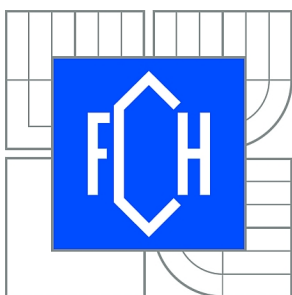




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# VISKOZIMETRICKÉ STUDIUM CHOVÁNÍ SYSTÉMŮ L-LYSINU A 6-AMINOKAPRONOVÉ KYSELINY S HYALURONANEM V OBLASTI NÍZKÝCH KONCENTRACÍ AMINOKYSELIN

VISCOMETRIC STUDY OF L-LYSINE- AND 6-AMINOCAPROIC ACID-HYALURONAN SYSTEMS  
BEHAVIOR WITHIN THE RANGE OF LOW AMINOACIDS CONCENTRATIONS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

MARCELA ŠIMÁČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. MARTIN CHYTIL, Ph.D.

BRNO 2012



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

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0702/2011** Akademický rok: **2011/2012**  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Student(ka): **Marcela Šimáčková**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie (B2801)  
Studijní obor: Spotřební chemie (2806R002)  
Vedoucí práce: **Ing. Martin Chytil, Ph.D.**  
Konzultanti:

### Název bakalářské práce:

Viskozimetrické studium chování systémů L-Lysinu a 6-aminokapronové kyseliny s hyaluronanem v oblasti nízkých koncentrací aminokyselin

### Zadání bakalářské práce:

Viskozimetrická měření systémů hyaluronanu s protonizovanými aminokyselinami v oblasti nízkých koncentrací aminokyseliny.

Porovnání s předchozími poznatky o interaktivitě hyaluronanu s protonizovanými aminokyselinami.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 4.5.2012

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

-----  
Marcela Šimáčková  
Student(ka)

-----  
Ing. Martin Chytil, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2012

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Tato práce se zabývá studiem interakcí mezi vysokomolekulovou kyselinou hyaluronovou (1,75 MDa HA) a aminokyselinami, konkrétně lysinem a 6-aminokapronovou kyselinou. K interakcím by mělo docházet mezi karboxylovou skupinou vázanou v molekule řetězce HA nesoucí záporný náboj a kladným nábojem nacházejícím se na atomu dusíku protonizované aminokyseliny. Přítomnost těchto interakcí by pak znamenala možnost navázání např. léčiv na modifikovanou kyselinu hyaluronovou. V takovém případě by HA fungovala jako cílený nosič.

Interakce byly zkoumány v oblasti nízkých koncentrací pro obě aminokyseliny, konkrétně pod  $10 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , a pro 6-aminokapronovou kyselinu také v oblasti vysokých koncentrací, konkrétně nad  $20 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Přítomnost interakcí byla zkoumána nejen pomocí reologie, ale i měřením pH a vodivosti. Na základě tohoto výzkumu byly interakce potvrzeny poklesem viskozity v systému.

## **ABSTRACT**

This bachelor thesis investigates the interaction between high-molecular weight hyaluronic acid (1.75 MDa HA) and amino acids, particularly lysine and 6-aminocaproic acid. The interactions should occur between the carboxyl groups of HA carrying a negative charge and a positive charge located on the nitrogen atom of the protonated amino acids. The presence of these interactions would mean the possibility of establishing bioactive compounds, e.g. drugs, on hyaluronic acid, in which it would act as a targeting carrier.

The interactions were examined at low concentrations for both aminoacids, i.e. below  $10 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , and for 6-aminocaproic acid also at high aminoacid concentrations, i.e. above  $20 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . The presence of interaction was investigated using not only rheology, but also by measuring pH and conductivity. Based on this research, the interactions manifested in terms of a decrease in the system viscosity.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

kyselina hyaluronová, lysin, 6-aminokapronová kyselina, reologie, interakce

## **KEY WORDS**

hyaluronic acid, lysine, 6-aminocaproic acid, rheology, interaction

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..

## PROHLÁŠENÍ

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

.....  
podpis studenta

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu této práce Ing. Martinu Chytilovi, Ph.D. za ochotu, trpělivost, připomínky a odborné rady při konzultacích. Dále bych ráda poděkovala svému příteli Tomáši Bělochovi za pomoc při tvorbě grafiky a podporu.

## OBSAH

1. ÚVOD .....	7
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1. Kyselina hyaluronová.....	8
2.1.1. Úvod.....	8
2.1.2. Struktura.....	8
2.1.3. Výskyt .....	10
2.1.4. Výroba.....	10
2.1.5. Využití.....	10
2.1.6. Reologické vlastnosti .....	11
2.1.7. Interakce kyseliny hyaluronové .....	12
2.2. Lysin.....	14
2.3. 6-aminokapronová kyselina .....	15
2.4. Konduktometrie.....	15
2.4.1. Základní definice.....	15
2.4.2. Metody měření vodivosti .....	16
2.5. pH metrie.....	17
2.5.1. Základní definice.....	17
2.5.2. Metody stanovení pH .....	18
2.5.2.1. Stanovení pomocí univerzálních indikátorových papírků.....	18
2.5.2.2. Stanovení pomocí acidobazických indikátorů.....	18
2.5.2.3. Stanovení pomocí pH-metru .....	18
2.5.3. Chloridostříbrná elektroda.....	18
2.6. Reologie .....	19
2.6.1. Základní definice.....	19
2.6.2. Newtonské a neneutonské kapaliny .....	21
2.6.2.1. Newtonské kapaliny .....	21
2.6.2.2. Neneutonské kapaliny .....	21
2.6.2.2.1. Pseudoplastické neneutonské kapaliny .....	22
2.6.2.2.2. Dilatantní neneutonské kapaliny .....	22
2.6.2.2.3. Plastické neneutonské kapaliny.....	22
2.6.3. Tixotropie a reopexie .....	23
2.7. Reometrie (měřicí systémy) .....	23

2.7.1.	Měřicí systém kužel-deska .....	24
2.7.2.	Měřicí systém dvou souosých válců.....	25
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	26
3.1.	Použité materiály k přípravě roztoků .....	26
3.2.	Metody .....	26
3.2.1.	Příprava roztoků .....	26
3.2.2.	Měření pH .....	27
3.2.3.	Měření vodivosti .....	28
3.2.4.	Reologická měření.....	28
3.3.	Vyhodnocení naměřených dat .....	29
3.3.1.	Vyhodnocení pH .....	29
3.3.2.	Vyhodnocení vodivosti .....	30
3.3.3.	Vyhodnocení reologie .....	31
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	33
4.1.	Měření pH .....	33
4.2.	Měření vodivosti .....	35
4.3.	Reologická měření.....	37
5.	ZÁVĚR.....	43
6.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	44
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	46
8.	PŘÍLOHY.....	47

# 1. ÚVOD

Kyselina hyaluronová byla poprvé izolována v roce 1934 Karlem Mayerem a jeho asistentem Johnem Palmerem z očního sklivce skotu. Kyselina hyaluronová ovlivňuje náš každodenní život. Jedná se o látku, která se přirozeně vyskytuje v lidském organismu, avšak její koncentrace s věkem klesá. Nachází se v synoviální tekutině, kůži, pojivových tkáních a kapilárních stěnách. Lidské tělo tedy nejen že dokáže tuto látku vyrobit, ale dokáže ji také samo odbourávat. Její vysoké hydrofilní a viskoelastické vlastnosti zajišťují v těle řadu důležitých funkcí jako např. hydrataci tkání, tlumení nárazů při chůzi nebo promazávání pohyblivých částí těla, jako jsou klouby. Právě díky těmto předpokladům si kyselina hyaluronová našla široké uplatnění nejen v lékařství, ale i v kosmetice.

V současné době je však výzkum kyseliny hyaluronové zaměřen zejména na její použití v lékařství, konkrétně pak k léčení rakoviny. Na základě výsledků výzkumu bylo prokázáno, že HA se nachází ve zvýšeném množství i v rakovinotvorných buňkách, kde je vázána pomocí buněčných receptorů CD44. Právě tato skutečnost by mohla být s výhodou využita k léčení rakoviny, kdy by pacient nemusel absolvovat chemoterapii. Kyselina hyaluronová by tedy mohla fungovat jako přenašeč, který by zanesl léčivo přímo k postižené buňce rakovinou. Další využití HA v lékařství je zejména k výrobě očních a nosních kapek, zvlhčujících povrch oka a sliznice, hojení a regeneraci pooperačních a kožních ran.

Tato práce navazuje na bakalářskou práci Bc. Jana Zemana (*Reologické studium interakcí vysokomolekulárního hyaluronanu a protonizovaných aminokyselin*), v jehož studii byly dokázány elektrostatické interakce kyseliny hyaluronové s aminokyselinami, konkrétně pak s lysinem a 6-aminokapronovou kyselinou. V tomto případě se jednalo o studium interakcí vysokomolekulového hyaluronanu s příslušnými aminokyselinami v širším koncentračním rozpětí.

Hlavním cílem této práce je však prokázat přítomnost elektrostatických interakcí mezi hyaluronanem s lysinem v oblasti nízkých koncentrací a s 6-aminokapronovou kyselinou v oblasti nízkých i vysokých koncentrací. K interakcím by mělo docházet mezi aminoskupinou, která je obsažena v molekule aminokyseliny a karboxylovými skupinami nacházejících se v molekule hyaluronanu. Aminoskupina však musí být nejdříve protonizována minerální kyselinou. V této studii byla k protonizaci použita kyselina chlorovodíková.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

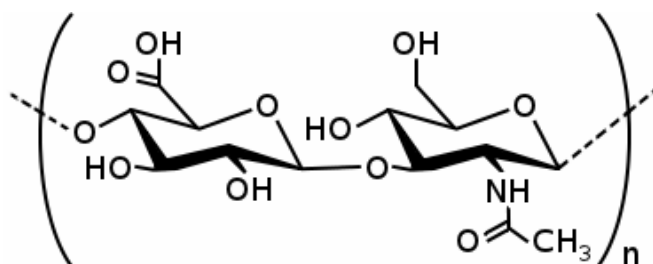
### 2.1. Kyselina hyaluronová

#### 2.1.1. Úvod

Kyselina hyaluronová byla poprvé izolována v roce 1934 Karlem Mayerem a jeho asistentem Johnem Palmerem z očního sklivce skotu. Postupným zkoumáním zjistili, že tato látka se skládá ze dvou molekul, uronové kyseliny a aminocukru. Od toho byl také odvozen její název, z řeckého slova "hyalos" (skelný) a z anglického uronic acid (uronová kyselina). Dnes je však tato makromolekula spíše nazývána jako "hyaluronan", což odráží skutečnost, že v živém organismu existuje jako sodná sůl kyseliny hyaluronové (sodium hyaluronate) [1,2]. Kyselina hyaluronová byla v běžné praxi poprvé použita v roce 1942, kdy Endre Balazs zažádal o patent pro použití jako náhradu za vaječný bílek v pekařských výrobcích [1].

#### 2.1.2. Struktura

Hyaluronan (hyaluronát sodný, kyselina hyaluronová, HA) je lineární přírodní polysacharid složený ze střídavě se opakujících disacharidových jednotek. Ty se skládají z N-acetyl-D-glukosaminu a D-glukuronové kyseliny a navzájem jsou vázány  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) a  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) glykosidickou vazbou [3].



Obrázek 1: Základní strukturní jednotka kyseliny hyaluronové

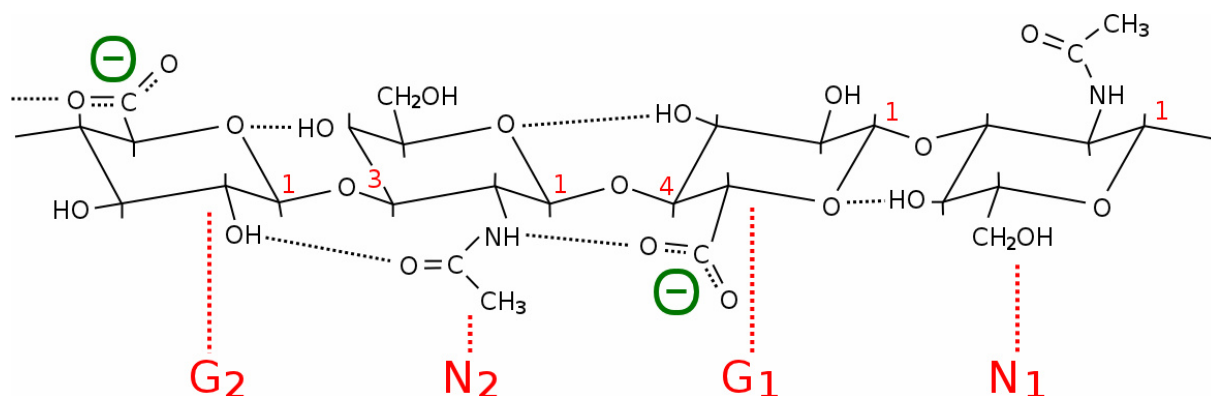
Počet  $n$  opakujících se disacharidových jednotek v jedné molekule kyseliny hyaluronové může nabývat hodnot od několika tisíců až do deseti milionů. Každá disacharidová jednotka váží přibližně 400 daltonů (zkratka této jednotky je Da, kde  $1 \text{ Da} = 1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) a její průměrná délka je kolem 1 nm. Molekulová hmotnost kyseliny hyaluronové může dosáhnout až 4 milionů Da. Délka řetězce tedy závisí na molekulové hmotnosti. Pokud by molekula HA měla  $n$  blížící se 10 000, pak by její celková délka nataženého řetězce dosahovala 10  $\mu\text{m}$  [2].

Základní řetězec tvořený glukózovými kruhy, které jsou v  $\beta$  konfiguraci, umožňuje všechny své objemné skupiny (hydroxylovou skupinu a karboxylovou skupinu) mít v prostorově příznivých eqatoriálních (rovníkových) pozicích. Malé atomy vodíku zaujímají prostorově méně příznivé axiální (svislé) polohy. Z výše uvedeného vyplývá, že struktura disacharidu je energeticky velmi stabilní. Ke stabilizaci celé struktury přispívají také celkem čtyři vodíkové můstky na každý mer řetězce. K tvorbě vodíkových můstků dochází

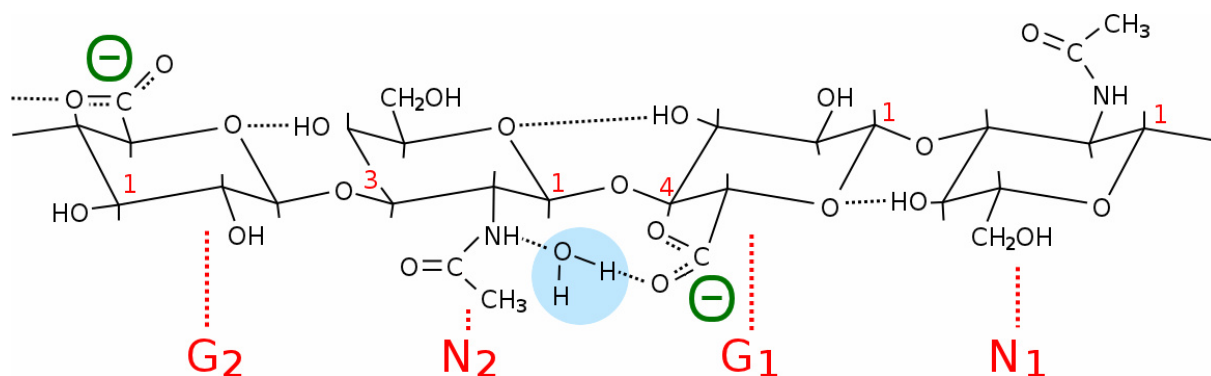


mezi vodíkem, vázaným na hydroxylových a karboxylových skupinách, a kyslíkem, který je vázán v glukózovém cyklu [1].

Ve vodném prostředí interaguje hyaluronan s rozpouštědlem, což se projevuje navázáním vody na strukturu řetězce. V tomto prostředí dochází k obtáčení struktury řetězce a vzniku šroubovice (helix). Axiální atomy vodíku tvoří nepolární (hydrofobní) část řetězce, zatímco rovníkové postranní hydroxylové a karboxylové skupiny tvoří polární (hydrofilní) část řetězce. Nepolární část řetězce je orientovaná dovnitř a polární část řetězce do vnějšího prostředí, které je tvořeno rozpouštědlem. Výsledkem této struktury je vysoká hydrofilita hyaluronanu, která způsobuje navázání molekuly vody na řetězec HA. Voda se váže do míst, kde se původně nacházely vodíkové můstky mezi aminoskupinou glukosaminu a karboxylovou skupinou glukuronové kyseliny. Dochází tak ke vzniku tzv. vodného můstku. Díky vysoké molekulové hmotnosti má kyselina hyaluronová unikátní viskoelastické a reologické vlastnosti, a proto hraje důležitou roli v živých organismech [1,2,3].



Obrázek 2: Znázornění vodíkových můstků mezi N-acetyl-D-glukosaminem (N) a kyselinou D-glukuronovou (G) v bezvodném prostředí



Obrázek 3: Znázornění vodíkových můstků mezi N-acetyl-D-glukosaminem (N) a kyselinou D-glukuronovou (G) ve vodném prostředí s vyznačeným vodným můstkem

Vodný roztok kyseliny hyaluronové je bezbarvý a bez zápachu. Viskozita (vnitřní odpor HA proti toku) i elasticita (schopnost struktury HA podléhat mechanickému namáhání, přičemž nedochází k jejímu trvalému poškození) kyseliny hyaluronové se liší v závislosti na její koncentraci a molekulové hmotnosti. Čím vyšší molekulové hmotnosti a koncentrace HA dosahuje, tím vyšší je její viskozita i elasticita [4].

### 2.1.3. Výskyt

HA se v lidském těle vyskytuje jako sodná sůl kyseliny hyaluronové (sodium hyaluronate). Ve vysokých koncentracích se nachází v některých měkkých pojivových tkáních, kůži, pupeční šňůře, synoviálních tekutinách, sklivci, plicích, ledvinách, mozku a svalových tkáních [1].

Tabulka 1: Výskyt kyseliny hyaluronové v různých živočišných tkáních [3]

Místo výskytu	Množství	Jednotka
Kohoutí hřebínek	7500	[ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]
Lidská pupeční šňůra	4100	[ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]
Lidská synoviální tekutina	1400 – 3600	[ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]
Nosní chrupavka skotu	1200	[ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]
Lidský sklivec	140 – 340	[ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]
Lidská pokožka	100	[ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]
Mozek králíka	65	[ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]
Srdce králíka	27	[ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]
Lidská moč	0,1 – 0,3	[ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]
Lidské sérum	0,01 – 0,1	[ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]

### 2.1.4. Výroba

Poprvé byla kyselina hyaluronová izolována v roce 1934 Karlem Mayerem a jeho asistentem z očního sklivce skotu. Následně byla získána z lidského pupečníku, a krátce poté o vysoké molekulové hmotnosti i z hřebínku kohouta [2]. V dnešní době je získávána pomocí biosyntézy některých bakterií z rodu *Streptococcus*. *Streptococcus equi* produkuje kyselinu hyaluronovou o nižších molekulových hmotnostech, *Streptococcus zooepidemicus* produkuje kyselinu hyaluronovou o vyšších molekulových hmotnostech, které se blíží 2 MDa [3,5,6].

### 2.1.5. Využití

Kyselina hyaluronová je v různých koncentracích lidskému tělu látka vlastní, nacházející se ve všech biologických tekutinách a tkáních. Je složkou pojivových tkání a kapilárních stěn, čímž brání pronikání cizorodých a patogenních látek do organismu. Vzhledem k tomu, že kyselina hyaluronová je vysoce hydrofilní, je její funkcí v těle, mimo jiné, vázat na sebe vodu, promazávat pohyblivé části těla (klouby) a tlumit nárazy při pohybu. Zároveň kontroluje hydrataci tkání a přenos vody v těle. Jeden gram HA je schopen na sebe navázat více než 2 litry vody, díky tomu můžeme kyselinu hyaluronovou označit za přírodní hydratační prostředek [4]. S přibývajícím věkem však obsah kyseliny hyaluronové v těle klesá (pokles HA začíná po 40. roku života). HA je tedy odbouratelná a v organismu nedochází k její kumulaci [7]. Díky tomuto předpokladu kyselina hyaluronová našla široké uplatnění jak v kosmetickém průmyslu, tak i v medicíně. V kosmetickém průmyslu je HA používána

zejména na obnovu a rekonstrukci měkkých tkání, k hydrataci pokožky. V medicíně se pak používá zejména jako diagnostický ukazatel pro mnoho nemocí včetně rakoviny (zvýšená hladina HA), ale i pro doplnění synoviální tekutiny pomocí nitrokloubních injekcí. Kyselina hyaluronová je hlavní složkou sklivce oka, a proto se používá v řadě očních operací, kde díky svým viskoelastickým vlastnostem chrání jemné oční tkáně a poskytuje prostor při chirurgických zákrocích. Její další možné použití je ve formě očních kapek, které přirozeně zvlhčují povrch oka a také ve formě nosních kapek zvlhčujících nosní sliznici. Mezi další možnosti využití patří hojení a regenerace pooperačních a kožních ran. Kyselina hyaluronová byla také zkoumána jako zprostředkovatel přenosu léků pro oční, nosní a plicní podání [1,2,3].

V současné době je však výzkum kyseliny hyaluronové zaměřen zejména na její použití v lékařství, konkrétně pak k léčení rakoviny. Na základě výsledků výzkumu bylo prokázáno, že HA se nachází ve zvýšeném množství i v rakovinotvorných buňkách, kde je vázána pomocí buněčných receptorů CD44. Právě tato skutečnost by mohla být s výhodou využita k léčení rakoviny, kdy by pacient nemusel absolvovat chemoterapii. Ta zasahuje celý lidský organismus, a tím pádem má i mnoho vedlejších účinků zhoršujících celkový zdravotní stav pacienta. Kyselina hyaluronová by tedy mohla fungovat jako přenašeč, který by zanesl léčivo přímo k rakovinou postižené buňce.

### 2.1.6. Reologické vlastnosti

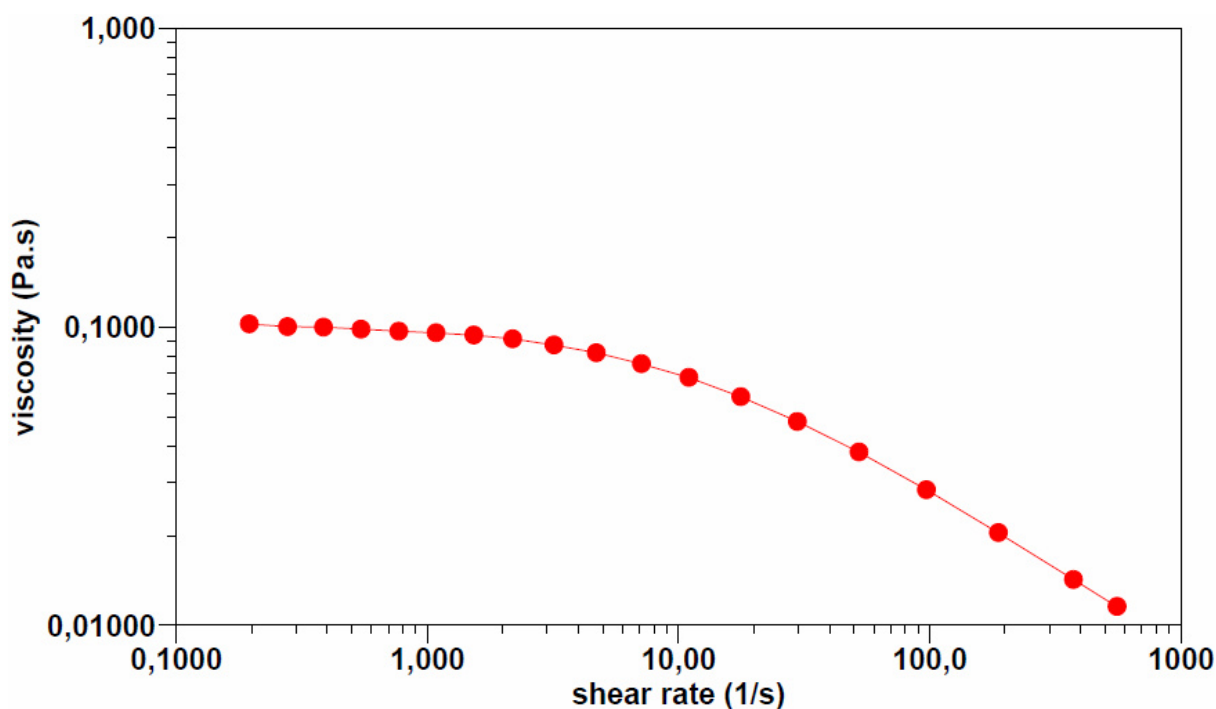
Již řadu let je zkoumáno chování kyseliny hyaluronové ve vodných roztocích z důvodu unikátních viskoelastických vlastností. Při dostatečně vysoké molekulové hmotnosti HA vykazuje za velmi nízkých koncentrací dosti vysokou viskozitu, která se však při zvyšující se smykové rychlosti snižuje. Z grafu (Obrázek 4), který znázorňuje tokovou křivku<sup>1</sup> kyseliny hyaluronové je patrné, že při velmi nízkých smykových rychlostech, kdy  $\dot{\gamma} \rightarrow 0$ , se roztok HA chová jako newtonská kapalina. V této oblasti je tedy charakterizována tzv. limitní viskozitou  $\eta_0$ . Obdobné chování je pozorovatelné i u vysokých smykových rychlostí, kde  $\dot{\gamma} \rightarrow \infty$ . V tomto případě je charakterizována tzv. asymptotickou viskozitou  $\eta_\infty$ , která dosahuje nižších hodnot než limitní viskozita. Přitom platí, že limitní viskozita je vykazována u HA s vysokou molekulovou hmotností (v řádech MDa), která má narozdíl od nízkomolekulové HA dostatečně dlouhé řetězce, u kterých dochází k jejich vzájemnému zaplétání v oblasti nízkých smykových rychlostí. U zapletených řetězců je lepší schopnost odolávat deformaci, nedochází však mezi nimi ke vzájemné interakci. Tato limitní viskozita je tedy závislá především na zmíněné molekulové hmotnosti, koncentraci daného roztoku a smykové rychlosti. Jedná se o projev typického newtonského chování. Pokud však dojde k velmi rychlému nárůstu smykové rychlosti, pohyblivost zapleteného řetězce HA začne být značně omezována a sníží se schopnost odolávat deformaci. Řetězce se orientují ve směru toku a následkem toho dojde k poklesu viskozity. V tomto okamžiku se jedná o charakteristické nenewtonské chování. Původního propletení řetězce může být opět

---

<sup>1</sup> Tokové křivky jsou charakteristické pro nenewtonské kapaliny, u kterých nemůžeme určit jednu hodnotu dynamické viskozity, která by byla konstantní v celém oboru tečného napětí. Tokové křivky tedy zobrazují grafické znázornění závislosti tečného napětí na smykové rychlosti, tj.  $\tau = \tau(\dot{\gamma})$ , nebo závislosti zdánlivé viskozity na smykové rychlosti, tj.  $\eta = \eta(\dot{\gamma})$  [8,9].

dosaženo pouze v omezené míře tím, že se po určité době část struktury řetězce zrelaxuje. To ovšem záleží na míře mechanického působení. Pokud je tedy dosahováno dostatečně velkých smykových rychlostí, k propletení řetězce již nedochází a HA bude opět vykazovat newtonské chování (asymptotická viskozita). Na základě těchto skutečností je kyselina hyaluronová řazena mezi pseudoplastické kapaliny [10,11,12,13].

U nízkomolekulové HA (pod 500 kDa) již popsané chování prokázáno nebylo. Vzhledem k tomu, že v tomto případě řetězec nedosahuje dostatečně velkých rozměrů, nedochází k jeho proplétání. Nízkomolekulová HA tedy vykazuje newtonské chování, tj. s rostoucí smykovou rychlostí nedochází k poklesu viskozity [10,12].



Obrázek 4: Toková křivka 0,1% roztoku 1,75 MDa kyseliny hyaluronové ve vodě při teplotě 25 °C

### 2.1.7. Interakce kyseliny hyaluronové

Jako interakce kyseliny hyaluronové jsou uvažovány elektrostatické interakce, tzv. Coulombické interakce. Jedná se o přitažlivé nebo odpuzivé nekovalentní interakce, které vznikají mezi dvěma opačně nabitými náboji nebo permanentními dipóly. Látky jsou k sobě přitahovány pomocí Coulombické síly, která je definována Coulombovým zákonem:

$$F_e = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \cdot \frac{|Q_1||Q_2|}{r^2}, \quad (1)$$

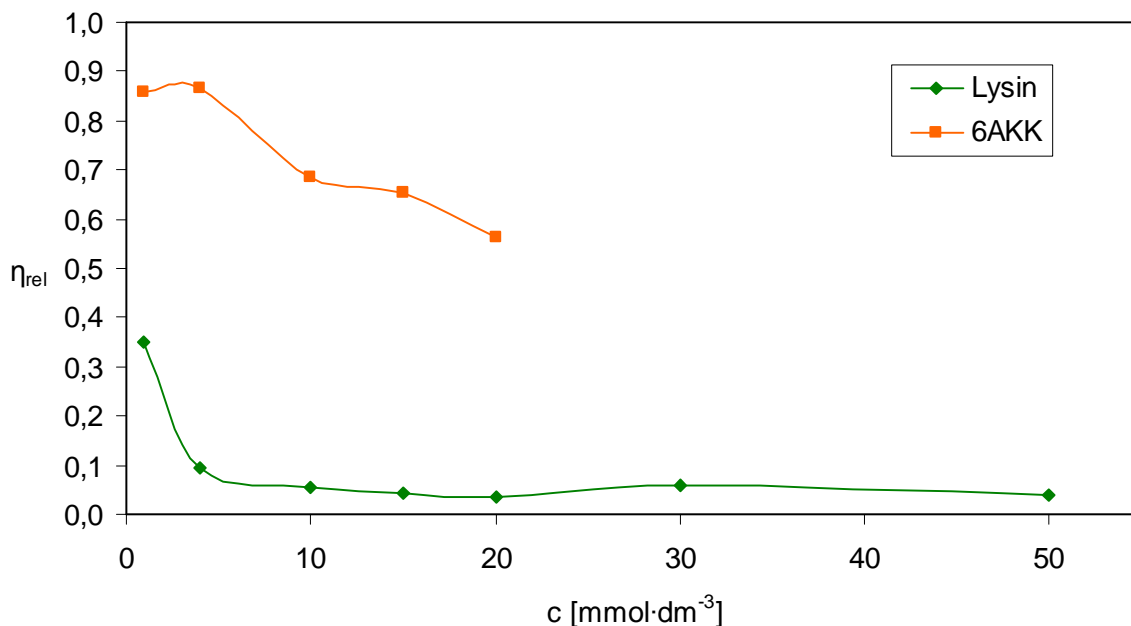
kde  $Q_1$  a  $Q_2$  jsou velikosti nábojů,  $\epsilon_0$  je permitivita vakua,  $\epsilon_r$  je relativní permitivita prostředí a  $r$  je vzdálenost nábojů [14].

V současné době se výzkum zaměřuje na interakce mezi HA a amfifily, konkrétně aminokyselinami. Tyto interakce jsou zkoumány především z důvodu jejich praktického použití v medicíně. Vzhledem k tomu, že HA je lidskému tělu látka vlastní, mohla by být využita jako přenašeč léčiv např. na místo zasažené rakovinou. V experimentální části této práce budou zkoumány interakce mezi HA a aminokyselinami, konkrétně pak s lysinem v oblasti nízkých koncentrací a 6-aminokapronovou kyselinou v oblasti nízkých i vysokých koncentrací. Jedná se o fyzikální úpravu HA, kde jsou na polysacharidový řetězec pomocí elektrostatických interakcí navázány postranní molekuly aminokyselin. Takto upravená HA v kombinaci s vhodnými aminokyselinami by pak mohla být schopná na sebe navázat léčivo a cíleně je transportovat do postiženého místa. Lysin a 6-aminokapronová kyselina sloužily pouze k ověření výše zmíněných interakcí, ve skutečnosti na sebe nejsou schopny léčivo navázat.

Výzkum interakcí mezi HA a aminokyselinami byl podložen základními poznatky o elektrostatických interakcích mezi HA a kationaktivními tenzidy [15,16]. Jak kationaktivní tenzidy, tak aminokyseliny jsou amfifilní látky, které ve své molekule obsahují navázaný atom dusíku. Tenzidy jsou definovány jako povrchově aktivní organické látky, snižující povrchové napětí kapalin, díky čemuž usnadňují rozpouštění i málo rozpustných látek jako jsou např. léčiva. Strukturu tenzidu tvoří nepolární (hydrofobní) konec, kterým je alkylový řetězec a polární (hydrofilní) konec, kterým je u kationaktivních tenzidů kation.

Kvartérní amoniové soli jsou řazeny mezi kationaktivní tenzidy a patří mezi nejvíce prozkoumané z hlediska interakcí s HA. Jejich struktura je tvořena alkylovým řetězcem (hydrofobní konec) a amonným kationem (hydrofilní konec). Tyto tenzidy se od aminokyselin odlišují zejména tím, že neobsahují žádnou karboxylovou skupinu a na atomu dusíku mají kladný náboj. Vzájemná podoba interakcí mezi HA s aminokyselinami a HA s kationaktivními tenzidy spočívá především v tom, že k interakci dochází mezi kladným nábojem, který se nachází na atomu dusíku a karboxylovou skupinou obsaženou ve struktuře HA. V případě aminokyselin lze kladného náboje na atomu dusíku vázaného v aminoskupině dosáhnout její protonizací (změnou pH) [15,16,17].

Jak již bylo zmíněno v úvodu, tato práce navazuje na bakalářskou práci Bc. Jana Zemana (*Reologické studium interakcí vysokomolekulárního hyaluronanu a protonizovaných aminokyselin*). Interakce mezi vysokomolekulovou HA a protonizovanými aminokyselinami, konkrétně lysinem a 6-aminokapronovou kyselinou, byly dokázány ve výše zmíněné práci pomocí měření viskozity. V přítomnosti interakcí dochází ke snížení relativní viskozity, viz Obrázek 5. V případě měření roztoků HA s lysinem byla prokázána největší míra interakcí v koncentrační oblasti 0-10 mmol·dm<sup>-3</sup>. U roztoků HA s 6-aminokapronovou kyselinou byly vykazovány interakce v koncentrační oblasti 0-20 mmol·dm<sup>-3</sup>. Vzhledem k tomu, že u lysinu i 6-aminokapronové kyseliny se v bakalářské práci Bc. Jana Zemana jednalo o měření v širším koncentračním rozpětí, je tato práce zaměřena na ověření interakcí v extrémních koncentracích, tj. v oblasti nízkých a vysokých koncentrací [18].

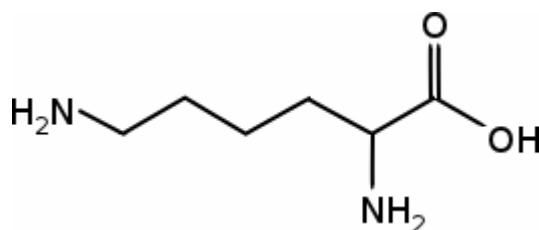


Obrázek 5: Pokles relativní viskozity u roztoků HA s lysinem a HA s 6-aminokapronovou kyselinou [18]

## 2.2. Lysin

Lysin patří do skupiny esenciálních kódovaných aminokyselin, které si lidský organismus nedokáže sám syntetizovat, a proto je musíme přijímat v potravě. Nachází se např. v mléčných výrobcích, luštěninách, hovězím a kuřecím masu. Lysin patří mezi základní stavební kameny bílkovin. Je důležitý pro správný růst, pomáhá snižovat hladinu cholesterolu, absorbovat vápník, dále je důležitý pro tvorbu kolagenu a pojivových tkání, včetně kůže, šlach a chrupavek. Nedostatek lysinu může způsobit únavu, nevolnost, závratě, ztrátu chuti k jídlu, neklid, pomalý růst a anémii [19]. Již více než 40 let je lysin vyráběn pomocí bakterií *Corynebacterium glutamicum* [20].

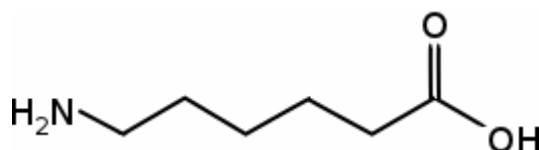
Ve struktuře lysinu se nachází navázané dvě aminoskupiny. Jedna aminoskupina je vázána na primárním  $\alpha$ -uhlíku a druhá na  $\epsilon$ -uhlíku. Vzhledem k tomu, že se na postranním řetězci molekuly lysinu nachází aminoskupina, je lysin řazen mezi zásadité aminokyseliny. V kyselém prostředí se tedy chová jako zásada, přijímá proton a tvoří amonný kation. Disociační konstanty lysinu pK při 25 °C jsou  $pK_{COOH} = 2,20$ ,  $pK_{NH_2} = 8,90$  a  $pK_{\epsilon-NH_2} = 10,28$ . Hodnota izoelektrického bodu lysinu je 9,59. Systematický název lysinu je kyselina 2,6-diaminohexanová, v literatuře bývá také někdy označován zkratkou Lys nebo písmenem K [21].



Obrázek 6: Lysin

### 2.3. 6-aminokapronová kyselina

6-aminokapronová kyselina je ve své struktuře podobná lysinu. V její molekule se však nachází jen jedna aminoskupina vázaná na  $\epsilon$ -uhlíku, která způsobuje bazické vlastnosti této látky. Na rozdíl od lysinu, který má ve své struktuře vázány dvě aminoskupiny, je 6AKK méně bazickou. Disociační konstanty  $pK$  při 25 °C 6AKK jsou  $pK_{COOH} = 4,43$  a  $pK_{NH_2} = 10,75$ . Hodnota izoelektrického bodu 6AKK je 7,6. Systematický název 6AKK je 6-aminohexanová kyselina. Velkého využití našla 6AKK (komerčně známá jako Amicar) v lékařství, kde se používá ke kontrole krvácení po operacích srdce [22].



Obrázek 7: 6-aminokapronová kyselina

### 2.4. Konduktometrie

#### 2.4.1. Základní definice

Konduktometrie je elektrometrická metoda, pomocí které zjišťujeme, zda má daný materiál nebo roztok schopnost vést elektrický proud, tzn. je vodivý. Vodivost roztoku je podmíněna přítomností pohyblivých částic, iontů, které nesou náboj. Cílem této metody je měření elektrických vlastností celého objemu roztoku mezi elektrodami. Čím více má daný roztok nabitých částic, tím lépe vede elektrický proud, a tím vyšší je hodnota vodivosti. Vodivost je definována jako převrácená hodnota elektrického odporu  $R$ , značí se  $G$ :

$$G = \frac{1}{R}. \quad (2)$$

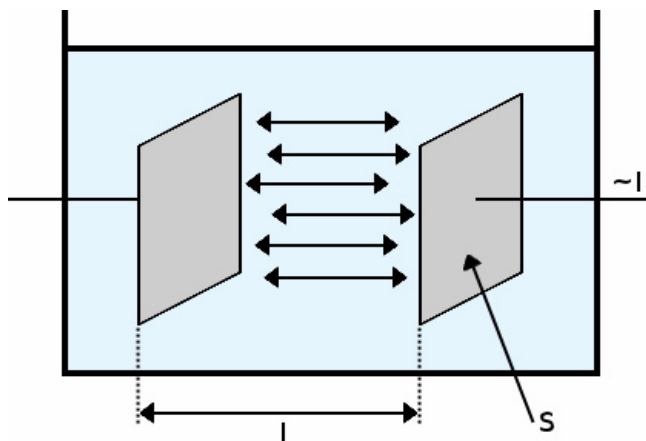
Jednotkou vodivosti je Siemens neboli  $\Omega^{-1}$ , který v soustavě SI můžeme vyjádřit ve tvaru  $m^{-2} \cdot kg^{-1} \cdot s^3 \cdot A^2$ . Při měření vodivosti se využívají dvě vodivé desky (elektrody), které jsou umístěny v roztoku. Na těchto deskách je po přivedení střídavého napětí  $U$  měřen elektrický proud  $I$ . Vodivost se následně určí z Ohmova zákona:

$$G = \frac{I}{U}. \quad (3)$$

Při měření vodivosti dvou těles má vyšší vodivost to těleso, u kterého lze naměřit vyšší hodnotu elektrického proudu, tj. projde jím větší náboj  $Q$  za jednotku času  $t$ . Geometrické vlastnosti vodiče, konkrétně pak plocha elektrod  $S$  a jejich vzdálenost  $l$ , přímo ovlivňují vodivost. Z tohoto důvodu byla zavedena další veličina zvaná měrná vodivost neboli konduktivita  $\kappa$ . V případě, že měříme vodivost v soustavě o jednotkové vzdálenosti elektrod a jednotkové ploše elektrod, platí vztah:

$$\kappa = G \cdot \frac{l}{S}. \quad (4)$$

Jednotkou konduktivity je  $S \cdot m^{-1}$ , v soustavě SI je pak vyjádřena ve tvaru  $m^{-3} \cdot kg^{-1} \cdot s^3 \cdot A^2$ . Měrná vodivost  $\kappa$  charakterizuje analyzovaný roztok, podíl  $l/S$  charakterizuje měřicí zařízení – vodivostní nádobku [23,24,25].



Obrázek 8: Princip měření vodivosti

V experimentální části této práce bude měřena vodivost roztoků hyaluronanu.

#### 2.4.2. Metody měření vodivosti

Vodivost roztoku měříme pomocí vodivostní nádoby obsahující dvě elektrody. Do roztoku je vložena skleněná či plastová trubice (výše zmíněná vodivostní nádobka). Obě elektrody, které se nachází uvnitř trubice, musí být úplně ponořeny. Tyto elektrody jsou obvykle pokryty platinovou černí. Vzhledem k tomu, že vodivost výrazně závisí na teplotě, bývá součástí měřicího přístroje teploměr, který automaticky upravuje okamžitou teplotu na kalibrační hodnotu teploty  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Odporovou konstantu vodivostní nádoby  $C$  charakterizuje geometrie elektrod, která je při měření vodivosti roztoku pomocí vodivostní nádoby zachována, tzn.  $l/S$  se nemění. Vlastnosti vodivostní nádoby jsou pak charakterizovány pomocí její odporové konstanty  $C$ :

$$C = \frac{\kappa}{G} = \kappa \cdot R, \quad (5)$$

kde  $R$  je odpor [24,25].

Roztoky kyseliny hyaluronové s protonizovanými aminokyselinami byly měřeny pomocí konduktometru.



## 2.5. pH metrie

### 2.5.1. Základní definice

Obecně hodnota pH slouží ke stanovení kyselosti (acidity) či zásaditosti (bazicity) roztoku. pH může nabývat ve vodě hodnot od 0 do 14, přičemž platí, že neutrální roztok má pH rovno 7. V případě, že se jedná o kyselý roztok je pH menší než 7 a u zásaditého je pH větší než 7.

V praxi můžeme pH roztoku měřit různými způsoby, např. pomocí univerzálních indikátorových papírků nebo pro přesnější stanovení se používají pH metry.

pH je obecně definováno jako záporně vzatý dekadický logaritmus aktivity vodíkových iontů. V případě zředěných roztoků bývá aktivitní koeficient vodíkových iontů téměř jednotkový, proto bývá aktivita nahrazována koncentrací.

$$pH = -\log a_{H^+}, \quad (6)$$

v případě zředěných roztoků pak platí

$$pH = -\log c_{H^+}. \quad (7)$$

Za neutrální látku je považována dokonale čistá voda. Voda podléhá samovolné disociaci na oxoniové ionty  $H_3O^+$ , přesněji však  $[H(H_2O)_4]^+$  a hydroxylové ionty  $OH^-$ . Tato disociace vody se nazývá autoprotolýza a její celková rovnice je



Vznik oxoniových iontů je zapříčiněn tím, že volné vodíkové kationty nejsou schopny samostatné existence ve vodě. Vodíkový kationt je tedy hydratován, tzn. reaguje s molekulou vody a tím dochází ke vzniku oxoniového kationtu [26,27].

Tabulka 2: Klasifikace pH

Roztok	pH
Kyselý	< 7
Zásaditý	> 7
Neutrální	= 7

U reálných roztoků však dochází k vzájemnému ovlivňování jednotlivých složek systému. Z tohoto důvodu nemůžeme ve vztahu pro výpočet pH použít látkovou koncentraci jako u roztoků ideálních (zředěných). K výpočtu pH se v takovém případě používá aktivita. Vzájemný vztah mezi aktivitou a koncentrací určuje tzv. aktivitní koeficient  $f$ . Platí:

$$a_i = c_i \cdot f_i. \quad (9)$$

Vztah pro výpočet pH, resp. pOH je pak ve tvaru:

$$pH = -\log a_{H_3O^+} = -\log c_{H_3O^+} \cdot f_{H_3O^+} \quad [26,27]. \quad (10)$$

## 2.5.2. Metody stanovení pH

V praxi můžeme pH roztoku stanovit různými způsoby, např. pomocí univerzálních indikátorových papírků, které se pro každou hodnotu pH charakteristicky zbarví. Pro velmi přesné stanovení pH se používají pH-metry.

### 2.5.2.1. Stanovení pomocí univerzálních indikátorových papírků

Tato metoda stanovení pH patří mezi méně přesné (orientační). Jedná se o proužky filtračního papíru, které jsou napuštěny vhodným indikátorem. Poté, co se na tento proužek nanese kapka analyzovaného roztoku, dojde k charakteristickému zbarvení papírku. Následným porovnáním zbarvení indikátorového papírku s kalibrovanou barevnou stupnicí můžeme určit pH.

### 2.5.2.2. Stanovení pomocí acidobazických indikátorů

Tato metoda stanovení pH patří mezi přesné. Tyto acidobazické indikátory jsou roztoky slabých organických kyselin nebo zásad, u kterých se zbarvení nedisociovaných molekul liší od zbarvení jejich vlastních iontů – dochází k oxidaci nebo redukci barviva. K malému množství analyzovaného roztoku se obvykle kápnou 2 až 3 kapky příslušného indikátoru, následně se roztok promíchá a sleduje se jeho charakteristické zbarvení. Tento typ stanovení pH se používá zejména u acidobazických titrací [28].

*Tabulka 3: Příklady nejvyužívanějších acidobazických indikátorů*

Indikátor	Barevný přechod	pH přechodu
Methyloranž	červená až žlutá	3,0 – 4,4
Methylčerveně	červená až žlutá	4,2 – 6,3
Fenolftalein	bezbarvý až červenofialový	8,2 – 10,0

### 2.5.2.3. Stanovení pomocí pH-metru

Tato metoda stanovení pH patří mezi velmi přesné. Je založena na měření elektrického potenciálu mezi měrnou elektrodou (skleněnou) a referenční elektrodou (chloridostříbrnou) na potenciometru, který má vysoký vstupní odpor. pH-metry se obvykle potenciometricky kalibrují pomocí standardních roztoků o přesně známém pH při standardní teplotě. Jako kalibrační (standardní) teplota se nastavuje 20 °C nebo 25 °C. Následně se měří pH analyzovaného roztoku [29].

## 2.5.3. Chloridostříbrná elektroda

Chloridostříbrná elektroda je referenční elektroda pH-metru, jejíž potenciál je známý pro danou teplotu. Principem je měření změny elektrického potenciálu na různých částech elektrody, ze kterých je následně vypočítáno pH. Tento pH-metr je tedy přesný potenciometr s vysokým vstupním odporem (obvykle je požadován minimálně  $10^{14} \Omega$ ), jehož škála je v jednotkách pH [29].

Samotná chloridostříbrná elektroda se skládá ze stříbrného drátku, který je potažený tenkou vrstvou chloridu stříbrného. Tento drátek je ponořený do nasyceného roztoku chloridu draselného. Celá elektroda je obalena skleněnou baňkou, která má maximální průměr do jednoho centimetru. Ve stěně skleněné baňky se nachází membrána, reakce této membrány na koncentraci  $H_3O^+$  je charakteristická. Tato membrána zajišťuje vodivostní kontakt roztoku

KCl s okolním prostředím elektrody. V případě rovnováhy mezi elektrodou a okolním prostředím dojde ke vzniku stálého elektrického potenciálu. Tento elektrický potenciál může být ovlivněn pouze změnou aktivity (koncentrace) vodíkových iontů v roztoku KCl [30]. Pokud dojde k ponoření elektrody do analyzovaného roztoku, způsobí to změnu rovnováhy na straně roztoku KCl. Toto je zapříčiněno tím, že na povrchu membrány se začnou sorbovat nebo desorbovat nabitě částice. Změna rovnováhy na straně roztoku KCl způsobí změnu elektrického potenciálu, což vede k určení pH v analyzovaném roztoku. Před každým měřením je nutné pH metr vždy nakalibrovat. Kalibrace se provádí pomocí standardních roztoků o přesně známém pH při standardní teplotě. Tato pH jsou pak přiřazena k určitým hodnotám elektrického potenciálu. Jako kalibrační (standardní) teplota se nastavuje 20 °C nebo 25 °C.

Změnu elektrického potenciálu vyjadřuje Nernstova rovnice:

$$E_{(AgCl/Ag)} = E_{(Ag^+/Ag)}^0 - \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln a_{Cl^-}, \quad (11)$$

kde  $E_{(AgCl/Ag)}$  je potenciál chloridostříbrné elektrody,  $E_{(Ag^+/Ag)}^0$  je standardní elektrodový potenciál ustanovený mezi stříbrným drátkem a roztokem KCl,  $R$  je univerzální plynová konstanta ( $R = 8,31441 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ),  $T$  je termodynamická teplota roztoku [K],  $F$  je Faradayova konstanta ( $F = 9,648 \cdot 10^4 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) a  $a_{Cl^-}$  je aktivita chloridových aniontů.

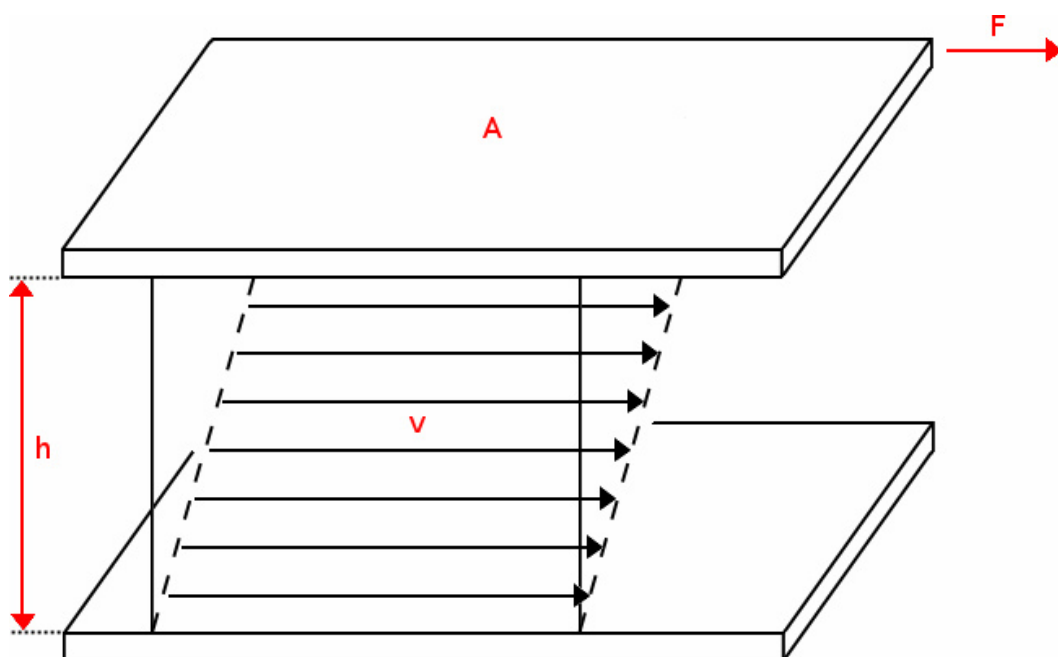
## 2.6. Reologie

### 2.6.1. Základní definice

Reologie je vědní disciplína, která se zabývá deformacemi a tokem materiálů. Od toho byl také odvozen její název, který se skládá z řeckých slov "rhein" (téci) a "logos" (nauka), neboli věda o toku. Její základy položil v roce 1929 americký fyzik E. C. Bingham a jeho kolega Marcus Reiner [11].

Reologie popisuje deformaci látek vlivem vnějších sil. Tato deformace bývá označována jako *tok* neboli *viskózní deformace* a je velmi dobře pozorovatelná zejména u kapalin. Kromě této deformace existuje ještě deformace plastická a elastická. Pro viskózní deformaci obecně platí, že při působení vnější síly se deformace přímo úměrně zvětšuje [8].

Pro znázornění toku kapaliny je použito dvou po sobě se posouvajících desek, umístěných v konstantní vzdálenosti. Jedna z desek tvoří nepohyblivou podložku, zatímco druhá deska se pohybuje rovnoběžně ve vzdálenosti  $h$  rychlostí  $v$ , a tím dochází k deformaci materiálu umístěného mezi deskami.



Obrázek 9: Model s posuvnými deskami

Tuto závislost můžeme vyjádřit pomocí Newtonova viskozitního zákona:

$$\tau = \eta \cdot \frac{d\gamma}{dt} = \eta \cdot \dot{\gamma} \text{ [Pa]}, \quad (12)$$

kde  $\tau$  je tečné napětí,  $\eta$  je viskozita materiálu,  $\dot{\gamma}$  je rychlost růstu deformace, nazývaná též jako smyková rychlost [8,11,23].

Tečné napětí  $\tau$  je definováno jako podíl působící síly  $F$ , která vyvolává deformaci a plochy  $A$ , na kterou tato síla působí:

$$\tau = \frac{F}{A} \text{ [N}\cdot\text{m}^{-2} = \text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-2} = \text{Pa}]. \quad (13)$$

Dynamická viskozita materiálu  $\eta$  je definována jako podíl tečného napětí a smykové rychlosti:

$$\eta = \frac{\tau}{\frac{d\gamma}{dt}} = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \text{ [Pa}\cdot\text{s}]. \quad (14)$$

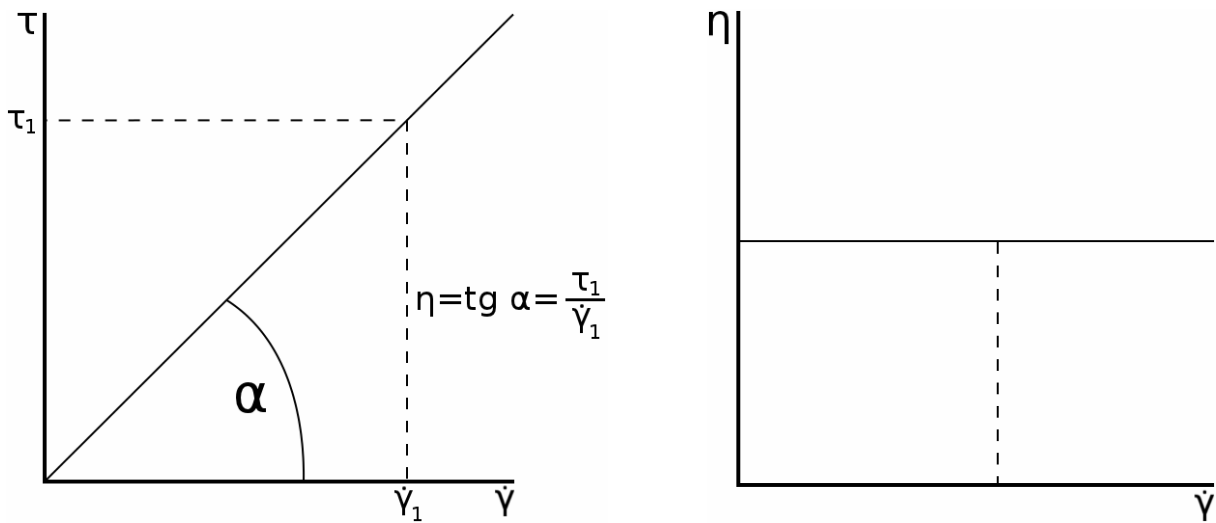
Smyková rychlost  $\dot{\gamma}$  je definována jako podíl vzájemné rychlosti pohybu desek a jejich vzdáleností:

$$\dot{\gamma} = \frac{dv}{dh} = \frac{v}{h} \text{ [s}^{-1}\text{]}. \quad (15)$$

## 2.6.2. Newtonské a neneutonské kapaliny

### 2.6.2.1. Newtonské kapaliny

Kapaliny, které se řídí Newtonovým viskozitním zákonem označujeme jako newtonské. Obvykle se jedná o čisté kapaliny nebo roztoky látek s nízkou molekulovou hmotností. Pro newtonské kapaliny je charakteristické, že dynamická viskozita  $\eta$  je jejich látkovou konstantou. Pokud tedy během deformace zvyšujeme smykovou rychlost, dochází k lineárnímu růstu tečného napětí, přičemž platí, že závislost dynamické viskozity na smykové rychlosti je konstantní. Kapalina s vyšší viskozitou má nižší rychlost růstu deformace v případě, že je tečné napětí konstantní [8,9,11].



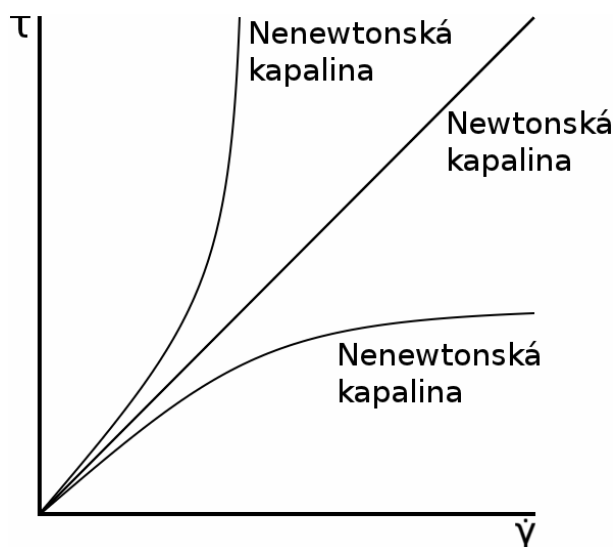
Obrázek 10: Toková a viskozitní křivka newtonské kapaliny

### 2.6.2.2. Neneutonské kapaliny

Kapaliny, které se neřídí Newtonovým viskozitním zákonem označujeme jako neneutonské. Mezi tyto kapaliny patří například roztoky polymerů. Pro neneutonské kapaliny platí vždy pro každý jeden bod, tj. poměr tečného napětí a smykové rychlosti, obdobně jako u newtonských kapalin vztah

$$\tau = \eta \cdot \frac{d\gamma}{dt} = \eta \cdot \dot{\gamma}, \quad (16)$$

s tím rozdílem, že  $\eta$  ( $\dot{\gamma}$ ) je tzv. zdánlivá viskozita. Tato zdánlivá viskozita už není látkovou konstantou kapaliny, tj. nemůžeme určit jednu hodnotu dynamické viskozity, která by byla konstantní v celém oboru tečného napětí. Zdánlivá viskozita tedy závisí na změně smykové rychlosti nebo tečném napětí. Závislost tečného napětí na smykové rychlosti není u neneutonských kapalin lineární [8,9,11].



Obrázek 11: Křivky newtonských a nenewtonských kapalin

Nenewtonské kapaliny můžeme rozdělit do tří základních skupin (pseudoplastické, dilatantní a plastické) shrnutých v následujících podkapitolách [9,11].

#### 2.6.2.2.1. Pseudoplastické nenewtonské kapaliny

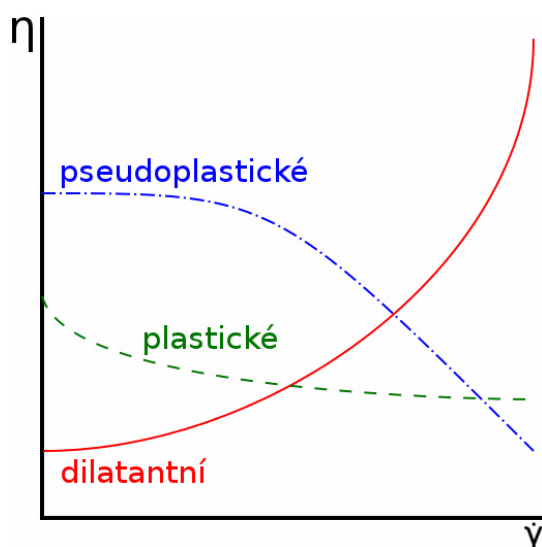
Pro pseudoplastické kapaliny je charakteristické, že během deformace jejich zdánlivá viskozita klesá s rostoucí smykovou rychlostí. Typickým zástupcem těchto pseudoplastických kapalin jsou např. roztoky mýdel nebo roztoky polymerů.

#### 2.6.2.2.2. Dilatantní nenewtonské kapaliny

Opakem pseudoplastických kapalin jsou kapaliny dilatantní, u kterých během deformace dochází k růstu zdánlivé viskozity se zvyšující se smykovou rychlostí. Toto chování se obvykle vyskytuje u vysoce koncentrovaných suspenzí jako např. vlhký písek na pláži nebo sediment škrobu ve studené vodě.

#### 2.6.2.2.3. Plastické nenewtonské kapaliny

Poslední skupinu tvoří látky plastické, pro které je typické, že k toku u nich dochází až po překročení prahové hodnoty tečného napětí, tzv. meze toku  $\tau_K$ . Příkladem plastických kapalin jsou koncentrované průmyslové a odpadní kaly nebo kašovité suspenze křídly a vápna.



Obrázek 12: Křivky neneutronských kapalin

### 2.6.3. Tixotropie a reopexie

Jako tixotropní a reopexní neneutronské kapaliny označujeme ty kapaliny, u kterých je jejich deformace závislá nejen na velikosti působící síly, ale také na její době působení.

U tixotropních látek dochází vlivem mechanického namáhání (působícím po určitou dobu), tj. při zvyšujícím se tečném napětím, k pozvolnému poklesu zdánlivé viskozity. Jakmile se však tečné napětí začne snižovat, dochází ke zpětnému vzrůstu zdánlivé viskozity a tím pádem i obnovení celé struktury. Této vlastnosti je s výhodou využíváno u nátěrových hmot [9,11].

Naproti tomu u reopexních neneutronovských kapalin dochází vlivem mechanického namáhání (působícím po určitou dobu), tj. při zvyšujícím se tečném napětím, k růstu zdánlivé viskozity. Poté, co se tečné napětí začne snižovat, dojde ke zpětnému snižování zdánlivé viskozity a návratu do původního stavu [9].

### 2.7. Reometrie (měřící systémy)

Reologické vlastnosti materiálů se měří pomocí přístroje, který se nazývá reometr. Každý reometr se skládá ze dvou základních částí – rotační (pohyblivé) a statické (nepohyblivé). Naměřená data můžeme získat jako závislost mezi smykovou rychlostí a tečným napětím nebo závislost zdánlivé viskozity na tečném napětí či smykové rychlosti. Tato data podávají informace o vzorku z hlediska jeho viskozity či tokových vlastností. Naopak pomocí oscilačního měření, kdy rotační část reometru vykonává oscilační pohyb, získáváme data, která nám podávají informace o elasticitě vzorku. Podle druhu analyzovaného vzorku volíme vhodnou geometrii měřícího systému, např. systém kužel-deska, deska-deska nebo systém dvou sousedních válců [9].

### 2.7.1. Měřicí systém kužel-deska

V tomto měřícím systému je malé množství vzorku umístěné mezi dvě plochy, kde je podrobováno deformaci. Jedna plocha (deska) je statická, druhá (kužel) pak rotační. Při otáčení kužele kapalina vykazuje určitý odpor vůči směru otáčení. Tento odpor je úměrný viskozitě dané kapaliny a projevuje se ve formě krouticího momentu. Daný systém je vhodný pro viskóznější kapaliny.

Vztah pro výpočet tečného napětí u systému kužel-deska je ve tvaru:

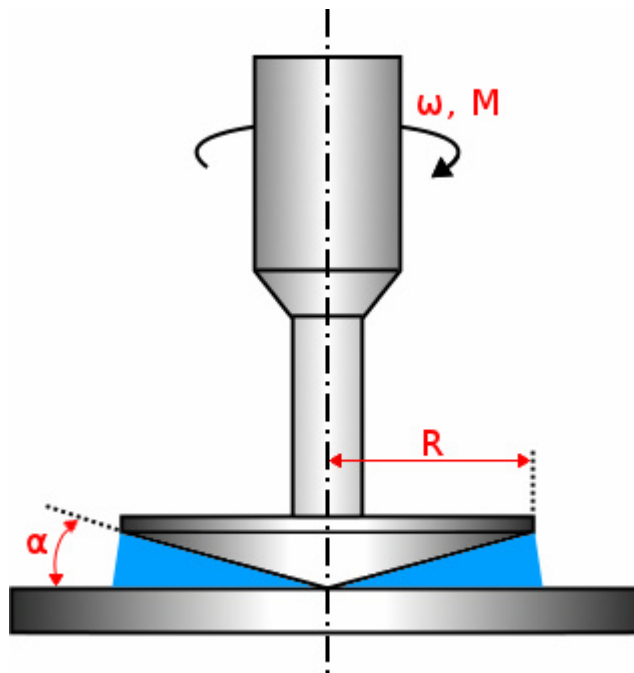
$$\tau = \frac{3 \cdot M}{2 \cdot \pi \cdot R^3}, \quad (17)$$

kde  $M$  je moment síly a  $R$  je poloměr podstavy kužele.

Vztah pro výpočet smykové rychlosti u systému kužel-deska je ve tvaru:

$$\dot{\gamma} = \frac{\omega}{\alpha}, \quad (18)$$

kde  $\omega$  je úhlová rychlost a  $\alpha$  je úhel zkosení kužele.



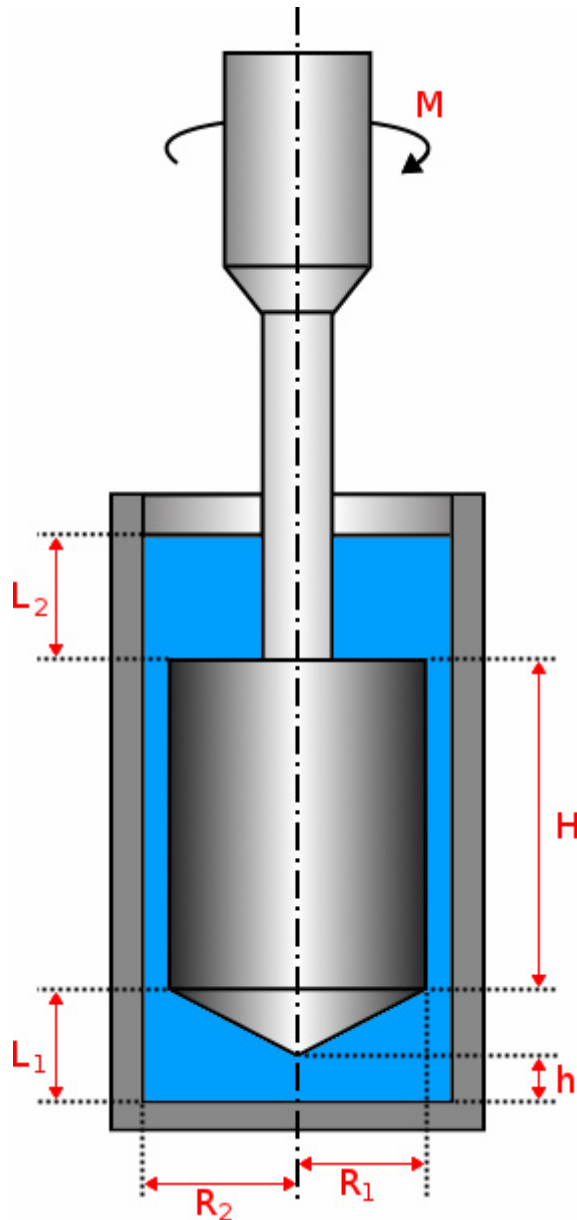
Obrázek 13: Měřicí systém kužel-deska

Výhodou tohoto systému je zejména malá spotřeba vzorku a také jeho temperování, které je díky malé vrstvě vzorku a velké ploše desky velmi účinné. Mezi další výhody patří snadné čištění, obsluha a také nezávislost smykové rychlosti na poloměru desky. Nevýhodou je, že tento systém se nedá použít pro vzorky s nízkou viskozitou, protože při velké rychlosti otáčení kužele může dojít k vystříknutí vzorku [9,11].



### 2.7.2. Měřicí systém dvou souosých válců

Tento měřicí systém se skládá ze dvou souosých válců, kdy jeden z nich je rotační plný a druhý je statický dutý. Mezi těmito dvěma válci je mezera, ve které se nachází měřený vzorek. Daný měřicí systém je vhodný zejména pro nízko až středně viskózní vzorky. Výhodou tohoto systému je především snadné dávkování vzorku, nemožnost jeho ztráty při vysokých smykových rychlostech a snadná eliminace vypařování vzorku. Nevýhodou je zejména velká spotřeba vzorku a také čištění celého systému mezi jednotlivými měřeními [9,11].



Obrázek 14: Měřicí systém dvou souosých válců

## 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1. Použité materiály k přípravě roztoků

Kyselina hyaluronová o molekulové hmotnosti 1,75 MDa byla poskytnuta firmou Contipro Group s.r.o. v Dolní Dobruči (Česká republika). Injekční voda<sup>2</sup> pro přípravu roztoků byla vyrobena firmou Fresenius Kabi Italia, S.r.l., Verona (Itálie). Lysin a 6-aminokapronová kyselina čistoty p.a. byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, Steinheim (Německo).

### 3.2. Metody

#### 3.2.1. Příprava roztoků

Na analytických vahách bylo naváženo přesné množství kyseliny hyaluronové. Tato navážka HA byla přidávána po malých dávkách vrstvicím způsobem do injekční vody. Podstatou tohoto vrstvicího způsobu bylo střídavé přidávání malého množství injekční vody a HA, přičemž po každém přidání byl roztok řádně promíchán. Výsledná koncentrace připraveného roztoku byla 0,1% hm. Roztok byl připravován na magnetické míchače za stálého míchání a laboratorní teploty. Vzniklý roztok byl řádně uzavřen a míchán 24 hodin pro dosažení co nejvyšší homogenity. Po ukončení míchání byly roztoky kyseliny hyaluronové uloženy do lednice pro zpomalení degradačních pochodů.

Pro přípravu roztoku aminokyseliny bylo za laboratorní teploty na analytických vahách naváženo potřebné množství aminokyseliny tak, aby výsledná koncentrace byla  $0,132 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Při přípravě byla použita injekční voda. Vzniklý roztok byl po dobu 24 hodin míchán na magnetické míchače a po dokončení míchání byl roztok aminokyseliny uchovávan v lednici.

Pro protonizaci roztoků aminokyselin byla použita HCl o příslušné koncentraci dle aminokyseliny. V případě lysinu byl použit roztok  $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  HCl a v případě 6AKK byl použit roztok HCl o celkové koncentraci  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

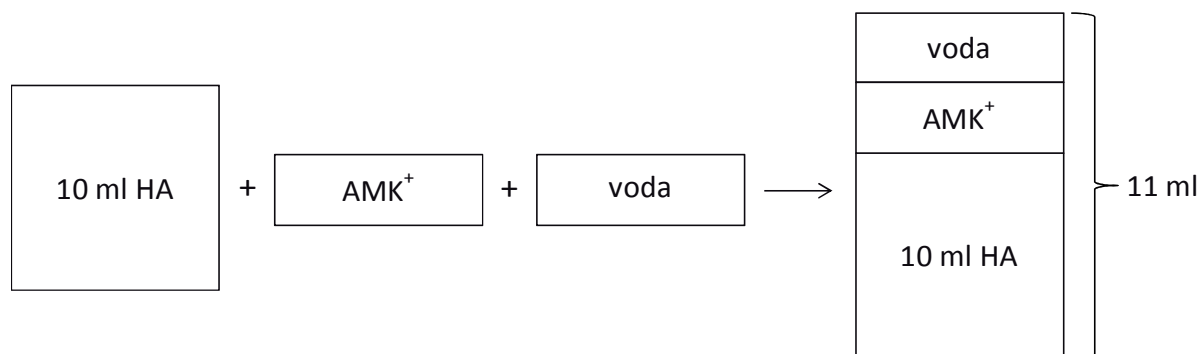
Protonizace roztoků aminokyselin byla prováděna za laboratorní teploty. Do lahvičky bylo napipetováno 10 ml připraveného roztoku aminokyseliny o koncentraci  $0,132 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Poté bylo připipetováno potřebné množství HCl určené z titrační křivky [18] a injekční vody tak, aby výsledná koncentrace protonizovaného roztoku aminokyseliny byla  $0,11 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Vzniklé roztoky byly řádně uzavřeny a míchány 24 hodin na magnetické míchače. Po ukončení míchání byly uchovávány v lednici.

Byly připraveny celkem 3 sady kyseliny hyaluronové s protonizovanými aminokyselinami. Sada lysinu pro nízké koncentrace, sada 6-aminokapronové kyseliny pro nízké koncentrace a sada 6-aminokapronové kyseliny pro vysoké koncentrace. Všechny sady byly připraveny za laboratorní teploty. Sada lysinu pro nízké koncentrace obsahovala celkem 9 roztoků: Referenční vzorek HA a roztoky v koncentračním rozmezí  $0,5\text{-}10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Sada 6-aminokapronové kyseliny pro nízké koncentrace obsahovala také celkem 9 roztoků:

---

<sup>2</sup> Injekční voda je voda, která se používá pro výrobu injekčních roztoků. Tato voda je zbavena minerálů a následně destilována.

Referenční vzorek HA a roztoky v koncentračním rozmezí  $0,5-10 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Poslední sada, tedy 6-aminokapronová kyselina pro vysoké koncentrace, obsahovala celkem 5 roztoků: Referenční HA a roztoky v koncentračním v rozmezí  $20-50 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . K dílčím sadám byly připraveny ještě sady samotných protonizovaných aminokyselin v injekční vodě, tedy bez kyseliny hyaluronové. Všechny vzorky byly připraveny tak, že bylo odpipetováno 10 ml připraveného roztoku kyseliny hyaluronové. Poté, dle příslušné koncentrace jednotlivých roztoků, bylo připipetováno potřebné množství injekční vody a protonizované aminokyseliny. Výsledný objem připravovaných roztoků byl vždy 11 ml, viz Obrázek 15. Vzniklé roztoky byly řádně uzavřeny a míchány 24 hodin na magnetické míchačce. Po ukončení míchání byly roztoky opět uchovávány v lednici.



Obrázek 15: Schéma přípravy roztoků

### 3.2.2. Měření pH

Před měřením pH byly všechny roztoky vytemperovány na laboratorní teplotu. Měření probíhalo na pH metru od firmy Mettler Toledo za referenční teploty  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Kalibrace tohoto pH metru byla provedena dle návodu výrobce, tzn. byly použity 3 pufrы o pH 7,0; 4,01 a 2,01 dodávané firmou Mettler Toledo. Při měření bylo postupováno následovně: Skleněná elektroda byla ponořena do měřeného roztoku a po přibližně 3 minutách došlo k adaptaci elektrody na dané prostředí. Poté bylo měřeno pH v čase do ustálení. Celkem bylo odečteno 6 hodnot pH. Z těchto hodnot, které byly následně použity k dalšímu vyhodnocování, bylo vypočítáno průměrné pH a směrodatná odchylka.

Tabulka 4: Ukázka naměřených hodnot pH pro  $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  roztok  $\text{H}^+\text{Lys}$  v HA při referenční teplotě  $25 \text{ }^\circ\text{C}$

Číslo měření	pH
1	4,88
2	4,87
3	4,87
4	4,87
5	4,87
6	4,87
průměr	4,872
směrodatná odchylka	0,004

Směrodatná výběrová odchylka  $\sigma$  byla počítána podle následujícího vzorce:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (19)$$

### 3.2.3. Měření vodivosti

Všechny roztoky byly před měřením vytemperovány na laboratorní teplotu. Měření vodivosti probíhalo na konduktometru od firmy Greinsinger Electronic za referenční teploty 25 °C. Kalibrace konduktometru byla provedena dle návodu výrobce, tzn. pomocí vodivostního standardu dodávaného firmou Mettler Toledo s vodivostí 1413  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Při samotném měření bylo postupováno následujícím způsobem: Elektroda konduktometru byla ponořena do měřeného roztoku a po přibližně 3 minutách došlo k adaptaci elektrody na dané prostředí. Poté byla měřena vodivost v čase do ustálení. Celkem bylo odečteno 6 hodnot vodivosti. Z těchto hodnot, které byly následně použity k dalšímu vyhodnocování, byla vypočítána průměrná vodivost a směrodatná odchylka.

Tabulka 5: Ukázka naměřených hodnot vodivosti pro 1,5  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  roztok  $\text{H}^+\text{Lys}$  v HA při referenční teplotě 25 °C

Číslo měření	$\kappa$ [ $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ]
1	306
2	307
3	308
4	308
5	307
6	308
průměr	307,33
směrodatná odchylka	0,82

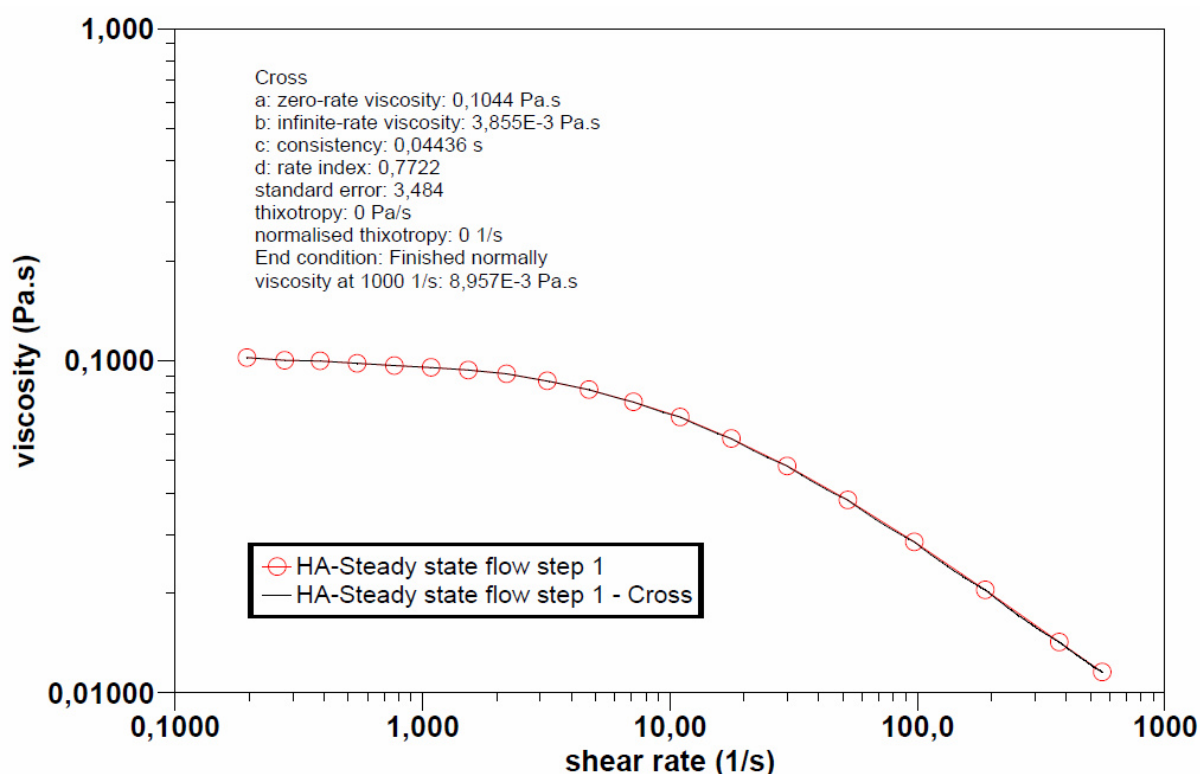
Směrodatná výběrová odchylka  $\sigma$  byla vypočítána na základě stejného vzorce jako u pH.

### 3.2.4. Reologická měření

Měření viskozity jednotlivých roztoků bylo stěžejní metodou pro posouzení interakcí mezi HA a protonizovanými aminokyselinami v oblasti uvedených koncentrací. Měření viskozity probíhalo na přístroji reometru AR - G2 od firmy TA Instruments. Před samotným měřením byly vždy všechny roztoky vytemperovány na laboratorní teplotu. Vzhledem k tomu, že k přípravě roztoků byla použita vysokomolekulová kyselina hyaluronová, konkrétně HA s molekulovou hmotností 1,75 MDa, byl k měření použit měřicí systém kužel-deska, který je vhodný zejména pro viskóznější kapaliny. Úhel zkosení kužele je 1° a průměr 60 mm. Tato geometrie bývá také označována C60/1.

Vzorek byl před každým měřením temperován po dobu 5 minut na teplotu 25 °C. K měření viskozity byl použit test *Steady State*, tedy metoda ustáleného stavu. Tento test je vhodný zejména pro měření tokových vlastností jednotlivých vzorků, jehož výsledkem je viskozitní

křivka vyjadřující závislost zdánlivé viskozity na smykové rychlosti. Jednotlivé body viskozitní křivky byly měřeny celkem třikrát, přičemž naměřená hodnota smykové rychlosti se při jednom určitém tečném napětí nesměla lišit více jak o 5 % v časovém intervalu 10 sekund. Celková doba měření jednoho bodu byla nastavena na 3 minuty a 10 sekund. Viskozita každého roztoku byla na reometru proměřena nejméně dvakrát, přičemž před jednotlivými měřeními byl reometr vždy důkladně očištěn a pro každé měření byl vždy nadávkován nový vzorek. K analýze tokové křivky byl použit *Cross model*, kterým byla naměřená data proložena v programu TA Data Analysis od firmy TA Instruments. Prostřednictvím tohoto modelu byl zjištěn parametr  $\eta_0$ , který odpovídá parametru *zero-rate viscosity* v legendě níže uvedeného grafu.



Obrázek 16: Viskozitní křivka 0,1% 1,75 MDa HA ve vodě proložena Crossovým modelem

### 3.3. Vyhodnocení naměřených dat

#### 3.3.1. Vyhodnocení pH

K vyhodnocení naměřených hodnot pH byl použit program MS Excel. Vzhledem k tomu, že při každém měření pH roztoku bylo odečteno vždy šest hodnot pH, bylo nejdříve z těchto dat vypočítáno průměrné pH jednotlivých roztoků. Takto vypočítané hodnoty pH roztoků HA s protonizovanými aminokyselinami a roztoků aminokyselin ve vodě pak byly vyneseny vždy pro konkrétní řadu do jednoho grafu v závislosti na koncentraci aminokyseliny. Z grafické závislosti bylo možné určit, do jaké míry došlo k ovlivnění pH přidávkem kyseliny hyaluronové.

V dalším kroku při vyhodnocování dat bylo vypočítáno pro každý roztok relativní pH, tedy  $pH_{rel}$ . Z těchto hodnot byla vynesena grafická závislost  $pH_{rel}$  na koncentraci aminokyseliny.  $pH_{rel}$  je definováno následujícím vztahem:

$$pH_{rel} = \frac{\overline{pH}_{HA+AMK+voda}}{\overline{pH}_{voda+AMK}}, \quad (20)$$

kde  $\overline{pH}_{HA+AMK+voda}$  je průměrné pH roztoku kyseliny hyaluronové s aminokyselinou a  $\overline{pH}_{voda+AMK}$  je průměrné pH roztoku aminokyseliny ve vodě. Z uvedeného vztahu vyplývá, že relativní pH vyjadřuje poměr pH mezi roztokem obsahující kyselinu hyaluronovou s přídatkem aminokyseliny a roztokem samotné aminokyseliny ve vodě.

Do grafu byly vyneseny také chybové úsečky pro každý měřený roztok, jejichž velikost byla vypočítána ze vztahu:

$$\Delta\left(\frac{a}{b}\right) = \sqrt{\left(\frac{\Delta a}{a}\right)^2 + \left(\frac{\Delta b}{b}\right)^2} \cdot pH_{rel}, \quad (21)$$

kde  $\Delta a$  je směrodatná výběrová odchylka pH pro roztok HA s aminokyselinou,  $a$  je průměrné pH roztoku HA s aminokyselinou,  $\Delta b$  je směrodatná výběrová odchylka pH pro roztok aminokyseliny ve vodě,  $b$  je průměrné pH roztoku aminokyseliny ve vodě a  $pH_{rel}$  je relativní hodnota pH.

### 3.3.2. Vyhodnocení vodivosti

K vyhodnocení naměřených hodnot vodivosti byl použit program MS Excel a postup vyhodnocení byl obdobný jako u vyhodnocení pH. Vzhledem k tomu, že při měření bylo stejně jako u pH odečteno šest hodnot vodivosti, byla před vyhodnocením relativní vodivosti vypočítána průměrná vodivost pro každý roztok. Vodivosti roztoků HA s aminokyselinou a roztoků aminokyseliny ve vodě byly následně pro jednotlivé koncentrační řady vyneseny do grafu oproti koncentraci nebo přídatku aminokyseliny. Z těchto grafických závislostí pak bylo možné určit, jak byla vodivost roztoku ovlivněna přítomností kyseliny hyaluronové. Poté byla vypočítána relativní vodivost, tedy  $\kappa_{rel}$ , která byla vynesena do grafu v závislosti na koncentraci aminokyseliny.  $\kappa_{rel}$  je definováno vztahem:

$$\kappa_{rel} = \frac{\overline{\kappa}_{HA+AMK+voda}}{\overline{\kappa}_{voda+AMK}}, \quad (22)$$

kde  $\overline{\kappa}_{HA+AMK+voda}$  je průměrná vodivost roztoku hyaluronanu s aminokyselinou a  $\overline{\kappa}_{voda+AMK}$  je průměrná vodivost roztoku aminokyseliny ve vodě. Tato relativní vodivost  $\kappa_{rel}$  vyjadřuje poměr vodivosti mezi roztokem kyseliny hyaluronové s aminokyselinou a roztokem samotné aminokyseliny ve vodě. Velikost chybových úseček pro každý měřený roztok byla vypočítána ze vztahu:

$$\Delta\left(\frac{a}{b}\right) = \sqrt{\left(\frac{\Delta a}{a}\right)^2 + \left(\frac{\Delta b}{b}\right)^2} \cdot \kappa_{rel}, \quad (23)$$

kde  $\Delta a$  je směrodatná výběrová odchylka vodivosti pro roztok HA s aminokyselinou,  $a$  je průměrná vodivost roztoku HA s aminokyselinou,  $\Delta b$  je směrodatná výběrová odchylka vodivosti pro roztok aminokyseliny ve vodě,  $b$  je průměrná vodivost roztoku aminokyseliny ve vodě a  $\kappa_{rel1}$  je hodnota relativní vodivosti 1.

Do grafu byla vynesena také relativní vodivost  $\kappa_{rel2}$  v závislosti na koncentraci aminokyseliny, kde  $\kappa_{rel2}$  je definována vztahem:

$$\kappa_{rel2} = \frac{\overline{\kappa_{HA+AMK+voda}}}{\overline{\kappa_{HA}}}, \quad (24)$$

kde  $\overline{\kappa_{HA+AMK+voda}}$  je průměrná vodivost roztoku hyaluronanu s aminokyselinou a  $\overline{\kappa_{HA}}$  je průměrná vodivost samotného roztoku kyseliny hyaluronové. Z uvedeného vztahu vyplývá, že relativní vodivost  $\kappa_{rel2}$  definuje poměr vodivosti roztoku hyaluronanu s aminokyselinou k samotnému roztoku hyaluronanu. Vyjadřuje tedy, jak je ovlivněna vodivost přidavkem aminokyseliny. Velikost chybových úseček byla v tomto případě určena ze vztahu:

$$\Delta\left(\frac{a}{b}\right) = \sqrt{\left(\frac{\Delta a}{a}\right)^2 + \left(\frac{\Delta b}{b}\right)^2} \cdot \kappa_{rel2}, \quad (25)$$

kde  $\Delta a$  je směrodatná výběrová odchylka vodivosti pro roztok HA s aminokyselinou,  $a$  je průměrná vodivost roztoku HA s aminokyselinou,  $\Delta b$  je směrodatná výběrová odchylka vodivosti pro roztok HA,  $b$  je průměrná vodivost roztoku HA a  $\kappa_{rel2}$  je hodnota relativní vodivosti 2.

### 3.3.3. Vyhodnocení reologie

K vyhodnocení naměřených hodnot jednotlivých roztoků kyseliny hyaluronové s protonizovanými aminokyselinami byly použity programy TA Data Analysis od firmy TA Instruments a MS Excel. Pomocí programu TA Data Analysis byla z naměřených hodnot pro jednotlivé roztoky vynesena viskozitní křivka vyjadřující závislost zdánlivé viskozity na smykové rychlosti. Viskozitní křivka byla proložena vhodným reologickým modelem. Roztoky kyseliny hyaluronové o vysoké molekulové hmotnosti 1,75 MDa vykazovaly typické newtonské chování, proto byl v rámci této bakalářské práce k vyhodnocení použit Crossův model definován následujícím vztahem:

$$\eta = \eta_{\infty} + \frac{\eta_0 - \eta_{\infty}}{1 + (c \cdot \dot{\gamma})^m}, \quad (26)$$

$$\text{kde } c = \frac{1}{\dot{\gamma}_c} = \tau_{relax}. \quad (27)$$

$\eta_0$  je limitní viskozita definována pro limitně nízké smykové rychlosti,  $\eta_{\infty}$  je asymptotická viskozita,  $\dot{\gamma}$  je smyková rychlost,  $\dot{\gamma}_c$  je kritická smyková rychlost a  $c$  je čas relaxace.

Aby bylo možné vyhodnotit interakce mezi kyselinou hyaluronovou a protonizovanými aminokyselinami, byla z *Crossova modelu* pro každý roztok odečítána hodnota limitní viskozity  $\eta_0$ , též označovaná jako *zero-rate viscosity*. Hodnota odchylky (*standard error*)

nesměla u vyhodnocených dat překročit hodnotu 20. Tato podmínka byla splněna, proto byl daný model považován za vhodný. Odchylka je definována následujícím vztahem:

$$\Delta x = \frac{\left[ \frac{(x_n - x_c)^2}{(n-2)} \right]^{\frac{1}{2}}}{rozsah} \cdot 1000, \quad (28)$$

kde  $x_n$  jsou naměřené hodnoty,  $x_c$  jsou vypočítané hodnoty,  $n$  je počet naměřených hodnot v křivce a rozsah je rozdíl mezi minimální a maximální hodnotou, která byla naměřena. Vzhledem k tomu, že viskozita každého roztoku byla vždy měřena dvakrát, výslednou limitní viskozitou byla průměrná hodnota těchto dvou měření.

Naměřená reologická data byla dále vyhodnocena pomocí relativní viskozity, která vyjadřuje, jak se mění viskozita roztoku v závislosti na koncentraci protonizované aminokyseliny. Relativní viskozita je vyjádřena pomocí vztahu:

$$\eta_{rel} = \frac{\eta_0 (HA + AMK + voda)}{\eta_0 (HA + voda)}, \quad (29)$$

kde  $\eta_0 (HA+AMK+voda)$  je limitní viskozita roztoku HA s přídavkem protonizované aminokyseliny a  $\eta_0 (HA+voda)$  je limitní viskozita roztoku HA ve vodě.

Velikost chybových úseček byla určena ze vztahu:

$$\Delta \left( \frac{a}{b} \right) = \sqrt{\left( \frac{\Delta a}{a} \right)^2 + \left( \frac{\Delta b}{b} \right)^2} \cdot \eta_{rel}, \quad (30)$$

kde  $\Delta a$  je směrodatná výběrová odchylka limitní viskozity pro roztok HA s aminokyselinou,  $a$  je průměrná limitní viskozita roztoku HA s aminokyselinou,  $\Delta b$  je směrodatná výběrová odchylka limitní viskozity pro roztok HA,  $b$  je průměrná limitní viskozita roztoku HA a  $\eta_{rel}$  je hodnota relativní viskozity.



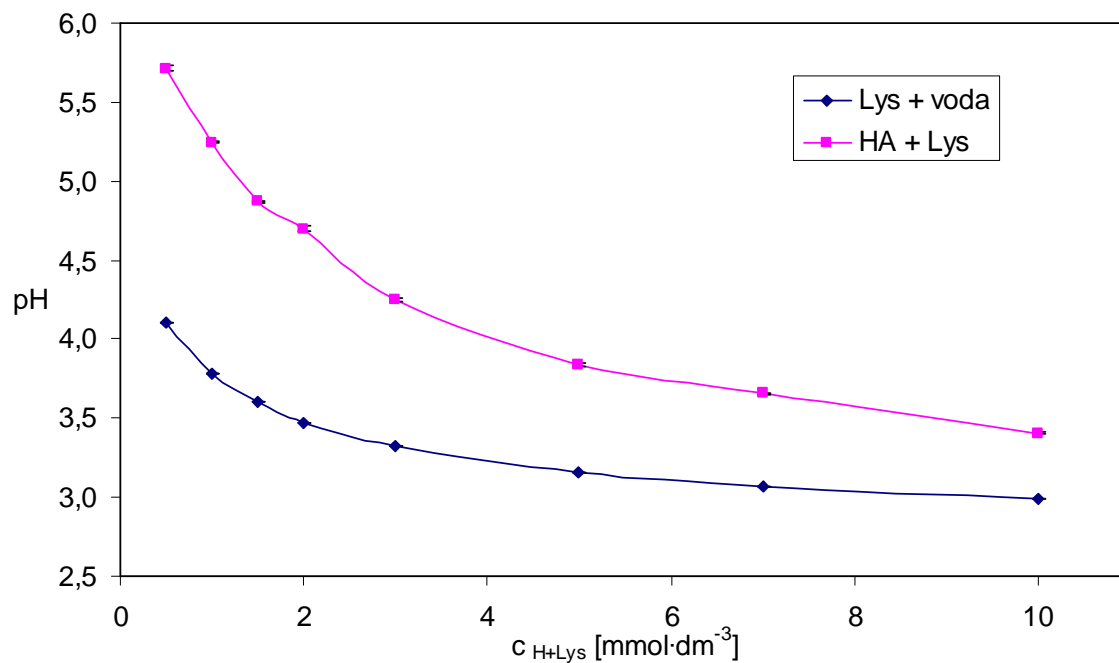
## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Následující podkapitoly shrnují výsledky měření pH, měření vodivosti a reologického měření roztoků kyseliny hyaluronové s přidavkem protonizované aminokyseliny, konkrétně pak lysinu a 6-aminokapronové kyseliny. V případě měření pH a vodivosti jsou uvedeny i naměřené výsledky roztoků čisté vody s přidavkem protonizované aminokyseliny (bez přidavku kyseliny hyaluronové). Výsledky byly vyneseny do grafů a pro přehlednost zapsány do tabulek.

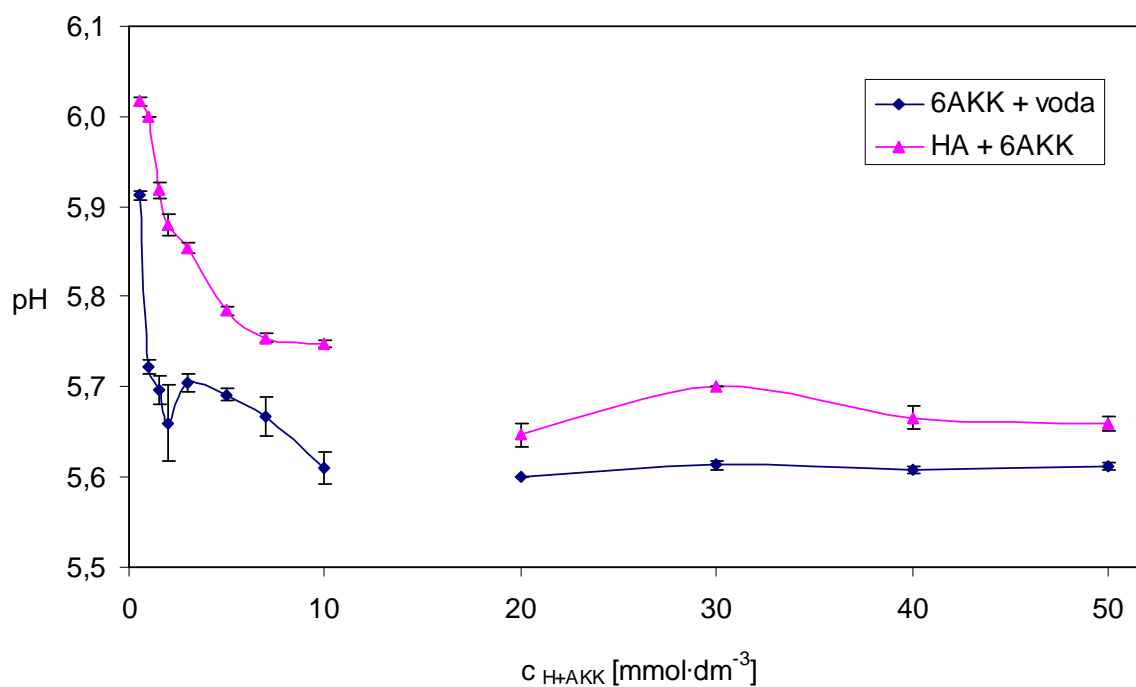
### 4.1. Měření pH

Pomocí měření pH bylo možné posoudit přítomnost interakcí mezi kyselinou hyaluronovou a protonizovanými aminokyselinami. Pokud by k interakcím v roztoku HA s přidavkem protonizované aminokyseliny opravdu docházelo, mělo by dojít ke zvýšení hodnoty pH. Toto zvýšení pH by pak značilo, že při vzniku interakcí mezi kyselinou hyaluronovou a protonizovanou aminokyselinou dochází k navázání kladně nabitých protonizované aminokyseliny na řetězec hyaluronanu. Snižuje se tedy počet kladně nabitých částic v roztoku. Roztok vody s protonizovanou aminokyselinou by pak vzhledem k většímu počtu kladně nabitých částic dosahoval podstatně nižších hodnot pH. Po zpracování a vnesení naměřených dat do grafů bylo potvrzeno, že k interakcím mezi HA a protonizovanými aminokyselinami dochází. Tyto interakce vznikají mezi kyselinou hyaluronovou, která nese záporný náboj na karboxylových skupinách ve svém řetězci, a kladným nábojem na atomu dusíku, který je obsažen v molekule aminokyseliny. Dochází tedy k celkovému snížení počtu kladně nabitých protonizovaných aminokyselin v roztoku, což se projevuje již zmíněným zvýšením pH.

Interakce byly dokázány jak u roztoků HA s přidavkem lysinu v oblasti nízkých koncentrací, tak u roztoků HA s přidavkem 6AKK v oblasti nízkých i vysokých koncentrací. Ve všech uvedených případech došlo po přidání protonizované aminokyseliny do roztoku kyseliny hyaluronové ke zvýšení pH. Níže uvedené grafy znázorňují zvýšení pH u roztoku HA s přidavkem protonizovaného lysinu v závislosti na koncentraci aminokyseliny a zvýšení pH u systému 6AKK v závislosti na koncentraci aminokyseliny v oblasti nízkých i vysokých koncentrací při teplotě 25 °C.



Obrázek 17: Zvýšení pH u roztoku HA s přidavkem protonizovaného lysinu v závislosti na koncentraci aminokyseliny při teplotě 25 °C

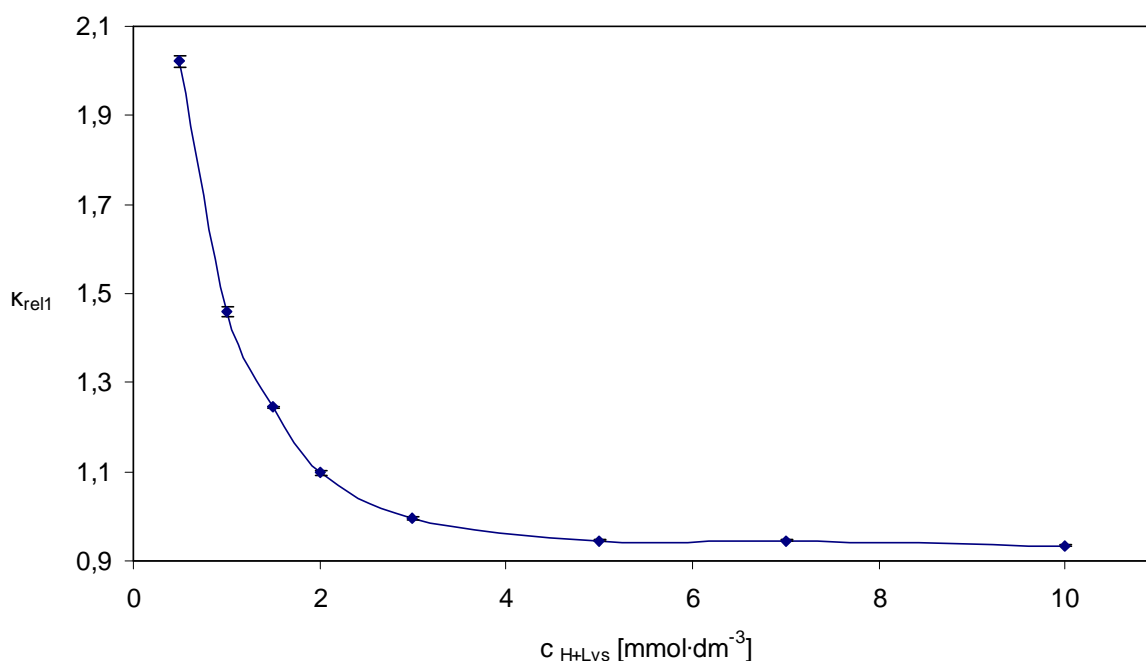


Obrázek 18: Zvýšení pH u roztoku HA s přidavkem protonizované 6AKK v závislosti na koncentraci aminokyseliny v oblasti nízkých i vysokých koncentrací při teplotě 25 °C

## 4.2. Měření vodivosti

Pomocí měření vodivosti bylo možné určit nejen přítomnost interakcí mezi HA a protonizovanými aminokyselinou, ale do určité míry i velikosti těchto interakcí.

V případě zkoumání interakcí u roztoků s přidavkem lysinu v oblasti nízkých koncentrací se změna vodivosti mezi roztokem HA s přidavkem aminokyseliny a vodným roztokem aminokyseliny projevila výrazným poklesem  $\kappa_{rel}$ . Tento pokles je velmi dobře vidět v obrázku 19. K poklesu  $\kappa_{rel}$  dochází s rostoucí koncentrací lysinu v roztoku. Vysoká vodivost roztoku kyseliny hyaluronové s přidavkem lysinu o koncentraci  $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  oproti roztoku vody s lysinem je způsobena velmi malým přidavkem protonizovaného lysinu. U roztoku s takto nízkým přidavkem lysinu, tedy s nízkou koncentrací, k interakcím pravděpodobně nedochází. K tomu, aby došlo k interakcím mezi kyselinou hyaluronovou a protonizovanou aminokyselinou, je potřeba překročit určitou hraniční koncentraci, za kterou HA a aminokyselina zaujmají vhodné prostorové uspořádání, které tyto interakce umožňuje.



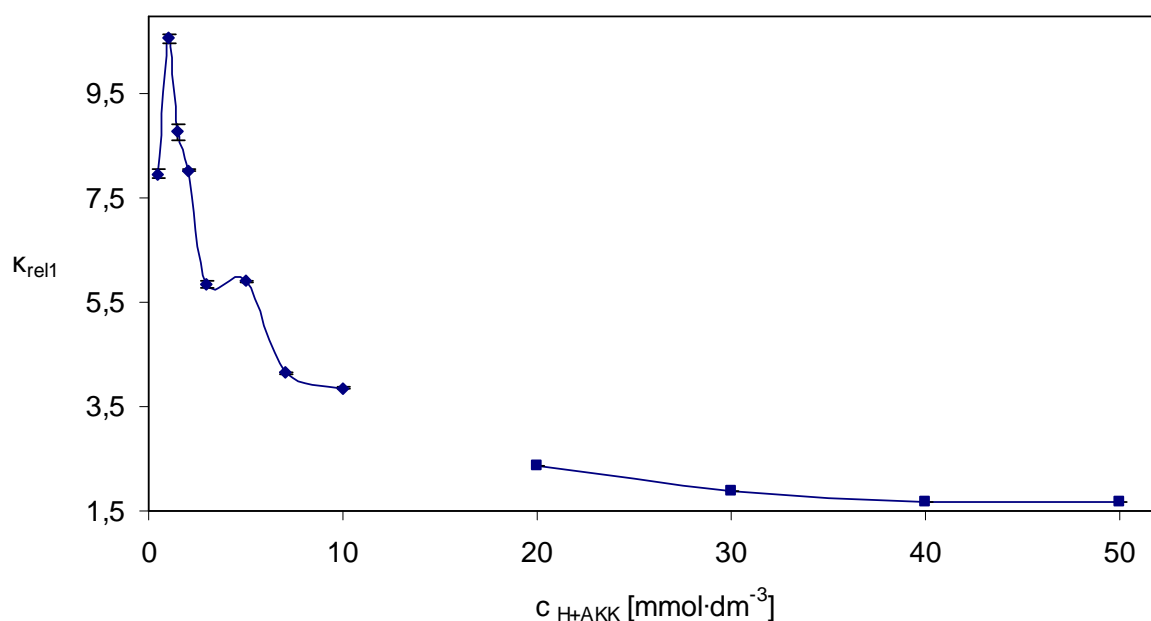
Obrázek 19: Relativní vodivost  $I$  v závislosti na koncentraci lysinu v roztoku HA při teplotě  $25 \text{ }^\circ\text{C}$

V případě zkoumání interakcí roztoků kyseliny hyaluronové s přidavkem 6-aminokapronové kyseliny v oblasti nízkých koncentrací došlo ke vzrůstu  $\kappa_{rel}$  s lokálním maximem při koncentraci  $1 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Poté následoval pokles  $\kappa_{rel}$  a její ustálení na hodnotě přibližně 4. Tento trend je opačný než v případě měření vodivosti u systému lysinu.

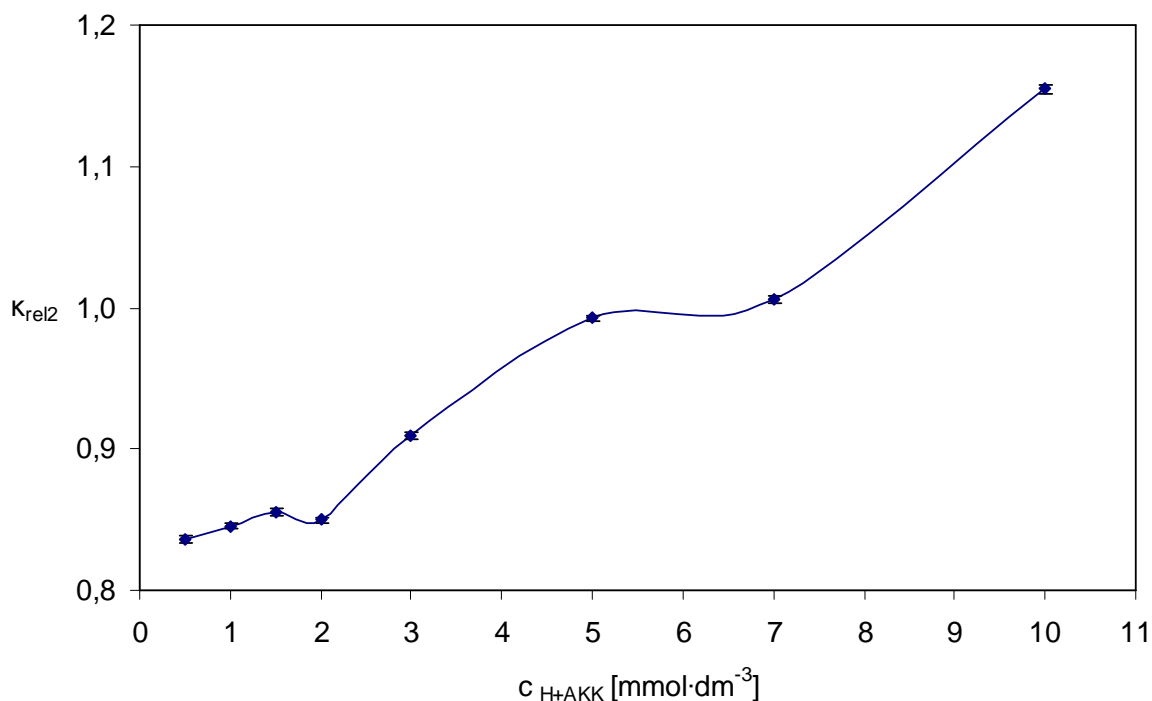
U roztoků kyseliny hyaluronové s přidavkem 6-aminokapronové kyseliny v oblasti vysokých koncentrací došlo k poklesu  $\kappa_{rel}$  a následně k jejímu ustálení na hodnotě přibližně 1,7. Výše zmíněné chování  $\kappa_{rel}$  vysvětluje skutečnost, že na protonizaci 6AKK byla použita kyselina chlorovodíková o mnohem nižší koncentraci, než v případě lysinu, z důvodu nižší

zásaditosti 6AKK. Díky tomu bylo v roztoku přítomno méně kladně nabitých částic, tj. protonizovaných aminokyselin, a v důsledku toho byla naměřena i nižší vodivost  $\kappa_{rel2}$  jednotlivých roztoků. Vodivost tedy byla značně ovlivněna přítomností HA v roztoku, která vykazuje mnohem vyšší hodnoty vodivosti než 6AKK.

Nejvýznamnější pokles  $\kappa_{rel2}$  byl pozorován u systému 6AKK v oblasti nízkých koncentrací, kde u roztoků  $0,5-5 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  hodnoty  $\kappa_{rel2}$  klesly pod hodnotu 1. Tento pokles se nachází ve stejném koncentračním rozpětí, ve kterém byly vykazovány i změny pro  $\kappa_{rel1}$ . Tato skutečnost potvrzuje vznik interakcí.



Obrázek 20: Relativní vodivost 1 v závislosti na koncentraci 6AKK v roztoku HA v oblasti nízkých i vysokých koncentrací při teplotě  $25 \text{ }^\circ\text{C}$



Obrázek 21: Relativní vodivost 2 v závislosti na koncentraci 6AKK v roztoku HA v oblasti nízkých koncentrací při teplotě 25 °C

### 4.3. Reologická měření

Výsledky reologického měření roztoků kyseliny hyaluronové s přidavkem protonizované aminokyseliny, konkrétně lysinu v oblasti nízkých koncentrací a 6-aminokapronové kyseliny v oblasti nízkých i vysokých koncentrací, jsou uvedeny v následujícím odstavci. Naměřená data byla zpracována v programu TA Data Analysis od firmy TA Instruments a následně shrnuta do tabulek a grafů v programu MS Excel.

Základní předpoklad pro přítomnost interakcí mezi kyselinou hyaluronovou a protonizovanými aminokyselinami je pokles viskozity v měřeném systému za konstantních podmínek, jako je např. teplota. Vzhledem k tomu, že k celkovému snížení viskozity v rámci jednotlivých systémů došlo, byla přítomnost interakcí mezi HA a aminokyselinami skutečně dokázána.

V případě systému kyseliny hyaluronové s přidavkem protonizovaného lysinu v oblasti nízkých koncentrací byla naměřena limitní viskozita  $\eta_0$  0,1% roztoku samotné 1,75 MDa HA ve vodě při limitní nízké smykové rychlosti  $\eta_0 = 108,10$  mPa·s. S rostoucí koncentrací lysinu v roztoku docházelo k postupnému poklesu viskozity. Roztok o nejnižší koncentraci  $0,5$  mmol·dm<sup>-3</sup> vykazoval nejvyšší limitní viskozitu  $81,08$  mPa·s a roztok o nejvyšší koncentraci  $10$  mmol·dm<sup>-3</sup> vykazoval nejnižší limitní viskozitu, jejíž hodnota byla  $7,24$  mPa·s.

Tabulka 6: Limitní viskozity systému HA s přidavkem lysinu

$c_{Lys}$ [mmol·dm <sup>-3</sup> ]	$\eta_0$ [mPa·s]
0,5	81,08
1,0	61,96
1,5	44,39
2,0	40,96
3,0	30,03
5,0	13,79
7,0	9,40
10,0	7,24

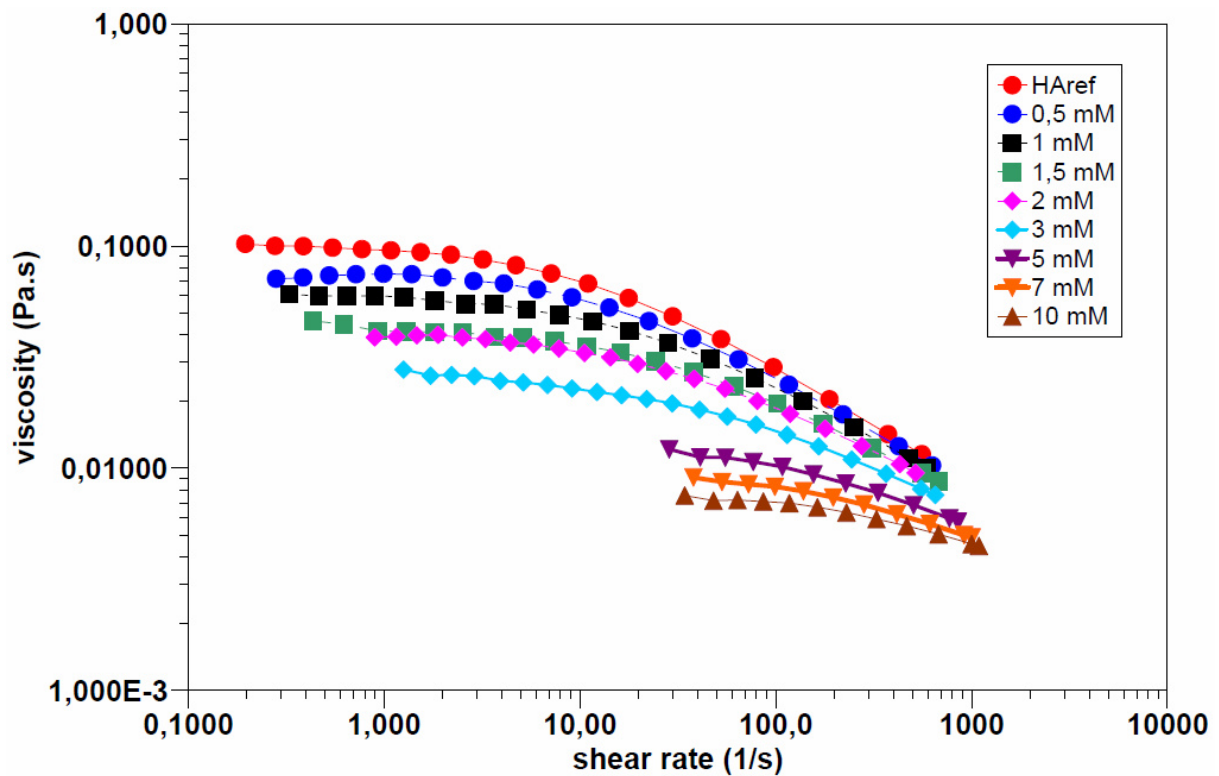
U systému kyseliny hyaluronové s přidavkem protonizované 6-aminokapronové kyseliny docházelo s její rostoucí koncentrací v roztoku k poklesu viskozity. V případě systému kyseliny hyaluronové s přidavkem protonizované 6AKK byla naměřena limitní viskozita  $\eta_0$  0,1% roztoku samotné 1,75 MDa HA ve vodě při limitní nízké smykové rychlosti  $\eta_0 = 107,85$  mPa·s, v oblasti vysokých koncentrací  $\eta_0 = 121,65$  mPa·s. U systému v oblasti nízkých koncentrací byla naměřena v případě nejnižší koncentrace 0,5 mmol·dm<sup>-3</sup> nejvyšší limitní viskozita 124,45 mPa·s a nejnižší limitní viskozita 86,72 mPa·s při nejvyšší koncentraci 10 mmol·dm<sup>-3</sup>. Systém v oblasti vysokých koncentrací vykazoval nejvyšší limitní viskozitu 74,25 mPa·s u roztoku o koncentraci 20 mmol·dm<sup>-3</sup> a nejnižší limitní viskozitu 45,66 mPa·s při nejvyšší koncentraci 50 mmol·dm<sup>-3</sup>.

Tabulka 7: Limitní viskozity systému HA s přidavkem 6AKK v oblasti nízkých a vysokých koncentrací

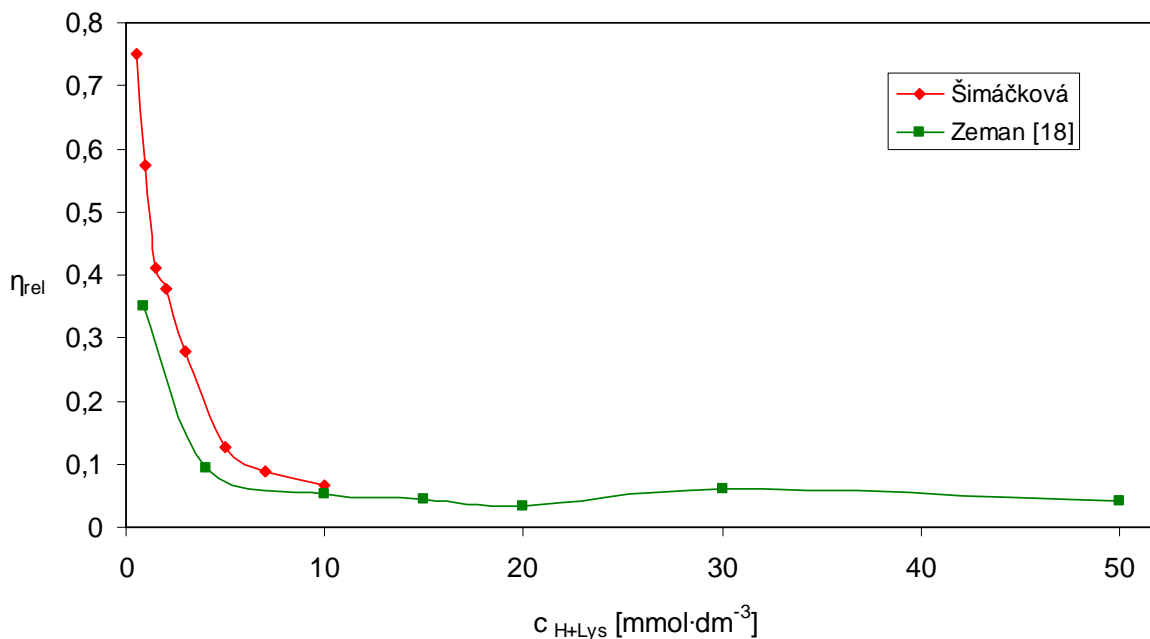
$c_{6AKK}$ [mmol·dm <sup>-3</sup> ]	$\eta_0$ [mPa·s]
0,5	124,45
1,0	119,15
1,5	119,05
2,0	112,70
3,0	113,20
5,0	112,10
7,0	100,42
10,0	86,72
20,0	74,25
30,0	70,39
40,0	54,82
50,0	45,66

Obrázek 22 zobrazuje průběh viskozitních křivek jednotlivých roztoků HA s přidavkem protonizovaného lysinu, z nichž je patrný pokles viskozity s rostoucí smykovou rychlostí. Jedná se tedy o typické neneutonské chování. V Obrázku 23 je zobrazena křivka relativní

viskozity, která vyjadřuje změnu viskozity roztoku v závislosti na koncentraci lysinu. Je zde také porovnán klesající trend relativní viskozity naměřený v rámci této bakalářské práce a v rámci bakalářské práce Jana Zemana [18]. Z poklesu relativní viskozity roztoku v závislosti na jeho rostoucí koncentraci lysinu tedy vyplývá, že mezi HA a protonizovaným lysinem k interakcím dochází. Tyto interakce vznikají mezi karboxylovou skupinou vázanou v molekule HA nesoucí záporný náboj a lysinem, který se na HA váže pomocí kladného náboje nacházejícího se na atomu dusíku.



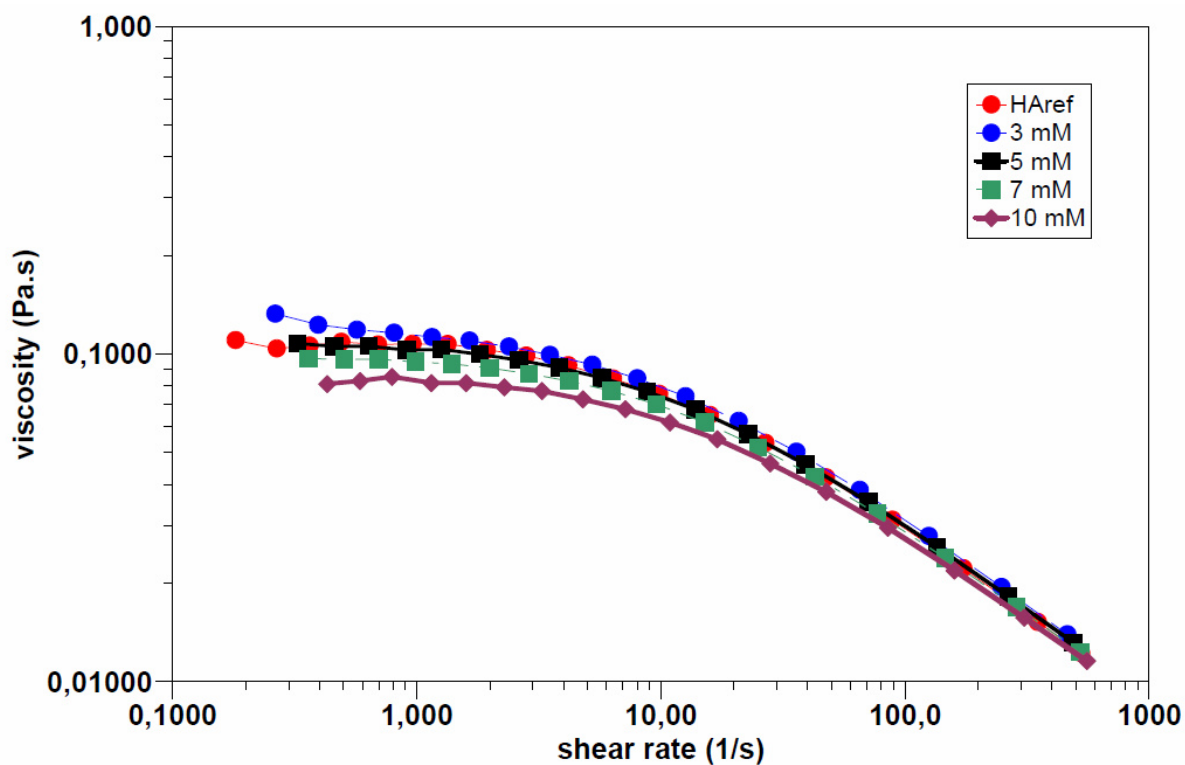
Obrázek 22: Průběh viskozitních křivek u systému 1,75 MDa HA s přidavkem protonizovaného lysinu



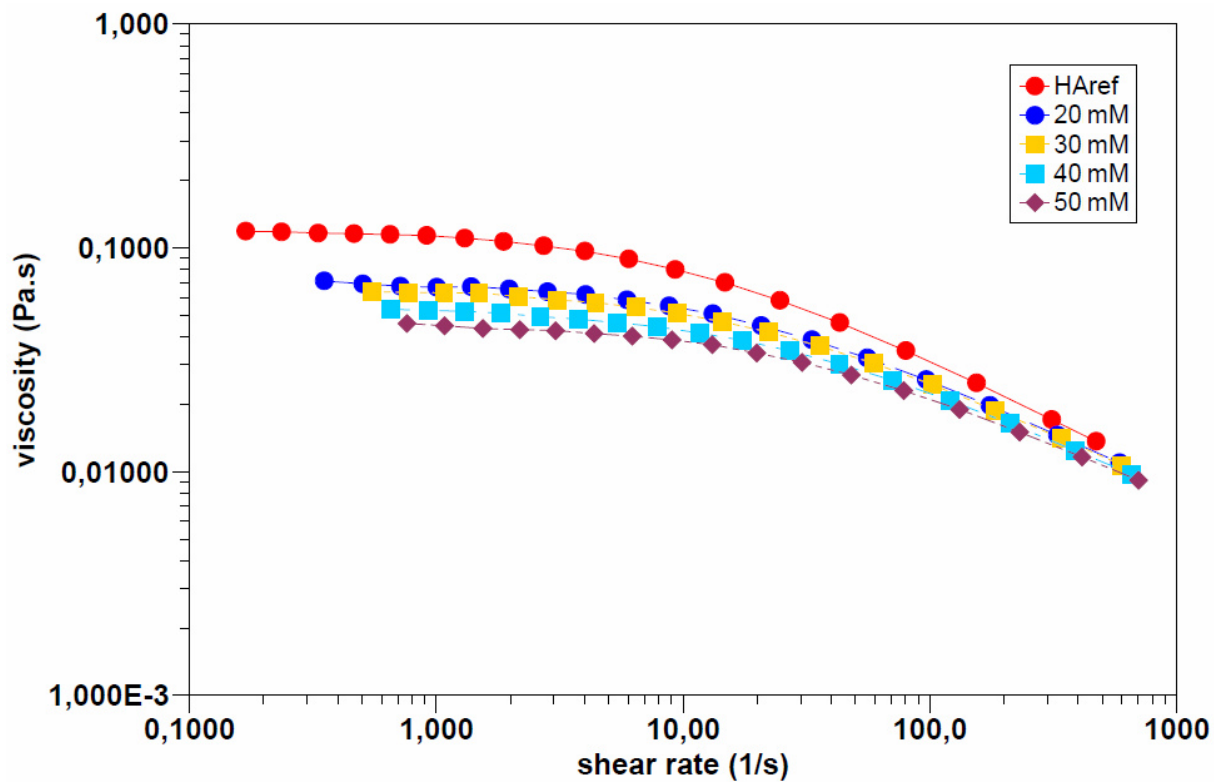
Obrázek 23: Průběh relativní viskozity u systému 1,75 MDa HA s přidavkem protonizovaného lysinu

V případě systému s přidavkem protonizované 6AKK dochází stejně jako u lysinu k poklesu viskozity s rostoucí smykovou rychlostí, což je projev neneutonského chování. Obrázky 24, 25 zobrazují průběh viskozitních křivek jednotlivých roztoků HA s přidavkem 6AKK. Obrázek 26 zobrazuje pokles relativní viskozity v závislosti na rostoucí koncentraci 6AKK v roztoku v oblasti nízkých i vysokých koncentrací. Je zde také porovnán klesající trend relativní viskozity naměřený v rámci této bakalářské práce a v rámci bakalářské práce Jana Zemana [18]. Pokles relativní viskozity u systému s přidavkem 6AKK není tak strmý, jako tomu bylo u systému s přidavkem lysinu. Tato skutečnost značí, že k interakcím mezi HA a 6AKK opravdu dochází, ale oproti interakcím mezi HA a lysinem jsou tyto interakce slabší.

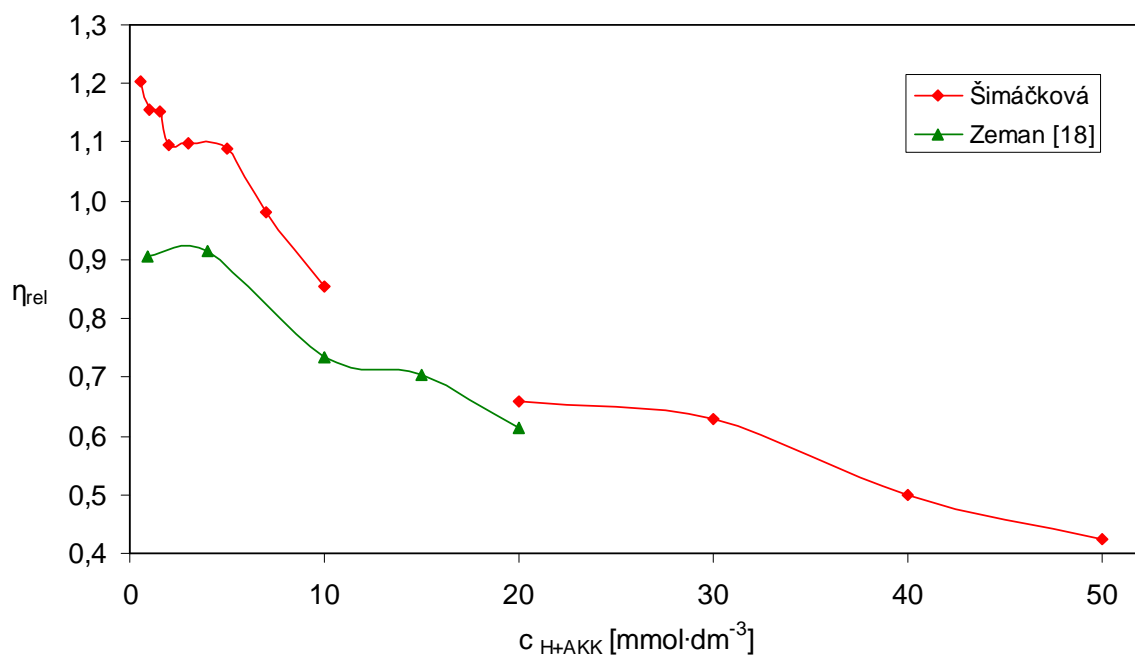




Obrázek 24: Průběh viskozitních křivek u systému 1,75 MDa HA s přidavkem protonizované 6AKK v oblasti nízkých koncentrací



Obrázek 25: Průběh viskozitních křivek u systému 1,75 MDa HA s přidavkem protonizované 6AKK v oblasti vysokých koncentrací



Obrázek 26: Průběh relativní viskozity u systému 1,75 MDa HA s přidavkem protonizované 6AKK v oblasti nízkých i vysokých koncentrací

## 5. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo podrobněji proměřit interakce mezi vysokomolekulovou HA (1,75 MDa) a protonizovanými aminokyselinami, lysinem a 6-aminokapronovou kyselinou, v extrémních koncentracích. Tyto interakce byly již prokázány v bakalářské práci Bc. Jana Zemana, kde byly měřeny v širším koncentračním rozpětí [18]. Interakce byly zkoumány pomocí měření pH, kde by mělo dojít v případě jejich vzniku ke zvýšení hodnoty pH, a vodivosti, kde by mělo dojít k poklesu vodivosti v důsledku snížení počtu volných nabitých částic v roztoku. V obou případech byly vždy měřeny roztoky HA s protonizovanou aminokyselinou, ale z důvodu porovnání i roztoky protonizované aminokyseliny ve vodě. Nejstěžejnějším měřením však bylo měření reometrické, kterému byly podrobeny pouze roztoky HA s protonizovanou aminokyselinou. V případě vzniku interakcí by mělo dojít ke snížení viskozity v důsledku zmenšení objemu molekul HA [18].

Měření pH bylo potvrzeno zvýšení hodnoty pH v důsledku vzniku interakcí. Samotný roztok aminokyseliny ve vodě pak vykazoval nižší hodnoty pH v důsledku většího počtu kladně nabitých částic, tj. protonizovaných aminokyselin. Poté, co byla přidána HA k tomuto roztoku, došlo ke vzniku interakcí. To se projevilo zvýšením pH v důsledku snížení počtu volně kladně nabitých částic v roztoku. Tento trend byl pozorován jak u systému HA s protonizovaným lysinem v oblasti nízkých koncentrací, tak u systému HA s protonizovanou 6AKK v oblasti nízkých i vysokých koncentrací. Byly tedy potvrzeny výsledky naměřené v rámci bakalářské práce Bc. Jana Zemana [18].

Interakce u systému HA s protonizovaným lysinem se v rámci měření vodivosti projevily prudkým poklesem vodivosti roztoku HA s lysinem vzhledem k roztoku lysinu ve vodě. Z tohoto prudkého poklesu lze také usuzovat, že interakce mezi HA a lysinem jsou poměrně silné. V případě systému HA s protonizovanou 6AKK byl v oblasti nízkých koncentrací pozorován trend opačný. Nejdříve došlo ke zvýšení vodivosti roztoku HA s 6AKK vzhledem k vodivosti roztoku 6AKK ve vodě, maxima bylo dosaženo při koncentraci  $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , a poté k postupnému poklesu. Tento pokles byl sledován i v oblasti vysokých koncentrací, kde následně došlo k ustálení na hodnotě 1,7. Zvýšení vodivosti roztoku HA s 6AKK vzhledem k vodivosti roztoku 6AKK ve vodě je pravděpodobně projev HA, která vykazuje podstatně vyšší hodnoty vodivosti než samotná 6AKK. Interakce tedy byly vykazovány v oblasti nízkých i vysokých koncentrací. To je způsobeno nižší zásaditostí 6AKK než v případě lysinu, kde byly interakce vykazovány pouze v oblasti nízkých koncentrací [18]. 6AKK obsahuje pouze jednu aminoskupinu, proto na saturaci řetězce HA je potřeba přibližně dvojnásobné množství 6AKK než v případě lysinu. 6AKK byla také z důvodu nižší zásaditosti protonizována HCl s nižší koncentrací. V případě měření vodivosti byly potvrzeny výsledky naměřené v rámci bakalářské práce Bc. Jana Zemana [18].

Nejstěžejnějším měřením této práce bylo měření reometrické. Vznik interakcí mezi HA s protonizovanými aminokyselinami se projevilo snížením viskozity. V případě systému HA s lysinem došlo k prudkému poklesu relativní viskozity, což svědčí o vzniku poměrně silných interakcí v porovnání se systémem HA s 6AKK, kde jsou interakce podstatně slabší. Z tohoto důvodu lze usuzovat, že interakce s 6AKK probíhají jiným mechanismem než v případě lysinu. U systému 6AKK byly prokázány interakce jak v oblasti nízkých, tak v oblasti vysokých koncentrací, byl zde ale vykazován pozvolný pokles relativní viskozity. Tento pozvolný pokles se pak v oblasti vysokých koncentrací 6AKK začal zmírňovat a lze předpokládat, že u koncentrací nad  $50 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  dochází k vysycení řetězce HA.

## 6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] NECAS, J., L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER a J. KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan). *Veterinari Medicina*. 2008, č. 53, s. 397-411.
- [2] HASCALL a LAURENT. Hyaluronan: Structure and Physical Properties. *GlykoForum* [online]. 1997, No. 1 [cit. 2012-04-20]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [3] KOGAN, Grigorij, Ladislav ŠOLTÉS, Robert STERN a Peter GEMEINER. Hyaluronic acid : a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett*. 2007, č. 29, s. 17-25.
- [4] "Hyaluronic Acid" Expedition: Hyaluronic Acid - This is what I am!. *Seikagaku corporation* [online]. 2012 [cit. 2012-04-20]. Dostupné z: <http://www.seikagaku.co.jp/english/ha/ha02.html>
- [5] SUGAHARA, Kazuyuki, Nancy B. SCHWARTZ a Albert DORFMAN. Biosynthesis of Hyaluronic Acid by Streptococcus. *The Journal of Biological Chemistry*. 1979, č. 14, s. 6252-6261.
- [6] LAPČÍK, Lubomír et al. Hyaluronan: Structure, properties and application. *Chemical reviews*. 1998, No. 8, s. 2663-2684.
- [7] "Hyaluronic Acid" Expedition: Hyaluronic Acid- Everywhere in your body. *Seikagaku corporation* [online]. 2012 [cit. 2012-04-20]. Dostupné z: <http://www.seikagaku.co.jp/english/ha/ha01.html>
- [8] PEKAŘ, Miloslav, Martina KLUČÁKOVÁ, Michal VESELÝ a Michal ČEPPAN. *Fyzikální chemie a fotochemie*. první. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2003. ISBN 80-214-2470-2.
- [9] SOPOUŠEK, Jiří. *Základy reologie a reometrie kapalin* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2007 [cit. 2012-04-20]. Dostupné z: [http://is.muni.cz/el/1431/jaro2007/C5760/um/2457585/2457594/Reologie\\_a\\_reometrie\\_kapalin.pdf](http://is.muni.cz/el/1431/jaro2007/C5760/um/2457585/2457594/Reologie_a_reometrie_kapalin.pdf)
- [10] CALCIU-RUSU, Daniela, Ernst ROTHFUSS, John ECKELT, Tanja HAASE, H. Burkhard DICK a Bernhard A. WOLF. Rheology of Sodium Hyaluronate Saline Solutions for Ophthalmic Use. *Biomacromolecules*. 2007, No. 4, s. 1287-1292.
- [11] WEIN, Ondřej. *Úvod do reologie*. první. Brno: Malé Centrum, 1996.
- [12] KENNEDY, John F., Glyn O. PHILLIPS a Peter A. WILLIAMS. *Hyaluronan: Chemical, Biochemical and Biological Aspects* [online]. Volume 1. 2002 [cit. 2012-04-20]. ISBN 1 85573 570 9. Dostupné z: <http://books.google.cz/books?id=1OmYewmd-SoC&lpg=PA201&ots=-5Ff1ASX91&dq=Hyaluronan%20rheology&pg=PA41#v=onepage&q=Hyaluronan%20rheology&f=false>
- [13] GATEJ, Iuliana, Marcel POPA a Marguerite RINAUDO. Role of the pH on Hyaluronan Behavior in Aqueous Solution. *Biomacromolecules*. 2005, No. 1, s. 61-67.
- [14] KODÍČEK, Milan. *Biochemické pojmy: výkladový slovník* [online]. 2004 [cit. 2012-04-20]. ISBN 80-7080-551-X. Dostupné z: [http://gvm.vm.cz/vyuka/bio\\_pojmy/hesla/interakce\\_elektrostaticke.html](http://gvm.vm.cz/vyuka/bio_pojmy/hesla/interakce_elektrostaticke.html)

- [15] HERSLÖF, Asa, Lars-Olof SUNDELÖF a Katarina EDSMAN. Interaction between Polyelectrolyte and Surfactant of Opposite Charge. Hydrodynamic Effects in the Sodium Hyaluronate/Tetradecyltrimethylammonium Bromide/Sodium Chloride/Water System. *The Journal of Physical Chemistry*. 1992, No. 5, s. 2345-2348.
- [16] THALBERG, Kyrre a Björn LINDMAN. Interaction between Hyaluronan and Cationic Surfactants. *The Journal of Physical Chemistry*. 1989, No. 4, s. 1478-1483.
- [17] FUKADA, Kazuhiro, Emi SUZUKI a Tsutomu SEIMIYA. Rheological Properties of Sodium Hyaluronate in Decyltrimethylammonium Bromide Aqueous Solutions. *Langmuir*. 1999, No. 12, s. 4217-4221.
- [18] ZEMAN, Jan. *Reologické studium interakcí vysokomolekulárního hyaluronanu a protonizovaných aminokyselin*. Brno, 2011. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Ing. Martin Chytil, Ph.D.
- [19] Lysine. *University of Maryland Medical Center* [online]. 2011 [cit. 2012-04-20]. Dostupné z: <http://www.umm.edu/altmed/articles/lysine-000312.htm>
- [20] *Microbial Production of L-Amino Acids* [online]. 2003 [cit. 2012-04-20]. ISBN 3-540-43383-X. Dostupné z: [http://books.google.cz/books?id=bBf-42O85tMC&pg=PA59&dq=Biotechnological+Manufacture+of+Lysine&hl=cs&ei=XyytTrC2BYT4sgaz0LXUDw&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=1&ved=0CDEQ6AEwAA#v=onepage&q=Biotechnological%20Manufacture%20of%20Lysine&f=false](http://books.google.cz/books?id=bBf-42O85tMC&pg=PA59&dq=Biotechnological+Manufacture+of+Lysine&hl=cs&ei=XyytTrC2BYT4sgaz0LXUDw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CDEQ6AEwAA#v=onepage&q=Biotechnological%20Manufacture%20of%20Lysine&f=false)
- [21] Lysin. *Datový standard MZ ČR* [online]. 2005 [cit. 2012-04-20]. Dostupné z: [http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD\\_DS3/hypertext/KPAAQ.htm](http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS3/hypertext/KPAAQ.htm)
- [22] Aminocaproic acid - injection, Amicar. *MedicineNet.com: We Bring Doctors' Knowledge to You* [online]. 2011 [cit. 2012-04-20]. Dostupné z: [http://www.medicinenet.com/aminocaproic\\_acid-injection/article.htm](http://www.medicinenet.com/aminocaproic_acid-injection/article.htm)
- [23] SCHRAMM, Gebhard. *A Practical Approach to Rheology and Rheometry*. Federal Republic of Germany: Gebrueder HAAKE GmbH, 1998.
- [24] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [25] BAREK, Jiří, František OPEKAR a Karel ŠTULÍK. *Elektroanalytická chemie*. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-1146-5.
- [26] KOTOUČEK, M., J. SKOPALOVÁ a P. ADAMOVSÝ. *Příklady z analytické chemie* [online]. 2010 [cit. 2012-04-20]. Dostupné z: <http://ach.upol.cz/ucebnice/>
- [27] *Odmaturuj z chemie*. Brno: DIDAKTIS spol. s r. o., 2002. ISBN 80-86285-56-1.
- [28] *Acidobazické titrace: Acidobazické indikátory* [online]. Hradec Králové: Univerzita Hradec Králové, 2004 [cit. 2012-04-20].
- [29] SOMMER, Lubomír. *Základy analytické chemie II*. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214-1742-0
- [30] MONK, Paul M.S. *Fundamentals of electroanalytical Chemistry* [online]. 2001 [cit. 2012-04-20]. ISBN 978-0-471-88140-6. Dostupné z: [http://books.google.cz/books?id=dAB5g98E2T0C&printsec=frontcover&dq=Fundamentals+of+Electroanalytical+Chemistry.&hl=cs&ei=gSrITmOAcch-Qbg1t0k&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&redir\\_esc=y#v=onepage&q=Fundamentals%20of%20Electroanalytical%20Chemistry.&f=false](http://books.google.cz/books?id=dAB5g98E2T0C&printsec=frontcover&dq=Fundamentals+of+Electroanalytical+Chemistry.&hl=cs&ei=gSrITmOAcch-Qbg1t0k&sa=X&oi=book_result&ct=result&redir_esc=y#v=onepage&q=Fundamentals%20of%20Electroanalytical%20Chemistry.&f=false)

## 7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

HA	hyaluronan, kyselina hyaluronová
6AKK	6-aminokapronová kyselina
Lys	Lysin
Da	Dalton-jednotka molekulové hmotnosti (1 Da = $1,66 \cdot 10^{-27}$ kg)
•	
$\gamma$	smyková rychlost
•	
$\gamma_c$	kritická smyková rychlost
$\eta_0$	limitní viskozita
$\eta_\infty$	asymptotická viskozita
CD44	receptor, na který se váže kyselina hyaluronová
$\eta$	dynamická viskozita
$r, R$	poloměr
$\varepsilon_r$	relativní permitivita
$\varepsilon_0$	permitivita vakua
$Q$	elektrický náboj
$\pi$	Ludolfovo číslo
$G$	vodivost
$a$	aktivita
$U$	napětí
$I$	elektrický proud
$c$	koncentrace
$f$	aktivitní koeficient
$E$	elektrický potenciál
$A$	plocha
$v$	rychlost
$F$	síla
$h$	vzdálenost
$\tau$	tečné napětí
$M$	moment síly
$\omega$	úhlová rychlost
$\alpha$	úhel zkosení
T	termodynamická teplota [K]
pK	disociační konstanta
$\kappa$	konduktivita
$S$	plocha elektrod
$l$	vzdálenost elektrod
$\eta_{rel}$	relativní viskozita
$\kappa_{rel1}$	relativní vodivost 1
$\kappa_{rel2}$	relativní vodivost 2
$pH_{rel}$	relativní pH
$t$	teplota [°C]

## 8. PŘÍLOHY

Tabulka 8: Hodnoty limitních a relativních viskozit pro systém HA s přidavkem protonizovaného lysinu v oblasti nízkých koncentrací při 25 °C

$c_{Lys}$ [mmol·dm <sup>-3</sup> ]	$\eta_0$ [mPa·s]	$\eta_{rel}$ [mPa·s]
0,0	108,10	-
0,5	81,08	0,750
1,0	61,96	0,573
1,5	44,39	0,411
2,0	40,96	0,379
3,0	30,03	0,278
5,0	13,79	0,128
7,0	9,40	0,087
10,0	7,24	0,067

Tabulka 9: Hodnoty limitních a relativních viskozit pro systém HA s přidavkem protonizované 6AKK v oblasti nízkých a vysokých koncentrací při 25 °C

$c_{6AKK}$ [mmol·dm <sup>-3</sup> ]	$\eta_0$ [mPa·s]	$\eta_{rel}$ [mPa·s]
0,0	107,85	-
0,5	124,45	1,154
1,0	119,15	1,105
1,5	119,05	1,104
2,0	112,70	1,045
3,0	113,20	1,050
5,0	112,10	1,039
7,0	100,42	0,931
10,0	86,72	0,804
20,0	74,25	0,610
30,0	70,39	0,579
40,0	54,82	0,451
50,0	45,66	0,375