



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY

MATERIALS RESEARCH CENTRE

# DYNAMICKÝ ROZPTYL SVĚTLA A ELEKTROANALYTICKÉ METODY VE STUDIU SYSTÉMŮ HYALURONANU A AMINOKYSELIN

DYNAMIC LIGHT SCATTERING AND ELECTROANALYTICAL INVESTIGATION OF  
HYALURONAN-AMINO ACIDS SYSTEMS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

JOHANA BABRNÁKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. MARTIN CHYTIL, Ph.D.

BRNO 2014



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

## Zadání bakalářské práce

|                         |   |                                  |
|-------------------------|---|----------------------------------|
| Číslo bakalářské práce: | <b>FCH-BAK0783/2013</b>                   | Akademický rok: <b>2013/2014</b> |
| Ústav:                  | Centrum materiálového výzkumu             |                                  |
| Student(ka):            | <b>Johana Babrnáková</b>                  |                                  |
| Studijní program:       | Chemie a chemické technologie (B2801)     |                                  |
| Studijní obor:          | Chemie pro medicínské aplikace (2808R031) |                                  |
| Vedoucí práce           | <b>Ing. Martin Chytil, Ph.D.</b>          |                                  |
| Konzultanti:            |   |                                  |

### Název bakalářské práce:

Dynamický rozptyl světla a elektroanalytické metody ve studiu systémů hyaluronanu a aminokyselin

### Zadání bakalářské práce:

Využití metody dynamického rozptylu světla ve studiu interakcí hyaluronanu a protonizovaných aminokyselin lysinu a argininu a stanovení velikosti vznikajících útvarů.

Zavedení konduktometrických a acidobazických titrací ve studiu interakcí hyaluronanu a aminokyselin. Vyhodnocení výsledků a zhodnocení použitelnosti titrací.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 23.5.2014

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

-----  
Johana Babrnáková  
Student(ka)

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

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

V Brně, dne 31.1.2014

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

## ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá studiem interakcí mezi polysacharidem hyaluronanem (HA) o nízké a vysoké molekulové hmotnosti a protonizovanými amfifilními aminokyselinami lysinem a argininem. Interakce byly pozorovány v oblasti nízkých koncentrací v koncentračním rozmezí lysinu a argininu  $0\text{--}15\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . K interakcím dochází mezi karboxylovou skupinou HA a aminoskupinou protonizované aminokyseliny. Prokázání těchto interakcí by umožnilo fyzikální modifikaci HA a následné využití jako cíleného nosiče léčiv.

Byla zkoumána odolnost vůči iontové síle o koncentraci  $0,015$  a  $0,15\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  NaCl. Z předešlých výsledků vyplývá, že systém s neprotonizovanými aminokyselinami se rozpadá již při nízkých koncentracích elektrolytu v roztoku. Interakce proto byly posíleny protonizací aminokyselin pomocí kyseliny chlorovodíkové. Pro negativní vliv chloridových aniontů byly aminokyseliny oproti úplné protonizaci protonizovány také do pH roztoku HA. K výzkumu interakcí byly použity metody měření pH, měření vodivosti a dynamického rozptylu světla.

## ABSTRACT

The bachelor thesis deals with interactions between low-molecular and high-molecular weight hyaluronic acid (HA) and protonized amphiphilic amino acids Lysine and Arginine. The interactions were observed in the area of low aminoacids concentrations with in the range  $0\text{--}15\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . The interactions occur between the carboxyl groups of HA and the amino group of the protonated amino acids. Proving these interactions would allow us to physically modify HA and further more, use such a system as a carrier of pharmaceuticals.

The resistance towards the ionic strength at the concentration of  $0,015$  and  $0,15\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  NaCl was investigated. Previous results show that the system with unprotonated amino acids at low concentrations of electrolyte in the solution is rather disturbing. Therefore, the interactions were reinforced by the aminoacids protonation using HCl. The amino acids were protonated not only completely, but also partly because of negative influence of chloride anions. To study the interactions pH-metry, conductance and Dynamic Light Scattering were used.

## KLÍČOVÁ SLOVA

hyaluronan, amfifil, lysin, arginin, interakce, iontová síla, DLS, konduktometrie

## KEY WORDS

hyaluronan, amphiphile, lysine, arginine, interactions, ionic strength, DLS, conductimetry

BABRNÁKOVÁ, J. *Dynamický rozptyl světla a elektroanalytické metody ve studiu systémů hyaluronanu a aminokyselin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 55 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Martin Chytil, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

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

.....  
podpis studenta

Děkuji Centru materiálového výzkumu na Fakultě chemické za poskytnutí všeho pro realizaci studia interakcí, svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Martinu Chytilovi, Ph.D. za motivaci, rady a ochotu a Ing. Michalovi Kalinovi za pomoc při zvládnutí měření na přístroji Zetasizer Nano.



## OBSAH

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | ÚVOD .....  | 7  |
| 2     | TEORETICKÁ ČÁST.....  | 8  |
| 2.1   | Kyselina hyaluronová .....  | 8  |
| 2.1.1 | Úvod .....  | 8  |
| 2.1.2 | Struktura HA.....   | 8  |
| 2.1.3 | Výskyt a úloha HA v organismu .....   | 10 |
| 2.1.4 | Výroba a současné využití HA .....  | 10 |
| 2.2   | Interakce kyseliny hyaluronové s nabitými molekulami .....  | 11 |
| 2.2.1 | Interakce HA s amfifily .....   | 12 |
| 2.3   | Aminokyseliny .....   | 16 |
| 2.3.1 | Lysin .....   | 16 |
| 2.3.2 | Arginin.....  | 17 |
| 2.4   | Metody studia interakcí.....  | 17 |
| 2.4.1 | pH-metrie.....  | 17 |
| 2.4.2 | Konduktometrie .....  | 19 |
| 2.4.3 | Optické vlastnosti disperzních systémů.....   | 21 |
| 2.4.4 | Dynamický rozptyl světla.....   | 23 |
| 3     | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....  | 27 |
| 3.1   | Materiály k přípravě roztoků.....   | 27 |
| 3.2   | Příprava vzorků .....   | 27 |
| 3.2.1 | Protonizace aminokyselin.....   | 27 |
| 3.2.2 | Příprava vzorků na titrace.....   | 30 |
| 3.2.3 | Příprava vzorků na měření velikosti částic.....   | 30 |
| 3.3   | Měření a vyhodnocení.....   | 31 |
| 3.3.1 | Acidobazické a konduktometrické titrace .....   | 31 |
| 3.3.2 | Dynamický rozptyl světla.....   | 31 |
| 4     | VÝSLEDKY A DISKUZE .....  | 33 |
| 4.1   | Acidobazické a konduktometrické titrace.....  | 33 |
| 4.1.1 | Vliv zvýšení koncentrace elektrolytu na $0,015 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .... | 33 |
| 4.1.2 | Vliv částečné a úplné protonizace lysinu .....  | 37 |
| 4.1.3 | Vliv použití argininu a lysinu a vliv molekulové hmotnosti HA .....   | 38 |
| 4.2   | Výsledky z měření DLS.....  | 40 |

|   |   |    |
|---|---|----|
| 5 | ZÁVĚR.....                              | 47 |
| 6 | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....          | 48 |
| 7 | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ..... | 52 |
| 8 | PŘÍLOHY.....                            | 53 |

# 1 ÚVOD

Ještě na začátku 20. století vědci netušili o existenci přírodního polysacharidu, kyseliny hyaluronové, která se nachází ve všech obratlovcích živočišné říše. Teprve roku 1934 byl tento polysacharid popsán a dále zkoumán. Bylo zjištěno, že kyselina hyaluronová díky své struktuře zajišťuje ve tkáních viskoelasticitu, je biologicky aktivní a je schopna vázat vodu. Protože se jená o látku tělu vlastní, započal následně výzkum kyseliny hyaluronové pro použití v kosmetice a medicíně. Nyní se již setkáváme s mnohými produkty, jež kyselinu hyaluronovou obsahují, jako např. pleťové krémy, oční a nosní kapky, přípravky na hojení ran, atd.

Na základě polyelektrolytického charakteru a biodegradability hyaluronanu bylo navrženo, že by se mohl hyaluronan stát vhodným nosičem pro cílenou distribuci léčiv. Rakovinové buňky v sobě obsahují velkou koncentraci kyseliny hyaluronové díky zvýšené míře buněčného receptoru CD44, který na sebe váže HA z mezibuněčné hmoty. Samotný hyaluronan není schopen léčivo na sebe navázat, proto bylo zkoumáno mnoho látek, které by hyaluronan účelně modifikovaly. Za vhodné mezivazebné molekuly mezi hyaluronanem a léčivem byly uvažovány amfifily. Nejdříve se výzkum ubíral studováním interakcí především kationických tenzidů. Pokračováním výzkumu bylo studium interakcí mezi hyaluronanem a amfifilními aminokyselinami. Tyto aminokyseliny mají nejen podobnou strukturu jako kationické tenzidy, ale také jsou tělu vlastní, tedy zcela biokompatibilní. Výsledky mnohých prací potvrzují existenci těchto interakcí. Zkoumání mohlo zkomplikovat zvýšení iontové síly v systému na koncentraci fyziologického roztoku, kdy se interakce hyaluronanu a amfifilní aminokyseliny vytrácí. Nosiče tedy musí být schopny odolávat iontové síle nacházející se v krevní plazmě, což odpovídá koncentraci solí  $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Jako řešení se naskytla možnost protonizace aminokyselin, po níž byly interakce ve fyziologickém roztoku opět pozorovatelné. Pro eliminaci přebytku chloridových aniontů v systému bylo použito metody lyofilizace nebo částečné protonizace aminokyselin do hodnoty pH naměřené pro samotnou kyselinu hyaluronovou.

Cílem této práce je prostudování interakcí mezi nízkomolekulovou nebo vysokomolekulovou kyselinou hyaluronovou a protonizovanými aminokyselinami lysinem a argininem. Byl zkoumán vliv úplné a částečné protonizace aminokyseliny, použití nízkomolekulového a vysokomolekulového hyaluronanu a vliv iontové síly v prostředí o koncentraci  $0,015$  a  $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

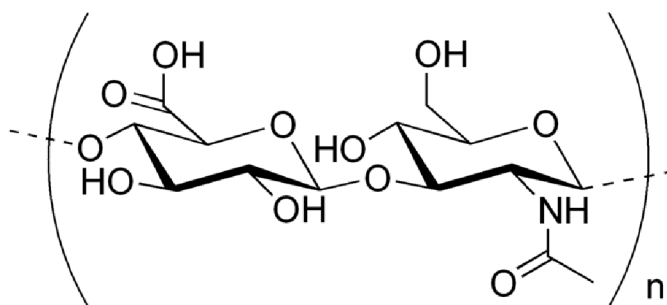
## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Kyselina hyaluronová

#### 2.1.1 Úvod

Kyselina hyaluronová (HA) je přírodní polyanionický polysacharid ze skupiny glukosaminoglykanů přítomný v mezibuněčné hmotě pojivových tkání většiny obratlovců. Opakující se disacharidická jednotka se skládá z monosacharidu kyseliny glukuronové, která je glykosidickou vazbou  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) spojena s dalším monosacharidem N-acetylglukosaminem. Jednotlivé disacharidické jednotky jsou pospojovány v polymer glykosidickými vazbami  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Počet těchto podjednotek se může pohybovat ve stovkách až deseti milionech, přičemž jedna disacharidová jednotka má přibližně molekulovou hmotnost 400 Da ( $1 \text{ Da} \approx 1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) a její průměrná délka je kolem 1 nm [1], [2].

Glukuronová kyselina obsahuje ve své struktuře karboxylovou skupinu o pKa 3–4 závisící na iontových podmínkách rozpouštědla. Karboxylová skupina je tedy při neutrálním pH disociovaná, z tohoto důvodu se HA v živém organismu převážně vyskytuje ve formě své sodné soli, tedy hyaluronanu sodného, proto je tato makromolekula spíše nazývána jako „hyaluronan“ [3]. Za objevitele HA jsou považováni německý chemik Karl Meyer a jeho asistent Američan John Palmer. V roce 1934 společně izolovali HA z očního sklivce skotu [4].



Obrázek 1: Struktura disacharidové jednotky HA.

#### 2.1.2 Struktura HA

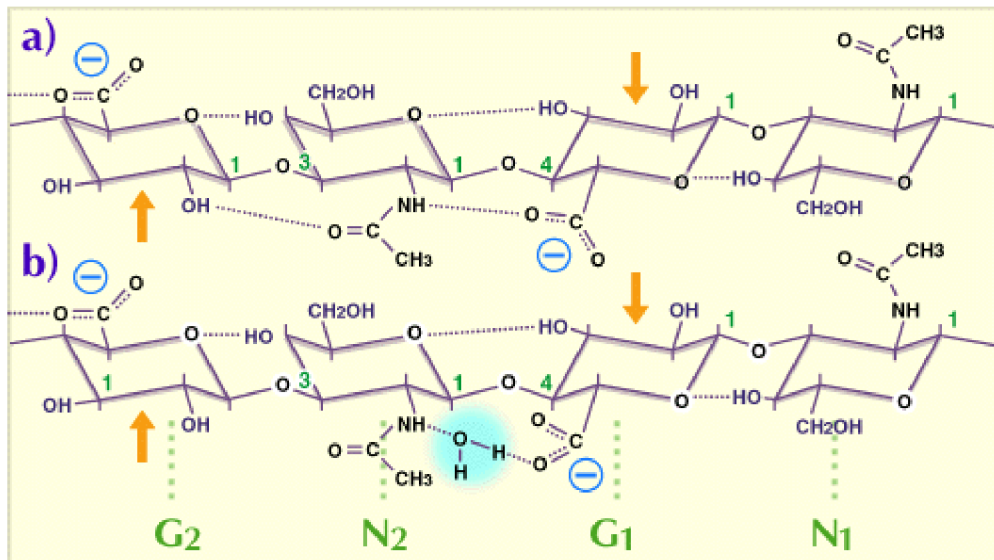
Struktura HA v roztoku je určena strukturou disacharidové jednotky, vnitřními vodíkovými můstky, elektrostatickými odpuzivými silami mezi karboxyly a interakcí HA s rozpouštědlem. Dosud se nepodařilo jednoznačně určit konformaci HA v roztoku, přestože je struktura HA poměrně jednoduchá.

V hlavním řetězci se vyskytují dva hlavní druhy vazeb. Kovalentně se váží pyranosové kruhy glykosidickou vazbou, kde atom kyslíku váže dohromady jednotlivé sacharidové jednotky [5], [6].

Druhým typem vazeb a tím i stabilizujícím prvkem celé molekuly je vznik vodíkových můstků mezi vodíky z hydroxylových skupin a volnými elektronovými páry kyslíku v pyranosovém cyklu či v karboxylových skupinách. Na každý mer uvnitř řetězce tak připadají čtyři vodíkové můstky.

V nevodném prostředí (nepolární charakter) vznikají vazby výhradně vodíkové.

Ve vodných roztocích dochází k nevazebné interakci hyaluronanu se samotnou vodou, kdy do dřívějších vodíkových můstků vstupuje molekula vody a představuje tak spojovací články ve vazbě mezi vodíkovým a kyslíkovým atomem HA, vznikají tedy tzv. vodné můstky. Tato vlastnost činí z HA silně hygroskopickou látku. Vlivem rozdílné polarizace polysacharidového řetězce dochází ve vodných roztocích k přeskupení jeho struktury.



Obrázek 2: Vodíkové můstky mezi kyselinou D-glukuronovou (G) a N-acetyl-D-glukosaminem (N) naznačené tečkovanými čarami a) v nevodném prostředí; b) ve vodném prostředí s naznačeným vodným můstkem [2].

Axiální atomy vodíku tvoří nepolární, hydrofobní oblast a naopak ekvatoriální skupiny (-OH a -COOH) tvoří polární, hydrofilní oblast. Makromolekula hyaluronanu se stáčí do levotočivé šroubovice (helix), kde je nepolární část orientovaná dovnitř a polární vně do prostředí s rozpouštědlem a samotná šroubovice je ještě dále několikrát zahnutá. Sekundární strukturou HA v polárním rozpouštědle je tzv. *dvouhybový helix* (strukturu tvoří pouze jeden řetězec) [5], [7], [8].

Kyselina hyaluronová může díky své polymerní struktuře nabývat širokého rozmezí molekulových hmotností v návaznosti na velikost svého polymeračního stupně. Počet propojených základních jednotek (merů) nabývá v přirozeném stavu hodnot  $10^2$  až  $10^4$  a molekulová hmotnost tak může dosáhnout až 4 milionů Da. Veliká variabilita v počtu jednotek v jednom řetězci způsobuje odlišné vlastnosti kyseliny hyaluronové o různé molekulové hmotnosti [2], [8], [9].

Konformace polyelektrolytů, mezi které patří také HA, je dána stupněm disociace, solvatací a mírou hydrofobních interakcí. Důležitým faktorem jsou elektrostatické interakce, jak mezi jednotlivými řetězci navzájem, tak i mezi řetězcem a disperzním prostředím, obzvláště pokud se jedná o roztok nízkomolekulárního elektrolytu. Konformace řetězce HA je tak dána chováním hlavního řetězce polyelektrolytu (délka či modifikace řetězce), tak i interakcemi s částicemi rozpouštědla [13].

Molekuly HA se seskupují v roztoku do nahodilých svinutých struktur a klubek, tzv. *hydrodynamických domén*, které při vysoké molekulové hmotnosti HA  $> 1$ MDa zabírají

velký hydrodynamický objem. Při nízkých koncentracích se domény vyskytují v roztoku izolovaně. S postupně zvyšující se koncentrací HA v roztoku roste jak počet domén, tak i jejich velikost a při kritické koncentraci dojde k dotyku jednotlivých domén v roztoku, molekuly HA se začnou vzájemně zaplétat do sebe. Čím vyšší molekulové hmotnosti a koncentrace HA dosahuje, tím vyšší je její viskozita i viskoelasticita. Vysokomolekulární HA zajišťuje mechanickou odolnost a viskoelasticitu, nízkomolekulární HA je v organismu využívána převážně k transportu vody a je přítomna při různých buněčných procesech [2], [5].

Doménová struktura hyaluronanu má za následek, že malé molekuly, jako je voda, elektrolyty a živiny mohou volně difundovat skrz rozpouštědlo. Velké molekuly (bílkoviny) jsou však částečně vypuzovány z roztoku v důsledku jejich hydrodynamické velikosti v roztoku. Síť molekuly hyaluronanu poskytuje méně prostoru pro velké molekuly, což vede k pomalejší difúzi makromolekul uvnitř sítě. Zapletení řetězců naznačuje možné gelové chování roztoku, nedochází ale ke stabilním mezimolekulárním interakcím a zapletené řetězce jsou stále pohyblivé. Spojení řetězců v doménách tedy není stálé a velice flexibilně vzniká a zaniká, proto velikost efektivních pórů se tedy neustále mění. Z tohoto důvodu mohou projít sítí hyaluronanu v zásadě všechny molekuly, jsou ovšem zpomalovány v závislosti na jejich hydrodynamickém objemu [2].

### 2.1.3 Výskyt a úloha HA v organismu

HA se vyskytuje u obratlovců prakticky ve všech tkáních, a to ve dvou podobách. Je rozšířenou komponentou extracelulární matrix tkání jako její organizátor a volný působí jako humektant (kůže), lubrikant (větší klouby) či látka udržující tvar (oční bulva) nebo jako složka výplňové hmoty (pupeční šňůra) některých orgánů. V lidském těle tvoří důležitou složku očního sklivce, synoviální tekutiny v kloubech, nebo buněk v děloze před ovulací. Hyaluronan je ve vysokých koncentracích zastoupen v kůži (7–8 g na dospělého člověka), což tvoří 50 % veškerého množství. Nejvyšší koncentrace hyaluronanu v lidském těle se nachází v pupeční šňůře ( $4 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). V těle rostlin se HA nevyskytuje [1], [2], [3].

Hyaluronan při vysoké koncentraci vytváří zapletenou síť řetězců a vykazuje viskoelastické vlastnosti, které závisí nejen na jeho koncentraci, ale hlavně molekulové hmotnosti v roztoku. Jeho úloha v organismu je tedy silně závislá na molekulové hmotnosti. Vysokomolekulární hyaluronan nejeví prakticky žádnou biologickou aktivitu ve smyslu regulace pochodů v organismu nebo regulace buněk a slouží hlavně jako strukturní a organizační jednotka, která zajišťuje mechanickou odolnost a viskoelasticitu např. v chrupavce, kloubní tekutině či v očním sklivci. Naproti tomu hyaluronan s nízkou nebo velmi nízkou molekulovou hmotností (obecně platí s molekulovou hmotností kolem 100 kDa a nižší) má vliv na různé pochody v tkáních a buňkách, přičemž bylo prokázáno, že čím nižší je molekulová hmotnost, tím vyšší je biologická aktivita. Váže se na proteiny v mimobuněčném matrixu a na povrchy buněk, kde je součástí receptorů pro mnoho buněčných procesů. HA se také podílí na kontrole transportu vody v tkáních [1], [10].

### 2.1.4 Výroba a současné využití HA

Prvními zdroji hyaluronanu byly živočišné tkáně s přirozeně vysokou koncentrací této látky a proto byl také roku 1934 poprvé izolován z očního sklivce skotu. Největší koncentrace

se nachází především v pokožce, chrupavkách a dalších visko-elastických měkkých tělních tkáních [11].

Průmyslová výroba hyaluronanu je dnes založená zejména na fermentačním způsobu. Získává se pomocí biosyntézy některých bakterií *Streptococcus*. Pro produkci nižších molekulových hmotností se používají bakterie *Streptococcus equi*, naopak molekulové hmotnosti blíží se 2 MDa lze získat pomocí bakterie *Streptococcus zooepidemicus*. V České republice je HA vyráběna společností Contipro Group s.r.o., která sídlí v Dolní Dobrouči [6].

V současné době je hyaluronan široce využíván v oční chirurgii, v revmatologii, v léčbě hojení ran a v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Velkou výhodou je jeho netoxičita a také biodegradabilita. Hyaluronan je tělu zcela vlastní látka, takže nehrozí riziko vzniku zánětu nebo podráždění, tak jako u syntetických preparátů [9].

Kyselina hyaluronová je hlavní složkou sklivce oka, a proto se používá v řadě očních operací, kde díky svým viskoelastickým vlastnostem chrání jemné oční tkáně a poskytuje prostor při chirurgických zákrocích. Její další možné použití je ve formě očních kapek, které přirozeně zvlhčují povrch oka a také ve formě nosních kapek zvlhčujících nosní sliznici [25].

Velké uplatnění nachází kyselina hyaluronová v kosmetickém průmyslu. S rostoucím věkem dochází k úbytku HA v lidské pokožce, proto bývá častou složkou např. v krémech proti vráskám, v přípravcích na holení, v pleťové vodě, v přípravcích po opalování, proti vypadávání vlasů či bývá dokonce využívána jako plnivo při plastických operacích. Mezi další možnosti využití patří hojení a regenerace pooperačních a kožních ran. Pro hojení ran se komerčně používá biomateriál HYAFF<sup>®</sup>, dalším přípravkem je *Hyodine*<sup>®</sup>, který se skládá z hyaluronanu sodného, jodidu draselného a jódu. Hyaluronan splňuje řadu potřebných vlastností, hraje důležitou roli při tvorbě chrupavky a reguluje kondenzaci mezenchymálních buněk. Hyaluronan nachází uplatnění také v léčbě osteoartritidy kolenního kloubu. Při kloubních zánětech je schopen na sebe vázat vodu a proteiny a ulehčovat tak pohyb kloubů či tlumit nárazy při pohybu [26], [27].

Nejnovějším směrem výzkumu HA je jeho použití jako potencionálního nosiče bioaktivních látek, který by zaručil cílenou distribuci léčiv do rakovinotvorných buněk v těle pacienta a uvolnění léčiva na postiženém místě. Rakovinové buňky v sobě obsahují velkou koncentraci kyseliny hyaluronové díky zvýšené míře receptoru CD44, který na sebe váže HA z mezibuněčné hmoty a využívá se zde velkého počtu interakcí s tímto receptorem [28].

## **2.2 Interakce kyseliny hyaluronové s nabitými molekulami**

Důležitý výzkum, který se týká kyseliny hyaluronové, se zabývá jejími interakcemi s dalšími látkami pro její stabilitu v roztocích, netoxičitu a přirozenou přítomnost v lidském těle. Jako navázané látky je uvažována skupina léčiv, které by bylo možné prostřednictvím kyseliny hyaluronové transportovat cíleně na místo jejich požadovaného působení. Protože molekula kyseliny hyaluronové neposkytuje ve své přirozené formě vhodné vlastnosti pro přímé navázání léčiva, je nutno ji modifikovat [12]. Chemickou modifikací dochází k přípravě derivátu HA tak, aby byly zachovány výhodné vlastnosti hyaluronanu jako je rozpustnost, biodegradabilita nebo přístupná aminoskupina na *N*-acetylglukosaminu.

Další možností je fyzikální modifikace HA navázáním jiných postranních molekul na řetězec makromolekuly pomocí nevazebných interakcí. HA je lineární polymer rozpustný ve vodě, kde tvoří viskoelastické roztoky a obsahuje v celé délce řetězce vazebně záporně nabitě karboxylové skupiny  $-\text{COO}^-$  schopné interagovat již zmiňovanou nevazebnou fyzikální interakcí za pomoci *Coulombických sil* s dalšími kladně nabitými amfifilními látkami [11], [12].

Látky jsou k sobě poutány elektrickou silou  $F_e$ , která se řídí *Coulombovým zákonem*:

$$F_e = \frac{1}{4\pi \cdot \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r} \cdot \frac{|Q_1| \cdot |Q_2|}{r^2}, \quad (1)$$

kde  $\varepsilon_0$  je permitivita vakua,  $\varepsilon_r$  je relativní permitivita daného prostředí,  $Q_1$  a  $Q_2$  jsou velikosti nábojů a  $r$  je vzdálenost nábojů [14].

Takto navázaná amfifilní látka, která je schopna interagovat s nějakou bioaktivní látkou a zároveň je vázaná na HA, vytváří pak komplex, jež jako celek je nosič dané látky a umožňuje její transport v lidském těle.

### 2.2.1 Interakce HA s amfifily

Jako mezivazebná sloučenina uvažovaná k propojení molekul léčiv a řetězce kyseliny hyaluronové byly studovány amfifily, jako jsou kationaktivní tenzidy a amfifilní aminokyseliny.

Amfifilní látka vykazuje dvojitou afinitu, což znamená, že se skládá z polární a nepolární části. Polární skupina na jedné straně obsahuje heteroatomy jako O, S, P, N, zabudované do funkčních skupin (alkoholy, thiooly, estery, ethery, kyseliny, sulfáty, fosfáty aj.). Na druhé straně se nachází nepolární skupina, což je obecně uhlovodíkový řetězec alkylového nebo alkylbenzenového typu. Polární část vykazuje silnou afinitu pro polární rozpouštědla, jako je např. voda, nazývá se tedy hydrofilní. Apolární část se označuje jako hydrofobní, nebo také lipofilní [16].

Nízkomolekulární amfifily (př. tenzidy či amfifilní aminokyseliny) se mohou pomocí elektrostatických nebo hydrofobních interakcí adsorbovat na polyelektrolyt a tím změnit jeho konformaci, tudíž i jeho fyzikální vlastnosti. Molekuly se nekovalentně váží karboxylovými skupinami hyaluronanu a heteroatomem, jenž nese kladný náboj.

Interakcemi v systému se změní konformace klubka HA a dochází ke kontrakci *hydrodynamického objemu* a následnému snížení viskozity roztoku. Viskozita roztoku HA klesá, protože dochází díky elektrostatickým interakcím k odstínění vnitřních odpudivých sil, které drží řetězec klubka od sebe a mají za následek velký hydrodynamický objem domény HA [15].

#### 2.2.1.1 Interakce HA s tenzidy

Výzkum interakcí v systému HA-amfifilní aminokyseliny vychází ze znalostí, které byly získány studováním elektrostatických interakcí HA s jinými amfifily, především kationaktivními tenzidy.

Tenzidy jsou obecně organické sloučeniny, které se řadí do skupiny *povrchově aktivních látek*. Samovolně se koncentrují na fázovém rozhraní, kde snižují povrchovou nebo



mezifázovou energii, díky čemuž usnadňují rozpouštění i málo rozpustných látek jako jsou např. léčiva. Podle schopnosti disociovat ve vodném roztoku se tyto látky dělí na ionogenní (anionaktivní, kationaktivní, amfoterní) a neionogenní. Neionogenní tenzidy nedisociují, nemají výrazně lokalizovaný náboj, hydrofilní skupiny a polární část je zde tvořena například větším počtem kyslíkových atomů v molekule. Ionogenní tenzidy ve vodě disociují, tím vzniká povrchově aktivní iont. U amfoterních povrchově aktivních látek závisí náboj aktivního iontu na pH roztoku. U kationaktivních tenzidů vzniká disociací povrchově aktivní kation. Anionaktivní tenzidy disociují za vzniku povrchově aktivních aniontů a patří sem hlavně alkalické soli vyšších mastných kyselin [17].

Mezi významné vlastnosti tenzidu patří schopnost agregovat ve vodných roztocích do útvarů zvaných *micely*. K formování micel dochází po překročení určité koncentrace tenzidu v roztoku. Takto koncentrace, při které je povrch nasycen molekulami tenzidu, se nazývá kritická micelární koncentrace (CMC). Micely jsou shluky molekul tenzidu, které tvoří většinou kulovité tvary, mohou se ale vytvářet i válce či dvojvrstvy. Tvar micely závisí zejména na struktuře molekuly tenzidu, případně i koncentraci. Podle druhu rozpouštědla se odvíjí uspořádání molekuly tenzidu v micelle. V polárním rozpouštědle (např. vodě) jsou molekuly tenzidu organizovány tak, že hydrofilní polární hlava je na povrchu agregátu a hydrofobní nepolární řetězec je uvnitř agregátu. Celá micela je tak ve vodě rozpustná a v jejím hydrofobním jádře se mohou rozpustit sloučeniny ve vodě nerozpustné. V nepolárním rozpouštědle (např. benzenu) jsou hydrofilní části molekuly ukryty v nitru micely a hydrofobní alkylové řetězce směřují z micely do rozpouštědla [13], [15].

Micelizace povrchově aktivní látky by měla začít, když se zastaví prudký pokles povrchového napětí se zvyšující se koncentrací povrchově aktivní látky. Měření povrchového napětí v podstatě zjišťuje akumulaci tenzidu na povrchu kapaliny (adsorpce). Měření s roztoky hyaluronanu nepotvrdily povrchovou aktivitu hyaluronanu až do koncentrace  $2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ , která je v souladu se zjištěními Riberio et al. [18]. V této studii všechny naměřené údaje pro závislosti povrchového napětí na koncentraci povrchově aktivní látky ve fyziologickém roztoku neprokázaly žádný nebo malý vliv hyaluronanu (jakékoli molekulové hmotnosti) na povrchovou aktivitu, a to zejména na micelizaci, tj. hodnota kritické micelární koncentrace zjištěná podle tensiometrie není prakticky ovlivněna přítomností hyaluronanových řetězců [19].

### ***Interakce s kationickými tenzidy***

Kationaktivní tenzidy jsou většinou kvartérní amoniové soli, které se od aminokyselin odlišují zejména tím, že neobsahují žádnou karboxylovou skupinu a na atomu dusíku mají kladný náboj. Aminokyseliny stejně jako tezidy obsahují na konci řetězce aminoskupinu, jejíž protonizace je závislá na  $pK_b$  a pH roztoku dané aminokyseliny, takže permanentního kladného náboje na dusíku lze dosáhnout protonizací aminokyseliny (snížením pH roztoku). Vlastnosti tenzidů a aminokyselin se tedy mohou za jistých podmínek podobat [20].

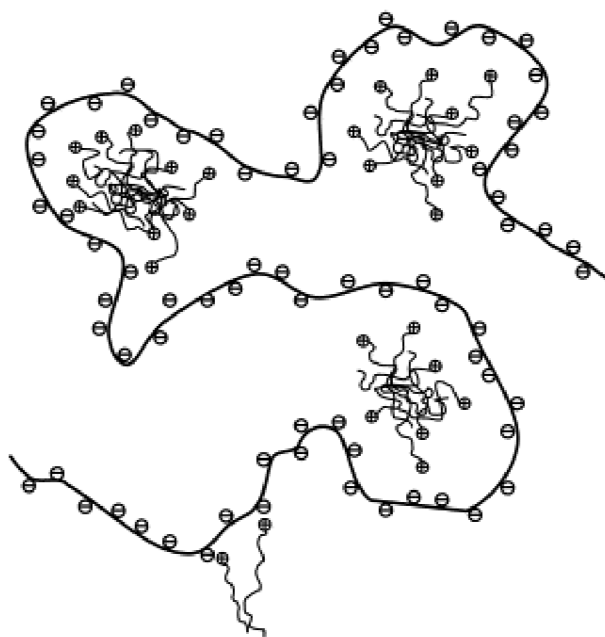
Interakce mezi hyaluronanem a trimethylalkylamonium bromidem s různou délkou řetězce alkyly byly zkoumány pomocí různých metod, jejichž výsledky ukazují, že vazba na povrch hyaluronanu probíhá u povrchově aktivních látek s 10 či více uhlíky v alkylovém řetězci. Interakce probíhá mezi karboxylovými skupinami hyaluronanu a dusíkovým atomem, jenž

nese kladný náboj. Vazba je však podstatně slabší než u ostatních karboxylátových polyelektrolytů vzhledem k nízké lineární hustotě náboje na povrchu hyaluronanu.

Hyaluronan vyvolává agregaci ve vodných roztocích TTAB (Tetradekyltrimethylammonium bromide) při nižších koncentracích, než je CMC, což je vysvětleno kooperativní vazbou tenzidu na řetězec biopolymeru a formování agregátů vypadajícími jako micely. Je známo, že soli tyto interakce potlačují. Přidaná sůl patrně zcela stíní interakce a vznikající agregáty jsou samostatné micely TTAB v solném roztoku. Při koncentraci nižší než CMC tenzidu nebylo pozorováno rozpouštění ve fyziologickém roztoku.

Interakce mezi hyaluronanem a CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) jsou demonstrovány zvýšením CMC a rozšířením micelizační oblasti, zejména v případě přidavku hyaluronanu s vysokou molekulovou hmotností.

Agregace CTAB ve srovnání s TTAB je mnohem více ovlivněna přítomností hyaluronanu, což může být připsáno delšímu alkylovému řetězci tenzidu. Zvýšená CMC CTAB v přítomnosti hyaluronanu je způsobena silnějšími hydrofobními interakcemi mezi cetylalkoholovými řetězci a hydrofobními místy na kostře hyaluronanu. Hydrofobně vázané molekuly tenzidu se pak nemohou podílet na tvorbě micel [17], [19].



Obrázek 3: Elektrostatické vazby v komplexech polyelektrolyt-tenzid [48].

### 2.2.1.2 Interakce HA s aminokyselinami

Aminokyseliny jsou uvažovány jako modifikační sloučenina z důvodu jejich biokompatibility a praktického použití v medicíně. Jak již bylo výše zmíněno, vhodnými sloučeninami pro modifikaci hyaluronanu jako nosiče jsou amfifily, tedy v případě aminokyselin jsou to např. lysin, arginin, kyselina 6-aminokapronová.

Při studiu interakcí mezi HA s aminokyselinami v prostředí s různou iontovou silou bylo zjištěno, že iontová síla má zásadní vliv na stabilitu systému HA-aminokyselina. Elektrostatické interakce mezi karboxylovou skupinou na HA a aminoskupinami na aminokyselinách nejsou dostatečně silné, aby odolaly větší iontové síle roztoku.

Protonizací se zajistí na aminokyselině permanentní kladný náboj, takže takto připravený systém je poté dostatečně stabilní pro použití v krevním řečišti, kde iontová síla má sílu roztoku o koncentraci elektrolytu  $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Posílení interakcí bylo prokázáno pomocí reometrie, kdy relativní viskozita směsí klesala v některých případech z původní hodnoty až na polovinu. K nejvýraznějšímu posílení interakcí došlo u směsi s lysinem a argininem. Aminokapronová kyselina má ve své struktuře pouze jednu aminoskupinu a izoelektrický bod aminokyseliny je 7,25, proto nebylo posílení interakcí tak markantní [49].

Zkoumáním systému vysokomolekulární kyseliny hyaluronové a amfifilních protonizovaných kyselin, jež byly zastoupeny lysinem a kyselinou 6-aminokapronovou, byly z výsledků získaných reometrickým a konduktometrickým měřením potvrzeny interakce mezi protonizovanými aminokyselinami a kyselinou hyaluronovou. Největší míra interakcí byla pozorována při koncentracích aminokyselin  $0,9\text{--}10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , kdy byl pozorován pokles relativní vodivosti a relativní limitní viskozity. Od koncentrací  $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  u lysinu již nedochází k dalším interakcím, což je zapříčiněno nasycením karboxylových skupin na hyaluronanu molekulami protonizovaných aminokyselin. V případě interakcí hyaluronanu s kyselinou 6-aminokapronovou je patrný soustavný pokles relativní limitní viskozity i při koncentracích  $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , což je nejspíš dáno přítomností pouze jedné protonizované aminoskupiny oproti dvěma skupinám u lysinu [50].

Navázáním na Zemana potvrdila Marcela Šimáčková interakce vysokomolekulárního hyaluronanu s amfifilními protonizovanými aminokyselinami, která podrobněji proměřovala interakce mezi vysokomolekulovou HA (1,75 MDa) a protonizovanými aminokyselinami, lysinem a 6-aminokapronovou kyselinou, v extrémních koncentracích [51].

Dalším pokračováním studia interakcí protonizovaných amfifilních aminokyselin s HA představuje práce Jany Chlumské. Interakce dále studovala měřením velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla. Měření velikosti částic pomocí dynamického rozptylu světla bylo provedeno u koncentrační řady lysinu bez přídavku nízkomolekulárního elektrolytu, koncentrační řady lysinu, který byl protonizován pouze do pH 0,25 % hm. HA, koncentračních řad s přídavkem NaCl – HA s protonizovaným lysinem a  $15 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  NaCl a HA s lysinem protonizovaným do pH 0,1 % hm. HA a  $15 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Ve všech případech je patrný rostoucí trend velikosti částic s přídavkem protonizovaného lysinu. Dle intenzity je možno pozorovat v roztocích vždy dva píky o různé velikosti částic, v roztoku tedy vznikají i větší agregáty [52].

Pomocí dynamického rozptylu světla a kryogenní transmisní elektronové mikroskopie byl sledován vznik komplexů kyseliny hyaluronové v prostředí polyethylenglykolu s poly-L-lysinem. Jednotlivé vzorky se lišily velikostí řetězců. Pro účinný vznik komplexů byla nezbytná minimální molekulová hmotnost HA cca 9 kDa, při čemž bylo potřeba minimálně 5 kDa polyethylenglykolu, aby se zabránilo makroskopické agregaci. Nanokomplex je ve formě gelu, který velice bobtná po přídavku NaCl. Zvýšení iontové síly vede k narušení struktury gelu, avšak strukturu lze obnovit opětovným snížením iontové síly. Zesíťováním pomocí karbodiimidu získává gel velmi dobře definovanou strukturu a vysokou stabilitu vůči změnám iontové síly [21].

Vliv hyaluronanu na agregaci hydrofobních aminokyselin byl zkoumán fluorescenční studii. Gly-C<sub>12</sub> (Glycin) a Ser-C<sub>12</sub> (Serin) ukázaly ve výsledcích fluorescenční studie velmi podobné chování, a to jak ve vodě, tak i v 0,15 mol·dm<sup>-3</sup> NaCl, kdy pyrenová sonda potvrdila vznik hydrofobních domén nad určitou koncentrací alkyl-aminokyselin. Vliv přídavku hyaluronanu je závislý na složení rozpouštědla. Ve vodě hyaluronan snižuje kritickou micelární koncentraci podobným způsobem jako v roztoku s nízkomolekulárním elektrolytem, zatímco v 0,15 mol·dm<sup>-3</sup> NaCl v podstatě není pozorován žádný účinek. Pokles koncentrace povrchově aktivní látky, při které je pozorována agregace tenzidu lze přičíst standardnímu chování povrchově aktivních látek v přítomnosti opačně nabitých polyelektrolytů [22] – polyelektrolyt vyvolává agregaci tenzidu vazáním opačně nabitých molekul tenzidů na polyelektrolyt, agregace je tedy pozorována v nižší koncentraci, než je kritická micelární koncentrace tenzidu; tato nižší koncentrace se proto nazývá kritická agregační koncentrace. Molekulová hmotnost hyaluronanu má pouze mírné účinky – kritická agregační koncentrace je o něco nižší v přítomnosti vysoké molekulové hmotnosti přípravku.

V případě Asp-C<sub>8</sub> (Kyselina asparagová) ve vodě a v 0,15 mol·dm<sup>-3</sup> NaCl není CMC snížena přítomností elektrolytu, ale naopak je pozorován mírný nárůst v CMC. Hydrofobně modifikovaná kyselina asparagová je strukturálně odlišná od dvou výše uvedených derivátů aminokyselin, a to zejména v tom, že má dva hydrofobní řetězce, jejich délka je menší než v předchozích dvou případech. Tyto řetězce pravděpodobně zabraňují vzájemnému kontaktu nabitých polárních skupin, chrání před odpudivými interakcemi a v důsledku toho potlačují účinek přidané soli [22], [23].

V případě Glu-C<sub>10</sub> (Kyselina glutamová) nebyla zjištěna jeho agregace pyrenovou metodou, stejné hodnoty byly naměřeny ve vodě a 0,15 mol·dm<sup>-3</sup> NaCl v přítomnosti a nepřítomnosti hyaluronanu. Přestože je Glu-C<sub>10</sub> konstrukčně podobný Asp-C<sub>8</sub>, uspořádání alkylového řetězce v Glu-C<sub>10</sub> je pravděpodobně odlišné, brání shlukování do micelárních agregátů a snižuje rozpustnost [24].

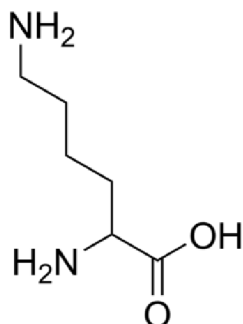
## 2.3 Aminokyseliny

### 2.3.1 Lysin

Lysin, systematickým názvem 2,6-diaminohexanová kyselina, obsahuje ve své struktuře dvě aminoskupiny, čímž se řadí mezi zásadité aminokyseliny. Jedna aminoskupina je vázána na primárním  $\alpha$ -uhlíku a druhá na  $\epsilon$ -uhlíku. Vyskytuje se ve dvou enantiomerech L a D, v bílkovinách pouze L-forma. Hodnota izoelektrického bodu pI je 9,59. Disociační konstanty lysinu pK při 25 °C jsou pK<sub>COOH</sub> = 2,20, pK<sub>NH2</sub> = 8,90 a pK <sub>$\epsilon$ -NH2</sub> = 10,28. V prostředí o pH nižším než je izoelektrický bod se tedy chová jako zásada, přijímá proton a dochází k tvorbě amonného kationtu, nad hodnotou izoelektrického bodu pak převládá tvorba karboxylových aniontů [29].

Lysin patří do skupiny esenciálních kódovaných aminokyselin, které si lidský organismus nedokáže sám syntetizovat, musí tak být přijímán samotný jako součást potravy. Je potřebný pro růst a produkci karnitinu, pomáhá snižovat hladinu cholesterolu, dále hraje důležitou úlohu při produkci kolagenu a pojivových tkání, včetně kůže, šlach a chrupavek a při metabolismu mastných kyselin. Anaerobní degradací v mrtvé tkáni je lysin dekarboxilován za tvorby pentan-1,5-diaminu, tzv. *mrtvolný jed*, což je jedovatá sloučenina

způsobující toxicitu tlejícího masa. Hlavním zdrojem lysinu v potravě je maso a masné výrobky. Z rostlinných poživatin lysin obsahují především sojové boby, fazole, hrách nebo arašídý. Lysin se vyrábí z 90% technologickými postupy pomocí mikroorganismů. Dnes je produkován výhradně pomocí bakteriální syntézy bakteriemi *Corynebacterium glutamicum* [30], [31].

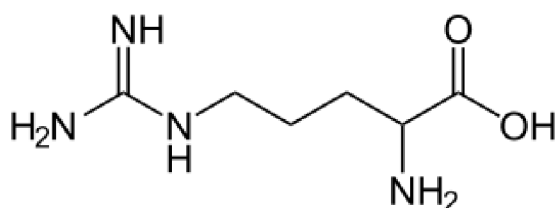


Obrázek 4: Molekula lysinu.

### 2.3.2 Arginin

Arginin, systematicky (2S)-2-amino-5-guadinovalerová kyselina, je semiesenciální kódovaná aminokyselina. V literatuře je arginin označován písmenem R nebo zkratkou Arg. Arginin patří mezi bazické aminokyseliny. Jeho bazicita převyšuje bazicitu lysinu a je způsobena přítomností *guanidinové skupiny* na konci řetězce. Disociační konstanty pK aminokyseliny při 25 °C jsou  $pK_{COOH} = 2,17$ ;  $pK_{NH_2} = 9,04$ ;  $pK_{E-NH_2} = 12,48$  a izoelektrický bod je roven 10,76.

Arginin patří do skupiny semiesenciálních kódovaných aminokyselin, v průběhu růstu jej tělo není schopno syntetizovat, avšak po většinu lidského života je to neesenciální aminokyselina, takže není nutno jej dodávat pomocí stravy. Největší množství argininu nalzáme v mléčných výrobcích (mléko, jogurty, tvaroh), v hovězím a vepřovém mase či v mořských plodech. Z rostlinné stravy se nejvíc vyskytuje v pšeničných klíčcích, pohance či ořeších. V lidském těle má funkci při hojení ran, buněčném dělení, kontrole močoviný v těle, uvolňování hormonů a je prekurzorem pro syntézu oxidu dusného [32], [33].



Obrázek 5: Molekula argininu.

## 2.4 Metody studia interakcí

### 2.4.1 pH-metrie

#### 2.4.1.1 Rovnovážná potenciometrie

Analyt je pomocí této analytické metody stanoven z rovnovážného napětí elektrochemického článku tvořeného indikační elektrodou ponořenou do analyzovaného

roztoku a referentní elektrodou spojenou s analyzovaným roztokem solným můstkem. Napětí je měřeno za podmínek, při nichž článkem neteče elektrický proud.

### 2.4.1.2 Měření pH

Nejpřesnější metodou pro stanovení pH je užití pH-metru (upravený voltmetr). Při měření pH se nezjišťuje koncentrace (aktivita)  $H^+$  iontů, z níž by bylo možno pH vypočítat z definiční rovnice,  $pH = -\log a(H^+)$ , ale porovnává se membránový potenciál dané elektrody (odezva elektrody) změřený v analyzovaném roztoku –  $E_M(x)$ , a v roztoku standardním o známé hodnotě pH –  $E_M(st)$ , měří se tedy elektrický potenciál mezi měrnou a referentní elektrodou na potenciometru.

$$pH = pH(st) - \frac{E_M(x) - E_M(st)}{0,059} \quad (2)$$

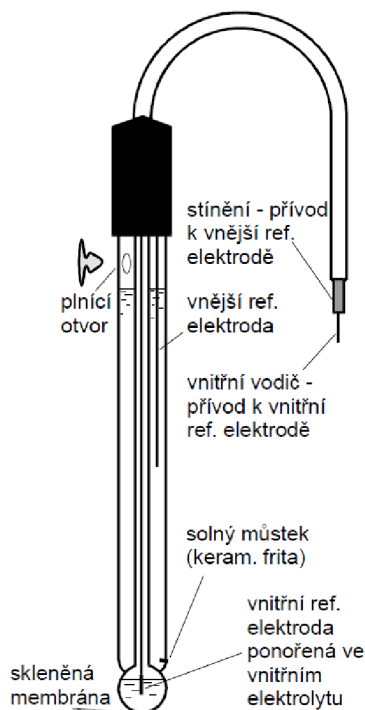
pH se měří pomocí měrné elektrody zapojené v článku s referenční elektrodou. Jako měrná elektroda je využívána skleněná elektroda, jako referentní se používají elektrody II. druhu, jejichž potenciál zůstává konstantní při změně prostředí. Nejčastěji se používá kalomelová nebo argentschloridová srovnávací elektroda. Argentschloridová elektroda je složena ze stříbrného drátku potaženého vrstvou AgCl, který je ponořený do nasyceného roztoku KCl. Elektroda je obalena skleněným pláštěm, ve kterém se nachází membrána citlivá na koncentraci oxoniových iontů v roztoku. Skleněná elektroda je tvořena křemičitanovou krystalovou mřížkou skla, na kterou se vážou elektrostatickými silami ionty vodíku a alkalických kovů. Při styku s roztokem se na povrchu vytváří solvatovaná vrstva, kde dochází k výměně vodíkových iontů mezi roztokem a sklem. Membránový potenciál skleněné elektrody vzniká jako rozdíl potenciálů na vnější a vnitřní stěně skleněné membrány [34], [35], [36].

Mezi kombinovanou skleněnou pH-elektrodou a okolním prostředím se v případě rovnováhy vyvine stálý elektrický potenciál, jenž je ovlivňován pouze změnou aktivity (koncentrace) vodíkových kationtů v roztoku KCl. Po ponoření elektrody do měřeného roztoku se na povrchu membrány, jež specificky reaguje na koncentraci  $H_3O^+$  iontů, začnou sorbovat a nebo desorbovat nabitě částice a v závislosti na tom se změní i stav rovnováhy na straně roztoku KCl. Tato změna pak vede ke změně elektrického potenciálu, z čehož lze určit velikost pH v měřeném roztoku. Závislost změny elektrického potenciálu na elektrodě je vyjádřena *Nernstovou rovnicí*:

$$E_{(AgCl/Ag)} = E_{(Ag^+/Ag)}^0 + \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln(a_{Ag^+}), \quad (3)$$

kde  $E_{(AgCl/Ag)}$  je výsledný potenciál argentschloridové elektrody,  $E_{(Ag^+/Ag)}^0$  je standardní elektrodový potenciál elektrody ustanovený mezi roztokem KCl a stříbrným drátkem, R je univerzální plynová konstanta, T je teplota roztoku v K a F je Faradayova konstanta [37], [38].

Před použitím pH-metrů k měření pH neznámého roztoku je nutno je kalibrovat. Kalibrační pufrů by měly být vybírány tak, aby pH neznámých roztoků bylo mezi hodnotami pH použitých kalibračních pufrů.



Obrázek 6: Kombinovaná skleněná pH elektroda [36].

### 2.4.1.3 Potenciometrické titrace

Potenciometrie je často používanou objektivní metodou zjišťování konečného bodu titrací měřením závislosti potenciálu vhodné indikační elektrody na objemu odměrného roztoku přidaného do titrovaného roztoku. Touto závislostí je sigmoidní titrační křivka, jejíž inflexní bod je zpravidla považován za bod ekvivalence. Přesně tomu tak je pouze v případě, že analyt a titrační činidlo reagují v molárním poměru 1:1. V mnoha případech, především při redoxních titracích, tomu tak často nebývá. Z praktického hlediska však rozdíl mezi spotřebou odečtenou v bodě ekvivalence a v bodě inflexu titrační křivky způsobuje zanedbatelnou titrační chybu, protože křivka je zde velmi strmá [36].

### 2.4.2 Konduktometrie

Konduktometrie je neselektivní elektroanalytická metoda, při níž se analyt stanovuje na základě měření elektrické vodivosti, charakterizující schopnost roztoku vést elektrický proud. Hlavními vodiči proudu v roztoku jsou ionty. Konduktometrie poskytuje informace o totálním obsahu látek v analyzovaném roztoku, protože na výše uvedených vlastnostech se podílí všechny látky v roztoku a příspěvek jednotlivých komponent nelze rozlišit.

Vodivost roztoku,  $G$  [ $\Omega^{-1}$ , S], je rovna převrácené hodnotě odporu,  $R$  [ $\Omega$ ]. Měří se ve vodivostní nádobce mezi dvěma elektrodami o geometrické ploše  $A$  [ $\text{cm}^2$ ], vzdálených od sebe  $L$  [cm], a platí pro ni vztah:

$$G = \frac{1}{R} = \kappa \frac{A}{L}, \quad (4)$$

kde  $\kappa$  [ $\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ ] je měrná vodivost roztoku, tzv. konduktivita. Konduktivita je charakteristickou vlastností analyzovaného roztoku a závisí na koncentraci všech iontů v roztoku, zatímco podíl  $A/L$  charakterizuje experimentální uspořádání vodivostní nádoby:

$$\kappa = G \cdot \frac{L}{A} = G\Theta, \quad (5)$$

kde  $\Theta$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] je tzv. konstanta vodivostní nádoby. Aby bylo možno z hodnoty vodivosti  $G$  změřené v určité vodivostní nádobce měrnou vodivost  $\kappa$  určit, musí být hodnota konstanty vodivostní nádoby známa. Většinou ji nelze určit z geometrických rozměrů, protože elektrické pole je málokdy přesně vymezeno geometrickými rozměry elektrod. Proto se v dané nádobce změní vodivost roztoku, jehož měrná vodivost je přesně známa a konstanta nádoby se vypočítá.

#### 2.4.2.1 Měření vodivosti

V praxi je vodivost roztoků měřena pomocí systému dvou elektrod, jež jsou vůči sobě zafixovány v konstantní poloze a připojeny na přesný *ampérmetr*. Mezi svorkami je udržováno konstantní napětí a v závislosti na vodivosti kapaliny se mění velikost proudu mezi elektrodami.

Vodivost lze zjistit např. ze změřeného úbytku napětí  $U$  na odporu  $R$  vodivostní nádoby s analyzovaným roztokem, jíž prochází konstantní střídavý elektrický proud  $I$ :

$$G = \frac{1}{R} = \frac{I}{U}. \quad (6)$$

V důsledku procházejícího proudu se mohou na elektrodách vytvářet povlaky např. produktů elektrodové reakce, může se uplatňovat i ne zcela eliminovaná polarizace elektrod. Tyto efekty se projevují jako odpor na rozhraní obou elektrod a roztoku a přispívají tak k celkovému odporu ve vodivostní nádobce;  $R = R(\text{rozt}) + R(\text{el/rozt})_1 + R(\text{el/rozt})_2$ .

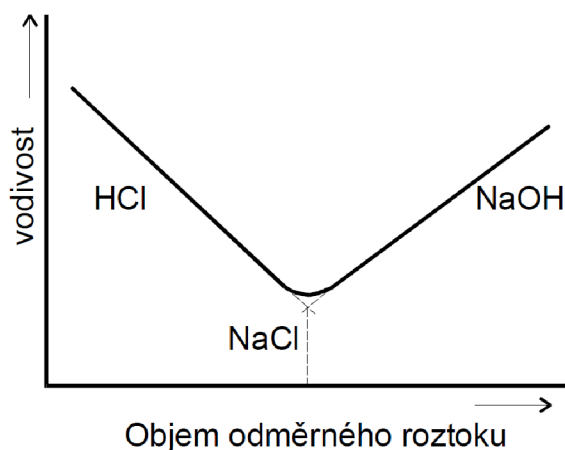
Vodivost zjištěná v dvouelektrodové vodivostní nádobce tak neodpovídá pouze hledané vodivosti analyzovaného roztoku, ale je nežádoucím způsobem ovlivněna jevy na rozhraní elektroda/roztok.

#### 2.4.2.2 Konduktometrické titrace

Pokud se v průběhu titrace mění vodivost roztoku, lze konduktometrie použít jako indikační metody zjišťování konečného bodu titrace. K tomu dochází při titracích acidobazických, srážecích a komplexometrických.

Konduktometrické titrace se provádějí v titračních nádobkách (kádinkách), v nichž jsou v titrovaném roztoku ponořeny vodivostní elektrody. Roztok je v průběhu titrace míchán, titrační činidlo se používá dostatečně koncentrované, aby objem přidaný v průběhu titrace byl zanedbatelný ve srovnání s objemem titrovaného roztoku. Není tak zapotřebí provádět korekci vodivosti na změnu objemu roztoku [36], [38].





Obrázek 7: Lineární titrační křivka při konduktometrické titraci silné kyseliny (HCl) silnou zásadou (NaOH). U jednotlivých částí křivky jsou uvedeny sloučeniny, které určují vodivost roztoku. Vysoká vodivost roztoku daná vodíkovými ionty v průběhu titrace klesá, jak tyto ionty z roztoku ubývají. V ekvivalenci určují vodivost ionty sodné a chloridové. Po překročení ekvivalence vodivost opět roste, jak v roztoku přibývá iontů hydroxidových [36].

### 2.4.3 Optické vlastnosti disperzních systémů

K význačným zvláštnostem disperzních soustav patří jejich charakteristické optické vlastnosti. Fyzikální vlastnosti koloidních částic, které ovlivňují optické vlastnosti celé koloidní soustavy, jsou velikost, elektrická vodivost a absorpce světla látkou tvořící disperzní fázi.

Při prostupu světla disperzním systémem dochází k poklesu intenzity záření v důsledku pravé absorpce a rozptylu světla. Intenzita procházejícího záření je dána Lambert-Beerovým zákonem, z kterého vyplývá, že intenzita prošlého světla je závislá na koncentraci absorbující složky a na tloušťce vrstvy. *Pravá absorpce* znamená, že pohlcené záření zvýší vnitřní energii molekul systému a přemění se v teplo, u *rozptylu světla* na částicích systému je záření opět emitováno ve formě světelné energie [39], [40].

Velikost obou těchto efektů závisí na charakteru disperzního systému i na vlnové délce světla. U analyticky disperzních systémů se uplatňuje převážně pravá absorpce, zatímco v disperzních systémech, které obsahují částice koloidních nebo větších rozměrů, se uplatňuje hlavně rozptyl světla.

Rozptyl světla je dobře pozorovatelný u systémů s různými indexy lomu disperzních částic a disperzního prostředí, tedy na hrubých i koloidních disperzích. U *hrubých disperzí* dochází k odrazu a lomu světelných paprsků na povrchu částic pod různými úhly; světlo se difúzně rozptyluje a současně se polarizuje. To se projevuje zákalem disperze, který je pozorovatelný v libovolném směru, i v tenkých vrstvách. V *koloidních disperzích* se vyskytují částice, které mají velikost částic srovnatelnou nebo menší než je vlnová délka světla. V těchto systémech se uplatňuje odraz a ohyb světla na malých částicích. Čím menší částice je, tím více se uplatňuje ohyb oproti odrazu. Koloidní disperze mají většinou nižší intenzitu rozptýleného záření, což se v tenkých vrstvách projevuje tak, že se zdají být čiré. Tlusté vrstvy koloidních disperzí a koloidní disperze pozorované z boku oproti černému pozadí vytvářejí jemný zákal neboli opalescenci.

Rozptyl světla rozdělujeme na elastický a dynamický. Fyzikální podstatou elastického rozptylu světla je snížení intenzity primárního paprsku vlivem odrazu, lomu nebo interference světla na malých částicích. Při tomto procesu nedochází k absorpci, ale část záření se může odrazet do všech stran. Elastický rozptyl světla můžeme stanovit buď turbidimetricky, kdy se měří intenzita rozptýleného paprsku ve směru primárního paprsku a nebo nefelometricky, kdy se měří intenzita rozptýleného paprsku při úhlu 90°. Existují i metody, při kterých se měří rozptyl pro více úhlů, tzv. MALS (Multi-angle-light-scattering) [41], [42].

### ***Klasická teorie rozptylu světla – Rayleighova rovnice***

Účinkem procházející světelné vlny, tedy v kmitajícím elektrickém poli, se molekuly polarizují, vytvářejí se indukované *oscilující* dipóly, v jejichž okolí vzniká periodické elektrické pole, které se šíří všemi směry jako vlnění. Každá molekula ozářená primárním světlem se tedy stává zdrojem rozptýleného světla o témže kmitočtu. Ve stejnorodém prostředí se účinkem interference sekundárních vln podle Huygensova principu šíří světlo pouze ve směru primární (dopadající) světelné vlny.

V nestejnorožném prostředí, které obsahuje částice s polarizovatelností odlišnou od polarizovatelnosti prostředí, indukuje procházející světelné vlnění v těchto částicích dipólové momenty jiné velikosti než v částicích disperzního prostředí. Záření těchto dipólů už není kompenzováno ve smyslu Huygensova principu a jeví se jako rozptýlené světlo. Rozptýlené světlo se šíří všemi směry; jeho intenzita je však v různých směrech různá.

Kvantitativní zpracování těchto úvah vedlo ke vztahu pro intenzitu světla rozptýleného jednotkou objemu velmi zředěného disperzního systému pod úhlem  $\theta$ :

$$I_{\theta} = I_0 \cdot \frac{\pi^2 \cdot \alpha^2 \cdot \nu}{\varepsilon_0^2 \cdot \lambda^4 \cdot r^2} \cdot \frac{(1 + \cos^2 \theta)}{2}, \quad (7)$$

kde  $I_0$  je celková intenzita dopadajícího (primárního) nepolarizovaného záření,  $\nu$  je počet částic v jednotce objemu soustavy ( $= N/V$ ),  $\varepsilon_0$  permitivita vakua ( $8,854 \cdot 10^{-12} \text{ C}^2 \cdot \text{J}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$ ),  $\lambda$  vlnová délka primárního i rozptýleného světla v daném disperzním prostředí ( $\lambda = \lambda_0 / n_0$ , kde  $\lambda_0$  je vlnová délka záření ve vakuu),  $r$  vzdálenost detektoru, měřícího intenzitu od zdroje rozptýleného světla,  $\theta$  úhel pozorování, tj. úhel sevřený primárním paprskem a paprskem rozptýleného světla, který dopadá do detektoru,  $\alpha$  je polarizovatelnost částice, tj. moment dipólu indukovaného v částici elektrickým polem o jednotkové intenzitě.

Rayleighovu teorii rozptylu světla lze aplikovat jen na velmi zředěné disperzní systémy, obsahující malé disperzní částice, alespoň přibližně kulovitého tvaru, které jsou elektricky nevodivé a izotropní (tj. takové, jejichž polarizovatelnost je ve všech směrech stejná) [42].

### ***Flukтуаční teorie rozptylu světla – Einsteinova-Debyeova rovnice***

Klasická teorie nedovede vysvětlit rozptyl světla v opticky homogenním prostředí. Odlišnost indexu lomu v některých místech nemusí být totiž vždy způsobena tím, že systém obsahuje disperzní částice. Fakt, že rozptyl světla byl pozorován (i když v nepatrné míře) i u čistých kapalin, vysvětluje flukтуаční teorie. Z teorie kapalin vyplývá, že počet molekul v malém objemovém elementu podléhá v čase fluktuacím. Fluktuace v počtu částic mají za následek fluktuace v hustotě a fluktuace v indexu lomu. Tím se mohou na krátkou dobu vytvořit místa o větší hustotě a větším indexu lomu, která mohou způsobit slabý rozptyl.

Ve velmi zředěných koloidních systémech, kde se rozptyl jedné částice nepřekládá přes rozptyl druhé, není třeba na tyto fluktuace brát zřetel a stačí uvažovat jen rozdíl indexů lomu disperzního podílu a prostředí. V koncentrovanějších systémech je nutno uvažovat nejen rozdíl v indexech lomu, ale i fluktuace v koncentraci disperzních částic, ke kterým dochází v objemových jednotkách o rozměrech menších než vlnová délka dopadajícího světla.

### ***Celková intenzita světla rozptýleného ve všech směrech***

Podmínkou pro to, aby nastal rozptyl světla, je optická heterogenita systému, tj. rozdíl v indexech lomu, což je splněno u lyofobních systémů, kde je rozptyl intenzivní; u lyofilních systémů je rozptyl slabší. Při průchodu bílého světla systémem je světlo kratších vlnových délek (modré) mnohem více rozptylováno než dlouhovlnné (červené). Bezbarvé koloidní systémy při bočním osvětlení bílým světlem modravě opaleskují – dochází především k rozptylu paprsků o malých vlnových délkách. V procházejícím světle se naopak tyto koloidní systémy zbarvují do červena, protože při jeho průchodu mizí ze spektra v důsledku rozptylu modré paprsky.

To, že je obloha zbarvena do modra, je způsobeno tím, že světlo kratší vlnové délky (modrá, 430–500 nm) je rozptylováno více než světlo delší vlnové délky (červená, 680–720 nm). Absolutní množství světla, rozptýleného 1 cm<sup>3</sup> vzduchu nebo vody, je sice nepatrné, ale ohromná tloušťka atmosféry a fluktuace molekul způsobuje, že rozptyl není zanedbatelný. Červánky, které můžeme pozorovat při východu nebo západu Slunce, jsou způsobené odfiltrováním krátkovlnné oblasti barevného spektra při delším průchodu atmosférou [42], [43].

#### **2.4.4 Dynamický rozptyl světla**

Metoda dynamického rozptylu světla (DLS z anglického *Dynamic Light Scattering*) je fyzikální analytická metoda, jež zkoumá vlastnosti částic v objemu roztoků a je v současné době velmi používanou technikou pro měření velikosti částic a charakterizaci distribuce velikosti částic obvykle v submikronové oblasti. Tato metoda je založena na principu měření intenzity světla rozptýleného molekulami ve vzorku v průběhu času.

Molekuly v roztoku difundují Brownovým pohybem. Podle toho, jak se pohybuje částice vůči detektoru, frekvence rozptýleného záření se buď zvyšuje, nebo snižuje a tím vzniká fázový rozdíl mezi rozptýlenými vlnami, které mezi sebou interferují. Platí tedy, že čím rychleji se molekuly pohybují, tím rychleji se mění intenzita rozptýleného záření. Rychlost změny intenzity rozptýleného záření přímo závisí na pohybu molekuly.

Pohyb neboli difúzi molekuly ovlivňují tyto faktory:

- ❖ Teplota – čím vyšší teplota, tím větší rychlostí se molekuly pohybují
- ❖ Viskozita rozpouštědla – čím viskóznější je rozpouštědlo, tím pomaleji se molekuly pohybují
- ❖ Velikost částic – čím větší jsou částice, tím pomalejší rychlostí se pohybují.

Pokud jsou teplota a rozpouštědlo konstantní, pak je změna intenzity rozptýleného světla přímo úměrná velikosti molekuly. Tato veličina se nazývá hydrodynamický poloměr. Pokud by se molekuly v roztoku chovaly stacionárně, pak by množství rozptýleného světla bylo konstantní.

V polydisperzních systémech se pohybují částice více velikostí, pak výsledná korelační funkce je složitější než u systému monodisperzních. Dolní hranice měřícího rozsahu se pohybuje okolo 0,5 nm a maximum okolo 3 μm, protože větší částice již nepodléhají Brownovu pohybu [39], [44], [45].

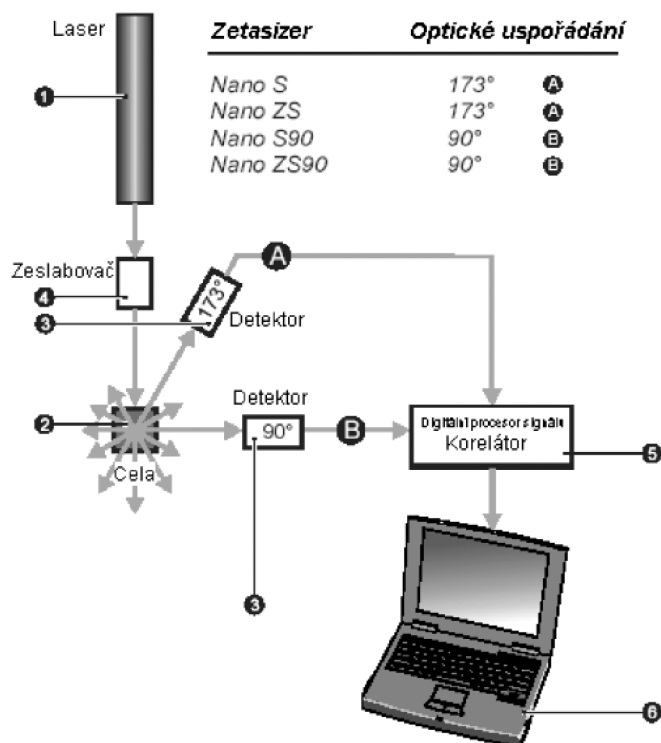
#### 2.4.4.1 Měření dynamického rozptylu světla

Měření velikosti částic je možné provádět pomocí přístrojů řady Zetasizer Nano. Tyto přístroje fungují na principu dynamického rozptylu světla.

V případě měření naprosto nehybných částic v roztoku je zobrazování řízeno interferenčním jevem a dle fázových posunů vln se poté zobrazují jasné či tmavé oblasti. Pokud světlo dorazí na detektor ve stejné fázi, vytvoří se jasná oblast světla. Tmavé oblasti by se vyskytovaly tam, kde by byly fázové příspěvky vzájemně destruktivní a navzájem by se vyrušily. V reálných kapalinách jsou částice neustále v pohybu díky Brownovu pohybu. Tento pohyb vzniká díky náhodné srážce částic s molekulami kapaliny. Je známo, že malé částice se v kapalině pohybují rychle, a velké částice se pohybují pomalu. Tento pohyb probíhá neustále, takže jestliže vezmeme dva „obrázky“ vzorku oddělené krátkým časovým intervalem, můžeme vidět, o kolik se částice přesunula, respektive zjistit difúzní koeficient ze středního posuvu částice a pak přes Stokes-Einsteinovu rovnici vypočítat hydrodynamický poloměr. Jestliže došlo k minimálnímu pohybu a polohy částic jsou velmi podobné, pak budou částice ve vzorku velké; podobně, jestliže došlo k velkému pohybu a polohy částic jsou zcela rozdílné, pak částice ve vzorku jsou malé. Přístroj tedy měří fluktuaci intenzity, nejprve určí statistickou analýzou (korelační analýzou) difúzní koeficient  $D$ , který lze Stokes-Einsteinovou rovnicí při znalosti teploty měření  $T$ , viskozity disperzního prostředí  $\eta_0$  přepočítat na velikost částic (hydrodynamický průměr kulovité částice)  $d_H$  [43], [46]:

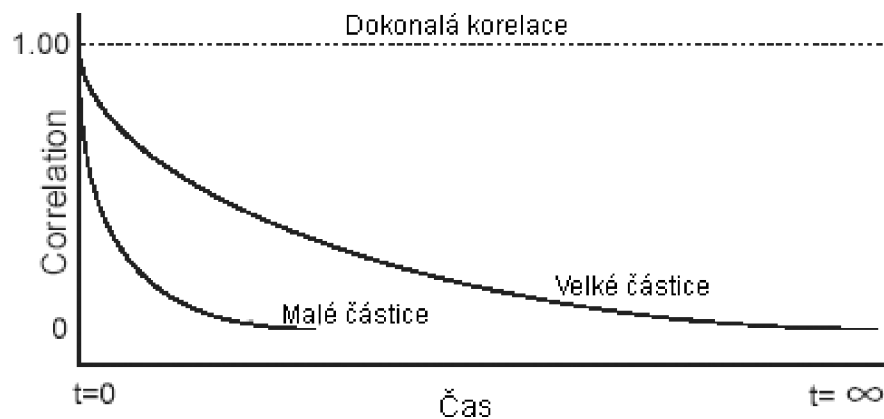
$$d_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 D}, \quad (8)$$

kde  $k_B$  je Boltzmannova konstanta ( $k_B = 1,380\,648\,8 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$ ).



Obrázek 8: Schéma přístroje Zetasizer Nano ZS, obsahuje šest hlavních komponent – laser (1), celu (2), detektor (3), zeslabovač (4), korelátor (5) a počítač (6) [46].

Laser se používá jako zdroj světla pro ozáření vzorku uvnitř cely. Většina paprsku světla projde vzorkem nezměněna, jen malá část je rozptýlena částicemi uvnitř vzorku. Částice rozptylují světlo ve všech směrech, proto je teoreticky možné umístit detektor do jakékoli polohy a stále bude měřit intenzitu rozptýleného světla. V přístrojích Zetasizer Nano je detektor umístěn buď v úhlu 173° nebo 90°. Aby detektor mohl intenzitu rozptýleného světla změřit, musí být v určitém rozsahu hodnot. Příliš mnoho světla způsobí přetížení detektoru. Zeslabovač způsobí snížení intenzity laserového paprsku, a tím dojde i ke snížení intenzity rozptýleného světla. Toho se využívá u velmi koncentrovaných vzorků nebo při měření velkých částic. Zeslabovač může fungovat i obráceně, tedy že propustí více laserového světla, pokud je to nutné. Více laserového světla je potřeba při měření velmi malých velikostí částic nebo vzorků o nízké koncentraci, tedy vzorků, které rozptylují málo světla. Uvnitř přístroje se nachází digitální korelátor, který měří stupeň podobnosti dvou signálů v určité době. Intenzity signálů v krátkém časovém úseku jsou si velmi podobné, o chvíli později se podoba snižuje, až s časem dosáhne korelace na nulu. Dokonalé korelace (1) dosáhneme v případě identických signálů, tedy porovnáním intenzity v určitém čase samu se sebou. Žádná korelace (0) znamená, že mezi signály není žádná shoda [46].



Obrázek 9: Korelace v časových úsecích.

Detekce zpětného rozptylu znamená, že přístroje Zetasizer Nano ZS měří informace o rozptýleném záření v blízkosti  $180^\circ$ .

Světelný paprsek při měření zpětného rozptylu nemusí procházet celým vzorkem, prochází tedy kratší optickou dráhou, a proto je možné měřit vzorky o vyšší koncentraci. Při těchto měřeních se také eliminuje výskyt mnohonásobného rozptylu světla, tudíž rozptýlené světlo na jedné částici je rozptylováno i na dalších částicích. Díky snížení výskytu mnohonásobného rozptylu můžeme měřit koncentrovanější vzorky a je možné snížit efekt prachu neboli kontaminujících látek v dispergovadle. Částečky prachu jsou oproti částicím ve vzorku mnohem větší a velké částice rozptylují světlo ve směru primárního paprsku.

Většího rozsahu koncentrací vzorku se může dosáhnout také použitím pohyblivé čočky. Pro vzorky o nízké koncentraci nebo pro vzorky, které obsahují malé částice je výhodnější větší množství rozptylu ve vzorku, měřící bod je více u středu. Pro velké částice nebo pro více koncentrované vzorky je naopak výhodnější mít měřící bod blíže ke stěně cely, čímž se sníží efekt mnohonásobného rozptylu [46].

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiály k přípravě roztoků

Hyaluronan o molekulové hmotnosti 110–130 kDa, 1500–1750 kDa vyrobena firmou Contipro Group s.r.o., Dolní Dobrouč, Česká republika; *MILLI-Q* voda vyrobena v laboratoři Fakulty chemické VUT, Brno, Česká republika; L-lysin a L-arginin čistoty p.a. poskytnuty firmou Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo; chlorid sodný a kyselina chlorovodíková čistoty p.a. zakoupen od firmy Lach-Ner s.r.o., Neratovice, Česká republika.

### 3.2 Příprava vzorků

Kyselina hyaluronová byla předvážena na laboratorních vahách s přesností 1/100 g a následně vysušena v sušárně po dobu třiceti minut při teplotě 90 °C, protože při opakovaném otevírání zásobní vialky pohlcuje vodu ze vzdušné vlhkosti. Přesné množství suché kyseliny hyaluronové bylo za laboratorní teploty odváženo na analytických vahách a daná navážka byla postupně přidávána do menšího množství rozpouštědla, tedy Milli-Q vody. Pak bylo střídavě přidáváno vždy další menší množství HA a rozpouštědla a ponecháno opět míchat. Tak se pokračovalo, dokud se pokud možno celá navážka nepřidala do Milli-Q vody. Ze zbytku na váženec se pak spočítala skutečná navážka a celkové množství Milli-Q vody se dopočítalo a vypočítaný zbytek se přidal do míchaného roztoku. Cílem tohoto způsobu je dosažení co největší homogenity roztoku a zabránění vzniku shluků kyseliny. Pro dosažení úplné homogenity byl roztok míchán 24 hodin a výsledná koncentrace zásobního roztoku nízkomolekulové i vysokomolekulové HA byla 2,5 g·dm<sup>-3</sup>. Pokud roztoky nebyly používány na další přípravu nebo nebyly proměřovány, pak byly pro zpomalení degeneračních pochodů ponechány v lednici, ne však déle než po dobu dvou týdnů.

Vypočítané množství aminokyseliny bylo naváženo na analytických vahách a to bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky. Roztok byl důkladně promíchán a jeho výsledná koncentrace byla pro obě aminokyseliny 264 mmol·dm<sup>-3</sup>. Roztoky aminokyselin stejně jako roztoky HA byly uchovány v lednici.

Pro přípravu zásobního roztoku NaCl o koncentraci 0,3 mol·dm<sup>-3</sup> bylo naváženo přesné množství na analytických vahách a to následně převedeno do odměrné baňky s Milli-Q vodou. Roztok byl promíchán a uchováván v lednici.

#### 3.2.1 Protonizace aminokyselin

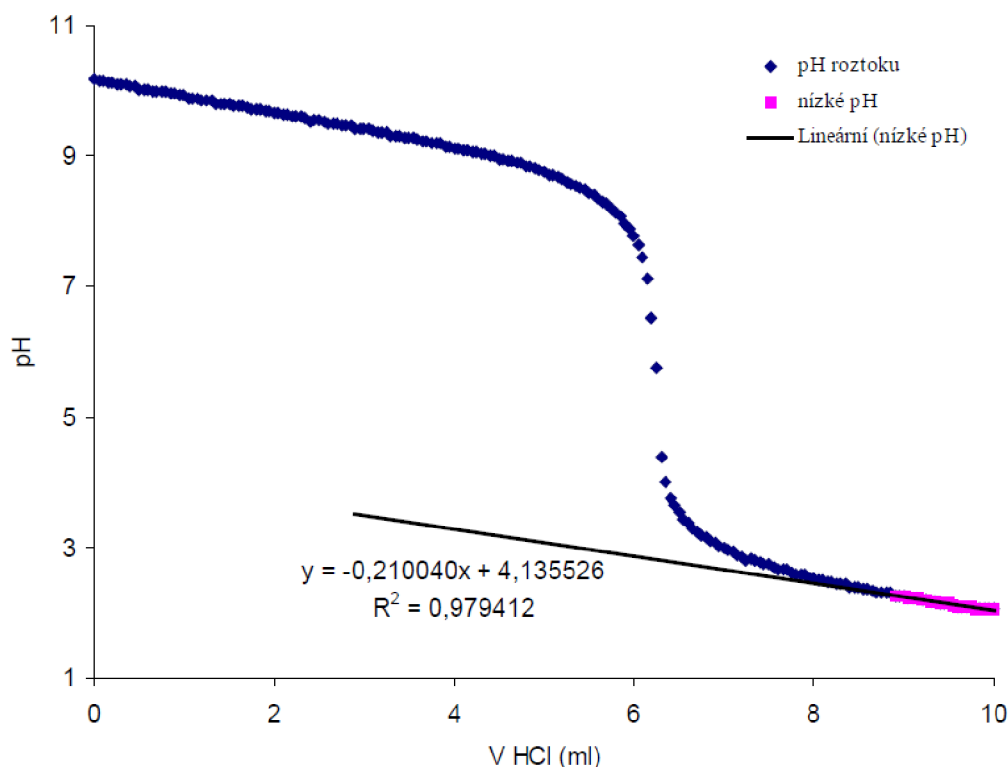
Protonizace roztoků aminokyselin byla prováděna za laboratorní teploty. HCl pro protonizaci aminokyselin byla připravena ze zásobní lahve o koncentraci 35 % hm. Přesné množství kyseliny bylo napipetováno do odměrné baňky s injekční vodou a doplněno po rysku, následně promícháno. Koncentrace připravené kyseliny pro obě aminokyseliny byla 2,2 mol·dm<sup>-3</sup>.

#### *Úplná protonizace*

Podle postupu protonizace uvedeném v bakalářské práci Jana Zemana bylo určeno, že nejmenší přídavek kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 1 mol·dm<sup>-3</sup> k roztoku 50 cm<sup>3</sup>

lysinu o koncentraci  $120 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  je  $8 \text{ cm}^3$  roztoku HCl. Po doplnění roztoku na  $60 \text{ cm}^3$  injekční vodou je pak výsledná koncentrace lysinu  $100 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  [50].

$$c_{Lys} = \frac{120 \cdot 50}{60} \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3} = 100 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$$



Obrázek 10: Titrace  $120 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  lysinu  $1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  HCl [50].

Dle zjištěných výsledků Jana Zemana byly následně spočítány potřebné objemy a koncentrace roztoku kyseliny chlorovodíkové pro protonizaci roztoku lysinu pro potřeby přípravy jejich směsí s hyaluronanem. Potřebná koncentrace zásobního roztoku protonizovaného lysinu pro naši zkoumanou řadu je  $220 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . To je tedy  $2,2\times$  větší koncentrace lysinu, než byla použita při acidobazické titraci. Pro zachování objemů všech komponent na protonizaci je nutno tedy jejich koncentrace tímto koeficientem vynásobit:

$$c_{Lys} = 120 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3} \cdot 2,2 = 264 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$$

$$c_{HCl} = 1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \cdot 2,2 = 2,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$$

$$V_{Lys} = 50 \text{ cm}^3$$

$$V_{HCl} = 8 \text{ cm}^3$$

$$V_{H_2O} = 2 \text{ cm}^3$$

$$\left. \begin{array}{l} V_{Lys} = 50 \text{ cm}^3 \\ V_{HCl} = 8 \text{ cm}^3 \\ V_{H_2O} = 2 \text{ cm}^3 \end{array} \right\} V_{celk} = 60 \text{ cm}^3$$

### Částečná protonizace

Pro částečnou protonizaci aminokyselin bylo nutné nejdříve změřit hodnotu pH kyseliny hyaluronové. Pro roztok o koncentraci  $2,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  nízkomolekulární HA byla změřena hodnota  $\text{pH} = 5,8\text{--}6,0$  a pro vysokomolekulární HA  $\text{pH} = 5,9\text{--}6,1$ . Výsledné pH částečně



protonizované aminokyseliny se mělo pohybovat mezi změřenými hodnotami pH HA s maximální odchylkou  $\pm 0,3$ . Z titračních křivek byl vypočítán přibližný objem HCl potřebný pro protonizaci, stěžejní však bylo výsledné pH protonizované aminokyseliny.

#### ❖ Lysin

Z uvedené titrační křivky na obrázku 10 lze vyčíst, že pro dosažení pH = 5,8–6,1 je nutno přidat přibližně 6 cm<sup>3</sup> HCl. Bylo napipetováno 50 cm<sup>3</sup> lysinu (264 mmol·dm<sup>-3</sup>), ten byl umístěn na magnetické míchačce, aby byl roztok v celém objemu dobře promíchán, a po každém přidavku HCl bylo změřeno pH roztoku. Po dosažení pH přibližně 5,9–6,1 již nebylo pipetováno další množství HCl, pouze byl doplněn objem roztoku injekční vodou na 60 cm<sup>3</sup>. Přesné množství HCl napipetováno do roztoku bylo 5,73 cm<sup>3</sup> a výsledné pH částečně protonizovaného lysinu mělo hodnotu pH = 5,9.

#### ❖ Arginin

Pro výpočet množství HCl pro částečnou protonizaci argininu byla použita titrační křivka získaná z výsledků diplomové práce Martina Trojana (Obrázek 11), kdy ve své práci titroval arginin (100 mmol·dm<sup>-3</sup>) kyselinou chlorovodíkovou (1 mol·dm<sup>-3</sup>). Bod ekvivalence byl dosažen po přidání 4,75 cm<sup>3</sup> HCl do 50 cm<sup>3</sup> argininu [49]. Aby byly zachovány poměry a množství pro částečnou protonizaci argininu (264 mmol·dm<sup>-3</sup>), má být použita kyselina chlorovodíková 2,64 mol·dm<sup>-3</sup>.

$$c_{Arg} = 100 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot 2,64 = 264 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

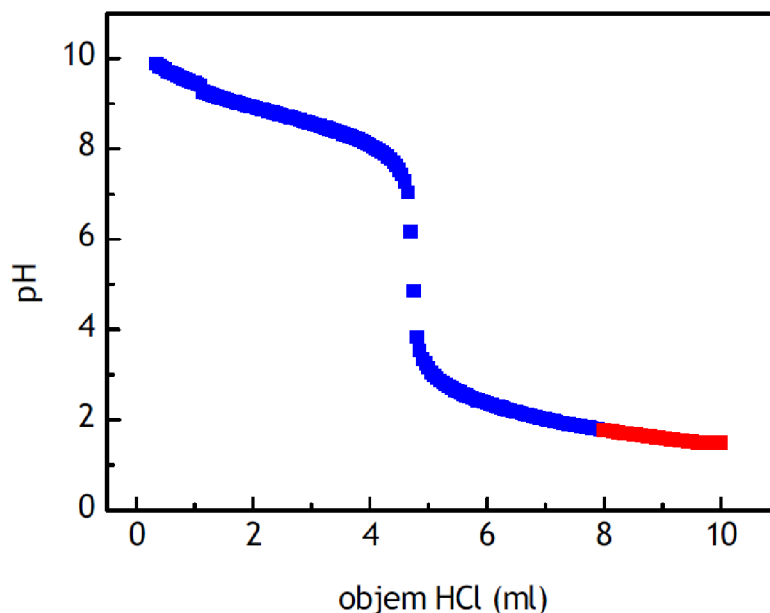
$$c_{HCl} = 1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot 2,64 = 2,64 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

$$V_{Arg} = 50 \text{ cm}^3$$

$$V_{HCl} = 4,75 \text{ cm}^3$$

$$V_{H_2O} = 5,25 \text{ cm}^3$$

$$\left. \begin{array}{l} V_{Arg} = 50 \text{ cm}^3 \\ V_{HCl} = 4,75 \text{ cm}^3 \\ V_{H_2O} = 5,25 \text{ cm}^3 \end{array} \right\} V_{celk} = 60 \text{ cm}^3$$



Obrázek 11: Titrační křivka titrace roztoku argininu o koncentraci 100 mmol·dm<sup>-3</sup> pomocí roztoku HCl o koncentraci 1 mol·dm<sup>-3</sup> s vyznačenou lineární oblastí křivky [49].

Protože náš zásobní roztok kyseliny chlorovodíkové má koncentraci  $2,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , je nutno množství HCl a vody pro protonizaci přepočítat:

$$V_{HCl} = \frac{4,75 \cdot 2,64}{2,2} \text{ cm}^3 = 5,7 \text{ cm}^3,$$

$$V_{H_2O} = V_{celk} - V_{Arg} - V_{HCl} = (60 - 50 - 5,7) \text{ cm}^3 = 4,3 \text{ cm}^3.$$

Výsledná koncentrace protonizovaného argininu je pak  $220 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ :

$$c_{Arg} = \frac{264 \cdot 50}{60} \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3} = 220 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}.$$

Po zjištění přibližného přidavku HCl do aminokyseliny jsme dále postupovali stejným postupem jako u částečné protonizace lysinu. Přesné množství HCl napipetováno do roztoku bylo  $5,76 \text{ cm}^3$  a výsledné pH částečně protonizovaného argininu mělo hodnotu  $\text{pH} = 5,78$ .

### 3.2.2 Příprava vzorků na titrace

Pro titraci byl použit zásobní roztok protonizované aminokyseliny. Na jednu titraci činila spotřeba aminokyseliny  $5 \text{ cm}^3$ . Aminokyselina byla titrována do devíti různých prostředí o objemu  $50 \text{ cm}^3$ . Prostředí se lišila iontovou silou (bez NaCl;  $0,015 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  NaCl;  $0,15 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  NaCl) a přítomností kyseliny hyaluronové (bez HA, tj. MQ; nízkomolekulová HA; vysokomolekulová HA). Jestliže byl titrován částečně i úplně protonizovaný lysin a částečně protonizovaný arginin do devíti prostředí, bylo provedeno celkem 27 titrací.

Tabulka 1: Přehled složek prostředí, do kterých byla titrována protonizovaná aminokyselina,  $M - \text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

|   | Bez NaCl   | 0,015 M NaCl | 0,15 M NaCl |
|---|--|--------------|-------------|
| MQ  | titrace $5 \text{ cm}^3$ protonizované aminokyseliny |              |             |
| Nízkomolekulová HA, [ $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ]  |  |              |             |
| Vysokomolekulová HA, [ $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ] |  |              |             |

### 3.2.3 Příprava vzorků na měření velikosti částic

Pro měření velikosti částic byly připraveny koncentrační řady protonizovaných aminokyseliny v roztoku HA a NaCl o celkovém objemu každého vzorku  $5 \text{ cm}^3$ . Objemy komponent byly vypočítány tak, aby výsledná koncentrace ve vzorku  $5 \text{ cm}^3$  byla dle následující tabulky 2:

Tabulka 2: Výsledné koncentrace při přípravě vzorků na měření velikosti částic.

| Složka            | Koncentrace zásobního roztoku         | Výsledná koncentrace ve vzorku $5 \text{ cm}^3$                             |
|-------------------|---------------------------------------|---|
| Protonizovaná AMK | $220 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ | $1-15 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$                                      |
| HA                | $2,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$    | $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  |
| NaCl              | $0,3 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  | $0,15 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}; 0,015 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ |

Nejdříve byla do vialek s míchadlem napipetována HA s protonizovanou aminokyselinou v koncentrační řadě  $1-15 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Tyto roztoky bylo nutno míchat po dobu 24 hodin a teprve pak bylo možno přidat roztok NaCl a pro doplnění do  $5 \text{ cm}^3$  Milli-Q vodu. Výsledná koncentrační řada byla taktéž míchána 24 hodin.

Před samotným měřením byly namíchané vzorky vytemperovány na laboratorní teplotu, pokud byly předtím uchovávány v lednici, přefiltrovány přes mikrofiltr Millex  $0,45 \mu\text{m}$  nebo  $0,22 \mu\text{m}$  přímo do plastové kyvety. Případné bublinky v roztoku byly odstraněny ultrazvukem a takto připravené a přefiltrované vzorky byly uzavřeny a ponechány třicet minut ustálit.

### 3.3 Měření a vyhodnocení

#### 3.3.1 Acidobazické a konduktometrické titrace

Připravený roztok kyseliny hyaluronové či Milli-Q vody o určité iontové síle a objemu 50 cm<sup>3</sup> s míchadlem byl umístěn na magnetickou míchačku. K automatickému titrátoru byl připojen zásobní roztok protonizované aminokyseliny. Na titrátoru byl nastaven přídavek 0,02 cm<sup>3</sup> aminokyseliny za minutu. Měření pH i vodivosti probíhalo zároveň a bylo prováděno na pH-konduktometru MettlerMulti při referenční teplotě 25 °C, který byl před měřením nakalibrován dle návodu pomocí tří pufrů o hodnotě pH 7,00; 4,01 a 2,00 a vodivostního standardu s měrnou vodivostí 1413 μS·cm<sup>-1</sup> dodanými výrobcem. Hodnoty pH a vodivosti byly průběžně zaznamenávány v počítači programem SevenEasy. Doba intervalu zaznamenání hodnot byla nastavena na 10 sekund, takže za každý přídavek protonizované aminokyseliny bylo odečteno 6 hodnot pH a vodivosti. Naměřené hodnoty byly uloženy v programu MS Excel a zde se dále pracovalo s jejich vyhodnocením. Protože v okamžiku hned po přidavku aminokyseliny do roztoku není ještě aminokyselina zcela rozptýlena po celém objemu, byla vždy první a poslední hodnota pH a vodivosti vyloučena. Z takto upravených dat byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{(n-1)}}. \quad (9)$$

Bylo vypočítáno relativní pH a konduktivita dle následujícího vzorce:

$$pH_{rel} = \frac{\overline{pH}_{HA+AMK+H_2O \text{ prostředí}}}{\overline{pH}_{AMK+H_2O \text{ prostředí}}}, \quad (10)$$

$$\kappa_{rel} = \frac{\overline{\kappa}_{HA+AMK+H_2O \text{ prostředí}}}{\overline{\kappa}_{AMK+H_2O \text{ prostředí}}}. \quad (11)$$

Chybové úsečky v grafech nejsou zobrazeny pro velké množství hodnot.

Všechny následující závislosti jsou pro porovnání uváděny na molárním poměru protonizované aminokyseliny k HA. Koncentrace disacharidových jednotek HA byla získána podělením hmotnostní koncentrace HA molární hmotností disacharidové jednotky HA:

$$c_{HA} = \frac{w_{HA}}{M_{HA}} = \frac{1}{415,349} \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} = 2,407 \text{ 6 mmol} \cdot \text{dm}^{-3},$$

kde  $w_{HA}$  [g·dm<sup>-3</sup>] je hmotnostní koncentrace HA a  $M_{HA}$  [g·mol<sup>-1</sup>] je molární hmotnost disacharidové jednotky HA.

Titrací protonizované aminokyseliny byl roztok HA zředován, výsledná koncentrace HA v roztoku byla vypočítána pak dle momentálního přídavku protonizované aminokyseliny.

#### 3.3.2 Dynamický rozptyl světla

Měření dynamického rozptylu světla bylo realizováno na přístroji Zetasizer Nano společnosti Malvern Instruments Ltd. Přístroj má schopnost měřit tři charakteristiky kapalných vzorků: velikost částic, Zeta potenciál a molekulovou hmotnost, a umožňuje měřit v širokém rozsahu koncentrací. Pro charakterizaci našich kapalných vzorků byl využit pouze parametr pro zjištění velikosti částic. Zeta potenciál nebylo možno z důvodu vysoké iontové síly změřit.

Pro úplně i částečně protonizovaný lysin v prostředí nízkomolekulové HA byl použit filtr 0,22 μm i 0,45 μm. Protože použití filtru s menšími póry nemělo zásadní vliv na přesnost

výsledků, nebyl již u argininu aplikován. Nebyl také použit u vzorků aminokyseliny v prostředí vysokomolekulové HA, neboť pro velikost biopolymeru nebylo možno roztok mechanicky přefiltrovat.

Před samotným měřením provedl Zetasizer Nano temperaci vzorku po nastavenou dobu 60 sekund na teplotu 25 °C. Zetasizer software vyhodnocuje velikost částic dle intenzity nebo objemu, dále difúzní koeficient a index polydisperzity. Všechny vzorky byly měřeny minimálně šestkrát, tedy po třech měřeních byl vzorek znovu nadávkován do kyvety.

Výsledky byly převedeny do programu MS Excel a vyhodnocovány parametry Z-průměr (udává statistickou distribuci průměru velikosti všech částic v roztoku), difúzní koeficient,  $d_{vol}$  (udává velikost částic dle jejich objemů) a  $d_{int}$  jednotlivých píků (určuje intenzitu a procentuelní zastoupení částic v roztoku). Pro vyloučení odlehlých hodnot byl proveden Dean-Dixonův test:

$$Q_1 = \frac{|x_2 - x_1|}{|x_n - x_1|}, \quad (12)$$

$$Q_2 = \frac{|x_n - x_{n-1}|}{|x_n - x_1|}, \quad (13)$$

kde  $Q$  zastupuje kritické hodnoty,  $x_1$  nejnižší hodnota ze série měření,  $x_n$  nejvyšší hodnota série měření a  $x_2$  a  $x_{n-1}$  reprezentují sousední výsledky nejnižších a nejvyšších hodnot.

Kritické hodnoty  $Q$  jsou uvedeny v tabulce 3 [50]:

Tabulka 3: Kritické hodnoty  $Q$  pro 3–6 hodnot a hladinu významnosti  $\alpha = 0,05$ .

| n | $Q_n$ |
|---|-------|
| 3 | 0,941 |
| 4 | 0,765 |
| 5 | 0,642 |
| 6 | 0,560 |

Pro průměrné hodnoty parametrů byly dále vypočítány směrodatné odchylky a po vynesení průměrných hodnot parametrů do grafu v závislosti na  $\frac{c_{HA}}{c_{AMK}}$  byly zde zobrazeny i chybové úsečky ze směrodatných odchylek.

Celkem bylo změřeno sedm koncentračních řad pro lysin a čtyři koncentrační řady pro arginin. Tabulka 4 znázorňuje změřené koncentrační řady aminokyselin.

Tabulka 4: Změřené koncentrační řady protonizovaných aminokyselin dynamickým rozptylem světla, Ú. p. – úplně protonizovaný, Č. p. – částečně protonizovaný, M – mol·dm<sup>-3</sup>.

| HA, [1 g·dm <sup>-3</sup> ] |       | Nízkomolekulová |        | Vysokomolekulová |        |
|-----------------------------|-------|-----------------|--------|------------------|--------|
| NaCl                        |       | 0,015 M         | 0,15 M | 0,015 M          | 0,15 M |
| Lysin,<br>[1–15 mM]         | Ú. p. | ✓               | ✓      | ✓                | ✗      |
|                             | Č. p. | ✓               | ✓      | ✓                | ✓      |
| Arginin,<br>[1–15 mM]       | Č. p. | ✓               | ✓      | ✓                | ✓      |

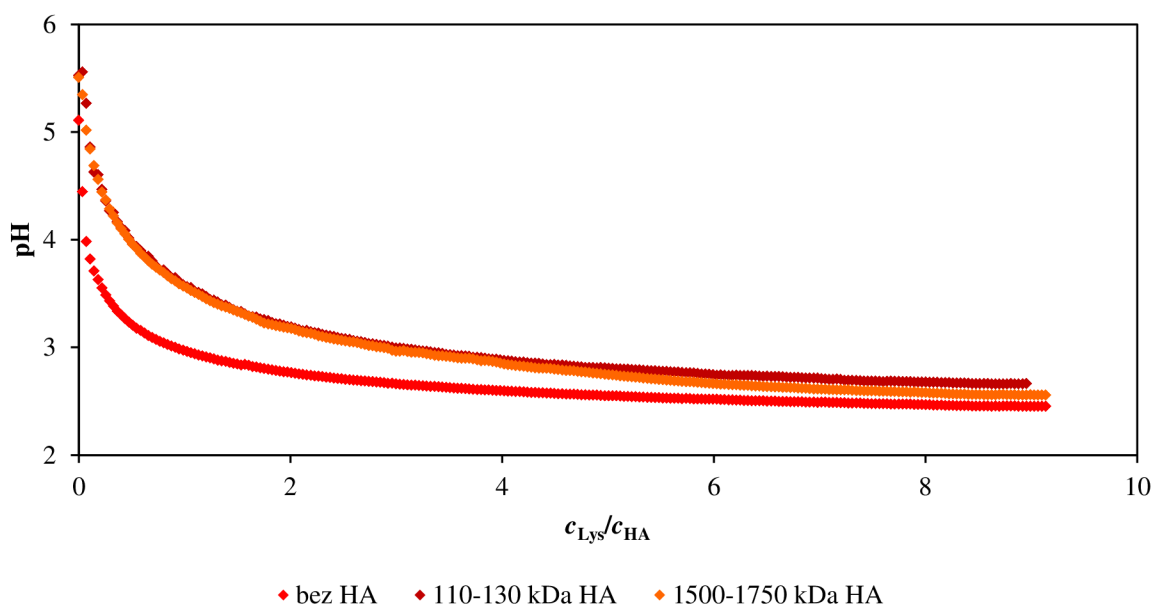
## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Acidobazické a konduktometrické titrace

Acidobazickými titracemi byl sledován průběh závislosti pH a vodivosti na zvyšující se koncentraci aminokyseliny. Pomocí měření pH a vodivosti je možné určit jednak přítomnost interakcí mezi HA a protonizovanými aminokyselinami a také do určité míry i velikosti těchto interakcí. Jejich měřením v podstatě zjišťujeme, zda kladné náboje aminoskupiny interagují se záporně nabitými karboxylovými skupinami hyaluronanu.

Dochází-li k těmto interakcím, v systému hyaluronan-aminokyselina, nastává zvýšení pH oproti systému voda-aminokyselina v důsledku navázání kyselých aminoskupin na karboxylové a v roztoku se snižuje počet kladně nabitých částic.

Celkový trend pH při titracích aminokyseliny do vody i hyaluronanu je klesající. U úplně protonizovaného lysinu se tento trend dá očekávat, protože úplnou protonizací aminokyseliny se změnilo pH pod hodnotu hyaluronanu. Klesající průběh je však znatelný i u částečně protonizovaných aminokyselin. Tyto rozdíly v pH jsou nejvíce pozorovatelné při nízkých koncentracích aminokyseliny v roztoku. To dokazuje vznik interakcí, neboť titrací aminokyseliny do roztoku hyaluronanu se záporný náboj hydroxylových skupin eliminuje navázáním kladné aminoskupiny.



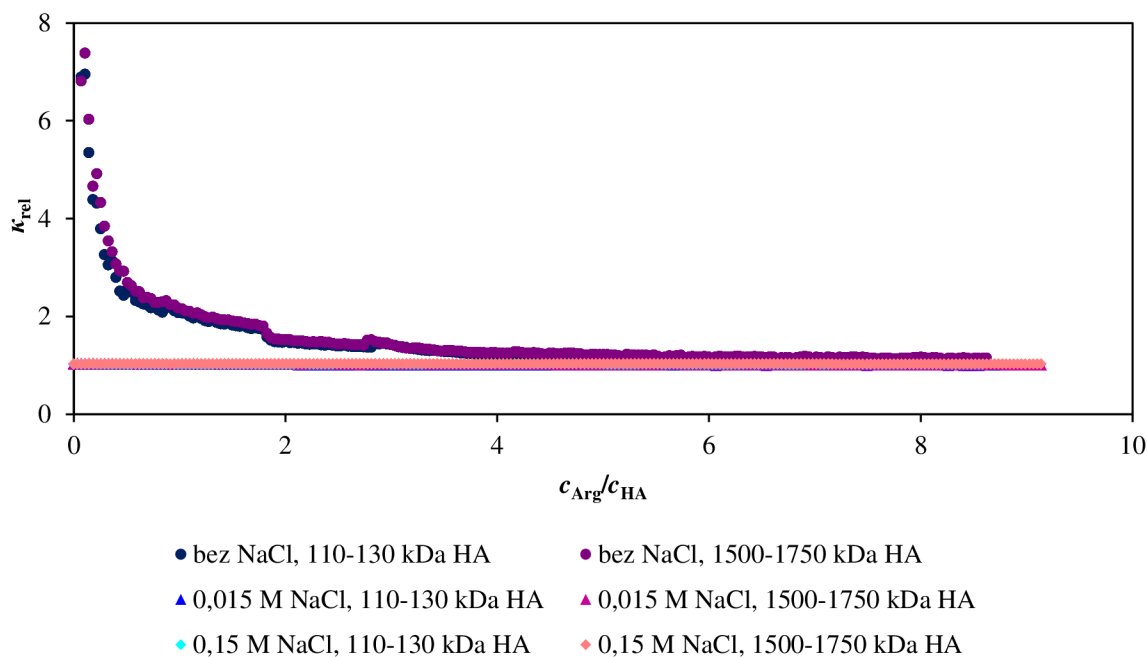
Obrázek 12: Závislost pH na  $\frac{c_{Lys}}{c_{HA}}$  pro úplně protonizovaný lysin v prostředí  $0,015 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$ .

Měrná vodivost v roztocích s rostoucí koncentrací aminokyseliny lineárně roste, pro systém s HA byly však získány vyšší hodnoty oproti naměřeným hodnotám pro systém aminokyseliny bez HA.

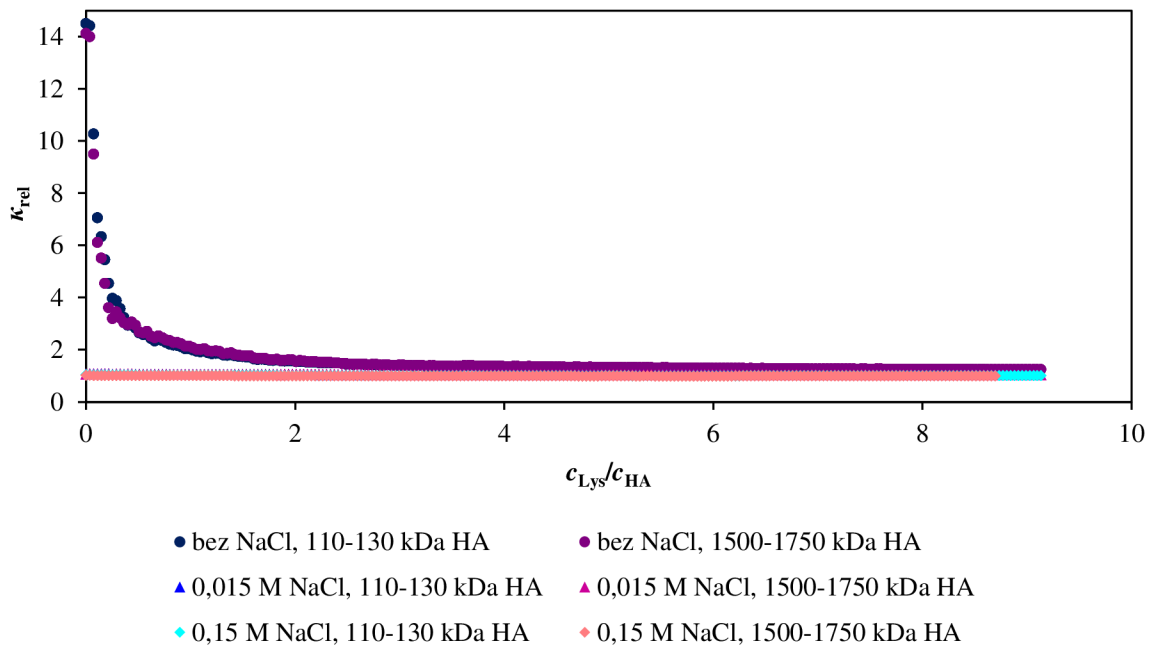
#### 4.1.1 Vliv zvýšení koncentrace elektrolytu na $0,015 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

Jedním z cílů bakalářské práce bylo zjistit, zda je systém hyaluronan-aminokyselina odolný vůči iontové síle, která se nachází v krevním řečišti.

Dle obrázků 13 a 14 v systémech bez přídavku NaCl relativní vodivost s rostoucí koncentrací aminokyseliny klesá. Zvýšením iontové síly v roztoku však již klesající trend u částečně protonizovaného lysinu a argininu není takřka patrný. V roztocích bez nízkomolekulárního elektrolytu jsou karboxylové skupiny schopny interagovat s protonizovanou aminokyselinou. Zvýší-li se iontová síla v roztoku, dochází k odstínění vnitřních odpuzivých sil v hydrodynamických doménách, náboj karboxylových skupin se sníží v důsledku interakce makromolekuly s ionty elektrolytu a HA již neposkytuje volné karboxylové skupiny pro interakci s protonizovanou aminokyselinou.

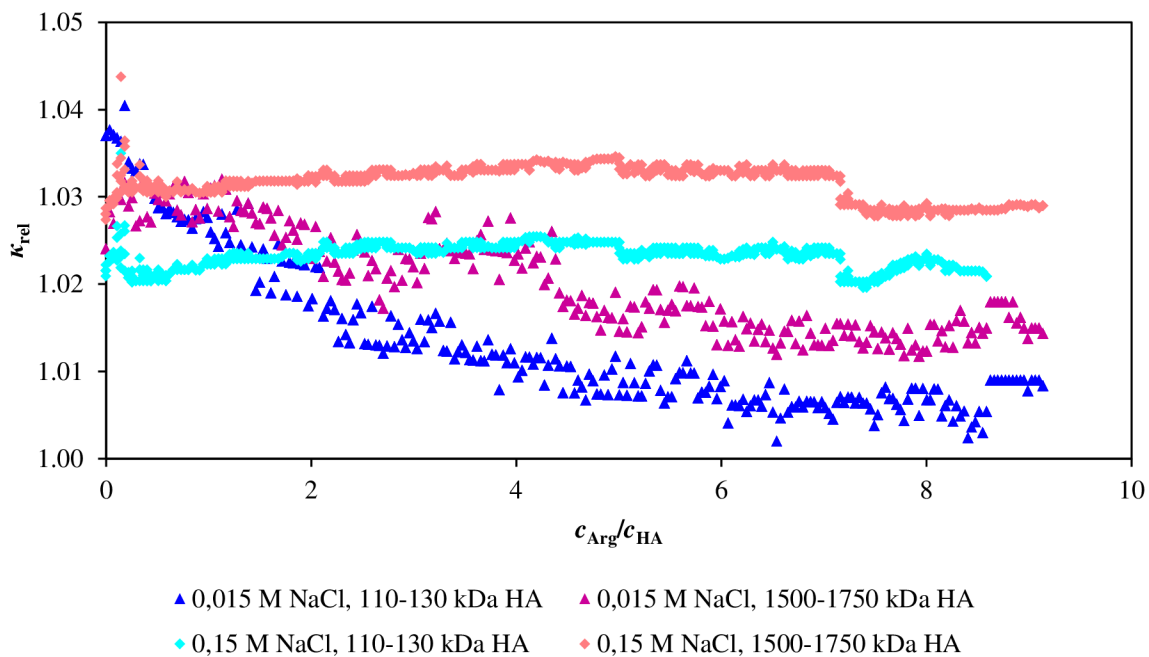


Obrázek 13: Závislost relativní vodivosti na  $\frac{c_{Arg}}{c_{HA}}$  pro částečně protonizovaný arginin.

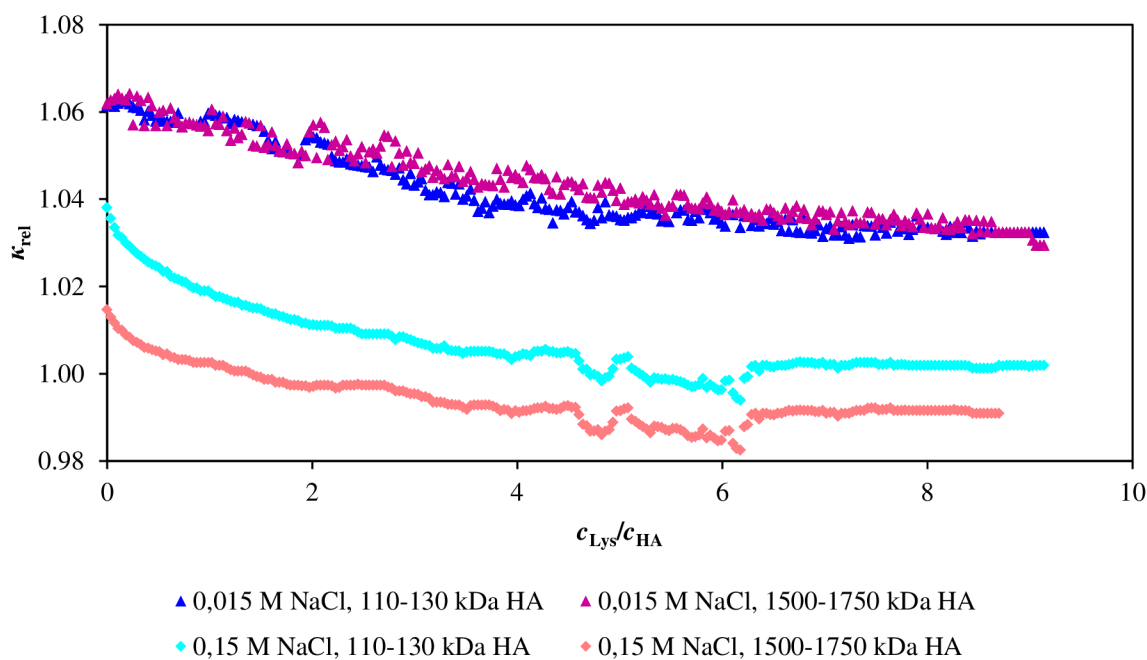


Obrázek 14: Závislost relativní vodivosti na  $\frac{c_{Lys}}{c_{HA}}$  pro částečně protonizovaný lysin.

Vyloučíme-li však z grafu koncentrační řadu lysinu a argininu bez elektrolytu, lze opět pozorovat mírně klesající trend za použití  $0,015 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  NaCl, u částečně protonizovaného lysinu na obrázku 16 je tento mírně klesající průběh znatelný i za použití  $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  NaCl.



Obrázek 15: Závislost relativní vodivosti na  $\frac{c_{Arg}}{c_{HA}}$  pro částečně protonizovaný arginin.

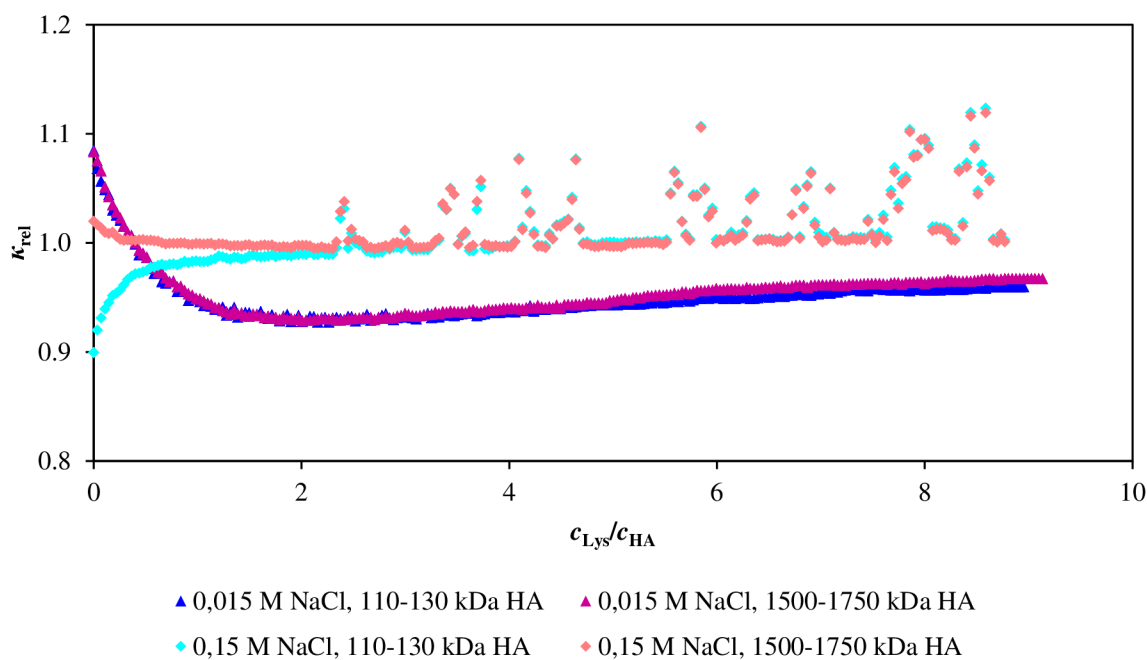


Obrázek 16: Závislost relativní vodivosti na  $\frac{c_{Lys}}{c_{HA}}$  pro částečně protonizovaný lysin.

Důkazem, že zvyšující se iontová síla potlačuje interakce mezi protonizovanými aminokyselinami a hyaluronanem, je pokles strmosti křivek, případně jejich linearizace.

Zatímco částečně protonizované aminokyseliny interagují se zvyšující se iontovou silou velice slabě, úplně protonizovaný lysin interaguje velice zřetelně i za zvýšené iontové síly, konkrétně při koncentraci NaCl  $0,015 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Při této koncentraci elektrolytu jsou interakce nejlépe pozorovatelné při nízkých koncentracích úplně protonizovaného lysinu. Dalším zvýšením koncentrace NaCl na  $0,15 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  se průběh relativní vodivosti liší pro různou molekulovou hmotnost HA. Úplně protonizovaný lysin s nízkomolekulárním hyaluronanem při svých nízkých koncentracích hodnoty relativních vodivosti zvyšuje, s vysokomolekulárním hyaluronanem má však mírnější a klesající průběh. Úplně protonizovaný lysin může tedy v systému s HA i při vyšší iontové síle interagovat. Úplnou protonizací aminokyseliny byl posílen kladný náboj aminoskupiny mnohem více než protonizací částečnou. U částečné protonizace je možné, že ne všechny aminoskupiny byly přidáním množstvím HCl protonizovány. Při úplné protonizaci je sice přítomen nadměrný počet chloridových iontů, pro interakci s HA při zvýšené iontové síle v roztoku má však větší množství HCl pro úplnou protonizaci příznivý dopad.





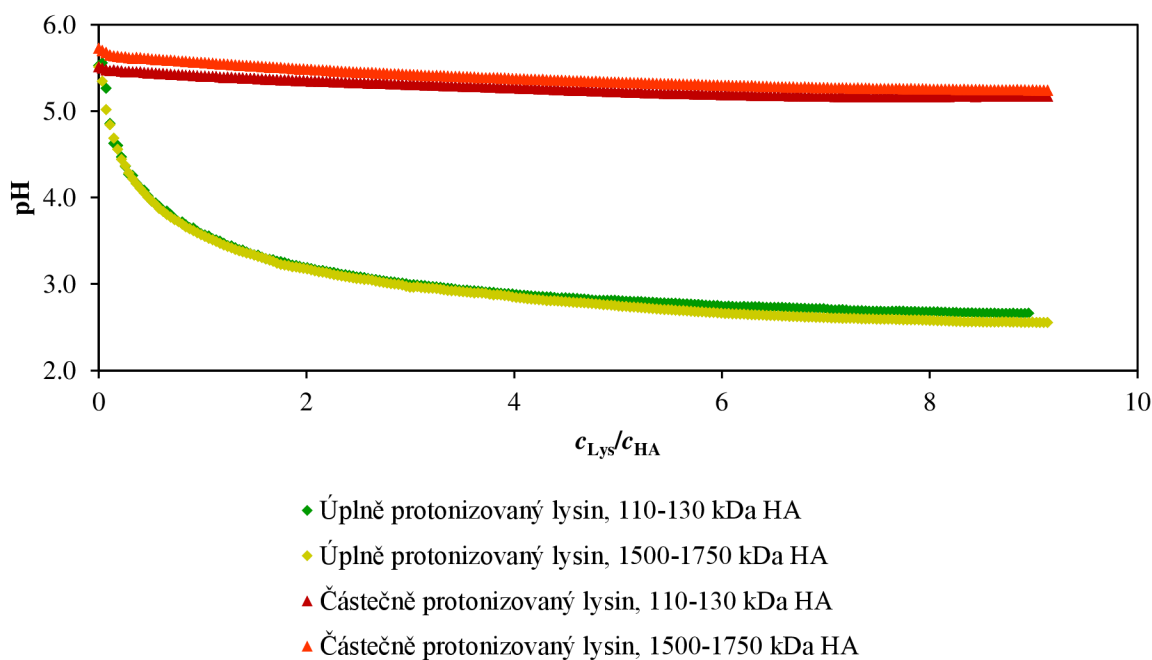
Obrázek 17: Závislost relativní vodivosti na  $\frac{c_{Lys}}{c_{HA}}$  pro úplně protonizovaný lysin.

Výsledky získané měřením pH dle přílohy 1 potvrzuje schopnost úplně protonizovaného lysinu interagovat s nízkomolekulovým HA i při koncentraci NaCl  $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

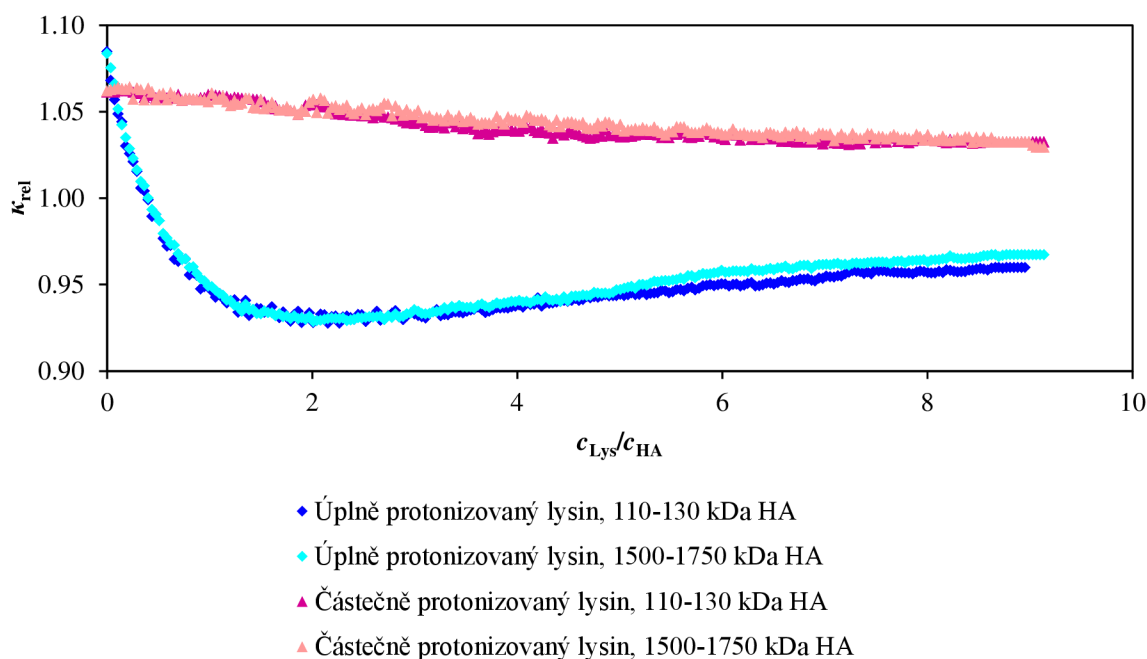
Konduktometrickými výsledky nelze interakce aminokyselin s HA při vyšší koncentraci elektrolytu zcela prokázat. Hodnoty měrných vodivostí, ať už v přítomnosti HA nebo ne, jsou příliš vysoké a interakce tak nejsou dobře zaznamenatelné.

#### 4.1.2 Vliv částečné a úplné protonizace lysinu

Měřeními pH i vodivosti jsme získali u úplně protonizovaného lysinu markantnějších sklonů v titračních křivkách. Výsledky pH i vodivosti výrazně prokazují, že úplně protonizovaný lysin lépe interaguje než částečně protonizovaný lysin. Potvrzuje se to větší strmostí výsledků u úplně protonizovaného lysinu. Jak již bylo výše diskutováno, u úplně protonizovaného lysinu je zajištěna protonizace všech aminoskupin. Protonizované aminoskupiny si konkurují se sodným iontem elektrolytu v navázání na karboxylovou skupinu, z toho vyplývá, že čím více se protonizovaných molekul aminokyseliny v roztoku nachází, tím je pravděpodobnější jejich kontakt a následné interakce s karboxylovými skupinami na HA řetězci. Celkem podstatným otázkou v této problematice je, do jaké míry ovlivňuje výsledky přítomnost nadbytečné HCl, přestože bylo přidáno předem vypočítané množství z titračních křivek získaných z předchozích bakalářských prací. Přítomnost chloridů v roztoku může zkreslovat výsledky relativních vodivostí i pH.



Obrázek 18: Závislost pH na  $\frac{c_{Lys}}{c_{HA}}$  pro protonizovaný lysin v prostředí  $0,015 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$ .



Obrázek 19: Závislost relativní vodivosti na  $\frac{c_{Lys}}{c_{HA}}$  pro protonizovaný lysin v prostředí  $0,015 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$ .

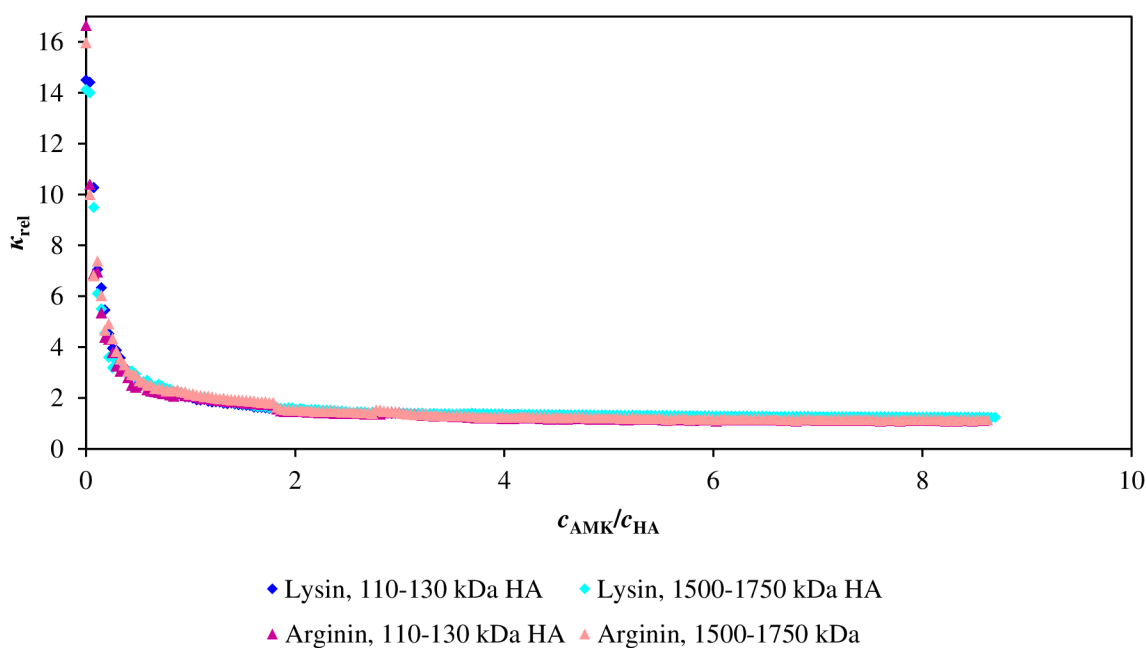
#### 4.1.3 Vliv použití argininu a lysinu a vliv molekulové hmotnosti HA

V porovnávání existence interakcí systému s částečně protonizovaným argininem se systémem s částečně protonizovaným lysinem musíme brát zřetel, že arginin je význačný guanidinovou skupinou, která způsobuje jeho silnou polaritu. Guanidinová skupina je tvořena dvěma aminoskupinami a jednou iminoskupinou a každá tato skupina je schopna nést tak jako

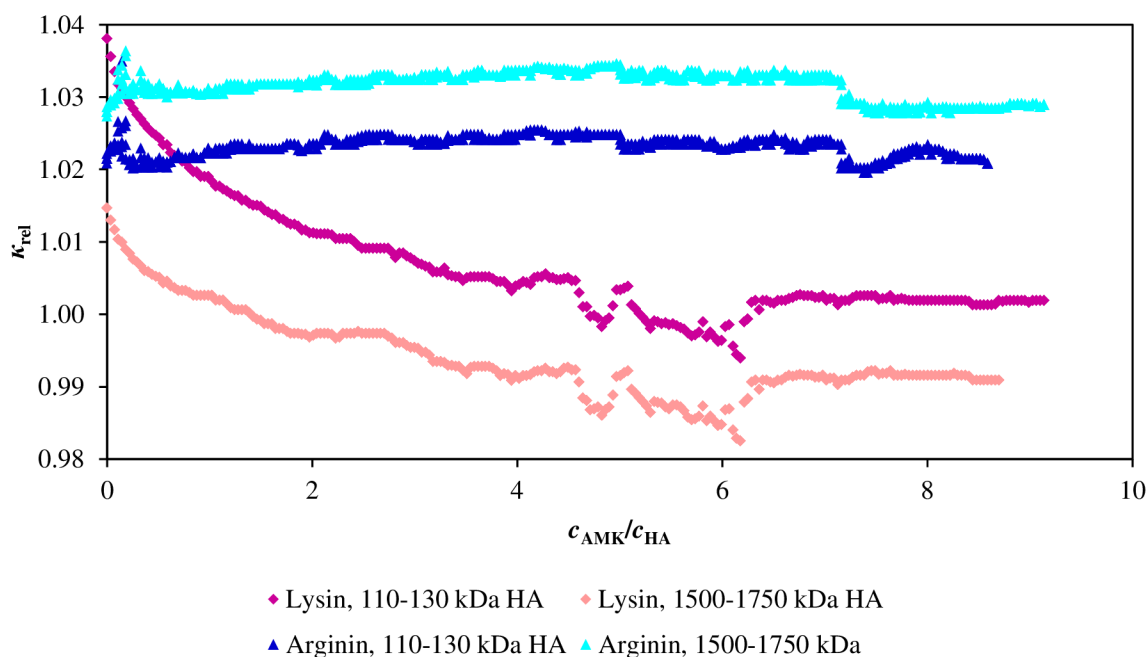
aminoskupina lysinu kladný náboj, pokud se nachází v prostředí o pH nižším, než je izoelektrický bod argininu. Při interakcích argininu s HA může guanidinová skupina po navázání na karboxylovou stericky bránit navázání další molekuly na řetězec, je tedy možné, že ne všechny karboxylové skupiny se záporným nábojem mají prostor k interakci s argininem. Z důvodu větší bazicity argininu je kladný náboj na guanidinové skupině stabilnější než u lysinu v prostředí o hodnotě pH nacházející se v roztoku HA. Dalším dodáním iontů z HCl při protonizaci se již kladný náboj nemusí více stabilizovat, tak jako u lysinu a ionty mohou zůstat volně v roztoku. Při porovnávání výsledků titrací částečně protonizovaného lysinu a argininu jsme získali následující výsledky.

V prostředí bez elektrolytu není v závislosti relativní vodivosti pozorovatelný žádný rozdíl mezi částečně protonizovaným lysinem a argininem. Na grafu závislosti relativního pH pro stejný systém v příloze 2 již můžeme pozorovat větší sklon při titraci částečně protonizovaného lysinu. Předpoklad, že lysin interaguje s HA výrazněji než arginin, se potvrzuje také na obrázku 21. Je-li zvýšená iontová síla na koncentraci elektrolytu  $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , interakce u částečně protonizovaného argininu nejsou již vůbec patrné, naproti tomu lysin interaguje v tomto prostředí zřetelně.

Molekulová hmotnost HA v zásadě nemá pro interakce aminokyseliny žádný vliv, což je patrné téměř u všech vyhodnocených grafů.



Obrázek 20: Závislost relativní vodivosti na  $\frac{c_{AMK}}{c_{HA}}$  pro částečně protonizovaný lysin a arginin v prostředí bez NaCl.



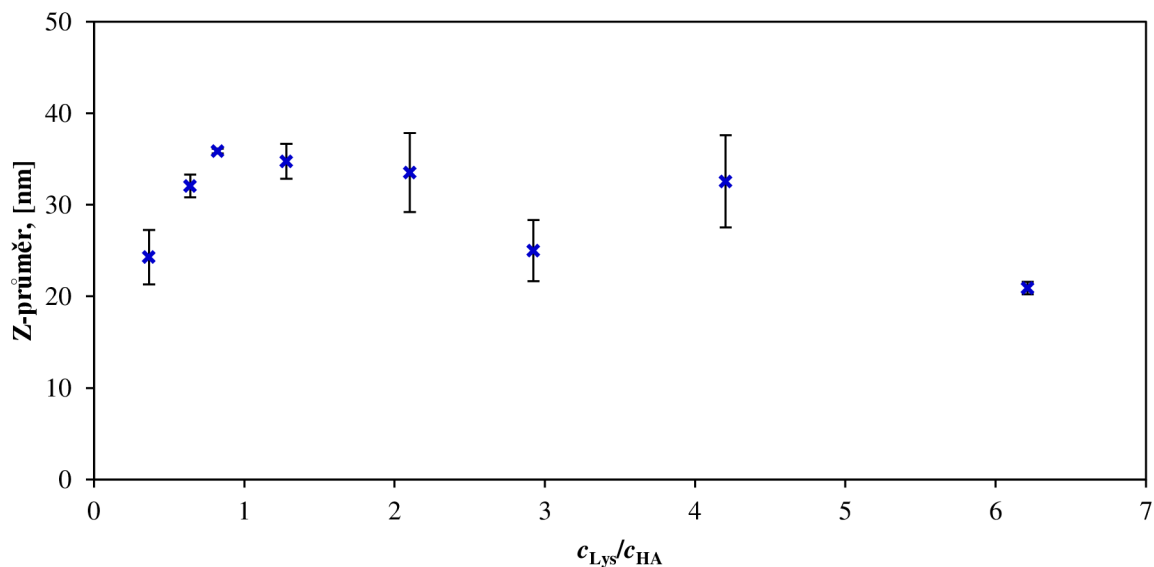
Obrázek 21: Závislost relativní vodivosti na  $\frac{c_{AMK}}{c_{HA}}$  pro částečně protonizovaný lysin a arginin v prostředí  $0,15 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$ .

## 4.2 Výsledky z měření DLS

Měření DLS bylo prováděno u koncentračních řad částečně protonizovaného lysinu, úplně protonizovaného lysinu a částečně protonizovaného argininu. Byly sledovány interakce aminokyselin v prostředí nízkomolekulárního a vysokomolekulárního hyaluronanu a vliv iontové síly na tento systém, vliv částečné a úplné protonizace aminokyseliny a rozdílnost výsledků při použití lysinu nebo argininu pro vznik interakcí. Z ekonomických důvodů byly také porovnávány výsledky vzorků přefiltrovaných přes filtr Millex o velikosti pórů  $0,22 \mu\text{m}$  a  $0,45 \mu\text{m}$ .

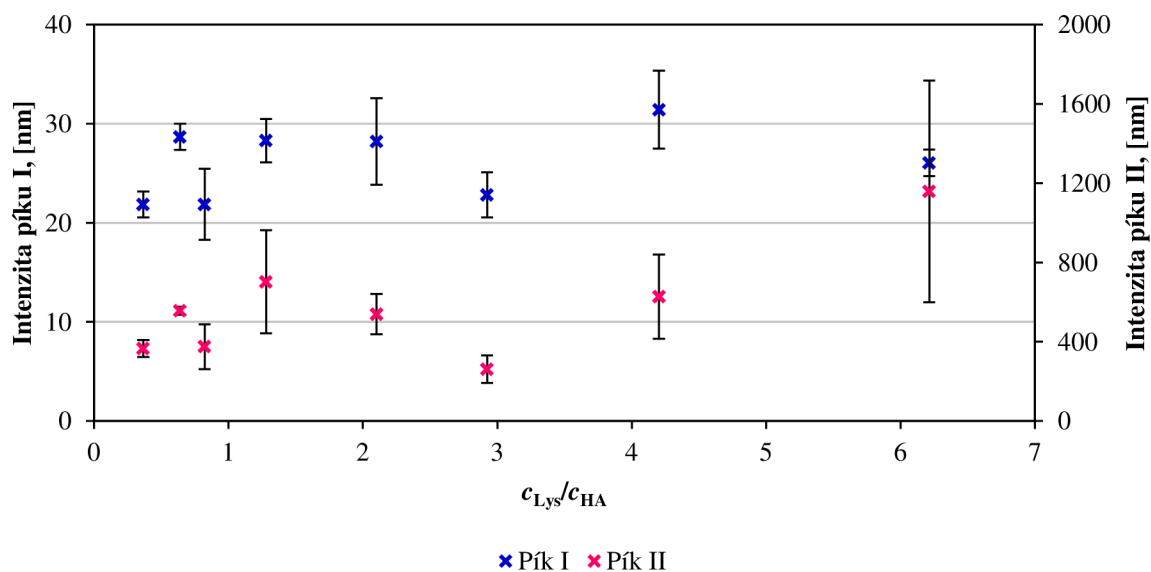
Výsledky DLS jsou často vyjádřeny Z-průměrem. Poněvadž výpočet Z-průměru je matematicky stabilní a výsledek Z-průměru není citlivý na šum, stal se vhodným parametrem pro velikost DLS. Metodou DLS se analyzuje fluktuace intenzity světla rozptýleného částicemi. Dochází ke změně frekvence rozptýleného záření dle pohybu částic od detektoru. Z-průměr je vyjádřen jako harmonický průměr intenzity tohoto rozptýleného světla. Zvyšuje-li se velikost částic, úměrně se také zvyšuje Z-průměr. Přestože se jedná pouze o průměrnou hodnotu, parametr Z-průměr poskytuje spolehlivé údaje o průměrné velikosti a distribuci velikosti částic, lze jej snadno měřit, a proto se stal přijatelnou normou pro prezentaci výsledků pro změnu velikosti částic v měření DLS.

V předešlých bakalářských pracích bylo zjištěno, že velikost částic v roztoku nízkomolekulového HA roste se zvětšující se koncentrací protonizovaného lysinu [52]. Po proměření všech připravených vzorků v rámci této bakalářské práce lze tyto výsledky částečně potvrdit. S přidavkem aminokyseliny do systému je ve většině případů patrný rostoucí trend, který však u některých vzorků po dosažení určité koncentrace aminokyseliny dosáhne svého maxima a po dalším zvětšování koncentrace aminokyseliny dochází ke zmenšení Z-průměru.

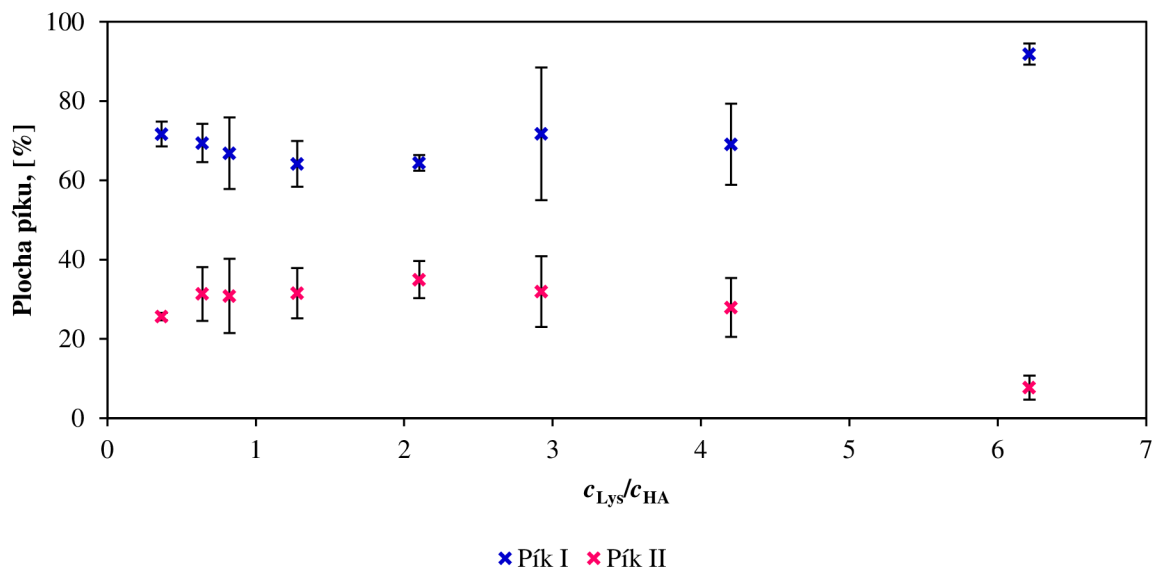


Obrázek 22: Naměřené hodnoty Z-průměru v závislosti na  $\frac{c_{Lys}}{c_{HA}}$  v systému částečně protonizovaného lysinu s 110–130 HA a  $0,015 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$ .

Zetasizer Nano je schopen mimo jiné vyhodnotit i další parametry velikosti částic. Proměřováním roztoků HA byly zjištěny vždy dva píky, u vysokomolekulové HA se často vytvářel i třetí pík. Plocha píku I se pohybovala v rozmezí 50–100 %, druhý pík byl méně dominantní.

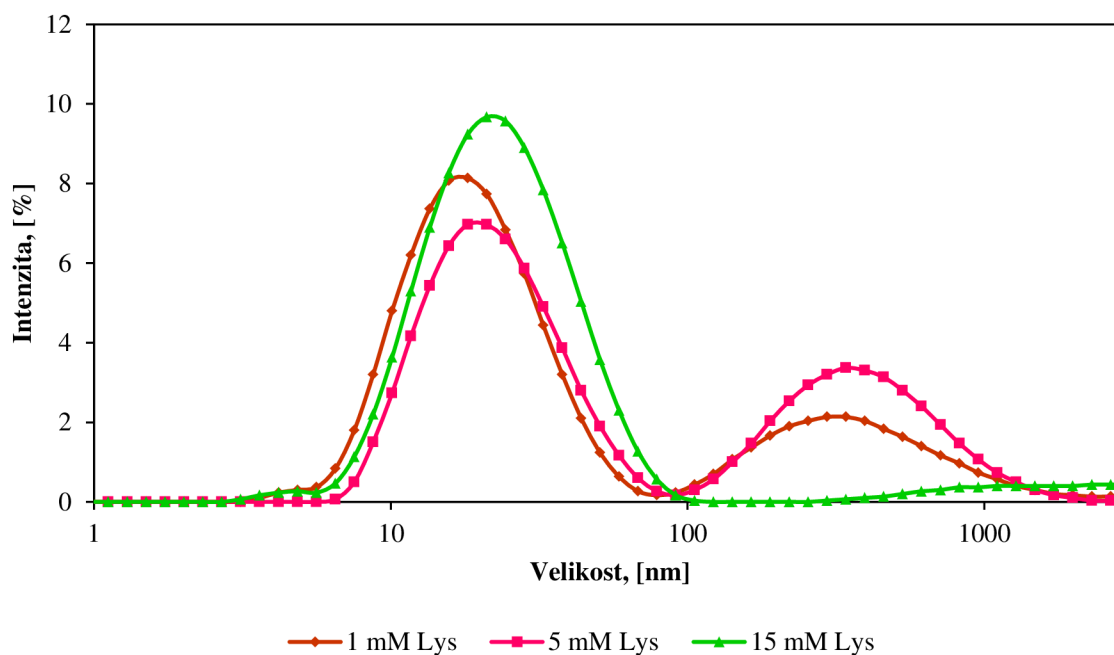


Obrázek 23: Naměřené hodnoty velikosti intenzity u obou píků v závislosti na  $\frac{c_{Lys}}{c_{HA}}$  v systému částečně protonizovaného lysinu s 110–130 HA a  $0,015 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$ .



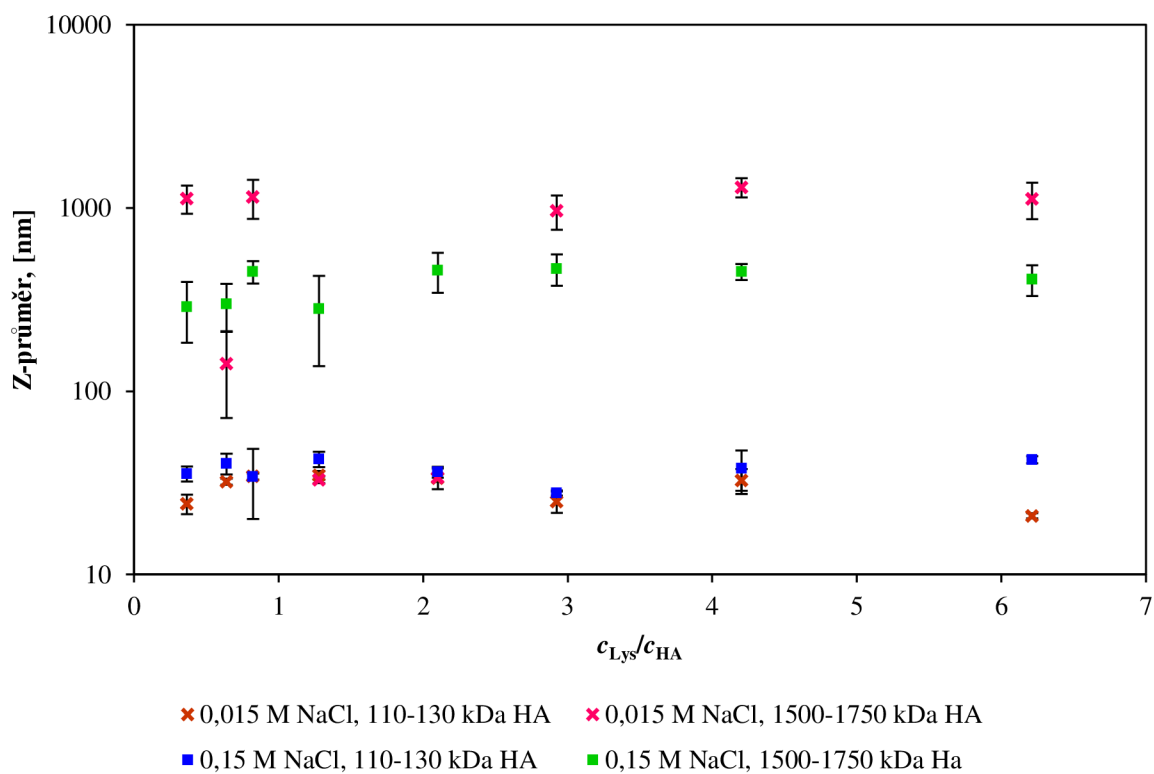
Obrázek 24: Naměřené hodnoty ploch u obou píků v závislosti na  $\frac{c_{Lys}}{c_{HA}}$  v systému částečně protonizovaného lysinu s 110–130 HA a  $0,015 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$ .

Roztok kyseliny hyaluronové je polydisperzní systém a tvoří jej převážně částice o poloměru cca 20–30 nm.



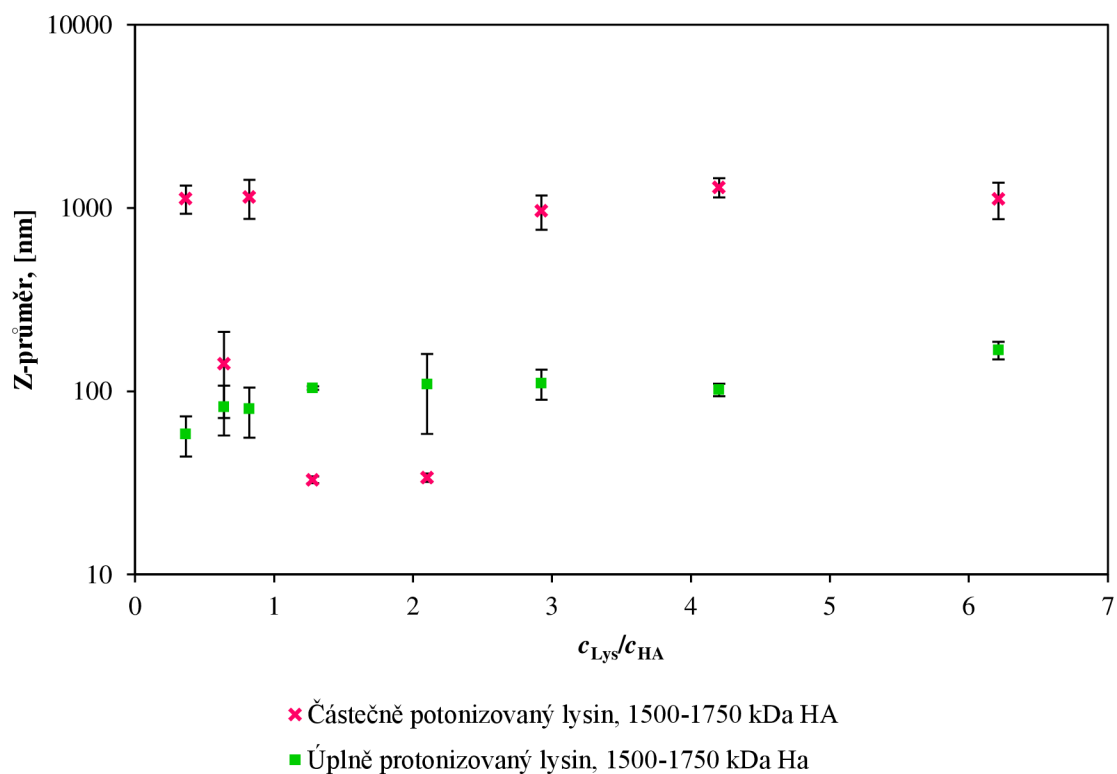
Obrázek 25: Naměřené hodnoty intenzity píků v závislosti na velikosti částic v systému částečně protonizovaného lysinu s 110–130 HA a  $0,015 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$ , pro koncentrace částečně protonizovaného lysinu 1, 5 a  $15 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

Změna velikosti částic zvýšením iontové síly v systému hyaluronan-aminokyselina není u nízkomolekulové HA příliš znatelný. Pro koncentraci  $0,15 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  a  $0,015 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$  byly naměřeny podobné hodnoty. Vliv iontové síly se výrazněji projevil v systému s vysokomolekulovým hyaluronanem, kdy zvýšení iontové síly mělo za následek zmenšení velikosti částic.



Obrázek 26: Naměřené hodnoty Z-průměru v závislosti na  $\frac{c_{Lys}}{c_{HA}}$  v systému částečně protonizovaného lysinu.

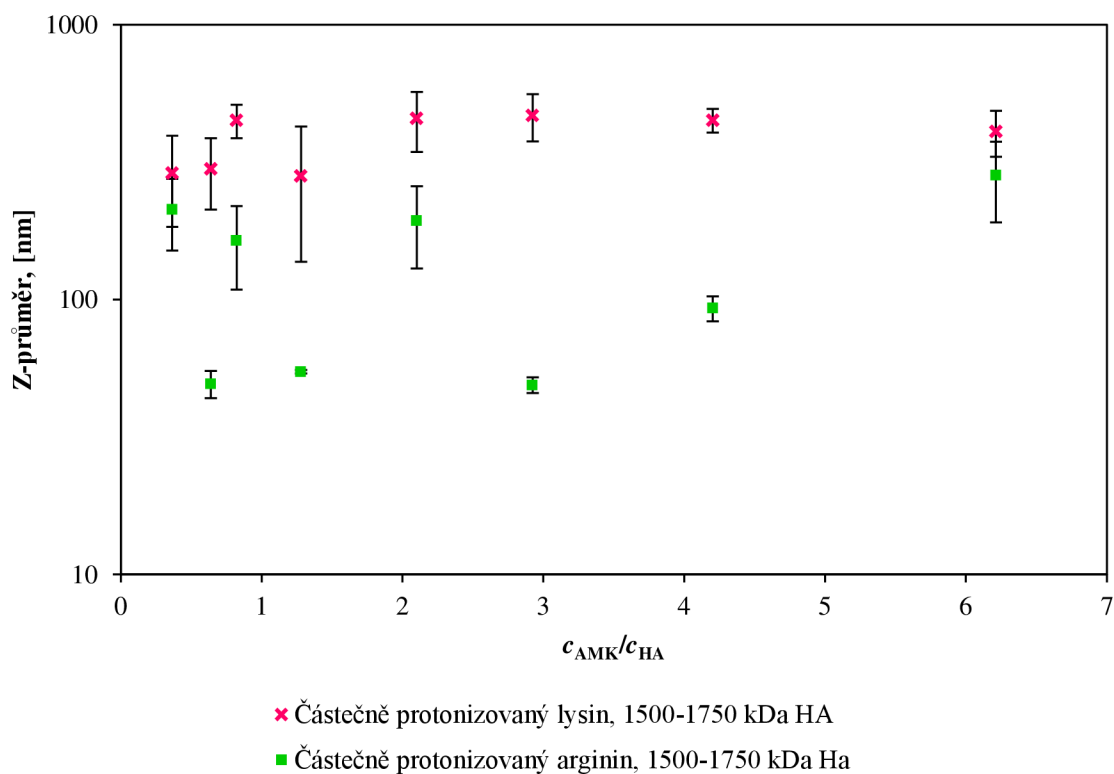
Dále byl sledován vliv protonizace na velikost částic. U nízkomolekulového HA není rozdíl v protonizaci znatelný. Odlišnost nastává v případě vysokomolekulového hyaluronanu, kdy pro úplně protonizovaný lysin byly naměřeny menší velikosti částic v roztoku než u částečně protonizovaného lysinu. Při úplné protonizaci je sice větší koncentrace chloridových iontů, ale v případě úplně protonizovaného lysinu je větší kladný náboj, který by měl vést k lepší elektrostatické interakci. Pro arginin vliv protonizace nelze posoudit, protože koncentrační řady úplně protonizovaného argininu nebyly v rámci bakalářské práce proměřeny.



Obrázek 27: Naměřené hodnoty Z-průměru v závislosti na  $\frac{c_{Lys}}{c_{HA}}$  při koncentraci  $0,015 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  NaCl.

Při použití částečně protonizovaného argininu je velikost částic oproti částečně protonizovanému lysinu menší. Porovnáním výsledků získaných titracemi je tedy potvrzena domněnka výraznějších elektrostatických interakcí částečně protonizovaného lysinu s HA než částečně protonizovaného argininu. Změna velikosti částic je opět lépe znatelná v systémech s vysokomolekulovým hyaluronanem.





Obrázek 28: Naměřené hodnoty Z-průměru v závislosti na  $\frac{c_{AMK}}{c_{HA}}$  koncentraci  $0,15 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  NaCl.

Posledním srovnávacím kritériem byl vliv použití filtru při přípravě vzorků na měření. Porovnáním hodnot získaných pro stejný systém, avšak s filtrací přes  $0,45 \mu\text{m}$  a  $0,22 \mu\text{m}$  filtr není viditelná žádná markantní změna, viz přílohy 3 a 4. Předpoklad pro získání přesnějších hodnot při použití filtru s menšími póry se tedy nepotvrdil.

Po vyhodnocení dat se ve všech proměřených koncentračních řadách vyskytovaly vysoké hodnoty směrodatné odchylky, proto výsledky není možno považovat za příliš objektivní. Pro studium interakcí byl použit hyaluronan s molekulovou hmotností  $110\text{--}130 \text{ kDa}$  a  $1500\text{--}1750 \text{ kDa}$ . Přestože se nejedná o velkou polydisperzitu v intervalu molekulových hmotností, lze usoudit, že nepravidelný trend při vyhodnocování velikosti částic mohl být částečně způsoben touto polydisperzitou, která je u nízkomolekulového HA  $20 \text{ kDa}$  a u vysokomolekulového HA  $250 \text{ kDa}$ . Částice v roztoku se neustále s časem posunují do všech směrů, což je principem přístroje pro měření velikosti částic. Tento pohyb tedy způsobuje, že v daném okamžiku je měřena a vyhodnocována jiná částice než v okamžiku následujícím. Liší-li se molekulové hmotnosti o  $20 \text{ kDa}$ , odpovídá to  $17 \%$  z celkové hodnoty. Rozdíl molekulových hmotností tedy mohl způsobit i rozdíl v naměřených hodnotách velikosti částic. Systém částečně a úplně protonizovaného lysinu s nízkomolekulovým HA byl proměřován 6 krát přes filtr  $0,45 \mu\text{m}$  a 6 krát přes filtr  $0,22 \mu\text{m}$ . I když byl jeden systém proměřen 12 krát, výsledné hodnoty se mnohdy neshodovaly. Chybu experimentátora lze částečně vyloučit, protože proměřených koncentračních řad bylo vícero a odlišnosti ve velikosti částic se nacházely u všech. Odlišnosti ve výsledcích mohly být také způsobeny opakovaným používáním filtrů po regeneraci.

Použití metody dynamického rozptylu světla se ve výsledku nejeví jako vhodné. Vzorek hyaluronanu a aminokyseliny je polydisperzní systém a při použití vyšší iontové síly přístroj není schopen data správně vyhodnotit.

## 5 ZÁVĚR

Systém nízkomolekulárního a vysokomolekulárního HA s protonizovanými amfifilními aminokyselinami byl studován v prostředí různé iontové síly. Ke studiu byly použity elektroanalytické metody a dynamický rozptyl světla.

Nejdůležitějším kritériem pro pozorování existence interakcí byl vliv iontové síly. Vyhodnocením konduktometrických výsledků interakce nejvýrazněji probíhaly v prostředí bez elektrolytu. Při zvýšení koncentrace NaCl na  $0,015 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  se interakce vyskytují za použití všech protonizovaných aminokyselin, tj. částečně a úplně protonizovaného lysinu a částečně protonizovaného argininu. Zvýšením koncentrace NaCl na  $0,15 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  byly interakce nejlépe průkazné pro úplně protonizovaný lysin, v systému s částečně protonizovaným lysinem byl trend méně patrný a částečně protonizovaný arginin již při takto vysoké koncentraci elektrolytu neinteragoval vůbec.

Výsledky pH a relativní vodivosti ukazují, že systém HA s úplně protonizovaným lysinem je stabilnější a odolnější vůči iontové síle než s částečně protonizovaným lysinem. Křivky u úplně protonizovaného lysinu se výrazně mění s jeho přidávkem do systému, obzvláště při nízkých koncentracích.

Proměrováním roztoků HA s částečně protonizovaným argininem byly elektrostatické interakce prokázány pro prostředí bez NaCl a s koncentrací elektrolytu  $0,015 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , nebylo však dosaženo tak dominantních výsledků jako u částečně protonizovaného lysinu. Kombinací výsledků měření DLS, konduktivity a pH lze konstatovat, že lysin je pro interakce s HA vhodnější modifikační sloučeninou než arginin.

Vliv molekulové hmotnosti HA pro interakce s aminokyselinami konduktometrickými a acidobazickými titracemi nebyl prokázán. V měření DLS však poskytoval vysokomolekulární HA zřetelnější výsledky, které se shodovaly s výsledky získaných z titrací.

Stejně jako vliv molekulové hmotnosti, nebyl patrný vliv použití filtru při přípravě vzorků na měření. Výsledné hodnoty pro filtr  $0,22 \mu\text{m}$  a  $0,45 \mu\text{m}$  se pohybovaly v téměř shodném rozmezí.

Měření pH byly spíše ověřovány výsledky získané měření konduktivity. Metoda DLS poskytovala výsledky s velkými směrodatnými odchylkami. Pro lepší průkaznost a reprodukovatelnost by bylo vhodné celé měření DLS zopakovat. V případě dosažení obdobných výsledků by se tato metoda ukázala pro sledování námi zkoumaných interakcí jako vhodná. Z použitých metod lze považovat za nejprůkaznější konduktometrické výsledky. Přestože má iontová síla značný vliv na konduktivitu, interakce byly poměrně dobře patrné.

## 6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VELEBNÝ, Vladimír: *Hyaluronan – biopolymer pro tkáňové inženýrství*. Thesis. Brno: Vysoké učení technické v Brně. 2012. 1st ed. 29 p.
- [2] HASCALL, Vincent C. a Torvard C. LAURENT. Hyaluronan: Structure and properties. *Glycoforum* [online]. 1997, no. 1, [cit. 2013-04-27]. Dostupné také z <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>.
- [3] NECAS, J.; L. BARTOSIKOVA aj. KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*. 2008, vol. 53, no. 8, p. 397–411.
- [4] MEYER, Karl, PALMER, John. The polysaccharide of the vitreous humor. *The journal of biological chemistry*. 1934, vol. 107, p. 629–634.
- [5] SCOTT, J. E. Secondary and Tertiary Structure of Hyaluronan in Aqueous Solution. *Glycoforum* [online]. 1998, no. 2, p. 6–20 [cit. 2011-12-03]. Dostupné také z <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/hyaluronanE.html>.
- [6] LAPČIK, Lubomír, et al. Hyaluronan: Structure, properties, and applications. *Chemical Reviews*. 1998, vol. 98, no. 8, p. 2663–2684. ISSN: 15206890.
- [7] HATAKEYAMA, Hyoe; HATAKEYAMA, Tatsuko. Interaction between water and hydrophilic polymers. *Thermochimica Acta*. 1998, 308, p. 3–22.
- [8] LUO, YI; KIRKER, KELLY R.; PRESTWICH, GLENN D. Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2000, 69, p. 169–184.
- [9] GUTOWSKA, ANNA; JEONG, BYEONGMOON; JASIONOWSKI, MAREK. Injectable Gels for Tissue Engineering. *THE ANATOMICAL RECORD*. 2001, 263, p. 342–349.
- [10] GARG, Hari G., HALES Charles A. Chemistry and Biology of Hyaluronan. Solution Properties of Hyaluronan. Oxford, UK: Elsevier Ltd, 2004, vol. , no. , p.1–21. ISSN: 0 08 044382 6
- [11] FRASER, J. R. E., T. LAURENT a U. B. G. LAURENT. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*, 1997, vol. 242, iss.1, s. 27–33. ISSN 0954-6820
- [12] KENNEDY, JOHN F.; PHILLIPS, GLYN. O; HASCALL, PETER A. *HYALURONAN: Chemical, Biochemical and Biological Aspects*. Cambridge, England : Woodhead Publishing Ltd., 2002. 580 s. ISBN 1855735709. Dostupné z {<http://books.google.cz/books?id=1OmYewmd-SoC&lpg=PA201&ots=-5Ff1ASX91&dq=Hyaluronan%20rheology&pg=PA41#v=onepage&q=Hyaluronan%20rheology&f=false>}
- [13] FUKUDA, Kazuhiro; SUKUZU, Emi; SEIMIYA, Tsutumo. Rheological Properties of Sodium Hyaluronate in Decyltrimethylammonium Bromide Aqueous Solutions. *Langmuir*. 1999, 15, s. 4217–4221.
- [14] THALBERG, Kyrre a Björn LINDMAN. Interaction between Hyaluronan and Cationic Surfactants. *The Journal of Physical Chemistry*. 1989, No. 4, s. 1478–1483.
- [15] PISARČIK, Martin et al. Aggregation Properties of Sodium Hyaluronate with Alkanediyl-bis(dimethylalkylammonium Bromide) Surfactant in Aqueous Sodium Chloride Solution. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2000, vol 228, iss. 2, s. 207–212. DOI: 10.1006/jcis.2000.6948.

- [16] SCHWARTZ, A. M., PERRY a J BERCH. *Surface active agents and detergents*. Dotisk. New York: R. E. Krieger Pub, 1977. ISBN 0882751573.
- [17] VALEUR, B.: *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001. ISBN 3-527-29919-X
- [18] RIBEIRO, Walkíria, José Luís MATA and Benilde SARAMAGO. Effect of Concentration and Temperature on Surface Tension of Sodium Hyaluronate Saline Solutions. *Langmuir*. 2007, vol. 23, no. 13, p. 7014–7017. ISSN 0743-7463.
- [19] HALASOVÁ, T., KROUSKÁ, J., MRAVEC, F., PEKAŘ, M., Hyaluronan-surfactant interactions in physiological solution studied by tensiometry and fluorescence probe techniques. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2011, vol. 391, no. 1-3, p. 25–31 [cit. 2013-06-10]. ISSN: 0927-7757. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/>.
- [20] HERSLÖF, Asa, Lars-Olof SUNDELÖF a Katarina EDSMAN. Interaction between Polyelectrolyte and Surfactant of Opposite Charge. Hydrodynamic Effects in the Sodium Hyaluronate/Tetradecyltrimethylammonium Bromide/Sodium Chloride/Water System. *The Journal of Physical Chemistry*. 1992, No. 5, s. 2345–2348.
- [21] NOVOA-CARBALLAL, Ramon, Dmitry V. PERGUSHOV, Axel H. E. MÜLLER, George W. GREENE, Gregory D. JAY, Jacob N. ISRAELACHVILI a Jesper ØSTERGAARD. Interpolyelectrolyte complexes based on hyaluronic acid-block-poly(ethylene glycol) and poly-L-lysine: Experimental Factors Role to Successfully Preserve Viability and Functionality of Cells. *Soft Matter*. 2013, vol. 9, no. 16, p. 4297. DOI: 10.1039/C3SM27549C. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/>.
- [22] HOLMBERG, Krister. *Surfactants and polymers in aqueous solution*. 2nd ed. Chichester: John Wiley, 2003, p. 277–315. ISBN 0-471-49883-1.
- [23] MUKERJEE, P., MYSELS, K. J. Critical micelle concentrations of aqueous surfactant systems. *NBS*. 1971, Washington
- [24] HALASOVÁ, T., MRAVEC, F., PEKAŘ, M., The effect of hyaluronan on the aggregation of hydrophobized amino acids – A fluorescence study. *Carbohydrate polymers* [online]. 2013, vol. 97, no. 1, p. 34–37 [cit. 2013-06-10]. ISSN: 0144-8617. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/>.
- [25] KOGAN, Grigorij, Ladislav ŠOLTĚS, Robert STERN a Peter GEMEINER. Hyaluronic acid : a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett*. 2007, č. 29, s. 17–25.
- [26] PISARČIK, Martin, et al. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. Amsterdam: Elsevier Science B. V., 1999. ISSN: 0927-7757
- [27] COLLEN, Sascha, Michel P. J. VAN DEN BEKEROM, Michiel MULIER a Daniel HAVERKAMP. Hyaluronic Acid in the Treatment of Knee Osteoarthritis. *BioDrugs*. 2012, roč. 26, č. 4, s. 257–268. ISSN 1173-8804
- [28] JARACZ, Stanislav et al. Recent advances in tumor targeting anticancer drug conjugates. *Bioorganic and Medical Chemistry*. 2005, iss. 13, s. 5043–5054.
- [29] Lysin. *Datový standard MZ ČR* [online]. 2005 [cit. 2012-04-20]. Dostupné z: [http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD\\_DS3/hypertext/KPAAQ.htm](http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS3/hypertext/KPAAQ.htm)
- [30] Lysine. *University of Maryland Medical Center* [online]. 2011 [cit. 2013-04-27]. Dostupné z: <http://www.umm.edu/altmed/articles/lysine-000312.htm>
- [31] *Microbial Production of L-Amino Acids* [online]. 2003 [cit. 2012-04-20]. ISBN 3-540-43383-X. Dostupné z: <http://books.google.cz/books?id=bBf->

42O85tMC&pg=PA59&dq=Biotechnological+Manufacture+of+Lysine&hl=cs&ei=XyytTrC2BYT4sgaz0LXUDw&sa=X&oi=book\_result&ct=result&resnum=1&ved=0CDEQ6AEwAA#v=onepage&q=Biotechnological%20Manufacture%20of%20Lysine&f=false

- [32] KODÍČEK, Milan. *Biochemické pojmy*. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT v Praze, 2004. ISBN 80-7080-551-X.
- [33] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie I*. Vyd. 1. Praha: Academia, 1992. ISBN 80-200-0438-6.
- [34] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [35] SOMMER, Lubomír. *Základy analytické chemie II*. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214-1742-0
- [36] OPEKAR, F., JELÍNEK I., RYCHLOVSKÝ, P., PLZÁK, Z. Základní analytická chemie. Vyd. 1. Praha: Univerzita Karlova v Praze, 2003. p. 89–97, 114–119. ISBN 80-246-0553-8
- [37] CHRISTIAN, Gary D.; O'REILLY, James E. *Instrumental Analysis*. USA: Allyn and Bacon Inc., 1986. 996 s. ISBN 0205086853.
- [38] WEST, Skoog; CROUCH, Holler. *Analytical Chemistry : An Introduction*. USA: Saunders College Publishing, 2000. 807 s. ISBN 0030202930.
- [39] KVÍTEK, Libor. Metody studia koloidních soustav. In: *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis* [online]. Olomouc, Czech Republic: Faculty of Physical Culture, Palacky University [cit. 2013-02-10]. Dostupné z: <http://chemikalie.upol.cz/skripta/>
- [40] KVÍTEK, Libor, Aleš PANÁČEK. *Základy koloidní chemie*. [online] Olomouc, 2007 [cit. 2013-02-09]. Dostupné z: <http://fch.upol.cz/skripta/kol/koch.pdf>
- [41] Applications of Oligosaccharides: Hyaluronic acid oligosaccharides (4–12mers). In: BARNETOVÁ, Eliška. *Komunikační mix pro společnost Contipro Group: Communication Mix for Company Contipro Group* [online]. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta podnikatelská, 2010 [cit. 2013-02-15]. Dostupné z: <http://www.contipro.com>
- [42] BARTOVSKÁ, Lidmila. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*: 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1992, 119 s. ISBN 80-708-0158-1
- [43] JACKSON, Kevin. Dynamický rozptyl světla - co, jak, proč?. *CHEMagazín: časopis pro chemicko-technologickou a laboratorní praxi*. Pardubice: Ing. Miloslav Rotrekl, 2007, XVII, č. 1, s. 12–14. ISSN 1210-7409.
- [44] Optické vlastnosti koloidních soustav: fyzikální princip metody měření velikosti částic a zeta potenciálu. *Krystalografická společnost* [online]. 2008 [cit. 2013-02-10]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/texty-ulohy-uvod.htm>
- [45] PECORA, Robert. *Dynamic light scattering: the method and some applications*. Editor Wyn Brown. Oxford [England]: Clarendon Press, 1993, 735 s. Monographs on the physics and chemistry of materials. ISBN 978-0-19-853942-1.
- [46] MALVERN INSTRUMENTS LTD. *Zetasizer Nano: Příručka pro uživatele*. 3.0. 2007, 196 s.
- [47] BALAZS, Endre A. Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives. *Cosmetic and Pharmaceutical Applications of Polymers*. Boston, MA: Springer US, 1991, p. 293. DOI: 10.1007/978-1-4615-3858-5\_29. Dostupné z: <http://link.springer.com/>.

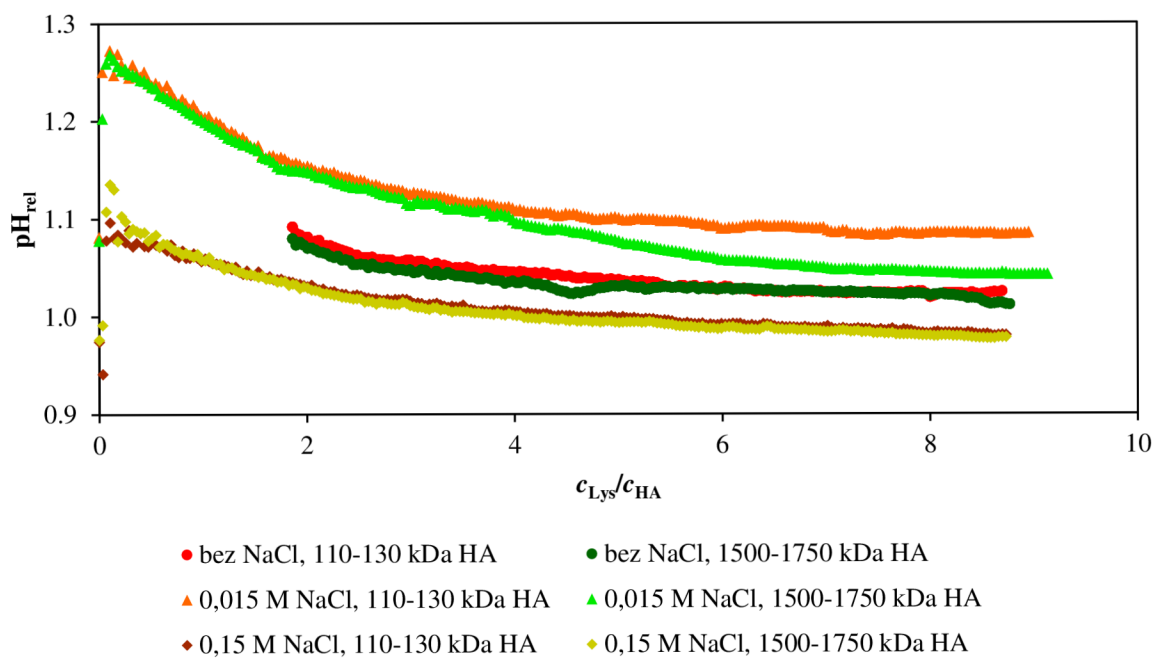
- [48] Kötz, J., Kosmella, S., Beitz, T. Self-assembled polyelectrolyte systems. *Progress in Polymer Science* 26. 2001. vyd. 8. s. 1199–1232.
- [49] TROJAN, Martin. *Nové metody přípravy protonizovaných aminokyselin a jejich interakce s polyelektrolyty*. Brno, 2012. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Ing. Martin Chytil, Ph.D.
- [50] ZEMAN, Jan. *Reologické studium interakcí vysokomolekulárního hyaluronanu a protonizovaných aminokyselin*. Brno, 2011. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Ing. Martin Chytil, Ph.D.
- [51] ŠIMÁČKOVÁ, Marcela. *Viskozimetrické studium chování systému L-Lysinu a 6-amonikapronové kyseliny s hyaluronanem v oblasti nízkých koncentrací aminokyselin*. Brno, 2012. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Ing. Martin Chytil, Ph.D.
- [52] CHLUMSKÁ, Jana. *Studium interakcí protonizovaných aminokyselin s nízkomolekulárním hyaluronanem*. Brno, 2013. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Ing. Martin Chytil, Ph.D.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

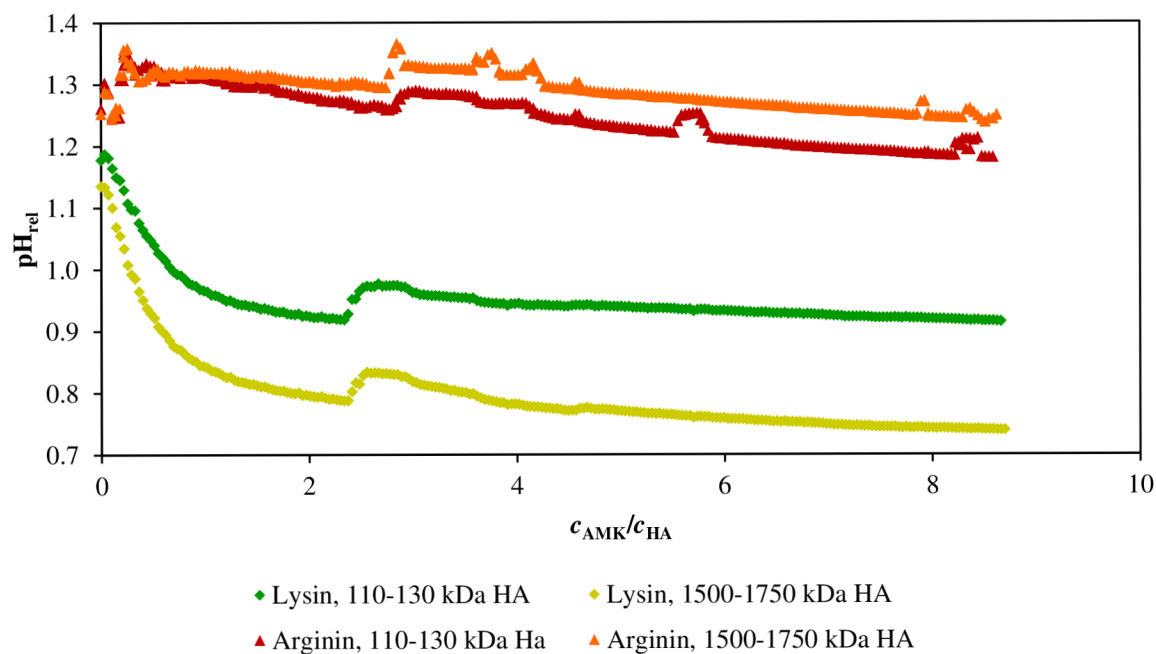
|                |   |
|----------------|---|
| HA             | Hyaluronan, kyselina hyaluronová  |
| Arg            | Arginin   |
| Lys            | Lysin   |
| CD44           | Receptor, na který se váže kyselina hyaluronová   |
| DLS            | Dynamický rozptyl světla  |
| Da             | Dalton – jednotka molekulové hmotnosti ( $1 \text{ Da} = 1,66 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$ )        |
| $r, R$         | Poloměr, [m]  |
| $\epsilon_r$   | Relativní permitivita   |
| $\epsilon_0$   | Permitivita vakua = $8,854 18 \cdot 10^{-12} \text{ C}^2 \cdot \text{J}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$ |
| $Q$            | Elektrický náboj, [C]   |
| $\pi$          | Ludolfovo číslo   |
| $\kappa$       | Konduktivita, měrná vodivost, [ $\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]                                 |
| $G$            | Vodivost, [S]   |
| $U$            | Napětí, [V]   |
| $I$            | Elektrický proud, [A], intenzita nepolarizovaného záření, [ $\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$ ]      |
| $c$            | Koncentrace, [ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]  |
| $E$            | Elektrický potenciál, [V]   |
| $A$            | Plocha, [ $\text{m}^2$ ]  |
| $v$            | Rychlost, [ $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ]  |
| $F_e$          | Elektrická síla, [N]  |
| $T$            | Termodynamická teplota [K]  |
| pK             | Disociační konstanta  |
| $S$            | Plocha elektrod, [ $\text{m}^2$ ]   |
| $L$            | Vzdálenost elektrod, [m]  |
| $\theta$       | Konstanta vodivostní nádoby, [ $\text{cm}^{-1}$ ]   |
| $\eta_0$       | Viskozita disperzního prostředí, [ $\text{Pa} \cdot \text{s}$ ]                                   |
| $k_B$          | Boltzmannova konstanta = $1,380 648 8 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$               |
| $R$            | Univerzální plynová konstanta = $8,314 462 1 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ |
| $F$            | Faradayova konstanta = $96 485, 336 5 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$                            |
| $D$            | Difúzní koeficient, [ $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ]  |
| $\kappa_{rel}$ | Relativní měrná vodivost  |
| $pH_{rel}$     | Relativní pH  |
| $t$            | Teplota, [ $^{\circ}\text{C}$ ]   |
| $d_H$          | Hydrodynamický průměr kulovité částice, [m]   |
| $\rho$         | Hustota, [ $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$ ]  |
| $R$            | Elektrický odpor, [ $\Omega$ ]  |
| $\alpha$       | Polarizovatelnost částice, [ $\text{C} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1}$ ]                    |
| $Q_n$          | Kritické hodnoty pro Dean-Dixonův test  |
| $\sigma$       | Směrodatná odchylka   |



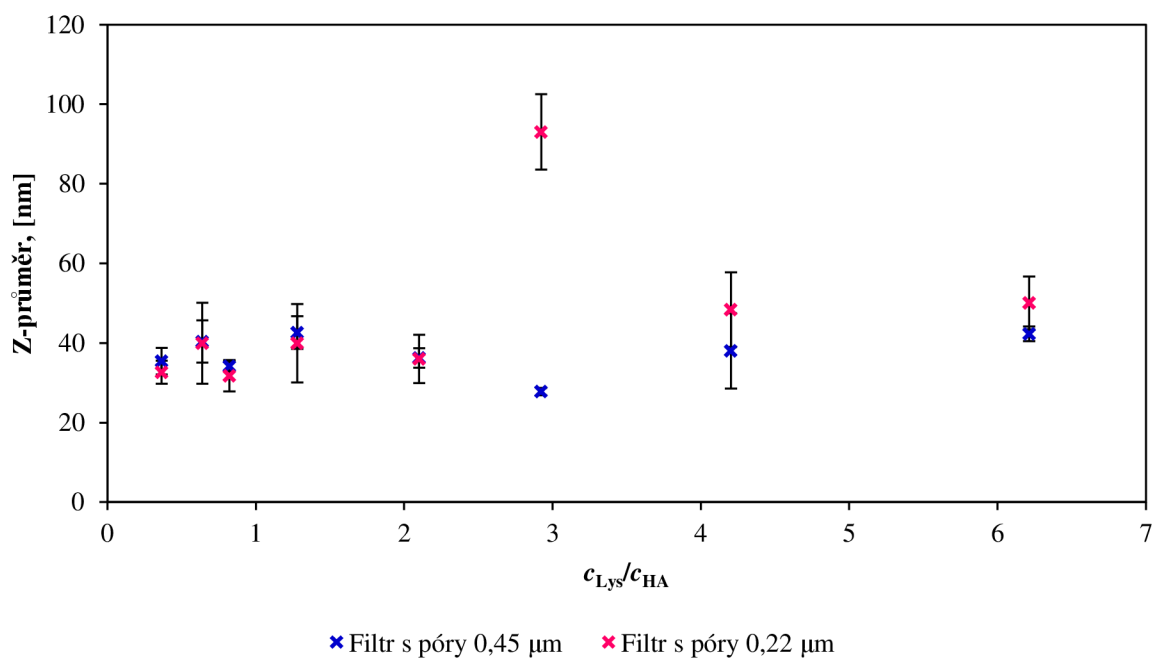
## 8 PŘÍLOHY



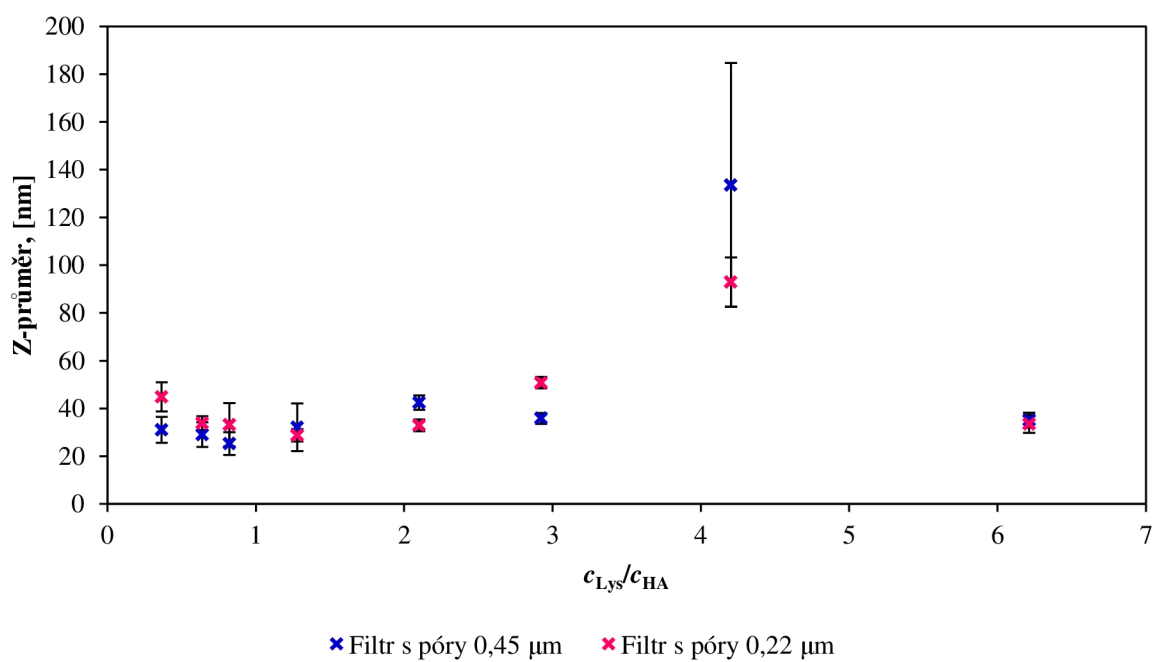
Příloha 1: Závislost relativního pH na  $\frac{c_{Lys}}{c_{HA}}$  pro úplně protonizovaný lysin.



Příloha 2: Závislost relativního pH na  $\frac{c_{AMK}}{c_{HA}}$  pro částečně protonizovaný lysin a arginin v prostředí bez NaCl.



Příloha 3: Naměřené hodnoty Z-průměru částečně protonizovaného lysinu s HA 110–130 kDa v závislosti na  $\frac{c_{Lys}}{c_{HA}}$  při koncentraci  $0,15 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  NaCl.



Příloha 4: Naměřené hodnoty Z-průměru úplně protonizovaného lysinu s HA 110–130 kDa v závislosti na  $\frac{c_{Lys}}{c_{HA}}$  při koncentraci  $0,015 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  NaCl.

| $c_{AMK}/c_{HA}$ | Částečně protonizovaný lysin |        | Úplně protonizovaný lysin |        | Částečně protonizovaný arginin |        |
|------------------|------------------------------|--------|---------------------------|--------|--------------------------------|--------|
|                  | 0,015 M                      | 0,15 M | 0,015 M                   | 0,15 M | 0,015 M                        | 0,15 M |
| 0,366            | 24,3                         | 35,4   | 31,1                      | 60,7   | 22,4                           | 28,4   |
| 0,640            | 32,1                         | 40,4   | 29,1                      | 43,8   | 393,6                          | 33,1   |
| 0,822            | 34,3                         | 34,2   | 25,3                      | 38,0   | 483,1                          | 30,4   |
| 1,279            | 34,7                         | 42,6   | 32,2                      | 40,9   | 27,9                           | 29,8   |
| 2,102            | 33,5                         | 36,3   | 42,5                      | 40,4   | 24,2                           | 39,9   |
| 2,924            | 25,0                         | 27,8   | 35,9                      | 85,7   | 311,5                          | 45,6   |
| 4,203            | 32,5                         | 38,0   | 133,6                     | 47,8   | 32,8                           | 32,6   |
| 6,214            | 20,9                         | 42,3   | 35,1                      | 88,2   | 131,9                          | 34,8   |

Příloha 5: Naměřené hodnoty Z-průměru [nm] v závislosti na  $\frac{c_{AMK}}{c_{HA}}$  pro HA 110–130 kDa v různých prostředích.

| $c_{AMK}/c_{HA}$ | Částečně protonizovaný lysin |        | Úplně protonizovaný lysin |        | Částečně protonizovaný arginin |        |
|------------------|------------------------------|--------|---------------------------|--------|--------------------------------|--------|
|                  | 0,015 M                      | 0,15 M | 0,015 M                   | 0,15 M | 0,015 M                        | 0,15 M |
| 0,366            | 1125,1                       | 288,7  | 58,4                      | -      | 636,7                          | 212,7  |
| 0,640            | 141,2                        | 299,1  | 73,6                      | -      | 519,6                          | 49,4   |
| 0,822            | 1147,0                       | 422,2  | 80,3                      | -      | 728,7                          | 163,9  |
| 1,279            | 32,9                         | 344,8  | 104,0                     | -      | 1027,3                         | 54,7   |
| 2,102            | 33,8                         | 456,5  | 109,2                     | -      | 602,8                          | 193,8  |
| 2,924            | 963,3                        | 467,0  | 103,7                     | -      | 908,4                          | 48,9   |
| 4,203            | 1294,7                       | 449,2  | 101,9                     | -      | 475,5                          | 93,1   |
| 6,214            | 1118,6                       | 408,5  | 167,8                     | -      | 754,2                          | 282,9  |

Příloha 6: Naměřené hodnoty Z-průměru [nm] v závislosti na  $\frac{c_{AMK}}{c_{HA}}$  pro HA 1500–1750 kDa v různých prostředích.