

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

SYSTEM KOLAGEN-HYALURONAN V KOLOIDNÍM STŘÍBŘE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

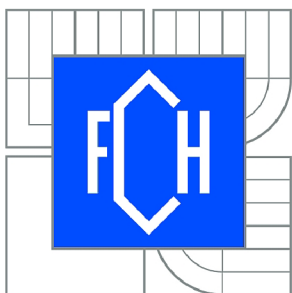
RENÁTA SKLENÁŘOVÁ

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

SYSTÉM KOLAGEN-HYALURONAN V KOLOIDNÍM STŘÍBŘE

SYSTEM OF COLLAGEN-HYALURONAN IN COLLOIDAL SILVER

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

RENÁTA SKLENÁŘOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. ANDREA KARGEROVÁ, Ph.D.

BRNO 2015



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0903/2014** Akademický rok: **2014/2015**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Renáta Sklenářová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)
Studijní obor: Biotechnologie (2810R001)
Vedoucí práce **Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.**
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Systém kolagen-hyaluronan v koloidním stříbře

Zadání bakalářské práce:

1. Seznámit se s densitometrií a reologií
2. Navrhnout experimenty zkoumající vliv koncentrace a teploty na hustotu a ultrazvukovou rychlost roztoků
3. Realizovat a vyhodnotit experimenty.
4. Zhodnotit výsledky.

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

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.

Renáta Sklenářová
Student(ka)

Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

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

ABSTRAKT

Bakalářská práce je zaměřena na charakteristiku roztoků hyaluronanu a kolagenu v koloidním stříbře. Tyto roztoky polysacharidu a proteinu byly připravovány v několika koncentračních řadách, které byly analyzovány densitometrem od firmy Anton Paar a reometrem od firmy TA Instruments. Měřena byla hustota, ultrazvuková rychlost a viskozita. Cílem práce bylo najít optimální poměr kolagenu a hyaluronanu v koloidním stříbře, který by vyhovoval transdermálnímu vstřebávání a přípravě kožního hojivého spreje.

ABSTRACT

The bachelor thesis is focused on the characteristics of solutions of hyaluronan and collagen in colloidal silver. These solutions polysaccharide and protein were prepared at several concentration rows that were analyzed by densitometer from Anton Paar and rheometer from TA Instruments. There were measured density, ultrasonic velocity and viscosity. The aim was to find the optimal ratio of collagen and hyaluronan in colloidal silver, which would suit the transdermal absorption and prepare skin healing spray.

KLÍČOVÁ SLOVA

hyaluronan, kolagen, koloidní stříbro, hustota, reologie

KEY WORDS

hyaluronan, collagen, colloidal silver, density, reology

CITACE

SKLENÁŘOVÁ, R. *Systém kolagen-hyaluronan v koloidním stříbře*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 29 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Andrea Kargerová, 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

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala mojí vedoucí bakalářské práce Ing. Andree Kargerové, Ph.D. za její odborné rady a cennou pomoc při zpracování celé práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Martinu Boháči, Ph.D. za pomoc při reologickém měření. V neposlední řadě také děkuji svým rodičům za podporu ve studiu.

OBSAH

1. Úvod.....	6
2. Teoretická část.....	7
2.1. Kyselina hyaluronová.....	7
2.1.1. Historie	7
2.1.2. Struktura kyseliny hyaluronové	7
2.1.3. Využití hyaluronanu	8
2.2. Kolagen.....	9
2.2.1. Charakteristika a typy kolagenu.....	9
2.2.2. Struktura a syntéza kolagenu	9
2.2.3. Fyzikálně – chemické vlastnosti kolagenu	10
2.3. Koloidní stříbro	10
2.4. Hustota a ultrazvuková rychlost.....	11
2.5. Reologie	11
3. Experimentální část.....	13
3.1. Použité chemikálie	13
3.2. Příprava roztoků.....	13
3.2.1. Koncentrační řada roztoků kolagenu.....	13
3.2.2. Koncentrační řada roztoků hyaluronanu.....	13
3.2.3. Koncentrační řada roztoků kyseliny hyaluronové s kolagenem	14
3.3. Měření hustoty a ultrazvukové rychlosti, přístroj DSA 5000 M.....	14
3.3.1. Princip metody	14
3.3.2. Výsledky a vyhodnocení z densitometru.....	15
3.4. Reologie roztoků kolagenu a hyaluronanu, Discovery Hybrid Rheometer.....	18
3.4.1. Princip metody	18
3.4.2. Výsledky a vyhodnocení reologického měření	19
4. Závěr	23
5. Citace	24
6. Přílohy	26

1. ÚVOD

Bakalářská práce je zaměřena na problematiku systému hyaluronan-kolagen, který je charakterizován v různých poměrech obou látek.

Kyselina hyaluronová (též hyaluronát sodný, hyaluronan) i kolagen jsou látky tělu vlastní. Nevývólávají imunogenní reakce, jsou netoxické a nedráždivé. Aplikace kyseliny hyaluronové se liší v závislosti na její molekulové hmotnosti. Jednou z významných vlastností hyaluronanu je schopnost vázat na sebe vodu. Nízkomolekulární hyaluronan dobře proniká kůží a zlepšuje její fyzikální vlastnosti a redukuje vrásky. Hyaluronan bývá důležitou součástí kosmetických přípravků. Mimo kožního podání hyaluronanu se od 90. let minulého století využívá i žilní podání při léčbě artrotických potíží.

Kolagen, ze kterého připravujeme roztoky, je izolován z rybích kůží, které se rychle zamrazí pro uchování molekuly. Ryby jsou pro tento účel chovány v čistých vodách a jsou krmeny vyváženou stravou. Tato metoda izolace je výjimečná tím, že zachovává neporušenou strukturu řetězců α -1 a α -2 tvořící trojitý helix. Díky zachování struktury je téměř identický s kolagenem, který je našemu tělu vlastní. [14]

Tato práce dále popisuje metodiku, která byla využívána k charakterizaci roztoků. V experimentální části práce jsou jednotlivé koncentrační řady analyzovány densitometrem DSA 5000 M. Tento přístroj byl využíván k měření hned dvou fyzikálních veličin současně, a to hustoty roztoků a jejich ultrazvukové rychlosti. U jednotlivých roztoků byly měřeny i jejich reologické vlastnosti.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Kyselina hyaluronová

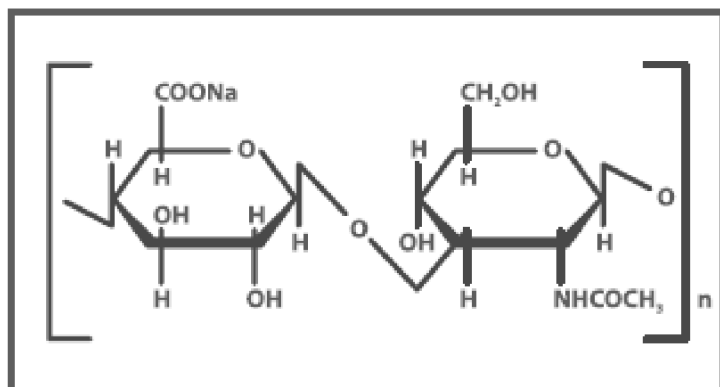
2.1.1. Historie

Historicky první zmínka o její izolaci sahá do roku 1934, kdy ji Karel Mayer získal z očního sklivce skotu. Přesné složení bylo objeveno až na počátku padesátých let dvacátého století. Původně byla izolována ze zvířecích tkání, zejména kohoutích hřebínků. Dnes ji získáváme pomocí biotechnologického procesu – mikrobiální fermentace z buněčných stěn bakterií rodu *Streptococcus zooepidemicus*. Tento bakteriální kmen produkuje hyaluronan o vysoké molekulové hmotnosti. Další možnost izolace je z geneticky modifikovaných bakterií *Bacillus subtilis*. [1]

2.1.2. Struktura kyseliny hyaluronové

Kyselina hyaluronová je polysacharid, který se skládá z opakujících se jednotek β -(1, 3)-D-glukuronové kyseliny a β -(1, 4)-N-acetyl-D-glukosaminu v poměru 1:1. Je rozpustná ve vodě a nerozpustná v nepolárních rozpouštědlech. Vyznačuje se vysokou molekulovou hmotností, která závisí na způsobu její izolace. Hyaluronan s molekulovou hmotností 1 MDa a vyšší tvoří již v 1 % hmotnostní koncentraci viskózní roztok. Molekulová hmotnost uváděná v Daltonech odpovídá klasické jednotce g/mol. V lidském těle má hyaluronan nejvyšší zastoupení v synoviální tekutině, sklivci a kůži. [2]

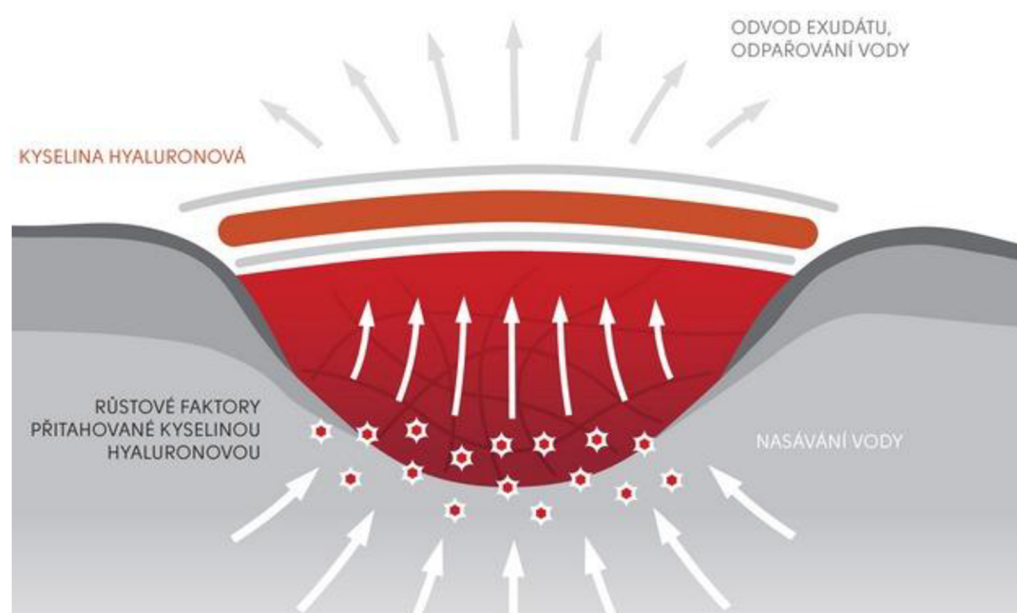
Jednotlivé monosacharidové podjednotky jsou spojovány β (1'– 3) glykosidickými vazbami a disacharidové podjednotky jsou spojovány β (1– 4') glykosidickými vazbami. D-glukuronová kyselina i N-acetyl-D-glukosamin vychází z molekuly glukózy a prostorově objemné struktury (hydroxylové nebo karboxylové) orientují do ekvatoriální polohy. Toto uspořádání je pro kyselinu hyaluronovou energeticky výhodné. [3] Strukturu polysacharidu znázorňuje **Obr. 1**.



Obr. 1: Struktura kyseliny hyaluronové [4]

2.1.3. Využití hyaluronanu

Pro své účinky je kyselina hyaluronová využívána v kosmetickém průmyslu, medicíně a veterinárním lékařství. Při zranění je hyaluronan štěpen na menší fragmenty o nízké molekulové hmotnosti. Díky těmto fragmentům nastává imunitní odpověď organismu a začíná proces regenerace. V místě rány se nově syntetizovaný hyaluronan, díky své vysoké afinitě k vodě, hydratuje a vytváří prostředí vhodné pro syntézu pojivové tkáně. Je zodpovědný za orientaci kolagenových vláken a mikrofibril. Vlhké prostředí navíc podporuje obnovu a růst buněk jak vidíme na **Obr. 2**. Kyselina hyaluronová je také schopna ze zdravého okolí rány přitahovat růstové a výživové faktory, které přispívají správnému hojení. Další vliv na migraci buněk je aktivace signální kaskády, díky interakcím s receptory hyaluronanu, zejména receptoru CD 44. Dodáváním hyaluronanu do místa zranění jsme schopni částečně ovlivnit míru zjizvení tkáně. [5]



Obr. 2: Proces hojení rány [6]

Endogenní, nebo-li tělu vlastní, hyaluronan je hlavní složkou kloubní synoviální tekutiny. Je syntetizován v buněčných membránách působením enzymu, syntázy hyaluronanu. Hyaluronan chrání kloubní struktury tak, že působí jako lubrikant a zároveň zvyšuje stabilitu kloubu. Díky jeho fyzikálním vlastnostem zamezuje ztrátu synoviální tekutiny během flexe a usnadní výměnu látek mezi synoviálními kapilárami a chrupavkou. Roztok hyaluronanu je jeden z nejužívanějších nitrokloubních přípravků, určených k léčbě osteoartrózy. [7]

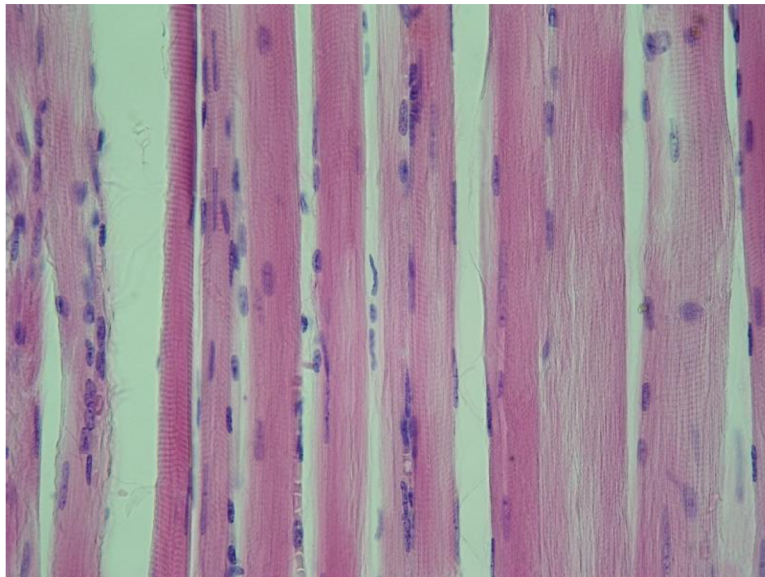
Jedno z dalších významných využití hyaluronanu díky svým viskoelastickým vlastnostem nalezneme v očním lékařství. Kyselina hyaluronová je přirozenou součástí očního sklivce. Slouží jako náhrada za tekutinu sklivce ztracenou během operace šedého zákalu nebo implantace čoček. Přípravky s hyaluronanem chrání citlivé oči a jsou vhodné při terapii suchého oka. [8]

2.2. Kolagen

2.2.1. Charakteristika a typy kolagenu

Kolagen je vláknitá, ve vodě nerozpustná bílkovina tvořící základ pojivových tkání a dalších struktur. Kolageny jsou jednou z nejdůležitějších součástí intersticia, tzv. vmezeřené tkáni orgánů, tvořené řídkým vazivem. Představují asi 30 % všech bílkovin lidského těla. Základní jednotku kolagenu – tropokolagenu jsou tři polypeptidové řetězce. Podle rozdílného sestavení těchto řetězců rozdělujeme kolageny cca do 27 skupin, z nichž prvních 5 je v lidském těle nejvíce zastoupených.

Kolagen typu I tvoří cca 90 % lidského těla, vyskytuje se především v kůži a kostech. Tento typ kolagenu má využití v potravinářství, kosmetice a je využíván jako médium pro pěstování tkáňových struktur. Kolagen typu II je hlavní součástí hyalinní a elastické chrupavky, kde má výživovou funkci a zároveň se v něm "usazují" chondrocyty. Oproti typu I obsahuje více hydroxylysinu. Kolagen typu III se nachází zejména v dermis, krevních cévách a vnitřních orgánech. Ve stáří bývá nahrazován kolagenem I. typu, proto se také označuje jako kolagen embryonálního vývoje. Hlavní součástí bazální membrány je kolagen IV, kolagen V je součástí hladké svaloviny a cév [9]. Kolageny některých typů tkání tvoří příčné pruhování, které vidíme na **Obr. 3**.



Obr. 3: Příčné pruhování kosterního svalu [10]

2.2.2. Struktura a syntéza kolagenu

Jednotlivé α -helixy jsou levotočivé spirály se společnou osou, které jsou stočeny ve směru od N-koncové skupiny k C-koncové skupině. Společně tvoří pravotočivou trojitou šroubovici tzv. superhelix (tropokolagen), který je stabilizován vodíkovými můstky. Vodíkové můstky spojují NH- skupinu glycinu a karbonylovou skupinu nacházející se na vedlejší řetězci. Tato molekula dosahuje v průměru asi 1,3 nm a délky kolem 300 nm. Jednotlivé α -řetězce jsou charakteristické přítomností opakující se sekvence aminokyselin, kterou tvoří $(Gly-X-Y)_n$. Každý z řetězců obsahuje více než 1000 aminokyselin. Kromě důležité přítomnosti glycinu

nacházíme v pozici X a Y nejčastěji prolin a hydroxyprolin nebo hydroxylysin. Hydroxyprolin a hydroxylysin vznikají posttranslační modifikací prolinu a lysinu za účasti vitamínu C. [11]

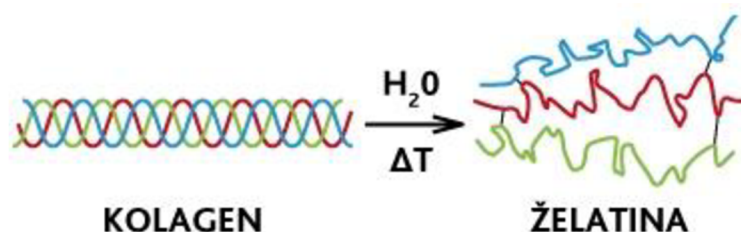
Tvorby kolagenu se účastní několik desítek genů, které kódují určitou sekvenci mRNA do které se pomocí transkripce přepisují. Tato mediátorová RNA se napojí na ribozomy endoplazmatického retikula, kde probíhá translace a vzniká primární struktura

pre-prokolagenu, který obsahuje N- a C- konec. Tyto části jsou štěpeny a vzniká propeptid, který podléhá hydroxylaci. Hydroxylové skupiny se glykosylují pomocí glukózy nebo galaktózy a dochází ke stáčení tří řetězců a tvoří se prokolagen. Při jeho vyloučení z intracelulárního prostoru (vně buňky) vzniká za katalýzy membránových enzymů, zejména tzv. kolagenové peptidázy tropokolagen. Spojením několika molekul tropokolagenu vznikají dlouhá vlákna - fibrily, která jsou ohebná, měkká a vysoce pevná v tahu. Jejich pevnost se udává v rozmezí 50 – 100 MPa a modul pružnosti řádově 10^3 MPa. [15]

2.2.3. Fyzikálně – chemické vlastnosti kolagenu

Molekula kolagenu má polyelektrolytický charakter, tzn. její náboj se mění v závislosti na pH. V silně zásadité oblasti se molekula kolagenu jeví jako záporně nabitá a naopak v silně kyselé oblasti jako kladně nabitá. Izoelektrický bod kolagenu najdeme při pH 7.

Jednou z významných fyzikálních vlastností kolagenu je tvorba želatiny. Želatina vzniká z molekuly kolagenu při přerušení vazeb mezi jednotlivými α -helixy (**Obr. 4**). K přerušení těchto vazeb je nutné zvýšit teplotu na 90 °C. Při dlouhodobém působení zvýšené teploty na molekulu kolagenu dochází k částečné hydrolyze, čili denaturaci. Při následném ochlazení vzniká opět kolagen, avšak s mírnými rozdíly v primární struktuře. [25]



Obr. 4: Denaturace molekuly kolagenu [19]

2.3. Koloidní stříbro

Koloidní roztoky řadíme mezi tzv. disperzní soustavy, které jsou složeny s disperzní fází a disperzního prostředí. Obsahuje-li soustava tyto dvě fáze, pak ji nazýváme jako heterogenní. Částice koloidní soustavy můžeme zobrazit pomocí elektronového mikroskopu, kde pozorujeme velikost v řádu nm až μ m. Částice koloidního roztoku stříbra využívaného v experimentální části jsou menší než 10 nm. [12]

Historické zmínky využívání stříbra sahají až do doby Římského impéria. Stříbro se využívalo zejména pro své antimikrobiální vlastnosti při léčbě přenosných infekcí až do období mezi světovými válkami, kdy se začaly užívat antibiotika. V České republice

není od roku 2008 povoleno užívat koloidní stříbro jako potravinový doplněk a od roku 2010 není povoleno pro vnitřní užití v celé EU.

Koloidní stříbro je využíváno pro své antibiotické, antivirové, antimykotické a především pro naši práci významné, hojivé účinky. Účinek stříbra je založen na deaktivaci enzymu, který je důležitý pro aerobní metabolismus jednobuněčných mikroorganismů. Výhodou tohoto procesu je, že si na něj mikroorganismy doposud nevytvořily rezistenci. Ionty stříbra působí i na funkční a strukturní proteiny, které se nacházejí v buněčné membráně. Jejich navázání na tyto proteiny způsobuje ztrátu pevnosti a zániku samotné buňky mikroorganismu.

Koloidní stříbro při aplikaci do rány nezpůsobuje pálení a je využíváno při vlhkém hojení zejména popálenin, omrzlin a proleženin. Ionty stříbra jsou využívány v lékařských náplastech na pooperační péči i v kosmetickém průmyslu. Jedno z dalších aplikací nalezneme u rostlin napadených parazity. Tito parazité rovněž nevykazují proti postřiku koloidním stříbrem žádnou odolnost. [16]

2.4. Hustota a ultrazvuková rychlost

Hustota patří k základním fyzikálním vlastnostem látek. Vyjadřuje podíl hmotnosti dané látky, m , a objemu, V . Na hustotě kapaliny závisí i její ultrazvuková rychlost, která mimo jiné závisí i na jejím složení, teplotě a viskozitě. Rychlost šíření ultrazvuku můžeme vyjádřit vzorcem $c = \sqrt{\frac{E}{\rho}}$, kde E je modul objemové pružnosti. Závislost ultrazvukové rychlosti na koncentraci bývá u vodných roztoků solí, jakožto i u hyaluronanu přibližně lineární. Rychlost šíření ultrazvuku se určuje z doby, kterou ultrazvukový pulz potřebuje na překonání vzdálenosti mezi vysílačem a přijímačem. U přijímače ultrazvukových vln je důležité pro správnou detekci, aby kapalina neobsahovala suspendované částice nebo bubliny plynu. Jejich přítomnost způsobuje rozptyl vln a chyby v detekci.

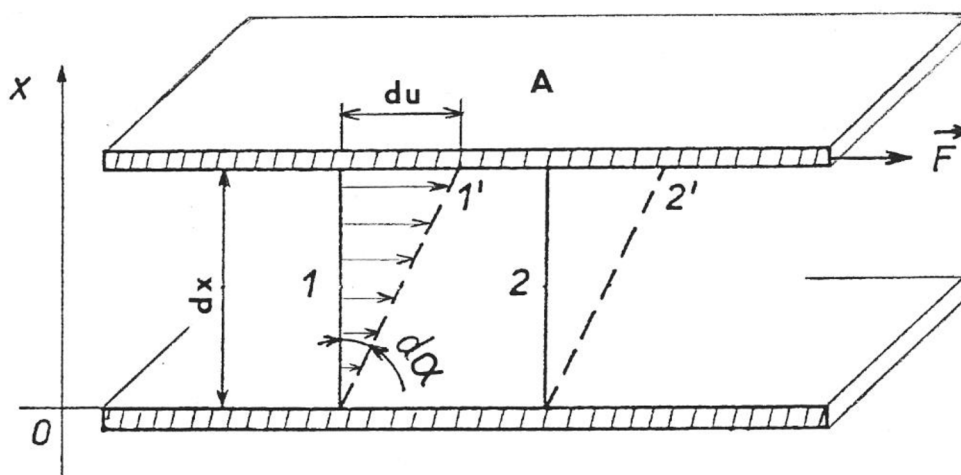
V průmyslu jsou na měření hustoty a ultrazvukové rychlosti značně využívány analyzátoři vibrační, zejména hustoměry z kmitající trubici, do které dávkuje vzorek. Významnou předností těchto hustoměrů je, že provozní tlak, průtok kapaliny a změny viskozity neovlivňují naměřené výsledky. [25]

2.5. Reologie

Reologie je vědní obor, který se zabývá deformacemi materiálů působením vnějších sil. U kapalin se zabývá zejména jejich tokem neboli viskózní deformací. Viskozita kapalin charakterizuje míru odporu kapaliny vůči jejímu toku. Při působení vnější síly na kapalinu se zvětšuje její deformace, přičemž rychlost zvětšení deformace je úměrná působící síle. Znalost reologie kapalin je velmi významná při charakterizaci látek a řadě dalších technologických procesů.

V případě materiálu, kdy viskozitu považujeme za látkovou konstantu, platí pro tečné napětí Newtonův zákon: $\tau = \eta \cdot \frac{du}{dx} = \eta \cdot D$

zde je τ tečné napětí, η je dynamická viskozita, du je vzájemná rychlost pohybu smykových rovin vzdálených o dx a D je tzv. smyková rychlost

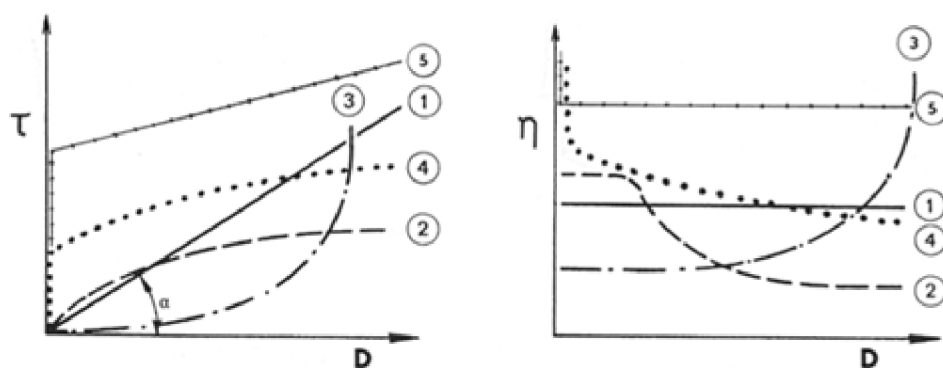


Obr. 5: Model viskózní deformace [18]

Dynamická viskozita, η , je závislá na teplotě a tlaku. Při zvyšující se teplotě u plynů roste a u kapalin klesá. Pokud ji podělíme hustotou, ρ , získáme hodnotu kinematické viskozity v $[m^2/s]$.

Kapaliny, které nelze charakterizovat pouze jednou hodnotou dynamické viskozity, se nazývají jako neneutonské. Tyto kapaliny charakterizujeme pomocí tokových křivek, které nám demonstrují závislosti tečného napětí na smykové rychlosti. Tento poměr nám udává zdánlivou viskozitu. Jednotlivé tokové křivky vidíme na **Obr. 6**.

Neneutonské kapaliny dále dělíme na pseudoplastické, dilatantní a binghamské. U těchto kapalin pozorujeme i závislost časovou. U kapalin pseudoplastických pozorujeme zmenšení zdánlivé viskozity s rostoucí smykovou rychlostí a naopak u dilatantních kapalin zdánlivá viskozita roste. Binghamské kapaliny mají tzv. mez toku, která nastane až při určitém smykovém napětí. Kapaliny, které mění svou zdánlivou viskozitu s časem, rozdělujeme na tixotropní a reopektické. U látek tixotropních zdánlivá viskozita s prodlužujícím se časem působení síly klesá a naopak u látek reopektických roste. Pokud ovšem tyto kapaliny ponecháme v klidu, zdánlivá viskozita se vrátí na původní hodnotu. [17], [18]



Obr. 6: Tokové křivky kapalin: 1 – newtonská kapalina, 2 – viskózní kapalina, 3 – dilatantní kapalina, 4 – plastická kapalina, 5 – binghamská kapalina [18]

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Použité chemikálie

Hyaluronan - Hyactive, Batch No: 021014-E1, expirace 22.9. 2016, specifikace 392-10-01, 13 kDa

Kolagen – Natural collagen Inventia, číslo výrobku 010214, expirace 08/2015

Koloidní stříbro – Antibakterin medium 20 ppm, šarže 23.8 PPM, vyrobeno 25.7. 2014

3.2. Příprava roztoků

3.2.1. Koncentrační řada roztoků kolagenu

K měření roztoků kolagenu byly připraveny sady vzorků se vzrůstající koncentrací. Kolagen byl podle teoretické - zvolené koncentrace přesně navážen do uzavíratelné plastové nádoby a doplněn 20 ml koloidního stříbra. Roztoky byly následně umístěny na elektromagnetickou míchačku, kde byly ponechány 24 hodin. Podle navážky ve 20 ml koloidního stříbra byla vypočtena koncentrace na 1000 ml.

3.2.2. Koncentrační řada roztoků hyaluronanu

K měření roztoků hyaluronanu byla připravena sada vzorků se vzrůstající koncentrací. Hyaluronan byl podle zvolené koncentrace přesně navážen do uzavíratelné nádoby a doplněn 20 ml koloidního stříbra. Roztoky byly následně umístěny na elektromagnetickou míchačku, kde byly ponechány 24 hodin. Podle navážky ve 20 ml koloidního stříbra byla vypočtena koncentrace na 1000 ml.

3.2.3. Koncentrační řada roztoků kyseliny hyaluronové s kolagenem

K měření systému roztoků kolagen-hyaluronanu byly připraveny 3 sady vzorků se vzrůstající koncentrací kolagenu od 10 g/l po 20 g/l. V každé sadě tedy bylo připraveno 11 analyzovaných roztoků. K jednotlivým sadám bylo přidáno ekvivalentní množství roztoku hyaluronanu s konstantní koncentrací v celé sadě vzorků. K první sadě byl přidán roztok hyaluronanu o koncentraci 0,5 g/l, ke druhé o koncentraci 1 g/l a ke třetí 1,5 g/l. Jednotlivé vzorky kolagenu i hyaluronanu byly připravovány vážením a byly ponechány 24 hodin na elektromagnetické míchače. Po této době byly smíchány a byly ponechány dalších 24 hodin na elektromagnetické míchače. Jednotlivé vzorky byly připravovány v celkovém objemu 20 ml.

3.3. Měření hustoty a ultrazvukové rychlosti, přístroj DSA 5000 M

3.3.1. Princip metody

Přístrojem DSA 5000 M (*Obr. 7*) je možné měřit dvě fyzikální veličiny současně – hustotu a rychlost zvuku. Hustotu měříme pomocí oscilační U-trubice z borosilikátového skla, kam nadávkuje stříkačkou vzorek. Trubice se v závislosti na povaze vzorku elektronicky rozkmitá na svoji charakteristickou frekvenci. Hustota je následně přístrojem vypočtena z oscilační periody U-trubice a referenčního oscilátoru.

Stanovení rychlosti zvuku je prováděno v cele, která je tvořena ultrazvukovým vysílačem a přijímačem na druhé straně. Rychlost zvuku je přístrojem spočítána na základě přijatých zvukových vln o známé periodě a vzdálenosti mezi vysílačem a přijímačem.

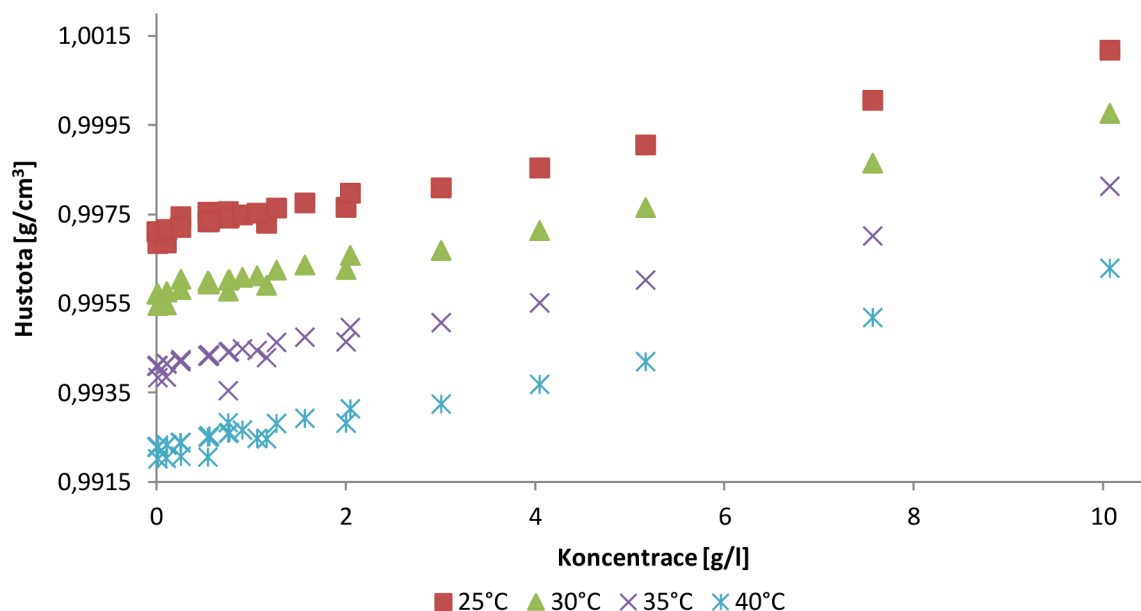
Díky přidavnému referenčnímu oscilátoru je možné měřit velmi stabilně v celém teplotním rozsahu, proto je metoda dobře použitelná vzhledem k vysoké teplotní závislosti hustoty a ultrazvukové rychlosti. [1]



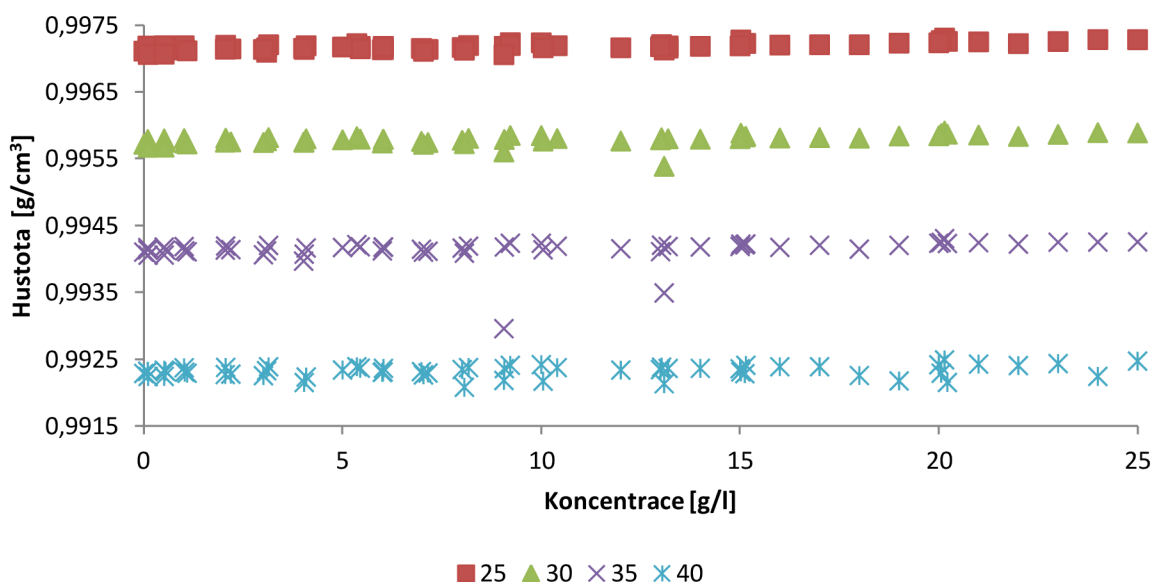
Obr. 7: DSA 5000 M, Anton Paar [21]

3.3.2. Výsledky a vyhodnocení z densitometru

Naměřená data z densitometru DSA 5000 M, popisují závislost hustoty vzorku a rychlosti procházející ultrazvukové vlny v prostředí analyzovaného vzorku na teplotě a na hmotnostní koncentraci.



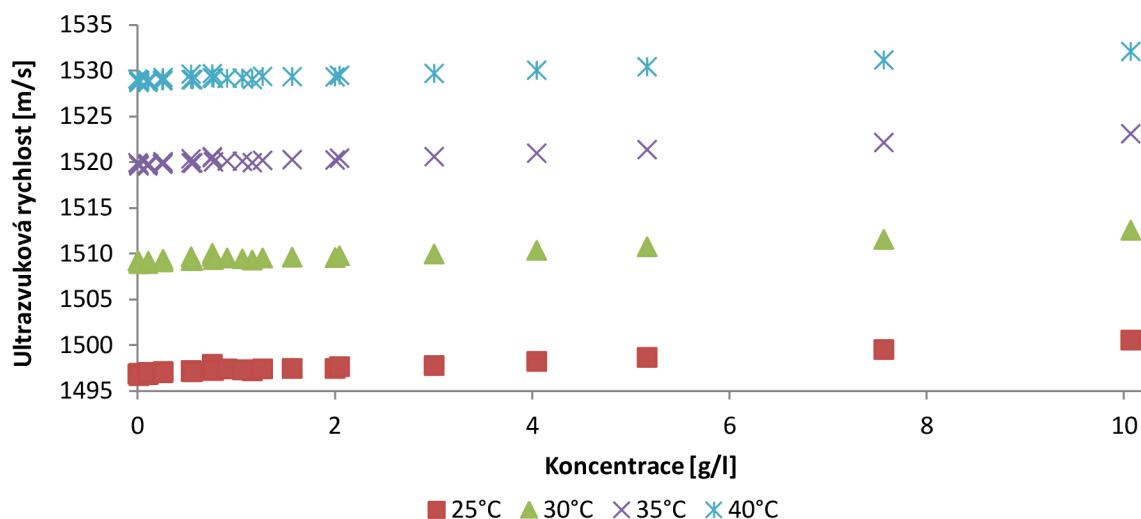
Graf 1: Závislost hustoty na koncentraci hyaluronanu při vzrůstající teplotě



Graf 2: Závislost hustoty na koncentraci kolagenu při vzrůstající teplotě

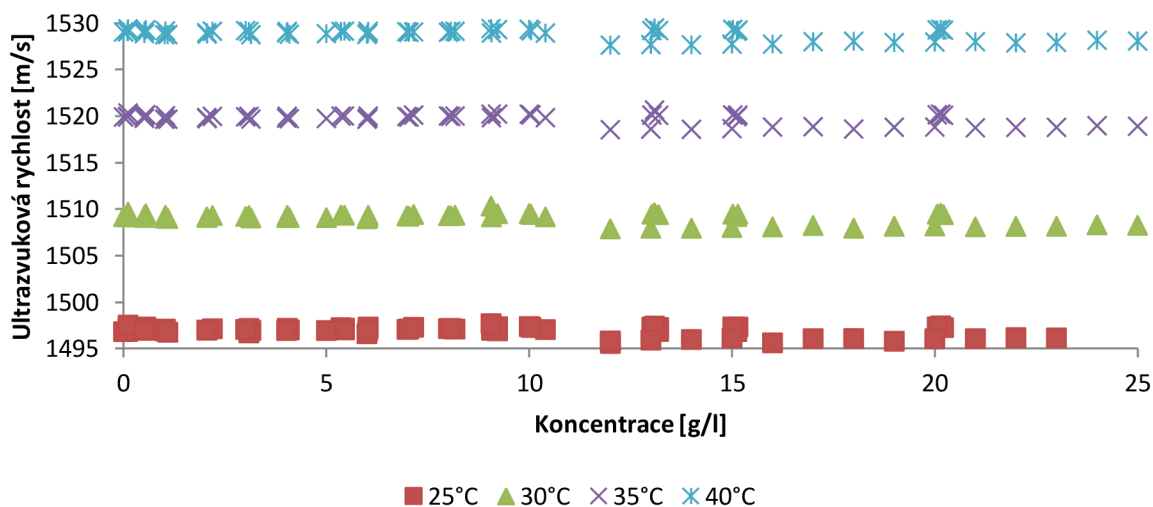
Z naměřených dat můžeme usuzovat, že se vzrůstající teplotou dochází ke snížení hustoty jednotlivých roztoků. Avšak v rámci konstantní teploty má hustota se vzrůstající koncentrací lineární nárůst viz. **Graf 1** a **Graf 2**. Tato závislost byla pozorována u roztoků hyaluronanu.

Oproti této závislosti hyaluronanu pozorujeme u kolagenu, v rámci měření při konstantní teplotě, lineární nárůst jen nepatrně. U některých roztoků kolagenu docházelo k nespecifickému nárůstu, který se od lineárního trendu mírně lišil. K této situaci docházelo ve většině případů po delším stání roztoků nebo jejich skladování ve skleněných lahvičkách, kde jsme pozorovaly ulpívání gelu na stěnách. Tuto skutečnost jsme eliminovaly použitím uzavíratelných plastových nádobek. Některé sady roztoků kolagenu jsme pro porovnání stability skladovali v lednici. Rozdíl mezi skladováním v lednici a při laboratorní teplotě nebyl pozorován.

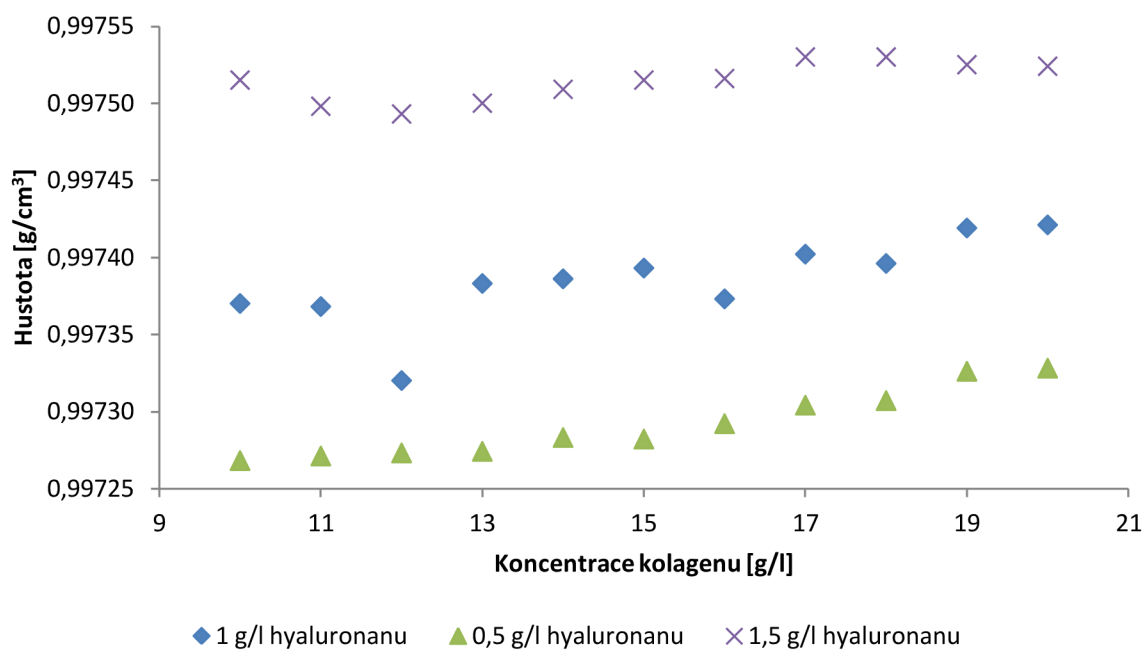


Graf 3: Závislost ultrazvukové rychlosti na koncentraci hyaluronanu při vzrůstající teplotě

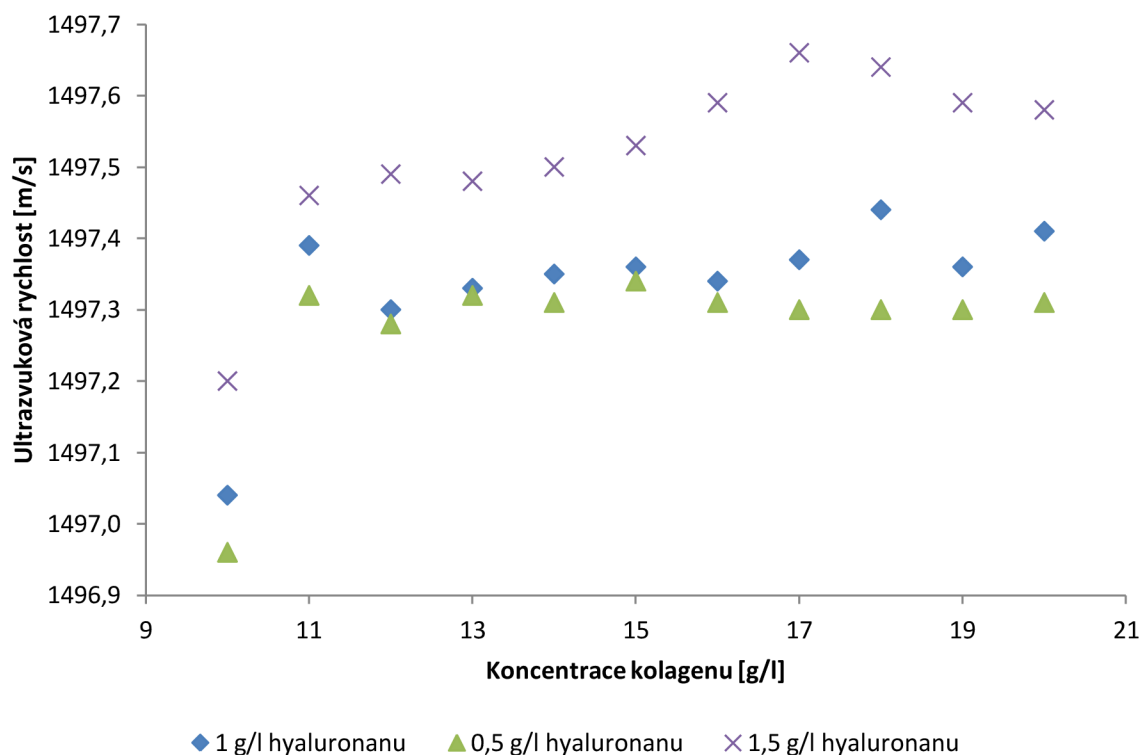
Opačná situace než u měření hustoty nastává u měření ultrazvukové rychlosti. Tedy rychlosti zvuku ve vzorku, kde se zvyšováním teploty dochází i ke zvyšování rychlosti zvuku viz. **Graf 3** a **Graf 4**. Avšak v rámci konstantní teploty pozorujeme, stejně jako u měření hustoty, lineární nárůst se zvyšující se koncentrací.



Graf 4: Závislost ultrazvukové rychlosti na koncentraci kolagenu při vzrůstající teplotě



Graf 5: Závislost hustoty roztoků kolagen-hyaluronanu při 25 °C



Graf 6: Závislost ultrazvukové rychlosti roztoků kolagen-hyaluronanu při 25 °C

Při měření systému obou charakterizovaných látek – kolagenu i hyaluronanu byla měřena opět hustota i ultrazvuková rychlost. Při měření hustoty jsme u přidavku nižších koncentrací hyaluronanu (0,5 g/l a 1 g/l) pozorovaly mírný lineární nárůst se zvyšující se koncentrací kolagenu. Při vyšším přidavku hyaluronanu se hustota v celé sadě vzorků zvyšuje jen minimálně viz. **Graf 5**. Při měření závislosti ultrazvukové rychlosti jsme zaznamenaly nárůst při koncentraci kolagenu kolem 17 g/l viz. **Graf 6**. Při této kombinaci 17 g/l kolagenu a 1,5 g/l hyaluronanu má zkoumaný biomateriál vysoký modul pružnosti. $E = \rho \cdot c^2 = 0,994521 \cdot 1520,58^2 = 2,299 \cdot 10^6$ Pa. Jednotlivé sady roztoků byly měřeny teplotním skenem v rozsahu teplot 25-40 °C s krokem 5 °C. Měření teplotní závislosti nemá vliv na poměr charakterizovaných polymerů viz. příloha **Graf X 1**, **Graf X 2** a **Graf X 3**.

3.4. Reologie roztoků kolagenu a hyaluronanu, Discovery Hybrid Rheometer

3.4.1. Princip metody

Reologické vlastnosti roztoků kolagen-hyaluronanu byly měřeny na Discovery Hybrid Rheometer II od firmy TA Instruments (**Obr. 8**). Pro měření viskozity byla geometrie souosých válců. Do mezery mezi válci byl nadávkován vzorek o objemu 20 ml. Před samotným měřením probíhala v přístroji temperace pomocí peltierovského jacketu, ve kterém je usazen vnější statický válec. Vnitřní pohyblivý válec byl před měřením kalibrován na setrvačnost, tření a rotační mapování v celém rozsahu smykové rychlosti. Samotné měření probíhalo při konstantní teplotě 25 °C. Vzorky byly měřeny v režimu flow sweep (průměrování každého naměřeného bodu) bez předmíchání v rozsahu smykové rychlosti 1-1000 (s⁻¹), 10 bodů na dekádu. Naměřená data byla zpracována v programu TRIOS.

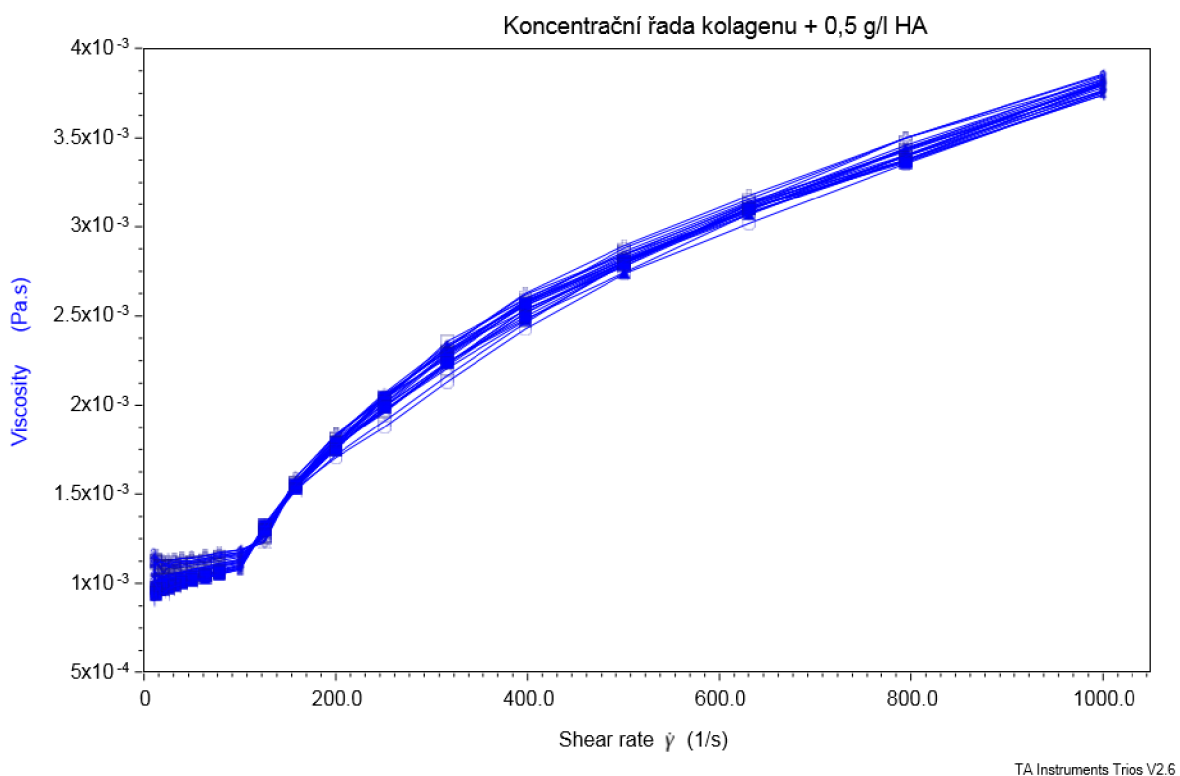


Obr. 8: Discovery Hybrid Rheometers, TA Instruments [22]

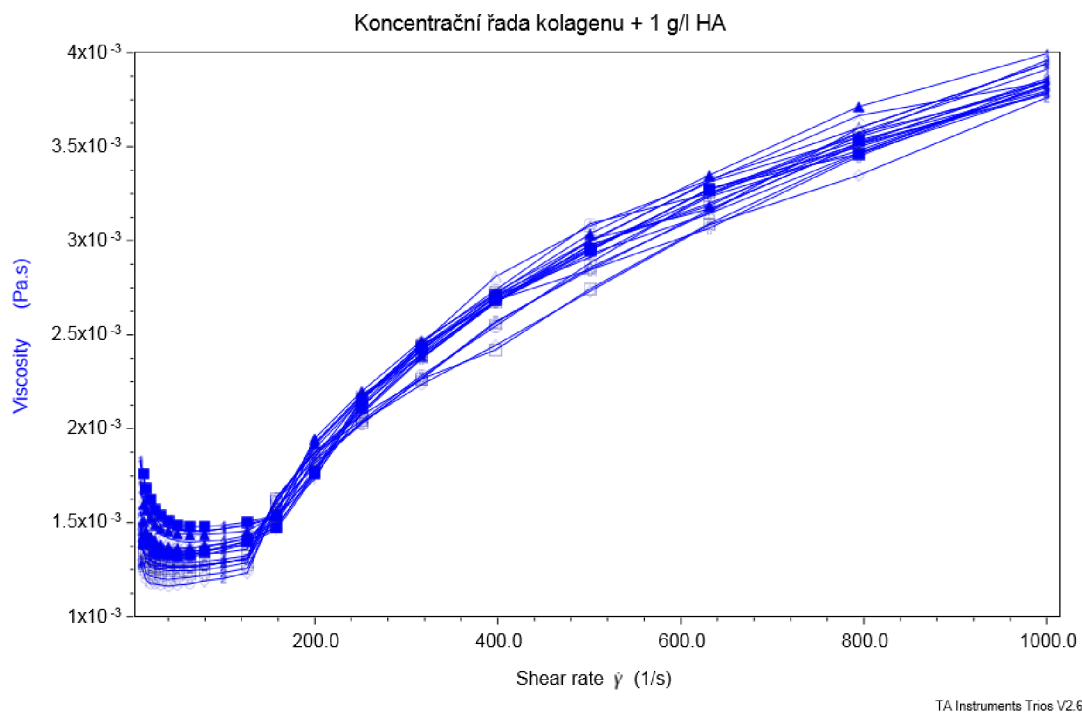
3.4.2. Výsledky a vyhodnocení reologického měření

Pomocí reometru byly měřeny 3 koncentrační řady kolagenu s přidavkem hyaluronanu, který měl v každé sadě konstantní koncentraci. Měřena byla tzv. toková křivka, kdy byla viskozita jednotlivých roztoků kolagen-hyaluronanu měřena v závislosti na smykové rychlosti (shear rate). Měření probíhalo při zvyšujících se i snižujících se otáčkách (hysterezní křivka), ale z výsledků nebyla potvrzena tixotropní ani reopektická závislost. Měřené roztoky kolagen-hyaluronanu v koloidním stříbře tudíž nemají zdánlivou viskozitu závislou na čase.

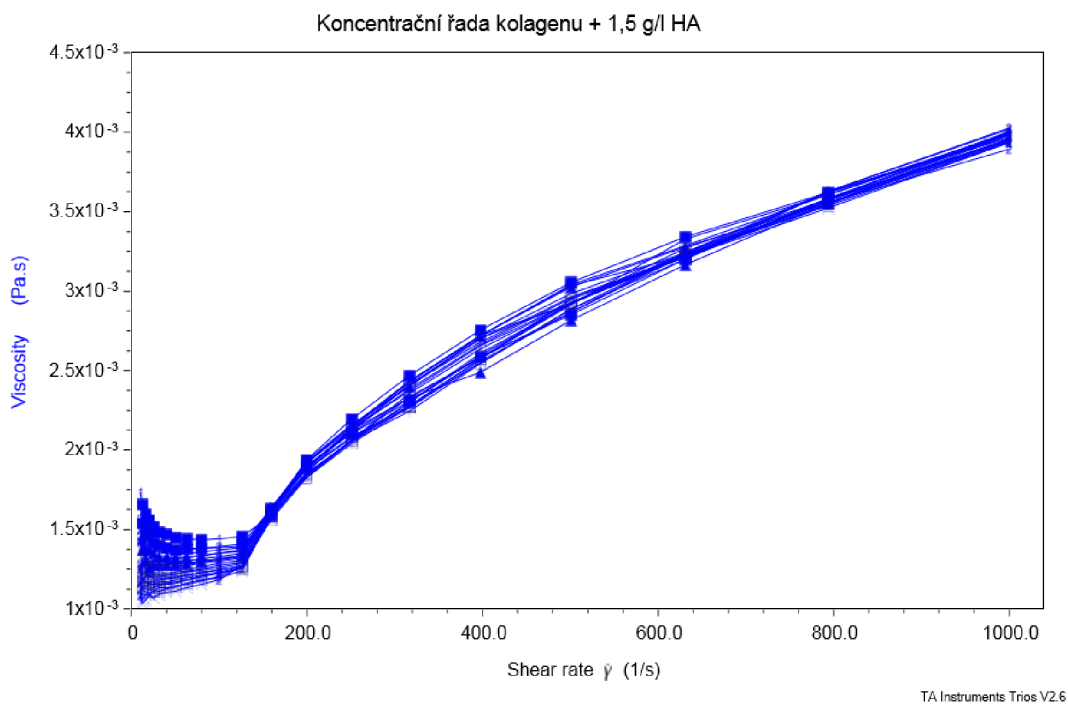
Následující grafy (**Graf 7**, **Graf 8**, **Graf 9**) porovnávají vliv hmotnostní koncentrace hyaluronanu na koncentrační řadu kolagenu. Z naměřených výsledků vidíme, že přidavek hyaluronanu v tak nízkých koncentracích (0,5; 1 a 1,5 g/l) téměř neovlivňuje naměřenou viskozitu systému kolagen-hyaluronan. Vliv hmotnostní koncentrace kolagenu, ze kterého byly připraveny vzorky v rozsahu od 10-20 g/l je taktéž nepatrný. Jednotlivé křivky znázorňující dynamickou viskozitu mají tudíž stejný trend.



Graf 7: Závislost viskozity na smykové rychlosti při koncentraci hyaluronanu 0,5 g/l

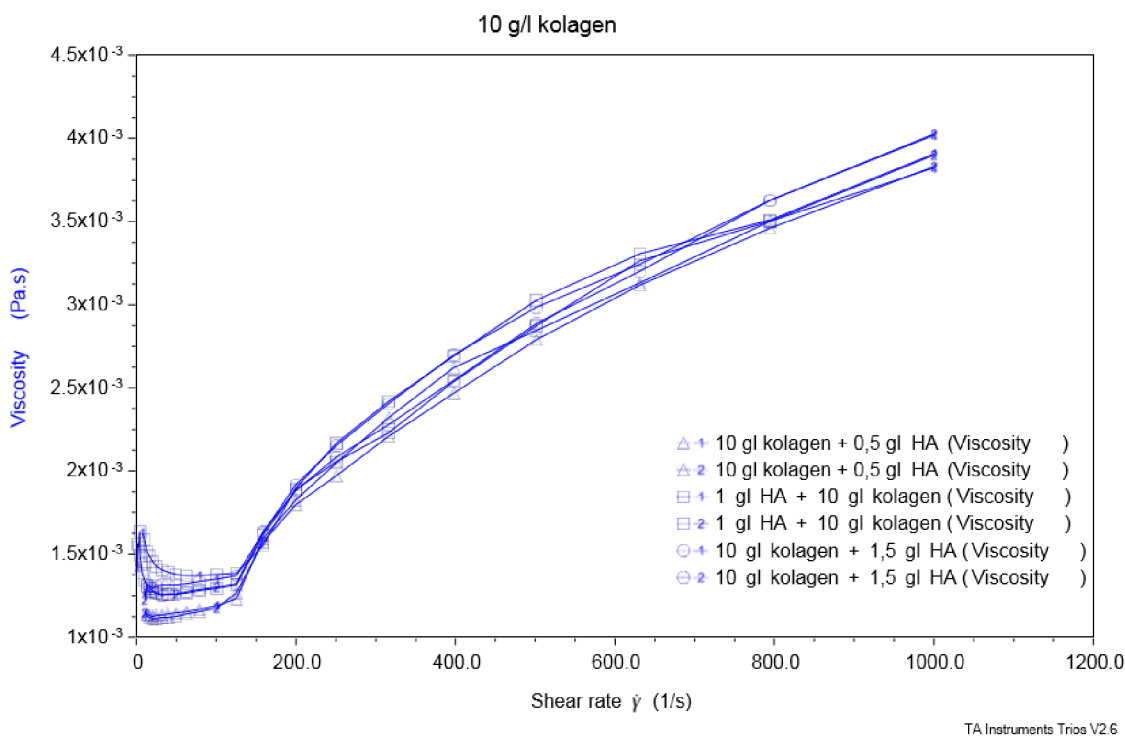


Graf 8: Závislost viskozity na smykové rychlosti při koncentraci hyaluronanu 1,0 g/l



Graf 9: Závislost viskozity na smykové rychlosti při koncentraci hyaluronanu 1,5 g/l

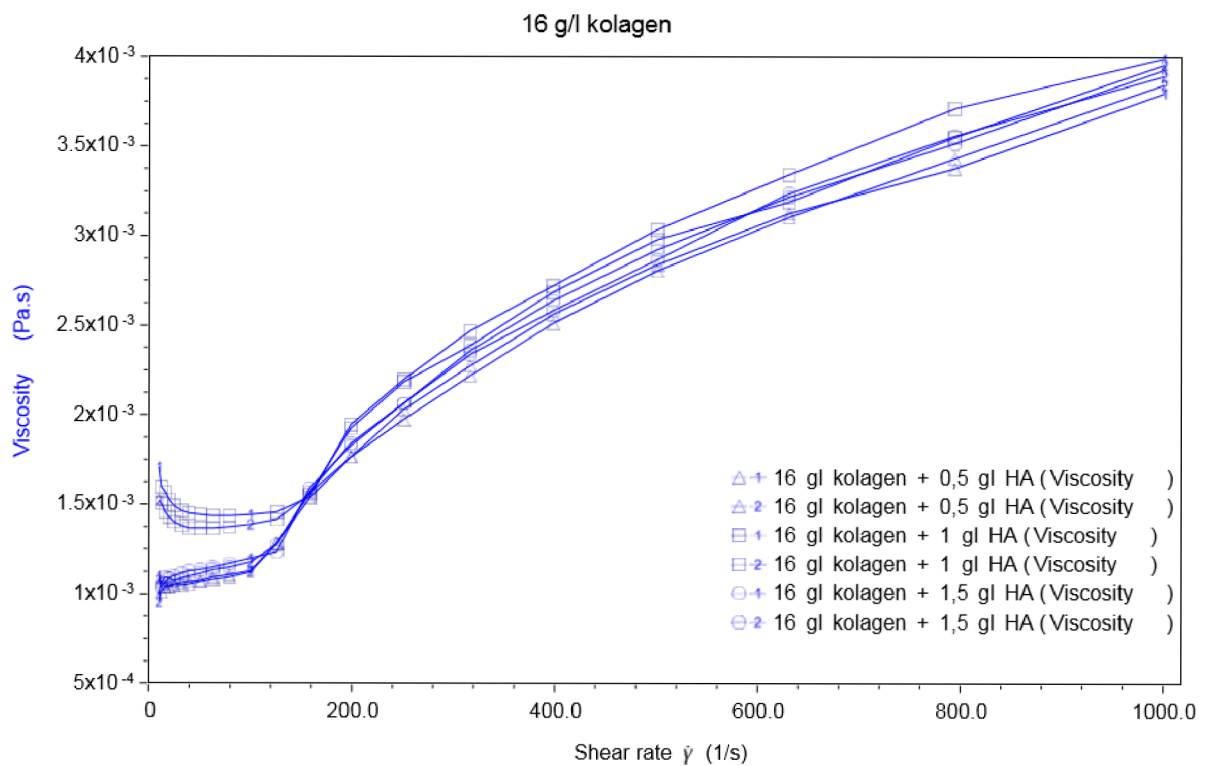
Pro přesnější porovnání závislosti viskozity na smykové rychlosti je v následujícím grafu zobrazena konstantní koncentrace kolagenu 10 g/l a jednotlivé přídavky kosmetického hyaluronanu.



Graf 10: Vliv přídavku hyaluronanu na viskozitu při koncentraci kolagenu 10 g/l

Jednotlivé roztoky polymerů mají při nižších hodnotách smykové rychlosti, konkrétně od 10 do 125,98 s⁻¹ charakter newtonské kapaliny. Při vyšších hodnotách pozorujeme dilatantní závislost, která by mohla negativně působit při výrobě hojivého spreje. Tato závislost není však natolik velká, aby způsobila prudký nárůst zdánlivé viskozity viz. **Graf 10**.

U roztoků kolagenu s koncentrací od 16-20 g/l, které byly smíchány s hyaluronanem o koncentraci 1 g/l byla pozorována dilatance až od stříhového napětí 158,48 s⁻¹ viz. **Graf 11**.



TA Instruments Trios V2.6

Graf 11: Vliv přídavku hyaluronanu na viskozitu při koncentraci kolagenu 16 g/l

4. ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo nastínit problematiku využití kyseliny hyaluronové a kolagenu v jednotlivých odvětvích průmyslového využití, zejména v medicíně, veterinárním lékařství a kosmetice. Zejména jsme chtěli nalézt optimální poměr kolagenu a hyaluronanu, který by vyhovoval pro přípravu hojivého kožního spreje.

V experimentální části jsou popsány jednotlivé metody charakterizace roztoků. Nejprve byly charakterizovány jednotlivé sady roztoků hyaluronanu a kolagenu pomocí densitometru s vibrační U-trubicí. Díky tomuto analyzátoru bylo možno měřit současně hustotu a ultrazvukovou rychlost. Měření probíhalo v rozmezí teplot 25 – 40 °C. Touto metodou bylo zjištěno, že koncentrační řady charakterizovaných polymerů mají lineární závislost.

Při měření jednotlivých kombinací kolagenu s hyaluronanem v koloidním stříbře bylo zjištěno, že přidavek hyaluronanu o vyšší hmotnostní koncentraci má za následek zvýšení hustoty. Při zvyšování teploty se naměřená hustota snižovala, ale v rámci koncentrační řady si udržela stejný trend.

Z měření reologického chování vzorků kolagen-hyaluronanu bylo zjištěno, že jednotlivé vzorky koncentrační řady mají při nižší smykové rychlosti newtonský charakter. Při smykové rychlosti vyšší než 125,9 s⁻¹ byla pozorována jistá dilatance. U více koncentrovaných roztoků kolagenu s hyaluronanem o hmotnostní koncentraci 1 g/l byla dilatance pozorována až od smykové rychlosti 158,5 s⁻¹.

Pro možnou přípravu kožního hojivého spreje bych podle doposud získaných výsledků navrhovala použít vyšší koncentraci kolagenu (nad 15 g/l) s nižší koncentrací hyaluronanu (pod 2 g/l).

5. CITACE

- [1] BURGESS, Cheryl M. *Cosmetic dermatology*. Berlin: Springer, 2005, 170 p. ISBN 35-402-3064-5.
- [2] ŠLEZINGROVÁ, K., D. ŠMEJKALOVÁ, M. BOBEK a V. VELEBNÝ. Syntéza a charakterizace palmitoyl hyaluronanu. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2012, č. 6. ISSN 0009-2770.
- [3] HASCALL, Vincent C. a Torvard C. LAURENT. Hyaluronan Structure and Physical Properties. In: *GlycoForum* [online]. 1997 [cit. 2014-12-26]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [4] Kyselina hyaluronová: obrázek. In: *Contipro* [online]. 2011 [cit. 2014-12-26]. Dostupné z: <http://www.contipro.cz/o-contipru/kyselina-hyaluronova>
- [5] DAVID-RAOUDI, Maha, Frédéric TRANCHEPAIN, Brigitte DESCHREVEL, Jean-Claude VINCENT, Patrick BOGDANOWICZ, Karim BOUMEDIENE a Jean-Pierre PUJOL. Differential effects of hyaluronan and its fragments on fibroblasts: Relation to wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. 2008, vol. 16, issue 2, s. 274-287. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2007.00342.x.
- [6] Účinky kyseliny hyaluronové na špatné hojení ran. In: *Hyiodine* [online]. 2014 [cit. 2014-12-26]. Dostupné z: <http://www.hyiodine.cz/spatne-hojeni-ran>
- [7] PAVELKA, Karel. A KOLEKTIV. *Farmakoterapie revmatických onemocnění*. Praha: Grada Publishing a.s., 2005. ISBN 8024704595.
- [8] ALMOND, A. Hyaluronan. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007, č. 13 [cit. 2014-12-14]. DOI: 10.1007/s00018-007-7032-z.
- [9] FÖLDI, M. a E. FÖLDI. *Lymfologie*. Praha: Grada, 2014, 698 s. ISBN 9788024743004.
- [10] Sval příčně pruhovaný kosterní - detail: obrázek. In: *Atlas histologie LF UP* [online]. 2006 [cit. 2014-12-30]. Dostupné z: <http://ultrastruktura.upol.cz/v%C3%BDuka/AtlasSM/poh/slides/ph012.html>
- [11] MURRAY, Robert K. *Harperova ilustrovaná biochemie*. 5. české vyd., 1. v nakl. Galén. Překlad Bohuslav Matouš. Praha: Galén, c2012, xii, 730 s. ISBN 978-807-2629-077.
- [12] KVÍTEK, Libor; PANÁČEK, Aleš. *Základy koloidní chemie*. Univerzita Palackého v Olomouci, 2007.
- [13] ANTON PAAR. *Návod k použití: DSA 5000 M*. Austria: Anton Paar, 2011. ISBN D17IB001CS-B.
- [14] Tropokolagen. *Tropokolagen* [online]. 2013 [cit. 2015-01-07]. Dostupné z: <http://www.tropokolagen.cz/>
- [15] SHOULDERS, Matthew D. a Ronald T. RAINES. Collagen Structure and Stability. *Annual Review of Biochemistry*. 2009, vol. 78, issue 1, s. 929-958. DOI: 10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833.

- [16] JOSEF PIES, Uwe Reinelt a [z německého originálu přeložil P. SVOBODA]. *Koloidní stříbro: velká kniha zdraví pro člověka, zvířata a rostliny*. Vyd. 1. Olomouc: Fontána, 2012. ISBN 978-807-3366-773.
- [17] PEKAŘ, M., M. KLUČÁKOVÁ, M. VESELÝ a M. ČEPPAN. *Fyzikální chemie a fotochemie: praktikum*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2003, 114 s. ISBN 80-214-2470-2.
- [18] PIRKL, Slavomír. Reologie a reometrie kapalin. In: *Ústav aplikované fyziky a matematiky UP* [online]. 2014 [cit. 2015-04-07]. Dostupné z: <http://kf.upce.cz/>
- [19] Fyzikálně-chemické vlastnosti kolagenu. In: *Orling* [online]. [2010] [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: <http://www.orling.cz/cz/kolagen/kolagen-pevnost-integrita-struktura.html>
- [20] KADLEC, Karel. Provozní snímače hustoty kapalin. *Automa: časopis pro automatizační techniku*. 2011, č. 1, 44 - 48.
- [21] DSA 5000 M: obrázek. 2011. *Anton Paar* [online]. [cit. 2015-05-10]. Dostupné z: <http://www.anton-paar.cz/>
- [22] Discovery Hybrid Rheometers: obrázek. 2015. *TA Instruments* [online]. [cit. 2015-05-10]. Dostupné z: <http://www.tainstruments.com/>

6. PŘÍLOHY

Tabulka X 1: Hustoty roztoků kolagen-hyaluronanu při konstantní koncentraci hyaluronanu 0,5 g/l

c_{kolagen} [g/l]	ρ [g/cm ³] 25 °C	ρ [g/cm ³] 30 °C	ρ [g/cm ³] 35 °C	ρ [g/cm ³] 40 °C
10	0,997268	0,995872	0,994257	0,992440
11	0,997271	0,995878	0,994257	0,992419
12	0,997273	0,995882	0,994266	0,992449
13	0,997274	0,995880	0,994265	0,992449
14	0,997283	0,995892	0,994278	0,992459
15	0,997282	0,995890	0,994279	0,992458
16	0,997292	0,995902	0,994287	0,992468
17	0,997304	0,995913	0,994299	0,992485
18	0,997307	0,995916	0,994301	0,992486
19	0,997326	0,995933	0,994320	0,992503
20	0,997328	0,995937	0,994324	0,992507

Tabulka X 2: Ultrazvukové rychlosti roztoků kolagen-hyaluronanu při konstantní koncentraci hyaluronanu 0,5 g/l

c_{kolagen} [g/l]	c [m/s] 25 °C	c [m/s] 30 °C	c [m/s] 35 °C	c [m/s] 40 °C
10	1496,96	1509,33	1520,03	1529,14
11	1497,32	1509,47	1520,14	1529,30
12	1497,28	1509,44	1520,12	1529,28
13	1497,32	1509,45	1520,10	1529,21
14	1497,31	1509,43	1520,10	1529,19
15	1497,34	1509,49	1520,16	1529,28
16	1497,31	1509,44	1520,09	1529,19
17	1497,30	1509,43	1520,09	1529,19
18	1497,30	1509,42	1520,08	1529,20
19	1497,30	1509,44	1520,09	1529,24
20	1497,31	1509,44	1520,10	1529,21

Tabulka X 3: Hustoty roztoků kolagen-hyaluronanu při konstantní koncentraci hyaluronanu 1,0 g/l

c_{kolagen} [g/l]	ρ [g/cm³] 25 °C	ρ [g/cm³] 30 °C	ρ [g/cm³] 35 °C	ρ [g/cm³] 40 °C
10	0,997370	0,995973	0,994359	0,992541
11	0,997368	0,995975	0,994360	0,992542
12	0,997320	0,995928	0,994314	0,992495
13	0,997383	0,995988	0,994373	0,992555
14	0,997386	0,995993	0,994379	0,992561
15	0,997393	0,995994	0,994362	0,992473
16	0,997373	0,995980	0,994366	0,992548
17	0,997402	0,996008	0,994392	0,992574
18	0,997396	0,996001	0,994386	0,992536
19	0,997419	0,996023	0,994408	0,992589
20	0,997421	0,996025	0,994408	0,992589

Tabulka X 4: Ultrazvukové rychlosti roztoků kolagen-hyaluronanu při konstantní koncentraci hyaluronanu 1,0 g/l

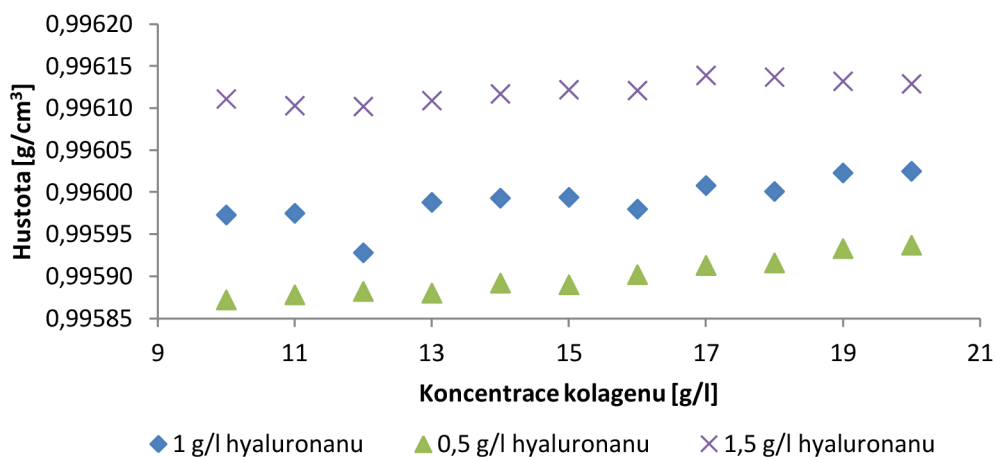
c_{kolagen} [g/l]	c [m/s] 25 °C	c [m/s] 30 °C	c [m/s] 35 °C	c [m/s] 40 °C
10	1497,04	1509,42	1520,11	1529,24
11	1497,39	1509,51	1520,18	1529,30
12	1497,30	1509,44	1520,13	1529,25
13	1497,33	1509,50	1520,16	1529,27
14	1497,35	1509,49	1520,16	1529,29
15	1497,36	1509,48	1520,15	1529,26
16	1497,34	1509,48	1520,14	1529,25
17	1497,37	1509,50	1520,17	1529,29
18	1497,44	1509,56	1520,22	1529,34
19	1497,36	1509,68	1520,38	1529,52
20	1497,41	1509,62	1520,30	1529,45

Tabulka X 5: Hustoty roztoků kolagen-hyaluronanu při konstantní koncentraci hyaluronanu 1,5 g/l

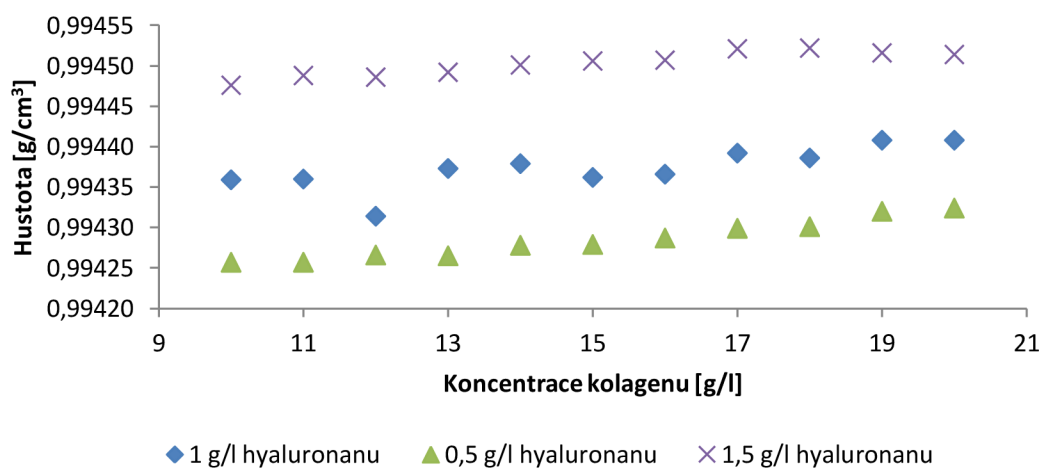
c_{kolagen} [g/l]	ρ [g/cm ³] 25 °C	ρ [g/cm ³] 30 °C	ρ [g/cm ³] 35 °C	ρ [g/cm ³] 40 °C
10	0,997515	0,996111	0,994476	0,992608
11	0,997498	0,996103	0,994488	0,992671
12	0,997493	0,996102	0,994486	0,992669
13	0,997500	0,996109	0,994492	0,992675
14	0,997509	0,996117	0,994501	0,992682
15	0,997515	0,996122	0,994506	0,992688
16	0,997516	0,996121	0,994507	0,992689
17	0,997530	0,996139	0,994521	0,992703
18	0,997530	0,996137	0,994522	0,992703
19	0,997525	0,996132	0,994516	0,992697
20	0,997524	0,996129	0,994514	0,992698

Tabulka X 6: Ultrazvukové rychlosti roztoků kolagen-hyaluronanu při konstantní koncentraci hyaluronanu 1,5 g/l

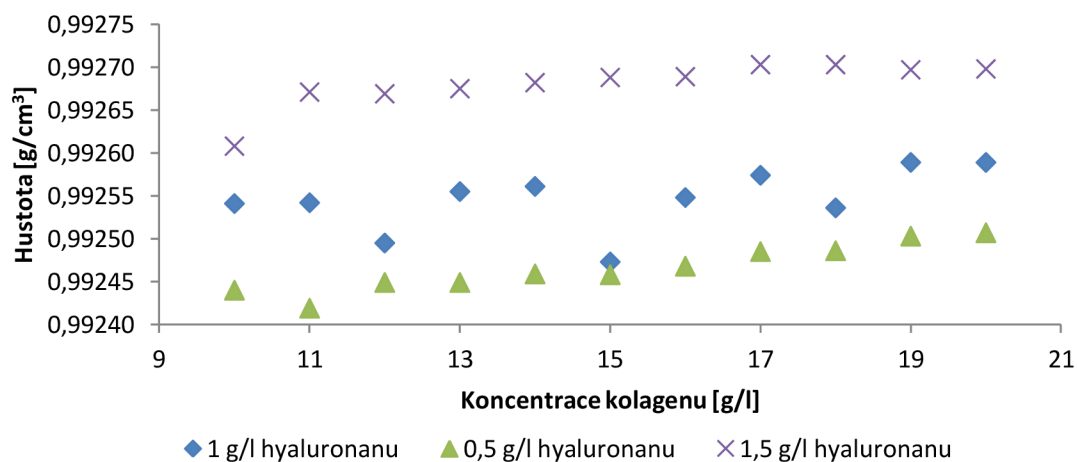
c_{kolagen} [g/l]	c [m/s] 25 °C	c [m/s] 30 °C	c [m/s] 35 °C	c [m/s] 40 °C
10	1497,20	1509,53	1520,22	1529,33
11	1497,46	1509,62	1520,28	1529,42
12	1497,49	1509,61	1520,26	1529,38
13	1497,48	1509,61	1520,29	1529,52
14	1497,50	1509,63	1520,33	1529,47
15	1497,53	1509,66	1520,42	1529,78
16	1497,59	1509,72	1520,52	1529,71
17	1497,66	1509,81	1520,58	1529,75
18	1497,64	1509,79	1520,50	1529,77
19	1497,59	1509,70	1520,35	1529,45
20	1497,58	1509,68	1520,36	1529,51



Graf X 1: Závislost hustoty na koncentraci systému kolagen-hyaluronanu při 30 °C



Graf X 2: Závislost hustoty na koncentraci systému kolagen-hyaluronanu při 35 °C



Graf X 3: Závislost hustoty na koncentraci systému kolagen-hyaluronanu při 40 °C