

# Chování hyaluronanu ve zředěných iontových roztocích

Iveta Balogová

---

Bakalářská práce  
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav fyziky a mater. inženýrství

akademický rok: 2013/2014

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Iveta Balogová**  
Osobní číslo: **T11593**  
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Materiálové inženýrství**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Chování hyaluronanu ve zředěných iontových roztocích**

Zásady pro vypracování:

Vzhledem k tomu, že byla zvolena rešeršní varianta bakalářské práce, jsou zásady pro její kvalitní sepsání následující:

1. Nejprve vypracujte rešerši zaměřenou na základní vlastnosti a chování hyaluronanu ve zředěných roztocích, kde je jediným rozpouštědlem demineralizovaná voda. Zaměřte se především na podstatu chování polymerních klubek z hlediska primární, sekundární a terciární struktury makromolekuly hyaluronanu.
2. Dále se zaměřte na iontové roztoky polysacharidů, zejména na ionty z Hofmeisterovy řady. V souvislosti s bodem (1) je třeba se zaměřit na interakce mezi ionty a hyaluronanem, jehož nadmolekulární struktura je určena především vodíkovými můstky a s nimi souvisejícím hydrofilním charakterem HA, ale také s hydrofobními doménami v polymerním řetězci.
3. Poslední část rešeršní práce by měla pojednávat o experimentálních metodách, které jsou pro studium zředěných roztoků polymerů zásadní.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. Kogan G. Šoltés, L., Stern R., Mendichi R. Hyaluronic acid: a biopolymer With versatile physico-chemical and biological properties. Chapter 31-Handbook 2007, ISBN:978-1-60021-652-0
2. Scott J.E., Cummings C., Brass A., Chen Y. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Biochem. J. 1991, 274, ps: 600-705
3. Laurent T.C., Laurent U.B.G., Fraser J.R.E. The structure and function of hyaluronan: An overview. Immun Cell Biol 1996, 74: A1-A7
4. Heatley F., Scott J. E.: A water molecule participates in the secondary structure of hyaluronan. Biochem. J. (1998) 254, 489-493
5. Scott J. E., Supramolecular organisation of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues. FASEB Journal, 6, 2639-2645

Vedoucí bakalářské práce:

**doc. Mgr. Aleš Mráček, Ph.D.**

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

**7. února 2014**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**30. května 2014**

Ve Zlíně dne 7. února 2014

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



  
doc. Mgr. Aleš Mráček, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně ..... 20.5.2014

Balogová I  
.....

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.



## **ABSTRAKT**

Kyselina hyaluronová HA je biopolymer složený z opakujících se disacharidových jednotek kyseliny D-glukoronové a N-acetyl-D-glukosaminu. Mezi její důležité vlastnosti patří spolupráce s membránovými proteiny a řízení transportu tekutin v organismu. Své uplatnění nachází v mnoha oblastech, jako např. v medicínském, farmaceutickém nebo kosmetickém průmyslu. Při použití čisté HA dochází k její degradaci a znečištění různými mikroorganismy. Přídavkem konzervačních látek je možné degradaci potlačit. Tyto konzervační látky zabraňují degradaci, ale zároveň způsobují změnu ve struktuře HA. Tyto změny ve struktuře je možné redukovat přídavkem iontů Hofmeisterovy řady. Tato bakalářská práce se zabývá vlivem iontů Hofmeisterovy řady na makromolekulární klubka hyaluronanu ve vodném roztoku.

Klíčová slova: Kyselina Hyaluronová, Hofmeisterova řada iontů

## **ABSTRACT**

Hyaluronic acid HA is a biopolymer which consists of repeated disaccharide subunits of D-glucuronic acid and D-N-acetylglucosamine. Important functions of HA include the cooperation with membrane proteins and the control of fluid transport in the organism. It is applied in many fields such as medical, pharmaceutical and cosmetic industry. The pure HA is during its use contaminated and degraded by various microorganisms, which can be prevented by adding conservants. However, these substances alter the acid's structure. It is possible to limit these structural changes by adding ions of the Hofmeister series. This bachelor thesis is aimed to examine the influence of these ions on macromolecular hyaluronan coils in the aqueous solution.

Keywords: Hyaluronic acid, Hofmeister serie

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce doc. Mgr. Aleši Mráčkovi, Ph.D. za jeho vedení a pomoc při tvorbě této bakalářské práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

ÚVOD.....	10
<b>I TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>11</b>
<b>1 KYSELINA HYALURONOVÁ.....</b>	<b>12</b>
1.1 HISTORIE.....	<b>CHYBA! ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.</b>
1.2 VLASTNOSTI KYSELINY HYALURONOVÉ.....	12
1.2.1 CD44.....	13
1.2.2 RHAMM.....	14
1.3 STRUKTURA KYSELINY HYALURONOVÉ.....	14
1.3.1 Molekulová hmotnost.....	15
1.3.2 Struktura kyseliny hyaluronové v roztoku.....	15
1.3.3 Viskozita roztoků kyseliny hyaluronové.....	19
1.4 VÝSKYT KYSELINY HYALURONOVÉ.....	20
1.4.1 Extracelulární matrix EM.....	21
1.5 FUNKCE KYSELINY HYALURONOVÉ A JEJÍ SODNÉ SOLI.....	22
1.5.1 Inhibitor narušení membrány červených krvinek.....	22
1.5.2 Spolupráce hyaluronanu s membránami.....	22
1.5.3 Hyaluronan ve sklivci oka.....	23
1.5.4 Hyaluronan ve tkáních.....	24
1.6 VYUŽITÍ KYSELINY HYALURONOVÉ.....	24
1.7 METABOLISMUS KYSELINY HYALURONOVÉ.....	25
<b>2 HOFMEISTEROVA ŘADA IONTŮ.....</b>	<b>27</b>
2.1 HISTORIE HOFMEISTEROVY ŘADY.....	27
2.2 INTERAKCE IONTŮ HOFMEISTEROVY ŘADY S PROTEINY.....	28
2.3 INTERAKCE IONTŮ HOFMEISTEROVY ŘADY S POLYMERY.....	29
2.4 INTERAKCE IONTŮ HOFMEISTEROVY ŘADY S KYSELINOU HYALURONOVOU.....	30
<b>3 METODY STUDIA ZŘEDĚNÝCH ROZTOKŮ HYALURONANU.....</b>	<b>33</b>
3.1 VISKOZIMETRIE.....	33
3.1.1 Viskozita.....	33
3.1.2 Viskozita disperzních systémů s kapalným disperzním prostředím.....	34
3.1.3 Viskozita roztoků lineárních makromolekul a jejich molární hmotnost.....	35
3.1.4 Metody měření viskozity.....	35
3.1.4.1 Kapilární metoda.....	35
3.1.4.2 Metoda padající kuličky.....	37
3.1.4.3 Rotační viskozimetr.....	38
3.1.5 Závislost viskozity na smykové rychlosti u kyseliny hyaluronové.....	38
3.1.6 Vliv iontů Hofmeisterovy série na viskozitu kyseliny hyaluronové v závislosti na teplotě.....	39
3.2 POVRCHOVÉ NAPĚTÍ.....	39
3.2.1 Metody měření povrchového napětí.....	39
3.2.1.1 Statické metody.....	40
3.2.1.2 Semistatické metody.....	43
3.2.1.3 Dynamické metody.....	44
3.2.2 Vliv iontů HS na povrchové napětí hyaluronanu.....	44



<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>46</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>47</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>51</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>53</b>

## ÚVOD

Kyselina hyaluronová je polymer, který se řadí do skupiny glykosaminoglykanů. V její struktuře se opakují disacharidové jednotky v poměru 1:1. Každá disacharidová jednotka je složena z kyseliny D-glukoronové a N-acetyl-D-glukosaminu. Na řetězci HA se vyskytují polární a nepolární části. Důsledkem toho je skutečnost, že molekula HA vytváří v roztoku statistická klubka, jejichž tuhost je dána přítomností vodíkových vazeb. Tuhost polymerních klubek HA má za následek skutečnost, že jsou tyto klubka schopné v sobě udržet obrovské množství vody, a to až tisícinásobek své hmotnosti, proto má HA hydratační účinky. Molekulová hmotnost HA se liší tím, z jakého zdroje byla získána, a také jakým způsobem. Pohybuje se okolo statisíců až několika milionů Daltonů, nicméně nejčastější velikost je mezi dvěma až pěti miliony Daltony. Jedna disacharidová jednotka může mít molekulovou hmotnost kolem čtyři sta Daltonů. V roztocích, ve kterých je HA obsažena o vysokých koncentracích nebo vyšší molární hmotnosti, je možné pozorovat extrémně vysokou závislost viskozity na smykové rychlosti. Se zvyšující se koncentrací HA v roztoku nebo při rostoucí molární hmotnosti této kyseliny přechází HA z newtonského na nenewtonské.

Kyselina hyaluronová v čistém stavu degraduje, a je velmi brzy znečištěna různými mikroorganismy. Tato degradace může být potlačena přidavkem konzervačních látek, mezi které patří např. benzalkonium chlorid, který je antibakteriální a působí proti plísním. Nicméně tyto látky způsobují změnu struktury HA. Přídavkem iontů Hofmeisterovy řady budou tyto změny potlačeny.

Cílem této bakalářské práce je popsat vzájemnou interakci mezi ionty Hofmeisterovy řady a kyselinou hyaluronovou. Chování hyaluronových klubek může být popsáno pomocí difúzního procesu botnání, nebo z pohledu viskozimetrie, popř. měřením povrchového napětí.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 KYSELINA HYALURONOVÁ

## 1.1 Historie

V roce 1934 Karl Mayer a John Palmer izolovali z očního sklivce hovězího dobytka dosud neznámou látku, kterou dnes známe jako kyselinu hyaluronovou. Název kyselina hyaluronová se skládá ze dvou slov, z řec. hyalos (= sklo) a z angl. uronic acid (= uronová kyselina). Neznámou byla z toho důvodu, že na rozdíl od jiných glykosaminoglykanů (např. heparin) se v její struktuře nenacházel žádný sulfoester, celková délka jejího řetězce je větší a neváže se na proteinové jádro.

V roce 1950 byla Karlem Mayerem podrobně popsána chemická struktura kyseliny hyaluronové. Díky tomu se zjistilo, že se tato látka v organismu vyskytuje nejčastěji jako sodná, popř. jiná sůl této kyseliny, je známa spíše jako hyaluronan nebo hyaluronát. V roce 1986 byl zásluhou E. Balazse termín hyaluronan zařazen do mezinárodního názvosloví sacharidů. Kyselina hyaluronová se původně získávala z kohoutích hřebínků nebo pupeční šňůry. Takto získaná HA měla vysokou molární hmotnost. Díky tomu byla vynaložena velká snaha o to, aby se HA získávala průmyslově. Toto průmyslové získávání se provádělo tak, že se zmrazily kohoutí hřebínky nebo pupeční šňůra. Poté byla odstraněna jejich buněčná stěna, ve které se HA nachází. Dále proběhla extrakce vodou a HA byla nakonec vysrážena organickými rozpouštědly (např. etanolem).

V současné době se HA stále získává z kohoutích hřebínků nebo z lidské pupeční šňůry, avšak nejčastěji se zhotovuje pomocí biotechnologické výroby. Provádí se fermentací bakterie *Streptococcus zooepidemicus* nebo *Streptococcus equi*. Tyto bakterie mají na svém obalu kyselinu hyaluronovou, která je velmi čistá. Molární hmotnost HA z bakterie *Streptococcus equi* je nižší, než když je získána kvašením *Streptococcus zooepidemicus* [1-4].

V České republice se kyselina hyaluronová vyrábí ve firmě Contipro Biotech s.r.o. v Dolní Dobrouči [5].

## 1.2 Vlastnosti kyseliny hyaluronové

Kyselina hyaluronová je nesulfátovaný glykosaminoglykan. Je důležitou součástí mezibuněčné hmoty pojivové tkáně. Nejvíce se nachází ve vazbě se sodíkem (hyaluronát sodný). Lidské tělo o hmotnosti 70 kg obsahuje zhruba 15 g HA, přičemž dochází k jejímu neustálému obnovování v těle.

Aktivně se účastní imunologických procesů jako signální molekula, zároveň má vliv na pohyb a přilnavost buněk při jejich množení a diferenciaci do jednotlivých typů, vzhledem k jejich příslušnému funkčnímu uplatnění. Má dobré viskoelastické vlastnosti.

Díky své chemické struktuře má schopnost na sebe vázat vodu, může tedy dobře hydratovat tkáň [6]. Zhruba 50% celkového obsahu HA v lidském těle se nachází v pokožce, která je díky tomu dostatečně hydratována. Přispívá k optimální organizaci pojivové tkáň v místě poranění, čímž urychlí proces hojení až o 70%. Podporuje tvorbu kolagenu [7].

Kyselina hyaluronová je přírodním antioxidantem. V našem těle probíhají různé chemické reakce, díky kterým vznikají volné radikály. Volné radikály jsou elektricky nabití ionty, které způsobují nerovnováhu při symbióze buněk. Tímto mohou vyvolat např. rakovino-tvorné bujení. HA jakožto antioxidant, pomáhá v boji při zhašení radikálů.

Společně s kolagenem vytvářejí kombinaci, která pomáhá při léčbě tkání, poškozené a stár-noucí pokožky. Podílí se na ochraně kůže před vnějšími vlivy. Způsobuje pevnost a pružnost pokožky. Zabraňuje vzniku strií, jizev a vrásek, je schopna odstranit i starší, výraznější vrásky. Urychluje hojení popálenin. Zlepšuje průchodnost mazových žláz. Má dobré lubri-kační vlastnosti, kterými tlumí nárazy a zabraňuje tření mezi klouby [8].

Existuje několik typů receptorů, které jsou v buněčných membránách specifických pro HA:

- CD44
- RHAMM (HA receptor, který zajišťuje buněčný pohyb)
- LYVE-1 (HA receptor, který se nachází na endotelu lymfatických cév)
- HARE (HA receptor zajišťující endocytózu)
- Layilin
- Toll-like receptor 4 (TLR4)

Zatím mezi nejlépe popsané patří CD44 a RHAMM. Předpokládá se, že ovlivňují migraci nádorových a zánětlivých buněk. Mají vliv na jejich proliferaci, adhezivitu a invazivitu [6].

### 1.2.1 CD44

Jedná se transmembránový glykoprotein, na který se váže HA. Vyskytuje se na leukocytech, endotelu, parenchymových a epiteliálních buňkách. Existuje minimálně 17 jeho izoform. CD44 má dvě důležité funkce, slouží jako receptor pro HA, a také jako zprostředkovatel

vyzrávání, adheze a přestupu aktivovaných T-lymfocytů z krevního řečiště do místa zánětu. Koordinuje signály pro buněčné přežívání a smrt.

V místě, kde vznikne infekce, poranění, nebo zánět dochází k uvolnění cytokinů, díky kterým se HA uvolní také na povrchu endoteliálních buněk přilehlých cév. K těmto cévám je HA přichycena pomocí CD44 [6].

### 1.2.2 RHAMM

Na rozdíl od CD44 se nejedná o transmembránový protein. Na membránu je napojen zvenčí, proto může dobře interagovat s přítomnými glykosaminoglykany. Urychluje G2 a M fázi buněčného cyklu. Podporuje tvorbu nových cév [6].

## 1.3 Struktura kyseliny hyaluronové

HA je mukopolysacharid, lineární glykosaminoglykan, ve kterém se opakují disacharidové jednotky v poměru 1:1. Každá disacharidová jednotka se skládá z uronové kyseliny a aminocukru. Uronovou kyselinou je  $\beta$  (1,3)-D-glukoronová kyselina a aminocukrem je  $\beta$  (1,4)-N-acetyl- D-glukosamin, jsou mezi sebou navzájem propojené glykosidickými vazbami. Na rozdíl od ostatních glykosaminoglykanů, které se nacházejí v mezibuněčné hmotě (např. chondroitin nebo heparin), neobsahuje sulfátovou skupinu [6].

Velikost řetězců HA se pohybuje od 0,2 do 10 MDa, nicméně nejčastější velikost je mezi dvěma až pěti MDa [6]. Opakujících se disacharidových jednotek může být v celé molekule hyaluronanu až 10 000 i více, přičemž jedna disacharidová jednotka může mít molekulovou hmotnost kolem 400 Da. Průměrná délka jednoho disacharidu je 1 nm, takže výsledná molekula hyaluronanu, skládající se z až 10 000 disacharidových jednotek, se může protáhnout až na 10  $\mu$ m [9].

Ve vodném prostředí nebo za fyziologických dochází u HA k disociaci COOH skupin. V této fázi může na sebe navázat kationty (např.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) za vzniku soli této kyseliny [3].

Monovalentní ionty mohou vytvářet vazby pouze s jednou skupinou  $\text{COO}^-$ , zatímco divalentní se dvěma. V důsledku toho divalentní ionty vytvářejí větší domény v rámci jednoho řetězce [4].

Jedním z parametrů pro popis řetězce makromolekuly HA je záporný logaritmus disociační konstanty pK. Hodnoty pK všech funkčních skupin v rámci jednoho řetězce se navzájem ovlivňují [3].

### 1.3.1 Molekulová hmotnost

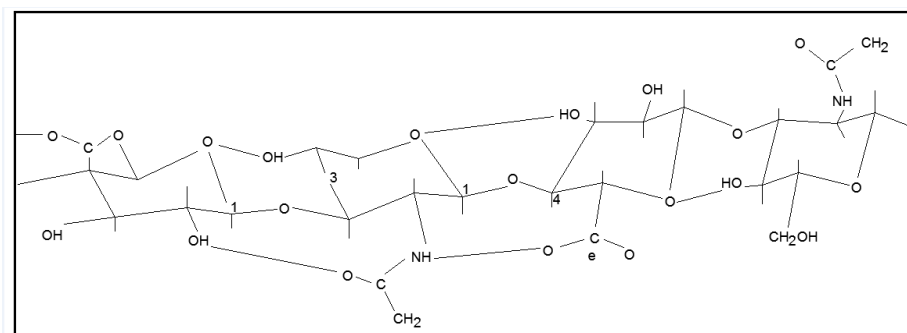
Molekulová hmotnost HA je ovlivněna tím, jakým způsobem je HA získána, a také z jakého je zdroje. Např. z lidské pupeční šňůry byla metodou rozptylu světla zjištěna  $M_r$  až  $3,4 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ , zatímco z kohoutích hřebínků metodou ultracentrifugace až  $1,2 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Existuje mnoho technik měření pro zjištění molární hmotnosti. Např. metodou rozptylu světla nebo osmometrií, metodou ultracentrifugace, nejčastější jsou však viskozimetrická měření [3].

### 1.3.2 Struktura kyseliny hyaluronové v roztoku

Ve fyziologickém roztoku je tuhost struktury HA dána chemickou strukturou disacharidu (omezená rotace kolem interglykosidických vazeb), vnitřními vodíkovými vazbami a vzájemnou interakcí hyaluronanu s rozpouštědlem.

Na řetězci HA se nacházejí COOH skupiny, které v roztoku disociují. Díky tomu se HA ve vodných roztocích chová jako záporně nabitý polyelektrolyt. Je schopná na sebe vázat kladné ionty nezávisle na jejich mocenství. Stupeň disociace ovlivňuje konformaci, tvar, stupeň hydratace i rozměry řetězce HA. Stupněm disociace je myšleno, jaký počet disociovaných COOH skupin se na řetězci nachází. Stupeň disociace závisí na iontové síle, pH, přítomnosti iontů s kladným nábojem a na teplotě. Hodnota pK HA ve vodném roztoku se nachází v intervalu od 3,45 (pro čistou vodu) do 2,95 (v 0,2 M NaCl). Hodnoty jsou závislé na koncentraci elektrolytu [3].

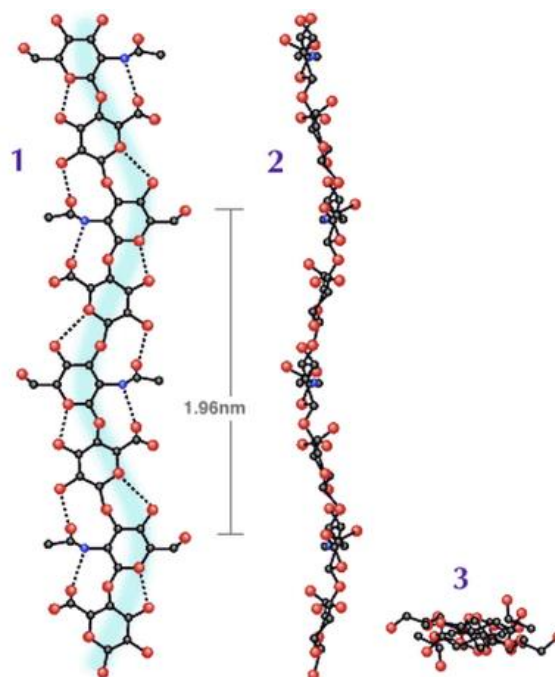
Primární struktura kyseliny hyaluronové je tvořena opakujícími se disacharidovými jednotkami  $\beta$  (1,3)-D-glukoronové kyseliny a  $\beta$  (1,4)-N-acetyl- D-glukosaminu, mezi sebou navzájem propojenými glykosidickými vazbami  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) a  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), přičemž mezi každými sousedícími disacharidovými jednotkami jsou vodíkové vazby. Počet těchto jednotek na řetězci HA může být 100 000 i více [9-10].



**Obrázek 1: Primární struktura kyseliny hyaluronové [3].**

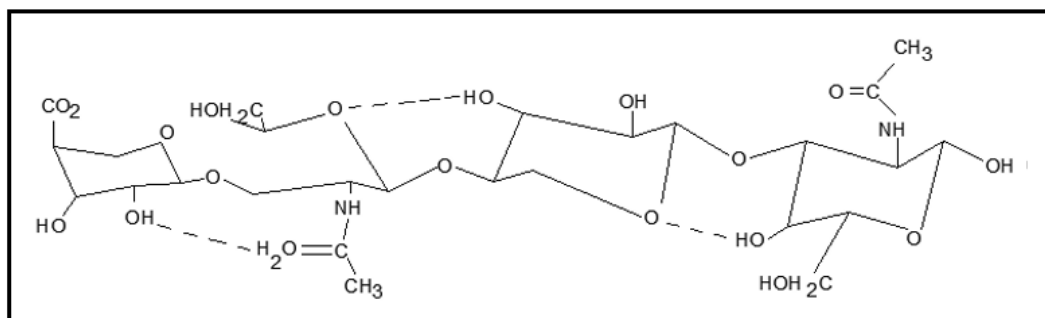


Hydrofobní část molekuly je možno určit až v rámci sekundární struktury, která je podélně tvořena vodíkovými atomy z osmi CH skupin, které se střídají po stranách molekuly. Sekundární struktura je tvořena dvakrát stočenou šroubovicí (v rámci jedné tetrasacharidové jednotky), přičemž každá disacharidová jednotka je stočená vůči těm ostatním o  $180^\circ$ , tetrasacharidové jednotka stočená celkově o  $360^\circ$  [10].

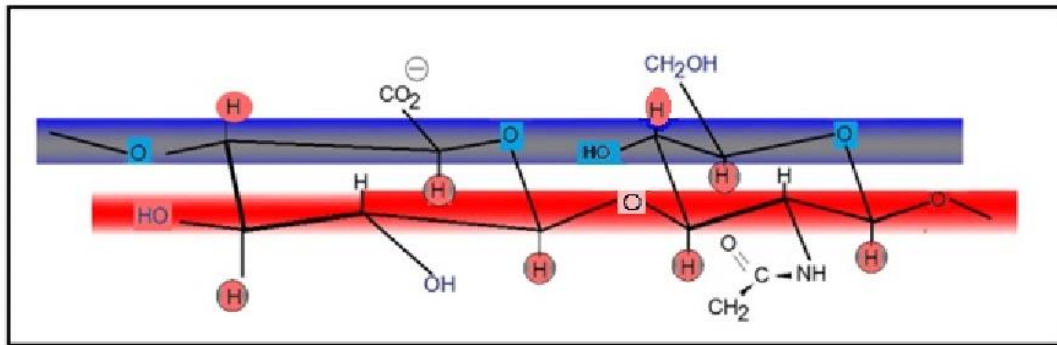


**Obrázek 2: Sekundární struktura kyseliny hyaluronové. Modré kuličky označují *N*-acetylglukosamin. U části 1 a 2 je možné vidět dvakrát stočený řetězec HA. Část 3 představuje pohled podél dvakrát stočeného řetězce [11].**

Osové atomy vodíku ve struktuře HA představují nepolární a hydrofobní část, zatímco vnější části řetězce jsou polární a hydrofilní. Stočení řetězce je dáno přítomností vodíkových vazeb [9].



**Obrázek 3: Sekundární struktura kyseliny hyaluronové, čárkovanou čarou jsou zaznačeny vodíkové vazby [6].**



**Obrázek 4: Polární (červená barva) a nepolární (modrá barva) části řetězce HA [9].**

Důsledkem výskytu polární a nepolární části na řetězci HA je skutečnost, že molekula HA vytváří v roztoku statistická klubka (obr. č. 5), jejichž tuhost je dána přítomností vodíkových vazeb. Díky této tuhosti může uvnitř svých klubek udržet obrovské množství vody, a to až tisícinásobek své hmotnosti [2-3, 9]. Statistická klubka HA zaujímají v roztoku velký objem, nicméně opravdová hmotnost pro daný objem je velmi nízká  $\sim 0,1\%$  (hmotnost/objem). Hodnota poměru hmotnosti a objemu bude klesat rostoucím zředěním [9].



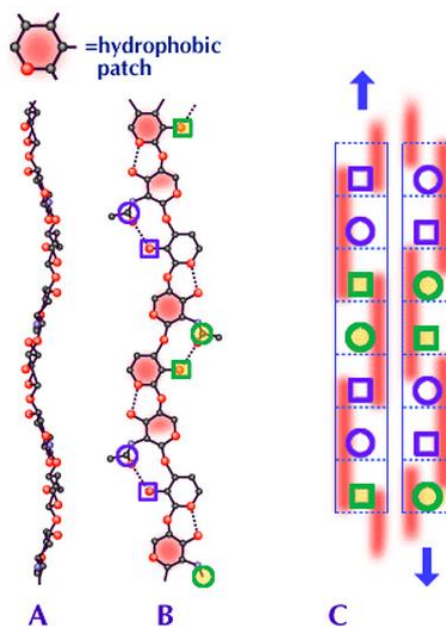
**Obrázek 5: Fotografie z elektronového mikroskopu znázorňující vzájemné propletení řetězců kyseliny hyaluronové [9].**

Hydrofobní části mají obrovský vliv na chování řetězců HA ve vodním prostředí. Dochází totiž k tomu, že se hydrofobní molekuly ve vodě shlukují dohromady a zmenší se jejich povrch. Tento mechanismus řídí tvar membrán a přispívá ke stabilitě např. dvojité šroubovice DNA [11].

Terciální struktura je stabilizována mezimolekulárními vazbami [6]. Řetězce hyaluronanu se dokážou spolu shlukovat, a vytvářet tzv. agregáty. Jejich výsledkem jsou rozsáhlé hyaluronové sítě, tzv. matrice HA. Napomáhá tomu spojování hydrofobních částí řetězců. K tomuto spojení může dojít jen mezi antiparalelními řetězci, tzn., jsou stejné, ale protisměrně

orientované. Důsledkem toho je, že co je možné na jednom z řetězců, to je také možné na tom druhém, který je spojen k tomu prvnímu. Agregáty mohou růst z obou stran.

Vzhledem k tomu, že HA tvoří ve vodném roztoku záporný polyelektrolyt, tak by se jednotlivé řetězce měly odpuzovat, a vézt spíše k disociaci agregátů. Proto zde působí také hydrofobní interakce a vodíkové vazby mezi acetamidovou a karboxylovou skupinou [11].



**Obrázek 6: Hydrofobní části HA. Znázornění acetamidových a karboxylových skupin [11].**

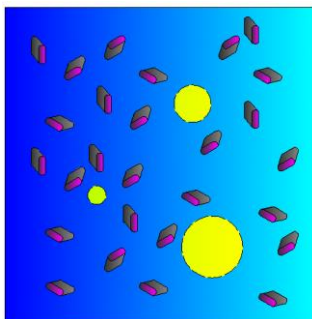
Na obr. č. 6 je možno u části A a B vidět molekulu HA. Červené oblasti u části B představují hydrofobní oblasti, které se nacházejí podél třech jednotek HA (tzn. disacharid HA, a k němu přidaná ještě glukoronová kyselina z další, následující disacharidové jednotky) na polymerním řetězci. Kroužky reprezentují acetamidovou skupinu, čtverečky představují skupinu karboxylovou. Část C je schéma znázorňující boční pohled dvou řetězců HA, které jsou vůči sobě antiparalelní. Čárkované čáry oddělují každou sacharidovou jednotku HA. Modré kroužky a čtverečky (B a C) jsou na stejné straně řetězce, zatímco zelené ne. Dvojitě stočení řetězce, které je možné vidět u částí A a B platí i pro část C, která je složená ze dvou antiparalelních řetězců. Tyto dva antiparalelní řetězce jsou stejně stočeny, jako je u části A a B, proto nemají problém při agregaci do sebe zapadnout. Mezi acetamidovou a karboxylovou skupinou se nacházejí vodíkové vazby. Tyto vazby je možné vidět na části B, kde jsou vyznačeny tečkovaně [11].

Agregace řetězců HA je výsledkem interakce mezi hydrofobními částmi řetězců a interakcí vodíkových vazeb mezi acetamidovými a karboxylovými skupinami [10].

Molární hmotnost kyseliny hyaluronové ovlivňuje stupeň zesíťování. S rostoucí molární hmotností roste velikost sítí, tyto sítě mají hexagonální tvar. K tvorbě sítí může docházet i při nižší molární hmotnosti HA, ale jsou od sebe vzájemně oddělené.

Interakce, které způsobují soudržnost sítí hyaluronanu jsou docela slabé, proto bude tvar sítí nebo jejich disociace záviset např. na teplotě. Při vyšší koncentraci hyaluronanu dochází ke zpevňování vazeb mezi sítěmi. Tvary hyaluronanu v rámci sekundární struktury ovlivňují tvary sítí [11].

Difúze objemnějších částic (např. proteiny) skrz síť HA je velmi omezena. Tento jev je dán různou velikostí otvorů v síti, skrz které mohou dané částice procházet [9].

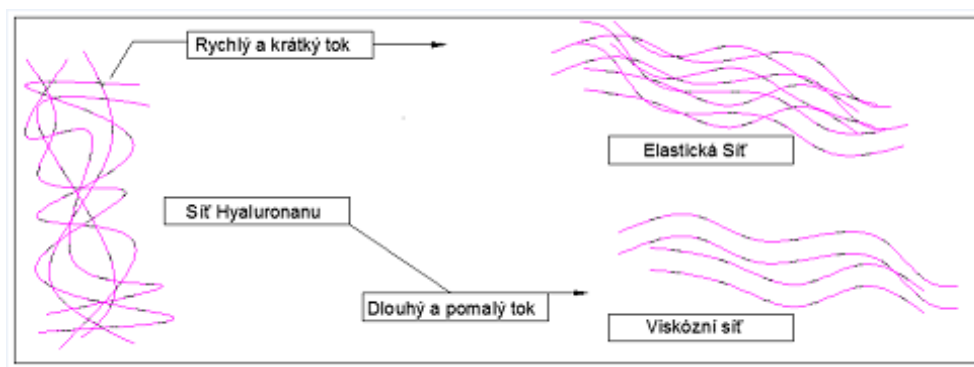


*Obrázek 7: Odlišnost velikosti otvorů v síti HA, jimiž difundují částice [9].*

### 1.3.3 Viskozita roztoků kyseliny hyaluronové

Původně lineární řetězce HA se v roztoku zaplétají a vytvářejí statistická klubka, která se navzájem proplétají do sebe, a to už při nízkých koncentracích této kyseliny. Důsledkem toho je neobvyklé chování HA z pohledu reologie. Extrémně vysokou závislost viskozity na smykové rychlosti je možné pozorovat u roztoků, v nichž je obsažena HA o vysoké koncentraci nebo vyšší molární hmotnosti. Na základě výše popsaných vlastností lze říct, že je HA díky svému reologickému chování pseudoplastický materiál, tj. s rostoucím napětím se její viskozita zmenšuje [12]. Se zvyšující se molární hmotností, koncentrací nebo smykovou rychlostí přechází HA z newtonského chování na neneutronské. Se zvyšující se koncentrací HA v roztoku nebo při rostoucí molární hmotnosti této kyseliny roste také viskoelasticita roztoku. Viskoelasticita HA ve vodném roztoku závisí na pH a je ovlivněna iontovou silou prostředí, ve kterém se právě nachází. HA má hodnotu pK asi 3,0, a proto změna pH bude mít velký vliv na rozsah ionizace HA řetězců. Změna ionizace řetězců HA ovlivňuje vzájemné mezimolekulární interakce mezi molekulami HA a v důsledku toho se mění i reologické vlastnosti celého roztoku kyseliny hyaluronové [10].

Pokud jsou sítě HA vystaveny rychlému a krátkému trvání toku kapaliny, působí na ně smykové napětí, což způsobuje elastické vlastnosti těchto sítí. Naopak při pomalém a dlouhém toku kapaliny skrz síť bude docházet k postupnému rozdělování sítí na jednotlivé řetězce, které se navíc ještě začnou narovnávat. Existují způsoby, jak vytvořit příčné kovalentní vazby mezi sítěmi HA. Jejich cílem je vytvořit stabilní molekulovou síť, která bude vykazovat viskoelastické vlastnosti [9].



**Obrázek 8: Viskózní a elastické vlastnosti hyaluronanu [9].**

#### 1.4 Výskyt kyseliny hyaluronové

Kyselina hyaluronová je důležitou součástí mezibuněčné hmoty (extracelulární matrix EM). Nejčastěji vytváří chemickou vazbu se sodíkem za vzniku hyaluronátu sodného. Nejvíce se nachází v těle obratlovců, nicméně lze ji najít i v buněčné stěně některých prokaryot, jako např. *Streptococcus* nebo *Pasteurella*. Najdeme ji také ve slizovitých obalech některých organismů. Nachází se v pojivových, epitelálních a nervových tkáních. Lze ji také najít v očním sklivci nebo synoviální (nitrokloubní) tekutině, kde díky svým viskoelastickým vlastnostem slouží jako lubrikant. Tím, že se nachází mezi klouby, zabraňuje jejich tření, tlumí nárazy a zpomaluje degradaci chrupavky. Nejvíce se na její tvorbě v těle podílejí fibroblasty, keratinocyty a chondrocyty. Významná místa výskytu hyaluronátu v lidském těle jsou znázorněna v tabulce č. 1 [6].

**Tabulka 1: Výskyt hyaluronátu v lidském těle [6].**

Lokalizace	Množství HA	Biologický poločas	Molekulová hmotnost
Mezibuněčná hmota	> 2,5 g/l	Hodiny až týdny	Vysoká
Pupečník	2-4 g/l	Hodiny	Vysoká
Synoviální tekutina	2-4 g/l	----	----
Lymfa	< 10 mg/l	Minuty	Různá
Sérum	0,01-0,10 mg/l	Minuty	Různá

### 1.4.1 Extracelulární matrix EM

Každá buňka má na svém povrchu specifické proteiny. Díky nim je schopna vzájemné adherence (přilnavosti) buněk, komunikace a shlukování ostatních buněk do tkání.

Tkáně jsou složeny z buněk. Na povrchu buněk je hmota, která propojuje různé tkáně dohromady, udržuje jejich tvar, je schopná přenášet pohyb a postarat se o přísun živin a vody. Tuto hmotu nazýváme extracelulární matrix (EM).

Pojivová tkáň je složena především z EM, která není umístěna v buňkách, ale je jimi pouze produkována. Pojivovou tkáň tvoří hlavně fibroblasty.

Funkce a vlastnosti tkání jsou dány fyzikálními vlastnostmi EM. Nejtvrdší EM mají kosti, a především zuby, protože jsou v EM uloženy vápenaté soli. V pojivových tkáních kůže a v chrupavce je EM pórovitá, zatímco v šlachách pružná. V krvi je tvořena tekutou krevní plasmou. Počet rozpustných a nerozpustných částí ovlivňuje vlastnosti a strukturu EM.

Extracelulární matrix funguje jako informační systém, díky kterému mohou buňky detekovat, vytvářet nebo řídit chemické signály. Signály jsou z extracelulární hmoty přenášeny do nitra buňky pomocí transmembránových receptorů. Typickým příkladem transmembránových receptorů jsou integriny.

EM tvoří překážku pronikajícím mikroorganismům, podporuje vstup živin do buněk, nebo výstup metabolitů, podporuje hojení zánětů nebo defektů.

EM se skládá převážně z těchto makromolekul:

- (1) glykosaminoglykanů a proteoglykanů – způsobují gelovou strukturu pojivových tkání
- (2) fibrózních proteinů (např. kolageny-zapříčiňují pevnost a elastiny- způsobují pružnost)
- (3) multiadhezních molekul (např. fibronectin, nidogen nebo laminin) – díky nim může EM vytvořit spojení s buňkami [13]

## 1.5 Funkce kyseliny hyaluronové a její sodné soli

Funkce kyseliny hyaluronové je silně ovlivněna její molární hmotností a konformací. Fyziologické funkce HA v organismech jsou ovlivněny jejími fyzikálními a chemickými vlastnostmi. Jednou z jejích důležitých funkcí je, že reguluje vzájemné interakce mezi polymerem a rozpouštědlem, což ve výsledku znamená, že ovlivňuje transport tekutin v organismu. Podílí se na distribuci plazmových proteinů mezi vnitřkem a vnějškem cév. Ovlivňuje transportní děje v tkáních. Nachází se v synoviální tekutině, kde funguje především jako lubrikant [3].

HA se díky své viskoelasticitě podílí na ochraně organismu a udržování celistvosti živých tkání, jako je např. kloubní chrupavka, kůže nebo oční sklívec [14]. Zajišťuje ochranu tkání proti různým infekcím, a je také důležitým antioxidantem.

V průběhu stárnutí se snižuje koncentrace HA v pokožce. V důsledku tohoto jevu dochází k dehydrataci pokožky, která poté ztrácí svou pevnost, pružnost a poddajnost, což vede k jejímu postupnému zvrásňování [7].

### 1.5.1 Inhibitor narušení membrány červených krvinek

Hyaluronan funguje jako možný inhibitor (zpomalovač) při prasknutí červených krvinek roztržením buněčné membrány. K roztržení dojde v případech, kdy se jedná o denaturovanou formu (pozměněná struktura). Pokud je hyaluronan připraven při nízkých teplotách, nemá schopnost inhibice. Nicméně zahřátím na 100°C a následným prudkým ochlazením dojde k přechodu do denaturované formy. Hyaluronan se tímto stává silným inhibitorem. Pokud dojde k zahřátí na 100°C, a následné ochlazování je pozvolné, struktura má dostatečný čas na renaturaci. Hyaluronan je poté velmi slabým inhibitorem, zvyšuje flexibilitu membrány červených krvinek a urychluje tok lymfy v průběhu absorpce tuků z tenkého střeva [11].

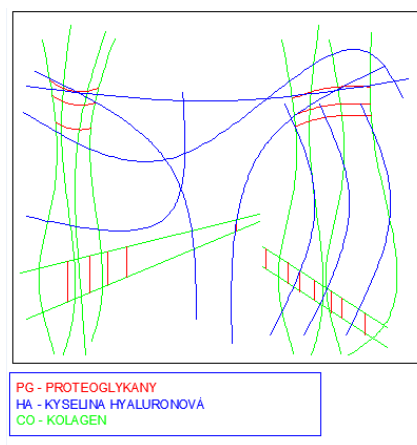
### 1.5.2 Spolupráce hyaluronanu s membránami

Spousta biologických rolí hyaluronanu závisí na jeho schopnosti interagovat s membránovými proteiny. Hyaluronan je transportní molekula, která je schopná přenášet látky skrz buněčnou membránu. Tyto transportéry mají hydrofobní a hydrofilní vlastnosti, které se liší podle toho, zdali se jedná o přenos dovnitř nebo směrem ven z buňky [11].



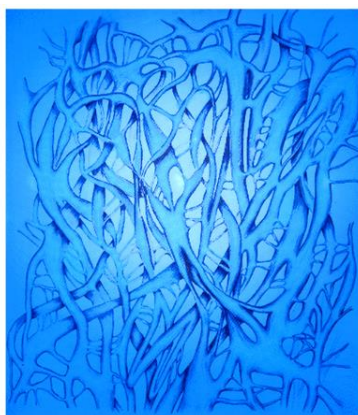
### 1.5.3 Hyaluronan ve sklivci oka

Sklivec je stabilní gel, který u lidí nebo u některých zvířat obsahuje hyaluronan. Pouze vysokomolekulární hyaluronan v koncentracích 2 mg/ml odpovídá koncentraci hyaluronanu ve sklivci a nenachází se ve formě hyaluronanu. Tvrdost struktury hyaluronanu ve tkáních je zvyšována začleněním řídkých sítí tenkých kolagenových fibril. Existují dvě možná uspořádání hyaluronanu a kolagenu ve sklivci. Základní struktura sklivce je složena ze tří částí: Z hyaluronanu, fibril kolagenu a glykosaminoglykanu (např. chondroitin sulfát) [11].



**Obrázek 9: Schéma znázorňující tříložkovou strukturu sklivce – hyaluronanu, fibril kolagenu a proteoglykanů [11].**

Proteoglykany spojují fibrily kolagenu prostřednictvím specifických vazeb. Struktura proteoglykanů je udržována odděleně díky hyaluronovým sítím, které interagují s chondroitinem sulfátem (proteoglykan) [11].



**Obrázek 10: Síť hyaluronanu nacházející se ve sklivci při koncentraci 1-4 mg/ml [11].**

Pokud je hyaluronan štěpen hyaluronidázou, fibrily kolagenu začnou spolu agregovat a vytvoří sraženinu. Tento problém postihuje osoby staršího věku, a jedince, kteří trpí krátkozrakostí. Zároveň s agregací probíhá zkapalnění určité části sklivce, zejména ve střední části. Vědecky bylo prokázáno mnoho spojitostí mezi procesem stárnutí a enzymatickou degradací hyaluronanu ve sklivci.

Při nižší koncentraci hyaluronanu nejsou jeho řetězce už tak dlouhé na to, aby se dokázaly spojit se sousedními řetězci, a vytvořit agregát. Přítomnost hyaluronanu o nižší molární hmotnosti způsobuje degradaci elastických a viskózních vlastností, které by v případě roztohu hyaluronanu o vyšší molární hmotnosti zůstaly. Degradace hyaluronanu zhoršuje funkčnost sklivce oka [11].

#### 1.5.4 Hyaluronan ve tkáních

V hyalinní chrupavce je hyaluronan obsažen při koncentraci 1 mg/g, což je dost na to, aby mohl vyplnit objem tkáně při nedostatku ostatních složek.

Menší koncentraci hyaluronanu je možné najít také ve formě sítí v mnoha pojivových tkáních, kde se nachází v blízkosti buněk hladkého svalstva v aortě, nebo se vyskytuje v blízkosti fibroblastů, kde je součástí dermis pokožky. V těchto tkáních tvoří hyaluronan něco jako „lešení“ pro vytvoření vazby s chondroitinem sulfátem, což je proteoglykan, který společně s hyaluronanem formuje síť v těchto tkáních.

Největší množství hyaluronanu je obsaženo v kožní tkáni člověka, a to v dermis a epidermis. Průměrné množství u dospělého člověka činí 7-8 g, což odpovídá 50% celkového množství v těle. V dermis je obsaženo 0,5 mg/g, a v epidermis se nachází 0,1 mg/g [9].

### 1.6 Využití kyseliny hyaluronové

Kyselina hyaluronová je díky svým dobrým viskoelastickým vlastnostem využívána v oční chirurgii, plastické chirurgii, při artroskopických operacích a terapii močové inkontinence. Zároveň působí jako prevence jizvení při endoskopických operacích a léčby nádorů uvnitř močového měchýře. Je také součástí nosních a očních kapek [6].

Kyselina hyaluronová má své velké uplatnění v oční chirurgii. Ochraňuje jemné oční tkáně jako např. buněčnou vrstvu vnitřku (endotel) rohovky před poškozením v průběhu chirurgické operace. Při operaci šedého zákalu je možné HA použít jako náhradu za sklivce. Díky svým viskoelastickým vlastnostem je HA schopna udržet hloubku a tvar přední oční komory.

Elasticita roztoků HA zajišťuje ochranu očních buněk před poškozením, které by bylo způsobeno kontaktem s chirurgickými nástroji a implantáty. V současné době se HA nejvíce využívá při operaci katarakty, při této operaci se přidává pacientům 1% roztok HA [3].

Druhou největší oblastí jejího využití jsou vnitrokloubní aplikace (viskosuplementace) u pacientů, kteří trpí osteoartrózou (degenerativní onemocnění kloubů). HA se při této operaci aplikuje intraartikulárně (injekce přímo do kloubů). Lze jí také aplikovat periartikulárně (okolo kloubů) při podvrtnutí kotníku. Díky svým viskoelastickým vlastnostem je HA schopna udržet hloubku a tvar přední oční komory. Při vysoké smykové rychlosti dochází ke snížení viskozity HA, což usnadňuje její vstřikování [3].

HA se velice často využívá také v plastické chirurgii, kde se používá jako výplň vrásek, při odstraňování jizev nebo zvětšování prsou.

V kosmetickém průmyslu se přidává do krémů proti vráskám. Známou kosmetickou firmou, která přidává do svých krémů kyselinu hyaluronovou, je firma Anti Aging [10].

Biologické účinky HA se liší v závislosti na její molární hmotnosti:

- 250 – 2200 kDA - Oční chirurgie, intra-artikulární injekce, biologicky aktivní bandaže, léčba poranění chrupavky a šlach, redukce zjizvení tkáně, podpora regenerace jaterní tkáně, umělé kožní a kostní štěpy.
- 7-250 kDA - Protirakovinná léčba, zvýšení imunitní odezvy na bakteriální infekce, protizánětlivé preparáty, léčba zranění a popálenin, podpora pro regeneraci míchy po zranění, podpurný materiál pro léčbu pomocí kmenových buněk.
- Oligosacharidy HA (obsahující 4-18 merů) - Detekce nádorů, protirakovinná léčba založená na nanočásticích, stimulace tvorby nových cév, léčení žilní nedostatečnosti [5].

## 1.7 Metabolismus kyseliny hyaluronové

Metabolismus hyaluronanu je velmi dynamický. Některé buňky, jako např. chondrocyty v chrupavkách, aktivně syntetizují a odbourávají hyaluronan po celou dobu životnosti tkáně. Syntéza je většinou kompenzována rozkladem, čímž se udržuje konstantní koncentrace hyaluronanu v tkáních. Metabolická studia prokázala, že poločas rozpadu molekuly hyaluronanu v tkáních je 2-3 týdny. Keratinocyty v epidermis jsou dalším příkladem buněk, které

aktivně syntetizují a rozkládají hyaluronan. V tomto případě je poločas rozpadu molekuly hyaluronanu o dost kratší, trvá méně než jeden den [9].

Některé buňky přednostně hyaluronan syntetizují více, než odbourávají. Příkladem mohou být buňky v dermis. Velká část molekul hyaluronanu unikne z těchto tkání tím způsobem, že jsou zachyceny receptory buněk retikuloendoteliálního systému v lymfatických uzlinách a játrech, kde jsou následně připraveny na pozdější rozklad v lysozomech. Poločas rozpadu hyaluronanu v krvi je velmi krátký, trvá jen několik minut. Buňky, které se nacházejí na stěnách kloubního pouzdra, syntetizují hyaluronan a uvolňují ho do synoviální tekutiny, kde se stává důležitou součástí. Přispívá totiž k viskoelastickým vlastnostem tekutiny. Také synoviální tekutina odtéká prostřednictvím lymfatického systému, před vstupem do krevního řečiště. Buňky retikuloendoteliálního systému, které se nacházejí na stěnách lymfatických cév, aktivně odbourávají téměř 90% hyaluronanu před tím, než si je převezme vaskulární systém. Odhaduje se, že téměř 1/3 z celkového počtu hyaluronanu v lidském těle je metabolicky odstraněn a nahrazen zhruba za jeden den [9].

## 2 HOFMEISTEROVA ŘADA IONTŮ

Kyselina hyaluronová ve vodném prostředí degraduje, a je velmi brzy znečištěna různými mikroorganismy. Degradace struktury kyseliny hyaluronové může být potlačena přidavkem konzervačních látek, mezi které patří např. benzalkonium chlorid, který snižuje povrchové napětí vodných roztoků, je antibakteriální a působí proti plísním. Benzalkonium chlorid působí také jako denaturant (= změni strukturu HA, a tím také její fyzikálně-chemické vlastnosti). Změny ve struktuře HA způsobené přidavkem konzervačních látek je možné redukovat přidavkem iontů Hofmeisterovy řady, které podporují hydrofilní interakce HA, a rozpouštějí denaturanty.

### 2.1 Historie Hofmeisterovy řady

První zmínka o Hofmeisterově (nebo také lyotropní) řadě HS přišla v roce 1888 a popisovala vliv iontů na fyzikální chování široké škály vodních procesů od koloidních systémů až po skládání bílkovin [15]. Jedním z prvních vědců, který se zabýval vlivem solí na bílkoviny, byl Franz Hofmeister (1850 - 1922).

Díky Hofmeisterovým vědeckým pokusům bylo zjištěno, že vysolovací schopnosti jednotlivých solí jsou velmi odlišné. Např. síranové soli jsou schopné velmi dobře vysolovat bílkoviny, zatímco dusičnany jsou velmi neefektivní. Chlorid sodný se nachází zhruba uprostřed mezi sírany a dusičnany. Hofmeister zkoumal také sérii aniontů se stejným kationtem a naopak. Díky tomu dokázal zjistit, jak působí jednotlivé kationty a anionty na bílkoviny. Na základě jeho práce byla vytvořena lyotropní (Hofmeisterova) řada iontů, která je seřazena podle schopnosti jednotlivých iontů vysolovat bílkoviny z roztoku.

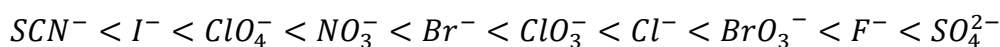
Dnes sice máme daleko modernější a lepší techniky pro purifikaci bílkovin z roztoku než jen jejich vysolování z roztoku, nicméně to neznamená, že by Hofmeisterova řada dnes nenašla své uplatnění, velice často se jejího modelu využívá při zkoumání různých biologických, chemických a fyzikálně-chemických vlastností. Existuje mnoho procesů, při kterých se chování iontů solí vysvětluje na základě HS. Mezi tyto procesy patří např. denaturace bílkovin, aktivita enzymů, krystalizace bílkovin, povrchové napětí roztoků a spousta dalších [16 - 47].

## 2.2 Interakce iontů Hofmeisterovy řady s proteiny

Ionty Hofmeisterovy řady ovlivňují rozpustnost proteinů, jejich stabilitu, a také stabilitu jejich sekundární, terciální a kvartérní struktury.

Každá interakce mezi ionty HS a proteiny může být charakterizována buď procesem vsolování, nebo vysolování („salting in“ a „salting out“ efekt) [18].

Mechanismus HS se zabývá především experimenty s rozpouštědly, které obsahují vyšší koncentraci solí. HS je seřazena podle schopnosti iontů vysolovat proteiny. HS pro anionty je:



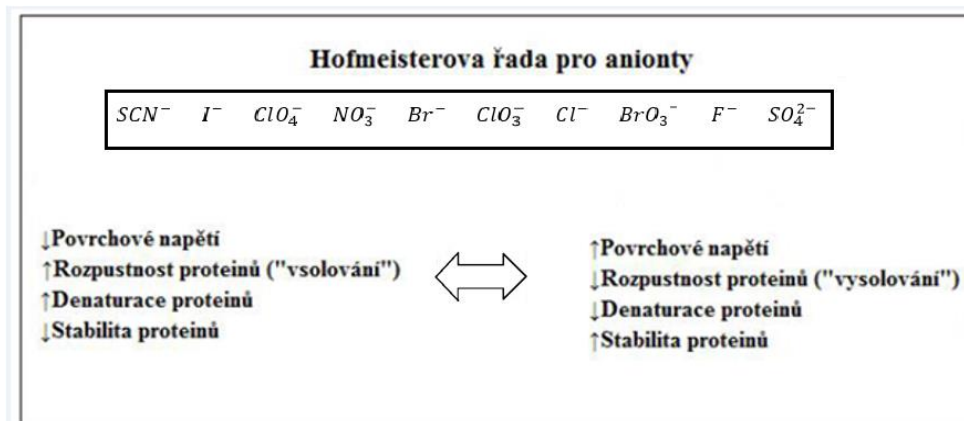
A pro kationty:



Platí, že ionty (jak anionty, tak kationty), které jsou více nalevo, mají silnou schopnost vsolovat (salt-in“) proteiny, zvyšují rozpustnost proteinu, a tím posilují jeho hydrofilní vlastnosti. Rozpustnost je dána vznikem vazeb s ionty, které mají silný „vsolovací“ efekt. Tyto ionty snižují povrchové napětí. Působí denaturačně na protein, a tím snižují stabilitu proteinu [15]. Např.  $I^-$  a  $SCN^-$  jsou silné denaturanty, vsolují peptidickou skupinu, a v důsledku toho dojde ke změně struktury proteinu. Anionty, které se nacházejí nalevo od  $Cl^-$  se označují jako kosmotropní [16].

Naopak platí, že ionty, které jsou více napravo, mají „vysolovací“ účinky. Díky nim dojde k vysrážení proteinu. Tyto ionty zvyšují povrchové napětí, snižují rozpustnost proteinu a mají „vysolovací“ efekt, nejsou silnými denaturanty, tudíž podporují stabilitu struktury proteinu. Anionty, které jsou napravo od  $Cl^-$  se označují jako chaotropní.

V případě HS se mluví častěji o aniontech než o kationtech. Pořadí HA pro anionty a jejich typické vlastnosti jsou zobrazeny na obr. č. 11 [16].



**Obrázek 11: Hofmeisterova řada pro anionty [15].**

Každá interakce je určitým způsobem specifická. Existují také případy, kdy se pozorovaný jev nechová podle modelu HS. Nebo se ionty solí svým chováním řadí v obráceném pořadí [16, 18].

### 2.3 Interakce iontů Hofmeisterovy řady s polymery

Ionty HS mají významný vliv na vodné roztoky polymerů. V experimentech se využívají zejména roztoky s vyšší koncentrací iontů HS.

Ionty, které jsou v řadě více napravo, zvyšují povrchové napětí rozpouštědla, snižují rozpustnost nepolárních makromolekul („vysolují“ je, „salt-out“), což vede k posílení hydrofobních interakcí. Zatímco ionty, které jsou více nalevo, zvyšují rozpustnost nepolárních makromolekul („salt in“) a snižují tím hydrofobní interakce. Tyto soli reagují přímo s proteiny nebo polymery a vytvářejí vazby s ionty, které mají silný „vsolovací“ („salt-in“) efekt. Podobné iontové efekty je možno vidět při botnání několika polymerních gelů [18]. Suzuki a spol. zkoumali, zdali ionty HS ovlivňují objemové změny polymerních gelů v závislosti na teplotě, a bylo zjištěno, že tento vliv mají [4].

Interakce mezi polymerními filmy a jejich rozpouštědly je možné popsat pomocí difúzního procesu botnání. Molekuly rozpouštědla musí proniknout do polymeru, a poté se polymerní řetězce musí rozpustit vlivem molekul rozpouštědla. Poté botnání pokračuje expanzivní prací polymerních řetězců, jejich rostoucí pohyblivostí a propustností. Expanzivní práci polymerních řetězců je zde myšleno tak, že v důsledku pohyblivosti a přizpůsobivosti řetězců dochází k pohlcování rozpouštědla polymerem, který následně zvětší svůj objem. Afinity mezi polymerním filmem a rozpouštědlem je velmi důležitá při difúzním procesu botnání.



Obecně platí, že čím budou polymerní řetězce méně přizpůsobivé a poddajné vůči expanzivní práci, tím více poroste potenciální bariéra, kterou bude nutné překonat pro to, aby difúzní proces botnání proběhl [4].

## 2.4 Interakce iontů Hofmeisterovy řady s kyselinou hyaluronovou

Při rozpouštění HA ve vodě dochází k difúznímu procesu botnání, při kterém dochází ke zvýšení pohyblivosti, přizpůsobivosti a propustnosti HA řetězců. V důsledku toho mohou molekuly rozpouštědla, kterým je v tomto případě voda, proniknout do polymeru (dovnitř řetězců HA). Při difúzním procesu botnání dochází k objemové expanzi HA řetězců v důsledku pohlcování rozpouštědla. Přídavkem iontů HS dojde ke změnám interakce mezi molekulami HA a rozpouštědla. Pokud budou do rozpouštědla přidány ionty HS, které mají posilovat hydrofobní interakce, tak bude difúzní proces mezi HA a rozpouštědlem zpomalen. Naopak po přidání iontů, které zvyšují hydrofilní interakce, bude difúze urychlena [4, 19].

Difúzní proces může být obecně popsán difúzním koeficientem, čím je difúzní koeficient vyšší, tím je rychlejší difúze. Při difúzi dochází k pohybu molekul z míst s jejich vyšší koncentrací do míst, kde je jejich koncentrace nižší. Nedifunduje jen jedna látka do druhé. Proces je pro látku a rozpouštědlo vzájemný [19]. Vzájemná difúze mezi molekulami HA a molekulami rozpouštědla je charakterizována vzájemným difúzním koeficientem [4].

Mráčkem a spol. byl interferometrickou metodou studován vliv iontů HS na chování hyaluronanu, a také na jeho botnání. Byla zjišťována závislost vzájemného difúzního koeficientu na koncentraci čistého hyaluronanu, a také s přídavkem iontů HS. Po přídavku KF došlo k prudkému poklesu rychlosti difúzního procesu botnání (při iontové síle  $I = 0,1$  mol/l) v porovnání s čistou HA. Ionty  $F^-$  totiž silně podporují hydrofobní interakce, protože narušují interakce mezi vodíkovými můstky s dipóly vody. Díky tomu dojde k posílení vodíkových můstků. Čím silnější jsou vodíkové můstky, tím má řetězec vyšší tuhost. Čím vyšší je tuhost řetězce, tím je jeho přizpůsobivost vůči difúzi menší. Hodnota vzájemného difúzního koeficientu je tedy nízká. V důsledku toho se řetězce sbalí a dojde k vysrážení HA. S rostoucím pořadím iontů HS směrem k hydrofobní části řetězce dochází ke snižování hodnoty vzájemného difúzního koeficientu [4, 18].

Na druhou stranu, po přídavku KI došlo k urychlení difúzního procesu botnání, a tím také ke zvýšení hodnoty vzájemného difúzního koeficientu. Ionty  $I^-$  totiž podporují hydrofilní interakce. Tyto soli (složené s iontů, které zesilují hydrofilní interakce) reagují přímo s HA a

vytvářejí vazbu s ionty, které mají silný „vsolovací“ („salt-in“) efekt. Ve výsledku tedy dojde k rozpuštění („vsolování“) HA.

Rychlost difúzního procesu botnání je také ovlivněna teplotou. S rostoucí teplotou roste rychlost difúzního procesu botnání [4].

Výsledky získané při studiu difúzního procesu botnání lze porovnat s výsledky získanými při viskozimetrických měřeních. Přídavkem iontů do vodného roztoku hyaluronanu dojde ke snížení kinematické viskozity. Nicméně po přídavku  $F^-$  se hodnota kinematické viskozity zvýší, protože přítomnost  $F^-$  zvyšuje tuhost řetězců HA. V důsledku toho se řetězce více brání toku [4, 20].

S rostoucí teplotou kinematická viskozita klesá, protože řetězce, které budou mít vyšší energii (dodaná teplem), budou kmitat rychleji, což způsobí jejich větší poddajnost vůči toku [4].

K tomu, aby řetězce vykonaly expanzivní práci, musí jim být dodána energie. Řetězcům, které se brání difúznímu procesu botnání v důsledku své vysoké tuhosti, která je způsobena např. přídavkem iontů HS, které podporují hydrofobní interakce, bude nutné dodat větší energii, aby došlo k difúzi [19, 21]. Příkladem toho může být roztok HA-KF. Ionty  $F^-$  způsobují zvýšení tuhosti řetězce HA. Proto bude nutné těmto řetězcům dodat větší energii, aby proběhla difúze. Čím více budou ionty HS posilovat hydrofilní interakce, tím přizpůsobivější bude řetězec HA, a tím méně energie mu bude postačovat k tomu, aby proběhl difúzní proces botnání, např. HA-KI [4].

Čím bude vyšší koncentrace soli, která způsobuje hydrofobní interakce, v roztoku HA, tzn., čím vyšší bude iontová síla dané soli, tím tužší budou řetězce HA, a bude nutné jim dodat více energie, aby proběhla difúze.

Naopak čím bude vyšší iontová síla soli, která posiluje hydrofilní interakce, tím méně energie bude stačit řetězcům HA na to, aby proběhla difúze. Řetězce HA se totiž pohyblivostí nebrání.

Čím bude koncentrace dané soli vyšší, tím více se budou zesilovat účinky dané soli na řetězec HA.

K tomu, aby proběhla difúze, tzn., vzájemný pohyb řetězců HA a molekul vody, je rovněž nutné dodat energii. Tato energie se nazývá aktivační entalpie difúze. Čím budou řetězce HA méně pohyblivé, tím bude nutné dodat více energie, aby vzájemná difúze proběhla. Naopak čím budou pohyblivější, tím méně energie bude stačit [4, 19].

Funkčnost kyseliny hyaluronové může být často vysledována na základě botnajících vlastností její polyelektrolytní sítě. Ve vodném roztoku se z HA stává negativně nabitý polyelektrolyt, jehož velikost, konformace a stupeň hydratace závisí na stupni disociace [4].

### 3 METODY STUDIA ZŘEDĚNÝCH ROZTOKŮ HYALURONANU

Roztoky hyaluronanu můžeme zkoumat různými způsoby. Můžeme měřit jejich viskozitu pomocí různých metod nebo můžeme měřit povrchové napětí.

#### 3.1 Viskoziometrie

Viskoziometrie je metoda, která se zabývá měřením viskozity látek. Princip viskoziometrie spočívá v měření mechanického odporu, který kapalina klade při tečení. Způsoby, kterými lze měřit viskozitu látek, jsou:

- Kapilární metoda
- Metoda padající kuličky
- Rotační viskoziometrie

##### 3.1.1 Viskozita

Viskozita tekutiny popisuje vnitřní tření mezi vrstvami kapaliny při jejich pohybu. U ideálních kapalin se předpokládá nulové vnitřní tření. Při proudění reálné kapaliny se její části pohybují. Důsledkem tohoto jevu je, že se jednotlivé vrstvy po sobě posouvají s různou rychlostí, což vede k vnitřnímu tření. Viskozita popisuje, jak se tekutina brání tečení.

Vnitřní tření mezi jednotlivými pohybovými vrstvami v kapalině je analogické smykovému (tečnému) tření mezi pevnými tělesy, z toho důvodu se při vnitřním tření v kapalině kinetická energie přeměňuje na teplo podobně, jako při tření mezi pevnými látkami.

Mezi jednotlivými vrstvami, které se po sobě posouvají, vzniká tečné (smykové) napětí  $\tau$ , které zabraňuje kapalině téct. Tečné napětí vyjadřuje sílu, která je potřebná k vzájemnému klouzáni vrstev na jednotce plochy styku vrstev.

V případě pomalého (laminárního) proudění u newtonovských kapalin dochází k tomu, že tečné napětí roste s rostoucí rychlostí kapaliny. Závislost tečného napětí na rychlosti deformace ve smyku určuje vztah:

$$\tau = \eta \frac{dv}{dy}, \quad (1)$$

kde  $\tau$  je tečné napětí,  $dv/dy$  označuje změnu rychlosti ve směru kolmém na rychlost a  $\eta$  je dynamická viskozita. Jednotkou dynamické viskozity je  $[\text{N}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s} = \text{Pa}\cdot\text{s}]$ , dříve se nejčastěji uváděla v poissonech [P], přičemž  $0,1\text{P} = 1\text{Pa}\cdot\text{s}$ .

Rovnici č. 1 lze použít v případě newtonovských kapalin, jako např. u nízkomolekulárních látek nebo u velmi zředěných polymerních roztoků.

V případě velmi zředěných polymerních roztoků viskozita kapalina s rostoucím tlakem roste, ale se vzrůstající teplotou klesá [15].

Kromě dynamické viskozity existuje také kinematická viskozita  $\nu$ , která je dána podílem dynamické viskozity a hustoty kapaliny:

$$\nu = \frac{\eta}{\rho} \quad (2)$$

Jednotkou kinematické viskozity je  $[m^{-2}s^{-1}]$ , dřívější používanou jednotkou byla Stokes [S], přičemž  $0,01 \text{ S} = 1 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  a využití kinematické viskozity je vhodné v případě, kdy jako jedinými působícími silami jsou setrvačnost, gravitace a vazké tření [23].

Viskozita roztoků polymerů je ovlivněna molární hmotností polymerů, teplotou, tlakem, a závisí na typu rozpouštědla [24].

### 3.1.2 Viskozita disperzních systémů s kapalným disperzním prostředím

Reologické chování koloidních částic (disperzní podíl) je ovlivněno viskozitou disperzního prostředí, tvarem a velikostí částic a interakcemi částice-disperzní prostředí nebo částice-částice. Viskozita disperzního prostředí je vždy menší než viskozita disperzního systému. Disperzní systém je soustava, která obsahuje dva druhy hmoty, disperzní podíl a disperzní prostředí. V tabulce č. 2 jsou uvedeny veličiny, kterými je možné vyjádřit viskozitu disperzních systémů [24].

**Tabulka 2: Veličiny vyjadřující viskozitu disperzních systémů [24, 31].**

Název	Definiční vztah
Relativní viskozita (viskozitní poměr)	$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0}$
Inkrement relativní viskozity (specifická viskozita)	$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0}$
Redukovaná viskozita (viskozitní číslo)	$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c}$
Inherentní viskozita	$\eta_{inh} = \frac{\ln \eta_r}{c}$
Limitní viskozitní číslo (vnitřní viskozita)	$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c}$
$\eta$ je viskozita roztoku, $\eta_0$ je viskozita rozpouštědla, $c$ je koncentrace polymerního roztoku	

### 3.1.3 Viskozita roztoků lineárních makromolekul a jejich molární hmotnost

Objem částic, a také viskozita, v případě roztoků lineárních makromolekul, závisí na množství rozpouštědla, které v sobě makromolekulární klubka zadržují. Rozpouštědlo se potom pohybuje s klubkem. To, jakým způsobem je schopné v sobě makromolekulární klubko zadržovat rozpouštědlo, závisí na ohebnosti řetězců, délce řetězce a afinitě polymeru k rozpouštědlu. Vztah, který popisuje závislost viskozity makromolekulárních roztoků na molární hmotnosti polymeru, se nazývá Mark-Houwinkova rovnice:

$$[\eta] = K \cdot M_r^a, \quad (3)$$

kde  $[\eta]$  je limitní viskozitní číslo. Parametry  $K$  a  $a$  jsou konstanty Mark-Houwinkovy rovnice, které jsou typické pro systém polymer-rozpouštědlo. Tyto konstanty závisí na iontové síle roztoku, pH a v případě vyšších molárních hmotností na smykovém napětí. Jednotkou  $K$  je  $[cm^3 \cdot g^{-1}]$ . Konstanty  $K$  a  $a$  se stanovují experimentálně na základě molárních hmotností, které byly stanoveny (např. metodou rozptylu světla) pro frakce polymeru s nejužší distribucí molárních hmotností.

V případě polydisperzních systémů se měřením viskozity dostane viskozimetrický průměr molárních hmotností  $\overline{M}_\eta$ , jehož hodnota leží mezi číselným a hmotnostním průměrem molární hmotnosti. Pro  $M_\eta$  platí:

$$M_\eta = [\sum(w_i \cdot M_i^a)], \quad (4)$$

kde  $w_i$  je hmotnostní zlomek frakce  $i$  [24].

Viskozimetrický průměr molárních hmotností  $M_\eta$  byl u HA stanoven z její vnitřní viskozity. Bylo prokázáno, že parametry  $a$  a  $K$  závisí na iontové síle a hodnotě pH roztoků HA.

Pro hmotnostní střed molárních hmotností  $M_w < 10^6$  Da jsou hodnoty konstant Mark-Houwinkovy rovnice  $K = 0,029$  a  $a = 0,80$ . Pro  $M_w > 10^6$  Da jsou  $K = 0,397$  a  $a = 0,601$ .

Tyto závislosti byly naměřeny pro iontovou sílu  $I = 28 \frac{mol}{l}$  [3].

### 3.1.4 Metody měření viskozity

#### 3.1.4.1 Kapilární metoda

Pro kapilární metodu se používají kapilární (výtokové) viskozimetry. Tato metoda je založena na měření objemu kapaliny, který proteče za určitý čas svislou kapilárou o daném poloměru  $r$  a délce  $l$ . Při tomto měření se vychází z Hagen-Poiseuillovy rovnice:

$$\eta = \frac{\pi r^4 \Delta p \tau}{8 V l}, \quad (5)$$

kde  $V$  je objem kapaliny, který proteče za určitý čas  $\tau$ ,  $r$  je poloměr kapiláry,  $l$  délka svislé kapiláry,  $\Delta p$  je rozdíl tlaků. Rozdíl tlaků  $\Delta p$  je dán hydrostatickým tlakem kapaliny ve svislé kapiláře. Hagen-Poiseuillova rovnice byla odvozena pro případ laminárního proudění, při kterém platí, že vektor rychlosti je parabolický [22].

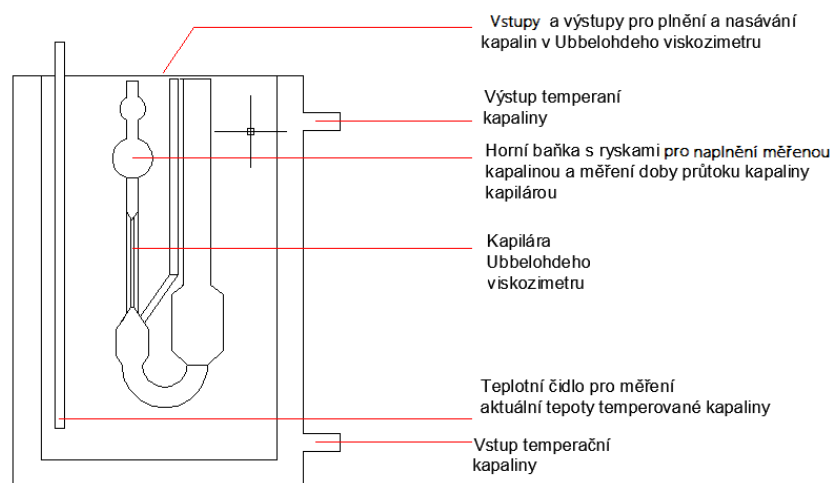
Měření se obvykle provádí tak, že se ve stejném viskozimetru srovnává viskozita měřené kapaliny  $\eta$  s referenční (srovnávací) kapalinou, jejíž viskozita je dobře známa  $\eta_{ref}$ . Doba průchodu obou kapalin je na kapiláře vymezena dvěma ryskami A a B. Pro poměr dynamických viskozit měřené a referenční kapaliny platí:

$$\frac{\eta}{\eta_{ref}} = \frac{\tau \varrho}{\tau_{ref} \varrho_{ref}}, \quad (6)$$

kde  $\tau$  je doba, za kterou proteče objem měřené kapaliny,  $\tau_{ref}$  je doba, za kterou proteče objem referenční kapaliny,  $\varrho$  je hustota měřené kapaliny a  $\varrho_{ref}$  je hustota referenční kapaliny.

Díky kapilárním viskozimetrům je možno získat přesné výsledky, nicméně tyto viskozimetry se nemohou používat v případě neneutonských kapalin [25].

Měření touto metodou může probíhat např. na Ubbelohdeho viskozimetru.



**Obrázek 12: Ubbelohdeho kapilární viskozimetr [22].**

### 3.1.4.2 Metoda padající kuličky

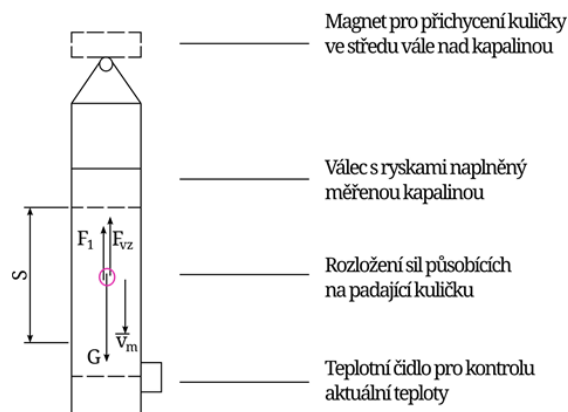
Viskozita je určována na základě toho, jak rychle padá kulička v měrné kapalině, která je nalita ve válci vymezeného dvěma ryskami. Předpokladem je, aby hustota kuličky  $\rho_k$  byla větší než hustota kapaliny  $\rho$ . Při pádu kuličky v kapalině je na pohyb kuličky kladen odpor ze strany kapaliny. Na padající kuličku působí síla  $F$ , která je dána tíhou  $G$  zmenšenou o vztlakovou sílu  $F_{vz}$  kapaliny:

$$F = G - F_{vz}. \quad (7)$$

Proti síle  $F$  působí síla odporu kapaliny  $F_t$ , která je tím větší, čím se těleso v kapalině rychleji pohybuje. Při tzv. mezní rychlosti  $v_m$  se bude kulička pohybovat rovnoměrně, což znamená, že  $F_t = F$ .

Tento stav se popisuje tzv. Stokesovou rovnicí:

$$\eta = \frac{2}{9} \cdot g(\rho_k - \rho) \frac{r^2}{v_m}. \quad (8)$$



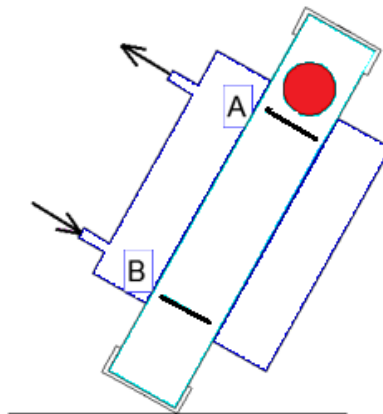
**Obrázek 13: Experimentální uspořádání pro měření viskozity kapaliny metodou padající kuličky, v obrázku je znázorněno i rozložení sil působících na kuličku [22].**

Mezi kuličkové viskozimetry řadíme např. Höpplerův viskozimetr, ve kterém se koule pohybuje skleněnou trubicí s přesným vnitřním průměrem, nakloněnou pod úhlem  $10^\circ$ . Tato trubice je naplněna měřenou kapalinou a je vymezena dvěma ryskami. Měří se doba, po kterou kulička projde vymezenými ryskami. Při tomto měření se obvykle používá srovnávací způsob:

$$\frac{\eta}{\eta_{ref}} = \frac{v_{ref}}{v} \cdot \left( \frac{\rho_k - \rho}{\rho_k - \rho_{ref}} \right), \quad (9)$$



kde  $\rho_k$  je hustota kuličky,  $\rho$  je hustota měřené kapaliny,  $\rho_{ref}$  je hustota referenční kapaliny,  $v$  a  $v_{ref}$  jsou rychlosti pádu kuličky v měřené a referenční kapalině.  $\tau$  a  $\tau_{ref}$  jsou doby pádu kuličky v měřené a referenční kapalině [24].



Obrázek 14: Höpplerův viskozimetr [24].

### 3.1.4.3 Rotační viskozimetr

Rotační viskozimetry se skládají z válcové nádoby naplněné kapalinou, ve které je ponořeno rotující těleso, kterým může být kužel nebo válec. Principem této metody je měření úhlu pootočení  $\varphi$  rotujícího tělesa v kapalině od původní polohy.

$$\varphi = K\omega\eta, \quad (10)$$

kde  $\omega$  je úhlová rychlost a  $K$  je konstanta přístroje.

Rotační viskozimetry se používají i při studiu neneutronovských kapalin, protože je možné s nimi měřit závislost úhlu pootočení (úměrný napětí) na rychlosti otáček (úměrná rychlosti deformace) [24].

### 3.1.5 Závislost viskozity na smykové rychlosti u kyseliny hyaluronové

Martin Trojan ve své diplomové práci měřil závislost viskozity na smykové rychlosti u HA. Viskóznější směsi, které obsahovaly HA o molekulové hmotnosti 1,75 MDa, byly měřeny metodou kužel-deska. Pro HA o molekulové hmotnosti 70 kDa se pro měření viskozity použila metoda sousých dvouválců. Směsi obsahující HA o molekulové hmotnosti 1,75 MDa se chovaly neneutronovsky, tj. viskozita se měnila v závislosti na smykové deformaci.

Směsi, které obsahovaly HA o molekulové hmotnosti 70 kDa vykazovaly newtonské chování, tj. viskozita nezávisela na smykové rychlosti [26].

### 3.1.6 Vliv iontů Hofmeisterovy série na viskozitu kyseliny hyaluronové v závislosti na teplotě

Mráček a spol. zkoumali vliv iontů HS na HA. Ve svém měření porovnávali také, jak se změní kinematičká viskozita HA přidáním těchto iontů. Kinematičká viskozita byla měřena na Ubelohdeho viskozimetru při koncentraci HA 0,01 mol/l, měření probíhalo při teplotách: 25 °C, 30°C, 37°C, 40°C, 45°C. Iontová síla roztoku byla 0,05 mol/l. Přídavkem iontů do vodného roztoku kyseliny hyaluronové se snížila kinematičká viskozita. Měření probíhalo při různých teplotách, přičemž s rostoucí teplotou viskozita klesala (kapalina se méně brání tečení). Bylo také pozorováno, že po přidání KF do vodného roztoku HA se zvýšila kinematičká viskozita, což podporuje hypotézu, že přítomnost F<sup>-</sup> způsobuje zvýšení tuhosti řetězce [4].

## 3.2 Povrchové napětí

Na fázovém rozhraní kapalina/plyn nebo tuhá látka/plyn probíhají interakce mezi molekulami plynu a kapaliny/pevné látky. Síly, které působí na molekulu, která je uvnitř kapaliny/pevné látky, se navzájem vykompenzují. Pokud se ovšem molekula nachází na povrchu kapaliny/pevné látky, budou na ni působit síly pouze ze strany kapalně/pevné fáze. Výslednicí těchto sil je potom tah dovnitř kapaliny/pevné látky. Aby mohly molekuly přejít z objemové fáze na fázové rozhraní, musí být přitom vykonána práce, která je tím větší, čím větší je počet molekul převedených z objemové fáze na fázové rozhraní. Dodáním této práce dojde také ke zvýšení Gibbsovy a Helmholtzovy energie. Rovnovážnému stavu při konstantním tlaku a konstantní teplotě odpovídá minimum Gibbsovy energie, proto se systém snaží plochu fázového rozhraní zmenšit na minimum. Nejmenším možným povrchem je kulový tvar. Povrchové napětí  $\gamma$  udává, jak moc se kapalina snaží zaujmout co nejmenší povrch.

Lze jej vyjádřit jako sílu  $F$  působící kolmo na délku  $l$  myšleného řezu povrchem, přičemž tato délka leží v tečné rovině k povrchu v daném bodě.

$$\gamma = \frac{F}{l}. \quad (11)$$

Jednotkou povrchového napětí  $\gamma$  je  $[N \cdot m^{-1}]$ . Jeho hodnota pro vodu je  $72,8 \text{ mN} \cdot m^{-1}$  při teplotě 20°C. Čím vyšší bude teplota, tím vyšší bude hodnota povrchového napětí [28].

### 3.2.1 Metody měření povrchového napětí

Existují tři základní metody:

- Statické metody

- Semistatické metody
- Dynamické metody

### 3.2.1.1 Statické metody

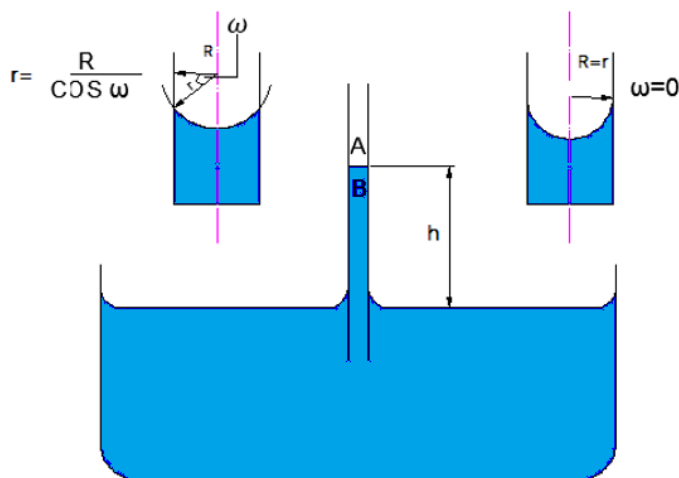
Při těchto metodách se sleduje ustálený rovnovážný stav, který umožňuje získat hodnoty povrchového napětí v rovnovážném stavu, což je obzvláště důležité při studiu roztoků. Koncentrace v objemové fázi je odlišná od koncentrace na fázovém rozhraní, může docházet rovněž i k orientaci molekul. U obou těchto dějů je vyžadován určitý čas k ustavení, na což ale v případě povrchů, které se rychle obnovují, není čas. Po dosažení rovnováhy jsou hodnoty povrchového napětí nezávislé na čase [24, 27].

#### 3.2.1.1.1 Metoda kapilární elevace

Povrchové napětí je měřeno na základě výšky vzestupu kapaliny v kapiláře (kapilární elevace).

$$\gamma = \frac{h \cdot R \cdot (\rho_A - \rho_B) \cdot g}{2 \cos \phi}, \quad (12)$$

kde  $h$  je výška, které dosáhla kapalina v kapiláře, je měřena od roviny, ve které je Laplaceův tlak nulový,  $\rho_A$  a  $\rho_B$  jsou hustoty fází A a B,  $\phi$  je úhel smáčení,  $R$  je vnitřní poloměr kapiláry. Při měření by se měly používat kapiláry, které jsou vyrobeny z materiálu, jež je dobře smáčen kapalinou, tzn.  $\phi = 0^\circ \Rightarrow \cos \phi = 1$ . Velice často se používají materiály vyrobené ze skla [27-28].



Obrázek 15: Kapilární elevace: (a) meniskus dobře smáčejících kapalin, (b) dokonale smáčejících kapalin [27].

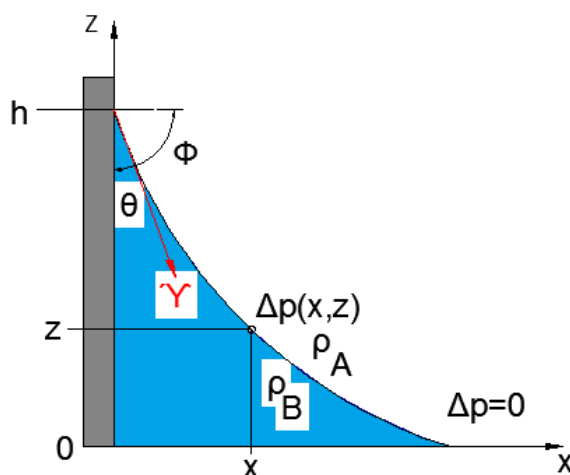
## 3.2.1.1.2 Vzestup kapaliny na svislé destičce

Při této metodě je destička ponořena do kapaliny. Měří se, do jaké výšky vystoupí meniskus kapaliny na svislém povrchu destičky.

Je-li úhel smáčení znám (nebo je nulový), je možno stanovit povrchové napětí. Může to fungovat i opačně, je-li známo povrchové napětí, může být na základě toho určen úhel smáčení. Integrací Laplaceovy-Youngovy rovnice získáme vztah, který platí pro desku dostatečné šířky.

$$\sin \phi = 1 - \frac{\Delta \rho \cdot g \cdot h^2}{2\gamma}, \quad (13)$$

kde  $\Delta \rho$  je rozdíl hustot dvou sousedních fází,  $\phi$  je úhel smáčení,  $h$  je výška, do které vystoupí meniskus kapaliny [27].



Obrázek 16: Vzestup kapaliny na svislé desce [27].

## 3.2.1.1.3 Metoda vyvažování Wilhelmyho destičky

Tato metoda spočívá v měření změny hmotnosti destičky, způsobené kapalinou, která vzlíná na jejím povrchu. Úhel smáčení se určí na základě síly  $F$ , která je nutná k vyvážení přesných vah po změně hmotnosti destičky.

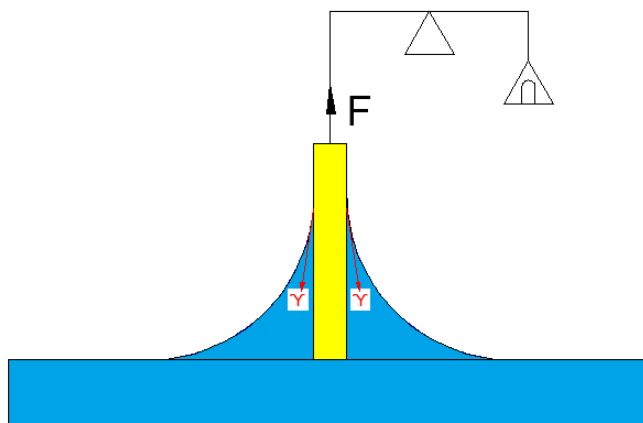
$$F = L \cdot \gamma \cdot \cos \phi, \quad (14)$$

kde  $L$  je obvod destičky. Pokud je destička ponořena do větší hloubky, je nutné při výpočtu počítat i s objemem kapaliny  $V$ , který byl vytlačen částí destičky.

$$F = L \cdot \gamma \cdot \cos \phi - V \cdot \Delta \rho \cdot g, \quad (15)$$

kde  $\Delta \rho$  je rozdíl hustot tekutin a  $g$  je tíhové zrychlení.

Při této metodě je nutné, aby váhy, ve kterých se pracuje, byly přesné, a aby obvod destičky byl po celé její výšce stejný. Je také nutné, aby povrch destičky byl homogenní. Někdy může dojít k problému, že při časově dlouhých měření začne materiál destičky botnat, což ve výsledku způsobí změnu objemu vytlačené kapaliny [24, 27].



**Obrázek 17: Vyvažování Wilhelmyho destičky [27].**

#### 3.2.1.1.4 Analýza profilu kapky

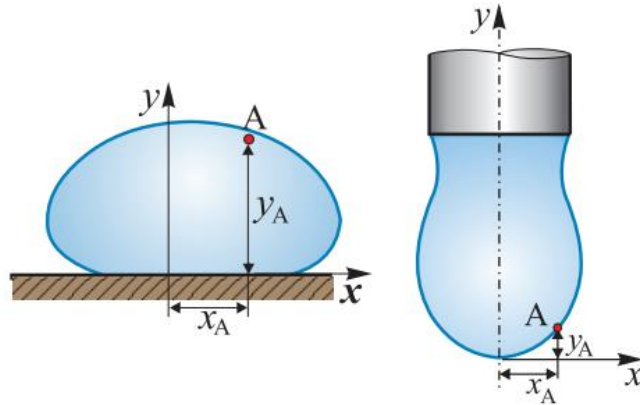
Měření touto metodou spočívá v porovnání skutečného profilu kapky s teoretickým tvarem daným Laplaceovou-Youngovou rovnicí:

$$\Delta p = \gamma \cdot \left( \frac{1}{R_1(x,y,z)} + \frac{1}{R_2(x,y,z)} \right), \quad (16)$$

kde  $\Delta p$  je kapilární tlak,  $R_1$  a  $R_2$  jsou hlavní poloměry křivosti. Kapilární tlak  $\Delta p$  a hlavní poloměry křivosti  $R_1$  a  $R_2$  jsou funkcemi výskytu povrchu kapky v prostoru.

Původní způsob provádění této metody byl velmi pracný. Spočíval v odečítání geometrických parametrů ( $x_A$ ,  $y_A$ ) přisedlé nebo visící kapky. Poté byly tyto parametry porovnávány s tabelovými hodnotami těchto parametrů.

Dnes se tato metoda vykonává především za použití počítače. Je označována jako ADSA (Axysymmetric Drop Shape Analysis). Díky ní můžeme zjistit hodnotu úhlu smáčení, povrchového napětí, plochy povrchu kapky, poloměru křivosti nebo poloměru obvodu smáčení. Tento experiment je možno provádět i při zvýšené teplotě nebo zvýšeného tlaku [28].



Obrázek 18: Geometrické parametry  $(x_A, y_A)$  a) přisedlé b) visící kapky [28].

### 3.2.1.2 Semistatické metody

Tyto metody rovněž spočívají v dosažení rovnovážného stavu, s tím rozdílem, že rovnováha je nestabilní. V průběhu zkoumání soustavy je nutné zvolit takovou rychlost, která bude stačit k přiblížení se rovnovážnému stavu. Cílem je zkrátit dobu měření, ale zároveň získat výsledky, které se přibližují skutečným hodnotám [24].

#### 3.2.1.2.1 Metoda maximálního přetlaku v bublině

Do studované kapaliny je ponořena kapilára, kterou je přiváděn inertní plyn pod postupně zvyšujícím se přetlakem  $p$ . Na zabroušeném konci kapiláry se začne vytvářet bublina plynu o poloměru  $r$ . Přetlak v bublině je roven součtu hydrostatického tlaku a tlaku, který je potřebný pro překonání povrchového napětí. Čím více bublina poroste, tím více se zmenšuje poloměr jejího zakřivení. Hodnota  $r$  je minimální v okamžiku, kdy bublina dosáhne polokulovitěho tvaru. Tehdy je  $r$  rovno poloměru kapiláry  $R$ . V tomto okamžiku dosahuje tlak minimální hodnoty:

$$p = h \cdot \rho \cdot g + \frac{2\gamma}{R}, \quad (17)$$

kde  $\rho$  je hustota kapaliny,  $h$  je hloubka zabroušeného konce kapiláry v kapalině,  $g$  je gravitační zrychlení.

Pokud se tlak bude dále zvyšovat, poloměr bubliny prudce poroste. V určitém okamžiku bublina přestane být stabilní a odtrhne se [24].

### 3.2.1.2.2 Stalagmometrická metoda (metoda vážení kapky)

Měření je prováděno na základě určování střední hmotnosti kapky, která se působením gravitační síly, odtrhne od zabroušeného ústí silnostěnné kapiláry o vnějším povrchu  $R$ . Předpokladem je, že tíha kapky je kompenzována silami povrchového napětí.

$$mg\phi = 2\pi R\gamma \quad (18)$$

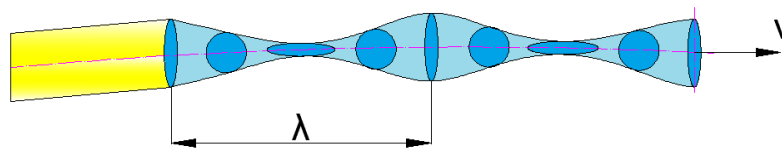
Ve skutečnosti však určitá část kapky zůstane viset na konci kapiláry. Neodtrhne se jen jediná kapka, ale spolu s ní několik dalších. Do rovnice je tedy nutné přidat koeficient korekce  $\phi$ . Při tomto měření se používá především srovnávací metoda [28].

### 3.2.1.3 Dynamické metody

Tyto metody se používají především pro studium nerovnovážných stavů povrchových vrstev kapalin. Je možno také určit rychlost ustavení rovnovážné struktury jejich povrchu. Jako příklad je možno uvést metodu oscilujícího paprsku. Při ní je z eliptického otvoru vypouštěn proud kapaliny ve tvaru eliptického válce do vzduchu nebo do druhé kapaliny. Na tento proud působí povrchové síly, které se mu snaží dodat tvar válce s kruhovým průřezem, a setrvačné síly, díky kterým vznikají příčné oscilace, při nichž je postupně zaměňována kratší a delší osa elipsy.

Dělu vlny  $\lambda$  je možné stanovit optickými metodami. Hodnotu povrchového napětí je možno určit z délky vlny a objemové rychlosti proudění.

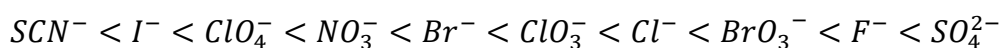
Metodu je vhodné použít v případech, kdy není kladen důraz na přesnost, ale jsou měřeny rychlé změny v hodnotách povrchového napětí [24, 29,30].



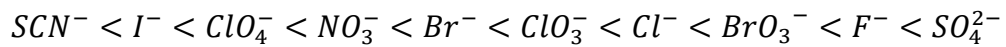
Obrázek 19: Oscilující proud kapaliny [27].

### 3.2.2 Vliv iontů HS na povrchové napětí hyaluronanu

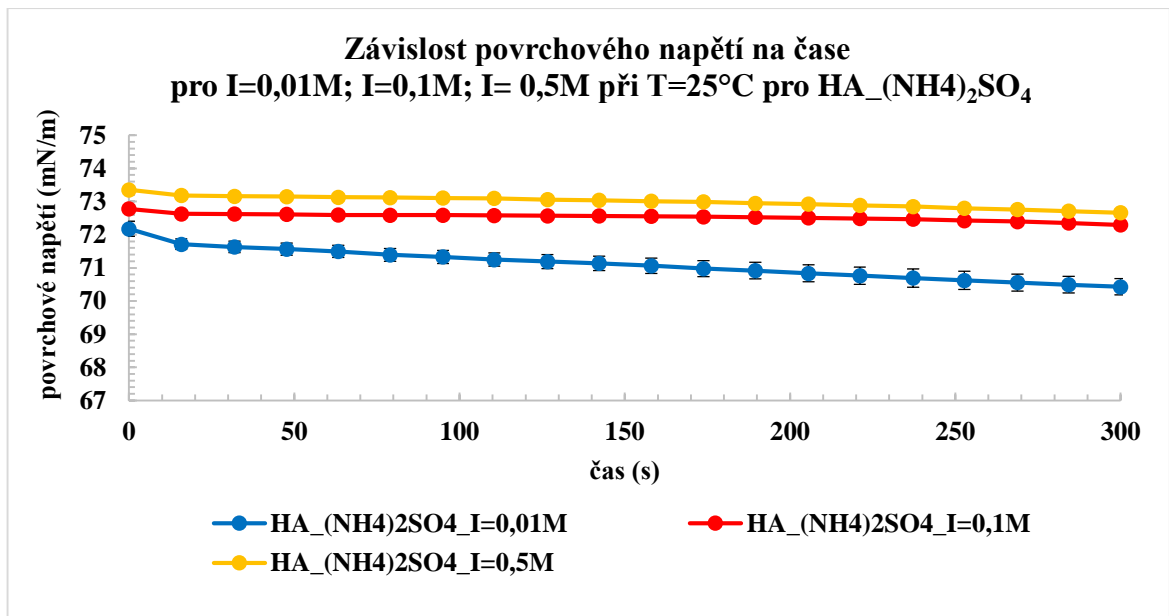
Přidáním iontů HS do roztoku hyaluronanu dojde ke změně povrchového napětí. Ionty, které jsou více nalevo od  $\text{Cl}^-$ , snižují povrchové napětí.



Ty více napravo povrchové napětí zvyšují. Povrchové napětí je ovlivňováno teplotou a iontovou silou roztoku. S rostoucí iontovou se hodnota povrchového napětí zvyšuje.

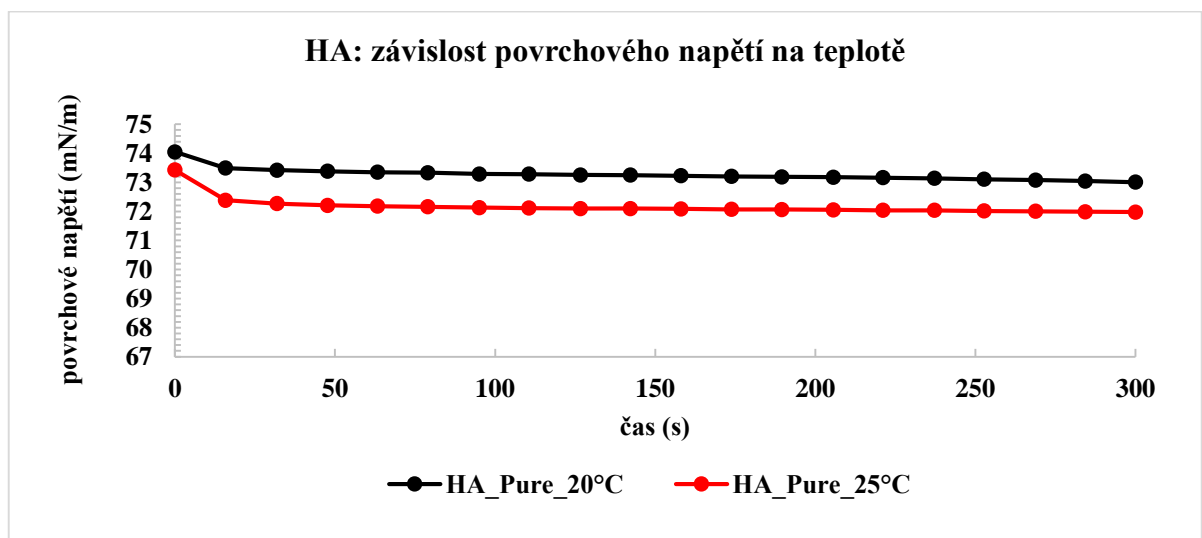


Ty více napravo povrchové napětí zvyšují. Povrchové napětí je ovlivňováno teplotou a iontovou silou roztoku. S rostoucí iontovou se hodnota povrchového napětí zvyšuje.



*Obrázek 20: Vliv iontové síly na povrchové napětí.*

S rostoucí teplotou povrchové napětí klesá [15]. V tomto případě bylo povrchové napětí měřeno metodou Wilhelmyho destičky.



*Obrázek 21: Závislost povrchového napětí na teplotě pro HA.*



## ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo studovat vliv iontů Hofmeisterovy série na vodný roztok HA, a to především z pohledu difúzního procesu botnání, viskozity a povrchového napětí.

V rámci sekundární struktury u HA jsou na řetězci HA patrné polární a nepolární části. Důsledkem této skutečnosti vytváří řetězce HA v roztoku statistická klubka, jejichž tuhost je dána přítomností vodíkových vazeb.

Přídavek iontů HS do vodného roztoku HA ovlivňuje pohyblivost a přizpůsobivost řetězců HA. Kosmotropní ionty podporují hydrofilní interakce, což znamená, že působením těchto iontů na řetězce HA se tyto řetězce stanou pohyblivějšími a přizpůsobivějšími, takže molekuly rozpouštědla budou moci proniknout do klubka HA, které poté začne zvětšovat svůj objem. Tento jev se označuje jako difúzní proces botnání. Chaotropní ionty posilují hydrofobní interakce. Působením těchto iontů na řetězec HA dochází k narušení vodíkových můstků s dipóly vody, následkem toho se zvyšuje tuhost řetězců. Dojde k vysrážení HA („vysolování“, „salt out“). Interakce mezi ionty HS a řetězci HA jsou ovlivněny teplotou a koncentrací iontů. S rostoucí teplotou se zvyšuje rychlost difúze. S rostoucí koncentrací iontů HS ve vodném roztoku HA, se zvyšuje účinek těchto iontů, charakteristický pro dané ionty.

U roztoků HA s přídavkem iontů HS lze měřit povrchové napětí. Kosmotropní ionty snižují povrchové napětí, chaotropní ho zvyšují. S rostoucí teplotou povrchové napětí klesá.

Kosmotropní ionty zvyšují pohyblivost a přizpůsobivost řetězců HA, takže po jejich přídavku do roztoku HA dojde ke snížení viskozity, naopak chaotropní zvyšují tuhost řetězců, takže se tyto řetězce stanou méně přizpůsobivými, viskozita roste.

Povrchové napětí je možné měřit několika způsoby. V případě roztoku HA je možné ho měřit metodou Wilhelmyho destičky. Stejně tak existuje mnoho způsobů, jak změřit viskozitu roztoku, v tomto případě je však ideální, aby tato metoda byla vhodná pro neneutonské kapaliny, protože se zvyšující se molární hmotností, koncentrací nebo smykovou rychlostí přechází HA z newtonského chování na neneutonské. Při studiu neneutonských kapalin jsou vhodné rotační viskozimetry.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] STUHLMEIER, Karl M. Aspects of the biology of hyaluronan, a largely neglected but extremely versatile molecule. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 2006, vol. 156, 21-22, s. 563-568. DOI: 10.1007/s10354-006-0351-0. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10354-006-0351-0>
- [2] NEČAS, J., L. BARTOŠÍKOVÁ, P. BRAUNER a J. KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinární medicína*. 2008, 397- 411. Dostupné z: <http://81.0.228.28/publicFiles/02029.pdf>
- [3] LAPČÍK, Lubomír, Lubomír LAPČÍK, Stefaan DE SMEDT, Joseph DEMEESTER a Peter CHABREČEK. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications †. *Chemical Reviews*. 1998, vol. 98, issue 8, s. 2663-2684. DOI: 10.1021/cr941199z. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr941199z>
- [4] MRÁČEK, Aleš, Júlia VARHANÍKOVÁ, Marián LEHOCKÝ, Lenka GŘUNDĚLOVÁ, Alena POKOPCOVÁ a Vladimír VELEBNÝ. The Influence of Hofmeister Series Ions on Hyaluronan Swelling and Viscosity. *Molecules*. 2008, vol. 13, issue 5, s. 1025-1034. DOI: 10.3390/molecules13051025. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/13/5/1025/>
- [5] CONTIPRO. *Kyselina hyaluronová* [online]. Dolní Dobrouč, 2006 [cit. 2014-05-18]. Dostupné z: <http://www.contipro.cz/o-contipru/kyselina-hyaluronova>
- [6] SLÍVA, Jiří a Juraj MINÁRIK. Hyaluronát – nejen pasivní pozorovatel, nýbrž aktivní modulátor imunitních reakcí. *New EU Magazine of Medicine*. 2009, s. 75-78. Dostupné z: [http://neumm.cz/public/img/neumm\\_09\\_1-2/pdf/sliva\\_minarik\\_hyaluronat.pdf](http://neumm.cz/public/img/neumm_09_1-2/pdf/sliva_minarik_hyaluronat.pdf)
- [7] VOINCHET, J., VASSEUR a KERN. Efficacy and Safety of Hyaluronic Acid in the Management of Acute Wounds. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2006, s. 353-357. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.2165/00128071-200607060-00003>

- [8] JG COSMETICS. *Kyselina hyaluronová v praxi* [online]. Milotice [cit. 2014-05-18]. Dostupné z: <http://www.jg.cz/>
- [9] HASCALL, Vincent C. a Torward C. LAURENT. GLYCOFORUM. *Hyaluronan: Structure a Physical Properties* [online]. 1997 [cit. 2014-05-18]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [10] BROWN, MB a SA JONES. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2005, vol. 19, issue 3, s. 308-318. DOI: 10.1111/j.1468-3083.2004.01180.x.
- [11] SCOTT, John E. *Secondary and tertiary structures of Hyaluronan in Aqueous Solution* [online]. [cit. 2014-04-14]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>
- [12] HOEKSTRA, Djoerd. Hyaluronan as a Versatile Biomaterial for Surface Treatment of Medical Device.
- [13] MASOPUST, Jaroslav. *Patobiochemie buňky*. 1. vyd. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, 2003, 344 s. ISBN 80-239-1011-6. Dostupné z: <http://dotdiag.cz/img/prednasky/bunka.pdf>
- [14] MIYAZAKI, C., S. YOMOTA a OKADA. Ultrasonic depolymerization of hyaluronic acid. *Polymer Degradation and Stability*. 2001, 77 - 85. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/S0141391001001045>
- [15] ZHANG, Yanjie a Paul S. CREMER. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2006, 658 - 663.
- [16] JUNGWIRTH. Slaná voda, bílkoviny a pražský rodák Franz Hofmeister. In: [online]. [cit. 2014-05-18]. Dostupné z: <http://marge.uochb.cas.cz/~jungwirt/paper192.pdf>

- [17] RÖSLER, Ernst. *The Hofmeister series: a review of monatomic ions near the hydrophobic/water interface*. Amsterdam, 2013. Dostupné z: <http://www.science.uva.nl/onderwijs/thesis/centraal/files/f466727650.pdf>. University of Amsterdam, FNWI, HIMS. Vedoucí práce Prof. Dr. E.J. Meijer.
- [18] Baldwin, R., L.: How Hofmeister ion Interaction Affect Protein Stability. *Biophysical Journal* 1996, vol. 71, str. 2056-2063.
- [19] Roztoky makromolekul. [online]. Vydavatelství VŠCHT [cit. 2014-04-14]. Dostupné z: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-001/hesla/roztoky\\_makromolekul.html](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/roztoky_makromolekul.html)
- [20] POKOPCOVÁ, Alena. *Vplyv iónov Hofmeisterovho radu na viskozitu hyaluronanu*. Zlín, 2008. Dostupné z: [https://dspace.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/6440/pokopcov%C3%A1\\_2008\\_bp.pdf?sequence=1](https://dspace.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/6440/pokopcov%C3%A1_2008_bp.pdf?sequence=1). Bakalářská práce. UTB Zlín. Vedoucí práce doc. Mgr. Aleš Mráček, Ph.D.
- [21] MILLER-CHOU, Beth A. A review of polymer dissolution. *Progress in Polymer Science*. 2003, vol. 28, issue 8, s. 1223-1270. DOI: 10.1016/S0079-6700(03)00045-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670003000455>
- [22] FAKULTA TECHNOLOGICKÁ, UTB ve Zlíně. *Laboratorní cvičení z Fyziky: Měření kinematické a dynamické viskozity kapalin* [online]. Zlín [cit. 2014-03-04]. Dostupné z: [http://ufmi.ft.utb.cz/texty/fyzika\\_2/F2\\_lab\\_02.pdf](http://ufmi.ft.utb.cz/texty/fyzika_2/F2_lab_02.pdf)
- [23] KULICKE, Werner-Michael. *Viscosimetry of polymers and polyelectrolytes*. Berlin, 2004, 120 s. ISBN 35-404-0760-X.
- [24] BARTOVSKÁ, Lidmila. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 4. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002, 192 s. ISBN 80-7080-475-0.
- [25] *Měření viskozity: Kapilární metoda* [online]. Vydavatelství VŠCHT [cit. 2014-03-11]. Dostupné z: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-001/hesla/mereni\\_viskozity.html](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/mereni_viskozity.html)

- [26] TROJAN, Martin. *Viskozimetrie Systémů Hyaluronan-Amfifil*. Brno, 2010. FCH-BAK0489/2009. Dostupné z: <https://dspace.vutbr.cz/bitstream/handle/11012/7274/Martin%20Trojan%20-%20Bakal%C3%A1%C5%99sk%C3%A1%20pr%C3%A1ce.pdf?sequence=1>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Martin Chytil.
- [27] VYDAVATELSTVÍ VŠCHT. *Měření povrchového a mezifázového napětí* [online]. [cit. 2014-05-18]. Dostupné z: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-001/hesla/mereni\\_povrchoveho\\_a\\_mezifazoveho\\_napeti.html](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/mereni_povrchoveho_a_mezifazoveho_napeti.html)
- [28] NOVÁK, Josef, Ivan CIBULKA a Vladimír DOHNAL. *Fyzikální chemie: bakalářský a magisterský kurz*. Praha, 2008. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/fch/cz/pomucky/FCH4Mgr.pdf>. Skripta. VŠCHT Praha.
- [29] *Heterogenní systémy: Metody měření povrchové energie*. Univerzita Palackého Olomouc.
- [30] KVÍTEK, Libor. *Metody studia koloidních soustav*. Katedra fyzikální chemie PřF UP Olomouc, 2006.
- [31] LUBOMÍR ŠIMEK, Josef Hrnčířík. *Fyzikální chemie II: (koloidní a makromolekulární systémy)*. Vyd. 2. Zlín. ISBN 978-807-3181-697.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

HA	Kyselina hyaluronová.
CD44	Receptor HA, který hraje důležitou roli v imunitních procesech.
RHAMM	Protein, který zprostředkovává buněčnou hybnost a adhezi.
LYVE-1	Receptor HA, který se nachází se na lymfatickém endotelu
HARE	Receptor HA zprostředkující endocytózu.
LAYILIN	Receptor HA uplatňující se při migraci buněk.
TLR4	Skupina bílkovinných receptorů, která rozeznává nebezpečné struktury.
T-lymfocyty	Druh bílých krvinek, který je podstatou buněčné imunity.
G2 fáze	V této fázi se buňka připravuje na rozdělení.
M fáze	Poslední etapa buněčného typu, jaderné dělení.
Da	Dalton.
COOH	Karboxylová skupiny.
Na <sup>+</sup>	Kation sodný.
K <sup>+</sup>	Kation draselný.
Ca <sup>2+</sup>	Kation vápenatý.
pK	Záporný logaritmus disociační konstanty.
Mr	Relativní molekulová hmotnost.
EM	Extracelulární matrix.
HS	Hofmeisterova řada.
F <sup>-</sup>	Fluoridový anion.
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Síranový anion.
Li <sup>+</sup>	Kation lithný.
KF	Fluorid draselný.
I	Iontová síla.

KI	Jodid draselný.
$M_w$	Hmotnostní průměr molární hmotnosti.
$M_\eta$	Viskozimetrický průměr molární hmotnosti.

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1: Primární struktura kyseliny hyaluronové [3].</i>	15
<i>Obrázek 2: Sekundární struktura kyseliny hyaluronové. Modré kuličky označují N-acetylglukosamin. U části 1 a 2 je možné vidět dvakrát stočený řetězec HA. Část 3 představuje pohled podél dvakrát stočeného řetězce [11].</i>	16
<i>Obrázek 3: Sekundární struktura kyseliny hyaluronové, čárkovanou čarou jsou zaznačeny vodíkové vazby [6].</i>	16
<i>Obrázek 4: Polární (červená barva) a nepolární (modrá barva) části řetězce HA [9].</i>	17
<i>Obrázek 5: Fotografie z elektronového mikroskopu znázorňující vzájemné propletení řetězců kyseliny hyaluronové [9].</i>	17
<i>Obrázek 6: Hydrofobní části HA. Znázornění acetamidových a karboxylových skupin [11].</i>	18
<i>Obrázek 7: Odlišnost velikosti otvorů v síti HA, jimiž difundují částice [9].</i>	19
<i>Obrázek 8: Viskózní a elastické vlastnosti hyaluronanu [9].</i>	20
<i>Obrázek 9: Schéma znázorňující tříšložkovou strukturu sklivce – hyaluronanu, fibril kolagenu a proteoglykanů [11].</i>	23
<i>Obrázek 10: Síť hyaluronanu nacházející se ve sklivci při koncentraci 1-4 mg/ml [11].</i>	23
<i>Obrázek 11: Hofmeisterova řada pro anionty [15].</i>	29
<i>Obrázek 12: Ubbelohdeho kapilární viskozimetr [22].</i>	36
<i>Obrázek 13: Experimentální uspořádání pro měření viskozity kapaliny metodou padající kuličky, v obrázku je znázorněno i rozložení sil působících na kuličku [22].</i>	37
<i>Obrázek 14: Höpplerův viskozimetr [24].</i>	38
<i>Obrázek 15: Kapilární elevace: (a) meniskus dobře smáčejších kapalin, (b) dokonale smáčejších kapalin [27].</i>	40
<i>Obrázek 16: Vzestup kapaliny na svislé desce [27].</i>	41
<i>Obrázek 17: Využívání Wilhelmyho destičky [27].</i>	42
<i>Obrázek 18: Geometrické parametry (<math>x_A</math>, <math>y_A</math>) a) přisedlé b) visící kapky [28].</i>	43
<i>Obrázek 19: Oscilující proud kapaliny [27].</i>	44
<i>Obrázek 20: Vliv iontové síly na povrchové napětí.</i>	45
<i>Obrázek 21: Závislost povrchového napětí na teplotě pro HA.</i>	45



**SEZNAM TABULEK**

*Tabulka 1: Výskyt hyaluronátu v lidském těle [6]. .....21*

*Tabulka 2: Veličiny vyjadřující viskozitu disperzních systémů [24, 31]. .....34*