



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

HYALURONAN HYDROGELS

HYALURONAN HYDROGELS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Hana Vaculíková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1283/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Hana Vaculíková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název diplomové práce:

Hyaluronan hydrogels

Zadání diplomové práce:

1. Optimalizace tvorby gelů
2. Měření vzorků pomocí ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením a reologie
3. Vyhodnocení výsledků

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019

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

Bc. Hana Vaculíková
student(ka)

Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

V této diplomové práci byla optimalizována příprava agarózo-želatinových hydrogelů s přídavkem různých koncentrací nízkomolekulárního a vysokomolekulárního hyaluronanu a poté byly u nich zkoumány viskoelastické vlastnosti reologickými oscilačními testy a ultrazvukovou spektrometrií s vysokým rozlišením. Reologií byly naměřeny hodnoty elastického a viskózního modulu při vybraných amplitudách napětí, oscilačních frekvencí a teplotách. U druhé uvedené metody byly změřeny hodnoty ultrazvukové rychlosti vzorků při teplotním skenu od 85 do 25 °C a od 25 do 85 °C v přístroji HR-US 102, které byly porovnávány s ultrazvukovými rychlostmi naměřenými při teplotě $27,0 \pm 0,5$ °C modulem pro gely HR-EX-SSC.

Klíčová slova

Gely, agaróza, želatina, hyaluronan, reologie, ultrazvuková spektrometrie s vysokým rozlišením

Abstract

In this thesis there was preparation optimized for agarose-gelatin hydrogels with addition of various concentrations of low-molecular and high-molecular hyaluronan and than there were examined viscoelastic properties of them by rheological oscilation tests and high-resolution ultrasonic spektrometry. By rheology were measured values of elastic and viscous modulus for selected amplitude of strain, oscilation frequencies and temperatures. In the second method there were recorded values of ultrasonic velocities of samples at temperature scanning from 85 to 25 °C and from 25 to 85 °C in HR-US 102, which were compared with ultrasonic velocities measured at the temperature $27,0 \pm 0,5$ °C by gel-modul HR-EX-SSC.

Key words

Gels, agarose, gelatin, hyaluronan, reology, high-resolution ultrasonic spectrometry

Citace

VACULÍKOVÁ, Hana. *Hyaluronan hydrogels* [online]. Brno, 2019 [cit. 2019-04-29]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113575>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Andrea Kargerová.

Prohlášení

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

.....
Podpis studenta

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce, Ing. Andrei Kargerové, Ph.D. za ochotu, trpělivost, užitečné rady a celkovou nápomoc, bez níž by tato práce nemohla vzniknout. Dále bych ráda poděkovala Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D. za skvělou spolupráci při měření na reometru. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině, přátelům a blízkým, kteří mi byli velkou oporou při studiu.

Obsah

1 Úvod	7
2 Teoretická část	8
2.1 Gely.....	8
2.1.1 Vlastnosti gelových soustav	8
2.1.2 Využití gelů	9
2.1.3 Klasifikace gelů.....	9
2.1.4 Reverzibilní gely	9
2.1.5 Ireverzibilní gely	10
2.2 Agaróza.....	11
2.2.1 Struktura agarózy	11
2.2.2 Fyzikálně chemické vlastnosti agarózy a jejích gelů	11
2.2.3 Využití agarózových hydrogelů	12
2.3 Želatina	13
2.3.1 Definice a historie želatiny.....	13
2.3.2 Chemické složení želatiny.....	13
2.3.3 Fyzikální a chemické vlastnosti želatiny.....	13
2.3.4 Výroba želatiny	15
2.3.5 Nové alternativní zdroje želatiny	15
2.3.6 Použití želatiny	16
2.4 Hyaluronan.....	17
2.4.1 Historie hyaluronanu	17
2.4.2 Chemická struktura a molekulová hmotnost hyaluronanu	17
2.4.3 Chování hyaluronanu v roztoku	18
2.4.4 Výskyt hyaluronanu v organismu.....	18
2.4.5 Syntéza a degradace hyaluronanu	18
2.4.6 Vlastnosti a použití hyaluronanu	19
2.5 Reologie	21
2.5.1 Úvod a princip metody	21
2.5.2 Využití reologie.....	21
2.5.3 Dělení látek podle Newtonova zákona v reologii	22
2.5.4 Viskoelastické materiály v reologii	22
2.5.5 Reometrie	24
2.6 Ultrazvuková spektrometrie s vysokým rozlišením.....	25
2.6.1 Princip metody	25
2.6.2 Využití metody	26
2.7 Současný stav řešené problematiky	27
3 Experimentální část	35
3.1 Použité chemikálie.....	35
3.2 Příprava vzorků.....	35
3.2.1 Příprava a optimalizace agarózo-želatinových gelů.....	35
3.2.2 Příprava a optimalizace agarózo-želatinových gelů s přídavkem hyaluronanu	36
3.3 Měření viskoelastických vlastností reometrem AR-G2.....	38
3.4 Měření ultrazvukovým spektrometrem s vysokým rozlišením HR-US a HR-EX-SSC	102 40
3.5 Výsledky a diskuze	44
3.5.1 Měření oscilačních testů u agarózo-želatinových gelů s přídavkem hyaluronanu reometrem AR-G2.....	44 44

3.5.2 Měření relativní ultrazvukové rychlosti v závislosti na teplotě u agarózo-želatinových roztoků s přídavkem hyaluronanu ultrazvukovým spektrometrem s vysokým rozlišením (HR-US 102)	57
3.5.3 Měření relativní ultrazvukové rychlosti u agarózo-želatinových gelů s přídavkem hyaluronanu ultrazvukovým spektrometrem s vysokým rozlišením (HR-EX-SSC)	59
3.5.4 Shrnutí výsledků dosažených pomocí reologie a ultrazvukové spektrometrie s vysokým rozlišením u agarózo-želatinových gelů/roztoků s přídavkem hyaluronanu	60
4 Závěr	61
5 Použitá literatura	64
Seznam použitých symbolů a zkratk	72
Příloha	74

1 Úvod

Gely jsou řazeny do průmyslově, vědecky i výzkumně významné kategorie látek, zejména pro jejich vlastnosti, jež hrají důležitou roli v mnohých výrobních procesech. Mezi takovou skupinu látek patří i některé biopolymery, například agaróza a želatina, které jsou využívány především díky svým gelujícím schopnostem.

Agarózové gely se vyznačují termoreverzibilitou a hysterezní povahou. I když molekuly této látky nenesou žádný náboj, vedou elektrický proud, a proto jsou důležité v různých separačních technikách. Také se používají při mikrobiálních kultivacích jako médium a v potravinářství jako želírující aditivum. V posledních pár letech začala být tato látka zkoumána pro možné aplikace v tkáňovém inženýrství, aby zlepšila buněčné procesy.

Želatina bývá získávána částečnou hydrolýzou kolagenu, a stejně jako kolagen i tento protein má amfoterní povahu. Její gely jsou termoreverzibilní a nachází své uplatnění zejména v potravinářství jako aditivum, nebo se přidávají do doplňků stravy. Též jsou součástí mnohých farmaceutických (tobolky) i kosmetických (krémy) výrobků.

V biochemických oborech, kupříkladu v lékařství, tkáňovém inženýrství se pracuje hlavně s biokompatibilními a biodegradabilními materiály, které současně umožňují kooperaci s buňkami. Tudíž byl do připravovaných agarózo-želatinových gelů přidáván hyaluronan.

Hyaluronan se hojně vyskytuje v živočišných a prokaryotických organismech. V tělech savců se nejvíce nachází v kůži, očním sklivci a synoviální tekutině kloubů. Je známo, že různé molekulové hmotnosti hyaluronanu plní v organismu odlišné funkce, kdy například vysokomolekulární hyaluronan slouží jako lubrikant, napomáhá transportu vody v tkáních a v kůži zajišťuje její elasticitu, naproti tomu nízkomolekulární hyaluronan se účastní buněčných procesů, hojení ran a aktivuje imunitní systém.

V této práci je popsána optimalizace přípravy a dále charakterizováno viskoelastické chování agarózo-želatinových gelů s různými koncentracemi vysokomolekulárního a nízkomolekulárního hyaluronanu pomocí reologie a ultrazvukové spektrometrie s vysokým rozlišením, kdy reologií byly měřeny elastické a viskózní moduly v závislosti na amplitudě napětí, frekvenci a teplotě. Druhou metodou byly u vzorků měřeny relativní ultrazvukové rychlosti v závislosti na teplotě přístrojem HR-US 102. Nakonec byly tyto ultrazvukové rychlosti srovnávány s ultrazvukovými rychlostmi získanými z přístroje HR-EX-SSC pro dané vzorky při teplotě $27,0 \pm 0,5$ °C.

2 Teoretická část

2.1 Gely

Nejpraktičtější koloidní soustavy jsou kapalně disperzní prostředí a pevná disperzní fáze, které se nazývají buď soly, pro případ lyofobních roztoků, nebo koloidní roztoky u lyofilních koloidů [1]. Když ve zmíněné soustavě je spojitě disperzní prostředí [2] a disperzní částice o vysoké koncentraci [1] v něm nejsou pohyblivé [2], vznikají polotuhé systémy tzv. gely [3], v něž se umí změnit jak roztoky lyofilní, tak i lyofobní soly [1].

2.1.1 Vlastnosti gelových soustav

Gel je trojrozměrnou sítí procházející celým disperzním prostředím, tvořený spojenými disperzními částicemi pomocí chemických a fyzikálních sil. Ačkoli je disperzní prostředí kapalně, existenci této sítě se gely charakterizují mechanickými vlastnostmi tuhého stavu [1], například pružností [4]. Gel se chová elasticky až do určité míry tečného napětí, tzv. kritického napětí, jež závisí na koncentraci částic a pevnosti spojů mezi nimi. Čím více je vazeb mezi řetězci polymeru, tím méně lze měnit jejich tvar a tím rigidnější vzniká prostorová síť [2]. Viskozita i síla gelu se zvyšují s hustotou zesílení gelu, nicméně narůstající teplotou může viskozita vzrůst nebo klesnout podle molekulárních interakcí mezi řetězcem a rozpouštědlem [3]. Jsou-li síly mezi disperzními částicemi struktury sítě velmi slabé, je možno mechanickými účinky rozrušit tyto vazby a převést gel na sol [2] bez změny objemu nebo teploty [3]. Při tixotropii [2], což je typ neneutronovského průtoku [3], když ztekucený sol stojí v klidu, vazby se pozvolna obnovují a dochází ke gelaci. Zmíněný jev vykazují některé reverzibilní i ireverzibilní gely s fyzikálními spoji [2]. Difuzivita v závislosti na velikosti a struktuře sítě polymeru v gelu se mění s koncentrací řetězců, hustotou zesílení a teplotou, čehož se využívá v separačních technologiích, a to gelové elektroforéze i gelové permeační chromatografii [4]. U reverzibilních i ireverzibilních systémů [2] dochází obvykle k pomalému shlukování. Při procesu stárnutí postupně vznikají husté sítě polymerů. Když se interakce mezi částicemi disperzní fáze stane tak velká [3], že část původně přítomné kapaliny, je vytlačována z gelu a odmísí se od něj, síťovitá struktura se smršťuje. Tento proces [2], synerese [3], lze pozorovat hlavně u čerstvých gelů [2] v organických hydrogelech, organogelech i anorganických hydrogelech [3].

2.1.2 Využití gelů

Gely a gelace významně figurují v mnoha chemických a biologických systémech [4], kupříkladu v lékařství při srážení krve, v biologii živočichů a rostlin i v dalších průmyslových odvětvích. Gelace je důležitá procedura pro výrobu vláken, aplikaci lepidel, zpracování kůží, přípravu gelových kapslí ve farmaceutickém průmyslu, produkci specializovaných materiálů ve sklářském a keramickém průmyslu a rovněž i v potravinářství [2].

2.1.3 Klasifikace gelů

Podle charakteru disperzního prostředí se rozdělují na hydrogely, s vodou jako disperzním médiem, nebo organogely složené z kapalné organické fáze. Na základě reologických vlastností se člení na plastické, pseudoplastické, nebo tixotropní gely. Na bázi fyzické povahy lze gelové soustavy dělit na elastické nebo pevné [3]. Gely podle schopnosti navrátit se po vysušení do původního stavu se rozdělují na reverzibilní a ireverzibilní [1].

2.1.4 Reverzibilní gely

Reverzibilní gely přecházejí při vysoušení na kompaktní xerogely, kdy zmenšují svůj objem [1] a zůstává pouze disperzní fáze s neomezeným smrštěním. Často gely si ponechávají vysokou pórovitost a obrovskou plochu spolu s velmi malými póry [3]. Po přijetí molekul disperzního prostředí, tzv. botnáním, se mění zpět do původní podoby tak [1], že interakce gel-gel jsou nahrazeny interakcí gel-rozpouštědlo [3]. Touto schopností disponují samovolně vznikající lyofilní koloidy, protože tyto právě roztoky makromolekulárních látek jsou termodynamicky stabilní. U těchto látek se zakládá proces gelace ve vytváření trvanlivých spojů působením chemických nebo fyzikálních sil mezi částicemi, které jsou označeny jako styčné body nebo uzly [1]. Podle povahy sil mezi částicemi jsou gely klasifikovány na fyzikální a chemický gel [4]. Fyzikálně síťované gely jsou spojené úseky řetězců polymerů [2] interakcemi krátkého dosahu, jako van der Waalsovy, hydrofobní, vodíkové a Coulombova mezi náboji [4] do uzlových oblastí, které se liší strukturou, velikostí, trvanlivostí a pevností. Gely s pevnými uzly se podobají gelům s kovalentními vazbami, naopak gely se slabými spoji se rozpadají vlivem větších napětí i vyšší teploty. Gely, jež ohřátím se změny na roztok a jeho ochlazením zpět na gel, se nazývají termoreverzibilní. Rozlišuje se teplota tuhnutí, při níž roztok tuhne v gel, a teplota ztekucení, kdy gel přechází na sol. Jejich hodnoty se liší, protože gel postupně vzniká přechodem solu přes viskózní, polotuhá stadia, tudíž teplota tuhnutí je nižší než teplota ztekucení. Tento jev se jmenuje hystereze [2]. Styčné body v případě chemického gelu jsou propojeny kovalentní vazbou [4].

Kovalentně síťované gely se podle přítomnosti kapalného disperzního prostředí vyskytují jako xerogely nebo lyogely a představují velmi rozsáhlou trojrozměrnou síťovitou strukturu chemických vazeb vytvořené nelineární kondenzační nebo adiční polymerací monomerů, také z lineárních polymerů zesíťováním vhodným síťovacím činidlem [2]. Síťová struktura takových gelů, zejména povaha styčných bodů, zůstává stálá i po změně vnějších podmínek, jako je teplota, jelikož dané vazby mají vyšší spojovací energie než tepelná energie [4]. Zvýšením teploty je bráněno zesíťování makromolekul v disperzním prostředí, ale snížení teploty obvykle tvorbu gelu podporuje. U takových roztoků gelaci pomáhá vyšší koncentrace, protože vzrůstá počet vazeb daných molekul nebo jejich částí. Gelaci vodných roztoků amfoterních vysokomolekulárních elektrolytů, například bílkovin, významně ovlivňuje pH roztoku, zejména hodnota pH izoelektrického bodu [2].

2.1.5 Ireverzibilní gely

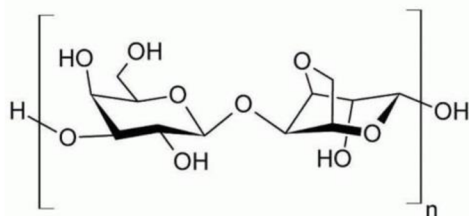
Ireverzibilní gely jsou porézní a v průběhu vysoušení téměř nezmenší svůj objem. V kontaktu s disperzním prostředím [1] jsou sice schopné určité množství kapaliny sorbovat [2], avšak nepřechází do původního stavu [1], tím pádem jejich přeměna na xerogel je nevratná [2]. Tyto gely se vytváří z lyofobních solů, k čemuž je nutné mírně snížit stabilitu koloidního systému tak, aby nedošlo k agregaci a následně koagulaci. Částečné narušení stability [1] se provádí nejčastěji přidávkem elektrolytu v koncentraci nižší než koagulační práh [2]. Tím ztrácí pevnost jen ty povrchové koloidní částice, kde schází ochranná vrstva a v těchto místech se spojí molekuly lyofobního koloidu [1] za vzniku prostorové sítě [2]. Při jejich přípravě je třeba dodat energii, například mechanickou [1]. Na průběh jejich gelace má vliv několik podmínek. První z nich je, že koncentrace disperzního podílu musí dosáhnout minimální hodnoty, jelikož pod ní dochází ke koagulaci. Pro vznik gelu také pomáhá menší rozměr částic při konstantní hmotnosti disperzního podílu. Dále hraje důležitou roli tvar částic, kdy gel snáze vzniká s anizometrickými částicemi, kde právě na hranách a hrotech s nejméně vyvinutou elektrickou dvojvrstvou nebo solvátovým obalem dochází ke spojování částic. Rychlost tvorby a vlastnosti gelu výrazně ovlivňuje teplota. Jejím zvýšením se zrychlí gelace, nicméně intenzivním ohříváním lze zpět přeměnit gel v sol. Též mechanické působení obecně brání gelaci [2].

2.2 Agaróza

Agaróza je biopolymerní látka vytvářející hydrokoloidní formu agaru, který se nachází v buněčné stěně červených mořských řas rodu Agarophyte [5], Floridae, Gelidium [6] a Rhodophyta [7].

2.2.1 Struktura agarózy

Agaróza je přírodní [8], netoxický [9] lineární polysacharid tvořený opakujícími se jednotkami agarobiózy, což je disacharid složený z β -D-galaktopyranózy, vázanou přes α -(1,3) s 3,6-anhydro- α -L-galaktopyranózou, vázanou β -(1,4) glykozidovou vazbou. Obvykle nemá žádný náboj, nicméně může obsahovat nabitě karboxylové, pyruvátové, nebo sulfátové skupiny [8]. Podle toho, zda jde o nízkomolekulární, nebo vysokomolekulární agarózu, se molekulová hmotnost pohybuje v rozmezí od 630 do 120 000 [6].



Obr. 1: *Struktura agarózy* [10].

2.2.2 Fyzikálně chemické vlastnosti agarózy a jejich gelů

Agaróza se běžně po extrakci a purifikaci vyskytuje ve formě bílého prášku, který se nerozpouští ve vodě při laboratorní teplotě, zatímco zahřátím nad kritickou teplotu tání dochází ke zvýšení rozpustnosti a vzniku solu, v němž jsou vytvářeny dlouhé svazky vláken. Jeden typ agarózy se vyznačuje teplotou tání kolem 65 °C a druhý okolo 95 °C [9]. Ochlazováním se postupně sol dostává do mikrogelové fáze, kde zůstávají tyto svazky spojené [11], poté propletené [9], a které jsou následně stabilizovány slabými vazebnými interakcemi [11]. Z toho vyplývá, že dvojité helikální struktury se změní na trojdimenzionální síť [12] a při přibližné teplotě tuhnutí/gelace 25–35 °C [7] vzniká polotuhý termoreverzibilní hydrogel [5]. Tyto hydrogely obsahují agarózové řetězce připoutané k sobě pomocí vodíkových můstků a mezi nimi se nachází póry [7], jejichž velikost závisí na koncentraci agarózy [8]. Mezi vlastnosti těchto hydrogelů lze uvést jev zvaný hystereze, kdy teplota tání se neshoduje s teplotou tuhnutí (rozdíl se pohybuje i o několik desítek stupňů) a je popsán hysterezní křivkou, z níž lze vidět, že při zvyšování teploty jsou naměřeny jiné hodnoty než

při ochlazování [13]. Výskyt tohoto děje je připisován vzniku velkých agregátů, které zůstávají stabilní i při vyšších teplotách, oproti strukturám formujícím se chlazením [7]. Mechanické vlastnosti čistého agarózového gelu se odvíjí od molekulové hmotnosti a koncentrace [14].

2.2.3 Využití agarózových hydrogelů

Agaróza, zejména ve formě gelu [8], nachází své využití v mnohých vědeckých i průmyslových aplikacích jako je například potravinářský průmysl, biochemické laboratoře (kultivace, dělicí techniky), analytické chemie [14], farmacie a biomedicínské aplikace [9].

Hydrogely z agarózy velmi dobře vedou elektrický proud, a proto jsou používány v různých separačních technikách, obzvláště v procesech gelové elektroforézy jako nosičový neutrální základ [15]. Segmenty velkých biomolekul po zapojení do elektrického pole jsou separovány v pórech gelu podle molekulové hmotnosti. Průměrná velikost pórů agarózových hydrogelů do značné míry ovlivňuje jejich koncentrace, čím vyšší koncentrace agarózy, tím je velikost pórů menší [14] a rychlost pohybu separovaných částic se sníží [15]. Široce jsou tyto gely také využívány v imuno elektroforéze, afinitní a gelové permeační chromatografii [9].

V biochemických laboratořích jsou agarózové hydrogely využívány pro kultivaci mikroorganismů jako vhodná tuhá kultivační média pro samotný růst mikroorganismů [14]. V současnosti je prováděna řada studií ohledně aplikace agarózy v tkáňovém inženýrství, přesněji v oblasti vývoje nosičů s řízeným uvolňováním aktivních látek. Slouží také jako modelový podklad pro studium tkáňového transportu, mikrobiálních biofilmů, nebo buněčných procesů, jelikož zadržují velké množství vody a živin, podporují tím růst buněk a jejich regeneraci [16]. Protože biokompatibilní agaróza je do jisté míry inertní, bylo by možné ji v budoucnu používat pro růst lidských tkání [17].

V potravinářském průmyslu se uplatňují jako zahušťovací a želírovací aditiva [13]. Ve farmaceutickém a mikrobiologickém průmyslu jsou také hojně využívány hydrogely s vysokou mechanickou odolností [17] a rigidnější strukturou [16].

2.3 Želatina

2.3.1 Definice a historie želatiny

V literatuře se objevují různé definice želatiny. Uvádí se, že želatina je čištěný přírodní rozpustný bílkovinný produkt, tvořící nebo netvořící gel, získaný z živočišného kolagenu buď částečnou kyselou, nebo alkalickou hydrolyzou kostí, kůží, povázek a šlach zvířat (včetně ryb a drůbeže). [18]

Slovo želatina je původem z latinského slova „gelatus“, což označuje rosol či ztuhlost. Želatina byla poprvé použita již v Egyptě jako lepidlo v hrobech faraonů. V 18. století byl přijat patent na její výrobu. V roce 1845 byla vynalezena želatina na dezerty a o necelých třicet let později firma Hartley začala vyrábět želé. 20. století znamenalo období ochucování želatiny různými příchutěmi a také propagací želatiny v mnoha druzích potravin. [19]

2.3.2 Chemické složení želatiny

Želatina je lehce stravitelná [20] a z chemického pohledu heterogenní směs [18] skládající se z 18 aminokyselin [20]. Přibližné hodnoty složení aminokyselin ve struktuře želatiny je: glycin 21 %, prolin 12 %, hydroxyprolin 12 %, kyselina glutamová 10 %, alanin 9 %, arginin 8 %, kyselina asparagová 6 %, lyzin 4 %, serin 4 %, leucin 3 %, valin, fenylalanin a threonin 2 %, izoleucin, hydroxylyzin 1 %, methionin a histidin < 1 % a tyrozin < 0,5 % [21]. Kromě tryptofanu jsou v želatině obsaženy všechny ostatní esenciální aminokyseliny [18]. Průmyslově se želatina vyrábí z kolagenu [20], jehož existuje mnoho různých forem, nicméně želatina je získávána pouze ze zdrojů bohatých na kolagen typu I [21].

2.3.3 Fyzikální a chemické vlastnosti želatiny

Želatina je pevná, průhledná, křehká látka, nažloutlé barvy, téměř bez chuti a zápachu. Při běžných teplotních a vlhkostních podmínkách má 9–10 % vody. V kontaktu se studenou vodou hydratuje za vzniku oddělených, nabotnalých částic. Zahříváním přecházejí tyto nabotnalé částice do roztoku, kde důležitou roli hrají pH, metody výroby, teplotní historie a koncentrace želatiny. [22]

Želatina, podobně jako kolagen, má amfoterní charakter, což znamená, že ve vodném roztoku se podle pH může chovat buď jako kyselina, nebo jako zásada. V silně kyselém roztoku se kladně nabitá želatina v elektrickém poli pohybuje jako kation, naopak v silně zásaditém roztoku je záporně nabitá a pohybuje se jako anion. V izoelektrickém bodě nedochází k žádnému pohybu částic. U želatiny vyrobené kyselým způsobem se izoelektrický

bod vyskytuje mezi pH 7,5 a 9,3 a u želatiny, vyrobené alkalickým způsobem, jsou hodnoty tohoto bodu v rozmezí pH 4,7 do 5,2. [22]

Tvorba hydrogelů je jednou z nejvýznamnějších vlastností želatiny [22][23]. Přestože kolagen a želatina pochází ze stejné makromolekuly, vzájemně se jejich gelovací mechanismus i vytvořená síťová struktura značně liší. Při gelování kolagenu jsou agregovány kolagenové molekuly a vytváří se fibrily, vyvolané změnami iontové síly, pH a teploty. V průběhu tohoto procesu dochází k lagové fázi, kdy primární agregáty molekul kolagenu jsou nukleovány. Poté začíná boční agregace podjednotek do dosažení rovnováhy. Oproti tomu u želatiny, kdy přechází reverzní cívka na šroubovice [24] v důsledku vzniku vodíkových můstků [18], tyto šroubovice jsou podobné trojvrstvému kolagenu, nicméně není dosaženo rovnováhy [24].

Tyto gelační schopnosti želatiny tvořící různě pevné gely jsou kvantitativně analyzovány, a slouží jako způsob jakostní kontroly. Želírující sílu želatiny vyjadřuje Bloom-hodnota [22], určující kvalitu a cenu vyrobené želatiny [20]. Měření pevnosti gelu se provádí pomocí Bloomova gelometru tak, že se nechá 7,5 g želatiny rozpustit ve 105 g vody za vzniku jejího roztoku o koncentraci 6,67 % při 60 °C a poté je ochlazen na $10 \pm 0,1$ °C po dobu 16 hodin. Následuje stanovení síly odporu vzniklého gelu vůči pronikajícímu válečku o průměru 4 mm do hloubky 12,7 mm. Hodnota síly vyvinutá pro průnik odpovídá Bloom-hodnotě daného gelu. Pro obchodní účel se pevnost želatiny pohybuje od 50 do 300 Bloom [22]. Technologicky velmi důležitá viskozita želatiny je zjišťována viskozimetrickou pipetou v roztoku o koncentraci 6,67 % při teplotě 60 °C. Hodnota viskozity se pohybuje mezi 15 až 75 [20]. Pevnost a viskozita želatinového gelu postupně slábnou při dlouhodobém zahřívání nad teplotu 40 °C. Tuto degradaci můžeme urychlit působením pH a působením bakteriemi [22].

Bod tání želatiny je přechodovým bodem od želé k roztoku a obvykle se pohybuje okolo 28–30 °C. Bod tuhnutí se nachází při teplotě nižší než 25 °C, kdy nastává velmi pozvolný přechod od roztoku k želé. Oba zmíněné body hrají důležitou roli ve výrobním procesu. [23]

Veškeré výše uvedené fyzikálně-chemické vlastnosti, včetně primárního uspořádání aminokyselin želatinového řetězce úzce souvisí se zdroji kolagenu (použitý surový materiál) a se způsobem výroby želatiny. [21]

2.3.4 Výroba želatiny

Ve výrobě želatiny se v současnosti nejvíce používají vepřové nebo hovězí kůže, které jsou různě předupraveny a dále zakonzervovány před nežádoucími kontaminacemi mikroorganismy. Dále je materiál ve štípacím stroji rozsekán na malé kousky. Pak následuje samotná alkalická, nebo kyselá předúprava. [20]

Alkalickým způsobem se zpracovávají povápněné nebo nasolené kůže. Nakrájené kousky se několik týdnů máčejí ve vápenném mléce o hodnotě pH 12–13. Hlavní cíl alkalické úpravy představuje dosažení určitého stupně zbobtnání kožní hmoty, kdy dojde k silnému rozvolnění struktury kolagenu, což umožní snadné vnikání roztoků dovnitř celého systému a ulehčí převedení kolagenu do roztoku působením horké vody [18]. Pak následuje odvápnění promýváním 4% kyselinou chlorovodíkovou, která má pH < 1,5, kdy jsou mechanicky odstraněny vápenné ionty [20], uvolněné nebo odbourané součásti bílkovin i jiné nečistoty [18] a zároveň tyto drastické změny pH dokonale zničí možné mikroorganismy [20]. Nedostatečnou likvidací těchto látek by zapříčinilo masivní snížení jakosti výrobků [18]. Následně je materiál promýván ve vřelé vodě a dále pokračuje samotný proces vaření. Tímto postupem se získává želatina typu B [20].

Kyselou předúpravou jsou připravovány želatiny typu A a většinou se zpracovávají vepřové a rybí kůže [18]. Kůže se po promytí a rozřezání nechá na 24 až 48 hodin v kyselé lázni s pH pod 1,5 a posléze se promyje čistou vodou [20].

Vaření se uskutečňuje ve varných kádích [18], do nichž se vloží vepřové nebo hovězí kůže a potom probíhá celá řada horkovodních extrakcí obvykle v rozmezí 50–60 °C až 100 °C [20], aby došlo k denaturaci a solubilizaci kolagenu [18]. Následuje proces odstředování a několikastupňový proces filtrací. Dalším krokem se přeměňuje suspenze na rosol v tepelném výměníku, kdy dochází ke zmrazení a následné sterilizaci při 140 °C. Po tomto úkonu jsou želatiny zpracovány do nití a sušeny v sušícím tunelu, kde je upravena vlhkost obsažená v želatině. Poté se želatinové nitě zkrátí, rozemelou a síťováním jsou rozděleny na prášek a částice s různou zrnitostí [20].

2.3.5 Nové alternativní zdroje želatiny

V současné době je želatina, používána pro potravinářský a farmaceutický průmysl, téměř odvozena od živočišných produktů [21], kdy mezi nejčastější zdroje jsou řazeny prasečí kůže, kůže skotu a kosti z vepřového a skotu [24]. Zhruba každý rok se jí spotřebuje asi 55 000 tun. Z tohoto důvodu byly v posledním desetiletí zkoumány alternativní zdroje kolagenu pro

výrobu želatiny, jako jsou rybí kůže, kosti a ploutve, mořské řasy, nebo medúzy. Jako nový způsob byl vyzkoušen postup přeměny kukuřičných rostlin, aby produkovaly vysoce kvalitní želatinu bezpečným a levným způsobem, což by umožňovalo vývoj různých želatin s danými molekulovými hmotnostmi a konkrétními vlastnostmi pro různé potřeby. Vedle toho rostlinná rekombinantní želatina by řešila obavy ohledně možného výskytu infekcí z vedlejších živočišných produktů. Nedávno byl vyvinut biotechnologický proces výroby želatiny pomocí rekombinantní DNA, což pomohlo eliminovat již zmíněné riziko přírodní kontaminace. Existence těchto komerčních rekombinantních kolagenů/želatin na trhu se stává běžně užívaným materiálem při vývoji lékařských aplikací na opravu měkkých a tvrdých tkání [21].

2.3.6 Použití želatiny

Potravinářský průmysl je jedním z největších spotřebitelů želatiny. Želatina je hlavně používána jako pojivo tuků, vody a při úpravě masných a rybích výrobků, zahuš'ovadlo mléčných nízkotučných výrobků, stabilizátor dezertních krémů a ve výrobě cukrovinek, mražených dortů a zmrzlin. S ohledem na pozitivní účinek želatiny na lidský organismus, například předcházení vzniku artritidy, osteoporózy a mnoho jiných, se objevuje také v různých doplňcích stravy. [23]

Farmaceutická želatina nachází uplatnění hlavně při výrobě perorálních želatinových tobolek, perel, čípků, pastilek a zdravotních bonbonů. Využívá se jako pojivo při tabletování farmak. Sama o sobě je želatina používána pro povrchové tvrzení vnějších ob vazů na ranách, zlomeninách [25] a k zastavení vnitřního krvácení po úrazech díky tzv. absorpčnímu želatinovému tamponu, jenž zaujímá důležité místo zejména v chirurgii [22].

Aplikace technické želatiny v praxi je velmi rozmanité, od úpravy velikosti a povrchu tkanin [18], výroby papíru, plastů, hnojiv, pracích prášků, čisticích prostředků, v metalurgii [20], přes použití jako adheziva, filmy, světelné filtry a kultivační média pro bakteriologické testy [18]. V kosmetice pro vysoký obsah kolagenu, který napomáhá k výživě pokožky a vlasů, slouží k výrobě krémů, šamponů a mýdel [20].

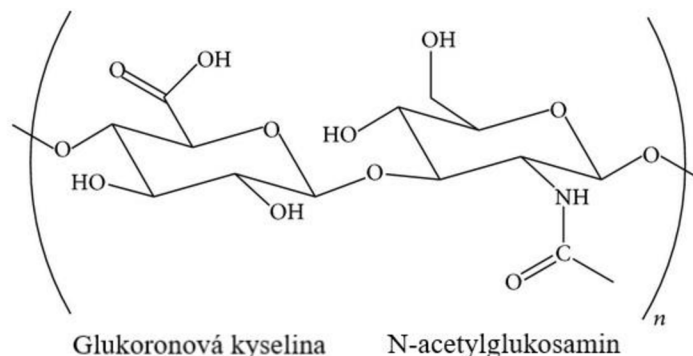
2.4 Hyaluronan

2.4.1 Historie hyaluronanu

Poprvé byl tento polysacharid jako takový připraven v druhé polovině devatenáctého století [26], ale až v roce 1934 byl spolehlivě izolován z hovězího očního sklivce [27] [28]. Jelikož tato nově objevená látka obsahovala dvě různé molekuly cukru, z nichž jednou byla uronová kyselina, byl navržen název „hyaluronová kyselina“, z řeckého „hyalos“ – sklo a již zmíněné uronové kyseliny [29].

2.4.2 Chemická struktura a molekulová hmotnost hyaluronanu

Hyaluronan je lineární přírodní [27] [28] mukopolysacharid [30], řadí se do skupiny záporně nabitých glykosaminoglykanů spolu s chondroitinsulfáty, keratansulfáty nebo heparansulfáty [31]. Oproti jiným mukopolysacharidům není sulfatovaný [30]. Hyaluronan je tvořen opakujícími se disacharidovými jednotkami skládajícími se z D-glukoronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu vzájemně spojených β -1,3 glykosidickými vazbami. Jednotlivé disacharidové jednotky jsou vázány β -1,4 glykosidickými vazbami [31] a počet těchto jednotek v dané molekule může dosáhnout 10 000 i více [27].



Obr. 2: *Primární struktura hyaluronanu složená z glukoronové kyseliny a N-acetylglukosaminu [32].*

U těchto typů mukopolysacharidů se molekulová hmotnost uvádí v Daltonech (Da), což je jednotka odpovídající klasické jednotce g/mol [27]. Hyaluronan se obecně vyznačuje vysokou molekulovou hmotností, úzce související se způsobem jeho izolace [33]. Jelikož každá disacharidová jednotka této látky odpovídá přibližně 400 Da, molekulová hmotnost může dosáhnout až několika milionů Da [31].

2.4.3 Chování hyaluronanu v roztoku

Primární struktura hraje důležitou úlohu v tvorbě sekundární struktury ve vodě [34]. Řetězec hyaluronanu obsahuje relativně neohebný cukerný kruh, ale také glykosidické vazby, spojující tyto cukry atomem kyslíku, orientovaným ve tvaru „V“ [35]. Na konci každé β -glykosidické vazby by tyto cukerné zbytky mohly teoreticky neomezeně rotovat [34], nicméně prokazatelně existuje pouze několik preferovaných konfigurací. Jelikož v roztoku jsou všechny prostorově objemné hydrofilní hydroxylové nebo karboxylové skupiny u D-glukoronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu [27] uspořádány v ekvatoriální poloze a v axiální poloze se nachází hydrofobní atomy vodíku a tvoří se plochá, kroučící se struktura. Každá disacharidová jednotka v této struktuře je pootočena o 180° oproti předchozí i následující jednotce [31]. Po získání původní orientace řetězce (otočení o 360°), vzniká se slabšími ne vazebnými interakcemi (vodíkové můstky, hydrofobní interakce) [35] dvakrát stočená šroubovice „two-fold helix“, jež v roztoku představuje doménu [36], energeticky velmi stabilní sekundární strukturu hyaluronanu [31]. Zároveň axiální hydrofobní domény hyaluronanu tvořené vodíky při kontaktu s rozpouštědlem jsou směřovány dovnitř řetězce, naproti tomu polární skupiny jsou orientovány do rozpouštědla, což přispívá k vysoké hydrofilitě hyaluronanu a k vazbě vody do jejího řetězce [35], čímž vytváří síť již při velmi nízkých koncentracích hyaluronanu [27]. Výskyt hydrofilních a hydrofobních zón má za následek amfifilní charakter [34].

2.4.4 Výskyt hyaluronanu v organismu

Bylo zjištěno, že hyaluronan u všech obratlovců, včetně člověka [37], se vyskytuje jako polyanion [38] sodné či draselné soli [39]. Jedná se o jednu z hlavních komponent extracelulární matrix, kde interaguje především proteiny [27] a je přirozenou součástí pojivových, epitelových a nervových tkání [29]. S ohledem na typ tkáně, zejména oční sklivce, synoviální tekutina kloubních chrupavek, kůže, pupeční šňůra, kolísá množství hyaluronanu [27]. Jeho vysoký obsah byl objeven také v plicích, ledvinách, mozku a svalech [40]. V neposlední řadě se hyaluronan nachází na povrchu některých bakterií (*Streptococcus*, *Pasteurella*) [37].

2.4.5 Syntéza a degradace hyaluronanu

Buněčný hyaluronan je syntetizován fibroblasty a enzymy, hyaluronansyntázami. Jedná se o integrální membránové proteiny, které se u obratlovců vyskytují ve třech formách: HAS1, HAS2 a HAS3. Tyto proteiny od neredukujícího konce [31] tvoří dlouhé, lineární řetězce

hyaluronanu střídavým připojováním kyseliny glukoronové a N-acetylglukosaminu [29]. Na rozdíl od jiných glykosaminoglykanů, nová struktura hyaluronanu je přímo vytlačena do extracelulární matrix [31].

Hyaluronan podléhá za fyziologických podmínek degradaci kyslíkovými radikály, nebo enzymy. V prvním případě degradace probíhá jako vedlejší reakce působení neutrofilních granulocytů během zánětu, především u revmatoidní artritidy [37] [41]. U savců probíhá enzymatická degradace hyaluronanu o vysoké molekulové hmotnosti hyaluronidázou štěpící jej na menší oligosacharidy, které jsou poté rozloženy β -D-glukoronidázou a β -N-acetyl-hexosaminidázou odstraněním neredukujících terminálních cukrů [29]. Kromě již zmíněných savců, existují také bakteriální, parazitické a korýší hyaluronidázy [42].

2.4.6 Vlastnosti a použití hyaluronanu

Fyzikálně-chemické vlastnosti a biologické funkce hyaluronanu, které jsou využívány v mnoha vědeckých a průmyslových aplikacích, ovlivňuje prostorové uspořádání, zdroj původu [29], ale hlavně jeho molekulová hmotnost [31]. Hyaluronan má antioxidační účinek [39], je hypoalergenní, biodegradabilní a biokompatibilní [29]. Díky této povaze je hyaluronan široce používán v kosmetickém průmyslu, medicínských aplikacích, tkáňovém inženýrství (scaffoldy) a technologii léčiv [34]. Existuje mnoho výrobků s touto látkou v různých formách, přes gely, tuby, pláty pevných materiálů, až po jemně tkané mřížky [29]. Podle molekulové hmotnosti jsou rozlišovány tzv. vysokomolekulární hyaluronan o molekulové hmotnosti $4 \cdot 10^2$ – $2 \cdot 10^4$ kDa a nízkomolekulární hyaluronan (tzv. fragmenty hyaluronanu) [43].

Vysokomolekulární hyaluronan napomáhá během flexe [44] tvorbě synoviální tekutiny kloubů a uděluje jí ne-newtonskou viskozitu (viskoelasticitu) a další důležité mechanické vlastnosti [31]. Hyaluronan také slouží jako lubrikant snižující tření a tlumící nárazy [42], čímž chrání kloubní struktury a zvyšuje stabilitu kloubu [44]. Při kloubních zánětech postupně klesá molekulová hmotnost hyaluronanu ze 7 MDa na 3–5 MDa, což omezuje schopnost synoviální tekutiny plnit její funkce. Pro opětovné zlepšení funkčnosti kloubů, lze aplikovat injekce hyaluronanu přímo do kloubní oblasti [42]. Vpravený hyaluronan poté nahrazuje synoviální tekutinu, čehož se hojně používá v revmatologii a ortopedii [27] [41] při léčbě osteoartrózy [44]. Hyaluronan je díky svým viskoelastickým vlastnostem [45] využíván při operaci oka jako náhrada očního sklivce [31] v oftalmologické chirurgii, například během implantace čoček [42]. Hyaluronan funguje v očních kapkách jako lubrikant a zvlhčovač

oka [36]. Mezi jednu z nejvýznamnějších vlastností hyaluronanu patří zadržování velkého množství vody [29] a pomáhá jejímu transportu napříč tkání [27] [41]. Jelikož hyaluronan v kůži zastává funkci humektantu, po jeho aplikaci do pokožky posiluje její pevnost, pružnost a podporuje tvorbu nových kolagenových a elastinových vláken [29]. V kosmetice je hyaluronan přidáván do krémů a gelů proti vráskám a stárnutí pleti [40]. V plastické chirurgii se využívá hyaluronanu [27] [41] v injektovatelné podobě k vyplnění, zvětšení tkáňových prostorů v kůži a svalech [29]. Platí, že vysokomolekulární hyaluronan přispívá k celistvosti tkání a při zranění je schopen přítomný zánět potlačovat [46].

Nízkomolekulární hyaluronan, nebo oligosacharidy 25–50 disacharidových jednotek, účinkuje proti apoptóze [31] a je nezbytné při hojení ran [46], jelikož vyvolává imunitní odpověď [43] (zánět s otokem [31]) a regeneraci organismu [43], čemuž dopomáhá vysokomolekulární hyaluronan [46] vytvářející hydratační „cesty“ přivádějící výživové hojivé faktory při obnově a růstu buněk [47] k místu zranění [46]. Nízkomolekulární hyaluronan podporuje angiogenezi (tvorba nových kapilár a cév) [31] a stimuluje syntézu fibroblastů, posléze kolagenu [46]. Vysokomolekulární hyaluronan snižuje kontrakci fibroblastů [29], čímž podporuje bezjizvé hojení [39], čehož se využívá při léčbě popálenin a kožních vředů [26]. Nicméně menší fragmenty tohoto polymeru se podílejí i na řadě patologických dějů [48]. Předpokládá se, že hrají roli jako endogenní výstražné signály a spouštěče různých signálních drah [31], obzvláště při buněčném dělení, mitóze, vzniku tumorů, metastáz a zánětů [41]. Uvedené procesy jsou řízeny buněčnými povrchovými receptory, například receptorem CD44. Ten umožňuje mezibuněčné interakce s hyaluronanem, jako jsou interakce buňka–buňka, buňka–substrát, adheze, buněčná migrace, proliferace, aktivace, vstřebávání hyaluronanu a jeho degradace [36]. Vyšší koncentrací nízkomolekulárního hyaluronanu jsou při rakovině nádorové buňky více pohyblivé [48] a neřízeně rostou. Hyalinní oligosacharidy vyživují nádorové tkáně vznikem nových krevních řečišť, chrání před imunitním systémem a zvyšují vytváření metastáz [37] [41]. Jelikož plní hyaluronan v nádoru významnou úlohu, mohl by fungovat jako cílený distributor bioaktivních léčiv do postižených tkání v lidském těle, což by zachránilo pacienty před chemoterapiemi, které zasahují celý organismus [45].

2.5 Reologie

2.5.1 Úvod a princip metody

Reologie je vědní obor zabývající se studiem chováním pevných a tekutých látek na působení vnějších sil [49]. Jedná se o nauku kombinující mechaniku a fyzikální chemii [50]. Termín „reologie“ pochází z řečtiny: "rhein" a znamená řeka, tok nebo proudit. V doslovném překladu tedy rheologie označuje vědu o toku. Nicméně reologie se neomezuje pouze na tokové chování tekutin [51], avšak umožňuje také odhalit deformační chování pevných látek. Spojení těchto vlastností spočívá v tom, že tok látky způsobuje velké deformace pomocí smykových sil [50]. Míru deformace plynného, kapalného a pevného skupenství popisují modely jako ideální plyn, nestlačitelná kapalina a pružné těleso, kde ideální pevná látka má nekonečně velký modul pružnosti a ideální nestlačitelná tekutina má nulovou viskozitu a objemovou roztažnost. Elastické chování, které popisuje zejména tuhá tělesa, se projevuje znovuoobením tvaru látky po odstranění vnější síly způsobující deformaci. Naproti tomu viskózní chování, jenž je charakteristické pro tekutiny (kapaliny), způsobí, že materiál působením vnější síly teče a látka po odstranění této síly definitivně změní tvar [34]. Odpor proti toku, nebo-li míra odporu materiálu proti vnější síle, charakterizuje viskozita. Podle druhu zatížení ji lze rozlišit na smykovou a elongační viskozitu. Častější bývá rozdělení dle měření, a to na dynamickou a kinematickou viskozitu. Dynamická viskozita bývá definována newtonovskou rovnicí jako viskozita kapaliny vystavené smyku mezi dvěma rovnoběžnými deskami, z nichž jedna se vůči druhé pohybuje ve své rovině rovnoměrným přímočarým pohybem [51]. Tato veličina závisí na teplotě a tlaku, kdy u plynů se zvyšující se teplotou roste a u kapalin klesá [52]. Kinematická viskozita je vyjádřena jako podíl dynamické viskozity a hustoty měřené kapaliny [51]. Lze ji využít při popisu hydrodynamiky kapalin [49].

2.5.2 Využití reologie

Reologické vlastnosti materiálů, viskozity, meze toku a moduly pružnosti, je třeba znát nejen k charakterizování samotné látky, ale napomáhá také při řešení mnoha technických problematik [49]. Většina průmyslově vhodných materiálů vykazuje komplexní reologické chování, které určuje zpracovatelnost materiálu. Reologická měření nacházejí mnohá využití v různých průmyslových oblastech, kupříkladu v letectví, automobilovém průmyslu, elektronice, potravinářství, lékařství a jiné [53].

2.5.3 Dělení látek podle Newtonova zákona v reologii

U newtonovské kapaliny (ideálně viskózní kapaliny) platí přímá úměrnost mezi smykovým (tečným) napětím a gradientem rychlosti podle Newtonova zákona a jejich viskozita je fyzikální konstantou při konstantní teplotě a tlaku [34]. Tento zákon pro tečné napětí τ udává součin dynamické viskozity η a gradientu rychlosti D , který charakterizuje změny tvaru v proudící kapalině. Tímto pravidlem se obvykle řídí nízkomolekulární látky [49].

Nenewtonovské kapaliny se neřídí daným zákonem [49] a nelze charakterizovat jejich popis jedinou hodnotou dynamické viskozity. Takové látky popisují tokové křivky, jejichž tečné napětí závisí na smykové rychlosti. Poměr tečného napětí a smykové rychlosti udává tzv. zdánlivou viskozitu [52], která není látkovou konstantou. Takový materiál může být roztok nebo tavenina polymerů, suspenze nebo různé pasty. Nenewtonovské kapaliny jsou děleny dle závislosti na čase, a to na časově závislé a nezávislé. U prvního typu se zdánlivá viskozita mění s dobou působení deformace. Jejich tokové křivky jsou hysterezní, tzn. průběh při zvyšování napětí je odlišný od průběhu při jeho snižování. Patří sem tixotropní kapaliny [49], u nichž zdánlivá viskozita s prodlužujícím se časem působení síly klesá [52] (dochází k jejich řidnutí) [34]. Tento typ vyhovuje např. nátěrovým hmotám. Naopak u reopektických kapalin zdánlivá viskozita během smykového namáhání s časem roste [49] (dochází k houstnutí) [34]. Tento typ se vyskytuje velmi zřídka [49]. Pro nenewtonovské kapaliny časově nezávislé platí, že zdánlivá viskozita závisí na teplotě. Dělí se na pseudoplastické kapaliny, kdy zdánlivá viskozita klesá se zvyšujícím se smykovým napětím (řidnutí) [34]. Jedná se např. o roztoky a taveniny polymerů, roztoky mýdel a detergentů, některé suspenze apod [49]. Další typ, dilatantní kapaliny, se vyznačují vzrůstem zdánlivé viskozity se zvyšujícím se tečným napětím (houstnou) [34]. Takové chování se vyskytuje poměrně málo, nicméně bylo pozorováno v některých vysoce koncentrovaných suspenzích. Poslední skupinou [49], plastické kapaliny tečou až po překročení určitého prahového smykového napětí [34], tzv. meze toku [52]. Řadí se sem např. koncentrované průmyslové a odpadní kaly [50].

2.5.4 Viskoelastické materiály v reologii

Tlumení mechanických vibrací souvisí s viskoelasticitou materiálů. U dynamického namáhání se napětí i poměrná deformace mění s časem a dochází k určitému fázovému zpoždění vůči napětí, což je způsobeno strukturálním tlumením materiálu a část vložené

mechanické energie se změni na teplo. Z hlediska množství disipované energie při dynamickém namáhání se materiály dělí na elastické, viskózní a viskoelastické. [54]

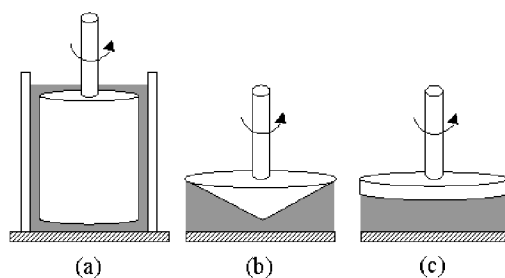
U ideálně elastických materiálů se veškerá energie nashromážděná při zatížení, zpětně využívá při odlehčení daného vzorku a tím pádem se mechanická energie nemění v teplo. Proto fázový posun mezi napětím a poměrnou deformací je nulový. Chování ideálně elastických materiálů popisuje Hookův zákon, při němž závislost mezi napětím a poměrnou deformací je lineární. Při harmonickém namáhání se viskózní materiály chovají úplně naopak oproti čistě elastickým vzorkům. Při zatížení vzorku materiálu se disipuje veškerá vložená energie v teplo, tudíž nelze využít žádnou mechanickou energii při odlehčení tohoto vzorku. Napětí předbíhá poměrnou deformaci s fázovým posunem $\pi/2$. [54]

Viskoelastické materiály patří mezi ideálně elastické [54] (podle Hookova zákona), ideálně viskózní (podle Newtona) látky a vykazují tyto vlastnosti současně [34]. Může se jednat téměř o každý reálný materiál, především o přírodní, technické materiály. Zde platí, že fázový posun mezi napětím a deformací se nachází v intervalu od nuly do $\pi/2$. Část vložené mechanické energie, využitá při následném odlehčení a zbytek disipující v teplo [54], je možné kvantitativně vyjádřit viskoelastickými parametry (moduly). Paměťový (elastický) modul G' popisuje míru energie uložené ve vzorku během namáhání, která se po jejím odstranění částečně nebo zcela využije na kompenzaci deformace. Míru disipované deformační energie na teplo při namáhání, kdy dochází k nevratné deformaci, udává ztrátový (viskózní) modul G'' . Spolupůsobení obou chování u viskoelastických materiálů lze popsat komplexním modulem G^* vyjádřen vektorovým součinem paměťového a ztrátového modulu. Pro popis tohoto systému se využívají zejména oscilační testy. Od nejvyšší po nejnižší definovanou frekvenci otáčení, ω , se otáčí senzor reometru, přičemž na měřený vzorek působí konstantní smykové napětí. Křivka deformace je posunuta ve fázi o úhel fázového posunu. Pokud tento posun nabývá hodnoty menší než jedna, materiály se chovají jako kapaliny, v opačném případě (když posun bude větší než jedna) se jedná o materiály spíše tuhé. Dále mohou být viskoelastické parametry vyjádřeny pomocí frekvence, času a teploty. Frekvenční oscilační testy vypovídají o změnách v závislosti na frekvenci, přitom tvar a velikost křivek závisí na molekulární struktuře. Měření oscilačních teplotních ramp s konstantní amplitudou napětí probíhá při lineární rychlosti ohřevu/ochlazování. Je možné sledovat odezvu materiálu pro jednu nebo více frekvencí. Takovým způsobem se získává pohled na dynamické změny viskoelastického chování v závislosti na teplotě, například při fázových přechodech u gelů, kdy teplota bodu gelace náleží průsečíku modulů ($G' = G''$) [34].

2.5.5 Reometrie

Technologie využívána k získání reologických dat se nazývá reometrie [50]. Jejím úkolem je experimentální stanovení závislosti zdánlivé viskozity na tečném napětí nebo gradientu rychlosti pro daný vzorek. V celém rozsahu měření musí být laminární proudění a v případě neneutronovských kapalin správná geometrie toku. Podle principu měření viskozity, se reometry/viskozimetry dělí na pádové, průtokové a rotační [49].

Rotační reometry představují přístroje k charakterizaci reologického chování mnohých materiálů, u nichž je možné kromě viskozity stanovit i jiné vlastnosti ve smykovém (smykové napětí, prahové napětí) nebo oscilačním (viskoelastické moduly, komplexní viskozita) testu [51]. Smykové testy se zakládají na získání otáčivého momentu vzorku měřením smykové rychlosti s konstantním točivým momentem, kdy nedochází k jeho deformaci. U oscilačních testů se také nejdříve nastaví nedeformující hodnota napětí a poté se měří odezva vzorku na zvyšování oscilační rychlosti (frekvence). Podle skupenství vzorku, míry viskozity, pH a dalších vlastností se vybírá měřicí geometrie nebo senzor [34]. Pracovní část rotačního reometru tvoří [51], buď statická část a rotující senzor, nebo dvě rotující části [34], mezi něž se vkládá zkoušený materiál. Obě části geometrie jsou souosé a dle konzistence materiálů a druhu měření se využívají tři základní konfigurace: válec-válec, deska-deska a kužel-deska (Obr. 3 Obr. 3). Rychlost smykové deformace se počítá z úhlové rychlosti rotující části a smykové napětí je určeno krouticím momentem [51]. Nejběžnější typ s dvěma válci představuje uspořádání, z nichž vnitřní část rotuje, vnější je stacionární. Tato geometrie se používá zejména pro nízkoviskózní kapaliny. Nevýhoda spočívá ve velkém množství vzorku a složitém čištění. Pro měřicí systém dvou desek s rovným povrchem, se nejčastěji využívá stacionární spodní a horní rotující desky. Takové uspořádání lze použít při měření tuhých struktur (gelů, elastomerů, past) s malým množstvím vzorku. Nevýhoda geometrie spočívá v nekonstantním napětí směrem k okrajům desky [34].



Obr. 3: Schéma měřicího systému dvojitého válce (a), kužel-deska (b) a deska-deska (c) [55].

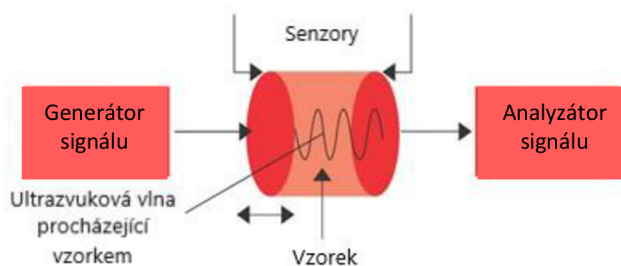
2.6 Ultrazvuková spektrometrie s vysokým rozlišením

2.6.1 Princip metody

Ultrazvuková spektrometrie s vysokým rozlišením (HR-US z anglického high resolution ultrasonic spectroscopy) [34] je relativně nová, nedestruktivní analytická metoda pro popis molekulárních a mikrostrukturních procesů [56] celé škály látek s mikro a makro vlastnostmi [57]. Většina klasických spektroskopických metod využívá jako zdroj signálu elektromagnetické vlny neboli světelné záření (UV-VIS spektrometry, infračervená spektroskopie, fluorescenční spektroskopie a jiné). Nevýhoda spočívá v měření signálu každé vlnové délky zvlášť, což vyžaduje buď univerzální méně citlivé, nebo specificky konstruované optické prvky. Avšak u ultrazvukové spektroskopie se měří elektronicky syntetizovaná rychlost ultrazvukové vlny v širokém rozmezí frekvencí bez šumu [34]. Už dříve byla dobře známa analýza ultrazvukem v lékařství, například u screeningu nenarozených dětí. Později se ultrazvuk začal využívat pro rozbor dalších materiálů a roztoků [58], nicméně bylo potřeba eliminovat např. velké objemy vzorků. Ovšem vývoj elektroniky a digitální zpracování signálu umožnil tyto limity překonat [56]. Další výhodou oproti klasickým spektroskopickým metodám je univerzálnost, vysoká citlivost [34], rychlost analýzy vzorků [57], schopnost měřit průsvitné a zcela neprůsvitné vzorky [34]. Při měření nedochází ke kontaminaci, resorpci a biodegradaci vzorku [57].

Ultrazvukové mechanické vlnění dosahuje frekvence vyšší než 20 000 Hz, což je horní frekvenční mez slyšitelnosti lidského ucha. Tyto vysokofrekvenční akustické vlny, šířící se vzorkem a prostředím, jsou charakterizovány několika parametry, ultrazvukovou rychlostí, což je rychlost šíření zvuku daným prostředím a ultrazvukovým zeslabením, které udává množství pohlceného zvuku vlivem prostředí [34]. Obě veličiny jsou na sebe navzájem fyzicky nezávislé [58]. Ultrazvuková spektrometrie s vysokým rozlišením současně měří změnu rychlosti a zeslabení ultrazvukové vlny procházející prostředím. Zeslabení závisí na kmitočtu ultrazvukových kmitů a volí se podle něj vhodná frekvence zobrazení [34].

Typický ultrazvukový spektrometr se skládá ze dvou piezotransduktorů a měřících cel, přičemž první z převaděčů vyslaný elektrický signál přemění na ultrazvukovou vlnu, druhý zachytává vycházející vlny a mění je zpět na elektrický záznam [57]. V měřících celách se vyskytuje referenční prostředí a měrný vzorek a jejich měření se koná současně. Konečné hodnoty ultrazvukové rychlosti a zeslabení obou prostředí lze sečíst (paralerní režim), nebo odečíst (diferenciální režim) [34].



Obr. 4: Schéma ultrazvukového spektrometru [58].

Měření ultrazvukové rychlosti znamená podrobovat vzorek opakované kompresi a dekompresi. Při stlačování a uvolňování materiálu jsou zaznamenávány přitažlivé a odpudivé síly, které specificky mění mikroelasticitu analytu. Rychlé změny deformace nemají destruktivní dopad na měřený vzorek. Hlavní příspěvek, jenž ovlivňuje rychlost průchodu ultrazvukové vlny, představuje pružnost/elasticitu média. Mezi další vlivy patří molekulové uspořádání, mezimolekulární interakce, hustota a reologické chování, jež lze pomocí této metody stanovovat [34]. Energetické ztráty zapříčiněné absorpcí a rozptylem energie v ultrazvukových vlnách umožňují určit ultrazvukové zeslabení. Pro jeho popis se používají často termíny jako podélný ztrátový modul a viskozita média [57]. Typické měření zeslabení zahrnuje sledovat kinetiku chemických reakcí, dynamiku molekulárních procesů, mikrostrukturální uspořádání materiálu, včetně velikosti a tvarů jejich částic, změny struktury spojené s agregací řetězců při gelovatění, krystalizaci (stanovení teploty tání) a další [34].

2.6.2 Využití metody

Ultrazvukové spektrometry s vysokým rozlišením jsou široce využívány ve výzkumu, vývoji produktu, kvalitě, kontrole [56] a řízení procesů v biotechnologických, farmaceutických [58], lékařských [34], zemědělských, potravinářských, chemických, petrochemických a polymerních průmyslových odvětvích [58]. Tato metoda našla své uplatnění v analýze chemických a biochemických reakcí [56], v měření velikosti částic, pozorování konformačních přechodů v polymerech a biopolymerech [58]. Pomocí teplotních závislostí lze popsat agregační a gelační jevy spojené s fázovými přechody [34]. Dále se mohou tyto spektrometry použít k hodnocení stability a struktury emulzí a suspenzí, sledování tvorby micel a určení kritické micelární koncentrace [58], k detekci interakce antigen-protilátka a v neposlední řadě také pro vizualizaci kazů či defektů mikrostruktury uvnitř i na povrchu pevných vzorků nebo stanovení homogenity vzorku [34].

2.7 Současný stav řešené problematiky

V dnešní době jsou předmětem studia látky, zejména biopolymery, nacházející uplatnění a použití ve farmacii, potravinářství, kosmetice a hlavně v medicíně, nebo případně v tkáňovém inženýrství. Agaróza, želatina i hyaluronan patří do skupiny těchto biomateriálů, které jsou samostatně i v určitých kombinacích v dnešní době hojně zkoumány různými metodami pro konkrétní aplikace. V rámci této práce byly reologií a ultrazvukovou spektrometrií s vysokým rozlišením měřeny viskoelastické vlastnosti gelů vytvořených z daných látek.

V článku od autorů Fernández, Lópeze a Mijangose byly studovány tok a viskozita vodných roztoků agarózy a viskoelastické vlastnosti agarózových hydrogelů stanovením viskózních křivek v závislosti na teplotě, vysvětlující gelovací mechanismus agarózy na základě dvoustupňového modelu, kdy dochází k vytvoření dvojité helixové agarózové řetězce následovaných jejich agregací za vzniku mikrokrystalických spojů gelové struktury. Dynamická viskoelastická měření byla provedena reometrem a zahrnovala měření elastického modulu G' , modulu viskozity G'' při různých teplotách od 38 do 68 °C, kde tvar téměř všech viskózních křivek agarózových roztoků, kromě nejkonzentrovějšího vzorku, vykazoval charakteristiku pro pseudoplastické kapaliny. U různých koncentrací vodných roztoků agarózy při zjišťování závislosti viskozity na teplotě bylo patrné, že viskozita narostla s koncentrací agarózových roztoků. Také se poklesem teploty až na 38–40 °C u nízké koncentrace viskozita nezměnila, i když běžně za této teploty je pozorováno prudké zvýšení viskozity, což značí agregaci agarózových řetězců v oblasti gelování. Pro vyšší koncentrace než 4 g/ml se snižující se teplotou až do 60 °C zůstávala viskozita stejná, avšak s dalším snížením teploty viskozita stoupla a už kolem 40 °C viskozita vykazovala ostrý nárůst. [7]

Podobnou problematikou se zabýval výzkum Nordqvista a Vilgise, kdy byly analyzovány viskoelastické vlastnosti vodných roztoků na bázi agarózy a hydrogelů při fázovém přechodu mezi kapalinou a pevným stavem reologickými metodami. Pro účely v potravinářském průmyslu byla též zkoumána kombinace agarózy s xanthanem. Jako v předchozím článku, i zde byla provedena dynamická viskoelastická měření vzorků, měření elastického modulu (G'), viskózního modulu (G'') a oscilační experimenty ke studiu cyklu sol-gel-sol tj. 80–20 °C, 20–95 °C, 95–20 °C a 20–95 °C s rychlostí ochlazování/ohřevu 1 °C/min. Tento přechod probíhal v rozmezí teplot od 55 do 30 °C. Též byl zkoumán vliv doby přehřevu roztoků agarózy/vody po dobu 30, 60 a 120 min, ovšem nebyl nalezen žádný vliv na G' , a proto doba přehřevu byla pro všechny další testy udržována po 30 min. Při

ochlazení/ohřevu by mělo být bráno v úvahu, že při rychlejších rychlostech chlazení molekuly nemají čas na uspořádání v strukturách a mohou tak způsobit rozdílný stupeň porozity. Tvar viskózních křivek znovu znázorňuje dvoustupňový gelovací proces během ochlazování. První je vytvoření dvojitého šroubu po ochlazení při přibližně 45 °C. Teplotní rozmezí kolem 30 °C patrně odpovídá agregaci několika řetězců, což zvyšuje modul G' . Současně cílem tohoto příspěvku bylo zavedení jednoduchého modelu zahušťování xanthanu, který mění vlastnosti želatinace agarózy. Při přidání xantanu byla potlačena agregace helixů tvořených agarózovými molekulami do spojených micel, což způsobilo měkčí elasticitu a silnou vazbu vody. Díky tomu byla zaručena elasticita gelů po delší dobu. [59]

Další práce od Czernera, Fellaye, Suáreze a spol. popisuje stanovení modulu pružnosti želatinového gelu pomocí jednoosého stlačení a nízkého deformačního reologického měření s využitím kulových a plochých válcových razníků. V tomto případě byla oscilační měření provedena pomocí dvou paralelních desek při konstantní frekvenci 1 Hz k ověření lineárního viskoelastického rozmezí, přičemž byly poté měřeny elastické (G') a viskózní (G'') smykové moduly pro širokou škálu frekvencí až do 50 Hz při 21 °C. Hydrogel se choval jako hyperelastická pevná látka odolná proti deformaci při velkých kmitech a nevykazovala žádnou závislost na frekvenci v lineárním viskoelastickém rozmezí. Vzniklá adheze mezi razníkem a hydrogelem ovlivňovala odrazovou odezvu a přesnost stanovení modulu pružnosti ve větším rozsahu, než bylo předpokládáno tak, že přilnavost vedla k vyšším hodnotám modulu pružnosti. Tím pádem vliv adheze se zvyšuje se snižováním vzdálenosti měřících desek. Ke stanovení modulu pružnosti byl použit hybridní model na základě elastického kontaktu a modelu adheze. [60]

V této diplomové práci byly zmíněny alternativní zdroje želatiny (kapitola 2.3.5). V souvislosti s tímto tématem lze uvést studii Huanga, Tua a Wanga, v níž byla zkoumána tzv. ultrazvuková léčba (UWB) jako potencionální přístup k extrakci látek s lepšími vlastnostmi, například funkční vlastnosti bílkovin, výtěžnost a sílu gelu, konkrétně želatiny z ryb. Bylo prokázáno, že želatinu lze hydrolyzovat za vysokých teplot, což vede k nízkým vlastnostem jejího gelu, tudíž je třeba určit vhodnou extrakční teplotu pro funkční vlastnosti želatiny. Cílem této práce bylo posoudit reologické chování i strukturální vlastnosti želatiny v různých stupních extrakce při působení vlivu UWB na rybí želatinu. Klasická ClearWaterBay (CWB) i ultrazvuková UltrasonicWaterBay (UWB) extrakce byly prováděny při teplotě 60, 70 a 80 °C, označené jako CWB60, CWB70 a CWB80, UWB60, UWB70, a UWB80. Pro reologická měření byl použit reometr s geometrií kuželu a desky. Teplotní zkoušky byly od

40 do 10 °C a následně od 10 do 40 °C s rychlostí chlazení/ohřevu 1 °C/min při 1 Hz s konstantním napětím 0,5 %. V průběhu chlazení vykazovaly všechny želatinové roztoky téměř konstantní nízký modul elasticity a vysoký modul viskozity do teploty 10 °C, kde byl pozorován prudký vzestup obou modulů. Nejdříve gelování projevil vzorek UWB60. Snížením teploty se zvyšovala schopnost želatiny vytvářet trojitě struktury. Během ohřívání se želatinová gelová síť oslabila, množství trojitých struktur se snížilo, gely začaly tát a modul viskozity byl vyšší než modul elasticity, což indikovalo přechod gelu na kapalný stav a želatina se nakonec stala viskózní kapalinou. V této studii vykazovaly želatiny připravené UWB při všech teplotách vyšší hodnoty obou modulů při gelování a tání než ty připraveny CWB. Dále bylo uskutečněno měření dynamického kmitání, čili pevnost gelové sítě, od 0,1 do 100 Hz při 10 °C a napětí 0,5 %. V této studii vykazoval vzorek UWB60 nejvyšší hodnoty elastického modulu při rostoucí frekvenci, což naznačovalo, že UWB60 má nejsilnější gelovou strukturu a nejlepší gelové vlastnosti oproti ostatním vzorkům. Bylo dokázáno, že UWB může garantovat strukturu želatiny, která vykazuje lepší reologické chování než CWB. UWB se projevila jako slibná technologie při extrakci vysoce kvalitní rybí želatiny. [61]

Nedestruktivní techniky, kam se řadí například metody využívající ultrazvukové vlnění, charakterizují mechanické vlastnosti buněk, tkání a biomateriálů, čímž poskytují základní metriky pro návrh tkáňového inženýrství. V tomto článku od autorů Kohlese, Masona, Adamse a spol. byla popsána metoda ultrazvuku pro analýzu agarózového hydrogelového přípravku jako substrátu lepidla pro chrupavku v reálném čase. Vzhledem k homogenitě agarózových kostek byly měřeny podélně a příčně se šířící vlny ultrazvukové rychlosti, a tím byla stanovena hustota agregovaných biomateriálů všech vzorků. Podle předpokladů z literatury analyzované vzorky chrupavky potvrdily hustotu agregátu 1330 kg/m³, podélnou na 1500–1720 m/s i příčnou rychlost šíření na 350–950 m/s. [62]

Výzkumem viskoelastického charakteru a struktury želatinových hydrogelů se zabývala práce využívající ultrazvukovou spektrometrii. Článek od Parkera a Poveye obsahoval popis závislosti ultrazvukové rychlosti a zeslabení na teplotě a koncentraci u roztoků želatiny. V prvním případě byla měřena závislost ultrazvukové rychlosti a zeslabení na různých koncentracích daných roztoků pro tři různé teploty. Výsledkem bylo, že ultrazvuková rychlost se zvyšuje s koncentrací přibližně lineárně a také se zvyšující se teplotou. Tím pádem, nejvyšší ultrazvuková rychlost platí pro nejvyšší koncentraci při nejvyšší teplotě. V případě ultrazvukového zeslabení jde o opačný případ z hlediska porovnání teplot, přičemž čím vyšší

je teplota, tím nižší je ultrazvukové zeslabení. Je to dáno tím, že pro nízké teploty platí gelovitý stav želatiny, zatímco při vyšších teplotách se vyskytuje ve formě solu. Nicméně gelovitý stav nelze předpokládat pro koncentrace nižší než 1 g/l ani pro nízké teploty. Za druhé byla měřena závislost ultrazvukové rychlosti a ultrazvukového zeslabení na rostoucí teplotě od 5 do 80 °C pro každou koncentraci želatiny. Výsledkem bylo, že pro všechny koncentrace se ultrazvuková rychlost nejdříve s rostoucí teplotou zvyšovala do vrcholu mezi 50–75 °C, kde nastal zlom a nakonec s dalším nárůstem teploty ultrazvuková rychlost klesala. Tvar křivek byl pravděpodobně způsoben vodní složkou ve vzorku. Ultrazvukové zeslabení bylo s nárůstem teploty snižováno. Při nízkých koncentracích roztoků byl pokles ultrazvukového zeslabení plynulý, nicméně s přibývajícím koncentrací roztoků docházelo ke ztelnějším zlomům kolem 30 °C, která byla označena teplotou přechodu gel-sol. Dále byl proveden test termoreverzibility, kdy byla měřena každá koncentrace roztoku želatiny s postupným snižováním a následným zvyšováním teploty, tzn. od 80 do 5 °C a poté od 5 do 80 °C. Hysterezní smyčka se nacházela mezi 22–30 °C. Byla ztelnější u ultrazvukového zeslabení než u ultrazvukové rychlosti, jelikož ultrazvukové zeslabení souvisí s formací šroubovice ve struktuře želatiny. Stejně výsledky byly získány pro všechny vzorky gelů, rozdíl se objevil pouze v hodnotách amplitud, které se lišily dle koncentrace želatiny. Posledním úkolem bylo popsat přechod gel-sol pomocí ultrazvukové spektrometrie a reologie. Pomocí obou technik bylo dosaženo podobných výsledků, kdy teplota přechodu gel-sol byla stanovena na 24,4 °C pro gelovatění a 30,5 °C pro tání. [63]

Reologické studie byly provedeny nejen pro samotné gely agarózy a želatiny, ale také pro gely s jejich kombinací. V jedné takové práci od Wataseho a Nishinariho byly připravovány různé koncentrace čistých agarózových nebo želatinových hydrogelů a tyto různé koncentrace agarózového a želatinového roztoku byly kombinovány do směsných hydrogelů uvedených látek a jejich reologické vlastnosti byly získány relaxometrem. Byly zaznamenány moduly pružnosti u testu stresové relaxace, které se snižovaly až po 4 hodinách. Modul pružnosti (E), který se nejdéle neměnil (neklesal) byl pravděpodobně modul pružnosti hlavní síťové struktury spojené slabými sekundárními vazbami. Při měření E v závislosti na teplotě u vzorků bylo ztelné snížení E s nárůstem teploty, což by se dalo přisoudit tepelnému rozpadu nekovalentních křížových vazeb v gelech. Hodnoty E pro samostatné čisté gely obou látek byly vyšší, než E u gelových směsí těchto látek. Tento pokles E byl nejvíce zaznamenán u vzorků s vysokou koncentrací želatiny a současně s vyšším obsahem agarózy. Dále bylo měřeno chování gelu s nejděším relaxačním časem na teplotě pro různé koncentrace

jednotlivých složek. Bylo zjištěno, že s nárůstem koncentrace dochází ke zvýšení relaxačních časů a snížení aktivační energie, díky vzniku hustší síťové struktury, nicméně v případě směsí měřených gelů měly kratší dobu relaxačního času oproti gelům, buď pouze z agarózy, nebo jen ze želatiny. Tato skutečnost byla způsobena vzájemnou překážkou agarózy a želatiny z hlediska síťování struktury, a proto ve směsných gelech těchto dvou látek by neměly být obě složky ve vysokých koncentracích. [64]

Je známo, že hyaluronan je využíván zejména v kosmetice, lékařství nebo v tkáňovém inženýrství, a proto je důležitý popis viskozity a viskoelastivity. Přirozeně se vyskytující hyaluronan se rozpadá už během tří dnů, takže prodloužení trvanlivosti polymeru je nezbytné pro vývoj různých kosmetických či medicínských produktů. Níže popsána studie ukazuje využití reologie k charakterizaci fyzikálních vlastností tří hyalinních kožních plnidel za použití rotačního reometru s Peltierovou destičkou a měřicího systému pro paralelní desky při 25 °C. Oscilační testy zahrnovaly stanovení lineární viskoelastické oblasti (LVO) při frekvenci 1 Hz a bylo zjištěno, že všechny vzorky měly podobný průběh LVO s kritickým napětím v oblasti 20 %. Naměřené hodnoty elastického modulu v LVO ukázaly nejnižší elastický modul vzorku A, prostřední hodnota elastického modulu náležela vzorku B a nejvyšší vzorku C. Poté byly měřeny testy kmitočtu od 0,1 do 10 Hz za použití konstantního napětí z LVO, kdy hodnoty elastického modulu u vzorků A, B a C v 1 Hz korelovaly s daty z předchozího měření. Z testovaných tří vzorků hyaluronanu bylo potvrzeno, že vzorek gelu A měl opět nejnižší elastický modul, tudíž byl nejslabší a vzorek gelu C měl nejvyšší měřený modul, a proto byl nejsilnější. Dále byla ověřena závislost viskozity na smykové rychlosti. Viskozita se značně snižovala s rostoucí smykovou rychlostí a struktura plniv byla tak silná, že při nízkých smykových rychlostech byla viskozita velmi vysoká a nadále stoupala s klesající smykovou rychlostí, což naznačovalo pevné chování gelu v klidu. Tato skutečnost odpovídala výsledkům z oscilačního testu vykazující vysoce elastickou gelovitou strukturu, kde nejslabší vzorek byl A a nejpevnější C. S použitím axiálního testování, které znamenalo rychle měnit mezery mezi deskami od 1 do 20 mm, byla stanovena přílnavost plniva záznamem normálového profilu síly. Normálové síly v závislosti na čase byly záporné, protože vzorek byl tahán dolů horní deskou díky lepivým/kohézním silám a směrem k nule se rozpadal. Normálové síly pro vzorky byly opět ve shodě s pořadím předešlých měření elastického modulu, kdy vzorek C měl nejvyšší a vzorek A nejnižší stupeň soudržnosti. Závěrem lze říci, že reologické vlastnosti dermálních plniv na základě hyaluronanu jsou důležité parametry pro aplikace těchto produktů, a to konkrétně, že gely

s vyšší elasticitou jsou více odolné proti deformacím a lze je využít pro výplň hlubších vrásek, naproti tomu slabší gely mohou být aplikovány jako výplň do rtů nebo jemnějších tkání. [65]

V dalším článku se autoři Mondal, Haridas, Letha a spol. zaměřili na vývoj hydrogelů hyaluronanu (Hya) pro obnovu chrupavky, kdy vznik extracelulární matrice je závislá na poměru botnání, rychlosti degradace, či síly hydrogelu. Vzhledem k tomu, že hyaluronan velmi rychle degraduje, ač je biokompatibilní, je omezeno jeho využití pro regeneraci tkání, a proto je potřeba jej kovalentně sítí síťovacím činidlem, například divinylsulfonem (DVS), jež by napomohlo k sítování biokompatibilního hydrogelu s lepší viskoelasticitou. Byly vyzkoušeny tři různé koncentrace DVS, a to 40 ml, 60 ml a 80 ml v hydrogelu. Ihned po jejich přípravě bylo možné vidět, že hydrogely ze 40 ml byly husté viskózní kapaliny a další dva hydrogely vypadaly gelovitě. Cílem reologického měření bylo charakterizovat modul pružnosti a viskózní modul pro každý Hya-DVS hydrogel. Oscilační experimenty hydrogelů Hya-DVS byly měřeny pomocí reometru s geometrií kužel-deska při 37 °C v lineární viskoelastické oblasti. Všechny hydrogely vykazovaly rostoucí viskoelasticitu se zvyšující se koncentrací DVS. Moduly pružnosti hydrogelů s 60 ml a 80 ml DVS byly vyšší než viskózní moduly, což znamenalo elastickou povahu hydrogelu a větší podobnost s gely, avšak v případě hydrogelů se 40 ml DVS měl viskózní modul vyšší hodnotu. To ukazuje, že 40 ml DVS hydrogely byly tekuté. Ztrátový úhel, $\tan d$, je užitečný při kvantifikaci přítomnosti a rozsahu elasticity v tekutině a bývá stanoven jako poměr viskózního a elastického modulu. Když $\tan d$ je menší než jedna, označuje to elastické chování a naopak hodnoty větší než jedna indikují chování viskózní. Zde hydrogely s 60 a 80 ml DVS vykazovaly hodnotu $\tan d$ menší než jednu. U těchto dvou hydrogelů byla tvořena síťová struktura efektivním zesílením po přidavku DVS, které snižovalo vnitřní mobilitu polymerních řetězců. Tím pádem tyto struktury nebyly schopny uvolnit napětí a gel se choval pružně jako třírozměrná síť, přičemž způsob ukládání aplikovaného napětí byla tvorba sítě. Uvedená studie se také zabývala proliferací buněk a bylo zjištěno, že u všech tří hydrogelů Hya-DVS k ní docházelo, což značilo jeho potenciál jako biomateriál pro aplikace tkáňového inženýrství. [66]

V následujících třech článcích byly stručně popsány výzkumy zabývající se mechanickými vlastnostmi hydrogelů hyaluronanu a želatiny, nejčastěji využívané pro aplikace v tkáňovém inženýrství. V prvním z nich od Koruera, Kenara, Dogera a Karaoze byla popsána výroba kompozitního gelu krevní plazmy hyaluronanu-želatiny pro rekonstrukci tkáně. Standardní přístupy obnovy měkkých tkání běžně zahrnují autologní transplantaci tukového tkáně, nicméně většina této tkáně po aplikování je v krátkém čase vstřebána, díky čemu je nutné

vyrobit dlouhodobě implantovatelné hydrogelové materiály, které by podporovaly regeneraci tkání. V tomto článku bylo zkoumáno působení 3D scaffoldů z přírodních materiálů, jmenovitě gely fibrinogenu (krevní plazma) s hyaluronanem a želatinou (Hya-Gel plazmové gely) ve srovnání s obyčejnými zesíťovanými plazmovými gely připraveny bez hyaluronanu a želatiny, pouze s vodou, na životaschopnost, proliferaci a adipogenní diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk (AD-MSK) pro rekonstrukční aplikace. Test pevnosti v tlaku měl určit pružné moduly obou skupin gelů pomocí mechanického testeru z křivky napětí a deformace. Plazmové gely Hya-Gel vykazovaly vyšší pórovitost, zvýšil se jejich modul pružnosti, též podporovaly fixaci a proliferaci MSC a jejich porézní struktura se zachovala i po 21 dnech. Dále i při analýze adipogenního diferenciačního potenciálu AD-MSK byly lipidové vesikuly výrazněji akumulovány na plazmových gelech Hya-Gel než na prostých plazmových gelech, kde žádná tvorba této tkáně nebyla pozorována, i když měly tyto gely bližší mechanické vlastnosti k nativní tukové tkáni. Výsledky ukázaly, že plazmatický gel Hya-Gel s vhodnou pórovitostí, mechanickými vlastnostmi a vynikajícími vlastnostmi buněčného růstu a adipogeneze by směl sloužit jako adekvátní scaffoldy pro tkáňové inženýrství. [67]

V následujícím článku byly s optimálními mechanickými vlastnostmi vytvořeny a studovány biomimetické hybridní hydrogely hyaluronanu (Hya) s želatinou (Gel), jež vyvolaly velký zájem v tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně, protože by tak bylo možné napodobit extracelulární matrix nativních tkání. S využitím různých koncentrací hyaluronanu a želatiny byly charakterizovány fyzikální vlastnosti výsledných hydrogelů včetně bobtnání a kompresních modulů za použití mechanického testovacího nástroje. Byla tu objevena souvislost mezi bobtnáním hydrogelů a změnou hmotnostního poměru jednotlivých složek v gelu. Například přidání 1% hyaluronanu do 3% hydrogelu želatiny významně snížilo hmotnostní poměr bobtnání u původního 3% želatinového hydrogelu z 28,6 na 20,5. Předpokladem pro tyto závěry je, že zvyšující se koncentrace polymeru roste hustota zesíťování, a proto výsledné hydrogely vykazují menší velikost pórů a méně bobtnání oproti nižším koncentracím polymerů. Ovšem po dalším zvýšení koncentrace hyaluronanu na 2%, již nedošlo k tak výrazné změně hmotnostního poměru bobtnání hybridních hydrogelů hyaluronanu s želatinou. Navíc byl určen vliv koncentrace polymeru na poměr bobtnání hydrogelů s jednotlivými složkami. V tomto pokusu byl vyloučen hyaluronan z hydrogelů želatiny a bylo vidět, že se současným zvýšením koncentrace želatiny z 3 na 10% poměr bobtnání vody klesl z 28,6 na 8,0. Stejně tak, když hydrogel želatiny nebyl přítomen

v hydrogelech hyaluronanu, zvýšení koncentrace hyaluronanu z 1 na 2% snížilo poměr bobtnání z 52,2 na 39,0. Byl také stanoven modul stlačení z měření lineární části křivky napětí-deformace v 5–10% deformační oblasti. Zvýšení mechanických vlastností hydrogelů jsou ovlivňovány hustotou zesílení polymerních sítí. Kompresní moduly pro 3, 5 a 10% želatinu-methakrylát (GelMA) byly stanoveny na 0,9; 3,4 a 33,6 kPa, tudíž došlo k jejich zvýšení s rostoucí koncentrací polymeru. Podobné zvýšení koncentrace 1% hyaluronanu na 2% způsobilo nárůst kompresního modulu z 1,5 na 3,8 kPa. Také přidáním druhého polymeru (1 nebo 2% hyaluronanu) do 3% hydrogelu želatiny narostla hodnota kompresního modulu. Celkově byly hybridní hydrogely hyaluronanu s želatinou mechanicky optimalizovány s výslednými moduly v rozsahu od 5 do 73 kPa, čehož by se mohlo užít pro řadu různých aplikací tkáňového inženýrství, jako jsou neurální, srdeční, kardiovaskulární, ortopedické, jelikož se podobaly mechanickým hodnotám nativní tkáně. [68]

V poslední zmíněné práci byly do hydrogelů připravených fyzikálně zesíťovaným hyaluronanem (Hya) a želatiny (Gel) přidáván anorganický jílu. Opět se tato práce zabývá reologickými vlastnostmi měřenými rotačním reometrem za použití geometrie deska-deska, přičemž byly prováděny testy oscilačního smykového napětí a frekvence. Z dotyčných reologických testů vyplývá, že gely Hya-Gel zesíťované s jílem tvořily nejstabilnější sítě, zatímco hydrogely Hya-jílu byly poměrně měkké a hydrogely z Gel-jílu vyšly jako meziprodukty. Ukázalo se, že modul pružnosti se zvyšoval s rostoucím poměrem polymeru a jílu, kdy tento poměr 1 : 20 ve všech hydrogelech projevoval maximální tuhost, zatímco v poměru 1 : 5 byly gely nejméně tuhé, a proto koncentrace jílu hraje důležitou roli v mechanické stabilitě těchto hydrogelů. Tyto výsledky byly potvrzeny také při měření obou modulů gelů v závislosti na frekvenci. Poměry polymeru a jílu 1 : 5 ve všech gelech nedosáhly úrovně nízkých frekvencí (0,1–10 Hz), což vypovídá o špatné stabilitě gelu a naopak gel 1 : 20 měl nejvyšší tuhost. Nicméně při vyšších frekvencích (10–100 Hz) stoupal u všech hydrogelů modul pružnosti, kde nejrychleji narůstal pro gely 1 : 20 a nejpomaleji u gelů 1 : 5. Taková podrobná reologická charakterizace hydrogelů Hya-Gel-jílu bez chemických přísad by mohla dopomoci při navrhování biomateriálů určených pro biomedicínské nebo farmaceutické účely. [69]

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

Agaróza: Agarose E, CONDA pronadisa; CAT: 8100.11; šarže: D00133

Želatina: Želatina čirá; Labeta, a.s.; expirace: 9. 8. 2020

Hyaluronan: Hyaluronan sodný; Contipro Biotech s.r.o. (ČR); šarže: 120218-E1, molekulová hmotnost 250–450 kDa, 600–800 kDa

Ultračistá deionizovaná voda z přístroje PURELAB

3.2 Příprava vzorků

3.2.1 Příprava a optimalizace agarózo-želatinových gelů

Na základě článku [64], kde byly měřeny reologické vlastnosti agarózo-želatinových gelů, byly pro přípravu těchto gelů vybrány koncentrace 30 g/l želatiny a 3 g/l agarózy, objem 20 ml výsledných gelů a konečná teplota ohřevu 80 °C. Z výsledků vyplývající z dané studie je jasné, že je třeba mít jednu ze složek s nízkou koncentrací oproti té druhé.

V první řadě bylo třeba ověřit, že zvolené koncentrace jsou dostatečné pro tvorbu gelů. Na základě následujícího postupu byly připraveny referenční gely agarózy a želatiny. Do vialky bylo na analytických vahách naváženo potřebné množství agarózy, která byla následně zalita 20 ml ultračisté deionizované vody tak, aby koncentrace agarózového gelu odpovídala 3 g/l. Do roztoku bylo vhozeno míchadélko, vialka byla uzavřena a v kádince s vodou dána na magnetickou míchačku s ohřevem a teplotním senzorem, který byl ponořen do vody ve zhruba 1/3 výšky vialky. Agaróza byla postupně rozpouštěna mícháním při rychlosti 300 rpm a zahříváním do teploty 80 °C. Poté byla vialka vyjmuta z kádinky, následně byl celý horký roztok agarózy přelit do menší misky, překryt parafilmem a dán vychladnout při laboratorní teplotě do následujícího dne. Tentýž postup byl proveden i se želatinou o výsledné koncentraci 30 g/l. Ve výsledku oba gely vypadaly pevně a také po otočení dnem vzhůru zůstala hmota gelů na svém místě.

Jelikož se v této práci připravují gely kombinace agarózy s želatinou, bylo nutné optimalizovat přípravu této směsi. Byly vyzkoušeny dvě „cesty“.

1) Příprava agarózo-želatinových gelů „suchou cestou“

Platí zde stejný postup, jaký je uveden výše, jenom s tím rozdílem, že do jedné vialky byly naváženy agaróza o výsledné koncentraci 3 g/l a želatina o konečné koncentraci 30 g/l. Objem přidané ultračisté deionizované vody byl 20 ml.

2) Příprava agarózo-želatinových gelů „mokrou cestou“

V tomto postupu bylo do jedné vialky naváženo potřebné množství agarózy a do druhé želatiny tak, aby po přidání 10 ml roztoku želatiny k roztoku agarózy, jež bylo též 10 ml ve vialce, byly výsledné koncentrace v gelu stejné, jako v případě přípravy suchou cestou. Obě vialky po přidání ultračisté deionizované vody byly podrobeny následujícímu procesu míchání a zahřívání, jako tomu bylo při přípravě referenčních gelů agarózy a želatiny. Po dosažení konečné teploty byly obě vialky vyjmuty z kádinky. Potom byl co možná nejrychleji napipetován potřebný objem z roztoku želatiny a přidán k roztoku agarózy. Následně byla tato výsledná směs roztoků po dobu 10 s protřepána na vortexové třepačce. Nakonec byl tento smíchaný roztok přelit do menší misky, překryt parafilmem a ponechán vychlazení při laboratorní teplotě.

Z obou postupů vyšly gely okometricky pevné, a proto příprava této směsi může být suchou i mokrou cestou. Pro další přípravu gelů byla zvolena varianta suché cesty, jelikož navažováním jsou způsobeny menší chybné odchylky, než tomu bývá při pipetování a ředění roztoků.

3.2.2 Příprava a optimalizace agarózo-želatinových gelů s přidavkem hyaluronanu

Vzhledem k tomu, že nebyl nalezen žádný konkrétní postup přípravy takové směsi látek v gelu, bylo důležité najít vhodnou „cestu“. Bylo vyzkoušeno několik možností, kde ve všech vzorcích gelů byla zachována koncentrace 3 g/l agarózy, 30 g/l želatiny a dále byly zvoleny přídavky hyaluronanu o výsledných koncentracích 0,1; 0,5; 1; 3 a 5 g/l pro molekulové hmotnosti (MW) 250–450 kDa a 600–800 kDa. Celkový objem každého vzorku byl 20 ml.

1) Příprava agarózo-želatinových gelů s přidavkem hyaluronanu „suchou cestou“

První pokus spočíval v tom, že do deseti vialek byly naváženy agaróza, želatina i hyaluronan o daných molekulových hmotnostech podle vybraných výše zmíněných koncentrací. Každá vialka byla zalita 20 ml ultračisté deionizované vody. Proces míchání a ohřívání probíhal naprosto totožně, jako při přípravě gelů bez hyaluronanu. Nakonec byly

vzniklé roztoky přelity do malých misek, zakryty parafilmem a ponechány při laboratorní teplotě do dalšího dne.

Okometricky byly gely ztuhlé, nicméně hyaluronan vytvořil u dna každé vialky průhlednou část a nad ní byla zakalená vrstva agarózy se želatinou. Bylo usouzeno, že tento způsob přípravy pro takové gely není vhodný.

2) Příprava agarózo-želatinových gelů s přidavkem hyaluronanu „mokrou cestou“

Další postupy vyžadovaly dostatečné rozpuštění hyaluronanu, což bylo možné zajistit 24hodinovým mícháním jejich roztoků před přidáním do výsledných roztoků/gelů. Bylo také dohodnuto, že stejný objemový podíl v gelu měly mít agaróza se želatinou a hyaluronan byl pouze přídavek, tudíž objemový poměr agaróza : želatina : hyaluronan byl 2 : 2 : 1 v celkovém objemu vzorku.

Nejprve byl vyzkoušen postup přípravy gelů ředěním jednotlivých roztoků agarózy s želatinou přidavkem hyaluronanu ze zásobního roztoku.

Na analytických vahách byl do uzavíratelné odměrné sklenice navážen hyaluronan s MW 250–450 kDa o výchozí koncentraci 25 g/l, do něhož bylo přidáno 30 ml ultračisté deionizované vody. Do sklenice bylo vloženo míchadélko a sklenice byla po uzavření dána míchat při rychlosti 250 rpm na magnetickou míchačku při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Identickým způsobem byl nachystán roztok hyaluronanu s MW 600–800 kDa o totožné počáteční koncentraci.

Následující den byla do desíti vialek navážena potřebná množství agarózy i želatiny tak, aby byly získány výše zvolené koncentrace obou látek. Do všech těchto vialek bylo přidáno 16 ml ultračisté deionizované vody. Dalším krokem bylo míchání a zahřívání těchto roztoků podle již známého postupu. Po dosažení požadované teploty 85 °C byly vialky s roztoky vyjmuty z vodní lázně. Následovalo pipetování potřebného objemu z již nachystaných zásobních roztoků hyaluronanu, aby vznikly koncentrační řady pro obě MW s výslednými koncentracemi hyaluronanu. Každá vialka byla poté podle nutnosti doplněna ultračistou deionizovanou vodou na objem 20 ml. Hotové roztoky byly zvortexovány a následně přelity do malých misek, kde byly překryté parafilmem dány vychladnout při laboratorní teplotě do dalšího dne.

Výsledek tohoto postupu také nebyl shledán jako vhodný, jelikož tak vysoké koncentrace zásobních roztoků hyaluronanu byly při pipetování zachytávány v pipetě, což zapříčinilo

možné nepřesnosti a tím pádem i když gely vypadaly okometricky tuhé, nebylo jisté, zda byly koncentrace roztoků správné.

Na základě výše posledně uvedeného poznatku byla příprava trochu pozměněna tak, že byly jednotlivé roztoky hyaluronanu ředěny roztokem agarózy s želatinou ze zásobního roztoku. Na analytických vahách byla do pěti vialek navážena potřebná množství hyaluronanu o MW 250–450 kDa, která byla zalita 4 ml ultračisté deionizované vody. Do vialek byla dána míchadélka a vialky byly po uzavření míchána při rychlosti 250 rpm na magnetické míchače při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Obdobným způsobem byly připraveny roztoky hyaluronanu s MW 600–800 kDa.

Následující den bylo do uzavíratelné sklenice naváženo potřebné množství agarózy s želatinou, k čemuž bylo přilito 160 ml ultračisté deionizované vody. Opět následovalo míchání a zahřívání této směsi podle zavedeného průběhu. Po dosažení požadované teploty byla sklenice s roztokem vyndána z kádinky s vodou. Poté bylo postupně ke každému roztoku hyaluronanu napipetováno 16 ml roztoku agarózy s želatinou. Výsledné roztoky byly protřepány na vortexu, nality do misek, zakryty parafilmem a nakonec ponechány při laboratorní teplotě do druhého dne.

Díky tomu, že vytvořené gely vypadaly na pohled ztuhlé a homogenní v celém objemu, byl tento postup vyhodnocen jako nejlepší, a proto byl nadále používán pro přípravu těchto gelů.

3.3 Měření viskoelastických vlastností reometrem AR-G2

Reometrem lze pomocí několika různých režimů (např. oscilační, relaxační, tokové testy) pozorovat chování vzorku, přičemž proměnnou může být napětí, frekvence, teplota, smyková rychlost nebo čas. Přístrojem jsou najednou při oscilačních testech zaznamenávány například paměťový G' [Pa], ztrátový G'' [Pa] a komplexní G^* [Pa] modul, ztrátový úhel δ [°], úhlový posun ω [Hz] [34]. Pomocí magnetického ložiska reometr umožňuje měnit velmi nízké hodnoty otáčivého momentu od $3 \cdot 10^{-2}$ do $2 \cdot 10^5$ μ Pa, s rozlišením 1 μ Pa [70]. Přístrojem jsou také měřeny smykové napětí v závislosti na použité geometrii od $8 \cdot 10^{-4}$ do 508 Pa, dále měřitelná frekvence v mezích $1,19 \cdot 10^{-7}$ –100 Hz a teplota od -40 až do 200 °C, kdy rychlost ohřevu může být až 50 °C/min s přesností 0,1 °C [71]. Měřicí systém lze temperovat Peltierovou deskou či Peltierovým systémem dvojitého válce [72]. Podle tuhosti vzorku se hodnota normálové síly pohybovala od 4 do 10 N. Jelikož se při měření teplotních závislostí mění teplota celého měřicího systému, je důležité geometrii důkladně kalibrovat, díky čemuž přístroj samostatně dokáže zohlednit tepelnou roztažnost materiálu dané geometrie. Expanze

či kontrakce materiálu je automaticky vynahrazena změnou pozice horní pohyblivé části geometrie ($0,6 \mu\text{m}/^\circ\text{C}$), a proto hodnoty nastavené měřicí mezery jsou v průběhu měření stejné [34].



Obr. 5: Reometr AR-G2 od firmy TA Instruments [73].

Veškeré gely směsi agarózy-želatiny a také jejich kombinací s vybranými koncentracemi hyaluronanu o uvedených molekulových hmotnostech byly proměřovány na reometru AR-G2 od firmy TA Instruments pomocí ocelové desky typu „solvent trap“ s lapačem rozpouštědel o průměru 40 mm. Podle návodu od výrobce byla před měřením vzorků vybraná geometrie vytemperována a kalibrována. Dále bylo provedeno rotační mapování pohyblivé části geometrie v celém rozsahu smykové rychlosti, byly nastaveny nulová poloha geometrie a poté také zvolené experimenty, popsány níže. Na stacionární (spodní) část měřicí geometrie deska-deska bylo nadávkováno množství cca 2 ml vzorku. Po dosažení měřicí polohy ($500 \mu\text{m}$) bylo odstraněno přebytečné množství vzorku. Měřicí systém byl potom překryt kovovou krytkou, jež se nedotýkala senzoru, aby se zamezilo odpařování vzorku. Testy byly spuštěny po zadání všech parametrů a po jejich dokončení byly obě desky očištěny destilovanou vodou a etanolem.

Všechny vzorky byly měřeny třemi testy v oscilačním režimu. Před každým testem bylo potřeba provést relaxaci a temperaci vzorku za dané teploty měření, tzv. *conditioning step*, po dobu 2 min. První z nich, *Strain sweep test*, byly změřeny viskoelastické vlastnosti gelů v závislosti na amplitudě napětí od 0,01–1000 % při konstantní frekvenci 1 Hz a konstantní teplotě 25°C se 6 body za dekádu. Z tzv. lineární oblasti viskoelastivity (LVO) byla zvolena jako vhodná amplituda napětí (deformace) hodnota 1 % pro každý měřený vzorek, která byla využita pro měření dalších oscilačních testů. Druhým testem, *Frequency sweep test*, byly zjišťovány viskoelastické povahy vzorků v rozmezí úhlové frekvence 0,001–20 Hz při

konstantní amplitudě napětí (určené z LVO) a teplotě 25 °C, 6 bodů na dekádu. Poslední test, *Temperature sweep step*, sledoval závislost viskoelastického chování na teplotě ohřívání/ochlazení s krokem 2 °C, kdy vzorek byl ekvilibrován pro zajištění rovnoměrnosti teploty v materiálu po vybranou dobu, 30 s, při konstantním napětí 1 % a frekvenci 1 Hz. Teplotní závislost zahrnovala ohřívání z 25–85 °C a ochlazení z 85–25 °C.

3.4 Měření ultrazvukovým spektrometrem s vysokým rozlišením HR-US 102 a HR-EX-SSC

Ultrazvukový spektrometr (HR-US 102 a HR-EX-SSC) disponuje titračním, kinetickým měřicím režimem nebo režimem teplotních ramp. Přístroj zaznamenává s vysokým rozlišením a reprodukovatelností současně ultrazvukovou rychlost ($\pm 0,2$ mm/s) i zeslabení (0,2 %). Zařízení má v sobě zabudované dvě cely pro paralelní či diferenciální analýzu vzorků. Měřitelná frekvence se nachází v intervalu 2–18 MHz a teplotu lze měřit od -20 do 120 °C s rozlišením 0,01 °C [34]. Temperace přístroje je umožněna externím termostatem firmy Thermo Haake s programovatelnou rychlostí ohřevu/ochlazení s nastavitelnými hodnotami teploty jednotlivých cyklů a celkového času temperace [74]. Do přístroje HR-US 102 lze dávkovat pouze vzorky v kapalném stavu, na rozdíl od přístroje HR-EX-SSC (high-resolution external solid state cells), kterým je možné měřit vzorky v tuhém/gelovém stavu. Nicméně tento HR-EX-SSC musí být při měření připojen k HR-US 102, čili by se dalo říci, že HR-EX-SSC slouží jako přídatný modul umožňující analýzu tuhých/gelových soustav [75].



Obr. 6: Ultrazvukový spektrometr s vysokým rozlišením (HR-US 102 uprostřed a HR-EX-SSC vlevo) s termostatem Thermo Haake C25P (vpravo). Foto: autor práce

Ultrazvuková rychlost byla měřena na přístroji HR-US 102 a HR-EX-SSC. Měření bylo provedeno pro vzorky samotné směsi agarózy s želatinou, a také jejich kombinaci s vybranými koncentracemi hyaluronanu o uvedených molekulových hmotnostech. U obou přístrojů probíhalo měření ultrazvukové rychlosti diferenciální analýzou, což znamená, že je zaznamenáván rozdíl ultrazvukové rychlosti procházející měrnou (nachází se vzorek) a referenční (obsahuje referenční prostředí – ultračistou deionizovanou vodu) celou.

Pomocí přístroje HR-US 102 byla konkrétně sledována závislost ultrazvukové rychlosti na teplotě, s využitím termostatu Thermo Haake C25-P. Samotné měření probíhalo při šesti frekvencích v rozpětí 2,9–15,1 MHz tzv. rezonančního nastavení, kdy každé frekvenci připadá harmonické číslo píku n , jež náleží pro frekvenci měřeného vzorku a srovnávacího prostředí.

Před měřením vzorků bylo nutné provést dostatečné promytí obou cel a kalibraci přístroje na referenční prostředí. Jelikož nebyly vzorky při laboratorní teplotě v kapalném stavu, nebylo by možné je nadávkovat do přístroje, a proto jako počáteční teplota byla stanovena hodnota 85 °C, tudíž v prvním kroku probíhalo ochlazování a teprve ve druhém ohřívání. Tím pádem byla provedena kalibrace přístroje pro tyto vstupní podmínky.

Nejdříve byl nastaven termostat na teplotu 85 °C. Dále byla do dvou eppendorfových vialek nalita ultračistá deionizovaná voda, která v nich byla odplyněna centrifugací při 3000 rpm po dobu 5 min. Poté, co došlo k vytemperování ultrazvukového spektrometru na 85 °C, byla tato voda napipetována do každé cely o objemu 1 ml. Nastavení některého píku (například prvního, pík 1) při 85 °C proběhlo přes frekvenční skenování obou cel v režimu *amplitude/frequency scan*. V softwaru HR-US byla vykreslena závislost amplitudy výstupního signálu (mV) na frekvenci akustického signálu pomocí vstupních hodnot pro pík 1 z měření při 25 °C (uvedeny v **Tabulka 1**) (vstupní napětí, číslo píku, doporučená frekvence a variační rozpětí 0,07–0,15 MHz) a výsledná poloha píku 1 při 85 °C je shodná s požadovanou frekvencí. Poté byl podrobněji analyzován profil píku 1 zadáním příslušné polohy (frekvence) s rozsahem 20 Hz při dané teplotě, čímž byla získána jeho přesná frekvence a odpovídající harmonické číslo. Současně stejným postupem běželo skenování druhé cely. Jelikož se vyskytovalo v obou celách shodné prostředí, hodnoty ležely na sobě. Výsledné frekvence obou cel byly uloženy jako referenční frekvence pro pík 1. Obdobně byly zjišťovány i ostatní píky. Správně kalibrované referenční hodnoty frekvencí a čísel píků pro ultračistou deionizovanou vodu byly zkontrolovány v režimu *velocity/attenuation scan*, kde bylo nastaveno měření závislosti relativní ultrazvukové rychlosti při 85 °C s amplitudou vstupního signálu 1 V po dobu 10 min. Výsledné rozdíly hodnot ultrazvukových rychlostí

byly zaznamenány okolo 0 m/s, protože se v celách nacházelo stejné prostředí, voda. Avšak vyšší odchylky, řádově v desetinách, by mohly znamenat špatné nastavení frekvencí a čísel píků, nebo nedostatečné vyčištění cel.

Tabulka 1: Hodnoty frekvencí jednotlivých píků a jejich odpovídající harmonická čísla a amplitudy vstupního signálu referenčního prostředí při 25 °C.

Pořadí píku	Amplituda vstupního signálu (V)	Číslo píku	Frekvence (MHz)
1	1	22,4	2,9
2	0,4	42,6	5,2
3	0,16	65,1	8,1
4	0,4	93,4	11,3
5	0,4	98,9	12,2
6	4	120,0	14,8

Tabulka 2: Hodnoty frekvencí jednotlivých píků a jejich odpovídající harmonická čísla a amplitudy vstupního signálu pro referenční prostředí při 85 °C.

Pořadí píku	Amplituda vstupního signálu (V)	Číslo píku	Frekvence (MHz)
1	1	22,4	2,9
2	0,4	42,6	5,4
3	0,16	65,1	8,2
4	0,4	93,4	11,7
5	0,4	98,9	12,3
6	4	120,0	15,0

Měření samotných výše uvedených vzorků probíhalo tak, že jejich připravené roztoky ve vialkách, o teplotě 80 °C, byly o objemu 1,5 ml nadávkovány do měřicí cely, které byly jako referenční prostředí vytemperovány na požadovanou teplotu, 85 °C, při níž podle stejného postupu jako u kalibrace byl v režimu *amplitude/frequency scan* nastaven pík (například pík 1) skenováním frekvence měrné cely. Pro vykreslení frekvenčního skenu roztoku vzorku byla využita data stanovená z kalibrace píku 1 při teplotě 85 °C (**Tabulka 2**) v rozmezí 0,07–0,15 MHz, při kterém byla přiřazením harmonického čísla píku srovnávacího prostředí k měřenému vzorku zjištěna odpovídající frekvence (poloha) píku 1 při stejné teplotě. Analýzou profilu píku při 85 °C byla určena přesná frekvence a harmonické číslo píku 1 pro vzorek. Následným uložením těchto frekvencí byla způsobena změna přednastavených hodnot pro měrnou celu z kalibrace. Všech 5 zbylých píků a jejich příslušné frekvence byly přiřazeny

stejným způsobem. Měření ultrazvukové rychlosti v závislosti na teplotě probíhalo v režimu *velocity/attenuation scan*, kdy byla opět zaznamenávána relativní ultrazvuková rychlost při amplitudě vstupního signálu 1 V po dobu 1000 min. Na termostatu byl naprogramován teplotní sken se dvěma cykly, kdy každý z nich zahrnoval ochlazení od 85 do 25 °C a ohřívání od 25 do 85 °C. Po dokončení nastavení přístroje a termostatu bylo spuštěno měření vzorků po dobu 16 hod.

Přístrojem HR-EX-SSC byla měřena ultrazvuková rychlost vzorků v gelovém stavu při stálé teplotě. Avšak u daného přístroje bylo měření hodně závislé na laboratorní teplotě a teplotě zaznamenané teplotním senzorem uvnitř cel, jelikož tento přístroj nebyl připojený k termostatu. Z toho důvodu bylo měření ultrazvukové rychlosti bráno pouze za orientační, vzhledem k výsledkům získaných z HR-US 102. Pro toto měření byly vybrány dvě frekvence s příslušnými harmonickými čísly píků n , a to konkrétně pík 2 a pík 4.

Jako v předchozím případě, i zde byly obě cely důkladně promyty a přístroj musel být kalibrován na referenční prostředí, čili ultračistou deionizovanou vodu při teplotě uvnitř cel. Nastavení v režimu *amplitude/frekvency scan* i kontrola v režimu *velocity/attenuation scan* zvolených píků byly provedeny naprosto totožně, jako u přístroje HR-US 102, tentokrát při teplotě $27,0 \pm 0,5$ °C (**Tabulka 3**).

Tabulka 3: Hodnoty frekvencí jednotlivých píků a jejich odpovídající harmonická čísla a amplitudy vstupního signálu pro referenční prostředí při teplotě $27,0 \pm 0,5$ °C.

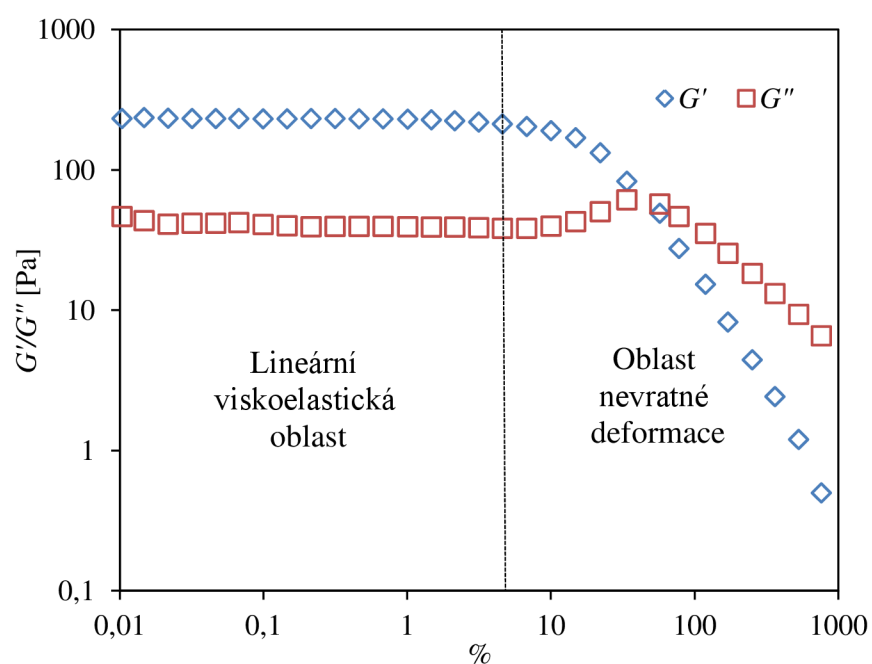
Pořadí píku	Amplituda vstupního signálu (V)	Číslo píku	Frekvence (MHz)
2	0,4	42,6	5,4
4	0,4	93,4	11,6

Do gelů v miskách u všech výše zmíněných vzorků byl speciálním dávkovačem vytvořen obrys, pomocí něhož byl opatrně špachtličkou vyřezán příslušný vzorek a ten byl ihned nadávkován do měřicí cely. Následující kroky byly vedeny postupy s ohledem na kalibraci dotyčného přístroje, jako tomu bylo u HR-US 102. Opět byly u vzorku nastaveny frekvence s příslušnými harmonickými čísly píků v režimu *amplitude/frekvency scan* a měření jeho ultrazvukové rychlosti probíhalo v režimu *velocity/attenuation scan* při amplitudě vstupního signálu 1 V po dobu 30 min při teplotě $27,0 \pm 0,5$ °C.

3.5 Výsledky a diskuze

3.5.1 Měření oscilačních testů u agarózo-želatinových gelů s přídavkem hyaluronanu reometrem AR-G2

Reometrem AR-G2 byly zjišťovány viskoelastické vlastnosti agarózo-želatinových gelů s přídavkem hyaluronanu, kdy experimenty zahrnovaly *Strain sweep test*, *Frequency sweep test* a *Temperature sweep test*. Pro lepší reprodukovatelnost výsledků byl každý test proveden vždy s nově nadávkovaným vzorkem nejméně dvakrát. Naměřená data byla vyhodnocována v programu TA Data Analysis a zpracována v Microsoft Excelu 2010.



Obr. 7: Příklad závislosti elastickeho (G') a viskozniho (G'') modulu na amplitudě napětí agarózo-želatinového gelu s přídavkem koncentrace 1 g/l hyaluronanu o MW 250-450 kDa.

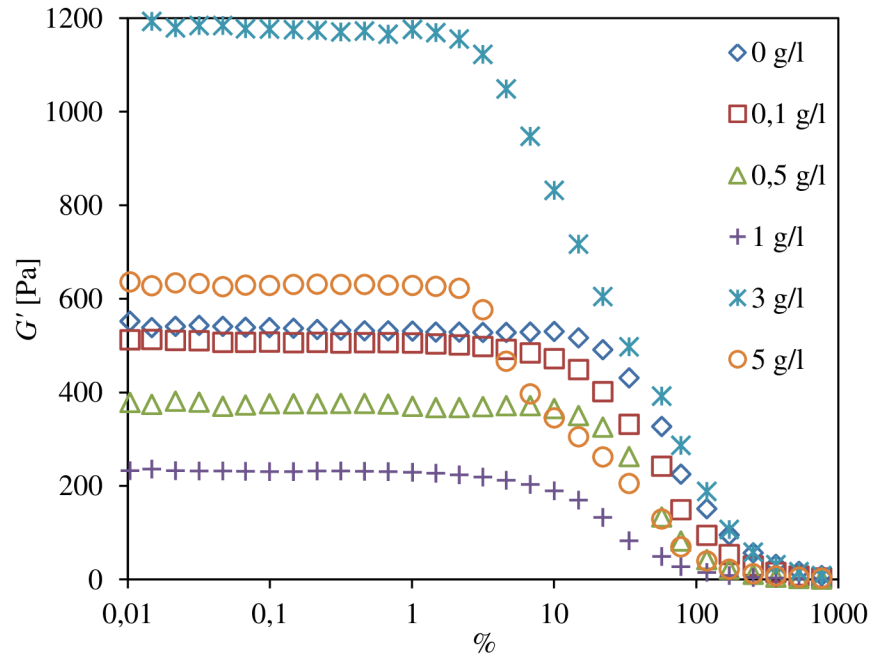
Na Obr. 7 je znázorněn příklad závislosti elastickeho i viskozniho modulu na amplitudě napětí u agarózo-želatinového gelu s přídavkem hyaluronanu o koncentraci 1 g/l o MW 250–450 kDa, kdy s rostoucím napětím postupně klesal elastickeý modul a rostl modul viskozni, což dokazuje postupnou deformaci vzorku. Dále je zde vyznačena hraniční amplituda napětí (přerušovanou čarou), jež odděluje lineární viskoelastickou oblast, kde dochází k vratné deformaci, od oblasti nevratné deformace, ve které je struktura již nevratně narušená a není schopná se obnovit. Všechny ostatní připravené gely s dalšími koncentracemi a molekulovými hmotnostmi hyaluronanu vykazovaly stejný průběh křivek, ve smyslu toho,

že v lineární viskoelastické oblasti byl vyšší elastický modul a při napětí v oblasti nevratné deformace viskózní modul.

Tabulka 4: *Hraniční amplitudy napětí lineární viskoelastické oblasti (LVO) agarózo-želatinových gelů s koncentracemi 0; 0,1; 0,5; 1; 3 a 5 g/l hyaluronanu o MW 250–450 a 600–800 kDa.*

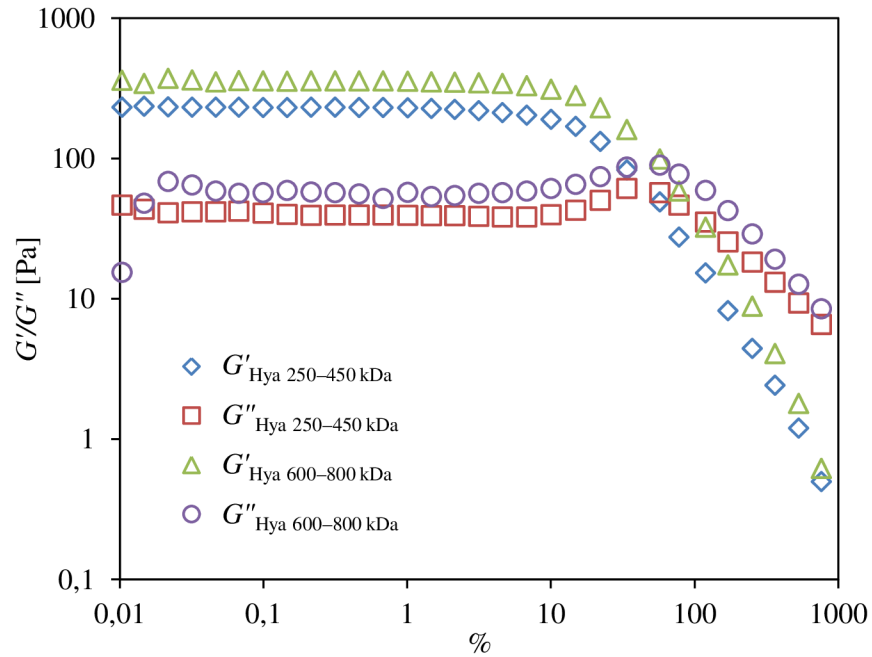
MW hyaluronan [kDa]	250–450			600–800		
$c_{\text{hyaluronan}}$ [g/l]	% _{LVO}	G' [Pa]	G'' [Pa]	% _{LVO}	G' [Pa]	G'' [Pa]
0	10,1	530,3±12,2	37,9±0,7	10,1	530,3±12,2	37,9±0,7
0,1	6,8	483,9±10,4	60,4±5,3	6,8	484,9±13,7	87,1±5,1
0,5	6,8	371,3±14,9	51,6±2,9	6,8	412,8±10,2	53,3±3,3
1	4,6	211,9±12,1	38,3±8,8	4,6	341,8±16,0	57,2±6,3
3	1,5	1168,9±89,6	192,3±14,3	1,5	1469,9±120,5	230,1±15,9
5	2,2	622,2±8,8	95,5±7,1	2,2	878,7±24,8	145,2±2,4

Tabulka 4 zaznamenává hraniční amplitudy napětí lineární viskoelastické oblasti (LVO) a k nim náležící elastické a viskózní moduly pro všechny připravované vzorky, kde hodnoty G' a G'' jsou vyšší u MW 600–800 kDa pro všechny koncentrace hyaluronanu v gelech. Dále bylo zřejmé, že s přibývajícím koncentrací hyaluronanu dochází k dřívější deformaci, což naznačuje postupné snížení hodnoty hraniční amplitudy napětí, ovšem nejprve byly struktury poškozeny ve vzorcích s koncentracemi 3 g/l hyaluronanu a nejpozději vzorky samotné agarózy s želatinou bez přídavku hyaluronanu (0 g/l).



Obr. 8: Závislost elastického (G') modulu na amplitudě napětí u agarózo-želatinových gelů s koncentrací 0; 0,1; 0,5; 1; 3 a 5 g/l hyaluronanu o MW 250–450 kDa.

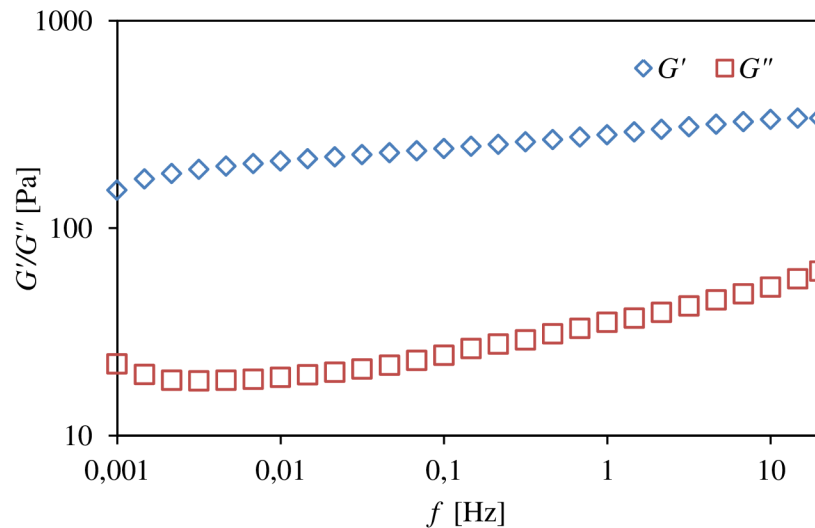
Obr. 8 ukazuje závislost elastického modulu na amplitudě napětí agarózo-želatinových gelů se všemi výše uvedenými koncentracemi hyaluronanu o MW 250–450 kDa, kde bylo možné sledovat, že nejvyšší hodnoty G' měl vzorek s koncentrací 3 g/l hyaluronanu a naproti tomu nejnižší hodnoty připadaly koncentraci 1 g/l hyaluronanu. Na Obr. X1 v Příloze je vidět podobný graf závislosti G' na amplitudě napětí daných gelů s veškerými naměřenými koncentracemi hyaluronanu o MW 600–800 kDa.



Obr. 9: Porovnání závislosti elastického (G') a viskózního (G'') modulu na amplitudě napětí agarózo-želatinového gelu s přidavkem 1 g/l hyaluronanu o MW 250–450 kDa s agarózo-želatinovým gelem se stejnou koncentrací přidavku hyaluronanu o MW 600–800 kDa.

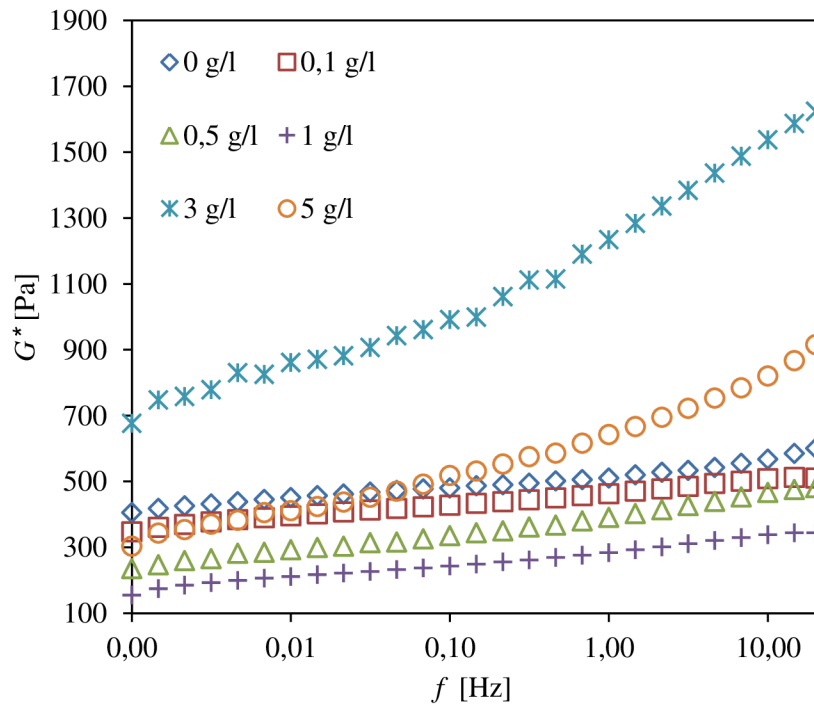
Porovnání křivek závislosti elastického a viskózního modulu na amplitudě napětí agarózo-želatinových gelů s koncentrací 1 g/l hyaluronanu mezi MW 250–450 a 600–800 kDa je zobrazeno na Obr. 9. Naměřené hodnoty obou modulů byly zvýšené pro vyšší MW u všech koncentrací hyaluronanu v porovnání s nižší MW hyaluronanu.

Na Obr. X2 v Příloze byly pro příklad vykresleny křivky G' a G'' na amplitudě napětí agarózo-želatinového gelu s přidavkem 1 g/l hyaluronanu o MW 250–450 kDa pro dvě samostatná měření, které měly za úkol znázornit reprodukovatelnost a opakovatelnost výsledků.



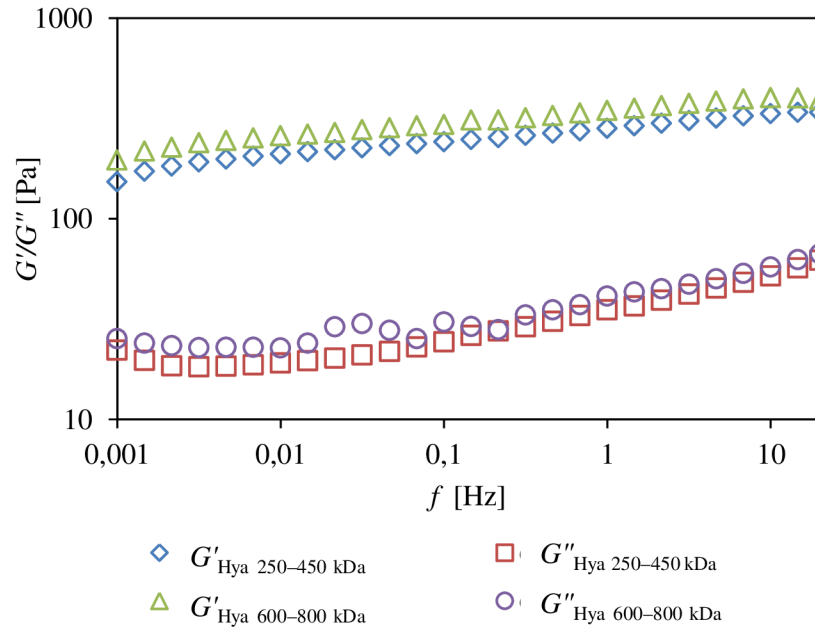
Obr. 10: Příklad závislosti elastického (G') a viskózního (G'') modulu na oscilační frekvenci agarózo-želatinového gelu s přidavkem koncentrace 1 g/l hyaluronanu o MW 250–450 kDa.

Obr. 10 vykresluje závislost G' a G'' na oscilační frekvenci u agarózo-želatinového gelu s koncentrací 1 g/l hyaluronanu o MW 250–450 kDa. V celém rozsahu frekvencí byly měřené gely viskoelastické a zesítěné, čili by se mohlo též uvést, že dané vzorky podléhaly pouze elastické (vratné) deformaci. Jelikož se při žádné měřené frekvenci ani jednoho vzorku nevyskytly moduly překřížení ($G' = G''$), měly tyto gely tuhou strukturu a nikoliv kapalnou. Dále platilo, že zvyšování frekvence neumožňuje, aby vzorky dostatečně zrelaxovaly, což se projevovalo růstem hodnot obou modulů. Tento společný nárůst G' a G'' je dán jejich vzájemnou komplementárností.



Obr. 11: Závislost komplexního (G^*) modulu na oscilační frekvenci u agarózo-želatinových gelů s koncentrací 0; 0,1; 0,5; 1; 3 a 5 g/l hyaluronanu o molekulové hmotnosti 250–450 kDa.

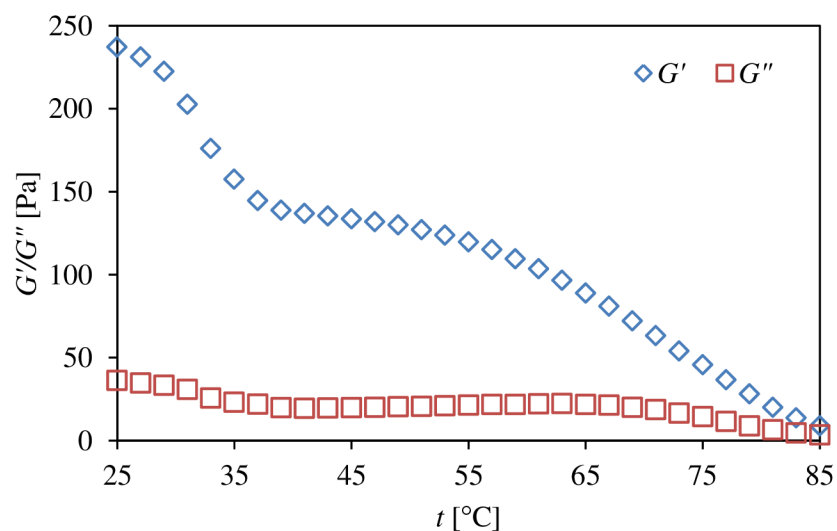
Na Obr. 11 je znázorněn graf závislosti G^* na oscilační frekvenci u agarózo-želatinových gelů se všemi používanými koncentracemi přídavku hyaluronanu o MW 250–450 kDa. Podobný graf je umístěn na Obr. X3 v Příloze s MW hyaluronanu 600–800 kDa. Tato data G^* byla vypočtena z G' a G'' rovnicí $G^* = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2}$. Bylo možné pozorovat, že čím prudší nárůst G^* byl, tím více vzorky podléhají deformaci své struktury. Nejvíce tento nárůst byl patrný u vzorků s 3 a 5 g/l a nejméně u 1 g/l hyaluronanu v daných gelech.



Obr. 12: Porovnání závislosti elastického (G') a viskózního (G'') modulu na oscilační frekvenci agarózo-želatinového gelu s přidavkem 1 g/l hyaluronanu o MW 250–450 kDa s agarózo-želatinovým gelem se stejnou koncentrací přidavku hyaluronanu o MW 600–800 kDa.

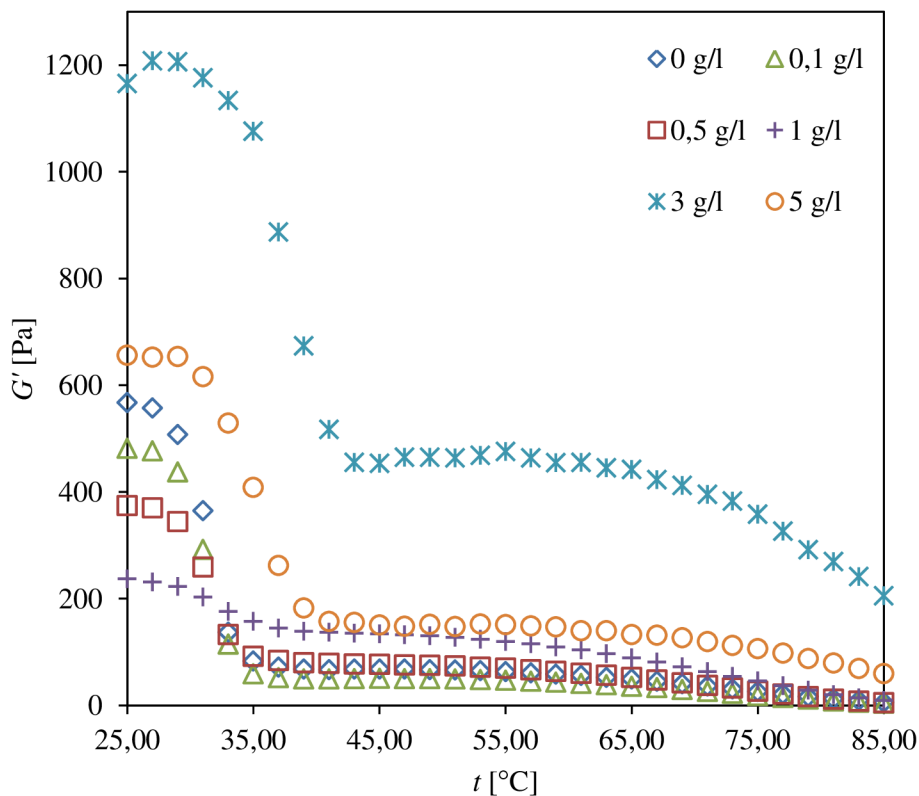
Obdobně jako u Obr. 9 a Obr. 12 byly srovnávány průběhy křivek závislosti G' a G'' , v tomto případě na oscilační frekvenci agarózo-želatinových gelů s koncentrací 1 g/l hyaluronanu o MW 250–450 a 600–800 kDa, kde opět byly hodnoty obou modulů vyšší pro MW 600–800 kDa. Tytéž výsledky byly u všech koncentrací hyaluronanu v porovnání s MW 250–450 kDa.

Na Obr. X4 v Příloze byly vykresleny závislosti G' a G'' na oscilační frekvenci agarózo-želatinového gelu s přidavkem 1 g/l hyaluronanu o MW 600–800 kDa dvou samostatných měření, které měly znázornit reprodukovatelnost a opakovatelnost výsledků.



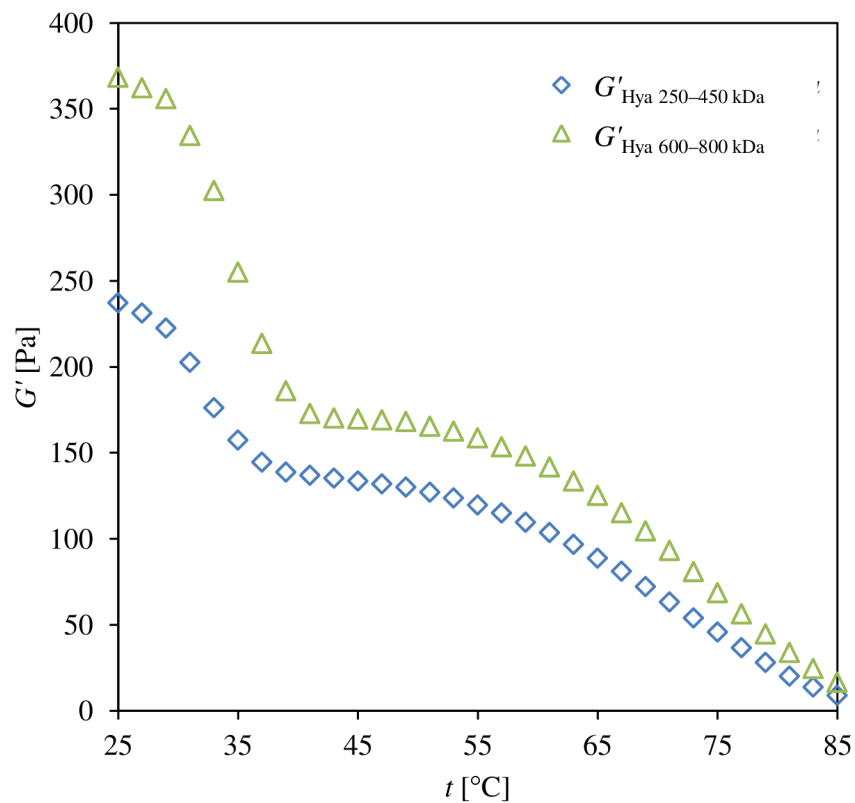
Obr. 13: Příklad závislosti elastickeho (G') a viskozniho (G'') modulu na teplotě 25–85 °C s krokem 2 °C agarózo-želatinového gelu s přidavkem koncentrace 1 g/l hyaluronanu o MW 250–450 kDa.

Výše vykreslený graf (Obr. 13) znázorňuje závislost G' a G'' na teplotě od 25 do 85 °C u vybrané koncentrace (1 g/l) přídatku hyaluronanu o MW 250–450 kDa ve studovaných gelech, kde s rostoucí teplotou klesají hodnoty obou modulů. Takový průběh křivek byl obdobný i pro všechny ostatní měřené gely (tj. koncentrace a molekulové hmotnosti hyaluronanu).



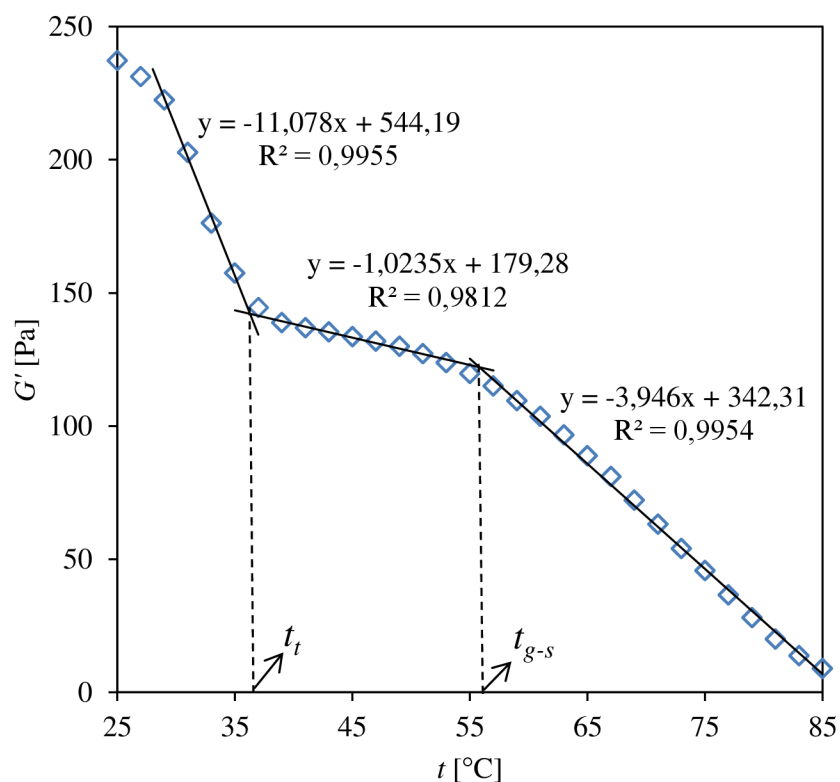
Obr. 14: Závislost elastického (G') modulu teplotě 25–85 °C s krokem 2 °C u agarózo-želatinových gelů s koncentrací 0; 0,1; 0,5; 1; 3 a 5 g/l hyaluronanu o molekulové hmotnosti 250–450 kDa.

Na Obr. 14 je zobrazena závislost G' na teplotě od 25 do 85 °C agarózo-želatinových gelů se všemi výše uvedenými koncentracemi hyaluronanu o MW 250–450 kDa, kde platilo, že při všech teplotách nejvyšší hodnoty G' měl vzorek s koncentrací 3 g/l hyaluronanu a naproti tomu nejnižší hodnoty připadaly zpočátku koncentraci 1 g/l hyaluronanu, nicméně po překročení teploty přes 33 °C náležela nejnižší hodnota G' vzorkům s nulovou koncentrací hyaluronanu. V příloze na Obr. X5 jsou vidět stejné výsledky pro závislost G' na teplotě od 25 do 85 °C daných gelů s veškerými naměřenými koncentracemi hyaluronanu o MW 600–800 kDa.



Obr. 15: Porovnání závislosti elastického (G') modulu na teplotě 25–85 °C s krokem 2 °C agarózo-želatinového gelu s přidavkem 1 g/l hyaluronanu o MW 250–450 kDa s agarózo-želatinovým gelem se stejnou koncentrací přidavku hyaluronanu o MW 600–800 kDa.

Obr. 15 popisuje průběhy křivek závislosti G' na teplotě od 25 do 85 °C agarózo-želatinových gelů s koncentrací 1 g/l hyaluronanu o MW 250–450 a 600–800 kDa, kdy hodnoty tohoto modulu byly vyšší u MW 600–800 kDa. Stejných výsledků bylo dosaženo u všech dalších koncentrací hyaluronanu v porovnání s nižší MW, a to 250–450 kDa.



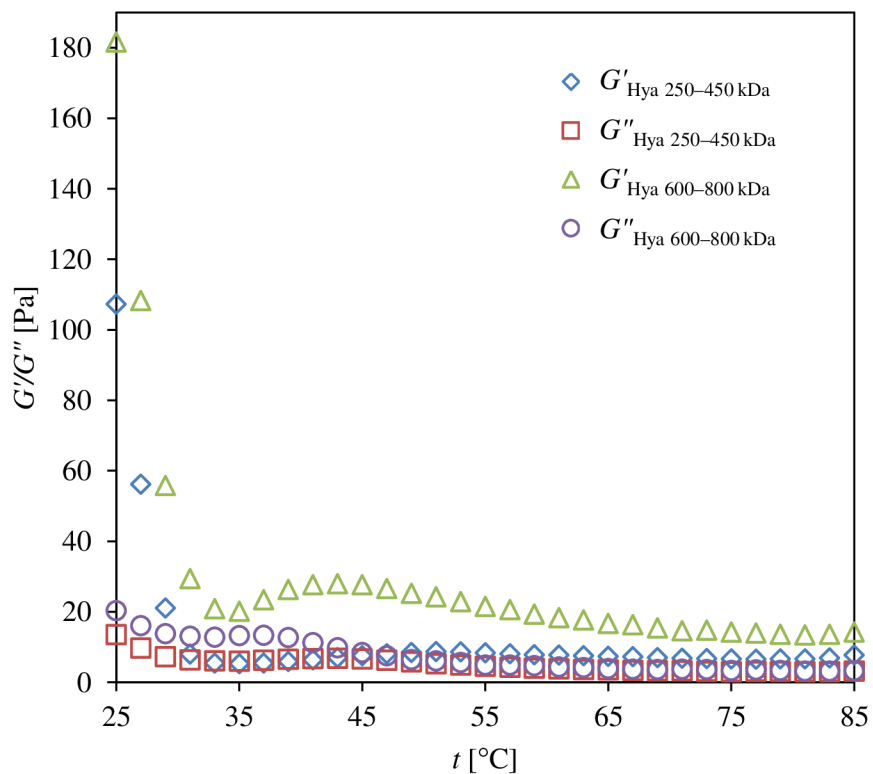
Obr. 16: Příklad výpočtu teploty tání (t_t) a teploty gel-sol přechodu (t_{g-s}) ze závislosti elastického (G') modulu na teplotě 25–85 °C s krokem 2 °C z průsečíků rovnic lineární regrese u agarózo-želatinového gelu s přidavkem koncentrace 1 g/l hyaluronanu o MW 250–450 kDa.

Obr. 16 ukazuje příklad určení teploty tání a teploty gel-sol přechodu z křivky závislosti G' na teplotě od 25 do 85 °C, kdy vypočtené průsečíky rovnic lineární regrese by měly odpovídat výše uvedeným teplotním přechodům u daných gelů. V tomto případě, u vzorku s koncentrací 1 g/l hyaluronanu o MW 250–450 kDa byla teplota tání 36,3 °C a teplota gel-sol přechodu 55,8 °C.

Tabulka 5: Teploty tání (t_t) a teploty gel-sol přechodů (t_{g-s}) ze závislosti elastického (G') modulu na teplotě 25–85 °C s krokem 2 °C agarózo-želatinových gelů s přidavkem 0; 0,1; 0,5; 1; 3 a 5 g/l hyaluronanu o MW 250–450 a 600–800 kDa vypočtených z průsečíků rovnic lineární regrese v MS Excel 2010.

MW _{hyaluronan} [kDa]	250–450		600–800	
$C_{\text{hyaluronan}}$ [g/l]	t_t [°C]	t_{g-s} [°C]	t_t [°C]	t_{g-s} [°C]
0	34,4	54,7	34,4	54,7
0,1	34,7	55,6	38,1	55,9
0,5	34,8	55,1	37,9	58,0
1	36,3	55,8	39,5	58,4
3	42,6	59,1	42,6	64,1
5	39,1	60,6	39,0	60,1

V **Tabulka 5** jsou uvedeny vypočítané teploty tání a teploty gel-sol přechodu pro všechny měřené gelové vzorky. Bylo patrné, že u vyšší MW hyaluronanu byly hodnoty teplot vyšší než u nižší MW hyaluronanu a dále platilo, že u všech vzorků s rostoucím přidavkem hyaluronanu došlo k téměř lineárnímu zvýšení teploty tání i teploty gel-sol přechodu, což bylo zřejmě způsobeno tím, že agaróza i želatina po překročení teplot 30 až 34 °C začínají rozplétat své řetězové struktury a dalším zahříváním nad kritickou teplotu kolem 50 °C jsou porušeny i zbylé vazby (vodíkové můstky), čímž vznikají oddělené řetězce daných sloučenin, díky čemuž zde hrály roli pouze řetězce hyaluronanu. Nejvyšší posun se objevil u koncentrace 3 g/l hyaluronanu pro obě jeho molekulové hmotnosti.

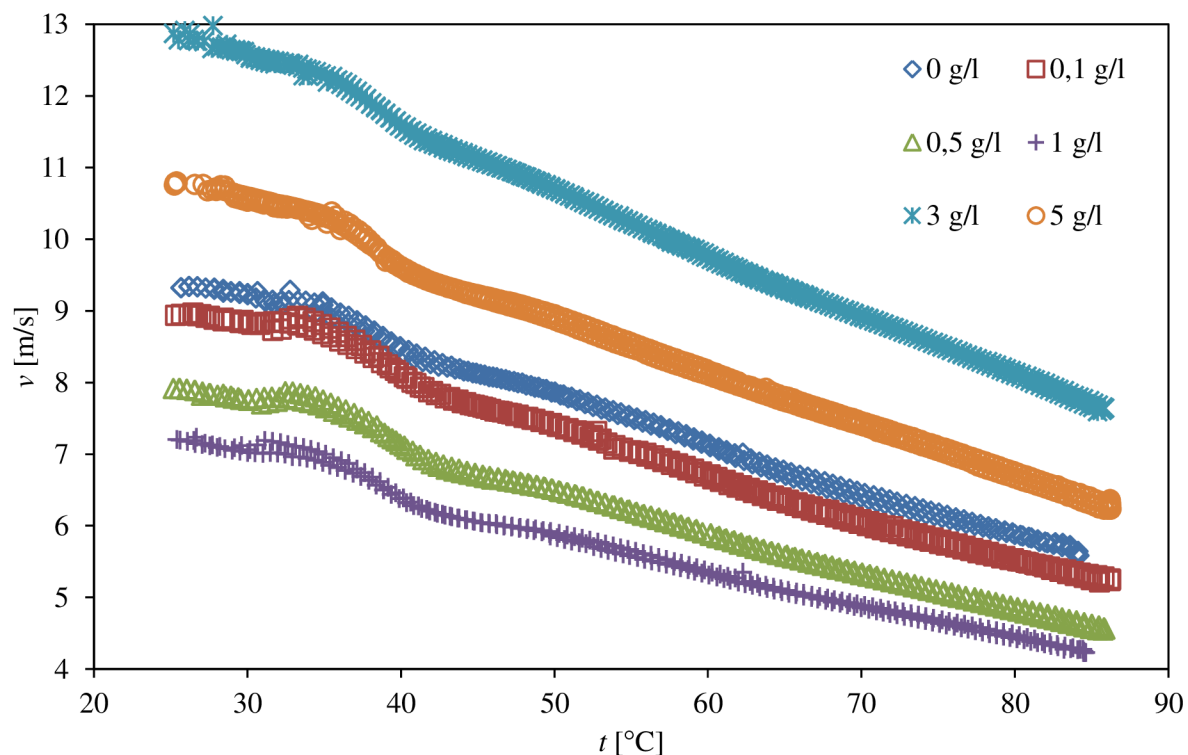


Obr. 17: Příklad porovnání závislosti elastického (G') a viskózního (G'') modulu na teplotě 85–25 °C s krokem 2 °C agarózo-želatinového gelu s přidavkem 1 g/l hyaluronanu o MW 250–450 kDa s agarózo-želatinovým gelem se stejnou koncentrací přidavku hyaluronanu o MW 600–800 kDa.

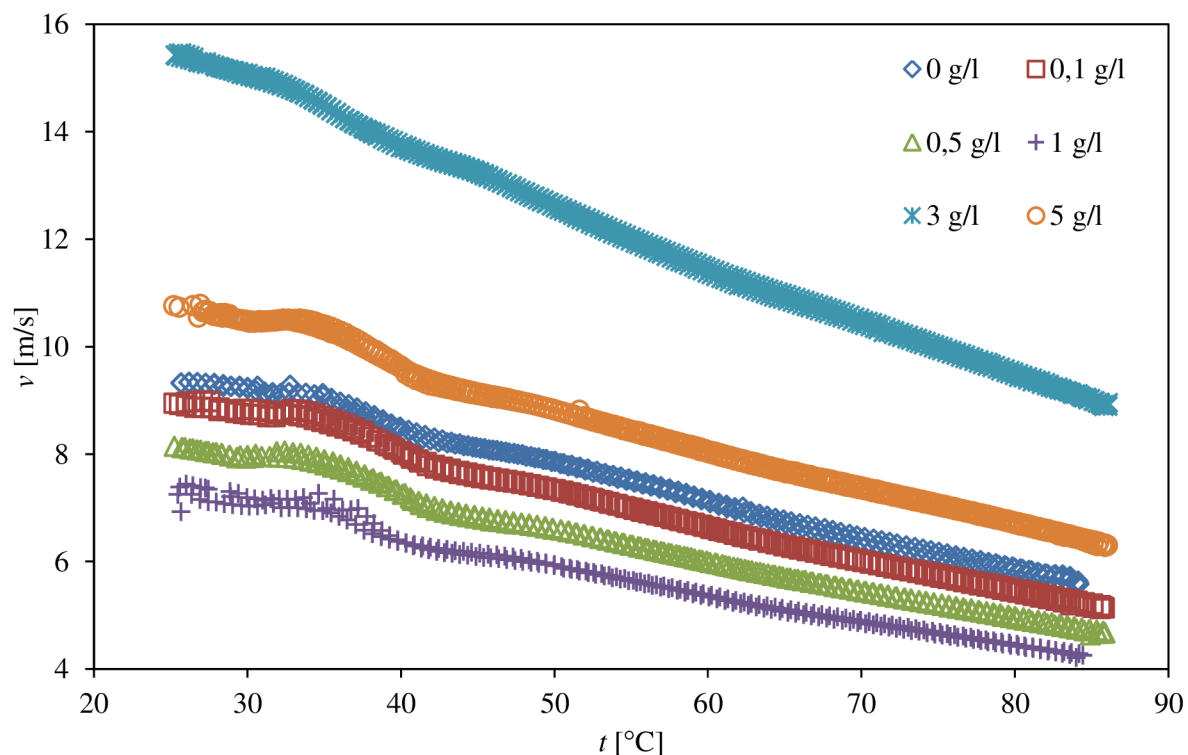
Obr. 17 porovnává závislosti G' a G'' na teplotě od 85 do 25 °C agarózo-želatinových gelů s koncentrací 1 g/l hyaluronanu o MW 250–450 a 600–800 kDa, kdy vyšší u MW 600–800 kDa vykazovaly vyšší hodnoty obou modulů oproti MW 250–450 kDa. Stejných výsledků bylo dosaženo u všech dalších koncentrací hyaluronanu v porovnání s nižší MW hyaluronanu. Při tomto měření nebylo u žádného vzorku dosaženo stejných hodnot G' , ani G'' pro teplotu 25 °C, jako tomu bylo při teplotě 25 °C u závislosti G' a G'' na teplotě 25–85 °C, zřejmě díky nedostatku času pro obnovení struktury.

3.5.2 Měření relativní ultrazvukové rychlosti v závislosti na teplotě u agarózo-želatinových roztoků s přidavkem hyaluronanu ultrazvukovým spektrometrem s vysokým rozlišením (HR-US 102)

Pomocí ultrazvukového spektrometru s vysokým rozlišením byly naměřeny hodnoty relativních ultrazvukových rychlostí v závislosti na teplotě. Jelikož měření nezávisí na frekvenci, interpretovaná data, uvedená v grafech se týkají pouze jedné ze šesti frekvencí. Byla vybrána frekvence 11,7 MHz, pro níž je hodnota čísla piků 93,4. Přestože měření bylo nejméně dvakrát opakováno, a zahrnovalo dva teplotní cykly pro každý vzorek, uvedená data se týkají pouze jediného měření a současně jen jednoho ze dvou cyklů zvolených vzorků, jelikož v prvním případě byla další měření použita pro ověření správnosti výsledků, nicméně výsledné hodnoty relativních ultrazvukových rychlostí nelze zprůměrovat, díky nemožnosti zajistit tytéž teploty a čas při měření, a zadruhé, hodnoty relativních ultrazvukových rychlostí v prvním cyklu odpovídaly hodnotám relativních ultrazvukových rychlostí v druhém cyklu a struktura se neměnila. Naměřená data byla vyhodnocována v programu HR-US software a dále zpracována v MS Excelu 2010.



Obr. 18: Závislost relativní ultrazvukové rychlosti (v) na teplotě 85–25 °C a 25–85 °C pro koncentrace 0; 0,1; 0,5; 1; 3 a 5 g/l hyaluronanu o MW 250–450 kDa v připravených agarózo-želatinových roztocích v ultračisté deionizované vodě.



Obr. 19: Závislost relativní ultrazvukové rychlosti (v) na teplotě 85–25 °C a 25–85 °C pro koncentrace 0; 0,1; 0,5; 1; 3 a 5 g/l hyaluronanu o MW 600–800 kDa v připravených agarózo-želatinových roztocích.

Na Obr. 18 a Obr. 19 lze vidět závislost relativní ultrazvukové rychlosti na klesající (85–25 °C) a rostoucí (25–85 °C) teplotě pro připravené agarózo-želatinové roztoky s přidavkem hyaluronanu o daných koncentracích a výše uvedených MW, kde platí, že s klesající teplotou vzrostly hodnoty relativních ultrazvukových rychlostí, jelikož z měřených roztoků se zřejmě stávaly gely/tužší látky a jak je známo, ultrazvuková rychlost se nejlépe šíří v pevných soustavách, oproti kapalným a tím pádem má vyšší hodnoty. Na obou obrázcích (Obr. 18 a Obr. 19) je možné sledovat, jak od koncentrace 0 g/l do koncentrace 1 g/l hyaluronanu klesají hodnoty relativních ultrazvukových rychlostí, poté dochází k jejich prudkému zvýšení u koncentrace 3 g/l hyaluronanu a nakonec opět k poklesu hodnot relativních ultrazvukových rychlostí u koncentrace 5 g/l.

3.5.3 Měření relativní ultrazvukové rychlosti u agarózo-želatinových gelů s přidavkem hyaluronanu ultrazvukovým spektrometrem s vysokým rozlišením (HR-EX-SSC)

Pomocí ultrazvukového spektrometru s vysokým rozlišením HR-EX-SSC byly naměřeny hodnoty relativních ultrazvukových rychlostí v závislosti na teplotě zaznamenané teplotním senzorem uvnitř cel, které sloužily výhradně pro srovnání s daty naměřenými pomocí přístroje HR-US 102. U přístroje HR-US 102 byly výchozí měřené vzorky v kapalném stavu, zato u modulu HR-EX-SSC bylo možné tyto vzorky měřit v tuhém (gelovém) stavu. Tak jako v předchozím případě, i zde uvedená data přísluší pouze jedné frekvenci, a to 11,6 MHz s číslem píku 93,4. Veškeré výsledné hodnoty relativních ultrazvukových rychlostí byly získány jako průměr jejich deseti hodnot během 30 minutového měření každého vzorku. Opět byla naměřená data vyhodnocována v programu HR-US software a dále zpracována v MS Excelu 2010.

Tabulka 6: *Výsledné relativní ultrazvukové rychlosti při teplotě $27,0 \pm 0,5$ °C pro agarózo-želatinové gely s koncentrací hyaluronanu 0; 0,1; 0,5; 1; 3 a 5 g/l o MW 250–450 a 600–800 kDa z přístroje HR-EX-SSC a relativní ultrazvukové rychlosti jejich roztoků z HR-US 102 z daného teplotního rozsahu.*

MW _{hyaluronan} [kDa]	HR-EX-SSC		HR-US 102	
	250–450	600–800	250–450	600–800
C _{hyaluronan} [g/l]	v [m/s]			
0	9,9946	9,9946	9,3301	9,3301
0,1	9,6767	9,9745	8,9452	8,9778
0,5	9,5100	9,5120	7,9007	8,0747
1	7,3710	7,4571	7,2309	7,3694
3	13,5142	16,6919	12,8593	15,299
5	11,9149	11,9918	10,7621	10,7847

V **Tabulka 6** byly porovnávány hodnoty relativních ultrazvukových rychlostí pro uvedené vzorky změřené při teplotě v přístroji ($27,0 \pm 0,5$ °C) HR-EX-SSC s hodnotami relativních ultrazvukových rychlostí ležící v příslušném teplotním rozsahu získané z měření teplotního skenu pomocí HR-US 102 (Obr. X6 v Příloze vykresluje hodnoty ultrazvukových rychlostí (**Tabulka 6**) v závislosti na koncentraci hyaluronanu), kdy bylo zjištěno, že hodnoty relativních ultrazvukových rychlostí z HR-EX-SSC jsou o trochu vyšší než hodnoty

relativních ultrazvukových rychlostí z HR-US 102, pravděpodobně díky rychlé změně teploty při měření teplotní rampy nebylo možné, aby došlo k dostatečnému ustálení vnitřní struktury v měřeném vzorku.

Také zde bylo možné pozorovat, že hodnoty relativních ultrazvukových rychlostí z přístroje HR-EX-SSC byly vyšší pro MW hyaluronanu 600–800 kDa, oproti 250–450 kDa hyaluronanu a též platí, že od koncentrace 0 g/l do 1 g/l hyaluronanu se hodnoty relativních ultrazvukových rychlostí snižovaly, tudíž jí patřily nejnižší hodnoty relativních ultrazvukových rychlostí, dále narostly u vzorků s obsahem 3 g/l hyaluronanu, jímž přísluší její nejvyšší hodnoty a na závěr tyto hodnoty poklesly u koncentrace 5 g/l hyaluronanu.

3.5.4 Shrnutí výsledků dosažených pomocí reologie a ultrazvukové spektrometrie s vysokým rozlišením u agarózo-želatinových gelů/roztoků s přídavkem hyaluronanu

U všech provedených reologických testů, ať už to bylo měření elastických, viskózních, komplexních modulů, určování teploty tání, teploty gel-sol přechodu, ale také při měření relativní ultrazvukové rychlosti ultrazvukovou spektrometrií s vysokým rozlišením bylo zjištěno, že vyšší hodnoty výše jmenovaných veličin náležely agarózo-želatinovým gelům/roztokům s přídavkem hyaluronanu o MW 600–800 kDa ve srovnání s gely s hyaluronanem o MW 250–450 kDa. V případě srovnání jednotlivých koncentrací náležící pouze jedné MW, ať už 250–450, nebo 600–800 kDa platilo, že výše uvedené veličiny měly nejvyšší hodnoty u koncentrace 3 g/l hyaluronanu v gelech. Pravděpodobně zde docházelo ke srážení hyaluronanu samotného se sebou, nýbrž také k synerezi, kdy z vnitřní struktury gelu se trocha rozpouštědla dostává k povrchu, v tomto případě ultračistá deionizovaná voda, jež byla zpozorována na dně misky po narušení struktury při dávkování do přístrojů, a tím bývá gel více tuhý. Naproti tomu nejnižší hodnoty u většiny měřených veličin se týkaly u koncentrace 1 g/l hyaluronanu, kdy zřejmě došlo k určitému zředění směsi agarózy s želatinou.

4 Závěr

Cílem této práce bylo seznámit se s reologií a ultrazvukovou spektrometrií s vysokým rozlišením pro charakteristiku gelových soustav. V teoretické části byly sepsány obecné údaje o gelech, agaróze, želatině a hyaluronanu. Všechny zmíněné látky jsou využívány především v biochemických aplikacích, zejména v potravinářství, kosmetice, farmacii, ale také v lékařství a tkáňovém inženýrství. Dále jsou zde uvedeny informace o reologii a ultrazvukové spektrometrii s vysokým rozlišením. V závěru této části práce jsou stručně zreprodukovány články o současném stavu řešené problematiky. Na základě článku *Rheological properties of agarose-gelatin gels* [64] z této kapitoly byly zvoleny koncentrace agarózy a želatiny pro veškeré připravované vzorky. Experimentální část zahrnuje optimalizaci přípravy a měření agarózo-želatinových gelů s přídavkem o různých koncentracích nízkomolekulárního a vysokomolekulárního hyaluronanu, konkrétně jejich elastického a viskózního modulu reologickými oscilačními testy a též jejich relativních ultrazvukových rychlostí ultrazvukovou spektrometrií s vysokým rozlišením přístroji HR-US 102 a HR-EX-SSC.

U první metody, reologie, bylo nejprve nutné stanovit lineární viskoelastickou oblast každého vzorku, kdy bylo zjištěno, že hraniční amplituda napětí lineární viskoelastické oblasti a oblastí deformace byla různá pro jednotlivé koncentrace přídavku hyaluronanu, kdy toto hraniční napětí bylo nižší, čím vyšší byl přídavek hyaluronanu. Nejnižší napětí měly vzorky těchto gelů s koncentrací 3 g/l hyaluronanu, které současně vykazovaly nejvyšší hodnoty elastických a viskózních modulů, z čehož vyplývá, že nejrychleji podléhají nevratným deformacím. Naproti tomu nejpozději byly zdeformovány vzorky bez přídavku hyaluronanu, čili vzorky o koncentraci 0 g/l hyaluronanu. Dále tyto hodnoty napětí byly shodné u stejných koncentrací vysokomolekulárního i nízkomolekulárního hyaluronanu.

Následovalo měření elastických a viskózních modulů v závislosti na oscilační frekvenci, kde bylo dokázáno, že u vzorků byla v celém rozsahu oscilační frekvence zachována gelová (viskoelastická) povaha. Také z elastických a viskózních modulů byly stanoveny komplexní moduly, které svým průběhem mohou vyjadřovat míru deformace měřených vzorků. U vzorku 3 g/l obou molekulových hmotností hyaluronanu byl vidět nejprudší nárůst komplexních modulů s nárůstem oscilační frekvence, což vyjadřuje největší tendenci tohoto vzorku k rychlejším deformacím. Vzorky o nižších koncentracích hyaluronanu (0; 0,1; 0,5 a 1 g/l) nevykazovaly takový nárůst komplexních modulů, a proto by měly být více stabilní

v rozpětí daných oscilačních frekvencí. Nejnižší hodnoty komplexních modulů náležely koncentraci 1 g/l taktéž oběma molekulovým hmotnostem hyaluronanu.

V třetím reologickém testu byly měřeny závislosti elastických a viskózních modulů nejprve na rostoucí teplotě, kde obě měřené veličiny klesaly u všech daných vzorků. Z těchto křivek každého jednotlivého vzorku byly pozorovány dvě zřetelné zlomové oblasti, kdy první představovala teplotu tání a druhá teplotu gel-sol přechodu. Pro obě tato místa byly vypočteny konkrétní hodnoty teploty tání a teploty gel-sol přechodů a z nich vyplývalo, že přídavek hyaluronanu zvýšil obě zlomové teploty, kde nejvyšší hodnoty teplot náležely koncentracím 3 g/l pro vysokomolekulární i nízkomolekulární hyaluronan. Pravděpodobně po překročení 34 °C došlo k tání agarózy i želatiny, molekulární struktury obou látek byly značně oslabeny a při dalším zvyšování teploty byly zřejmě zcela rozpleteny a roztaveny, tudíž hlavní vliv představovaly řetězce hyaluronanu a tím pádem by bylo možné tvrdit, že čím vyšší byla koncentrace hyaluronanu, tím více narůstaly obě teploty. Při snižování teploty nebylo u žádného vzorku dosaženo původních výchozích hodnot ani jednoho z modulů, pravděpodobně kvůli nedostatečnému času pro znovuoobnovení struktury. V případě, že by bylo poskytnuto více času pro chlazení vzorků, gelová struktura by byla možná opětovně vytvořena, jelikož agaróza i želatina jsou termoreverzibilní.

Druhou měřicí metodou byla ultrazvuková spektrometrie s vysokým rozlišením, pomocí níž byly měřeny hodnoty relativních ultrazvukových rychlostí veškerých vzorků. Touto metodou byly v první řadě měřeny relativní ultrazvukové rychlosti v závislosti na teplotě, kdy byly všechny dotyčné vzorky téměř okamžitě po přichystání (vzorky byly horké a v kapalném stavu) podrobeny dvěma teplotním cyklům, kdy jeden cyklus obsahoval snižování (85–25 °C) a následné zvyšování (25–85 °C) teploty. Bylo zjištěno, že nejvyšší výsledné hodnoty relativních ultrazvukových rychlostí u obou molekulových hmotností přídavku hyaluronanu byly zaznamenány u koncentrace 3 g/l a nejnižší u 1 g/l v celém rozsahu teplot.

Přístrojem HR-EX-SSC byly u všech vzorků měřeny relativní ultrazvukové rychlosti při teplotě určené teplotním senzorem uvnitř měřících cel, která byla v rozsahu $27,0 \pm 0,5$ °C. V závislosti těchto měřených hodnot na koncentraci hyaluronanu (pro každou MW hyaluronanu zvlášť) platilo, že nejvyšší relativní ultrazvukové rychlosti náležely vzorkům s koncentrací 3 g/l hyaluronanu a nejnižší připadala vzorku 1 g/l hyaluronanu. Nakonec byly tyto získané hodnoty srovnávány s hodnotami naměřenými během teplotní rampy, připadající teplotě $27,0 \pm 0,5$ °C, kde hodnoty z teplotní rampy byly nižší než hodnoty z měření za uvedené teploty, což mohlo být způsobeno, zaprvé, možnou chybou samotného přístroje,

který nebyl napojen na termostat, a proto jeho měření nemuselo být zcela přesné, a také tím, že vzorky byly ve stabilizovanějším stavu, jelikož při měření teplotní rampy byl vzorek velmi rychle podrobován jiným teplotním podmínkám a díky tomu nemusela být struktura zrelaxována a kompletně ustálena.

Celkově lze uvést, že u všech provedených testů náležely nejvyšší měřené hodnoty vzorkům s přidavkem vysokomolekulárního hyaluronanu ve srovnání se vzorky s nízkomolekulárním hyaluronanem. Zároveň bylo vyzkoumáno, že nejvyšší výsledné hodnoty patřily vysokomolekulárnímu i nízkomolekulárnímu hyaluronanu o koncentraci 3 g/l, kdy s největší jistotou docházelo ke srážení řetězců hyaluronanu samotných se sebou a také bylo při dávkování gelů do přístrojů (AR-G2, HR-EX-SSC) pozorováno menší množství rozpouštědla na dně misky, zřejmě způsobené synerezí, která napomáhá k vyšší tuhosti gelu. Nejnižších hodnot bylo nejčastěji dosaženo u přidavku o koncentraci 1 g/l u obou molekulárních hmotností hyaluronanu. Dalo by se říci, že přidáváním hyaluronanu do koncentrace 1 g/l byly gelové struktury agarózy s želatinou do určité míry zředěny a staly se více viskózními.

Dosažených poznatků by bylo možné využít například v tkáňovém inženýrství nebo v lékařství, kdy by dle požadavků bylo možné vytvořit potřebnou aplikaci, ať už by se to týkalo především hojení povrchových ran, nebo také případných implantátů.

V této práci byly popsány viskoelastické vlastnosti agarózo-želatinových gelů s přidavkem nízkomolekulárního i vysokomolekulárního hyaluronanu reologickými testy a ultrazvukovou spektrometrií s vysokým rozlišením. V budoucnu by toto téma mohlo být zaměřeno na schopnost růstu, proliferaci a migraci mezenchymálních kmenových buněk. Dále by bylo zajímavé studovat sterilitu a porozitu u takových gelových struktur.

5 Použitá literatura

- [1] KVÍTEK, L. a A. PANÁČEK. *Základy koloidní chemie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. ISBN 978-80-244-1669.
- [2] BARTOVSKÁ L a M. ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 5th ed. Praha: VŠCHT Praha, 2005. ISBN 80-7080-579-X
- [3] HEMENDRASINH, J. R. and D. P. MEHTA. A Review on Pharmaceutical Gel. *International Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2015, **1**(1), 33-47 [cit. 2019-02-10]. ISSN 0975-4725. Dostupný z: https://www.researchgate.net/publication/286451492_A_Review_on_Pharmaceutical_Gel
- [4] TOKITA, M. Transport Phenomena in Gel. *Gels* [online]. 2016, **2**(17) [cit. 2019-02-10]. ISSN 2310-2861. DOI: 10.3390/gels2020017.
- [5] SAMBROOK, J. a D. RUSSELL. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd. ed. New York: Cold spring harbor laboratory press, 2001. ISBN 978-0-87969577-4.
- [6] PÉREZ, S., M. KOUWIJZER, K. MAZEAU & S. B. ENGELSEN. Modeling polysaccharides: Present status and challenges. *Journal of Molecular Graphics* [online]. 1996, **14**(6), 307–321 [cit. 2019-02-10]. ISSN 1093-3263. DOI: 10.1016/s0263-7855(97)00011-8.
- [7] FERNÁNDEZ, E., D. LÓPEZ, C. MIJANGOS, M. DUSKOVA-SMRCKOVA, M. ILAVSKY a K. DUSEK. Rheological and thermal properties of agarose aqueous solutions and hydrogels. *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics* [online]. 2008, **46**(3), 322–328 [cit. 2019-02-10]. ISSN 1099-0488. DOI 10.1002/polb.21370.
- [8] WILSON, K. a J. WALKER. *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. 7th ed. New York: Cambridge University Press, 2009. ISBN 0521731674.
- [9] CAMMACK, R. *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology*. Rev. ed. New York: Oxford University Press, 2011. ISBN 9780198529170.
- [10] Ultrapure Agarose. ThermoFisher Scientific [online]. b.r. [cit. 2019-03-18]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/16500500>
- [11] GRIESS, G., K. GUISELEY a P. SERWER. The relationship of agarose gel structure to the sieving of spheres during agarose gel electrophoresis. *Biophysical Journal*. 1993, **65**(1), 138-148. ISSN 0006-3495.

- [12] FUJII, T. Scaling analysis on elasticity of agarose gel near the sol–gel transition temperature. *Food Hydrocolloids* [online]. 2000, **14**(4), 359-363 [cit. 2019-02-10]. ISSN 0268-005X. DOI: 10.1016/S0268-005X(00)00012-6.
- [13] KRŇÁVKOVÁ, Š. *Studium sol – gel procesu agarózy pomocí klasické reologie a dynamického rozptylu světla*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. s. 43. Vedoucí bakalářské práce Ing. Jiří Smilek.
- [14] LE GOFF, K. J., C. GAILLARD, W. HELBERT, C. GARNIER a T. AUBRY. Rheological study of reinforcement of agarose hydrogels by cellulose nanowhiskers. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2015, 116, 117-123 [cit. 2019-02-10]. ISSN 0144-8617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.04.085.
- [15] RENN, D. Agar and agarose: indispensable partners in biotechnology. *Industrial and Engineering Chemistry Product Research and Development*. 1984, **23**(1), 17-21. ISSN 0196-4321.
- [16] DUŠENKOVÁ, A. *Optimalizace mikroeologických technik pro charakterizaci biopolymerních gelů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 38 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
- [17] SAPÁROVÁ, A. *Příprava a vlastnosti agarosového hydrogelu s micelárními doménami*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 63 s. Vedoucí diplomové práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc..
- [18] HRDOVÁ, L. *Želatina – vlastnosti, metody charakterizace a její použití v potravinářském a farmaceutickém průmyslu*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 2008. 53 s. Vedoucí bakalářské práce: Ing. Věra Kašpárková, CSc.
- [19] History of Gelatin, Gelatine, and JELL-O. *What's Cooking America* [online]). 2004 [cit. 2019-02-10]. Dostupné z: <https://whatscookingamerica.net/History/Jell-0-history.htm>
- [20] OUŘEDNÍČKOVÁ, V. *Mikrobiální degradace fotografických materiálů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 45 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Mária Veselá, Ph.D.
- [21] GORGIEVA, S., V. KOKOL. *Biomaterials Applications for Nanomedicine Published: Collagen- vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility. Review and*

- Perspectives* [online]. Intechopen, 2011 [cit. 2019-02-10]. ISBN 978-953-307-661-4. DOI: 10.5772/1957.019-02-10].
- [22] *Gelatin handbook* [online]. New York: Gelatin manufacturers institute of America, inc., 1973 [cit. 2019-02-10]. Dostupné z: http://www.gelatin-gmia.com/images/GMIA_Gelatin_Manual_2012.pdf
- [23] Hages pro Českou republiku. *Želatína* [online]. 2005 [cit. 2019-03-09]. Dostupný z: <http://www.hages.cz/katalogy/zelatina.pdf>
- [24] GÓMEZ-GUILLÉN, M. C., B. GIMÉNEZ, M. E. LÓPEZ-CABALLERO, M. P. MONTERO. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids* [online]. 2011, **25**(8), 1813-1827. [cit. 2019-02-10]. ISSN 0268-005X. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2011.02.007.
- [25] MLÁDEK, M., et al. *Zpracování opadů kožedělného průmyslu*. 1. vyd. Praha 1: Nakladatelství technické literatury, n.p., 1971. 324 s.
- [26] SZEWIECZKOVÁ, J. *Studium interakcí hyaluronan-fosfolipid za přítomnosti biokompatibilních neionogenních tenzidů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 50 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Filip Mravec, Ph.D..
- [27] HASCALL a LAURENT. Hyaluronan: Structure and Physical Properties. *GlykoForum* [online]. 1997. [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [28] Hyaluronic Acid. *Kaviskin* [online]. 2011 [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: <http://www.kaviskin.com/info/hyaluronicacid.html>
- [29] SEDLÁČKOVÁ, M. *Dermální výplně na bázi kyseliny hyaluronové*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 2013, 57 s, Vedoucí bakalářské práce RNDr. Iva Hauerlandová, Ph.D.
- [30] SLÍVA, J., J. MINÁRIK. Hyaluronát – nejen pasivní pozorovatel, nýbrž aktivní modulátor imunitních reakcí. *New EU Magazine of Medicine* [online]. 2009, **1**(2), 75-79 [cit. 2019-02-10]. ISSN: 2310-3434. Dostupný z: http://www.neumm.cz/public/img/neumm_09_1-2/pdf/sliva_minarik_hyaluronat.pdf
- [31] JUGL, A. *Studium interakcí hyaluronan-aminokyseliny*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 86 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.

- [32] BOERIU, C. G., J. SPRINGER, F. K. KOOY, L. A. M. VAN DEN BROEK a G. EGGINK. Production Methods for Hyaluronan [online]. [cit. 2019-03-18]. ISBN 10.1155/2013/624967. DOI: 10.1155/2013/624967.
- [33] ŠLEZINGROVÁ, K., D. ŠMEJKALOVÁ, M. BOBEK a V. VELEBNÝ. Syntéza a charakterizace palmitoyl hyaluronanu. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2012, 6. ISSN 0009-2770.
- [34] POLEDŇÁKOVÁ, H. *Teplotní závislost karagenanu a hyaluronanu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 97 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.
- [35] SCOTT, J. E. Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solution. Some Biological Consequences. *GlycoForum* [online]. 1998 [cit. 2019-03-11]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>
- [36] CIMALOVÁ, J. *Ionokomplexy hyaluronanu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 59 s. Vedoucí diplomové práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc..
- [37] STEINBÜCHEL, A. a M. HOFRICHTER. *Biopolymers*. Chichester: Wiley-VCH, 2003. ISBN 3527302301.
- [38] CHLUMSKÁ, J. *Studium interakcí protonizovaných aminokyselin s nízkomolekulárním hyaluronanem*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. 45 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Martin Chytil, Ph.D..
- [39] CIMALOVÁ, J. *Ionokomplexy hyaluronanu pro kosmetické a farmaceutické účely*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 42 s. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
- [40] Kyselina hyaluronová. *Celostnimedica.cz* [online]. 2009 [cit. 2019-02-04]. Dostupné z: <http://www.celostnimedica.cz/kyselina-hyaluronova.htm>
- [41] GIRISH, K. S. a K. KEMPARAJU. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sciences* [online]. 2007, **80**(21), 1921-1943 [cit. 2019-02-10]. ISSN 00243205. DOI: 10.1016/j.lfs.2007.02.037.
- [42] ALMOND, A. Hyaluronan. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2007, **64**(13), 1591-1596 [cit. 2019-02-10]. ISSN 1420-682x. DOI: 10.1007/s00018-007-7032-z.

- [43] STERN, R., A. A. ASARI a K. N. SUGAHARA. Hyaluronan fragments: An information-rich system. *European Journal of Cell Biology* [online]. 2006, **85**(8), 699–715 [cit. 2019-02-10]. ISSN 0171-9335. DOI: 10.1016/j.ejcb.2006.05.009
- [44] PAVELKA, K. a KOLEKTIV. *Farmakoterapie revmatických onemocnění*. Praha: Grada, 2005. ISBN 8024704595.
- [45] PAVELKA, K. Kyselina hyaluronová v léčbě osteoartrózy. *Medical Tribune* [online]. 2009, č. 2 [cit. 2019-02-10]. Dostupné z: <http://www.tribune.cz/clanek/13792>
- [46] VAŠÍČKOVÁ, K. *Interakce tenzidů se směsí hyaluronanů o různé molekulové hmotnosti*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 61 s. Vedoucí diplomové práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc..
- [47] DAVID-RAOUDI, M., F. TRANCHEPAIN, B. DESCHREVEL, J. VINCENT, P. BOGDANOWICZ, K. BOUMEDIENE a J. PUJOL. Differential effects of hyaluronan and its fragments on fibroblasts: Relation to wound healing. *Wound Repair and Regeneration* [online]. 2008, **16**(2), 274-287 [cit. 2019-02-10]. ISSN 1524-475X. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2007.00342.x.
- [48] LOKESHWAR, V. B., C. OEBEK, M. S. SOLOWAY a N. L. BLOCK. Tumor-associated hyaluronic acid: a new sensitive and specific urine marker for bladder cancer. *Cancer Research* [online]. 1997, **57**(4), 773–777 [cit. 2019-02-10]. ISSN: 1538-7445. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/57/4/773.long>
- [49] Reologie a reometrie kapalin. In: *IS MUNI* [online]. 2014 [cit. 2019-02-10]. Dostupný z: https://is.muni.cz/el/1431/podzim2014/C5160/um/2457585/2457594/Reologie_a_reometrie_kapalin.pdf
- [50] MEZGER, T. *The Rheology Handbook*. 3rd revised edition. Germany, 2011, ISBN 978-3-86630-890-9
- [51] Reologie. In: *Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická* [online]. 2017 [cit. 2019-02-10]. Dostupné z: http://ufmi.ft.utb.cz/texty/kzm/KZM_03.pdf
- [52] 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.
- [53] ARES-G2 Rheometer. *TA Instruments* [online]. 2017 [cit. 2019-02-19]. Dostupný z: <https://www.tainstruments.com/wp-content/uploads/BROCH-ARES-G2-2017-EN.pdf>

- [54] Viskoelasticita materiálů. In: *Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně* [online]. 2005 [cit. 2019-02-10]. Dostupné z: http://ufmi.ft.utb.cz/texty/env_fyzika/EF_06.pdf
- [55] Rotational Methods: Rotational Rheometer. In: *National Institute of Standards and Technology* [online]. [cit. 2019-03-18]. Dostupné z: <https://ciks.cbt.nist.gov/~garbocz/S/P946/node14.htm>
- [56] BURKIN, V., M. C. ALTAS. *CI.1:High-resolution ultrasonic spectroscopy*. [online]. Dublin, 2017 [cit. 2019-02-10]. ISBN 978-3-9816876-4-4. DOI: 10.5162/sensor2017/C1.1
- [57] TUKARAM K. et al. High Resolution Ultrasonic Spectroscopy. *American Journal of PharmTech Research* [online]. 2013, **3**(1), 306-319 [cit. 2019-02-10]. ISSN 2249-3387 Dostupný z: <http://www.ajptr.com/archive/volume-3/february-2013-issue-1/31020.html>
- [58] SMYTH, C. et al., High-Resolution Ultrasonic Spectroscopy: Analysis of Microemulsion. *Spectroscopy*. 2005, **20**(2), 44-49. ISSN 0887-6703.
- [59] NORDQVIST D. & T. A. VILGIS. Rheological Study of the Gelation Process of Agarose-Based Solutions. *Food Biophysics* [online]. 2011 [cit. 2019-02-10]. ISSN 1557-1866. DOI 10.1007/s11483-011-9225-0.
- [60] CZERNER, M., L. S. FELLAY, M. P. SUÁREZ, P. M. FRONTINI AND L. A. FASCE. Determination of Elastic Modulus of Gelatin Gels by Indentation Experiments, *Procedia Materials Science* [online]. 2015 [cit. 2019-02-10]. ISSN 2211-8128. DOI: 10.1016/j.mspro.2015.04.075.
- [61] HUANG, T., Z. TU, XINCHEN-SHANGGUAN, H. WANG, L. ZHANG AND X. SHA. Rheological and structural properties of fish scales gelatin: Effects of conventional and ultrasound-assisted extraction. *International Journal Of Food Properties* [online]. 2017, **20**(2), 1210–1220 [cit. 2019-02-10]. ISSN 1532-2386. DOI: 10.1080/10942912.2017.1295388.
- [62] KOHLES, S., S. S. MASON, A. P. ADAMS, R. J. BERG, J. BLANK, F. GIBSON AND J. RIGHETTI. Ultrasonic wave propagation assessment of native cartilage explants and hydrogel scaffolds for tissue engineering. *Int J Biomed Eng Technol* [online]. 2012, **10**(3), 296–307 [cit. 2019-02-10]. ISSN 1752-6426. DOI: 10.1504/IJBET.2012.050263.

- [63] PARKER N. G., M. J. W. POVEY. Ultrasonic study of the gelation of gelatin: phase diagram, hysteresis and kinetics. *Food Hydrocolloids* [online]. 2012, **26**(1), 99-107 [cit. 2019-02-10]. ISSN 0268-005X. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2011.04.016.
- [64] WATASE, M., K. NISHINARI. Rheological properties of agarose-gelatin gels. *Rheol Acta* [online]. 1980, **19**(2), 220-225 [cit. 2019-03-23]. ISSN 0035-4511. DOI: 10.1007/BF01521934.
- [65] APPLICATION NOTE: Evaluating the Rheological Properties of Hyaluronic Acid Hydrogels for Dermal Filler Applications. *SelectScience* [online]. Courston: Science House, 2015 [cit. 2019-03-07]. Dostupné z: www.selectscience.net/application-notes/evaluating-the-rheological-properties-of-hyaluronic-acid-hydrogels-for-dermal-filler-applications/?artID=36704
- [66] MONDAL, S., N. HARIDAS, S. S. LETHA, V. VIJITH, G. RAJMOHAN AND M. J. ROSEMARY. Development of injectable high molecular weight hyaluronic acid hydrogels for cartilage regeneration. *Journal Of Macromolecular Science, Part A: Pure And Applied Chemistry* [online]. 2016, **53**(8), 507–514 [cit. 2019-02-10]. ISSN 1060-1325. DOI: 10.1080/10601325.2016.1189284.
- [67] KORUER, E., H. KENAR, E. DOGER, E. KARAOZ. Production of a composite hyaluronic acid/gelatin blood plasma gel for hydrogel-based adipose tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res Part A* [online]. 2014, **102A**(7), 2220–2229 [cit. 2019-02-19]. ISSN 1552-4965. DOI: 10.1002/jbm.a.34901.
- [68] CAMCI-UNAL, G., D. CUTTICA, N. ANNABI, D. DEMARCHI AND A. KHADEMHOSEINI. Synthesis and Characterization of Hybrid Hyaluronic Acid-Gelatin Hydrogels. *Biomacromolecules* [online]. 2013, **14**(4), 1085–1092 [cit. 2019-02-10]. ISSN 1525-7797. DOI: 10.1021/bm3019856.
- [69] BHATNAGAR, D., D. XU, D. GERSAPPE AND M. H. RAFAILOVICH. Hyaluronic Acid and Gelatin Clay Composite Hydrogels: Substrates for Cell Adhesion and Controlled Drug Delivery. *Journal of Chemical and Biological Interfaces* [online]. 2014 [cit. 2019-02-19]. ISSN 2330-1570. DOI: 10.1166/jcbi.2014.1022.
- [70] VANANROYE, A. SMART – AR-G2 (TA Instruments). In: *KU LEUVEN: SMART* [online]. 2016 [cit. 2019-03-03]. Dostupné z: <http://cit.kuleuven.be/smart/infrastructure/documents/AR-G2.pdf>

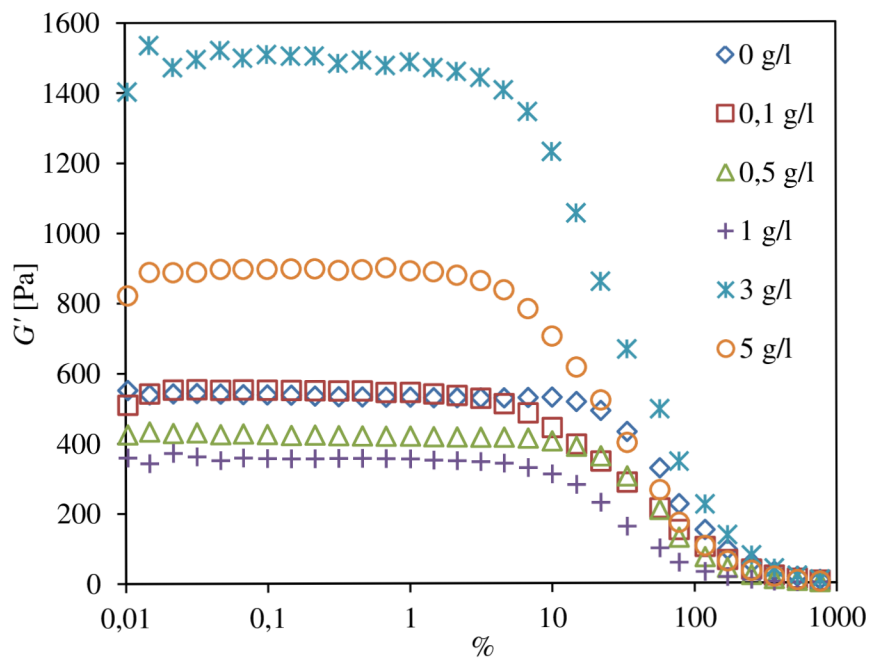
- [71] TA INSTRUMENTS. *AR 500/1000 Rheometers: Hardware Manual* [online]. New Castle, USA: TA Instruments, 2000 [cit. 2019-03-03]. Dostupné z: <http://regmed.musc.edu/atbc/files/TAmanual/TA%20AR%201000%20Manual.pdf>
- [72] PEYRONEL, M. F., A. G. MARANGONI. Controlled-Stress Rheometry. In: *AOCS Lipid Library* [online]. 2017 [cit. 2019-03-03]. Dostupné z: <http://lipidlibrary.aocs.org/Biochemistry/content.cfm?ItemNumber=40883>
- [73] TA INSTRUMENTS [online]. *AR Rheometer Instrumentation, Calibration and Maintenance*. 2008 [cit. 2019-04-18]. Dostupné z: http://labshare.hzau.edu.cn/upfile/doc/b313f9_AR%20Operation%20Training.pdf
- [74] Thermo / HAAKE C25P Refrigerated Bath With Phoenix II Controller. In: *Artisan: Technology Group* [online]. [cit. 2019-03-03]. Dostupné z: https://www.artisanng.com/Scientific/6095315/Thermo_HAAKE_C25P_Refrigerated_Bath_With_Phoenix_II_Controller
- [75] ULTRASONIC SCIENTIFIC: the wave of the future [online]. Dublin, Irsko: Sonas Technologies [cit. 2018-05-03]. Dostupné z: <http://www.ultrasonicscientific.com>

Seznam použitých symbolů a zkratek

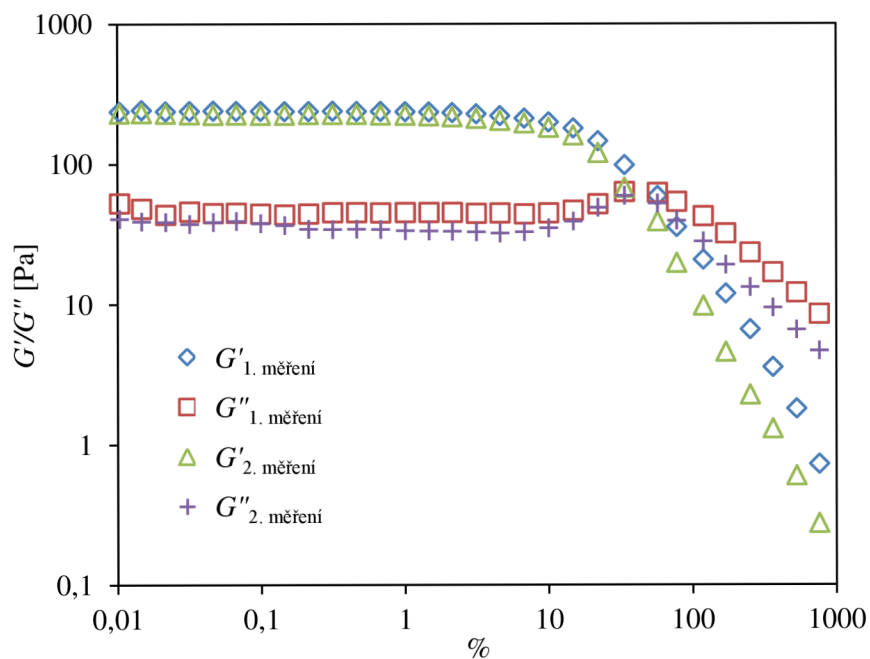
3D	three-dimensional, trojrozměrný
α	řecké písmeno alfa
β	řecké písmeno beta
AD	adipose-derived, odvozené z tukové tkáně
CD44	clusters of differentiation 44, specifický receptor
CWB	Clear Water Bay, technologie čištění
D-	enantiomer stáčeující rovinu polarizovaného světla vpravo
DNA	deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
DVS	divinylsulfoxid
Gel	želatina
HAS1	hyaluronan synthase 1, lidský enzym kódující hyaluronan
HAS2	hyaluronan synthase 2, lidský enzym kódující hyaluronan
HAS3	hyaluronan synthase 3, lidský enzym kódující hyaluronan
HR-EX-SSC	high resolution external solid state cells, ultrazvuková spektrometrie s vnějšími celami pro tuhé vzorky
HR-US	high resolution ultrasonic spektroskopie, ultrazvuková spektrometrie s vysokým rozlišením
Hya	hyaluronan
L-	enantiomer stáčeující rovinu polarizovaného světla vlevo
LVO	lineární viskoelastická oblast
MA	methakrylát
MSC	mesenchymal stem cell, mezenchymální kmenové buňky
MW	molecular weight, molekulová hmotnost
pH	potencial of hydrogen, záporně vzatý dekadický logaritmus aktivity oxoniových kationtů
two-fold helix	dvojitá spirála
UV-VIS	ultraviolet-visible spectrometry, ultrafialová-viditelná spektrometrie
UWB	Ultrasonic Water Bay, technologie čištění pomocí ultrazvuku
%	amplituda napětí
δ	ztrátový úhel
η	dynamická viskozita
π	fázový posun
τ	tečné napětí
ω	úhlový posun
c	koncentrace
D	gradient rychlosti
E	modul pružnosti
f	frekvence
G'	elastický modul
G''	viskózní modul
G^*	komplexní modul

m	m-tá hodnota amplitudy
n	pořadí píku
t	teplota
t_{g-s}	teplota gel-sol přechodu
t_i	teplota tání
v	relativní ultrazvuková rychlost
$^{\circ}$	stupeň
$^{\circ}\text{C}$	stupeň Celsia, jednotka teploty
$^{\circ}\text{C}/\text{min}$	stupeň Celsia za minutu, jednotka rychlosti
Da	dalton, jednotka molekulové hmotnosti
g	gram, jednotka hmotnosti
g/l	gram na litr, jednotka hmotnostní koncentrace
g/ml	gram na mililitr, jednotka hmotnostní koncentrace
g/mol	gram na mol, jednotka molární koncentrace
hod	hodin, jednotka času
Hz	Herz, jednotka frekvence
kg/m^3	kilogram na metr krychlový, jednotka hustoty
min	minut, jednotka času
ml	mililitr, jednotka objemu
mm	milimetr, jednotka délky
m/s	metr za sekundu, jednotka rychlosti
mm/s	milimetr za sekundu, jednotka rychlosti
N	Newton, jednotka síly
Pa	Pascal, jednotka tlaku
R	regresní koeficient
rpm	revolutions per minute, otáčky za minutu, vedlejší jednotka frekvence
s	sekunda, jednotka času
μm	mikrometr, jednotka délky
$\mu\text{m}/^{\circ}\text{C}$	mikrometr za stupeň Celsia, jednotka tepelné roztažnosti
V	Volt, jednotka napětí
x	hodnota na vodorovné ose v grafu
y	hodnota na svislé ose v grafu
\pm	znaménko plus-mínus
%	procento
<	znaménko menší než
>>	znaménko mnohem větší než
=	znaménko rovnosti
$\sqrt{\quad}$	odmocnina

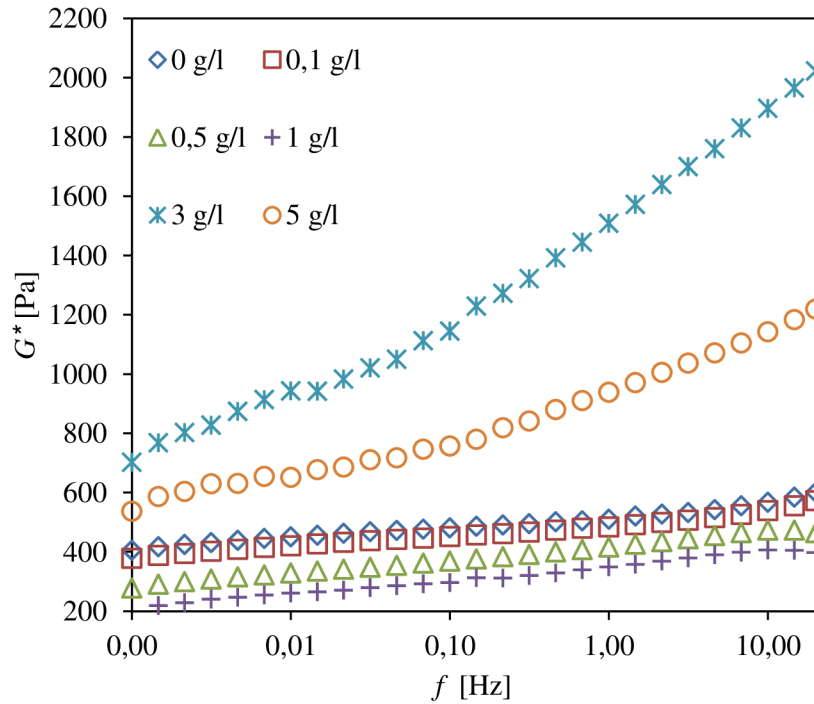
Příloha



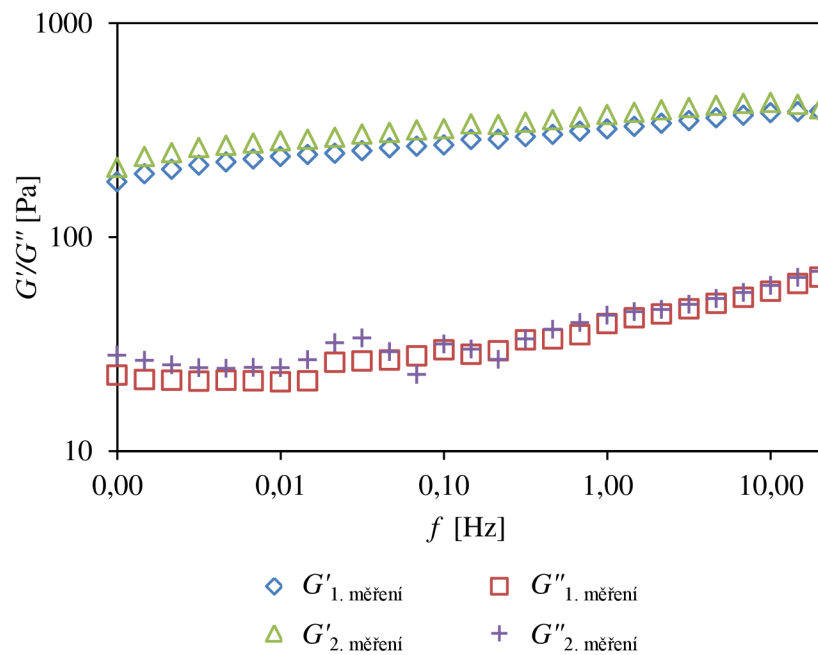
Obr. X1: Závislost elastického (G') modulu na amplitudě napětí u agarózo-želatinových gelů s koncentrací 0; 0,1; 0,5; 1; 3 a 5 g/l hyaluronanu o MW 600-800 kDa.



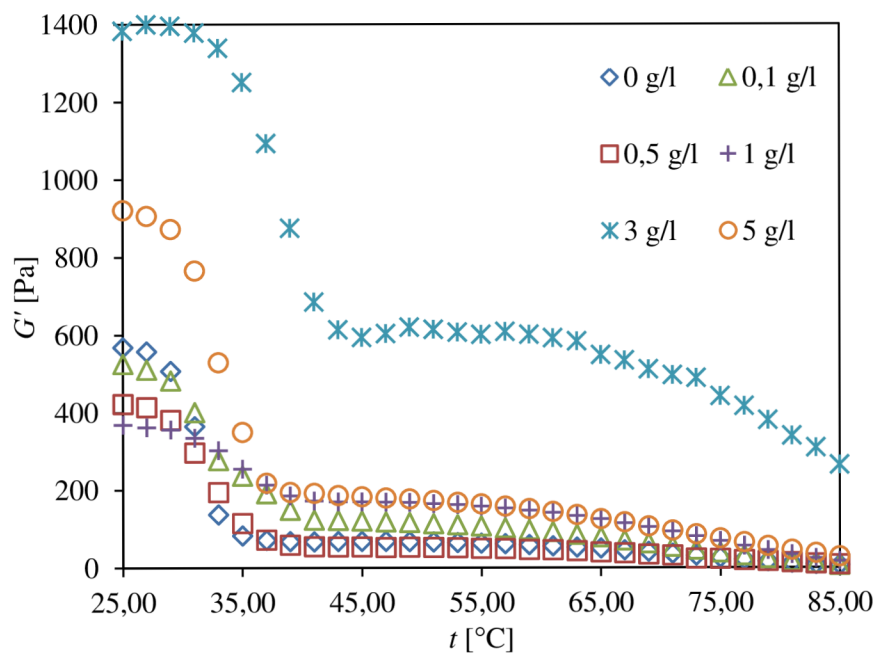
Obr. X2: Příklad reprodukovatelnosti závislosti elastického (G') a viskózního (G'') modulu na amplitudě napětí agarózo-želatinového gelu s přidávkou 1 g/l hyaluronanu o MW 250-450 kDa z 1. a 2. měření.



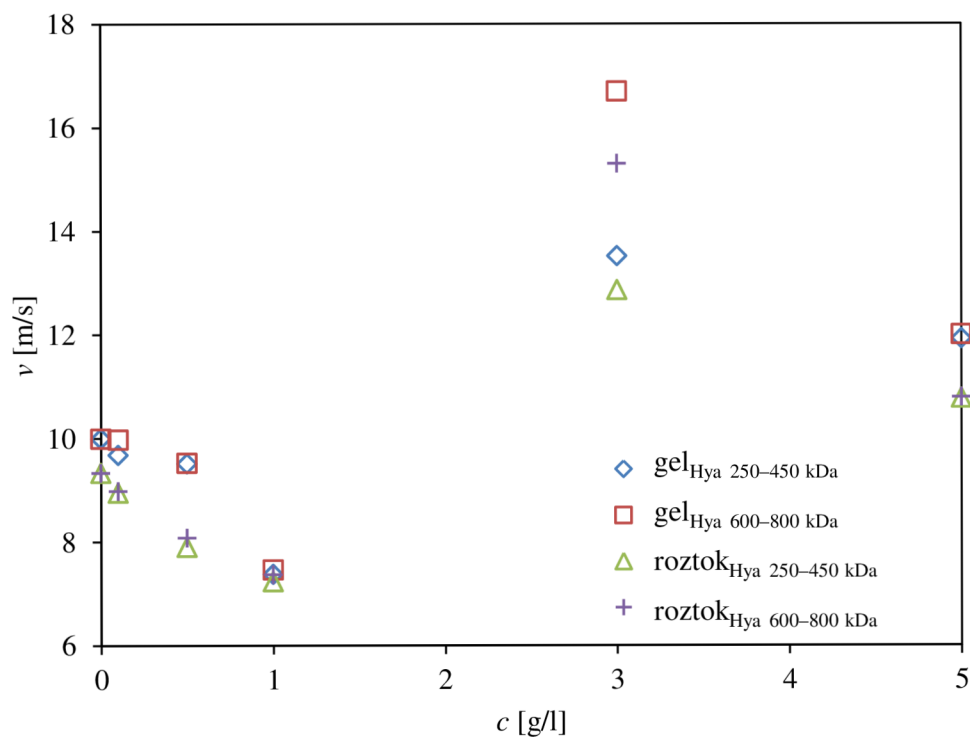
Obr. X3: Závislost komplexního (G^*) modulu na oscilační frekvenci u agarózo-želatinových gelů s koncentrací 0; 0,1; 0,5; 1; 3 a 5 g/l hyaluronanu o MW 600-800 kDa.



Obr. X4: Příklad reprodukovatelnosti závislosti elastického (G') a viskózního (G'') modulu na oscilační frekvenci agarózo-želatinového gelu s přidávkem 1 g/l hyaluronanu o MW 600-800 kDa z 1. a 2. měření.



Obr. X5: Závislost elastickeho (G') modulu teplotě 25-85 °C s krokem 2 °C u agarózo-želatinových gelů s koncentrací 0; 0,1; 0,5; 1; 3 a 5 g/l hyaluronanu o MW 600-800 kDa.



Obr. X6: Srovnání závislosti ultrazvukové rychlosti na koncentraci 0; 0,1; 0,5; 1; 3 a 5 g/l přidavku hyaluronanu o MW 250-450 a 600-800 kDa při $27,0 \pm 0,5$ °C naměřené pomocí HR-US 102 a HR-EX-SSC.