VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

CHOVÁNÍ HYALURONAN-ALBUMINOVÝCH KOMPLEXŮ VE FYZIOLOGICKÉM PROSTŘEDÍ

HYALURONAN-ALBUMIN COMPLEXES BEHAVIOR AT PHYSIOLOGICAL CONDITIONS.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE Nikola Šuleková
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE Ing. Martin Chytil, Ph.D.
SUPERVISOR

BRNO 2016

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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	**FCH-BAK0827/2014**	Akademický rok: **2015/2016**
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	**Nikola Šuleková**	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806R002)	
Vedoucí práce	**Ing. Martin Chytil, Ph.D.**	
Konzultanti:	Ing. Jiří Smilek, Ph.D.	

Název bakalářské práce:

Chování hyaluronan-albuminových komplexů ve fyziologickém prostředí

Zadání bakalářské práce:

Osvojit si vybrané experimentální techniky pro charakterizaci vzájemných interakcí hyaluronanu s albuminem.
Prostudovat interaktivitu hylauronanu a albuminu ve fyziologickém prostředí.
Výsledky srovnat s předchozími poznatky o interaktivitě studovaných látek.

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

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.

- -	- -	- -
Nikola Šuleková 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 pojednává o interakcích vysokomolekulové a nízkomolekulové kyseliny hyaluronové (HA) s hovězím sérovým albuminem (BSA) ve fyziologickém prostředí. Navazuje na předešlé práce o interakcích HA s amfifilními látkami, které jsou v současnosti hojně studovány pro své možné využití v medicíně jako nosiče léčiv. K měření byly použity roztoky s konstantní koncentrací HA a koncentrací BSA v rozmezí 0,25 – 20 g/l, které byly připraveny při laboratorní teplotě a při 37°C. Tyto roztoky byly proměřeny s použitím reometrie a turbidimetrie.

Bylo zjištěno, že maximum absorbance stoupá se zvyšující se koncentrací BSA a nevykazuje rozdíly v závislosti na teplotě přípravy. Naproti tomu u turbidity dochází k výrazným rozdílům mezi vzorky připravenými při laboratorní teplotě a při 37°C. Celkově dochází ke zvýšení turbidity s koncentrací BSA. Zvýšení teploty způsobilo u všech vzorků nárůst viskozity, která se dále měnila s koncentrací BSA. Nejvyšší turbiditu, maximum absorbance i nejvyšší viskozitu vykazovaly směsné roztoky vysokomolekulové HA a BSA a nejnižší roztoky samotného BSA. Výsledky naznačují vznik komplexů kyseliny hyaluronové, kterých vlastnosti jsou závislé na koncentraci BSA, molekulové hmotnosti HA a na teplotě přípravy.

ABSTRACT

This thesis discusses the interactions of low molecular weight and high molecular weight hyaluronic acid (HA) with bovine serum albumin (BSA) in physiological environment. It is based on previous work dealing with HA and amphiphilic substances which are currently widely studied for its potential applications in medicine. Solutions of HA with fixed concentration and albumin of concentration in the range of 0,25 – 20 g/l were prepared at room temperature and at 37°C and examined by rheometry and turbidimetry.

It was observed that the maximum absorbance increases with increasing concentration of BSA and does not show variations depending on the temperature of preparation. On the other hand, the turbidity occurs in significant differences between the samples prepared at ambient temperature and at 37°C. Overall, the turbidity increases with the concentration of BSA. Rasing the temperature caused the increase in viscosity of the samples, which was further varied with the concentration of BSA. Mixed solutions of high molecular weight HA and BSA showed the highest turbidity, maximum absorbance and viscosity, while the solutions of BSA showed the lowest values. The results indicate formation of complexes, of which properties are dependent on BSA concentration, the molecular weight of HA, and the temperature of preparation.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kyselina Hyaluronová, albumin, reometrie, turbidimetrie.

KEY WORDS

Hyaluronic acid, albumine, rheometry, turbidimetry

ŠULEKOVÁ, N. *Chování hyaluronan-albuminových komplexů ve fyziologickém prostředí.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 48 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 mému vedoucímu Ing. Martinu Chytilovi, Ph.D. za jeho pomoc a cenné rady při vypracovávání této práce a za jeho ochotu a trpělivost při konzultacích.

Speciální poděkování patří mým rodičům za podporu při studiu.

OBSAH

1 ÚVOD 7
2 Teoretická část 8
2.1 Kyselina hyaluronová 8
2.1.1 Úvod 8
2.1.2 Struktura 8
2.1.3 Vlastnosti 10
2.1.4 Využití 12
2.2 Albumin 12
2.2.1 Úvod 12
2.2.2 Struktura 12
2.2.3 Vlastnosti 14
2.2.4 Využití 15
2.3 Polysacharid - proteinové interakce 15
2.3.1 Současný stav problematiky interakcí 16
2.4 Reologie 17
2.4.1 Úvod 17
2.4.2 Definice 18
2.4.3 Měřící systémy 20
2.4.4 Tokové testy 21
2.5 UV – VIS Spektrometrie 21
2.5.1 Turbidimetrie 23
3 Experimentální část 24
3.1 Používané chemikálie a přístroje 24
3.2 Příprava roztoků 24
3.3 Měření pH 25
3.4 Měření turbidity 25
3.5 Měření reologických vlastností 26
4 Výsledky a diskuze 27
4.1 Měření turbidity 27
4.1.1 Roztoky BSA 28
4.1.2 Roztoky nízkomolekulové HA a BSA 29
4.1.3 Roztoky vysokomolekulové HA a BSA 32

4.2 Měření reologických vlastností ... 34
4.2.1 Roztoky BSA ... 35
4.2.2 Roztoky nízkomolekulové HA a BSA ... 36
4.2.3 Roztoky vysokomolekulové HA a BSA ... 37
5 Závěr ... 39
6 Seznam použitých zdrojů ... 40
7 Seznam použitých zkratek a symbolů ... 43
8 Přílohy ... 45

1 ÚVOD

Kyselina hyaluronová je polysacharid, který se přirozeně vyskytuje v těle a proto jako látka tělu vlastní, při aplikacích nezpůsobuje imunitní odpověď organizmu a alergické reakce. Nezpůsobuje zatěžování organizmu, jelikož tělo je schopné hyaluronan snadno odbourávat. Tyto vlastnosti ji předurčují jako látku vhodnou na využití v medicíně a v kosmetice. Kvůli svojí viskoelasticitě a zadržování vody se využívá pro hydrataci pokožky a redukci vrásek. Podporuje syntézu kolagenu a proto je vhodnou látkou pro snadnější hojení ran. Nejnovější studie kyseliny hyaluronové se zabývají zejména jejím využitím při léčbě rakoviny. Zjistilo se, že je schopná interagovat s receptorem, který se nachází na povrchu rakovinných buněk a proto by mohla sloužit jako nosič léčiva a tím inhibovat růst nádoru a šíření metastáz. Toto léčivo by bylo možné zabudovat do albuminu.

Albumin je nejčastěji se vyskytujícím proteinem v krevní plasmě. V těle se nachází v každé tkáni a je zodpovědný za mnoho funkcí jako je udržování pH krve a udržování osmotického krevního tlaku. Je důležitou transportní bílkovinou, která přenáší neuvěřitelné množství endogenních i exogenních látek, jako jsou mastné kyseliny, fospolipidy, živiny, steroidní hormony a těžké kovy. Kvůli této své vlastnosti je studována možnost využít albumin jako transportér léčiv a nanočástic a také je studováno, jak interakce léčiva s albuminem ovlivňuje vlastnosti přenášeného léčiva.

Předmětem této práce jsou interakce hyaluronanu a albuminu a studium jejich vlastností v závislosti na koncentraci albuminu, způsobě přípravy a molekulové hmotnosti hyaluronanu. Interakce těchto látek jsou v současné době předmětem studia mnoha prací, kvůli svému potenciálnímu využití jako nosiče léčiv.

2 Teoretická část

2.1 Kyselina hyaluronová

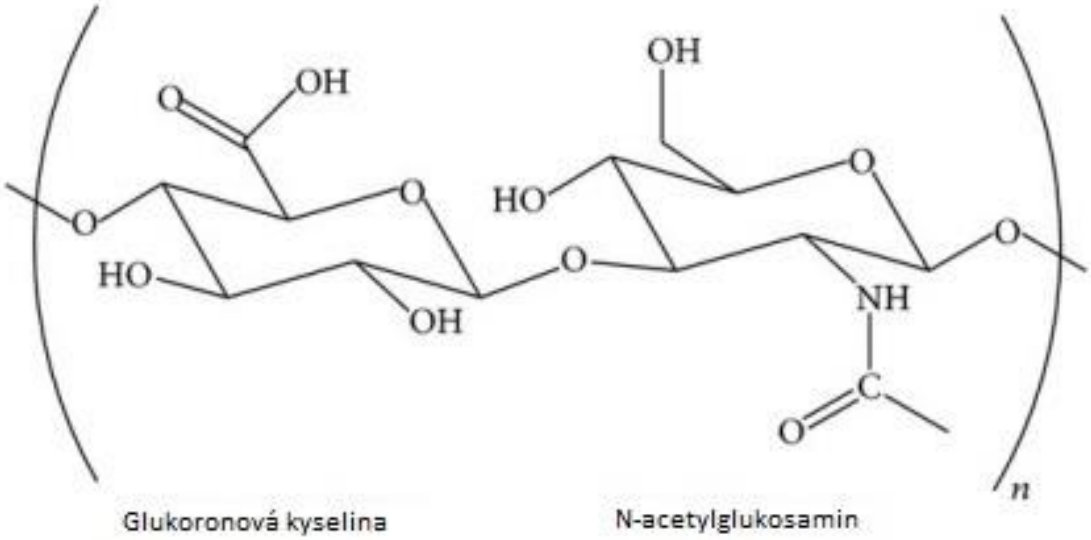
2.1.1 Úvod

Postup pro izolaci kyseliny hyaluronové (HA) jako nového glykosaminoglykanu z hovězího sklivce byl poprvé popsán v roce 1934 Karlem Meyerem a Johnem Palmerem. Ukázalo se, že tato látka neobsahuje žádné sulfoestery, ale obsahuje uronovou kyselinu. Proto ji pojmenovali „hyalos“ ,z řeckého slova „hyaloid“, což znamená sklo a z anglického výrazu „uronic acid“, tedy uronová kyselina. Užívá se také název „hyaluronan“, což odráží skutečnost, že se *in vivo* nevyskytuje jako protonizovaná kyselina, ale jako sůl. [1]

Průmyslová výroba HA je založena na dvou hlavních procesech - na extrakci z živočišných tkání a mikrobiální fermentaci za použití bakteriálního kmene. Jako zdroje pro extrakci se využívají synoviální tekutiny, kohoutí hřebínky, pupeční šňůry, hlasivky a jiné měkké tkáně. Nevýhodou této přípravy je nízká koncentrace hyaluronanu v tkanivu a vysoká polydisperzita produktů související s přirozenou polydisperzitou hyaluronanu a také s jeho degradací v průběhu extrakce, která je způsobena nešetrnými podmínkami extrakce a rozbitím polymerových řetězců skrze enzymatickou hydrolýzu. Purifikace HA z živočišných tkání je obtížná a výtěžek není dokonale čistý, jelikož jsou přítomné stopy bílkovin a dalších látek. Proto jsou v současnosti tyto zdroje nahrazovány biosyntézou s využitím bakterií z rodu *Streptococus*, zejména kmeny *Streptococus equi* a *Streptococus zooepidemicus.* Tyto mikroorganizmy jsou schopny produkovat hyaluronan a využívat jej k zapouzdření svých buněk. Jelikož hyaluronan, který vyprodukují je totožný s hyaluronanem vyskytujícím se v těle jejich hostitele, není imunitní systém hostitele schopen rozpoznat přítomnost bakterií. [2]

2.1.2 Struktura

Hyaluronan je lineární polysacharid skládající se ze dvou sacharidových jednotek tvořených N-acetylglukosaminem a glukoronovou kyselinou propojených střídajícími se glykozidickými vazbami β (1→ 3) v monomerních jednotkách a β (1→ 4), které vážou jednotky mezi sebou (*Obrázek 1*). Obě jsou tedy spojovány monosacharidovými kruhy, ale střídavě. Struktura disacharidu je energeticky velice stabilní, jelikož oba cukry jsou prostorově příbuzné glukóze, která v β konfiguraci umožňuje stericky výhodnou ekvatoriální pozici objemných skupin (hydroxylové skupiny, karboxylová skupina, anomerní uhlík na přilehlém cukru), přičemž axiální pozici, která je méně stericky výhodná, zabírají atomy vodíku. Oba sacharidy zajímají stabilní židličkovou konformaci, která předurčuje konformaci polymeru v roztoku. Řetězec HA se formuje do šroubovice a následující formování struktury závisí na prostředí. Je tedy ovlivňováno mnoha faktory, jako je teplota a interakce tohoto polymeru s rozpouštědlem, s polymerem nebo přítomnými ionty. Může získat strukturu náhodného klubka, ale také může nastat situace, kdy je jeho struktura natažená, pokud se nachází ve vodě a nejsou přítomné žádné protiionty kromě jeho vlastních. [1,2]



Obrázek 1: *Struktura HA.* [2]

Kyselina hyaluronová patří mezi glykosaminoglykany (stejně jako chondroitin sulfát, heparin sulfát, keratan sulfát ad.), které jsou charakteristické opakující se disacharidovou strukturou aminosacharidu (glukosaminu nebo galaktosaminu) a hexózy, galaktózy, glukoronové kyseliny nebo iduronové kyseliny. Hyaluronan je jediný člen této skupiny, který není sulfatovaný a v proteoglykanu není kovalentně vázaný k proteinu. V organizmech je HA produkována hyaluronan syntetázou pomocí jejích aktivovaných nukleotidových cukrů (UDP - kyseliny glukurónové a UDP – N - acetylglukosaminu) ve formě dlouhých lineárních polymerů. Počet opakujících se disacharidů v molekule je přibližně 10 000, byly ale publikovány i řetězce o délce 25 000. Velikost polymerů může být od 5 000 Da do 20 milionů Da (jednotka Dalton je rovna jednotce $g.mol^{-1}$) v závislosti na typu tkaniva. [2]

Hyaluronové řetězce obsahují dva druhy vazeb. Sacharidové řetězce, které jsou relativně stabilní ve svých tvarech a glykosidické vazby, které umožňují několik možných konfigurací. Tyto glykozidické vazby obsahují atom kyslíku, který spojuje cukry mezi sebou. Kyslík má svoje dvě vazby ve tvaru písmena V a substituenty připojeny na koncích ramen se mohou otáčet o 360°. Výpočty a molekulové modelování, ale ukázaly, že tyto substituenty nemají úplnou volnost v otáčení a nemohou zaujmout všechny možné konfigurace, jelikož může nastat situace, kdy si dva cukry vzájemně prostorově brání.

I když hyaluronan za jistých podmínek získává strukturu náhodného klubka, experiment založený na jeho oxidaci jodistanem vedl k předpokladu, že i v tomto stavu má preferované tvary. Glykolové skupiny ve zbytcích glukoronátu byly odolné vůči oxidaci, i když identické struktury u jiných polymerů byly lehce oxidovatelné. Pomocí NMR, se zjistilo, že ve struktuře hyaluronanu, je každá disacharidová jednotka otočená o 180° oproti sousedním jednotkám, dvě otočení (360°) vedou k původní orientaci a tím se struktura může stát dvojnásobným helixem v závislosti na podmínkách prostředí a v něm se vyskytujících protiiontů. Tato dvojitá spirála má rozsáhlou hydrofobní oblast, kterou tvoří vodíkové atomy a hydrofilní oblast tvořenou postranními řetězci. Tato hydrofilní oblast vede ve vodném prostředí

ke shlukování, kdy hyaluronan agreguje se sebou samým, čímž se snižuje plocha jeho kontaktu s rozpouštědlem. Dvojitý helix má obě strany stejné, ale vůči sobě antiparalelní a agregáty mohou dále růst z obou stran. Hyaluronan netvoří skutečnou polymerní síť, ale pro zjednodušení představy o struktuře a interakcích se využívá pojmu „hyaluronové sítě“. Interakce, které drží tyto hyaluronové sítě jsou poměrně slabé a proto se mohou agregáty rozpadat. Rozpad je podporován elektrostatickým odpuzováním mezi zápornými náboji, zpomalují ho hydrofobní interakce a vodíkové vazby mezi acetamidovou a karboxylovou skupinou. Tyto interakce mají krátký dosah, a proto vyžadují blízkou komplementaritu mezi dvěma částmi a to je nejlépe dosažené popsanou protilehlostí stran. [3]

2.1.3 Vlastnosti

Ve fyziologickém roztoku je molekula kyseliny hyaluronové zpevněná kombinací chemické struktury disacharidu, vnitřními vodíkovými vazbami a interakcí s rozpouštědlem. Axiální atomy vodíku tvoří nepolární, hydrofobní část, zatímco ekvatoriální postranní řetězce tvoří polární, hydrofilní část, čím tvoří strukturu šroubovice a také zapříčiňují amfifilnost molekuly. Výsledná struktura náhodného klubka zabírá velkou oblast, ale koncentrace hyaluronanu uvnitř makromolekulového klubka je velmi nízká. Malé molekuly v roztoku, jako jsou voda a elektrolyty, můžou do oblasti volně difundovat, ale velké molekuly, jako jsou proteiny, jsou z oblasti částečně vyloučeny, kvůli jejich hydrodynamickému poloměru. Čím větší jsou molekuly, tím méně prostoru jim hyaluronová síť poskytuje, což způsobuje pomalejší difúzi makromolekul a jejich nižší koncentraci v oblasti klubka. Řetězce hyaluronanu v roztoku jsou v neustálém pohybu a také póry, kterými mohou procházet molekuly, mění svoji velkost. Statisticky existují póry všech velkostí, ale s odlišnou pravděpodobností. Skrze hyaluronovou síť tedy mohou projít všechny molekuly, ale s odlišným rozsahem poškození v závislosti na jejich hydrodynamickém poloměru. [1]

Vlastnosti HA jsou také ovlivněny interakcí mezi jejími molekulami. V mnoha případech je organizována do extracelulárního matrixu specifickými interakcemi s ostatními matrixovými makromolekulami. Vysokomolekulový hyaluronan v roztoku vytváří propletenou molekulovou síť skrze sterické interakce a skrze vlastní asociaci v jednotlivých molekulách a mezi molekulami. Když hydrofobní část reaguje s hydrofobní části druhé molekuly, nebo s jinou hydrofobní části té stejné molekuly, tak tato síť vykazuje odlišné vlastnosti než izolovaná molekula hyaluronanu. Změnu vlastností způsobují také vodíkové můstky. Při pomalém proudění tekutiny skrze síť může docházet k částečné separaci molekul, čímž se umožní pohyb kapaliny a síť vykazuje viskózní deformaci, zatímco při rychlém proudění vykazuje síť elastické vlastnosti. [1]

Na rozdíl od ostatních glykosaminoglykanů, u nichž sulfátová skupina může být rozložena podél polymeru různými způsoby a tím umožňuje existenci ve velkém počtu rozdílných izomerů, existuje jenom jeden druh hyaluronanu. [3]

Jelikož pK karboxylových skupin na koncích glukoronové kyseliny je 3-4, v závislosti na iontových podmínkách, při pH 7 jsou tyto skupiny převážně disociované. Na každém

řetězci se nacházejí negativní náboje, které vznikají disociací karboxylové skupiny a jsou vyrovnávány mobilními kationty jako Na^+, K^+, Ca^{2+} a Mg^{2+}. Molekula HA je tedy polyanion, který je v asociaci s kationtem pro dosažení neutrality celkového náboje. Tyto náboje ovlivňují rozpustnost hyaluronanu ve vodě. Zatímco popsaný polyaniontový hyaluronan je ve vodě rozpustný, nenabitý – například methylesterifikovaný hyaluronan je nerozpustný. [1,3]

Jednou z typických vlastností kyseliny hyaluronové je vysoká viskozita jejich vodných roztoků. Viskozita, stejně jako další reologické vlastnosti jsou závislé na teplotě, koncentraci, hodnotě pH a molekulové hmotnosti. Nejčastěji je kyselina hyaluronová studována při podmínkách, kdy je dostatečná iontová síla (větší nebo rovna 0,1 M), na maskováni elektrostatického odpuzování (aniontových skupin HA řetězců obklopených kationty), s použitím NaCl, KCl nebo $NaNO_3$ (i jiných látek v závislosti na dalším použití nebo metodě měření) jako podporujícího elektrolytu, při neutrálním pH a v rozsahu teplot 20 - 37°C. Při těchto podmínkách platí, že specifická viskozita (*rovnice (9)*) homogenních roztoků při velmi nízké smykové rychlosti je jednoduchou funkcí koncentrace a molekulové hmotnosti, zahrnuté ve vnitřní viskozitě. Tento vztah je znázorněn v *rovnici (1)*, kde c označuje koncentraci, η_{sp} specifickou viskozitu, $[\eta]$ vnitřní viskozitu a k_H je Hugginsova konstanta, jejichž hodnota se mění v závislosti na převládajících interakcích a je možné jí ovlivnit mnoha způsoby, jako například volbou rozpouštědla, jeho složením, teplotou. Je ale třeba poznamenat, že roztoky hyaluronanu, které obsahují nerozpuštěné agregáty, nebo jiné struktury nezahrnuté do rovnice mohou poskytnut data, které nejsou v souladu s uvedenou rovnicí.

$$\eta_{sp} = c \cdot [\eta] + k' \cdot (c \cdot [\eta])^2 + \frac{(k')^2}{2!} \cdot (c \cdot [\eta])^3 + \frac{(k')^3}{3!} \cdot (c \cdot [\eta] \ldots)^4 \qquad (1)$$

Když známe molekulovou hmotnost a konstanty pro dané podmínky a daný rozsah molekulových hmotností *K, a* můžeme určit vnitřní viskozitu na základě Mark-Howink-Sakuradova vztahu (*rovnice (2)*), kde *M* je molekulová hmotnost. V praxi se častěji využívá opačný postup, kdy se z viskozimetrického měření určí hodnota vnitřní viskozity a ze znalosti konstant *K, a* se vypočte molekulová hmotnost. Vnitřní viskozita je ukazatelem hydrodynamického objemu hyaluronových řetězců v roztoku. Když je smyková rychlost, kterou působíme na roztok hyaluronanu vyšší než rychlost, kterou se obnovují hyaluronanové řetězce dochází k jejich deformaci a rozplétání, což způsobí pokles vnitřní viskozity. Při viskozimetrických měřeních je tedy vnitřní viskozita závislá nejen na molekulové hmotnosti, kvalitě rozpouštědla ad., ale také na smykové rychlosti. [4]

$$[\eta] = K \cdot M^a \qquad (2)$$

2.1.4 Využití

Kyselina hyaluronová je přirozeně syntetizována v těle. Imunitní systém člověka na ni reaguje pozitivně a při jeho použití v medicíně a kosmetice nedochází k nežádoucím alergickým reakcím. Organizmus jí snadno odbourává a tak nedochází k jeho zatěžování. [5]

Hyaluronan se využívá v kosmetice zejména kvůli jeho vysoké viskoelasticitě a zadržování vody. Vyskytuje se přirozeně v pokožce, ale jeho množství s věkem klesá depolymerizací. Jako doplněk v kosmetických produktech napomáhá kůži zadržovat vlhkost a to způsobuje, že pokožka vypadá mladší. [6] Ve formě krémů a gelů po aplikaci na pokožku podporuje syntézu kolagenu, čímž urychluje hojení ran a také redukuje vrásky obnovou visko-elastických vlastností pokožky. [5]

Důležitou aplikací v medicíně je použití sodné soli kyseliny hyaluronové na léčbu osteoartritidy. Tato sůl napomáhá snižování degenerace chrupavky a uvolňování proteoglykanů z chrupavkových tkání. Chrání povrch kloubní chrupavky a snižuje bolestivost. Využití má také v oftalmologii kde se využívá při léčbě šedého zákalu (nemoc která způsobuje snížení průhlednosti oční čočky). Pro toto využití byl vyvinut produkt „Healon“, který se při kataraktové operaci aplikuje na ochranu endotelu rohovky nebo jiných částí před mechanickým poškozením. [6] Současné studium využití v medicíně se zabývá specifickými interakcemi hyaluronanu a receptoru CD 44, který se nachází na povrchu nádorových buněk. Ukázalo se, že zavádění činidel, které interagují s tímto receptorem, vede ke snížení zánětlivých reakcí a místního růstu nádorů a také se snižuje šíření metastáz. [7]

2.2 Albumin

2.2.1 Úvod

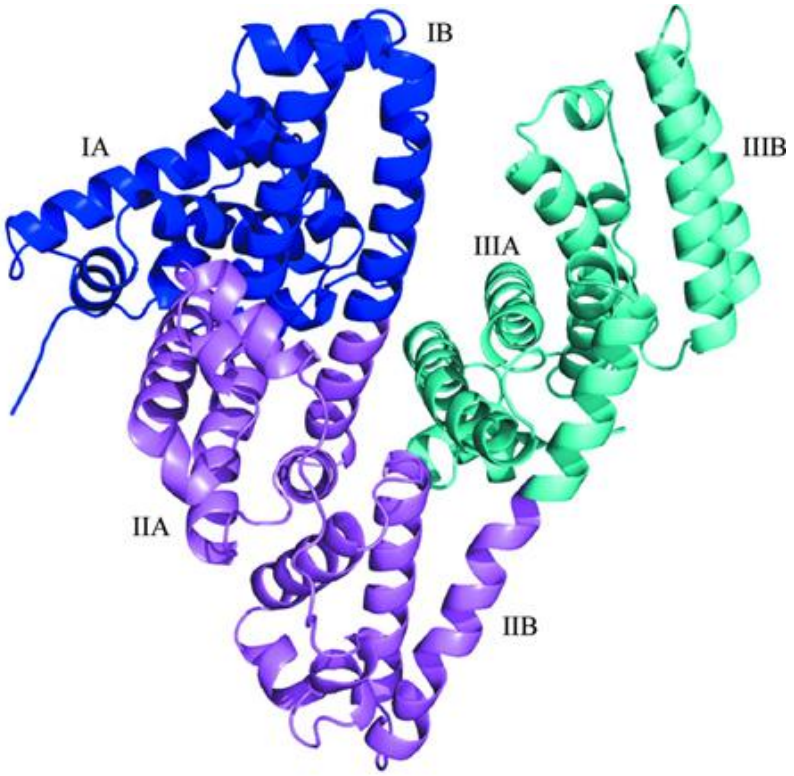
Sérový albumin je jedním z nejvíce studovaných proteinů. Je nejhojnější bílkovinou v krevní plasmě s typickou koncentrací 5 g / 100 ml. [8] Je velmi dobře rozpustný a tvoří 60 % celkové hmotnostní koncentrace plazmatických proteinů. Přispívá 80 % ke koloidnímu osmotickému krevnímu tlaku. Je také zodpovědný za udržování pH krvi a poskytuje aminokyseliny na syntézu jiných proteinů v periferních tkáních. Slouží jako transportní protein pro přenášení látek jako jsou volné mastné kyseliny, fosfolipidy, steroidní hormony a těžké kovy. [9] V těle se nachází v každé tkáni, ale v nejvyšším množství je přítomen ve svalech a v podkoží. [10]

U savců je syntetizován v játrech jako preproalbumin (preprotein), který má 609 aminokyselin. Po odstranění signálního peptidu je výsledný proalbumin dále zpracován odstraněním šesti zbytků propeptidů z N-konců. Poté je albumin vypuštěn do krevního oběhu s poločasem rozpadu 19 dnů. [9]

2.2.2 Struktura

Molekula sérového albuminu je tvořena jediným polypeptidovým řetězcem. Ten je členěný na tři homologické domény, které jsou topologicky identické a jsou si velmi podobné ve své

3D struktuře. Domény jsou rozděleny 17 disulfidickými vazbami do devíti dvojitých helixů (každá doména obsahuje tři dvojité helixy). Tyto helixy v každé doméně formují triplet sekvencí velký-malý-velký helix. Každá doména je dále složena ze dvou subdomén. [8] Subdomény jsou tvořeny α-helixy, celkový počet těchto α-helixů v krystalu albuminu je 28. Jedna subdoména je tvořena třemi nebo čtyřmi α-helixy. [10] Alfa helixy jsou v subdoménách rovnoměrně rozmístěny a nacházejí se také ve spojeních mezi doménami. Většina zbytků v dlouhých smyčkách a v oblastech spojování domén je α-helikální struktury, zatímco vnitřní částí jsou zejména nehelikální. Téměř všechny hydrofobní zbytky jsou umístěny uvnitř a mezi α-helixy, přičemž polární zbytky jsou na vnější straně struktury. [11] Subdomény, které jsou tvořeny prvními dvěma helixy, jsou značené písmenem A, subdomény tvořené třetími helixy písmenem B. Pro přesnější určení se před písmena označující subdoménu přidávají čísla, označující konkrétní helix. Subdoména IA je tvořena helixy 1 a 2, subdoména IB helixem 3, subdoména IIA helixy 4 a 5, subdoména IIB helixem 6, subdoména IIIA helixy 7 a 8 a nakonec subdoména IIIB je tvořená helixem číslo 9. [10]



Obrázek 2: *Struktura BSA s vyznačenými domény*. [13]

Kvůli vysokému obsahu alfa helixů je struktura albuminu ve větší míře alfa-helikální (67 %), menší část zabírá struktura beta skládaného listu. Rentgenová strukturní analýza ukázala, že albumin má tvar podobný srdci. [10]

Tvorba disulfidických můstků je typická pro extracelulární proteiny. Tvoří se mezi nejbližšími cysteiny a přispívají k celkové stabilitě albuminu. [10] Při neutrálním pH jsou nepřístupné pro rozpouštědla a jsou chráněny před redukčními činidly. Konformace disulfidických můstků je primárně gauche-gauche-gauche (gauche = synklinální), s torzními uhly shlukování kolem ± 80°. Tato konformace je zodpovědná za stabilitu albuminu i při

vyšších teplotách. [9] Bylo dokázáno, že albumin může být zahříván po dobu 10 hodin při teplotě 60°C bez poškození. [12] Stabilitu dále ovlivňuje koncentrace proteinu a volné thiolové skupiny ve struktuře. [9] Smyčky propojeny disulfidickými můstky umožňují molekule se reverzibilně sbalovat a rozbalovat vlivem pH. Molekula albumin je při pH 4 až 8 svinutá. Při změnách pH za tuto hranici dochází k nabíjení zbytků aminokyselin, které byly nenabité a to způsobí repulzi mezi kladnými náboji. Molekula se začne rozbalovat a dochází ke konformačním změnám, kdy vznikají různé konformery, až se molekula ustálí v konformeru, který je nejstabilnější. Jsou známy 4 konformery v závislosti na pH. [10]

2.2.3 Vlastnosti

Molekula hovězího sérového albuminu (BSA) obsahuje 583 zbytků aminokyselin (na rozdíl od lidského sérového albuminu, který jich obsahuje 585) a dosahuje molekulovou hmotnost 66,7 kDa. Průměrná šířka je 30 Å a délka 80 Å. [10] Má vysoký obsah cysteinu a nabitých aminokyselin (kyseliny asparagové, kyseliny glutamové, lysinu, argininu), což má vliv na celkový náboj molekuly. [8] Při pH 7 je na jedné molekule albuminu 185 ionizovaných skupin, isoelektrický bod má hodnotu přibližně 4,7 a isoionický 5,2. Díky tomu je albumin dobře rozpustný ve vodě při nižších koncentrací, u vyšších může docházet ke tvorbě agregátů. Celkový náboj závisí na pH, při neutrálním pH je záporný, jelikož počet kyselých aminokyselin je vyšší než bazických. Náboj proteinu nabývá hodnoty -12 až -17. Pro popis náboje při neutrálním pH se používá průměrná hodnota 15. Oproti jiným proteinům má nízký obsah tryptofanu, methioninu, glycinu a isoleucinu. [10]

Albumin dosahuje maxima absorbance v oblasti vlnových délek 260 – 290 nm. Při 400 nm a výše, což je oblast viditelného spektra, albumin neabsorbuje. [14] U absorbance albuminu hrají velkou roli zejména aminokyseliny, které obsahují aromát. Jsou to tryptofan, tyrosin a fenylalanin. [10] Při nižších hodnotách vlnových délek, v oblasti ultrafialové, absorbuje peptidová vazba. [14]

Viskozita je závislá na vnitřních vlastnostech (molekulová hmotnost, objem, tvar, povrchový náboj a snadnost deformace) a také na podmínkách okolí. Zejména na pH, teplotě, iontové síle, typu iontů, smykových podmínkách a na způsobu tepelného zpracování. Vnitřní viskozita albuminu dosahuje hodnoty 3,7 - 4,2 $ml.g^{-1}$ a narůstá se štěpením disulfidických vazeb. U roztoků, které mají koncentraci 65 $mg.ml^{-1}$ a níže viskozita narůstá se zvyšující se koncentrací lineárně, kdežto u roztoků o koncentraci vyšší než je 65 $mg.ml^{-1}$ narůstá exponenciálně. [8]

Albumin hraje významnou roli v organizmu. Mimo již popsaných úloh v těle jako je udržování pH krve a krevního tlaku, je jeho nejvýraznější vlastností na sebe reverzibilně vázat neuvěřitelné množství ligandů. Působí jako rezervoár a zároveň přenašeč endogenních látek (například bilirubin a mastné kyseliny) a exogenních látek (léčiva a živiny) v krvi. [15] Je hlavním nosičem mastných kyselin, které jsou jinak v plasmě nerozpustné. Má vysokou afinitu k mastným kyselinám, hematinu a k malým záporně nabitým aromatickým sloučeninám. Vytváří kovalentní adukty s kovy jako Cu (II), Ni (II), Hg (II), Ag (II), a Au (I). Je rezervoárem a nosičem oxidu dusnatého. [8]

2.2.4 Využití

BSA se využívá zejména jako náhrada lidského albuminu při testování a to jako standard při přípravě vakcín, jako léčivo samo o sobě, v imunologických testech a mnoha dalších. [13]

Aktuální studium využití v medicíně se zabývá zejména schopností albuminu na sebe vázat léčivo a také jak samotná interakce s albuminem ovlivňuje vlastnosti léčiva. Jelikož u hydrofobních léčiv albumin zvyšuje jejich rozpustnost v plasmě, významně ovlivňuje účinnost léčiva. Předmětem studia je také možnost využít albumin pro transport nanočástic. [16]

2.3 Polysacharid - proteinové interakce

Při míchání polysacharidů a proteinů může docházet k dvěma odlišným jevům. Biopolymery se můžou vzájemně odpuzovat (jsou nekompatibilní, nastává segregace) nebo se vzájemně přitahují (nastává asociace). Stabilita těchto směsí závisí na jejich vzájemné koncentraci. U velmi zředěných roztoků je vznikající systém stabilní, protože převažuje směšovací entropie a proteiny s polysacharidy jsou mísitelné. Při zvyšování koncentrace může docházet k nestabilitě v závislosti na typu interakcí. Biopolymerní směsi mají většinou tendenci segregovat, což snižuje stabilitu systému. U polymerů podobné struktury a tvaru je to způsobováno rozdílem interakční energie mezi segmenty polymerů. U strukturně rozdílných polymerů v důsledku segregace dochází ke snížení koncentrace jednoho polymeru v okolí polymeru druhého, což je zapříčiněno ztrátou konformační entropie poblíž rozhraní. Překročení určité koncentrace vede k fázové separaci, k rozdělení směsi na protein-obohacenou a polysacharid-obohacenou fázi. Nestabilitu polymerních směsí ale může také způsobit příliš silné vzájemné přitahování, kdy se polysacharid adsorbuje na povrch proteinu. Když množství polymeru není dostatečné na to, aby pokrylo celý povrch proteinu, polysacharid se může adsorbovat na více než jen na jednom povrchu proteinu, čímž spojuje více proteinových částic. U směsí polysacharid-protein tedy buď dojde k tomu, že se polysacharid naadsorbuje na protein nebo způsobí vzájemné přitahování proteinových částic, což vede k fázové separaci. [17]

Pro proteiny jsou typické jejich emulgační vlastnosti, zatímco polysacharidy jsou známy svou vlastností zadržovat vodu. Jelikož se často tyto biopolymery vyskytují ve formě vícesložkové směsi, je složité rozlišit jejich jednotlivé role. Celková interakce mezi dvěma biopolymery je závislá na mezimolekulových silách, které nastávají mezi jednotlivými segmenty a postranními řetězci dvou makromolekul, na jejich četnosti a vzájemném poměru typů interakcí. Těmito mezimolekulovými silami můžou být:

- kovalentní vazby - velmi silné vazby, které zvyšují stabilitu komplexů
- elektrostatické interakce - Coulumbicka síla, která může být odpudivá nebo přitažlivá v závislosti na tom, zda jsou náboje stejné nebo opačné, je závislá na pH
- vyloučený objem - odpudivé interakce nastávající při překryvu elektronových oblaků

- vodíkové vazby - přitažlivé interakce, jejich vliv se zvyšující teplotou stává méně významným
- hydrofobní síly - přitažlivé interakce mezi nepolárními skupinami, jejich síla roste se zvyšující se teplotou
- iontové přemostění - druh Coulombické interakce mezi vícemocnými kationty a dvěma rozdílnými anionty
- Van der Waalsovy síly - slabé přitažlivé interakce, mezi skupinami, které mají dipól. [18]

2.3.1 Současný stav problematiky interakcí

Práce *Lenormand a spol.* [19] mimo jiné sledovala chování hyaluronan - albuminových směsí při pH 4 a prokázala, že hyaluronan tvoří s albuminem elektrostatické komplexy v rozmezí molekulových hmotností HA 10^3 - 10^6 g.mol^{-1}. Rozpustnost těchto komplexů je závislá na molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové, tedy na délce jejího řetězce. Komplexy o molekulové hmotnosti HA menší než 4 000 g.mol^{-1} jsou rozpustné a vysoce nabité. Se zvýšením molekulové hmotnosti do maximálních hodnot 37 000 g.mol^{-1} dochází ke vzniku sedimentujících komplexů, které mají nižší, prakticky žádný náboj. Při molekulové hmotnosti do 15 000 g.mol^{-1} vznikají nerozpustné komplexy, stejně jako při hodnotách do 200 000 g.mol^{-1}, kde ale navíc vznikají i slabě nabité sedimentující komplexy.

Dále bylo v této práci zjištěno, že pro roztoky o koncentraci HA a BSA 0,2 a 1 g.l^{-1}, při pH 4 je ideální stechiometrický poměr roven 36 disacharidovým jednotkám HA na jednu molekulu BSA. Ze skutečnosti, že tato stechiometrie je stejná při všech molekulových hmotnostech vyplývá, že HA - BSA komplexy mají odlišnou strukturu v závislosti na délce hyaluronanového řetězce. Na základě tohoto zjištění autoři popsali tři pravděpodobné typy komplexů. V případě kratšího řetězce hyaluronanu je jedna molekula albuminu obklopena několika fragmenty HA. U delších řetězců naopak několik molekul BSA obklopuje jeden fragment HA. U střední hodnoty délky řetězce jeden fragment hyaluronanu obklopuje jednu molekulu albuminu. [19]

V práci *Jana Zemana* [20] byly mimo jiné sledovány interakce HA - BSA při koncentracích albuminu v rozmezí 0,1 - 5 g.l^{-1}. Při reologickém měření bylo zjištěno, že relativní viskozita se mění následujícím způsobem:

- při nejnižší koncentraci BSA je relativní viskozita nižší než viskozita samotného roztoku HA
- zvyšováním koncentrace albuminu po hodnotu 0,3 g.l^{-1} relativní viskozita roste
- po zvýšení koncentrace BSA na 1 g.l^{-1} dochází k poklesu viskozity
- při dalším zvyšování koncentrace viskozita roste

Tento jev je vysvětlován změnami ve struktuře a konformaci hyaluronanových řetězců důsledkem navazujících se molekul albuminu.

Dále byly v této práci spektrofotometricky proměřeny roztoky o stejném složení jako v případě reologického měření. Bylo zjištěno, že největší nárůst absorbance vykazují roztoky

o koncentracích 0,1 a 1 $g.l^{-1}$. Poté při vlnové délce 280 nm se zvyšující se koncentrací se jejich absorbance výrazně nemění po koncentraci 3 $g.l^{-1}$. Po dosažení této koncentrace absorbance stoupá, což bylo vysvětleno pravděpodobným plným obsazením hyaluronanového řetězce molekulami BSA. Při vlnové délce 400 nm, byla u koncentrace 1 $g.l^{-1}$ naměřena nejvyšší absorbance, která následně klesala. Mírně stoupala pro nejvyšší koncentraci BSA. Tento pokles absorbance při vyšších koncentracích by mohl být způsoben narušováním agregátu s dalším navazováním molekul BSA. [20]

Práce *Qiaomei a spol.* [21], navazuje na předešlé studie, kterými bylo zjištěno, že při určitém pH proteiny interagují s anionickými polysacharidy za vzniku protein–polysacharidových komplexů, které jsou rozpustné. Toto pH je značeno jako první kritické pH. Při druhém kritickém pH dochází k nárůstu turbidity, což značí agregaci rozpustných komplexů na komplexy nerozpustné. Při třetím kritickém pH nerozpustné komplexy disociují na komplexy rozpustné. Dále navazuje na studie, které zjistily, že i když obecně platí, že přídavek soli snižuje tvorbu protein – polysacharidových koacervátů, při určitých koncentracích solí naopak docházelo k jejich zvýšené tvorbě. Tato práce sledovala turbidimetrické a reologické vlastnosti koacervátů BSA a pektínu a prokázala závislost na koncentraci přidané soli a počátečním BSA – pektínovém poměru. Prokázala, že zvyšování koncentrace soli od 0,01 M po 0,4 M, vede ke snižování hodnoty prvního kritického pH. Zvyšování počátečního poměru BSA – pektín z 1:1 na 10:1 vede ke zvýšení prvního kritického pH a snížení druhého kritického pH, čím dochází k zmenšení intervalu mezi těmito dvěma kritickými hodnotami a to podporuje tvorbu koacervátů. [21]

2.4 Reologie

2.4.1 Úvod

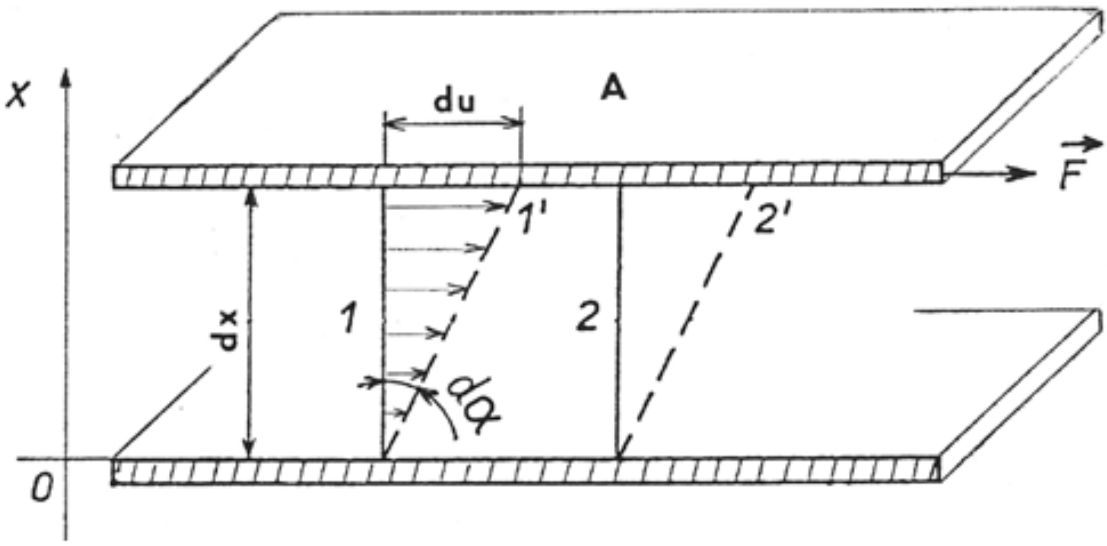
Pojem reologie je složen ze dvou slov: *rhein* a *logos*, což se dá přeložit jako nauka o toku, tedy nauka o odpovědi hmoty na mechanický podnět. [22] Popisuje změny kapalin, plynů i pevných látek jako následek působení vnějších sil. Ideální pevné látky se při působení vnějšího napětí deformují elasticky. Energie, která byla vložena na tuto deformaci, je plně obnovena po odstranění působícího napětí. Ideální kapaliny a plyny, se naproti tomu deformují nevratně, „tečou“, jsou viskózní. Energie, která je potřebná na tuto deformaci, se disipuje ve formě tepla a neobnoví se pouhým odstraněním napětí, které způsobilo deformaci. Reálné látky, se ale takto nechovají. Reálné pevné látky se také mohou deformovat nevratně a většina reálných tekutin vykazuje reologické vlastnosti, které jsou někde mezi látkami pevnými a kapalnými. Chovají se tedy viskoelasticky. [23]

K studiu reologie nedělitelně patří pojem viskozita. Ta je mírou vnitřního odporu materiálu, který je kladen pohybu částic nebo molekul. Tento odpor vzniká v důsledku mezimolekulových přitažlivých sil a chaotického tepelného pohybu. Čím je tepelný pohyb intenzivnější, tím je viskozita nižší, proto ve většině případů hodnota viskozity klesá s teplotou. Viskozita je ovlivňována mnoha faktory, jako jsou například tvar částic, náboj částic, adsorpce, solvatace a bobtnání. Výjimečné viskozitní chování se objevuje u lineárních polymerů. U těch dochází v roztoku k pohybu řetězců a ke změnám v konformaci, přičemž se

tvoří jakési „klubko“. Možnost vzniku makromolekulového klubka a jeho vlastnosti jsou závislé na tom zda a do jaké míry jsou polymerní řetězce ohebné (pokud jsou neohebné a tuhé není možné jejich svinutí a vznik klubka). Jestliže je klubko tvořené z více ohebných řetězců, zadržuje se v něm kapalina (tzv. neprůtočné klubko) a tím dochází ke zvýšeným hodnotám redukované viskozity (*rovnice (10)*). U látek, které mají méně ohebné řetězce je toto klubko méně propletené a rozpouštědlo skrze něj může proudit (tzv. průtočné makromolekuly). To, do jaké míry dojde ke svinutí makromolekuly do klubka, závisí na míře afinity polymeru k rozpouštědlu. V případě vyšší afinity, se polymer snaží dostat co nejvíc svých skupin do kontaktu s rozpouštědlem a proto je klubko méně svinuté a má nižší hustotu řetězců uvnitř klubka. Tím zadržuje více vody a viskozita je vyšší. U nižší afinity se naopak polymer více svine a klubko je méně rozvolněné. To se projeví nižší viskozitou, jelikož klubko není schopno zadržovat tolik rozpouštědla. U polyelektrolytov ovlivňuje viskozitu i přítomnost protiiontů v roztoku, a iontová sila roztoku. Vysokomolekulární elektrolyt tvoří vlivem odpudivých elektrostatických interakcí větší rozpletenější klubko o menší hustotě než by tvořil v případě kdy by neměl žádné náboje (u nenabitého polymeru nedochází k takovým odpudivým interakcím, které by způsobovaly rozvolňování klubka). S menší hustotou klubka dochází ke zvyšování viskozity. Přídavkem nízkomolekulového elektrolytu (při určité hodnotě iontové síly, při které dochází k vzájemnému rušení odpudivých interakcí) se v okolí nabitých skupin vytváří iontová atmosféra s opačně nabitými ionty, což snižuje elektrostatické síly a svinutí se jeví jako v případě nenabitého polymeru. Přidávání nizkomolekulového elektrolytu k vysokomolekulovému tedy snižuje viskozitu jeho roztoku. [24]

2.4.2 Definice

Pro vysvětlení základních reologických pojmů se využívá následující model (model paralelních desek (*Obrázek 3*). Představme si dvě rovnoběžné desky, mezi kterými je vzdálenost d*x* (rozteč). Spodní deska je statická, ale na vrchní desku působí síla *F*, která způsobí její pohyb konstantní rychlostí. Tím, že se pohybuje, dojde k jejímu posunutí vůči spodní nehybné desce. Toto posunutí se značí *du* a síla, která působí na plochu desky se nazývá smykové nebo tečné napětí σ .



***Obrázek 3**: Model paralelních desek.* [22]

To je dáno poměrem síly *F*, která působí na nestatickou desku a plochou této desky *A*:

$$\sigma = \frac{F}{A}\left[\mathrm{kg}\cdot\mathrm{m}^{-1}\cdot\mathrm{s}^{-2}\right]. \tag{3}$$

Poměr posunutí a rozteče udává relativní deformaci γ:

$$\gamma = \frac{\mathrm{d}u}{\mathrm{d}x}. \tag{4}$$

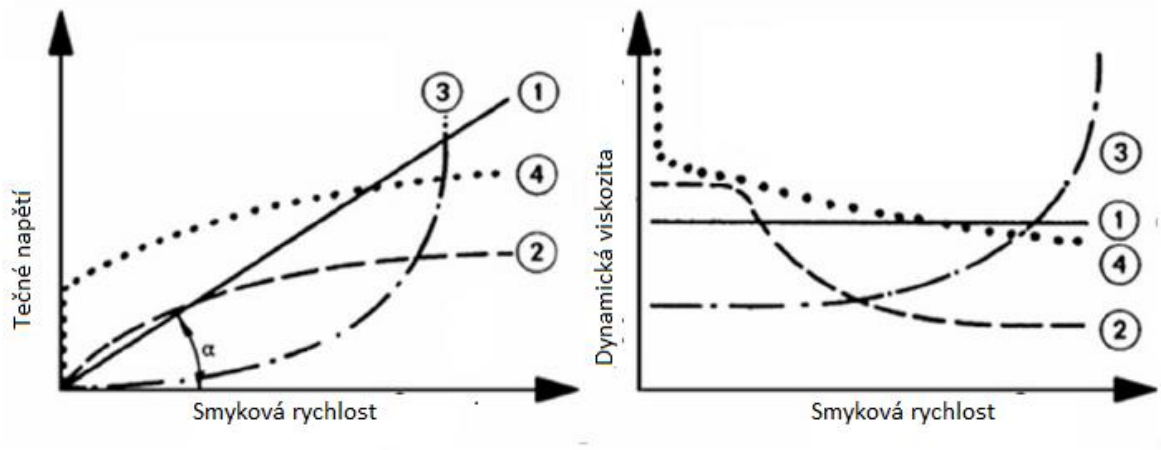
Časová změna této deformace se nazývá smyková rychlost $\dot{\gamma}$:

$$\dot{\gamma} = \frac{\mathrm{d}\gamma}{\mathrm{d}x} = \frac{\mathrm{d}u}{\mathrm{d}x\mathrm{d}t}. \tag{5}$$

Newtonův zákon definuje vztah mezi tečným napětím a smykovou rychlostí, kde konstantou úměrnosti je dynamická viskozita $\eta\,[\mathrm{Pa}\cdot\mathrm{s}]$. [22]

$$\sigma = \frac{F}{A} = \eta\cdot\frac{\mathrm{d}\gamma}{\mathrm{d}t} = \eta\cdot\dot{\gamma} \tag{6}$$

Podle toho, zda se kapaliny tímto zákonem řídí, je dělíme na newtonovské, u kterých viskozita zůstává s narůstajícím tečným napětím konstantní a nenewtonovské, u kterých se viskozita s narůstajícím tečným napětím mění. U newtonovských kapalin závislost smykové rychlosti na tečném napětí začíná v nule a dále se lineárně zvyšuje pod uhlem α vzhledem k ose na které je vynesena smyková rychlost (*Obrázek 4*). Kapaliny, které se takto nechovají označujeme za nenewtonovské. Tyto dále dělíme na dilatantní, které s rostoucí smykovou rychlostí zvyšují svou viskozitu, pseudoplastické, které naopak s rostoucí smykovou rychlostí svou viskozitu snižují a plastické, které se i při působení tečného napětí chovají jako tuhý systém a vykazovat tok začnou až po překročení určitého tečného napětí, které se nazývá mez toku. Poté se jejich viskozita snižuje s rostoucí smykovou rychlostí. [22,23]



Obrázek 4: *Rozdílné tokové chování: 1 je newtonovská kapalina, 2 je pseudoplastická, 3 dilatantní a 4 je plastická kapalina.* [23]

Z předešlého vztahu tedy vyplývá, že dynamická viskozita se rovná hodnotě tečného napětí podělené hodnotou smykové rychlosti (*rovnice (7)*).

$$\eta = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}} \tag{7}$$

Dalším významným pojmem, který se uplatňuje zejména při měření pomocí kapilárních viskozimetrů je kinematická viskozita. Ta je ve vztahu s dynamickou viskozitou podle *rovnice (8)* , kde ρ je hustota. [23]

$$\nu = \frac{\eta}{\rho} \tag{8}$$

Specifická viskozita (η_{sp}) udává přírůstek viskozity vztažený na viskozitu čistého disperzního prostředí (η_0).

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} \tag{9}$$

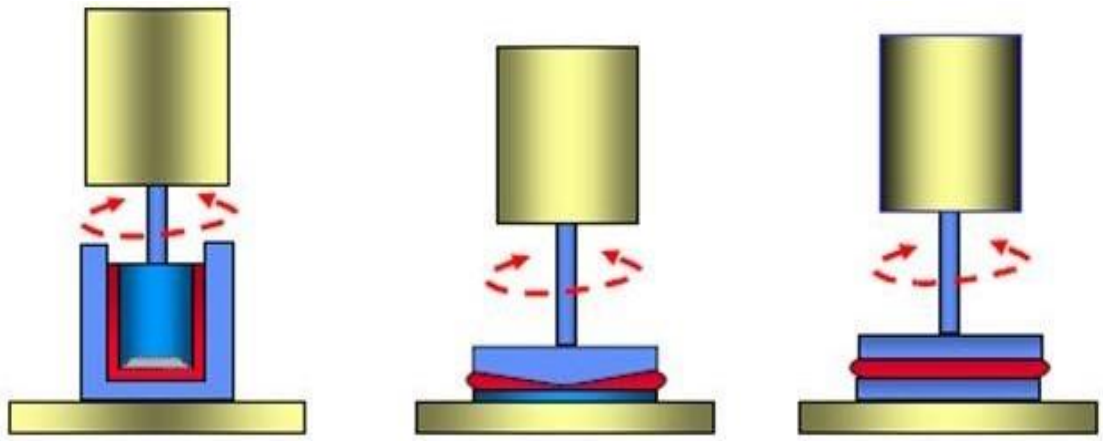
Podělením specifické viskozity hodnotou hmotnostní koncentrace získáváme redukovanou viskozitu (η_{red}).

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} \tag{10}$$

2.4.3 Měřící systémy

Pro měření reologických vlastností látek se využívá přístroj reometr, který se skládá ze statické a rotující části, u které se na rotující hřídel připojují měřící geometrie. Geometrií je

několik typů, které se vzájemně liší svým tvarem a rozměry a výběr použité geometrie závisí jak na typu vzorku, tak na jeho viskozitě. Mezi základní typy geometrií patří: systém souosých válců, systém kužel – deska a systém deska – deska. [22]



Obrázek 5: *Typy geometrií, nalevo typ válec-válec, vprostřed kužel-deska, napravo deska-deska.* [25]

Systém souosých dvouválců se využívá k měření kapalin s nižšími viskozitami, u kterých jsou potřebné vyšší smykové rychlosti. Systém je složen ze dvou válců - statického a rotujícího - mezi kterými se nachází měřená kapalina. Nevýhodou tohoto systému je vyšší spotřeba vzorku a složitější čištění geometrie. Při použití této geometrie platí pro tečné napětí vztah popsaný v *rovnici (11),* kde M_z je točivý moment rotujícího válce, R_1 a R_2 jsou poloměry válců.

$$\sigma = \frac{M_z}{2 \cdot \pi \cdot \left(R_2^2 - R_1^2\right) \cdot H} \tag{11}$$

2.4.4 Tokové testy

Tokové testy slouží k měření smykové rychlosti s nastavením tečného napětí nebo k měření tečného napětí s nastavením smykové rychlosti. Dva základní typy měření jsou kontinuální rampa a režim ustáleného stavu. U obou je snímání prováděno v zadaných intervalech. Výhodou kontinuální rampy je možnost rychle zmapovat tokové vlastnosti dané tekutiny, ale s kratší dobou trvání testu se snižuje přesnost výsledků. Vyšší přesnosti dosahuje režim ustáleného stavu, ve kterém se odečítá měřená hodnota až po dosažení ustálení. Za ustálení se považuje stav, kdy se měřená veličina po definovanou dobu nemění o více než nastavenou procentuální odchylku. [22]

2.5 UV – VIS Spektrometrie

UV - VIS spektrometrie (také nazývána spektrofotometrie) je analytickou metodou zabývající se elektronovými spektry látek, které absorbují elektromagnetické záření v ultrafialové až

viditelné oblasti. Tato oblast je ohraničena hodnoty vlnových délek 200 až 800 nm. Látky, které absorbují záření v rozhraní vlnových délek 380 až 770 nm jsou látky barevné, látky které absorbují pod hodnotou 380 nm jsou bezbarvé.

Jako zdroj záření se v spektrometrech využívají deutériové výbojky pro UV oblast a wolframové nebo halogenové žárovky pro oblast viditelnou. Vzorky jsou pro měření dávkovány do kyvet, které realizují absorbující prostředí a musí splňovat několik kritérií. Jejich vnitřní tloušťka musí být konstantní a známá a může se pohybovat v rozmezí od 0,1 do 10 cm. Dále musí být tvořeny z materiálu, který v měřené oblasti neabsorbuje. Nejvhodnější pro UV - VIS spektrometrii jsou kyvety křemenné. Kyvety skleněné umožňují měření pouze ve VIS oblasti, jelikož v UV oblasti absorbují. [26]

Měřenými spektrofotometrickými veličinami mohou být

- Transmitance

$$T = \frac{I}{I_0} \; [\%], \tag{12}$$

kde I je intenzita záření prošlého vzorkem, a I_0 je intenzita záření prošlého srovnávacím vzorkem (slepým vzorkem).

- Absorbance

$$A = -\log\frac{I}{I_0} = -\log T\,. \tag{13}$$

- Absorptance

$$\alpha = 100 - T(\%)\,. \tag{14}$$

Absorbance je dále definována Lambert – Beerovým zákonem (*rovnice (15)*), kde ε je molární absorpční koeficient, *l* je délka absorbující vrstvy a *c* je koncentrace analytu. [27]

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l\,. \tag{15}$$

Spektrometry mohou být dvojího uspořádání, jako spektrometry jednopaprskové a dvoupaprskové. U jednopaprskových prochází záření nejprve monochromátorem, poté kyvetou a dopadá na detektor. V přístrojích s diodovým polem (diode - array), je detektor nahrazen fotodiodami a monochromátor je umístěn až za kyvetou. Tyto poskytují dokonalejší způsob vyhodnocování absorbance. U dvoupaprskových spektrometrů se paprsek po výstupu z monochromátoru rozdělí, přičemž jedna část prochází měrnou kyvetou a druhá srovnávací kyvetou. Využívají se také „ratio – recording“ spektrofotometry, kdy je paprsek po výstupu

z monochromátoru pomocí rotujícího polokruhové zrcadla nasměrováván střídavě do kyvety se vzorkem a do srovnávací kyvety. [26]

2.5.1 Turbidimetrie

Turbidimetrie je analytická metoda sloužící k pozorování rozptylu světla skrze částice, které jsou v roztoku suspendovány. Těmito částicemi můžou být různé sraženiny nebo koloidní částečky. Ve směru procházejícího záření je umístěn detektor, který sleduje intenzitu rozptýleného záření prošlého kyvetou se vzorkem. Rozptyl světla se projevuje ve všech směrech, včetně směru přímého.[26]

Zdánlivá absorbance (turbidance) je dána vztahem:

$$S = \log\frac{I_0}{I'} = \frac{k \cdot r^3}{r^4 + \alpha \cdot \lambda^4} \cdot c \cdot l = \eta_T \cdot c \cdot l \,. \qquad (16)$$

Kde je η_T turbiditní koeficient, I_0 je intenzita primárního záření, k je konstanta zahrnující povahu zákalu a způsob měření, α je konstanta, jejíž hodnota je závislá na uspořádání měření a r je střední poloměr částice. Závislost zdánlivé absorbance na koncentraci je lineární při nízké koncentraci měřeného vzorku. Zvýšením koncentrace dochází ke zvýšenému rozptylu a křivka závislosti se zakřivuje směrem k ose x. [27]

Intenzita záření, které prošlo vzorkem, se srovnává s intenzitou záření, které prošlo čistým rozpouštědlem. Jelikož tvar a velkost částic ovlivňují rozptyl světla, je nutné, aby při měření bylo tyto vlastnosti stejné. [26] Měření se může provádět na všech druzích spektrofotometrů a fotometrů, které využívají UV – VIS monochromatického záření. [26,27]

3 Experimentální část

3.1 Používané chemikálie a přístroje

Chemikálie

- Hyaluronan (90 – 130 kg.mol^{-1}), Contipro Pharma, a.s.
- Hyaluronan (1 500 – 1 750 kg.mol^{-1}), Contipro Pharma, a.s.
- Hovězí sérový albumin, čistota ≥ 98 %, Sigma-Aldrich
- *MILI - Q* voda
- Chlorid sodný, M_r = 58,443, Lach-Ner s.r.o.
- Dihydrát hydrogenfosforečnanu disodného, M_r = 177,99, obsah 99 %, Penta
- Monohydrát kyseliny citronové, M_r = 210,14, obsah 99,8 %, Penta

Přístroje

- reometr AR - G2, TA instruments
- UV - VIS spektrofotometr, HITACHI
- pH - metr SevenMulti, Mettler Toledo

3.2 Příprava roztoků

Nejdříve byl připraven citrátovo - fosfátový pufr z vodného roztoku kyseliny citrónové o koncentraci 0,05 mol.dm^{-3}, s přídavkem chloridu sodného o koncentraci 0,15 mol.dm^{-3} a z fosforečnanu disodného o koncentraci 0,1 mol.dm^{-3}, také s přídavkem chloridu sodného o koncentraci 0,15 mol.dm^{-3}. Tyto látky byly podle výpočtů naváženy v suchém stavu na analytických váhách s přesností na čtyři desetinná místa a poté byly analyticky převedeny do odměrné baňky a doplněny po rysku *MILI-Q* vodou. Oba roztoky byly ponechány na magnetické míchačce do úplného rozpuštění suchých částí. Poté byl roztok fosforečnanu s chloridem sodným přidáván pomocí automatické pipety k roztoku kyseliny citrónové s chloridem sodným za současného měření pH k docílení pH v rozmezí 7,2 - 7,3. Připravený pufr byl následně přefiltrován a jeho pH bylo opět změřeno. V případě vysokých rozdílů bylo jeho pH upraveno přidáním fosforečnanu (v případě příliš nízkého pH) nebo kyseliny citrónové (v případě příliš vysokého pH).

Zásobní roztoky HA v pufru byly připraveny následujícím způsobem. Hyaluronan v práškové formě byl nejprve kvůli svojí hygroskopicitě sušený při teplotě 90°C po dobu 20 minut. Poté byl podle výpočtů navážen na analytických váhách na předem zvážených váženkách, s přesností na čtyři desetinná místa k dosažení koncentrace zásobního roztoku u vysomolekulové HA 2 g.l^{-1}, u nízkomolekulové HA 5 g.l^{-1}. Navážka HA byla postupně rozpouštěna v pufru, kdy byla do lahvičky umístěné na magnetické míchačce (nastaveno 250 ot / min) převedena část pufru a část navážky. Po dostatečném zhydratování přisypaného podílu bylo přidáno další množství obou komponent a stejným způsobem se pokračovalo v přípravě roztoku, dokud nebylo dosaženo přidání předem vypočteného množství. Váženky byly opět zváženy na analytických váhách, k zjištění skutečného množství přidaného

hyaluronanu a na základě toho byl upraven přídavek pufru. Připravený roztok byl ponechán 24 hodin na magnetické míchačce k docílení dostatečné homogenity roztoku.

Obdobným způsobem byl připraven i zásobní roztok albuminu v pufru o koncentraci 40 $g.l^{-1}$. K zvýšení homogenity byl roztok umístěn na 30 minut do ultrazvuku. U kyseliny hyaluronové nebylo možné tento způsob dosažení maximální homogenity uplatnit, jelikož tato látka působením ultrazvuku degraduje. [28]

Ze zásobních roztoků byly připraveny následující roztoky:

- BSA v pufru v rozsahu koncentrací 0,25 - 20 $g.l^{-1}$
- BSA v pufru v rozsahu koncentrací 0,25 - 20 $g.l^{-1}$, s vysokomolekulovou HA o koncentraci 1$g.l^{-1}$, BSA v pufru v rozsahu koncentrací 0,25 - 20 $g.l^{-1}$, s nízkomolekulovou HA o koncentraci 2,5 $g.l^{-1}$
- vysokomolekulová HA v pufru o koncentraci 1$g.l^{-1,}$ nízkomolekulová HA v pufru o koncentraci 2,5 $g.l^{-1}$

Všechny uvedené roztoky byly připravované při dvou teplotách. Jedna sada vzorků byla ponechána po dobu 24 hodin na magnetické míchačce při laboratorní teplotě. Druhá sada byla na 24 hodin vložena do vodní lázně, která byla umístěná na magnetické míchačce do sušárny nastavěné na teplotu 37°C.

Roztoky byly po přípravě uchovány v chladu až do dalšího použití.

3.3 Měření pH

Pro měření pH byl použit pH metr od firmy Mettler Toledo Seven Easy, který byl nakalibrován pomocí sady pufrů na kalibraci od firmy Mettler Toledo o pH 4; 7 a 9. Roztoky byly před měřením vytemperovány na laboratorní teplotu, která kolísala kolem 25°C. Měření bylo prováděno při zapnuté funkci ATC – *Auto Temperature Control* – která převádí naměřenou hodnotu vzorku o jiné teplotě na hodnotu pH při 25°C. Elektroda byla před každým použitím omyta destilovanou vodou, následně osušena vatovou buničinou a až poté vložena do roztoků. Po započetí měření bylo každých 30 sekund zaznačeno aktuální pH až do dosažení ustálení. Za ustálení bylo považováno 5 po sobě jdoucích hodnot, které byly stejné, nebo byl mezi nimi rozdíl menší než 1 %. V tom případě bylo jako výsledné pH vzata průměrná hodnota těchto 5 dat.

3.4 Měření turbidity

Připravené roztoky byly vytemperovány na laboratorní teplotu. Následně byly vzorky převedeny do centrifugačních zkumavek a odstředěny po dobu 30 minut při 4 000 ot/min, pro odstranění bublinek a případných nečistot a zejména pro dosažení usazení pevného podílu, který u některých vzorků vzniká jako projev interakcí a tvorby agregátů. Pro samotné měření byly supernatanty převedeny do křemenných kyvet. Tyto kyvety, s optickou délkou 1 cm, byly před každým použitím vypláchnuty destilovanou vodou, ethanolem a vysušeny proudem vzduchu. Spektrofotometr U-3900H od firmy Hitachi High-Tech byl nastaven na měření

absorbance v rozsahu vlnových délek 700 - 250 nm s rychlostí skenování 120 nm/min a s počtem měření 2. Poté byly jako *blank* vloženy dvě křemenné kyvety obsahující pufr, použitý k přípravě roztoků a byla změřena *baseline* (základní čára). Pufr v jedné z kyvet byl nahrazen kyvetou obsahující vzorek určený k měření a byla proměřena absorbance. K dalšímu zpracování byly vybrány hodnoty absorbancí při vlnových délkách 280 nm a 400 nm. První hodnota je z oblasti, kdy absorbance albuminu dosahuje maxima (260 – 290 nm) a vyšší vlnová délka představuje oblast, kde již albumin neabsorbuje a naměřená hodnota představuje turbiditu vzorku.

3.5 Měření reologických vlastností

Měření bylo provedeno na reometru AR - G2 od firmy TA Instruments a ke zpracování dat byl také použit program od této firmy – TA Data Analysis. U všech vzorků byla použita geometrie válec – válec, "double gap concentric cylinders" (systém souosých dvouválců), s dvojitou mezerou. Jednotlivé roztoky byly před měřením vytemperovány na laboratorní teplotu, geometrie byla očištěna destilovanou vodou, ethanolem a poté vysušena. Přístroj byl nakalibrován podle doporučení výrobce. Poté byly do měřící geometrie nadávkovány roztoky pomocí automatické pipety. Roztoky, které byly připravovány při laboratorní teplotě, byly proměřeny při 25°C a 37°C a vzorky, které byly inkubovány při 37°C, byly měřeny při 25°C. Každý roztok byl proměřen dvakrát s využitím 10 minutové relaxační pauzy mezi měřeními.

Měření probíhalo pomocí následujících testů:

- *Conditioning step 1* – sloužících k vytemperování vzorků po dobu 5 minut při smykové rychlosti 50 s^{-1}. U jedné sady vzorků byla nastavena teplota 25°C, u druhé 37°C. Vybraná teplota byla dále používaná po celou dobu měření.
- *Continuous ramp step* – pomocí kterého, byl proměřen vzorek při smykové rychlosti 0,01 – 1000 s^{-1} s nastavěnou dobou měření 5 minut. Naměřené hodnoty byly použity pro graf závislosti viskozity na smykovém napětí, na základě kterého byl vybrat vhodný rozsah smykového napětí pro následující měření.
- *Steady state flow step 1* - který odečítá hodnoty tokových vlastností měřené kapaliny až po dosažení ustáleného stavu. Bylo nastaveno smykové napětí, na základě výsledků z Continuous ramp step. Pro samotnou kyselinu hyaluronovou to byl rozsah 0,1 - 4 Pa. Tento rozsah byl postupně zmenšován se vzrůstající koncentrací albuminu.
- *Conditioning step 2* – kdy byl vzorek ponechán relaxovat po dobu 10 minut.
- *Steady state flow step 2* – viz. *Steady state flow step 1*.

Měření se skládala z několika kroků, při prvním měření byly kroky uspořádány v následujícím pořadí: *Conditioning step 1, Continuous ramp step, Conditioning step 2, Steady state flow step 1.* Poté byl nádávkován nový vzorek, který byl proměřen v pořadí: *Conditioning step 1, Steady state flow step 1, Conditioning step 2, Steady state flow step 2.*

Tímto způsobem byly proměřeny všechny roztoky popsané v přípravě roztoků, s výjimkou roztoků obsahujících jenom albumin, které byly připraveny při laboratorní teplotě. U těchto

roztoků byla změřena celá koncentrační řada při teplotě 25°C, ale pro měření při teplotě 37°C byly z časových důvodů vybrány pouze vzorky s koncentrací albuminu 1; 5 a 20g.l^{-1}.

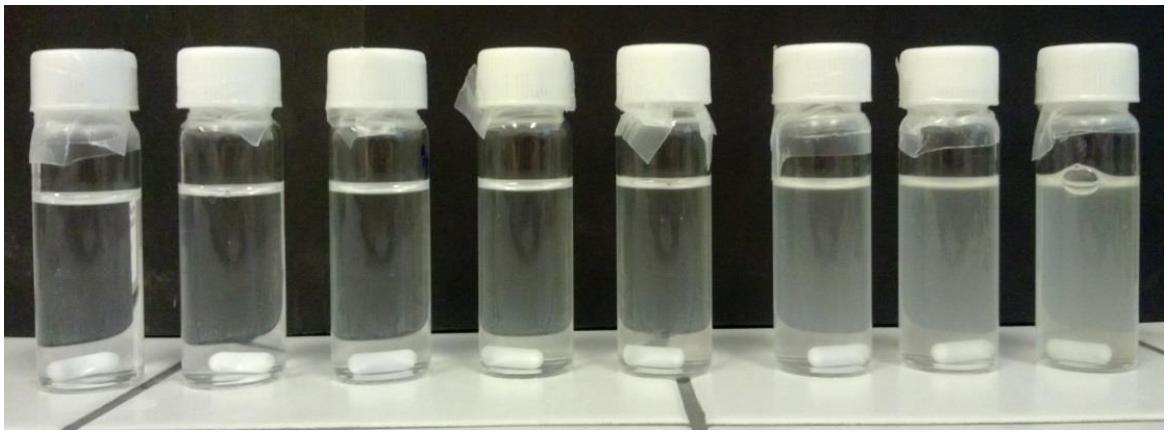
4 Výsledky a diskuze

4.1 Měření turbidity

Z měření roztoků byly získány hodnoty absorbancí při vlnových délkách 250 - 700 nm. Tyto hodnoty byly vyneseny do grafů jako závislost absorbance na vlnové délce, byly tedy získána absorpční spektra. Dále bylo pracováno s hodnotami absorbancí při dvou vlnových délkach: u délky 280 nm, kdy albumin dosahuje svého absorpčního maxima a u délky 400 nm, kde již albumin neabsorbuje. [13] Pro další zpracování byly pro vlnovou délku 280 nm použity pouze hodnoty absorbancí do maximální koncentraci BSA 5 g.l^{-1}, jelikož absorpční spektra u vyšších koncentrací ukázaly v této oblasti velké odchylky a tudíž toto měření nebylo vhodné pro tak vysoké koncentrace. Při interpretaci výsledků u maxima absorbance je ale potřeba zohledňovat příspěvek turbidity, proto byla od těchto hodnot odečtená turbidita a byla vynesena závislost $A_{280} – A_{400}$ na koncentraci BSA. Pro vlnovou délku 400 nm byly použity hodnoty absorbancí v celém rozsahu koncentrací. Hodnoty absorbancí u těchto hodnot vlnových délek, tedy hodnoty turbidity byly vyneseny do grafů jako závislost na koncentraci BSA. Byla vypočtena relativní absorbance pro rozsah koncentrací BSA 0,25 g.l^{-1} až 5 g.l^{-1} jako rozdíl absorbancí A_{280}-A_{400} u roztoků obsahujícího BSA a HA (A_{HB}) podělena rozdílem absorbancí u roztoku samotného BSA(A_B):

$$A_{rel} = \frac{A_{HB280} - A_{HB400}}{A_{B280} - A_{B400}} . \qquad (17)$$

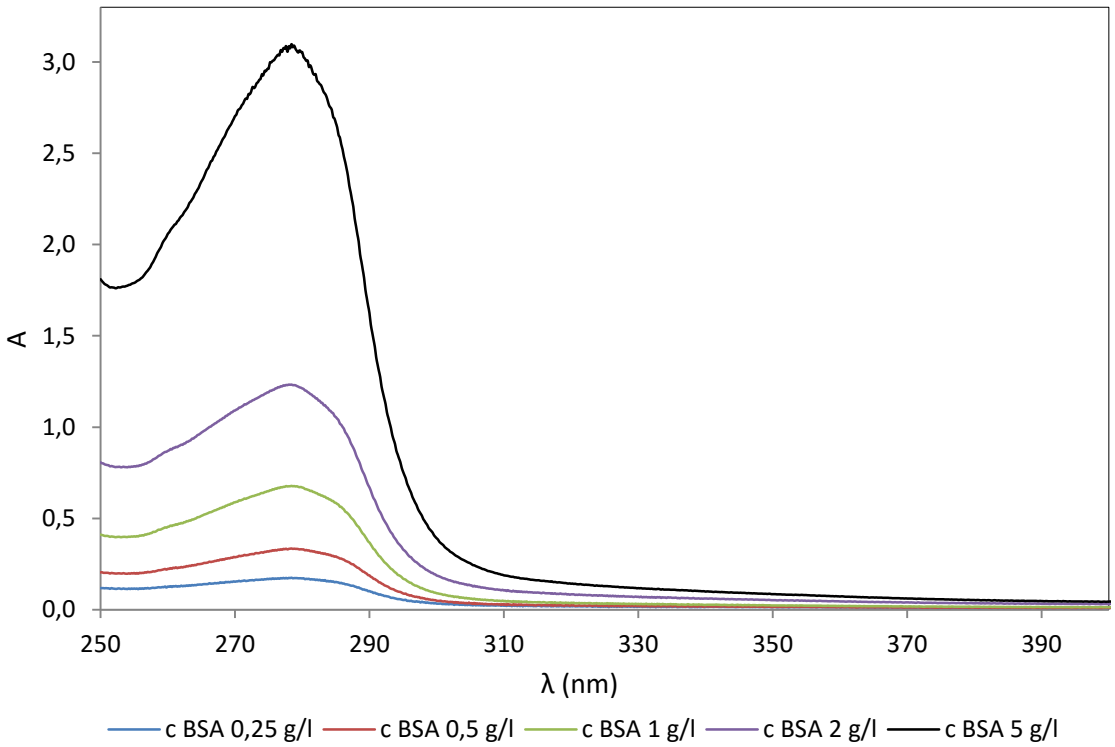
Jelikož všechny vzorky byly před měřením odstředěny, je potřeba zohlednit při interpretaci výsledků fakt, že část agregátů sedimentovala a tudíž změřená absorbance je nižší. Tyto částečky se usadily na dně zkumavky, což bylo vidět i pouhým okem, zejména u vyšších koncentrací, tedy v určitých molárních poměrech BSA a HA. V roztoku zůstaly pouze rozpustné a částečně rozpustné agregáty a částečky menší velikosti, které se při dané hodnotě rychlosti otáček odstřeďováním neusadily. U roztoků před odstředěním byl vidět zákal způsobený obsahem agregátů, který se stupňoval se zvyšující koncentrací BSA (*Obrázek 6*).



Obrázek 6: *Roztoky vysokomolekulové HA s BSA inkubovány při 37°C, seřazeny zleva doprava podle vzrůstající koncentrace BSA.*

4.1.1 Roztoky BSA

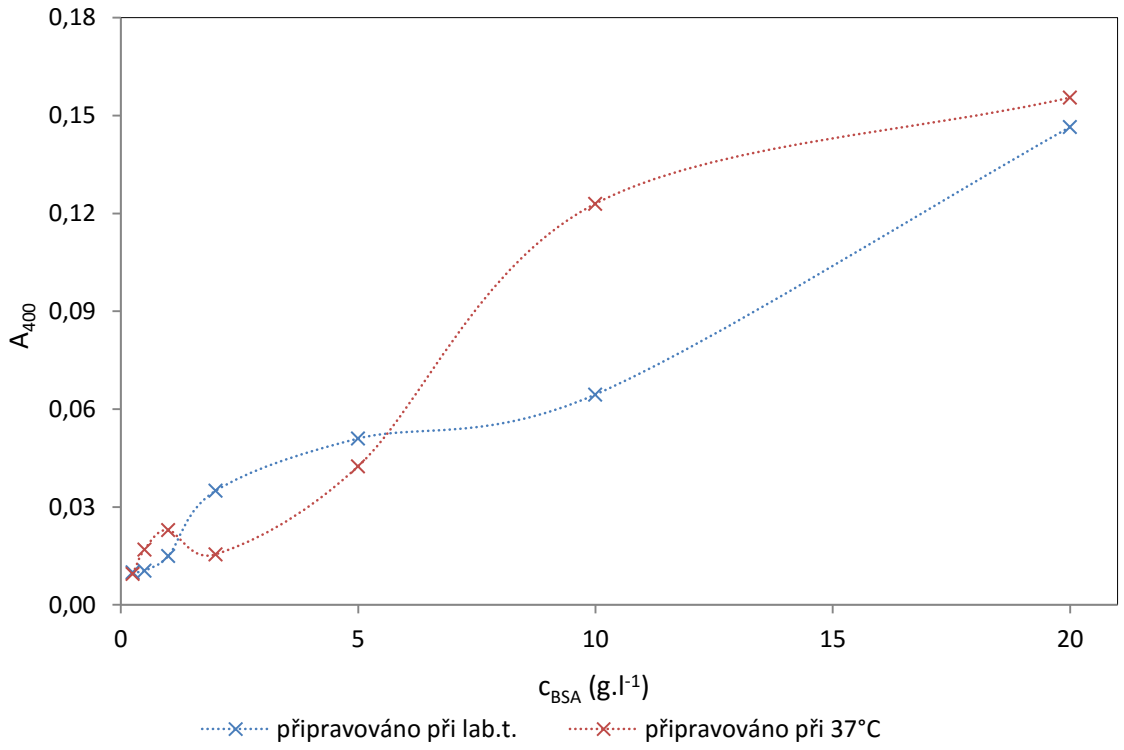
Na následujícím obrázku (*Obrázek 7*) je znázorněno absorpční spektrum roztoků BSA připravovaných při laboratorní teplotě. Na tomto grafu je vidět již výše popsaný fakt, že albumin dosahuje svého absorpčního maxima v okolí vlnové délky 280 nm. Při hodnotě 400 nm již neabsorbuje, tudíž je možno tuto hodnotu vlnové délky použít pro sledování turbidity. [13] Maximum absorbance vzrůstá s koncentrací albuminu. Stejným způsobem se chovaly i roztoky BSA které byly inkubovány při 37°C.



Obrázek 7: *Absorpční spektrum roztoků BSA připravovaných při laboratorní teplotě.*

Závislost maxima absorbance (po odečtení turbidity) pro roztoky obou způsobů přípravy je zobrazena v následující části práce (*Obrázek 9*). Z tohoto grafu pro vzorky obsahující pouze BSA vyplývá, že oba roztoky se chovají velmi podobně a tedy pro roztoky samotného BSA nemá popsaný rozdíl teplot při přípravě efekt. Dále je vidět, že absorbance v maximu stoupá s koncentrací BSA téměř lineárně.

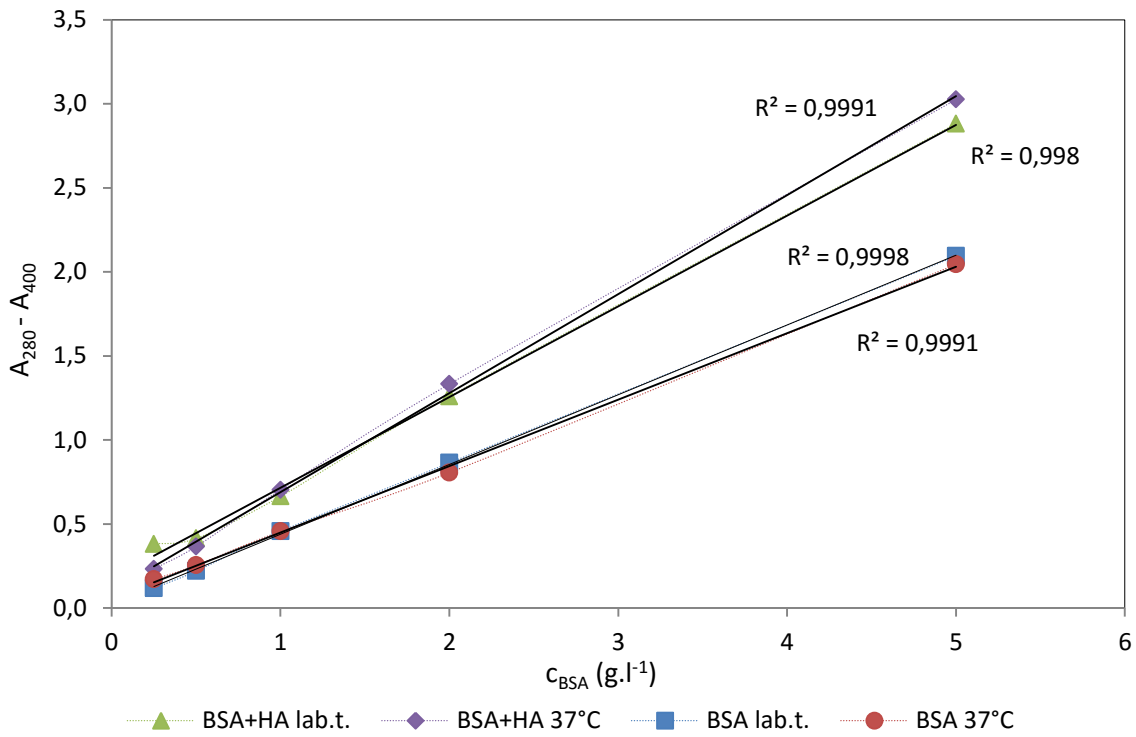
Rozdíl, ale nastává při vlnové délce 400 nm (*Obrázek 8*). U této závislosti turbidita roztoků připravovaných při laboratorní teplotě stoupá, ale na rozdíl od maxima absorbance stoupá nelineárně. K ještě větší změně dochází u roztoků připravovaných druhým způsobem, kdy turbidita stoupá po koncentraci BSA 1 $g.l^{-1}$. Mezi touto koncentrací a koncentrací 2 $g.l^{-1}$ dochází k jejímu poklesu a následně opět stoupá.



Obrázek 8:*Závislost turbidity na koncentraci BSA.*

4.1.2 Roztoky nízkomolekulové HA a BSA

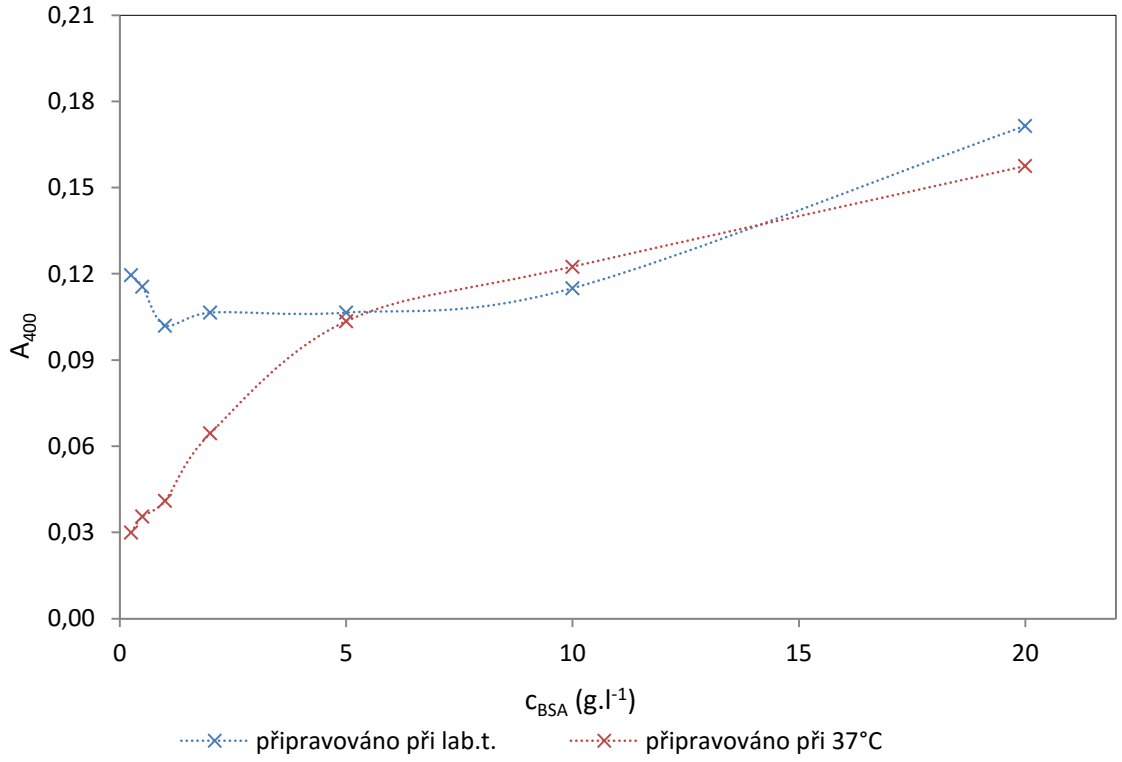
Absorpční spektrum (viz příloha) roztoků nízkomolekulové HA s BSA i závislost maxima absorbance na koncentraci (*Obrázek 9*) ukázaly, že stejně jako tomu bylo u roztoků obsahujících pouze BSA, absorbance narůstá se zvyšující se koncentrací BSA a rozdíl mezi dvěma způsoby přípravy je minimální. Tudíž použitý rozsah teplot neovlivňuje absorbanci ve vlnové délce 280 nm. Obecně je absorbance u roztoků, které obsahovaly HA vyšší, než u roztoků samotného BSA. U směsí připravovaných při laboratorní teplotě sice dochází u nižších koncentrací k poklesu absorbance pod absorbanci samotného BSA, ale tento rozdíl může být také způsoben chybou přípravy nebo měření.



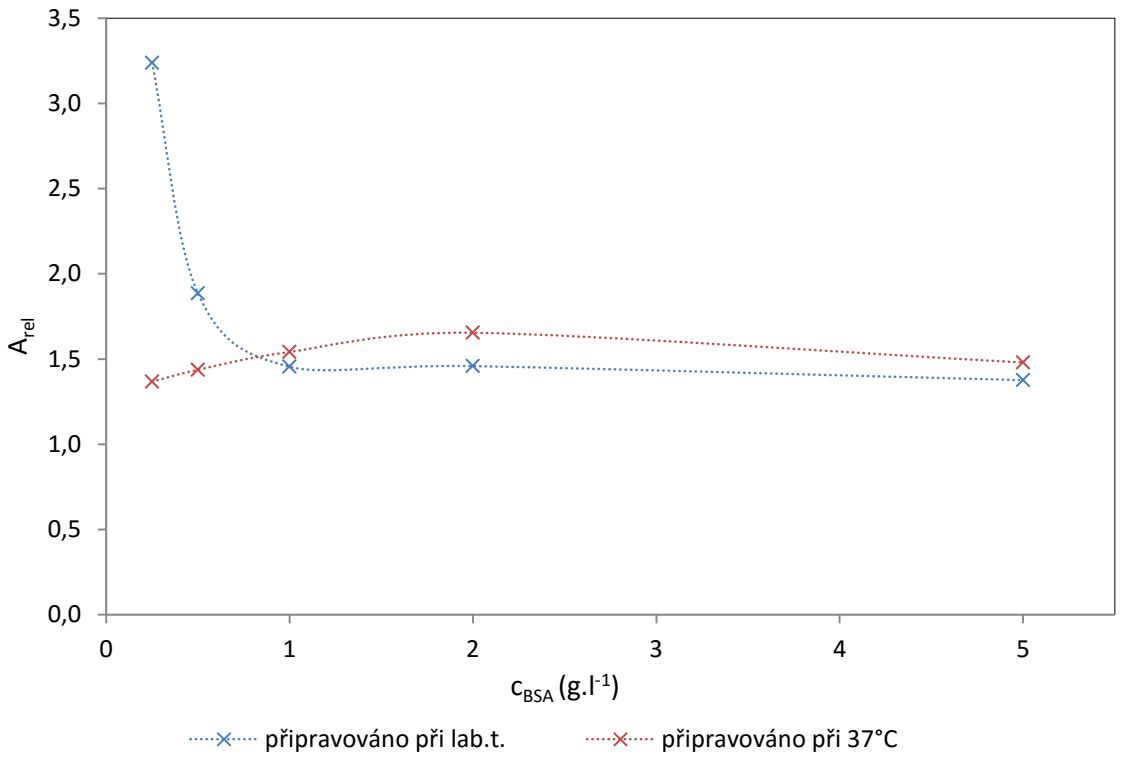
Obrázek 9: *Absorbance při vlnové délce 280 nm s odečtenou turbiditou u směsí nízkomolekulové HA s BSA a samotného BSA.*

K výrazným rozdílům mezi jednotlivými koncentracemi, ale dochází u turbidity. U roztoků připravovaných při laboratorní teplotě (*Obrázek 10*) turbidita klesá po hodnotu koncentrace 1 $g.l^{-1}$. Následným zvyšováním koncentrace se absorbance již příliš nemění, výrazně stoupá až v rozsahu koncentrací 10 $g.l^{-1}$ - 20 $g.l^{-1}$. U vzorků, které byly inkubovány při vyšší teplotě, naopak dochází k zvyšování absorbance s rostoucí koncentrací BSA.

Pro zjednodušení byla dále používaná hodnota relativní absorbance vypočtená z *rovnice (17)*. Z její závislosti (*Obrázek 11*) vyplývá, že roztoky připravované při laboratorní teplotě mají nejvyšší hodnotu na začátku a poté klesá až po koncentraci 1 $g.l^{-1}$. Dále se výrazně nemění. Naproti tomu, u roztoků které byly inkubovány při 37°C hodnota relativní absorbance mírně narůstá po koncentraci BSA 2 $g.l^{-1}$a poté mírně klesá.



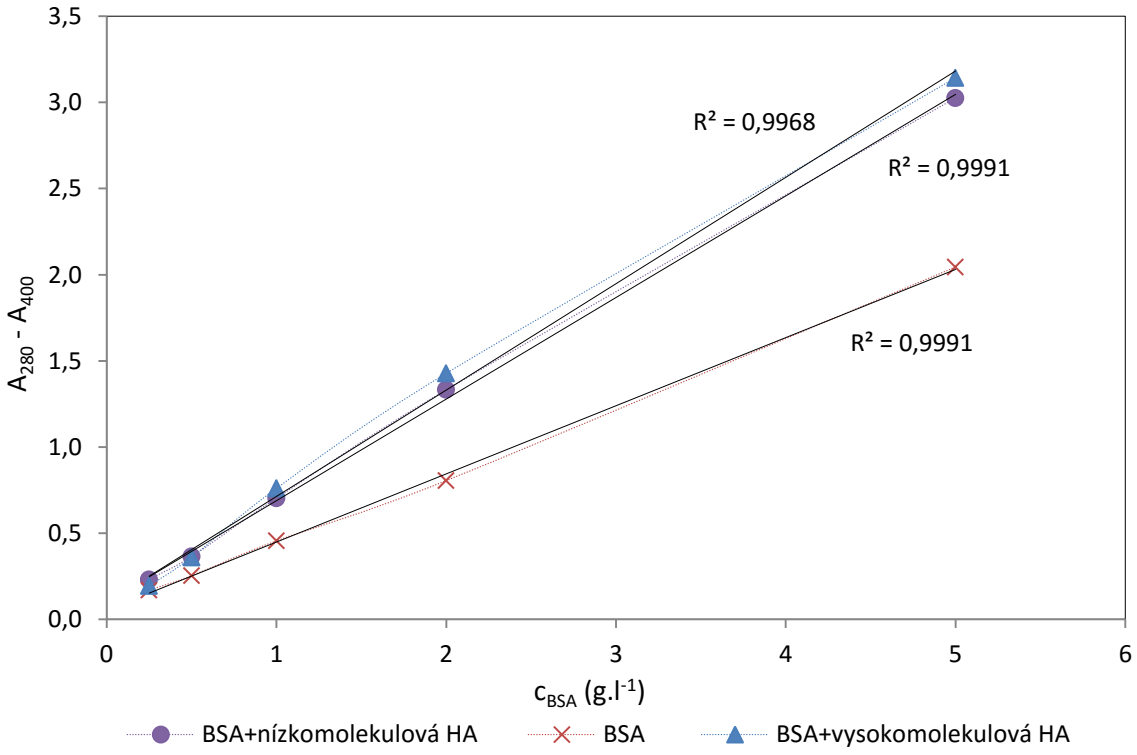
Obrázek 10: *Turbidita směsí nízkomolekulové HA s BSA.*



Obrázek 11: *Relativní absorbance směsí nízkomolekulové HA s BSA.*

4.1.3 Roztoky vysokomolekulové HA a BSA

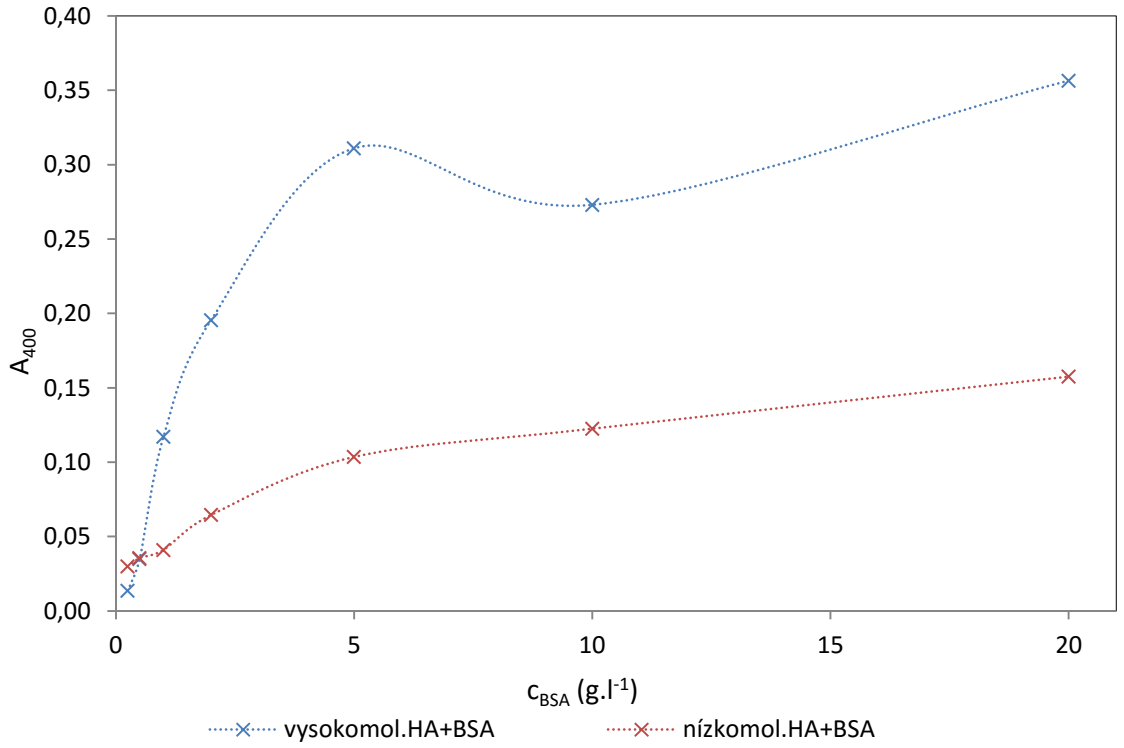
Roztoky obsahující vysokomolekulovou HA připravované při laboratorní teplotě vykazovaly velké odchylky, proto byly pro další zpracování použity pouze výsledky získané z měření roztoků inkubovaných při 37°C. Tyto vzorky opět vykazují nárůst absorbance se zvyšující se koncentrací (absorpční spektrum – viz příloha) stejným způsobem jako u roztoků obsahujících nízkomolekulovou HA a BSA a u roztoků samotného BSA. Jejich absorbance je ale vyšší než u těchto vzorků (*Obrázek 12*).



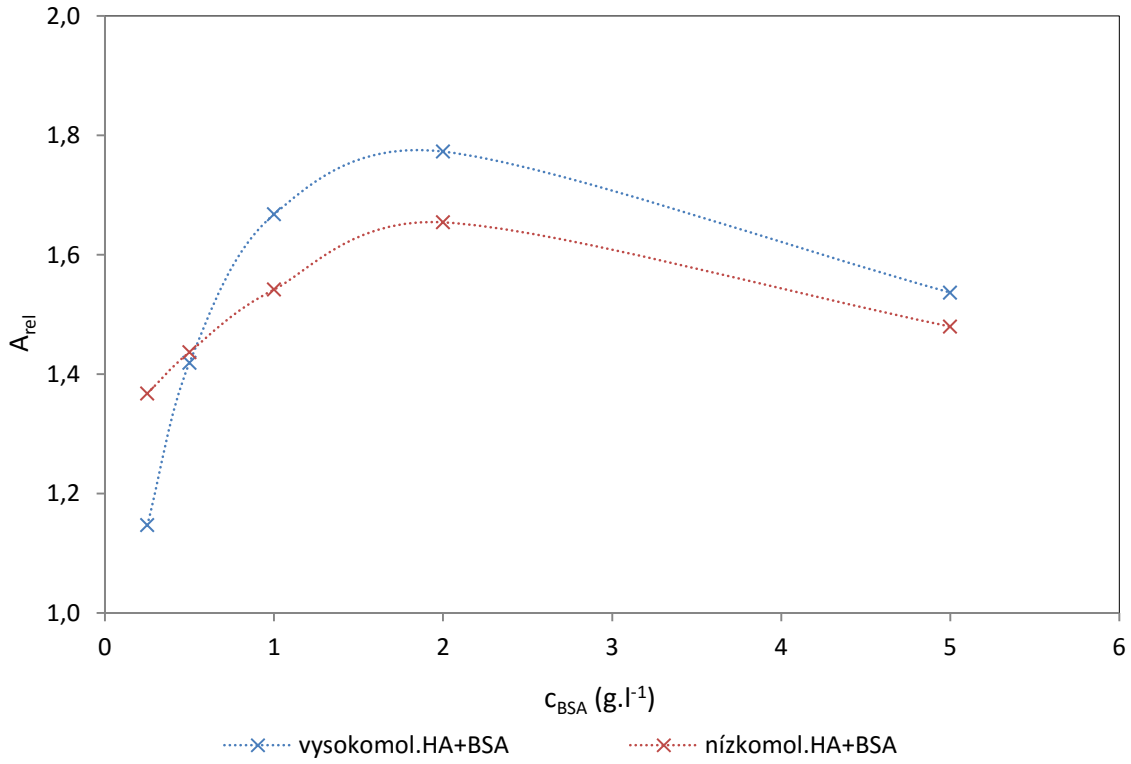
Obrázek 12: *Absorbance při vlnové délce 280 nm° s odečtením turbidity u všech roztoků připravovaných při 37°C.*

Systém vysokomolekulové HA a BSA vykazuje daleko strmější nárůst turbidity s koncentrací BSA než je tomu v případě roztoků obsahujících nízkomolekulovou HA (*Obrázek 13*). Mezi koncentracemi 5 $g.l^{-1}$ a 10 $g.l^{-1}$ dochází k poklesu hodnot turbidity, která jinak u ostatních koncentrací roste.

Relativní absorbance (*Obrázek 14*) u systému vysokomolekulové HA a BSA i u systému nízkomolekulové HA a BSA vykazuje nárůst po hodnotu koncentrace 2 $g.l^{-1}$ a poté klesá. Od koncentrace 0,5 $g.l^{-1}$ je absorbance vyšší u roztoků s vysokomolekulovou HA. Z této závislosti vyplývá, že při teplotě 37°C vzorky s odlišnými molekulovými hmotnostmi nevykazují příliš odlišné chování v závislosti na koncentraci BSA.



Obrázek 13: *Turbidita směsí BSA a HA inkubovaných při 37°C.*



Obrázek 14: *Relativní absorbance směsí BSA a HA připravovaných při 37°C.*

Ze zjištěných dat všech roztoků vyplývá, že maximum absorbance u všech měřených vzorků téměř lineárně stoupá se zvyšující se koncentrací BSA v rozsahu koncentrací 0,25 – 5 $g.l^{-1}$. Minimální rozdíly v tomto bodě v závislosti na přípravě roztoků naznačují, že při hodnotě vlnové délky 280 nm nemá rozdíl mezi laboratorní teplotou a 37°C vliv na absorbanci. Tato teplota, ale ovlivňuje turbiditu vzorků, což se projevilo značnými rozdíly v turbiditě mezi roztoky připravovanými při laboratorní teplotě a roztoky inkubovanými při 37°C. Změny v turbiditě také nastávaly v závislosti na koncentraci BSA, kdy ve většině případů docházelo k jejímu zvyšování s rostoucí koncentrací BSA. Změny mezi jednotlivými koncentracemi vedou ke zjištění, že zde dochází k rozdílným strukturním změnám mezi jednotlivými poměry koncentrací HA – BSA. Nejvyšší maximum absorbance i nejvyšší turbiditu vykazují směsi vysokomolekulové HA s BSA a nejnižší hodnoty dosahuje samotný roztok BSA. Zjištěná data naznačují pravděpodobný vznik komplexů HA a BSA, jejichž existence se projevuje zvýšením turbidity.

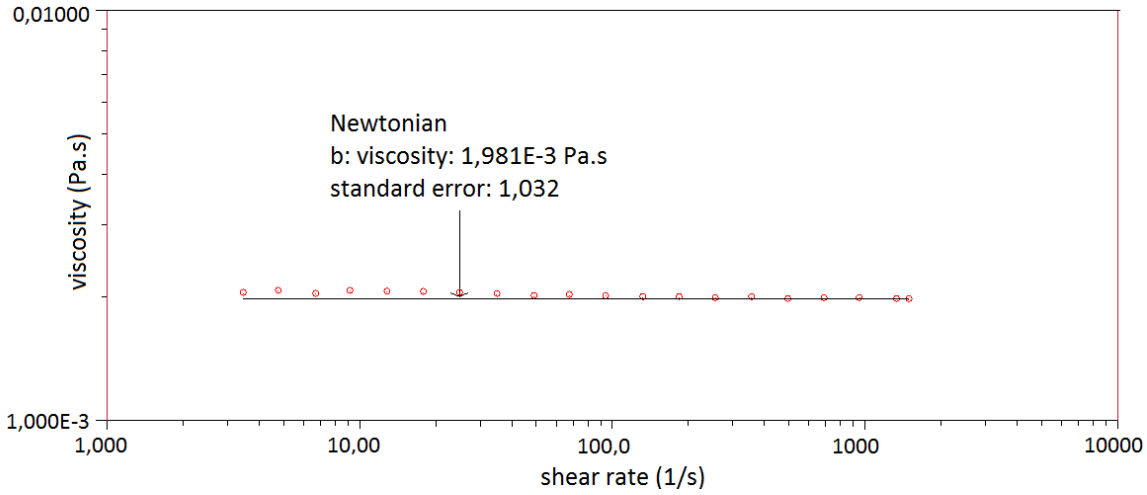
4.2 Měření reologických vlastností

Reologickým měřením byla získána závislost viskozity na smykové rychlosti (viz příloha). Tato závislost byla v programu TA Data Analysis proložena modelem, který nejvíce odpovídal zjištěnému reologickému chování látky se standardní chybou menší než 16. U vzorků, které se chovaly v souladu s Newtonovým viskozitním zákonem (roztoky BSA, roztoky nízkomolekulové HA a směsné roztoky nízkomolekulové HA a BSA) byl použit *Newtonský* model (*Obrázek 15),* pomocí kterého byla zjištěna hodnota viskozity. U *nenewtonovských* vzorků (roztoky vysokomolekulové HA a její směsné roztoky s BSA) byla toková křivka proložena *Crossovým* modelem (*rovnice (18), Obrázek 16*), pomocí kterého byla dohledána viskozita pro danou smykovou rychlost. Byla zvolena hodnota smykové rychlosti 10 1/s což je hodnota, která je dostatečně nízká aby splňovala cíl pracovat s hodnotou viskozity blízké limitní viskozitě (u slabších interakcí je vhodné používat smykovou rychlost co nejnižší, v ideálním případě blížící se nule) a také je zároveň dostatečně vysoká na to, aby roztoky nevykazovaly velké odchylky, jelikož zejména u vyšších koncentrací docházelo při nízkých hodnotách smykové rychlosti k nepřesnému měření. Jelikož byl každý roztok proměřen vícekrát, ze získaných hodnot viskozit byly pro každý roztok vypočítány průměrné hodnoty, které byly použity pro další zpracování.

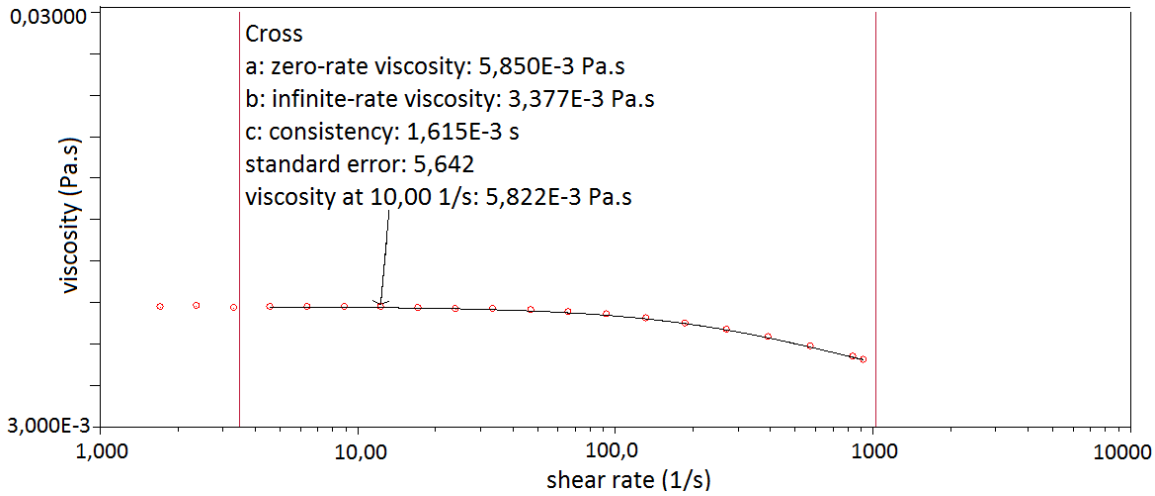
Model *Cross* je definován vztahem:

$$\eta = \eta_\infty + \frac{\eta_0 - \eta_\infty}{1 + \left(C\dot{\gamma}\right)^m}, \qquad (18)$$

kde η_∞ je asymptotická viskozita, η_0 je limitní viskozita, m – tzv. *rate index* - je mocnina, se kterou se mění viskozita v závislosti na smykové rychlosti, $\dot{\gamma}$ je smyková rychlost a C - tzv. *Konzistence* – je převrácená hodnota kritické smykové rychlosti, což odpovídá relaxačnímu času. [29]



Obrázek 15:*Toková křivka pro nízkomolekulovou HA proložená Newtonským modelem.*



Obrázek 16:*Toková křivka pro vysokomolekulovou HA proložená modelem Cross s označením intervalu pro který byl model aplikován.*

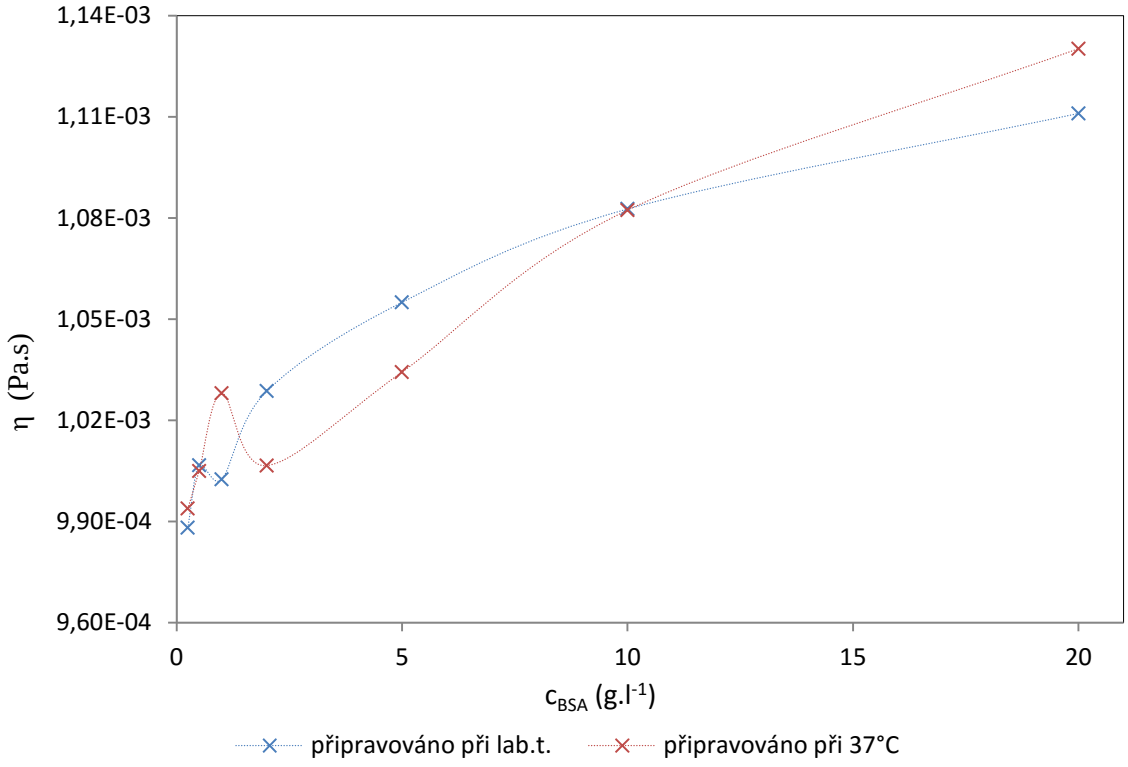
U roztoků samotného BSA byla viskozita vynesena do grafů jako závislost na koncentraci BSA. U roztoků BSA s HA byla vypočtena relativní viskozita jako viskozita u směsných roztoků (η_{HA+BSA}) podělena hodnotou viskozity u roztoku samotné HA (η_{HA}). Z vypočtené hodnoty relativní viskozity byly vytvořeny grafy v závislosti na koncentraci BSA.

$$\eta_{rel} = \frac{\eta_{HA+BSA}}{\eta_{HA}}, \tag{19}$$

4.2.1 Roztoky BSA

Z grafu pro měření při 25°C (*Obrázek 17*) vyplývá že u roztoků celkově viskozita stoupá s rostoucí koncentrací. K odchylkám dochází u nižších koncentrací což ale může být způsobeno nepřesnou přípravou nebo chybou v měření. U nejvyšší koncentrace BSA je

hodnota viskozity vyšší u roztoku připravovaného při 37°C než u roztoku připravovaného při laboratorní teplotě. Pro měření při 37°C byly vybrány pouze roztoky připravovány při laboratorní teplotě o koncentracích 1, 5 a 20 g.l$^{-1.}$ U výsledků tohoto měření (viz. příloha) se ukazuje, že viskozita roste se zvyšující se koncentrací BSA a hodnoty viskozity jsou nižší než je tomu u roztoků měřených při 25°C.

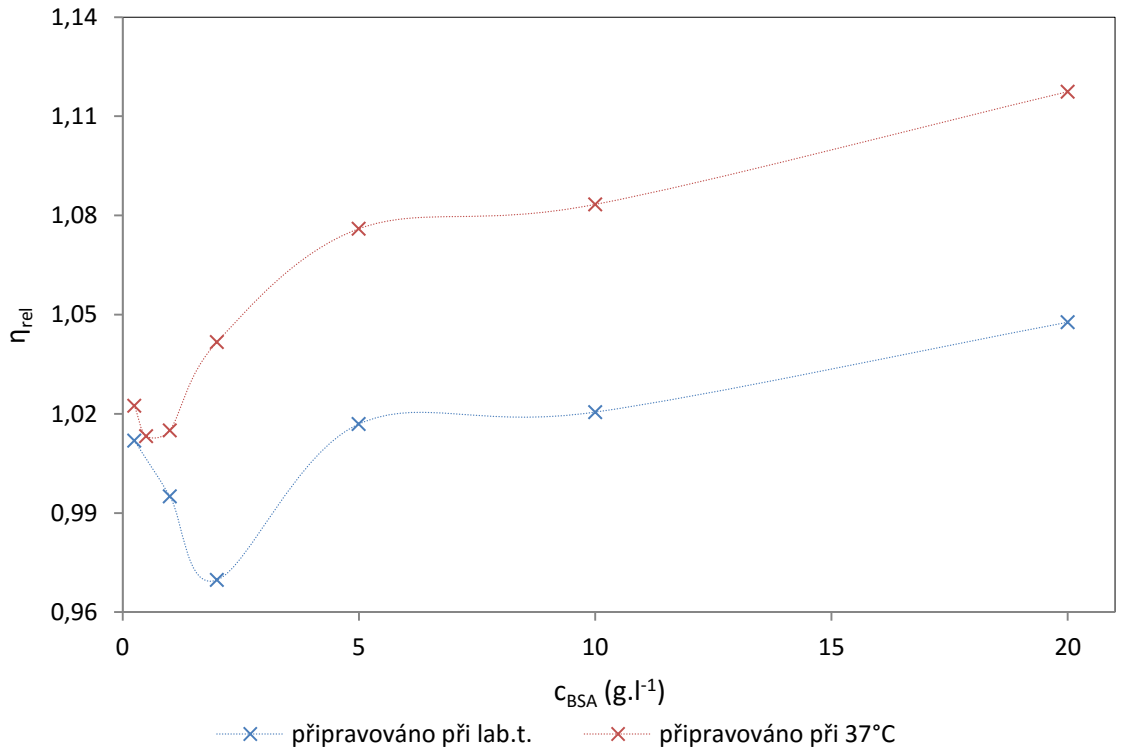


Obrázek 17:*Závislost viskozity na koncentraci, u roztoků BSA měřených při 25°C.*

4.2.2 Roztoky nízkomolekulové HA a BSA

Ukázalo se, že u roztoků, které obsahují nízkomolekulovou HA a BSA je relativní viskozita podstatně vyšší než viskozita roztoků, které obsahují pouze BSA. Také zde dochází k výraznějším rozdílům v závislosti na způsobě přípravy, kde se ukazuje, že viskozita roztoků inkubovaných při 37°C je vyšší než u roztoků, které byly připravovány při nižší teplotě.

U vzorků, které byly měřeny při 25°C dochází nejprve k poklesu relativní viskozity až po dosažení určité koncentrace BSA a poté viskozita stoupá. U roztoků připravovaných při laboratorní teplotě dochází k této změně v okolí koncentrace 2 g.l^{-1}, u roztoků inkubovaných při 37°C je to v blízkosti koncentrace 0,5 g.l^{-1} (*Obrázek 18*). Roztoky připravené při laboratorní teplotě byly proměřeny i při 37°C, kde relativní viskozita klesá mezi koncentracemi 0,5 – 1 g.l^{-1} a 10 – 20 g.l^{-1}, mezi ostatními koncentracemi stoupá.(viz. příloha)



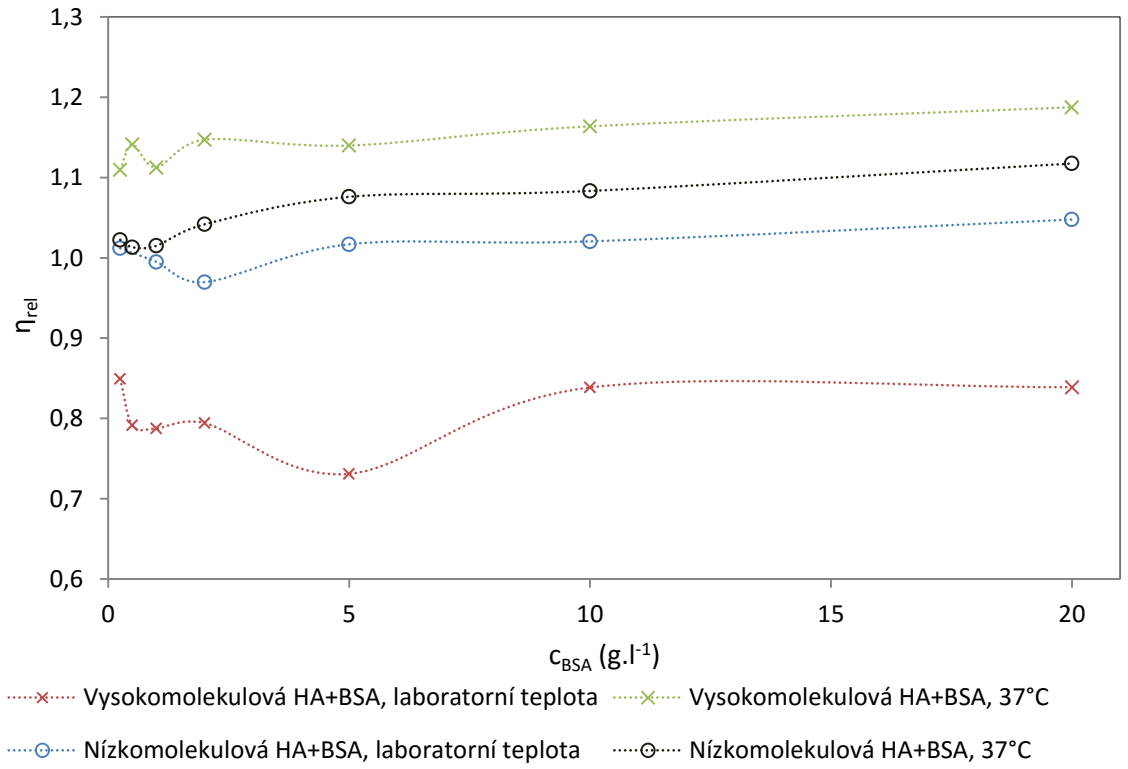
***Obrázek 18**: Závislost relativní viskozity na koncentraci BSA u roztoků nízkomolekulové HA a BSA měřených při 25°C.*

4.2.3 Roztoky vysokomolekulové HA a BSA

Ze závislosti viskozity na smykové rychlosti bylo zjištěno, že roztoky které obsahují vysokomolekulovou HA se chovají jako *nenewtonovské* kapaliny (*Obrázek 16*). Hodnota viskozity u těchto vzorků je vyšší než u vzorků obsahujících pouze BSA a je ovlivňována teplotou (*Obrázek 19*), jelikož vzorky připravovány při vyšší teplotě vykazují také vyšší viskozitu. Dále jsou v tomto grafu zobrazeny rozdíly v závislosti na molekulové hmotnosti HA. Zatímco změřená viskozita je u obou teplot přípravy vyšší u vysokomolekulové HA, vypočtená relativní viskozita je u roztoků připravovaných při laboratorní teplotě vyšší než u vzorků obsahujících nízkomolekulovou HA.

Roztoky s vysokomolekulovou HA připraveny odlišným způsobem vykazují také rozdílné chování v závislosti na koncentraci BSA (*Obrázek 19*). Při měření při teplotě 25°C u vzorků, inkubovaných při 37°C viskozita u nižších koncentrací fluktuuje a v okolí bodu 2 $g.l^{-1}$ začíná mírně stoupat. Po dosažení této hodnoty se již viskozita výrazně nemění. U roztoků, které byly měřeny i připravovány při 25°C dochází u nízkých koncentrací k fluktuacím, což může být způsobeno konformačními změnami HA, ale také chybou měření nebo nepřesností při přípravě vzorků. Viskozita klesá s lokálním minimem v okolí koncentrace 5 $g.l^{-1}$. Po dalším zvyšování koncentrace viskozita stoupne a dále se již výrazně nemění. Obdobné chování vykazují i roztoky připravované při laboratorní teplotě a měřeny při 37°C (viz.příloha). U směsí s vysokomolekulovou HA připravovaných při laboratorní teplotě dochází k poklesu relativní viskozity pod hodnotu 1 (viskozita směsí je nižší než viskozita samotné HA), tento

fakt může být způsoben tím, že struktura získává natolik výhodnou prostorovou konformaci, že dochází ke snížení viskozity oproti hodnotě viskozity samotné HA.



Obrázek 19: *Závislost relativní viskozity na koncentraci BSA u roztoků HA a BSA měřených při 25°C.*

Z porovnání všech typů roztoků použitých pro reologické měření, vyplývá, že reologické vlastnosti jsou závislé jak na koncentraci BSA, tak na molekulové hmotnosti HA a na teplotě při které jsou vzorky připravovány. Nejvyšší hodnoty viskozity vykazují roztoky vysokomolekulové HA a BSA a nejnižší vzorky samotného BSA. Roztoky, které obsahují vysokomolekulovou HA vykazují chování nenewtonovské kapaliny, zatímco roztoky nízkomolekulové HA, roztoky BSA a směsné roztoky těchto dvou látek se chovají v souladu s Newtonovým viskozitním zákonem. Nejvyšší relativní viskozitu vykazují směsné roztoky vysokomolekulové HA a BSA inkubovány při 37°C a tedy u těchto roztoků dochází k nejvyššímu nárůstu viskozity oproti viskozitě samotné HA. Naproti tomu u směsných roztoků s vysokomolekulovou HA připravovaných při laboratorní teplotě, jako u jediných dochází k snížení viskozity pod hodnotu viskozity samotné HA. U jednotlivých roztoků obsahujících HA dochází k zvýšení viskozity při zvýšení teploty přípravy, což může být způsobeno strukturními změnami BSA, u kterého se zvyšující se teplotou dochází k rozplétání řetězců a tím jsou místa, na které se může hyaluronan navázat dostupnější. Koncentrace BSA ovlivňuje viskozitu roztoků, ale nedochází k jejímu rovnoměrnému nárůstu nebo poklesu. To je pravděpodobně způsobeno faktem, že u jednotlivých koncentrací dochází jak k rozdílnému seskupení molekul, tak k jejich odlišné konformaci a všechny tyto změny ovlivňují viskozitu roztoků.

5 Závěr

Z UV-VIS spektrofotometrického měření pro rozsah koncentrací BSA 0,25 – 5 $g.l^{-1}$ vyplývá, že v bodě kdy albumin dosahuje maximum absorbance, absorbance, až na mírné fluktuace při nižších koncentracích, stoupá se stoupající koncentrací BSA téměř lineárně. Obdobným způsobem se chovaly roztoky připravované při laboratorní teplotě i roztoky inkubovány při 37°C, z čehož vyplývá, že popsaný rozdíl teplot nemá při vlnové délce 280 nm vliv na absorbanci. Také bylo zjištěno, že nejnižších absorbancí dosahují roztoky samotného BSA a nejvyšších roztoky obsahující BSA a vysokomolekulovou HA. Zvyšování absorbance je pravděpodobně způsobeno vznikem komplexů HA a BSA.

K výrazným rozdílům docházelo u měření turbidity v rozsahu koncentrací BSA 0,25–20 $g.l^{-1}$, kde celkově došlo ke zvýšení turbidity s narůstající koncentrací BSA, ale tento nárůst nebyl lineární na rozdíl od maxima absorbance a hodnota turbidity se lišila v závislosti na složení vzorků a na způsobě přípravy. Vzorky stejného složení připravené při rozdílných teplotách nevykazovaly stejný trend změn absorbance v závislosti na koncentraci BSA, což naznačuje, že u rozdílných teplot dochází k jiným strukturním změnám. Stejně jako u vlnové délky 280 nm vykazovaly nejvyšší absorbanci, i u vlnové délky 400 nm vykazovaly nejvyšší turbiditu vzorky vysokomolekulové HA a nejnižší vzorky samotného BSA. Jelikož se obecně turbidita zvětšuje s rostoucí velikostí částic, ze zjištěných dat je pravděpodobné, že dochází ke vzniku komplexů BSA a HA. Teplota přípravy ovlivňovala turbiditu roztoků, ale neovlivňovala jejich maximum absorbance, z čeho se dá usuzovat, že rozdíl teplot má vliv na velkost částic ale nemá vliv na jejich absorpční vlastnosti.

Reologickým měřením bylo zjištěno, že nejvyšší viskozitu vykazují roztoky vysokomolekulové HA a BSA a nejnižší roztoky samotného BSA Tyto rozdíly naznačují pravděpodobný vznik komplexů nízkomolekulové HA a BSA a vysokomolekulové HA a BSA, které se liší hodnotou viskozity. Závislost reologických vlastností na molekulové hmotnosti HA dále ukazuje, že roztoky s nízkomolekulovou HA se chovají jako *newtonovské* kapaliny. Naproti tomu roztoky s vysokomolekulovou HA se chovají jako *nenewtonovské* kapaliny.

Závislost na teplotě přípravy ukazuje, že směsné vzorky, které byly připraveny při vyšší teplotě, mají také vyšší viskozitu. To může být způsobeno skutečností, že albumin se zvyšující se teplotou rozplétá svou strukturu a tím jsou místa, na které se může hyaluronan navázat dostupnější. U vzorků inkubovaných při 37°C byla relativní viskozita vyšší u směsí vysokomolekulové HA a BSA než u směsí s nízkomolekulovou HA, zatímco u vzorků připravovaných při laboratorní teplotě tomu bylo naopak, kdy dokonce docházelo k poklesu viskozity směsi vysokomolekulové HA a BSA pod hodnotu viskozity samotného roztoku HA. Tento pokles viskozity může být způsoben zaujmutím prostorově výhodné konformace, pravděpodobně dochází ke kontrakci HA řetězce. Vzorky vykazovaly také změny při rozdílných koncentracích BSA. Tyto změny ale nevykazovaly společnou závislost, což je pravděpodobně způsobenou faktem, že při jednotlivých vzájemných poměrech HA a BSA dochází ke změnám ve struktuře a konformaci a tyto změny ovlivňují hodnotu viskozity.

6 Seznam použitých zdrojů

[1] Hyaluronan Structure and Physical Properties. *Glycoforum* [online]. [cit. 2016-02-15]. Dostupné z: http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html

[2] BOERIU, Carmen G., Jan SPRINGER, Floor K. KOOY, Lambertus A. M. VAN DEN BROEK a Gerrit EGGINK. Production Methods for Hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*. 2013, 2013, 1-14. DOI: 10.1155/2013/624967. ISSN 1687-9341. Dostupné také z: http://www.hindawi.com/journals/ijcc/2013/624967/

[3] Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solution. Some Biological áConseqences. *Glycoforum* [online]. [cit. 2016-02-15]. Dostupné z: http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html

[4] COWMAN, Mary K., Shiro MATSUOKA, Floor K. KOOY, Lambertus A. M. VAN DEN BROEK a Gerrit EGGINK. Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate Research*. 2005,340(5), 791-809. DOI: 10.1016/j.carres.2005.01.022. ISSN 00086215. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621505000534

[5] Hyaluronic acid. *Kaviskin* [online]. [cit. 2016-02-15]. Dostupné z: http://www.kaviskin.com/info/hyaluronicacid.html

[6] Medical Applications of Hyaluronan. *Glycoforum* [online]. [cit. 2016-02-15]. Dostupné z: http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA13/HA13E.html

[7] ISACKE, Clare M. a Helen YARWOOD. The hyaluronan receptor, CD44. *The International Journal of Biochemistry*. 2002, 34(7), 718-721. DOI: 10.1016/S1357-2725(01)00166-2. ISSN 13572725. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272501001662

[8] Interaction of SWP with bovine serum albumin (BSA). *Friedli* [online]. [cit. 2016-02-16]. Dostupné z: http://www.friedli.com/research/phd/chapter5a.html

[9] AZIMZADEH. *An experimental approach to probe conformational changes in proteinstructure using a biotin derivative followed by mass spectrometr*. Philipps-Universität Marburg, 2008. Dizertační práce.

[10] PETERS, Theodore. *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*. New York: Elsevier, 1995. ISBN 978-0-12-552110-9

[11] TAI, Heng Chiat. *X-ray crystallographic studies of bovine serum albumin and helicobacter pylori thioredoxin-2*. 2004. Dizertační práce. Univerzity of Saskatchewan

[12] PICÓ, Guillermo A. Thermodynamic features of the thermal unfolding of human serum albumin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1997, **20**(1), 63-73. DOI: 10.1016/S0141-8130(96)01153-1. ISSN 01418130. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813096011531

[13] BUJACZ, Anna, Kamil ZIELINSKI a Bartosz SEKULA. Structural studies of bovine, equine, and leporine serum albumin complexes with naproxen. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2014, 82(9), 2199-2208. DOI: 10.1002/prot.24583. ISSN 08873585. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1002/prot.24583

[14] MARSHALL, Alan G. *Biophysical Chemistry: Principles, Techniques and Applications*. New York: John Wiley & Sons In, 1978. ISBN 978-0471027188

[15] YAMASAKI, Keishi, Victor Tuan Giam CHUANG, Toru MARUYAMA a Masaki OTAGIRI. Albumin–drug interaction and its clinical implication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2013, 1830(12), 5435-5443. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.05.005. ISSN 03044165. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416513002018

[16] NAVEENRAJ, Selvaraj a Sambandam ANANDAN. Binding of serum albumins with bioactive substances – Nanoparticles to drugs. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 2013, 14, 53-71. DOI: 10.1016/j.jphotochemrev.2012.09.001. ISSN 13895567. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389556712000639

[17] DE KRUIF, C.G a R TUINIER. Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocolloids*. 2001,15(4-6), 555-563. DOI: 10.1016/S0268-005X(01)00076-5. ISSN 0268005x. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X01000765

[18] DICKINSON, Eric. Stability and rheological implications of electrostatic milk protein–polysaccharide interactions. *Trends in Food Science*. 1998, 9(10), 347-354. DOI: 10.1016/S0924-2244(98)00057-0. ISSN 09242244. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224498000570

[19] LENORMAND, Hélène, Brigitte DESCHREVEL a Jean-Claude VINCENT. Chain length effects on electrostatic interactions between hyaluronan fragments and albumin. *Carbohydrate Polymers*. 2010, 82(3), 887-894. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.06.011. ISSN 01448617. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861710004662

[20] ZEMAN, Jan. *Reologické studium interakcí vysokomolekulárního hyaluronanu a protonizovaných aminokyselin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011, 44 s.

[21] RU, Qiaomei, Yuwen WANG, Jooyoung LEE, Yuting DING a Qingrong HUANG. Turbidity and rheological properties of bovine serum albumin/pectin coacervates: Effect of salt concentration and initial protein/polysaccharide ratio. Carbohydrate Polymers. 2012, 88(3), 838-846. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.01.019. ISSN 01448617. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861712000215

[22] CHYTIL, Martin. Modul č. 3: hydrogely na bázi biopolymerů.

[23] SCHRAMM, Gebhard. A Practical Approach to Rheology and Rheometry. HAAKE, 1994

[24] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav. Vyd. 4. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2002, 192 s. ISBN 80-708-0475-0.

[25] Rheology of Thermosets Part 2: Rheometers. Polymer Innovation Blog: Practical tips and advice for polymer, innovation and product development professionals [online]. [cit. 2016-02-16]. Dostupné z: http://polymerinnovationblog.com/rheology-thermosets-part-2-rheometers/

[26] Sprektrometrické analytické metody I, Nemcova, Cermakova, Rychlovsky ISBN: 80-246-0776-X

[27] Základy analytické chemie 2, Sommer ISBN: 80-214-1742-0

[28] DŘÍMALOVÁ, Evženia, Vladimír VELEBNÝ, Vlasta SASINKOVÁ, Zdenka HROMÁDKOVÁ a Anna EBRINGEROVÁ. Degradation of hyaluronan by ultrasonication in comparison to microwave and conventional heating. *Carbohydrate Polymers*. 2005,61(4), 420-426. DOI: 10.1016/j.carbpol.2005.05.035. ISSN 01448617. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861705002328

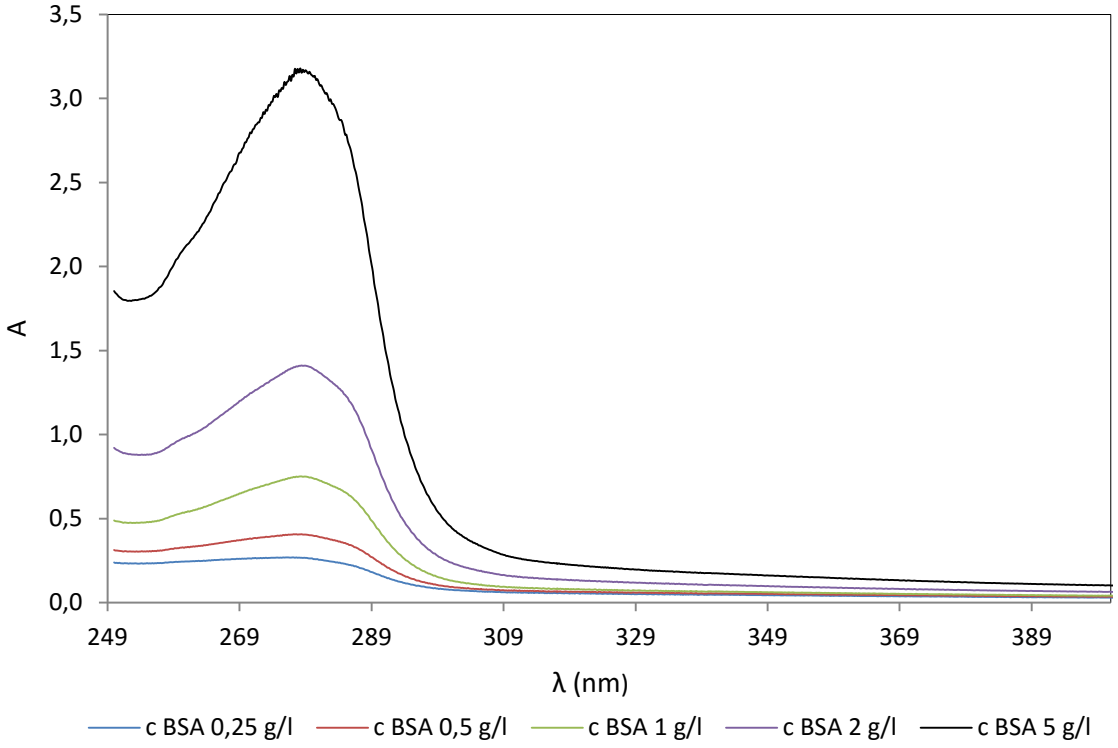
[29] Rheology and Viscosity Testing Tips: Making Use Of Models: The Cross Model. Rheologyschool[online]. [cit. 2016-02-22]. Dostupné z: http://www.rheologyschool.com/advice/rheology-tips/25-making-use-of-models-the-cross-model

7 Seznam použitých zkratek a symbolů

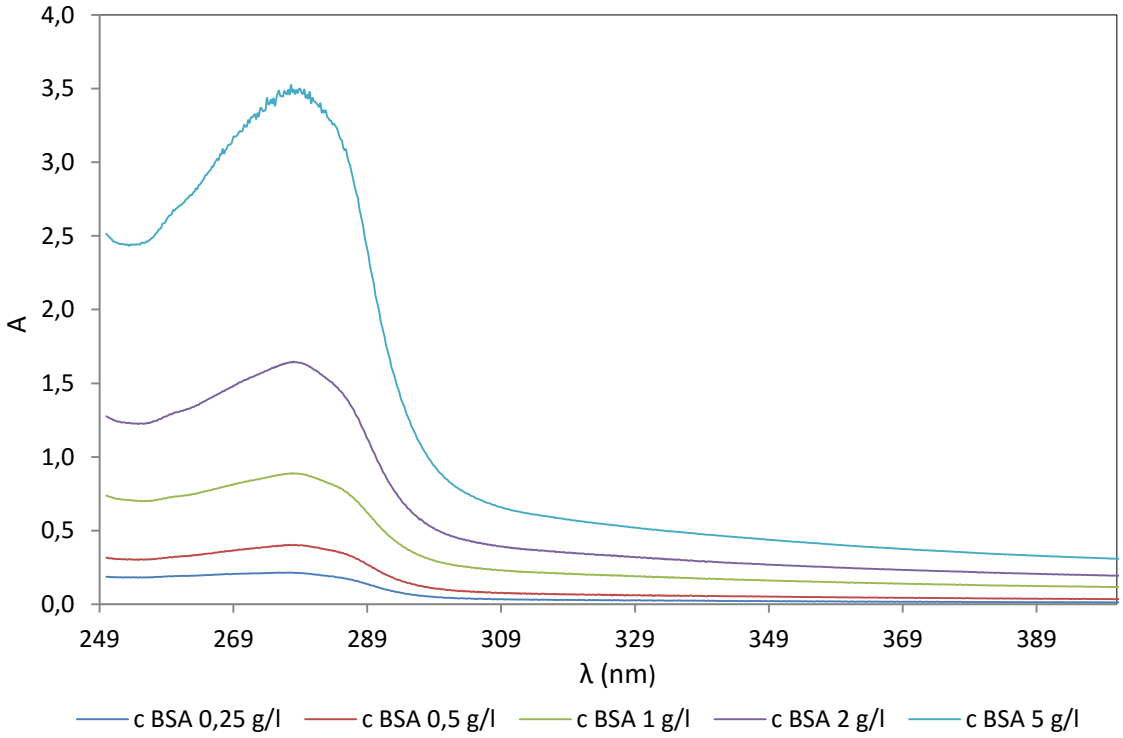
HA	kyselina hyaluronová
BSA	hovězí sérový albumin
Da	Dalton, atomová hmotnostní jednotka
η_{sp}	specifická viskozita
η	dynamická viskozita
k_H	Hugginsova konstanta
M	molekulová hmotnost
K, a	konstanty pro dané podmínky a rozsah molekulových hmotností
CD 44	receptor na povrchu nádorových buněk
Dx	rozteč
F	síla
Du	posunutí
σ	smykové napětí
A	plocha
γ	relativní deformace
$\dot{\gamma}$	smyková rychlost
ν	kinematická viskozita
ρ	hustota
M_z	točivý moment rotujícího válce
R_1, R_2	poloměry válců
T	transmitance
I	intenzita záření prošlého vzorkem
I_0	intenzita záření prošlého srovnávacím vzorkem
A	absorbance
α	absorptance
ε	molární absorpční koeficient
l	délka absorbující vrstvy
c	koncentrace
S	turbidance
η_t	turbiditní koeficient
k	konstanta zahrnující povahu zákalu a způsob měření
α'	konstanta, jejíž hodnota je závislá na uspořádání měření
r	střední poloměr částice
A_{rel}	relativní absorbance
A_{HB280}	absorbance roztoku HA a BSA při vlnové délce 280 nm
A_{HB400}	absorbance roztoku HA a BSA při vlnové délce 400 nm
A_{B280}	absorbance BSA při vlnové délce 280 nm
A_{B400}	absorbance BSA při vlnové délce 400 nm
η_∞	asymptotická viskozita
η_0	limitní viskozita
m	rychlostní konstanta

C	časová konstanta
η_{rel}	relativní viskozita
η_{HA+BSA}	viskozita směsi HA a BSA
η_{HA}	viskozita roztoku HA

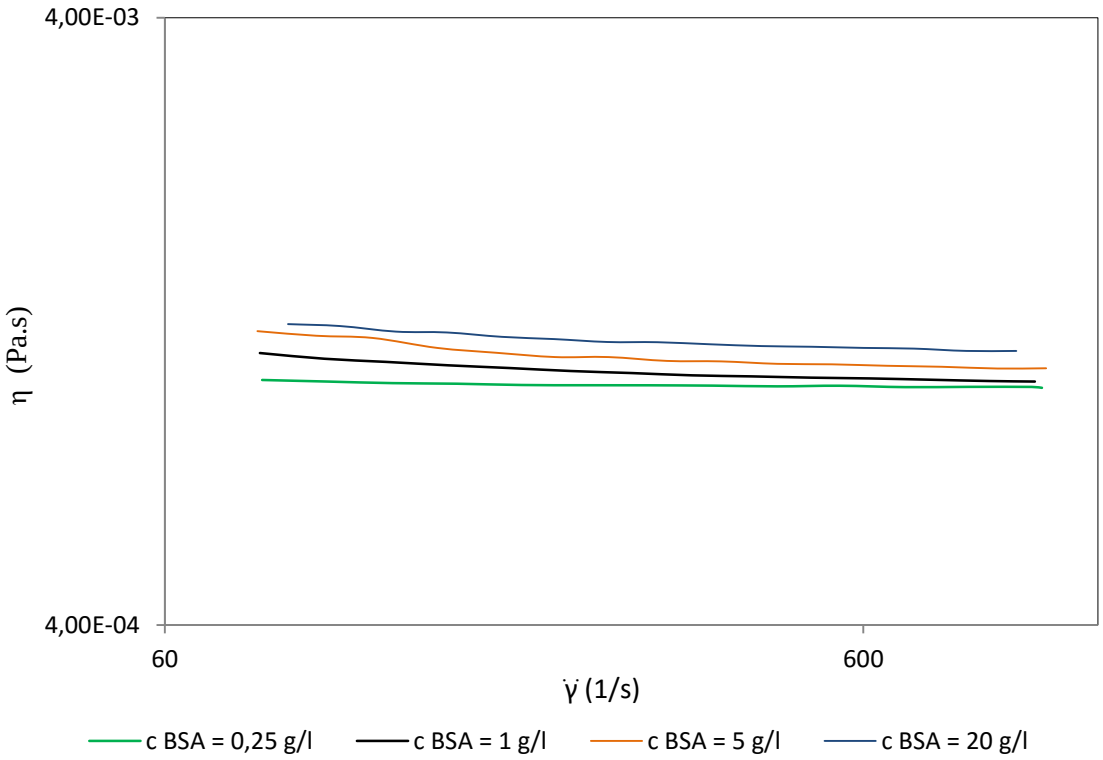
8 Přílohy



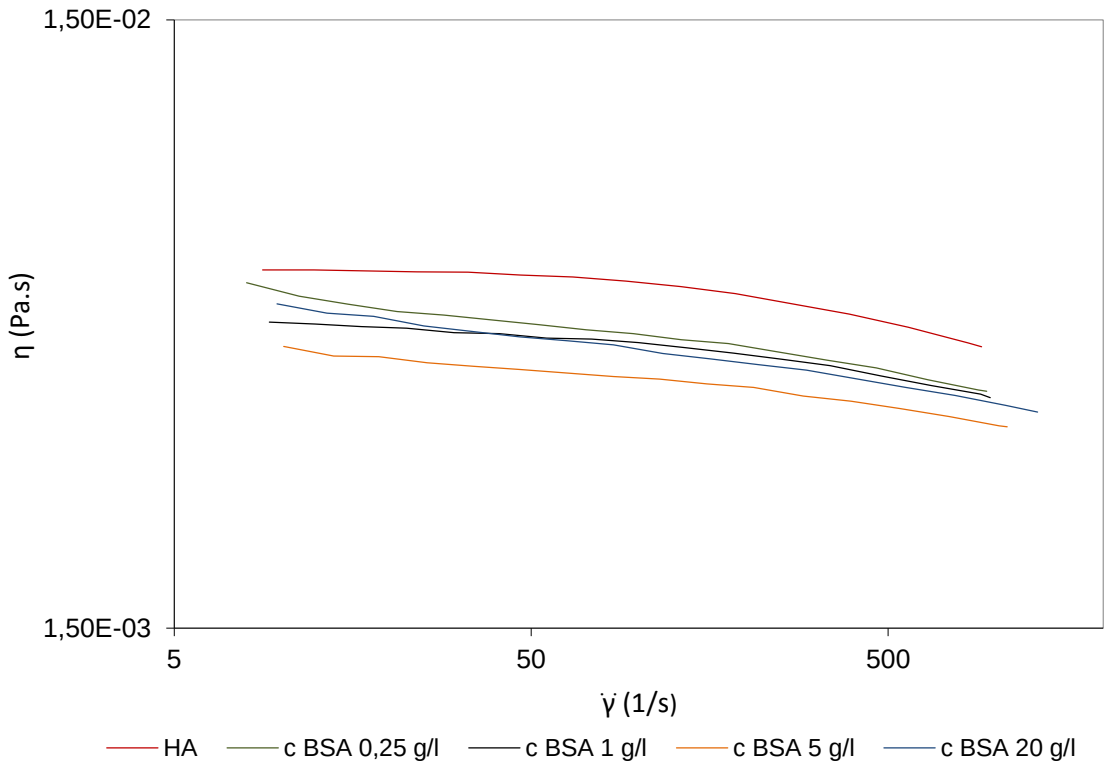
Obrázek 20: *Absorpční spektrum roztoků nízkomolekulové HA a BSA připravovaných při laboratorní teplotě.*



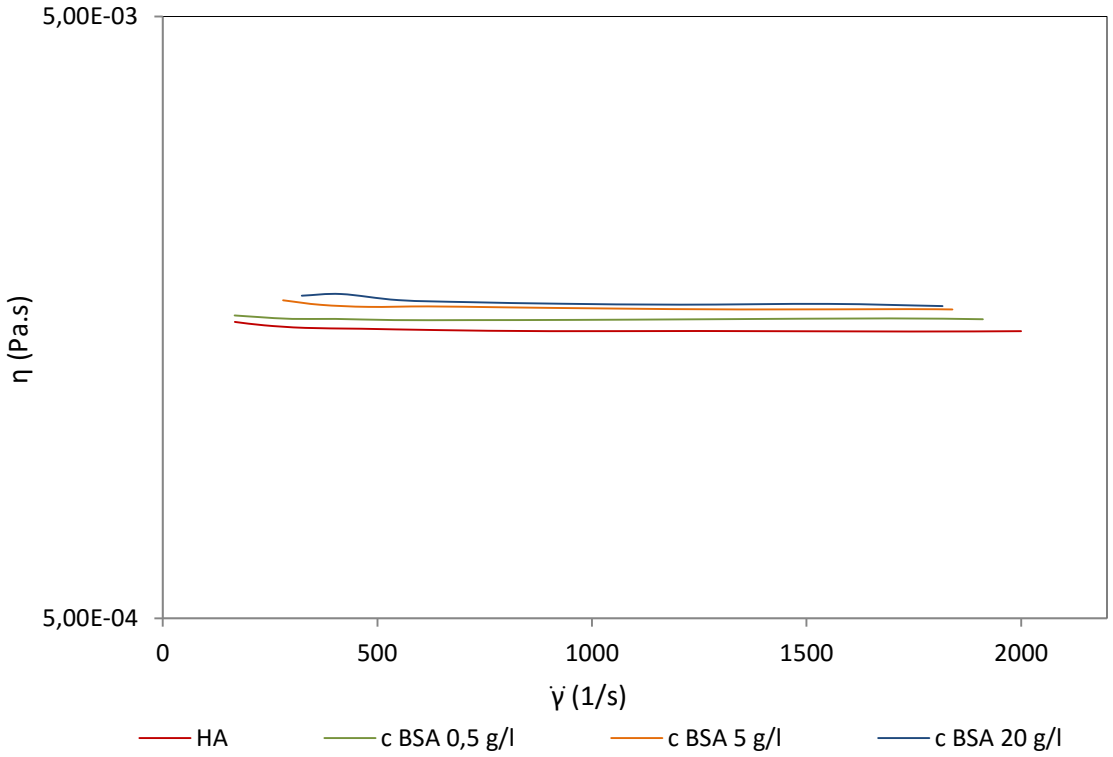
Obrázek 21*:Absorpční spektrum roztoků vysokomolekulové HA a BSA připravovaných při laboratorní teplotě.*



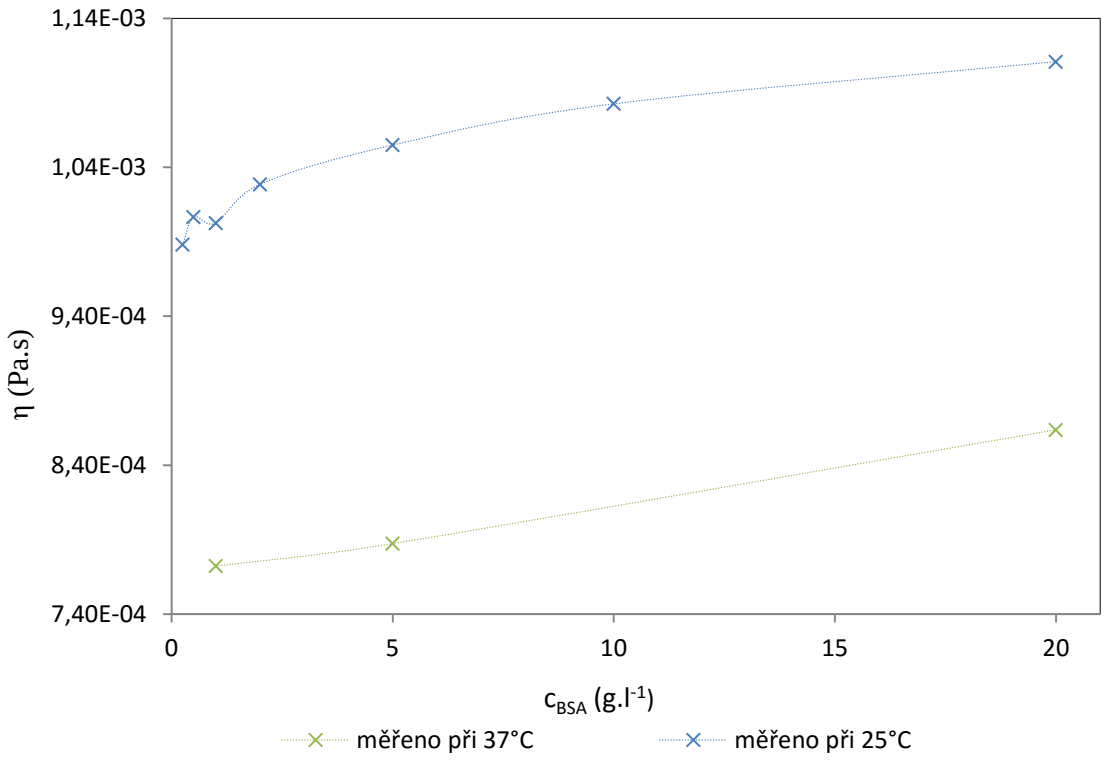
Obrázek 22: *Závislost viskozity na smykové rychlosti u roztoků BSA připravovaných při laboratorní teplotě a měřených při 25°C.*



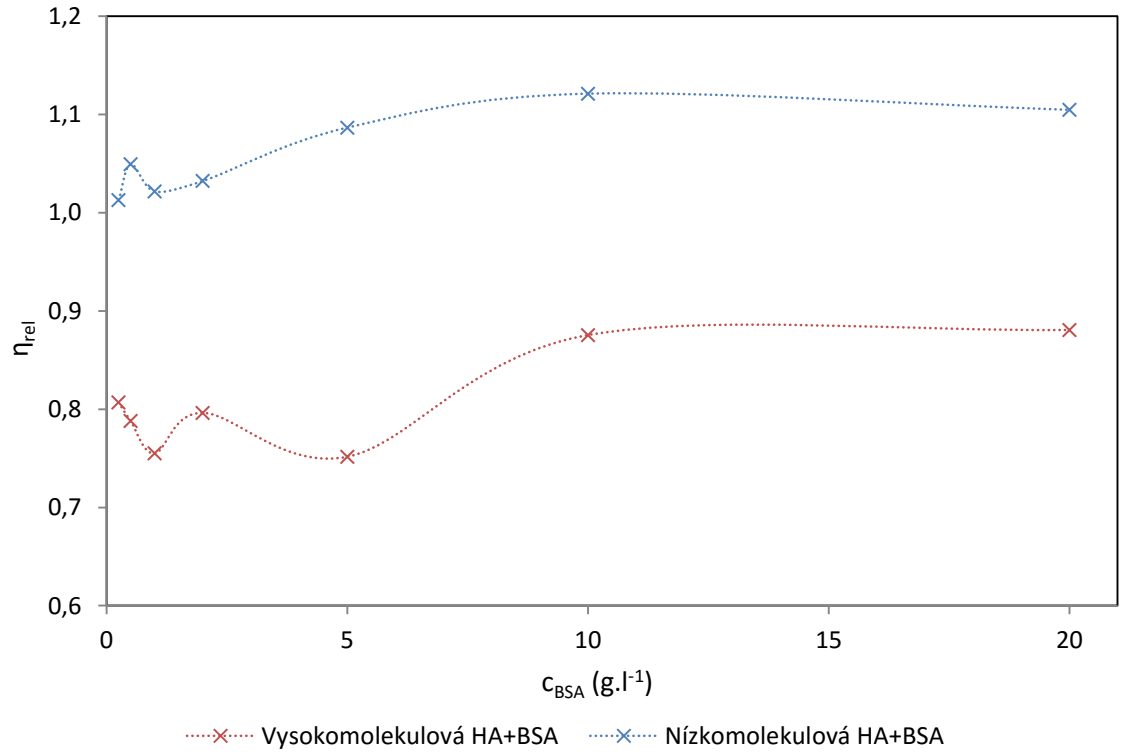
Obrázek 23: *Tokové křivky roztoků vysokomolekulové HA a BSA a roztoku samotné HA připravovaných při laboratorní teplotě a měřených při 25°C.*



Obrázek 24: *Tokové křivky roztoků nízkomolekulové HA a BSA a roztoku samotné HA připravovaných při laboratorní teplotě a měřených při 37°C.*



Obrázek 25: *Závislost viskozity na koncentraci u roztoků BSA připravovaných při laboratorní teplotě*



Obrázek 26: *Závislost relativní viskozity na koncentraci u směsných roztoků HA a BSA připravovaných při laboratorní teplotě a měřených při 37°C.*