

# **Dynamická mechanická analýza fólií hyaluronanu**

Bc. Martin Stašek

---

Diplomová práce  
2017



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav fyziky a mater. inženýrství

akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Martin Stašek**  
Osobní číslo: **T15271**  
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Materiálové inženýrství**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Dynamická mechanická analýza fólií hyaluronanu**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracovat rešerši k problematice struktury a viskoelastických vlastností hyaluronanu.
2. Navrhnout metodiku pro měření dynamických mechanických charakteristik u tenkých fólií HA v tahu.
3. Připravit vzorky o různé molární hmotnosti.
4. Měřit teplotní a frekvenční závislosti viskoelastických charakteristik.
5. Zpracovat naměřená data a experimenty kriticky vyhodnotit.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. Cowman M. K., Matsuoka S.: Experimental approaches to hyaluronan structure. Carbohydrate Research 340 (2005) 791809.
2. Gřundělová L., Gregorová A., Mráček A., Vícha R., Smolka P., Minařík M.: Viscoelastic and mechanical properties of hyaluronan films and hydrogels modified by carbodiimide. Carbohydrate Polymers 119 (2015) 142148.
3. Gřundělová L.: Stabilita a chování hyaluronanu v roztocích pro technologii výroby farmaceutických přípravků. Disertační práce UTB Zlín, 2014.
4. Collins M.N., Birkinshaw C.C.: Physical properties of crosslinked hyaluronic acid hydrogels. J Mater Sci: Mater Med (2008) 19:33353343.
5. Menard, K.P.: Dynamic mechanical analysis, CRC Press 2008.

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Marta Sližová, CSc.

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání diplomové práce:

3. února 2017

Termín odevzdání diplomové práce:

19. května 2017

Ve Zlíně dne 10. února 2017



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.  
*děkan*




doc. Mgr. Aleš Mráček, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

## 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 ..... 19.5.2017

.....  


<sup>21)</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 nahlázení 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>22)</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>23)</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 výdětku jim 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 přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce je zaměřena na studium mechanických vlastností dynamicky namáhaného hyaluronanu v tahu. Teoretická část se zabývá strukturou hyaluronanu a možnostmi jeho chemické modifikace s důrazem na přípravu filmů, síťovaných pomocí různých síťovacích činidel. Další kapitoly popisují princip dynamické mechanické analýzy a hodnotí termické a mechanické vlastnosti zkoumané pomocí vybraných metod. Experimentální část se věnuje přípravě síťovaného i nesíťovaného hyaluronanu o různé molární hmotnosti ve formě filmu. Dále je popsáno vytváření optimální a reprodukovatelné metody pro měření filmů pomocí dynamické mechanické analýzy. Závěrem jsou hodnoceny mechanické vlastnosti připravených filmů, měřené jako teplotní a frekvenční závislosti.

Klíčová slova: kyselina hyaluronová, síťování, dynamická mechanická analýza

## **ABSTRACT**

This thesis is focused on the study of mechanical properties of dynamically stressed hyaluronan by tension. The theoretical part deals with structure of hyaluronan and the possibilities of its chemical modification with emphasis on preparation of films, cross-linked with different cross-linking agents. Other chapters describe the principle of dynamic mechanical analysis and evaluate thermal and mechanical properties examined by selected methods. The experimental part deals with preparation of cross-linked and non-cross-linked hyaluronan of various molecular weights in the form of film. Further, the creation of an optimal and reproducible method for measuring films by using dynamic mechanical analysis is described. In the end there are evaluated mechanical properties of the prepared films, measured as temperature and frequency dependencies.

Keywords: hyaluronic acid, crosslinking, dynamic mechanical analysis

Rád bych poděkoval vedoucí mé bakalářské práce RNDr. Martě Sližové, CSc. za příkladné vedení, odborné rady, poskytnuté podklady, celkovou pomoc a čas věnované mi při tvorbě této práce. Taktéž děkuji RNDr. Petru Sližovi za pomoc při dopravě kapalného dusíku z CPS na FT, Ing. Jiřímu Kalousovi, Ph.D. za pomoc při obsluze DMA přístroje a Bc. Martině Bradáčové za pomoc při přípravě fólií hyaluronanu. Také bych chtěl poděkovat své rodině za podporu při studiu a tvorbě této práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>1 KYSELINA HYALURONOVÁ</b> .....	<b>13</b>
1.1 VÝSKYT A VÝROBA .....	13
1.2 STRUKTURA KYSELINY HYALURONOVÉ.....	16
1.3 CHEMICKÉ MODIFIKACE .....	20
1.3.1 Síťování pomocí EDC .....	22
1.3.2 Síťování pomocí DVS .....	23
1.3.3 Síťování pomocí ADH .....	25
<b>2 DYNAMICKÁ MECHANICKÁ ANALÝZA</b> .....	<b>28</b>
2.1 KONSTRUKCE MĚŘICÍHO PŘÍSTROJE.....	28
2.2 PRINCIP METODY DMA.....	30
2.3 MĚŘENÍ SEKUNDÁRNÍCH PŘECHODŮ .....	33
<b>3 TERMICKÉ A MECHANICKÉ VLASTNOSTI HYALURONANU</b> .....	<b>37</b>
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>45</b>
<b>4 PŘÍPRAVA VZORKŮ</b> .....	<b>46</b>
4.1 PŘÍPRAVA NESÍŤOVANÝCH FÓLIÍ .....	47
4.2 PŘÍPRAVA SÍŤOVANÝCH FÓLIÍ.....	48
<b>5 METODIKA MĚŘENÍ DYNAMICKÉ MECHANICKÉ ANALÝZY</b> .....	<b>52</b>
5.1 POUŽITÝ PŘÍSTROJ .....	52
5.2 UPÍNÁNÍ VZORKŮ .....	53
5.3 TEPLTNÍ ZÁVISLOSTI .....	55
5.3.1 Nesíťované fólie .....	55
5.3.2 Síťované fólie .....	62
5.3.3 Reprodukovatelnost měření .....	67
5.4 FREKVENČNÍ ZÁVISLOSTI .....	71
5.4.1 Nesíťované fólie .....	71
5.4.2 Síťované fólie .....	77
5.4.3 Reprodukovatelnost měření .....	82
<b>6 NAMĚŘENÉ VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>87</b>
6.1 TEPLTNÍ ZÁVISLOSTI .....	87
6.1.1 Nesíťované fólie .....	87
6.1.2 Síťované fólie .....	94
6.1.3 Vzájemné srovnání síťovaných a nesíťovaných fólií.....	99
6.2 FREKVENČNÍ ZÁVISLOSTI .....	101
6.2.1 Nesíťované fólie .....	101
6.2.2 Síťované fólie .....	106
6.2.3 Vzájemné srovnání síťovaných a nesíťovaných fólií.....	111
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>113</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>115</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>121</b>



<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>123</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>129</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>130</b>

## ÚVOD

V posledních letech se stále více rozvíjí aplikace biopolymerů, zejména proteinů a polysacharidů, v různých odvětvích průmyslu. Jednou z těchto látek je i kyselina hyaluronová, polysacharid o velké molekulové hmotnosti, který se skládá ze dvou opakujících se disacharidových jednotek. V roce 1934 do té doby neznámou látku poprvé izolovali z kravských očí Karl Mayer s kolegou Johnem Palmerem a pojmenovali ji jako kyselina hyaluronová. Skutečný potenciál této látky byl však objeven až roku 1942 maďarským vědcem Endre A. Balazsem, který vytvořil první patent jejího využití jako náhrady vaječného bílku pro pekařský průmysl. Balazs věnoval značnou část života studiu kyseliny hyaluronové. Vytvořil mnoho patentů týkajících se různých postupů izolace a aplikace této látky. Mimo jiné zjistil, že se tato kyselina častěji vyskytuje ve formě soli a zasadil se o zařazení termínu “hyaluronan“ do mezinárodního názvosloví polysacharidů. V 50. letech 20. století byla kyselina hyaluronová poprvé použita v oblasti medicíny jako náhrada očního sklivce. Od té doby se tato látka stala velmi atraktivním biomateriálem, který našel uplatnění v mnoha odvětvích, jako například farmacie, kosmetický průmysl, tkáňové inženýrství, ortopedie, oftalmologie a dalších oblastech medicíny.

Jednou z předních vlastností kyseliny hyaluronové je její schopnost vázat a udržovat velké množství vody. Díky svým hydrofilním vlastnostem může její řetězec ve vodných roztocích expandovat až na tisícinásobek svého původního objemu. Kyselina v čistém stavu poměrně rychle podléhá biodegradaci a může být lehce znečištěna různými mikroorganismy. Proto bývá často modifikována pomocí konzervačních látek a síťovacích činidel, což vede k tvorbě hydrogelů, které jsou mnohem odolnější vůči působení bioaktivních látek. Molekulová hmotnost kyseliny hyaluronové je poměrně vysoká. Pohybuje se mezi sto tisíci až několika miliony Daltonů, v závislosti na zdroji a metodě jejího získávání. Dalším typickým znakem je viskoelastické chování hyaluronanu. Se zvyšující se koncentrací kyseliny a s rostoucí molekulovou hmotností mají její roztoky značně nenevtonské chování a velmi vysokou viskozitu.

Dynamická mechanická analýza je velmi užitečnou metodou při studiu viskoelastických materiálů. Jejím principem je sledování odezvy materiálu na vybuzené kmity. Zpravidla slouží k měření teplotních a frekvenčních závislostí komplexního modulu. Díky tomu lze identifikovat řadu přechodů v polymerních materiálech a určit souvislosti mezi jejich mechanickými vlastnostmi a strukturou. Testování vzorků pomocí dynamické mechanické

analýzy je obvykle nedestruktivní, jelikož na materiál zpravidla působí podstatně menší napětí než při zkouškách statických.

Cílem této diplomové práce je dynamická mechanická analýza filmů hyaluronanu z hlediska viskoelastických vlastností v závislosti na teplotě a frekvenci mechanického zatěžování. Dále také vytvoření optimálních a reprodukovatelných metod, což je základním předpokladem pro získání kvalitních výsledků pro následnou analýzu. Součástí práce je také příprava nemodifikovaných a síťovaných filmů hyaluronanu o různé molekulové hmotnosti.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 KYSELINA HYALURONOVÁ

Kyselina hyaluronová (HA) je vysokomolekulární biopolymer řadící se mezi polysacharidy. Její molekula je tvořena opakující se jednotkou N-acetyl glukosaminu a kyseliny D-glukoronové. Molekulová hmotnost jedné makromolekuly může dosahovat od stovek tisíc až po několik milionů Daltonů, v závislosti na zdroji a metodě, pomocí které se získává [1,2]. Zpravidla se vyskytuje u řady živočichů, bakteriálních kmenů a podle Kendalla [3] ji lze nalézt i u některých druhů řas. Mezi její základní biologické funkce lze zařadit kontrolu tkáňové hydratace a transportu vody, zachovávání viskoelasticity tekutin spojujících tkání a supramolekulární shromažďování proteoglykanů v mezibuněčném prostoru. Z aplikačního hlediska bývá využívána například jako lubrikant v ortopedii, látka zvyšující viskozitu očních kapek v oftalmologii nebo jako materiál zvyšující hydrataci a elasticitu pokožky v kosmetice. Existuje i jistý potenciál jejího budoucího použití jako nosiče při cílené dopravě léčiv pro léčbu nádorových onemocnění.[1,4,5,15]

### 1.1 Výskyt a výroba

Kyselina hyaluronová je důležitou součástí mezibuněčné hmoty (extracelulární matrix) pojivových tkání. Slíva a Minárik [2] uvádí, že lidské tělo o hmotnosti 70 kg obsahuje zhruba 15 g tohoto biopolymeru. Přibližně jedna třetina je spotřebována během dne a toto množství se pravidelně obnovuje. Nejčastěji se vyskytuje ve formě soli. Zpravidla vytváří chemickou vazbu se sodíkem za vzniku hyaluronátu sodného (hyaluronan). Největší množství hyaluronanu odpovídající přibližně 50 % jeho celkového množství se vyskytuje v pokožce (epidermis a dermis), kde poskytuje buňkám mobilitu a vytváří vhodné prostředí pro jejich pohyb mezibuněčným prostorem [1,6,13]. Díky své schopnosti vázat obrovské množství vody také výrazně napomáhá hydratovat pokožku a zvyšovat její elasticitu. Hyaluronan se dále vyskytuje v koncentraci přibližně 3-4 mg.ml<sup>-1</sup> ve spojení s proteiny v synoviální tekutině. Tato tekutina tvoří vrstvu silnou asi 2 μm pokrývající vnitřní povrch kloubů. HA zde působí jako lubrikant. Díky svým viskoelastickým vlastnostem snižuje tření a absorbuje tlakové nárazy, čímž dochází ke zmírnění opotřebování kloubů. Kvůli tomuto namáhání je neustále degradována a následně znovu obnovována [1,7]. Hyaluronan se taktéž vyskytuje v očním sklivci o koncentraci 0,1 mg.ml<sup>-1</sup>. Na povrchu oka vytváří hydratační film, který slouží k udržení dostatečné vlhkosti a také jako ochrana tkáně před mechanickým poškozením [1,8]. Ve vyšších koncentracích se HA vyskytuje

ještě v pupeční šňůře a kohoutích hřebíncích, které se zvláště v minulosti staly preferovaným zdrojem její průmyslové výroby.

Kromě živočišných zdrojů lze hyaluronan nalézt u některých bakteriálních kmenů v jejich slizovitých obalech (membránách). Membrány jsou používány k zapouzdření bakteriálních buněk. Tyto buňky jsou pak nerozpoznatelné imunitním systémem, jelikož je kyselina hyaluronová biokompatibilní a nevyvolává imunitní reakci organismu. Mezi bakteriální kmeny obsahující HA lze zařadit například *Pasteurella multocida*, *Streptococcus zoopidemicus*, *Streptococcus pyogenes* nebo *Streptococcus equi*. Zmíněné kultury patří v současnosti k velmi významným zdrojům průmyslové produkce kyseliny hyaluronové. [1,9,14]

Průmyslová výroba kyseliny hyaluronové je možná pomocí různých postupů. Jedna z prvních metod, založená na extrakci z živočišných tkání, byla vytvořena v roce 1968 Swannem [13]. Jako výchozí surovina pro tento způsob izolace byly použity kohoutí hřebínky a lidské pupeční šňůry. Tyto jsou nejprve zmrazeny, aby došlo k rozrušení buněčné stěny, a následně jsou rozemlety na malé kousky. Takto připravená surovina poté prochází extrakcí v etanolu s přidavkem cetylpyridinium chloridu, chloroformu a vody. Extrakce je několikrát opakována, aby bylo dosaženo co nejvyšší čistoty. Získaný materiál je pak třeba přefiltrovat od extrakční směsi a stabilizovat pomocí přídavku NaCl. Výsledný produkt obsahuje 0,5 % bílkovin a jeho výtěžnost se pohybuje okolo 1 g.kg<sup>-1</sup> výchozí látky. Pro další snížení obsahu bílkovin pod 0,1 % je možno využít čištění pomocí iontové výměnné chromatografie [11,13]. Hlavní nevýhodou této metody je degradace produktu způsobená aktivitou enzymu hyaluronidázy a možnost kontaminace viry z proteinové surovinové základny. Další nevýhodou je také náročnost samotného procesu extrakce, kdy musí být dodrženy striktní podmínky. Takto připravený hyaluronan se předně využíval k laboratorním účelům s cílem charakterizovat biopolymer a jeho aplikační možnosti [1,12,13]. V roce 1979 maďarský vědecký pracovník Balazs vyvinul postup izolace a purifikace hyaluronanu z živočišných zdrojů, který splňoval kritéria průmyslové výroby s možností použití HA pro farmaceutické aplikace [10].

Další možností výroby kyseliny hyaluronové je metoda bakteriální fermentace. Mezi nejpoužívanější bakteriální kmeny pro tyto postupy se řadí zejména *Streptococcus equi* a *Streptococcus zoopidemicus*. Kultivace bakteriální buněčné struktury probíhá v roztocích glukózy a fruktózy s obsahem soli a kvasinek při rozmezí teplot 30-37 °C a pH mezi 7-8,5. Vytvořené kultury produkují hyaluronan ve svých membránách. Ten je dále izolován za

pomocí filtrace a srážení pomocí propanolu s acetátem sodným. Výťažnost této metody se pohybuje v rozmezí 5-7 g.l<sup>-1</sup> [11,13,14]. Vzhledem k tomu, že vstupní materiály nejsou živočišného původu, je tímto postupem zabráněno kontaminaci produktu priony (infekční bílkoviny) a viry. Nevýhodou této metody je možno spatřit v možné kontaminaci produktu bakteriálními endotoxiny, které mohou způsobovat zánětlivé reakce při styku s živou tkání [13,14].

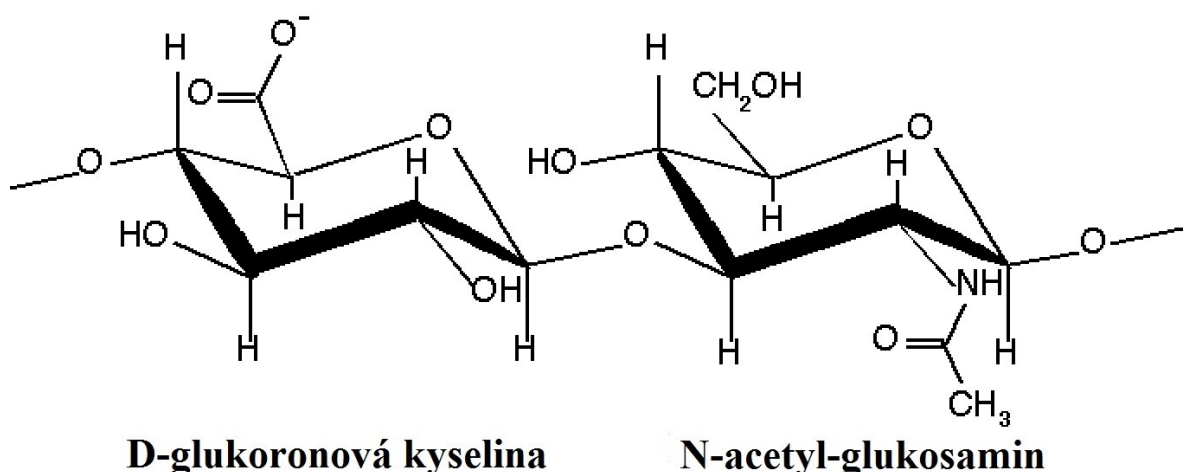
V současnosti stále probíhá výzkum ve snaze dosáhnout vyšší výtěžnosti hyaluronanu zejména u procesu fermentace, který se staví do popředí zájmů, jelikož jsou tyto metody méně nákladné a taktéž méně zatěžují životní prostředí. Ke zvýšení efektivity je přistupováno z více směrů. V prvním případě je to snaha o optimalizaci stávajících postupů změnou procesních podmínek. V druhém případě pak nalezení nových zdrojů výroby, například použití odlišných bakteriálních kmenů, či příprava rekombinantních mikroorganismů (geneticky modifikované) produkujících vyšší množství HA. Součástí těchto výzkumů je také snaha o přípravu hyaluronanu o vyšších molekulových hmotnostech a nižší polydisperzitě. Tyto vlastnosti jsou odlišné na základě výchozího zdroje a použité metody [1,11,13].

Tabulka 1 – Hodnoty relativní molekulové hmotnosti HA připravené z různých zdrojů [11]

Tkáň	Relativní molekulová hmotnost	Technika měření
lidská pupeční šňůra	$3,4 \times 10^6$	rozptyl světla
hovězí sklivec	$7,7 \times 10^4$	rozptyl světla
	$1,7 \times 10^6$	sedimentace a difuze
hovězí synoviální tekutina	$14 \times 10^6$	rozptyl světla
lidská synoviální tekutina zdravá	$6 \times 10^6$	rozptyl světla
revmatická	$(2,7 - 4,5) \times 10^6$	rozptyl světla
kohoutí hřebínek	$1,2 \times 10^6$	sedimentace
Streptokokové kultury	$0,115 \times 10^6$	sedimentace a viskozimetrie
	$0,93 \times 10^6$	

## 1.2 Struktura kyseliny hyaluronové

Z hlediska chemické struktury kyseliny hyaluronové se jedná o glykosaminoglykan. Jedná se o nevětvený, lineární mukopolysacharid. Je tvořený opakující se disacharidovou jednotkou složenou z  $\beta(1,3)$ -D-glukuronové kyseliny a  $\beta(1,4)$ -N-acetyl-glukosaminu v poměru 1:1. V molekule jsou navzájem spojeny glykosidickou vazbou a každá jednotka obsahuje jednu karboxylovou skupinu, čtyři hydroxylové a jednu acetamidovou skupinu. Na rozdíl od jiných glykosaminoglykanů nacházejících v mezibuněčné hmotě (např. chondroitin a heparin) neobsahuje sulfátovou skupinu. Díky velkému množství hydroxylových skupin je kyselina hyaluronová schopna velmi dobře vázat vodu. Ve vodném prostředí dochází k disociaci karboxylových skupin. Díky tomu je HA velmi dobře rozpustná ve vodě. Tyto disociované skupiny taktéž umožňují navázání kationtů různých kovů (např.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ), či jiné kladně nabitě látky, a vytvářet tak příslušné soli. Monovalentní ionty mohou vytvářet vazby pouze s jednou skupinou  $\text{COO}^-$ . Bivalentní ionty pak mohou být navázány na dvě takové skupiny, v důsledku čehož může docházet k tvorbě větších domén v rámci jednoho řetězce. Beta konfigurace umožňuje, aby všechny objemné skupiny (hydroxylové, karboxylová a acetamidová) mohly zaujmout stericky výhodné ekvatoriální pozice a malé atomy vodíku pak zabírají méně stericky příznivé axiální polohy. Díky tomu je tato disacharidová struktura, prezentovaná na Obr. 1, energeticky velmi stabilní. [2,4,15,16]



Obr. 1 – Strukturní jednotka kyseliny hyaluronové s disociovanou karboxylovou skupinou  
(Vytvořeno a upraveno podle [16])



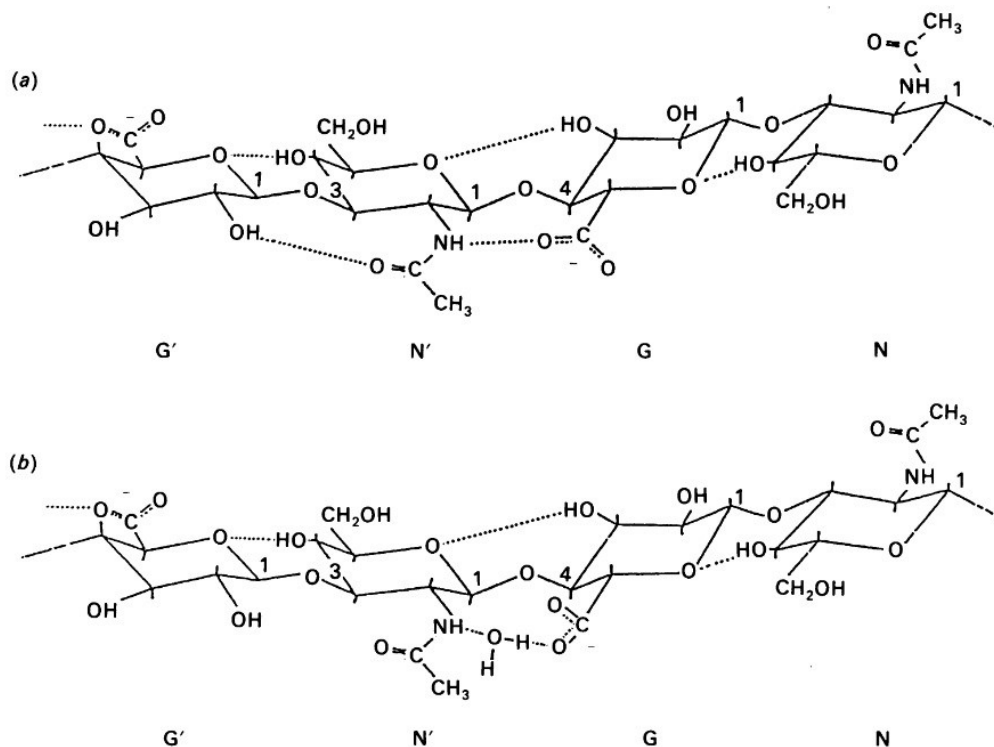
Velikost řetězců kyseliny hyaluronové se může pohybovat v rozmezí od 0,2 do 10 MDa. Nejčastější velikost však zpravidla bývá mezi 2-5 MDa. Počet disacharidových jednotek v celé makromolekule HA může dosahovat 10 000 a více, přičemž molekulová hmotnost jedné takové jednotky odpovídá zhruba 400 Da. Vzhledem k tomu, že průměrná délka disacharidové jednotky se pohybuje okolo 1 nm, lze předpokládat, že plně natažený řetězec HA dosahuje délky 10  $\mu\text{m}$ . Tato délka zhruba odpovídá velikosti lidské červené krvinky. Na Obr. 2, získaného pomocí elektronové mikroskopie, jsou vidět propletené hyaluronové molekuly na rovném povrchu zastíněné těžkým kovem pro získání kontrastu. [1,2,16]



Obr. 2 – Snímek elektronové mikroskopie propletených molekul HA [16]

Kromě výše popsané primární struktury lze u kyseliny hyaluronové pozorovat také strukturu sekundární. Tato byla zkoumána zejména v roztocích, kde dochází k disociaci karboxylové skupiny, díky čemuž se HA chová jako záporně nabitý elektrolyt. Stupeň disociace závisí na iontové síle, pH a teplotě. Počet disociovaných skupin ovlivňuje konformaci i rozměry řetězce a také stupeň jeho hydratace [11]. Sekundární struktura je tvořena dvakrát stočenou šroubovicí v rámci jedné tetrasacharidové jednotky, která je celkově stočena o  $360^\circ$  oproti sousedním. Každá disacharidová jednotka je tedy pootočena o  $180^\circ$  vůči předcházející i následující jednotce v řetězci HA. Toto stáčení řetězce je důsledkem existence intramolekulárních vodíkových vazeb.[1,6,17]

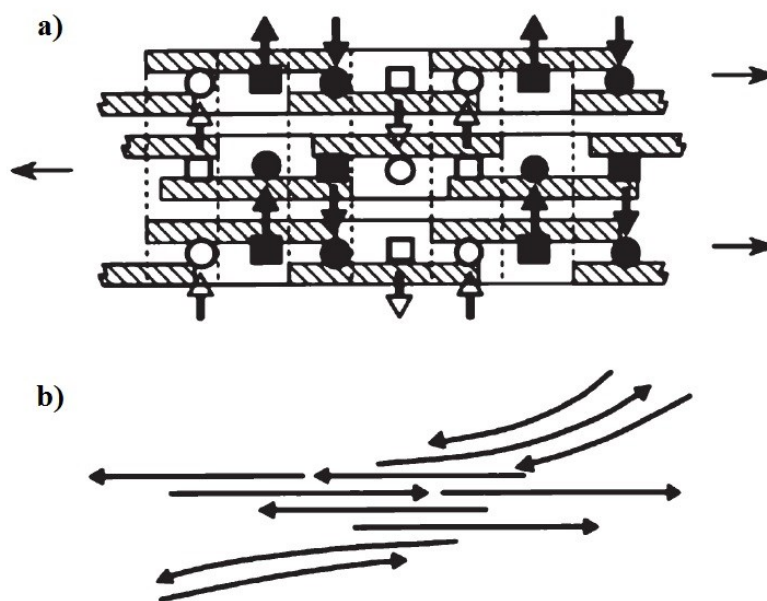
Vodíkové můstky mohou vznikat dvěma různými způsoby, v závislosti na složení roztoku. Tyto odlišné mechanismy jsou prezentovány na Obr. 3. V prvním případě (a) vznikají přímé vodíkové vazby mezi hydroxylovými, acetamidovými a karboxylovými skupinami. To bylo pozorováno v čistém roztoku dimethyl sulfoxidu. U vodných roztoků dimethyl sulfoxidu (b) bylo pozorováno nahrazení těchto vazeb vodíkovým můstkem přes molekulu vody mezi acetamidovou a karboxylovou skupinou. [17,18,19]



Obr. 3 – Sekundární struktura kyseliny hyaluronové v roztocích [18]

Cowman ve své publikaci [15] popisuje konformaci natažených vláken hyaluronanu v pevném stavu. Vyhodnocení proběhlo na základě rentgenové difrakce. Uvádí, že jednoduchá šroubovice HA obsahuje 2, 3 nebo 4 disacharidové jednotky v rámci jejího otočení o  $360^\circ$ . Počet jednotek se liší v závislosti na přítomných iontech ( $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , atd.). V rámci tohoto výzkumu byl taktéž pozorován výskyt dvojité šroubovice za přítomnosti méně obvyklých iontů ( $\text{H}^+/\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ). Obě tyto struktury jsou stabilizovány vodíkovými vazbami, spojující sousední zbytky cukru přes obě glykosidické vazby. Scott [17] se o daném výzkumu taktéž zmiňuje a udává, že jednoduchá šroubovice je pozorována u vzorků připravených za vyššího pH. Vzorky u nichž se vyskytovala dvoušroubovice, byly připraveny při pH nižším, než by bylo možno dosáhnout ve fyziologickém prostředí.

Další studie prokázaly existenci hydrofobních, nepolárních oblastí v rámci jednoho řetězce kyseliny hyaluronové. Tyto části jsou tvořeny axiálními vodíky z osmi C-H skupin, umístěných střídavě na obou stranách šroubovice. Naopak ekvatoriálně uložené boční řetězce tvoří polární a hydrofilní část molekuly. Díky existenci těchto oblastí se mohou molekuly HA vzájemně shlukovat a vytvářet tak terciární strukturu polymeru. Dochází k vytváření antiparalelní (protisměrně orientované) struktury. Toto shlukování může probíhat po obou stranách šroubovice, čímž dochází k tvorbě rozsáhlé molekulové fyzikální sítě označované jako matrice kyseliny hyaluronové. Mechanismus tvorby antiparalelní struktury je prezentován na Obr. 4a, znázornění vzniku mezimolekulární sítě pak na Obr. 4b. Hydrofobní části molekul (na obrázku znázorněny šrafovaně) se mohou skládat vždy jen proti sobě. Výsledné struktury jsou stabilizovány vznikem intermolekulárních vodíkových vazeb mezi karboxylovou a acetamidovou skupinou. [1,6,16-19]



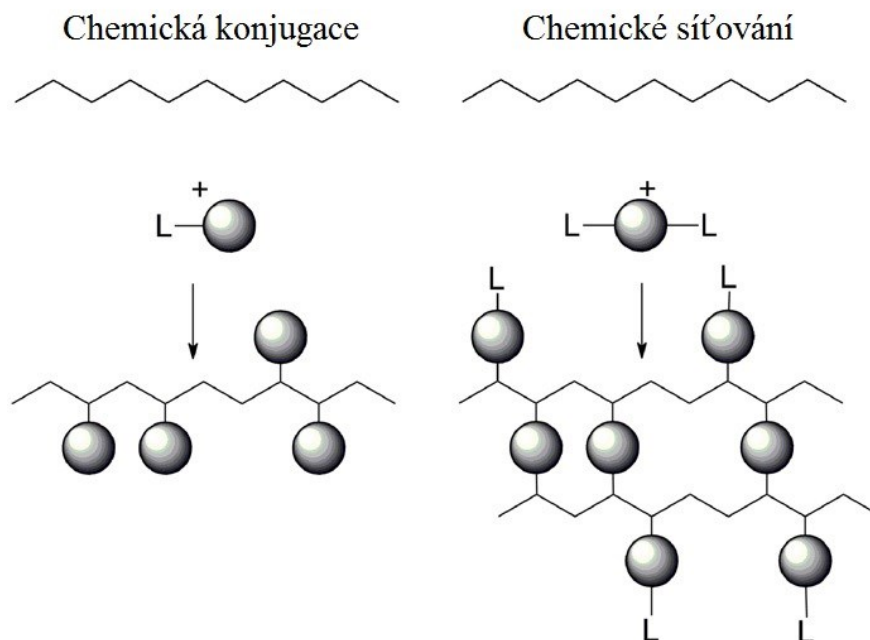
Obr. 4 – Terciální struktura (a) a matrice (b) kyseliny hyaluronové [6]

Řetězce hyaluronanu zauímají v roztocích konformaci statistického klubka, jehož tuhost je dána přítomností vodíkových vazeb. Při vyšší koncentraci hyaluronanu dochází ke zpevnování sítě. Molární hmotnost HA ovlivňuje stupeň síťování, přičemž s jejím růstem dochází ke zvětšování velikosti sítě. Díky tomu může klubko udržet vodu až o tisícínásobku své hmotnosti. Statistické klubko hyaluronanu tedy zauímá v roztoku poměrně velký objem, přestože jeho skutečná koncentrace uvnitř těchto domén je velmi nízká ( $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). [4,15,17,18]

### 1.3 Chemické modifikace

Nativní hyaluronan má pro farmaceutické a medicínské aplikace velmi omezené možnosti použití. Pro tkáňové inženýrství je pak v této podobě prakticky nepoužitelný. Přirozeně vyskytující se fyzikální sítě jsou tvořeny pomocí Van der Waalsových sil, vodíkových můstků a hydrofobních vazeb. Tyto interakce jsou poměrně slabé. Z tohoto důvodu je hyaluronan ve své přirozené podobě velmi dobře rozpustný, snadno biodegradovatelný a jeho mechanické vlastnosti jsou nevhodné pro širší použití.[20,22]

Chemické modifikace nabízí řadu možností k vylepšení požadovaných vlastností pro danou aplikaci. Chemické úpravy bývá zpravidla dosaženo pomocí jedné nebo více chemických reakcí modifikačního činidla s karboxylovými nebo hydroxylovými skupinami, při nichž dochází ke vzniku kovalentních nebo iontových vazeb. Tyto vazby jsou mnohem silnější než interakce držící pohromadě fyzikální síť [20,22]. Schanté [21] uvádí, že pro určité úpravy může být využita také aminoskupina, získaná deacetylací acetamidové skupiny. Chemické modifikace mohou být provedeny dvěma způsoby, jak prezentuje Obr. 5.



Obr. 5 – Schématické znázornění chemické konjugace a chemického síťování [21]

První možností je chemická konjugace, kdy je daná látka vázána přes funkční skupinu pouze k jednomu řetězci hyaluronanu. V závislosti na stupni substituce a typu použitého modifikátoru lze regulovat biokompatibilitu derivátu HA, řídit rychlost degradace

a zejména měnit jeho fyzikální vlastnosti dle potřeby. Kromě látek ovlivňujících zmíněné vlastnosti mohou být k řetězci vázány látky biologicky aktivní. Toho se využívá zejména při cílené dopravě léčiv, kdy je díky kovalentní vazbě mezi léčivem a hyaluronanem prodloužena jeho životnost v organismu. V ideálním případě dochází k uvolnění léčivé látky degradací této vazby až ve specifickém místě, kde chceme, aby léčivo působilo.[20,21,23]

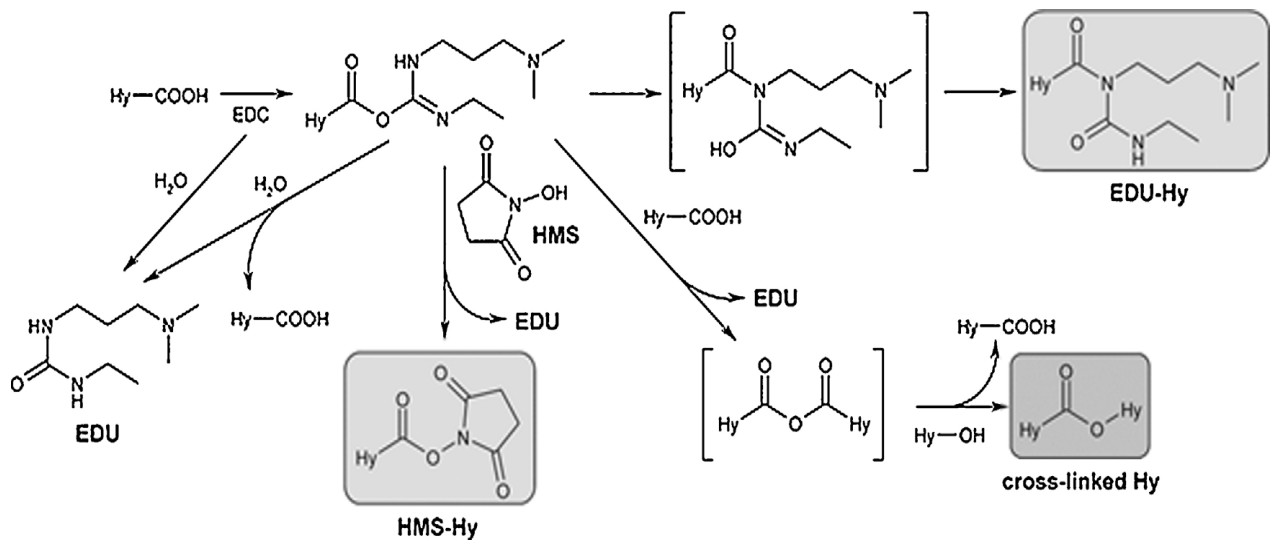
Druhou možností modifikace je chemické síťování. Je to jedna nebo více reakcí, při nichž se daná látka současně váže k více řetězcům hyaluronanu za vzniku trojrozměrných struktur – hydrogelů. Obecně existují tři různé metody síťování: přímé síťování, síťování HA derivátů a síťování rozdílných HA derivátů. V prvním případě se jedná o přímé reakce síťovacího činidla s funkčními skupinami řetězce kyseliny hyaluronové. V dalších dvou případech pak nejprve dochází k vytvoření stejných respektive různých derivátů HA na jednotlivých řetězcích, což je vlastně obdoba konjugace. Takto upravené řetězce jsou následnou chemickou reakcí provázány mezi sebou za vzniku trojrozměrného hydrogelu. V závislosti na použitém činidlu je možno síťování provádět ve vodných roztocích. Některá síťovací činidla jsou citlivá na hydrolýzu a v takových případech jsou reakce prováděny v organických rozpouštědlech, jako je například dimethylformamid nebo dimethyl sulfoxid. Stejně jako v případě konjugace lze regulovat biokompatibilitu, fyzikální vlastnosti a rychlost degradace sítě pomocí výběru typu chemické reakce, síťovacího činidla a stupněm substituce. Například esterová vazba je velmi snadno biodegradovatelná, jelikož se v tkáních vyskytuje velké množství esteráz. To jsou enzymy, které s různou rychlostí ruší esterové vazby a tím zpětně generují nemodifikovaný hyaluronan, jež může být dále odbourán enzymem hyaluronidázy. Stabilnější je pak vazba karbamátová, která je v organismu jen pomalu odbouratelná. Naopak prakticky neodbouratelné jsou sloučeniny navázané etherovou vazbou, případně ve formě substituovaného amidu karboxylové skupiny. [20,21,22]

V současnosti existuje, a stále probíhá, řada studií, které se věnují vývoji nových chemických postupů výroby derivátů kyseliny hyaluronové s vhodnými vlastnostmi podle specifických potřeb dané aplikace. Chemické modifikace HA se ukazují jako vhodná cesta k využití hyaluronanu jako scaffoldů pro pěstování buněčných struktur, nosičů účinných látek pro cílenou distribuci a řízené uvolňování léků a taktéž pro výrobu mikro a nanovláken využitelných v regenerativní, ale i jiných oblastech medicíny.[20,21]

### 1.3.1 Síťování pomocí EDC

Jednou z možností chemického síťování je použití N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid hydrochloridu (EDC) jako síťovacího činidla. Síťování kyseliny hyaluronové pomocí této látky bylo poprvé patentováno roku 1970 Hamiltonem a kol. [25]. EDC je považován jako výhodné síťovací činidlo díky nízké cytotoxicitě a rozpustnosti ve vodě. Gřundělová a kol. [24] jej použili v rámci svého výzkumu pro přípravu síťovaného hyaluronanu ve formě válečků a v kombinaci s N-Hydroxysuccinimidem (NHS) pro přípravu síťovaných filmů. Příprava filmů probíhala tak, že do předem připraveného 1 % roztoku HA v deionizované vodě byl přidán EDC (100 mmol) a NHS v hmotnostním poměru 2:1. Roztok byl poté míchán po dobu jedné hodiny při teplotě 25 °C, aby došlo k rozpuštění přidaných látek. Roztok byl následně titrován 0,1 M HCl tak, aby hodnota pH byla v rozmezí 4,5-4,75. Titrace probíhala 1 h za neustálého míchání. Výsledný roztok byl poté nalit do polystyrenové formy o rozměrech 100 x 80 x 0,05 mm a následně sušen do konstantní hmotnosti při 50 °C.

Pro hlubší porozumění modifikačního mechanismu hyaluronanu pomocí EDC byla na síťovaných vzorcích provedena FTIR spektroskopie a nukleární magnetická rezonance (NMR). Porovnáním spekter síťovaných a nesíťovaných vzorků bylo potvrzeno úspěšné provedení modifikace HA. Dále bylo zjištěno, že síťovací činidlo EDC se chemicky neváže ke kyselině hyaluronové, ale způsobuje aktivaci její karboxylové skupiny. EDC zprostředkovává tvorbu anhydridu kyseliny mezi dvěma karboxylovými skupinami, patřící stejné molekule HA. Tento anhydrid pak podle Tomihata [26] reaguje s hydroxylovou skupinou patřící jiné molekule hyaluronanu za vzniku esterové vazby, jejichž výskyt byl potvrzen FTIR spektroskopii. Díky esterovým vazbám je možné propojení více řetězců mezi sebou, což vede ke vzniku rozsáhlé intermolekulární sítě. Během reakce EDC s karboxylovými skupinami dochází k tvorbě aktivního O-acylmočovinného meziprojektu. Ten je nestabilní a přesmykem se může snadno měnit ve stabilní a nereverzibilní N-acylmočovinu. Přídavek NHS zabraňuje tvorbě tohoto nereverzibilního a nežádoucího produktu. EDC je následně vyloučen z reakce ve formě rozpustných derivátů močoviny (EDU), které vznikají jako vedlejší produkt síťovací reakce. Pomocí nukleární magnetické rezonance bylo zjištěno, že všechny karboxylové skupiny byly modifikovány pomocí EDC dle výše popsaného způsobu. Předpokládaný mechanismus síťování kyseliny hyaluronové pomocí EDC a NHS je prezentován na Obr. 6. [24,26]



Obr. 6 – Mechanismus síťování kyseliny hyaluronové pomocí EDC a NHS [24]  
(Hy – kyselina hyaluronová, HMS – *N*-Hydroxysuccinimid, EDU – rozpustné deriváty močoviny)

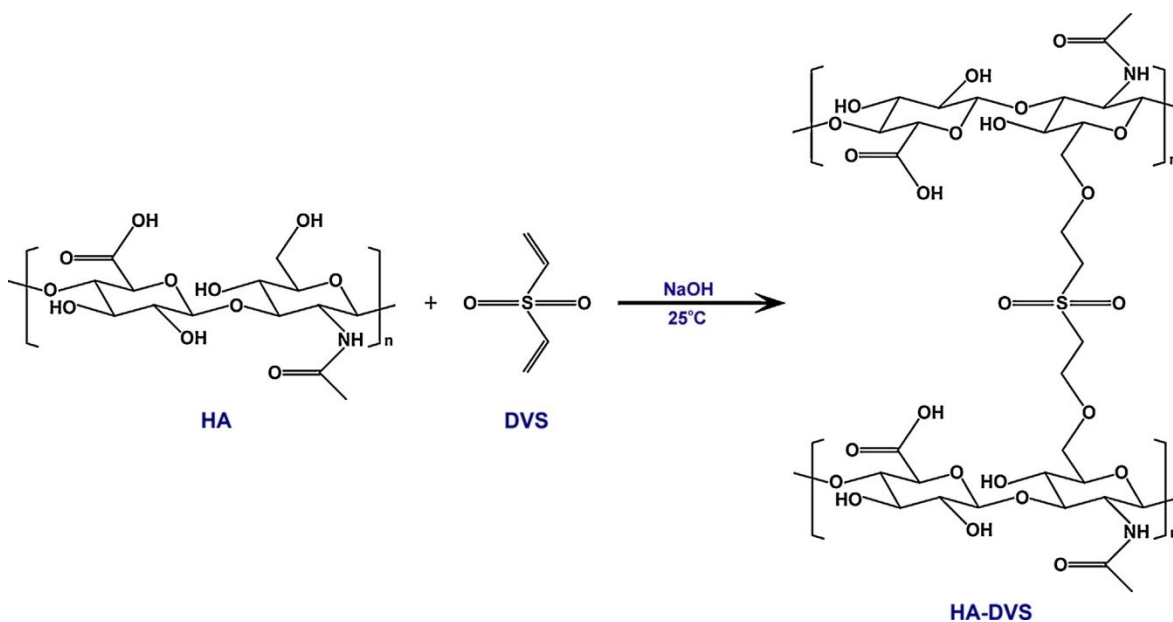
### 1.3.2 Síťování pomocí DVS

Mezi další hojně používané metody chemické modifikace kyseliny hyaluronové lze zařadit síťování pomocí divinyl sulfonu (DVS). První použití této metody je datováno do roku 1986, kdy byl vytvořen patent výzkumníky Balazsem a Leschinerem [28]. Na rozdíl od předchozí metody, síťování pomocí DVS je nutné provádět v zásaditém prostředí. Díky vysokému pH jsou deprotonovány hydroxylové skupiny za vzniku záporně nabitých alkoxidových skupin ( $\text{RO}^-$ ). Tyto skupiny jsou tzv. aktivní nukleofil, který velmi ochotně reaguje s elektrofilní dvojnou vazbou DVS za vzniku kovalentní etherové vazby mezi molekulou HA a DVS. Tento typ reakce se nazývá Michaelova adice. Vzhledem k tomu, že molekula DVS obsahuje dvě dvojně vazby, může reagovat s další alkoxidovou skupinou jiné molekuly HA a tak dochází ke vzniku rozsáhlé sítě. Na rozdíl od EDC se tedy DVS přímo účastní procesu chemického síťování kyseliny hyaluronové. [27,29,30]

Shimojo a kol. [27] použili DVS jako modifikační činidlo pro přípravu síťovaného hyaluronanu ve formě filmů, který byl následně použit pro přípravu mikročastic. Nejprve byly připraveny 3 % roztoky HA v NaOH o koncentracích v rozmezí  $0,05\text{--}1\text{ mol.l}^{-1}$ . Dále byl do roztoku přidán NaCl a síťovací činidlo DVS. Hmotnostní poměr přidávaných látek HA:NaCl:DVS byl 1:1:1. Síťovací reakce probíhala po dobu 4 hodin při teplotě  $25\text{ }^\circ\text{C}$ . Pro odstranění nezreagovaných složek byl roztok promýván deionizovanou vodou 2 dny za neustálého míchání. Po vysušení promytého roztoku byl hydrogel protřepáván po dobu 24

hodin v  $10 \text{ mmol.l}^{-1}$  roztoku solného fosfátového pufru (PBS) ke stabilizaci pH hydrogelu. Pomocí homogenizátoru pak byly získány mikročástice, jež byly použity pro další výzkum.

Platí, že čím vyšší je pH roztoku, tím více je deprotonováno hydroxylových skupin. Současně také platí, že s rostoucím pH dochází k poklesu molekulové hmotnosti HA v důsledku její degradace alkalickou hydrolyzou. Shimojo [27] udává, že hodnota pH musí být vyšší než 9, aby ještě docházelo k tvorbě alkoxidových skupin. Jako optimální podmínky pak určuje pH v rozmezí 11,79-12,63, přičemž v daném intervalu lze dobře kontrolovat stupeň zesítnění. Při vyšších hodnotách pH docházelo k velmi výrazné degradaci řetězců HA. Lai [29] v rámci svého výzkumu zjistil, že se zvyšující se koncentrací DVS v roztoku roste jeho množství síry ve výsledném materiálu a zároveň dochází k poklesu hydroxylových skupin. Z toho lze usoudit, že s rostoucí koncentrací DVS dochází k tvorbě více etherových vazeb během síťovacího procesu. Lze tedy říci, že stupeň síťování kyseliny hyaluronové pomocí DVS je možno řídit koncentrací síťovacího činidla a hodnotou pH, při níž reakce probíhá. Mechanismus síťovacího procesu je prezentován na Obr. 7.

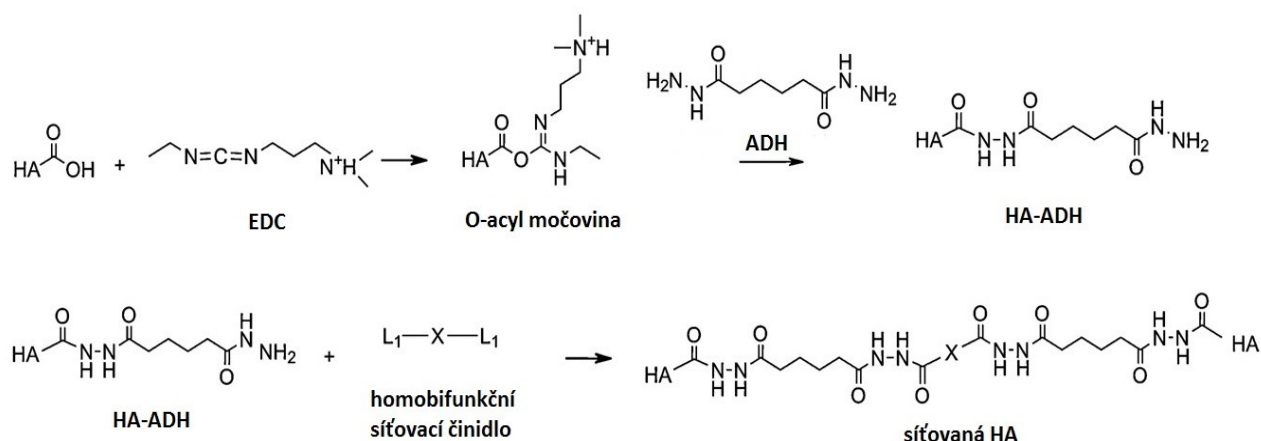


Obr. 7 – Mechanismus síťování kyseliny hyaluronové pomocí DVS [29]



### 1.3.3 Síťování pomocí ADH

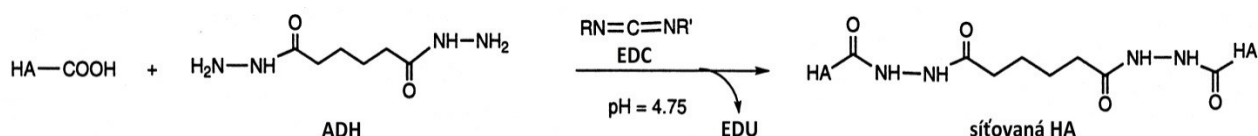
Jednou z dalších možností chemické modifikace kyseliny hyaluronové je použití dihydrazidu kyseliny adipové (ADH). Modifikační reakce probíhá v kyselém prostředí ve vodných roztocích. Zpravidla bývá přidáván EDC, jako aktivátor karboxylových skupin hyaluronanu, kdy dochází ke vzniku aktivního O-acylmočoviny. Ten následně reaguje s ADH za tvorby dihydrazidových vazeb. Schanté [21] uvádí, že touto cestou jsou připraveny HA-ADH deriváty, které samy o sobě nedokáží vytvářet intermolekulární síť. Pro její vznik je třeba přidavku homobifunkčních síťovacích činidel. Mezi takové látky lze zahrnout například bis(sulfosuccinimidyl) suberát ( $BS^3$ ); 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionát (DTSSP) nebo 2-methyl suberimidát (DMS). Tato síťovadla vytvářejí kovalentní vazby s HA-ADH deriváty, čímž dochází ke vzniku síťovaného hyaluronanu. Daný postup byl využit již dříve pro přípravu hydrogelu HA Hahnem a kol. [31]. Mechanismus síťovacího procesu je prezentován na Obr. 8.



Obr. 8 – Mechanismus síťování kyseliny hyaluronové pomocí ADH a EDC s použitím homobifunkčních síťovacích činidel. [21]

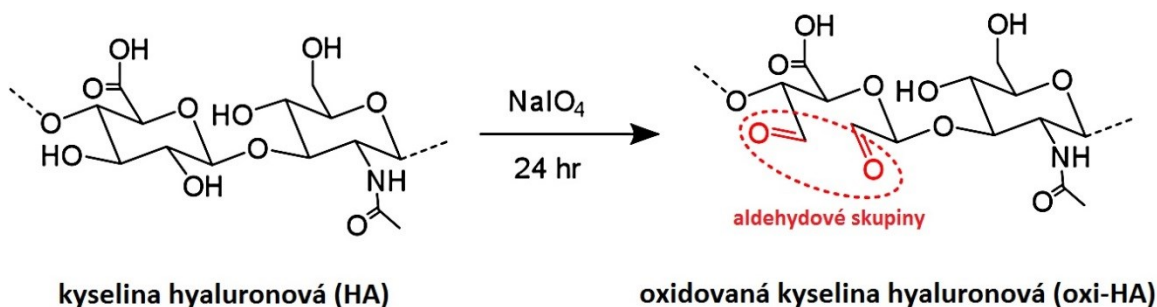
Na rozdíl od předchozích autorů, Prestwich [32] a Schramm [33] ve svých publikacích uvádí, že lze vytvářet síťované hydrogely hyaluronanu s pomocí ADH a EDC i bez přidavku homobifunkčních síťovacích činidel. V rámci jejich metod hraje EDC taktéž roli aktivátoru karboxylových skupin HA. ADH opět vytváří dihydrazidové vazby se vzniklým meziproductem močoviny, za vzniku HA-ADH derivátu. Ve vhodném pH (4,7) mohou tyto dále reagovat s karboxylovou skupinou jiné molekuly HA, čímž vzniká intermolekulární síť. EDC je pak z reakce vylučován jako rozpustný derivát močoviny (EDU).

Autoři obou popsaných metod používají k přípravě hydrogelů obdobné podmínky (kyselé pH, stejná síťovací činidla a rozpouštědlo). Taktéž se shodují, že po ukončení síťovacích reakcí je nutné výsledný produkt promývat v dialyzační trubici pomocí PBS od přebytečných síťovadel a vedlejších produktů. Není proto příliš jasné, jak vznikl tento rozpor. Mechanismus síťování bez použití homobifunkčních síťovacích činidel je prezentován na Obr. 9.

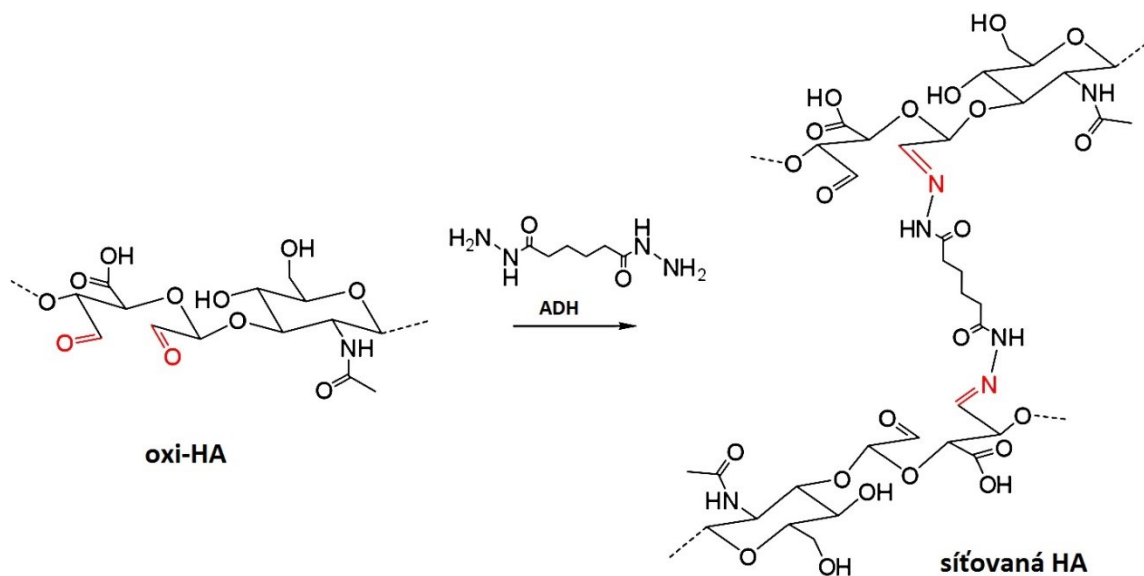


Obr. 9 – Mechanismus síťování kyseliny hyaluronové pomocí ADH a EDC bez použití homobifunkčních síťovacích činidel [32]

V roce 2011 byl Su a jejími spolupracovníky [34] patentován nový postup síťování kyseliny hyaluronové pomocí ADH. Jejich metoda je založena na přímé reakci oxidované HA s ADH. Oxidace kyseliny probíhá ve vodném roztoku s přidávkou jodistanu sodného ( $\text{NaIO}_4$ ). V rámci oxidace dochází k přeměně hydroxylových skupin na skupiny aldehydové. Tyto velmi snadno a rychle reagují s aminoskupinami molekul ADH za vzniku síťovaného hydrogelu. Čím vyšší je koncentrace  $\text{NaIO}_4$ , tím více aldehydových skupin vzniká. Toho lze v kombinaci se změnou koncentrace síťovacího činidla ADH využít pro snadné řízení stupně zesíťování hyaluronanu. Výzkum prokázal, že HA s vysokým stupněm síťování dokáže odolávat enzymatické degradaci po dobu až 5 týdnů, což poskytuje řadu potenciálních možností využití tohoto materiálu v *in vivo* aplikacích. Proces oxidace kyseliny hyaluronové je prezentován na Obr. 10 a mechanismus síťovací reakce na Obr. 11.[35]



Obr. 10 – Oxidace kyseliny hyaluronové pomocí jodistanu sodného [35]



Obr. 11 – Mechanismus síťování oxidované kyseliny hyaluronové pomocí ADH [35]

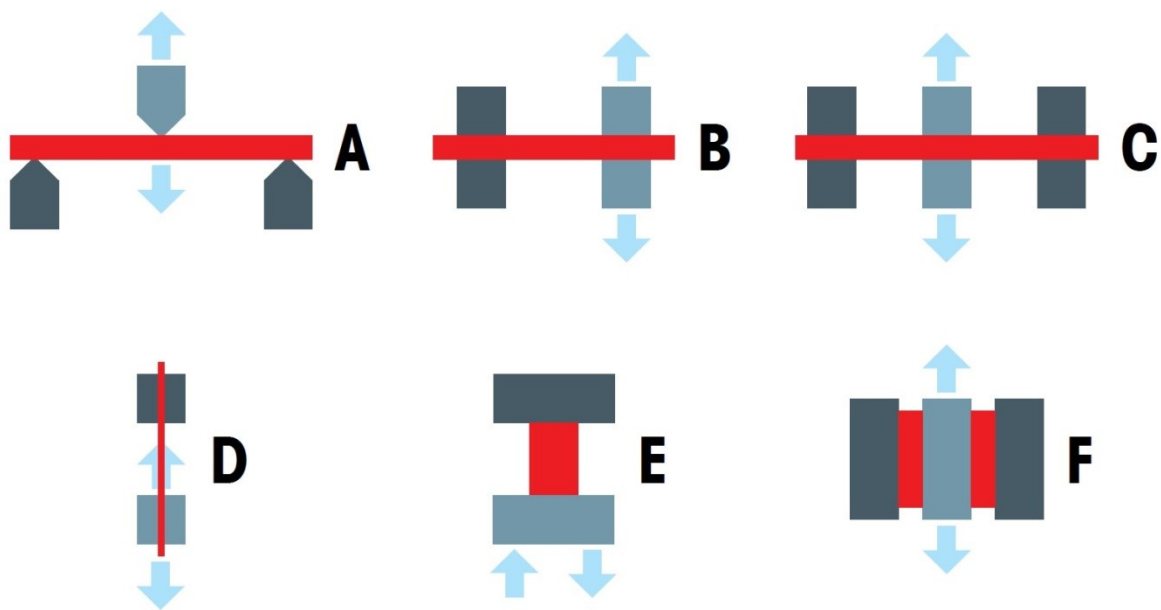
Závěrem lze říci, že studium síťování kyseliny hyaluronové zaujímá významné místo a pokrývá širokou oblast nedávných a současně probíhajících výzkumů. Kromě výše zmíněných, lze k chemické modifikaci HA použít řadu dalších látek [21] od halogenderivátů (bromidy, iodidy) přes aldehydy (glutaraldehyd, formaldehyd), anhydridy (oktanyl succin anhydrid, methakrylový anhydrid), dusíkaté sloučeniny (diaminy, azoly), alkoholy (ethylenglykol, polyglycerol) až po siričné sloučeniny (sulfidy, thioly) a další. Vzhledem k nepřehlednému množství možností se přímo nabízí vypracování akademické studie, zabývající se chemickými modifikacemi kyseliny hyaluronové. Sumarizace existujících poznatků do jedné práce by velmi usnadnila orientaci v dané problematice. Díky možnosti ovlivňovat výsledné vlastnosti materiálu výběrem modifikačního činidla a typem použité metody, lze předpokládat, že výzkum a vývoj nových metod v této oblasti bude pokračovat i v následujících letech.

## 2 DYNAMICKÁ MECHANICKÁ ANALÝZA

Dynamická mechanická analýza (DMA) se v současnosti stává stále více používanou metodou pro studium fyzikálních a mechanických vlastností materiálů. V praxi jsou materiály často vystaveny různým provozním podmínkám, především tepelnému a mechanickému namáhání, jež se velmi často vyskytují současně. Mechanické namáhání může být statické, kdy je těleso relativně v klidu a působí na něj konstantní zatížení. V reálném světě se však často setkáváme s materiály, které jsou namáhány dynamicky. V tomto případě je na těleso vyvozeno časově proměnné napětí, způsobené zpravidla vibracemi a cyklickým zatěžováním. Dynamická mechanická analýza se řadí mezi nejcitlivější techniky, schopné charakterizovat a interpretovat chování dynamicky namáhaného materiálu. Analyzovat lze širokou paletu materiálů. Nejčastěji se DMA používá k charakterizaci termoplastů, reaktoplastů, elastomerů, kovů a kompozitních materiálů. Pomocí DMA lze stanovit teplotu skelného přechodu, bod tání a měknutí, mechanické ztráty (tlumicí schopnost materiálu), tečení metodou krípu, stupeň krystalizace, míru orientace, bod zesíťování, stárnutí materiálu a další. Tyto vlastnosti mají zpravidla přímý vztah ke zpracovatelnosti a použitelnosti daného výrobku. [36,37,38]

### 2.1 Konstrukce měřicího přístroje

Základem přístroje jsou dvě vyvážená rovnoběžná ramena, která jsou uložena na speciálních čepech, umístěných blízko středu ramen. Tyto čepy jsou tvořeny vysoce přesnými torzními pružinami. Mezi ramena se do speciálního držáku (čelistí) upíná vzorek, který vytváří rezonanční systém. Tím je myšlena rezonanční frekvence závislá na modulu a geometrii testovaného vzorku. Deformace vzorku je způsobena dvěma protichůdnými momenty stejné velikosti. Tyto momenty působí na protilehlé konce zkušební vzorku upnutého do svorek. Celé zařízení je navíc umístěno v temperační komoře, což umožňuje měření v širokém rozsahu teplot (-190 až 600 °C), ale také v izotermním režimu při jedné konstantní teplotě. Vzhledem k široké škále testovaných materiálů, existují rozdílné požadavky na výsledky, které lze získat různými metodami měření. Proto je možno na přístroji měnit držáky vzorku (upínací čelisti) a měnit tak formy deformace podle potřeby zvoleného experimentu. Tvar a rozměry zkušebních vzorků pro různé jednotlivé typy čelistí jsou zpravidla dány výrobcem měřicího přístroje. Obr. 12 prezentuje deformační módy nastavitelné pro přístroj DMA 1 METTLER TOLEDO, který byl použit i v rámci měření praktické části této diplomové práce. [37,38,39]



Obr. 12 – Ukázka deformačních módů nastavitelných na přístroji DMA 1 METTLER TOLEDO [39]

**A) Třibodový ohyb** (*3-point bending*) – zkušební vzorek je podepřen pod oběma konci bez pevného uchycení. Deformační impuls působí uprostřed vzorku. Tento mód se používá pro měření tuhých vzorků, jako jsou kompozitní materiály a termosety.

**B) Jednostranný konzolový ohyb** (*single cantilever*) – zkušební vzorek je pevně uchycen na obou koncích. Deformační impuls působí na jeden z konců. Daný mód se používá pro měření velmi tuhých kovových a polymerních vzorků. Taktéž je doporučen pro stanovení ztrátového faktoru práškových materiálů.

**C) Dvoustranný konzolový ohyb** (*dual cantilever*) – zkušební vzorek je pevně uchycen na obou koncích. Deformační impuls působí uprostřed vzorku. Tento mód je vhodný pro tenké vzorky a materiály s nižší tuhostí jako jsou polymerní fólie.

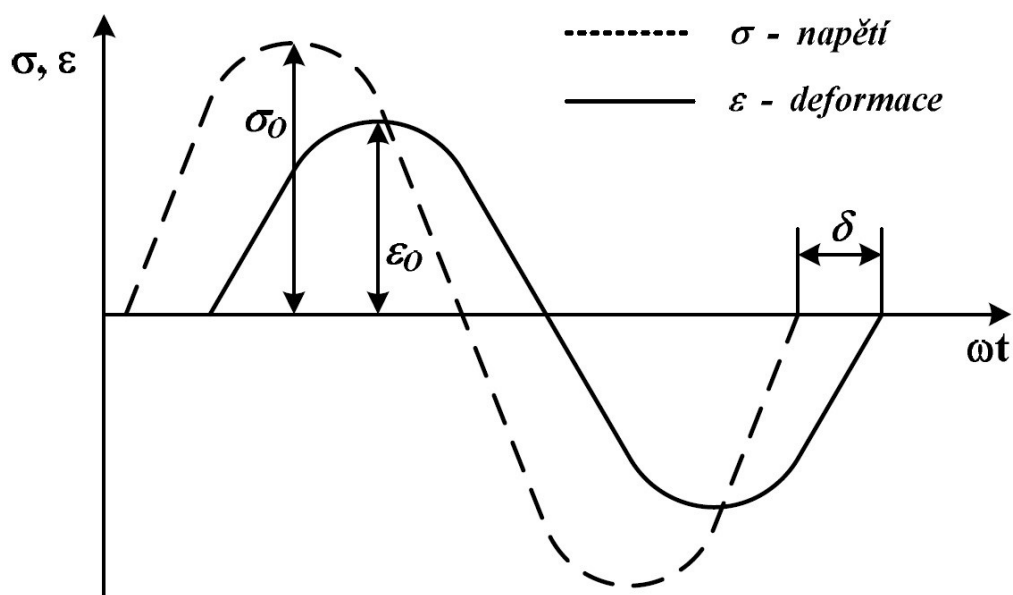
**D) Tah** (*tension*) – zkušební vzorek je pevně uchycen k pohyblivé a nepohyblivé čelisti. Deformační impuls je dán pohybem jedné upínací čelisti. Na zkušební vzorek musí být vyvozeno předpětí, aby se zabránilo jeho kroucení. Měření v tahu je vhodné pro materiály ve formě vláken a pásků.

**E) Tlak** (*compression*) – zkušební vzorek je umístěn mezi dvě horizontální destičky. Deformační impuls je dán pohybem jedné z destiček. Měření v tlaku je vhodné pro měkké materiály, jako jsou elastomery a polymerní pěny.

**F) Smyk (*shear sandwich*)** – u sendvičového uspořádání jsou použity dva zkušební vzorky umístěné mezi dvě nepohyblivé destičky. Mezi oběma vzorky je pohyblivá destička, která svým pohybem vytváří deformační impuls. Tento mód se používá pro měření měkkých materiálů, jako jsou elastomery a lepidla citlivá na tlak. Výhodné je i použití tohoto uspořádání pro studium vytvrzovacích reakcí termosetů. [36,39]

## 2.2 Princip metody DMA

Dynamická mechanická analýza je založena na sledování viskoelastické odezvy materiálu podrobeného malému oscilačnímu napětí. To může být vyvozeno dvěma způsoby. V prvním případě je zkušební vzorek namáhán cyklicky měnící se silou. V druhém případě je vzorek cyklicky deformován na určitou hodnotu deformace. Mechanicky namáhaný viskoelastický materiál lze z hlediska jeho chování popsat jako pružnou hookovskou látku a současně jako viskózní newtonskou kapalinu. Typickým znakem viskoelastického chování je opožděná reakce materiálu na mechanické namáhání. Toto zpoždění deformace za vloženým napětím se nazývá fázový úhel ( $\delta$ ) a je dáno uspořádáním a stavbou řetězců v polymerním systému. Obecný průběh napětí a deformace při dynamickém namáhání viskoelastického materiálu je prezentován na Obr. 13. [36,40]



Obr. 13 – Obecný průběh napětí  $\sigma$  a deformace  $\epsilon$  při dynamickém namáhání viskoelastického materiálu [40]

Pokud je na materiál vyvozeno střídavé harmonické zatížení, lze časový průběh napětí popsat pomocí vztahu:

$$\sigma(t) = \sigma_0 \sin(\omega t + \delta), \quad (1)$$

kde:  $\omega = 2\pi f$  je úhlová frekvence,  $\sigma_0$  amplituda napětí a  $\delta$  fázový úhel.

Napětí tedy předbíhá deformaci o fázový úhel  $\delta$ . Časový průběh poměrné deformace lze popsat pomocí vztahu:

$$\varepsilon(t) = \varepsilon_0 \sin(\omega t), \quad (2)$$

kde:  $\varepsilon_0$  je amplituda poměrné deformace.

Napětí a deformaci jsou pak spolu svázány veličinou zvanou komplexní dynamický modul pružnosti podle vztahu:

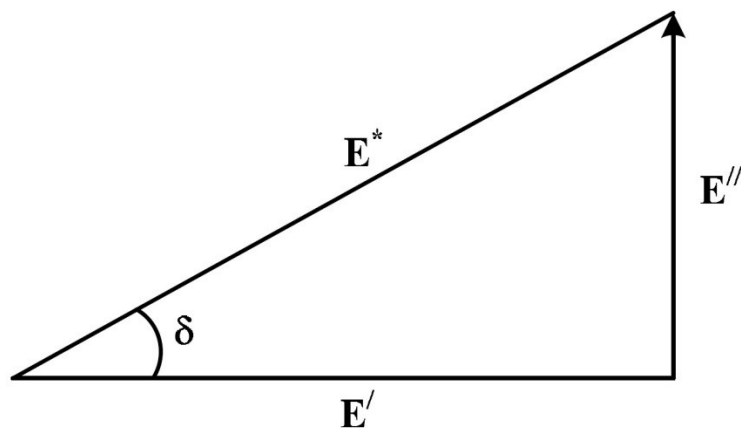
$$\sigma(t) = E^*(\omega) \cdot \varepsilon(t), \quad (3)$$

kde:  $E^*$  je komplexní dynamický modul pružnosti.

Komplexní dynamický modul je závislý na úhlové frekvenci a udává odolnost materiálu proti deformaci. Lze jej rozdělit na dvě vzájemně nezávislé složky. Reálnou část tvoří elastický soufázový modul a imaginární část je tvořena ztrátovým modulem. Platí pro ně následující vztah:

$$E^*(\omega) = E'(\omega) + iE''(\omega), \quad (4)$$

kde:  $E'$  je soufázový modul a  $E''$  ztrátový modul.



Obr. 14 – Vzájemný vztah komplexního, soufázového a ztrátového modulu [40]

Obr. 14 zobrazuje dynamický komplexní modul a jeho jednotlivé složky v komplexní rovině. Na jeho základě lze odvodit následující vztahy, kterými jsou moduly vzájemně svázány. Taktéž je definován poměr ztrátového a soufázového modulu, který se nazývá ztrátový faktor. [37,40]

$$E'(\omega) = E^*(\omega) \cdot \cos \delta \quad (5)$$

$$E''(\omega) = E^*(\omega) \cdot \sin \delta \quad (6)$$

$$\tan \delta = \frac{E''}{E'} \quad (7)$$

Soufázový modul je ve fázi s deformací a charakterizuje pevnostní vlastnosti materiálu. Představuje míru ideálně elastického odporu proti dynamickému namáhání při dané frekvenci a teplotě. Soufázový modul je vratnou složkou komplexního modulu určující hodnotu akumulované a uvolněné energie v jednotce objemu. Ztrátový modul je zpožděn o fázový úhel  $\delta$  a charakterizuje tlumící vlastnosti materiálu. Představuje mechanické ztráty a určuje množství energie přeměněné v teplo během jedné periody deformace při dané frekvenci a teplotě. Pro vysoké frekvence a velmi nízké teploty se hodnota ztrátového modulu blíží k nule, jelikož segmenty makromolekul nejsou za těchto podmínek schopny dostatečně rychle reagovat na vnější zatížení. U ideálně elastického materiálu je napětí s deformací ve fázi a tudíž mezi nimi nedochází ke zpoždění ( $\delta = 0$ ). Komplexní modul je v takovém případě roven soufázovému modulu ( $E^* = E'$ ). U čistě viskózních materiálů je fázový úhel nejvyšší ( $\delta = \frac{\pi}{2}$ ) a komplexní modul je pak roven ztrátovému modulu ( $E^* = E''$ ). U viskoelastických materiálů leží fázový úhel v intervalu  $\delta \in \left(0; \frac{\pi}{2}\right)$ . Ztrátový faktor  $\tan \delta$  udává míru tlumící schopnosti materiálu. Pokud je hodnota ztrátového faktoru vyšší, převládá v materiálu neelastická (viskózní) složka modulu. Nižší hodnoty ztrátového faktoru pak poukazují na více elastický materiál. [36,40]

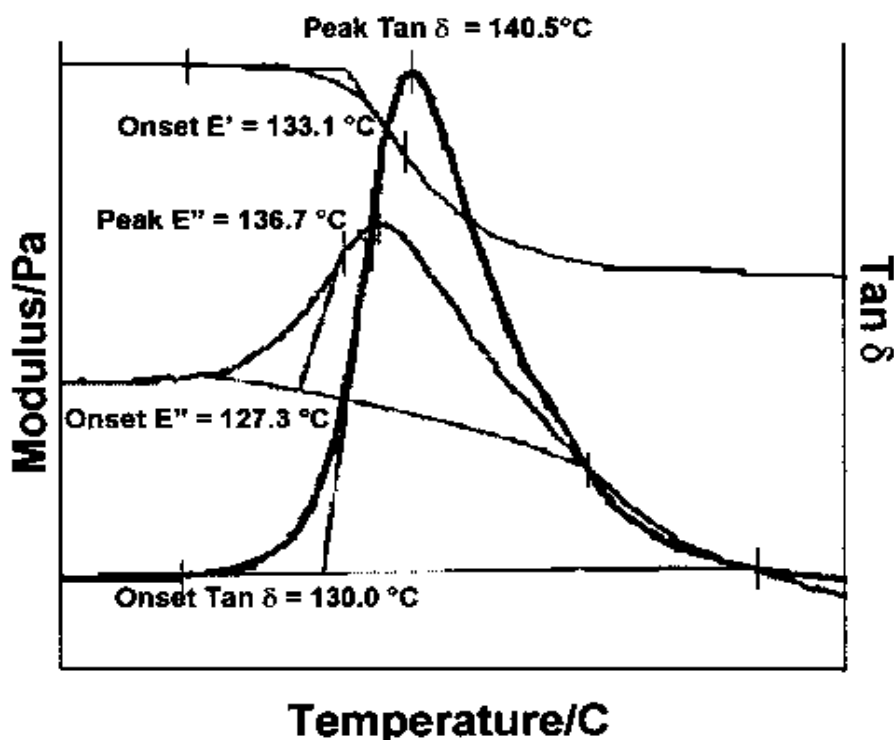
Jednou z největších výhod dynamické mechanické analýzy je právě možnost zaznamenání jednotlivých složek komplexního dynamického modulu a tak hodnotit materiál z hlediska elastického chování a mechanických ztrát. Měření bývá zpravidla prováděno v závislosti na měnící se teplotě nebo frekvenci. Díky tomu lze v relativně krátkém čase, oproti jiným metodám, získat poměrně komplexní charakteristiku viskoelastických materiálů vystavených různorodým podmínkám. [36,37]



### 2.3 Měření sekundárních přechodů

Teplota skelného přechodu ( $T_g$  nebo  $T_a$ ) se řadí mezi sekundární přechody (relaxační maxima) materiálu a lze označit ji jako jednu z nejdůležitějších veličin ve vztahu k chování amorfních polymerů. Při této teplotě se významně mění řada fyzikálních vlastností materiálu, kdy dochází k přechodu polymeru ze skelného do kaučkovitého stavu. Například modul pružnosti se může změnit až o 3 řády v rozmezí několika málo °C v okolí  $T_g$ . Přechod je spojen se změnou pohyblivosti segmentů hlavního řetězce tvořených zpravidla 20-50 atomy. Pod teplotou skelného přechodu zamrzá pohyb segmentů a polymer je tvrdý, křehký a má vysoký modul pružnosti. Nad  $T_g$  přestávají být segmenty zamrzlé a mají vyšší pohyblivost. Díky tomu může materiál snadněji reagovat na vyvozené napětí. Polymer je pak měkčí, houževnatější a má nižší modul pružnosti. [36,41]

Dynamická mechanická analýza se řadí mezi nejpřesnější metody měření teploty skelného přechodu. Existuje několik způsobů vyhodnocení hodnoty  $T_g$  i ostatních sekundárních přechodů a jsou prezentovány na Obr. 15.



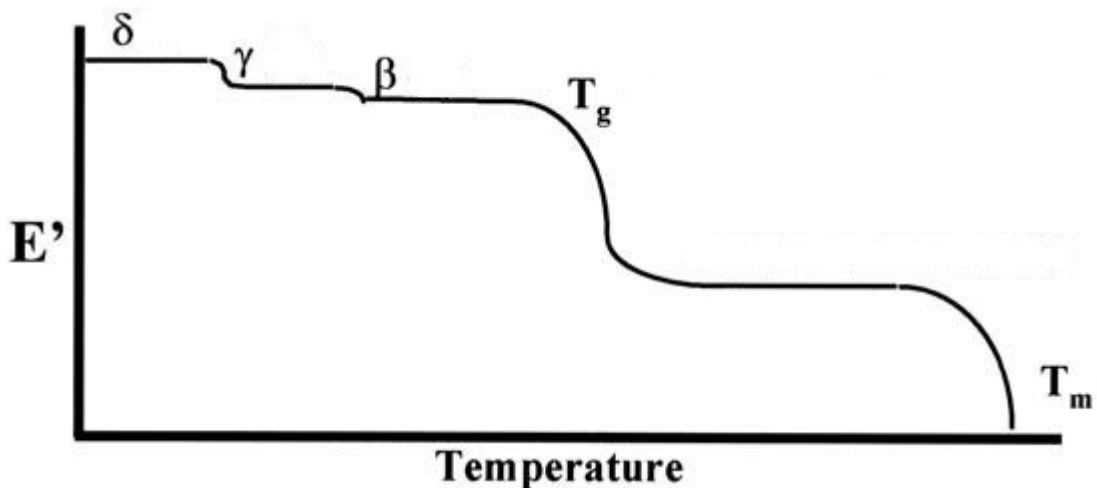
Obr. 15 – Možnosti vyhodnocení sekundárních přechodů [36]

V prvním případě to může být určení tzv. hodnoty *onset*, což je teplota kdy dochází k odklonu křivky od její základní linie. Získává se jako průsečík prodloužené přímkou základní linie a přímkou procházející inflexním bodem stupňovité změny dané veličiny. *Onset* teplota může být vyhodnocována u křivek soufázového modulu, ztrátového modulu a ztrátového faktoru. Druhou možností je určení maxima píku dané veličiny. To je možné provést u křivek ztrátového modulu a ztrátového faktoru. Některé zdroje [42,43] také uvádí možnost určení  $T_g$  pomocí tzv. *midpoint* teploty. Ta odpovídá inflexnímu bodu stupňovité změny soufázového modulu. Je to teplota, při které proběhne polovina změny tohoto modulu. V závislosti na způsobu vyhodnocení teploty skelného přechodu se tato může lišit v rozmezí až 50 °C v rámci jednoho měření. Z tohoto důvodu je v praxi nezbytné uvádět jakým způsobem byla tato teplota vyhodnocena. [36,40]

Kromě teploty skelného přechodu, která je v literatuře často označována za hlavní sekundární přechod, lze u některých polymerních materiálů nalézt i vedlejší sekundární přechody. Tyto je výhodné měřit pomocí dynamické mechanické analýzy, jelikož jsou zpravidla méně výrazné nebo příliš široké a proto je lze pomocí jiných metod (DSC, TMA) zachytit jen velmi obtížně. Vedlejší sekundární přechody vyskytující se za velmi nízkých teplot pod  $T_g$  jsou označovány jako nízkoteplotní relaxační maxima a značí se řeckými písmeny  $\beta$ ,  $\gamma$  a  $\delta$ . Jejich molekulární podstata není dodnes přesně objasněna. Podle dosavadních studií jsou tyto přechody spojeny se změnou pohyblivosti určitých úseků polymerního řetězce, v důsledku zvýšení volného objemu materiálu.  $\beta$  přechod bývá zpravidla dáván do souvislosti s uvolněním rotačního a posuvného pohybu vedlejších řetězců a bočních skupin navázaných na hlavní řetězec makromolekuly.  $\gamma$  relaxace je přiřazována natahování a ohýbání vazeb mezi 2-4 atomy hlavního či postranního řetězce. V některých případech bývá spojován i s obsahem vázané vody v polymeru.  $\delta$  přechod se vyskytuje za extrémně nízkých teplot a je dáván do souvislosti vibračními pohyby jednotlivých vazeb mezi atomy. Je nutné podotknout, že studium molekulární podstaty nízkoteplotních přechodů je velmi obtížné a proto se mu v současnosti věnuje jen úzká skupina výzkumníků. Zpravidla se používá kombinovaných metod FTIR spektroskopie a DMA, přičemž získání kvalitních a relevantních výsledků je velmi komplikované. [36,40,43-45]

Kromě výše zmíněných přechodů se mohou u některých materiálů v kaučukovitém stavu vyskytovat i vysokoteplotní relaxační maxima nad teplotou skelného přechodu. V literatuře jsou zpravidla značeny jako  $\alpha^*$ . Lze se setkat i s indexovaným označením  $\alpha'$ ,  $\alpha''$  atd. pokud se těchto přechodových oblastí materiálu vyskytuje více. S rostoucím

počtem indexů roste i teplota, při níž se přechod vyskytuje. U amorfních materiálů jsou tato maxima spojena se uvolněním pohyblivosti větších polymerních celků s následkem změny konformací řetězce nebo vzniku agregátů. U semikrystalických materiálů jsou tyto přechody spojeny se vzájemným skluzem krystalitů. Vysokoteplotní přechody jsou silně ovlivněny tepelnou historií a fyzikálním stárnutím materiálu. [36,40,43]

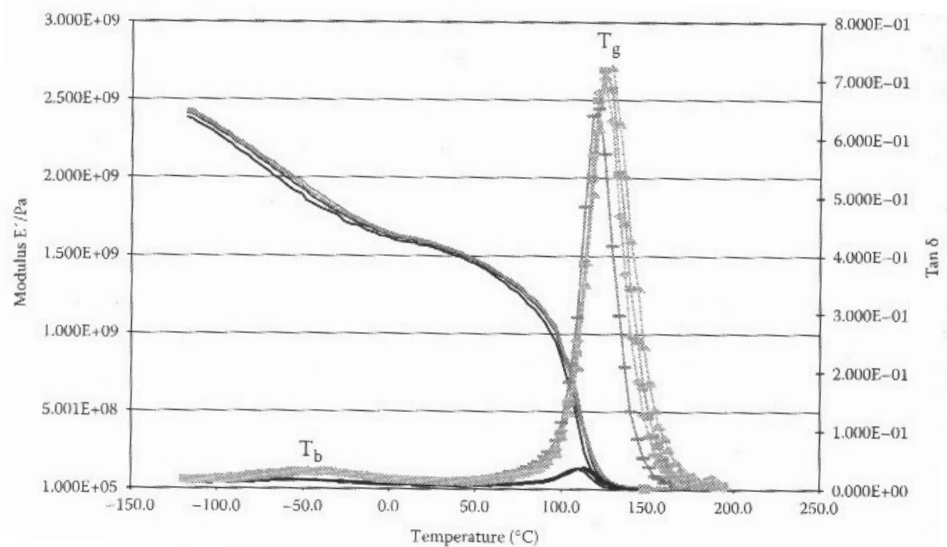


Obr. 16 – Idealizovaný scan DMA prezentující nízkoteplotní sekundární přechody a  $T_g$  materiálu na křivce souřezového modulu [36]

Sekundární přechody a zejména  $T_g$  závisí na molekulární struktuře materiálu. Například delší postranní řetězce, vyšší symetrie makromolekuly nebo také vyšší obsah nasorbované vody způsobuje pokles teploty skelného přechodu. Naopak vyšší polarita a větší obsah vodíkových můstků tuto teplotu intenzivně zvětšují. Se zvyšující se molekulovou hmotností polymeru taktéž dochází k růstu  $T_g$ . Stoklasa udává, že toto platí pouze u krátkých řetězců a při vyšších molekulových hmotnostech tato závislost zaniká. U síťovaných materiálů pak hraje významnou roli stupeň síťování, kdy s jeho růstem dochází ke zvyšování teploty skelného přechodu. [36,41]

Kromě vlastností materiálu mají při určování sekundárních přechodů významný vliv také podmínky měřicího procesu. Se zvyšující se rychlostí ohřevu jsou detekované přechody výraznější, ale současně dochází k jejich posuvu do vyšších teplot. Při použití příliš vysoké rychlosti ohřevu materiál reaguje na teplotní změny s určitým zpožděním, což způsobuje tento posun. Naopak za použití příliš nízké rychlosti ohřevu nemusí být přechody vůbec detekovány. Je proto vhodné volit rychlosti ohřevu v závislosti na typu materiálu a geometrii zkušební vzorku tak, aby mohl na teplotní změnu reagovat v celém

svém objemu. Také frekvence zatěžování hraje roli při měření relaxačních maxim a může vést k jejich posunu až o několik desítek °C, jak prezentuje Obr. 17. Platí, že při použití vyšších frekvencí materiál nestíhá adekvátně reagovat na vyvozené napětí a díky tomu se jeví tužší, než je ve skutečnosti. Proto se zvyšující se frekvencí dochází k posunu přechodových teplot k vyšším hodnotám. Ze zmíněných důvodů je nutné při měření sekundárních přechodů uvádět, za jakých procesních podmínek byly tyto vyhodnoceny. [36,37,43]



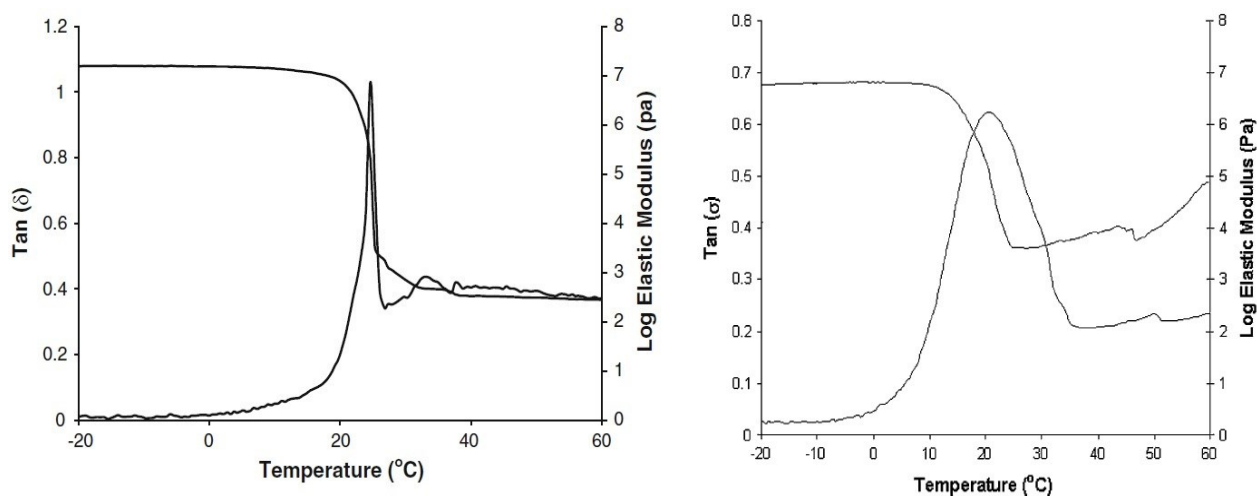
Obr. 17 – Vliv změny frekvence na sekundární přechody materiálu [36]

Kromě teplotních závislostí lze sekundární přechody materiálu měřit pomocí frekvenčních závislostí na základě ekvivalence teploty a času. V oblasti vysokých frekvencí se materiál chová jako ve skelném stavu, odpovídajícímu teplotám pod  $T_g$ . Při vysoké frekvenci segmenty řetězců nestíhají reagovat na vložené napětí a jeví se jako zamrzlé. Při snižování frekvence mají segmenty stále více času k reakci na vložené napětí a materiál ztrácí svoji tuhost. Při překročení určité frekvence dochází ke stupňovité změně mechanických vlastností a materiál se chová jako v kaučukovitém stavu, odpovídajícímu teplotám nad  $T_g$ . Pro přesnou detekci těchto přechodů je však nutné zaznamenávat obrovské množství hodnot. Zejména u nízkých frekvencí to může vést k prodloužení jednoho měření až na několik desítek hodin. U vyšších frekvencí existují omezení měřícího instrumentu, který je schopen měřit frekvence zpravidla jen do 1000 Hz. Z těchto důvodů se v praxi tohoto způsobu měření sekundárních přechodů příliš nevyužívá. [36,43]

### 3 TERMICKÉ A MECHANICKÉ VLASTNOSTI HYALURONANU

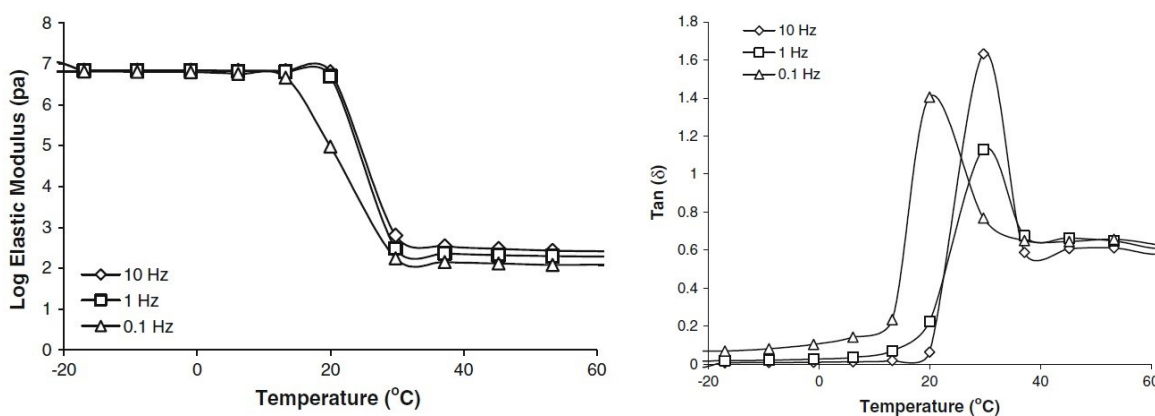
Studiu termických a mechanických vlastností hyaluronanu se do současnosti věnovala jen úzká skupina vědeckých pracovníků. Z hlediska jeho použití *in vivo* stojí ve středu zájmů spíše výzkumy ohledně jeho biodegradace, chování v roztocích nebo možnostech chemické modifikace. Přesto lze nalézt odborné publikace, ve kterých se autoři věnují právě studiu termických a mechanických vlastností hyaluronanu.

Collins a Birkinshaw [46] uskutečnili výzkum hyaluronanu síťovaného DVS a glutaraldehydem (GTA), pomocí dynamické mechanické analýzy ve smyku. Zkušební vzorky byly ve formě válečku a před měřením byly po různou dobu podrobeny botnání v destilované vodě. Měření byly teplotní závislosti od -30 do 100 °C, při frekvenci 1 Hz. Rychlost ohřevu byla nastavena na 4 K/min. Získané křivky pro vzorky, které byly podrobeny botnání po dobu 2 hodin, jsou prezentovány na Obr. 18. Z výsledků vyplývá, že u více nabotnaných vzorků dochází k poklesu elastického modulu. Se zvyšujícím se obsahem vody dochází ke snížení maxima píku ztrátového faktoru a taktéž k jeho rozšíření. Toto maximum odpovídá teplotě skelného přechodu a u obou vzorků se nachází v rozmezí teplot 20-25 °C. Nicméně u vzorků síťovaných pomocí GTA je  $T_g$  nižší než by se očekávalo. To může být způsobeno přítomností nezreagovaného síťovadla, jež má v tomto případě plastifikační efekt. Nad teplotou skelného přechodu nedochází k poklesu modulu k hodnotám blízkým nule, a proto mají zkoumané materiály využitelné mechanické vlastnosti i nad tímto přechodem při teplotě 37 °C.



Obr. 18 – Teplotní závislost DMA hyaluronanu síťovaného pomocí DVS (vlevo) a GTA (vpravo) [46]

Vzorky síťované pomocí DVS byly dále podrobeny zkoumání vlivu odlišné zatěžovací frekvence na hodnotu  $T_g$  a získané křivky jsou prezentovány na Obr. 19. Pro měření bylo použito frekvencí 10, 1 a 0,1 Hz. Z výsledků vyplývá, že elastický modul se zvyšuje spolu s rostoucí frekvencí. Pod teplotou skelného přechodu je tento efekt však poměrně malý. Výrazněji se projevuje až v kaučukovité oblasti, kdy se modul liší až o 18 % napříč frekvenčním rozsahem. Měření taktéž ukázalo, že teplota skelného přechodu se zvyšuje s rostoucí frekvencí. Rozdíl  $T_g$  je velmi výrazný mezi použitím frekvence 0,1 a 1 Hz, kdy tento dosahuje až 10 °C. Mezi frekvencemi 1 a 10 Hz se hodnota  $T_g$  liší jen minimálně, kdy rozdíl dosahuje pouze 1 °C. Tento jev je patrně dán tím, že frekvence vyšší než 0,1 jsou příliš velké a segmenty potřebují více času na relaxaci. Na to poukazuje i malý pík vyskytující se na křivce elastického modulu těsně před stupňovitým poklesem indikujícím teplotu skelného přechodu.

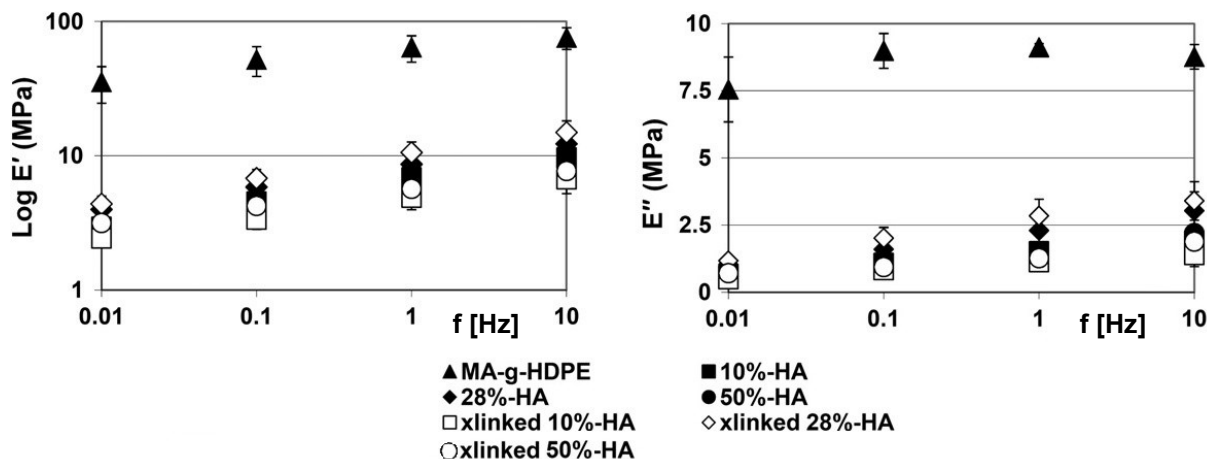


Obr. 19 – Vliv použité frekvence na měření teplotních závislostí hyaluronanu [46]

Collins a Birkinshaw se věnovali výzkumu síťovaného hyaluronanu pomocí DMA i v rámci dalšího výzkumu [47]. Zde byly použity zkušební vzorky ve formě filmů a byl sledován zejména vliv různých síťovacích činidel na teplotní závislosti. Jako síťovací činidlo byl použit EDC, GTA, DVS a poly(ethylenglykol) diglycidyl ether (EX 810). DMA měření probíhalo ve smykovém módu při frekvenci 1 Hz a rychlosti ohřevu 4 K/min od -30 do 100 °C. Ze získaných výsledků vyplývá, že teplota skelného přechodu neprojevuje výraznou závislost na použitém síťovadle.  $T_g$  všech vzorků se nacházela v rozmezí teplot 25-32 °C. Posun  $T_g$  k vyšším teplotám oproti předchozímu měření u vzorků síťovaných pomocí GTA a DVS může být dán odlišným množstvím pohlcené vody. Z hlediska mechanických vlastností je patrný výraznější vliv odlišných druhů síťovadel. Pod  $T_g$  se elastický modul drží u všech vzorků na téměř stejné hodnotě. Nad teplotou skelného přechodu

je však patrný vliv jednotlivých síťovacích činidel. Nejvyšší modul nad  $T_g$  mají vzorky síťované pomocí EDC, což je spojováno s vysokým stupněm síťování u tohoto materiálu. Nižších hodnot dosahuje elastický modul nad  $T_g$  u vzorků síťovaných pomocí DVS a dále pak pro materiál síťovaný pomocí GTA. Nejnižší modul nad teplotou skelného přechodu byl naměřen pro vzorky síťované pomocí EX 810. To je spojováno s nižším stupněm síťování, ale také s vysokým stupněm nabobtnání daného materiálu. Rozdíl mezi moduly EDC a EX 810 modifikovaného hyaluronanu je poměrně výrazný a dosahuje hodnoty až dvou řádů. Collins tyto rozdíly v závěru připisuje právě odlišné hustotě síťování v rámci použití rozdílných síťovacích činidel.

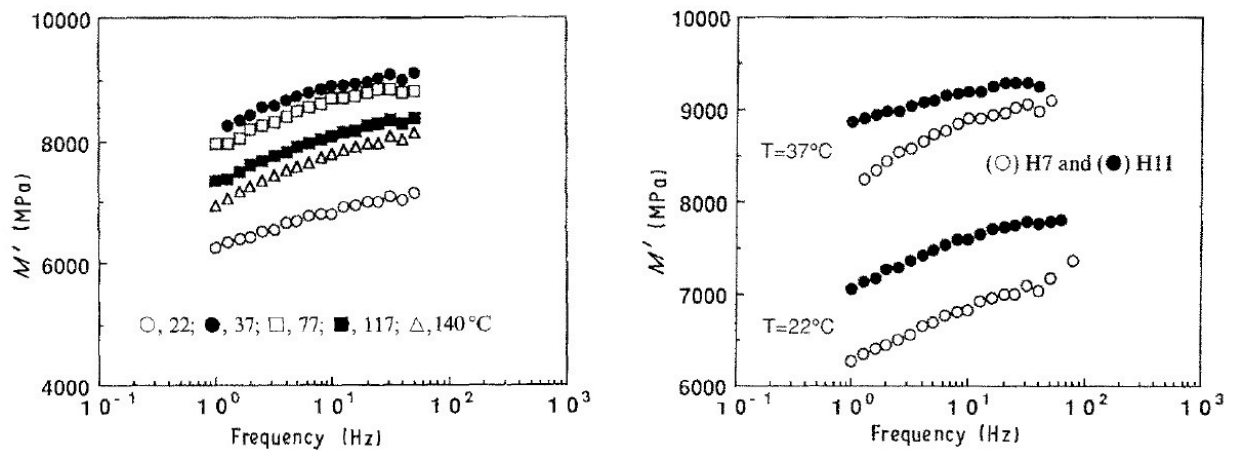
Oldinski a kol. [48] se zabývali výzkumem kopolymeru síťovaného i nesíťovaného hyaluronanu a vysokohustotního polyethylenu (HDPE). Síťovaný hyaluronan byl připraven pomocí hexadecyltrimethylammonium bromidu (CTA). Bylo vytvořeno několik vzorků ve formě válečků o různém zastoupení jednotlivých složek. Měření bylo provedeno pomocí DMA v tlaku, přičemž vzorky byly po celou dobu měření ponořeny v roztoku PBS o teplotě 37 °C. Materiál byl stlačován o 10  $\mu\text{m}$  při vybraných frekvencích od 0,01 do 10 Hz. Procesní podmínky byly voleny tak, aby co nejlépe odpovídaly fyziologickému prostředí. Získané závislosti souřezového a ztrátového modulu jsou prezentovány na Obr. 20. Z výsledků vyplývá, že s rostoucí frekvencí dochází ke zvyšování  $E'$  i  $E''$ . Hodnoty souřezového modulu všech vzorků dosahují rozsahu 2,4-4,24 MPa při 0,01 Hz, 3,4-4,4 MPa při 0,1 Hz, 4,9-10,6 MPa při 1 Hz a 6,7-15 MPa při frekvenci 10 Hz. V rámci srovnání jednotlivých vzorků se při všech frekvencích jeví materiály s obsahem HA 28 %, jako nejvíce tuhé. A to jak v případě síťované, tak i nesíťované HA, přičemž nesíťované vzorky mají modul jen o něco málo nižší. Největší poddajnost pak vykazují vzorky se síťovanou HA o obsahu 10 %, jelikož mají nejnižší  $E'$  při všech frekvencích. Závislosti ztrátového modulu vykazují obdobný trend. Největších ztrát dosahují síťované vzorky 28 %-HA a druhý nejvyšší  $E''$  mají nesíťované vzorky s obsahem HA 28 %. Nejnižší ztráty u všech frekvencí pak vykazují síťované materiály s 10 % obsahem HA. Závěrem lze říci, že HA-HDPE kopolymery kombinují vlastnosti obou složek. HDPE dodává materiálu vyšší tuhost a proto je tento kopolymer tužší než čisté hydrogely hyaluronanu. HA naopak dodává materiálu větší poddajnost a proto je kopolymer houževnatější než čistý vysokohustotní polyethylen. Taktéž nelze tvrdit, že existuje významná korelace mezi hodnotami modulů a koncentrací jednotlivých složek, jelikož kopolymery o stejném (50 %) zastoupení složek nedosahují v rámci modulů maximálních ani minimálních hodnot.



Obr. 20 – Frekvenční závislosti DMA v tlaku pro HA-HDPE kopolymery o různém zastoupení jednotlivých složek [48]

Studiu frekvenčních závislostí se věnovali také Iannace a kol. [49]. Hodnotili termomechanické vlastnosti derivátů HA ve formě vláken. Jako zkušební materiál byl použit ethyl ester kyseliny hyaluronové (H7) a benzyl ester kyseliny hyaluronové (H11). Měření probíhalo pomocí DMA v tahu, za teploty při různých teplotách. Naměřená data souřazového modulu jsou prezentována na Obr. 21. Bylo zjištěno, že při zvyšování teploty z 22 na 37 °C dochází k výraznému zvýšení souřazového modulu o přibližně 2000 MPa. Při dalším zvyšování teploty na 77, 117 a 140 °C dochází naopak k poklesu modulu s každou vyšší teplotou. Tento pokles není příliš razantní, vzhledem k tomu, že se jedná o poměrně široký teplotní interval. Počáteční nárůst modulu mezi 22 a 37 °C Iannace spojuje se ztrátou vody obsažené v materiálu, což má za následek zvýšení jeho tuhosti. Následující pokles modulu je spojován s vyšší dissipací energie molekul při vyšších teplotách. Ve všech případech pak docházelo k nárůstu souřazového modulu se zvyšující se frekvencí. V rámci srovnání jednotlivých derivátů je patrné, že souřazový modulu benzyl esteru HA je vyšší, než modulu ethyl esteru HA. To je dáno patrně objemnými benzylovými substituenty, které způsobují vyšší tuhost celé makromolekuly. Při 22 °C je rozdíl modulů těchto materiálů téměř konstantní v celém rozsahu měřených frekvencí a dosahuje zhruba 1000 MPa. Při teplotě 37 °C rozdíl mezi moduly již konstantní není a s rostoucí frekvencí se postupně snižuje. Na počátku měření při nízké frekvenci dosahuje přibližně 800 MPa a při vyšších frekvencích na konci měření zhruba 200 MPa. V závěru Iannace udává, že deriváty tvořené odlišnými substituenty mají různý vliv na interakci s molekulami vody a to má vliv na výsledné mechanické vlastnosti materiálu.



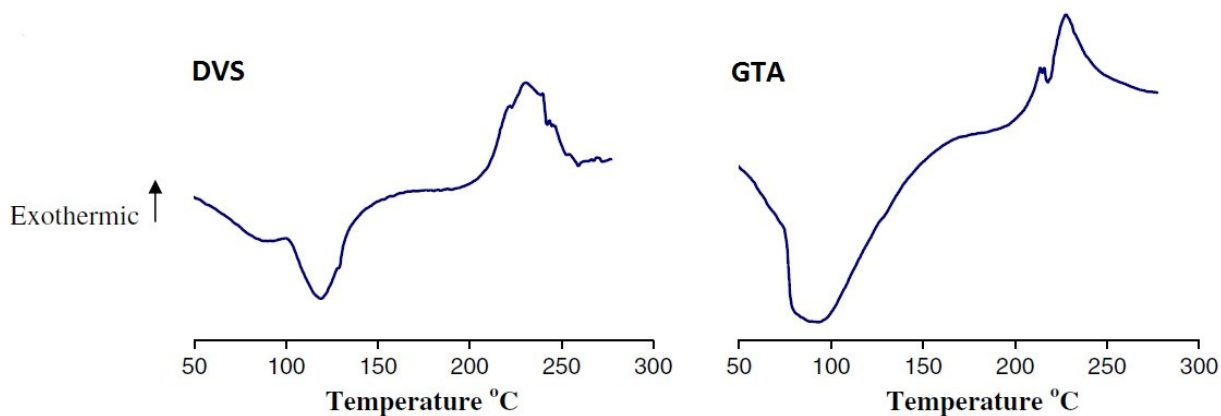


Obr. 21 – Frekvenční závislost ethyl esteru kyseliny hyaluronové pro různé teploty (vlevo) a frekvenční závislost obou typů derivátů pro dvě různé teploty (vpravo) [49]

Cascone [50] hodnotil mechanické vlastnosti hydrogelů síťovaného kopolymeru HA a polyvinyl alkoholu (PVA) pomocí DMA měření ve smyku. Ze závislosti souřazového modulu na dynamické zatěžovací síle vyplývá, že hodnota modulu vykazuje výraznou závislost na síle. Se zvyšující se hodnotou síly dochází k růstu souřazového modulu. Ten se mění v rozmezí zhruba jednoho řádu od 0,1 do 1 MPa, v rozsahu měření od 0,3 do 1 N. Součástí výzkumu bylo také hodnocení vlivu složení kopolymeru na jeho mechanické vlastnosti, za použití síly 0,8 N. Souřazový modul čistého PVA dosahuje 0,8 MPa, přičemž s rostoucím množstvím HA v materiálu roste i hodnota modulu až do 1,2 MPa při obsahu 20 % HA. S dalším zvyšováním obsahu HA pak dochází k poklesu modulu až na 0,4 MPa při stejném (50 %) zastoupení obou složek. Lze tedy říci, že s rostoucí koncentrací HA v materiálu se tento stává více tuhým. Při překročení určité hranice (20 %-HA) je vliv zvyšování koncentrací hyaluronu v kopolymeru opačný a materiál se stává více poddajný.

Studiu mechanických vlastností hyaluronanu se věnovali i další vědečtí pracovníci. Grundělová a kol. [24] provedli tahové zkoušky filmů z nesíťovaného a síťovaného hyaluronanu pomocí EDC a NHS. Měření probíhalo za rychlosti protahování 1 mm/min při laboratorní teplotě. Napětí při přetržení nesíťovaného filmu dosahovalo  $(83 \pm 15)$  MPa, což je o mnohem více než napětí při přetržení síťovaného filmu  $(24 \pm 0,2)$  MPa. Taktéž bylo zjištěno, že relativní deformace síťovaných vzorků  $(133 \pm 9)$  % při přetržení je razantně vyšší než relativní deformace nesíťovaných vzorků  $(5,2 \pm 0,6)$  %. Ze získaných výsledků vyplývá, že síťování hyaluronanu pomocí EDC a NHS mění jeho charakter a má výrazný vliv na mechanické vlastnosti.

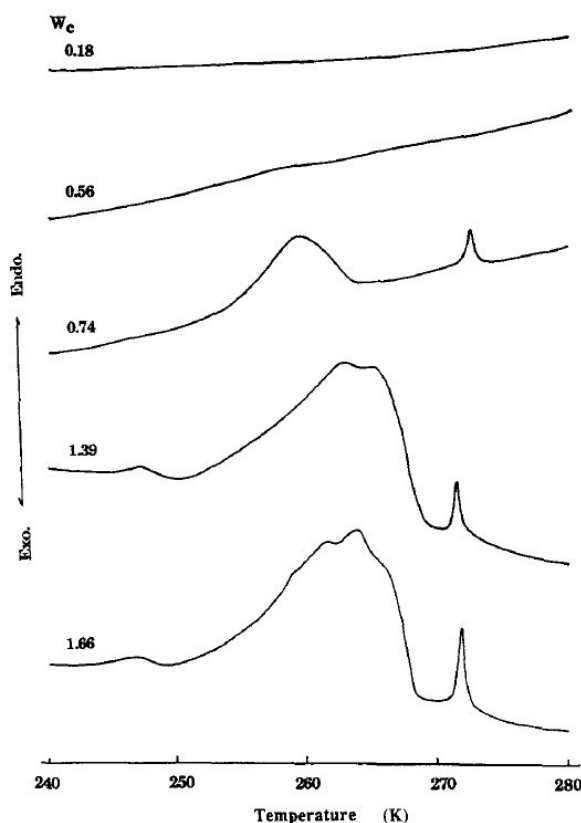
Další, často využívaný způsob studia termických vlastností hyaluronanu, je měření pomocí diferenční skenovací kalorimetrie (DSC). Collins [46] využil této metody pro měření hyaluronanu síťovaného pomocí DVS a GTA. Vzorky ve formě válečků byly podrobeny ohřevu z laboratorní teploty na 300 °C, při rychlosti ohřevu 10 K/min. Zkušební vzorky byly předem botnány v destilované vodě po krátkou dobu. Získaná data jsou prezentována na Obr. 22. Získané křivky jsou si svým tvarem velmi podobné. V obou případech se objevuje endotermní pík v okolí 100 °C. Ten je spojován se ztrátou vlhkosti, zbývající v materiálu po počátečním sušení. Vzorky síťované pomocí GTA mají tento pík širší a posunutý k nižším teplotám což je patrně způsobeno větším obsahem vlhkosti v daném materiálu. Mnohem ostřejší, exotermní píky se u obou vzorků vyskytují mezi 200 a 250 °C. Předpokládá se, že první a menší pík odpovídá konverzi řetězců do méně uspořádaného stavu. Druhý a větší pík pak představuje tepelnou degradaci materiálu. Relativní velikost těchto dvou exotermních píků je ovlivněna odlišným síťovacím činidlem. Lze tedy říct, že na základě použitého síťovadla může materiál obsahovat odlišné množství vlhkosti, která se uvolňuje při mírně odlišných teplotách, v závislosti na jejím množství. Použité síťovací činidlo pak ovlivňuje teplotu degradace materiálu jen minimálně.



Obr. 22 – DSC křivky hyaluronanu síťovaného pomocí DVS (vlevo) a GTA (vpravo) [46]

Takigami a kol. [51] použili DSC pro výzkum hyaluronanu síťovaného pomocí formaldehydu. Zkušební vzorky byly smíchány s destilovanou vodou a byly botnány po různé době, aby byly připraveny vzorky s odlišným obsahem vody. Přebytná voda pak byla odstraněna za pokojové teploty v sušárně, obsahující 50 % roztok  $H_2SO_4$ . Vzorky byly chlazeny z 303 na 150 K, při rychlosti chlazení 10 K/min. Následně byly podrobeny ohřevu ze 150 na 303 K, při rychlosti ohřevu 10 K/min. Naměřená data pro ohřev jsou

prezentována na Obr. 23. Z výsledků vyplývá, že vzorky obsahující velmi malé množství vody nevykazují žádné výrazné přechody v celém teplotním rozsahu. U křivky pro vzorek s obsahem vody 0,74 g/g (hmotnost vody/hmotnost vysušeného hyaluronanu) se již vyskytují dva výrazné endotermní píky. První pík v okolí 260 K, je spojován s táním zamrzlé vody vázané v materiálu. Druhý pík v okolí 273 K, je pak spojován s táním volné vody. U vzorků s ještě vyšším obsahem vody (1,39 a 1,66) se vyskytuje i třetí endotermní pík v okolí 248 K. Ten je také spojován s vodou vázanou v materiálu. U těchto vzorků dochází k rozšíření druhého píku. To je dáno vyšším obsahem vázané vody. Lze u něj také pozorovat více lokálních maxim, což poukazuje na to, že zamrzlá vázaná voda v hyaluronanu prochází více termodynamickými stavy. Se zvyšováním obsahu vody také dochází k posunutí tohoto píku k vyšším teplotám. Třetí pík, náležící volné vodě, se vyskytuje opět v okolí 273 K a mění se pouze jeho výška. To je dáno vyšším obsahem volné vody v materiálu, přičemž její množství nemá výrazný vliv na teplotu tání této vody. Závěrem lze tedy říci, že voda vázaná v materiálu mění svůj stav mezi 250-270 K, což může mít za následek změnu vlastností materiálu nad a pod tímto teplotním intervalem. K tání volné vody dochází zpravidla při teplotě 273 K a nad ní by již neměla výrazně ovlivňovat vlastnosti materiálu.



Obr. 23 – DSC křivky síťovaného hyaluronanu s různým obsahem vody [51]

Studiu hyaluronanu pomocí DSC se věnovali i další vědečtí pracovníci [47,52,53]. Ve všech případech byl materiál hodnocen z hlediska chování vázané a volné vody. Dospěli k obdobným výsledkům, jako Takigami. Voda v materiálu se projevuje až při vyšším zastoupení než 0,5 g/g a k jejímu tání respektive tuhnutí dochází při záporných teplotách v rozmezí -20 až -5 °C. Teplota tohoto přechodu se pak posouvá k vyšším teplotám s rostoucím množstvím vody v materiálu.

O vyhodnocování teploty skelného přechodu pomocí DSC se zmiňuje okrajově Hatakeyama ve své publikaci [54]. Uvádí, že pomocí DSC je poměrně obtížné tento přechod detekovat u síťovaného hyaluronanu. Přechod není příliš výrazný a často se vyskytuje v oblasti, kde dochází ke změně stavu vázané vody. Protože se tyto změny vyskytují jako pík, často překryjí skelný přechod, který se na DSC křivce vyskytuje jako stupňovitá změna. Proto lze  $T_g$  pomocí DSC nejlépe detekovat u čistých vzorků hyaluronanu, jelikož tyto nejsou schopny pojmout tak velké množství vody, jako vzorky síťované. Jako výhodnější se tedy jeví vyhodnocování skelného přechodu pomocí DMA, vzhledem k vyšší citlivosti této metody.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 PŘÍPRAVA VZORKŮ

Pro přípravu vzorků byla použita kyselina hyaluronová ve formě bílého prášku, dodaná firmou Contipro a.s. Materiál byl skladován v lednici v plastových nádobách utěsněných parafilmem, aby nedocházelo k pohlcování vzdušné vlhkosti. Z daného materiálu byly připraveny fólie. V prvním případě byly fólie tvořeny čistě kyselinou hyaluronovou. V druhém případě byly fólie modifikovány pomocí síťovadel a tak došlo k vytvoření síťovaných vzorků. Kyselina hyaluronová byla použita o různých molekulových hmotnostech, aby mohl být sledován vliv odlišné molekulové hmotnosti na dynamické mechanické vlastnosti materiálu.

Z připravených fólií byly vytvořeny zkušební vzorky ve formě pásků o šířce 6 mm a délce 30 mm. Poté byla měřena jejich tloušťka pomocí mikrometru, přičemž každý vzorek byl změřen 3x v jeho pracovní oblasti a pro samotné měření byla použita průměrná hodnota tloušťky daného vzorku. Nejprve byly vzorky vyřezávány pomocí lámacího nože a zafixované šířky na posuvném měřidle. Tento postup se ale ukázal jako neefektivní, příliš zdouhavý a taktéž docházelo k prokluzu fólie pod posuvným měřidlem. To způsobilo vyřezání nekvalitního vzorku, který nedosahoval požadovaného tvaru pásku s konstantními rozměry. Rozdíl šířky mezi jedním a druhým koncem byl mnohdy v řádu jednotek mm. Takový vzorek nemohl být podroben měření v důsledku nerovnoměrného rozložení napětí na obou koncích, což by mohlo ovlivnit výsledky. Díky tomu také docházelo k plýtvání zkoušeného materiálu. Ze zmíněných důvodů bylo následně použito vysekávacího nože, vyrobeného na zakázku firmou SEFO plus s.r.o., o rozměrech 60 x 6 mm. Použití vysekávacího nože zajistilo konstantní šířku vzorků, významně urychlilo celý proces vyřezávání a do značné míry snížilo plýtvání materiálem, jelikož po vyseknutí zůstávaly pouze nepatrné odřezky. Takto získaný vzorek byl ještě v půlce přestřižen. Tím vznikly dva finální vzorky o dostatečné délce 30 mm, jež mohly být podrobeny měření. Vzorky připravené na dynamickou mechanickou analýzu byly skladovány v uzavřených obalech v exikátoru, aby nedocházelo k pohlcování vzdušné vlhkosti. Veškerá manipulace se vzorky byla prováděna v rukavicích, aby se zabránilo jejich kontaminaci potem nebo jinými nečistotami. Z tohoto důvodu byl kladen důraz na čistotu použitých cel pro odlévání fólií.

#### 4.1 Příprava nesít'ovaných fólií

Pro přípravu nesít'ovaných fólií byla použita kyselina hyaluronová o molekulové hmotnosti 240 kDa, 500 kDa, 600 kDa, 1180 kDa a 1500 kDa. Nejprve bylo do skleněné uzavíratelné nádoby o objemu 100 ml naváženo 63,89 g deionizované vody. Poté bylo naváženo 0,6389 g kyseliny hyaluronové o dané molekulové hmotnosti a tato navážka byla přidána do ultračisté vody. Daný poměr odpovídá vzniku 1 % roztoku kyseliny hyaluronové ve vodě a tento poměr byl dodržen pro všechny použité molekulové hmotnosti.

K samotnému rozpouštění bylo použito dvou odlišných metod. V prvním případě byla nádoba s navážkami připevněna k třepacímu přístroji do horizontální polohy a roztok byl protřepáván po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě, aby došlo k dokonalému rozpuštění kyseliny. V druhém případě bylo do nádoby s navážkami přidáno teflonové míchadlo a nádoba byla umístěna do vodní lázně o teplotě 50 °C, kde byla za současného míchání ponechána po dobu 24 hodin. V rámci použití obou metod došlo po uplynulém čase k dokonalému rozpuštění kyseliny hyaluronové.

Nelze říci, že by byl jeden ze způsobů rozpouštění výhodnější. Při přípravě většího množství vzorků je vhodnější použití třepacího přístroje, protože umožňuje připevnění až čtyř nádob v rámci jednoho cyklu. Při rozpouštění za vyšší teploty se do jedné lázně vejdou pouze dvě nádoby, takže pro přípravu více vzorků je třeba použít více vodních lázní.

Po uplynutí rozpouštěcího cyklu byly sestaveny odlévací cely, skládající se ze dvou plastových dílů, mezi které bylo vloženo podložní sklo. Mezi toto sklo a vrchní plastový díl bylo uloženo pryžové těsnění, aby nedocházelo k protékání roztoku mimo celu. Roztok kyseliny hyaluronové byl poté odlit na podložní sklo a cela byla přemístěna do předem vyhřáté sušárny na teplotu 50 °C. Výhodné je použití sušárny bez ventilátoru, aby se předešlo kontaminaci vzorků nečistotami. Při této teplotě byly vzorky vysušovány po dobu 48 hodin. Použití vyšší teploty v sušárně částečně zkracuje potřebnou dobu pro vysušení fólie, avšak může způsobovat její kroucení, což bylo pozorováno u sušení při 60 °C. Pokroucenou fólii se již nepodařilo narovnat. To způsobovalo další potíže při vysekávání zkušebních vzorků. Všechny ostatní vzorky sušeny při zmíněných 50 °C. Výsledkem byla rovná, bezbarvá a plně transparentní fólie, která byla po odebrání z cely vložena mezi 2 vrstvy parafilmu a umístěna v uzavřených obalech do exikátoru. Z takto připravených fólií byly vysekávány zkušební vzorky postupem popsáním na začátku kapitoly.

## 4.2 Příprava síťovaných fólií

K přípravě síťovaných fólií byla použita kyselina hyaluronová o molekulové hmotnosti 500 kDa, 1180 kDa a 1500 kDa. Pro přípravu bylo využito postupu podle Gřundělové a kol.[24]. Jako síťovací činidlo byl použit N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid hydrochlorid (EDC) v kombinaci s N-Hydroxysuccinimidem (NHS). Obě sloučeniny byly dodány firmou Sigma-Aldrich s.r.o.

Nejdříve byl připraven 1 % roztok kyseliny hyaluronové do skleněných nádobek o objemu 100 ml, za použití vodní lázně o teplotě 50 °C. Zde byla kyselina rozpouštěna po dobu 24 hodin. Poté byl roztok vyndán z vodní lázně a půl hodiny ponechán při laboratorní teplotě za stálého míchání, aby došlo k jeho ochlazení z rozpouštěcí teploty. Následně byl do roztoku přidán EDC v molární koncentraci 0,1 mol/l, což odpovídá navážce 1,2248 g. Dále byl do roztoku přidán NHS v poměru 1:2 k EDC, odpovídající 0,6124 g. Připravený roztok byl míchán po dobu 1 hodiny. Ze začátku byly nastaveny vyšší otáčky míchadla, aby došlo k dobrému promíchání síťovadel s roztokem kyseliny. Při vyšších otáčkách v roztoku vzniká velké množství bublin. Pro omezení jejich vzniku byly po půl hodině otáčky sníženy o 2 stupně.

Po uplynutí stanovené doby byl roztok titrován 0,1 M HCl tak, aby pH roztoku bylo v rozmezí 4,5 – 4,75. Síťovací reakce probíhala v tomto intervalu po dobu 1 hodiny. Hodnota pH byla sledována pomocí předem kalibrovaného pH metru. Pro roztok kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 500 kDa byly v prvním případě přidány 3 ml HCl. Hodnota pH klesla z 6,83 na 4,42. Množství přidané kyseliny se ukázalo jako příliš velké. Naměřená hodnota pH byla menší, než udává předepsaný interval. Další HCl přidávána nebyla. Roztok byl ponechán za stálého míchání síťovací reakci po dobu 1 hodiny, kdy hodnota pH samovolně klesla na 4,35. Reakce byla ukončena a roztok byl odlit do cely na přípravu fólií. V druhém případě byl roztok míchán spolu se síťovadly 1,5 hodiny. To je o půl hodiny více, než předepsaná doba. Hodnota pH roztoku po této době byla 4,68 bez přídavku kyseliny. Tato hodnota je uvnitř předepsaného intervalu a během reakce pozvolna klesala. Reakce byla ponechána bez přídavku kyseliny. Síťování bylo ukončeno po uplynutí 1 hodiny na pH 4,49 a roztok byl poté odlit do cely. Ze zmíněného vyplývá, že je velmi důležité dodržet předepsanou dobu míchání roztoku kyseliny hyaluronové se síťovadly. Přídavek HCl by neměl být příliš velký. Během síťovací reakce dochází k samovolnému poklesu pH a mohlo by dojít k přesahu spodní hranice pH z předepsaného intervalu.



Počátek síťovací reakce roztoku kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 1180 kDa byl na hodnotě pH 5,14. HCl byla postupně přidávána po 100  $\mu$ l, přičemž po celkovém přidavku 2,3 ml pH kleslo na 4,72. Další HCl nebyla přidávána. pH roztoku pozvolně klesalo až na hodnotu 4,55, kdy byla reakce po 1 hodině ukončena, a roztok byl odlit do cely.

Titrace roztoku kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 1500 kDa byla započata na hodnotě pH 5,17. Stejně jako v předchozím případě byla HCl přidávána po 100  $\mu$ l, kdy celkový přírůstek 3,5 ml snížil hodnotu pH na 4,70. Bez dalšího přírůvku HCl probíhala reakce po dobu 1 hodiny. Během této doby došlo k samovolnému poklesu pH na 4,50, kdy byla reakce ukončena a roztok byl opět odlit do cely.

Po ukončení titrace a odlití roztoků do cel na přípravu fólií, byly tyto vloženy do předem vyhřáté sušárny na teplotu 50 °C. Sušení probíhalo 72 hodin, na rozdíl od nesítovaných fólií, jelikož po 48 hodinách nebyly okraje fólie plně vysušeny. Nedokonalé vysušení způsobovalo problém při jejich odebírání z podložního skla. Taktéž bylo zjištěno, že čím nižší je teplota sušení, tím méně bublin obsahuje výsledná fólie. Použití nižší teploty než 50 °C by samotný proces značně prodloužilo. Vyrobene fólie byly v případě všech použitých molekulových hmotností částečně transparentní a jemně bíle zakalené, jak je patrné z Obr. 24. Po odebrání fólií z cel byly tyto opět vloženy mezi 2 vrstvy parafilmu a uloženy v uzavřeném obalu do exikátoru.



Obr. 24 – Vysušená síťovaná fólie kyseliny hyaluronové (1500 kDa) uvnitř cely

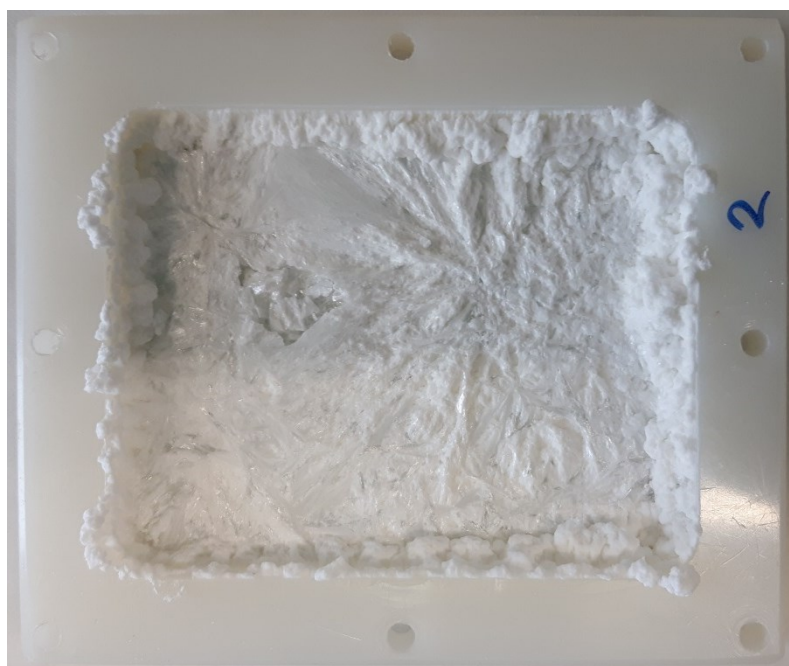
Součástí přípravy síťovaných fólií kyseliny hyaluronové byla také snaha o přípravu pomocí odlišných síťovacích činidel. Konkrétně šlo o použití divinyl sulfonu (DVS) podle Shimoja a kol. [2] v prvním případě a o použití dihydrazidu kyseliny adipové (ADH) v kombinaci s EDC podle Hanha a kol. [3] v případě druhém. Obě použité metody byly modifikovány tak, aby byla připravena 1 % fólie. Poměry jednotlivých složek zůstaly nezměněny.

V rámci přípravy pomocí DVS bylo rozpouštěno 0,64 g kyseliny hyaluronové v 64 ml roztoku NaOH o koncentraci 1 mol/l, ve vodní lázni o teplotě 50 °C po dobu 24 hodin. Poté bylo do roztoku přidáno 0,64 g NaCl a 0,64 g DVS. Síťovací reakce probíhala za neustálého míchání při laboratorní teplotě a při pH vyšším než 9. To bylo kontrolováno pomocí pH metru. Po uplynutí 4 hodin byl roztok odlit do cely a tato byla vložena do sušárny vyhřáté na 50 °C. Sušení probíhalo 72 hodin. Výsledným produktem ovšem nebyla kompaktní fólie, nýbrž žlutohnědý práškový materiál propojený kousky fólie, jak je patrné z Obr. 25. Při pokusu o sloupnutí materiálu z podložního skla docházelo k jeho okamžitému drolení. Proto jej nebylo možné použít k měření na DMA. Jako kritický nedostatek se ukázalo nedodržení posledního kroku použité metody a to vypírání přebytečného síťovadla pomocí deionizované vody a stabilizací pH solným fosfátovým pufrům (PBS).



Obr. 25 – Výsledný materiál vzniklý síťováním kyseliny hyaluronové pomocí DVS

V rámci přípravy pomocí síťovacího systému ADH/EDC byl připraven 1 % vodný roztok kyseliny hyaluronové stejným způsobem, jako v případě použití EDC/NHS. Následně bylo do roztoku přidáno 11,7 g ADH v poměru 18:1 ke kyselině hyaluronové a dále 1,07 g EDC v poměru 1,66:1 ke kyselině hyaluronové. Reakce probíhala při hodnotě pH 4,8, čehož bylo dosaženo přidávkem 31 ml 0,1 M HCl. Po 2 hodinách byla reakce ukončena, roztok byl odlit do cely a sušen při 50 °C po dobu 72 hodin. Výsledný produkt trpěl stejným nedostatkem, jako materiál síťovaný pomocí DVS, a sice přebytkem síťovacího činidla ve vzniklé fólii. V tomto případě došlo ke vzniku bílého materiálu pěnovitého charakteru, ve kterém byla rozprostřena fólie, jak je vidět na Obr. 26. Nedodržení promývání pomocí dialyzační trubice se ukázalo jako fatální chyba při procesu přípravy. Takto připravená fólie nemohla být použita pro měření na DMA, protože se jí nepodařilo vcelku oddělit od podložního skla.



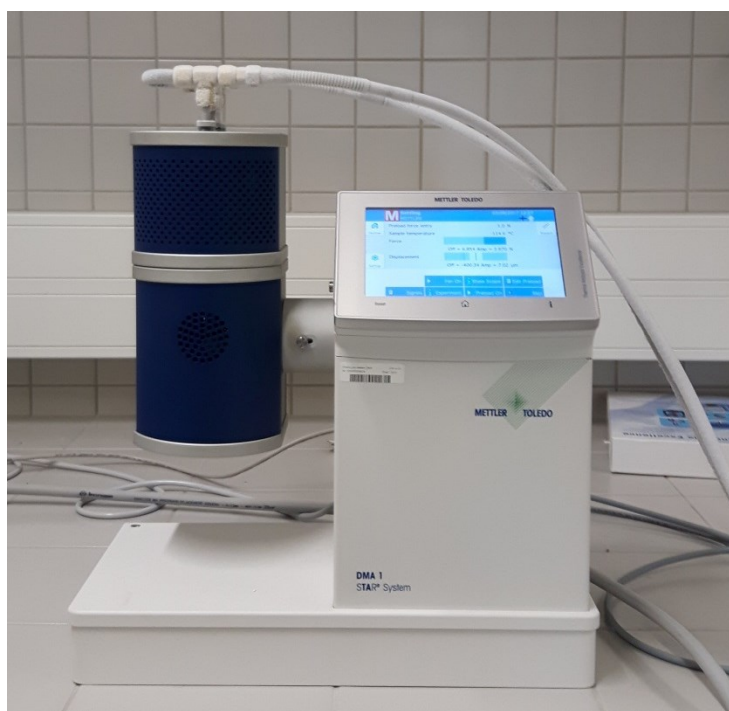
Obr. 26 – Výsledný materiál vzniklý síťováním pomocí ADH/EDC

Závěrem lze tvrdit, že při použití neověřených postupů síťování kyseliny hyaluronové, je nutné dodržet všechny kroky zmíněné v popisu dané metodiky, abychom dospěli k vytvoření kvalitního produktu, použitelného pro další výzkum. Až při zvládnutí dané metody je možno si dovolit určité úpravy, vedoucí k námi požadovaným vlastnostem.

## 5 METODIKA MĚŘENÍ DYNAMICKÉ MECHANICKÉ ANALÝZY

### 5.1 Použitý přístroj

Pro měření dynamické mechanické analýzy bylo použito přístroje DMA 1 METTLER TOLEDO, vyrobeného firmou Mettler-Toledo s.r.o. ve Švýcarsku. Přístroj umožňuje měření v různých měřících módech jako ohyb, tah, smyk nebo komprese. V rámci měření pro diplomovou práci byl zvolen měřicí mód pro tah. Přístroj umožňuje měření frekvenčních závislostí v rozsahu od 0,001 Hz do 300 Hz a teplotních závislostí v rozsahu od -190 °C do 600 °C. Součástí měřícího aparátu je chladicí systém pro chlazení pomocí tekutého dusíku, uloženého v Dewarově nádobě o kapacitě 35 l. Pracovní délka měřených vzorků byla nastavena na 10 mm, přičemž jeho maximální protažení může být až 1 mm a rozsah použité síly je od 0,001 N do 10 N. Podrobnější technická data, jako jsou citlivost a technické rozlišení přístroje, jsou uvedena v příloze (viz. **PŘÍLOHA P I**). Přístroj je připojen k počítači, který je vybaven programem Mettler: STARe Software. Pomocí tohoto softwaru je měřicí přístroj obsluhován a taktéž jsou v něm získávány výsledky měření. Získané výsledky byly následně převedeny na textový formát a jejich konečné zpracování bylo provedeno v programu MS Excel 2010.



Obr. 27 – Použitý přístroj DMA 1 METTLER TOLEDO

## 5.2 Upínání vzorků

Základním předpokladem pro provedení kvalitního měření a získání relevantních dat je správné upnutí zkušební vzorku do čelistí měřicího přístroje. Je velmi důležité, aby byl zkušební vzorek uchycen kolmo k čelistem, tedy rovnoběžně s měřícím čidlem, a zároveň byl umístěn v jejich středu, jak prezentuje Obr. 28. Díky tomu bude namáhání vzorku rovnoměrné a napěťová, respektive deformační odezva bude v souladu s napěťovým, respektive deformačním impulsem měřicího přístroje. Při upnutí mimo střed čelistí by docházelo k vytváření momentu sil na měřený vzorek, což by mohlo vést ke znehodnocení výsledků. Při nerovnoběžném uchycení vzorku s měřícím čidlem by se již nejednalo o jednoosé, rovnoměrné protahování podél vzorku, a vedlo by k získání nerelevantních výsledků.



Obr. 28 – Správné upnutí zkušební vzorku v čelistech měřicího přístroje

Při upínání zkušební vzorku je nutné dbát zvýšené opatrnosti vůči měřicímu čidlu. Pro ochranu měřicího čidla by měla být použita plastová zarážka, která čidlo fixuje tak, aby na něj nemohl být vyvinut moment síly při upínání vzorku. K tomu dochází zvláště při upínání tuhých vzorků, a pokud se tak stane i přes použití ochranné zarážky, přístroj nahlásí chybu a je nutno jej restartovat, případně vyrovnat měřicí čidlo do původní polohy. Stejně tak u teplotního čidla je nutné dbát zvýšené opatrnosti. Teplotní čidlo nedisponuje žádnou ochranou a je umístěno přímo v prostoru pro upínání vzorku. Proto je nutné vyhnout se jakémukoliv styku s ním, aby nedošlo k jeho ohnutí či jinému poškození, což by mohlo vést ke ztrátě jeho funkčnosti.

V rámci upínání vzorku je výhodné zvolit sílu dotažení šroubů upevňujících vzorek mezi čelisti podle aktuálního charakteru zkoumaného materiálu. U tužších materiálů, jako je nesíťovaná fólie kyseliny hyaluronové, je potřeba utáhnout vzorek co nejpevněji, aby nedocházelo k jeho prokluzu mezi čelistmi během samotného měření. U poddajnějších materiálů, jako je síťovaná fólie, je situace odlišná. Vzorek takového charakteru musí být taktéž utažen tak, aby neprokluzoval mezi čelistmi. Dotažení nemůže být provedeno “až na doraz“, jelikož může lehce dojít k přetržení vzorku již během jeho upínání. To bylo hlavním problémem při uchycování síťovaných fólií, které byly čelistmi přestříženy při snaze upnout vzorek co nejpevněji.

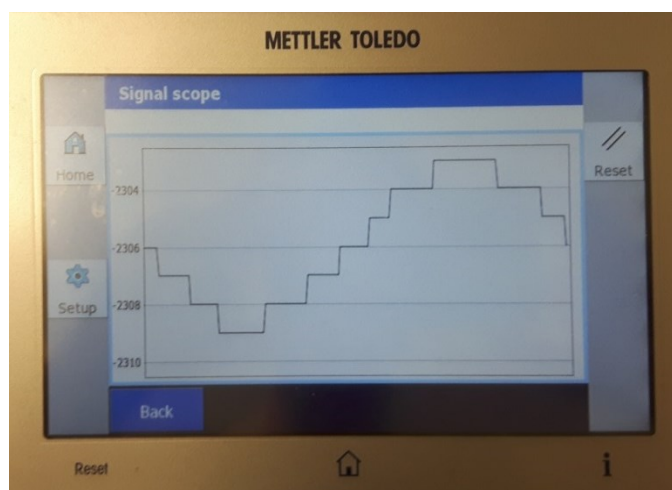
Nezbytnou součástí upínání vzorků pro dynamické měření v tahu je vytvoření předpětí, což je konstantní síla působící na vzorek před samotným měřením. Díky předpětí je materiál udržován pod minimálním napětím tak, aby nedocházelo k jeho vyboulení nebo prověšení během měřicího procesu. Předpětí by mělo být zvoleno tak, aby byl vzorek plně natažený, avšak nemělo by docházet k jeho výraznému protažení, protože by tak byly ovlivněny získané výsledky. Hodnotu předpětí lze nastavit pomocí programu v počítači, Pro měření fólií kyseliny hyaluronové o daných rozměrech bylo použito předpětí 1N.

### 5.3 Teplotní závislosti

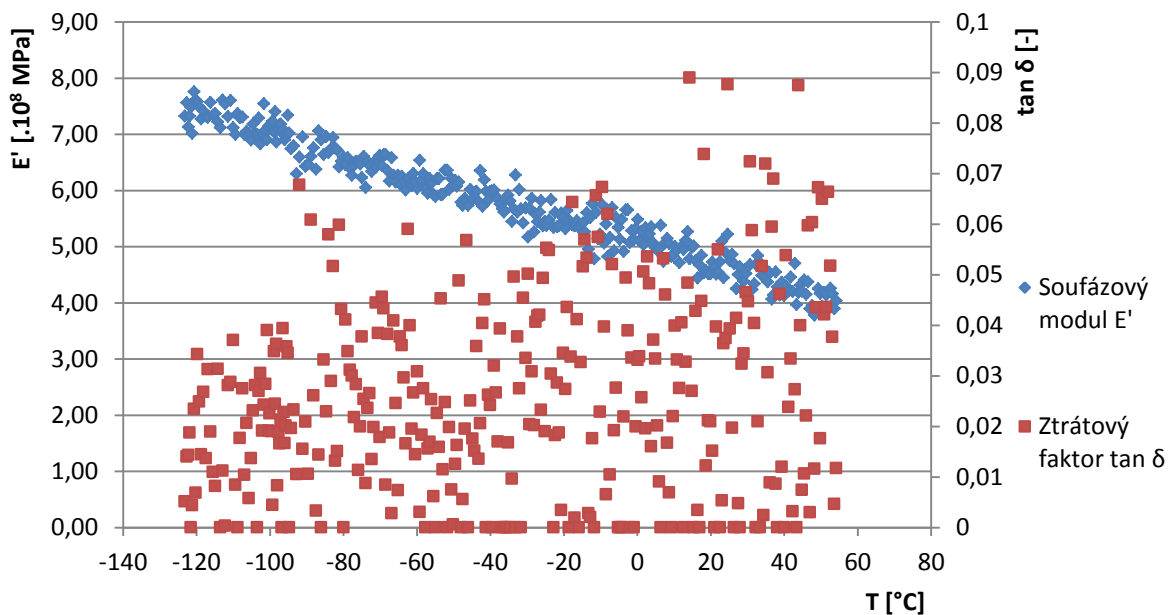
Pro provedení správného měření a získání kvalitních dat je stěžejní vytvoření optimální měřicí metody pro daný materiál. V rámci měření teplotních závislostí byly zkušební vzorky podrobeny ohřevu z (-120) resp. (-90) °C na 60 °C, při rychlosti ohřevu 4 K/min a oscilační frekvenci 1 Hz. Pro zjištění ideální metody byla provedena řada pokusů, při nichž byly měněny jednotlivé parametry měřicího procesu. V prvním případě docházelo ke změně amplitudy síly působící na zkušební vzorek. V druhém případě bylo použito různé amplitudy výchylky protažení materiálu. Součástí hledání optimální metody bylo pozorování vlivu rychlosti ohřevu na získané výsledky. Hodnocení použitých metod bylo vyvozeno na základě signálu z přístroje, který udává, zda je deformační nebo napěťový impuls přístroje v souladu s deformační nebo napěťovou odezvou materiálu. Zde byla snaha, aby měl signál sinusový charakter a současně, aby sinusová křivka byla co nejhladší. Dalším, neméně důležitým aspektem hodnocení, byla analýza získaných dat. Zde byl kladen důraz především na to, aby jednotlivé body byly co nejméně rozházeny a tvořily tak co nejhladší křivku. Absolutní hodnoty měřených veličin byly hodnoceny až v rámci zkoumání reprodukovatelnosti použité metody.

#### 5.3.1 Nesít'ované fólie

Pro nesít'ované fólie byla optimální metoda zkoumána u vzorků o molekulové hmotnosti 600 kDa. Jako první byla použita metoda, při níž byla kontrolována síla působící na zkušební vzorek. Při nastavení síly 0,1 N byl signál z přístroje značně kostrbatý, jak je patrné z Obr. 29. Získaná data (Obr. 30) jsou velmi rozházená, a proto byla tato metoda shledána jako nevhodná pro měření dané závislosti.

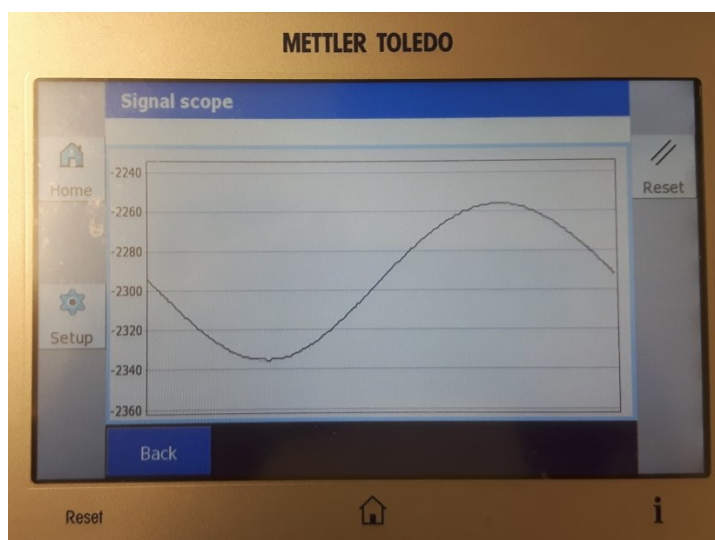


Obr. 29 – Signál přístroje pro teplotní závislost nesít'ovaných vzorků při použití síly 0,1 N



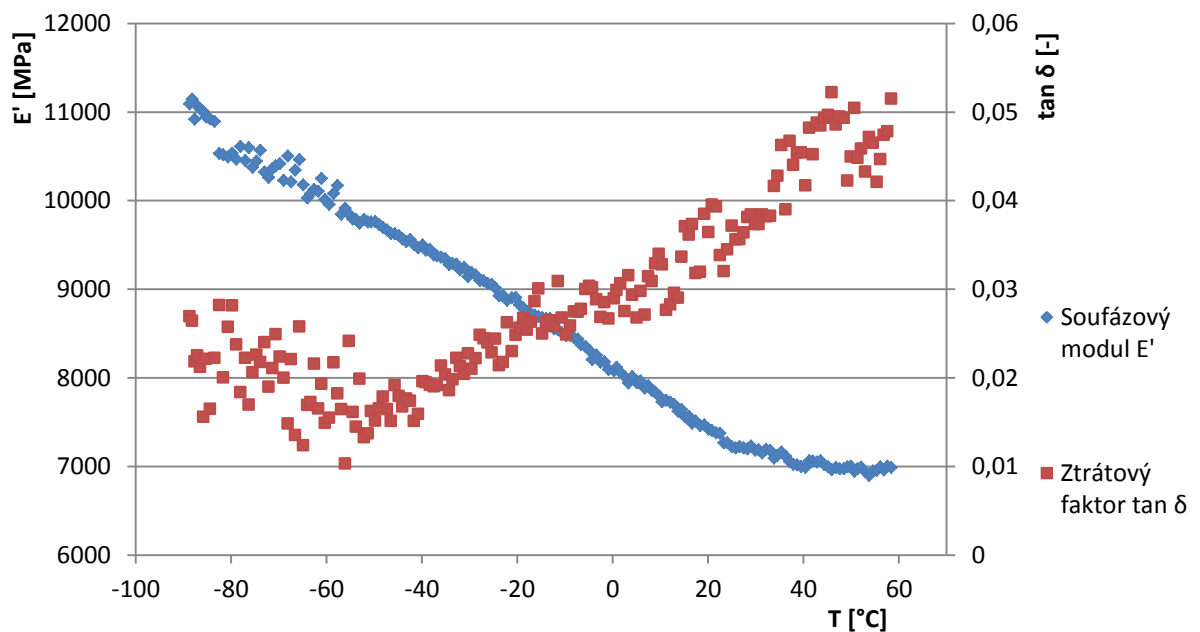
Obr. 30 – Naměřená data pro teplotní závislost nesít'ovaných vzorků při použití síly 0,1 N

U dalšího pokusu byla síla působící na vzorek nastavena na 1 N. Signál odezvy materiálu měl sinusový charakter a samotná křivka byla poměrně hladká, jak prezentuje Obr. 31. Naměřená data soufázového modulu  $E'$  a ztrátového faktoru  $\tan \delta$  jsou zobrazena na Obr. 32. Je vidět, že hodnoty  $E'$  jsou mnohem méně rozházené, než v případě použití první metody. Stejně tak v případě  $\tan \delta$  je patrné výrazné zlepšení. V rámci dosažení kvalitnějších výsledků byla u dalšího pokusu zvýšena působící síla na 2 N. Při této síle byl zkušební vzorek přetržen při dosažení počáteční teploty.



Obr. 31 – Signál přístroje pro teplotní závislost nesít'ovaných vzorků při použití síly 1 N

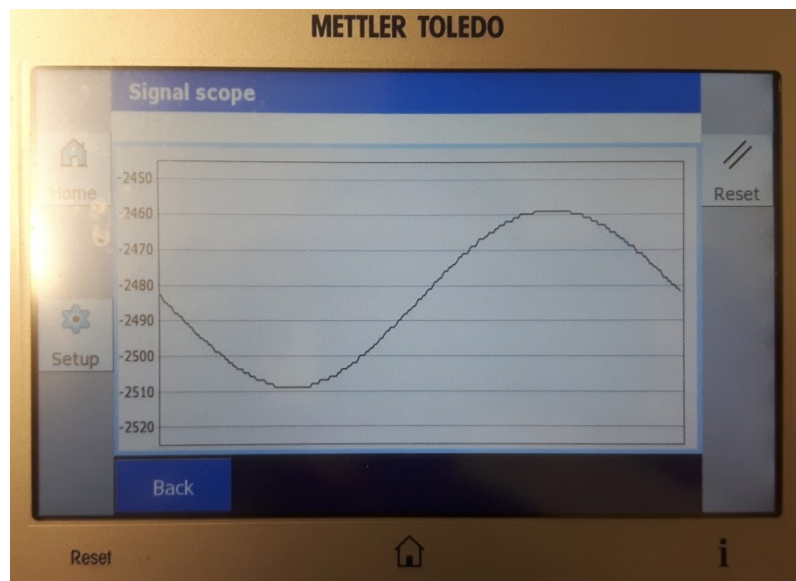




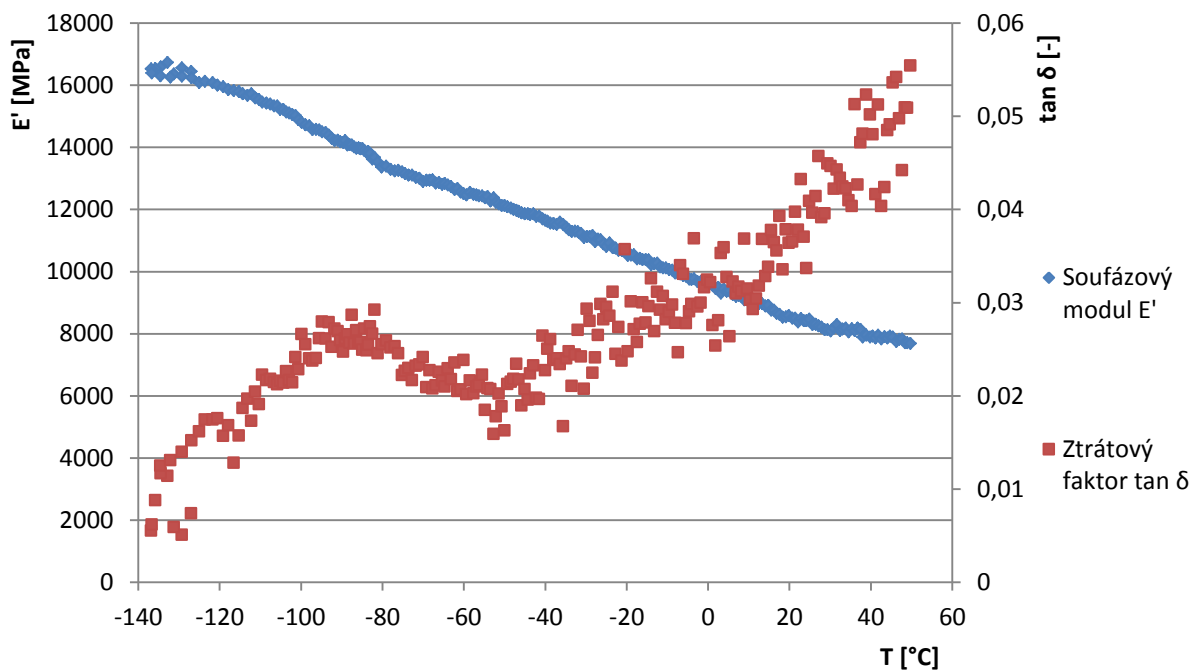
Obr. 32 – Naměřená data pro teplotní závislost nesíťovaných vzorků při použití síly 1 N

Z dosažených poznatků je možné vyvodit, že použití příliš malé zatěžovací síly vede k zisku velmi nekvalitních dat, nepoužitelných pro další vyhodnocení. Zvyšováním použité síly lze dosáhnout menšího rozptylu naměřených hodnot a tím uskutečnit kvalitnější experiment. Pro daný materiál a danou teplotní závislost lze označit použití síly 1 N, jako hraniční napěťový impuls, jelikož při dalším zvyšování zatěžující síly dochází k porušení zkušební vzorku. Tato metoda se však stále nejeví jako ideální pro další vyhodnocování vlastností materiálu.

V rámci optimalizace měření bylo následně přistoupeno k vytvoření metod, fungujících na principu kontroly výchylky protažení vzorků. Jako první byla amplituda výchylky nastavena na 4  $\mu\text{m}$ . Signál z přístroje si držel sinusový charakter po celou dobu měření, avšak samotná křivka byla mírně kostrbatá, jak je vidět na Obr. 33. Rozptyl naměřených dat zhruba odpovídá předchozí použité metodě. Hlavní rozdíl je ve výskytu inflexního bodu u souřadného modulu, který nastává okolo (-85)  $^{\circ}\text{C}$  a který nebyl patrný při použití předchozí metody. Získané křivky  $E'$  a  $\tan \delta$  jsou prezentovány na Obr. 34.



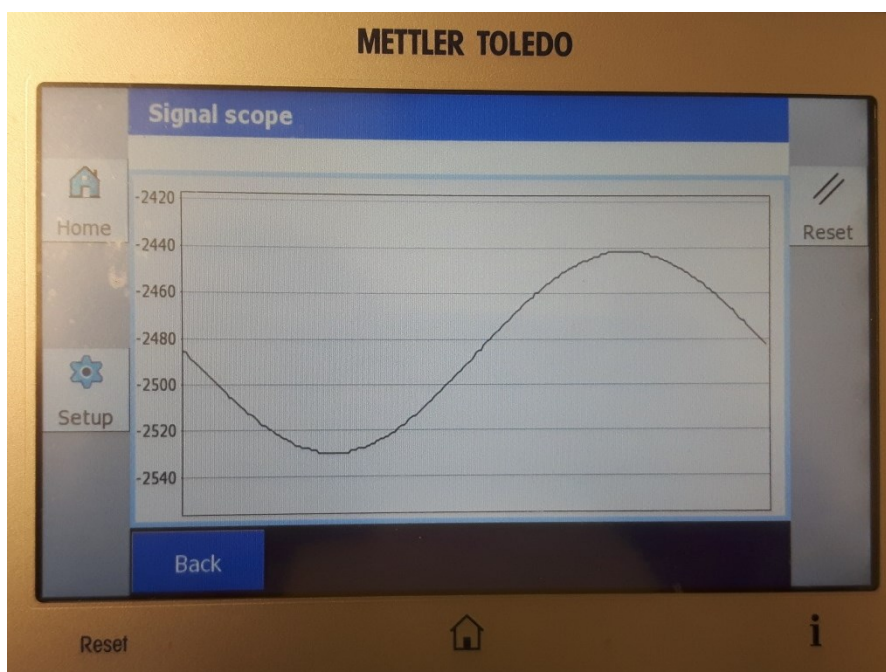
Obr. 33 – Signál přístroje pro teplotní závislost nesíťovaných vzorků při použití výchylky 4  $\mu\text{m}$



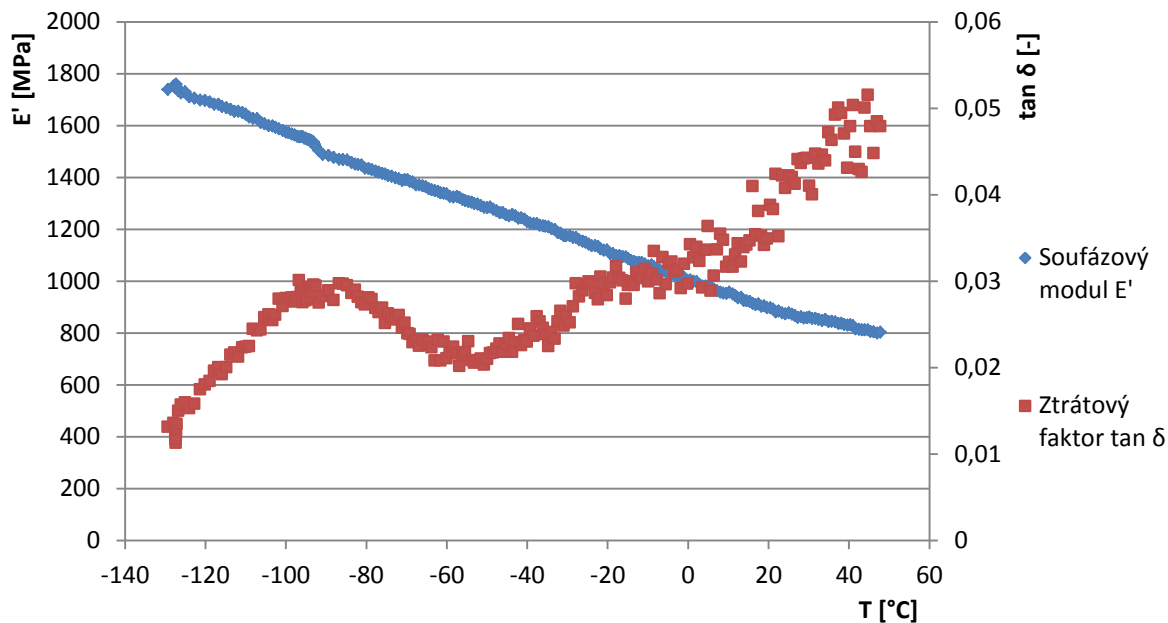
Obr. 34 – Naměřená data pro teplotní závislost nesíťovaných vzorků při použití výchylky 4  $\mu\text{m}$

V druhém případě byla amplituda výchylky nastavena na 7  $\mu\text{m}$ . Signál přístroje byl sinusového charakteru po celou dobu měření. Samotná křivka byla téměř hladká, jen s velmi malými nerovnostmi. Rozptyl naměřených hodnot byl menší než v předchozím případě. U křivky ztrátového faktoru je stále zřetelný, zvláště v oblasti vyšších teplot. Křivka pro soufázový modul nevykazuje téměř žádný rozptyl a inflexní bod je více zřetelný než v předchozím případě. Signál přístroje pro tuto metodu ukazuje Obr. 35 a naměřená data Obr. 36.

Ve snaze o dosažení ještě kvalitnějších výsledků byla v dalším pokusu výchylka zvýšena na 9  $\mu\text{m}$ , avšak při tomto nastavení došlo k přetržení zkušební vzorku při ochlazení na počáteční teplotu. Ze získaných poznatků tak plyne, že zvyšování výchylky vzorku vede k získání dat s nižším rozptylem hodnot. Použití amplitudy 7  $\mu\text{m}$  lze tedy označit jako hraniční. Při jejím dalším zvyšování dochází k porušení zkušební vzorku.



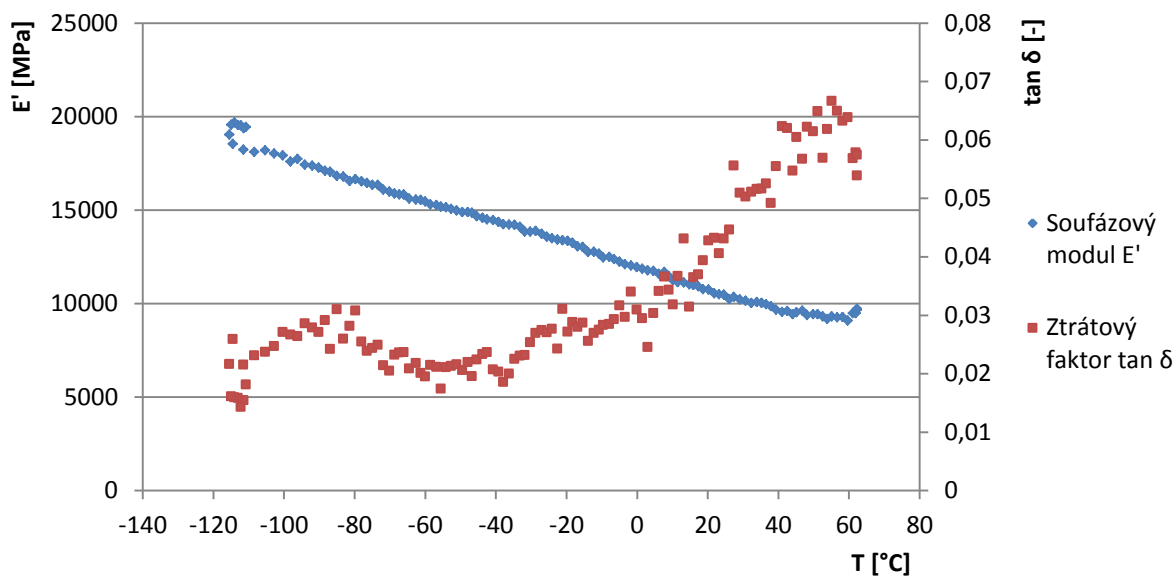
Obr. 35 – Signál přístroje pro teplotní závislost nesíťovaných vzorků při použití výchylky 7  $\mu\text{m}$



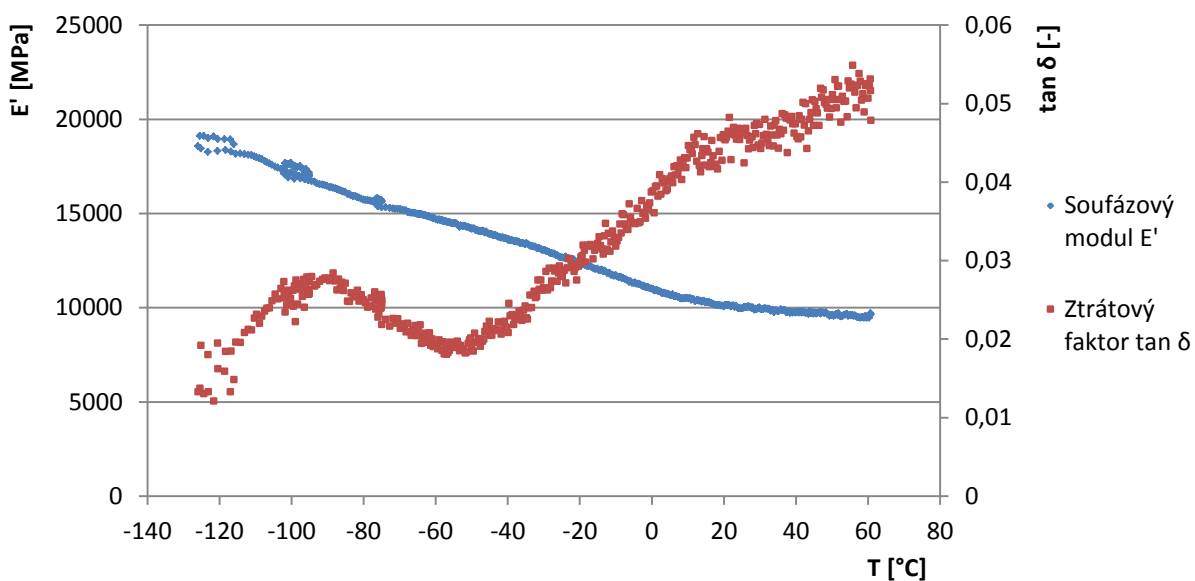
Obr. 36 – Naměřená data pro teplotní závislost nesíťovaných vzorků při použití výchylky 7  $\mu\text{m}$

Součástí hledání optimální měřicí metody bylo také hodnocení vlivu rychlosti ohřevu na výsledná data. To bylo testováno za použití amplitudy výchylky 7  $\mu\text{m}$  a vzorků o molekulové hmotnosti 1500 kDa. Ve snaze o urychlení měřicího procesu byla rychlost ohřevu nejprve zvýšena na 8 K/min, čímž se doba měřicího cyklu snížila na polovinu. Získané křivky jsou prezentovány na Obr. 37. Z výsledků vyplývá, že daná rychlost ohřevu je příliš velká, jelikož nebyl zachycen inflexní bod u křivky náležící souřáznovému modulu. U ztrátového faktoru je patrný vyšší rozptyl naměřených hodnot. Proto lze tvrdit, že i když zvýšení rychlosti ohřevu zkracuje čas potřebný pro dané měření, má negativní vliv na získané výsledky.

Během dalšího pokusu byla rychlost ohřevu snížena na 2 K/min. Křivky získané pomocí této metody jsou prezentovány na Obr. 38. Z výsledků vyplývá, že daná rychlost ohřevu je příliš malá a v určitých částech křivek dochází k dvojímu měření při jedné teplotě. To je dáno nejspíše tepelnou setrvačností a snahy přístroje ji vyrovnat. Takto změřené hodnoty navíc nejsou shodné a znehodnocují tak získané výsledky. Nejvíce patrné je to u křivek  $E'$  při teplotách (-100) a (-80)  $^{\circ}\text{C}$ . Zvolená rychlost ohřevu taktéž dvojnásobně prodlužuje dobu jednoho experimentu. Ze zmíněných důvodů lze usoudit, že snižování rychlosti ohřevu má negativní vliv na získané výsledky.



Obr. 37 – Naměřená data teplotní závislosti při rychlosti ohřevu 8 K/min

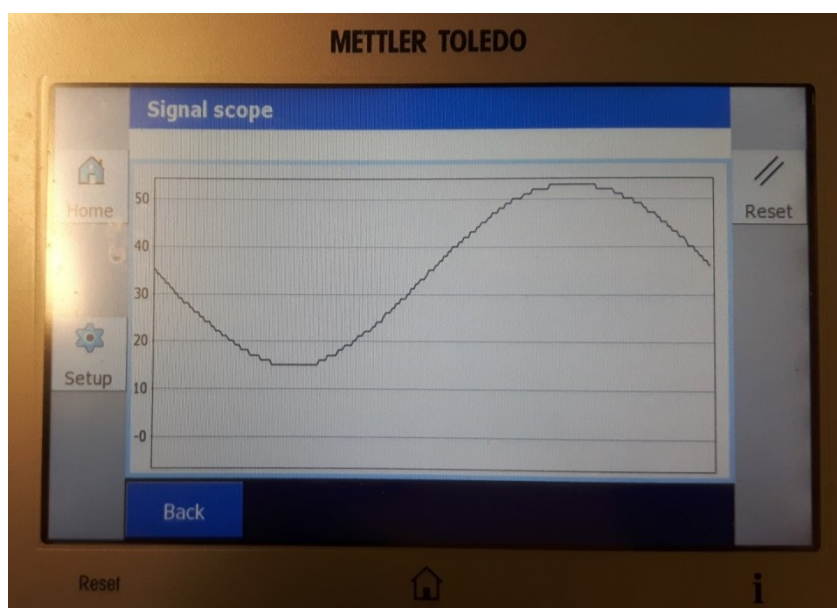


Obr. 38 – Naměřená data teplotní závislosti při rychlosti ohřevu 2 K/min

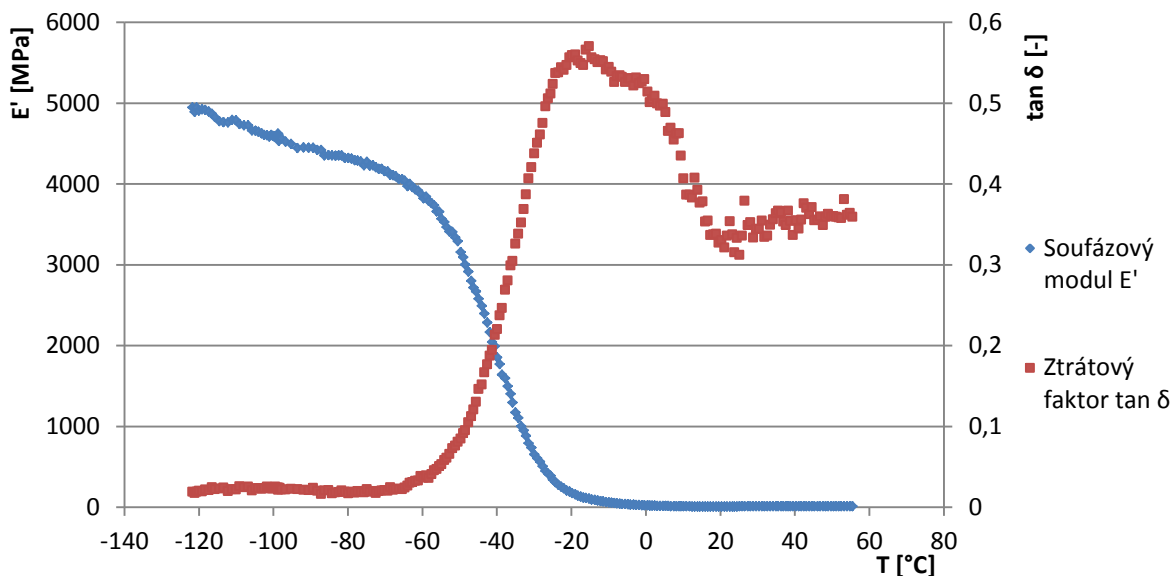
Závěrem lze tvrdit, že použití kontroly amplitudy výchylky je výhodnější, než použití kontroly síly působící na zkušební vzorek. Jako optimální metoda pro měření teplotních závislostí nesíťovaných fólií kyseliny hyaluronové bylo shledáno nastavení výchylky na 7  $\mu\text{m}$  při rychlosti ohřevu 4 K/min. Touto metodou bylo dosaženo nejlepších výsledků v rámci rozptylu naměřených hodnot a odezvy signálu z přístroje.

### 5.3.2 Síťované fólie

Pro síťované fólie byla optimální metoda zkoumána u vzorků o molekulové hmotnosti 500 kDa. Jako první byla k testování použita kontrola výchylky. Nastavení amplitudy na 7  $\mu\text{m}$ , které bylo optimální pro měření nesíťovaných vzorků, se v případě síťovaných fólií ukázalo jako nepoužitelné. Během ochlazování zkušební vzorku na počáteční teplotu došlo k jeho přetržení okolo (-50)  $^{\circ}\text{C}$ . Výchylka byla poté snížena na 5  $\mu\text{m}$ . I při této výchylce došlo k přetržení zkušební vzorku během jeho ochlazování. V tomto případě k porušení došlo okolo (-90)  $^{\circ}\text{C}$ . Při použití výchylky 3  $\mu\text{m}$  již nedocházelo k přetržení vzorku a měření proběhlo úspěšně v celém teplotním rozsahu. Signál přístroje si držel sinusový charakter, avšak křivka nebyla hladká, jak je patrné z Obr. 39. Z naměřených dat vyplývá, že danou metodu by bylo možné použít pro další vyhodnocování vlastností materiálu. Hodnoty soufázového modulu a ztrátového faktoru vykazují pouze mírný rozptyl a u křivek jsou pozorovatelné změny ve formě inflexního bodu u  $E'$  a píku u  $\tan \delta$ . Naměřené závislosti jsou prezentovány na Obr. 40.

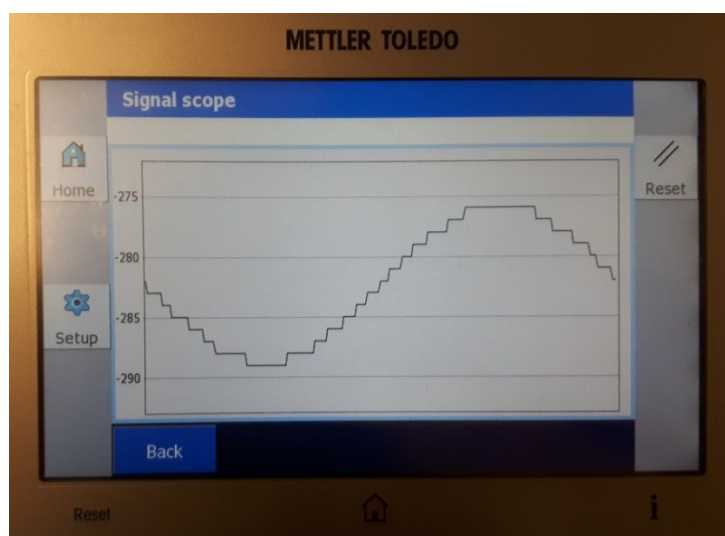


Obr. 39 – Signál přístroje pro teplotní závislost síťovaných vzorků při použití výchylky 3  $\mu\text{m}$

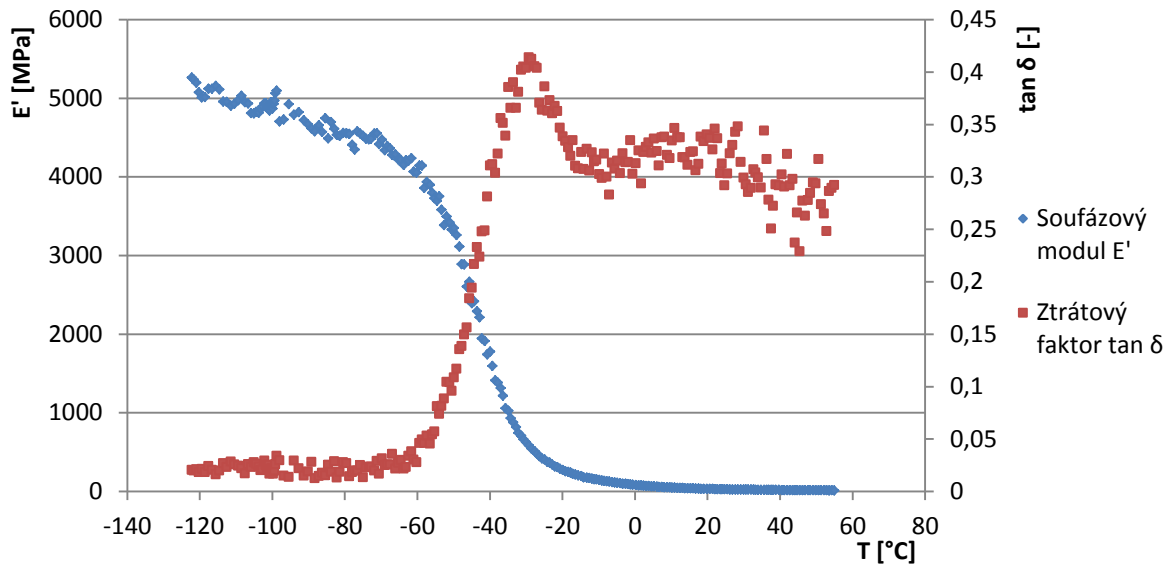


Obr. 40 – Naměřená data pro teplotní závislost síťovaných vzorků při použití výchylky 3  $\mu\text{m}$

U dalšího pokusu byla výchylka snížena na 1  $\mu\text{m}$ . Signál přístroje měl sinusový charakter, ale samotná křivka byla více kostřbatá než v předchozím případě, jak je patrné z Obr. 41. Obr. 42 pak obsahuje naměřená data. Na první pohled je patrné, že rozptyl hodnot je vyšší, než při použití předchozí metody. Ukázalo se, že zde platí stejná pravidla jako v případě nesíťovaných vzorků. Při snižování amplitudy výchylky dochází ke snížení hladkosti sinusové křivky signálu z přístroje a taktéž ke zvyšování rozptylu naměřených dat.

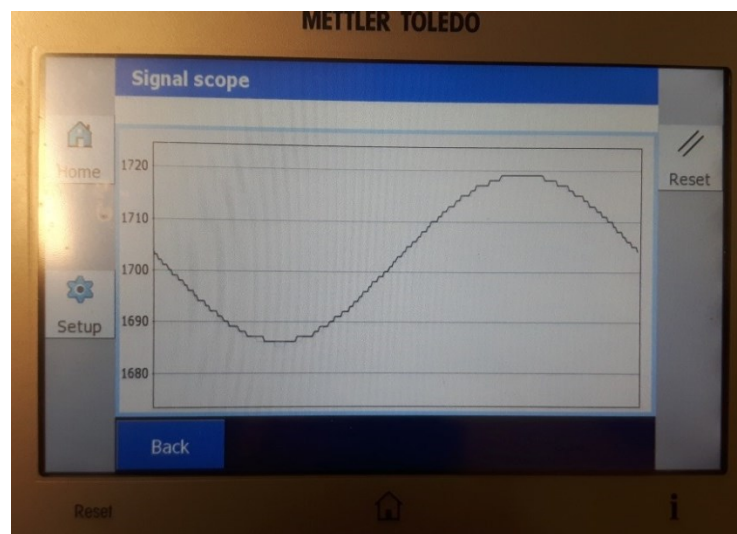


Obr. 41 – Signál přístroje pro teplotní závislost síťovaných vzorků při použití výchylky 1  $\mu\text{m}$



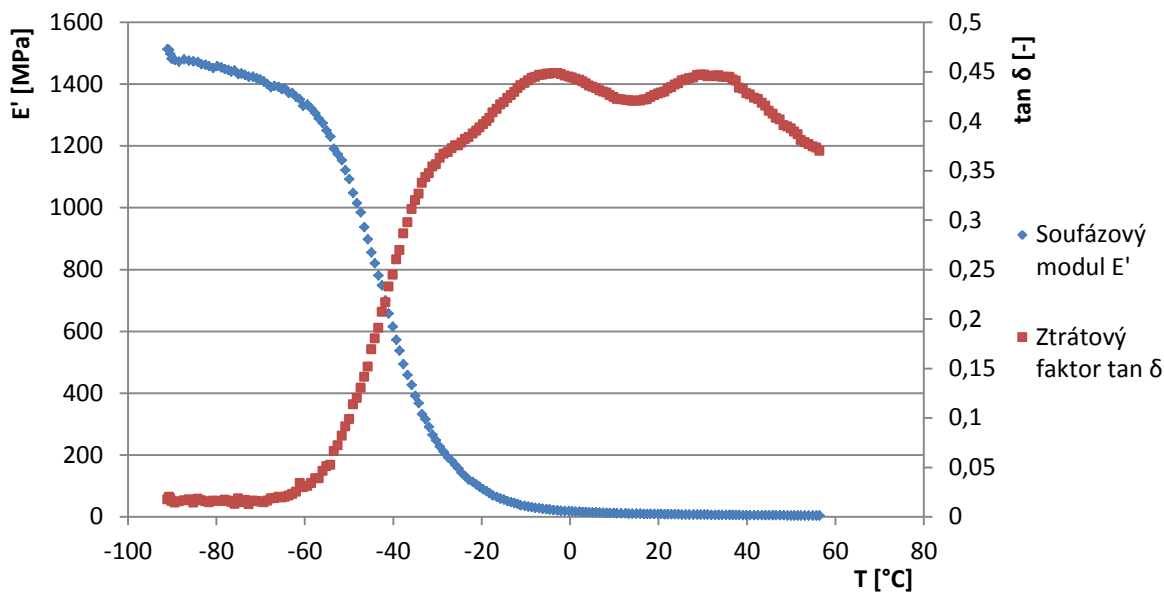
Obr. 42 – Naměřená data pro teplotní závislost síťovaných vzorků při použití výchylky 1  $\mu\text{m}$

V dalších pokusech bylo přistoupeno k použití metod, založených na kontrole síly působící na zkušební vzorek. Nejprve byla síla nastavena na 0,5 N. Signál přístroje, zobrazený na Obr. 43, má sinusový charakter a jeho hladkost je obdobná jako v případě použití amplitudy výchylky 3  $\mu\text{m}$ . V rámci naměřených hodnot je pozorován jen nepatrný rozptyl. Křivka soufázového modulu si drží obdobný trend jako v předchozích případech. Křivka ztrátového faktoru je však poměrně odlišná. Dochází zde k výskytu dvou pík s obdobnou hodnotou maxima, což nebylo pozorováno při použití předchozích metod. Naměřené křivky jsou prezentovány na Obr. 44.



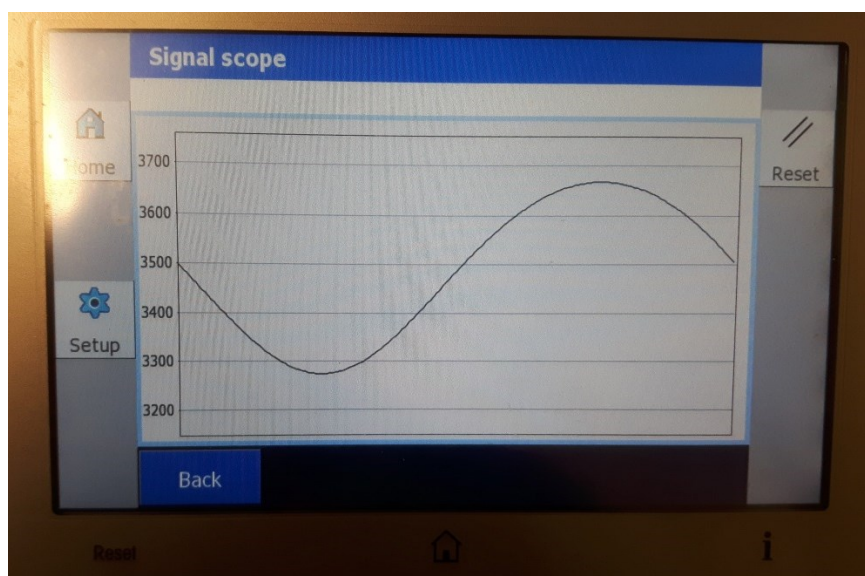
Obr. 43 – Signál přístroje pro teplotní závislost síťovaných vzorků při použití síly 0,5 N



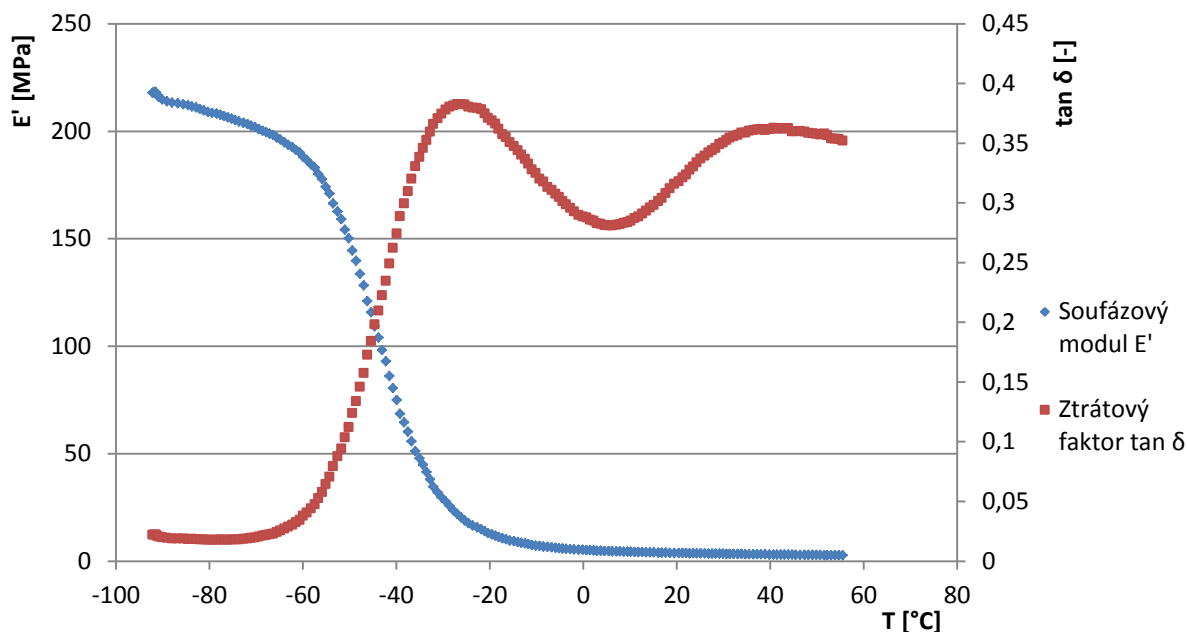


Obr. 44 – Naměřená data pro teplotní závislost síťovaných vzorků při použití síly 0,5 N

Při nastavení síly 1 N byla křivka signálu přístroje téměř dokonale hladká, jak je vidět na Obr. 45. Naměřená data jsou prezentována na Obr. 46. Rozptyl hodnot je v tomto případě téměř neznamenný. Křivka náležící  $E'$  vykazuje obdobný trend jako v předchozích případech, kdy se objevuje velmi zřetelný pokles modulu v rozmezí teplot od (-50) do (-30) °C. Křivka  $\tan \delta$  obsahuje dva píky. Lze ale předpokládat, že hodnota ztrátového faktoru by dále klesala. Při dalším měření byla síla nastavena na 2N, avšak při této hodnotě již docházelo k přetržení zkušební vzorku během počátku experimentu.



Obr. 45 – Signál přístroje pro teplotní závislost síťovaných vzorků při použití síly 1 N



Obr. 46 – Naměřená data pro teplotní závislost síťovaných vzorků při použití síly 1 N

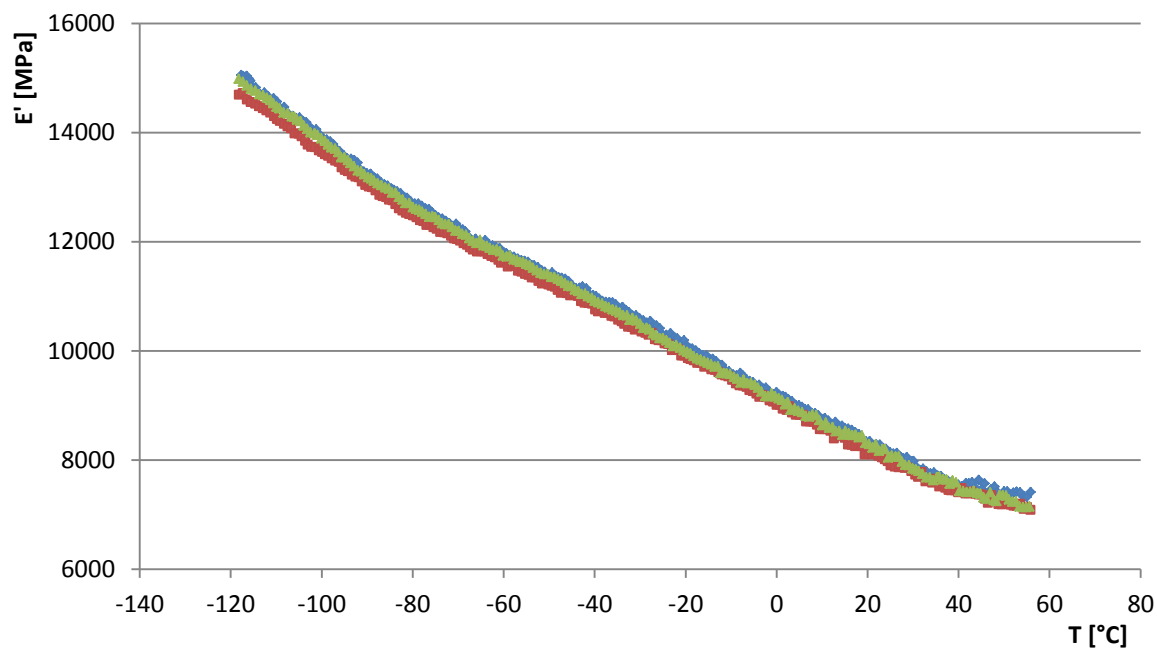
Závěrem lze tvrdit, že data získaná pomocí metody s nastavením konstantní výchylky jsou dále použitelná pro další vyhodnocení. Platí, že zvyšování výchylky vede k získu kvalitnějších výsledků. Jako hraniční se jeví protažení 3  $\mu\text{m}$ . Při dalším zvyšování dochází k porušení zkušebních vzorků. Ze získaných poznatků ovšem vyplývá, že pro síťované fólie je výhodnější použití metody na principu kontroly síly působící na vzorek. I zde platí, že zvyšování použité síly vede k získu kvalitnějších výsledků. Jako hraniční hodnotu lze označit 1 N, jelikož při dalším zvyšování docházelo k porušení zkušebních vzorků. Jako optimální metoda pro měření teplotních závislostí síťovaných fólií kyseliny hyaluronové bylo shledáno nastavení síly 1 N při rychlosti ohřevu 4 K/min. Touto metodou bylo dosaženo nejlepších výsledků v rámci rozptylu naměřených hodnot a odezvy signálu z přístroje.

### 5.3.3 Reprodukovatelnost měření

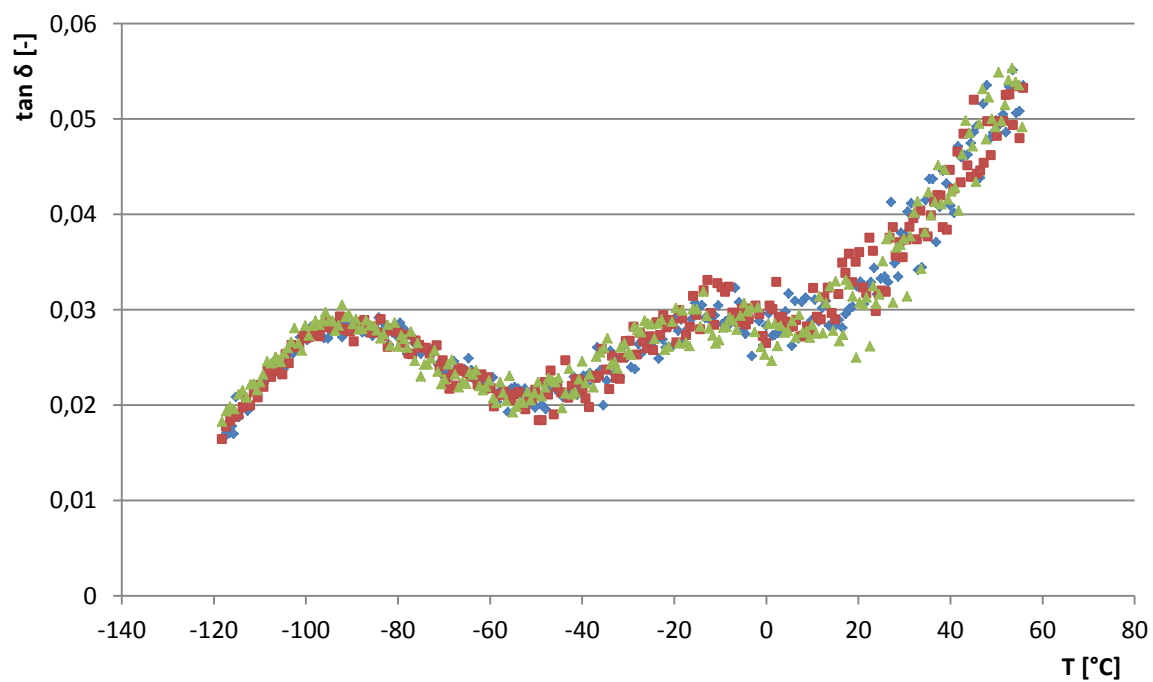
V rámci reprodukovatelnosti měřících metod byla hodnocena naměřená data souřazového modulu a ztrátového faktoru. Testování bylo provedeno pouze pro metody, které byly shledány jako optimální pro daný materiál. Hlavním aspektem hodnocení byla zejména podobnost získaných křivek. Důraz byl kladen taktéž na změny tvaru křivek, které zpravidla odpovídají fázovým přechodům materiálu. V poslední řadě pak byly hodnoceny absolutní hodnoty získaných veličin. U teplotních závislostí nebylo vyhodnocení provedeno pomocí statistických metod, protože měřící přístroj nedokáže zaznamenávat měřená data při stejné teplotě, i když je použita stejná metoda. Měřící proces je spouštěn zpravidla automaticky, i tak se často počátek měření liší v rámci až jednoho °C. I při manuálním spuštění při totožné teplotě dochází v průběhu měření k zaznamenávání dat při mírně odlišných teplotách. Ze zmíněných důvodů je hodnocení reprodukovatelnosti provedeno srovnáním získaných dat.

U nesíťovaných fólií byla reprodukovatelnost měření hodnocena u třech vzorků o molekulové hmotnosti 500 kDa. Měření bylo provedeno za pomoci metody kontroly výchylky, kdy amplituda protažení byla nastavena na 7  $\mu\text{m}$  při zatěžovací frekvenci 1 Hz. Zkušební vzorky byly podrobeny ohřevu z (-120) °C na 60 °C při rychlosti ohřevu 4 K/min. Naměřená data souřazového modulu jsou prezentována na Obr. 47. Z výsledků vyplývá, že získané křivky jsou z hlediska svého tvaru poměrně shodné. Mají stejný trend a v celém rozsahu měření se téměř překrývají. Absolutní hodnoty  $E'$  se liší jen minimálně. Nejvyššího rozdílu je dosaženo zejména na počátku měření v oblasti záporných teplot a také na konci měření při teplotách nad 40 °C. V obou případech však tento rozdíl dosahuje maximálně několika desítek MPa. Data náležící ztrátovému faktoru jsou prezentována na Obr. 48. Lze říci, že křivky  $\tan \delta$  jsou si svým tvarem velmi podobné. Jejich maxima se vyskytují při takřka stejných teplotách s rozdílem maximálně několika jednotek °C. Absolutní hodnoty ztrátového faktoru se na počátku měření liší v rámci několika tisícin. Se vzrůstající teplotou se rozdíl absolutních hodnot zvyšuje, přičemž na konci měření nepřesahuje hodnotu jednotek setin.

Ze získaných poznatků vyplývá, že zvolená metoda pro měření teplotních závislostí nesíťovaných fólií je velmi dobře reprodukovatelná. Rozdíly mezi jednotlivými měřeními jsou velmi malé a mohou být způsobeny kolísáním tloušťky zkušebních vzorků. Tyto nepřesnosti mají jen nepatrný vliv na vlastnosti materiálu. Proto může být použitá metoda doporučena k opakovanému měření a vyhodnocování mechanických vlastností materiálu.



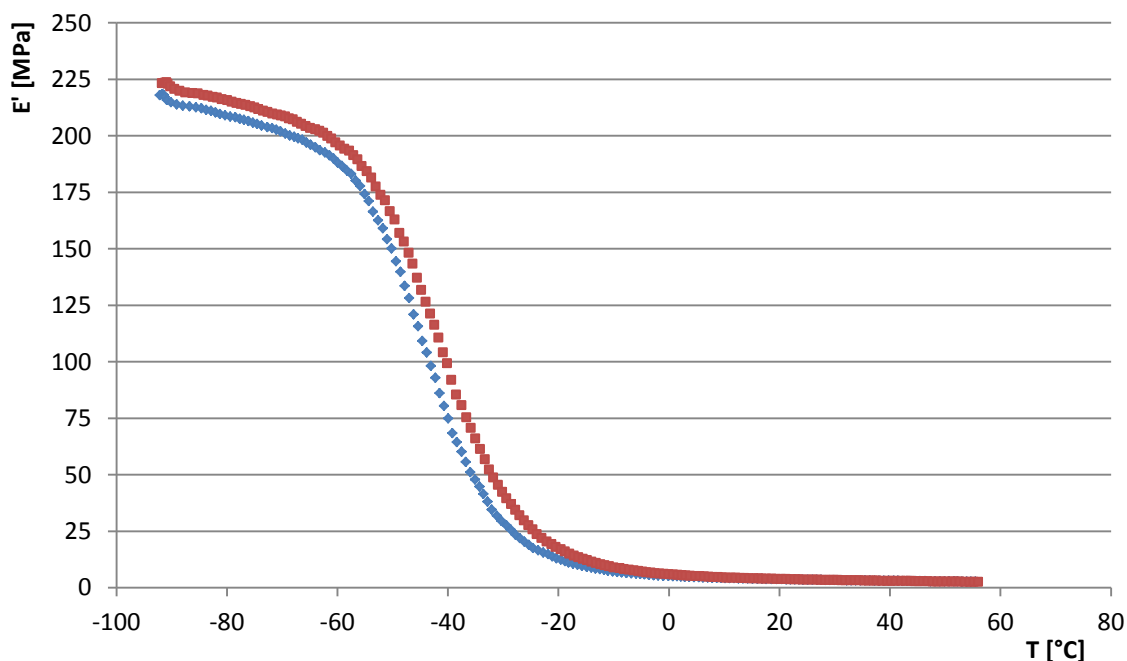
Obr. 47 – Závislost souřazového modulu na teplotě pro tři nesíťované vzorky



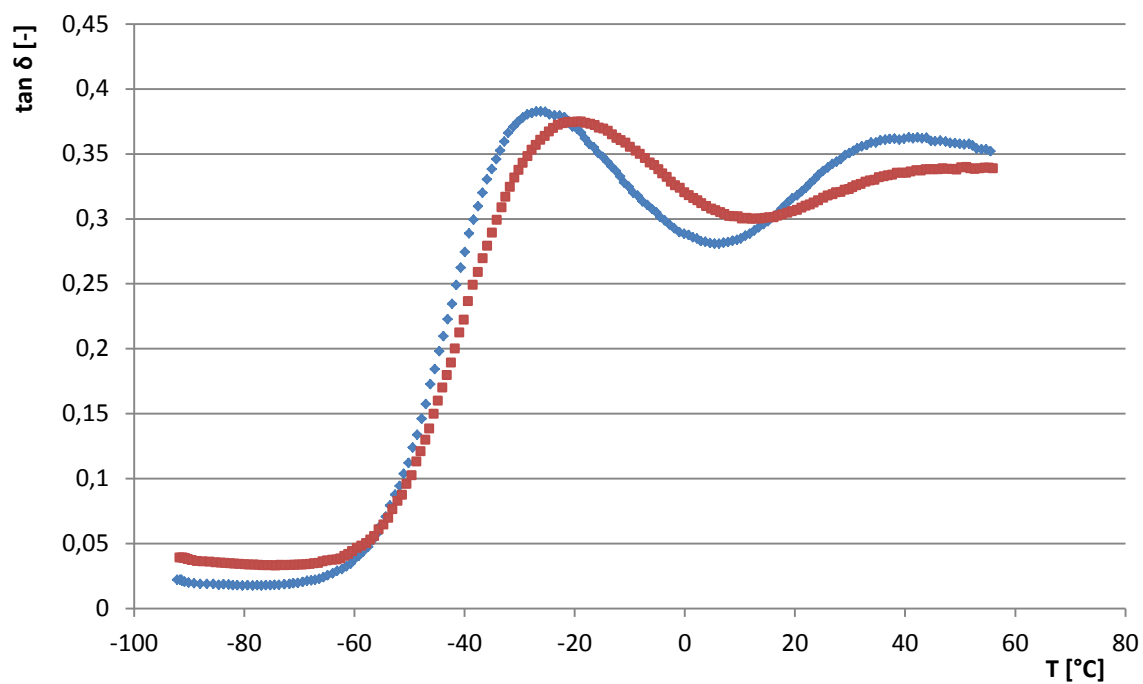
Obr. 48 – Závislost ztrátového faktoru na teplotě pro tři síťované vzorky

U síťovaných fólií byla reprodukovatelnost měření hodnocena u vzorků o molekulové hmotnosti 500 kDa. Zkušební vzorky byly podrobeny ohřevu z (-90) °C na 60 °C při nastavení zatěžovací síly 1 N, rychlosti ohřevu 4 K/min a při zatěžovací frekvenci 1 Hz. Naměřená data náležící  $E'$  jsou zobrazena na Obr. 49 a data náležící  $\tan \delta$  na Obr. 50. Ze získaných výsledků je patrné, že křivky soufázového jsou v případě obou měření téměř shodné. Svým tvarem se od sebe prakticky neliší. Rozdíl absolutních hodnot modulu měřeno při dané teplotě je minimální a dosahuje maximálně několika jednotek MPa. Nejvyšší rozdíly se vyskytují v oblasti záporných teplot. Při překročení 0 °C se zvyšující se teplotou se křivky překrývají. Křivky teplotních závislostí ztrátového faktoru jsou z hlediska tvaru velmi podobné. Maxima křivek jsou mírně posunuta, přičemž rozdíl teplot, kdy k těmto změnám dochází, nepřekračuje 10 °C. Absolutní hodnoty ztrátového faktoru se liší jak v extrémních, tak i v rámci ostatních úseků měřené závislosti. Zaznamenané rozdíly však nepřesahují hodnotu několika setin.

Ze získaných výsledků vyplývá, že metoda použitá pro síťované fólie je dobře reprodukovatelná. Nepřesnosti v měřených závislostech jsou patrně způsobeny rozdíly v tloušťce vzorků, výskytem bublin, náhodnou chybou měření, případně pak různým obsahem vázané vody. Zmíněné nedostatky mají jen malý vliv na mechanické vlastnosti, měřené za teplotního programu. Z těchto důvodů může být použitá metoda doporučena k opakovanému měření a vyhodnocování mechanických vlastností materiálu.



Obr. 49 – Závislost soufázového modulu na teplotě pro dva síťované vzorky



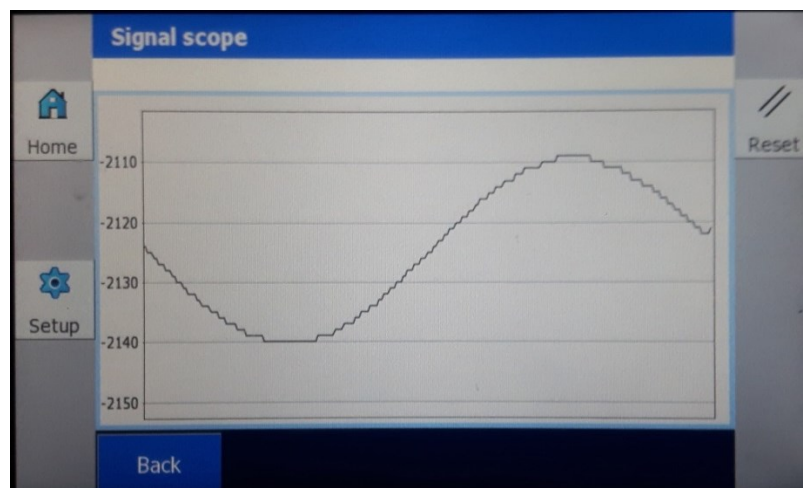
Obr. 50 – Závislost ztrátového faktoru na teplotě pro dva síťované vzorky

## 5.4 Frekvenční závislosti

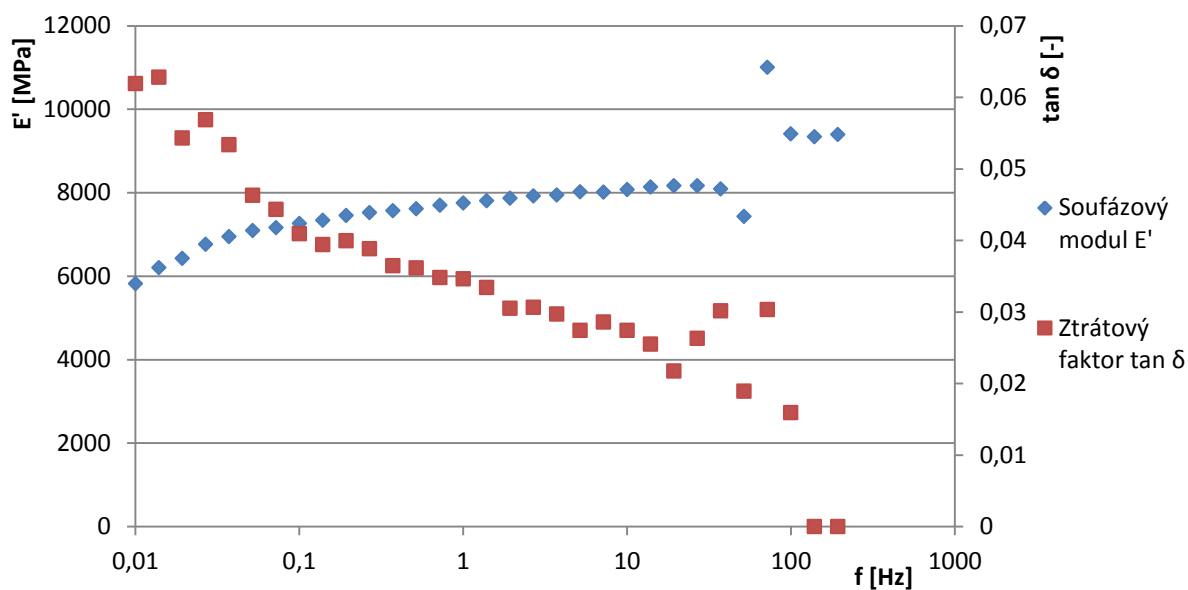
V rámci vytváření optimální metody pro měření frekvenčních závislostí byly zkušební vzorky podrobeny měření ve frekvenčním rozsahu od 0,01 Hz do 200 Hz. Změna frekvence probíhala v logaritmickém měřítku, přičemž bylo nastaveno zaznamenávání 7 hodnot na dekádu. Experimenty probíhaly za laboratorní teploty bez temperace. Teplota v laboratoři se zpravidla pohybovala mezi 23 – 25 °C. Stejně jako v případě teplotních závislostí bylo pro optimalizaci metody použito změny procesních parametrů. V prvním případě docházelo ke změně síly působící na zkušební vzorek. V druhém případě bylo použito různé výchylky protažení materiálu. Hodnocení použitých metod bylo opět vyvozeno na základě signálu z přístroje a také na základě rozptylu naměřených hodnot.

### 5.4.1 Nesít'ované fólie

Pro měření nesít'ovaných folií byly použity vzorky o molekulové hmotnosti 500 kDa. Jako první byly použity metody, při nichž byla kontrolována síla působící na zkušební vzorek. Při nastavení 0,5 N měl signál přístroje sinusový charakter. Samotná křivka byla poměrně kostřbatá, jak prezentuje Obr. 51. Z naměřených dat vyplývá, že hodnoty soufázového modulu nevykazují téměř žádný rozptyl do frekvence 37 Hz. Nad touto frekvencí je pozorován výrazný rozptyl, který však není dán použitou metodou. Byl způsoben rezonancí danou typem upínacího zařízení přístroje a určitou geometrií vzorku. Byl pozorován u všech měření frekvenčních závislostí, takže na něj v rámci hodnocení vytváření optimální metody nebude brán zřetel. Hodnoty ztrátového faktoru vykazují znatelně vyšší rozptyl během celého procesu měření. Naměřená data pro danou metodu jsou prezentovány na Obr. 52.

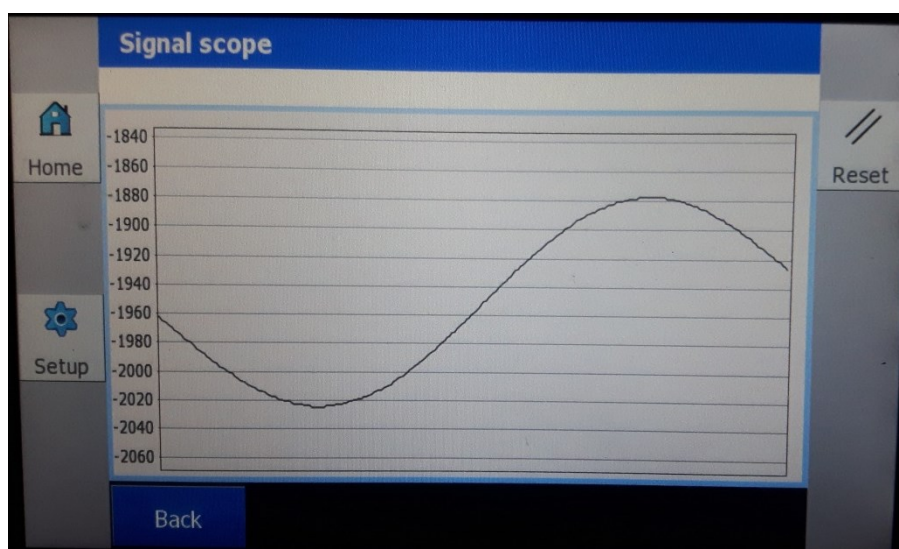


Obr. 51 – Signál přístroje frekvenční závislosti nesít'ovaných vzorků při použití síly 0,5 N



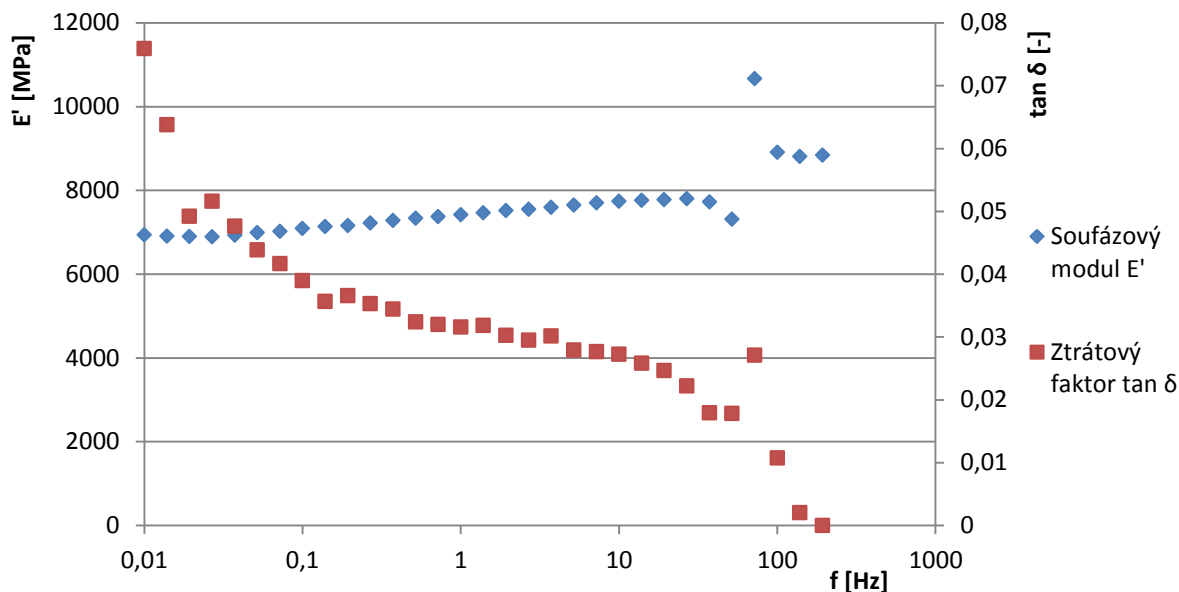
Obr. 52 – Naměřená data frekvenční závislosti nesíťovaných vzorků při použití síly 0,5 N

Při dalším měření byla síla nastavena na 1 N. Signál přístroje měl sinusový charakter a jeho křivka byla téměř dokonale hladká. Hodnoty  $E'$  opět nevykazují téměř žádný rozptyl, kromě zmíněného rezonančního úseku. Taktéž je pozorován mírně odlišný trend získaných dat. Zejména u nižších frekvencí dochází k pozvolnějšímu růstu modulu než v předchozím případě. U závislosti náležící  $\tan \delta$  je patrné snížení rozptylu zaznamenaných dat. Pouze jedna hodnota při frekvenci 0,019 Hz je výrazně odkloněna od získané křivky. Signál přístroje pro tuto metodu ukazuje Obr. 53 a naměřená data Obr. 54.



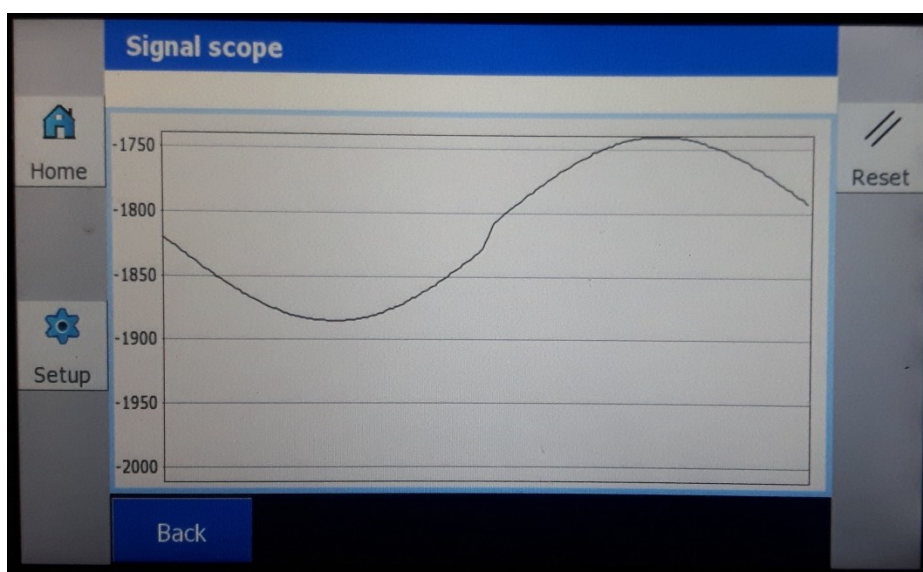
Obr. 53 – Signál přístroje frekvenční závislosti nesíťovaných vzorků při použití síly 1 N



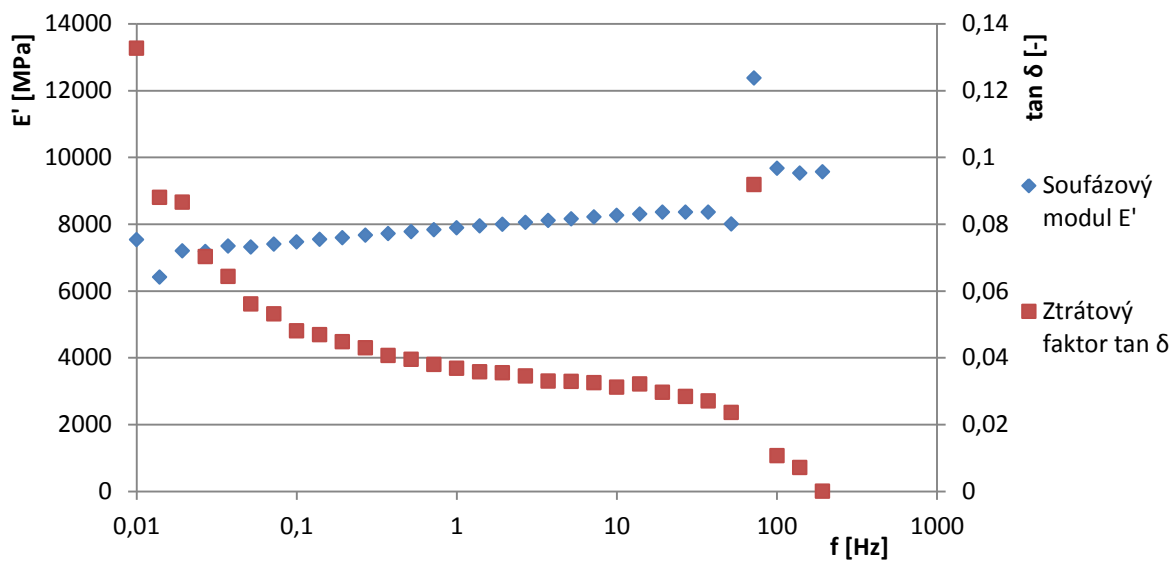


Obr. 54 – Naměřená data frekvenční závislosti nesíťovaných vzorků při použití síly 1 N

Při použití síly 2 N byl signál přístroje bez větších nerovností. Na počátku měření se však uprostřed křivky objevil prudší nárůst signálu, jak je patrné z Obr. 55. Tato nerovnost rušila harmonický charakter, typický pro sinusové kmitání. To se projevilo u zaznamenaných dat souřazového modulu i ztrátového faktoru, kdy se druhá hodnota, měřená při 0,013 Hz výrazně odkloňuje od získaných křivek. Při vyšších frekvencích se zmíněný problém dále neobjevil. Obě závislosti pak nevykazují téměř žádný rozptyl hodnot, jak ukazuje Obr. 56.

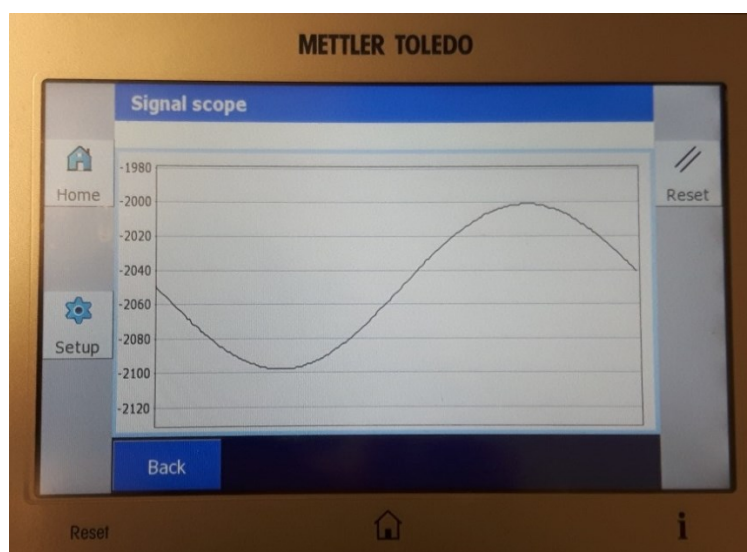


Obr. 55 – Signál přístroje frekvenční závislosti nesíťovaných vzorků při použití síly 2 N

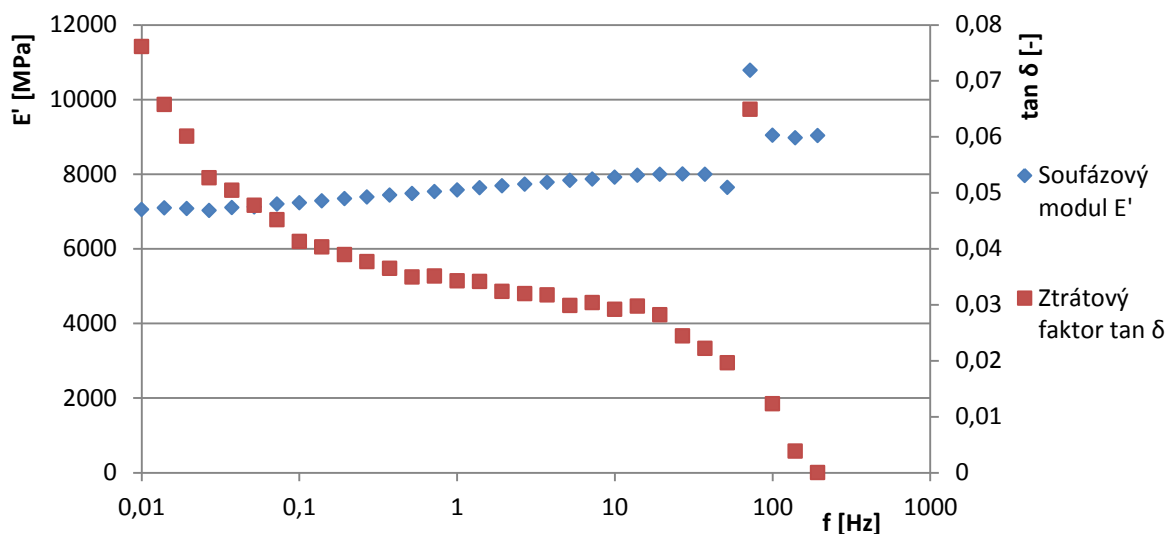


Obr. 56 – Naměřená data frekvenční závislosti nesíťovaných vzorků při použití síly 2 N

V dalších pokusech bylo přistoupeno k použití kontroly amplitudy výchylky vzorku. Jako první bylo nastaveno protažení 7  $\mu\text{m}$ . U této metody byl signál přístroje téměř hladký a držel si sinusový charakter po celou dobu měření. U závislosti soufázového modulu není pozorován téměř žádný rozptyl. U závislosti ztrátového faktoru se zaznamenané hodnoty odkloňují od získané křivky jen velmi nepatrně. Při tomto nastavení výchylky se navíc nevyskytují výraznější odchylky v datech naměřených při nižších frekvencích, jako tomu bylo v předchozích případech. Signál přístroje je prezentován na Obr. 57 a závislosti E' a tan  $\delta$  na Obr. 58.

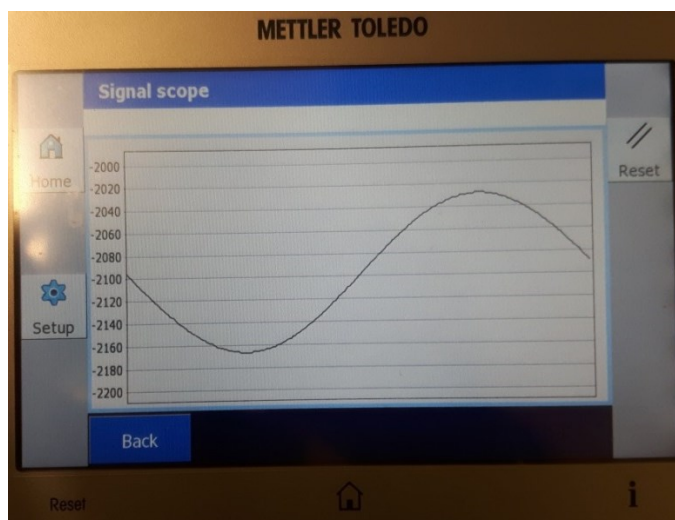


Obr. 57 – Signál přístroje frekvenční závislosti nesíťovaných vzorků při použití výchylky 7  $\mu\text{m}$

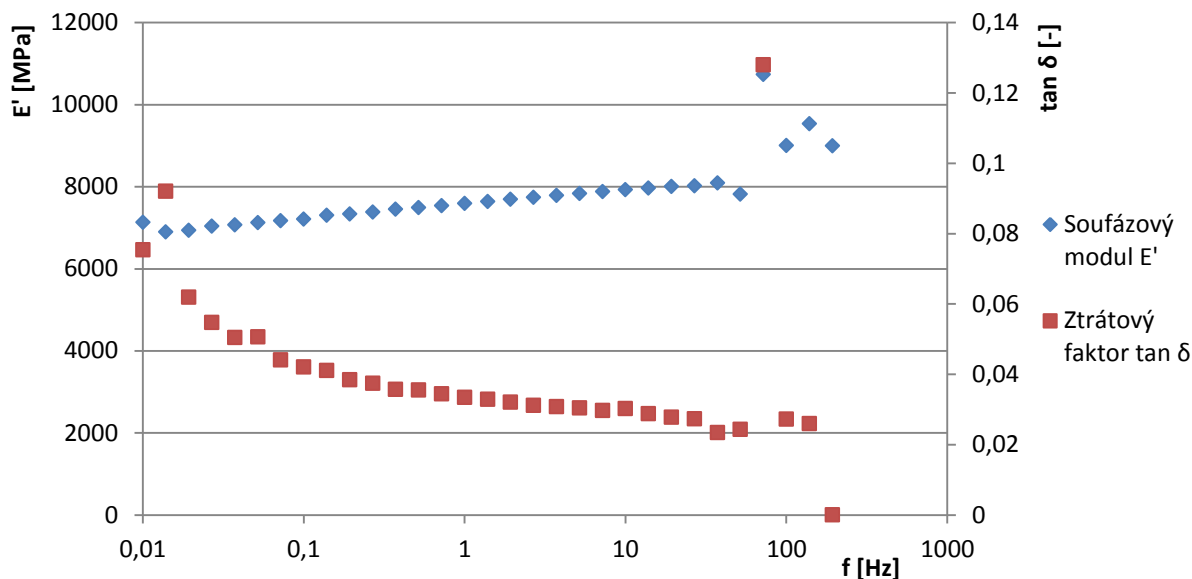


Obr. 58 – Naměřená data frekvenční závislosti nesíťovaných vzorků při použití výchylky 7  $\mu\text{m}$

Pro další měření byla výchylka nastavena na 10  $\mu\text{m}$ . Signál přístroje si držel sinusový charakter po celou dobu měření, jak lze vidět na Obr. 59. Samotná křivka byla hladká, jen s velmi nepatrnými nerovnostmi. V rámci získaných křivek soufázového modulu a ztrátového faktoru dochází k minimálnímu rozptylu naměřených hodnot, který je nižší než při použití předchozí metody. Na druhou stranu se při nízké frekvenci na počátku měření opět objevil výraznější odklon od naměřených křivek, k němuž docházelo při použití metod založených na kontrole síly působící na vzorek. Získané závislosti jsou prezentovány na Obr. 60.



Obr. 59 – Signál přístroje frekvenční závislosti nesíťovaných vzorků při použití výchylky 10  $\mu\text{m}$



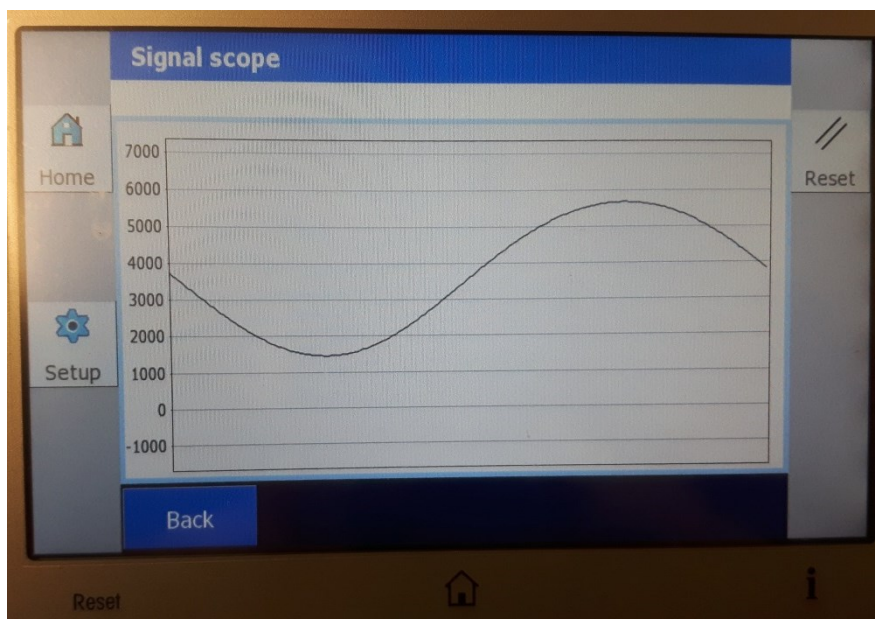
Obr. 60 – Naměřená data frekvenční závislosti nesítovaných vzorků při použití výchylky 10  $\mu\text{m}$

Ze získaných poznatků vyplývá, že zvyšování zatěžující síly vede k zisku dat s menším rozptylem hodnot. Při použití příliš nízkého zatížení (0,5 N) jsou data více rozhozená a samotné závislosti se zřetelně liší svým tvarem. V rámci síly nastavené na 1 N a 2 N jsou rozdíly v rozptylu hodnot jen minimální a křivky se z hlediska tvaru výrazně neliší. Avšak za použití vyšší síly (2 N) dochází u soufázového modulu, měřeného při nízkých frekvencích, k zisku hodnot více odlehlých od dané křivky. Proto se zdá použití 1 N výhodnější, i přes mírně vyšší rozptyl ztrátového faktoru. Pro použití metod založených na principu kontroly výchylky vzorků platí obdobné zákonitosti. Zvyšování amplitudy protažení vede k zisku kvalitnějších dat s nižším rozptylem hodnot. Pokud je nastavená výchylka příliš velká, objevují se výraznější rozdíly u měření při nízkých frekvencích. Jako výhodné se tedy jeví použití výchylky 7  $\mu\text{m}$ , i přes mírně vyšší rozptyl naměřených dat. Nižší hodnota protažení se nedoporučuje, jelikož by vedla ke zvýšení rozptylu. Závěrem lze tvrdit, že pro měření frekvenčních závislostí existuje větší volnost pro výběr použité metody, než v případě teplotních závislostí. Jako optimální se tak jeví použití postupu s nastavením síly 1 N nebo postupu s použitím výchylky 7  $\mu\text{m}$ . Mezi závislostmi získanými pomocí obou typů metod jsou jen minimální rozdíly, které nijak výrazně neovlivňují naměřená data.

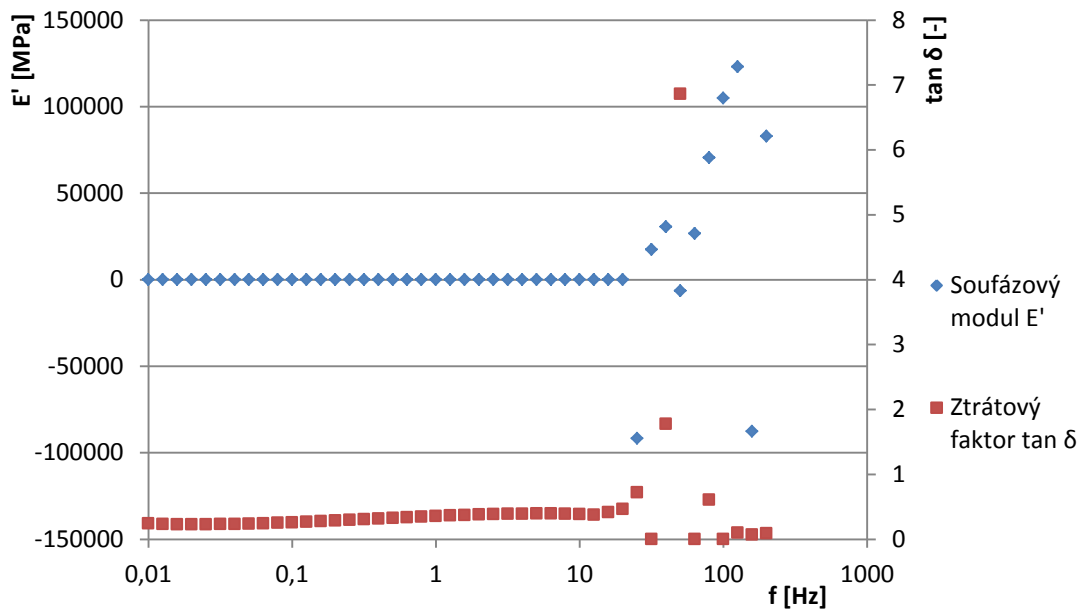
### 5.4.2 Síťované fólie

Pro měření síťovaných fólií byly použity vzorky o molekulové hmotnosti 500 kDa a 1500 kDa. Jako první byla použita metoda, při níž byla kontrolována síla působící na zkušební vzorek. Při nastavení 1 N docházelo k tomu, že přístroj nedodržel přednastavené parametry. Skutečná síla během měřícího procesu dosahovala pouze 0,09 N při výchylce 350  $\mu\text{m}$ . Při námi zvoleném zatížení by zřejmě došlo k překročení maximální možné výchylky, a proto přístroj automaticky korigoval zvolenou metodu. Získaný signál byl sinusového charakteru a jeho křivka byla poměrně hladká, jak prezentuje Obr. 61. Naměřená data jsou zobrazena na Obr. 62. Zde je patrné, že při daném nastavení dochází k výraznému rozptylu měřených hodnot vlivem rezonance u frekvencí nad 25 Hz. U ztrátového faktoru je patrný mírný rozptyl hodnot, přičemž od frekvence 25 Hz taktéž dochází k velmi silné rezonanci. Je nutné podotknout, že po ukončení měření byl vzorek výrazně prověšený. Měření od určité frekvence tudíž neprobíhalo správně, jelikož byl vzorek nevratně deformován. Danou metodou byl měřen zkušební vzorek o molekulové hmotnosti 500 kDa.

K dalším změnám zatěžovací síly nebylo přistoupeno, jelikož by opět docházelo ke korigování použité metody ze strany přístroje. Lze říci, že metody použité na principu kontroly síly působící na vzorek jsou nevhodné pro měření frekvenčních závislostí síťovaných vzorků při laboratorní teplotě.

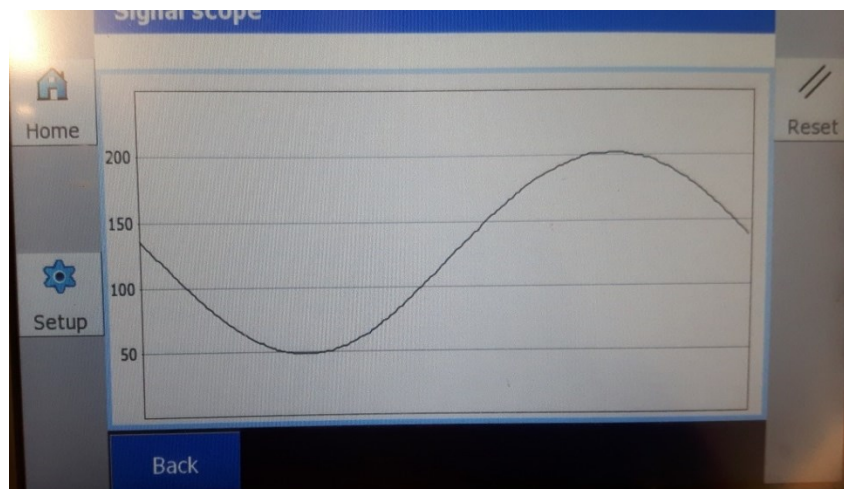


Obr. 61 – Signál přístroje frekvenční závislosti síťovaných vzorků při použití síly 1 N

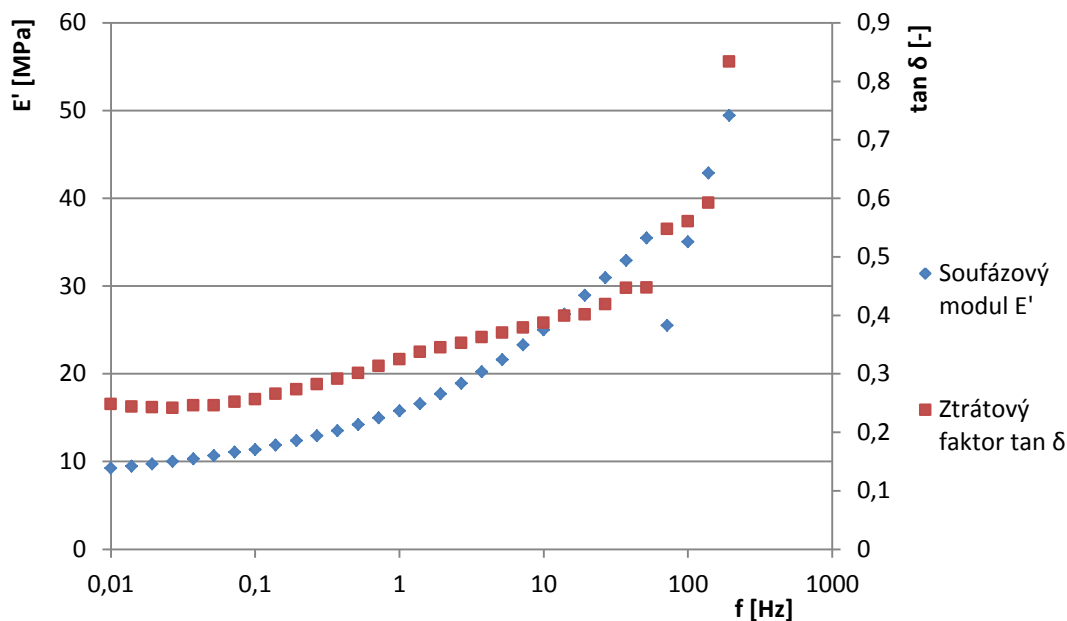


Obr. 62 – Naměřená data frekvenční závislosti síťovaných vzorků při použití síly 1 N

U dalších experimentů byly použity metody založené na kontrole výchylky zkušebních vzorků. V prvním případě byla výchylka nastavena na 10  $\mu\text{m}$ . Pro měření byl použit vzorek o molekulové hmotnosti 500 kDa. Signál přístroje byl sinusového charakteru a jeho křivka obsahovala jen drobné nerovnosti, jak je patrné z Obr. 63. Hodnoty soufázového modulu nevykazují téměř žádný rozptyl až do frekvence 51 Hz. Nad touto frekvencí dochází k rezonanci. U závislosti ztrátového faktoru je pozorován mírný rozptyl do frekvence 51 Hz, kdy se opět začíná projevovat rezonance. Naměřená data jsou prezentována na Obr. 64.

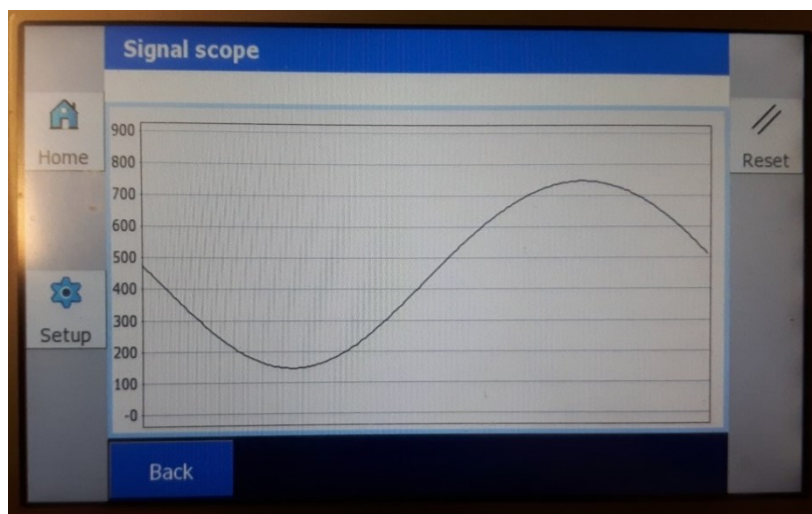


Obr. 63 – Signál přístroje frekvenční závislosti síťovaných vzorků při použití výchylky 10  $\mu\text{m}$

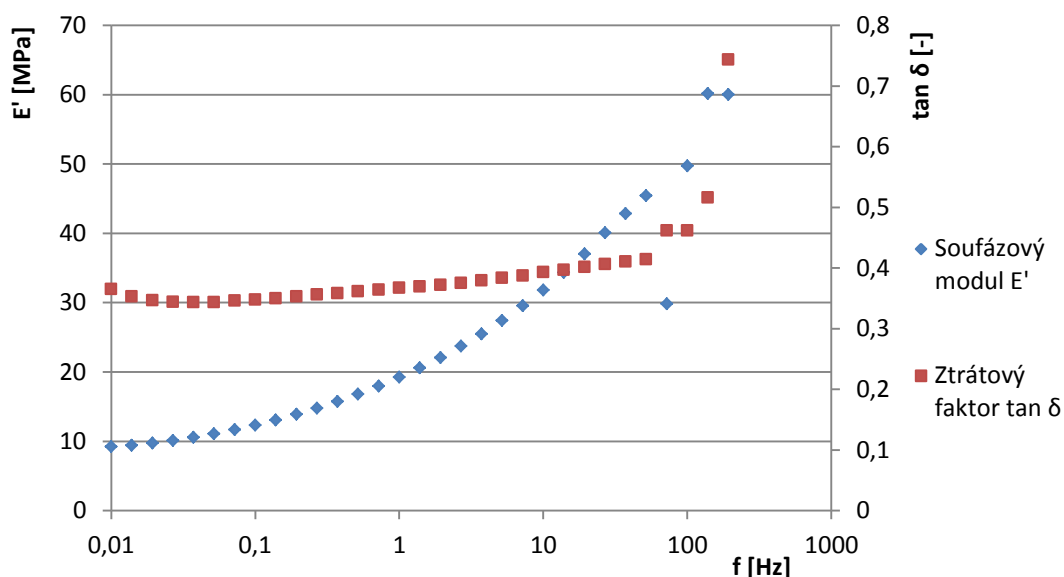


Obr. 64 – Naměřená data frekvenční závislosti síťovaných vzorků při použití výchylky 10  $\mu\text{m}$

Další měření bylo provedeno se zkušebním vzorkem o molekulové hmotnosti 1500 kDa. Výchylka byla nastavena na 20  $\mu\text{m}$ . Signál přístroje byl opět sinusového charakteru a jeho křivka byla hladší než při použití předchozí metody. Hodnoty soufázového modulu tvoří křivku exponenciálního charakteru bez viditelného rozptylu. U závislosti ztrátového faktoru taktěž není patrný téměř žádný rozptyl získaných hodnot. Signál přístroje je prezentován na Obr. 65 a závislosti  $E'$  a  $\tan \delta$  na Obr. 66.

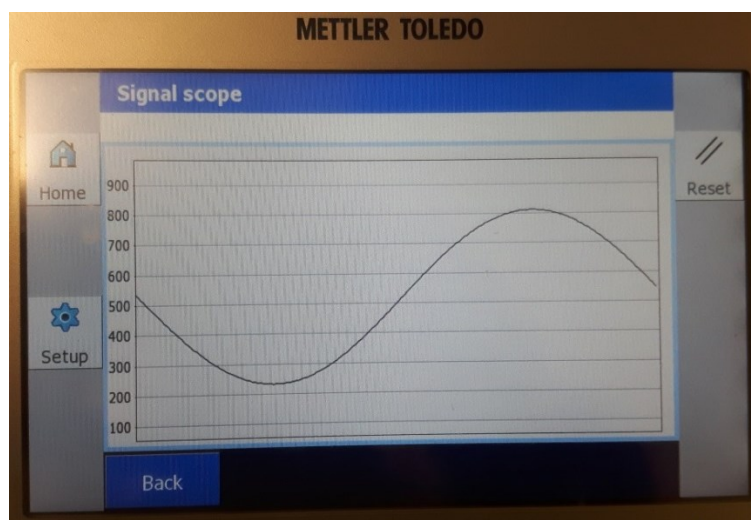


Obr. 65 – Signál přístroje frekvenční závislosti síťovaných vzorků při použití výchylky 20  $\mu\text{m}$



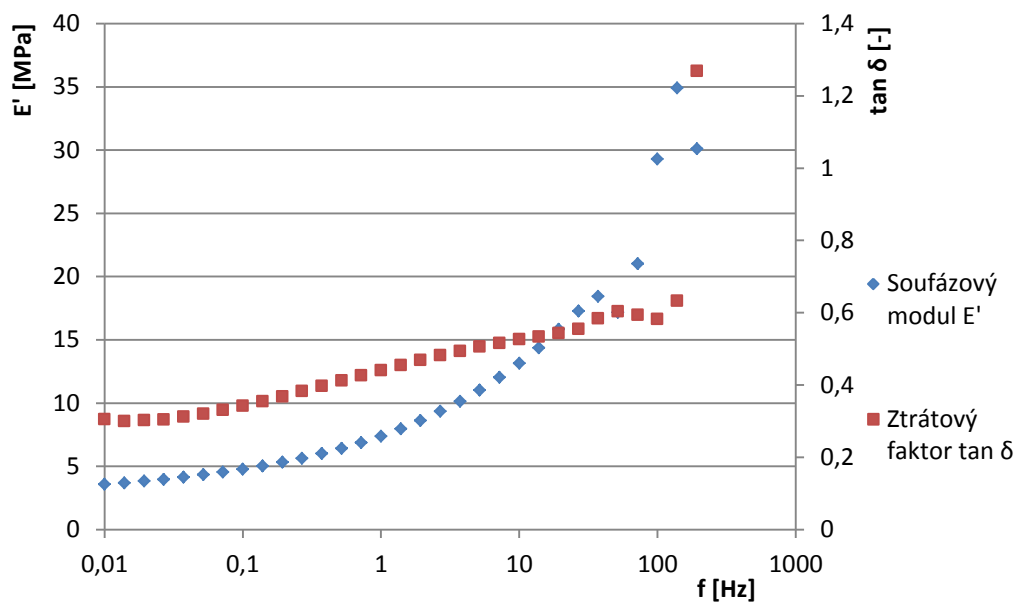
Obr. 66 – Naměřená data frekvenční závislosti síťovaných vzorků při použití výchylky 20  $\mu\text{m}$

U dalšího pokusu byla výchylka zvýšena na 40  $\mu\text{m}$ . Experiment byl proveden se vzorkem o molekulové hmotnosti 500 kDa. Při daném nastavení přístroj nedokázal udržet přednastavenou výchylku. Skutečná výchylka během měřicího procesu dosahovala 50  $\mu\text{m}$ . Signál přístroje byl sinusového charakteru. Hladkost křivky byla obdobná jako za použití předchozí metody, jak je vidět na Obr. 67. Hodnoty souřazového modulu opět nevykazují viditelný rozptyl. Stejně tak u závislosti ztrátového faktoru není patrný výraznější rozptyl naměřených dat. Získané závislosti jsou prezentovány na Obr. 68.



Obr. 67 – Signál přístroje frekvenční závislosti síťovaných vzorků při použití výchylky 40  $\mu\text{m}$





Obr. 68 – Naměřená data frekvenční závislosti síťovaných vzorků při použití výchylky 40  $\mu\text{m}$

Ze získaných poznatků vyplývá, že použití metod na principu kontroly zatěžující síly je nevhodné pro měření frekvenčních závislostí síťovaných fólií kyseliny hyaluronové. Při této metodě docházelo k automatické korekci přístroje, kdy nebyly dodrženy přednastavené parametry měřicího procesu. I přes zmíněnou korekci docházelo k zisku dat s velmi výraznou rezonancí, která nastávala dříve, než při použití ostatních metod. Řešením by mohlo být použití velmi malé síly, aby se omezila maximální výchylka udělená vzorku. K tomu by však musela být použita síly na spodní hranici rozsahu přístroje, což by mohlo způsobovat další problémy. Spodní hranice rozsahu totiž odpovídá samotné citlivosti přístroje. Proto použití těchto metod nedoporučuji. Jako výhodnější se ukázalo použití metod na principu kontroly výchylky udělené zkušebnímu vzorku. Bylo zjištěno, že u soufázového modulu nedochází k výraznějšímu rozptylu naměřených hodnot. U ztrátového faktoru bylo pozorováno mírné zmenšení rozptylu spolu se zvyšující se výchylkou vzorku. Rozdíl mezi jednotlivými metodami byl však jen nepatrný a výrazně neovlivňoval naměřená data. Při nastavení výchylky 40  $\mu\text{m}$  docházelo k automatické korekci přístroje, kdy skutečná výchylka dosahovala hodnot o 25 % vyšších. Proto se použití vyššího protažení nejeví jako vhodné. Optimální metodou pro měření frekvenčních závislostí síťovaných fólií za laboratorní teploty se tedy jeví použití kontroly výchylky v rozmezí 10 – 20  $\mu\text{m}$ .

### 5.4.3 Reprodukovatelnost měření

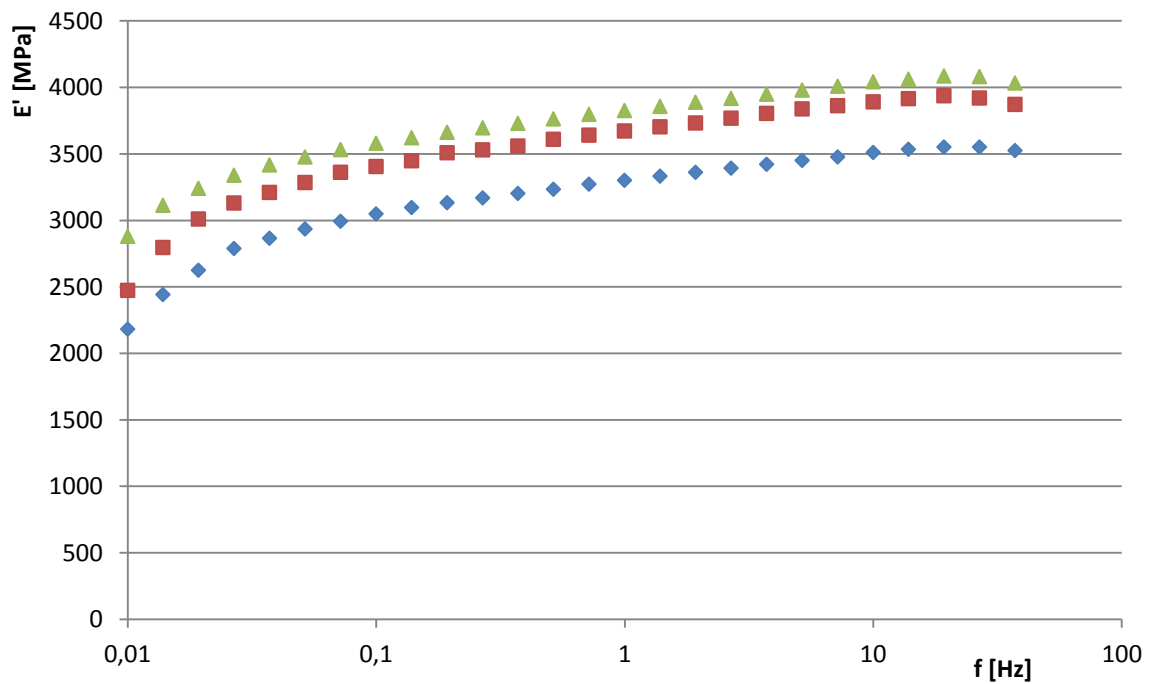
V rámci reprodukovatelnosti měřících metod byla opět hodnocena naměřená data soufázového modulu a ztrátového faktoru. Stejně jako v případě teplotních závislostí bylo testování provedeno pouze pro metody, které byly shledány jako optimální pro daný typ materiálu. Hlavním kritériem hodnocení byla zejména podobnost získaných křivek. V druhé řadě pak byla vypočtena relativní chyba měření pro dané frekvence. Frekvenční závislost byla měřena v rozsahu od 0,01 Hz do 200 Hz za laboratorní teploty. Změna frekvence probíhala v logaritmickém měřítku, přičemž bylo nastaveno zaznamenávání 7 hodnot na dekádu. Z hodnocení reprodukovatelnosti byly vynechány frekvence vyšší než 37 Hz, jelikož při nich dochází k rezonanci dané typem upínacího zařízení přístroje a geometrií zkušební vzorku.

U nesítovaných fólií byla reprodukovatelnost měření frekvenčních závislostí hodnocena u vzorků o molekulové hmotnosti 240 kDa. Zkušební vzorky byly měřeny za pomoci metody kontroly síly, při nastavení 1 N. Naměřená data soufázového modulu jsou prezentována na Obr. 69. Z výsledků je patrné, že křivky  $E'$  jsou z hlediska svého tvaru poměrně totožné. Absolutní hodnoty byly následně hodnoceny pomocí relativní chyby měření, prezentované v tabulce č. 2. Nejvyšší chyby 10 % bylo dosaženo při počáteční frekvenci a tato chyba se postupně snižuje. Pro většinu měřených frekvencí dosahuje relativní odchylka 6 %. Nejnižší chyby je dosaženo u vyšších frekvencí, kdy její hodnota klesá na 5 %. Data ztrátového faktoru jsou zobrazena na Obr. 70. Z výsledků je patrné, že křivky jsou exponenciálního charakteru a z hlediska svého tvaru jsou si podobné. Relativní chyby měření ztrátového faktoru jsou prezentovány v tabulce č. 3. Nejvyšší odchylky 14 % je dosaženo opět na počátku měření. Se zvyšující se frekvencí pak dochází k poklesu vypočtené chyby. Pro většinu měřených frekvencí se relativní odchylka měření drží v intervalu 5 – 8 %.

Z výsledků vyplývá, že metoda zvolená pro nesítované fólie je poměrně dobře reprodukovatelná. Relativní chyba měření se zpravidla drží pod 10 % a tuto hodnotu překračuje jen výjimečně. Dochází k tomu zejména na počátku měření, kdy dochází k ustalování měřícího procesu. Zmíněné nepřesnosti jsou patrně způsobeny kolísáním tloušťky u jednotlivých zkušebních vzorků. Zjištěné nedostatky mají jen malý vliv na mechanické vlastnosti, měřené při frekvenční závislosti. Proto může být použitá metoda doporučena pro opakované měření a vyhodnocování mechanických vlastností materiálu, podrobeného dynamickému namáhání.

Tabulka 2 – Relativní chyby souřázového modulu měřeného při daných frekvencích

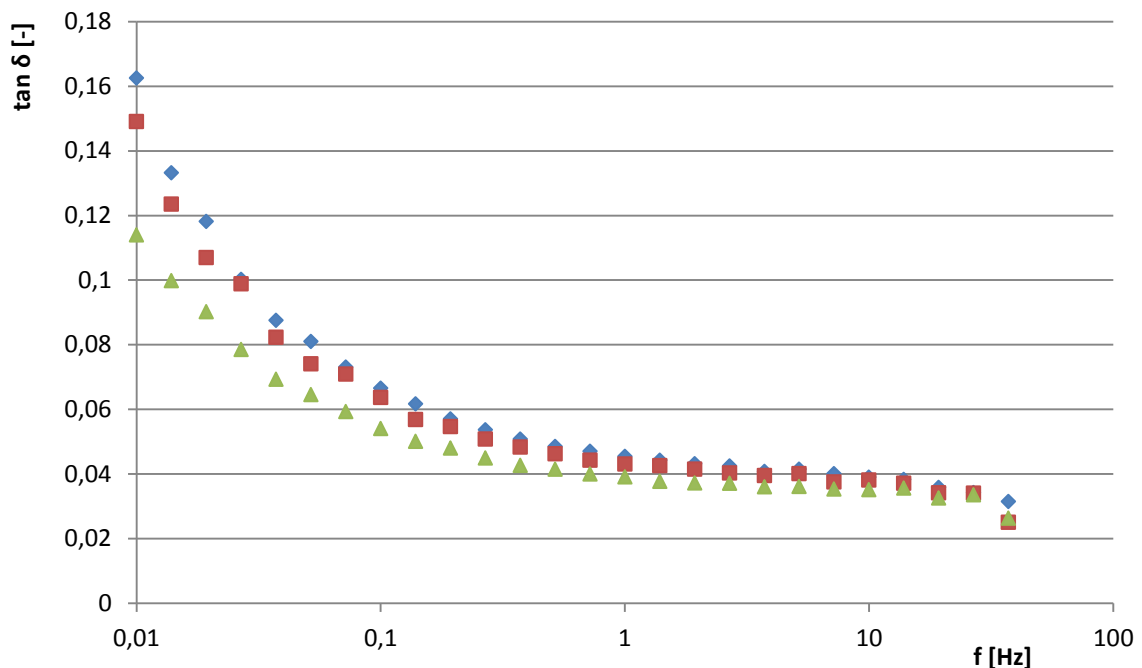
f [Hz]	0,010	0,014	0,019	0,027	0,038	0,052	0,072	0,10	0,14	0,19	0,27	0,37	0,52
$\Delta E'$ [%]	10	9	8	7	7	7	7	6	6	6	6	6	6
f [Hz]	0,72	1,0	1,4	1,9	2,7	3,7	5,2	7,2	10	14	19	27	37
$\Delta E'$ [%]	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5



Obr. 69 – Závislost souřázového modulu na frekvenci pro tři nesíťované vzorky

Tabulka 3 – Relativní chyby ztrátového faktoru měřeného při daných frekvencích

f [Hz]	0,010	0,014	0,019	0,027	0,038	0,052	0,072	0,10	0,14	0,19	0,27	0,37	0,52
$\Delta \tan(\delta)$ [%]	14	11	10	11	9	8	9	8	8	7	7	7	6
f [Hz]	0,72	1,0	1,4	1,9	2,7	3,7	5,2	7,2	10	14	19	27	37
$\Delta \tan(\delta)$ [%]	6	6	7	6	5	5	6	5	5	3	4	1	10



Obr. 70 – Závislost ztrátového faktoru na frekvenci pro tři nesítované vzorky

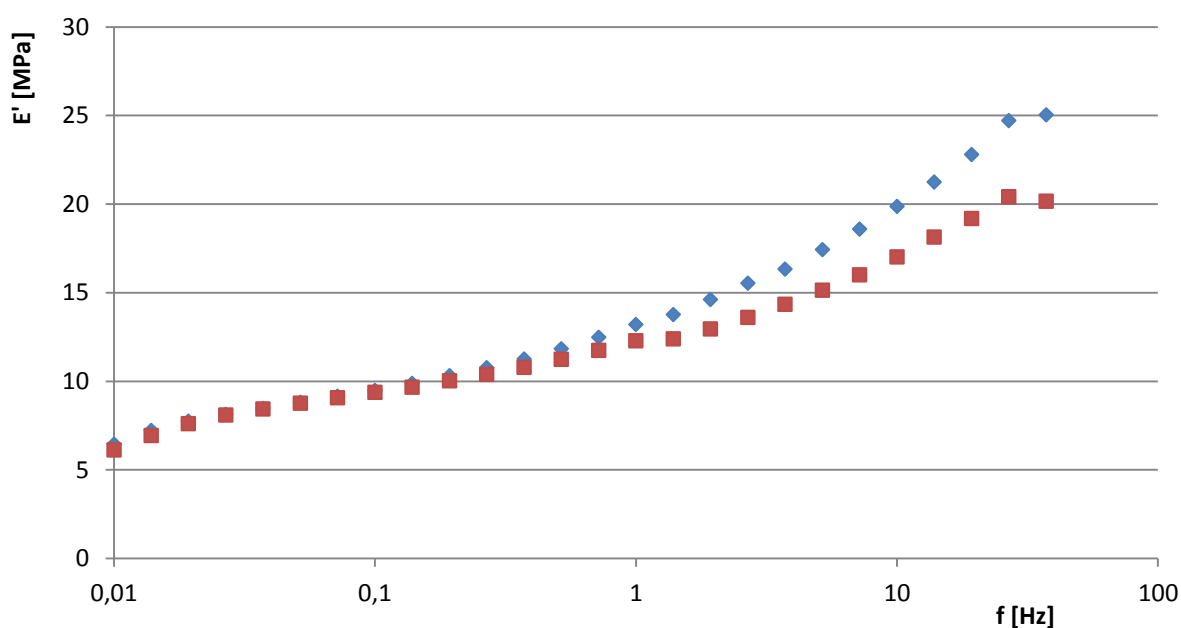
U sítovaných fólií byla reprodukovatelnost měření frekvenčních závislostí hodnocena u vzorků o molekulové hmotnosti 1180 kDa. Zkušební vzorky byly měřeny za pomoci metody kontroly výchylky, při nastavení 20  $\mu\text{m}$ . Naměřená data soufázového modulu jsou prezentována na Obr. 71. Z výsledků vyplývá, že křivky  $E'$  jsou z hlediska svého tvaru jen velmi podobné. Od počátku měření se závislosti překrývají, ale od frekvence 1 Hz dochází k jejich výraznějšímu odklonu. I přes tuto změnu drží po celou dobu měření obdobný rostoucí trend. Výjimkou je hodnota získaná při frekvenci 37 Hz, kdy u jedné z křivek dochází k mírnému poklesu modulu. To může být způsobeno nástupem rezonančního efektu, který byl výrazný až při vyšších frekvencích. Relativní odchylky soufázového modulu jsou prezentovány v tabulce č. 4. Na počátku měření byla hodnota chyby 3 % a se zvyšující frekvencí se postupně snižovala na 1 %. Od 1 Hz pak dochází s rostoucí frekvencí ke zvyšování relativní odchylky. Nejvyšší hodnota dosahuje 11 % při frekvenci 37 Hz. Naměřená data ztrátového faktoru jsou zobrazena na Obr. 72. Zde je patrná výrazná podobnost získaných závislostí. Od počátku měření docházelo k poklesu  $\tan \delta$  až do frekvence 0,052 Hz. Při dalším zvyšování frekvence dochází k růstu zaznamenaných dat až do 19 Hz. Poté nastává u jednoho vzorku pokles ztrátového faktoru, který pokračuje až do rezonance. U druhého vzorku se tento pokles projevuje pouze u následující frekvence a dále znovu roste. Tato nejasnost může být způsobena nástupem rezonančního efektu, který není

při dané frekvenci tak patrný, jako při frekvencích vyšších. Relativní chyby měření ztrátového faktoru jsou prezentovány v tabulce č. 5. Nejvyšší hodnota chyby dosahuje 5 % u hodnot zaznamenaných v rozmezí 0,038 – 0,19 Hz. Ostatní odchylky byly nižší s minimální hodnotou 1 % při frekvenci 1,4; 1,9 a 37 Hz.

Ze získaných poznatků vyplývá, že metoda zvolená pro síťované fólie je dobře reprodukovatelná. V rámci souřazového modulu překročí relativní chyba měření hodnotu 10 % jen výjimečně u frekvencí, nad nimiž dochází k rezonanci přístroje a geometrie vzorku. U souřazového modulu relativní chyba měření nepřekračuje hodnotu 5 %. Tyto nepřesnosti mohou být způsobeny kolísáním tloušťky zkušebních vzorků, náhodnou chybou měření, případně pak mírně odlišným obsahem vody, pohlcené ze vzdušné vlhkosti. Zjištěné nedostatky mají jen malý vliv na mechanické vlastnosti. Proto může být použita metoda doporučena pro opakované měření a vyhodnocování mechanických vlastností materiálu.

Tabulka 4 – Relativní chyby souřazového modulu měřeného při daných frekvencích

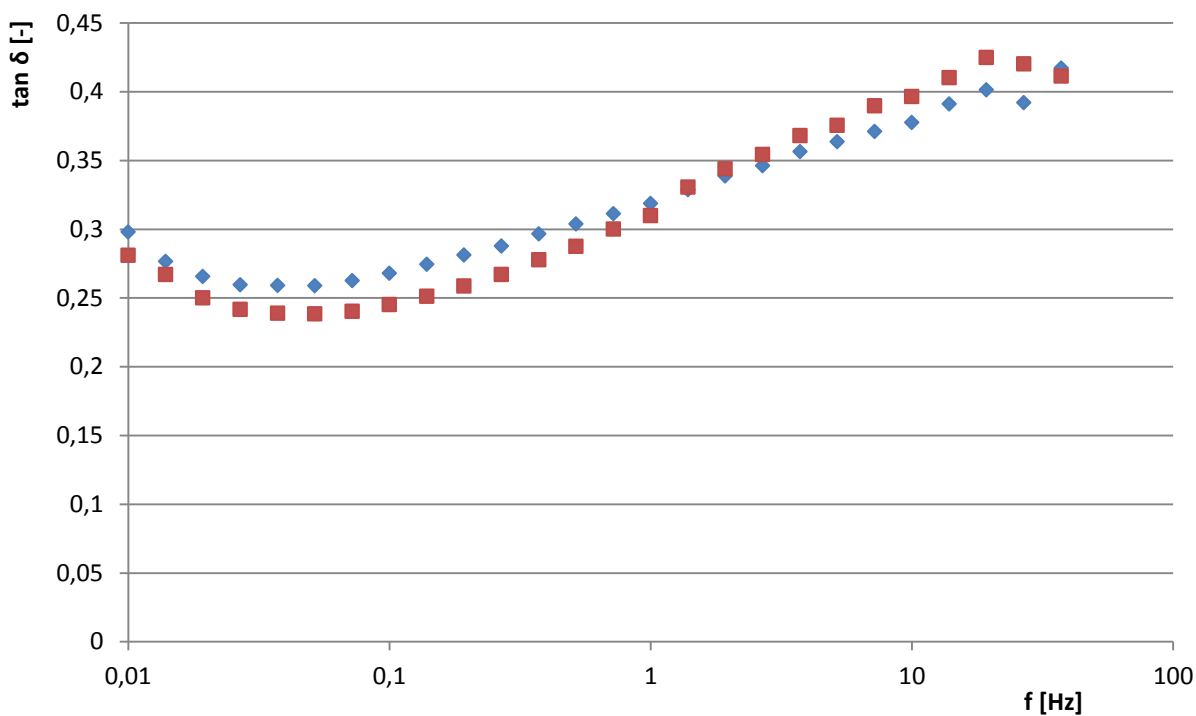
f [Hz]	0,010	0,014	0,019	0,027	0,038	0,052	0,072	0,10	0,14	0,19	0,27	0,37	0,52
$\Delta E'$ [%]	3	3	1	1	1	1	1	1	2	2	2	3	3
f [Hz]	0,72	1,0	1,4	1,9	2,7	3,7	5,2	7,2	10	14	19	27	37
$\Delta E'$ [%]	4	4	6	7	7	7	8	8	8	8	9	10	11



Obr. 71 – Závislost souřazového modulu na frekvenci pro dva síťované vzorky

Tabulka 5 – Relativní chyby ztrátového faktoru měřeného při daných frekvencích

f [Hz]	0,010	0,014	0,019	0,027	0,038	0,052	0,072	0,10	0,14	0,19	0,27	0,37	0,52
$\Delta \tan(\delta)$ [%]	3	2	4	4	5	5	5	5	5	5	4	4	3
f [Hz]	0,72	1,0	1,4	1,9	2,7	3,7	5,2	7,2	10	14	19	27	37
$\Delta \tan(\delta)$ [%]	2	2	1	1	2	2	2	3	3	3	3	4	1



Obr. 72 – Závislost ztrátového faktoru na frekvenci pro dva síťované vzorky

## 6 NAMĚŘENÉ VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro studium termických a mechanických vlastností fólií hyaluronanu při dynamickém namáhání, bylo využito metod, které byly v předchozích kapitolách shledány jako optimální pro daný typ materiálu a způsob měření.

### 6.1 Teplotní závislosti

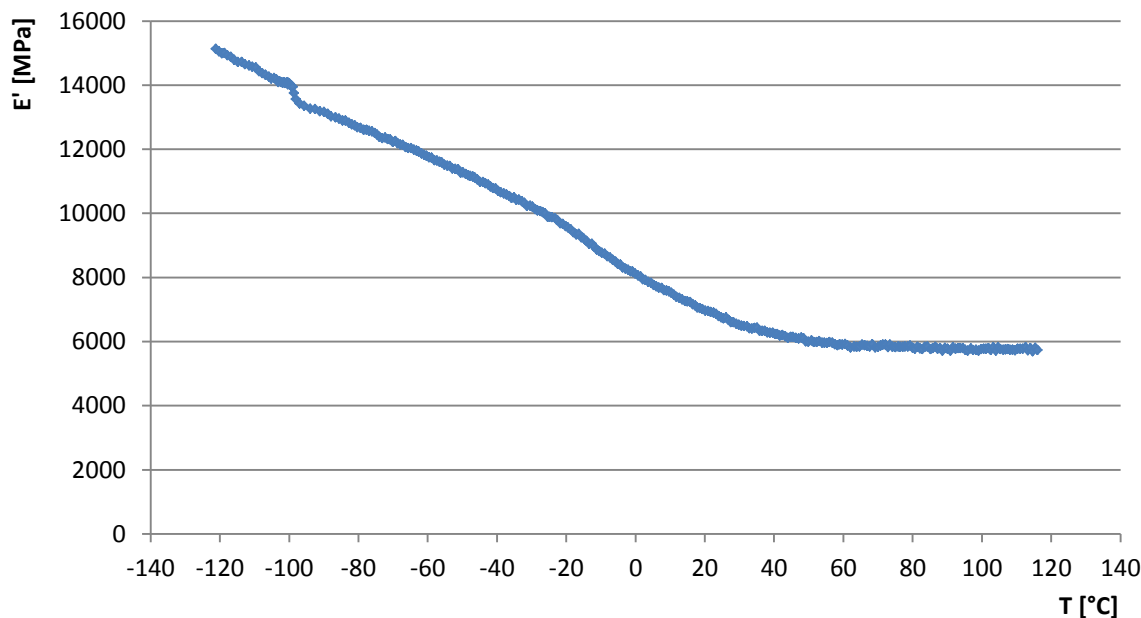
U teplotních závislostí bylo provedeno jedno měření vzorku o dané molekulové hmotnosti v širokém teplotním intervalu do 120 °C, aby mohla být charakterizována i vyšší teplotní oblast. V rámci srovnání jednotlivých vzorků pak byla měření prováděna pouze do teploty 60 °C a to zejména kvůli optimalizaci měřicího procesu.

#### 6.1.1 Nesíťované fólie

Nesíťované vzorky byly podrobeny dynamickému namáhání frekvencí 1 Hz, při nastavení amplitudy výchylky 7  $\mu\text{m}$  a rychlosti ohřevu 4 K/min.

Vzorky o molekulové hmotnosti 240 kDa byly měřeny v teplotním rozsahu od (-120 °C) do 120 °C. Data souřazového modulu jsou prezentována na Obr. 73. Od počáteční teploty (-120 °C) dochází se zvyšováním teploty k lineárnímu poklesu souřazového modulu z 15 100 MPa na hodnotu 14 200 MPa, při (-104 °C). Mezi teplotou (-104 °C) a (-98 °C) je patrná prudká, stupňovitá změna modulu, kdy tento poklesne o 700 MPa, v poměrně krátkém teplotním intervalu. Tato změna charakterizuje  $\beta$  přechod (viz. kapitola 2.3), kdy dochází k uvolňování pohybu bočních substituentů [36, 43]. U hyaluronanu to mohou být hydroxylové, karboxylové a acetamidové skupiny. S dalším zvyšováním teploty pak dochází opět k téměř lineárnímu poklesu  $E'$ , až na 10 000 MPa při (-25 °C). Mezi (-25 °C) a 35 °C se vyskytuje další stupňovitá změna modulu, kdy tento poklesne o 4 000 MPa. Charakterizuje teplotu skelného přechodu  $T_g$ , kdy dochází k uvolnění pohybu segmentů polymerního řetězce. Oproti předchozímu  $\beta$  přechodu je tato změna velmi povolná a dochází k ní v širokém teplotním intervalu. Velká šířka teplotního intervalu tohoto přechodu je patrně způsobena existencí fyzikální sítě, případně vázanou vodou v materiálu, jelikož k jejímu uvolňování dochází právě u mírně záporných teplot [47, 51-53]. Nad teplotou 40 °C opět dochází k téměř lineárnímu poklesu modulu s rostoucí teplotou. Na rozdíl od předchozích lineárních oblastí, zde modul klesá jen pozvolna a mezi 40 – 120 °C se sníží jen o 400 MPa. V celém rozsahu měření (-120 °C) až 120 °C tedy souřazový modul klesl z 15 000 MPa na hodnotu 5 800 MPa. Tato změna je poměrně výrazná a je jasné,

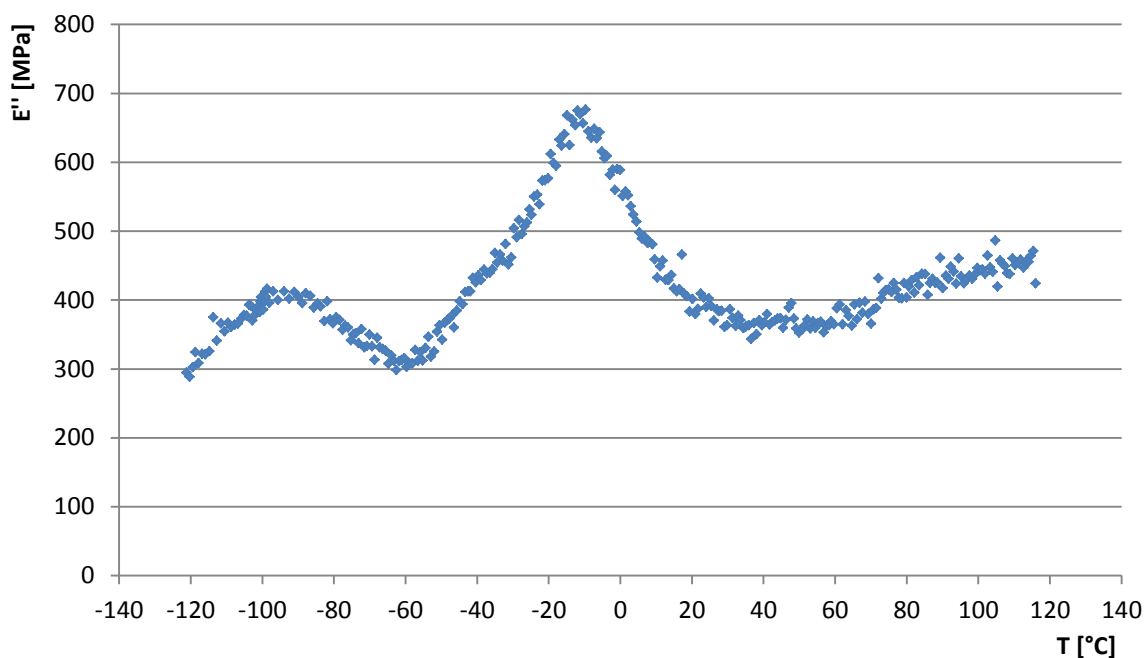
že při zvyšování teploty ztrácí materiál svoji tuhost. Hodnota  $E'$  5 800 MPa je však stále vysoká a proto lze tvrdit, že materiál zcela neztrácí své mechanické vlastnosti i za vyšších teplot.



Obr. 73 – Teplotní závislost souřazového modulu pro nesířovaný vzorek o molekulové hmotnosti 240 kDa

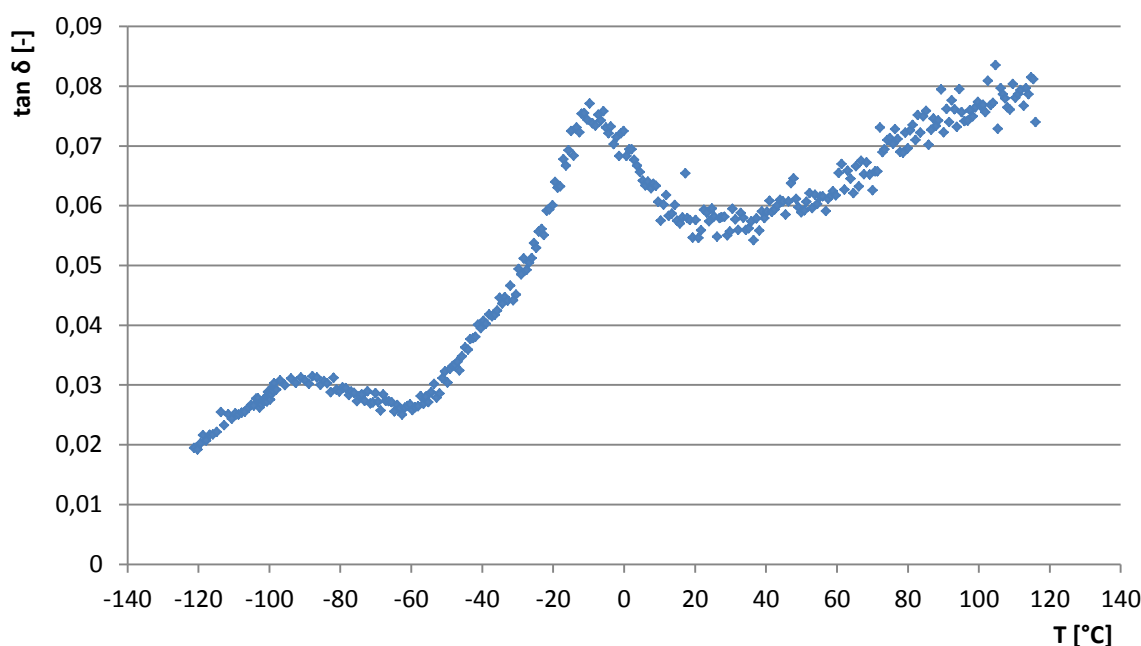
Naměřená data ztrátového modulu jsou prezentovány na Obr. 74. Křivka ztrátového modulu tvoří první pik mezi (-120 °C) a (-65 °C). Hodnota modulu 400 MPa při teplotě (-97 °C) pak odpovídá maximu tohoto píku, který charakterizuje  $\beta$  přechod materiálu. Ten představuje lokální maximum ztráty energie v materiálu. S dalším zvyšováním teploty modul opět roste až do hodnoty 670 MPa, při (-15 °C). Zde se vyskytuje druhé maximum ztrátového modulu, které odpovídá teplotě skelného přechodu. Materiál zde dosahuje nejvyšších ztrát energie, využité k uvolnění pohybu segmentů HA řetězce. S dalším zvyšováním teploty dochází k poklesu  $E''$  na hodnotu 340 MPa, při 36 °C. Následně dochází k růstu ztrátového modulu až na 460 MPa, při konečné teplotě 115 °C.





Obr. 74 – Teplotní závislost ztrátového modulu pro nesítovaný vzorek o molekulové hmotnosti 240 kDa

Data ztrátového faktoru jsou prezentována na Obr. 75. Získaná závislost má obdobný charakter jako u ztrátového modulu. Na získané křivce se vyskytují dva píky. První pík, charakteristický pro  $\beta$  přechod, se nachází mezi (-120 °C) a (-65 °C). Jeho maximum odpovídá teplotě (-91 °C) a hodnotě ztrátového faktoru 0,031. Druhý pík, charakteristický pro teplotu skelného přechodu, se nachází mezi (-65 °C) a 25 °C. Jeho maximum odpovídá teplotě (-12 °C) a hodnotě ztrátového faktoru 0,075. Při zvyšování teploty nad 25 °C dochází k růstu ztrátového faktoru až na 0,08, při konečné teplotě 115 °C. Přechodové teploty vyhodnocené pomocí ztrátového faktoru jsou mírně posunuty k vyšším, oproti přechodovým teplotám hodnoceným pomocí ztrátového modulu. To je dáno tím, že  $\tan \delta$  je ovlivněn i hodnotami soufázového modulu.

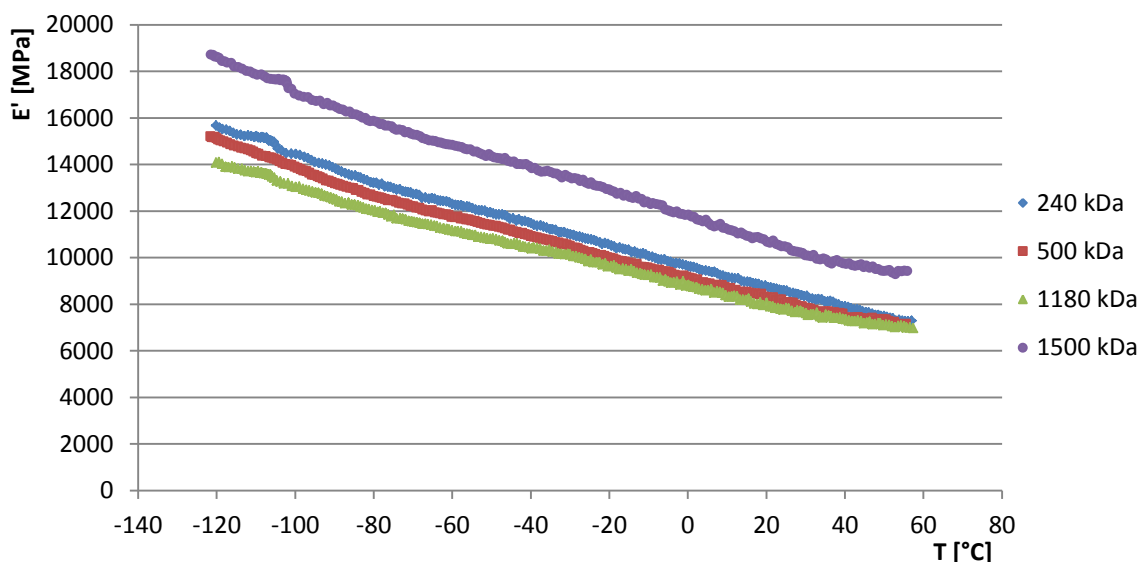


Obr. 75 – Teplotní závislost ztrátového faktoru pro nesíťovaný vzorek o molekulové hmotnosti 240 kDa

V rámci srovnání teplotních závislostí vzorků o různé molekulové hmotnosti byly tyto podrobeny ohřevu z (-120 °C) na 60 °C. Data soufázového modulu jsou prezentována na Obr. 76. U všech vzorků dochází k poklesu modulu s rostoucí teplotou. Stupňovitá změna, odpovídající  $\beta$  přechodu, se vyskytuje mezi (-110 °C) a (-100 °C) u všech vzorků, s výjimkou u fólie o molekulové hmotnosti 500 kDa. Absence přechodu může být způsobena rozdílným obsahem vázané vody. Taktéž to může souviset s odlišným stárnutím jednotlivých vzorků. Pro ověření těchto hypotéz by bylo potřeba provést další měření na více zestárlých a čerstvých vzorcích, v kombinaci s nízkoteplotní FTIR spektroskopií umožňující studium vnitřní struktury materiálu a také v kombinaci s termogravimetrickou analýzou umožňující určit obsah vody v materiálu.

Je zajímavé, že u žádného ze vzorků se nevyskytuje druhá stupňovitá změna, odpovídající skelnému přechodu. U vzorků o molekulové hmotnosti 240 kDa byla tato změna patrná při měření do 120 °C. Objevovala se v oblasti mezi (-20 °C) a 40 °C. Skelný přechod by měl být tedy zachycen i při měření do 60 °C. Vzorky byly v obou případech (při měření do 60 i 120 °C) nejprve ochlazen z laboratorní na počáteční, zápornou teplotu a až poté došlo k jejich ohřevu. Nedošlo tedy k odlišné změně jejich tepelné historie. Vzhledem k tomu není absence této změny příliš jasná. Z výsledků taktéž vyplývá, že neexistuje

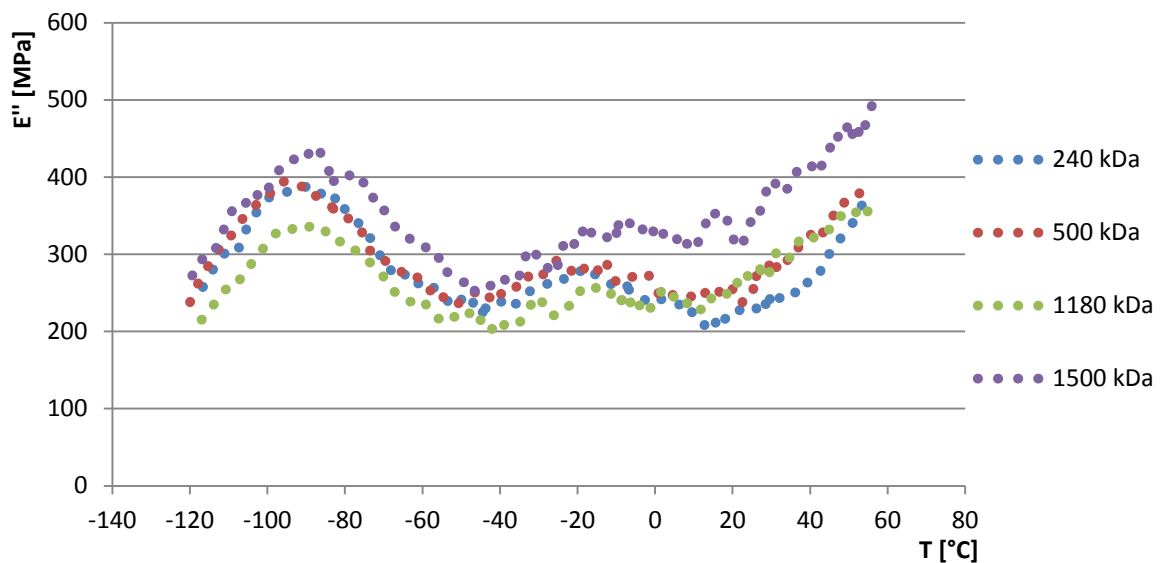
přímá korelace mezi molekulovou hmotností materiálu a souřazovým modulem. Nejvyššího modulu sice dosahují vzorky o nejvyšší molekulové hmotnosti, avšak druhý nejvyšší modul mají vzorky o nejnižší molekulové hmotnosti, přičemž rozdíl mezi nimi je v průběhu měření mezi 2 000 a 3 000 MPa. S růstem molekulové hmotnosti od 240 kDa do 1180 kDa pak dochází k poklesu elastického modulu v celém teplotním intervalu. Rozdíl modulu mezi těmito vzorky je nejvyšší za nízkých teplot, kdy dosahuje 500-1000 MPa. Se zvyšováním teploty se tento rozdíl postupně snižuje a při teplotě 60 °C dosahuje jen několika desítek MPa. Je možné se domnívat, že při molekulové hmotnosti 1500 kDa a vyšší, dochází k vytvoření odlišné struktury fyzikální sítě, jelikož až u této molekulové hmotnosti je rozdíl v souřazovém modulem statisticky významný. Pro potvrzení tohoto předpokladu by bylo nutné provést další měření se vzorky o vyšších molekulových hmotnostech.



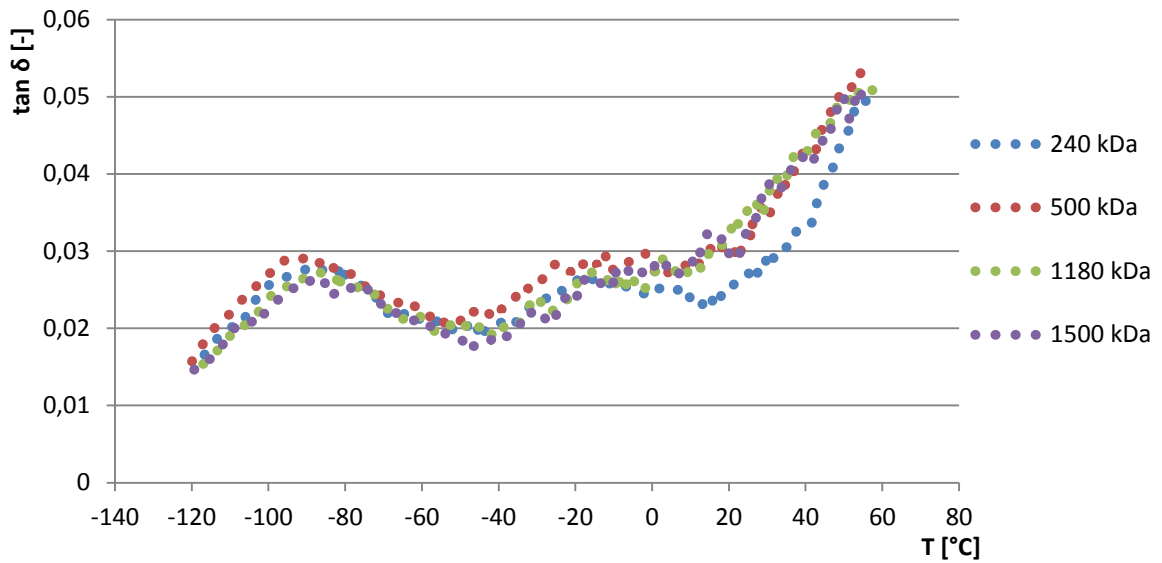
Obr. 76 – Teplotní závislost souřazového modulu nesíťovaných vzorků o různé molekulové hmotnosti

Data ztrátového modulu jsou prezentována na Obr. 77 a data ztrátového faktoru na Obr. 78. Obě závislosti mají obdobný charakter. U všech vzorků se vyskytují na získaných křivkách dvě relaxační maxima. První, odpovídající  $\beta$  přechodu, se vyskytuje v okolí teploty (-95 °C) u ztrátového modulu. U ztrátového faktoru se toto maximum vyskytuje v okolí (-90 °C). Z hlediska různých molekulových hmotností se teploty odpovídající tomuto přechodu liší v rozmezí maximálně 5 °C. Druhé relaxační maximum, odpovídající teplotě skelného přechodu, není příliš výrazné. U ztrátového modulu se vyskytuje v okolí (-22 °C) a u ztrátového faktoru v okolí (-15 °C). V rámci různé molekulové

hmotnosti se však i tato maxima liší v rozmezí jen několika jednotek °C. Přesnější analýzu znemožňuje poměrně velký rozptyl dat. Lze tedy říci, že relaxační maxima ztrátového modulu a ztrátového faktoru jen málo závisí na molekulové hmotnosti materiálu. Z hlediska hodnot modulu se v závislosti na molekulové hmotnosti materiály příliš neliší a není zde patrný její výrazný vliv. Nejvyšší ztrátový modul mají vzorky o molekulové hmotnosti 1500 kDa. Nejnížší pak vzorky o molekulové hmotnosti 1180 kDa, přičemž rozdíl mezi nimi jen výjimečně přesahuje hodnotu 100 MPa. U ztrátového faktoru je situace mírně odlišná. Nejnížších mechanických ztrát dosahují z počátku vzorky o molekulové hmotnosti 1500 kDa a nejvyšších pak vzorky o molekulové hmotnosti 500 kDa. Při překročení 0 °C mají nejnížší ztrátový faktor vzorky o molekulové hmotnosti 240 kDa a u ostatních vzorků dosahuje  $\tan \delta$  přibližně stejných hodnot. Z hlediska mechanických ztrát taktéž není pozorován výrazný vliv molekulové hmotnosti, jelikož rozdíl ztrátového faktoru u jednotlivých vzorků nepřesahuje hodnotu jedné setiny v celém rozsahu měření.



Obr. 77 – Teplotní závislost ztrátového modulu nesíťovaných vzorků o různé molekulové hmotnosti



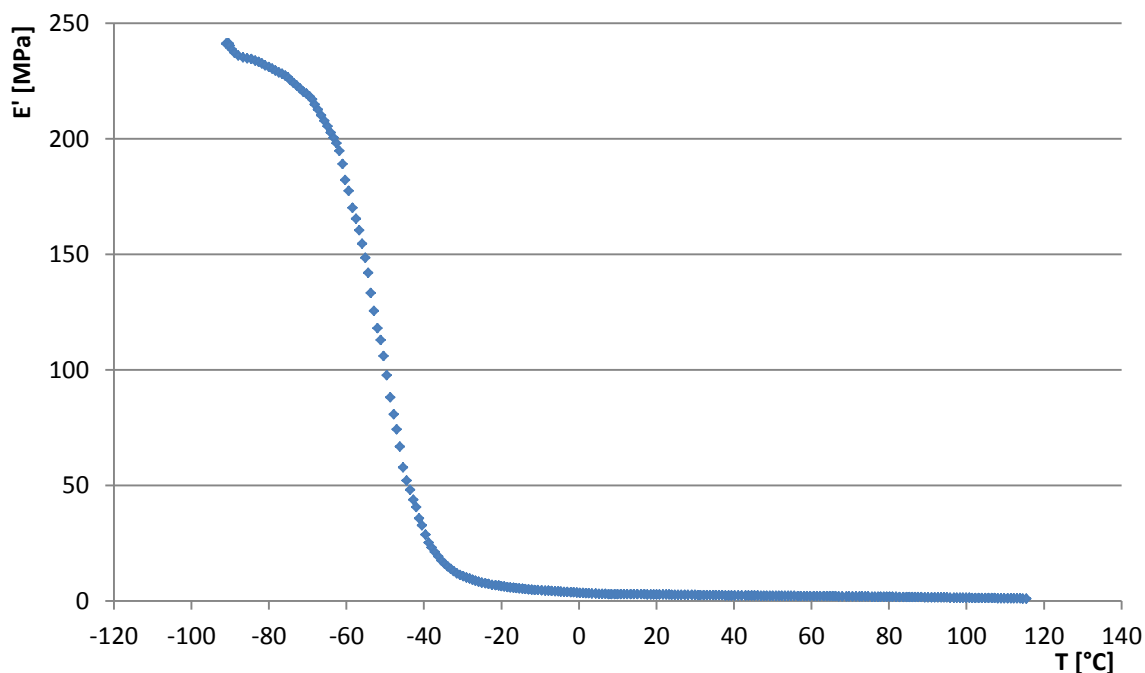
Obr. 78 – Teplotní závislost ztrátového faktoru nesíťovaných vzorků o různé molekulové hmotnosti

Závěrem lze říci, že teplotní oblasti sekundárních přechodů nesíťovaných fólií hyaluronanu jsou jen nepatrně ovlivněny molekulovou hmotností materiálu, což uvádí i Stoklasa [41]. Vliv délky řetězce na souřazový modul materiálu je výrazný až od 1500 kDa, kdy se jeho modul zvyšuje o 20 až 30 % oproti ostatním vzorkům. Z hlediska ztrát energie v materiálu jsou rozdíly mezi zkoumanými vzorky nevýznamné. U ztrátového modulu ani ztrátového faktoru nebyla prokázána jednoznačná závislost molekulové hmotnosti nesíťovaného hyaluronanu na jeho dynamické mechanické vlastnosti.

### 6.1.2 Síťované fólie

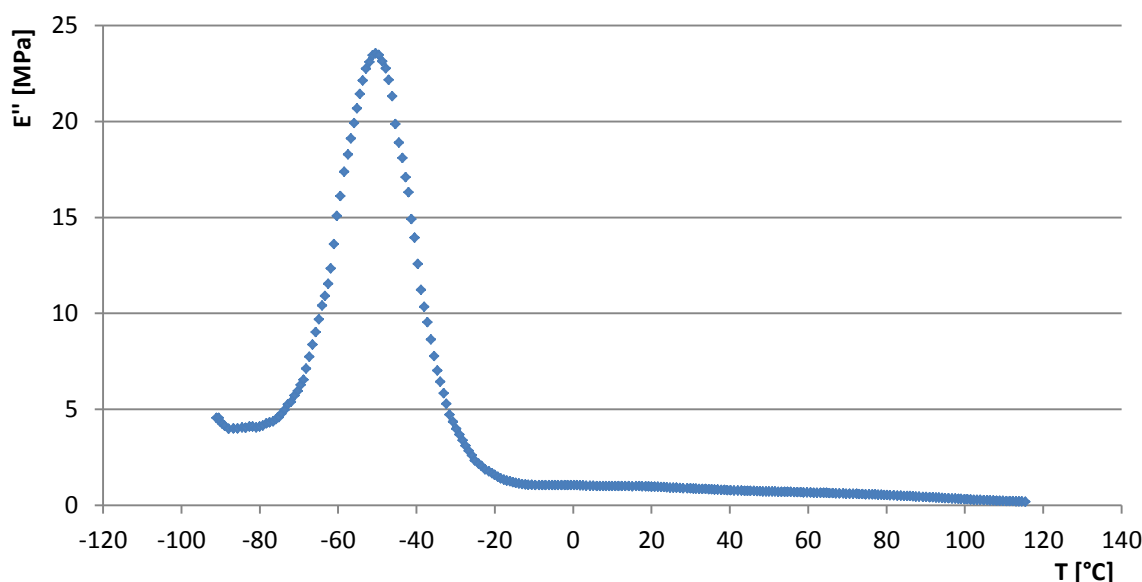
Síťované vzorky byly podrobeny dynamickému namáhání o frekvenci 1 Hz, při nastavení amplitudy síly 1 N a rychlosti ohřevu 4 K/min. Tyto vzorky byly měřeny od počáteční teploty (-90 °C), jelikož při ochlazení na (-120 °C) zpravidla docházelo k jejich porušení již na počátku měření.

V rámci hodnocení širšího teplotního intervalu byly vzorky o molekulové hmotnosti 500 kDa měřeny od (-90 °C) do 120 °C. Data soufázového modulu jsou prezentována na Obr. 79. V okolí (-90 °C) se vyskytuje poměrně prudký pokles modulu. Lze předpokládat, že by mohl být součástí  $\beta$  přechodu, který se vyskytoval u nesíťovaných vzorků u teplot kolem (-100 °C). Mezi teplotou (-75 °C) a (-35 °C) se nachází velmi výrazná, stupňovitá změna soufázového modulu, kdy tento klesá z 230 MPa na 20 MPa. Tato změna charakterizuje teplotu skelného přechodu. Při dalším zvyšování teploty pak modul klesá už jen pozvolna, až na konečnou hodnotu 1 MPa, při 115 °C. V celém měřeném teplotním rozsahu tedy modul klesl z počátečních 245 MPa k velmi nízkým hodnotám. Z toho vyplývá, že skelný přechod reflektuje výraznou změnu mechanických vlastností síťovaných fólií hyaluronanu. Pod touto teplotou je materiál relativně tuhý a křehký, což dokazovalo jeho porušování při nižších teplotách. Nad (-35 °C) pak materiál ztrácí svou tuhost a stává se velmi poddajný.



Obr. 79 – Teplotní závislost soufázového modulu pro síťovaný vzorek o molekulové hmotnosti 500 kDa

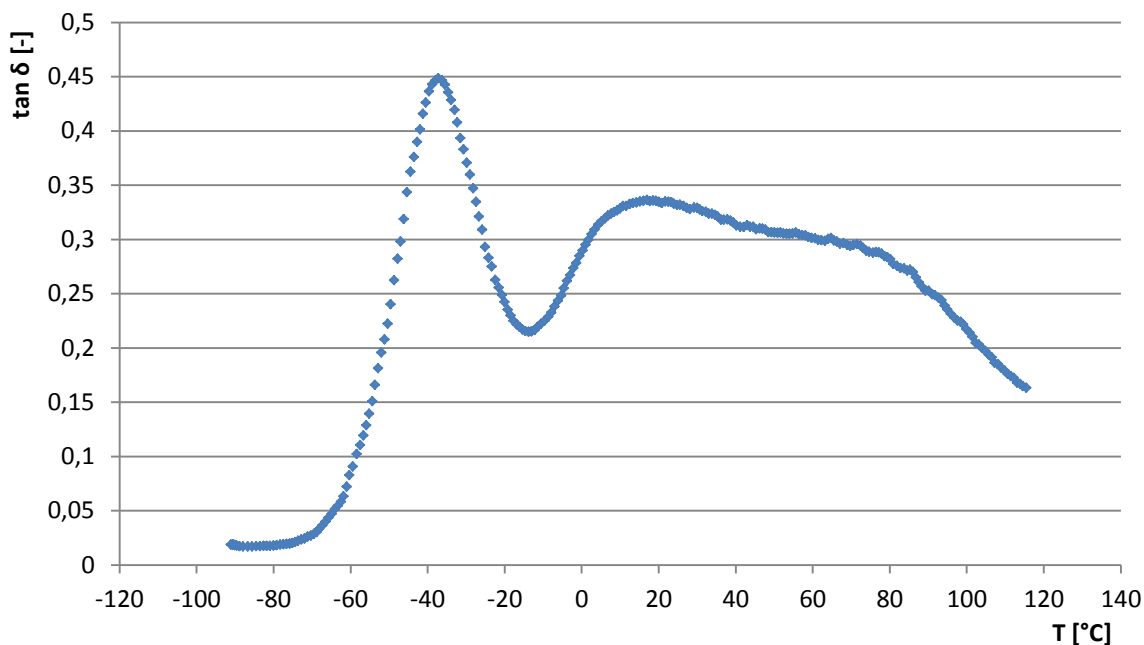
Data ztrátového modulu jsou prezentována na Obr. 80. V okolí ( $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) se vyskytuje prudký pokles modulu. Má se za to, že je to ukončení píku relaxačního maxima odpovídající  $\beta$  přechodu. K jeho výskytu opravdu docházelo při měření od nižších záporných teplot, při použití metody s amplitudou výchylky  $3\text{ }\mu\text{m}$ . Při této metodě nedocházelo k porušení vzorků a tak mohly být měřeny od ( $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Maximum tohoto píku se nacházelo okolo teploty ( $-110\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Dále se na křivce ztrátového modulu vyskytuje mezi ( $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a ( $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) velmi výrazný pík, odpovídající skelnému přechodu. Jeho maximum je při teplotě ( $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a hodnotě modulu  $23,5\text{ MPa}$  a materiál zde dosahuje největších ztrát energie. Při dalším zvyšování teploty nad ( $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) již dochází k velmi pozvolnému poklesu ztrátového modulu až na konečných  $0,2\text{ MPa}$ , při  $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



Obr. 80 – Teplotní závislost ztrátového modulu pro síťovaný vzorek o molekulové hmotnosti 500 kDa

Data ztrátového faktoru jsou prezentována na Obr. 81. Z počátku měření je ztrátový faktor téměř konstantní kolem hodnoty  $0,02$ . Mezi ( $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a ( $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) se na křivce vyskytuje výrazný pík, odpovídající skelnému přechodu. Jeho maximum dosahuje hodnoty  $0,45$ , při teplotě ( $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Od teploty ( $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) dochází k poměrně prudkému nárůstu ztrátového faktoru až na hodnotu  $0,33$  při  $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Toto lokální maximum by mohlo být přiřazeno k uvolňování volné vody v materiálu. Dále ztrátový faktor pozvolna klesá na hodnotu  $0,28$  při  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nad touto teplotou klesá  $\tan\delta$  prudce až na hodnotu  $0,16$  při teplotě  $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Celá oblast od ( $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) do  $115\text{ }^{\circ}\text{C}$  by mohla být také považována za velmi široký dvojité

pík, který se v literatuře označuje jako vysokoteplotní relaxační maximum a je spojován s uvolňováním pohybu velkých úseků a změnám konformace řetězce (viz. kapitola 2.3). Pro potvrzení této hypotézy by bylo zapotřebí provést měření v kombinaci s FTIR nebo NMR spektroskopii, umožňující náhled do struktury materiálu.

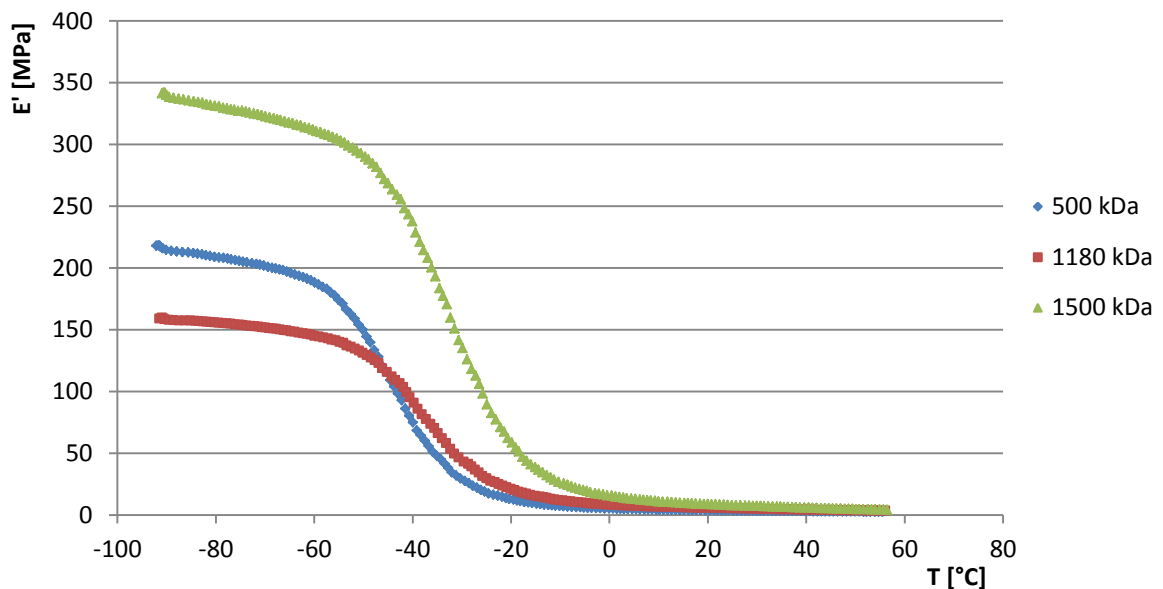


Obr. 81 – Teplotní závislost ztrátového faktoru pro síťovaný vzorek o molekulové hmotnosti 500 kDa

V rámci srovnání teplotních závislostí vzorků o různé molekulové hmotnosti byly tyto podrobeny ohřevu z (-90 °C) na 60 °C. Data souřazového modulu jsou prezentována na Obr. 82. U všech vzorků dochází k poklesu modulu s rostoucí teplotou. Na každé křivce se taktéž vyskytuje výrazná stupňovitá změna, která odpovídá skelnému přechodu. Teplota, kdy dochází ke skelnému přechodu, se liší v závislosti na molekulové hmotnosti vzorku, přičemž počátek i konec této stupňovité změny modulu se posouvá k vyšším teplotám s rostoucí molekulovou hmotností. Pro vzorky o molekulové hmotnosti 500 kDa nastává v rozmezí (-60 °C) a (-30 °C). Pro vzorky o hmotnosti 1180 kDa se tento přechod vyskytuje mezi (-52 °C) a (-25 °C) a pro vzorky o molekulové hmotnosti 1500 kDa mezi (-50 °C) a (-15 °C). Pod teplotou skelného přechodu, se jednotlivé vzorky z hlediska souřazového modulu poměrně liší. Na počátku měření mají nejvyšší modul 340 MPa vzorky o molekulové hmotnosti 1500 kDa a nejnižší modul 160 MPa naopak vzorky o molekulové hmotnosti 1180 kDa. Modul pro vzorky o hmotnosti 500 kDa se nachází mezi nimi. Proto



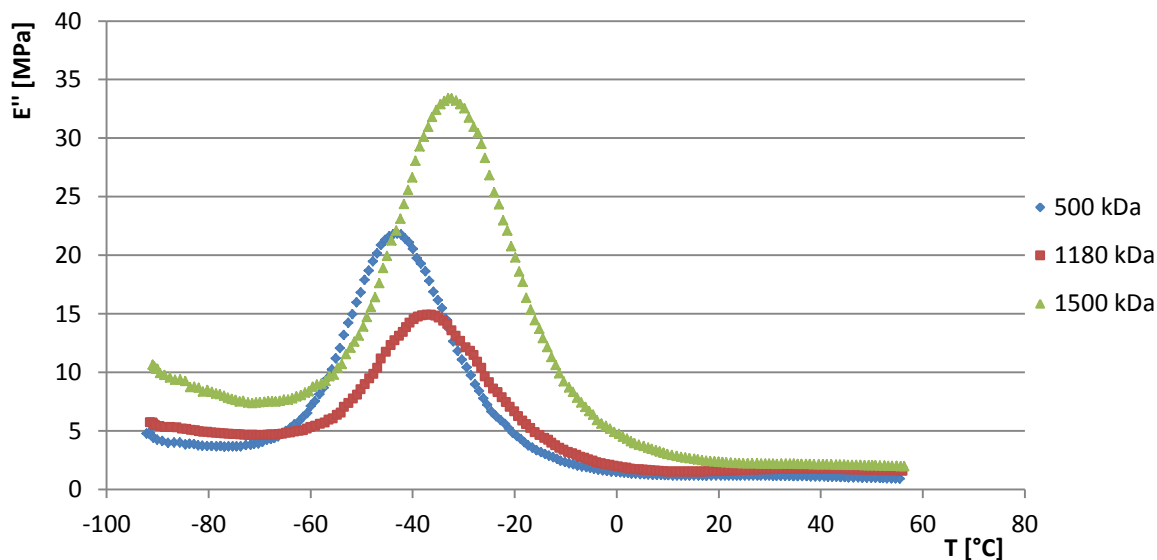
nelze tvrdit, že by existovala přímá korelace mezi délkou řetězce a souřazovým modulem materiálu. Nad teplotou 0 °C pak klesá modul na hodnoty blízké nule a rozdíly mezi jednotlivými vzorky jsou zde nevýznamné.



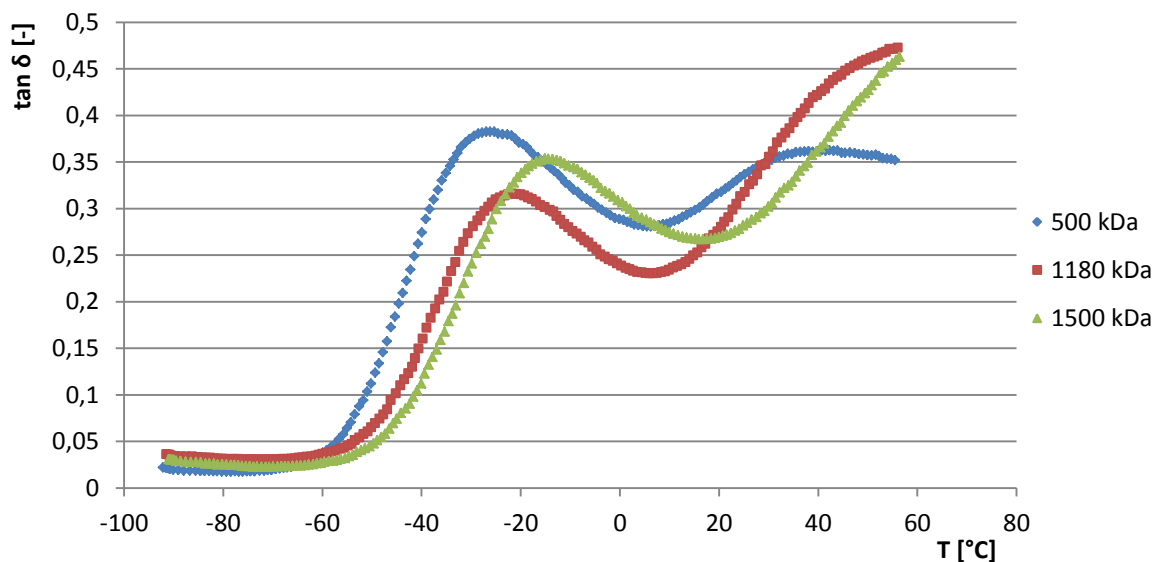
Obr. 82 – Teplotní závislost souřazového modulu síťovaných vzorků o různé molekulové hmotnosti

Data ztrátového modulu jsou prezentována na Obr. 83 a data ztrátového faktoru na Obr. 84. U všech křivek se vyskytuje výrazné relaxační maximum, odpovídající skelnému přechodu. Platí, že tato maxima se posunují k vyšším teplotám zhruba o 5 °C, se zvyšující se molekulovou hmotností jednotlivých vzorků. Taktéž je zde patrný posun těchto pík k vyšším teplotám u křivek ztrátového faktoru. Teplota skelného přechodu vyhodnocená z křivek ztrátového modulu dosahuje hodnot (-45 °C), (-40 °C) a (-35 °C), postupně pro vzorky o molekulové hmotnosti 500, 1180 a 1500 kDa.  $T_g$  vyhodnocená pomocí ztrátového faktoru pak (-29 °C), (-24 °C) a (-18 °C). Z výsledků vyplývá, že pod teplotou skelného přechodu roste ztrátový modul se zvyšující se molekulovou hmotností, přičemž rozdíl mezi nejvyšší a nejnižší hodnotou nepřekračuje 6 MPa. Nad teplotou 20 °C klesá ztrátový modul všech vzorků na hodnotu blízkou nule a rozdíl mezi nimi je zanedbatelný. Z hlediska ztrátového faktoru se pod  $T_g$  materiály vzájemně příliš neliší. Nad skelným přechodem se u vzorku o molekulové hmotnosti 500 kDa vyskytuje další relaxační maximum. Počáteční náběh tohoto maxima je patrný i u ostatních vzorků. Vyplývá, že se tento pík posouvá k vyšším teplotám spolu s rostoucí molekulovou hmotností. Z toho lze usoudit, že toto

vysokoteplotní maximum je spíše spojeno s uvolňováním pohybu velkých úseků a změnou konformací řetězce než s uvolňováním volné vody. Jak již bylo zmíněno, pro potvrzení této hypotézy by bylo zapotřebí měření s náhledem na strukturu materiálu.



Obr. 83 – Teplotní závislost ztrátového modulu síťovaných vzorků o různé molekulové hmotnosti



Obr. 84 – Teplotní závislost ztrátového faktoru síťovaných vzorků o různé molekulové hmotnosti

Závěrem lze tedy říci, že teplota skelného přechodu síťovaných fólií hyaluronanu vykazuje přímou závislost na molekulové hmotnosti daného vzorku a roste se zvyšující se molekulovou hmotností. Vliv délky řetězce na souřazový modul materiálu je výrazný

zejména pod teplotou skelného přechodu a nad touto teplotou vliv molekulové hmotnosti není významný. Obdobně je tomu i z hlediska ztrátového modulu materiálu, kdy tento roste spolu s molekulovou hmotností, zejména v oblasti skelného přechodu. Při vyšších teplotách jsou rozdíly jednotlivých materiálů velmi malé. V rámci mechanického tlumení je pak situace odlišná. Pod teplotou skelného přechodu se od sebe materiály příliš neliší, ale nad tímto přechodem vykazují materiály značné rozdíly.

### 6.1.3 Vzájemné srovnání síťovaných a nesíťovaných fólií

V rámci srovnání síťovaných a nesíťovaných fólií je patrný výrazný rozdíl mezi oběma typy materiálu. U nesíťovaných vzorků lze dobře detekovat  $\beta$  přechod, který se na křivkách soufázového modulu vyskytuje jako stupňovitá změna. Na křivkách ztrátového modulu a ztrátového faktoru se pak vyskytuje jako první relaxační maximum s výrazným nízkoteplotním píkem. U síťovaných vzorků se na křivce soufázového modulu vyskytuje pokles hodnot, který je patrně součástí tohoto přechodu. Jeho výskyt byl skutečně zaznamenán jako první relaxační maximum na křivkách ztrátového faktoru při vytváření optimální metody, při nastavení amplitudy výchylky 3  $\mu\text{m}$  (viz. Obr. 40). V případě síťovaného materiálu je však tento pík mnohem méně výrazný. To je patrně dáno právě síťovacím procesem.  $\beta$  přechod se spojuje s uvolněním pohybu bočních substituentů řetězce. U síťovaných materiálů je značná část těchto substituentů využita k vytvoření vazeb mezi řetězci. Vzniklé vazby zabraňují pohybu těchto substituentů, a proto zde může být  $\beta$  přechod méně výrazný než u nesíťovaných materiálů. Naopak skelný přechod je mnohem výraznější u síťovaných materiálů. Lze jej dobře detekovat jak na křivkách soufázového modulu, tak i na křivkách ztrátového modulu a faktoru. U nesíťovaných materiálů se na křivkách soufázového modulu tento přechod vyskytuje jen u některých vzorků. Na křivkách ztrátového modulu a ztrátového faktoru se pak vyskytuje jako druhý relaxační pík u všech vzorků, avšak je mnohem méně výrazný než v případě síťovaných materiálů. Tento rozdíl může být spojen s tím, že v případě nesíťovaných materiálů je pohyb segmentů hlavního řetězce více omezen pevnou terciární strukturou, čemuž nasvědčují vysoké hodnoty soufázového modulu nesíťovaných vzorků. Z výsledků taktéž vyplývá, že u síťovaných materiálů dochází k posuvu teploty skelného přechodu do nižších teplot. To je patrně dáno větším obsahem vázané a volné vody v síťovaných materiálech. Ty obecně dokáží pojmout větší množství vody. K obdobným závěrům dospěli i jiní vědečtí pracovníci [46, 47, 54], kteří udávají, že se zvyšujícím se obsahem vody dochází k poklesu teploty skelného přechodu. Bylo také zjištěno, že u síťovaných vzorků je skelný přechod více ovlivněn molekulovou

hmotností vzorku, než v případě nesíťovaných materiálů, kde se  $T_g$  v závislosti na molekulové hmotnosti materiálu téměř neliší.

V rámci srovnání absolutních hodnot modulů je taktéž patrný vliv síťování na mechanické vlastnosti fólií hyaluronanu. Síťované materiály jsou mnohem více poddajné. Rozdíl mezi soufázovým modulem síťovaných a nesíťovaných vzorků dosahuje dvou až tří řádů. To je patrně dáno mnohem vyšším obsahem vázané i volné vody u síťovaných materiálů. Tomu nasvědčuje i fakt, že tyto vzorky měly mnohem větší tloušťku, která se oproti nesíťovaným vzorkům lišila až o jeden řád. Bylo také zjištěno, že soufázový modul síťovaných vzorků klesá za vyšších teplot téměř k nulovým hodnotám, zatímco modul nesíťovaných vzorků dosahuje několika tisíců MPa. Nesíťované materiály jsou tedy použitelné z hlediska mechanických vlastností i za vyšších teplot. U obou typů materiálu je taktéž patrný vliv molekulové hmotnosti na jejich soufázový modul. Pro síťované vzorky je vliv molekulové hmotnosti výrazný zejména v oblasti pod teplotou skelného přechodu a při teplotách nad  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  není významný. U nesíťovaného materiálu, se vliv molekulové hmotnosti na soufázový modul vzorku s rostoucí teplotou sice snižuje, přesto je však patrný i za vyšších teplot.

Ztrátový modul se u obou typů materiálu liší v rozmezí jednoho až dvou řádů, přičemž vyšší modul mají nesíťované vzorky. V obou případech je vliv molekulové hmotnosti na ztrátový modul velmi malý v celém rozsahu měření. Z výsledků taktéž vyplývá, že nesíťované materiály vykazují mnohem nižší mechanické tlumení, jelikož ztrátový faktor nepřesahuje hodnotu 0,1 v celém teplotním intervalu. Síťované vzorky vykazují vysoké mechanické tlumení, zejména nad skelným přechodem dosahuje ztrátový faktor hodnoty téměř 0,5. Za vyšších teplot se tedy u síťovaných materiálů ztrácí mnohem větší množství vložené energie, než u vzorků nesíťovaných.

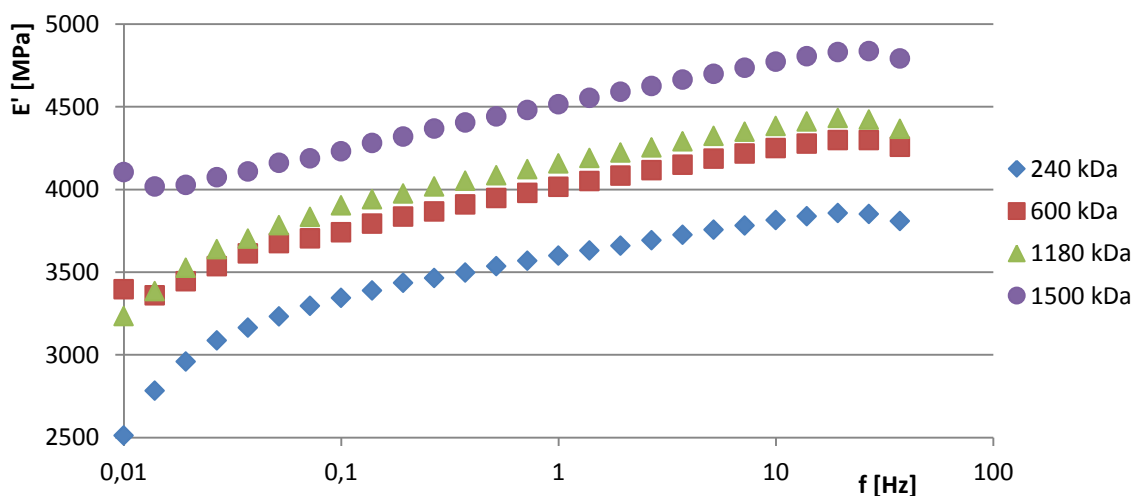
## 6.2 Frekvenční závislosti

U frekvenčních závislostí byla provedena měření v rozsahu od 0,01 Hz do 200 Hz. Pro kvalitnější zhodnocení výsledků jsou zde uvedeny data pouze do 37 Hz, jelikož nad touto frekvencí docházelo k rezonanci. Měření byla provedena při teplotách 25, 30, 37 a 45 °C, aby mohl být hodnocen vliv teploty na mechanické vlastnosti materiálu.

### 6.2.1 Nesít'ované fólie

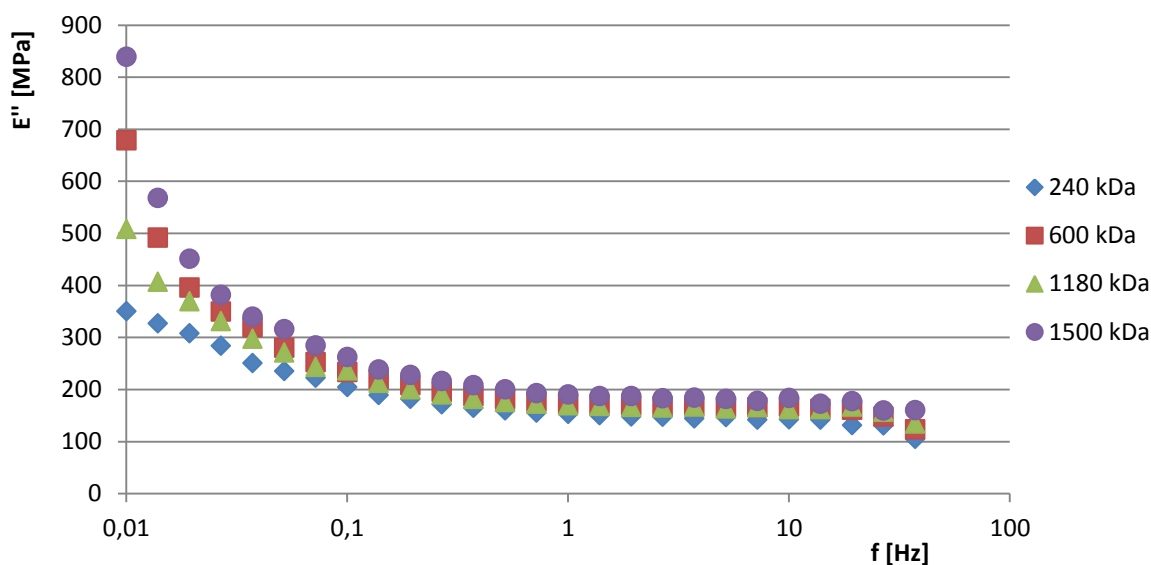
Nesít'ované vzorky byly podrobeny dynamickému namáhání v daném frekvenčním rozsahu, při nastavení amplitudy síly 1 N. Všechna měření byla provedena u 3 jednotlivých vzorků a výsledné závislosti byly sestrojeny pomocí průměrných hodnot.

Srovnání souřazového modulu, v rámci vzorků o různé molekulové hmotnosti, je prezentováno na Obr. 85. Je patrné, že skoro v celém frekvenčním rozsahu roste hodnota modulu se zvyšující se frekvencí téměř lineárně. To je dáno tím, že čím vyšší je zatěžovací frekvence, tím méně času mají řetězce k reakci na vyvozené napětí. Reakce materiálu se tak opožďuje a ten se pak jeví jako více tuhý. Na počátku měření při nízkých frekvencích je růst modulu prudší u vzorků o molekulové hmotnosti 240 a 1180 kDa. Při vyšších frekvencích, nad 20 Hz, se pak u všech vzorků vyskytuje mírný pokles souřazového modulu. To je patrně způsobeno nástupem rezonančního efektu, který při těchto frekvencích ještě není příliš výrazný. Z výsledků taktéž vyplývá, že u nesít'ovaných vzorků existuje přímá závislost mezi souřazovým modulem a molekulovou hmotností vzorku. Tento roste se zvyšující se molekulovou hmotností materiálu.

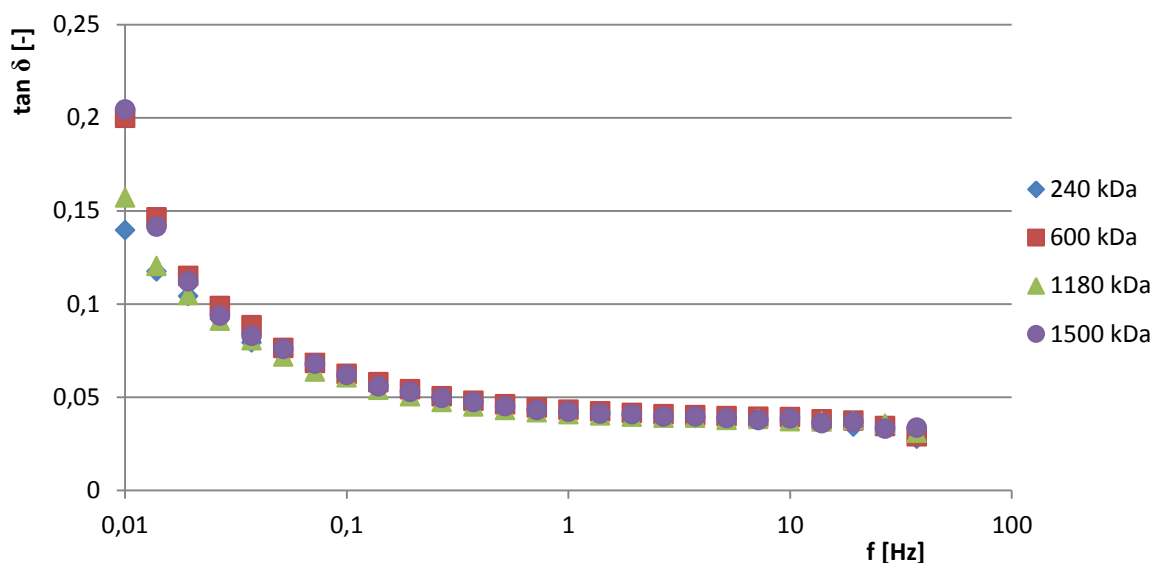


Obr. 85 – Frekvenční závislost souřazového modulu nesít'ovaných vzorků o různé molekulové hmotnosti při teplotě 25 °C

Srovnání ztrátového modulu resp. ztrátového faktoru, v rámci vzorků o různé molekulové hmotnosti, je prezentováno na Obr. 86 resp. na Obr. 87. Získané závislosti mají v obou případech obdobný tvar. S rostoucí frekvencí dochází k poklesu naměřených hodnot, přičemž tento pokles má exponenciální charakter. Křivky ztrátového modulu vykazují vyšší závislost na molekulové hmotnosti vzorku převážně u nízkých frekvencí na počátku měření. Zde dosahují rozdíly mezi jednotlivými vzorky 150 až 200 MPa. Tento rozdíl se dále snižuje a u vyšších frekvencí již nepřesahuje hodnotu několika desítek MPa. Obdobně je tomu i u křivek ztrátového faktoru. Jednotlivé vzorky se z hlediska  $\tan \delta$  liší výrazněji jen u prvních dvou frekvencí 0,01 a 0,014 Hz. Nejnižšího ztrátového faktoru zde dosahují vzorky o molekulové hmotnosti 240 kDa a nejvyššího pak vzorky o molekulové hmotnosti 1500 kDa. Je zajímavé, že hodnoty ztrátového modulu a ztrátového faktoru nevykazují jednoznačnou závislost mezi molekulovou hmotností vzorků, jako tomu bylo v případě souřezového modulu.

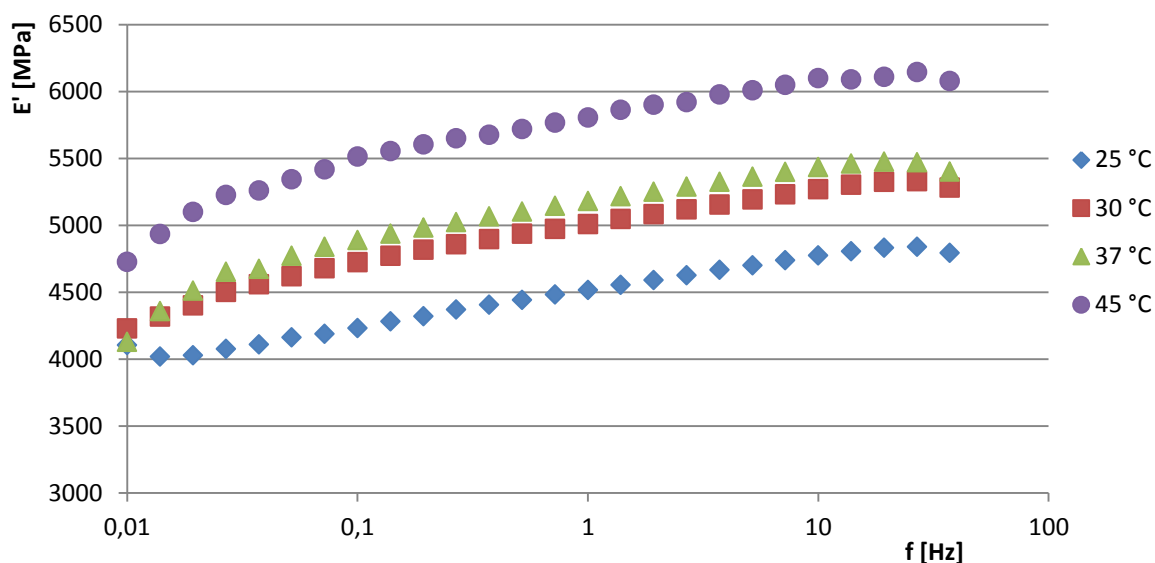


Obr. 86 – Frekvenční závislost ztrátového modulu nesíťovaných vzorků o různé molekulové hmotnosti při 25 °C



Obr. 87 – Frekvenční závislost ztrátového faktoru nesíťovaných vzorků o různé molekulové hmotnosti při 25 °C

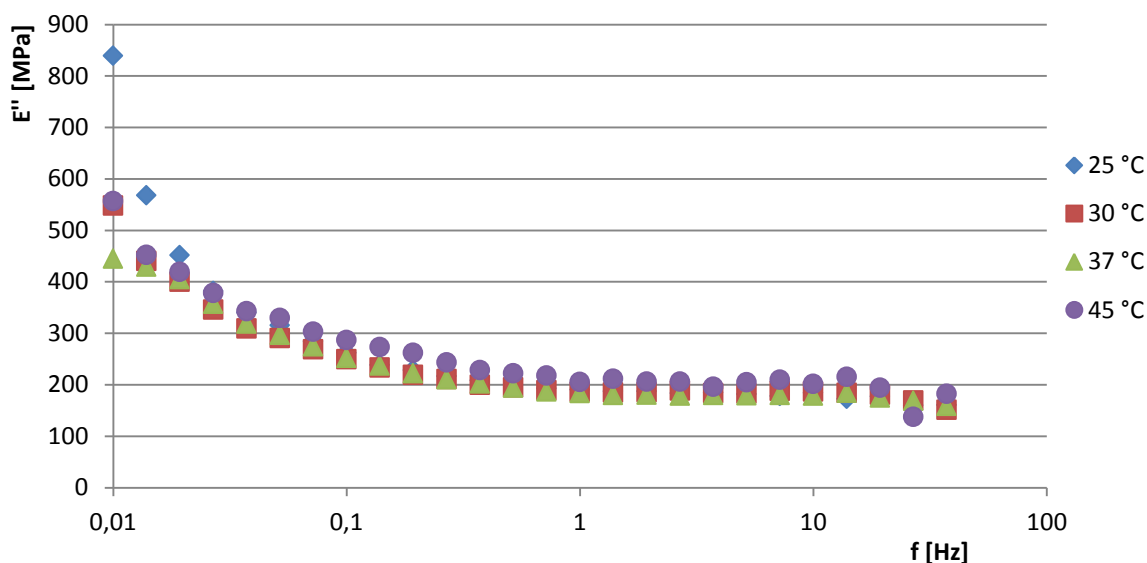
Vliv teploty na mechanické vlastnosti materiálu byl hodnocen u vzorků o molekulové hmotnosti 1500 kDa. Data soufázového modulu jsou prezentována na Obr. 88. Při laboratorní teplotě je nárůst soufázového modulu téměř lineární v celém frekvenčním rozsahu. Za vyšších teplot se při nízkých frekvencích vyskytuje prudší nárůst modulu. Od frekvence 0,027 Hz však i tyto křivky vykazují téměř lineární charakter. Při vyšších frekvencích, nad 20 Hz, se opět vyskytuje mírný pokles modulu způsobený patrně nástupem rezonančního efektu. Jak je vidět, při měření frekvenčních závislostí dochází s růstem teploty ke zvýšení hodnot soufázového modulu, zvláště u frekvencí nad 0,027 Hz. Toto zjištění je zajímavé, jelikož v rámci měření teplotních závislostí docházelo k poklesu soufázového modulu s rostoucí teplotou. Nárůst soufázového modulu se zvyšující se teplotou v rámci frekvenčních závislostí uvádí i Iannace [49], který spojuje tento růst se ztrátou vody obsažené v materiálu.



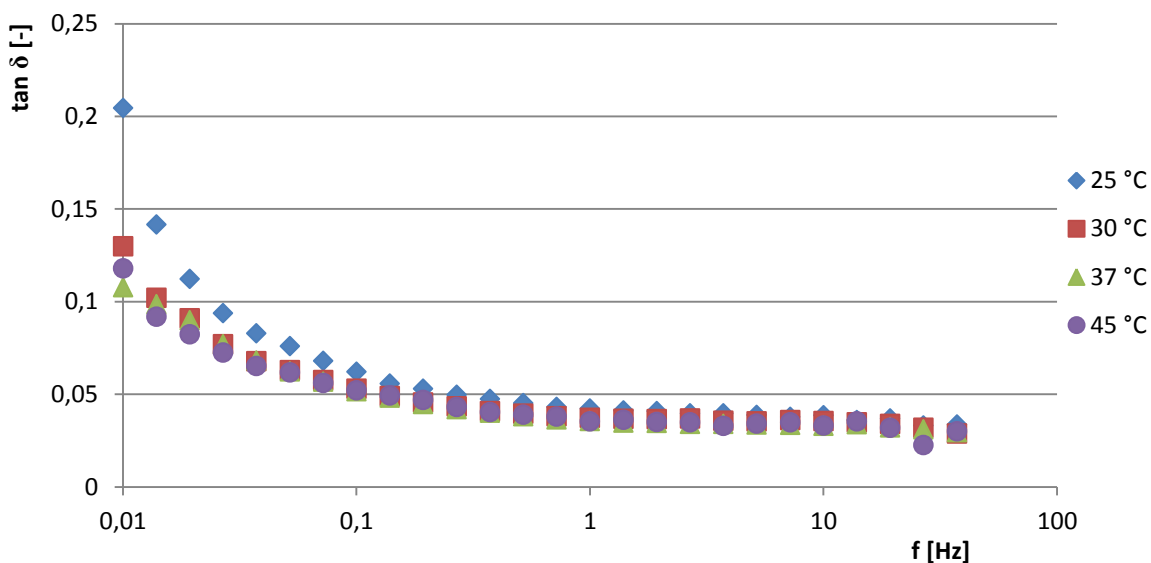
Obr. 88 – Frekvenční závislost souřazového modulu nesíťovaných vzorků o molekulové hmotnosti 1500 kDa při různých teplotách

Data ztrátového modulu jsou prezentována na Obr. 89 a data ztrátového faktoru na Obr. 90. Získané závislosti mají v obou případech obdobný tvar. S rostoucí frekvencí dochází k poklesu naměřených hodnot, přičemž tento pokles má exponenciální charakter. Křivky ztrátového modulu vykazují výraznější závislost na teplotě pouze u nižších frekvencí. Modul zde dosahuje nejvyšších hodnot při teplotě 25 °C. Nejnižší ztrátový modul pak vykazují vzorky měřené při 37 °C. Rozdíl mezi nimi je zhruba 400 MPa a s rostoucí frekvencí se rychle snižuje. U frekvenčních závislostí ztrátového faktoru je situace obdobná. Nad frekvencí 1 Hz je vliv teploty na  $\tan \delta$  jen nepatrný a rozdíl mezi jeho hodnotami dosahuje maximálně několika tisícin. Pod touto frekvencí je vliv teploty výraznější, zejména u teploty 25 °C. Ztráty energie v materiálu jsou tedy výrazněji ovlivněny jeho teplotou pouze v oblasti velmi nízkých frekvencí a za vyšších frekvencí vliv teploty téměř zaniká.





Obr. 89 – Frekvenční závislost ztrátového modulu nesíťovaných vzorků o molekulové hmotnosti 1500 kDa při různých teplotách



Obr. 90 – Frekvenční závislost ztrátového faktoru nesíťovaných vzorků o molekulové hmotnosti 1500 kDa při různých teplotách

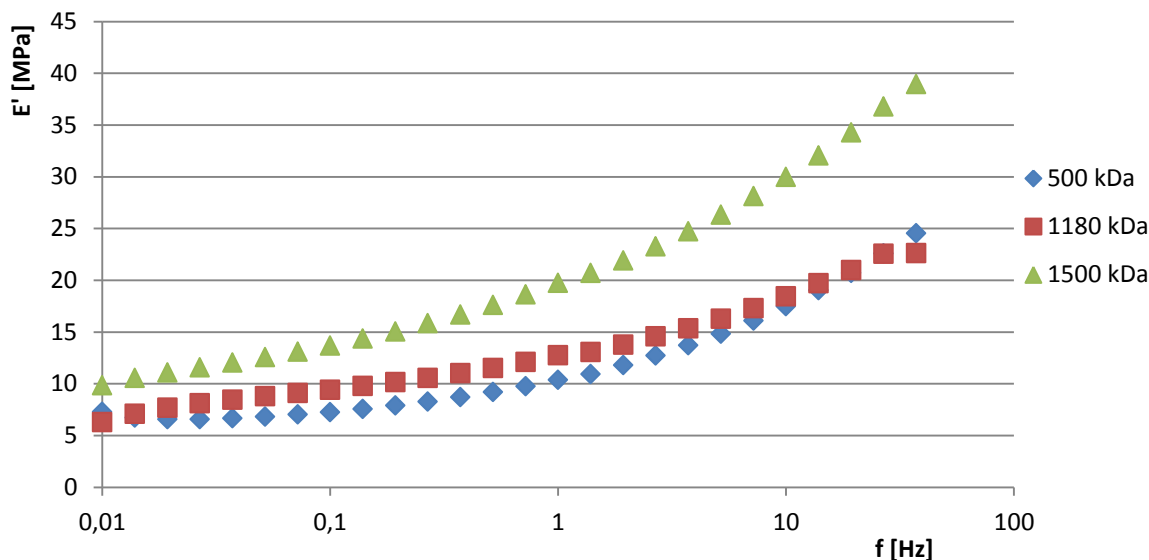
Závěrem lze říci, že tuhost nesíťovaných fólií hyaluronanu, temperovaných při určité teplotě, se zvyšuje s rostoucí zatěžovací frekvencí. Naopak ztrátový modul a mechanické tlumení materiálu se s rostoucí frekvencí snižují. Z hlediska molekulové hmotnosti bylo zjištěno, že s jejím růstem dochází ke zvyšování elastického modulu materiálu a tedy i jeho tuhosti. Ztrátový modul a ztrátový faktor jsou ovlivněny molekulovou hmotností materiálu

pouze v oblasti velmi nízkých frekvencí, přičemž nebyla prokázána jednoznačná závislost molekulové hmotnosti na tyto vlastnosti. Z hlediska odlišné teploty, na kterou byly zkušební vzorky temperovány, bylo zjištěno, že hodnota soufázového modulu roste spolu se zvyšující se teplotou, vlivem snižujícího se obsahu vody v materiálu [49]. Ztrátový modul a ztrátový faktor byly teplotou výrazněji ovlivněny pouze v oblasti nízkých frekvencí, přičemž opět nebyla prokázána přímá korelace mezi teplotou a ztrátami energie v materiálu.

### 6.2.2 Sít'ované fólie

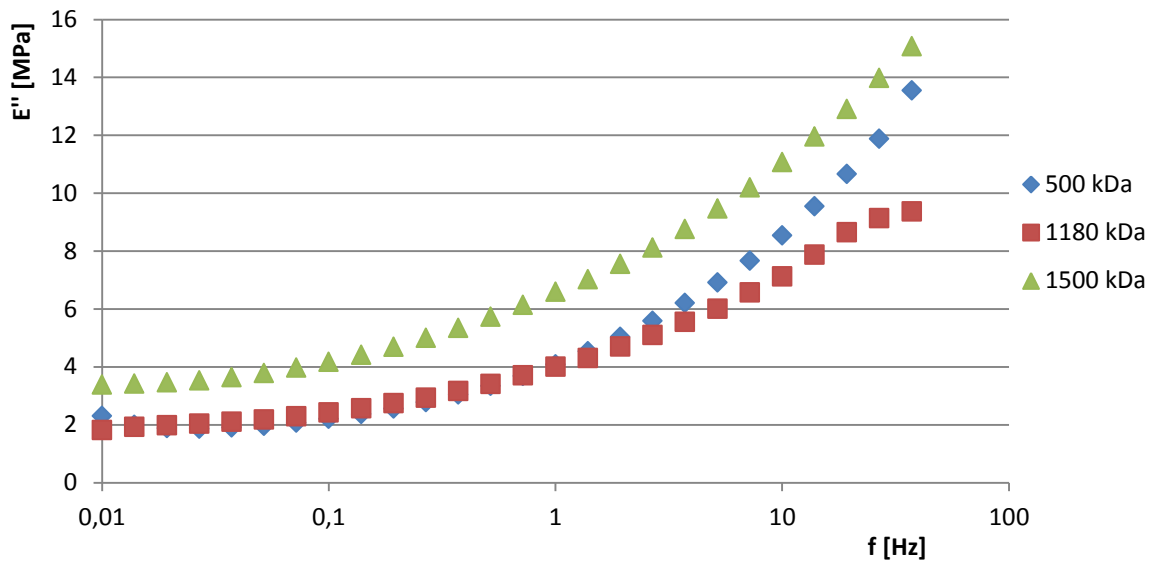
Sít'ované vzorky byly podrobeny dynamickému namáhání v daném frekvenčním rozsahu, při nastavení amplitudy výchylky 20  $\mu\text{m}$ . Všechna měření byla provedena u 2 jednotlivých vzorků a výsledné závislosti byly sestrojeny pomocí průměrných hodnot.

Srovnání soufázového modulu, v rámci sít'ovaných vzorků o různé molekulové hmotnosti, je prezentováno na Obr. 91. Je patrné, že hodnota modulu roste spolu se zvyšující se frekvencí v celém frekvenčním rozsahu, přičemž tento nárůst má exponenciální charakter. To může být opět spojeno s tím, že segmenty řetězce nestíhají dostatečně rychle reagovat na změnu napětí a materiál tak při vyšší frekvenci vykazuje větší tuhost. Získané křivky vykazují přímou závislost mezi molekulovou hmotností vzorku a soufázovým modulem. Se zvyšující se molekulovou hmotností rostou hodnoty modulu. Tento efekt je výrazný zejména u vzorků o molekulové hmotnosti 1500 kDa. Na počátku měření dosahuje rozdíl jeho modulu oproti ostatním vzorkům pouze 4 MPa, avšak s rostoucí frekvencí se tento rozdíl zvyšuje až na konečných 15 MPa. Pro vzorky o molekulové hmotnosti 500 a 1180 kDa je rozdíl mezi moduly patrný zejména mezi 0,02 a 10 Hz. I v této oblasti však dosahuje maximálně 3 MPa. Nad i pod tímto intervalem jsou rozdíly v soufázových modulech těchto vzorků zanedbatelné.

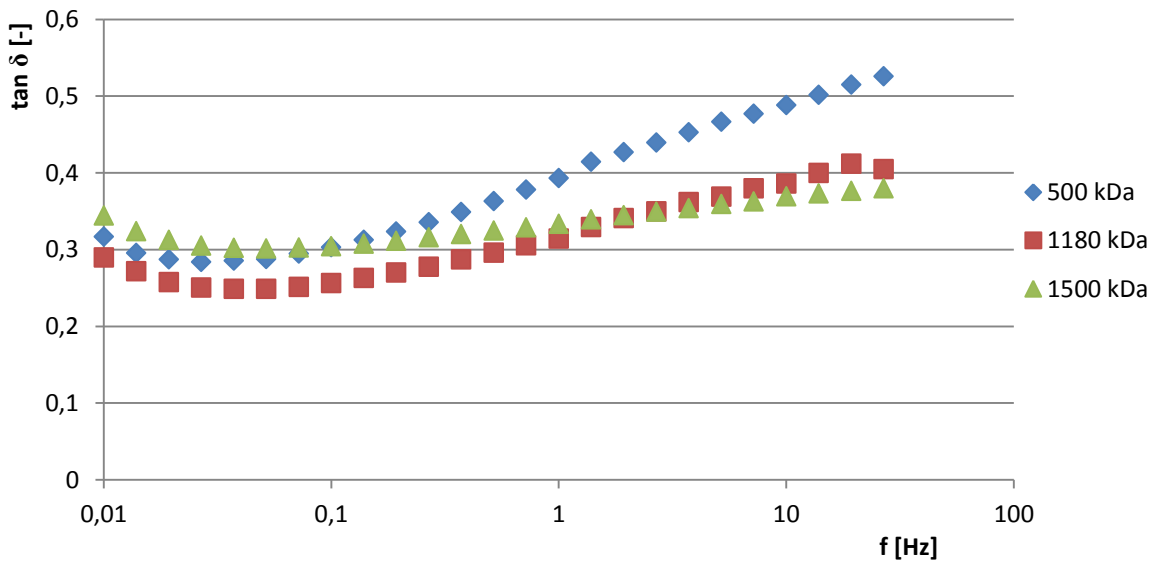


Obr. 91 – Frekvenční závislost soufázového modulu síťovaných vzorků o různé molekulové hmotnosti při teplotě 25 °C

Data ztrátového modulu jsou prezentována na Obr. 92 a data ztrátového faktoru na Obr. 93. V případě ztrátového modulu dochází v celém frekvenčním rozsahu ke zvyšování modulu spolu se zvyšující se frekvencí. Nárůst ztrátového modulu má exponenciální charakter. To může být spojeno s blížící se rezonanční frekvencí HA sítě, kdy materiál přechází z elasticky poddajného do elasticky tuhého stavu. Závislost mezi ztrátovým modulem a molekulovou hmotností vzorku opět výrazná zejména při nižších frekvencích, u vzorků o molekulové hmotnosti 1500 kDa. Téměř nulový rozdíl ve ztrátovém modulem vykazují vzorky o molekulové hmotnosti 500 a 1180 kDa, až do frekvence 2,7 Hz. Nad touto frekvencí dochází k vyššímu nárůstu modulu u vzorků o molekulové hmotnosti 500 kDa a jeho hodnoty se začínají přibližovat hodnotám ztrátového modulu náležícím vzorkům o molekulové hmotnosti 1500 kDa. U závislosti ztrátového faktoru dochází od počátku měření nejprve k jeho poklesu, až do frekvence 0,025 Hz. S dalším zvyšováním frekvence pak ztrátový faktor roste téměř lineárně u všech vzorků, až do konečné frekvence 27 Hz. Frekvenční závislosti ztrátového faktoru nevykazují přímou korelaci s molekulovou hmotností materiálu. V oblasti nízkých frekvencí se od sebe vzorky liší jen nepatrně, kdy rozdíl  $\tan \delta$  dosahuje maximálně několika setin. Výrazněji se odlišují vzorky o molekulové hmotnosti 500 kDa až při vyšších frekvencích.



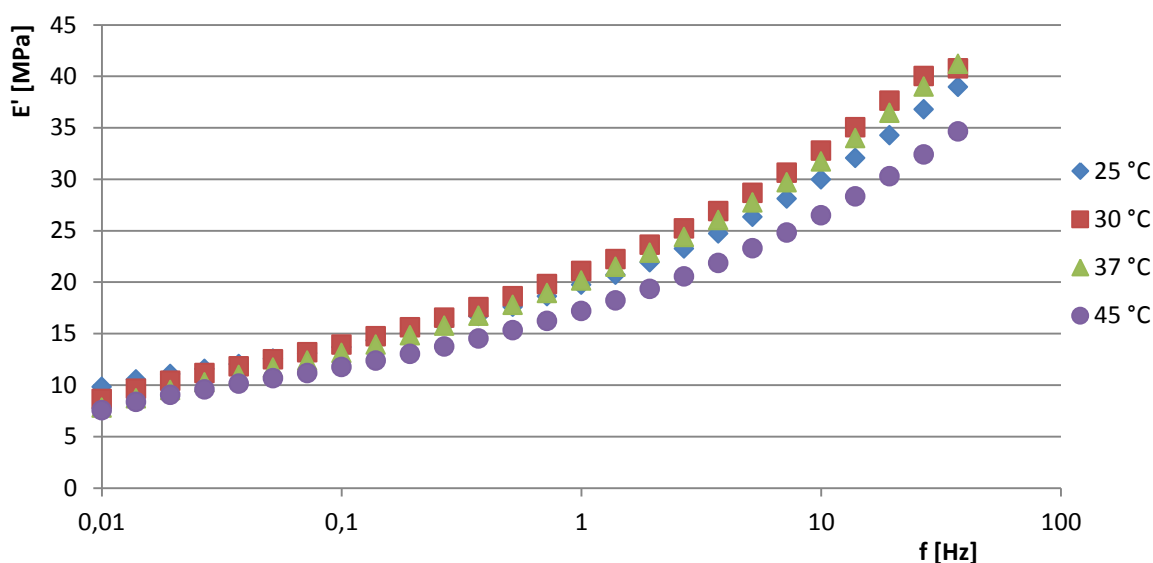
Obr. 92 – Frekvenční závislost ztrátového modulu síťovaných vzorků o různé molekulové hmotnosti při 25 °C



Obr. 93 – Frekvenční závislost ztrátového faktoru síťovaných vzorků o různé molekulové hmotnosti při 25 °C

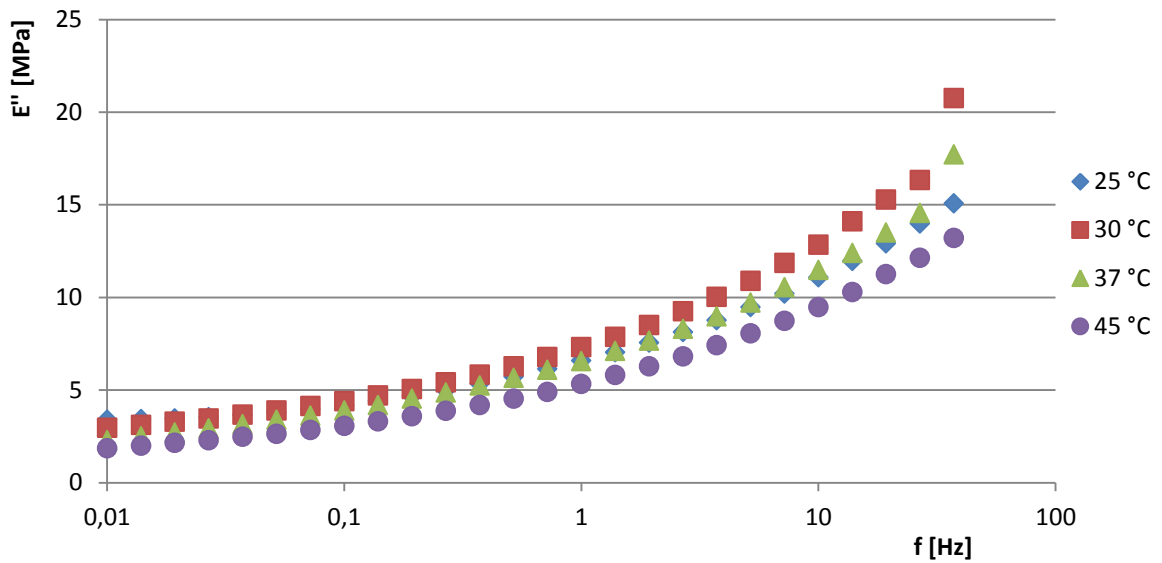
Vlivu teploty na mechanické vlastnosti síťovaného materiálu byl hodnocen u vzorků o molekulové hmotnosti 1500 kDa. Data soufázového modulu jsou prezentována na Obr. 94. Opět platí, že s rostoucí frekvencí dochází ke zvyšování soufázového modulu, přičemž tento nárůst má exponenciální charakter. Do frekvence 0,1 Hz se hodnoty soufázového modulu vzorků, měřených při různých teplotách, liší jen velmi málo v rozmezí jednotek MPa. Se zvyšující se frekvencí se rozdíly v modulech postupně zvyšují, avšak

stále nepřesahují hodnotu několika jednotek MPa. Získané závislosti vykazují přímou korelaci mezi teplotou a souřazovým modulem pouze do frekvence 0,027 Hz. Do této frekvence se modul snižuje s rostoucí teplotou. Nad touto frekvencí již tato závislost neplatí. U vyšších frekvencí byly naměřeny nejnižší hodnoty modulu při teplotě 45 °C. Nejvyšší modul byl pak naměřen při teplotě 30 °C. Získané výsledky tedy plně nekorespondují s výsledky získanými pomocí měření teplotních závislostí, kdy nad teplotou skelného přechodu docházelo k mírnému, ale stálému, poklesu souřazového modulu s rostoucí teplotou.

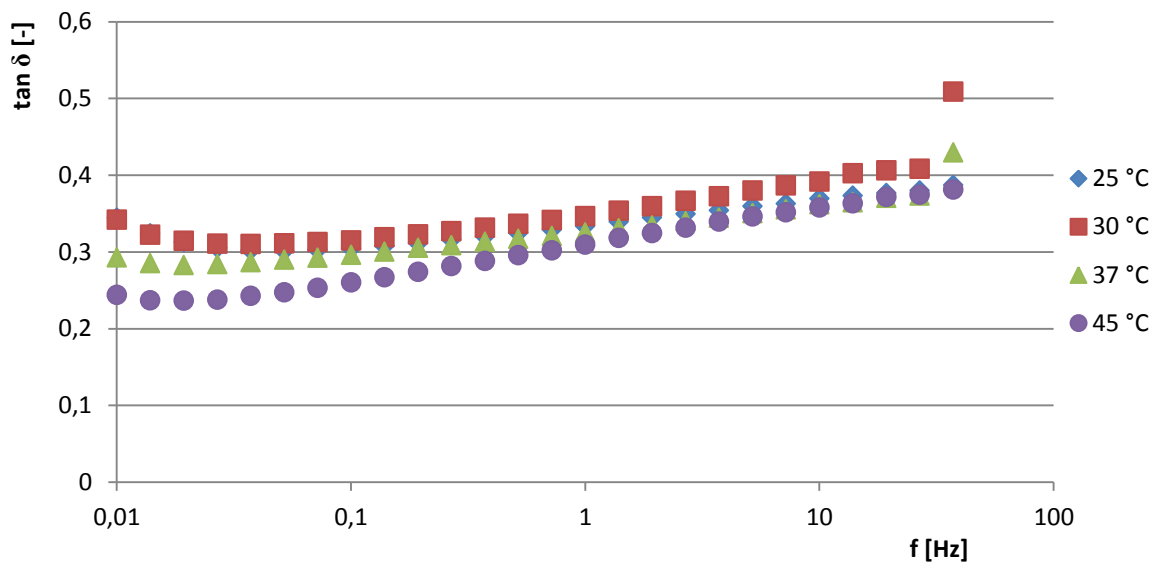


Obr. 94 – Frekvenční závislost souřazového modulu síťovaných vzorků o molekulové hmotnosti 1500 kDa při různých teplotách

Data ztrátového modulu jsou prezentována na Obr. 95 a data ztrátového faktoru na Obr. 96. Při všech teplotách, dochází k exponenciálnímu růstu ztrátového modulu spolu se zvyšující se frekvencí. U nízkých frekvencí jsou rozdíly modulu při různých teplotách jen malé a dosahují maximálně jednoho MPa. Se zvyšováním frekvence se zvyšuje i rozdíl v modulech mezi jednotlivými teplotami, avšak stále nepřesahují hranici několika jednotek MPa. Přímá korelace ztrátového modulu a teploty je výrazná v rozmezí 30 až 45 °C, zejména v oblasti vyšších frekvencí, kdy se modul snižuje s rostoucí teplotou. V rámci ztrátového faktoru opět dochází na počátku měření k jeho poklesu, až do frekvence 0,02 Hz. S dalším zvyšováním frekvence pak roste ztrátový faktor téměř lineárně. V případě  $\tan \delta$  platí, že rozdíly mezi jednotlivými teplotami jsou nejvíce výrazné zejména v oblasti nízkých frekvencí a s rostoucí frekvencí se tyto rozdíly snižují. Taktéž platí, že ztrátový faktor klesá spolu s rostoucí teplotou, pouze u nízkých frekvencí do 0,02 Hz.



Obr. 95 – Frekvenční závislost ztrátového modulu síťovaných vzorků o molekulové hmotnosti 1500 kDa při různých teplotách



Obr. 96 – Frekvenční závislost ztrátového faktoru síťovaných vzorků o molekulové hmotnosti 1500 kDa při různých teplotách

Závěrem lze říci, že tuhost síťovaných fólií hyaluronanu, temperovaných při určité teplotě, se zvyšuje s rostoucí frekvencí zatěžování. Stejně tak ztrátový modul materiálu se s rostoucí frekvencí zvyšuje. Ztrátový faktor se snižuje při zvyšování frekvence do určité hodnoty, avšak s dalším zvyšováním frekvence již dochází k jeho růstu. Z hlediska molekulové hmotnosti bylo zjištěno, že s jejím růstem dochází ke zvyšování elastického modulu

materiálu a tedy i jeho tuhosti. Ztrátový modul a ztrátový faktor jsou ovlivněny molekulovou hmotností materiálu, přičemž vliv molekulové hmotnosti se projevuje více u vyšších frekvencí. Z hlediska odlišné teploty bylo zjištěno, že její vliv na soufázový a ztrátový modul se výrazněji projevuje až při vyšších frekvencích, přičemž v rozmezí 30 až 45 °C dochází k poklesu obou modulů s rostoucí teplotou [49]. Ztrátový faktor byl teplotou výrazněji ovlivněn pouze v oblasti nízkých frekvencí, přičemž jeho hodnota s rostoucí teplotou klesá.

### 6.2.3 Vzájemné srovnání síťovaných a nesíťovaných fólií

V rámci srovnání frekvenčních závislostí síťovaných a nesíťovaných fólií je patrný výrazný rozdíl mezi oběma typy materiálu. V obou případech dochází k růstu elastického modulu se zvyšující se frekvencí. U síťovaných materiálů má však tento nárůst exponenciální charakter. U obou materiálů byl také pozorován nárůst elastického modulu se zvyšující molekulovou hmotností, přičemž tento jev je výraznější u nesíťovaných fólií. Nesíťované vzorky také vykazují přímou korelaci mezi teplotou a elastickým modulem, přičemž dochází ke zvyšování soufázového modulu s rostoucí teplotou vlivem vylučování vlhkosti z materiálu. U síťovaných vzorků se moduly vzorků při odlišných teplotách liší jen nepatrně. Mezi 25 a 30 °C soufázový modul roste se zvyšující se teplotou a u vyšších teplot se pak snižuje s rostoucí teplotou.

Z hlediska ztrátového modulu mají oba typy materiálu zcela odlišný charakter. Ztrátový modul nesíťovaných fólií klesá se zvyšující se frekvencí, přičemž modul síťovaných fólií roste spolu s rostoucí frekvencí. To může být spojeno s vnitřní strukturou materiálů, kdy řetězce nesíťovaných vzorků stále více neschopují reagovat na dynamické zatěžování a díky tomu s každým dalším cyklem ztrácejí čím dál menší množství energie. U síťovaných vzorků patrně leží rezonanční frekvence sítě v oblasti vyšších frekvencí. To se projevuje právě nárůstem ztrátového modulu, jak se k této frekvenci blížíme. Ani u jednoho materiálu nebyla prokázána přímá korelace mezi molekulovou hmotností a ztrátovým modulem.

V rámci mechanického tlumení materiálu vykazují síťované a nesíťované fólie taktéž odlišné chování. U nesíťovaných vzorků ztrátový faktor klesá spolu s rostoucí frekvencí v celém frekvenčním rozsahu. U síťovaných vzorků dochází při nízkých frekvencích také nejprve k poklesu ztrátového faktoru, ovšem při dalším zvyšování frekvence jeho hodnoty rostou. Ani jeden typ materiálu nevykazuje přímou závislost ztrátového faktoru na molekulové hmotnosti. U nesíťovaných vzorků je vliv molekulové hmotnosti velmi malý a

výrazněji se vyskytuje jen u nízkých frekvencí. U síťovaných vzorků je tento vliv výraznější, přičemž nejvíce se projevuje u vyšších frekvencí. Závislost ztrátového faktoru na teplotě se u síťovaných i nesíťovaných materiálů projevuje zejména u nízkých frekvencí a při vyšších frekvencích již není významná. Obě závislosti vykazují korelaci mezi teplotou a ztrátovým faktorem, právě v oblasti nízkých frekvencí, přičemž hodnoty ztrátového faktoru klesají spolu s rostoucí teplotou.



## ZÁVĚR

V rámci vytváření optimálních metod pro měření dynamické mechanické analýzy bylo zjištěno, že pro síťované a nesíťované fólie hyaluronanu, o dané geometrii zkušebních vzorků, je potřeba odlišného nastavení experimentu. Vhodné nastavení použitých metod se také liší při měření frekvenčních a teplotních závislostí. Pro měření teplotních závislostí nesíťovaných materiálů je výhodné použití amplitudy výchylky 7  $\mu\text{m}$ , u síťovaných materiálů pak použití amplitudy síly 1 N. Vhodná rychlost ohřevu je v obou případech 4 K/min. Pro měření frekvenčních závislostí byla pozorována větší volnost nastavení experimentu. U nesíťovaných materiálů je možno použít amplitudu výchylky 7  $\mu\text{m}$ , případně pak amplitudu síly 1 N. Pro síťované materiály se jako optimální jeví použití amplitudy výchylky v rozmezí 10-20  $\mu\text{m}$ .

V rámci teplotních závislostí bylo zjištěno, že síťování hyaluronanu má výrazný vliv na skelný přechod. U nesíťovaných materiálů se pohybuje v oblasti vyšších teplot v okolí (-15  $^{\circ}\text{C}$ ), u síťovaných materiálů pak v okolí (-45  $^{\circ}\text{C}$ ). Bylo prokázáno, že se  $T_g$  síťovaných fólií posunuje k vyšším teplotám s rostoucí molekulovou hmotností. U nesíťovaných fólií nebyl tento jev prokázán.

U obou typů materiálu dochází k poklesu elastického modulu s rostoucí teplotou. Síťované fólie jsou mnohem poddajnější, jejich souřezový modul je o 2 až 3 řády nižší. Tento rozdíl je důležitý zejména nad skelným přechodem, kde jejich modul klesá k velmi nízkým hodnotám. Naopak nesíťované vzorky si i nad teplotou skelného přechodu zachovávají vysoký elastický modul.

U křivek ztrátového modulu nesíťovaných vzorků bylo kromě skelného přechodu pozorováno i nízkoteplotní relaxační maximum v okolí (-100  $^{\circ}\text{C}$ ), které odpovídá  $\beta$  přechodu. U síťovaných vzorků byl pozorován pouze náznak tohoto píku. Síťované vzorky mají o jeden až dva řády nižší ztrátový modul. Platí, že nad  $T_g$  dochází ke zvyšování ztrátového modulu a faktoru nesíťovaných fólií s rostoucí teplotou, naopak u síťovaných fólií hodnoty modulu i faktoru klesají. Síťované materiály vykazují vyšší mechanické tlumení. Zejména nad teplotou skelného přechodu jsou hodnoty jejich ztrátového faktoru až o jeden řád vyšší. U obou typů materiálu byla pozorována souvislost molekulové hmotnosti a mechanických ztrát.

V rámci frekvenčních závislostí byl pro oba typy materiálu prokázán růst soufázového modulu s rostoucí frekvencí. U nesíťovaných vzorků byl nárůst elastického modulu téměř lineární, naopak u síťovaných vzorků měl exponenciální charakter, což poukazuje na odlišnou strukturu obou materiálů. U frekvenčních závislostí byla pro oba typy materiálu prokázána přímá korelace mezi molekulovou hmotností materiálu a elastickým modulem, přičemž tento roste se zvyšující se molekulovou hmotností vzorku. U nesíťovaných vzorků roste elastický modul se zvyšující se teplotou. U síťovaných vzorků modul roste do 30 °C a s dalším zvyšováním teploty klesá. Z hlediska mechanických ztrát je také patrný vliv síťování. Se zvyšující se frekvencí dochází k poklesu ztrátového modulu nesíťovaných materiálů, u síťovaných materiálů naopak roste. Ztrátový faktor nesíťovaných fólií klesá s rostoucí frekvencí v celém frekvenčním rozsahu. U síťovaných fólií ztrátový faktor nejprve klesá a u vyšších frekvencí dochází k jeho růstu. U obou typů materiálu je vliv molekulové hmotnosti a teploty vzorků na ztrátový modul a ztrátový faktor poměrně nevýznamný.

Závěrem lze tedy říci, že síťování hyaluronanu výrazně mění charakter tohoto materiálu a má značný vliv na jeho chování při dynamickém mechanickém namáhání. Chemické modifikace tedy nabízí možný způsob změny mechanických i termických vlastností hyaluronanu, které tak mohou být upraveny podle požadavků na jeho plánované aplikace.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] GRÜNDELOVÁ, Lenka. *Stabilita a chování hyaluronanu v roztocích pro technologii výroby farmaceutických přípravků*. Disertační práce. Zlín: UTB, Fakulta technologická. 2014
- [2] SLÍVA, Jiří a Juraj MINÁRIK. Hyaluronát – nejen pasivní pozorovatel, nýbrž aktivní modulátor imunitních reakcí. *New EU Magazine of Medicine*. 2009, roč. 1, č. 2, s. 75-79.
- [3] KENDALL, F. E., M. HEIDELBERGER a M. H. DAWSON. A serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strains of group A hemolytic streptococcus. *J Biol Chem*. 1937, vol. 118, p. 61-69
- [4] NEČAS, J., L. BARTOŠÍKOVÁ, P. BRAUNER a J. KOLÁR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinary medicine*. 2008, vol. 8, p. 61-69.
- [5] PLATT, Virginia M. a Francis C. SZOKA. Anticancer Therapeutics: Targeting Macromolecules and Nanocarriers to Hyaluronan or CD44, a Hyaluronan Receptor. *Molecular Pharmaceutics* [online]. 2008, vol. 5(4), p. 474-486 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1021/mp800024g.
- [6] BROWN, M. B., a S. A. JONES. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* [online]. 2005, vol. 19(3), p. 308-318 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.1111/j.1468-3083.2004.01180.x.
- [7] KOGAN, Grigorij, Ladislav ŠOLTÉS, Robert STERN a Peter GEMEINER. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters* [online]. 2006, vol. 29(1), p. 17-25 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.1007/s10529-006-9219-z
- [8] LONGAS, O. M. Hyaluronan in Aging. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*, edit. Garg H. and Hales C., Elsevier Ltd., 2004, p. 351-366.
- [9] DEANGELIS, P. L. Hyaluronan synthases: fascinating glycosyltransferases from vertebrates, bacterial pathogens, and algal viruses. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* [online]. 1999, vol. 56(7-8), p. 670-682 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.1007/s000180050461.

- [10] BALAZS, E. A. (1979). Ultrapure hyaluronic acid and the use thereof. US Patent, 4141973.
- [11] LAPČÍK, L. Jr., M. BOHDANECKÝ, L. LAPČÍK a D. BAKOŠ. Kyselina hyaluronová – příprava, struktúra, vlastnosti, aplikácia. *Chemické Listy* 85, 1991, str. 281-299.
- [12] BOERIU, Carmen G., Jan SPRINGER, Floor K. KOOY, Lambertus A. M. VAN DEN BROEK a Gerrit EGGINK. Production Methods for Hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry* [online]. 2013, p. 1-14 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.1155/2013/624967.
- [13] SCHIRALDI, Chiara, Annalisa LA a Mario DE. Biotechnological Production and Application of Hyaluronan. *Biopolymers* [online]. Sciyo, 2010 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.5772/10271
- [14] LIU, Long, Yanfeng LIU, Jianghua LI, Guocheng DU a Jian CHEN. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microbial Cell Factories* [online]. 2011, vol. 10(1), p. 99 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.1186/1475-2859-10-99.
- [15] COWMAN, Mary K. a Shiro MATSUOKA. Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate Research* [online]. 2005, vol. 340(5), p. 791-809 [cit. 2017-04-04]. DOI: 10.1016/j.carres.2005.01.022.
- [16] HASCALL, C. V. a Torvard C. LAURENT. Hyaluronan: structure and physical properties. *Glycoforum*. 1977, p. 1-5. (Dostupné z <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>).
- [17] SCOTT, J. E., Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solutions. Some biological consequences. 1998, p. 1-10. (Dostupné z <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>).
- [18] HEATLEY, F. a J. E. SCOTT. A water molecule participates in the secondary structure of hyaluronan. *Biochemical Journal*. 1988, vol. 254, p. 489-493
- [19] BLUNDELL, Charles D., Paul L. DEANGELIS a Andrew ALMOND. Hyaluronan: the absence of amide–carboxylate hydrogen bonds and the chain conformation in aqueous solution are incompatible with stable secondary and tertiary structure models. *Biochemical Journal* [online]. 2006, vol. 396(3), p. 487-498 [cit. 2017-04-05]. DOI: 10.1042/BJ20060085.

- [20] VELEBNÝ, Vladimír. *Hyaluronan - biopolymer pro tkáňové inženýrství*. Brno: VUTIUM, 2012. Vědecké spisy Vysokého učení technického v Brně. Habilitační a inaugurační spisy. ISBN 978-80-214-4420-1.
- [21] SCHANTÉ, Carole E., Guy ZUBER, Corinne HERLIN a Thierry F. VANDAMME. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2011, vol. 85(3), p. 469-489 [cit. 2017-04-06]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.03.019
- [22] SAARAI, Amarjargal. *Hydrogels for biomedical applications: Hydrogely pro použití v biomedicíně*. Doctoral thesis summary. Zlín: Tomas Bata University in Zlín, 2012. ISBN 978-80-7454-240-4
- [23] MANJU, S. a K. SREENIVASAN. Conjugation of curcumin onto hyaluronic acid enhances its aqueous solubility and stability. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2011, vol. 359(1), p. 318-325 [cit. 2017-04-06]. DOI: 10.1016/j.jcis.2011.03.071.
- [24] GRUNDĚLOVÁ, Lenka, Adriana GREGOROVA, Aleš MRÁČEK, Robert VÍCHA, Petr SMOLKA a Antonín MINAŘÍK. Viscoelastic and mechanical properties of hyaluronan films and hydrogels modified by carbodiimide. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2015, vol. 119, p. 142-148 [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.11.049
- [25] HAMILTON, R., Fox, E. M., ACHARYA, R. A. a A. E. WALTS. (1970). Water insoluble derivates of hyaluronic acid. US Patent, 4937270.
- [26] TOMIHATA, K. a Y. IKADA. Crosslinking of hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1997, vol. 37, p. 243-251
- [27] SHIMOJO, Andréa A. M., Aline M. B. PIRES, Rafael LICHY a Maria H. A. SANTANA. The Performance of Crosslinking with Divinyl Sulfone as Controlled by the Interplay Between the Chemical Modification and Conformation of Hyaluronic Acid. *Journal of the Brazilian Chemical Society* [online]. 2015, vol. 26, no. 3, p. 506-512, [cit. 2017-03-16]. DOI: 10.5935/0103-5053.20150003
- [28] BALAZS, E. a A. LESCHINER. (1986). Cross-linked gels of hyaluronic acid and products containing such gels. US Patent, 4582865

- [29] LAI, Jui-Yang. Relationship between structure and cytocompatibility of divinyl sulfone cross-linked hyaluronic acid. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2014, vol. 101, p. 203-212 [cit. 2017-04-13]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.09.060.
- [30] YU, Y. a Ying CHAI. One-Step "Click" Method for Generating Vinyl Sulfone Groups on Hydroxyl-Containing Water-Soluble Polymers. *Biomacromolecules* [online]. 2012, vol 13, p. 937-942 [cit. 2017-04-13]. DOI: 10.1021/bm2014476.
- [31] HAHN, Sei Kwang, Jung Kyu PARK, Takashi TOMIMATSU a Tsuyoshi SHIMOBOJI. Synthesis and degradation test of hyaluronic acid hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2007, vol. 40(4), p. 374-380, [cit. 2017-03-16]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2006.09.019
- [32] PRESTWICH, Glenn D., Dale M. MARECAK, James F. MARECEK, Koen P. VERCRUYSSSE a Michael R. ZIEBELL. Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. *Journal of Controlled Release* [online]. 1998, vol. 53(1-3), p. 93-103 [cit. 2017-04-17]. DOI: 10.1016/S0168-3659(97)00242-3.
- [33] SCHRAMM, Charlotte, Martin S. SPITZER, Sigrid HENKE-FAHLE, et al. The Cross-linked Biopolymer Hyaluronic Acid as an Artificial Vitreous Substitute. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* [online]. 2012, vol. 53(2), p. 613-622 [cit. 2017-04-17]. DOI: 10.1167/iovs.11-7322. ISSN 1552-5783.
- [34] SU, Wen-Yu, Ko-Hua CHEN, Yu-Chun CHEN a Feng-Huei LIN. (2011). Cross-linked oxidated hyaluronic acid for use as a vitreous substitute. US Patent, 20110200676
- [35] SU, Wen-Yu, Ko-Hua CHEN, Yu-Chun CHEN, Yen-Hsien LEE, Ching-Li TSENG a Feng-Huei LIN. An Injectable Oxidated Hyaluronic Acid/Adipic Acid Dihydrazide Hydrogel as a Vitreous Substitute. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 2011, vol. 22(13), p. 1777-1797 [cit. 2017-04-17]. DOI: 10.1163/092050610X522729.
- [36] MENARD, Kevin P. *Dynamic mechanical analysis: a practical introduction*. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. ISBN 978-1-4200-5312-8.
- [37] PAVLÍNEK, Vladimír. *Termické analýzy*. Studijní texty z předmětu Kontrolní a zkušební metody [online]. [cit. 2017-04-18]. Zlín: UTB. Dostupné z: [http://ufmi.ft.utb.cz/texty/kzm/KZM\\_06.pdf](http://ufmi.ft.utb.cz/texty/kzm/KZM_06.pdf)

- [38] VANÍČEK, Jiří. *Dynamicko – mechanická analýza (DMA)*. Studijní materiály z předmětu Metody termické analýzy [online]. [cit. 2017-04-18]. Liberec: TÚ. Dostupné z: [http://www.kmi.tul.cz/studijni\\_materialy/data/2013-04-17/08-43-42.pdf](http://www.kmi.tul.cz/studijni_materialy/data/2013-04-17/08-43-42.pdf)
- [39] *DMA 1 METTLER TOLEDO*. Popis přístroje DMA 1 [online]. [cit. 2017-04-18]. Mettler toledo. Dostupné z: [https://cs.mt.com/dam/MT-CZ/Brochures/LAB/30129289\\_V10.12\\_DMA1\\_Brochure\\_cz.pdf](https://cs.mt.com/dam/MT-CZ/Brochures/LAB/30129289_V10.12_DMA1_Brochure_cz.pdf)
- [40] POLANSKÝ, Radek. Viskoelastické chování reaktoplastických kompozitních materiálů při mechanickém zatížení. *Elektrorevue* [online]. 2010, roč. 12(5), s. 1-7 [cit. 2017-04-18]. ISSN: 1213-1539.
- [41] STOKLASA, K. *Makromolekulární chemie I*. Studijní texty z předmětu Makromolekulární chemie I. Zlín: UTB, 2005, 108 s.
- [42] MEISSNER, B. a V. ZILVAR. *Fyzika polymerů: struktura a vlastnosti polymerních materiálů*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1987, 306 s.
- [43] HAVRÁNEK, A. *Úvod do bioreologie*. Učební texty Karlovy univerzity v Praze. Praha: Karolinum, 2007
- [44] Laredo, E., N. Suarez, A. Bello a L. Marquez. The glass transition in linear low density polyethylene determined by thermally stimulated depolarization currents. *Journal of Polymer Science* [online]. 1996, vol. 34, p. 641–648.
- [45] JOHARI, G. P. Localized molecular motions of  $\beta$ -relaxation and its energy landscape. *Journal of Non-Crystalline Solids* [online]. 2002, p. 317-325 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1016/S0022-3093(02)01491-6.
- [46] COLLINS, Maurice N. a Colin BIRKINSHAW. Physical properties of crosslinked hyaluronic acid hydrogels. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2008, vol. 19, p. 3335-3343 [cit. 2017-05-05]. DOI: 10.1007/s10856-008-3476-4.
- [47] COLLINS, Maurice N. a Colin BIRKINSHAW. Comparison of the effectiveness of four different crosslinking agents with hyaluronic acid hydrogel films for tissue-culture applications. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2007, vol. 104, p. 3183-3191 [cit. 2017-05-05]. DOI: 10.1002/app.25993.

- [48] OLDINSKI, Rachael A., Timothy T. RUCKH, Mark P. STAIGER, Ketul C. POPAT a Susan P. JAMES. Dynamic mechanical analysis and biomineralization of hyaluronan–polyethylene copolymers for potential use in osteochondral defect repair. *Acta Biomaterialia* [online]. 2011, vol. 7, p. 1184-1191 [cit. 2017-05-06]. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.11.019.
- [49] IANNACE, S., L. AMBROSIO, L. NICOLAIS, A. RASTRELLI a A. PASTORELLO. Thermomechanical properties of hyaluronic acid-derived products. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 1992, vol. 3, p. 59-64 [cit. 2017-05-08]. DOI: 10.1007/BF00702946.
- [50] CASCONI, G. Maria. Dynamic-Mechanical Properties of Bioartificial Polymeric Materials. *Polymer International* [online]. 1997, vol. 43, p. 55-69.
- [51] TAKIGAMI, Shoji, Machiko TAKIGAMI a Glyn O. PHILLIPS. Hydration characteristics of the cross-linked hyaluronan derivative hylan. *Carbohydrate Polymers* [online]. 1993, vol. 22, p. 153-160 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1016/0144-8617(93)90136-R.
- [52] PRŮŠOVÁ, A., D. ŠMEJKALOVÁ, M. CHYTI, V. VELEBNÝ a J. KUČERÍK. An alternative DSC approach to study hydration of hyaluronan. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2010, vol. 82, p. 498-503 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.05.022.
- [53] ŠMEJKALOVÁ, Daniela, Martina HERMANNOVÁ, Romana ŠULÁKOVÁ, Alena PRŮŠOVÁ, Jiří KUČERÍK a Vladimír VELEBNÝ. Structural and conformational differences of acylated hyaluronan modified in protic and aprotic solvent system. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2012, vol. 87, p. 1460-1466 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.09.057.
- [54] HATAKEYAMA, Hyoe a Tatsuko HATAKEYAMA. Interaction between water and hydrophilic polymers. *Thermochimica Acta* [online]. 1998, vol. 308, p. 3-22 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1016/S0040-6031(97)00325-0.



**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

ADH	dihydrazid kyseliny adipové
BS <sup>3</sup>	bis(sulfosuccinimidyl) suberát
CTA	hexadecyltrimethylammonium bromid
DMA	dynamická mechanická analýza
DMS	2-methyl suberimidát
DSC	diferenční skenovací kalorimetrie
DTSSP	3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionát
DVS	divinyl sulfon
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid hydrochlorid
EDU	rozpustné deriváty močoviny
EX 810	poly(ethylenglykol) diglycidyl ether
FTIR	infračervená spektroskopie
GTA	glutaraldehyd
HA	kyselina hyaluronová
HDPE	vysokohustotní polyethylen
H7	ethyl ester kyseliny hyaluronové
H11	benzyl ester kyseliny hyaluronové
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	nukleární magnetická rezonance
PBS	solný fosfátový pufr
PVA	polyvinyl alkohol
TMA	termomechanická analýza
$\alpha, \beta, \gamma$	sekundární přechody
$\Delta$	relativní chyba měření
$\delta$	fázový (ztrátový) úhel

---

$\varepsilon$	poměrná deformace
$\varepsilon_0$	amplituda poměrné deformace
$\sigma$	napětí
$\sigma_0$	amplituda napětí
$\omega$	úhlová frekvence
$\tan \delta$	ztrátový faktor
$E^*$	komplexní dynamický modul pružnosti
$E'$	soufázový modul pružnosti
$E''$	ztrátový modul pružnosti
$f$	frekvence
$t$	čas
$T$	teplota
$T_g, T_\alpha$	teplota skelného přechodu

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 – Strukturní jednotka kyseliny hyaluronové s disociovanou karboxylovou skupinou ( <i>Vytvořeno a upraveno podle [16]</i> ) .....	16
Obr. 2 – Snímek elektronové mikroskopie propletených molekul HA [16].....	17
Obr. 3 – Sekundární struktura kyseliny hyaluronové v roztocích [18].....	18
Obr. 4 – Terciální struktura (a) a matrice (b) kyseliny hyaluronové [6] .....	19
Obr. 5 – Schématické znázornění chemické konjugace a chemického síťování [21] .....	20
Obr. 6 – Mechanismus síťování kyseliny hyaluronové pomocí EDC a NHS [24] ( <i>Hy – kyselina hyaluronová, HMS – N-Hydroxysuccinimid, EDU – rozpustné deriváty močoviny</i> ) .....	23
Obr. 7 – Mechanismus síťování kyseliny hyaluronové pomocí DVS [29].....	24
Obr. 8 – Mechanismus síťování kyseliny hyaluronové pomocí ADH a EDC s použitím homobifunkčních síťovacích činidel. [21].....	25
Obr. 9 – Mechanismus síťování kyseliny hyaluronové pomocí ADH a EDC bez použití homobifunkčních síťovacích činidel [32] .....	26
Obr. 10 – Oxidace kyseliny hyaluronové pomocí jodistanu sodného [35].....	26
Obr. 11 – Mechanismus síťování oxidované kyseliny hyaluronové pomocí ADH [35] .....	27
Obr. 12 – Ukázka deformačních módů nastavitelných na přístroji DMA 1 METTLER TOLEDO [39] .....	29
Obr. 13 – Obecný průběh napětí $\sigma$ a deformace $\epsilon$ při dynamickém namáhání viskoelastického materiálu [40].....	30
Obr. 14 – Vzájemný vztah komplexního, souřazového a ztrátového modulu [40] .....	31
Obr. 15 – Možnosti vyhodnocení sekundárních přechodů [36].....	33
Obr. 16 – Idealizovaný scan DMA prezentující nízkoteplotní sekundární přechody a $T_g$ materiálu na křivce souřazového modulu [36] .....	35
Obr. 17 – Vliv změny frekvence na sekundární přechody materiálu [36].....	36
Obr. 18 – Teplotní závislost DMA hyaluronanu síťovaného pomocí DVS (vlevo) a GTA (vpravo) [46] .....	37
Obr. 19 – Vliv použité frekvence na měření teplotních závislostí hyaluronanu [46].....	38
Obr. 20 – Frekvenční závislosti DMA v tlaku pro HA-HDPE kopolymery o různém zastoupení jednotlivých složek [48] .....	40

Obr. 21 – Frekvenční závislost ethyl esteru kyseliny hyaluronové pro různé teploty (vlevo) a frekvenční závislost obou typů derivátů pro dvě různé teploty (vpravo) [49].....	41
Obr. 22 – DSC křivky hyaluronanu síťovaného pomocí DVS (vlevo) a GTA (vpravo) [46] .....	42
Obr. 23 – DSC křivky síťovaného hyaluronanu s různým obsahem vody [51] .....	43
Obr. 24 – Vysušená síťovaná fólie kyseliny hyaluronové (1500 kDa) uvnitř cely .....	49
Obr. 25 – Výsledný materiál vzniklý síťováním kyseliny hyaluronové pomocí DVS.....	50
Obr. 26 – Výsledný materiál vzniklý síťováním pomocí ADH/EDC.....	51
Obr. 27 – Použitý přístroj DMA 1 METTLER TOLEDO.....	52
Obr. 28 – Správné upnutí zkušebního vzorku v čelistech měřicího přístroje .....	53
Obr. 29 – Signál přístroje pro teplotní závislost nesíťovaných vzorků při použití síly 0,1 N .....	55
Obr. 30 – Naměřená data pro teplotní závislost nesíťovaných vzorků při použití síly 0,1 N .....	56
Obr. 31 – Signál přístroje pro teplotní závislost nesíťovaných vzorků při použití síly 1 N .....	56
Obr. 32 – Naměřená data pro teplotní závislost nesíťovaných vzorků při použití síly 1 N .....	57
Obr. 33 – Signál přístroje pro teplotní závislost nesíťovaných vzorků při použití výchylky 4 $\mu\text{m}$ .....	58
Obr. 34 – Naměřená data pro teplotní závislost nesíťovaných vzorků při použití výchylky 4 $\mu\text{m}$ .....	58
Obr. 35 – Signál přístroje pro teplotní závislost nesíťovaných vzorků při použití výchylky 7 $\mu\text{m}$ .....	59
Obr. 36 – Naměřená data pro teplotní závislost nesíťovaných vzorků při použití výchylky 7 $\mu\text{m}$ .....	60
Obr. 37 – Naměřená data teplotní závislosti při rychlosti ohřevu 8 K/min .....	61
Obr. 38 – Naměřená data teplotní závislosti při rychlosti ohřevu 2 K/min .....	61
Obr. 39 – Signál přístroje pro teplotní závislost síťovaných vzorků při použití výchylky 3 $\mu\text{m}$ .....	62
Obr. 40 – Naměřená data pro teplotní závislost síťovaných vzorků při použití výchylky 3 $\mu\text{m}$ .....	63

Obr. 41 – Signál přístroje pro teplotní závislost síťovaných vzorků při použití výchylky 1 $\mu\text{m}$ .....	63
Obr. 42 – Naměřená data pro teplotní závislost síťovaných vzorků při použití výchylky 1 $\mu\text{m}$ .....	64
Obr. 43 – Signál přístroje pro teplotní závislost síťovaných vzorků při použití síly 0,5 N.....	64
Obr. 44 – Naměřená data pro teplotní závislost síťovaných vzorků při použití síly 0,5 N.....	65
Obr. 45 – Signál přístroje pro teplotní závislost síťovaných vzorků při použití síly 1 N.....	65
Obr. 46 – Naměřená data pro teplotní závislost síťovaných vzorků při použití síly 1 N.....	66
Obr. 47 – Závislost soufázového modulu na teplotě pro tři nesíťované vzorky.....	68
Obr. 48 – Závislost ztrátového faktoru na teplotě pro tři síťované vzorky.....	68
Obr. 49 – Závislost soufázového modulu na teplotě pro dva síťované vzorky .....	69
Obr. 50 – Závislost ztrátového faktoru na teplotě pro dva síťované vzorky .....	70
Obr. 51 – Signál přístroje frekvenční závislosti nesíťovaných vzorků při použití síly 0,5 N.....	71
Obr. 52 – Naměřená data frekvenční závislosti nesíťovaných vzorků při použití síly 0,5 N.....	72
Obr. 53 – Signál přístroje frekvenční závislosti nesíťovaných vzorků při použití síly 1 N.....	72
Obr. 54 – Naměřená data frekvenční závislosti nesíťovaných vzorků při použití síly 1 N.....	73
Obr. 55 – Signál přístroje frekvenční závislosti nesíťovaných vzorků při použití síly 2 N.....	73
Obr. 56 – Naměřená data frekvenční závislosti nesíťovaných vzorků při použití síly 2 N.....	74
Obr. 57 – Signál přístroje frekvenční závislosti nesíťovaných vzorků při použití výchylky 7 $\mu\text{m}$ .....	74
Obr. 58 – Naměřená data frekvenční závislosti nesíťovaných vzorků při použití výchylky 7 $\mu\text{m}$ .....	75

Obr. 59 – Signál přístroje frekvenční závislosti nesít'ovaných vzorků při použití výchylky 10 $\mu\text{m}$ .....	75
Obr. 60 – Naměřená data frekvenční závislosti nesít'ovaných vzorků při použití výchylky 10 $\mu\text{m}$ .....	76
Obr. 61 – Signál přístroje frekvenční závislosti sít'ovaných vzorků při použití síly 1 N.....	77
Obr. 62 – Naměřená data frekvenční závislosti sít'ovaných vzorků při použití síly 1 N.....	78
Obr. 63 – Signál přístroje frekvenční závislosti sít'ovaných vzorků při použití výchylky 10 $\mu\text{m}$ .....	78
Obr. 64 – Naměřená data frekvenční závislosti sít'ovaných vzorků při použití výchylky 10 $\mu\text{m}$ .....	79
Obr. 65 – Signál přístroje frekvenční závislosti sít'ovaných vzorků při použití výchylky 20 $\mu\text{m}$ .....	79
Obr. 66 – Naměřená data frekvenční závislosti sít'ovaných vzorků při použití výchylky 20 $\mu\text{m}$ .....	80
Obr. 67 – Signál přístroje frekvenční závislosti sít'ovaných vzorků při použití výchylky 40 $\mu\text{m}$ .....	80
Obr. 68 – Naměřená data frekvenční závislosti sít'ovaných vzorků při použití výchylky 40 $\mu\text{m}$ .....	81
Obr. 69 – Závislost soufázového modulu na frekvenci pro tři nesít'ované vzorky.....	83
Obr. 70 – Závislost ztrátového faktoru na frekvenci pro tři nesít'ované vzorky.....	84
Obr. 71 – Závislost soufázového modulu na frekvenci pro dva sít'ované vzorky.....	85
Obr. 72 – Závislost ztrátového faktoru na frekvenci pro dva sít'ované vzorky.....	86
Obr. 73 – Teplotní závislost soufázového modulu pro nesít'ovaný vzorek o molekulové hmotnosti 240 kDa.....	88
Obr. 74 – Teplotní závislost ztrátového modulu pro nesít'ovaný vzorek o molekulové hmotnosti 240 kDa.....	89
Obr. 75 – Teplotní závislost ztrátového faktoru pro nesít'ovaný vzorek o molekulové hmotnosti 240 kDa.....	90
Obr. 76 – Teplotní závislost soufázového modulu nesít'ovaných vzorků o různé molekulové hmotnosti.....	91
Obr. 77 – Teplotní závislost ztrátového modulu nesít'ovaných vzorků o různé molekulové hmotnosti.....	92

Obr. 78 – Teplotní závislost ztrátového faktoru nesít'ovaných vzorků o různé molekulové hmotnosti .....	93
Obr. 79 – Teplotní závislost soufázového modulu pro sít'ovaný vzorek o molekulové hmotnosti 500 kDa .....	94
Obr. 80 – Teplotní závislost ztrátového modulu pro sít'ovaný vzorek o molekulové hmotnosti 500 kDa .....	95
Obr. 81 – Teplotní závislost ztrátového faktoru pro sít'ovaný vzorek o molekulové hmotnosti 500 kDa .....	96
Obr. 82 – Teplotní závislost soufázového modulu sít'ovaných vzorků o různé molekulové hmotnosti .....	97
Obr. 83 – Teplotní závislost ztrátového modulu sít'ovaných vzorků o různé molekulové hmotnosti .....	98
Obr. 84 – Teplotní závislost ztrátového faktoru sít'ovaných vzorků o různé molekulové hmotnosti .....	98
Obr. 85 – Frekvenční závislost soufázového modulu nesít'ovaných vzorků o různé molekulové hmotnosti při teplotě 25 °C .....	101
Obr. 86 – Frekvenční závislost ztrátového modulu nesít'ovaných vzorků o různé molekulové hmotnosti při 25 °C .....	102
Obr. 87 – Frekvenční závislost ztrátového faktoru nesít'ovaných vzorků o různé molekulové hmotnosti při 25 °C .....	103
Obr. 88 – Frekvenční závislost soufázového modulu nesít'ovaných vzorků o molekulové hmotnosti 1500 kDa při různých teplotách .....	104
Obr. 89 – Frekvenční závislost ztrátového modulu nesít'ovaných vzorků o molekulové hmotnosti 1500 kDa při různých teplotách .....	105
Obr. 90 – Frekvenční závislost ztrátového faktoru nesít'ovaných vzorků o molekulové hmotnosti 1500 kDa při různých teplotách .....	105
Obr. 91 – Frekvenční závislost soufázového modulu sít'ovaných vzorků o různé molekulové hmotnosti při teplotě 25 °C .....	107
Obr. 92 – Frekvenční závislost ztrátového modulu sít'ovaných vzorků o různé molekulové hmotnosti při 25 °C .....	108
Obr. 93 – Frekvenční závislost ztrátového faktoru sít'ovaných vzorků o různé molekulové hmotnosti při 25 °C .....	108

---

Obr. 94 – Frekvenční závislost souřazového modulu síťovaných vzorků o molekulové hmotnosti 1500 kDa při různých teplotách .....	109
Obr. 95 – Frekvenční závislost ztrátového modulu síťovaných vzorků o molekulové hmotnosti 1500 kDa při různých teplotách .....	110
Obr. 96 – Frekvenční závislost ztrátového faktoru síťovaných vzorků o molekulové hmotnosti 1500 kDa při různých teplotách .....	110



**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 – Hodnoty relativní molekulové hmotnosti HA připravené z různých zdrojů [11] .....	15
Tabulka 2 – Relativní chyby soufázového modulu měřeného při daných frekvencích .....	83
Tabulka 3 – Relativní chyby ztrátového faktoru měřeného při daných frekvencích .....	83
Tabulka 4 – Relativní chyby soufázového modulu měřeného při daných frekvencích .....	85
Tabulka 5 – Relativní chyby ztrátového faktoru měřeného při daných frekvencích .....	86

## SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P I: TECHNICKÁ DATA DMA 1 METTLER TOLEDO .....	131
--	-----

# PŘÍLOHA P I: TECHNICKÁ DATA DMA 1 METTLER TOLEDO

## 8 Technická data

<b>Princip měření</b>		
Typ senzoru posunu	LVDT	
Typ hnacího motoru	Dataphysics GW-V2 PA30E	
<b>Teplotní data</b>		
Teplotní rozsah	-190 až 600 °C	
Technické rozlišení	0,1 K	
Přesnost	0,75 K	
<b>Rychlost chlazení a ohřevu</b>		
Rychlost ohřevu	0,1 až 20 K/min	
Rychlost chlazení	0,1 až 30 K/min	
<b>Topný prvek</b>		
Design	Thermo-Coax: Nerezová ocel s minerální izolací, zapouzdřený topný prvek. Vnější pouzdro je uzemněno.	
Úroveň napětí	44 VDC do 13 prvků	
Příkon	Max. 150 W	
<b>Spotřeba chladiva</b>	<b>1 L Dewar s obtokem</b>	<b>351 L Dewar s Autocryo Type 3 kit</b>
-100 °C	3 min (0,3 L LN <sub>2</sub> )	6 min (0,4 L LN <sub>2</sub> )
-150 °C	5 min (0,5 L LN <sub>2</sub> )	8 min (< 1 L LN <sub>2</sub> )
-190 °C	10 min (cca. 1 L LN <sub>2</sub> )	15 min (cca. 1,8 L LN <sub>2</sub> )
<b>Síla</b>		
Rozsah	0,001 až 10 N	
Technické rozlišení	0.25 mN	
Citlivost	1 mN	
<b>Posun</b>		
Rozsah	+/- 1,0 mm	
Technické rozlišení	2 nm	
Citlivost	30 nm	
<b>Tuhost</b>		
V celém rozsahu (Tuhost se mění v závislosti na měřicím módu.)	50 až 105 N/m	
Přesnost	0,5 %	
<b>Tan delta</b>		
Rozsah	0,0001 až 50	
Technické rozlišení	0,00001	
Citlivost	0,0001	
<b>Frekvence</b>		
Rozsah	0,001 až 300 Hz	
Technické rozlišení	0,0001	
Frekvenční kroky	0,001	
Frekvenční módy	Lineární nebo logaritmický	
	Multifrekvenční (sekvenčně)	