



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

CHARAKTERIZACE INTERAKCÍ HYALURONANU A ALBUMINU

CHARACTERIZATION OF HYALURONAN INTERACTIONS WITH ALBUMIN

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

KRISTÝNA MIKOLÁŠOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. MARTIN CHYTIL, Ph.D.

BRNO 2015



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0802/2013	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Kristýna Mikolášová	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)	
Vedoucí práce	Ing. Martin Chytil, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Charakterizace interakcí hyaluronanu a albuminu

Zadání bakalářské práce:

Prostudovat interakce hyaluronanu a albuminu v prostředí pufru použitím metod reologie, viskozimetrie, solubilizace barviva a elektroanalytických.

Vyhodnotit vliv koncentrace hyaluronanu a míru solubilizace modelového barviva vzniklými agregáty.

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Kristýna Mikolášová
Student(ka)

Ing. Martin Chytil, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zaměřuje na výzkum fyzikálních interakcí mezi kyselinou hyaluronovou a bílkovinou albuminem. K výzkumu interakcí bylo použito měření pH, konduktivity, viskozity, turbidity a reometrie. Interakce byly pozorovány v roztocích o stálé koncentraci albuminu $1,0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ a proměnlivé koncentraci kyseliny hyaluronové od $0,1$ do $2,0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Veškeré vzorky byly proměřeny a výsledky byly porovnány s roztokem kyseliny hyaluronové bez přídavku albuminu.

Výsledky ukazují, že dochází k interakcím mezi kyselinou hyaluronovou a albuminem hlavně u roztoků vysokomolekulové kyseliny hyaluronové. Interakce se projevily změnou viskozity roztoků. Po přidání albuminu do referenčních roztoků můžeme pozorovat snížení viskozity. Snížení pozorujeme i u roztoků nízkomolekulové kyseliny hyaluronové, ale není tak výrazné.

ABSTRACT

This bachelor thesis focuses on the research of physical interactions between hyaluronic acid and a protein albumin. In order to investigate these interactions following methods were used: pH and conductivity measurement, viscosimetry, turbidimetry and rheometry. The interactions were observed in solutions of fixed albumin concentration $1.0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ and varying concentrations of hyaluronic acid from 0.1 to $2.0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Results were compared with a solution of hyaluronic acid without the addition of albumin.

The results show that there are interactions between hyaluronic acid and albumin solutions, especially for those containing high molecular weight hyaluronic acid. The interactions exhibited a change in viscosity of solutions. We can see a reduction in viscosity after adding albumin to the reference solutions. The reduction is noticeable even in the low molecular weight HA solutions, but is not so significant.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kyselina hyaluronová, albumin hovězího séra, fyzikální interakce, reometrie, viskozimetrie, turbidimetrie, konduktometrie.

KEYWORDS

Hyaluronic acid, bovine serum albumin, physical interactions, rheometry, viscosimetry, turbidimetry, conductometry.

MIKOLÁŠOVÁ, K. *Charakterizace interakcí hyaluronanu a albuminu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 53 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Martin Chytil, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Martinu Chytilovi, Ph.D za odborné vedení, mnoho cenných rad a především za čas a bezmeznou trpělivost, kterou mi při konzultacích věnoval.

Dále bych ráda poděkovala všem svým přátelům/kolegům za mnoho užitečných rad a pomoci při vypracování této bakalářské práce.

Speciální poděkování patří mé rodině za nesmírnou podporu při studiu.

OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1.	Kyselina hyaluronová.....	8
2.1.1.	Výskyt a syntéza	8
2.1.2.	Struktura.....	8
2.1.3.	Využití a vlastnosti	9
2.1.4.	Receptor CD 44	10
2.2.	Albumin.....	11
2.2.1.	Výskyt a syntéza	11
2.2.2.	Struktura.....	11
2.2.3.	Využití a vlastnosti	12
2.3.	Interakce kyseliny hyaluronové a albuminu.....	12
2.4.	Použité měřicí metody.....	14
2.4.1.	Viskozimetrie	14
2.4.2.	Turbidimetrie.....	17
2.4.3.	Konduktometrie.....	18
2.4.4.	pH metrie.....	18
2.4.5.	Reologie	19
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
3.1.	Použité chemikálie a přístroje.....	25
3.2.	Příprava vzorků	25
3.3.	Měření viskozity pomocí mikroviskozimetru AMVn.....	27
3.4.	Měření turbidity a solubilizace.....	28
3.5.	Měření konduktivity a pH	28
3.6.	Měření reologických vlastností pomocí reometru AR – G2.....	29
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	32
4.1.	Měření viskozity pomocí mikroviskozimetru AMVn.....	32
4.2.	Měření turbidity a solubilizace.....	33
4.3.	Měření konduktivity a pH	37
4.4.	Měření reologických vlastností pomocí reometru AR-G2.....	38

5	ZÁVĚR.....	43
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	45
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATECH A SYMBOLŮ	49
8	PŘÍLOHY	51

1 ÚVOD

Tato práce se zaměřuje na výzkum fyzikálních interakcí mezi kyselinou hyaluronovou a bílkovinou albuminem.

Kyselina hyaluronová je zcela přirozeně v těle se vyskytující lineární polysacharid složený z opakujících se disacharidových jednotek (kyselina β -D-glukuronová a N-D-acetylglukosamin) a s proměnlivou molekulovou hmotností. Má jednoduchou primární strukturu, ale v závislosti na velikosti molekuly a jejím prostorovém uspořádání vykazuje velmi rozdílné biologické účinky. Nachází se v mezibuněčné hmotě, lidském oku a také hydratuje pokožku [1]. Je zcela biodegradabilní, takže má široké využití v kosmetice, neboť nezpůsobuje alergické reakce a negativní odezvy imunitního systému.

Albumin je hlavním proteinem lidské plasmy ($45 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$) a tvoří asi 60 % plasmatických proteinů. Kromě krve se vyskytuje také v dalších tělních tekutinách, jako je tkáňový a mozkomíšní mok. Je důležitý hlavně při transportu různých látek krví (mastné kyseliny, minerály, léky) a pomáhá udržet stálé vnitřní prostředí organismu [1]. Albumin je využíván v lékařství jako transportér celé řady léků a léčivých látek krví.

Cílem této práce je prozkoumat fyzikální interakce těchto dvou látek a zjistit, jak se mění jejich vlastnosti při různých koncentracích. Hlavním cílem ovšem bylo zjistit, zda můžeme použít hyaluronan jako vhodný nosič a albumin jako transportér léčiva při cílené léčbě rakoviny. Nádorové buňky mají totiž na svém povrchu receptor CD 44, který na sebe váže ve zvýšené míře hyaluronan. Pokud by tedy nosič léčiva obsahoval hyaluronan, mohl by sloužit k výrobě léčiva s cílenou distribucí na nádorová onemocnění. Výsledkem by bylo urychlení a zacílení léčby, tím pádem menší negativní dopad na lidský organismus.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová (HA) byla poprvé izolována v roce 1934 z očního sklivce hovězího skotu. První izolaci kyseliny hyaluronové provedli K. Mayer a J.W.Palmer [3]. Dlouho po svém objevu neměla HA skoro žádné praktické využití. Bylo to z důvodu její obtížné separace z živých tkání. Proto se dlouho jako zdroj používaly různé měkké tkáně savců, jako například chrupavky a kůže. V dalších letech byla HA izolována také z očního sklivce prasat, roztoků hovězí krve a kohoutích hřebínků. Izolací z kohoutích hřebínků je možné získat její nejvyšší molekulovou hmotnost a to 3,5 - 4 MDa (*Dalton (Da) je jiný název pro jednotku g·mol⁻¹ a běžně se využívá v biochemii a biologii*) [4].

2.1.1. Výskyt a syntéza

HA se přirozeně vyskytuje u obratlovců prakticky ve všech tkáních, kde nachází široké uplatnění v biologických funkcích. Vzhledem k výskytu látky v živých organismech (při biologickém pH 7,4) jako polyaniontu a ne ve formě protonované kyseliny je více využíván název hyaluronan. Záporný náboj vzniklý z disociované karboxylové skupiny se kompenzuje kationty – hlavně Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺.

Aktivita hyaluronanu v organismu je silně závislá na molekulové hmotnosti. Obecně se dá říci, že vysokomolekulární hyaluronan nejeví v organismu prakticky žádnou aktivitu ve smyslu regulace pochodů a slouží převážně jako strukturní jednotka. Oproti tomu nízkomolekulový hyaluronan (pod 100 kDa) má vliv na různé pochody v tkáních a buňkách. Dokonce bylo prokázáno, že čím je nižší molekulová hmotnost, tím je vyšší biologická aktivita [5].

Hyaluronan je syntetizován hyaluronan syntázou, která je lokalizována v membráně buněk a je enzymem mnoha buněk organismu obratlovců. Jako takové jsou to zejména fibroblasty a krevní destičky, které se zapojují do tvorby extracelulární matrix (ECM) [5]. Ve výrobním procesu mohou HA produkovat geneticky změněné kmeny bakterií *Escherichia coli*. Dalším užívaným způsobem biotechnologické výroby je získávání HA z buněčných stěn bakterií druhu *Streptococcus zooepidemicus* [1].

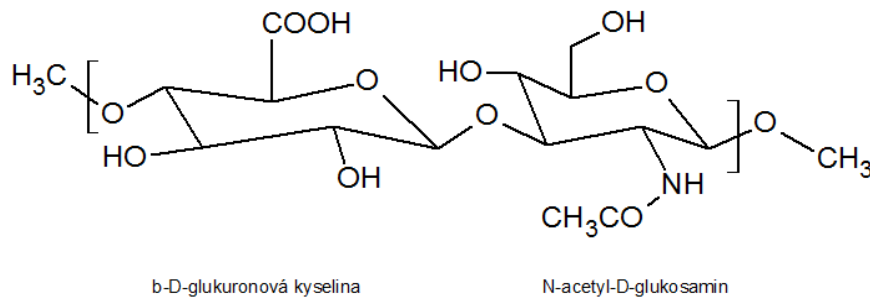
2.1.2. Struktura

Kyselina hyaluronová je polysacharid patřící do skupiny glykosaminoglykanů. Jejich typickým znakem je struktura tvořená z neustále opakujících se disacharidických jednotek. V případě hyaluronanu se opakující disacharidická jednotka skládá z monosacharidu kyseliny glukuronové, která je glykosidickou vazbou β-1,3 spojena s dalším monosacharidem N-acetyl-D-glukosaminem. Jednotlivé disacharidické jednotky jsou pak pospojovány v polymer glykosidickými vazbami β-1,4 [5].

Počet těchto podjednotek se může pohybovat ve stovkách až deseti milionech. Společně tvoří jednu strukturní jednotku celého polymeru (*Obrázek 1*).

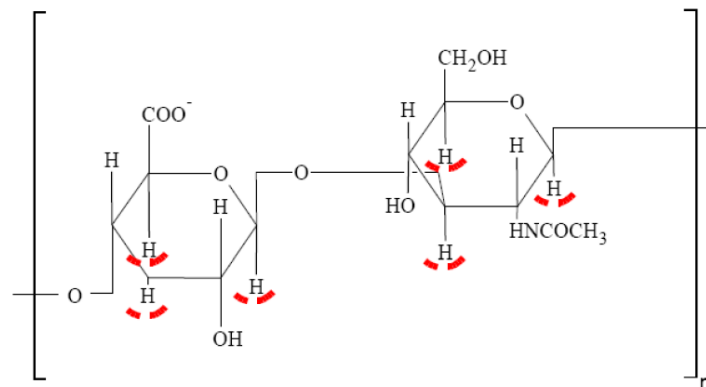
Ze struktury hyaluronanu lze odvodit, že se jedná o polymer, který je díky velkému množství hydroxylových skupin ve své struktuře schopen na sebe vázat velké množství vody. Je ve

vodě poměrně dobře rozpustný díky nábojové repulsi vyvolané karboxylovými skupinami disociovanými při pH hodnotě existující ve fyziologické tkáni [5],[6].



Obrázek 1: Struktura HA. Základ tvoří opakující se disacharidové jednotky β -D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu [5].

Oba monosacharidy, které tvoří HA (Obrázek 1), prostorově vycházejí z glukózy, která v β -konfiguraci dovoluje všem objemným skupinám (hydroxylové, karboxylové, acetamidové) být ve stericky příznivé ekvatoriální pozici, zatímco všechny malé atomy vodíku zaujímají méně stericky příznivé axiální polohy (Obrázek 2). A proto je struktura disacharidu energeticky velmi stabilní.



Obrázek 2: Podtržené axiální vodíky ve struktuře HA tvoří hydrofobní část [7].

Vzhledem k široké škále možných molekulových hmotností získávají různě dlouhé řetězce kyseliny hyaluronové odlišné vlastnosti.

2.1.3. Využití a vlastnosti

HA má široké praktické využití (buněčná biologie, kosmetika, chirurgie, imunologie, farmaceutika atd.), neboť nezpůsobuje alergické reakce a negativní odezvy imunitního systému. Naopak je zcela biologicky odbouratelná a její metabolické deriváty taktéž nepředstavují zátěž pro organismus. Sama kyselina hyaluronová je silně hygroskopická a dokáže na sebe vázat vodu až do tisícnásobku vlastní hmotnosti [8].

Již v 60. letech 20. století se HA využívala k lokální léčbě popálenin a kožních vředů. Od roku 1979 je HA na trhu určená pro použití v oční chirurgii. Užívá se k dočasnému vyplnění

prostoru přední komory oční a ochraně očních tkání (hlavně endotelu rohovky a duhovky) před poškozením při nitroočních operacích (např. operace šedého zákalu, implantace čočky), neboť vytváří na povrchu oka mikroskopický film, který brání nadměrnému poškození a podporuje regeneraci. Nyní se v tomto odvětví nově využívá díky svým viskoelastickým vlastnostem i jako lubrikační látka v očních kapkách nebo roztocích na kontaktní čočky [9].

Druhé nejširší využití HA představuje u pacientů s osteoartrózou intraartikulární aplikace (*viskosuplementace = normalizace reologických vlastností synoviální tekutiny v kloubu pomocí injekce HA*). Novou možností je periartikulární aplikace HA při podvrtnutí kotníku, kdy dochází k injekční aplikaci tzv. vějířovitou technikou, která zaručuje rovnoměrnou distribuci HA podél poškozeného vazů. Tato metoda je velice účinná a rozšiřuje možnost léčby pohybového aparátu [10].

Významné je využití k augmentaci v plastické chirurgii (vyplň vrásek, vtažených jizev, zvětšení prsou), neboť zvýšená koncentrace kyseliny hyaluronové v pokožce vede k její celkové obnově a hlavně ke zlepšení její pružnosti a elasticity, které lidská pokožka přirozeně ztrácí s věkem [11]. HA se také užívá v přípravcích pro podporu hojení ran, neboť zvyšuje syntézu kolagenu v pokožce a díky tomu se poraněná tkáň lépe a hlavně rychleji hojí. Dobré výsledky byly zaznamenány v kombinaci s jódem při hojení chronických ran, diabetických nohou a bérkových vředů (např. přípravek Hyiodine od firmy Contipro Pharma, a.s.) [12]. Další možností využití je ve veterinární medicíně, kde se vysokomolekulární hyaluronan uplatňuje díky svým viskoelastickým a protizánětlivým vlastnostem. Užívá se především při léčbě nemocí kloubů koní, psů a koček [13].

Nejmodernější oblastí využití hyaluronanu se stala cílená distribuce léčiv do tkání organismů, kde se hyaluronan samovolně koncentruje. Jde například o nádorové tkáně, které mají na svém povrchu receptor CD 44, který ve zvýšené koncentraci váže kyselinu hyaluronovou z okolních tkání. Při cílené distribuci léčiv je léčivo zabudováno do struktury nosiče a je dopraveno až k postižené tkáni. Uvolnění léčiva je poté provedeno například ultrazvukem, změnou teploty nebo pH [14],[15].

2.1.4. Receptor CD 44

Proto, aby mohly být buňky ovlivňovány nějakým signálem, musí ho nejdříve rozpoznat, což se děje pomocí receptorů. Ty jsou lokalizovány na povrchu většiny buněk a specificky interagují pouze s určitými látkami. Buňky mohou s hyaluronanem, který je v ECM, interagovat prostřednictvím několika receptorů. Největší pozornost se zatím zaměřila na receptor CD 44.

Jde o glykoprotein, který má velice proměnlivou strukturu (*existuje minimálně 9 forem tohoto receptoru*) [5]. Receptor prochází cytoplasmatickou membránou a jedním svým koncem zasahuje do intracelulárního matrix a druhým naopak vyčnívá do extracelulárního prostoru. S kyselinou hyaluronovou reaguje velice citlivě a interaguje buď přes karboxylové, nebo přes hydroxylové skupiny.

Každá interakce vede ke spuštění řady enzymů, které přenášejí signál z povrchu buňky do jádra a vyvolávají buď aktivaci, nebo potlačení transkripce genu do RNA, která spouští další pochody v buňce. Přitom není jedno, zda s receptorem interaguje vysokomolekulární hyaluronan, nebo pouze jeho fragmenty.

Protože je CD 44 receptorem endocytózního typu, je pro výzkum velice zajímavý a to z hlediska cílené distribuce léčiv. Když dojde k jeho interakci s fragmentem hyaluronanu, vchlípí se společně s ním do buňky, kde se vytvoří speciální vakuola, ve které poté hyaluronan degraduje. To ve výsledku znamená, že nanočástice značená hyaluronanem, která nese biologicky aktivní látku, může být takovýmto způsobem dopravena přímo do buňky stejně jako hyaluronan s navázanou biologicky aktivní látkou [5].

Protože nádorové buňky mají zvýšenou produkci receptorů CD 44, které jsou na hyaluronan velice citlivé a specificky s ním interagují, může být hyaluronan použit jako nosič léčiva. Toto léčivo HA transportuje k nádorovým buňkám se zvýšenou produkcí receptoru CD 44. Při chemoterapii byly použity protilátky anti-CD 44 a výsledky testů ukázaly zpomalení, nebo úplné zastavení nemoci. A právě tohoto způsobu přenosu léčiva do buňky se v dnešní době snaží využít stále více výzkumných týmů a chtějí vyvinout přípravky pro různá onemocnění, které by minimálně zatěžovaly lidský organismus [14], [16].

2.2. Albumin

2.2.1. Výskyt a syntéza

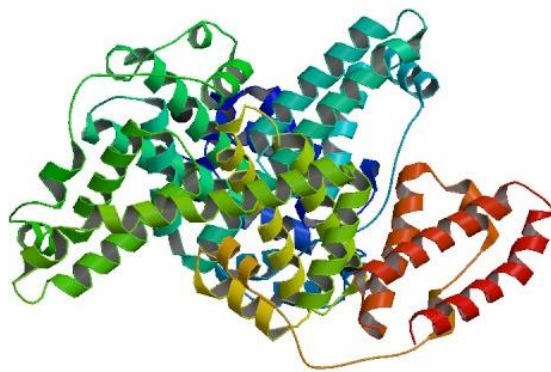
Albumin (BSA) patří mezi tělu vlastní látky a patří do skupiny proteinů krevní plazmy. Tvoří 52 – 60 % všech plazmatických bílkovin. Kromě krve (přibližně 42 % z celkového množství tělního albuminu) se vyskytuje ve svalech, ale také v tělních tekutinách, jako je tkáňový a mozkomíšní mok.

Syntéza albuminu je cíleně prováděna parenchymálními buňkami v játrech (*stejně jako je to u většiny proteinů krevní plazmy*), protože ho člověk nemůže přijímat přímo z potravy pro jeho složitou strukturu. Jeho tvorba je závislá na příjmu aminokyselin do organismu [17].

2.2.2. Struktura

Albumin hovězího séra je polypeptidový protein elipsoidního tvaru s molekulovou hmotností 66 kDa. Analýzy krystalové struktury odhalily, že BSA obsahuje 582 aminokyselin s 20 tyrosinovými zbytky a dvěma tryptofany, které se nachází v polohách 134 (na povrchu molekuly) a 212 v molekulovém řetězci [17].

Celková molekula albuminu je při běžném pH krve 7,4 negativně nabitá, a proto je ideální ji ještě před fyzikálním navázáním na jiné látky protonizovat snížením pH celého roztoku pod izoelektrický bod albuminu (například použitím vhodného pufru), který má hodnotu 4,7 [18].



Obrázek 3: Albumin z hovězího séra [19]

2.2.3. Využití a vlastnosti

Albumin je z hlediska vlastností velice rozmanitý protein. Je schopný reverzibilně vázat širokou paletu nerozpustných ligandů, i když je jeho hlavní funkcí transport metabolitů jako například živin, hormonů štítné žlázy, bilirubinu, volných mastných kyselin, kationtů kovů (zinek, měď, vápník, hořčík) a v neposlední řadě různých léčiv. Právě kvůli své schopnosti vázat a transportovat různé látky je nyní albumin nejvíce zkoumán z pohledu transportních systémů v oblasti cílené distribuce léčiv [17].

Kromě důležité role při udržování koloidního osmotického tlaku v krvi, může albumin hrát dominantní roli v oblasti účinnosti léčiva, neboť zvyšuje zdánlivou rozpustnost hydrofobních léků v plazmě. Vazebná afinita jakékoliv látky na sérový albumin, je jedním z hlavních faktorů, které určují časový průběh absorpce léčiva, distribuci, metabolismus a vylučování [17].

2.3. Interakce kyseliny hyaluronové a albuminu

Protože je kyselina hyaluronová přirozeně schopna se vázat s dalšími látkami ve formě chemických i fyzikálních interakcí, nabízí se toto její chování využít a použít ji jako nosiče pro cílenou distribuci léčiv. Interakce probíhá mezi záporně nabitými karboxylovými skupinami HA a většinou kladně nabitými dusíkovými atomy v aminoskupině mezivazebné látky. Jako mezivazebná sloučenina vhodná k propojení molekuly léčiva a řetězce HA byl dříve uvažován například decyltrimethylamonium bromid nebo aminokyselina lysin a její derivát kyselina 6-aminokapronová. Obecně lze tedy říci, že jde o amfifily, jako jsou kationtové tenzidy a amfifilní aminokyseliny.

Tato interakce je podmíněna přítomností kladného náboje na aminoskupinách těchto látek a proto je výhodné předem tyto látky protonizovat. Díky tomu se mohou lépe vázat na karboxylové skupiny v hyaluronanu nevazebnými fyzikálními interakcemi, jež mají základ v tzv. Coulombických silách, které jsou svojí podstatou síly působící mezi dvěma a více elektrickými náboje a řídí se Coulombovým zákonem:

$$F_e = \frac{|Q_1| \cdot |Q_2|}{4 \cdot \pi \cdot r^2 \cdot \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r} \text{ [N]} \quad (1)$$

kde Q_1 a Q_2 jsou velikosti na sebe působících nábojů v C, r je vzájemná vzdálenost nábojů os sebe v m, ε_0 je permitivita vakua v jednotkách $F \cdot m^{-1}$ a ε_r je relativní permitivita okolního prostředí ve $F \cdot m^{-1}$ [4].

Studie autorů *Hélène Lenormand a spol.* [21] pojednává o schopnosti BSA obnovovat enzymovou aktivitu hyaluronidázy, která se ne vazebně váže na vysokomolekulovou HA. Výzkum poukazuje na to, že BSA může při určitých hodnotách pH nahradit enzym hyaluronidázu (*HAase, přirozený enzym pro metabolismus kyseliny hyaluronové. HAase štěpí HA na oligosacharidy vytvořením komplexu enzym-substrát*) na vazebných místech HA a vytvořit tak s HA elektrostatický komplex. Nejúčinnější je tato interakce při pH = 4 [21]. Největší aktivity dosahoval enzym při koncentraci BSA 0,5 g l⁻¹, kdy bylo zpět do roztoku uvolněno dostatečné množství HAase, ale samotný řetězec HA ještě nebyl stíněn příliš velkým množstvím molekul BSA, které jsou vzhledem ke své molekulové hmotnosti poměrně rozměrné. Dále byl z výzkumu stanoven poměr interagujících molekul BSA na 10 vůči jednomu řetězci HA o molekulové hmotnosti 1 MDa. Celý výzkum byl realizován pomocí měření turbidity [4].

Studie autorů *Hélène Lenormand a spol.* [22] poukazuje na to, že HA tvoří s BSA elektrostatické komplexy při pH = 4 a to bez ohledu na délku řetězce HA v celém rozmezí molekulové hmotnosti od 10³ až do 10⁶ g·mol⁻¹. Pouze povaha HA-BSA komplexů závisí na délce řetězce HA:

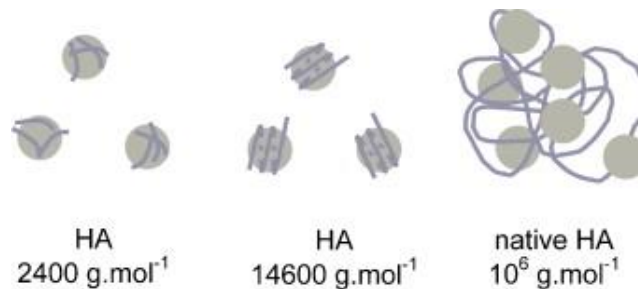
- molekulová hmotnost HA < 4 000 g mol⁻¹: vysoce nabitě rozpustné komplexy
- molekulová hmotnost HA od 4 000 do 37 000 g mol⁻¹: mírně nabitě sedimentující komplexy
- molekulová hmotnost HA > 15 000 g mol⁻¹ s optimem při 50 000 g mol⁻¹: nerozpustné komplexy
- molekulová hmotnost HA > 200 000 g mol⁻¹: lehce nabitě sedimentující komplexy a zároveň i nerozpustné komplexy

Vlastnosti HA-BSA komplexů však závisí na délce HA řetězce, dále pak na koncentraci, pH a také iontové síle. Například rozpustnost komplexu HA-BSA, závisí na délce řetězce HA. HA-proteinové komplexy jsou více rozpustné při nízké, než při vysoké molekulové hmotnosti HA. Při pH = 4 a vyšším mohou existovat rozpustné komplexy, avšak nerozpustné komplexy nikoli. Iontová síla je dalším parametrem pro tvorbu komplexu HA-BSA. Elektrostatické interakce mezi HA a BSA jsou slabší, když se zvýší iontová síla, ovšem když jde o pH fyziologické (± 7,4), vyznačují se interakce svou pevností [22].

Jak vidíme na obrázku (*Obrázek 4*), může HA s BSA tvořit komplexy třech typů:

- Jedna molekula BSA je obklopena několika malými fragmenty nízkomolekulové HA a je vytvořen komplex kulovitěho typu.
- Jedna molekula BSA je obklopena jedním fragmentem HA o střední délce.

- Jedna dlouhá molekula vysokomolekulové HA obklopuje několik molekul BSA. Děje se to proto, že molekula HA je kompaktnější když se spojí s proteiny, než když je volná.



Obrázek 4: Modely pro různé typy komplexů vytvořených mezi HA a BSA v závislosti na délce řetězce HA; 1. jedna molekula BSA obklopena několika malými fragmenty HA, 2. jedna molekula BSA je obklopena jedním fragmentem HA o průměrné délce, 3. jedna dlouhá molekula HA obklopuje více molekul BSA [22].

Díky tomu se dá snadno předpokládat, že délka řetězce HA může řídit vazbu na povrch proteinů a pokud je protein zároveň enzym, můžeme také předpokládat, že bude mít také vliv na enzymovou aktivitu.

Ze studie byl také stanoven ideální interakční poměr disacharidových jednotek HA k jedné molekule BSA na 36. Celý výzkum fyzikálních interakcí byl prováděn nepřímo pomocí HAAse, která rozkládá HA, ale je také schopna s ní v omezené míře ne vazebně interagovat a tím se inhibuje. Pokud musí o interakční místa na HA soutěžit s BSA, který se váže silněji, dostává se opět ve volné formě do roztoku a jeho enzymatické schopnosti se obnovují [4]. Celý výzkum byl realizován pomocí měření turbidity a dynamického rozptylu světla.

Studie autorů *Hélène Lenormand a spol.* [23] poukazuje na existenci nespecifických ne vazebných interakcí mezi HAase a HA v širokém rozpětí pH (3 až 10). Při koncentraci HA 1 g.l⁻¹ a teplotě 6°C byly zjištěny dvě interagující formy komplexů. Při pH v rozmezí 3 až 5 vznikají méně rozpustné komplexy, které sedimentují. Při pH v rozmezí 5 až 10 pak vznikají velmi rozpustné komplexy. Největší sedimentace je dosaženo při pH v rozmezí 5 až 6, kdy je na jednu molekulu HAase navázáno 23 - 71 dikarboxylových skupin HA v závislosti na pH.

2.4. Použité měřicí metody

2.4.1. Viskozimetrie

Viskozimetrie je instrumentální metoda zabývající se měřením viskozity tekutin, respektive ve velké většině kapalin, protože viskozita plynů je o několik řádů nižší než u kapalin a ve většině aplikací zanedbatelná. Základní měrnou veličinou ve viskozimetrii je viskozita – jedna ze základních charakteristik kapalného skupenství hmoty.

Viskozita udává vztah mezi tečným napětím τ a smykovou rychlostí kapaliny $\dot{\gamma}$:

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \text{ [Pa} \cdot \text{s]} \quad (2)$$

Zjednodušeně odpor kapaliny vůči pohybu (toku) a je projevem jistého vnitřního tření kapaliny. Čím vyšší má kapalina viskozitu, tím hůře teče. Viskozita je dále závislá také na teplotě [24].

V praxi se setkáváme se dvěma druhy viskozity, dynamickou (η) a kinematickou (ν). Jejich vzájemný stav vystihuje rovnice:

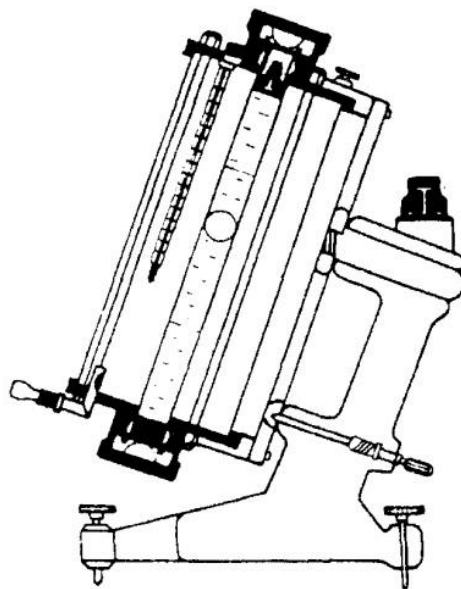
$$\nu = \frac{\eta}{\rho} \text{ [m}^2 \cdot \text{s}^{-1}] \quad (3)$$

kde ρ je hustota dané kapaliny.

Kinematická viskozita v sobě zahrnuje i vliv gravitační síly na tok uvažované kapaliny a je tedy vhodnější v případech, kdy se viskozita měří v přístrojích, v nichž je pohyb kapaliny vyvolán gravitací (Ubbelohdeho viskozimetr). Jednotkou dynamické viskozity je Pa·s, jednotkou kinematické pak $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [24].

2.4.2.1. Pádové viskozimetry

Těmito typy viskozimetrů měříme dynamickou viskozitu. Patří sem Stokesův, či Höpplerův viskozimetr (Obrázek 5).



Obrázek 5: Höpplerův viskozimetr [24]

V termostatovaném plášti je umístěna průhledná trubice se studovanou kapalinou. V kapalině padá kulička a měří se čas potřebný k průchodu dráhy vyznačené dvěma ryskami na trubici. Přístroj je výrobcem kalibrován, viskozita kapaliny se poté vypočte z rovnice:

$$\eta = t(\rho_1 - \rho_2) \cdot K \text{ [Pa} \cdot \text{s]} \quad (4)$$

kde t je čas naměřený v sekundách, ρ_1 je hustota kuličky v $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$, ρ_2 je hustota kapaliny v $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ a K je konstanta kuličky udávaná výrobcem v $\text{mPa} \cdot \text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$.

Tato rovnice byla odvozena pro idealizovaný případ pádu jediné kulové částice v prostředí o viskozitě η . Předpokládá se, že na částici přitom působí pouze gravitační síla F_g , síla vztahová F_{vz} a odpor prostředí proti pohybu částice F_r . Poté, kdy se mezi uvedenými silami ustaví rovnováha, padá částice konstantní rychlostí v . Sílu odporu prostředí poté vyjadřujeme *Stokesovým zákonem*:

$$F_r = 6\pi\eta r v \text{ [N]} \quad (5)$$

kde r je poloměr kulové částice.

Viskozita je závislá na struktuře konkrétní kapaliny, ale obecně hlavně na teplotě. Závislost viskozity na teplotě se obvykle popisuje empirickou exponenciální závislostí:

$$\eta = A \cdot e^{E/RT} \text{ [Pa} \cdot \text{s]} \quad (6)$$

kde A a E jsou konstanty, R je univerzální plynová konstanta a T je teplota v Kelvinech.

2.4.2.2. Kapilární (výtokové) viskozimetry

Tyto viskozimetry patří k těm nejčastěji používaným. Měření je založeno na průtoku kapaliny kapilárou, kterého je dosaženo díky gravitaci. Měří se čas, za který proteče určitý objem kapaliny kapilárou. Průtok kapaliny kapilárou je popsán Hagen-Poiseuilleovým zákonem:

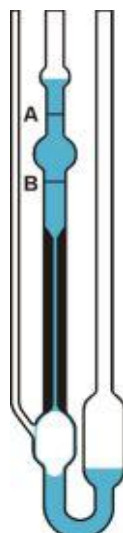
$$Q = \frac{\pi \cdot \Delta p \cdot R^4}{8 \cdot \eta \cdot L} \text{ [m}^3 \cdot \text{s}^{-1}] \quad (7)$$

z této rovnice je pak dynamická viskozita určena vztahem:

$$\eta = \frac{\pi \cdot \Delta p \cdot R^4}{8 \cdot V \cdot L \cdot T} \text{ [Pa} \cdot \text{s]} \quad (8)$$

kde R je průměr kapiláry a L její délka, Δp je rozdíl tlaků daný hydrostatickým tlakem kapaliny ve svislé kapiláře, který je úměrný hustotě kapaliny, V je objem kapaliny, který proteče kapilárou za čas τ . Viskozita je tedy úměrná hustotě kapaliny a době průtoku.

Kapilární viskozimetry jsou přesné (0,01 až 0,1 %), avšak nemohou být použity pro neneutonské kapaliny, neboť rychlostní gradient není konstantní – roste se vzdáleností od osy kapiláry. Tento druh viskozimetru se hodí pro měření viskozit velmi viskózních látek [25].



Obrázek 6: Ubbelohdeho viskozimetr [28]

2.4.2. Turbidimetrie

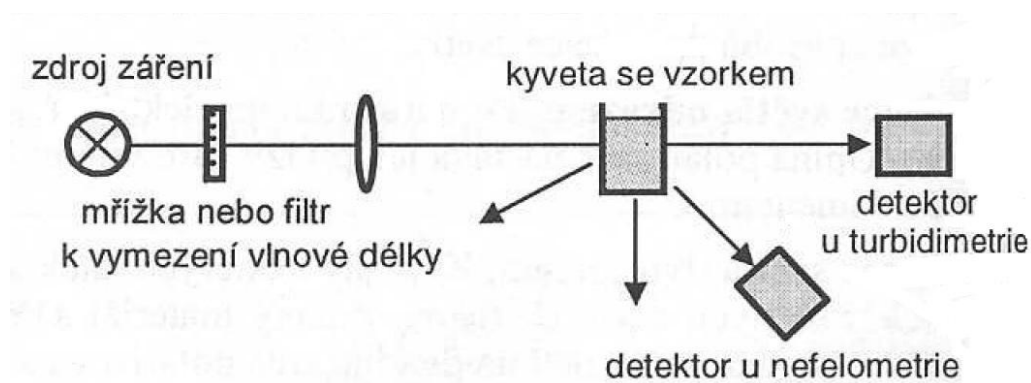
Turbidimetrie je metoda založená na měření stupně zákalu (turbidity). Na částicích dochází k rozptylu záření a částečně i jeho absorpci. Sleduje se pokles intenzity záření procházejícího absorbující a rozptylující vrstvou. Prošlé záření má tedy vždy nižší intenzitu než záření dopadající (světelný zdroj). Výrazný je vliv teploty, která ovlivňuje tvorbu i velikost částic [29].

Měření se provádí v přímém směru, v ose světelného paprsku zdroje jako u fotometrických postupů. Při turbidimetrických měřeních je obtížné připravit reprodukovatelně suspenzi měřené reakční směsi, aby byla dostatečně stálá.

Zvláště ve zředěných disperzích (roztocích) je přechod mezi absorpční fotometrií a turbidimetrií neostrý, a proto lze měřenou veličinu T (turbidance = absorbance) vyjádřit vztahem:

$$T = (\varepsilon + T_k) \cdot c \cdot L \quad [-] \quad (9)$$

kde ε je absorpční koeficient specifický pro každou látku, T_k je turbiditní koeficient, c je koncentrace a L je světelná dráha (tloušťka) měřicí kyvety [4].



Obrázek 7: Schéma nefelometru a turbidimetru [26]

2.4.3. Konduktometrie

Konduktometrie [26][27] je fyzikální a analytická metoda, která se zabývá měřením konduktivity (*měrné elektrické vodivosti*) roztoků elektrolytů a obecně látek v jakémkoli skupenství. Vodivost G je fyzikální veličina popisující schopnost zkoumané látky vést elektrický proud. Čím je hodnota G vyšší, tím je látka lepším vodičem. Z této charakteristiky pak vyplývá, že vodivost je nepřímo úměrná odporu, který naopak popisuje „neochotu“ tělesa vést elektrický proud:

$$G = \frac{1}{R} [\text{S}] \quad (10)$$

kde R je odpor tělesa. Dnes se jednotka elektrické vodivosti označuje jako siemens S a je převrácenou hodnotou ohmu, $S = \Omega^{-1}$, proto se dříve označovala jako *mho*, což je anagram slova ohm, a bývá v takovém případě někdy značen pomocí obráceného řeckého písmena Ω jako „ Ω “. Fyzikální rozměr vodivosti tedy je:

$$S = m^{-2} \cdot kg^{-1} \cdot s^3 \cdot A^2 \quad (11)$$

Vodivost v roztoku je měřena na dvou elektrodách, na které je přiváděno napětí U a měřen elektrický proud I .

$$G = \frac{I}{U} [\text{S}] \quad (12)$$

Velikost vodivosti je ovlivněna vlastnostmi vodiče – průřezem plochy kolmé na dráhu vedení proudu S , délkou mezi elektrodami l a konduktivitou κ .

$$G = \kappa \cdot \frac{S}{l} [\text{S}] \quad (13)$$

2.4.4. pH metrie

Pro přesná měření hodnot pH vodných roztoků se v současné době používá prakticky výlučně potenciometrie s využitím skleněné elektrody jako měrného členu. Podstatou uvedené metody je velmi přesné měření elektrického potenciálu mezi měrnou (*skleněnou*) a referenční elektrodou. Jako referenční elektrody lze v tomto případě využít prakticky každé elektrody II. druhu, tedy elektrody, jejichž potenciál zůstává konstantní při změně prostředí, v němž je ponořena. Nejčastěji se zde uplatňuje kalomelová nebo argentochloridová srovnávací elektroda [4].

Argentochloridová elektroda je složena ze stříbrného drátku potaženého vrstvou AgCl , který je ponořený do nasyceného roztoku KCl . Elektroda je obalena skleněným pláštěm, ve kterém se nachází membrána citlivá na koncentraci chloridových iontů v roztoku. Změnou aktivity vodíkových iontů dojde ke změně elektrochemického potenciálu dle Nernstovy rovnice:

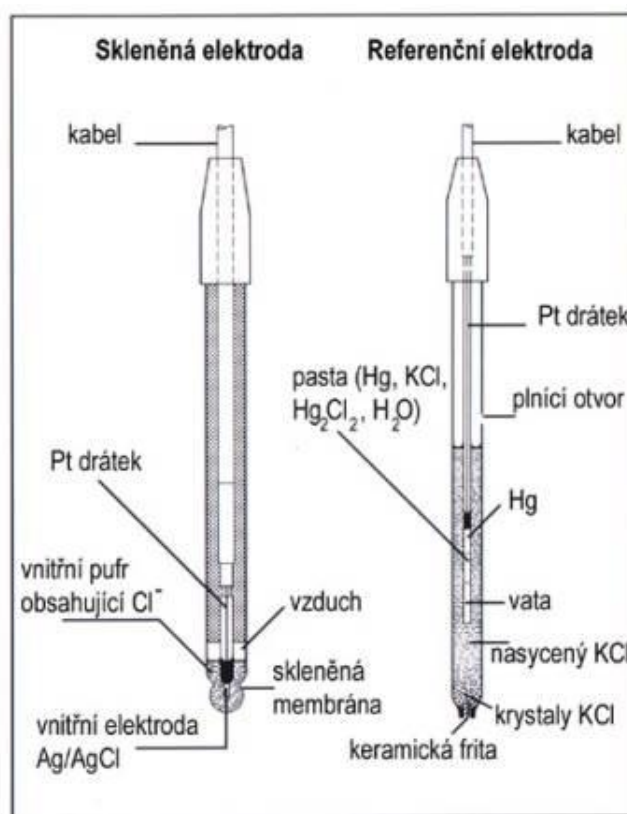
$$E_{(\text{AgCl}/\text{Ag})} = E_{(\text{Ag}^+/\text{Ag})}^0 - \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln a_{\text{Cl}^-} [\text{V}] \quad (14)$$

kde $E_{(\text{AgCl}/\text{Ag})}$ je potenciál argentochloridové elektrody, $E_{(\text{Ag}^+/\text{Ag})}^0$ je standardní elektrodový potenciál ustanovený mezi stříbrným drátkem a roztokem KCl , R je univerzální plynová konstanta ($R = 8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$), T je termodynamická teplota roztoku $[\text{K}]$, F je Faradayova konstanta ($F = 9,648 \cdot 10^4 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$), a a_{Cl^-} je aktivita chloridových aniontů [26].

Skleněná elektroda je tvořena křemičitanovou krystalovou mřížkou skla, na kterou se vážou elektrostatickými silami ionty vodíku a alkalických kovů. Při styku s roztokem se na povrchu vytváří solvatovaná vrstva, kde dochází k výměně vodíkových iontů mezi roztokem a sklem. Membránový potenciál skleněné elektrody vzniká jako rozdíl potenciálů na vnější a vnitřní stěně skleněné membrány. Potenciál této elektrody závisí na poměru aktivit vodíkových iontů na obou stranách membrány dle Nicolsky-Eisenmanovy rovnice:

$$E = K + \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{a_{H^+}}{a_{H^+ (inner)}} \quad [V] \quad (15)$$

kde E je potenciál skleněné elektrody, K je standardní potenciál zahrnující v sobě druh a složení skla, způsob přípravy elektrody, kvalitu povrchu a vnitřní náplň elektrody, R je univerzální plynová konstanta ($R = 8,314 \text{ 41 J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$), T je termodynamická teplota roztoku [K], F je Faradayova konstanta ($F = 9,648 \cdot 10^4 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$), a $\frac{a_{H^+}}{a_{H^+ (inner)}}$ je poměr aktivit vodíkových iontů na obou stranách membrány [27].



Obrázek 8: Skleněná a kalomelová elektroda pro měření pH [31]

2.4.5. Reologie

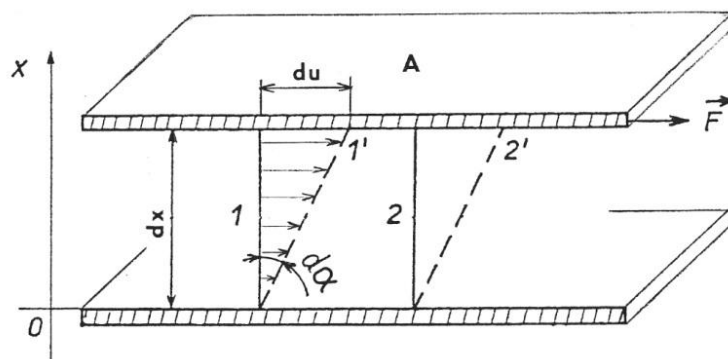
Reologie byla založena Eugenem C. Binghamem a Markusem Reinerem v roce 1929. Tento vědní obor se zabývá studiem vnitřní reakce látek (pevných i tekutých) na působení vnějších sil resp. jejich deformovatelností a tokovými vlastnostmi. Zjednodušeně řečeno, reologie je nauka o toku. Tok označujeme také pojmem viskózní deformace. Působením vnější síly se deformace stále zvětšuje, přičemž rychlost zvětšování této deformace je úměrná působící síle [4].

Matematickým vyjádřením tokových vlastností kapalin jsou reologické stavové rovnice, které zpravidla vyjadřují vztah mezi deformačním smykovým (tečným) napětím τ a deformací tekutiny.

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \text{ [Pa} \cdot \text{s]} \quad (16)$$

$$\tau = \frac{F}{A} \text{ [Pa]} \quad (17)$$

Pro určení základních reologických parametrů se používá model s posuvnými deskami. Model se skládá z dolní nepohyblivé a horní pohyblivé desky. Vzdálenost obou desek h je konstantní. Vrchní deska o povrchu A [m²] se pohybuje vůči dolní desce rychlostí v [m.s⁻¹] pomocí síly F [N].

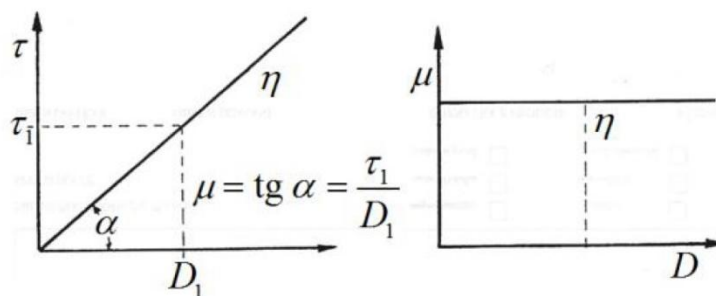


Obrázek 9: Model s posuvnými deskami [30]

2.4.5.1. Newtonské a nnewtonské kapaliny

Z reologického hlediska můžeme kapaliny rozdělit do dvou základních skupin podle jejich chování při působící deformační síle:

Newtonské kapaliny jsou látky, jejichž viskozita se při zvyšujícím se tečném napětí nemění a smyková rychlost je tedy lineárně závislá na tečném napětí [30].



Obrázek 10: Toková a viskózní křivka newtonských kapalin [30]

Platí pro ně klasický Newtonův zákon viskozity:

$$\eta = \frac{\tau}{\left(\frac{d\gamma}{dt}\right)} = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \text{ [Pa} \cdot \text{s]} \quad (18)$$

kde τ je tečné napětí a $\dot{\gamma}$ smyková rychlost kapaliny.

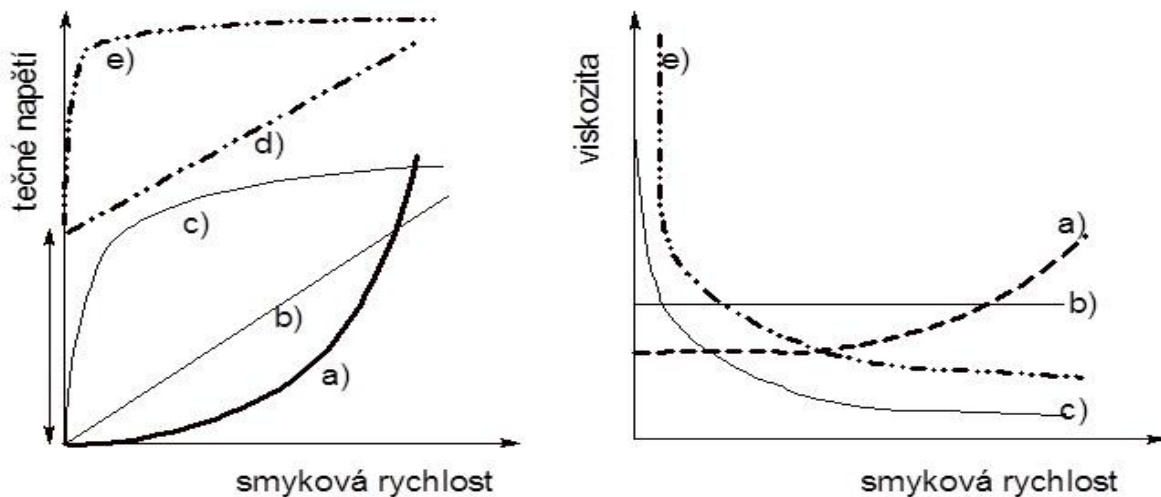
Vedle newtonských kapalin existují i kapaliny reologicky složitější, které se Newtonovým zákonem viskozity neřídí. Označují se jako *nenevtonské kapaliny* a jsou to například roztoky a taveniny polymerů, suspenze, různé pasty apod. platí pro ně analogicky s Newtonovým zákonem rovnice:

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \text{ [Pa]} \quad (19)$$

kde K , n jsou empirické látkové parametry charakterizující vlastnosti toku nenevtonské kapaliny a závisejí na teplotě. Parametr K je součinitel (koeficientem) konzistence a n je index toku ($n > 1$ pro pseudoplasticitu, $n = 1$ pro newtonské kapaliny, $n < 1$ pro dilatanci) [30].

Základní typy nenevtonských kapalin [28]:

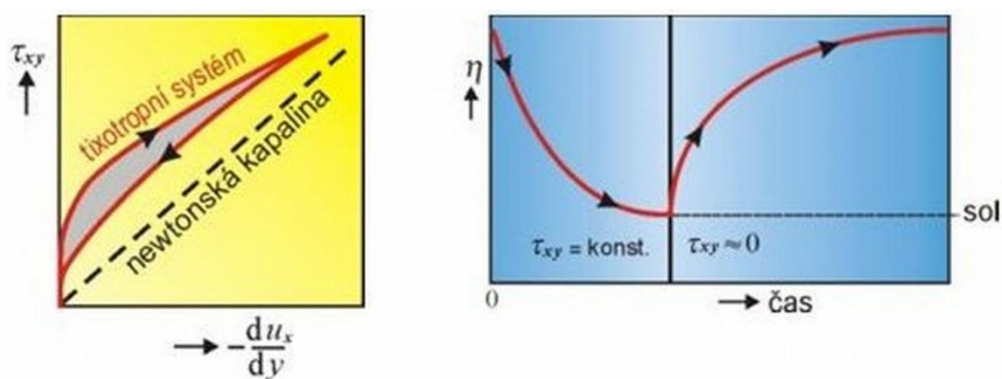
- a) *Pseudoplastické kapaliny*, jejichž zdánlivá viskozita se s rostoucím gradientem rychlosti zmenšuje. Jde např. o roztoky a taveniny polymerů, roztoky mýdel a detergentů, některé suspenze apod.
Z technického hlediska je pseudoplasticitu zpravidla vítanou vlastností poněvadž snižuje energetickou náročnost při míchání, toku kapalin potrubím apod.
- b) *Dilatantní kapaliny*, jejichž zdánlivá viskozita roste s rostoucím gradientem rychlosti. Toto chování bylo pozorováno ve velmi vysoce koncentrovaných suspenzích (např. v PVC plastisolech). Zpravidla nám toto chování komplikuje další technologické procesy, takže se dilatace potlačuje změnou složení.
- c) *Binghamské kapaliny*, tj. kapaliny s plastickou složkou deformace, u nichž dochází k toku až po překročení určitého prahového smykového napětí, tzv. meze toku. Patří sem např. koncentrované průmyslové a odpadní (spláskové) kaly, kašovitě suspenze křídly a vápna aj.



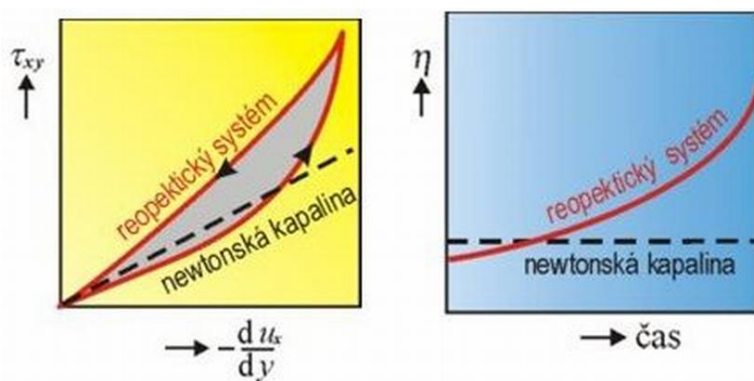
Obrázek 11: Tokové a viskozitní charakteristiky některých kapalin (a - dilatantní, b - newtonská, c - pseudoplastická, d - Binghamská, e - plastická) [30]

Existují také kapaliny s časově závislou složkou deformace, které mění zdánlivou viskozitu s dobou působení napětí. Jejich tokové křivky jsou hysteretzní, průběh při zvyšování napětí se liší od průběhu při jeho snižování. Rozlišují se dva základní typy [28]:

- Látky tixotropní*, u nichž zdánlivá viskozita klesá s prodlužující se dobou působení napětí. Jedná se např. o nátěrové hmoty.
- Látky reopektické*, jejichž zdánlivá viskozita během smykového namáhání s časem roste. S tímto chováním se oproti tixotropii setkáváme velmi zřídka (např. u suspenzí bentonitu).



Obrázek 12: Toková křivka a časový průběh viskozity u tixotropního systému [28]



Obrázek 13: Toková křivka a časový průběh viskozity u reopektického systému [28]

Anomálie viskozity mohou být velmi různorodé a v praxi se můžeme setkat i s různými kombinacemi chování viskózního s elastickým (kapaliny viskoelastické nebo elastoviskózní). Do této skupiny kapalin se řadí např. velmi koncentrované suspenze a velmi koncentrované roztoky makromolekul [30].

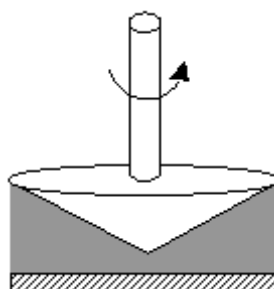
2.4.5.2. Měřicí systémy

Zde jsou popsány základní měřicí systémy, které byly použity při experimentálním měření pro tuto bakalářskou práci.

a) Systém kužel – deska

Tato geometrie se používá pro měření kapalin o nízkých a středně vysokých viskozitách. Skládá se ze spodní (nepohyblivé) části v podobě rovné desky a vrchní (pohyblivé) části v podobě pohyblivého kužele, kdy obvyklý úhel kužele je od 0,5 do 4°.

Velkou výhodou tohoto systému je velice jednoduché dávkování vzorku, nízká spotřeba vzorku. Mezi nevýhody patří nepřesná analýza kapalin s nízkou viskozitou, neboť při vyšších smykových rychlostech dochází k odtržení kapaliny a až k vystříknutí kapaliny mimo reometr. Další nevýhodou je, že vzorek může začít při delších měřeních vysychat, protože se může rozpouštět po delší době a při vyšších teplotách odpařovat. Tomuto problému se dá zabránit nanesením tenké vrstvy silikonového oleje, který po nanesení vytváří tenký film, který zabraňuje odpařování těkavější kapaliny z roztoku.

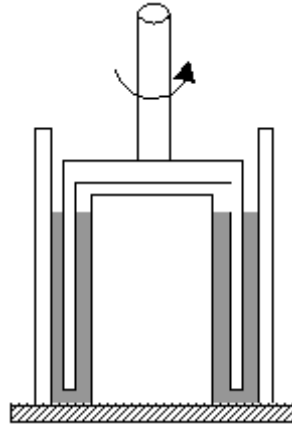


Obrázek 14: Systém kužel – deska [4]

b) Systém sousých dvojbálců

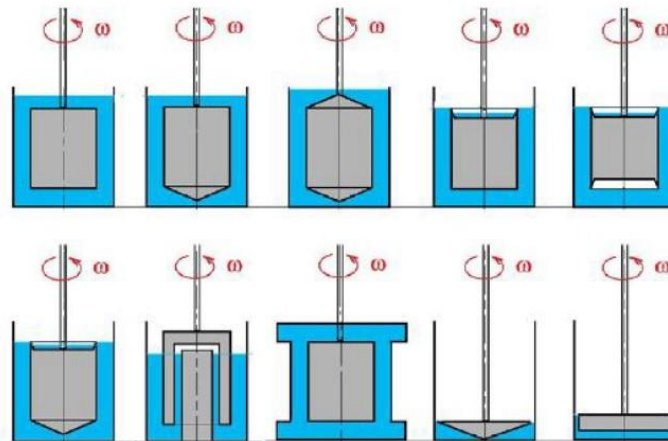
Jde o speciální variantu koaxiálních dvojbálců (*double gap concentric cylinders*), ve kterém jsou oba válce duté a zasouvají se do sebe, a tak je kapalina měřena ve dvou mezerách zároveň. Používá se hlavně pro měření velmi málo viskózních vzorků.

Velkou nevýhodou tohoto systému je vyšší spotřeba vzorku na jedno měření a jeho pracné čištění – geometrie se musí celá rozebrat a vymýt.



Obrázek 15: Systém sousých dvojbálců [4]

Další typy měřících systému pak můžeme vidět na dalším obrázku (Obrázek 16):



Obrázek 16: Přehled jiných měřících systémů [30]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Použité chemikálie a přístroje

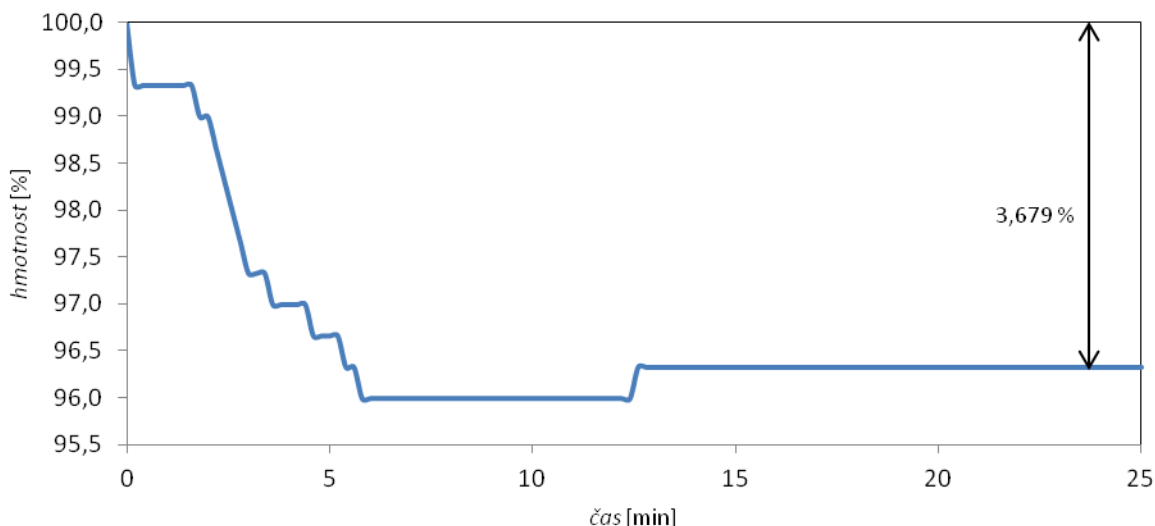
- kyselina citrónová p.a., Penta
- monohydrogenfosforečnanu disodného p.a., Penta
- kyselina hyaluronová 90 – 130 kg·mol⁻¹, Contipro Pharma, a.s.
- kyselina hyaluronová 1 500 – 1 750 kg·mol⁻¹, Contipro Pharma, a.s.
- albumin from bovine serum, SIGMA-ALDRICH
- Milli-Q voda

- pH-metr SevenMulti (Mettler Toledo)
- analytické váhy (Denver Instrument)
- sušárna Venticell (BMT, a.s.)
- vlhkostní analyzátor IR 35 (Denver Instrument)
- magnetická míchačka MIX 15 eco
- automatický viskozimetr AMVn a hustoměr DMA 4500 (AntonPaar)
- reometr AR – G2 (TA Instruments)
- UV-VIS spektrofotometr HITACHI
- automatický titrátör TITRONIC universal (SCHOTT Instruments)

3.2. Příprava vzorků

Všechny roztoky byly připravovány v Milli-Q vodě. Nejprve byly připraveny roztoky kyseliny citrónové a monohydrogenfosforečnanu disodného pro pozdější přípravu citráto-fosfátového pufru o pH přibližně 4. Na analytických vahách bylo naváženo potřebné množství kyseliny citrónové (pro výslednou koncentraci roztoku 0,05 M) a monohydrogenfosforečnanu disodného (koncentrace 0,1 M). Navážky byly kvantitativně převedeny do odměrných baněk, doplněny Milli-Q vodou po rysku, bylo vhozeno magnetické míchadlo a poté byly roztoky míchány minimálně hodinu na magnetické míchačce. Poté následovala příprava citráto-fosfátového pufru. Nejprve však musel být pH-metr nakalibrován dle postupu předepsaného od výrobce. Pro kalibraci byly použity standardní kalibrační pufrы od firmy Mettler Toledo o pH 2,00; 4,01 a 7,00. Pufr byl poté připravován přidáváním monohydrogenfosforečnanu disodného do kyseliny citrónové, která byla umístěna na magnetické míchačce a neustále bylo sledováno pH výsledného pufru. Pokud se naměřené pH ustálilo po dobu dvou minut na hodnotě $4,00 \pm 0,05$, byla tato hodnota brána jako konečná. Dále byly připraveny zásobní roztoky kyseliny hyaluronové ($4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) a albuminu ($2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$).

Suchý práškový hyaluronan byl před jakoukoli manipulací ponechán 25 minut při 90°C v sušárně, aby se z něj odstranila přebytečná vlhkost. Průběh sušení na sušících vahách a procentuální změnu hmotnosti můžeme pozorovat na grafu (Obrázek 17). Jak je z grafu patrné, klesla hmotnost hyaluronanu při sušení o 3,679 %.



Obrázek 17: Průběh sušení suchého práškového hyaluronanu na sušících vahách při 90 °C

Do předem zvážených váženek bylo na analytických vahách naváženo potřebné množství obou biopolymerů. Navážky byly poté po částech převedeny do zásobních lahví, do předem vypočítaného objemu pufru. To probíhalo tak, že se do zásobních lahví napipetovala část pufru a následně byla převedena část navážky. Opět byl přidán určitý objem pufru a část navážky. To se stále opakovalo až do přidání téměř veškeré navážky. Vrstvení se provádělo i proto, aby nevznikaly shluky biopolymerů, které se poté velice obtížně rozpouštěly. Po celou dobu byly roztoky míchány na magnetických míchačkách a dále ještě míchány 24 hodin, aby došlo k úplnému zhomogenizování. Až bylo do zásobní lahve převedeno veškeré množství biopolymeru, byla váženka opět zvážena na analytických vahách. Z důvodu výpočtu přesného objemu pufru, ve kterém bylo třeba biopolymer rozpustit, tzn., aby bylo dosaženo přesné koncentrace zásobních roztoků obou biopolymerů.

Jakmile bylo míchání ukončeno, zásobní roztoky byly ihned použity k přípravě výsledných roztoků, nebo byly uchovány v ledničce, aby nedošlo k degradačním procesům.

Výsledné roztoky pak byly připravovány do 50 ml Erlenmeyerových baněk smícháním určitých (předem vypočítaných) objemů BSA, HA a pufru (*Tabulka 1*). Dále byly ještě připravovány roztoky referenční (bez přídavku BSA) pro porovnání (*Tabulka 2*).

Tabulka 1: Příprava směsných roztoků

koncentrace HA [g/l]	BSA v pufru 2 g·l⁻¹ [ml]	HA v pufru 4 g·l⁻¹ [ml]	pufr o pH 4 [ml]
0,0	15	-	15,000
0,1	15	0,375	14,625
0,3	15	1,125	13,875
0,7	15	2,625	12,375
1,0	15	3,750	11,250
2,0	15	7,500	7,500

Tabulka 2: Příprava referenčních roztoků HA

koncentrace HA [g/l]	HA v pufru 2 g·l⁻¹ [ml]	pufr o pH 4 [ml]
0,1	1,0	19,0
0,3	3,0	17,0
0,7	7,0	13,0
1,0	7,5	7,5
2,0	15,0	-

3.3. Měření viskozity pomocí mikroviskozimetru AMVn

Pro proměření viskozity na mikroviskozimetru AMVn od firmy AntonPaar bylo nutné vzorky nejdříve přefiltrovat přes stříkačkový filtr o velikosti pórů 0,45 μm. Před započítáním proměrování samotných vzorků bylo nutné přístroj nakalibrovat na Milli-Q vodu. Poté byly vzorky vyklepáním zbaveny bublinek vzduchu a byla proměřena jejich hustota a přesná teplota. Ty byly poté zadány do nastavení pro proměření viskozity.

Do kapiláry byla opatrně vložena kulička, nadávkován vzorek přes stříkačku, kapilára se uzavřela, utěsnila a následně byla vložena do přístroje. Poté bylo nutné nastavit měřicí podmínky (hustota kapaliny, měřicí teplota, úhel naklonění kapiláry, použitý typ kapiláry a kuličky).

Pro roztoky nízkomolekulové HA byla použita kapilára s rozsahem měření 0,3 – 10 mPa·s a pro roztoky vysokomolekulové HA, která vykazovala viditelně vyšší viskozitu, byla použita kapilára s rozsahem měření 2,5 – 70 mPa·s.

Po ukončení měření přístroj vyhodnotil hodnotu dynamické viskozity [mPa·s], čas průchodu kuličky kapilárou [s] a variační koeficient [%]. Všechny tyto naměřené hodnoty byly sledovány při dvou úhlech naklonění kapiláry, a to 50° a 70°. Následně byly zpracovány a vyhodnoceny pomocí programu Microsoft Excel (Microsoft).

Byla sledována závislost relativní viskozity směsného roztoku na koncentraci HA. Relativní viskozita pak byla vypočítána jako poměr:

$$\eta_{rel} = \frac{\eta(\text{HA+BSA})}{\eta(\text{HA})} [-] \quad (20)$$

kde $\eta(\text{HA+BSA})$ je dynamická viskozita směsného roztoku o určité koncentraci a $\eta(\text{HA})$ je dynamická viskozita referenčního roztoku HA o totožné koncentraci.

3.4. Měření turbidity a solubilizace

Měření zákalu směsných roztoků bylo prováděno na spektrofotometru od firmy HITACHI. Měřilo se v křemenných kyvetách (optická délka kyvety byla 1 cm) při vlnových délkách od 250 nm do 700 nm při rychlosti skenování 300 nm/min.

Pro měření turbidity bylo odebráno 5 ml vzorku a převedeno do odstředovacích zkumavek. Vzorky byly poté 25 minut odstředovány při 4 000 ot/min a po odstředění byl supernatant proměřen na přístroji HITACHI. Jako „baseline“ byl použit roztok pufru.

Pro měření solubilizace bylo do malých vialek napipetováno 200 μ l 2 mM Sudanu III v acetonu. Aceton byl poté odpařen ponecháním vialek při zapnutém odtahu, aby vznikl tenký film barviva. Poté bylo přidáno 5 ml vzorku a vialky byly umístěny při laboratorní teplotě na 24 hodin do třepačky. Poté byly vzorky opět převedeny do odstředovacích zkumavek a 25 minut odstředovány při 4 000 ot/min. Poté byl supernatant proměřen na přístroji HITACHI a jako „baseline“ byl použit opět roztok pufru.

Pro vyhodnocení turbidity a solubilizace byl použit program Microsoft Excel (Microsoft). Při vyhodnocování tohoto měření bylo sledováno několik hodnot absorbance:

- maximální hodnota v rozmezí vlnových délek 260 – 290 nm, která odpovídá absorbanci maxima albuminu. Od naměřené hodnoty byla ještě poté odečtena hodnota absorbance při 400 nm, kdy již albumin neabsorbuje, aby byl eliminován vliv turbidity.
- hodnota při vlnové délce 400 nm, kdy už albumin neabsorbuje
- maximální hodnota v rozmezí vlnových délek 500 - 550 nm, kdy dosahuje svého maxima Sudan III, abychom zjistili, jaké množství barviva se nasolubilizovalo. Od naměřené hodnoty byla ještě poté odečtena hodnota turbidity při stejné vlnové délce, jako byla vlnová délka pro maximum Sudanu III, aby byla výsledná hodnota co nej přesnější.

Naměřené hodnoty absorbancí byly poté vynášeny do grafů v závislosti na koncentraci jednotlivých roztoků.

3.5. Měření konduktivity a pH

Na začátku celého měření musel být pH metr nakalibrován dle postupu předepsaného od výrobce. Pro kalibraci byly použity standardní kalibrační pufrы od firmy Mettler Toledo o pH 2,00; 4,01 a 7,00. Dále byla provedena také kalibrace vodivostní elektrody, aby bylo měření co nej přesnější. Pro kalibraci byl použit kalibrační roztok standardu o známé vodivosti ($1413 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) od firmy Metrohm AG.

Pro proměření konduktivity a pH byl připraven zásobní roztok BSA v pufru o koncentraci $60 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, který byl poté titrován do:

- 50 ml pufru o přibližném pH = 4
- 50 ml roztoku nízkomolekulové HA v pufru ($1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$)
- 50 ml roztoku vysokomolekulové HA v pufru ($1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$)

Do kádinky, ve které bylo 50 ml jednoho z výše zmíněných roztoků, byly ponořeny elektrody na měření vodivosti a pH tak, aby se nedotýkaly a byly zcela ponořeny.

Bylo přidáváno celkem 10 ml roztoku BSA v pufru - 50 μl roztoku po 60 s, tomu odpovídá 200 přidavků a celková doba titrace byla přibližně 200 minut. Roztok byl v průběhu celého měření neustále míchán na magnetické míchače.

Pro vyhodnocení titrací byl použit program SevenMulti (Mettler Toledo Analytical) a Microsoft Excel (Microsoft).

3.6. Měření reologických vlastností pomocí reometru AR – G2

Reologické měření bylo použito z důvodu přesnějšího zjištění viskozit jednotlivých vzorků. Pro vyhodnocení naměřených dat byly použity programy TA Data Analysis (TA Instruments) a Microsoft Excel (Microsoft). Jednotlivé vzorky byly měřeny na dvou geometrických systémech:

- *kužel – deska* (průměr 60 mm, úhel zkosení 1°), u roztoků s vyšší viskozitou (většinou neneutonské chování) - *Obrázek 14*
- *systém souosých dvojeválců* (double gap concentric cylinders), u roztoků s nižšími hodnotami viskozity (newtonské chování) - *Obrázek 15*

Výsledné směsné roztoky HA a BSA, které byly namíchány podle tabulky (*Tabulka 1*), byly ponechány minimálně 1 hodinu při laboratorní teplotě, aby došlo k jejich teplotě na laboratorní teplotu. Mezitím byl přístroj nakalibrován a připraven pro první měření – nastavení nulové polohy, nastavení měřicí polohy, atd. dle návodu od výrobce. Poté byl do přístroje nadávkován pomocí automatické pipety příslušný objem vzorku a bylo spuštěno měření.

Tentýž postup byl použit i pro referenční roztoky HA (*Tabulka 2*).

Tabulka 3: Použití měřicích geometrií u jednotlivých roztoků (SSD = systém souosých dvojuválnů)

koncentrace HA [g/l]	Použitá geometrie			
	Nízkomolekulová HA (90 – 130 kDa)		Vysokomolekulová HA (1500 – 1750 kDa)	
	referenční roztoky	směsné roztoky	referenční roztoky	směsné roztoky
0,0	-		-	
0,1	SSD	SSD	SSD	SSD
0,3				
0,7				
1,0			kužel - deska	
2,0				

Na roztocích byly prováděny tokové testy. Ty se při měření na systému souosých dvojuválnů skládaly z kroků:

- *Conditioning Step*, kdy byl vzorek ponechán 5 minut v klidu, aby došlo k jeho vytemperování na 25 °C.
- *Continuous Ramp Step*, kdy byl zrychleně (za 5 minut) proměřen vzorek, aby byl zjištěn přibližný průběh následujícího měření. Byla nastavena smyková rychlost od 0,1 s⁻¹ do 1 000 s⁻¹.
- *Conditioning Step 1*, kdy byl vzorek ponechán 5 minut v klidu, aby došlo k jeho vytemperování na 25 °C.
- *Steady State Flow Step 1*, kdy byl samotný vzorek proměřován. Byla nastavena smyková rychlost od 0,1 s⁻¹ do 1 000 s⁻¹.
- *Conditioning Step 2*, kdy byl vzorek ponechán 10 minut v klidu. Tento krok je vkládán mezi dvě měření, aby došlo ke zrelaxování vzorku.
- *Steady State Flow Step 2*, kdy bylo nastaveno smykové napětí od 0,01 Pa do 5 Pa.

Takto byl nastaven test při použití měřicího systému souosých dvojuválnů, neboť při tomto měření dochází k větší spotřebě vzorku a čištění geometrie je časově náročnější. Při použití měřicího systému kužel – deska byly kroky pozměněny, neboť mohla být geometrie častěji čištěna a tím pádem mohla být zachována „čerstvost“ vzorku, který byl po každém měření vyměněn za nový. Jednotlivé kroky pro měření tedy byly:

- *Conditioning Step*, kdy byl vzorek ponechán 5 minut v klidu, aby došlo k jeho vytemperování na 25 °C.
- *Continuous Ramp Step*, kdy byl vzorek proměřen konstantním přírůstkem smykové rychlosti po dobu 5 minut. Šlo tedy o kratší test pro rychlé otestování tokového chování vzorku. Byla nastavena smyková rychlost od 0,1 s⁻¹ do 1 000 s⁻¹.

Vyčištění geometrie a výměna vzorku.

- *Conditioning Step*, kdy byl vzorek opět ponechán 5 minut v klidu, aby došlo k jeho vytemperování na 25 °C.
- *Steady State Flow Step*, kdy byl samotný vzorek proměřován. Byla nastavena smyková rychlost od 0,1 s⁻¹ do 1 000 s⁻¹.

Vyčištění geometrie, výměna vzorku a opětovný *Conditioning Step* a *Steady State Flow Step*.

Naměřená data byla u nízkomolekulové HA v intervalu 100 – 1 000 s⁻¹ proložena vhodným reologickým modelem, který nejpřesněji popisoval chování dané kapaliny (standardní chyba < 20). V tomto případě šlo o Newtonův model.

U vysokomolekulové HA musela být data nejdříve v intervalu 10 – 1 000 s⁻¹ proložena nejvhodnějším reologickým modelem (*Cross*). Poté byla pomocí programu TA Data Analysis zjištěna hodnota limitní viskozity při nekonečně malé smykové rychlosti (η_0) a hodnota viskozity při smykové rychlosti 200 s⁻¹ (η_{200}). Tento postup byl zvolen u směsných a také u referenčních roztoků kvůli měnícímu se chování (tokovým vlastnostem) vysokomolekulové HA.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

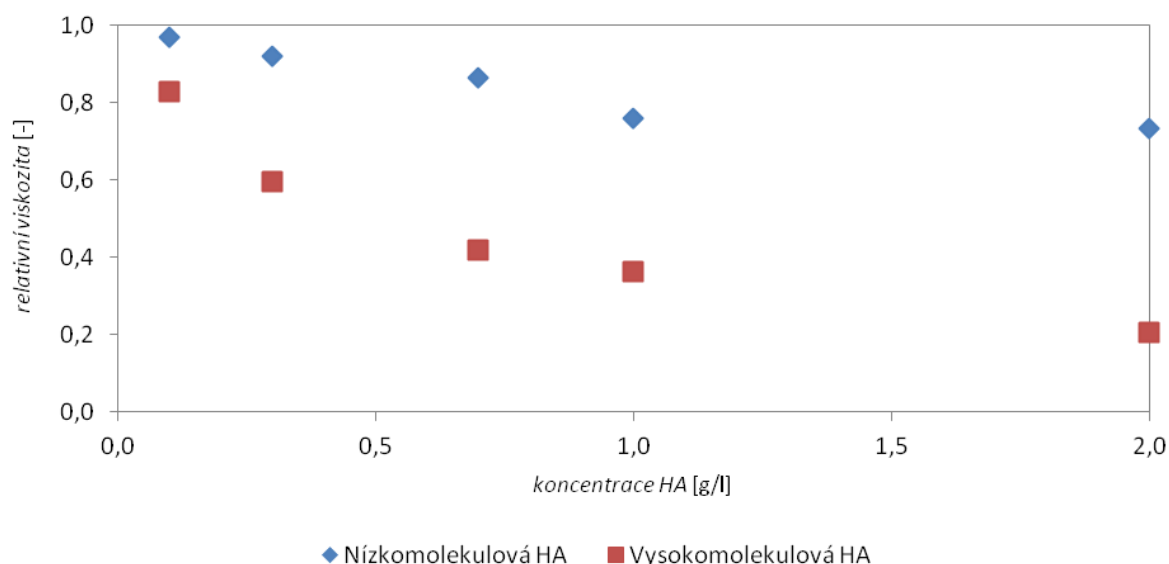
Tato část mé práce se zabývá vynesením jednotlivých výsledků měření do přehledných tabulek, grafů, doplněním o komentáře a diskusí k jednotlivým výsledkům.

4.1. Měření viskozity pomocí mikroviskozimetru AMVn

Dynamická viskozita byla na automatickém mikroviskozimetru AMVn měřena při dvou úhlech a to při 50° a 70°. Veškeré naměřené hodnoty byly zaznamenány do tabulky (*Tabulka 6*), ovšem do grafu byly vyneseny pouze hodnoty pro 50° naklonění, neboť hodnoty při 70° měly prakticky totožný trend (*Obrázek 29*).

Byla sledována závislost relativní viskozity směsného roztoku (20) na koncentraci kyseliny hyaluronové.

Z grafu (*Obrázek 18*) je viditelné, že směsné roztoky nízkomolekulové HA mají vyšší relativní viskozitu než směsné roztoky vysokomolekulové HA. Pokud bychom však porovnávali naměřené hodnoty dynamické viskozity, jednoznačně bychom mohli říci, že roztoky vysokomolekulové HA jsou více viskózní než roztoky nízkomolekulové HA. Tento fakt je viditelný z tabulky (*Tabulka 6*) a byl patrný již při pozorování směsných roztoků pouhým okem.

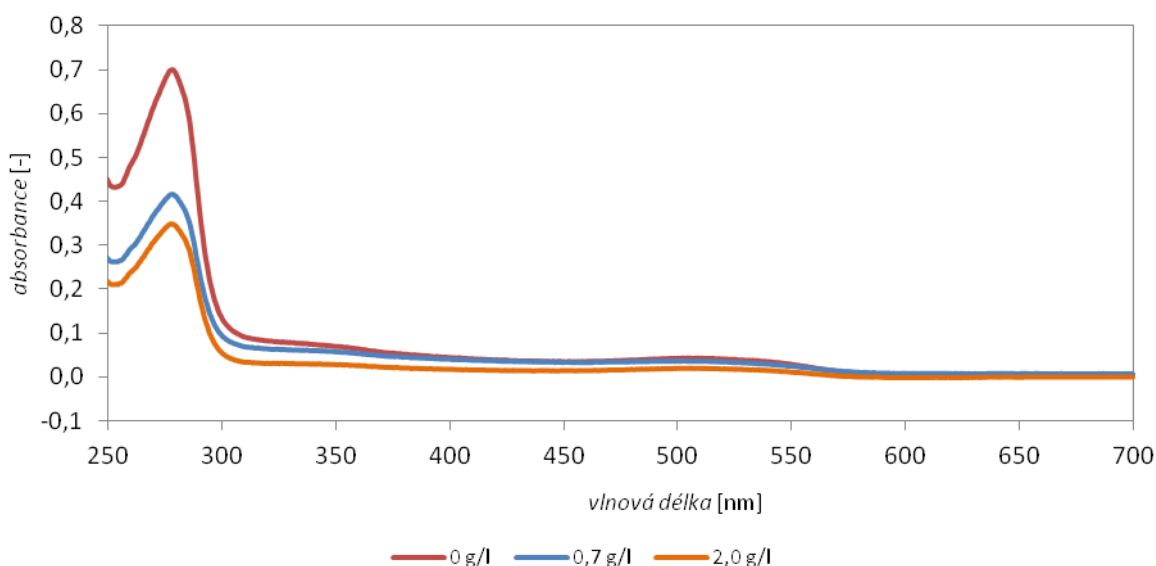


Obrázek 18: Závislost relativní viskozity směsného roztoku na koncentraci HA (měřeno viskozimetrem AMVn)

Z tohoto měření můžeme předpokládat, že bude docházet k interakcím mezi HA a BSA v rozsahu koncentrací od 0,1 až do 2,0 g·l⁻¹, neboť můžeme sledovat pokles relativní viskozity roztoku.

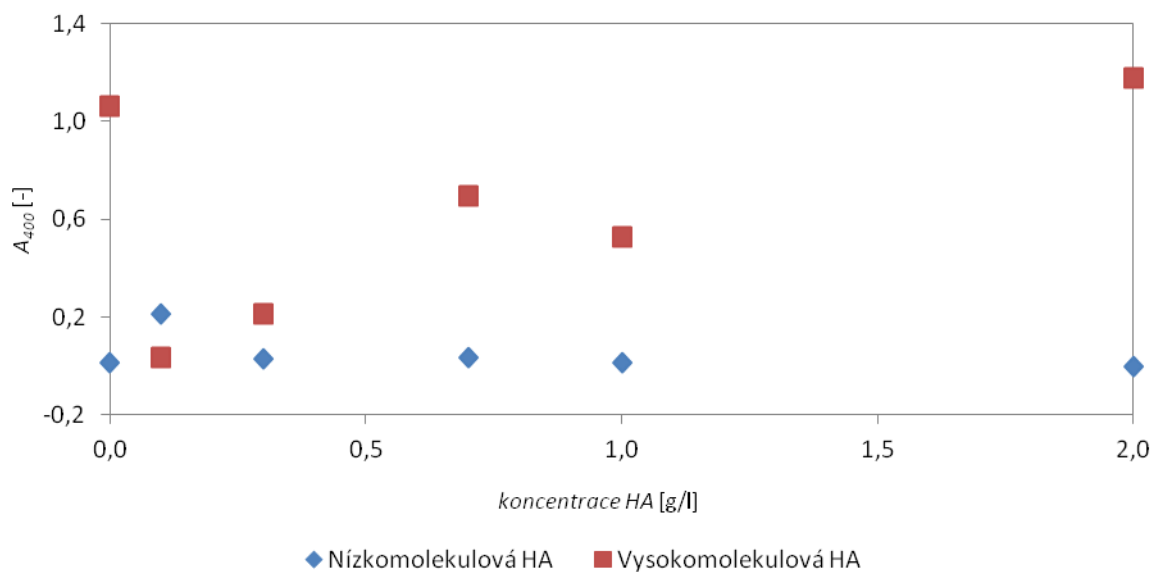
4.2. Měření turbidity a solubilizace

Všechny připravené směsné roztoky byly proměřeny na přístroji HITACHI a byly získány hodnoty absorbancí při vlnových délkách v intervalu 250 – 700 nm. Z naměřených hodnot byly sestaveny závislosti absorbance na vlnové délce - absorpční spektra (Obrázek 30, Obrázek 31). Do grafu závislosti absorbance roztoku na vlnové délce (Obrázek 19) byla pro přehlednost vynesena spektra pouze tří směsných roztoků nízkomolekulové HA (0, 0,7 a 2,0 g·l⁻¹). Z absorpčních spekter pro směsné roztoky nízkomolekulové HA je patrné, že absorbance přidavkem kyseliny hyaluronové klesá. Nejvyšších hodnot absorbance tím pádem dosahuje roztok albuminu. Pokud se ovšem zaměříme na absorpční spektra pro směsné roztoky vysokomolekulové HA (Obrázek 31), můžeme pozorovat odlišné chování. Na první pohled vidíme, že píky v rozsahu vlnových délek 260 – 290 nm (*v tomto rozmezí vlnových délek albumin absorbuje*), dosahují mnohem vyšších hodnot absorbance, avšak nejsou tak zřetelné jako u nízkomolekulové HA. Ovšem co je daleko zajímavější, že pro koncentrace 0,7 a 2,0 g·l⁻¹ vykazuje roztok vyšší hodnoty absorbance než pro roztok samotného BSA v pufru, což je zapříčiněno vysokou turbiditou, nebo co je pravděpodobnější - dochází k vytvoření komplexu HA-BSA, který má odlišné absorpční vlastnosti.



Obrázek 19: Závislost absorbance roztoku na vlnové délce (směsný roztok nízkomolekulové HA)

Z grafu závislosti absorbance roztoku při 400 nm na koncentraci HA (Obrázek 20) je viditelné, že hodnoty absorbancí pro směsné roztoky vysokomolekulové HA rostou se zvyšující se koncentrací HA. Je patrné, že směsné roztoky vysokomolekulové HA vykazují (až na koncentraci 0,1 g·l⁻¹) vyšší hodnoty absorbancí než směsné roztoky nízkomolekulové HA. To bylo nejspíš způsobeno zákalem, tudíž částicemi nerozpuštěnými v roztoku. Pokud tyto částice navíc při odstředování nedokonale sedimentovaly a nebyly tím pádem z roztoku odstraněny, mohou být příčinou vysoké turbidity.



Obrázek 20: Závislost absorpance roztoku při 400 nm na koncentraci HA

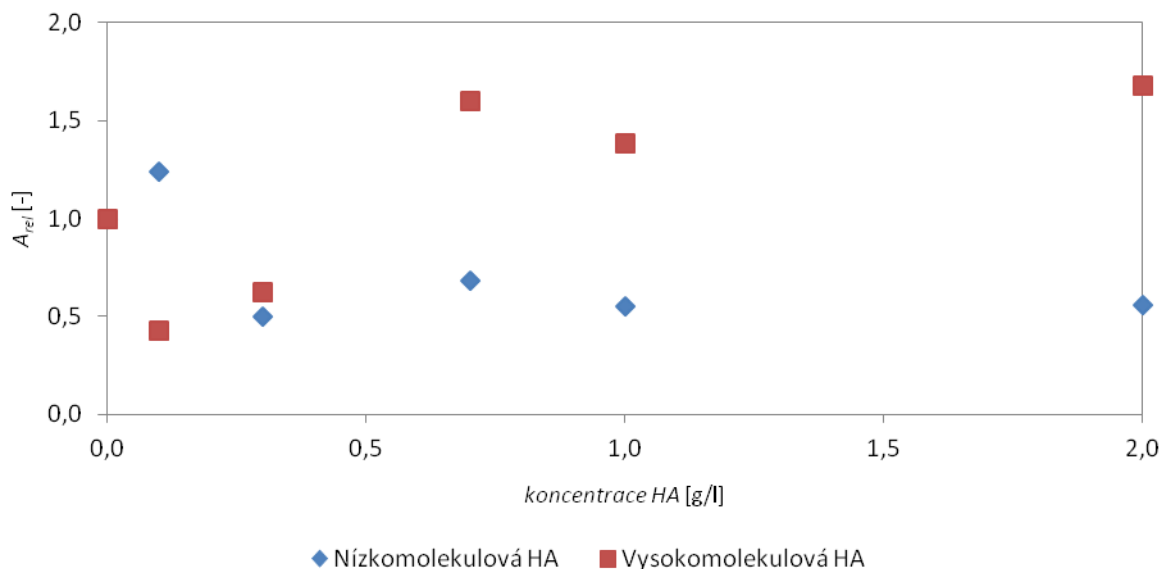
Dále byla sledována změna absorpance albuminu u směsných roztoků nízkomolekulové a vysokomolekulové HA v porovnání s roztokem bez kyseliny hyaluronové.

Z grafu závislosti relativní absorpance roztoku na koncentraci HA (Obrázek 21) je patrné, že u směsného roztoku nízkomolekulové HA při koncentraci $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ hodnota relativní absorpance nejdříve roste a poté klesá při koncentraci $0,3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ až k hodnotě 0,50. Při dalším zvyšování koncentrace směsného roztoku HA se již hodnota relativní absorpance nějak výrazně nemění.

Naopak u směsného roztoku vysokomolekulové HA hodnota relativní absorpance nejprve klesá při nižších koncentracích HA, což bylo pravděpodobně způsobeno vytvořením méně rozpustného komplexu HA a BSA, který byl při centrifugaci usazen a tím pádem i odstraněn z roztoku. Poté až na mírnou odchylku při koncentraci směsného roztoku $0,7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ hodnota relativní absorpance dále roste a pravděpodobně by rostla i při dalším zvyšování koncentrace proměřovaného roztoku.

Jako relativní absorpance je pak brána hodnota maximální absorpance směsného roztoku v rozsahu vlnových délek 260 - 290 nm, od které je odečtena hodnota absorpance směsného roztoku při 400 nm (odečet turbidity), v poměru s týmiž hodnotami, ale pro roztok bez přídavku kyseliny hyaluronové:

$$A_{rel} = \frac{A_{max}(BSA+HA) - A_{400}(BSA+HA)}{A_{max}(BSA) - A_{400}(BSA)} [-] \quad (21)$$



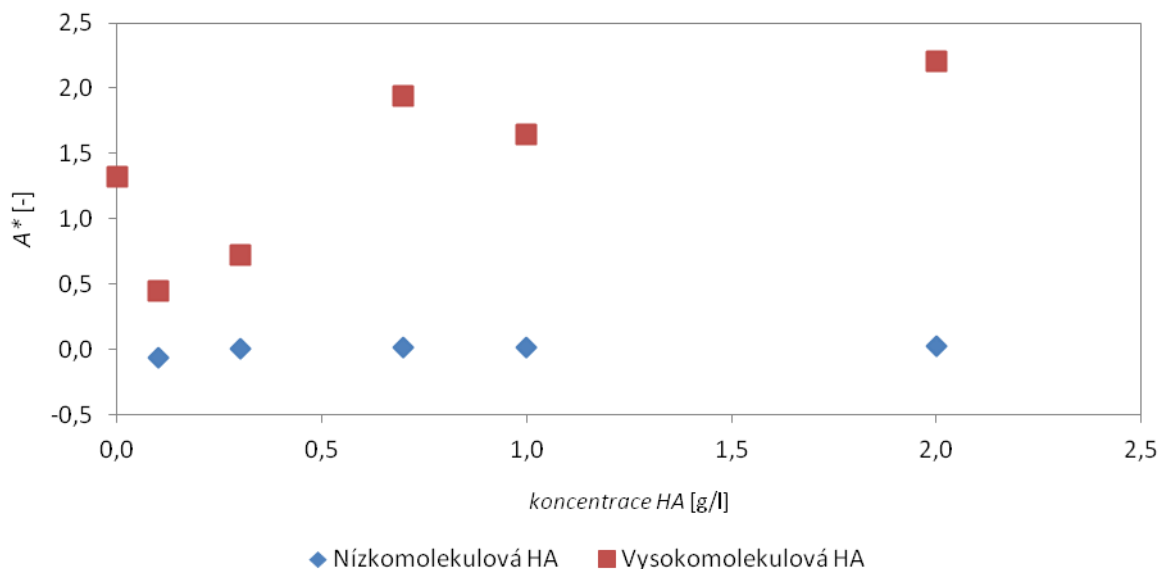
Obrázek 21: Závislost relativní absorbance roztoku v rozsahu vlnových délek 260 - 290 nm na koncentraci HA

Z vypočítaných hodnot relativní absorbance můžeme předpokládat, že k interakcím mezi HA a BSA dochází u směsných roztoků HA v celém proměřovaném rozsahu koncentrací, neboť u nich vidíme pokles, nebo naopak nárůst hodnoty relativní absorbance oproti roztoku albuminu bez přídavku kyseliny hyaluronové. Tato změna je způsobena tím, že pravděpodobně dochází k interakcím BSA s karboxylovými skupinami HA. Můžeme předpokládat, že se interakce budou vyskytovat až po překročení jisté kritické koncentrace, při které se HA a BSA nejvhodněji uspořádají v roztoku.

Z grafu pro měření solubilizace (Obrázek 22) lze usoudit, že se ve směsných roztocích o vyšší koncentraci kyseliny hyaluronové vytváří komplexy HA a BSA. Tyto komplexy mají ve své struktuře hydrofobní místa, kam se může barvivo Sudan III nasolubilizovat, protože se se zvyšující koncentrací HA v roztoku zvyšuje i solubilizace Sudanu III.

Směsné roztoky vysokomolekulové HA vykazují obecně vyšší hodnoty absorbance než směsné roztoky nízkomolekulové HA, proto byla u všech roztoků vždy od naměřené hodnoty maximální absorbance Sudanu III v rozmezí vlnových délek 500 - 550 nm poté ještě odečtena hodnota turbidity při stejné vlnové délce, jako byla vlnová délka pro maximum Sudanu III, aby se eliminoval vliv turbidity při solubilizaci barviva. Tato hodnota rozdílu absorbancí jednotlivých roztoků byla v grafu označena jako A^* .

Směsné roztoky nízkomolekulové HA vykazovaly viditelně nižší hodnoty pro hodnotu A^* . Z grafu je patrné, že se do komplexu HA a BSA prakticky žádné barvivo nenasolubilizovalo, nebo bylo z roztoku odstraněno při centrifugaci. To mohlo být příčinou záporných nebo prakticky nulových hodnot A^* . Takže jsme dospěli k závěru, že nízkomolekulová HA by nejspíš nebyla vhodným nosičem pro cílenou distribuci léčiva.



Obrázek 22: Závislost hodnoty rozdílu absorbancí A^* roztoku na koncentraci HA

Naměřená data byla pro přehlednost zaznamenána do tabulky (Tabulka 4). Byla měřena maximální hodnota absorpance v rozsahu vlnových délek 260 – 290 nm (A_{\max} BSA), hodnota absorpance, při které již albumin neabsorbuje (A_{400}) a maximální hodnota v rozmezí vlnových délek 500 - 550 nm, kdy dosahuje svého maxima Sudan III, abychom zjistili, jaké množství barviva se nasolubilizovalo (A_{\max} Sudan III). Měření byla provedena pro obě molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové.

Tabulka 4: Naměřené hodnoty absorbancí pro obě molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové

směsné roztoky HA (90 – 130 kDa) a BSA				
koncentrace HA [g·l ⁻¹]	A_{\max} BSA	A_{400}	A_{\max} Sudan III	λ pro A_{\max} Sudan III [nm]
0,0	0,616	0,046	0,044	506,0
0,1	0,961	0,085	0,063	502,9
0,3	0,333	0,031	0,024	503,9
0,7	0,424	0,040	0,036	504,0
1,0	0,344	0,023	0,024	504,9
2,0	0,333	0,019	0,021	507,1

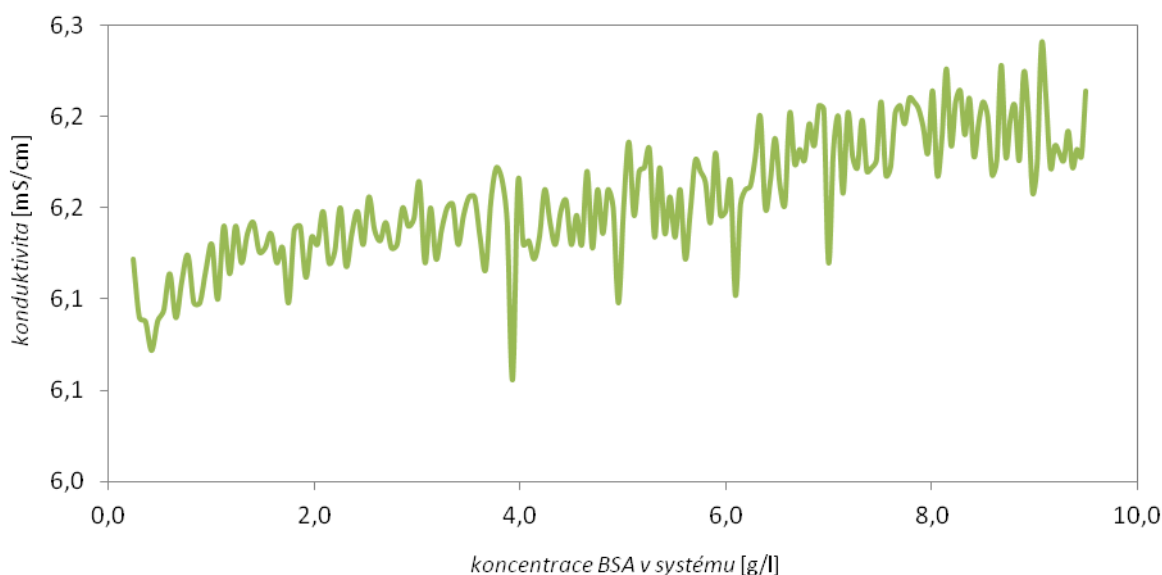
směsné roztoky HA (1 500 – 1750 kDa) a BSA				
koncentrace HA [g·l ⁻¹]	A_{\max} BSA	A_{400}	A_{\max} Sudan III	λ pro A_{\max} Sudan III [nm]
0,0	2,094	0,721	0,463	500,0
0,1	0,479	0,018	0,029	511,9
0,3	0,857	0,124	0,083	501,3
0,7	2,346	0,690	0,399	500,1
1,0	1,958	0,505	0,298	500,0
2,0	2,907	1,051	0,615	500,0

4.3. Měření konduktivity a pH

Všechny tři připravené roztoky byly titrovány roztokem BSA v pufru o koncentraci $60 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Byla sledována změna pH a vodivosti systému na koncentraci BSA v systému.

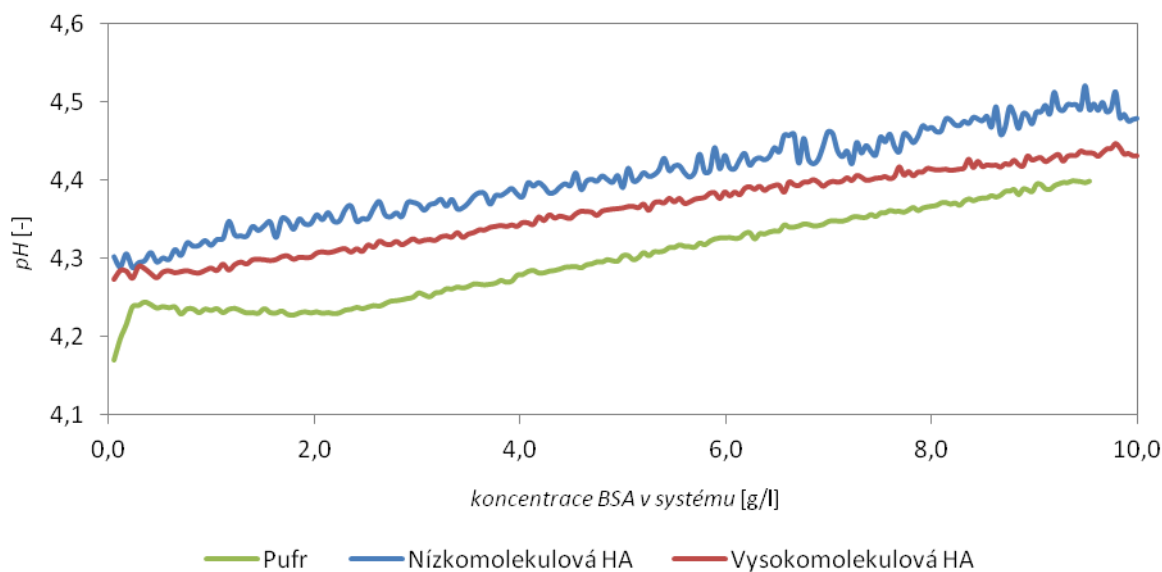
Závislost konduktivity na koncentraci BSA v systému (Obrázek 23) byla pro přehlednost vynesena pouze pro systém obsahující pufr. Z grafu je patrné, že vodivost systému po celou dobu měření mírně roste.

Pokud se ovšem zaměříme na graf závislosti konduktivity na koncentraci BSA v systému (Obrázek 33) pro systém obsahující nízkomolekulovou a vysokomolekulovou HA, nevidíme tak jednoznačný nárůst vodivosti. U systému, který obsahuje nízkomolekulovou HA, můžeme pozorovat spíše oscilaci okolo původní hodnoty. U systému, který obsahuje vysokomolekulovou HA, potom pozorujeme mírný nárůst vodivosti oproti systému s nízkomolekulovou HA. Můžeme tedy usuzovat, že přidavek BSA do roztoku HA mění vodivostní vlastnosti.



Obrázek 23: Závislost konduktivity systému obsahujícího pufru na koncentraci BSA v systému

Z grafu závislosti pH systému na koncentraci BSA v systému (Obrázek 24) je patrné, že pokud připravené roztoky titrujeme roztokem BSA v pufru o koncentraci $60 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, pH výsledného systému vždy roste. Nejvyšších hodnot pH pak dosahuje systém obsahující nízkomolekulovou HA. Můžeme tedy obecně říci, že v přítomnosti HA se pH systému zvyšuje a tím pádem musí v systému docházet k jistým interakcím.



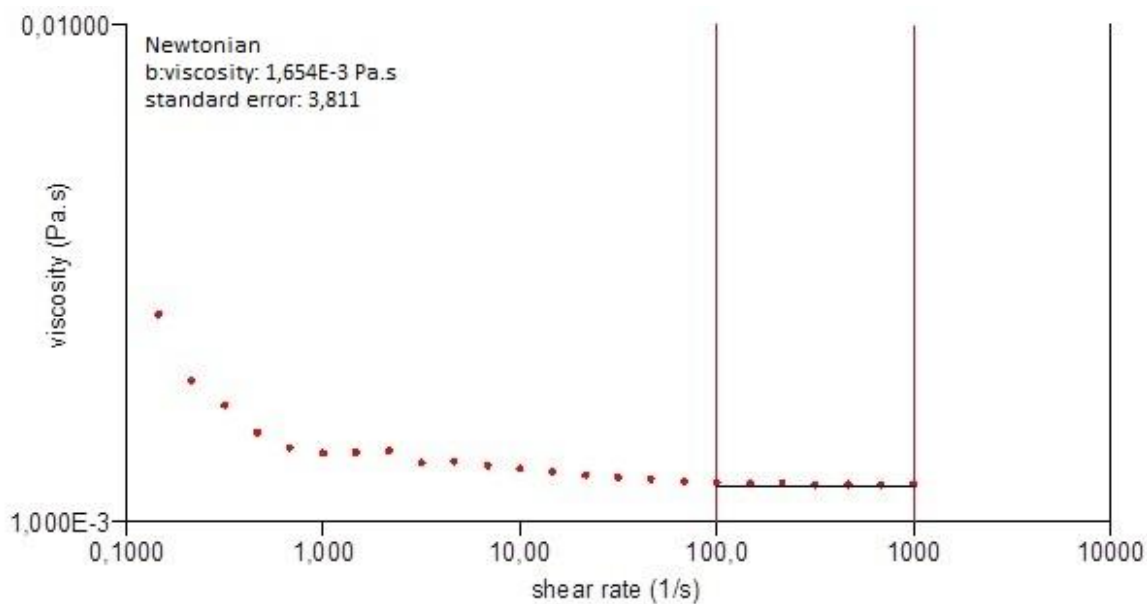
Obrázek 24: Závislost pH systému na koncentraci BSA v systému

4.4. Měření reologických vlastností pomocí reometru AR-G2

Roztoky připravené podle tabulek (*Tabulka 1 a Tabulka 2*) byly proměřeny na reometru AR-G2 a byly získány grafy závislosti dynamické viskozity η na smykové rychlosti $\dot{\gamma}$. Bylo zvoleno ohraničení v rozmezí $100 - 1000 \text{ s}^{-1}$ a v tomto rozsahu bylo měření proloženo vhodným reologickým modelem. Pomocí softwaru TA Data Analysis (TA Instruments) byly pro nízkomolekulovou HA vyhodnoceny hodnoty dynamické viskozity η a pro vysokomolekulovou HA hodnoty viskozity při smykové rychlosti 200 s^{-1} η_{200} a zaznamenány do tabulky (*Tabulka 5*).

Referenční i směsné roztoky **nízkomolekulové HA** vykazují newtonské vlastnosti (*platí pro ně Newtonův zákon (18)*) a proto byla jejich viskozita vyjádřena Newtonovým reologickým modelem.

Z grafu (*Obrázek 25*) je pak patrné, že se jejich dynamická viskozita při hodnotách nad 100 s^{-1} prakticky nemění se zvyšující se smykovou rychlostí.



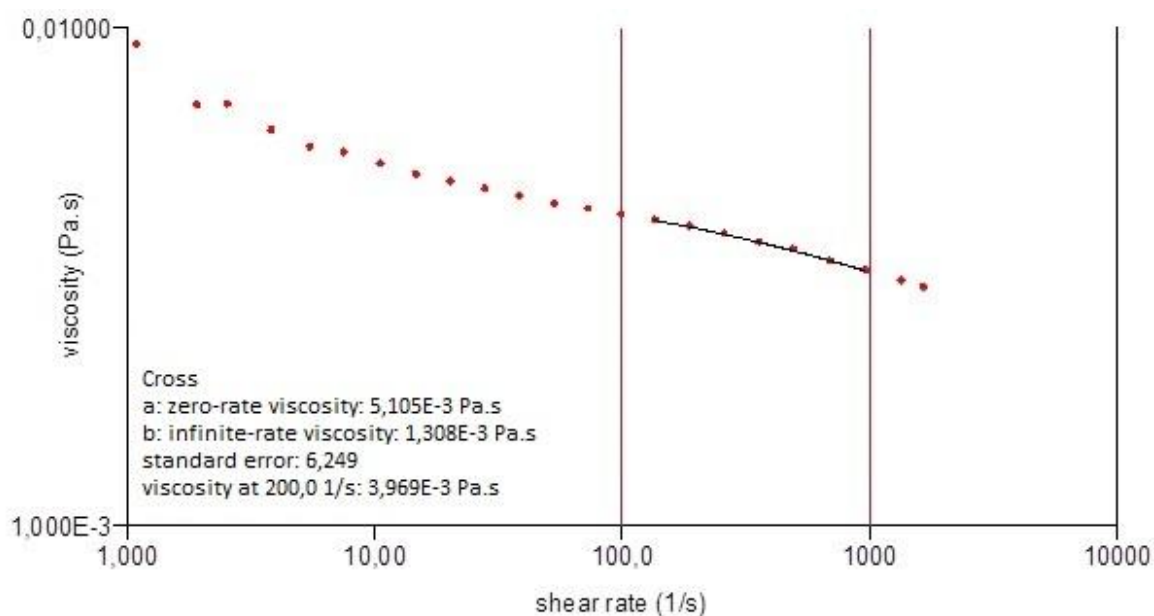
Obrázek 25: Vyhodnocení naměřených dat pomocí TA Data Analysis. Viskozitní křivka pro referenční roztok nízkomolekulové HA o koncentraci 2,0 g·l⁻¹

Na grafu (Obrázek 26) vidíme vyhodnocení měření pomocí softwaru TA Data Analysis (TA Instruments) pro směsný roztok **vysokomolekulové HA** o koncentraci 2,0 g·l⁻¹. Nejdříve je zvoleno ohraničení v rozmezí 100 – 1000 s⁻¹. Neboť se nejedná o newtonskou kapalinu, byla křivka proložena Crossovým reologickým modelem:

$$\eta = \eta_{\infty} + \frac{(\eta_0 - \eta_{\infty})}{1 + \left(\frac{\dot{\gamma}}{\dot{\gamma}_c}\right)^m} \quad (22)$$

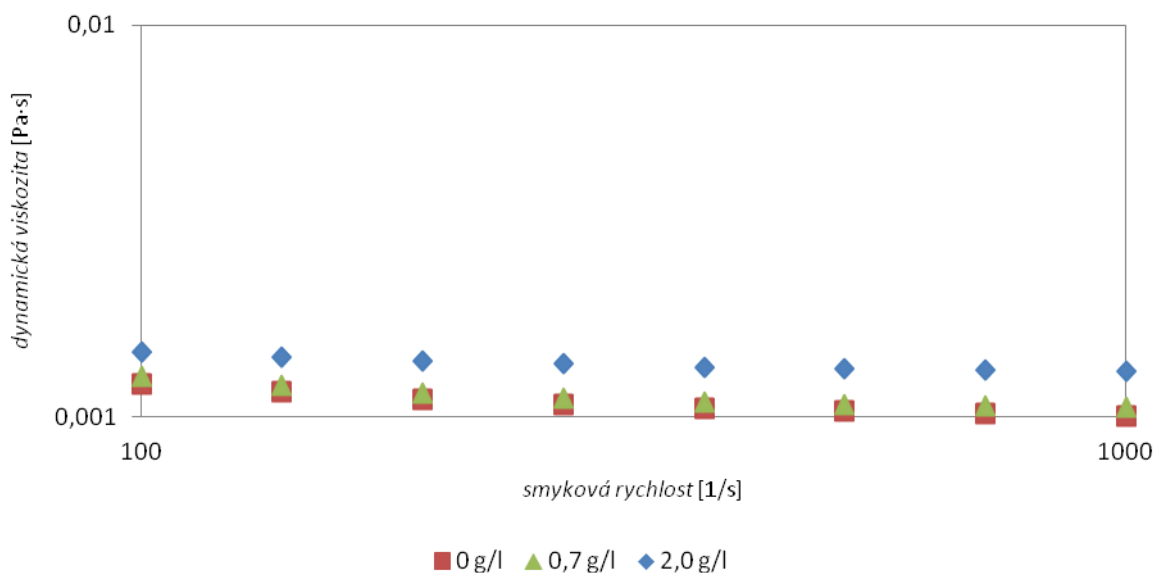
kde hodnoty η_0 je limitní viskozita, η_{∞} je asymptotická viskozita, $\dot{\gamma}$ je smyková rychlost a $\dot{\gamma}_c$ je kritická smyková rychlost [32].

Velice důležitá byla hodnota limitní viskozity, která je v grafu ze software TA Data Analysis popisována jako „zero-rate viscosity“ a odpovídá teoretické viskozitě roztoku při nekonečně malé smykové rychlosti, ovšem kvůli měnícím se reologickým vlastnostem byla pro nás stěžejní hodnota viskozity při smykové rychlosti 200 s⁻¹ η_{200} . Tuto hodnotu nám opět vypočítal software a v grafu (Obrázek 26) je vidět na posledním řádku v celkovém vyhodnocení.



Obrázek 26: Vyhodnocení naměřených dat pomocí TA Data Analysis. Viskozitní křivka pro směsný roztok vysokomolekulové HA o koncentraci 2,0 g·l⁻¹

Na grafu závislosti dynamické viskozity η na smykové rychlosti (Obrázek 27) vidíme porovnání naměřených hodnot pro vybrané směsné roztoky koncentrační řady nízkomolekulové HA (0, 0,7 a 2,0 g·l⁻¹). Je patrné, že všechny tři roztoky vykazují podobný trend a že hodnota viskozity s rostoucí smykovou rychlostí klesá.



Obrázek 27: Závislost dynamické viskozity na smykové rychlosti pro vybrané směsné roztoky nízkomolekulové HA (měřeno reometrem AR-G2)

Pro přehlednost byly všechny hodnoty dynamické viskozity η pro směsné i referenční roztoky nízkomolekulové HA a hodnoty viskozity při smykové rychlosti 200 s^{-1} η_{200} pro směsné i referenční roztoky vysokomolekulové HA zaznamenány do tabulky v závislosti na koncentraci roztoku HA (Tabulka 5).

Tabulka 5: Naměřené hodnoty viskozit pro referenční a směsné roztoky v závislosti na koncentraci HA (měřeno reometrem AR-G2)

HA (90 – 130 kDa)	referenční roztoky	směsné roztoky
koncentrace HA [g·l ⁻¹]	η [mPa·s]	η [mPa·s]
0,0	-	0,9788
0,1	0,9658	0,9876
0,3	1,0495	0,9632
0,7	1,1650	1,0600
1,0	1,2930	1,0910
2,0	1,6570	1,2815

HA (1 500 – 1 750 kDa)	referenční roztoky	směsné roztoky
koncentrace HA [g·l ⁻¹]	η_{200} [mPa·s]	η_{200} [mPa·s]
0,0	-	0,9615
0,1	1,2590	0,9583
0,3	1,9060	1,0660
0,7	3,7175	1,4590
1,0	4,9865	4,5010
2,0	14,4800	5,5390

Z naměřených dat je patrné, že pokud porovnáme hodnoty viskozity η a η_{200} naměřené na reometru AR-G2 (Tabulka 5) s hodnotami dynamické viskozity η naměřenými na automatickém mikroviskozimetru AMVn (Tabulka 6), dosahují hodnoty z reometru většinou vyšších hodnot.

Softwarem vypočítané hodnoty viskozity η a η_{200} pro směsné roztoky byly poté porovnány s hodnotami referenčních roztoků a tento poměr byl pak vyneseno do grafu (Obrázek 28) jako relativní viskozita η_{rel} .

Pro směsné roztoky nízkomolekulové HA byl jako relativní viskozita použit poměr:

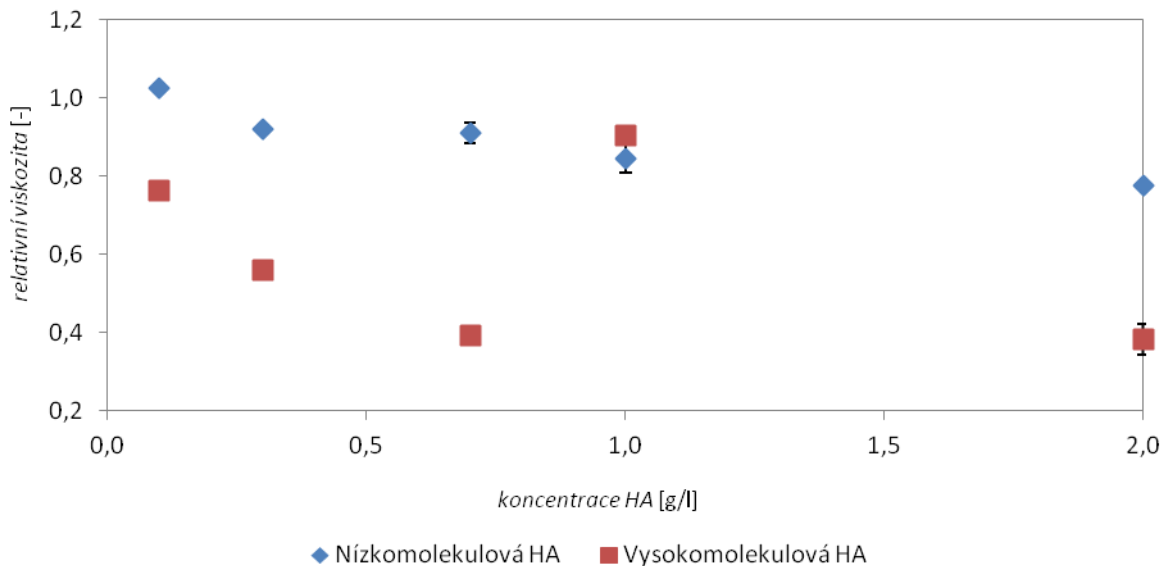
$$\eta_{rel} = \frac{\eta(\text{HA+BSA})}{\eta(\text{HA})} [-] \quad (23)$$

kde $\eta(\text{HA} + \text{BSA})$ je dynamická viskozita směsného roztoku HA a BSA o určité koncentraci a $\eta(\text{HA})$ je dynamická viskozita referenčního roztoku HA o totožné koncentraci.

Pro směsné roztoky vysokomolekulové HA byl použit obdobný poměr pro výpočet relativní viskozity, avšak do čitatele byla zadána hodnota η_{200} pro směsný roztok HA a BSA o určité koncentraci a do jmenovatele pak hodnota η_{200} pro referenční roztok HA o totožné koncentraci.

$$\eta_{rel} = \frac{\eta_{200}(\text{HA+BSA})}{\eta_{200}(\text{HA})} [-] \quad (24)$$

Z grafu závislosti relativní viskozity η_{rel} na koncentraci HA (Obrázek 28) je patrné, že pro směsné roztoky nízkomolekulové HA tato hodnota neustále klesá. Co se týká směsných roztoků vysokomolekulové HA, tak hodnota η_{rel} také klesá, ale poté můžeme sledovat nárůst a opět pokles u roztoku o koncentraci HA $1,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Tento nárůst byl pravděpodobně způsoben určitou chybou při přípravě roztoku, nebo při samotném měření, neboť je patrné, že hodnota relativní viskozity η_{rel} se zvyšující koncentrací roztoku HA klesá. U roztoku o koncentraci $2,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ již můžeme předpokládat maximální navázání BSA na HA, neboť η_{rel} roztoku již dále neklesá.



Obrázek 28: Závislost relativní viskozity roztoku na koncentraci HA (měřeno reometrem AR-G2)

5 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo prozkoumat a charakterizovat interakce mezi kyselinou hyaluronovou (nízkomolekulovou i vysokomolekulovou) a albuminem v prostředí citrát-fosfátového pufru o pH přibližně 4. K prostudování těchto interakcí bylo využito metod viskozimetrie, solubilizace barviva, elektroanalytických, a reologických. Na základě proměření všech připravených roztoků pomocí námi vybraných metod můžeme usuzovat, že mezi HA a BSA dochází k interakcím.

Viskozimetrickým měřením bylo dokázáno, že dochází k interakcím mezi kyselinou hyaluronovou a albuminem, neboť byl pozorován pokles viskozity. Byly získány hodnoty dynamických viskozit pro referenční i směsné roztoky vysoko- a nízkomolekulové HA. Roztoky byly vždy měřeny při dvou úhlech a z naměřených dat je patrné, že naměřené hodnoty dynamické viskozity z automatického mikroviskozimetru AMVn (*Tabulka 6*) dosahují většinou nižších hodnot než hodnoty viskozity η a η_{200} z reometru AR-G2 (*Tabulka 5*). Z tohoto měření můžeme předpokládat, že bude docházet k interakcím HA a BSA v rozsahu koncentrací od 0,1 až do 2,0 g·l⁻¹, neboť můžeme sledovat pokles relativní viskozity roztoku.

Spektrofotometrickým měřením byly získány závislosti absorbancí na vlnové délce pro jednotlivé roztoky a z nich sestrojena absorpční spektra. Naměřené hodnoty pro směsné roztoky byly poté porovnány s naměřenými hodnotami roztoku bez kyseliny hyaluronové. Z absorpčních spekter směsných roztoků vysoko- a nízkomolekulové HA (*Obrázek 30*, *Obrázek 31*) je patrné, že směsné roztoky vysokomolekulové HA vykazují vyšší hodnoty absorpance než směsné roztoky nízkomolekulové HA. To bylo nejspíš způsobeno základem, tudíž většími částicemi rozptýlenými v roztoku. Pokud tyto částice navíc při odstředování nedokonale sedimentovaly a nebyly tím pádem z roztoku odstraněny, mohou být příčinou vysoké turbidity.

Proměření A_{\max} BSA u směsných roztoků bylo zjištěno, že u směsných roztoků vysokomolekulové HA dochází při nižších koncentracích roztoků k poklesu hodnoty A_{\max} BSA a až poté k nárůstu. Naopak u směsných roztoků nízkomolekulové HA dochází u nízkých koncentrací roztoků nejdříve k nárůstu a až poté k poklesu hodnoty A_{\max} BSA. Jinak se hodnota A_{\max} BSA u směsných roztoků nízkomolekulové HA prakticky nemění. To může být způsobeno úplným navázáním molekul albuminu na řetězec kyseliny hyaluronové, kdy již řetězec není schopen BSA dále vázat a absorpance se tím pádem již dále nemění. U absorpance naměřené při vlnové délce 400 nm A_{400} poté pozorujeme prakticky totožný trend jako u hodnoty A_{\max} BSA, avšak hodnoty A_{400} dosahují obecně vyšších hodnot.

Spektrofotometrickým měřením byla dále sledována solubilizace analyticky dobře detekovatelného Sudanu III do struktury komplexu kyseliny hyaluronové a albuminu. Tyto komplexy mají ve své struktuře hydrofobní místa, kam se může barvivo Sudan III nasolubilizovat, protože se se zvyšující koncentrací zvyšuje i solubilizace Sudanu III. Směsné roztoky vysokomolekulové HA vykazují viditelně vyšší hodnoty absorpance. To znamená, že se nasorbuje i více Sudanu III. Z toho můžeme usuzovat, že vysokomolekulární HA by byl vhodnějším nosičem pro cílenou distribuci léčiv než nízkomolekulová HA, neboť se podle měření do komplexu nízkomolekulové HA a BSA prakticky žádný Sudan III nenasolubilizoval.

Elektroanalytické vlastnosti jednotlivých roztoků byly sledovány pomocí měření vodivosti a pH. Konduktometrické měření bylo při tomto výzkumu zvoleno především z důvodu ověření správnosti přípravy jednotlivých roztoků. Z grafů je patrné, že pro systém obsahující pufr

(Obrázek 23) konduktivita výsledného systému mírně roste, pro systém obsahující nízkomolekulovou HA pozorujeme spíše oscilaci okolo původní hodnoty konduktivity a pro systém obsahující vysokomolekulovou HA potom pozorujeme pouze mírný nárůst vodivosti. Můžeme tedy usuzovat, že přídavek BSA do roztoku HA mírně mění vodivostní vlastnosti. Proměřením pH výsledného systému pak můžeme jednoznačně říci, že přídavek kyseliny hyaluronové do roztoku zvyšuje jeho pH.

Další důležitou metodou pro prozkoumání interakcí mezi kyselinou hyaluronovou a albuminem bylo reologické měření. Abychom mohli lépe objasnit problematiku interakcí, byly vždy hodnoty naměřené pro směsné roztoky porovnány s hodnotami roztoků referenčních. Reologickým měřením bylo zjištěno, že pro koncentrační řadu nízkomolekulové HA hodnota relativní viskozity η_{rel} neustále klesá. Co se týká vysokomolekulové HA, relativní viskozita η_{rel} také klesá, ale poté můžeme sledovat nárůst a opět pokles relativní viskozity u roztoku HA o koncentraci $1,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. U roztoku o koncentraci $2,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ již můžeme předpokládat maximální navázání BSA na HA, neboť η_{rel} roztoku již dále neklesá. Z tohoto měření tedy můžeme konstatovat, že dochází k interakcím mezi HA a BSA v celém koncentračním rozsahu, neboť relativní viskozita roztoku s přídavkem HA neustále klesá.

Problematika interakcí kyseliny hyaluronové a albuminu se bude pravděpodobně v budoucnu ubírat směrem prozkoumání interakcí u roztoků připravených v MQ vodě a prozkoumání odolnosti roztoků vůči iontové síle.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Kyselina hyaluronová. *Contipro* [online]. [cit. 2014-11-23]. Dostupné z: <http://www.contipro.com/cs/o-kyseline-hyaluronove>
- [2] MURRAY, Robert, Daryl GRANNER a Peter MAYES. *Harperova Biochemie: a LANGE medical book*. 23. vyd., V ČR 3. vyd., V nakl. H. Jinočany: H, 1998, xiii, 872 s. ISBN 80-857-8738-5.
- [3] HIRA, Maggie. What Is the Best Way to Use Hyaluronic Acid on the Face?. In: *EHow: how to do just about everything* [online]. Salt Lake City, UT: eHow, inc., 1999- [cit. 2014-11-23]. Dostupné z: http://www.ehow.com/way_5611015_way-use-hyaluronic-acid-face_.html
- [4] ZEMAN, Jan. *Studium interakcí polyelektrolytů s kladně nabitými dusíkatými amfifilními látkami*. Brno, 2013. 65 l. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=62980. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Ing. Martin Chytil, Ph.D.
- [5] VELEBNÝ, Vladimír. *Hyaluronan - biopolymer pro tkáňové inženýrství: Hyaluronan - biopolymer for tissue engineering : teze habilitační práce*. Brno: VUTIUM, 2012. 29 s. ISBN 978-80-214-4420-1. Teze habilitační práce. Vysoké učení technické v Brně, fakulta chemická.
- [6] SCOTT, John E. Secondary and Tertiary structures of Hyaluronan in Aqueous Solution. Some Biological Consequences. In: *Glycoforum* [online]. 1998-05-15 [cit. 2014-11-23]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>
- [7] Hascall, V. C., Laurent T. C.: Hyaluronan: Structure and Physical Properties. [HTML dokument]. Dec. 15, 1997, Glycoforum. [cit. 2014-11-23]. Dostupný z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [8] NEČAS, J, L BARTOSIKOVA, P BRAUNER a J KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*. 2008, roč. 53, č. 8, 397–411. Dostupné z: <http://agriculturejournals.cz/publicFiles/02029.pdf>
- [9] Hyiodine: Hlavní složka kyselina hyaluronová. CONTIPRO PHARMA, a.s. [online]. [cit. 2013-06-08]. Dostupné z: <http://www.hyiodine.cz/o-hyiodine>
- [10] HRAZDIRA, Luboš. Periartikulární injekční forma kyseliny hyaluronové. *Remedia*. 2008, č. 5, s. 399-400. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Periartikularni-forma-kyseliny-hyaluronove>
- [11] KaviSkin [online]. 2013 [cit. 2014-12-25]. Hyaluronic Acid. Dostupné z: <http://www.kaviskin.com/info/hyaluronicacid.html>

- [12] LUO, Yi, Kelly R KIRKER a Glenn D PRESTWICH. Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2000, vol. 69, issue 1, s. 169-184. DOI: 10.1016/S0168-3659(00)00300-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016836590000300X>
- [13] Hyaluronan ve veterinární medicíně. CONTIPRO PHARMA, a.s. [online]. [cit. 2014-12-25]. Dostupné z: <http://www.contipro.com/cs/hyaluronan-ve-veterinarni-medicine>
- [14] STERN, R, A ASARI a K SUGAHARA. Hyaluronan fragments: An information-rich system. *European Journal of Cell Biology*. 2006-08-03, vol. 85, issue 8, s. 699-715. DOI: 10.1016/j.ejcb.2006.05.009. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0171933506001014>
- [15] PECHAR, Michal a Karel ULBRICH. Polymerní terapeutika u nás a ve světě. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2009, roč. 103, č. 1, s. 3-10. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_01_3-10.pdf
- [16] CD44. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 2014-10-15 [cit. 2014-12-25]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/CD44>
- [17] NAVEENRAJ, Selvaraj a Sambandam ANANDAN. Binding of serum albumins with bioactive substances – Nanoparticles to drugs. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 2013, vol. 14, s. 53-71. DOI: 10.1016/j.jphotochemrev.2012.09.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389556712000639>
- [18] SHOUREN GE, Ken KOJIO, Atsushi TAKAHARA a Tisato KAJIYAMA. Bovine serum albumin adsorption onto immobilized organotrichlorosilane surface: Influence of the phase separation on protein adsorption patterns. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 1998, vol. 9, issue 2, s. 131-150. DOI: 10.1163/156856298X00479. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1163/156856298X00479>
- [19] Bovine serum albumin. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 2014-05-22 [cit. 2014-12-26]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Bovine_serum_albumin
- [20] SHARMA, Vivek, Aditya JAISHANKAR, Ying-Chih WANG a Gareth H. MCKINLEY. Rheology of globular proteins: apparent yield stress, high shear rate viscosity and interfacial viscoelasticity of bovine serum albumin solutions. *Soft Matter*. 2011, vol. 7,

issue 11, s. 5150-. DOI: 10.1039/c0sm01312a. Dostupné z:

<http://xlink.rsc.org/?DOI=c0sm01312a>

- [21] LENORMAND, Hélène, Frédéric TRANCHEPAIN, Brigitte DESCHREVEL a Jean-Claude VINCENT. The hyaluronan–protein complexes at low ionic strength: How the hyaluronidase activity is controlled by the bovine serum albumin. *Matrix Biology*. 2009, vol. 28, issue 6, s. 365-372. DOI: 10.1016/j.matbio.2009.04.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0945053X09000572>
- [22] LENORMAND, Hélène, Brigitte DESCHREVEL a Jean-Claude VINCENT. Chain length effects on electrostatic interactions between hyaluronan fragments and albumin. *Carbohydrate Polymers*. 2010, vol. 82, issue 3, s. 887-894. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.06.011. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861710004662>
- [23] LENORMAND, Hélène, Fériel AMAR-BACOUPE a Jean-Claude VINCENT. PH effects on the hyaluronan hydrolysis catalysed by hyaluronidase in the presence of proteins. Part III. The electrostatic non-specific hyaluronan–hyaluronidase complex. *Carbohydrate Polymers*. 2011, vol. 86, issue 4, s. 1491-1500. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.06.044. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861711005145>
- [24] PEKAŘ, Miloslav, Martina KLUČÁKOVÁ, Michal VESELÝ a Michal ČEPPAN. Fyzikální chemie a fotochemie. první. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2003. ISBN 80-214-2470-2.
- [25] NOVÁK, Josef P. *Fyzikální chemie II*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, 319 s. ISBN 80-708-0436-X.
- [26] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [27] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie II*. Vyd. 1. V Brně: Vutium. ISBN 80-214-1742-0.
- [28] BARTOVSKÁ, Lidmila. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 5. přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005, 244 s. ISBN 80-708-0579-X.

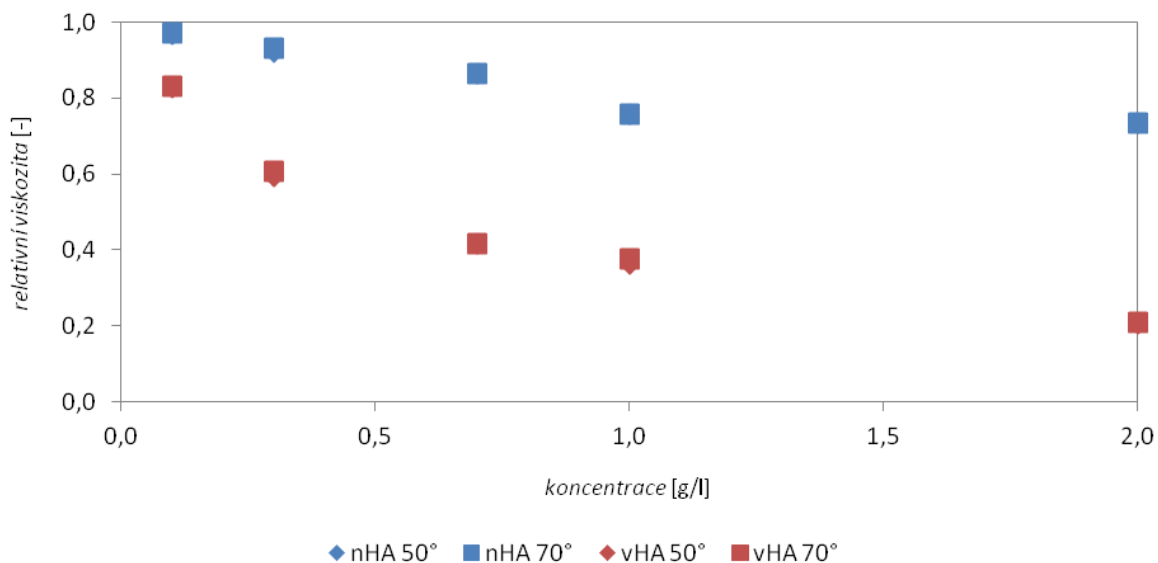
- [29] ŠTERN, P. Současné možnosti turbidimetrie a nefelometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2006, roč. 3, s. 146-151. Dostupné z:
<http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/kbm0603-146.pdf>
- [30] HOLUBOVÁ, Renata. *Základy reologie a reometrie kapalin*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. Studijní opora. ISBN 978-80-244-4178-8. Dostupné z:
http://mofychem.upol.cz/KA6/Zaklady_reologie.pdf
- [31] WILHELM, Zdeněk. Encyklopedie 6 - laboratorní medicíny pro klinickou praxi - na CD. 2006. vyd. Katedra klinické biochemie IPVZ Praha: SEKK s.r.o., 2006. s. 120 - 170, 50 s. IPVZ 6 2006. ISBN 80-238-9775-6.
- [32] TROJAN, M. Viskozimetrie systémů hyaluronan-amfifil. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 39 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Martin Chytil, Ph.D.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATECH A SYMBOLŮ

HA	kyselina hyaluronová, hyaluronan
BSA	albumin z hovězího séra
Da	dalton, atomová hmotnostní jednotka, $1 \text{ Da} = 1,66 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$
ECM	extracelulární matrix
CD-44	receptor specificky reagující na kyselinu hyaluronovou
RNA	ribonucleic acid, ribonukleová kyselina
HAase	enzym hyaluronidáza
SDS	system souosých dvouválců
Q_1, Q_2	velikosti na sebe působících nábojů
r	vzdálenost dvou nábojů od sebe
ϵ_0	permitivita vakua
ϵ_r	relativní permitivita okolního prostředí
η	dynamická viskozita
ν	kinematická viskozita
τ	tečné napětí
$\dot{\gamma}$	smyková rychlost
$\dot{\gamma}_c$	kritická smyková rychlost
ρ	hustota
t	čas
K	konstanta kuličky [$\text{mPa} \cdot \text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$]
F	síla
F_g	gravitační síla
F_{vz}	vztlaková síla
F_r	odpor prostředí proti pohybu částice
r	poloměr
R	univerzální plynová konstanta, $R = 8,314 \text{ 41 J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$
T	termodynamická teplota [K]
R	průměr kapiláry
L	délka kapiláry
Δp	rozdíl tlaků
V	objem
T	turbidance, absorbance
ϵ	absorpční koeficient
T_k	turbiditní koeficient
c	koncentrace
L	tloušťka kyvety
G	vodivost
R	odpor
U	napětí
I	elektrický proud
κ	konduktivita
S	průřez
l	délka
E	elektroodový potenciál
F	Faradayova konstanta, $F = 9,648 \cdot 10^4 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$

a	aktivita iontu
K	standardní potenciál
A	povrch
v	rychlost
K	koeficientem konzistence
n	index toku
η_{rel}	relativní viskozita
η_0	limitní viskozita při nekonečně malé smykové rychlosti
η_∞	asymptotická viskozita
η_{200}	viskozita při smykové rychlosti 200 s^{-1}
A	absorbance
A_{rel}	relativní absorbance
A_{mx}	maximální absorbance
A_{400}	hodnota absorbance při vlnové délce 400 nm
λ	vlnová délka

8 PŘÍLOHY

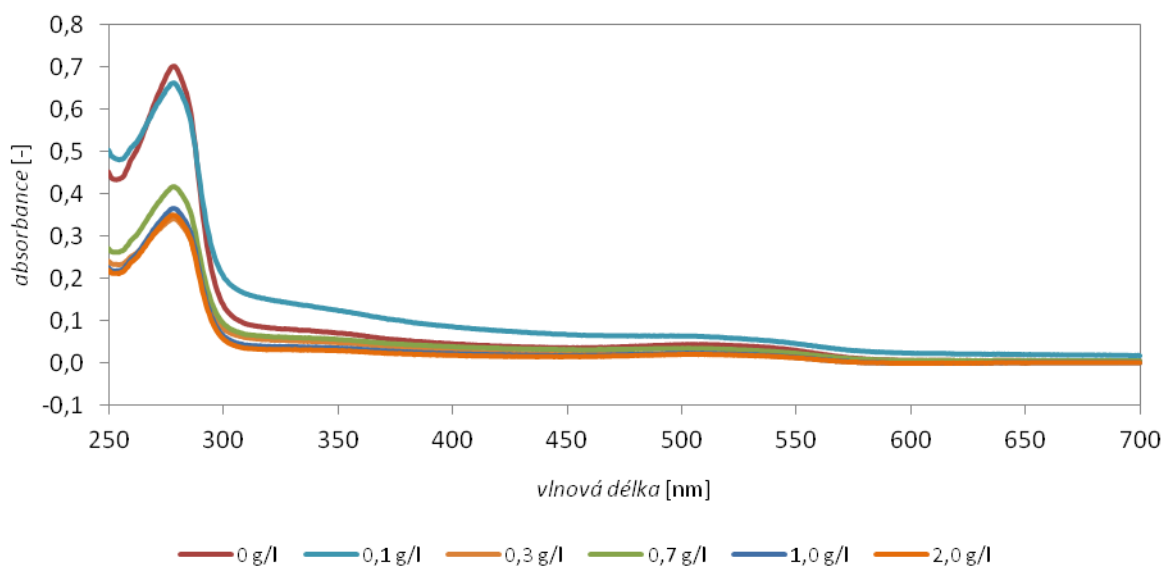


Obrázek 29: Závislost relativní viskozity roztoku na koncentraci HA (měřeno viskozimetrem AMVn)

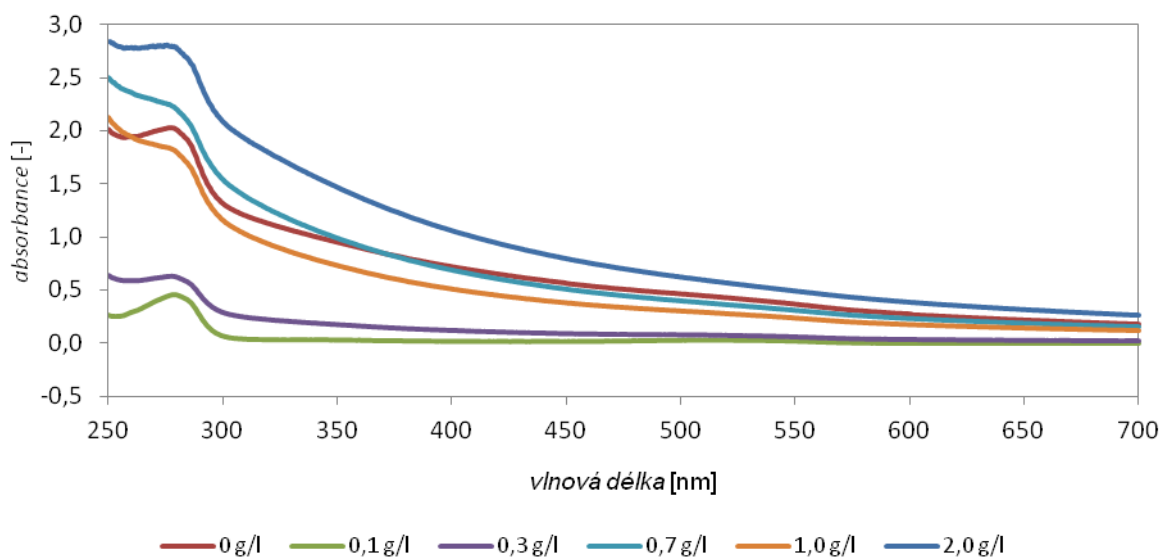
Tabulka 6: Naměřené hodnoty dynamické viskozity pro referenční roztoky a směsné roztoky v závislosti na koncentraci HA (měřeno viskozimetrem AMVn)

HA (90 – 130 kDa) koncentrace HA [g·l ⁻¹]	referenční roztoky		směsné roztoky	
	η [mPa·s]		η [mPa·s]	
	50°	70°	50°	70°
0,0	-	-	0,9365	0,9366
0,1	0,9594	0,9585	0,9290	0,9295
0,3	1,0150	1,0143	0,9329	0,9451
0,7	1,1425	1,1400	0,9858	0,9855
1,0	1,3526	1,3498	1,0250	1,0211
2,0	1,5964	1,5916	1,1698	1,1671

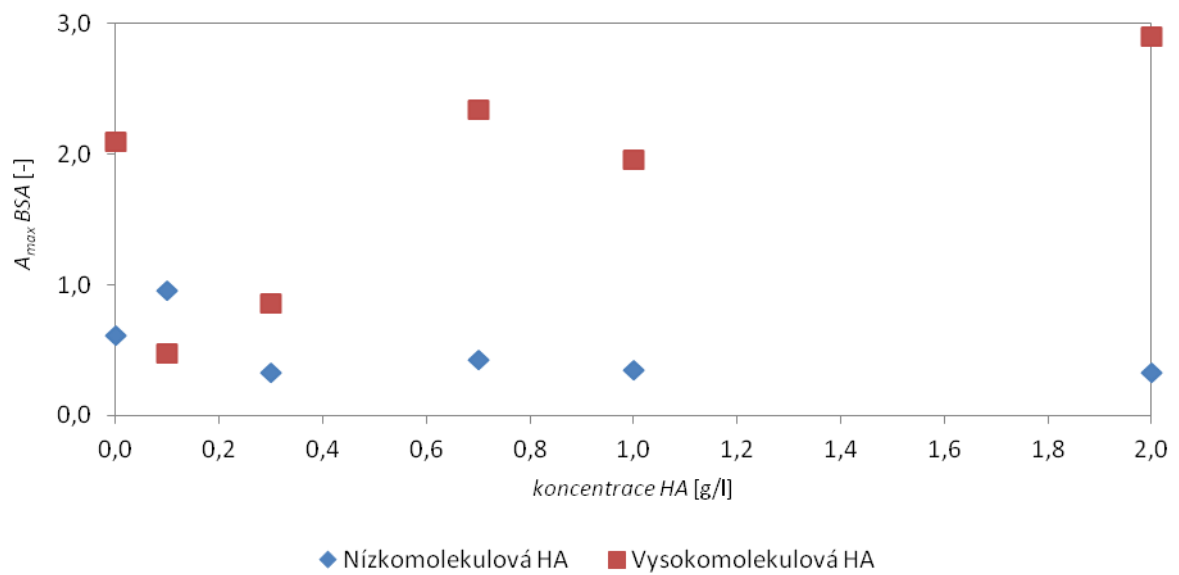
HA (1 500 – 1 750 kDa) koncentrace HA [g·l ⁻¹]	referenční roztoky		směsné roztoky	
	η [mPa·s]		η [mPa·s]	
	50°	70°	50°	70°
0,0	-	-	0,9455	0,9455
0,1	1,1605	1,1480	0,9587	0,9539
0,3	1,6485	1,6149	0,9776	0,9797
0,7	3,1262	3,0110	1,3002	1,2547
1,0	4,6965	4,4579	1,7051	1,6736
2,0	15,5824	14,6787	3,1679	3,0650



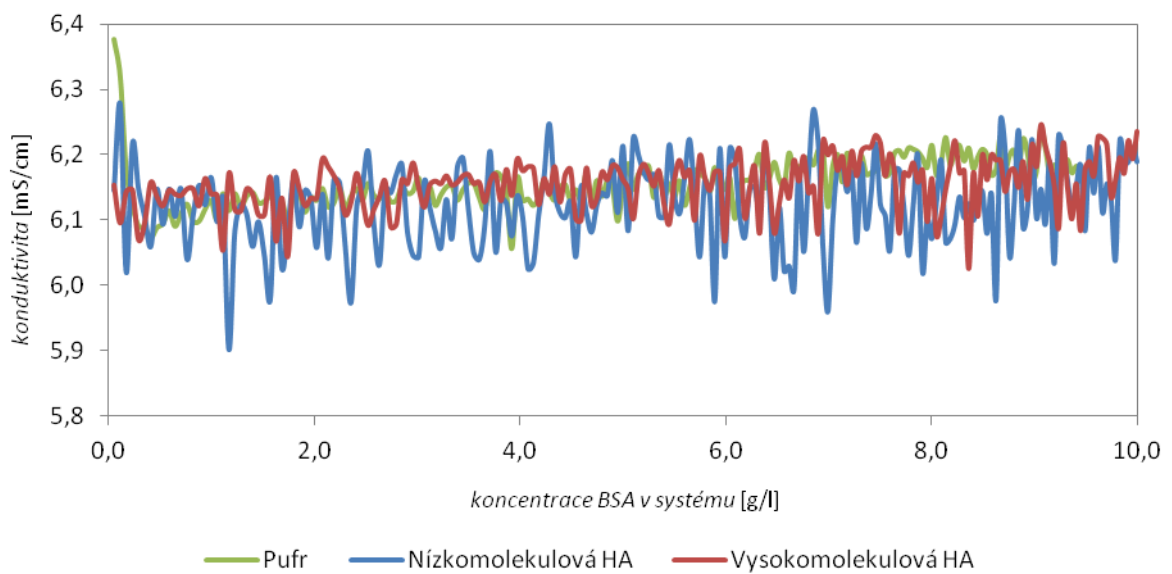
Obrázek 30: Závislost absorpance roztoku na vlnové délce (směsný roztok nízkomolekulové HA)



Obrázek 31: Závislost absorpance roztoku na vlnové délce (směsný roztok vysokomolekulové HA)



Obrázek 32: Závislost maximální absorbance albuminu (v rozmezí vlnových délek 260 - 290 nm) pro jednotlivé roztoky na koncentraci HA



Obrázek 33: Závislost konduktivity systému na koncentraci BSA v systému