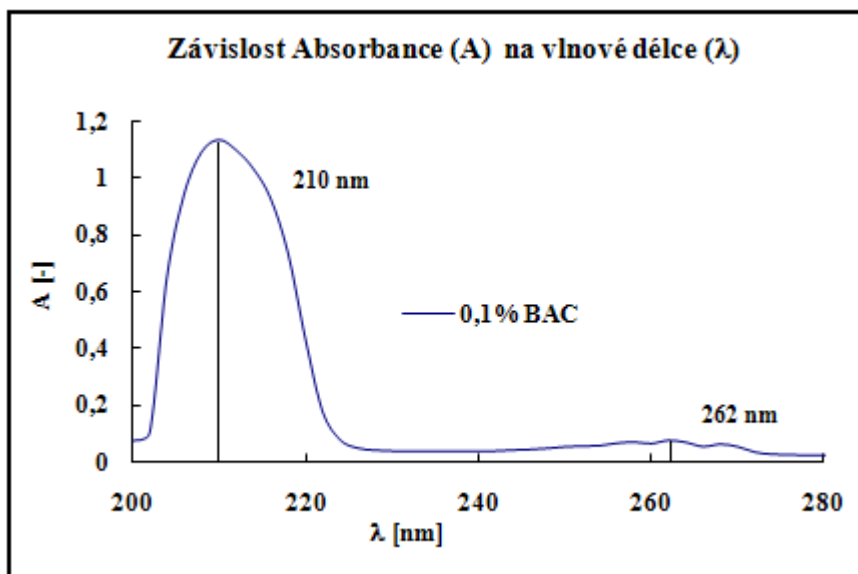
Vliv přísad kvartérních amoniových solí, v našem případě benzalkonia chloridu, na chování hyaluronanu byl taky sledován pomocí UV-VIS spektroskopie. Nejprve bylo změřeno absorpční spektrum čistého roztoku kyseliny hyaluronové. Toto spektrum je zobrazeno na obr.č.33.



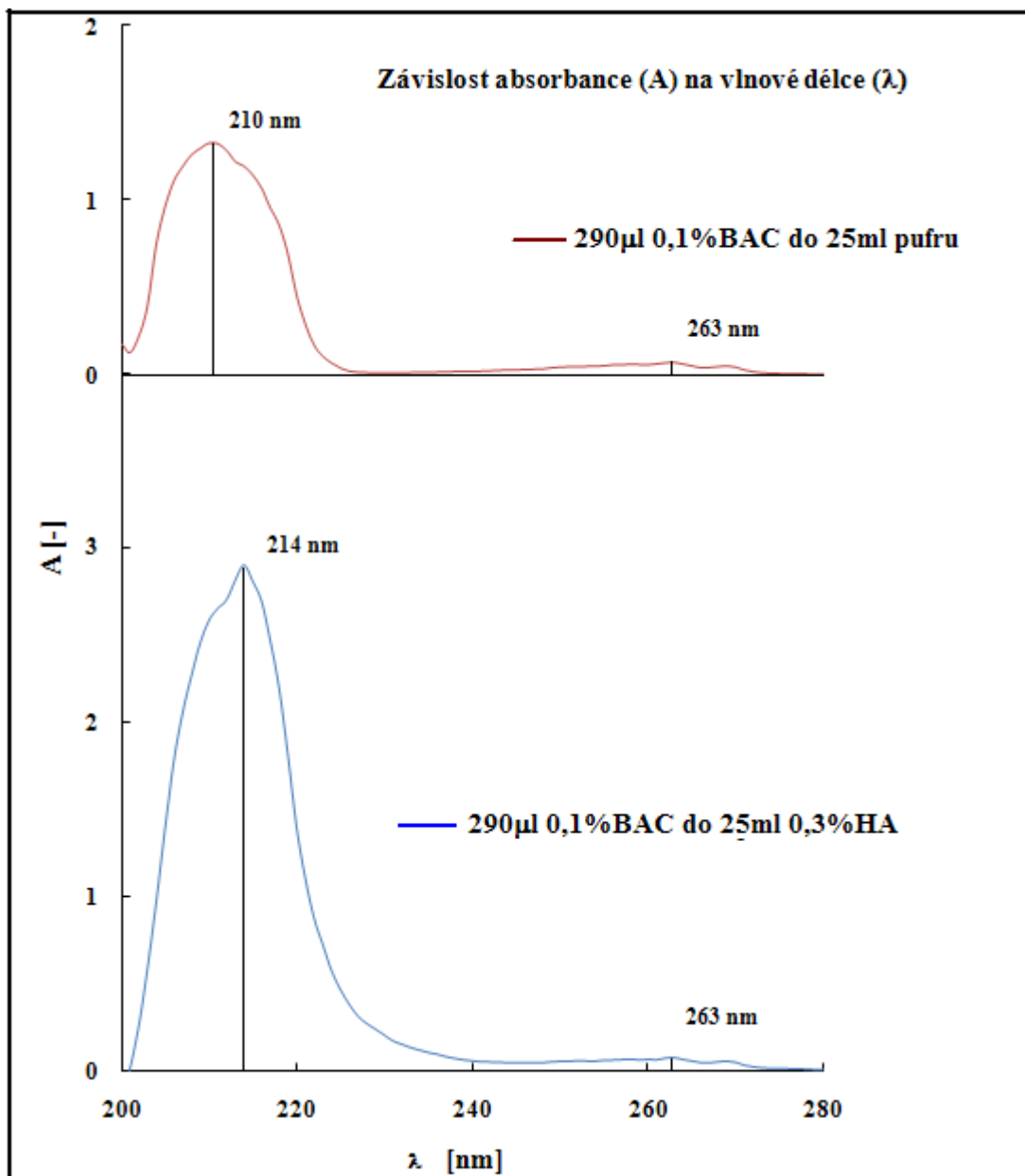
Obrázek č.33-Absorpční spektrum 0,3% Kyseliny hyaluronové

V UV spektru dochází k absorpci při vlnové délce  $\sim 213$ nm, která odpovídá karboxylové skupině. Tento výrazný monomodální pík, je pro kyselinu hyaluronovou typický. Obrázek č.34 představuje změřené spektrum čistého roztoku BAC. Absorpční spektrum HA s 290 $\mu$ l BAC s přísadkou 290 $\mu$ l BAC popisuje obr č.35.



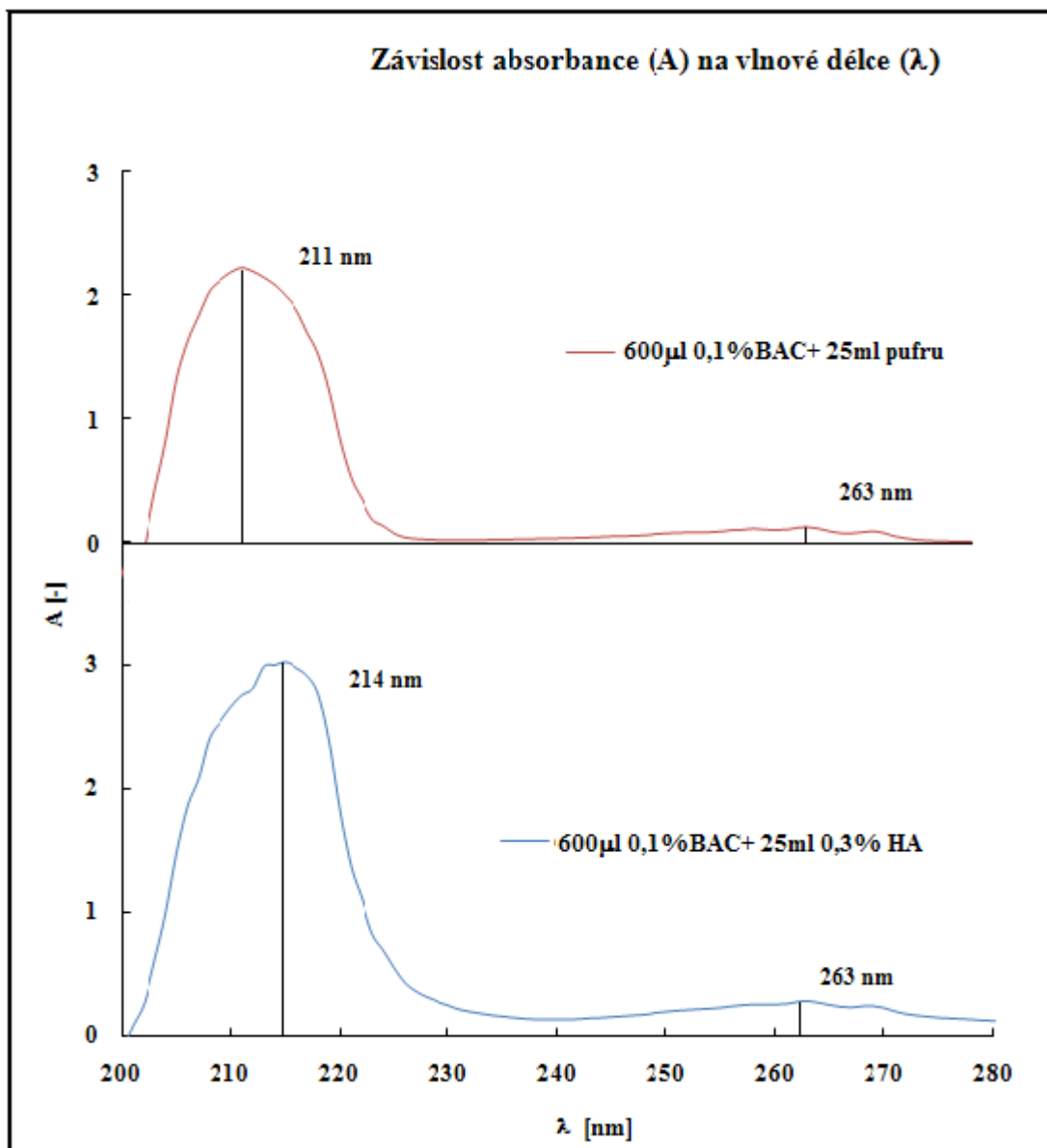


Obrázek č.34- Absorpční spektrum 0,1% Benzalkonia chloridu

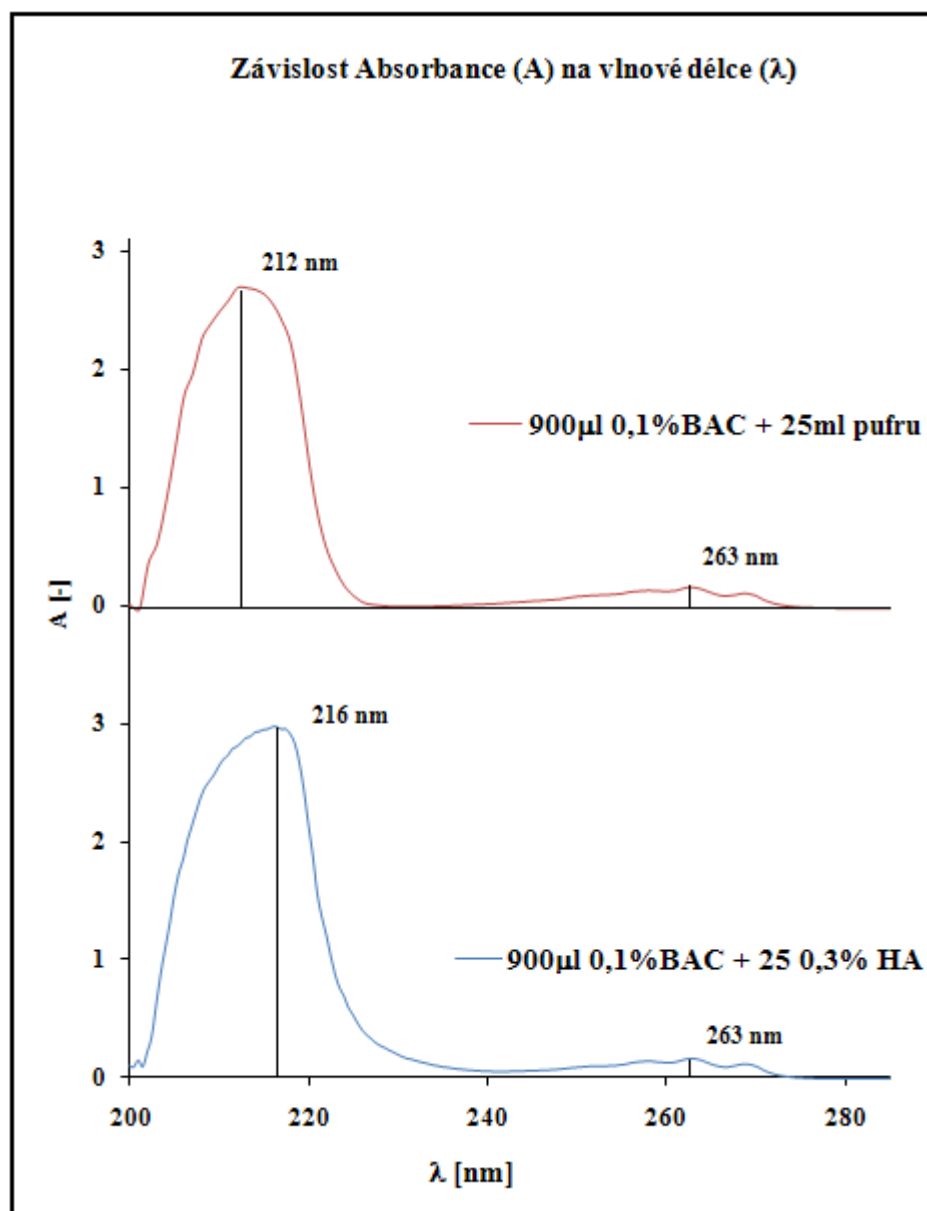


*Obrázek č.35-Absorpční spektrum fosfátového pufru s přidavkem 290µl BAC (vlevo) a 0,3% HA s 290µl BAC (vpravo)*

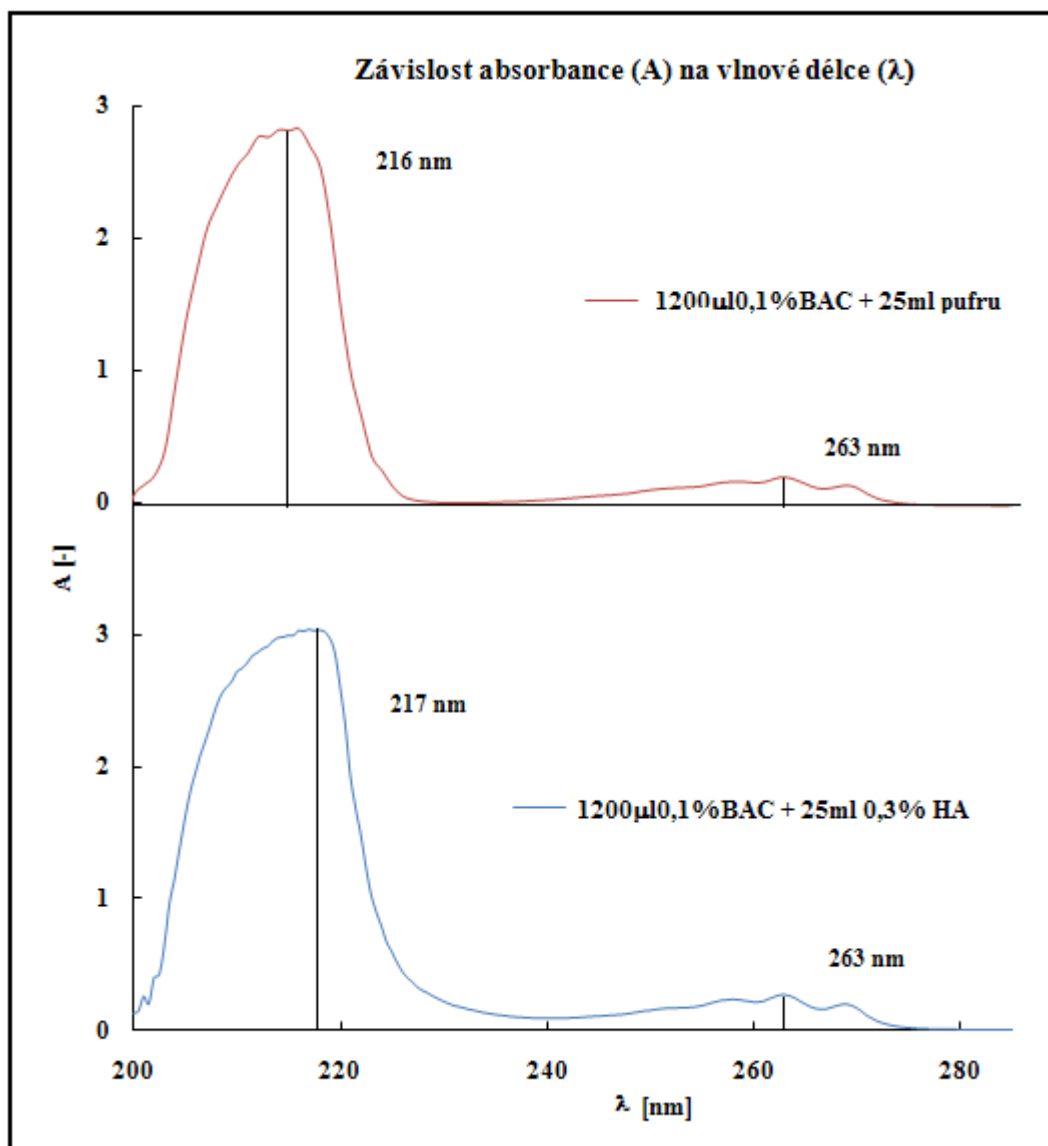
Při porovnání absorpčního spektra s čistou HA je vidět, že v oblasti vlnové délky 260-280nm došlo k vytvoření nepatrné absorpci. Tento pík bude odpovídat přidané kvartérní amoniové soli.



Obrázek č.36- Absorpční spektrum fosfátového pufru s přidavkem 600  $\mu$ l BAC (vlevo) a 0,3% HA s 600  $\mu$ l BAC (vpravo)



Obrázek č.37- Absorpční spektrum fosfátového pufu s přidavkem 900  $\mu$ l BAC (vlevo) a 0,3% HA s 900  $\mu$ l BAC (vpravo)



*Obrázek č.38- Absorpční spektrum fosfátového pufru s přidavkem 1200  $\mu$ l BAC (vlevo) a 0,3% HA s 1200  $\mu$ l BAC (vpravo)*

Pokud si projdeme naměřená absorpční spektra všech přísadků, dojdeme k závěru, že s rostoucím přísadkem BAC, roste i jeho absorbance (prvního i druhého píku) a tím i vliv kvartérní amoniové soli na strukturu a chování hyaluronanu. Nepatrný růst absorbance obou píků, je vidět v tab. č.4.

Tabulka č.5. Příslušné hodnoty absorpance a vlnové délky u jednotlivých přídavek BAC do HA

přídavek BAC do 0,3% HA [ $\mu$ l]	1.pík		2.pík	
	A [-]	$\lambda$ [nm]	A [-]	$\lambda$ [nm]
290 $\mu$ l	2,90	214	0,08	263
600 $\mu$ l	3,00	214	0,28	263
900 $\mu$ l	2,97	216	0,16	263
1200 $\mu$ l	3,04	217	0,28	263
vzorek	A [-]	$\lambda$ [nm]	A [-]	$\lambda$ [nm]
90 $\mu$ l	2,78	213	-	-
290 $\mu$ l	1,13	210	0,08	262

Tabulka č.6- Příslušné hodnoty absorpance a vlnové délky u jednotlivých přídavek čistého BAC

čistý přídavek BAC [ $\mu$ l]	1.pík		2.pík	
	A [-]	$\lambda$ [nm]	A [-]	$\lambda$ [nm]
290 $\mu$ l	1,32	210	0,06	263
600 $\mu$ l	2,22	211	0,12	263
900 $\mu$ l	2,71	212	0,17	263
1200 $\mu$ l	2,84	216	0,20	263

## ZÁVĚR

V diplomové práci bylo studováno chováním klubek hyaluronanu v roztocích kvartérní soli – Benzalkonium chloridu. Cílem bylo pokusit se přiblížit interakční chování, konformační změny struktury kyseliny hyaluronové a přidávaného BAC. Použité koncentrace přísad BAC, byly zvoleny cíleně, kvůli zachování podobnosti s oftalmologickými aplikacemi.

Kyselina hyaluronová je záporný polyelektrolyt, který v roztoku zaujímá konformaci náhodného (statistického) klubka. Postupným navazováním opačně nabitých iontů z roztoku, se sbalená konformace postupně expanduje, mění uspořádání hyaluronanu v roztoku.

K charakterizaci chování roztoků kyseliny hyaluronové byla použita UV/VIS spektroskopie a metoda měření velikosti částic na principu dynamického rozptylu světla. Ze získaných UV absorpčních spekter připravených roztoků lze dojít k závěru, že s rostoucí koncentrací BAC, roste i jeho absorbance a tím i vliv kvartérní amoniové soli na strukturu a chování hyaluronanu. Na této metodě se nedá dost dobře prokázat zjištěná změna konformace řetězce kyseliny hyaluronové, ke které byly použity metody DLS.

Při měření velikosti částic bylo zjištěno, přes obtíže jenž se vyskytují u použití metody DLS pro roztoky polysacharidů (HA), že s postupným zvyšováním podílu BAC vzhledem k HA, roste střední velikost částic, klubko se rozbaluje. Po dosažení koncentračního maxima se expanze zastavuje, a dochází k poklesu hydrodynamického průměru částic, polymerní řetězec se sbaluje. Toto pozorování doplňuje a zároveň koreluje s výsledky prezentovanými v literatuře pro vyšší koncentrace BAC v roztoku, které není možné použít v oftalmologických aplikacích.

V budoucnu bude nezbytné pro studium této problematiky, rovněž použít jiné měřicí metody, které chování roztoků HA s přísadkou BAC osvětlí z jiného pohledu.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] Sliva, J., Minařík J., Hyaluronát – nejen pasivní pozorovatel, nýbrž aktivní modulátor imunitních reakcí. *New EU Magazine of Medicine*, 2009, roč.1, č.2, s.75-79.
- [2] Shalaby W. S., Karen J. L., *Burg Absorbable and Biodegradable polymers: USA*: CRC Press, 289p. ISBN 978-0-8493-1484-1 (hardback) 978-0-203-49301-4 (electronic)
- [3] Lapcik L., Lapcik L. Jr., Smedt de S., Demeester J. Chabreck P., Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. *Chem. Rev.*, 1998, vol. 98, no. 8, p. 2663-2684.
- [4] Necas J., Bartosikova L., Brauner P., Kolar J., Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinari Medicina*, 2008, vol. 53, no. 8, p. 397-411.
- [5] Prehm P., Hyaluronan., Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Waldeyerstr. 15, D-48129 Münster, Germany; 379-386
- [6] Leach J. Baier., Schmid E. Christine. Hyaluronan, *Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering*. USA, Texas, DO: 10.1081/E-EBBE 120007317
- [7] Phillips O. Glyn., Kennedy J. F., Williams A. Peter. Hyaluronan: Chemical, biological and biological aspects: England: Woodhead Publishong Ltd, 2002. 560p. ISBN 1 85573 570 9 (2 volume set)
- [8] Hyaluronic acid and wound healing. Dostupné na:  
<http://www.medira.co.uk/downloads/Hyaluronic%20acid%20and%20wound%20healing.pdf>
- [9] Hong S. S., Chen J., Zhang J. G., Tao Y. Ch., Liu Y. L. Purification and Structure Identification of Hyaluronic Acid. *Chinese Chemical Letters*. 2004, Vol. 15, No. 7, p. 811-812.
- [10] Benešová K., Pekař M., Lapčík L., Kučerík J. Stability evaluation of n-alkyl hyaluronic acid Derivates by dsc and tg measurement. *Journal of Thermal Analyses and Calorimetry*. 2006, Vol. 83, no.2, p. 341-348
- [11] Brown M.B., Jones S.A., Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *European Academy of Dermatology and venereology*. 2005, Vol.19, p.308-318
- [12] Bartůňková J., Goetz P., Chromý V., Jabor A., Jirásek J.E., Mareš J., Palička V., Pelouch V., Průša R., Štern P., Zima T., *Patobiochemie buňky: učební texty*. Praha, Univerzita Karlova v Praze, 2. Lékařská fakulta, 2003, s. 54.



- [13] Oligo a polysacharidy Rostlinného a živočišného původu. Dostupné na:  
<http://www.vscht.cz/lam/new/VKzCHPrirL9.pdf>
- [14] Hascall Vincent C., Hyaluronan: structure and physical properties. Dostupné na:  
(<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/hyaluronanE.html>)
- [15] Kučerová I., Doubravová K., Škrdlantová M., Prošek T., Šerák J., Kouřil M., Bárto-  
vá B., Pavlíčková M., Pospíšilová I., Novák P., Kubatík T., Návody K Laboratorním  
Pracím. VŠCHT
- [16] Knudson W., Knudson Cheryl B., The hyaluronan receptor, CD44. Dostupné na:  
([www.glycoforum.gr.jp](http://www.glycoforum.gr.jp))
- [17] Šafránková B., Role hyaluronanu v rozvoji aterosklerózy. Bakalářská práce. Brno,  
Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2008, s.39, vedoucí diplomové prá-  
ce: Kubala L.
- [18] Fučíková T. a kolektiv, Základy klinické imunologie: Praktický slovník medicíny,  
Praha: RDI PRESS a Agentura KRIGL, 1994,
- [19] Höh H. Kyselina hyaluronová v oftalmologii. Neubrandenburg, ursafarm, 2005,  
s.48
- [20] <http://lekarske.slovniky.cz>
- [21] Hrazdírka L., a Beránková L., Handl M., Frei R., Komplexní pohled na poranění hle-  
zenního kloubu ve sportu. Ortopedie. 2008, roč. 2., č.6., s. 267-275
- [22] Olejárová M., Symptomatická terapie osteoartrózy. Praha, Univerzita Karlova, sub-  
katedra revmatologie IPVZ. Dostupné na:  
<http://www.farmakoterapie.cz/cz/Clanek/564#lit>
- [23] Paichl P., Smysly. Dostupné na: <http://www.paichl.cz/paichl/knihy/Smysly.htm>
- [24] Valentová Z., Dezinfekční látky: Informativní Rešerše, D11-25 - (CPN), LHR  
221, 2007, s. 37.
- [25] Hampl F., Biomimetika - Organizované Vrstvy, Liposomy. Praha, VŠCHT, Ústav  
organické chemie, s. 181-192.
- [26] Šmidrkal J., Tenzidy a detergenty dnes. Chemické listy, 1999, 93, s. 421-427.
- [27] Fyziologie mikroorganismů. Dostupné na:  
(<http://fzp.ujep.cz/~trogl/6Fyziologie.pdf>)

- [28] Sa'ib Al-khouri, UV/Vis and CD Spectral Studies of the Interaction between Pincyanol Chloride and Alginates,  $\gamma$ -Cyclodextrin, and Aerosol-OT, 2003, der fakultät für naturwissenschaften der universität duisburg-essen, p. 120.
- [29] Arugonda S. K., Quaternary Ammonium. New zealand, University of Otago, school of pharmacy, 1998, p.22.
- [30] Zhuoqun Z., Tinghua W., Xiaoping Z., The synthesis of quaternary ammonium salts from ammonium salts and dialkyl carbonate. Chem. Commun.2006, p.1864-1865.
- [31] Quaternary ammonium compounds in cosmetic products; Risk assessment of antimicrobial and antibiotic resistance development in microorganisms; Opinion of the Panel on Biological Hazards of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety, ISBN: 978-82-8082-339-7
- [32] Kopecky F., Fazikaš T., Kopecká B., Kaclík P., Hydrophobicity and critical micelle concentration of some QAS with one or two hydrofobic tails. Acta. Facult. Pharm. Univ. Comenianae. 2007, Vol. 54. P. 84-94.
- [33] Elektromagnetické záření: Učební texty. Ostrava, FBI-VŠB-TU-Ostrava, 7.s.,
- [34] Analysis of Benzalkonium Chloride on the Acclaim Surfactant Column by High-Performance Liquid Chromatography, DIONEX, Application Note 237
- [35] Kratochvil F., Benzalkonium chlorid. Im-Bio-Pharm Consult, Brno. [www.epitesty.cz](http://www.epitesty.cz)
- [36] Hlinomazová Z., Konzervační látky a oftalmologika, Suché oko. Dostupn na: <http://www.sucheoko.sk/sk/konzervacnilatky.htm>
- [37] <http://genetika.wz.cz>
- [38] T. Provder(ed.) Particle size distribution Assessment and characterization American chemmical society, 1987, vol. 322,
- [39] Study, Elizalde O., Leal G. P., Leiza J. R., Particle Size Distribution Measurements of Polymeric Dispersions: Part. Part. Syst. Charact. 2000, Vol.17., 236-243.
- [40] Bartovská L., Šišková M. Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav. 5. vyd., Praha, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2005. ISBN 80-7080-579-X
- [41] Pabst W., Gregorová E., Charakterizace částic a částicových soustav. studijní materiály FRVŠ 674 / 2007 F1 / b. Praha, VŠCHT. s. 109.

- [42] Harding S. E., Kjell M. V., Stokke B. T., Smidsrød O. Molecular weight determination of Polysaccharides: Advanced in carbohydrate analysis. Volume 1., JAI Press Ltd, 1991, p.63-144. ISBN 1-55938-265-1.
- [43] Polymer Molecular weight, chapter 3. Dostupné na:  
[http://www.ias.ac.in/initiat/sci\\_ed/resources/chemistry/MolWeight.pdf](http://www.ias.ac.in/initiat/sci_ed/resources/chemistry/MolWeight.pdf)
- [44] Sklenák L., Preparativní a separační metody: Učební texty, Ostrava, Univerzita Ostrava, 2005, s. 61.
- [45] Klímková Š., Nosek J., Pluhař T., Černík M., Vlastnosti železných nanočástic. APROCHEM. 2009, s. 3596-3602
- [46] Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes. Malvern instruments ltd,
- [47] Tscharmuter W., Photon Correlation spectroscopy in particle sizing: Instruments corporation. Encyclopedia of Analytical chemistry. USA, p. 1-13.
- [48] Wyatt K. J., Wyatt Ch. J. Dynamický rozptyl světla – co, jak, proč? CHEMagazín, 2007, Roč. 17., č. 1., s. 12-14.
- [49] Finsy R., Particle Sizing by Quasy-elastic light Scattering. Adv. Colloid interface Sci. 1994, Vol.52., p. 78-143.
- [50] Finsy R., Jaeger de N., Particle sizing by photon correlation spectroscopy, part II., Average values, Part. Part. Syst. charact. 1991, Vol.8., p.187-193.
- [51] Finsy R., Jaeger de N., Particle sizing by photon correlation spectroscopy, part III., Mono and bimodal distributions and data analysis Part. Part. Syst. Charact. 1992, Vol.9., p.125-137.
- [52] Jaeger de N., Demeyere H., Finsy R., Smeyers R, Vanderdeelen J., Meeren van der P., Laethen van M., Particle sizing by photon correlation spectroscopy, part I. monodisperse latices influence of scattering angle and concentration of dispersed material Part. Part. Syst. Charact. 1991, Vol.8., p. 179-186.
- [53] Milde D., Spektrální metody. katedra analytické chemie. 2004-2008, dostupné na:  
<http://aix-lin.upol.cz/~milde/IM-uvod.pdf>
- [54] Káš J., Kodíček M., Valentová O., Laboratorní techniky biochemie. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2006, ISBN 80-7080-586-2.
- [55] Greenlief, UV-VIS Absorption Spectroscopy, UV-Vis-1, , CH 4200, Fall 2004.  
dostupné na:  
<http://www.chem.missouri.edu/Greenlief/courses/4200F04/Spectroscopy%20Instrumentation.pdf>

- [56] Klouda P., Moderní analytické metody. 2.vydání, nakl. Pavel Kloudal, 2003, s.132, ISBN 80-86369-07-2.
- [57] Lapčíková, B.Instrumentální metody strukturní analýzy pevné fáze: učební texty. Zlín, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.
- [58] Lapcik L. Jr., Dammer Ch., Valko M., Hyaluronic acid-copper(II) complex: Spectroscopic characterization, Colloid Polym Sci.1992, Vol. 270, p. 1049-1052.
- [59] UV-visible spectroscopy: Modern Chemical Techniques, The Royal Society of Chemistry, London 1992.
- [60] [www.vitrim.cz/inc/kat/08\\_pristroje\\_mereni\\_fyzvel.pdf](http://www.vitrim.cz/inc/kat/08_pristroje_mereni_fyzvel.pdf) (Laboratorní přístroje měření fyzikálních veličin)
- [61] Jitendra M., Dharmesh V., Prashant B., Aggregation behavior of quaternary salt based cationic surfactants, Thermochemica Acta 2005, Vol.428, p. 147–155.
- [62] Kopecký F., Fazekas T., Kopecká B., Kaclík P., Hydrophobicity and critical micelle concentration of some quaternary ammonium salts with one or two hydrophobic tails, Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae 2007, Vol. 54, p.84-94.
- [63] Villetti M. A., Borsali R., Crespo S. J., Soldi V., Fukada K., Static and dynamic light scattering of polyelectrolyte/surfactant solutions: the Na-Hyaluronate/(C<sub>10</sub>TAB) systém, Macromol. Chem. Phys. 2004, Vol. 205, p. 907-917.
- [64] Pisárčík M., Imae T., Děvínský F., Lacko I., Aggregates of sodium hyaluronate with cationic and aminoxide surfactants in aqueous solution-light scattering study, Colloids and Surfaces:Physicochem. Eng. Aspect 2001, Vol. 183-185, p. 555-562.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

HA	Kyselina hyaluronová
$M_w$	Molekulová hmotnost
CD44	Adhezivní molekuly glykoproteinové povahy vyskytující se na povrchu buněk
RHAMM	Receptor pro HA zprostředkující buněčnou mobilitu
NTG	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoquanidine
UV-VIS	Ultrafialové-viditelné oblast záření
EM	Extracelulární matrix
GAG	Glykosaminoglykany
Da	Daltony
GPC	Gelová permeační chromatografie
LYVE-1	Receptor HA nacházející se na endotelu lymfatických cév
TGF- $\beta$ 1	Transformující růstový faktor
ICAM-1	Receptor pro rinoviry
HARE	Hyaluronový receptor pro endocytozu
TLR4	Receptor indukující expresi genů zánětlivé reakce
QAS	Kvartérní amoniové soli
Syndet	Syntetický detergent
LAS	Lineární natrium-sek-alkylbenzensulfonát
AOS	$\alpha$ -olefinsulfonáty
BAC	Benzalkonium chlorid
PHMB	Polyhexamethylen-biquanid
CMC	Kritická micelární koncentrace
CPC	Kritický „sbalovací“ parametr
H-ZSM-5	Katalyzátor na bázi zeolitů

PSD	Distribuce velikost částic
DLS	Dynamický rozptyl světla
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
IČ	Infračervená spektroskopie

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek č.1-Složité struktura kyseliny hyaluronové [26] .....</i>	14
<i>Obrázek č.2- Změřené IR-spektrum a UV/VIS absorpce kde je přítomný červený posun [9]. .....</i>	16
<i>Obrázek č.3 - opakující se disacharid hyaluronanu [14] .....</i>	16
<i>Obrázek č.4- Primární struktura HA složená z opakující se disacharidové jednotky D-glucoronové kyseliny a N-acetyl-D-glucosaminu .....</i>	17
<i>Obrázek č.5- snímek z elektronového mikroskopu, kde je vidět propletený řetězec HA [14]......</i>	19
<i>Obrázek č.6-Vyobrazení různých izoforem receptoru CD44 [17] .....</i>	23
<i>Obrázek č.7-reakční mechanismus kvartérních amoniových sloučenin [24]......</i>	33
<i>Obrázek č.8 - Kritický sbalovací parametr .....</i>	36
<i>Obrázek č.9 – Jednotlivé typy vznikajících agregátů .....</i>	36
<i>Obrázek č. 10 – Základní struktura benzalkonium a cetrimonium chloridu .....</i>	37
<i>Obrázek č.11-Benzalkonium chlorid [34]. .....</i>	41
<i>Obrázek č.12- Základní typy polydisperzity. a) Monodisperze. b) „primární polydisperzita“. c) „sekundární polydisperzita“ d) Polydisperzní směs [42]......</i>	
<i>Obrázek č.13- Distribuce molekulové hmotnosti [43]. .....</i>	48
<i>Obrázek č.14 - uspořádání při rozptylu [52]. .....</i>	51
<i>Obrázek č.15- Základy metody dynamického rozptylu světla [47]. .....</i>	52
<i>Obrázek č.16- chaotický pohyb částice [48]. .....</i>	52
<i>Obrázek č.17- Definování hydrodynamického poloměru <math>R_h</math> na molekule [48]......</i>	53
<i>Obrázek č.18- Příklady časové závislosti intenzity při měření částice o rozměru 40nm a 4nm ve vodě [48]......</i>	54
<i>Obrázek č.19-Znázornění převodu časového záznamu intenzity na korelační funkci [48]. .....</i>	54
<i>Obrázek č.20 -Optické uspořádání Zetasizer nano série pro měření DLS [46]......</i>	56
<i>Obrázek č.21-Elektromagnetické spektrum podle rozsahu vlnový délek [33]. .....</i>	59
<i>Obrázek č.22- Schéma elektronových přechodů při absorpci záření [59]. .....</i>	60
<i>Obrázek č.23-Absorpční spektrum kyseliny hyaluronové (křivka1) [58]......</i>	61
<i>Obrázek č.24- Elektronové přechody v molekule [59]. .....</i>	62
<i>Obrázek č.25-Porovnání distribuce Intenzity, objemu a počtu [46]. .....</i>	69

<i>Obrázek č.26-Srovnání různým koncentračních rozmezí HA v roztoku pro daný poměr počtu molekul BAC (<math>N_{BAC}</math>) k jedné makromolekule HA (<math>N_{HA}</math>).</i>	73
<i>Obrázek č.27-Grafické vyjádření střední velikosti polymerních klubek HA na koncentraci BAC, pro střední koncentraci HA v roztoku <math>5,9 \cdot 10^7 \pm 0,3 \cdot 10^7 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}</math>.</i>	74
<i>Obrázek č.28-Grafické vyjádření střední velikosti polymerních klubek HA na koncentraci BAC, pro střední koncentraci HA v roztoku <math>5,6 \cdot 10^7 \pm 0,3 \cdot 10^7 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}</math>.</i>	75
<i>Obrázek č.29-Grafické vyjádření střední velikosti polymerních klubek HA na koncentraci BAC, pro střední koncentraci HA v roztoku <math>4,8 \cdot 10^7 \pm 0,2 \cdot 10^7 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}</math>.</i>	76
<i>Obrázek č.30 - Intenzitní distribuce velikosti částic čisté HA</i>	77
<i>Obrázek č.31 – Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 900<math>\mu\text{l}</math> BAC</i>	78
<i>Obrázek č.32 – Grafické srovnání intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 900<math>\mu\text{l}</math> BAC (zelená křivka) s čistou HA (červená křivka)</i>	79
<i>Obrázek č.33-Absorpční spektrum 0,3% Kyseliny hyaluronové</i>	80
<i>Obrázek č.34- Absorpční spektrum 0,1% Benzalkonia chloridu</i>	81
<i>Obrázek č.35-Absorpční spektrum fosfátového pufru s přidavkem 290<math>\mu\text{l}</math> BAC (vlevo) a 0,3% HA s 290<math>\mu\text{l}</math> BAC (vpravo)</i>	82
<i>Obrázek č.36- Absorpční spektrum fosfátového pufru s přidavkem 600<math>\mu\text{l}</math> BAC (vlevo) a 0,3% HA s 600<math>\mu\text{l}</math> BAC (vpravo)</i>	83
<i>Obrázek č.37- Absorpční spektrum fosfátového pufru s přidavkem 900<math>\mu\text{l}</math> BAC (vlevo) a 0,3% HA s 900<math>\mu\text{l}</math> BAC (vpravo)</i>	84
<i>Obrázek č.38- Absorpční spektrum fosfátového pufru s přidavkem 1200<math>\mu\text{l}</math> BAC (vlevo) a 0,3% HA s 1200<math>\mu\text{l}</math> BAC (vpravo)</i>	85
<i>Obrázek č.39- Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 1200<math>\mu\text{l}</math> BAC</i>	100
<i>Obrázek č.40- Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 900<math>\mu\text{l}</math> BAC</i>	100
<i>Obrázek č.41- Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 600<math>\mu\text{l}</math> BAC</i>	101
<i>Obrázek č.42- Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 290<math>\mu\text{l}</math> BAC</i>	101
<i>Obrázek č.43- Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 90<math>\mu\text{l}</math> BAC</i>	102
<i>Obrázek č.44- Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 1200<math>\mu\text{l}</math> BAC</i>	103
<i>Obrázek č.45- Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 900<math>\mu\text{l}</math> BAC</i>	103



---

<i>Obrázek č.46- Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 600<math>\mu</math>l BAC .....</i>	104
<i>Obrázek č.47- Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 290<math>\mu</math>l BAC .....</i>	104
<i>Obrázek č.48- Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 900<math>\mu</math>l BAC .....</i>	105
<i>Obrázek č.49- Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 1200<math>\mu</math>l BAC .....</i>	106
<i>Obrázek č.50- Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 900<math>\mu</math>l BAC .....</i>	106
<i>Obrázek č.51- Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 600<math>\mu</math>l BAC .....</i>	107
<i>Obrázek č.52- Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 290<math>\mu</math>l BAC .....</i>	107
<i>Obrázek č.53- Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 90<math>\mu</math>l BAC .....</i>	108

**SEZNAM TABULEK**

<b>Tabulka 1- Jednotlivé aplikace kyseliny hyaluronové v oftalmologii .....</b>	<b>26</b>
<b>Tabulka 2-přehled nejpoužívanějších metod k určování velikosti a tvaru částic [45]. .....</b>	<b>50</b>
<b>Tabulka č.3- Střední velikost částic HA    Tabulka č.4 – Střední velikost částic HA po přidavku BAC .....</b>	<b>76</b>
<b>Tabulka č.5.Příslušné hodnoty absorbance a vlnové délky u jednotlivých přídavků BAC do HA .....</b>	<b>86</b>
<b>Tabulka č.6- Příslušné hodnoty absorbance a vlnové délky u jednotlivých přídavků čistého BAC .....</b>	<b>86</b>

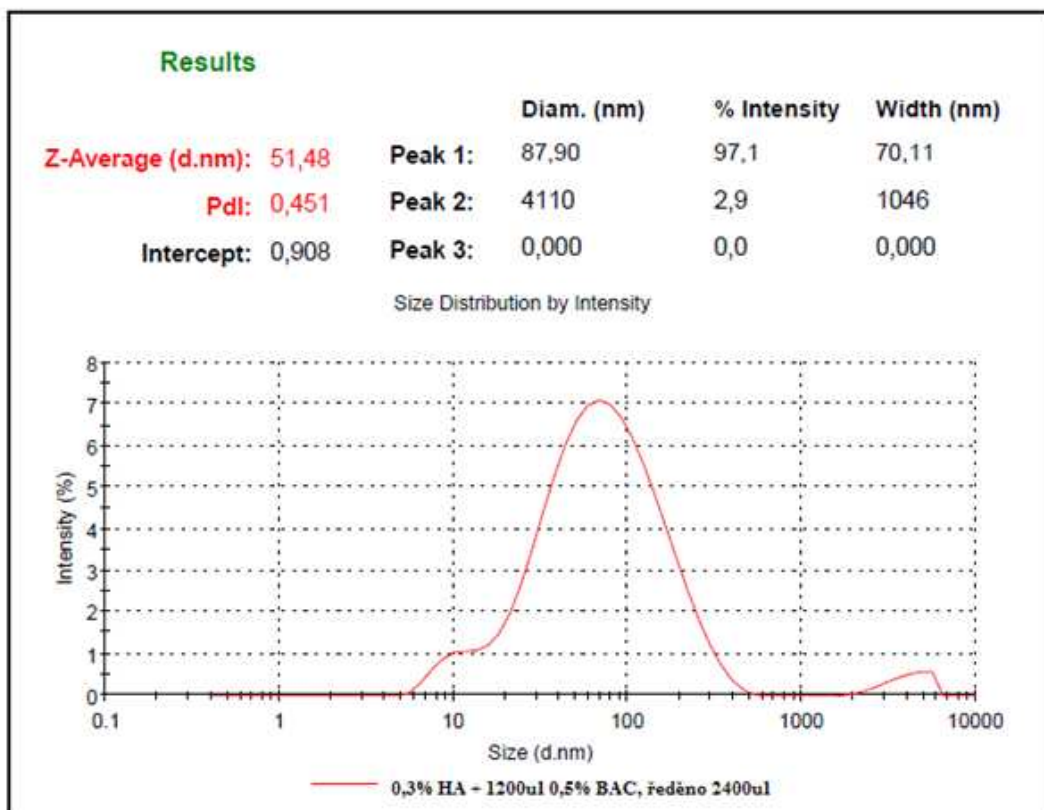
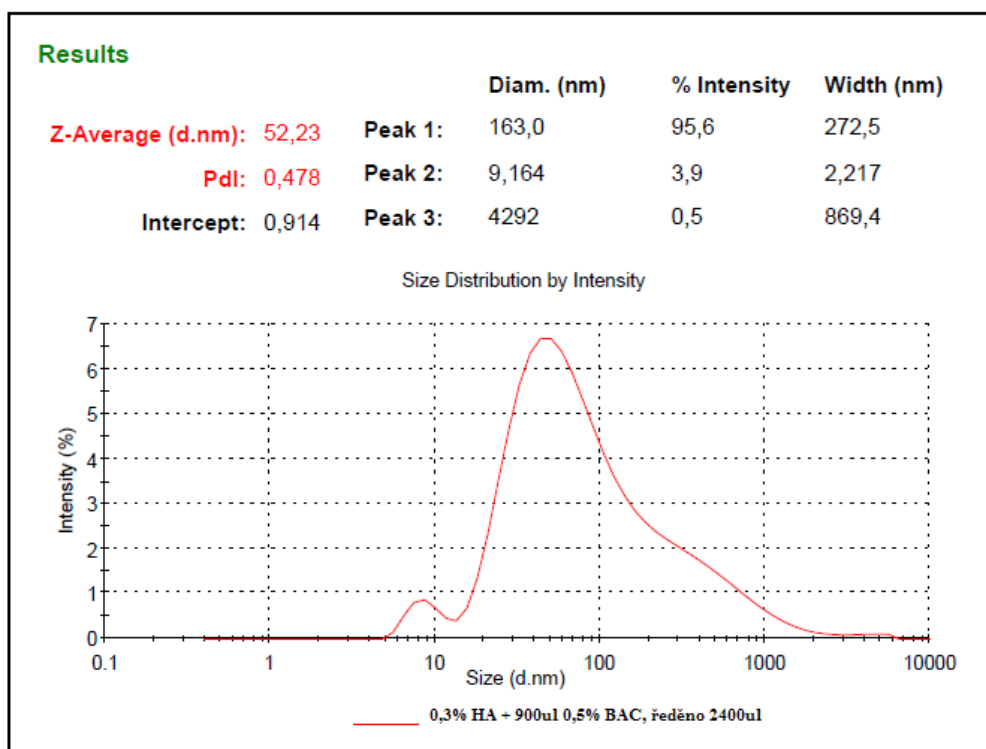
## SEZNAM PŘÍLOH

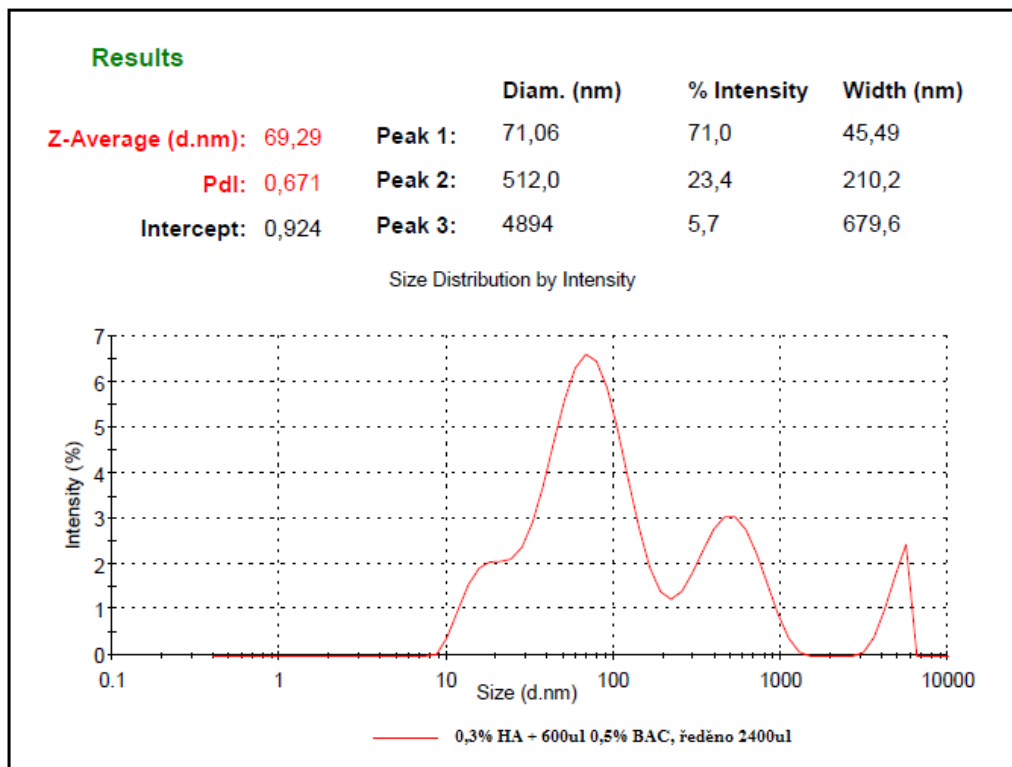
PŘÍLOHA PI.: Intenzitní distribuce velikosti částic roztoku HA s přídavkem BAC, při celkové koncentraci  $5,9 \cdot 10^{-7} \pm 0,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  HA v roztoku pufru.

PŘÍLOHA PII.: Intenzitní distribuce velikosti částic roztoku HA s přídavkem BAC, při celkové koncentraci  $5,6 \cdot 10^{-7} \pm 0,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  HA v roztoku pufru.

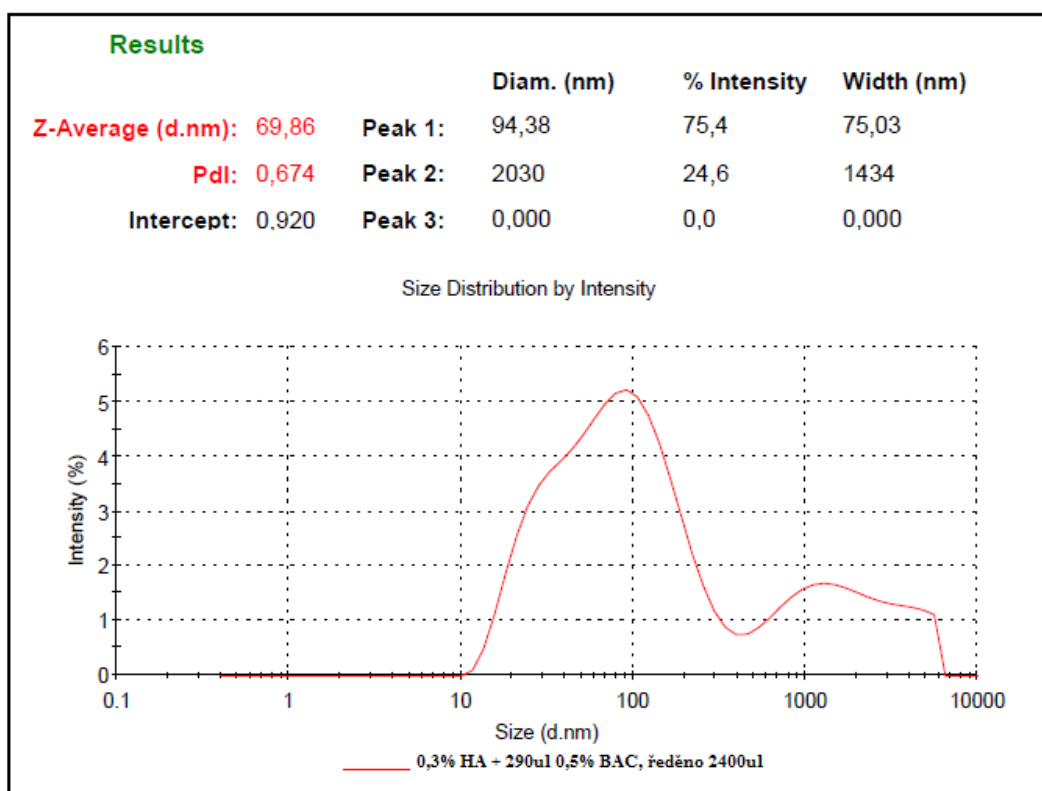
PŘÍLOHA PIII.: Intenzitní distribuce velikosti částic roztoku HA s přídavkem BAC, při celkové koncentraci  $4,8 \cdot 10^{-7} \pm 0,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  HA v roztoku pufru.

## PŘÍLOHA P I:

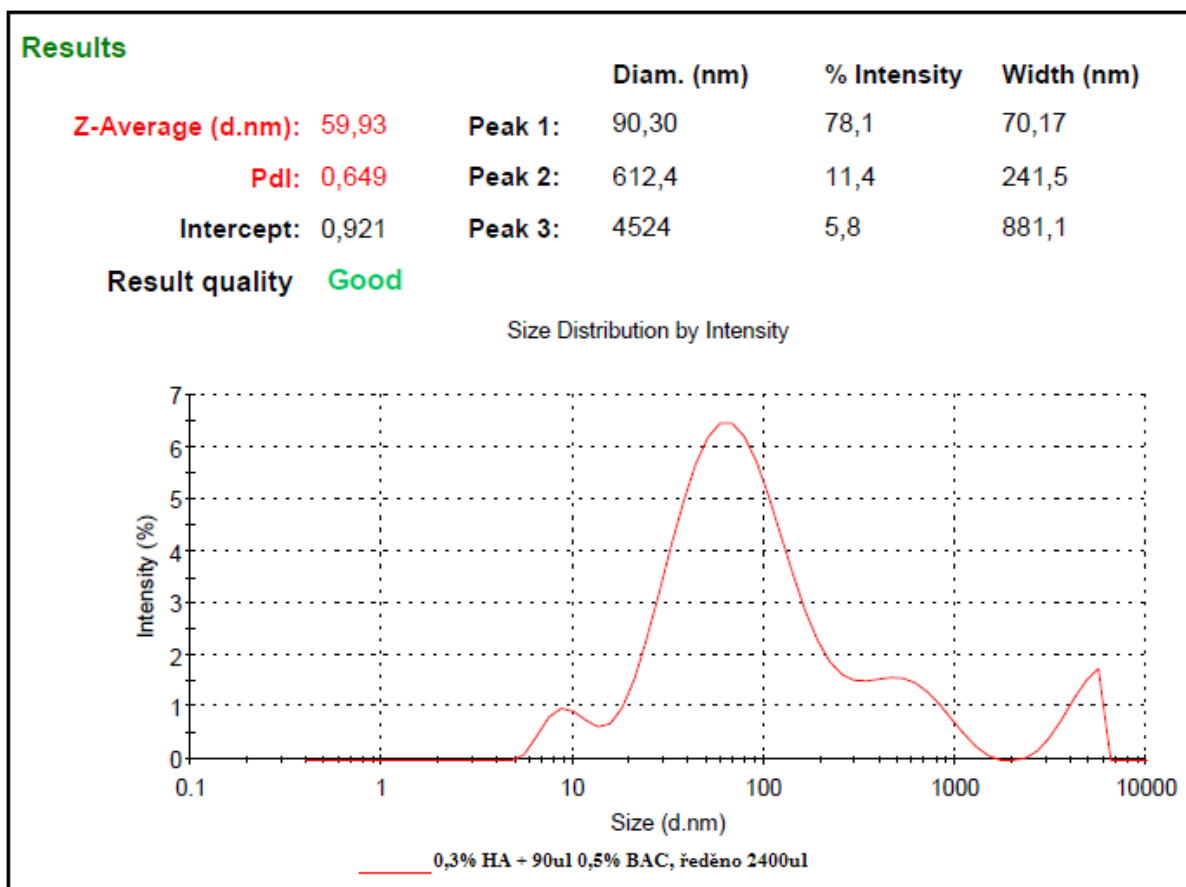
Obrázek č.39- Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 1200 $\mu$ l BACObrázek č.40- Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 900 $\mu$ l BAC



Obrázek č.41- Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 600µl BAC

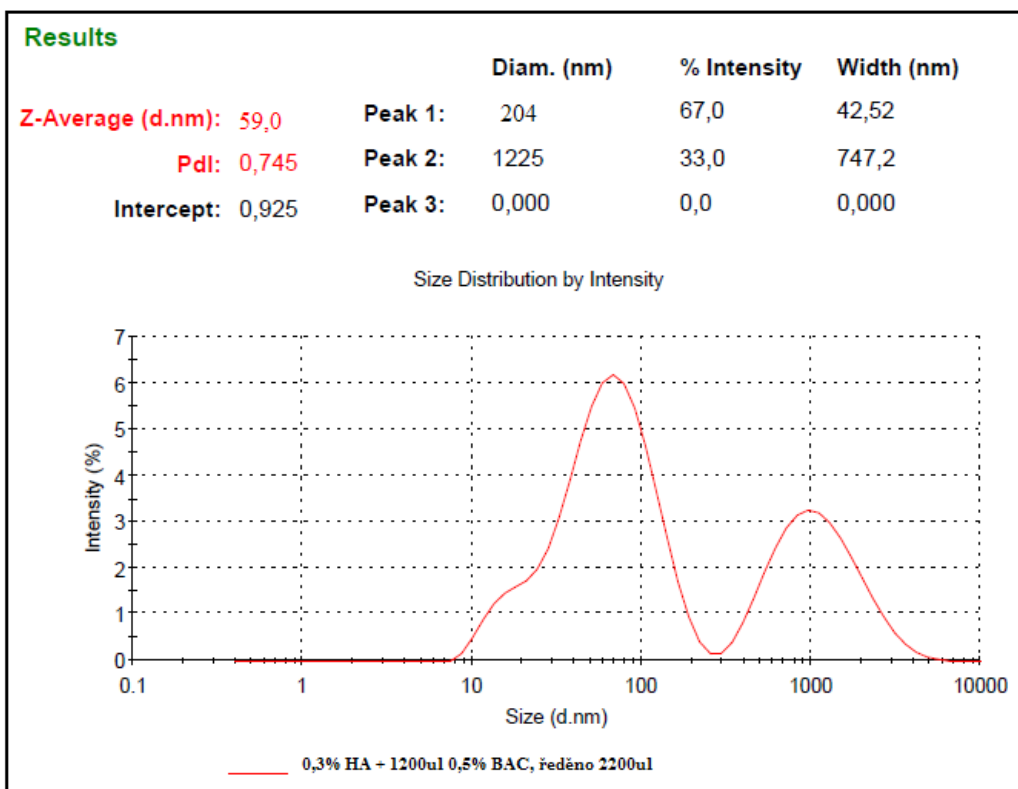


Obrázek č.42- Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 290µl BAC

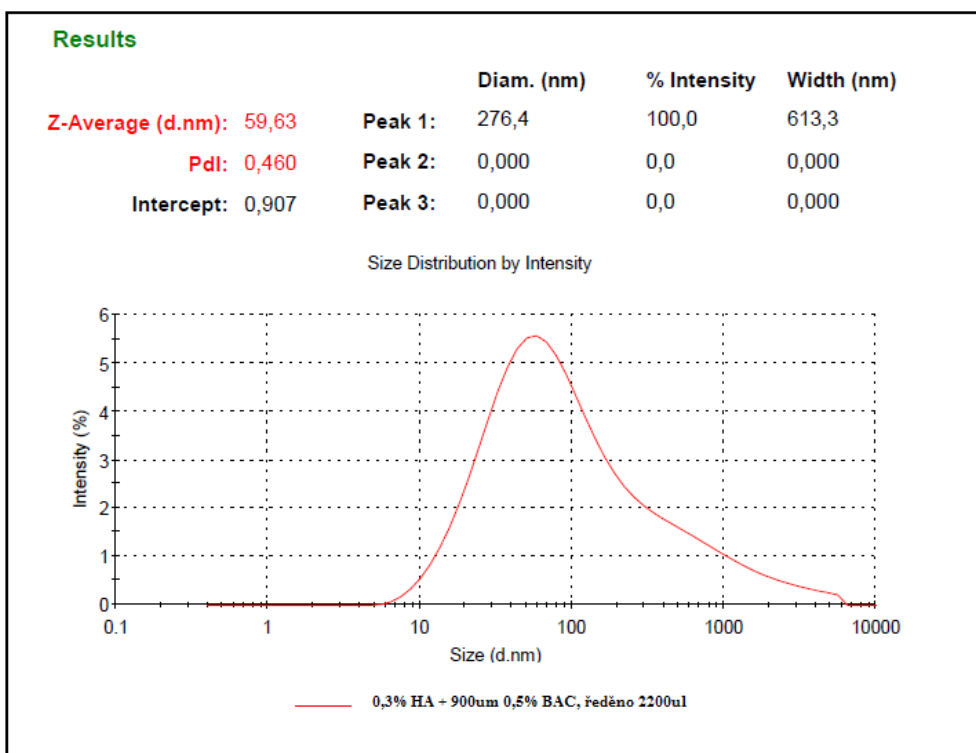


Obrázek č.43- Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přídávkem 90 $\mu$ l BAC

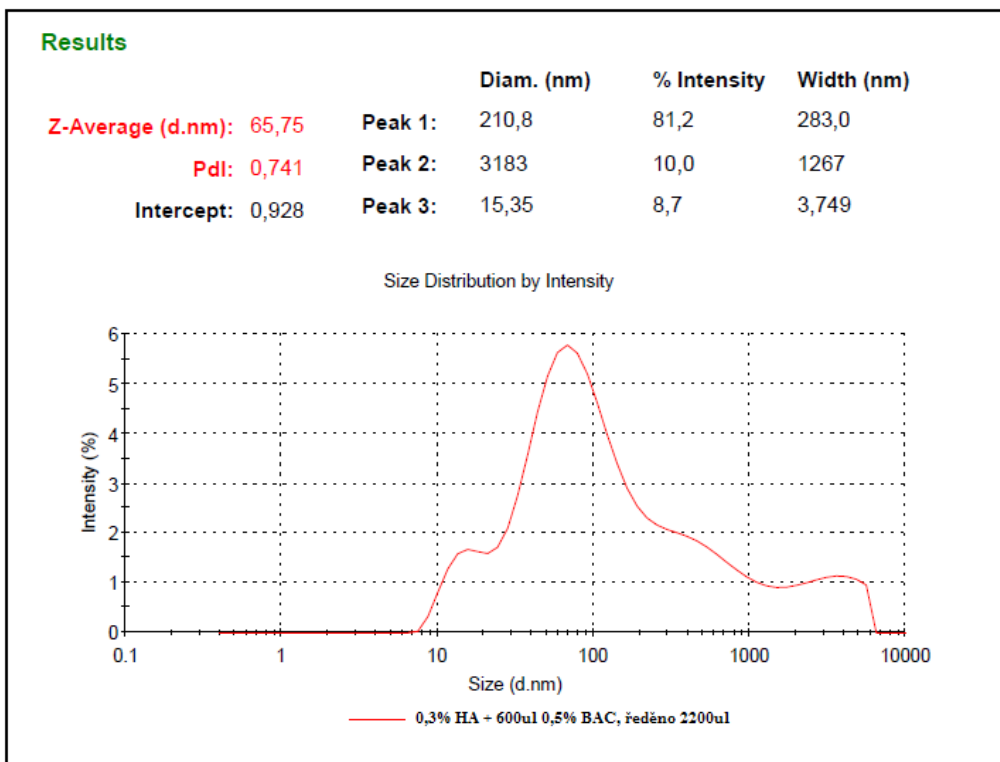
PŘÍLOHA P II.:



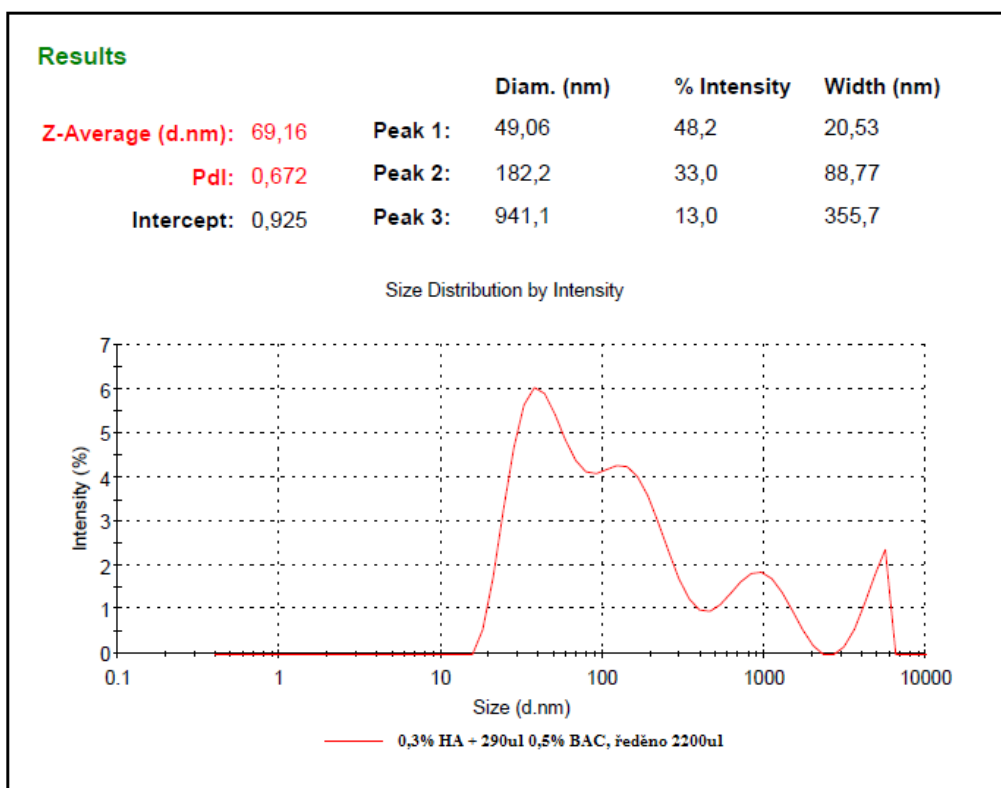
Obrázek č.44- Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 1200 $\mu$ l BAC



Obrázek č.45- Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 900 $\mu$ l BAC

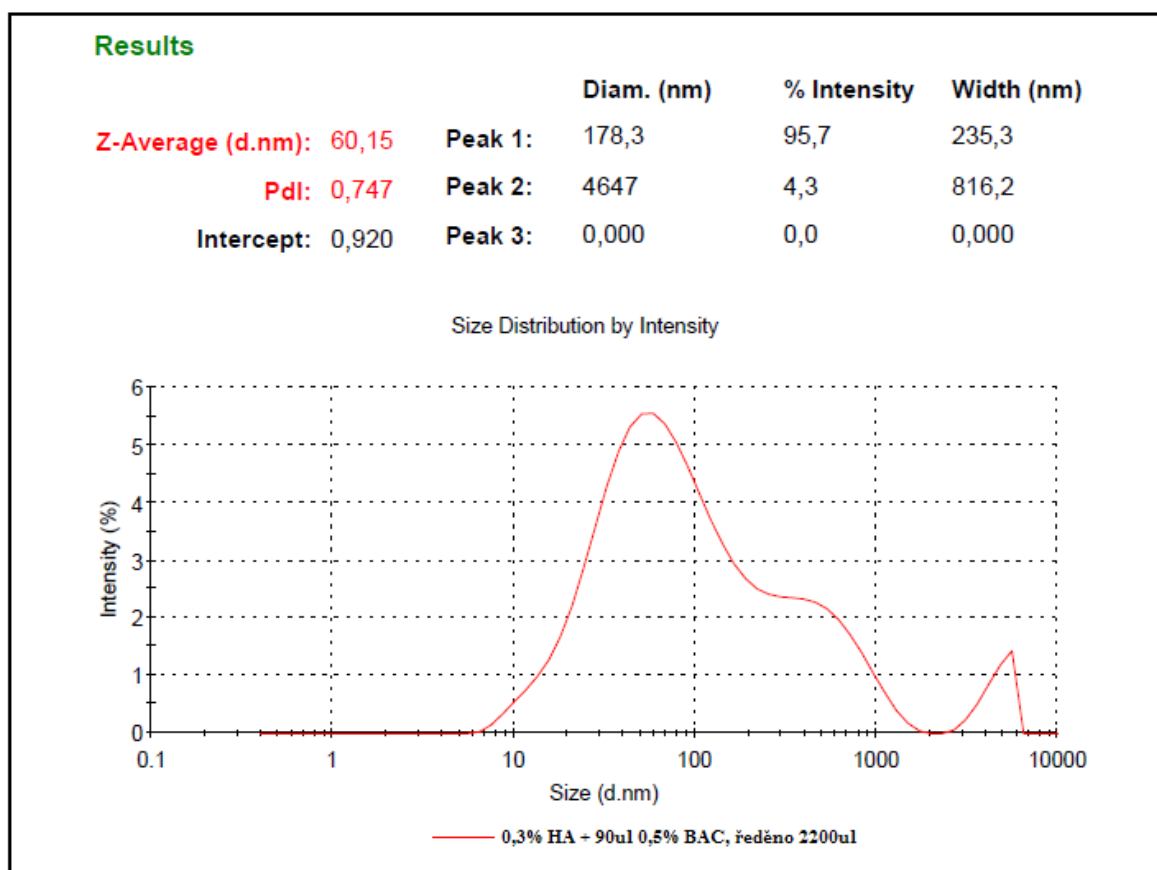


Obrázek č.46- Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 600 $\mu$ l BAC



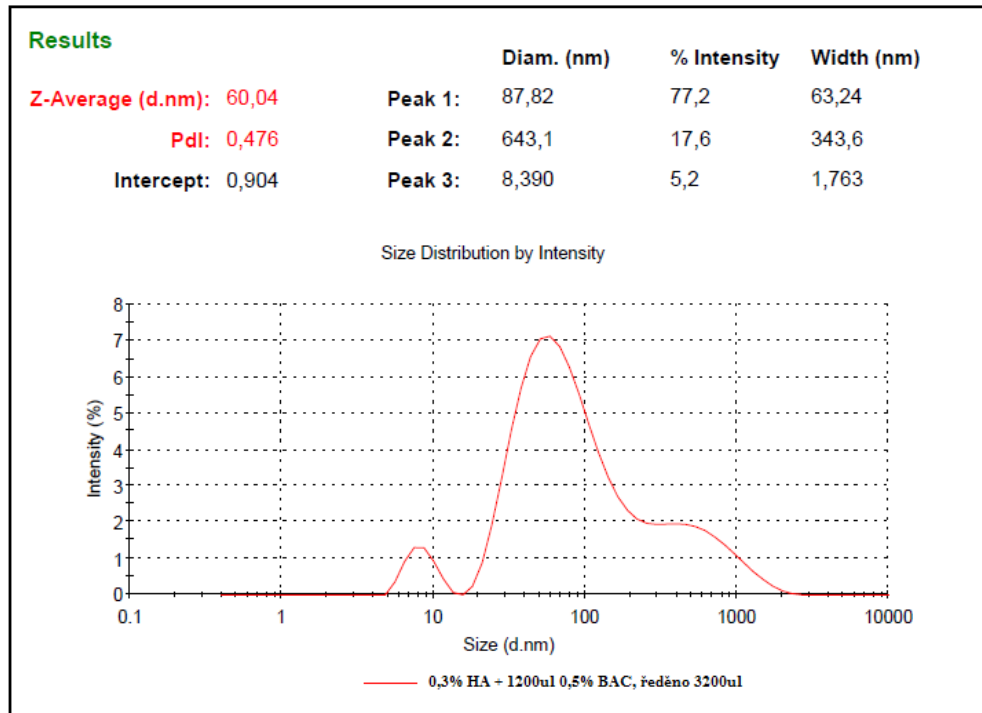
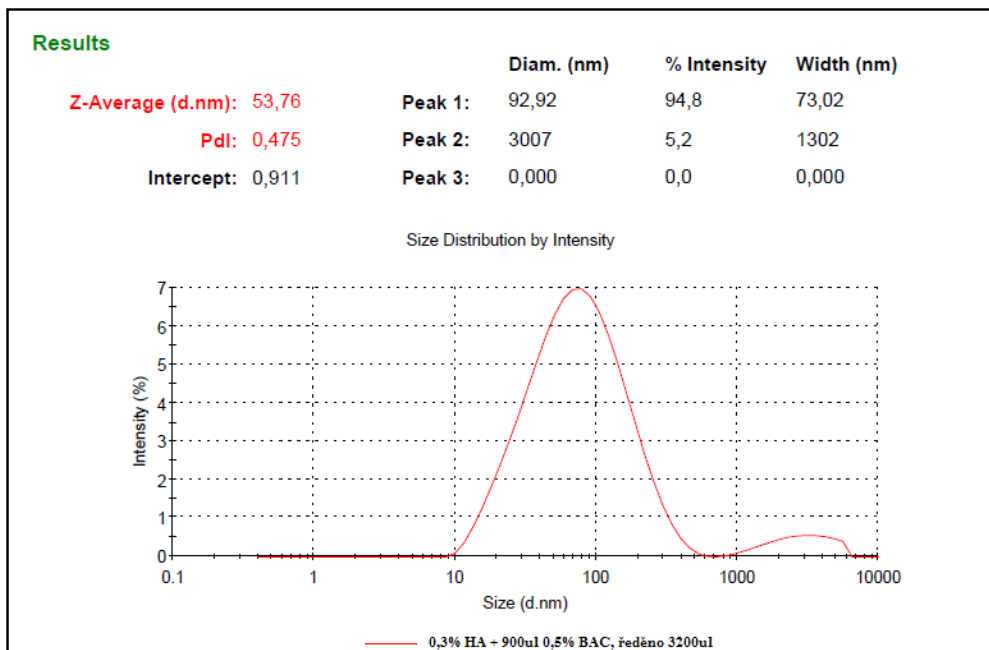
Obrázek č.47- Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 290 $\mu$ l BAC

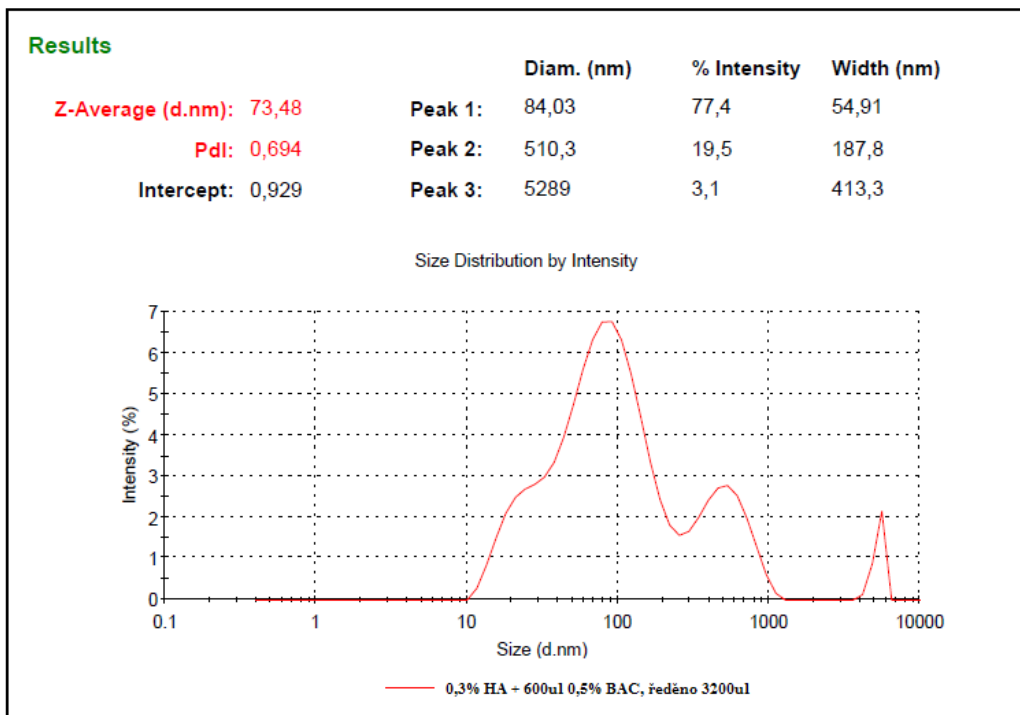




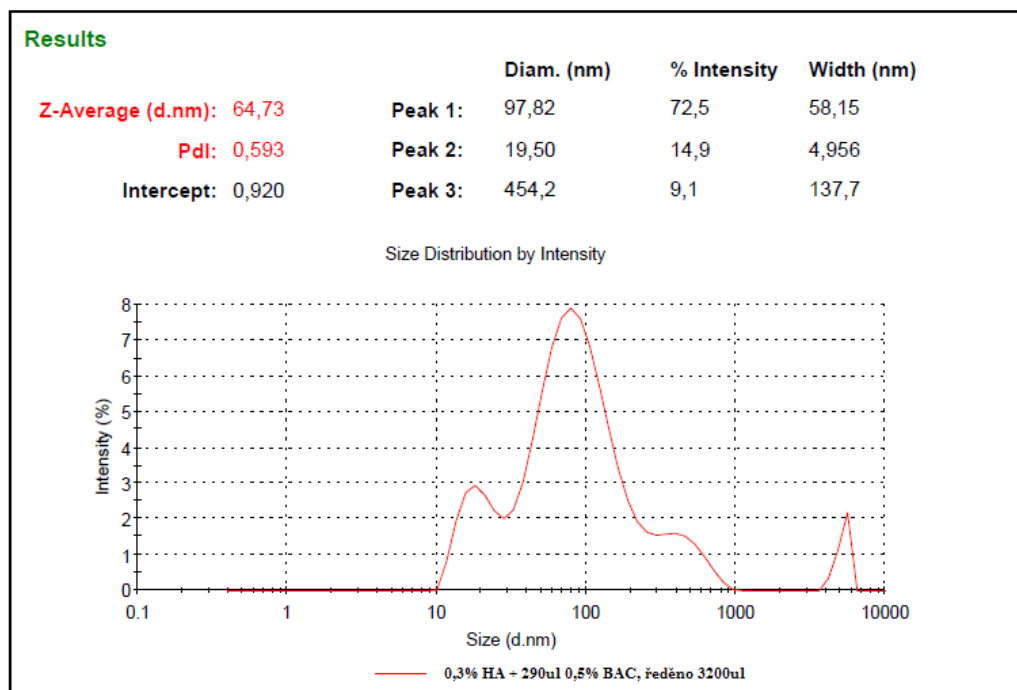
Obrázek č.48- Intenzitní distribuce velikostí částic HA s přidavkem 900 $\mu$ l BAC

## PŘÍLOHA P III.:

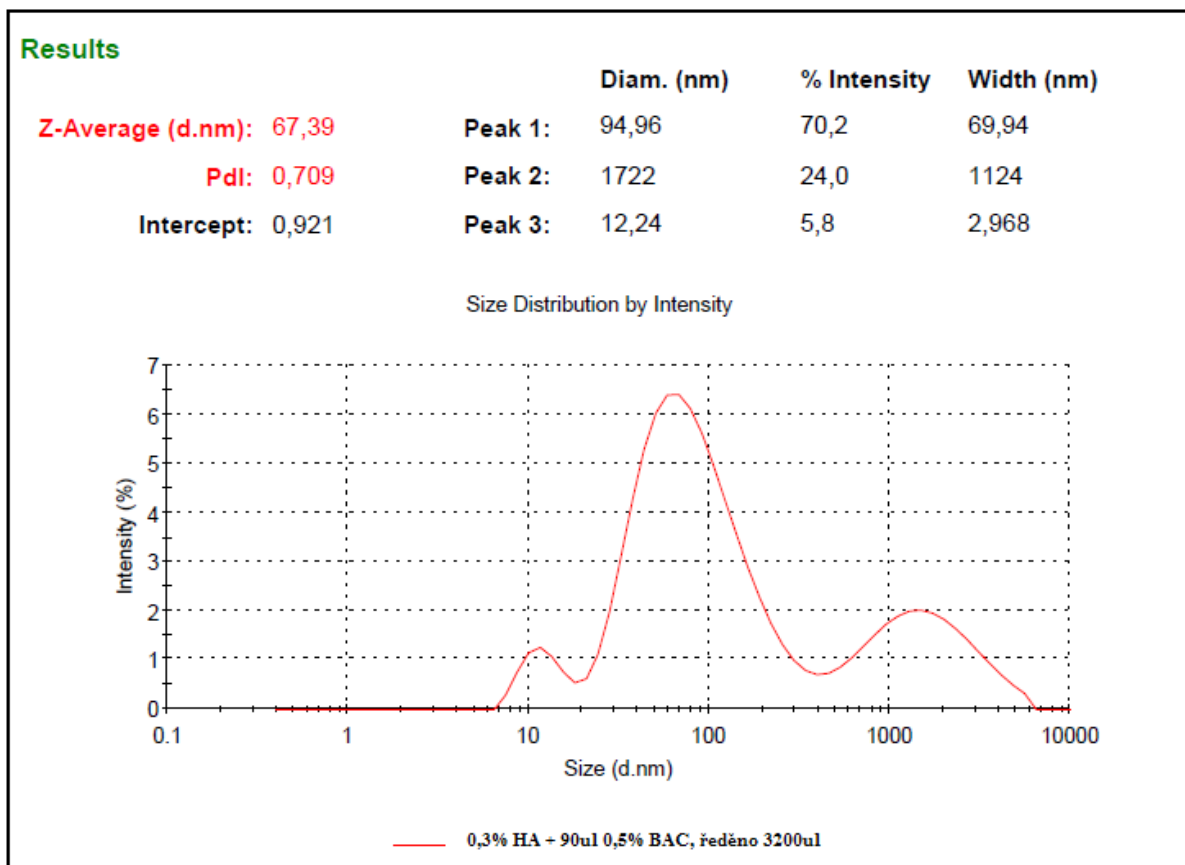
Obrázek č.49- Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 1200 $\mu$ l BACObrázek č.50- Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 900 $\mu$ l BAC



Obrázek č.51- Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 600 $\mu$ l BAC



Obrázek č.52- Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 290 $\mu$ l BAC



Obrázek č.53- Intenzitní distribuce velikosti částic HA s přidavkem 90 $\mu$ l BAC