

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY
MATERIALS RESEARCH CENTRE

DYNAMIKA SYSTÉMŮ HYALURONANU A ALBUMINU

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

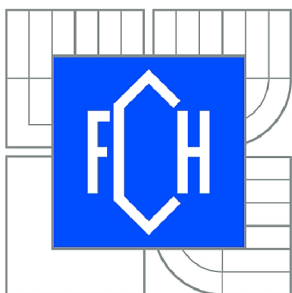
SABÍNA JARÁBKOVÁ

BRNO 2014



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY

MATERIALS RESEARCH CENTRE

DYNAMIKA SYSTÉMŮ HYALURONANU A ALBUMINU

HYALURONAN-ALBUMIN SYSTEM DYNAMICS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

SABÍNA JARÁBKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. MARTIN CHYTIL, Ph.D.

BRNO 2014



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0792/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Centrum materiálového výzkumu	
Student(ka):	Sabína Jarábková	
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:

Dynamika systémů hyaluronanu a albuminu

Zadání bakalářské práce:

Zavedení metody povrchové reologie ve studiu interakcí albuminu s hyaluronanem.
Porovnání výsledků povrchové reologie s metodami měření povrchového napětí.

Termín odevzdání bakalářské práce: 23.5.2014

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.

Sabína Jarábková
Student(ka)

Ing. Martin Chytil, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá dynamikou systémů hyaluronanu (HA) a hovězího sérového albuminu (BSA). Při výzkumu bylo použito těchto metod: povrchová reologie, tenziometrie, metoda maximálního přetlaku v bublině a UV-VIS spektrofotometrie. K měření byly použity roztoky s různou koncentrací albuminu a konstantní koncentrací hyaluronanu (vysokomolekulárního i nízkomolekulárního) a poté naopak. Všechny roztoky byly proměřeny a získaná data byla porovnávána s výsledky sérového albuminu v pufru bez hyaluronanu. Roztoky byly připravovány v prostředí citrátovo-fosfátového pufru o pH přibližně 4. Byly pozorovány interakce mezi hyaluronanem a sérovým albuminem.

ABSTRACT

The bachelor thesis deals with the hyaluronan and albumin system dynamics. In this study was to use these methods: interfacial rheology, tensiometry, method of maximum pressure in the bubble and UV-VIS spectrophotometry. The measurements were used with various concentrations of albumin and a constant concentration of hyaluronan(high molecular and low molecular too) and then conversely. All solutions were measured and the obtained data were compared with the results of BSA in buffer without HA. Solutions were prepared with citrate-phosphate buffer of pH about 4. Were observed interaction between HA and BSA.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kyselina hyaluronová, hovězí sérový albumin, povrchová reologie, tenziometrie, metoda maximálního přetlaku v bublině, UV-VIS spektrofotometrie.

KEY WORDS

Hyaluronic acid, bovine serum albumine, interfacial rheology, tensiometry, maximum bubble pressure, UV-VIS spectroscopy.

Jarábková, S. *Dynamika systémů hyaluronanu a albuminu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 52 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 diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
Podpis studenta

Ráda bych zde poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Martinu Chytilovi, PhD. za cenné rady a připomínky, trpělivost při konzultacích a čas, který mi věnoval.

OBSAH

1 ÚVOD.....	7
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1 Kyselina hyaluronová	8
2.1.1 Struktura a výskyt	8
2.1.2 Zdroje a výroba HA	8
2.1.3 Využití a vlastnosti HA.....	9
2.1.4 Hyaluronanový receptor CD44	10
2.2 Albumin	10
2.3 Interakce HA a BSA	11
2.4 Povrchové napětí a metody měření povrchového napětí	12
2.4.1 Statické metody	12
2.4.2 Dynamické metody	15
2.5 Reologie	16
2.5.1 Newtonské kapaliny	16
2.5.2 Nenewtonské kapaliny	17
2.5.3 Tixotropie a reopexie	18
2.5.4 Oscilační testy	18
2.6 Povrchová reologie	19
2.7 Turbidimetrie	20
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	21
3.1 Chemikálie	21
3.2 Použité metody.....	21
3.2.1 Příprava roztoků.....	21
3.2.2 Reologické měření	22
3.2.3 Měření tenziometrie metodou Du Noüy	24
3.2.4 Měření tenziometrie metodou maximálního přetlaku v bublině.....	24
3.2.5 Turbidimetrické a UV-VIS měření	25
3.3 Vyhodnocení naměřených dat.....	26
3.3.1 Vyhodnocení reologie	26
3.3.2 Vyhodnocení tenziometrických dat.....	26
3.3.3 Vyhodnocení turbidimetrie a UV-VIS spektrofotometrie.....	27
4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	28

4.1	Reologické měření	28
4.2	Měření povrchového napětí metodou maximálního přetlaku v bublině	34
4.3	Měření povrchového napětí metodou Du Noüy	35
4.4	Turbidimetrické a UV-VIS měření	37
5	ZÁVĚR	41
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	43
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	45
7.1	Seznam zkratk a symbolů	45
8	PŘÍLOHY	46

1 ÚVOD

V roce 1934 se poprvé K. Meyerovi a J. Palmerovi podařilo izolovat kyselinu hyaluronovou z očního sklivce hovězího skotu. V té době ještě ani netušili, že tento jejich objev bude mít takové využití zejména v medicíně, farmacii a kosmetice. Její hlavní výhodou je, že se přirozeně vyskytuje v lidském organismu, a tak je hodně používána při léčbě revma, osteoartritidy nebo při kožních zraněních. Nezpůsobuje žádné alergické reakce, je snadno odbouratelná a v tkáních zajišťuje viskoelasticitu.

Jedná se o polymer, který je schopen vázat vysoké množství vody díky existenci velkého množství hydroxylových skupin ve své struktuře a díky nábojové repulsi vyvolané karboxylovými skupinami disociovanými při fyziologickém pH je ve vodě celkem dobře rozpustný. Hydroxylové a karboxylové skupiny jsou velmi výhodnými místy pro chemické modifikace [1].

Cílem této práce bylo prozkoumat interakce HA a BSA, jak se mění povrchové napětí v citrátovo-fosfátovém pufru a hlavním cílem bylo zjistit, zda je hyaluronan vhodným nosičem léčiv při léčbě rakoviny a zda je možné zabudovat léčivo do albuminu. Ke studiu byly použity reologické, tenzometrické, turbidimetrické metody a UV-VIS spektrofotometrie.

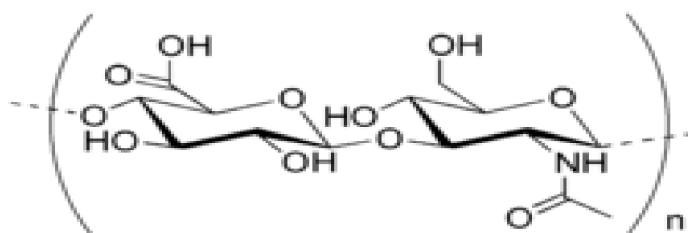
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová (HA) je přirozeně se vyskytující lineární polysacharid. Poprvé se jí podařilo izolovat K. Meyerovi a J. Palmerovi v roce 1934. Do té doby byla neznámou látkou. Kyselina hyaluronová byla poprvé izolována z očního sklivce hovězího skotu. Pojmenování dostala díky obsahu kyseliny uronové (uronic acid) a jejího původu z čoček (hyaloid = sklo) [2].

2.1.1 Struktura a výskyt

Kyselina hyaluronová je přírodní, negativně nabitý polysacharid díky disociaci karboxylových a hydroxylových skupin. Vyskytuje se ve velkém rozmezí molekulových hmotností (cca 10^1 - 10^6 g/mol) a většinou je uspořádaná do nerozvětvených makromolekul. Struktura je tvořena pravidelně se opakující disacharidickou jednotkou. Tato disacharidická jednotka je tvořena z β -(1-3)-N-acetyl-D-glukosaminu a β -(1-4)-D-glukuronové kyseliny. V molekule kyseliny hyaluronové může být až 10 000 a více opakujících se disacharidových jednotek. V disociovaném stavu nesou za fyziologických podmínek všechny glukuronové jednotky záporný náboj. Tento záporný náboj se kompenzuje kationty, zejména Na^+ , K^+ , Ca^{2+} a Mg^{2+} [2]. Když se kyselina hyaluronová nachází ve formě sodné či jiné soli, nazývá se hyaluronan.



Obr. 1: Hyaluronan.

HA je látka lidskému tělu vlastní. To znamená, že u obratlovců se hyaluronan vyskytuje prakticky ve všech tkáních. Jednak může být vázán na extracelulární matrix jako její organizátor nebo může být volný jako humektant (kůže), lubrikant (větší klouby), látka udržující tvar (oční bulva). Dále může být i jako složka výplňové hmoty některých orgánů (pupeční šňůra) [1]. A nejvyšší koncentrace HA v lidském těle je dosahována právě v synoviálních tekutinách, pupeční šňůře, chrupavkách a sklivci. V přírodě se ještě HA vyskytuje ve vysokých koncentracích například v kohoutích hřebíncích, nebo v kůži žraloků [2]. Pro laboratorní účely se využívá třeba i hyaluronan z prasečí kůže nebo osrdečnickové tekutiny králíků.

2.1.2 Zdroje a výroba HA

V současné době je HA získáván ve velké míře mikrobiální fermentací z mikroorganismů, a to konkrétně ze speciálně modifikovaného druhu streptokoků (*Streptococcus Equi* nebo *Streptococcus Zoepidemicus*). Tyto bakteriální kmeny dokáží produkovat velice čistý

hyaluronan o vysoké molekulové hmotnosti. Ještě častěji se využívá genetické modifikace bakterie *Bacillus subtilis*, kde se využívá její schopnosti rychle se množit, přičemž produkuje jen velmi malé množství endotoxinů a exotoxinů. Díky tomu splňuje normy pro použití v medicíně. Pro kosmetické účely je používán i HA izolovaný z kohoutích hřebínků, nicméně tato výroba je v celosvětovém měřítku už minoritní [2].

2.1.3 Využití a vlastnosti HA

HA plní v lidském těle mnoho funkcí. Například brání prostupu virů a bakterií přes matrici k buňce, v synoviální tekutině slouží HA díky svým viskoelastickým vlastnostem jako lubrikační činidlo a tlumič nárazů, zlepšuje metabolismus chondrocytů a inhibuje degradaci kloubní chrupavky, brání ukládání kolagenu a tím podporuje bezjizevnaté hojení tkáně a spoustu jiných funkcí. Všechny tyto funkce a vlastnosti hodně závisí na molekulové hmotnosti hyaluronanu [3]. Vysokomolekulární hyaluronan plní úlohu lubrikantu, humektantu a kromě toho má ještě organizační roli. To znamená, že po interakci s proteoglykanovými podjednotkami vytváří obrovské nadmolekulární útvary, a tím obsazuje značnou část extracelulárního prostoru a pak má vliv na organizaci složek v tomto prostoru. Naproti tomu hyaluronan s nízkou nebo velmi nízkou molekulovou hmotností (pod cca 500 kg/mol) má vliv na děje, které probíhají v buňkách nebo tkáních. Studiemi bylo dokázáno, že čím nižší je molekulová hmotnost hyaluronanu, tím vykazuje vyšší biologickou aktivitu [1].

Hyaluronan je v současné době využíván a zkoumán ve vícero oborech: buněčná biologie, kosmetika, chirurgie, imunologie, farmaceutika atd. Avšak díky tomu, že se HA přirozeně vyskytuje v lidském těle, je odbouratelná a není toxická, má velké uplatnění zejména v kosmetice a medicíně. V medicíně se hyaluronan využívá v mnoha oblastech. Široké uplatnění má v očním lékařství, kde pomáhá zvlhčovat povrch oka ve formě očních kapek nebo pomáhá chránit oční tkáň během operací [3]. Velmi časté jsou aplikace HA na pokožku ve formě krémů nebo gelů, kdy dochází k urychlení hojení z důvodu zvlhčení ran a potlačování zjizvení. Další využití HA je například při výměně synoviálních tekutin v kloubech nebo při vyhlazování vrásek, kde se HA doplňuje do kůže, hrtanu nebo hlasivek. V současné době je však velice populární výzkum HA z pohledu nosičových systémů pro cílenou distribuci léčiv. Při cílené distribuci léčiv jde o děj, kdy je léčivo (aktivní látka) zabudováno uvnitř nosiče a je dopraveno až do postižené oblasti. V ideálním případě se zdravou tkání neinteraguje. Jde tedy o EPR efekt (z angl. *Enhanced Permeability and Retention*) tudíž o zvýšenou propustnost a zádrž, protože velké molekuly se do nádorových tkání dostávají snadněji a pak se tam hromadí. Celkem často se tam hromadí i koncentračně, například i o řád od okolní tkáň. Uvolnění toho léčiva z nosiče je ovlivňováno vícero faktory, například ultrazvukem, změnou pH, změnou teploty nebo elektromagnetickým polem [4, 5]. Pro cílenou distribuci léčiv se využívají interakce s karboxylovými nebo hydroxylovými skupinami na řetězci HA. Další způsob je zabudovávání léčiv do micel, protože micely jsou z biokompatibilních a biodegradovatelných polymerů [2]. Jsou dva způsoby zabudovávání léčiv do micel. Buď může být léčivo vázáno hydrofobně (rozpuštěno v jádře micely) nebo hydrofilně (chemicky přímo navázáno na polymerní nosič).

HA má i unikátní reologické vlastnosti, které závisí na molekulové hmotnosti rozpuštěné HA a její koncentraci v roztoku. Nejvíce studovanými a využívanými vlastnostmi jsou tokové vlastnosti. Důležitými parametry jsou v tomto případě hodnoty limitních viskozit

a smykových rychlostí [6, 7]. Roztoky dostatečně dlouhých hyaluronanových řetězců o molární hmotnosti nad 10^5 MDa (Da je atomová hmotnostní jednotka, $1 \text{ Da} = 1,66 \cdot 10^{-24} \text{ g}$) již při nízkých koncentracích dosahují velmi vysokých hodnot limitních viskozit η_0 (limitní viskozita při nekonečně nízké smykové rychlosti). Z těchto hodnot vychází viskoelastické chování roztoků HA v živých organismech. Při nízkých smykových rychlostech se roztoky chovají jako newtonské kapaliny s vysokou hodnotou viskozity. S rostoucí smykovou rychlostí ale dochází k poklesu viskozity a roztoky se chovají pseudoplasticky, protože dochází k rozplétání dlouhých řetězců HA vlivem orientovaného mechanického působení. Při velmi vysokých smykových rychlostech začíná roztok opět vykazovat newtonské chování. Roztoky hyaluronanových řetězců s nízkou molekulovou hmotností se chovají pořád newtonsky, protože nejsou schopny tvořit shluky [6, 7].

2.1.4 Hyaluronanový receptor CD44

Buněčný receptor CD44 může interagovat s HA buď přes karboxylové, nebo hydroxylové skupiny. Je nejvíce a nejlépe prostudovaným HA receptorem. Patří do skupiny glykoproteinů a na hyaluronan reaguje velice citlivě. Je schopen vázat také fibronectin, laminin, nebo kolagen [8].

Jednou z nejvýznamnějších oblastí, kde probíhá výzkum HA s receptorem CD44 je při léčbě rakoviny. Nádorové buňky vykazují nadprodukcí buněčných receptorů CD44, které jsou na HA citlivé a specificky s ním interagují. HA byl nosičem látek (léčiv), které transportoval k nádorovým buňkám s nadprodukcí CD44 receptorů. Při chemoterapii pro léčbu nádorů s CD44 receptorem byly použity protilátky anti-CD44. Výsledky testů dokázaly zpomalení nebo zastavení choroby [8].

2.2 Albumin

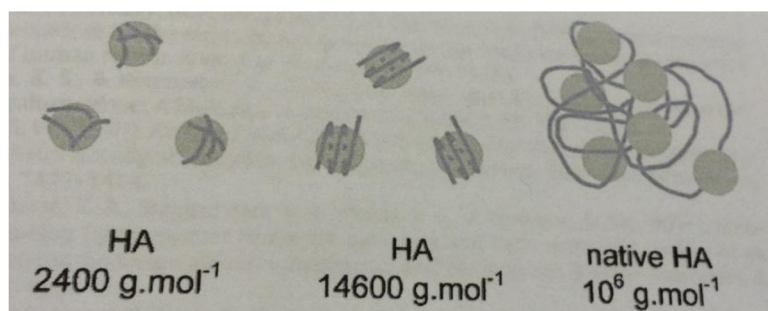
Hovězí sérový albumin (BSA) se řadí mezi proteiny krevní plazmy. Tvoří přibližně 52-60 % všech plazmatických bílkovin. Albumin je polypeptidový protein, který je tvořený jediným řetězcem 585 aminokyselin, který je tvořen jedním polypeptidem o dobře známé sekvenci [9]. Konečnou podobou tohoto řetězce je stabilizace 17 disulfidickými můstky mezi molekulami cysteinu. Působením proteáz se dále štěpí. Jeho molekulová hmotnost je 66-67 kDa. Nepatří mezi glykoproteiny na rozdíl od ostatních plazmatických proteinů. Kromě krve se vyskytuje také ve svalech nebo v tělních tekutinách, jako je tkáňový a mozkomíšni mok. V krvi se ho nachází zhruba 42 % z celkového tělního albuminu [9, 10]. Albumin je syntetizován v játrech (parenchymálních buňkách jater) jako většina proteinů krevní plazmy, protože nemůže být přijímán přímo z potravy. Pomáhá udržovat stálé vnitřní prostředí organismu. Jeho úlohou je udržování koloidního osmotického tlaku v krvi a taktéž je univerzálním nosičem rozličných biologicky aktivních látek. I přesto, že jeho hlavní funkcí je transport metabolitů jako jsou živiny, hormony nebo mastné kyseliny, je schopen vázat velkou řadu relativně nerozpustných endogenních a exogenních ligandů [9]. Dále má ještě farmakokinetický význam, s jeho transportní funkcí souvisí i přeprava široké škály léků krevním řečištěm (xenobiotika, antibiotika atd.) a dokáže ovlivňovat i účinnost léků, neboť zvyšuje zdánlivou rozpustnost hydrofobních léčiv v plazmě [9, 11]. Kromě rozpustnosti léčiv určuje také biologickou dostupnost léků (absorpci léků) díky vazebné afinitě. Pokud je vazebná afinita nízká, absorpce léčiva není možná. V případě zvýšené vazebné afinity

bioaktivních látek na sérové albuminy, je možná absorpce a distribuce léků na různé tkáně. Pokud je ale vazebná afinita příliš vysoká, absorpce léku sice možná je, ale jeho dodání na požadovanou tkáň je omezené z důvodu stability komplexu, a to nepříznivě ovlivňuje farmakokinetiku léčiva [9].

Albumin je v současné době díky své schopnosti vázat na sebe látky nebo léky a přepravovat je krevním řečištěm, zkoumán z pohledu nosičových systémů při cílené distribuci léčiv [11].

2.3 Interakce HA a BSA

Hyaluronan a hovězí sérový albumin jsou schopny tvořit elektrostatické HA-BSA komplexy zejména při pH 4, protože při tomto pH jsou nejučinnější, a to bez ohledu na délku řetězce HA (velké oblasti od 10^3 do 10^6 g/mol). Elektrostatické komplexy s BSA jsou schopny tvořit také krátké HA oligosacharidy. Na délce HA řetězce však do značné míry závisí struktura komplexu. Krátké HA řetězce mohou tvořit s BSA komplexy kulovitěho tvaru, přičemž molekula BSA je obklopena několika fragmenty HA. V tomto případě jsou kladné náboje nesené molekulou BSA. Dlouhé HA řetězce tvoří komplex s BSA tak, že molekula HA uvězní několik sférických molekul BSA, je to z toho důvodu, že molekula HA je kompaktnější když se spojí s proteiny, než když jde o volnou molekulu HA. Pokud jde o střední délku HA řetězců, komplex se tvoří spojením jedné molekuly HA s jednou molekulou BSA. Z toho se dá usoudit, že délka řetězce HA může řídit přístup na povrch proteinů a v případě, že protein je enzymem, tak může řídit i enzymovou aktivitu [12].



Obr. 2: Modely pro různé typy komplexů vytvořených mezi HA a BSA v závislosti na délce řetězce HA; jedna molekula BSA obklopena několika fragmenty HA při malé délce HA řetězce; jedna molekula HA uvězní několik molekul BSA při velké délce HA řetězce; jedna molekula BSA je obklopena jedním fragmentem HA při střední délce HA řetězce.

Na délce HA řetězce také závisí povaha HA-proteinových komplexů. Například rozpustnost HA-proteinových komplexů závisí na velikosti HA, přičemž slabší a lépe rozpustné komplexy se tvoří s kratšími řetězci HA. Rozpustností a tvorbou HA-BSA komplexů se zabývali i některé studie. Tyto studie byly vykonány při daných experimentálních podmínkách, zejména byly zaměřeny na pH a koncentraci HA a BSA, přičemž šlo o pH 4, koncentraci HA 0,2 g/l a BSA 1 g/l. Ty samé experimenty byly vykonány i s nativním HA, to je s molekulovou hmotností kolem 10^6 g/mol, a taktéž ukázaly, že povaha HA-BSA komplexů závisí od koncentrace HA a BSA a/nebo pH. Například rozpustné komplexy mohou existovat i při pH větším než 4, ale nerozpustné ne. Dalším klíčovým parametrem pro tvorbu HA-BSA komplexů byla iontová síla. Při zvyšující se iontové síle

dochází k zeslabení elektrostatické interakce mezi HA a BSA. Avšak ve fyziologickém prostředí byly komplexy vyznačovány iontovou pevností [12, 13].

Další studie byla zaměřena na stechiometrii. Šlo o zjištění poměru disacharidů hyaluronanu na molekulu BSA při použitých experimentálních podmínkách. Tyto podmínky byly opět pH 4 a koncentrace HA 0,2 g/l a BSA 1 g/l. Bylo zjištěno, že rovnost kladných a záporných nábojů nastává při stechiometrii, kdy je na molekulu BSA potřeba 44 HA disacharidů. Stechiometrie však zůstává konstantní bez ohledu na délku HA řetězců [12].

2.4 Povrchové napětí a metody měření povrchového napětí

Povrchové napětí je efekt, při kterém se povrch kapalin chová elasticky a snaží se dosáhnout stavu minimální energie. To znamená, že se kapalina snaží při daném objemu stáhnout svůj povrch tak, aby měl co nejmenší plochu [14].

Pro měření povrchového napětí se používá více metod. Dají se rozdělit do třech základních skupin: statické, semistatické a dynamické metody. Metody jsou vhodné i pro měření mezifázového napětí [14].

2.4.1 Statické metody

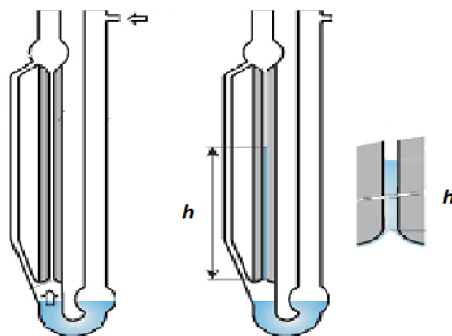
Statické metody jsou založeny na sledování ustáleného rovnovážného stavu sledovaného systému. Tyto metody umožňují získat skutečné rovnovážné hodnoty povrchového napětí. To je důležité zejména při studiu roztoků. Na fázových rozhraních je jiná koncentrace než v objemu a dochází tu k orientacím molekul v prostoru. Tato metoda není vhodná pro rychle se obnovující povrchy, protože oba tyto děje vyžadují určitou dobu k ustavení rovnováhy. Mezi statické metody patří například metoda kapilární elevace, sledování tvaru kapek a bublin v gravitačním poli nebo metoda vytahování destičky [14].

2.4.1.1 Metoda kapilární elevace

Tato metoda je založena na měření výšky vzestupu kapaliny h ve vertikální kapiláře. Platí vztah:

$$\gamma = \frac{h \cdot \rho \cdot g \cdot r}{2 \cos \theta} \quad (1)$$

ρ je hustota kapaliny (hustotu plynu se zanedbává), g je gravitační zrychlení, r je poloměr kapiláry, θ je smáčecí úhel. Nejčastěji se používají skleněné tenké kapiláry, které musí být dokonale čisté a musí být dokonale smáčeny měřenou kapalinou. Po celé délce by kapilára měla mít stejný průměr [14].



Obr. 3: Kapilární tenziometr s visící hladinou.

2.4.1.2 Metody založené na sledování tvaru kapek a bublin

Touto metodou se povrchové nebo mezifázové napětí zjišťuje pozorováním a porovnáváním parametrů profilů visících nebo přisedlých kapek (bublin) s teoretickým tvarem získaným numerickou integrací Laplaceovy rovnice. Obraz kapky je pozorován mikroskopem, snímán kamerou a zpracováván počítačem. Metoda je absolutní a skutečně statická. Umožňuje přesné měření velmi nízkých i vysokých povrchových napětí [14].

2.4.1.3 Wilhelmyho metoda vyvažování destičky

$$p^{\beta} - p^{\alpha} = \gamma \cdot \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right), \quad (2)$$

kde R_1 a R_2 jsou poloměry křivosti, p^{β} je konkávní tlak a p^{α} je tlak konvexní.

Celková hmotnost vztlínající kapaliny připadající na jednotku obvodu destičky pak nezávisí na tvaru menisku a při nulovém úhlu smáčení je rovna povrchovému napětí. Pro sílu F (obvykle se měří při takové poloze destičky, kdy její dolní hrana je přesně ve výši hladiny kapaliny), kterou je nutno vynaložit pro vyvážení destičky o šířce d a tloušťce t ($t \ll d$), platí vztah [14]:

$$F = 2 \cdot (d + t) \cdot \gamma = 2d\gamma. \quad (3)$$

2.4.1.4 Semistatické metody

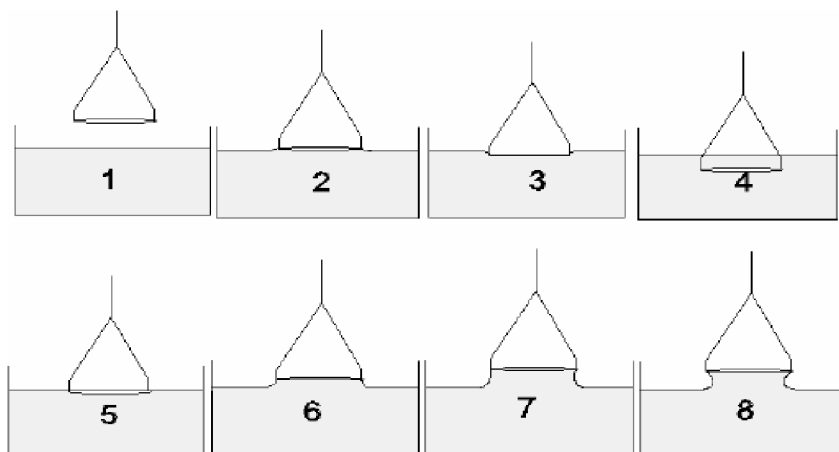
Tyto metody jsou založené na dosažení rovnovážného stavu soustavy podobně jako statické metody. V tomto případě je však problém, že rovnováha je nestabilní, proto je nutné zvolit optimální čas k přiblížení k rovnovážnému stavu. Mezi tyto metody se řadí například metoda odtrhování kroužku, metoda maximálního přetlaku v bublině nebo stalagmometrická metoda [14].

2.4.1.5 Metoda odtrhování kroužku (Du Noüy)

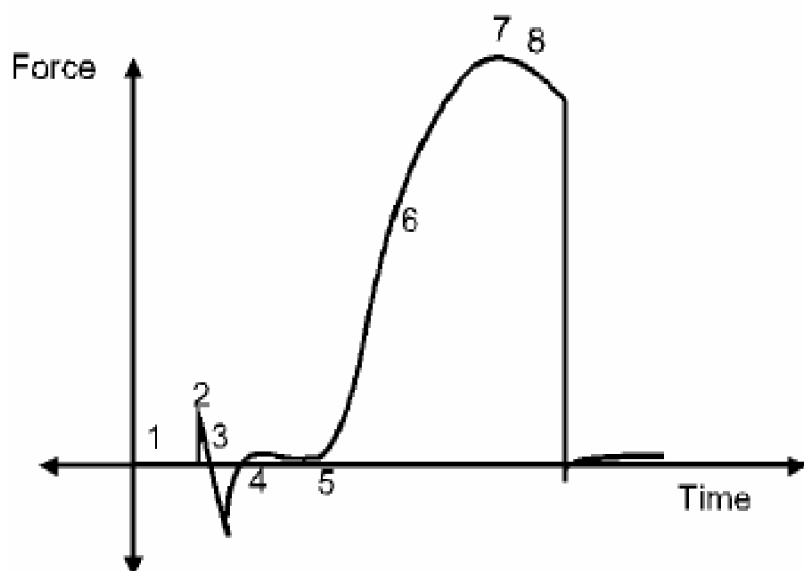
Metoda kroužku Du Noüy byla historicky první vyvinutou metodou. Je pojmenována po objeviteli Pierru Lecomte du Noüy (francouzský biofyzik a filozof). Při této metodě se zkoumají povrchové a mezifázové vlastnosti kapalin. Měří se síla F potřebná k odtržení platinovo-iridiového kroužku z fázového rozhraní. (Kroužek je vyroben ze slitiny, jejíž složení je cca z 90 % Pt a 10 % Ir.) Tento kroužek se využívá z důvodu vysoké odolnosti a nereaktivity téměř vůči všem chemickým látkám. Musí být dobře smáčen kapalinou, tedy kontaktní úhel by měl být roven nule, pak platí vztah:

$$\gamma = \frac{F}{4\pi \cdot r_p} \cdot \phi, \quad (4)$$

F je síla potřebná k odtržení kroužku, r_p je poloměr kroužku, ϕ je korekce na kapalinu, která ulpí na kroužku. Pokud během experimentu nedochází k odtržení kroužku, dá se tato metoda považovat za statickou (podobně jako Wilhelmyho metoda) [15].



Obr. 4: Schéma průběhu experimentu metodou odtrhování kroužku.



Obr. 5: Schematický diagram metody Du Noüy.

Průběh měření metodou Du Noüy je následující:

1. Kroužek je nad povrchem kapaliny a zbytek je nastaven na nulu.
2. Kroužek se dotkne povrchu kapaliny a dostává se do styku s některými pozitivními silami.
3. Když je kroužek tlačěn skrz povrch do kapaliny, na kroužek se aplikují negativní síly.
4. Dochází k smáčení svislých podpěr kroužku, takže některé pozitivní síly zůstanou.

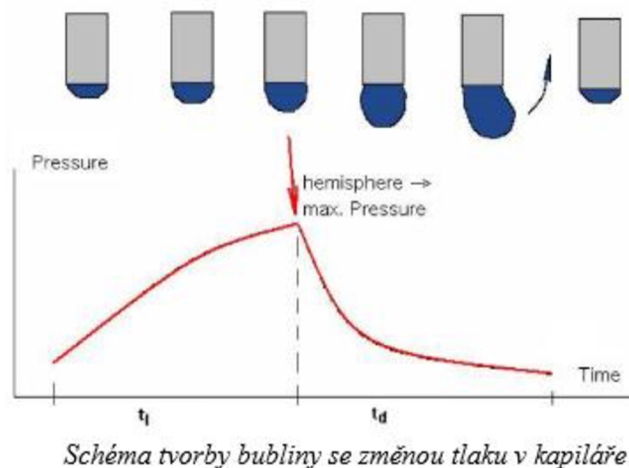
5. Kroužek se pomalu začne vytahovat z kapaliny. Síla začne stoupat, když se horní plocha kroužku dotýká povrchu kapaliny. Je to proto, že povrchové napětí kapaliny se snaží zabránit pronikání kroužku z povrchu kapaliny.
6. Dochází k vytahování kroužku nahoru, dokud není kapalina připojena ke kroužku a dosaženo maximální síly.
7. Síla potřebná k vytažení kroužku z kapaliny je úměrná povrchovému napětí kapaliny. Čím větší síla je potřebná, tím větší je povrchové napětí. [15]

2.4.1.6 Metoda maximálního přetlaku v bublině

Ve studovaném roztoku se za přetlaku p na konci kapiláry, ponořené pod hladinou, vytváří bublina plynu (nejčastěji vzduch). S růstem bubliny se zmenšuje poloměr jejího zakřivení. Přetlak v bublině je roven součtu hydrostatického tlaku a tlaku potřebného k překonání povrchového napětí γ . Platí vztah:

$$p = h \cdot \rho \cdot g + \frac{2\gamma}{r}, \quad (5)$$

kde p je tlak, h je hloubka ponoření kapiláry, g je gravitační zrychlení, γ je povrchové napětí a r je poloměr bubliny, respektive kapiláry. V okamžiku, kdy bublina dosáhne polokulovitěho tvaru, je r minimální a je rovno poloměru kapiláry. Tlak v bublině v tomto okamžiku dosahuje maximální hodnoty. Při dalším zvětšení tlaku poloměr bubliny prudce roste, bublina se stává nestabilní a odtrhne se [14].



Obr. 6: Schéma tvorby bubliny se změnou tlaku v kapiláře.

2.4.2 Dynamické metody

Tyto metody se využívají pro studium výrazně nerovnovážných stavů povrchových vrstev kapalin a rychlosti ustavování rovnovážné struktury jejich povrchu. Do této skupiny metod

patří například metoda oscilujícího paprsku. Proud kapaliny je vypouštěn z eliptického válce do vzduchu nebo druhé kapaliny. Působením povrchových sil se snaží dodat paprsku tvar válce s kruhovým průřezem. Metoda nachází uplatnění při měření rychlých změn povrchového napětí [14].

Podle výše uvedeného dělení patří metoda maximálního přetlaku v bublině mezi semistatické metody, avšak za určitých podmínek může být i metodou dynamickou. Těmi podmínkami jsou:

1. Molekuly rozpuštěné látky jsou rozmístěny v objemu roztoku.
2. Molekuly se mohou dostat na nově vznikající povrch při tvorbě bubliny. Pokud se ale bubliny tvoří dostatečně rychle, celý povrch se nestihne nasýtit [14].

2.5 Reologie

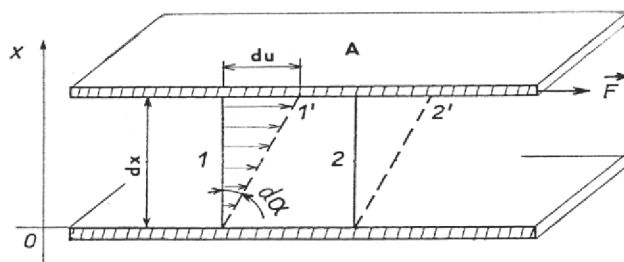
Reologie byla založena Eugenem C. Binghamem a Markusem Reinerem v roce 1929. Reologie se zabývá deformacemi materiálů vlivem vnějších sil a tokovými vlastnostmi. Zjednodušeně řečeno, reologie je nauka o toku. Tok můžeme považovat za zvláštní druh deformace, vedle deformace elastické a plastické, který je dobře pozorovatelný zejména u kapalin. Tok označujeme také pojmem viskózní deformace. Působením vnější síly se deformace stále zvětšuje, přičemž rychlost zvětšování této deformace je úměrná působící síle. Představa toku kapaliny jako pohybu po sobě se posouvajících myšlených vrstev hmoty se vyjadřuje newtonským viskozitním zákonem:

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}, \quad (6)$$

$$\tau = \frac{F}{A}, \quad (7)$$

$$\tau = \eta \cdot D, \quad (8)$$

(τ je tečné napětí [$\text{N} \cdot \text{m}^{-2} = \text{kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-2} = \text{Pa}$], F je síla vyvolávající deformaci, A je plocha, $\dot{\gamma}$ je relativní deformace, D je smyková rychlost, η je dynamická viskozita [$\text{Pa} \cdot \text{s}$] [16].

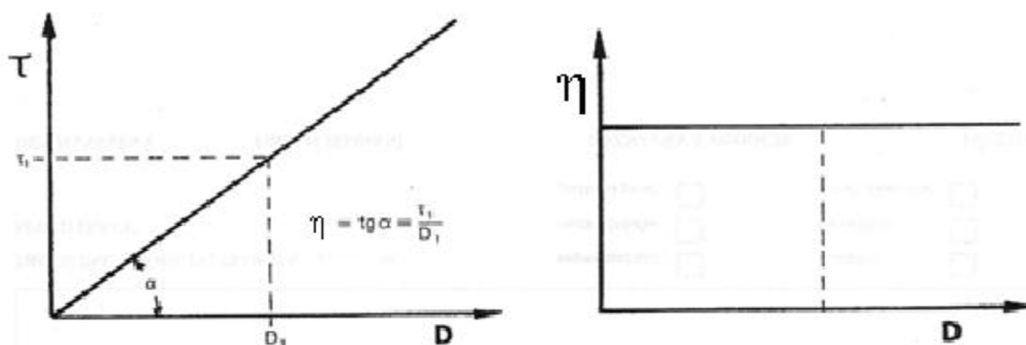


Obr. 7: Model s posuvnými deskami.

2.5.1 Newtonské kapaliny

Pro tyto kapaliny platí klasický výše uvedený Newtonův zákon. Převážně to jsou roztoky nízkomolekulárních látek a čisté kapaliny, protože při deformaci se jejich molekuly v roztoku vzájemně neovlivňují, dochází jenom k zanedbatelným interakcím mezi částicemi.

Se zvyšujícím se tečným napětím se nemění viskozita a tečné napětí je lineárně závislé na smykové rychlosti. Na následujícím obrázku jsou znázorněny toková (vlevo) a viskozitní (vpravo) křivka newtonské kapaliny (jde o závislost tečného napětí/viskozity na smykové rychlosti) [17, 18].



Obr. 8: a) závislost tečného napětí na smykové rychlosti b) závislost viskozity na smykové rychlosti.

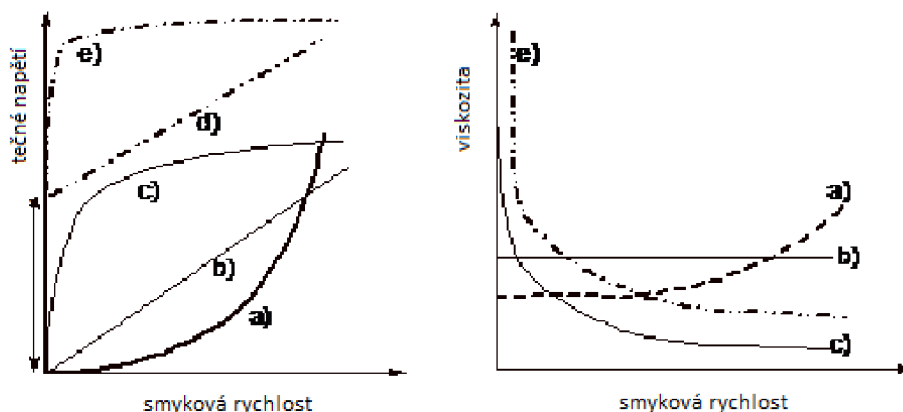
2.5.2 Neneutonské kapaliny

Tyto kapaliny se neřídí výše uvedeným Newtonovým zákonem viskozity. Patří sem disperzní soustavy koloidní i heterogenní, to znamená polymerní roztoky, soli, suspenze, pasty apod. Nelze pro ně stanovit jedinou hodnotu viskozity, která by byla konstantní v celém oboru možných hodnot tečného napětí a díky této nekonstantní viskozitě získávají specifické mechanické vlastnosti. Neneutonské kapaliny se dělí na pseudoplastické kapaliny, dilatantní kapaliny a plastické kapaliny [16].

K pseudoplastickým kapalinám patří například nátěrové hmoty. Tyto kapaliny prakticky okamžitě snižují svou viskozitu při zvyšující se smykové rychlosti, na rozdíl od plastických kapalin [18].

K dilatantním kapalinám patří například vysoce koncentrovaná škrobová suspenze. Tyto kapaliny zvyšují svou viskozitu při zvyšující se smykové rychlosti [18].

U plastických kapalin dochází k toku až po překročení určitého prahového smykového napětí, tzv. meze toku (kluzu). Do této skupiny kapalin patří Binghamské kapaliny. Jsou to kapaliny s elastickou složkou deformace. Pod hodnotou meze toku můžou mít i elastickou složku deformace. Patří k nim například kašovitě suspenze typu křída nebo vápno, které jsou rozptýlené v nějakém médiu nebo v disperzním prostředí (voda atd.) [18].



Obr. 9: a) Dilatantní b) Newtonská c) Pseudoplastická d) Plastická (Bingham) e) Plastická.

2.5.3 Tixotropie a reopexie

Tixotropie a reopexie patří k dalším projevům tokového chování neneutonských kapalin. Ke změnám vnitřní struktury dochází vlivem časového působení deformace. To má dopad i na makroskopické chování tekutiny. U tixotropních klesá viskozita s dobou působení mechanického zatížení. Patří sem například nátěrové hmoty, laky, které se po delším působení štětce snáze roztírají a po skončení roztírání nestékají. U reopexních roste viskozita s dobou působení napětí. Brání tak dalším deformacím. Příkladem reopexní látky je vysoce koncentrovaná vodní suspenze škrobu [18].

2.5.4 Oscilační testy

Oscilační testy se používají pro zkoumání všech druhů viskoelastických materiálů, od nízko-viskózních kapalin po polymerní roztoky a taveniny, disperze (tj. suspenze, emulze a pěny), pasty, gely, elastomery, a dokonce i tuhé pevné látky. Tento způsob testování se zařazuje mezi dynamické mechanické analýzy [19].

Základní principy oscilačních testů jsou popisovány na modelu dvou desek. Tlačná tyč je excentricky připojena jedním koncem k pohybuujícímu se kolu a druhý konec je připevněn k horní oscilující desce. Spodní deska je stacionární. Vzdálenost mezi deskami určuje mezera stříhu. Pokud se kolo otáčí, horní deska osciluje dopředu a dozadu a její pohyb způsobuje stříhání vzorku, který je umístěn mezi dvěma deskami. Podmínkou je, aby se vzorek deformoval homogenně v celém smykovém rozsahu a nevytvářel žádné nehomogenní plastické deformace. Druhou podmínkou je, aby vzorek přilnul k oběma deskám bez jakýchkoliv protiskluzových účinků. Vzorek může vykazovat elastické, viskózní nebo viskoelastické chování. Sledovanými veličinami jsou v tomto případě komplexní modul, ztrátový úhel, elastický modul a viskózní modul. Komplexní modul G^* [Pa] podává informace o celkové rezistenci nebo mechanické odolnosti toho vzorku a vypočte se dle vztahu:

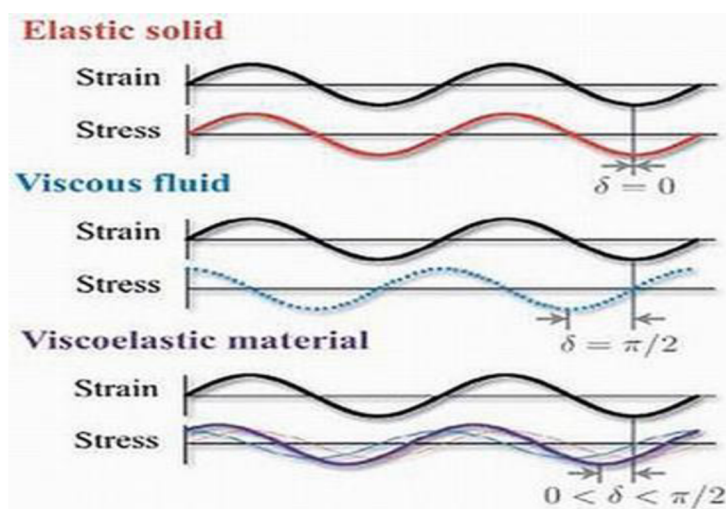
$$G^* = G' + iG'' \quad (9)$$

G' je paměťový (elastický) modul, udává se v Pa a souvisí se schopností tělesa (vzorku) uchovat elastickou energii, G'' je viskózní (ztrátový) modul, udává se také v Pa a souvisí

s nevratnou změnou deformační energie. Z těchto veličin pak získáváme ztrátový úhel, který vyjadřuje poměr mezi paměťovým a viskózním modulem dle vztahu:

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'}. \quad (10)$$

Z velikosti ztrátového úhlu se dá usuzovat charakter chování zkoumaného vzorku. Pokud je $\delta = 45^\circ$ (tedy $\tan \delta = 1$) vzorek vykazuje viskoelastické chování, v případě, že $\delta > 45^\circ$ (tedy $\tan \delta > 1$) vzorek vykazuje viskózní chování a v případě, že $\delta < 45^\circ$ (tedy $\tan \delta < 1$) se vzorek chová elasticky [19].



Obr. 10: Chování materiálu při oscilačních testech.

2.6 Povrchová reologie

Metoda, která zkoumá děje (deformace), které probíhají na fázových rozhraních dvou různých prostředí. Nejčastěji jde o mezifázové rozhraní zkoumaná kapalina/vzduch, ale může být i rozhraní dvou nemísitelných kapalin. Tyto mezifázové techniky jsou rozděleny na přímé a nepřímé. Principem nepřímých metod je analýza obrazu sledovaných částic, které se nachází v tom povrchu, zatímco přímé metody jsou založeny přímo na měření posunu, nebo krouticího momentu sondy, která je umístěna v daném rozhraní [20].

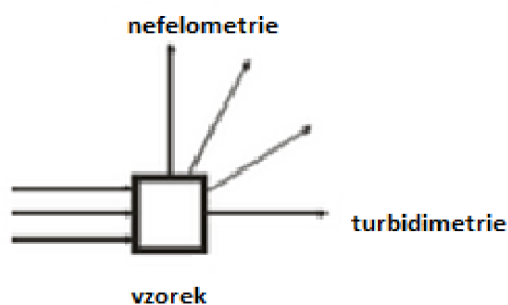
Jelikož jde o velmi úzké rozhraní dvou tekutin (cca 1 mm), je potřeba použití velice citlivé geometrie a také přístroje, který je schopen zaznamenat nízké točivé momenty. I v tomto případě je používána geometrie Du Noüy. Jedná se o velmi citlivou geometrii, která je schopna dostatečně přesně odečítat viskozity povrchu. Jde o platinovo-iridiový kroužek, který je vysoce odolný a nereaktivní téměř vůči všem chemickým látkám. Před každým použitím je potřeba kroužek smočit v zředěné kyselině chlorovodíkové a následně vyžít plamenem plynového kahanu, z důvodu odstranění nežádoucích nečistot [21].

Povrchová reologie se využívá v široké škále technických aplikací, zejména u koloidních systémů jako jsou pěny nebo emulze. Chování mezifázového toku těchto systémů je řízeno přítomností povrchově aktivních látek, proteinů, lipidů, makromolekul a částic v mezifázové vrstvě, které se tvoří v důsledku adsorpce aktivních látek v mezifázové vrstvě popřípadě tvorbou nerozpustných amfifilních látek. Překvapivé ale je, že i vzhledem k různorodosti využití povrchové reologie je stále málo vyvinutá v porovnání s jinými reologickými

metodami. Nedostatečná vyvinutost této měřicí techniky může být způsobena zejména obtížnou reprodukovatelností naměřených dat [20].

2.7 Turbidimetrie

Turbidimetrie je optická metoda, která se zabývá měřením zákalu (turbidity). Nejčastěji se měří kapalné roztoky, které jsou dávkovány do kyvet. Při turbidimetrickém měření se sleduje pokles intenzity záření, které dopadá na detektor v poměru se zářením, které vychází ze zdroje. Je to z toho důvodu, že část záření, které dopadá na vzorek, je vzorkem absorbováno, část záření se rozptýlí do směrů odlišných od osy záření a část záření prochází vzorkem a dopadá na detektor, přičemž ale turbidita není projevem absorbance, ale právě odrazem, lomem a difrakcí světla na částicích vzorku. Měření se provádí na běžných laboratorních spektrometrech [22].



Obr. 11: Turbidimetrické měření. Zdroj světla prochází z levé strany na pravou stranu.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

K výzkumu byla použita kyselina hyaluronová, vyrobena firmou Contipro Group s.r.o., Dolní Dobrouč, Česká republika. Při práci byly použity vzorky molekulových hmotností 90-130 kDa a 1500-1750 kDa. Molekulové hmotnosti byly garantovány přímo firmou Contipro Group s.r.o. Dále byla k přípravě roztoků kyseliny hyaluronové a albuminu použita voda MILI-Q připravená v laboratoři Fakulty chemické VUT v Brně. Pro přípravu roztoků albuminu byl použit hovězí sérový albumin od firmy Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo. K výzkumu byly použity tlumivé roztoky (pufry). Pufry byly připravovány z kyseliny citronové, hydrogenfosforečnanu disodného a MILI-Q vody.

3.2 Použité metody

3.2.1 Příprava roztoků

Všechny potřebné roztoky byly připravovány v MILI-Q vodě. Pro pufr se použily roztoky kyseliny citronové a hydrogenfosforečnanu disodného. Po promíchání byly roztoky dále použity pro přípravu citrátovo-fosfátového pufru o pH přibližně 4, tento pufr byl označen jako surový pufr. Roztoky kyseliny citronové a hydrogenfosforečnanu disodného byly připravovány stejným způsobem. Nejdřív byla navážena potřebná navážka kyseliny citronové nebo hydrogenfosforečnanu disodného na analytických vahách. Pak byly tyto navážky kvantitativně převedeny do odměrných baněk. Roztoky byly ponechány na magnetické míchačce po dobu jedné hodiny. Výsledná koncentrace roztoku kyseliny citronové byla 0,1 M a hydrogenfosforečnanu disodného 0,2 M.

Před přípravou pufru byl pH-metr nakalibrován dle návodu výrobce. Pro kalibraci byly použity standardní kalibrační pufry od firmy Mettler Toledo o pH 2,00; 4,01 a 7,00. Samotný pufr se připravoval postupným přidáváním hydrogenfosforečnanu disodného do určitého objemu kyseliny citronové za stálého míchání a stálého sledování pH přístrojem Mettler Toledo. Hodnota pH byla sledována do ustálení (přibližně 2 minuty). Ze surového pufru pak byl ještě připraven pufr v poměru 1:1 s MILI-Q vodou, který byl pak následně používán pro ředění vzorků na měření.

Zásobní roztoky kyseliny hyaluronové a albuminu byly připravovány následujícím způsobem. Nejdřív byla navážena navážka potřebného biopolymeru na analytických vahách. Poté byla navážka postupně po částech přidávána do určeného množství MILI-Q vody. Tento proces probíhal tak, že do zásobní lahve byla vždy napipetovaná část MILI-Q vody, a následně byla přisypaná část biopolymeru. Roztoky byly míchány na magnetické míchačce. Tímto způsobem aplikace bylo zajištěno převrstvení toho biopolymeru a tím i rovnoměrnější rozložení po celém objemu míchaného roztoku. Vrstvení roztoku se provádělo i z důvodu eliminace vzniku počátečních shluků biopolymeru, které by pak byly obtížněji rozpustitelné. Po přidání veškeré navážky biopolymeru do roztoku byla váženka opět zvážena na analytických vahách. Tímto způsobem bylo zjištěno, kolik biopolymeru ulpělo na stěnách váženky. Pro zajištění dostatečné homogenity roztoků, byly roztoky ponechány na magnetické míchačce do dalšího dne (přibližně 24 hodin) při laboratorní teplotě. Po ukončení míchání byly roztoky uchovávány v ledničce, aby nedocházelo k degradačním procesům.

Rozdíl v přípravě hyaluronanu a albuminu spočíval jenom v tom, že hyaluronan bylo třeba před přípravou roztoků vysušit v sušárně po dobu 30 minut při 90 °C kvůli snížení obsahu vody. Potřebná koncentrace připravovaných zásobních roztoků kyseliny hyaluronové byla 8 g/l a 4 g/l potřebná koncentrace připravovaných zásobních roztoků albuminu byla 20 g/l a 40 g/l.

Roztoky hyaluronanu a albuminu byly dále naředěny v poměru 1:1 surovým pufrem, aby byla upravena jejich koncentrace na poloviční hodnotu. Tyto roztoky byly dále používány pro přípravu výsledných roztoků s výslednými koncentracemi. Výsledné roztoky byly posléze připravovány tak, že roztoky HA nebo BSA o poloviční koncentraci byly naředěny pufrem 1:1 podle potřebné výsledné koncentrace.

Tab. 1: *Výsledné koncentrace všech roztoků.*

	Konstantní koncentrace HA [1 g/l]		Konstantní koncentrace BSA [5 g·l ⁻¹]
Koncentrace BSA [g/l]:	10	Koncentrace HA [g/l]:	2
	5		1
	2		0,5
	1		0,2
	0,75		0,1
	0,5		
	0,25		

Stejně koncentrace byly připravovány pro obě molekulové hmotnosti HA.

3.2.2 Reologické měření

Reometrické měření povrchové reologie a povrchového napětí bylo využito ke studiu výskytu a charakteristiky interakcí mezi hyaluronanem a hovězím sérovým albuminem. Pro měření povrchových reologických vlastností byla použita citlivá geometrie Du-Noüy, tedy platinovo-iridiový kroužek. Vzorky byly opět ponechány k vytemperování při laboratorní teplotě alespoň hodinu před měřením v laboratoři. Mezičase byl přístroj nakalibrován a připraven na měření. To znamená, že byla nastavena nulová poloha pomocí speciálního nástavce připojeného na měřící geometrii do místa, kam se umísťuje Pt-Ir kroužek. Po nastavení nulové polohy byl speciální nástavec vyměněn za kroužek Du-Noüy. Poté byla na desku reometru umístěna nádobka se vzorkem. Měřící poloha kroužku byla manuálně nastavena tak, aby byl kroužek umístěn do povrchové vrstvy zkoumaného vzorku. Aby bylo zabráněno odpařování zkoumaného roztoku byla do měřícího prostoru reometru vložena nádobka s pufrem a celý měřící prostor byl zakryt plastovým krytem. Po ukončení každého měření byl kroužek Du-Noüy vyčištěn v 6 % roztoku kyseliny chlorovodíkové a následně pak vyžhán plamenem plynového kahanu. Každý vzorek byl dávkován do nové čisté skleněné nádoby.

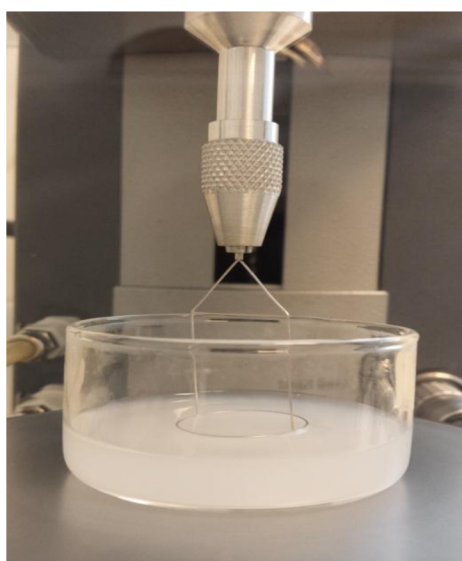
Ke studiu povrchových vlastností byly použity oscilační testy. Při oscilačních testech dochází k tomu, že se měřící geometrie vychyluje z počáteční polohy střídavě na jednu a na druhou stranu. Ke studiu byly použity časové oscilační testy tzv. *Oscillating Time Sweep test* a frekvenční oscilační testy tzv. *Frequency Sweep test*. Samotné měření probíhalo tak,

že nejdřív bylo třeba vzorek nechat 2 minuty vytemperovat na 25 °C v kroku, který se nazýval *Conditioning*. Pak byly prováděny dva časové oscilační testy. První oscilační test probíhal po dobu 15 minut a měřicí geometrie se vychylovala s konstantní úhlovou rychlostí 1 rad/s, velikost výchylky byla 0,5 %. Druhý oscilační test probíhal opět po dobu 15 minut s velikostí výchylky 0,5 %, ale měřicí geometrie se vychylovala s konstantní rychlostí 0,1 rad/s. Po ukončení časových oscilačních testů následoval opět krok zvaný *Conditioning* o délce 5 minut. Tento krok se vkládal mezi časové a frekvenční testy z důvodu relaxace vzorku, aby vzorek už nebyl zatížen mechanickým zatížením při časových oscilačních testech. Po relaxačním kroku následoval frekvenční test, při kterém měřicí geometrie oscilovala opět s velikostí výchylky 0,5 % a různou rychlostí v intervalu 10-0,05 rad/s. Po skončení frekvenčního testu byla geometrie očištěna v roztoku 6 % kyseliny chlorovodíkové. Po vyčištění geometrie byl udělán ještě jeden frekvenční test se stejným vzorkem. Rozdíl byl jenom v tom, že relaxační krok před frekvenčním testem byl nastaven na 15 minut.

Tab. 2: Přehled parametrů pro měření povrchové reologie.

1. měření			
	čas [min]	uhlová rychlost ω [rad/s]	velikost výchylky [%]
Conditioning 1	2	-	-
Time sweep step 1	15	1	0,5
Time sweep step 2	15	0,1	0,5
Conditioning 2	5	-	-
Frequency sweep step	-	10 - 0,05	0,5
2. měření			
Conditioning	15	-	-
Frequency sweep step	-	10 - 0,05	0,5

I navzdory velké časové náročnosti byly tyto testy provedeny se všemi roztoky.



Obr. 12: Měřicí systém pro povrchovou reologii.

3.2.3 Měření tenziometrie metodou Du Noüy

Tenziometrické měření povrchového napětí bylo využito ke studiu výskytu a charakteristiky interakcí mezi hyaluronanem a hovězím sérovým albuminem. Pro měření povrchových vlastností byla použita stejná geometrie, Du-Noüy. Toto měření bylo prováděno podobně jako reologické měření, ale hlavním rozdílem mezi těmito metodami byl směr pohybu platinovo-iridiového kroužku Du-Noüy. Při reologickém měření se kroužek pohyboval do stran a při tenziometrickém měření ve směru kolmém k povrchu. Další rozdíl je v tom, že při tenziometrickém měření se sleduje síla, se kterou se musí kroužek oscilovat.

Vzorky byly opět ponechány k vytemperování při laboratorní teplotě alespoň hodinu před měřením v laboratoři. Mezičase byl přístroj nakalibrován a připraven na měření. Kalibrace vah byla provedena závažím o přesné hmotnosti. Poté se začalo s vlastním měřením. Na měření bylo dávkováno cca 15 ml vzorku. Parametry pro měření byly nastaveny na 15 minut nebo alespoň 20 bodů. Po ukončení každého měření byl kroužek Du-Noüy vyčištěn ponořením do 6% roztoku kyseliny chlorovodíkové a následně pak vyžhán plamenem plynového kahanu. Každý vzorek byl dávkován do nové čisté skleněné nádoby.

3.2.4 Měření tenziometrie metodou maximálního přetlaku v bublině

Ještě před začátkem měření bylo třeba nechat roztoky vytemperovat na laboratorní teplotu a provést autokalibraci přístroje, aby se zjistilo, zda přístroj i kapilára dobře fungují. Autokalibrace přístroje byla prováděna s destilovanou vodou. Základní technické parametry pro tenzimetr BPA-800P jsou:

Tab. 3: *Základní technické parametry pro tenzimetr BPA-800P.*

Rozsah povrchového napětí	10 – 100 mN/m
Přesnost stanovení	± 0,1 mN/m
Citlivost	± 0,25 mN/m
Měřitelné časové rozmezí	10 ms – 10 s
Teplotní rozmezí	0 – 90 °C

Povrchové napětí bylo měřeno metodou maximálního přetlaku v bublině, to znamená, že byl měřen přetlak p na konci kapiláry, která byla ponořena pod hladinu roztoku, ve kterém se vytvářely bubliny plynu (vzduchu). Maximálního přetlaku v bublině bylo dosaženo, když byl poloměr bubliny rovný poloměru kapiláry. Povrchové napětí je přístrojem automaticky vypočítáno podle vztahu:

$$\gamma = f \cdot \frac{r \cdot P}{2}, \quad (11)$$

přičemž γ je povrchové napětí, r je poloměr bubliny, P je příslušný tlak a f je korekční faktor pro kapiláry o poloměru menším než 0,1 mm. Příslušný tlak odpovídá vztahu:

$$P = P_S - P_H - P_D, \quad (12)$$

kde P_S je nejvyšší naměřený tlak v bublině, P_H je hydrostatický tlak a P_D je tlak odporu vzduchu. Tyto tenziometry jsou při měření povrchového napětí schopny zohledňovat

i viskozitu roztoků a hydrostatický tlak. V laboratorní praxi jsou hojně využívány zejména díky jejich prostorové nenáročnosti a díky tomu, že jsou jednoduché na používání [23].

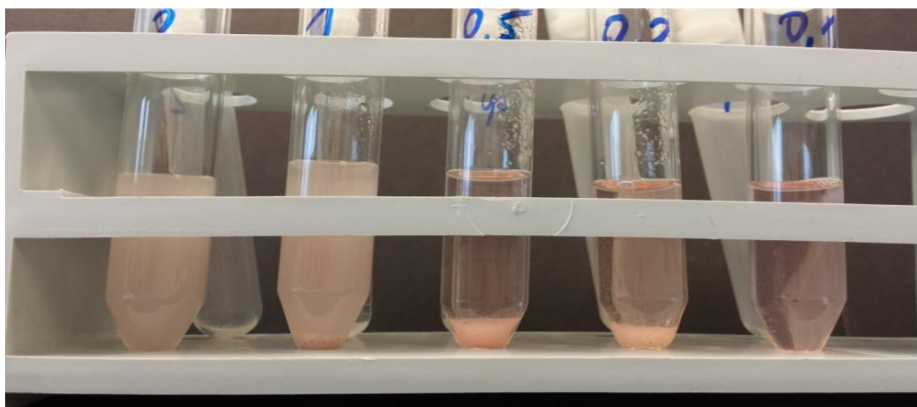
Samotné měření bylo prováděno standardní metodou, to znamená, že čas potřebný pro tvorbu bubliny (respektive průtok vzduchu) se měnil od 10 ms do přibližně 10 s. Přibližná doba experimentu byla 20 minut. Doba experimentu závisela na viskozitě roztoků, při viskóznějších roztocích byla doba experimentu o něco delší.



Obr. 13: Měřicí systém pro tenziometrické měření maximálního přetlaku v bublině.

3.2.5 Turbidimetrické a UV-VIS měření

Turbidimetrické měření bylo provedeno na spektrofotometru HITACHI a Varian Cary 50, kde byl sledován zákal daného roztoku. Na přístroji HITACHI byla měřena koncentrační řada albuminu. Koncentrační řada hyaluronanu byla měřena na přístroji Varian Cary 50 z důvodu poruchy lampy na přístroji HITACHI. Měřilo se v křemenných kyvetách v rozmezí vlnových délek 700-250 nm, optická délka kyvety byla 1 cm a rychlost scanu byla zvolena na 300 nm/min. Detektorem pak bylo detekováno záření procházející vzorkem, které se porovnávalo se zářením vycházejícím ze zdroje. Ještě předtím, než mohlo probíhat měření, bylo třeba všechny roztoky odstředit. Roztoky byly odstředovány po dobu 30 minut rychlostí 4 000 ot./min z důvodu usazení pevného podílu. Kromě používaných roztoků pro všechny ostatní měření bylo třeba připravit roztoky pro solubilizaci, a to tak, že do malých vialek bylo napipetováno 200 - 400 μ l Sudanu III v acetonu. Aceton byl následně odpařen v digestoři, tím bylo dosaženo 2 mM koncentrace Sudanu III. Následně bylo do těchto vialek napipetováno 5 ml roztoků vzorků a vialky byly do dalšího dne ponechány na třepačce při laboratorní teplotě. Nejprve byla změřena základní čára tzv. „baseline“ na vzorku pufry, ve kterém byly připraveny vzorky. Posléze byla změřena absorbance všech vzorků (těch původních i těch se Sudanem III). Pro vyhodnocení turbidity byly použity hodnoty absorbance při vlnové délce 400 nm, při které BSA neabsorbuje.



Obr. 14: Fotografie koncentrační řady HA vzorků se Sudanem III po odstředění.

3.3 Vyhodnocení naměřených dat

3.3.1 Vyhodnocení reologie

Pro vyhodnocení naměřených hodnot jednotlivých roztoků koncentrační řady albuminu i koncentrační řady hyaluronanu byly použity programy TA Data Analysis od firmy TA Instruments a MS Excel. Při vyhodnocování časových oscilačních testů byla sledována závislost komplexního modulu $|G^*|$ nebo ztrátového úhlu δ na čase. Z posledních cca 20 hodnot (hodnot, které se daly považovat za ustálené) byl zhotoven průměr a byl vypočítán variační koeficient a směrodatná odchylka pro získání rovnovážné hodnoty komplexního modulu a ztrátového úhlu. Časová hodnota byla extrapolovaná na nekonečno. Při frekvenčních oscilačních testech byl zhotoven průměr obou měření a až tyto průměrné hodnoty byly vynášeny do grafů. V programu TA Data Analysis bylo pomocí funkce QC (Quality Control) ověřováno o kolik procent se tyto dvě měření od sebe odlišují. Bylo zjištěno, že některé měření se od sebe odlišují i o 30 % a více.

3.3.2 Vyhodnocení tenziometrických dat

Naměřená data pomocí tenziometrických metod byly zpracovávány v programu MS Excel. Byla sledována závislost povrchového napětí na čase nebo závislost povrchového napětí na převrácené hodnotě odmocniny z času. Pro vyhodnocování byly použity dvě metody, první metodou byla extrapolace času na nekonečno. Jednotlivé křivky v grafech byly proloženy lineárními a polynomickými funkcemi. Z posledních cca 10-20 hodnot (hodnot, které se daly považovat za ustálené) byl zhotoven průměr a byl vypočítán variační koeficient a směrodatná odchylka pro získání rovnovážné hodnoty povrchového napětí, což bylo druhou vyhodnocovací metodou. Pro tenziometrickou metodu pomocí tenziometru KSV Sigma 701 se dalo použít pro výpočet průměrné hodnoty více hodnot, ale při tenziometrické metodě pomocí tenziometru BPA-800P nebylo tolik ustálených hodnot, a proto se pro výpočet průměru dalo použít maximálně 10 hodnot.

3.3.3 Vyhodnocení turbidimetrie a UV-VIS spektrofotometrie

Naměřená data pomocí turbidimetrie a UV-VIS spektrofotometrie byla zpracovávána v programu MS Excel. Byla sledována absorbance v rozmezí vlnových délek 275-285 nm, kdy při této vlnové délce albumin dosahuje svého maxima, dále byla sledována absorbance při vlnové délce 400 nm, protože při 400 nm albumin neabsorbuje, a dále byla sledována absorbance při rozmezí vlnových délek 510-530 nm, kdy Sudan III dosahuje svého maxima, ke zjištění množství nasolubilizovaného barviva ve vzorku. Hodnoty absorbancí byly vynášeny do grafů v závislosti na koncentraci daných vzorků.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V následujících odstavcích, tabulkách a grafech jsou uvedeny výsledky získané v měření daném rozsahem této práce, včetně diskuze k jednotlivým výsledkům.

4.1 Reologické měření

Výsledky měření povrchově reologických vlastností roztoků koncentrační řady albuminu i koncentrační řady hyaluronanu jsou uvedeny v následujícím odstavci. Naměřená data byla zpracována v programu TA Data Analysis od firmy TA Instruments a následně shrnuta do tabulek a grafů v programu MS Excel.

Při povrchové reologii byly zkoumány vlastnosti mezifázového rozhraní vzduch/ zkoumaný roztok. Z naměřených dat z oscilačních testů byly vybrány hodnoty komplexního modulu $|G^*|$ a ztrátového úhlu δ pro dvě oscilační frekvence 1 rad/s a 0,1 rad/s (viz příloha **Tab. 4** a **Tab. 6**). Byly porovnávány hodnoty komplexního modulu nebo ztrátového úhlu ze vzorků albuminu v pufru vůči vzorkům albuminu s vysokomolekulárním hyaluronanem nebo nízkomolekulárním hyaluronanem.

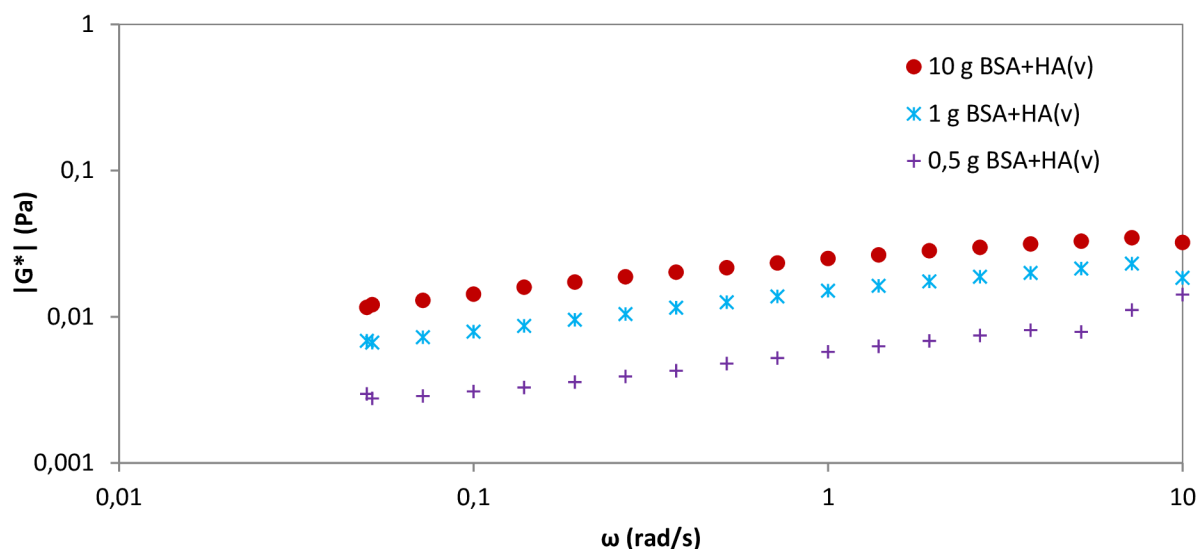
Z naměřených dat uvedených v **Tab. 4** vyplývá, že hodnoty komplexních modulů roztoků albuminu se značně liší od hodnot komplexních modulů roztoků albuminu s hyaluronanem. Z toho lze usuzovat, že mezi albuminem a hyaluronanem dochází k interakcím. Tyto interakce vznikají mezi karboxylovou skupinou vázanou v molekule HA nesoucí záporný náboj a albuminem, který se na HA váže pomocí kladného náboje nacházejícího se na atomu dusíku. Z větší části jde o elektrostatické interakce, i když dochází i k hydrofobním interakcím [12, 13]. Roztoky s nízkými koncentracemi albuminu i hyaluronanu byly obtížně měřitelné a reprodukovatelnost měření nebyla téměř možná, pravděpodobně z důvodu nestability povrchu roztoků. Dalším problémem mohla být nízká elasticita roztoků, a proto byly výsledky příliš rozptýlené. Odlišnosti ve výsledcích mohou být, a pravděpodobně také jsou, způsobeny odlišným způsobem přípravy roztoků. Největší interakce je možné zaznamenat pravděpodobně kolem koncentrace BSA 1 g/l a koncentrace HA 0,2 – 1 g/l (u vysokomolekulárního hyaluronanu). Roztoky s nízkomolekulárním hyaluronanem byly obtížně měřitelné a měření bylo někdy třeba zopakovat i vícekrát, zejména u nízkých koncentrací hyaluronanu nebo albuminu.

Z naměřených hodnot ztrátových úhlů je vidět, že povrch roztoků je elastický, protože hodnoty ztrátových úhlů jsou pod 45° (viz příloha **Tab. 4** a **Tab. 6**). Nejvíce elastický povrch s nejvyšší mechanickou odolností mají roztoky s nejvyššími koncentracemi BSA. Při koncentrační řadě hyaluronanu to ale není tak jednoznačné, protože u roztoků s vysokomolekulárním hyaluronanem má nejvyšší elasticitu roztok o nejnižší koncentraci hyaluronanu a u nízkomolekulárního hyaluronanu trend není úplně jednoznačný, protože hodnoty ztrátových úhlů jsou hodně podobné (viz **Tab. 4**).

Tab. 4: Hodnoty komplexního modulu $|G^*|$ a ztrátového úhlu delta v závislosti na koncentraci albuminu nebo hyaluronanu při oscilační frekvenci 1 rad/s.

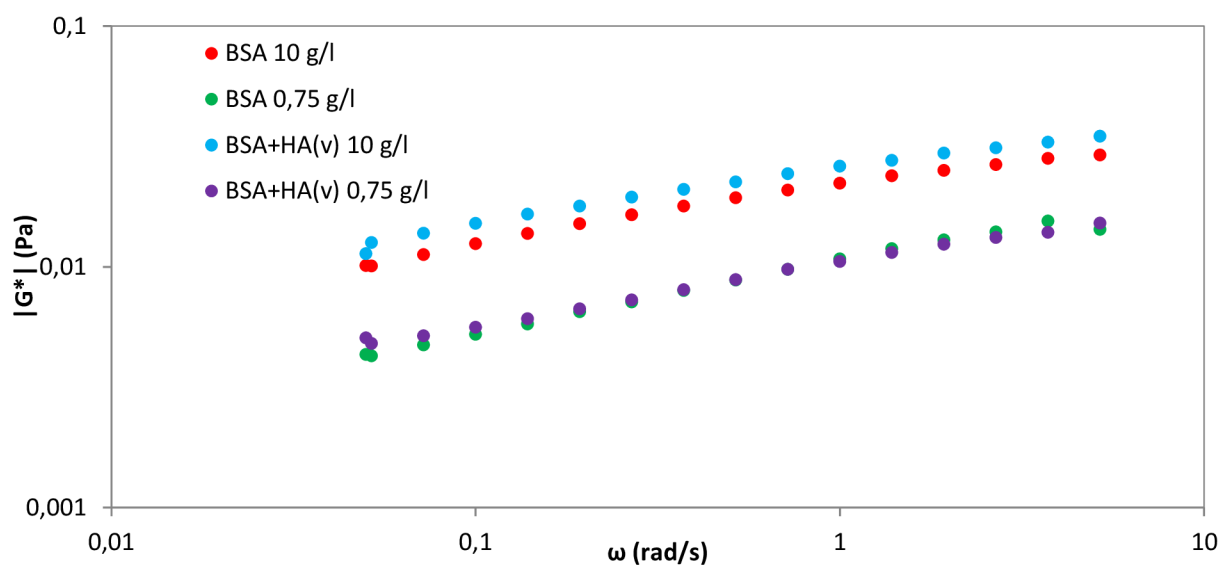
ω 1 rad/s				
	BSA + HA(1500-1750 kDa) =>koncentrace HA je 1 g/l		BSA + HA(90-130 kDa) =>koncentrace HA je 1 g/l	
Koncentrace BSA [g/l]	$ G^* $ [Pa]	δ [°]	$ G^* $ [Pa]	δ [°]
10	0,0210	20,4	0,0251	19,9
5	0,0104	27,3	0,0218	20,8
2	0,0119	29,1	0,0129	27,7
1	0,0115	27,1	0,0151	24,6
0,75	0,0085	30,7	0,0115	25,4
0,5	0,0112	25,4	0,0058	33,5
0,25	0,0071	28,9	-	-
BSA v pufru				
Koncentrace BSA [g/l]	$ G^* $ [Pa]	δ [°]		
10	0,0247	26,6		
5	0,0119	31,1		
2	0,0030	50,1		
1	0,0065	29,4		
0,75	0,0021	33,2		
0,5	0,0053	30,5		
0,25	0,0027	28,8		
	HA(1500-1750 kDa) + BSA =>koncentrace BSA je 5 g/l		HA(90-130 kDa) + BSA =>koncentrace BSA je 5 g/l	
Koncentrace HA [g/l]	$ G^* $ [Pa]	δ [°]	$ G^* $ [Pa]	δ [°]
2	0,0120	30,7	0,0199	23,0
1	0,0047	39,5	0,0209	20,9
0,5	0,0131	25,9	0,0171	27,0
0,2	0,0058	43,1	0,0198	23,3
0,1	0,0171	24,6	0,0190	24,8

V grafu na **Obr. 15** je ukázka výsledků frekvenčních testů pro koncentrační řadu albuminu s vysokomolekulárním hyaluronanem. Z grafu je patrné, že roztok s nejvyšší koncentrací má nejvyšší hodnotu komplexního modulu $|G^*|$, tudíž povrch vzorku s nejvyšší koncentrací má nejvyšší mechanickou odolnost. Hodnota komplexního modulu postupně klesá s klesající koncentrací albuminu a klesá i mechanická odolnost povrchu těch vzorků.



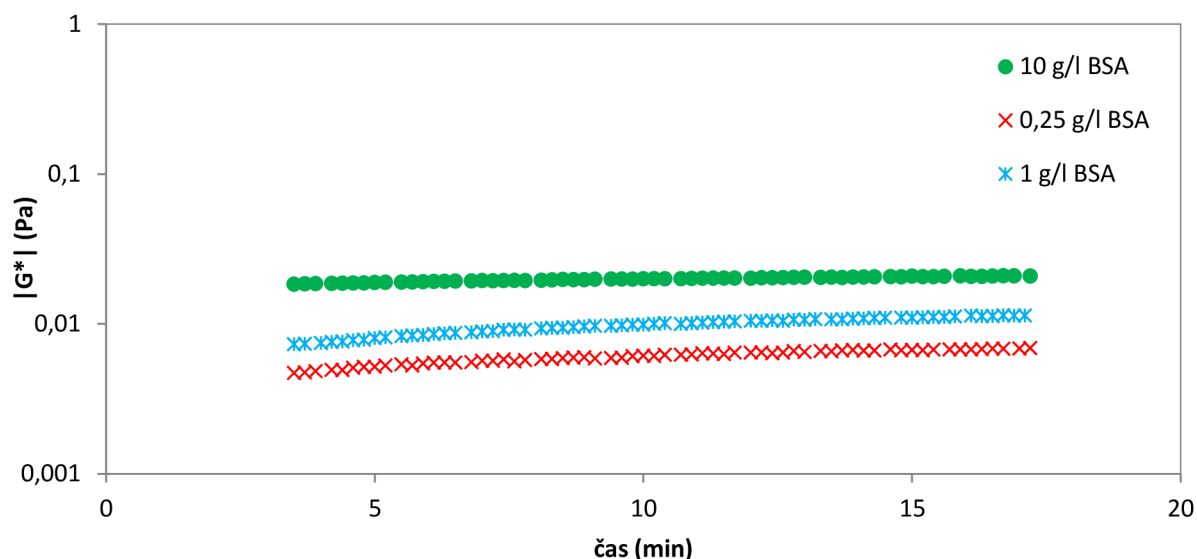
Obr. 15: Graf závislosti komplexního modulu $|G^*|$ na úhlové frekvenci pro koncentrační řadu albuminu s vysokomolekulárním hyaluronanem. Koncentrace hyaluronanu byla konstantní 1 g/l.

V grafu na **Obr. 16** je ukázka výsledků frekvenčních testů pro koncentrační řadu albuminu v pufru a koncentrační řadu albuminu s vysokomolekulárním hyaluronanem. V grafu jsou uvedeny výsledky z prvního měření vzorků a je vidět, že se tyto měření od sebe liší. Z grafu je patrné, že po přidavku hyaluronanu vzroste hodnota komplexního modulu proti vzorkům samotného albuminu v pufru (u obou koncentrací), což je trochu zvláštní, protože z předběžných nepublikovaných výsledků (kdy šlo o roztoky HA a BSA ve vodě) měly křivky odlišný trend, po přidavku HA se snížila odolnost i elasticita povrchu. Z našich výsledků ale vyplývá, že povrchy vzorků s hyaluronanem mají větší mechanickou odolnost a pevnost. Odlišnost měření může být způsobena odlišnou přípravou vzorků, odlišným prostředím atd.



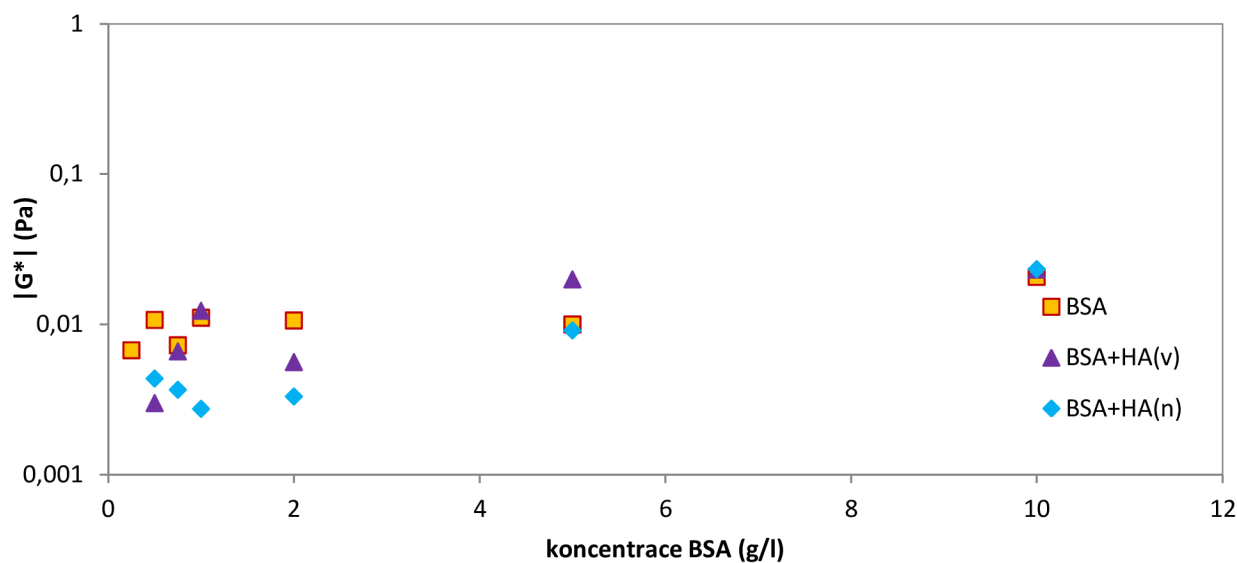
Obr. 16: Závislost komplexního modulu $|G^*|$ na úhlové frekvenci pro koncentrační řadu albuminu v pufru a koncentrační řadu albuminu s vysokomolekulárním hyaluronanem. Koncentrace hyaluronanu byla konstantní 1 g/l.

V grafu na **Obr. 17** je ukázka výsledků časových oscilačních testů pro koncentrační řadu albuminu v pufru. Z těchto výsledků také lze usuzovat, že povrchy roztoků s vyšší koncentrací mají větší mechanickou odolnost a pevnost. Při roztocích s vyšší koncentrací BSA/ HA je povrch stabilní a stabilita se nemění, avšak při nižších koncentracích BSA/ HA se stabilita povrchů mění, až se postupně blíží k nějaké rovnovážné hodnotě.

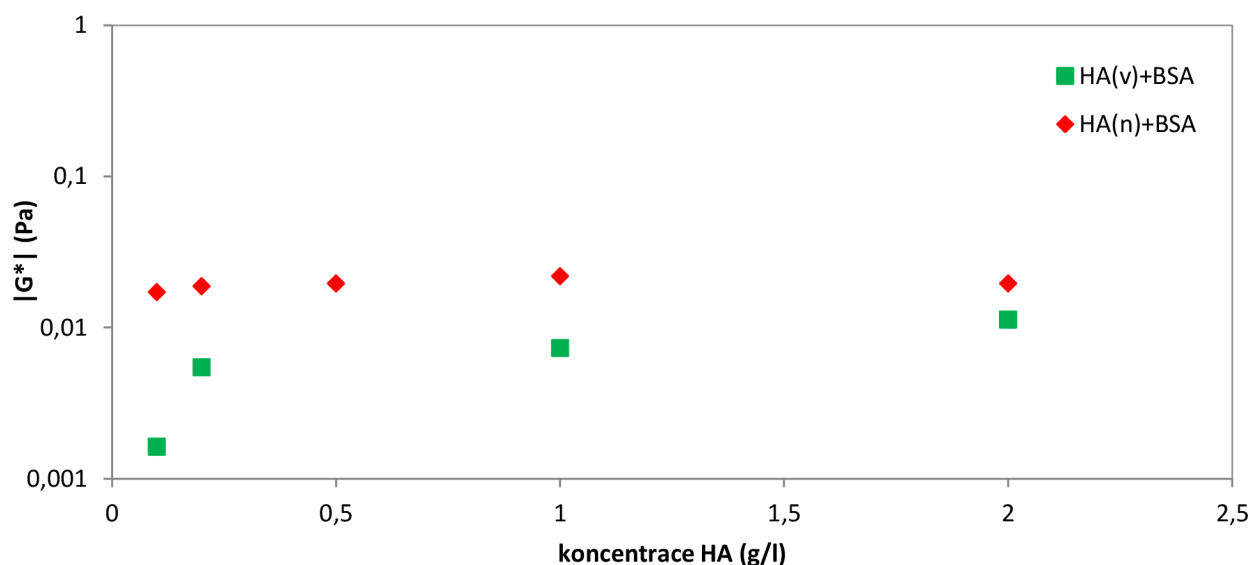


Obr. 17: Graf závislosti komplexního modulu $|G^*|$ na čase (časový oscilační test) pro koncentrační řadu albuminu v pufru.

V grafu na **Obr. 18** a **Obr. 19** jsou grafy závislosti rovnovážných hodnot komplexních modulů na koncentraci BSA/ HA při oscilační frekvenci 1 rad/s. Rovnovážné hodnoty byly získány z výsledků časových oscilačních testů. Z ustálených hodnot byla získána průměrná hodnota komplexních modulů (nebo ztrátových úhlů (viz příloha)), následně byl vypočítán variační koeficient a směrodatná odchylka. V prvním grafu je vidět, že hodnoty komplexních modulů jsou při nejvyšší koncentraci téměř stejné pro všechny koncentrační řady albuminu a moc se neliší, ale postupně se snižující se koncentrací albuminu dochází k větším odlišnostem, zejména u koncentrační řady albuminu s nízkomolekulárním hyaluronanem. Z tohoto grafu lze usuzovat, že roztoky s nízkomolekulárním hyaluronanem se vyznačují nižší mechanickou odolností a pevností než roztoky albuminu bez hyaluronanu, ale u roztoků s vysokomolekulárním hyaluronanem to není tak jednoznačné. Z druhého grafu, kde jsou porovnávány koncentrační řady hyaluronanu ale vyplývají poněkud protichůdné výsledky. Z tohoto grafu je vidět, že u roztoků s nízkomolekulárním hyaluronanem se hodnoty komplexních modulů příliš nemění v rozsahu celé koncentrační řady, ale u roztoků s vysokomolekulárním hyaluronanem hodnoty komplexních modulů postupně klesají s klesající koncentrací roztoků. Z grafu se dá ještě usoudit, že povrchy roztoků s nízkomolekulárním hyaluronanem mají vyšší mechanickou odolnost a pevnost.



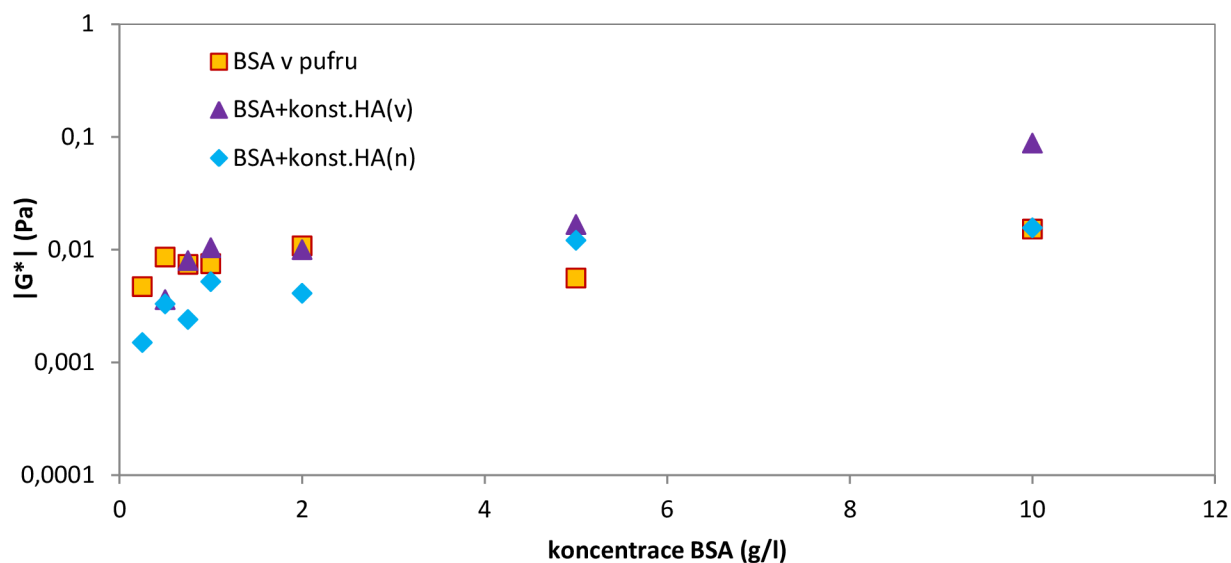
Obr. 18: Graf závislosti rovnovážných hodnot komplexního modulu $|G^*|$ na koncentraci BSA při oscilační frekvenci 1 rad/s pro 3 koncentrační řady (BSA v pufru, BSA s přidavkem vysokomolekulárního HA a BSA s přidavkem nízkomolekulárního HA). Koncentrace HA byla konstantní 1 g/l.



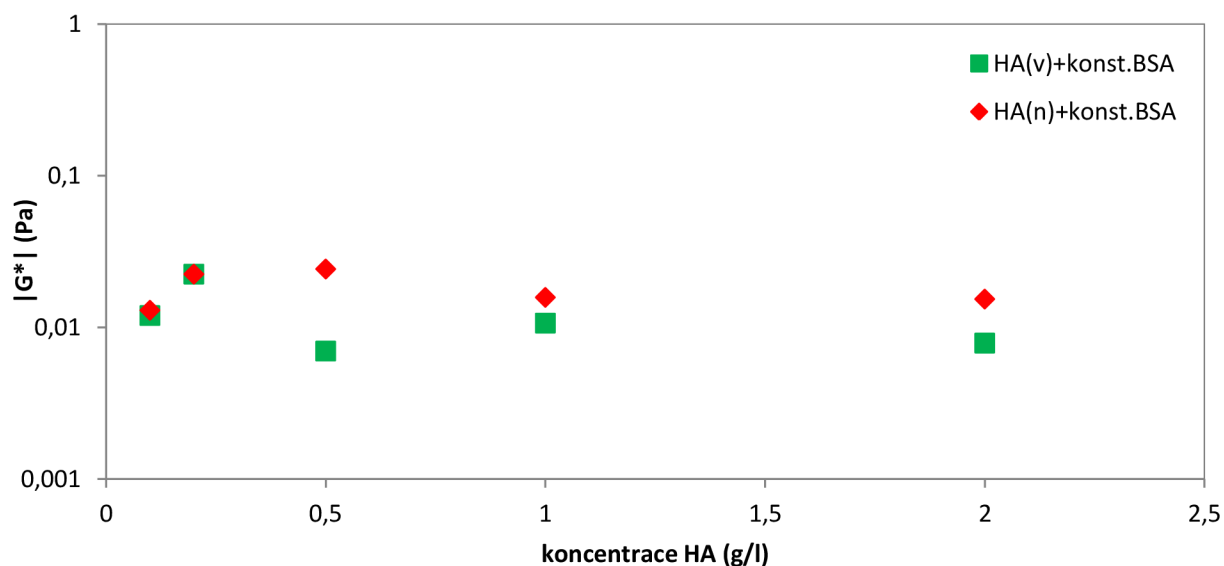
Obr. 19: Graf závislosti rovnovážných hodnot komplexního modulu $|G^*|$ na koncentraci HA při oscilační frekvenci 1 rad/s pro 2 koncentrační řady (vysokomolekulární HA s BSA a nízkomolekulární HA s BSA). Koncentrace BSA byla konstantní 5 g/l.

Na **Obr. 20** a **Obr. 21** jsou grafy závislosti rovnovážných hodnot komplexních modulů na koncentraci BSA/ HA při oscilační frekvenci 0,1 rad/s. Rovnovážné hodnoty byly získány z výsledků časových oscilačních testů podobně jako v předchozím případě. Výsledky v prvním grafu odpovídají přibližně výsledkům, které vyplývají z grafu na **Obr. 18**. Ve druhém grafu se výsledky o něco liší od výsledků, které jsou uvedeny v grafu na **Obr. 19**, ale liší se zejména u nízkých koncentrací hyaluronanu. Při vyšších koncentracích se dá říct, že se výsledky shodují. Rozdílnost výsledků u nízkých koncentrací může být způsobena i tím,

že roztoky s nízkými koncentracemi byly obtížně měřitelné, tudíž výsledky těchto měření nemusí být zcela přesné.



Obr. 20: Graf závislosti rovnovážných hodnot komplexního modulu $|G^*|$ na koncentraci BSA při oscilační frekvenci 0,1 rad/s pro 3 koncentrační řady (BSA v pufru, BSA s přidavkem vysokomolekulárního HA a BSA s přidavkem nízkomolekulárního HA). Koncentrace HA byla konstantní 1 g/l.

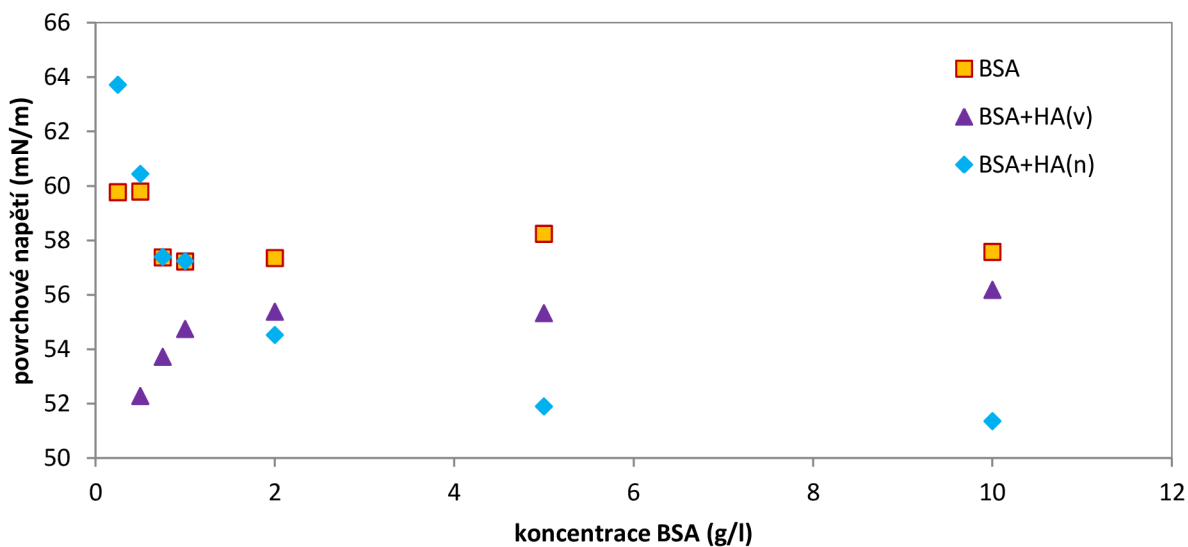


Obr. 21: Graf závislosti rovnovážných hodnot komplexního modulu $|G^*|$ na koncentraci HA při oscilační frekvenci 0,1 rad/s pro 2 koncentrační řady (vysokomolekulární HA s BSA a nízkomolekulární HA s BSA). Koncentrace BSA byla konstantní 5 g/l.

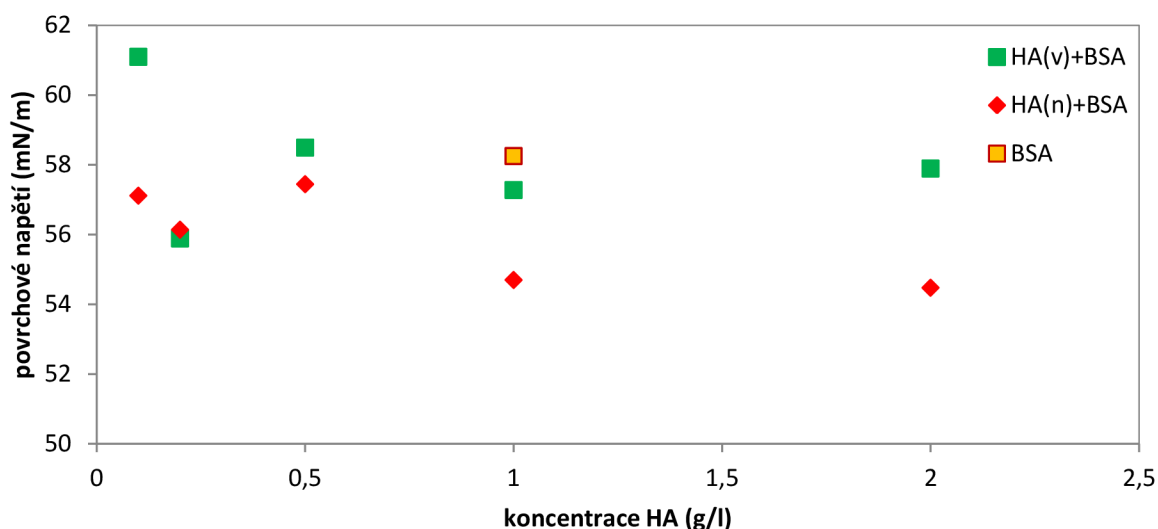
4.2 Měření povrchového napětí metodou maximálního přetlaku v bublině

V grafu na **Obr. 22** jsou uvedeny výsledky tenziometrického měření povrchového napětí. Z grafu je patrné, že výsledky jednotlivých koncentračních řad se značně liší. U koncentračních řad albuminu a albuminu s nízkomolekulárním hyaluronanem se povrchové napětí se snižující koncentrací zvyšuje. Větší změny povrchového napětí se vyskytují v roztocích s nízkomolekulárním hyaluronanem než při roztocích samotného albuminu v pufru. Je to zřejmé, protože HA snižuje sorpci BSA na povrch bublin. U koncentrační řady albuminu s vysokomolekulárním hyaluronanem je ale průběh opačný a hodnoty povrchového napětí se snižují se snižující se koncentrací. Výsledky jsou však nejasné, protože to vypadá, jako kdyby vysokomolekulární hyaluronan podporoval sorpci BSA na povrch bublin. Odlišnosti ve výsledcích můžou být zapříčiněny odlišným způsobem přípravy roztoků. Z výsledků se ale dá usoudit, že mezi albuminem a hyaluronanem dochází k interakcím.

V grafu na **Obr. 23** je uveden graf pro koncentrační řady hyaluronanu. V tomto případě je vidět, že povrchové napětí je vyšší u vzorků s vysokomolekulárním hyaluronanem. Dále je z grafu patrné, že v tomto případě se v obou případech povrchové napětí zvyšuje se snižující se koncentrací hyaluronanu. Z toho lze usuzovat, že vysokomolekulární hyaluronan má pravděpodobně více volných vazebných míst pro interakce s albuminem, a proto je možné zaznamenávat vyšší hodnoty povrchového napětí. Koncentrační řady hyaluronanu byly srovnány s roztokem BSA v pufru o koncentraci 5 g/l, jelikož všechny roztoky obsahovaly BSA o koncentraci 5 g/l. Z grafu je vidět, že povrchové napětí BSA v pufru je vyšší než u koncentračních řad HA, je to logické, protože hyaluronan zpomaluje sorpci BSA z povrchu roztoků na povrch bublin.



Obr. 22: Graf závislosti rovnovážné hodnoty povrchového napětí na koncentraci BSA pro 3 koncentrační řady (BSA v pufru, BSA s přidavkem vysokomolekulárního HA, BSA s přidavkem nízkomolekulárního HA). Koncentrace HA byla konstantní 1 g/l.

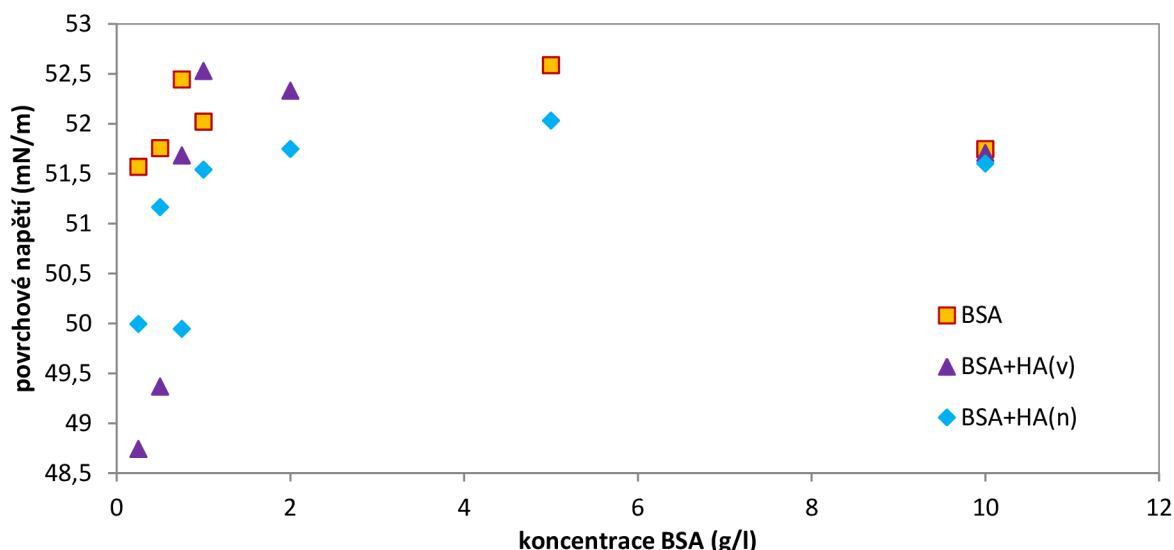


Obr. 23: Graf závislosti rovnovážné hodnoty povrchového napětí na koncentraci HA pro 2 koncentrační řady (roztoky vysokomolekulárního HA s BSA a roztoky nízkomolekulárního HA s BSA). Koncentrace BSA byla konstantní 5 g/l.

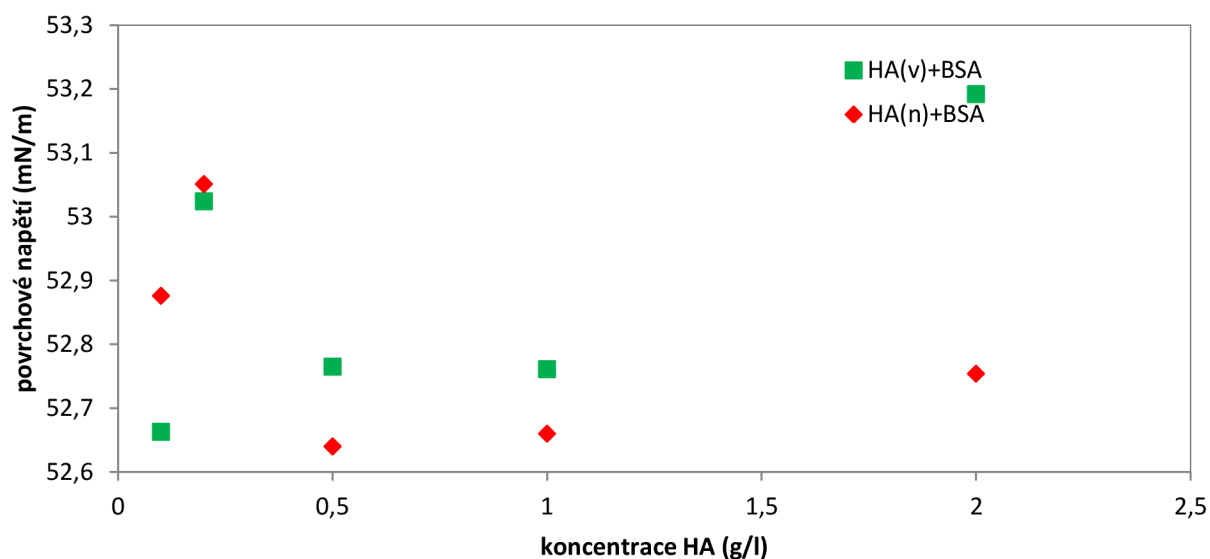
4.3 Měření povrchového napětí metodou Du Noüy

V grafu na **Obr. 24** jsou uvedeny výsledky tenziometrického měření povrchového napětí metodou Du Noüy. Z grafu je patrné, že povrchové napětí u nejvyšší koncentrace BSA je téměř stejné pro všechny koncentrační řady, pak až při nižších koncentracích BSA se hodnoty povrchových napětí začínají lišit. Z toho lze usoudit, že při koncentraci BSA 10 g/l spolu HA a BSA sice interagují, ale nemá to už žádný vliv na povrch roztoků a tudíž ani na změny povrchového napětí. Na rozdíl od předchozí tenziometrické metody v tomto případě nastává mírný vzrůst povrchového napětí do koncentrace BSA 5 g/l a pak se hodnoty povrchového napětí začínají se snižující koncentrací BSA snižovat ve všech koncentračních řadách. Tudíž se dá usoudit, že při vyšší elasticitě povrchu je vyšší i povrchové napětí. Příliš rozptýlené výsledky u nízkých koncentrací albuminu mohou být způsobeny i tím, že hyaluronan vychytal všechny albumin z povrchu roztoku do jeho objemu, a tím pádem výrazně změnil stabilitu povrchu a povrchové napětí.

V grafu na **Obr. 25** je uveden graf pro koncentrační řady hyaluronanu. Z naměřených dat lze usoudit, že po dosažení minimální počáteční koncentrace hyaluronanu 0,1 g/l dochází k mírnému nárůstu povrchového napětí až do koncentrace 0,2 g/l, poté následuje mírný pokles hodnot povrchového napětí a poté opět mírný nárůst při koncentraci 2 g/l. Z výsledků je ale patrné, že HA nemá až taký výrazný vliv na změnu povrchového napětí, protože celkově se hodnoty příliš nemění, i když k menším změnám, pohybujícím se v rozmezí 1 mN/m, dochází. V tomto případě je také vidět, že povrchové napětí je vyšší u vzorků s vysokomolekulárním hyaluronanem. Takže z tohoto měření také lze usuzovat, že vysokomolekulární hyaluronan má zřejmě více volných vazebných míst pro interakce s BSA, a proto je možné zaznamenávat o něco vyšší hodnoty povrchového napětí.

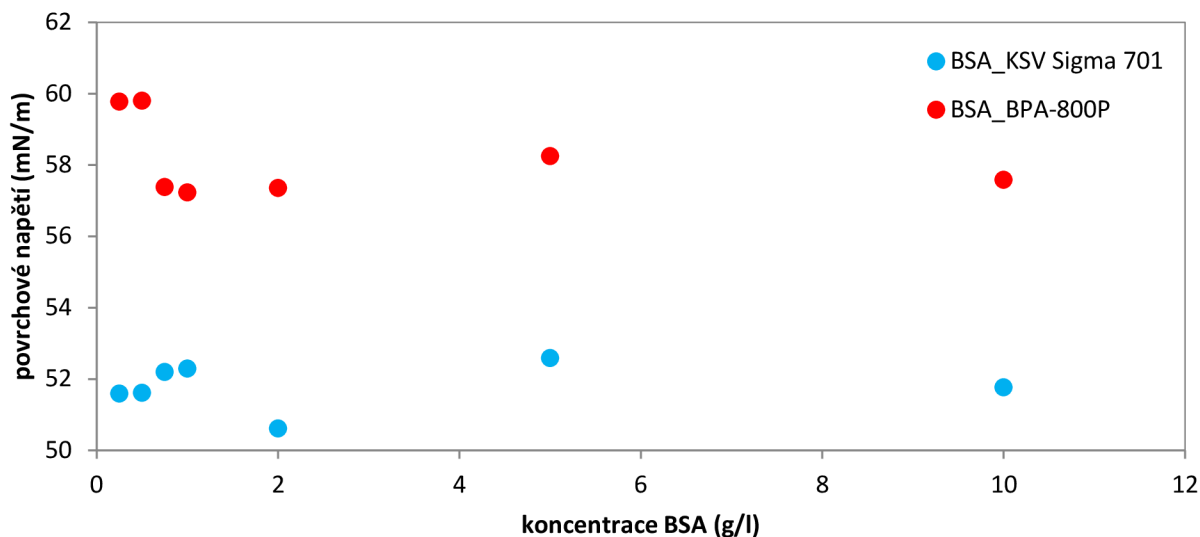


Obr. 24: Graf závislosti rovnovážné hodnoty povrchového napětí na koncentraci BSA pro 3 koncentrační řady (BSA v pufru, BSA s přidavkem vysokomolekulárního HA, BSA s přidavkem nízkomolekulárního HA). Koncentrace HA byla konstantní 1 g/l.



Obr. 25: Graf závislosti rovnovážné hodnoty povrchového napětí na koncentraci HA pro 2 koncentrační řady (vysokomolekulární HA s BSA a nízkomolekulární HA s BSA). Koncentrace BSA byla konstantní 5 g/l.

V grafu na **Obr. 26** je znázorněno porovnání obou tenziometrických metod na koncentrační řadě albuminu v pufru. Z tohoto grafu je zřejmé, že výsledky hodnot povrchových napětí jsou vyšší při měření povrchového napětí metodou maximálního přetlaku v bublině. Vyšší povrchové napětí je zřejmě způsobeno tím, že povrchově aktivní látky, které se v roztocích nacházejí, se nestačí sorbovat z povrchu roztoků na povrch bublin, protože nemají tolik času, aby se sorbovaly na povrch bublin s ohledem na krátký čas života bublin.



Obr. 26: Graf závislosti povrchového napětí na koncentraci BSA pro koncentrační řadu albuminu v pufru.

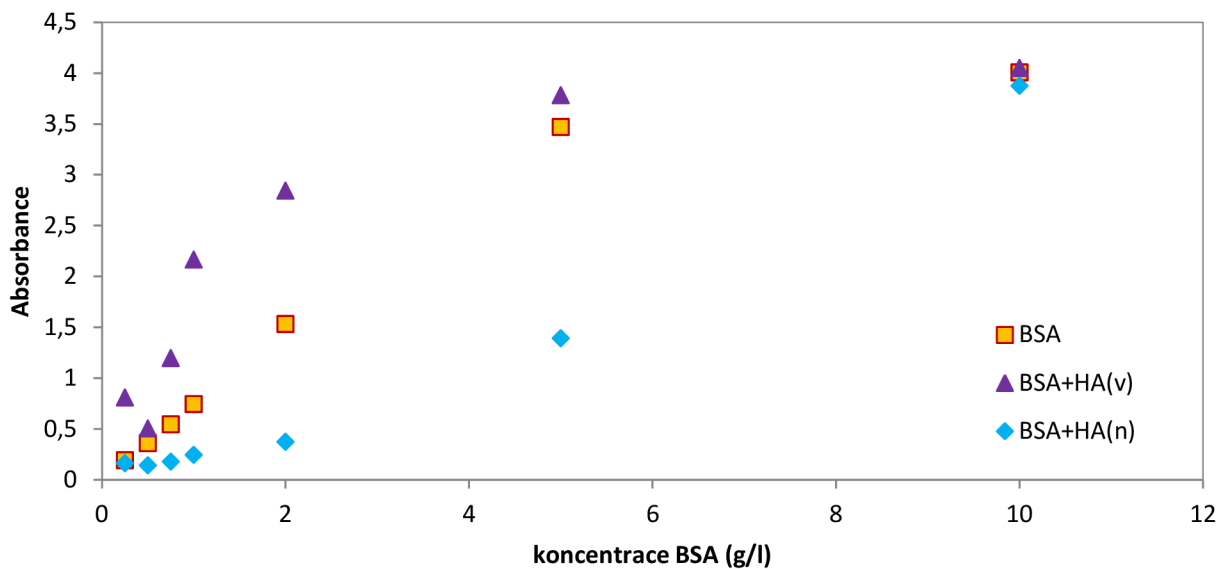
4.4 Turbidimetrické a UV-VIS měření

Při turbidimetrickém a UV-VIS měření byly získány hodnoty absorbancí všech roztoků všech koncentračních řad. Hodnoty absorbancí roztoků s hyaluronanem byly porovnávány s hodnotami absorbancí roztoků bez hyaluronanu. Byla sledována absorbance při vlnových délkách v rozmezí 275 – 285 nm (maximální absorpce albuminu), 400 nm (vlnová délka, při které albumin neabsorbuje) a 510 – 530 nm (maximální absorpce Sudanu III). Do grafů byly vynášeny závislosti absorbancí na koncentraci daných vzorků. Z naměřených dat vyplývá (**Obr. 27**), že absorpce čistého albuminu v pufru je přímo úměrná jeho koncentraci, ale při vyšších koncentracích už neplatí Lambert-Beerův zákon, protože trend už není lineární. U vzorků s přídatkem vysokomolekulárního HA dochází ke zvýšení absorbance, což může být způsobeno vysokou turbiditou. V roztocích se pravděpodobně vytváří komplex o určité energii a vypadá to tak, že hyaluronan zháší molekuly BSA, zejména u vzorků s nízkomolekulárním hyaluronanem. U všech měření (**Obr. 27**, **Obr. 28** a **Obr. 29**) je vidět, že nejvyšších hodnot absorbance bylo dosažováno u vzorků albuminu s vysokomolekulárním hyaluronanem. Tento výsledek je pravděpodobně způsoben tím, že vzorky s vysokomolekulárním hyaluronanem obsahovaly větší částice, které se v roztocích úplně nerozpustily a po odstředění ani nesedimentovaly a vytvářely zákal. Dále lze z naměřených hodnot usuzovat, že k interakcím mezi HA a BSA dochází s největší pravděpodobností u vzorků s koncentracemi od 0,5 g/l do 5 g/l. V tomto koncentračním rozmezí zřejmě dochází k vázání karboxylových skupin v molekule HA s albuminem. Dá se předpokládat, že interakce se budou ve zvýšené míře vyskytovat až po překročení kritické koncentrace, při které je dosaženo vhodného prostorového uspořádání HA a BSA v roztoku. Všechny naměřené data byly zaznamenány do tabulek (**Tab. 5** a **Tab. 7**) a vyneseny do grafů (**Obr. 27**, **Obr. 28**, **Obr. 29**, **Obr. 37**, **Obr. 38** a **Obr. 39**).

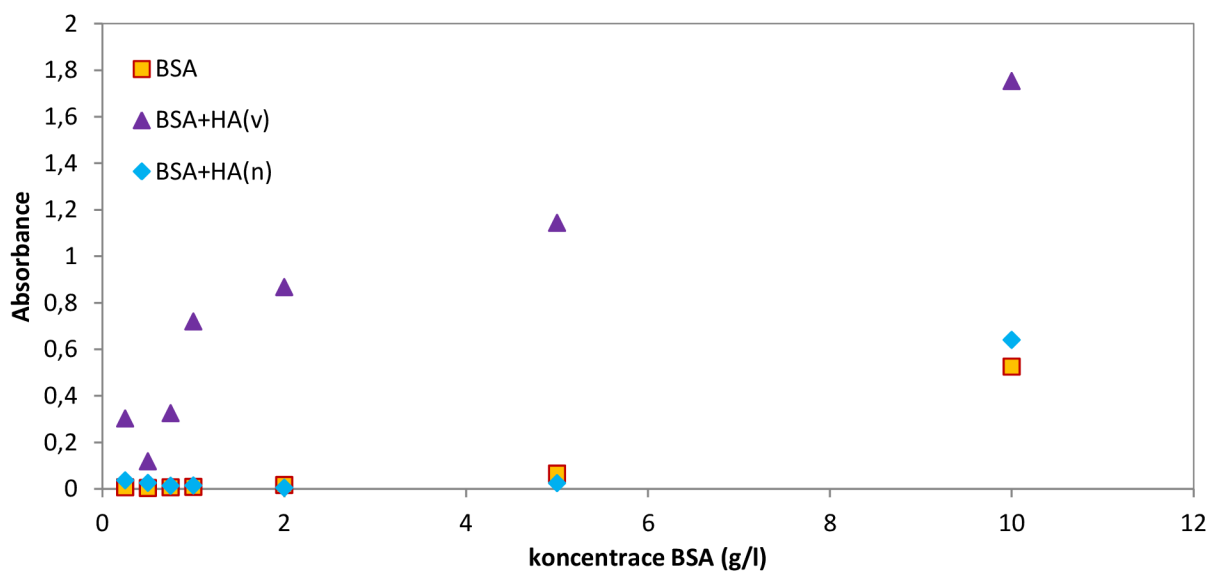
V grafu na **Obr. 29** jsou uvedeny výsledky solubilizačních měření. Z výsledků lze usoudit, že v roztocích se vytváří částice (komplexy), které mají hydrofobní domény, do nichž se může Sudan III solubilizovat, protože se zvyšující se koncentrací se zvyšuje i solubilizace Sudanu III. U roztoků, které obsahují vysokomolekulární hyaluronan se dá usoudit, že se nasorbuje více Sudanu III, a proto se dosahuje vyšších hodnot absorbance, ale nedá se to tak jednoznačně určit, protože absorbanci zkresluje vysoká turbidita, která byla u těchto vzorků naměřena.

Tab. 5: Hodnoty absorbance při určitých vlnových délkách pro koncentrační řadu albuminu.

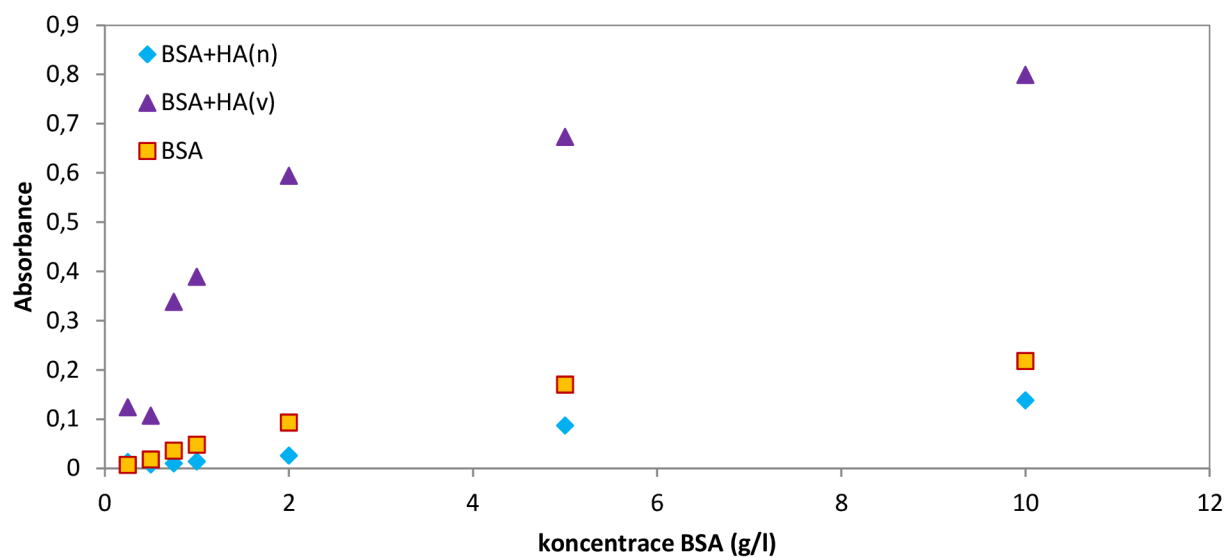
BSA v pufru			
koncentrace BSA [g/l]	A_{max.BSA}	A_{400 nm}	A_{max.SUD III}
10	4,006	0,526	0,218
5	3,470	0,066	0,170
2	1,533	0,017	0,093
1	0,746	0,009	0,048
0,75	0,547	0,007	0,036
0,5	0,362	0,004	0,018
0,25	0,194	0,007	0,007
BSA+HA (1500-1750 kDa) => koncentrace HA je 1 g/l			
koncentrace BSA [g/l]	A_{max.BSA}	A_{400 nm}	A_{max.SUD III}
10	4,050	1,754	0,799
5	3,782	1,144	0,673
2	2,844	0,868	0,594
1	2,166	0,720	0,389
0,75	1,198	0,326	0,338
0,5	0,506	0,119	0,107
0,25	0,811	0,303	0,124
BSA+HA (90-130 kDa) => koncentrace HA je 1 g/l			
koncentrace BSA [g/l]	A_{max.BSA}	A_{400 nm}	A_{max.SUD III}
10	3,874	0,641	0,138
5	1,393	0,025	0,087
2	0,375	0,005	0,026
1	0,247	0,015	0,014
0,75	0,180	0,014	0,010
0,5	0,144	0,026	0,008
0,25	0,164	0,037	0,013



Obr. 27: Závislost maximální absorpce BSA v rozmezí vlnových délek od 275 nm do 285 nm na koncentraci BSA pro 3 koncentrační řady (BSA v pufru, BSA + vysokomolekulárním HA, BSA + nízkomolekulární HA).



Obr. 28: Závislost absorbance při 400 nm na koncentraci BSA pro 3 koncentrační řady (BSA v pufru, BSA + vysokomolekulárním HA, BSA + nízkomolekulární HA).



Obr. 29: Závislost maximální absorpce Sudanu III v rozmezí vlnových délek od 510 nm do 530 nm na koncentraci BSA pro 3 koncentrační řady (BSA v pufru, BSA + vysokomolekulární HA, BSA + nízkomolekulární HA).

5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo podrobněji prozkoumat interakce a dynamiku systémů hyaluronanu (vysokomolekulárního i nízkomolekulárního) a albuminu. Ke zkoumání interakcí a dynamiky těchto systémů bylo použito měření povrchové reologie, tenziometrické měření pomocí tenziometru KSV Sigma 701 a tenziometrické měření pomocí tenziometru BPA-800P. Ze získaných výsledků ze všech metod bylo potvrzeno, že mezi hyaluronanem a albuminem dochází k interakcím.

Nejstěžejnější metodou ke zkoumání interakcí mezi hyaluronanem a albuminem bylo měření povrchové reologie. Pro zjištění interakcí byly porovnávány hodnoty, které byly získány z měření samotného albuminu s hodnotami získanými po přidavku hyaluronanu. Naměřená data se velmi lišila, což bylo zřejmě způsobeno rozdílným způsobem přípravy, prostředím a pravděpodobně rychlým stárnutím povrchu vzorků. Z reologického měření však vyplývá, že k interakcím dochází. Předpoklad byl, že $|G^*|$ a δ by se měly snížit po přidavku hyaluronanu do roztoků, ale to se nám zcela nepotvrdilo, protože hodnoty ztrátového úhlu a komplexních modulů nevykazovaly pravidelně klesající trend a výsledky naměřených dat byly dost rozptýlené. Ale samozřejmě se nám potvrdilo, že HA ovlivňuje povrch těch roztoků a dochází k interakcím. Největší interakce u koncentrační řady albuminu byly pozorovány kolem koncentrace BSA 1 g/l a u koncentrační řady hyaluronanu v rozmezí koncentrací HA 0,2 – 1 g/l.

Interakce mezi HA a BSA se u tenziometrických měření projevovaly změnami povrchového napětí. Opět bylo porovnáváno povrchové napětí roztoků albuminu s hodnotami povrchových napětí po přidavku hyaluronanu. Z naměřených dat bylo zjištěno, že vysokomolekulární hyaluronan má zřejmě více volných vazebných míst pro interakce s albuminem než nízkomolekulární hyaluronan, protože roztoky s vysokomolekulárním hyaluronanem vykazovaly vyšší povrchové napětí, a z toho lze usoudit, že hyaluronan pravděpodobně vychytal velké množství BSA z povrchu do objemu roztoku, a tím pádem by povrchové napětí mělo narůstat.

Pomocí UV-VIS spektrofotometrie byla zkoumána samotná cílená distribuce léčiv nepřímou metodou, a to konkrétně solubilizací modelové látky (analyticky dobře detekovatelné) do komplexu HA/BSA. Cílem této práce bylo prozkoumat, zda by hyaluronan mohl být vhodným nosičem léčiv, a zda by albumin mohl být vhodnou molekulou, do které by se to léčivo zabudovávalo. Z výsledků získaných pomocí turbidimetrického a UV-VIS měření se dá usuzovat, že zejména u vzorků s vysokomolekulárním hyaluronanem se turbidita zvyšovala v důsledku velkých částic, které se ani nerozpustily a ani v roztoku nesedimentovaly, ale vykazují rozptyl. Z toho lze usuzovat, že jsou méně polární než prostředí, což vede k předpokladu solubilizace léčiva (potvrdilo se to i měřením), i když výsledky jsou zkreslovány samotnou turbiditou. U vzorků s nízkomolekulárním hyaluronanem byla zvýšená turbidita zaznamenána až při nejvyšších koncentracích albuminu, protože v roztocích nevznikaly žádné velké částice a ani v nich nemělo co sedimentovat. Při vyšších koncentracích BSA by se teoreticky do BSA léčivo zabudovat dalo, protože v grafu na **Obr. 29** je vidět, že dochází ke zvýšení absorbance při vyšších koncentracích BSA, a to znamená, že se Sudan III do BSA solubilizuje. Z těchto výsledků lze říct, že nejvhodnějším nosičem pro cílenou distribuci léčiv by měl být vysokomolekulární hyaluronan, avšak musí se brát v potaz, že absorbance toho vysokomolekulárního

hyaluronanu a tudíž i solubilizace Sudanu III může být do jisté míry ovlivněna jeho vysokou turbiditou.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] VELEBNÝ, RNDr. Vladimír Velebný, CSc. CONTIPRO. Hyaluronan: Polymer pro tkáňové inženýrství. Brno, 2012.
- [2] KOGAN, G., ŠOLTÉS, L., STERN, R.: Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range as biomedical and industrial applications. *Springer Science + Business Media*, 2006, v. 351, s. 2-10.
- [3] ZEMAN, J. *Studium interakcí polyelektrolytů s kladně nabitými dusíkatými amfifilními látkami*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013, s. 16, 17. Vedoucí diplomové práce Ing. Martin Chytil, PhD.
- [4] PECHAR, M. et al.: Polymerní terapeutika u nás a ve světě. *Chemické listy*, 2009, roč. 103, č. 1, s. 3-10.
- [5] JAIN, K.: Drug Delivery in Cancer, Technologies and Commercial Opportunities. *Decision Resources, Inc.*, Waltham 2000.
- [6] LAURENT, T. C., FRASSER, J. R. E., LAURENT, U. B. G. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*. 1997, 242, s. 27-33.
- [7] LIFECORE [online]. 2013 [cit 2013-12-28]. *Lifecore and Hyaluronan – Utilizing Nature to Improve Lives*. Dostupné z: <http://www.lifecore.com/MoreAboutHyaluronan/tabid/62/Default.aspx>.
- [8] CULTY, Martine, Huong A. NGUYEN a Charles B. UNDERHILL. The Hyaluronan Receptor (CD44) Participates in the Uptake and Degradation of Hyaluronan. *Department of Anatomy and Cell Biology, Georgetown Medical Center, Washington DC* 20007 [online]. 1992 [cit. 2013-12-28] Dostupné z: <http://jcb.rupress.org/content/116/4/1055.full.pdf>. VELEBNÝ, RNDr. Vladimír Velebný, CSc. CONTIPRO. *Hyaluronan: Polymer pro tkáňové inženýrství*. Brno, 2012.
- [9] NAVEENRAJ, S., ANANDAN, S. Binding of serum albumins with bioactive substances – Nanoparticles to drugs. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 14 (2013) [online]. s. 54-71 [cit. 2014-5-5]. Dostupné z: <http://www.elsevier.com/locate/jphotochemrev>
- [10] KOJIO, K., TAKAHARA, A. Bovine serum albumin adsorption onto immobilized organotrichlorosilane surface: influence of the phase separation on protein adsorption patterns. *J Biomater Sci Polym Ed*. 1998, roč. 2, č. 9, s. 50-131.
- [11] MOSKAITIS, John E., Daniel R. SCHOENBERG a Walter WAHLI. Amphibian albumins as members of the albumin, alpha-fetoprotein, vitamin D-binding protein multigene family. *Journal of Molecular Evolution*. 1989, č. 29, s. 344-354. DOI: BF02103621.
- [12] LENORMAND, H., DESCHREVEL, B., VINCENT, J. C. Chain length effects on electrostatic interactions between hyaluronan fragments and albumin. *Carbohydrate Polymers*. 82 (2010) s. 887-894. Dostupné z: <http://www.elsevier.com/locate/carbpol>
- [13] LENORMAND, H., DESCHREVEL, B., TRANCHEPAIN, F., VINCENT, J. C. Electrostatic interactions between hyaluronan and proteins at pH 4: How do They modulate hyaluronidase activity. *Biopolymers*, 89, 1088-1103.
- [14] Bartovská, L., Šišková, M.: *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2005, s 57-60, ISBN 80-7080-579-X.

- [15] KROUSKÁ, J.: *Colloid properties of hyaluronane sols*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 21-25 s. Vedoucí diplomové práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
- [16] PEKAŘ, Miloslav, Martina KLUČÁKOVÁ, Michal VESELÝ a Michal ČEPAN. *Fyzikální chemie a fotochemie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2003. ISBN: 80-214-2470-2.
- [17] SCHRAMM, Gebhard. *A Practical Approach to Rheology and Rheometry*. Německo : Gebrueder GmbH, 1994. 290 s.
- [18] SOPOUŠEK, Jiří. *Základy reologie a reometrie kapalin* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2007 [cit. 2014-03-19]. Dostupné z: http://is.muni.cz/el/1431/jaro2007/V5760/um/2457585/2457594/Reologie_a_reometrie_kapalin.pdf
- [19] MEZGER, Thomas. *The Rheology Handbook*. Hanover [Germany]: Vincentz Network, 2011. ISBN 978-3-86630-864-0.
- [20] DERKATCH, Svetlana, Jürgen Krägel. Interfacial shear rheology. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 15 (2010), s. 246-255 [cit. 2014-05-05]. Dostupné z: <http://www.elsevier.com/locate/cocis>
- [21] MILLER, Reinhard, L LIGGIERI a V KROTOV. *Interfacial rheology*. Boston: Brill, 2009, xii, 684 p. *Progress in colloid and interface science*, v. 1. ISBN 90-041-7586-5.
- [22] ZEMAN, J. *Studium interakcí polyelektrolytů s kladně nabitými dusíkatými amfifilními látkami*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013, s. 26, 27. Vedoucí diplomové práce Ing. Martin Chytil, PhD.
- [23] KSV BPA-800P Manual, re. 1.0. 2004.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

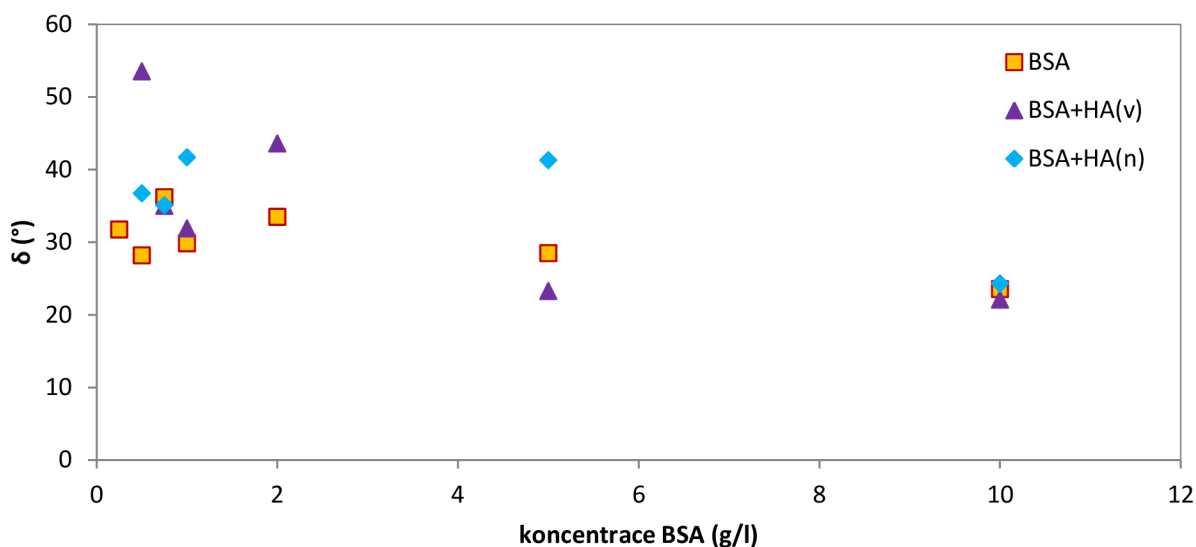
7.1 Seznam zkratk a symbolů

Zkratka	Význam zkratky
HA	kyselina hyaluronová, hyaluronan
BSA	hovězí sérový albumin
Da	Dalton [atomová hmotnostní jednotka]
CD44	buněčný receptor (hyaluronanový)
G^*	komplexní modul
δ	ztrátový úhel
η_0	limitní viskozita
ρ	hustota
g	gravitační zrychlení
r	poloměr kapiláry/ bubliny
θ	smáčecí úhel
h	výška kapiláry, hloubka ponoření kapiláry
d	šířka destičky
F	síla
t	tloušťka destičky
γ	povrchové napětí
r_p	poloměr kroužku
φ	korekce na kapalinu
p	tlak
τ	tečné napětí
A	plocha
D	smyková rychlost
η	dynamická viskozita
G'	elastický (paměťový) modul
G''	viskózní (ztrátový) modul
δ	ztrátový úhel
ω	úhlová frekvence
f	korekční faktor
P_S	nejvyšší naměřený tlak v bublině
P_H	hydrostatický tlak
P_D	tlak odporu vzduchu
R_1, R_2	poloměry křivosti
p^α	konvexní tlak
p^β	konkávni tlak

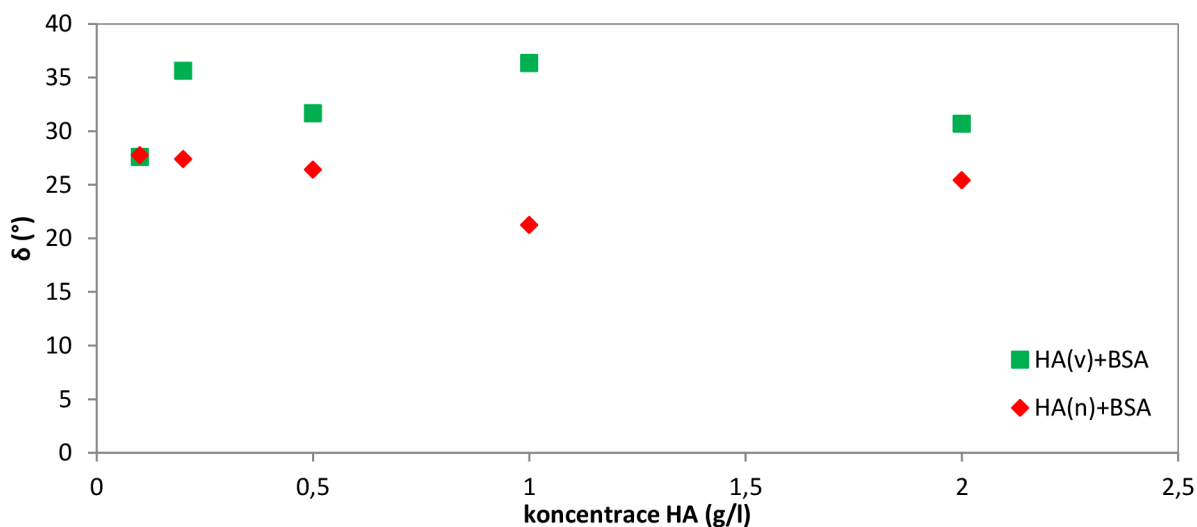
8 PŘÍLOHY

Tab. 6: Hodnoty komplexního modulu $|G^*|$ a ztrátového úhlu delta v závislosti na koncentraci albuminu nebo hyaluronanu při oscilační frekvenci 0,1 rad/s.

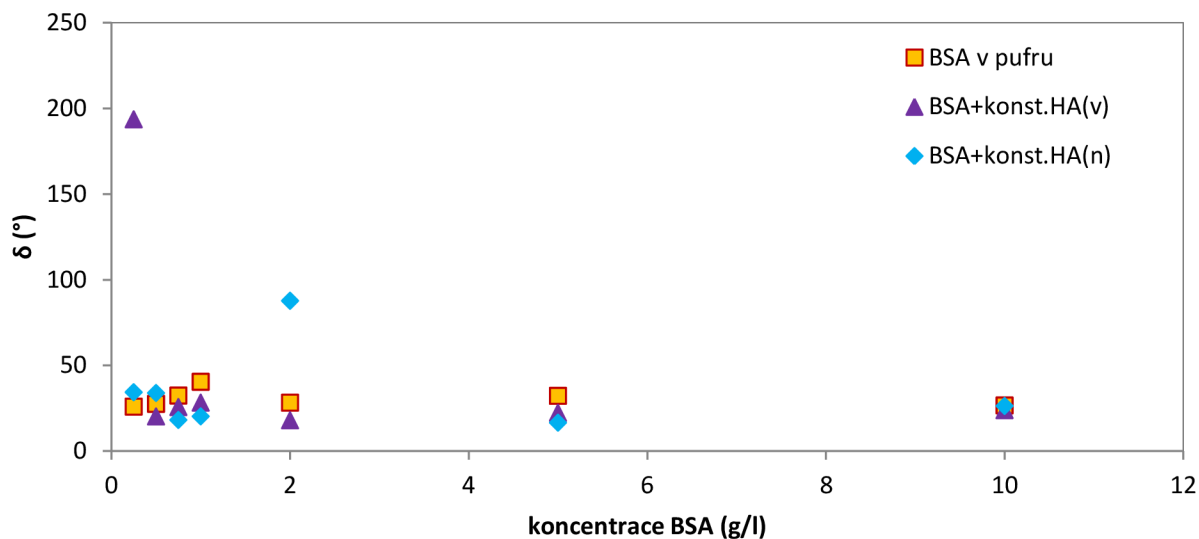
ω 0,1 rad/s				
	BSA+HA(1500-1750 kDa) =>koncentrace HA je 1 g/l		BSA+HA(90-130 kDa) =>koncentrace HA je 1 g/l	
Koncentrace BSA [g/l]	$ G^* $ [Pa]	δ [°]	$ G^* $ [Pa]	δ [°]
10	0,014305	27,990	0,013380	30,990
5	0,012260	30,845	0,006400	42,445
2	0,006684	35,350	0,003539	48,630
1	0,007919	33,570	0,003075	36,385
0,75	0,006317	33,040	0,001085	34,840
0,5	0,003090	34,365	0,002379	38,345
0,25	0,000603	3,897	0,001510	25,490
BSA v pufru				
Koncentrace BSA [g/l]	$ G^* $ [Pa]	δ [°]		
10	0,011975	32,180		
5	0,005182	33,820		
2	0,005783	37,070		
1	0,005213	31,455		
0,75	0,004035	35,825		
0,5	0,005695	33,710		
0,25	0,003258	34,355		
	HA(1500-1750 kDa) + BSA =>koncentrace BSA je 5 g/l		HA(90-130 kDa) + BSA =>koncentrace BSA je 5 g/l	
Koncentrace HA [g/l]	$ G^* $ [Pa]	δ [°]	$ G^* $ [Pa]	δ [°]
2	0,006927	45,500	0,010612	30,830
1	0,002128	27,921	0,012120	27,615
0,5	0,007615	43,060	0,010025	32,730
0,2	0,004834	23,895	0,010451	33,450
0,1	0,008842	32,955	0,010100	32,845



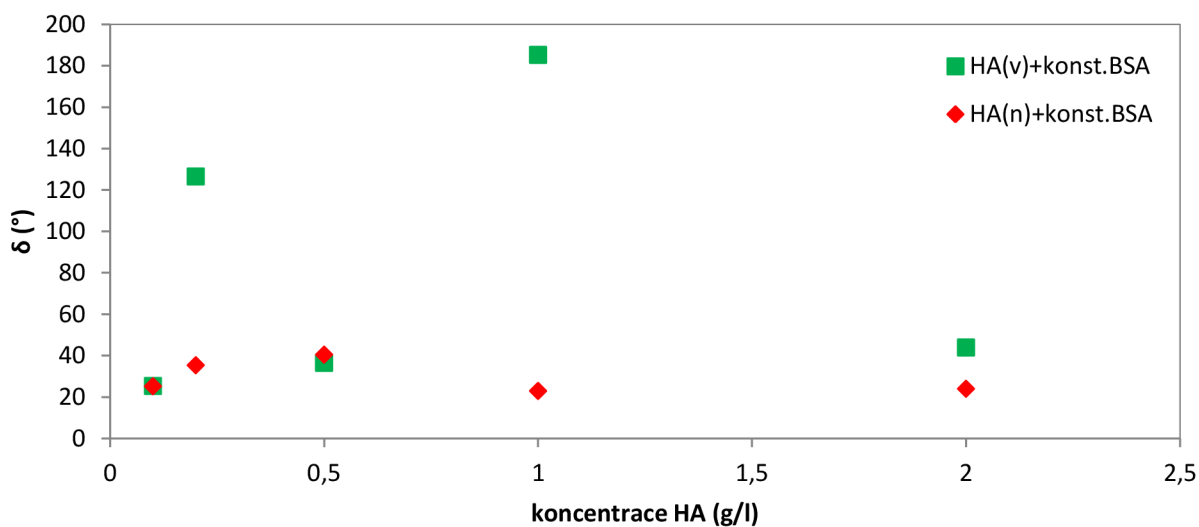
Obr. 30: Graf závislost rovnovážných hodnot ztrátového úhlu na koncentraci BSA při oscilační frekvenci 1 rad/s pro 3 koncentrační řady (BSA v pufru, BSA s přidavkem vysokomolekulárního HA a BSA s přidavkem nízkomolekulárního HA). Koncentrace HA byla konstantní 1 g/l.



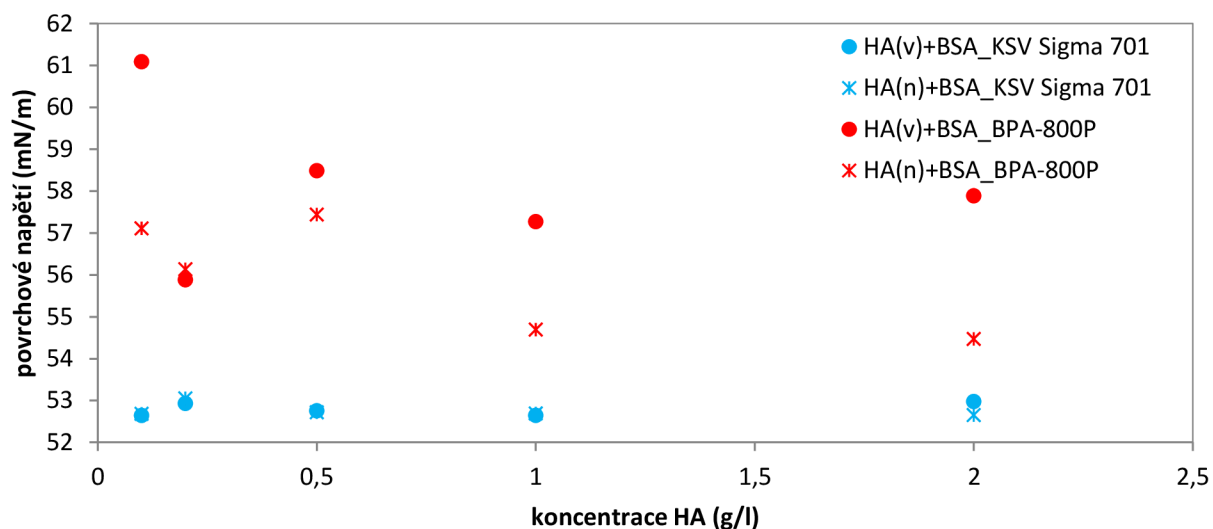
Obr. 31: Graf závislost rovnovážných hodnot ztrátového úhlu na koncentraci HA při oscilační frekvenci 1 rad/s pro 2 koncentrační řady (vysokomolekulární HA s BSA a nízkomolekulární HA s BSA). Koncentrace BSA byla konstantní 5 g/l.



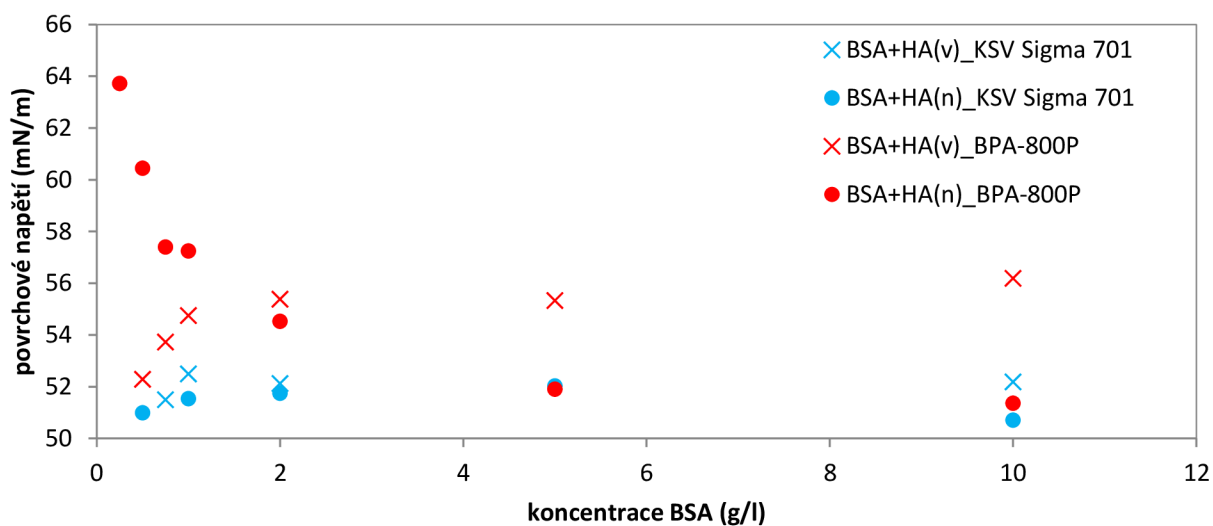
Obr. 32: Graf závislosti rovnovážných hodnot ztrátového úhlu na koncentraci BSA při oscilační frekvenci 0,1 rad/s pro 3 koncentrační řady (BSA v pufru, BSA s přidavkem vysokomolekulárního HA a BSA s přidavkem nízkomolekulárního HA). Koncentrace HA byla konstantní 1 g/l.



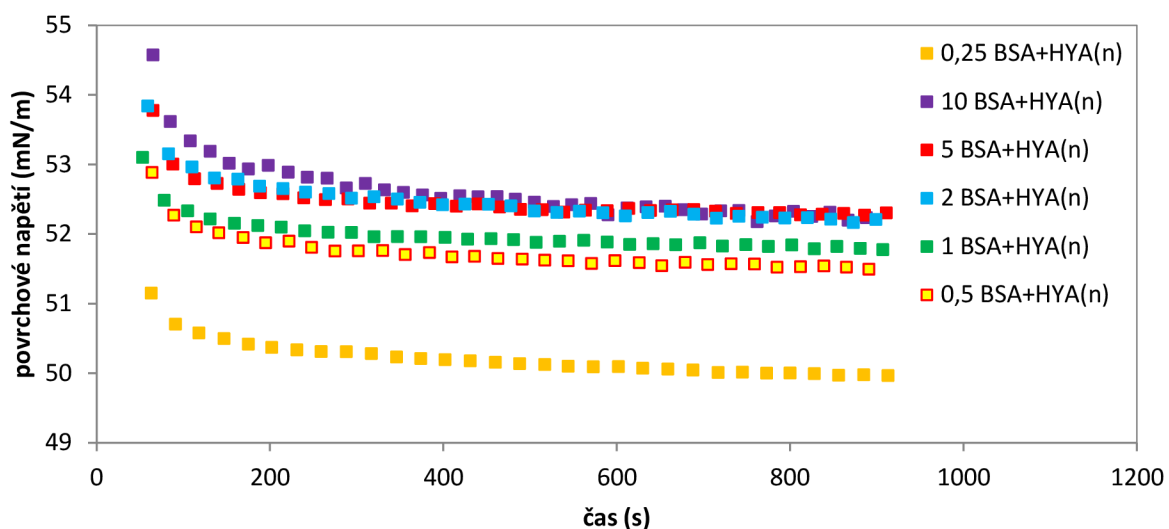
Obr. 33: Graf závislosti rovnovážných hodnot ztrátového úhlu na koncentraci HA při oscilační frekvenci 0,1 rad/s pro 2 koncentrační řady (vysokomolekulární HA s BSA a nízkomolekulární HA s BSA). Koncentrace BSA byla konstantní 5 g/l.



Obr. 34: Graf závislosti povrchového napětí na koncentraci HA pro 2 koncentrační řady hyaluronanu (vysokomolekulární HA s BSA a nízkomolekulární HA s BSA). Koncentrace BSA byla konstantní 5 g/l.



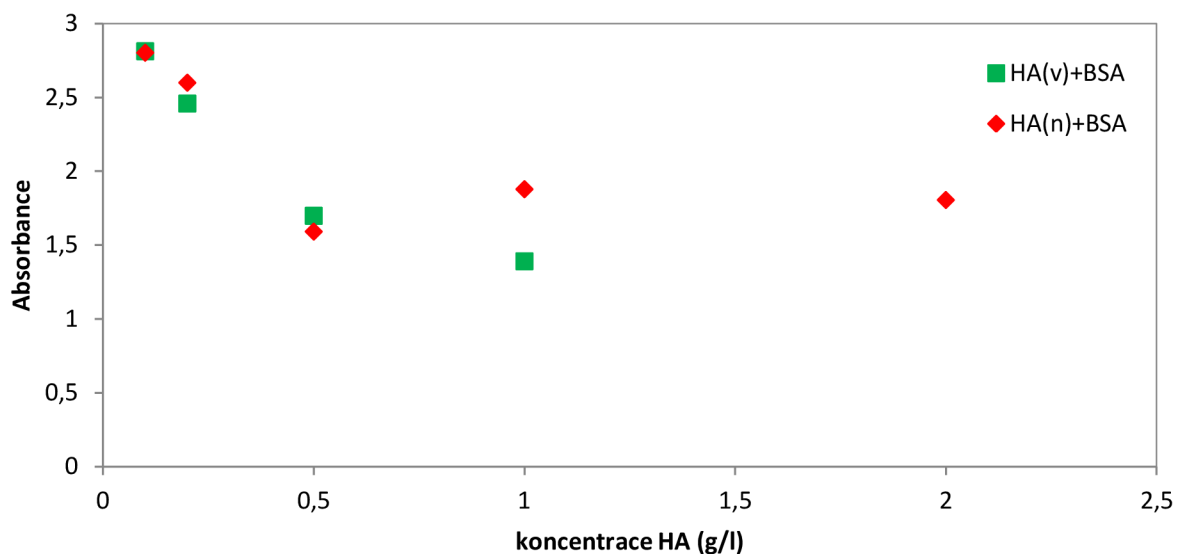
Obr. 35: Graf závislosti povrchového napětí na koncentraci BSA pro 2 koncentrační řady albuminu (BSA s přidavkem vysokomolekulárního HA a BSA s přidavkem nízkomolekulárního HA). Koncentrace HA byla konstantní 1 g/l.



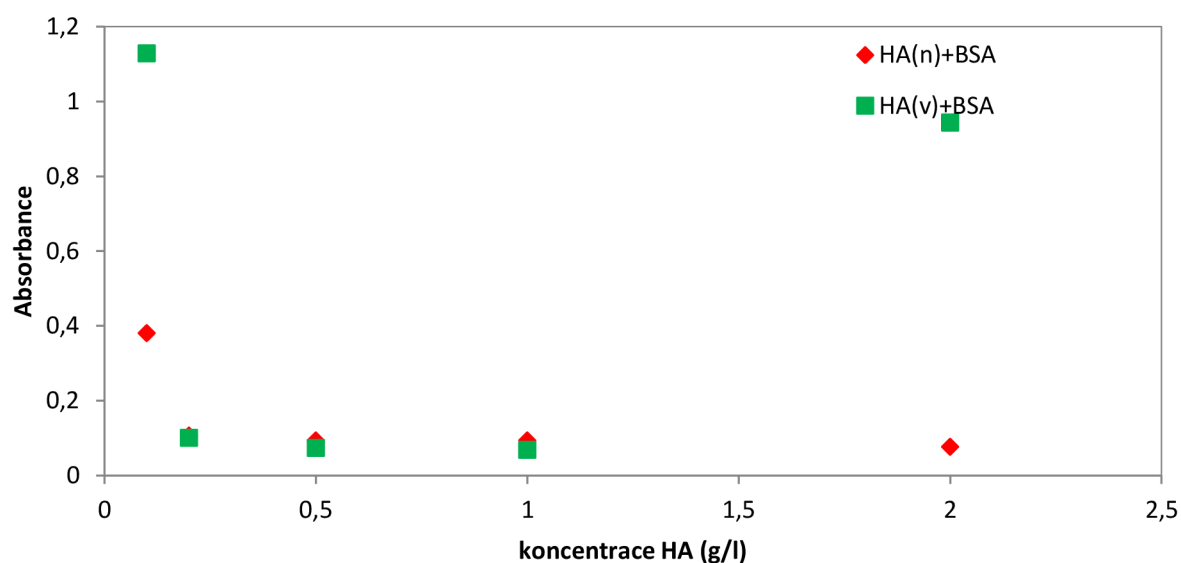
Obr. 36: Graf závislosti povrchového napětí na čase pro koncentrační řadu BSA s přidavkem nízkomolekulárního HA. Koncentrace HA byla konstantní 1 g/l.

Tab. 7: Hodnoty absorbance při určitých vlnových délkách pro koncentrační řadu hyaluronanu.

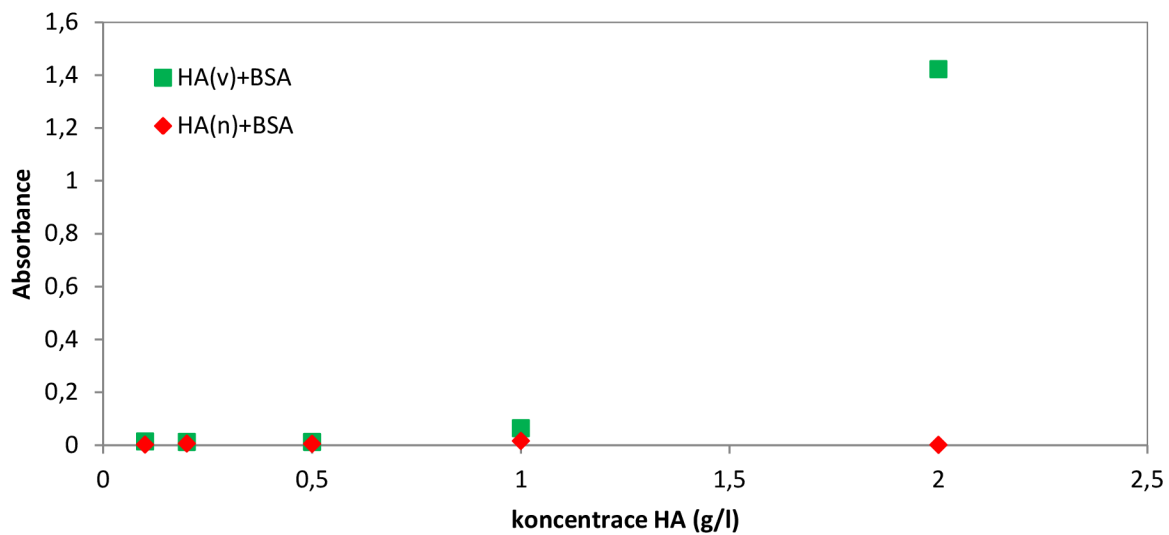
HA (1500-1750 kDa) +BSA => koncentrace BSA je 5 g/l			
koncentrace HA [g/l]	$A_{\max.BSA}$	$A_{400 \text{ nm}}$	$A_{\max.SUD \text{ III}}$
2	10	1,422	0,944
1	1,390	0,064	0,069
0,5	1,698	0,012	0,074
0,2	2,458	0,012	0,101
0,1	2,812	0,014	1,129
HA (90-130 kDa) +BSA => koncentrace BSA je 5 g/l			
koncentrace HA [g/l]	$A_{\max.BSA}$	$A_{400 \text{ nm}}$	$A_{\max.SUD \text{ III}}$
2	1,805	0,001	0,077
1	1,878	0,016	0,094
0,5	1,591	0,005	0,094
0,2	2,599	0,006	0,107
0,1	2,802	0,002	0,381



Obr. 37: Závislost maximální absorpce BSA v rozmezí vlnových délek od 275 nm do 285 nm na koncentraci HA pro 2 koncentrační řady HA (vysokomolekulární HA s BSA a nízkomolekulární HA s BSA). Koncentrace BSA byla konstantní 5 g/l.



Obr. 38: Závislost maximální absorpce Sudanu III v rozmezí vlnových délek od 510 nm do 530 nm na koncentraci HA pro 2 koncentrační řady HA (vysokomolekulární HA s BSA a nízkomolekulární HA s BSA). Koncentrace BSA byla konstantní 5 g/l.



Obr. 39: Závislost absorbance při 400 nm na koncentraci HA pro 2 koncentrační řady HA (vysokomolekulární HA s BSA a nízkomolekulární HA s BSA). Koncentrace BSA byla konstantní 5 g/l.