



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

STUDIUM INTERAKCÍ HYALURONAN-AMINOKYSELINY

STUDY OF INTERACTIONS OF HYALURONAN-AMINO ACIDS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Adam Jugl

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.

BRNO 2016



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0950/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Bc. Adam Jugl	
Studijní program:	Chemie pro medicínské aplikace (N2846)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808T031)	
Vedoucí práce	Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Studium interakcí hyaluronan-aminokyseliny

Zadání diplomové práce:

1. Nastudovat z literatury interakce hyaluronan-aminokyselina
2. Měření interakcí hyaluronan-aminokyseliny ultrazvukovou spektroskopií

Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

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

Bc. Adam Jugl
Student(ka)

Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

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

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá studiem interakcí mezi polysacharidem hyaluronanem o různých molekulových hmotnostech s aminokyselinami argininem, lysinem, argininem hydrochloridem a 6-aminokapronovou kyselinou. Předpokládají se interakce mezi karboxylovými skupinami hyaluronanu a aminoskupinami aminokyselin. Interakce byly zkoumány pomocí technik ultrazvukové spektroskopie, DLS, měřením pH a vodivosti. Výsledky byly porovnávány s roztoky polystyren sulfonátu sodného.

Pomocí ultrazvukové spektroskopie byla pozorována změna koncentračního inkrementu při titracích aminokyselin do vody a roztoků polymerů především u vysokých molekulových hmotností hyaluronanu a u NaPSS v kombinaci s 6AKK v koncentračním rozsahu přidané aminokyseliny 0–30 mM. Velikost této změny by mohla znamenat míru interakcí mezi polymery a aminokyselinami. Tato teorie ale nebyla potvrzena ostatními metodami. V případě měření pH a vodivosti roztoků byly interakce potvrzeny pouze pro nízkomolekulární hyaluronan a polystyren sulfonát interagující s argininem. U stanovování velikosti částic a měření zeta potenciálu pomocí DLS nebylo ze získaných výsledků možné stanovit jednoznačné závěry.

Celkově se problematika interakce aminokyselin spolu s polyanionty ukázala nad očekávání komplexní a bude vhodné pozorování provedená v této práci dále rozšířit.

Abstract

The master's thesis deals with the study of the interaction between the polysaccharide hyaluronan of different molecular weights with the amino acids arginine, lysine, arginine hydrochloride and 6-aminocaproic acid. They are expected interaction between carboxyl groups of hyaluronan and amino groups of amino acids. These interactions were investigated by using ultrasonic spectroscopy, DLS, measuring pH and conductivity. Obtained results were compared with sodium polystyrene sulfonate.

With ultrasonic spectroscopy was observed a change of concentration inkrement for titration of amino acid to water or polymers solutions especially for high molecular weight hyaluronan and for NaPSS in combination with 6AKK in concentration range of added amino acid 0–30 mM. The size of this change could mean a degree of interaction between polymers and amino acids. This theory has not been confirmed by other methods. By pH and conductivity measurements interations between arginine and low molecular weight hyaluronan and NaPSS were only confirmed. There was no possibility to make unequivocal conclusions from determination of particle size and zeta potential by DLS.

Overall, the issue of the interaction of amino acids with polyanions was proved above expectations complex and will be appropriate to further expand the observations made in this thesis.

Klíčová slova

hyaluronan, lysin, arginin, arginin hydrochlorid, 6-aminokapronová kyselina, ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením

Keywords

hyaluronan, lysine, arginine, arginine hydrochloride, 6-aminocaproic acid, high resolution ultrasonic spectroscopy

Citace

JUGL, A. *Studium interakcí hyaluronan-aminokyseliny*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 86 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová 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.

.....
Bc. Adam Jugl

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucí mé diplomové práce Ing. Andree Kargerové, Ph.D. za množství vynaloženého času, rad a připomínek, bez kterých by tato diplomová práce nemohla vzniknout. Můj dík patří také prof. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc. díky jehož radám bylo možné získat zcela nový úhel pohledu na studovanou problematiku.

OBSAH

ÚVOD	7
1 TEORETICKÁ ČÁST	8
1.1 Hyaluronan a jeho vlastnosti	8
1.1.1 Historie	8
1.1.2 Struktura hyaluronanu	9
1.1.3 Biologické funkce hyaluronanu	12
1.1.4 Hyaluronan v medicíně	14
1.1.5 Elektrostatické komplexace hyaluronanu.....	16
1.2 Polystyren sulfonát	18
1.2.1 Elektrostatické interakce NaPSS	19
1.3 Aminokyseliny.....	19
1.3.1 Lysin.....	20
1.3.2 Arginin	20
1.3.3 6-aminokapronová kyselina	21
1.4 pH metrie	22
1.4.1 Metody měření pH	22
1.4.2 Potenciometrické titrace	22
1.5 Konduktometrie	23
1.5.1 Metody měření vodivosti	23
1.5.2 Konduktometrické titrace	23
1.6 Ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením	24
1.6.1 Princip měření	25
1.6.2 Využití ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením v praxi	27
1.7 Dynamický rozptyl světla.....	28
1.8 Elektrické vlastnosti koloidních soustav	29
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
2.1 Použité chemikálie.....	32
2.2 Příprava roztoků	33
2.2.1 Příprava zásobního roztoku PBS.....	33
2.2.2 Příprava roztoků hyaluronanu a polystyren sulfonátu sodného	33
2.2.3 Příprava roztoků aminokyselin.....	34
2.3 Automatické titrace, měření pH a vodivosti	34

2.4	Měření dynamického rozptylu světla a zeta potenciálu.....	34
2.5	Měření ultrazvukové rychlosti a zeslabení	35
2.5.1	Titrační měření	35
2.6	Vyhodnocení dat a diskuze.....	36
2.6.1	Titrace prováděné na ultrazvukovém spektrometru	36
2.6.2	Titrace prováděné na DLS.....	50
2.6.3	Měření pH a vodivosti.....	57
3	ZÁVĚR.....	65
4	CITACE.....	67
5	SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	74
6	PŘÍLOHY	76

ÚVOD

Kyselina hyaluronová, též zvaná hyaluronan nebo zkráceně HA, je známá již desítky let. Poprvé byl tento záporně nabitý polysacharid izolovaný skupinou kolem Karla Meyera v roce 1934. Bylo zjištěno, že látka je vlastní všem obratlovcům a nachází se tedy i v lidském těle, kde plní řadu důležitých funkcí. Mezi nejdůležitější patří zajišťování viskoelasticity a biologická aktivita hyaluronanu. Důsledkem intenzivního výzkumu, bylo především v posledních letech rozšířeno využití hyaluronanu v oblasti medicíny (přípravky na hojení ran), kosmetiky (krémy s přídavkem hyaluronanu) i farmacie (oční kapky).

Současný trend výzkumu hyaluronanu je orientován směrem k cílené distribuci léčiv, kde by hyaluronan mohl sehrát důležitou roli nosiče léčiva směrem k nádorovým buňkám. Vzhledem obtížnostem při vazbě léčiva přímo na hyaluronan je nutné hyaluronan modifikovat. Jelikož se jedná o polyanion, modifikace by mohly být nekovalentního (elektrostatického charakteru). V první fázi výzkumu se k modifikaci využívaly kationické tenzidy, ovšem vzhledem k lepší biokompatibilitě jsou zkoumány i možné interakce s kladně nabitými aminokyselinami.

Protože biologická aktivita hyaluronanu v lidském těle probíhá pomocí interakce hyaluronanu s buněčnými receptory, které mají ve své struktuře krátké aminokyselinové sekvence obsahující více bazických aminokyselin, zkoumá tato práce možné interakce aminokyselin s hyaluronanem nejen za účelem modifikace hyaluronanu, ale také kvůli možnosti bližšího pochopení interakcí mezi hyaluronanem a bazickými receptorovými doménami.

Diplomová práce navazuje na předchozí práce studentů z Fakulty chemické, kteří se zabývali interakcí hyaluronanu a bazických aminokyselin. V této práci však na rozdíl od ostatních byla pro studium těchto interakcí využita velmi citlivá ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením, která umožnila měření v titračním režimu. Jako doplňkové metody byly použity DLS a měření pH a vodivosti.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Hyaluronan a jeho vlastnosti

Hyaluronan se vyskytuje v tkáních všech obratlovců a také na povrchu některých bakterií (*Streptococcus*, *Pasteurella*), u kterých slouží jako protiantigenní kapsule, která jim pomáhá v infikaci hostitele [1]. Jedná se o jednu z hlavních komponent extracelulární matrix, kde interaguje s ostatními složkami, především proteiny. Jeho koncentrace kolísá v závislosti na typu tkáně od $0,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ve sklivci až po $4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ v synoviální tekutině. U bakterií, podobně jako v tkáni kohoutích hřebínků, může koncentrace dosáhnout až $7,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ [2]. Největší množství hyaluronanu se vyskytuje v kůži, kde u dospělého člověka tvoří až 8 g hmotnosti, tato hmotnost tvoří asi polovinu celkového množství hyaluronanu v lidském těle. Existuje pouze jediný druh tohoto polysacharidu [3]. [4], [5], [6], [7], [8]

U dospělého člověka dochází k obnově hyaluronanu každý den. V závislosti na literatuře se liší uváděné množství od 34 mg až po 15 g denně. V různých tkáních má hyaluronan různou délku poločasu rozpadu, která se velmi liší. Například u přední komory oka je to 1–1,5 h, ve sklivci 70 dní, v synoviální tekutině přibližně 12 h a v krevním řečišti se poločas rozpadu hyaluronanu pohybuje pouze řádu minut. Průměrná doba života molekuly v lidském těle je 2–3 týdny. [1], [2], [4], [7]

Komerčně je hyaluronan získáván z kohoutích hřebínků nebo streptokoků (*Streptococcus zooepidemicus*) fermentační metodou. Hyaluronan získávaný z kohoutích hřebínků je stále komerčně dostupný především díky vysoké molekulové hmotnosti, čistotě a nezánetlivým vlastnostem. Avšak hyaluronan dnes získávaný ze streptokoků většinu těchto vlastností splňuje také a je výrazně levnější. Jedním z potenciálních kandidátů je také *Bacillus subtilis*, který je geneticky modifikován a nese gen pro produkci hyaluronanu. Takto modifikovaný kmen je schopný produkovat hyaluronan o molekulové hmotnosti kolem 1 MDa, je snadno kultivovatelný a neprodukuje žádné exo nebo endotoxiny. Navíc neprodukuje žádný enzym, který by mohl vzniklý polysacharid štěpit. [1], [2], [4], [5], [9]

1.1.1 Historie

V roce 1934 byl Karlem Meyerem popsán způsob izolace nového glykosaminoglykanu ze sklivce hovězích očí. Meyer však hyaluronan neobjevil, jak bývá často mylně uváděno, pouze popsal některé z jeho vlastností. Izolovaný polysacharid byl pojmenován hyaluronová kyselina z řeckého *hyalos* – skleněný. Při používání názvů tohoto polysacharidu platí,

že hyaluronan je obecný pojem na rozdíl od hyaluronové kyseliny a hyaluronátu, které označují kyselinu, respektive její sůl. [1], [2], [4], [6], [7], [10]

Meyer a Palmer dokázali, že objevená látka obsahuje uronové kyseliny, cukr s vázanou aminoskupinou, ale žádné sulfoestery. Za fyziologického pH jsou všechny karboxylové skupiny disociovány, a proto by se látka měla jmenovat hyaluronát. Dnes se látka nejčastěji objevuje pod názvem hyaluronan pro zvýraznění její sacharidové podstaty. [1], [2]

V průběhu času byl hyaluronan izolován z mnoha zdrojů, jako jsou kůže, kohoutí hřebínky, pupečnicková šňůra a také ze streptokoků. [1], [5]

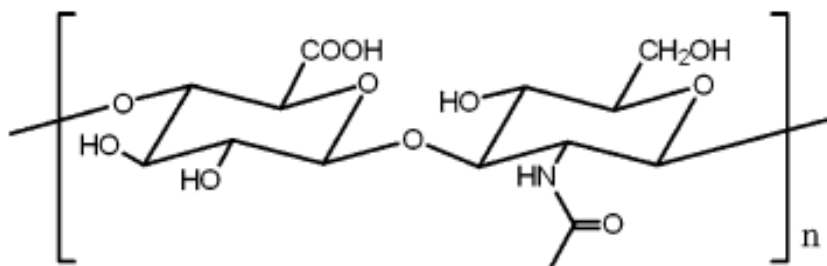
V padesátých a šedesátých letech byla intenzivně studovaná fyzikálně-chemická stránka hyaluronanu. Bylo objeveno mnoho rolí, které plní hyaluronan v lidském těle, jako je regulace vodní rovnováhy, osmotického tlaku nebo stabilizaci struktur díky elektrostatické interakci. V roce 1972 byla objevena první interakce mezi hyaluronanem a proteiny. [1]

Katabolizmus a anabolizmus hyaluronanu byl popsán v devadesátých letech. Bylo zjištěno, že hyaluronan je syntetizován přímo do extracelulárního prostoru z plazmatické membrány na rozdíl od ostatních glykosaminoglykanů, které jsou vytvářeny v Golgiho komplexu. Dále bylo zjištěno, že hyaluronan hraje významnou úlohu v životním cyklu buňky, na jejímž povrchu se ve větší či menší míře vyskytují receptory pro hyaluronan. Mezi nejznámější patří například CD44, RHAMM – receptor pro hyaluronanem zprostředkovanou mobilitu, LYVE-1 – receptor vyskytující se na povrchu endotelových buněk lymfatické tkáně a řada dalších. [1], [5], [6]

1.1.2 Struktura hyaluronanu

1.1.2.1 Chemická struktura

Hyaluronan je lineární polysacharid, patřící do skupiny záporně nabitých glykosaminoglykanů spolu s chondroitinsulfáty, keratansulfáty nebo heparansulfáty. Na rozdíl od nich však ve své struktuře neobsahuje sulfátovou skupinu. Hyaluronan je tvořen opakujícími se disacharidovými jednotkami. Každá jednotka se skládá z D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu vzájemně spojených β -1,3 glykosidickými vazbami. Jednotlivé disacharidové jednotky jsou spojovány β -1,4 glykosidickými vazbami, jak ukazuje **Obrázek 1**. Jednotlivé cukry na konci každé glykosidické vazby mohou teoreticky neomezeně rotovat. Přesto bylo prokázáno, že se vyskytují v několika preferovaných konfiguracích. [1], [2], [3], [5], [6], [7], [8], [10], [11], [12]



Obrázek 1: Struktura kyseliny hyaluronové, složená z opakujících se disacharidových jednotek D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu. [13]

Syntéza hyaluronanu probíhá na plazmatické membráně a k jejímu průběhu není potřeba jiný prekurzor než aktivované nukleotidové cukry (UDP-glukuronovou kyselinu a UDP-N-acetylglukosamin), které po syntéze tvoří jeho primární strukturu. Řetězec na membráně narůstá od neredukujícího konce a je pomocí póru, který tvoří samotná syntáza hyaluronanu zapuštěná v cytoplazmatické membráně, extrudován přímo do extracelulární matrix, na rozdíl od ostatních glykosaminoglykanů, které jsou formovány v Golgiho aparátu a teprve následně vyloučeny z buňky. [1], [2], [4], [6], [7], [12]

V závislosti na druhu tkáně se u savců vyskytují tři druhy syntáz hyaluronanu. Tyto syntázy jsou nezávisle regulovány a jejich rychlost obnovy je 82 min, což signalizuje vysokou míru kontroly, a zároveň produkují hyaluronan v rozdílných množstvích a molekulových hmotnostech. [1], [4], [11]

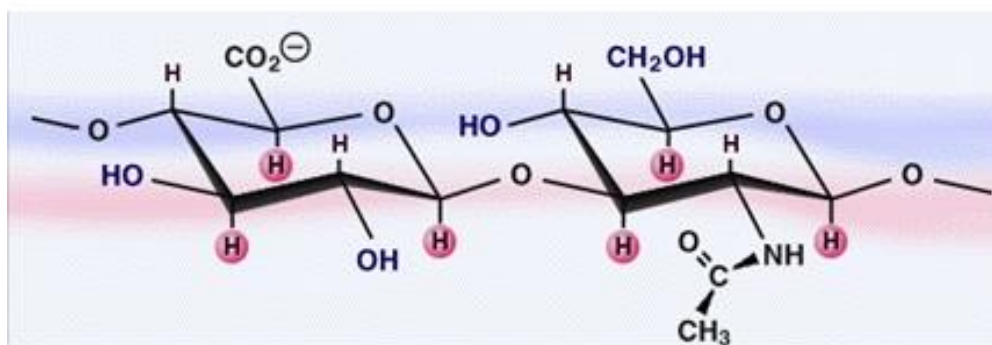
Každá disacharidová jednotka hyaluronanu odpovídá přibližně 400 Da. Délka řetězce může dosáhnout i více než 10 000 těchto jednotek v řadě a molekulová hmotnost může dosáhnout až několika milionů Da. Syntetizovaný řetězec se však nemůže zvětšovat do nekonečna především díky termodynamickému hledisku, neboť rostoucí řetězec snižuje entropii a ta musí být kompenzována volnou energií získatelnou ze štěpení aktivovaných nukleotidových cukrů. [1], [2], [4], [5], [6]

1.1.2.2 Struktura v roztoku

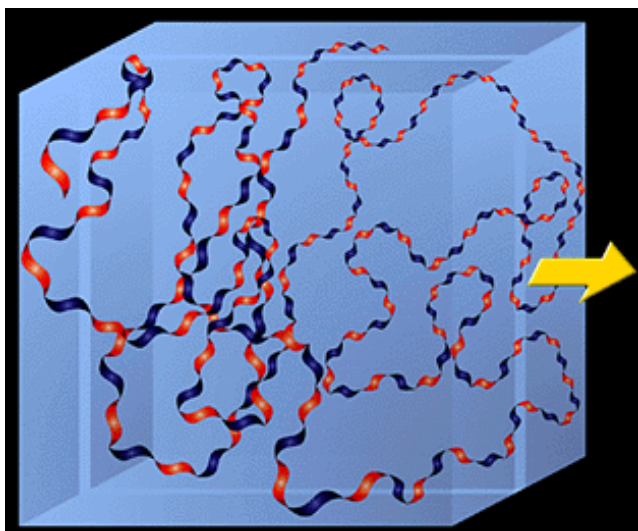
Ve fyziologickém prostředí jsou všechny karboxylové skupiny ve struktuře hyaluronanu disociované, neboť jejich pK se pohybuje v rozsahu 3–4 v závislosti na iontové síle. Takovýto polyanion má ve své struktuře přidružené výměnné ionty, aby celá jeho struktura byla elektroneutrální. Mezi tyto kationty patří Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} a další. Vyměnitelné ionty jsou nezbytné pro dobré rozpouštění hyaluronanu ve vodných roztocích, neboť pokud jsou všechny karboxylové skupiny metylované, není hyaluronan ve vodě rozpustný. Čistá

hyaluronová kyselina vytváří ve vodě charakteristické vysoce viskózní a elastické roztoky. [1], [2], [3], [10]

Za fyziologických podmínek je struktura hyaluronanu tvořena chemickými vazbami tvořícími základ disacharidových jednotek a intramolekulárních vodíkových můstků, které jsou obtížně rozlišitelné s vodíkovými můstky tvořenými s molekulami vody. Vzhledem k tomu, že jsou všechny objemné a zároveň hydrofilní skupiny uspořádány v ekvatoriální poloze a atomy vodíku, které tvoří hydrofobní části molekuly v poloze axiální, jak ukazuje **Obrázek 2**, dochází v roztoku k tvorbě ploché, stuhu připomínající, kroutící se struktury (**Obrázek 3**). Tato stuha má ve své struktuře rozsáhlá hydrofobní místa, která se pravidelně opakují na opačných stranách stuhu a vytvářejí tak základ pro agregaci řetězců. V této struktuře dochází k rotaci o 180° každé disacharidové jednotky oproti předchozí i následující jednotce. Tato struktura je energeticky velmi stabilní a tvoří sekundární strukturu hyaluronanu. [1], [2], [3], [4], [8], [10], [12]



Obrázek 2: Červeně zvýrazněné axiální vodíkové atomy a modře zdůrazněné ekvatoriální hydrofilní skupiny ve struktuře hyaluronanu. [2]



Obrázek 3: Znárodnění struktury hyaluronanu, jež připomíná stuhu s pravidelně se opakujícími se hydrofobními (červená) a hydrofilními (modrá) disacharidovými jednotkami. [2]

Obě strany stuhu jsou identické, proto může docházet k růstu ve vodném prostředí za tvorby sítí. Tyto sítě mohou vznikat již při nízkých koncentracích. Molekuly hyaluronanu tvoří ve fyziologických roztocích rozsáhlá náhodná klubka, která zabírají velký objem. Již od koncentrace $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ se mohou klubka vzájemně prolínat, neboť koncentrace hyaluronanu uvnitř klubka je velmi nízká (nižší než 0,1 %hm). Takto uspořádaný hyaluronan hraje v živém systému důležitou roli, neboť malé molekuly, jako je voda nebo elektrolyty, mohou jednoduše procházet skrze klubko, nikoliv však velké molekuly. Molekuly s příliš velkým hydrodynamickým objemem jsou při průchodu skrz klubko výrazně zpomaleny. V konečném důsledku mohou i velké molekuly projít, neboť u klubka dochází k neustálému pohybu a vznikání a zanikání pórů o různé velikosti. Takovéto chování vede k ovlivňování difuze u velkých molekul a ke vzniku různých koncentrací velkých molekul v prostředí s hyaluronanem a mimo něj. [1], [2], [3], [7]

V pevném stavu se hyaluronan, jak dokázala Struther Arnottova skupina, může vyskytovat v dvoušroubovicovém uspořádání, ale pouze ve speciálních podmínkách neodpovídajících podmínkám fyziologickým. [3], [4]

1.1.3 Biologické funkce hyaluronanu

Hyaluronan ovlivňuje chování buněk v řadě oblastí, které se mohou zdát vzájemně protichůdné. Při migraci buněk, mitóze nebo při vzniku nádoru dochází ke zvýšené syntéze hyaluronanu. Přebytek tohoto polysacharidu v nádorové tkáni zvyšuje možnost růstu

nezakotvených buněk a tumorigenicitu. Ne všechny nádorové buňky tvoří samy ve zvýšené míře hyaluronan, ale mohou stimulovat okolní buňky k jeho tvorbě. Hyaluronan však na druhé straně zvyšuje buněčnou adhezi, agregaci buněk, ale inhibuje proliferaci. Všechny tyto akce jsou řízeny pomocí receptorů exprimovaných na povrch buňky, které mají ve své struktuře motiv pro vazbu hyaluronanu. Mezi proteiny schopné takové interakce řadíme například HARE, kterým se řídí endocytóza hyaluronanu, LYVE1 – receptor endoteliálních buněk v lymfatické soustavě, strukturně podobný receptoru CD44 a mnohé další včetně intracelulárních receptorů, jejichž funkce zatím nebyla plně objasněna [14]. Vazba na receptor, například RHAMM, probíhá pomocí krátké aminokyselinové sekvence, která obsahuje více bazických aminokyselin [4]. U většiny ostatních receptorů je za vazbu odpovědná doména asi 100 aminokyselin, známá jako „Link module“ [15]. Obě tyto interakce ukazují na využití elektrostatických interakcí při rozpoznávání hyaluronanu receptory. [1], [5], [6], [7]

Vzhledem k jednotvárné primární struktuře hyaluronanu se předpokládá, že funkci, jakou hyaluronan aktuálně plní, ovlivňuje jeho molekulová hmotnost. Dlouhé polymerní řetězce vyplňují prostor, zabraňují tvorbě krevních kapilár a jsou imunosupresivní na rozdíl od řetězců střední délky (25–50 disacharidových jednotek), které stimulují zánět, imunitu a mají pozitivní vliv na tvorbu nových kapilár. Oligosacharidy působí proti apoptóze a indukují proteiny tepelného šoku. Předpokládá se, že působí jako endogenní výstražné signály a spouštěče různých signálních drah. [5], [6], [11]

V nádorových tkáních je koncentrace hyaluronanu vyšší než u tkání zdravých. V těchto případech hyaluronan podporuje růst tumoru tím, že stimuluje neukotvený růst a proliferaci buněk, chrání před imunitním systémem a zvyšuje pravděpodobnost tvorby metastáz. Oligosacharidy vznikající degradací hyaluronanu jsou odpovědné za tvorbu nového krevního řečiště v rychle rostoucí nádorové tkáni. [1], [6]

Hyaluronan se vyskytuje i jako vnitřní součást některých buněk, zde však jeho funkce zatím nebyla plně pochopena. [4], [5]

Jednou z hlavních fyziologických funkcí hyaluronanu je tvorba hydratovaných „cest“, které umožňují buňkám procházet skrz buněčné a vláknité bariéry. Zvláště důležité jsou při mitóze, hojení ran a morfogenezi. [1]

Po uzavření rány krevními destičkami a fibrinem dochází ke vzniku zánětlivé reakce a buňky v okolí rány syntetizují mezi vlákna fibrinu hyaluronan. Dojde k otoku rány a vlákna fibrinu se stanou více porézními, aby mohlo dojít k migraci buněk do rány. Postupem času

dochází k degradaci komplexu hyaluronan-fibrin a jeho nahrazení kolagenovými vlákny spolu s proteoglykany. Produkty degradace hyaluronanu navíc podporují angiogenezi (tvorbu nových kapilár) a cév. Hyaluronan ale nemusí být vždy k užitku. Záněty v orgánech jsou často doprovázeny akumulací hyaluronanu a následným vznikem otoku, což může vést až k nefunkčnosti jednotlivých orgánů (opuchnutí revmatoidních kloubů, otok odmítnutého transplantátu...). [1], [4], [7]

Bylo také zjištěno, že buňky hladkého svalstva během virové infekce syntetizují povrchově vázaný hyaluronan ve formě, na kterou adherují mononukleární leukocyty. [4]

1.1.3.1 Degradace hyaluronanu

Protože je hyaluronan velmi dlouhá molekula, v nataženém stavu může v závislosti na počtu monomerních jednotek měřit až 25 μm (velikost erytrocytu je 10 μm , což odpovídá nataženému řetězci o molekulové hmotnosti 4 miliony daltonů [2], [7]), je náchylný na různé druhy degradací včetně degradace mechanické. Za fyziologických podmínek připadají v úvahu degradace pomocí kyslíkových radikálů a hyaluronidáz. [1], [6]

Degradace pomocí volných kyslíkových radikálů probíhá nejčastěji jako vedlejší reakce působení neutrofilních granulocytů během zánětu. Obzvláště patrný výsledek tohoto procesu, který vede k dramatickému poklesu viskozity spolu s molekulovou hmotností hyaluronanu je patrný především u revmatoidní artritidy, kdy dochází ke ztrátě funkčnosti synoviální tekutiny. Hlavním degradačním produktem je L-threotetradialdosa. [1], [6]

Hyaluronidázy jsou rozdělovány do tří skupin: savčí, bakteriální a hyaluronidázy z parazitů a korýšů. Působením savčích, parazitických a korýších hyaluronidáz vznikají tetra a hexa sacharidy, bakteriální hyaluronidázy produkují jednoduché cukry. Savčí hyaluronidázy jsou hydrolázy, čímž se liší od mikrobiálních hyaluronidáz, které pracují jako eliminázy. V lidském těle bylo objeveno šest velmi podobných genů pro hyaluronidázy [4]. Geny jsou shodné z více než 40 %, ale exprese každého genu je napříč tkáněmi unikátní [6]. [1]

V lidském těle dochází k degradaci hyaluronanu pomocí lymfatického odstraňování hyaluronanu z tkání a následné degradaci v lymfatických uzlinách a játrech. Vědci se domnívají, že receptory exprimované na povrchu jaterních endoteliálních buněk jsou významně zodpovědné za tento degradační proces. [4]

1.1.4 Hyaluronan v medicíně

Přípravky na bázi hyaluronanu se využívají v řadě lékařských (oftalmologii, obohacování synoviální tekutiny, distribuce léčiv nebo pro separaci tkání po operaci, hojení ran)

a kosmetických aplikací, díky biokompatibilitě, biodegradabilitě a viskoelastických vlastnostech hyaluronanu. [1], [5], [6], [13], [16]

První využití hyaluronanu se datuje do padesátých let dvacátého století, kdy byl použit jako náhrada očního sklivce během oční operace Rakouským týmem [10]. Dodnes se během očních operací využívá 1% roztok hyaluronanu [4] pro ochranu buněk oka během operace i jako náhrada sklivce. [1], [2], [6], [7]

Hyaluronan obsažený v synoviální tekutině, které uděluje ne-newtonskou viskozitu a další nezbytné mechanické vlastnosti [12], provádí nezbytnou lubrikaci kloubů, snižuje tření a slouží jako tlumič nárazů. Při zánětlivých procesech jako rheumatoidní artritida dochází k poklesu molekulové hmotnosti tohoto polysacharidu ze 7 MDa na 3–5 MDa. Tento proces byl popsán v kapitole **1.1.3.1**. Tato změna výrazně redukuje schopnost synoviální tekutiny plnit její funkce. K podobným změnám dochází v synoviální tekutině i v případě osteoartritidy. Pro opětovné zlepšení funkčnosti kloubů se používají, jak ukázal již Balazs a Denlinger (1989) u kloubů koní [4], injekce hyaluronanu přímo do oblasti kloubu. Vpravený hyaluronan potlačuje degeneraci chrupavky, zlepšuje vlastnosti synoviální tekutiny. Odhaduje se, že více než 10 % populace s věkem přes 55 let postihuje osteoartritida [5]. [1], [6], [7]

Využití hyaluronanu v injektovatelné podobě jako výplně vrásek patří mezi kosmetické aplikace. Na rozdíl od produktů založených na kolagenu jsou produkty založené na mírně zesíťovaném hyaluronanu více efektivní, neboť jsou velmi pružné. [5]

1.1.4.1 Distribuce léčiv za použití hyaluronanu

V minulých letech byl hyaluronan výrazně využíván pro přepravu léčiv v dermálním a transdermálním podání, kde pomáhal léčivým látkám penetrovat do pokožky. Pro svoje viskoelastické a mukoadhezivní vlastnosti byl použit pro oční a nosní podání léčivých substancí a bylo také zjištěno, že vysokomolekulární hyaluronan je schopen zvyšovat biologickou dostupnost různých léčiv (vasopressin, pilokarpin, gentimycin...) právě na základě těchto vlastností. [6]

Díky svým netoxickým vlastnostem byl využit i v parenterálním podání léčiv. Velmi zajímavé se jevily především konjugáty nízkomolekulárního hyaluronanu s butyrátem, paclitaxelem nebo doxorubicinem pro cílenou distribuci těchto léčiv do nádorových tkání. Především butyrát sodný s krátkým poločasem rozpadu přibližně 5 minut v lidském těle, bylo nutné pro jeho správnou aktivitu zacílit do nádorových tkání tak, aby došlo ke zvýšení koncentrace butyrátu. Za tímto účelem bylo zvoleno kovalentní napojení butyrátu na hyaluronan [17]. Dále byly vytvořeny různé druhy podobných konjugátů s lipozomy,

kopolymery nebo implantáty založené na modifikovaném hyaluronanu, pro distribuci DNA nebo protinádorových léčiv nebo peptidů. [6], [16]

1.1.5 Elektrostatické komplexace hyaluronanu

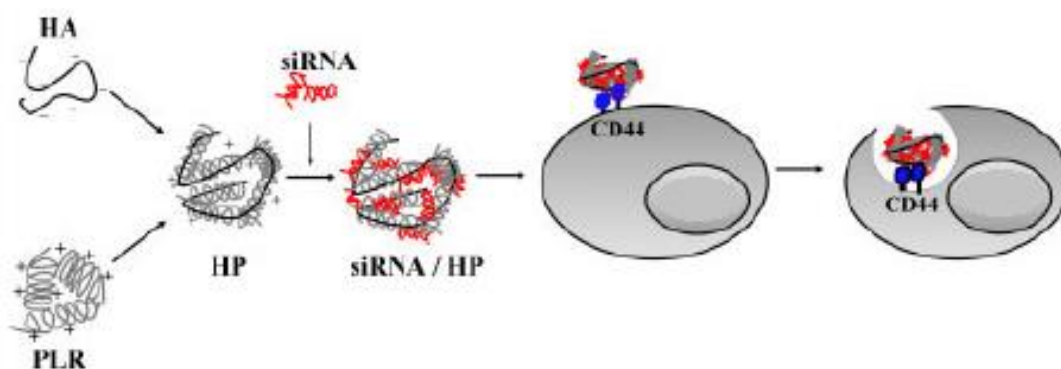
Elektrostatická vazba nízkomolekulárních ligandů na hyaluronan byla studována mnoha technikami, jako je fluorescenční spektroskopie, povrchová plasmonová rezonance, kalorimetrie, dynamický rozptyl světla nebo kapilární elektroforéza. [13], [18]

Pomocí kapilární elektroforézy bylo zjištěno, že deriváty β -naftylamidu s Arg, Lys a Ala interagují ve fosfátovém pufru (pH 7,4; I = 0,17 M) velmi slabě na rozdíl od prostředí acetátového pufru (pH 4,65; I = 0,05 M), kde byla elektrostatická interakce silnější především díky nižší iontové síle. [13]

Elektrostatická komplexace hyaluronanu byla také použita pro cílenou distribuci siRNA. Hyaluronan (HA, 19 kDa) interagoval s poly L-argininem (PLR) ve vodném prostředí a výsledný komplex (HP) byl použit pro interakci s siRNA a její cílenou distribuci, jak ukazuje **Obrázek 4**. Účinnost cílené distribuce závisela především na množství exprimovaného receptoru CD44 na povrchu buněk a molekulové hmotnosti hyaluronanu. Částice byly testovány in vivo i in vitro. [16], [18]

Obdobný příklad elektrostatických interakcí hyaluronanu s kationickými lipozomy a plazmidovou DNA byl vytvořen Balbinio skupinou, kde komplex lipozom/DNA nechali interagovat s nízkomolekulárním hyaluronanem (16 kDa) ve vodném prostředí s cílem získat prostředek pro cílenou distribuci genů. [18]

Pomocí elektrostatických interakcí byly také vytvořeny injektovatelné hydrogely, ve kterých dochází k interakci mezi nanočásticemi obsahujícími na svém povrchu amfifilní kopolymer polyethylenglykolu a mléčné kyseliny a dále kyselinou hyaluronovou, resp. karboxymethylcelulózou nekovalentně modifikovanou přísadkou kationaktivního tenzidu (CTAB). [19]



Obrázek 4: Hypotetické schéma tvorby komplexu HP pro cílenou distribuci siRNA. [16]

1.1.5.1 Interakce s aminokyselinami

Myšlenka využití elektrostatické interakce hyaluronanu s aminokyselinami není revoluční. Již v řadě prací bylo dokázáno, že hyaluronan s aminokyselinami ve vhodných podmínkách interaguje. Jako důležité se jeví především pH a iontová síla, přičemž pokud klesne pH na hodnotu kolem 2,5, není prakticky možné pozorovat žádné interakce, neboť karboxylové skupiny hyaluronanu zajišťující interakci nejsou nadále disociované. [15]

Výzkum v tomto případě navazuje na poznatky interakcí mezi hyaluronanem a kationaktivními tenzidy, které podobně jako aminokyseliny nesou na atomu dusíku kladný náboj a jsou proto schopny vazby se záporně nabitou karboxylovou skupinou hyaluronanu. V tomto ohledu je důležitá především práce doktorky Kargerové [20], která se zabývá studiem interakcí hyaluronanu a kationaktivního tenzidu pomocí ultrazvukové spektroskopie (detailně popsáno v kapitole **1.6.2**).

K měření interakcí mezi aminokyselinami a hyaluronanem byly využívány různé metody měření, jako je pH metrie [21], [22], [23], konduktometrie [22], [24], [25], viskozimetrie [21], [26], dynamický rozptyl světla [21], [23] nebo reologie [24], [25], [27], [28]. Bylo zjištěno, že velký vliv na sílu interakcí má především iontová síla roztoku a také pH, při kterém dochází k interakcím mezi aminokyselinou a hyaluronanem. Vysoká iontová síla roztoku má za následek odstínění elektrostatických interakcí. Tuto skutečnost je možné částečně kompenzovat snížením pH, při kterém dochází k interakcím.

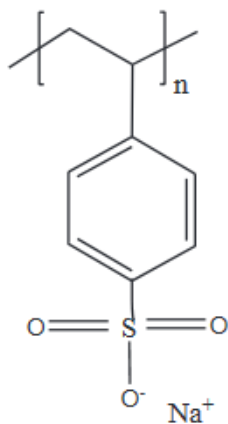
Cílem této práce bylo prozkoumat elektrostatické interakce hyaluronanu s bazickými aminokyselinami v různém rozsahu molekulových hmotností hyaluronanu od nízké molekulové hmotnosti až po vysokomolekulový hyaluronan. Jako srovnávací polymer byl zvolen polystyren sulfonát sodný. Jako stěžejní metoda pro zkoumání interakcí byla zvolena ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením, především kvůli předpokládanému

objevení různých přechodových stavů v systému hyaluronan-aminokyselina za různých koncentrací aminokyseliny, obdobně jako tomu bylo v případě studia komplexů hyaluronan-tenzid [20]. Jako doplňková metoda byla zvolena pH metrie a konduktometrie roztoků aminokyselin, polyaniontů a jejich kombinace během titrace kyselinou chlorovodíkovou a měření dynamického rozptylu světla v průběhu titrací roztoků hyaluronanu roztoky aminokyselin spolu s měřením zeta potenciálu těchto roztoků.

1.2 Polystyren sulfonát

Podobně jako v případě hyaluronanu je polystyren sulfonát (Poly(sodium 4-styrenesulfonate)) polyelektrolyt, tedy polymer nesoucí ve své struktuře podstatnou část iontových nebo ionizovatelných skupin, případně obojí [29]. Sodná sůl polystyren sulfonátu (NaPSS) je chemicky syntetizovaný bílý prášek, který se v přírodě běžně nevyskytuje a připravuje se radikálovou polymerizací styren sulfonátu [30] nebo přímou sulfonací polystyrenu [31]. Pokud budeme uvažovat úplnou sulfonaci všech monomerů v polymeru, má polymer v roztoku tyčinkovitou konformaci [31], naopak pokud bude množství sulfonových skupin nižší než na každém čtvrtém monomeru, polymer zaujme globulární válcovitou strukturu. Sodnou sůl polystyren sulfonátu sodného znázorňuje **Obrázek 5**. Jedná se, podobně jako v případě hyaluronanu, o anionický polyelektrolytový systém, avšak na rozdíl od hyaluronanu nese záporný náboj sulfoskupina na každé monomerní jednotce v řetězci.

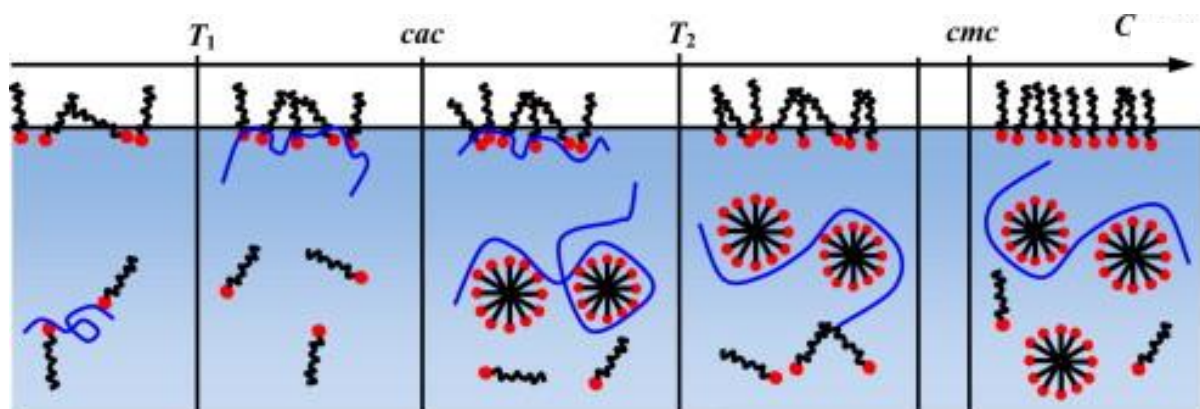
Pro experimentální využití se NaPSS využívá především jako modelový polyelektrolytový systém [30]. V praxi se NaPSS přidává jako plastifikační přísada do tmelů, barvicích činidel, membrán v palivových člancích a také v síťované podobě do iontoměničových pryskyřic. V medicíně našel uplatnění především při léčbě hyperkalemie (nadměrného obsahu draslíku v těle), kde se využívají sodné a vápenaté soli. [29]



Obrázek 5: Struktura polystyrensulfonátu sodného. [32]

1.2.1 Elektrostatické interakce NaPSS

Podobně jako v případě hyaluronanu i zde byly studovány elektrostatické interakce NaPSS s polu s kationaktivními tenzidy, konkrétně s C_8mimBr pomocí měření vodivosti, povrchového napětí, fluorescence a DLS [32], a $C_{14}mimBr$ s využitím isothermální titrační mikrokolorimetrie, DLS a měření vodivosti [33]. V obou případech byla stanovována kritická micelární koncentrace (CMC) a vliv teploty a koncentrace NaPSS na tuto koncentraci. Jako nejzajímavější se jeví fakt, že byly v obou případech zaznamenány kromě CMC i další hodnoty koncentrací, ve kterých dochází k tvorbě rozdílných interakcí mezi NaPSS a kationaktivními tenzidy, jak ilustruje **Obrázek 6**. Toto pozorování je velmi podobné výsledkům práce doktorky Kargerové [20] (kapitola 1.6.2), kde byl ale na rozdíl od prací skupin kolem Zhanga a Pala využitý jako anionický polyelektrolyt hyaluronan. Vzhledem k podobnosti výsledků u podobných experimentů s hyaluronanem a NaPSS se jeví polystyren sulfonát jako vhodný srovnávací polymer.



Obrázek 6: Schématický diagram organizace interakcí $C_{14}mimBr$ a NaPSS v závislosti na koncentraci tenzidu. [33]

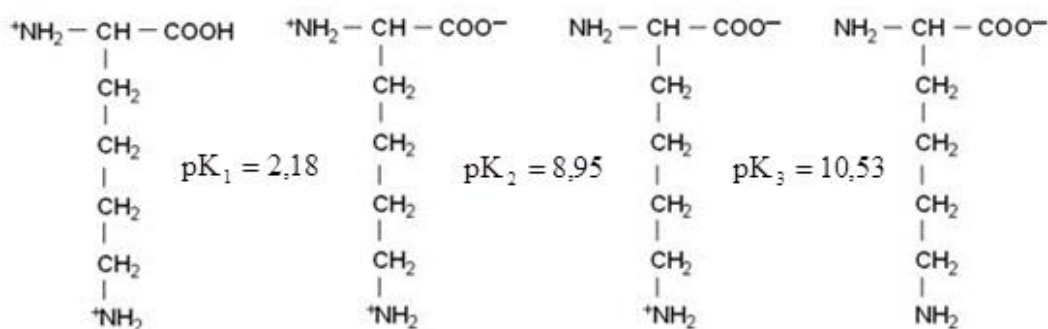
1.3 Aminokyseliny

Aminokyseliny jsou základní stavební složky proteinů, ve kterých se v různém zastoupení vyskytuje přibližně 20 L- α -aminokyselin spojených do řetězců peptidovou vazbou. Aminokyseliny obsahují, jak název napovídá, aminoskupinu i karboxylovou skupinu. U α -aminokyselin jsou obě tyto skupiny vázány ke stejnému atomu uhlíku, který je chirální (s výjimkou glycinu). Dle struktury postranních řetězců dělíme aminokyseliny na zásadité, kyselé, aromatické, alifatické a sírné. [34]

V závislosti na pH mohou aminokyseliny měnit svůj náboj od kladně nabitých až po záporně nabitě. Jedná se tedy o amfolyty. Jako elektroneutrální se aminokyselina jeví v isoelektrickém bodě (pI), což je hodnota pH, kde v celkovém součtu nenese aminokyselina nulový náboj. Obecně lze říci, že v oblasti pH pod isoelektrickým bodem aminokyseliny dochází k tvorbě kladně nabitě molekuly, naopak nad hodnotou isoelektrického bodu převládá záporný náboj. Vzhledem k velkému počtu nabitých skupin ve struktuře aminokyselin se snadno rozpouští v polárních rozpouštědlech. [34]

1.3.1 Lysin

L-Lysin (zkráceně Lys, K) je bazická aminokyselina, u člověka jedna z 10 esenciálních. Důležitou roli hraje v metabolismu mastných kyselin, vápníku a kolagenu. Využívá se při léčbě osteoporózy a oparů. Průmyslově se získává fermentačně pomocí *Corynebacterium glutamicum*. Isoelektrický bod lysinu $pI=9,7$, hodnoty disociačních konstant jsou $pK_{COOH} = 2,18$, $pK_{NH_2} = 8,95$ a $pK_{\epsilon-NH_2} = 10,53$. Jeho chemickou strukturu v závislosti na pH znázorňuje **Obrázek 7**. [34], [35], [36], [37]

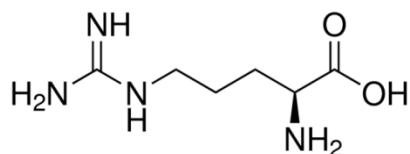


Obrázek 7: Struktura lysinu v závislosti na pH prostředí. [38]

1.3.2 Arginin

L-arginin (zkráceně Arg, R) je bazická aminokyselina, pro člověka esenciální během růstu, po jeho ukončení již nikoliv, tzv. semiesenciální aminokyselina. Produkován je pomocí extrakce z proteinového hydrolyzátu a pomocí fermentace mutovaných kmenů (*Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis* nebo *Serratia marcescens*) [39]. Isoelektrický bod argininu $pI=10,80$, hodnoty disociačních konstant pK při $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ jsou $pK_{COOH} = 2,18$, $pK_{NH_2} = 9,09$

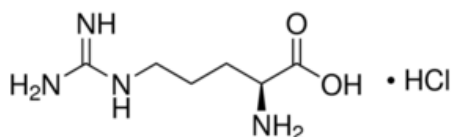
a $pK_{\epsilon-NH_2} = 13,20$. Chemická struktura argininu je znázorněna na obrázku (**Obrázek 8**). [34], [40]



Obrázek 8: Chemická struktura argininu. [40]

1.3.2.1 L-arginin monohydrochlorid

Jedná se o sůl L-argininu, která je vyráběna neutralizací L-argininu chlorovodíkovou kyselinou [41]. Schématický vzorec je ukázán na obrázku (**Obrázek 9**).

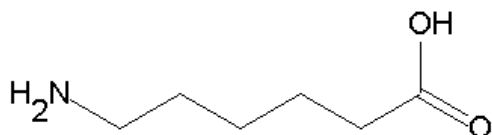


Obrázek 9: Schématické znázornění struktury L-argininu hydrochloridu. [42]

1.3.3 6-aminokapronová kyselina

Kyselina 6-aminokapronová (6AKK), systematickým názvem 6-aminokexanová kyselina je syntetickým derivátem lysinu. Ve své struktuře (**Obrázek 10**) nenesou rozdíl od lysinu α -aminoskupinu, což snižuje bazicitu této látky oproti lysinu. Jedná se o antifibrinolytikum a využívá se především ke stavění krvácení například po chirurgických zákrocích. 6AKK vystupuje také jako intermediát při polymerizaci Nylonu-6. [43]

Izoelektrický bod 6-aminokapronové kyseliny $pI = 7,59$ byl vypočítán podle vztahu (1) [44]. Hodnoty disociačních konstant pK při 25 °C jsou $pK_{COOH} = 4,43$, $pK_{NH_2} = 10,75$. [43]



Obrázek 10: Chemická struktura 6-aminokapronové kyseliny. [45]

$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2} \quad (1)$$

1.4 pH metrie

V čisté vodě je velmi malá elektrická vodivost, která je způsobená přítomností iontů H_3O^+ a OH^- , vzniklých autoprotolýzou vody (rovnice (2)). Koncentrace těchto iontů významným způsobem závisí na teplotě, ale pro teplotu 25 °C odpovídá součin jejich koncentrací hodnotě 10^{-14} a je vždy konstantní. Jedná se o tzv. iontový součin vody. Zároveň platí, že v čisté vodě je koncentrace hydroxidových aniontů stejná jako koncentrace oxoniových kationtů. Takový roztok považujeme za neutrální a jeho $pH=7$ dle rovnice (3). Vodné kyselé roztoky se vyznačují zvýšenou koncentrací oxoniových kationtů, a jejich pH se pohybuje v oblasti 0–6, zatímco bazické látky rozpuštěné ve vodě mají přebytek hydroxidových aniontů a jejich pH doplňuje stupnici do 14. [46]



$$pH = -\log[H_3O^+] \quad (3)$$

1.4.1 Metody měření pH

pH můžeme stanovovat několika různými způsoby, jako jsou univerzální indikátorové papírky, acidobazické indikátory, které mění svou barvu v závislosti na pH , nebo pomocí pH metru. pH metr měří elektrický potenciál mezi měrnou (skleněnou) a referenční elektrodou, elektrický potenciál je měřen na velmi citlivém potenciometru s vysokým vstupním odporem. Jako referenční elektrody jsou využívány takové elektrody, jejichž potenciál zůstává v průběhu měření konstantní. Jedná se o tzv. elektrody druhého druhu, mezi něž řadíme argentochloridovou elektrodu, kalomelovou elektrodu a další. Oba typy elektrod potřebných k měření mohou být spojeny do jedné kombinované elektrody. [47], [48]

1.4.2 Potenciometrické titrace

Při potenciometrických titracích měříme závislost napětí mezi vhodně zvolenými elektrodami na objemu přidávaného titračního činidla a z titrační křivky následně zjišťujeme bod ekvivalence. V závislosti na typu zvolené indikační elektrody můžeme sledovat různé typy titrací, jako jsou srážecí, komplexotvorné nebo acidobazické. Bod ekvivalence se nachází v inflexním bodě titrační křivky, která má při titraci jedné složky typický tvar S. [47], [48]

1.5 Konduktometrie

Principem konduktometrie je měření vodivosti zkoumaných vzorků. Konduktometrii rozdělujeme na přímou a na konduktometrické titrace, kdy sledujeme závislost vodivosti elektrolytu na objemu přidaného titračního činidla. [46], [47]

Vodivost (G) je fyzikální veličina, která vyjadřuje schopnost zkoumaného vzorku vést elektrický proud. Čím lépe vzorek proud vede, tím vyšší je hodnota vodivosti. Pokud je vzorek roztokem, jeho vodivost vzrůstá s počtem nabitých částic (iontů) v roztoku. Vodivost je definována jako převrácená hodnota elektrického odporu, jak ukazuje rovnice (4). Její jednotkou je Siemens [S]. [46], [47]

$$G = \frac{1}{R} \quad (4)$$

Princip měření vodivosti spočívá v umístění dvou vodivých desek do měřeného vzorku. Na desky je přivedeno napětí (U) a proud (I) a vodivost je určena rovnicí (5). [46], [47]

$$G = \frac{I}{U} \quad (5)$$

Měrnou vodivost (κ) zavádíme, neboť vodivost je veličina závislá na geometrii a umístění vodivých desek do vzorku (l – vzdálenost desek, S – plocha desek). Její jednotkou je [$S \cdot m^{-1}$] a výpočet provádíme pomocí vztahu (6). Základní jednotka však bývá pro měření běžných elektrolytických vzorků příliš velká, proto se využívají její zmenšené varianty. Nejčastěji [$mS \cdot cm^{-1}$] a [$\mu S \cdot cm^{-1}$]. [46], [47]

$$\kappa = G \frac{l}{S} \quad (6)$$

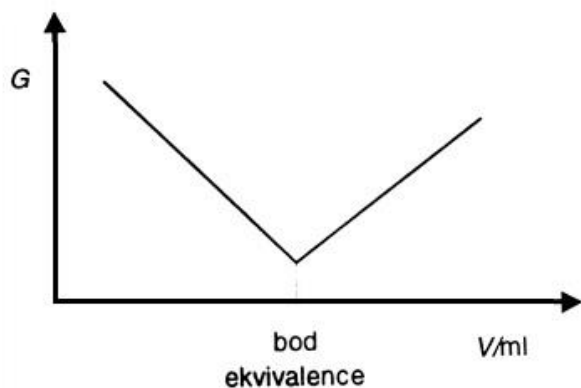
1.5.1 Metody měření vodivosti

Vodivost vzorku provádíme pomocí vodivostní cely ponořené do vzorku. Vodivostní celu (skleněnou nebo plastovou trubici) ponoříme do vzorku, tak aby byly ponořeny obě elektrody. Protože vodivost významným způsobem závisí na teplotě, se kterou vodivost roste, bývá součástí konduktometrů teploměr a přístroj automaticky upravuje hodnoty vodivosti. Kalibrační hodnota teploty je obvykle 25 °C. [46], [47]

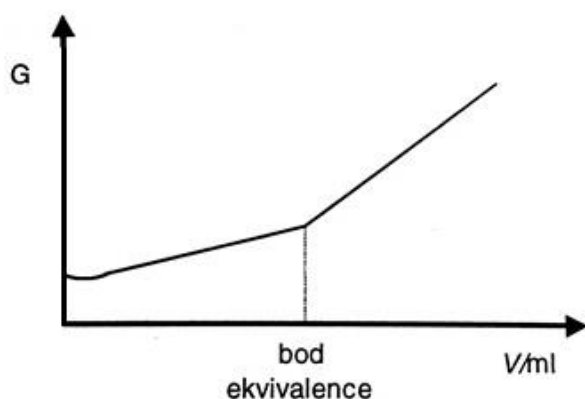
1.5.2 Konduktometrické titrace

Rozlišujeme dva druhy konduktometrických titrací, a to silné kyseliny silnou zásadou (**Obrázek 11**) a slabé kyseliny slabou zásadou (**Obrázek 12**). V praktické části diplomové

práce byly titrovány roztoky hyaluronanu, aminokyselin a roztoky obsahující hyaluronan i aminokyseliny pomocí kyseliny chlorovodíkové. [46], [47]



Obrázek 11: Konduktometrická titrační křivka titrace silné kyseliny silnou zásadou. [47]



Obrázek 12: Konduktometrická titrační křivka titrace slabé kyseliny slabou zásadou. [47]

1.6 Ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením

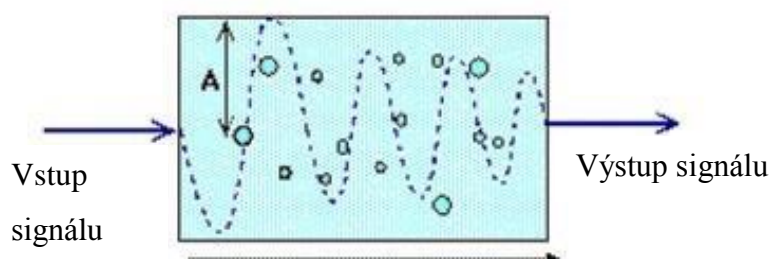
Problematika měření pomocí ultrazvukové spektroskopie již byla řešena v mé bakalářské práci [49]. Využití ultrazvuku jako nedestruktivní techniky pro charakterizaci a zkoumání materiálů bylo studováno po desetiletí. Nejprve se ultrazvuk jako analytický nástroj ujal v medicíně, kde způsobil malou revoluci. Avšak aplikace ultrazvuku v oblasti studia materiálů byla brzděna především nedostatečně vyspělou elektronikou, nutností měřit pouze velké množství vzorku, nízkým rozlišením a komplikovaným postupem při měření. [50], [51]

Podobně jako ostatní spektroskopické techniky, které využívají elektromagnetické záření, je ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením (HRUS), z anglického high resolution ultrasonic spectroscopy, taktéž spektroskopickou technikou. Pro analýzu, však na rozdíl od ostatních spektroskopií, využívá zvukových vln o vysoké frekvenci. To umožňuje využití této techniky ke studiu téměř jakéhokoliv materiálu nezávisle na jeho optických vlastnostech. Zkoumání vzorku pomocí zvukových vln navíc dovoluje měření až na osmi frekvencích najednou, neboť jsou zvukové vlny generovány elektronicky. [50]

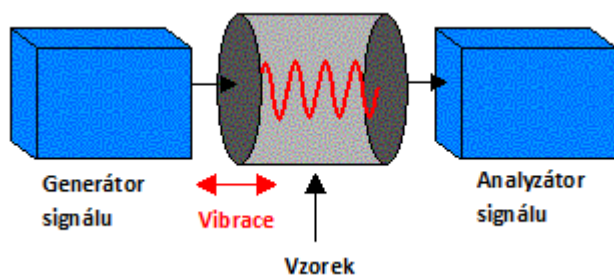
1.6.1 Princip měření

Zvukové vlny prochází ve spektrometru dvěma celami současně. Vzorek je umístěn do měrné cely a například čisté disperzní prostředí do cely referenční. Měření je tedy v ultrazvukovém spektrometru prováděno jako komparativní. [52]

Analýza vzorku ultrazvukovou spektroskopií je založena na měření rychlosti průchodu ultrazvukové vlny vzorkem a změně její amplitudy, jak ukazuje **Obrázek 13**. Zvuková vlna je generovaná z elektrického signálu piezoelektrickým převodníkem na jedné straně cely, prochází vzorkem a v pozměněné podobě je detekovaná druhým piezoelektrickým převodníkem na opačné straně cely, který ji převádí zpět na elektrický signál (**Obrázek 14**). Ze změny charakteristik ultrazvukových vln jsou následně usuzovány vlastnosti měřeného vzorku. [53]



Obrázek 13: Schéma znázorňující průchod zvukové vlny vzorkem. [53]

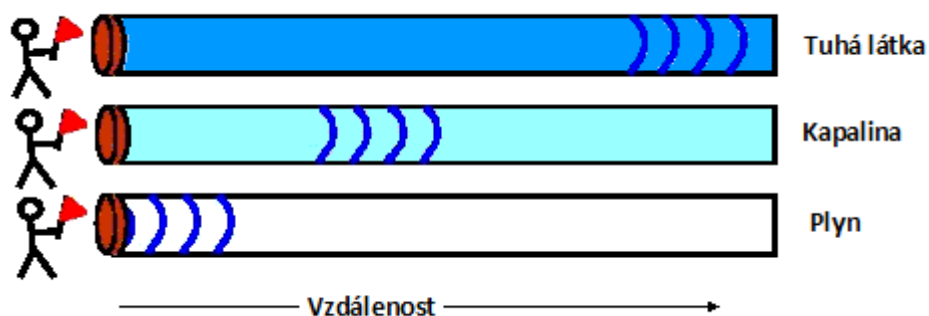


Obrázek 14: Princip měření ultrazvukového spektrometru. [53]

Zvuková vlna procházející vzorkem, podobně jako vlna mechanická, testuje intermolekulární síly vzorku opakovanou kompresí a dekompresí při svém průchodu vzorkem. Molekuly ve vzorku na sebe působí buď přitažlivě, nebo odpudivě a mění tím mikro-elastické vlastnosti vzorku, proto se každý vzorek v závislosti na svém složení stává během měření jedinečný. Protože je velikost komprese a dekomprese způsobená zvukovou vlnou velmi malá, jedná se o nedestruktivní techniku. [54]

Studování vzorku pomocí ultrazvukové spektroskopie jde do jisté míry přirovnat k reologickému studování vzorku. Na rozdíl od klasické reologie, kde dochází k pomalým deformacím vzorku, způsobuje zvuková vlna deformace mnohem rychlejší. [51]

Hustota a elasticita největší měrou ovlivňují rychlost, se kterou se zvuková vlna šíří vzorkem. Vzhledem k tomu, že elasticita je velmi citlivá na intermolekulární uspořádání vzorku, je důležitějším znakem v porovnání s hustotou. Obecně platí, že nejnižší rychlost průchodu zvukové vlny mají plyny, kde se zvuková vlna šíří asi pětkrát pomaleji v porovnání s kapalinami. Nejvyšší rychlost šíření je dosaženo v pevných látkách, neboť mají nejvyšší modul pružnosti v porovnání s ostatními skupenstvími. Tuto závislost znázorňuje **Obrázek 15**. [51], [55]



Obrázek 15: Zvuková vlna procházející různými druhy prostředí. [55]

Zvuková vlna procházející vzorkem ztrácí část své energie tím, že ve vzorku způsobuje kompresi a dekompresi. Ztráta energie se promítne do snížení amplitudy zvukové vlny. Ultrazvukové zeslabení potom kvantifikuje míru ztráty této energie. [56]

Obecně můžeme zeslabení ultrazvukové vlny rozdělit do dvou kategorií: zeslabení v homogenních vzorcích a ve vzorcích nehomogenních. Homogenní vzorky zeslabují zvukové vlny díky své kompresi a dekompresi. Měření zeslabení homogenních vzorků pomáhá pozorovat strukturální změny, asociace, vazbu ligandů k makromolekulám a další rychlé chemické změny. Zatímco v nehomogenních vzorcích dochází k útlumu zvukových vln díky rozptylu na částicích uvnitř roztoku. Platí, že čím větší je zeslabení, tím větší je podíl disperzních částic. [56]

Platí, že velikost zeslabení zvukové vlny, na rozdíl od rychlosti propagace zvukové vlny vzorkem, není závislá na teplotě. [57]

1.6.2 Využití ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením v praxi

Mezi typické příklady využití ultrazvukové spektroskopie patří analýza vazby biopolymer–ligand, agregace v suspenzích a emulzích, tvorba polymerních gelů, změna konformace biopolymerů a mnoho dalších procesů. [51], [57]

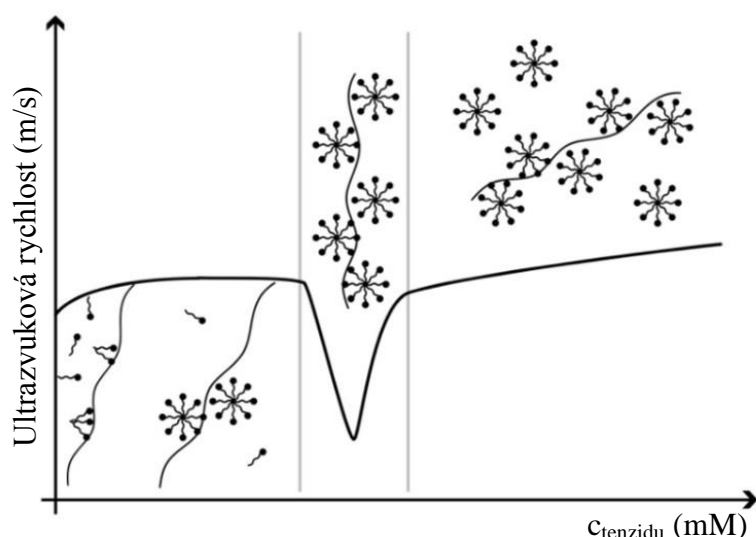
Pomocí spektroskopie lze též přesně určit hodnotu kritické micelární koncentrace (CMC). Podle prof. Pekaře [52] je vznik micel provázen snížením rychlosti šíření zvukových vln díky elastickému micelárnímu jádru. Mezi další experimenty ukazující citlivost ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením na uspořádání molekul ve vzorku patří například studium vazby protein-ligand, které bylo podobně jako v předchozím případě uspořádáno opět do titračního režimu. Tentokrát však docházelo k postupnému přidavku roztoku ligandu do měrné cely obsahující roztok proteinu. Výsledkem experimentu bylo snižování velikosti ultrazvukové rychlosti v důsledku uvolňování molekul vody z hydratačního obalu a jejich nahrazení ligandem. Voda v hydratačním obalu je totiž méně stlačitelná než voda objemová. [57]

Během měření vlastností roztoků hyaluronanu bylo zjištěno, že velikost relativní ultrazvukové rychlosti nezáleží na molekulové hmotnosti hyaluronanu, ale pouze na koncentraci dimerů D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu, které se nacházejí ve vzorku. S rostoucí koncentrací hyaluronanu ve vzorku dochází k lineárnímu nárůstu relativní rychlosti jak pro roztoky ve vodném prostředí, tak pro roztoky v 0,15 M chloridu sodném, a to díky tvorbě hydratovaných molekul hyaluronanu, neboť jak uvádí prof. Pekař [52], je hydratační voda méně stlačitelná než voda objemová. Protože stlačitelnost vody klesá

s teplotou, dochází i k poklesu rychlosti šíření zvukových vln vzorkem. Tento efekt je mnohem výraznější v porovnání s efektem koncentrace. [9], [49]

Pomocí ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením bylo prováděno i zkoumání interakcí mezi hyaluronanem a kladně nabitými povrchově aktivními látkami (CTAB, TTAB). Experiment byl prováděn v titračním režimu ve vodném prostředí a v prostředí 0,15 M roztoku chloridu sodného s různými molekulovými hmotnostmi hyaluronanu. Díky citlivosti měření pomocí ultrazvukové spektroskopie bylo ve vodném prostředí odhaleno až 6 různých druhů komplexů hyaluronan-tenzid, které zobrazuje **Obrázek 16**. [20]

Je důležité si ovšem uvědomit, že ultrazvuková spektroskopie je metoda nepřímá, a jak je interpretována příčina změny ve velikosti ultrazvukové rychlosti nebo zeslabení zvukové vlny, je především otázkou znalostí problematiky a zkušeností s touto technikou. [52]



Obrázek 16: Ilustrace komplexů hyaluronan-tenzid v závislosti na koncentraci tenzidu v roztoku. [20]

1.7 Dynamický rozptyl světla

Metoda dynamického rozptylu světla (DLS z *anglického dynamic light scattering*) je fyzikálně-analytická metoda používaná pro stanovování velikosti částic v koloidních systémech. Je založena na měření intenzity rozptýleného světla v průběhu času pomocí molekul vzorku. Díky Brownovu pohybu částic v roztoku dochází ke změně vzdálenosti mezi částicemi rozptylující světlo a detektorem. Vzhledem k využití monochromatického záření pro osvětlování vzorku dochází k interferenci rozptýleného záření od částic z různé vzdálenosti od

detektoru, který je umístěn buď v úhlu 173° nebo 90° [58]. Protože však dochází k pohybu částic díky tepelnému pohybu, výsledná intenzita rozptýleného světla se v čase mění. Pohyb částic v roztoku je za stálé teploty a v nezměněném rozpouštědle závislý pouze na velikosti částic (s rostoucí velikostí klesá rychlost pohybu). Protože na částice větší než $3\ \mu\text{m}$ nepůsobí tepelný pohyb, je velikost intenzity rozptýleného světla konstantní. S ohledem na tuto skutečnost je velikost částic, které lze touto metodou stanovit omezena na horní hranici $3\ \mu\text{m}$ a spodní hranice stanovení je $0,5\ \text{nm}$. [59], [60], [61], [62]

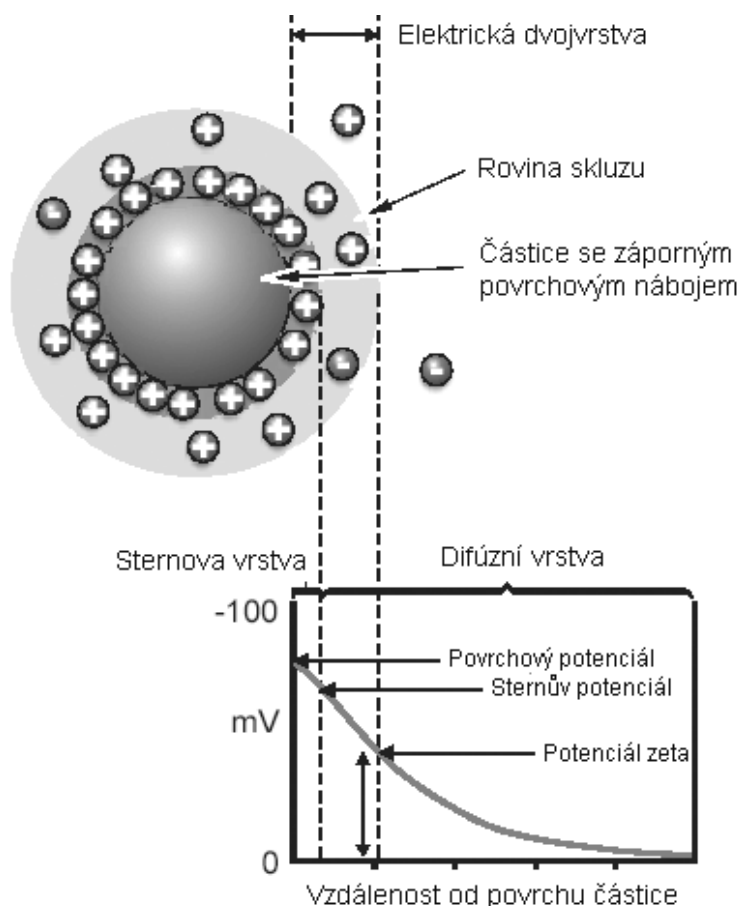
Detekce zpětného rozptylu, tedy využití detektoru v úhlu 173° , má oproti měření v úhlu 90° několik výhod. Světlo musí projít kratší optickou dráhou vzorku, a je proto možné měřit koncentrovanější roztoky, výrazněji odpadá chyba způsobená přítomností velkých částic ve vzorku (např. prachu), neboť takové částice rozptylují především v přímém směru a efekt mnohonásobného rozptylu je minimální při 180° . Ten je navíc eliminován použitím pohyblivé čočky, která umožňuje měnit polohu ohniska uvnitř cely. Pro malé částice je posunut blíže k prostředku cely, pro velké částice naopak ke stěně cely. [58]

Velikost částice stanovená pomocí DLS je vyjádřena pomocí hydrodynamického poloměru R_h . Jedná se o poloměr koule, která by za dané teploty a v daném rozpouštědle difundovala rychlostí jako měřené částice [63]. [59], [62]

Výsledky stanovení velikosti částic pomocí metody DLS jsou většinou ve shodě s výsledky stanovenými pomocí elektronového mikroskopu. Případné rozdíly mohou být způsobeny vysušováním vzorku pro elektronový mikroskop, případně solvatačním obalem částic, který je zahrnutý do hydrodynamického poloměru částice stanovovaného pomocí DLS. [59], [60]

1.8 Elektrické vlastnosti koloidních soustav

Koloidní nabitě částice kolem sebe vytváří, podobně jako jednoduchý ion v roztoku, atmosféru iontů opačného znaménka. Na povrchu nabitě koloidní částice tedy vzniká elektrická dvojvrstva. Ta jde podle Sterna pomyslně rozdělit na dvě části, jak ukazuje **Obrázek 17**. Jednak část bližší k povrchu nazývaná Sternova vrstva, kde působí adsorpční síly, a vzdálenější difúzní část, kde lze adsorpční síly zanedbat. [59], [62]



Obrázek 17: Znázornění elektrické dvojrstvy koloidních částic. [64]

Mezi povrchem koloidní částice a roztokem lze rozlišit dva druhy potenciálových rozdílů. Jedná se o elektrochemický potenciál, jehož hodnota je dána celkovým potenciálovým rozdílem mezi povrchem částice a objemem kapaliny, a elektrokinetický potenciál, tzv. ζ (zeta) potenciál, který vyjadřuje potenciálový rozdíl mezi objemem kapaliny a difúzní částí elektrické dvojrstvy. Zeta potenciál je odpovědný za existenci elektrokinetických jevů, jako je elektroforéza, elektroosmóza, potenciál proudění nebo sedimentační potenciál. [59], [65]

Velikost zeta potenciálu ovlivňuje i stabilitu koloidního systému. Pokud je potenciál dostatečně velký, tedy nad hranicí 30 mV v kladné, nebo záporné oblasti, je koloidní systém obecně považovaný za stabilní. Pokud však potenciál klesne dovnitř tohoto intervalu, převládnu přitažlivé mezimolekulové síly mezi částicemi disperzní fáze a dochází k flokulaci. [64], [65]

Pro určení zeta potenciálu je nejprve potřeba zjistit elektroforetickou pohyblivost částic a následně se pomocí Henryho rovnice (7) vypočítá zeta potenciál, kde U_E je elektroforetická mobilita, ε je dielektrická konstanta, ζ je zeta potenciál, η je viskozita rozpouštědla, $f(ka)$

vyjadřuje Henryho funkci, u kterých se jako aproximace používají buď hodnota 1,5 pro vodné prostředí, nebo 1,0 pro měření vzorků v jiném než vodném prostředí. [58]

$$U_E = \frac{2g\zeta f(ka)}{3\eta} \quad (7)$$

Určení elektroforetické pohyblivosti probíhá pomocí elektroforézy vzorku, kdy je na elektrody květy aplikován potenciál a částice se pohybují směrem k elektrodě s opačným nábojem. Rychlost pohybu částic je měřena metodou laserové dopplerovy velocimetrie. Při této technice se světlo rozptýlené v úhlu 17° kombinuje s referenčním paprskem, což vyvolá kolísající signál intenzity. Platí, že poměr fluktuace je úměrný rychlosti částic. [58]

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité chemikálie

Hyaluronan sodný: Contipro Biotech s.r.o. (Česká republika)

Použité šarže jsou uvedeny v tabulce (*Tabulka 1*).

Tabulka 1: Hyaluronan sodný použitý pro experimenty.

Hyaluronan sodný		
M _w kDa	Šarže	M _w (*) kDa
8–15	213-6147	9
300–500	213-6349	341
1 500–1 750	213-5226	1 635
	214-9062	1 616

M_w (*) je molekulová hmotnost získaná pomocí HPLC/SEC-MALS analýzy provedenou výrobcem.

Seznam použitých chemikálií je zobrazen v tabulce (*Tabulka 2*).

Tabulka 2: Použité chemikálie.

Chemikálie	Vlastnosti
L-lysin	Sigma Aldrich (Německo), 98% TLC, CAS: 56-87-1, šarže BCBL1852V
L-arginin	Sigma Aldrich (Německo), 99,5% NT, CAS: 74-79-3, šarže BCBB9650
6-aminokapronová kyselina	Sigma Aldrich (Německo), 99%, CAS: 60-32-2, šarže 038K0716
L-arginin monohydrochlorid	Sigma Aldrich (Německo), 98,5-101 %, CAS 1119-34-2, šarže BCBC4471V
Polystyren sulfonát sodný	Sigma Aldrich (Belgie), CAS: 25704-18-1 šarže BCBL4875V, střední M _w 70 kDa
Chlorid sodný	Lachner (Česká republika), CAS: 7647-14-5, čistota 99,5 %
Dihydrogenfosforečnan draselný	Lachner (Česká republika), CAS: 7778-77-0, čistota 99 %
Hydrogenfosforečnan draselný	Lachner (Česká republika), CAS: 7758-11-4, čistota 99 %

2.2 Příprava roztoků

2.2.1 Příprava zásobního roztoku PBS

Pro přípravu zásobního roztoku fosfátového pufru bylo v 1000 ml ultra čisté deionizované vodě z přístroje PURELAB rozpuštěno 2,83 g K_2HPO_4 , 0,19 g KH_2PO_4 a 8 g NaCl. Roztok byl pro dokonalé promíchání ponechán před použitím 24 h na míchačce v uzavřené nádobě.

2.2.2 Příprava roztoků hyaluronanu a polystyren sulfonátu sodného

Roztoky hyaluronanu používané v práci o koncentraci 0,1 %hm pro molekulové hmotnosti 1 616 kDa, 1 635 kDa, 341 kDa i 9 kDa byly připravovány přímým rozpouštěním hyaluronanu v ultračisté deionizované vodě z přístroje PURELAB. Tato voda byla používána i při přípravě všech dalších roztoků a měření. Všechny komponenty roztoků, tedy hyaluronan i voda, byly během přípravy váženy. Roztoky byly před měřením ponechány 24 h v uzavřené nádobě míchat při laboratorní teplotě. Pokud vzorky nebylo možné změřit ihned, byly uchovávány v chladničce při teplotě do 5 °C v uzavřených nádobách po dobu maximálně jednoho týdne z důvodů zamezení možné degradace hyaluronanu [66].

Obdobně jako v případě vodných roztoků se postupovalo i v případě roztoků připravovaných v prostředí PBS.

Roztoky polystyren sulfonátu sodného (NaPSS) byly připravovány jako srovnávací k roztokům hyaluronanu o koncentraci 0,1 %hm. Byla zvolena taková koncentrace, aby počet záporně nabitých skupin v roztocích hyaluronanů odpovídal počtu záporně nabitých skupin v roztoku NaPSS. Vzhledem k rozdílné molekulové hmotnosti monomeru (hyaluronan $M_r = 401,3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ a NaPSS $M_r = 206,2 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) bylo spočítáno množství záporně nabitých karboxylových skupin v 0,1 g hyaluronanu na $2,4919 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$. Pro stejný počet záporně nabitých sulfonových skupin v řetězci polystyren sulfonátu je třeba navážit 0,051 4 g NaPSS. Výsledná koncentrace NaPSS tedy byla stanovena na 0,051 4 %hm. Vzorky byly připravovány stejným způsobem jako v případě roztoků hyaluronanu, tedy přesným navažováním obou komponent roztoku na analytických vahách, jak NaPSS v podobě nažloutlého prášku, tak ultračisté deionizované vody z přístroje PURELAB.

2.2.3 Příprava roztoků aminokyselin

Roztoky čistých aminokyselin byly připravovány v odměrných baňkách přímým rozpouštěním dané aminokyseliny (lysinu, argininu, 6-aminokapronové kyseliny nebo arginin hydrochloridu) v ultračisté deionizované vodě z přístroje PURELAB. Všechny aminokyseliny ve formě prášku byly během přípravy váženy, tak aby výsledná koncentrace aminokyseliny v roztoku byla 6, 350 nebo 400 mM.

Roztoky obsahující hyaluronan nebo polystyren sulfonát s aminokyselinou rozpuštěné v ultračisté vodě byly připravovány obdobným způsobem. Nejprve byl připraven roztok aminokyseliny o požadované koncentraci v odměrné baňce a po dokonalém promíchání byl přidáván k přesně naváženému hyaluronanu tak, aby koncentrace hyaluronanu byla vždy 0,1 %hm. V případě NaPSS se jednalo o koncentraci 0,051 4 %hm. Následně byl vzorek ponechán 24 h na míchačce v uzavřené nádobě při laboratorní teplotě.

Obdobně jako v případě vodných roztoků se postupovalo i v případě roztoků připravovaných v prostředí PBS.

2.3 Automatické titrace, měření pH a vodivosti

Automatické titrace byly realizovány pomocí automatického titrátoru (Schott Instruments: Titronic Universal), který byl propojený s pH metrem Mettler Toledo (skleněná elektroda Metrohm 6.0256.100) a vodivostní elektrodou (Mettler Toledo InLab 731). Před použitím byl pH metr kalibrován pomocí tří kalibračních pufrů v předpokládaném rozsahu měřeného pH, temperovaných na 25 °C. K přesnému objemu vzorku (32,5 ml) obsahujícímu buď hyaluronan, hyaluronan s aminokyselinou nebo NaPSS čistý nebo v kombinaci s některou z aminokyselin, případně roztok samotné aminokyseliny rozpuštěné buď v čisté vodě nebo v PBS, byla v malých objemech (0,05 ml/60 s) přiváděna 0,1 M HCl a za stálého míchání vzorku byla kontinuálně měřena vodivost a pH. Koncentrace aminokyseliny v roztocích pro tato měření měla koncentraci vždy 6 mM. Získaná data byla vynášena do grafu, kde na ose y byly zobrazeny hodnoty naměřeného pH resp. vodivosti a na ose x objem přidané kyseliny chlorovodíkové.

2.4 Měření dynamického rozptylu světla a zeta potenciálu

Pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS od společnosti Malvern Instruments a titrační jednotky MPT-2 Autotitrátor byly prováděny automatické titrace hyaluronanu o koncentraci 0,1 %hm a molekulových hmotnostech 9, 1 616 a 1 635 kDa roztoky Arg a Arg hydrochloridu

o koncentracích 0,2 a 0,4 M. Byly zaznamenávány hodnoty velikosti částic, zeta potenciálu a pH. Měření probíhalo při teplotě 25 °C v průtočné cele (DTS 1070). Objem hyaluronanu pro titraci byl stanoven na 10 ml. Získaná data velikosti koloidních částic a zeta potenciálu byla vynášena proti koncentraci titračního činidla.

2.5 Měření ultrazvukové rychlosti a zeslabení

Ke zkoumání interakcí mezi hyaluronanem a aminokyselinami byl použit přístroj HRUS 102, od firmy Ultrasonic Scientific, Irsko. Všechny vzorky byly měřeny na třech frekvencích v rozsahu 2,5–15,0 MHz, přičemž platí, že harmonická čísla píků, která se počítají jako podíl frekvence píku a rozdílu frekvencí dvou sousedních píků, byla stejná pro všechny měřené vzorky a referenční médium. Čísla píků, při kterých probíhalo měření, byla 22,46; 94,30 a 121,00. Protože měření na ultrazvukovém spektrometru jsou prováděna jako komparativní [52], byly všechny vzorky měřeny proti čistému rozpouštědлу, tedy vodě.

Do přístroje byl dávkován vždy přesně jeden mililitr odplyněného vzorku. Odplynění bylo prováděno na centrifuze při 3 000 ot/min po dobu 5 minut.

2.5.1 Titrační měření

Přístroj HRUS 102 umožňuje provádět řadu různých druhů měření, jako je kinetické (za konstantní teploty), titrační nebo měření v teplotním režimu [52]. V experimentální části této práce byly kombinovány dva typy měření, a to měření kinetické při 25 °C a titrační, kdy se za stálé teploty přiváděl roztok aminokyseliny (titru) k roztoku hyaluronanu v měrné cele. Teplota roztoků v celách byla kontrolována pomocí termostatu s vodní lázní Thermo Haake Phoenix s přesností $\pm 0,01$ °C.

Během titračního měření byla aplikována jednak titrace s manuálním přidáváním aminokyseliny (**Obrázek 18**) pouze se spodním mícháním (400 ot/min) měřeného roztoku v cele.

Pro přidávání roztoku aminokyseliny byla využita Hamilton syringe o objemu 100 μ l a minimální velikosti přídatku 2 μ l.

Velikost přídatku titračního činidla byla 2 μ l respektive 6 μ l. Po přídatku bylo zapnuto spodní míchání po dobu 3 minut pro dokonalé promísení vzorku, následované ustalováním vzorku po dobu 6 min, tak aby data ultrazvukové rychlosti a zeslabení využitá pro vyhodnocení byla stabilní. Pro vyhodnocení byly odečítány vždy tři poslední ustálené hodnoty relativní rychlosti i zeslabení.



Obrázek 18: Systém pro manuální přidávání aminokyselin.

2.6 Vyhodnocení dat a diskuze

2.6.1 Titrace prováděné na ultrazvukovém spektrometru

Na ultrazvukovém spektrometru byly prováděny dva základní typy titrací. V první řadě se jedná o titrace, během kterých bylo přidáváno titrační činidlo do koncentrace 14,107 5 mM (42 μ l titračního činidla). V druhém případě byl koncentrační rozsah navýšen až na koncentraci 30,656 9 mM (96 μ l titračního činidla). Nižší rozsah koncentrací znamená přibližně 5,9 molekul aminokyseliny na jednu nabitou disacharidovou jednotku hyaluronanu, případně monomer NaPSS. V případě vyšší koncentrace je přebytek asi 12,8 molekul aminokyseliny na jeden záporný náboj hyaluronanu, resp. NaPSS.

Výsledné závislosti jsou průměrem tří opakovaných měření pro každou titraci. V programu MS Excel byly k jednotlivým hodnotám stanoveny směrodatné odchylky, která jsou v grafech znázorněné pomocí chybových úseček. Data relativních rychlostí byla vyhodnocena pomocí statistického programu QC Expert 3.3 software (TriloByte, Czech Republic). V naměřených

závislostech nezáleží na frekvenci, při které je vzorek měřen. Proto jsou uváděny pouze výsledky z měření na čísle píku (č. p.) 94,3.

2.6.1.1 *Ultrazvuková rychlost, 42 μ l titračního činidla*

Naměřená data (**Obrázek 19**) popisují závislost relativní rychlosti zvukové vlny procházející vzorkem v závislosti na koncentraci přidaného titračního činidla – arginin hydrochloridu a prostředí, do kterého byl titrován. Obecně platí, že výchozí roztoky hyaluronanu měly vždy koncentraci 0,1 %hm, roztoky NaPSS pak 0,051 4 %hm a v měrné cele se nacházel vždy 1 ml roztoku. Výsledkem je pro každé prostředí lineárně rostoucí závislost. Všechny lineární závislosti jsou popsány v tabulce (**Tabulka 3**).

Graf na obrázku (**Obrázek 19**) zároveň ilustruje, že velikost relativní rychlosti je závislá nejen na množství přidaného Arg hydrochloridu, ale také na prostředí, do kterého je přidáván.

Koncentrační inkrement $\left(\frac{0,001\text{m}^4}{\text{s} \cdot \text{mol}} \right)$ (směrnice) pro prostředí hyaluronanu o molekulové

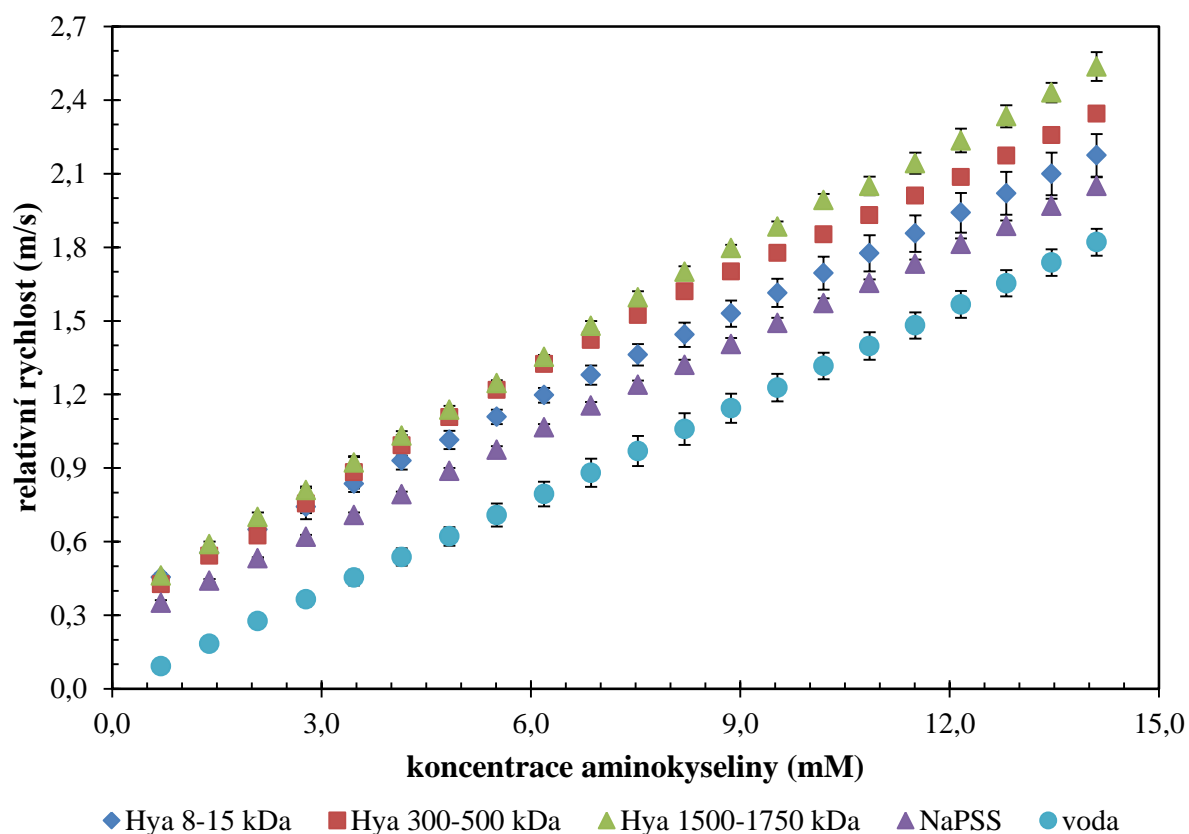
hmotnosti 9 kDa, NaPSS a vody (**Tabulka 3**) je při uvažování odchylek téměř shodný, liší se pouze úsek, který přímky vytýkají na ose y. Titrace do prostředí vody mají úsek přibližně kolem hodnoty 0 m/s, což se jeví jako správné s ohledem na skutečnost, že měření probíhá jako komparativní a ve srovnávací cele bylo pro všechna měření umístěno čisté disperzní prostředí, tedy také voda. Polystyren sulfonát má hodnotu úseku nižší v porovnání s roztoky hyaluronanu, neboť jeho roztok měl koncentraci pouze 0,051 4 %hm na rozdíl od 0,1%hm roztoků hyaluronanu.

U molekulových hmotností hyaluronanů 341 a 1 635 kDa však dochází k růstu velikosti směrnice s rostoucí molekulovou hmotností. V případě hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1 635 kDa je rozdíl mezi slepou titrací a titrací do prostředí polyaniontu přibližně

$0,025 \frac{0,001\text{m}^4}{\text{s} \cdot \text{mol}}$, u nižší molekulové hmotnosti 341 kDa pak $0,0136 \frac{0,001\text{m}^4}{\text{s} \cdot \text{mol}}$. Úsek na ose y

však pro obě molekulové hmotnosti zůstává ve shodě s nízkomolekulárním hyaluronanem. Tento odklon směrnic od směrnic slepých titrací by mohl ukazovat na změnu v uspořádání molekul v roztoku. V případě této práce by se tedy mohlo jednat právě o vizualizaci elektrostatických interakcí. Tato skutečnost by mohla naznačovat, že čím vyšší je koncentrační inkrement v porovnání se slepou titrací, tím větší je míra interakcí elektrostatických interakcí mezi polymerem a aminokyselinou.

Obdobné lineární závislosti byly naměřeny i v případě argininu. Výsledky včetně směrnic jsou uvedeny v příloze (**Obrázek P 1, Tabulka P 1**).



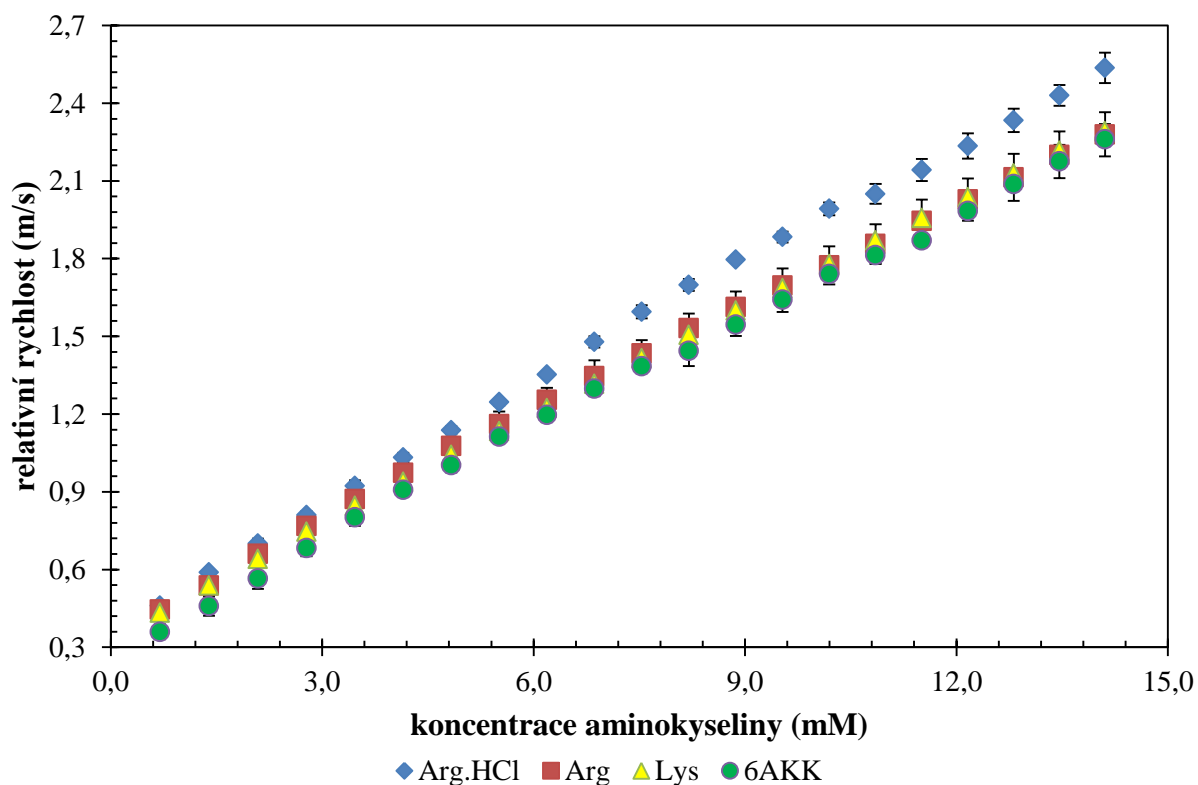
Obrázek 19: Graf znázorňující velikosti relativní rychlosti v závislosti na koncentraci přidaného Arg hydrochloridu a druhu titrovaného roztoku (č. p. 94,3).

Tabulka 3: Směrnicové tvary přímek vzniklé proložení naměřených dat během titrací Arg hydrochloridu pro jednotlivá prostředí, spolu s vícenásobným korelačním koeficientem.

Arg hydrochlorid	směrnicový tvar přímky				
	směrnice	odchylka směrnice	úsek (osa y)	odchylka úseku (osa y)	vícenásobný korelační koeficient
Hya 1 500–1 750 kDa	0,153 6	0,001 1	0,394 5	0,009 5	0,998 4
Hya 300–500 kDa	0,142 2	0,001 5	0,390 8	0,013 1	0,996 4
Hya 8–15 kDa	0,127 6	0,001 4	0,390 8	0,012 3	0,996 0
NaPSS	0,126 9	0,000 5	0,271 0	0,004 6	0,999 4
voda	0,128 6	0,001 2	0,003 0	0,010 5	0,997 1

Data z grafu (**Obrázek 20**) ukazují titrace různých aminokyselin do prostředí hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1 635 kDa. Je patrné, že velikost relativní rychlosti nezáleží na druhu

přidávané aminokyseliny, ale pouze na její koncentraci. Všechny naměřené závislosti pro vysokomolekulární hyaluronan byly vyhodnoceny jako lineární a výsledné směrnice tvaru přímeek, včetně odchylek a vícenásobného koeficientu spolehlivosti, jsou zaznamenány v tabulce (**Tabulka 4**). Výrazně vyšší hodnota směrnice (koncentračního inkrementu) lineární závislosti (**Tabulka 4**) oproti ostatním aminokyselinám včetně samotného argininu v případě přidavků Arg hydrochloridu je pravděpodobně způsobena obsahem chloridových aniontů přidávaných do roztoku spolu s argininem. V porovnání se slepými titracemi (**Obrázek P 3**, **Tabulka P 3**) mají všechny titrace téměř stejnou odchylku koncentračního inkrementu, tato hodnota se pohybuje kolem $0,025 \cdot 0 \frac{0,001\text{m}^4}{\text{s} \cdot \text{mol}}$. Nejvyšší hodnoty dosahuje u Lys $0,025 \cdot 8 \frac{0,001\text{m}^4}{\text{s} \cdot \text{mol}}$, nejnižší naopak u Arg $0,024 \cdot 1 \frac{0,001\text{m}^4}{\text{s} \cdot \text{mol}}$. Rozdíly mezi jednotlivými titračními činidly jsou velmi malé a při uvažování směrodatných odchylek zanedbatelné.



Obrázek 20: Graf znázorňující velikosti relativní rychlosti na koncentraci přidaného titračního činidla pro prostředí roztoku hyaluronanu 1 500–1 750 kDa (č. p. 94,3).

Tabulka 4: Směrnice tvary přímek vzniklé proložením naměřených dat během titrací různých titračních činidel do prostředí hyaluronanu 1 500–1 750 kDa.

Hya 1 500–1 750 kDa	směrnice tvar přímky				
Titrační činidlo	směrnice	odchylka směrnice	úsek (osa y)	odchylka úseku (osa y)	vícenásobný korelační koeficient
Arg.HCl	0,153 6	0,001 1	0,394 5	0,009 5	0,998 4
Arg	0,135 5	0,001 7	0,394 1	0,014 5	0,995 2
Lys	0,138 6	0,000 5	0,360 0	0,004 6	0,999 5
6AKK	0,139 7	0,001 1	0,304 0	0,009 6	0,998 0

V příloze na grafu (**Obrázek P 2**) jsou znázorněny obdobné lineární závislosti, které jsou popsány pomocí přímek (**Tabulka P 2**) pro titrace aminokyselin do prostředí NaPSS. Nejvyšší koncentrační inkrement má opět arginin hydrochlorid. Při porovnání jednotlivých inkrementů s inkrementy získanými titracemi do vody (**Tabulka P 3**) však zjistíme, že pouze 6AKK má vyšší koncentrační inkrement při titraci do roztoku NaPSS než při titraci do vody. Tento rozdíl inkrementů je však v porovnání s roztoky vysokomolekulárního hyaluronanu výrazně nižší a činí přibližně $0,0043 \frac{0,001\text{m}^4}{\text{s} \cdot \text{mol}}$.

Slepé titrace, tedy titrace aminokyselin do vody, včetně lineárních směrnic těchto závislostí jsou umístěny v příloze (**Obrázek P 3, Tabulka P 3**). I v tomto případě je vidět odklon velikosti koncentračního inkrementu v případě Arg hydrochloridu od ostatních inkrementů aminokyselin a zároveň mírný odklon 6AKK od argininu a lysinu. Velikost rozdílu je však v tomto případě poměrně malá.

Vyšší koncentrační inkrement v případě 6AKK titrované do NaPSS v porovnání s vodou by tedy bylo možné vysvětlit rozdílnou strukturou této molekuly oproti ostatním použitým aminokyselinám. Vzhledem k menší velikosti molekuly v porovnání s Arg a Lys je možné, že díky struktuře NaPSS, který ve svém řetězci nese nabitou sulfonovou skupinu na každém monomeru, je pro aminokapronovou kyselinu snazší dosáhnout interakcí v porovnání s Arg a Lys díky sterickým důvodům. U řetězců hyaluronanu tato skutečnost neplatí, neboť je náboj v řetězci umístěn na každé druhé disacharidové jednotce, tedy ve větší vzdálenosti od sebe.

2.6.1.2 *Ultrazvuková rychlost, 96 μ l titračního činidla*

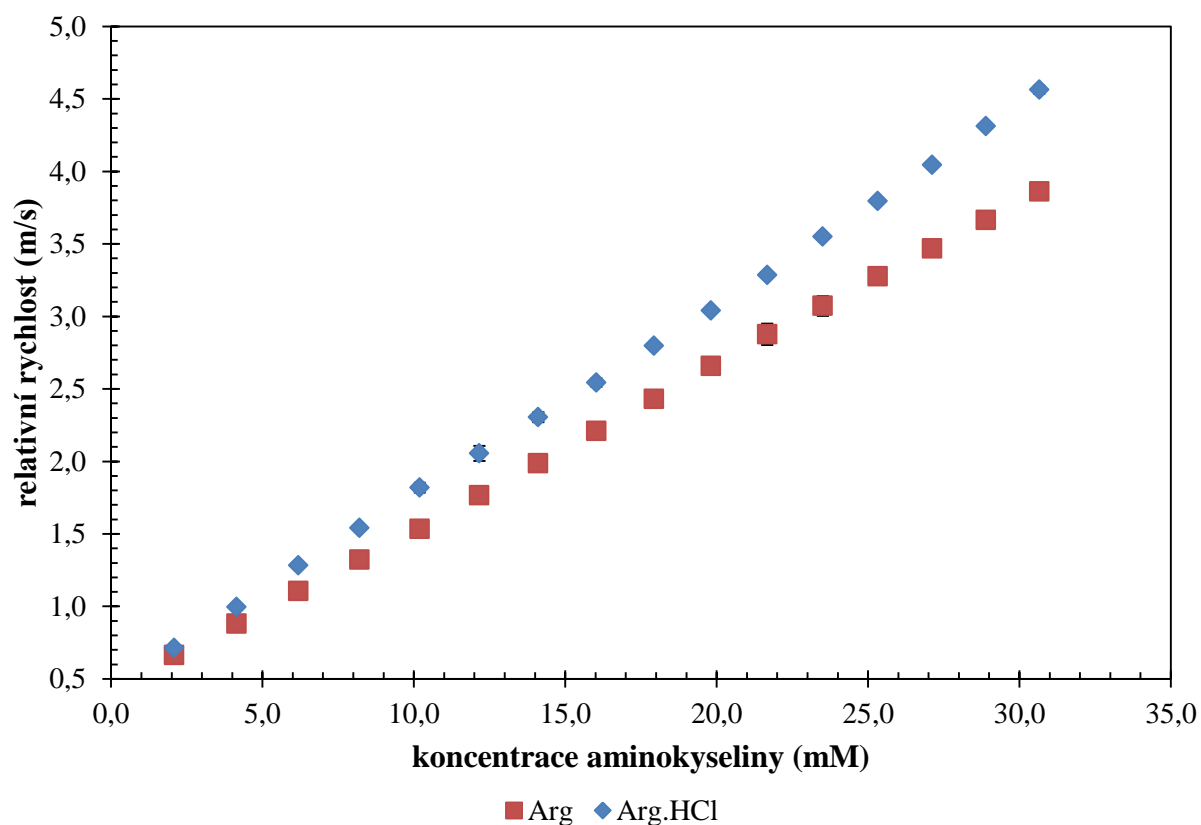
Titrace s větším objemem titračního činidla byly prováděny pouze s Arg a Arg hydrochloridem do roztoků hyaluronanu o molekulové hmotnosti 9 a 1 635 kDa. Cílem těchto titrací bylo určit, zda ani při vyšší koncentraci aminokyseliny nedochází ke změně lineárně rostoucí závislosti relativní rychlosti na koncentraci titračního činidla.

Obdobně jako v případě titrací v nízkém rozmezí koncentrací i zde byla výsledná závislost relativní rychlosti na koncentraci přidané aminokyseliny lineárně rostoucí.

Graf (**Obrázek 21**) zobrazuje tuto závislost pro nízkomolekulární hyaluronan. Stejně jako u titrací s menším objemem titračního činidla je koncentrační inkrement výrazně vyšší v případě Arg hydrochloridu, jak ukazuje **Tabulka 5**. Ve shodě s těmito pozorováními jsou i data zobrazená v příloze (**Obrázek P 4, Tabulka P 4**) pro vysokomolekulární hyaluronan.

Při srovnání koncentračních inkrementů odpovídajících titrací aminokyselin o objemu přídatku 2 μ l a 6 μ l, dojdeme k závěru, že jsou jak pro Arg, tak pro Arg hydrochlorid vyšší v případě titrací s větším přidaným objemem. Tento trend je patrný především pro vysokomolekulární hyaluronan (**Tabulka P 4**) v případě Arg hydrochloridu. Tato skutečnost by mohla být způsobena větším přidaným objemem titračního činidla v jednom přídatku (6 μ l) v kombinaci se zachováním času míchání a ustalování. Při zkoumání velikosti koncentračního inkrementu je tedy pravděpodobně přesnější uvažovat naměřené závislosti s menšími přídatky, neboť se domnívám, že data získaná z těchto titrací budou přesnější.

Rozdíl mezi koncentračními inkrementy zde nebyl uvažován, neboť slepé titrace s větším přidaným objemem nebyly realizovány.



Obrázek 21: Graf znázorňující velikosti relativní rychlosti na koncentraci přidaného titračního činidla pro prostředí roztoku hyaluronanu 8–15 kDa (č. p. 94,3).

Tabulka 5: Směrnivé tvary přímek vzniklé proložením naměřených dat během titrací různých titračních činidel do prostředí hyaluronanu 8–15 kDa.

Hya 8–15 kDa	směrnivý tvar přímky				
Titrační činidlo	směrnice	odchylka směrnice	úsek (osa y)	odchylka úseku (osa y)	vícenásobný korelační koeficient
Arg.HCl	0,133 0	0,000 4	0,436 2	0,006 7	0,999 7
Arg	0,113 0	0,000 4	0,405 2	0,008 5	0,999 3

Z výsledků pro oba druhy titrací je patrné, že nedochází k žádným změnám v závislosti relativní rychlosti na koncentraci přidané aminokyseliny. Ta zůstává lineárně rostoucí v celém rozsahu, na rozdíl od titrací s tenzidy, kdy dochází k výrazným změnám v závislosti na koncentraci přidaného tenzidu [20]. Domnívám se, že tento rozdíl bude způsoben rozdílnou stavbou tenzidů v porovnání s aminokyselinami.

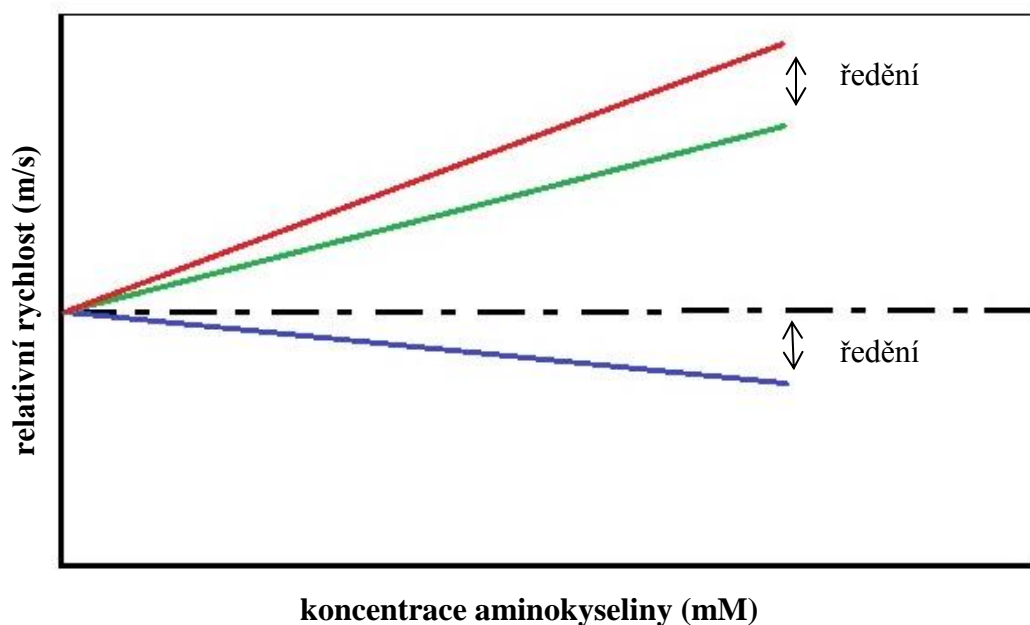
Díky přítomnosti hydrofobní a hydrofilní části tenzidu dochází během zvyšování jeho koncentrace k hromadění tenzidu nejprve na mezifázovém rozhraní, s dalším zvyšováním koncentrace pak k vytváření micel, jak dobře ilustruje **Obrázek 6**. Proto během titrací s tenzidy nastává tolik změn v relativní rychlosti, neboť relativní rychlost reaguje na množství tenzidu přítomného v roztoku (**Obrázek 16**), ať už volného nebo ve formě micel, a ta se s rostoucí koncentrací mění nelineárně.

Je tedy patrné, že aminokyselina, která je ve vodném prostředí nabitá na opačných koncích molekuly, během přikapávání do roztoku hyaluronanu nebo NaPSS pouze přímo úměrně zvyšuje svoji koncentraci v roztoku a tím i relativní rychlost. To vede k lineárnímu nárůstu relativní rychlosti.

Důležitým znakem při zkoumání elektrostatických interakcí mezi aminokyselinami a záporně nabitými polymery by se tedy mohly stát rozdíly mezi koncentračními inkrementy u slepých titrací a odpovídajících titrací do prostředí polyaniontů.

2.6.1.3 Ředění roztoků v důsledku titrace

Pokud budeme uvažovat, že odklon směrnice závislosti relativní rychlosti na koncentraci titračního činidla od slepých titrací znamená vyjádření míry interakcí, jako jediný interagující polymer se jeví hyaluronan o molekulových hmotnostech 341 a 1 635 kDa (**Obrázek 19** a **Obrázek P 1**). V případě NaPSS je jako jedinou interagující látku možné uvažovat 6AKK. Zředováním roztoků hyaluronanu nebo NaPSS vodou obsaženou v přidávaném roztoku titračního činidla by mělo docházet ke snižování relativní rychlosti. Naopak přidávkem malých rigidních molekul a iontů dochází k jejímu zvyšování. Vzhledem k experimentálně stanovené rovnici $y = 3,601 \cdot x + 0,042$ [49], která odhaluje závislost mezi relativní rychlostí zvukových vln procházejících roztokem hyaluronanu na jeho koncentraci v %hm, znamená zředění hyaluronanu o 4,08 % hm změnu relativní rychlosti o 0,014 7 m/s v případě titrací s přidávkem 42 μ l. U titrací s přidaným objemem 96 μ l je změna koncentrace 8,79 %hm, které odpovídá změna relativní rychlosti 0,031 6 m/s. Tyto změny v relativní rychlosti v důsledku ředění vzorků ilustruje **Obrázek 22**.



- Změna relativní rychlosti v důsledku ředění polymeru.
- Naměřené hodnoty relativní rychlosti během titrace.
- Velikost relativní rychlosti při uvažování ředění.

Obrázek 22: Schématické znázornění změny relativní rychlosti v důsledku ředění roztoků během titrace.

Pro výpočet míry změny relativní rychlosti bylo nutné provést vážení jednotlivých roztoků během titrace. **Tabulka P 5** ukazuje jednotlivá data z měření hmotnosti 1 ml roztoků hyaluronanu. Z naměřených hodnot byly vypočítány průměr a směrodatná odchylka. Hodnota průměru pak byla použita pro další výpočty. Zároveň bylo během měření zjištěno, že hmotnost roztoku nezávisí na molekulové hmotnosti hyaluronanu, ze které byl roztok připraven. Data v tabulce (**Tabulka P 6**) ukazují hmotnosti roztoků aminokyselin. Pro stanovení hmotnosti přídatku 2 a 6 μl jednotlivých titračních činidel byly váženy tyto roztoky po pěti přídavicích, tedy 10 μl . Přídatky byly uskutečněny pomocí stejné Hamilton syringe, kterou byly dávkovány během titrací do roztoků polymerů.

Na základě těchto výsledků byly přepočítány průměrné hodnoty koncentrací vzorků a následně pomocí rovnice $y = 3,601 \cdot x + 0,042$ [49] i velikost relativní rychlosti. Získaná data byla vynesena do grafů s upravenou hodnotou relativní rychlosti, jak ukazují vybrané grafy na obrázcích (**Obrázek P 5**, **Obrázek P 6** a **Obrázek P 7**), a k nim byla pomocí programu QC expert doplněna příslušná vyhodnocení lineárních závislostí (**Tabulka P 7**, **Tabulka P 8**, **Tabulka P 9**).

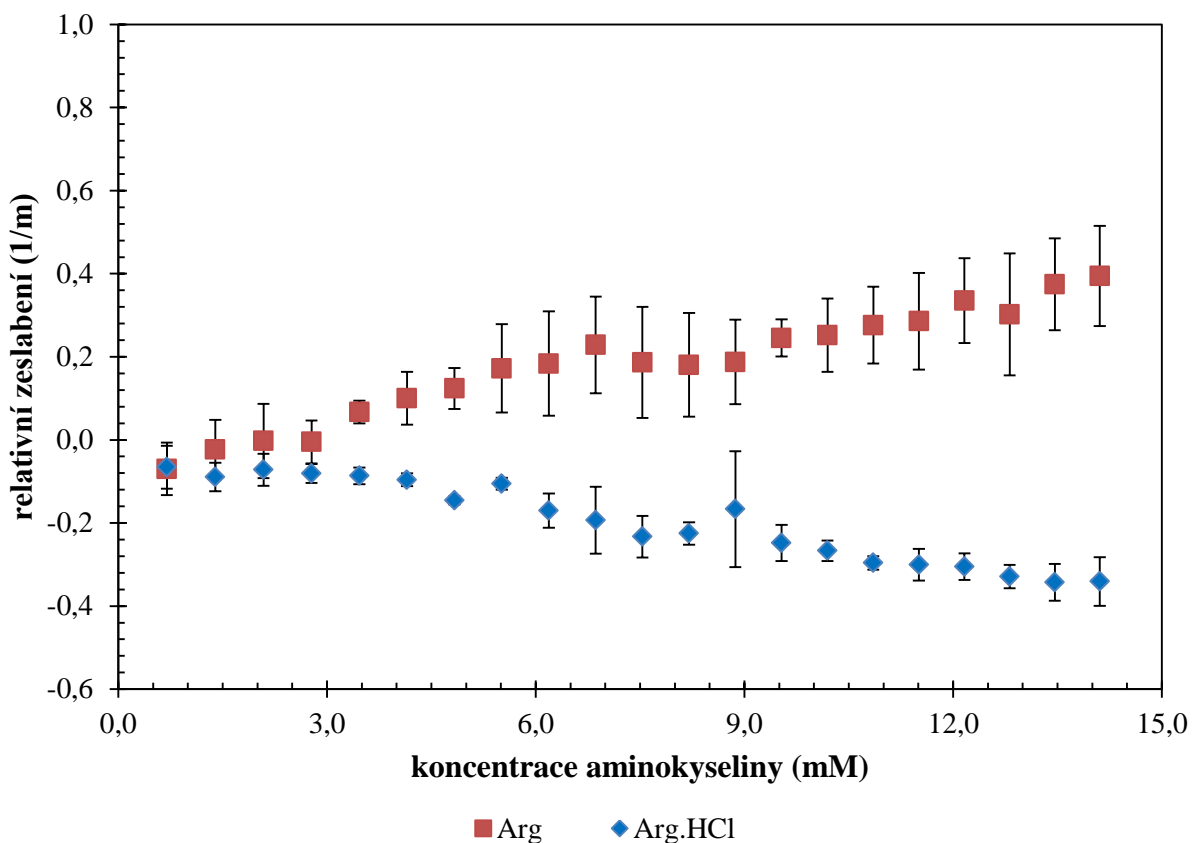
Ze zjištěných velikostí koncentračních inkrementů, které jsou ve všech případech přibližně o $0,001 \cdot \frac{0,001 \text{m}^4}{\text{s} \cdot \text{mol}}$ větší v porovnání s příslušnými koncentračními inkrementy bez uvažování ředění, je možné se domnívat, že v případě roztoků hyaluronanu nehraje ředění významnou roli, neboť v mnoha případech je velikost směrodatné odchylky koncentračního inkrementu větší než rozdíl mezi koncentračními inkrementy s ředěním a bez něho.

V případě roztoků polystyren sulfonátu nebyla stanovena obdobná experimentální rovnice jako pro roztoky hyaluronanu a nebylo tedy možné spočítat případný vliv ředění.

2.6.1.4 Ultrazvukové zeslabení

Spolu s měřením ultrazvukové rychlosti bylo u všech titrací měřeno i zeslabení zvukových vln během průchodu vzorkem.

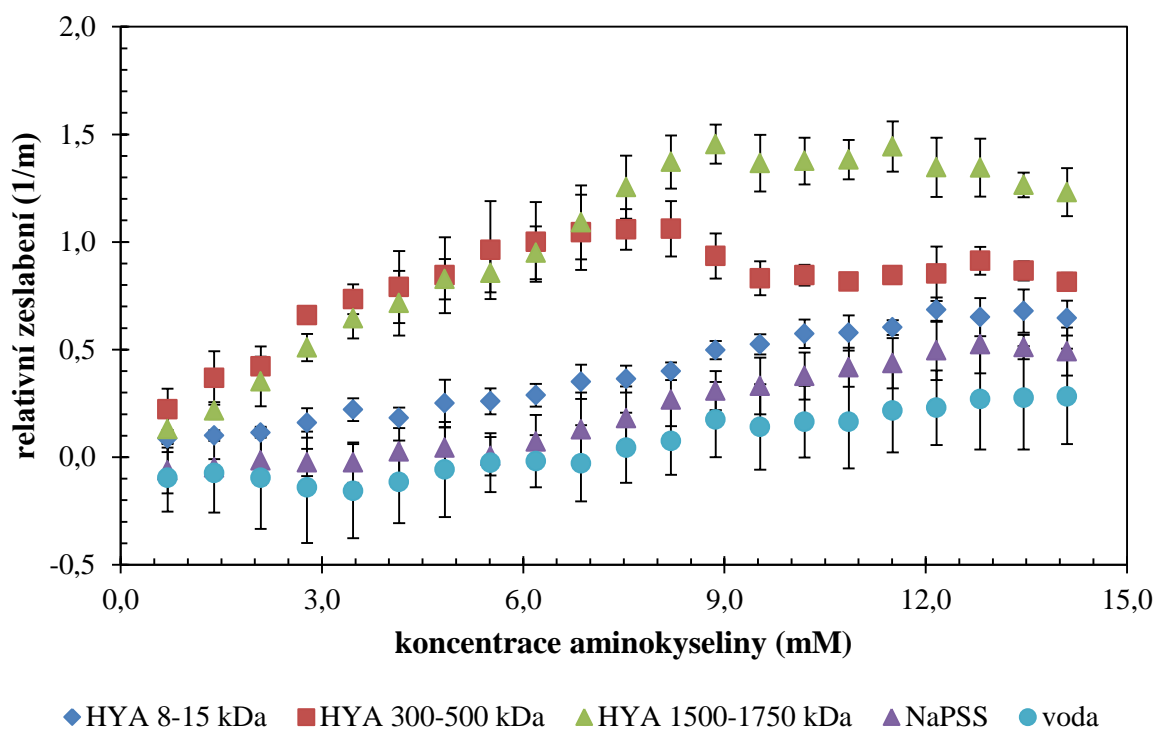
Při srovnání s daty získanými měřeními relativní rychlosti je však patrná mnohem větší odchylka v rámci jednotlivých měření, vyjádřená pomocí chybových úseček. Tato skutečnost je navíc velmi dobře patrná z dat vyobrazených na obrázcích (**Obrázek 23**, **Obrázek P 9** a **Obrázek P 10**), které zobrazují velikost relativního zeslabení během titrací jednotlivých aminokyselin do vody. Z dat je možné usuzovat pouze na mírně snižující se relativní zeslabení s rostoucí koncentrací v případě Arg hydrochloridu, resp. na rostoucí relativní zeslabení u Arg. Hodnotám Lys i 6AKK vzhledem k velikosti chybových úseček není možné přiřadit žádný trend.



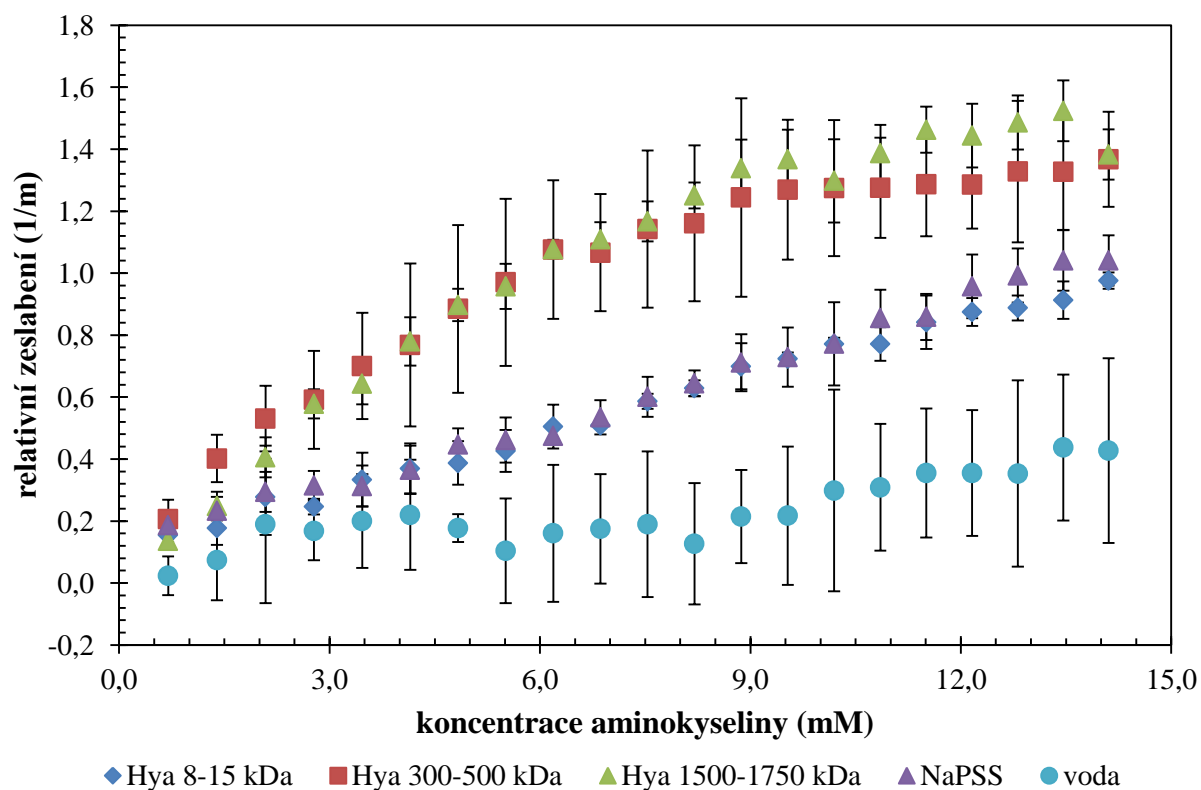
Obrázek 23: Graf znázorňující velikosti relativního zeslabení na koncentraci přidaného titračního činidla do vody (č. p. 94,3).

Data z grafů (**Obrázek 24**, **Obrázek 25**) znázorňují velikost relativního zeslabení pro rostoucí koncentraci Arg, resp. Arg hydrochloridu v závislosti na prostředí. Pro obě skupiny dat je společným znakem odlišná velikost relativního zeslabení pro hyaluronan o molekulových hmotnostech 341 a 1 635 kDa. V případě přidávaného Arg hydrochloridu nastává zlom u obou molekulových hmotností přibližně u koncentrace 8,2 mM, zatímco u čistého Arg je tento zlom posunut do koncentrace kolem 10 mM.

Ostatní polymery zobrazené na grafu (**Obrázek 24**), tedy NaPSS a hyaluronan o molekulové hmotnosti 9 kDa, kopírují trend vody a žádný výrazný zlom v jejich případě zaznamenán nebyl. Obdobně jako v případě dat vyobrazených na obrázku (**Obrázek 25**) je patrné, že u této dvojice polymerů k žádnému zlomu nedochází.



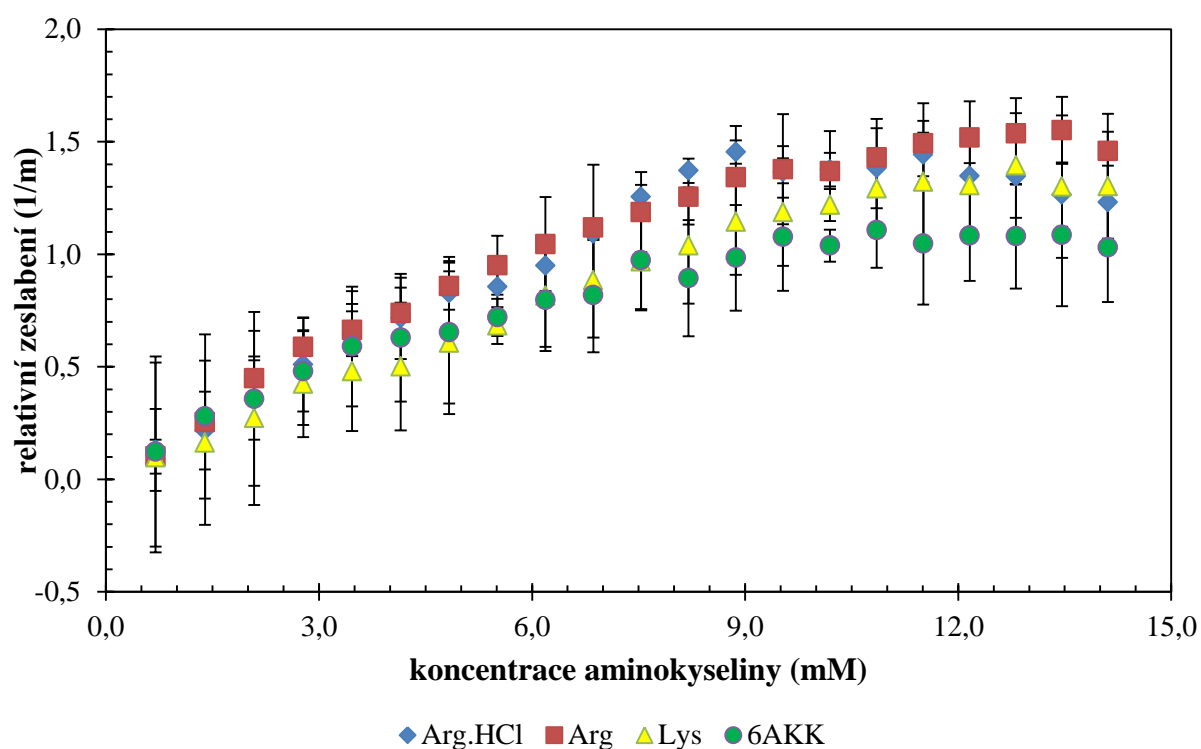
Obrázek 24: Graf znázorňující velikosti relativního zeslabení v závislosti na koncentraci přidaného Arg hydrochloridu a druhu titrovaného roztoku (č. p. 94,3).



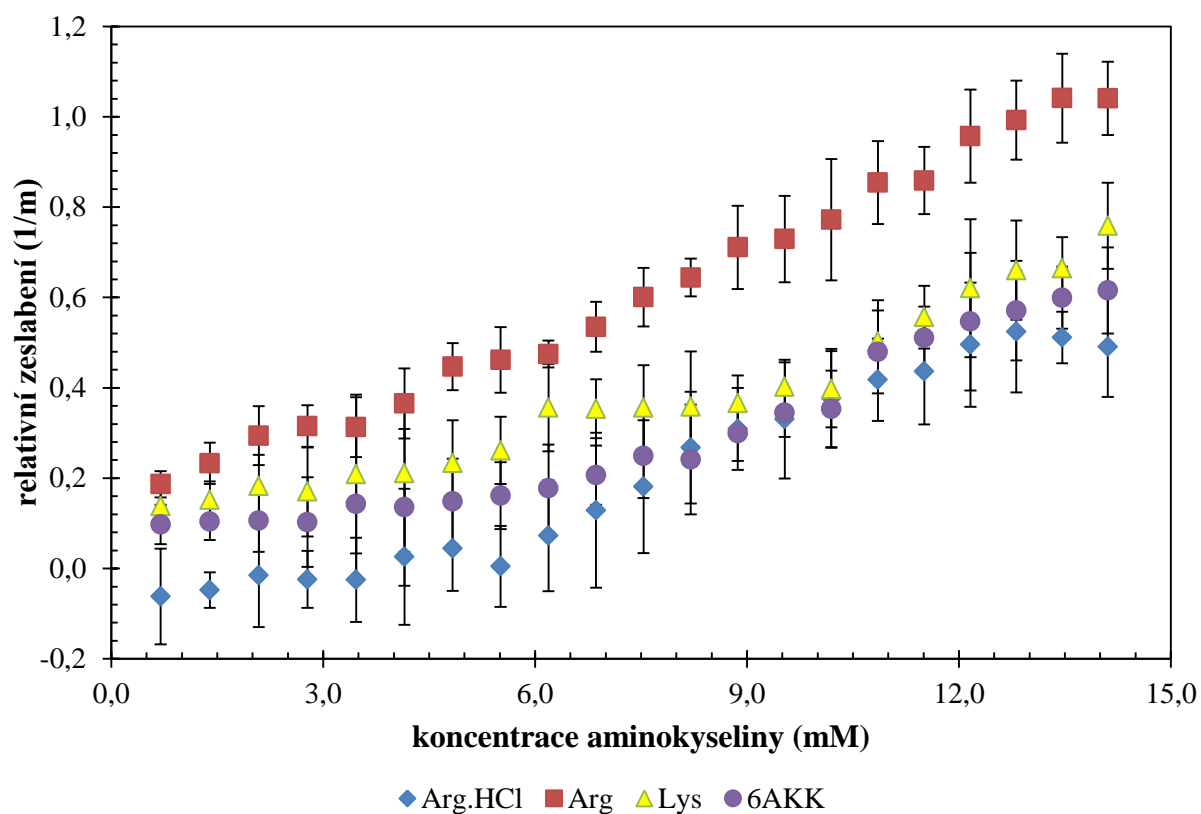
Obrázek 25: Graf znázorňující velikosti relativního zeslabení v závislosti na koncentraci přidaného Arg a druhu titrovaného roztoku (č. p. 94,3).

Toto pozorování je v souladu s daty uvedenými na grafech (**Obrázek 26**, **Obrázek 27**), které ukazují závislost relativního zeslabení na koncentraci pro jednotlivé přidané aminokyseliny v prostředí vysokomolekulárního hyaluronanu a polystyren sulfonátu.

Obrázek 26 dobře dokládá zlom v relativním zeslabení pro všechny aminokyseliny. V případě Arg hydrochloridu dochází ke zlomu dříve v porovnání s ostatními aminokyselinami při koncentraci přibližně 8,9 mM, zatímco u zbylých aminokyselin se zlom objevuje přibližně v oblasti 10,2 mM. Naopak graf na obrázku (**Obrázek 27**) znázorňuje velikost relativního zeslabení pro NaPSS během přidávání různých aminokyselin. Je patrné, že na rozdíl od přítomnosti vysokomolekulárního hyaluronanu v titrovaném roztoku zde ve studovaném koncentračním rozsahu nedochází k obdobnému zalomení.



Obrázek 26: Graf znázorňující velikosti relativního zeslabení na koncentraci přidaného titračního činidla pro prostředí roztoku hyaluronanu 1 500–1 750 kDa (č. p. 94,3).



Obrázek 27: Graf znázorňující velikosti relativního zeslabení na koncentraci přidaného titračního činidla pro prostředí roztoku NaPSS (č. p. 94,3).

Naměřené závislosti relativního zeslabení zvukových vln v závislosti na koncentraci aminokyseliny vykazují zlom především pro polymery hyaluronanu o molekulových hmotnostech v rozsahu 300–500 kDa a 1 500–1 750 kDa pro všechny studované aminokyseliny. Naopak u NaPSS a hyaluronanu s nejnižší molekulovou hmotností 9 kDa k žádnému podobnému zlomu nedochází.

Změna v závislosti relativní rychlosti by mohla mít dva různé důvody. Vzhledem k tomu, že je tato změna patrná především u hyaluronanu s konformací náhodného klubka [66], mohla by změna velikosti zeslabení zvukových vln souviset s konformační změnou ve struktuře polymeru díky postupnému vysycování vazných míst. Toto pozorování je zároveň ve shodě se závěry z vyhodnocování dat relativní rychlosti, kde byly předpokládány výrazné především s hyaluronanem o vysoké molekulové hmotnosti. V případě tyčinkovitých struktur hyaluronanu je možné, že během případných interakcí ke změnám ve struktuře nedochází. Je však potřeba brát v úvahu také velikost chybových úseček, které napovídají, že mnohem přesnějším parametrem pro vyhodnocování interakcí je v porovnání se zeslabením zvukových vln relativní rychlost.

Pokud bychom brali v úvahu závěry z měření relativního zeslabení, které by mohlo ukazovat na změny ve struktuře polymeru v důsledku interakcí, je možné, že u dat relativní rychlosti neznamena odklon koncentračního inkrementu od slepé titrace míru interakcí mezi polyanionty a titračním činidlem, ale právě vizualizaci těchto konformačních změn. Vzhledem k tomu, že u polymerů tyčinkovitého tvaru změna pravděpodobně neprobíhá, mají směrnici shodnou se slepou titrací, naopak u vysokomolekulárního hyaluronanu, který zaujímá konformaci náhodného klubka, je rozdíl mezi koncentračními inkrementy nezanedbatelný.

2.6.2 Titrace prováděné na DLS

Pomocí dynamického rozptylu světla byly zkoumány interakce hyaluronanu o molekulové hmotnosti 9 a 1 635 kDa každá s 0,2 M Arg a Arg hydrochloridem. V případě vysokomolekulárního hyaluronanu byla koncentrace aminokyselin navýšena na 0,4 M.

Prováděna byla vždy jedna titrace, během níž byly zaznamenávány hodnoty velikosti částic ve třech opakováních a hodnoty zeta potenciálu ve čtyřech opakováních. Z těchto hodnot byly vypočítány směrodatné odchylky pomocí programu MS Excel, které jsou v grafech znázorněny pomocí chybových úseček.

Hodnota Z-average, která byla zvolena pro charakterizaci velikosti částic, je definována jako průměrná velikost harmonické intenzity průměru částice. Takto získaná hodnota velikosti částic je srovnatelná s výsledky z ostatních technik pouze v případě, že se jedná o monodisperzní systém s částicemi sférického tvaru ve vhodném prostředí. Vzhledem k tomu, že je průměrná velikost částic vážena pátou mocninou, je měření citlivé na přítomnost velmi malého množství větších částic, které mohou zcela zastínit přítomnost menších agregátů. [63]

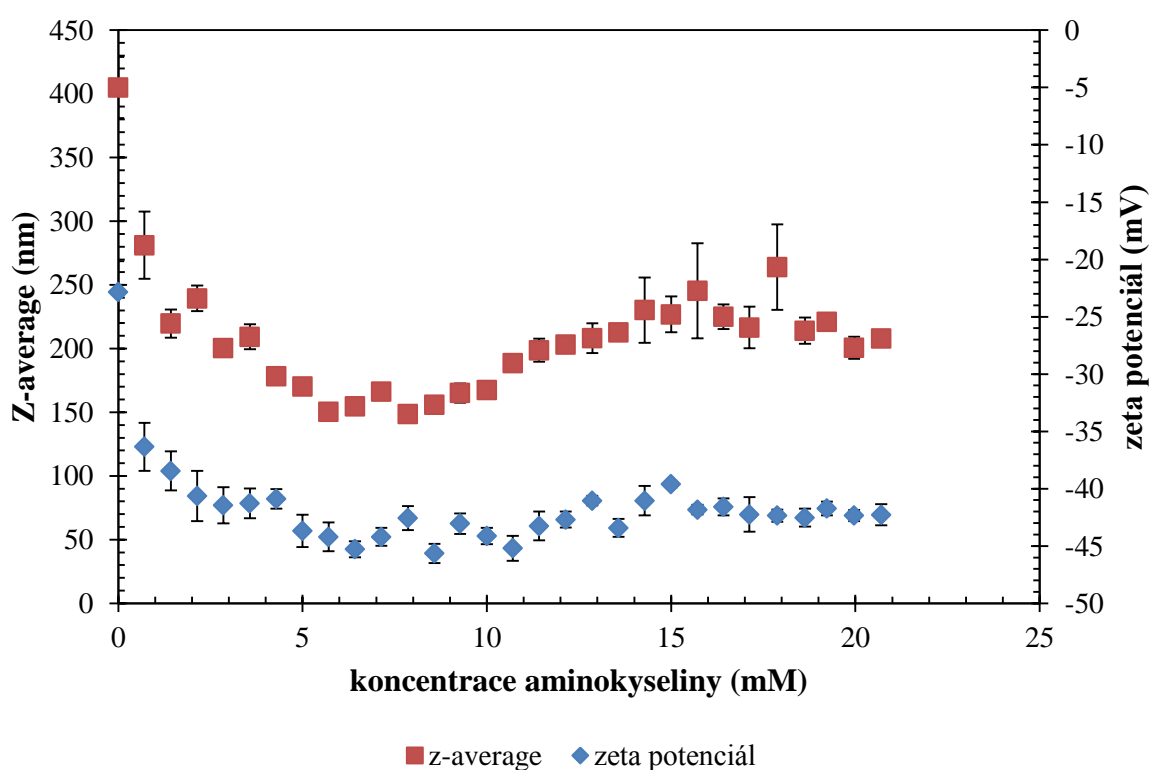
2.6.2.1 Titrace 0,2 M roztoky

Data v grafech zobrazují závislost velikosti částic (z-average) a zeta potenciálu na koncentraci přidávaného Arg (**Obrázek 28**) a Arg hydrochloridu (**Obrázek 29**) do prostředí hyaluronanu o molekulové hmotnosti 9 kDa.

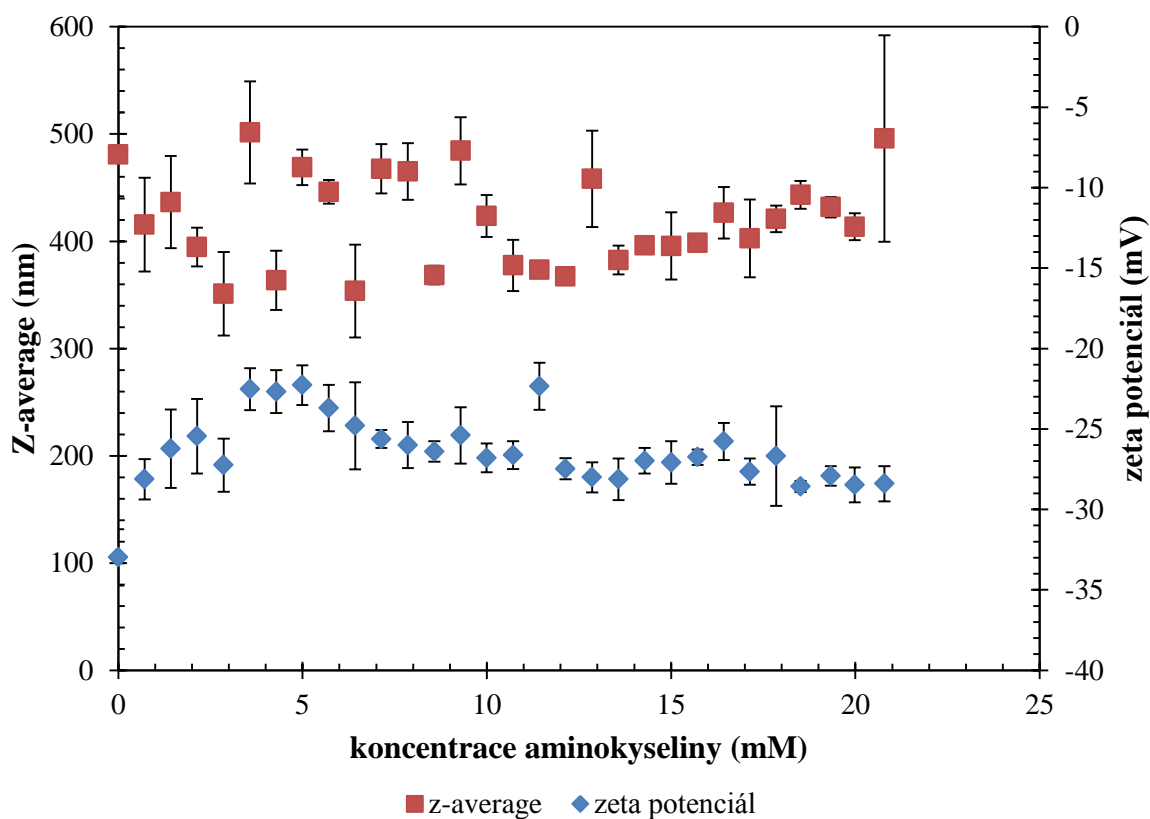
Oba dva roztoky mají na počátku zápornou hodnotu zeta potenciálu. Během přidávání Arg dochází k postupnému snižování zeta potenciálu z počátečních nestabilních hodnot potenciálu -22,85 mV až na hodnoty pod -40 mV. Dochází tedy ke stabilizaci systému. V případě přidavků Arg hydrochloridu je výchozí hodnota potenciálu téměř -33 mV. Na rozdíl od

přídavků Arg dochází během titrace k mírnému nárůstu a následně, s rostoucí koncentrací aminokyseliny ke stabilizaci systému na hodnotách kolem -30 mV.

V případě velikosti částic kopírují data u titrace Arg vizuálně trend zeta potenciálu. Podobně jako v jeho případě i zde dochází s rostoucí koncentrací k poklesu, jedná se však o změnu ve velikosti částic z počáteční hodnoty 405 nm až na hodnotu přibližně 150 nm při koncentraci přibližně 8 mM. Po tomto bodě mají data mírně rostoucí trend a v poslední části titrace dochází ke stabilizaci kolem 200 nm. U titrace Arg hydrochloridem není v datech zřejmý trend jako v předchozím případě. Hodnoty velikosti částic v průběhu titrace pouze oscilují kolem hodnoty 400 nm.



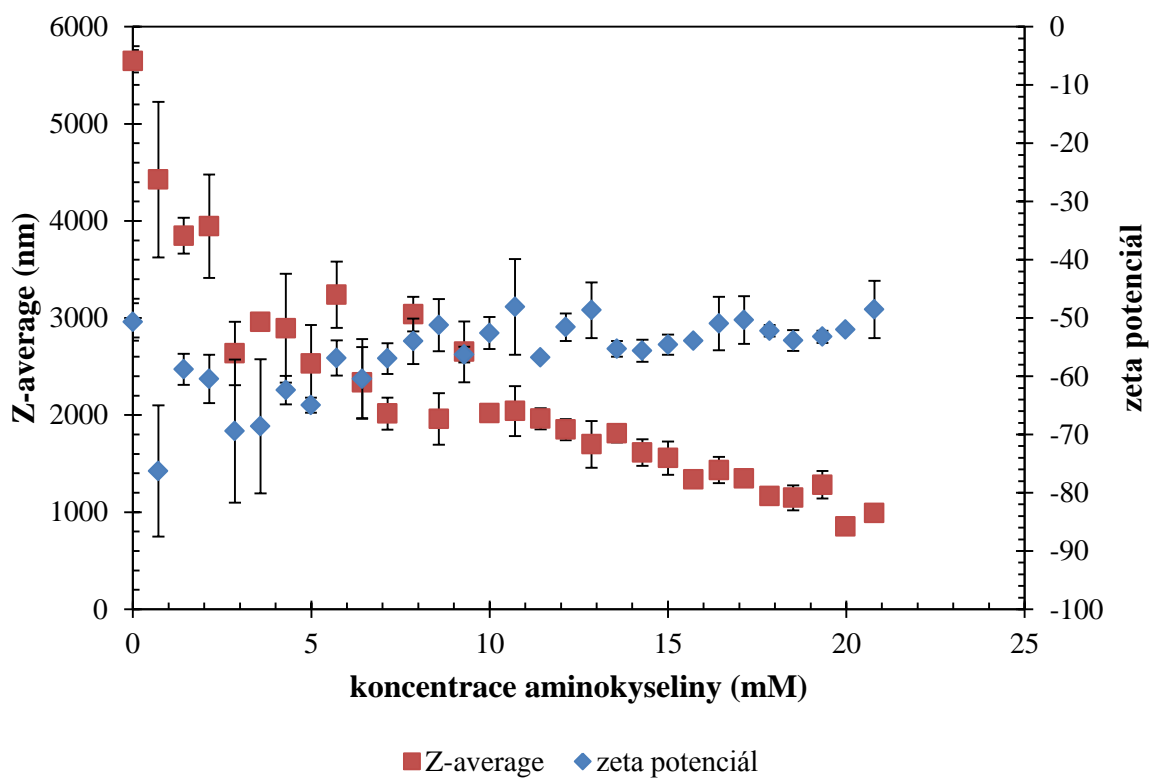
Obrázek 28: Průběh titrace 0,2 M Arg do hyaluronanu 8–15 kDa.



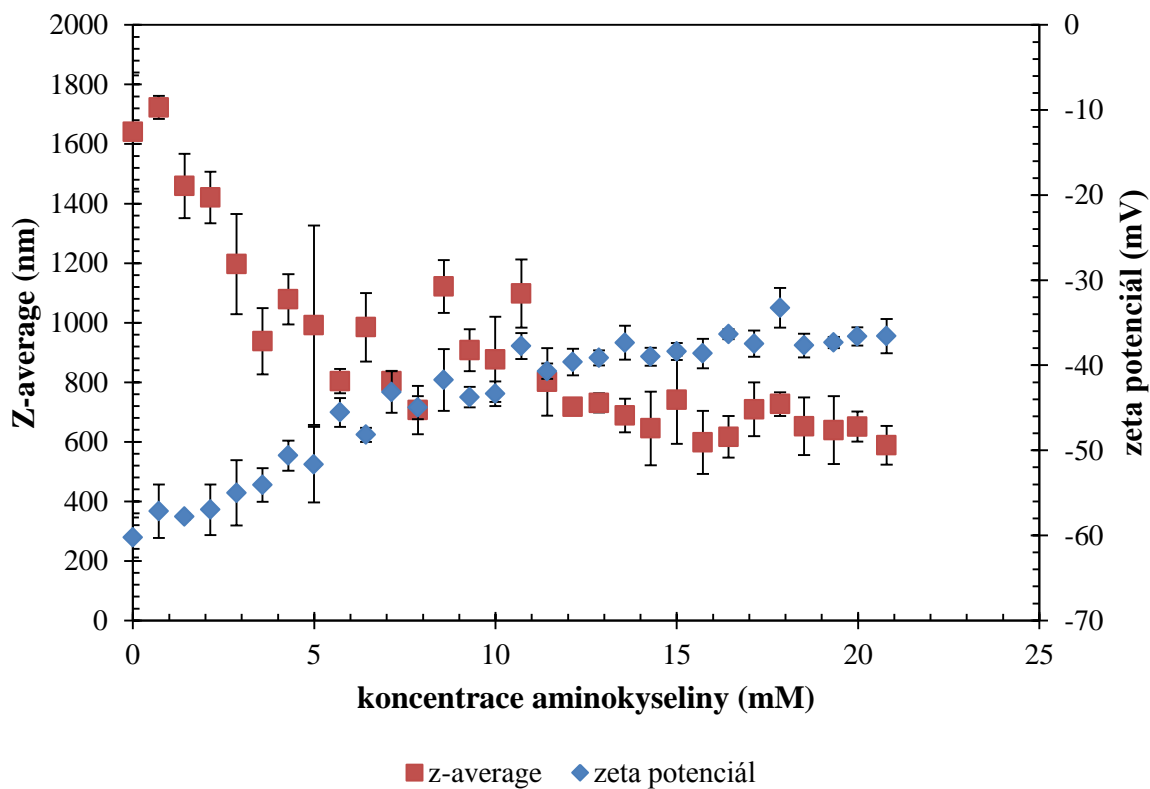
Obrázek 29: Průběh titrace 0,2 M Arg hydrochloridu do hyaluronanu 8–15 kDa.

V případě titrací do prostředí vysokomolekulárního hyaluronanu jsou trendy ve velikosti částic v průběhu titrace Arg (**Obrázek 30**) i Arg hydrochloridem (**Obrázek 31**) stejné. V průběhu titrace dochází k poklesu velikosti částic, samotná velikost se však výrazněji liší. V případě titrace Arg se jedná o pokles z přibližně 5 645 nm k 1 000 nm, u hydrochloridu je počáteční hodnota kolem 1 640 a klesá až na 588 nm. Tato skutečnost by mohla být způsobena rozdílnou šarží hyaluronanu použitého na přípravu roztoků. Zatímco hyaluronan titrovaný Arg hydrochloridem měl molekulovou hmotnost 1 635 kDa, titrace Arg probíhala do roztoku hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1 616 kDa.

Zeta potenciál v obou případech titrací ve finální koncentraci osciluje v záporných hodnotách pod -30 mV a systém se proto jeví jako stabilní.



Obrázek 30: Průběh titrace 0,2 M Arg do hyaluronanu 1 500–1 750 kDa.



Obrázek 31: Průběh titrace 0,2 M Arg hydrochloridu do hyaluronanu 1 500–1 750 kDa.

Z výsledků získaných titracemi 0,2M roztoky aminokyselin do prostředí nízko a vysokomolekulárního hyaluronanu nemůžeme usuzovat jednoznačné závěry. K interakcím mezi hyaluronanem a aminokyselinami nicméně mohlo ve studovaném rozsahu interakcí dojít.

V případě zeta potenciálu by nejspíše v průběhu titrace nemělo dojít ke změně ze záporných hodnot. Tabulky (*Tabulka 6, Tabulka 7*) zobrazují průměry naměřeného pH z posledních třech přidavků titrace pro obě aminokyseliny do obou typů roztoků hyaluronanu. U pH naměřeného pro 0,2 M Arg je možné předpokládat jeden kladný a jeden záporný náboj na molekule. Pokud by tedy takováto molekula interagovala s hyaluronanem, kladný náboj aminoskupiny aminokyseliny by kompenzoval záporný náboj karboxylové skupiny hyaluronanu. Aminokyselině by však stále zbýval jeden záporný náboj, který by mohl suplovat úlohu kompenzovaného náboje. Výsledný zeta potenciál by tedy pravděpodobně zůstal nezměněn. Mírně odlišná situace s náboji ve struktuře aminokyseliny je v případě Arg hydrochloridu. Vzhledem k naměřenému pH lze na molekule předpokládat obě kladně nabitě aminoskupiny a záporný náboj skupiny karboxylové. V takovém případě by u vysokomolekulárního hyaluronanu, který v roztoku tvoří náhodné klubko [66], připadala v úvahu možnost intramolekulárních nebo intermolekulárních vazeb. U polymerů s nižší molekulovou hmotností, které mají v roztoku tvar tyčinky [31], [66] by se pravděpodobněji jednalo o intermolekulární interakce. Neinteragující záporný náboj by poté opět dodával případně vzniklým aglomerátům polymeru s aminokyselinou zápornou hodnotu potenciálu, která by se však pohybovala v méně záporných hodnotách potenciálu vzhledem k menšímu množství přítomného záporného náboje.

V případě velikosti částic by naměřené menší hodnoty velikosti částic ke konci titrací v porovnání s výchozími nemusely nutně znamenat nepřítomnost interakcí. U vysokomolekulárního hyaluronanu by interakcemi došlo k posunutí záporného náboje směrem od řetězce, v případě Arg hydrochloridu navíc i ke snížení jeho množství v celé délce řetězce. Tato skutečnost by mohla mít za následek lepší sbalení náhodně uspořádaného klubka řetězce, a tedy i zmenšení hydrodynamického poloměru. U nízkomolekulárního hyaluronanu je v případě Arg pokles kompenzovaný růstem velikosti částic, u Arg hydrochloridu velikost v průběhu titrace zůstává konstantní.

Tabulka 6: Průměrné hodnoty naměřeného pH během posledních třech přidavků 0,2 M roztoku aminokyseliny do roztoků hyaluronanu 9 kDa.

Hya 8–15 kDa	průměr pH	směrodatná odchylka
Arg	9,42	0,00
Arg.HCl	6,80	0,02

Tabulka 7: Průměrné hodnoty naměřeného pH během posledních třech přidavků 0,2 M roztoku aminokyseliny do roztoků hyaluronanu 1 500–1 750 kDa.

Hya 1 500–1 750 kDa	průměr pH	směrodatná odchylka
Arg	9,63	0,01
Arg.HCl	7,09	0,01

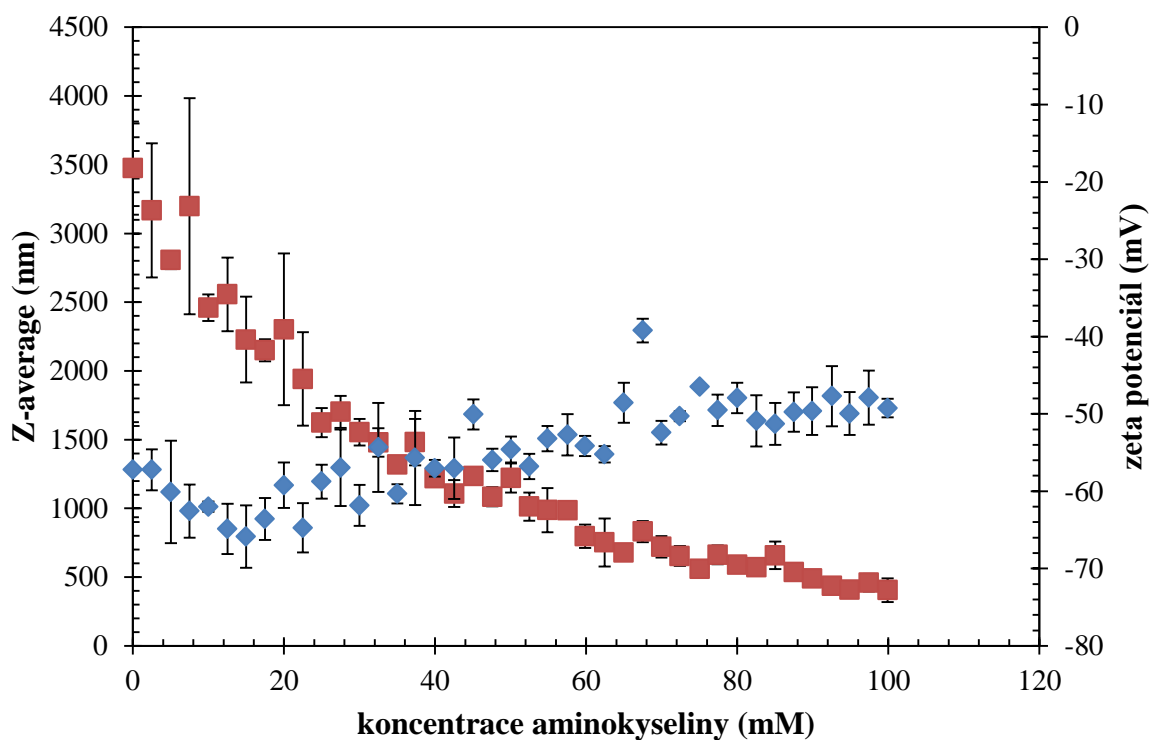
2.6.2.2 Titrace 0,4 M roztoky

Cílem titrací s vyšší koncentrací roztoků aminokyselin bylo zjistit, zda ani ve výrazně vyšších koncentracích nedochází k výrazným změnám ve velikosti nebo zeta potenciálu. Poměr jednoho náboje hyaluronanu v roztoku o koncentraci 1 %hm je při výsledné koncentraci aminokyseliny 100 mM přibližně 53 molekul aminokyseliny na jednu disacharidovou jednotku hyaluronanu. Je tedy patrné, že molekul aminokyselin je v roztoku značný přebytek a nepřítomnost interakcí z důvodů nízké koncentrace molekul, při které by se interakční centra molekul mohla v roztoku míjet.

Z výsledků znázorněných na grafech (**Obrázek 32** a **Obrázek 33**) je patrné, že velikost částic s množstvím přidaných molekul aminokyseliny klesá, stejně jako v případě titrací 0,2 M roztoky. V případě Arg hydrochloridu (**Obrázek 33**) je možné pozorovat zastavení velikosti poklesu částic přibližně při koncentraci 35 mM, za touto koncentrací zůstává velikost částic nezměněna a pohybuje se kolem hodnoty 500 nm. Zeta potenciál mírně vzrůstá a jeho velikost je při finální koncentraci $-21,25$ mV. Systém se tedy nachází v nestabilní oblasti potenciálu. Zeta potenciál u titrace Arg (**Obrázek 32**) se drží na záporných hodnotách v rozmezí mezi -64 a -45 mV, tedy ve stabilní oblasti, velikost částic pak s koncentrací klesá.

pH v případě titrací koncentrovanějšími roztoky zůstává stejné, co se množství nábojů na aminokyselinách týká, jak ukazuje **Tabulka 8**. Je tedy pravděpodobné, že i zde platí stejná úvaha, která byla zmíněna výše. Ta je navíc podpořena poměrně rychlým poklesem ve velikosti částic během titrace Arg hydrochloridem, kdy se velikost již od koncentrace 35 mM

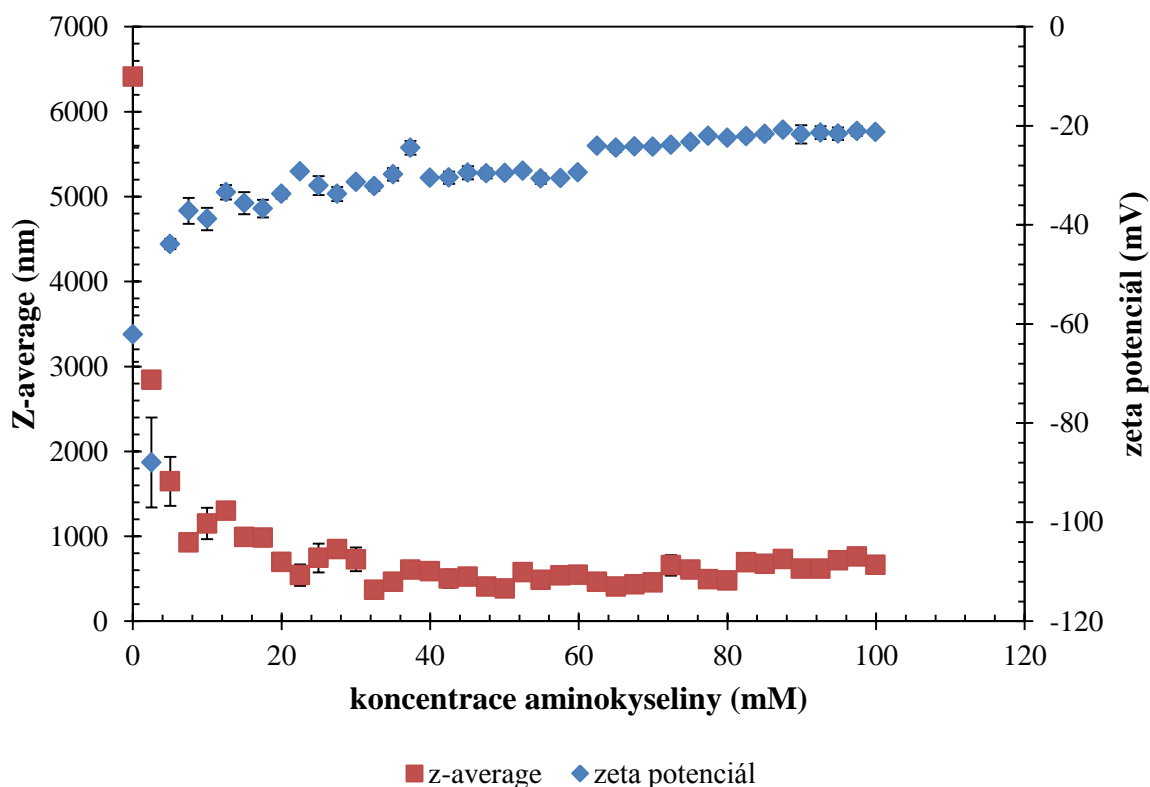
významněji nemění. Je možné uvažovat, že se jedná o koncentraci, při níž dojde k interakci na všech karboxylových skupinách hyaluronanu, a tedy k nejlepšímu možnému sbalení řetězce. Také velikost potenciálu, který osciluje kolem hodnot -20 mV a je tedy výrazně méně záporný v porovnání s výchozím systémem, ukazuje na možné interakce.



Obrázek 32: Průběh titrace 0,4 M Arg do hyaluronanu 1 500–1 750 kDa.

Tabulka 8: Průměrné hodnoty naměřeného pH během posledních třech přidavků 0,4 M roztoku aminokyseliny do roztoku hyaluronanu 1 500–1 750 kDa.

Hya 1 500–1 750 kDa	průměr pH	směrodatná odchylka
Arg	10,10	0,00
Arg.HCl	6,97	0,02



Obrázek 33: Průběh titrace 0,4 M Arg hydrochloridu do hyaluronanu 1 500–1 750 kDa.

Z naměřených dat pomocí DLS je zřejmé, že k interakcím v systému hyaluronan-aminokyselina může docházet. Potenciál během titrací zůstává záporný a velikost částic se s rostoucí koncentrací aminokyseliny zmenšuje, resp. u nízkomolekulárního hyaluronanu zůstává přibližně stejná. Při vyhodnocování výsledků je však důležité si uvědomit, že u každé titrace bylo provedeno pouze jedno opakování. Některá data, jako v případě zeta potenciálu na grafu (**Obrázek 33**), je možné považovat za ne úplně přesná a uskočení zeta potenciálu od koncentrace 62,5 mM na hodnoty kolem -23 mV za případnou chybu měření.

2.6.3 Měření pH a vodivosti

Elektrostatické interakce byly také zkoumány pomocí přidavků 0,1M kyseliny chlorovodíkové. Pro každou aminokyselinu byly připraveny roztoky čisté aminokyseliny, aminokyseliny se studovaným polymerem a nakonec byl titrován i samotný polymer.

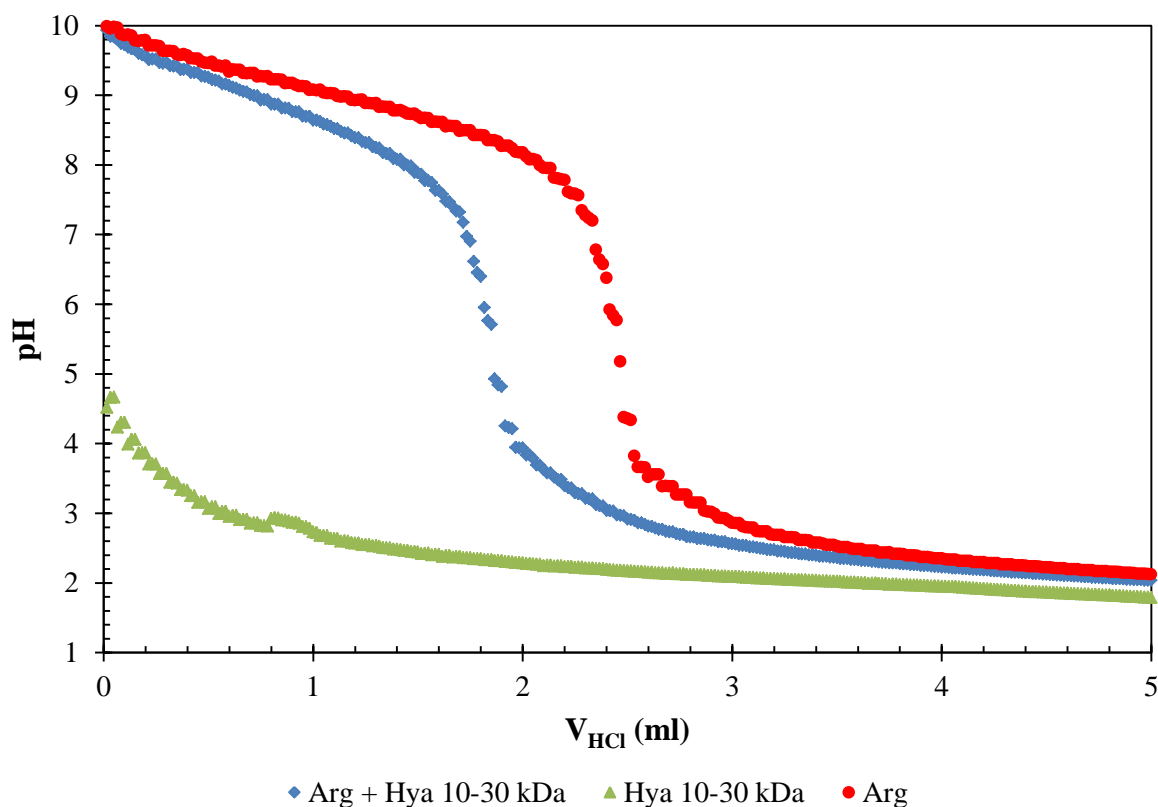
Zobrazené výsledky jsou průměrem ze dvou opakování samostatně připravovaných roztoků.

Cílem těchto titrací bylo zjistit případné interakce mezi polymery a aminokyselinami měřením pH a vodivosti. Obdobné titrace s měřením pH a vodivosti byly rozpracovány již

v práci doktorky Krouské [22]. Proto byly zvoleny jako metoda určující přítomnost nebo nepřítomnost elektrostatických titrací.

2.6.3.1 Měření pH

V systémech obsahujících Arg spolu s nízkomolekulárním hyaluronanem (9 kDa) a polystyren sulfonátem byly interakce zaznamenány. Data na grafech (**Obrázek 34**, **Obrázek P II**) jednoznačně ukazují na rozdíl pro roztoky obsahující pouze Arg a Arg spolu s polymerem.



Obrázek 34: Graf znázorňující změnu pH během přidavků 0,1 M HCl pro různé systémy.

Větší spotřeba HCl pro dosažení bodu ekvivalence v porovnání se systémem obsahujícím Arg s hyaluronanem případně NaPSS je způsobena větším množstvím volných molekul aminokyseliny, které jsou schopny interakce s molekulami kyseliny chlorovodíkové. Přítomnost volných $-\text{NH}_3^+$, které mají bazický charakter, vede k pomalejší změně pH roztoku [22]. Část molekul aminokyselin, které jsou v přebytku oproti záporným nábojům hyaluronanu resp. NaPSS v poměru přibližně 1:2,41, je zbavená svého bazického chování díky možnosti elektrostatických interakcí s polymerem. Díky tomu je množství HCl potřebné

pro stejný pokles pH nižší u systémů s polymerem, pokud dochází k interakcím. Tato teorie je názorně zpracována v tabulkách (*Tabulka 9, Tabulka 10*).

Tabulka 9 znázorňuje možné reakce v systému s obecnou aminokyselinou mající dvě aminoskupiny, která je rozpuštěná ve vodě. Taková aminokyselina je v případě vodného roztoku nabitá jedním kladným a jedním záporným nábojem. Protože při reakci s kyselinou chlorovodíkovou se v první fázi jedná především o reakci s aminoskupinami, je skutečnost, že aminokyselina (AMK) má již jeden kladný náboj ilustrovaný pomocí „⁺“. Z tabulky (*Tabulka 9*) vyplývá, že při přidání kyseliny chlorovodíkové do takového roztoku mohou nastat tři základní druhy reakcí. Nabitá aminokyselina, která zpomaluje pokles pH je znázorněná jako $\text{HAMK}^{2+}/\text{AMK}^+$.

Tabulka 10 naopak ukazuje možné reakce v případě, že se v systému nachází i záporně nabitý polymer, se kterým může spolu s kladně nabitými aminokyselinami interagovat za vzniku neutrálních komplexů. Vzhledem k přebytku aminokyselin oproti interakčním místům polymerů se však v roztoku stále vyskytují volné aminokyseliny, které brání rychlejšímu snížení pH.

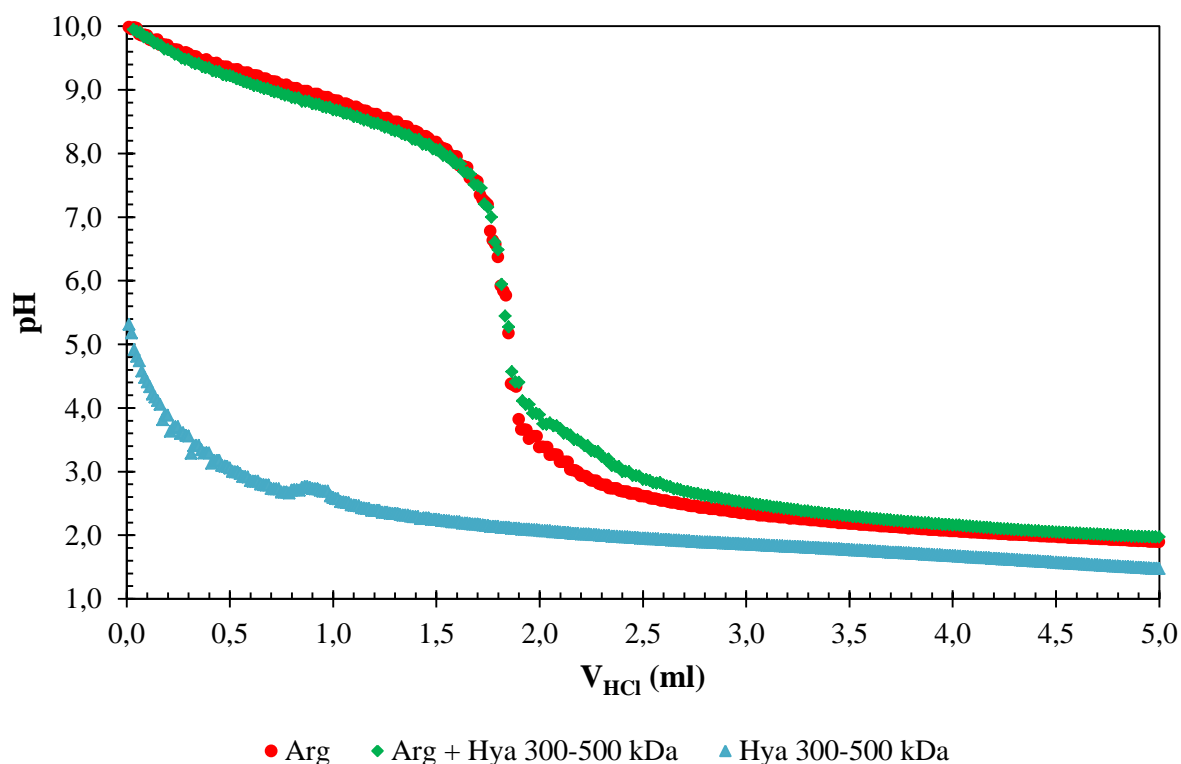
Tabulka 9: Schématické obecné znázornění možných rovnic během přidávání HCl do systému bez polymeru.

AMK + H ₂ O	možné reakce
Interakce kyseliny s vodou	$\text{HCl} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_3\text{O}^+ + \text{Cl}^-$
Interakce kyseliny s AMK	$\text{HCl} + \text{AMK}^+ \rightarrow \text{HAMK}^{2+} + \text{Cl}^-$
	$\text{H}_3\text{O}^+ + \text{AMK}^+ \rightarrow \text{HAMK}^{2+} + \text{H}_2\text{O}$

Tabulka 10: Schématické obecné znázornění možných rovnic během přidávání HCl do systému s polymerem.

AMK + polymer	možné reakce
Interakce kyseliny s vodou	$\text{HCl} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_3\text{O}^+ + \text{Cl}^-$
Interakce kyseliny s AMK	$\text{HCl} + \text{AMK}^+ \rightarrow \text{HAMK}^{2+} + \text{Cl}^-$ $\text{H}_3\text{O}^+ + \text{AMK}^+ \rightarrow \text{HAMK}^{2+} + \text{H}_2\text{O}$
Interakce AMK s polymerem	$\text{polymer}^{n-} + \text{AMK}^+ \rightarrow \text{polymerAMK}^{(n-1)-}$ $\text{polymerAMK}^{(n-1)-} + \text{HCl}/\text{H}_3\text{O}^+ \rightarrow \text{polymerAMK}^{(n-2)-} + \text{Cl}^-/\text{H}_2\text{O}$

Nedostatkem měření pH a vodivosti roztoků během titrací je ovšem fakt, že elektrostatické interakce mezi polymerem a aminokyselinami byly zaznamenány pouze v případě NaPSS a hyaluronanu o molekulové hmotnosti 9 kDa s polu s Arg. U ostatních kombinací polymerů a aminokyselin nebyl zaznamenán rozdíl mezi čistou aminokyselinou a aminokyselinou v roztoku s polymerem, jak ukazují vzorová data na obrázku (**Obrázek 35**), pro Arg spolu s hyaluronanem o molekulové hmotnosti 341 kDa.



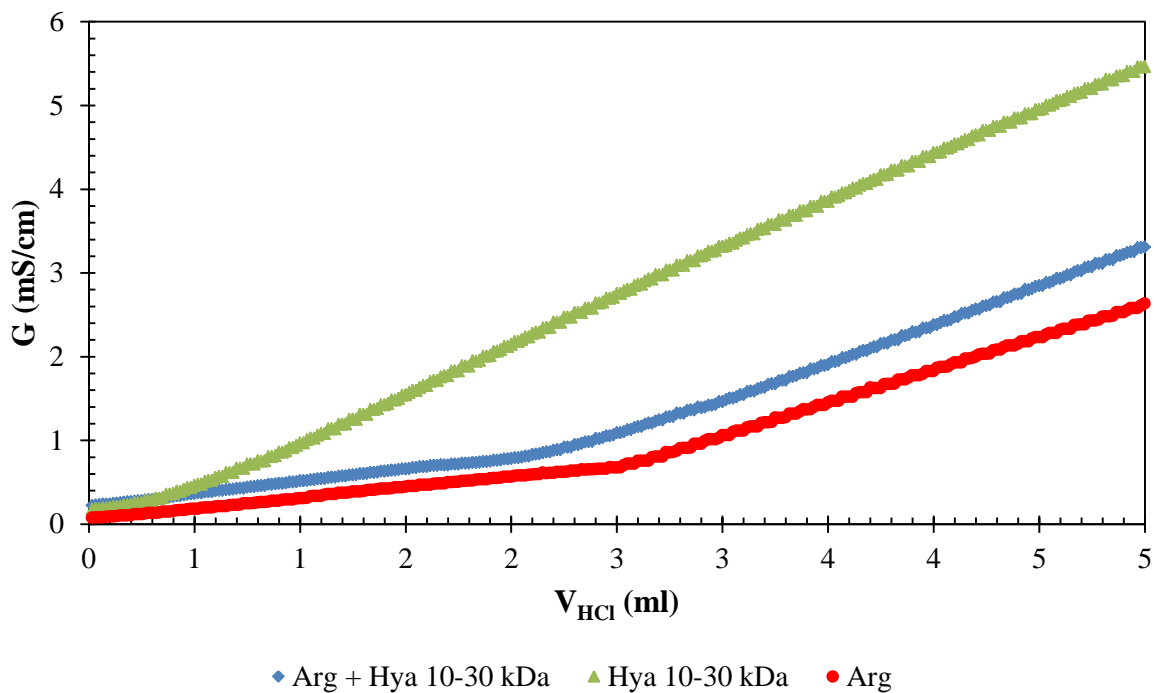
Obrázek 35: Graf znázorňující změnu pH během přidavků 0,1 M HCl pro různé systémy.

2.6.3.2 Měření vodivosti

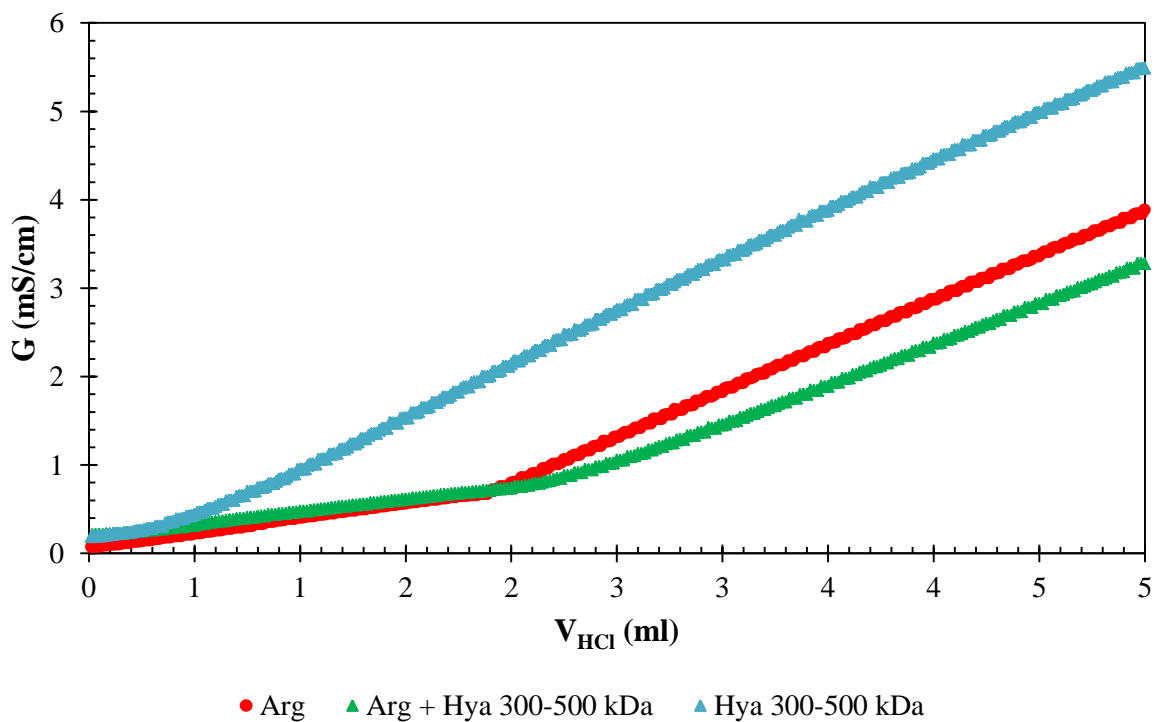
Spolu s pH byla v titrovaných roztocích měřena i vodivost. Pro interagující systémy platí, že nejvyšší vodivost měl vždy samotný polymer rozpuštěný v roztoku, následovaný roztokem aminokyseliny spolu s polymerem, a nejnižší vodivost měla samotná aminokyselina, jak je patrné z dat na grafech (**Obrázek 36**, **Obrázek P 12**). To je způsobeno množstvím přítomných malých nabitých částic v roztoku.

V případě roztoku polymeru dochází k disociaci veškeré přidané HCl na H_3O^+ a Cl^- , při dostatečném poklesu pH pod disociační konstantu polymeru (v případě hyaluronanu $\text{pK} = 3\text{--}4$ [2]) navíc dochází i k využití sodných iontů. V případě roztoků čisté aminokyseliny se při stejném objemu přidané 0,1M HCl spotřebuje větší část oxoniových kationtů na protonizaci aminokyseliny, která je horším vodičem v porovnání s oxoniovými kationty. Množství chloridových iontů zůstává ve všech roztocích stejné, můžeme ho tedy zanedbat, navíc zde nejsou přítomny sodné kationty. Roztoky aminokyselin se poté nachází někde na pomezí. Pokud aminokyselina interaguje s polymerem, nezapojuje se do vodivosti, zároveň je zde díky rychlejšímu poklesu pH vyšší koncentrace oxoniových kationtů a přítomny jsou také sodné protiionty polymeru.

V případě, že by k interakci mezi aminokyselinou a polymerem nedocházelo, jak ilustruje **Obrázek 37**, by vodivost zůstávala přibližně stejná až do chvíle, kdy přidáním určitého množství kyseliny chlorovodíkové překročíme hodnotu pH pro disociaci karboxylových nebo sulfonových skupin polymeru. Část oxoniových iontů by následně byla spotřebována a místo nich do roztoku uvolněny sodné ionty, které mají v porovnání nižší vodivost. Proto by měly mít roztoky aminokyselin s polymerem nižší vodivost.



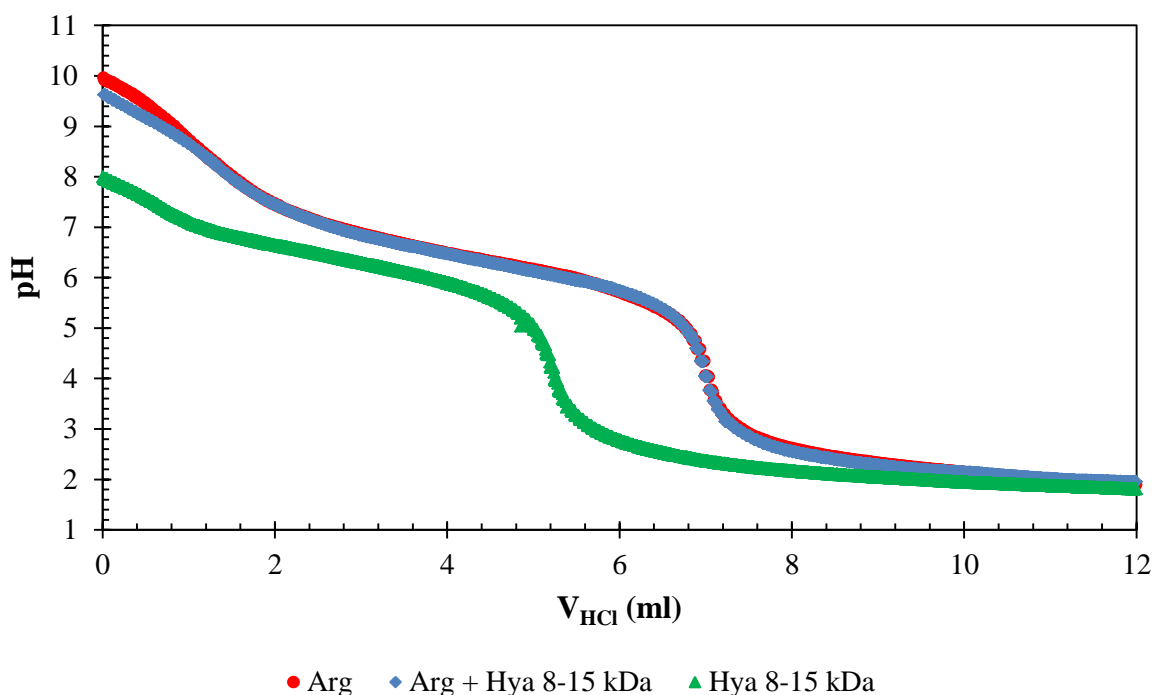
Obrázek 36: Graf znázorňující změnu vodivosti během přidavků 0,1 M HCl pro různé systémy.



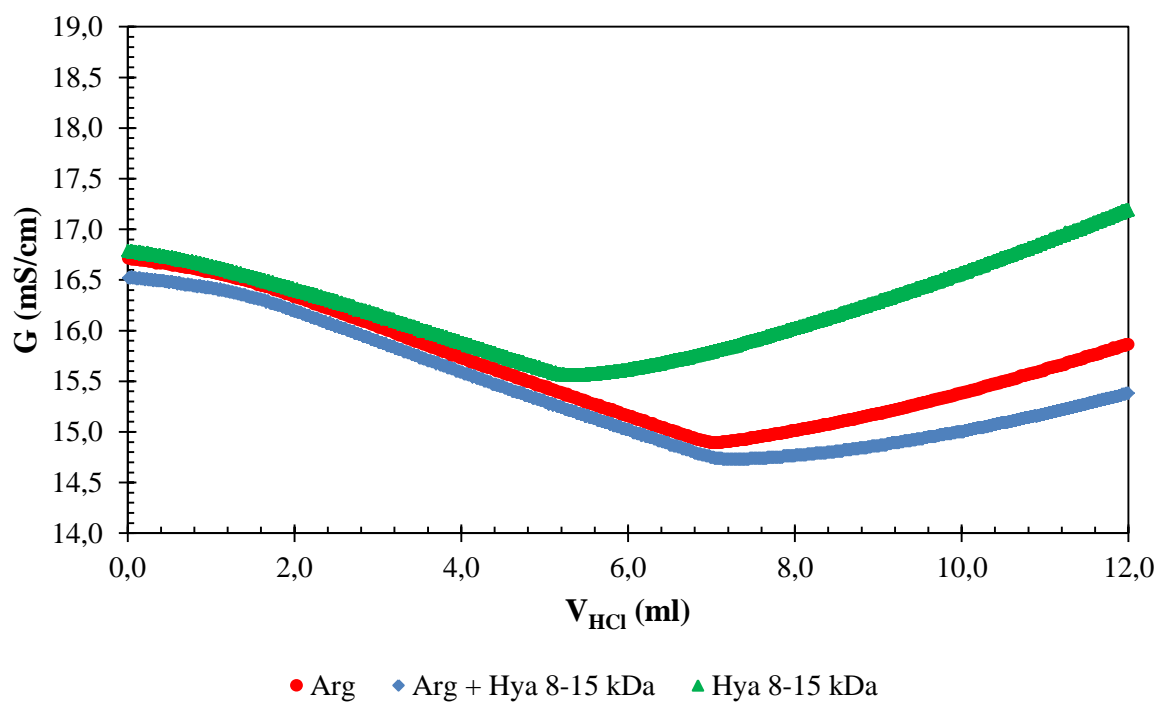
Obrázek 37: Graf znázorňující změnu vodivosti během přidavků 0,1 M HCl pro různé systémy.

2.6.3.3 Titrace v prostředí PBS

V rámci titrací, při kterých bylo měřeno pH a vodivost roztoků, byla také zkoumána možnost studia těchto interakcí v prostředí fosfátového pufru (PBS). Byly provedeny pouze titrace v systému s nízkou molekulovou hmotností hyaluronanu. Na modelovém grafu (**Obrázek 38**) jsou znázorněny titrace 0,1 M kyseliny chlorovodíkové do roztoků připravených v PBS. Jedná se o roztoky s hyaluronanem o molekulové hmotnosti 9 kDa spolu s argininem. Z dat uvedených v tomto grafu je ovšem patrné, že pufr nebyl dostatečně silný, aby udržel pH na hodnotě 7,4. A tak se pH roztoku pohybuje na hodnotách kolem 10, stejně jako v případě vodných roztoků. Zároveň je zřejmá nepřítomnost interakcí jak pro zaznamenávané pH (**Obrázek 38**) tak vodivost (**Obrázek 39**). To že systém nevykazuje interakce je v souladu s předpokladem, neboť interakcím brání vysoká iontová síla roztoku [23].



Obrázek 38: Graf znázorňující změnu vodivosti během přidávků 0,1 M HCl pro různé systémy připravené v prostředí PBS.



Obrázek 39: Graf znázorňující změnu vodivosti během přidavků 0,1 M HCl pro různé systémy připravené v prostředí PBS.

3 ZÁVĚR

Interakce mezi aminokyselinami Lys, Arg, 6AKK a Arg hydrochloridem byly v diplomové práci studovány pomocí tří různých metod: ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením, měřením pH, vodivosti a dynamického rozptylu světla spolu se zeta potenciálem.

U ultrazvukové spektroskopie byla vyhodnocována data relativní rychlosti a zeslabení. Lineárně rostoucí závislosti relativní rychlosti na koncentraci přidané aminokyseliny, pozorované až do koncentrace 30 mM, byly přepočítány na koncentrační inkrementy, jejichž míra rozdílu oproti slepým titracím by mohla znamenat míru interakcí mezi molekulami hyaluronanu a aminokyselin. Největší rozdíl v tomto případě vykazaly polymery vysokých molekulových hmotností hyaluronanu (341, 1 635 kDa) nezávisle na přidávaném titračním činidle. V případě titrací do roztoků polystyren sulfonátu byl vyšší koncentrační inkrement v porovnání se slepou titrací pozorován pouze u 6AKK.

Koncentrační inkrement se pro systémy významněji nezměnil ani při započítání ředění roztoků hyaluronanu a ukázalo se, že tento vliv je pro roztoky hyaluronanu možné zanedbat.

Relativní zeslabení zvukových vln ukázalo u vysokých molekulových hmotností hyaluronanu změnu v trendu přibližně při koncentraci 10 mM pro jednotlivé aminokyseliny. Vzhledem k zaznamenání tohoto zlomu u polymerů s konformací náhodného klubka by se mohlo jednat o změnu jeho konformace v roztoku díky interakcím s aminokyselinami. U nízkých molekulových hmotností a polystyren sulfonátu podobné ohyby pro přidavek 2 μ l zaznamenány nebyly, neboť zaujímají tyčinkovitý tvar a konformaci pravděpodobně nemění. Vzhledem k nepřesnosti měření relativního zeslabení je však pro určení závěrů z měření na ultrazvukovém spektrometru směrodatnější relativní rychlost.

Měření zeta potenciálu a velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla během titrací aminokyselin do roztoků hyaluronanu bylo zjištěno, že velikost částic se u vysokomolekulárního hyaluronanu s přidavkem aminokyselin snižuje, u nízkomolekulárního hyaluronanu pak zůstává přibližně stejná. Zeta potenciál se v průběhu titrace mírně mění, zůstává však po celou dobu v záporných hodnotách. Případné elektrostatické interakce však pomocí této metody potvrzeny nebyly.

Metodou, která ale poskytla jednoznačné výsledky, jsou titrace 0,1 M kyseliny chlorovodíkové do roztoků obsahujících polyanion a aminokyselinu, případně každou komponentu zvlášť. Zde byly jednoznačně prokázány interakce mezi NaPSS spolu s hyaluronanem o molekulové hmotnosti 9 kDa a Arg. Na rozdíl od práce doktorky Krouské [22] byly elektrostatické interakce prokázány pouze v těchto případech. Při titracích do

roztoků připravených v prostředí PBS nebyly podle očekávání interakce pozorovány z důvodů vysoké iontové síly roztoku.

Z výše popsaných závěrů je patrné, že jednotlivé metody poskytly vzájemně protichůdné informace o případných elektrostatických interakcích. Data z ultrazvukové spektroskopie ukazují na interakce u vysokých molekulových hmotností hyaluronanu a systému NaPSS-6AKK. Naopak titrace kyselinou chlorovodíkovou prokázaly interakce pouze u NaPSS a 9kDa hyaluronanu v roztocích s Arg. Výsledky měření pomocí DLS neposkytují jednoznačné závěry, které by mohly ukazovat na přítomnost interakcí.

V této diplomové práci bylo úspěšně dosaženo předepsaných cílů. Bylo změřeno a popsáno chování systémů hyaluronan–aminokyselina ultrazvukovou spektroskopií. Srovnávacím polymerem byl díky podobnému chování s tenzidy zvolen NaPSS. Jako doplňkové metody pro určení interakcí v těchto systémech bylo použito měření na DLS a měření pH a vodivosti. Cílem další práce by mohlo být stanovení závislosti ultrazvukové rychlosti na koncentraci při ředění roztoků polystyren sulfonátu pro vyloučení vlivu ředění vzorků na velikost koncentračního inkrementu a rozšíření počtu opakování a druhů systémů při stanovování velikosti částic a zeta potenciálu s cílem jednoznačně stanovit přítomnost nebo nepřítomnost interakcí. V úvahu by také připadalo využití izotermální titrační kalorimetrie ke studiu interakcí.

4 CITACE

- [1] STEINBÜCHEL, A. a M. HOFRIKTER. *Biopolymers*. Chichester: Wiley-VCH, 2003. ISBN 3527302301.
- [2] Hyaluronan: Structure and Physical Properties. *GlycoForum: Science of Hyaluronan* [online]. 1997 [cit. 2016-01-26]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [3] Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solution. Some biological consequences. *GlycoForum: Science of Hyaluronan* [online]. 1998 [cit. 2016-01-26]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>
- [4] ALMOND, A. Hyaluronan. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007, **64**(13), 1591-1596. DOI: 10.1007/s00018-007-7032-z. ISSN 1420-682x. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-007-7032-z>
- [5] KOGAN, Grigorij, Ladislav ŠOLTÉS, Robert STERN a Peter GEMEINER. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*. 2006-12-8, **29**(1), 17-25. DOI: 10.1007/s10529-006-9219-z. ISSN 0141-5492. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-006-9219-z>
- [6] GIRISH, K.S. a K. KEMPARAJU. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sciences*. 2007, **80**(21), 1921-1943. DOI: 10.1016/j.lfs.2007.02.037. ISSN 00243205. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002432050700210X>
- [7] LAURENT, Torvard C.; FRASER, J. R. Hyaluronan. *The FASEB Journal*, 1992, 6:7: 2397-2404.
- [8] HAXAIRE, Katia, et al. Conformational behavior of hyaluronan in relation to its physical properties as probed by molecular modeling. *Glycobiology*, 2000, 10:6: 587-594.
- [9] KARGEROVÁ, A. a M. PEKAŘ. Densitometry and ultrasound velocimetry of hyaluronan solutions in water and in sodium chloride solution. *Carbohydrate Polymers*. 2014, **106**, 453-459. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.01.020. ISSN 01448617. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861714000228>
- [10] HARGITTAI, István a Magdolna HARGITTAI. Molecular structure of hyaluronan: an introduction. *Structural Chemistry*. 2008, **19**(5), 697-717. DOI: 10.1007/s11224-008-9370-3. ISSN 1040-0400. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11224-008-9370-3>

- [11] SCOTT, John E.; HEATLEY, Frank. Biological properties of hyaluronan in aqueous solution are controlled and sequestered by reversible tertiary structures, defined by NMR spectroscopy. *Biomacromolecules*, 2002, 3.3: 547-553.
- [12] SCOTT, John E., et al. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer. *Biochemical Journal*, 1991, 274.3: 699-705.
- [13] YE, Fengbin, Yuanyi XIE, Henrik JENSEN, Susan Weng LARSEN, Anan YAGHMUR, Claus LARSEN a Jesper ØSTERGAARD. Interaction of Amino Acid and Dipeptide β -Naphthylamide Derivatives with Hyaluronic Acid and Human Serum Albumin Studied by Capillary Electrophoresis Frontal Analysis. *Chromatographia*. 2013, **76**(1-2), 49-57. DOI: 10.1007/s10337-012-2369-3. ISSN 0009-5893. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10337-012-2369-3>
- [14] PONTA, Helmut, Larry SHERMAN a Peter A. HERRLICH. CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **4**(1), 33-45. DOI: 10.1038/nrm1004. ISSN 14710072. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrm1004>
- [15] CHYTIL, Martin, Martin TROJAN a Alexander KOVALENKO. Study on mutual interactions and electronic structures of hyaluronan with Lysine, 6-Aminocaproic acid and Arginine. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2016, **142**, 8-15 [cit. 2016-03-22]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.01.035. ISSN 01448617. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861716000503>
- [16] KIM, Eun-Joong, Gayong SHIM, Kwangmyeung KIM, Ick Chan KWON, Yu-Kyoung OH a Chang-Koo SHIM. Hyaluronic acid complexed to biodegradable poly L-arginine for targeted delivery of siRNAs. *The Journal of Gene Medicine*. 2009, **11**(9), 791-803. DOI: 10.1002/jgm.1352. ISSN 1099498x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jgm.1352>
- [17] CORADINI, Danila, et al. Hyaluronic acid as drug delivery for sodium butyrate: Improvement of the anti-proliferative activity on a breast-cancer cell line. *International journal of cancer*, 1999, 81.3: 411-416.
- [18] BALBINO, Tiago A., Gabriela S.C. CORREA, Marianna T.P. FAVARO, Marcelo A.S. TOLEDO, Adriano R. AZZONI a Lucimara G. DE LA TORRE. Physicochemical and in vitro evaluation of cationic liposome, hyaluronic acid and plasmid DNA as pseudo-

- ternary complexes for gene delivery. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2015, **484**, 262-270. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2015.08.005. ISSN 09277757. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775715301497>
- [19] APPEL, Eric A., Mark W. TIBBITT, Jessica M. GREER, Owen S. FENTON, Klaus KREUELS, Daniel G. ANDERSON a Robert LANGER. Exploiting Electrostatic Interactions in Polymer–Nanoparticle Hydrogels. *ACS Macro Letters*. 2015, **4**(8), 848-852. DOI: 10.1021/acsmacrolett.5b00416. ISSN 2161-1653. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsmacrolett.5b00416>
- [20] KARGEROVÁ, Andrea, Miloslav PEKAŘ, Jessica M. GREER, Owen S. FENTON, Klaus KREUELS, Daniel G. ANDERSON a Robert LANGER. High-Resolution Ultrasonic Spectroscopy Study of Interactions between Hyaluronan and Cationic Surfactants. *Langmuir*. 2014, **30**(40), 11866-11872. DOI: 10.1021/la501852a. ISSN 0743-7463. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la501852a>
- [21] CHLUMSKÁ, J. *Studium interakcí protonizovaných aminokyselin s nízkomolekulárním hyaluronanem*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. 45 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Martin Chytil, Ph.D.
- [22] KROUSKÁ, J. *Interakce hyaluronanu a povrchově aktivních látek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. Vedoucí dizertační práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
- [23] BABRNÁKOVÁ, J. *Dynamický rozptyl světla a elektroanalytické metody ve studiu systémů hyaluronanu a aminokyselin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 55 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Martin Chytil, Ph.D.
- [24] ZEMAN, J. *Reologické studium interakcí vysokomolekulárního hyaluronanu a protonizovaných aminokyselin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 44s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Martin Chytil, Ph.D.
- [25] TROJAN, M. *Nové metody přípravy protonizovaných aminokyselin a jejich interakce s polyelektrolyty*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 67 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Martin Chytil, Ph.D.
- [26] ZEMAN, J. *Studium interakcí polyelektrolytů s kladně nabitými dusíkatými amfifilními látkami*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 65 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Martin Chytil, Ph.D.

- [27] ŠIMÁČKOVÁ, M. *Viskozimetrické studium chování systémů L-Lysinu a 6-aminokapronové kyseliny s hyaluronanem v oblasti nízkých koncentrací aminokyselin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 47 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Martin Chytil, Ph.D.
- [28] TROJAN, M. *Viskozimetrie systémů hyaluronan-amfifil*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 39 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Martin Chytil, Ph.D.
- [29] GIRARD, Jérôme, Priscilla S. BRUNETTO, Olivier BRAISSANT, Zarko RAJACIC, Nina KHANNA, Regine LANDMANN, Alma U. DANIELS a Katharina M. FROMM. Development of a polystyrene sulfonate/silver nanocomposite with self-healing properties for biomaterial applications. *Comptes Rendus Chimie*. 2013, **16**(6), 550-556. DOI: 10.1016/j.crci.2013.04.010. ISSN 16310748. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S163107481300129X>
- [30] SEN, Akhil Kumar, Sandip ROY, Vinay A JUVEKAR, Zarko RAJACIC, Nina KHANNA, Regine LANDMANN, Alma U. DANIELS a Katharina M. FROMM. Effect of structure on solution and interfacial properties of sodium polystyrene sulfonate (NaPSS). *Polymer International*. 2007, **56**(2), 167-174. DOI: 10.1002/pi.2154. ISSN 09598103. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pi.2154>
- [31] MANTHA, Sriteja, Arun YETHIRAJ, Vinay A JUVEKAR, Zarko RAJACIC, Nina KHANNA, Regine LANDMANN, Alma U. DANIELS a Katharina M. FROMM. Conformational Properties of Sodium Polystyrenesulfonate in Water: Insights from a Coarse-Grained Model with Explicit Solvent. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2015, **119**(34), 11010-11018. DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b01700. ISSN 1520-6106. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpcc.5b01700>
- [32] PAL, Amalendu, Sangeeta YADAV, Vinay A JUVEKAR, Zarko RAJACIC, Nina KHANNA, Regine LANDMANN, Alma U. DANIELS a Katharina M. FROMM. Binding interaction between 1-octyl-3-methylimidazolium bromide and sodium polystyrene sulfonate in aqueous solution: Insights from a Coarse-Grained Model with Explicit Solvent. *Fluid Phase Equilibria*. 2016, **412**(34), 71-78. DOI: 10.1016/j.fluid.2015.12.034. ISSN 03783812. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378381215302764>
- [33] ZHANG, Qian, Wenpei KANG, Dezhi SUN, Jie LIU, Xilian WEI, Regine LANDMANN, Alma U. DANIELS a Katharina M. FROMM. Interaction between

- cationic surfactant of 1-methyl-3-tetradecylimidazolium bromide and anionic polymer of sodium polystyrene sulfonate: Insights from a Coarse-Grained Model with Explicit Solvent. *Applied Surface Science*. 2013, **279**(34), 353-359. DOI: 10.1016/j.apsusc.2013.04.105. ISSN 01694332. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169433213008234>
- [34] MURRAY, Robert K. *Harperova Biochemie*. 23. vyd., (4. české vyd.), v H. Jinočany: H, 2002. Lange medical book. ISBN 80-731-9013-3.
- [35] Lysine. *University of Maryland medical centre* [online]. 2015 [cit. 2016-02-12]. Dostupné z: <http://umm.edu/health/medical/altmed/supplement/lysine>
- [36] Lysine. *Institute of Chemistry: Department of Biology, Chemistry, Pharmacy – FU Berlin* [online]. 1998 [cit. 2016-02-12]. Dostupné z: http://www.chemie.fu-berlin.de/chemistry/bio/aminoacid/lysin_en.html
- [37] PFEFFERLE, Walter, Bettina MÖCKEL, Brigitte BATHE a Achim MARX. *Biotechnological Manufacture of Lysine*. 59. DOI: 10.1007/3-540-45989-8_3. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/3-540-45989-8_3
- [38] SHIM, Jaesool, Prashanta DUTTA, Cornelius F. IVORY a Achim MARX. A pK determination method for proteins from titration curves using principle component analysis. *AIChE Journal*. 2008, **54**(9), 2238-2249. DOI: 10.1002/aic.11528. ISSN 00011541. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/aic.11528>
- [39] ED. BY H.-J. REHM .. *Biotechnology*. 2nd, completely rev. ed. Weinheim [u.a.]: VCH, 1998. ISBN 3-527-28310-2.
- [40] Arginine. *Institute of Chemistry: Department of Biology, Chemistry, Pharmacy – FU Berlin* [online]. 1998 [cit. 2016-02-12]. Dostupné z: http://www.chemie.fu-berlin.de/chemistry/bio/aminoacid/arginin_en.html
- [41] L-Arginine hydrochloride: PubChem. *PubChem: Open chemistry database* [online]. Bethesda, USA: National Institutes of Health, c2016 [cit. 2016-03-23]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-Arginine_hydrochloride#section=Top
- [42] L-Arginine monohydrochloride: Sigma-Aldrich. *Sigma-Aldrich* [online]. Sigma-Aldrich Co., c2016 [cit. 2016-03-23]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/largininemonohydrochloride21066111934211?lang=en&ion=CZ>
- [43] 6-aminohexanoic acid. *National Center for Biotechnology Information: PubChem Compound Database* [online]. [cit. 2016-02-13]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6-aminohexanoic_acid#section=Top

- [44] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. Opr. Vyd. Praha: Academia, 1996, 186, 134, 191 s. ISBN 80-200-0600-1.
- [45] 6-Aminohexanoic Acid. *ChemSynthesys: Chemical Database* [online]. [cit. 2016-02-12]. Dostupné z: <http://www.chemsynthesis.com/base/chemical-structure-13630.html>
- [46] GARAJ, Ján, Dušan BUSTIN a Zdeněk HLADKÝ. *Analytická chémie*. První. Bratislava: Nakladatelství technické literatury, 1987.
- [47] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. A dopl. Vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [48] CHRISTIAN, Gary D. *Analytical chemistry*. 5th ed. New York: Wiley, 1994, xx, 812p. ISBN 04-715-9761-9.
- [49] JUGL, Adam. *Charakterizace medicínských biopolymerů ultrazvukovou spektroskopií*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 41 s. Vedoucí práce Ing. Andrea Kargerová.
- [50] Introduction: High resolution ultrasonic spectroscopy. *Ultrasonic Scientific: the wave of the future* [online]. 2007 [cit. 2016-02-14]. Dostupné z: <http://www.ultrasonic-scientific.com/Technology/Technology%20-%20intro.htm>
- [51] BUCKIN, Vitaly, KUDRYASHOV, Eugeny; O'DRISCOLL Breda. High-resolution ultrasonic spectroscopy for material analysis. *Spectroscopy perspectives*. 2002, č. 28, s. 28-31.
- [52] PEKAŘ, M., KUČERÍK J.; ŠMEJKALOVÁ D.. Nové možnosti ultrazvukové spektroskopie v koloidní chemii. *CHEMagazín*. 2005, roč. 15, č. 1, s. 12-14.
- [53] Principles of the ultrasonic measurement. *Ultrasonic Scientific: The wave of the future* [online]. 2007 [cit. 2016-02-14]. Dostupné z: <http://www.ultrasonic-scientific.com/Technology/Technology%20-%20principles.htm>
- [54] The Ultrasonic wave: Direct probing of intermolecular forces. *Ultrasonic Scientific: The wave of the future* [online]. 2007 [cit. 2016-02-14]. Dostupné z: <http://www.ultrasonic-scientific.com/Technology/Technology%20-%20principles.htm>
- [55] The Ultrasonic wave: Direct probing of intermolecular forces. *Ultrasonic Scientific: The wave of the future* [online]. 2007 [cit. 2016-02-14]. Dostupné z: <http://www.ultrasonic-scientific.com/Technology/Technology%20-%20US%20wave.htm>
- [56] Ultrasonic attenuation. *Ultrasonic Scientific: the wave of the future* [online]. 2007 [cit. 2016-02-14]. Dostupné z: <http://www.ultrasonic-scientific.com/Technology/Technology%20-%20attenuation.htm>

- [57] O'DRISCOLL, B., C. SMYTH, A.C. ALTING, R.W. VISSCHER a V. BUCKIN. Recent applications for high – resolution ultrasonic spectroscopy. *American Laboratory*. 2003, s. 54-57.
- [58] MALVERN INSTRUMENTS LTD. *Zetasizer Nano: Příručka pro uživatele. 3.0.* Worcestershire, United Kingdom, 2007, 196 s.
- [59] KVÍTEK, Libor. Metody studia koloidních soustav. In: *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis* [online]. Olomouc, Czech Republic: Faculty of Physical Culture, Palacky University [cit. 2016-04-15]. Dostupné z: <http://chemikalie.upol.cz/skripta/>
- [60] Optické vlastnosti koloidních soustav: fyzikální princip metody měření velikosti částic a zeta potenciálu. *Krystalografická společnost* [online]. 2008 [cit. 2016-04-15]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/texty-ulohy-uvod.htm>
- [61] KVÍTEK, Libor, NOVOTNÝ a Petr PIKAL. Stanovení velikostní distribuce částic anorganických disperzí metodou dynamického rozptylu světla. *Chemické listy*. 1998, č. 92, s. 431-433. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1998_05_431-433.pdf
- [62] HOLOUBEK, Jaroslav. Some applications of light scattering in materials science. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* [online]. 2007, **106**(1-3), 104-121 [cit. 2016-04-15]. DOI: 10.1016/j.jqsrt.2007.01.013. ISSN 00224073. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022407307000246>
- [63] *DYNAMIC LIGHT SCATTERING: COMMON TERMS DEFINED* [online]. 2011 [cit.2016-04-17]. Dostupné z: http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/wpcontent/uploads/2011/02/DLS_Terms_defined_Malvern.pdf
- [64] Krystalografická společnost [online]. 2001 [cit. 2016-04-15]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.htm>
- [65] KVÍTEK, Libor. *Základy koloidní chemie. 1. Vyd.* Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007, 70 s. ISBN 978-80-244-1669-4.
- [66] SIMULESCU, Vasile, Michal KALINA, Jakub MONDEK a Miloslav PEKAŘ. Long-term degradation study of hyaluronic acid in aqueous solutions without protection against microorganisms. *Carbohydrate Polymers*. 2016, **137**, 664-668. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.10.101. ISSN 01448617. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861715010814>

5 SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

Da	Dalton, $1 \text{ Da} = 1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
hm%	Hmotnostní koncentrace (podíl hmotnosti složky k hmotnosti rozpouštědla)
0,1%, 0,051 4%	Ve spojitosti s roztoky hyaluronanu respektive NaPSS se jedná opět o hmotnostní koncentraci
M	Molarita [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]
siRNA	Short interfering RNA
HA, Hya	Hyaluronan, z anglického hyaluronic acid
pH	Záporně vzatý dekadický logaritmus aktivity oxoniových kationtů, určuje míru kyselosti vzorku
pK	Záporný dekadický logaritmus disociační konstanty při 25°C
pI	Isoelektrický bod aminokyseliny, hodnota pH při kterém aminokyselina nenese v celkovém součtu náboj
M_w	Molekulová hmotnost, z anglického molecular weight
Hz	Hertz, jednotka frekvence
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, z anglického high performance liquid chromatography
I	Iontová síla roztoku je veličina charakterizující množství částic nabitých částic v roztoku.
CTAB/TTAB	Kationaktivní tenzidy Cetyltrimethylammonium bromid/tetradecyltrimethylammonium bromid
NaPSS	Polystyren sulfonát sodný
(C_8mimBr)/ ($\text{C}_{14}\text{mimBr}$)	Kationaktivní tenzidy 1-octyl-3-methylimidazolium bromid/1-methyl-3-tetradecylimidazolium bromid
CMC	Kritická micelární koncentrace (koncentrace, při níž dochází v roztoku k tvorbě micel)
ot/min	Jednotka rychlosti, udává počet otáček za minutu.
č. p.	Číslo píku
Arg	Arginin
Arg.HCl	Arginin hydrochlorid
Lys	Lysin

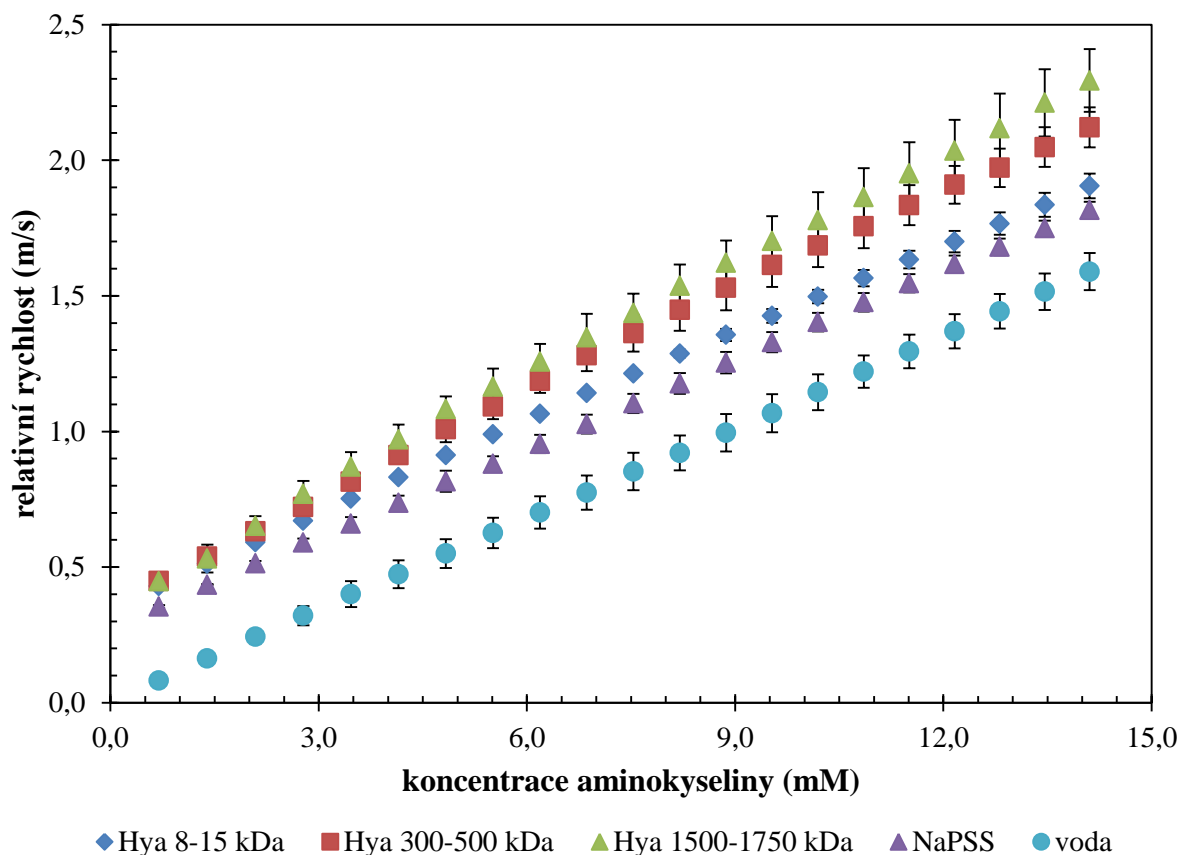
6AKK

6-aminokapronová kyselina

DLS

Dynamický rozptyl světla z anglického „dynamic light scattering“

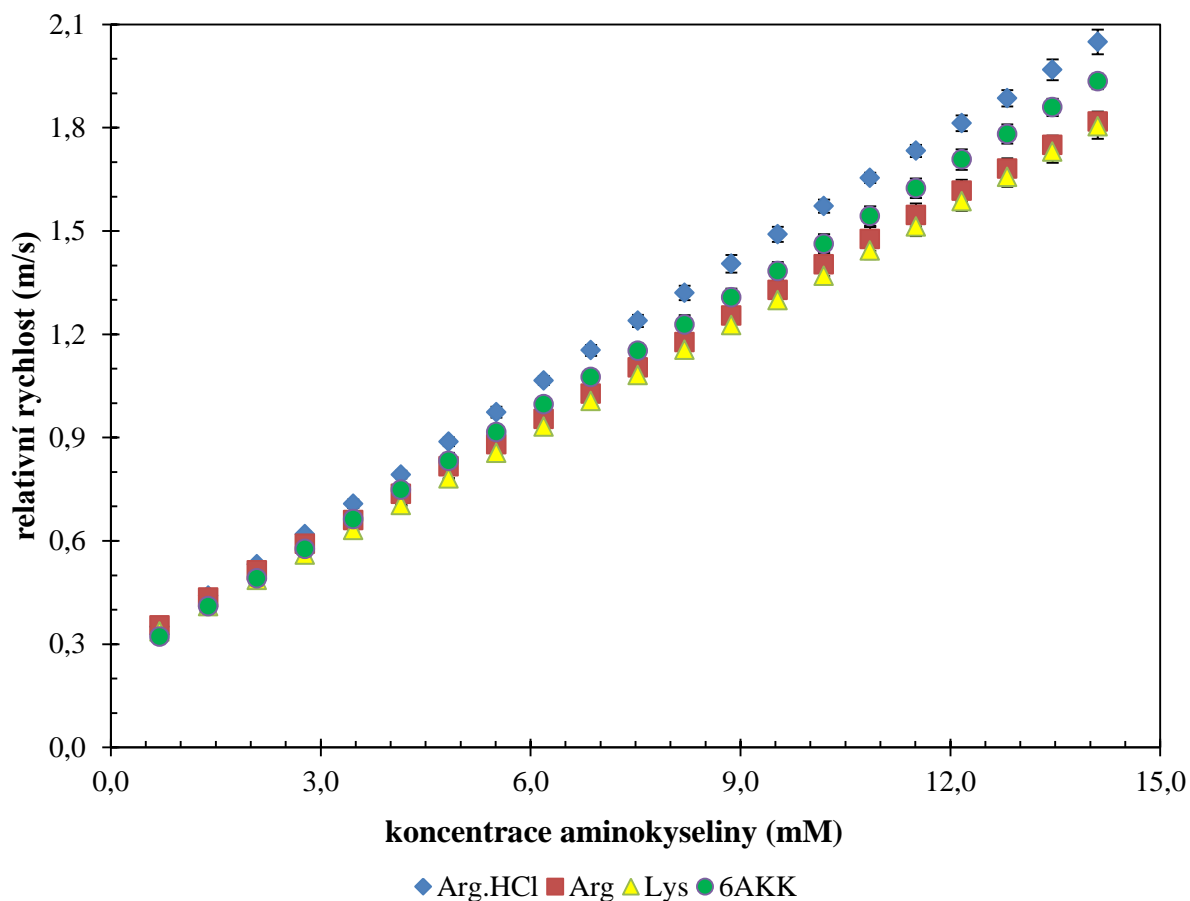
6 PŘÍLOHY



Obrázek P 1: Graf znázorňující velikosti relativní rychlosti v závislosti na koncentraci přidaného Arg a druhu titrovaného roztoku (č. p. 94,3)

Tabulka P 1: Směrnicové tvary přímek vzniklé proložení naměřených dat během titrací Arg hydrochloridu pro jednotlivá prostředí, spolu s vícenásobným korelačním koeficientem.

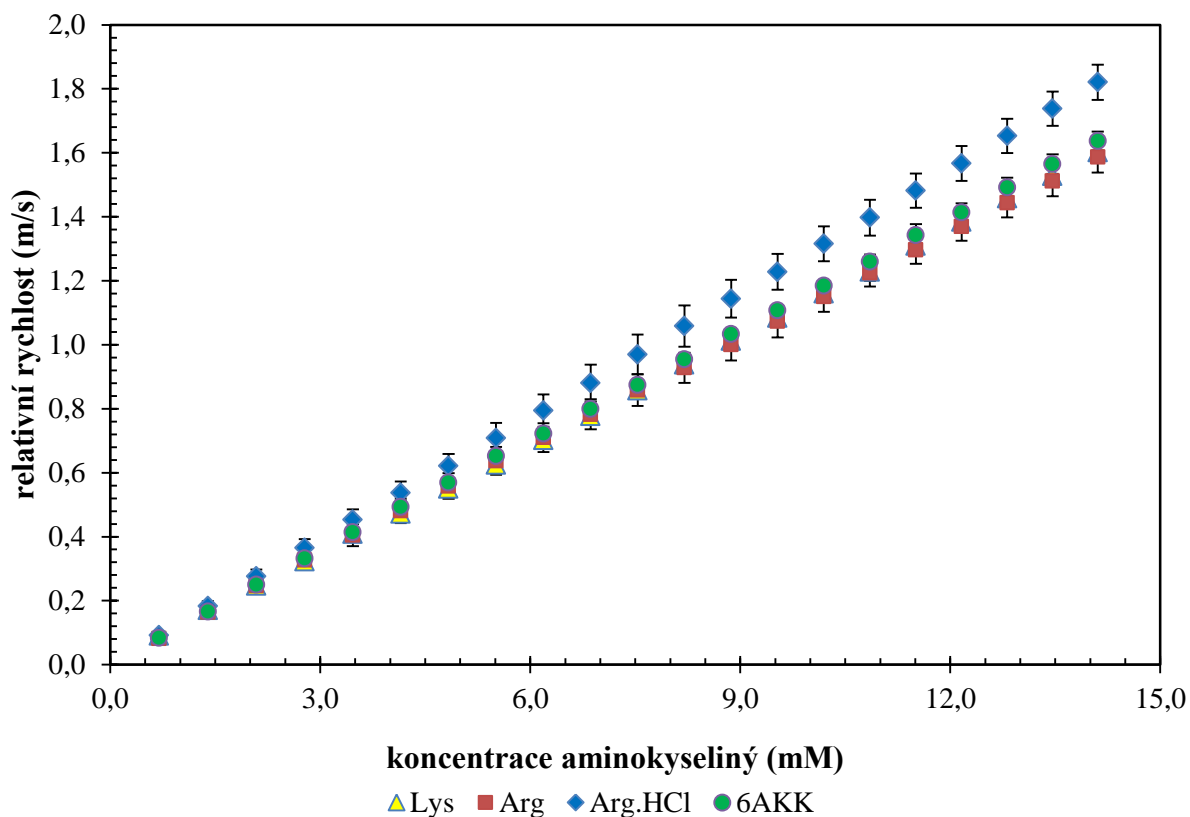
Arg	směrnicový tvar přímky				
	směrnice	odchylka směrnice	úsek (osa y)	odchylka úseku (osa y)	vícenásobný korelační koeficient
Hya 1 500–1 750 kDa	0,135 5	0,001 7	0,394 1	0,014 5	0,995 2
Hya 300–500 kDa	0,125 6	0,001 7	0,388 9	0,014 3	0,994 6
Hya 8–15 kDa	0,109 7	0,000 7	0,373 5	0,006 0	0,998 8
NaPSS	0,109 3	0,000 8	0,282 7	0,006 7	0,998 4
voda	0,111 4	0,001 1	0,015 2	0,009 2	0,997 2



Obrázek P 2: Graf znázorňující velikosti relativní rychlosti na koncentraci přidaného titračního činidla pro prostředí roztoku NaPSS. (č. p. 94,3).

Tabulka P 2: Směrnicové tvary přímek vzniklé proložení naměřených dat během titrací různých titračních činidel do prostředí NaPSS.

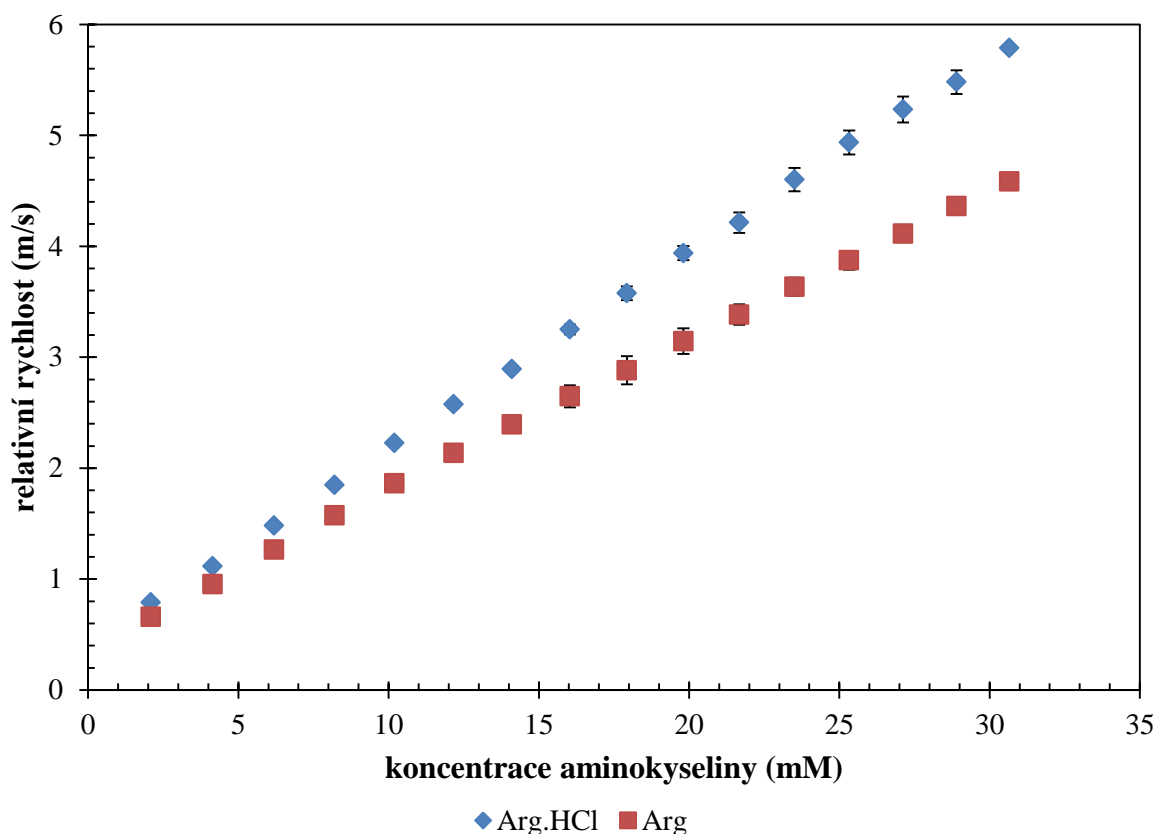
NaPSS	směrnicový tvar přímky				
	směrnice	odchylka směrnice	úsek (osa y)	odchylka úseku (osa y)	vícenásobný korelační koeficient
Arg.HCl	0,126 9	0,000 5	0,271 0	0,004 6	0,999 4
Arg	0,109 3	0,000 8	0,282 7	0,006 7	0,998 4
Lys	0,109 5	0,000 5	0,254 7	0,004 1	0,999 4
6AKK	0,119 8	0,000 6	0,246 2	0,004 9	0,999 3



Obrázek P 3: Graf znázorňující velikosti relativní rychlosti na koncentraci přidaného titračního činidla do vody. (č. p. 94,3).

Tabulka P 3: Směrnicové tvary přímek vzniklé proložení naměřených dat během titrací různých titračních činidel do prostředí vody.

Voda	směrnicový tvar přímky				
	směrnice	odchylka směrnice	úsek (osa y)	odchylka úseku (osa y)	vícenásobný korelační koeficient
Arg.HCl	0,128 6	0,001 2	0,003 1	0,010 6	0,997 2
Arg	0,111 4	0,001 1	0,015 2	0,009 2	0,997 2
Lys	0,112 8	0,000 5	0,009 5	0,004 6	0,999 3
6AKK	0,115 5	0,000 5	0,008 8	0,004 3	0,999 4



Obrázek P 4: Graf znázorňující velikosti relativní rychlosti na koncentraci přidaného titračního činidla pro prostředí roztoku hyaluronanu 1 500–1 750 kDa (č. p. 94,3).

Tabulka P 4: Směrnivé tvary přímek vzniklé proložení naměřených dat během titrací různých titračních činidel do prostředí hyaluronanu 1 500–1 750 kDa.

Hya 1 500–1 750 kDa	směrnivý tvar přímky				
Titrační činidlo	směrnice	odchylka směrnice	úsek (osa y)	odchylka úseku (osa y)	vícenásobný korelační koeficient
Arg.HCl	0,177 0	0,000 8	0,136 2	0,014 6	0,999 1
Arg	0,136 3	0,000 8	0,433 6	0,016 0	0,998 2

Tabulka P 5: Hmotnost 1 ml hyaluronanu o koncentraci 0,1 %hm.

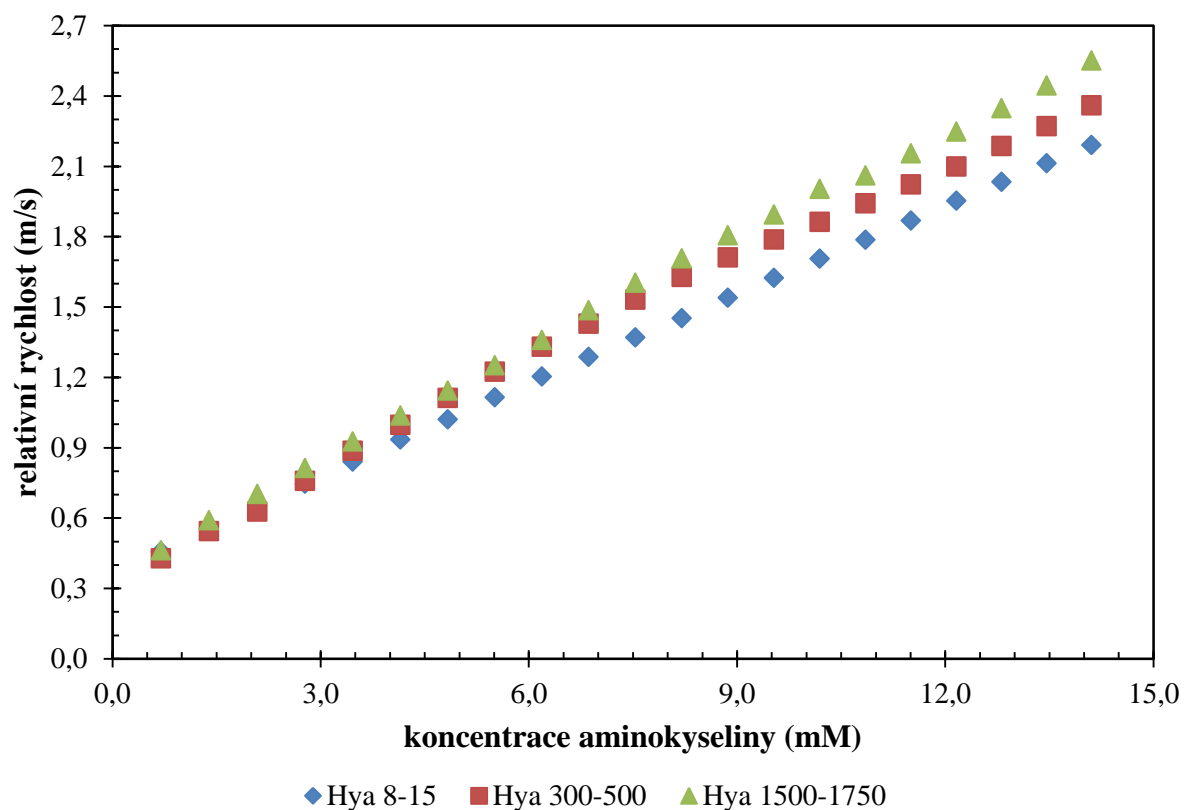
Hyaluronan 0,1 %hm	
Číslo měření	hmotnost (g)
1	1,008 8
2	1,008 7

3	1,005 6
4	1,006 2
5	1,005 7
6	1,004 3
7	1,006 7
8	1,005 8
9	1,004 8
10	1,007 5

Průměr	1,006 4
Směrodatná odchylka	0,001 4

Tabulka P 6: Hmotnost 10 μ l titračních činidel o koncentraci 0,35 M.

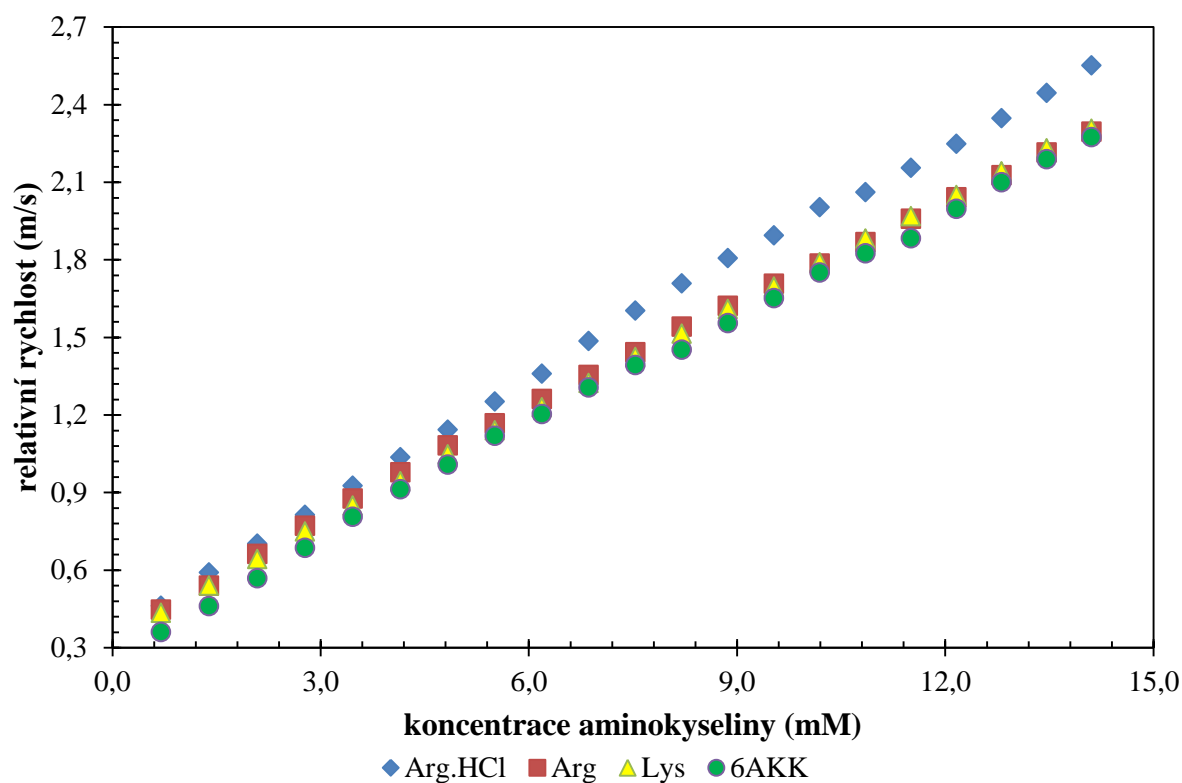
0,35M titrační činidla				
Číslo měření	hmotnost			
	6AKK	Lys	Arg	Arg hydrochlorid
1	0,009 2	0,010 0	0,009 9	0,010 0
2	0,009 5	0,010 2	0,010 1	0,010 1
3	0,009 8	0,010 2	0,010 2	0,010 2
4	0,009 7	0,010 1	0,010 1	0,010 4
5	0,009 8	0,010 0	0,010 0	0,010 2
6	0,009 7	0,010 1	0,009 9	0,010 1
7	0,010 2	0,010 3	0,010 1	0,010 3
8	0,009 9	0,009 9	0,010 3	0,010 2
9	0,009 6	0,010 2	0,010 0	0,010 4
10	0,009 8	0,010 1	0,010 2	0,010 1
Průměr	0,009 7	0,010 1	0,010 1	0,010 2
Směrodatná odchylka	0,000 2	0,000 1	0,000 1	0,000 1



Obrázek P 5: Graf znázorňující velikosti relativní rychlosti v závislosti na koncentraci přidaného Arg hydrochloridu a druhu titrovaného roztoku při uvažovaném ředění roztoků v průběhu titrace (č. p. 94,3).

Tabulka P 7: Směrnicové tvary přímek vzniklé proložení dat během titrací Arg hydrochloridu pro jednotlivá prostředí, spolu s vícenásobným korelačním koeficientem při uvažování ředění roztoků.

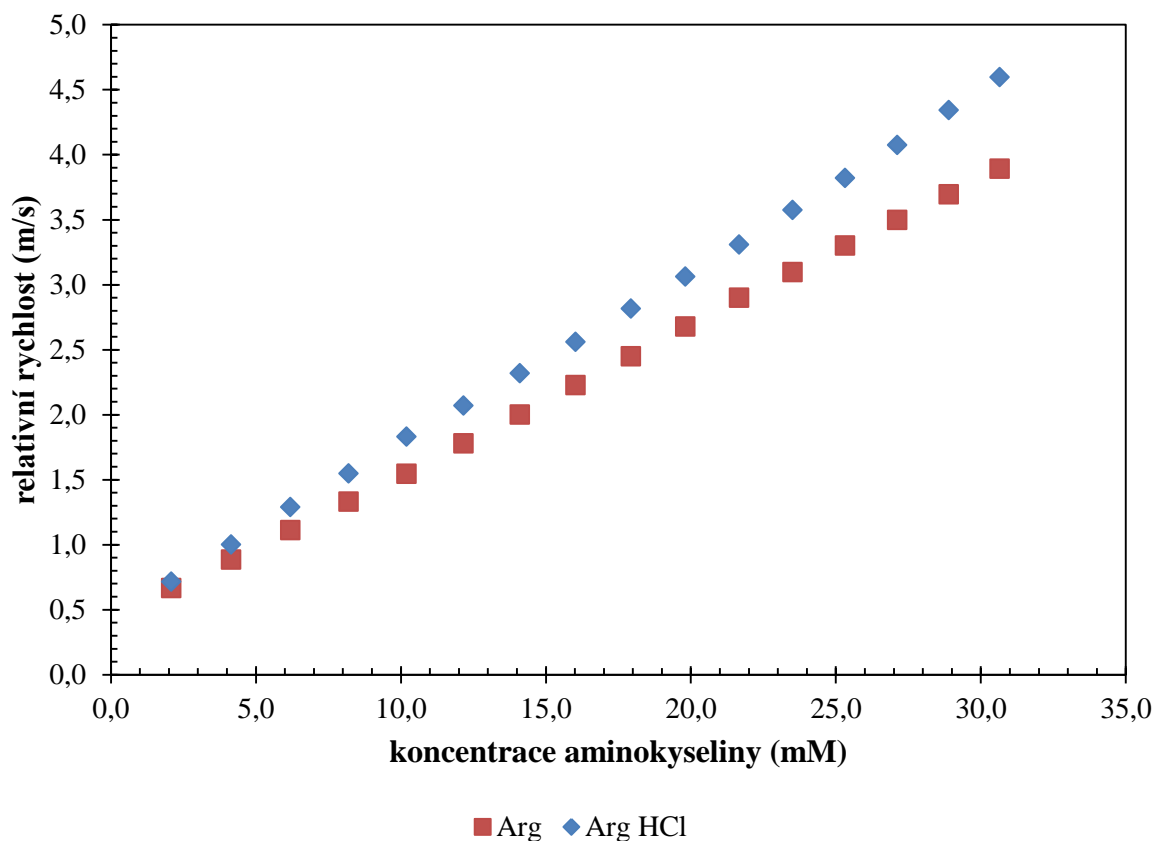
Arg hydrochlorid	směrnicový tvar přímky				
	směrnice	odchylka směrnice	úsek (osa y)	odchylka úseku (osa y)	vícenásobný korelační koeficient
Hya 1 500–1 750 kDa	0,154 6	0,001 5	0,394 5	0,012 5	0,999 1
Hya 300–500 kDa	0,143 3	0,002 4	0,390 8	0,020 8	0,997 3
Hya 8–15 kDa	0,128 7	0,000 6	0,390 9	0,005 1	0,999 8



Obrázek P 6: Graf znázorňující velikosti relativní rychlosti na koncentraci přidaného titračního činidla pro prostředí roztoku hyaluronanu 1 500–1 750 kDa při uvažovaném ředění roztoků v průběhu titrace (č. p. 94,3).

Tabulka P 8: Směrnicové tvary přímek vzniklé proložením dat během titrací různých titračních činidel do prostředí hyaluronanu 1 500–1 750 kDa při uvažování ředění roztoků v průběhu titrace.

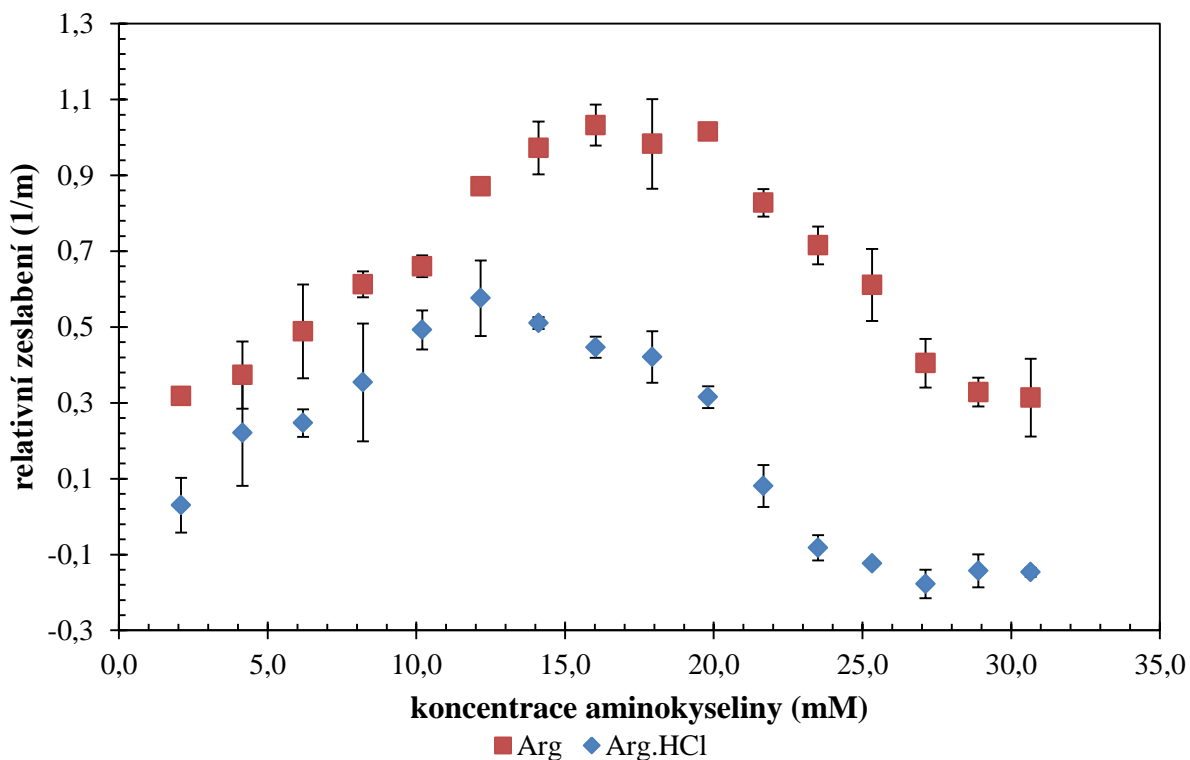
Hya 1 500–1 750 kDa	směrnicový tvar přímky				
Titrační činidlo	směrnice	odchylka směrnice	úsek (osa y)	odchylka úseku (osa y)	vícenásobný korelační koeficient
Arg.HCl	0,154 6	0,001 5	0,394 5	0,012 5	0,999 1
Arg	0,136 5	0,001 2	0,394 1	0,010 3	0,999 2
Lys	0,139 6	0,000 6	0,360 0	0,005 1	0,999 8
6AKK	0,140 6	0,001 4	0,304 0	0,011 9	0,999 1



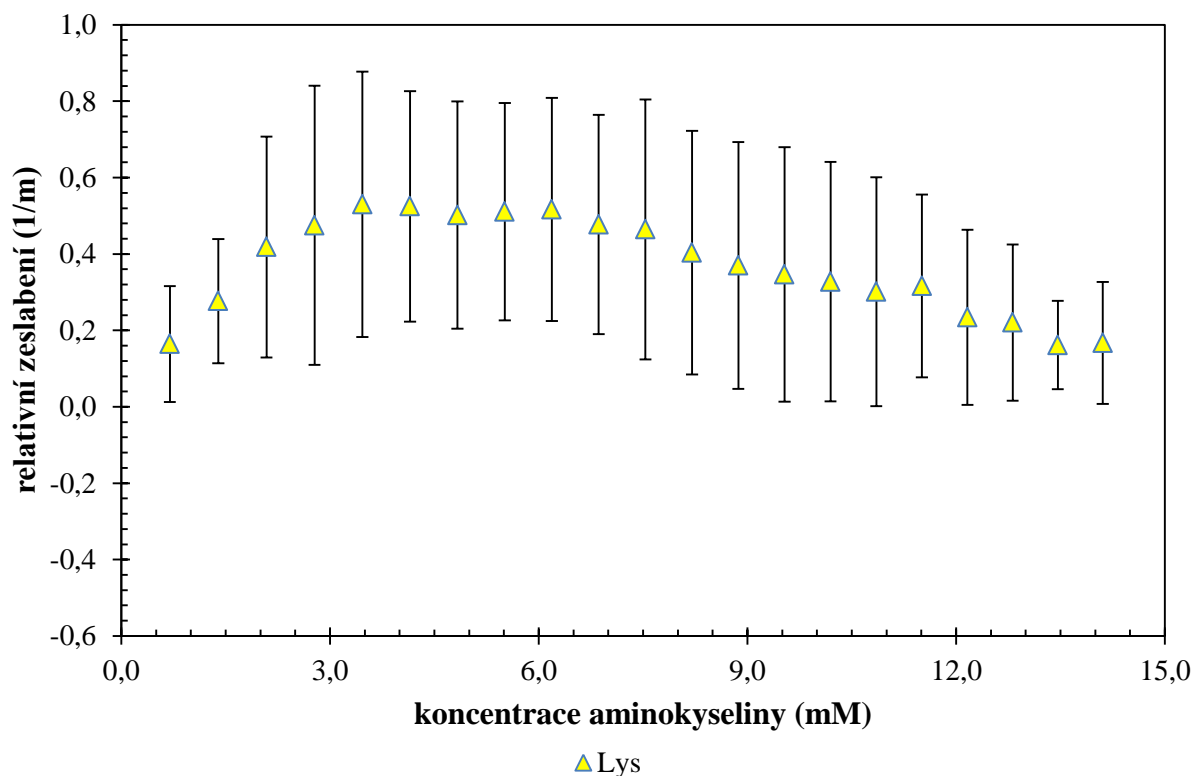
Obrázek P 7: Graf znázorňující velikosti relativní rychlosti na koncentraci přidaného titračního činidla pro prostředí roztoku hyaluronanu 8–15 kDa při uvažovaném ředění roztoků v průběhu titrace (č. p. 94,3).

Tabulka P 9: Směrnice tvary přímek vzniklé proložení dat během titrací různých titračních činidel do prostředí hyaluronanu 8–15 kDa při uvažování ředění roztoků v průběhu titrace.

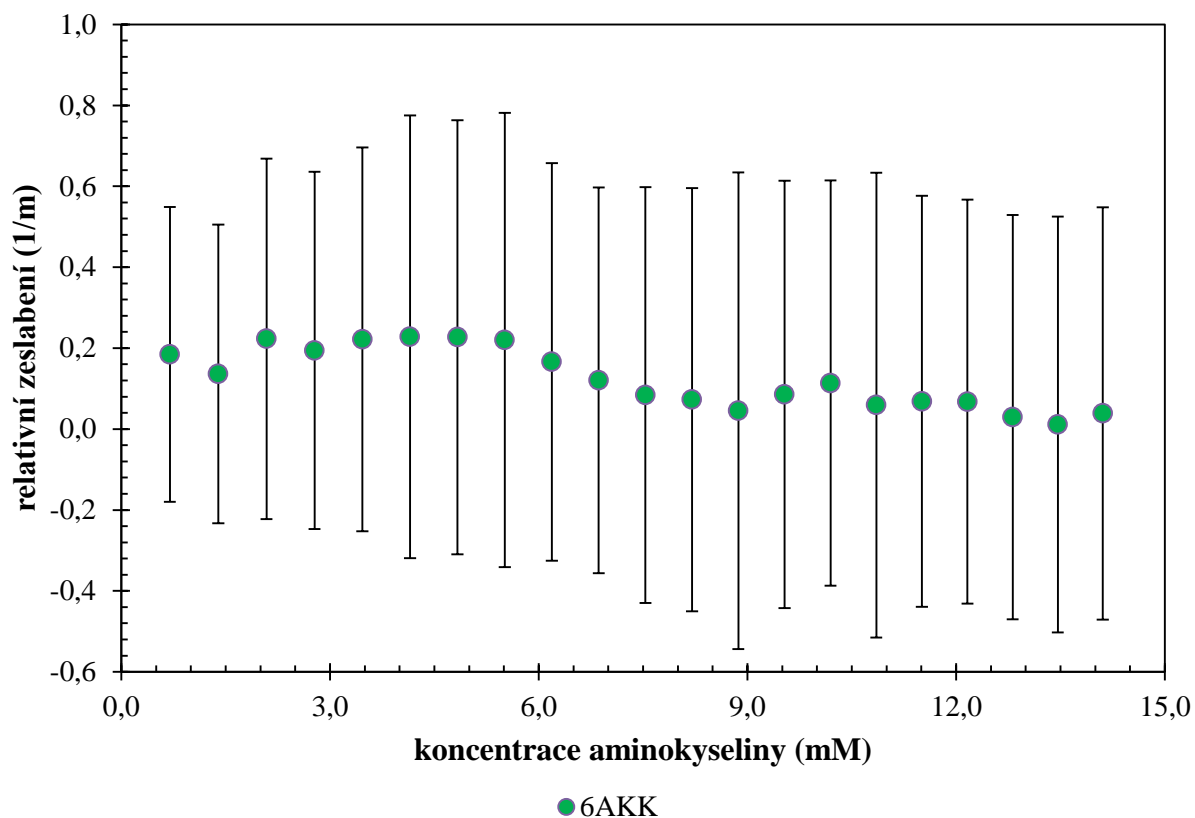
Hya 8–15 kDa	směrnice tvar přímky				
Titrační činidlo	směrnice	odchylka směrnice	úsek (osa y)	odchylka úseku (osa y)	vícenásobný korelační koeficient
Arg.HCl	0,134 1	0,000 7	0,436 2	0,013 3	0,999 8
Arg	0,114 1	0,000 4	0,404 9	0,007 3	0,999 9



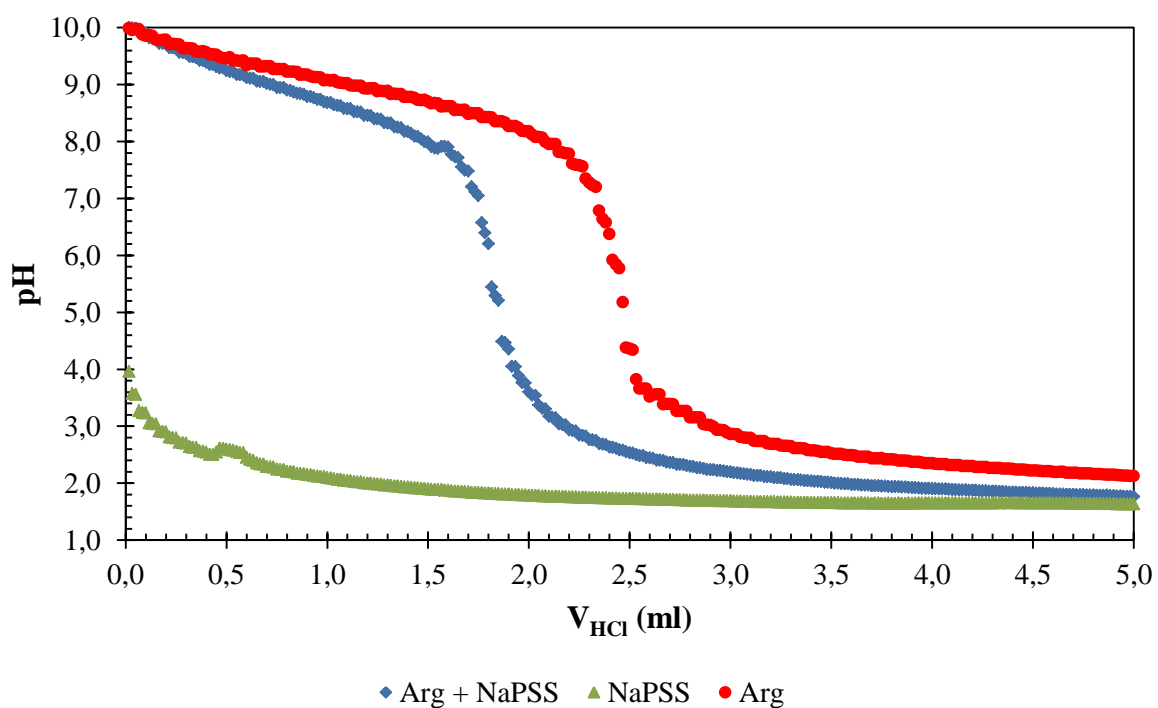
Obrázek P 8: Graf znázorňující velikosti relativního zeslabení na koncentraci přidaného titračního činidla pro prostředí roztoku hyaluronanu 8–15 kDa (č. p. 94,3).



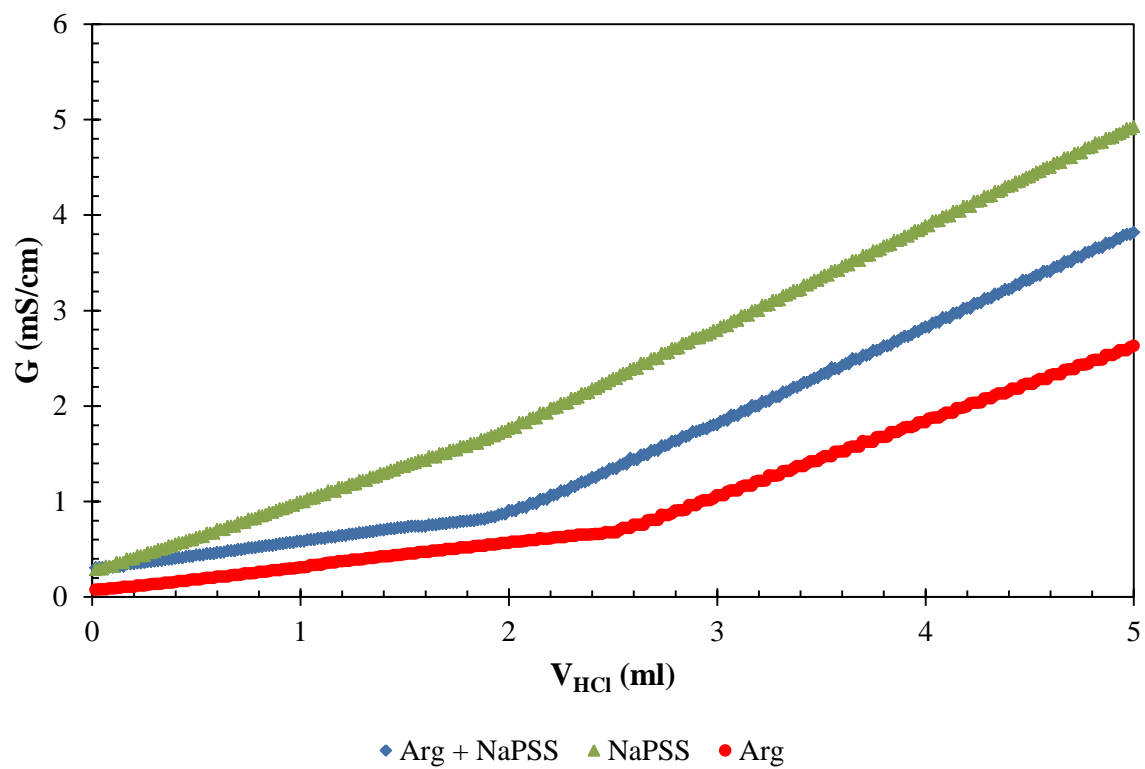
Obrázek P 9: Graf znázorňující velikosti relativního zeslabení na koncentraci přidaného titračního činidla do vody (č. p. 94,3).



Obrázek P 10: Graf znázorňující velikosti relativního zeslabení na koncentraci přidaného titračního činidla do vody (č. p. 94,3).



Obrázek P 11: Graf znázorňující změnu pH během přidavků 0,1 M HCl pro různé systémy.



Obrázek P 12: Graf znázorňující změnu vodivosti během přidavků 0,1 M HCl pro různé systémy.