

# Viskozita vodných roztoků hyaluronanu v přítomnosti solí

Bc. Markéta Kratochvílová Dis.

---

Diplomová práce  
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky  
akademický rok: 2014/2015

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Markéta Kratochvílová, DiS.**  
Osobní číslo: **T13406**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Viskozita vodných roztoků hyaluronanu  
v přítomnosti solí**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Vypracujte literární rešerši na zadané téma. Stručně charakterizujte hyaluronan, jeho fyzikálně-chemické vlastnosti a zaměřte se především na popis chování tohoto polymeru ve zředěných vodných roztocích. Věnujte se problematice solí/iontů Hofmeisterovy řady a jejich vlivu na změny konformace polymerního klubka. Shrňte a diskutujte současný stav této problematiky. Dále se zaměřte na viskozimetrickou metodu jako nástroj hodnocení konformačních charakteristik polymerů.

### II. Praktická část

1. V praktické části proveďte viskozimetrická měření zředěných roztoků hyaluronanu v přítomnosti vybraných solí Hofmeisterovy řady. Stanovení proveďte při různých teplotách. Výsledky zpracujte, přehledně uspořádejte a diskutujte. Na základě provedených experimentů popište změny konformace klubka hyaluronanu v závislosti na přítomnosti studovaných solí v roztoku tohoto polymeru.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] COWMAN, Mary K. a Shiro MATSUOKA. Experimental Approaches to Hyaluronan Structure. Carbohydrate Research. 2005, vol. 340, no. 5, s. 791-809. ISSN 00086215.

[2] GARCÍA-ABUÍN, A., et al. Viscosimetric Behaviour of Hyaluronic Acid in Different Aqueous Solutions. Carbohydrate Polymers. 2011, vol. 85, no. 3, s. 500-505. ISSN 0144-8617.

[3] KUNZ, Werner. Specific Ion Effects in Colloidal and Biological Systems. Current Opinion in Colloid & Interface Science. 2010, vol. 15, no. 1 s. 34-39. ISSN 1359-0294.

[4] KULICKE, Werner-Michael and Christian CLASEN. Viscosimetry of polymers and polyelectrolytes. Berlin: Springer, 2004. Springer laboratory, 120 s. ISBN 3-540-40760-X.

Vedoucí diplomové práce:

**doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.**

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

**20. ledna 2015**

Termín odevzdání diplomové práce:

**18. května 2015**

Ve Zlíně dne 20. ledna 2015

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



  
Ing. Martina Černeková, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby<sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3<sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60<sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60<sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu 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 11. 5. 2015

Markéta Kratochvílová

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

(1) Vysoká škola 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 nahlázení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

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

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

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užitje-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).

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

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

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo 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 přihlídá k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce se zabývá roztokovým chováním kyseliny hyaluronové v přítomnosti solí Hofmeisterovy řady. Polymerní roztoky byly studovány pomocí viskozimetrického měření Ubbelohdeho kapilárním viskozimetrem. V práci byly stanoveny základní viskozitní charakteristiky, a to limitní viskozitní číslo a Hugginsova konstanta. Bylo zjištěno, že přítomnost solí v polymerním roztoku způsobuje pokles viskozity oproti viskozitě stanovené v demineralizované vodě. Přídavkem chaotropních iontů do roztoku kyseliny hyaluronové dochází k intenzivnějšímu snížení její viskozity ve srovnání s přidavkem iontů kosmotropních. Stanovená viskozitní data byla srovnána s analýzou vzorku hyaluronanu provedenou pomocí gelové permeační chromatografie a dynamického rozptylu světla.

Klíčová slova: kyselina hyaluronová, Hofmeisterova řada, viskozita

## **ABSTRACT**

The thesis focuses on the solution behaviour of hyaluronic acid in the presence of salts of Hofmeister series. Polymer solutions were studied by viscometric measurements using Ubbelohde capillary viscometer. In the thesis, the fundamental viscosity characteristics were determined, namely the intrinsic viscosity and the Huggins constant. It has been found that the presence of salt in the solution decreased polymer viscosity compared to viscosity measured in demineralized water. Furthermore, the addition of chaotropic ions to the hyaluronic acid solution leads to a more intensive decrease of the viscosity than in the case of the addition of kosmotropic ions. The determined viscosity data were compared with the analysis of the hyaluronan performed by gel permeation chromatography and dynamic light scattering.

Keywords: hyaluronic acid, Hofmeister series, viscosity

Děkuji vedoucí mé diplomové práce doc. Ing. Věře Kašpárkové, CSc. za odbornou pomoc, ochotu, trpělivost a cenné rady.

Děkuji také rodičům za podporu ve studiu a své sestře Mgr. Evě Přikrylové za připomínky k jazykové stránce textu práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné. Dále prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautor.

Ve Zlíně

.....

podpis studenta

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>1 KYSELINA HYALURONOVÁ</b> .....	<b>13</b>
1.1 SYNTÉZA A BIOTRANSFORMACE .....	13
1.2 VÝROBA HA .....	14
1.3 CHEMICKÁ STRUKTURA.....	17
1.4 CHOVÁNÍ HA V ROZTOCÍCH .....	18
1.5 VÝZNAM A PRAKTICKÉ POUŽITÍ.....	20
<b>2 HOFMEISTEROVA ŘADA</b> .....	<b>21</b>
2.1 IONTY HOFMEISTROVY ŘADY .....	21
<b>3 VISKOZITA</b> .....	<b>25</b>
3.1 VISKOZITA – ZÁKLADNÍ POJMY .....	25
3.2 VISKOZITA ZŘEDĚNÝCH ROZTOKŮ POLYMERŮ .....	27
3.2.1 Limitní viskozitní číslo .....	28
3.2.2 Závislost limitního viskozitního čísla na koncentraci .....	29
3.2.3 Závislost limitního viskozitního čísla na molekulové hmotnosti.....	30
3.2.4 Závislost limitního viskozitního čísla na teplotě.....	31
3.3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	33
<b>4 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE</b> .....	<b>38</b>
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>39</b>
<b>5 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE</b> .....	<b>40</b>
5.1 VZOREK HYALURONANU .....	40
5.2 SOLI S IONTY HOFMEISTROVY ŘADY .....	40
5.3 PŘÍSTROJE A POMŮCKY .....	40
<b>6 METODIKA</b> .....	<b>41</b>
6.1 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ SOLÍ PRO ROZPOUŠTĚNÍ HYALURONANU .....	41
6.2 PŘÍPRAVA VZORKŮ HYALURONANU .....	42
6.3 MĚŘENÍ VISKOZITY .....	42
6.4 STANOVENÍ LIMITNÍHO VISKOZITNÍHO ČÍSLA A HUGGINSOVY KONSTANTY .....	43
<b>7 VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>46</b>
7.1 VOLBA TYPU SOLI A IONTOVÉ SÍLY VODNÝCH ROZTOKŮ SOLÍ .....	46
7.2 VLIV SOLÍ NA VISKOZITU HA .....	46
7.2.1 Hugginsův koeficient .....	55
7.3 ZPRACOVÁNÍ VISKOZIMETRICKÝCH DAT PODLE FUSSE .....	56
7.4 SROVNÁNÍ RETENČNÍHO CHOVÁNÍ VZORKŮ HYALURONANU PŘI CHROMATOGRAFICKÉ ANALÝZE A VÝSLEDKŮ Z VISKOZIMETRIE .....	59
7.5 SROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ Z VISKOZIMETRIE S VELIKOSTÍ ČÁSTIC STANOVENOU DYNAMICKÝM ROZPTYLEM SVĚTLA.....	62
7.6 VLIV TEPLoty NA LIMITNÍ VISKOZITNÍ ČÍSLO NAHY .....	64
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>66</b>



<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>68</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>75</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>77</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>79</b>

## ÚVOD

Kyselina hyaluronová je nevětvený záporně nabitý glykoproteoglykan, jehož základní stavební jednotku tvoří monosacharidy, kyselina  $\beta(1,3)$ -*D*-glukuronová a  $\beta(1,4)$ -*N*-acetyl-*D*-glukosamin. Za fyziologických podmínek se vyskytuje ve formě sodné soli, hyaluronátu sodného. Najdeme ji prakticky ve všech tkáních obratlovců. V těle člověka tvoří základní stavební jednotku mezibuněčné matrix, je zastoupena v synoviální tekutině, pupečníku, v kůži, sklivci, lymfě a séru. Nachází se také v buněčné stěně prokaryotických organismů, například v bakteriích rodu *Streptococcus*, *Pasteurella*. Důležitými vlastnostmi kyseliny hyaluronové je její biokompaktibilita a schopnost vázat a zadržovat velké množství vody. V organismu slouží jako humektant v kůži, lubrikant v kloubech, složka výplňové hmoty v pupeční šňůře či látka udržující tvar oční bulvy. Široce se využívá ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Díky svojí vysoké kapacitě zadržovat vodu, nedráždivosti a rychlé adsorpci je přidávána do očních či nosních kapek. Dále je využívána jako nosič peptidových a proteinových léčiv či léků proti rakovině a uplatňuje se také při artroskopických operacích, k prevenci tvorby jizev při endoskopických operacích, terapii močové inkontinence, intraartikulárně při osteoartróze, k intravezikální instilaci při cystidách a v neposlední řadě i v plastické chirurgii jako výplň vrásek.

Přestože je kyselina poměrně dobře rozpustná ve vodě, v praxi se pro její převedení do roztoku využívá spíše různých typů solí. Jelikož se chování hyaluronanu ve vodě a v roztocích solí velmi liší, je žádoucí je podrobněji studovat. V rámci této diplomové práce byly aplikovány soli Hofmeisterovy řady. Hofmeisterova řada je lyotropní série, ve které jsou soli seřazeny dle jejich schopnosti vysolovat bílkoviny. Podle pozice v Hofmeisterově řadě jsou ionty děleny na kosmotropy a chaotropy, toto dělení je založeno na vlastnostech jednotlivých iontů. Kosmotropní ionty jsou slabě hydratované měkké kationty s nízkou hustotou náboje a silně hydratované tuhé anionty s vysokou hustotou náboje, které zvyšují povrchové napětí a stabilitu bílkovin, snižují rozpustnost uhlovodíků a denaturaci bílkovin a mají silný vysolovací účinek. Oproti tomu chaotropní ionty jsou slabě hydratované měkké anionty s nízkou hustotou náboje a silně hydratované tuhé kationty s vysokou hustotou náboje, které snižují povrchové napětí a stabilitu bílkovin, zvyšují rozpustnost uhlovodíků a denaturaci bílkovin a mají silný vsolovací účinek.

Pro experiment byly zvoleny soli s kombinací 1) chaotropní kationt a chaotropní aniont ( $\text{NH}_4\text{SCN}$ ), 2) kosmotropní kationt a kosmotropní aniont ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), 3) kosmotropní kationt a chaotropní aniont ( $\text{NaSCN}$  a  $\text{NaCl}$ ) a 4) chaotropní kationt a kosmotropní aniont

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). Chování kyseliny hyaluronové, resp. jejího polymerního klubka, pak bylo sledováno pomocí viskozimetrického měření na Ubbelohdeho kapilárním viskozimetru. Pro práci byla zvolena jednotná iontová síla roztoků solí, a to  $I = 0,1 \text{ M}$ .

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 KYSELINA HYALURONOVÁ

Objev kyseliny hyaluronové (dále jen HA) je připisován Karlu Mayerovi a Johnu Palmerovi, kteří ji roku 1934 poprvé izolovali ze sklivce skotu. O několik let později, roku 1950, popsali také její chemickou strukturu.

Za fyziologických podmínek existuje HA jako polyelektrolyt, obvykle ve formě sodné soli – hyaluronátu sodného (NaHY). V těle člověka tvoří hyaluronát základní stavební jednotku mezibuněčné matrix a je zastoupen především v synoviální tekutině, pupečníku a dále také v menších množstvích v kůži, sklivci, lymfě a séru. Vyskytuje se prakticky ve všech tkáních obratlovců, a to jak ve volné formě, tak vázaný. Mimo to je zastoupen v buněčné stěně prokaryotických organismů, například v bakteriích rodu *Streptococcus*, *Pasteurella*.

### 1.1 Syntéza a biotransformace

V těle savců probíhá syntéza HA, na rozdíl od ostatních glykosaminoglykanů, které jsou vytvářeny v Golgiho aparátu, v plazmě. HA syntetizují především buňky zapojené do tvorby extracelulární matrix, fibroblasty, keratinocyty, krevní destičky, a to prostřednictvím enzymu hyaluronan syntázy, který je lokalizován v membráně buněk. Enzym způsobuje spojení aktivovaných monosacharidů kyseliny glukuronové a *N*-acetylglukosaminu a vytvořená HA je vysouvána z buňky do extracelulárního prostoru, kde dochází k jejímu navázání na proteoglykanovou jednotku. Interakcí s proteoglykanovými jednotkami vznikají nadmolekulární útvary, které obsazují značnou část extracelulárního prostoru a ovlivňují organizaci ostatních zde přítomných složek, především kolagenu [1] [2].

Tento vliv je uplatňován zejména díky schopnosti HA vázat a zadržovat velké množství vody. Extracelulární voda vytváří prostor pro život buněk, pro přenos živin a kyslíku od krevních kapilár k buňkám, či pro mezibuněčnou komunikaci. Navázaná voda je dále nezbytná pro zajištění správné konformace bílkovinných složek extracelulární matrix.

Navíc struktura nadmolekulárních útvarů, vzniklých po interakci HA s proteoglykanovými jednotkami, umožňuje jednotlivým složkám matrix vzájemně se proplétat a vytvářet např. podpůrné struktury buněk a tkání. HA je tedy složka zodpovědná za fyzikální a mechanické vlastnosti tkání a orgánů a vytváří jejich vnitřní strukturu [3].

Podobné vlastnosti vykazují také fragmenty HA vyskytující se v tkáni za fyziologických i nefyziologických podmínek. Prvním případem vzniku fragmentů HA je její běžná obnova v tkáni, podmíněná působením enzymů hyaluronidázy a specifických proteáz. Produktem této obnovy jsou fragmenty HA o vysoké molekulové hmotnosti bez biologické aktivity, které se dostávají krví do jater, kde jsou štěpeny na monosacharidy a klasickou cestou metabolizovány [3].

Druhý případ nastává, jakmile se v tkáni objeví zánět nebo je tkáň napadena mikroorganismy či jinými organismy (například pavoučí a hadí jed obsahuje hyaluronidázy). Zánět iniciuje vznik volných radikálů degradujících HA na fragmenty. Vysoká citlivost HA k působení volných radikálů způsobí, že vzniknou především fragmenty s nízkou a velmi nízkou molekulovou hmotností.

Činnost buňky v organismu je možno ovlivnit specifickými signály, které však musí být nejprve rozpoznány. Děje se tak prostřednictvím receptorů přítomných na povrchu buněk. Nejvýznamnějším z receptorů, který řídí interakci buněk s HA, je receptor CD44, glykoprotein, procházející cytoplasmatickou membránou tak, že jedním koncem vyčnívá do extracelulárního prostoru a druhým do intracelulárního prostoru. Část v extracelulárním prostoru interaguje s extracelulární HA a to pouze za určitého počtu monosacharidů ve fragmentu. V případě imunitních buněk jsou podmínkou alespoň čtyři monosacharidy, u keratinocytů devět monosacharidů a u většiny ostatních buněk je minimální počet monosacharidů šest [3].

## 1.2 Výroba HA

První metodu získávání HA vyvinul maďarský vědec Dr. Andre A. Balazs. K izolaci byla používána pupečnicková šňůra nebo kohoutí hřebínky [4]. Surovina byla nejprve zamrazena, čímž došlo k rozrušení buněčných stěn, a byla rozřezána na kousky, které byly následně extrahovány etanolem s přídavkem cetylpyridinia chloridu, chloroformu a vody. Získaný extrakt byl přečištěn, bylo upraveno jeho pH a iontová síla. [5]. Kromě extrakční metody se získávala HA také mikrobiální fermentací z bakterií rodu *Streptococcus* a *Pasteurella*.

Tradiční výroba HA pomocí extrakce z živočišných tkání, nejčastěji kohoutích hřebínků (viz výše), s sebou přináší riziko virové kontaminace a také vysoké náklady na získávání a čištění živočišného materiálu. Tyto nevýhody staví do popředí zájmu mikrobiální fermentaci, která navíc nabízí řadu dalších předností, především možnost optimalizace a říze-

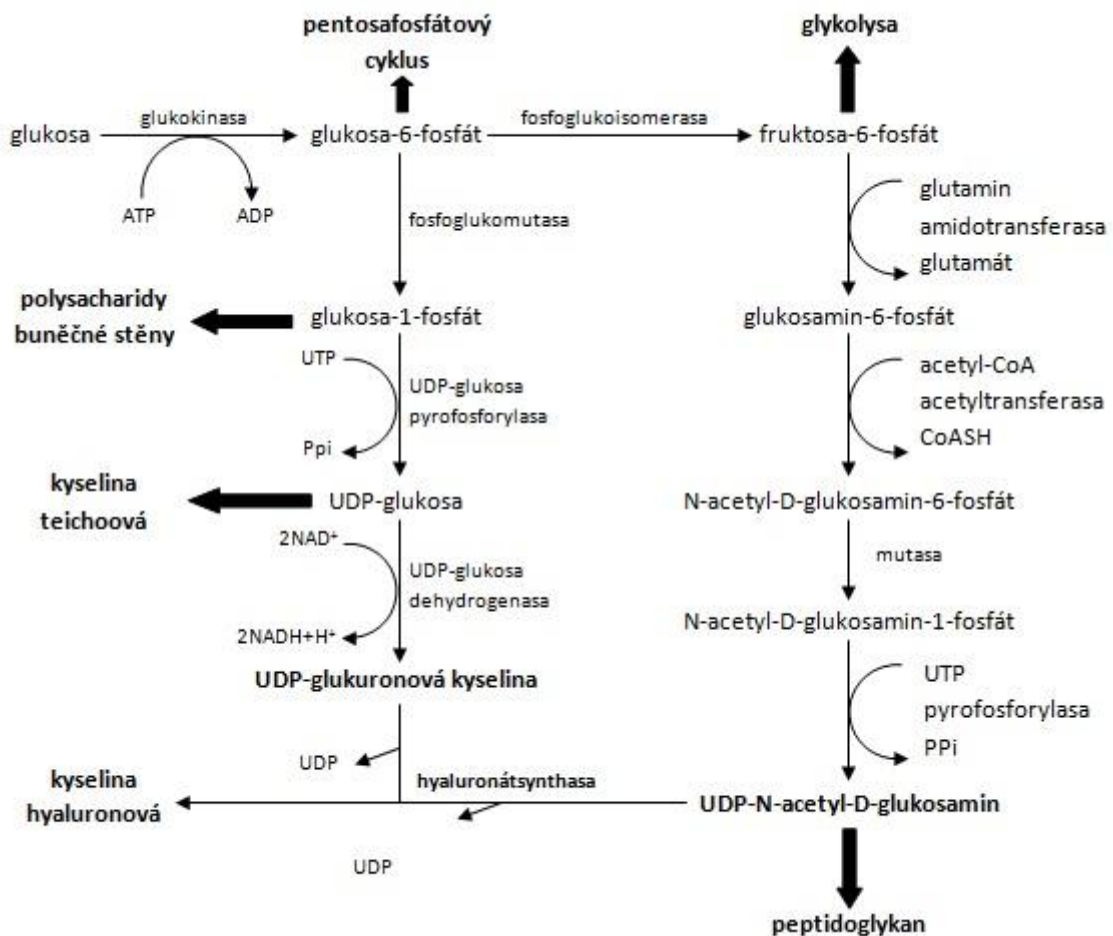
ní jakosti vyprodukované HA prostřednictvím kontroly kultivačních podmínek a genetického inženýrství [6] [7]. Výhodou jsou také nižší výrobní náklady [8].

Při biotechnologickém postupu je HA syntetizována v podobě extracelulárních kapslí uvolňovaných do média bakteriemi rodu *Streptococcus* skupiny A a C – *Streptococcus equi*, *Streptococcus equumilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus equi subsp. equi*, *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* a rodu *Pasteurella* [7] [8] [9] [10, s. 343]. Jedná se o patogenní gram pozitivní bakterie, tvořící pod mikroskopem okrouhlé či vejčité buňky uspořádané v párech nebo řetězcích, obklopené průsvitnou mukoidní vrstvou – extracelulární kapsle HA [10]. Tyto kapsle podporují migraci bakterií přes epiteliální vrstvy do tkání a také slouží jako ochrana bakterií, které je používají k zapouzdření svých buněk, čímž zabraňují imunitnímu systému, aby je rozpoznal jako patogen [10]. Kmeny používané k průmyslové výrobě HA jsou řazeny, jak bylo již zmíněno výše, do Lancefield-sérologických skupin A a C, a jsou tudíž patogenními mikroorganismy [11].

První mikrobiální HA izoloval v r. 1980 Shiseido fermentací kmene *Streptococcus zooepidemicus* [12]. Nevýhodou metody byla přítomnost toxinů omezující použití takto připravené HA v medicíně.

Streptokoky používané k syntéze HA jsou navíc nutričně náročné bakterie s omezenou schopností syntetizovat vitaminy B a některé aminokyseliny. Například doplnění argininu a lyzinu do kultivačního média působí příznivě na růst buněk i produkci HA [12]. Velkou nevýhodou streptokokové fermentace je vznik kyseliny mléčné jako hlavního produktu kvašení. Kyselina inhibuje růst buněk a syntézu HA. Je tedy důležité vytvořit optimální podmínky fermentace, které omezí glykolýzu a tvorbu biomasy ve prospěch syntézy HA (Obr. 1).

Vzhledem k uvedeným nevýhodám se začalo k přípravě HA využívat alternativního postupu, a to produkce rekombinantní HA. Jako hostitelé sloužily gram pozitivní a gram negativní bakterie – *Bacillus sp.*, *Lactococcus lactis*, *Agrobacterium sp.*, *Escherichia coli*, kterým byl přidán gen HA synthasa ze streptokoka [12].



Obr. 1. Biosynetická dráha HA u *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* [11].

Pires uvádí [6] obecné požadavky na kultivační médium k mikrobiální výrobě HA, které má obsahovat glukózu jako zdroj uhlíku, dále komplexní zdroje dusíku a růstové faktory v podobě kvasnicového extraktu, hydrolyzátu kaseinu nebo peptonu a v neposlední řadě také minerální zdroje. Optimální podmínky pro fermentaci streptokoka jsou teplota 37 °C, pH 7 a dostatečný přísun kyslíku. Streptokoky jsou fakultativně anaerobní bakterie, přičemž bylo zjištěno, že právě aerobní kultura je produktivnější [12].

Již od konce minulého století existují studie zabývající se metabolismem HA a účinky různých faktorů ovlivňujících její syntézu pomocí *Streptococcus zooepidemicus*. Sledovány byly tyto kultivační podmínky: zdroj uhlíku, poměr uhlíku a dusíku, výživa, počáteční koncentrace glukózy, pH, teplota, míchání a provzdušňování [12] [13].

Pires se spolupracovníky se ve své studii [7] zabývá vlivem minerálních iontů na fermentaci *Streptococcus zooepidemicus* a produkci HA. Jedná se o následující ionty –  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ . Liu ve své studii [8] zkoumá vliv rozpuštěného kyslíku na fermentaci *Streptococcus zooepidemicus*. Výsledkem studie Hu-

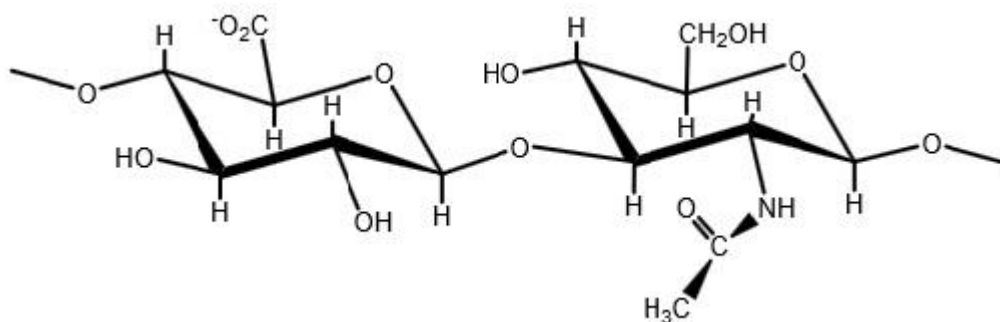


anga a kol. [14] bylo zjištění, že použití opakované vsádkové kultury při výrobě HA zvýší 2,5x produktivitu ve srovnání s šaržovou výrobou. Závěry studie Kima a kol. [15] zlepšily produkci HA pomocí víceetapňové rychlosti míchání a regulace přístupu teploty.

Studie Huanga a kol. [16] modeluje mikrobiální produkci HA pomocí *Streptococcus zooepidemicus*. Buňky s extracelulární kapsulární HA byly získány následujícím způsobem. K buněčné suspenzi byla přidána hyaluronidáza (inkubace při 37 °C) a k rozrušení buněk došlo v ledové lázni ultrazvukem. Složení média (na 1 litr) ve fermentoru bylo následující: 20 g glukózy, 10 g kvasnicového extraktu, 2,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 g NaCl, 1,5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O [16]. Kultivace byla prováděna při 37 °C a pH 7 (dosaženo přidavkem NaOH), míchání 300 ot./min. a 20% saturaci kyslíkem. Vzorek byl nejprve inkubován s dodecylsulfátem sodným, který způsobil uvolnění kapsulární HA a usnadnil oddělení buněk. Ty byly následně odstředěny a supernatant byl zředěn 2–3x vodou. Koncentrace HA byla stanovena spektrofotometricky vůči kyselině *D*-glukuronové jako standardu.

### 1.3 Chemická struktura

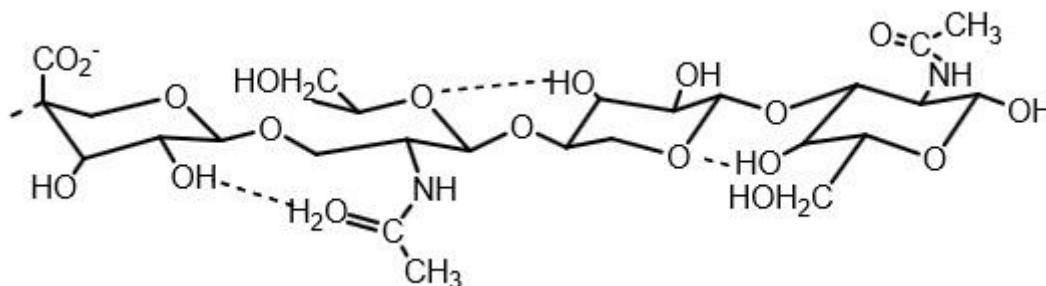
Z chemického hlediska je HA nevětvený záporně nabitý glykoproteoglykan, jehož základní stavební jednotkou jsou monosacharidy, kyselina  $\beta(1,3)$ -*D*-glukuronová a  $\beta(1,4)$ -*N*-acetyl-*D*-glukosamin spojené  $\beta(1,3)$ -glykosidickou vazbou (Obr. 2). Jednotlivé disacharidy jsou dále spojeny  $\beta(1,4)$ -glykosidickou vazbou a vytvářejí řetězce s molekulovou hmotností 0,2 – 1.10<sup>7</sup>g/mol.



Obr. 2. Monomerní jednotka HA [17].

Pootočením každého disacharidu o 180 ° vůči sousední jednotce, tedy o 360 ° u dvou otáček, vytváří HA šroubovici stabilizovanou vodíkovými vazbami, která je označována jako sekundární struktura HA (Obr. 3). Vzájemným antiparalelním spojením dvou molekul HA dochází ke vzniku dvakrát stočené šroubovice stabilizované vodíkovými vazbami mezi amidy a karboxyly sousedních molekul, čímž vzniká terciární struktura. Tato fakta týkající

se strukturního uspořádání HA potvrdilo i měření pomocí nukleární magnetické rezonance [18]. Uvedená chemická struktura disacharidu ovlivňuje chování celého řetězce HA v roztoku společně s dalšími faktory, jako je působení vnitřních vodíkových vazeb a interakce s rozpouštědlem [4] [19].



Obr. 3. Sekundární struktura HA [17].

Atomy vodíku jsou v každém disacharidu HA umístěny v energeticky méně výhodné axiální rovině a tvoří nepolární – hydrofobní část molekuly, zatímco objemné skupiny orientované do ekvatoriální roviny vykazují polární – hydrofilní charakter.

Díky značnému zastoupení volných hydroxylových skupin má HA schopnost vázat velké množství vody. Hydroxylové i přítomné karboxylové skupiny jsou navíc velmi vhodným místem chemické modifikace. Iontovou vazbou se na disociovanou karboxylovou skupinu mohou vázat kationty kovů, polymerní kationty nebo kladně nabitě lipidické látky [3].

Důležitou vlastností HA je rozpustnost ve vodě způsobená odpudivými silami karboxylových skupin disociovaných při fyziologickém pH. Po jejím rozpuštění vzniká viskoelastický roztok. Autoři Slíva a Minárik uvádí, že koncentrace HA 10 mg/ml zvýší viskozitu vody až 5000x [20].

Zásadním faktorem, který hraje důležitou roli při působení HA v těle, je molekulová hmotnost tohoto polymeru. Obecně platí, že HA s nízkou a velmi nízkou molekulovou hmotností ( $M_w < 500\,000$  g/mol) ovlivňuje pochody v buňkách a tkáních, zatímco HA s vysokou molekulovou hmotností nejeví biologickou aktivitu a slouží pouze jako strukturní jednotka. Navíc je prokázáno, že čím nižší je molekulová hmotnost HA, tím vyšší je její biologická aktivita [3].

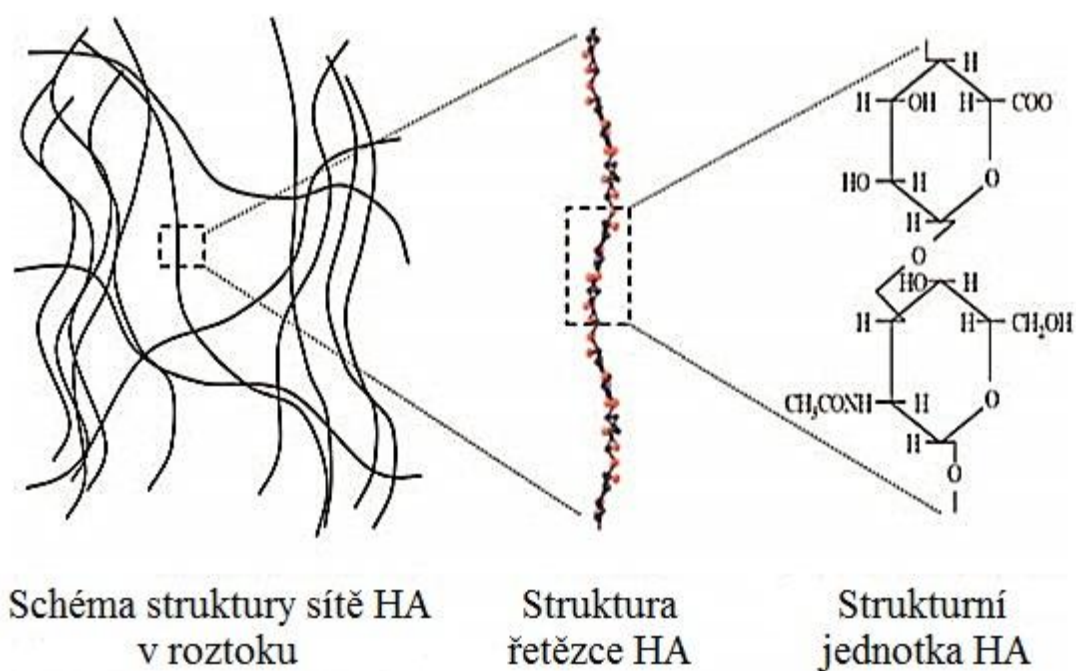
#### 1.4 Chování HA v roztocích

Každá monomerní jednotka HA obsahuje jednu karboxylovou skupinu, která je za fyziologických podmínek silně disociována, což propůjčuje molekule charakter polyaniontu.

V blízkosti těchto ionizovaných karboxylových skupin dochází ve vodném prostředí k navázání kationtů a následně i k možné změně konformace makromolekuly [21].

Katie Haxaire se spolupracovníky ve své práci [22] konstatovali, že za přítomnosti iontů ve vodném roztoku zaujímá řetězec HA odlišnou konformaci ve srovnání s konformací pozorovanou v čisté vodě. Tato fakta byla potvrzena i studii jiných autorů [9], kteří zjistili, že HA tvoří v kyselém prostředí v přítomnosti většiny kationtů dvojistou šroubovici. V přítomnosti vápenatých iontů pak trojitou levotočivou šroubovici a v přítomnosti sodných a draselných iontů levotočivou čtyř-šroubovici [9].

Vodné roztoky HA vykazují mimořádné reologické vlastnosti. Již v roztoku o velmi nízké koncentraci dochází ke vzájemnému proplétání řetězců polymeru. V roztoku polymer vytváří tuhá klubka schopná navázat vodu v množství odpovídajícím až tisícinásobku své hmotnosti. [4]. Při vyšších koncentracích roste viskozita a roztok HA vykazuje charakter gelu. Smykovým namáháním dochází k snižování viskozity, což je projevem pseudoplasticity [4].



Obr. 4. Schéma struktury HA ve zředěném roztoku [23].

Klubka polymeru v roztoku jsou velká a vyplňují velké domény. V biologických podmínkách to má za následek, že malé molekuly (voda, živiny, nízkomolekulární elektrolyty) v rámci domény volně difundují rozpouštědlem, zatímco velké molekuly (proteiny) jsou

odtud díky své hydrodynamické velikosti vylučovány. Přestože síť makromolekul HA zaujímá v doméně značnou část prostoru, skutečná koncentrace HA je uvnitř (díky navázané vodě) velmi nízká (0,1 mg/ml) a domény se překrývají [4]. Sítě HA jsou v roztoku v neustálém pohybu, což mění i velikosti pórů. Autoři Hascall a Laurent [19] uvádí, že statisticky mohou existovat všechny velikosti pórů, avšak s různou pravděpodobností, z čehož plyne, že v zásadě mohou projít hyaluronovou sítí všechny molekuly v závislosti na jejich hydrodynamickém objemu.

## 1.5 Význam a praktické použití

Schopnost vázat vodu, viskoelastické vlastnosti či biokompatibilita jsou vlastnosti, které předurčují HA v organismu řadu funkcí. HA slouží například jako humektant v kůži, lubrikant v kloubech, složka výplňové hmoty v pupeční šňůře či látka udržující tvar oční bulvy. Co se týká praktického využití ve farmacii, je HA, díky své vysoké kapacitě zadržovat vodu a nedráždivosti, přidávána do očních kapek. Vzhledem k viskozitě a pseudoplasticitě roztoků HA kapky v očích déle vydrží. HA je také přidávána do nosních sprejů jako alternativa syntetických léčiv. Využívá se zde její rychlé absorpce v nosní dutině [24].

Dále je HA využívána jako nosič peptidových a proteinových léčiv či léků proti rakovině, díky afinitě HA k receptoru CD44, který je nadměrně exprimován u nádorových buněk. [25]. HA se také uplatňuje při artroskopických operacích, k prevenci tvorby jizev při endoskopických operacích, terapii močové inkontinence, intraartikulárně při osteoartróze, k intravezikální instilaci při cystidách a v neposlední řadě i v plastické chirurgii jako výplň vrásek.

Vzhledem k tomu, že diplomová práce není zaměřena na význam a použití HA, jsou zde uvedeny pouze vybrané aplikace.

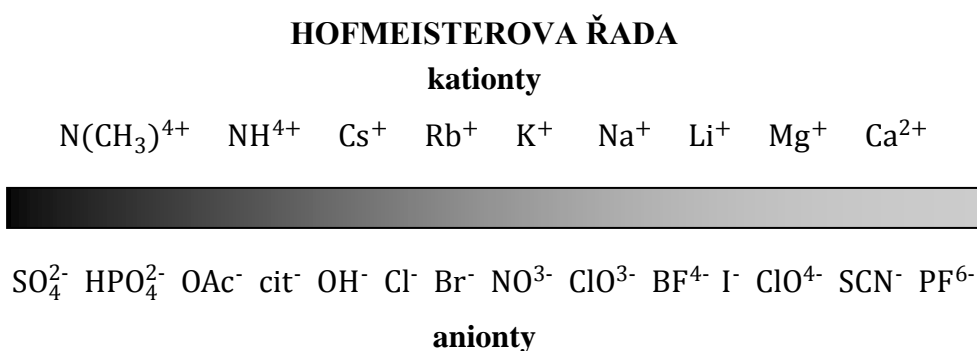
## 2 HOFMEISTEROVA ŘADA

Franc Hofmeister, farmakolog, vědec a profesor na Karlově univerzitě v Praze sestavil na přelomu 19. a 20. století lyotropní řadu solí, která byla později pojmenovaná podle svého autora jako Hofmeisterova. Oblastí zájmu France Hofmeistera se staly ionty, které měly podle jeho mínění významný dopad na biochemické procesy probíhající v lidském těle. V 19. století byly tyto mechanismy těžko pochopitelné, zatímco právě iontové efekty se již v této době daly snadno změřit. Botnání nebo srážení bylo možné detekovat již pouhým okem [26]. Všechny Hofmeisterovy závěry týkající se vzájemných interakcí dvou iontů, či iontu s molekulou vody, jsou velmi významné a jsou na nich založeny další studie.

Hofmeisterova řada srovnává ionty podle jejich schopnosti vysolovat bílkoviny. Původní studie o rozpustnosti vaječného bílku v solných roztocích a určení koncentrace potřebné k vysrážení bílkoviny se stala milníkem v chemii bílkovin [27] [28]. Kromě denaturace, vysolování a vsolování bílkovin vysvětluje také další jevy, například povrchové napětí elektrolytů, aktivitu enzymů či iontovou výměnu. Pro sbalování a rozbalování proteinů („folding/unfolding“) zůstává však stále neobjasněna [29].

### 2.1 Ionty Hofmeisterovy řady

Werner Kunz ve své práci [26] upozorňuje na fakt, že Hofmeister navrhl řadu pouze pro soli, nikoliv pro jednotlivé ionty. Dále podotýká, že každá publikaci tuto řadu iontů uvádí poněkud jinak, navíc některé ionty jsou do série obtížně zařaditelné – např. guanidinový iont. Podle své schopnosti slabě hydratovat by měl být zařazen vlevo (mezi kosmotropy – viz vysvětlení níže) a naopak jeho denaturační účinek by jej měl řadit napravo (mezi chaotropy). V Hofmeisterově řadě jsou podle Kunze [26] ionty seřazeny následujícím způsobem:



Obr. 5. Hofmeisterova řada iontů [26].

Podle pozice v Hofmeisterově řadě jsou ionty děleny na kosmotropy a chaotropy. Co se týká aniontů, kosmotropy jsou umístěné vlevo, až po chloridový iont, chaotropy se nacházejí od  $\text{Cl}^-$  iontu vpravo [30]. U kationtů je tomu naopak. Kunz [26] dále shrnuje následující fakta, uvedená v Tab. 1.

Tab. 1. Vybrané účinky kosmotropních a chaotropních iontů dle Kunze [26].

Kosmotropní ionty	Chaotropní ionty
zvyšují povrchové napětí	snižují povrchové napětí
snižují rozpustnost uhlovodíků	zvyšují rozpustnost uhlovodíků
vysolovací účinek (tvorba agregátů)	vsolovací účinek (rozpuštění)
snižují denaturaci bílkovin	zvyšují denaturaci bílkovin
zvyšují stabilitu bílkovin	snižují stabilitu bílkovin
slabě hydratované měkké kationty s nízkou hustotou náboje	silně hydratované tuhé kationty s vysokou hustotou náboje
silně hydratované tuhé anionty s vysokou hustotou náboje	slabě hydratované měkké anionty s nízkou hustotou náboje

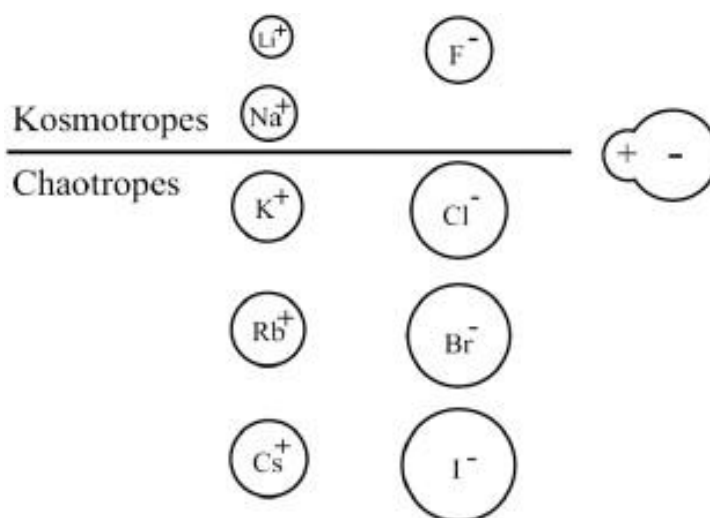
Kosmotropní ionty jsou co do velikosti malé (Obr. 6), silně hydratované ionty s vysokou hustotou náboje (což je poměr mezi nábojem a velikostí iontu), která způsobuje silnou elektrostatickou vazbu v těsném uspořádání okolních molekul vody. Mají schopnost rozrušit vodíkové vazby v systému „voda-voda“. S vodou vykazují tyto ionty interakce silnější, než je vzájemná interakce molekul vody. Snižují rozpustnost nepolárních molekul a mají silný vysolovací účinek na proteiny a jiné makromolekuly.

Chaotropní ionty jsou velké (Obr. 6), slabě hydratované ionty s nízkou hustotou náboje, díky níž zůstávají okolní molekuly vody spojeny vodíkovými vazbami. Ionty vykazují s vodou naopak slabší interakci, než je vzájemná interakce molekul vody. Zvyšují rozpustnost nepolárních molekul a mají vsolovací účinek.

Werner Kunz ve své práci [26] rovněž uvádí dělení iontů na tzv. měkké („soft“) a tvrdé („hard“). Tvrdí, že, když je iont malý, okolní molekuly vody jsou kolem něj pevně vázány. Iont působí jako tuhý, tvrdý (kosmotropy). Naopak velké ionty mají hydratační slupku vol-

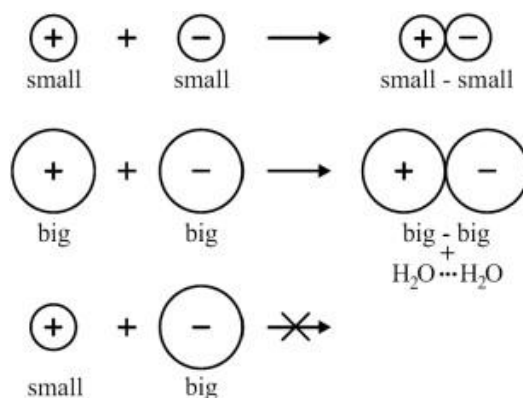
ně vázán a působí měkce (chaotropy). Rozlišení mezi oběma typy vychází z pevnosti interakce „iont-voda“ ve srovnání s interakcí „voda-voda“ (Obr. 7).

Rozdělení kationtů ze I. A skupiny a halogenů (VII. A) skupiny periodické tabulky prvků na silně hydratované kosmotropy a slabě hydratované chaotropy je uveden na Obr. 6. Také Collins [31] podotýká, že kosmotropní ionty představují skupinu slabě hydratovaných měkkých kationtů s nízkou hustotou náboje a silně hydratovaných tvrdých aniontů s vysokou hustotou náboje. U chaotropů je tomu naopak, jsou skupinou silně hydratovaných tvrdých kationtů s vysokou hustotou náboje a slabě hydratovaných měkkých aniontů s nízkou hustotou náboje [26].



Obr. 6. Členění iontů I. A a VII. A skupiny periodické tabulky na kosmotropní a chaotropní dle velikosti [26].

Dále se zde zabývá faktem, že dva opačně nabitě silně hydratované malé ionty se silně přitahují, vytváří páry a vylučují mezi sebou hydratační sféry. U slabě hydratovaných měkkých iontů je situace sice odlišná, ovšem se stejným výsledkem. Elektrostatická přitažlivost mezi nimi je menší než u kosmotropů, hydratační sféry jsou však volně vázané, a chaotropy mohou tudíž také tvořit iontové páry a vypuzovat hydratační vodu. Interakcí tvrdého iontu s opačně nabitým měkkým iontem silný iontový pár nevzniká – přitažlivost měkkého iontu není dostatečně silná, navíc tvrdý iont ztrácí hydratační slupku, tím pádem je tento iontový pár tvrdý-měkký iont vždy oddělen vodou (Obr. 7). Kunz také zmiňuje pravidlo [26], kdy tvrdá hlavní skupina bude přednostně reagovat s tvrdým protiontem a měkká hlavní skupina s měkkým protiontem.



Obr. 7. Interakce iontů [26].

Werner Kunz ve své práci [26] také dále vysvětluje, proč je rozdělení iontů na kosmotropní a chaotropní obrácené pro kationty a anionty. Podle závěrů této práce bílkoviny obsahují mnoho silných aniontových hlavních skupin (karboxylová skupina) a slabé kationtové skupiny (amidová skupina), přičemž interakce proteinů se silnými kationty a slabými anionty je výraznější než u slabých kationtů a silných aniontů. Obecně platí, že účinky kationtů jsou méně výrazné než specifické účinky aniontů. Anionty silněji interagují s vodou než kationty stejné velikosti a mocenství [26].

Podle autorů Kumara a Venkantesua [29] bylo prokázáno, že specifická kombinace chaotropního kationtu a kosmotropního aniontu stabilizuje proteiny. Interakce iontů Hofmeisterovy řady s proteiny je podmíněna schopností iontů narušit vodíkové vazby, nepolárními interakcemi a dále elektrostatickým efektem, který přispívá ke stabilitě proteinů. Interakce a chování aniontů v roztocích závisí na prostředí rozpouštědla a typu rozpuštěné látky, proto ionty Hofmeisterovy řady nemusí proteiny stabilizovat či destabilizovat v přesném pořadí série. Hlavním faktorem vlivu iontů v roztoku na stabilizaci proteinů je energetická rovnováha mezi separací náboje a tvorba nebo porušení solvatačního pláště kolem povrchu proteinů [29].

Je popsáno, že ionty Hofmeisterovy řady mají vliv nejen na výše uvedené interakce s proteiny, ale i na rozpustnost a chování dalších polymerů. Ovlivňují jejich strukturu a stabilitu ve vodných roztocích. Z tohoto důvodu je studium chování HA (polyelektrolyt) v přítomnosti iontů Hofmeisterovy řady zajímavé a může přinést nové informace o konformačním chování tohoto polymeru.



### 3 VISKOZITA

Reologie je věda zabývající se popisem chování materiálu, na který působí vnější síly. Studuje vzájemný vztah mezi napětím, deformací a časem. Projevem deformace při působení napětí na kapalinu je tok. Rychlost toku kapaliny je přímo úměrná působící vnější síle a nepřímo úměrná vnitřním silám působícím proti toku. Toto vnitřní tření vzniká v kapalině jako důsledek tepelného pohybu molekul a mezimolekulárních přitažlivých sil. Veličinou charakterizující vnitřní tření je základní veličina reologie – viskozita [32] [33] [34].

#### 3.1 Viskozita – základní pojmy

Viskozita určuje odpor proti toku neboli míru vnitřního odporu materiálu vůči vnějšímu zatížení. Základním vztahem definujícím viskozitu je Newtonův zákon stanovující vztah mezi smykovým napětím  $\tau$  a rychlostí smykové deformace  $\gamma$  jako přímou úměru. Jeho znění je uvedeno v Rov. 1:

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

Smykové napětí  $\tau$  je přímo úměrné poměru přírůstku rychlosti  $dv$  mezi dvěma sousedními proudícími vrstvami kapaliny a vzdálenosti těchto vrstev  $dy$ . Je tedy přímo úměrné gradientu rychlosti mezi vrstvami kapaliny  $dv/dy$ , tedy rychlosti smykové deformace  $\gamma$ . Konstantou úměrnosti je zde dynamická viskozita  $\eta$  [35].

Uvažujeme-li kapalinu proudící kapilárou, v případě ideální kapaliny bude ve všech místech průřezu kapiláry proudit stejnou rychlostí. V případě reálné kapaliny bude rychlost v jednotlivých vrstvách proměnná, uprostřed kapiláry bude nejvyšší, a směrem ke stěnám bude klesat k nule. Změnou rychlosti ve směru kolmém na směr rychlosti dochází k vnitřnímu tření, které má za následek vznik tečných napětí. Newtonova rovnice popisuje vztah mezi tečným napětím a změnou rychlosti proudění ve směru kolmém ke směru proudění  $y$  [36]. Proudění, při kterém nedochází k mísení kapaliny mezi jednotlivými vrstvami, se nazývá laminární proudění. Laminárně proudí kapalina při nižších rychlostech, zvýšením rychlosti proudění dochází k tvorbě vírů a proudění se mění v turbulentní, při kterém již dochází k mísení vrstev kapaliny [37].

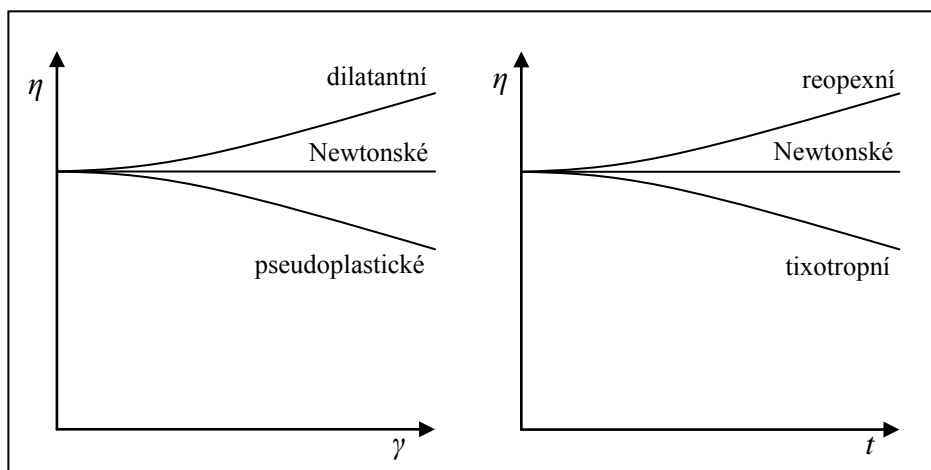
Podle způsobu měření lze rozlišit vzájemně na sobě závislé veličiny, a to viskozitu dynamickou a kinematickou. Dynamická viskozita je definována výše pomocí Newtonovy rovnice (Rov. 1).

Kinematickou viskozitu lze získat jako podíl viskozity dynamické  $\eta$  k hustotě  $\rho$  měřené kapaliny (Rov. 2):

$$\nu[m^2/s] = \frac{\eta}{\rho} \quad (2)$$

Látky, které se během působení smykového napětí chovají dle Newtonova zákona (Rov. 1), se označují jako newtonské. Jejich viskozita je nezávislá na čase i rychlosti smykové deformace. Řadíme sem například vodu, olej či med.

Odlišné chování vykazují tzv. nenewtonské kapaliny, jejichž viskozita může v závislosti na smykové deformaci klesat – pseudoplastické, či stoupat – dilatantní (Obr. 8). Typickým představitelem pseudoplastických kapalin jsou roztoky polymerů a dilatantních kapalin škrobová suspenze. Zvláštní skupinu tvoří tzv. binghamské kapaliny, které začínají téci až po překonání tzv. prahového napětí  $\tau_0$ . Mohou být newtonské, pseudoplastické i dilatantní. Mezi binghamské kapaliny lze zařadit například zubní pastu. Dále existují také nenewtonské kapaliny s časovou závislostí. U tixotropních kapalin viskozita s dobou působení napětí klesá (nátěrové hmoty), u reopexních roste (suspenze bentonitu) [32] [33]. Vybrané příklady typů kapalin jsou názorně popsány na Obr. 8:



Obr. 8. Závislosti viskozity na rychlosti smykové deformace a na čase.

Ke stanovení viskozity existuje několik základních měřících metod. K těm nejjednodušším patří metoda výtokového pohárku, padající kuličky či měření kapilárními viskozimetry (Cannon-Fenskeův, Ostwaldův, Vogel-Ossagův, Ubbelohdeho). Modernější metody měře-

ní jsou založeny na rotačních reometrech s různou geometrií, například válec-válec, deska-deska a kužel-deska [34]. V rámci této diplomové práce byl pro měření viskozity použit kapilární Ubbelohdeho viskozimetr, a proto bude tomuto typu měření věnována větší pozornost.

### 3.2 Viskozita zředěných roztoků polymerů

Základní vztah kapilární viskozimetrie newtonských kapalin představuje Poiseuilův zákon (Rov. 3):

$$Q = \frac{\pi \times (p_2 - p_1) \times r^4 \times t}{8 \times l \times \eta} \quad (3)$$

Francouzský lékař Jean Léonard Marie Poiseuille na základě svých experimentů při studiu krevního oběhu odvodil zákon proudění viskózních kapalin úzkou kapilárou (proudění krve cévami). Současně a nezávisle na něm odvodil tento vztah i německý inženýr Gotthilf Heinrich Ludwig Hagen, a proto se lze v literatuře setkat též s označením Hagen-Poiseuilova rovnice.

Rovnice vyjadřuje skutečnost, že objemový tok  $Q$  viskózní kapaliny při laminárním proudění tenkou kapilárou kruhového průřezu o poloměru  $r$  a délce  $l$  je přímo úměrný tlakovému spádu na koncích kapiláry  $(p_2 - p_1)$ , čtvrté mocnině průměru kapiláry a době průtoku  $t$  a nepřímo úměrný délce kapiláry a dynamické viskozitě [38] [9].

Při praktickém použití kapilárního viskozimetru se postupuje tak, že se provede jedno měření průtokového času kapilárou s kapalinou, jejíž viskozita je známá ( $\eta_1$ ), a ke druhému měření je použita kapalina, jejíž viskozita má být stanovena ( $\eta_2$ ). Za předpokladu, že měření je provedeno ve stejném viskozimetru, tedy že objem kapiláry je stejný a  $\Delta p = \rho gh$ , potom podle Hagen–Poisueilleovy rovnice platí (Rov. 4, 5):

$$V = \rho_1 \times g \times h \times \frac{t_1}{\eta_1} = \rho_2 \times g \times h \times \frac{t_2}{\eta_2} \quad (4)$$

$$\rho_1 \times \frac{t_1}{\eta_1} = \rho_2 \times \frac{t_2}{\eta_2} \quad (5)$$

Z této rovnice pak pro dynamickou ( $\eta$ ) a kinematickou viskozitu ( $\nu$ ) měřené látky vyplývá platnost Rov. 6.

$$\eta_2 = \eta_1 \times \frac{t_2 \times \rho_2}{t_1 \times \rho_1} \rightarrow v_2 = v_1 \times \frac{t_2}{t_1} \quad (6)$$

### 3.2.1 Limitní viskozitní číslo

Důležitým parametrem, který lze měřením na kapilárním viskozimetru získat, je limitní viskozitní číslo  $[\eta]$  (LVČ). Pro jeho stanovení je nutné znát následující veličiny:

Relativní viskozitu  $\eta_{rel}$  (vizkozitní poměr) jako poměr mezi viskozitou roztoku  $\eta$  a viskozitou čistého rozpouštědla  $\eta_0$ , kterou lze za předpokladu stejné hustoty rozpouštědla a roztoku vyjádřit jako poměr doby průtoku roztoku  $t$  a čistého rozpouštědla  $t_0$  (Rov. 7):

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} \text{ resp. } \frac{t}{t_0} \quad (7)$$

Specifickou viskozitu  $\eta_{sp}$  (měrná viskozita) definovanou Rov. 8:

$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 \quad (8)$$

Redukovanou viskozitu  $\eta_{red}$  (vizkozitní číslo) jako poměr mezi viskozitou specifickou  $\eta_{sp}$  a koncentrací měřeného roztoku  $c$  (Rov. 9):

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} \quad (9)$$

Inherentní viskozitu  $\eta_{inh}$  (logaritmické viskozitní číslo) jako poměr přirozeného logaritmu redukované viskozity  $\ln\eta_{red}$  a koncentrace měřeného roztoku  $c$  (Rov. 10):

$$\eta_{inh} = \frac{\ln\eta_{red}}{c} \quad (10)$$

Mezní hodnota poměru specifické viskozity a koncentrace nekonečně zředěného roztoku odpovídá limitnímu viskozitnímu číslu  $[\eta]$  (vnitřní viskozita) (Rov. 11):

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c} \quad (11)$$

Z Rov. 8 je patrné, že pro stanovení limitního viskozitního čísla je viskozita zředěného roztoku měřena při různých koncentracích a následně je provedena extrapolace k nulové koncentraci měřeného polymeru. Hodnota limitního viskozitního čísla se vyjadřuje v jednotkách ml/g, případně dl/g. Jeho velikost závisí na struktuře a konformaci molekul polymeru, na jeho molekulové hmotnosti, na typu použitého rozpouštědla a dále také na teplotě, při které je měření prováděno [9].

### 3.2.2 Závislost limitního viskozitního čísla na koncentraci

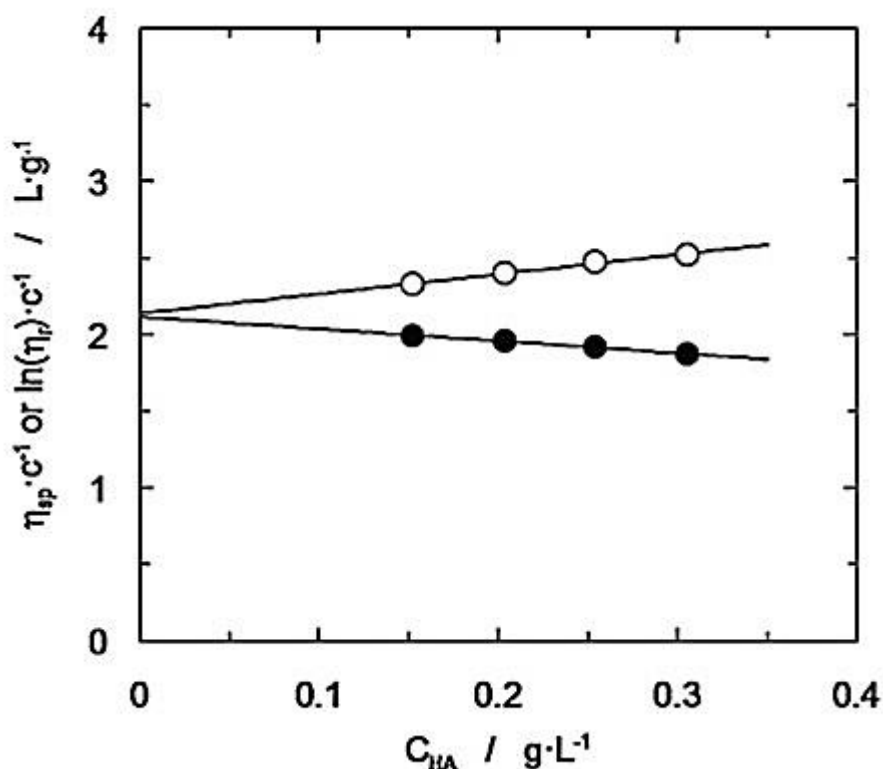
K interpretaci závislosti limitního viskozitního čísla na koncentraci lze použít Hugginsovu (Rov. 12) a Kramerovu rovnici (Rov. 13):

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k_H \times [\eta]^2 \times c \quad (12)$$

$$\frac{\ln \eta_{red}}{c} = [\eta] + k_K \times [\eta]^2 \times c \quad (13)$$

Hugginsův  $k_H$  a Kramerův  $k_K$  koeficient popisují interakci polymerní molekuly s rozpouštědlem, jsou závislé na charakteru rozpouštědla, jeho iontové síle, pH a na molekulové hmotnosti polymeru. Podle stupně sbalení makromolekulárního klubka lze rozlišit rozpouštědla dobrá a rozpouštědla špatná. U polymeru rozpuštěného ve špatném rozpouštědle jsou ochotněji vytvářeny vzájemné kontakty mezi segmenty makromolekuly než mezi polymerem a molekulami rozpouštědla. Klubka tak zůstávají sbalena. Naopak v dobrém rozpouštědle vyvíjí makromolekula snahu vystavit se co nejvíce působení rozpouštědla, jsou preferovány kontakty polymer – rozpouštědlo a klubka se rozbalují [39]. Hodnota konstanty  $k_H$  se u polymerů v dobrém rozpouštědle pohybuje v blízkosti hodnoty 0,3 a u polymerů ve špatném rozpouštědle mezi 0,8 – 1,0 [9].

Prakticky lze hodnotu limitního viskozitního čísla získat jako průsečík dvou přímk na ose  $y - z$  lineární závislosti redukované viskozity na koncentraci vycházející z Hugginsovy rovnice (Rov. 12) a logaritmu relativní viskozity na koncentraci vycházející z Kramerova vztahu (Rov. 13).



Obr. 9. Stanovení limitního viskozitního čísla dle Hugginse  $\circ$  a Kramera  $\bullet$  [40].

### 3.2.3 Závislost limitního viskozitního čísla na molekulové hmotnosti

Kromě koncentrace měřeného roztoku je důležitým parametrem ovlivňujícím viskozitu také molekulová hmotnost polymeru. Zákonitou souvislost limitního viskozitního čísla a molekulové hmotnosti makromolekul popsal H. Staudinger (Rov. 14), který také dokázal, že specifická viskozita zředěných roztoků polymerů s jejich molekulovou hmotností roste [41]:

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = K'M \quad (14)$$

V Rov. 14 je  $M$  molekulová hmotnost polymeru a  $K$  je konstanta charakteristická pro dvojici polymer – rozpouštědlo. Vztah mezi limitním viskozitním číslem a molekulovou hmotností je vyjádřen pomocí Mark–Houwinkovy rovnice (Rov. 15), která poskytuje přímé informace o konfiguraci a konformaci polymerních řetězců ve zředěném polymerním roztoku za daných podmínek, kterými jsou teplota měření a typ rozpouštědla:

$$[\eta] = K \times M^a \quad (15)$$

Exponent  $a$  nese právě informaci o konformaci a konfiguraci polymeru a také o jeho interakci s polymerem. Oba parametry,  $K$  a  $a$ , jsou závislé na systému polymer – rozpouštědlo. Hodnota  $a$  se u lineárních polymerů v termodynamicky dobrých rozpouštědlech pohybuje kolem 0,7. Hodnoty 0,8 – 1,0 zřídka až 2,0 pak ukazují na prodlouženou, tyčinkovitou konformaci makromolekuly. Za tzv. theta-podmínek se  $a$  rovná 0,5. V případě, že rozpuštěná makromolekula v roztoku netvoří klubko, nýbrž jen kompaktní částici s konstantní hustotou, blíží se parametr  $a$  nule [42] [43].

Pro výše uvedený exponent  $a$  existuje také několik následujících pravidel [41]. Exponent  $a$  nabývá u vinylových polymerů, polyamidů, polyesterů, polyetherů a dalších hodnoty 0,5 – 0,85, přičemž v dobrých rozpouštědlech dosahuje hodnot i vyšších. Zpravidla vyšších hodnot blízkých jedné nabývá u derivátů polysacharidů, které jsou na typu rozpouštědla nezávislé. Hodnota exponentu  $a$  je v rozmezí hodnot 1 – 2 vzácná. Hodnota exponentu  $a$  je u rozvětvených polymerů menší než u lineárních. U určitého polymeru platí mezi konstantou  $K$  a exponentem  $a$  nepřímá závislost, kdy čím vyšší exponent, tím nižší konstanta.

Mark-Houwinkovu rovnici lze využít pro stanovení průměrné molekulové hmotnosti polymerů, přesnost stanovení však závisí na spolehlivosti parametrů  $K$ ,  $a$ , obvykle získaných z literatury. Důležité je, aby byl vzorek měřen za stejných podmínek, při jakých byly tyto parametry určeny [42].

### 3.2.4 Závislost limitního viskozitního čísla na teplotě

Vliv teploty na limitní viskozitní číslo je předmětem řady experimentálních a teoretických prací. Jejich výsledky ukázaly, že teplotní závislost  $[\eta]$  je poměrně komplikovaná, o čemž svědčí následující rovnice (Rov. 16):

$$d \ln \frac{[\eta]}{dT} = 1,5 d \ln \frac{(h_{\theta}^2)}{dT} + d \ln \frac{\alpha^3}{dT} \quad (16)$$

kde  $d \ln \frac{[\eta]}{dT}$  je teplotní koeficient  $ETA$ ,  $T$  je teplota,  $h_{\theta}^2$  je neporušený rozměr polymerního řetězce a  $\alpha^3$  je stupeň jeho expanze. Z Rov. 16 vyplývá, že její první člen  $d \ln \frac{(h_{\theta}^2)}{dT}$  závisí na změně neporušeného rozměru polymerního klubka s teplotou, která je způsobená konformačními změnami klubka v roztoku. Druhý člen rovnice ukazuje, že základní příčinou teplotní závislosti  $ETA$  v dobrých rozpouštědlech je změna  $\alpha^3$ . Tato závislost může být rostoucí, klesající nebo může procházet maximem. Například u roztoků polymerů v dobrých rozpouštědlech je závislost  $ETA$  na teplotě jen nepatrná.

Z praktického hlediska je pro správné stanovení viskozity důležité udržet konstantní teplotu měření. Přesnost, se kterou je teplota udržována, by měla být nejméně 0,1 °C. Je známo, že viskozita polymerních roztoků i viskozita rozpouštědla vždy s teplotou klesá. Na druhou stranu limitní viskozitní číslo se v závislosti na teplotě může chovat rozdílně a hodnota  $[\eta]$  se může:

- 1) Zvyšovat s teplotou:      pak       $\Delta[\eta]/\Delta T > 0$
- 2) Být na teplotě nezávislá:      pak       $\Delta[\eta]/\Delta T = 0$
- 3) Snižovat s teplotou:      pak       $\Delta[\eta]/\Delta T < 0$



### 3.3 Současný stav řešené problematiky

V literatuře lze nalézt řadu prací zabývajících se reologických studiích roztoků hyaluronanu. Měření viskozity se stalo základem pro stanovení molekulové hmotnosti a pro charakterizaci chování tohoto polymeru v roztoku. Důležitou veličinou je zde limitní viskozitní číslo, díky kterému lze za pomoci Mark-Houwinkova vztahu (Rov. 15) získat průměrnou molekulovou hmotnost HA. Závislost limitního viskozitního čísla na koncentraci lze interpretovat pomocí Hugginsovy (Rov. 12) nebo Kramerovy rovnice (Rov. 13). Pro studium konformačních změn HA jsou důležité okolní podmínky měření, především iontová síla, typ protiiontu, teplota, pH a stupeň degradace polymeru. Mnoho prací je věnováno nalezení optimálních hodnot vedoucích k dosažení cílených fyzikálních vlastností HA či jejím fyziologickým účinkům.

Jako měřicí přístroje byly v rámci těchto prací hojně využívány kapilární [17] [32] [44] [45] [46] [47] [48] a rotační viskozimetry s různou geometrií [44] [46] [48] [49] [50]. Vzhledem k tomu, že je HA běžně používána v medicíně či kosmetice, setkáváme se nejčastěji s měřením při 25 °C (laboratorní teplota) a 37 °C (tělesná teplota) a s NaCl jako rozpouštědlem (simulace fyziologického roztoku).

Jednu z takových prací publikovali Yu a spolupracovníci [44], kteří studovali roztok HA v 0,15M NaCl, což je koncentrace blízká fyziologickému roztoku, při které bylo dosaženo účinku elektrostatického odpuzování mezi aniontovými skupinami HA řetězců obklopených kationty. Studie uvádí dva opačné procesy, které zde probíhají. 1) Přidání soli vede obvykle k rozpadu makromolekulárního řetězce, a tím ke snížení viskozity roztoku. 2) Sůl ovšem také podporuje interakce mezi molekulami, což může naopak viskozitu zvyšovat [44]. Praktická realizace experimentu byla provedena pomocí reometru s geometrií kužel-deska. Měřeny byly vzorky o různé molekulové hmotnosti při 25 °C. Studie prokázala změny reologického chování HA v roztocích s přídavkem NaCl. Při nízké koncentraci HA (0,4 mg/ml) se polymer v roztoku se solí choval téměř newtonsky. Další studované koncentrace roztoků HA připravené ve vodě s obsahem NaCl byly nižší než roztoků bez soli. Výjimkou byla koncentrace 20 mg/ml, kde tomu bylo naopak.

Měření NaHY rozpuštěného v 0,146M roztoku NaCl se zabývá také studie autorky Calciu-Rusu a jejího kolektivu [45]. Experiment byl prováděn pomocí kapilárního Ubbelohdeho viskozimetru o průměru kapiláry 0,63 mm při 25 °C. Výchozím materiálem byl NaHY získaný z bakteriální fermentace o průměrné molekulové hmotnosti  $1,55 \cdot 10^6$  g/mol.

V práci bylo stanoveno limitní viskozitní číslo a pro výpočet molekulové hmotnosti byla aplikována Mark–Houwinkova rovnice. Součástí studie bylo také měření na reometru s geometrií kužel-deska při 10; 20 a 30 °C. Studie sloužila pro řešení vhodného použití NaHY v lékařství. Cílem bylo nalezení optimální molekulové hmotnosti a koncentrace pro aplikaci v oční chirurgii. Pro srovnání sloužily komerční oční viskochirurgické materiály.

Viskozimetrické měření pro nalezení optimálních podmínek využití polymeru v medicínské aplikaci, konkrétně opět v oftalmologii, sleduje i další studie autorů Maleki a kol. [46]. Práce je zaměřena na studium časové závislosti viskozity při nízkých rychlostech smykové deformace a navazuje na předchozí studie, které uvádí, že se HA s rostoucí rychlostí smykové deformace i při poměrně nízkých koncentracích chová tixotropně (viz Obr. 8) [46]. Při vyšších rychlostech smykové deformace klesá viskozita v průběhu času. Reologické měření bylo prováděno pomocí rotačního viskozimetru s geometrií kužel-deska při 25 a 37 °C. Jako materiál byly použity vzorky NaHY o molekulové hmotnosti  $1,9 \cdot 10^6$  g/mol v 0,01M NaCl. U vyšších koncentrací polymeru bylo pozorováno při nižších smykových rychlostech newtonské chování a tixotropní chování při vyšších smykových rychlostech. Studie také řešila závislost relativní viskozity na teplotě a koncentraci při nízkých rychlostech smyku. S rostoucí koncentrací HA byl zaznamenán silný vzestup relativní viskozity.

Chování polyelektrolytů v roztoku a vliv iontové síly modifikované přídavkem soli na jeho vlastnosti sledoval ve své práci García-Abuín se spolupracovníky [32] pomocí Ubbelohdeho kapilárního viskozimetru o průměru kapiláry 0,5 mm při 25 °C.

Kapilární viskozimetr využili ve své studii také Lath s kolektivem [47] a Stankovská s kolektivem [48]. První práce uvádí použití Ubbelohdeho kapilárního viskozimetru s průměrem kapiláry 0,53 mm pro měření roztoku HA v 0,2M NaCl při 25 °C. Pro výpočet LVČ byla aplikována Hugginsova (Rov. 12) a Kramerova rovnice (Rov. 13). Druhá práce se také zabývá stanovením molekulárních charakteristik HA s využitím měření jejích roztoků v 0,2M NaCl při 25 °C. Pro reologická měření byl navíc využit rotační viskozimetr.

Kolektiv autorů s Kupskou [49] studovali NaHY o molekulové hmotnosti  $0,7 - 0,9 \cdot 10^6$  g/mol v roztocích vody a KCl pomocí kapilárního Ubbelohdeho viskozimetru o průměru kapiláry 0,836 mm. Jako rozpouštědla byla použita redestilovaná deionizovaná voda a 0,01M KCl při 25; 30 a 35 °C. Předmětem řešení byly fyzikální vlastnosti, biologické a fyziologické funkce roztoku HA, které podle autorů vychází ze schopnosti HA tvo-

řit viskoelastický roztok. Byly sledovány konformační změny, které byly ve vodě i KCl podobné, u HA rozpuštěné v KCl pak méně intenzivní.

Autoři Chytil a Pekař [50] ve své práci sledují reologii roztoků HA a hydrofobně modifikované HA při 25 °C pomocí automatického mikrokapilárního viskozimetru. Bylo stanoveno limitní viskozitní číslo a Hugginsova konstanta. V práci bylo navíc sledováno chování roztoku podrobeného smykové deformaci při měření reometrem s geometrií kužel-deska.

Ve studii autorů Cowman a Matsuoky [51] lze nalézt teoretický rámec interpretace reologických dat pro roztoky HA. V popředí stojí viskozimetrická měření využívaná k určení tvaru molekuly, její tuhosti, expanze či mezimolekulárních interakcí. Součástí experimentů bylo určení vlivu proměnných – molekulové hmotnosti, teploty, koncentrace, iontové síly a smykové rychlosti na chování klubka HA. Tato studie rovněž shrnuje dostupné hodnoty Hugginsovy konstanty a exponentu  $a$  z Mark–Houwinkovy rovnice (Rov. 15), které byly publikovány v literatuře. V práci jsou uvedeny hodnoty exponentů, které byly získány viskozimetrickým měřením zředěného roztoku HA v 0,15M NaCl při 25 °C. Přestože se jednalo o měření za stejných podmínek (koncentrace, teplota, typ rozpouštědla), hodnoty exponentů se u různých autorů liší, především u vysokomolekulární HA (Tab. 2). Zajímavé výsledky byly získány pro nízkomolekulární HA, kdy všichni autoři shodně publikovali hodnotu  $a$  v rozmezí 1,0 – 1,2 R. L. Cleland (1970, 1984), E. Shimada a G. J. Matsumura (1975), R. E. Turner, P. Lin a M. K. Cowman (1988), S. Hokputsa a kolektiv (2003) [51]].

Tab. 2. Hodnoty exponentu  $a$  Mark-Houwinovy rovnice pro HA v roztoku NaCl při teplotě 25 °C uvedené ve studii [51].

<b>Autoři studie (rok)</b>	<b>Hodnota exponentu <math>a</math></b>
T. C. Laurent (1960)	0,780
E. A. Balazs (1965)	0,800
R. L. Cleland a J. L. Wang (1970)	0,816
E. Shimada, G. J. Matsumura (1975)	0,760
H. Bothner, T. Waaler, O. Wik (1988)	0,779
E. Fouissac a kolektiv (1992)	0,780
A. Gamini, S. Paoletti, F. Zanetti (1992)	0,810
T. Yanaki, M. Yamaguchi (1994)	0,829
N. Berriaud, M. Milas, M. Rinaudo (1998)	0,790
R. Takahashi a kolektiv (1999)	0,790
R. Mendichi, L. Šoltés, A. Giacometti Schieronni (2003)	0,778
S. Hokputsa a kolektiv (2003)	0,730
K. Hayashi a kolektiv (1995)	0,920

Podobně tomu bylo i s hodnotami publikovanými pro Hugginsovu konstantu. Teoretická hodnota byla uvedena jako 0,4, ovšem reálně stanovené hodnoty se opět v různých studiích liší (Tab. 3).

Tab. 3. Hodnoty Hugginsovy konstanty  $k_H$  pro HA v roztoku NaCl při teplotě 25 °C uvedené ve studii [51].

Autoři studie (rok)	Hodnota exponentu $k_H$
E. Shimada, G. J. Matsumura (1975)	0,350 – 0,450
A. Gamini, S. Paoletti, F. Zanetti (1992)	0,370 – 0,430
E. Fouissac, M. Milas, M. Rinaudo (1993)	0,330 – 0,570
T. Yanaki, M. Yamaguchi (1994)	0,350
N. Berriaud, M. Milas, M. Rinaudo (1998)	0,396 – 0,427
K. Hayashi a kolektiv (1995)	0,340 – 0,430
K. Hayashi a kolektiv (1996)	0,340 – 0,430
Y. Mo a kolektiv (1999)	0,370 – 0,450
M. Milas a kolektiv (2001)	0,400
W. E. Krause, E. G. Bellomo, R. H. Colby (2001)	0,340

Jako poslední studii je možno zmínit práci kolektivu Mráčka [17], která je věnována podobnému tématu jako je řešená diplomová práce, a to vlivu iontů Hofmeisterovy řady na roztoky hyaluronanu. V experimentální části studie bylo pomocí interferometru prováděno stanovení difúzního koeficientu reprezentujícího hydrofobní a hydrofilní interakce makromolekul HA. Vedle sledování procesu botnání byla současně pomocí Ubbelohdeho viskozimetru stanovena kinematická viskozita. V studii byla použita HA o molekulové hmotnosti  $0,63 \cdot 10^6$  g/mol, která byla rozpuštěna v chloridu sodném, chloridu hořečnatém, jodidu draselném a fluoridu draselném. Měření probíhalo při 25; 30; 37; 40 a 45 °C při koncentraci polymeru 0,01M. Přidávky iontů způsobily snížení kinematické viskozity, nejmenší pokles byl zaznamenán přidávkem fluoridu draselného, což podpořilo hypotézu o zvýšení tuhosti řetězce HA přítomností fluoridového aniontu.

## 4 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Prvním cílem diplomové práce bylo zpracovat literární rešerši na zadané téma. Teoretická část shrnuje základní informace o kyselině hyaluronové, její struktuře, výrobě, využití a chování v roztoku. Dále jsou uvedeny informace o Hofmeisterově řadě iontů a o metodách vhodných pro stanovení viskozity polymerů ve zředěných roztocích se zaměřením na roztoky hyaluronanu.

Cílem praktické části diplomové práce bylo sledovat viskozitní chování hyaluronanu ve zředěných roztocích solí s ionty Hofmeisterovy řady. Byla studována závislost viskozity na typu iontu (chaotropní, kosmotropní) a na teplotě. K tomuto účelu bylo použito měření viskozity v roztocích pomocí Ubbelohdeho viskozimetru.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE

### 5.1 Vzorek hyaluronanu

Pro experiment byl použit vzorek hyaluronanu, laskavě poskytnutý firmou Contipro Group s. r. o., Dolní Dobrouč, s molekulovou hmotností v rozsahu  $1,8 - 2,1 \cdot 10^6$  g/mol.

### 5.2 Soli s ionty Hofmeisterovy řady

Vzorek hyaluronanu byl pro měření viskozity rozpuštěn v roztocích solí uvedených v Tab. 4.

Tab. 4. Přehled solí použitých pro experiment.

Název	Vzorec	M [g/mol]	Výrobce
Thiokyanatan sodný	NaSCN	81,07	Sigma-Aldrich, s. r. o.
Thiokyanatan amonný	NH <sub>4</sub> SCN	76,12	Lach-ner, s. r. o.
Síran sodný	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	142,04	Sigma-Aldrich, s. r. o.
Síran amonný	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	132,14	Lach-ner, s. r. o.
Chlorid sodný	NaCl	58,44	Sigma-Aldrich, s. r. o.

### 5.3 Přístroje a pomůcky

- Kryostat Ministat cc1, výrobce – Huber;
- Ubbelohdeho viskozimetr s vodní lázní;
- Analytické váhy Denver Summit SI-234, výrobce – Denver Instrument;
- Magnetické míchadlo s ohřevem MR Hei-Tec, výrobce – Heidolph;
- Teploměr vertex 50 °C;
- Běžné laboratorní sklo a vybavení (odměrné baňky, kádinky, váženky, pipety).



## 6 METODIKA

### 6.1 Příprava roztoků solí pro rozpouštění hyaluronanu

Z každé ze solí uvedených v Tab. 4 byl připraven roztok jejím rozpuštěním v demineralizované vodě. Iontová síla roztoku  $I$  činila vždy 0,1 M. Příklad výpočtu množství NaSCN potřebného pro přípravu roztoku o  $I = 0,1$  M je uveden v Rov. 17 – 19. Množství všech solí potřebných pro přípravu 100 ml roztoků jsou pak uvedena v Tab. 5.

*Iontovou sílu roztoku je možno stanovit podle rov. (17)*

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i \times Z_i^2 \quad (17)$$

Kde

$c_i$  koncentrace jednotlivých iontů

$Z_i$  náboj jednotlivých iontů

*Výpočet koncentrace a navážky soli NaSCN pro přípravu roztoku o iontové síle 0,1M*

$$M_{NaSCN} = 81,06 \text{ g/mol}$$

$$V_{roztoku} = 100 \text{ ml}$$



$$I = \frac{1}{2} \times (1 \times 1^2 + 1 \times 1^2) \times c$$

$$0,1 = 1 \times c$$

$$c = 0,1 \text{ mol/l}$$

$$m_{NaSCN} = c \times M_{NaSCN} \times V \quad (19)$$

$$m_{NaSCN} = 0,1 \text{ mol/l} \times 81,06 \text{ g/mol} \times 0,1 \text{ l} = \mathbf{0,8106 \text{ g NaSCN}}$$

Tab. 5. Hmotnost solí pro přípravu 100 ml roztoků.

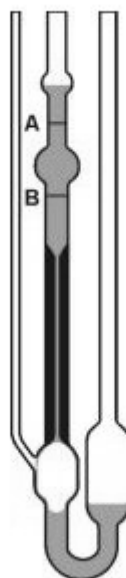
Sůl	Navážka [g]
NaSCN	0,8106
NH <sub>4</sub> SCN	0,7614
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,4730
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,4401
NaCl	0,5844

## 6.2 Příprava vzorků hyaluronanu

Pro vlastní analýzu byly vzorky připraveny navážením polymeru a jeho rozpuštěním v daném roztoku soli. Hyaluronan byl navážen na analytických vahách s přesností na 0,0001 g tak, aby výchozí koncentrace polymeru v roztoku činila  $1,0 \cdot 10^{-3}$  g/ml. Rozpouštění probíhalo za míchání při teplotě 50 °C po dobu přibližně 20 hodin. Před měřením byl vzorek vždy filtrován přes skleněnou fritu S1. Takto připravené vzorky byly použity k viskozimetrické analýze.

## 6.3 Měření viskozity

Měření probíhalo pomocí Ubbelohdeho kapilárního viskozimetru (Obr. 10). Nejprve bylo vždy provedeno měření průtokového času čistého rozpouštědla (15 ml) a následně byly měřeny průtokové časy vzorku polymeru o nejvyšší koncentraci ( $1,0 \cdot 10^{-3}$  g/ml). Tento roztok byl postupně ředěn čistým rozpouštědlem tak, aby bylo připraveno 5 koncentrací v rozmezí cca  $7,5 \cdot 10^{-4}$ ;  $6,0 \cdot 10^{-4}$ ;  $5,0 \cdot 10^{-4}$ ;  $4,3 \cdot 10^{-4}$ ;  $3,7 \cdot 10^{-4}$  g/ml. Pro každou z nich byl opět měřen čas průtoku kapilárou viskozimetru. Průtokový čas byl měřen 5x a jednotlivé hodnoty se nelišily více než o 0,5 s. Z těchto hodnot byl vypočten průměr a použit k dalším výpočtům. Každý vzorek byl proměřen při teplotě 15; 25; 30; 35 a 45 °C.



Obr. 10. Ubbelohdeho viskozimetr [52].

#### 6.4 Stanovení limitního viskozitního čísla a Hugginsovy konstanty

Z průměrných hodnot průtokových časů roztoků vzorku a čistého rozpouštědla a z hodnot koncentrací příslušných roztoků vzorku byly podle Rov. 7 – 10 vypočteny potřebné údaje pro stanovení limitního viskozitního čísla. Příklad výpočtu pro vzorek HA rozpuštěný v NaSCN měřený při 25 °C je uveden v Rov. 20 až 23. Z těchto údajů pak byly sestrojeny grafy závislosti redukované viskozity na koncentraci (Hugginsova Rov. 12) a závislosti  $\frac{\ln \eta_{rel}}{c}$  na koncentraci (Kramerova Rov. 13). Dále byl výpočet limitního viskozitního čísla proveden následujícími způsoby:

- 1) Extrapolací lineární části závislosti  $\eta_{red}$  na nulovou koncentraci (koncentrační rozmezí  $1,0 \cdot 10^{-3}$  až  $5,0 \cdot 10^{-4}$  g/ml) byla získána hodnota odpovídající limitnímu viskozitnímu číslu  $[\eta]$  (Obr. 11). Hugginsova konstanta  $k_H$  pak byla stanovena ze směrnice Hugginsovy rovnice (Rov. 25 a 26). Obdobně byla data zpracována podle Kramerovy rovnice (Rov. 27 a 28), kdy závislost  $\frac{\ln \eta_{rel}}{c}$  vs  $c$  extrapolovaná k nulové koncentraci rovněž poskytla hodnotu limitního viskozitního čísla.
- 2) Vzhledem k nelinearitě závislosti  $\eta_{red}$  vs  $c$  v oblasti nízkých koncentrací byly výsledky viskozitních měření zpracovány rovněž pomocí postupu doporučeného Fossem [53], který je uveden v Rov. 20. V této rovnici je  $B$  parametr, který charakterizuje interakci polyiontů. Podle [41] tento parametr závisí na molekulové hmot-

nosti polymeru a relativní permitivitě rozpouštědla. Podrobněji bude tento způsob vyhodnocení i jeho teoretické základy diskutován v části 7.3 diplomové práce.

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = \frac{[\eta]}{(1 + B\sqrt{c})} \quad (20)$$

V další části textu je uveden příklad výpočtu limitního viskozitního čísla a Hugginsovy konstanty podle Rov. 7 – 12. Výpočet je proveden pro NaSCN, koncentraci HA ve vzorku  $c_{HA} = 1,02 \cdot 10^{-3}$  g/ml, dobu průtoku čistého rozpouštědla  $t_0 = 69,00$  s a dobu průtoku polymerního roztoku = 318,19 s

$$\eta_{rel} = \frac{t}{t_0} = \frac{318,19 \text{ s}}{69 \text{ s}} = 4,61 \quad (21)$$

$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 = 4,61 - 1 = 3,61 \quad (22)$$

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} = \frac{3,61}{0,00102 \text{ g/ml}} = 3\,554,36 \text{ ml/g} \quad (23)$$

$$\eta_{inh} = \frac{\ln \eta_{rel}}{c} = \frac{\ln 4,61 \text{ ml/g}}{0,00102 \text{ g/ml}} = 1\,504,42 \text{ ml/g} \quad (24)$$

Rovnice regrese získaná z lineární závislosti  $\left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right)$  na  $c$  (dle Hugginse, Rov. 25, 26)

a  $\left(\frac{\ln \eta_{rel}}{c}\right)$  na  $c$  (dle Kramera, Rov. 27, 28):

$$y = 1\,319\,716x + 2\,203 \quad (25)$$

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = 1\,319\,716c + 2\,203 \quad (26)$$

$$y = -530\,889x + 2\,036 \quad (27)$$

$$\frac{\ln \eta_{rel}}{c} = -530\,889c + 2\,036 \quad (28)$$

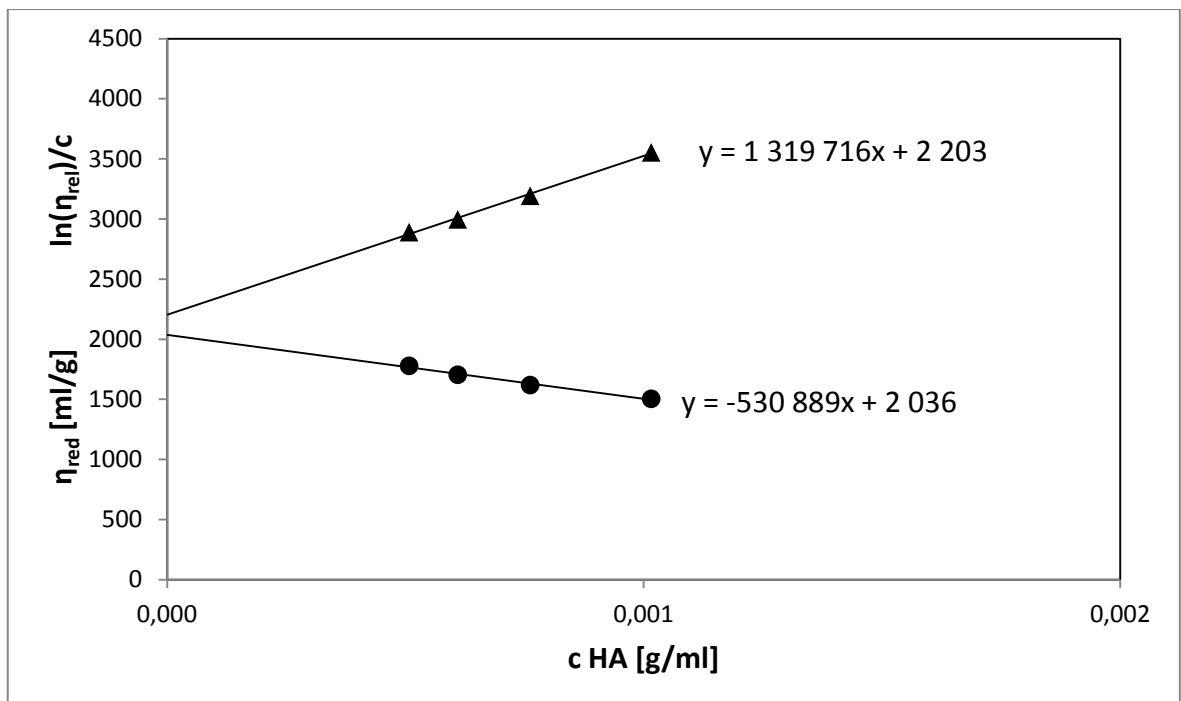
Z rovnic lze pak vyjádřit hodnoty limitního viskozitního čísla:

$$[\eta] = 2\,203 \text{ ml/g (dle Hugginse)}$$

$$[\eta] = 2\,036 \text{ ml/g (dle Kramera)}$$

$$k_H = \frac{1\,319\,716}{[\eta]^2} = \frac{1\,319\,716}{2\,203^2} = 0,27 \quad (29)$$

$$k_K = \frac{-530\,889}{[\eta]^2} = \frac{-530\,889}{2\,036^2} = -0,13 \quad (30)$$



Obr. 11. Stanovení limitního viskozitního čísla dle Hugginse ▲ a Kramera ● pro vzorek HA rozpuštěný v roztoku NaSCN, teplota měření 25 °C.

## 7 VÝSLEDKY A DISKUZE

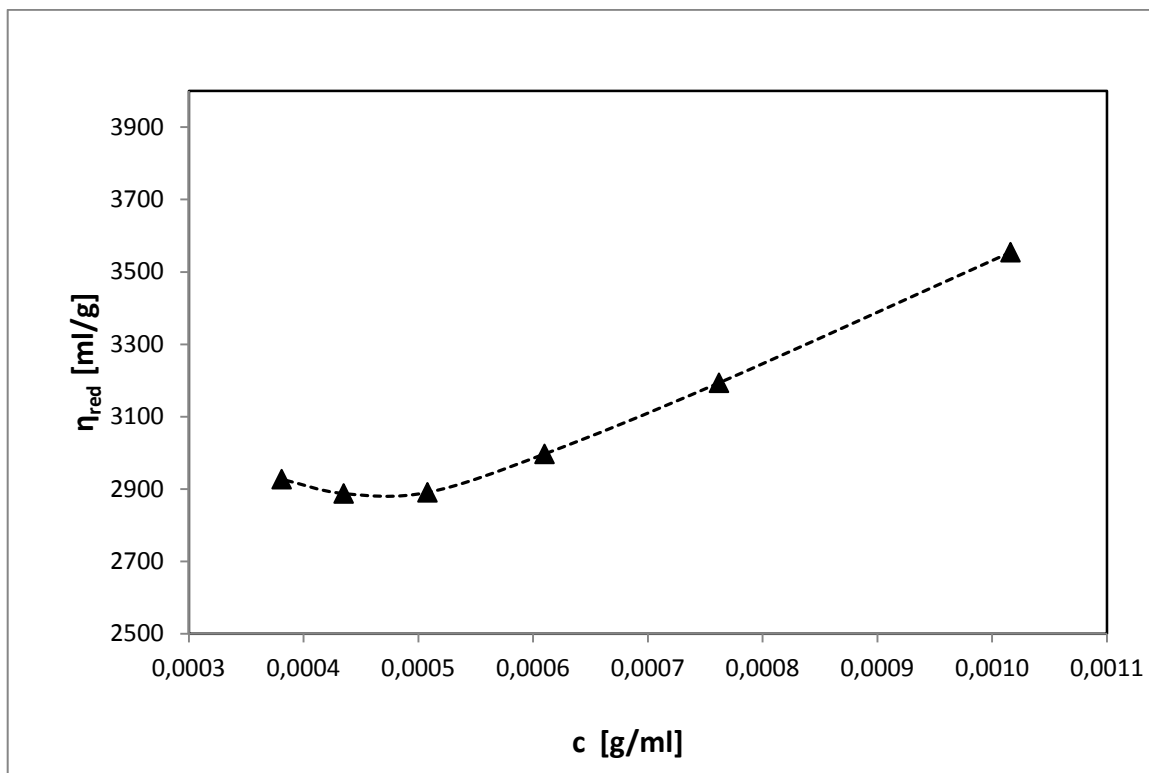
### 7.1 Volba typu soli a iontové síly vodných roztoků solí

Jak již bylo uvedeno výše, pro rozpouštění vzorku NaHY byly připravovány roztoky solí s ionty Hofmeisterovy řady, které jsou uvedeny v Tab. 4. Použité soli byly zvoleny tak, aby obsahovaly následující kombinace iontů: 1) chaotropní kationt a chaotropní aniont ( $\text{NH}_4\text{SCN}$ ), 2) kosmotropní kationt a kosmotropní aniont ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), 3) kosmotropní kationt a chaotropní aniont ( $\text{NaSCN}$  a  $\text{NaCl}$ ) a 4) chaotropní kationt a kosmotropní aniont ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ).

Volba iontové síly solných roztoků byla motivována skutečností, že představená viskozitní studie je součástí rozsáhlejší práce sledující vliv iontů na chování HA pomocí dalších metod. Jsou například využity dynamický rozptyl světla a měření povrchového napětí. Proto byla i pro viskozitní měření zvolena stejná iontová síla roztoků solí, a to 0,1 M (Tab. 5).

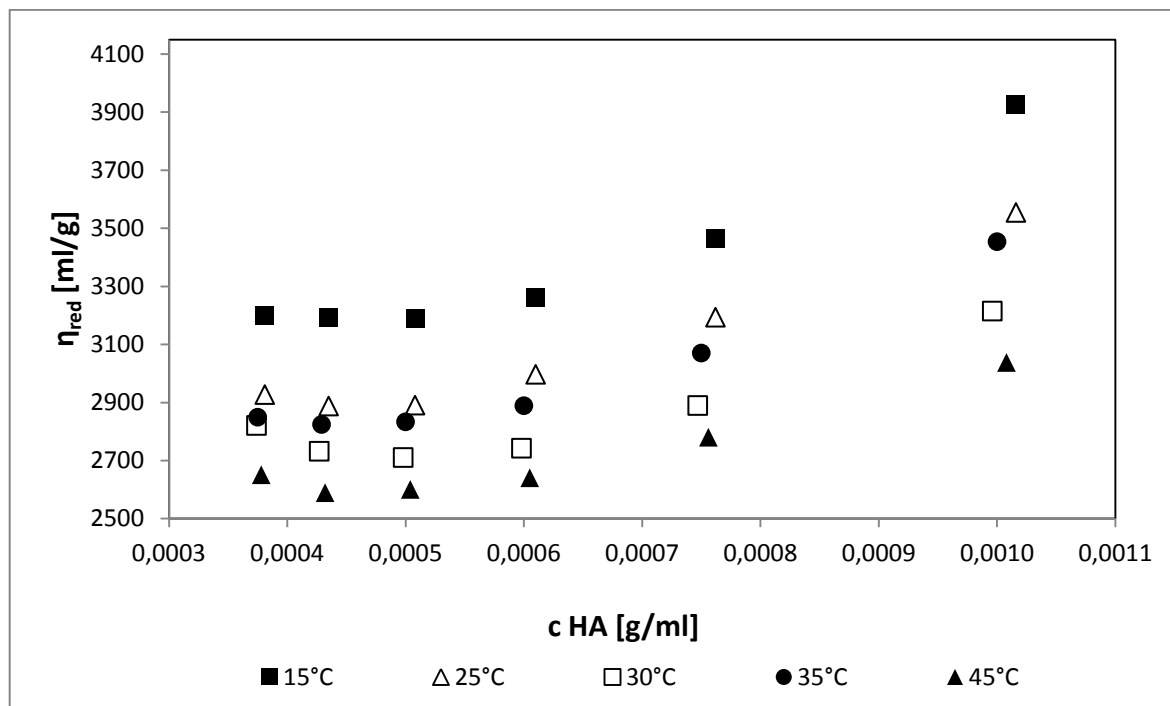
### 7.2 Vliv solí na viskozitu HA

Již v teoretické části práce bylo zmíněno, že HA je polymer řazený do skupiny polyelektrolytů. Polyelektrolyty jsou obecně polymery obsahující skupiny schopné disociace. Nesou ve své molekule velký počet iontových nábojů polyiontů, spolu s malými protiionty zajišťujícími elektroneutralitu systému [53]. Na rozdíl od běžných polymerů, pro které je závislost redukované viskozity  $\eta_{red}$  vynesena proti koncentraci polymeru lineární (Rov. 12), je viskozitní chování polyelektrolytů v roztocích odlišné. To je zřejmé z Obr. 12, který ukazuje charakteristický rys této závislosti, a to že  $\eta_{red}$  vs  $c$  lineární není, pro nízké koncentrace vykazuje zakřivení a  $\eta_{red}$  s klesající koncentrací roste.



Obr. 12. Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci pro polyelektrolyt.

Obdobné chování bylo zaznamenáno i pro vzorky hyaluronanu studované v této práci. Obr. 13 znázorňuje viskozitní chování HA v roztoku NaSCN o iontové síle 0,1 M, stanovené při teplotách 15 – 45 °C. Z grafu je zřejmé, že pro nízké koncentrace se hodnota  $\eta_{red}$  zvyšuje, a jak bylo naznačeno výše, závislost vykazuje nelineární chování. Obr. 13 zároveň ilustruje skutečnost, že s rostoucí teplotou viskozita roztoků HA postupně klesá, což je v souladu s teoretickými předpoklady. Obdobné chování bylo pozorováno i v případě roztoků HA ve všech ostatních solích s drobnými výjimkami, které jsou diskutovány dále v textu.



Obr. 13. Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci při teplotě 15 – 45 °C u Na-SCN.

Na tomto místě je třeba konstatovat, že koncentrace roztoků HA zvolené pro viskozitní měření jsou, oproti koncentracím běžných polymerů (např. polystyrenu), nízké. Obvyklý koncentrační rozsah pro viskozitní měření běžných polymerů je (v závislosti na molekulové hmotnosti) 1 – 0,2 %, zatímco v případě HA se pohybovaly koncentrace v intervalu 0,1 – 0,02 %. Důvodem této volby byla vysoká viskozita studovaných roztoků HA (molekulová hmotnost vzorku byla  $2,1 \cdot 10^6$  g/mol) a tedy dlouhé průtokové časy těchto roztoků kapilárou viskozimetru, které činily až 400 s. Vzhledem ke skutečnosti, že při viskozitních měřeních musí být průtokový čas rozpouštědla (tedy vodného roztoku soli), které protéká stejnou kapilárou, alespoň 100 s, aby bylo možno zanedbat při výpočtu vliv kinetické energie [41], a vzhledem k dlouhým průtokovým časům roztoku HA bylo tedy nutno použít tyto nízké koncentrace.

Srovnáme-li viskozitní chování HA v roztocích solí (Tab. 6 a 7) s chováním jejích roztoků v demineralizované vodě [9], jsou na první pohled zřejmé velké rozdíly. Limitní viskozitní číslo HA stanovené v demineralizované vodě je oproti jeho hodnotám stanoveným v roztocích solí výrazně vyšší a činí 5940 ml/g (hodnota převzata z disertační práce L. Grundělové) [9]. V roztocích solí pak byly stanoveny jeho hodnoty vždy nižší než 2800 ml/g. Vyšší viskozita HA ve vodě, ve srovnání s viskozitou v roztocích solí, je



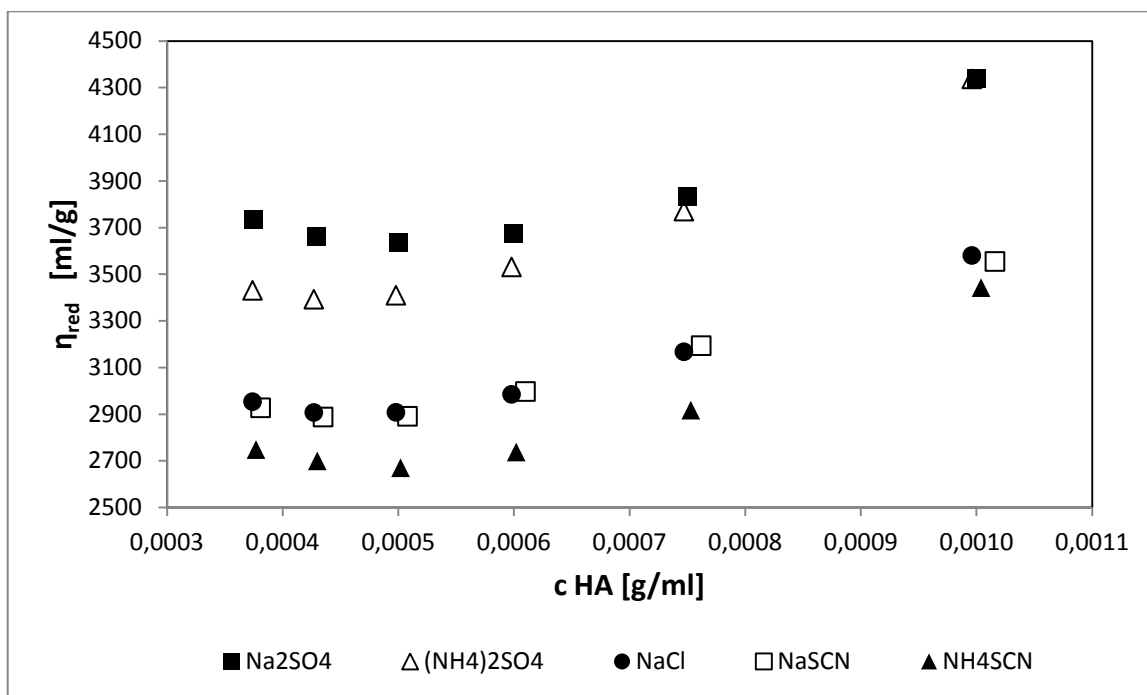
způsobena rozdílnou konformací polymerních řetězců v daném rozpouštědle. Zatímco ve vodě jsou řetězce HA více nataženy, v přítomnosti iontů je struktura HA kompaktnější, a viskozita polymeru se snižuje. Důvodem většího sbalení polymerního klubka v roztocích solí je efekt stínění elektrostatických repulzí mezi podobnými náboji umístěnými podél polymerního řetězce, způsobený přidavkem nízkomolekulární soli. Ten má za následek pokles viskozity polymerního roztoku.

Uvedený tvar viskozitní závislosti rovněž ukazuje, že zvolená iontová síla roztoku nebyla zcela postačující pro to, aby byla viskozitní závislost lineární v celém studovaném koncentračním rozsahu hyaluronanu. Podle závěrů práce [51] zahrnují nejběžnější podmínky pro studium HA rozpuštění polymeru v roztoku soli o dostatečné iontové síle ( $I > 0.1$  M), např. NaCl při neutrálním pH, a teplotě 20 – 37 °C. Obecně je možné konstatovat, že vodný roztok NaCl je nejvíce používaným rozpouštědlem pro viskozitní měření HA a její chování v tomto rozpouštědle je v literatuře popsáno nejlépe. Důvodem je, že tato situace simuluje chování HA v kontaktu s tělními tekutinami a tkáněmi.

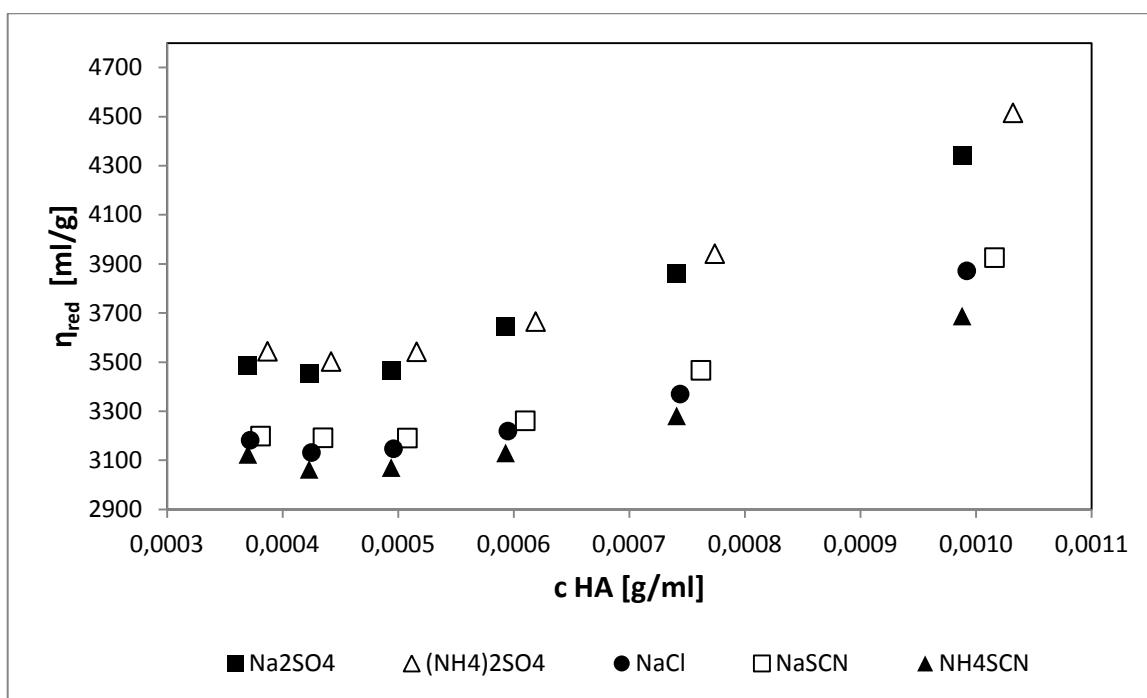
Na Obr. 14 jsou uvedeny závislosti redukované viskozity na koncentraci polymeru rozpuštěného v jednotlivých solích Hofmeisterovy řady, stanovené při 25 °C. Na dalších obrázcích (Obr. 15 – 18) pak jsou stejné závislosti stanovené při ostatních studovaných teplotách (15, 30, 35 a 45 °C). Z Obr. 14 je zřejmé, že svým viskozitním chováním se vzájemně podobají roztoky HA v síranech, jejichž viskozita je obecně nejvyšší, a závislosti  $\eta_{red}$  vs  $c$  leží výše ve srovnání s křivkami pro HA rozpuštěnou v obou solích, kde je aniontem thiokyanatan a chlorid. Ty leží ve spodní části grafu závislosti redukované viskozity na koncentraci.

Obdobný výsledek ukazují i další grafy závislosti  $\eta_{red}$  vs  $c$  (Obr. 15 až 18). Nejvyšších viskozit dosahují vždy vzorky HA, pokud jsou rozpuštěny ve vodných roztocích obou solí, kde aniontem jsou sírany. S výjimkou situace při teplotě 15 °C byla nejvyšší viskozita stanovena vždy pro HA v roztoku síranu sodného. Naopak nejnižší viskozita byla naměřena pro HA v thiokyanatanu amonném, s výjimkou teploty 35 °C (zde je nejnižší viskozita HA rozpuštěné v NaCl). Stejně pořadí viskozit HA rozpuštěné v jednotlivých solích bylo pozorováno při teplotách 25 a 45 °C. V případě měření při teplotě 15 °C byl rozdíl pouze v pořadí viskozit HA v roztocích síranů, při teplotě 30 °C pak v pořadí v roztocích chloridu sodného a thiokyanatanu sodného, kdy HA v NaCl má vyšší viskozitu než v NaSCN. Výjimka z poměrně systematického chování HA v roztocích solí byla pozorována v případě HA v NaSCN charakterizované při teplotě 35 °C, kde viskozit-

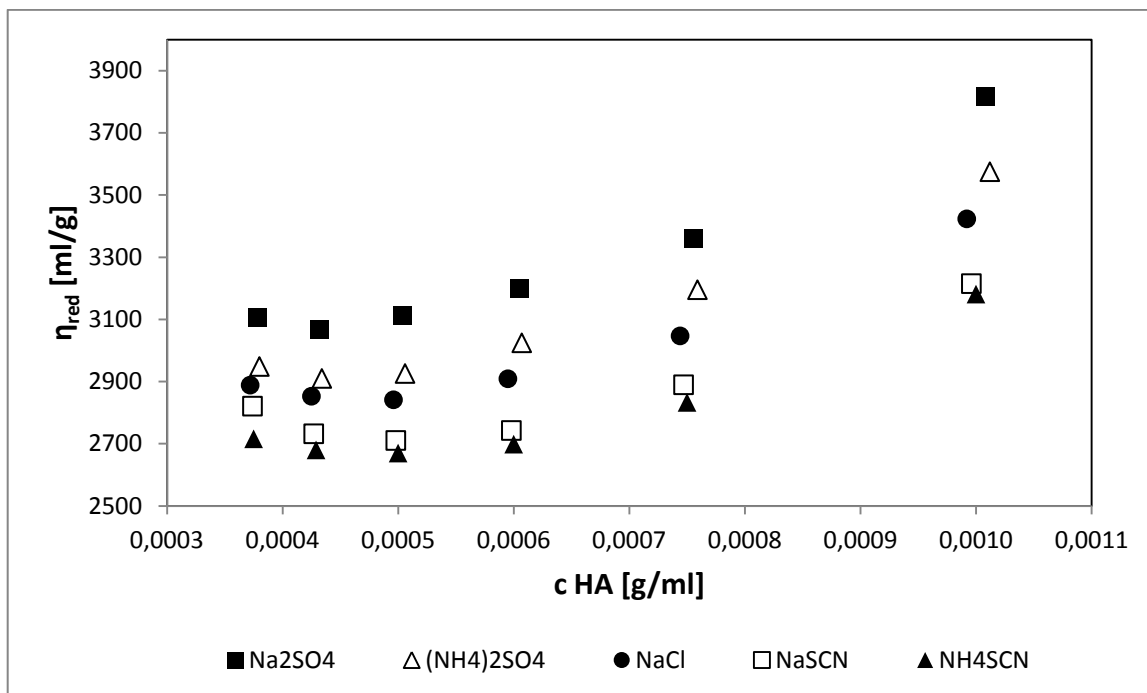
ní HA v thiokyanatanu sodném leží mezi viskozitními křivkami zaznamenanými pro HA v roztocích obou síranů (Obr. 17).



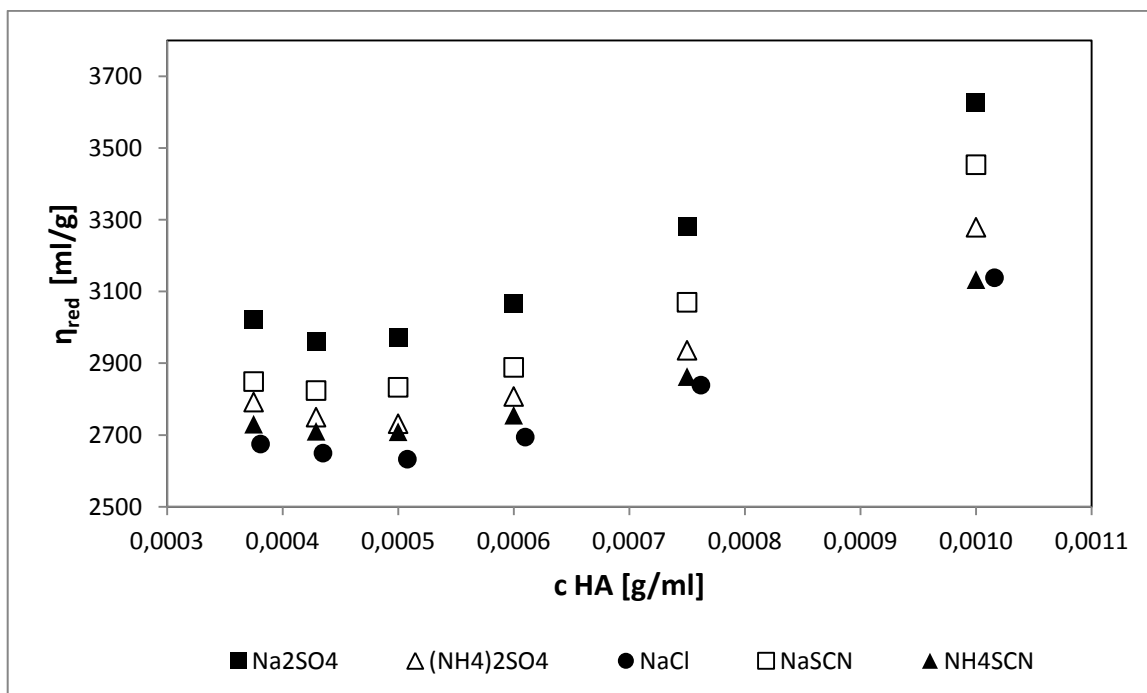
Obr. 14. Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci pro HA v roztocích studovaných solí při teplotě 25 °C.



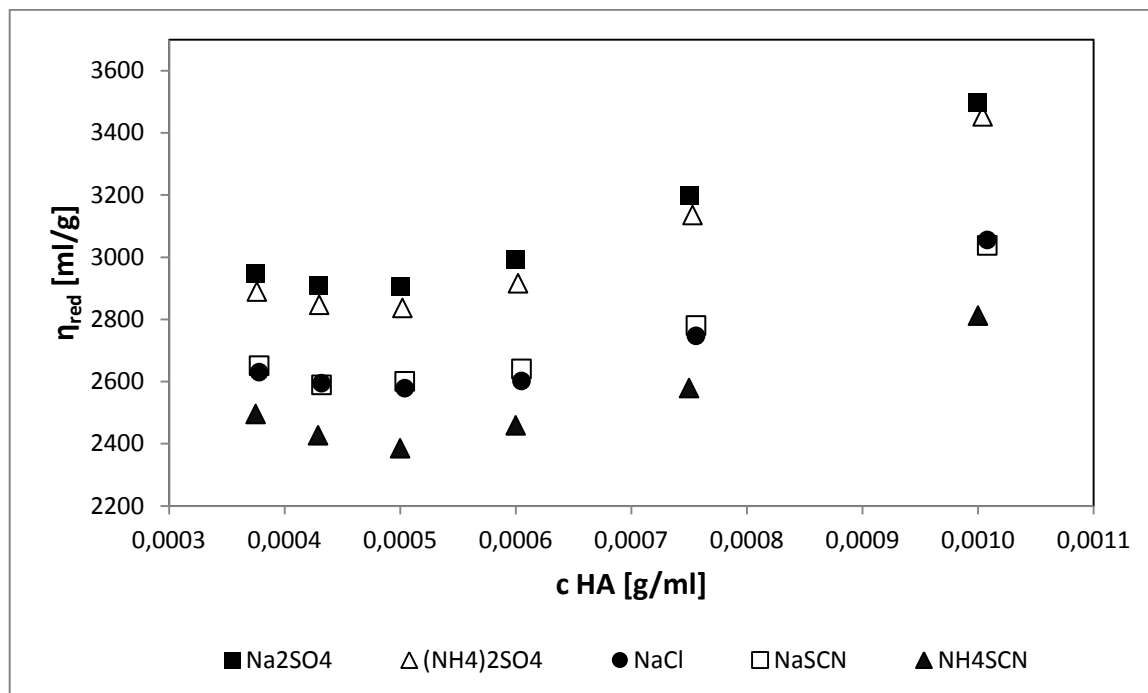
Obr. 15. Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci pro HA v roztocích studovaných solí při teplotě 15 °C.



Obr. 16. Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci pro HA v roztocích studovaných solí při teplotě 30 °C.



Obr. 17. Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci pro HA v roztocích studovaných solí při teplotě 35 °C.



Obr. 18. Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci pro HA v roztocích studovaných solí při teplotě 45 °C.

Hodnoty LVČ stanovené z výše uvedených grafů podle Hugginsovy rovnice jsou uvedeny v Tab. 6 a na Obr. 19. Pro jejich stanovení pomocí lineární regrese byly použity pouze hodnoty z lineární části závislosti  $\eta_{red}$  vs  $c$  (rozmezí koncentrací  $5,0 - 10,0 \cdot 10^{-4}$  g/ml). Stejně tomu tak bylo také u LVČ vypočítaných dle Kramerovy rovnice (Tab. 7, Obr. 20).

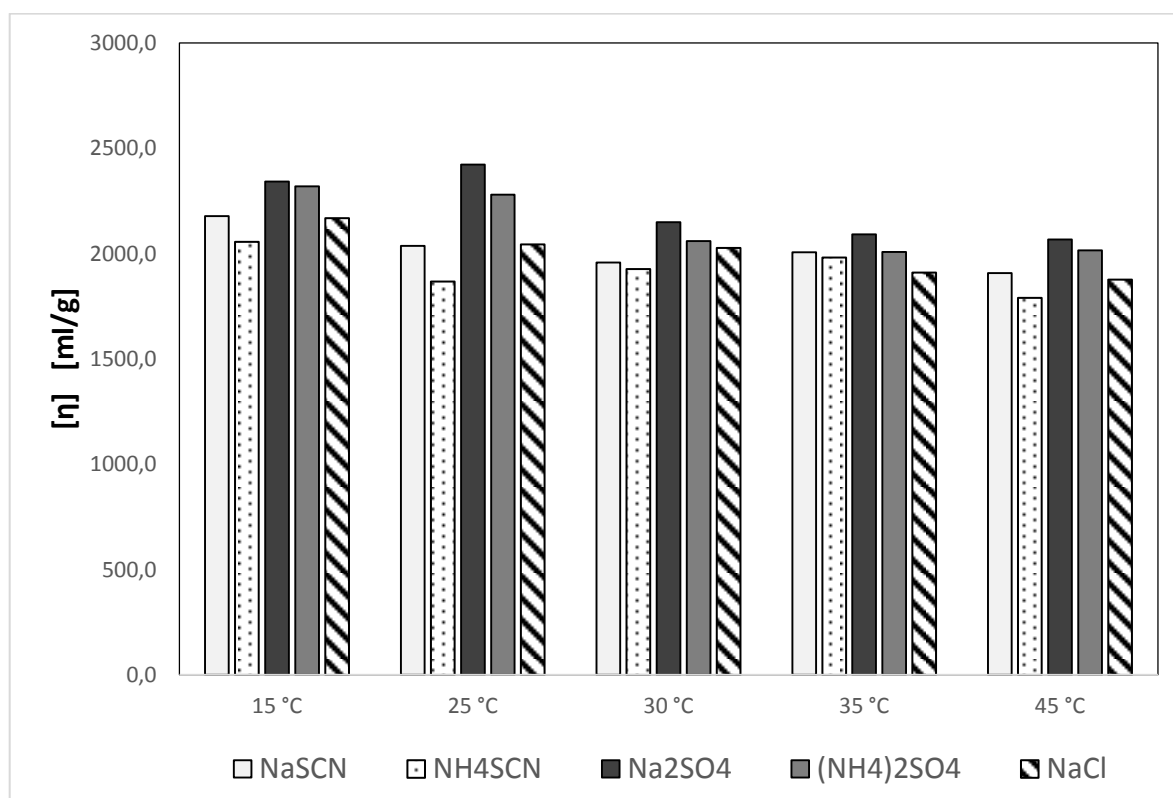
Z Obr. 19 a Tab. 6 lze pozorovat, že při teplotách 15; 25 a 45 °C LVČ hyaluronanu stanovené v roztocích solí roste v tomto pořadí:  $\text{NH}_4\text{SCN} < \text{NaCl} < \text{NaSCN} < (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 < \text{Na}_2\text{SO}_4$ . U hodnot limitních viskozitních čísel stanovených při teplotě 30 °C byl zaznamenán rozdíl pouze v pořadí NaSCN a NaCl a při teplotě 35 °C v pořadí NaCl a  $\text{NH}_4\text{SCN}$ . Zároveň je však třeba konstatovat, že hodnoty LVČ pro HA v roztoku NaSCN a NaCl jsou si velmi podobné.

Obdobných výsledků bylo dosaženo při stanovení LVČ dle Kramera. Z Obr. 20 je zřejmé, že hodnoty limitního viskozitního čísla pro HA ve studovaných roztocích rostou obdobným způsobem jako v předchozím případě (pro teploty 15; 25 a 45 °C). Při teplotě 30 °C se opět objevil rozdíl v pořadí hodnot LVČ pro HA v roztoku NaSCN a NaCl a při teplotě 35 °C v pořadí LVČ v roztocích NaCl, NaSCN a  $\text{NH}_4\text{SCN}$ . Korelace mezi daty získanými pomocí Hugginsovy a Kramerovy rovnice vychází z teoretických předpokladů uvedených v kapitole 3.2.2, kdy by obě rovnice měly při extrapolaci k nulové

koncentraci roztoku poskytnout společný průsečík a jedinou hodnotu LVČ. V našem případě tomu tak není, hodnoty se mírně liší vzhledem ke skutečnosti, že extrapolace nezahrnovala hodnoty  $\eta_{red}$  pro nejnižší koncentrace, na kterých se již projevilo zakřivení závislosti  $\eta_{red}$  vs  $c$  typické pro polyelektrolyty v roztocích s nedostatečně vysokou iontovou silou.

Tab. 6. Hodnoty limitních viskozitních čísel [ml/g] stanovené podle Hugginse pro HA rozpuštěnou v roztocích uvedených solí.

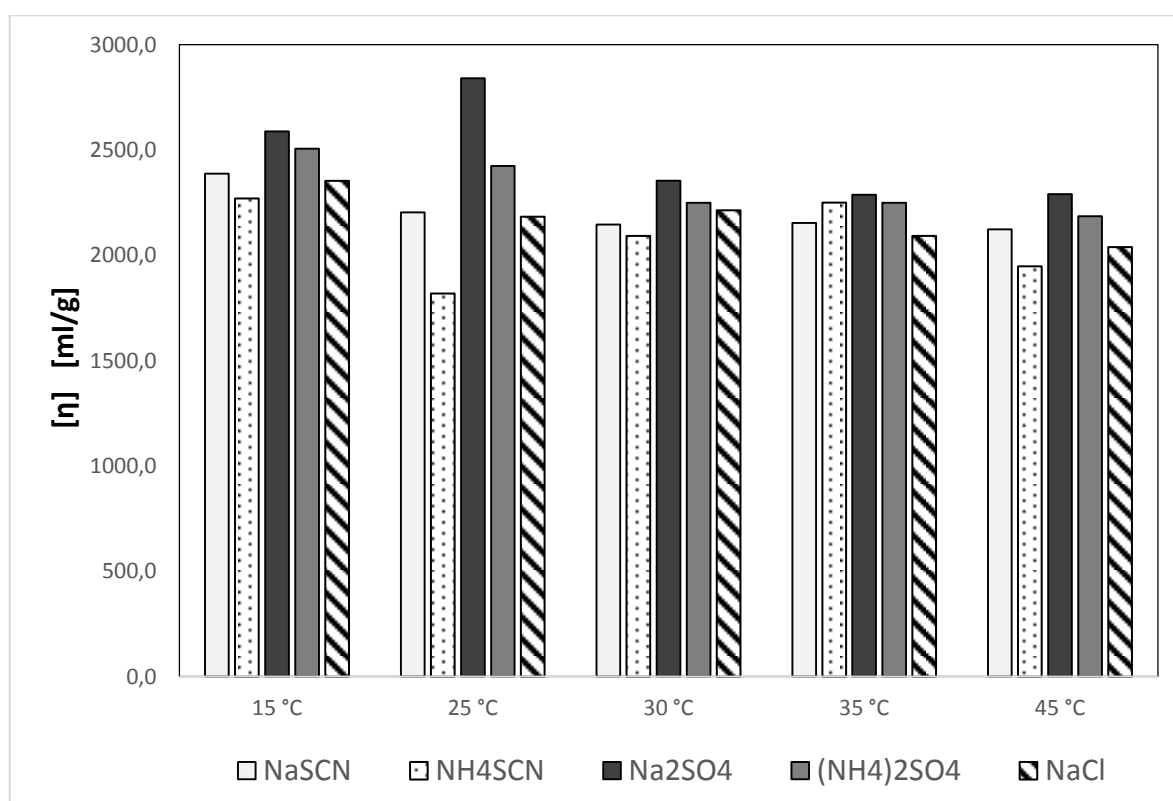
	Teplota stanovení [°C]				
	15	25	30	35	45
	<b>Limitní viskozitní číslo [ml/g]</b>				
<b>NaSCN</b>	2177	2036	1957	2005	1907
<b>NH<sub>4</sub>SCN</b>	2055	1868	1928	1982	1791
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	2341	2423	2149	2090	2066
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	2319	2280	2059	2007	2015
<b>NaCl</b>	2169	2044	2027	1911	1877



Obr. 19. Limitní viskozitní čísla stanovená pro HA v roztocích solí Hofmeisterovy řady dle Hugginse.

Tab. 7. Hodnoty limitních viskozitních čísel [ml/g] stanovené podle Kramera.

	Teplota stanovení [°C]				
	15	25	30	35	45
	Limitní viskozitní číslo [ml/g]				
<b>NaSCN</b>	2387	2203	2145	2153	2122
<b>NH<sub>4</sub>SCN</b>	2270	1819	2093	2250	1948
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	2588	2840	2354	2287	2290
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	2505	2423	2248	2250	2185
<b>NaCl</b>	2354	2184	2215	2092	2039



Obr. 20. Limitní viskozitní čísla stanovaná dle Kramera.

Problematikou konformačních změn HA v roztocích se ve své práci zabývali i Cowman a Matsuoka [51], kteří došli k závěru, že kromě elektrostatických interakcí může přispívat ke kondenzaci polyelektrolytu i efekt hydratace. Jako kondenzace se zde označuje jev, při kterém se mohou protiionty vázat na polyionty, dokud hustota náboje mezi sousedními monomerními náboji umístěnými podél polymerního řetězce neklesne pod určitou kritickou hodnotu. Vysoce hydrofilní polymery zvyšují strukturovanost vody ve své bezprostřední blízkosti. Způsobem, který je teoreticky obdobný hydrofobnímu efektu, vede proces hydratace ke zvýšení entropie molekul vody uvolněných spojením dvou polymerních

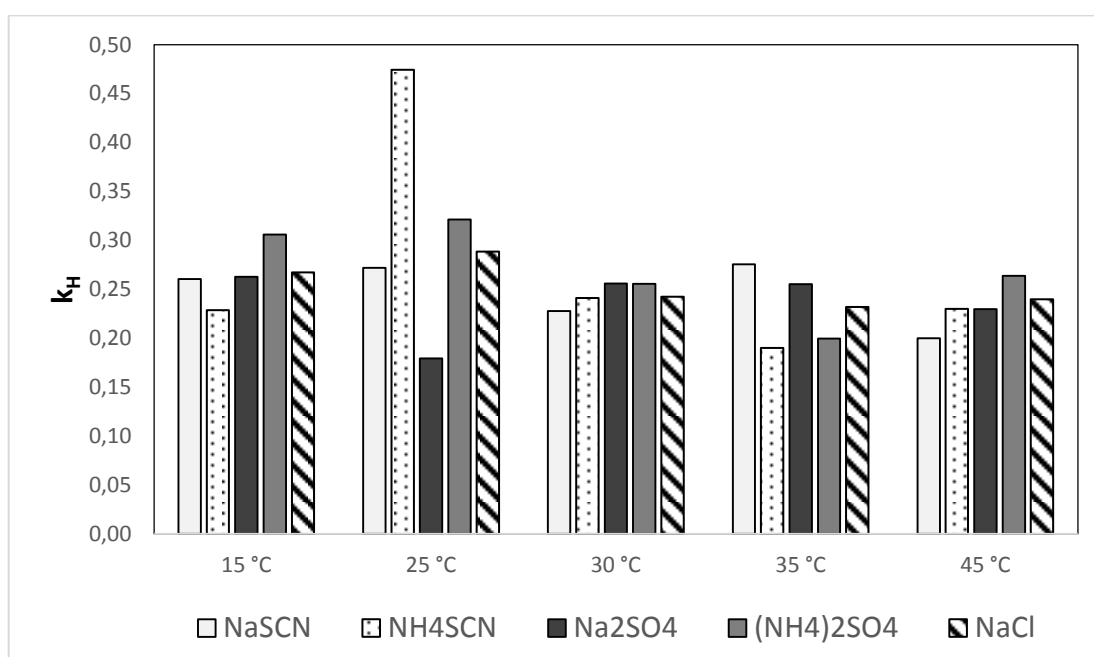
segmentů. Spojené povrchy polymeru si však mohou ponechat jednu nebo více vrstev molekul vody, které segmenty polymeru nadále propojují. Zajímavým aspektem tohoto příspěvku hydratace ke kondenzaci polyelektrolytu je skutečnost, že chaotropní ionty, které mají schopnost rozrušit strukturu vody v okolí polymeru („bulk water“), budou působit ve prospěch smrštění klubka, protože rozdíl entropie mezi vodou vázanou na řetězec polyelektrolytu a okolní vodou („bulk water“) se zvýší.

### 7.2.1 Hugginsův koeficient

Kromě  $[\eta]$  lze z viskozitních měření (Rov 7 – 13) získat i další důležitý parametr, který popisuje chování polymerního klubka v roztoku, a to Hugginsův koeficient ( $k_H$ ). Jeho hodnoty pro HA ve studovaných roztocích solí jsou shrnuty v Tab. 8 a Obr. 21. Jak již bylo uvedeno v teoretické části, Hugginsův koeficient slouží k popisu interakce polymer – rozpouštědlo a dle teorie nabývá hodnoty kolem 0,3 u polymerů v dobrém rozpouštědle a 0,8 až 1,0 u polymerů ve špatném rozpouštědle. Koeficient je tedy závislý na charakteru rozpouštědla a molekulové hmotnosti polymeru. Z teoretického hlediska jsou interakce mezi polymerem a rozpouštědlem poměrně složité a není jednoduché je popsat [41]. Dostupné teoretické práce říkají, že koeficient je klesající funkcí expanze polymerního klubka (jeho velikosti), vyjádřené faktorem  $\alpha_\eta$ . Ten pak závisí na molekulové hmotnosti a síle interakce polymer-rozpouštědlo. Proto by  $k_H$  měl být nižší v dobrých rozpouštědlech a u polymerů o vyšší molekulové hmotnosti [41]. Hodnoty  $k_H$  pro HA byly publikovány řadou výzkumných týmů a jsou shrnuty v teoretické části v Tab. 3, která uvádí data získaná měřeními při 25 °C pro HA rozpuštěnou v NaCl. Na základě těchto dat je možno konstatovat, že hodnoty  $k_H$  se pro měřené vzorky liší a pohybují se v intervalu 0,33 – 0,57. Z měření provedených v této diplomové práci (Tab. 8) lze shrnout, že  $k_H$  pro HA v daných roztocích solí nabývala, s výjimkou HA v roztoku  $\text{NH}_4\text{SCN}$  při 25 °C, hodnot ležících v intervalu 0,20 – 0,30. Tyto hodnoty jsou ve srovnání s hodnotami publikovanými o něco nižší a nacházejí se na spodní hranici intervalu uvedeného v Tab. 3. Nelze však opomenout skutečnost, že tato data z teoretické části práce jsou stanovena v roztocích chloridu sodného a pro polymery, které mají jinou molekulovou hmotnost, než námi studovaný polymer. Z Tab. 8 nelze rovněž učinit žádný závěr o vlivu teploty na hodnotu  $k_H$ .

Tab. 8. Hodnoty Hugginsových konstant pro jednotlivé soli při měřených teplotách

	Teplota stanovení [°C]				
	15	25	30	35	45
	$k_H$				
NaSCN	0,26	0,27	0,23	0,28	0,20
NH <sub>4</sub> SCN	0,23	0,47	0,24	0,19	0,23
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,26	0,18	0,26	0,26	0,23
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,31	0,32	0,26	0,20	0,26
NaCl	0,27	0,29	0,24	0,23	0,24



Obr. 21. Hugginsovy konstanty pro HA v roztocích studovaných solí.

### 7.3 Zpracování viskozimetrických dat podle Fousse

Důležitými parametry viskozity roztoků polyelektrolytů jsou koncentrace polymeru a jeho ionizační stupeň. Vzhledem k závislosti na ionizačním stupni může docházet k tomu, že elektrostatické síly přítomných skupin brání sbalení řetězce. Vlastnosti takových roztoků lze pak silně ovlivnit právě přidáním jednoduchých solí, např. NaCl, což způsobí zvýšení koncentrace protiiontů, a zároveň jsou do systému zaváděny malé ionty stejného náboje, jako nese polyiont [53]. V roztoku bez přidání solí působí mezi náboji hlavního řetězce coulombické interakce, které mohou způsobovat natažení jednotlivých částí řetězce polymeru, a ovlivňovat tak reologické chování polyelektrolytu. Tyto elektrostatické interakce mohou být vhodným přidáním protiiontu zastíněny, což umožňuje molekule polymeru



zaujmout sbalenější a kompaktnější konformaci. Tuhost polymerního řetězce v roztoku pak bude udávat jeho stupeň sbalení.

Jestliže je viskozita stanovována u roztoků bez přídavku solí, je nutné uvažovat také vliv interakce nabitých řetězců a výsledky nelze interpretovat jen na základě smrštění nebo rozpletení polymerního klubka. U nenabitých polymerů může být vyloučen vliv interakcí extrapolací  $\eta_{red}$  na nulovou koncentraci polymeru v roztoku. Tvar jednotlivých makromolekul pak málo závisí na koncentraci roztoku. U polyelektrolytů dochází k úplně jiné situaci. Pokud roste zředění, roste i objem dostupný pro protionty. Ty se mohou vzdálit více od polyiontu, a snížit tak stínění vázaných nábojů. Dochází tak k nárůstu odpuzivých sil a snaze polyelektrolytů se rozpínat. Redukovaná viskozita polyelektrolytů pak při ředění roste, závislost  $\eta_{red}$  vs  $c$  je zakřivená a extrapolace je obtížná. Z tohoto důvodu Fuoss navrhl postup pro zpracování podobných dat podle Rov. 20, podle níž by  $\frac{1}{\eta_{red}}$  měla být lineární funkcí  $\sqrt{c}$ . Tento postup s úspěchem použili například Yoo a kol. [54] pro popis viskozitního chování methoxy-pektinů.

Jak již bylo uvedeno, charakteristickým rysem chování HA v roztocích je vliv přítomnosti solí na chování jejích zředěných roztoků. Je typické, že zvyšováním koncentrace solí dochází ke sbalování polymerního klubka, a tím pádem ke snižování viskozity. Tento jev byl již výše v textu vysvětlen pomocí stínícího vlivu přidaných jednoduchých solí, které ovlivňují elektrostatické interakce polymeru. V případě HA je pokles viskozity výsledkem potlačení elektrostatického odpuzování mezi disociovanými karboxylovými skupinami.

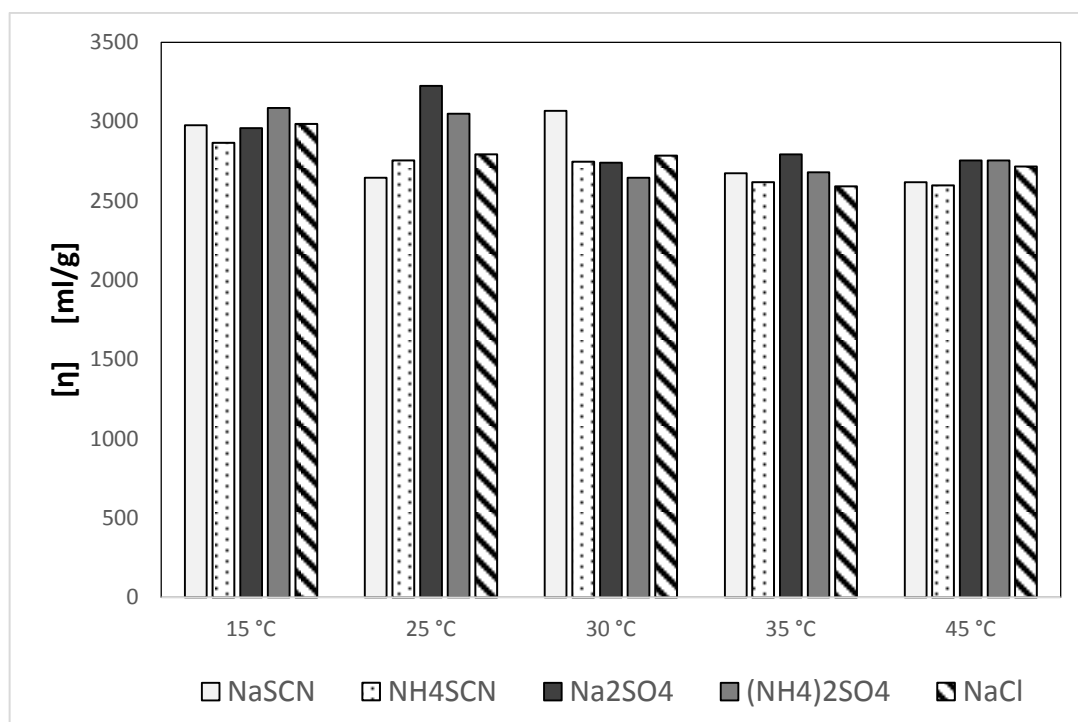
Hodnoty limitního viskozitního čísla zpracované podle této metody jsou uvedeny v Tab. 9 a graficky znázorněny na Obr. 22. Je třeba konstatovat, že ani tato extrapolace určená pro zpracování viskozitní dat polymerů v roztocích s nízkou iontovou silou neposkytla lineární závislost v celém studovaném koncentračním rozsahu. Vzhledem k tomu, že pro stanovení byla použita viskozitní data měřená při nižších koncentracích ( $3,7 - 6,0 \cdot 10^{-4}$  g/ml), takto stanovené LVČ nabývaly vyšších hodnot. Podobně jako u stanovení dle Hugginse a Kramera vykazovaly vzorky hyaluronanu rozpuštěné v roztocích síranů vyšší hodnoty LVČ než vzorky v roztocích thiokyanatanů. Jedinou výjimku představovalo měření při 30 °C, kde tomu bylo naopak.

Výsledky této části práce ukazují, že při nízké iontové síle jsou hodnoty LVČ hyaluronanu vyšší, než je tomu v případě, kdy je polymer rozpuštěn v roztocích s vyšší iontovou silou. Tuto skutečnost potvrzují i literární studie [58] [59].

Ze souhrnného zhodnocení postupů použitých pro vyhodnocení viskozitních dat je možno učinit závěr, že i přes to, že se absolutní hodnoty LVČ liší, všechny metody vedou ke stejnému závěru, a sice že polymerní řetězec HA je více sbalený ve vodných roztocích thio- kyanatanů než v roztocích síranů.

Tab. 9. Hodnoty limitních viskozitních čísel [ml/g] pro HA podle Fuosse.

	Teplota stanovení [°C]				
	15	25	30	35	45
<b>NaSCN</b>	2976	2646	3067	2674	2618
<b>NH<sub>4</sub>SCN</b>	2865	2755	2747	2618	2597
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	2959	3424	2740	2793	2755
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	3086	3049	2646	2681	2755
<b>NaCl</b>	2985	2793	2786	2591	2717



Obr. 22. Limitní viskozitní čísla stanovená pro HA dle Fuosse.

#### 7.4 Srovnání retenčního chování vzorků hyaluronanu při chromatografické analýze a výsledků z viskozimetrie

Výsledky z viskozimetrických měření byly srovnány s analýzou stejného vzorku hyaluronanu provedenou pomocí gelové permeační chromatografie (GPC) [55]. Tato separační chromatografická metoda slouží běžně ke stanovení molekulové hmotnosti polymerů [56]. Při analýze je zředěný roztok polymeru nanesen do chromatografické kolony obsahující náplň s porézními částicemi. Prostory mezi částicemi a póry gelové náplně jsou vyplněny rozpouštědlem. Po nanesení vzorku na vstup dochází k separaci analyzovaných látek mezi mobilní a stacionární fází. Molekuly jsou při průchodu kolonou zadržovány podle toho, jak pronikají do pórů chromatografické náplně, ve kterých se nachází rozpouštědlo, a to tak, že nejmenší molekuly difundují až dovnitř gelové náplně, což zpomaluje jejich průchod kolonou. Molekuly se střední velikostí proniknou do větších pórů gelu. Molekuly, s rozměry přesahujícími velikost pórů, procházejí kolonou bez zadržování a do gelové náplně nepronikají vůbec. Dělení probíhá primárně podle hydrodynamického objemu polymerních molekul a malé molekuly, u kterých je klubko více sbaleno, vycházejí z kolony později (v delších retenčních časech) než polymerní klubka, která jsou expandovaná [57]. Z hodnot retenčních časů  $R_T$  lze tedy usuzovat velikost polymerního klubka a porovnat ji kvalitativně s viskozimetrickým měřením.

Na Obr. 23 a v Tab. 10 jsou znázorněny retenční časy vzorku hyaluronanu o stejné molekulové hmotnosti, jako je studována v této diplomové práci. V práci [55] bylo zjištěno, že retenční časy zaznamenané pro vzorky HA byly delší při analýze v mobilní fázi obsahující sírany, naopak kratší v mobilní fázi s thiokyanatany. Toto chování by tedy znamenalo, že klubko HA v přítomnosti síranů zůstává více sbaleno, což prodlužuje retenční časy, zatímco v přítomnosti thiokyanatanů dochází k jeho rozbalování (Obr. 24) a retenční časy při průchodu kolonou by se měly zkracovat.

Viskozimetrická měření však ukázala opačný výsledek. Na grafech závislosti redukované viskozity na koncentraci (Obr. 13 – 18) lze vidět, že křivky zaznamenané pro HA v roztocích obou síranů leží vždy v horní části grafu, a mají tedy vyšší viskozitu (více expandované klubko) ve srovnání s HA měřenou v roztocích thiokyanatanů a chloridu sodného, jejichž viskozitní křivky leží ve spodní části grafu. Z této skutečnosti by pak mělo vyplývat, že sírany snižují viskozitu HA s menší účinností a polymerní klubka by v jejich

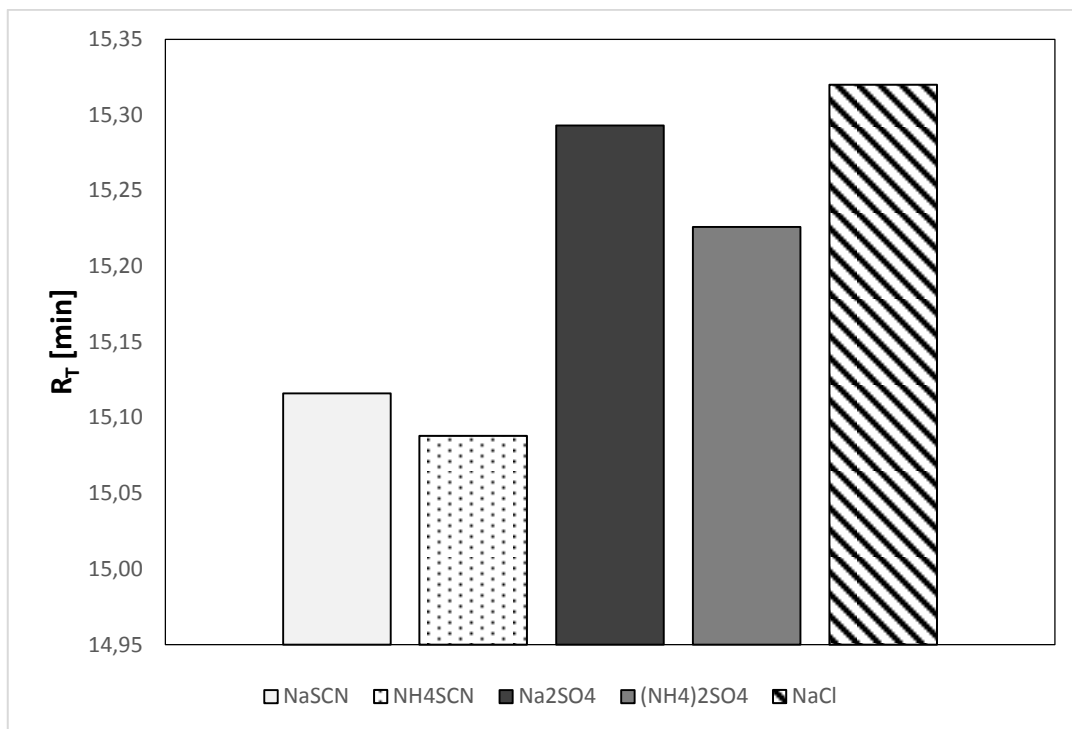
přítomnosti měla být více rozbalena. V přítomnosti thiokyanatanů, které viskozitu snižují více, by měla klubka zůstat naopak sbalena.

Pro vysvětlení tohoto nesouladu mezi chováním HA při chromatografické analýze a viskozimetrickém stanovení lze navrhnout následující hypotézy:

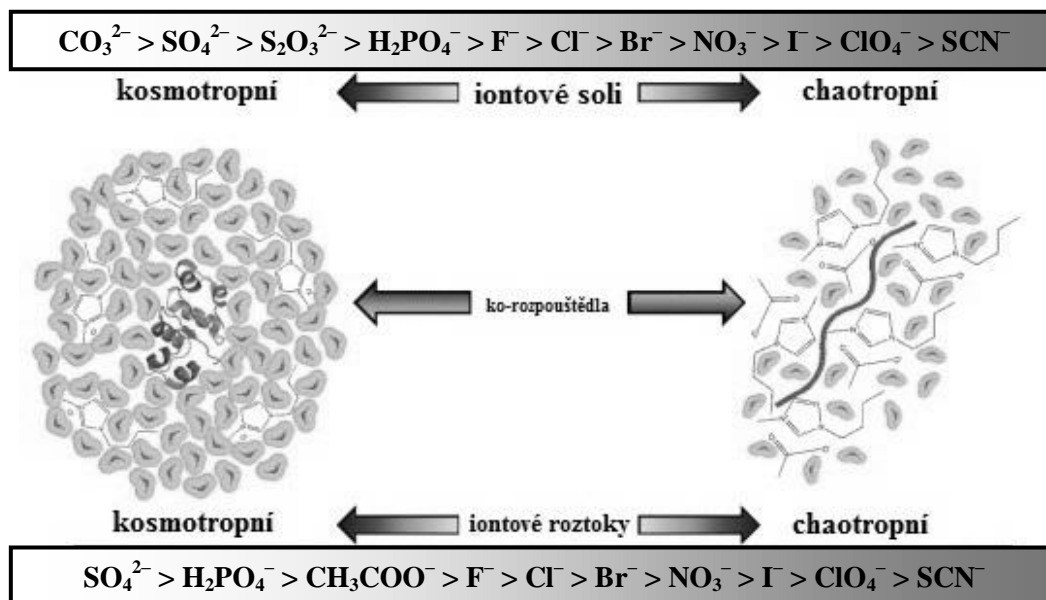
1. **Vliv interakce polymeru s náplní kolony.** Při GPC analýze se předpokládá, že separace probíhá pouze na základě síťového efektu a nedochází k žádným interakcím polymeru s náplní kolony. V případě polyelektrolytů tomu tak není a k různým interakcím mezi polymerem a kolonovou náplní docházet může. Mohou to být např. intermolekulární a intermolekulární elektrostatické interakce či adsorpce. Tyto nežádoucí vlivy lze eliminovat působením zvýšené iontové síly, změnou pH mobilní fáze či přidávkem organického rozpouštědla. Lze se proto domnívat, že iontová síla roztoků solí použitých jako mobilní fáze nebyla dostatečná k eliminaci interakcí mezi HA a náplní kolony, což ovlivnilo retenční časy polymeru.
2. **Vliv smykových sil na solvatační obal polymerního klubka:** Při průchodu HA porézní náplní GPC kolony jsou polymerní klubka vystavena značným smykovým silám. Je tedy možno spekulovat, že při průchodu polymeru rozpuštěného v roztoku kosmotropního iontu, kde je typická přítomnost solvatační vrstvy, je působením smykových sil tato solvatační vrstva odstraněna, což opět ovlivní retenční časy.

Tab. 10. Naměřené retenční časy v GPC pro HA o molekulové hmotnosti  $2,1 \cdot 10^6$  g/mol pro  $N = 3$  podle [55].

Použitá sůl	NaSCN	NH <sub>4</sub> SCN	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NaCl
<b>R<sub>T</sub> [min]</b>	15,12 ± 0,02	15,09 ± 0,03	15,29 ± 0,03	15,23 ± 0,01	15,32 ± 0,01



Obr. 23. Retenční časy maxim chromatografických piků ( $R_T$ ) vzorku HA o  $M_W = 2,1 \cdot 10^6$  g/mol ve studovaných solích.



Obr. 24. Interakce molekuly proteinu s iontovými roztoky [29].

## 7.5 Srovnání výsledků z viskozimetrie s velikostí částic stanovenou dynamickým rozptylem světla

Výsledky z viskozimetrických měření byly srovnány rovněž s měřením velikostí částic pomocí dynamického rozptylu světla [9]. Měřením intenzity rozptýleného světla je možné u polymerů ve zředěných roztocích určit molekulovou hmotnost, tvar a velikost molekuly. Dynamický rozptyl světla je důležitou experimentální metodou široce využívanou pro určení velikostí částic v koloidních systémech. Měření je založeno na vysílání světla z laserového zdroje dopadajícího do polymerního roztoku. Interakcí světla s částicemi v roztoku dochází k fázovému posunu, který je doprovázen změnou frekvence rozptýleného záření, závislou právě na velikosti částic.

V Tab. 11 jsou uvedeny výsledky měření velikosti částic/polymerních klubek HA, které byly získány pomocí dynamického rozptylu světla při teplotě 25 °C. Data byla převzata z práce L. Grundělové [9]. Hodnota z-průměru velikosti částic, což je intenzitně vážený průměr velikostí všech částic v disperzi, je uvedena v prvním sloupci tabulky. Hodnoty velikostí označené jako Pík 1 a 2 poukazují, že ve vzorku jsou přítomny částice/polymerní klubka dvou odlišných velikostí a převažující populace klubek s velikostí v rozmezí od stovek nm je doprovázena malými částicemi s velikostí v desítkách nm. Těchto malých částic však není mnoho, cca 10 %. V roztoku HA rozpuštěné v deionizované vodě byly přítomny částice o velikosti 38 a 297 nm, což vedlo k závěru, že HA tvoří ve vodě spíše rozvolněnou konformaci.

V tabulce dále vidíme, že přidavkem solí dochází ke zmenšení velikosti klubek, kdy z-průměr poklesl z hodnoty 286 nm (demineralizované voda) na hodnoty v rozmezí 61 – 70 nm, které byly stanoveny v jednotlivých solích. Tento pokles je projevem sbalování polymerních řetězců, které zároveň vede i k pozorovanému snížení viskozity. Tímto srovnáním je potvrzeno, že přidavek soli snižuje viskozitu polymerního roztoku. Z Tab. 11 však není možné jednoznačně určit, jaký vliv na konformaci klubka mají jednotlivé soli, protože rozdíly v hodnotách z-průměru nejsou velké a není možné pozorovat ani systematické rozdíly mezi velikostmi klubek u HA v přítomnosti síranů a thiokyanatanů.

Tab. 11. Z-průměr velikosti částic stanovený pro HA v roztocích studovaných solí metodou dynamického rozptylu světla [9].

	Z-průměr [nm]	Pík 1 [nm]	Pík 2 [nm]
<b>H<sub>2</sub>O</b>	286	38	297
<b>NaSCN</b>	69	9	121
<b>NH<sub>4</sub>SCN</b>	68	12	105
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	70	12	116
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	66	14	107
<b>NaCl</b>	61	13	99

Studie dynamického rozptylu světla je součástí disertační práce zahrnující také vlastní viskozimetrické měření roztoků HA v roztocích solí Hofmeisterovy řady [9]. Autorka ve své práci uvádí několik zajímavých výsledků shodných s našimi viskozitními měřeními. V první řadě je zde uveden fakt, že ionty Hofmeisterovy řady snižují viskozitu, přičemž chaotropní ionty jsou účinnější než ionty kosmotropní [9]. Tento závěr byl potvrzen také naším měřením, kdy podle Obr. 14 – 17 snižují kosmotropní sírany viskozitu s menší účinností než chaotropní thiokyanatany a chlorid. V obou viskozitních studiích bylo použito shodně kombinace chaotropního kationtu a aniontu, kosmotropního kationtu a aniontu a kombinace kosmotropního a chaotropního iontu.

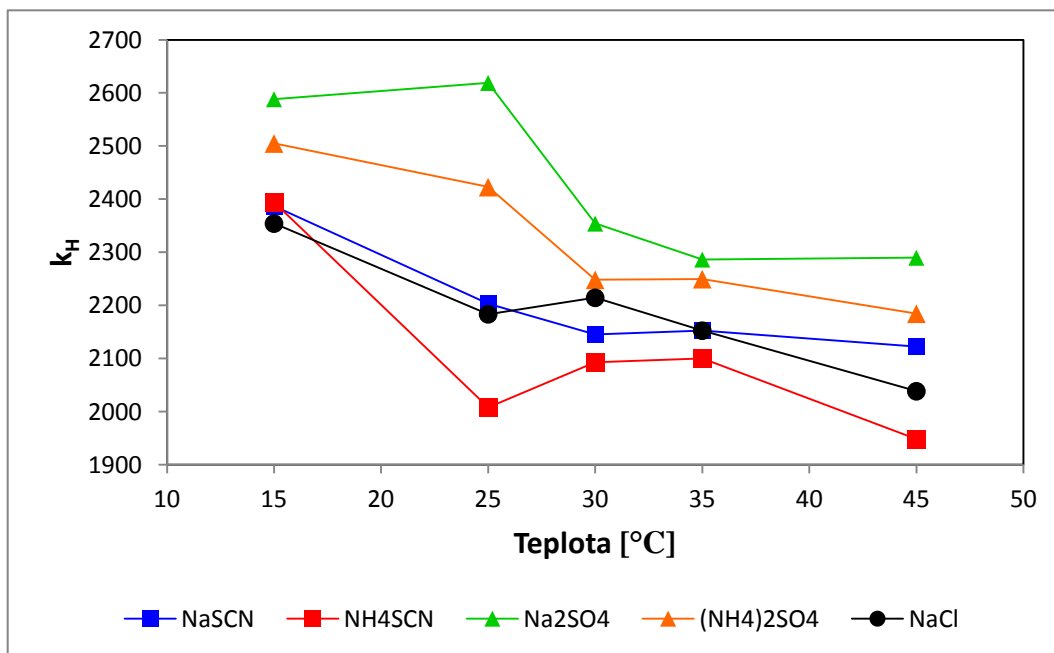
Podle výsledků naší práce snižuje viskozitu nejvýrazněji NH<sub>4</sub>SCN a nejméně pak Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. NH<sub>4</sub>SCN představuje kombinaci chaotropního kationtu i aniontu, což potvrdilo fakt, že chaotropní ionty snižují účinněji viskozitu oproti právě kombinaci kosmotropního kationtu a aniontu Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, který by měl mít na viskozitu HA nejmenší vliv.

NaSCN a NaCl jsou kombinací chaotropního aniontu (SCN<sup>-</sup> a Cl<sup>-</sup>) a kosmotropního kationtu (Na<sup>+</sup>), v jejichž přítomnosti jsou viskozity HA podle výsledků naší práce oproti síranům nižší. Převládá zde pravděpodobně vliv účinnějšího chaotropního aniontu. Grundělová [9] ve své práci uvádí fakt, že u kombinace chaotropního aniontu a kosmotropního kationtu převládá sice vliv kationtu, aniont však tuto převahu omezuje. U opačné kombinace, tedy v případě (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = chaotropní kationt a (NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup> = kosmotropní aniont

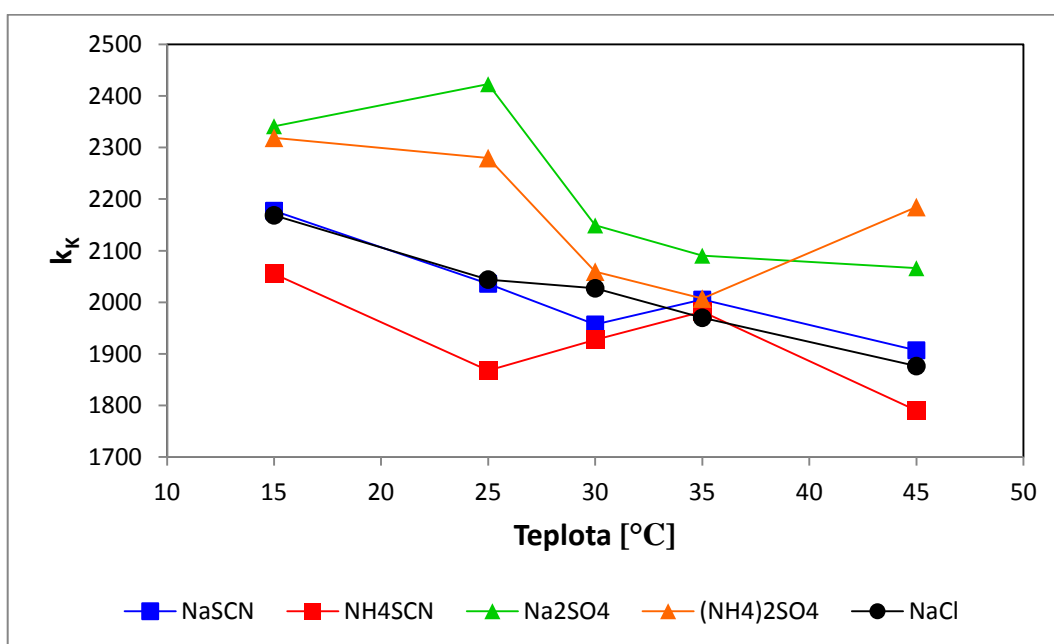
( $\text{SO}_4^-$ ), uvádí převahu kosmotropního aniontu, který by měl viskozitu snižovat s menší účinností. V našem měření, kdy je viskozita HA v roztoku síranu vyšší, se tento předpoklad tedy opět potvrdil.

## 7.6 Vliv teploty na limitní viskozitní číslo NaHY

Na Obr. 25 a 26 je uvedena teplotní závislost hodnot LVČ stanoveného dle Hugginse a Kramera.



Obr. 25. Graf teplotní závislosti LVČ stanoveného dle Hugginse.



Obr. 26. Graf teplotní závislosti LVČ stanoveného dle Kramera.



Z obou obrázků je patrná již výše naznačená skutečnost, že LVČ s rostoucí teplotou klesá. Tento graf však ilustruje další zajímavý efekt, a to rozdílné viskozitní chování HA při 25 a 35 °C. Zatímco hodnoty LVČ stanovené pro HA v jednotlivých solích při 25 °C se výrazně liší, při teplotě 35 °C naopak leží v poměrně úzkém intervalu. To by nasvědčovalo tomu, že teplotní závislost expanze a smrštění polymerního klubka je do určité míry rovněž ovlivněna typem přítomné soli. Teplotní závislosti HA se ve své práci zabývali Fouissac s kolektivem [60]. Studovali teplotní závislost LVČ roztoků HA v 0,1 M NaCl v rozsahu 15 – 55 °C a s rostoucí teplotou zaznamenali rovněž pokles LVČ odrážející nárůst hustoty konfomeru při vysokých teplotách. Nověji se teplotní závislosti HA zabýval Hoefling s kolektivem [61], kteří navrhli postup pro predikci teplotní závislosti viskozity v rozmezí 25 – 65 °C pro semi-zředěné roztoky HA.

Zajímavá skutečnost týkající se chování iontů v roztocích v závislosti na teplotě byla publikována v práci [62], která uvádí, že, jak teplota, tak tlak, mají vliv na „kosmotropní/chaotropní“ stav iontů, který se ztrácí při vysokých teplotách a při vysokých koncentracích. I když to není situace, která by nastala v případě naší diplomové práce, stojí tento fakt za zmínku.

## ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo sledovat viskozitní chování hyaluronanu ve zředěných roztocích solí s ionty Hofmeisterovy řady. Studována byla především závislost viskozity na typu iontu a na teplotě.

Již z předešlých studií bylo známo, že přidavek soli do vodného roztoku kyseliny hyaluronové způsobuje snížení jeho viskozity. V provedeném experimentu byla pomocí Ubbelohdeho viskozimetru získána hodnota redukované viskozity a dva důležité parametry: 1) limitní viskozitní číslo, které udává za daných podmínek (teplota měření, typ rozpouštědla) přímé informace o konfiguraci a konformaci polymerních řetězců ve zředěném polymerním roztoku. 2) Hugginsova konstanta, která silně závisí na charakteru rozpouštědla a molekulové hmotnosti polymeru a slouží k popisu interakce polymer – rozpouštědlo.

Z provedených měření bylo zjištěno, že přidavkem chaotropních iontů do roztoku HA dochází k intenzivnějšímu snížení její viskozity ve srovnání s přidavkem iontů kosmotropních. Viskozita roztoku kyseliny hyaluronové v roztoku soli obsahující chaotropní kationt i aniont ( $\text{NH}_4\text{SCN}$ ) byla vždy nejnižší a naopak viskozita HA v roztoku soli s kosmotropním kationtem i aniontem ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) nejvyšší. Mezi těmito hodnotami ležely viskozity roztoků HA rozpuštěných v přítomnosti solí s kombinací kosmotropního a chaotropního iontu ( $\text{NaSCN}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ). Lze tedy předpokládat, že chaotropní ionty snižují viskozitu účinněji než kosmotropní a že tedy efektivněji přispívají ke sbalení polymerního klubka. Obtížnější by však bylo určit, který z vlivů převládá u soli, která je kombinací kosmotropního a chaotropního iontu. Vzhledem k tomu, že viskozity roztoků HA s chaotropním aniontem ( $\text{SCN}^-$  a  $\text{Cl}^-$ ) a kosmotropním kationtem ( $\text{Na}^+$ ) byly nižší než u roztoků s kosmotropním aniontem ( $\text{SO}_4^-$ ) a chaotropním kationtem ( $\text{NH}_4^+$ ), lze usoudit, že v prvním případě převládal vliv chaotropu ( $\text{SCN}^-$  a  $\text{Cl}^-$ ), který viskozitu více snižuje, a v druhém případě naopak kosmotropu ( $\text{SO}_4^-$ ). Tato skutečnost potvrzuje informace, které lze nalézt v literatuře [26], a to že efekt aniontů je významnější než efekt kationtů.

Hodnoty limitního viskozitního čísla byly srovnány s výsledky studie roztokového chování hyaluronanu v roztocích Hofmeisterových solí, získanými metodou dynamického rozptylu světla. Zde bylo rovněž potvrzeno, že přidavkem solí dochází ke sbalování polymerních řetězců, což vysvětluje pokles viskozity roztoků HA. V roztocích solí byla naměřena přibližně čtyřikrát menší průměrná velikost částic/klubek HA oproti velikosti po rozpuštění v demineralizované vodě.

Je však třeba konstatovat, že celá práce vychází z viskozitního měření provedeného v roztocích solí s použitou iontovou silou  $I = 0,1$ . Výsledky však naznačují, že tato iontová síla nebyla dostatečná k potlačení elektrostatických repulzí mezi podobnými náboji umístěnými podél polymerního řetězce, což mělo za následek nelineární chování závislosti  $\eta_{red}$  vs  $c$ , a LVČ bylo stanoveno pouze z lineární části této závislosti. Pro další práci lze tedy navrhnout provedení obdobné studie v roztocích o vyšší iontové síle. Zajímavé by rovněž bylo rozšířit studii o srovnání viskozitních dat získaných pomocí Ubbelohdeho viskozimetru a viskozitních měření provedených pomocí rotačního reometru.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] DICKER, Kevin T., GURSKI, Lisa A., PRADHAN-BHATT, Swati, WITT, Robert L., FARACH-CARSON, Mary C. a Xinqiao JIA. Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta biomaterialia*. 2014, vol. 10, no. 4. ISSN: 1558-1570.
- [2] VIGETTI, Davide, KAROUSOU, Eugenia, VIOLA, Manuela, DELEONIBUS, Sara, DE LUCA, Giancarlo a Alberto PASSI. Hyaluronan: biosynthesis and signaling. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 2014, vol. 1840, no. 82452. ISSN: 0006-3002.
- [3] VELEBNÝ, Vladimír. *Hyaluronan – biopolymer pro tkáňové inženýrství*. Teze habilitační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Brno: VUTIUM, 2012.
- [4] NEČAS, J., BARTOŠÍKOVÁ, L., BRAUNER, P. a J. KOLÁŘ. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni medicina*. 2008, vol. 53, no. 8, s. 397–411.
- [5] SCOTT, J. E., CUMMINGS, C., BRASS, A. a Y. CHEN. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer. *Biochemical Journal*. 1991, vol. 274, no. 3 s. 699–705. ISSN: 0264-6021.
- [6] PIRES, Aline M. B., MACEDO, André C., EGUCHI, Silvia Y. a Maria H. A. SANTANA. Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives. *Bioresource Technology*. 2010, vol. 101, no. 16, s. 6506–6509. ISSN: 0960-8524.
- [7] PIRES, Aline Mara B., EGUCHI, Silvia Y. a Maria Helena Andrade SANTANA. The influence of mineral ions on the microbial production and molecular weight of hyaluronic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010, vol. 162, no. 8, s. 2125–2135. ISSN: 0273-2289.
- [8] LIU, Long, DU, Guocheng, CHEN, Jian, WANG, Miao a Jun SUN. Comparative study on the influence of dissolved oxygen control approaches on the microbial hyaluronic acid production of *Streptococcus Zooepidemicus*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2009, vol. 32, no. 6, s. 755–763. ISSN: 1615-7591.

- [9] GRUNDĚLOVÁ, Lenka. *Stabilita a chování hyaluronanu v roztocích pro technologii výroby farmaceutických přípravků*. Zlín, 2014. Disertační práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí diplomové práce Aleš Mráček.
- [10] CHONG, Barrie Fong, BLANK, Lars M., MCLAUGHLIN, Richard a Lars K. NIELSEN. Microbial hyaluronic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005, vol. 66, no. 4, s. 341–351. ISSN: 0175-7598.
- [11] HAMŠÍKOVÁ, Martina. Mikrobiální produkce kyselin hyaluronové. *BIOPROSPECT*. Praha: BIOTECHNOLOGICKÁ SPOLEČNOST, 2011, ročník 21, číslo 1, s. 15–18. ISSN: 1210-1737.
- [12] LIU, Long, LIU, Yanfeng, LI, Jianghua, DU, Guocheng a Jian CHEN. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microbial Cell Factories*. 2011, vol. 10, no. 199. ISSN:1475-2859.
- [13] PIRES, Aline Mara Barbosa a Maria Helena A. SANTANA. Metabolic effects of the initial glucose concentration on microbial production of hyaluronic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010, vol. 162, no. 6, s. 1751–1761. ISSN: 0273-2289.
- [14] HUANG, Wei-Chih, CHEN, Teh-Liang a Shu-Jen CHEN. Production of hyaluronic acid by repeated batch fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 2008, vol. 40, no. 3, s. 460–464. ISSN: 1369-703X.
- [15] KIM, Sae-Jin , SUNG-YURB Park a Chan-Wha KIM. A novel approach to the production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2006, Vol. 16, No. 12, s. 1849–1855. ISSN: 1017-7825.
- [16] HUANG, Wei-Chih, CHEN, Teh-Liang a Shu-Jen CHEN. Modeling the microbial production of hyaluronic acid. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*. 2007, vol. 38, no. 3, s. 355–359. ISSN: 0368-1653.
- [17] MRÁČEK, Aleš, VARHANÍKOVÁ, Júlia, LEHOCKÝ, Marián, GRUNDĚLOVÁ, Lenka, POKOPCOVÁ, Alena a Vladimír VELEBNÝ. The influence of Hofmeister series ions on hyaluronan swelling and viscosity. *Molecules* 2008, vol. 13, s. 1025–1034. ISSN: 1420-3049.

- [18] SCOTT, J. E. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solutions [online]. © *Glycoforum*, 1998 [cit. 2013-11-19].  
Dostupné z:  
<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>
- [19] HASCALL, C. V. a C. T. LAURENT. Hyaluronan: structure and physical properties [online]. © *Glycoforum*, 1997 [cit. 2013-11-19].  
Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [20] SLÍVA, Jiří a Juraj MINÁRIK. Hyaluronát – nejen pasivní pozorovatel, nýbrž aktivní modulátor imunitních reakcí. *Praktická gynekologie*. 2009, č. 3, s. 143–147. ISSN: 1211-6645.
- [21] LAPČÍK, Lubomír, a Miroslav RAAB. *Nauka o materiálech II*. Vyd. 2., rozš. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2004, s. 105-128. 11 Biomateriály a hybridní biomateriály. 133 s. ISBN 80-7318-229-7 (brož.)
- [22] HAXAIRE, Katia, BRACCINI, Isabelle, MILAS, Michel, RINAUDO, Marguerite a Serge PÉREZ. Conformational behavior of hyaluronan in relation to its physical properties as probed by molecular modeling. *Glycobiology*. 2000, vol. 10, no. 6 s. 587–594. ISSN: 0959-6658.
- [23] LONDONO, David, HECHT, Anne-Marie, BASSER, Peter, HORKAY, Ferenc a Erik GEISLER. Ions in hyaluronic acid solutions. *Journal of Chemical Physics*. 2009, vol. 131, no. 18 s. 184902-184902-8. ISSN: 0021-9606.
- [24] VENKATESH, Srinu. Hyaluronan, nature's lubricant [online]. *The optician* 239.6251. 2010, 18–19. [cit. 2. 11. 2014].  
Dostupné z:  
<http://search.proquest.com.proxy.k.utb.cz/docview/356852491?pq-origsite=summon>
- [25] YU-JIN, Jin, TERMSARASAB, Ubonvan a Kim DAE-DUK. Hyaluronic acid in drug delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2010, vol. 40, no. special issue, s. 33–34.
- [26] KUNZ, Werner. Specific ion effects in colloidal and biological systems. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2010, vol. 15, no. 1, s. 34–39. ISSN: 1359-0294.

- [27] VLACHY, Nina, JAGODA-CWIKLIK, Barbara, VÁCHA, Robert, TOURAUD, Didier, JUNGWIRTH, Pavel a Werner KUNZ. Hofmeister series and specific interactions of charged headgroups with aqueous ions. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2009, vol. 146, no. 1 s. 42–47. ISSN: 0001-8686.
- [28] LEBERMAN, Reuben. The Hofmeister series and ionic strength. *FEBS Letter*. 1991, vol. 284, no. 2, s. 293–294. ISSN: 0014-5793.
- [29] KUMAR, Awanish a Pannuru VENKANTESU. Does the stability of proteins in ionic liquids obey the Hofmeister series? *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014, vol. 63, s. 244–253. ISSN: 0141-8130.
- [30] ZHANG, Yanjie a Paul S. CREMER. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2006, vol. 10, no. 6, s. 658–663. ISSN: 1367-5931.
- [31] COLLINS, Kim D. Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process. *Methods*. 2004, vol. 34, no. 3, s. 300–311. ISSN: 1046-2023.
- [32] Závislost viskozity na procesních a molekulárních parametrech [online]. *Učební texty Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně* [cit. 8. 12. 2014].  
Dostupné z:[http://ufmi.ft.utb.cz/texty/fyzika\\_pol/FP\\_03.pdf](http://ufmi.ft.utb.cz/texty/fyzika_pol/FP_03.pdf)
- [33] Tokové chování polymerních tavenin – reologické modely [online]. *Učební texty Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně* [cit. 8. 12. 2014].  
Dostupné z:[http://ufmi.ft.utb.cz/texty/fyzika\\_pol/FP\\_02.pdf](http://ufmi.ft.utb.cz/texty/fyzika_pol/FP_02.pdf)
- [34] Reologie [online]. *Učební texty Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně* [cit. 8. 12. 2014].  
Dostupné z:[http://ufmi.ft.utb.cz/texty/kzm/KZM\\_03.pdf](http://ufmi.ft.utb.cz/texty/kzm/KZM_03.pdf)
- [35] Stanovení viskozity roztoků – teoretická část [online]. *Učební texty Vysoké školy chemicko-technologické v Praze* [cit. 8. 12. 2014].  
Dostupné z:  
[http://old.vscht.cz/met/stranky/vyuka/labcv/labor/res\\_stanoveni\\_viskozity\\_roztoku/teorie.htm](http://old.vscht.cz/met/stranky/vyuka/labcv/labor/res_stanoveni_viskozity_roztoku/teorie.htm)
- [36] CHMELÍK, František. *Fyzika I – mechanika* [online]. Verze 20. 3. 2014 [cit. 8. 12. 2014].  
Dostupné z:  
<http://material.karlov.mff.cuni.cz/people/hajek/skripta/skripta.pdf>

- [37] KVÍTEK, Libor a Aleš PANÁČEK. *Základy koloidní chemie*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2007. s 16–18.
- [38] Mechanika tekutin [online]. *Učební texty Karlovy univerzity v Praze* [cit. 8. 12. 2014].  
Dostupné z:  
[http://physics.mff.cuni.cz/kfpp/skripta/kurz\\_fyziky\\_pro\\_DS/display.php/kontinuum/4](http://physics.mff.cuni.cz/kfpp/skripta/kurz_fyziky_pro_DS/display.php/kontinuum/4)
- [39] Roztoky makromolekul [online]. *Učební texty Vysoké školy chemicko-technologické v Praze* [cit. 8. 12. 2014].  
Dostupné z: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-001/hesla/roztoky\\_makromolekul.html](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/roztoky_makromolekul.html)
- [40] GARCÍA-ABUÍN, A., et al. Viscosimetric behaviour of hyaluronic acid in different aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*. 2011, vol. 85, no. 3, s. 500–505. ISSN: 0144-8617.
- [41] BOHDANECKÝ, Miloslav. *Základy makromolekulární fyzikální chemie a fyziky: Struktura a vlastnosti makromolekulárních látek a soustav*. Praha: Ústav makromolekulární chemie, 1970, xiii, 405 s.
- [42] PODZIMEK, Š., et al. Solution properties of hyaluronic acid and comparison of SEC-MALS-VIS data with off-line capillary viscometry. *Journal of Applied Polymer Science*. 2010, vol. 116, no. 5, s. 3013–3020. ISSN: 0021-8995.
- [43] VOLLMERT, Bruno. *Základy makromolekulární chemie*. 1. vyd. Praha: Academia, 1970, 773 s.
- [44] YU, F. Y., ZHANG, F., LUAN, T., ZHANG, Z. N. a H. B. ZHANG. Rheological studies of hyaluronan solutions based on the scaling law and constitutive models. *POLYMER*. 2014, vol. 55, no. 1, s. 295–301. ISSN: 0032-3861.
- [45] CALCIU-RUSU, Daniela, ROTHFUSS, Ernst, ECKELT, John, HAASE, Tanja, DICK, H. Buckhard a Bernhard A. WOLF. Rheology of sodium hyaluronate saline solutions for ophthalmic use. *Biomacromolecules*. 2007, vol. 8, no. 4, s. 1287–1292. ISSN: 1525-7797.
- [46] MALEKI, Atoosa, KJØNIKSEN, Anna-Lena a Bo NYSTRÖM. Anomalous viscosity behavior in aqueous solutions of hyaluronic acid. *Polymer Bulletin*. 2007, vol. 59, no. 2, s. 217–226. ISSN: 0170-0839.



- [47] LATH, D., CSOMOROVÁ, K., KOLLÁRIKOVÁ, G., STANKOVSKÁ M. a L. ŠOLTÉS. Molar mass – intrinsic viscosity relationship of high-molar-mass hyaluronans: involvement of shear rate. *Chemical Papers*. 2005, vol. 59, no. 5, s. 291–293. ISSN: 0366-6352.
- [48] STANKOVSKÁ, M., ŠOLTÉS, L., VIKARTOVSKÁ, A., MENDICHI, R., LATH, D., MOLNÁROVÁ, M. a P. GEMEINER. Study of hyaluronan degradation by means of rotational viscometry: contribution of the material of viscometer. *Chemical papers*. 2004, vol. 58, no. 5, s. 348–352. ISSN: 0366-6352.
- [49] KUPSKÁ, Ivana, LAPČÍK, Lubomír, LAPČÍKOVÁ, Barbora, ŽÁKOVÁ, Karolína a Jana JURÍKOVÁ. The viscometric behaviour of sodium hyaluronate in aqueous and KCl solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2014, vol. 454, no. 1, s. 32–37. ISSN: 0927-7757.
- [50] CHYTIL, Martin a Miloslav PEKAŘ. Effect of new hydrophobic modification of hyaluronan on its solution properties: evaluation of self-aggregation. *Carbohydrate Polymers*. 2009, vol. 76, no. 3, s. 443–448. ISSN: 0144-8617.
- [51] COWMAN, Mary K. a Shiro MATSUOKA. Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate Research*. 2005, vol. 340, no. 5, s. 791–809. ISSN: 0008-6215.
- [52] Měření viskozity [online]. *Učební texty Vysoké školy chemicko-technologické v Praze* [cit. 15. 3. 2015].  
Dostupné z: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-001/hesla/mereni\\_viskozity.html](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/mereni_viskozity.html)
- [53] MORAWETZ, H. *Chování makromolekul v roztoku*. 1. vyd. Praha: Academia, 1971. 512 s. ISBN 509-21-872.
- [54] YOO, Sang-Ho, FISHMAN, Marshall L., HOTCHKISS, Arland T., LEE, Hyeon Gyu. Viscometric behavior of high-methoxy and low-methoxy pectin solutions. *Food Hydrocolloids*. 2006, vol. 20, no. 1, s. 62–67. ISSN: 0268-005X.

- [55] KRPALOVÁ, Zuzana. *Charakterizace hyaluronanu pomocí gelové permeační chromatografie*. Zlín, 2014. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí diplomové práce Věra Kašpárková.
- [56] CHURÁČEK, J. *Analytická separace látek*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990, 384 s. ISBN: 8003005698.
- [57] MORI, Sadao a Howard G. BARTH. *Size exclusion chromatography*. Berlin: Springer, c1999, 234 s. ISBN: 3-540-65635-9.
- [58] HAYASHI, Kanako, TSUTSUMI, Kikuko, NORISUYE, Takashi, TERAMOTO, Akio. Electrostatic contributions to chain stiffness and excluded – volume effects sodium hyaluronate solutions. *Polymer journal*. 1996, vol. 28, s. 922–928.
- [59] TSUTSUMI, Kikuko, NORISUYE, Takashi. Excluded – volume effects in sodium hyaluronate solutions revisited. *Polymer journal*. 1998, vol. 30, s. 345–349.
- [60] FOUISSAC, E., MILAS, M. a M. RINAUDO. Shear-rate, concentration, molecular weight, and temperature viscosity dependences of hyaluronate, a wormlike polyelectrolyte. *Macromolecules*. 1993, vol. 26, s. 6945–6951.
- [61] HOEFLING, Joanne M., COWMAN, Mary K., MATSUOKA, Shiro a Andre BALAZS. Temperature effect on the dynamic rheological characteristics of hyaluronan, hylana and synvisc. *Hyaluronan*. 2002, vol. 1, s. 103–105.
- [62] OPARIN, R; FEDOTOVA, M; TROSTIN, V. Relationship between the structural state of water and the character of ion hydration in concentrated 1: 1 aqueous solutions of electrolytes in extreme conditions. *Journal of Structural Chemistry*. 2002, vol. 43, no. 3 s. 467–472. ISSN: 0022-4766.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

a	Konstanta Mark–Houwinkovy rovnice
c	Koncentrace
Ca <sup>2+</sup>	Vápenatý kationt
Cu <sup>2+</sup>	Měďnatý kationt
Co <sup>2+</sup>	Kobaltnatý kationt
Fe <sup>2+</sup>	Železnatý kationt
Fe <sup>3+</sup>	Železitý kationt
HA	Kyselina hyaluronová
I	Iontová síla
K	Konstanta Mark–Houwinkovy rovnice
K <sup>+</sup>	Draselný kationt
k <sub>H</sub>	Hugginsův koeficient
k <sub>K</sub>	Kramerův koeficient
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Hydrogenfosforečnan draselný
l	Délka kapiláry
M	Střední molekulová hmotnost
M <sub>w</sub>	Hmotnostní průměr molekulové hmotnosti
Mg <sup>2+</sup>	Hořečnatý kationt
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Heptahydrát síranu hořečnatého
Mn <sup>2+</sup>	Manganatý kationt
Na <sup>+</sup>	Sodný kationt
NaCl	Chlorid sodný
NaHY	Hyaluronát sodný
NaOH	Hydroxid sodný
NaSCN	Thiokyanatan sodný

---

$\text{Na}_2\text{SO}_4$	Síran sodný
$\text{NH}_4\text{SCN}$	Thiokyanatan amonný
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Síran amonný
$p$	Tlak
$Q$	Objemový tok
$r$	Průměr kapiláry
$R_T$	Retenční čas
$t$	Doba průtoku kapilárou
$t_0$	Doba průtoku čistého rozpouštědla
$\text{Zn}^{2+}$	Zinečnatý kationt
$[\eta]$	Limitní viskozitní číslo
$\eta$	Viskozita
$\eta_0$	Viskozita čistého rozpouštědla
$\eta_{\text{rel}}$	Relativní viskozita
$\eta_{\text{red}}$	Redukovaná viskozita
$\eta_{\text{sp}}$	Specifická viskozita
$\eta_{\text{inh}}$	Inherentní viskozita
$\tau$	Smykové napětí
$\rho$	Hustota
$\nu$	Kinematická viskozita
$\pi$	Ludolfovo číslo

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Biosyntetická dráha HA u Streptococcus equi subsp. zooepidemicus [11].</i>	16
<i>Obr. 2. Monomerní jednotka HA [17].</i>	17
<i>Obr. 3. Sekundární struktura HA [17].</i>	18
<i>Obr. 4. Schéma struktury HA ve zředěném roztoku [23].</i>	19
<i>Obr. 5. Hofmeisterova řada iontů [26].</i>	21
<i>Obr. 6. Členění iontů I. A a VII. A skupiny periodické tabulky na kosmotropní a chaotropní dle velikosti [26].</i>	23
<i>Obr. 7. Interakce iontů [26].</i>	24
<i>Obr. 8. Závislosti viskozity na rychlosti smykové deformace a na čase.</i>	26
<i>Obr. 9. Stanovení limitního viskozitního čísla dle Hugginse <math>\circ</math> a Kramera <math>\bullet</math> [40].</i>	30
<i>Obr. 10. Ubbelohdeho viskozimetr [52].</i>	43
<i>Obr. 11. Stanovení limitního viskozitního čísla dle Hugginse <math>\blacktriangle</math> a Kramera <math>\bullet</math> pro vzorek HA rozpuštěný v roztoku NaSCN, teplota měření 25 °C.</i>	45
<i>Obr. 12. Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci pro polyelektrolyt.</i>	47
<i>Obr. 13. Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci při teplotě 15 – 45 °C u NaSCN.</i>	48
<i>Obr. 14. Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci pro HA v roztocích studovaných solí při teplotě 25 °C.</i>	50
<i>Obr. 15. Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci pro HA v roztocích studovaných solí při teplotě 15 °C.</i>	50
<i>Obr. 16. Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci pro HA v roztocích studovaných solí při teplotě 30 °C.</i>	51
<i>Obr. 17. Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci pro HA v roztocích studovaných solí při teplotě 35 °C.</i>	51
<i>Obr. 18. Graf závislosti redukované viskozity na koncentraci pro HA v roztocích studovaných solí při teplotě 45 °C.</i>	52
<i>Obr. 19. Limitní viskozitní čísla stanovená pro HA v roztocích solí Hofmeisterovy řady dle Hugginse.</i>	53
<i>Obr. 20. Limitní viskozitní čísla stanovená dle Kramera.</i>	54
<i>Obr. 21. Hugginsovy konstanty pro HA v roztocích studovaných solí.</i>	56
<i>Obr. 22. Limitní viskozitní čísla stanovená pro HA dle Fousse.</i>	58

---

<i>Obr. 23. Retenční časy maxim chromatografických piků (<math>R_T</math>) vzorku HA o <math>M_w = 2,1 \cdot 10^6</math> g/mol ve studovaných solích. ....</i>	61
<i>Obr. 24. Interakce molekuly proteinu s iontovými roztoky [29, s. 248]. ....</i>	61
<i>Obr. 25. Graf teplotní závislosti LVČ stanoveného dle Hugginse. ....</i>	64
<i>Obr. 26. Graf teplotní závislosti LVČ stanoveného dle Kramera. ....</i>	64

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tab. 1. Vybrané účinky kosmotropních a chaotropních iontů dle Kunze [26].</i>	22
<i>Tab. 2. Hodnoty exponentu a Mark-Houwinyovy rovnice pro HA v roztoku NaCl při teplotě 25 °C uvedené ve studii [51].</i>	36
<i>Tab. 3. Hodnoty Hugginsovy konstanty <math>k_H</math> pro HA v roztoku NaCl při teplotě 25 °C uvedené ve studii [51].</i>	37
<i>Tab. 4. Přehled solí použitých pro experiment.</i>	40
<i>Tab. 5. Hmotnost solí pro přípravu 100 ml roztoků.</i>	42
<i>Tab. 6. Hodnoty limitních viskozitních čísel [ml/g] stanovené podle Hugginse pro HA rozpuštěnou v roztocích uvedených solí.</i>	53
<i>Tab. 7. Hodnoty limitních viskozitních čísel [ml/g] stanovené podle Kramera.</i>	54
<i>Tab. 8. Hodnoty Hugginsových konstant pro jednotlivé soli při měřených teplotách</i>	56
<i>Tab. 9. Hodnoty limitních viskozitních čísel [ml/g] pro HA podle Fuosse.</i>	58
<i>Tab. 10. Naměřené retenční časy v GPC pro HA o molekulové hmotnosti <math>2,1 \cdot 10^6</math> g/mol pro <math>N = 3</math> podle [55].</i>	60
<i>Tab. 11. Z-průměr velikosti částic stanovený pro HA v roztocích studovaných solí metodou dynamického rozptylu světla [9].</i>	63