

Studium chování biopolymerů v roztocích

Bc. Tereza Dehnerová

Diplomová práce
2020



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Tereza Dehnerová**
Osobní číslo: **T18295**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Studium chování biopolymerů v roztocích**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na dané téma.
2. Připravte polymerní roztoky za rozdílných fyzikálních podmínek a při rozdílném složení disperzního prostředí.
3. Připravené roztoky charakterizujte pomocí dynamického rozptylu světla, tenziometrických a viskozitních měření.
4. Experimentální výsledky přehledně diskutujte a uveďte hlavní závěry práce.

Forma zpracování diplomové práce: **Tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

1. Teraoka I., Polymer Solutions: An Introduction to Physical Properties, John Wiley Sons, 2002, ISBN: 0-471-38929-3
2. Jones R.A.L., Polymers at Surfaces and Interfaces, Cambridge University Press, 1999, ISBN-13-978-521-47965-3
3. Morawetz, H., Chování makromolekul v roztoku, nakladatelství Československé akademie věd, Praha, 1971
4. Hunter R.J., Introduction to Modern Colloid Science. Oxford University Press, 1994

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Antonín Minařík, Ph.D.**
Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2020**
Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 20. února 2020

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou 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;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou 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);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové 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.

Prohlašuji,

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá studiem faktorů ovlivňujících konformační uspořádání hyaluronanu (HA) v roztocích a na fázových rozhraních kapalina/plyn. V rámci provedených experimentů byl studován vliv složení disperzního prostředí, hmotnostního podílu polymeru a procesních podmínek přípravy tohoto biopolymerního roztoku. Připravené roztoky byly charakterizovány pomocí dynamického rozptylu světla, tensiometrie, viskozimetrie a velikostně vylučovací chromatografie s vícenásobným rozptylem světla (SEC-MALS). Z experimentálních výsledků vyplynulo, že pomocí organizovaných toků kapaliny lze nejlépe ovlivňovat konformační uspořádání HA v prostředí pufru. Takto vyvolané změny se projevují změnou střední velikosti polymerních klubek, jejich tepelnou stabilitou a povrchovou aktivitou. Bylo zjištěno, že pro danou molekulovou hmotnost HA existuje specifický teplotní a koncentrační rozsah, ve kterém lze iniciovat přechod do nového časově stálého konformačního uspořádání.

Klíčová slova: hyaluronan, rozpouštění, velikost polymerních klubek, povrchová aktivita, dynamický rozptyl světla, tensiometrie, viskozimetrie

ABSTRACT

The diploma thesis deals with the study of factors influencing the conformational arrangement of hyaluronan (HA) in solutions and at liquid/gas phase interfaces. The effects of the composition of the dispersion medium, the weight fraction of the polymer and the process conditions for the preparation of this biopolymer solution has been studied in the experiments. The prepared solutions were characterized by dynamic light scattering, tensiometry, viscosimetry and size exclusion chromatography (SEC-MALS). The experimental results showed that the conformational arrangement of HA in a buffer medium can be best influenced by means of organized fluid flows. The changes thus induced are manifested by a change in the mean size of the polymer coils, their thermal stability and surface activity. It has been found that there is a specific temperature and concentration range for a given molecular weight of HA in which a transition to a new time-stable conformational arrangement can be initiated.

Keywords: hyaluronan, dissolution, size of the polymer coils, surface activity, dynamic light scattering, tensiometry, viscometry

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Antonínu Minaříkovi, Ph.D. za ochotu, čas a cenné rady při její realizaci.

Ráda bych poděkovala i Ing. Lence Musilové, Ph. D. za ochotu a za rady při charakterizování polymerních roztoků.

Dále bych chtěla poděkovat mé rodině za podporu při studiu.

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

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1 HYALURONÁT SODNÝ	11
1.1 PRODUKCE HA.....	11
1.2 PŘÍTOMNOST HA V LIDSKÉ KŮŽI.....	12
1.2.1 Extracelulární matrix.....	12
1.3 STRUKTURA HA.....	14
1.3.1 Primární struktura.....	14
1.3.2 Sekundární struktura	15
1.3.3 Terciální struktura	15
1.3.3.1 Strukturální všestrannost.....	16
2 POLYMERNÍ KLUBKO.....	17
2.1 MOLEKULOVÁ HMOTNOST	18
2.2 VLIV TEPLoty A pH NA KONFORMACI POLYMERNÍHO KLUBKA	20
2.3 DEFORMACE A CHOVÁNÍ POLYMERNÍCH KLUBEK ZA TOKU	20
2.3.1 Brownův pohyb.....	23
2.4 ROZTOKY HA VE VODNÉM PROSTŘEDÍ.....	24
2.5 ROZTOKY HA VE FYZIOLOGICKÉM ROZTOKU	25
2.6 PŘIROZENÉ SÍŤOVÁNÍ HA V ROZTOCÍCH.....	26
2.6.1 Hydrogely HA.....	27
3 HYALURONAN A JEHO DERIVÁTY PRO TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ	29
3.1 HYDROGELOVÉ SCAFFOLDY	29
3.1.1 Použití scaffoldů na bázi HA v regenerativní medicíně.....	30
3.1.2 Použití scaffoldů na bázi HA v anti-aging a estetické medicíně.....	30
3.2 DALŠÍ BIOMEDICÍNSKÉ, FARMAKOLOGICKÉ A ESTETICKÉ APLIKACE HA.....	30
3.2.1 3D matrice buněčných kultur	30
3.2.2 Biotisk	31
3.2.3 Aplikace jako nosiče léčiva pro prodloužené uvolňování.....	31
3.2.4 Signalizace na bázi HA	32
CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	33
II PRAKTICKÁ ČÁST	34
4 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ.....	35
4.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	36
4.2 ČIŠTĚNÍ LABORATORNÍHO SKLA	36
4.3 ZAŘÍZENÍ PRO PŘÍPRAVY POLYMERNÍCH ROZTOKŮ / FILMŮ	37
4.3.1 TFFC zařízení.....	37
4.3.2 Třepací stroj LT 2.....	38
4.3.3 Magnetické míchací zařízení.....	38

4.4	CHARAKTERISTIKA POLYMERNÍCH ROZTOKŮ	39
4.4.1	DLS	39
4.4.2	Tensiometrie.....	41
4.4.3	SEC-MALS	43
4.4.4	Viskozimetrie	44
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	46
5.1	VLIV DISPERZNÍHO PROSTŘEDÍ NA CHOVÁNÍ HA.....	46
5.2	VLIV FILTROVÁNÍ NA CHOVÁNÍ HA V ROZTOCÍCH.....	48
5.3	VLIV KONCENTRACE HA NA CHOVÁNÍ TOHOTO POLYMERU V ROZTOKU	49
5.3.1	Rozpouštění HA ve fyziologickém roztoku pomocí třepacího zařízení	49
5.3.2	Rozpouštění HA ve fyziologickém roztoku pomocí TFFC zařízení.....	51
5.3.3	Rozpouštění HA v roztoku pufru pomocí třepacího zařízení.....	53
5.3.4	Rozpouštění HA v roztoku pufru pomocí temperovaného míchání.....	55
5.3.5	Rozpouštění HA v roztoku pufru pomocí TFFC zařízení	57
5.4	VLIV STŘEDNÍ TEPLoty A TEPLoTNÍHO SPÁDU	60
5.5	VISKOZITNÍ MĚŘENÍ	65
5.6	VLIV SOLIDIFIKACE	67
5.7	SEC-MALS CHARAKTERIZACE ROZTOKŮ HA	74
	ZÁVĚR	76
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	77
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	84
	SEZNAM OBRÁZKŮ	86
	SEZNAM TABULEK.....	90

ÚVOD

Hyaluronát sodný je důležitou součástí savčí extracelulární matrix (ECM – ExtraCellular Matrix). Díky své vynikající biokompatibilitě a četným možnostem modifikace je tento biopolymer používán v širokém spektru aplikací. Ve farmaceutickém průmyslu představuje perspektivní materiál pro vývoj nosičů léčiv, v oblasti biomedicínského inženýrství se jedná o vhodný materiál pro bioprinting, přípravu 3D scaffoldů nebo pro aplikace v oblasti tzv. přesné medicíny (PM – Precision Medicine). Funkce hyaluronanu je podmiňována jeho molekulovou hmotností (MW – Molecular Weight) a konformací, ve které se nachází.

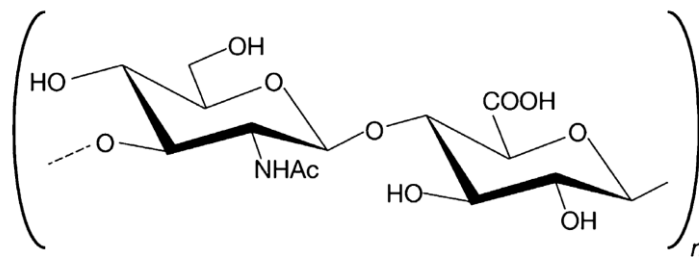
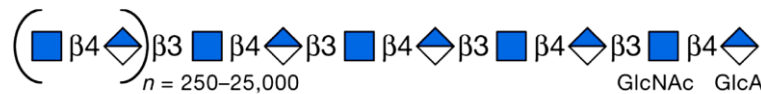
Teoretická část práce je zaměřena na popis struktury HA s důrazem na konformační variabilitu jeho polymerních klubek v závislosti na okolních podmínkách. Další část řešerše představuje aktuální přehled aplikačních možností tohoto polymeru.

V rámci experimentální části byly studovány změny střední velikosti polymerních klubek HA v závislosti na teplotě pomocí dynamického rozptylu světla (DLS – Dynamic Light Scattering). Pomocí tensiometrických měření byla analyzována povrchová aktivita HA na fázových rozhraních kapalina/plyn. Dále byly studovány viskozitní charakteristiky vybraných polymerních roztoků s cílem vyhodnotit, jak je tato vlastnost systému ovlivněna procesními podmínkami dispergace HA. Mimo to byly polymerní roztoky charakterizovány metodou SEC-MALS, jenž poskytuje informace jak o molekulové hmotnosti, tak o střední velikosti a tvaru klubek HA v daném disperzním prostředí. Z experimentálních výsledků vyplývá rozhodující vliv disperzního prostředí a procesních podmínek dispergace HA na změny jeho fyzikálně-chemických charakteristik.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 HYALURONÁT SODNÝ

V roce 1934 Karl Meyer a jeho asistent John Palmer izolovali nový glykosaminoglykan (GAG – GlycosAminoGlycan) ze sklivce očí skotu. Tento izolovaný biopolymer pojmenovali jako hyaluronát sodný (HA). Bylo zjištěno, že tento GAG obsahuje kyselinu D-glukuronovou a N-acetyl-D-glukosamin, jenž jsou společně kovalentně vázány střídajícími β (1/4) a β (1/3) glykosidickými vazbami (Obr. 1), a to bez známky přítomnosti sulfosterů [1–8].



Obr. 1. Struktura HA [3]

Počet opakujících se disacharidů, n , v molekule HA může dosáhnout 10 000 nebo více. Molekulová hmotnost je až 4 miliony daltonů (každý disacharid má přibližně 400 daltonů). Průměrná délka disacharidu je přibližně 1 nm. V těle dosahuje HA maximální koncentrace ve vodném prostředí tkání, jako jsou například synoviální tekutina, pupeční šňůra nebo právě zmíněný sklivec. Kromě jmenovaných je HA přítomen v *dermis*, šlachách, chrupavkách, srdečních chlopních a arteriálních stěnách, meziobratlových ploténkách [4–6, 9, 11, 12].

1.1 Produkce HA

Hyaluronát sodný může být produkován několika buněčnými typy, přičemž převládá biosyntéza v buňkách mesenchymálních. Výroba HA ve větším měřítku je navzdory technologickému pokroku stále náročná, a to zejména z hlediska požadované vysoké čistoty a dosažení distribuce molekulových hmotností odpovídajících biologickým požadavkům lidského organismu. Vysoké nároky na jmenované proměnné hluboce ovlivňují kvalitu produktu a buněčnou odpověď. Mimo jiné je i extrakční výtěžek obvykle nízký [1, 10–12].

Průmyslová produkce HA je založena na použití živočišných nebo mikrobiálních zdrojů. Mezi živočišné zdroje běžně používané pro extrakci HA patří: lidská pupeční šňůra, hovězí synoviální tekutina a kohoutí hřebínek, kde koncentrace HA činí 7,5 mg/g. Existují však technické a etické obavy, které silně omezují použití HA získaného ze zvířat pro biomedicínské a farmaceutické aplikace. Izolace HA z tkání je složitá a časově náročná, protože zahrnuje extrémní podmínky zpracování (například mletí, kyselé ošetření a vystavení organickým rozpouštědlům) a různé kroky čištění za účelem snížení počtu biologických kontaminantů. Pozůstatky těchto v tkání přirozeně vázaných látek, především proteoglykanů a hyaluronidáz, mohou při pozdější aplikaci materiálu vyvolávat nežádoucí imunitní reakci. V izolovaném HA se dále mohou vyskytovat nukleové kyseliny, priony nebo viry [1, 10–12].

Na základě všech těchto úvah je v současné době nejrozšířenější cestou pro velkovýrobu HA mikrobiální fermentace. Syntéza HA probíhá extracelulárně pomocí streptokoků skupiny A a skupiny C dle Lancefielda. Hlavním zdrojem HA v průmyslovém měřítku je v současné době zejména *Streptococcus zooepidemicus*, což je grampozitivní bakterie, jejíž biosyntetická dráha HA již byla do značné míry prozkoumána. Další možností je fermentace pomocí *Pseudomonas aeruginosa*. Výhodami fermentace jsou neomezené suroviny, nízké náklady a jednoduché postupy přípravy [10–12].

1.2 Přítomnost HA v lidské kůži

Hyaluronát sodný je přítomen v mnoha různých tkáních lidského těla, viz kapitola 1, přičemž nejdůležitějším orgánem je samotná kůže. Tělo o hmotnosti 70 kg obsahuje přibližně 15 g HA. Již v roce 1969 bylo prokázáno, že HA je přítomen jak v *epidermis*, tak v *dermis*. Hyaluronát sodný je v lidské *epidermis* extracelulární a je lokalizován mezi bazálními a spinálními buňkami. Uvádí se také, že HA je přítomen v rohové vrstvě (*SC – Stratum corneum*), kde zastává důležitou úlohu při udržování hladiny vlhkosti pokožky.

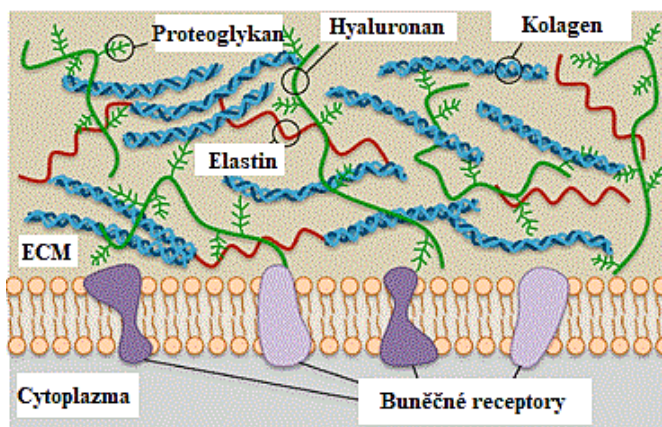
V *dermis* HA plní důležitou funkci spočívající v hydrataci kolagenových a elastinových vláken. Tento mechanismus bude podrobněji popsán v podkapitole 1.2.1 [2, 3, 13].

1.2.1 Extracelulární matrix

Extracelulární matrix zastává klíčovou roli v homeostatických a patologických procesech. Složitost biologie ECM je z části výsledkem heterogenity jejích složek, které se účastní

mimořádně dynamických interakcí mezi sebou navzájem, stejně jako s rezidentními a migrujícími buňkami.

Hyaluronát sodný je jediný polysacharid produkovaný na buněčném povrchu a uvolňovaný do ECM jako vysokomolekulární GAG. V ECM hyaluronan působí jako složka vázající vodu, tvoří tedy „rezervoár“ vody, a to zejména v již jmenované *dermis*. Tímto způsobem HA poskytuje tkáni odolnost vůči fyzickému stresu a udržuje tvar i tón tkáně a slouží proti poškození buněk. Tvoří „vlhké“ mikroprostředí, čímž mimo jiné usnadňuje i hojení ran. V ECM jsou spojeny dlouhé řetězce HA v proteoglykany (viz Obr. 2) a jsou propletené s jinými složkami ECM, jako je kolagen, elastin, fibronektin, laminin, ... [11, 14, 15].



Obr. 2. Schéma ECM [11]

Zmatečným aspektem stávající literatury je to, že v závislosti na kontextu má HA různé a někdy protichůdné účinky na mnoho biologických funkcí; například pro nebo protizánětlivé, podporující a inhibující buď migraci nebo buněčnou proliferaci. Výzkum za posledních několik let začal vrhat světlo na základní mechanismy, které vysvětlují tyto rozdílné efekty. Existují alespoň čtyři klíčové mechanismy, kterými jsou funkce a aktivita HA regulovány:

- fyzikální vlastnosti, distribuce velikosti polymerních klubek a molekulových hmotností,
- chemické modifikace, vazební partneři, síťovací vzory a makromolekulární struktura,
- metabolismus syntézy a degradace HA, jakož i regulace mikroprostředí,
- zapojení receptoru a signalizace.

Tyto mechanismy se vzájemně nevylučují. Například metabolismus HA mění velikost, distribuci a fyzikálně-chemické vlastnosti, zatímco regulace mikroprostředí může ovlivnit vzory síťování a vazby vazebného partnera. Biologie HA je tedy nejlépe pochopena určením toho, jak jeho individuální účinky přispívají k dynamickému procesu, který řídí biologii na buněčné, orgánové a organizační úrovni [3, 14].

1.3 Struktura HA

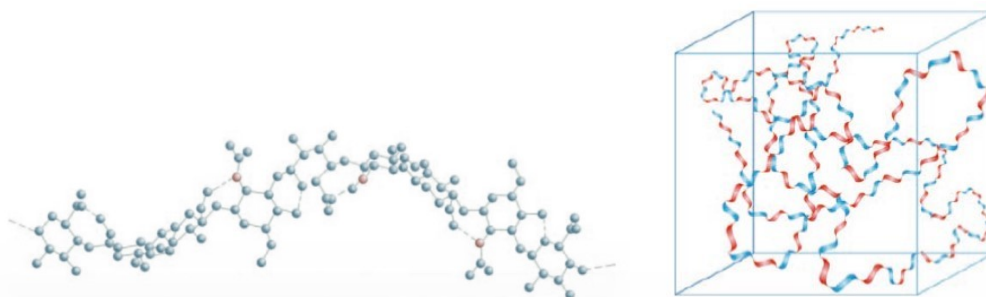
Hyaluronát sodný je strukturálně jednoduchý, nerozvětvený polysacharid, polyelektrolyt, biopolymer a humektant. Ve srovnání s jinými biopolymery, jako jsou nukleové kyseliny a proteiny, je struktura hyaluronanu mnohem méně rozvinutá [16, 17].

Extrémní délka molekuly HA spolu s jeho vysoce hydrofilní povahou mu umožňuje organizovat se ve tkáních do retikulární nebo síťové struktury, kde jsou řetězce propleteny a stabilizovány intra-molekulárními vodíkovými vazbami i interakcemi s rozpouštědlem.

Velké množství hydroxylových a karboxylových skupin v molekule umožňuje tvořit ve vodném prostředí četné intramolekulární a intermolekulární vodíkové vazby, mající za následek určitou tuhost řetězce a jeho stáčení do jednoduché nebo dvojité šroubovice [11, 12].

1.3.1 Primární struktura

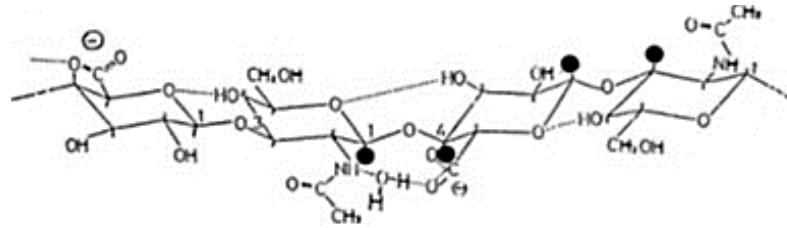
Makromolekula HA je složena z axiálních nepolárních atomů a polárních bočních řetězců, které mají za následek hydrofobní a hydrofilní vlastnosti polymeru. Výsledkem konkrétního uspořádání je vytvoření struktury, která se podobá „skroucené stužce“, viz Obr. 3, přičemž modrá krabička představuje doménu molekuly v roztoku. Střídavé modré a červené řetězce představují strukturu stužky s modrou (hydrofilní) a červenou (hydrofobní) oblastí [17].



Obr. 3. Primární struktura HA a model hyaluronové „stužky“ v 3D oblasti [17, 18]

1.3.2 Sekundární struktura

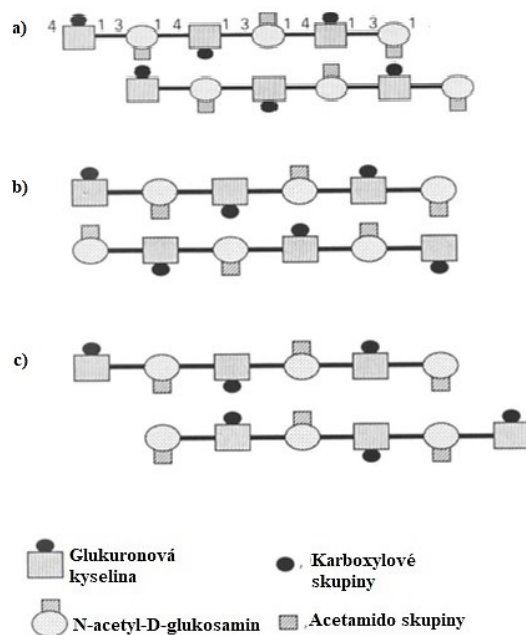
Sekundární struktura HA, viz Obr. 4, je ve vodných roztocích popsána jako levotočivá spirála, která tvoří duplexní terciární strukturu β -listu v důsledku hydrofobních interakcí a intermolekulárních vodíkových vazeb. Díky tomuto prostorovému uspořádání je HA hlavní odpovědnou látkou za hydrataci, udržení turgoru a viskoelasticitu tkání, které budou popsány dále [11, 16, 17].



Obr. 4. Sekundární struktura HA [16]

1.3.3 Terciální struktura

Terciální struktura HA je silně závislá na prostředí. Relativní tuhost glykosidických a intramolekulárních vodíkových vazeb má tendenci omezovat rotaci a konformační variabilitu. To se však zdá být vyvráceno působením molekulárního prostředí vedoucího k velké variabilitě terciární struktury. Na Obr. 5 jsou vyobrazeny 3 možná uspořádání molekul HA [16].

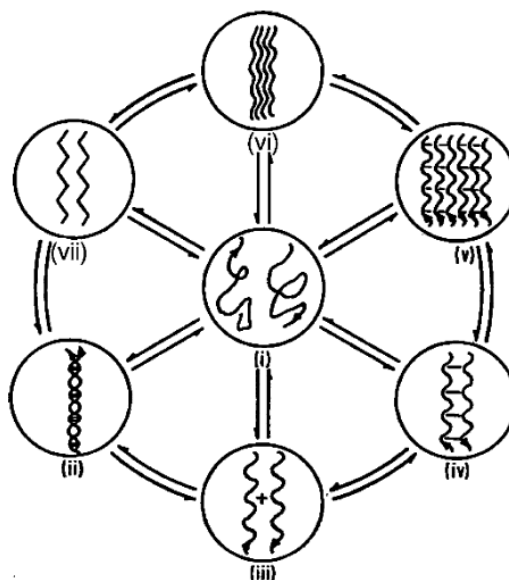


Obr. 5. Terciální struktura HA ve vodných roztocích [19]

První řetězec v každém páru by měl být zobrazen jako ležící přímo nad druhým. Čísla se týkají polohy glykosidických vazeb. V odstavci (a) jsou řetězce paralelní, přičemž dvojice alternativních karboxylových skupin – acetamido skupin jsou umístěny nad sebou. V odstavci (b) jsou řetězce antiparalelní, se skupinou karboxylovou – acetamido skupinou, páry leží nad sebou. V odstavci (c) jsou řetězce antiparalelní, avšak v porovnání s (b) se střídající jednou sacharidovou jednotkou [19].

1.3.3.1 Strukturální všestrannost

Pozoruhodnou všestrannost struktury dvojité šroubovice hyaluronanu prokázali Atkins a Sheehan [20], kteří zkoumali konverzi dvojláknových formací na jednovláknové. Schéma demonstrující vzájemné vztahy struktur se nachází na Obr. 6.



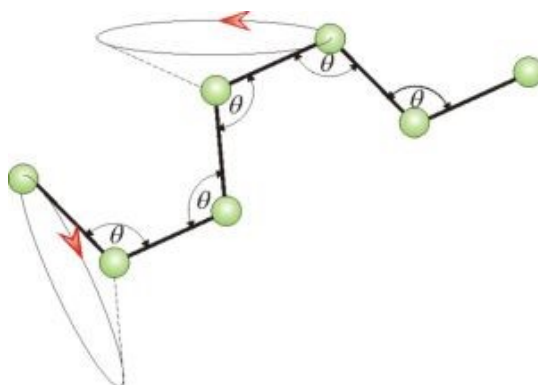
Obr. 6. Schéma strukturální všestrannosti HA [34]

Rozmanitý soubor experimentálních podmínek byl využit při shromažďování informací o vzniku struktur charakterizovaných následujícím způsobem: (i) řetězce ve zředěných roztocích; (ii) dvojitá šroubovice; (iii) dvě antiparalelní šroubovice bez nevzájemného navinutí; (iv) jednoduché šroubovice v těsnějším uspořádání; (v) šest řetězců v uspořádaném stavu; (vi) řetězce v ještě kompaktnějším uspořádání; (vii) plně rozšířené jednotlivé řetězce [34].

2 POLYMERNÍ KLUBKO

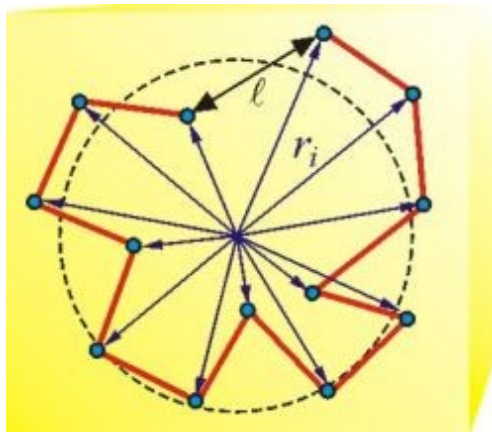
Již v roce 1964 Laurent prováděl studii HA [21], ve které navrhl, že HA se chová jako náhodné klubko a dále naznačuje, že jeho fyzikální vlastnosti, jako je například tuhost, jsou jeho vnitřní vlastností [16].

Makromolekulární klubko představuje neuspořádaný útvar, do kterého je v roztoku stočena lineární makromolekula. Na základě tepelného pohybu jednotlivých segmentů či působením vnějších sil, dokáže molekula lineárního polymeru v přítomnosti disperzního prostředí měnit svůj tvar. Toto je přičítáno intramolekulárním rotacím, viz Obr. 7, díky kterým dochází k vibraci částí molekul a k translačnímu a k rotačnímu pohybu celých molekul. Každý řetězec mění svůj tvar i rozměr v čase – mění konformaci [9, 22].



Obr. 7. Vnitřní rotace
v makromolekulárním řetězci [22]

Rozměr neboli stočení klubka popisuje gyrační poloměr (Obr. 8) charakterizující velikost částice libovolného tvaru. Jedná se o vzdálenost od osy rotace, ve které by musela být soustředěna všechna hmotnost částice, aby vykazovala stejný moment setrvačnosti jako částice skutečná. Stanovení gyračního poloměru lze uskutečnit bez ohledu na tvar částic pomocí měření rozptylu světla [23].



Obr. 8. Schématický náčrt náhodného klubka [23]

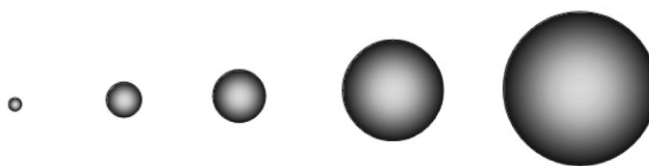
Kde:

l je vzdálenost konců řetězce,

r_i je vzdálenost daných členů od středu klubka.

2.1 Molekulová hmotnost

Funkce a aktivita HA závisí mimo jiné na jeho střední molekulové hmotnosti, tedy na velikosti polymerních klubek. Na Obr. 9 je znázorněna závislost hydrodynamické velikosti řetězců HA na MW. Hyaluronové řetězce s molekulovou hmotností 0,1; 0,5; 1; 3 a 6 milionů mají hydrodynamické průměry přibližně 50, 140, 210, 400 a 600 nm ve fyziologickém roztoku [24].



Obr. 9. Hydrodynamická velikost řetězce HA [24]

Vysokomolekulární (HMW – High Molecular Weight) i nízkomolekulární (LMW – Low Molecular Weight) HA vykazuje mnoho biologických aktivit zodpovědných za elasticitu mezibuněčné tkáně, podílející se na fibrogenезi zejména kolagenových vláken, antiangiogenních, protizánětlivých a imunosupresivních účincích. Oba typy jsou široce používány jako výchozí materiál pro výrobu hydrogelů, nástrojů tkáňového inženýrství (TE – Tissue

Engineering), vehikul pro dodávání léčiv a jako tkáňové plnivo. V Tab. 1 jsou shrnuty funkce HA v lidském těle v závislosti na MW [25, 26].

Tab. 1. Přehled funkcí HA při daných MW [25]

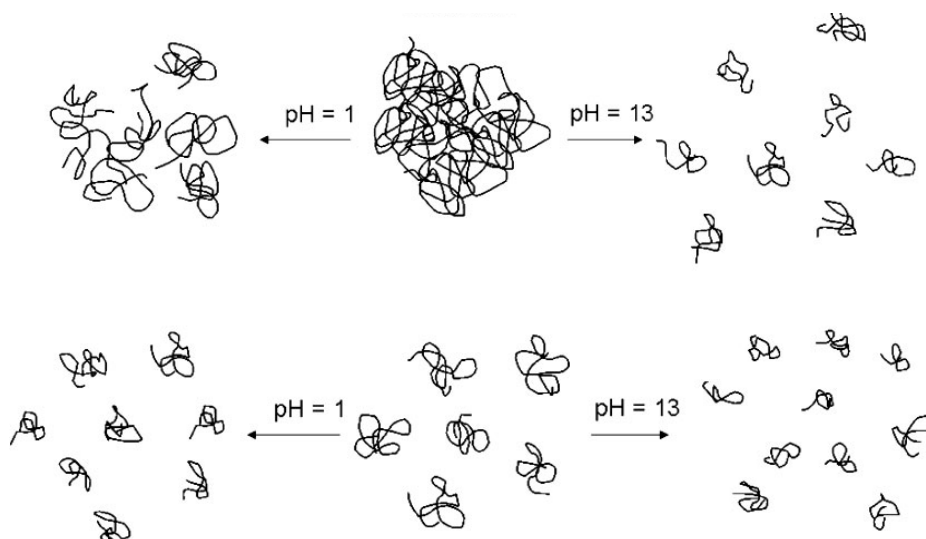
Molekulová hmotnost [kDa]	Funkce
10–20	Působí jako signální látka
50	Hydratační aktivita
300	Anti-aging a antiatrofická aktivita
500	Imunomodulační aktivita
1500–1700	Pomocná terapie u revmatické artritidy

Z tabulky vyplývá, že směsi HA s HMW jsou protizánětlivé a antiangiogenní. Vzhledem ke své extrémně hydrofilní povaze může HA vázat až na 1000násobek své hmotnosti vody, čímž se vytváří velmi objemná, expandovaná struktura s náhodnými klubky ve vodných i fyziologických roztocích. S největší pravděpodobností působí HA jako izolační povlak nebo prostorový pufr, což umožňuje, aby molekuly s nízkou molekulovou hmotností, jako jsou elektrolyty, voda a živiny, volně difundovaly. Velké molekuly, jako jsou proteiny nebo dokonce buňky, jsou částečně vyloučeny kvůli jejich hydrodynamickým rozměrům v roztoku.

Hyaluronan při nižších koncentracích a nižších molekulových hmotnostech (fragmentovaný HA) podporuje zrání monocytů do makrofágů. Tyto fragmenty HA společně zvyšují expresi prozánětlivých chemokinů v buněčných liniích makrofágů, stejně jako v alveolárních makrofázích z poraněných plic. Na druhou stranu tetrasacharid hyaluronanu chrání před ischemickým poraněním mozku. Důvody ale nejsou zcela jasné. Existuje několik faktorů, které v tomto mají svoji roli. Jedná se například o receptorové shlukování, zapojení buněčné absorpce, intra-extracelulární signalizace a interakce s ligandy HA [14, 18, 25].

2.2 Vliv teploty a pH na konformaci polymerního klubka

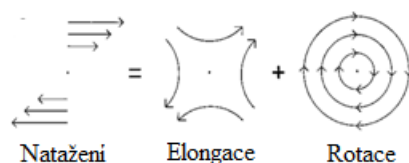
Velký hydrodynamický objem řetězců HA závisí na celkové tuhosti řetězce. Rostoucí teplota usnadňuje rotaci kolem spojů a řetězce získávají pružnost. Dochází ke zmenšení molekulárního objemu a snížení viskozity. Viskozita roztoků HA není v prostředí fyziologickém příliš citlivá na pH. Při velmi vysokém pH nad hodnotou pH 11 je rotační svoboda v glykosidických vazbách značně zvýšena kvůli rozbití zbytkových vodíkových vazeb a objem řetězce se zmenšuje, což snižuje viskozitu roztoku. Při nízkém pH asi 2,5, při fyziologické iontové síle, vzniká zajímavý viskoelastický tmel, téměř jako gel, v důsledku vzájemné asociace. Avšak mezi hodnotami pH 6,5–8,0 je expanze řetězců HA téměř konstantní a vnitřní viskozita se nemění, viz Obr. 10 [27–32].



Obr. 10. Vliv pH na řetězce HA [33]

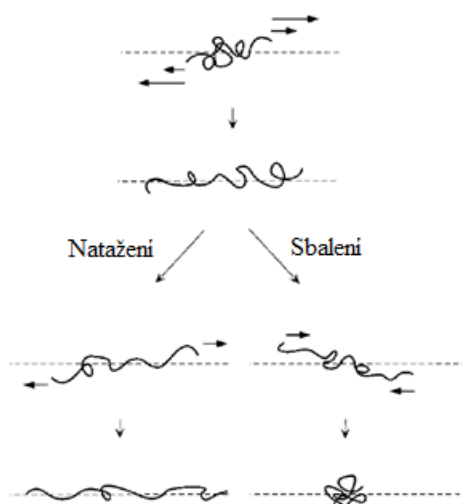
2.3 Deformace a chování polymerních klubek za toku

Jedním z důležitých parametrů majících vliv na viskozitu HA během smykového namáhání za toku je rychlost smykové deformace. Polymerní systémy v roztoku vykazují změnu uspořádání polymerních řetězců už při působení nízkých smykových rychlostí. Deformace, viz Obr. 11, vyjadřuje natažení polymerního klubka za toku kapaliny a je popsána dvěma složkami: rotačním tokem o úhlové rychlosti ω a elongačním tokem s rychlostí deformace [18, 34].



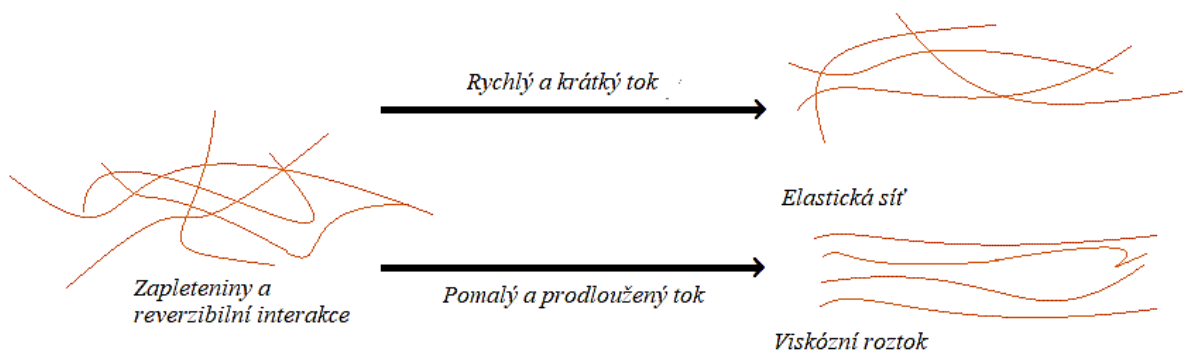
Obr. 11. Deformace klubka [34]

Při nulové rychlosti deformace dochází k rotacím bez deformace klubka, naopak při nulové úhlové rychlosti dochází k velké deformaci klubka. U reálných toků kapalin jsou nenulové obě složky. K natažení klubka ve směru proudění dochází při rovnosti obou složek. Po natažení klubka následuje zpětná relaxace. Při ní je snaha o dosažení minima energie klubka ovlivňována Brownovým pohybem, který bude popsán níže. Po dosažení relaxace klubko zůstane buď v nataženém stavu nebo se sbalí do podoby náhodného klubka. Na Obr. 12 jsou znázorněny deformace polymerního klubka a následné možnosti relaxace [34].



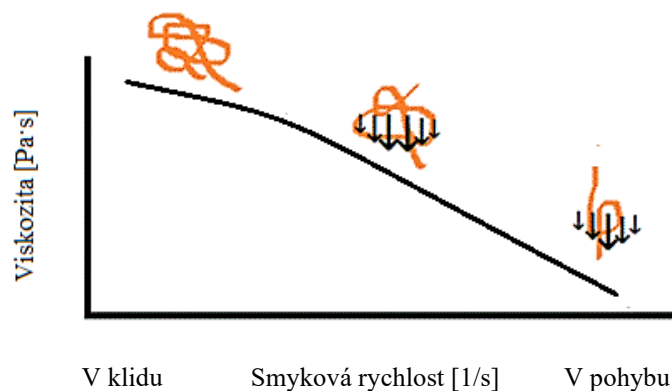
Obr. 12. Možnosti přeuspořádání polymerních řetězců za toku [34]

Obrázek 13 znázorňuje jakým způsobem ovlivňuje rychlost toku výsledné chování polymeru. Hyaluronan s vysokou molekulovou hmotností je převážně elastický při nízkých smykových rychlostech, zatímco hyaluronan s nízkou molekulovou hmotností se chová převážně viskózním způsobem [18].



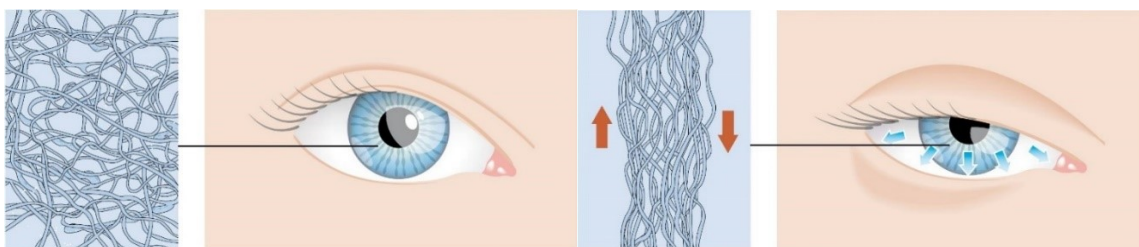
Obr. 13. Chování HA za toku, upraveno dle [5]

Závislost viskozity polymerního roztoku na rychlosti smykové deformace pro pseudoplastický materiál je znázorněna na Obr. 14. Vysoká pseudoplasticita znamená, že viskozita roztoku rychle klesá se zvyšující se smykovou rychlostí. Nízká pseudoplasticita znamená, že viskozita roztoku klesá pomalu se stoupající smykovou rychlostí [18].



Obr. 14. Pseudoplastické chování HA, upraveno dle [18]

Ze všech viskoelastických látek mají hyaluronové roztoky nejvyšší stupeň pseudoplasticity. Pseudoplasticita roztoku hyaluronanu může být také ilustrována pomocí mrkajícího procesu, který je vyobrazen na Obr 15. Mezi mrknutím (tj. při nízké smykové rychlosti) je roztok hyaluronanu v klidu a molekuly přebírají náhodně svinutou strukturu, která nabízí ochranné elastické vlastnosti (Obr 15 a). Při mrkání dochází ke zvýšení smykové rychlosti. Molekuly hyaluronanu jsou méně zamotané a mají tendenci se zarovnat, aby se mohly volně pohybovat jedna za druhou. Výsledkem je nižší viskozita a snadnější pohybování víček kolem povrchu oka (Obr 15 b). Pokles viskozity, ke kterému dochází v reakci na zvýšení smykové rychlosti, zabraňuje vymizení hyaluronanu z oka během mrkání, což umožňuje HA setrvat v oku mnohem déle. [18].

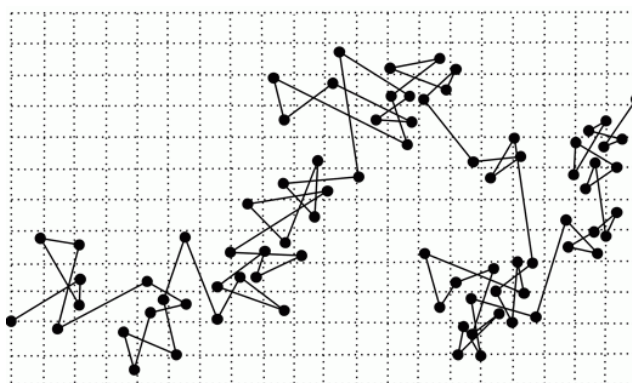


Obr. 15. (a) (vlevo) hyaluronové molekuly v klidu (mezi mrknutím); (b) (vpravo) a během smykového namáhání (během mrknutí) [18]

2.3.1 Brownův pohyb

Brownův pohyb v letech 1904 a 1905 objasnili Marian Smoluchowski a Albert Einstein. Pojmenování nese podle Roberta Browna, který v roce 1827 zaznamenal neuspořádaný a neustálý pohyb malých plynových zrněk ve vodě, přičemž tento pohyb je důkazem tepelného pohybu částic. Bližší definice je vyjádřena jako pohyb mikroskopických částic v kapalině nebo plynu, který je náhodný. Rychlost pohybu molekul vody je přímo úměrná teplotě roztoku, dochází k neustálým srážkám, přičemž směr i síla srážek jsou náhodné, tedy i okamžitá poloha částice je náhodná. Pohyb částic se dělí na: otáčivý, posuvný nebo kmitavý. U částic, které jsou v klidu, v daném okamžiku nepřevládá žádný směr [35, 36].

Částice o rozměrech v řádu μm vykonávají ve vodném prostředí pohyb trhavý, který je nepravidelný a je indukovaný molekulami vody. Charakter pohybu není závislý na vnějších podmínkách ani na chemickém složení. Směr pohybu částic se rychle mění. Čímž menší rozměry částic za zvýšené teploty okolního prostředí budou přítomné, tím větší intenzita pohybu bude vykazována [35].



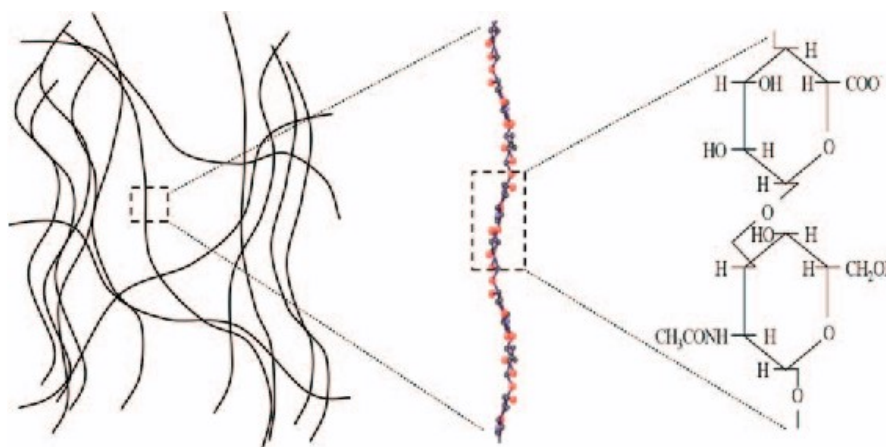
Obr. 16. Pohyb částic při Brownově pohybu [35]

Každá z daných úseček představuje asi 10^{23} nepozorovatelných posunutí v jedné částici [35].

2.4 Roztoky HA ve vodném prostředí

Při kombinaci HA s vodou má polymerní roztok viskoelastické vlastnosti, které jsou ovlivněny jeho polymerními a polyelektrolitickými charakteristikami [8, 18].

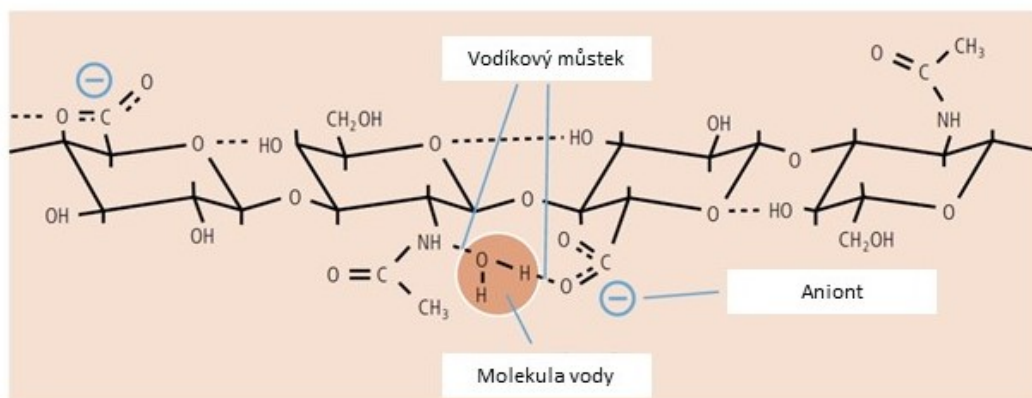
Glykosaminoglykany (GAG) zastávají významné strukturální a mechanické funkce, často založené na jejich výrazné tendenci obsadit velké domény ve vodném roztoku. Na Obr. 17 je znázorněna jednoduchá struktura polymerní sítě ve vodném prostředí [19].



Struktura polymerní sítě v roztoku Struktura řetězce HA HA jako stavební jednotka

Obr. 17. HA ve vodném roztoku [37]

Na Obr. 18 je vyobrazena schopnost HA vázat vodu. Klubičková struktura HA vede k tvorbě velkých hydrofilních domén, které se váží na vodu slabou vodíkovou vazbou. Tyto domény jsou velmi účinné při zadržování vody. Během komprese se hyaluronan chová jako houba a uvolňuje vodu do okolního prostředí. Když je tlaková síla odstraněna, osmotický tlak vtahuje vodu zpět do konstrukce. Výše zmíněné vlastnosti mají za následek pomalé odpařování vody z roztoků HA [18, 38].



Obr. 18. Schopnost zadržování vody, upraveno dle [18]

2.5 Roztoky HA ve fyziologickém roztoku

Náhodné klubko HA ve fyziologickém roztoku vykazuje značnou tuhost. U semi-flexibilního polymeru, jako je právě HA, vykazuje nejvyšší objem voda, která není navázaná polymerem. Tvar polymeru se neustále mění, přičemž voda stále přispívá k účinné velikosti každé molekuly, protože pohyb rozpouštědla je ovlivněn třecí interakcí s těsně vzdálenými segmenty polymeru. Kvůli rychlým pohybům řetězců může být časově průměrný tvar molekuly popsán jako koule s největší hustotou řetězcových segmentů v blízkosti středu. Čím větší je polymer, tím nižší je průměrná hustota, protože objem roste rychleji než hmotnost. Pro HA s molekulovou hmotností v milionech daltonů to vede k extrémně velkým objemům řetězců. Expandovaný tvar pružného polymeru v roztoku je klíčovým důvodem vysoké viskozity polymerních roztoků. Hydrodynamický objem řetězců HA se obvykle zkoumá pomocí iontové síly, která je blízká fyziologické. Při této iontové síle jsou náboje na karboxylových skupinách na řetězci HA téměř všechny vzájemně odděleny a odpor mezi nimi významně nezvyšuje objem polymerních klubek [5].

U roztoků s nižšími koncentracemi soli, přibližně pod 0,15 M NaCl, by elektrostatický odpor zvýšil hydrodynamický objem jednotlivých molekul HA a také by se zvýšil odpor mezi molekulami. Aby bylo možno odhadnout koncentraci, při níž by roztok HA mohl překročit překrytí polymerních klubek, je nutno zvážit hydrodynamickou velikost polymeru s různými molekulovými hmotnostmi. U HA s molekulovou hmotností 6 milionů vyžaduje překrytí polymerních klubek koncentraci HA jen asi 320 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. S molekulovou hmotností 1 milion by koncentrace překrytí polymerních klubek byla přibližně 1400 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ [38].

2.6 Přirozené síťování HA v roztocích

Hyaluronát sodný je v roztoku schopen tvořit dočasné polymerní sítě, jejichž vlastnosti závisí na koncentraci polymeru a jeho molekulové hmotnosti. Řetězce v síti mezi sebou nejsou vázány kovalentně. V roce 1964 se Laurent a kol. [40] pokusili o sesíťování hyaluronanu. Použili jednoduchý a efektivní postup pro spojování řetězců HA, čímž došlo k vytvoření ještě větší molekuly s vyšší molekulovou hmotností, v podstatě k tvorbě gelů. Podařila se jim příprava bez jakéhokoli zjevného poškození aminových a karboxylových skupin hyaluronanu. Další studie od Laurenta a kol. [21] týkající se interakce mezi hyaluronanem s jinými biologickými makromolekulami vedla k pozoruhodným pozorováním, které se zdají být důležité pro hlubší pochopení struktury hyaluronanu. V důsledku tuhosti řetězců HA přítomných ve vytvořené trojrozměrné síti polymerního gelu, složeného z HA a dalších proteinů, bylo pozorováno vylučování proteinů a dalších součástí. Výsledky nebyly kompatibilní s rozsáhlou dvojitou šroubovicí nebo jinými agregovanými konformacemi hyaluronanu [12, 16].

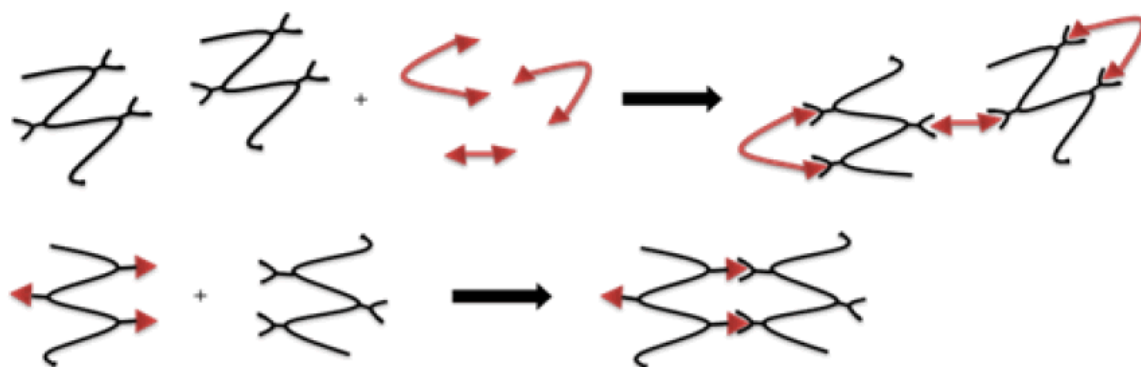
I přes to, že síťovitá struktura vytvořená roztokem polymeru HA nemá kovalentně sesíťované vazby mezi molekulami, tak i přesto si zachovává elastické a viskózní vlastnosti. V roztocích s vysokou koncentrací se zvyšuje množství vodíkových vazeb a molekulární řetězce jsou navzájem zapleteny, případně tvoří strukturu prostorové sítě. Hyaluronan vytváří polymerní sítě i za nízkých koncentrací (1 mg/ml). Je to dáno spojením hydrofobních částí za vzniku terciární struktury. Hyaluronové sítě s vysokou molekulovou hmotností v této koncentraci nevykazují žádné molekulární konce. Polymerní sítě jsou zdánlivě nekonečné. Každá molekula hyaluronanu je spojena se všemi ostatními molekulami právě prostřednictvím sítě, přičemž interakce udržující síť pohromadě jsou poměrně slabé. V důsledku toho dochází k tvorbě agregátů. Ty se vytváří a oddělují v závislosti na podmínkách prostředí [17].

Síťová struktura HA v organismu plní funkci filtru pro exogenní látky, bakterie a infekční činidla a tím zpomaluje jejich infiltraci. Některé bakterie (např. *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes et pneumoniae*) jsou však schopny tuto síť pomocí enzymu hyaluronidázy otevřít, tedy enzym je schopný štěpit HA na disacharidové GlcUA-GlcNAc nebo HA fragmenty, hydrolýzou hexosaminidového β (1,4) vazby mezi zbytky GlcNAc a GlcUA [11].

2.6.1 Hydrogely HA

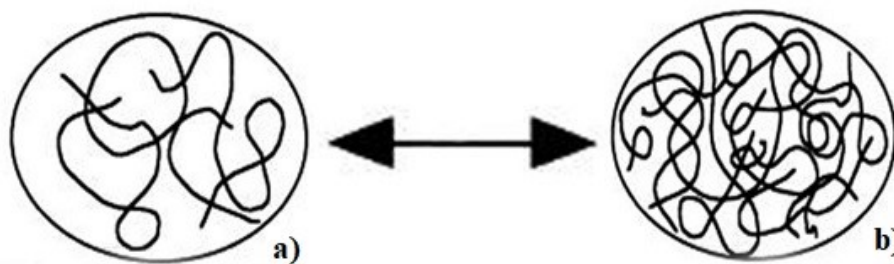
Hydrogely jsou tvořeny 3D sítí polymerních řetězců. Tato síť může být reverzibilní nebo trvalá v závislosti na fyzikální (vodíkové a iontové vazby, hydrofobní interakce) nebo chemické (kovalentní vazby) povaze sesíťení.

Na Obr. 19 jsou znázorněny 2 reakce. Tvorba nevyhovující sítě (reakce výše), je zpravidla pozorována s použitím bifunkčních síťovacích činidel s nízkou molekulovou hmotností, zatímco sesíťování polyfunkčních polymerů majících komplementární reaktivní funkce umožňuje tvorbu sítě, která je efektivní (spodní reakce) [4].



Obr. 19. Možná tvorba sítě v hydrogelu [4]

Polymerní gel je tvořen nabotnáním polymeru v rozpouštědle, v tomto případě HA ve vodném prostředí. Obrázek 20 demonstruje polymerní gel (a), ve kterém je obsažen nízký podíl polymeru a vysoký podíl rozpouštědla. Na Obr. 20 (b) je vyobrazen částečně nabotnalý stav polymeru v prostředí rozpouštědla. Podíl polymeru je v tomto případě vysoký a podíl rozpouštědla je nízký [39].



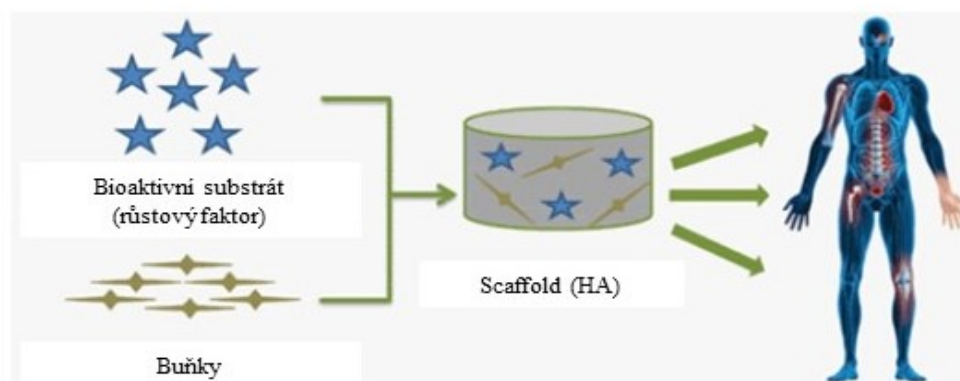
Obr. 20. Polymerní gel; a) nabotnalý stav; b) částečně nabotnalý stav [39]

Vlastnosti hydrogelů, mimo jiné biokompatibilita, degradace na organismem odbouratelné produkty a vysoký obsah vody, umožňují jejich využití v regenerativní a estetické medicíně. Poréznost hydrogelů a jejich hydrofilní charakter jsou podstatné pro vývoj nosičů léčiv.

Správně zvolenými technikami lze zpracovat hydrogel do podoby přirozené ECM s požadovanými fyzikálními a chemickými vlastnostmi podporujícími proliferaci buněk, případně buněčnou diferenciaci. Cytokompatibilita, mechanická a chemická stabilita hydrogelů může být zvýšena přidáním jiných přírodních ve vodě rozpustných polymerů (např. kolagenu, želatiny, alginátu, agarózy, polysacharidů) nebo přidáním směsi syntetických polymerních látek (např. polyakrylátů). Kombinace HA, kolagenu a sericinu může potenciálně vést ke vzniku hydrogelu s vynikajícími vlastnostmi pro regeneraci tkání [4, 9, 41, 42].

3 HYALURONAN A JEHO DERIVÁTY PRO TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Biopolymery obecně představují ideální kandidáty pro přípravu komponentů pro TE – lze upravit jejich mechanické vlastnosti a výslednou geometrii v konkrétní aplikaci a rychlost jejich degradace v organismu je srovnatelná s tvorbou nové tkáně. Hydrofilní povaha HA vyžaduje modifikace řetězce za účelem podpory buněčné adheze. Z hlediska stability biomateriálu je zkoumána řada metod chemického síťování. Zlepšení mechanických vlastností síťováním umožňuje dlouhodobé biomedicínské aplikace. Na Obr. 21 jsou vyobrazeny principy TE [4, 6].



Obr. 21. Principy TE zahrnující dodávky buněk a bioaktivních látek pacientům za účelem obnovení ztracené funkce tkání [4]

3.1 Hydrogelové scaffoldy

Tvorba gelu by měla probíhat dostatečnou rychlostí a za fyziologicky přijatelných podmínek (tj. teplota při 37 °C a pH 7) bez vzniku vedlejších toxických produktů [43].

Pokud je tkáň značně poškozena, transplantace tkáně (např. kosti) nebo protetické implantáty jsou obvykle považovány za hlavní lékařské řešení. Transplantace tkáně může být omezena zásobováním tkáně nutrieny, způsobuje pacientům nepohodlí, zvyšuje riziko přenosu onemocnění a může způsobit imunitní odezvy. Kromě toho nejsou protetické implantáty fyziologicky funkční a jsou příliš často doprovázeny infekcí a strukturálním selháním. Jako alternativní terapeutickou volbu k transplantaci tkáně a protézové implantaci ukázala TE velmi slibné výsledky [4, 6].

3.1.1 Použití scaffoldů na bázi HA v regenerativní medicíně

S pokrokem v technologii zpracování mikročástic lze dosáhnout mikroskopické kontroly buněčné proliferace a diferenciací ve scaffoldech založených na HA. Všeobecně mohou být scaffoldy na bázi HA úspěšně využívány pro aplikace klinického tkáňového inženýrství a tím vyhovět pacientům [1].

3.1.2 Použití scaffoldů na bázi HA v anti-aging a estetické medicíně

V souvislosti se stárnutím populace a zvyšujícím se zájmem o estetickou medicínu dochází k rozvoji trhu s dermálními výplněmi na bázi HA. Hyaluronát sodný je v kosmetické praxi užíván nejen ve formě kožních výplní, ale lze jej aplikovat i při korekci defektů měkké tkáně, zahrnujících regeneraci pokožky, eliminaci vrásek nebo hojení drobných ran. Hyaluronát sodný poskytuje účinnou neinvazivní alternativu pro korekci obrysových defektů díky své schopnosti vázat vodu a snadné implantaci. Různé kosmetické formulace pro topické použití obsahují LMW HA, který má schopnost proniknout do *SC*, kde zlepšuje hydrataci tkání. V medicíně se využívá HMW HA. V USA bylo schváleno osm kosmetických výplní s obsahem HA pro komercializaci Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA – Food and Drug Administration) navzdory hlášení závažných nežádoucích účinků [4, 6, 11].

3.2 Další biomedicínské, farmakologické a estetické aplikace HA

Pokroky v glykobiologii poukázaly na to, že HA se aktivně účastní různých buněčných komunikačních událostí. Pravděpodobně iniciuje a kontroluje události spojené se zánětem, zráním a migrací zánětlivých buněk a podobně. Hyaluronát sodný se uvolňuje po poranění jako molekulární vzor spojený s poškozením. Současný biotechnologický výzkum zkoumá produkci a použití HA pro řadu pokročilých aplikací. Odbourání HA je v závislosti na tkáni velmi rychlé: poločas rozpadu HA je asi 10 týdnů u sklivce, 1–3 týdny v chrupavce, 1–2 dny v *epidermis* a pouze 2–5 min v krevním řečišti. Nevýhodou je, že vysoký stupeň botnání HA vede k nízké biochemické funkčnosti pro připojení a proliferaci buněk a špatné mechanické stabilitě ve vodném prostředí [3, 11].

3.2.1 3D matrice buněčných kultur

Tradiční přístup ke tkáňové kultuře s buňkami pěstovanými na dvourozměrných (2D) substrátech nedokáže rekapitulovat 3D mikroprostředí, interakce mezi buňkami a maticemi

a často ani funkci tkání *in vivo*, což omezuje jejich význam pro pokročilý výzkum. V posledních deseti letech byly opakovaně prokázány funkční rozdíly mezi 2D kulturami a 3D konstrukcemi u mnoha typů tkání a nemocí. Pro řešení potřeby 3D výzkumu buněčných kultur byly vyvinuty různé přírodní, syntetické a polosyntetické ECM analogy jako matrice pro enkapsulaci buněk, například 4 komerčně dostupné produkty – Matrigel®, Purecol®, PuraMatrix™ a Extracel™. Kromě optimálních biologických odpovědí poskytují 3D matrice založené na HA další výhody ve srovnání s jejich přirozenými nebo syntetickými protějšky. Výhoda užití HA jako základního stavebního prvku pro 3D matrice spočívá v dostupné syntéze materiálu, snadné výrobě produktu a četným možnostem modifikace vlastností pro specifické aplikace [6].

3.2.2 Biotisk

Biotisk je dynamicky se rozvíjející odvětví biotechnologie. Jedná se o aditivní biofabrikaci biologických komponent zaměřených na budování nebo modelování životaschopných orgánů (bioinků) ve 3D podobě. Metoda používá počítačově řízený 3D tiskový hardware k přesnému ukládání směsí buněk a biomateriálů nebo bezbuněčných zástupných polymerů do přesných geometrií za účelem vytvoření anatomicky správných biologických struktur. Hyaluronát sodný ve své nativní formě není optimální pro biotisk, a to z důvodu nedostatečných mechanických vlastností pro udržení stabilní 3D nosné struktury. Je to spíše viskózní kapalina. Velmi měkké hydrogely HA, které nejsou strukturně robustní, neumožňují účinné vytlačování pro biotisk. Řešení této problematiky představují četné přístupy k síťování HA [6].

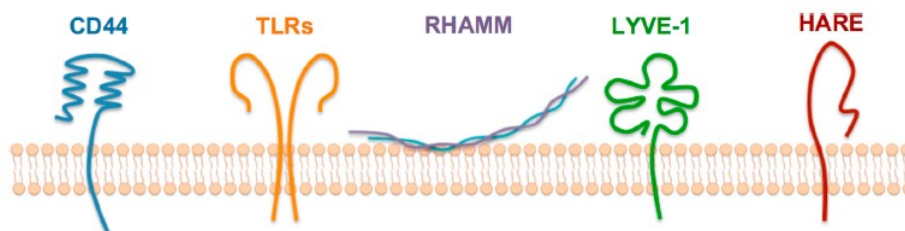
3.2.3 Aplikace jako nosiče léčiva pro prodloužené uvolňování

Hyaluronát sodný pro své vynikající vlastnosti může být použit jako nosič léčiva pro prodloužené uvolňování. Nicméně jeho nízká stabilita je nepříznivým faktorem při aplikaci genových vektorů, proto je opět nutná chemická modifikace. Bylo zjištěno, že HA receptor CD44 je exprimován na nízké úrovni na povrchu epitelových buněk, hematopoetických buněk a neuronálních buněk a také je nadměrně exprimován v mnoha buňkách nádorového typu. Vzhledem k cílovému systému podávání léčiva z nosného materiálu je léčivo kovalentně vázáno na nosič nebo je na nosiči zachyceno. Léčivo je cíleno do nádorové tkáně nebo orgánu prostřednictvím transportních vlastností a specifické rozpoznávací funkce nosiče v lidském těle. Terapie zaměřená na nádory je v současné době určena především

podle principu zvýšeného účinku retence permeace (EPR – Enhanced Permeability Retention). Běžně používané aktivní cílení je zprostředkováno receptory, protilátkami nebo polypeptidy, přičemž jejich vazba na ligandy má dobrou specificitu i afinitu. S prohloubením výzkumu bylo zjištěno, že HA se může vázat s proteiny a receptory, což hraje důležitou roli při tvorbě, opravách, regulaci buněk a angiogenezi lidských tkání. Proto je HA široce používán v oblasti medicíny. Použití HA jako nosiče léčiv je různorodé (nosiče s prodlouženým uvolňováním pro různá léčiva: protinádorová léčiva, protizánětlivá léčiva a anestetika) [12].

3.2.4 Signalizace na bázi HA

Se zaměřením na hojení ran a obnovu tkání se zdá, že signalizace založená na HA má za následek růst cév, aktivaci zánětlivých buněk a regulaci epitelových buněk i fibroblastů. Hyaluronát sodný zejména usnadňuje proliferaci fibroblastů a migraci zprostředkovanou transformujícím růstovým faktorem pI (TGF- pI), čímž dochází ke zvýšenému vylučování kolagenu v místě poranění, tak i k migraci myofibroblastů. Vazebné proteiny HA a HA mohou regulovat tkáňové poškození, zánětlivé reakce a opravné procesy prostřednictvím specifických interakcí s řadou kmenových buněk. Dosud byly identifikovány receptory, viz Obr. 22, pro HA, jako je klastrový determinant 44 (CD44), receptory podobné toll (TLR), receptor hyaluronanem zprostředkované motility (RHAMM), také známý jako CD168, endotheliální HA receptor lymfatické cévy (LYVE-1) a HA receptor pro endocytózu (HARE) [11, 14, 44].



Obr. 22. Receptory pro HA [11]

CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Připravit roztoky hyaluronanu (HA) o střední molekulové hmotnosti 370 kDa pomocí speciálního zařízení, které generuje samoorganizované toky kapaliny na základě nastaveného teplotního spádu.

Prostudovat, jak tyto organizované toky kapaliny ovlivňují chování hyaluronanu v rozdílných prostředích (pufr, fyziologický roztok, voda).

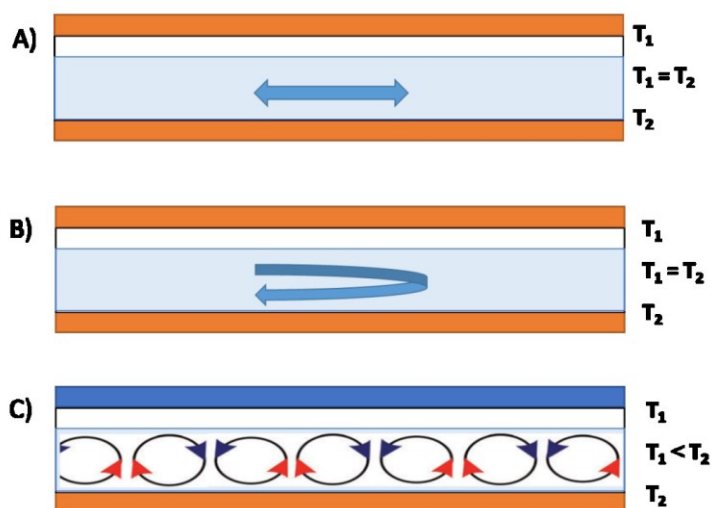
Zjistit, jak chování HA v roztoku ovlivňuje teplota jeho přípravy, použitá koncentrace polymeru a případná filtrace.

Najít takové podmínky přípravy polymerního roztoku, na jejichž základě dojde ke změně střední velikosti polymerních klubek HA, nárůstu jejich povrchové aktivity a ovlivnění tepelné stability s ohledem na jejich střední velikost měřenou pomocí dynamického rozptylu světla.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

Distribuce velikosti částic, změny povrchové aktivity a s tím spojená změna konformace HA, byly studovány u řady polymerních roztoků. Polymerní roztoky byly připraveny za rozdílných fyzikálních podmínek, které znázorňuje Obr. 23. Na tomto schématu se nachází tři různé přístupy rozpouštění HA: (a) třepáním – oscilace, (b) mícháním – rotace, (c) TFFC zařízením – samoorganizované proudění kapaliny.



Obr. 23. Různé možnosti přípravy roztoků HA

Samotná příprava polymerních roztoků probíhala výhradně ve skleněných nádobách, jejichž postup čištění je podrobněji popsán v podkapitole 4.2.

Pro rozpouštění HA v práškové formě byla použita: ultračistá voda s odporem $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ připravená pomocí reverzní osmózy, fyziologický roztok (vodný roztok chloridu sodného o koncentraci 0,9 hm. %) nebo pufr Tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochloride, Tris-HCl (koncentrace 50 mM, pH = 8).

Hyaluronan byl rozpouštěn na každém z níže uvedených zařízení po dobu 24 hodin.

Příprava polymerních roztoků na TFFC zařízení probíhala následovně: na spodní topnou / chladičí desku byl aplikován stolní olej pro lepší kontakt topné / chladičí desky s Petriho miskou, a to z důvodu nerovností na spodní straně použité misky. Na předem zváženou Petriho misku o průměru 11 cm bylo naváženo vypočtené množství HA, které bylo pře-vrstveno daným rozpouštědlem, a to vždy o hmotnosti 67 g. Po vložení Petriho misky s polymerním roztokem na topnou / chladičí desku s aplikovaným olejem došlo k jejímu zakrytí pomocí nerezové desky očištěné ethanolem a vysušené proudem suchého vzduchu.

Na tuto nerezovou desku byla přiložena druhá topná / chladičí deska. Při působení teplotního spádu na polymerní roztok docházelo ke kondenzaci části rozpouštědla na povrch nerezové desky. Po dokončení procesu rozpouštění v TFFC zařízení bylo počáteční koncentrace HA dosaženo doplněním odpovídajícího množství rozpouštědla.

Příprava roztoků HA pomocí třepání / míchání probíhala navážením daného množství HA do skleněné nádoby (o objemu 30 ml), následně byla skleněná nádoba doplněna rozpouštědlem na objem 20 ml a poté byla ponechána třepat při laboratorní teplotě 23 °C nebo míchat při teplotě 46 °C.

Pozn.: pH pufru bylo kontrolováno pomocí Multimetru SensoDirect 150 Set od společnosti Lovibond. Byla využita pH elektroda SensoDirect Type330 od stejné společnosti.

4.1 Použité chemikálie

Mezi chemikálie použité pro přípravu polymerních roztoků spadají následující látky:

- Hyaluronát sodný v kosmetické čistotě o střední molekulové hmotnosti 370 kDa od společnosti Contipro a. s.,
- Trisma® base od společnosti Sigma-Aldrich,
- Kyselina chlorovodíková 35% od společnosti Lach – Ner s.r.o.,
- 0,9% NaCl p.a. – Bioextra od společnosti Sigma-Aldrich,
- Ultračistá voda s odporem 18,2 MΩ·cm připravená pomocí reverzní osmózy na zařízení Direct-Q.

4.2 Čištění laboratorního skla

Pro zabránění kontaminace polymerních roztoků bylo přistoupeno k několika krokům čištění použitého materiálu pro jejich přípravu. Byly připraveny lázně o složení:

- kyselina sírová zředěná s vodou v poměru 1:1 s následným oplachem v destilované vodě,
- kyselina chlorovodíková zředěná s vodou v poměru 1:1 s následným oplachem v destilované vodě,
- oplach v 5% roztoku peroxidu vodíku.

V těchto lázních bylo užívané sklo postupně ponecháno po dobu 15 minut při pokojové teplotě.

Následoval oplach skla destilovanou vodou, acetonem, destilovanou vodou a ethanolem. V konečné fázi bylo přistoupeno ke sterilizaci skla při 120 °C po dobu 20 min v sušícím zařízení Memmert s nucenou cirkulací vzduchu.

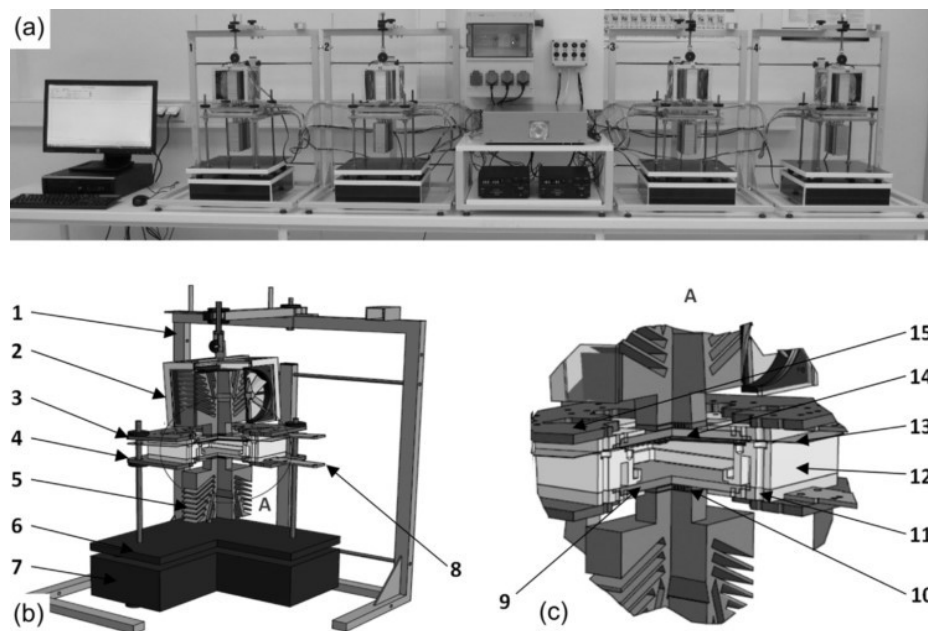
4.3 Zařízení pro přípravy polymerních roztoků / filmů

Pro přípravu polymerních roztoků / filmů bylo využito několika typů zařízení:

- TTFC zařízení,
- třepací stroj LT 2,
- magnetické míchací zařízení IKA RCT basic napojené na temperanční lázeň.

4.3.1 TTFC zařízení

Prioritně byly roztoky HA připravovány ve speciálním zařízení, které je označeno jako TTFC. Tento přístroj umožňuje cílenou modifikaci fyzikálně-chemických vlastností disperzních systémů za pomoci samoorganizovaného toku kapaliny. TTFC je sestaven ze 2 základních ploch, které přivádí / odvádí teplo, a to vede přes samoorganizované procesy až ke změně konformací polymerních klubek v roztoku. Na Obr. 24 se nachází: (a) experimentální přístroj pro definovanou modifikaci a solidifikaci polymerních roztoků, (b) funkční subjednotka, (c) náhled na střední část funkční subjednotky. Podrobnější popis jednotlivých částí zařízení + funkce lze nalézt v práci A. Minaříka a kol. [45].



Obr. 24. TFFC zařízení [45]

4.3.2 Třepací stroj LT 2

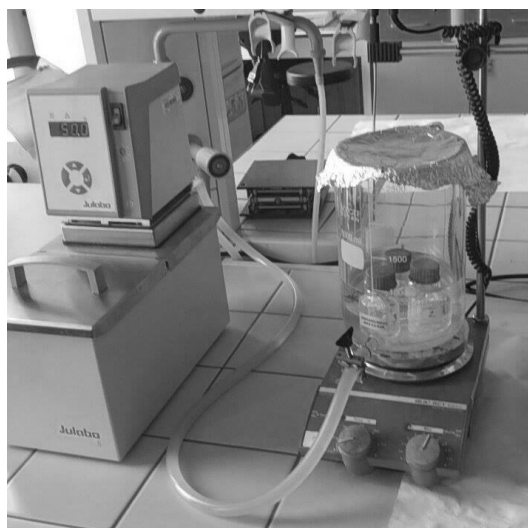
Pro přípravu polymerních roztoků bylo využito třepacího zařízení s nastavitelnou rychlostí pohybu v horizontálním směru, které je znázorněno na Obr. 25.



Obr. 25. Třepací zařízení LT 2

4.3.3 Magnetické míchací zařízení

Pro přípravu polymerních roztoků bylo využito magnetického zařízení typu IKA RCT basis s termostatem značky Julabo a temperovanou lázní, viz Obr. 26.



*Obr. 26. Magnetické míchadlo
s temperovanou lázní*

4.4 Charakteristika polymerních roztoků

Roztoky HA byly charakterizovány pomocí několika metod:

- DLS,
- tensiometrie,
- viskozitní měření,
- SEC-MALS.

4.4.1 DLS

Dynamický rozptyl světla je metoda, kterou lze stanovit velikosti i extrémně malých částic v submikronovém rozsahu, přičemž tyto částice vykazují Brownův pohyb. Rychlost difuze pohybu částic je nepřímo úměrná hydrodynamickému průměru částic (Stokes-Einsteinova rovnice) [46, 47].

$$D = \frac{k T}{3 \pi \eta d_p} \quad (1)$$

Kde:

k Boltzmannova konstanta

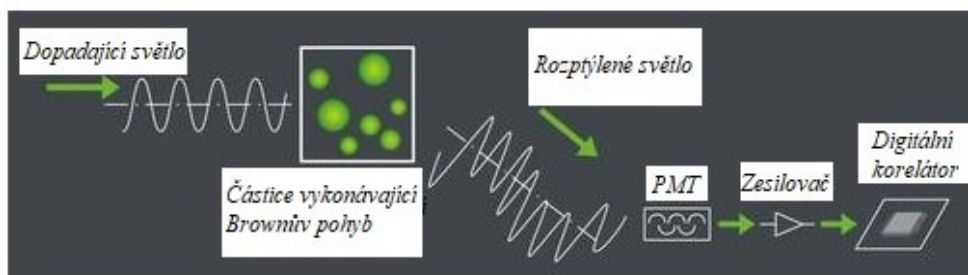
T teplota

η viskozita

d_p hydrodynamický průměr

D rychlost difuze

Na Obr. 27 je schematicky znázorněn princip metody DLS. Interference elektromagnetického záření může být buď konstruktivní (zesílení) nebo destruktivní (zeslabení). Časem se interference mění, a to díky tomu, že částice jsou navázány v kapalinách. Záznam interference je prováděn pomocí vysoce citlivého fotonásobiče (PMT – PhotoMultiplier Tube). Časová závislost intenzity rozptýleného světla závisí na rychlosti pohybu částic a tím i na jejich velikosti, která je analyzována autokorelací. Analyzátoři zaznamenávají světlo rozptýlené (pod úhlem 90° k dopadajícímu světlu) nebo rozptyl zpětný (tedy 173°) [46, 48].



Obr. 27. DLS, upraveno dle [46]

Pro charakterizaci byl použit Zetasizer nano od firmy Malvern, viz Obr. 28. Tento přístroj umožňuje měřit změny střední velikosti polymerních klubek s teplotou. Měření těchto změn probíhalo při lineárně se zvyšující teplotě v rozmezí 25 až 55°C . Před charakterizací bylo nutno provést zředění roztoků na základní koncentraci $0,1 \text{ hm. \% HA}$ a následné zředění základní koncentrace roztoku HA pomocí rozpouštědla v poměru $1:3$ a $1:1$.



Obr. 28. Zetasizer nano [49]

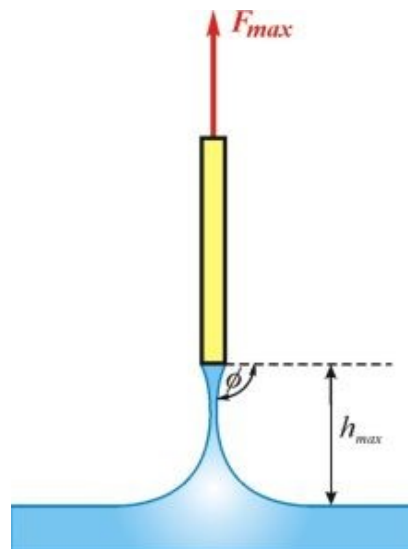
4.4.2 Tensiometrie

Povrchové napětí polymerních roztoků bylo měřeno pomocí Wilhelmyho destičkové metody. Na povrchu platinové destičky dochází k vytvoření menisků z obou stran. Pokud dochází k pohybu fázového rozhraní vzhledem k destičce směrem dolů, síla F , která působí na destičku, vzroste, přičemž v okamžiku těsně před odtrhnutím dosáhne maxima, což je znázorněno na Obr. 29 [50].

$$F_{max} = 2 l \gamma \quad (2)$$

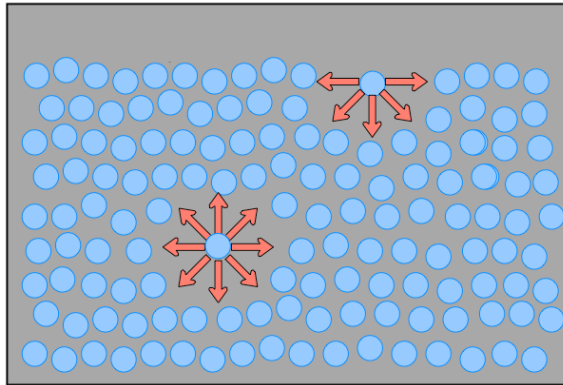
Kde:

F_{max}	maximální síla
l	délka destičky
γ	povrchové napětí



Obr. 29. Povrchové napětí [50]

Na každou molekulu kapaliny působí přitažlivými silami sousední molekuly. Existuje představa „myšlené koule“ kolem každé molekuly kapaliny, jejíž poloměr činí 1 nm. Síly působících okolních molekul na tuto myšlenou kouli, která se nazývá jako sféra molekulového působení, jsou zanedbatelné. Obr. 30 popisuje to, jakým způsobem se liší silové působení pro molekuly, které se nacházejí blíže povrchu kapaliny (síly se nevyrovnávají a výsledná síla není nulová, míří do středu kapaliny) a pro molekuly, které se nacházejí v objemové části kapaliny (molekuly na sebe působí přitažlivými silami, síly se vzájemně vyrušují) [51, 52].



Obr. 30. Povrchové napětí [51]

Pro přesun molekul z objemové části kapaliny na povrch kapaliny je nutno překonat síly. Energie molekul blízko povrchu, povrchová energie, je tím větší, čím blíže k sobě molekuly v kapalině jsou:

$$E = \gamma \cdot S \quad (3)$$

Kde:

E povrchová energie

γ povrchové napětí

S povrch

Povrchové napětí klesá s rostoucí teplotou. Každá soustava přechází do takového stavu, ve kterém má nejmenší potenciální energii, což pro kapalinu zastává tvar koule [51, 52].

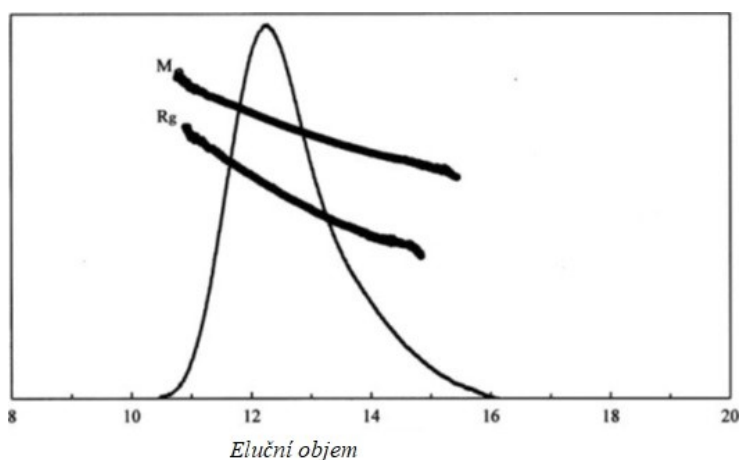
Pro samotné měření povrchového napětí byl použit přístroj K100MK3 od firmy Krüss, viz Obr. 31. Experimentální měření polymerních roztoků probíhalo po dobu 300 sekund při teplotě $(37,0 \pm 0,1) \text{ }^\circ\text{C}$ z důvodu přiblížení se teplotě lidského těla. Měření předcházela temperace roztoků v sušícím zařízení Memmert při teplotě $40 \text{ }^\circ\text{C}$.



Obr. 31. Tensiometr Krüss
K100MK3

4.4.3 SEC-MALS

Jedná se o absolutní techniku pro stanovení molární hmotnosti a geometrického poloměru makromolekul v roztoku. Jde o kombinaci chromatografie s vyloučením velikosti s analýzou rozptylu světla s více úhly. Hyaluronát sodný je detekován pomocí detektoru Wyatt MALS s výkonným softwarem ASTRA. Data jsou analyzována pomocí Zimmova grafu, který umožňuje simultánní extrapolaci na nulový úhel a nulovou koncentraci. Analýza dat zahrnuje měření gyračního poloměru (R_g) a molekulové hmotnosti (M) průběžně pro eluované vzorky, což poskytuje okamžitý výpočet distribuce molekulové hmotnosti (Obr. 32) [53, 54].



Obr. 32. SEC-MALS, HA s molekulovou hmotností
 $1,0 \cdot 10^6$, upraveno dle [53]

Asymetrická frakcionace pomocí tokového pole byla provedena ve velkém kanálu (LC model) s lichoběžníkovým designem od společnosti Wyatt Technology Europe GmbH (Dernbach, Německo) vybaveného membránou z regenerované celulózy (MWCO 30 kDa) od společnosti Merck Millipore (Darmstadt, Německo) a rozpěrkou 350 μm . Objem injektovaného vzorku činil 180 μl .

Roztok byl hodnocen pomocí HPLC systému Agilent 1100 Series s variabilním UV detektorem (Agilent, Německo), s použitím délky detekční vlny 280 nm. Tento systém byl navíc připojen k víceúhlému detektoru rozptylu světla DAWN EOS (Wyatt, Německo) a detektoru indexu lomu Shodex RI-71 (Shodex, Německo). Molekulové hmotnosti a gyrační poloměry ze signálů rozptylu světla byly vypočteny pomocí softwaru ASTRA 6 (Wyatt, Německo).

4.4.4 Viskozimetrie

Jednou z nejvýznamnějších vlastností roztoků HA je jejich viskozita. Studium viskozity obecně slouží k určení vlivu proměnných, jako je koncentrace, molekulová hmotnost, teplota, iontová síla, smyková rychlost apod. Všechny tyto proměnné též slouží k identifikaci tvaru molekulární domény, expanzi, rigidity a možných intramolekulárních interakcí [53].

K měření kinematické viskozity byl využit Ubbelohdeho kapilární viskozimetr v kombinaci s ViscoClock SI Analytics GmbH, což je zařízení, které přesně odečítá čas, za který polymerní roztok proteče kapilárou. Viskozimetr se nachází na Obr. 33.

Pro účel určení kinematické viskozity byly zvoleny 2 typy skleněných kapilárních viskozimetrů. Typ I vykazuje vnitřní průměr $0,63 \pm 0,01$ mm a konstantu $0,009670$ mm²/s². Typ II vykazuje vnitřní průměr $1,13 \pm 0,01$ mm a konstantu $0,1024$ mm²/s². Měření bylo prováděno při objemu polymerního roztoku 15 ml za pokojové teploty. K výpočtu kinematické viskozity byl použit vztah:

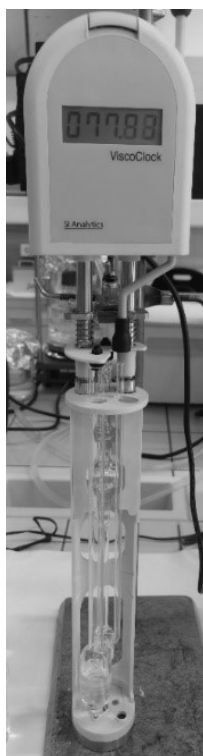
$$v = \tau \cdot K \quad (4)$$

Kde:

v kinematická viskozita

τ doba průtoku

K konstanta



*Obr. 33. Ubbelohdeho kapilární
viskozimetr*

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci experimentální práce byly analyzovány roztoky HA o MW = 370 kDa v rozmezí koncentrací 0,1–1 hm. %.

V prvním kroku byl studován vliv filtrace na změny střední velikosti polymerních klubek charakterizovaných pomocí DLS. Následně bylo vybranými metodami porovnáváno chování HA v roztocích v závislosti na rozdílných teplotních podmínkách jejich přípravy a typu disperzního prostředí. Byl zohledněn rovněž vliv koncentrace HA v roztoku. V poslední řadě byly vybrané roztoky solidifikovány do formy filmu a následně převedeny zpět do roztoku. Pro určení čistoty solidifikovaných polymerních filmů byla použita infračervená spektroskopie (FTIR).

Pozn.: Za preferované disperzní prostředí byl považován pufr (Tris-HCl).

Pozn.: Preferovanou přípravou polymerních roztoků bylo rozpouštění v TFFC zařízení.

Pozn.: Charakterizace povrchové aktivity polymerních roztoků probíhala pomocí tensiometrie při teplotě 37 °C. Měřeným poklesem γ v intervalu 16 až 300 s [mN/m] je myšlen rozdíl mezi hodnotou γ polymerního roztoku na konci měření, tedy 300 s, a hodnotou zaznamenanou v čase 16 s. Celkovou změnou γ v intervalu 0 až 300 s oproti vodě [mN/m] je myšlen pokles / nárůst γ oproti hodnotě γ disperzního prostředí ($71,00 \pm 0,01$) mN/m při teplotě 37 °C.

Pozn.: Z-ave představuje střední velikost polymerních klubek stanovenou z DLS.

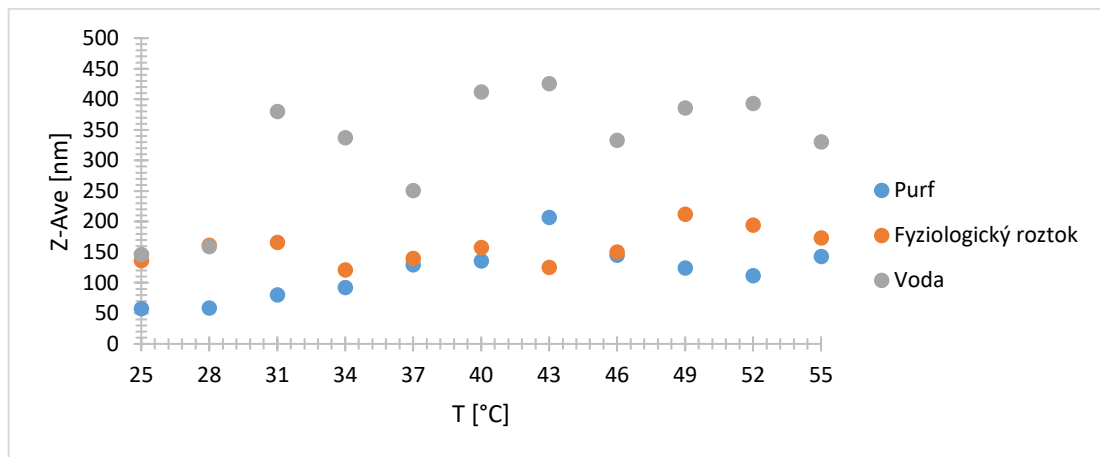
5.1 Vliv disperzního prostředí na chování HA

Prvním studovaným faktorem byl vliv složení disperzního prostředí, ve kterém byl HA rozpouštěn. Hyaluronové roztoky byly připravovány nejdříve v prostředí vody a fyziologického roztoku. Následně bylo přistoupeno k přípravě HA roztoků v přítomnosti pufru.

Obrázek 34 zobrazuje závislost střední velikosti polymerních klubek na lineárně se zvyšující teplotě. Polymerní roztoky byly připraveny za užití odlišných rozpouštědel v jinak identických podmínkách. Pro demonstraci byla zvolena koncentrace 0,1 hm. % HA v roztoku. Příprava roztoků probíhala na TFFC zařízení při teplotním spádu 50/40 °C. Z Obr. 34 plyne, že HA připravený v demineralizované vodě je schopen se s lineárně zvyšující teplotou náhodně rozbalovat a sbalovat, přičemž střední velikost polymerních klubek

se pohybuje v rozmezí hodnot od 150 do 425 nm. Tento fakt není překvapivý z toho důvodu, že demineralizovaná voda neobsahuje ionty, které by byly schopny zastabilizovat jeho strukturu. Existuje zde možnost volné rotace postranních segmentů.

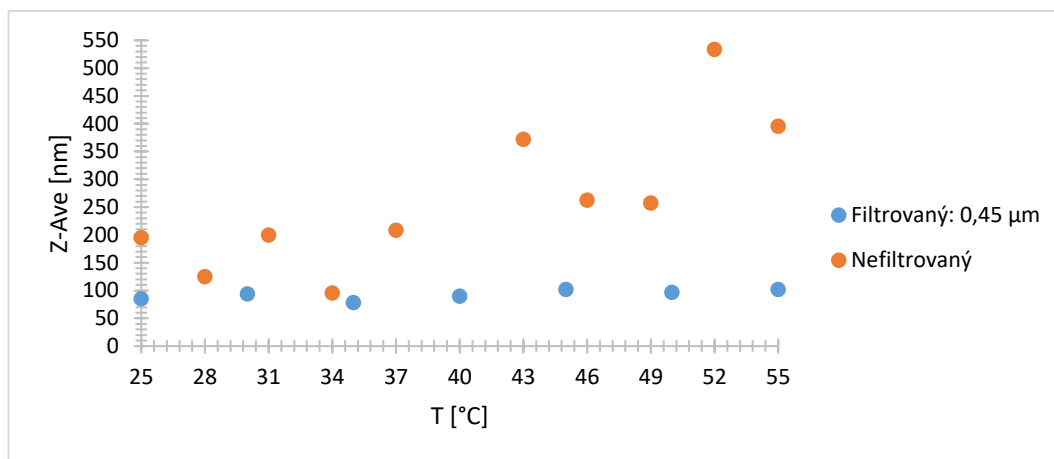
Naopak v prostředí fyziologického roztoku, podobně v prostředí pufru, dochází ke stabilizaci polymerních klubek. Polymerní roztoky se chovají termálně stabilněji, přičemž velikost polymerních částic je výrazně nižší ve srovnání s vodným prostředím.



Obr. 34. Srovnání vlivu disperzního prostředí na střední velikosti polymerních klubek

5.2 Vliv filtrování na chování HA v roztocích

Filtrace polymerních roztoků pomocí mikrofiltru o velikosti pórů 0,45 μm byla provedena za účelem eliminace nečistot v roztoku před DLS analýzou. Na Obr. 35 je vyobrazena závislost střední velikosti polymerních klubek na teplotě pro koncentraci 0,15 hm. % HA ve fyziologickém roztoku připraveném pomocí TFFC zařízení při teplotním spádu 50/40 $^{\circ}\text{C}$.



Obr. 35. Grafické znázornění velikosti polymerních klubek na teplotě s vyobrazeným vlivem filtrování na chování polymerních roztoků

Z experimentálních výsledků plyne, že filtrované roztoky vykazují výraznou konformační stabilitu v rozsahu sledovaných teplot. Důvodem tohoto pozorování může být rozrušení polymerní sítě v průběhu mikrofiltrace nebo odstranění větších agregátů a nečistot. Otázkou zůstává, zda opravdu nedochází k rozrušení terciální struktury HA vyvolané rozdílnými podmínkami přípravy polymerního roztoku. Zajímavou skutečností je to, že v případě jiných koncentračních poměrů HA v roztoku nebylo možné pozorovat rozdíl mezi filtrovaným a nefiltrovaným roztokem.

Po vykonání řady dalších experimentálních měření, přičemž pro bližší specifikaci je část těchto výsledků znázorněna na Obr. 36, bylo přistoupeno k tomu, že již filtrace polymerních roztoků před samotnou charakterizací pomocí DLS nebyla vykonána, aby se předešlo případnému rozrušení konformačního uspořádání klubek v důsledku rozdílných přístupů přípravy polymerních roztoků.

5.3 Vliv koncentrace HA na chování tohoto polymeru v roztoku

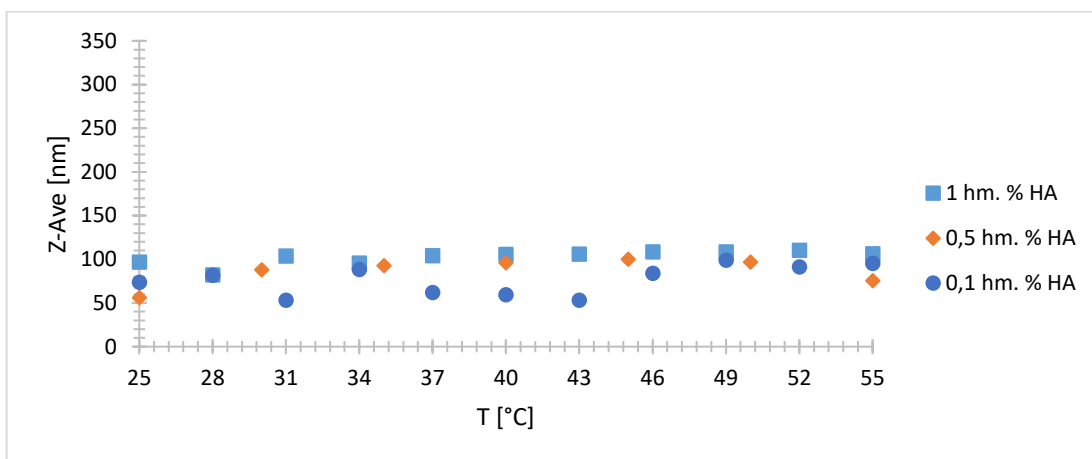
Třetím studovaným faktorem, který ovlivňuje konformaci polymerních klubek v roztocích, je vliv smykového namáhání biopolymeru, který přímo souvisí s koncentrací polymeru v roztoku, jak bylo naznačeno v podkapitole 2.6.1. Organizované smykové namáhání v rámci těchto experimentů bylo zprostředkováno organizovanými toky kapaliny generovanými v důsledku teplotních spádů v TFFC zařízení.

5.3.1 Rozpouštění HA ve fyziologickém roztoku pomocí třepacího zařízení

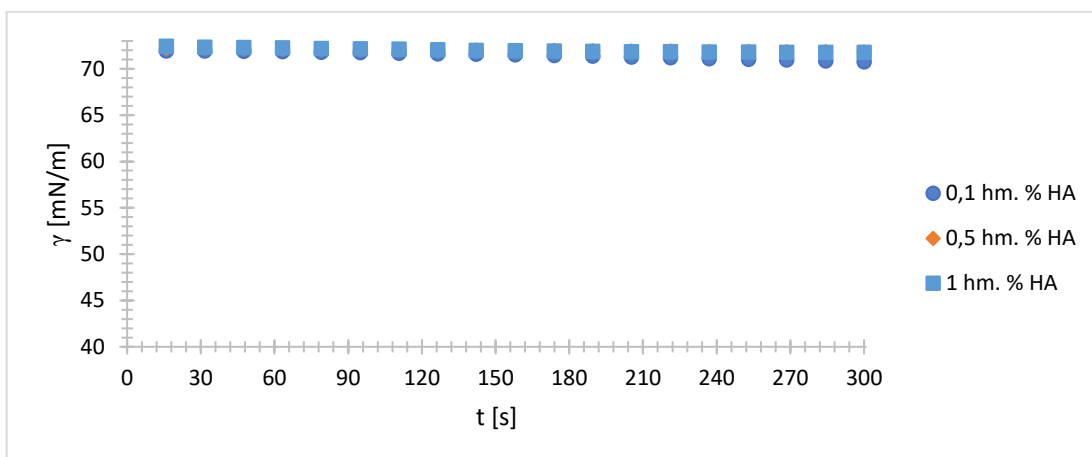
U polymerních roztoků připravených pomocí třepacího zařízení a TFFC zařízení byla provedena charakterizace změn středních velikostí polymerních klubek s teplotou a schopností obsazovat fázové rozhraní v čase (měření povrchového napětí).

Na Obr. 36 jsou vyobrazeny změny střední velikosti polymerních klubek v závislosti na zvyšující se teplotě. Jak již bylo zmíněno výše, tyto polymerní roztoky byly jako jediné vystaveny filtrování před samotnou charakterizací pomocí DLS. Z experimentálních výsledků vyplynulo, že velikost polymerních klubek v závislosti na lineárně se zvyšujícím teplotním režimu byla v rozmezí 53 až 110 nm.

Na Obr. 37 je znázorněna grafická závislost povrchového napětí na čase, která vypovídá o tom, že polymerní roztoky připravené pomocí třepacího zařízení nevykazují v daném časovém intervalu zvýšenou povrchovou aktivitu. Jejich povrchová aktivita není vyšší než povrchová aktivita vody. Jediné mírné navýšení povrchové aktivity lze pozorovat v případě roztoků s nízkým podílem HA (Tab. 2). V takovémto případě lze vycházet z předpokladu, že při této nízké koncentraci vystupují jednotlivé makromolekuly HA spíše jako samostatné jednotky schopné obsazovat fázové rozhraní. Zatímco v případě roztoků s vyšším hmotnostním podílem HA jsou stabilizovány do podoby prostorové sítě.



Obr. 36. Grafické znázornění změn velikosti polymerních klubek s teplotou pro HA ve fyziologickém roztoku s následnou filtrací. Roztoky připravené pomocí třepacího zařízení.



Obr. 37. Grafická závislost povrchového napětí na čase pro HA ve fyziologickém roztoku. Roztoky připravené pomocí třepacího zařízení.

Tab. 2. Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 37

w [hm. %]	T [°C]	Měřený pokles γ v intervalu 16 až 300 s [mN/m]	Celková změna γ v intervalu 0 až 300 s oproti vodě [mN/m]
0,1	23	$1,14 \pm 0,09$	$0,26 \pm 0,09$
0,5		$0,41 \pm 0,03$	$-0,08 \pm 0,02$
1		$0,67 \pm 0,05$	$-0,75 \pm 0,08$

5.3.2 Rozpouštění HA ve fyziologickém roztoku pomocí TFFC zařízení

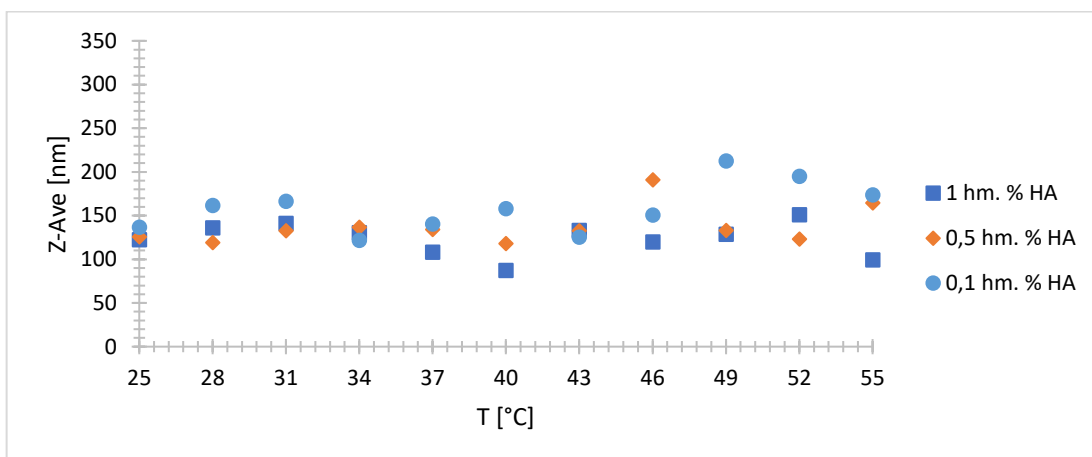
Primární příprava polymerních roztoků byla prováděna pomocí řízeného smykového namáhání kapaliny, které je generováno na základě nastaveného teplotního spádu v TFFC zařízení.

Pro demonstraci vlivu TFFC zařízení na změny fyzikálně-chemických charakteristik HA byl tento polymer rozpouštěn ve fyziologickém roztoku při teplotním spádu 50/40 °C.

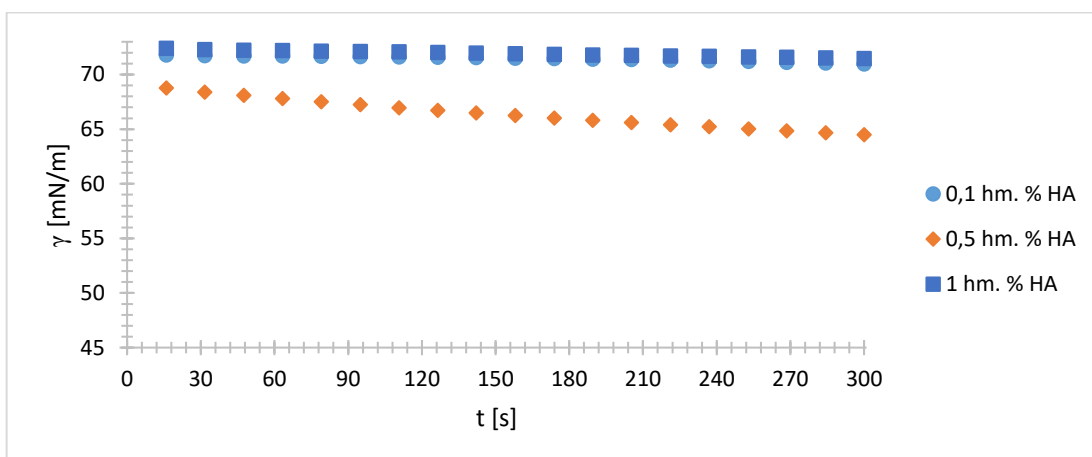
Na Obr. 38 je vyobrazena grafická závislost střední velikosti polymerních klubek na zvyšující se teplotě, ze které lze pozorovat rozdílné hodnoty střední velikosti polymerních klubek vzhledem k přípravě stejných polymerních roztoků pomocí třepání, viz Obr. 36. Z experimentálních výsledků vyplynulo, že střední velikost polymerních klubek HA se pohybuje rozmezí 87–212 nm.

U nižšího hmotnostního podílu HA v roztoku se střední velikost polymerních klubek pohybovala v širším rozmezí velikosti oproti jiným zvoleným koncentracím. Tuto skutečnost lze opět přičítat rozdílným agregačním a sít'otvorným schopnostem HA při rozdílných podílech tohoto polymeru v roztoku. Celkově lze konstatovat, že na zmíněné závislosti nelze pozorovat výraznější nestabilitu z hlediska změn střední velikosti klubek HA s teplotou.

Na Obr. 39 je znázorněna grafická závislost povrchového napětí na čase, která vypovídá o tom, že polymerní roztok obsahující 0,5 hm. % HA vykazuje vyšší povrchovou aktivitu. Toto napovídá o skutečnosti, že pro dosažení změn v konformačním uspořádání řetězců HA je nezbytné zvolit vhodné disperzní prostředí, hmotnostní podíl polymeru v roztoku a správný teplotní režim rozpouštění v TFFC zařízení, jak bude podrobněji diskutováno v dalších částech výsledků této práce.



Obr. 38. Grafické znázornění velikosti polymerních klubek na teplotě pro polymerní roztoky připravené ve fyziologickém roztoku při $T = 50/40$ °C



Obr. 39. Grafická závislost změn povrchového napětí na čase pro polymerní roztoky připravené ve fyziologickém roztoku při $T = 50/40$ °C

Tab. 3. Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 39

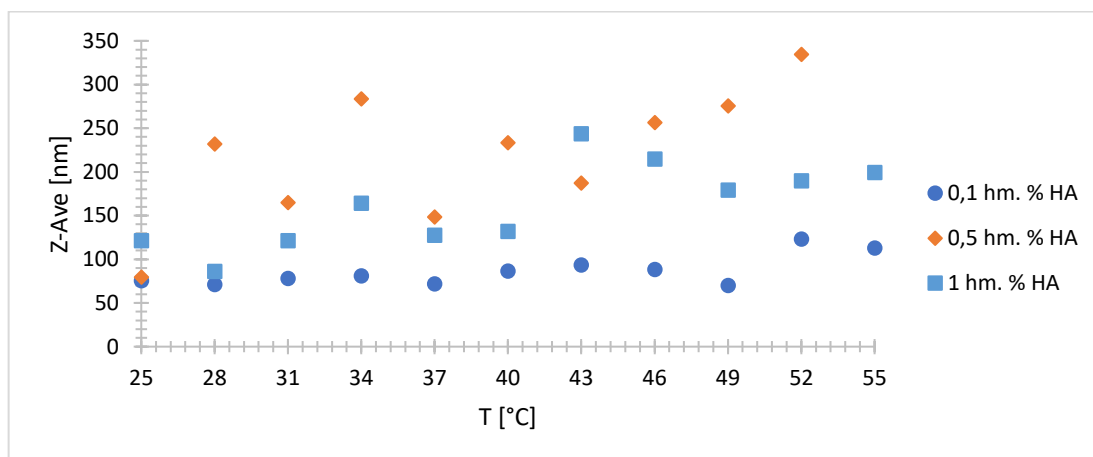
w [hm. %]	T [°C]	Měřený pokles γ v intervalu 16 až 300 s [mN/m]	Celková změna γ v intervalu 0 až 300 s oproti vodě [mN/m]
0,1	50/40	$0,80 \pm 0,06$	$0,03 \pm 0,08$
0,5		$4,27 \pm 0,30$	$6,51 \pm 0,16$
1		$0,96 \pm 0,07$	$-0,45 \pm 0,09$

5.3.3 Rozpouštění HA v roztoku pufru pomocí třepacího zařízení

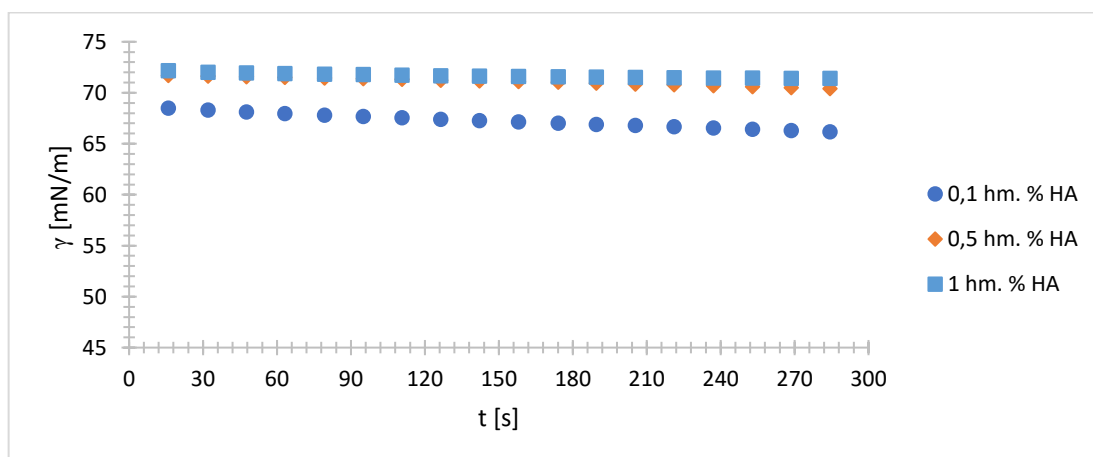
Třetím disperzním prostředím pro HA byl roztok pufru (Tris-HCl). Podobně jako v předchozích případech bylo pro rozpouštění využito třepacího zařízení a TFFC zařízení. Mimo tyto přístupy bylo dále využito temperovaného míchání. Výsledky z jednotlivých přístupů rozpouštění budou diskutovány v následujících podkapitolách. Tato část výsledků bude věnována přípravě polymerních roztoků pomocí třepacího zařízení při laboratorní teplotě, 23 °C.

Z výsledků uvedených na Obr. 40 plyne, že každý z výše charakterizovaných roztoků se vyznačuje rozdílnými změnami středních velikostí polymerních klubek s teplotou. Nejmenší změny z pohledu vývoje střední velikosti polymerních klubek lze pozorovat v případě roztoků s podílem HA 0,1 hm. %. Zaznamenaná střední velikost polymerních klubek HA se měnila s teplotou v rozmezí 50–350 nm. Největší výkyvy v měřených hodnotách byly zaznamenány v případě roztoku s obsahem 0,5 hm.% HA.

Na Obr. 41 je znázorněna grafická závislost povrchového napětí na čase. I v tomto případě lze konstatovat, že vyšší hmotnostní podíly polymeru v roztoku propůjčují polymernímu systému povrchovou inaktivitu. Není tomu tak v případě 0,1 hm. % HA v roztoku, který se jeví mírně povrchově aktivně. V prostředí pufru činí povrchová aktivita pro koncentraci 0,1 hm. % HA $\gamma = 4,95 \pm 0,14$ mN/m. V případě vyhodnocení povrchové aktivity u fyziologického roztoku při téže koncentraci HA povrchová aktivita činí $\gamma = 0,26 \pm 0,09$ mN/m.



Obr. 40. Grafické znázornění změn střední velikosti polymerních klubek HA s teplotou v prostředí *Tris-HCl* pufru. Roztoky připraveny pomocí třepacího zařízení při 23 °C



Obr. 41. Grafická závislost změn povrchového napětí na čase pro polymerní roztoky HA připravené v prostředí *Tris-HCl* pufru pomocí třepacího zařízení při 23 °C

Tab. 4. Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 41

w [hm. %]	T [°C]	Měřený pokles γ v intervalu 16 až 300 s [mN/m]	Celková změna γ v intervalu 0 až 300 s oproti vodě [mN/m]
0,1	23	$2,43 \pm 0,17$	$4,95 \pm 0,14$
0,5		$1,36 \pm 0,10$	$0,7 \pm 0,1$
1		$0,75 \pm 0,05$	$-0,40 \pm 0,08$

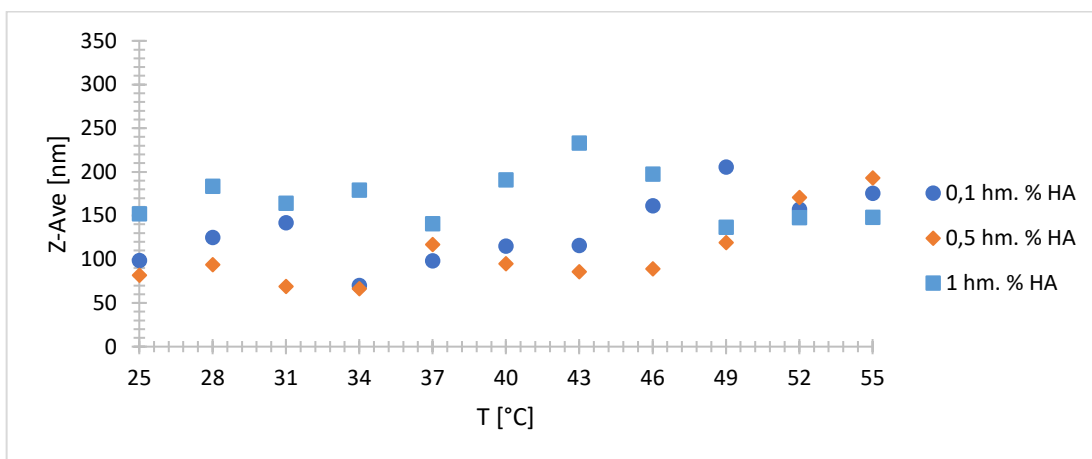
5.3.4 Rozpouštění HA v roztoku pufru pomocí temperovaného míchání

Dalším přístupem přípravy polymerního roztoku s ohledem na studium změn střední velikosti polymerních klubek s teplotou a změn jejich povrchové aktivity na fázovém rozhraní kapalina/plyn bylo temperované míchání při teplotě 46 °C.

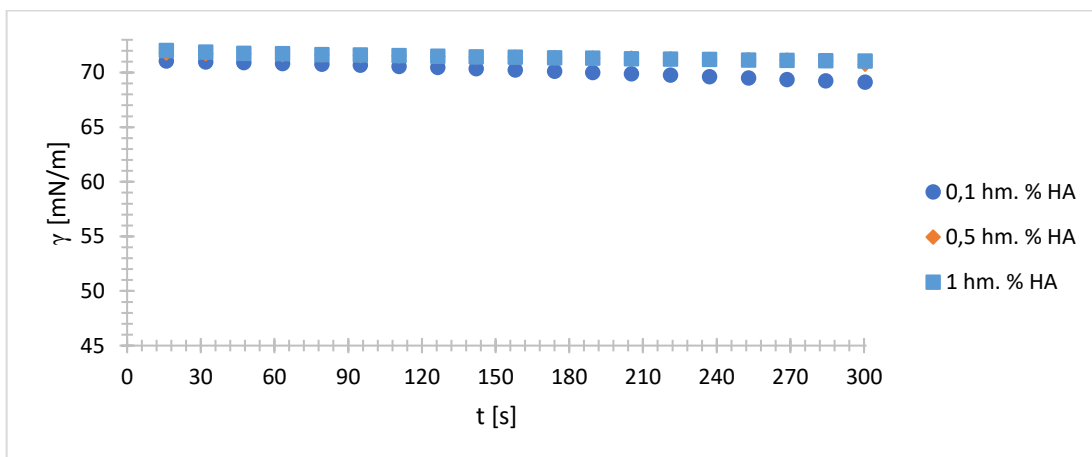
Na Obr. 42 je vyobrazena závislost střední velikosti polymerních klubek na teplotě. Z experimentálních výsledků vyplynulo, že teplotní trendy jsou s přípravou totožného roztoku pomocí třepacího zařízení rozdílné, viz. srovnání s Obr. 40.

Oproti přípravě polymerních roztoků pomocí třepacího zařízení, viz Obr. 40, lze pozorovat, že se zaznamenané změny střední velikosti polymerních klubek pomocí DLS pohybují v užším rozmezí hodnot, a to mezi 66 a 233 nm. Ještě větší pokles těchto hodnot lze pozorovat v případě přípravy polymerních roztoků pomocí TFFC zařízení, viz Obr. 44, jak bude diskutováno v následující podkapitole.

Na Obr. 43 se nachází grafické znázornění změn povrchového napětí na čase. Z tohoto porovnání je patrný mírný pokles povrchového napětí v čase pro nejmenší hmotnostní podíl polymeru v roztoku. Oproti přístupu založeném na třepání, Obr. 41, je tento pokles zanedbatelný.



Obr. 42. Grafické znázornění změn střední velikosti polymerních klubek HA s teplotou pro Tris-HCl roztoky připravené pomocí míchání při 46 °C



Obr. 43. Grafické znázornění změn povrchového napětí v čase pro Tris-HCl roztoky HA připravené pomocí míchání při 46 °C

Tab. 5. Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 43

w [hm. %]	T [°C]	Měřený pokles γ v intervalu 16 až 300 s [mN/m]	Celková změna γ v intervalu 0 až 300 s oproti vodě [mN/m]
0,1	46	$1,94 \pm 0,15$	$1,89 \pm 0,13$
0,5		$1,02 \pm 0,06$	$0,23 \pm 0,08$
1		$0,97 \pm 0,07$	$-0,06 \pm 0,09$

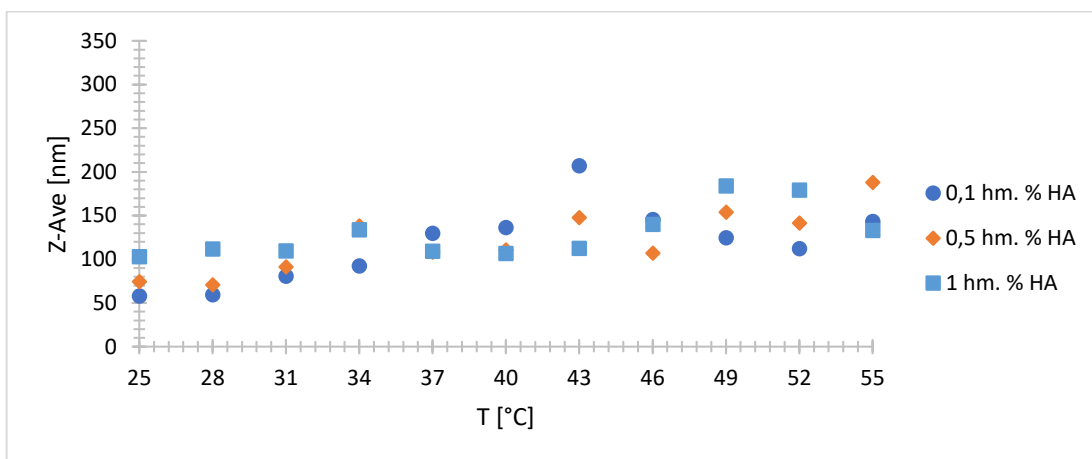
5.3.5 Rozpouštění HA v roztoku pufru pomocí TFFC zařízení

Posledním přístupem přípravy polymerních roztoků v prostředí pufru (Tris-HCl) bylo vystavení řetězců HA účinkům teplotního spádu v TFFC zařízení. Roztoky byly připravovány při spádu 50/40 °C.

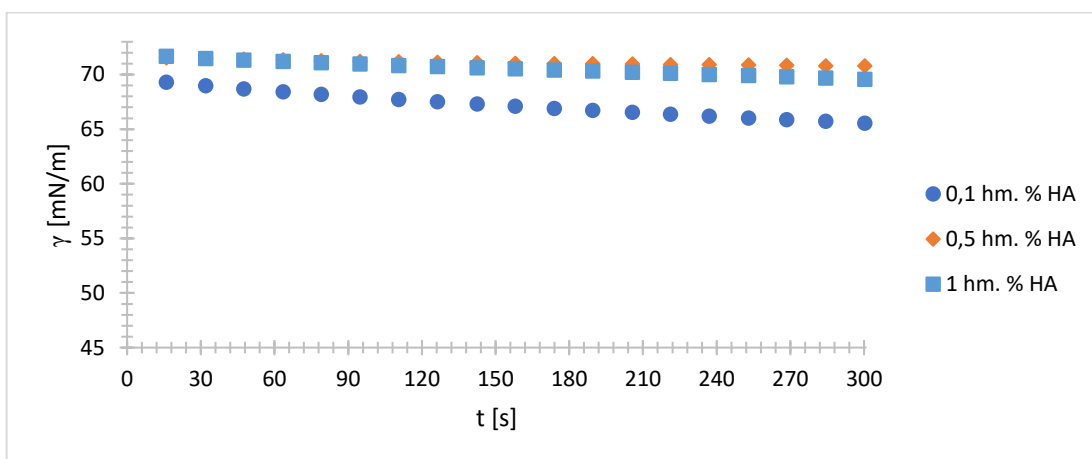
Na Obr. 44 je vyobrazena grafická závislost změn střední velikosti polymerních klubek s rostoucí teplotou. Z tohoto porovnání je patrné, že střední velikost polymerních klubek charakterizovaná pomocí DLS se pro všechny hmotnostní podíly HA v Tris-HCl pohybuje v rozmezí 58–207 nm. Toto rozmezí je v porovnání s přípravou pomocí třepání nebo míchání při zvýšené teplotě nejmenší. Tato skutečnost naznačuje významný vliv organizovaných toků kapaliny a zvýšené střední teploty roztoků na změnu střední velikosti klubek HA a možnosti jejich následné expanze při vyšších teplotách.

Souhrnně jsou výsledky z DLS měření pro různé přístupy přípravy HA roztoků v Tris-HCl porovnány na konci této podkapitoly.

Na Obr. 45 se nachází grafická závislost povrchového napětí na čase. Zde je rovněž patrný vliv řízeného smykového namáhání polymerních řetězců v roztoku Tris-HCl. Na Obr. 45 lze pozorovat, že i vyšší hmotnostní podíl polymeru může vykazovat mírně zvýšenou povrchovou aktivitu. Podobně jako v případě předešlých způsobů přípravy nejvyšší povrchovou aktivitu vykazuje nejnižší podíl polymeru v roztoku.



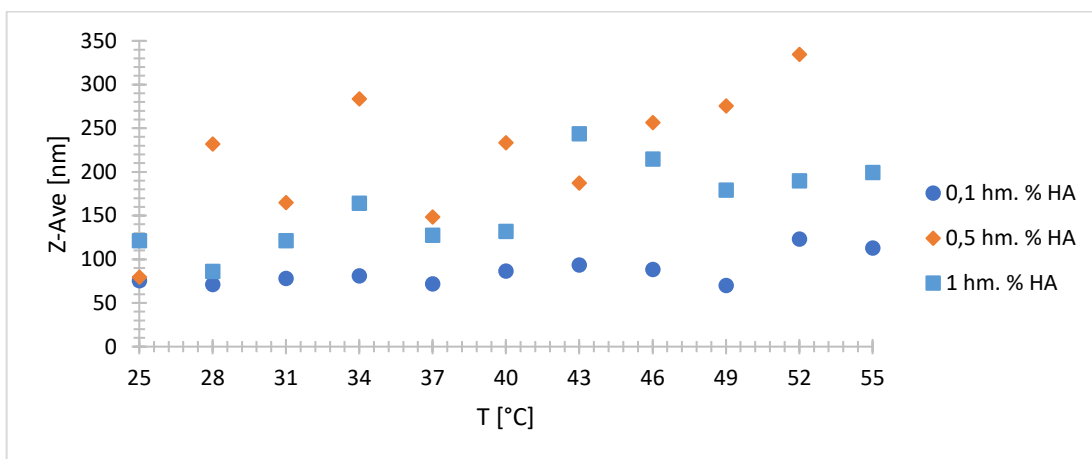
Obr. 44. Grafické znázornění změn střední velikosti polymerních klubek HA s teplotou pro Tris-HCl roztoky připravené v TFFC při $T = 50/40$ °C



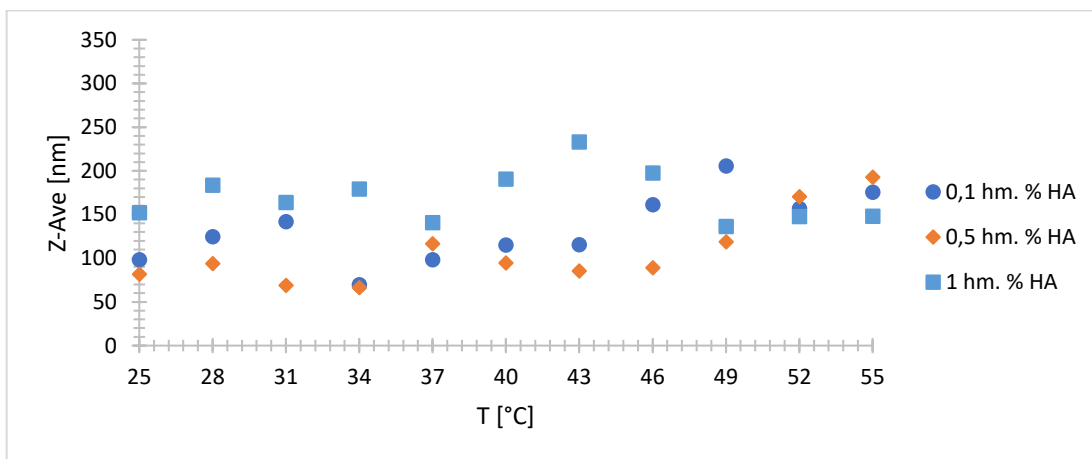
Obr. 45. Grafické znázornění změn povrchového napětí v čase pro Tris-HCl roztoky HA připravené pomocí TFFC při $T = 50/40$ °C

Tab. 6: Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 45

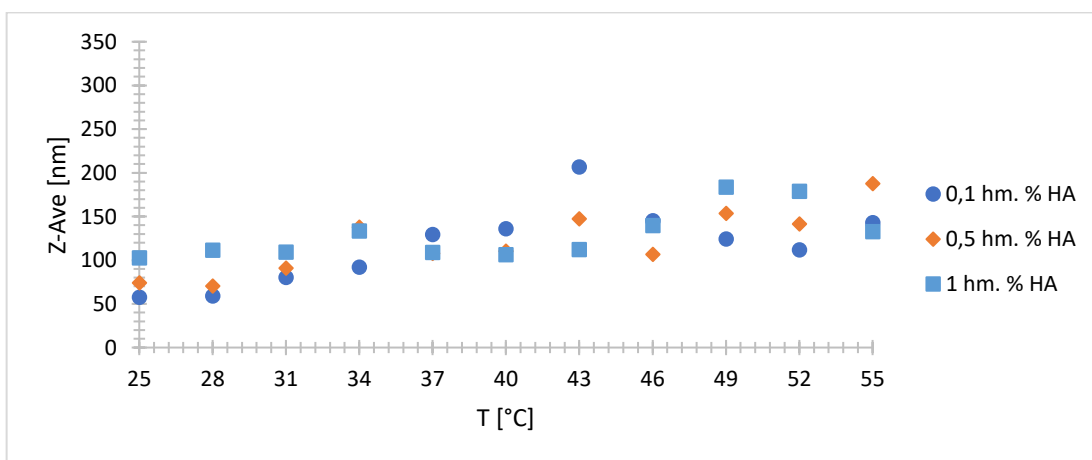
w [hm. %]	T [°C]	Měřený pokles γ v intervalu 16 až 300 s [mN/m]	Celková změna γ v intervalu 0 až 300 s oproti vodě [mN/m]
0,1	50/40	$3,90 \pm 0,30$	$4,74 \pm 0,19$
0,5		$0,76 \pm 0,06$	$0,22 \pm 0,08$
1		$2,21 \pm 0,15$	$1,44 \pm 0,13$



Obr. 40. Grafické znázornění změn střední velikosti polymerních klubek HA s teplotou v prostředí *Tris-HCl* pufru. Roztoky připraveny pomocí třepacího zařízení při 23°C.



Obr. 42. Grafické znázornění změn střední velikosti polymerních klubek HA s teplotou pro *Tris-HCl* roztoky připravené pomocí míchání při 46 °C



Obr. 44. Grafické znázornění změn střední velikosti polymerních klubek HA s teplotou pro *Tris-HCl* roztoky připravené v TFFC při $T = 50/40$ °C

5.4 Vliv střední teploty a teplotního spádu

Výsledky prezentované v rámci předešlé podkapitoly ukázaly vliv rozdílných způsobů přípravy HA v roztoku Tris-HCl pufru na změny fyzikálně-chemických charakteristik tohoto makromolekulárního systému. Slabým místem těchto srovnání je fakt, že rozpouštění jednotlivých roztoků probíhalo při rozdílných středních teplotách. S cílem prokázat dominantní vliv organizovaných toků kapaliny na změny vlastností klubek HA v roztoku byly v rámci dalších experimentů uvažovány nejen teplotní spády, ale rovněž střední teploty v roztoku, viz. Tab. 7

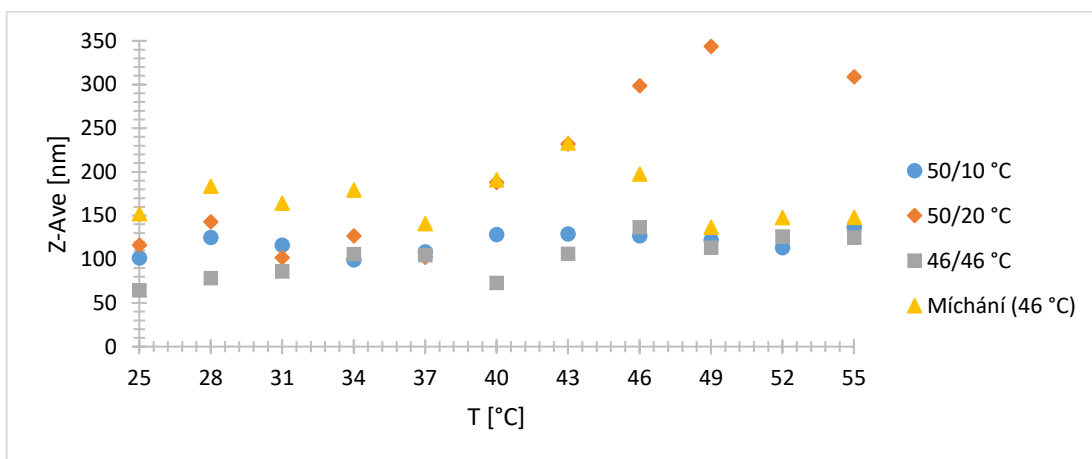
Tab. 7. Střední teploty polymerních roztoků při nastavených teplotních spádech

Nastavený teplotní spád [°C]	Střední teplota polymerního roztoku [°C]
50/10	45,9
46/46	46,0
50/20	46,3
50/30	48,8
50/40	49,4

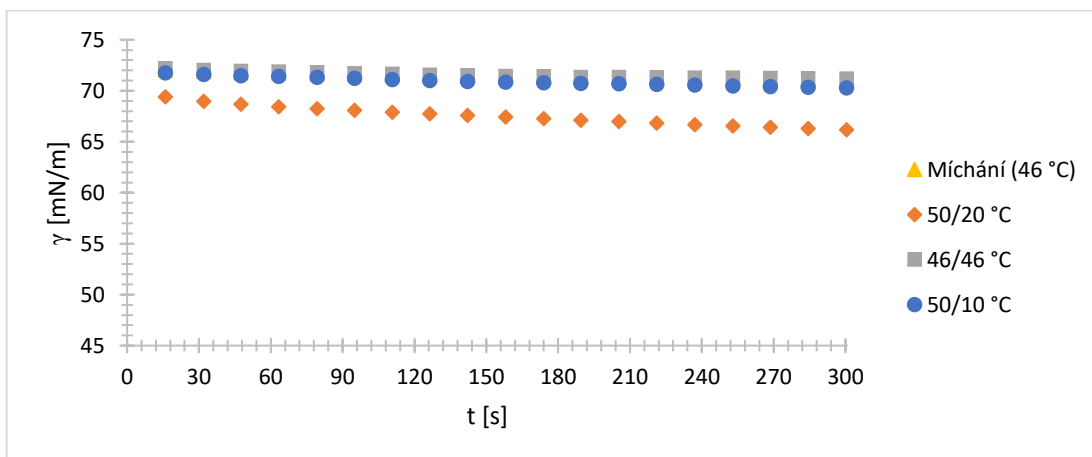
Pro srovnání vlivu teplotních spádů a absolutních teplot byl zvolen experiment, kde bylo přistoupeno k přípravě polymerních roztoků o stejné koncentraci HA za teplotních podmínek: 50/10 °C, 50/20 °C, 46/46 °C a 46 °C. Srovnávací teplota 46 °C byla zvolena z toho důvodu, že střední teplota roztoku při teplotním spádu 50/10 °C, popř. 50/20 °C se pohybuje blízko 46 °C.

Na Obr. 46 se nachází grafická závislost změn střední velikosti polymerních klubek na teplotě pro 1 hm. % HA v prostředí Tris-HCl pufru. Z této závislosti lze vyzorovat zcela rozdílné chování polymerních klubek připravených v různých teplotních režimech. To poukazuje na vliv teplotního spádu na uspořádání polymerních klubek v roztoku.

Na Obr. 47 je znázorněna grafická závislost povrchového napětí na čase. Z grafické závislosti je patrné, že teplotní spád 50/20 °C propůjčuje HA v roztoku nejvyšší povrchovou aktivitu. Teplotní spád 50/10 °C činí polymer mírně povrchově aktivním. Příprava polymerního roztoku při konstantní teplotě (46/46 °C) daný systém výrazněji neovlivňuje.



Obr. 46. Změny středních velikosti polymerních klubek s teplotou pro 1 hm. % HA Tris-HCl roztoky připravené při rozdílných teplotních spádech a středních teplotách



Obr. 47. Srovnání změn povrchového napětí v čase pro 1 hm. % HA v Tris-HCl roztoky připravené při rozdílných teplotních spádech a středních teplotách

Tab. 8. Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 47

T [°C]	w [hm. %]	Měřený pokles γ v intervalu 16 až 300 s [mN/m]	Celková změna γ v intervalu 0 až 300 s oproti vodě [mN/m]
50/10	1	$1,5 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$
50/20		$3,2 \pm 0,2$	$4,83 \pm 0,16$
46/46		$1,01 \pm 0,07$	$-0,19 \pm 0,09$
46		$0,97 \pm 0,07$	$-0,06 \pm 0,09$

Další experimenty byly zaměřeny na určení vhodného teplotního spádu pro zvolené koncentrace HA v roztoku Tris-HCl, a to pro 0,1 hm. % HA, 0,5 hm. % HA a 1 hm. % HA.

Na Obr. 48, 49 a 50 jsou znázorněny grafické závislosti změn středních velikosti polymerických klubek s rostoucí teplotou charakterizace pomocí DLS.

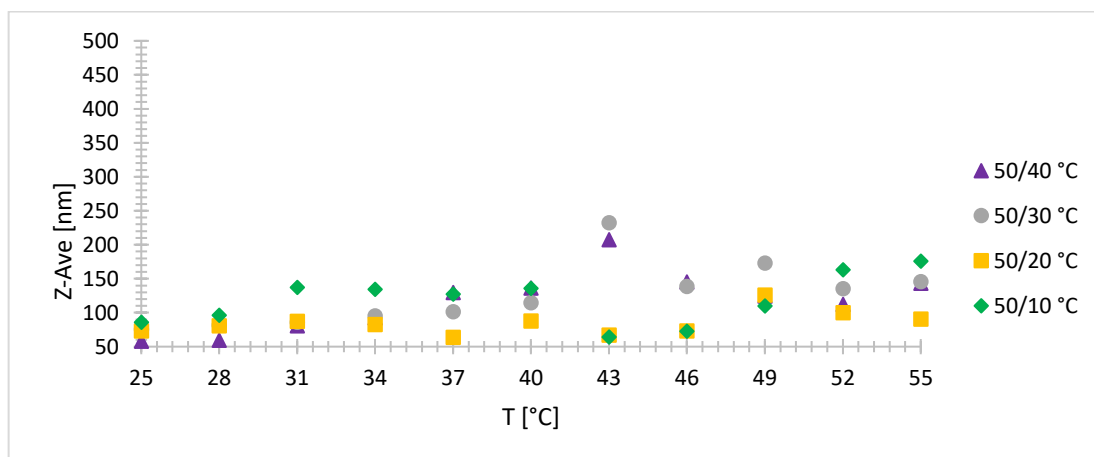
Z Obr. 48 je patrné, že v případě 0,1 hm. % HA v prostředí Tris-HCl nelze pozorovat výraznější změny střední velikosti polymerických klubek s teplotou. Mírnější posun střední velikosti polymerických klubek je pozorován pro teplotní spády 50/30 °C a 50/40 °C. V případě použití teplotního spádu 50/30 °C vykazuje daný systém značnou povrchovou aktivitu (změny $\gamma = 19,1 \pm 0,1$ mN/m), jak plyne z dat uvedených na Obr. 51 a v Tab. 9.

Z Obr. 49 vyplývá, že pro koncentraci 0,5 hm. % HA v prostředí pufru dochází k nejvýraznějším změnám velikosti polymerických klubek s teplotou v případě roztoků vystavených teplotnímu spádu 50/20 °C a 50/30 °C. Vzhledem k tomuto rozmezí byl pro další charakterizaci připraven roztok při teplotním spádu 50/25 °C. Roztok připravený při takovémto teplotním rozdílu vykazuje nejvýraznější nárůst povrchové aktivity HA vzhledem k čistému rozpouštědлу: $\gamma = 5,1 \pm 0,2$ mN/m, viz Tab. 9.

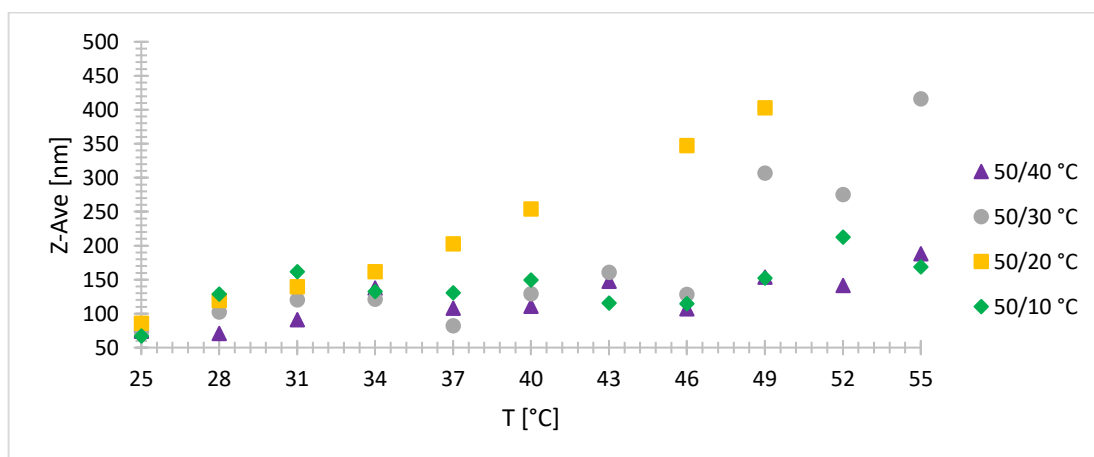
V případě polymerního roztoku s obsahem 1 hm.% HA lze pozorovat nejvýraznější změny střední velikosti polymerických klubek s teplotou pro roztoky připravené při teplotním spádu 50/20 °C a 50/30 °C, viz Obr. 50. Nejvyšší povrchovou aktivitu na fázových rozhraních kapaliny plyn vykazuje systém připravený při teplotním spádu 50/20 °C: $\gamma = 4,83 \pm 0,16$ mN/m, viz Tab. 9.

Obrázky 48, 49 a 50 poukazují na to, že čím je vyšší koncentrace HA v roztoku, tím je třeba zvolit vyšší teplotní spád tak, aby daný polymerní systém vykazoval vyšší povrchovou aktivitu na fázových rozhraních kapalina/plyn. Avšak teplotní spád nesmí být zvolen příliš vysoký, aby nebylo narušeno organizované proudění kapaliny.

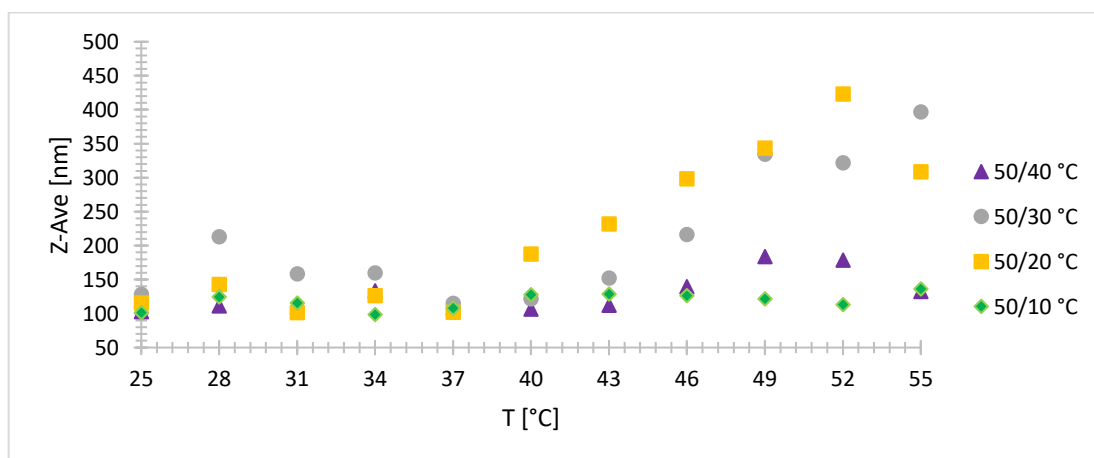
Z experimentů vyplynulo, že pro koncentraci 0,1 hm. % HA v prostředí pufru Tris-HCl je vhodný teplotní spád 50/30 °C. Pro koncentraci 0,5 hm. % HA v prostředí pufru Tris-HCl je vhodný teplotní spád 50/25 °C. Pro koncentraci 1 hm. % HA v prostředí pufru Tris-HCl je vhodný teplotní spád 50/20 °C.



Obr. 48. Změny střední velikosti polymerních klubek s teplotou pro Tris-HCl roztoky s 0,1 hm. % HA. Roztoky připravovány při rozdílných teplotních spádech v TFFC zařízení.

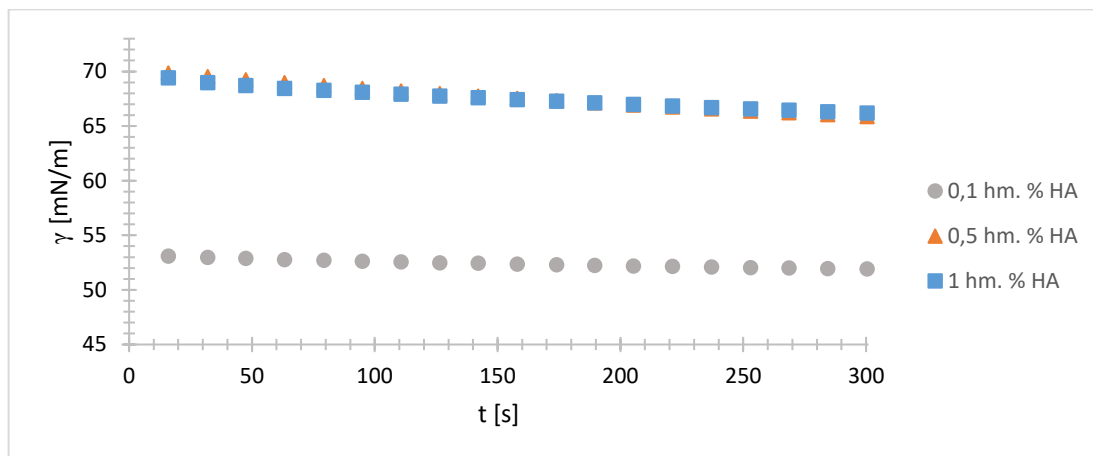


Obr. 49. Změny střední velikosti polymerních klubek s teplotou pro Tris-HCl roztoky s 0,5 hm. % HA. Roztoky připravovány při rozdílných teplotních spádech v TFFC zařízení.



Obr. 50. Změny střední velikosti polymerních klubek s teplotou pro Tris-HCl roztoky s 1 hm. % HA. Roztoky připravovány při rozdílných teplotních spádech v TFFC zařízení.

Na Obr. 51 je znázorněna grafická závislost povrchového napětí na čase pro teplotní režimy, při nichž porovnávané vzorky HA vykazovaly nejvyšší povrchovou aktivitu, tj. největší pokles měřené hodnoty povrchového napětí v čase. Nevyšší povrchovou aktivitu opět vykazoval systém s nejnižším hmotnostním podílem polymeru, viz. Tab. 9.



Obr. 51. Grafické znázornění změn povrchového napětí na čase pro rozdílné hmotnostní podíly HA v roztoku Tris-HCl a tomu odpovídající teplotní spády, viz. Tab. 9.

Tab. 9. Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 51

T [°C]	w [hm. %]	Měřený pokles γ v intervalu 16 až 300 s [mN/m]	Celková změna γ v intervalu 0 až 300 s oproti vodě [mN/m]
50/30	0,1	$1,19 \pm 0,09$	$19,1 \pm 0,1$
50/25	0,5	$4,0 \pm 0,3$	$5,1 \pm 0,2$
50/20	1	$3,2 \pm 0,2$	$4,83 \pm 0,16$

5.5 Viskozitní měření

V rámci objasnění vlivu rozdílných procesních podmínek přípravy roztoků HA na jejich tokové vlastnosti byla měřena kinematická viskozita u šesti vybraných vzorků při laboratorní teplotě, 23 °C.

Pro měření viskozity byly připraveny roztoky na TFFC zařízení, a to: 0,1 hm. % HA (50/30 °C), 0,5 hm. % HA (50/25 °C) a 1 hm. % HA (50/20 °C) v prostředí pufru Tris-HCl. Dále byly připraveny referenční roztoky pomocí třepacího zařízení při laboratorní teplotě, 23 °C.

Pro charakterizaci roztoků o koncentraci 0,1 hm. % HA a pro charakterizaci samotného pufru Tris-HCl byl využit viskozimetr typu I, s konstantou $K = 0,009670 \text{ mm}^2/\text{s}^2$.

Pro charakterizaci 0,5 hm. % HA a 1 hm. % HA byl využit viskozimetr typu II, s konstantou $K = 0,1024 \text{ mm}^2/\text{s}^2$.

Tab. 10. Naměřené časy průtoku a vypočtené viskozity pro HA roztoky v Tris-HCl

Charakterizace rozpouštědla, voda s Tris-HCl			
$\bar{\tau}$ [s]		ν [mm^2/s]	
97,19 ± 0,11		0,940 ± 0,001	
Charakterizace HA vodných roztoků s Tris-HCl			
Příprava	w [hm. %]	$\bar{\tau}$ [s]	ν [mm^2/s]
TFFC 50/30 °C	0,1	203,8 ± 0,5	1,97 ± 0,01
Třepací zařízení 23 °C		222,7 ± 0,5	2,15 ± 0,01
TFFC 50/25 °C	0,5	123,4 ± 0,3	12,63 ± 0,03
Třepací zařízení 23 °C		139,4 ± 0,5	14,27 ± 0,05
TFFC 50/20 °C	1	451 ± 3	46,2 ± 0,3
Třepací zařízení 23 °C		523,6 ± 1,3	53,62 ± 0,14

V Tab. 10 se nachází naměřené časy průtoku a vyhodnocení viskozity pro samotné rozpouštědlo i polymerní roztoky. Z experimentálních výsledků vyplynulo, že hodnoty viskozity jsou pro polymerní roztoky, které byly vystavené teplotnímu spádu, nižší oproti polymerním roztokům, které byly vystaveny přípravě pomocí třepacího zařízení. Do určité míry tato skutečnost může být dána i rozdílnými středními teplotami, při nichž byl HA rozpuštěn.

Tyto výsledky přímo naznačují konformační změny řetězců HA v roztoku. Vlivem samoorganizovaného toku kapaliny (TFFC) dochází k řízenému proudění kapaliny a tím ke změně konformace polymerních klubek v důsledku koordinovaného proudění toku. Takto upravené systémy se projevují nižší viskozitou.

Pro třepané roztoky, charakterizované při laboratorní teplotě, činí střední velikost polymerních částic konkrétně pro koncentraci HA 0,1 hm. %: 75,29 nm; pro 0,5 hm. %: 79,39 nm a pro 1 hm. %: 121,25 nm.

Pro roztoky připravené pomocí TFFC zařízení, charakterizované při laboratorní teplotě, činí střední velikost polymerních částic konkrétně pro koncentraci HA 0,1 hm. %: 75,05 nm; pro 0,5 hm. %: 62,90 nm a pro 1 hm. %: 115,83 nm.

5.6 Vliv solidifikace

V rámci této podkapitoly bude řešen vliv solidifikace polymerního roztoku HA do podoby filmu s následným rozpuštěním a opětovnou charakterizací rozpuštěného HA s ohledem na změny středních velikostí polymerních klubek a jejich povrchovou aktivitu na fázových rozhraních kapalina/plyn. Provedený experiment se dá shrnout následovně:

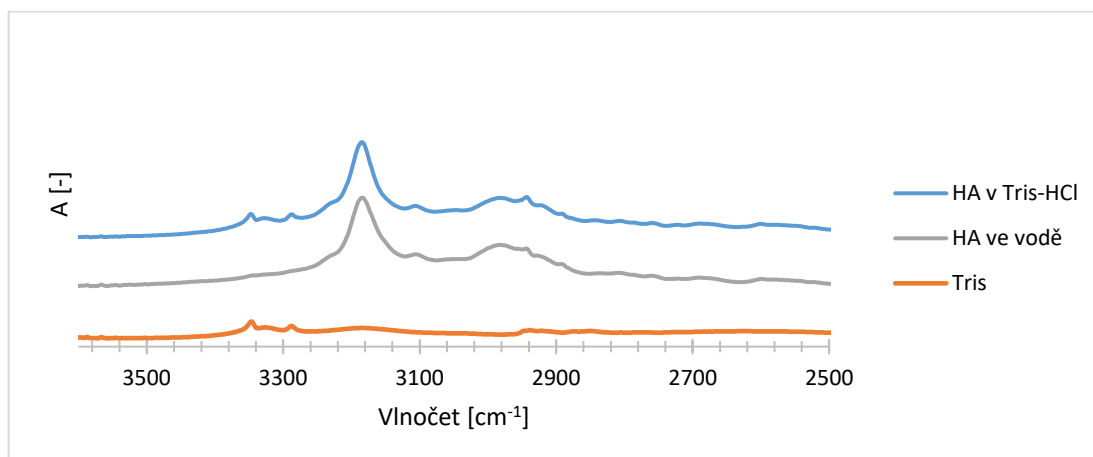
Prášek HA → Roztok HA z prášku → Solidifikovaný film HA → Roztok HA z filmu

Polymerní roztoky s obsahem 0,15 hm. % HA byly připravovány při teplotních spádech 50/30 °C a 46/46 °C v prostředí pufru. Dále byly tyto roztoky solidifikovány při stejném teplotním spádu, tedy 50/30 °C (popřípadě 46/46 °C), po dobu 24 hodin. Následně bylo přistoupeno k opětovnému převedení vzniklých polymerních filmů na polymerní roztoky pomocí pufru nebo demineralizované vody na výchozí koncentraci před solidifikací filmu HA. Rozpuštění polymerních filmů bylo prováděno po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě, 23 °C.

Pro posouzení vlivu proudění v TFFC zařízení na polymerní roztoky byly připraveny roztoky o stejné koncentraci HA v prostředí pufru Tris-HCl pomocí třepacího zařízení při laboratorní teplotě. Tyto roztoky byly solidifikovány při teplotním spádu 50/30 °C na TFFC zařízení po dobu 24 hodin.

Proces solidifikace byl prováděn na Petriho misce o vnitřním průměru 6 cm, přičemž objem dávkovaného základního roztoku na Petriho misku činil 14,030 ml.

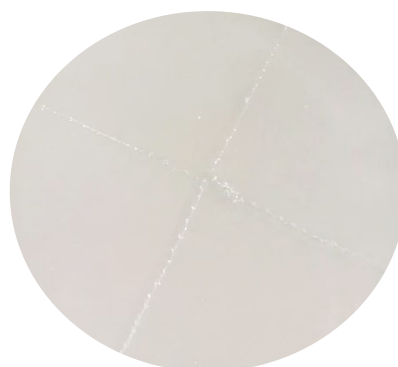
Pro ověření zbytkového množství Tris v solidifikovaném filmu byla provedena FTIR analýza HA vrstev po odpaření rozpouštědla. Z FTIR spekter vyplynulo, že Tris je i po solidifikaci stále přítomen v HA filmu. Na Obr. 52 je porovnáno spektrum HA filmu z vody a roztoku obsahujícího Tris oproti spektru Tris ve formě prášku. Typické píky pro Tris se nachází v rozmezí 3400 až 3250 cm^{-1} .



Obr. 52. Porovnání FTIR spekter filmů HA připravených z vodného prostředí nebo v prostředí obsahujícího Tris oproti čistému Tris v práškové formě

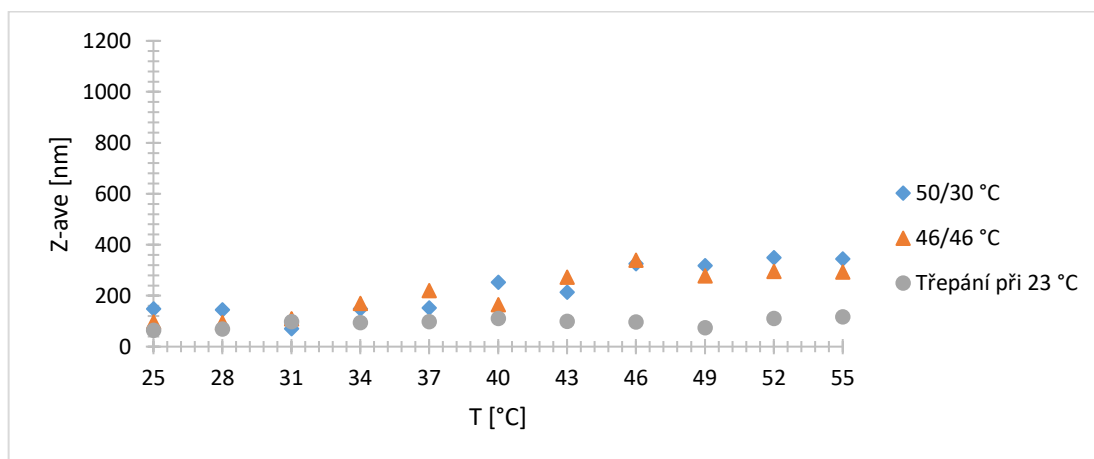
Pozn.: Pro analýzu FTIR bylo využito thermoscientific Spektrometru FTIR Nicolet iS5.

Vzniklý polymerní film je vyobrazen na Obr. 53. Polymerní film z TFFC zařízení je rozdělen na 4 části, přičemž sám o sobě je hladký, bez známek přítomnosti pufry.

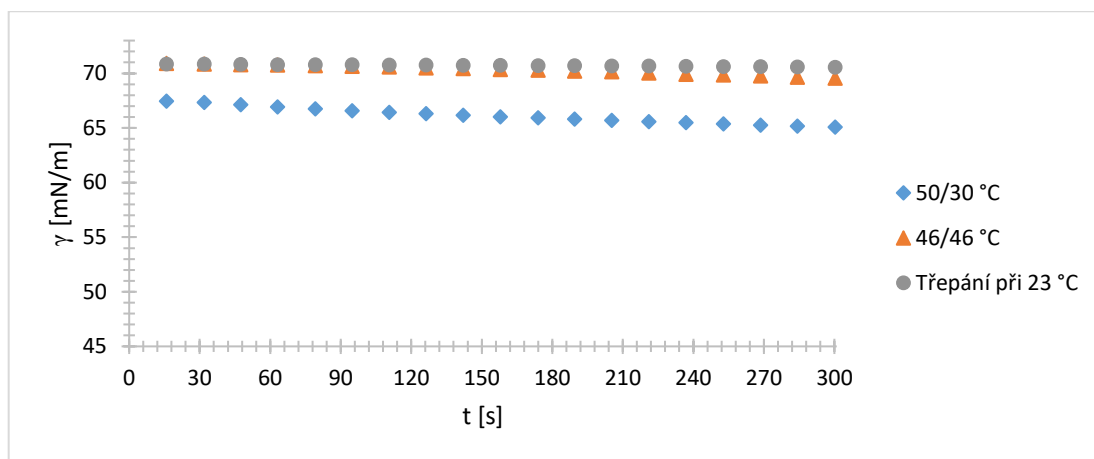


Obr. 53. Polymerní film z TFFC

Na Obr. 54 jsou uvedeny změny střední velikosti polymerních klubek v závislosti na teplotě měření pro 0,15 hm. % roztoky HA v Tris-HCl, které byly použity pro následnou přípravu polymerních filmů. Z těchto srovnání je patrné, že vzorky připravované při vyšší teplotě nebo teplotním spádu se vyznačují rozdílným chováním jak vzhledem ke změně střední velikosti polymerních klubek s teplotou, tak s ohledem na míru povrchové aktivity, viz Obr. 55 a Tab. 11.



Obr. 54. Změny střední velikosti HA klubek s teplotou pro 0,15 hm. % HA v Tris-HCl



Obr. 55. Změny povrchového napětí v čase roztoků s 0,15 hm. % HA v Tris-HCl

Tab. 11. Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 55

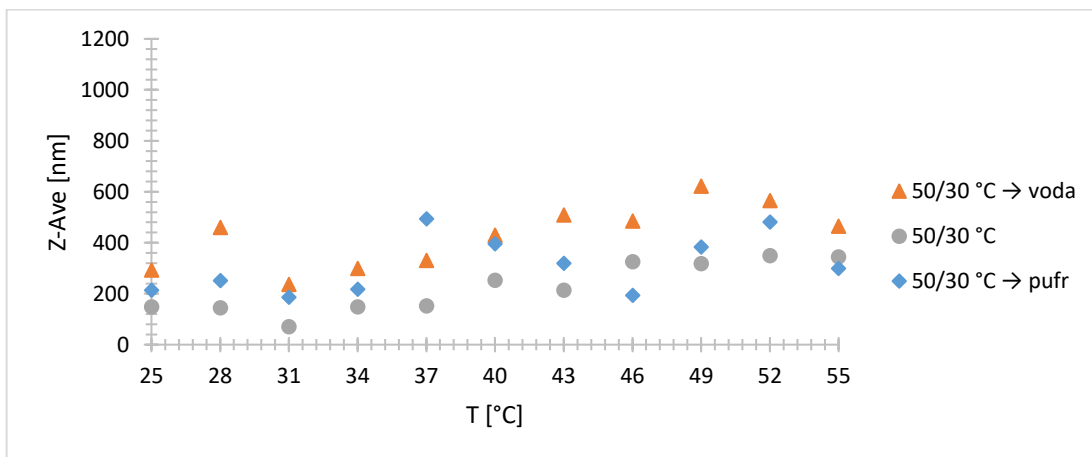
w [hm. %]	T [°C]	Měřený pokles γ v intervalu 16 až 300 s [mN/m]	Celková změna γ v intervalu 0 až 300 s oproti vodě [mN/m]
0,15	23	$0,30 \pm 0,02$	$0,45 \pm 0,06$
	46/46	$1,3 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,1$
	50/30	$2,36 \pm 0,17$	$5,93 \pm 0,14$

Obrázek 56 znázorňuje teplotní závislost střední velikosti klubek HA na teplotě. Na Obr. 56 se nachází základní polymerní roztok (50/30 °C), který byl připravený pomocí TFCC při teplotním spádu 50/30 °C v prostředí pufru Tris-HCl. Tento polymerní roztok

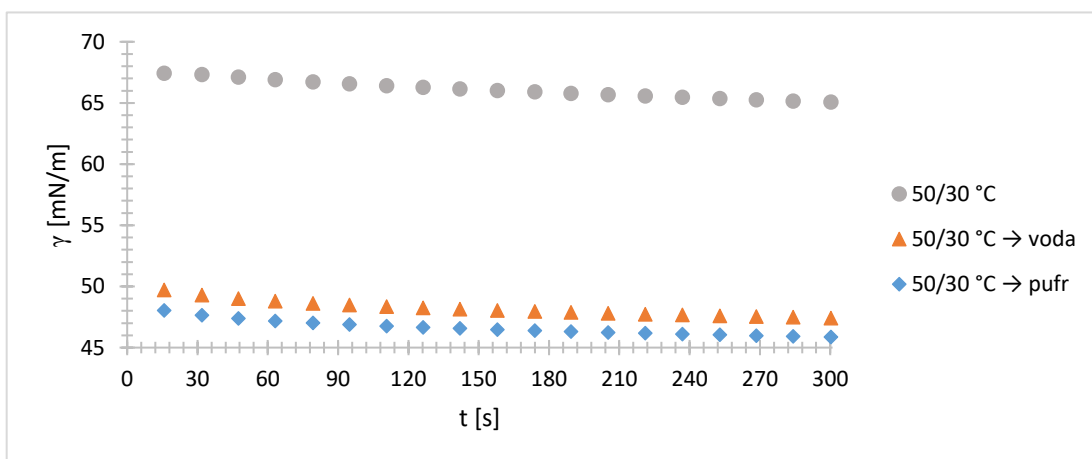
byl podroben procesu solidifikace pomocí TFFC zařízení při stejně nastaveném teplotním spádu. Po 24hodinové solidifikaci byl polymerní film zpětně rozpuštěn pomocí Tris-HCl pufru / demineralizované vody na původní koncentraci HA v roztoku. Opětovné rozpouštění bylo provedeno po dobu 24 hodin za laboratorní teploty. U těchto polymerních roztoků (50/30 °C → pufr, 50/30 °C → voda) byla provedena charakterizace změn střední velikosti polymerních klubek s teplotou měření (DLS) a změny povrchové aktivity (Tensiometrie).

Z Obr. 56 vyplývá, že jednotlivé teplotní trendy jsou si podobné, přičemž ty roztoky, u kterých byl aplikován proces solidifikace, vykazují celkově vyšší velikost polymerních klubek oproti základnímu roztoku.

Na Obr. 57 je vyobrazena závislost povrchového napětí na čase pro základní polymerní roztok a pro polymerní roztoky připravené ze solidifikovaného polymerního filmu. Polymerní roztoky z filmů HA vykazují vysokou povrchovou aktivitu. Rozdíl v povrchové aktivitě u opětovně rozpuštěných polymerních roztoků je nutno přičítat nejen solidifikačnímu procesu, ale i základní přípravě roztoku pomocí TFFC zařízení před vlastní solidifikací, jak plyne z výsledků na Obr. 58, 59 a Tab. 12.



Obr. 56. Změny střední velikosti HA klubek s teplotou pro 0,15 hm. % HA v Tris-HCl připraveného ze solidifikovaného filmu



Obr. 57. Změny povrchového napětí v čase roztoků s 0,15 hm. % HA v Tris-HCl připraveného ze solidifikovaného filmu

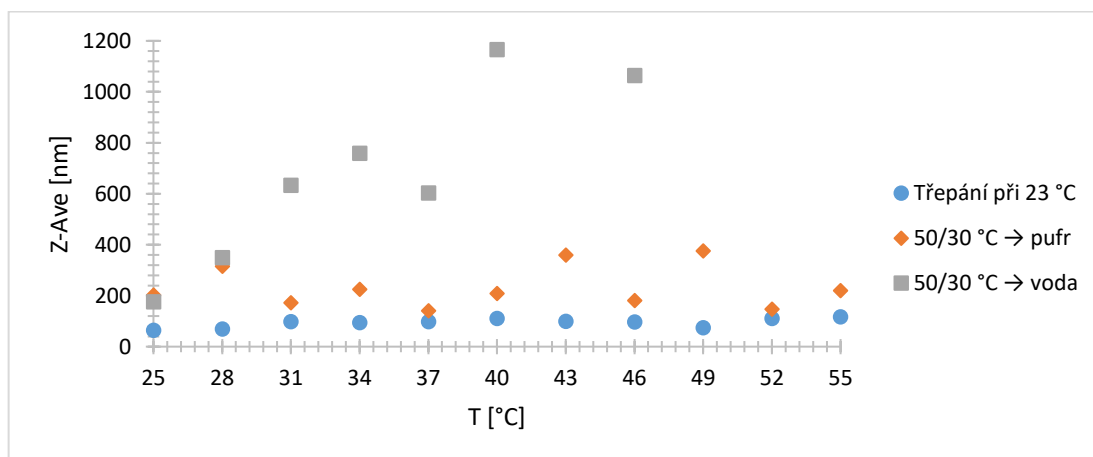
Tab. 12. Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 57

w [hm. %]	T [°C]	Měřený pokles γ v intervalu 16 až 300 s [mN/m]	Celková změna γ v intervalu 0 až 300 s oproti vodě [mN/m]
0,15	50/30	$2,36 \pm 0,17$	$5,93 \pm 0,14$
	50/30 → voda	$2,28 \pm 0,15$	$23,58 \pm 0,13$
	50/30 → pufr	$2,17 \pm 0,15$	$25,14 \pm 0,12$

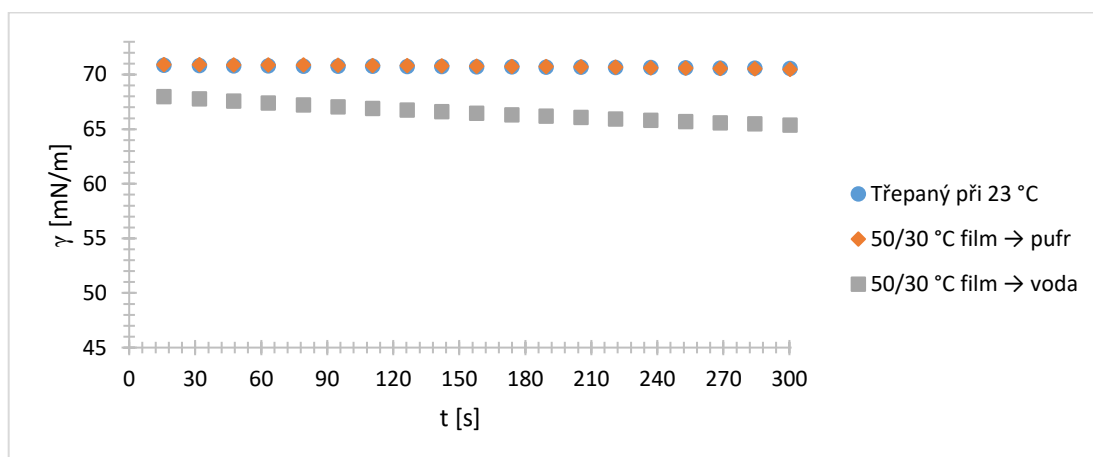
Pokud byl polymerní roztok připraven pomocí třepacího zařízení při laboratorní teplotě (23 °C) a následně byl solidifikován při teplotním spádu 50/30 °C a v konečné fázi byl polymerní film opětovně rozpuštěn pomocí demineralizované vody nebo pufru na původních 0,15 hm. % HA v roztoku, tedy jediná změna nastala v počáteční přípravě základního roztoku, byly pozorovány rozdílné výsledky oproti datům na Obr. 56 a 57.

Z Obr. 58 vyplynulo, že pokud nebyl polymerní roztok připraven pomocí TFFC zařízení, ale byl připraven pomocí třepacího zařízení, tak ani proces solidifikace pomocí TFFC zařízení není dostatečný k tomu, aby dodal polymernímu roztoku specifické fyzikální vlastnosti. Dále lze pozorovat, že pokud pro opětovné rozpuštění polymerního filmu bylo využito jiného rozpouštědla než toho, které bylo počátečně aplikováno pro základní přípravu roztoku, tedy demineralizované vody, tak roztok vykazoval rozdílné chování. Nebylo zde pozorováno podobné chování jako u základního třepaného roztoku (s ohledem na charakterizaci DLS). Lze pozorovat, stejně jako ve výše popsaném případě (Obr. 56), že polymerní roztoky, které prošly procesem solidifikace, vykazují vyšší hodnoty střední velikosti polymerních klubek v závislosti na teplotě měření pomocí DLS.

Z hlediska charakterizace povrchové aktivity těchto polymerních roztoků (Obr. 59) nebylo dosaženo takových výsledků jako v předchozím případě (Obr. 57). Z Obr. 59 je patrné, že pokud bylo pro opětovné rozpuštění polymerního filmu použito demineralizované vody, polymerní roztok vykazoval vyšší povrchovou aktivitu a značnou termální nestabilitu měřených změn středních velikostí polymerních klubek pomocí DLS.



Obr. 58. Změny střední velikosti HA klubek s teplotou pro 0,15 hm. % HA v Tris-HCl připraveného ze solidifikovaného filmu z třepaného roztoku



Obr. 59. Změny povrchového napětí v čase roztoků s 0,15 hm. % HA v Tris-HCl připraveného ze solidifikovaného filmu z třepaného roztoku

Tab. 13. Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 59

w [hm. %]	T [°C]	Měřený pokles γ v intervalu 16 až 300 s [mN/m]	Celková změna γ v intervalu 0 až 300 s oproti vodě [mN/m]
0,15	23	$0,30 \pm 0,02$	$0,45 \pm 0,06$
	50/30 → voda	$2,62 \pm 0,19$	$5,64 \pm 0,15$
	50/30 → pufr	$0,45 \pm 0,04$	$0,53 \pm 0,07$

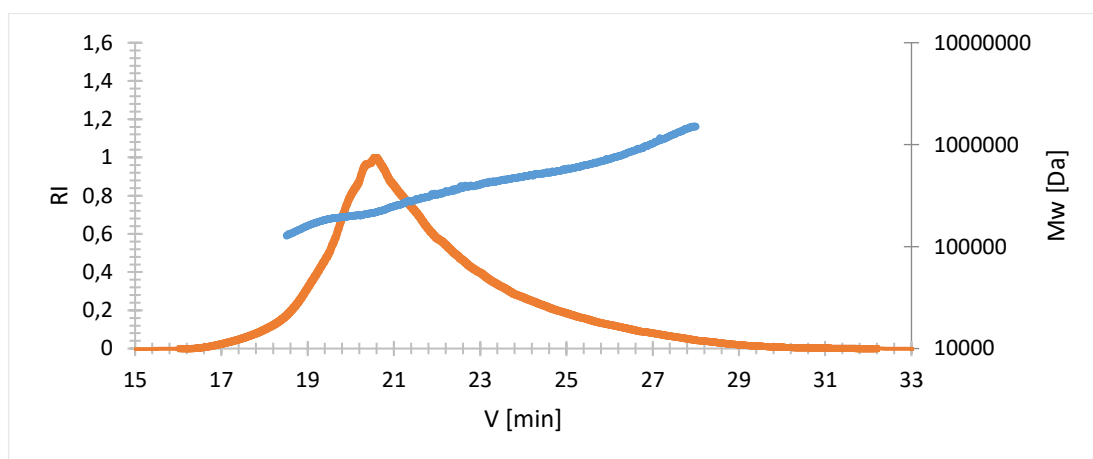
5.7 SEC-MALS charakterizace roztoků HA

Pro vyhodnocení jednotlivých charakteristik byly připraveny polymerní roztoky v prostředí pufru, přičemž střední MW HA činila 370 kDa.

Pozn.: Mn je číselný a Mw je hmotnostní střed molekulových hmotností.

Pozn.: R(avg) se rozumí hydrodynamický poloměr klubka HA.

Na Obr. 60 je vyobrazen chromatogram pro polymerní roztok obsahující 0,5 hm. % HA. Tento roztok byl připraven v prostředí pufru při teplotním spádu 50/20 °C. Přičemž RI znamená refrakční index a V znamená retenční čas.



Obr. 60. SEC-MALS chromatogram s MW v piku pro 0,5 hm. % roztok HA v Tris-HCl připravený v teplotním spádu 50/20 °C pomocí zařízení TFFC

V Tab. 14 jsou vyhodnoceny charakteristiky HA rozpouštěného pomocí TFFC zařízení. Při konstantní teplotě 46/46 °C byl pozorován pokles „stoupání křivky“ se zvyšující se koncentrací polymeru v roztoku. Zároveň byl pozorován pokles Mn i R(avg). V případě přípravy v teplotním spádu 50/20 °C byl tento trend opačný. Srovnáme-li tato data s výsledky pro ostatní způsoby přípravy roztoků HA (temperované třepání nebo míchání), viz Tab. 15 a 16, tak je nutné konstatovat, že nepozorujeme žádné jednoznačné trendy vypovídající o rozdílné přípravě daných vzorků. Jediné, co lze obecně konstatovat, je to, že hodnota R(avg) se pohybuje kolem 60 nm a stoupání křivky je do hodnoty 0,36. Z hlediska stoupání křivky existuje pravidlo, které hovoří o tom, že pokud je hodnota menší než 0,33, znamená to, že polymer tvoří sféru. Od hodnoty 0,5 po hodnotu 0,6 polymer vytváří lineárně protažené náhodné klubko. Když je hodnota vyšší než 1, tak tvoří rigidní tyčinku. Z hlediska zvolených koncentrací polymeru v roztoku a střední molekulové hmotnosti

370 kDa lze konstatovat, že všechny připravené roztoky spadají do kategorie sférických částic.

Závěry z tohoto měření nutno brát jako orientační z důvodu malého počtu opakování a nedostatečného prozkoumání vlivu toků na HA řetězce v průběhu jejich separace v průtokovém kanále SEC-MALS zařízení.

Tab. 14. Vyhodnocení SEC-MALS pro HA v Tris-HCl z TFFC zařízení

w [hm. %]	T [°C]	Mn [kDa]	Mw [kDa]	R(avg) [nm]	Stoupání křivky
0,1	46/46	383,6	463,8	64,6	0,2418
1		323,0	394,8	60,5	0,1290
0,1	50/20	361,2	496,6	60,0	0,1730
1	Ts = 46	319,2	416,6	61,5	0,3621

Tab. 15. Vyhodnocení SEC-MALS pro HA v Tris-HCl z temperovaného třepání

w [hm. %]	T [°C]	Mn [kDa]	Mw [kDa]	R(avg) [nm]	Stoupání křivky
0,1	46	327,4	422,1	62,3	0,2597
1		326,0	424,3	60,1	0,3519

Tab. 16. Vyhodnocení SEC-MALS pro HA v Tris-HCl z temperovaného míchání

w [hm. %]	T [°C]	Mn [kDa]	Mw [kDa]	R(avg) [nm]	Stoupání křivky
0,1	46	347,9	473,1	58,1	0,2801
1		352,6	465,9	60,7	0,2524

ZÁVĚR

Bylo studováno chování hyaluronanu v roztocích a na fázových rozhraních kapalina/plyn v závislosti na procesních podmínkách jejich přípravy a hmotnostním podílu polymeru.

Hyaluronan o zvolené molekulové hmotnosti byl rozpouštěn v demineralizované vodě, fyziologickém roztoku a v pufru. Z hlediska procesních podmínek přípravy byly vzorky připravovány za rozdílných teplotních podmínek pomocí laboratorní třepačky, temperovaného míchadla a zařízení pro řízené generování teplotních spádů.

Z experimentálních výsledků vyplynula citlivost studovaného systému s ohledem na jeho smykové namáhání, jak během procesu rozpouštění, tak následné filtrace před vlastní charakterizací pomocí dynamického rozptylu světla a tensiometrických měření.

Koordinované smykové namáhání řetězců hyaluronanu v roztoku má za následek změny jeho konformačního uspořádání, což se projevuje posunem střední velikosti polymerních klubek charakterizovaným pomocí dynamického rozptylu světla. Spolu s touto změnou se mění i tepelná stabilita jednotlivých klubek, vztažená k jejich expanzi, s rostoucí teplotou. Mimo to narůstá povrchová aktivita tohoto polymeru na fázových rozhraních a klesá viskozita roztoku. V rámci řady experimentů bylo zjištěno, že pro daný typ disperzního prostředí a hmotnostní podíl polymeru existuje určitý rozsah středních teplot a teplotních spádů, jenž má za následek vyvolání trvalých konformačních změn řetězců hyaluronanu. Zajímavým poznatkem je fakt, že pozorované konformační změny v upořádání tohoto polymerního systému lze vyvolat převedením polymerního roztoku do podoby solidifikované folie, kterou lze opětovně rozpustit.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KIM, H., H. JEONG, S. HAN, S. BEACK, B. W. HWANG, M. SHIN, S. S. OH, S. K. HAHN. Hyaluronate and its derivatives for customized biomedical applications. *Biomaterials* [online]. Elsevier, 2017, **123**, 155-171 [cit. 2019-10-18]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.01.029. ISSN: 01429612.
- [2] DAS, D., T. T. H. PHAM, I. NOH. Characterizations of hyaluronate-based terpolymeric hydrogel synthesized via free radical polymerization mechanism for biomedical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. Elsevier B.V, 2018, **170**, 64–75 [cit. 2019-10-18]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2018.05.059. ISSN 09277765.
- [3] MUTO, J., K.SAYAMA, R. L. GALLO, K. KIMATA. Emerging evidence for the essential role of hyaluronan in cutaneous biology. *Journal of Dermatological Science* [online]. 2019, **94**(1), 190–195 [cit. 2019-06-05]. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2019.01.009. ISSN: 09231811.
- [4] MENNA, F. Hyaluronic Acid and Derivatives for Tissue Engineering. *Journal of Biotechnology* [online]. 2013, **s3** [cit. 2019-10-07]. DOI: 10.4172/2155-952X.S3-001.
- [5] HASCALL, V. C., T. C. LAURENT. Hyaluronan: Structure and Physical Properties. *Glycoforum* [online]. 1997. [cit. 2018-09-14]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>.
- [6] SERBAN, M. A., A. SKARDAL. Hyaluronan chemistries for three-dimensional matrix applications. *Matrix Biology* [online]. Elsevier B.V, 2019, **78–79**, 337–345 [cit. 2019-06-03]. DOI: 10.1016/j.matbio.2018.02.010. ISSN: 0945053X.
- [7] GARCÍA-ABUÍN, A., D. GÓMEZ-DÍAZ, J. M. NAVAZA, L. REGUEIRO, I. VIDAL-TATO. Viscosimetric Behaviour of Hyaluronic Acid in Different Aqueous Solutions. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2011, vol. 85, no. 3 s. 500–505 [cit. 2019-09-10]. ISSN: 0144-8617.

- [8] KOGAN, G., L. ŠOLTÉS, R. STERN, P. GEMEINER. Hyaluronic Acid: A Natural Biopolymer with a Broad Range of Biomedical and Industrial Applications. *Biotechnology Letters*. 2007, vol. 29, no. 1 s. 17–25 [cit. 2019-07-11]. ISSN: 0141-5492.
- [9] MUSILOVÁ, L., A. MRÁČEK, A. KOVALCIK, P. SMOLKA, A. MINAŘÍK, P. HUMPOLÍČEK, R. VÍCHA, P. PONÍŽIL. Hyaluronan hydrogels modified by glycinated Kraft lignin. *Carbohydrate Polymers* [online]. Elsevier, 2018, **181**, 394–403 [cit. 2019-06-05]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.10.048. ISSN 01448617.
- [10] STERN, R., H. I. MAIBACH. Hyaluronan in skin. *Clinics in Dermatology* [online]. Elsevier, 2008, **26**(2), 106–122 [cit. 2019-09-28]. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2007.09.013. ISSN 0738081X.
- [11] GALLO, N., H. NASSER, L. SALVATORE, et al. Hyaluronic acid for advanced therapies. *European Polymer Journal* [online]. Elsevier, 2019, **117**, 134–147 [cit. 2019-06-03]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2019.05.007. ISSN 00143057.
- [12] HUANG, G., J. CHEN. Preparation and applications of hyaluronic acid and its derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. Elsevier B.V, 2019, **125**, 478–484 [cit. 2019-06-04]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.074. ISSN 01418130.
- [13] SALWOWSKA, N. M., K. A. BEBENEK, D. A. ŻĄDŁO, D. L. WCISŁO-DZIADECKA. Physiochemical properties and application of hyaluronic acid. *Journal of Cosmetic Dermatology* [online]. WILEY, 2016, **15**(4), 520–526 [cit. 2019-09-29]. DOI: 10.1111/jocd.12237. ISSN 14732130.
- [14] GARANTZIOTIS, S., R. C. SAVANI. Hyaluronan biology. *Matrix Biology* [online]. Elsevier B.V, 2019, **78–79**, 1–10 [cit. 2019-06-05]. DOI: 10.1016/j.matbio.2019.02.002. ISSN 0945053X.
- [15] ROBERT, A. M., L. ROBERT, G. RENARD. Biological effects of hyaluronan in connective tissues, eye, skin, venous wall. Role in aging. *Pathologie Biologie* [online]. Elsevier SAS, 2010, **58**(3), 187–198 [cit. 2019-09-28]. DOI: 10.1016/j.patbio.2009.09.010. ISSN 03698114.

- [16] HARGITTAI, I., M. HARGITTAI. Molecular structure of hyaluronan. *Structural Chemistry* [online]. Springer US, 2008, **19**(5), 697–717 [cit. 2018-09-13]. DOI: 10.1007/s11224-008-9370-3. ISSN 10400400.
- [17] TBR Chemedica UK vismed. What is hyaluronic acid (HA)? *Ostenil.trbchemedica* [online]. TRB Chemedica (UK) Ltd, 9 Evolution, Lymedale Business Park, Hooters Hall Road, Newcastle-under-Lyme, Staffordshire, ST5 9QF, [cit. 2018-09-09]. Dostupné z: <http://ostenil.trbchemedica.co.uk/business-professionals/hyaluronic-acid>.
- [18] TRB Chemedica UK vismed. Role and purpose of hyaluronan. *Vismed.trbchemedica.co.uk* [online]. TRB Chemedica (UK) Ltd, 9 Evolution, Lymedale Business Park, Hooters Hall Road, Newcastle-under-Lyme, Staffordshire, ST5 9QF, [cit. 2018-09-09]. Dostupné z: <http://vismed.trbchemedica.co.uk/business-professionals/role-and-purpose-of-hyaluronan/properties-of-hyaluronan>.
- [19] SCOTT, J. E., C. CUMMINGS, A. BRASS, Y. CHEN. Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solution, Investigated by Rotary Shadowing-electron Microscopy and Computer Simulation. Hyaluronan is a Very Efficient Network-forming Polymer. *Biochemical Journal* [online]. 1991, vol. 274, no. 3 s. 699–705 [cit. 2019-09-20]. ISSN: 0264-6021.
- [20] ATKINS, E. D., J. SHEEHAN. Hyaluronates: relation between molecular conformation. *Science* [online]. American Association for the Advancement of Science, 1973, **179**(4073), 562–564 [cit. 2019-12-31]. DOI: 10.1126/science.179.4073.562. ISSN: 00368075.
- [21] LAURENT, T. C. The interactions between polysaccharides and other macromolecules. 9. The exclusion of molecules from hyaluronic acid gels and solutions. *Biochemical Journal* [online]. 1964, **93**(1), 106–112 [cit. 2019-12-20]. DOI: 10.1042/bj0930106.
- [22] VSCHT. *Co je co v povrchové a koloidní chemie* [online]. 2005 [cit. 2018-09-10]. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/hesla/gyracni_polomer.html.

- [23] VSCHT. *Co je co v povrchové a koloidní chemie* [online]. 2005 [cit 2018-09-10]. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/hesla/makromolekularni_klubko.html.
- [24] COWMAN, M. K., S. MATSUOKA. The Intrinsic Viscosity of Hyaluronan. In *Hyaluronan*. JF Kennedy, Phillips GO, Williams PA, Hascall VC, Editor. Woodhead Publishing Ltd. Cambridge, 2002; 75–78 [cit. 2018-09-03]. DOI: 10.1533/9781845693121.75.
- [25] MOHAN, N., R. BALAKRISHNAN, S. SIVAPRAKASAM. Optimization and effect of dairy industrial waste as media components in the production of hyaluronic acid by *Streptococcus thermophilus*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* [online]. Taylor, 2016, **46**(6), 628–638 [cit. 2018-09-03]. DOI: 10.1080/10826068.2015.1128446. ISSN: 10826068.
- [26] KUPPER, S., I. KŁOSOWSKA-CHOMICZEWSKA, P. SZUMAŁA. Collagen and hyaluronic acid hydrogel in water-in-oil microemulsion delivery systems. *Carbohydrate Polymers* [online]. Elsevier, 2017, **175**, 347–354 [cit. 2019-06-04]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.08.010. ISSN: 01448617.
- [27] MORRIS E. R., D. A. RESS, E. J. Welsh. Conformation and dynamic interactions in hyaluronate solutions. *J Mol Biol*. 1980; **138**(2): 383–400 [cit. 2018-09-14]. DOI: 10.1016/0022-2836(80)90294-6.
- [28] MATHEWS, M. B., L. DECKER. Conformation of hyaluronate in neutral and alkaline solutions. *Biochim Biophys Acta* [online]. 1977; **498**(1): 259–63 [cit.2018-09-14]. DOI: 10.1016/0304-4165(77)90107-6.
- [29] GATEJ, I., M. POPA, M. RINAUDO. Role of the pH on hyaluronan behavior in aqueous solution. *Biomacromolecules*. 2005; **6**(1): 61–7 [cit.2018-09-14]. DOI: 10.1021/bm040050m.
- [30] PIGMAN, W., W. HAWKINS, E. GRAMPLING, *et al*. Factors affecting the viscosity of hyaluronic acid and synovial fluid. *Arch Biochem Biophys*. 1960; **89**: 184–93 [cit. 2018-09-14]. DOI: 10.1016/0003-9861(60)90041-2.
- [31] BALAZS, E. A. Sediment volume and viscoelastic behavior of hyaluronic acid solutions. *Fed Proc* [online]. 1966; **25**(6): 1817–22 [cit. 2018-09-14].

- [32] BALAZS, E. A., M. K. COWMAN, S. O. BRILLER, *et al.* On the Limiting Viscosity Number of Hyaluronate in Potassium Phosphate Buffers Between pH 6.5 and 8. *Biopolymers* [online]. 1983; **22**(2): 589–591 [cit. 2018-09-14]. DOI: 10.1002/bip.360220202.
- [33] MALEKI, A., A-L. KJØNIKSEN, B. NYSTRÖM. Effect of pH on the behavior of hyaluronic acid in dilute and semidilute aqueous solutions. *Macromolecular Symposia* [online]. 2008, **274**(1), 131–140 [cit. 2018-09-09]. DOI: 10.1002/masy.200851418. ISSN 10221360.
- [34] SMITH, D., H. BABCOCK, S. CHU. Single-Polymer Dynamics in Steady Shear Flow. *Science* [online]. American Association for the Advancement of Science, 1999, **283**(5408), 1724–1727 [cit. 2018-09-14]. DOI: 10.1126/science.283.5408.1724. ISSN: 00368075.
- [35] Brownův pohyb. In: *edu.techmania* [online] [cit. 2018-09-14]. Dostupné z: <https://edu.techmania.cz/cs/veda-v-pozadi/597>.
- [36] Brownův pohyb. In: *moodle2.gymcheb* [online] [cit. 2018-09-14]. Dostupné z: http://moodle2.gymcheb.cz/pluginfile.php/125589/mod_resource/content/2/Brown_difuze.pdf.
- [37] HORKAY, F., P. J. BASSER, D. J. LONDONO, A-M. HECHT, E. GEISLER. Ions in hyaluronic acid solutions. *Journal of Chemical Physics* [online]. Amer Inst Physics, 2009, **131**(18), 184902–184909 [cit. 2018-09-09]. DOI: 10.1063/1.3262308. ISSN: 00219606.
- [38] ALTMAN, G. H., F. DIAZ, C. JAKUBA, *et al.* Silk-based biomaterials. *Biomaterials* [online]. Elsevier, 2003, **24**(3), 155–159 [cit. 2018-09-14]. DOI: 10.1016/S0142-9612(02)00353-8.
- [39] ISLAM, M., S. Peculiarity of polymer gel mechanism. In: *textilesolutionbd* [online]. 2018. [cit. 2018-03-01]. Dostupné z: <http://textilesolutionbd.blogspot.com/2017/01/peculiarity-of-polymer-gel-mechanism.html>.

- [40] LAURENT, T. C. K. HELLSING, B. GELOTTE. Cross-linked gels of hyaluronic acid. *Acta Chem Scand* [online]. 1964, 18: 274–275 [cit. 2019-09-13]. DOI: 10.3891/acta.chem.scand.18-0274.
- [41] BORZACCHIELLO, A., L. RUSSO, B. M. MALLE, K. SCHWACH-ABDELLAOUI, L. AMBROSIO. Hyaluronic acid based hydrogels for regenerative medicine applications. *BioMed Research International* [online]. Hindawi, 2015, 871218–871212 [cit. 2019-09-29]. DOI: 10.1155/2015/871218. ISSN: 23146133.
- [42] VULPE, R., M. POPA, L. PICTON, V. BALAN, V. DULONG, M. BUTNARU, L. VERESTIUC. Crosslinked hydrogels based on biological macromolecules with potential use in skin tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. Elsevier Science Bv, 2016, **84**, 174–181 [cit. 2019-10-18]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.12.019. ISSN: 01418130.
- [43] BERGMAN, K. Hyaluronan Derivatives and Injectable Gels for Tissue Engineering. *Acta universitatis upsaliensis uppsala* [online]. 2008. [cit. 2019-10-19]. ISSN: 1651-6214. ISBN: 978-91-554-7335-8.
- [44] SKANDALIS, S., S. KARALIS, T. HELDIN, Paraskevi. Intracellular Hyaluronan: Importance for Cellular Functions. *Seminars in Cancer Biology* [online]. 2019. [cit. 2019-10-19]. ISSN: 1044-579X.
- [45] MINAŘÍK, A., P. SMOLKA, M. MINAŘÍK, M., *et al.* Special instrument for the de-fined modification of polymer properties in solutions and polymer layers. *Measurement* [online]. Elsevier Sci, 2017, **97**, 218–220 [cit. 2019-10-20]. DOI: 10.1016/j.measurement.2016.11.006.
- [46] Princip DLS. *Retsch-technology* [online] [cit. 2019-10-22]. Dostupné z: <https://www.retsch-technology.com/applications/technical-basics/dynamic-light-scattering/>?
- [47] Teorie DLS. *Wyatt* [online] [cit. 2019-10-22]. Dostupné z: <https://www.wyatt.com/library/theory/dynamic-light-scattering-theory.html>.

- [48] DLS. *Nanoparticleanalyzer* [online] [cit. 2019-10-22]. Dostupné z: https://nanoparticleanalyzer.com/nanoparticle-analysis-comparison-dls.php?gclid=EAIaIQobChMikperrd274wIVWeJ3Ch3LYA7bEAAAYASAAEgIaW_D_BwE.
- [49] Zetasizer nano range. *Malvern* [online] [cit. 2019-10-23]. Dostupné z: <https://www.malvern.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/defaultb.html>.
- [50] Wilhelmy plate. *Vydavatelstvi.vscht* [online] [cit. 2019-11-11]. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/hesla/metody.odtrhavaci_metody.html.
- [51] Tenziometrie. *Fyzweb* [online] [cit. 2019-11-11]. Dostupné z: <http://fyzweb.cz/clanky/index.php?id=144>.
- [52] Teorie tenziometrie. *Edu.techmania* [online] [cit. 2019-11-11]. Dostupné z: <https://edu.techmania.cz/cs/encyklopedie/fyzika/struktura-latek/povrch-kapaliny>.
- [53] COWMAN, M. K., S. MATSUOKA. Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate Research* [online]. Elsevier, 2005, **340**(5), 791–809 [cit. 2019-07-17]. DOI: 10.1016/j.carres.2005.01.022. ISSN 00086215.
- [54] SEC-MALS. *Wyatt* [online] [cit. 2019-11-12]. Dostupné z: <https://www.wyatt.com/solutions/techniques/sec-mals-molar-mass-size-multi-angle-light-scattering.html>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A	Absorbance
DLS	Dynamický rozptyl světla
ECM	Extracelulární matrix
EPR	Princip zvýšeného účinku retence permeace
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GAG	Glykosaminoglykan
HA	Hyaluronát sodný / hyaluronan
HMW	Vysokomolekulární hmotnost
LMW	Nízkomolekulární hmotnost
Mn	Číselná průměrná molekulová hmotnost
MW	Hmotnostní průměrná molekulová hmotnost
PM	Přesná medicína
PMT	Fotonásobič
SC	<i>Stratum corneum</i>
SEC-MALS	Velikostně vylučovací chromatografie s vícenásobným rozptylem světla
TE	Tkáňové inženýrství
D	Rychlost difuze
d_p	Hydrodynamický průměr
E	Povrchová energie
F_{max}	Maximální síla
γ	Povrchové napětí
k	Boltzmannova konstanta
K	Konstanta
l	Délka destičky

ν	Kinematická viskozita
η	Dynamická viskozita
$R(\text{avg})$	Hydrodynamický poloměr
RI	Refrakční index
S	Povrch
T	Teplota
t	Čas
τ	Doba průtoku
V	Retenční objem
w	Hmotnostní koncentrace
Z-ave	Střední velikost polymerních klubek

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1.	<i>Struktura HA [3]</i>	11
Obr. 2.	<i>Schéma ECM [11]</i>	13
Obr. 3.	<i>Primární struktura HA a model hyaluronové „stužky“ v 3D oblasti [17, 18]</i>	14
Obr. 4.	<i>Sekundární struktura HA [16]</i>	15
Obr. 5.	<i>Terciální struktura HA ve vodných roztocích [19]</i>	15
Obr. 6.	<i>Schéma strukturní všestrannosti HA [34]</i>	16
Obr. 7.	<i>Vnitřní rotace v makromolekulárním řetězci [22]</i>	17
Obr. 8.	<i>Schématický náčrt náhodného klubka [23]</i>	18
Obr. 9.	<i>Hydrodynamická velikost řetězce HA [24]</i>	18
Obr. 10.	<i>Vliv pH na řetězce HA [33]</i>	20
Obr. 11.	<i>Deformace klubka [34]</i>	21
Obr. 12.	<i>Možnosti přeuspořádání polymerních řetězců za toku [34]</i>	21
Obr. 13.	<i>Chování HA za toku, upraveno dle [5]</i>	22
Obr. 14.	<i>Pseudoplastické chování HA, upraveno dle [18]</i>	22
Obr. 15.	<i>(a) (vlevo) hyaluronové molekuly v klidu (mezi mrknutím); (b) (vpravo) a během smykového namáhání (během mrknutí) [18]</i>	23
Obr. 16.	<i>Pohyb částic při Brownově pohybu [35]</i>	23
Obr. 17.	<i>HA ve vodném roztoku [37]</i>	24
Obr. 18.	<i>Schopnost zadržování vody, upraveno dle [18]</i>	25
Obr. 19.	<i>Možná tvorba sítě v hydrogelu [4]</i>	27
Obr. 20.	<i>Polymerní gel; a) nabotnalý stav; b) částečně nabotnalý stav [39]</i>	27
Obr. 21.	<i>Principy TE zahrnující dodávky buněk a bioaktivních látek pacientům za účelem obnovení ztracené funkce tkání [4]</i>	29
Obr. 22.	<i>Receptory pro HA [11]</i>	32

Obr. 23.	<i>Různé možnosti přípravy roztoků HA</i>	35
Obr. 24.	<i>TFFC zařízení [45]</i>	38
Obr. 25.	<i>Třepací zařízení LT 2</i>	38
Obr. 26.	<i>Magnetické míchadlo s temperovanou lázní</i>	39
Obr. 27.	<i>DLS, upraveno dle [46]</i>	40
Obr. 28.	<i>Zetasizer nano [49]</i>	40
Obr. 29.	<i>Povrchové napětí [50]</i>	41
Obr. 30.	<i>Povrchové napětí [51]</i>	42
Obr. 31.	<i>Tensiometr Krüss K100MK3</i>	43
Obr. 32.	<i>SEC-MALS, HA s molekulovou hmotností $1,0 \cdot 10^6$, upraveno dle [53]</i>	43
Obr. 33.	<i>Ubbelohdeho kapilární viskozimetr</i>	45
Obr. 34.	<i>Srovnání vlivu disperzního prostředí na střední velikosti polymerních klubek</i>	47
Obr. 35.	<i>Grafické znázornění velikosti polymerních klubek na teplotě s vyobrazeným vlivem filtrování na chování polymerních roztoků</i>	48
Obr. 36.	<i>Grafické znázornění změn velikosti polymerních klubek s teplotou pro HA ve fyziologickém roztoku s následnou filtrací. Roztoky připravené pomocí třepacího zařízení</i>	50
Obr. 37.	<i>Grafická závislost povrchového napětí na čase pro HA ve fyziologickém roztoku. Roztoky připravené pomocí třepacího zařízení</i>	50
Obr. 38.	<i>Grafické znázornění velikosti polymerních klubek na teplotě pro polymerní roztoky připravené ve fyziologickém roztoku při $T = 50/40$ °C</i>	52
Obr. 39.	<i>Grafická závislost změn povrchového napětí na čase pro polymerní roztoky připravené ve fyziologickém roztoku při $T = 50/40$ °C</i>	52
Obr. 40.	<i>Obr. 40. Grafické znázornění změn střední velikosti polymerních klubek HA s teplotou v prostředí Tris-HCl pufro. Roztoky připraveny pomocí třepacího zařízení při 23 °C</i>	54, 59

Obr. 41.	Grafická závislost změn povrchového napětí na čase pro polymerní roztoky HA připravené v prostředí Tris-HCl pufro pomocí třepacího zařízení při 23 °C	54
Obr. 42.	Grafické znázornění změn střední velikosti polymerních klubek HA s teplotou pro Tris-HCl roztoky připravené pomocí míchání při 46 °C	56, 59
Obr. 43.	Grafické znázornění změn povrchového napětí v čase pro Tris-HCl roztoky HA připravené pomocí míchání při 46 °C	56
Obr. 44.	Grafické znázornění změn střední velikosti polymerních klubek HA s teplotou pro Tris-HCl roztoky připravené v TFFC při $T = 50/40$ °C	58, 59
Obr. 45.	Grafická znázornění změn povrchového napětí na čase pro Tris-HCl roztoky HA připravené pomocí TFFC při $T = 50/40$ °C	58
Obr. 46.	Změny středních velikosti polymerních klubek s teplotou pro 1 hm. % HA Tris-HCl roztoky připravené při rozdílných teplotních spádech a středních teplotách	61
Obr. 47.	Srovnání změn povrchového napětí v čase pro 1 hm. % HA v Tris-HCl roztoky připravené při rozdílných teplotních spádech a středních teplotách	61
Obr. 48.	Změny střední velikosti polymerních klubek s teplotou pro Tris-HCl roztoky s 0,1 hm. % HA . Roztoky připravovány při rozdílných teplotních spádech v TFFC zařízení	63
Obr. 49.	Změny střední velikosti polymerních klubek s teplotou pro Tris-HCl roztoky s 0,5 hm. % HA . Roztoky připravovány při rozdílných teplotních spádech v TFFC zařízení	63
Obr. 50.	Změny střední velikosti polymerních klubek s teplotou pro Tris-HCl roztoky s 1 hm. % HA . Roztoky připravovány při rozdílných teplotních spádech v TFFC zařízení	63
Obr. 51.	Grafické znázornění změn povrchového napětí na čase pro rozdílné hmotnostní podíly HA v roztoku Tris-HCl a tomu odpovídající teplotní spády, viz Tab. 9	64

Obr. 52.	<i>Porovnání FTIR spekter filmů HA připravených z vodného prostředí nebo v prostředí obsahujícího Tris oproti čistému Tris v práškové formě</i>	68
Obr. 53.	<i>Polymerní film z TFFC</i>	68
Obr. 54.	<i>Změny střední velikosti HA klubek s teplotou pro 0,15 hm. % HA v Tris-HCl</i>	69
Obr. 55.	<i>Změny povrchového napětí v čase roztoků s 0,15 hm. % HA v Tris-HCl</i>	69
Obr. 56.	<i>Změny střední velikosti HA klubek s teplotou pro 0,15 hm. % HA v Tris-HCl připraveného ze solidifikovaného filmu</i>	71
Obr. 57.	<i>Změny povrchového napětí v čase roztoků s 0,15 hm. % HA v Tris-HCl připraveného ze solidifikovaného filmu</i>	71
Obr. 58.	<i>Změny střední velikosti HA klubek s teplotou pro 0,15 hm. % HA v Tris-HCl připraveného ze solidifikovaného filmu z třepaného roztoku</i>	73
Obr. 59.	<i>Změny povrchového napětí v čase roztoků s 0,15 hm. % HA v Tris-HCl připraveného ze solidifikovaného filmu z třepaného roztoku</i>	73
Obr. 60.	<i>SEC-MALS chromatogram s MW v píku pro 0,5 hm. % roztok HA v Tris-HCl připravený v teplotním spádu 50/20 °C pomocí zařízení TFFC</i>	74

SEZNAM TABULEK

Tab. 1.	<i>Přehled funkcí HA při daných MW [25]</i>	19
Tab. 2.	<i>Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 37</i>	50
Tab. 3.	<i>Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 39</i>	52
Tab. 4.	<i>Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 41</i>	54
Tab. 5.	<i>Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 43</i>	56
Tab. 6.	<i>Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 45</i>	58
Tab. 7.	<i>Střední teploty polymerních roztoků při nastavených teplotních spádech</i>	60
Tab. 8.	<i>Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 47</i>	61
Tab. 9.	<i>Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 51</i>	64
Tab. 10.	<i>Naměřené časy průtoku a vyhodnocené viskozity pro polymerní roztoky v Tris-HCl</i>	65
Tab. 11.	<i>Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 55</i>	69
Tab. 12.	<i>Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 57</i>	71
Tab. 13.	<i>Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 59</i>	73
Tab. 14.	<i>Vyhodnocení SEC-MALS pro HA v Tris-HCl z TFFC zařízení</i>	75
Tab. 15.	<i>Vyhodnocení SEC-MALS pro HA v Tris-HCl z třepání</i>	75
Tab. 16.	<i>Vyhodnocení SEC-MALS pro HA v Tris-HCl z temperovaného míchání</i>	75