



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

**PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE SMĚSNÝCH
HYDROGELŮ NA BÁZI SYSTÉMU
HYALURONAN-ALBUMIN**

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF MIXED HYDROGELS BASED ON THE
SYSTEM HYALURONAN-ALBUMIN

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Pavla Hájovská

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Michal Kalina, Ph.D.

BRNO 2017



Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1004/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Pavla Hájovská**
Studijní program: Spotřební chemie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **Ing. Michal Kalina, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Příprava a charakterizace směsných hydrogelů na bázi systému hyaluronan-albumin

Zadání diplomové práce zadání:

- 1) Literární rešerše na téma příprava směsných gelů albuminu a polysacharidů, jejich charakterizace a studium transportních vlastností
- 2) Zkombinovat poznatky získané z literární rešerše s daty naměřenými během předchozí bakalářské práce studentky pro zvolení optimálních zástupců hyaluronan-albuminových směsných gelů pro další experimentální charakterizaci a studium transportních vlastností
- 3) Samotná charakterizace zvolených hydrogelů vybranými metodami dostupnými na FCH VUT v Brně (zejména reologie a metody termické analýzy)
- 4) Studium transportní vlastností připravených hydrogelů pro zvolenou sondu
- 5) Závěrečné shrnutí získaných výsledků a diskuze

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Pavla Hájovská
student(ka)

Ing. Michal Kalina, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá přípravou a následnou charakterizací albuminových (BSA) a směsných hyaluronan-albuminových (HA+BSA) hydrogelů. Experimentální charakterizace byla založena na reologickém měření vlivu iontové síly, pH a molekulové hmotnosti hyaluronanu na proces gelace a vlastnosti vzniklých gelů, stejně tak jako na měření časové stability těchto vlastností. Dalším předmětem studia bylo bobtnání gelů ve vodě a v pufrch o různém pH. Charakterizace byla doplněna o termickou analýzu, popis morfologie využitím elektronové mikroskopie a studium transportních vlastností hydrogelů pro zvolenou modelovou látku.

Vlivem rostoucí iontové síly docházelo k posunu bodu gelace k vyšším teplotám a vzniklé gely vykazovaly vyšší hodnoty komplexního modulu. V případě, kdy bylo pH nižší než hodnota izoelektrického bodu BSA, se uplatňovaly přitažlivé elektrostatické interakce mezi albuminem a hyaluronanem a ke gelaci docházelo výrazně rychleji než v případě, kdy bylo pH vyšší než izoelektrický bod BSA. Hodnoty komplexního modulu naopak s rostoucím pH stoupaly. Vyšších hodnot komplexního modulu rovněž dosahovaly vzorky v přítomnosti nízkomolekulového HA, v porovnání s vysokomolekulovým HA. Reologické vlastnosti BSA gelů byly v čase stálé, naproti tomu směsné HA+BSA gely byly charakteristické výrazným poklesem komplexního modulu v prvních třech dnech skladování.

Studované vzorky gelů ztrácely ohřevem na 100 °C víc než 80 % své hmotnosti, jako důsledek vypařování vody. Zvýšením teploty na 250 °C nedocházelo u xerogelů k dalším změnám spojeným s úbytkem hmotnosti, na rozdíl od práškového BSA, u kterého byl v důsledku počínající degradace pozorován úbytek hmotnosti při teplotě 220 °C.

Studium bobtnání, stejně jako snímky z elektronové mikroskopie, poukazyvaly na vyšší hustotu síťování BSA gelů v porovnání se směsnými HA+BSA vzorky, které dosahovaly vyšších hodnot stupně bobtnání. Rovnovážný stupeň bobtnání všech vzorků byl nejnižší při pH 4, což je pH blízké izoelektrickému bodu BSA.

Vypočítané hodnoty relativního difuzního koeficientu, vztažené na difuzivitu methylenové modři ve vodě, se pohybovaly v řádu 10^{-2} při difuzi do fyziologického roztoku a v řádu 10^{-3} v případě difuze z gelu do vody. Probíhající transport modelového barviva z gelu byl výrazně pomalejší v porovnání s jeho difuzí ve vodě, což bylo způsobeno zejména porozitou hydrogelu a elektrostatickou imobilizací kladně nabitých molekul methylenové modři na záporně nabitých řetězcích BSA a HA.

KLÍČOVÁ SLOVA

Albumin, kyselina hyaluronová, hydrogel, reologie, termická analýza, bobtnání, difuze.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with preparation and subsequent characterization of albumin (BSA) and mixed hyaluronan-albumin (HA+BSA) hydrogels. The experimental characterization was based on the rheological measurements of the influence of ionic strength, pH and molar mass of HA on the gelation process and the properties of formed gels, as well as the time stability of these properties. Following object of the study was swelling of hydrogels in water and buffers with different pH value. Characterization was extended by thermal analysis, morphology description using scanning electron microscopy (SEM) and study of transport properties of hydrogels for selected model substance.

Due to increasing ionic strength, the gel point was shifted towards higher temperature values and the resulting gels exhibited higher values of complex moduli. In case when pH was lower than isoelectric point of BSA, attractive electrostatic interactions between albumin and hyaluronan took place and the faster gelation occurred, compared to the case when pH was higher than isoelectric point of BSA. On the contrary, values of complex moduli increased with increasing pH. The gel samples prepared in the presence of low molecular weight HA reached higher values of complex moduli, compared to samples with the high molecular weight HA. Rheological properties of BSA gels were stable over time, whereas the mixed HA+BSA were characterized by significant decrease of complex moduli during the first three days of storage.

Due to heating up to 100 °C, more than 80 % of the weight of studied samples was lost, as a result of water evaporation. Further heating of hydrogels, up to 250 °C, did not cause other changes associated with weight loss, in contrast with crystalline powder BSA, in which another weight loss at 220 °C was observed, as a result of the beginning degradation.

Swelling studies, as well as SEM images, indicated higher crosslink density of BSA gels, compared to HA+BSA samples, which exhibited higher values of swelling ratio. The lowest values of equilibrium swelling ratio were observed at pH 4, which is close to the isoelectric point of albumin.

Calculated diffusion coefficients relative to diffusivity of methylene blue in water ranged between the order of 10^{-2} for diffusion into physiological solution and the order of 10^{-3} for the diffusion into water. Ongoing transport of model dye from gel to solution was significantly slower, compared to its diffusion in water, as a result of gel porosity and electrostatic immobilization of positively charged molecules of methylene blue on the negatively charged BSA and HA chains.

KEY WORDS

Albumin, hyaluronic acid, hydrogel, rheology, thermal analysis, swelling, diffusion.

HÁJOVSKÁ, P. *Příprava a charakterizace směsných hydrogelů na bázi systému hyaluronan-albumin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 65 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Michal Kalina, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. 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.

.....
podpis studenta

Ráda bych zde poděkovala vedoucímu této diplomové práce Ing. Michalu Kalinovi, Ph.D. a odbornému konzultantovi Ing. Martinu Chytilovi, Ph.D. za motivaci, rady a připomínky v průběhu práce a za ochotu a trpělivost při konzultacích.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Kyselina hyaluronová.....	9
2.1.1	Úvod.....	9
2.1.2	Struktura.....	9
2.1.3	Vlastnosti	10
2.1.4	Využití	11
2.2	Albumin.....	12
2.2.1	Úvod.....	12
2.2.2	Struktura.....	12
2.2.3	Vlastnosti	13
2.2.4	Využití	14
2.3	Gely	15
2.3.1	Úvod.....	15
2.3.2	Dělení gelů.....	15
2.3.3	Vlastnosti gelů	17
2.4	Reologie	19
2.4.1	Úvod.....	19
2.4.2	Základní pojmy	19
2.4.3	Viskozita	20
2.4.4	Elasticita.....	21
2.4.5	Viskoelasticita.....	22
2.4.6	Reometrie.....	24
2.5	Termická analýza	25
2.5.1	Úvod.....	25
2.5.2	Termogravimetrie	26
2.5.3	Diferenciální kompenzační kalorimetrie	27
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	29
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
4.1	Použité chemikálie	35
4.2	Použité metody.....	35
4.2.1	Příprava vzorků.....	35
4.2.2	Reologické měření	36
4.2.3	pH titrace.....	37

4.2.4	Charakteristika bobtnání	37
4.2.5	Termická analýza	37
4.2.6	Elektronová mikroskopie (SEM)	37
4.2.7	Uvolňování modelové látky	38
4.2.8	Zpracování a vyhodnocení	38
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	40
5.1	Reologické měření	40
5.1.1	Vliv iontové síly	40
5.1.2	Vliv pH	41
5.1.3	Vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu	43
5.1.4	Časová stálost reologických vlastností	44
5.2	Bobtnání	46
5.3	Termická analýza	48
5.3.1	Mikrokalorimetrie	48
5.3.2	Termogravimetrie a diferenciální kompenzační kalorimetrie	49
5.4	Elektronová mikroskopie	50
5.5	Uvolňování modelové látky	51
6	ZÁVĚR	54
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	56
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	59
9	PŘÍLOHY	61

1 ÚVOD

Hydrogely jsou makromolekulární síťovité struktury, vznikající z přírodních nebo syntetických polymerů. Jsou schopny absorbovat značné množství vody bez toho, aby došlo k jejich rozpuštění. Kombinují vlastnosti pevných látek vycházející z elastického chování makromolekulární sítě a současně vlastnosti kapalin, jako důsledek přítomnosti velkého množství vody. Tyto unikátní reologické vlastnosti předurčují jejich aplikace v medicíně jako nosiče léčiv, materiály pro krytí ran, biosenzory, scaffoldy pro tkáňové inženýrství nebo implantáty v estetické medicíně. Uplatnění nacházejí rovněž ve farmaceutickém průmyslu jako růstové médium pro mikroorganismy, při přípravě finálních produktů (gelové kapsle) nebo v potravinářském průmyslu.

S cílem zlepšení vlastností gelů výzkum v posledních letech směřuje k vývoji nových hydrogelů na báze dvou nebo více polymerů. Využívá se chemické modifikace použitých polymerů, kovalentního síťování nebo fyzikálních interakcí, a to za účelem dosažení požadovaných vlastností připraveného materiálu, jako jsou například mechanické vlastnosti, stabilita nebo afinita k určitým typům látek, které jsou nezbytné pro jejich aplikace.

Albumin a kyselina hyaluronová jsou biodegradabilní, tělu vlastní látky, což je činí atraktivními pro vývoj biokompatibilních materiálů. Albumin je nejvíce zastoupeným proteinem krevní plazmy, je nezbytný například pro metabolismus lipidů a transport iontů kovů v krvi. Ve své struktuře obsahuje vazebná místa s afinitou k nejrůznějším léčivům. Kyselina hyaluronová se nachází v těle každého obratlovce, kde zabezpečuje například údržbu viskoelasticity pojivových tkání nebo kontrolu jejich hydratace. Hyaluronan nachází mnoho využití v lékařství, jako složka léků v oční chirurgii, při léčbě artritidy nebo v estetické chirurgii.

Jedním z cílů této práce je prostřednictvím reologického měření prozkoumat vliv pH, iontové síly a molekulové hmotnosti použitého hyaluronanu na průběh gelace směšného vzorku hyaluronanu a albuminu o konstantní koncentraci 13 % (w/w) a hmotnostním poměru HA:BSA = 1:12 a následně prostudovat i vliv těchto podmínek na reologické vlastnosti připravených gelů.

Druhým cílem experimentální části této práce je komplexnější charakteristika pěti vybraných vzorků gelů, konkrétně čistě albuminových i směšných hyaluronan-albuminových vzorků ve vodném prostředí a ve fyziologickém roztoku. Charakteristika zahrnuje reologické studium vlastností připravených gelů, procesu jejich gelace a rovněž sledování stability reologických vlastností těchto vzorků v čase. Další metodou použitou pro charakterizaci vzorků je termická analýza a to za účelem porovnání termické stability gelů s práškovým albuminem a stejně tak určení obsahu vody v připravených gelech. Bobtnání připravených gelů bylo studováno gravimetricky v prostředí o různém pH, morfologie vzorků byla analyzována prostřednictvím elektronové mikroskopie vysušených xerogelů a cílem poslední části této práce je popis uvolňování modelové látky (methylenová modř) ze struktury gelu do vody, resp. fyziologického roztoku.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kyselina hyaluronová

2.1.1 Úvod

Kyselina hyaluronová je lineární polysacharid přirozeně se vyskytující v těle všech obratlovců. Poprvé byla izolována v roce 1934 z kravského očního sklivce Karlem Mayerem a Johnem Palmerem. Zjistili, že se molekula skládá ze dvou molekul cukru, přičemž jednu z nich identifikovali jako uronovou kyselinu. Navrhli tak název hyaluronová kyselina, který má původ v řeckém *hyalos* (sklo) a uronová kyselina [1,2]. Samotná chemická struktura však byla popsána Karlem Mayerem a jeho kolegy až v roce 1950. I když byla poprvé izolována ve formě kyseliny, ve fyziologických podmínkách se vyskytuje ve formě své sodné soli – hyaluronanu sodného [1].

Kyselina hyaluronová se přirozeně vyskytuje zejména v extracelulární matrix pojivových tkání, ale byl prokázán i její intracelulární výskyt [3]. Kromě obratlovců se přirozeně vyskytuje také u některých bakterií, zejména u rodu *Streptococcus*. V lidském těle se nachází v synoviální tekutině, pupeční šňůře nebo očním sklivci. Téměř polovina hyaluronanu (HA) lidského těla se nachází v kůži, kde v intracelulárním prostoru může dosahovat koncentrace až $2,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ [4].

Mezi biologické funkce kyseliny hyaluronové v organismu patří udržování viskoelasticity pojivových tkání, kontrola hydratace a transportu vody, shromažďování proteoglykanů v extracelulární matrix, četné receptory-zprostředkované role v buněčném dělení, mitóze, vzniku tumorů, metastáz, zánětů [1,4].

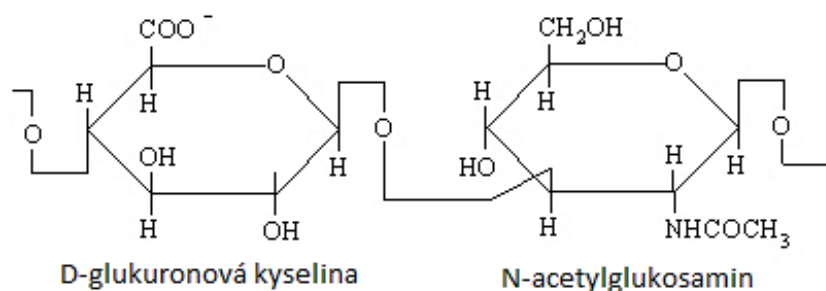
Jako zdroj pro výrobu hyaluronanu se dlouho využívaly různé měkké tkáně savců, jako chrupavky, kůže nebo kohoutí hřebínky, které obsahují jeho nejvyšší přirozenou koncentraci. Tento způsob byl následně nahrazen biosyntézou za pomoci některých druhů bakterií, především jde o bakterie *Streptococcus Zooepidemicus* a *Streptococcus Equi*, jež jsou schopny produkovat hyaluronan o molekulových hmotnostech od několika desítek kDa po přibližně 2 MDa [4,5].

2.1.2 Struktura

Kyselina hyaluronová je lineární polysacharid řadící se do skupiny aminoglykanů, kde patří mezi nejjednodušší z nich. Jako jediná z aminoglykanů není kovalentně vázaná s proteinem, vyráběná v Golgiho aparátu a není sulfatovaná [4].

Molekula HA může být tvořena různým počtem opakujících se disacharidových jednotek v rozsahu od několika stovek až do několika tisíců. Hmotnost každé disacharidové jednotky je přibližně 400 Daltonů, tudíž může molekulová hmotnost HA dosáhnout až 4 milionů Daltonů. Průměrná délka každé disacharidové jednotky je přibližně 1 nm z čehož plyne, že celková délka řetězce je přímo určena jeho molekulovou hmotností [2].

Chemická struktura HA je dána opakujícími se disacharidovými jednotkami kyseliny glukuronové a N-acetylglukosaminu, které jsou spojeny střídajícími se β -1,4 a β -1,3 glykosidickými vazbami (viz Obrázek 1) [1, 2, 6]. V každé disacharidové jednotce se nachází jedna karboxylová skupina, tudíž je molekula HA polyelektrolyt [6]. Oba cukry jsou odvozeny od molekuly glukózy, která v beta konfiguraci umožňuje všem větším skupinám zaujmout stericky výhodnou ekvatoriální pozici, zatímco malé vodíkové atomy zaujímají stericky méně výhodnou axiální pozici, což vede ke vzniku energeticky velmi stabilní disacharidové struktury [1,2].



Obrázek 1- struktura disacharidové jednotky hyaluronanu [1]

Konformace HA v krystalické formě byla zkoumána pomocí rentgenové difrakce. Pozorovaná helikální konformace obsahovala 2, 3 nebo 4 disacharidové jednotky na jedno otočení v závislosti od přítomného protiiontu (H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+}). V iontovém prostředí (směs H^+/K^+ , Rb^+ , NH_4^+) možno pozorovat i strukturu dvoušroubovice, kde na jedno otočení připadají 4 disacharidové jednotky. Všechny tyto struktury jsou dále stabilizovány vznikajícími vodíkovými můstky [6].

Nukleární magnetická resonance potvrdila přítomnost struktury v roztoku, ve které je každá jednotka otočena o 180° vůči sousedícím jednotkám. Dvě otočení (celkově 360°) tudíž přivádí zpátky původní konfiguraci. Jako důsledek dochází ve vodném prostředí k navázání molekuly vody do struktury šroubovice a ke vzniku tzv. vodných můstků. Voda se váže do míst, kde se původně nacházely vodíkové můstky a hovoříme tak o primárně vázané vodě [7].

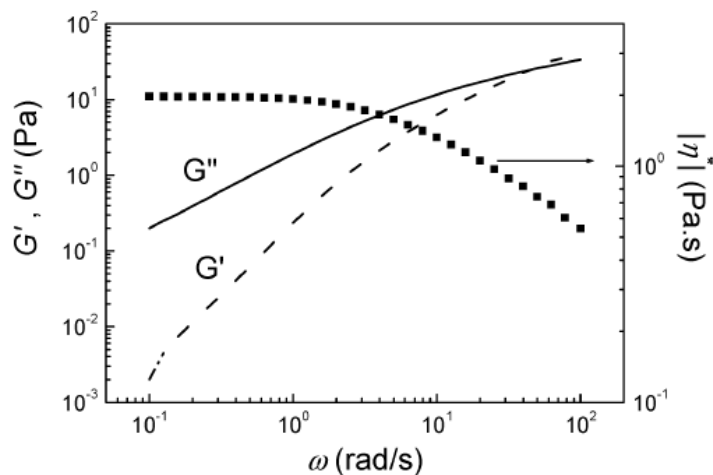
2.1.3 Vlastnosti

Uspořádání řetězce, kdy axiální vodíkové atomy tvoří hydrofobní část a ekvatoriální karboxylové skupiny hydrofilní část, způsobuje, že je molekula vysoce hydrofilní a má jedinečné viskoelastické a reologické vlastnosti [1,2].

Hyaluronan je ve vodě rozpustný při neutrálním pH ve formě své soli a v důsledku disociace většiny karboxylových skupin má molekula záporný náboj [2]. Z analýzy distribuce molekulové hmotnosti možno v kyselém ($pH = 1,6$) a bazickém ($pH = 12,6$) prostředí pozorovat lehkou degradaci. Kromě dvou případů nejsou reologické vlastnosti HA hodnotou pH významně ovlivněny. Při $pH = 2,5$ je pozorována gelace roztoku, jako důsledek redukce náboje a případné protonace aminoskupin, což vede ke vzniku interakcí mezi řetězci. Při $pH > 12$ dochází v důsledku částečného rozpadu sítě vodíkových vazeb ke snížení pevnosti kostry řetězce polymeru a tím k poklesu viskozity [8].

Reologické vlastnosti roztoků hyaluronanu jsou spojené s molekulovou hmotností použitého HA a současně jeho koncentrací. Roztoky HA s vysokou molekulovou hmotností vykazují měřitelné odchylky od Newtonova zákona. Řetězce v roztoku jako důsledek nevazebného proplétání tvoří metastabilní síť, což má za následek vysoké hodnoty limitní viskozity. Působením vnějšího napětí se však molekuly začnou pohybovat, vzniklé struktury se začnou rozplétat a dochází k poklesu viskozity. (viz Obrázek 2). Po dosažení kritické hodnoty deformačních sil se již rozpletené struktury nestíhají obnovovat a roztok vykazuje newtonské chování. Řetězce nízkomolekulové HA netvoří v roztoku propletené sítě, tudíž viskozita těchto roztoků není závislá na působení deformačních sil a jejich chování je v platnosti s Newtonovým viskozitním zákonem [9].

Jako velká molekula je HA náchylný k mechanické degradaci buď působením ultrazvuku, nebo termální degradaci při zvýšené teplotě. Fyziologicky může být HA degradován volnými radikály kyslíku nebo hyaluronidázami [10].



Obrázek 2 – závislost paměťového modulu, ztrátového modulu a komplexní viskozity na frekvenci pro HA o molekulové hmotnosti $1100 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ [9]

2.1.4 Využití

HA byl poprvé komerčně použit v roce 1942 Endre Balazsem jako substitute vaječného bílku v pekařských výrobcích. V roce 1950 našel HA první uplatnění v medicíně při operaci lidského oka [1,2].

V současnosti aplikace HA zahrnují produkty pro oftalmologii, léčbu kloubních patologií, estetickou medicínu nebo transport léčiv. HA ve formě očních kapek efektivně chrání rohovku a je zvláště důležitý v případě syndromu suchého oka. Další aplikací je intraartikulární injekce jako náhrada za synoviální tekutinu. Používá se také na kontrolu pooperační adheze a prevenci vzniku jizev a rovněž podporu hojení ran. Spolu s kolagenem nachází využití v estetické medicíně ve formě injekcí pro vyhlazování vrásek [11].

Za účelem vytvoření materiálů, které jsou dostatečně mechanicky a chemicky odolné, byla studována řada chemických modifikací nativního HA. Výsledné deriváty mohou vykazovat výrazně odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti, přičemž si zachovávají biokompatibilitu a biodegradabilitu nativního HA. Typickým příkladem modifikací HA jsou konverze viskózního roztoku přidávkem síťovacího činidla na hydrogel, navázání funkčních skupin pro studium cíleného transportu léčiv a jejich postupného uvolňování, příprava kompozitních materiálů s jinými přírodními a syntetickými polymery, nebo navázání HA na povrch lipozomů jako alternativa k použití polyethylenglykolu [12].

HA je ideální molekulou pro použití jako nosič léčiv. Jako polysacharid je přirozenou součástí tkání a tudíž je imunologicky inertní. Ve své primární struktuře však obsahuje skupiny schopné vázat aktivní látky [10]. Bylo prokázáno, že některé druhy rakovinových buněk obsahují zvýšené množství receptorů, které vážou HA. Receptor CD-44 ve své struktuře obsahuje specifickou doménu, pozůstávající ze 160 aminokyselinových zbytků, na kterou se váže HA, přičemž afinita je závislá na velikosti oligomerů. Spojení specifických interakcí a biokompatibility HA jsou klíčové faktory pro biokonjugaci HA a cytotoxických látek. Spojením vzniká neaktivní forma, která se endocytózou dostává do rakovinových buněk, kde intracelulárně dochází k uvolnění léčiva v aktivní cytotoxické formě [13].

Pokrok ve výzkumu HA významně přispívá k řešení mnoha problémů v medicíně, avšak mnoho fyziologických funkcí HA zůstává neobjevených. Existují teorie, že se HA účastní patogeneze metastáz a revmatologických autoimunních onemocnění a výzkum bude kromě jiného směřovat také k terapeutickému využití HA v těchto onemocněních [10].

2.2 Albumin

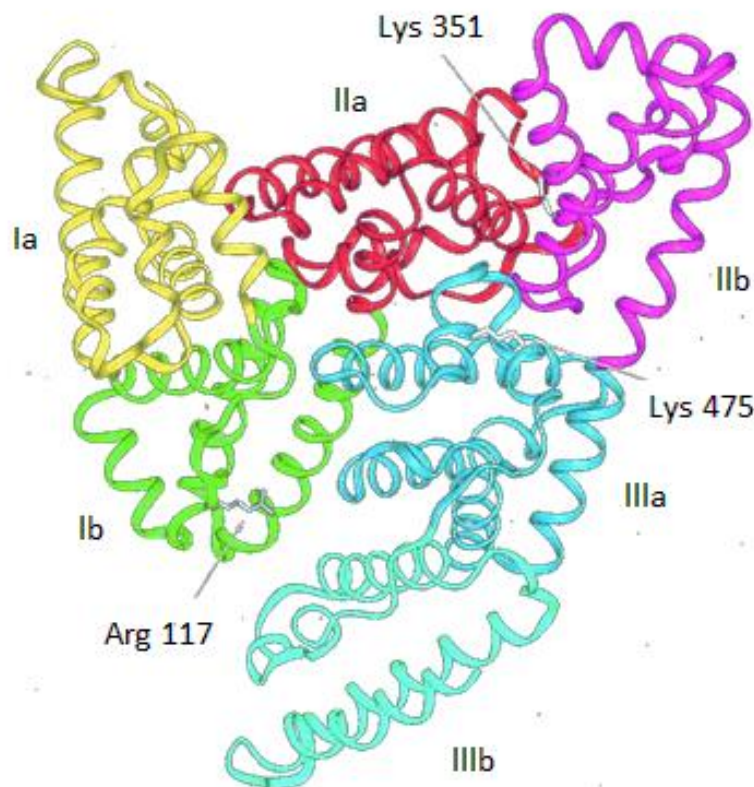
2.2.1 Úvod

Název albumin pochází z obecnějšího termínu, *albumen*, který ve staré němčině označoval protein. Svůj původ má však latinském *albus* (bílý), podle barvy vaječného bílku. V současnosti je pojmem albumin označován specifický protein živočišné krevní plasmy [14].

V lidském těle je albumin syntetizován v játrech rychlostí přibližně 0,7 mg/hod na jeden gram jater (tzn. 10–15 g denně) a jeho poločas rozpadu v organismu je průměrně 19 dní. Působí jako solubilizační činidlo pro vyšší mastné kyseliny, a proto je nezbytný pro metabolismus tuků. Ve své struktuře obsahuje vazebná místa s afinitou k různým látkám. Váže bilirubin, široké spektrum terapeutických léčiv (například peniciliny, sulfonamidy, indolové sloučeniny, benzodiazepiny) nebo kationty kovů. Specificky váže Cu^{2+} , Ni^{2+} a nespecificky váže Ca^{2+} a Zn^{2+} , čímž zabezpečuje transport těchto iontů kovů v krvi. Kromě toho je také hlavním proteinem odpovědným za koloidní osmotický tlak krve. Po jeho rozštěpení, vzniklé aminokyselinové zbytky slouží jako zdroj výživy pro periferní tkáně [15].

2.2.2 Struktura

Molekula albuminu se skládá z 585 aminokyselinových zbytků. Je charakteristický nízkým obsahem tryptofanu a methioninu, naopak vysoce zastoupeny jsou cystein a zbytky nabitých aminokyselin jako lysin nebo arginin. Albumin ve své primární struktuře obsahuje 35 molekul cysteinu, formujících 17 disulfidických můstků stabilizujících terciární strukturu a jednu volnou molekulu cysteinu v poloze 34 [14, 16].



Obrázek 3 – schéma struktury HSA s barevně odlišenými poddoménami (žlutá – Ia, červená – IIa, modrá – IIIa, zelená – Ib, purpurová – IIb, tyrkysová – IIIb). Arg117, Lys351 a Lys475, které mohou být vazebnými místy pro mastné kyseliny, jsou znázorněny jako bílé spoje. [17]

Všechny známé sérové albuminy obratlovců (evolučně vyspělejších než ještěři) mají stejnou distribuci cysteinů v molekule i terciární doménovou strukturu [14].

Struktura lidského albuminu (human serum albumin, HSA) byla studována krystalograficky, s rozlišením 2,5 Å. HSA je helikální protein obsahující ve své struktuře velké množství flexibilních částí řetězce, výsledkem čehož je molekula ve tvaru srdce (schéma viz Obrázek 3) s rozměry přibližně 80×80×30 Å. Molekula HSA je rozdělena do tří domén, I (obsahuje aminokyselinové zbytky 1–195), II (196–383) a III (384–585), které nejsou identické jenom topologicky, jak můžeme předpokládat porovnáním primární sekvence aminokyselin, ale i svým třídímenzionálním uspořádáním. Každá doména je dále rozdělena do dvou poddomén tvořených 4 (poddoména a) nebo 6 (poddoména b) helikálními strukturami. Poslední helix jedné domény je vždy spojen s prvním helixem následující domény a tudíž je molekula HSA tvořena celkem 28 helikálními strukturami [17].

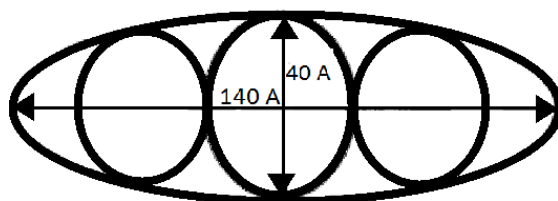
Albumin obsahuje dvě stabilní vazebná místa schopná vázat většinu léčiv v terapeutických koncentracích. Podle Sudlowovy nomenklatury se objemné heterocyklické anionty (bilirubin, antikoagulační látky, nesteroidová protizánětlivá léčiva) váží na Sudlowovo místo I (lokalizováno v poddoméně IIa) zatím co Sudlowovo místo II (lokalizováno v poddoméně IIIa) je upřednostňováno aromatickými karboxyláty (profeny – ibuprofen, fenoprofen, ketoprofen nebo benzodiazepiny jako diazepam) [16].

2.2.3 Vlastnosti

Molekulová hmotnost lidského a hovězího albuminu (bovine serum albumin, BSA) určená výpočtem na základě aminokyselinové sekvence dává porovnatelné hodnoty, konkrétně 66,438 kDa pro HSA a 66,411 kDa pro BSA. Albumin v roztoku obsahuje kovalentně vázané zbytky, jako například glykolové skupiny, které nejsou v této kalkulaci zahrnuty. Zaužívaná standardní hodnota 66,500 kDa vychází z gelové elektroforézy a charakterizuje BSA včetně kovalentně vázaných skupin, přičemž neuvažuje pevně vázanou vodu [14].

Albumin je ve vodném prostředí vysoce rozpustný. Tato vlastnost má původ v primární struktuře a jeho vysokém celkovém náboji (přibližně 185 ionizovaných skupin v molekule při pH 7,0) [14]. Je stabilní v rozmezí pH 4–9, rozpustný v 40% etanolu a může být zahříván na teplotu 60 °C po dobu 10 hodin bez škodlivých účinků [15].

Viskozita roztoků albuminu není tak vysoká jako v případě fibrilárních proteinů (například fibrinogenu), ale je výrazně vyšší, než by byla v případě sférického tvaru molekuly BSA. Tvar molekuly BSA v roztoku byl predikován několika studiemi a využitím různých fyzikálních metod jako elipsoid, tvořený z lineárně uspořádaných tří domén (viz Obrázek 4). I když jsou peptidové řetězce v roztoku v blízkém kontaktu, pořád zůstává dostatek prostoru pro vtěsnání molekul rozpouštědla do struktury proteinu. Prostřednictvím několika metod, jako jsou infračervená spektrometrie, hydrodynamické metody nebo nukleární magnetická resonance, je možno detekovat monomolekulární vrstvu vody, pevně vázanou k povrchu proteinu prostřednictvím vodíkových vazeb [14].



Obrázek 4 – model molekuly albuminu v roztoku získaný na základě hydrodynamických měření [14]

Nativní BSA rozpuštěný ve vodě v neutrálním pH netvoří gely, protože intermolekulární odpuzivé síly (hlavně elektrostatické) dominují nad přitažlivými interakcemi (hydrofobní a Van der Waalsovy). Po zahřátí na teplotu, při které dochází ke konformačním změnám globulárního proteinu, dochází ke střetu reaktivních částí, jako například částí hydrofobních nebo částí obsahujících thiolové skupiny. Vlivem vhodných podmínek dochází v roztoku ke zvýšení aktivity na povrchu proteinu, což vede k agregaci a formaci gelu. Intramolekulární interakce podmiňují strukturu sítě gelu a ta následně ovlivňuje jeho fyzikálně-chemické vlastnosti [18].

2.2.4 Využití

Už v polovině dvacátého století se objevily první studie demonstrující skutečnost, že nádory zachytávají proteiny z krevní plazmy a využívají produkty jejich degradace na rychlé rozmnožování. Studie distribuce albuminu prokázaly, že 3–25 % aplikované dávky proteinu se akumuluje v nádoru. To činí albumin slibným nosičem léčiv například na cílenou léčbu rakoviny. Komplex albuminu s navázaným metotrexátem¹, který již prošel klinickými testy pro použití v protinádorové léčbě, vykazuje aktivitu i při modelové léčbě kolagenem indukované artritidy. Albumin v kombinaci s doxorubicinem² funguje jako účinný nosič aktivních látek s cíleným transportem do jater, například při léčbě hepatocelulárního karcinomu [15].

Albuminové nanočástice přitahují pozornost, protože oproti jiným proteinům vykazují několik unikátních vlastností. Albumin je pro organizmus netoxický, je schopný reverzibilně vázat velké množství hydrofobních léčiv. Vzhledem k velkému množství nabitých aminokyselinových zbytků je schopen elektrostaticky vázat pozitivně i negativně nabitě látky a současně je schopen kovalentní vazby s léčivem za účasti karboxylových funkčních skupin nebo aminoskupin. Kromě toho má velmi výhodný farmakokinetický profil, díky svému poločasů rozpadu v krevním řečišti (19 dní) [19]. Albuminové nanočástice mohou být připraveny při nenáročných podmínkách koacervací, řízenou desolvací nebo tvorbou emulze [16, 19].

Albumin nachází využití při přípravě povlaků na materiály pro *in vivo* použití, kde je cílem snížení adheze biologického materiálu. Tenká vrstva albuminu pasivuje povrch, minimalizuje adhezi a brání agregaci krevních destiček nebo leukocytů na povrchu materiálu. Albumin může být za tímto účelem síťován například glutaraldehydem nebo karbodiimidem, a takto připravené vrstvy jsou dále sterilizovány γ -zářením [14].

Existuje několik zajímavých možností medicinského využití albuminu, které doposud nebyly zcela prozkoumány. Například jeho použití jako transportní protein pro kovové komplexy nebo pro látky s možným anti-HIV působením. Dále pak použití kationizovaného albuminu jako nosiče pro transport léčiv hematoencefalickou bariérou. A nakonec také rozvoj podkožně a orálně aplikovatelných derivátů albuminu [15].

¹ Cytostatikum používané při léčbě leukemie nebo revmatoidní artritidy.

² Léčivo ze skupiny antracyklinů, které se využívají pro zabíjení rakovinových buněk v tumorech a krvi.

2.3 Gely

2.3.1 Úvod

Některé koloidní disperze pevných látek v kapalinách, ať se jedná o roztoky makromolekul či lyofobní soly, mají schopnost vytvářet gely – gelatinizovat. Gely jsou systémy tvořené trojrozměrnou sítí, která vytváří souvislou strukturu, prostupující celým disperzním prostředím. Spojité je tedy nejen disperzní prostředí, ale i disperzní podíl a disperzní částice nejsou schopné se nezávisle pohybovat disperzním prostředím [20].

Gely jsou významnou složkou přírodních systémů. Kombinace síly, elasticity a schopnosti vázat velké množství vody je nepostradatelná pro velké množství organismů – mezibuněčný prostor mořských řas (alginát síťovaný převážně vápenatými ionty) nebo oko (fyzikálně síťovaný hyaluronan). Gelové systémy jsou velmi důležité v biochemickém, biologickém a medicínském vývoji. Jsou často používány jako růstové médium pro mikroorganismy v potravinářském a farmaceutickém průmyslu, v medicíně při vývoji materiálu pro tkáňové inženýrství nebo ve formě gelových implantátů pro estetickou medicínu [21].

2.3.2 Dělení gelů

Podle toho, zda obsahují nebo neobsahují rozpouštědlo, se dělí gely na lyogely a xerogely (podle povahy rozpouštědla možno u lyogelů použít název hydrogel nebo organogel). Vysušením lyogelu vzniká kompaktní xerogel, jehož objem je menší, přibližně o objem odstraněného rozpouštědla. U reverzibilních gelů lze xerogel uvést do původního stavu lyogelu nabobtnáním, převod na xerogel je tedy vratný.

Síť může vzniknout z lineárního polymeru nebo jeho roztoku, vytvoří-li se mezi makromolekulami dostatečný počet spojů. Podle povahy těchto spojů pak rozlišujeme kovalentně nebo fyzikálně síťované gely [22].

Kovalentní gely

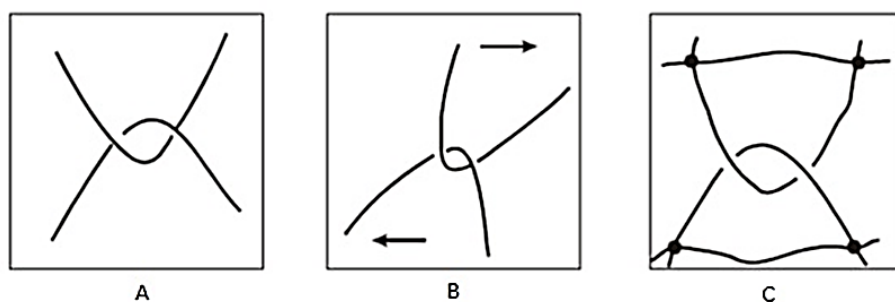
Spojí-li se lineární makromolekuly chemickými vazbami, vzniká vysokomolekulární sloučenina nikoliv již lineární, ale síťovité struktury (například vulkanizovaný kaučuk). Struktura gelů s chemickými vazbami je velmi pevná. Zpět na roztok by je bylo možno převést jedině odbouráním chemických vazeb – výsledný produkt by se však lišil od výchozího polymeru, neboť nelze očekávat, že by se zrušily pouze ty vazby, které vznikly při gelaci [20].

Stádium reakce, kdy dochází k přechodu solu na gel, se nazývá bod gelace. V praxi existují tři základní způsoby vzniku kovalentních gelů. Prvním z nich je polymerace, kdy malé molekuly, jako například epoxidy s aminy, nebo izokyanáty s polyalkoholy s více než dvěma funkčními skupinami, reagují za vzniku rozvětvených řetězců, které mohou dále kondenzovat, například za vzniku polyurethanů. Další možností je řetězová polymerace, při které jsou přítomny molekuly s více funkčními skupinami. Například polymerace styrenu s divinylbenzenem. A nakonec postpolymerizační reakce, při kterých je lineární nebo rozvětvený polymer síťovaný až po samotné polymeraci. Příkladem těchto reakcí může být vulkanizace kaučuku, síťování vyvolané elektronovým paprskem nebo gama zářením. Další metoda zahrnuje použití multifunkčního monomeru, přičemž polymerace a síťování probíhá simultánně a obě reakce jsou na sobě vzájemně nezávislé. Příkladem může být reakce polyethylakrylátu s divinylbenzenem jako síťovacím činidlem [23].

Fyzikální gely

Fyzikálně síťované gely vznikají z roztoků polymerů tak, že se úseky makromolekulárních řetězců sdružují působením fyzikálních sil do útvarů, které plní funkci uzlů. Takto vzniklé spoje jsou zpravidla v jednom nebo i ve třech rozměrech podstatně větší než kovalentní uzly; proto je lépe volit název uzlové nebo spojné oblasti [22]. V mnoha případech není povaha spojných oblastí zcela jasná. Mohou být tvořeny na základě coulombických, dipol-dipolových, hydrofobních interakcí, nebo vodíkovými můstky [24]. Makromolekuly se vzhledem ke své délce mohou začlenit do více než jedné uzlové oblasti, takže po délce řetězce se pak zapojené části střídají s volnými úseky, které si zachovávají ohebnost i tepelný pohyb. Jako fyzikální uzly mohou někdy působit také zapleteniny (viz Obrázek 5). Ty nejsou projevem přitažlivých sil, ale důsledkem toho, že si řetězce vlivem svých poloh navzájem brání v nezávislém pohybu [22].

Existuje množství způsobů, kterými se může uskutečňovat fyzikální síťování. Příkladem takových procesů jsou nedokonalá fázová separace v roztoku amorfního polymeru nebo nedokonalá krystalizace z roztoku polymeru. Prvního zmíněného případu je možné dosáhnout ochlazováním roztoku amorfního polymeru pod kritickou rozpouštěcí teplotu, kdy se roztok rozpadá na zředěnou a koncentrovanou fázi. Koncentrovaná fáze se může vyloučit ve formě rozptýlených nepatrných částic, propojených řetězci zředěné fáze. Pokud ochladíme soustavu pod teplotu skelného přechodu koncentrované fáze, částice ztuhnou a propojení je trvalé. Zředěná fáze je zesíťovaná, přičemž úlohu uzlových oblastí plní amorfní částice koncentrované fáze, které přešly do skelného stavu. V druhém zmíněném procesu, v gelech krystalizovatelných polymerů, mají spojové oblasti někdy podobu krystalických lamel, ve většině případů však existují ve formě roztrepených micel, což jsou útvary, v nichž se do krystalické mřížky ukládají poměrně krátké úseky několika desítek lineárních makromolekul. Důvody, proč nevznikne větší krystal, mohou být kinetické (růst krystalických mikrofází je pomalý nebo nemožný) nebo molekulárně-strukturní (řetězce obsahují jen krátké krystalizovatelné úseky). Také polymery, které se mohou organizovat do anizotropních fází (kapalných krystalů), někdy vytvářejí gely tak, že se místo segregace makroskopické fáze vytvoří síťovitá struktura [22].



Obrázek 5 – zapletenina: A – v klidu, B – při deformaci smykem, C – v permanentní síti [22]

Mnoho globulárních proteinů tvoří gely pouze vlivem zahřívání. Pravděpodobně nejznámějším případem je vaření vajíčka (v principu gelace ovalbuminu). V průběhu gelace indukované zahříváním je konformace proteinu narušena, ale celkový tvar molekuly není významně porušen. Při dostatečně nízkých koncentracích je tento proces reverzibilní, ale po překročení určité hranice koncentrace dochází k soupeření mezi intermolekulárními a intramolekulárními interakcemi. Pokud převáží intermolekulární interakce, dochází ke vzniku gelu. Při delším zahřívání dochází k výraznějším změnám a může dojít ke vzniku kovalentních intermolekulárních vazeb ve formě disulfidických můstků [24].

2.3.3 Vlastnosti gelů

Většina gelů vyskytujících se v rostlinách a v živočišném těle vykazuje anizotropii, která je daná podmínkami při tvorbě těchto gelů. Příčinou anizotropie uměle připravených gelů je obvykle jejich nerovnoměrná deformace při tvorbě nebo nerovnoměrná objemová kontrakce při vysoušení. U těchto gelů jsou vlastnosti jako změna lineárních rozměrů při bobtnání, lom a pohlcování světla, dvojlom i mechanické vlastnosti různé v různých směrech [20].

Kovalentní polymerní sítě (xerogely i lyogely) se co do vratnosti deformace chovají jako elastické látky. V kaučukovitém stavu, dostatečně vysoko nad teplotou skelného přechodu, se vyznačují vysokou průtažností s nízkým modulem elasticity (ke značné deformaci stačí malá síla). Jejich deformace však není okamžitá, probíhá konečnou rychlostí. Protahujeme-li elastické těleso silou F , změní se jeho délka z hodnoty L_0 na $L = L_0 + \Delta L$. Touto deformací vznikne v materiálu elastická retrakční síla, která vyrovná účinek tažné síly a materiál se po dosažení délky L již dále nedeformuje. Retrakční síla také způsobí, že se po zrušení vnější síly materiál vrací do původního, nedeformovaného stavu [22].

Uzlové oblasti fyzikálně síťovaných gelů se liší strukturou, velikostí a hlavně pevností a dobou trvání, což má hlavní vliv na vlastnosti vzniklých gelů. Gely s pevnými spoji se chovají obdobně jako gely s kovalentními vazbami, zatímco sítě gelů se slabými uzly se vlivem větších napětí rozpadají a soustava se začne chovat jako velmi viskózní kapalina. Je-li systém ponechán v klidu, přechází opět v gel [20, 21, 24].

Fyzikálně síťované gely nejsou ve stavu vnitřní termodynamické rovnováhy, pokud se síť vytvořila konečnou rychlostí. Jakmile vznikne síť udržovaná spojnými oblastmi o dlouhé životnosti, jejich existence znesnadňuje nebo i znemožňuje přeskupování řetězců, které by vedlo ke zdokonalování struktury. Přesto pomalu probíhají dodatečné samovolně reorganizační procesy spojené se snižováním Gibbsovy energie. Tento proces nazýváme zrání gelu. Pokud má za následek zvýšení počtu uzlů nebo jejich funkčnosti, hovoříme o synerzi: gel zmenší svůj objem a vyloučí odpovídající množství rozpouštědla [20, 22].

Elektrická vodivost gelů, jejichž disperzní prostředí obsahuje disociované nízkomolekulární elektrolyty je téměř stejně vysoká jako v odpovídajícím solu, z něhož gel vznikl, ačkoli v průběhu gelace prudce vzrůstá viskozita soustavy. Malé molekuly a ionty rozpuštěných látek se pohybují v disperzním prostředí mezi sítí tvořenou disperzním podílem téměř stejně rychle jako v příslušném solu. Díky síťovité struktuře není difuzivita nízkomolekulárních iontů v gelech téměř ovlivňována prouděním ani tepelnými konvekcemi [20].

Bobtnání gelů

Bobtnání polymerní fáze můžeme přirovnat k osmóze, kdy v důsledku síťovité struktury extrahovaného gelu odpadá potřeba semipermeabilní membrány, která by bránila polymeru v přechodu do rozpouštědla. Rozdíl tlaků mezi polymerní fází a rozpouštědlem, který je nutný k ustavení rovnováhy při osmóze, je při bobtnání gelu nahrazen elastickou retrakční silou, která vzniká v nabobtnalé síti, jako důsledek zvětšení jejího objemu [22].

Kvantitativně je možno tento proces popsat stupněm nabobtnání Q , definovaným jako hmotnost kapaliny pohlcené jednotkou suchého xerogelu:

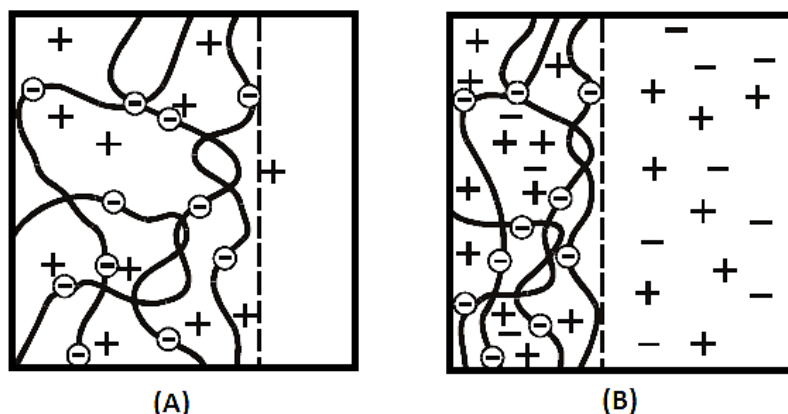
$$Q = \frac{m_t - m_0}{m_0} = \frac{\rho \cdot \Delta V}{m_0} \quad (1)$$

kde m_t je hmotnost bobtnajícího gelu v čase t od počátku bobtnání a m_0 je počáteční hmotnost xerogelu. Je možno jej stanovit jako přírůstek hmotnosti vážením, nebo měřením objemu pohlcené kapaliny ΔV , kde ρ je hustota této kapaliny [20].

Hodnoty stupně nabobtnání jsou závislé na několika různých parametrech. Hodnota Q je tím menší, čím větší je hustota síťování gelu, protože hustěji síťovaný gel vyvíjí větší elastickou retrakční sílu působící proti deformaci. Pro určitý vzorek gelu Q roste s kvalitou rozpouštědla; vskutku pořadí rozpouštědel zjištěné podle vnitřní viskozity pro daný lineární polymer, bývá totožné s pořadím zjištěným podle stupně nabobtnání pro síťovanou podobu toho samého polymeru. Stupeň nabobtnání gelu je tím menší, čím větší je molární objem rozpouštědla (vstup daného látkového množství do gelu při větším molárním objemu znamená větší deformaci) [22].

Řetězce ionogenních gelů (zesíťovaných polyelektrolytů) obsahují skupiny schopné elektrolytické disociace. Jsou-li v kontaktu s vodou nebo vodným roztokem soli, ustaví se po nějaké době bobtnací rovnováha. Je-li ionogenní gel nabobtnán vodou, jsou kromě molekul vody v mezerách síťovité struktury přítomné také protiiony, uvolněné disociací gelu. Obdobně jako u Donnanových rovnováh, platí i zde podmínka elektroneutality obou rovnovážných fází, takže do vnější vodné fáze může přejít jen zanedbatelné množství protiiontů (Obrázek 6A). Výrazný rozdíl koncentrace iontů mezi oběma fázemi, pak značně zvyšuje tendenci vody pronikat do gelu. Bobtnavost ionogenního gelu ve vodě je tedy výrazně větší ve srovnání s nedisociovanou sítí [21, 22].

Je-li v rozpouštědle přítomen nízkomolekulární elektrolyt, uplatní se membránové rovnováhy opačně: do gelu přejde nízkomolekulární elektrolyt v menší koncentraci, než v jaké zůstává v okolním kapalném rozpouštědle (Obrázek 6B) a celková hodnota bobtnacího tlaku se zmenšuje. Při velké koncentraci nízkomolekulárního elektrolytu klesne bobtnací tlak až na hodnotu odpovídající nedisociovanému gelu [20, 22].



Obrázek 6 – znázornění bobtnání ionogenního gelu (A) ve vodě, (B) v roztoku soli [20, 22]

Bobtnání ionogenního gelu je výrazně závislé i na valenci iontů soli. Bobtnání gelů obsahujících polyaniony bude menší a méně závislé na iontové síle v roztoku solí obsahujících divalentní kationty (například CaCl_2 , MgCl_2), než v roztoku solí s divalentními anionty (Na_2SO_4 , K_2SO_4) při stejné hodnotě iontové síly. Situace je pak analogická i pro gely tvořené polykationty [21].

U amfolytických gelů závisí obsah pohyblivých iontů v nabobtnalé síti značně na pH a je nejmenší v izoelektrickém bodě. Proto v tomto bodě vykazuje takový gel minimum stupně nabobtnání [22].

Gely neutrálních polymerů jsou schopny absorbovat množství vody maximálně dvoj- až trojnásobně vzhledem k jejich vlastní hmotnosti. Naproti tomu gely polyelektrolytů mohou nabobtnat až stonásobně při nízkých hodnotách iontové síly. Toho se často využívá při přípravě takzvaných superabsorpčních materiálů [21].

2.4 Reologie

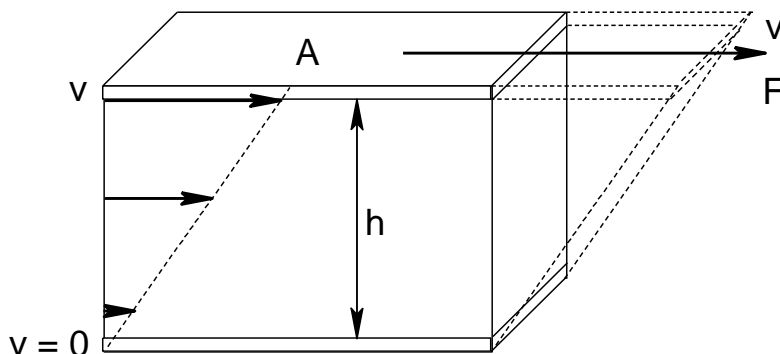
2.4.1 Úvod

Reologie je vědní obor, jehož předmětem studia jsou deformace a tok látek. Je to odvětví fyziky a fyzikální chemie, jelikož většina proměnných, které zde vystupují, pochází z mechaniky: síly, rychlosti, odchylky. Termín reologie má svůj původ v řečtině, ve spojení slov *rein* (těct) a *logos* (věda). Doslovný překlad tohoto spojení je tedy „věda o toku“. Reologické experimenty neposkytují pouze informace o toku kapalin, ale také informace o deformacích pevných látek [25].

Pevná látka nebo kapalina může na aplikovanou deformaci odpovědět třemi různými způsoby: může vykazovat elastické nebo viskózní vlastnosti, případně jejich kombinaci. Poslední zmíněná možnost popisuje viskoelastické chování [21].

2.4.2 Základní pojmy

K popisu základních reologických parametrů se používá model s posuvnými deskami (Obrázek 7), kdy spodní deska je statická (rychlost $v = 0$). Horní deska o ploše A je uvedena do pohybu o rychlosti v , smykovou silou F . Mezi deskami je vzdálenost h , kde je v prostoru nadávkován měřený vzorek. Při měření se předpokládá adheze vzorku k oběma deskám, a také laminární tok [25, 26].



Obrázek 7 – schéma modelu s posuvnými deskami [25]

Smykové napětí τ je definováno jako síla působící na jednotku plochy potřebná na udržení konstantní rychlosti pohybu:

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

Odpověď pevných látek na smykové napětí je deformace γ . Je to poměr změny délky nebo objemu k původní délce nebo objemu:

$$\gamma = \frac{dL}{h}, \quad (3)$$

kde dL = deformace v důsledku působení smykové rychlosti a h = výška tělesa.

Smyková rychlost $\dot{\gamma}$ je gradient rychlosti mezi deskami, kde dochází k laminárnímu toku kapaliny. Je definována jako poměr rychlosti v a vzdálenosti desek h : [21, 25, 26]

$$\dot{\gamma} = \frac{v}{h} [s^{-1}]. \quad (4)$$

2.4.3 Viskozita

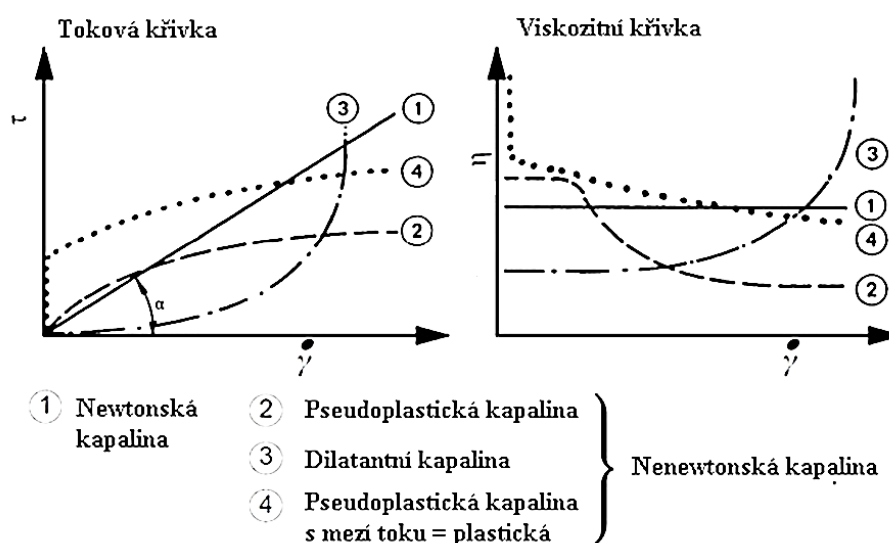
Pro všechny tekutiny (kapaliny, plyny) platí, že jednotlivé molekuly látky navzájem vykazují relativní pohyb, jedna vůči druhé, přičemž tento proces je vždy spojen s působením frikčních sil. Všechny tekutiny v pohybu tedy vykazují určitý odpor vůči toku, který je možné popsat termínem viskozita. Pro tekutiny vykazující ideálně viskózní tok platí, že aplikovaná deformační energie je vzorkem kompletně spotřebována a promění se na teplo, které může vzorek ohřát nebo může být uvolněno do okolního prostředí. Tento proces je ireverzibilní a ani po odstranění působícího napětí nedochází k reformaci vzorku [25].

Newtonské a neneutronské kapaliny

Pro ideálně viskózní kapaliny měřené za konstantní teploty je poměr smykového napětí a smykové rychlosti materiálovou konstantou, definicí dynamické viskozity η . Tento vztah se nazývá Newtonův zákon (5) a látky, pro které v této podobě platí, se nazývají newtonské (viz Obrázek 8 – křivky 1) [25, 26].

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} [Pa \cdot s] \quad (5)$$

Grafickým vyjádřením Newtonova zákona pro ideálně viskózní kapaliny je přímka vycházející z počátku a rostoucí pod úhlem α . Kterýkoliv bod na této přímce pak definuje dvojici hodnot smykového napětí τ a smykové rychlosti $\dot{\gamma}$. Poměr těchto dvou hodnot pak udává hodnotu viskozity η , která může být také definována jako tangens úhlu α [26].



Obrázek 8 – tokové a viskozitní křivky znázorňující různé typy tokového chování [26]

Pro neneutronské kapaliny viskozita již nebude konstantní, ale bude funkcí smykové rychlosti a/nebo času (6). Pro tyto látky lze definovat upravenou podobu Newtonova zákona (7) popisující takzvanou zdánlivou viskozitu η_{app} (z anglického *apparent viscosity*). Hodnoty zdánlivé viskozity jsou pro určitou látku přesně jenom vzhledem k určité smykové rychlosti a/nebo časové odpovědi materiálu [21].

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

$$\eta_{app} = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (7)$$

Tekutiny, jejichž viskozita klesá se zvyšující smykovou rychlostí, se nazývají pseudoplastické (viz Obrázek 8 – křivky 2). Celá řada materiálů, které se navenek jeví homogenní, jsou ve skutečnosti složené z několika složek. Pokud působíme malou smykovou rychlostí, částice si udržují nepravidelnou vnitřní strukturu a jsou charakterizovány vysokou hodnotou viskozity η_0 , nezávislou na smykové rychlosti, která se nazývá limitní (dolní) viskozita. Při zvyšování smykové rychlosti dochází k výraznému poklesu viskozity v důsledku snížení vlivu Brownova pohybu a orientování částic ve směru toku. Při působení dostatečně velkou smykovou rychlostí se viskozita začne asymptoticky blížit ke konstantní hodnotě limitní (horní) viskozity η_∞ , jelikož bylo dosaženo optimální orientace částic.

Dalším typem látek, které jsou charakterizovány závislostí viskozity na smykové rychlosti, jsou látky dilatantní (viz Obrázek 8 – křivky 3). Tyto látky ze zvyšující se smykovou rychlostí, zvyšují také svou viskozitu. Toto chování je u kapalin spíše výjimečné, vyskytuje se u některých vysoce koncentrovaných suspenzí.

Pojmem plastické kapaliny (viz Obrázek 8 – křivky 4) označujeme takové kapaliny, které mají mez toku (τ_0). Jsou to většinou disperze, ve kterých v klidu dochází ke vzniku inter/intramolekulárních interakcí, jejichž výsledkem je pevný charakter látky a teoreticky nekonečně velká viskozita. Pokud jsou vnější působící síly menší než vnitřní síly, stabilizující síť, deformace látky bude elastická. Když budou vnější síly silnější než vnitřní, překonají hraniční smykové napětí, které se nazývá mez toku. Po překročení této hranice se látka původně se jeví jako pevná, změní na tekoucí kapalinu. Příkladem takovýchto kapalin jsou olejové barvy [26].

Pro mnohé látky je viskozita závislá také na čase. V tomto případě můžeme pozorovat dva jevy, jejichž průběh je opačný. Pokud viskozita s časem klesá, hovoříme o tixotropii. Pokud viskozita s časem naopak roste, hovoříme o reopexii [21, 23, 25, 26].

Tixotropie je charakteristická pro disperze, které nevykazují pseudoplastické vlastnosti pouze v důsledku orientace částic, ale také v důsledku časově závislých molekulových interakcí. Tyto vazby, tvořící síť, jsou snadno narušitelné, dochází tak k rozpadu sítě a následně k poklesu viskozity. Tixotropické kapaliny jsou charakteristické svým potenciálem na obnovení své síťovité struktury, když je kapalina ponechána v klidu po dostatečně dlouhý časový interval. Změna struktury je tak reverzibilní.

Reopektické kapaliny jsou naopak charakteristické zvyšováním viskozity působením smykové rychlosti a následným nabýváním původní (nízké) viskozity, když jsou ponechány v klidu. Zatím co tixotropie je běžným chováním u mnohých kapalin, reopexie se vyskytuje velmi zřídka [26].

2.4.4 Elasticita

Pokud na ideálně elastický materiál působíme deformační energií, bude tato energie kompletně uchována v deformovaném materiálu a po odstranění bude úplně k dispozici, bez jakékoli ztráty, což umožní plnou reformaci namáhaného materiálu. Tvar deformovaného materiálu po odstranění deformační energie zůstává nezměněný, vůči svému původnímu tvaru, a tudíž jde o proces plně reverzibilní [21, 25].

Formálně je ideálně elastická deformace popsána Hookovým zákonem (8), který definuje modul pružnosti v tahu G_E , jako poměr mezi smykovým napětím a jím způsobenou deformací, přičemž pro ideálně elastickou deformaci je tento poměr konstantní [25].

$$G_E = \frac{\tau}{\gamma} [Pa] \quad (8)$$

2.4.5 Viskoelasticitá

Viskoelastické látky vždy vykazují viskózní i elastické vlastnosti současně. Viskózní složka materiálu se projevuje na základě Newtonova zákona (5), elastická složka podle Hookova zákona (8). Viskoelastické materiály vykazují více či méně časově opožděnou reakci na aplikované napětí nebo deformaci, stejně tak jako na jejich odstranění [25].

Při krátkém působení deformační síly, může být odpověď materiálu na namáhání elastická, avšak pokud necháme tuto sílu působit dostatečně dlouho, začne docházet k viskóznímu toku. Materiál tedy lze charakterizovat určitou časovou konstantou, která se nazývá relaxační čas t_{rel} a charakterizuje jeho viskoelastické chování. Stupeň elastického nebo viskózního chování tak bude záviset na čase pozorování t_{obs} relativnímu k danému relaxačnímu času. Poměr těchto dvou hodnot pak charakterizuje Debořino číslo (9) [21, 23]. Pro ideálně elastická tělesa platí, že $De = \infty$, naopak pro ideálně viskózní kapaliny je $De = 0$ [23].

$$De = \frac{t_{rel}}{t_{obs}} \quad (9)$$

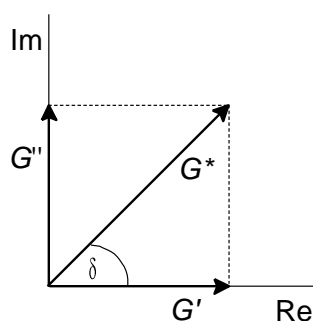
Jak již bylo zmíněno, viskoelastické materiály vykazují elastické i viskózní chování současně. To může být schematicky znázorněno vektorovým diagramem (viz Obrázek 9). Na ose x (reálná osa) je vynesena tzv. paměťový (elastický) modul G' [Pa], který je mírou deformační energie uložené ve vzorku v průběhu namáhání. Po odstranění zatížení je tato energie k dispozici, tedy v úloze hnací síly procesu reformace. Ztrátový (viskózní) modul G'' [Pa], vyneseny na ose y (imaginární osa), je mírou deformační energie spotřebované vzorkem v průběhu namáhání. Materiály vykazující toto chování se deformují nevratně a po ukončení namáhání se jejich tvar definitivně změní v důsledku působících sil. Komplexní modul G^* je pak určen vektorovým součtem jednotlivých modulů (10), tudíž je celkovou charakteristikou chování viskoelastické látky (obsahuje viskózní i elastickou složku). Analogicky ke komplexnímu modulu možno definovat také komplexní viskozitu η^* (11).

$$|G^*| = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} \quad (10)$$

$$|\eta^*| = \sqrt{(\eta')^2 + (\eta'')^2} \quad (11)$$

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} = \frac{\eta''}{\eta'} \quad (12)$$

Úhel δ , který svírá vektor komplexního modulu s reálnou osou x , a tudíž i s vektorem paměťového modulu, se nazývá ztrátový úhel. Jeho hodnota závisí na poměru hodnot reálné a imaginární složky komplexního modulu, případně komplexní viskozity, podle vztahu (12) a může nabývat hodnot od 0° (ideálně elastické těleso) do 90° (ideálně viskózní kapalina) [25].

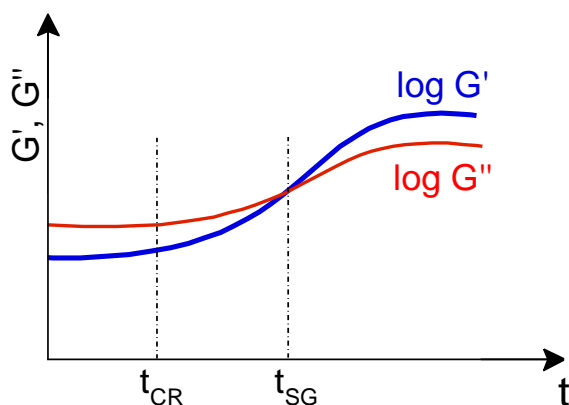


Obrázek 9 – vektorový diagram [25]

Měření viskoelastických materiálů

Základními testy pro měření viskoelastických vlastností jsou relaxační test a tzv. *creep test*. Relaxační test probíhá nastavením konstantní deformace γ a současným měřením smykového napětí τ v čase. *Creep test* je naopak prováděn nastavením konstantního smykového napětí, za současného měření deformace. Výsledkem měření jsou pak závislosti smykového napětí (nebo deformace) na čase [21, 23, 25, 26].

Na zkoumání vlastností různých viskoelastických látek od kapalin s nízkou viskozitou, roztoků polymerů, disperzí, gelů až po téměř tuhá tělesa, jsou často používané oscilační testy. Měření se provádí nastavením smykové deformace jako funkce sinus: $\gamma(t) = \gamma_A \cdot \sin \omega t$ (nebo analogicky nastavením smykového napětí). Jako výsledek pak získáme křivku smykového napětí (nebo deformace) jako fázově posunutou funkci sinus: $\tau(t) = \tau_A \cdot \sin(\omega t + \delta)$, s úhlem fázového posunu odpovídajícím ztrátovému úhlu δ [°] [21, 25].



Obrázek 10 – závislost G' a G'' na čase v průběhu síťování vzorku [25]

Tento typ testů je využíván například na měření časových závislostí chování vzorků vykazujících vznik síťování v průběhu měření (viz Obrázek 10). Časový bod t_{CR} (z anglického *curing time*) je tzv. počátek gelace. V tomto bodě hodnoty G' a G'' začínají stoupat, až dokud se asymptoticky nepřiblíží konstantní hodnotě. Časový bod t_{SG} (z anglického *sol-gel point*), ležící na průsečíku křivek G' a G'' , indikuje bod přechodu mezi solem a gelem. Tento bod se nazývá bodem gelace. Pro hodnoty paměťového a ztrátového modulu v tomto bodě platí, že $G' = G''$, tudíž pro ztrátový úhel platí, že $\tan \delta = 1$. Před samotnou formací gelu vzorek vykazuje spíše viskózní chování, nachází se tedy ve stádiu solu a hodnoty ztrátového modulu jsou vyšší, než hodnoty paměťového modulu. Od okamžiku, kdy jsou hodnoty paměťového modulu vyšší, se vzorek nachází v stádiu gelu.

Shrnutí jednotlivých charakteristik modulů a ztrátového úhlu pro různé materiály viz Tabulka 1 [25].

Tabulka 1 – shrnutí charakteristických hodnot modulů a ztrátového úhlu pro různé materiály [21, 25]

ideálně viskózní kapalina	viskoelastické kapaliny	bod gelace	viskoelastický gel (pevná látka)	ideálně elastická pevná látka
$\delta = 90^\circ$	$90^\circ > \delta > 45^\circ$	$\delta = 45^\circ$	$45^\circ > \delta > 0^\circ$	$\delta = 0^\circ$
$\tan \delta \rightarrow \infty$	$\tan \delta > 1$	$\tan \delta = 1$	$\tan \delta < 1$	$\tan \delta \rightarrow 0$
$G' \rightarrow 0$	$G' < G''$	$G' = G''$	$G' > G''$	$G' \rightarrow \infty$

2.4.6 Reometrie

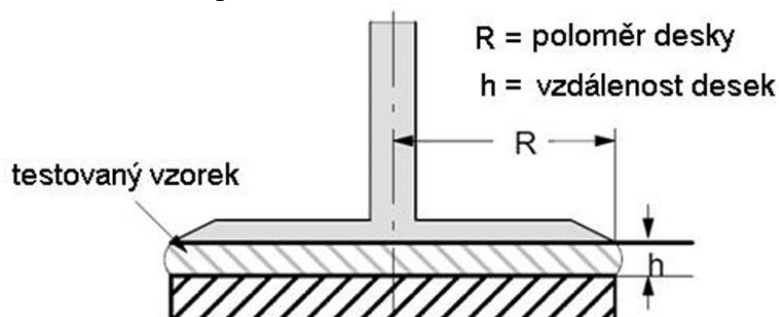
Pojem reometrie označuje soubor měřicích technologií využívaných k získání reologických dat. Důraz je zde kladen na měřicí systémy, přístroje, testy a jejich analýzu [25]. Mezi základní měřicí systémy (nazývané i měřicí geometrie) patří zejména systém válec-válec, kužel-deska a deska-deska [26].

Měřicí systémy

Systém *koaxiálních válců* skládající se ze dvou válců se společnou osou rotace, mezi kterými je nadávkovaný měřený vzorek. Výhodou je možnost měření nízkoviskózních látek i při vysoké smykové rychlosti, dobrá kontrola teploty díky velké styčné ploše, možnost zabránit odpařování vzorku použitím speciálního krytu. Nevýhodami jsou poměrně velká spotřeba vzorku, časově náročnější čištění, zvýšená možnost výskytu bublin u pastových vzorků nebo výskyt turbulentního toku při měření málo viskózních látek při vysoké smykové rychlosti.

Systém *kužel-deska* se skládá z kruhového kužele, charakterizovaného svým průměrem a úhlem zkosení, který je připojen na rotor, a je tedy pohyblivou částí měřicí geometrie. Statickou částí je deska. Výhodami jsou zejména: konstantní smyková rychlost podél celé geometrie, malé množství vzorku potřebné pro měření, snadné čištění. Nevýhodou je limitovaná velikost částic při měření disperzí, poměrně dlouhá doba relaxace například u gelů, teplotní gradient podél geometrie nebo nehomogenní tok na jejím okraji [25].

Měřicí systém *deska – deska* je složen ze dvou desek s rovným povrchem (viz Obrázek 11). Vrchní deska, fungující jako rotor, je obvykle vrchní částí měřicí geometrie a spodní deska je stacionární, připevněna k reometru. Rozměr vrchní desky je definován jejím poloměrem R . Pro vzdálenost h mezi deskami platí $h \ll R$ [26].



Obrázek 11 – schéma měřicího systému deska – deska [26]

Výhodami této měřicí geometrie jsou: možnost měření vzorků obsahujících relativně velké částice nebo prostorové struktury (gely, pasty, elastomery), při nastavení větší mezery vyžadují viskózní a viskoelastické vzorky méně času na přípravu samotného měření, čištění je velmi rychlé a jednoduché. Nevýhodou je nekonstantní napětí, jelikož smyková rychlost se mění od nuly ve středu, po vyšší hodnoty při okraji [25].

Pro newtonské kapaliny může být tento fakt zanedbán, avšak pro neneutonské kapaliny je nutné zavedení korekce:

$$\dot{\gamma}_{\max} = \frac{R}{h} \cdot \frac{2 \cdot \pi \cdot n}{60} \left[s^{-1} \right], \quad (12)$$

kde n značí rychlost rotoru reometru (min^{-1}) [26]. Zanedbání této korekce je možné i pro neneutonské kapaliny a to pro oscilační testy měřeny při nízkých hodnotách deformace, která leží v lineární oblasti viskoelastivity měřeného vzorku [25].

2.5 Termická analýza

2.5.1 Úvod

Kdykoliv má být nějaký materiál testován, jeden z nejjednodušších testů, který může poskytovat důležité informace o jeho struktuře, je pozorování změn v důsledku zahřátí [27].

Za zakladatele vědecké termické analýzy je považován Le Chatelier, který ji v r. 1886 poprvé použil ke studiu kalcitu. O rok později publikoval výsledky svého výzkumu termického chování jílovitých hornin ve formě termoanalytických křivek pěti jílových minerálů. Jednalo se o přímé měření změny rychlosti teploty zkoumaného vzorku při jeho rovnoměrném ohřevu. Sledované reakce se projevovaly s prodlevami v záznamech a určení tohoto zpoždění bylo velmi nepřesné [28].

Termická analýza může probíhat dvěma základními způsoby. V prvním případě sledujeme určité vlastnosti (například tepelnou kapacitu, entalpii, entropii nebo volnou energii) s vysokou přesností, při přesně definovaných podmínkách a za konkrétní teploty. Druhou možností je sledovat vlastnosti materiálu, včetně termických vlastností, v širším spektru teplot, v průběhu nastaveného teplotního programu [27].

Základním jevem důležitým pro tyto metody je změna entalpie (ΔH). Každou fyzikální a chemickou změnu lze charakterizovat změnou Gibbsovy volné energie (ΔG), která je dána vzorcem:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S, \quad (13)$$

kde ΔH je změna entalpie, T je absolutní teplota a ΔS je změna entropie během děje. Každý systém se snaží dosáhnout takového stavu, jemuž odpovídá nižší hodnota Gibbsovy volné energie G . Jako příklad lze uvést modifikační přeměnu látky z jedné krystalické formy do druhé, která má za dané teploty nižší hodnotu Gibbsovy volné energie a je tedy stabilnější. K vytvoření krystalické struktury nebo jiného stavu s nižší hodnotou volné entalpie může dojít při ohřevu i přes jednotlivé mezistupně. Příklady přeměn studované látky vlivem rostoucí teploty v jejím okolí jsou uvedeny v Tabulka 2 [28].

Tabulka 2 – fyzikální a chemické procesy způsobující přeměnu látky [28]

	Proces	Endotermní	Exotermní	Δm
Fyzikální	Krystalizace		+	beze změny
	Tání	+		beze změny
	Vypařování	+		úbytek
	Sublimace	+		úbytek
	Fázové přeměny	+	+	beze změny
Chemický	Chemisorpce		+	nárůst
	Dehydroxylace	+		úbytek
	Rozklad	+	+	úbytek
	oxidace		+	nárůst

Metody, které se zabývají sledováním změn tepla, se nazývají kalorimetrické. Kalorimetrické experimenty probíhají při konkrétních, kontrolovaných podmínkách, jako například konstantní objem nebo konstantní teplota. Kalorimetrie zahrnuje velkou škálu používaných technik včetně titrací, tokových testů, sledování reakcí nebo sorpcí a je možné ji použít na studium různých druhů materiálů, od pyrotechniky po farmaceutika.

Jednotlivé metody mohou být klasifikovány podle principu měření (například kompenzace tepla), podle operační metody (statické měření, sken) nebo podle konstrukčního principu (jedna nebo dvě cely). Nejčastěji používané metody termické analýzy, příslušné měřené fyzikální nebo chemické vlastnosti a možnosti jejich aplikace, shrnuje Tabulka 3.

Samotný teplotní program může probíhat různým způsobem. Vzorek může být zahříván (nebo chlazen) konstantní rychlostí (například $10 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$) nebo může být měřen izotermicky. Další možností je modulovaný teplotní program, v němž je funkce ohřevu nekonstantní, například sinusoidální nebo specificky upravená tak, aby odpovídala simulaci praktického industriálního provozu. Teplotní program může být také kontrolován přímo samotnou odpovědí vzorku na ohřev [27].

Tabulka 3 – přehled nejpoužívanějších metod termické analýzy [27]

Technika	Měřená vlastnost	Použití
Termogravimetrie	Hmotnost	Rozklad, oxidace
Diferenciální termická analýza	Rozdíl teplot	Fázové změny, reakce
Diferenciální kompenzační kalorimetrie	Tepelný tok	Tepelná kapacita, fázové změny, reakce
Termomechanická analýza	Deformace	Mechanické změny
Dynamická mechanická analýza	Změny rozměrů, moduly	Expanze, fázové změny, skelný přechod
Dielektrická termická analýza	Elektrická vlastnost	Expanze, fázové změny, skelný přechod
Analýza vyvíjených plynů	Vyvíjený plyn	Rozklad
Termooptometrie	Optická vlastnost	Fázové změny, povrchové změny, změna zbarvení

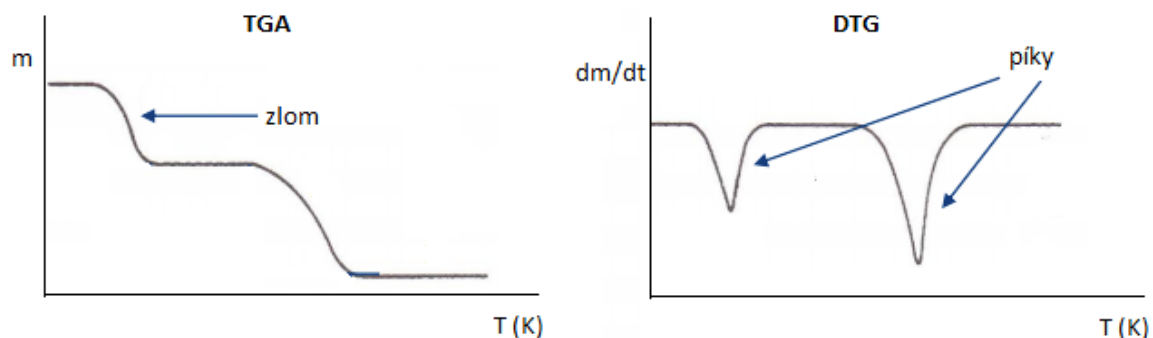
2.5.2 Termogravimetrie

Termogravimetrie (TG) nebo termogravimetrická analýza (TGA) je metoda, která je založená na měření hmotnosti, nebo její změny, v závislosti na teplotě, čase, nebo obou těchto veličin [27–29].

Výsledkem měření je termogravimetrická křivka, která znázorňuje závislost hmotnosti na teplotě nebo na čase a lze z ní odečíst teploty hmotnostních změn. Odvozenou metodou je derivační termogravimetrie (DTG), kde výsledná křivka uvádí rychlost hmotnostní změny na teplotě. Ta se používá, pokud změny hmotnosti neposkytují zřetelnou změnu, je vhodná k odlišení těsně po sobě jdoucích efektů [28, 29].

Přístroje pro TG se skládají z elektrické pece, analytických vah, nosičů vzorků, zařízení pro měření a řízení teploty a registračního zařízení - počítače. Vlastní termogravimetrická analýza probíhá na termovahách. Používají se tři způsoby umístění termovah vůči peci: vertikálně se vzorkem položeným na mechanismu termovah, vertikálně se vzorkem zavěšeným na mechanismu termovah, nebo horizontálně. V současné době se používá u všech třech typů kompenzační metody měření hmotnosti - vzorek je po celou dobu měření umístěn na stejném místě a případná změna hmotnosti je kompenzována pohybem na opačnou stranu a vzorek se hned vrátí do původní polohy před změnou. Ta je snímána nejčastěji optickým senzorem.

Měřený vzorek je v kelímku umístěném na termočláncu, který snímá aktuální teplotu. Materiálem nosiče je nejčastěji platina, korund, případně oxidová keramika (ZrO_2) [28].



Obrázek 12 – porovnání křivek TGA a DTG [28]

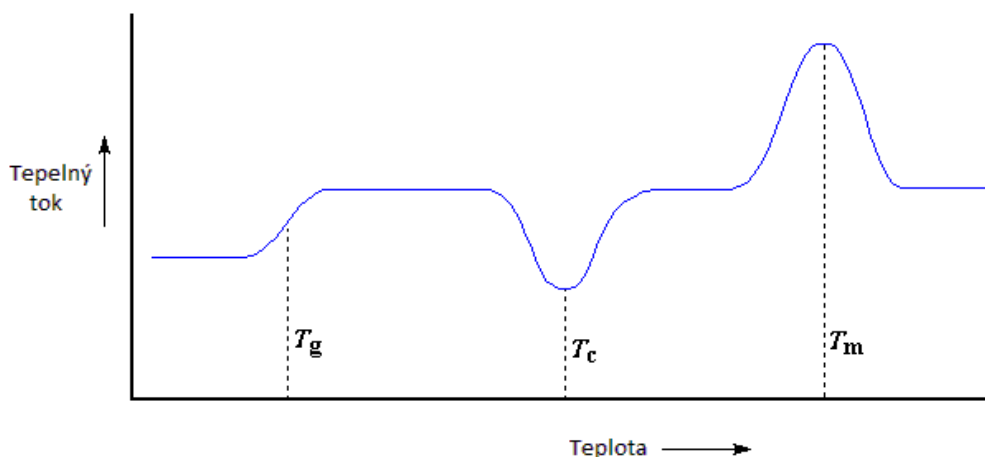
Nejjednodušší TG experimenty mohou být prováděny v atmosféře vzduchu, avšak vzorek může reagovat oxidací nebo hořením, proto se obvykle používá inertní plyn jako například dusík nebo argon. V některých případech lze naopak cíleně použít vybraný reaktivní plyn, jako například vodík redukující oxidy kovů [27].

Termogravimetrickou analýzu ovlivňuje řada faktorů. Zejména jsou to příprava vzorku (navážka, velikost částic, homogenita), tvar a velikost nosiče, tlak, zvolená atmosféra, vlhkost, použitý teplotní režim [28, 29].

Termogravimetrie může být použita jak pro kvalitativní (identifikace děje), tak pro kvantitativní analýzu (odečtení velikosti příslušných změn). Je možné ji použít například ke sledování sušení, dehydroxylace, tepelného rozkladu, tepelné oxidace, reakce v pevné fázi, reakce pevné a plynné fáze (oxidace, redukce, koroze), katalýzy, studiu reakční kinetiky a reakčních mechanismů, identifikaci sloučenin, popřípadě ke studiu nových sloučenin, stanovení čistoty chemických sloučenin [28].

2.5.3 Diferenciální kompenzační kalorimetrie

Principem diferenciální kompenzační kalorimetrie (DSC) je udržení stejné teploty měřeného vzorku a referenčního materiálu, které jsou současně zahřívány vedle sebe stejným teplotním programem. Udržení stejné teploty se prakticky realizuje dodáním energie do vzorku (v případě endotermního děje) nebo do referenčního materiálu (exotermní děj) [28, 29]. Výsledkem je pak křivka závislosti tepelného toku na teplotě (viz Obrázek 13) nebo čase [27].

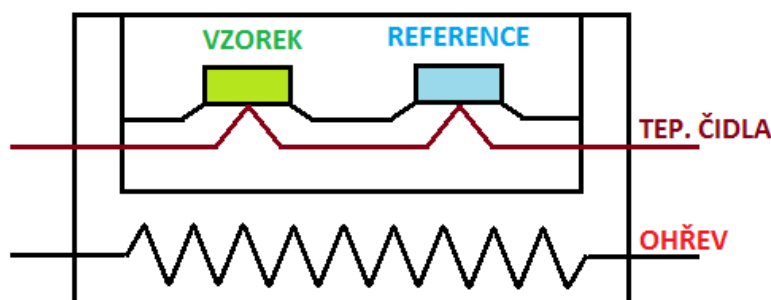


Obrázek 13 – DSC křivka zobrazující skelný přechod charakterizován teplotou T_g , krystalizaci s charakteristickou teplotou T_c a tání při teplotě T_m [30]

V praxi se používají dva typy analyzátorů. DSC s kompenzací příkonu, nazývaná též „obrácená“ dynamická termická analýza. Podstatou příkonu je zachování nulového teplotního rozdílu mezi měřeným a srovnávacím vzorkem. Základem jsou dvě oddělené měřicí cely a dva tepelné zdroje, oba vzorky jsou zahřívány stejnou rychlostí. Pokud v měřeném vzorku začne probíhat endotermní reakce, je teplotní rozdíl mezi měřeným a referenčním vzorkem vynulován dodáním energie do měřeného vzorku. A naopak, pokud probíhá exotermní děj, je teplota měřeného vzorku vyšší oproti referenčnímu. K vyrovnání teplot dochází dodáním méně energie do měřeného vzorku oproti referenčnímu. V obou vzorcích zůstává stejná teplota díky kompenzaci příkonu. Měřenou veličinou je elektrický příkon, který je potřebný k udržení konstantní teploty obou vzorků. Tento typ zařízení umožňuje zaznamenat velmi citlivé změny teploty a je vhodný ke sledování izotermních dějů [27–29].

DSC s kompenzací příkonu je složena ze dvou oddělených obvodů: i) kontrolního - měří průměrnou teplotu vzorků a automaticky vyrovnává tepelný výkon tak, že se průměrná teplota vzorků zvyšuje lineárně; ii) řídicího – zaznamenává rozdíly teplot mezi měřeným a srovnávacím vzorkem, určuje, který ze vzorků má vyšší teplotu a automaticky kompenzuje tyto teplotní rozdíly. Studovaný i referenční vzorek mají své nosiče, které obsahují teplotní čidla a topná tělíska. Vzorky jsou od sebe dokonale izolovány, aby se zabránilo tepelnému toku mezi nimi [28].

Druhým typem analyzátoru je DSC s tepelným tokem (schéma viz Obrázek 14) – oba vzorky, referenční i měřený, jsou umístěny na samostatných teplotních čidlech ve společné kalorimetrické cele. Měření rozdílu příkonu je nahrazeno měřením rozdílu teplot analyzovaného a referenčního vzorku, které jsou spojeny tepelným mostem. Při změnách teploty v měřeném vzorku, které jsou způsobené endotermními nebo exotermními ději, je rozdíl teplot zaznamenán jako tepelný tok od vzorku nebo do vzorku a je považován za úměrný rozdílu teplot [27–29].



Obrázek 14 – schéma DSC s tepelným tokem [27]

DSC s tepelným tokem se skládá z měřicí hlavy s držákem pro vzorek a srovnávací látku, pece, termostatu, zdroje plynů a zdroje napětí, regulátoru teploty a záznamového zařízení.

Pro DSC lze použít vzorky velmi malých hmotností (1 až 100 mg), které se vkládají do keramických nebo kovových misek, případně do folií, aby se docílilo dokonalého kontaktu s topným tělískem a teplotními čidly.

Diferenční kompenzační kalorimetrii lze studovat tepelné vlastnosti látek a materiálů. Tato metoda je využívána při výrobě skla, keramiky, farmaceutik, plastů, polymerů, potravin atd. Nejčastěji jsou studovány následující děje: tání, krystalizace, teploty skelného přechodu, oxidační stability atd. [28].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Hydrogely jsou v současnosti atraktivním materiálem pro použití v mnoha odvětvích. Výzkum směřuje zejména k charakteristice nových materiálů na bázi dvou nebo více polymerů, a rovněž ke studiu jejich aplikací. Cílem experimentální části této práce je charakteristika albuminových a směsných hyaluronan-albuminových gelů, prostřednictvím několika metod jako reologie, termická analýza nebo elektronová mikroskopie. Následující příklady studií, publikovaných v posledních letech, se zabývají zejména charakteristikou směsných gelů metodami využitými v této práci, a rovněž potenciálními aplikacemi hydrogelů na bázi albuminu nebo hyaluronanu.

Práce *R. J. Andrade a kol.* [31] se zabývala reologickou charakteristikou gelace modelové protein-polysacharidové směsi. Autoři, jako zástupce proteinů, použili izolovaný globulární hráškový protein, a jako polysacharid karagenan. Reologické měření probíhalo použitím geometrie deska-deska a zahrnovalo *frequency sweep* testy při různých teplotách, teplotní závislosti měřeny v rozsahu teplot 60–10 °C a časové závislosti měřeny při konstantní frekvenci 10 rad·s⁻¹ a teplotě 60 °C.

Časové závislosti viskoelastického chování měřeného materiálu potvrdily, že v délce měření *frequency sweep* testů (20 minut) byly viskoelastické vlastnosti vzorků stabilní. Vliv složení byl studován prostřednictvím teplotních závislostí pro vzorky s různým zastoupením proteinové a polysacharidové složky. Z výsledků je zřejmé, že přídavek proteinu způsobil posun bodu gelace v průběhu chlazení k nižším teplotám, což značí zpomalení tohoto procesu. To odpovídá předpokladům, podle kterých bude síť založena na helikálních agregátech karagenanu vznikat pomaleji v důsledku jeho nižšího zastoupení ve vzorku. *Frequency sweep* těchto vzorků při 60 °C odpovídal chování viskoelastického roztoku, docházelo k nárůstu hodnot G' se zvyšující koncentrací proteinu ve vzorku. Z výsledků je tudíž zřejmé, že vlastnosti roztoků byly dominantně ovlivněny zejména množstvím proteinu, zatímco proces gelace byl ve větší míře ovlivněn konformačními změnami polysacharidu [31].

Studie *Ali Rafi a kol.* [32] se zabývala reologickou a mikroskopickou charakteristikou směsných polysacharid-proteinových hydrogelů na bázi polysacharidu extrahovaného ze semen bazalky (*basil seed gum*, BSG) a β -lactoglobulinu (BLG). Reologické měření probíhalo na přístroji Physica MCR 301 (Anton Paar, Německo) použitím geometrie deska-deska. Měření probíhalo v několika krocích, které zahrnovaly ohřev na 90 °C, následovaný *frequency sweep* testem, chlazení zpět na teplotu 20 °C, při které byl vzorek měřen izotermně po dobu dalších 20 minut a nakonec *frequency sweep* při 20 °C.

Paměťový modul BSG vzorků byl výrazně závislý na jeho koncentraci. Ke gelaci, jejíž počátek bylo možné pozorovat při 80 °C, docházelo až v průběhu chlazení. Hodnoty G' a G'' po překročení bodu gelace asymptoticky rostly. U proteinových vzorků bylo pozorováno odlišné chování, vzorky gelovaly v průběhu ohřevu (bod gelace 73 °C) a při chlazení docházelo pouze k mírnému nárůstu hodnot obou modulů. Výrazný nárůst hodnot G' při ohřevu a jejich další nárůst v průběhu chlazení indikují vznik kovalentních a hydrofobních interakcí stabilizujících vzniklou síť.

V reologickém chování směsných gelů lze pozorovat vliv obou složek. V průběhu ohřevu docházelo k nárůstu hodnot G' , který indikuje vznik proteinové sítě. V průběhu chlazení docházelo k dalšímu zvyšování hodnot obou modulů, což poukazuje na vznik polysacharidové sítě. Výsledné hodnoty G' byly vyšší než u BLG gelů, rozdíl mezi hodnotami G' a G'' se rovněž zvětšil a vzniklé směsné gely byly tudíž elastičtější.

Mikrostruktura připravených gelů byla studována prostřednictvím rastrovací elektronové mikroskopie (*scanning electron microscopy*, SEM). Struktura proteinových vzorků byla kontinuální, vzorky BSG měly více fibrilární strukturu. Směsné gely měly bikontinuální mikrostrukturu, založenou na koexistenci BSG a BLG sítě. Tyto výsledky v kombinaci s reologickým chováním značí absenci mezimolekulových interakcí mezi proteinem a polysacharidem a poukazují na to, že v průběhu gelace směsných vzorků docházelo k fázové separaci [32].

Reologickou a mikroskopickou charakteristikou směsných hydrogelů na bázi galaktomannanu a κ -karagenanu se zabývala studie *Paulo A.G. Soares a kol.* [33] z roku 2015. Hydrogely byly připraveny se zásobních roztoků κ -karagenanu (0,3; 0,4 a 0,5 % w/v) a galaktomannanu (1,7 % w/v) při teplotě 50 °C.

Samotné reologické měření probíhalo na přístroji MCR301 (Anton-Paar, Rakousko) použitím geometrie deska-deska. *Frequency sweep* testy probíhaly v rozsahu 0,1–100 Hz, při konstantní deformaci 0,2 % a teplotě 25 °C. Naměřené hodnoty G' a G'' byly nezávislé na frekvenci oscilace a v celém měřeném rozsahu platí $G' > G''$, což je charakteristické reologické chování gelů. Stabilita reologických vlastností byla studována jako závislost paměťového a ztrátového modulu na délce skladování při teplotě 4 °C. Po 20 dnech docházelo k nárůstu hodnot G' a G'' , což není chování typické pro souvislou síť gelu, ale spíše pro emulze. Uvedené pozorování spíše naznačuje, že vzniklá struktura byla stabilizována interakcemi krátkého dosahu.

Snímky ze SEM charakterizovaly morfologii lyofilizovaného hydrogelu v první den po přípravě a po 90 dnech skladování při 4 °C. Struktura povrchu byla členitá, pórovitá, přičemž po 90 dnech byly póry na povrchu větší a členitost nebyla tak výrazná, což může být přisouzeno organizaci polysacharidů a jejich agregaci. Tyto rozdíly naznačují, že morfologie hydrogelu může být modifikována časem stárnutí a v závislosti od plánované aplikace mohou být připraveny hydrogely s různou porozitou. To může mít zásadní význam při uvolňování léčiv nebo v tkáňovém inženýrství [33].

Studii problematiky směsných hydrogelů se zabývala i práce *Raluca Vulpe a kol.* [34] z roku 2016. Předmětem této studie je zejména reologická charakteristika směsných hydrogelů na bázi hyaluronanu, kolagenu a sericinu, doplněna elektronovou mikroskopií, studiem bobtnání a degradace.

Reologická charakteristika probíhala na přístroji Discovery Hybrid Rheometer s použitou geometrií válec-válec (pro méně viskózní roztoky) a kužel-válec (pro viskóznější vzorky a hydrogely). Měření zahrnovalo tokové, oscilační testy a monitorování průběhu gelace jako časové závislosti paměťového a ztrátového modulu při frekvenci 1 Hz a deformaci 3 %.

Směsné roztoky HA a kolagenu byly připravené o různém složení. Sledován byl vliv přídavku jedné, nebo druhé složky. Přídavek kolagenu významně neovlivnil reologické chování HA vzorků. Naproti tomu vzorky kolagenu s přídavkem HA vykazovaly odlišné chování než čistě kolagenové vzorky, spíše podobné chování HA. Síťování probíhalo mnohem rychleji pro roztoky kolagenu a stejně tak výsledné hodnoty G' byly vyšší. Přídavek kolagenu do roztoku HA významně ovlivnil kinetiku síťování. Kolagen umožňuje tvořit amidové vazby, zatím co HA samotná umožňuje tvořit pouze vazby esterové, a to mělo za následek vyšší stupeň síťování, a tudíž i vyšší hodnoty G' . Stejný vliv měl i přídavek sericinu, který rovněž umožňuje vznik amidových i esterových vazeb.

Bobtnání připravených hydrogelů bylo studováno gravimetricky. Nejvyšší rovnovážný stupeň nabobtnání dosahovaly vzorky s HA samotným, naopak nejnižší Q dosahovaly kolagenové vzorky. Na základě elektronové mikroskopie je zřejmé, že struktura kolagenových gelů byla nejkompaktnější, což může vysvětlovat nízké dosažené hodnoty stupně nabobtnání. Studium degradace probíhalo v přítomnosti kolagenázy, hyaluronidázy nebo obou enzymů. Výsledky byly konzistentní se složením hydrogelu a příslušným prostředím [34].

Rozsáhlou studii albuminových hydrogelů představuje práce *S. T. K. Raja a kol.* [35], která se zabývala charakteristikou BSA hydrogelů připravených redoxním mechanismem. V prvním kroku (redukce) byl připraven roztok BSA, který byl v druhém kroku (oxidativní přeskládání) dialyzován proti pufrům o různém pH, na základě čehož byl analyzován vliv pH na gelaci BSA. S rostoucí koncentrací BSA docházelo k urychlení formace gelu a vzniklé gely byly mechanicky stabilnější. V rozsahu pH 4,0–5,0 byla formace gelu rychlá a struktura výrazně rigidní. Při pH < 3,0 nedochází ke gelaci BSA. V rozsahu pH 6,0–8,0 docházelo k intermolekulárním interakcím, vedoucím k rychlé gelaci, což značí, že dané podmínky jsou vhodné pro tvorbu disulfidických můstků. Při pH > 9 nedocházelo k tvorbě gelu v důsledku nárůstu odpuzovacích sil v kombinaci s počínající degradací proteinu.

Morfologie připravených gelů byla studována prostřednictvím SEM (Hitachi-S3400N). Připravené hydrogely byly lyofilizovány a byla na ně nanášena vrstva zlata. Struktura všech vzorků byla pórovitá, přičemž uniformita rostla s koncentrací BSA.

Bobtnání gelů bylo studováno gravimetricky při 37 °C. Bez ohledu na koncentraci bylo dosaženo rovnováhy mezi 12 a 18 hodinami. Výrazný vliv na dosažený stupeň nabobtnání mělo pH prostředí. Nejvyšší hodnoty Q bylo dosaženo v prostředí s pH 10,0 a naopak nejnižších hodnot při pH 5,0. Protonace v kyselém pH a deprotonace v alkalickém pH vedou ke vzniku náboje na aminokyselinách, což má za následek větší odpuzování řetězců BSA a následně dosažení vyšších hodnot Q .

Uvolňování modelové látky tetracyklinu bylo měřeno spektrometricky při 360 nm. V neredukujícím prostředí bylo po 24 hodinách uvolněno víc než 50 % modelové látky, toto množství se již v průběhu měření dál nezvyšovalo a zůstalo porovnatelné i po 60 hodinách. V redukujícím prostředí bylo uvolňování mnohem výraznější. V přítomnosti 50 mmol·dm⁻³ glutathionu došlo k uvolnění 60 % tetracyklinu již v průběhu 8 hodin. V prostředí s koncentrací glutathionu 100 mmol·dm⁻³ bylo již po 12 hodinách uvolněno 95 % modelového léčiva. Tyto výsledky tak naznačují, že BSA gely by mohly najít uplatnění jako redoxní nosiče léčiv, které jsou žádoucí například při léčbě rakoviny [35].

Studiem albuminových a směsných hyaluronan-albuminových gelů se zabývala bakalářská práce *Polysacharid-proteinové gely* [36], na kterou tato diplomová práce přímo navazuje. Práce se zabývala reologickou charakteristikou vlastností těchto gelů a procesu jejich gelace.

Reologická charakteristika probíhala na přístroji AR G2 (TA Instruments) použitím geometrie deska-deska. *Frequency sweep* testy byly měřeny při 25 °C pro rozsah frekvence 0,1–100 rad·s⁻¹. Teplotní závislosti byly měřeny při konstantní frekvenci 1 Hz. Teplotní program pozostával ze tří kroků: (1) ohřev 25–80 °C, rychlostí 2 °C/min; (2) 20 minut izoterma při 80 °C; (3) chlazení 80–25 °C, rychlostí 1 °C/min.

Vlivem rostoucí koncentrace proteinu docházelo k posunu bodu gelace k nižším teplotám, vzniklé gely dosahovaly vyšších hodnot G' a G'' , přičemž hodnoty G' byly po zahřátí vyšší než hodnoty G'' a nezávislé na frekvenci, což odpovídá reologickému chování gelů.

Přídavek hyaluronanu výrazně ovlivnil vlastnosti směsných roztoků, s rostoucí koncentrací HA ve vzorku docházelo k nárůstu hodnot G'' a G' . Přídavek HA rovněž způsobil posun bodu gelace k nižším teplotám v porovnání s čistě proteinovými vzorky. Vliv složení vzorků byl pozorován na řadě 4 vzorků s konstantní koncentrací polymeru 13 % a s různým hmotnostním poměrem HA:BSA, konkrétně 1:24, 1:18, 1:12 a 1:6. Z *frequency sweep* testů připravených gelů je zřejmé, že hodnoty G^* narůstaly od vzorku s poměrem 1:24 (nejmenší obsah HA), po vzorek 1:12, který dosahoval nejvyšších hodnot. Naopak vzorek s nejvyšším obsahem HA (poměr 1:6) dosahoval nejnižších hodnot. To značí, že závislost jednotlivých modulů gelu na složení nebude lineárně růst se zvyšujícím obsahem HA, ale tato funkce dosahuje maxima při určitém poměru, po jehož překročení hodnoty začínají klesat. Na základě měřených testů se tak jako optimální složení pro další studium jevil vzorek s koncentrací polymerní složky 13 % a s hmotnostním poměrem HA:BSA = 1:12, jelikož vykazoval nejlepší mechanické vlastnosti ze všech měřených vzorků [36].

Studiem hydrogelů na bázi hyaluronanu nebo albuminu pro konkrétní aplikace, zejména v odvětví medicíny, se v posledních letech zabývalo několik různých studií. Příkladem je práce *Brian G. Ballios a kol.* [37], předmětem které byl design injektovatelného biologicky vstřebatelného hydrogelu na bázi HA a methylcelulózy (MC) a jeho použitelnost při distribuci, přežití a integraci kmenových buněk po transplantaci v centrálním nervovém systému.

Studovaný HA-MC hydrogel je injektovatelný, minimálně bobtnající, bioresorbovatelný a jeho rychlá gelace je klíčovou vlastností pro dosažení uniformnější distribuce kmenových buněk v porovnání s konvenčními technikami dodávání buněk. V obou studovaných tkáních, buňky dodané v HA-MC přežívaly výrazně lépe než buňky dodané v solném roztoku. Kmenové buňky sítnice dodané v HA-MC se po integraci přizpůsobily morfologii tyčinek a zlepšily zrakové funkce slepých myší. Nervové kmenové buňky dodané v HA-MC vykazovaly uniformnější distribuci a lepší hloubku penetrace. V porovnání s konvenčním dodáním kmenových buněk, pouze jedinci s buňkami doručenými v HA-MC hydrogelu vykazovaly funkční napravení tkáně [37].

Přípravou a charakterizací směsných polysacharidových gelů na bázi alginát-hyaluronan (ALG-HA) pro použití jako krytí ran se zabývala studie *O. Catanzano a kol.* [38]. Morfologie připravených hydrogelů byla zkoumána prostřednictvím SEM. Lyofilizované vzorky měly pórovitou strukturu, s náhodnou distribucí pórů o velikosti 50–150 μm . Stupeň síťování byl porovnán na základě studie bobtnání vzorků o různém složení v roztoku NaCl. Všechny sledované vzorky vykazovaly obdobné chování, bez ohledu na přítomnost HA, což značí, že přítomnost HA ve vzorku měla pouze minimální vliv na stupeň síťování hydrogelu. Viskoelastické vlastnosti byly studovány reometricky, při konstantní teplotě, použitím geometrie deska-deska, zejména prostřednictvím *frequency sweep* testů a byly zaměřeny hlavně na sledování vlivu HA na gelaci a výsledné vlastnosti gelů. Zatímco viskoelastické vlastnosti roztoků a čas gelace značně závisely na koncentraci HA (více elastické vlastnosti při vyšší koncentraci HA), výsledné vlastnosti gelů byly obdobné.

Scratch test prováděný *in vitro* na několika různých buněčných kulturách prokázal, že začlenění HA do hydrogelu, zlepšuje migraci buněk. Hydrogely s HA rovněž významně zmenšovaly modelové rány u hlodavců. Výsledky studie tak demonstrují možnost použití tohoto materiálu pro směřování klinického hojení ran, přičemž ALG-HA hydrogely by mohly současně transportovat aktivní látky ze své struktury přímo do ran [38].

Další studii z dané oblasti představuje práce *Dalila Petta a kol.* [39], která se zabývala přípravou syntetického biomateriálu na bázi modifikovaného HA a fosforečnanu trivápenatého, s cílem připravit materiál schopný poskytnout alternativu nebo úplně nahradit autologní kostní transplantace. Reologická charakteristika sol-gel přechodu modifikovaného HA byla měřena prostřednictvím teplotních závislostí paměťového modulu v rozsahu teplot 20–40 °C, pro vzorky s koncentrací 10 % a 20 %. Vzorky vykazovaly výrazný nárůst hodnot G' (více než 2 řády) při teplotě 29 °C, přičemž výsledné hodnoty G' 20% vzorku byly řádově vyšší než vzorku s koncentrací 10 %.

Pro *in vitro* sledování uvolňování byly použity modelové molekuly dexametazonu (jako malá hydrofobní molekula) a lidský rekombinantní morfogenetický kostní protein-2. Připravený kompozitní materiál efektivně zpomalil uvolňování kostního proteinu. Dexametazon byl uvolněn téměř okamžitě, a to v důsledku různé molekulární struktury a afinity. *In vitro* experimenty nicméně přesně nekopírují prostředí tkáně a celkové uvolněné množství *in vivo* se bude vlivem mechanického namáhání, krevního tlaku nebo enzymatické degradace lišit [39].

Charakteristikou mikrogelů na bázi HA, s cílem jejich použití pro transport proteinů, se zabývala práce *Chunhong Luo a kol.* [40]. Předmětem této studie byla syntéza HA mikrogelů o různém stupni síťování pomocí divinylsulfonu jako síťovacího činidla v inverzním systému mikroemulze. Studovaný byl vliv stupně síťování na velikost částic, distribuci, morfologii, bobtnání, *in vitro* enzymatickou degradaci a transport BSA jako modelového proteinu.

Termická stabilita gelů byla studována prostřednictvím DSC v rozsahu teplot 20–300 °C. Vzorky, včetně samotného HA, nevykazovaly žádné výrazné termické přechody, což značí jejich podobnou termickou stabilitu. Morfologie byla studována prostřednictvím SEM vysušených HA mikrogelů. Struktura všech vzorků byla tvořena sférickými částicemi, přičemž vzorky s nižším obsahem divinylsulfonu vykazovaly větší uniformitu a menší velikost částic v porovnání s vzorky s vyšším obsahem síťovacího činidla. S rostoucím obsahem divinylsulfonu docházelo ke zvyšování hustoty síťování, projevující se poklesem Q a zpomalením degradace v přítomnosti hyaluronidázy. Uvolňování navázaného BSA bylo rovněž závislé na hustotě síťování. Vyšší obsah divinylsulfonu zpomalil difuzi BSA a bylo tedy uvolněno množství nižší, v porovnání se vzorky s nižší hustotou síťování.

Na základě výsledků studie se HA mikrogely jeví jako vhodné materiály pro cílené uvolňování proteinů, které může být regulováno prostřednictvím stupně síťování gelu [40].

Přípravou injektovatelných hydrogelů na bázi BSA konjugovaného s polyaminourethanem (PAU) a sledováním uvolňování doxorubicínu se zabývala studie *K. Manoukruang a kol.* [41]. Gelace PAU byla závislá zejména na teplotě a pH. Přídavek proteinu způsobil posun křivky fázového diagramu sol-gel přechodu k nižším teplotám, přičemž připravené vzorky se při fyziologických podmínkách nacházely ve stádiu gelu, což umožňuje jejich použití v biomedicinských aplikacích.

Uvolňování doxorubicínu probíhalo z PAU a PAU-BSA gelu do fosfátového pufru a uvolněné množství bylo měřeno spektrometricky při 495 nm. Doxorubicín byl uvolňován po dobu 5 týdnů relativně konstantní rychlostí, bez počátečního skokového uvolnění. Přítomnost proteinu způsobila, že celkové uvolněné množství bylo nižší, což značí, že BSA pomáhá udržovat léčivo ve struktuře gelu, což umožňuje efektivně prodloužit jeho vylučování [41].

Další studii představuje práce *L. Oss-Ronen a kol.* [42], která se zabývala přípravou hybridního hydrogelu na bázi BSA a polyethylenglykolu a následně charakteristikou uvolňování látek z této struktury s cílem jejího použití v medicíně jako scaffold. Látky použité pro studium uvolňování byly naproxen, Levemir® a Actrapid®, v nichž je v obou případech aktivní látkou insulin.

Z výsledků je zřejmé, že množství uvolněné látky je závislé jak na její velikosti, tak na afinitě k BSA. Nejvyšší uvolněné množství bylo možné pozorovat v případě naproxenu, jako důsledek jeho nízké molekulové hmotnosti v porovnání s insulinem (0,23 kDa vs. 5,8 kDa). Naopak nejnižšího uvolněného množství dosahuje Levemir®, v důsledku své afinity k BSA. Degradace byla měřena v prostředí enzymu trypsinu a sledováno bylo uvolňování naproxenu a BSA. V obou případech bylo uvolněné množství v přítomnosti enzymu výrazně vyšší.

Výsledky studie tak naznačují možné použití polymer-proteinových hybridních hydrogelů v tkáňovém inženýrství [42].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

- Albumin (9048–46–8), čistota $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
- Hyaluronan sodný (9067–32–7), 1500–1750 $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$, Tech. grade, ContiproPharma, a.s. (dále v textu značen jako HA_{HMW})
- Hyaluronan sodný (9067–32–7), 750–1000 $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$, Tech. grade, ContiproPharma, a.s. (dále v textu značen jako HA_{MMW})
- Hyaluronan sodný (9067–32–7), 90–130 $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$, Tech. grade, ContiproPharma, a.s. (dále v textu značen jako HA_{LMW})
- Chlorid sodný p.a. (7647–46–8), Lach-Ner, s.r.o.
- Kyselina citronová bezvodá p.a. (77–92–9), Penta
- Hydrogenfosforečnan disodný dihydrát p.a. (7558–80–7), Penta
- Hydroxid sodný p.a. (1310–73–2), Penta
- Tetraboritan sodný dekahydrát p.a. (1303–96–4), Penta
- Kyselina chlorovodíková 35% p.a. (7647–01–0), Penta
- Methylenová modř (61–73–4), Sigma-Aldrich
- Mili-Q (MQ) voda (7732–18–5)

4.2 Použité metody

4.2.1 Příprava vzorků

Při přípravě roztoků albuminu se postupovalo následujícím způsobem. Potřebná navážka BSA byla navážena na analytických vahách s přesností na čtyři desetinná místa. Samotný roztok byl připraven střídavým přidáváním rozpouštědla (voda, fyziologický roztok, roztok NaCl nebo pufr) a práškového BSA za současného míchání na magnetické míchače. Navážka BSA byla rozpuštěna v menším, než požadovaném množství rozpouštědla, přičemž jeho přidání bylo průběžně zaznamenáváno. Váženka pak byla znovu zvážena na analytických vahách a z rozdílu hmotností byla určena skutečná hmotnost rozpuštěného BSA. Na základě této hodnoty pak byl s přesností na mikrolitry propočítán objem rozpouštědla potřebný pro dosažení požadované koncentrace a zbývající množství bylo přidáno k roztoku. Takto připravený vzorek byl po dobu 24 hodin ponechán míchat na magnetické míchače při 300 otáčkách za minutu.

Směsné hyaluronan-albuminové vzorky byly připraveny ve dvou krocích. V prvním kroku byl ve větším množství připraven roztok BSA výše popsáním způsobem. Takto připravený roztok byl následně použit jako rozpouštědlo pro práškový hyaluronan. Jelikož je hyaluronan hygroskopický, před samotnou přípravou vzorku byl sušen při teplotě 90 °C po dobu 20 minut. Potřebné množství vysušeného HA bylo naváženo s přesností na 4 desetinná místa a rozpuštěno v roztoku BSA, přičemž postup byl shodný s postupem přípravy roztoku BSA. Takto připravený směsný roztok byl znovu ponechán po dobu 24 hodin na magnetické míchače při 300 otáčkách za minutu.

Roztoky NaCl, stejně jako všechny zásobní roztoky pro přípravu pufrů, byly připraveny navážením potřebného množství použité látky s přesností na 4 desetinná místa, rozpuštěním v menším množství vody, následným kvantitativním převedením do odměrné baňky a doplněním na příslušný objem. Jednotlivé pufrы (viz přílohy – Tabulka 10) byly připraveny postupným přidáváním zásobního roztoku jedné látky do roztoku jiné látky, přičemž po každém přidavku byl roztok promíchán a bylo změřeno jeho pH. Po dosažení požadované

hodnoty pH byl roztok míchán dalších 10 minut a pH bylo zkontrolováno ještě jednou. Fyziologický roztok byl připraven jako fosfátovo-citrátový pufr s pH 7,2 a koncentrací NaCl $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Samotné gely byly připraveny umístěním příslušných roztoků ve vodní lázni do sušárny vyhřáté na $80 \text{ }^\circ\text{C}$, kde byly ponechány po dobu 24 hodin. Po vytažení ze sušárny se připravené gely před jakýmkoli dalším měřením nechaly volně vytemperovat na laboratorní teplotu.

Všechny roztoky polymerů měly koncentraci v jednotkách $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$. Vzorky BSA měly koncentraci 13 % (w/v) (dále uváděno jen v %). Směsné vzorky měly celkovou koncentraci polymerní složky 13 %, přičemž hmotnostní poměr BSA:HA byl zachován jako 12:1.

Pro reologické měření vlivu iontové síly byly připraveny směsné vzorky 13% HA_{HMW}+BSA, s koncentrací NaCl 0,0005; 0,005; 0,15 a $0,3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Pro reologické měření vlivu pH byly připraveny vzorky 13% HA_{HMW}+BSA v pufru o různém pH (4; 4,9; 7; 8 a 9). Pro jednotlivé pufrы byla na základě přesného množství použitých roztoků vypočítána jejich iontová síla a ta byla následně upravená přidávkem NaCl tak, aby byla u všech měřených vzorků stejná, a bylo tak zamezeno vlivu iontové síly na reologické chování.

Na sledování vlivu molekulové hmotnosti byly připraveny směsné vzorky HA+BSA ve vodě, které se lišily pouze molekulovou hmotností použitého hyaluronanu, konkrétně HA_{HMW} (1500–1750 kDa), HA_{MMW} (750–1000 kDa) a HA_{LMW} (90–130 kDa).

Pro všechna ostatní měření (stabilita reologických vlastností, termická analýza, bobtnání, elektronová mikroskopie a uvolňování) bylo připraveno vždy 5 vybraných vzorků, konkrétně 13% BSA ve vodě, 13% HA_{HMW}+BSA ve vodě, 13% HA_{LMW}+BSA ve vodě, 13% BSA ve fyziologickém roztoku a 13% HA_{HMW}+BSA ve fyziologickém roztoku.

4.2.2 Reologické měření

Všechny reologická měření probíhala na přístroji AR G2 od firmy TA Instruments. Použitá měřicí geometrie byla pro všechny vzorky stejná, konkrétně deska-deska s průměrem 25 mm.

Samotnému měření předcházela kalibrace měřicí geometrie. Kalibrace teplotní roztažnosti byla provedena jednou, před prvním měřením, pro rozsah teplot $20\text{--}90 \text{ }^\circ\text{C}$. Po každém zapnutí přístroje pak bylo provedeno rotační mapování a nastavení nulové polohy geometrie.

Vzorek byl nadávkován do středu statické desky a rotující deska byla snížena do měřicí polohy ($250 \text{ }\mu\text{m}$ pro roztoky a $1000 \text{ }\mu\text{m}$ pro gely). Přbytek vzorku byl očištěn a kolem měřicí geometrie byla nanášena vrstva silikonového oleje, aby se zabránilo vysychání vzorku v průběhu měření. Každé měření pak začínalo relaxací a temperací vzorku při teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 5 minut. Všechna dále zmiňovaná měření byla prováděna alespoň dvakrát, vždy s nově nadávkovaným vzorkem, aby se zajistila reprodukovatelnost měření. Mezi každým měřením byly obě části měřicí geometrie očištěny destilovanou vodou a etanolem.

Prvním testem měřeným u všech vzorků byl *strain sweep test* (závislost modulů na deformaci) v rozsahu deformací 0,1–100 %, při konstantní frekvenci 1 Hz a teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Z lineární části závislosti byla vybrána hodnota deformace 2 %, která byla dále používána jako konstanta při nastavení dalších měření. Dalším měřeným testem byl *frequency sweep test* (závislost modulů na úhlové frekvenci oscilace). Měření probíhalo při teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a deformaci 2 %, pro rozsah frekvencí $0,1\text{--}100 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$.

Průběh gelace byl měřen prostřednictvím teplotních ramp při frekvenci 1 Hz a deformaci 2 %. Teplotní sken byl rozdělen do tří částí: (1) ohřev vzorku $25\text{--}80 \text{ }^\circ\text{C}$ rychlostí $2 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$; (2) 20 minut izoterma při teplotě $80 \text{ }^\circ\text{C}$; (3) chlazení vzorku $80\text{--}25 \text{ }^\circ\text{C}$ rychlostí $1 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$.

Stabilita reologických vlastností připravených gelů byla sledována po dobu 4 týdnů. Připravené vzorky byly v průběhu experimentu umístěny v exsikátoru, přičemž jedna série vzorků byla ponechána při laboratorní teplotě (průměrně 24 °C) a druhá byla umístěna v lednici (11 °C). U jednotlivých vzorků byl následně v časovém intervalu 0, 1, 3, 7, 14 a 28 dní měřen *frequency sweep test* a vyhodnocována byla změna dynamických modulů při vybrané frekvenci (10 Hz) v závislosti na čase.

4.2.3 pH titrace

pH titrace byly měřeny jako doplňující charakteristika k měření vlivu pH na vlastnosti směsných roztoků a gelů. Měření probíhalo na přístroji Zetasizer Nano ZS od firmy Malvern Instruments. Měřené byly vzorky BSA ve vodě a HA_{HMW} ve vodě o koncentraci 10 g·dm⁻³, na titraci byly použity roztoky HCl a NaOH o koncentraci 0,1 mol·dm⁻³. Měřená byla velikost částic (průměr ze dvou měření) a zeta potenciál (průměr z 5 měření) v rozsahu pH 3–10 pro BSA a 2–10 pro HA_{HMW}, přičemž měření bylo opakováno jak z kyselé oblasti do bazické, tak i naopak, z bazické oblasti do kyselé.

4.2.4 Charakteristika bobtnání

Závislost stupně bobtnání na čase byla měřena gravimetricky. Xerogely připravené vysušením gelů při teplotě 50 °C (24 hodin) byly zváženy v suchém stavu s přesností na 4 desetinná místa a umístěny do příslušného prostředí (voda, pufrы s pH 4, 7, 10) tak, aby byly celým svým objemem ponořené. Následně byly v časovém intervalu 1, 3, 7, 12, 24 hodin odebrány z příslušného prostředí, přebytečná kapalina byla z povrchu opatrně osušena a vzorek gelu byl zvážen rovněž s přesností na 4 desetinná místa. Z naměřených hmotností byl podle vztahu (1) určen stupeň bobtnání pro jednotlivé vzorky a následně vyhodnocená jeho časová závislost.

4.2.5 Termická analýza

Termogravimetrická analýza byla měřena na přístroji TGA Q5000 od firmy TA Instruments. Vzorky s hmotností řádově v jednotkách mg byly naváženy do platinové pánvičky, umístěné do přístroje a následně podrobeny teplotnímu programu. Vzorky byly měřené v inertní atmosféře N₂ v rozsahu 25–250 °C s rychlostí ohřevu 5 °C za minutu.

Diferenciální kompenzační kalorimetrie byla měřena na přístroji DSC Q2000 (TA Instruments). Nastavení měření bylo totožné s nastavením pro termogravimetrii. Vzorky o hmotnosti řádově v jednotkách mg byly naváženy do hliníkové pánvičky a umístěny do přístroje. Pánvička s nadávkovaným vzorkem byla v průběhu měření ponechána otevřená.

Mikrokalorimerní měření probíhalo na přístroji TAMIII od firmy TA Instruments. Měřený roztok byl v objemu 1 ml nadávkován do 3 vialek, které byly umístěny do přístroje, vytemperované při 25 °C a podrobeny teplotnímu programu. Výsledná křivka závislosti normalizovaného tepelného toku na teplotě byla získána jako průměr ze tří naměřených závislostí. Teplotní sken kopíroval nastavení při reologickém měření průběhu gelace, tzn. ohřev 25–80 °C, izoterma při 80 °C a následné chlazení zpět na teplotu 25 °C.

4.2.6 Elektronová mikroskopie (SEM)

Pro měření byly připraveny xerogely vysušením při teplotě 65 °C po dobu jedné hodiny. Takto připravené vzorky byly umístěny na měřicí podložku a pomocí přístroje Polaron (Sputter Coater 7640), na ně byla nanášena vrstva zlata, aby bylo dosaženo elektrické vodivosti povrchu vzorku. Samotné měření probíhalo na přístroji EVO LS od firmy Zeiss a příslušné snímky byly vyhotoveny se zvětšením 50, 500 a 5000krát.

4.2.7 Uvolňování modelové látky

Jako modelová látka pro měření uvolňování byla použita methylenová modř. Jednotlivé vzorky gelů (postup přípravy viz kapitola 4.2.1) byly připraveny s koncentrací barviva $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, každý vzorek ve 3 opakováních. Takto připravené gely byly umístěny do 50 ml vody (nebo fyziologického roztoku). Uvolňování bylo měřeno metodou UV-VIS spektrometrie na přístroji U-3900H spectrophotometer od firmy Hitachi. Byla měřena absorpční spektra příslušného roztoku v rozsahu 800–350 nm. Měření probíhalo v křemenné kyvetě s délkou optické dráhy 1 cm. Samotné měření probíhalo v časových intervalech 2, 4, 10, 24, 48, 72 a 96 hodin, přičemž mezi jednotlivými měřeními byly vzorky ponechány při laboratorní teplotě.

4.2.8 Zpracování a vyhodnocení

Naměřené výsledky reologických testů byly zpracovány v programu Data Analysis od TA Instruments, grafické zpracování probíhalo v programu MS Excel. Mechanické vlastnosti vzorků byly vyhodnoceny jako výsledky *frequency sweep* testů ve formě závislosti dynamických modulů na úhlové frekvenci oscilace. Průběh gelace byl porovnán obdobně, jako závislost dynamických modulů na teplotě. Samotný bod gelace byl vyhodnocován jako teplota, kdy je hodnota ztrátového úhlu δ rovna 45° , konkrétně z naměřených dat lineární interpolací hodnot dvou nejbližších změřených bodů (označeno indexem 0 a 1), podle vztahu:

$$t = t_0 + (\delta - \delta_0) \cdot \frac{t_1 - t_0}{\delta_1 - \delta_0}, \quad (14)$$

kde δ je hodnota ztrátového úhlu a t je příslušná hodnota teploty.

Výsledky pH titrací byly zpracovány v programech Zetasizer Software a MS Excel, jako závislost zeta potenciálu na pH. Vyhodnocován byl průběh této závislosti, dosažené hodnoty zeta potenciálu a zejména izoelektrický bod pI , kdy je hodnota zeta potenciálu nulová.

Charakteristika bobtnání byla vyhodnocena v programu MS Excel, jako závislost stupně bobtnání na čase pro různé vzorky bobtnající v prostředí o různém pH. Porovnávány pak byly rovněž stupně nabobtnání, tzn. hodnoty dosažené v čase 24 hodin.

Termogravimetrie a diferenciální kompenzační kalorimetrie byly vyhodnoceny v programu Universal Analysis od TA Instruments. Grafické zpracování probíhalo v programu MS Excel. V případě TGA byly graficky zpracovány závislosti hmotnosti na teplotě a z nich následně určen obsah vody ve vzorcích. V případě DCS byly zpracovány DSC-křivky závislosti tepelného toku na teplotě. Ty byly následně porovnány s TGA měřením, konkrétně endotermní píky, odpovídající vypařování vody. Termická stabilita byla porovnána rovněž s křivkami práškového BSA, měřeného při stejném teplotním programu. Mikrokolorimetrické měření bylo zpracováno v programu MS Excel, vynesení závislosti tepelného toku na teplotě. Vyhodnocována byla poloha píku, který odpovídá denaturaci proteinu. Konkrétní hodnota teploty v minimu píku byla určena přiblížením požadované oblasti, proložením lineárních částí přímkou a spočítáním jejich průsečíku.

Uvolňování modelové látky (methylenová modř) bylo studováno měřením absorpčních spekter prostředí, ve kterém byl umístěn gel obsahující modelové barvivo. Vyhodnocována byla hodnota absorbance při 665 nm, která byla na základě změřené kalibrační křivky (viz přílohy – Obrázek 30) přepočítaná na koncentraci a následně na uvolněné množství (v %). Výsledné hodnoty byly určeny jako aritmetický průměr z 3 hodnot naměřených pro jednotlivé vzorky a vyneseny v závislosti na čase.

Jednotlivé gely byly porovnávány i z hlediska rychlosti uvolňování modelového solutu (methylenová modř). Rychlost tohto procesu byla kvantifikována prostřednictvím hodnoty difúzního koeficientu methylenové modři v jednotlivých vzorcích gelů. Výpočet vycházel z modelu pro studium uvolňování látky z gelu o tvaru plošné desky o tloušťce δ :

$$\frac{n_t}{n_{rov}} = 4 \cdot \sqrt{\frac{D_{gel}}{\pi \cdot \delta}} \cdot \sqrt{t}, \quad (15)$$

kde n_t značí látkové množství uvolněného barviva v čase t , n_{rov} značí látkové množství uvolněného barviva v rovnováze, D_{gel} je difúzní koeficient barviva v gelu a δ je tloušťka gelu. Při výpočtu bylo zavedeno zjednodušení, na základě kterého je partiční koeficient na rozhraní gel/roztok roven 1, a tudíž je rovnovážná koncentrace barviva v roztoku rovna koncentraci barviva v gelu. Pro výpočet byla vynesena závislost poměru n_t a n_{rov} na \sqrt{t} proložena přímkou a z hodnoty její směrnice byl následně určen D_{gel} , podle vztahu:

$$D_{gel} = \frac{p^2 \cdot \pi \cdot \delta}{16}, \quad (16)$$

kde p značí hodnotu směrnice přímky. Získaný difúzní koeficient barviva v gelu byl na závěr vztažen k difúznímu koeficientu methylenové modři ve vodě ($D_0 = 8,3 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [43]), na základě čehož byla určena bezrozměrná hodnota relativního difúzního koeficientu D_{rel} , udávající velikost změny difúzního koeficientu methylenové modři v jednotlivých gelech oproti její difuzivitě ve vodě. Celé zpracování probíhalo v programu MS Excel.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Předmětem této práce bylo studium albuminových a směsných hyaluronan-albuminových gelů (postup přípravy viz kapitola 4.2.1). Připravené vzorky byly podrobeny reologickému studiu mechanických vlastností (kapitola 5.1), dále bylo studováno jejich bobtnání ve vodě a v pufrch o různém pH (kapitola 5.2). Termická stabilita je předmětem studia v kapitole 5.3, morfologie vzorků, studována prostřednictvím SEM, je diskutována v kapitole 5.4 a výsledky studia transportních vlastností pro zvolené modelové barvivo (methylenová modř) shrnuje kapitola 5.5.

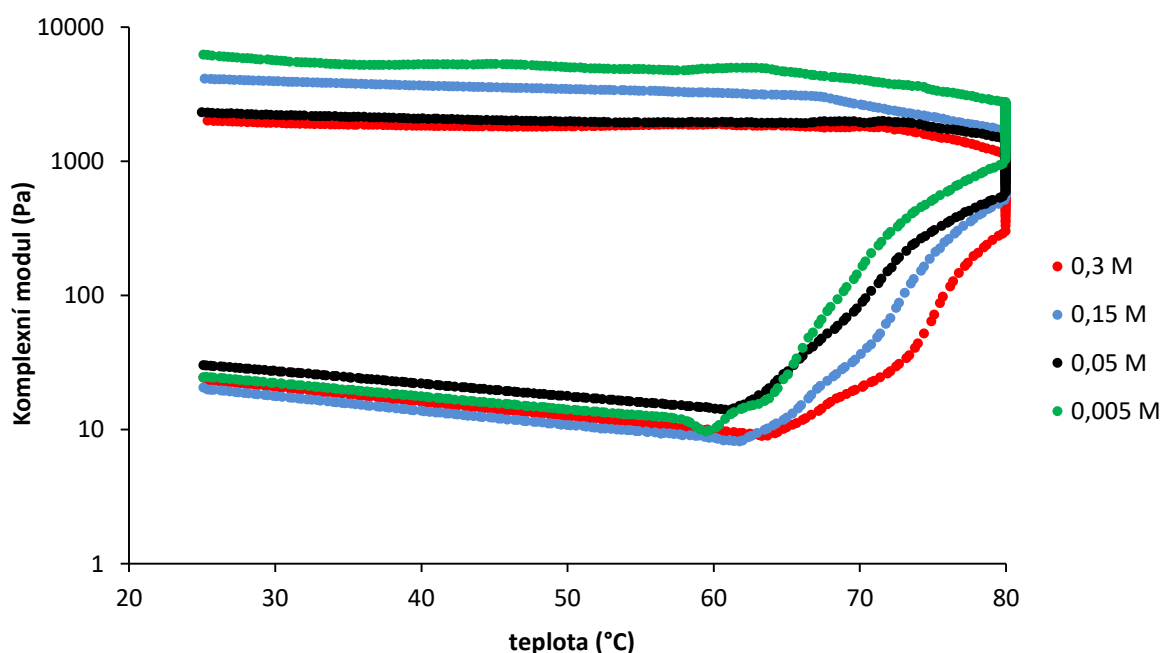
5.1 Reologické měření

Cílem reologického měření bylo studium vlivu iontové síly, pH a molekulové hmotnosti hyaluronanu na průběh gelace a výsledné vlastnosti připravených gelů. Studována byla rovněž časová stálost reologických vlastností vybraných vzorků.

5.1.1 Vliv iontové síly

Vliv iontové síly na reologické vlastnosti směsných hyaluronan-albuminových vzorků byl sledován na 4 vzorcích s rozdílnou koncentrací NaCl. Přítomnost sodných a chloridových iontů ovlivňuje působící elektrostatické síly, a tudíž má za následek rozdílné chování měřených vzorků.

Z naměřených teplotních ramp (viz Obrázek 15) je zřejmé, že všechny vzorky začínají podléhat změnám spojeným s nárůstem hodnot komplexního modulu při stejné teplotě, přibližně 60 °C, kterou je možno označit jako počátek gelace. Další průběh je již viditelně závislý na iontové síle roztoku. Vzorky s nižší iontovou silou podléhají výraznějším změnám, nárůst hodnot G^* je rychlejší. Tomuto trendu odpovídají i hodnoty samotného bodu gelace (viz Tabulka 4), kdy s rostoucí iontovou silou dochází k posunu bodu gelace směrem k vyšším teplotám, což značí zpomalení tohoto procesu. V průběhu chlazení již nedochází k výraznějším změnám, hodnoty G^* u všech vzorků důsledkem stabilizace vzniklé sítě pomalu narůstají.

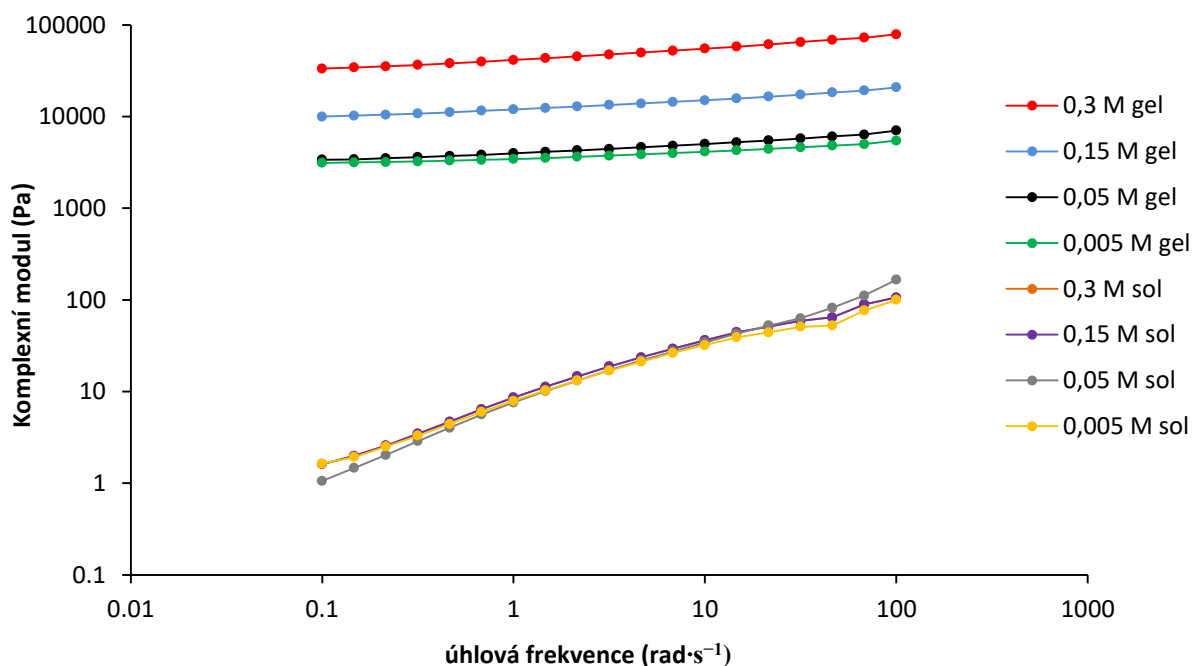


Obrázek 15 – závislost komplexního modulu na teplotě pro 13% směsné vzorky HA_{HMW}+BSA (1:12) s různou koncentrací NaCl

Tabulka 4 – body gelace (průměr ze dvou měření) pro směsné vzorky 13 % $HA_{HMW}+BSA$ (1:12) s různou iontovou silou

iontová síla vzorku	0,3 M	0,15 M	0,05 M	0,005 M
bod gelace (°C)	75,3 ± 0,3	72,0 ± 0,0	71,4 ± 0,3	69,4 ± 0,1

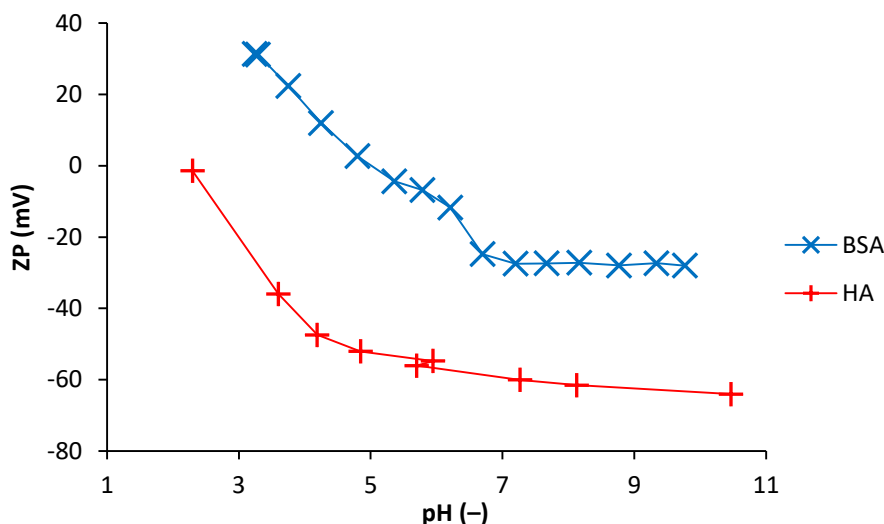
Porovnáním *frequency sweep* testů roztoků a připravených gelů (viz Obrázek 16) je zřejmé, že reologické vlastnosti samotných roztoků nejsou iontovou silou ovlivněny, což odpovídá i průběhu teplotních ramp. Pro všechny roztoky platí, že s rostoucí frekvencí dochází i k nárůstu hodnot G^* , přičemž konkrétní hodnoty všech vzorků jsou porovnatelné. Naproti tomu vlastnosti připravených gelů se liší v závislosti od iontové síly. Hodnoty G^* všech vzorků jsou na frekvenci téměř nezávislé, což odpovídá reologickému chování gelů. Dosažené hodnoty G^* jsou řádově vyšší než u roztoků a hodnoty pro jednotlivé gely rostou se stoupající iontovou silou. Komplexní modul vzorku s iontovou silou 0,3 M tak dosahuje řádově vyšších hodnot než vzorek s iontovou silou 0,005 M, což značí, že vlivem iontové síly dochází ke zlepšení mechanických vlastností, pravděpodobně v důsledku ovlivnění elektrostatických interakcí, které vede k stabilizaci vzniklé sítě.



Obrázek 16 – graf závislosti komplexního modulu na úhlové frekvenci oscilace pro 13% vzorky $HA_{HMW}+BSA$ (1:12) s různou iontovou silou ve stádiu solu a z něj připraveného gelu

5.1.2 Vliv pH

Chování amfifilních molekul je výrazně ovlivněno pH prostředí, jelikož toto mění jejich náboj a tím i povahu elektrostatických interakcí. Za účelem sledování vlivu pH na gelaci bylo reologické měření doplněno o pH titrace roztoků BSA i HA_{HMW} , které poskytují informace o náboji těchto molekul v měřené škále pH (viz Obrázek 17). Hyaluronan má v roztoku záporný náboj při $pH > 2$, tudíž v celém měřeném rozsahu pH. Izelektrický bod albuminu má hodnotu $pI = 5,1$. Nad touto hodnotou je náboj BSA záporný, při pH nižším jako 5,1 má molekula kladný náboj. Naměřená hodnota odpovídá datům publikovaným v literatuře, která pro endogenní BSA uvádí $pI = 4,7$ [14, 44, 45], resp. pro BSA zbaven mastných kyselin $pI = 5,3$ [46].



Obrázek 17 – závislost zeta potenciálu na pH pro roztoky BSA a HA_{HMW} jako výsledek pH titrací

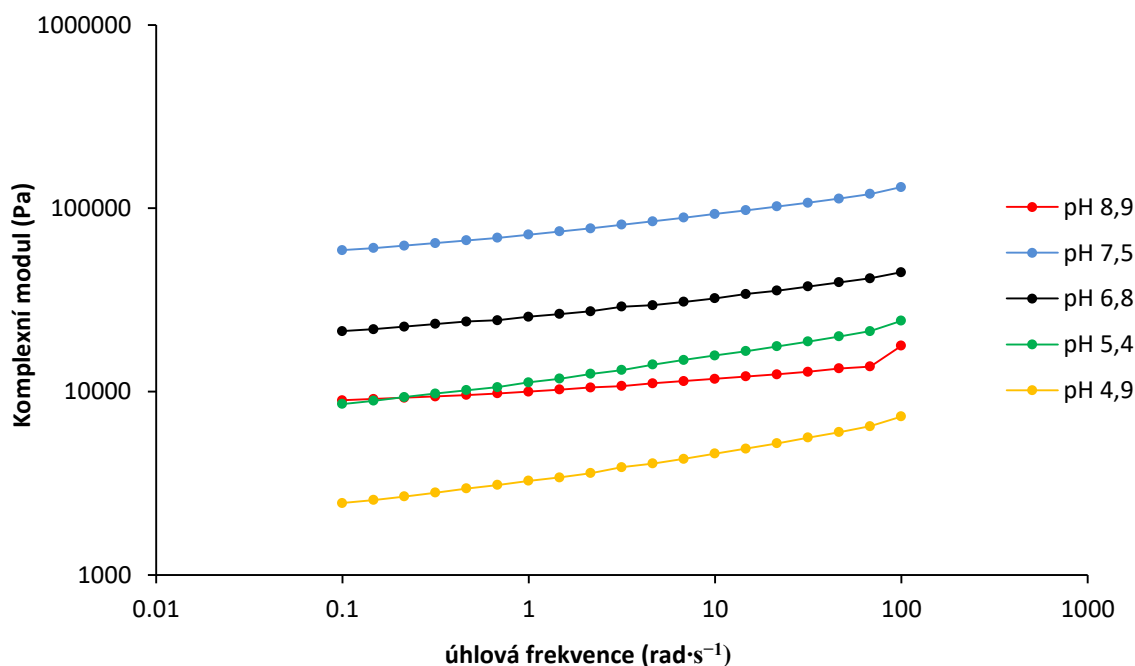
Vlivem protonace nebo deprotonace přítomných polymerů dochází ke změně koncentrace H^+ iontů v roztoku, a tudíž ke změně pH, v důsledku čehož se reálné pH připravených vzorků liší od pH pufrů použitých při přípravě směsných roztoků. Tyto rozdíly shrnuje Tabulka 5. K nejvýraznějším změnám dochází v okolí izoelektrického bodu BSA, k menším změnám dochází v neutrální a v alkalické oblasti.

Na základě změřených pH titrací a hodnot pH pro jednotlivé vzorky je možné předpokládat, že u vzorky s pH 4,9 dochází k přitažlivým elektrostatickým interakcím mezi kladně nabitým BSA a záporně nabitým HA, zatím co u ostatních vzorků jsou oba polymery nabitě záporně, což vede k odpudivým elektrostatickým interakcím.

Tabulka 5 – pH pufrů použitých pro přípravu směsných vzorků 13 % HA+BSA (1:12), změřené pH těchto vzorků a jejich body gelace (průměr ze dvou měření)

pH použitého pufru	4	4,7	7	8	9
pH směsného vzorku	4,9	5,4	6,8	7,5	8,9
bod gelace (°C)	70,7 ± 0,0	79,6 ± 0,5	78,7 ± 0,4	77,5 ± 0,5	76,0 ± 0,4

Změřené teplotní rampy (přílohy – Obrázek 31) mají základní průběh obdobný jako u studovaných vzorků s různou iontovou silou (kapitola 5.1.1). Počáteční chování všech vzorků je stejné, rovněž i hodnoty G^* jsou porovnatelné. Při teplotě 64 °C je možné pozorovat počátek gelace spojený s nárůstem hodnot G^* . Průběh, resp. vyhodnocovaný bod gelace, je již výrazně závislý na pH (viz Tabulka 5). Gelace probíhá zdaleka nejrychleji při pH = 4,9, tedy když je náboj polymerů opačný a mezimolekulové interakce mají přitažlivý charakter. Teplota bodu gelace ostatních roztoků pak roste od vzorků v alkalické oblasti (pH = 8,9) po vzorky v kyselé oblasti (pH = 5,4). Tento trend odpovídá hustotě povrchového náboje polymerů, která je nejvyšší v bazické oblasti, a naopak nejnižší při pH blízkém izoelektrickému bodu.



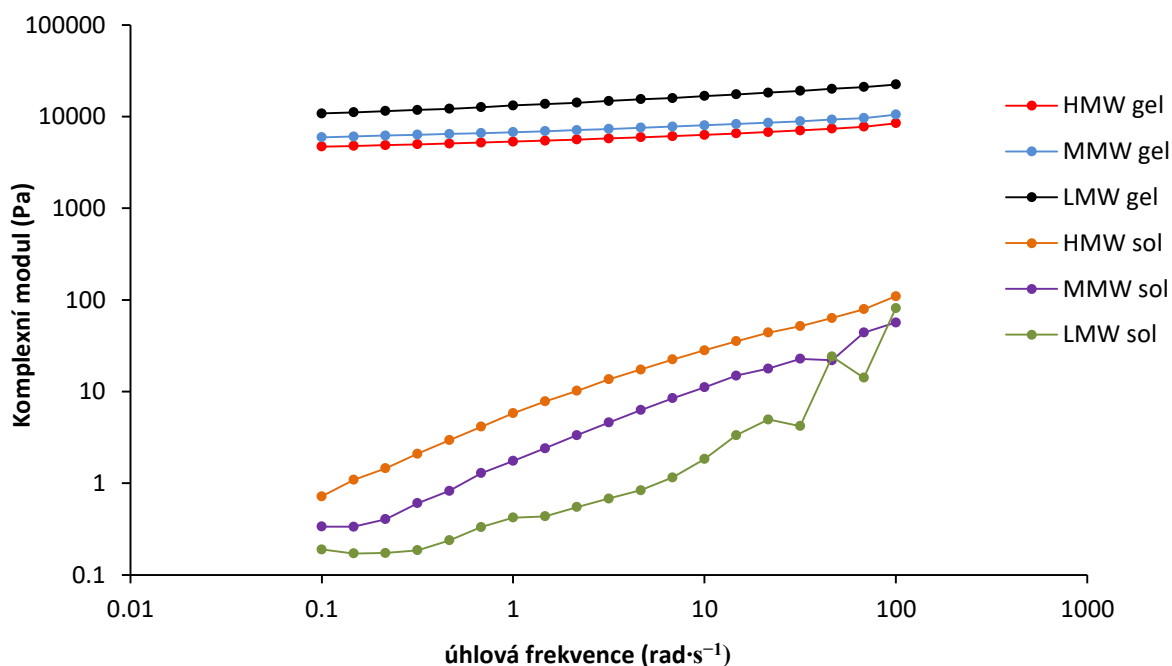
Obrázek 18 – závislost komplexního modulu na úhlové frekvenci oscilace pro 13% gely HA+BSA (1:12) o různém pH

Charakter *frequency sweep* testů (viz Obrázek 18) všech vzorků gelů odpovídá předpokládanému reologickému chování, hodnoty G^* jsou na úhlové frekvenci oscilace téměř nezávislé. Dosažené hodnoty G^* se zvyšují s rostoucím pH vzorků v rozsahu pH 4,9–7,5 a tedy s rostoucí hustotou náboje. Tomuto trendu neodpovídá vzorek gelu s pH 8,9, který dosahuje výrazně nižších hodnot G^* než by původní závislost naznačovala, k čemu dochází pravděpodobně v důsledku počínající degradace BSA, stabilita kterého se v literatuře uvádí v rozmezí pH 4–9 [14, 15]. Obdobné chování BSA v alkalickém pH ve své studii publikovali i S. T. K. Raja a kol. [35] (viz kapitola 3).

5.1.3 Vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu

Studium probíhalo na třech vzorcích, které se lišily molekulovou hmotností použitého HA, přičemž jeho hmotnostní koncentrace byla pro všechny vzorky zachována konstantní. Vysokomolekulový HA, na rozdíl od nízkomolekulového HA, tvoří v roztoku metastabilní síť charakteristické vysokou viskozitou a elastickou odpovědí na krátkodobé namáhání (viz kapitola 2.1.3). Roztoky obsahující HA_{HMW} tudíž dosahují vyšších hodnot G^* než vzorky s HA_{MMW}, resp. HA_{LMW} (viz Obrázek 19), přičemž tyto hodnoty u všech vzorků stoupají s rostoucí úhlovou frekvencí oscilace.

Jak je zřejmé z naměřených bodů gelace (viz Tabulka 6), proces síťování je nejrychlejší v přítomnosti HA_{LMW}. Kratší řetězce HA umožňují albuminu volnější pohyb v objemu roztoku, což vede k rychlejšímu střetu interagujících částí jeho řetězce. V porovnání s HA_{HMW} rovněž dochází ke vzniku pevnější sítě, což demonstrují naměřené frekvenční závislosti (viz Obrázek 19). Komplexní modul připravených gelů je na frekvenci oscilace téměř nezávislý, jeho hodnoty rostou od přibližně 6 000 Pa pro vzorek s HA_{HMW}, po přibližně 15 000 Pa pro vzorek obsahující HA_{LMW}. Hodnoty ztrátového úhlu jsou pro všechny připravené gely porovnatelné, v řádu jednotek stupňů, tudíž výrazně převládá elastická složka chování nad viskózní.



Obrázek 19 – graf závislosti komplexního modulu na úhlové frekvenci oscilace pro 13% vzorky HA+BSA (1:12) s různou molekulovou hmotností HA: LMW = 90–130 kDa; MMW = 750–1000 kDa; HMW = 1500–1750 kDa

Tabulka 6 – body gelace (průměr ze dvou měření) vzorků 13% BSA+HA (1:12) s různou molekulovou hmotností použitého HA

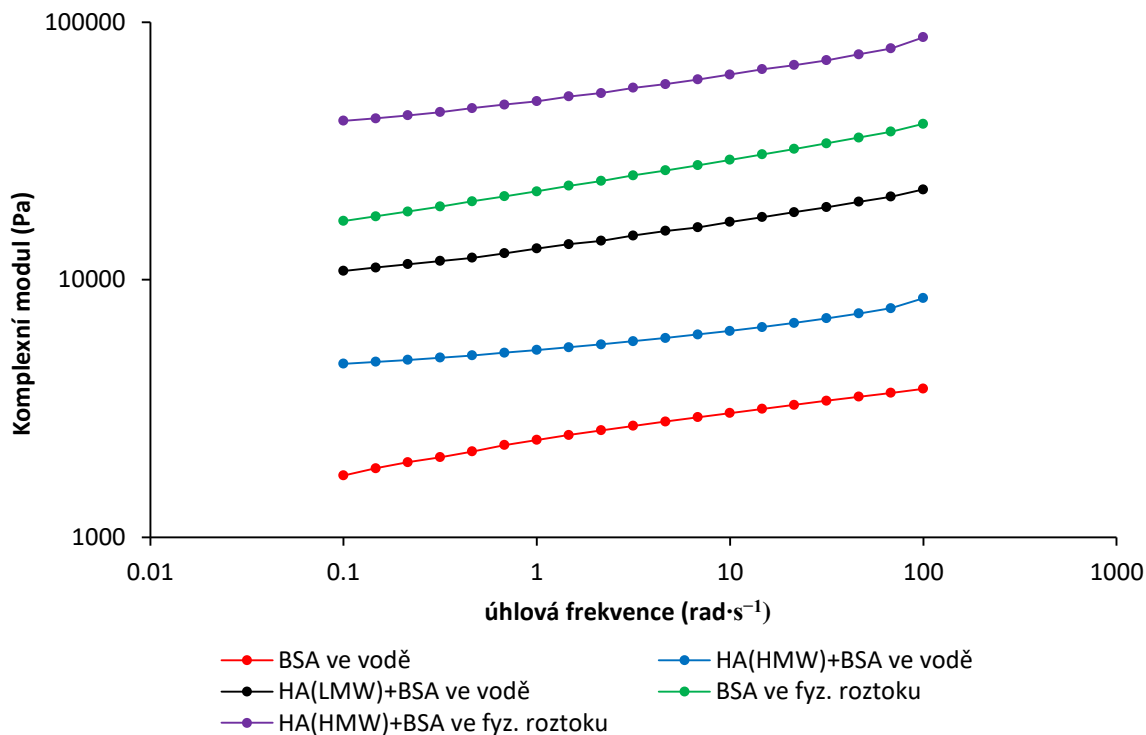
Vzorek	HA _{LMW}	HA _{MMW}	HA _{HMW}
Molekulová hmotnost HA (kDa)	90–130	750–1000	1500–1750
Bod gelace (°C)	66,6 ± 0,6	70,0 ± 1,9	69,4 ± 0,2

5.1.4 Časová stálost reologických vlastností

Časová stabilita reologických vlastností, stejně tak jako všechny následující rozebírané metody, byla studována na 5 vybraných vzorcích, konkrétně 13% BSA ve vodě, 13% HA_{HMW}+BSA ve vodě, 13% HA_{LMW}+BSA ve vodě, 13% BSA ve fyziologickém roztoku a 13% HA_{HMW}+BSA ve fyziologickém roztoku.

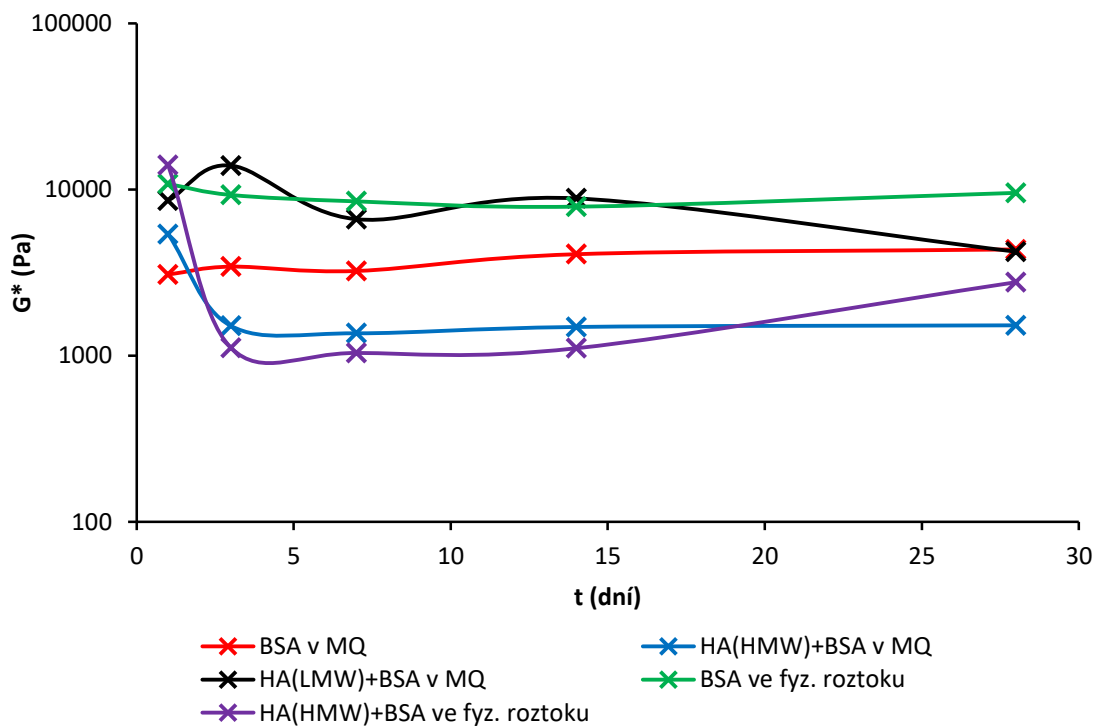
Jak je zřejmé z *frequency sweep* testů připravených gelů (viz Obrázek 20), obecně platí, že vzorky připravené ve fyziologickém roztoku dosahují vyšších hodnot G^* , než vzorky připravené ve vodě. Fyziologický roztok má vyšší hodnotu iontové síly, která ovlivňuje elektrostatické interakce, jak již bylo zmíněno v kapitole 5.1.1 (vliv iontové síly). Porovnáním albuminových a směsných hyaluronan-albuminových vzorků je zřejmé, že gely s obsahem HA dosahují vyšších hodnot G^* než čistě proteinové vzorky. Tento trend je totožný s výsledky publikovanými v práci *Polysacharid-proteinové gely* [36].

Závislost G^* na čase (viz Obrázek 21) pro směsné vzorky HA_{HMW}+BSA je charakteristická výrazným poklesem hodnot G^* v prvních třech dnech od přípravy a výsledné hodnoty jsou tak nižší, než u vzorků BSA. V dalším časovém intervalu již nedochází k výrazným změnám. Toto chování naznačuje, že v přítomnosti HA_{HMW} se vzniklá síť po přípravě nenachází ve stavu rovnováhy, které dosáhne až po určitém čase. Reologické vlastnosti vzorků BSA jsou naproti tomu stabilnější, k výrazným změnám hodnot G^* v čase nedochází.



Obrázek 20 – závislost komplexního modulu na úhlové frekvenci oscilace pro vybrané vzorky gelů 13% BSA a 13% HA+BSA (1:12) ve vodě a ve fyziologickém roztoku

Závislost G^* na čase má obdobný průběh při obou teplotách skladování gelů (23 °C i 10 °C), s tím rozdílem, že v případě směsných vzorků je výše zmiňovaný pokles hodnot G^* výraznější při teplotě 23 °C (viz přílohy – Obrázek 32), jelikož je energie tepelného pohybu řetězců polymeru vyšší.



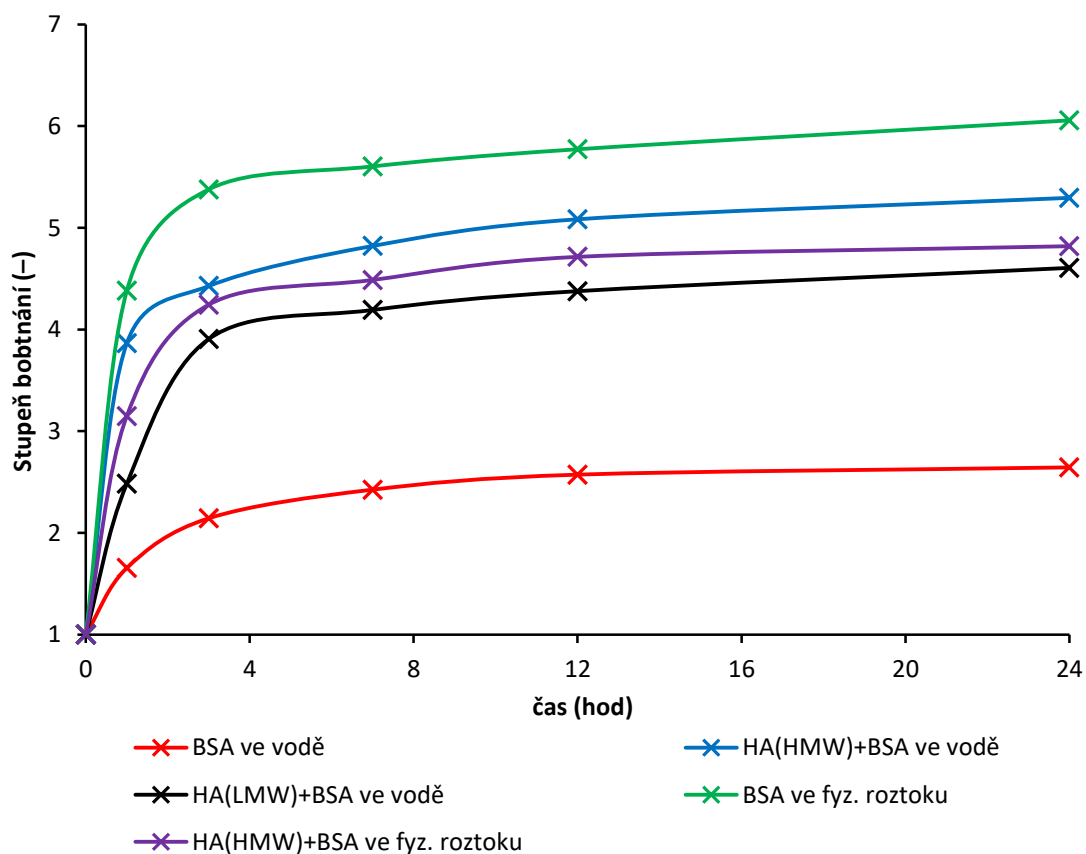
Obrázek 21 – závislost komplexního modulu (při úhlové frekvenci 10 rad·s⁻¹) na čase pro vzorky gelů 13% BSA a 13% HA+BSA (1:12) skladované při teplotě 23 °C.

5.2 Bobtnání

Studium bobtnání probíhalo na pěti vybraných vzorcích gelů v čtyřech různých prostředích, konkrétně ve vodě, jako neutrálním neiontovém prostředí, v kyselém prostředí (pufr pH 4), v neutrálním iontovém prostředí (pufr pH 7) a v bazickém prostředí (pufr pH 10).

Všechny naměřené závislosti měly stejný průběh (příklad viz Obrázek 22), kdy k nejvýraznějšímu nárůstu hmotnosti, a tím i stupně bobtnání, dochází již v průběhu první hodiny měření. O něco méně výrazný nárůst těchto hodnot možno pozorovat mezi první a třetí hodinou. Dále již hodnoty Q rostou jen minimálně. Souhrnné porovnání dosažených hodnot Q pro dané dvojice gelu a prostředí reprezentuje Obrázek 23.

Studované gely jsou tvořeny řetězci polyelektrolytů, tudíž jsou kromě vody v struktuře gelu přítomny také protiiony. Jelikož je hnací silou bobtnání osmóza, molekuly vody mají vysokou tendenci pronikat do struktury ionogenního gelu. Bobtnání v neutrálním prostředí je tedy výraznější, pokud je toto prostředí neiontové, tzn. stupeň bobtnání ve vodě je vyšší než v případě pufru s pH 7.



Obrázek 22 – závislost stupně bobtnání na čase pro 13% vzorky gelů v prostředí pufru s pH = 10

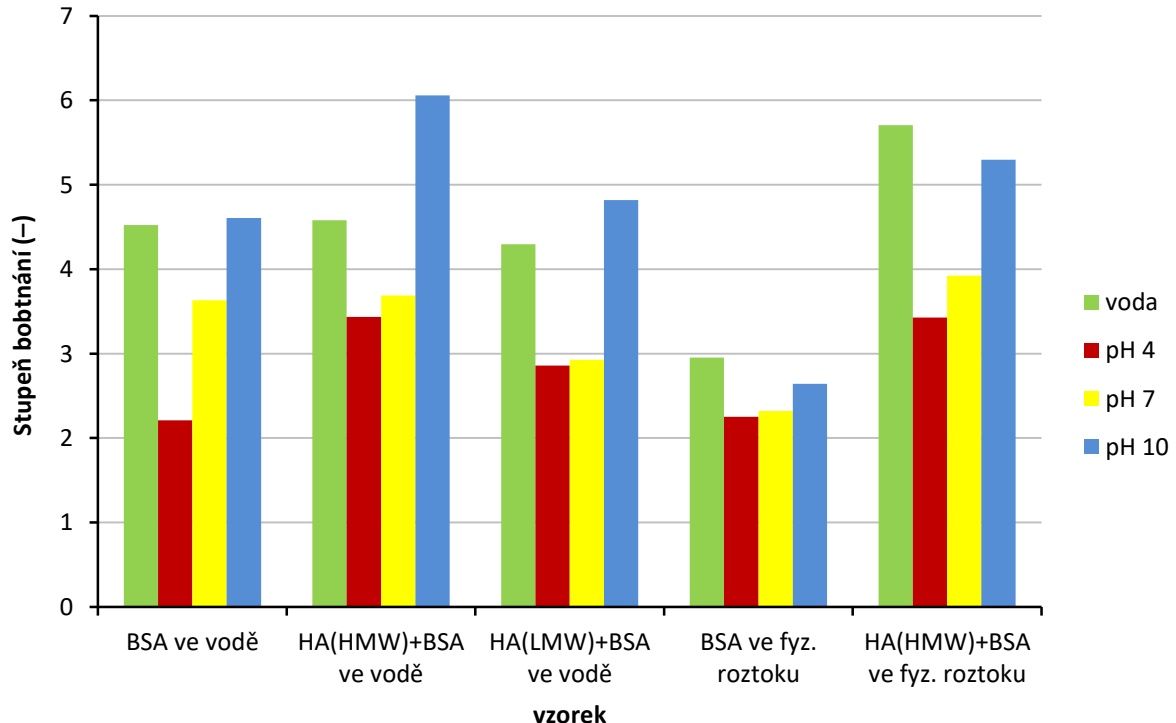
Porovnáním prostředí s různým pH je zřejmé, že dosažené hodnoty Q rostou se zvyšujícím se pH. Vzorky dosahují nejnižších hodnot Q při pH 4, naopak nejvyšších hodnot je dosaženo při pH 10. V kyselém prostředí dochází k protonaci aminoskupin u BSA a karboxylových skupin u HA, naopak v alkalickém prostředí dochází k jejich deprotonaci, jak již bylo zmíněno v kapitole 5.1.2. Změna hustoty náboje molekul pak přímo ovlivňuje elektrostatické interakce a tím i dosažený stupeň bobtnání. Obecně platí, že nejnižší stupeň bobtnání dosahují amfolytické gely v prostředí s pH blízkým izoelektrickému bodu, čemuž naměřené hodnoty odpovídají u všech vzorků ($pI_{BSA} = 5,1$).

Porovnáním vzorků BSA připravených ve vodě a ve fyziologickém roztoku je zřejmé, že vzorek připraven ve fyziologickém roztoku obecně dosahuje nižších hodnot Q jako gel připraven v prostředí vody, což naznačuje, že hustota síťování tohoto gelu je vyšší a tudíž je větší i elastická retrakční síla, která působí proti deformaci. Tomu odpovídají i naměřené hodnoty G^* , které jsou vyšší pro vzorek BSA ve fyziologickém roztoku (viz kapitola 5.1.4).

Další rozdíly v chování možno pozorovat v nejvyšším dosaženém stupni bobtnání jednotlivých vzorků. Gely připravené ve vodě dosahují nejvyšší hodnoty Q v alkalickém prostředí pufru s pH 10, zatím co gely připravené ve fyziologickém roztoku bobtnají nejvíce v prostředí vody. Tento rozdíl je způsoben působící osmotickou silou. Jak již bylo zmíněno, připravené gely v mezerách své síťovité struktury obsahují protiionty, přítomnost kterých má za následek vysokou tendenci vody pronikat do této struktury. Vzorky připravené ve fyziologickém roztoku obsahují kromě protiiontů i další nízkomolekulární ionty, které ještě zvyšují koncentrační gradient, na základě kterého voda proniká do gelu a tudíž je pro tyto vzorky bobtnání nejvýraznější právě ve vodě.

Pro dvojice proteinových a směsných polysacharid-proteinových vzorků obecně platí, že vyšších hodnot Q dosahují směsné vzorky HA+BSA. Toto chování možno přisoudit hygroskopickým vlastnostem hyaluronanu.

Porovnáním vzorků obsahujících HA_{HMW} a HA_{LMW} vidíme, že nižších hodnot Q ve všech prostředích dosahuje vzorek obsahující HA_{LMW}. Stejně jako u BSA vzorků možno předpokládat, že tento rozdíl je způsoben hustotou síťování gelů, která je vyšší u vzorku HA_{LMW}+BSA ve vodě, čemuž rovněž odpovídají i naměřené výsledky reologických testů (viz kapitola 5.1.3).



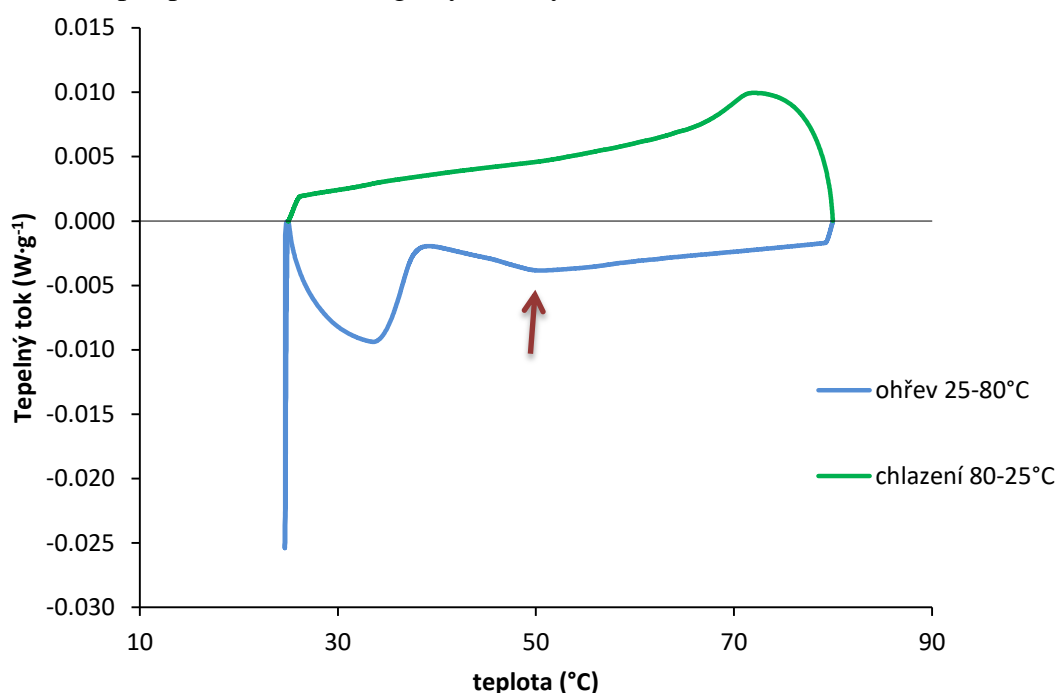
Obrázek 23 – dosažené hodnoty stupně bobtnání (po 24 hodinách) pro 13% vzorky gelů v příslušném prostředí.

5.3 Termická analýza

5.3.1 Mikrokolorimetrie

Cílem mikrokolorimetrického měření bylo podrobení připravených roztoků stejnému teplotnímu programu jako v případě reologického měření teplotních ramp a porovnání naměřených dat získaných jednotlivými metodami.

Získané výsledky z mikrokolorimetrie poskytují informaci pouze o denaturaci albuminu, která je spojená se spotřebou dodávaného tepla, tudíž se projeví jako endotermní pík v grafu závislosti normalizovaného tepelného toku na teplotě (příklad viz Obrázek 24). Tyto data však neposkytují další informace spojené se síťováním vzorků a vznikem gelu, tudíž se tato metoda nejeví vhodná pro porovnání s reologickými testy.



Obrázek 24 – závislost tepelného toku na teplotě pro vzorek 13% BSA ve vodě; pík označen červenou šipkou odpovídá denaturaci BSA, zbylé dva píky jsou pouze odpovědí na změnu teplotního programu a neposkytují informace o chování měřeného vzorku

Zjištěné teploty odpovídající minimu píku charakterizujícího denaturaci shrnuje Tabulka 7. Obecně platí, že tyto teploty jsou nižší pro čistě proteinové vzorky (v porovnání se směsnými vzorky) a stejně tak pro vzorky připravené ve vodě (v porovnání s jejich analogy připravenými ve fyziologickém roztoku). Zmíněné rozdíly jsou však minimální.

Tabulka 7 – teplota v minimu píku odpovídající denaturaci jednotlivých vzorků

Vzorek	Teplota (°C)
13% BSA ve vodě	49,9
13% HA _{HMW} +BSA ve vodě	51,4
13% HA _{LMW} +BSA ve vodě	52,4
13% BSA ve fyziologickém roztoku	52,2
13% HA _{HMW} +BSA ve fyziologickém roztoku	52,4

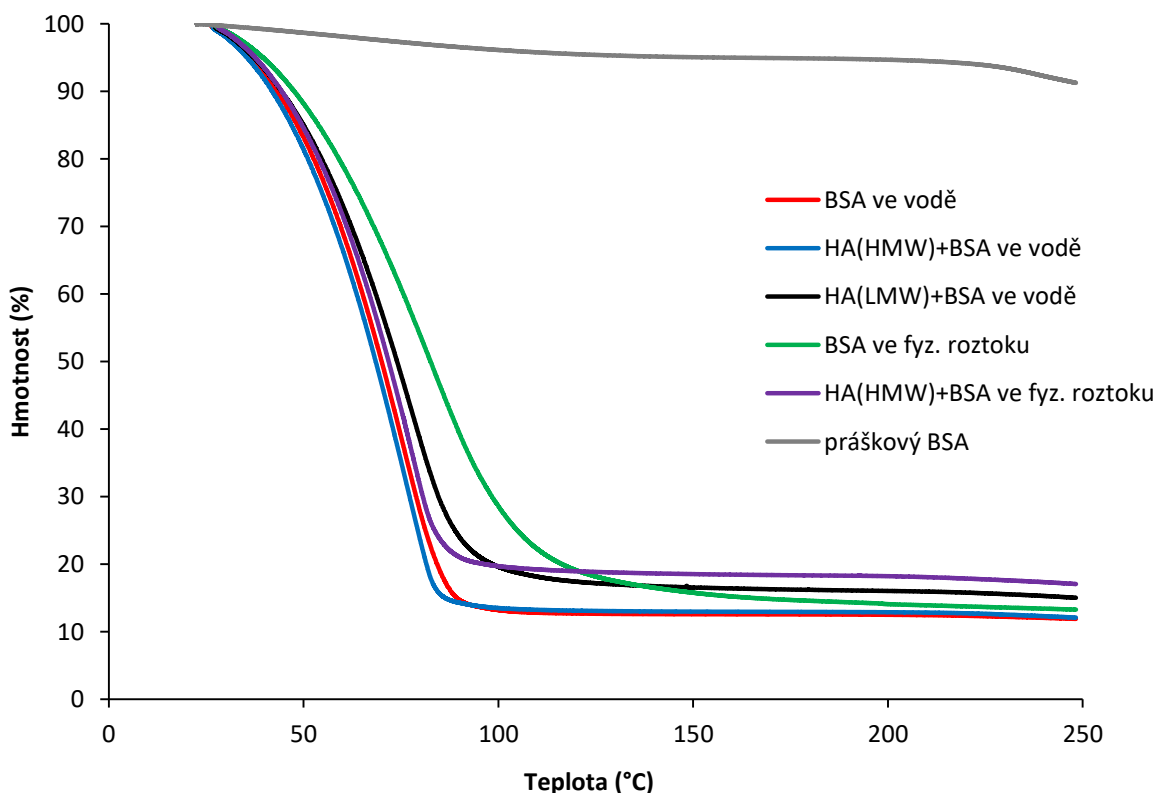
5.3.2 Termogravimetrie a diferenciální kompenzační kalorimetrie

Naměřené termogravimetrické křivky (viz Obrázek 25) mají pro všechny vzorky stejný průběh. Od počátku měření až po přibližně 90 °C dochází k výraznému úbytku hmotnosti v důsledku vypařování vody z hydrogelu. Změřený obsah vody se pohyboval v intervalu od 80,66 % pro směsný vzorek HA_{HMW}+BSA ve fyziologickém roztoku po 86,98 % pro vzorek BSA ve vodě (naměřené hodnoty pro všechny vzorky shrnuje Tabulka 8).

Samotný práškový BSA ve své struktuře obsahoval necelých 5 % vody. Kromě úbytku hmotnosti vlivem odpařování je možné u práškového BSA pozorovat i další úbytek hmotnosti, počínající při teplotě přibližně 200 °C, který možno přisoudit degradaci BSA. Naproti tomu při dalším ohřevu gelů nad teplotou 100 °C již nedochází k výraznější ztrátě hmotnosti, vzniklé xerogely lze tudíž v daném teplotním rozsahu považovat za stabilní.

Tabulka 8 – obsah vody pro vzorky gelů a práškový BSA

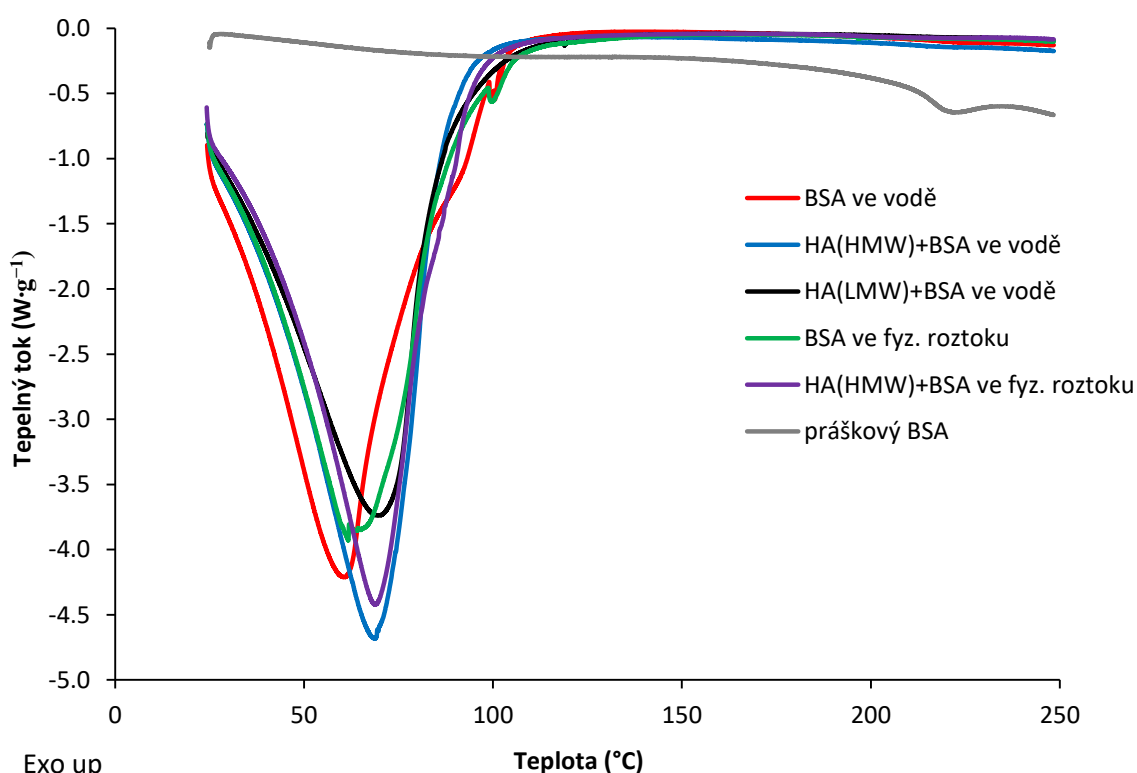
Vzorek		Obsah vody (% _{hm})
Práškový BSA		4,82
Gely	13% BSA ve vodě	86,98
	13% HA _{HMW} +BSA ve vodě	86,05
	13% HA _{LMW} +BSA ve vodě	86,35
	13% BSA ve fyziologickém roztoku	82,33
	13% HA _{HMW} +BSA ve fyziologickém roztoku	80,66



Obrázek 25 – závislost hmotnosti vzorku (%) na teplotě pro 13% vzorky gelů a práškový BSA

Naměřené DSC-křivky (viz Obrázek 26) jsou stejně jako TG-křivky porovnatelné pro všechny měřené gely. V rozsahu teploty do 100 °C je pozorován výrazný endotermní pík odpovídající vypařování vody, což je v souladu s výsledky získanými z TGA. Minimum píku se pro čistě albuminové vzorky nachází při teplotě přibližně o 7 °C nižší než je tomu u směsných vzorků, což může být způsobeno hygroskopickými vlastnostmi HA. Rovněž výparné teplo je pro BSA vzorky nižší než pro vzorky HA+BSA (konkrétní hodnoty viz přílohy – Tabulka 11).

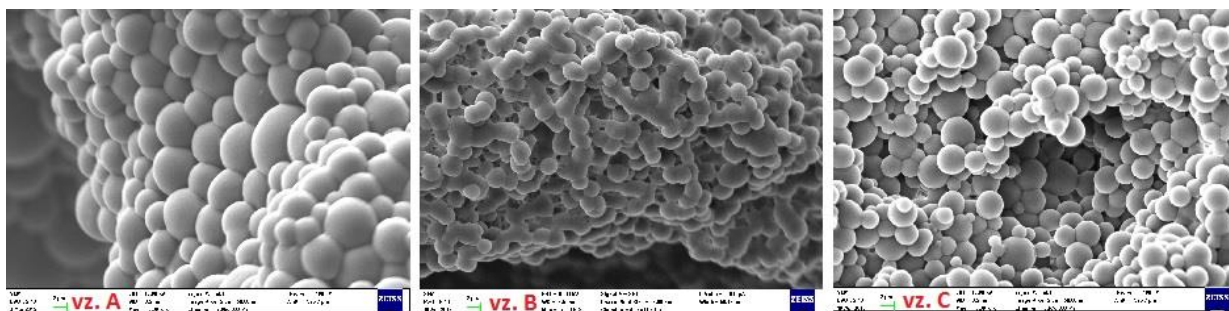
Stejně jako v případě TG měření je možné pozorovat rozdíly mezi práškovým BSA a vzorky gelů. V naměřené závislosti tepelného toku na teplotě pro práškový BSA můžeme pozorovat i druhý endotermní pík s minimem při teplotě přibližně 220 °C, který odpovídá počínající degradaci BSA. V případě naměřených závislostí pro gely se při dané teplotě žádné změny tepelného toku neprojeví, tudíž lze soudit, že vzniklé xerogely vlivem rostoucí teploty nepodléhají v daném rozsahu dalším výrazným změnám.



Obrázek 26 – závislost tepelného toku na teplotě pro 13% vzorky gelů a práškový BSA

5.4 Elektronová mikroskopie

Morfologie připravených gelů byla studována prostřednictvím SEM snímků při různém zvětšení. Již při 500násobném zvětšení (snímky viz přílohy – Obrázek 33–Obrázek 37) je možné pozorovat výrazné rozdíly v morfologii BSA a směsných HA+BSA gelů. Morfologie BSA gelů je homogenní, bez zjevné členitosti, zatím co struktura směsných vzorků je členitá. U všech HA_{HMW}+BSA gelů možno pozorovat sférické částice (viz Obrázek 27) s průměrem od 2 μm do 10 μm, přičemž distribuce velikosti není uniformní. V případě vzorku obsahujícího HA_{LMW} mají částice průměr přibližně 2 μm, jejich distribuce je uniformní a jednotlivé částice se spojují za vzniku větších, kontinuálních útvarů. Přídavek hyaluronanu, a následně i zvyšování jeho molekulové hmotnosti, pravděpodobně vede ke vzniku gelů s méně uniformní strukturou na mikroskopické úrovni.



Obrázek 27 – SEM snímky gelů (zvětšení 5000x); zleva: vz. A – 13% $HA_{HMW}+BSA$ (1:12) ve vodě; vz. B – 13% $HA_{LMW}+BSA$ (1:12) ve vodě; vz. C – 13% $HA_{HMW}+BSA$ (1:12) ve fyziologickém roztoku

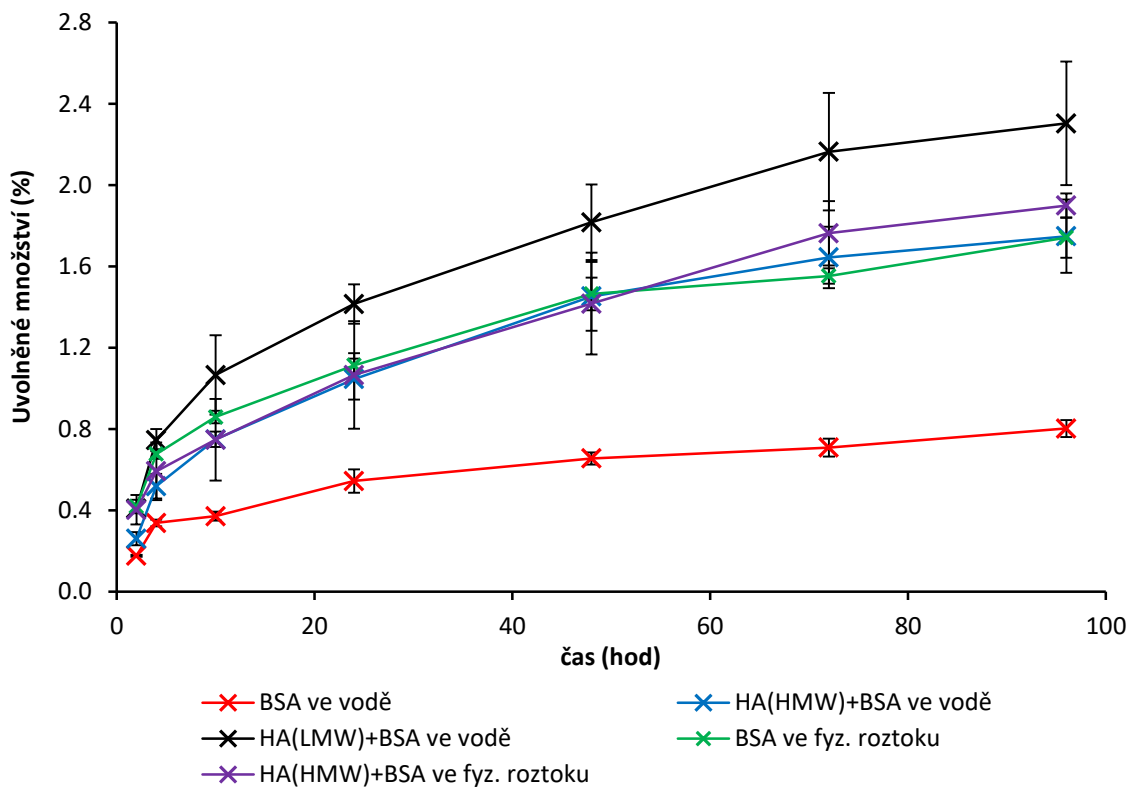
Členitá struktura směsných hydrogelů rovněž poukazuje na nižší hustotu síťování těchto vzorků v porovnání s čistě proteinovými gely. V případě směsných vzorků můžeme stejným způsobem konstatovat nižší hustotu síťování pro vzorky obsahující HA_{HMW} . Tyto závěry jsou v souladu s výsledky studia bobtnání gelů, kdy nejvíce bobtnaly směsné $HA_{HMW}+BSA$ gely, což rovněž poukazuje na nejnižší stupeň síťování (viz kapitola 5.2). K obdobným závěrům lze dospět i na základě reologických testů (viz kapitola 5.1.4), kdy po ustálení hodnot G^* pro jednotlivé vzorky, dosahovaly nejvyšších hodnot BSA gely a nižších hodnot vzorky $HA_{HMW}+BSA$.

5.5 Uvolňování modelové látky

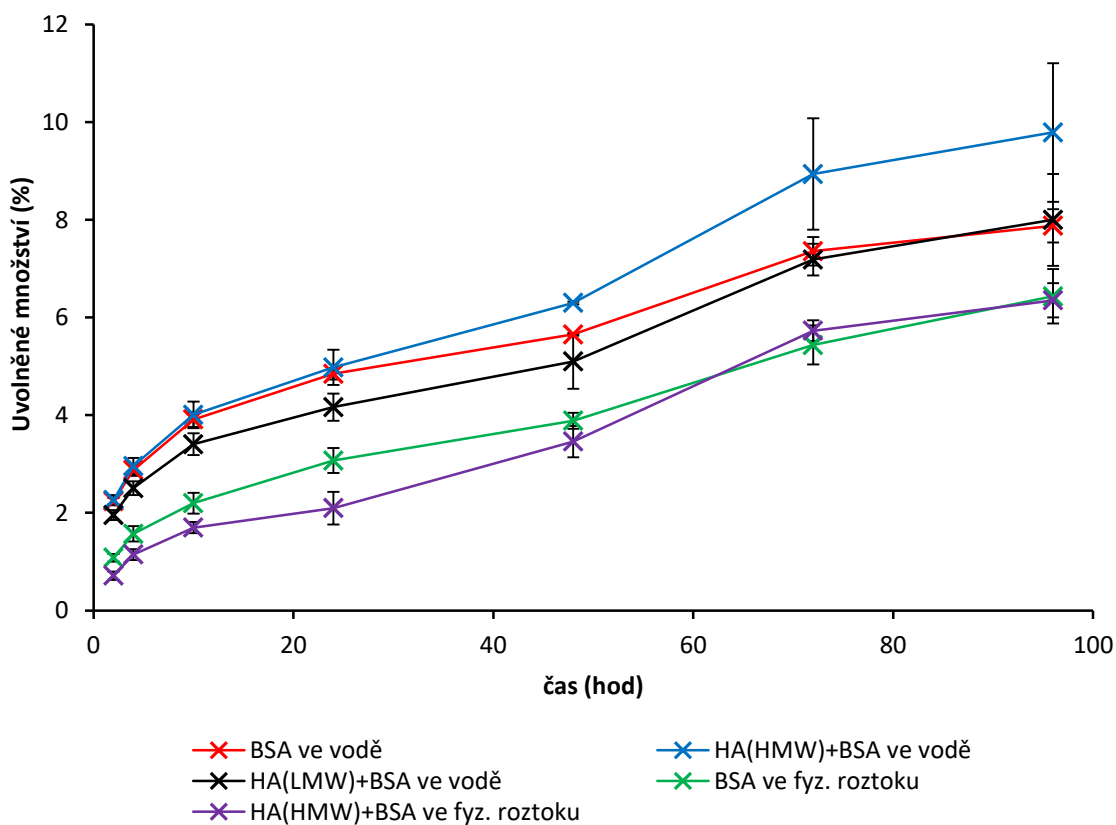
Principiálně je v rámci této kapitoly sledována difuze modelové látky (hydrofilní barvivo methylenová modř) do příslušných roztoků (voda, fyziologický roztok). Hnací sílu studovaného procesu představuje rozdíl v koncentraci barviva v gelech a okolním prostředí. Termodynamicky dochází k posunu na počátku nerovnovážného systému do stavu rovnováhy prostřednictvím difuze methylenové modři z gelu do prostředí, čímž dochází k postupnému vyrovnávání koncentrace barviva v obou fázích (gel a prostředí).

Pro všechny naměřené závislosti uvolněného množství na čase platí, že k nejrychlejšímu přechodu barviva z gelu dochází v průběhu prvních 10 hodin. V daném čase dochází k bobtnání vzorků a barvivo je uvolňované zejména z povrchu hydrogelu, který je v přímém kontaktu s vodou, resp. fyziologickým roztokem. Po tomto časovém intervalu je dosaženo bobtnací rovnováhy (viz kapitola 5.2), uvolňování pak probíhá po celou dobu měření relativně konstantní rychlostí.

Ze závislosti uvolněného množství na čase, v případě, kdy byla jako prostředí použita voda (viz Obrázek 28), je zřejmé, že celkové uvolněné množství je pro všechny vzorky ve sledovaném čase poměrně nízké (méně než 2,5 %). Nejnižší je toto množství pro vzorek BSA ve vodě, pravděpodobně jako důsledek vysoké hustoty síťování, čímž dochází k výraznějšímu bránění pohybu methylenové modři v gelu, což je v souladu s reologickým měřením (viz kapitola 5.1.4) i s výsledky ze SEM (viz kapitola 5.4).



Obrázek 28 – závislost uvolněného množství (%) modelového barviva na čase pro jednotlivé vzorky 13% gelů umístěné ve vodě



Obrázek 29 – závislost uvolněného množství (%) modelového barviva na čase pro jednotlivé vzorky 13% gelů umístěné ve fyziologickém roztoku

V případě měření ve fyziologickém roztoku (viz Obrázek 29) je dosažené celkové uvolněné množství vyšší u všech studovaných vzorků (v rozsahu od $6,4 \pm 0,4$ % do $9,8 \pm 1,4$ %), v porovnání s měřením probíhajícím ve vodě (od $0,80 \pm 0,04$ % do $2,30 \pm 0,30$ %). Samotný průběh změřené závislosti je stejný jako v předcházejícím případě, se skokovým uvolněním na začátku, a s následným postupným uvolňováním po celou dobu měření. Větší uvolněné množství je možné pozorovat u gelů připravených ve vodě, a to již v prvních hodinách experimentu, což může být způsobeno dosažením vyšších hodnot stupně nabobtnání těchto gelů (viz kapitola 5.2).

Tabulka 9 – Stanovené relativní difúzní koeficienty methylenové modři v jednotlivých studovaných vzorcích gelů a použitých prostředích, do kterých se methylenová modř uvolňuje

vzorek	$D_{rel} (-)$	
	voda	fyziologický roztok
13% BSA ve vodě	0,0007	0,0645
13% HA _{HMW} +BSA ve vodě	0,0035	0,0809
13% HA _{LMW} +BSA ve vodě	0,0054	0,0603
13% BSA ve fyziologickém roztoku	0,0033	0,0341
13% HA _{HMW} +BSA ve fyziologickém roztoku	0,0035	0,0284

Konkrétní hodnoty relativního difuzního koeficientu (postup výpočtu viz kapitola 4.2.8) shrnuje Tabulka 9. Samotná hodnota D_{rel} charakterizuje zpomalení difuze barviva v gelu oproti jeho difuzi v roztoku. Nízké hodnoty naznačují výrazné brždění tohoto procesu, které je způsobeno samotnou strukturou gelu, resp. jeho porozitou, a rovněž probíhajícími elektrostatickými interakcemi mezi kladně nabitými molekulami methylenové modři a záporně nabitými řetězci BSA a HA. Jak je zřejmé z prezentovaných závislostí i samotného D_{rel} , difuze probíhá daleko rychleji v prostředí fyziologického roztoku než ve vodě, i když je stupeň bobtnání studovaných gelů vyšší v neiontovém vodním prostředí (viz kapitola 5.2), a tudíž je porozita gelů v tomto prostředí vyšší. Důvodem může být ovlivnění imobilizační elektrostatické interakce mezi řetězci polymerů a molekulami barviva přítomností volných nízkomolekulárních iontů z fyziologického roztoku, což značí, že právě elektrostatická imobilizace má na zpomalení difuze majoritní vliv.

6 ZÁVĚR

Cílem této práce byla příprava albuminových a směsných hyaluronan-albuminových hydrogelů a jejich následná experimentální charakterizace. Studován byl vliv několika faktorů (iontová síla, pH, molekulová hmotnost hyaluronanu) na proces gelace a reologické vlastnosti připravených gelů. Na základě získaných výsledků bylo následně vybráno pět vzorků, pro které byla studována časová stálost reologických vlastností, termická stabilita, charakteristika bobtnání, morfologie a uvolňování modelového barviva z gelu.

Vlivem rostoucí iontové síly dochází k ovlivnění působících elektrostatických interakcí, což vede ke zpomalení procesu gelace, o čemž svědčí naměřené hodnoty bodů gelace ($75,3 \pm 0,3$ °C pro vzorek s iontovou silou 0,3 M v porovnání s $69,4 \pm 0,1$ °C pro vzorek s iontovou silou 0,0005 M). Výsledné mechanické vlastnosti připravených gelů jsou rovněž výrazně ovlivněny. Komplexní modul vzorku s iontovou silou 0,3 M dosahuje řádově vyšších hodnot než pro vzorek s iontovou silou 0,005 M, což může být důsledek ovlivnění elektrostatických interakcí, které vede k stabilizaci vzniklé sítě.

Výrazný vliv na chování vzorků má rovněž pH prostředí, jelikož albumin i hyaluronan jsou amfifilní molekuly. Gelace probíhá nejrychleji při pH 4,9, což je hodnota pH, při které je náboj použitých biopolymerů opačný (kladný pro BSA a záporný pro HA). V případě, že mají oba polymery záporný náboj, je proces gelace rychlejší při vyšším pH ($76,0 \pm 0,4$ °C při pH 8,9 v porovnání se $79,6 \pm 0,5$ °C při pH 5,4), a tedy když je vyšší i hustota náboje. Dosažené hodnoty G^* připravených gelů se zvyšují s rostoucím pH vzorků v rozsahu pH 4,9–7,5. Tomuto trendu neodpovídá vzorek s pH 8,9, který dosahuje nižších hodnot G^* , k čemu dochází pravděpodobně v důsledku počínající degradace BSA.

Molekulová hmotnost HA má vliv nejenom na výsledné vlastnosti gelů, ale i na reologické vlastnosti roztoků, kdy s rostoucí molekulovou hmotností dochází ke zvýšení G^* . Naopak výsledné gely dosahují vyšších hodnot G^* v případě nízkomolekulového HA, a rovněž samotný proces gelace je rychlejší pro vzorky s nižší molekulovou hmotností, jelikož kratší řetězce HA_{LMW} umožňují rychlejší střet interagujících částí řetězce albuminu.

Hodnoty G^* albuminových gelů jsou na čas nezávislé a jejich reologické vlastnosti tudíž lze považovat za časově stálé. Naproti tomu směsné vzorky $HA_{HMW}+BSA$ vykazují v prvních třech dnech po přípravě výrazný pokles G^* . Hodnoty G^* jsou pak dále konstantní, tudíž je možné po tomto časovém intervalu předpokládat dosažení stavu rovnováhy systému. Výsledné hodnoty G^* směsných vzorků jsou tedy obecně nižší než u BSA vzorků. Vyšší G^* dosahují vzorky připravené ve fyziologickém roztoku, než jejich analogy připravené ve vodě, jelikož tyto mají vyšší iontovou silou, což je v souladu s výše zmiňovanými výsledky reologického studia vlivu iontové síly.

Připravené vzorky gelů s rostoucím pH dosahují vyššího stupně bobtnání, naopak nejnižších hodnot Q dosahují v kyselém pH = 4, jelikož je toto nejbližší izoelektrickému bodu albuminu ($pI_{BSA} = 5,1$). Vyššího Q obecně dosahují směsné gely HA+BSA, pravděpodobně jako důsledek hygrokopických vlastností hyaluronanu, a rovněž nižší hustoty síťování těchto vzorků, v porovnání s čistě albuminovými gely, což je v souladu s výsledky z elektronové mikroskopie. Mikroskopická struktura albuminových vzorků je uniformní, nečlenitá, naproti tomu směsné HA+BSA gely jsou tvořeny sférickými částicemi s průměrem 2–10 μm .

Vlivem ohřevu dochází k výraznému úbytku hmotnosti hydrogelu, jako důsledek odpařování vody, která tvoří víc než 80 %_{hm} vzorku. V porovnání s práškovým BSA, který vlivem počínající degradace podléhá dalším změnám při 220 °C, jsou xerogely vzniklé

odpařením vody termicky stabilnější a v rozsahu do 250 °C nedochází k dalšímu úbytku jejich hmotnosti, resp. ke změnám tepelného toku dodávaného do vzorku.

Uvolňování methylenové modři z gelu má základní průběh stejný, bez ohledu na prostředí, ve kterém byly vzorky umístěny. Průběh je nejrychlejší v prvních 10 hodinách, kdy rovněž dochází k bobtnání hydrogelu. Po dosažení bobtnací rovnováhy je již rychlost uvolňování relativně konstantní. Vypočítané hodnoty relativního difuzního koeficientu jsou nízké, v řádu tisícín při uvolňování do vody a v řádu setin při uvolňování do fyziologického roztoku. Na základě uvedených výsledků lze konstatovat, že v porovnání s difuzí methylenové modři ve vodě, je tento proces v gelu výrazně zpomalován. Příčinou je samotná porózní struktura a rovněž probíhající elektrostatická imobilizace barviva. Celkové uvolněné množství je v měřeném časovém intervalu několikanásobně vyšší v případě difuze do fyziologického roztoku, o čemž svědčí i samotné hodnoty D_{rel} , které jsou v tomto případě řádově vyšší než hodnoty dosažené ve vodě.

Na základě prezentovaných výsledků lze tudíž předpokládat, že elektrostatická interakce mezi kladně nabitým barvivem a záporně nabitými řetězci polymerů má zásadní vliv na zpomalení probíhající difuze, což může být využito při přípravě systémů vyžadujících dlouhodobé postupné uvolňování aktivní látky. V případě, kdy je zpomalení probíhající difuze nežádoucí, je tento efekt teoreticky možné eliminovat použitím neutrálních, nebo záporně nabitých látek, případně snížením pH pod hodnotu izoelektrického bodu albuminu. Takové změny by měly ovšem za následek i strukturální změny gelů a skutečné chování takovýchto systémů by vyžadovalo další systematické studium.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] NECAS, BARTOSIKOVÁ, BRAUNER a KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*. 2008, č. 53, s. 397-411.
- [2] Hyaluronan: Structure and physical properties. In: *Glycoforum* [online]. [cit. 2016-07-06]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [3] EVANKO, Stephen a Thomas N. WIGHT. Intracellular hyaluronan. In: *Glycoforum* [online]. 2001 [cit. 2017-02-01]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA20/HA20E.html>
- [4] KOGAN, Grigorij, Ladislav ŠOLTÉS, Robert STERN a Peter GEMEINER. *Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications*. DOI: 10.1007/s10529-006-9219-z.
- [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] COWMAN, Mary K. a Shiro MATSUOKA. Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate Research*. 2005, 340(5), 791-809. DOI: 10.1016/j.carres.2005.01.022. ISSN 00086215.
- [7] SCOTT, John E. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution. Some biological consequences. In: *GlycoForum* [online]. [cit. 2016-07-06]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>
- [8] GATEJ, Iuliana, Marcel POPA a Marguerite RINAUDO. Role of the pH on Hyaluronan Behavior in Aqueous Solution. *Biomacromolecules*. 2005, vol. 6, issue 1, s. 61-67. DOI: 10.1021/bm040050m.
- [9] 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, 8(No. 4), 1287-1292.
- [10] *Biopolymers: Polysaccharides I*. Weinheim: Wiley-VCH, 2002, 532 s. ISBN 35-273-0226-3.
- [11] ROBERT, L. *Hyaluronan, a truly "youthful" polysaccharide. Its medical applications*. DOI: 10.1016/j.patbio.2014.05.019. ISBN 10.1016/j.patbio.2014.05.019.
- [12] PRESTWICH, Glenn D. Biomaterial from chemically-modified hyaluronan. In: *GlycoForum* [online]. [cit. 2014-10-27]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA18/HA18E.html>
- [13] JARACZ, Stanislav, Jin CHEN, Larisa V. KUZNETSOVA a Iwao OJIMA. *Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates*. DOI: 10.1016/j.bmc.2005.04.084. ISBN 10.1016/j.bmc.2005.04.084.
- [14] All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. Theodore Peters, Jr. San Diego, CA: Academic Press, 1996, 432 pp. ISBN 0-12-552110-3
- [15] KRATZ, Felix. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 2008, vol. 132, issue 3, s. 171-183. DOI: 10.1016/j.jconrel.2008.05.010.
- [16] ELZOGHBY, Ahmed O., Wael M. SAMY a Nazik A. ELGINDY. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 2012, vol. 157, issue 2, s. 168-182. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.07.031.

- [17] SUGIO S., A. KASHIMA, S. Mochizuki, *et al.* Crystal structure of human serum albumin at 2.5 angstrom resolution. *Protein Eng.*, 12 (1999), s. 439–446.
- [18] BAIER, Stefan K., Eric A. DECKER a D.Julian MCCLEMENTS. Impact of glycerol on thermostability and heat-induced gelation of bovine serum albumin. *Food Hydrocolloids*. 2004, 18(1), 91-100. DOI: 10.1016/S0268-005X(03)00046-8.
- [19] GALISTEO-GONZÁLEZ, F., J.A. MOLINA-BOLÍVAR a D.Julian MCCLEMENTS. Systematic study on the preparation of BSA nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014, 123(1), 286-292. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.09.028.
- [20] BARTOVSKÁ, Lidmila. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 5. přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005, 244 s. ISBN 80-708-0579-X.
- [21] SMIDSRØD, Olav a Størker T. MOE. *Biopolymer chemistry*. Trondheim: Tapir Academic Press, 2008, 398 s. ISBN 82-519-2384-2.
- [22] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 2. vyd. Praha: VŠCHT, 2001, 198 s. ISBN 80-708-0422-X.
- [23] SPERLING, Leslie Howard. *Introduction to physical polymer science*. Third edition. New York: Wiley-Interscience, 2001. ISBN 0-471-32921-5.
- [24] STEPTO, R.F.T. *Polymer networks: Principles of their formation, structure and properties*. First edition. London: Blackie Academic & Professional, 1998. ISBN 0 7514 0480 2.
- [25] MEZGER, Thomas G. *The rheology handbook: for users of rotational and oscillatory rheometers*. 3rd rev. ed. Hanover, Germany: Vincentz Network, 2011. ISBN 978-386-6308-640.
- [26] SCHRAM, Gebhard Author. *A practical approach to rheology and rheometry*. Německo: Gebroeder HAAKE GmbH, 1994, 290 s.
- [27] HAINES, P.J. (ed.). *Principles of thermal analysis and calorimetry*. Cambridge, UK: Royal society of chemistry, 2002. ISBN 0-85404-610-0.
- [28] KLOUŽKOVÁ, A., P. ZEMENOVÁ, J. KLOUŽEK a W. PABST. *Termická analýza*. VŠCHT Praha, 2002.
- [29] EHRENSTEIN, Gottfried W., Gabriela RIEDEL a Pia TRAWIEL. *Thermal analysis of plastics: Theory and practice*. Munich: Hanser, 2004. ISBN 3-446-22673-7.
- [30] Differential scanning calorimetry. In: *Polymer science learning center* [online]. University of Southern Mississippi [cit. 2016-11-07]. Dostupné z: <http://pslc.ws/macrog/dsc.htm>
- [31] ANDRADE, R. J., A. G. AZEVEDO, R. M. MUSAMPA a João M. MAIA. Thermo-rheological behavior of model protein–polysaccharide mixtures. *Rheologica Acta*. 2010, 49(4), 401-410. DOI: 10.1007/s00397-010-0431-3.
- [32] RAFÉ, Ali, Seyed M.A. RAZAVI, Reza FARHOOSH a João M. MAIA. Rheology and microstructure of basil seed gum and β -lactoglobulin mixed gels. *Food Hydrocolloids*. 2013, 30(1), 134-142. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2012.05.016.
- [33] SOARES, Paulo A.G., José R.P. C DE SEIXAS, Priscilla B.S. ALBUQUERQUE, Gustavo R.C. SANTOS, Paulo A.S. MOURÃO, Wilson BARROS, Maria T.S. CORREIA a Maria G. CARNEIRO-DA-CUNHA. Development and characterization of a new hydrogel based on galactomannan and κ -carrageenan. *Carbohydrate Polymers*. 2015, 134(1), 673-679. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.08.042.
- [34] VULPE, Raluca, Didier LE CERF, Virginie DULONG, Marcel POPA, Catalina PEPTU, Liliana VERESTIUC, Luc PICTON a Maria G. CARNEIRO-DA-CUNHA.

- Rheological study of in-situ crosslinkable hydrogels based on hyaluronan acid, collagen and sericin. *Materials Science and Engineering: C*. 2016, 69(1), 388-397. DOI: 10.1016/j.msec.2016.07.003.
- [35] RAJA, S Thirupathi Kumara, T THIRUSELVI, Asit Baran MANDAL, A GNANAMANI, Catalina PEPTU, Liliana VERESTIUC, Luc PICTON a Maria G. CARNEIRO-DA-CUNHA. PH and redox sensitive albumin hydrogel: A self-derived biomaterial. *Scientific Reports*. 2015, 5(1), -. DOI: 10.1038/srep15977.
- [36] HÁJOVSKÁ, P. *Polysacharid-proteinové gely*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 52 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Martin Chytil, Ph.D..
- [37] BALLIOS, Brian G., Michael J. COOKE, Laura DONALDSON, Brenda L.K. COLES, Cindi M. MORSHEAD, Derek VAN DER KOOY, Molly S. SHOICHET a Maria G. CARNEIRO-DA-CUNHA. A Hyaluronan-Based Injectable Hydrogel Improves the Survival and Integration of Stem Cell Progeny following Transplantation: A self-derived biomaterial. *Stem Cell Reports*. 2015, 4(6), 1031-1045. DOI: 10.1016/j.stemcr.2015.04.008.
- [38] CATANZANO, O., V. D'ESPOSITO, S. ACIERNO, et al. Alginate–hyaluronan composite hydrogels accelerate wound healing process: A self-derived biomaterial. *Carbohydrate Polymers*. 2015, 131(6), 407-414. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.05.081.
- [39] PETTA, Dalila, Garland FUSSELL, Lisa HUGHES, et al. Calcium phosphate/thermoreponsive hyaluronan hydrogel composite delivering hydrophilic and hydrophobic drugs: A self-derived biomaterial. *Journal of Orthopaedic Translation*. 2016, 5(6), 57-68. DOI: 10.1016/j.jot.2015.11.001.
- [40] LUO, Chunhong, Jianhao ZHAO, Mei TU, et al. Hyaluronan microgel as a potential carrier for protein sustained delivery by tailoring the crosslink network: A self-derived biomaterial. *Materials Science and Engineering: C*. 2014, 36(6), 301-308. DOI: 10.1016/j.msec.2013.12.021.
- [41] MANOKRUANG, Kiattikhun, Jae Seung LYM, Doo Sung LEE, et al. Injectable hydrogels based on poly(amino urethane) conjugated bovine serum albumin: A self-derived biomaterial. *Materials Letters*. 2014, 124(6), 105-109. DOI: 10.1016/j.matlet.2014.03.052.
- [42] OSS-RONEN, Liat, Dror SELIKTAR, Doo Sung LEE, et al. Polymer-conjugated albumin and fibrinogen composite hydrogels as cell scaffolds designed for affinity-based drug delivery: A self-derived biomaterial. *Acta Biomaterialia*. 2011, 7(1), 163-170. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.07.017.
- [43] LEAIST, Derek G. The effects of aggregation, counterion binding, and added NaCl on diffusion of aqueous methylene blue. *Canadian Journal of Chemistry*. 1988, 66(9), 2452-2457. DOI: 10.1139/v88-386.
- [44] DAWSON, R. M. C. *Data for biochemical research*. 3rd ed. Oxford: Clarendon Press, 1986. ISBN 01-985-5358-7.
- [45] MALAMUD, D. a James W. DRYSDALE. Isoelectric points of proteins, *Analytical Biochemistry*. 1978, 86(2), 620–647. ISSN 0003-2697.
- [46] KAPLAN, L.J. a J. F. FOSTES. et al., *Biochemistry*. 1971, 10(4), 630-636.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

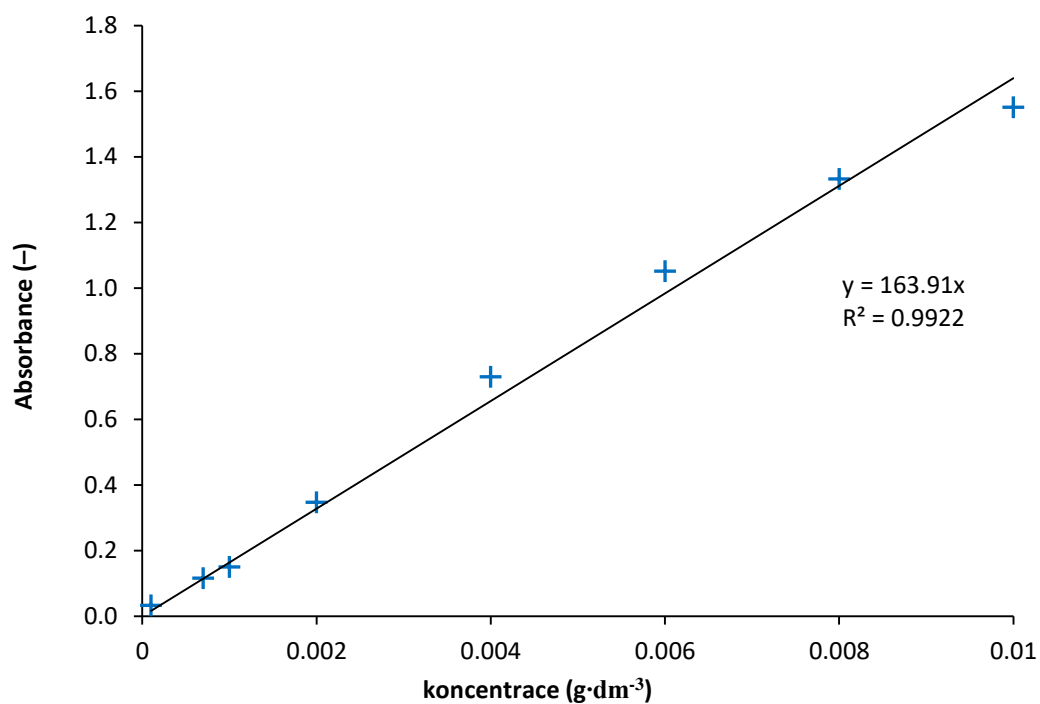
A	plocha
Å	angström, jednotka délky, $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$
ALG	alginát
BLG	β -lactoglobulin
BSA	hovězí sérový albumin
BSG	<i>basil seed gum</i>
CD-44	buněčný receptor schopný vázat hyaluronan
D_0	difuzní koeficient methylenové modři ve vodě
D_{gel}	difuzní koeficient methylenové modři v gelu
D_{rel}	relativní difuzní koeficient, poměr D_{gel} a D_0
Da	Dalton, jednotka molekulové hmotnosti, $1 \text{ Da} = 1,66 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$
De	Debořino číslo
DSC	diferenciální kompenzační kalorimetrie
DTG	derivační termogravimetrie
F	smyková síla
G	Gibbsova energie
G'	paměťový (elastický) modul
G''	ztrátový (viskózní) modul
G^*	komplexní modul
G_E	modul pružnosti v tahu
h	vzdálenost
H	enthalpie
HA	hyaluronan
HA_{HMW}	hyaluronan o molekulové hmotnosti 1500–1750 kDa
HA_{LMW}	hyaluronan o molekulové hmotnosti 90–130 kDa
HA_{MMW}	hyaluronan o molekulové hmotnosti 750–1000 kDa
HSA	lidský sérový albumin
L	délka
m	hmotnost
MC	methylcelulóza
MQ	Mili-Q voda
n	rychlost rotace reometru
n_t	látkové množství v čase t
n_{rov}	látkové množství v rovnováze
p	směrnice přímky
PAU	polyaminourethan
pI	izoelektrický bod
Q	stupeň nabobtnání
R	poloměr desky reometru
S	entropie
SEM	rastrovací elektronová mikroskopie
T	termodynamická teplota
t	teplota
t	čas

t_{rel}	relaxační čas
t_{obs}	čas pozorování
t_{CR}	počátek gelace
t_{SG}	čas bodu gelace
TG	termogravimetrie
TGA	termogravimetrická analýza
V	objem
v	rychlost
γ	deformace
$\dot{\gamma}$	smyková rychlost
δ	ztrátový úhel
δ	tloušťka gelu
η	dynamická viskozita
η_{app}	<i>apparent viscosity</i> , zdánlivá viskozita
η_0	limitní (dolní) viskozita
η_∞	limitní (horní) viskozita
η^*	komplexní viskozita
η'	reálná (dynamická) složka komplexní viskozity
η''	imaginární složka komplexní viskozity
ρ	hustota
τ	smykové napětí
τ_0	mez toku
ω	frekvence

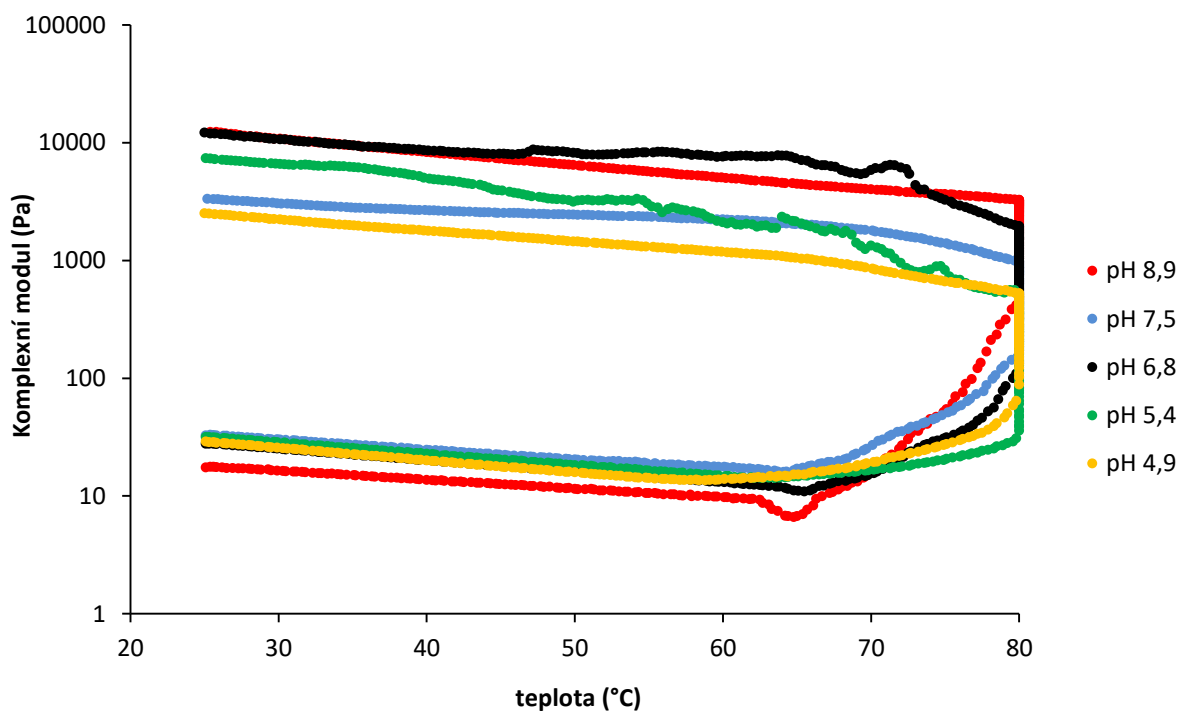
9 PŘÍLOHY

Tabulka 10 – seznam použitých pufrů, včetně látek a koncentrace použitých při jejich přípravě

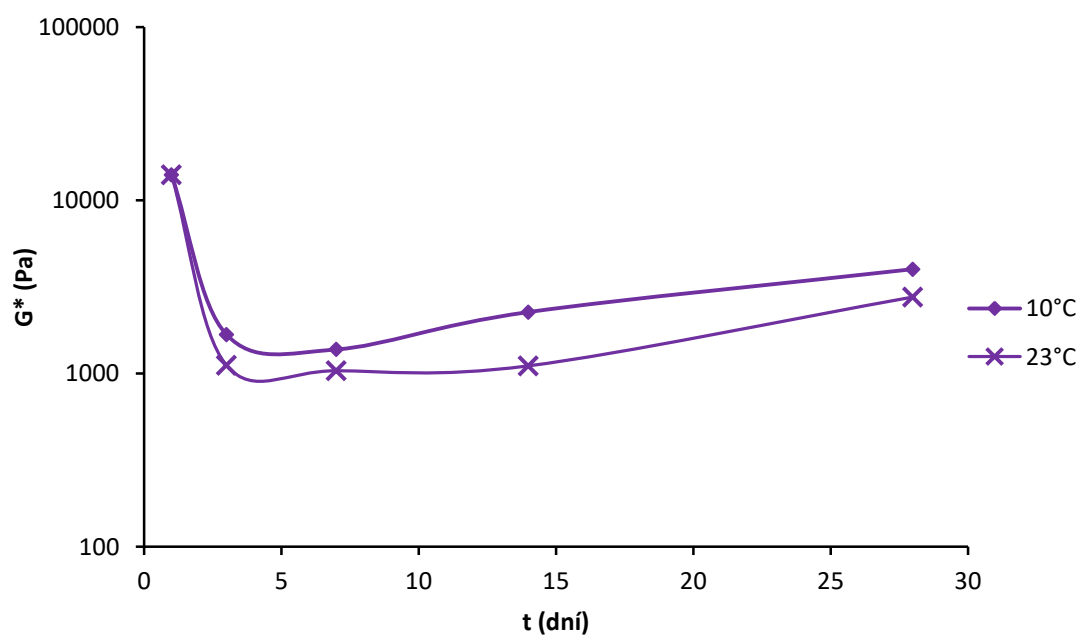
pH	Zásobní roztok		Přidávaný roztok	
	Použitá látka	Koncentrace (mol·dm ⁻³)	Použitá látka	Koncentrace (mol·dm ⁻³)
4	Kyselina citronová	0,05	Hydrogenfosforečnan disodný	0,1
4,9				
7	Hydrogenfosforečnan disodný	0,1	Kyselina citronová	0,05
7,2				
8	Tetraboritan sodný	0,025	Kyselina chlorovodíková	0,1
9				
10			Hydroxid sodný	0,1



Obrázek 30 – kalibrační křivka pro modelové barvivo – methylenová modř, absorbance při 665 nm



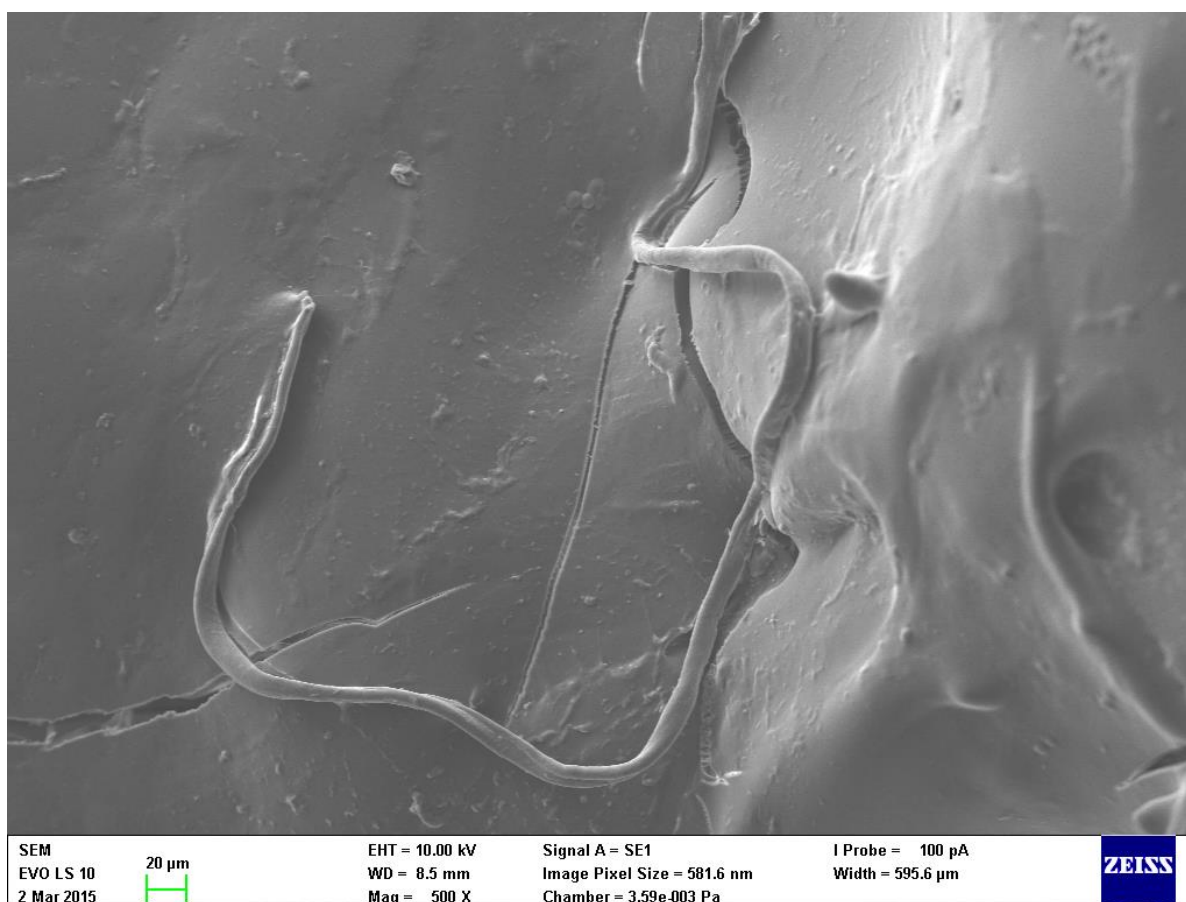
Obrázek 31 – závislost komplexního modulu na teplotě pro směsné 13% vzorky HA+BSA (1:12) o různém pH



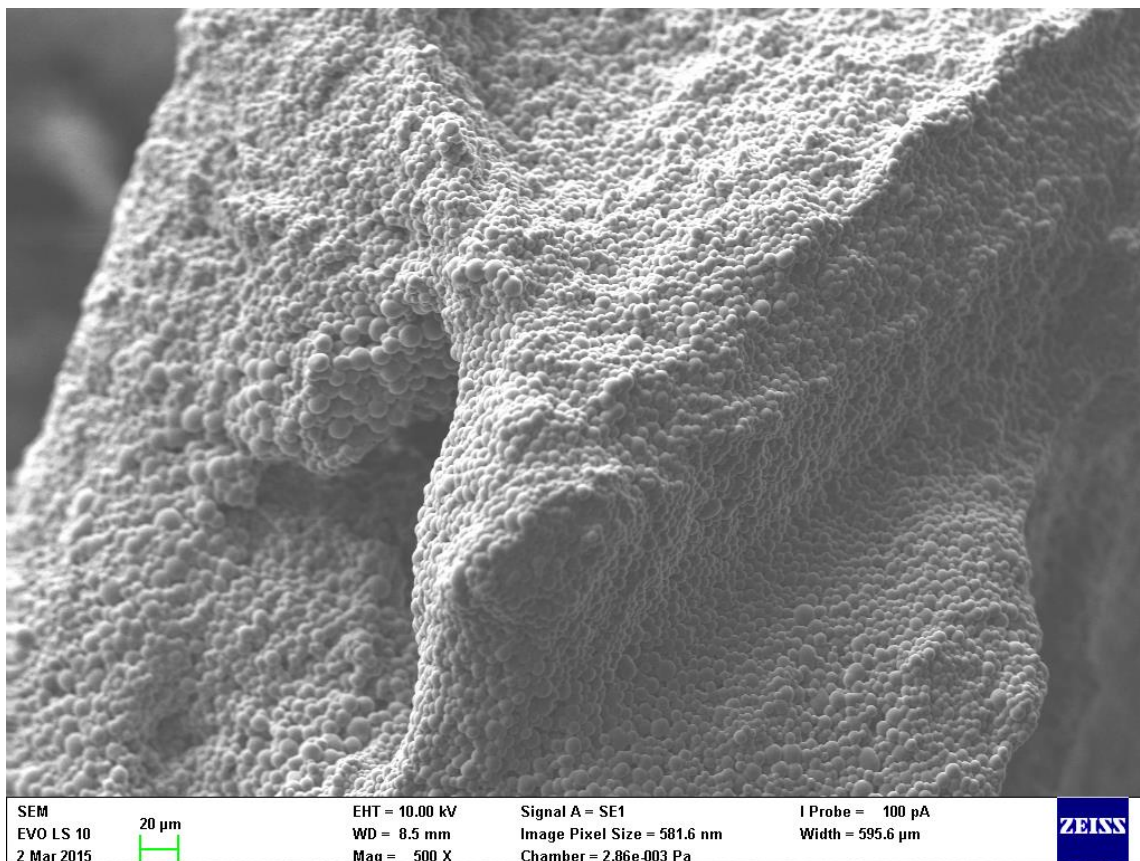
Obrázek 32 – závislost komplexního modulu (při úhlové frekvenci $10 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$) na čase pro 13% $\text{HA}_{\text{HMW}}+\text{BSA}$ (1:12) ve fyziologickém roztoku, skladované při teplotě $10 \text{ }^\circ\text{C}$ a $23 \text{ }^\circ\text{C}$

Tabulka 11 – teplota v minimu endotermního píku odpovídajícího vypařování vody a výparné teplo pro 13% vzorky gelů a práškový BSA jako výsledek DSC měření

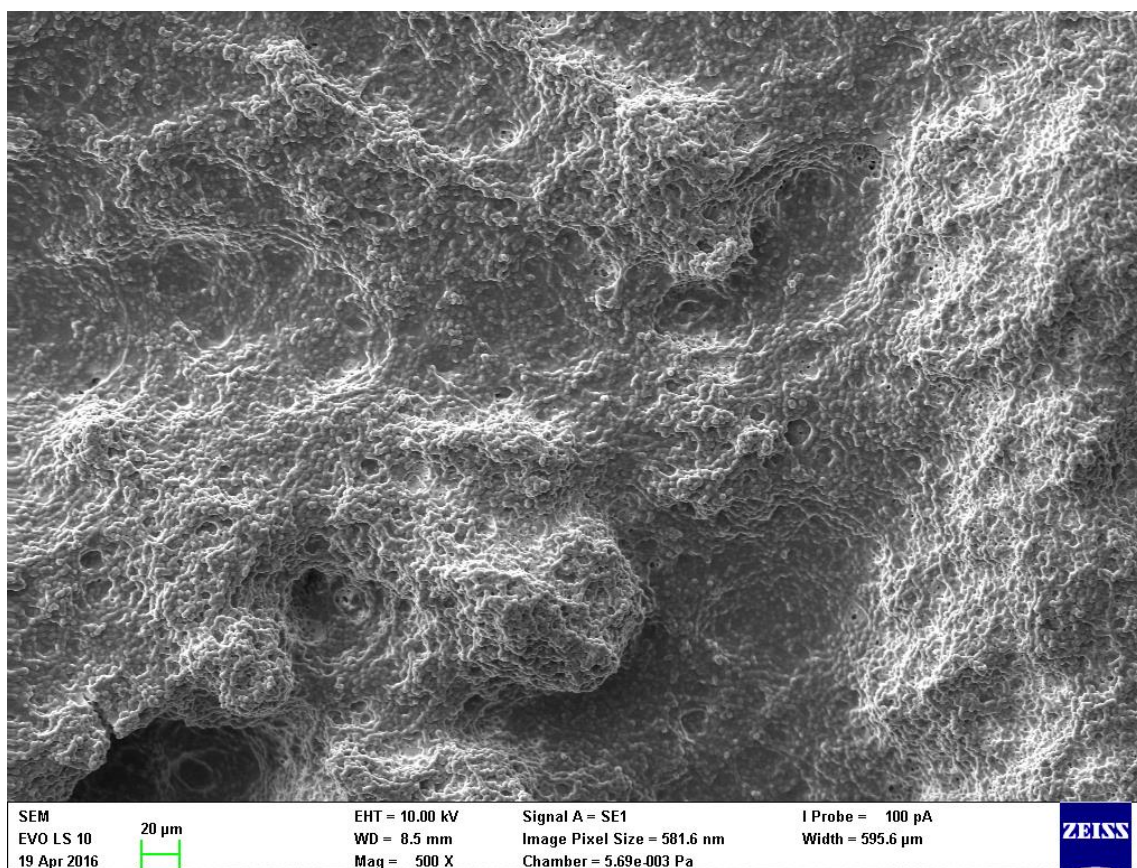
Vzorek		Minimum píku (°C)	Výparné teplo (J·g ⁻¹)
Práškový BSA		70,48	52,83
		219,48	18,16
Gely	13% BSA ve vodě	61,08	1423
	13% HA _{HMW} +BSA ve vodě	68,90	1513
	13% HA _{LMW} +BSA ve vodě	70,43	1211
	13% BSA ve fyziologickém roztoku	61,74	1342
	13% HA _{HMW} +BSA ve fyziologickém roztoku	69,05	1434



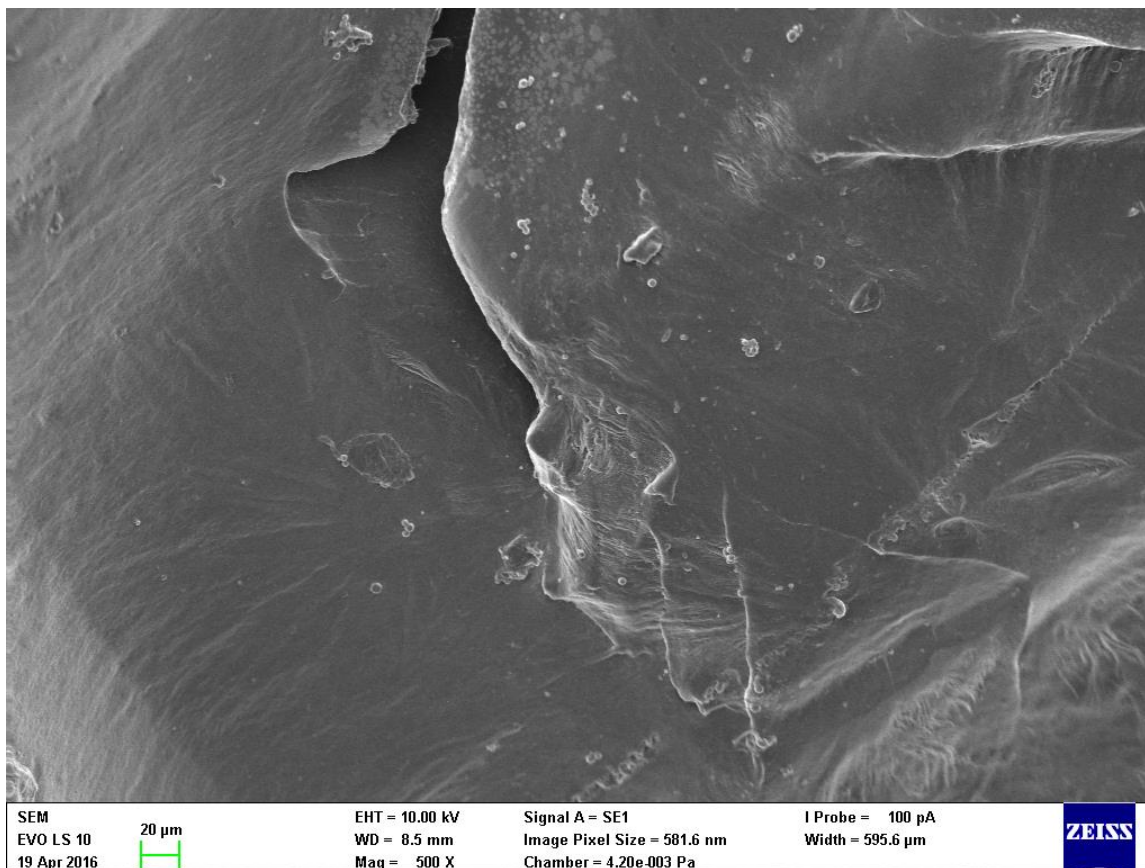
Obrázek 33 – SEM snímek gelu 13% BSA ve vodě



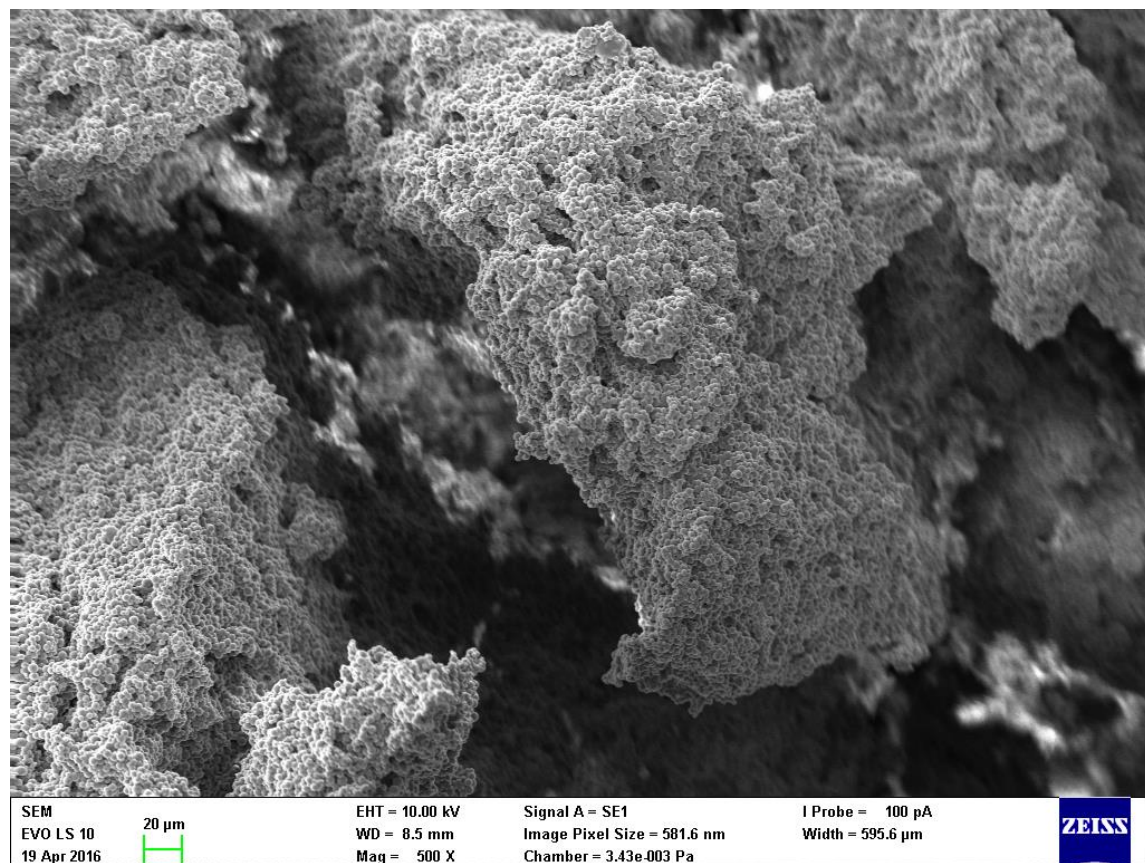
Obrázek 34 – SEM snímek gelu 13% HA_{HMW}+BSA (1:12) ve vodě



Obrázek 35 – SEM snímek gelu 13% HA_{LMW}+BSA (1:12) ve vodě



Obrázek 36 – SEM snímek gelu 13% BSA ve fyziologickém roztoku



Obrázek 37 – SEM snímek gelu 13% HA_{HMW}+BSA (1:12) ve fyziologickém roztoku