

Vplyv iónov Hofmeisterovho radu na viskozitu hyaluronanu

Alena Pokopcová

Bakalárska práca
2008



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav fyziky a mater. inženýrství

akademický rok: 2007/2008

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Alena POKOPCOVÁ

Studijní program: B 2808 Chemie a technologie materiálů

Studijní obor: Chemie a technologie materiálů

Téma práce: Vliv různých iónov Hofmeisterovej rady na viskozitu hyaluronu

Zásady pro vypracování:

1. Vypracovať rešeršiu na danú tému.
2. Vykonať experimenty na pripravených vzorkoch roztokov hyaluronanu s vybranými jontami Hofmeisterovej rady (hlavná experimentálna technika Ubbelohdeho viskozimeter).
3. S vedúcim bakalárskej práce prediskutovať výsledky.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. O.Wein:" Úvod ro reologie." Učební texty vysokých škol, Fakulta chemická VUT Brno, Brno (1997).
2. R.L. Baldwin, Biophysical Journal, 71 (1996), 2056–2063.
3. Další články v mezinárodních časopisech k danému tématu.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Aleš Mráček, Ph.D.

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

11. února 2008

Termín odevzdání bakalářské práce:

4. června 2008

Ve Zlíně dne 11. února 2008



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Lubomír Lapčík, Ph.D.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

Kyselina hyalurónová (HA) patrí medzi významné biopolyméry vďaka svojim charakteristickým vlastnostiam. Skladá sa z disacharidových jednotiek N-acetyl-D-glukosamidu a kyseliny D-glokurónovej. Nachádza sa v ľudskom tele a svojimi vlastnosťami ovplyvňuje mnohé mechanizmy. Využíva sa hlavne v medicíne na prípravu rôznych liečiv v oftalmológii, reumatológií, ortopédií, ale aj na liečenie rakoviny. Táto práca je zameraná na meranie viskozity hyaluronanu s prídavkami iónov z Hofmeisterovho radu, ktoré významne ovplyvňujú chovanie hyaluronanu vo vodných roztokoch. Prídavkom iónu sa mení viskozita roztoku HA, ktorá sa práve stanovuje.

Kľúčové slová: hyaluronan, viskozita, Hofmeisterov rad

ABSTRACT

Hyaluronan acid is important biopolymers due to characteristic properties. HA is composed of disaccharides units N-acetyl-D-glucosamid and D-glucuronic acid. HA occurs into a human body and influences many biochemical mechanisms. It is use especially in the medicine (drug development in ophtalmology, rheumatology, orthopaedic and cancer healing). This work is focused on the viscosity measurement of hyaluronan in water solution. Viskosity of hyaluronic acid solution was strongly depend on type of Hofmeister ion.

Keywords: hyaluronan, viscosity, Hofmeister serie

POĎAKOVANIE

Rada by som sa poďakovala pánovi Mgr. Alešovi Mráčkovi Ph.D za jeho pomoc a dohliadanie pri spracovávaní tejto práce. Taktiež vďaka patrí firme CPN spol. s. r. o. za grant (99-62) poskytnutý na spracovanie práce.

Prehlasujem, že som na bakalárskej práci pracovala samostatne a použitú literatúru som citovala. V prípade publikácie výsledkov, ako je to uvedené na základe licenčnej zmluvy, budem uvedená ako spoluautorka.

V Zlíne

.....

Podpis

OBSAH

ÚVOD	7
I TEORETICKÁ ČASŤ	8
1 POLYSACHARIDY	9
2 KYSELINA HYALURÓNOVÁ	10
2.1 CHEMICKÁ ŠTRUKTÚRA KYSELINY HYALURÓNOVEJ.....	10
2.2 ŠTRUKTÚRA HA V ROZTOKU	11
2.3 VÝSKYT KYSELINY HYALURÓNOVEJ	12
2.3.1 Funkcia kyseliny hyalurónovej v synoviálnej tekutine	13
3 REOLÓGIA A VISKOZIMETRIA	14
4 APLIKÁCIA HA V MEDICÍNE	18
4.1 HA A RAKOVINA	19
5 HOFMEISTEROV RAD	20
II PRAKTICKÁ ČASŤ	21
6 POUŽITÉ MATERIÁLY	22
6.1 PRÍPRAVA VZORIEK A PODMIENKY MERANIA.....	22
6.2 METÓDY.....	22
7 VÝSLEDKY A DISKUSIA	24
ZÁVER	27
ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	28
ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A ZKRATIEK	30
ZOZNAM OBRÁZKOV	31
ZOZNAM TABULIEK	32
ZOZNAM PRÍLOH	33

ÚVOD

Kyselina hyalurónová je veľmi zaujímavý a významný biopolymér. Je veľmi rozšírený vďaka jeho charakteristickým vlastnostiam, ktoré sa využívajú hlavne v lekárstve. HA bola objavená v roku 1934 Meyerom a Palmerom, a odvtedy prechádza rôznymi výskumami, pri ktorých získavame stále nové informácie o využití tohto polyméru. Môže dosahovať veľmi vysoké molekulové hmotnosti (až 10^6 Daltonov), pričom poníma veľmi veľké množstvo vody (stonásobok svojej hmotnosti) a vyskytuje sa takto v gélovej forme. Forma gélu má veľký význam pre človeka. Konkrétne, HA sa nachádza v kolennom kĺbe a spolu s kolagénovou zložkou pôsobí ako absorbent nárazov a chráni tak kĺb pred opotrebovaním a porušením. V takejto forme sa využíva na výrobu liečiv proti osteoartritíde, kde má vynikajúce výsledky pri liečení tejto choroby. Ale taktiež sa používa na prevenciu proti opotrebovaniu kĺbov. Pri vysokých molekulových hmotnostiach má HA schopnosť pôsobiť na rany a liečiť ich bez imunitnej odozvy. HA sa naviaže na postihnuté miesta a svojimi hydrofilnými účinkami dostáva vodu z rany, a taktiež aj zápalové časti. V najnovších výskumoch sa potvrdilo, že HA môže vplývať aj na bunky v ľudskom tele. Pokiaľ by sa výskum posunul oveľa ďalej a naozaj by sa dal vytvoriť mechanizmus, ktorým by sa HA s príslušnými zložkami dostala, a zmenila tak chovanie bunky, najmä expresným využitím gélu spôsobujúci účinnú imunitnú odozvu, bol by to veľký prínos. HA sa pri spracovávaní prevádza na roztoky a v roztokoch podlieha degradácií. Preto sa pridávajú ióny, ktoré zabraňujú práve týmto degradáciám. Ióny, ktoré boli v tejto práci použité, patria do Hofmeisterovho radu. Práca je zameraná na meranie viskozity prídavkom iónov z Hofmeisterovho radu a skúmanie vplyvu na zmenu viskozity daného roztoku HA.

I. TEORETICKÁ ČASŤ

1 POLYSACHARIDY

Polysacharidy sú tvorené z makromolekúl, väčšinou z viac ako desiatich sacharidových jednotiek. Sú najviac rozšírené organické polyméry získavané biosyntézou z rôznych rastlinných a živočíšnych zdrojov. Sú zaujímavé pre svoje vlastnosti v organickom tele. Majú obnoviteľný charakter, ale môžu sa aj rozkladať. Sú dostupné vďaka ich nízkym cenám a dajú sa ľahko prevádzať do iných foriem (derivátov). Používajú sa často vo vodnom roztoku [1, 11].

Podľa zloženia sacharidov rozdeľujeme homopolysacharid (reťazec je tvorený rovnakým druhom polysacharidových jednotiek) a heteropolysacharid (reťazec je tvorený rôznymi polysacharidovými jednotkami). Jedným z najznámejších polysacharidov je „glukán“, ktorý je tvorený z reťazcov glukózy [2].

Z hľadiska umiestnenia glykozidických väzieb rozoznávame polysacharidy lineárne (napr. celulóza) alebo vetvené (napr. glykogén). Polysacharidové zlúčeniny majú veľmi často triviálne názvy, prípadne sa tvoria aj semisystematické názvy. Na konci názvu dávame – „ozid“ a zlúčeniny rozlišujeme predponou α - alebo β - (glykozid) [2].

Pokiaľ dôjde k tomu, že sa aj druhý monosacharid viaže so svojou glykozidickou skupinou, nastane situácia, že sacharid už nemá ďalšiu voľnú hydroxyskupinu, a tým stráca svoje redukčné schopnosti. Hovoríme, že takéto sacharidy sú neredukujúce a predĺžovanie reťazca dochádza väčšinou práve na tejto neredukujúcej strane [1].

Polysacharidy majú zásobnú a stavebnú funkciu v organizmoch. Medzi najznámejšie polysacharidy patrí hlavne celulóza, škroby, inulín, pektíny, chitín, kyselina adípová, kyselina hyalurónová, a.i. Celulóza sa vyskytuje v prírode a podieľa sa na stavbe bunkovej steny. Celulóza je v tele ťažko odbúrateľná. Škroby (amylá) sú tvorené glukózou, viazanou α - glykozidicky, obsahujú aj veľa sprievodných látok (lipidy, proteíny). Opakujú sa jednotky amylózy (tvorí lineárny reťazec) a amylopektínu (obsahuje vetviace jednotky). Väčšina škrobov sa používa v potravinárstve, a to škrob zemiakový, kukuričný, pšeničný, ryžový, a.i [2].

2 KYSELINA HYALURÓNOVÁ

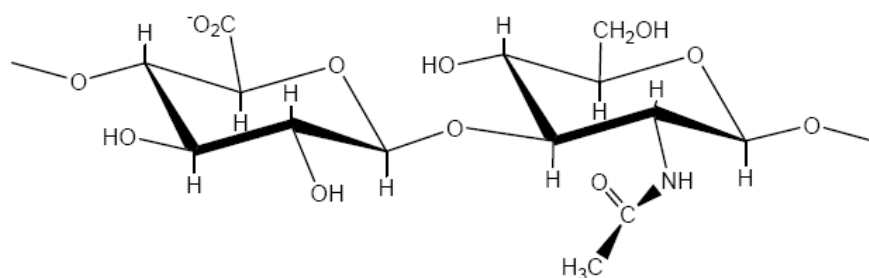
Kyselina hyalurónová (HA) patrí medzi živočíšne polysacharidy, nachádza sa v určitom množstve v ľudskom tele. Vyskytuje sa aj v niektorých patogénnych baktériách, ako je *Streptococcus* a *Pasteurella* [2]. Spevňuje štruktúry bunkovej steny, nachádza sa v koži a v stenách kapilár. Kyselina hyalurónová sa vyskytuje v kolennom mazive vo forme gélu. V takejto forme sa chová HA ako pseudoplastická kvapalina [5].

2.1 Chemická štruktúra kyseliny Hyalurónovej

V roku 1934 Karl Mayer popísal celkovú štruktúru a proces izolácie nového glykozidaminoglykánu zo sklovca oka a pomenoval ho „kyselina hyalurónová“. Je to prírodný polysacharid a dnes je názov tejto makromolekuly často používaný ako sodná soľ – „hyaluronan“ (HAn). V tom čase bol hyaluronan izolovaný z rôznych zdrojov, ako je sklovec, pupočná šnúra, koža, synoviálna tekutina a kohúti hrebienok. Významný bol objav v rámci výroby hyaluronanu z baktérie *Streptococci* [3].

HA je dlhý, polyaniónický a lineárny polymér s opakujúcimi sa disacharidovými štruktúrami [15]. Skladá sa zo základných jednotiek D-glukurónovej kyseliny a D-N-acetylglukozamínu, ktoré sú navzájom spojené striedajúcimi sa β -1,4 a β -1,3 glykozidickými väzbami, čo tvorí primárnu štruktúru.

Obr. 1 Monomerická jednotka kyseliny hyalurónovej [13]



Počet disacharidových jednotiek v celej hyalurónovej molekule môže narásť do hodnoty 10 000 aj viac a môže dosahovať molekulárne hmotnosti $4 \cdot 10^6$ Daltonov [3]. Vysoké hodnoty molekulárnej hmotnosti preukazujú vysokú viskozitu a výborné lubrikačné vlastnosti vo vnútri tela [16].

Vo fyziologických roztokoch je základom hyalurónovej molekuly kombinácia chemickej štruktúry disacharidu, vnútorných vodíkových väzieb a interakcií s rozpúšťadlom. Molekuly kyseliny hyalurónovej sa môžu zoskupovať špecifickými interakciami vo vode do zosieťovaných foriem, už pri nízkych koncentráciách .

Fyzikálnochemické vlastnosti boli vysvetlené okolo roku 1950 až 1960. Reťazce sú dlhé, v roztoku kladené náhodne a rozvetvené. Môžu dosahovať rozmery až 500 nm. Pri koncentrácií asi 0,1% sú reťazce zapletené medzi sebou a vykazujú vysokú viskozitu [4].

2.2 Štruktúra HA v roztoku

Aj napriek šesťdesiatročnému výskumu bola štruktúra HA v roztoku stále diskutabilná. Po dlhom skúmaní De Smedt a kol. a Scott a kol. zosumarizovali všeobecné vlastnosti HA pomocou nukleárnej magnetickej rezonancie, priestor-vypĺňajúcim molekulárnym modelom a počítačovou simuláciou [6, 7]. Scott a kol. stanovil štruktúru HA, ktorá zahŕňa 5 vodíkových väzieb na každú jednotku disacharidu a páskovitú jednoduchú špirálu HA. Zistili, že špirála HA má dve strany totožné, ale antiparalerné. Na špirále sa nachádzajú hydrofóbne miesta z ôsmich alebo deviatich -CH skupín, ktoré sa rozprestierajú na troch susediacich jednotkách sacharidu. Predpokladá sa, že práve táto vlastnosť má za následok vzájomného pôsobenia s lipidmi a membránami vo vode [6].

HA vo vodnom roztoku môžeme charakterizovať ako zmenu z newtonovskej kvapaliny na nenevtonovskú, v dôsledku zvyšujúcej sa molekulovej hmotnosti, koncentrácie a šmykovej rýchlosti. Takýto roztok má následne aj vyššie visko-elastické vlastnosti, ktoré sú závislé od pH a iónovej sily prostredia. Jej ďalšou významnou vlastnosťou v tkanivách je spájanie sa s vodou za vzniku gélových sústav [17].

Axiálne nepolárne vodíkové atómy tvoria nepolárny, relatívne hydrofóbny povrch, zatiaľ čo ekvatoriálna strana reťazca tvorí viac polárny, hydrofilný povrch, v dôsledku čoho sa vytvára skrútená pásová štruktúra. Molekula HA si osvojuje rozpínavú, náhodne špirálovitú štruktúru vo fyziologickom roztoku, ktorá zaberá veľmi veľkú oblasť [3].

Hydrofóbne miesta podporujú vytvorenie sietí a vedľajších nahromadenín. V HA štruktúre existujú miesta s prekrývajúcim vzájomným pôsobením, kde každá HA molekula

sa spája a viaže k antiparalernej molekule pred sebou a za sebou. Molekuly sú spojené pomocou sekundárnych valencií a takáto štruktúra je formálne ekvivalentná s beta rovinou [6].

Reologické vlastnosti HA roztokov sú veľmi citlivé na znečistenie, ktoré môže byť spôsobené prítomnosťou bielkovín. Milas a spol. pri svojej štúdií používali HAN z bakteriálnych zdrojov, približne rovnakej molekulovej hmotnosti a snažili sa minimalizovať prítomnosť bielkovinového nahromadenia zo zvieracích zdrojov. Dospeli k názoru, že HAN poskytuje ucelenú informáciu o viskozite. Demonštrovali, že roztoky HAN sú viskoelastické tekutiny a viskozita je závislá od koncentrácie, čo je typické pre polyelektrolyty s nadbytkom soli [5].

Tieto výsledky boli porovnané s predpokladmi jednoduchých teórií. Polyelektrolyty s nadbytkom soli sú podobné s nabitými polymérmi v dobrom rozpúšťadle. Pre zriedené roztoky, kde viskozita rozpúšťadla iba jemne zmení prítomnosť polyméru, platí Hugginsova rovnica [6] (rovnica popisujúca závislosť redukovanej viskozity na hmotnostnej koncentrácii polyméru [19]):

$$\eta_i / c = [\eta] + k_H [\eta]^2 c, \quad (1)$$

kde η_i / c - redukovaná viskozita, c - koncentrácia polyméru

Molekula HA sa taktiež v roztoku chová ako záporne nabitý polyelektrolyt, pretože obsahuje vo svojej štruktúre disociované -COOH skupiny. Potom jej konformácia, tvar, rozmery a stupeň hydratácie závisia na stupni disociácie. Stupeň disociácie je určený pH, iónovou silou a povahou prítomných, kladne nabitých iónov [6].

2.3 Výskyt kyseliny Hyalurónovej

Kyselina Hyalurónová je prítomná v tele každého stavovca, a taktiež v štruktúre niektorých patogénnych baktériách ako: Streptococcus a Pasteurella. HA je zložka medzibunkovej štruktúry (extracelulárny matrix) vo väčšine tkanív a v niektorých tkanivách je hlavnou zložkou. Vo vyšších koncentráciách sa nachádza napr. v kohúťom hrebienku, v sklovci oka, v pupočnej šnúre a koži. V niektorých tkanivách tvorí kyselina hyalurónová podstatnú

stavebnú zložku. V chrupavke vytvára zhluky agregátu a toto makromolekulárne zloženie v štruktúre udržiava pomocou špecifických, hyalurónovo-bielkovinových interakcií [4].

Je významnou zložkou kolagénu. Kolagén je extracelulárna, vo vode nerozpustná bielkovina. Svoju úlohu plní v spojivových tkanivách ako stavebná hmota. Vo forme kolagénových vlákien sa nachádza v tele cicavcov, konkrétne v pokožke, šľachách, kostiach zuboch a v chrupavke. Molekula kolagénu je tvorená aminokyselinami glycínom, prolínom, hydroxyprolínom a hydroxylyzínom. Využíva sa na výrobu gélu ako materiál pre výrobu chirurgických vlákien, v plastickej chirurgii a v kozmetike [8].

Najväčší zdroj hyaluronanu je v koži, u dospelého človeka celkovo až 8g. Hyaluronan sa taktiež nachádza vo vnútri rozmnožovacích buniek [6].

2.3.1 Funkcia kyseliny hyalurónovej v synoviálnej tekutine

Vysokomolekulárna HA je zodpovedná za visko-elastické vlastnosti v synoviálnej tekutine, ktorá pôsobí ako mazivo a absorbent nárazov súčasne [9, 24]. Kyselina hyalurónová pokrýva povrch kĺbovej chrupavky a zdieľa priestor v chrupavke medzi kolagénovými vláknami a sulfátovými proteoglykánmi. HA pravdepodobne chráni chrupavku pred opotrebovaním a zabraňuje strate proteoglykánov z chrupavky do synoviálneho priestoru. Svojou prítomnosťou udržiava potrebný a optimálny obsah zloženia chrupavky. Kyselina hyalurónová taktiež napomáha zabrániť prieniku zápalových buniek do kĺbového priestoru [9].

V akútnych a chronických zápalových procesoch kĺbu sa počet HA molekúl znižuje a zároveň sa počet buniek v kĺbovom priestore zväčšuje. Obsah HA, glykozamínoglykánov a keratan sulfátu je nižší v synoviálnej tekutine kolenného kĺbu trpiaceho osteoporózou ako v zdravom kĺbe. HA sa v synoviálnej tekutine viaže na chondrocyty a podporuje tým tvorbu chrupavky [9].

3 REOLÓGIA A VISKOZIMETRIA

Jednou z metód charakteristiky HA v roztoku je reológia a viskozimetria. Pod pojmom „reológia“ rozumieme štúdium deformácie a toku materiálu. Rozvoj reológie sa urýchlil v druhej polovici dvadsiateho storočia, kde sa rozšírilo hromadné používanie polymérových systémov a kládli sa podmienky na prípravu materiálu [10].

Čisto viskózne kvapaliny sú také, ktorých reologické správanie je opísané rovnicou [20]:

$$\tau = \eta_z(\dot{\gamma}) \dot{\gamma}, \quad (2)$$

kde τ – šmykové napätie, η_z - zdanlivá viskozita, $\dot{\gamma}$ - šmyková rýchlosť

V mechanike nestlačiteľných newtonovských kvapalín je viskozita (η) chápaná ako materiálová konštanta v Newtonovom viskóznom zákone, ktorá charakterizuje mechanické aspekty prúdenia pri určitej teplote a tlaku. Tieto materiálové konštanty sú reprezentované Navier- Stokesovými rovnicami:

$$\rho(\partial v_i / \partial t + v_j \partial v_i / \partial x_j - g_i) = -\partial p / \partial x_i + \eta \partial^2 v_i / \partial x_j^2, \quad (3)$$

ktoré je možné získať substitúciou Newtonovho viskózneho zákona do Cauchyho pohybovej rovnice [9]:

$$-\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} (r^2 \tau_r) = 0 \quad (4)$$

Viskozita je miera odporu tekutiny deformovať sa pod vplyvom šmykových napätí, alebo aj miera vnútorného trenia tekutín. Je závislá na teplote a je možné merať viskozitu kinematickú a dynamickú [10].

Meranie newtonovských kvapalín závisí na stanovení viskózne funkcie v oblasti, kde platí Newtonova viskózna hypotéza a stanovenie materiálovej konštanty η , ktorá je parametrom Navier- Stokesovej teórie. Cieľom je experimentálne stanoviť šmykovú rýchlosť aj šmykové napätie a potom tieto hodnoty spracovať na údaj o viskozite. Ďalej nám postačí skutočnosť, že pri pomalom režime prúdenia je pomer hnacej sily na rýchlosti toku úmerný viskozite [10].

Viskozimeter, ktorý je možno použiť: výtokový, s padajúcou guľkou a ponorný rotačný [10].

Zo skalárnej definičnej rovnice „ $\sigma = \eta\gamma$ “ plynie rozmer:

$$[\eta] = Pa.s = N.s.m^{-2} = kg.m^{-1}.s^{-1} = 10g.cm^{-1}.s^{-1} = 10P \quad (5)$$

Pri skúmaní viskozity koloidných systémov (koncentrované lyofilné suspenzie, emulzie, polymérne roztoky) došlo k zisteniu, že namerané hodnoty v závislosti na spôsobe merania sa môžu líšiť aj o dekadické rady. Túto odlišnosť je možné vysvetliť nelineárnou závislosťou šmykového napätia „ σ “ na šmykovej rýchlosti „ γ “ [10].

Základným rozdielom medzi newtonovskými a neneutronovskými kvapalinami je v lineárnej závislosti šmykového napätia a šmykovej rýchlosti. Newtonovské kvapaliny majú túto závislosť lineárnu.

HA sa v roztoku chová ako neneutronovská kvapalina, dosahuje vysokú hodnotu viskozity. Je to spôsobené vysokou molárnou hmotnosťou, koncentráciou a závisí to taktiež od iónovej sily prostredia [14].

Skalárnu funkciu skalárneho argumentu „ $\sigma = \sigma(\gamma)$ “ je treba chápať ako materiálovú vlastnosť. Úvahy pre limitné chovanie pre „ $\gamma \rightarrow 0$ “, (kde makroskopický pohyb je prekrytý pohybom Brownovým) alebo „ $\gamma \rightarrow \infty$ “, (kde elementy s makromolekulárnymi rozmermi nadobudli svetelnú rýchlosť) sú nedostatočné pre vyjadrenie fyzikálneho zmyslu a používajú sa skôr pre kvalifikáciu rôznych typov neneutronovského tokového chovania.

Viskóznu funkciu je možné vyjadriť aj pomocou premenných: „fluidita“ (ϕ) alebo „dissipancia“ (ψ):

$$\eta = \sigma / \gamma \quad \phi = \gamma / \sigma \quad \psi = \sigma \gamma \quad (6)$$

Medzné ideálne plastické chovanie je situácia, kde pri pod kritickým napätím materiál netečie, ale pri kritických podmienkach môže materiál tečť s ľubovoľnou šmykovou rýchlosťou [10].

Visko-plastické chovanie je charakteristické pre koloidné suspenzie a emulzie s vysokým obsahom dispergovanej fázy, ale polymérne roztoky a taveniny vykazujú limitné newtonovské chovanie o oblasti vysokých aj extrémne nízkych šmykových rýchlostí [16].

$$\eta_0 = \lim_{\gamma \rightarrow 0} \eta(\gamma) \quad \eta_\infty = \lim_{\gamma \rightarrow \infty} \eta(\gamma) \quad (7)$$

Dobrym príkladom neneutronovských kvapalín sú pseudoplastické kvapaliny. U nich viskozita klesá s rastúcou šmykovou rýchlosťou. Mieru pseudoplasticity je možné určiť pomocou indexu toku n :

$$n = \frac{d \ln \sigma}{d \ln \dot{\gamma}} = \frac{d \ln \eta}{d \ln \dot{\gamma}} + 1 = 1 / \left(\frac{d \ln \eta}{d \ln \sigma} \right) = \frac{d \ln \phi}{d \ln \dot{\gamma}} - 1 \quad (8)$$

Podľa vzťahu platí, že $n=1$ (newtonovské chovanie) a $n=0$ (ideálne plastické chovanie) [10].

Neneutronovské kvapaliny môžeme merať len takými prístrojmi, ktoré umožňujú realizovať kinematické podmienky šmykového toku, stanovenie šmykovej rýchlosti a šmykového napätia z primárnych dát experimentu a kalibračných charakteristík prístroja [10].

Kyselina hyalurónová sa pri vyšších koncentráciách chová ako neneutronovská pseudoplastická kvapalina. Je to spôsobené veľkým sieťovaním reťazcov a vysokou hydrofóbnou vlastnosťou. HA je schopná prijať niekoľkonásobné množstvo rozpúšťadla (až stonásobné) a dosahovať pritom vysoké hodnoty viskozity (10^6 Daltonov). Až pri nízkych koncentráciách sa začne roztok HA chovať ako newtonovská kvapalina. Tieto koncentrácie musia byť však veľmi nízke, lebo už pri obsahu 0,1% HA v rozpúšťadle je roztok dostatočne viskóznym a na Ubbelohdeovom viskozimetri ťažko merateľný [13].

Koncentrácia HA v tkanivách je často vyššia ako v jednotlivých molekulách, udržiavajúc si svoje rozšírené priestorové štruktúry. V mnohých prípadoch je hyaluronan usporiadaný v rámci medzibunkového priestoru pomocou špecifických interakcií s ostatnými makromolekulami v tomto priestore [3].

Vysokomolekulárny hyaluronan pri vysokých koncentráciách v roztoku (napríklad: 5 MDa a pri koncentráciách vyšších ako 0,1 mg/ml) môže formovať zapletené nadmolekulárne, terciárne a kvartérne štruktúry pomocou stérických interakcií a môže taktiež formovať samotné spojenia medzi molekulami a v rámci jednotlivých molekúl [3].

V druhom prípade sa môže vyskytnúť, keď plocha hydrofóbného povrchu základnej pásovej štruktúry interaguje opačným spôsobom s hydrofóbnym povrchom na porovnateľnej ploche inej molekule hyaluronanu alebo v inej časti tej istej molekuly. Také siete

vykazujú rozdielne vlastnosti, akoby vykazovali izolované molekuly hyaluronanu. Môžu odolávať prudkým krátkodobým tokom tekutiny cez sieť, a tým vykazujú elastické vlastnosti, ktoré môžu rozložiť záťažové a šmykové sily v rámci siete. Na druhej strane dlhodobý, pomalý tok tekutiny môže čiastočne oddeliť, usporiadať molekuly a dovoľuje pohyb a prejav viskózných vlastností [3].

4 APLIKÁCIA HA V MEDICÍNE

Využitie HA v medicíne sa objavilo už v šesťdesiatych rokoch produktom „Hyal-gel“ (liečenie lokálnych popálenín, kožných vredov). Postupne našla svoje umiestnenie aj v iných významných oblastiach. Klinické využitie HA je klasifikované z hľadiska jej účinkov a využiteľnosti vo viskóznej chirurgii, na ochranu citlivých tkanív, vyplňanie tkanivových priestorov, na regeneráciu po operáciách, na zabránenie nadmernému vytváraniu jaziev, nahradenie synoviálnej tekutiny, a mnoho iných [11].

V oftalmológii je HA hlavným komponentom sklovca vďaka jej visko-elastickým vlastnostiam. Jej funkciou je náhrada alebo výmena sklovitej tekutiny stratenej počas operácií (sivý zákal, implantácia šošoviek). Momentálne je na trhu už mnoho dostupných preparátov na báze hyaluronanu a v najnovšej štúdií Maltesea a spol. dospeli ku kombinácii hyaluronátu sodného a hydroxy-propylmetylovej celulózy, zvanou „VISC26“. Táto zmes spĺňa najoptimálnejšie požiadavky pre využitie výrobku ako oftalmologický chirurgický prostriedok [11].

Druhou hlavnou aplikáciou HA je v ortopedickej chirurgii a reumatológii. Využíva sa na viskóznú suplementáciu kĺbov postihnutých artritídou. Artritída je choroba postihujúca kĺby, zväčša staršiu časť obyvateľstva. Spôsobuje bolesť a meravosť postihnutého kĺbu, a má za následok časté degeneratívne zmeny v ďalších orgánoch (pľúca, srdce, cievy). Molekulárna hmotnosť HA v synoviálnej tekutine zdravého človeka je okolo 2-7MDa. Produkty s vysokým účinkom obsahujú zhruba rovnaké množstvo HA, a liečenie tak preukázalo, že vnútro- kĺbové pôsobenie HA zlepšuje symptómy osteoartritídy a podieľa sa na obnove maziva svojimi visko-plastickými vlastnosťami [11].

Ako ďalšie môžeme spomenúť HA a jej účinky v otolaryngológii. Je už známe, že HA sa vyskytuje v celom tele v rôznych koncentráciách. Najväčšie koncentrácie môžeme nájsť napríklad v špeciálnych tkanivách, ako sú hlasivky, synoviálna tekutina, pupočná šnúra a chrupavka. Tu ovplyvňuje rozličné funkcie v rámci jej fyzikálnych vlastností. V hlasivkách má úlohu pri vibračných pohyboch a vytváraní hlasu, kde osmotickými, visko-elastickými a vyplňajúcimi vlastnosťami ovplyvňuje hrúbku hlasiviek. Deriváty HA napomáhajú liečeniu zranených hlasiviek. Modifikáciou molekulovej štruktúry HA sa zvýšila jej životnosť doby prítomnosti v hlasivkách a využíva sa tak na liečenie porúch hlasiviek. Táto modifikácia je na základe priečno-väzbovej HA [11].

Prípravky z priečno-väzbovej HA sú v súčasnosti už bežne používané, napríklad na vyhladzovanie vrások a jaziev. Účinky HA gélov si našli uplatnenie v kozmetike (produkty založené na kolagéne). HA poskytuje požadovanú elasticitu na miestach, kde je injektovaná, ako sú vrásky na tvári, jazvy, hlasivková rekonštrukcia alebo podpora zvieračového svalu. Výsledky používania boli v porovnaní s inými komerčnými produktmi veľmi dobré [11].

Shu a kol. popísal vývoj neobvyklého priečno-väzbového hydrogél zloženého na HA, injektovaného priamo do spojivového tkaniva, kde preukázal využitie hydrogél na regeneráciu tkanív [23].

Prípravky s vysokomolekulárnej HA podporujú hojenie rán, žilových vredov na nohách, a tieto prípravky sa osvedčili aj v liečení chronických poranení. HA svojimi anti-oxidačnými vlastnosťami slúži ako protizápalová zložka obväzových materiálov [10]. Jeden z veľmi významných produktov na hojenie rán je produkt „Hyiodine“. Má široké uplatnenie v liečení, čistení a hydratácií hlbokých rán a kožných defektov. Je zložený z hyaluronátu sodného, jódu a jodidu draselného, kde prídavky jódu zabraňujú rýchlemu rozkladu hyaluronátu sodného baktériami z okolia rany. HA je telu vlastná, preto sa prípravok veľmi dobre znáša, a to je základ úspešného liečenia [21].

4.1 HA a rakovina

V posledných rokoch sa vývoj využitia HA v medicíne posunul veľmi ďaleko. Hyalurónová kyselina ako biopolymér s výnimočnými biofyzikálnymi vlastnosťami, prispieva k štruktúre mimobunkového priestoru a k priestorovým homeostázam. Pri súčasných štúdiách sa zistilo, že HA pôsobí na správanie buniek vo vnútri tela. HA je schopná vytvárať interakcie s bunkami s abnormálnym správaním (bunky artritídy, rakoviny) mechanizmom, ktorý však ešte dnes nie je úplne popísaný. Zatiaľ je známe, že časťou mechanizmu je transdukcia signálov vznikajúca v hyaluronanových CD44 a RHAMM interakciách. Ďalšie mechanizmy nie sú ešte známe, a preto môžeme len čakať na ďalšie príspevky štúdií. Dá sa konštatovať, že HA dokáže ovplyvniť a zmeniť vnútrobunkové zloženie a napomôcť liečniu postihnutých buniek rakovinou [12].

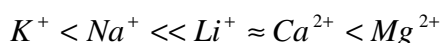
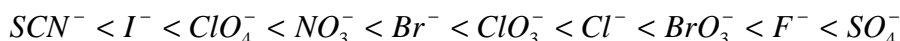
5 HOFMEISTEROV RAD

HA sa pri svojom spracovávaní prevádza do roztokov. V roztokoch, ale podlieha degradácií účinkami teploty, zložením roztoku a pH. Ióny Hofmeisterovho radu majú lyotropický efekt, svojimi účinkami expandujú zapletené špirály a roztok prechádza do formy gélu. Takto zabraňuje degradácií polyméru a podporuje jeho rozpúšťanie v rozpúšťadle [14].

Rakúsko-nemecký chemik Franz Hofmeister sa predstavil svojou radou solí. Bol to jeden z prvých vedcov, ktorý sa zaoberal výskumom proteínov. Študoval vplyv vybraných iónov na zmenu štruktúry proteínov.

Soli (respektíve ióny) z Hofmeisterovho radu majú trvalý efekt na rozpustnosť proteínov, v dôsledku toho aj na ich štruktúru (sekundárnu, terciárnu a kvartérnu) a hlavne na stabilitu daného proteínu [22].

Hofmeisterov rad (lyotropická séria- poradie schopnosti iónov premeniť sa na „salt-out“ alebo „salt-in“ proteíny) je považovaná za ióny, ktoré majú typický, iónovo-špecifický vplyv na polyméry vo vodnom systéme. Poradie Hofmeisterových aniónov a katiónov [14]:



Anóny na konci radu zvyšujú povrchové napätie roztoku a znižujú tak rozpustnosť v nepolárnych „salt-out“ molekulách, efekt tak zosilňuje hydrofóbne interakcie.

Na začiatku radu zase anóny zvyšujú rozpustnosť nepolárnych „salt-in“ molekúl a oslabujú hydrofóbny efekt. Takéto soli majú schopnosť ihneď interagovať s proteínmi a špecificky sa s nimi spájať. U katiónov je to táto skutočnosť opačná, na začiatku majú ióny hydrofóbne účinky a na konci hydrofilné. [22].

II. PRAKTICKÁ ČASŤ

6 POUŽITÉ MATERIÁLY

V tejto práci bol používaný hyaluronan (triedy 150806-D1) s molekulovou hmotnosťou 630 kDa, ktorý bol poskytnutý od firmy CPN spol. s. r.o., Dolní Dobrouč. Hyaluronan sa pripravoval v rozpúšťadle: destilovaná voda (H_2O).

Meranie bolo prevádzané za použitia iónov z Hofmeisterovho radu, ktoré sú súčasťou zlú-

čenie:	jodid draselný	KI (Riedel-da Haën Assay >99,5%)
	fluorid draselný	KF (Fluka Assay >99,5%)
	chlorid sodný	NaCl (Fluka Assay >99,5%)
	chlorid horečnatý	MgCl ₂ (Fluka Assay >99,5%)

Chemikálie sú štandardnej čistoty.

6.1 Príprava vzoriek a podmienky merania

Bol pripravovaný roztok hyaluronanu v destilovanej vode pri Iónovej sile: „ $I= 0,05 \text{ mol/l}$ “ a nechával sa miešať väčšinou 24 hodín pri laboratórnej teplote 22°C. Podľa vzorca Iónovej sily sa dopočítali príslušné prídavky zlúčeniny. Bolo odpipetované 20 ml roztoku hyaluronanu a pridalo sa príslušné množstvo zlúčeniny. Zamiešaný roztok sa vliat do Ubbelohdeovho viskozimetra. Viskozimeter bol dôkladne umytý a pripravený na meranie. Roztok sa temperoval v temperačnej vani a meral sa čas prietoku kvapaliny. Meranie bolo prevádzané pri 25, 30, 35, 40 a 45°C. Každý prídavok zlúčeniny bol meraný 7-krát a príslušné výsledky boli použité na vyhodnocovanie.

6.2 Metódy

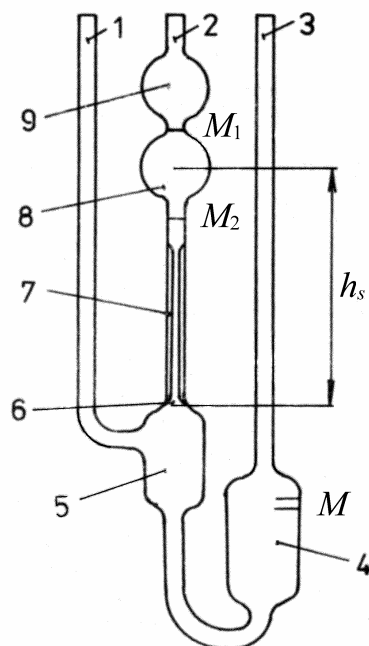
Sklenený Ubbelohdeov viskozimeter sa používa na presnejšie meranie viskozity newtovských kvapalín s viskozitou od $2 \cdot 10^{-4}$ do 20 Pa.s. Má tri ramená. Meraná kvapalina sa vleje do širokého ramena tak, aby hladina kvapaliny neprevyšovala označené rysky. Potom pomocou balóniku naplníme mernú banku na ramene. Meriame od vyznačenej rysky

po rysku. Uplatňuje sa tu hydrostatický tlak kvapaliny. Základom je meranie času prietoku testovanej kvapaliny s hustotou ρ , kapilárou (s priemerom 0,46mm) a s dĺžkou (L).

Ubbelohdeov viskozimeter sa používa na meranie kinematickej viskozity, kde pomocou nameraného času prietoku testovanej kvapaliny a konštanty daného viskozimetra, získame výpočtom kinematickú viskozitu roztoku. Kalibračná konštanta je udaná na liste spolu so svetlosťou kapiláry v balení [10].

Newtonovské kvapaliny tečú laminárnym tokom. Ide o posúvanie jednotlivých vrstiev po sebe, kde sa uplatňuje vnútorné trenie. Trecia sila, pôsobiaca medzi vrstvičkami, je úmerná veľkosti styčnej plochy „S“ a „gradientu rýchlosti“ [20].

Obr. 2 Ubbelohdeov kapilárny viskozimeter [20]



- 1 - odvzdušňovacia rúrka výtokovej banky,
- 2 - odvzdušňovací otvor zásobnej banky,
- 3 - plniaca rúrka,
- 4 - zberná banka,
- 5 - výtoková banka,
- 6 - výtokové ústie kapiláry,
- 7 - kapilára,
- 8 - odmerná banka,
- 9 - zásobná banka

7 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vplyv samostatných iónov môžeme vidieť v uvedenej tabuľke a grafoch závislosti kinematickej viskozity na teplote. Kinematická viskozita sa počítala pomocou vzorca:

$$\nu = A.t, \quad [m^2 s^{-1}] \quad (9)$$

kde ν - kinematická viskozita, A - konštanta viskozimetra, t - čas pretečenej kvapaliny

Konštanta „ A “ je udávaná pri každom viskozimetri, v tomto prípade má hodnotu:

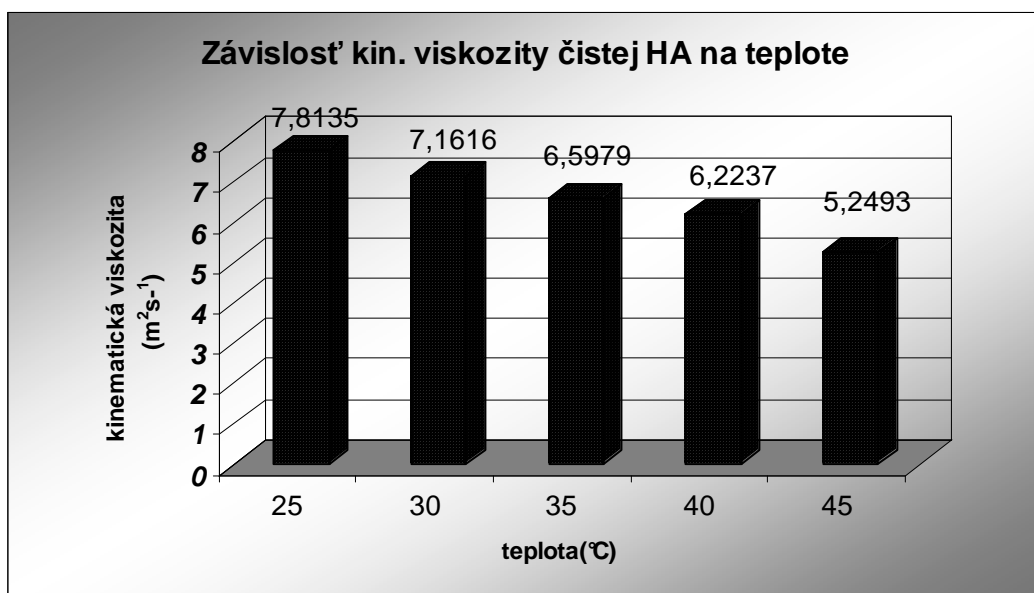
$$A = 0,002994 \text{ m}^2 \text{ s}^{-2}$$

Namerané hodnoty prietoku kvapaliny pri rôznych teplotách boli spriemerované a použité na výpočet kinematickej viskozity.

Tab. 1 Vypočítané hodnoty spriemerovaných časov prietoku čistej HA

čistá HA	
Teplota (°C)	Kinematická viskozita ($m^2 s^{-1}$)
25	$7,814 \cdot 10^{-6} \pm 0,006$
30	$7,162 \cdot 10^{-6} \pm 0,004$
35	$6,60 \cdot 10^{-6} \pm 0,01$
40	$6,224 \cdot 10^{-6} \pm 0,006$
45	$5,249 \cdot 10^{-6} \pm 0,006$

Obr. 3 Závislosť viskozity čistej HA na teplote



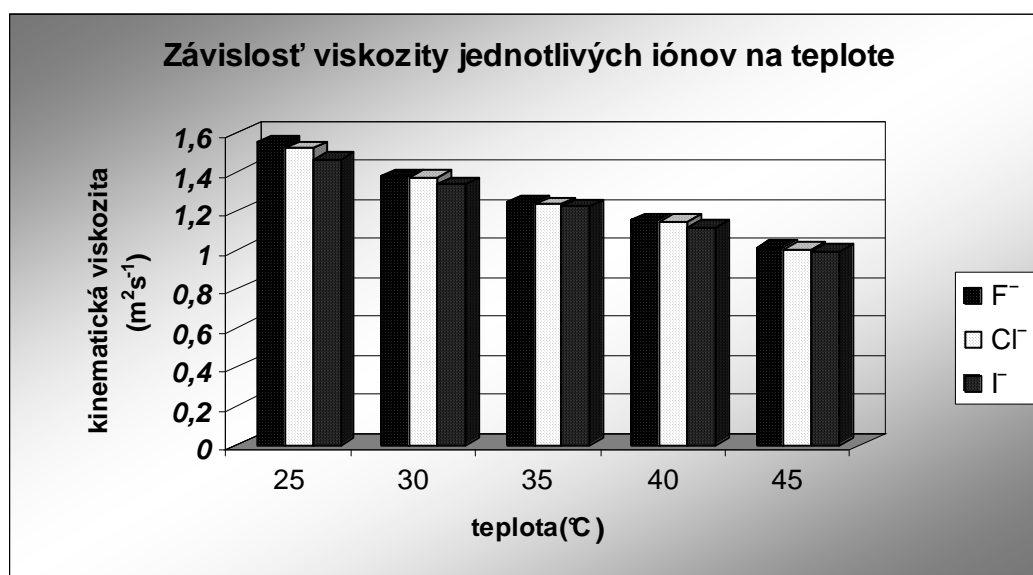
Z daných údajov je zrejmé, že viskozita 0,05 % HA s rastúcou teplotou klesá a roztok mení viskozitu.

Prídavkom iónu do roztoku HA sa mení štruktúra. Ión pomáha vytvoriť čo možno najvhodnejšie usporiadanie molekúl HA a roztok je potom viac viskózny. Už pri pripravovaní roztoku bola zreteľná zmena viskozity roztoku. Porovnávali sa jednotlivé prídavky iónov vzhľadom na Hofmeisterov rad. Zmenu viskozity prídavkom jednotlivých iónov môžeme vidieť v nasledujúcej tabuľke a grafoch, kde sa porovnávali anióny a katióny z Hofmeisterovho radu:

Tab. 2 Vypočítané hodnoty viskozity z príslušných spriemerovaných časov prietoku kvapaliny s prídavkom iónu

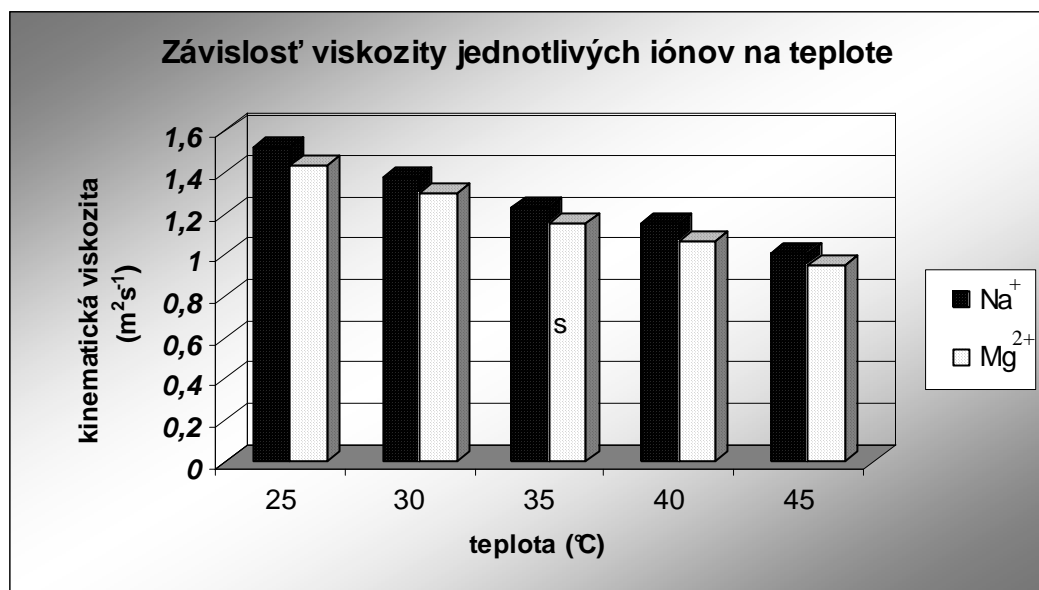
	KI	KF	NaCl	MgCl²
Teplota (°C)	Kinematická viskozita (m^2s^{-1})	Kinematická viskozita (m^2s^{-1})	Kinematická viskozita (m^2s^{-1})	Kinematická viskozita (m^2s^{-1})
25	$1,469 \cdot 10^{-6} \pm 0,002$	$1,553 \cdot 10^{-6} \pm 0,005$	$1,525 \cdot 10^{-6} \pm 0,004$	$1,436 \cdot 10^{-6} \pm 0,004$
30	$1,339 \cdot 10^{-6} \pm 0,002$	$1,379 \cdot 10^{-6} \pm 0,006$	$1,375 \cdot 10^{-6} \pm 0,003$	$1,299 \cdot 10^{-6} \pm 0,008$
35	$1,224 \cdot 10^{-6} \pm 0,003$	$1,246 \cdot 10^{-6} \pm 0,002$	$1,234 \cdot 10^{-6} \pm 0,002$	$1,154 \cdot 10^{-6} \pm 0,005$
40	$1,120 \cdot 10^{-6} \pm 0,002$	$1,152 \cdot 10^{-6} \pm 0,002$	$1,150 \cdot 10^{-6} \pm 0,003$	$1,066 \cdot 10^{-6} \pm 0,001$
45	$0,992 \cdot 10^{-6} \pm 0,003$	$1,014 \cdot 10^{-6} \pm 0,002$	$1,005 \cdot 10^{-6} \pm 0,002$	$0,949 \cdot 10^{-6} \pm 0,004$

Obr. 4 Graf zobrazujúci anióny z Hofmeisterovho radu



Na grafe vidíme, ako postupne klesá viskozita s rastúcou teplotou. Je známe, že fluór leží v Hofmeisterovom rade aniónov na pravej strane, a preto podporuje v roztoku HA hydrofóbne interakcie. Najmenej rozpúšťa roztok a viskozita je s porovnaním vyššia. Jód leží vľavo radu a vyvoláva naopak hydrofilné interakcie. Preto vypočítaná viskozita má menšie hodnoty.

Obr. 5 Graf zobrazujúci katióny z Hofmeisterovho radu



Na obrázku závislosti viskozity katiónov na teplote vidíme klesanie viskozity s rastúcou teplotou. Sodík leží v poradí Hofmeisterovho radu na ľavej strane a nameraná viskozita je preto vyššia ako Mg²⁺. Sodík teda podporuje viac hydrofóbne interakcie. Horčík vyvolá v roztoku HA hydrofilné interakcie, a preto je viskozita menšia.

Meraním sa potvrdilo, že ióny Hofmeisterovho radu majú značný vplyv na roztok HA, pretože ich prítomnosťou znížili viskozitu roztoku skoro sedemnásobne.

ZÁVER

Ióny Hofmeisterovho radu pôsobia na štruktúru molekuly HA a zmena viskozity závisí od toho, v akej časti radu solí sa daný ión nachádza. Zdá sa, že sa reťazce začnú rozbaľovať a voda sa dostáva do vnútra kľbka HA či naopak.. Ióny podporujúce hydrofilné vlastnosti spôsobia, že HA sa lepšie rozpúšťa vo vode a znižuje sa viskozita. Vplyv kladných a záporných iónov je možné pozorovať na obrázkoch 4. a 5. Vyhodnocovaním viskozity sa zistilo, že z radu solí, ktoré boli použité, najviac znižuje viskozitu roztoku HA Mg^{2+} zo skupiny katiónov a najmenej anión F^- . Prídavkom tohto katiónu do roztoku sa výrazne znížila viskozita, čo spôsobilo zmenu štruktúry HA. Z aniónov vyvoláva hydrofilné interakcie jód, ktorý sa nachádza na ľavej strane radu. Meraním sa zistilo, ako vplyvajú prídavky iónov Hofmeisterovho radu na roztok HA a potvrdzuje sa jeho platnosť. Pre lekárske účely sú poznatky o vplyve iónov na roztok HA veľmi dôležité, najmä pokiaľ je potrebné skladovať HA po dlhšiu dobu, pretože asi po týždni dochádza k degradácii HA v roztoku. Prídavkami kvartérnych solí sa potlačuje tento jav, ale ich prítomnosťou vzniká zrazenina. Ióny Hofmeisterovho radu by tak mohli byť využívané na riešenie tohto problému.

ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] *Carbohydrates: Polysaccharides* [online]. 2008 [cit. 2008-04-16]. Dostupný z WWW: <<http://employees.csbsju.edu/HJAKUBOWSKI/classes/ch331/cho/complexoligosacch.htm>>.
- [2] *Polysacharidy* [online]. 2007 [cit. 2008-05-17]. Dostupný z WWW: <<http://www.biotox.cz/naturstoff/chemie/ch-sach-poly.html>>.
- [3] Hascall, Vincent C., Laurent, Torvard C. Hyaluronan: Structure and Physical Properties. *Glycoforum*: 1997
- [4] Prehm, Peter. Hyaluronan: 1996 379-386.
- [5] Fouissac, E., Milas, M., Rinaudo, M., Borsali, R. *Macromolecules*: 1992 (25) 2613
- [6] De Smedt, S. C., Dekeyser, P., Ribitsch, V., Lauwers, A., Demeester, J. Viscoelastic and transient network properties of hyaluronic acid as a function of the concentration. *Biorheology*: 1993 (30) 31-45
- [7] Scott, J.E., Evered, D., Whelen, J., Eds, Wilez, The Biology of Hyaluronan. *Chichester*: 1989, 6
- [8] Ďuračková, Zdeňka. *Proteíny: Štruktúra a biologická funkcia* [online]. 2006 [cit. 2008-04-20]. Dostupný z WWW: <<http://158.195.32.143/uploads/media/Proteiny-VL.pdf>>.
- [9] *Cartilage hyaluronan mechanism of action osteoarthritis* [online]. Birmingham: University of Alabama at Birmingham, AL, USA, 2003 [cit. 2008-04-21]. Dostupný z WWW: <

- [14] Mráček, Aleš, Varhaníková, Júlia, Lehocký, Marián, Gründelová, Lenka, Pokopcová, Alena, Velebný, Vladimír. The Influence of Hofmeister Series Ions on Hyaluronan. *Molecules*: 2008 (13) 1025-1034.
- [15] *Disperné systémy: Informačné listy P-3* [online]. 2006 [cit. 2008-05-13]. Dostupný z WWW: <<http://www.kmti.szm.sk/ch-p3.pdf>>.
- [16] Hyaluronic acid: Background and Biology Dostupný z WWW: <<http://www.trbchemedica.co.uk/pdf/HYALURONIC%20ACID%20background%20&%20biology.pdf>>.
- [17] *Discovery of Hyaluronic Acid* [online]. *Rejuvenation Science*, 2004- [cit. 2008-05-10]. Dostupný z WWW: <http://www.rejuvenation-science.com/hylauronic-acid_prof.html>.
- [18] Brown, MB, Jones, SA. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *European Academy of Dermatology and Venereology*: 2005 308-318.
- [19] *Chemické Listy 88: Definice termínů vztahujících se k jednotlivým makromolekulám a jejich souborům a ke zředěným roztokům polymerů* [online]. 1994 [cit. 2008-05-21]. Dostupný z WWW: <<http://www.chemicke-listy.cz/download/chl88-366/88-366.htm>>.
- [20] Dzianik, František, Reologické vlastnosti látek: 2008, 1-23.
- [21] Hyiodine: *Contipro Group* 2006 Dostupný z WWW: <http://www.hyiodine.cz/index.php?action=content&link=hy_pi&lang=en>.
- [22] Baldwin, Robert L. How Hofmeister Ion Interactions Affect Protein Stability. *Biophysical Journal*: 1996 (71) 2056-2063.
- [23] Shu XY, Liu Y, Palumbol FS, Luo Y, Prestwich GD. In situ crosslinkable Hyaluronan hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials*: 2004 (25) 1339-1348
- [24] Lapčík, L.Jr., Lapčík L., De Smedt, S., Demeester, J., Chabreček, P. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. *Chemical reviews*: 1998 (98) 2663-2684

ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A ZKRATIEK

HA	Kyselina hyalurónová
HAn	hyaluronan, sodná soľ HA
η_i / c	Redukovaná viskozita
c	Koncentrácia polyméru
$[\eta]$	Limitné viskozitné číslo
τ	Šmykové napätie
η_z	Relatívna viskozita
$\dot{\gamma}$	Šmyková rýchlosť
R	Polomer molekuly
ρ	Hustota
σ	Tenzor napätia
φ	Fluidita
ϕ	Disipancia pri šmykovom toku
η_∞	Limitná viskozita
n	Index toku
KI	Jodid draselný
KF	Fluorid draselný
NaCl	Chlorid sodný
MgCl ₂	Chlorid horečnatý
v	Kinematická viskozita
A	Konštanta viskozimetra
t	Čas

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obr. 1 Monomerická jednotka kyseliny hyalurónovej [13]	10
Obr. 2 Ubbelohdeov kapilárny viskozimeter [20]	23
Obr. 3 Závislosť viskozity čistej HA na teplote.....	24
Obr. 4 Graf zobrazujúci anióny z Hofmeisterovho radu.....	25
Obr. 5 Graf zobrazujúci katióny z Hofmeisterovho radu.....	26

ZOZNAM TABULIEK

Tab. 1 Vypočítané hodnoty spriemerovaných časov prietoku čistej HA	24
Tab. 2 Vypočítané hodnoty viskozity z príslušných spriemerovaných časov prietoku kvapaliny s prídavkom iónu	25

ZOZNAM PRÍLOH

P I: Mráček, Aleš, Varhaníková, Júlia, Lehocký, Marián, Gřundělová, Lenka, Pokopcová, Alena, Velebný, Vladimír. The Influence of Hofmeister Series Ions on Hyaluronan. *Molecules*: 2008 (13) 1025-1034.

P II: Gřundělová, Lenka, Pokopcová, Alena, Varhaníková, Júlia, Bilerová, Helena, Mráček, Aleš, Velebný, Vladimír. The Influence of Hofmeister Series Ions on Hyaluronan Swelling and Viscosity. Brno, Juniormat '07: 2007 (13) 1025-1034

PRÍLOHA P I:

Mráček, Aleš, Varhaníková, Júlia, Lehocký, Marián, Gřundělová, Lenka, Pokopcová, Alena, Velebný, Vladimír. The Influence of Hofmeister Series Ions on Hyaluronan. *Molecules* 2008 (13) 1025-1034.

PRÍLOHA P II:

Gřundělová, Lenka, Pokopcová, Alena, Varhaníková, Júlia, Bilerová, Helena, Mráček, Aleš, Velebný, Vladimír. The Influence of Hofmeister Series Ions on Hyaluronan Swelling and Viscosity. Brno, Juniormat '07: 2007 (13) 1025-1034