

Charakterizace hyaluronanu sodného ve vodných roztocích a na fázových rozhraních

Bc. Dagmar Jurošková

Diplomová práce
2017



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Dagmar Jurošková**

Osobní číslo: **T15260**

Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**

Studijní obor: **Inženýrství polymerů**

Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Charakterizace hyaluronanu sodného ve vodných roztocích a na fázových rozhraních**

Zásady pro vypracování:

1. Provedte literární rešerši na dané téma.
2. Připravte vodné roztoky hyaluronanu sodného o rozdílných molekulových hmotnostech za odlišných fyzikálních podmínek.
3. Připravené disperzní systémy charakterizujte dostupnými technikami.
4. Získané výsledky přehledně diskutujte a uveďte v závěrech diplomové práce.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

1. Jones R. A. L., *Polymers at Surfaces and Interfaces*, Cambridge University Press, 1999, ISBN-13-978-521-47965-3

2. Sanchez I.C., *Physics of Polymer Surfaces and Interfaces*, Butterworth-Heinemann, 1992, ISBN 0-7506-9214-6

3. Teraoka I., *Polymer Solutions: An Introduction to Physical Properties*, John Wiley & Sons, 2002, ISBN:0-471-38929-3

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Antonín Minařík, Ph.D.

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání diplomové práce:

2. ledna 2017

Termín odevzdání diplomové práce:

10. května 2017

Ve Zlíně dne 1. března 2017

doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



doc. Ing. Tomáš Sedláček, 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 ¹⁾;
- 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 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ 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 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít 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 19. 5. 2017

.....


¹⁾ 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 nevydělečně 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.

²⁾ 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 vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ 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 užít 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

Byl studován vliv rozdílných přístupů přípravy polymerního roztoku hyaluronanu sodného na změnu jeho povrchové aktivity, střední velikosti polymerního klubka a viskozity roztoku. Vzorčky hyaluronanu sodného lišící se střední molekulovou hmotností byly rozpouštěny ve fyziologickém roztoku za využití metody třepání, temperovaného míchání a působení teplotního spádu (organizovaného proudění kapaliny). Připravené roztoky byly charakterizovány pomocí goniometrie (visící kapka), tenziometrie (Wilhelmyho destičková metoda), dynamického rozptylu světla a kuličkového viskozimetru. Z experimentálních výsledků vyplynulo, že bez působení organizovaného proudění kapaliny na rozpouštějící se polymer nelze upravit charakter polymerních klubek tak, aby vykazovaly zvýšenou povrchovou aktivitu či specifické chování z hlediska změny střední velikosti polymerního klubka s rostoucí teplotou.

Klíčová slova: Hyaluronan sodný, parametry rozpouštění, polymerní klubko, velikost, povrchová aktivita, viskozita

ABSTRACT

The influence of different approaches to the preparation of sodium hyaluronate polymer solution on the variation in its surface activity, the mean size of the polymer coil and the viscosity of the solution was studied. Samples of sodium hyaluronate differing in the mean molecular weight were dissolved in saline using shaking, tempered agitation, and temperature gradient (organized fluid flow). The prepared solutions were studied by goniometry (pendant drop), tensiometry (Wilhelmy plate method), dynamic light scattering and ball viscometer. Experimental results show that without the effect of an organized fluid flow on a dissolving polymer, the nature of polymer coil cannot be modified to show increased surface activity or specific behavior in terms of changing the mean size of the polymer coil with increasing temperature.

Keywords: Sodium hyaluronate, dissolving parameters, polymer coil, size, surface activity, viscosity.

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Antonínu Minaříkovi, Ph.D. za cenné rady, čas a péči, kterou mi věnoval po celou dobu realizace a zpracování práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Lence Musilové, Ph.D. za pomoc při vybraném laboratorním úsilí. V neposlední řadě děkuji také rodině za podporu při studiu.

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

OBSAH

ÚVOD	10
1 HYALURONAN SODNÝ	11
1.1 VÝSKYT, FUNKCE, VÝZNAM HA.....	11
1.2 CHEMICKÁ STRUKTURA.....	12
2 HYALURONAN SODNÝ V ROZTOKU	13
2.1 POLYMERŇÍ ŘETĚZCE A STATISTICKÉ KLUBKO HA VE VODNÝCH ROZTOCÍCH	13
2.2 STATISTICKÉ KLUBKO HA V SOLNÝCH ROZTOCÍCH.....	15
2.3 VLIV PH NA STATISTICKÉ KLUBKO HA.....	16
2.4 DIFUZE PŘES DOMÉNOVOU STRUKTURU HA.....	18
2.5 VISKOELASTICKÉ VLASTNOSTI ROZTOKŮ HA.....	18
2.5.1 Vliv proudění kapaliny na polymerní systém v roztoku	18
2.5.2 Vliv působení tlaku na polymerní systém v roztoku.....	21
2.6 METODY CHARAKTERIZACE ROZTOKŮ HA.....	23
2.6.1 Rozptyl světla.....	23
2.6.1.1 Statický rozptyl světla.....	23
2.6.1.2 Dynamický rozptyl světla	23
2.6.2 Reometrie, viskozimetrie	23
2.6.3 Chromatografie	24
2.6.4 Elektroforéza	25
2.6.5 Interferometrie.....	25
2.6.6 Rentgenová difrakce.....	25
2.6.7 Nukleární magnetická rezonance	25
2.6.8 Elektronová mikroskopie	26
2.6.9 Konfokální mikroskopie.....	26
2.6.10 Diferenciální skenovací kalorimetrie	26
3 HYALURONAN NA FÁZOVÝCH ROZHRANÍCH	28
3.1 ROZHRANÍ KAPALINA - PLYN.....	28
3.1.1 Adsorpce na rozhraní kapalina - plyn	29
3.1.2 Reorganizace na rozhraní kapalina - plyn.....	30
3.1.3 Metody charakterizace adsorpce a reorganizace na rozhraní kapalina - plyn.....	31
3.2 ROZHRANÍ KAPALINA - PEVNÁ LÁTKA	32
3.2.1 Smáčení	32
3.2.2 Adsorpce a reorganizace na rozhraní kapalina - pevná látka.....	32
3.2.3 Metody charakterizace adsorpce a reorganizace na rozhraní kapalina - pevná látka	33
3.3 ROZHRANÍ KAPALINA - KAPALINA	33
3.3.1 Bénard-Marangoniho proudění	34
3.3.2 Vliv B-M proudění a tokových nestabilit na polymerní klubko	34
I PRAKTICKÁ ČÁST	36
4 POPIS EXPERIMENTŮ	37

4.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	37
4.2	ČIŠTĚNÍ SKLA, KONTROLA JEHO POVRCHOVÉ ČISTOTY	37
4.3	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ	38
4.4	POUŽITÉ MĚŘICÍ METODY	40
4.4.1	Wilhelmyho destičková metoda	40
4.4.2	Metoda visící kapky	42
4.4.3	Dynamický rozptyl světla	42
4.4.4	Kuličkový viskozimetr	43
5	VÝSLEDKY A JEJICH DISKUZE.....	45
5.1	CHARAKTERIZACE ZMĚN POVRCHOVÉ AKTIVITY HA V ROZTOKU	45
5.1.1	Srovnání výsledků z měření pomocí tenziometrie a goniometrie	45
5.1.2	Míchané a třepané roztoky	47
5.1.3	Roztoky připravené na TFFC zařízení	53
5.1.4	Vliv filtrace na povrchovou aktivitu	55
5.2	VELIKOST POLYMERNÍCH KLUBEK A JEJICH CHOVÁNÍ SE ZMĚNOU TEPLoty	58
5.2.1	Z-average třepaných a míchaných roztoků	58
5.2.2	Z-average roztoků připravených na TFFC	62
5.2.3	Srovnání z-average roztoků připravených třepáním, mícháním a na TFFC	63
5.2.4	Vliv filtrace na změnu velikosti polymerního klubka.....	64
5.2.5	Teplotní závislosti z-average a jeho časová stálost.....	65
5.3	VISKOZITNÍ CHARAKTERISTIKY ROZTOKŮ HA	70
	ZÁVĚR	72
	SEZNAM OBRÁZKŮ	88
	SEZNAM TABULEK.....	91

ÚVOD

Funkce kyseliny hyaluronové, respektive hyaluronanu sodného je v živých organismech podmíněna nejen jeho střední molekulovou hmotností, ale rovněž uspořádáním řetězců v polymerním klubku, tj. velikostí a stabilitou klubka. Tyto změny uspořádání mohou mít za následek změnu viskozitního charakteru roztoku, mění se schopnost tvořit síťové struktury, difuzní charakteristiky, povrchová aktivita, atd. V literatuře je popsána celá řada faktorů ovlivňujících konformaci polymerních řetězců hyaluronanu sodného v roztocích. Velikost polymerního klubka tohoto polysacharidu lze ovlivňovat změnou pH prostředí, množstvím a typem přítomných iontů, aj. Z čistě fyzikálního hlediska, tzn. bez změny složení systému má na velikost klubka HA vliv zejména teplota a smykové namáhání. V rámci této diplomové práce byly řešeny především tyto dvě proměnné přímo zakotvené v rozdílných metodikách přípravy polymerních roztoků.

1 HYALURONAN SODNÝ

Hyaluronan sodný (HA) je sodná sůl kyseliny hyaluronové, která je řazena mezi přirozeně se vyskytující polysacharidy. Právě sodná sůl této kyseliny s anionickým charakterem se v přírodě vyskytuje nejčastěji díky její přítomnosti v živočišných tkáních s fyziologickým prostředím. [1, 2]

1.1 Výskyt, funkce, význam HA

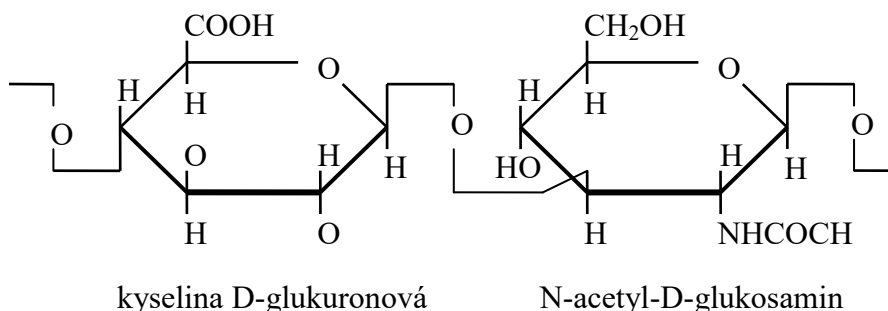
Tento vysokomolekulární biopolymer je součástí mnoha živočišných tkání. Funkce v dané tkáni je určena molekulovou hmotností HA, například synoviální tekutina nebo oční sklivec jsou tvořeny HA o molekulové hmotnosti 6–8 milionů Da. Dále je HA přítomna mimo jiné intracelulárně a v extracelulární a pericelulární matrix. Mezi plněné funkce patří zejména udržování viskoelastických charakteristik tekutin spojovacích tkání organismu (synoviální tekutina, oční sklivec, pupeční šňůra), role signální molekuly (cyklus života buňky, rané fáze hojení ran, migrace buněk, fagocytární reakce makrofágů, novotvorba krevních kapilár, supramolekulární shromažďování proteoglykanů v mezibuněčném prostoru). Díky schopnosti extrémní absorpce vody je umožněno udržování homeostázy, tkáňové hydratace a lubrikace. [1–5]

Mimo již uvedená místa výskytu u člověka je přítomna také u dalších obratlovců, například v kohoutích hřebíncích, prasečí kůži, králičí osrdečnickové tekutině, aj. Dále je součástí membrán některých mikrobiálních patogenů, například *Pasteurella multocida*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus equi*. Tyto mikroorganismy využívají HA k zapouzdřování svých buněk, čímž zabraňují imunitnímu systému rozpoznání patogenu, a snižování adheze k prostředí. [6–8]

Tyto mikroorganismy, kohoutí hřebínky, pupeční šňůra, sklivec hovězího dobytka a hovězí synoviální tekutina patří mezi nejvýnosnější zdroje průmyslové výroby HA. [7, 9]

1.2 Chemická struktura

Lineární makromolekula HA je tvořena disacharidovou jednotkou sestávající z kyseliny D-glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu, navzájem spojených střídavě $\beta(1\rightarrow4)$ a $\beta(1\rightarrow3)$ glykosidickými vazbami, jak lze vidět na Obr. 1. [1, 2]



Obr. 1: Strukturální jednotka HA [1]

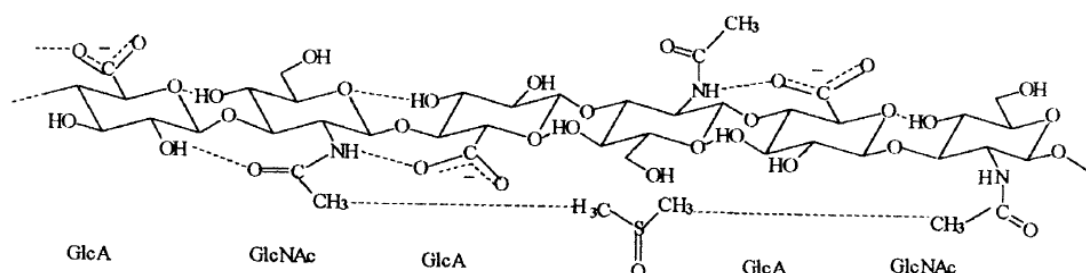
Na základě chemické struktury lze vysvětlit její schopnost značné absorpce vody, a to díky velkému množství přítomných karboxylových skupin. Navíc repulze nábojů těchto skupin zapříčiňuje velmi dobrou rozpustnost HA ve vodě. Hydroxylové a karboxylové skupiny jsou vhodným místem pro chemickou modifikaci molekuly. Na místo karboxylové skupiny je možné navíc po její disociaci navázání kationtů kovů (právě Na^+ ve fyziologickém prostředí) nebo polykationtů. [10]

Jak popsali zejm. Hascall a kol., k energetické stabilizaci disacharidové jednotky, potažmo polymerního řetězce, je nutné dosažení výhodného stérického uspořádání. V ekvatoriální rovině jsou uloženy objemné hydroxyly, některé karboxyly a anomerní uhlík (hydroxylové a karboxylové skupiny tvoří polární část řetězce). V méně energeticky výhodné axiální rovině jsou umístěny malé vodíkové atomy a představují nepolární část řetězce. [11, 12]

Disacharidové jednotky jsou vůči sobě vzájemně pootočený o 180° . Díky tomuto otáčení je výsledným uspořádáním celé molekuly jednoduchá pásová šroubovice stabilizovaná vodíkovými můstky. Tato šroubovice představuje sekundární strukturu polymerního řetězce HA. Vzájemná asociace HA řetězců je i přes jejich záporný náboj umožněna přítomností hydrofobních oblastí tvořených osmi C–H skupinami uloženými střídavě na stranách šroubovice. To způsobuje navíc již zmiňované stáčení řetězce a pravděpodobně také interakce s lipidovými membránami a proteiny v organismu. [12–19]

2 HYALURONAN SODNÝ V ROZTOKU

Jak již bylo zmíněno, terciární strukturou HA je točitá šroubovice. Toto uspořádání je stabilizováno vodíkovými vazbami mezi amidovými a karboxylovými skupinami, van der Waalsovými silami, vzájemným odpuzováním karboxylových skupin a elektrostatickými interakcemi. Kombinace těchto interakcí a hydrofobního chování umožňuje ukládání velkého počtu molekul HA vedle sebe a tím vznik tzv. polymerní sítě HA. Po vzniku vazby mezi dvěma hydrofobními místy na témže řetězci může navíc dojít k vytvoření tzv. smyčky, kterou lze vidět na Obr. 2. [20–22]

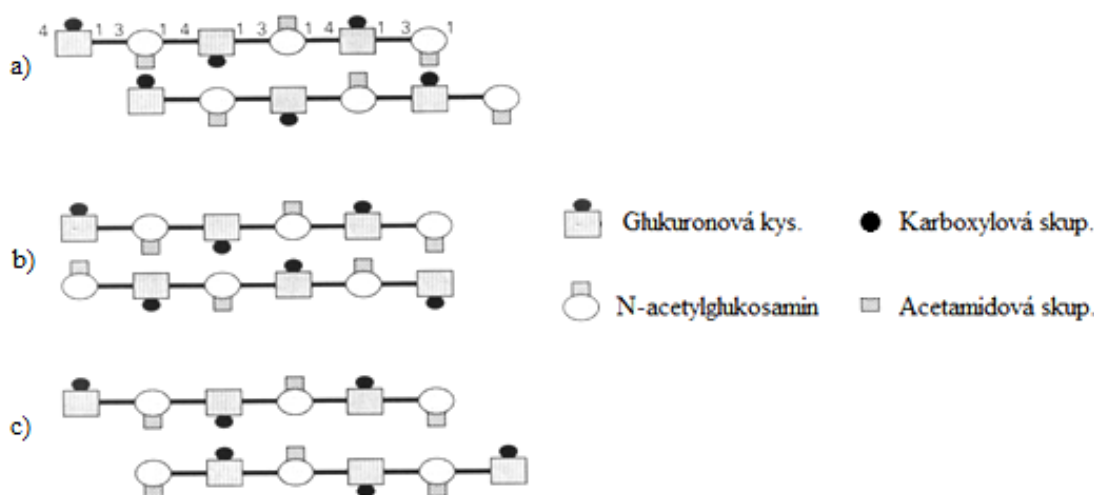


Obr. 2: Smyčka na řetězci HA [20]

2.1 Polymerní řetězce a statistické klubko HA ve vodných roztocích

Možná vzájemná uložení řetězců HA popsali Scott a kol., viz Obr. 3:

- Paralelní: střídavé uložení karboxylových a amidových skupin směřujících k ose, nebo od osy řetězce.
- Antiparalelní: Z páru karboxylové a amidové skupiny směřuje jedna skupina k ose a druhá od osy řetězce.
- Antiparalelní: Uložení jako v případě b), ale navíc je možné spojení karboxylových skupin podobně jako při tvorbě tzv. smyček. Toto uspořádání je nejpravděpodobnější díky téměř poloviční vazebné energii oproti zbylým možnostem uložení. [19]



Obr. 3: Možné vzájemné uložení řetězců HA [19]

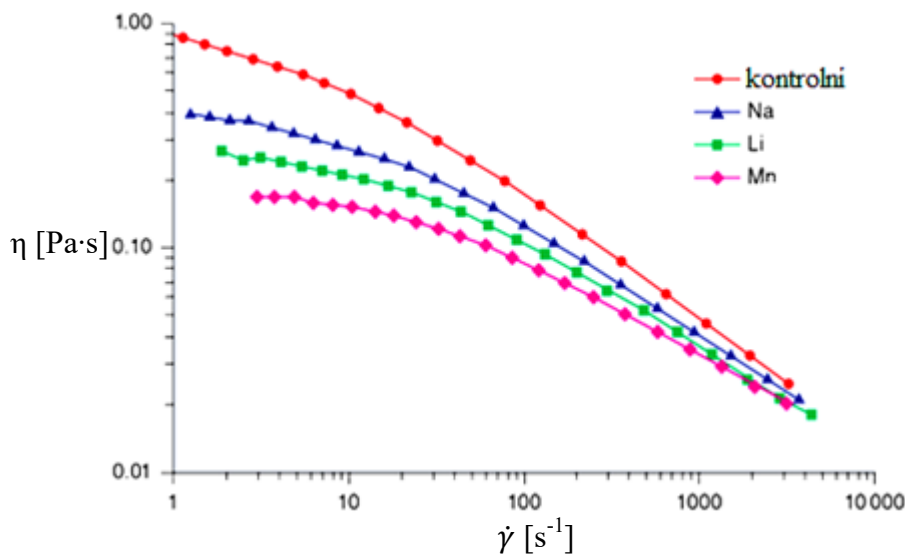
Krátké řetězce polymeru tvoří lineární část makromolekuly, zatímco dlouhé řetězce se sbalují a vytvářejí tuhé statistické klubko, jak také popsali Scott a kol. [14] Kombinací chemické struktury polymerního řetězce, vodíkových vazeb mezi sousedními sacharidy, repulzí mezi karboxyly, van der Waalsovými silami, elektrostatickými interakcemi a interakcemi s rozpouštědlem je určeno chování polymerního řetězce v roztoku. To je navíc ovlivněno shlukováním hydrofobních částí řetězců ve vodných roztocích, aniž by docházelo k tvorbě chemických vazeb. Tuhé, rozbalené polymerní klubko HA vyplňuje v roztoku velké domény, které se vzájemně překrývají a tvoří organizovanou síť (organizace sítě ovlivňuje např. morfogenezi). Skutečná koncentrace hyaluronanu v těchto doménách je velmi nízká, asi 0,1 mg/ml, případně méně ve zředěných roztocích. Síť v roztoku je tvořena už od velmi nízkých koncentrací HA v roztoku, od 1 $\mu\text{g/ml}$. Vysokomolekulární HA při této koncentraci tvoří téměř nekonečnou síť, nejsou detekovány okrajové řetězce. Naopak u nízkomolekulární HA je síť tvořena už při nižších koncentracích, ale vzniklé sítě se vyznačují zdánlivě separovanými ostrůvky. Spojováním řetězců do šroubovic vzniká mechanicky pevnější struktura přispívající k typickým reologickým vlastnostem roztoků tohoto polymeru. [12, 18, 19, 23]

Ve zředěném roztoku má HA charakter velkého solvatovaného klubka s asi 1000krát větším objemem oproti nesolvatované formě polymeru. Velikost statistického klubka je úměrná molekulové hmotnosti HA. Schopnost velké absorpce vody a tím způsobené velké expanze klubka je způsobena jeho chemickou strukturou (velké množství přítomných karboxylů a vodíkových vazeb ztužujících polymerní řetězec). [10]

2.2 Statistické klubko HA v solných roztocích

V polymerním řetězci HA se nachází značné množství karboxylových skupin. Díky tomu HA tvoří snadno komplexy s kationy přítomnými v roztoku, protože tak dochází k neutralizaci kyselého charakteru karboxylové části řetězce. Proto se HA vyskytuje ve fyziologickém prostředí organismu nejčastěji ve formě své soli, hyaluronanu sodném. Interakcí se sodnými ionty jsou vytěsněny molekuly vody z nabobtnalého polymerního klubka, čímž se zmenší jeho hydrodynamický objem, jeho flexibilita a difuzní koeficient vzrostou. Analýza koeficientu vzájemné difuze HA ukázala, že koeficient roste se zvyšující se koncentrací polymeru v roztoku nebo snižující se iontovou silou rozpouštědla. Difuzní koeficient je zvyšován pouze do určité koncentrace, po jejím překročení se stává nezávislým na koncentraci iontů v roztoku. [20, 22, 24, 25]

S rostoucí iontovou silou rozpouštědla je polymerní klubko HA ovlivňováno stále silnějšími coulombovskými interakcemi ovlivňujícími jeho konformaci. Interakce ovlivňující konformaci klubka jsou závislé také na mocenství iontů. Většina kationtů způsobuje uložení řetězců do dvojšroubovic. V přítomnosti sodných, draselných a amonných iontů jsou řetězce uloženy v levotočivých čtyřšroubovicích. Přítomnost vápenatých iontů vede k uložení v levotočivých trojšroubovicích. Charakter iontů a vzniklých šroubovic, respektive četnost přítomných vodíkových vazeb ztužujících klubko, ovlivňuje výsledné reologické chování. Například ke snížení viskozity přispívají vzestupně ionty sodné, draselné, manganaté a nejvíce vápenaté (z těchto příkladů). Další příklady iontů ovlivňující tokové vlastnosti jsou znázorněny na Obr. 4. Tyto ionty jsou přítomné v tělech organismů a s jejich pomocí mohou být upravovány tělní tekutiny dle momentálních požadavků organismu. [20–22, 26–29]

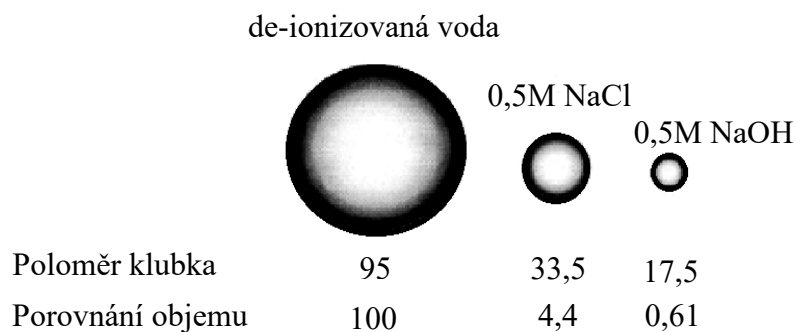


Obr. 4: Toková křivka HA rozpuštěné ve vodě a solných roztocích [21]

2.3 Vliv pH na statistické klubko HA

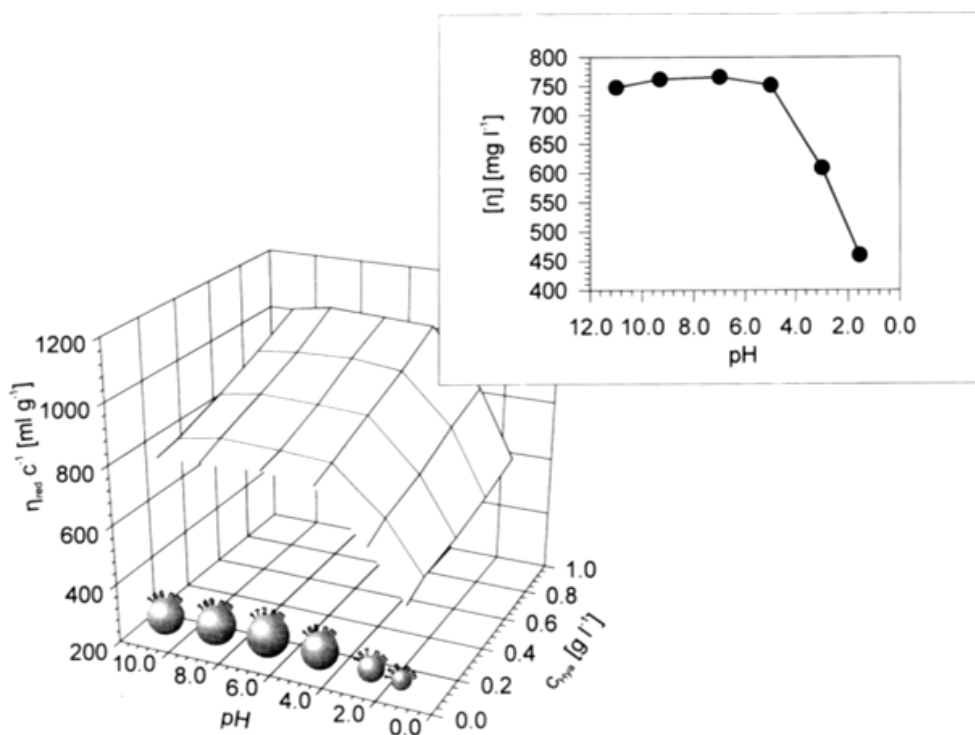
Disociační konstanta pK_A karboxylových skupin HA nabývá dle zbytků kyseliny glukuronové hodnot 3–4 v závislosti na iontových podmínkách roztoku. Hodnota pK_A ji řadí mezi středně silné kyseliny. Proto se změna pH roztoku výrazně projeví na míře disociace této kyseliny. Mírou disociace jsou ovlivněny mezimolekulární interakce jak mezi řetězci HA, tak i s ionty přítomnými v roztoku, čímž je ovlivněno reologické chování roztoků HA. Při pH 7 a výše jsou karboxylové skupiny převážně ionizovány a makromolekula HA se chová jako polyanion, který má přidružené, vyměnitelné kationové protiionty pro udržení neutrality náboje. Směrový tok elektrolytem prostřednictvím takové polyanionové domény může vést k dostatečnému oddělení náboje pro vytvoření proudového potenciálu. Mírný stupeň degradace je pozorován za kyselých ($pH \leq 1,6$) a zásaditých podmínek. ($pH \geq 12,6$). [12, 13, 30, 31]

Na Obr. 5 lze vidět srovnání velikosti polymerních klubek HA o $M_w = 500$ kDa rozpuštěného v de-ionizované vodě, roztoku NaCl a NaOH. Jak je uvedeno výše, zmenšení hydrodynamického objemu polymerního klubka má za následek zvětšení jeho flexibility a difuzního koeficientu. [20, 22]



Obr. 5: Porovnání velikostí polymerního klubka HA v různých roztocích, uvedené poloměry klubka jsou v nm [20]

Závislost viskozity na pH byla zkoumána Gurou a kol. V rozmezí pH 5–11 bylo naměřeno konstantní limitní viskozitní číslo. Při pH menším než 5 došlo k poklesu viskozity a objemu klubka pravděpodobně v důsledku protonace glukuronových skupin. Zjištěné viskozitní charakteristiky lze vidět na Obr. 6. [32] Při pH vyšším než 11 dochází k poklesu viskozity zejm. kvůli rozpadu vodíkových vazeb a tím snížení tuhosti řetězců. [31]



Obr. 6: Závislost viskozity roztoku a velikosti klubka na pH a koncentraci polymeru [32]

2.4 Difuze přes doménovou strukturu HA

V důsledku uspořádání polymerních klubek HA do doménové struktury mohou malé molekuly (voda, elektrolyty a živiny) volně difundovat s rozpouštědlem těmito doménami. Větší molekuly (proteiny) jsou z těchto domén kvůli své hydrodynamické velikosti částečně vyloučeny. Se zvětšující se velikostí molekuly je její difuze přes doménu pomalejší, je zadržována uvnitř pórů domény, jejichž efektivní velikost je v čase proměnná. Z toho vyplývá, že doménovou strukturou HA mohou projít molekuly různé velikosti. [12, 14]

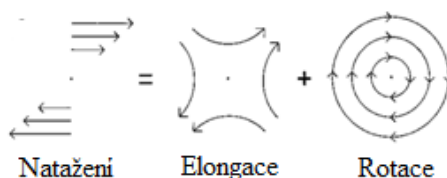
2.5 Viskoelastické vlastnosti roztoků HA

Na rozdíl od jiných polysacharidů dochází velmi snadno u HA k tvorbě slabě vázaných sítí už při velmi nízkých koncentracích polymeru v roztoku. Tyto sítě a chemická struktura jsou příčinou typického viskoelastického a pseudoplastického chování systému v roztoku. Viskoelastická je zvyšována s rostoucí molekulovou hmotností a koncentrací polymeru v roztoku. Dále je ovlivněna pH roztoku a iontovou silou rozpouštědla. Na základě viskozitních měření vodných roztoků HA Gribbon a kol. popsali, že s rostoucí molekulovou hmotností, koncentrací a rychlostí smykové deformace přechází roztoky z newtonského na neneutonské chování. [13, 30, 33–35]

2.5.1 Vliv proudění kapaliny na polymerní systém v roztoku

Při natahování polymerního klubka za toku kapaliny, respektive jeho deformaci za toku, působí zároveň dvě složky:

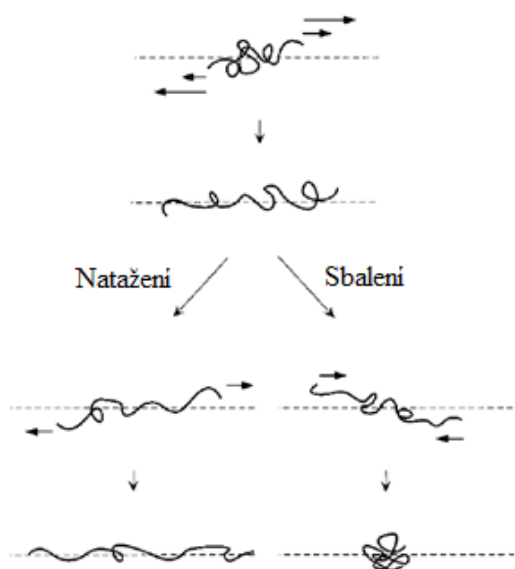
- rotační tok o úhlové rychlosti ω ,
- elongační tok s rychlostí deformace $\dot{\gamma}$ (viz Obr. 7) [36]



Obr. 7: Deformace klubka spolupůsobením

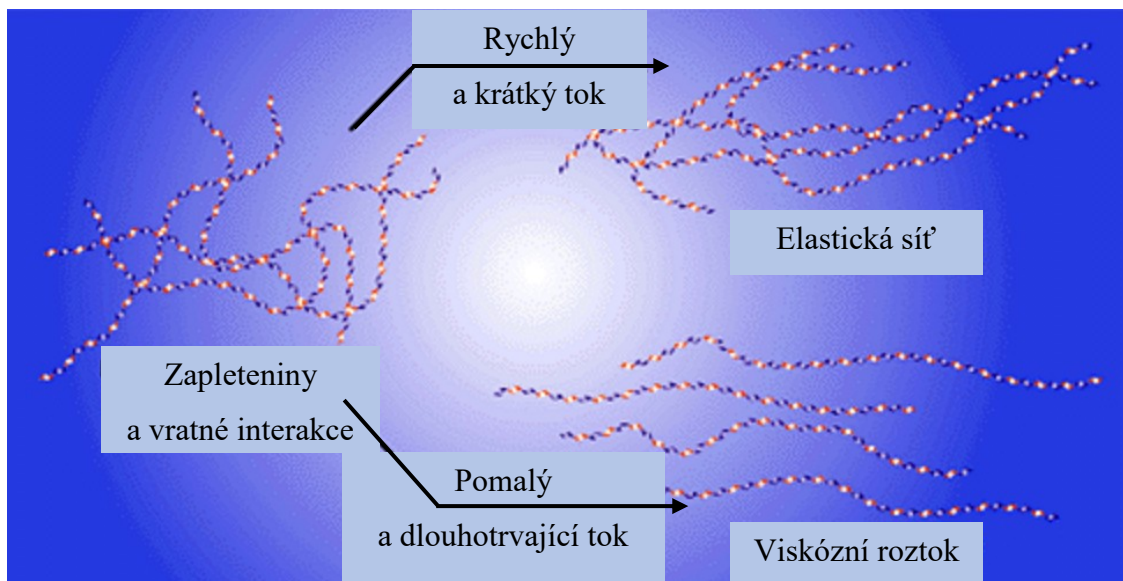
elongační a rotační složky toku kapaliny [36]

K rotaci klubka bez deformace klubka dochází při nulové rychlosti deformace. Naopak velké deformace klubka jsou předpokládány při nulové úhlové rychlosti. V reálném toku kapalin jsou obě složky nenulové, míra deformace klubka tudíž závisí na jejich relativní velikosti. Při stejném podílu obou složek dochází k největší deformaci, natažení klubka ve směru proudění. S rostoucím průtokem je umožněna větší míra protažení, protože je usnadněno překonání entropických sil v klubku. Po natažení klubka následuje jeho relaxace. Ta je ovlivněna jednak přirozenou snahou systému o dosažení minima energie, ale i Brownovým pohybem. Po ukončení relaxace zůstává klubko natažené do řetězce, nebo se sbalí zpět do podoby statistického klubka. Na Obr. 8 je znázorněna deformace a následná relaxace polymerního klubka. [36]



Obr. 8: Deformace a relaxace polymerních řetězců za toku [36]

Jak je již uvedeno výše, roztoky HA vykazují viskoelastický charakter. Elastické vlastnosti se projevují odolností polymerní sítě vůči rychlému a krátkodobému proudění roztoku. Odolnost je umožněna distribucí zatížení nebo smykové síly v rámci sítě. Za viskózní projev chování lze považovat odolnost sítě pomalému a dlouhotrvajícímu proudění, které vede k zipovému rozrušení intermolekulárních vazeb mezi řetězci (zejm. vodíkových můstků), dále k narovnání řetězců a jejich přeskupení díky opětovnému znovuvyvoření intermolekulárních vazeb. U vyšších koncentrací HA v roztoku za působení vysokofrekvenčních kmitů převládá elastická složka deformace. Na Obr. 9 je uveden viskoelastický model sítě HA dle Hascalla. [12, 33, 34]



Obr. 9: Model znázorňující viskoelastický charakter sítě HA [12]

Tento poměrně jednoduchý viskoelastický model byl posléze rozšiřován o další poznatky. Scott a Heatley popsali jednak řetězce HA jako antiparalelní šroubovice vzhledem podobné lanu, a jednak systém vodíkových vazeb rozšířený o spojení cukerných zbytků přes molekuly vody. Tento popis struktury koreluje s tuhostí řetězců a reversibilním poklesem vysoké viskozity při vysokém pH. Dle této dvojice je pro viskoelastické chování zásadní samoorganizace řetězců HA. Tuto teorii podporuje zejména přítomnost hydrofobních oblastí umožňující asociaci řetězců a jejich stáčení. [37, 38]

Pseudoplastický charakter roztoků HA je důsledkem rozbalování klubek a řetězců uspořádaných do šroubovic po uvedení roztoku do toku. S pseudoplasticitou souvisí tixotropní chování roztoků HA. To je určeno časově závislými a vratnými změnami uspořádání polymerního systému při rozrušování vazeb mezi řetězci a jejich následném znovuvytvoření. Při smykovém namáhání polymeru v roztoku je s časem snižována zdánlivá viskozita, při ponechání systému v klidu se vazby obnovují a viskozita opět roste. Tím se reorganizuje nejen polymerní klubko, ale i polymerní síť, do které jsou klubka propojena. S rostoucí koncentrací roztoku je sice zvyšována pevnost sítě, nicméně oproti tomu je snižována možnost její deformace, potažmo reorganizace. Systém degraduje až při dlouhodobém vystavení vysokým smykovým deformacím. [33, 34, 39]

Maleki a kol. se zabývali vlivem stálého smykového toku na intermolekulární asociace zředěných a polozředěných vodných roztoků HA. Výsledky jejich studia lze shrnout následovně:

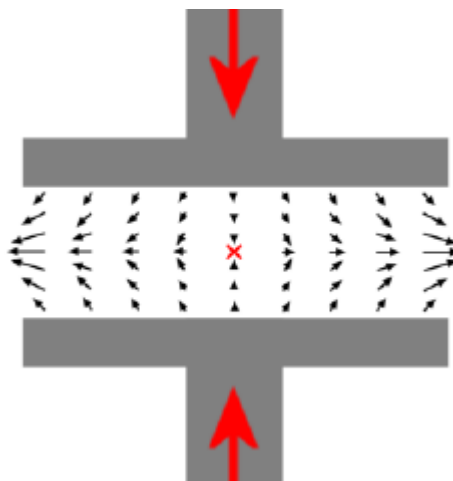
- Při působení vysokých rychlostí smykové deformace na polozředěné roztoky HA se výrazně projevilo jejich tixotropní chování. Při následném návratu k nízkým rychlostem smykové deformace nebyla pozorována hystereze.
- Polymerní systém HA mechanicky nedegraduje při vystavení vysoké rychlosti smykové deformace (1000 s^{-1} po dobu 10 min).
- Po zvýšení teploty z $10 \text{ }^\circ\text{C}$ na $45 \text{ }^\circ\text{C}$ u 1% hm. roztoku HA poklesla zdánlivá viskozita o cca 40 %.
- Při aplikaci nízké rychlosti smykové deformace ($0,001 \text{ s}^{-1}$) na zředěný roztok HA bylo pozorováno zvýšení viskozity roztoku. Tato skutečnost podporuje domněnku, že k tvorbě silnějších asociačních struktur při nízkých koncentracích HA dochází pravděpodobně díky snadnější reorganizaci řetězců. Dále se předpokládá, že smykem indukované protažení klubka a zipové rozrušení intermolekulárních vazeb mezi řetězci ovlivňuje následné znovuvytvoření vodíkově vázaných struktur a polymerní sítě.
- Při působení vyšší rychlosti smykové deformace ($0,1 \text{ s}^{-1}$) byly polymerní řetězce vyrovnány a viskozita klesala s časem, protože vyšší rychlost průtoku brání tvorbě asociačních struktur.
- Po vystavení roztoků zvyšující se rychlosti smykové deformace během krátkého času se polymerní síť rozpadla, ale byla obnovena po návratu k nízkým rychlostem smykové deformace. [39]

2.5.2 Vliv působení tlaku na polymerní systém v roztoku

Studiu planární elongace roztoků HA se věnovali Haward a kol., kdy simulovali namáhání synoviální tekutiny v kolenním kloubu (schéma viz Obr. 10). Za podmínky absence skluzu na stěně obecně platí, že tok generovaný tlakem vytváří složité, časově proměnné nehomogenní pole s charakterem:

- silného smyku v blízkosti povrchu desek,
- biaxiálního podélného toku,
- stagnačním bodem ve střední rovině mezi deskami (červený křížek na Obr. 10).

[40, 41]



Obr. 10: Schéma tokového pole generovaného tlakem [40]

Ve stagnačním bodě je rychlost kapaliny nulová, tudíž zdržná doba zde může být v podstatě nekonečná. Za tohoto předpokladu lze očekávat rozpletení flexibilních makromolekul a jejich značné protažení. Vlivem značného protažení dochází k překročení relaxačního času makromolekul HA, respektive Weissenbergova čísla, proto řetězce v protaženém stavu zůstanou. Protažení řetězců vede k řádovému nárůstu elastických napětí a zdánlivé viskozity. Tím je umožněn mechanismus pohlcování energie v průběhu nárazového zatížení i při velmi vysokých rychlostech deformace. [42–44]

Lubrikační vlastnosti HA způsobují vznik toku v objemu tekutiny a růst významu extenzionálních příspěvků k toku ve střední rovině mezi deskami oproti smykovým příspěvkům. [40]

Stabilitě lubrikačních a tlumících vlastností synoviální tekutiny na styku s chrupavkou se věnovali Zandara a kol. Jako modelový systém byla použita dipalmitoylfosfatidylcholinová dvojvrstva, na jejímž povrchu byla sledována adsorpce HA za působení různě vysokých hydrostatických tlaků a teplot. Byla prokázána mnohem větší stabilita a plná reverzibilita systému po adsorpci HA (přes hydrofobní oblasti na řetězcích). [45]

2.6 Metody charakterizace roztoků HA

2.6.1 Rozptyl světla

Rozptyl světla je primární metodou používanou k charakterizaci molekulové hmotnosti a velikosti makromolekul HA. Je řazen mezi absolutní techniky, jako je osmometrie, sedimentace nebo hmotnostní spektrometrie, ale pouze rozptyl světla lze použít ke spojení s online systémem např. gelové permeační chromatografie a tím získat kompletní informaci o rozptylech molekulových hmotností HA. [23]

2.6.1.1 Statický rozptyl světla

Mezi nejběžnější metody analýzy pomocí statického rozptylu světla patří širokoúhlý a víceúhlový rozptyl světla. Statický rozptyl světla umožňuje přímé měření, případně extrapolaci na nulovou koncentraci, díky čemuž lze zjistit průměrnou molekulovou hmotnost, polydisperzitu, gyrační poloměr, stupeň větvení, poloměr otáčení, tuhost řetězce, hodnotu druhého viriálního koeficientu nebo molekulární expanze HA. [23]

Kombinace gelové permeační chromatografie s detektorem víceúhlového rozptylu je standartní metodou pro analýzu molekulové hmotnosti HA. [23, 46, 47]

2.6.1.2 Dynamický rozptyl světla

Dynamický rozptyl světla neboli fotonová korelační spektroskopie je metoda používaná ke stanovení průměrné velikosti částic (tzv. z-average) a odhadu polydisperzity suspenzí, koloidních roztoků, makromolekul, tekutých krystalů, hydrodynamických interakcí v koncentrovaných roztocích disperzí. [48, 49] Příprava vzorků a postup měření HA roztoků byl optimalizován v rámci dizertační práce Lenky Musilové. [50, 51] Obdobný postup ke zjištění z-average a zeta potenciálu HA používají i další autoři. [25, 52, 53]

2.6.2 Reometrie, viskozimetrie

Jak již bylo popsáno výše, roztoky HA jsou Nenevtonské, viskoelastické a vyznačují se pseudoplastickým charakterem. To znamená, že jejich viskozita je výrazně závislá na rychlosti smykové deformace, molekulové hmotnosti, iontové síle rozpouštědla, teplotě, aj. Po překročení kritické koncentrace tvorby sítě roste viskozita roztoku exponenciálně s koncentrací. [18, 22, 54]

Relaxační čas polymerních řetězců, respektive jejich modul pružnosti, lze na reometrech měřit dvěma způsoby. Při měření rychlosti smykové deformace je relaxační čas úměrný převrácené hodnotě kritické smykové rychlosti odečtené z naměřené tokové křivky. Druhou možností je měření v oscilačním módu, kdy při nižších frekvencích převládá viskozitní odezva (představující ztrátový modul), naopak při vyšších frekvencích převládá elastická odezva roztoku (soufázový modul). Relaxační čas odpovídá převrácené hodnotě frekvence při překřížení těchto křivek. Měření viskozity roztoků HA by mělo probíhat při nízkých rychlostech smykové deformace tak, aby nebyl překročen relaxační čas polymerního řetězce a tím nedošlo ke zkreslení výsledků. [23, 55]

Stanovení viskozity roztoků je prováděno dle Hugginsovy, Kramerovy, Martinovy nebo Mark-Houwinkovy rovnice. Dále je možné přepočtení viskozity na molekulovou hmotnost polymeru. Experimentální zjištění viskozity probíhá na temperovaném kapilárním viskozimetru (případně ve spojení s metodou statického rozptylu světla), u rozpouštědla je předem stanovena Mark-Houwinkova konstanta (např. pomocí kapalinové chromatografie). Viskozimetr je volen dle molekulové hmotnosti HA tak, aby měření probíhalo za co nejmenší rychlosti smykové deformace. [20, 22, 32, 39, 56, 46, 51, 57]

Pro ve vodě rozpustné polysacharidy byly odvozeny alternativní Mark-Houwinkovy rovnice pro korelaci viskozity, rychlosti smykové deformace a koncentrace. Tyto rovnice platí pro oblasti buď velmi nízkých (respektive nulových) nebo velmi vysokých rychlostí smykových deformací, kde je viskozita konstantní. [58]

Reologická a viskozimetrická měření lze provádět na rotačním viskozimetru s geometrií dvojitého válce, sousých válců nebo geometrií kužel-deska, Ubbelohdeho kapilárním viskozimetru, kapilárním kuličkovém viskozimetru nebo ultrazvukovém viskozimetru. [22, 31, 32, 55, 56]

2.6.3 Chromatografie

Určení molekulové hmotnosti, respektive jejího rozptylu, probíhá pomocí gelové permeační, iontoměničové, iontově reverzní nebo kapalinové chromatografie ve spojení se statickým rozptylem světla. [20, 31, 32, 46, 47, 52, 53, 59,] Byla provedena také optimalizace frakcionace vylučovací chromatografie pro ultravysokomolekulární HA. [60]

2.6.4 Elektroforéza

Elektroforéza je další metodou k určení molekulové hmotnosti. HA je polyanion s konstantním poměrem náboje a molekulové hmotnosti, použitím vhodného média lze tedy na základě různé mobility makromolekul ve stejnosměrném elektrickém poli rozdělit vzorek na frakce o různé molekulové hmotnosti. Pro nízkomolekulární HA jsou používány zesíťené polyakrylamidové gely, pro separaci vysokomolekulární HA agarové gely. [20, 61, 47]

2.6.5 Interferometrie

Měření difuzních koeficientů závislých na koncentraci polymeru v roztoku bylo optimalizováno Dudou a kol. díky zkonstruování klínového interferometru. [62] Tuto metodu lze použít také pro stanovení koncentrace, popisu rozložení koncentračního gradientu a botnání polymeru rozpouštědlem. [63, 64] Mráčkem a Urbanem byl vytvořen software k analýze interferometrických dat z průběhu difuzního procesu při botnání polymeru, respektive HA. [65] Na základě výsledků získaných z klínového interferometru a viskozitních charakteristik byly provedeny výpočty zdánlivého difuzního koeficientu botnání, aktivační entalpie difuze, aktivační entalpie botnání a termodynamická aktivita rozpouštědla. [66] Vzájemné difuzní koeficienty byly naměřeny také Wikem a Comperem prostřednictvím mezní relaxace v analytické ultracentrifuze Raleighho interferenční optikou a absorpční optikou pomocí fluoresceinem značené HA. [24] Pro stanovení vzájemných difuzních koeficientů je nově používána Taylorova disperzní metoda. [57]

2.6.6 Rentgenová difrakce

Rentgenovou difrakcí byla stanovena konformace HA napnutých řetězců a popsány vybrané interakce. Jednořetězcové konformace obsahující 2, 3 nebo 4 disacharidové jednotky na otočku byly popsány v přítomnosti H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , aj. iontů. Dvojšroubovice se čtyřmi disacharidovými jednotkami na otočku byly popsány v iontových podmínkách H^+/K^+ , Rb^+ , NH_4^+ . [14, 23, 27, 67–69]

2.6.7 Nukleární magnetická rezonance

Prostřednictvím nukleární magnetické rezonance a simulace prostoru vyplňujících molekulárních modelů byla zobrazena sekundární struktura HA ve směsi vody a dimethylsulfoxidu. Struktura byla předem stanovena v dimethylsulfoxidu, rozpouštědle

působícím jako akceptor vodíkových vazeb. Zobrazeny tak byly stabilní vodíkové můstky. Po přidávání vody byly sledovány změny konformace HA s ohledem na tvorbu „vodných mostů“ mezi karboxyly a acetamidovými skupinami. [15, 23] Tato metoda byla použita k popisu sekundární, terciární struktury v roztoku (např. uspořádání intramolekulární vodíkové vazby kolem glykosidické vazby a její vliv na konformaci) a zároveň byl sledován vliv smykové deformace na změnu konformace klubka. Metoda může rovněž sloužit ke stanovení čistoty materiálu před biologickými testy. [16, 20, 31, 38, 53, 67, 69, 70, 71, 68, 72, 73]

2.6.8 Elektronová mikroskopie

Pomocí elektronové mikroskopie a následných počítačových simulací bylo zjištěno, že HA v roztoku může tvořit útvary podobné listům nebo tubám, které jsou stabilizovány prostřednictvím vodíkových vazeb mezi hydroxymetylovými a karboxylovými skupinami u antiparalelních řetězců. Uspořádání do listů a tub potvrzují některé viskoelastické a biologické vlastnosti HA. [19, 52, 53, 70, 72]

2.6.9 Konfokální mikroskopie

Spontánní asociace řetězců byla zobrazena pomocí FRAP a FRET metod, které umožňují zobrazení slabých interakcí i za vysokých koncentrací roztoku (tj. kdy je překročena kritická koncentrace a domény HA jsou překryty), kdy jsou interakce mezi řetězci nejpravděpodobnější. Koncentrační závislost umožňuje rozlišení elektrostatických interakcí a vodíkových můstků sousedních sacharidů, které se vyskytují za všech koncentrací. Také lze popsat difuzní charakteristiky včetně difuzního koeficientu vzniklé polymerní sítě. [20, 23, 35, 53, 74, 75]

2.6.10 Diferenciální skenovací kalorimetrie

Tato metoda ve spojení s termogravimetrickou analýzou byla použita ke stanovení počtu molekul vody v hydratovaném objemu HA různých molekulových hmotností v přítomnosti různých protiiontů rozpouštědla. Dále bylo zjištěno, že odpařování vody z HA je kompenzováno uvolňováním tepla a zároveň tvorbou nových vazeb v nadmolekulární struktuře. [76, 77]

Mimo výše uvedené techniky jsou v literatuře popsány studie využívající mikroskopii atomárních sil, tenziometrii a goniometrii, jak je popsáno v následující části věnované chování HA na fázových rozhraních.

3 HYALURONAN NA FÁZOVÝCH ROZHRAŇÍCH

Dle definice T. Younga aj. W. Gibbse je rozhraní hranicí mezi fázemi, na které se mění skokově jejich vlastnosti. Je přirovnáváno k hypotetické elastické membráně, na jejímž povrchu molekuly neustále interagují za účelem dosažení stavu energetického minima, potažmo co nejmenší a nejhladší plochy. Rozdílné typy povrchových rozhraní lze charakterizovat pomocí povrchového, respektive mezifázového napětí. [78]

3.1 Rozhraní kapalina - plyn

Tvorba tohoto typu rozhraní je řízena a ovlivněna zejm. těmito interakcemi:

- hydrofobními: Ve vodných roztocích, ve kterých jsou přítomny nepolární řetězce, mají tyto interakce největší vliv na tvorbu fázového rozhraní. Hnací silou procesu snižování povrchové energie je migrace hydrofobních řetězců a jejich následné asociace s jinými molekulami na rozhraní kapalina - plyn. Na fázovém rozhraní zabraňují kontaktu hydrofobních molekul s hydrofilními molekulami polárního rozpouštědla a tím podporují jejich reorganizaci.
- elektrostatickými: Jejich vliv závisí na podmínkách systému, mezi které patří pH nebo iontová síla rozpouštědla, a dále na charakteru přítomných molekul, zda obsahují stejné nebo opačné elektrické náboje. Výsledkem těchto podmínek jsou buď přitažlivé, nebo odpudivé interakce. Iontová síla rozpouštědla ovlivňuje nepřímo úměrně pevnost a rozsah těchto interakcí.
- vodíkovými vazbami: Jsou přítomny v systémech, kde rozpuštěná látka, případně rozpouštědlo, obsahují sami o sobě vodíkové vazby. Vzhledem k četnosti těchto vazeb u makromolekul HA lze předpokládat jejich zvýšený vliv.
- stérickým vyloučením: Makromolekuly HA jsou objemné makromolekuly, proto se v systémech stérické vyloučení vyskytuje za každých podmínek.
- povrchovým potenciálem: Vzniká v důsledku přítomnosti molekul vody, které se v blízkosti fázového rozhraní přednostně orientují kyslíkovými atomy směrem k rozhraní, a dosahuje hodnoty 100–200 mV. Tím dochází k ovlivňování migrace a reorganizace molekul povrchově aktivních látek (tenzidů/surfaktantů) na fázovém rozhraní. Potenciál je v konečném důsledku určován charakterem vzniklé mezifázové vrstvy a je úměrný hustotě přítomných dipólů. [79–81]

V daném systému je míra jednotlivých interakcí závislá na charakteristikách polymeru, respektive HA (molekulová hmotnost, konformace, flexibilita, aj.) a rozpouštědla (pH, iontová síla). [80]

V konkrétním systému při dané teplotě a tlaku jsou interakce řízeny snižováním Gibbsovy volné energie. Tudíž může být snížena entalpie nebo zvýšena entropie systému. Pokud má systém malý objem, přímé přitažlivé van der Waalsovy a coulombické síly snižují Gibbsovu energii na úkor entropie. [82]

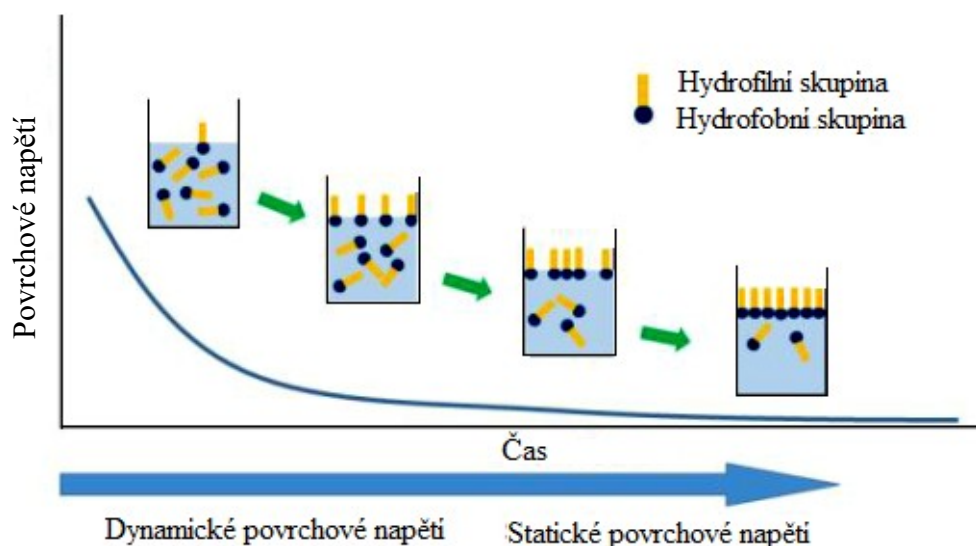
Chování všech polysacharidů, nejenom HA, na fázových rozhraních je předmětem mnohých studií, protože polysacharidy lze použít jako přírodní alternativu syntetickým látkám vkládaných do organismu a rozhraní kapalina - plyn lze připodobnit k membránám. Jak známo, celé organismy jsou tvořeny a řízeny mnoha těmito hierarchicky uspořádanými mikrostrukturami a jejich interakcemi. Studium chování a ovlivnění reorganizačních schopností polysacharidů na tomto fázovém rozhraní by tedy mohly přinést poznatky využitelné při vývoji systémů řízeného uvolňování léčiv, povrchových úpravách implantátů, vývoji biosenzorů, aj. [79, 81]

3.1.1 Adsorpce na rozhraní kapalina - plyn

Odpor molekul vody a nepolárních částí řetězců na rozhraní způsobuje pokles mezifázové volné energie a tím vede k adsorpci, agregaci, formování micel nebo separaci povrchově aktivních látek na tomto fázovém rozhraní. Polymerní řetězce migrují v důsledku Brownova pohybu a z podnětu hydrofobních sil k rozhraní, kde se reorganizují nepolárními částmi řetězce do plynné fáze a polárními do vodné fáze. Makromolekuly se přednostně na rozhraní reorganizují kvůli značnému odporu mezi nabitými polárními skupinami, které jsou v přímém kontaktu s vodou, přestože by byla v daném okamžiku energeticky výhodnější jejich agregace. Informace o změnách konformace polymeru na fázovém rozhraní nepřímo zprostředkovává měření změny povrchového napětí. [79, 81]

Zda se bude daný typ materiálu adsorbovat na fázovém rozhraní lze odhadnout z Gibbsovy rovnice a pokles povrchového napětí s časem v závislosti na koncentraci roztoku dle Hua-Rosenovy rovnice. Vliv koncentrace a teploty na časový vývoj povrchového napětí solných roztoků HA byl popsán Ribeirem a kol. U zředěných roztoků je nejdříve povrchové napětí téměř konstantní (tzv. indukční perioda), poté rychle poklesne (tvorba jedno/vícevrstevné adsorbované vrstvy na rozhraní) a je dosaženo mezivrstevné rovnováhy, kdy je pokles povrchového napětí velmi malý a makromolekuly jsou reorganizovány.

Nakonec je dosaženo rovnovážného stavu, kdy je povrchové napětí konstantní. U koncentrovanějších roztoků není detekována indukční perioda, protože počet molekul adsorbovaných na rozhraní je dostatečný, aby bylo zajištěno rychlé obsazení a reorganizování makromolekul HA na rozhraní. Časový vývoj povrchového napětí zahrnující jak adsorpci, tak i reorganizaci HA na rozhraní je znázorněn na Obr. 11. [83]



Obr. 11: Vývoj povrchového napětí v čase [84]

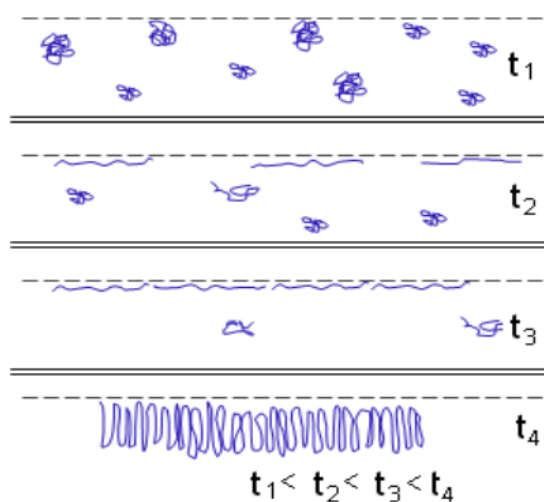
U zředěných roztoků prakticky bez povrchové aktivity jsou řetězce HA převážně odpuzovány od rozhraní v souladu s jejich hydrofilním charakterem. U koncentrovanějších roztoků je adsorpce výrazně vyšší a odpovídá hodnotám pro tvorbu více vrstev na rozhraní. U roztoků převyšujících kritickou koncentraci je na rozhraní posléze vytvořena také síť. Tvorba sítě, případně filmu, je studována s ohledem na interakce s buňkami. Další studie se zabývají tvorbou micel nebo derivátů HA a jejich chováním na tomto rozhraní pro řízenou distribuci léčiv. [83, 85, 86]

3.1.2 Reorganizace na rozhraní kapalina - plyn

Reorganizaci předchází difuze makromolekul na rozhraní. K charakteristikám tohoto děje patří rozptylování částic a vyrovnání jejich koncentrace v celém objemu. Fyzikální podstatou je druhý termodynamický zákon, tedy zvyšování entropie systému tak, aby bylo dosaženo stavu s co nejnižší energií. Rychlost je dána charakterem a koncentrací molekuly vzhledem k rozpouštědлу, což ovlivňuje silové interakce a difuzní koeficient,

dále je ovlivněna teplotou a viskozitou. Tyto parametry ovlivňují také celý následný proces reorganizace. [79, 81]

Po nadifundování makromolekul na rozhraní začíná jejich rozprostírání a rozbalování. Lineární molekuly difundují k rozhraní a ukládají se paralelně s ním, rozvětvené se rozprostírají dle typu molekul pod určitým úhlem k rozhraní. Poté je makromolekula reorganizována nepolárními řetězci k plynné fázi a polárními do vodné fáze. U polysacharidů je jejich volná energie ovlivněna stérickým odporem jednotlivých řetězců, který ve výsledku omezuje reorganizaci. Znázornění difuze, adsorpce a reorganizace v čase lze vidět na Obr. 12. [79, 81, 87]



Obr. 12: Difuze, adsorpce a reorganizace polysacharidu na fázovém rozhraní v čase [87]

3.1.3 Metody charakterizace adsorpce a reorganizace na rozhraní kapalina - plyn

Povrchové napětí je měřeno za použití následujících metod:

- visící kapky [83],
- Wilhelmyho destičkové metody [50] [51],
- Du Noüyho odtrháním prstence [86].

3.2 Rozhraní kapalina - pevná látka

Pro tento typ rozhraní je z fyzikálního hlediska důležitá znalost míry povrchové energie a s tím spojené smáčecí charakteristiky a velikost kontaktního úhlu mezi fázemi. Na základě těchto charakteristik lze popsat rozložení a velikost sil působících na tomto rozhraní. [78]

3.2.1 Smáčení

V souladu s druhým termodynamickým zákonem je snahou kapky dosažení stavu s co nejnižší energií. Po kontaktu s pevnou fází je její tvar změněn tak, aby byly v rovnováze kohezní síly působící uvnitř kapaliny a adhezní síly působící mezi kapalinou a pevnou fází. Velikost kontaktního úhlu je výsledkem poměru povrchových energií kapaliny a pevné látky spojené s rovnováhou adhezních a kohezních sil. [78]

3.2.2 Adsorpce a reorganizace na rozhraní kapalina - pevná látka

Na rozhraní kapaliny a hydrofobního povrchu dochází k adsorpci a reorganizaci makromolekul dle obdobných pravidel jako u rozhraní kapalina - plyn. Mezi významnější rozdíly patří řízení adsorpce pomocí elektrostatických a vodíkových sil namísto hydrofobních. S ohledem na pH a iontovou sílu rozpouštědla dochází k tvorbě vodíkových můstků a orientaci hydroxylových skupin k rozhraní. U zředěných roztoků jsou polymerní řetězce rozprostírány rovnoběžně s rozhraním, u koncentrovanějších jsou řetězce ukládány kolmo k rozhraní, stejně jako fázových rozhraní kapalina - plyn popisovaných výše. [88, 89]

U koloidních roztoků s velmi malými pevnými částicemi je adsorpce závislá na jejich koncentraci v roztoku. Při nízké koncentraci je adsorpce náhodná, při tzv. kritické koncentraci dochází k obsazení právě všech molekul schopných adsorpce a při vyšší koncentraci přebytečné makromolekuly mohou rozrušovat stávající vazby a tím destabilizovat stávající uspořádání na fázovém rozhraní. [79, 81]

3.2.3 Metody charakterizace adsorpce a reorganizace na rozhraní kapalina - pevná látka

- kolorimetrické metody: Hustota adsorbovaných molekul je sledována pomocí UV-VIS spektroskopie s ohledem na vývoj absorbance vzorku v čase. [90, 88]
- elektrokinetická měření: Je měřen zeta potenciál roztoků o různém pH a iontové síle, jsou popsány elektrostatické interakce. [88]
- FTIR, fluorescenční spektroskopie: Během adsorpce je sledován posun spekter a z nich popsáno uspořádání charakteristických skupin s ohledem na vzniklé vodíkové vazby mezi polymerem a povrchem. [52, 88] Metodu lze použít také k zobrazení hustoty adsorpce HA na povrchu. [45]
- AFM: Jsou zobrazeny polymerní řetězce v pevném stavu a jejich adheze k povrchu substrátu (slídy, příp. grafitu) za různých podmínek. [88, 89, 91, 92] Pokud je polymer v plném kontaktu s povrchem, lze určit navíc délku řetězce, molekulovou hmotnost a její rozptyl. Lze také zobrazit HA v kapalném stavu. [93]
- RTG analýza: Je zobrazena struktura substrátu (dvojvrstvy), průběh a hustota adsorpce HA. [45]

Interakce a chování polysacharidů, potažmo HA, na fázovém rozhraní kapalina - pevná látka jsou studovány za účelem aplikace získaných poznatků do oblasti zvyšování buněčné adheze na různých površích, pro popis vzájemných reakcí polysacharidů s proteiny, pro využití v tkáňovém inženýrství nebo v dalších odvětvích medicíny. [23, 89, 91, 94] Práce Bertsově a kol. je příkladem chemické modifikace povrchu biomateriálů a vývoje implantátů. Na silikagel s povrchovou vrstvou oxidu křemičitého byla chemicky naroubována HA o různých koncentracích. Nanášením méně koncentrovaných roztoků HA dvoustupňovou depozicí vznikají struktury s vyšším obsahem vody a jsou citlivější na přítomnost iontů, jsou tedy vhodné pro dopravu léčiv. Naproti tomu struktury vzniklé z koncentrovanějších roztoků mají dobré bariérové vlastnosti. [95]

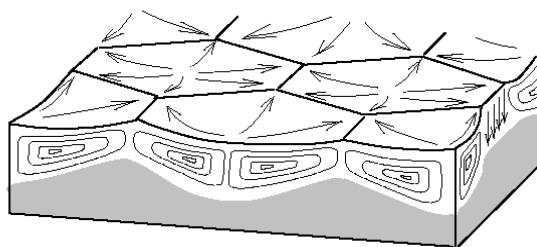
3.3 Rozhraní kapalina - kapalina

Toto rozhraní vzniká na styku dvou vzájemně nemísitelných kapalin nebo v rámci jedné kapaliny, ve které se vyskytují místa s různým povrchovým napětím, různými reologickými charakteristikami, aj. Tato místa vznikají například v důsledku působení samoorganizovaného Bénard-Marangoniho proudění v roztoku. Adsorpce a reorganizace

makromolekul probíhá na základě obdobných zákonitostí jako u rozhraní kapalina - plyn. [78, 96]

3.3.1 Bénard-Marangoniho proudění

Samoorganizované Bénard-Marangoniho proudění (B-M proudění) vzniká v roztocích s volným povrchem (fázové rozhraní kapalina - plyn) a výškou vodního sloupce do jednoho centimetru. Vznik tohoto proudění je podmíněn nehomogenitou povrchového napětí kapaliny vyvolávající vznik tečného napětí z důvodu teplotních fluktuací, popřípadě rozdílných koncentrací v povrchové vrstvě, což může být rovněž zapříčiněno horizontálním teplotním gradientem. Důsledkem těchto změn je transport po fázovém rozhraní z míst o vyšší teplotě do míst s nižší teplotou (tj. z míst o nižší hodnotě povrchového napětí do míst s vyšším povrchovým napětím). Mimo rychlých změn koncentrace v povrchové vrstvě kapaliny ovlivňuje průběh proudění vypařování rozpouštědla z horní vrstvy. To znamená, že vznikající proudění je snahou systému o vyrovnání hodnot povrchového napětí a koncentrací. Mimo to na styku jednotlivých B-M buněk dochází ke tvorbě rozhraní kapalina - kapalina. Trajektorie proudění a posuvu částic v hexagonálních buňkách je znázorněna na Obr. 13. [97]



Obr. 13: Bénard-Marangoniho buňky [97]

3.3.2 Vliv B-M proudění a tokových nestabilit na polymerní klubko

Bylo prokázáno, že polymerní klubko je tokem deformováno nebo orientováno a tvoří pravidelné časoprostorové struktury v závislosti na své elasticitě, jak bylo popsáno výše. Separace toku na makroskopické úrovni s různými reologickými charakteristikami může způsobovat smykem indukovaný vznik struktur, jejichž překryv je ovlivněn elasticitou polymerních klubek. Nestability spojené s reorganizací tokových mikrostruktur a doprovázené formováním pásů s různou rychlostí smykové deformace jsou běžnou součástí toku. [98–100]

Propojíme-li výše uvedené tokové nestability s nelinearitou B-M proudění, kdy na styku B-M buněk je proudění rychlejší oproti proudění ve středu buněk, vzniká velmi komplikovaný systém separovaných toků v rámci B-M buněk s různou rychlostí, teplotou a povrchovým napětím. Tyto separované toky o různých reologických charakteristikách různě deformují a reorganizují polymerní klubka. Na styku B-M buněk dochází k interagování polymerních klubek na rozhraní kapalina - kapalina, na horním okraji kapalina - vzduch. Polymerní klubka jsou tedy neustále mechanicky reorganizována. [97, 98, 101]

I. PRAKTICKÁ ČÁST

4 POPIS EXPERIMENTŮ

V souladu s hlavními cíli této práce byly připravovány roztoky hyaluronanu sodného o rozdílné střední molekulové hmotnosti. Pro přípravu roztoků bylo použito třepací zařízení, temperované magnetické míchadlo a zařízení generující teplotní spády. Připravené roztoky byly charakterizovány pomocí tenziometrie, goniometrie, dynamického rozptylu světla a viskozimetrie.

4.1 Použité chemikálie

K přípravě roztoků byl použit hyaluronan sodný v kosmetické čistotě o různé molekulové hmotnosti, viz Tab. 1, od společnosti Contipro a. s. Pro přípravu fyziologického roztoku (0,9% hm.) byl použit NaCl – Bioextra od Sigma-Aldrich a ultračistá voda s odporem 18,2 M Ω ·cm připravená pomocí reverzní osmózy na zařízení Direct-Q.

Tab. 1: Přehled použitých vzorků HA

Střední M_w [kDa]	Distribuce M_w [kDa]	Označení
124	100–150	M_w 124
243	150–350	M_w 243
370	250–450	M_w 370
600	500–1 200	M_w 600
1 180	500–1 200	M_w 1180
1 500	1 400–1 600	M_w 1500

4.2 Čištění skla, kontrola jeho povrchové čistoty

Veškeré sklo použité k přípravě a charakterizaci roztoků bylo očištěno v sérii lázní v řadě za sebou: kyselina sírová, oplach destilovanou vodou, kyselina chlorovodíková, oplach destilovanou vodou, peroxid vodíku. V každé z lázní kyselin a peroxidu bylo sklo ponecháno minimálně 20 minut. Poté bylo sklo opláchnuto destilovanou vodou, acetonem, destilovanou vodou a etanolem, s následným umístěním do sušárny vytemperované na 120 °C na dobu 20 min pro zajištění jeho sterility. Povrchová čistota skla s ohledem na přítomnost povrchově aktivních látek byla následně kontrolována měřením změn povrchového napětí čistého rozpouštědla, z něhož byly následně připravovány polymerní roztoky.

4.3 Příprava roztoků

Příprava roztoků probíhala třemi rozdílnými přístupy, v nichž se neměnila pouze střední teplota rozpouštění, ale rovněž míra namáhání polymerního systému v průběhu jeho rozpouštění.

Byly použity následující zařízení a nastavení procesních parametrů:

- Třepací stroj: HA byla rozpouštěna ve fyziologickém roztoku ve skleněné lahvi za pokojové teploty (24 ± 1) °C na třepacím stroji LT 2 po dobu 12 až 48 h, viz Obr. 14.



Obr. 14: Použité třepací zařízení s umístěným roztokem polymeru

- Temperované míchadlo: HA byla rozpouštěna ve fyziologickém roztoku ve skleněné lahvi na magnetickém míchadle (typ IKA RCT basic) s temperační lázní při teplotě 24 nebo 50 °C po dobu 12 až 48 h, viz Obr. 15.



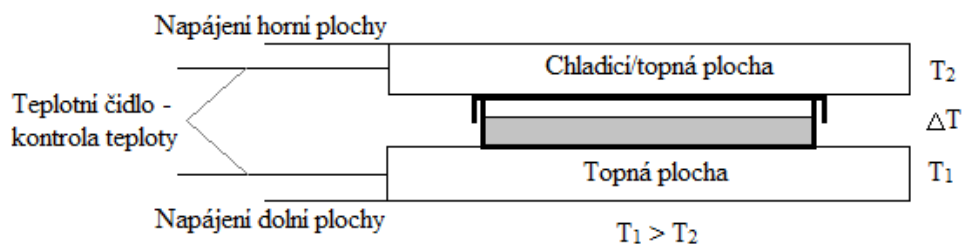
Obr. 15: Použitá temperační lázeň na magnetickém míchadle s roztokem polymeru

- Zařízení generující teplotní spád: HA byla rozpouštěna ve fyziologickém roztoku ve skleněné Petriho misce (o poloměru 5,5 cm a výšce 1,1 cm) v zařízení generujícím definované teplotní spády (TFFC, viz Obr. 16) po dobu 24 h za různých teplotních spádů. Rozložení teplot a směr teplotního spádu působícího na rozpouštěný roztok je znázorněn na Obr. 17.



Obr. 16: Speciálně zkonstruované zařízení na ÚFMI pro generaci definovaných teplotních spádů (TFFC)

V dolní části Obr. 16 je vyobrazena pracovní jednotka zařízení s popisem hlavních konstrukčních součástí: 1) pomocný rám, 2) ventilační tunel, 3) horní topná/chladicí plocha, 4) spodní topná/chladicí plocha, 5) chladič, 6) základna, 7) antivibrační blok, 8) držák teplotního čidla, 9) teplo vodivý „sendvič“ (Cu-polymer-Cu), 10) topný článek, 11) plastová deska, 12) modifikační cela, 13) nerezový plech, 14) kondenzátor, 15) ocelová deska.



Obr. 17: Rozložení teplot a směr teplotního spádu působícího na roztok polymeru umístěný v Petriho misce mezi funkční plochy zařízení uvedeného na Obr. 16

4.4 Použité měřicí metody

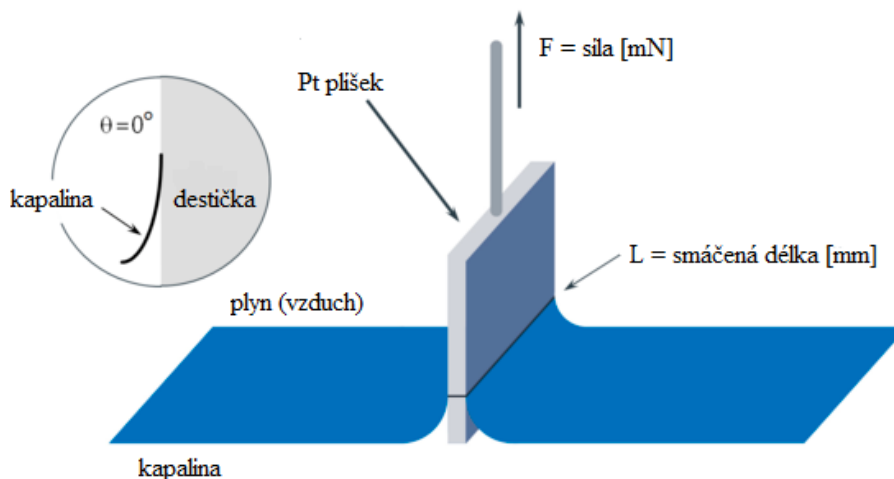
4.4.1 Wilhelmyho destičková metoda

Pomocí této metody bylo měřeno povrchové (mezifázové) napětí na rozhraní kapalina - plyn - pevná látka. Princip metody je založen na měření okamžité síly působící na destičku procházející fázovým rozhraním, viz Obr. 18. Síla je měřena velmi citlivým systémem vah. Plíšek je nejčastěji vyroben ze zdrsňené platiny kvůli její inertnosti a velmi vysoké povrchové energii, respektive nulovému kontaktnímu úhlu smáčení. [84] [102]

Povrchové napětí roztoku je přepočítáno ze vztahu (1). [84]

$$F = mg + L\sigma \cdot \cos\theta - sh\rho g, \quad (1)$$

kde: F síla potřebná k vyrovnání Pt plíšku do svislé polohy,
 m hmotnost plíšku,
 g gravitační zrychlení,
 L délka smáčení plíšku,
 σ povrchové napětí,
 ϑ kontaktní úhel smáčení,
 s tloušťka Pt plíšku,
 h výška ponoření,
 ρ hustota.



Obr. 18: Schéma Wilhelmyho destičkové metody [102]

V této práci byla metoda použita ke sledování ustalování rovnováhy roztoků HA v čase, pozorovatelné v podobě poklesu povrchového napětí roztoků s HA v čase, kde se HA může za určitých podmínek samovolně adsorbovat a reorganizovat.

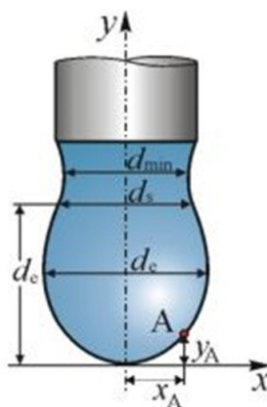
K měření povrchového napětí byl použit Processor Tensiometer, Krüss K12 od společnosti KRÜSS GmbH. Vzorky byly před měřením vytemperovány v sušárně na teplotu $37\text{ }^\circ\text{C}$. Poté byly přelity do vytemperované měřicí nádoby, která prošla standardním postupem čištění skla a byla ověřena její čistota kontrolním měřením povrchového napětí čisté vody nebo fyziologického roztoku. Vlastní měření na tenziometru Krüss K12 probíhalo při konstantní teplotě $37\text{ }^\circ\text{C}$. Před započítím měření byl vzorek 30 s intenzivně míchán, aby došlo k rozrušení organizace HA na fázovém rozhraní kapalina-plyn, poté byl ponechán 30 s v klidu, následně probíhalo měření povrchového napětí platinovou sondou po dobu 300 s. Mezi každým měřením byl plíšek opláchnut vodou, etanolem, vodou a vyžihán nad plamenem.

4.4.2 Metoda visící kapky

Druhou metodou použitou pro analýzu změn povrchové aktivity připravených roztoků HA byla metoda visící kapky. Princip této metodiky je založen na analýze profilu kapky, respektive porovnání skutečného profilu zkoumané kapky, viz Obr. 19, s teoretickým tvarem, který je dán Laplaceovou-Youngovou rovnicí (2):

$$\Delta p = \sigma \cdot \left(\frac{1}{R_1(x,y,z)} + \frac{1}{R_2(x,y,z)} \right), \quad (2)$$

kde kapilární tlak Δp i hlavní poloměry křivosti R_1 a R_2 udávají polohy povrchu kapky v prostoru.



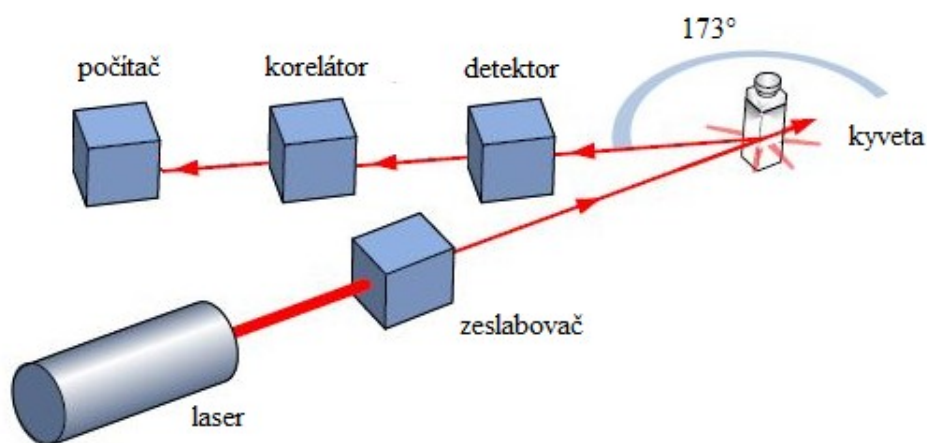
Obr. 19: Schéma proměnných analyzovaných na visící kapce nezbytných pro výpočet povrchového napětí [103]

Pro účely tohoto kontrolního měření bylo použito zařízení Krüss Drop Shape Analyzer DSA30. Měření na tomto zařízení probíhalo za konstantní teploty 37 °C při konstantní relativní vlhkosti.

4.4.3 Dynamický rozptyl světla

Dynamický rozptyl světla (DLS) je metoda pro stanovení velikosti částic (tzv. z-average) a odhadu polydisperzity, respektive intenzitně vážené distribuce velikosti všech populací částic přítomných ve zkoumaném vzorku. Dopadem monochromatického světla z laserového zdroje do roztoku s částicemi konajícími Brownův pohyb dojde k interferenci a Dopplerovu posunu. Důsledkem Dopplerova posunu je změna frekvence rozptýleného záření oproti původnímu záření spojená s velikostí částic. Výsledkem jsou fluktuace intenzity rozptýleného záření pohybující se okolo její průměrné hodnoty. V případě známé

teploty a viskozity rozpouštědla je fluktuace intenzity rozptýleného světla přímo úměrná velikosti molekuly, respektive jejímu hydrodynamickému průměru. Převod intenzity fluktuací rozptýleného světla na korelační funkci, měření stupně podobnosti mezi jednotlivými signály a přepočet na z-average zajišťuje korelátor. Schéma metody lze vidět na Obr. 20. [49, 103, 104]



Obr. 20: Schéma principu DLS metody [105]

K naměření z-average byl použit Zetasizer Nano ZS od společnosti Malvern Instruments. HA ve fyziologickém roztoku byla přefiltrována přes PTFE mikrofiltr (velikost pórů 0,45 μl). Poté byl vzorek HA v kyvetě nařazen fyziologickým roztokem na vhodnou koncentraci k detekci velikosti částic HA. Samotné měření velikosti částic probíhalo pod úhlem 173° při teplotě 25 °C. Měření závislosti z-average na teplotě byla provedena v rozsahu teplot 5 až 60 °C s krokem po 1 °C nebo v rozsahu 30 až 45 °C s krokem po 3 °C.

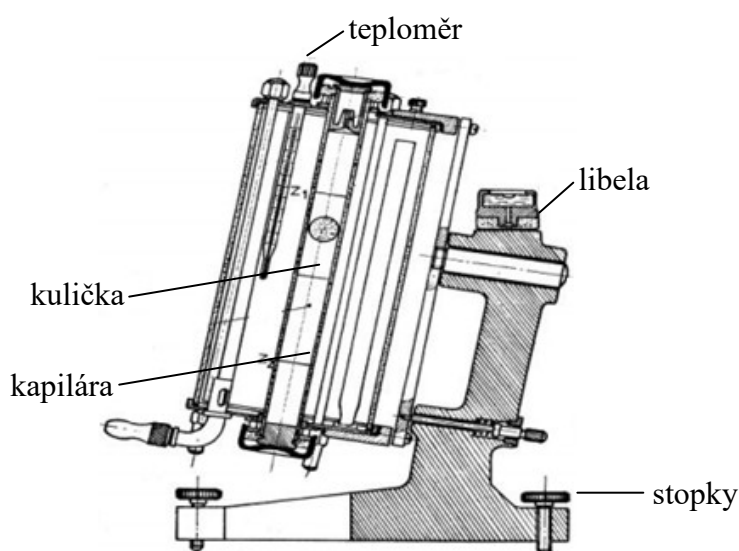
4.4.4 Kuličkový viskozimetr

K měření dynamické viskozity byl použit kuličkový Höpplerův viskozimetr. Hlavní část přístroje je tvořena temperovanou a uzavřenou skleněnou kapilárou, která je naplněna charakterizovanou kapalinou. Samotně měření viskozity spočívá v měření doby pádu kuličky mezi dvěma značkami na kapiláře. Typ kuličky je volen dle předpokládané velikosti viskozity. Dynamická viskozita je poté spočítána dle vztahu (3). [106]

$$\eta = \tau(\rho_1 - \rho_2) \cdot K \cdot 10^{-6}, \quad (3)$$

kde: η dynamická viskozita,
 τ doba pádu kuličky,
 ρ_1 hustota kuličky,
 ρ_2 hustota měřené kapaliny,
 K konstanta kuličky.

Na Obr. 21 je schéma Höpplerova (kuličkového) viskozimetru.



Obr. 21: Schéma Höpplerova viskozimetru [106]

V rámci této práce byl použit Höpplerův automatický kuličkový kapilární viskozimetr Lovis 2000 M/ME v kombinaci s hustoměrem od společnosti Anton-Paar. Byla použita skleněná kapilára o vnitřním průměru 1,59 mm a ocelová kulička s průměrem 1,5 mm a hustotou $7,66 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Měření viskozity probíhalo pod úhlem 10 a 70° v rozsahu teplot 25 až 50 °C s krokem 5 °C.

5 VÝSLEDKY A JEJICH DISKUZE

V rámci této části práce bude rozdiskutován vliv rozdílných postupů přípravy na změnu chování a charakteru polymerního klubka HA v roztoku. Pro účely tohoto popisu byly použity tři hlavní charakterizační metodiky, jak je popsáno v předešlé kapitole. Ve snaze o co nejpřehlednější prezentaci získaných výsledků a jejich diskuzi bude následující text členěn podle použitých měřicích metodik.

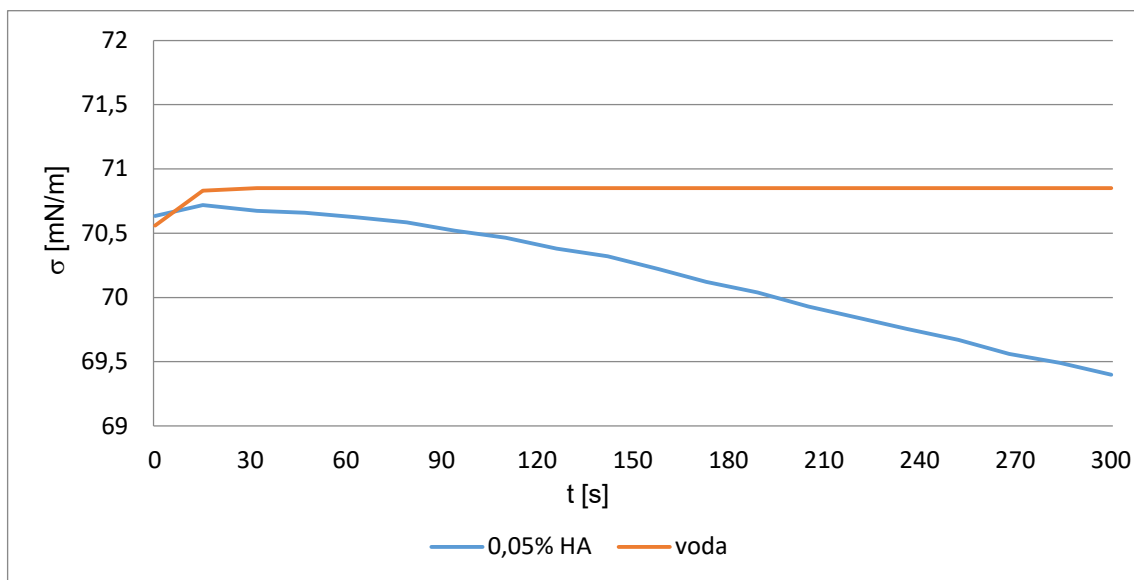
5.1 Charakterizace změn povrchové aktivity HA v roztoku

Dosavadní poznatky o chování polymerních klubek polysacharidů, potažmo HA na fázových rozhraních jsou popsány v kapitole 3.1 teoretické části práce. Vlastní difuze, adsorpce a reorganizace polymeru na fázovém rozhraní zásadním způsobem ovlivňují vývoj povrchového napětí v čase. Pro účely charakterizace rozdílného chování HA v roztocích připravených za odlišných podmínek byla použita tenziometrie (Wilhelmyho destičková metoda) a goniometrie (metoda visící kapky).

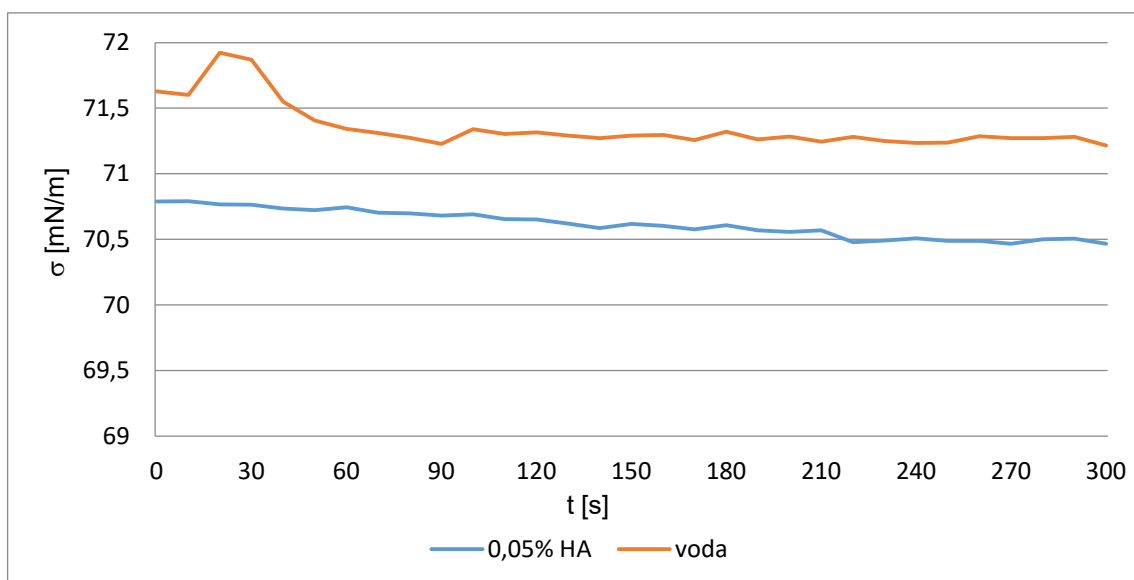
5.1.1 Srovnání výsledků z měření pomocí tenziometrie a goniometrie

V odborné literatuře je nejčastěji pro charakterizaci změn povrchové aktivity polysacharidů na fázových rozhraních zmiňována metodika visící kapky [83] Mimo to jsou zmiňovány postupy využívající Wilhelmyho destičkovou metodu [108]. Otázkou zůstává, která z metodik je vhodnější pro účely této charakterizace. Odpověď na tuto otázku lze nalézt z porovnání Obr. 22 a 23. V prvním experimentu byl charakterizován roztok HA a voda metodou visící kapky. Z dat uvedených na Obr. 23 lze vidět, že voda i HA vykazují podobnou míru poklesu povrchového napětí v čase, nicméně hodnoty povrchového napětí pro roztok HA jsou položeny o něco níže oproti čisté vodě. Podobné chování a hodnoty pro obdobné vzorky můžeme pozorovat na Obr. 22, jehož data byla získána pomocí tenziometrického přístupu. Z porovnání těchto dat plyne, že získané výsledky z obou metodik jsou srovnatelné. Nevýhodou metody visící kapky je její extrémní citlivost na působení sebemenší vibrací z okolí, což se projevuje „kostrbatou“ závislostí povrchového napětí na čase, viz Obr. 23 a 24. Tyto vibrace z okolí mohou negativně ovlivňovat proces organizace polymeru na fázovém rozhraní, což se může projevovat pomalejším poklesem hodnoty povrchového napětí, jak je patrné z porovnávaných obrázků. Z tohoto důvodu byla přednostně používána Wilhelmyho destičková metoda, která není na tuto proměnnou tak moc citlivá. Na druhou stranu nutno poznamenat,

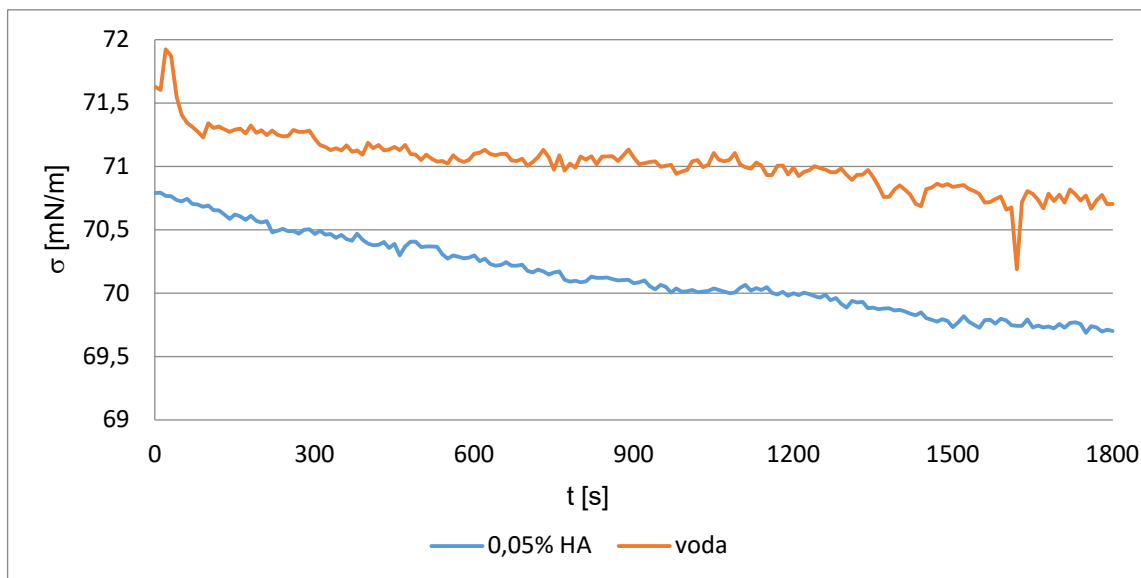
že pro dlouhodobá měření závislosti povrchového napětí na čase, viz Obr. 24, je vhodnější metoda visící kapky, kde data z podstaty uspořádání měření a měřicí cely nejsou ovlivněna odpařováním rozpouštědla a vysycháním povrchové vrstvy, jako v případě dlouhodobých měření na tenziometru (tato měření nebyla prováděna v rámci této diplomové práce).



Obr. 22: Změny povrchového napětí v čase pro roztok HA a vody měřené pomocí Wilhelmyho destičkové metody



Obr. 23: Změny povrchového napětí v čase pro roztok HA a vody měřené pomocí metody visící kapky



Obr. 24: Změny povrchového napětí v čase pro roztok HA a vody měřené pomocí metody visící kapky v dlouhém časovém intervalu

5.1.2 Míchané a třepané roztoky

V rámci mé bakalářské práce [109] bylo zjištěno, že vhodným nastavením procesních parametrů rozpouštění HA (střední teplota, teplotní spád, organizované proudění kapaliny, hmotnostní podíl polymeru v roztoku, výška rozpouštěného roztoku, čas) lze upravit charakter polymerního klubka HA tak, že vykazuje zvýšenou povrchovou aktivitu na fázovém rozhraní. Otázkou zůstává, zdali neexistuje jiná možnost přípravy polymerního roztoku, která způsobí změnu fyzikálních charakteristik polymerního systému tak, aby vykazoval obdobné chování, aniž bychom museli zasahovat do chemického složení systému. Ve snaze o nalezení odpovědi na tuto otázku byly připravovány řady roztoků pomocí rozdílných přístupů a byly charakterizovány změny jejich povrchových aktivit a dále pak diskutované střední velikosti polymerních klubek či změny viskozity systému jako celku.

V následující Tab. 2 jsou uvedeny hodnoty povrchového napětí roztoků všech dostupných středních molekulových hmotností (M_w) připravovaných třepáním 24 a 48 h za pokojové teploty a mícháním při 50 °C po 24 h. Pro tyto základní metody přípravy roztoků a jejich charakterizaci byly vybrány koncentrace od 1 % hm. pro nejnižší dostupnou střední molekulovou hmotnost do 0,05 % hm. pro nejvyšší střední molekulovou hmotnost. Snižující hmotnostní podíl HA v roztoku byl volen záměrně tak, aby střední hodnota viskozity byla co nejpodobnější. Jak je vidět v Tab. 2, povrchová aktivita všech

srovnávaných roztoků po 300 s se od začátku měření příliš nezměnila oproti rozpouštědлу, respektive fyziologickému roztoku. Z čehož plyne, že při takto nastavených hmotnostních podílech polymeru o rozdílných středních M_w nelze třepáním po dlouhou dobu 48 h při pokojové teplotě, či mícháním při zvýšené teplotě 50 °C upravit charakteristiky HA v roztoku tak, aby vykazovala zvýšenou povrchovou aktivitu na fázovém rozhraní.

Pozn.: Změna povrchové aktivity je vyjadřována $\Delta\sigma_{0-300} = \sigma_0 - \sigma_{300}$, kde σ_0 se rovná hodnotě povrchového napětí rozpouštědla (fyziologického roztoku) měřené v čase 10 s od začátku měření ($70,50 \pm 0,05$) mN/m. Tento propoččet byl volen záměrně s ohledem na nezanedbatelnou skutečnost, podle níž by počáteční hodnota povrchového napětí roztoků měla vycházet z jednoho bodu. To znamená, že pokud bychom ideálně rozrušili organizaci polymeru na fázovém rozhraní před počátkem měření a začali bychom měřit roztok, měli bychom v prvotních okamžicích měřit pouze povrchové napětí rozpouštědla, což je prakticky pomocí Wilhelmyho destičkové metody nemožné z důvodu časových prodlev popsaných v experimentální části práce.

Pozn.: Vysvětlení symbolů v následujících tabulkách:

M_w	střední molekulová hmotnost HA,
w	hmotnostní podíl polymeru v roztoku,
T_r	teplota rozpouštění nebo rozsah teplot na TFFC,
T_s	střední teplota v roztoku na TFFC,
t_r	čas rozpouštění,
σ_{10}	povrchové napětí roztoku HA v čase měření 10 s,
σ_{300}	povrchové napětí roztoku HA v čase měření 300 s,
σ_0	povrchové napětí fyziologického roztoku hodnota zaznamenaná v čase 10 s od začátku měření; $\sigma_0 = (70,50 \pm 0,05)$ mN/m.

Tab. 2: Změna povrchové aktivity polymerního klubka třepaných a míchaných roztoků všech dostupných středních molekulových hmotností

M_w [kDa]	w [%]	Příprava	T_r [°C]	t_r [h]	Povrchové napětí po 10 s σ_{10} [mN/m]	Povrchové napětí po 300 s σ_{300} [mN/m]	Změna povrch. napětí $\Delta\sigma_{0-300}$ [mN/m]
124	1	třepačka	24	24	$70,89 \pm 0,12$	$69,02 \pm 0,11$	1,48
				48	$71,22 \pm 0,18$	$70,66 \pm 0,23$	-0,16
		míchadlo	50	24	$70,89 \pm 0,07$	$70,22 \pm 0,21$	0,28
243	0,8	třepačka	24	24	$71,41 \pm 0,06$	$70,10 \pm 0,06$	0,40
				48	$70,81 \pm 0,04$	$70,19 \pm 0,07$	0,31
		míchadlo	50	24	$71,42 \pm 0,08$	$70,08 \pm 0,09$	0,42
370	0,6	třepačka	24	24	$71,30 \pm 0,02$	$68,86 \pm 0,02$	1,64
				48	$71,16 \pm 0,05$	$69,14 \pm 0,26$	1,36
		míchadlo	50	24	$71,27 \pm 0,21$	$70,13 \pm 0,08$	0,37
600	0,3	třepačka	24	24	$70,66 \pm 0,04$	$69,12 \pm 0,11$	1,38
				48	$71,09 \pm 0,08$	$69,86 \pm 0,11$	0,64
		míchadlo	50	24	$70,04 \pm 0,33$	$69,82 \pm 0,33$	0,68
1 180	0,1	třepačka	24	24	$70,90 \pm 0,16$	$69,78 \pm 1,12$	0,72
				48	$70,73 \pm 0,06$	$69,85 \pm 0,08$	0,65
		míchadlo	50	24	$71,01 \pm 0,09$	$70,03 \pm 0,02$	0,47
1 500	0,05	třepačka	24	24	$70,83 \pm 0,24$	$70,29 \pm 0,27$	0,21
				48	$70,64 \pm 0,09$	$69,40 \pm 0,00$	1,10
		míchadlo	50	24	$70,32 \pm 0,23$	$69,44 \pm 0,29$	1,06

V Tab. 3 jsou níže uvedeny povrchové aktivity koncentrační řady 0,1–0,8 % hm. třepaných roztoků při pokojové teplotě po dobu 24 h pro vybranou střední molekulovou hmotnost 370 kDa. Největší povrchovou aktivitu lze pozorovat u 0,1 % hm. roztoku HA. Z porovnání tohoto pozorování s daty uvedenými v Tab. 2. by se mohlo zdát, že pokud chceme zvýšit povrchovou aktivitu HA v roztoku, musíme zvolit optimální hmotnostní podíl polymeru v roztoku pro jeho přípravu tak, aby bylo zajištěno optimální ovlivňování makromolekulárních klubek v roztoku a přitom nedocházelo k tvorbě provázaných síťových struktur. Nicméně pokud porovnáme data uvedená v Tab. 3 a Tab. 4, vidíme, že zvýšené povrchové aktivity je dosaženo i u nízkého podílu polymeru v roztoku připraveného mícháním. Co je ovšem zásadní pro roztoky připravované mícháním, viz Tab. 4, nebyly získány z roztoků pro každý z uvedených hmotnostních podílů polymeru v roztoku, nýbrž postupným zředěním zásobního roztoku 1 % hm. Jednoprocentní roztok nevykazuje téměř žádnou povrchovou aktivitu, oproti tomu zředění tohoto roztoku

na 0,1 % hm. má za následek prudké zvýšení povrchové aktivity na fázovém rozhraní, což vypovídá o dominantním vlivu hmotnostního podílu polymeru na změnu povrchové aktivity HA bez ohledu na to, zda byl roztok připravován při nízkém, nebo vysokém hmotnostním podílu polymeru v roztoku. Z těchto výsledků plyne, že pokud zvolíme dostatečně nízký hmotnostní podíl polymeru v roztoku, dáme polymeru dostatek prostoru k tomu, aby mohlo dojít k rozrušení síťové struktury HA v roztoku a jednotlivá klubka se mohla chovat jako samostatné entity schopné samoorganizace na fázových rozhraních kapalina - plyn.

Tab. 3: Změna povrchové aktivity polymerního klubka v roztocích připravovaných třepáním pro molekulovou hmotnost 370 kDa a rozdílné hmotnostní podíly HA v roztoku

M_w [kDa] 370	Příprava: třepáním	T_r [°C] 24	t_r [h] 24
w [%]	Povrchové napětí po 10 s σ_{10} [mN/m]	Povrchové napětí po 300 s σ_{300} [mN/m]	Změna povrch. napětí $\Delta\sigma_{0-300}$ [mN/m]
0,1	69,12 ± 0,78	66,53 ± 0,95	3,97
0,2	71,22 ± 0,18	70,09 ± 0,27	0,41
0,4	71,09 ± 0,13	70,21 ± 0,34	0,29
0,6	70,87 ± 0,12	70,17 ± 0,15	0,33
0,8	70,47 ± 0,03	69,87 ± 0,02	0,63

Tab. 4: Změna povrchové aktivity polymerního klubka v roztocích připravovaných mícháním pro molekulovou hmotnost 370 kDa a roztoky připravené postupným zředováním zásobního roztoku o hmotnostním podílu $w = 1\%$ hm.

M_w [kDa] 370	Příprava: mícháním	T_r [°C] 50	t_r [h] 24
w [%]	Povrchové napětí po 10 s σ_{10} [mN/m]	Povrchové napětí po 300 s σ_{300} [mN/m]	Změna povrch. napětí $\Delta\sigma_{0-300}$ [mN/m]
0,1	66,86 ± 0,04	64,30 ± 0,19	6,20
0,2	69,43 ± 0,09	67,82 ± 0,81	2,68
0,3	70,54 ± 0,19	69,93 ± 0,33	0,57
0,4	70,13 ± 0,03	69,39 ± 0,01	1,11
0,5	70,64 ± 0,07	69,81 ± 0,04	0,69
0,6	69,57 ± 0,05	68,39 ± 0,16	2,11
0,7	70,35 ± 0,39	68,70 ± 0,39	1,80
1,0	70,97 ± 0,09	69,65 ± 0,08	0,85

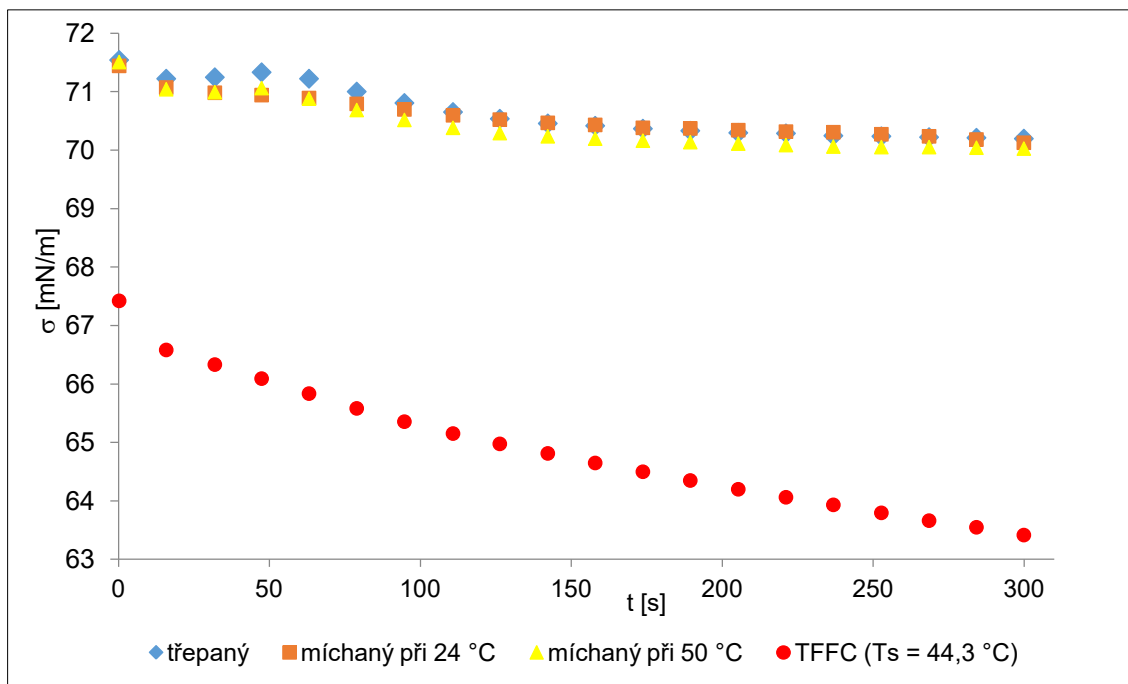
V Tab. 5 jsou uvedeny změny povrchové aktivity HA pro různě připravované roztoky vybrané molekulové hmotnosti 370 kDa. Tato data pouze rozšiřují uvedené výsledky a znovu ukazují, že nevhodně zvolený hmotnostní podíl polymeru v roztoku, v němž probíhá rozpouštění, znemožňuje zvýšení povrchové aktivity HA na fázovém rozhraní. Oproti tomu pokud použijeme dostatečně vysoký hmotnostní podíl polymeru v roztoku $w = 1\%$ hm., lze pomocí zařízení generující teplotní spády a s tím související toky kapaliny výrazně zvýšit povrchovou aktivitu HA, viz Tab. 6 a Obr. 25. Tento obrázek vyobrazuje celkový průběh změny povrchového napětí v čase a jasně demonstuje zvýšenou povrchovou aktivitu HA v roztoku, který byl připraven v TFFC zařízení. Tuto zvýšenou povrchovou aktivitu lze zdůvodnit změnou konformací polymerního systému v důsledku dlouhodobého smykového namáhání vzájemně se ovlivňujících řetězců HA, jak je naznačeno v teoretické části práce.

Tab. 5: Změna povrchové aktivity polymerního klubka roztoků vybrané molekulové hmotnosti 370 kDa připravovaných různými způsoby pro $w = 0,6$ % hm.

M_w [kDa]	w [%]	Příprava	T_r [°C]	t_r [h]	Povrchové napětí po 10 s σ_{10} [mN/m]	Povrchové napětí po 300 s σ_{300} [mN/m]	Změna povrch. napětí $\Delta\sigma_{0-300}$ [mN/m]
370	0,6	třepačka	24	12	$71,26 \pm 0,09$	$70,33 \pm 0,02$	0,17
				24	$71,30 \pm 0,02$	$68,86 \pm 0,02$	1,64
				48	$71,16 \pm 0,05$	$69,14 \pm 0,26$	1,36
		míchadlo	24	12	$71,32 \pm 0,06$	$69,98 \pm 0,07$	0,52
				24	$71,56 \pm 0,11$	$70,81 \pm 0,09$	-0,31
				48	$71,10 \pm 0,03$	$70,25 \pm 0,09$	0,25
			50	12	$71,41 \pm 0,03$	$70,59 \pm 0,13$	-0,09
				24	$71,27 \pm 0,21$	$70,13 \pm 0,08$	0,37
				48	$70,96 \pm 0,10$	$70,25 \pm 0,11$	0,25
		TFFC	50/24 ($T_s=45,8$)	20	$71,32 \pm 0,20$	$70,10 \pm 0,13$	0,40
			50/17 ($T_s=44,7$)		$71,09 \pm 0,08$	$69,62 \pm 0,26$	0,88
			50/10 ($T_s=44,3$)		$70,85 \pm 0,03$	$69,95 \pm 0,06$	0,55

Tab. 6: Změna povrchové aktivity polymerního klubka roztoků vybrané molekulové hmotnosti 370 kDa připravovaných různými způsoby pro $w = 1$ % hm.

M_w [kDa]	w [%]	Příprava	T_r [°C]	t_r [h]	Povrchové napětí po 10 s σ_{10} [mN/m]	Povrchové napětí po 300 s σ_{300} [mN/m]	Změna povrch. napětí $\Delta\sigma_{0-300}$ [mN/m]
370	1	třepačka	24	20	$71,54 \pm 0,01$	$70,20 \pm 0,01$	0,30
			24		$71,44 \pm 0,06$	$70,13 \pm 0,20$	0,37
		míchadlo	50		$71,51 \pm 0,02$	$70,03 \pm 0,04$	0,47
			TFFC		50/10 ($T_s=44,3$)	$67,42 \pm 1,13$	$63,41 \pm 1,15$



Obr. 25: Vliv způsobu přípravy na změnu povrchové aktivity roztoků HA 370 kDa připravených za jinak srovnatelných podmínek

5.1.3 Roztoky připravené na TFFC zařízení

Z dat uvedených v předešlých podkapitolách plyne, že u HA obsažené v relativně velkém hmotnostním podílu nelze zvýšit její povrchovou aktivitu bez využití TFFC zařízení, tj. bez působení organizovaného proudění kapaliny. Otázkou zůstává, lze-li roztoky HA o nějakém dalším hmotnostním podílu polymeru v roztoku upravit tak, aby vykazovaly zvýšenou povrchovou aktivitu. Je možné nastavit TFFC jiné parametry (zvolit jinou velikost teplotního spádu), aby došlo opět ke zvýšení povrchové aktivity dispergované HA ve fyziologickém roztoku. Odpovědi na tuto otázku lze nalézt v následujících tabulkách a obrázcích. Nutno poznamenat, že tato data korespondují s daty uvedenými v dřívější práci [109].

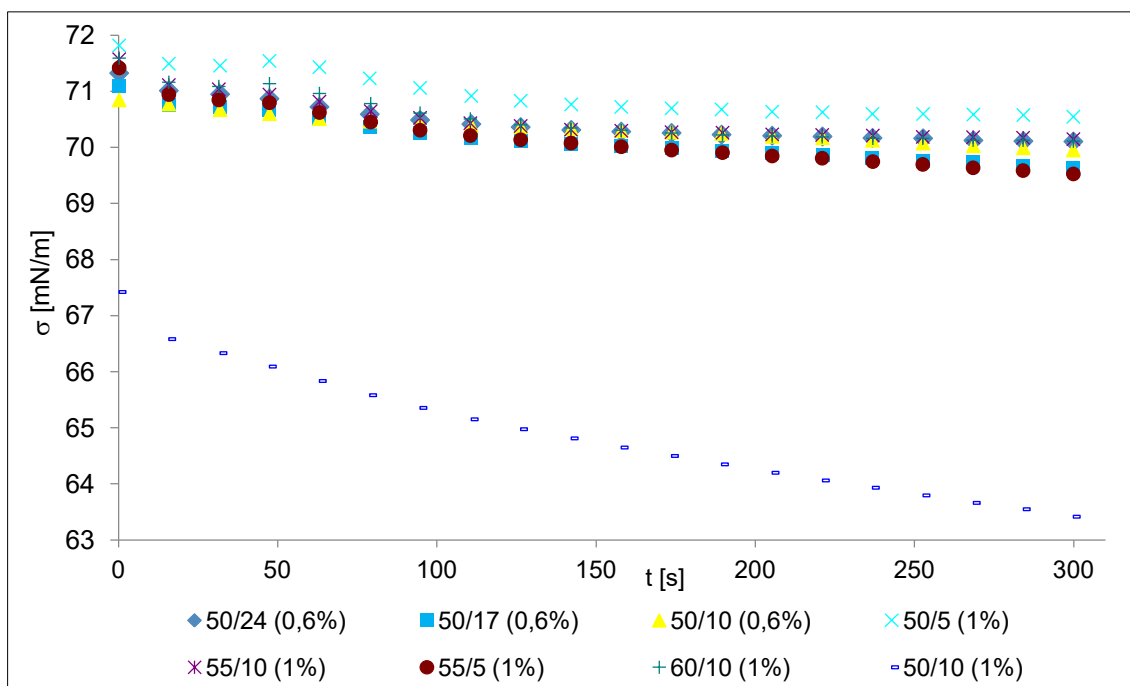
V Tab. 7 a 8 jsou uvedeny změny povrchové aktivity HA roztoků pro vybranou střední molekulovou hmotnost při přípravě v TFFC. V Tab. 7 jsou srovnány povrchové aktivity různě koncentrovaných roztoků vystavených shodnému teplotnímu spádu, v Tab. 8 jsou srovnány povrchové aktivity shodně koncentrovaných roztoků vystavených různému teplotnímu spádu. V obou tabulkách lze vidět markantní změnu povrchové aktivity u 1% hm. roztoku při teplotním spádu 50/10 °C. Vývoj povrchové aktivity HA oproti roztokům vystaveným odlišným teplotním spádům je uveden na Obr. 26.

Tab. 7: Změna povrchové aktivity roztoků rozpuštěných na TFFC, srovnání různých hmotnostních podílů HA v roztoku

M_w [kDa] 370		T_r [°C] 50/10	t_r [h] 20
w [%]	Povrchové napětí po 10 s σ_{10} [mN/m]	Povrchové napětí po 300 s σ_{300} [mN/m]	Změna povrch. napětí $\Delta\sigma_{0-300}$ [mN/m]
0,4	70,91 ± 0,14	70,10 ± 0,03	0,40
0,6	71,04 ± 0,08	69,84 ± 0,12	0,66
0,8	71,48 ± 0,18	70,27 ± 0,24	0,23
1,0	67,42 ± 1,13	63,41 ± 1,15	7,09
1,2	72,68 ± 0,02	70,55 ± 0,20	-0,05
1,4	71,72 ± 0,05	70,36 ± 0,02	0,14

Tab. 8: Změna povrchové aktivity roztoků rozpuštěných na TFFC, srovnání teplotních spádů

M_w [kDa] 370		w [%] 1	t_r [h] 20
T_r [°C]	Povrchové napětí po 10 s σ_{10} [mN/m]	Povrchové napětí po 300 s σ_{300} [mN/m]	Změna povrch. napětí $\Delta\sigma_{0-300}$ [mN/m]
50/10 ($T_s = 44,3$ °C)	67,42 ± 1,13	63,41 ± 1,15	7,09
50/5 ($T_s = 43,8$ °C)	71,82 ± 0,02	70,55 ± 0,02	-0,05
55/10 ($T_s = 46,3$ °C)	71,57 ± 0,00	70,15 ± 0,04	0,35
55/5 ($T_s = 44,1$ °C)	71,42 ± 0,07	69,53 ± 0,49	0,97
60/10 ($T_s = 47,5$ °C)	71,59 ± 0,11	70,11 ± 0,10	0,39



Obr. 26: Vliv působícího rozsahu teplot na změnu povrchové aktivity polymerního klubka HA v roztoku pro $M_w = 370$ kDa a výchozí podíl polymeru v roztoku $w = 0,6$ nebo 1 % hm.

5.1.4 Vliv filtrace na povrchovou aktivitu

Poslední diskutovanou proměnnou mající vliv na změnu povrchové aktivity je vliv filtrace roztoku HA před jeho charakterizací na dynamickém rozptylu světla (výsledky z této metodiky budou diskutovány v následující podkapitole). Tok kapaliny a tím spojené smykové namáhání HA při průchodu má v určitých případech za následek reverzibilní změnu povrchové aktivity HA, jak bude diskutováno níže.

V Tab. 9 a 10 jsou uvedeny povrchové aktivity různě připravovaných nefiltrovaných roztoků a roztoků měřených okamžitě po filtraci přes PTFE filtr s velikostí pórů $0,45$ μm , s uvedením výsledků pro roztok přeměřených následující den.

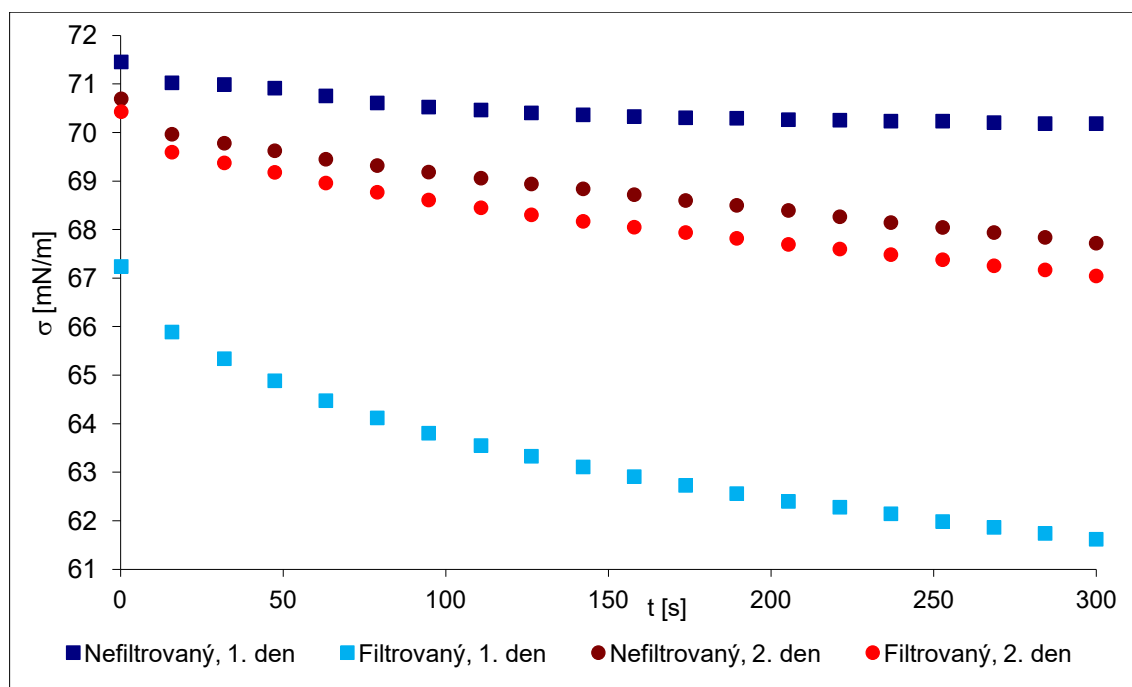
V Tab. 9 pro míchané roztoky je pozorovatelné, že povrchová aktivita nefiltrovaného roztoku druhý den mírně vzroste. Oproti tomu filtrace roztoku způsobí výrazné zvýšení povrchové aktivity oproti nefiltrovanému roztoku a s časem tato aktivita klesá k hodnotě povrchové aktivity nefiltrovaného roztoku z druhého dne, což je vidět rovněž z Obr. 27.

V Tab. 10 jsou uvedeny povrchové aktivity třepaných roztoků. Z dat uvedených pro tento experiment plyne, že takto připravený systém nevykazuje zvýšenou citlivost na proces filtrace, to znamená, že se nemění povrchová aktivita filtrovaného systému, viz Obr. 28.

Tyto výsledky naznačují, že HA v roztoku připraveném metodou míchání zaujímají jinou konformaci oproti HA, jež byla připravena metodou třepání. Roztoky připravené v TFCC zařízení nebyly s ohledem na tento vliv testovány, protože jak bylo diskutováno v dřívější práci [110] vykazují minimální citlivost s ohledem na tuto proměnou.

Tab. 9: Vliv filtrace na změnu povrchové aktivity v míchaných roztocích

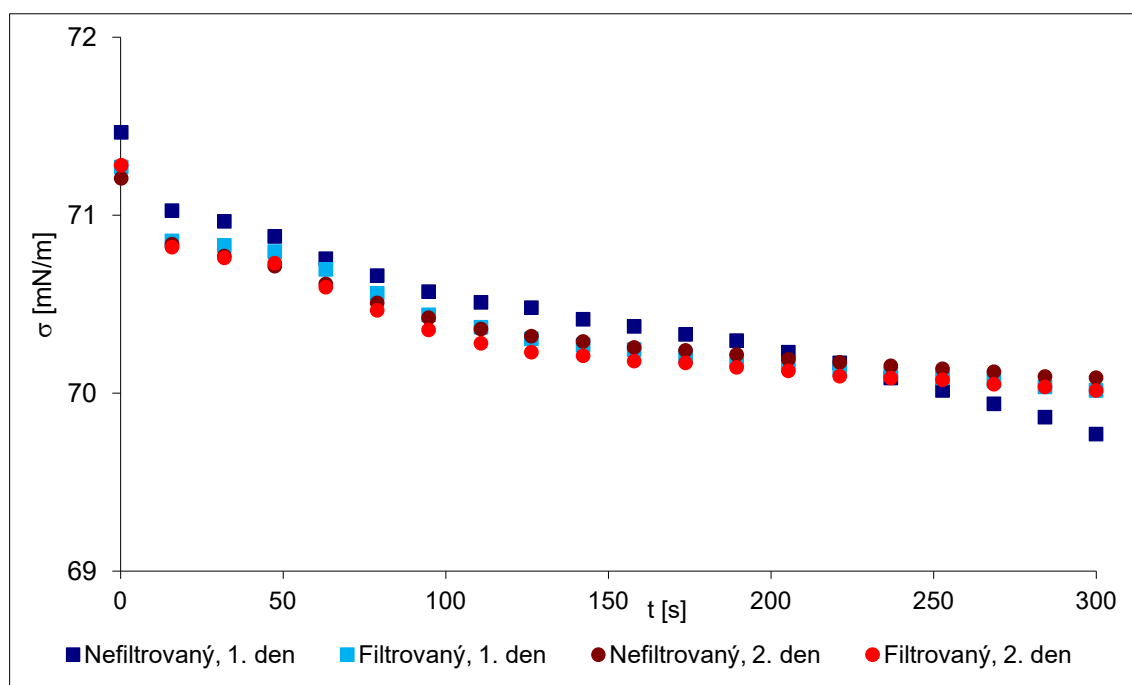
M_w [kDa]	w [%]	Příprava: mícháním	T_r [°C]	t_r [h]
243	1		50	24
		Povrchové napětí po 10 s σ_{10} [mN/m]	Povrchové napětí po 300 s σ_{300} [mN/m]	Změna povrch. napětí $\Delta\sigma_{0-300}$ [mN/m]
nefiltrovaný	1. den	$71,46 \pm 0,08$	$70,19 \pm 0,14$	0,31
	2. den	$70,70 \pm 0,14$	$67,72 \pm 2,97$	2,78
filtrovaný	1. den	$67,24 \pm 0,72$	$61,62 \pm 0,78$	8,88
	2. den	$70,43 \pm 0,05$	$67,05 \pm 0,14$	3,45



Obr. 27: Vliv filtrace na změnu povrchové aktivity polymerního klubka HA v míchaném roztoku ($M_w = 243$ kDa, $w = 1$ % hm.)

Tab. 10: Vliv filtrace na změnu povrchové aktivity HA v třepaných roztocích

M_w [kDa]	w [%]	Příprava: třepáním	T_r [°C]	t_r [h]
243	1		24	24
		Povrchové napětí po 10 s σ_{10} [mN/m]	Povrchové napětí po 300 s σ_{300} [mN/m]	Změna povrch. napětí $\Delta\sigma_{0-300}$ [mN/m]
nefiltrovaný	1. den	71,44 ± 0,04	69,96 ± 0,29	0,54
	2. den	71,37 ± 0,09	70,44 ± 0,16	0,06
filtrovaný	1. den	71,27 ± 0,06	70,02 ± 0,08	0,48
	2. den	71,28 ± 0,12	70,02 ± 0,03	0,48



Obr. 28: Vliv filtrace na změnu povrchové aktivity polymerního klubka HA

v třepaném roztoku ($M_w = 243$ kDa, $w = 1$ % hm.)

5.2 Velikost polymerních klubek a jejich chování se změnou teploty

Obecně je známo, že velikosti polymerních klubek HA v roztoku závisí na charakteristikách rozpouštědla (pH, iontová síla), polymeru (molekulová hmotnost a její rozptyl) a v neposlední řadě na historii smykového namáhání, jak je popsáno v literatuře a ukázáno na následujících výsledcích. To znamená, že rozdílné metody přípravy roztoků mají vliv rovněž na střední velikost polymerního klubka ve fyziologickém roztoku. Mimo jiné nelze zanedbat vliv filtrace vzorku před samotnou analýzou, jak bylo diskutováno výše. Měření z-average probíhalo při 25 °C.

5.2.1 Z-average třepaných a míchaných roztoků

V Tab. 11 jsou uvedeny hodnoty z-average a změny povrchové aktivity míchaných a třepaných roztoků všech dostupných středních molekulových hmotností. Jak lze očekávat s ohledem na rostoucí střední M_w , velikost polymerních klubek se zvětšuje. U vyšších molekulových hmotností jsou rozdíly mezi jednotlivými metodami přípravy výraznější. V rámci jedné molekulové hmotnosti lze říci, že hodnota z-average klesá pro systémy připravené při vyšší teplotě na míchadle oproti postupu třepání při pokojové teplotě. V některých případech je tato hodnota srovnatelná v rámci chyby měření. Nelze však říci, že v důsledku míchání roztoku při vyšší teplotě dochází k růstu hodnoty z-average. Porovnáme-li změny hodnot z-average se změnami hodnot povrchového napětí, tak lze konstatovat, že v tomto případě nelze pozorovat jakoukoliv závislost těchto proměnných.

Tab. 11: Z-average třepaných a míchaných roztoků všech dostupných středních molekulových hmotností

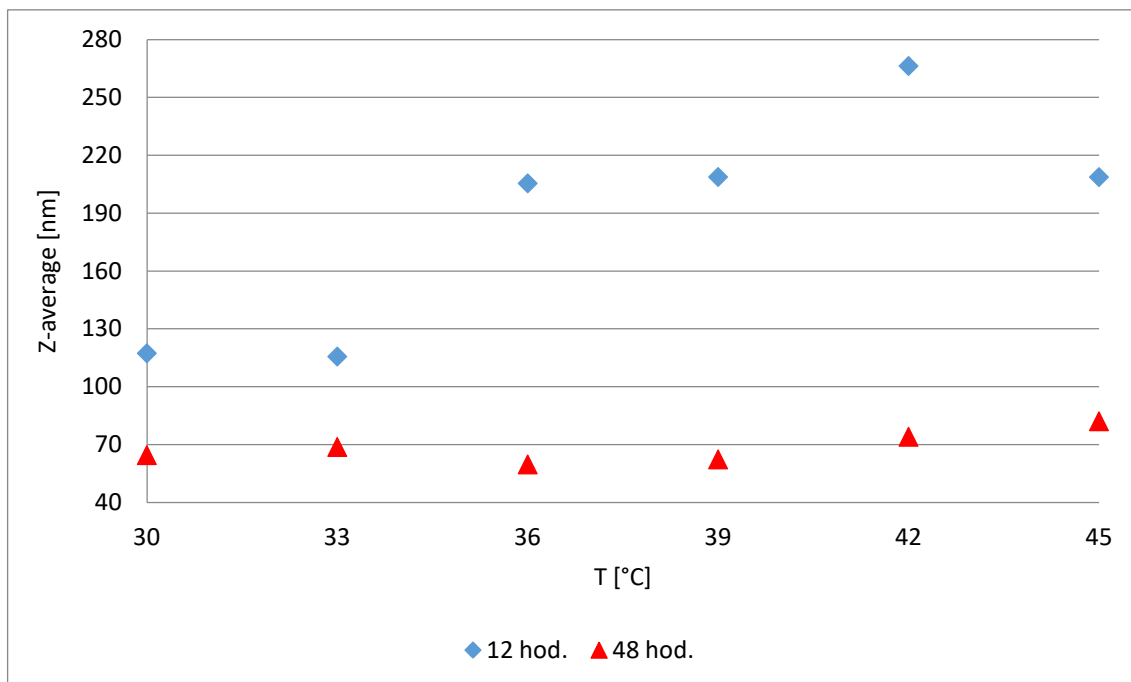
M_w [kDa]	w [%]	Příprava	T_r [°C]	t_r [h]	Změna povrch. napětí $\Delta\sigma_{0-300}$ [mN/m]	Z-average [nm]
124	1	třepačka	24	24	1,48	$34,9 \pm 0,8$
		míchadlo	50	24	0,28	$26,3 \pm 0,2$
243	0,8	třepačka	24	24	0,40	$33,1 \pm 0,1$
		míchadlo	50	24	0,42	$22,6 \pm 0,1$
370	0,6	třepačka	24	24	1,64	$56,3 \pm 0,9$
		míchadlo	50	24	0,37	$58,1 \pm 1,5$
600	0,3	třepačka	24	24	1,38	$64,3 \pm 0,9$
		míchadlo	50	24	0,68	$59,5 \pm 0,8$
1 180	0,1	třepačka	24	24	0,72	$50,1 \pm 0,7$
		míchadlo	50	24	0,47	$54,2 \pm 2,9$
1 500	0,05	třepačka	24	24	0,21	$129,7 \pm 1,8$
		míchadlo	50	24	1,06	$73,8 \pm 0,9$

V Tab. 12 jsou prezentovány změny hodnoty z-average klubek HA pro jednu střední M_w v závislosti na způsobu a době rozpouštění. Z dat je patrné, že s rostoucí dobou mírně narůstá nebo se nemění hodnota z-average daného systému. Z těchto dat by se dalo konstatovat, že u dané metodiky není důležité, jak dlouho je daný systém rozpouštěn. Nicméně toto konstatování není pravdivé, jak ukazují výsledky uvedené na Obr. 29–31. Tyto obrázky popisují vývoj hodnoty z-average s rostoucí teplotou od 30 do 45°C, zatímco data v Tab. 12 byla stanovena z měření při teplotě 25 °C.

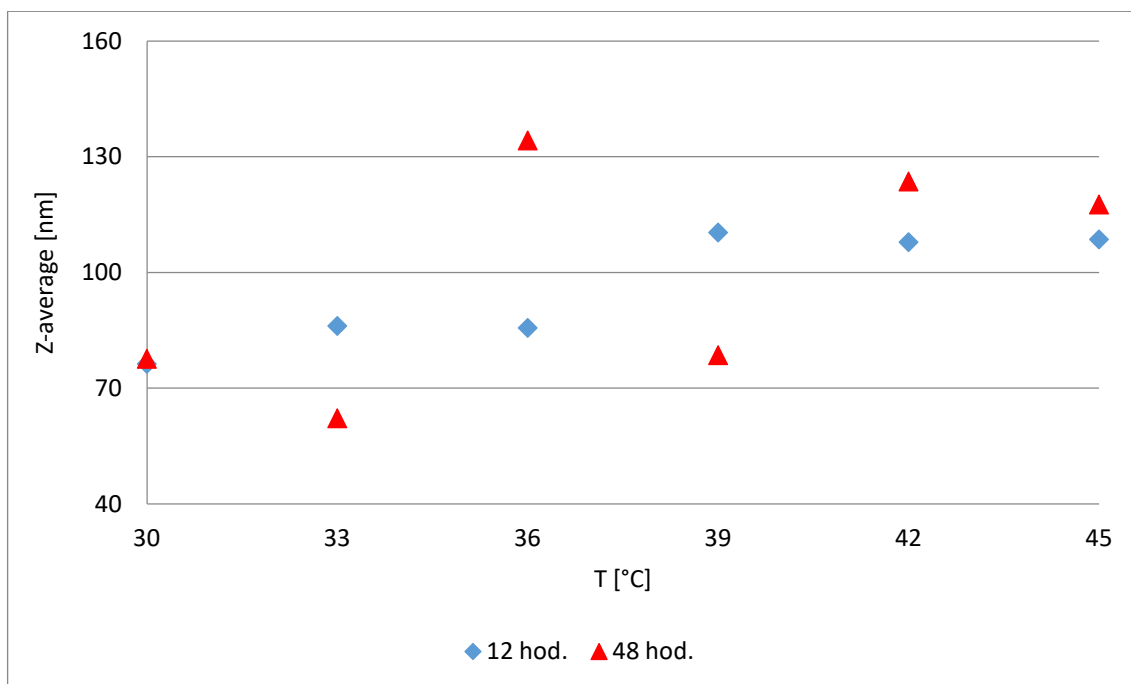
Tab. 12: Vliv doby přípravy roztoku rozpuštěného za jinak srovnatelných podmínek na z-average polymerního klubka HA

M_w [kDa]	w [%]	Příprava	T_r [°C]	t_r [h]	Změna povrch. napětí $\Delta\sigma_{0-300}$ [mN/m]	Z-average [nm]
370	0,6	třepačka	24	12	0,17	$58,9 \pm 1,1$
				48	1,36	$67,9 \pm 0,1$
		míchadlo	24	12	0,52	$58,2 \pm 1,5$
				48	0,25	$60,5 \pm 1,3$
		míchadlo	50	12	-0,09	$59,8 \pm 0,4$
				48	0,25	$61,2 \pm 3,4$

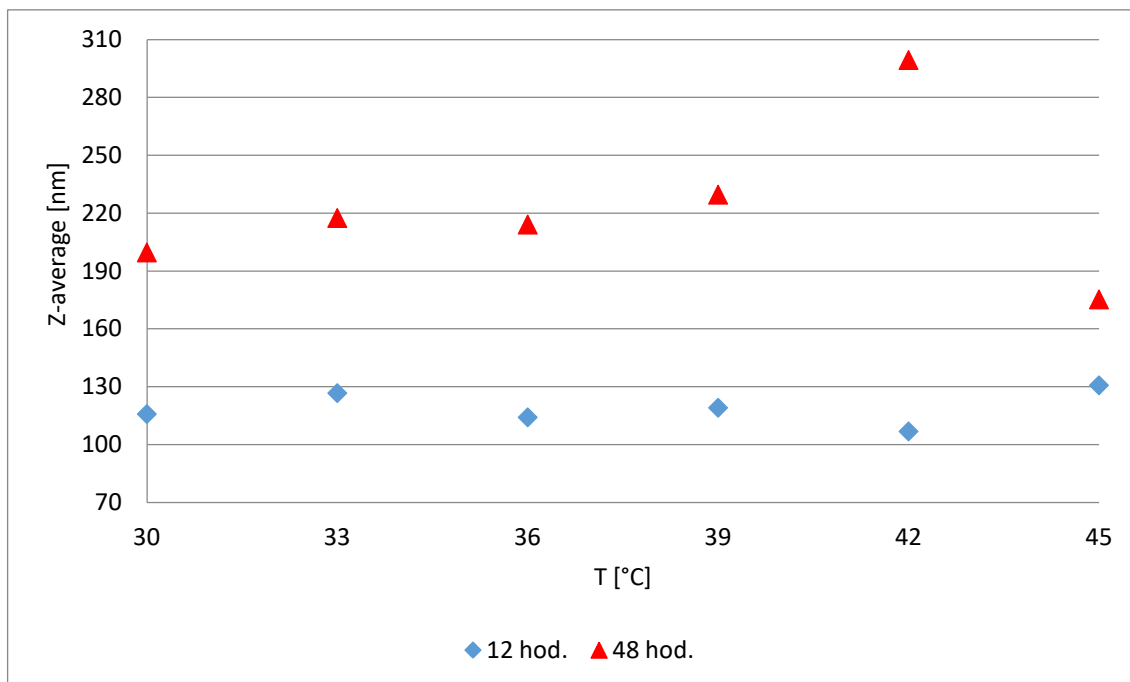
Z Obr. 29 je patrné, že polymerní klubka rozpouštěná na třepačce po delší dobu (48 h) se vyznačují daleko vyšší termální stabilitou. To znamená, že s rostoucí teplotou měření se téměř nemění hodnota z-average oproti systémům roztoků měřených po 12 h rozpouštění. Oproti tomu u roztoků připravovaných na míchadle při 24 °C, viz Obr. 30, nepozorujeme výraznější nárůst hodnoty z-average s rostoucí teplotou měření. Úplně opačná situace nastává u roztoků HA připravených na míchadle při 50 °C, viz Obr. 31. V tomto případě jsou hodnoty z-average posunuty k vyšším číslům a s rostoucí dobou rozpouštění nedochází k poklesu hodnoty z-average, ba naopak tato hodnota roste. To opět nasvědčuje skutečnosti, že s časem rozpouštění se mění konformace makromolekulárního systému, jak bylo naznačeno dříve v případě diskuze vlivu filtrace na změnu povrchové aktivity třepaných a míchaných vzorků HA v roztoku.



Obr. 29: Teplotní trend z-average polymerních klubek HA v roztocích připravených třepáním při 24 °C



Obr. 30: Teplotní trend z-average polymerních klubek HA v roztocích připravených mícháním při 24 °C



Obr. 31: Teplotní trend z-average polymerních klubek HA v roztocích připravených mícháním při 50 °C

5.2.2 Z-average roztoků připravených na TFFC

V Tab. 13 jsou uvedeny hodnoty z-average HA v roztoku připraveném při rozdílných teplotních spádech na TFFC zařízení. Nutno poznamenat, že se v tomto srovnání, viz Tab. 13, prolínají dvě proměnné, velikost teplotního spádu a hmotnostní podíl polymeru. Přes tuto nejednotnost ve srovnání je opět vidět, jak je důležité zvolit optimální hmotnostní podíl polymeru v roztoku, abychom mohli pozorovat zvýšení povrchové aktivity, které je spojeno s výrazným nárůstem hodnoty z-average.

Tab. 13: Z-average hodnoty polymerních klubek HA roztoků připravených na TFFC zařízení za rozdílných teplotních spádů a hmotnostních podílů polymeru v roztoku

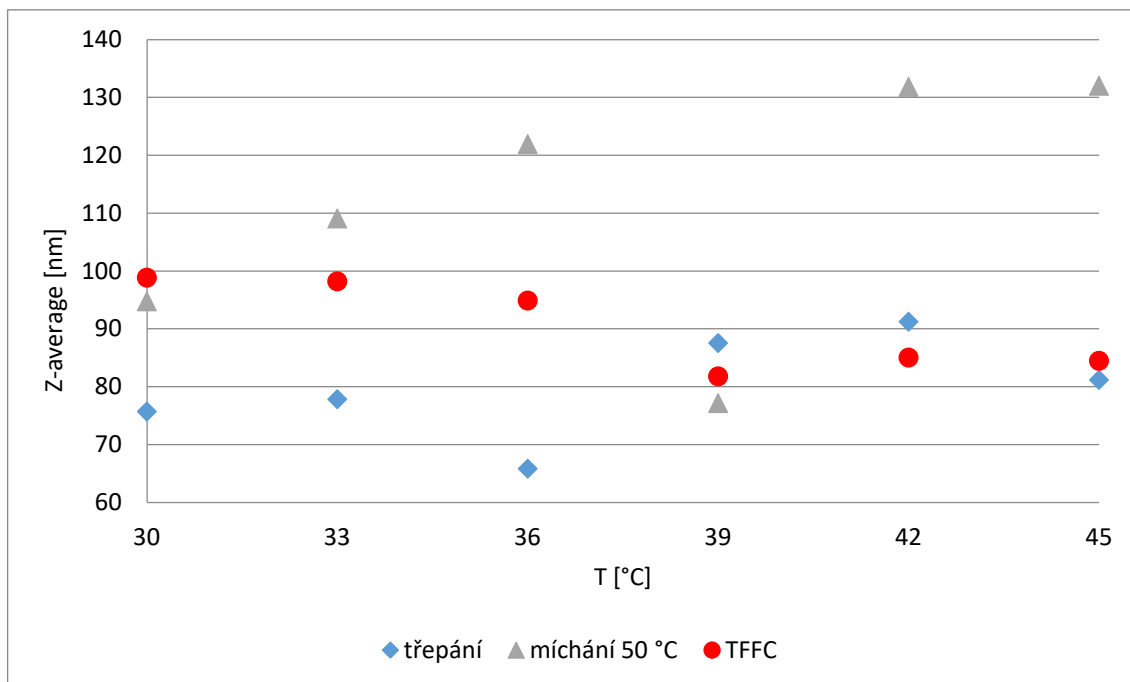
M_w [kDa]	w [%]	t_r [h]
370	0,6	20
T_r [°C]	Změna povrch. napětí $\Delta\sigma_{10-300}$ [mN/m]	Z-average [nm]
50/24 ($T_s = 45,8$ °C)	0,40	$56,8 \pm 0,2$
50/17 ($T_s = 44,7$ °C)	0,88	$58,3 \pm 0,1$
50/10 ($T_s = 44,7$ °C)	0,55	$60,7 \pm 0,4$
50/10 ($w = 1$ %, $T_s = 44,3$ °C)	7,09	$95,1 \pm 1,8$

5.2.3 Srovnání z-average roztoků připravených třepáním, mícháním a na TFFC

K roztoku připravenému na TFFC vykazující zdaleka nejvyšší povrchovou aktivitu a změnu hodnoty z-average klubek HA měřených při 25 °C byly pro srovnání připraveny srovnatelné roztoky o daném hmotnostním podílu polymeru a čase rozpouštění. Tyto roztoky se lišily pouze metodikou přípravy a s tím spojenou mírou smykového namáhání polymerního systému. Výsledky v podobě změřených středních hodnot z-average jsou uvedeny v Tab. 14. Změny povrchové aktivity třepaných a míchaných roztoků oproti roztoku připravenému na TFFC jsou zanedbatelné. Naměřené hodnoty z-average u třepaných a míchaných roztoků se vzájemně blíží v rámci chyby stanovení střední hodnoty. Jediný vzorek, který vybočuje jak svou povrchovou aktivitou, tak i hodnotou z-average je ten, který byl připraven na TFFC zařízení. Z dat uvedených na Obr. 32 plyne, že polymerní klubka HA rozpouštěná v TFFC zařízení po překročení teploty 33 až 36 °C místo toho, aby zvětšovala svou velikost, ji zmenšují oproti srovnávaným systémům.

Tab. 14: Z-average polymerních klubek 1% hm. roztoku HA o $M_w = 370$ kDa připraveného různými způsoby za stejný čas

M_w [kDa]	w [%]	Příprava	T_r [°C]	t_r [h]	Změna povrch. napětí $\Delta\sigma_{0-300}$ [mN/m]	Z-average [nm]
370	1	třepačka	24	20	0,30	$62,4 \pm 2,7$
		míchadlo	50		0,47	$57,1 \pm 1,2$
		TFFC	50/10 ($T_s = 44,3$)		7,09	$95,1 \pm 1,8$



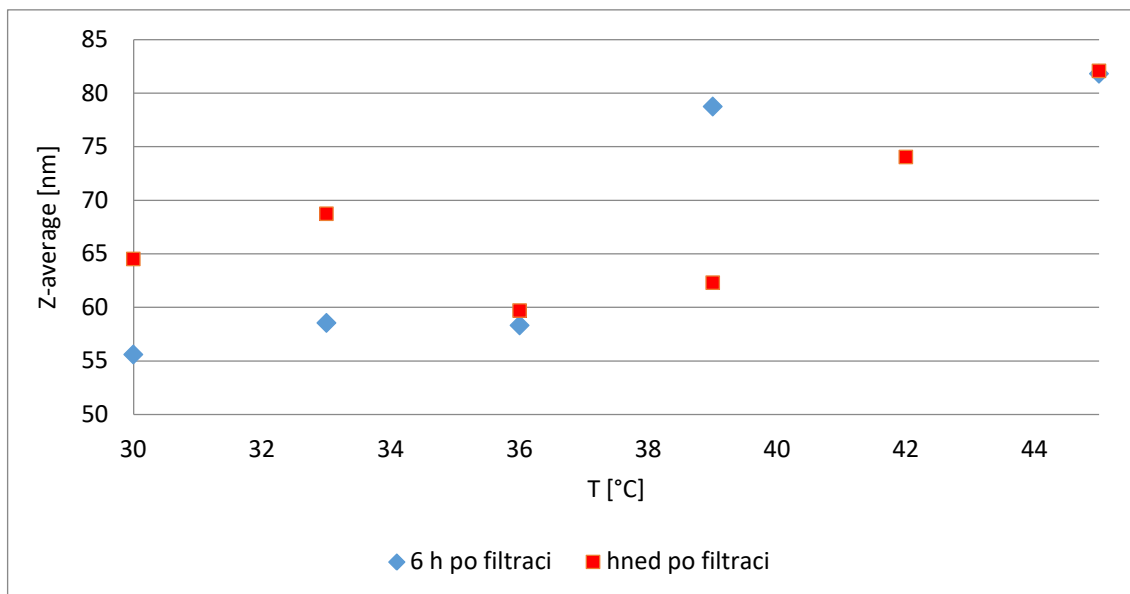
Obr. 32: Teplotní trend hodnot z-average polymerních klubek
HA o $M_w = 370$ kDa v roztoku rozpouštěné po dobu 20 h

5.2.4 Vliv filtrace na změnu velikosti polymerního klubka

Jak bylo diskutováno v části věnované studiu změn povrchové aktivity HA, filtrace některých systémů může mít vliv na krátkodobou změnu povrchové aktivity. Na základě tohoto zjištění byl testován vliv této proměnné na změnu velikosti polymerního klubka, hodnotu z-average. Z dat prezentovaných v Tab. 15 a na Obr. 33 plyne, že ihned po filtraci roste hodnota parametru z-average, což je s největší pravděpodobností spojeno s krátkodobou změnou konformace makromolekulárního systému. Po 6 hodinách od filtrace klesá změřená hodnota z-average, což se mimo jiné projevuje do teploty 39 °C rozdílnou změnou velikosti tohoto parametru, viz Obr. 33.

Tab. 15: Vliv filtrace na změnu velikosti polymerního klubka

M_w [kDa]	w [%]	Příprava:	t_r [h]
370	0,6	třepačka	48
Z-average [nm]			
ihned po filtraci	73,5 ± 0,2		
6 h po filtraci	62,1 ± 1,5		

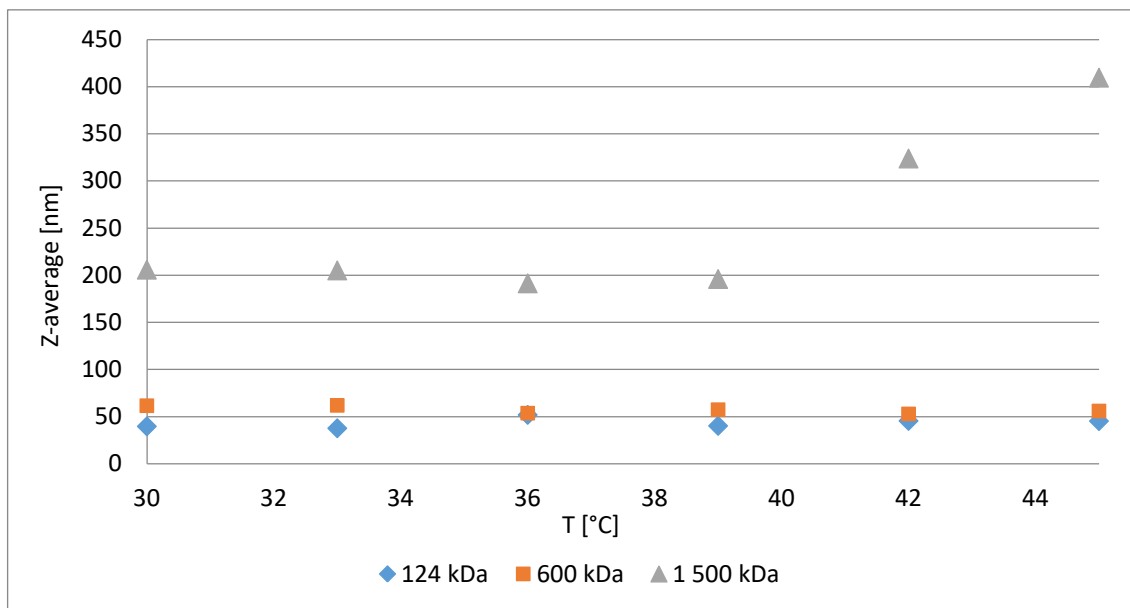


Obr. 33: Vliv filtrace na teplotní závislost změny velikosti polymerního klubka pro roztok 0,6 % hm. HA se střední M_w 370 kDa, třepaný po dobu 48 h

5.2.5 Teplotní závislosti z-average a jeho časová stálost

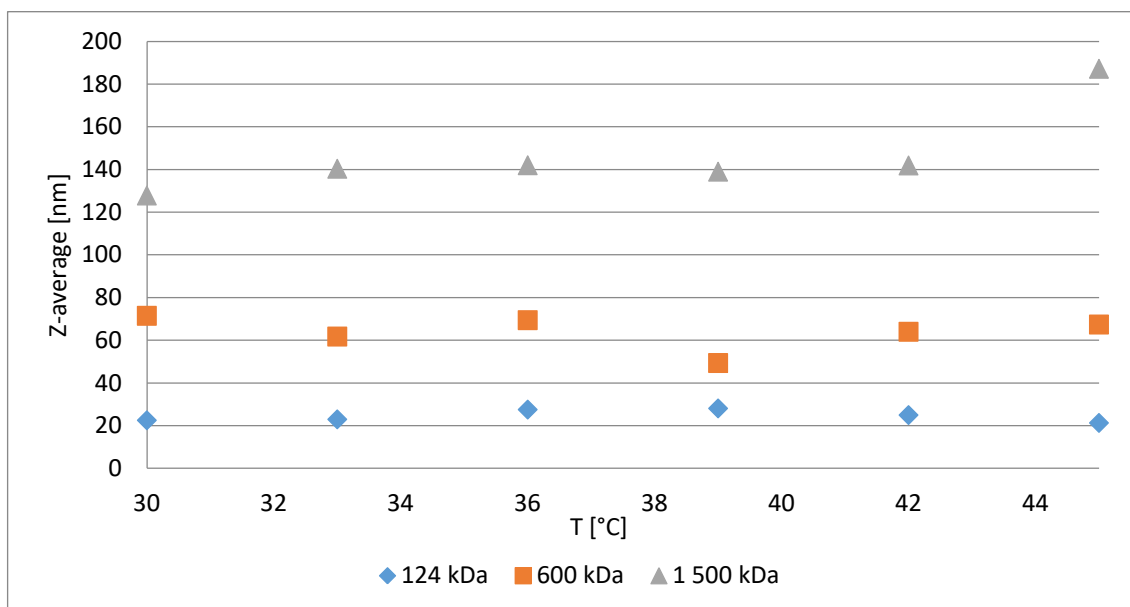
Na Obr. 34–36 jsou uvedeny teplotní závislosti z-average v rozmezí 30–45 °C vybraných molekulových hmotností s ohledem na různé metody přípravy roztoků. Z-average polymerních klubek příslušných roztoků naměřených při 25 °C lze nalézt výše v Tab. 11.

Na Obr. 34 jsou zobrazeny závislosti z-average na teplotě roztoků třepaných 24 h při pokojové teplotě. Lze pozorovat, že u středních molekulových hmotností 124 a 600 kDa jsou z-average téměř konstantní s teplotou, zatímco u střední molekulové hmotnosti 1 500 kDa lze pozorovat po překročení teploty 39 °C výraznější nárůst hodnoty z-average. Polymerní klubko se nad touto teplotou rozbaluje.



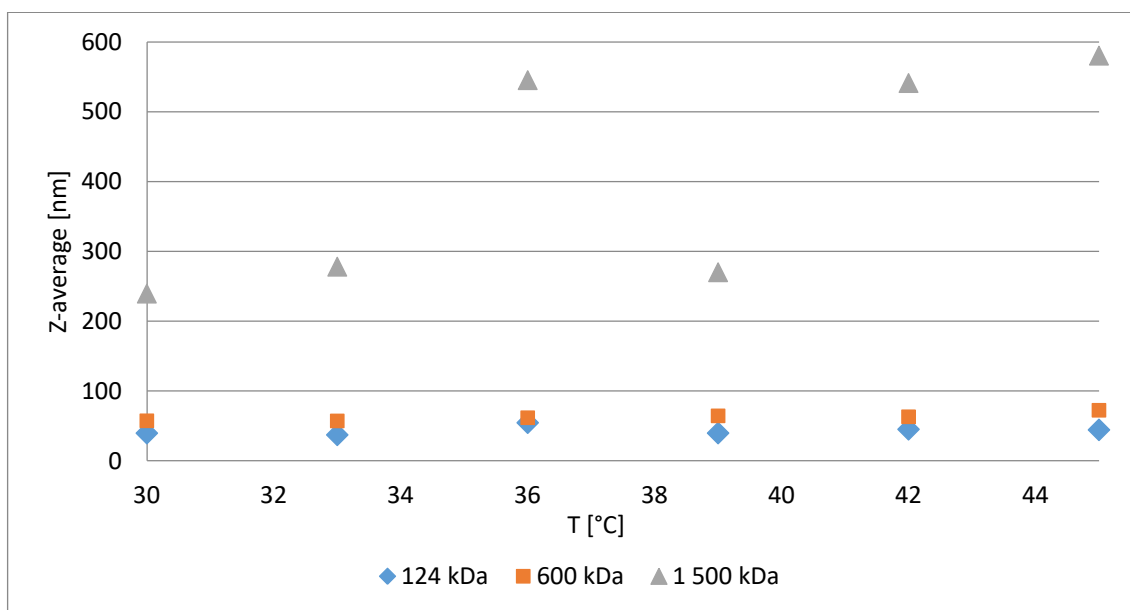
Obr. 34: Změny velikosti polymerních klubek v závislosti na teplotě u třepaných roztoků připravovaných po dobu 24 h při teplotě 24 °C. Výchozí hmotnostní podíly HA roztoků odpovídají datům uvedeným v Tab. 2

Na Obr. 35 jsou zobrazeny závislosti z-average na teplotě roztoků připravených třepáním po dobu 48 h. Ve srovnání s roztoky třepanými 24 h uvedenými výše na Obr. 34 lze pozorovat výrazný pokles hodnot z-average pro systém s nejvyšší střední M_w .



Obr. 35: Změny velikosti polymerních klubek v závislosti na teplotě u třepaných roztoků připravovaných po dobu 48 h při teplotě 24 °C. Výchozí hmotnostní podíly HA roztoků odpovídají datům uvedeným v Tab. 2

Na Obr. 36 lze pozorovat závislosti z-average na teplotě roztoků připravených mícháním při teplotě 50 °C. U nízké a střední molekulové hmotnosti je pozorovatelný obdobný vývoj hodnot z-average. Oproti tomu vysoká střední molekulová hmotnost 1 500 kDa má z-average mnohokrát větší, než naměřený při 25 °C. S vyšší teplotou klubko dále expanduje, zejm. pak po překročení teploty 36 °C. Z porovnání těchto výsledků je patrné, že nejcitlivější z pohledu změny hodnoty z-average je HA o nejvyšší střední M_w .



Obr. 36: Změny velikosti polymerních klubek v závislosti na teplotě u míchaných roztoků připravených po dobu 24 h při teplotě 50 °C. Výchozí hmotnostní podíly HA roztoků odpovídají datům uvedeným v Tab. 2

V Tab. 16 a 17 a na Obr. 37 a 38 jsou srovnány 1% hm. roztoky HA o střední molekulové hmotnosti 243 kDa připravené různými metodami s ohledem na jejich povrchovou aktivitu, hodnoty z-average polymerních klubek měřených při 25 °C a z pohledu závislost hodnoty z-average na teplotě. Mimo to je zde hodnocena časová stálost získaných dat z DLS měření ve dvou po sobě následujících dnech a časová stálost systémů, respektive přeměření charakteristik roztoků následný den. Z hlediska změn povrchové aktivity není ve dvou po sobě následujících dnech pozorována výraznější změna povrchové aktivity HA. Stejně tak ve většině případů (až na třepaný roztok) se nemění střední hodnota parametru z-average měřená při 25 °C. Co se však mění, jsou termální stability polymerních klubek, viz závislosti parametru z-average uvedené na Obr. 37 a 38. Data uvedená na Obr. 37 naznačují, že třepáním HA o této střední M_w a hmotnostním podílu v roztoku nelze

připravit termálně stabilní systém. Body na Obr. 37 měřené ve dvou po sobě následujících dnech jsou značně rozskákané. Oproti tomu míchaný roztok se vyznačuje výrazně stabilnějšími chováními, viz Obr. 38.

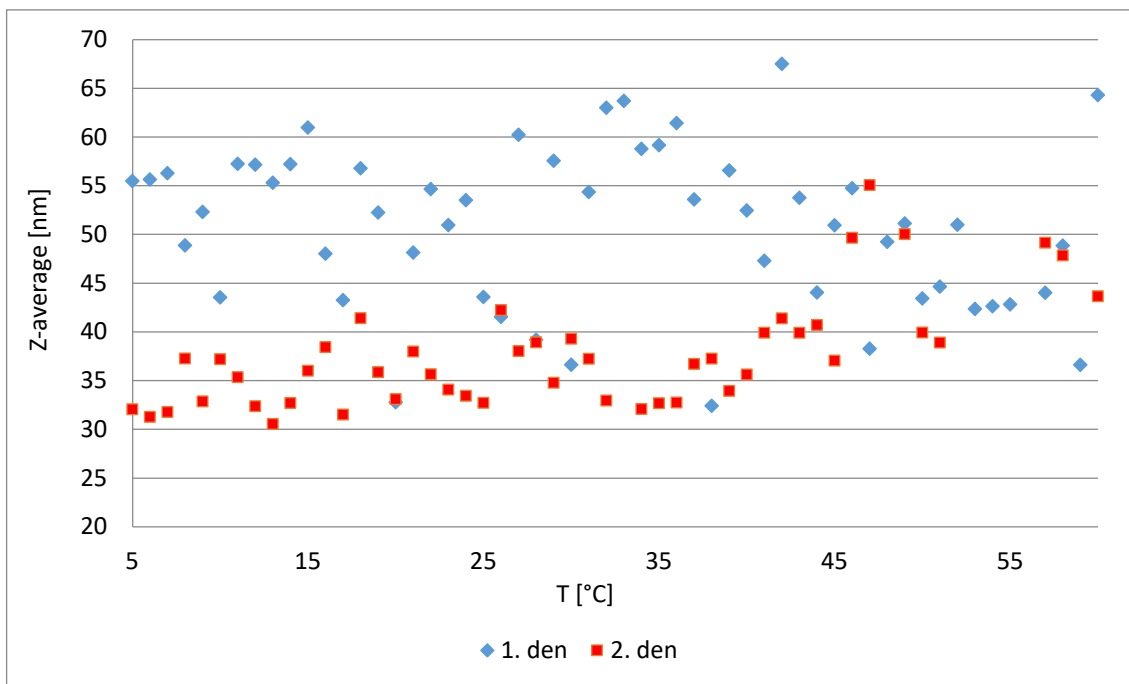
Stabilita roztoků připravených na TFFC zařízení byla studována v rámci dřívějších prací.

Tab. 16: Změny parametrů třepaného roztoku HA ve dvou po sobě následujících dnech

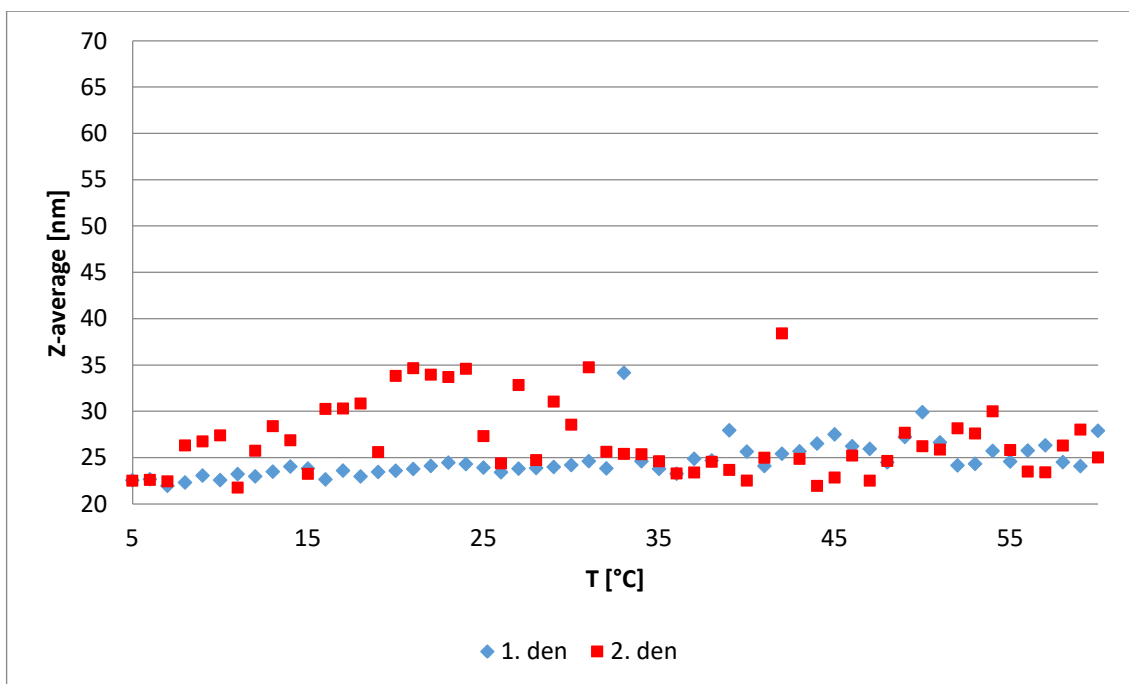
M_w [kDa]	w [%]	Příprava:	T_r [°C]	t_r [h]
243	1	třepáním	24	24
		Změna povrch. napětí $\Delta\sigma_{0-300}$ [mN/m]		Z-average při 25 °C [nm]
1. den		0,59		39,5 ± 6,5
2. den		0,08		34,8 ± 0,8

Tab. 17: Změny parametrů míchaného roztoku HA ve dvou po sobě následujících dnech

M_w [kDa]	w [%]	Příprava:	T_r [°C]	t_r [h]
243	1	mícháním	50	24
		Změna povrch. napětí $\Delta\sigma_{0-300}$ [mN/m]		Z-average při 25 °C [nm]
1. den		0,46		23,9 ± 1,4
2. den		2,80		25,0 ± 0,6



Obr. 37: Teplotní závislost z-average třepaného roztoku



Obr. 38: Teplotní závislost z-average míchaného roztoku

5.3 Viskozitní charakteristiky roztoků HA

Vybrané typy roztoků (připravené metodou třepání a míchání) byly charakterizovány pomocí viskozitních měření na kuličkovém viskozimetru. Byly charakterizovány roztoky o rozdílných molekulových hmotnostech v rozmezí teplot 25–50 °C, viz Tab. 18.

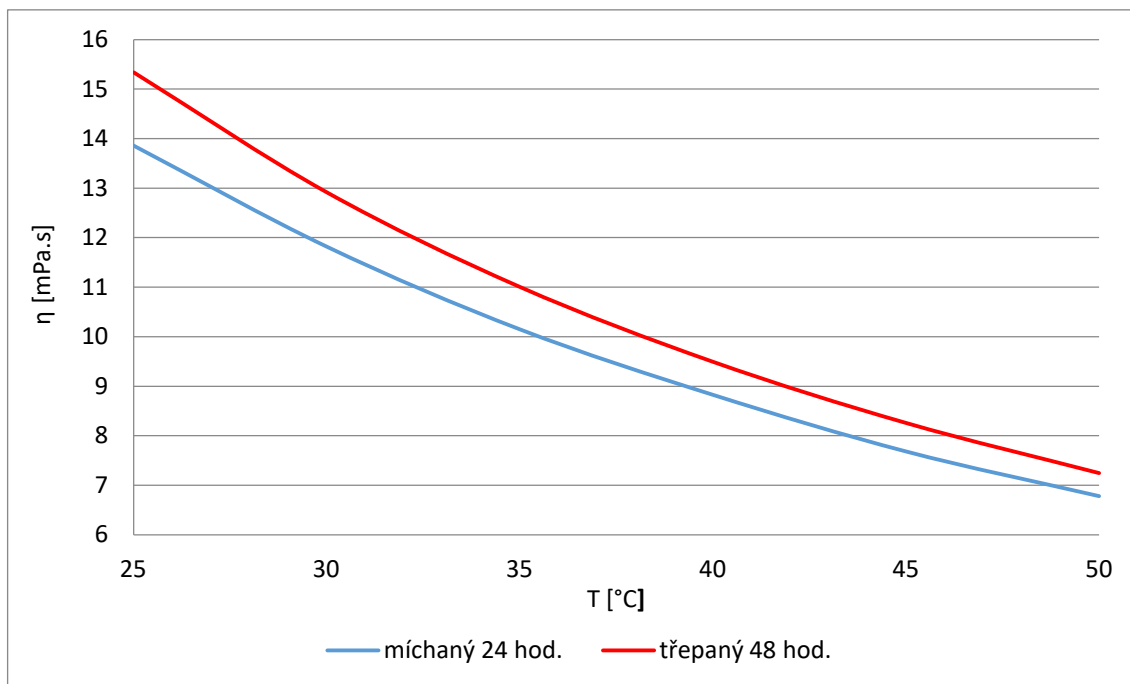
Tab. 18: Viskozitní charakteristiky třepaných a míchaných roztoků HA

M_w [kDa]	w [%]	Příprava	T_r [°C]	t_r [h]	Změna povrch. napětí $\Delta\sigma_{0-300}$ [mN/m]	Z-average [nm]	Dynamická viskozita 25–50 °C [mPa.s]
124	1	třepačka	24	48	-0,16	$23,86 \pm 0,16$	8,60–4,41
		míchadlo	50	24	0,28	$26,32 \pm 0,18$	7,47–3,91
370	0,6	třepačka	24	48	1,36	$67,93 \pm 0,14$	15,34–7,25
		míchadlo	50	24	0,37	$58,04 \pm 1,46$	13,86–6,78
1 180	0,1	třepačka	24	48	0,65	$62,07 \pm 0,30$	3,57–1,95
		míchadlo	50	24	0,47	$54,23 \pm 2,91$	1,86–1,09
1 500	0,05	třepačka	24	48	1,10	$118,7 \pm 0,13$	2,01–1,17
		míchadlo	50	24	1,06	$73,76 \pm 0,86$	1,86–1,09

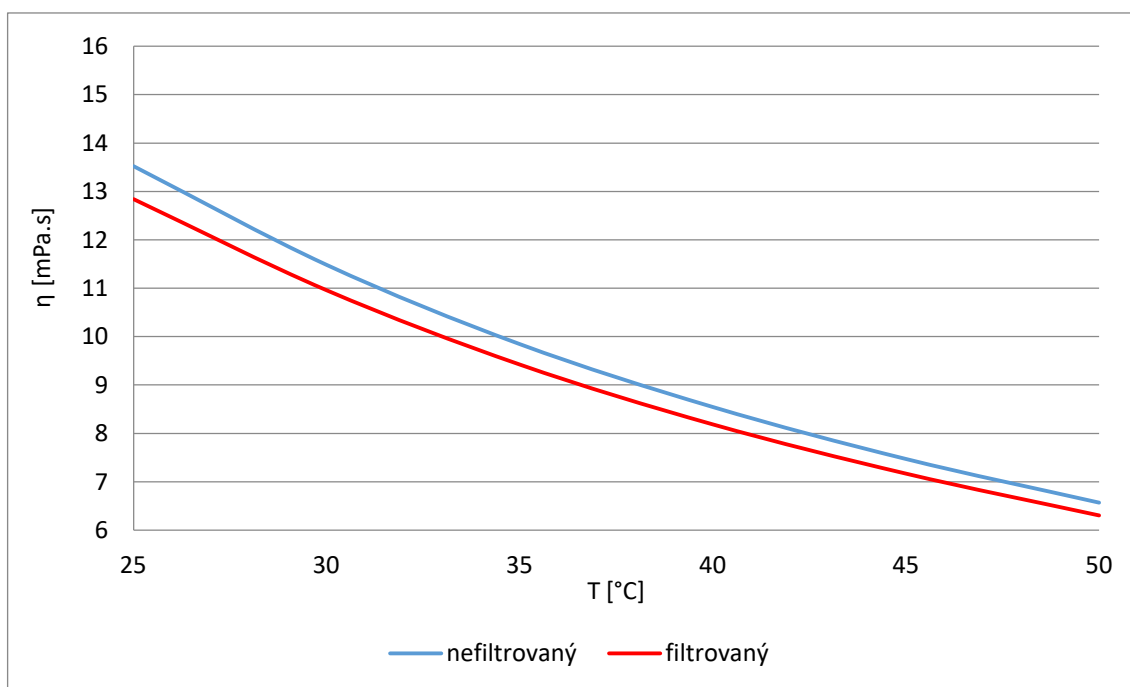
Z výsledků prezentovaných v Tab. 1 lze konstatovat následující. Třepané roztoky se vyznačují vyššími hodnotami viskozity, což je ve většině případu logicky spojeno s vyšší hodnotou parametru z-average, kdy větší, tj. více expandované, méně organizované klubka HA spolu mohou vzájemně interagovat a tvořit zapleteniny, což je příčinou právě této vyšší hodnoty měřené viskozity oproti roztokům připravovaným na míchadle.

Na Obr. 39 je uvedeno srovnání průběhu změny viskozity s teplotou pro roztok připravený mícháním a třepáním. Data uvedená na tomto obrázku odpovídají datům uvedeným v Tab. 18.

Na Obr. 40 je porovnání dynamických viskozit nefiltrovaného a filtrovaného roztoku vybrané střední molekulové hmotnosti 370 kDa. Filtrovaný roztok vykazuje nižší viskozitu oproti nefiltrovanému, což koresponduje s teorií snadnějšího toku natažených polymerních klubek oproti nedeformovaným klubkům, podobně jak bylo diskutováno pro změny povrchových aktivit vybraných roztoků a změn hodnoty parametru z-average.



Obr. 39: Změna viskozity s teplotou měřená na kuličkovém viskozimetru pro roztok obsahující 0,6 % hm. HA o střední $M_w = 370$ kDa



Obr. 40: Vliv filtrace na změnu dynamické viskozity 0,6 % hm. roztoku o střední $M_w = 370$ kDa, třepaného po dobu 24 h

ZÁVĚR

Byly studovány změny charakteristik polymerních klubek HA v roztocích připravovaných pomocí rozdílných přístupů. Vzorky HA o rozdílných středních M_w byly rozpouštěny na třepačce, temperovaném magnetickém míchadle a ve speciálním zařízení generujícím teplotní spády a z nich plynoucí samoorganizované proudění kapaliny. Z charakterizací pomocí vybraných experimentálních technik vyplynuly následující závěry.

Změny povrchové aktivity lze u studovaných systémů charakterizovat jak pomocí metody visící kapky, tak s využitím Wilhelmyho destičkové metody. Zaznamenávaná data z obou metodik jsou srovnatelná. Pomocí metody míchání nebo třepání nelze zvýšit povrchovou aktivitu rozpouštěné HA. Povrchová aktivita takto připravených systémů může být zdánlivě zvýšena výrazným zředěním systému do stavu, kdy jednotlivé makromolekuly mají dostatek prostoru k tomu, aby se mohly reorganizovat na fázovém rozhraní kapalina - plyn. Dále bylo potvrzeno, že roztoky připravené v teplotním spádu v TFFC při optimálně zvoleném výchozím hmotnostním podílu polymeru v roztoku vykazují výrazně vyšší povrchovou aktivitu, což je s největší pravděpodobností spojeno se změnou jejich konformace v prostoru, jak je naznačeno v odborné literatuře. Mimo to vykazují roztoky připravené mícháním při zvýšené teplotě výraznou citlivost na proces jejich filtrace, kdy zdánlivě roste jejich povrchová aktivita bezprostředně po průchodu systému přes mikrofiltr.

Z výsledků charakterizace změn velikosti polymerních klubek HA v roztocích připravovaných rozdílnými přístupy lze konstatovat následující. S rostoucí molekulovou hmotností roste střední hodnota z-average. Velikosti klubek HA v třepaných roztocích se vyznačuje stejnými nebo mírně vyššími hodnotami oproti systémům připraveným mícháním. Zásadním parametrem z hlediska přípravy je doba rozpouštění polymerního systému daným přístupem, která zásadním způsobem determinuje termální stabilitu polymerních klubek z hlediska možnosti jejich expanze v průběhu zahřívání. Dále bylo zjištěno, že zvýšení povrchové aktivity HA v roztoku připravovaném v TFFC zařízení je přímo spojeno se výrazným růstem hodnoty z-average, což svědčí o výrazné reorganizaci makromolekulárního systému v roztoku. Mimo to se mění termální stabilita makromolekulárního systému. Místo toho, aby se hodnota z-average s teplotou zvětšovala, klesá.

Bezprostřední filtrace třepaného roztoku před měřením způsobuje mírný nárůst hodnoty z-average, která se v průběhu několika hodin vrací na původní hodnotu. Vzorky HA o nejvyšší střední $M_w = 1500$ kDa se vyznačují největšími změnami parametru z-average v závislosti na způsobu jejich rozpouštění. Z hlediska termální stálosti velikosti polymerního klubka vykazují lepší vlastnosti roztoky připravované metodou míchání při vyšší teplotě.

Viskozitní měření potvrdila, že roztoky HA připravené na míchadle se vyznačují nižšími hodnotami viskozity, což je přímo spojeno s nižšími hodnotami střední velikosti polymerního klubka. Mimo to lze z viskozitních měření pozorovat vliv procesu filtrace na hodnoty měřené dynamické viskozity.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] LEWIS A., . *Drug-device Combination Products: Delivery Technologies and Applications*. Cambridge: Woodhead Pub, 2009. ISBN 978-184-5694-708.
- [2] HENCH, L. a J. JONES. *Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering*. Cambridge: Woodhead, 2005. ISBN 978-1-85573737-2.
- [3] BALAZS, F., T. LAURENT a R. JEANLOZ. Nomenclature of Hyaluronic Acid. *Biochem.* 1986, **242**.
- [4] FRASER, J., T. LAURENT a U. LAURENT. Hyaluronan: Its Nature, Distribution, Functions and Turnover. *Journal of Internal Medicine*. 1997, **242**(1), 27-33. DOI: 10.1046/j.1365-2796.1997.00170.x.
- [5] MANASA, M., V. SRIDEVI, M. CHANDANA LAKSHMI a J. DEDEEPIYA. *A Review on Hyaluronic Acid*. International Journal of Research in Chemistry and Environment, 2012. ISSN 2248-9649.
- [6] DEANGELIS, P. Hyaluronan synthases: Fascinating Glycosyltransferases from Vertebrates, Bacterial Pathogens, and Algal Viruses. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. 1999, **56**(7-8), 670-682. DOI: 10.1007/s000180050461.
- [7] DEANGELIS, P. Identification and Molecular Cloning of a Unique Hyaluronan Synthase from *Pasteurella Multocida*. *Journal of Biological Chemistry*. b.r., **273**(14), 8454-8458. DOI: 10.1074/jbc.273.14.8454.
- [8] SCHMIDT, Karl-Hermann, Elisabeth GÜNTHER a Harry COURTNEY. Expression of Both M Protein and Hyaluronic Acid Capsule by Group A Streptococcal Strains Results in a High Virulence for Chicken Embryos. *Medical Microbiology and Immunology*. 1996, **184**(4), 169-173. DOI: 10.1007/BF02456131.
- [9] BOERIU, C., J. SPRINGER, F. KOOY, L. VAN DEN BROEK a G. EGGINK. Production Methods for Hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*. 2013, , 14. DOI: 10.1155/2013/624967.
- [10] VELEBNÝ, V. *Hyaluronan - biopolymer pro tkáňové inženýrství*. 2012. Teze

- habilitační práce. VUT.
- [11] NEČAS, J., L. BARTOŠÍKOVÁ, P. BRAUNER a J. KOLÁŘ. Hyaluronic Acid (Hyaluronan): A Review. *Veterinární medicína*. 2008, **53**(8), 397–411.
- [12] HASCALL, C. a C. LAURENT. Hyaluronan: Structure and Physical Properties. *Glycoforum*. 1997, 1-5.
- [13] BROWN, M. a S. JONES. Hyaluronic Acid: A Unique Topical Vehicle for the Localized Delivery of Drugs to the Skin. *European Academy of Dermatology and venereology*. 2005, **19**, 308-318. DOI: 10.1111/j.1468- 3083.2004.01180.x.
- [14] SCOTT, J. Secondary and Teriary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solutions. *Some Biological Consequences*. 1998, , 1-10.
- [15] HEATLEY, F. a J. SCOTT. A Water Molecule Participates in the Secondary Structure of Hyaluronan. *Biochemical Journal*. 1988, **254**, 489-493.
- [16] SCOTT, John, Frank HEATLEY, Malcolm JONES, Allan WILKINSON a Anthony OLAVESSEN. Secondary Structure of Chondroitin Sulphate in Dimethyl Sulphoxide. *European Journal of Biochemistry*. 1983, **130**(3), 491-495. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1983.tb07177.x.
- [17] CALCIU-RUSU, D., E. ROTHFUSS, J. ECKELT, T. HAASE, H. DICK a B. WOLF. Rheology of Sodium Hyaluronate Saline Solutions for Ophthalmic Use. *Biomacromolecules*. 2007, **8**(4), 1287-1292. DOI: 10.1021/bm061039k.
- [18] LAURENT, T., B. LAURENT a J. FRASER. The Structure and Function of Hyaluronan: An Overview. *Immunology and Cell Biology*. 1996, **74**, 1-7.
- [19] SCOTT, J., C. CUMMINGS, A. BRASS a Y. CHEN. Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solutions, Investigated by Rotary Shadowing-electron Microscopy and Computer Simulation: Hyaluronan is Very Efficient Networkforming Polymer. *Biochemical Journal*. 1991, **274**, 699-705.
- [20] GARG, H. a Ch. HALES. Preface. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*. Elsevier, 2004, , 7. DOI: 10.1016/B978-008044382-9/50030-3.

- [21] KHABAROV, V., P. BOYKOV a M. SELYANIN. *Hyaluronic Acid: Preparation, Properties, Application in Biology and Medicine*. John Wiley & Sons, 2014. ISBN 978-111-8633-793.
- [22] GARCÍA-ABUÍN, A., D. GÓMEZ-DÍAZ, J. NAVAZA, L. REGUEIRO a I. VIDAL-TATO. Viscosimetric Behaviour of Hyaluronic Acid in Different Aqueous Solutions. *Carbohydrate Polymers*. 2011, **85**(3), 500-505. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.02.028.
- [23] COWMAN, M. a S. MATSUOKA. Experimental Approaches to Hyaluronan Structure. *Carbohydrate Research*. 2005, **340**(5), 791-809. DOI: 10.1016/j.carres.2005.01.022.
- [24] WIK, K.-O. a W. COMPER. Hyaluronate Diffusion in Semidilute Solutions. *Biopolymers*. 1982, **21**(3), 583-599. DOI: 10.1002/bip.360210308.
- [25] PISÁRČIK, M., D. BAKOŠ a M. ČEPPAN. Non-Newtonian Properties of Hyaluronic Acid Aqueous Solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 1995, **97**(3), 197-202. DOI: 10.1016/0927-7757(95)03097-W.
- [26] GEISLER, E., A. HECHT a F. HORKAY. Scaling Behavior of Hyaluronic Acid in Solution with Mono- and Divalent Ions. *Macromolecular Symposia*. 2010, **291-292**(1), 362-370. DOI: 10.1002/masy.201050543.
- [27] SHEEHAN, J. a E. ATKINS. X-Ray Fiber Diffraction Study of the Conformational Change in Hyaluronate Induced in the Presence of Sodium, Potassium and Calcium Cations. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1983, **5**, 215-221.
- [28] SHEEHAN, J., K. GARDNER a E. ATKINS. Hyaluronic acid: A Double-helical Structure in the Presence of Potassium at Low pH and Found also with the Cations Ammonium, Rubidium and Caesium. *Journal of Molecular Biology*. 1977, **117**(1), 113-135. DOI: 10.1016/0022-2836(77)90027-4.
- [29] HAXAIRE, K., I. BRACCINI, M. MILAS, M. RINAUDO a S. PEREZ. Conformational Behavior of Hyaluronan in Relation to its Physical Properties as Probed by Molecular Modeling. *Glycobiology*. 2000, **10**(6), 587-594. DOI: 10.1093/glycob/10.6.587.
- [30] MATA, J., D. VARADE a P. BAHADUR. Aggregation Behavior of Quaternary Salt

- Based Cationic Surfactants. *Thermochimica Acta*. 2005, **428**(1-2), 147-155. DOI: 10.1016/j.tca.2004.11.009.
- [31] GATEJ, I., M. POPA a M. RINAUDO. Role of the pH on Hyaluronan Behavior in Aqueous Solution. *Biomacromolecules*. 2005, **6**(1), 61-67. DOI: 10.1021/bm040050m.
- [32] GURA, E., M. HÜCKEL a P. MÜLLER. Specific Degradation of Hyaluronic Acid and Its Rheological Properties. *Polymer Degradation and Stability*. 1998, **59**(1-3), 297-302. DOI: 10.1016/S0141-3910(97)00194-8.
- [33] KENNEDY, J., G. PHILLIPS a P. WILLIAMS. *Hyaluronan Proceedings of an International Meeting, September 2000, North East Wales Institute, UK*. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd, 2002. ISBN 18-456-9312-4.
- [34] DICK, H. a O. SCHWENN. *Viscoelastics in Ophthalmic Surgery*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2000. ISBN 36-425-9779-3.
- [35] GRIBBON, P., B. HENG a T. HARDINGHAM. The Analysis of Intermolecular Interactions in Concentrated Hyaluronan Solutions Suggest no Evidence for Chain-chain Association. *Biochemical Journal*. 2000, **350**(1), 329-335. DOI: 10.1042/bj3500329.
- [36] SMITH, D. Single-Polymer Dynamics in Steady Shear Flow. *Science*. 1999, **283**(5408), 1724-1727. DOI: 10.1126/science.283.5408.1724.
- [37] SCOTT, J. a F. HEATLEY. Hyaluronan Forms Specific Stable Tertiary Structures in Aqueous Solution: A ¹³C NMR study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999, **96**(9), 4850-4855. DOI: 10.1073/pnas.96.9.4850.
- [38] SCOTT, J. a F. HEATLEY. Biological Properties of Hyaluronan in Aqueous Solution Are Controlled and Sequestered by Reversible Tertiary Structures, Defined by NMR Spectroscopy. *Biomacromolecules*. 2002, **3**(3), 547-553. DOI: 10.1021/bm010170j.

- [39] MALEKI, A., A. KJØNIKSEN a B. NYSTRÖM. Anomalous Viscosity Behavior in Aqueous Solutions of Hyaluronic Acid. *Polymer Bulletin*. 2007, **59**(2), 217-226. DOI: 10.1007/s00289-007-0760-2.
- [40] HAWARD, S., A. JAISHANKAR, M. OLIVEIRA, M. ALVES a G. MCKINLEY. Extensional Flow of Hyaluronic Acid Solutions in an Optimized Microfluidic Cross-slot Device. *Biomicrofluidics*. 2013, **7**(4). DOI: 10.1063/1.4816708.
- [41] ENGMANN, J., C. SERVAIS a A. BURBIDGE. Squeeze Flow Theory and Applications to Rheometry: A review. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*. 2005, **132**(1-3), 1-27. DOI: 10.1016/j.jnnfm.2005.08.007.
- [42] MOCHIMARU, Y. Unsteady-state Development of Plane Couette Flow for Viscoelastic Fluids. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*. 1983, **12**(2), 135-152. DOI: 10.1016/0377-0257(83)80034-2.
- [43] ODELL, J., A. MÜLLER a A. KELLER. Non-Newtonian Behaviour of Hydrolysed Polyacrylamide in Strong Elongational Flows: a transient network approach. *Polymer*. 1988, **29**(7), 1179-1190. DOI: 10.1016/0032-3861(88)90042-0.
- [44] PETRIE, C. Extensional Viscosity: A Critical Discussion. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*. 2006, **137**(1-3), 15-23. DOI: 10.1016/j.jnnfm.2006.01.011.
- [45] ZANDER, T., D. WIELAND, A. RAJ et al. The Influence of Hyaluronan on the Structure of a DPPC—bilayer Under High Pressures. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2016, **142**, 230-238. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.02.040.
- [46] HARMON, P., E. MAZIARZ a X. LIU. Detailed Characterization of Hyaluronan Using Aqueous Size Exclusion Chromatography with Triple Detection and Multiangle Light Scattering Detection. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2012, **100**(7), 1955-1960. DOI: 10.1002/jbm.b.32762.
- [47] ČOŽÍKOVÁ, D., T. ŠÍLOVÁ, V. MORAVCOVÁ, D. ŠMEJKALOVÁ, S. PEPELIAEV, V. VELEBNÝ a M. HERMANNOVÁ. Preparation and Extensive Characterization of Hyaluronan with Narrow Molecular Weight Distribution. *Carbohydrate Polymers*. 2017, **160**, 134-142. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.12.045.

- [48] HOLOUBEK, J. Some Applications of Light Scattering in Materials Science. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*. 2007, **106**(1-3), 104-121. DOI: 10.1016/j.jqsrt.2007.01.013.
- [49] RUSSO, P. *A Practical Minicourse in Dynamic Light Scattering*. In: . 2012, s. 2-48.
- [50] GRUNDĚLOVÁ, L. *Stabilita a chování hyaluronanu v roztocích pro technologii výroby farmaceutických přípravků*. UTB Zlín, 2010. Dizertační práce. Vedoucí práce A. Mráček.
- [51] GRUNDĚLOVÁ, L., A. MRÁČEK, V. KAŠPÁRKOVÁ, A. MINAŘÍK a P. SMOLKA. The Influence of Quarternary Salt on Hyaluronan Conformation and Particle Size in Solution. *Carbohydrate Polymers*. 2013, **98**(1), 1039-1044. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.06.057.
- [52] MONTANARI, E., C. DI MEO, S. SENNATO et al. Hyaluronan-cholesterol Nanohydrogels: Characterisation and Effectiveness in Carrying Alginate Lyase. *New Biotechnology*. 2017, **37**, 80-89. DOI: 10.1016/j.nbt.2016.08.004.
- [53] ŠMEJKALOVÁ, D., T. MUTHNÝ, K. NEŠPOROVÁ et al. Hyaluronan Polymeric Micelles for Topical Drug Delivery. *Carbohydrate Polymers*. 2017, **156**, 86-96. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.09.013.
- [54] FOUISSAC, E., M. MILAS a M. RINAUDO. Shear-rate, concentration, molecular weight, and temperature viscosity dependences of hyaluronate, a wormlike polyelectrolyte. *Macromolecules*. 1993, **26**(25), 6945-6951. DOI: 10.1021/ma00077a036.
- [55] LA GATTA, A., M. DE ROSA, M. FREZZA, C. CATALANO, M. MELONI a C. SCHIRALDI. Biophysical and Biological Characterization of a New Line of Hyaluronan-Based Dermal Fillers: A scientific rationale to specific clinical indications. *Materials Science and Engineering: C*. 2016, **68**, 565-572. DOI: 10.1016/j.msec.2016.06.008.
- [56] DAAR, E., L. KING, A. NISBET, R. THORPE a D. BRADLEY. Viscosity Changes in Hyaluronic Acid: Irradiation and Rheological Studies. *Applied Radiation and Isotopes*. 2010, **68**(4-5), 746-750. DOI: 10.1016/j.apradiso.2009.10.022.

- [57] MRÁČEK, A., L. GŘUNDĚLOVÁ, A. MINAŘÍK, L. VERÍSSIMO, M. BARROS a A. RIBEIRO. Characterization at 25 °C of Sodium Hyaluronate in Aqueous Solutions Obtained by Transport Techniques. *Molecules*. 2015, **20**(4), 5812-5824. DOI: 10.3390/molecules20045812.
- [58] RENAUD, M., M. BELGACEM a M. RINAUDO. Rheological Behaviour of Polysaccharide Aqueous Solutions. *Polymer*. 2005, **46**(26), 12348-12358. DOI: 10.1016/j.polymer.2005.10.019.
- [59] LV, M., M. WANG, W. CAI, W. HAO, P. YUAN a Z. KANG. Characterisation of Separated end Hyaluronan Oligosaccharides from Leech Hyaluronidase and Evaluation of Angiogenesis. *Carbohydrate Polymers*. 2016, **142**, 309-316. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.01.052.
- [60] MENDICHI, R. a A. SCHIERONI. *Aqueous Sec, Light Scattering and Viscometry of Ultra-High Molar Mass Hyaluronan*. Hyaluronan, 2011. ISBN 1855735709.
- [61] BHILOCHA, S., R. AMIN, M. PANDYA et al. Agarose and Polyacrylamide Gel Electrophoresis Methods for Molecular Mass Analysis of 5- to 500-kDa Hyaluronan. *Analytical Biochemistry*. 2011, **417**(1), 41-49. DOI: 10.1016/j.ab.2011.05.026.
- [62] DUDA, J., W. SIGELKO a J. VRENTAS. Binary Diffusion Studies With a Wedge Interferometer. *The Journal of Physical Chemistry*. 1969, **73**(1), 141-149. DOI: 10.1021/j100721a023.
- [63] UEBERREITER, J., Frithjof ASMUSSEN a J. VRENTAS. Velocity of Dissolution of Polymers. Part I. *Journal of Polymer Science*. 1969, **57**(165), 187-198. DOI: 10.1002/pol.1962.1205716515.
- [64] MILLER-CHOU, B. a J. KOENIG. A Review of Polymer Dissolution. *Progress in Polymer Science*. 2003, **28**(8), 1223-1270. DOI: 10.1016/S0079-6700(03)00045-5.
- [65] MRÁČEK, A. The Measurement of Polymer Swelling Processes by an Interferometric Method and Evaluation of Diffusion Coefficients. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010, **11**(2), 532-543. DOI: 10.3390/ijms11020532.

- [66] MRÁČEK, A., K. BENEŠOVÁ, A. MINAŘÍK, P. URBAN a L. LAPČÍK. The Diffusion Process of Sodium Hyaluronate (Na-Ha) and Na-Ha-n-alkyl Derivatives Films Swelling. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2007, **83**(1), 184-190. DOI: 10.1002/jbm.a.31188.
- [67] SCOTT, J. *Secondary Structures in Hyaluronan Solutions: Chemical and Biological Implications*. b.r., , 6. DOI: 10.1002/9780470513774.ch2.
- [68] ALMOND, A., P. DEANGELIS a C. BLUNDELL. Hyaluronan: The Local Solution Conformation Determined by NMR and Computer Modeling is Close to a Contracted Left-handed 4-Fold Helix. *Journal of Molecular Biology*. 2006, **358**(5), 1256-1269. DOI: 10.1016/j.jmb.2006.02.077.
- [69] FURLAN, S., G. LA PENNA, A. PERICO a A. CESÀRO. Hyaluronan Chain Conformation and Dynamics. *Carbohydrate Research*. 2005, **340**(5), 959-970. DOI: 10.1016/j.carres.2005.01.030.
- [70] MIKELSAAR, R. a J. SCOTT. Molecular Modelling of Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan, Compared with Electron Microscopy and NMR Data. Possible Sheets and Tubular Structures in Aqueous Solution. *Glycoconjugate Journal*. 1994, **11**(2), 65-71. DOI: 10.1007/BF00731145.
- [71] CALLAGHAN, P. Rheo NMR and Shear Banding. *Rheologica Acta*. 2008, **47**(3), 243-255. DOI: 10.1007/s00397-007-0251-2.
- [72] PRŮŠOVÁ, A., F. VERGELDT a J. KUČERÍK. Influence of Water Content and Drying on the Physical Structure of Native Hyaluronan. *Carbohydrate Polymers*. 2013, **95**(1), 515-521. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.03.031.
- [73] NESTOR, G. a C. SANDSTRÖM. NMR Study of Hydroxy and Amide Protons in Hyaluronan Polymers. *Carbohydrate Polymers*. 2017, **157**, 920-928. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.10.005.
- [74] GRIBBON, P. a T. HARDINGHAM. Macromolecular Diffusion of Biological Polymers Measured by Confocal Fluorescence Recovery after Photobleaching. *Biophysical Journal*. 1998, **75**(2), 1032-1039. DOI: 10.1016/S0006-3495(98)77592-7.
- [75] GRIBBON, P., B. HENG a T. HARDINGHAM. The Molecular Basis of the Solution

- Properties of Hyaluronan Investigated by Confocal Fluorescence Recovery After Photobleaching. *Biophysical Journal*. 1999, **77**(4), 2210-2216. DOI: 10.1016/S0006-3495(99)77061-X.
- [76] PRŮŠOVÁ, A., D. ŠMEJKALOVÁ, M. CHYTIL, V. VELEBNÝ a J. KUČERÍK. An Alternative DSC Approach to Study Hydration of Hyaluronan. *Carbohydrate Polymers*. 2010, **82**(2), 498-503. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.05.022.
- [77] KUČERÍK, J., A. PRŮŠOVÁ, A. ROTARU, K. FLIMEL, J. JANEČEK a P. CONTE. DSC Study on Hyaluronan Drying and Hydration. *Thermochimica Acta*. 2011, **523**(1-2), 245-249. DOI: 10.1016/j.tca.2011.04.034.
- [78] JAYCOCK, M. a G. PARFITT. *Chemistry of Interfaces*. New York: Halsted Press, 1981. ISBN 08-531-2028-5.
- [79] BASZKIN, A. a W. NORDE. *Physical Chemistry of Biological Interfaces*. New York: M. Dekker, 2000. ISBN 08-247-7581-3.
- [80] MCCLEMENTS, D. Non-covalent Interactions between Proteins and Polysaccharides. *Biotechnology Advances*. 2006, **24**(6), 621-625. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.07.003.
- [81] KASAPIS, S., I. NORTON a J. UBBINK. *Modern Biopolymer Science Bridging the Divide between Fundamental Treatise and Industrial Application*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2009. ISBN 00-809-2114-0.
- [82] DE KRUIF, C. a R. TUINIER. Polysaccharide Protein Interactions. *Food Hydrocolloids*. 2001, **15**(4-6), 555-563. DOI: 10.1016/S0268-005X(01)00076-5.
- [83] RIBEIRO, W., J. MATA a B. SARAMAGO. Effect of Concentration and Temperature on Surface Tension of Sodium Hyaluronate Saline Solutions. *Langmuir*. 2007, **23**(13), 7014-7017. DOI: 10.1021/la700269k.
- [84] What is Surface Tension?. *KYOVA INTERFACE SCIENCE CO., LTD* [online]. b.r. [cit. 2017-04-18].

- [85] VORVOLAKOS, K., J. COBURN a D. SAYLOR. Dynamic Interfacial Behavior of Viscoelastic Aqueous Hyaluronic Acid: Effects of molecular weight, concentration and interfacial velocity. *Soft Matter*. 2014, **10**(13), 2304-2312. DOI: 10.1039/C3SM52372A.
- [86] CHYTIL, M. a M. PEKAŘ. Effect of New Hydrophobic Modification of Hyaluronan on its Solution Properties: evaluation of self-aggregation. *Carbohydrate Polymers*. 2009, **76**(3), 443-448. DOI: 10.1016/j.carbpol.2008.11.003.
- [87] BASSOU, N. a Y. RHARBI. Role of Bénard–Marangoni Instabilities during Solvent Evaporation in Polymer Surface Corrugations. *Langmuir*. 2009, **25**(1), 624-632. DOI: 10.1021/la802979a.
- [88] WANG, J. a P. SOMASUNDARAN. Adsorption and Conformation of Carboxymethyl Cellulose at Solid–liquid Interfaces Using Spectroscopic, AFM and Allied Techniques. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2005, **291**(1), 75-83. DOI: 10.1016/j.jcis.2005.04.095.
- [89] MORRA, M., C. CASSINELLI, A. PAVESIO a D. RENIER. Atomic Force Microscopy Evaluation of Aqueous Interfaces of Immobilized Hyaluronan. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2003, **259**(2), 236-243. DOI: 10.1016/S0021-9797(02)00204-7.
- [90] DUBOIS, M., K. GILLES, J. HAMILTON, P. REBERS a F. SMITH. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*. 1956, **28**(3), 350-356. DOI: 10.1021/ac60111a017.
- [91] CASSINELLI, C., M. MORRA, A. PAVESIO a D. RENIER. Evaluation of Interfacial Properties of Hyaluronan Coated Poly(methylmethacrylate) Intraocular Lenses. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2000, **11**(9), 961-977. DOI: 10.1163/156856200744138.
- [92] COWMAN, M., C. SPAGNOLI, D. KUDASHEVA, M. LI, A. DYAL, S. KANAI a E. BALAZS. Extended, Relaxed, and Condensed Conformations of Hyaluronan Observed by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal*. 2005, **88**(1), 590-602. DOI: 10.1529/biophysj.104.049361.

- [93] SPAGNOLI, C., A. KORNIKOV, A. ULMAN, E. BALAZS, Y. LYUBCHENKO a M. COWMAN. Hyaluronan Conformations on Surfaces: Effect of Surface Charge and Hydrophobicity. *Carbohydrate Research*. 2005, **340**(5), 929-941. DOI: 10.1016/j.carres.2005.01.024.
- [94] VINDIGNI, V., G. PAJARDI, L. LANCEROTTO, G. GIATSIDIS, R. SALMASO, G. ABATANGELO a F. BASSETTO. Negative Pressure Therapy Potential Enhancement with a Biointeractive Hyaluronan Acid Scaffold Interface: Case Report. *Dermatologic Surgery*. 2011, **37**(4), 543-546. DOI: 10.1111/j.1524-4725.2011.01931.x.
- [95] BERTS, I., G. FRAGNETO, J. HILBORN a A. RENNIE. Tuning the Density Profile of Surface-grafted Hyaluronan and the Effect of Counter-ions. *The European Physical Journal E*. 2013, **36**(7), -. DOI: 10.1140/epje/i2013-13070-7.
- [96] RODRÍGUEZ PATINO, J. a A. PILOSO. Protein–polysaccharide Interactions at Fluid Interfaces. *Food Hydrocolloids*. 2011, **25**(8), 1925-1937. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2011.02.023.
- [97] SAVINO, R. *Surface Tension-driven Flows and Applications*. Kerala, India: Research Signpost, 2006. ISBN 81-308-0065-9.
- [98] SUBBOTIN, A., A. MALKIN a V. KULICHIKHIN. Self-organization in the Flow of Complex Fluids (Colloid and Polymer Systems). Part 2: Theoretical models. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2011, **162**(1-2), 29-38. DOI: 10.1016/j.cis.2010.10.002.
- [99] GROISMAN, A. a V. STEINBERG. Mechanism of Elastic Instability in Couette Flow of Polymer Solutions: Experiment. *Physics of Fluids*. 1998, **10**(10), 2451-2463. DOI: 10.1063/1.869764.
- [100] WILSON, H. Instabilities and Constitutive Modelling. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 2006, **364**(1849), 3267-3283. DOI: 10.1098/rsta.2006.1892.

- [101] AKBULUT, M., N. REDDY, B. BECHTLOFF, S. KOLTZENBURG, J. VERMANT a R. PRUD'HOMME. Flow-Induced Conformational Changes in Gelatin Structure and Colloidal Stabilization. *Langmuir*. 2008, **24**(17), 9636-9641. DOI: 10.1021/la800487b.
- [102] Wilhelmy Plate Method. *KRÜSS GmbH* [online]. b.r. [cit. 2017-04-21]. Dostupné z: <http://www.kruss.de/services/education-theory/glossary/wilhelmy-plate-method>
- [103] BARTOVSKÁ, L. a M. ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0579-X.
- [104] *Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes* [online]. Malvern Instruments, b.r. [cit. 2017-04-22]. Dostupné z: <http://www.malvern.com/en/products/technology/dynamic-light-scattering/default.aspx?gclid=COGivKn9t9MCFYVAGwod-mcCbw>
- [105] ARZENŠEK, D., R. PODGORNIK a D. KUZMAN. *Dynamic Light Scattering and Application to Protein Solutions*. Department of Physics, Faculty of Mathematics and Physics, University of Ljubljana, 2010.
- [106] *Dynamic Light Scattering and Application to Protein Solutions* [online]. b.r. [cit. 2017-04-22].
- [107] HOLUBOVÁ, R. *Základy reologie* [online]. In: . b.r. [cit. 2017-05-15]. Dostupné z: http://mofychem.upol.cz/KA6/Zaklady_reologie.pdf
- [108] RAJNOHOVÁ, E., A. MINAŘÍK, P. SMOLKA, A. MRÁČEK a P. URBANEC. Možnosti využití tenziometrických metod pro charakterizaci samo-organizačních schopností polysacharidů na fázovém rozhraní. *Chemické listy*. 2014, **108**, 40-43. ISSN 0009-2770.
- [109] JUROŠKOVÁ, D. *Studium chování polymerních klubek polysacharidů ve vodných roztocích*. UTB Zlín, 2015. Bakalářská práce. Vedoucí práce A. Minařík.
- [110] RAJNOHOVÁ, E. *Studium samoorganizačních schopností biopolymerů na fázových rozhraních*. 2016. Dizertační práce. UTB Zlín. Vedoucí práce Minařík.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HA	kyselina hyaluronová, respektive hyaluronan sodný
ω	úhlová rychlost
$\dot{\gamma}$	rychlost smykové deformace
B-M proudění	Bénard-Marangoniho proudění
B-M buňky	Bénard-Marangoniho buňky
TFFC	zařízení generující teplotní spády a s tím spojené proudění kapaliny
T_1	teplota topné plochy
T_2	teplota chladicí/topné plochy
T_r	rozsah použitých teplot v TFFC nebo teplota rozpouštění
T_s	střední teplota rozpouštění v roztoku na TFFC
t_r	čas rozpouštění
F	síla potřebná k vyrovnání Pt plíšku do svislé polohy
m	hmotnost Pt plíšku
g	gravitační zrychlení
L	délka smáčení Pt plíšku
σ	povrchové napětí
θ	kontaktní úhel smáčení
s	tloušťka Pt plíšku
h	výška ponoření
ρ	hustota
Δp	kapilární tlak
$R_{1,2}$	poloměr křivosti
η	dynamická viskozita
τ	doba pádu kuličky
ρ_1	hustota kuličky

ρ_2	hustota měřené kapaliny
K	konstanta kuličky
M_w	střední molekulová hmotnost HA
w_p	hmotnostní podíl polymeru v roztoku
σ_0	povrchové napětí fyziologického roztoku
σ_{10}	povrchové napětí roztoku HA v čase měření 10 s
σ_{300}	povrchové napětí roztoku HA v čase měření 300 s
$\Delta\sigma$	rozdíl $\sigma_{300} - \sigma_0$
t	čas měření

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1: Strukturní jednotka HA</i>	12
<i>Obr. 2: Smyčka na řetězci HA [20]</i>	13
<i>Obr. 3: Možné vzájemné uložení řetězců HA [19]</i>	14
<i>Obr. 4: Toková křivka HA rozpuštěné ve vodě a solných roztocích [21]</i>	16
<i>Obr. 5: Porovnání velikostí polymerního klubka HA v různých roztocích, uvedené poloměry klubka jsou v nm [20]</i>	17
<i>Obr. 6: Závislost viskozity roztoku a velikosti klubka na pH a koncentraci polymeru [32]</i>	17
<i>Obr. 7: Deformace klubka spolupůsobením</i>	18
<i>Obr. 8: Deformace a relaxace polymerních řetězců za toku [36]</i>	19
<i>Obr. 9: Model znázorňující viskoelastický charakter sítě HA [12]</i>	20
<i>Obr. 10: Schéma tokového pole generovaného tlakem [40]</i>	22
<i>Obr. 11: Vývoj povrchového napětí v čase [84]</i>	30
<i>Obr. 12: Difuze, adsorpce a reorganizace polysacharidu na fázovém rozhraní v čase [87]</i>	31
<i>Obr. 13: Bénard-Marangoniho buňky [97]</i>	34
<i>Obr. 14: Použité třepací zařízení s umístěným roztokem polymeru</i>	38
<i>Obr. 15: Použitá temperační lázeň na magnetickém míchadle s roztokem polymeru</i>	38
<i>Obr. 16: Speciálně zkonstruované zařízení na UFMI pro generaci definovaných teplotních spádů (TFFC)</i>	39
<i>Obr. 17: Rozložení teplot a směr teplotního spádu působícího na roztok polymeru umístěný v Petriho misce mezi funkční plochy zařízení uvedeného na Obr. 16</i>	40
<i>Obr. 18: Schéma Wilhelmyho destičkové metody [102]</i>	41
<i>Obr. 19: Schéma proměnných analyzovaných na visící kapce nezbytných pro výpočet povrchového napětí [103]</i>	42
<i>Obr. 20: Schéma principu DLS metody [105]</i>	43
<i>Obr. 21: Schéma Höpplerova viskozimetru [106]</i>	44
<i>Obr. 22: Změny povrchového napětí v čase pro roztok HA a vody měřené pomocí Wilhelmyho destičkové metody</i>	46
<i>Obr. 23: Změny povrchového napětí v čase pro roztok HA a vody měřené pomocí metody visící kapky</i>	46

Obr. 24: Změny povrchového napětí v čase pro roztok HA a vody měřené pomocí metody visící kapky v dlouhém časovém intervalu.....	47
Obr. 25: Vliv způsobu přípravy na změnu povrchové aktivity roztoků HA 370 kDa připravených za jinak srovnatelných podmínek.....	53
Obr. 26: Vliv působícího rozsahu teplot na změnu povrchové aktivity polymerního klubka HA v roztoku pro $M_w = 370$ kDa a výchozí podíl polymeru v roztoku $w = 0,6$ nebo 1 % hm.	55
Obr. 27: Vliv filtrace na změnu povrchové aktivity polymerního klubka HA v míchaném roztoku ($M_w = 243$ kDa, $w = 1$ % hm.).....	56
Obr. 28: Vliv filtrace na změnu povrchové aktivity polymerního klubka HA.....	57
Obr. 29: Teplotní trend z-average polymerních klubek HA v roztocích připravených třepáním při 24 °C.....	61
Obr. 30: Teplotní trend z-average polymerních klubek HA v roztocích připravených mícháním při 24 °C.....	61
Obr. 31: Teplotní trend z-average polymerních klubek HA v roztocích připravených mícháním při 50 °C.....	62
Obr. 32: Teplotní trend hodnot z-average polymerních klubek HA o $M_w = 370$ kDa v roztoku rozpouštěné po dobu 20 h.....	64
Obr. 33: Vliv filtrace na teplotní závislost změny velikost polymerního klubka pro roztok $0,6$ % hm. HA se střední M_w 370 kDa, třepaný po dobu 48 h.....	65
Obr. 34: Změny velikosti polymerních klubek v závislosti na teplotě u třepaných roztoků připravovaných po dobu 24 h při teplotě 24 °C. Výchozí hmotnostní podíly HA roztoků odpovídají datům uvedeným v Tab. 2.....	66
Obr. 35: Změny velikosti polymerních klubek v závislosti na teplotě u třepaných roztoků připravovaných po dobu 48 h při teplotě 24 °C. Výchozí hmotnostní podíly HA roztoků odpovídají datům uvedeným v Tab. 2.....	66
Obr. 36: Změny velikosti polymerních klubek v závislosti na teplotě u míchaných roztoků připravovaných po dobu 24 h při teplotě 50 °C. Výchozí hmotnostní podíly HA roztoků odpovídají datům uvedeným v Tab. 2.....	67
Obr. 37: Teplotní závislost z-average třepaného roztoku.....	69
Obr. 38: Teplotní závislost z-average míchaného roztoku.....	69
Obr. 39: Změna viskozity s teplotou měřená na kuličkovém viskozimetru pro roztok obsahující $0,6$ % hm. HA o střední $M_w = 370$ kDa.....	71

*Obr. 40: Vliv filtrace na změnu dynamické viskozity 0,6 % hm. roztoku o střední M_w
= 370 kDa, třepaného po dobu 24 h 71*

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1: Přehled použitých vzorků HA</i>	37
<i>Tab. 2: Změna povrchové aktivity polymerního klubka třepaných a míchaných roztoků všech dostupných středních molekulových hmotností</i>	49
<i>Tab. 3: Změna povrchové aktivity polymerního klubka v roztocích připravovaných třepáním pro molekulovou hmotnost 370 kDa a rozdílné hmotností podíly HA v roztoku</i>	50
<i>Tab. 4: Změna povrchové aktivity polymerního klubka v roztocích připravovaných mícháním pro molekulovou hmotnost 370 kDa a roztoky připravené postupným zředováním zásobního roztoku o hmotnostním podílu $w = 1\%$ hm.</i>	51
<i>Tab. 5: Změna povrchové aktivity polymerního klubka roztoků vybrané molekulové hmotnosti 370 kDa připravovaných různými způsoby pro $w = 0,6\%$ hm.</i>	52
<i>Tab. 6: Změna povrchové aktivity polymerního klubka roztoků vybrané molekulové hmotnosti 370 kDa připravovaných různými způsoby pro $w = 1\%$ hm.</i>	52
<i>Tab. 7: Změna povrchové aktivity roztoků rozpuštěných na TFFC, srovnání různých hmotnostních podílů HA v roztoku</i>	54
<i>Tab. 8: Změna povrchové aktivity roztoků rozpuštěných na TFFC, srovnání teplotních spádů</i>	54
<i>Tab. 9: Vliv filtrace na změnu povrchové aktivity v míchaných roztocích</i>	56
<i>Tab. 10: Vliv filtrace na změnu povrchové aktivity HA v třepaných roztocích</i>	57
<i>Tab. 11: Z-average třepaných a míchaných roztoků všech dostupných středních molekulových hmotností</i>	59
<i>Tab. 12: Vliv doby přípravy roztoku rozpuštěného za jinak srovnatelných podmínek na z-average polymerního klubka HA</i>	60
<i>Tab. 13: Z-average hodnoty polymerních klubek HA roztoků připravených na TFFC zařízení za rozdílných teplotních spádů a hmotnostních podílů polymeru v roztoku</i>	62
<i>Tab. 14: Z-average polymerních klubek 1% hm. roztoku HA o $M_w = 370$ kDa připraveného různými způsoby za stejný čas</i>	63
<i>Tab. 15: Vliv filtrace na změnu velikosti polymerního klubka</i>	64
<i>Tab. 16: Změny parametrů třepaného roztoku HA ve dvou po sobě následujících dnech</i>	68

<i>Tab. 17: Změny parametrů míchaného roztoku HA ve dvou po sobě následujících dnech</i>	<i>68</i>
<i>Tab. 18: Viskozitní charakteristiky třepaných a míchaných roztoků HA</i>	<i>70</i>