Tenké vrstvy hyaluronátu sodného na hladkých površích

Bc. Magdalena Koutná

Diplomová práce
2020

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav fyziky a mater. inženýrství

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Bc. Magdalena Koutná**
Osobní číslo:	**T18248**
Studijní program:	**N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor:	**Materiálové inženýrství**
Forma studia:	**Prezenční**
Téma práce:	**Tenké vrstvy hyaluronanu sodného na hladkých površích**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na dané téma.
2. Připravte polymerní roztoky hyaluronanu sodného za rozdílných fyzikálních podmínek bez a s obsahem solí.
3. Připravené roztoky naneste na povrch s nerovnostmi do jednoho nanometru tak, aby se na povrchu vytvořila polymerní mono vrstva, ze které budou patrná izolovaná polymerní klubka a řetězce.
4. Připravené povrchové vrstvy charakterizujte pomocí mikroskopie atomárních sil.
5. Experimentální výsledky přehledně diskutujte a uveďte hlavní závěry práce.

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

Seznam doporučené literatury:

1. Kirby, A., Gunning P., Morris, V., Ridout, M., Observation of the Helical Structure of the Bacterial Polysaccharide Acetan by Atomic Force Microscopy, Biophysical Journal 1995, 68, 360-363.
2. Jones R.A.L., Polymers at Surfaces and Interfaces, Cambridge University Press, 1999, ISBN-13-978-521-47965-3.
3. Kubínek, R., Mikroskopie skenující sondou, Univerzita Palackého v Olomouci 2003, ISBN 80-244-0602-0.
4. Cowman, M., Li, M., Balazs, E., Tapping Mode Atomic Force Microscopy of Hyaluronan: Extended and Intramoleculary Interacting Chains, Biophysical Journal 1998, 75, 2030-2037.
5. Temenoff, J.S., Biomaterials, The Intersection of Biology and Materials Science, Rice University 2009, ISBN-13: 9780130097101.

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

Datum zadání diplomové práce: **3. února 2020**
Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

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

Ve Zlíně dne 17. 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

Byly studovány agregační schopnosti hyaluronanu na povrchu kladně nabité slídy pomocí mikroskopie atomárních sil. Hyaluronan byl na povrch deponován z vodných roztoků bez a s obsahem pufračního činidla. Studovanými proměnnými byly typ disperzního prostředí, způsoby přípravy polymerních roztoků, koncentrace hyaluronanu, teplota, teplotní spád, způsob ředění výchozího roztoku pro depozici na nosný substrát, depozice a sušení hyaluronanu na nosném povrchu. Z experimentálních výsledků vyplynulo, že agregační a síťotvorné schopnosti hyaluronanu na povrchu kladně nabité slídy reflektují způsob přípravy polymerního roztoku a typ disperzního prostředí, ze kterého je tento polymer nanášen na nosný povrch.

Klíčová slova: hyaluronan, roztok, povrch, imobilizace, polymerní sítě a agregáty, mikroskopie atomárních sil.

ABSTRACT

Aggregation capabilities of hyaluronan on positively charged mica surface were studied by atomic force microscopy. Hyaluronan was deponated from aqueous solutions with and without buffer agent. Studied were variables such as type of disperse medium, temperature, temperature gradient, dilution means of original solutions before deposition on supporting surface. Experiment results demonstrate that aggregation and network making capabilities on positively charged mica surface reflect means of polymer solution preparations and type of disperse medium from which is polymer deponated on supporting surface.

Keywords: hyaluronan, atomic force microscopy, imobillisation, solution, surface, polymer network and aggregates.

Chtěla bych poděkovat vedoucímu své diplomové práce Ing. Antonínu Minaříkovi, Ph.D za odborné vedení, pomoc a rady, které mi pomohly k dokončení této práce.

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

OBSAH

ÚVOD **9**
I TEORETICKÁ ČÁST **10**
1 KYSELINA HYALURONOVÁ **11**
1.1 STRUKTURA A BIOLOGICKÉ FUNKCE 12
1.2 CHOVÁNÍ A USPOŘÁDÁNÍ POLYMERNÍCH ŘETĚZCŮ V ROZTOKU 15
1.2.2 Faktory podmiňující uspořádání polymerního řetězce v roztoku 16
2 MIKROSKOPIE ATOMÁRNÍCH SIL **21**
2.1 POPIS METODY 21
2.2 ZOBRAZOVÁNÍ MAKROMOLEKULÁRNÍCH SYSTÉMŮ 22
2.2.1 Nukleové kyseliny 23
2.2.2 Hylan A 24
2.3 CHARAKTERIZACE HA 26
II PRAKTICKÁ ČÁST **30**
3 MATERIÁLY A METODY **31**
3.1 POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE 31
3.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ HA A VZORKŮ PRO AFM 31
3.3 POUŽITÝ AFM MIKROSKOP A PROGRAMY K VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ 33
4 VÝSLEDKY A DISKUZE **34**
4.1 ROZTOKY PŘIPRAVOVANÉ V PUFRU 35
4.1.1 Vliv hmotnostního podílu HA v pufrovaném roztoku na změnu vzhledu imobilizované vrstvy HA rozpouštěné při střední teplotě 46/46 °C 35
4.1.2 Vliv hmotnostního podílu HA v pufrovaném roztoku na změnu vzhledu imobilizované vrstvy HA rozpouštěné při střední teplotě 46/46 °C s následným ředěním na (0,005 hm. %) 36
4.1.3 Vliv hmotnostního podílu HA v pufru na změnu vzhledu imobilizované vrstvy HA rozpouštěné při střední teplotě 46/46 °C na roztoky deponované ve svých výchozích koncentracích. 38
4.1.4 Vliv hmotnostního podílu HA v pufrovaném roztoku na změnu vzhledu imobilizované vrstvy HA připravené z roztoku rozpouštěného při rozdílných teplotních spádech 39
4.1.5 Vliv teploty zředění deponovaného roztoku v pufru na změnu vzhledu imobilizované vrstvy HA 44
4.1.6 Vliv míry zředění výchozího roztoku na změnu vzhledu HA na povrchu slídy 46
4.1.7 Vliv oplachování povrchu vzorků destilovanou vodou na změnu vzhledu zachycené HA na povrchu slídy 47
4.2 ROZTOKY HA PŘIPRAVOVANÉ VE VODĚ 49
4.2.1 Vliv hmotnostního podílu HA ve vodném roztoku 49

4.2.2 Vliv střední teploty na změnu agregovaných struktur na povrchu slídy deponovaných z vodných roztoků 50
4.2.3 Vliv teplotního spádu na změnu agregačních schopností HA připraveného ve vodě 52
4.2.4 HA imobilizovaný na povrchu slídy z třepaných roztoků připraveného při 23 °C 55
4.2.5 Následnost kroků přípravy vodných roztoků HA 56
4.3 HA DEPONOVANÝ Z ROZPUŠTĚNÝCH POLYMERNÍCH FILMŮ 58
ZÁVĚR 60
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 61
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK 66
SEZNAM OBRÁZKŮ 67

ÚVOD

Hyaluronan (HA) je přírodní polysacharid běžně se vyskytující v lidském těle, kde se účastní řady biologických procesů. Vykonávaná funkce se odvíjí od molární hmotnosti, která určuje, jestli se daná molekula hyaluronanu bude podílet např. na migraci buněk nebo hojení ran. Hyaluronan se díky tomu vyznačuje obrovským aplikačním potenciálem v oblastech tkáňového inženýrství, kosmetiky a medicíny. Tyto rozličné využití jsou dány jeho vlastnostmi a spektrem literárně popsaných postupů jejich modifikací. Lze jej použít například pro přípravu nanočástic pro distribuci léčiv nebo hydrogelů pro biotisk.

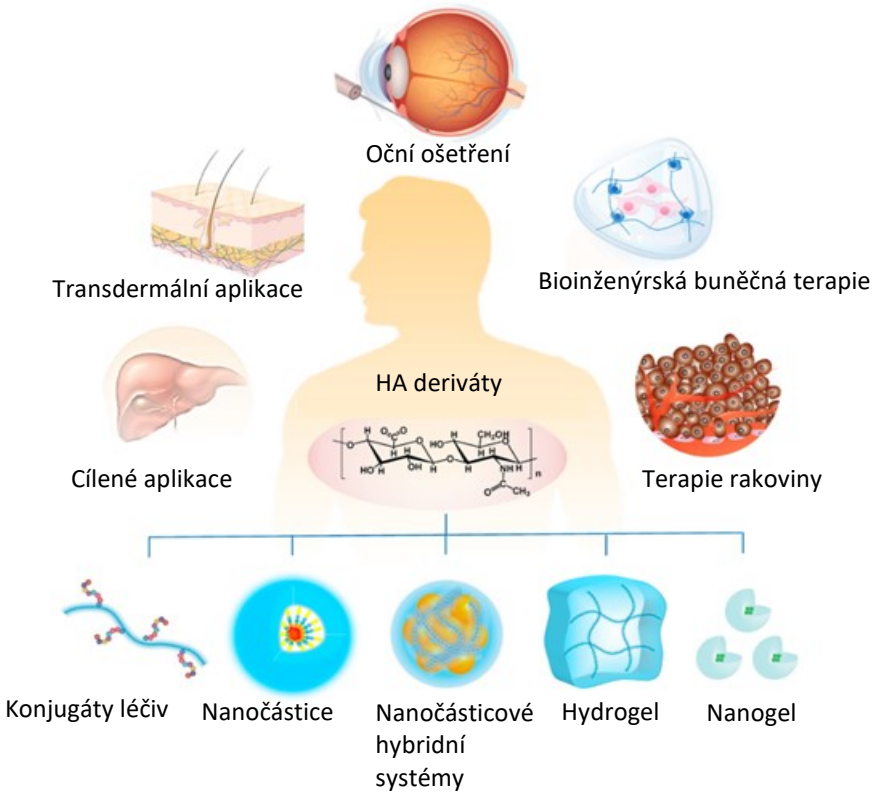
Rozsáhlá škála vlastností hyaluronanu je ovlivněna strukturou tohoto polymeru. Jeho terciární konformace je velice variabilní a lze ji měnit kontrolou faktorů, jako je pH roztoku, smykové namáhání a teplota během přípravy roztoku. Strukturálním uspořádáním a chováním hyaluronanu v roztoku společně s jeho biologickými funkcemi se věnuje teoretická část této práce. Spolu s tím je řešen úvod do mikroskopie atomárních sil (AFM), jenž je důležitým nástrojem pro charakterizaci celé řady makromolekulárních systémů (DNA, RNA atd.). S ohledem na zaměření této diplomové práce jsou zde rozebrány možnosti snímání HA pomocí této charakterizační techniky. Spolu s tím jsou popsány známé imobilizační přístupy vedoucí k imobilizaci takovýchto makromolekul na hladký povrch, pozorované konformace, podmínky vedoucí k jejich vytvoření a využití AFM pro jinou než čistě topologickou charakterizaci hyaluronanu.

Praktická část této diplomové práce je zaměřená na studium konformace hyaluronanu sodného imobilizovaném na hladkém povrchu modifikované slídy za použití AFM v poklepovém režimu v prostředí vzduchu. Pro tyto účely byly připravovány roztoky HA za odlišných fyzikálních podmínek, jako je typ disperzního prostředí, podíl polymeru v roztoku a teplota. Jsou zde popsány vrstvy HA deponované na povrch slídy z vodného nebo pufrového roztoku nebo roztoku připraveného z dříve solidifikovaného filmu. V závislosti na těchto proměnných jsou diskutovány agregačních schopností HA na pevném povrchu a jejich vztah ke konformačnímu uspořádaní tohoto biologicky důležitého polymeru v roztoku.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KYSELINA HYALURONOVÁ

Kyselina hyaluronová (HA), známá také jako hyaluronát sodný nebo hyaluronan je lineární polysacharid obsažený v extracelulární matrix (ECM) tkání u všech vyšších organismů. Kromě toho je produkována některými druhy bakterií jako extracelulární kapsle[1,2].HA je považována za extracelulární polymer a její funkce uvnitř buňky nebyla dosud zcela objasněna[3]. Jednou z aplikačních možností je tvorba hydrogelů zpravidla vyžadující její chemickou modifikaci. Modifikace polymeru umožňuje jeho síťování a začlenění derivátů, kterými lze ovlivňovat vlastnosti výsledné morfologie. Hydrogely na bázi HA vzhledem k biokompatibilitě a bioaktivitě materiálu nachází uplatnění zejména v estetické medicíně ve formě dermálních výplní nebo při léčbě neinvazivních kožních defektů. Ve farmakologii lze hydrogely použít pro cílenou distribuci léčiv. Schéma shrnující možnosti užití farmakologických preparátů na bázi HA je uvedeno na obr. 1. Výhledově HA představuje vhodný materiál pro přípravu bioinkoustů pro 3D biotisk a aplikace v oblasti bionanotechnologií[4–8].

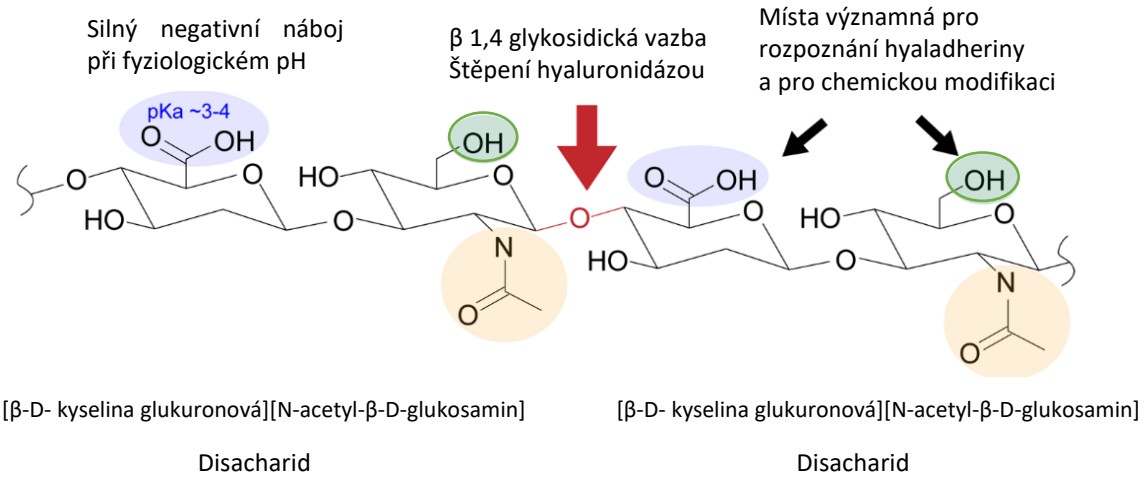


Obr. 1: Schéma různých terapeutických aplikací medikament založených na HA[4]

1.1 Struktura a biologické funkce

Hyaluronan je složený z opakujících se disacharidových jednotek obsahující kyselinu glukoronovou a N-acetyl-D-glukosaminu. Každý disacharid dosahuje délky 1,0 nm [9,10]. K HA syntéze dochází v plazmatické membráně pomocí hyaluronan syntetáz, které iniciují, prodlužují a přenášejí HA do ECM[11]. Degradace naopak nastává buď neenzymatickými procesy reaktivními formami kyslíku, nebo enzymatickými procesy pomocí hyaluronidáz, které způsobují depolymeraci HA[1]. V lidském těle se vyskytuje 15 g HA z čehož asi 5 g denně podléhá degradaci a je znova obnovováno[9].

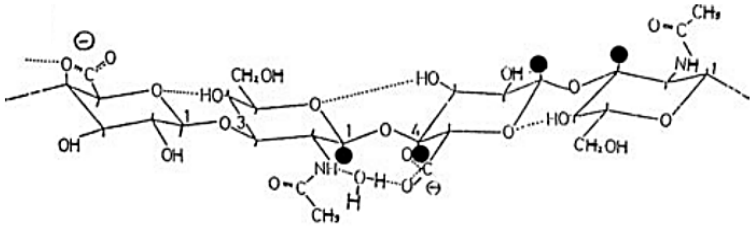
Každý disacharid se skládá z jedné karboxylové kyseliny, jednoho primárního alkoholu a jedné amidové složky (obr. 2). Ty jsou významné pro biologickou funkci HA a umožňují chemickou modifikaci. Karboxylová kyselina přítomná v podjednotce kyseliny glukuronové je při fyziologickém pH efektivně zbavená protonů a zodpovědná za polyaniontový charakter makromolekuly[3]. HA se v organismu nevyskytuje ve formě izolované molekuly. Nachází se v roztocích nebo je vázána na jiné biopolymery, např. hyaluronan vázajícími proteiny tzv. hyaladheriny.[1,12] Interakce mezi HA a proteinem má důležitou strukturní úlohu v extracelulárních prostorách, kde jsou komponenty EMC podrobeny silovému působení v případě deformace tkání nebo matrice. Příkladem struktury pocházející z takové interakce jsou objemné supramolekulární komplexy tvořené HA a proteoglykanem agrekanem. Tyto komplexy významně přispívají k integritě a biomechanickým vlastnostem chrupavky, jež jsou nezbytné pro funkci kloubů[13]. HA dále vykazuje významné signalizační vlastnosti související s vázáním na receptory přítomnými na povrchu buněk, z nichž hlavní je CD44[14].



Obr. 2: Chemická struktura HA: karboxylová kyselina (modrá), primárním alkohol (zelená) a amid (růžová)[3].

Primární struktura HA neobsahuje žádné peptidy. Stejně jako ostatní glycosaminoglycany je složena z jednoho polysacharidového řetězce, ale na rozdíl od ostatních zástupců této skupiny je HA jediná nesulfátovaná sloučenina. Tato uniformní struktura může na první pohled vyvolávat dojem, že HA vykonává pouze omezené biologické funkce. Ve skutečnosti jsou však tyto limitace překonány množstvím specifických HA vazebných míst[15,16].

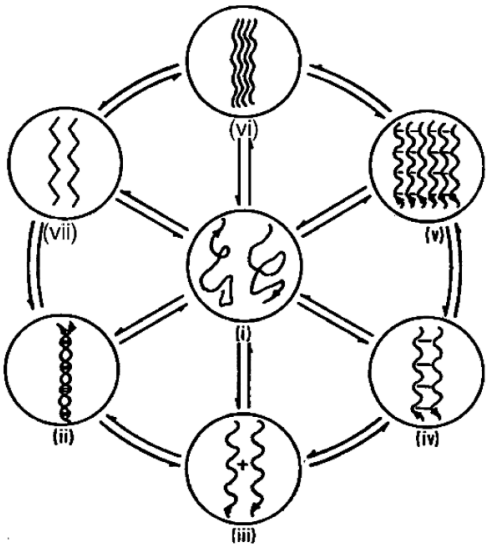
Sekundární struktura HA (obr. 3) je tvořena dvakrát stočenou šroubovicí, jejíž strany jsou identické, funkčně rovnocenné a antiparalelní. Ve struktuře HA, studované ve vodě a dimethyl sulfoxidu, může být začleněno až 5 H-vazeb na jednu tetrasacharidovou jednotku. H-vazby se formují podél osy polysacharidu a jsou příčinou stáčení řetězce. Dále podmiňují vznik hydrofobních oblastí umožňujících interakce s dalšími HA řetězci i přes jejich negativní náboj. Hydrofobní oblasti zaujímají 8 až 9 CH skupin přesahujících až přes 3 sousední sacharidové jednotky a představují alternativní strany polymeru. Tato vlastnost poskytuje vysvětlení pro interakce HA s lipidy a membránami[16,17]. Dvakrát stočená šroubovice je v roztocích schopna energeticky i stéricky tvořit rozsáhlé duplexní formace, jejichž hnací silou je právě interakce mezi hydrofobními oblastmi řetězce[18].Vnitřní zbytkové vodíkové vazby uvnitř HA jsou v polárních rozpouštědlech zesíleny vodíkovými vazbami v molekulách rozpouštědla[12].



Obr. 3: Sekundární struktura HA. Na obrázku je fragment řetězce složený ze dvou disacharidových jednotek. Čtyři vnitřní zbytkové vodíkové vazby jsou zesíleny vodními můstky mezi COO^- skupinou a acetamidovou NH skupinou[12].

Terciární struktura nejčastěji zaujímá formu listu nebo trubiček, které jsou modelovány paralelními, antiparalelními a skládanými řetězci. Tato struktura však vykazuje vysokou variabilitu a nízkou stabilitu i za mírných podmínek. Důsledky této nízké stability jsou pak snadné přechody mezi různými podobami hyaluronanu, přičemž důležitou roli v tomto procesu hraje mimo jiné i molární hmotnost HA[12,19].

Pro studium konformace HA byl tento biopolymer podroben řadě experimentů v rozdílných podmínkách. Na jejich základě bylo zjištěno, že strukturní uspořádání HA může být ve formě (i) molekulárního řetězce ve zředěném roztoku, (ii) dvojité šroubovice, (iii) dvojice antiparalelních řetězců, mezi kterými nedochází k propletení, (iv) jednoduché šroubovice s těsným prostorovým uspořádáním, (v) šestice řetězců s pravidelným uspořádáním, (vi) řetězce s těsnějším uspořádáním a (vii) zcela nataženými jednotlivými řetězci. Tato uspořádání jsou znázorněna na obr. 4.



Obr. 4: Možná uspořádání polymerního řetězce HA podmíněné experimentálními podmínkami[12]

HA vykazuje antagonistický efekt vůči řadě biologických funkcí jako jsou záněty, migrace buněk a jejich proliferace. Tyto protichůdné účinky lze vysvětlit mimo jiné velikostí a distribucí molekulární hmotnosti Mw, která se pohybuje v rozmezí ~$2 \cdot 10^5$ až ~$10 \cdot 10^6$. Biologické funkce HA se liší v závislosti na této rozdílné molární hmotnosti. Vysoko molekulární HA (> 1 MDa) je uplatňována v procesech, jako je hojení ran, potlačení zánětů, ochrana epitelové tkáně, homeostáze tkání, antiproliferativní a antiangiogenní účinky[9,15]. Dále má funkci jako antifibrotické činidlo při revmatické artritidě a osteoartritidě. Také snižuje adhezi během chirurgického zákroku v intraabdominální oblasti[20]. HA je nezbytná pro přežití zárodku během embryogeneze, a to v důsledku její funkce během procesu srdeční morfogeneze. Hygroskopické a viskoelastické vlastnosti HA umožňují udržovat strukturu a vnitřní napětí tkání, díky nim rovněž působí HA jako lubrikační činidlo v kloubech[14]. Množství HA významně vzrůstá při zánětlivých procesech vyvolaných například při infarktu myokardu, artritidě nebo odmítnutí transplantátu. Odstraněním HA včasnou léčbou infarktu myokardu pomocí hyaluronidázy je redukována

fibróza myokardu a zmírní se dopad infarktu[20]. HA s molekulární hmotností mezi 250 kDa až 1MDa se projevuje jako prostředek působící proti zánětům. Fragmenty HA o 117 kDa se ukazují jako účinné inhibitory migrace a invaze rakovinových buněk. Opačný efekt vykazují fragmenty o 35 kDa[15].

1.2 Chování a uspořádání polymerních řetězců v roztoku

Chování a uspořádání HA řetězců v roztoku se odvíjí od několika faktorů. Významná je molekulová hmotnost rozpuštěného polymeru a typ disperzního prostředí. Příkladem může být chování HA v neutrálních vodných roztocích (nebo v roztocích blízkých fyziologické koncentraci HA). Molekulární domény HA řetězců o vysoké molární hmotnosti zaujímají sférické uspořádání. Oproti tomu HA s menší molární hmotností se chová jako typický semiflexibilní polymer, kde krátké řetězce jsou viditelně protaženy, zatímco dlouhé řetězce se na svých koncích evidentně stáčí. Kromě molekulové hmotnosti a rozpouštědla má na chování HA vliv celá řada dalších faktorů (pH roztoku, přítomnost iontů, teplota, napětí atd.). K charakterizaci těchto vlivů slouží velké množství metod, jejichž stručný výčet je uveden v následujícím odstavci[21].

1.2.1 Metody charakterizace chování a struktury HA

Jedním z nejdůležitějších charakterizovaných parametrů u HA je jeho molekulová hmotnost . Stanovení Mw je obtížné určit vzhledem k polydisperzitě polymeru, podmínkám lišícím se od podmínek ideálního roztoku, obtížím při definování konformace a agregaci. Pro určení Mw se v posledních letech stala oblíbenou metodou rozměrově vylučovací chromatografii s dvojitou detekcí víceúhlového rozptylu světla a indexu lomu (SEC-MALS-RI) [2].

Informace o HA může poskytnout molekula vody uzavřená v této makromolekule. Jde o nepřímé nahlédnutí do struktury HA pomocí infračervená spektroskopie (FTIR). Ve FTIR spektru je sledován široký pík typický pro OH skupinu z molekuly vody. V HA roztocích o odlišných koncentracích byly pozorovány značné odchylky mezi píky OH skupin, což jednoznačně poukazovalo na přítomnost různých struktur ve vodném prostředí[22]. Reometr slouží ke zhodnocení reologických vlastností, z nichž předmětem zájmu je často viskoelasticita nebo viskozita roztoku v závislosti na koncentraci, molární hmotnosti nebo typu rozpouštědla[23]. Pro zhodnocení vlastností látek lze použít řadu dalších technik (NMR, RTG difrakce atd.). Význam pro charakterizaci makromolekul má mikroskopie atomárních sil, které je v této práci věnovaná samostatná kapitola. Zajímavá je i její kombinace s jinými metodami. Za zmínku zde stojí AFM spojená

s jednomolekulovou silovou spektroskopií (SMFS) představující důležitý nástroj pro studium intramolekulárních a intermolekulárních sil, stability dimerů a supramolekulách polymerů, interakcí makromolekula-rozpouštědlo, struktury ve vodném prostředí vázané vodíkovými vazbami a interakcí mezi proteoglykany a proteiny, tedy mezi HA a hyaladheriny[13,24].AFM-SMFS také umožňuje charakterizaci konformace a elastických vlastností jednotlivých polymerních řetězců. Výhodou této metody je kombinace možné lokalizace a skenování jednotlivých molekul v kontrolovaném prostředí[24].

1.2.2 Faktory podmiňující uspořádání polymerního řetězce v roztoku

Na základě studia HA výše zmíněnými metodami jsou pozorované strukturní změny hyaluronanu podmíněné řadou faktorů. Ty se projevují rozdíly ve struktuře HA molekuly v roztoku nebo v krystalické fázi ve srovnání s ideálně volnou molekulou. Volnou molekulou se rozumí molekulární struktura, která by byla pozorovaná ve vakuu[12].

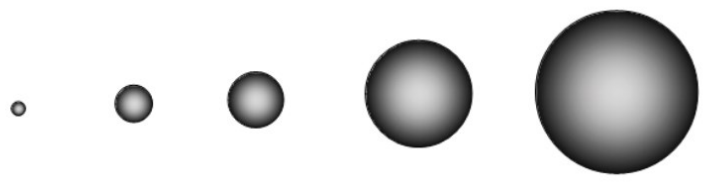
Charakterizace vysokomolekulární HA rozpuštěné ve vodě ukázala, že v případě HA dochází k agregaci řetězců polymeru do sítě zaujímající tvar připomínající medové plástve. Tloušťka řetězce se zvětšuje s rostoucí koncentrací polymeru ve vodném prostředí. Tato skutečnost naznačuje, že agregace je vratný a uspořádaný proces. U nízkomolekulární HA byly za srovnatelných podmínek rozeznatelné oblasti mající uspořádání sítě, kde jsou vzájemně propleteny makromolekuly HA vedoucí ke vzniku integrální struktury. Z tohoto důvodu se HA roztoky při koncentracích 0,5-1,0 g/l chovají jako slabý elastický gel. Dlouhé molekuly tvoří větší množství příčných vazeb než kratší molekuly, čímž je polymerní síť při dané koncentraci pevnější. HA o nízké viskozitě tvoří tuto polymerní síť jen v omezené míře oproti nativní HA[17,25].

Roztoky HA v rovnováze obsahují velký podíl uspořádaných struktur. Narušení řady z nich nastává mechanickým namáháním jako je míchání, přelévání nebo deformace synoviální tekutiny indukované pohybem kloubů. U narušených struktur se očekává reformování a návrat do původního stavu za současného uvolnění napětí. Tím je dosaženo elastického odrazu, jenž bývá pozorován u mechanicky narušených roztoků HA s vysokou molekulární hmotností[17]. U již zmíněného uspořádání na základě vodíkových vazeb a hydrofobních interakcí mezi antiparalelními řetězci se mohou vratně rozpadat agregáty zvýšením teploty nebo alkalizací roztoku[22]. Zvyšováním teploty byla prokázána tepelná destabilizace lokální superstruktury a změna struktury vedoucí k přechodu do formy náhodného klubka. Tento proces byl pozorován u jednotlivých HA molekul ve fyziologickém roztoku. Za pokojové teploty lze polymerní strukturu rozrušit aplikovaným napětím[24].

Nárůstem pH z neutrálního na zásadité také výrazně klesá tuhost polymerního řetězce (o 30 až 50 %) ve vodných roztocích. Jako vysvětlení změny tuhosti byl považován efekt pH na vodíkové vazby mezi amidovou a karboxylátovou aniontovou skupinou. Tato hypotéza však byla následně vyvrácena pořízením 2D-IR spektra při různých hodnotách pH. Bylo zjištěno, že zvýšení pH nevede ke změně podílu vázaných karboxylátových aniontových skupin. Vodíkové vazby mezi karboxylátovou aniontovou skupinou a amidovou skupinou nemají významný vliv na tuhost řetězce. Tento závěr potvrzuje tvrzení, že hlavním zdrojem tuhosti řetězce jsou vodíkové vazby na kyslíkových kruzích[26].

Ve fyziologických roztocích zaujímá HA objemnou strukturu náhodného klubka, která vzniká v důsledku vysoké hydrofility umožňující HA vázat až 1000x své hmotnosti vody.[20] Na uspořádání HA v roztocích má kromě pH vliv i koncentrace solí. Typ rozpouštědla pak ovlivňuje gyrační poloměr. Ve vodě je tento poloměr pro HA 200 nm. V roztoku cetylpyridinum hyaluronátu v metanolu je gyrační poloměr 120 nm. Tento pokles v gyračním poměru nastává v důsledku kolapsu řetězců, jež je způsoben neutralizací nábojů[18,27].

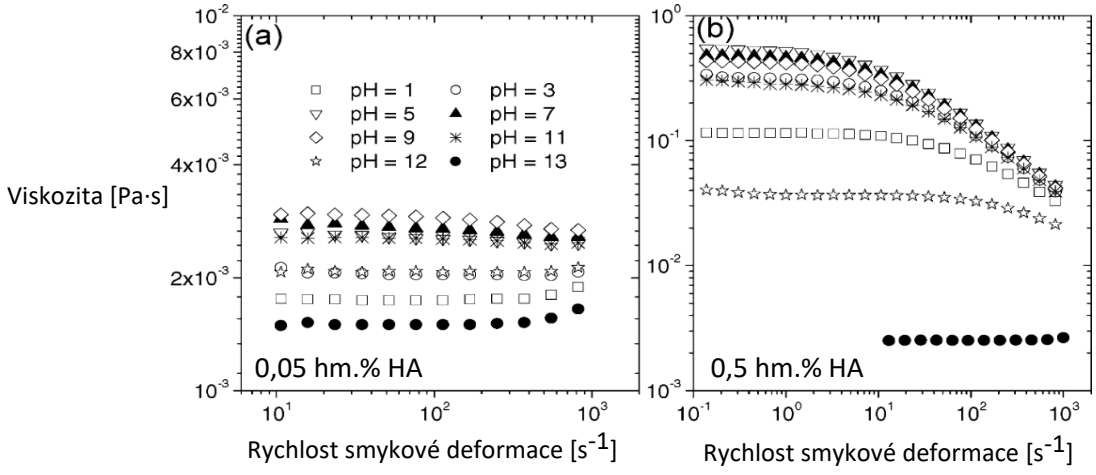
Ve zředěných roztocích při pH a iontové síle blízké fyziologickým podmínkám vykazují řetězce HA značnou tuhost. Zaujímají konformaci náhodného klubka s perzistentní délkou řetězce kolem 5-7 nm a vysoký hydrodynamický objem. Při iontová síle za těchto podmínek jsou náboje v důsledku karboxylátových skupin na polymerním řetězci od sebe téměř úplně stíněné. Repulze mezi nimi nemá významný vliv na expanzi objemu klubka. V roztocích, kde je koncentrace solí nižší než 0,15M NaCl, elektrostatická repulze navyšuje hydrodynamický objem jednotlivých molekul HA. Také dochází k nárůstu repulze mezi těmito molekulami. Hydrodynamický objem se mění s molární hmotností, jak znázorňuje obr. 5. Molární hmotnost má vliv na gyrační poměr a vnitřní viskozitu polymeru. Kombinace vysokého hydrodynamického objemu a vysoké *Mw* zapříčiní, že jednotlivé řetězce HA jsou vzájemně v kontaktu a dochází k jejich propletení. Tento jev nastává při koncentraci HA nad 1mg/ml nebo pro Mw nad 1-2 MDa[22,27,28].



Obr. 5: Změna hydrodynamické velikosti řetězců HA s narůstající molární hmotností. Řetězce hyaluronanu s molární velikostí (zleva) 0,1; 0,5; 1; 3 a 6 milionů zaujímají hydrodynamický poloměr 50, 140, 210, 400 a 600 nm ve fyziologických solných roztocích[27].

Při zvýšené koncentraci HA ve fyziologickém roztoku se řetězce vzájemně proplétají v důsledku rozšíření hydrodynamických domén polymeru. Výsledkem je významný nárůst viskozity [22]. Ve vodném roztoku HA se přídavkem NaCl potlačí elektrostatické repulzi mezi molekulami a viskozita se naopak sníží[23].

Viskozita i viskoelasticita HA v hydratovaném stavu jsou anomální, a to ve smyslu, že nejsou konstantní, ale mění se v závislosti na rychlosti smykové deformace a oscilačním pohybu. Viskozita 1% roztoku HA při molární hmotnosti $3\text{-}4\cdot10^6$ činí přibližně 500 000 násobek viskozity vody při nízkých rychlostech smykové deformace, ale může 1000krát klesnou, pokud je tlačena skrze injekční jehlu[16]. Viskozita HA roztoku může být také ovlivňována jeho pH hodnotou. Změna viskozity HA o Mw = $1{,}9\cdot10^6$ ve zředěném roztoku (0,5 hm.%) je zobrazena na obr. 6b. Viskozita se značně mění pro téměř všechny hodnoty pH při narůstající rychlosti smykové deformace. Výjimkou je pH=13, kde newtonský průběh viskozity naznačuje fragmentovanou strukturu a možné změny v konformaci řetězce. Pokles viskozity pro vysoké a nízké pH je způsoben rozpadem polymerní sítě štěpením glykosidických vazeb. Pro HA tato degradace začíná při pH menším než 4 a při pH větším než 11. Rozdílné chování HA lze pozorovat ve více zředěném roztoku HA (0,05 hm.%) na obr. 6a s molární hmotností Mw=$1{,}9\cdot10^6$, kde je viskozita za všech pH prakticky stejná a má newtonský průběh[27,29].



Obr. 6: Viskozitní chování zředěných (a) a semi-zředěných (b) HA roztoků za odlišných hodnot pH[29]

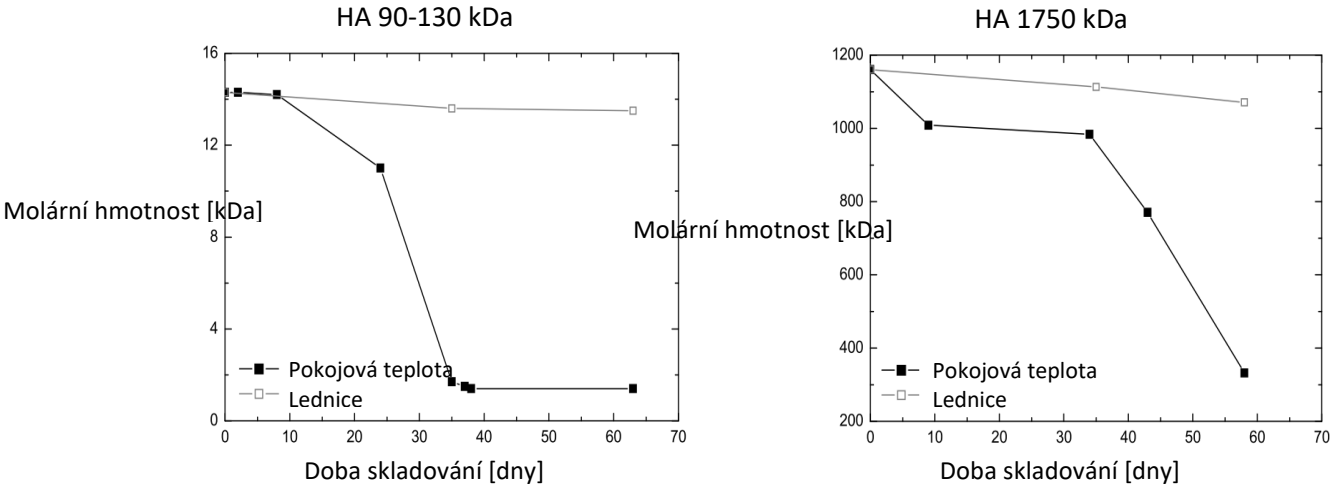
Studie provedená Gatej et al.[30] věnující se vlivu pH reologické vlastnosti vodných roztoky HA (Mw =10^6) potvrzuje, že reologické chování je neměnné v širokém rozmezí pH (2,8 až 12). Při hodnotě pH=2,5 popisuje termoreverzibilní gelovité chování a při nižším pH

(pH = 1,6) je polymer znova solubilizován. Za vyššího pH (>12,5) polymer přechází do konformace náhodného klubka v důsledku disociace OH skupin v zásaditém prostředí[30].

Vzhledem k polyelektrolytické povaze HA je její konformace v roztocích ovlivněna kromě již zmíněných faktorů (Mw, teplotou, pH) i přítomností protiiontů. Studie věnující se účinku protiiontů ukázaly, že v přítomnosti Na^+ a Ca^+ je větší pravděpodobnost tvorby HA agregátů než v prostředí s K^+ [1]. V roztocích soli je možná agregace HA oligomerů, které jsou tvořeny více než 20 disacharidů. U nízkomolekulární HA obsahující více než 300 disacharidů je agregace zjevná[17]. V roztocích bez přidaného elektrolytu vznikají polydisperzní propletené agregáty HA, jejichž stabilita zůstává konstantní v období několika týdnů. Roztoky mající středně až vysokou iontovou sílu jsou stabilní v řádu několika dní, poté se většina agregátů rozpadá[31].

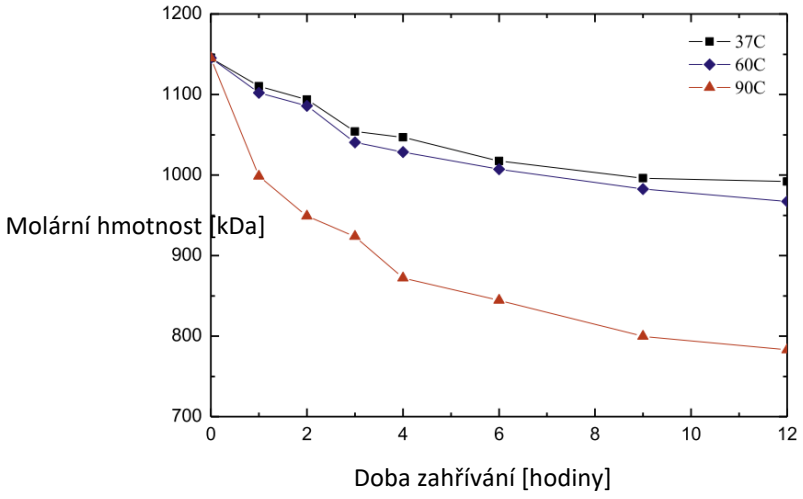
Jednou z důležitých informací o hyaluronanu je doba, po kterou lze roztoky tohoto polymeru skladovat, aniž by se u nich významně projevila degradace. Poznatky o degradaci HA v roztocích, které nejsou chráněny proti účinkům mikroorganismů, mají klíčový význam pro aplikace v kosmetice a medicíně[32]. Degradace nastává v důsledku zvýšení teploty a působení mikroorganismů náhodným štěpením řetězce, jak předkládá výzkumu provedený Mondeket al.[33] a Simulescu et al.[32]

Skladovat vodné roztoky HA za pokojové teploty lze 8 dní. Po této době se v roztoku objeví mikroorganismy, které se velice rychle množí a způsobují degradaci polymeru. Při skladování v lednici při teplotě 4 °C nedochází k výrazné změně průměrné molární hmotnosti po dobu 60 dní. Průběh degradace se také ovlivňuje molární hmotnost HA. Na obr.7 jsou průběhy změn molární hmotnost HA roztoků o dvou různých Mw rozpuštěného HA[33].



Obr. 7 : Průběh skladování HA vodných roztoků při laboratorní teplotě a v lednici (4 °C). (Vlevo) roztok HA o molární hmotnosti 90-130 kDa byl při pokojové teplotě stabilní po dobu 10 dní. Poté nastala rychlá degradace působením mikroorganismů. (Vpravo) roztok HA o Mw 1750 kDa při pokojové teplotě se zpočátku vykazuje pozvolnou degradací, která později nabírá na rychlosti. Degradace roztoků uchovávaných v lednici je v obou případech pomalá[33].

Vliv teplotního působení na stabilitu HA roztoku se odvíjí od aplikované teploty a doby, po kterou je roztok zahříván. Absorbovaná voda v tomto případě nemá žádný degradační účinek na rozdíl od samotné teplotní degradace. Při fyziologické teplotě lidského těla (37 °C) lze pozorovat mírnou degradaci. Podobný průběh je pozorovatelný při zvýšené teplotě 60 °C. Výrazná exponenciální degradace nastává při teplotě 90 °C (obr. 8). Degradace HA roztoků o dvou různých Mw (1,67 a 1,8 kDa) ukázala, že degradace má rychlejší průběh při nižší Mw (1,67 MDa)[32,33].

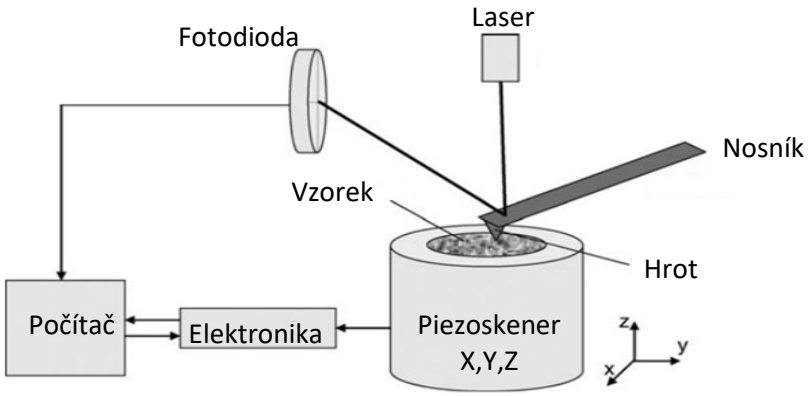


Obr. 8 : Termální degradace HA o molární hmotnost 1,67 kDa v roztoku[33]

2 MIKROSKOPIE ATOMÁRNÍCH SIL

Mikroskopie atomárních sil představuje účinný nástroj pro mapování široké škály povrchových vlastností vodivých i nevodivých materiálů. Kromě zobrazení topografie povrchu s rozlišením až v desetinách nm lze získat například informace o adhezi a deformaci povrchu nebo hustotě povrchového náboje. AFM lze také využít pro kontrolovanou manipulaci s mikro a nano objekty[34–36].

2.1 Popis metody



Obr. 9: Schéma aparatury AFM [37]

Principem AFM je skenování povrchu vzorku sondou opatřenou špičatým hrotem. Během skenování se v důsledku interakce hrotu se vzorkem nosník vychyluje a mění se tak i signál dopadajícího laserového paprsku, který se od nosníku odráží a je zachytáván fotodetektorem. Informace z fotodetektoru jsou pak zpracovávány do 3D topografie povrchu vzorku[38]. Pro změnu pozice vzorku je využíván piezoskener[34]. Schéma AFM je uvedena na obr. 9. Nevýhoda AFM spočívá v dlouhé době pořízení jednoho snímku. Výhodou je naopak výborné rozlišení snímků, které činí pro tvrdé hladké vzorky až 0,01 nm a pro měkké biologické vzorky ~1 nm. Rozlišení získaného snímku a přesnost měření přímo ovlivňuje výběr AFM hrotu. Tomuto tématu je také věnována řada studií zabývající se vylepšením parametrů hrotu, jako jsou tvar vrcholu, poloměr křivosti a úhel kužele[37]. AFM je ideální pro zobrazování velmi hladkých krystalických struktur až na atomové úrovni jako je slída. Ta se vyznačuje velice hladkou strukturou a její mřížka je často používaná jako snímací standard při kalibraci piezoelektrického skeneru pro měření v nanometrech[39,40]. Měření na AFM může probíhat v prostředí vzduchu, různých plynů, vakua nebo kapalin.[34]

AFM využívá tři režimy skenování: kontaktní, bezkontaktní a poklepový (obr. 10). V kontaktním režimu je hrot v neustálém kontaktu se vzorkem, na který tak působí vertikální a laterální síly. Vertikální složka má původ v deformaci nosníku (směrem nahoru), který udržuje hrot v kontaktu se vzorkem. Laterální složka vzniká v důsledku laterálního posunu vzorku během skenování. Kontaktní režim dosahuje atomového rozlišení pro tvrdé, hladké vzorky (silikon, slída). Měkké vzorky (proteiny) musí být pro skenování v tomto režimu pevně imobilizovány na povrchu substrátu, aby nedocházelo k jejich posunutí a deformacím během snímání. Pro skenování biomolekul se spíše využívá režimu poklepového[37,40].

Obr. 10: Znázornění režimů AFM[38]

Skenováním v poklepovém režimu se podstatně redukuje opotřebení hrotu, snižuje molekulární pohyb a poškození vzorku oproti skenování v kontaktním režimu. Poklepový režim je z tohoto důvodu široce využíván pro studium poddajných materiálů jako biomolekuly, polymery a nano struktur. Umožňuje také studium izolovaných biomolekul[36,37].

Při bezkontaktním režimu je hrot nosníku vzdálen od povrchu vzorku (50-150 Å). Hrot osciluje s malou amplitudou blízkou své rezonanční frekvenci. Interakce hrotu s povrchem indukuje změny v oscilaci. Ta je udržována systémem zpětné vazby upravováním průměrné vzdálenosti hrotu od povrchu vzorku, což může být dále využito ke snímání topografie vzorku. Bezkontaktní režim se uplatňuje pro snímání kovů, polovodičů, polymerů a biologických materiálů[38].

2.2 Zobrazování makromolekulárních systémů

Schopnost snímání pomocí AFM ve vodném prostředí umožňuje zkoumat řadu biologických systémů. K těmto účelům se často používá jako substrát povrch slídy. Slída se kromě hladkého povrchu vyznačuje silným negativním nábojem, což může indukovat lokální iontovou sílu v blízkosti povrchu. Tento jev může způsobit posun rovnováhy studovaných biomolekulárních procesů (např. biopolymerní adsorpce). Slída je smáčitelná

vodou, což zajišťuje dobrou adsorpci molekul a dalších objektů v měřítku nanometrů. Mnoho studií z posledních let (Ostendorf et al.[41] nebo Christenson el al.[39]) ukazuje, že se na povrchu odštěpené slídy v prostředí vzduchu se formuje uhličitan draselný K_2CO_3. Tato struktura vzniká okamžitě po odštěpení vrstvy slídy reakcí povrchu substrátu s atmosférickým CO_2 a s vodou. Tato zjištění poukazují na nutnost přehodnotit dřívější studie zaměřené na strukturu absorbované vody na povrchu slídy [39,42].

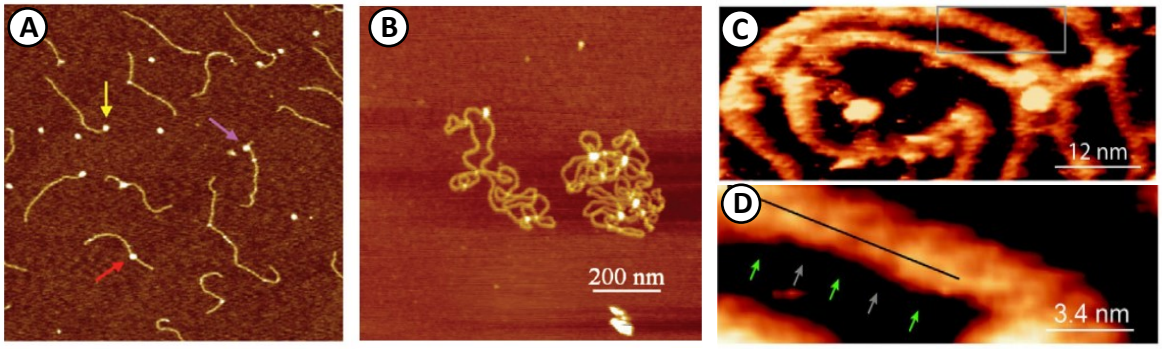
Zkoumané vzorky musí být na povrchu slídy dostatečně imobilizovány. V opačném případě by negativní náboj slídy měl za následek špatné rozlišení pořízeného snímku (hlavně u polysacharidů). Imobilizace probíhá fyzickou adsorpcí nebo chemickou fixací. V praxi je pro polysacharidy nejběžnějším a zároveň nejjednodušším způsobem imobilizace postup spočívající v nanesení malého množství vodného roztoku obsahující polysacharid na slídu. Následuje vypaření rozpouštědla nebo osušení vzorku např. dusíkem. Volným sušením na vzduchu dochází v důsledku odpařování rozpouštědla ke kondenzaci a přemisťování molekul polysacharidu, jež může vést k formování agregátů *in situ*, které nepředstavují uspořádání v původních roztocích[43]. Z tohoto důvodu je nutné povrch slídy před deponování roztoku modifikovat, čímž se výrazně zlepší elektrostatická imobilizace studované látky. K modifikaci se běžně používají divalentní ionty v roztocích[44,45] Divalentní kationty (Mg^{2+}, Ni^{2+}) umožňují adhezi negativně nabitých vzorků přemostěním na povrch substrátu. Jejich přítomnost v zobrazovacím pufru podporuje adhezi negativně nabitých molekul na povrch (slídy) v závislosti na koncentraci. V jistých případech musí být použity jiné metody přemostění, a to v důsledku interakce těchto iontů se vzorkem. Příkladem takové alternativní metody modifikace povrchu slídy je ošetření aminopropyltrietoxy silanem (APTES)[40].

Dalším používaným substrátem pro AFM je vysoce orientovaný pyrolytický grafit (HOPG), který má stejně jako slída hladký povrch a navíc má neutrální náboj[42]. Dále lze skenovat makromolekuly například na povrchu skla[46].

2.2.1 Nukleové kyseliny

AFM se ukazuje jako unikátní nástroj pro studium interakcí mezi proteiny a nukleovými kyselinami za téměř fyziologických podmínek. Také lze použít relativně dlouhé sekvence DNA a není nutné značení, barvení nebo fixace DNA či proteinu. Tím je umožněno přímé snímání na úrovni jedné molekuly, a lze tedy sledovat ojedinělé chování, které jinými technikami nepozorovatelné. Pro studium DNA se uplatňuje poklepový režim AFM, jelikož minimalizuje porušení vzorku na povrchu substrátu. Pomocí AFM lze získat informace ohledně biologických procesů zahrnujících transkripci, replikaci a rekombinaci

nebo o vazebných místech DNA[42,47]. Na obr. 11B je znázorněna plasmidová DNA. Je zde jasně viditelná dvouvláknová DNA na povrchu slídy ošetřené roztokem $NiCl_2$. Molekuly zde tvoří uzavřené smyčky a zkroucení vláken charakteristické pro nekondenzovanou DNA[45].



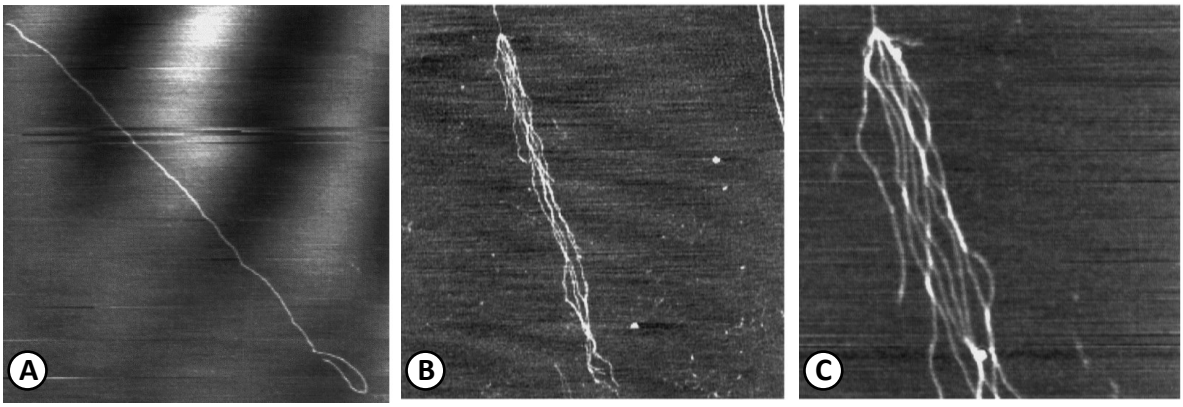
Obr. 11: A) Pozice vazebných proteinů na DNA (snímaná plocha 1x1μm). Šipky ukazují na protein-DNA komplexy na odlišných místech DNA [47]. B) Plasmidová DNA na povrchu slídy[45]. C) Snímek dvoušroubovice RNA při vysokém rozlišením. D) Detail vyznačeného úseku RNA[48].

Problematice snímání RNA a RNA-protein komplexů se věnuje podstatně méně studií, než je tomu v případě DNA. Důvodem může být složitá struktura RNA a její (bio)chemická nestálost. Pomocí AFM byla charakterizována RNA ve formě větvených molekula, oblasti s uspořádáním vlásenky a nanostruktury složené z RNA. Informace získané snímáním jednovláknové RNA silně závisí na tvaru a velikosti AFM hrotu a je zde nutné vylepšení dosud používaných technik. Pro snímání dvouvláknové RNA velikost rozlišení závisí na ostrosti hrotu a na silovém působením mezi hrotem a vzorkem. K rozlišení velkého a malého žlábku na řetězci je pak nutný poloměr AFM hrotů cca 2,5 nm. Dvouvláknová RNA je uvedena na obr. 11C a D. Dvoušroubovice RNA je zde po celé délce fixovaná na slídě a neutváří zde žádné složené struktury[48].

2.2.2 Hylan A

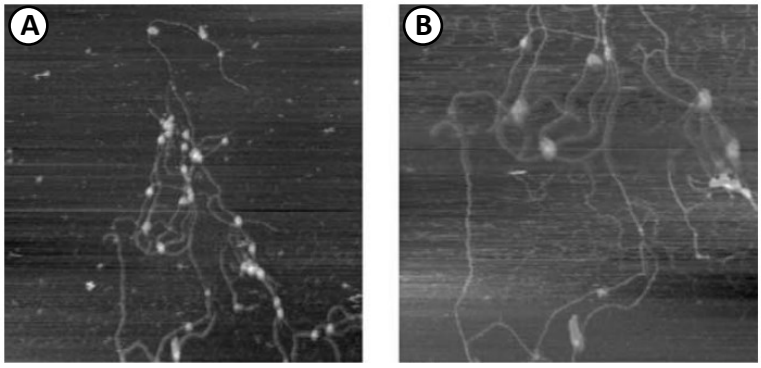
Jedná se o ve vodě rozpustný derivát kyseliny hyaluronové. V hylanu A nastává proteiny řízené zesíťování, které má za následek významně rozdílné vlastnosti hylanu A od hyaluronanu. Některé tyto vlastnosti (hlavně reologické) jsou silně ovlivněny molekulární hmotností. Hylan A se dále vyznačuje výjimečnou schopností vázat a udržovat molekuly vody (v 5% roztoku váže veškerou vodu). Z důvodu zvýšené molekulární hmotnosti a vysoké viskoelasticity nachází uplatnění v produktech pro biomedicínu[49,50]. Snímání hylanu A pomocí AFM probíhá opět v poklepovém režimu. Pro zobrazení jednotlivých

řetězců (obr. 12A) je nutné připravit výchozí roztok o dostatečně nízké koncentraci, aby byly molekuly od sebe oddělené. Před nanesením vzorku na povrch substrátu je nezbytné roztok dále zředit z důvodu zachování postačujícího oddělení molekul při interakci s povrchem substrátu. Hylan A tvoří velké množství struktur sdružených mezi sebou zahrnujících intermolekulární interakce. Obr. 12B znázorňuje sdružení řetězců hylanu A. Tyto řetězce jsou vzájemně spojené do uzlů. Také je možné, že tato struktura obsahuje proteiny zprostředkované zesítění, ale určení zesíťovaných bodů je u molekuly hylanu A zpravidla obtížné [49].



Obr. 12: AFM snímky Hylanu A: A) Izolovaný řetězec podrobený molekulovému česání v důsledku čehož byl téměř narovnán. Délka řetězce je přibližně 6,2 μm a velikost snímku 4,5 μm x 4,5 μm, šedá škála pokrývá 2 nm. B) Snímek propletené a/nebo zesíťované molekuly s rozsáhlým sdružením řetězců. Velikost snímku 3,5 μm x 3,5 μm, šedá škála pokrývá 1,5 nm. C) Detail horní sekce struktury (B) s velikostí snímku 1 μm x 1 μm, šedá škála pokrývá 2 nm[49].

Snímek hylanu A uvedený na obr.13 ukazuje přítomnost nepřetržité agregované sítě, ze které vychází jednotlivé řetězce. Řetězce se typicky vzájemně propletou a vytvoří agregáty. Smyčky vznikající v rámci jednoho řetězce jsou nejpravděpodobněji stabilizovány antiparalelní intramolekulární asociací řetězových segmentů[50]

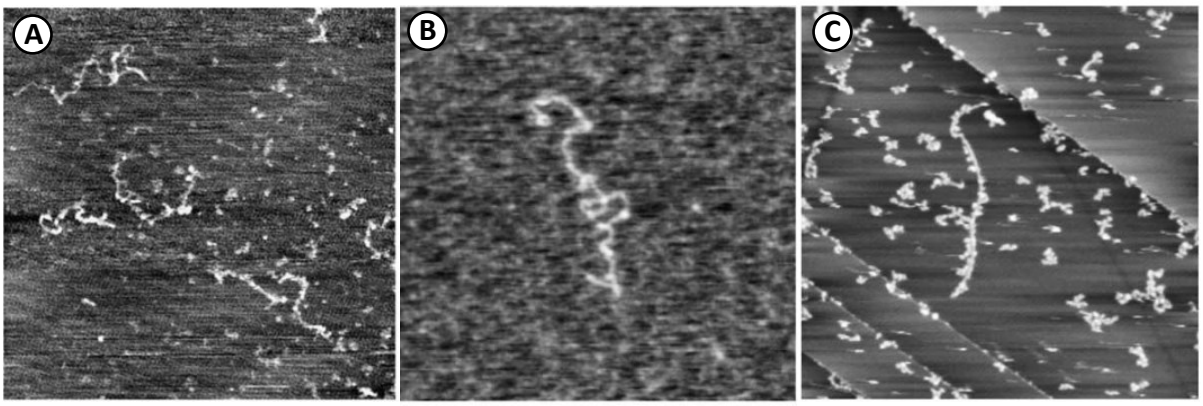


Obr. 13: Snímek hylanu A za koncentrace 1 $\mu g \cdot ml^{-1}$ deponovaný na povrch slídy a skenovaný pod n-butanolem: A) 400 x 400 nm, B) 200 x 200 nm[50]

2.3 Charakterizace HA

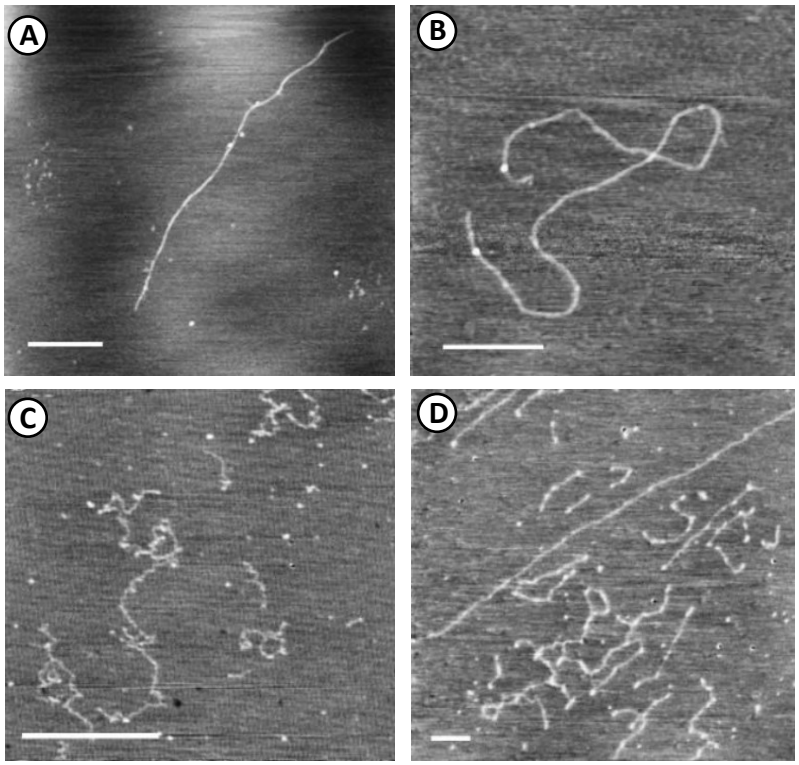
AFM snímání hyaluronanu na povrchu slídy ukazuje odlišné konformace řetězce a také různé intramolekulární a intermolekulární interakce. Molekuly HA lze zobrazovat jako natažené izolované řetězce, řetězce s intramolekulární vlastní asociací a jako sítě intermolekulárně sdružených řetězců. Pozoruhodnou vlastností HA na povrchu slídy je její tendence tvořit agregáty i za nižších koncentrací. Tento jev je připisován schopnosti hyaluronanu tvořit polymerní sítě. Jiné vysvětlení pochází z interakce vzorku s povrchem, na který je deponován. Jednotlivé povrchy se liší podle použitého substrátu (slída, grafit) a podle toho, zda povrch je nebo není modifikován. V případě modifikované slídy má její povrch větší drsnost a větší hydrofobicitu (podle modifikačního činidla) než slída nemodifikovaná. Zároveň ale bylo zjištěno, že nejsou znatelné rozdíly v pozorovaných strukturách HA na modifikované nebo nemodifikované slídě. Výrazné změny byly naopak patrné v případě deponování HA roztoku na grafit. Na povrchu grafitu byly detekovány polymerní řetězce stahující se do globulární podoby. Významná je skutečnost, že tyto řetězce nebyly propletené, ale viditelně oddělené, zatímco roztok za stejných podmínek na povrchu slídy vykazuje vysoké agregační schopnosti [49,51].

Na obr. 14C je zobrazená HA deponovaná z vodného roztoku o koncentraci 10 μg/ml na povrch grafitu. Zde jsou pozorovatelné globulární kondenzované systémy a izolované řetězce vykazující zjevné protažení v důsledku vlivu molekulárního česání. Stejný roztok byl dále nanesen na povrch čerstvě odštěpené slídy. Pozorována zde byla konformace relaxovaného klubka (řetězec má zjevný stupeň stáčení shodný s konformací řetězce ve zředěném roztoku) zobrazeném na obr. 14A. Roztok HA opět za stejných podmínek deponovaný na povrch slídy modifikované kvartérním alkylaminem TMSPTA (N-trimetoxysilylpropyl-N,N,N-trimethylamonium chlorid) na obr. 14B může zaujímat formu volně stočeného řetězce nebo rigidní konformaci, která může být protažená nebo částečně kondenzovaná[51].



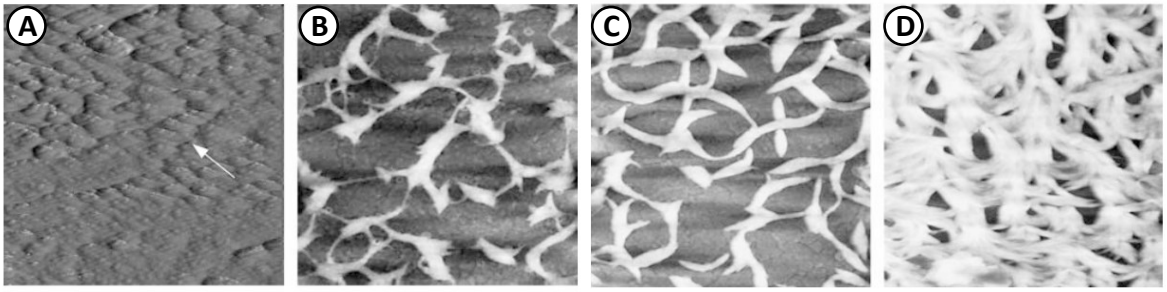
Obr. 14: AFM výškové snímky HA o střední Mw deponované z 10 μg/mL roztoku ve vodě na povrchu substrátu: A) povrch slídy nebyl modifikován, veikost snímku 1 μm x 1 μm x 0,9 nm. B) Slída modifikovaná pomocí TMSPTA, velikost snímku 750 nm x 750 nm x 1,3 nm. C) Povrch grafitu, velikost snímku 1 μm x 1 μm x 4,5 nm[51].

Jak již bylo zmíněno výše, molekuly hyaluronanu lze zobrazovat v různých formách. Jednou z těchto forem je konformace nataženého řetězce HA (obr. 15A). Toto uspořádání však neodpovídá 3D konfiguraci HA řetězce v roztocích. Nucené protažení řetězce je dosaženo molekulárním česáním kapkami vody při oplachu přebytečného roztoku HA na povrchu slídy, jejíž povrch byl předem ošetřen přidáním roztoku (10 mM $MgCl_2$) ke snížení elektrostatické repulze mezi vzorkem a povrchem. Nakonec je nezbytná prehydratace povrchu slídy při vlhkosti okolí. V případě, že nedojde k dostatečnému molekulárnímu česání, nebo když nastane výrazná relaxace lze pozorovat volně stočenou strukturu HA (obr. 15B). Forma relaxovaného klubka (obr. 15C) byla pozorována na povrchu čerstvě odštěpené vrstvy slídy. Tato struktura je shodná se známými vlastnostmi roztoku HA. Pokud je afinita k povrchu substrátu příliš nízká, může vznikat struktura kondenzovaného řetězce. Tyto struktury jsou viditelné na povrchu čerstvě odštěpené nebo předem hydratované slídy. Pro částečně kondenzované řetězce je charakteristická struktura připomínající perlový náhrdelník. Obr. 15D ukazuje případ kondenzované struktury, kde jsou zkracovány délky řetězce s narůstajícím globulárním uspořádáním řetězce[52].



Obr. 15: Různé konformace HA pozorované na povrchu slídy pomocí poklepového režimu AFM: A) ***Natažený řetězec HA****. Nízkomolekulární HA deponovaná z 2μg/ml roztoku v 10 mM $MgCl_2$ na předem hydratovaný povrch slídy. Měřítko činí 500 nm, výška 1-2 nm.B)* ***Částečně relaxovaná forma HA*** *na předem hydratované slídě. Nízkomolekulární HA deponovaná z 2 μg/ml roztoku v 10 mM $MgCl_2$. Měřítko činí 250 nm, výška 1-1,8 nm. C)****Relaxovaná forma HA*** *na čerstvě odštěpené vrstvě slídy. Vysokomolekulární HA deponovaná z 10 μg/ml roztoku ve vodě. Měřítko činí 500 nm, výška 1-1,3 nm. D)* ***Kondenzovaná forma HA*** *z vysokomolekulárního roztoku HA ve vodě o koncentraci 10 μg/ml. Měřítko činí 250 nm, výška 1,5-3 nm*[52]

Využitím AFM lze kromě snímku povrchu v 3D nano měřítku získat informace o nanomechanických vlastnostech studovaných povrchů, jako je lokální adheze a frikční síly. Měření těchto parametrů probíhá v kontaktním módu a při laterální silové modulaci (LFM) mikroskopie atomárních sil. Množství adsorbovaného polymeru je funkcí koncentrace HA v roztoku. Na obr. 16 lze vidět snímek adsorbované vrstvy HA na monovrstvě proteinu hovězího sérového albuminu (BSA) získaného v poklepovém režimu AFM. Polymerní síť připomínající strukturu pláství se tvoří na monovrstvě BSA (obr.156). Je pozorován nárůst šířky vláken sítě a zároveň zmenšení velikosti pláství v závislosti na adsorbovaném množství (obr.16: B, C a D). Obr. 16D zobrazuje nasycenou strukturu, kde jsou vlákna polymerní sítě složena z klastrů HA molekul[53].



Obr. 16: AFM snímky pořízené v poklepovém módu v prostředí vzduchu: A) vrstva BSA (1,5 μm x1,5 μm), kde je šipka ukazuje na molekulu BSA. Snímky B),C) a D) zobrazují adsorbovaný HA na BSA (5 μm x 5μm)s rozdílným adsorbovaným množstvím B) 25 ng, C) 50 ng a D) 88 ng[53].

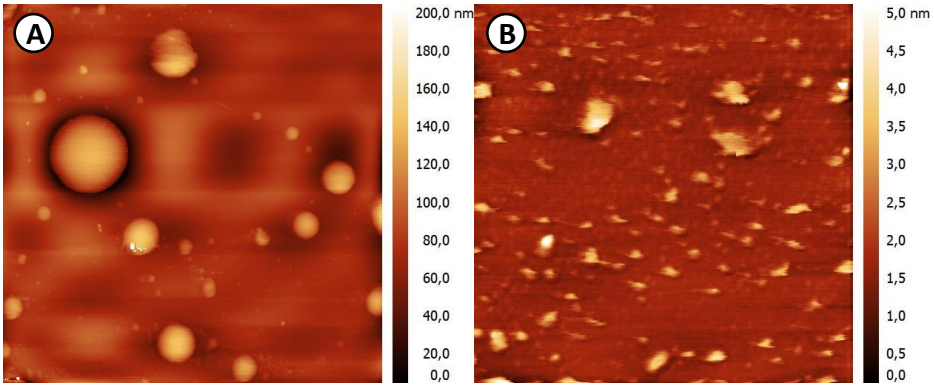
II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 MATERIÁLY A METODY

Předmětem studia byly rozdílné agregační schopnosti hyaluronanu sodného imobilizovaném na povrchu slídy. Pro přípravu roztoků byla HA rozpouštěna v ultračisté vodě a pufrované vodě s odlišnými podíly polymeru. Příprava dále probíhala za rozdílných fyzikálních podmínek. Pro následnou charakterizaci byly roztoky zředěny na srovnatelné koncentrace a deponovány na povrch modifikované slídy. Takto připravené povrhy s HA byly charakterizovány pomocí AFM.

3.1 Použité materiály a chemikálie

Pro přípravu roztoků byl použit hyaluronan (HA) o molární hmotnosti 370 kDa dodaný od společnosti Contipro a.s. v kosmetické kvalitě. HA byl rozpouštěn v ultračisté vodě (18,2 MΩ·cm) nebo v 50 mM pufru Tris-HCl o pH=8 (obr. 17). Pufr byl připraven rozpuštěním Tris(hydroxymehyl)aminomethanu v ultračisté vodě a okyselením na požadovanou hodnotu pH pomocí HCl. Obě chemikálie byly zakoupeny v p.a. čistotě od společnosti Sigma-Aldrich. Pro snímání pomocí AFM byly roztoky deponovány na substrát, kterým byla slída typu V-5 o velikosti 10 x10 mm od společností SPi Supplies. Povrch substrátu byl modifikován 0,1 M roztokem $MgCl_2$ v ultračisté vodě. $MgCl_2$ byla v p.a. kvalitě zakoupena od Sigma-Aldrich.



Obr. 17: Pufr Tris-HCl (50mM, pH=8) na povrchu slídy: A) velikost snímku 20 µm x 20 µm, B) velikost snímku 3 µm x 3 µm.

3.2 Příprava roztoků HA a vzorků pro AFM

První část roztoků byla připravována rozpuštěním HA v ultračisté vodě. Podíl polymeru v těchto roztocích byl 0,25 hm. %. Druhá část vznikla rozpouštěním HA v pufru Tris-HCl s množstvím polymeru 1 hm. %, 0,5 hm. % a 0,1 hm. %. Příprava roztoků probíhala na experimentálním přístroji TFFC (obr.19) vyvinutém na UFMI, UTB ve Zlíně, kde byla

vrstva polymerního roztoku vystavena buď teplotnímu spádu (50/10 °C), nebo konstantnímu ohřevu (46/46 °C). Pro porovnání agregačních schopností byly některé roztoky rozpouštěny třepáním při laboratorní teplotě 23°C. Příprava většiny roztoků však spočívala v rozpouštění polymeru přímo na TFFC (obr. 18), kde byl roztok o hmotnosti 47 g umístěn v Petriho misce o průměru 11,5 cm. Roztoky na TFFC byly podrobeny zvolenému teplotnímu režimu po dobu 22-24 hodin.

Obr. 18: Zařízení TFFC

Připravovány byly dále filmy z vodných roztoků HA o koncentraci 0,15 hm. %. Roztok polymeru byl nejprve po dobu 24 hodin třepán na třepacím zařízení a poté bylo 14,032 g přelito do dvou Petriho misek o průměru 6 cm.

Jedna miska byla vložena do speciální cely do TFFC při teplotním spádu 50/30 °C na 24 hodin. Druhá byla umístěna do MCDS (mikrokondenzační sušící systém) při teplotě 25/25 °C na dobu 94 hodin.

Další film byl připravován pouze na TFFC. V prvním kroku byl vložen na 24 hodin do TFFC zařízení s teplotním spádem 50/30 °C. Poté bylo opět množství 14,032 g roztoku HA přelito do Petriho misky a vloženo do speciální cely TFFC (50/30 °C) na dalších 24 hodin.

Všechny filmy byly po uplynulé době buď rozpuštěny ve vodě při laboratorní teplotě (opět 24 hodin) na původní koncentraci. Připravovány byly také filmy v pufru, které byly rozpuštěny na původní koncentraci v ultračisté vodě. Postup zde byl identický kromě doby ponechání filmu v MCDS, který zde činil 48 hodin.

Vzorky deponované HA pro snímání na AFM byly připravovány jak z neředěných roztoků, tak z roztoků ředěných na koncentraci 0,01 hm. % nebo 0,005 hm. %. Stejným způsobem byly připraveny vzorky z rozpuštěných HA filmů.

Povrch čerstvě odštípnuté vrstvy slídy byl modifikován 50 µl modifikačního roztoku $MgCl_2$ po dobu 60 s. Následovalo vysušení proudem vzduchu a nanesení 50 µl roztoku HA. Ten byl na substrátu ponechán 120 s a následně byl také vysušen proudem vzduchu. Roztoky, které byly připravovány v pufru byly před konečným vysušením opláchnuty proudem destilované vody z pipety. Vzorky HA filmu připravené v pufru před snímáním na AFM oplachovány nebyly.

3.3 Použitý AFM mikroskop a programy k vyhodnocení výsledků

Skenování vzorků probíhalo na mikroskopu atomárních sil NTEGRA Prima (obr. 19) zakoupeným od společnosti NT-MDT. Měření bylo provedeno v poklepovém režimu. Byla použita křemíková sonda NSG01 o výšce hrotu 14-16 µm a poloměrem křivosti 5-10 nm od společnosti NT-MDT. Byla skenována plocha 3 x 3 µm nebo 20 x 20 µm. Rychlost skenování byla 0,5 Hz s rozlišením 512 x 512 dpi při laboratorní teplotě (23 °C) v prostředí vzduchu.

Obr. 19: AFM mikroskop NTEGRA Prima

Vyhodnocení výsledků získaných z AFM probíhalo pomocí programu Gwyddion verze 2.55. Jedná se program zaměřený na vizualizaci, korekci a analýzu dat získaných SPM technikami (např. AFM, STM). Pomocí programu Gwyddion byly stanovovány parametry Ra a Rz, kde Ra udává střední drsnost a Rz střední největší výšku profilu. V programu ImageJ byla provedena obrazová analýza poskytující informace o pokrytí povrchu substrátu strukturami HA.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Praktická část práce pojednává o studiu vlivů rozdílných procesních parametrů přípravy roztoků HA na změny agregačních schopností tohoto polymeru na povrhu tuhého substrátu (slídy).

Studovány byly roztoky HA připravené v pufrovaném roztoku (Tris-HCl) s odlišným podílem polymeru během přípravy (0,1 hm. %, 0,5 hm. % a 1 hm. %). Tyto roztoky byly připravovány v TFFC při různých teplotních režimech. Sledovány byly vlivy podílu polymeru ve výchozím roztoku, teplotního spádu, rozdílné koncentrace deponované na substrát, rozdíly mezi oplachovanými a neoplachovanými povrchy slídy s HA a vliv zředění ředění roztoku před jeho depozicí na tuhý povrch.

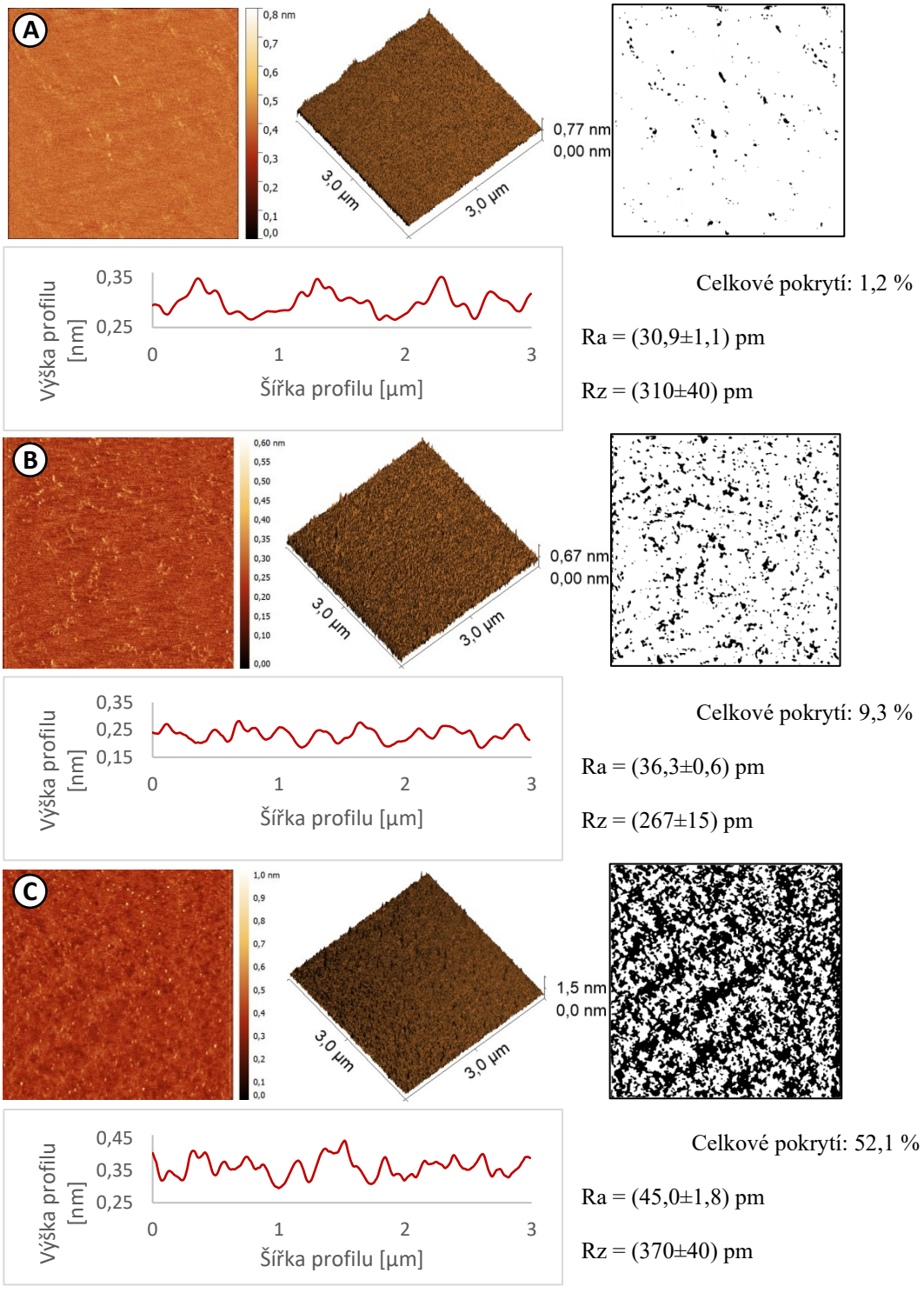
Výchozí koncentrace roztoků ve vodě byla (až na jednu výjimku) 0,25 hm. %. Roztoky byly připravovány na TFFC. Pro porovnání metod přípravy byl jeden roztok třepán a poté dán na TFFC. Dále byla porovnávána teplota během ředění roztoku, teplotní spád, hmotnostní podíl HA a střední teplota.

Filmy (systém roztok-film-roztok), byl připravován z 0,15 hm.% roztoku rozpouštěného třepáním nebo na TFFC buď ve vodě, nebo v pufru. Jeden film vznikal z třepaného roztoku vložením do MCDS. Další se připravil vložením třepaného roztoku do TFFC a poslední film vznikal pouze na TFFC. Roztoky připravované ve vodě i v pufru byly následně rozpuštěny ve vodě. Takto připravené filmy byly navzájem porovnány s ohledem na použité rozpouštědlo a proces přípravy.

Poznámka: **Před depozicí na povrch slídy byly všechny roztoky zředěny na srovnatelný hmotnostní podíl HA 0,01 hm. %, pokud tomu není uvedeno jinak**. Stejně tak byla velikost snímané plochy pomocí AFM 3 x 3 μm.

4.1 Roztoky připravované v pufru

4.1.1 Vliv hmotnostního podílu HA v pufrovaném roztoku na změnu vzhledu imobilizované vrstvy HA rozpouštěné při střední teplotě 46/46 °C



*Obr. 20: **Vliv hmotnostního podílu HA** v pufrovaném roztoku na vzhled imobilizovaného polymeru na povrchu slídy. Výchozí roztok připravován v TFFC při **46/46 °C**. Koncentrace výchozích roztoků před ředěním a depozicí na povrch: **A)** 0,1 hm. %, **B)**0,5 hm. %, **C)**1 hm.%.*

Získané výsledky byly podrobeny obrazové analýze. Jejím provedením lze získat informace o celkovém pokrytí substrátu polymerem jeho agregovanými strukturami. Z dat

získaných pomocí AFM byly vybráno 5 profilových řezů, ze kterých byly následně stanoveny parametry Ra a Rz. Nakonec byl vytvořen 3D model snímku z AFM pomocí programu Gwyddion. Na základě těchto údajů byl porovná vliv hmotnostního podílu na agregační vlastnosti hyaluronanu imobilizovaném na povrchu slídy (obr. 20).

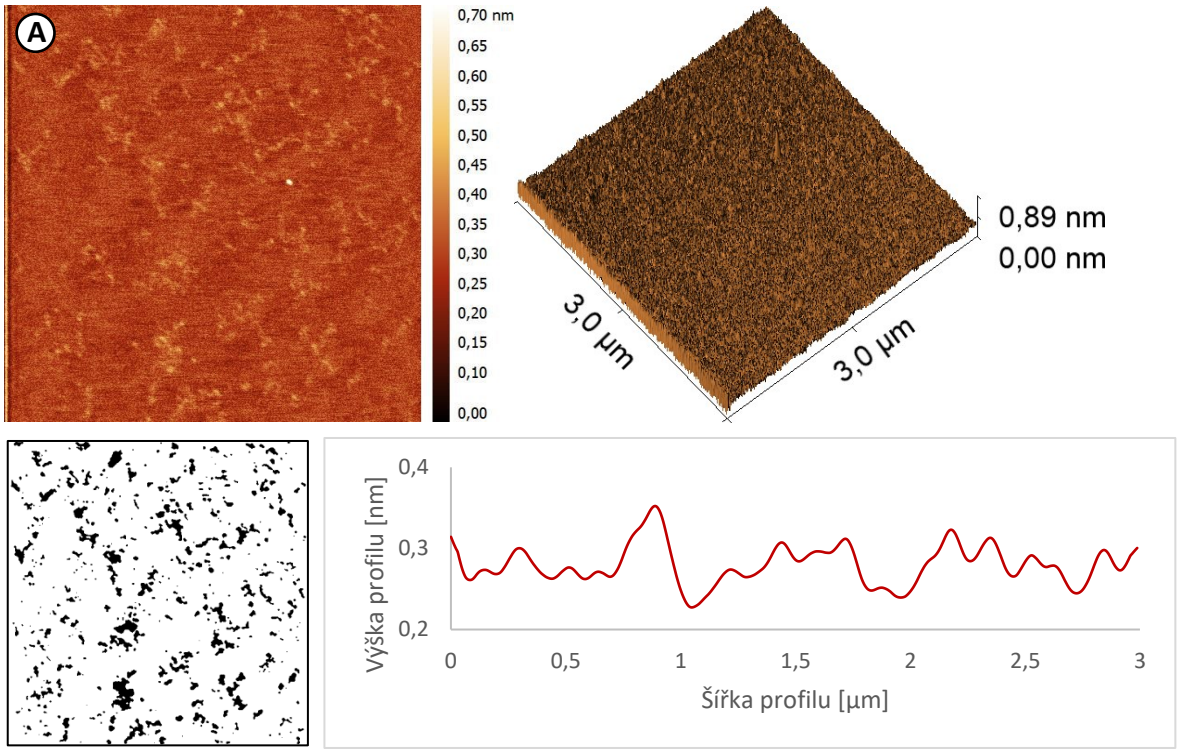
Na každé naměřené ploše jsou evidentní neuspořádané struktury HA. Z obrazové analýzy lze vidět, že nejmenší pokrytí substrátu polymerem (1,2 %) je z 0,01 hm.% roztoku. Stejně tak je zde pozorována malá měřených struktur. S vyšší koncentrací (0,5 hm.%) je evidentní nárůst pokrytí polymerem (9,3 %). Výrazně větší pokrytí povrchu polymerem lze pozorovat v případě výchozího roztoku s 1 hm. % HA. Pokrytí zde výrazně narůstá a jsou zde vidět malé agregované shluky polymeru, které lze v malé míře vidět v případě 0,5 hm. % roztoku, zatímco u 0,1 hm.% roztoku HA zcela chybí. S rostoucím podílem polymeru narůstá i výška pozorovaných struktur. I tak se však jedná o velice malé změny (u 0,1 hm. % je to 0,8 nm a 1 hm.% kolem 1,5 nm).

Pozorované rozdíly mezi srovnávanými vzorky na obr. 20 nejsou způsobeny rozdílnou koncentrací polymeru, jenž byl deponován na povrch slídy. Jak bylo uvedeno výše, vzorky byly před depozicí na povrch ředěny vždy na srovnatelnou koncentraci. To znamená, že pozorované rozdíly reflektují síťotvorné schopnosti HA v roztoku s rostoucím podílem polymeru při jeho rozpouštění. Zajímavé je, že se takto nabyté vlastnosti při vyšším hmotnostním podílu polymeru přenáší do zředěných roztoků.

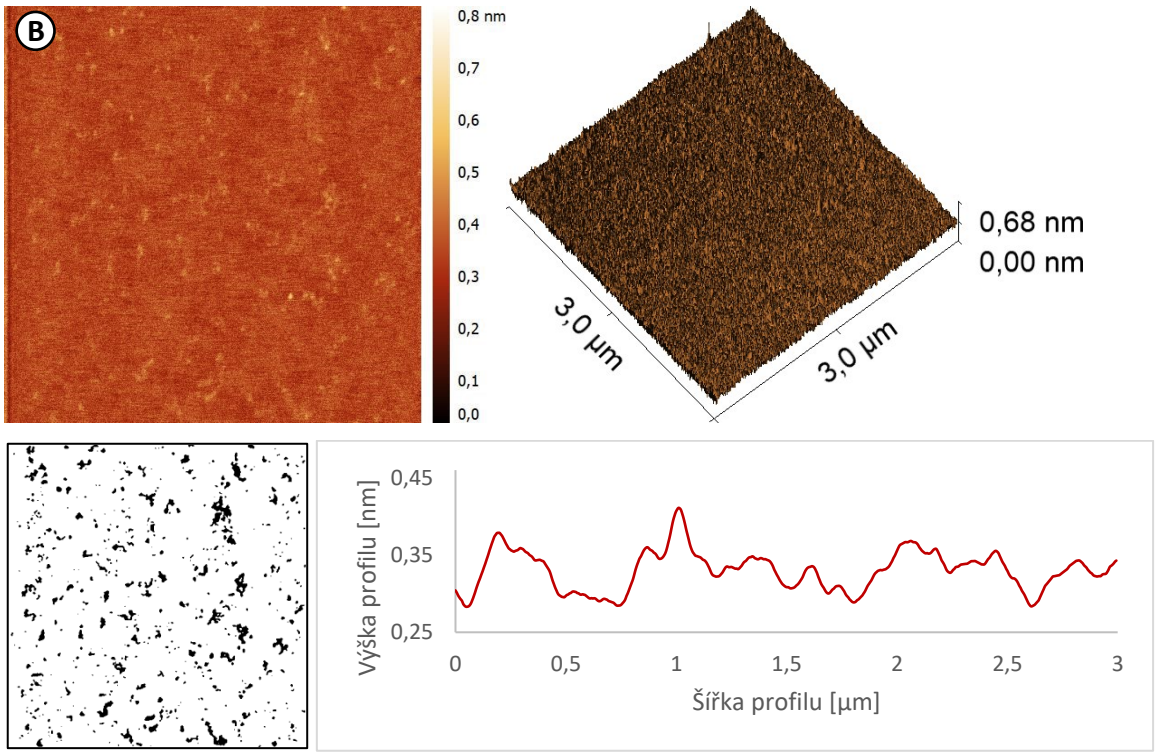
4.1.2 Vliv hmotnostního podílu HA v pufrovaném roztoku na změnu vzhledu imobilizované vrstvy HA rozpouštěné při střední teplotě 46/46 °C s následným ředěním na (0,005 hm. %)

Dalším krokem pro porovnání roztoků připravených při střední teplotě 46/46 °C bylo zředění deponovaného roztoku na podstatně menší koncentraci z 0,01 na 0,005 hm. %. Na obr. 21 jsou uvedeny snímky imobilizovaných řetězců HA z výchozích roztoků s obsahem 0,5 a 1 hm. %. Na obou snímcích jsou opět viditelné neuspořádané struktury HA, které tvoří shluky volně spojené polymerními řetězci. Jak je patrné ze vzorku pro výchozích 0,5 hm.% HA v pufrovaném roztoku, kde lze pozorovat mírný nárůst v pokrytí povrchu slídy HA.

Z porovnání dat uvedených na obr. 20 a 21 je zřejmé, s rostoucí mírou ředění z 0,01 na 0,005 hm. % dochází k rozrušení síťotvorných schopností HA na povrhu kladně nabité slídy a to zejména v případě systému s největším hmotnostním podílem polymeru v roztoku (1 hm.%).



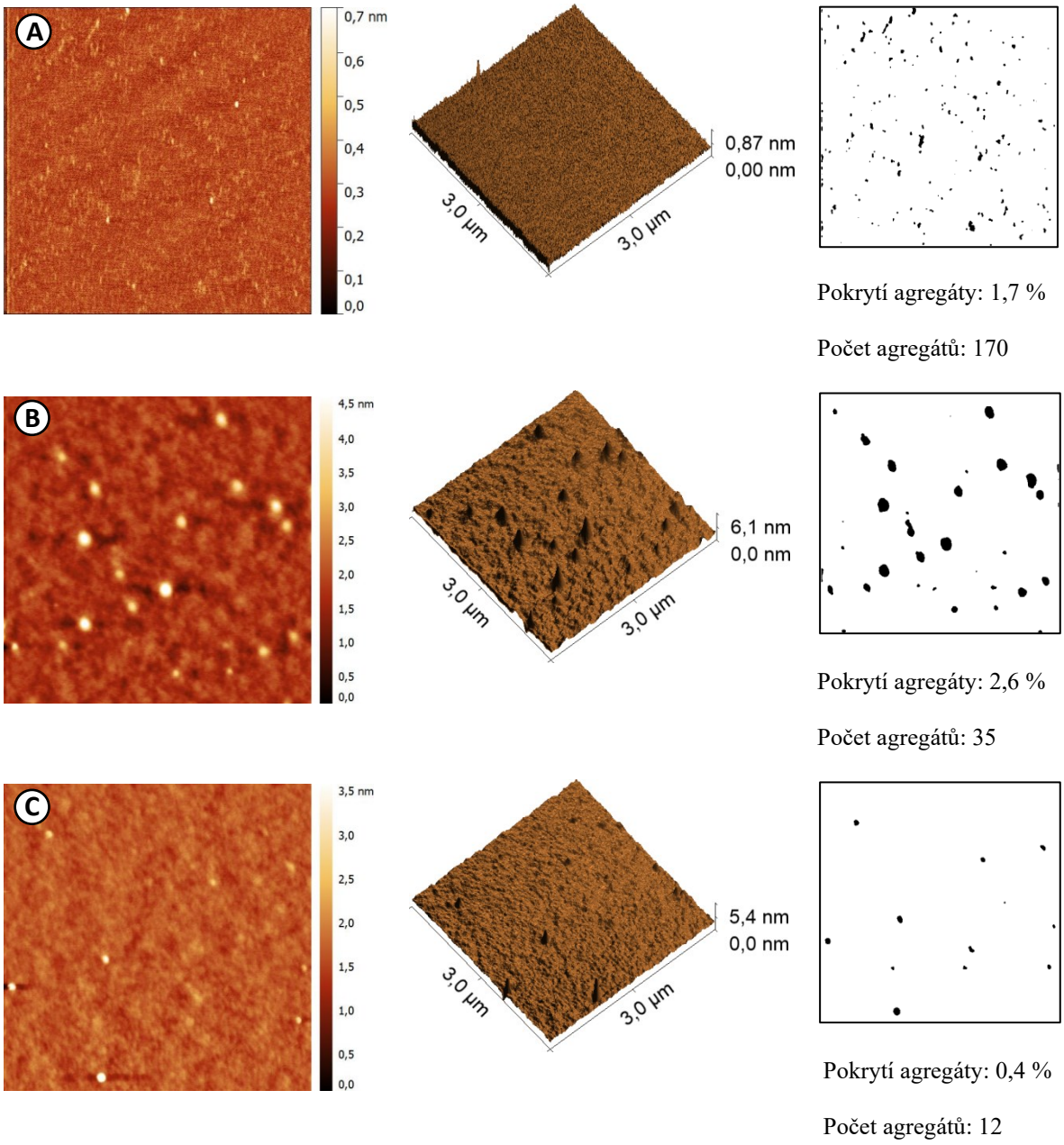
Celkové pokrytí: 9,2 % Ra = (33,97±1,17) pm Rz = (410±30) pm



Celkové pokrytí: 6,1 % Ra = (33,8±0,7) pm Rz = (250±10) pm

*Obr. 21: **Vliv hmotnostního podílu HA** v pufrovaném roztoku na změnu vzhledu imobilizovaného polymeru na povrchu slídy. Výchozí roztok připravován na TFFC při **46/46 °C** a před deponováním byl zředěn na **0,005 hm. %**. Koncentrace výchozího roztoku před ředěním: **A)** 0,5 hm. %, **B)**1 hm.%.*

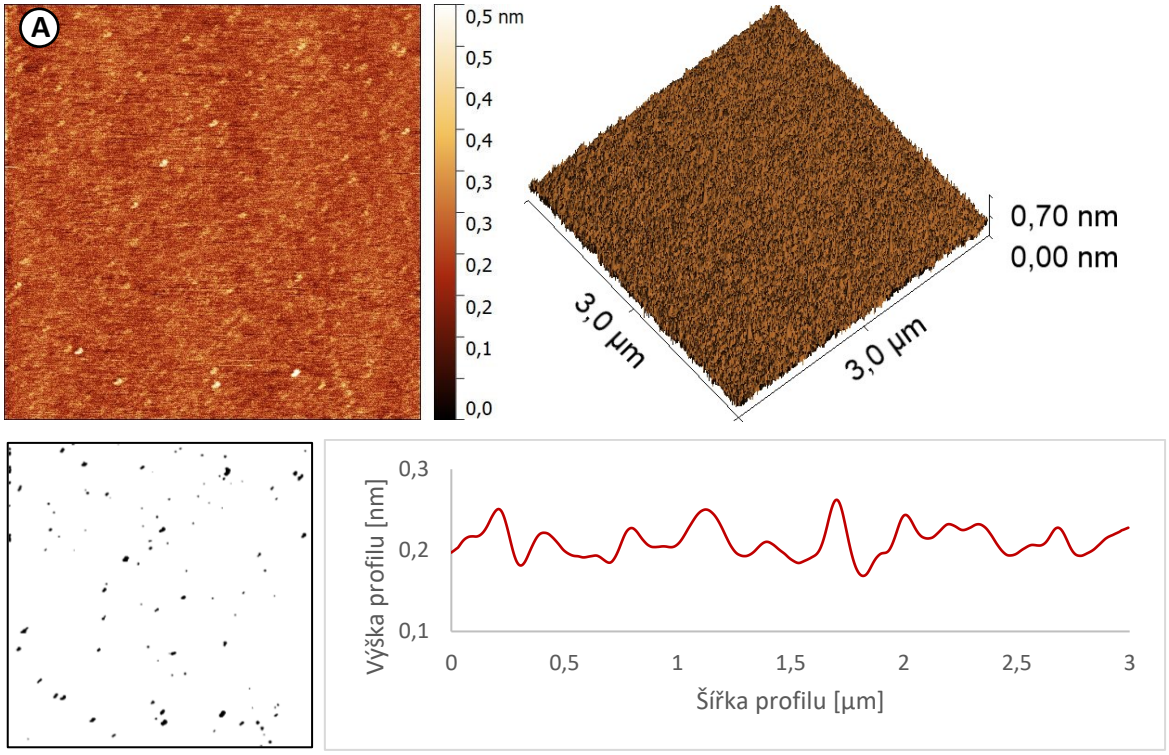
4.1.3 Vliv hmotnostního podílu HA v pufru na změnu vzhledu imobilizované vrstvy HA rozpouštěné při střední teplotě 46/46 °C na roztoky deponované ve svých výchozích koncentracích.



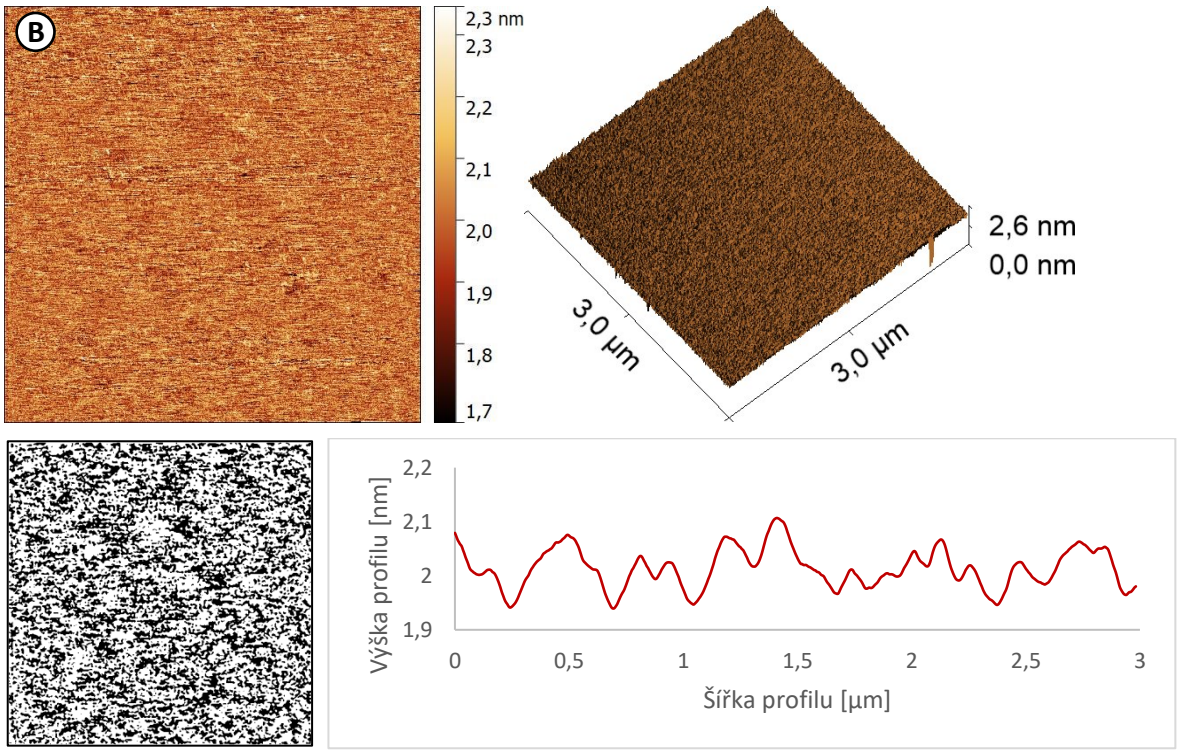
Obr. 22: ***Vliv střední teploty na změnu*** *vhledu imobilizované vrstvy HA na povrchu kladně nabité slídy. Výchozí roztok připravován v TFFC při* ***46/46 °C****. Roztoky byly* ***deponovány na povrch*** *ve svých* ***výchozích koncentracích****:* ***A)*** *0,1 hm. %,* ***B)****0,5 hm.%,* ***C)*** *1 hm. %.*

Kromě vlivu snížení koncentrace byl také pozorován vliv výchozí koncentrace roztoků na podobu HA struktur na povrchu slídy, obr. 21. V případě roztoku s 0,1 hm.% HA lze na povrchu pozorovat izolované shluky polymerních řetězců. Zatímco v případě vyššího hmotnostního podílu je povrch slídy kompletně pokrytý HA. Pozorujeme zvrásnění povrchu, z něhož vyčnívají větší agregát HA. Toto pozorování koresponduje s daty uvedenými na obr. 20.

4.1.4 Vliv hmotnostního podílu HA v pufrovaném roztoku na změnu vzhledu imobilizované vrstvy HA připravené z roztoku rozpouštěného při rozdílných teplotních spádech

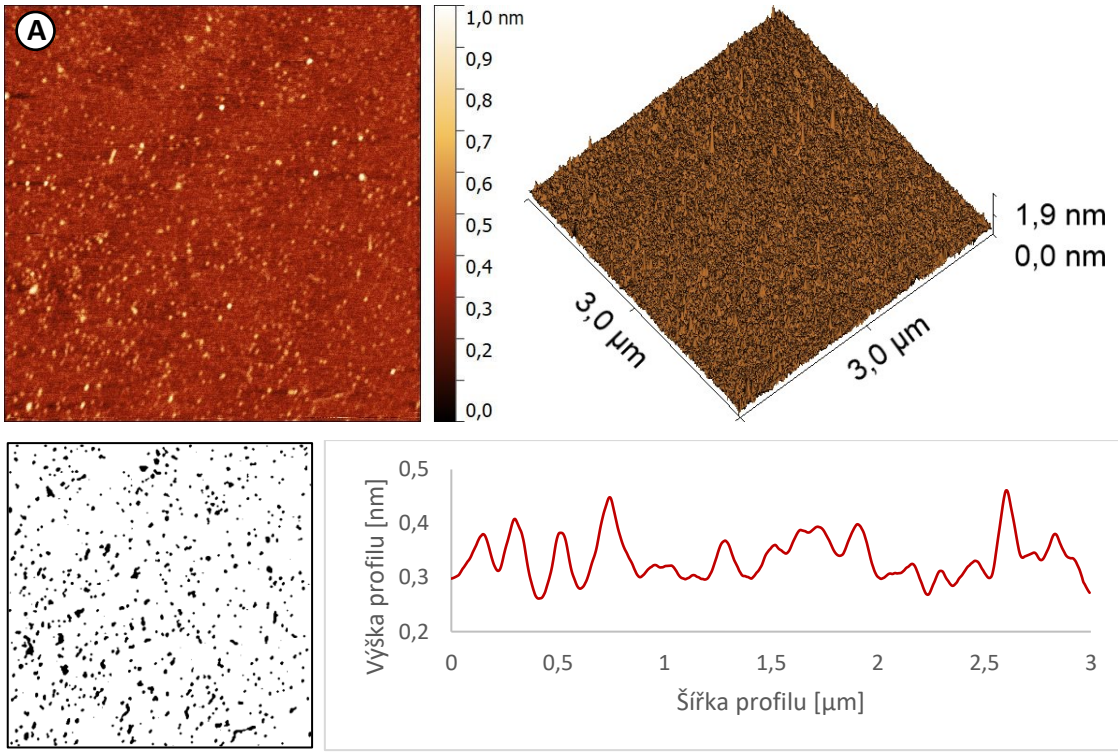


Pokrytí agregáty: 0,8 % Ra = (30,3±1,2) pm Rz = (202±13) pm

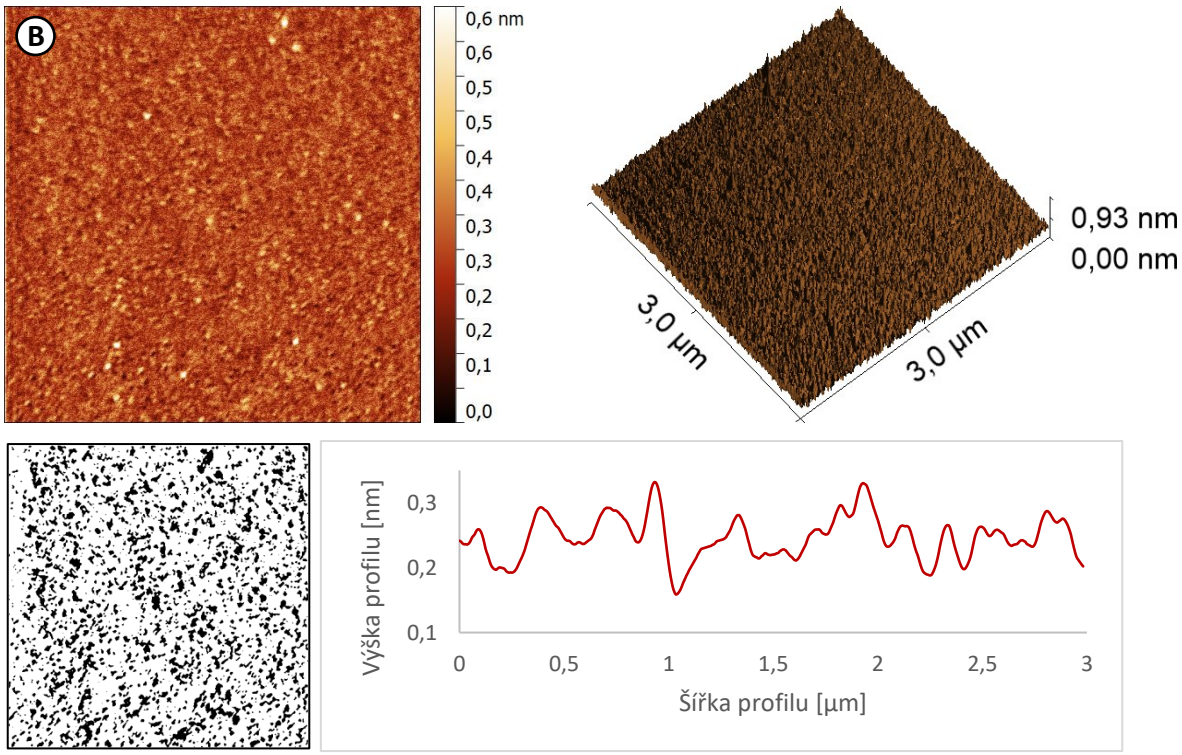


Celkové pokrytí: 39,2 % Ra = (53,3±1,2) pm Rz = (370±30) pm

*Obr. 23: **Vliv hmotnostního podílu HA** v pufrovaném roztoku na vzhled imobilizovaného polymeru na povrchu slídy. Výchozí roztok byl připravován na TFFC při **50/10 °C**. Koncentrace výchozích roztoků před ředěním a depozicí na povrch byly: **A)** 0,5 hm. %, **B)** 1 hm.%*

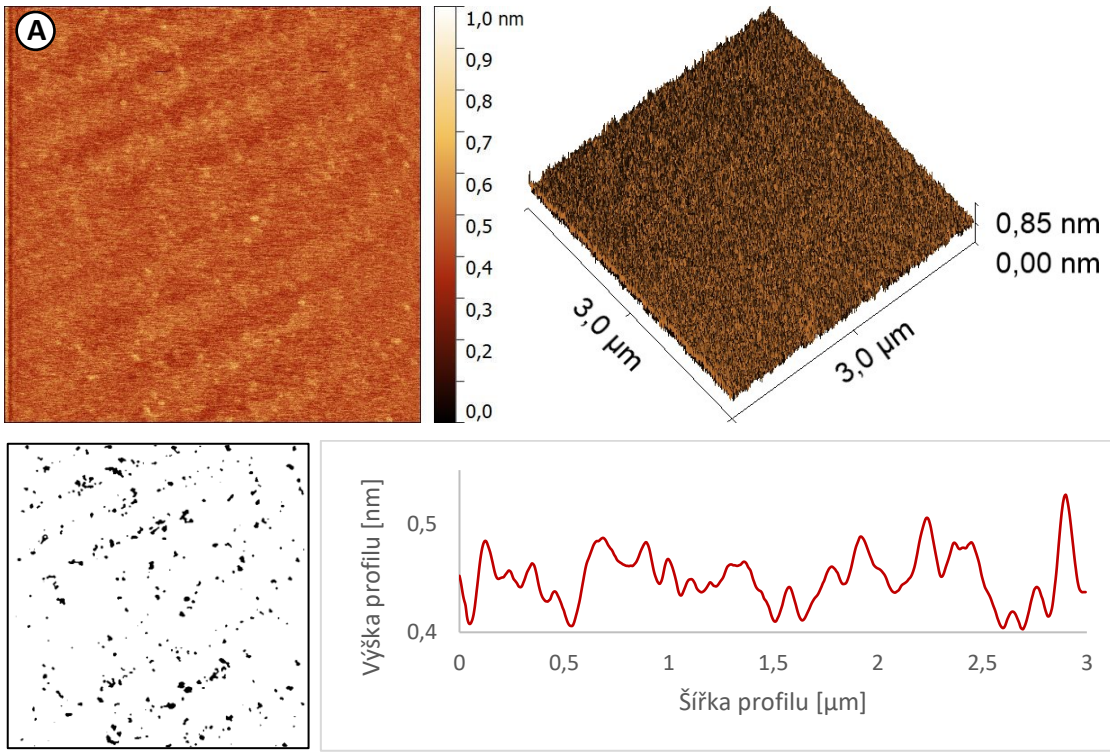


Pokrytí agregáty: 6,3 % Ra = (50±3) pm Rz = (430±70) pm

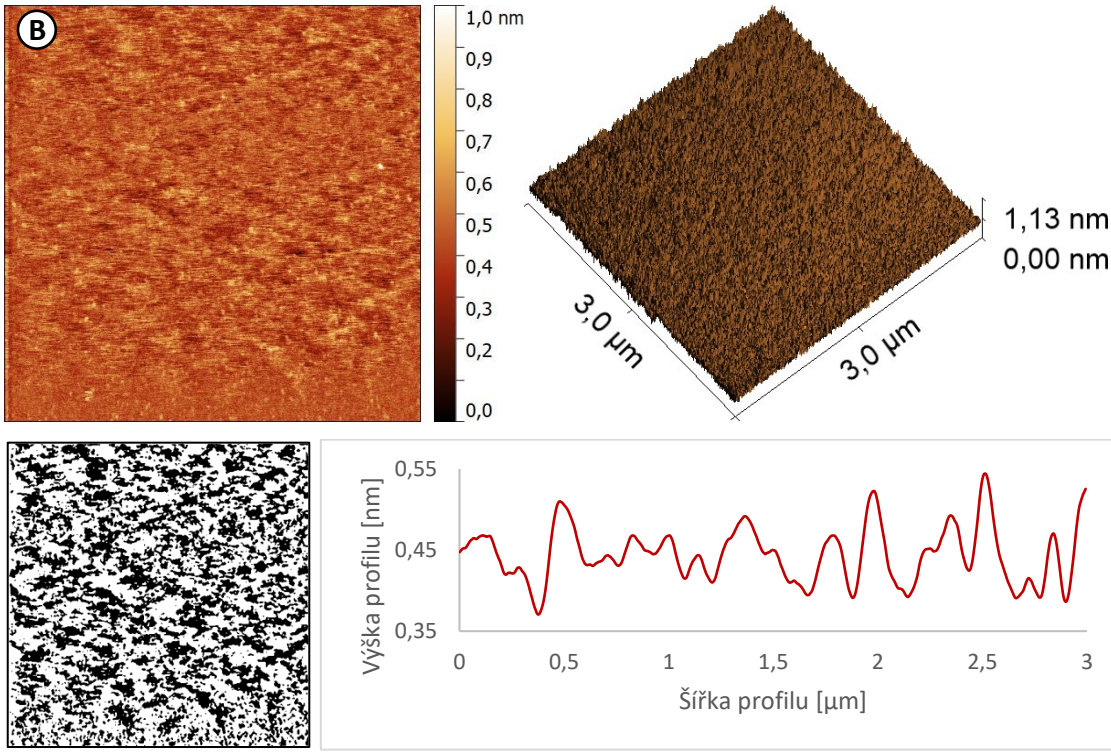


Celkové pokrytí: 20,6 % Ra = (38±2) pm Rz = (250±17) pm

*Obr. 24: **Vliv hmotnostního podílu HA** v pufrovaném roztoku na vzhled imobilizovaného polymeru na povrchu slídy. Výchozí roztok byl připravován na TFFC při **50/30 °C**. Koncentrace výchozích roztoků před ředěním a depozicí na povrch byly: **A)** 0,5 hm. %, **B)** 1 hm.%*

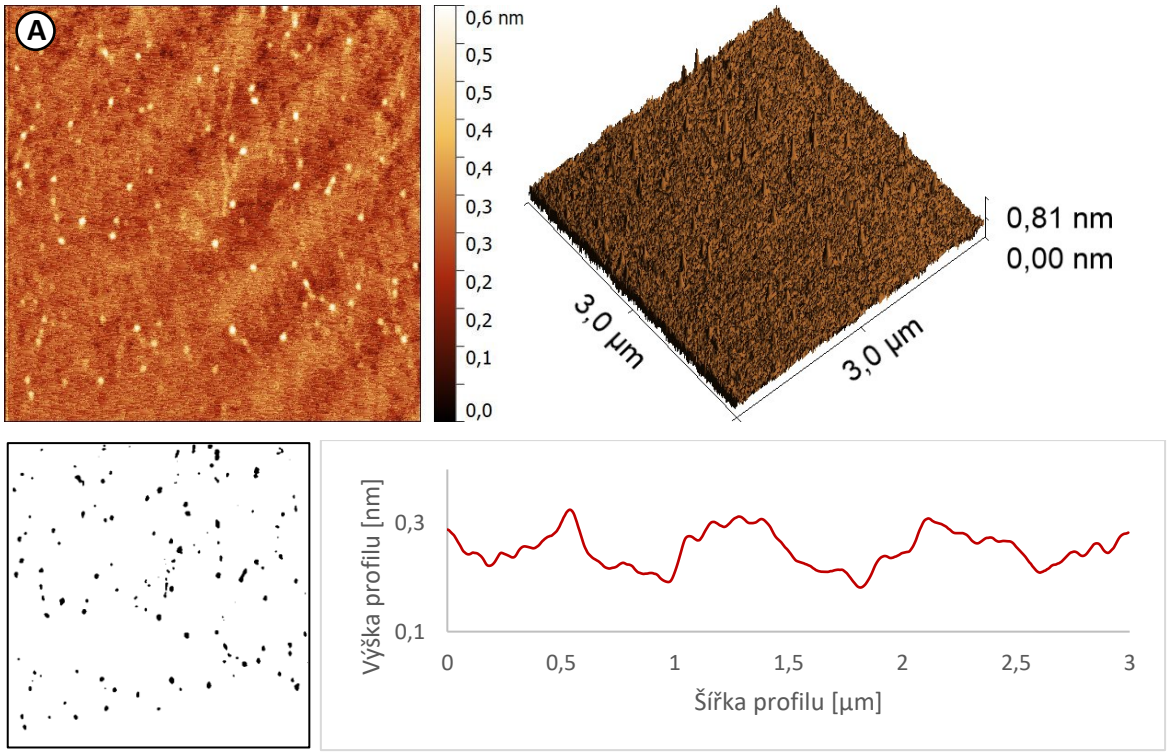


Pokrytí agregáty: 3,2 % Ra = (43,2±0,9) pm Rz = (331±16) pm

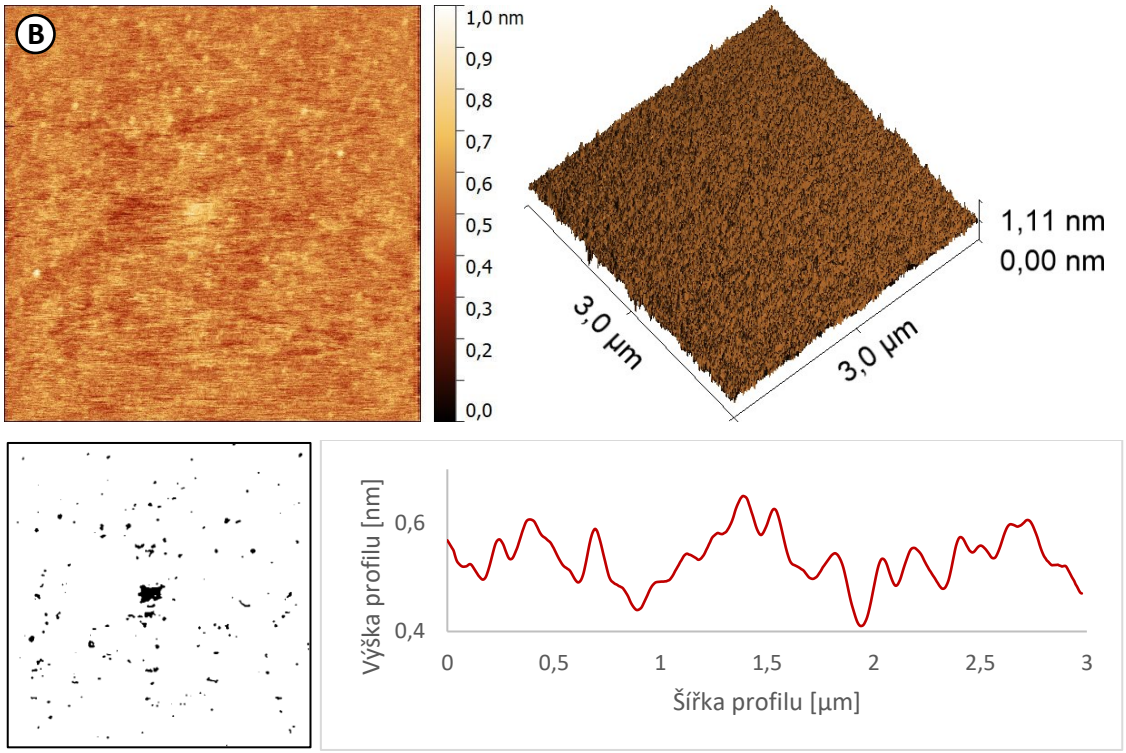


Celkové pokrytí: 41,2 % Ra = (45±4) pm Rz = (320±30) pm

Obr. 25: ***Vliv hmotnostního podílu HA*** *v pufrovaném roztoku na vzhled imobilizovaného polymeru na povrchu slídy. Výchozí roztok byl připravován na TFFC při* ***50/40 °C****. Koncentrace výchozích roztoků před ředěním a depozicí na povrch byly:* ***A)*** *0,5 hm. %,* ***B)*** *1 hm.%*



Pokrytí agregáty: 1,8 % Ra = (38,5±1,3) pm Rz = (282±13) pm



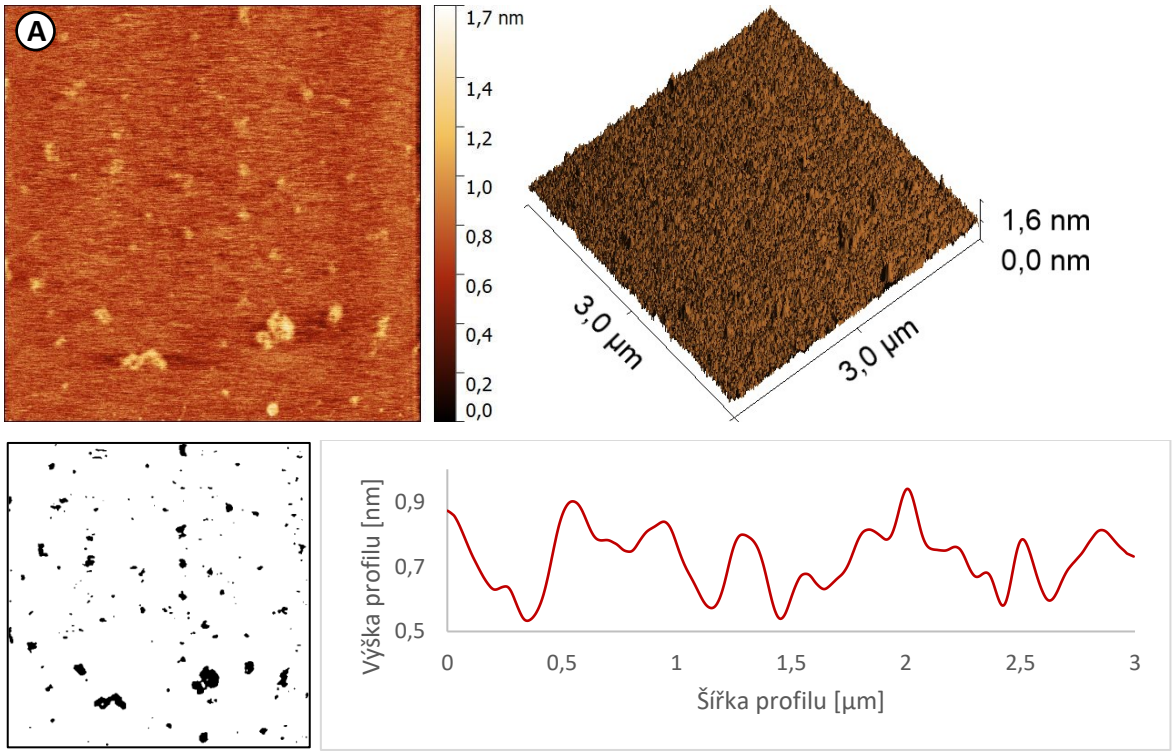
Pokrytí agregáty: 1,6 % Ra = (44,2±1,9) pm Rz = (295±19) pm

*Obr. 26:**Vliv teplotního spádu na roztok HA** v pufru na vzhled imobilizovaného polymeru na povrchu slídy. Výchozí roztok před ředěním **0,1 hm. %**. Teplotní spády na TFFC: **A)** 50/10 °C. %, **B)** 50/20 °C.*

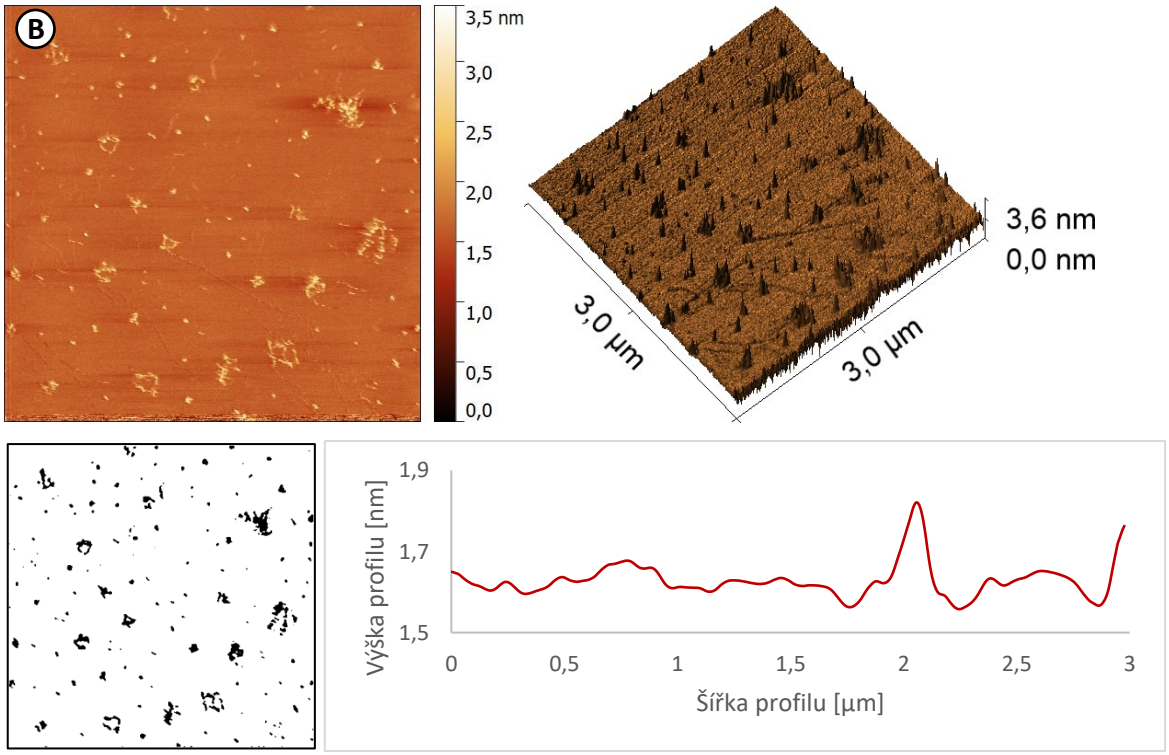
Na obr. 22-24 je srovnán vliv rozdílných hmotnostních podílů pro přípravu polymerních roztoků HA o dvou rozdílných teplotních spádech. Z těchto výsledků je opět patrný dominantní vliv hmotnostního podílu polymeru v roztoku na typ vznikajících agregovaných struktur na povrchu kladně nabité slídy. Vliv rozdílných teplotních spádu na změnu agregačních schopnosti HA na tuhém povrchu lze z těchto porovnání jen stěží jednoznačně určit. Vzniklé struktury HA z roztoků vystavených rozdílným teplotním podmínkám se liší především v případě roztoků s vyšším obsahem HA. U Roztoku s větší koncentrací lze pozorovat tvorbu mnohem větších struktur a větší míru pokrytí povrchu.

V případě roztoku připravovaného při větším teplotním spádu lze pozorovat mírně vyšší nárůst v počtu agregovaných struktur na úkor pokrytí povrchu HA, viz porovnání uvedené na obr. 25.

4.1.5 Vliv teploty zředění deponovaného roztoku v pufru na změnu vzhledu imobilizované vrstvy HA



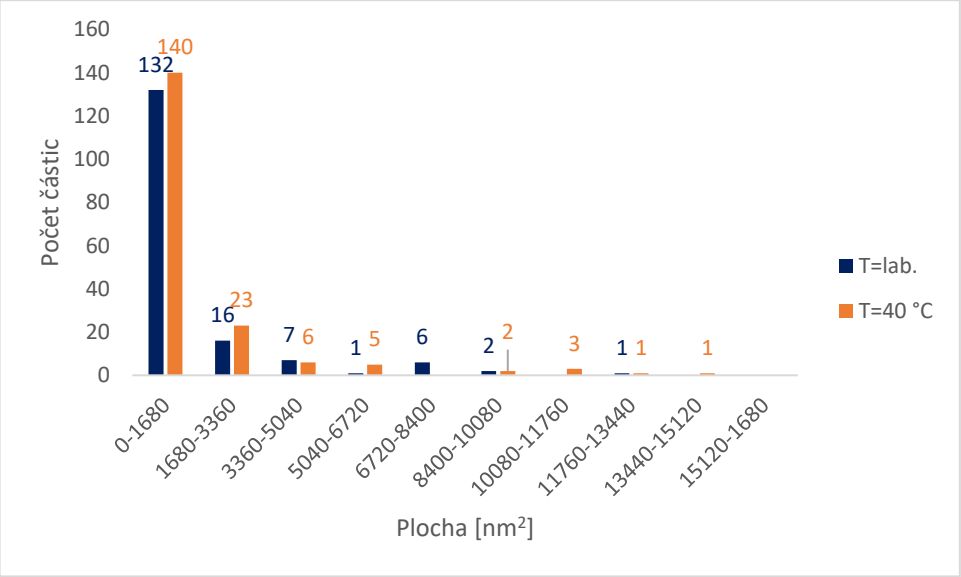
Pokrytí agregáty: 3,1 % Ra = (60,4±1,8) pm Rz = (438±16) pm



Pokrytí agregáty: 3,2 % Ra = (53±5) pm Rz = (708±48) pm *Obr. 27:* ***Vliv teploty ředění roztoku HA*** *na vzhled imobilizovaného polymeru na povrchu slídy. Výchozí* ***0,5 hm. %*** *roztok byl připravován v TFFC při* ***50/25 °C*** *a před nanesením na povrch byl zředěn na* ***0,01 hm. %*** *při teplotě:* ***A)*** *23 °C,* ***B)*** *40 °C.*

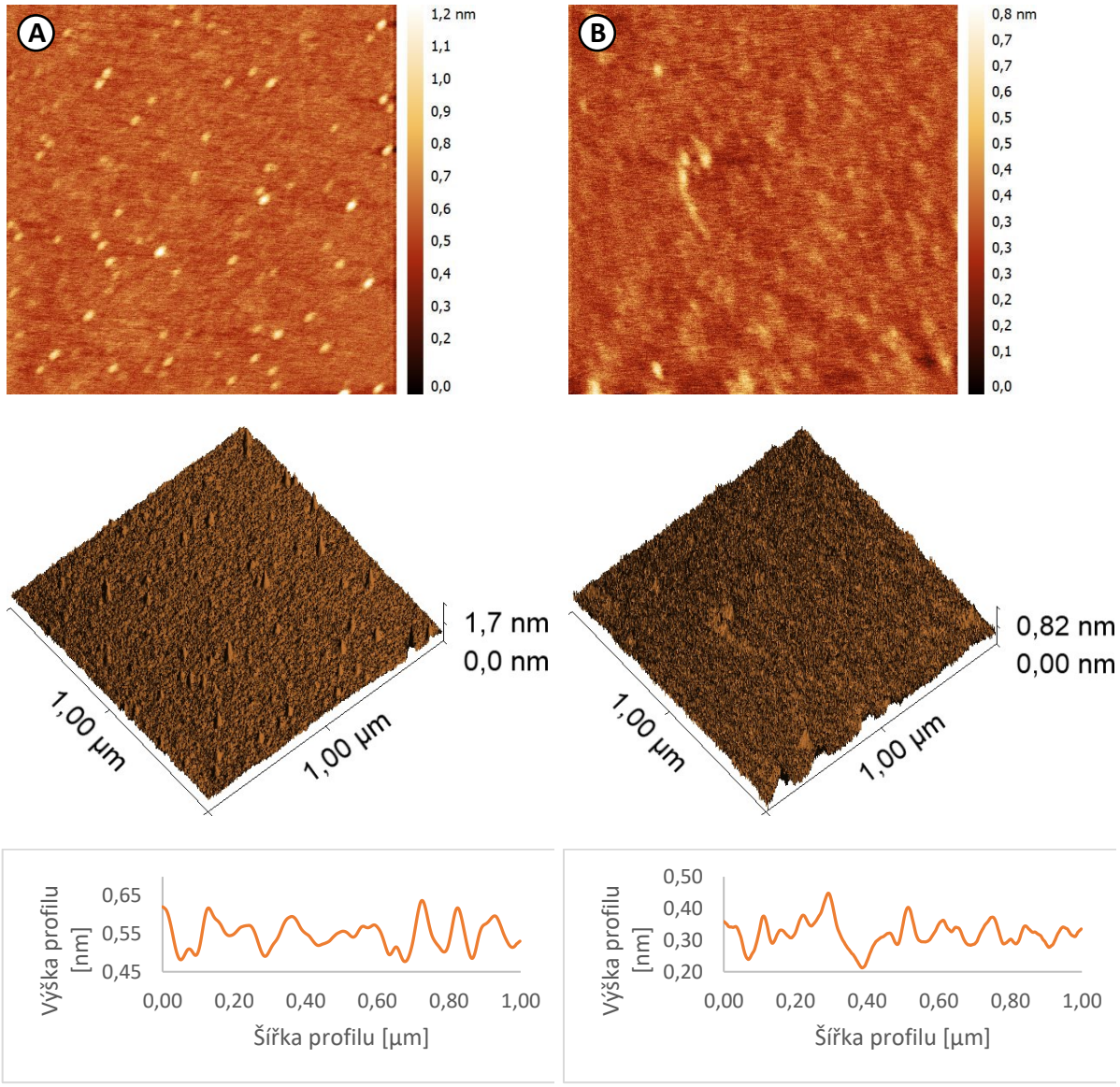
V tomto experimentu byl testován možný vliv teploty, při kterém probíhalo ředění výchozího roztoku před jeho depozicí na povrch slídy. V prvním případě (obr. 26A) probíhalo zředění roztoku při laboratorní teplotě, stejně jako v případě všechny ostatních experimentů prezentovaných v této práci. Snímek tohoto roztoku ukazuje formaci větších shluků polymeru s procentuálním pokrytím slídy 3,1 %. Vzniklé formace jsou nepravidelné tvarově i velikostně.

Pro ředění druhého vzorku byl výchozí roztok HA a pufr vytemperován na 40 °C. Roztok HA byl zředěn na požadovanou koncentraci a okamžitě deponovány na povrch slídy. Výsledky z takto provedeného ředění jsou uvedeny na obr. 26B. Na tomto snímku lze vidět izolované shluky řetězců HA. Co se týká průměrných velikostí těchto agregátů, tak v případě použití vyšší teploty ředění lze pozorovat mírný nárůst počtu agregovaných struktur HA, jak plyne z porovnání pruhovaných obrázků (obr. 26) a číselného rozdělení plošných průřezů uvedeného na obr. 27. Spolu s tím roste i výška pozorovaných agregátů na úkor pokrytí povrchu HA. Na základě těchto zjištění lze tedy říci, že jako lepší se jeví použití vyšší teploty pro ředění výchozích roztoků HA. Otázkou zůstává, jak tato vyšší teplota ovlivní výsledky, které mají vypovídat o vlivu tepelné historii přípravy výchozího polymerního roztoku.



Obr. 28: Rozdělení plošných průřezů agregovaných klubek HA ve výšce 0,8 nm až 1,2 nm nad povrchem slídy pro vzorky demonstrované na obr. 26

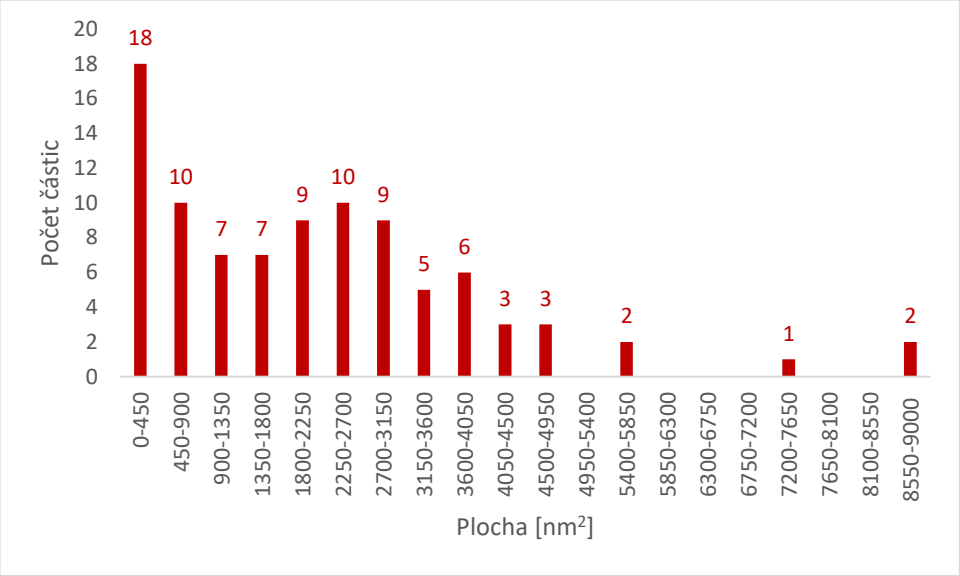
4.1.6 Vliv míry zředění výchozího roztoku na změnu vzhledu HA na povrchu slídy



Ra = (44±3) pm Rz = (310±30) pm Ra = (40,0±1,3) pm Rz = (260±14) pm

*Obr. 29: **Vliv ředění roztoku HA připraveného v pufru** na pozorované struktury imobilizované na povrchu slídy. Výchozí roztok 0,5 hm. % HA byl připravován v TFFC při teplotním spádu **50/30 °C**. Snímaná plocha byla **1 µm x 1 µm**. **A)** Roztok zředěn na **0,01 hm. % B)** Roztok zředěn na **0,001 hm. %.***

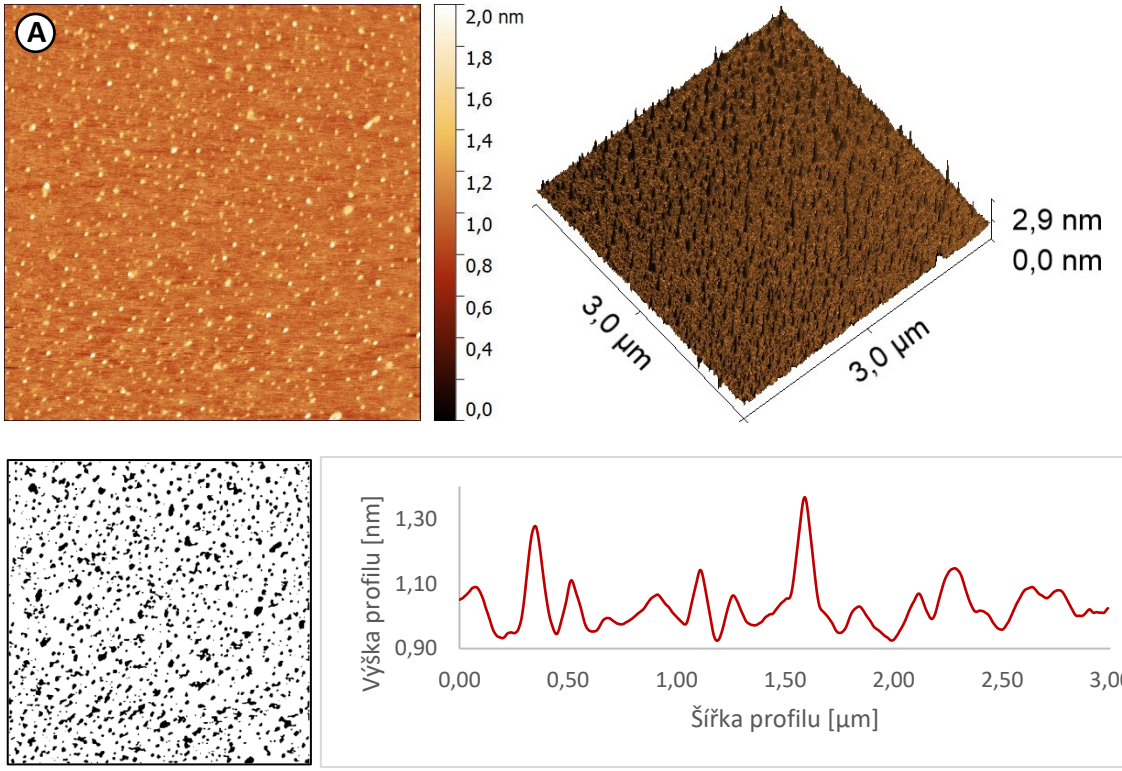
Obr. 28 demonstruje změny v podobě imobilizované HA pro dva rozdílné hmotnostní podíly polymeru v roztoku deponovaného na povrch slídy. Roztok o vyšším hmotnostním podílu má za následek vznik většího množství agregovaných struktur s výškou až 1,7 nm. Rozdělení velikostí plošných průřezů těmito strukturami je uvedeno na obr. 28. Při dalším desetinásobné zředění výchozího roztoku lze pozorovat menší množství agregovaných struktur nejen co do plochy tak do výšky (0,82 nm) na obr. 28B.



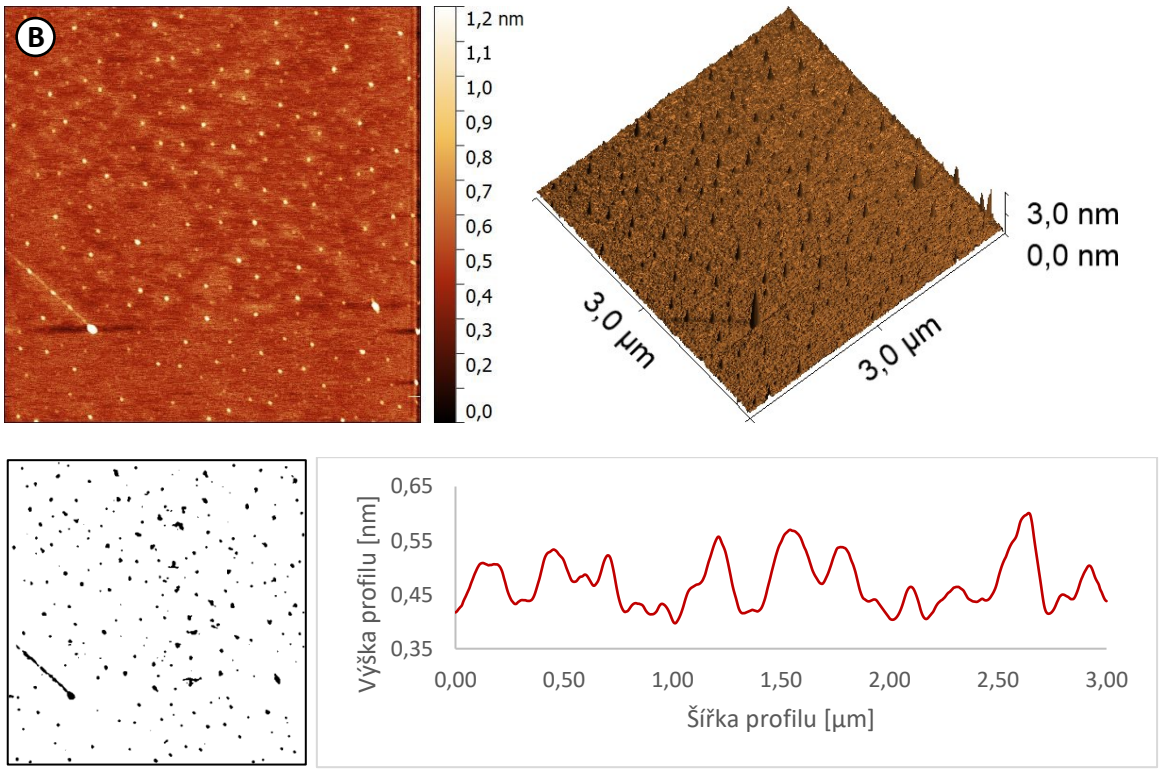
Obr. 30*:Rozdělení plošných průřezů agregovaných klubek HA ve výšce 0,7 nm nad povrchem slídy pro vzorky demonstrované na obr. 28A*

4.1.7 Vliv oplachování povrchu vzorků destilovanou vodou na změnu vzhledu zachycené HA na povrchu slídy

Pro přípravu vzorků pro charakterizaci pomocí AFM je nezbytné určit, zda a jakým způsobem se na povrchu slídy projevuje pufr používaný pro úpravu pH roztoku. Z tohoto důvodu byl proveden experiment spojený s depozicí HA z roztoku na povrch slídy následovaný oplachem pomocí destilované vody. Takto opláchnutý povrch byl následně osušen proudem suchého vzduchu. Výsledek z tohoto pokusu demonstruje obr. 30A a B. V případě opláchnutého vzorku lze na povrchu pozorovat velké množství malých agregátů. Zatímco v případě neoplachovaných povrchů pozorujeme menší množství agregátů na úkor větší pokrytí povrchů HA izolovanými řetězci. Stejný závěr plyne z rozdělní plošných průřezů agregovanými strukturami HA, viz obr. 31.

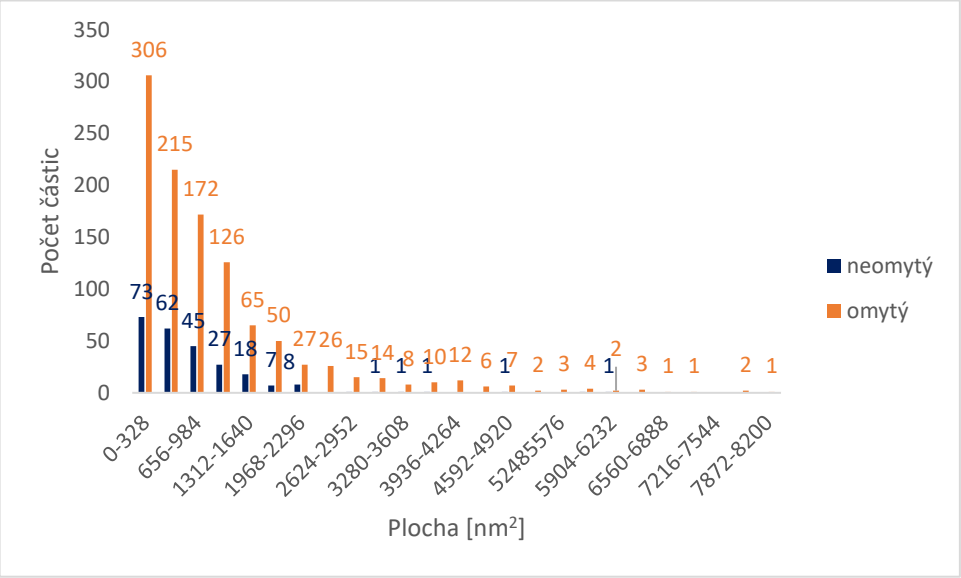


Pokrytí agregáty: 12,6 % Ra = (74±9) pm Rz = (700±90) pm



Pokrytí agregáty: 2,4 % Ra = (51±4) pm Rz = (390±40) pm

*Obr. 31: **Vliv omytí povrchu s imobilizovanou vrstvou HA nanesenou z pufrovaného roztok** na slídu. Výchozí roztok 0,5 hm. % HA byl připravován v TFFC při teplotním spádu **50/30 °C** a před deponováním byl zředěn na **0,001 hm. %**. **A)** Vzorek omytý destilovanou vodou **B)** Neomytý vzorek.*



Obr. 32:Rozdělení plošných průřezů agregovaných klubek HA ve výšce 0,8 nm až 1,1 nm nad povrchem slídy pro vzorky demonstrované na obr.30

4.2 Roztoky HA připravované ve vodě

4.2.1 Vliv hmotnostního podílu HA ve vodném roztoku

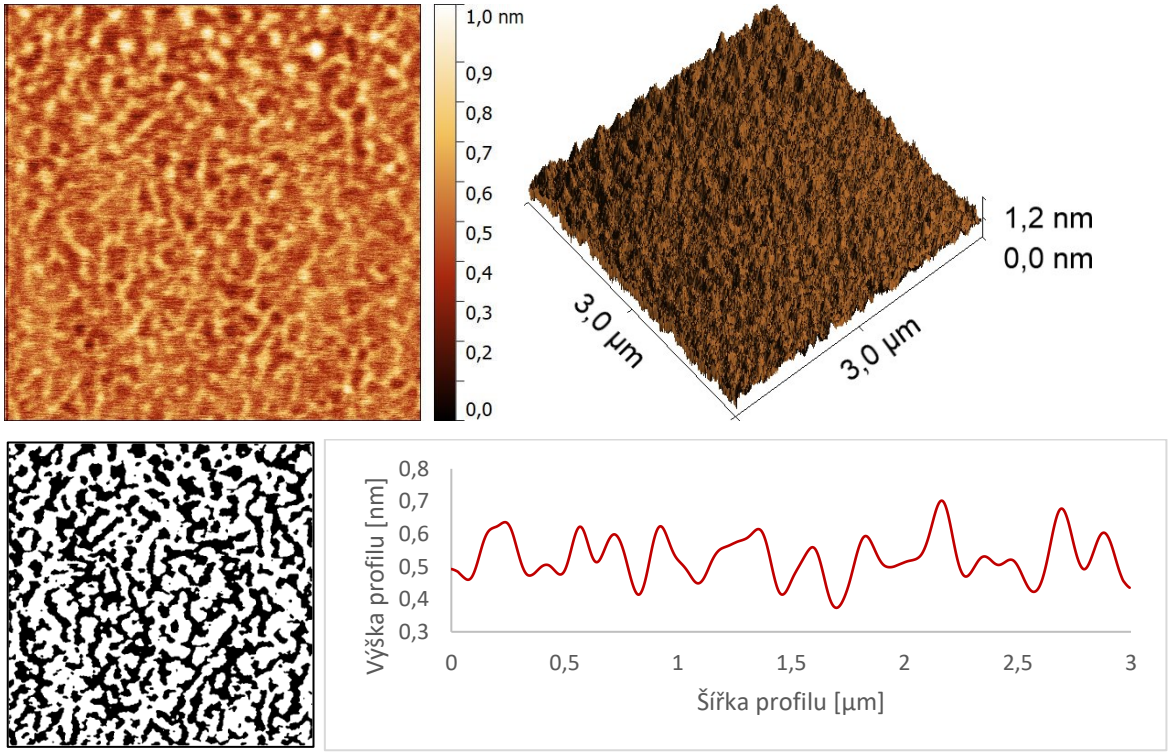
Roztoky HA ve vodě byly připravovány pro hmotnostní podíl 0,25 hm. %. Jedinou výjimkou, je roztok uvedený na obr. 33. Experimentálně zde byly zkoumány agregační schopnosti HA z výchozího 0,1 hm.% roztoku hyaluronanu zředěného na nízký hmotnostní podíl 0,005 hm.%. Výsledkem byla pravidelná síťová struktura s mírou pokrytí povrchu polymerem 41,5 %.

Vyhodnocení agregovaných struktur na povrchu slídy z vodných roztoků bez obsahu pufračního činidla probíhalo stejně jako v případě výše uvedených experimentálních výsledků pro pufrované roztoky. Byly analyzovány výškové změny povrchových agregátů HA a míra pokrytí povrchu agregáty. Ze studovaných proměnných byl vyhodnocován především vliv teploty a teplotního spádu na změnu organizace tohoto makromolekulárního systému.

Opět platí, že pokud není uvedeno jinak, jsou všechny roztoky pro depozici na povrch ředěny z 0,25 hm. % na 0,01 hm. % a skenovaná plocha pomocí AFM byla 3 x 3 µm.

Z porovnání agregovaných struktur deponovaných na povrch z pufrované (viz předcházející podkapitola) a vodné roztoky (tato podkapitola) plyne, že ve vodném prostředí HA tvoří daleko rozsáhlejší sítě a větší agregáty. Toto pozorování je v souladu

s literárními poznatky o chování HA v rozdílných disperzních prostředích. Jak bylo podrobněji popisování v teoretické části této práce.



Celkové pokrytí: 41,5 % Ra = (72±3) pm Rz = (460±10) pm

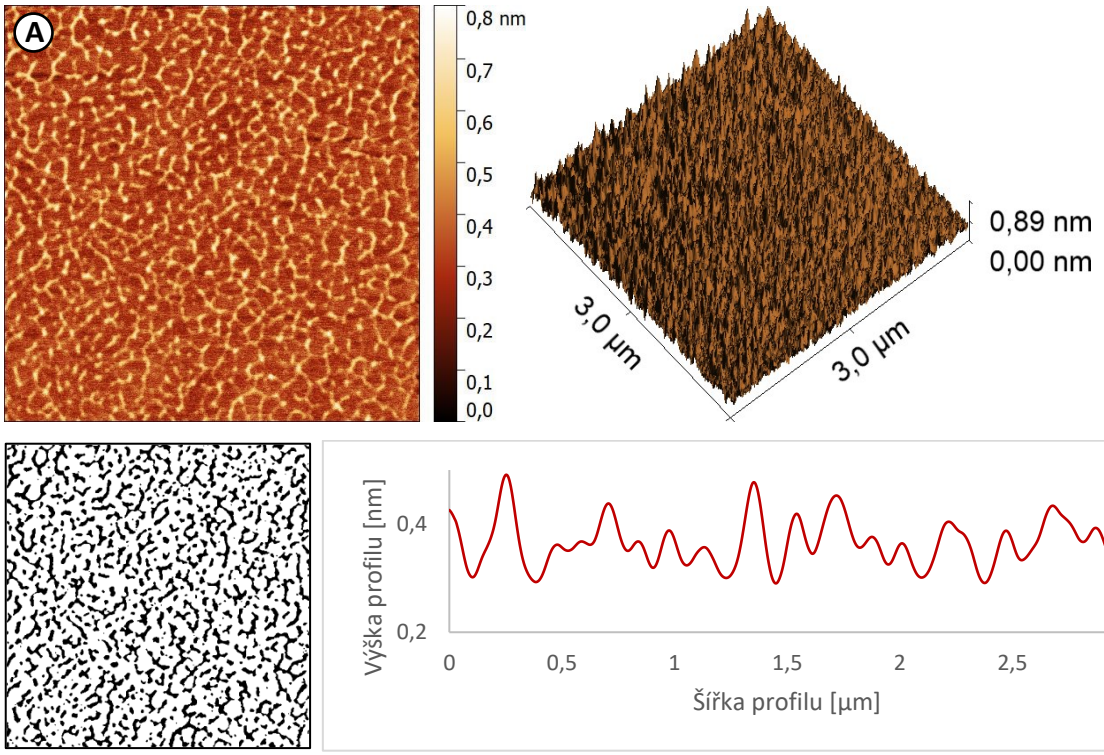
*Obr. 33: **Vliv hmotnostního podílu HA** ve vodném roztoku na vzhled imobilizovaného polymeru na povrchu slídy. Výchozí roztok obsahoval **0,1 hm. % HA**, byl připravován v TFFC při teplotním spádu **50/11 °C** a před nanesením na povrch slídy byl zředěn na **0,005 hm. %**.*

Stejně jako v případě pufrovaných roztok, tak i čistě ve vodných roztocích je typ vznikajících agregátů závislý na koncentraci polymeru ve výchozím roztoku a míře jeho zředění pro depozici na povrch slídy. Problematice vlivu hmotnostního podílu polymeru na typ vznikající agregované struktury na povrchu slídy byla věnována pozornost v bakalářské práci K. Kocourkové[54].

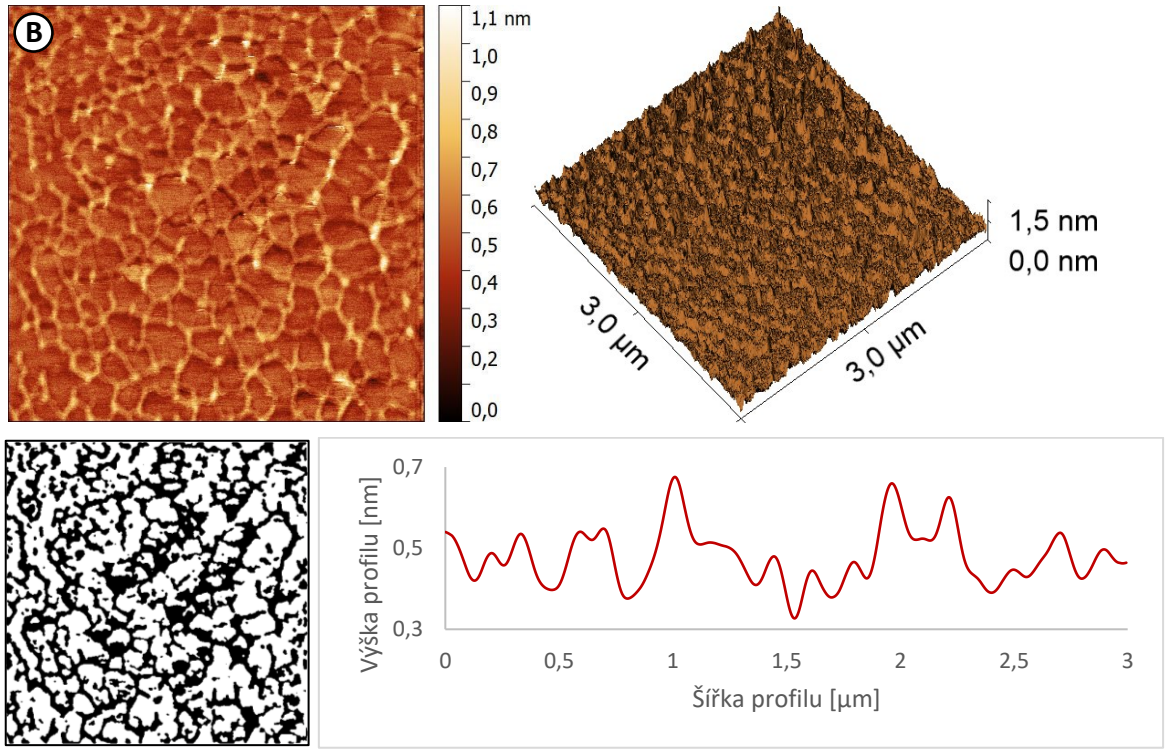
4.2.2 Vliv střední teploty na změnu agregovaných struktur na povrchu slídy deponovaných z vodných roztoků

Z porovnání uvedeného na obr. 33 plyne, že na typ agregované struktury HA na povrchu slídy má zásadní vliv střední teplota, při níž je daný polymer rozpouštěn. Pro účely zde prezentovaných porovnání byly polymerní roztoky připravovány v TFFC zařízení při dvou rozdílných teplotách. Teplota jak topné, tak chladící plochy byla nastavena na shodnou hodnotu. To znamená, že rozpouštěné roztoky nebyly vystaveny účinkům teplotních spádů. V roztocích neprobíhalo žádné organizované proudění kapaliny. Roztoky nebyly smykově namáhány. Z porovnání uvedeného na obr. 33 plyne, že zvýšení teploty o 6 °C při

rozpouštění HA ve vodném roztoku má za následek vznik zcela odlišných síťových struktur. Z roztoků připravených při vyšší střední teplotě vzniká výraznější síť s vyššími rozhraními, tvořenými agregovanými řetězci HA.



Celkové pokrytí: 25,0 % Ra = (70±3) pm Rz = (150±30) pm



Celkové pokrytí: 39,5 % Ra = (59±6) pm Rz = (430±40) pm

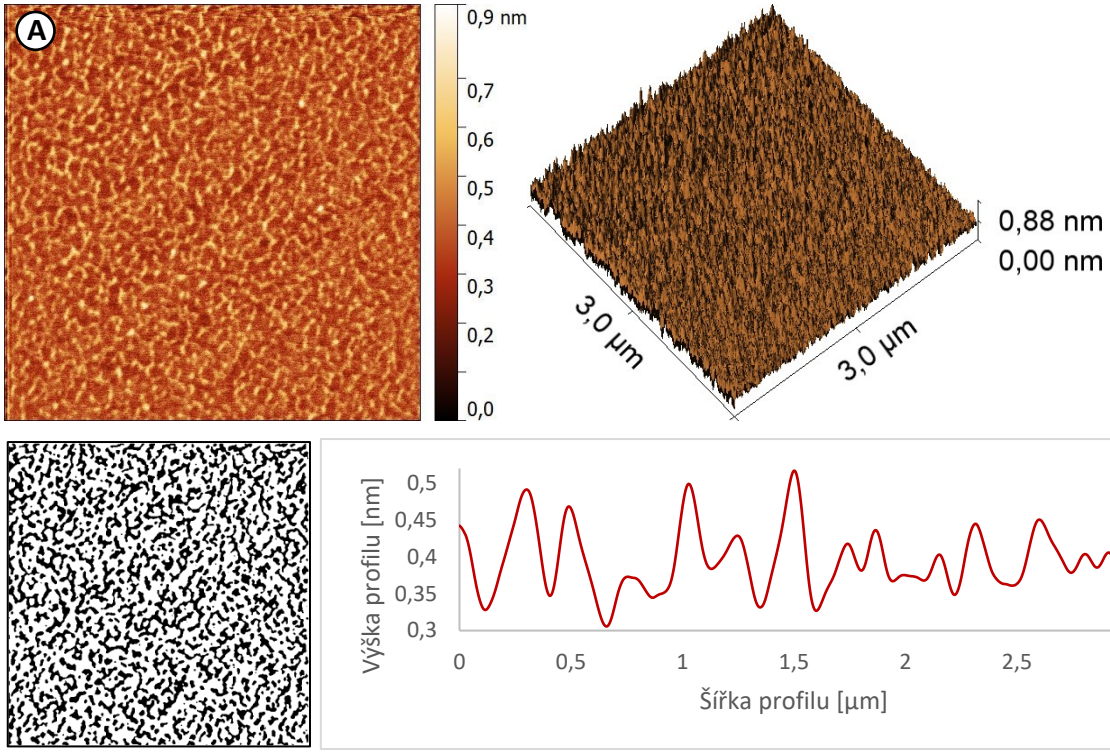
Obr. 34: ***Vliv střední teploty přípravy vodného roztoku HA*** *na vzhled imobilizovaného polymeru na povrchu slídy. Výchozí roztok připravován na TFFC při:* ***A)*** *40/40 °C,* ***B)*** *46/46 °C.*

4.2.3 Vliv teplotního spádu na změnu agregačních schopností HA připraveného ve vodě

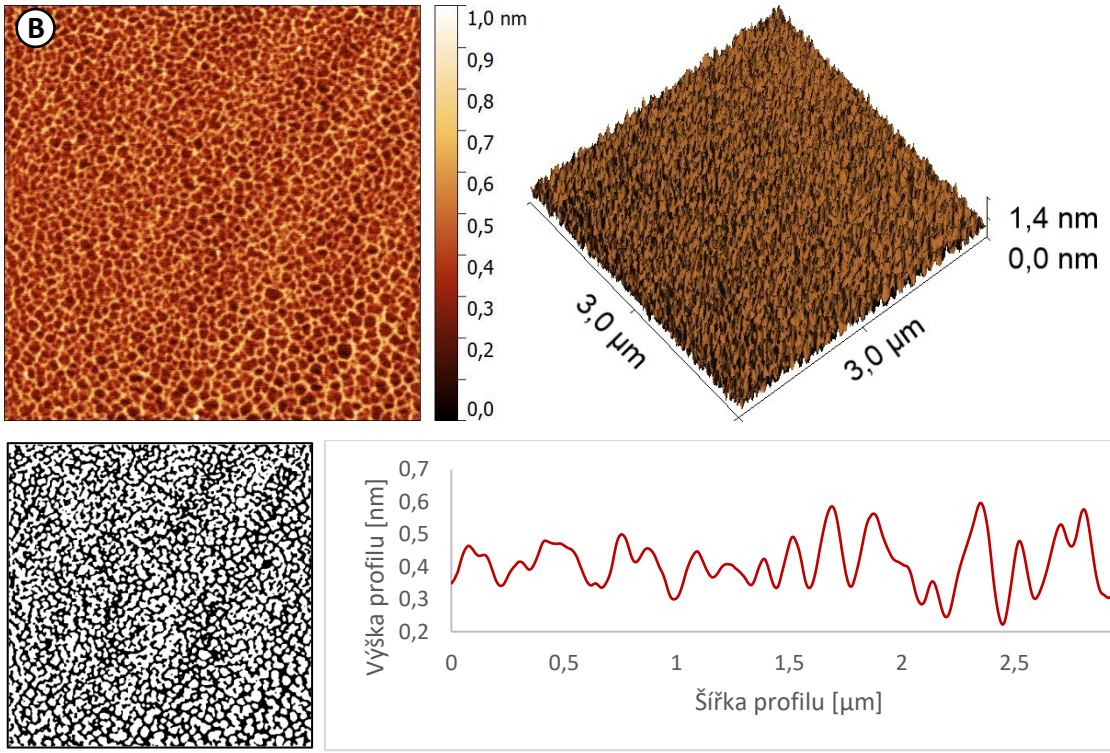
Předmětem této kapitoly je vliv teplotního spádu při rozpouštění HA ve vodném roztoku na následné agregační a síťotvorné schopnosti tohoto polymeru na povrchu kladně nabité slídy.

Výsledky z těchto experimentů jsou prezentovány na obr. 34 a 35. S klesající velikostí teplotního spádu generovaného pomocí TFFC zařízení v průběhu rozpouštění HA narůstá výška agregovaných struktur na povrchu tuhého substrátu. Mění se hustota sítě. Tato změna je částečně zapříčiněna nárůstem střední teploty v systému s klesající velikostí teplotního spádu.

Z porovnání síťových strukturu na obr. 34 a 35 s sítěmi na obr. 33, které vznikají při konstantní teplotě je pozorovatelný rozdíl. To znamená, že při rozpouštění polymerního systému se projevuje další faktor. Tím je teplotní spád, jenž je odpovědných za vznik organizovaných proudění kapaliny v průběhu rozpouštění HA. Toto proudění má za následek smykové namáhání polymerního systému, což se v konečném důsledku projevuje rozdílnými agregačními schopnosti HA na tuhém povrchu. Toto pozorování opět koreluje s literárními poznatky o vlivu smykového namáhání na řetězce HA, jak je podrobněji rozvedeno v teoretické části práce.

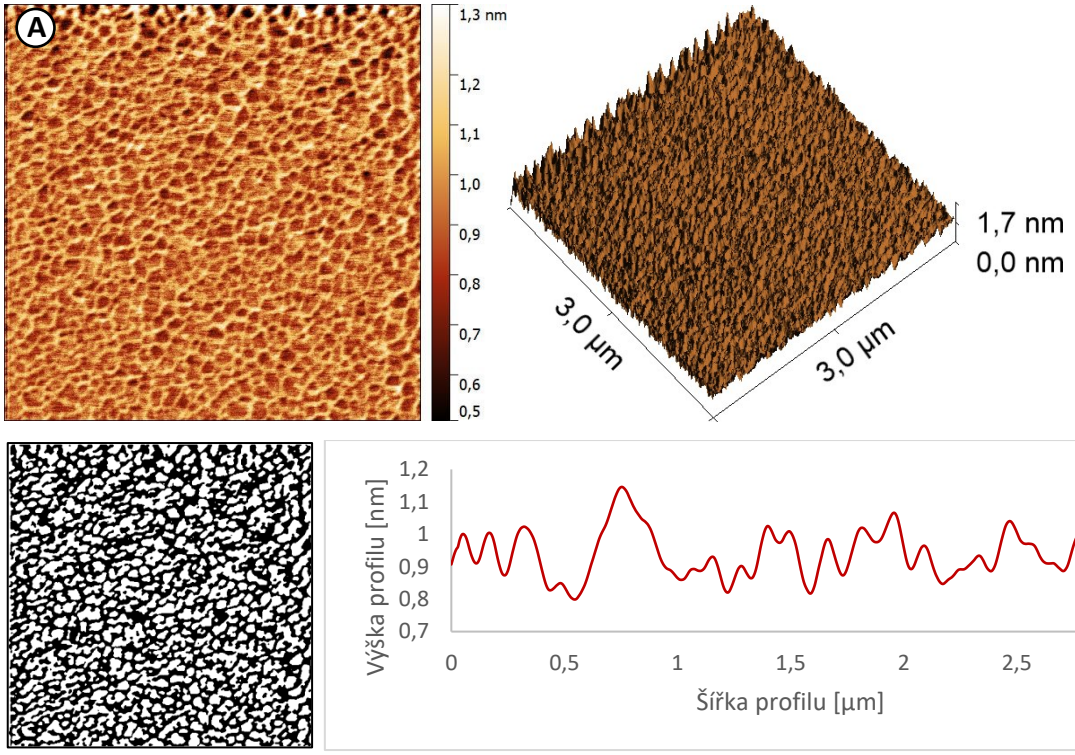


Celkové pokrytí: 34,8 % Ra = (61±3) pm Rz = (410±30) pm

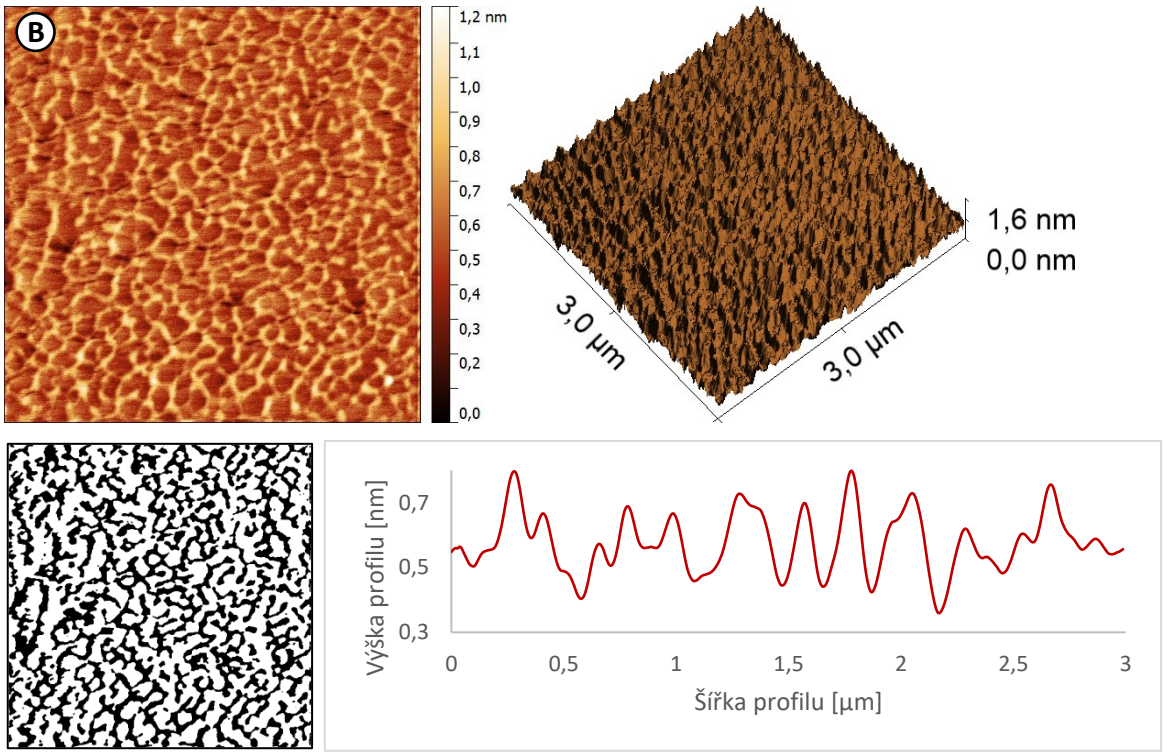


Celkové pokrytí: 43,3 % Ra = (101±4) pm Rz = (587±14) pm

*Obr. 35:**Vliv teplotního spádu HA** ve vodném roztoku na změnu agregačních schopností imobilizovaného polymeru na povrchu slídy. Výchozí roztok připravován na TFFC při teplotním spádu: **A)** 50/10 °C, **B)** 50/20 °C.*



Celkové pokrytí: 50,7 % Ra = (81±8) pm Rz = (560±70) pm



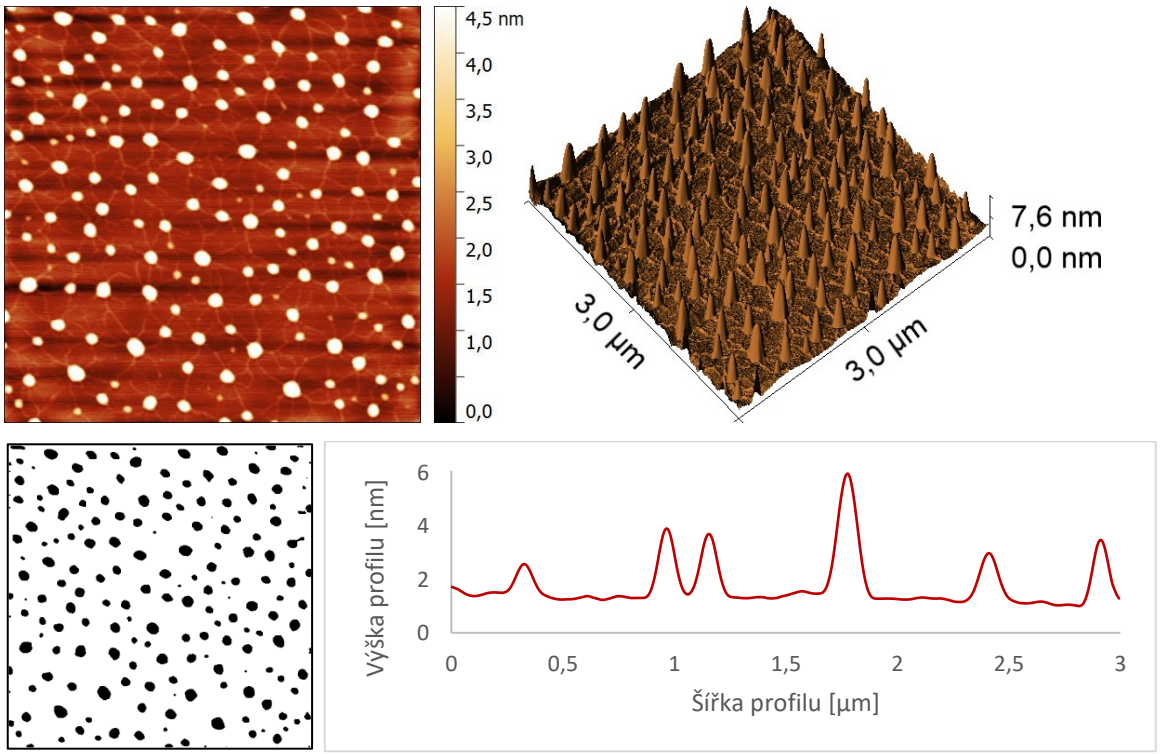
Celkové pokrytí: 38,2 % Ra = (87±6) pm Rz = (520±30) pm

*Obr. 36: **Vliv teplotního spádu na HA** ve vodném roztoku na změnu agregačních schopností imobilizovaného polymeru na povrchu slídy. Roztoky připravovány na TFFC při teplotním spádu: A) **50/35 °C** a B) **50/45 °C**.*

4.2.4 HA imobilizovaný na povrchu slídy z třepaných roztoků připraveného při 23 °C

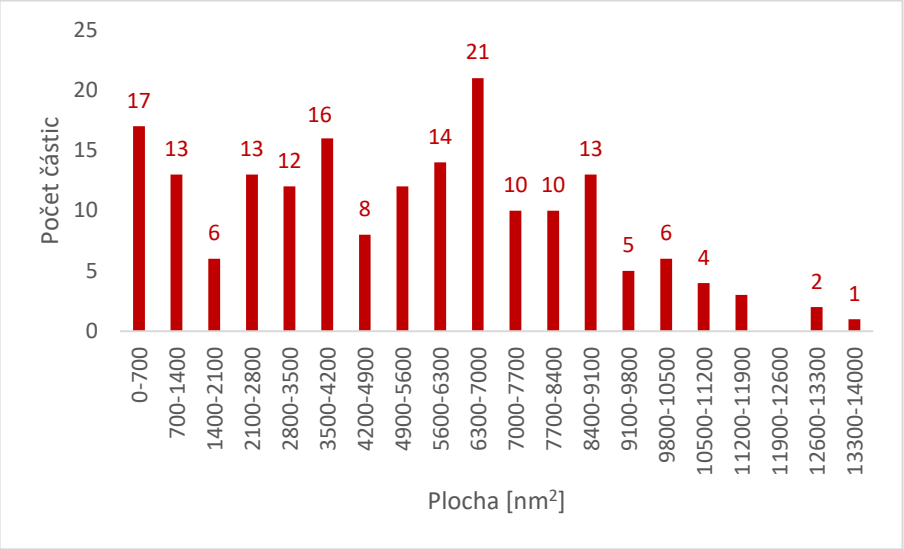
Struktura uvedené na obr. 36 je charakteristická pro HA deponovaný z roztoku připravovaného při laboratorní teplotě (23 °C) třepáním. HA z takto připraveného roztoku se na povrchu kladně nabité slídy organizuje do podoby agregátů propojených izolovanými shluky makromolekulárních řetězců. V pozadí agregátů lze pozorovat jemnou polymerní síť. Polymerní klubka zaujímají 10,8 % povrchu slídy a dosahují výšky 7,6 nm. Na obr. 36 jsou shrnuty výsledky z obrazované analýzy povrchu uvedeného na obr. 37. Je zde znázorněno rozdělení velikostí plošných průřezů agregáty HA. Z tohoto obrázku rozdělení je patrné, že vznikají jak malé, tak větší struktury a jejich počet je podobný.

Z porovnání zde prezentovaných výsledků s daty pro vzorky připravené při vyšší střední teplotě a teplotním spádu je patrný dominantní vliv teploty a smykového namáhání na agregační schopnosti HA v roztoku a na fázových rozhraních kapalina/pevná látka.



Pokrytí agregáty: 10,8 % Ra = (460±30) pm Rz = (3,4±0,4) nm

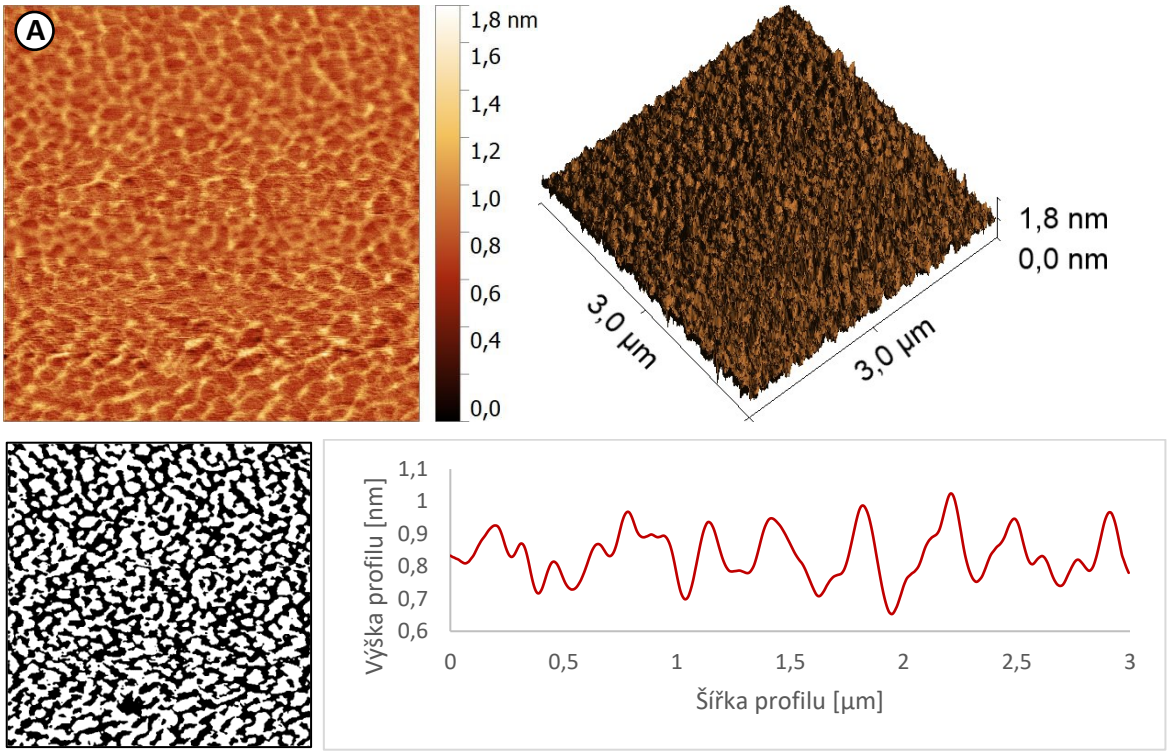
*Obr. 37: Agregované struktury HA na povrchu slídy vznikající z vodných roztoků připravených **třepání při 23°C**.*



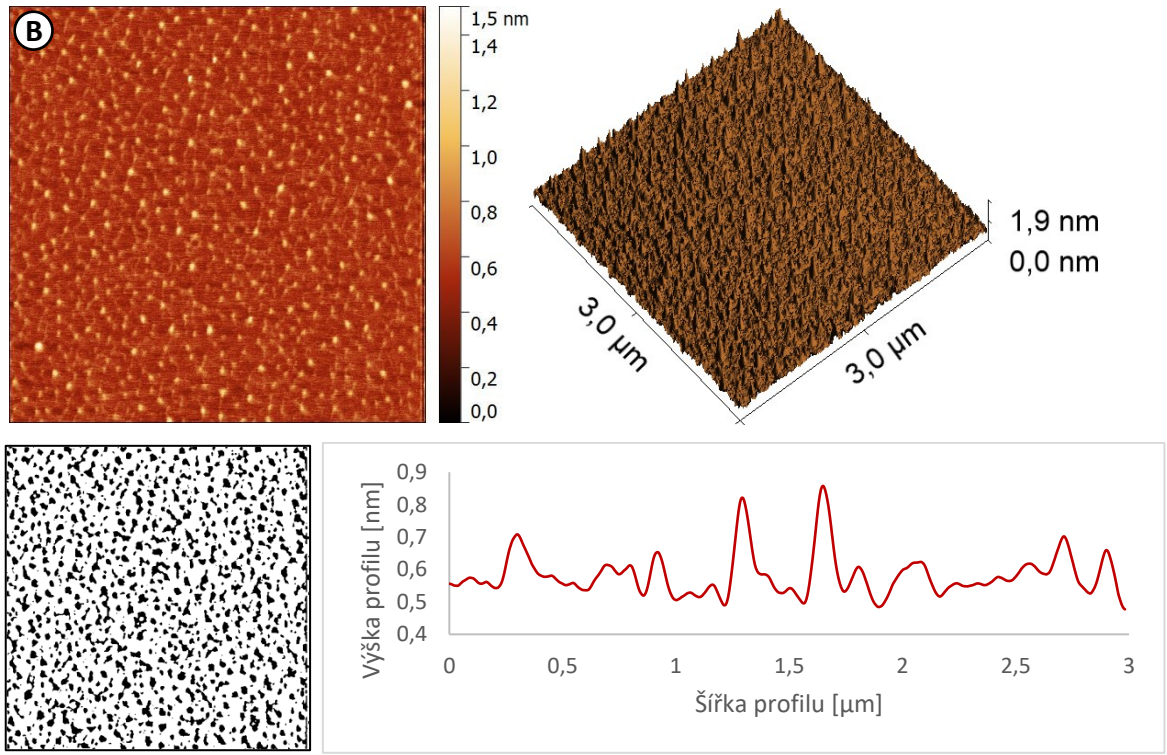
Obr. 38:Rozdělení plošných průřezů agregovaných klubek HA ve výšce 1-2 nm nad povrchem slídy pro vzorky demonstrované na obr. 36.

4.2.5 Následnost kroků přípravy vodných roztoků HA

Předchozí kapitola sledovala strukturu HA vzniklou z třepaných roztoků. Tato kapitola se zaměří na vliv dodatečného rozpouštění třepaného roztoku při 23 °C v TFFC zařízení při 50/10 °C. Tento pokus bude srovnán s přímým rozpouštěním roztoku v TFFC zařízení. To znamená, že v prvním případě probíhalo rozpouštění třepáním 24 hod. při 23 °C a následně byl roztok umístěn na 24 hod. do TFFC s nastavenou teplotou 50/10 °C. V druhém případě probíhalo přímé rozpouštění v TFFC zařízení po dobu 24 hod s nastavenou teplotu 50/10 °C. Výsledky z tohoto experimentů jsou srovnány na obr. 38. HA rozpouštěný pomocí dvou následných kroků svým vzhledem připomíná struktury vznikající při vyšší střední teplotě s menším teplotním spádem, viz obr. 35B. Zatímco výsledky pro přímé rozpouštění odpovídají datům prezentovaným na obr. 34A. Z tohoto srovnání plyne, že je spolu s teplotou je nezbytné kontrolovat celkovou dobu rozpouštění HA v daném disperzním prostředí.



Celkové pokrytí: 45,8 % Ra = (82±4) pm Rz = (550±30) nm

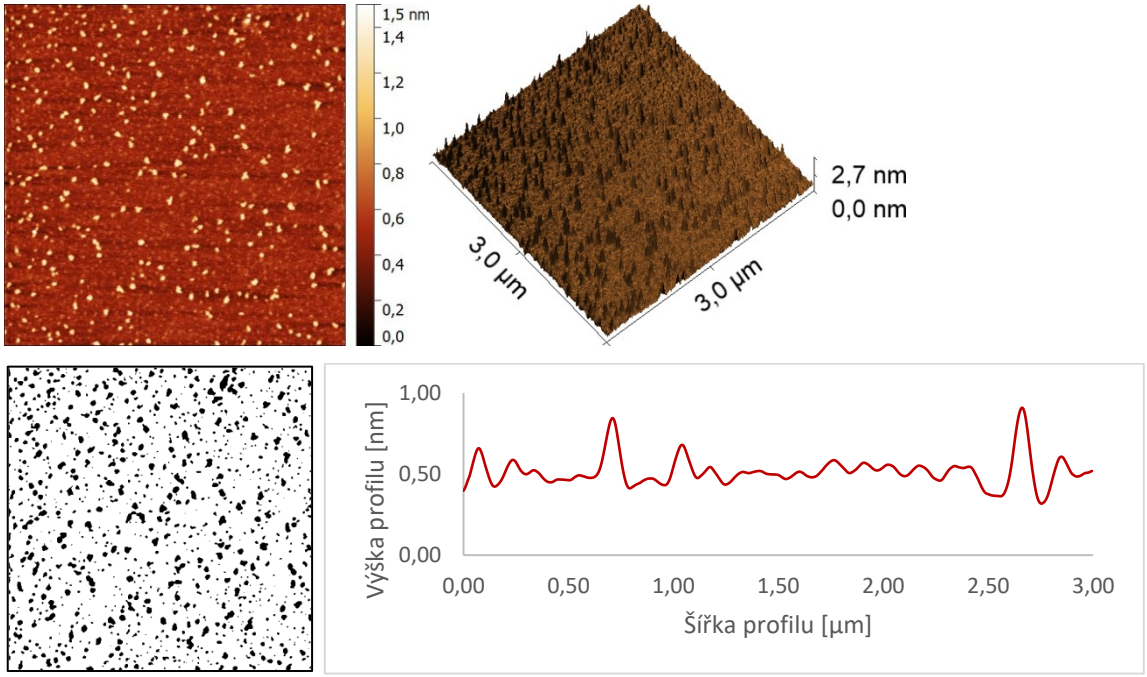


Celkové pokrytí: 22,5 % Ra = (70±3) pm Rz = (590±40) nm

*Obr. 39: **Vliv následných kroků rozpouštění HA** ve vodném roztoku na změnu agregačních schopností HA povrchu slídy. **A)** Roztok byl před úpravou v TFFC (50/10 °C, 24 hod.) rozpouštěn na třepacím zařízení (23 °C, 24 hod.). **B)** Roztok rozpouštěný v TFFC (50/10 °C, 24 hod.)..*

4.3 HA deponovaný z rozpuštěných polymerních filmů

V rámci poslední části výsledků bude diskutován vliv specifické přípravy polymerního roztoku prostřednictvím solidifikace výchozího roztoku do podoby filmu s následným převedením do roztoku. To znamená, že v prvním kroku byl připravené roztok HA, který byl sušením převeden do podoby filmu. Následně byl vzniklý film převeden nazpět do roztoku. Z takto připravených roztoků vznikají diametrálně rozdílné agregované struktury na povrchu kladně nabité slídy v porovnání s přímými přístupy rozpouštění HA, viz porovnání obr. 39 a 40 s výsledky v předešlých podkapitolách. Charakteristické agregované struktury uvedené na obr. 39 byly připraveny z roztoků filmů solidifikovaných při 25 °C. Pozn.: Pro přípravu filmů byl použit roztok rozpouštěný při 23 °C třepáním. Film byl převeden do roztoku opětovným rozpuštění ve vodě při 25 °C. To znamená, že daný polymerní systém nebyl vystaven žádné zvýšené teplotě během svého rozpouštění, sušení a opětovného rozpouštění. Přesto lze pozorovat výrazné změny v typu vznikající povrchových agregátů. Tyto agregáty jsou malé bez zjevného propojení izolovanými řetězci HA.

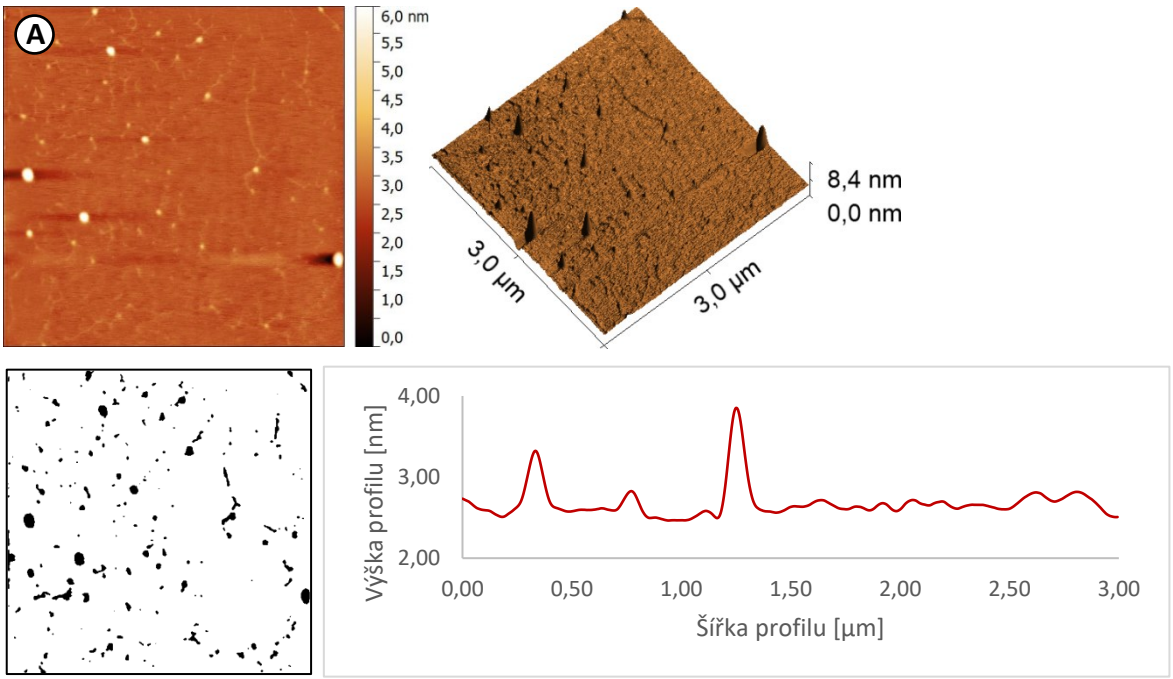


Pokrytí agregáty: 11,3 % Ra = (73±5) pm Rz = (620±50) pm

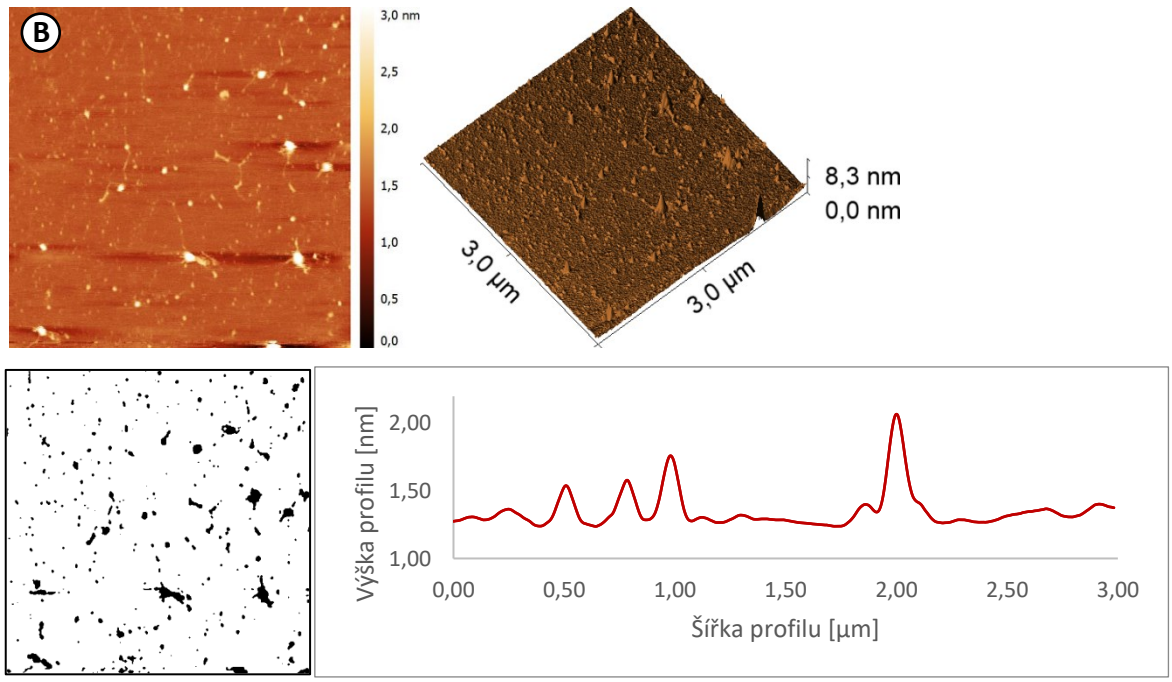
*Obr. 40: Agregované struktury HA vznikají z roztoků připravených rozpouštění filmů HA. Hmotnostní podíl HA ve vodě pro přípravu roztoku byl **0,15 hm. %.** Film byl solidifikován při teplotě **25 °C**. Roztoky deponované na povrch slídy obsahovaly **0,01 hm.% HA**.*

Odlišná situace nastává, když je polymerní roztok během své solidifikace vystaven účinkům teplotního spádu, viz obr. 40. V takovémto případě na povrchu nelze pozorovat

významné síťové struktury na bázi HA. Povrch je pokrytý izolovanými řetězci HA a malým množstvím drobných agregátů. Z těchto srovnání opět plyne dominantní vliv tepelné historie přípravy polymerních roztoků na agregační a síťotvorné schopnosti HA na povrchu kladně nabité slídy.



Pokrytí agregáty: 4,2 % Ra = (120±41) pm Rz = (1,2±0,7) nm



Pokrytí agregáty: 4,3 % Ra = (59±6) pm Rz = (610±80) pm

*Obr. 41: Agregované struktury HA vznikají z roztoků připravených rozpouštění filmů HA. Hmotnostní podíl HA ve vodě pro přípravu roztoku byl **0,15 hm. %.** Roztoky a filmy HA připravovány v **TFFC** při teplotě **50/30 °C**. Roztoky deponované na povrch slídy obsahoval **0,01 hm.%.** A) **Vodný roztok** – film – vodný roztok. B) **Pufrovaný roztok** – film – vodný roztok.*

ZÁVĚR

Byly studovány agregační schopnosti hyaluronanu na povrchu kladně nabité slídy v závislosti na složení disperzního prostředí a procesních podmínkách přípravy polymerního roztoku. Imobilizované řetězce, klubka a síťové struktury byly charakterizovaný pomocí mikroskopie atomárních sil.

Z experimentálních výsledků vyplynul dominantní vliv teploty a teplotního spádu na agregační schopnosti HA na povrchu tuhého substrátu. Z roztoků připravených při vyšší střední teplotě za současného působení teplotního spádu vznikají charakteristické síťové struktury. Zatímco v případě systémů rozpouštěných při nízké střední teplotě bez působení teplotního spádu lze na povrchu slídy pozorovat objemné agregované shluky propojené pomocí izolovaných řetězců.

Při použití disperzního prostředí na bázi pufru pro přípravu roztoků HA nelze na povrchu slídy pozorovat vznik výrazných síťových struktur jako v případě použití čisté vody. V takovémto případě je povrch buďto celý krytý polymerem nebo izolovanými řetězci HA a jejich shluky. Přes tyto odlišnosti lze i v tomto případě sledovat vliv procesních podmínek přípravy polymerních roztoků na změny agregačních schopností HA na povrchu zvoleného substrátu.

Neméně zajímavé výsledky plynou z experimentů věnovaných přípravě polymerních roztoků přes solidifikovaný film. V případě depozice HA ze systému roztok-film-roztok lze na povrchu slídy pozorovat buďto malé agregáty nebo izolované řetězce HA. Stejně jako v případě vrstev deponovaných přímo z primárního roztoku je typ vznikajících struktur podmiňován především tepelnou historií přípravy polymerního roztoku.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Vercruysse KP. Hyaluronan: A simple molecule with complex character. *RSC Polym Chem Ser*. 2011:261-291. doi:10.1039/9781849733519-00261
2. Bjerg M, Roubroeks JP, Qun L, et al. Thermal degradation and stability of sodium hyaluronate in solid state. *Carbohydr Polym*. 2014;107:25-30. doi:10.1016/j.carbpol.2014.02.005
3. Wolf KJ, Kumar S. Hyaluronic Acid: Incorporating the Bio into the Material. *ACS Biomater Sci Eng*. 2019;5(8):3753-3765. doi:10.1021/acsbiomaterials.8b01268
4. Kim H, Shin M, Han S, Kwon W, Hahn SK. Hyaluronic Acid Derivatives for Translational Medicines. *Biomacromolecules*. 2019;20:2889-2903. doi:10.1021/acs.biomac.9b00564
5. Shi W, Hass B, Kuss MA, et al. Fabrication of versatile dynamic hyaluronic acid-based hydrogels. *Carbohydr Polym*. 2020;233:115803. doi:10.1016/j.carbpol.2019.115803
6. La Gatta A, Schiraldi C, Zaccaria G, Cassuto D. Hyaluronan Dermal Fillers : Efforts Towards a Wider Biophysical Characterization and the Correlation of the Biophysical Parameters to the Clinical Outcome. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2020;13:87-97.
7. Zeid Daou CA, Bassim M. Hyaluronic acid in otology : Its uses , advantages and drawbacks - A review. *Am J Otolaryngol*. 2020;41. doi:10.1016/j.amjoto.2019.102375
8. Bano F, Carril M, Di Gianvincenzo P, Richter RP. Interaction of Hyaluronan with Cationic Nanoparticles. *Am Chem Soc*. 2015;31:8411-8420. doi:10.1021/acs.langmuir.5b01505
9. Camenisch TD, Mcdonald JA. Is Bigger Better ? *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000;23:431-433.
10. Chen X, Richter RP. Effect of calcium ions and pH on the morphology and mechanical properties of hyaluronan brushes. *Interface Focus*. 2019;9(2). doi:10.1098/rsfs.2018.0061
11. Skandalis SS, Karalis T, Heldin P. Intracellular hyaluronan : Importance for cellular functions. *Semin Cancer Biol*. 2020;62:20-30. doi:10.1016/j.semcancer.2019.07.002

12. Hargittai I, Hargittai M. Molecular structure of hyaluronan: An introduction. *Struct Chem*. 2008;19(5):697-717. doi:10.1007/s11224-008-9370-3

13. Bano F, Tammi MI, Kang DW, Harris EN, Richter RP. Single-Molecule Unbinding Forces between the Polysaccharide Hyaluronan and Its Binding Proteins. *Biophys J*. 2018;114(12):2910-2922. doi:10.1016/j.bpj.2018.05.014

14. Heldin P, Kolliopoulos C, Lin CY, Heldin CH. Involvement of hyaluronan and CD44 in cancer and viral infections. *Cell Signal*. 2020;65(June 2019):109427. doi:10.1016/j.cellsig.2019.109427

15. Valcarcel J, García MR, Varela UR, Vázquez JA. Hyaluronic acid of tailored molecular weight by enzymatic and acid depolymerization. *Int J Biol Macromol*. 2020;145:788-794. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.12.221

16. Fraser JR., Laurent T., Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med*. 1997;242:27-33.

17. Scott JE, Heatley F. Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: A 13C NMR study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(9):4850-4855. doi:10.1073/pnas.96.9.4850

18. Chabreček P. Hyaluronan : Preparation , Structure , Properties , and Applications †. *Am Chem Soc*. 1998;98(8). doi:10.1021/cr941199z

19. Weigel PH, Baggenstoss BA. Glycan Recognition What is special about 200 kDa hyaluronan that activates hyaluronan receptor signaling ? *Glycobiology*. 2017;27(9):868-877. doi:10.1093/glycob/cwx039

20. Garantziotis S, Savani RC. Hyaluronan biology : A complex balancing act of structure , function , location and context. *Matrix Biol*. 2019;78-79:1-10. doi:10.1016/j.matbio.2019.02.002

21. Cowman MK, Matsuoka S. Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydr Res*. 2005;340(5):791-809. doi:10.1016/j.carres.2005.01.022

22. Matteini P, Dei L, Carretti E, Volpi N, Goti A, Pini R. Structural behavior of highly concentrated hyaluronan. *Biomacromolecules*. 2009;10(6):1516-1522. doi:10.1021/bm900108z

23. Verma S, Kumar V, Gupta KD. Performance analysis of flexible multirecess hydrostatic journal bearing operating with micropolar lubricant. *Lubr Sci*. 2012;24(6):273-292. doi:10.1002/ls

24. Giannotti MI, Rinaudo M, Vancso GJ. Force spectroscopy of hyaluronan by atomic force microscopy: From hydrogen-bonded networks toward single-chain behavior. *Biomacromolecules*. 2007;8(9):2648-2652. doi:10.1021/bm700592j

25. Scott JE, Cummings C, Brasst A. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution , investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. *Biochem J*. 1991;274:699-705.

26. Giubertoni G, Koenderink GH, Bakker HJ. Direct Observation of Intrachain Hydrogen Bonds in Aqueous Hyaluronan. *J Phys Chem A*. 2019;123:8220-8225. doi:10.1021/acs.jpca.9b06462

27. Cowman MK, Schmidt TA, Raghavan P, Stecco A. Viscoelastic Properties of Hyaluronan in Physiological Conditions. *F1000Research*. 2015;(May):1-13. doi:10.12688/f1000research.6885.1

28. Mendichi R, Šoltés L, Schieroni A. Evaluation of Radius of Gyration and Intrinsic Viscosity Molar Mass Dependence and Stiffness of Hyaluronan. *Biomacromolecules*. 2003;4:1805-1810. doi:10.1021/bm0342178

29. Maleki A, Kjøniksen AL, Nyström B. Effect of pH on the behavior of hyaluronic acid in dilute and semidilute aqueous solutions. *Macromol Symp*. 2008;274(1):131-140. doi:10.1002/masy.200851418

30. Gatej I, Popa M, Rinaudo M. Role of the pH on hyaluronan behavior in aqueous solution. *Biomacromolecules*. 2005;6(1):61-67. doi:10.1021/bm040050m

31. Furlan S, Penna G La, Cesa A. Hyaluronan chain conformation and dynamics. *Carbohydr Res*. 2005;340:959-970. doi:10.1016/j.carres.2005.01.030

32. Simulescu V, Kalina M, Mondek J, Pekař M. Long-term degradation study of hyaluronic acid in aqueous solutions without protection against microorganisms. *Carbohydr Polym*. 2016;137:664-668. doi:10.1016/j.carbpol.2015.10.101

33. Mondek J, Kalina M, Simulescu V, Pekař M. Thermal degradation of high molar mass hyaluronan in solution and in powder; comparison with BSA. *Polym Degrad Stab*. 2015;120:107-113. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2015.06.012

34. Butt HJ, Cappella B, Kappl M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surf Sci Rep*. 2005;59(1-6):1-152. doi:10.1016/j.surfrep.2005.08.003

35. Chan SMT, Neu CP, DuRaine G, Komvopoulos K, Reddi AH. Atomic force

microscope investigation of the boundary-lubricant layer in articular cartilage. *Osteoarthr Cartil*. 2010;18(7):956-963. doi:10.1016/j.joca.2010.03.012

36. Xiang W, Tian Y, Liu X. Dynamic analysis of tapping mode atomic force microscope (AFM) for critical dimension measurement. *Precis Eng*. 2020. doi:10.1016/j.precisioneng.2020.03.023

37. Barattin R, Voyer N. Chemical modifications of AFM tips for the study of molecular recognition events. *Chem Commun*. 2008;(13):1513-1532. doi:10.1039/b614328h

38. Shi X, Qing W, Marhaba T, Zhang W. Atomic force microscopy - Scanning electrochemical microscopy (AFM-SECM) for nanoscale topographical and electrochemical characterization: Principles, applications and perspectives. *Electrochim Acta*. 2020;332:135472. doi:10.1016/j.electacta.2019.135472

39. Christenson HK, Thomson NH. The nature of the air-cleaved mica surface. *Surf Sci Rep*. 2016;71(2):367-390. doi:10.1016/j.surfrep.2016.03.001

40. Kasas S, Dietler G. DNA-protein interactions explored by atomic force microscopy. *Semin Cell Dev Biol*. 2018;73:231-239. doi:10.1016/j.semcdb.2017.07.015

41. Ostendorf F, Schmitz C, Hirth S, Angelika K, Kolodziej JJ, Reichling M. Evidence for Potassium Carbonate Crystallites on Air-Cleaved Mica Surfaces. *Langmuir*. 2009;25(20):10764-10767. doi:10.1021/la901311k

42. Dubrovin E V, Scha M, Klinov D V, Scha TE. Time-Lapse Single-Biomolecule Atomic Force Microscopy Investigation on Modi fi ed Graphite in Solution. *Am Chem Soc*. 2017;33:10027-10034. doi:10.1021/acs.langmuir.7b02220

43. Wang J, Nie S. Application of atomic force microscopy in microscopic analysis of polysaccharide. *Trends Food Sci Technol*. 2018;(February):0-1. doi:10.1016/j.tifs.2018.02.005

44. Jiang L, Titmuss S, Klein J. Interactions of hyaluronan layers with similarly charged surfaces: The effect of divalent cations. *Langmuir*. 2013;29(39):12194-12202. doi:10.1021/la401931y

45. Lidgi-Guigui N, Guis C, Brissault B, et al. Investigation of DNA condensing properties of amphiphilic triblock cationic polymers by atomic force microscopy. *Langmuir*. 2010;26(22):17552-17557. doi:10.1021/la103066c

46. Ito T. Observation of DNA molecules using fluorescence microscopy and atomic

force microscopy: An undergraduate instrumental analysis laboratory experiment. *J Chem Educ*. 2008;85(5):680-682. doi:10.1021/ed085p680

47. Beckwitt EC, Kong M, Van Houten B. Studying protein-DNA interactions using atomic force microscopy. *Semin Cell Dev Biol*. 2018;73:220-230. doi:10.1016/j.semcdb.2017.06.028

48. Schön P. Atomic force microscopy of RNA: State of the art and recent advancements. *Semin Cell Dev Biol*. 2018;73:209-219. doi:10.1016/j.semcdb.2017.08.040

49. Cowman MK, Li M, Dyal A, Balazs EA. Tapping mode atomic force microscopy of the hyaluronan derivative , hylan A. *Carbohydr Polym*. 2000;41:229-235.

50. Al-assaf S, Phillips GO, Gunning AP, Morris VJ. Molecular interaction studies of the hyaluronan derivative , hylan A using atomic force microscopy. *Carbohydr Polym*. 2002;47:341-345.

51. Spagnoli C, Korniakov A, Ulman A, Balazs EA, Lyubchenko YL, Cowman MK. Hyaluronan conformations on surfaces : effect of surface charge and hydrophobicity. *Carbohydr Res*. 2005;340:929-941. doi:10.1016/j.carres.2005.01.024

52. Cowman MK, Spagnoli C, Kudasheva D, et al. Extended, relaxed, and condensed conformations of hyaluronan observed by atomic force microscopy. *Biophys J*. 2005;88(1):590-602. doi:10.1529/biophysj.104.049361

53. Xu S, Yamanaka J, Sato S, et al. Two-dimensional auto-organised nanostructure of sodium hyaluronate and its frictional properties. *Colloid Polym Sci*. 2004;282:440-445. doi:10.1007/s00396-003-0964-4

54. Kozubíková K. Charakterizace hyaluronanu sodného pomocí AFM. Zlín, 2017. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, fakulta technologická.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HA Hyaluronan (kyselina hyaluronová)

AFM Mikroskopie atomárních sil

DNA Deoxyribonukleová kyselina

RNA Ribonukleová kyselina

ECM Extracelulární matrix

FTIR Infračervená spektroskopie

NMR Nukleární magnetická resonance

RTG Rentgen

SMFS Jednomolekulová silová spektroskopie

HOPG Orientovaný polygrafický grafit

MCDS Mikrokondenzační sušící zařízení

TMSPTA N-trimetoxysilylpropyl-N,N,N-trimethylamonium chlorid

SEC-MALS-RI Rozměrově vylučovací chromatografie s dvojitou detekcí víceúhlového rozptylu světla a indexu lomu

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Schéma různých terapeutických aplikací medikament založených na HA[4].....11

Obr. 2: Chemická struktura HA: karboxylová kyselina (modrá), primárním alkohol (zelená) a amid (růžová)[3].....12

Obr. 3: Sekundární struktura HA. Na obrázku je fragment řetězce složený ze dvou disacharidových jednotek. Čtyři vnitřní zbytkové vodíkové vazby jsou zesíleny vodními můstky mezi COO^- skupinou a acetamidovou NH skupinou[12]. 13

Obr. 4: Možná uspořádání polymerního řetězce HA podmíněné experimentálními podmínkami[12] 14

Obr. 5: Změna hydrodynamické velikosti řetězců HA s narůstající molární hmotností. Řetězce hyaluronanu s molární velikostí (zleva) 0,1; 0,5; 1; 3 a 6 milionů zaujímají hydrodynamický poloměr 50, 140, 210, 400 a 600 nm ve fyziologických solných roztocích[27]. 17

Obr. 6: Viskozitní chování zředěných (a) a semi-zředěných (b) HA roztoků za odlišných hodnot pH[29].....18

Obr. 7 : Průběh skladování HA vodných roztoků při laboratorní teplotě a v lednici (4 °C). (Vlevo) roztok HA o molární hmotnosti 90-130 kDa byl při pokojové teplotě stabilní po dobu 10 dní. Poté nastala rychlá degradace působením mikroorganismů. (Vpravo) roztok HA o Mw 1750 kDa při pokojové teplotě se zpočátku vykazuje pozvolnou degradací, která později nabírá na rychlosti. Degradace roztoků uchovávaných v lednici je v obou případech pomalá[33].....20

Obr. 8 : Termální degradace HA o molární hmotnost 1,67 kDa v roztoku[33] 20

Obr. 9: Schéma aparatury AFM [37] 21

Obr. 10: Znázornění režimů AFM[38].....22

Obr. 11: A) Pozice vazebných proteinů na DNA (snímaná plocha 1x1μm). Šipky ukazují na protein-DNA komplexy na odlišných místech DNA [47]. *B) Plasmidová DNA na povrchu slídy*[45]. *C) Snímek dvoušroubovice RNA při vysokém rozlišením. D) Detail vyznačeného úseku RNA*[48]. 24

Obr. 12: AFM snímky Hylanu A: A) Izolovaný řetězec podrobený molekulovému česání v důsledku čehož byl téměř narovnán. Délka řetězce je přibližně 6,2 μm a velikost snímku 4,5 μm x 4,5 μm, šedá škála pokrývá 2 nm. B) Snímek propletené a/nebo zesíťované molekuly s rozsáhlým sdružením řetězců. Velikost snímku 3,5 μm x 3,5 μm, šedá škála pokrývá 1,5 nm. C) Detail horní sekce struktury (B) s velikostí snímku 1 μm x 1 μm, šedá škála pokrývá 2 nm[49].....25

Obr. 13: Snímek hylanu A za koncentrace 1 $\mu g \cdot ml^{-1}$ deponovaný na povrch slídy a skenovaný pod n-butanolem: A) 400 x 400 nm, B) 200 x 200 nm[50].....25

Obr. 14: AFM výškové snímky HA o střední Mw deponované z 10 μg/mL roztoku ve vodě na povrchu substrátu: A) povrch slídy nebyl modifikován, veikost snímku 1 μm x 1 μm x 0,9 nm. B) Slída modifikovaná pomocí TMSPTA, velikost snímku 750 nm x 750 nm x 1,3 nm. C) Povrch grafitu, velikost snímku 1 μm x 1 μm x 4,5 nm[51].....27

Obr. 15: Různé konformace HA pozorované na povrchu slídy pomocí poklepového režimu AFM: A) ***Natažený řetězec HA****. Nízkomolekulární HA deponovaná z 2μg/ml roztoku v 10 mM $MgCl_2$ na předem hydratovaný povrch slídy. Měřítko činí 500 nm, výška 1-2 nm.B)* ***Částečně relaxovaná forma HA*** *na předem hydratované slídě. Nízkomolekulární HA deponovaná z 2 μg/ml roztoku v 10 mM $MgCl_2$. Měřítko činí 250 nm, výška 1-1,8 nm.*

*C)**Relaxovaná forma HA** na čerstvě odštěpené vrstvě slídy. Vysokomolekulární HA deponovaná z 10 μg/ml roztoku ve vodě. Měřítko činí 500 nm, výška 1-1,3 nm. D) **Kondenzovaná forma HA** z vysokomolekulárního roztoku HA ve vodě o koncentraci 10 μg/ml. Měřítko činí 250 nm, výška 1,5-3 nm*[52] 28

Obr. 16: AFM snímky pořízené v poklepovém módu v prostředí vzduchu: A) vrstva BSA (1,5 μm x1,5 μm), kde je šipka ukazuje na molekulu BSA. Snímky B),C) a D) zobrazují adsorbovaný HA na BSA (5 μm x 5μm)s rozdílným adsorbovaným množstvím B) 25 ng, C) 50 ng a D) 88 ng[53] 29

Obr. 17: Pufr Tris-HCl (50mM, pH=8) na povrchu slídy: A) velikost snímku 20 μm x 20 μm, B) velikost snímku 3 μm x 3 μm. 31

Obr. 18: Zařízení TFFC 32

Obr. 19: AFM mikroskop NTEGRA Prima 33

*Obr. 20: **Vliv hmotnostního podílu HA** v pufrovaném roztoku na vzhled imobilizovaného polymeru na povrchu slídy. Výchozí roztok připravován v TFFC při **46/46 °C**. Koncentrace výchozích roztoků před ředěním a depozicí na povrch: **A)** 0,1 hm. %, **B)**0,5 hm. %, **C)**1 hm.%.* 35

*Obr. 21: **Vliv hmotnostního podílu HA** v pufrovaném roztoku na změnu vzhledu imobilizovaného polymeru na povrchu slídy. Výchozí roztok připravován na TFFC při **46/46 °C** a před deponováním byl zředěn na **0,005 hm. %**. Koncentrace výchozího roztoku před ředěním: **A)** 0,5 hm. %, **B)**1 hm.%.* 37

Obr. 22: ***Vliv střední teploty na změnu** vhledu imobilizované vrstvy HA na povrchu kladně nabité slídy. Výchozí roztok připravován v TFFC při **46/46 °C**. Roztoky byly **deponovány na povrch** ve svých **výchozích koncentracích**: **A)** 0,1 hm. %, **B)**0,5 hm.%, **C)** 1 hm. %....* 38

*Obr. 23: **Vliv hmotnostního podílu HA** v pufrovaném roztoku na vzhled imobilizovaného polymeru na povrchu slídy. Výchozí roztok byl připravován na TFFC při **50/10 °C**. Koncentrace výchozích roztoků před ředěním a depozicí na povrch byly: **A)** 0,5 hm. %, B) 1 hm.%* 39

*Obr. 24: **Vliv hmotnostního podílu HA** v pufrovaném roztoku na vzhled imobilizovaného polymeru na povrchu slídy. Výchozí roztok byl připravován na TFFC při **50/30 °C**. Koncentrace výchozích roztoků před ředěním a depozicí na povrch byly: **A)** 0,5 hm. %, B) 1 hm.%* 40

*Obr. 25: **Vliv hmotnostního podílu HA** v pufrovaném roztoku na vzhled imobilizovaného polymeru na povrchu slídy. Výchozí roztok byl připravován na TFFC při **50/40 °C**. Koncentrace výchozích roztoků před ředěním a depozicí na povrch byly: **A)** 0,5 hm. %, B) 1 hm.%* 41

*Obr. 26:**Vliv teplotního spádu na roztok HA** v pufru na vzhled imobilizovaného polymeru na povrchu slídy. Výchozí roztok před ředěním **0,1 hm. %**. Teplotní spády na TFFC: **A)** 50/10 °C. %, **B)** 50/20 °C.* 42

Pokrytí agregáty: 3,2 % Ra = (53±5) pm Rz = (708±48) pm *Obr. 27: **Vliv teploty ředění roztoku HA** na vzhled imobilizovaného polymeru na povrchu slídy. Výchozí **0,5 hm. %** roztok byl připravován v TFFC při **50/25 °C** a před nanesením na povrch byl zředěn na **0,01 hm. %** při teplotě: **A)** 23 °C, **B)** 40 °C.* 44

Obr. 28: Rozdělení plošných průřezů agregovaných klubek HA ve výšce 0,8 nm až 1,2 nm nad povrchem slídy pro vzorky demonstrované na obr. 26 45

*Obr. 29: **Vliv ředění roztoku HA připraveného v pufru** na pozorované struktury imobilizované na povrchu slídy. Výchozí roztok 0,5 hm. % HA byl připravován v TFFC při*

*teplotním spádu **50/30 °C**. Snímaná plocha byla **1 μm x 1 μm**. **A)** Roztok zředěn na **0,01 hm. % B)** Roztok zředěn na **0,001 hm. %.*** 46

Obr. 30*:Rozdělení plošných průřezů agregovaných klubek HA ve výšce 0,7 nm nad povrchem slídy pro vzorky demonstrované na obr. 28A* 47

*Obr. 31: **Vliv omytí povrchu s imobilizovanou vrstvou HA nanesenou z pufrovaného roztok** na slídu. Výchozí roztok 0,5 hm. % HA byl připravován v TFFC při teplotním spádu **50/30 °C** a před deponováním byl zředěn na **0,001 hm. %**. **A)** Vzorek omytý destilovanou vodou **B)** Neomytý vzorek.* 48

Obr. 32:Rozdělení plošných průřezů agregovaných klubek HA ve výšce 0,8 nm až 1,1 nm nad povrchem slídy pro vzorky demonstrované na obr.30 49

*Obr. 33: **Vliv hmotnostního podílu HA** ve vodném roztoku na vzhled imobilizovaného polymeru na povrchu slídy. Výchozí roztok obsahoval **0,1 hm. % HA**, byl připravován v TFFC při teplotním spádu **50/11 °C** a před nanesením na povrch slídy byl zředěn na **0,005 hm. %**.* 50

*Obr. 34:**Vliv střední teploty přípravy vodného roztoku HA** na vzhled imobilizovaného polymeru na povrchu slídy. Výchozí roztok připravován na TFFC při: **A)** 40/40 °C, **B)** 46/46 °C.* 51

*Obr. 35:**Vliv teplotního spádu HA** ve vodném roztoku na změnu agregačních schopností imobilizovaného polymeru na povrchu slídy. Výchozí roztok připravován na TFFC při teplotním spádu: **A)** 50/10 °C**, B)** 50/20 °C.* 53

*Obr. 36: **Vliv teplotního spádu na HA** ve vodném roztoku na změnu agregačních schopností imobilizovaného polymeru na povrchu slídy. Roztoky připravovány na TFFC při teplotním spádu: A) **50/35 °C** a B) **50/45 °C**.* 54

*Obr. 37: Agregované struktury HA na povrchu slídy vznikající z vodných roztoků připravených **třepání při 23°C**.* 55

Obr. 38:Rozdělení plošných průřezů agregovaných klubek HA ve výšce 1-2 nm nad povrchem slídy pro vzorky demonstrované na obr. 36. 56

*Obr. 39: **Vliv následných kroků rozpouštění HA** ve vodném roztoku na změnu agregačních schopností HA povrchu slídy. **A)** Roztok byl před úpravou v TFFC (50/10 °C, 24 hod.) rozpouštěn na třepacím zařízení (23 °C, 24 hod.). **B)** Roztok rozpouštěný v TFFC (50/10 °C, 24 hod.).*..... 57

*Obr. 40: Agregované struktury HA vznikají z roztoků připravených rozpouštění filmů HA. Hmotnostní podíl HA ve vodě pro přípravu roztoku byl **0,15 hm. %.** Film byl solidifikován při teplotě **25 °C**. Roztoky deponované na povrch slídy obsahovaly **0,01 hm.% HA**.* 58

*Obr. 41: Agregované struktury HA vznikají z roztoků připravených rozpouštění filmů HA. Hmotnostní podíl HA ve vodě pro přípravu roztoku byl **0,15 hm. %.** Roztoky a filmy HA připravovány v **TFFC** při teplotě **50/30 °C**. Roztoky deponované na povrch slídy obsahoval **0,01 hm.%.** A) **Vodný roztok** – film – vodný roztok. B) **Pufrovaný roztok** – film – vodný roztok.* 59