

Charakterizace hyaluronanu sodného pomocí AFM

Karolína Kozubíková

Bakalářská práce
2017



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Karolína Kozubíková**

Osobní číslo: **T14361**

Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**

Studijní obor: **Polymerní materiály a technologie**

Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Charakterizace hyaluronanu sodného pomocí AFM**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte literární rešerši na zadané téma.
2. Optimalizujte proces přípravy monovrstev hyaluronanu sodného a proveďte jejich charakterizaci pomocí AFM.
3. Získané výsledky podrobte obrazové analýze a přehledně diskutujte ve výsledcích a závěrech bakalářské práce.



Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. Temenoff J.S., **Biomaterials: The Intersection of Biology and Materials Science**, Pearson Education 2008, ISBN0-13-009710-1
2. Self - **Organising Polymers**, Faraday Discussion, Volume 128, 2005, ISBN 0-85404-973-8
3. Jones R.A.L., **Polymers at Surfaces and Interfaces**, Cambridge University Press 1999, ISBN-10-521-47965-7
4. Kubínek R., **Mikroskopie skenující sondou**, Univerzita Palackého v Olomouci 2003, ISBN 80-244-0602-0

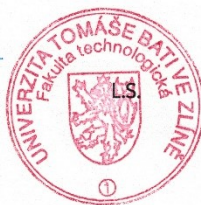
Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Antonín Minařík, Ph.D.**
Ústav fyziky a mater. inženýrství


Datum zadání bakalářské práce: **2. ledna 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **17. května 2017**

Ve Zlíně dne 1. března 2017


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




doc. Ing. Tomáš Sedláček, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 12. 5. 2017

Kozubíková

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Byla studována struktura hyaluronanu sodného na povrchu modifikované slídy metodou mikroskopie atomárních sil. Byly sledovány změny ve tvorbě agregovaných struktur v závislosti na změnách střední molekulové hmotnosti hyaluronanu sodného, hmotnostním podílu tohoto polymeru v roztoku, času přípravy, doby skladování a přítomnosti solí v roztoku. Z experimentálních výsledků vyplynulo, že výše uvedené proměnné mají výrazný dopad na agregační schopnost přichyceného hyaluronanu sodného na povrchu upravené slídy. To se projevuje zejména změnami počtu a velikosti agregovaných struktur.

Klíčová slova: hyaluronan sodný, imobilizace, povrch slídy, zobrazování, mikroskopie atomárních sil

ABSTRACT

The structure of sodium hyaluronate on the modified mica surface was studied using the Atomic Force Microscopy. Variations in aggregate structures were observed, depending on changes in the average molecular weight of sodium hyaluronate, the weight ratio of the polymer in solution, the preparation time, the storage time, and the presence of salts in the solution. Results of the experiment show that these variables have a significant impact on the aggregation capacity of the attached sodium hyaluronate on the treated mica surface. This is manifested particularly by changes in the number and size of aggregated structures.

Keywords: sodium hyaluronate, immobilization, mica surface, imaging, atomic force microscopy

Děkuji vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Antonínu Minaříkovi, PhD. za odborné vedení, věnovaný čas a nespočet cenných rad. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině za trpělivost a podporu při studiu.

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

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| ÚVOD..... | 10 |
| I TEORETICKÁ ČÁST..... | 11 |
| 1 HYALURONAN SODNÝ..... | 12 |
| 1.1 STRUKTURA | 12 |
| 1.2 FUNKCE..... | 14 |
| 1.3 METODY CHARAKTERIZACE | 14 |
| 2 CHARAKTERIZACE POLYSACHARIDŮ POMOCÍ MIKROSKOPIE ATOMÁRNÍCH SIL..... | 17 |
| 2.1 PRINCIP MIKROSKOPIE ATOMÁRNÍCH SIL A JEJÍ VYUŽITÍ PRO STUDIUM POLYSACHARIDŮ | 17 |
| 2.2 AFM STUDIUM KYSELINY HYALURONOVÉ | 18 |
| 2.2.1 Struktura chemicky síťovaného hyaluronanu | 19 |
| 2.2.2 Vliv charakteru povrchu na strukturu HA..... | 20 |
| 2.2.3 Vliv přípravy vzorku na strukturu HA | 23 |
| 2.2.4 Vliv teploty na konformační chování HA imobilizované na povrch | 25 |
| 2.2.5 Vliv přítomnosti iontů na strukturu HA | 27 |
| II PRAKTICKÁ ČÁST | 30 |
| 3 POPIS EXPERIMENTU | 31 |
| 3.1 POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE | 31 |
| 3.2 MIKROSKOP ATOMÁRNÍCH SIL..... | 31 |
| 3.3 PROGRAMY PRO ANALÝZU DAT AFM..... | 31 |
| 3.4 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ | 31 |
| 3.5 IMOBILIZACE HA NA POVRCH SLÍDY | 32 |
| 4 VÝSLEDKY A DISKUZE..... | 33 |
| 4.1 VLIV STŘEDNÍ M_w NA ZMĚNU VZHLEDU AGREGOVANÝCH STRUKTUR HA NA POVRCHU SLÍDY..... | 33 |
| 4.1.1 Vzorky deponované z roztoku obsahujícího 0,01 hm. % HA..... | 33 |
| 4.1.2 Vzorky deponované z roztoku obsahujícího 0,1 hm. % HA..... | 37 |
| 4.2 VLIV DOBY PŘÍPRAVY ROZTOKU NA ZMĚNU VZHLEDU AGREGOVANÝCH STRUKTUR HA NA POVRCHU SLÍDY | 43 |
| 4.3 VLIV DOBY SKLADOVÁNÍ ROZTOKU NA ZMĚNU VZHLEDU AGREGOVANÝCH STRUKTUR HA NA POVRCHU SLÍDY | 48 |
| 4.4 VLIV PŘÍTOMNOSTI SOLÍ NA ZMĚNU VZHLEDU AGREGOVANÝCH STRUKTUR HA NA POVRCHU SLÍDY | 52 |
| ZÁVĚR | 54 |
| SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... | 55 |

| | |
|--|-----------|
| SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK..... | 59 |
| SEZNAM OBRÁZKŮ | 60 |
| SEZNAM TABULEK..... | 63 |

ÚVOD

Kyselina hyaluronová je nedílnou součástí živých organismů, řadí se mezi nejrozšířenější biopolymery v přírodě. Díky svým specifickým vlastnostem je předmětem zkoumání, na jehož základě byla vytvořena i tato bakalářská práce.

Z výzkumu věnovaného tomuto polymeru v uplynulých osmi desítkách let vyplynulo, že není nezbytné izolovat kyselinu hyaluronovou, respektive hyaluronan sodný (HA), pouze ze vzorků tkáně (např. kohoutích hřebínků), ale lze ji připravit pomocí metabolických činností bakterií a dále ji modifikovat, díky čemuž nachází stále širší uplatnění v mnoha aplikacích. Uplatňuje se v tkáňovém inženýrství, v podobě mikrovláken v oblasti výzkumu hojení ran nebo ve vývoji cílené distribuce a řízeného uvolňování léčiv. Vlastností kyseliny hyaluronové lze využít ve výzkumu věnovaném protirakovinné léčbě založené na nanočásticích, při reparacích míchy nebo jako podpůrný materiál pro léčbu pomocí kmenových buněk.

Kyselina hyaluronová plní v organismu řadu funkcí závislých na délce makromolekulárního řetězce a nachází se v četných konformacích, čímž je podmíněna variabilita jejích vlastností.

Z výše uvedeného plyne, že je velmi žádoucí znát strukturu a umět ji řízeně formovat. Jednou z metodik, kterou lze popsat strukturu kyseliny hyaluronové, je mikroskopie atomárních sil (AFM). Pomocí AFM byla HA studována z hlediska konformačních změn na různých typech povrchů, byly studovány kationtově indukované konformační změny, byla zobrazována izolovaná vlákna atd.

Teoretická část práce zahrnuje seznámení se strukturou a funkcemi hyaluronanu a dosavadní poznatky o konformačních změnách na povrchu nebo v roztoku zkoumaných mimo jiné pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM).

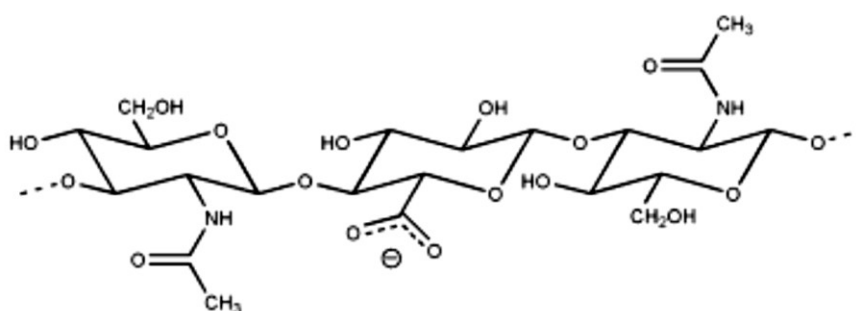
Praktická část práce se zaměřuje na charakterizaci makromolekul HA pomocí AFM s ohledem na změny střední molekulové hmotnosti, hmotnostní podíl HA v roztoku, historii přípravy roztoku HA, jeho uchovávání a přítomnost solí v roztoku.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 HYALURONAN SODNÝ

1.1 Struktura

Hyaluronan sodný je sůl kyseliny hyaluronové (HA). Jedná se o vysokomolekulární (10^5 - 10^7 Da) glykosaminoglykan. Polysacharidový řetězec je nerozvětvený a skládá se z disacharidové jednotky tvořené D-glukoronovou kyselinou a N-acetyl-D-glukosaminem [1; 2]. Na Obr. 1 je znázorněna schématická struktura trisacharidu hyaluronanu. Řetězec obsahuje jednu karboxylovou skupinu na disacharidovou jednotku, jedná se o polyanion [3; 4].



Obr. 1: Schématické znázornění trisacharidu hyaluronanu zahrnuje disacharidovou jednotku sestávající z N-acetyl-D-glukosaminu a D-glukoronové kyseliny [4].

Sekundární struktura je charakterizována intramolekulárními vodíkovými vazbami. Pokud je HA dispergována ve vodném prostředí, nelze tyto vazby lehce odlišit od vodíkových vazeb vlastního disperzního prostředí. Terciární struktura hyaluronanu je výrazně ovlivněna prostředím, v jakém se nachází. Relativně tuhé glykosidické vazby a vodíkové vazby mají tendenci do jisté míry bránit rotaci a tím omezují konformační variabilitu makromolekulárního řetězce [1]. Faktory ovlivňující sktrukturu HA mohou být pH, iontová síla, iontové interakce, přítomnost jiných látek atd.

Uspořádání řetězce je dáno také jeho chemickou podstatou. Jak již bylo zmíněno, HA je polyanion, tvoří samovolné asociace. Lze předpokládat, že v extracelulární matrix (ECM) existuje hyaluronan ve formě náhodně svinutých molekul – statistických klubek. Nicméně je známo, že v organismu se konformace HA liší podle druhu tkáně a funkce [3].

Původní předpoklad, že náhodná klubka jsou v roztoku stabilizována vodíkovými vazbami v kombinaci s elektrostatickými repulzními interakcemi mezi karboxylovými skupinami, byl dokázán pomocí různých technik [5]. Později byl doplněn o myšlenku, že významnější

vliv na stabilizaci konformace v roztoku má schopnost HA samovolně asociovat (tvořit asociované struktury). Tvorba asociovaných struktur však byla v rozporu s některými dříve potvrzenými vlastnostmi HA. Předně by docházelo k intramolekulárním interakcím, tedy k interakcím mezi jednotlivými segmenty jednoho řetězce než k interakcím mezi různými řetězci. To by vedlo k opačnému vlivu na tuhost řetězce a k tvorbě menších domén v roztoku, než jak je tomu ve skutečnosti. Je možné, že asociace jsou natolik slabé a nestálé, že způsobují neideální chování roztoku HA a ovlivňují reologické chování, ale netvoří stabilní síť, nezpůsobují nerozpustnost a umožňují tvorbu velkých makromolekulárních domén v roztoku. Bylo zjištěno, že k vysoce protažené makromolekulární konformaci přispívají jak intramolekulární vodíkové vazby, tak polyaniontové vlastnosti HA. Při fyziologické iontové síle jsou však elektrostatické účinky nízké. Nejpravděpodobnější vysvětlení pro velký hydrodynamický objem a neneutonské viskoelastické vlastnosti je přítomnost násobných dynamických vodíkových vazeb mezi sousedními sacharidy. Ty omezují rotaci a ohebnost glykosidických vazeb a způsobují vyšší tuhost systému při zachování relativně vysoké mobility polymerního řetězce [2].

HA se v neutrálním vodném roztoku nebo ve fyziologickém roztoku chová jako semi-flexibilní polymer. Krátká vlákna jsou spíše natažena, delší vlákna mají tendenci se svinovat. Molekulová doména tvoří statistické klubko znázorňující časový průměr všech možných konformací. Vzhledem k vysoké molekulové hmotnosti jsou domény natolik velké, že mohou jednotlivá vlákna HA spolu interagovat i při relativně nízkých koncentracích [3].

Jak bylo zmíněno výše, HA je polyanion a jeho konformace v roztoku je ovlivněna přítomností elektrolytů. Elektrolyty (NaCl, KCl, MgCl₂, MnCl₂, CaCl₂) a rozpouštědla mají vliv zejména na strukturu, ohebnost a hydrodynamické vlastnosti řetězce HA. Dále je nutno uvést, že nebyl prokázán vliv elektrolytů na spojování řetězců HA do sítě. HA je kompaktnější v přítomnosti iontů Ca²⁺ a Mn²⁺. Při neutrálním pH a fyziologické iontové síle zaujímá HA konformaci statistického klubka, které je stabilizované vodíkovými vazbami. Vodíkové vazby lze přerušit etanolem nebo jiným organickým rozpouštědlem, které z řetězce vytlačí vodu a tím dojde k vytvoření kompaktnějšího uspořádání HA [6].

1.2 Funkce

Z hlediska medicínských aplikací je v případě HA podstatná její vysoká biokompatibilita a biodegradabilita. Většina vlastností HA a z toho plynoucích funkcí v organismu závisí na její molekulové hmotnosti [7]. Specifické hydrodynamické a viskoelastické vlastnosti dané četnými možnostmi změn konformace umožňují hyaluronanu plnit celou řadu funkcí v organismu [8]. Kyselina hyaluronová je ve formě solí hlavní složkou extracelulární matrix, kde má klíčovou roli v procesu regenerace tkání. Interakcí s proteiny a proteoglykany HA organizuje ECM a udržuje tkáňovou homeostázu. Vazba HA s receptory na buněčném povrchu aktivuje různé signální dráhy, které regulují funkci buněk, vývoj tkáně, zánětu a progresi nádoru a metastáz [7; 9]. Je přítomná v synoviálních tekutinách a v očním sklivci, kde zajišťuje potřebnou viskoelasticitu. Dále kontroluje hydrataci tkání a dopravu vody nebo vázání proteoglykanů v ECM. Plní četné funkce jako receptor při buněčné mitóze a migraci. Z výše uvedeného plyne nezbytnost porozumět vlivu molekulární hmotnosti a koncentrace HA v roztoku na její vlastnosti a funkci při specifických interakcích s buňkami a komponentami ECM. To znamená, že pro úplné využití aplikačního potenciálu je třeba mít plně pod kontrolou veškeré interakce mezi HA a různými druhy prostředí [8]. Jednou z největších výzev moderní klinické medicíny je využití biologické aktivity kyseliny hyaluronové při opravách tkáně na více úrovních, s cílem co nejvíce zefektivnit proces hojení ran [7]. Mimo to je nezbytné mít na zřeteli možnosti degradace HA a s tím související vznik biologicky aktivních menších fragmentů, které hrají významnou roli při patologických procesech vznikajících při obnovování normální funkce tkáně [10].

1.3 Metody charakterizace

Od 80. let minulého století se struktura polysacharidů zkoumá zejména pomocí plynové a kapalinové chromatografie, hmotnostní spektrometrie, rentgenové difrakce, elektronové mikroskopie, nukleární magnetické rezonance, dynamického rozptylu světla, tenziometrie, goniometrie nebo v té době objevené mikroskopie atomárních sil (AFM – Atomic Force Microscopy) [11].

Pomocí rentgenové difrakce byla u HA určena jednošroubovicová konformace zahrnující 2, 3 nebo 4 disacharidy na jednu otočku v závislosti na přítomnosti protiiontu (H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , ...). V přítomnosti neobvyklých protiiontů (H^+/K^+ , Rb^+ , NH_4^+) dochází k tvorbě

dvoušroubovice se 4 disacharidovými jednotkami na otočku. Všechny struktury jsou stabilizovány vodíkovými vazbami mezi sousedícími zbytky cukrů napříč oběma glykosidickými vazbami [3].

Vztah mezi strukturou a dynamikou řetězce byl stanoven měřením závislosti korelačního času a NMR relaxačních parametrů na rozměru řetězce za použití výpočetních metod molekulární mechaniky a simulace Monte Carlo. Tímto postupem byl kvantifikován i příspěvek vodíkových vazeb na tuhost řetězce [12].

Metodou NMR a MD simulací byla vyšetřována konformace HA v roztoku. MD simulace zahrnovala v roztoku molekuly vody a sodné ionty, zatímco NMR byla aplikována na N-obohacené HA oligosacharidy. Na základě těchto měření byly zjištěny slabé přechodné vodíkové vazby rychle se měnící v rozpouštědle [13].

Ukázalo se, že při vysokých koncentracích HA ve fyziologickém roztoku jsou tvořeny stabilní superstruktury. Při zvyšování teploty dochází k náhlé změně reologických vlastností, měřených metodou padající kuličky, což je následek zanikání vazeb stabilizujících sít'. Tepelné narušení superstruktury vede k přechodu ze stabilní na dočasnou polymerní sít'. Předpokládá se, že v takovém roztoku jsou intramolekulární asociace indukovány hydrofobními interakcemi mezi nepolárními částmi řetězce.

Informace o struktuře HA byly dále získány metodou FTIR. Odhad síťového strukturního přechodu byl získán DSC analýzou [14]. Nicméně kompletní objasnění struktury polysacharidů je obtížné vzhledem k jejich komplikovanému složení a četným konformacím.

Při užití technik skenovací elektronové mikroskopie (SEM) a transmisní elektronové mikroskopie (TEM) pro charakterizaci HA je vyžadováno vysoké vakuum a složitá příprava vzorku. Pro rentgenovou difrakci (XRD) se používají vzorky ve formě vláken nebo filmů, které mají ve většině případů uspořádanou molekulární strukturu. Jinými slovy XRD poskytuje především informace o polysacharidech v pevném stavu, nikoliv v roztoku. Pro určení konformace v roztoku je vhodná nukleární magnetická rezonance (NMR), avšak u této techniky je obtížné určit NMR signály pro vysokomolekulární polysacharidy [15].

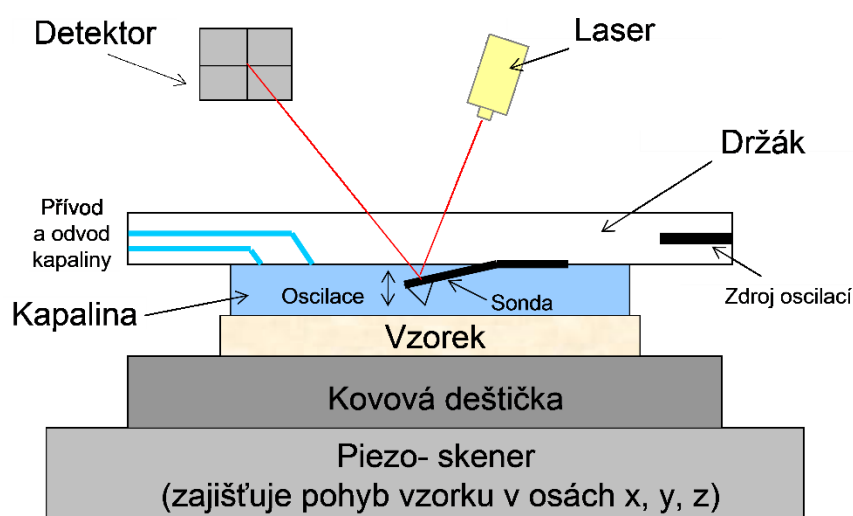
Pomocí DLS experimentu, měření viskozity a povrchového napětí byla studována interakce mezi HA a kvarterními solemi. Experimentální výsledky této práce ukázaly, jak koncentrace kvarterních solí HA ovlivňuje změnu konformace makromolekul HA v roztoku, což je spojeno se změnou velikosti polymerního klubka [16].

Neposlední z celé řady charakterizačních technik, které lze využít pro studium struktury jednotlivých řetězců HA je mikroskopie atomárních sil (AFM). V dalším textu bude této technice věnována značná pozornost v souladu s tématem této práce. AFM umožňuje zobrazovat polysacharidy jak v pevném stavu, tak v roztoku, bez nezbytnosti složité přípravy vzorku, což umožňuje udržet fyziologický stav a integritu charakterizovaných systémů [15].

2 CHARAKTERIZACE POLYSACHARIDŮ POMOCÍ MIKROSKOPIE ATOMÁRNÍCH SIL

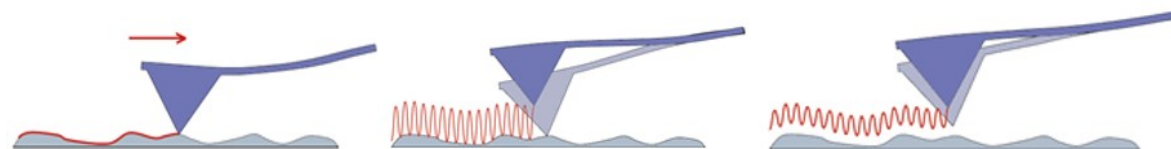
2.1 Princip mikroskopie atomárních sil a její využití pro studium polysacharidů

Mikroskopie atomárních sil (Atomic Force Microscopy – AFM) patří do souboru technik označovaných jako Mikroskopie skenující sondou (Scanning Probe Microscopy – SPM). Obraz povrchu vzorku je získáván skenováním povrchu sondou s ostrým hrotem [16].



Obr. 2: Princip AFM pracujícího v kapalině v pokleповém režimu s fixovanou sondou a pohyblivým vzorkem [17].

V případě techniky AFM rozeznáváme tři základní měřicí režimy, kontaktní, semikontaktní a bezkontaktní, viz. Obr. 3.



Obr. 3: Pracovní režimy AFM, kontaktní (vlevo), semikontaktní (uprostřed) a bezkontaktní (vpravo) [17].

V kontaktním režimu se hrot sondy dotýká povrchu vzorku, přičemž může být skutečný povrch vzorku stíněn vrstvou sorbované vody. Pro eliminaci vlivu povrchově sorbované vody a případných kapilárních sil lze vzorek zobrazovat například v kapalném prostředí. Zobrazením v kapalném médiu lze také předejít tvorbě agregovaných struktur při sušení vzorku v atmosféře. Bezkontaktní režim eliminuje destrukci vzorku při měření, avšak je používán zřídka pro biologické materiály z důvodu nízkého rozlišení. Nejvhodnější z diskutovaných

režimů pro zobrazení polysacharidů je semikontaktní, viz. Obr. 3 uprostřed. Tento mód je šetrnější než kontaktní režim a mimo to poskytuje dostatečné množství informací o zkoumaném povrchu. Metodou AFM lze také určit sílu působící mezi polysacharidy a jinými makromolekulami, případně povrchem [16].

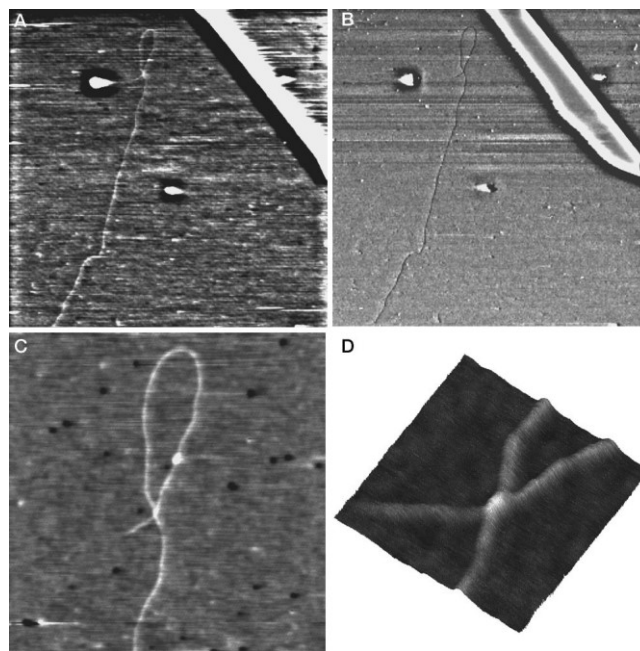
Studium polysacharidů metodou mikroskopie atomárních sil bylo započato v 90. letech minulého století, kdy byly získány první 3D profily povrchů periodické šroubovicové struktury bakteriálního polysacharidu Kirbym a kol [11].

Metodou AFM byly následně pozorovány osamocené molekuly polysacharidů [18; 19], další polysacharidové šroubovicové struktury [20] nebo síťové struktury [21; 22].

Mimo to je v literatuře popsán postup, jak pomocí mikroskopie atomárních sil provést dynamickou analýzu s následnou numerickou simulací molekulární struktury polysacharidu přichyceného k pohybující se sondě AFM [23].

2.2 AFM studium kyseliny hyaluronové

Prvotní studie prezentované v odborné literatuře se zabývají možnostmi využití poklepového režimu AFM pro zobrazování jednotlivých molekul HA. V rámci těchto měření byly zobrazeny 6-7 μm dlouhé makromolekuly na povrchu slídy. Výška zaznamenaného profilu jednotlivých vláken byla $(0,6 \pm 0,1)$ nm, což koresponduje s průměrem jednoho polysacharidového vlákna. V důsledku intramolekulárních interakcí se však řetězce vyskytovaly v ne příliš natažené formě, viz. Obr. 4 [24]. Řešení tohoto problému je v použití zředěného roztoku (1-5 $\mu\text{g/ml}$) nanášeného na povrch slídy. Vlastní adhezi HA ke slídě lze zvýšit přidáním roztoku MgCl_2 o nízké koncentraci do roztoku HA. Pokud je vzorek obsahující HA vystaven okolnímu prostředí (laboratorní teplota, vzdušná vlhkost), naadsorbuje se na něj tenká vrstva okolních plynů a vody. Pozorujeme-li HA v prostředí vzduchu, lze tedy předpokládat, že vzorek je ve více hydratovaném stavu, než kdybychom měření prováděli například v prostředí organických rozpouštědel, jak je popsáno v odborné literatuře [20; 25]. Z porovnání měření v poklepovém a kontaktním režimu vyplynulo, že měření v kontaktním režimu je obtížné z důvodu adhezivních sil mezi vrstvou vody a hrotem. Z tohoto důvodu se používá především poklepový režim AFM [24].



Obr. 4: Vzhled řetězců HA na povrchu slídy zobrazený pomocí AFM. Široké smyčky na zdánlivém konci řetězce vznikají antiparalelním uspořádáním segmentů řetězce do stabilizované kmenové struktury [24].

Stabilní výška dlouhého segmentu řetězce, viz. Obr. 4, naznačuje uspořádání vláken HA do dvojité spirály. Je pravda, že z tohoto typu měření nelze přesně určit, zda je tato struktura přítomna i v roztoku. Nicméně důkaz o samovolné asociaci HA ve fyziologickém roztoku byl dříve popsán jinými autory v 80. letech minulého století [3; 24].

V následujícím textu budou poznatky věnované možnostem zobrazování HA pomocí AFM rozděleny podle proměnných majících vliv na změnu vzhledu (uspořádání řetězců) HA na povrchu nosného substrátu. Bude řešena problematika vlivu chemického sesíťování, charakteru povrchu, způsobu přípravy atd.

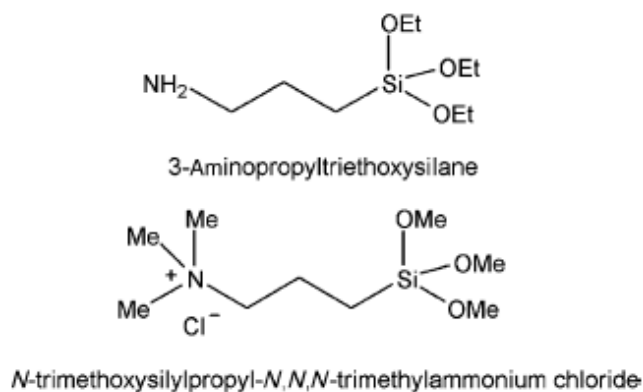
2.2.1 Struktura chemicky síťovaného hyaluronanu

V odborné literatuře popsané experimenty ukázaly, že formaldehydem síťovaný hyaluronan (hylan) má jiné chování v roztoku a jiné reologické vlastnosti než hyaluronan bez chemicky stabilizované sítě. Pomocí AFM bylo podáno molekulární vysvětlení těchto rozdílů. Průběh experimentu prezentovaný v literatuře spočíval v depozici hylanu i hyaluronanu na čerstvě odštipnutou slídu a v následném zobrazení výsledných struktur v butanolu [25]. Jak bylo

zmíněno výše, výhodou užití organického rozpouštědla při zobrazování polysacharidů je mimo jiné to, že zabraňuje hydrataci makromolekuly [20]. Při vysokých koncentracích (10 $\mu\text{g/ml}$) se roztoky hylanu a hyaluronanu chovají stejně, což bylo potvrzeno pomocí AFM. Při této koncentraci byla naměřena pro oba typy hyaluronanu podobná struktura propletených vláken s drobnými odchylkami v detailní struktuře způsobenými vazbou k povrchu a sušicím procesem. Po zředění (1 $\mu\text{g/ml}$) dojde k rozptýlení hyaluronanu a mohou být zobrazeny jednotlivé molekuly a malé agregáty, přičemž hylan po zředění tvoří velké agregované struktury [25].

2.2.2 Vliv charakteru povrchu na strukturu HA

Je známo, že polysacharidy mají vyšší afinitu ke slídě, na jejímž povrchu je sorbována tenká vrstva vody než k čerstvě odštipnuté slídě. Předmětem dalšího zkoumání se stala myšlenka, zda nábojově modifikovaný povrch bez vrstvy vody rovněž dokáže pevně vázat hyaluronan. Proto byla srovnána struktura imobilizovaného hyaluronanu na nemodifikované a modifikované slídě nebo grafitu. K modifikaci slídy byly použity deriváty silanu, viz. Obr. 5. V závislosti na typu použitého povrchu z hlediska náboje a hydrofobity lze na obrázcích 6, 8 a 9 pozorovat prodloužené, relaxované, kondenzované a interagující formy HA [26].



Obr. 5 Struktura silanových derivátů použitých k modifikaci slídy [26].

K výše zmíněné chemické modifikaci slídy byl použit 3-aminopropyltriethoxysilan (APTES) nebo N-trimethoxysilylpropyl-N,N,N-trimethylammonium chlorid (TMSPTA), viz Obr. 5, čímž na povrchu vznikly boční kationtové skupiny na koncích alifatických řetězců kovalentně

vázaných na povrch slídy. Hustota náboje na povrchu je tak nízká, že k imobilizaci makromolekul dochází bez drastických změn náboje. V tabulce 1 je srovnání velikostí kontaktních úhlů a hodnoty drsnosti pro povrchy s různými úpravami [26].

Tab. 1: Hodnoty kontaktních úhlů a drsnosti pro nemodifikovanou slídu, APTES- a TMSPTA- slídu a grafit [26]:

| Povrch | Kontaktní úhel | RMS |
|--------------|----------------|-------|
| Slída | 23±1° | 0,083 |
| APTES-slída | 31±1° | 0,271 |
| TMSPTA-slída | 36±1° | 0,258 |
| Grafit | 79±1° | 0,133 |

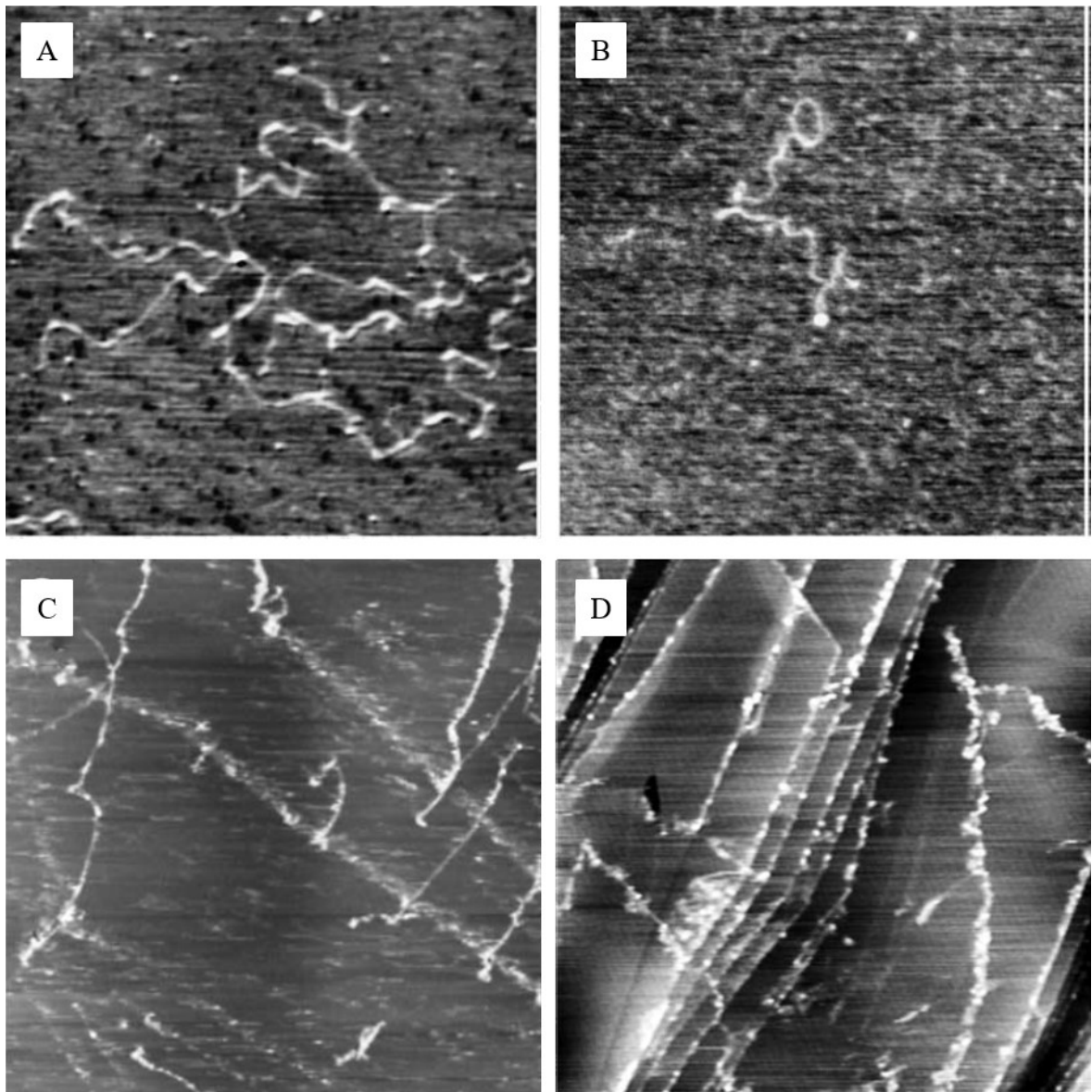
Z Tab. 1 vyplývá, že modifikovaná slída není dle očekávání atomárně rovná z důvodu přítomnosti shluků modifikačního činidla na povrchu. Takto modifikovaný povrch je vhodný pro zobrazení polysacharidového řetězce do výšky 0,5 nm. Na obrázku 6A a 6B je srovnání struktury izolovaného makromolekulárního řetězce imobilizovaného na nemodifikované slídě a TMSPTA modifikované slídě. Zobrazení HA na modifikované a nemodifikované slídě bylo shledáno stejně obtížným a pro oba povrchy byly získány podobné výsledky. Podobný průměrný počet zobrazených imobilizovaných vláken také naznačuje, že modifikace povrchu pomocí APTES a TMSPTA nemá příliš vliv na afinitu řetězce k povrchu. Stejně tak se u jednotlivých povrchů nelišilo konformační chování řetězců [26].

Na hydrofobní povrch vysoce orientovaného pyrolytického grafitu se ve srovnání se slídou váže HA podstatně lépe. Vrstva vody na grafitu postrádá strukturu a orientaci. Chování HA na povrchu grafitu je odlišné od chování na slídě. HA má silnou afinitu k povrchu grafitu. Hydrofobní povrch vysoce orientovaného pyrolytického grafitu umožňuje nejlepší zobrazení vláken s vysokým stupněm natažení (Obr. 6C, 6D). Na grafitu je kondenzace a tvorba asociací snížena z důvodu příznivějších interakcí ve srovnání se slídou. Roli v afinitě k povrchu hraje i vodivost materiálu [26].

Zvoleným substrátem lze tedy výrazně ovlivnit vzhled imobilizované makromolekuly. Je však třeba si uvědomit, že chování polymerního řetězce na povrchu a jeho výsledná struktura je ovlivněna nejen interakcemi mezi řetězcem a povrchem, ale pravděpodobně je i výsledkem již existujících mezimolekulárních interakcí v roztoku [24; 26].

Přes výše uvedené je v praxi nejčastěji používaným materiálem k imobilizaci polysacharidů, a především kyseliny hyaluronové, čerstvě odštipnutá slída. Negativní náboj vznikající při

štěpení vrstev ztrátou draselných kationtů bývá kompenzován modifikací slídy pomocí roztoku obsahujícího dvojmocný kation [16].



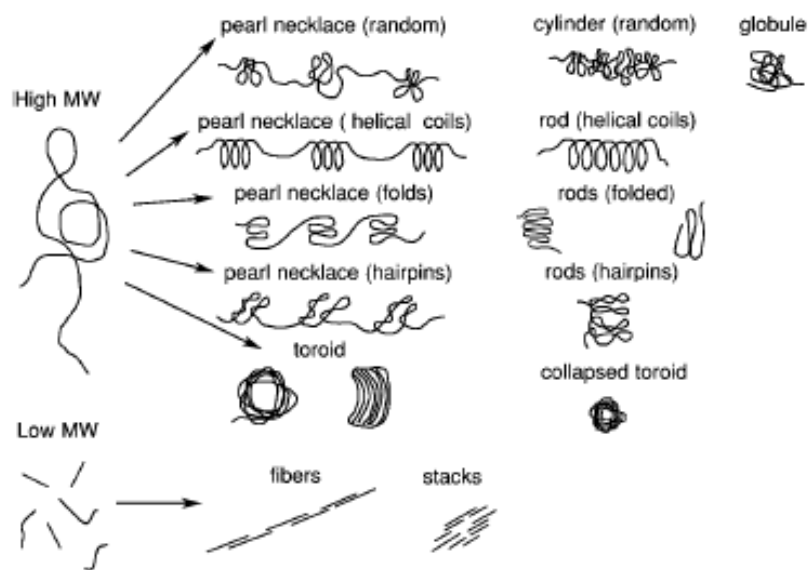
Obr. 6: TMAFM obraz vysoko- M_w HA deponované na nemodifikované slídě z $10\mu\text{g/ml}$ roztoku v H_2O , velikost $(1,3 \times 1,3) \mu\text{m} \times 2,5 \text{ nm}$ (A), na TMSPTA-modifikované slídě z $10\mu\text{g/ml}$ roztoku v H_2O , velikost $(1 \times 1) \mu\text{m} \times 1 \text{ nm}$ (B), TMAFM obraz středně- M_w HA deponované na grafitu z $10\mu\text{g/ml}$ roztoku v H_2O , velikost $(2,75 \times 2,75) \mu\text{m} \times 4 \text{ nm}$ (C), TMAFM obraz vysoko- M_w HA deponované na grafitu z $10\mu\text{g/ml}$ roztoku v H_2O , velikost $(3 \times 3) \mu\text{m} \times 2,7 \text{ nm}$ (D) [26].

2.2.3 Vliv přípravy vzorku na strukturu HA

Velký vliv na pozorovanou konformaci HA na povrchu má i způsob, jakým je polysacharid na slídu (nebo na jiný substrát) deponován.

Byl srovnán rozdíl metody volného kapání, depozice ultracentrifugací a adsorpce roztoku prezentovaný na schizophyllanu a kyselině huminové. Všemi metodami byly zobrazeny jak samostatné molekuly, tak agregáty, lišil se však poměr mezi nimi. [27]

Jak bylo zmíněno výše, povrch slídy po odštěpení získává částečně záporný náboj z důvodu ztráty části draselných iontů. Povrch proto začne absorbovat vodu ze vzduchu, míra hydratace však není kontrolovatelná. HA na slídě, i bez ohledu na stav prehydratace, má tendenci k intramolekulární kondenzaci. V závislosti na míře hydratace povrchu však dochází k tvorbě celé řady charakteristických kondenzovaných forem schematicky znázorněných na Obr. 7. [28].

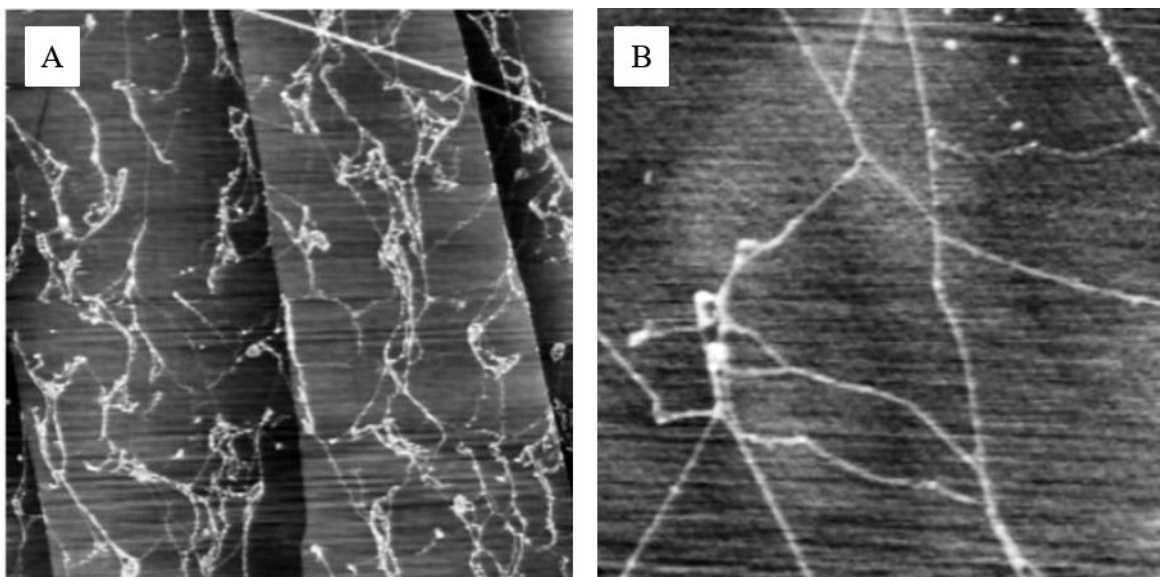


Obr. 7: Možné kondenzované konformace HA v polyelektrolytu [28].

Podrobná molekulární uspořádání v rámci jedné kondenzované struktury HA však nejsou dosud známa, připomínají však kondenzované formy jiných makromolekul, např. DNA.

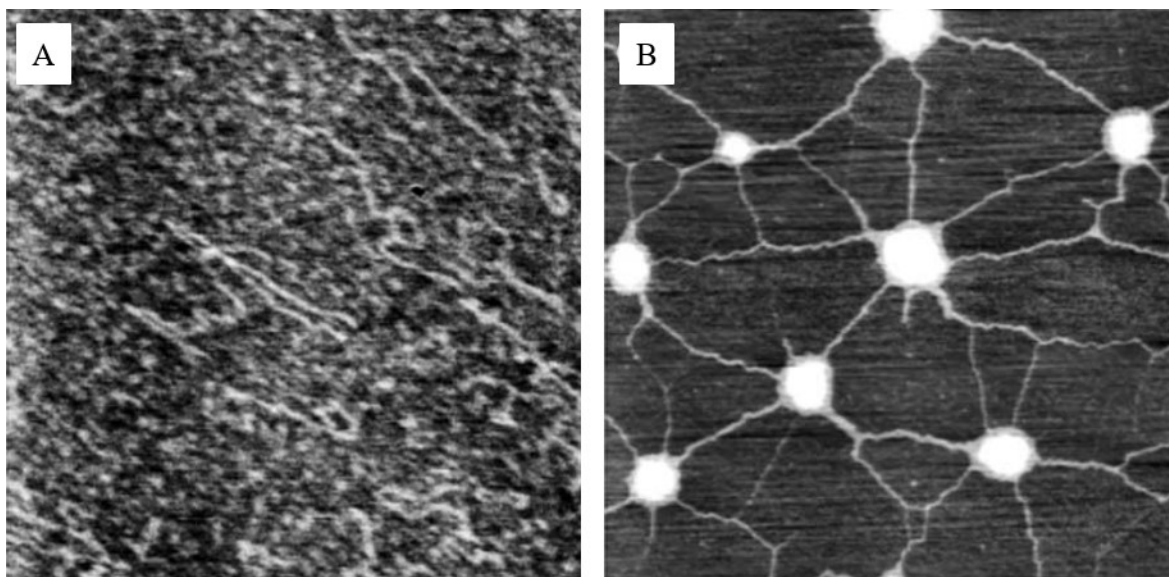
Pokud jsou vlákna na grafitu vysušena dusíkem bez předchozího oplachu, dochází k silnějším interakcím s povrchem než u vzorků s oplachem, viz. srovnání Obr. 6C, 6D a 8A, 8B. U vzorků s oplachem dochází k pohybu vláken za hrotem při skenování. Pohyb je nejmarkantnější u vysoko-molekulární HA, u středně-molekulární je méně častý. Z toho důvodu se

dá předpokládat, že kratší řetězce mohou dosahovat příznivějších konformací pro zvýšení interakcí se substrátem [28].



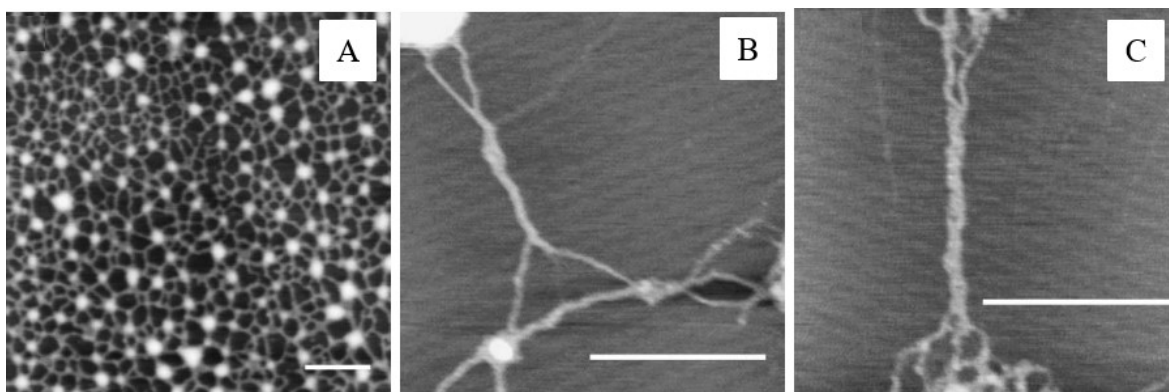
Obr. 8: TMAFM obraz vysoko- M_w HA deponované na grafitu z $10\mu\text{g/ml}$ roztoku v H_2O bez oplachu před sušením, velikost $(3 \times 3)\ \mu\text{m} \times 4\ \text{nm}$ (A), TMAFM obraz vysoko- M_w HA deponované na grafitu z $10\mu\text{g/ml}$ roztoku v H_2O bez oplachu před sušením, velikost $(1,5 \times 1,5)\ \mu\text{m} \times 1,6\ \text{nm}$ (B) [26].

Při vynechání oplachu na povrchu slídy s naneseným roztokem HA před sušením dusíkem při přípravě vzorku s imobilizovanou středně-molekulární HA nebyly pozorovány výrazné změny ve srovnání se strukturami pozorovanými v předchozí kapitole u vzorků s oplachem (Obr. 6A, 6B a 9A). U vysokomolekulární HA (Obr. 9B) však bylo možné při změně postupu (vynechání oplachu před sušením) pozorovat síť vláken, jejíž spojovací body jsou tvořeny kulovitými agregáty formovanými v důsledku sušícího procesu a nízké afinity polysacharidu k povrchu. Vlákna mezi agregáty jsou tvořena nataženými a vzájemně interagujícími řetězci [26].



Obr. 9: TMAFM obraz středně- M_w HA deponované na slídě z $10\mu\text{g/ml}$ roztoku v H_2O bez oplachu před sušením, velikost $(1,5 \times 1,5) \mu\text{m} \times 1,6 \text{ nm}$ (A), TMAFM obraz vysoko- M_w HA deponované na slídě z $10\mu\text{g/ml}$ roztoku v H_2O bez oplachu před sušením, velikost $(3 \times 3) \mu\text{m} \times 3 \text{ nm}$ (B) [26].

Podobný závěr, že HA deponovaná na povrch slídy se formuje do podoby sítě tvořené globulárními strukturami propojenými prodlouženými segmenty řetězců, byl učiněn i v dalších výzkumech, viz Obr. 10 [28].



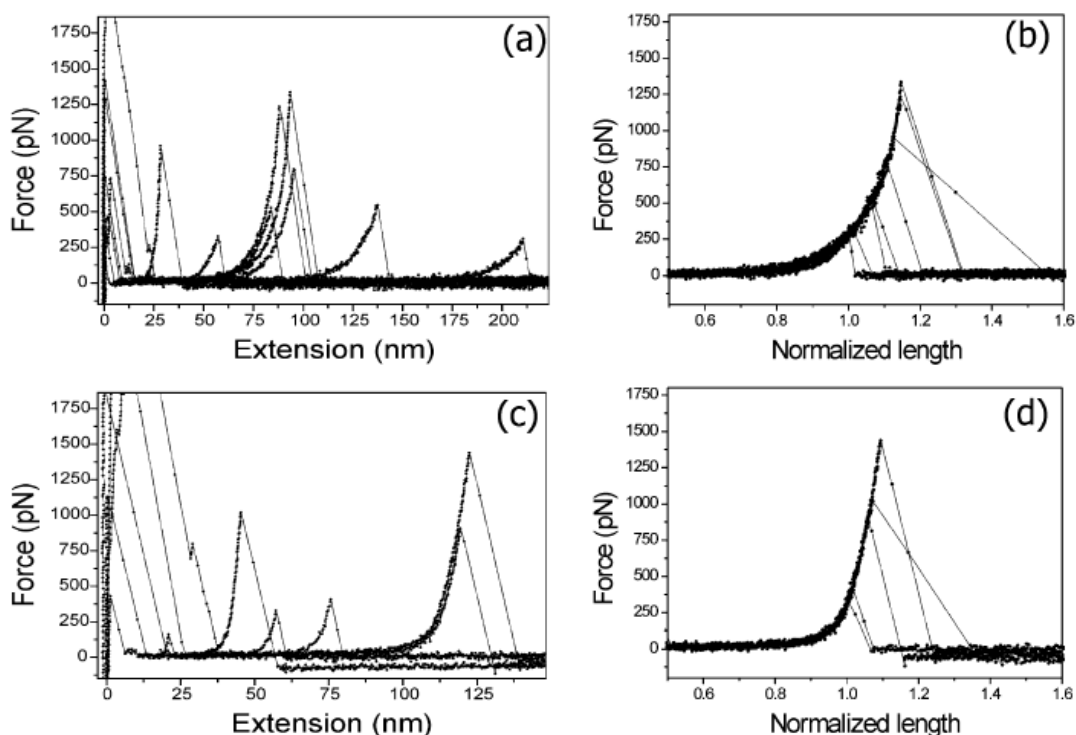
Obr. 10: Síť HA (A) deponované na čerstvě štípané slídě bez oplachu před sušením se stočenými vlákny (C) mezi globulárními strukturami [28].

2.2.4 Vliv teploty na konformační chování HA imobilizované na povrch

Při charakterizaci hyaluronanu sodného nelze zanedbat vliv teplotních změn na konformační chování. Následující experiment je důkazem, že pomocí AFM lze kromě výškového zobrazení získat i jiné informace o charakteru vzorku. Vliv teploty na stabilitu a konformační

chování HA ve fyziologickém roztoku na úrovni jedné molekuly byl vyšetřen technikou AFM-SMFS. Body, ve kterých je řetězec naadsorbován na hrot sondy, jsou náhodně rozmístěny podél řetězce. To způsobilo, že prodloužení molekul se liší pro každou tahovou zkoušku, což se projevilo v různých účinných délkách pro každý experiment. Pro porovnání tahových křivek (Obr. 11) pro různé teploty je proto třeba normalizovat hodnoty na prodloužení odpovídající určité předem zvolené síle. Skutečnost, že se normalizované křivky překrývají, je známkou natažení jednotlivých molekul, protože elastické vlastnosti rostou lineárně s délkou křivky. Pomocí AFM-SMFS byla dále prokázána lokální teplotní destabilizace. Při změně teploty z 29 °C na 46 °C došlo ke změně z pravidelné struktury na náhodné klubko [29].

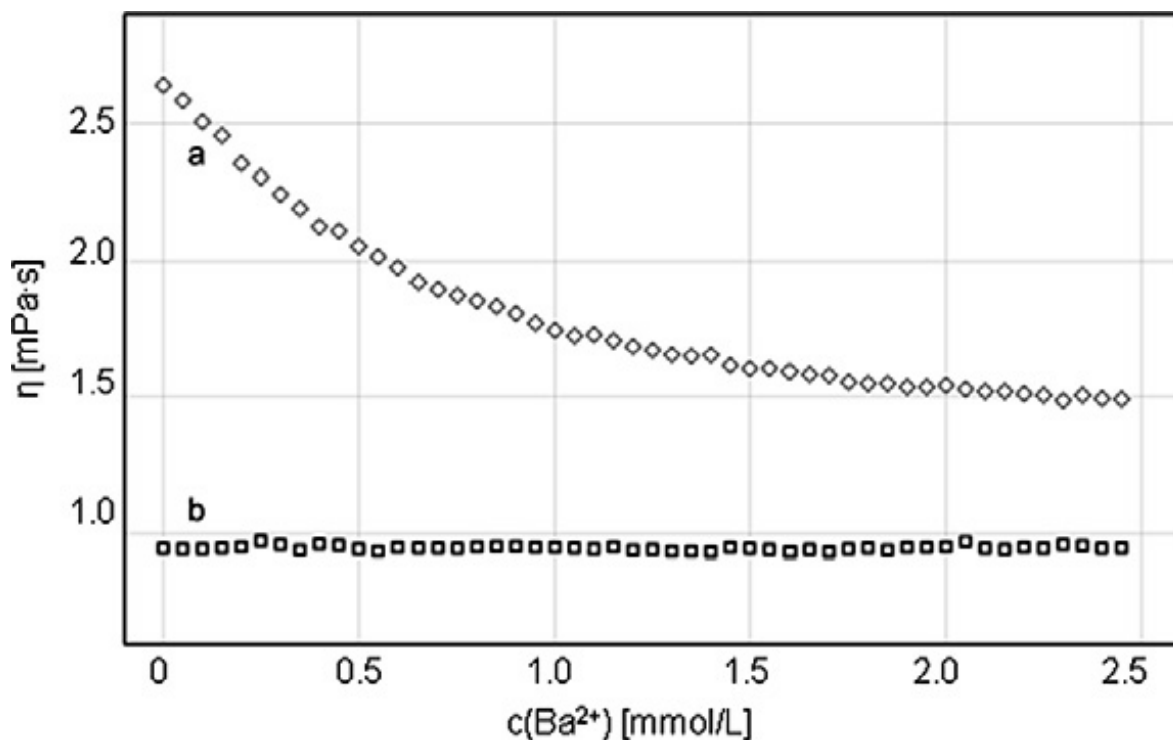
HA získává při pokojové ve fyziologickém roztoku superstrukturu – lokální strukturu sítě stabilizované vodíkovými vazbami podél řetězce mezi polárními skupinami HA a případně vodou, jakož i vodou zprostředkovanými intramolekulárními vazbami. Destabilizace struktury vzrůstá, pokud je teplota zvýšena nad 40°C. Při nízké teplotě je superstrukutra postupně narušována při nárůstu síly, což vede ke vzniku stejné konformační struktury, kterou HA zaujímá při vyšší teplotě. Pozorování změny z konformace pravidelné cívky na strukturu náhodného klubka při zvyšování teploty prokazuje teplenou destabilizaci lokální superstruktury. Postupné rozrušování struktury bylo pozorováno i při pokojové teplotě působením síly [29].



Obr. 11: Tahové křivky pro různé teploty měření (a) 29 °C, (c) 46 °C, (b), (d) normalizované délky [29].

2.2.5 Vliv přítomnosti iontů na strukturu HA

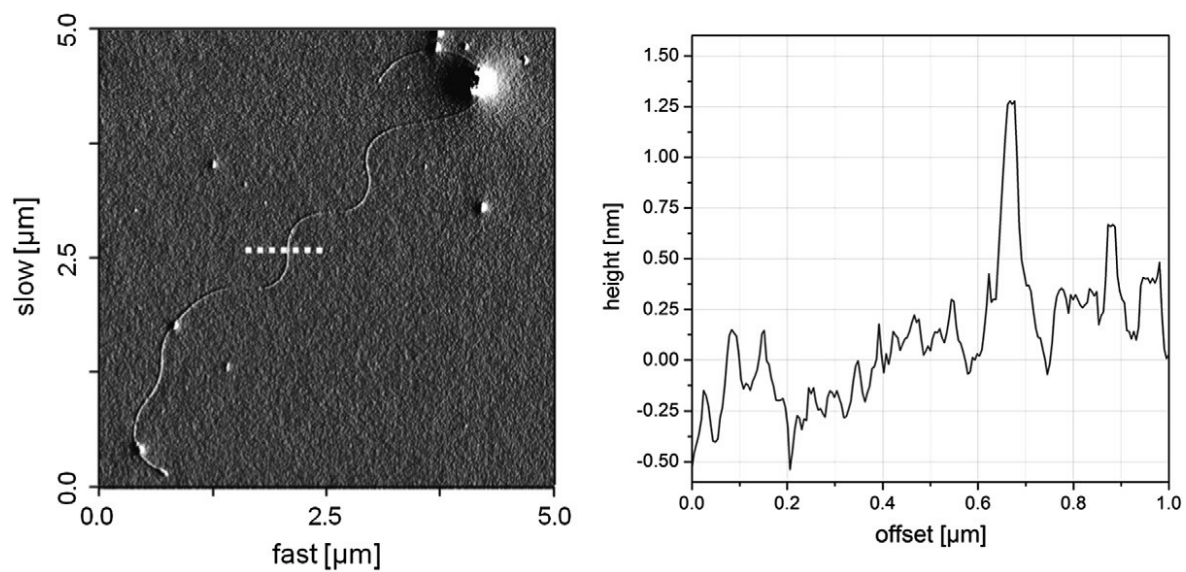
Strukturu HA významně ovlivňuje přítomnost iontů a solí v roztoku. Vliv bivalentních kationtů (Ba^{2+}) na molekulární konformace částečně deprotonované kyseliny hyaluronové byl sledován viskozimetricky a pomocí AFM. Výsledkem uvedeným v literatuře jsou kationtově indukované konformační změny vedoucí k nárůstu viskozity roztoku hyaluronanu. Korepondující AFM data odhalují, že bivalentní kationty indukují transformaci z prodloužené a mírně zakřivené konformace na vnitřně propojené molekuly vykazující ostré ohyby a menší hydrodynamický poloměr. Viskozita hyaluronanu se výrazně mění s koncentrací přítomného kationtu. Při zvýšení koncentrace kationtu až na 2,5 mM dojde ke snížení viskozity z 2,7 mPas na hodnotu přibližně 1,5 mPas (Obr. 12). Největší účinek lze pozorovat mezi koncentracemi 0 až 1,5 mM [30].



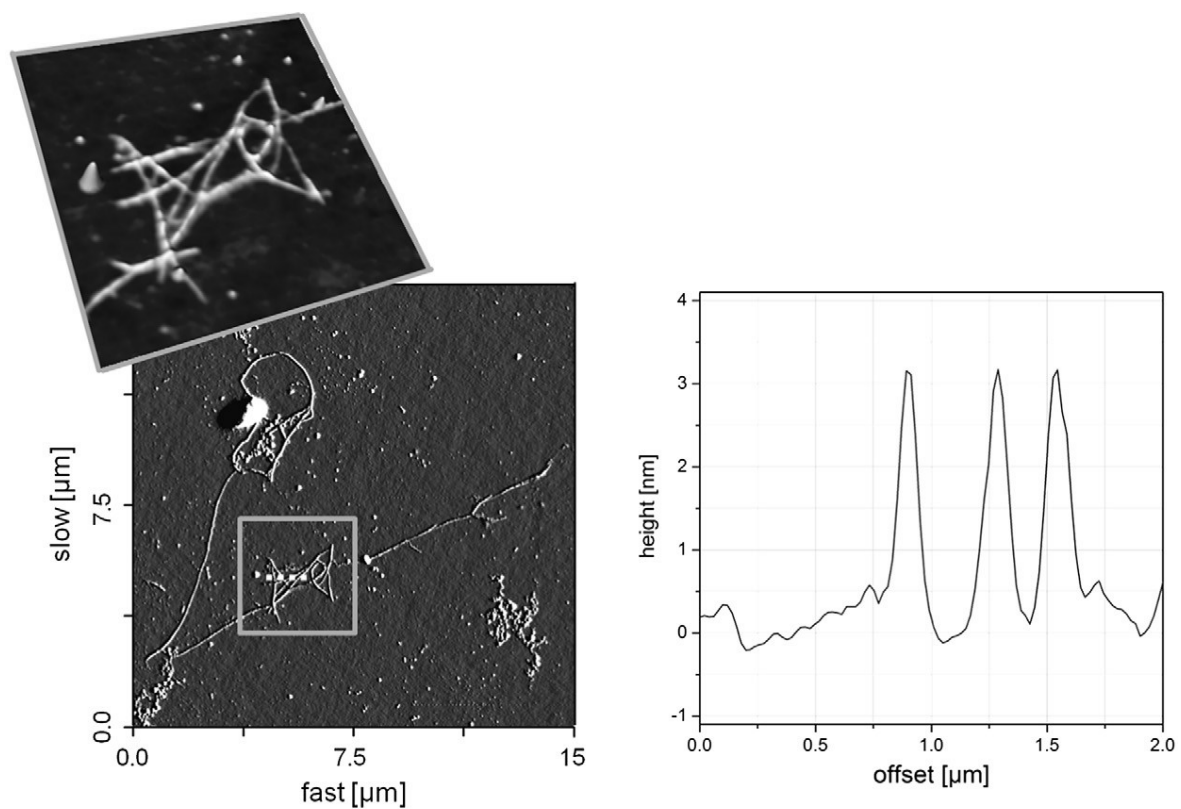
Obr. 12: Graf závislosti viskozity HA na koncentraci barnatých kationtů, srovnání s dextranem, na který nemá přítomnost bivalentního kationtu vliv [30].

Vliv bivalentního kationtu na snížení viskozity roztoku lze interpretovat jako redukcí hydrodynamického poloměru molekuly. Po přidání barnatých kationtů se dramaticky změní konformace molekul hyaluronanu. Dojde ke stočení řetězců do hustě zohýbaných svazků s ostrými záhyby, což lze pozorovat na obrázcích 13 a 14 [30].

Nerovnosti ve výškových profilech na Obr. 13 a 14 mohou být způsobeny použitím křemíku místo slídy, kdy slabší interakce mezi hyaluronanem a povrchem mohou vést ke snížení adheze a částečné separaci řetězce od povrchu [30].



Obr. 13: TMAFM zobrazení HA immobilizované z roztoku bez bivalentních kationtů [30].



Obr. 14: TMAFM zobrazení HA immobilizované z roztoku s bivalentními kationty [30].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 POPIS EXPERIMENTU

Cílem experimentu bylo optimalizovat postup přípravy monovrstev hyaluronanu sodného na povrchu slídy. To znamená imobilizovat hyaluronan sodný na povrch tak, aby bylo možné pozorovat jednotlivé izolované řetězce či agregáty polymerních řetězců. Následně pak tyto vrstvy analyzovat a vzájemně porovnat v závislosti na procesních podmínkách přípravy. Zhodnotit, zda pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM) lze pozorovat změny v povrchových strukturách ovlivněných střední molekulovou hmotností polymerů, výchozí koncentrací polymeru v roztoku, z níž byla vrstva připravována atd.

3.1 Použité materiály a chemikálie

Studovaným polymerním systémem byla sodná sůl kyseliny hyaluronové (hyaluronan sodný – HA) v kosmetické čistotě od společnosti Contipro a.s. Jako rozpouštědla byla použita ultra čistá voda ($18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) a fyziologický roztok obsahující NaCl, p.a. od společnosti SigmaAldrich. K chemické modifikaci povrchu byl použit roztok $0,1 \text{ M MgCl}_2$ ve vodě. MgCl_2 p.a. byl zakoupen od společnosti SigmaAldrich. Jako povrch sloužící k zachytávání monovrstev HA byla použita slída o rozměru $1 \times 1 \text{ cm}$, typ V-4 od SPI SUPPLIES.

3.2 Mikroskop atomárních sil

Měření byla provedena pomocí mikroskopu atomárních sil (AFM) NTEGRA Prima od společnosti NT-MDT. Všechny vzorky byly měřeny v poklepovém režimu (TMAFM) na vzduchu. Pro všechna měření byla použita silikon nitridová sonda NSG01 od společnosti NT-MDT. Byly skenovány plochy o rozměru $3 \times 3 \text{ }\mu\text{m}$, s rozlišením $512 \times 512 \text{ dpi}$ a rychlostí $0,3\text{-}0,7 \text{ Hz}$.

3.3 Programy pro analýzu dat AFM

Pro zpracování dat z AFM byl použit program Gwydion verze 2.42 – program pro vizualizaci a analýzu dat pro SPM zahrnující techniky AFM, MFM, STM, SNOM/NSOM. Dále byl použit program ImageJ verze 1.6_0_24, vydavatel National Institutes of Health.

3.4 Příprava roztoků

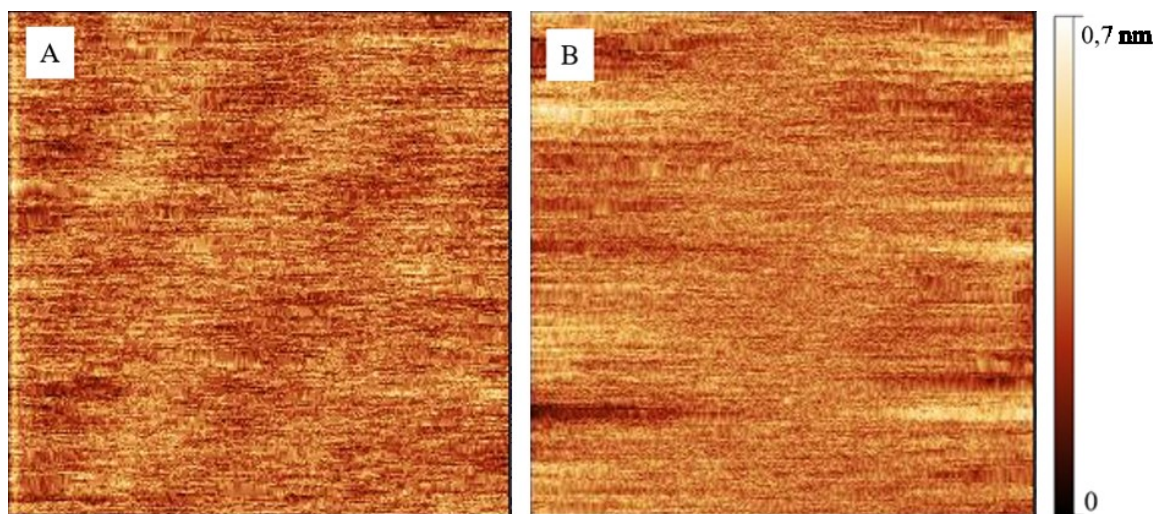
Pro všechny srovnávané experimenty byl použit následující postup. Byl připraven roztok hyaluronanu sodného určené střední molekulové hmotnosti o daném hmotnostním podílu

polymeru ve zvoleném rozpouštědle. Rozpouštění polymeru probíhalo na laboratorní třepačce po předem stanovenou dobu 22, 44 nebo 67 hodin při laboratorní teplotě 20 °C. Byly připravovány dva typy roztoků o hmotnostním podílu 0,1 % a 0,01 % a střední molekulové hmotnosti 124 kDa, 243 kDa, 370 kDa, 600 kDa, 1,18 MDa, 1,5 MDa a 2,36 MDa ve vodě nebo ve fyziologickém roztoku.

3.5 Imobilizace HA na povrch slídy

V prvním kroku bylo na čerstvě odštípnutou slídu nanášeno 50 μl 0,1 M MgCl_2 pomocí mikropipety. Po 60 s byla přebytečná kapalina osušena proudem vzduchu.

Ve druhém kroku bylo na povrch upravený pomocí MgCl_2 nanášeno 50 μl požadovaného roztoku HA, po 120 s byl přebytečný roztok opět osušen proudem vzduchu. V žádném kroku nebyl použit oplach vzorku vodou. Výše uvedené časy a koncentrace MgCl_2 , či HA byly stanoveny na základě řady předešlých experimentů, mající za cíl najít nejvhodnější parametry přípravy „monovrstvy“ HA na povrchu slídy. Vzhled povrchu slídy před modifikací a po modifikaci je na Obr. 15.



Obr. 15: Náhled na povrch slídy A) před modifikací B) po modifikaci pomocí MgCl_2 .

Obrázky pořízeny pomocí TMAFM. Rozměr zobrazené plochy 3x3 μm .

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V souladu s hlavním cílem bakalářské práce byl optimalizován postup imobilizace hyaluronanu sodného na povrchu slídy. Takto připravené vrstvy byly zobrazovány pomocí AFM. Získané záznamy byly následně vyhodnocovány, podrobovány obrazové analýze v programu Gwydion a ImageJ. Níže uvedené výsledky jsou členěny podle studovaných proměnných majících vliv na změnu vzhledu imobilizovaných klubek HA na povrchu slídy. Byly studovány tyto proměnné: střední molekulová hmotnost, hmotnostní podíl HA v roztoku, historie přípravy roztoku HA, jeho uchovávání a přítomnost solí v roztoku.

4.1 Vliv střední M_w na změnu vzhledu agregovaných struktur HA na povrchu slídy

V rámci tohoto experimentu byly připravovány dva typy rozdílných roztoků lišících se hmotnostním podílem HA v systému.

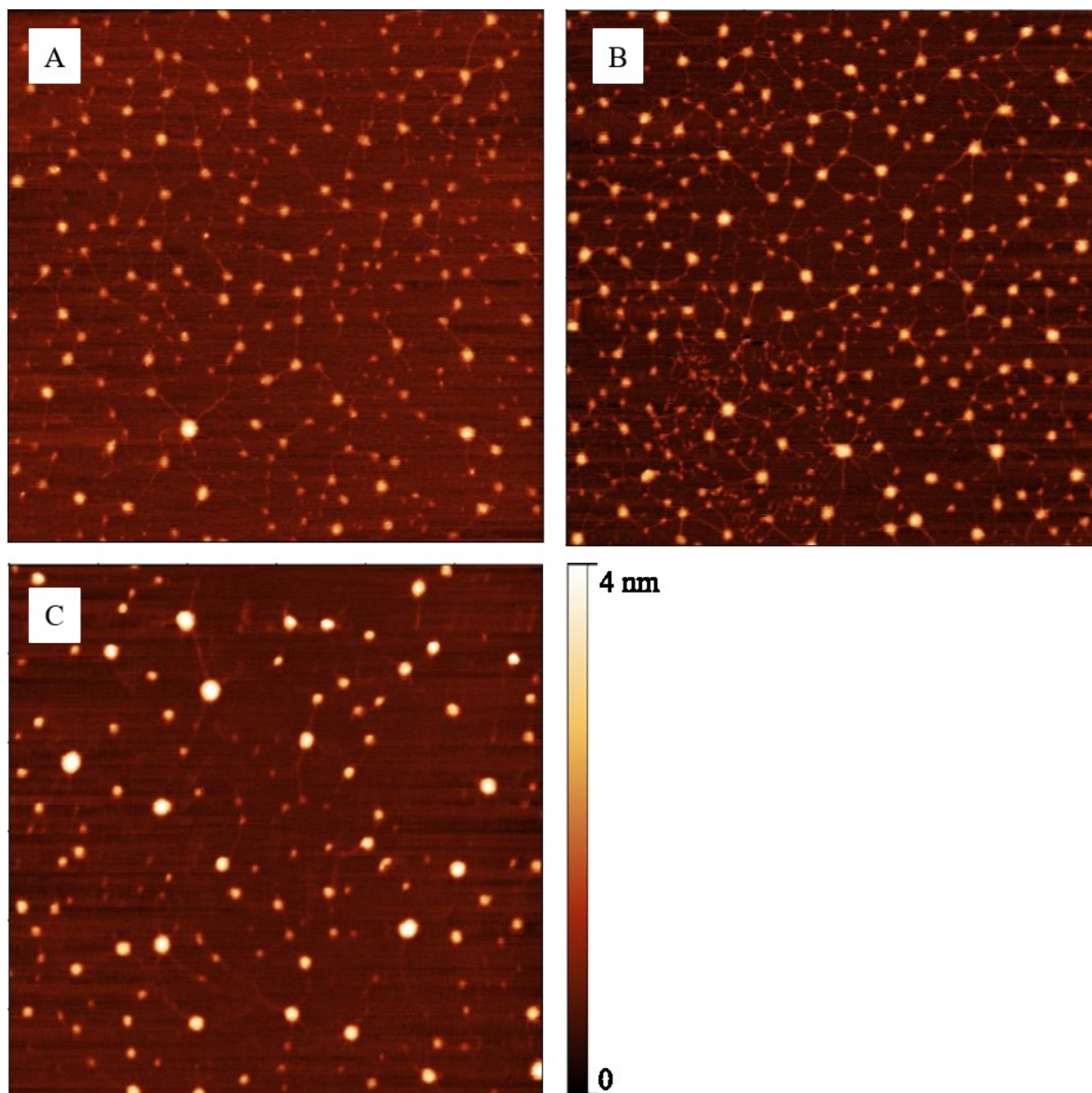
4.1.1 Vzorky deponované z roztoku obsahujícího 0,01 hm. % HA

V rámci prvního experimentu byly pro depozici na povrch slídy použity roztoky obsahující 0,01 hm. % HA o rozdílných středních molekulových hmotnostech M_w 2,36 MDa, 1,5 MDa a 1,18 MDa. HA byla rozpouštěna ve vodě na třepačce při laboratorní teplotě 20 °C po dobu 22 h. Na Obr. 16 je TMAFM zobrazení HA deponované na $MgCl_2$ modifikované slídě z vodného roztoku obsahujícího 0,01 hm. % HA. Na tomto obrázku lze pozorovat agregované shluky řetězců HA, které jsou propojeny do sítí, přičemž se změnou střední molekulové hmotnosti pozorujeme změny v jejich počtu a velikosti. HA o M_w 1,5 MDa tvoří agregáty nepatrně větší oproti HA s M_w 2,36 MDa, viz. srovnání Obr. 16A a B. K další změně dochází u HA s M_w 1,18 MDa, viz. Obr. 16C, kde lze pozorovat výrazný pokles počtu agregátů na vrub jejich zvětšování. Změny ve velikosti agregátů vystihují profilové řezy uvedené na Obr. 17, kde byla nastavena srovnatelná velikost měřítka na úrovni 4 nm. Rozdíly v maximálních převýšeních jsou vedeny spolu s dalšími parametry v Tab. 2.

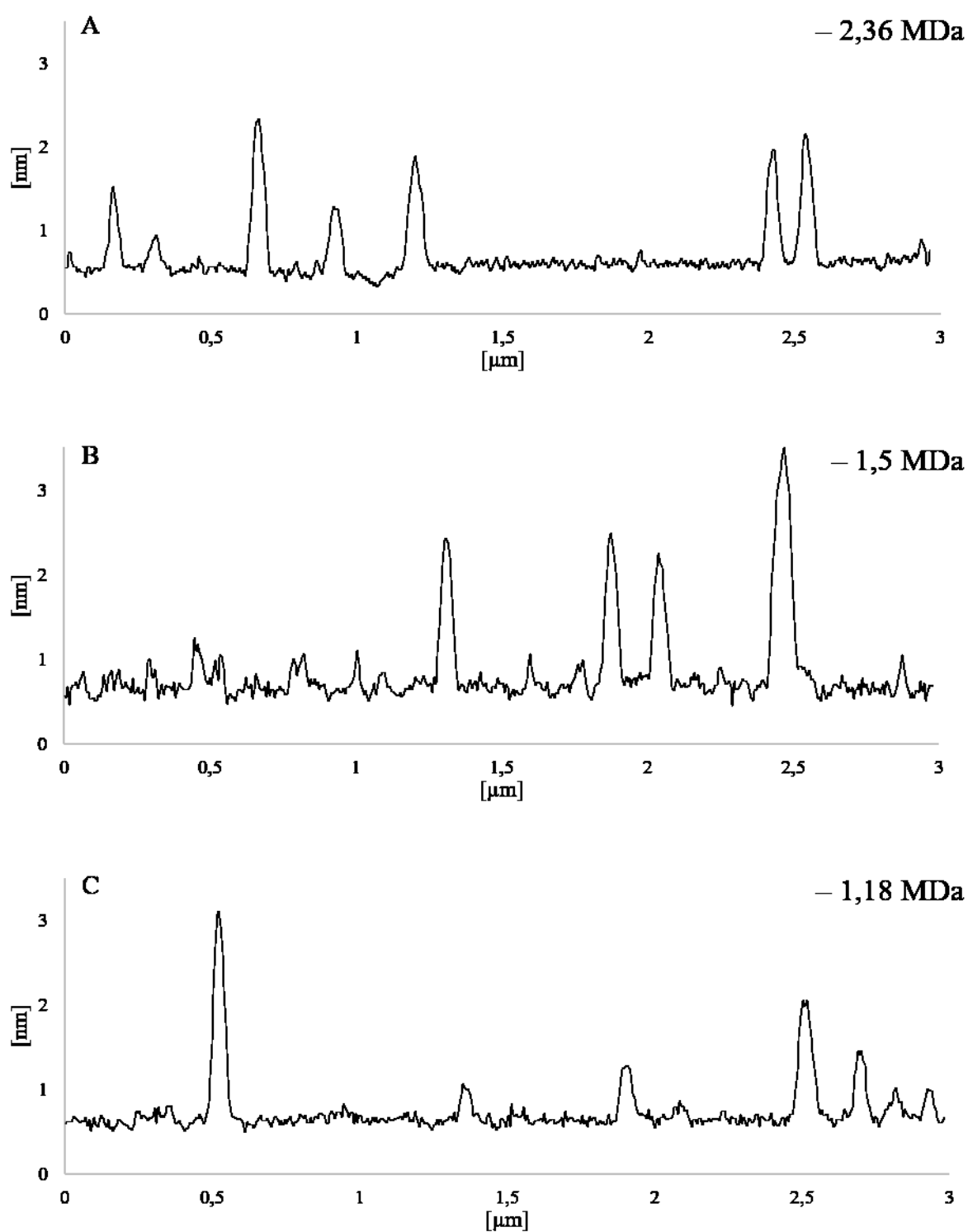
Z Obr. 17 plyne, že nejnižších maxim na ose z dosahuje profil A a výraznou členitost povrchových struktur lze pozorovat u profilu B. U HA o M_w 1,18 MDa dochází k nárůstu maxima až na 5,8 nm, viz. data v Tab. 2. S klesající střední molekulovou hmotností dochází dále

k nárůstu hodnoty RMS – zvyšuje se drsnost povrchu. Počet Agregátů a jejich celkový objem se pohybuje přes maximum, avšak rostoucí trend lze pozorovat zejména v průměrném objemu zrna.

Distribuce velikostí agregátů je u HA o rozdílných středních molekulárních hmotnostech 2,36 MDa a 1,5 MDa posunuta výrazně doleva k nižším hodnotám, u 1,18 MDa HA je distribuce značně široká, viz. Obr. 18.



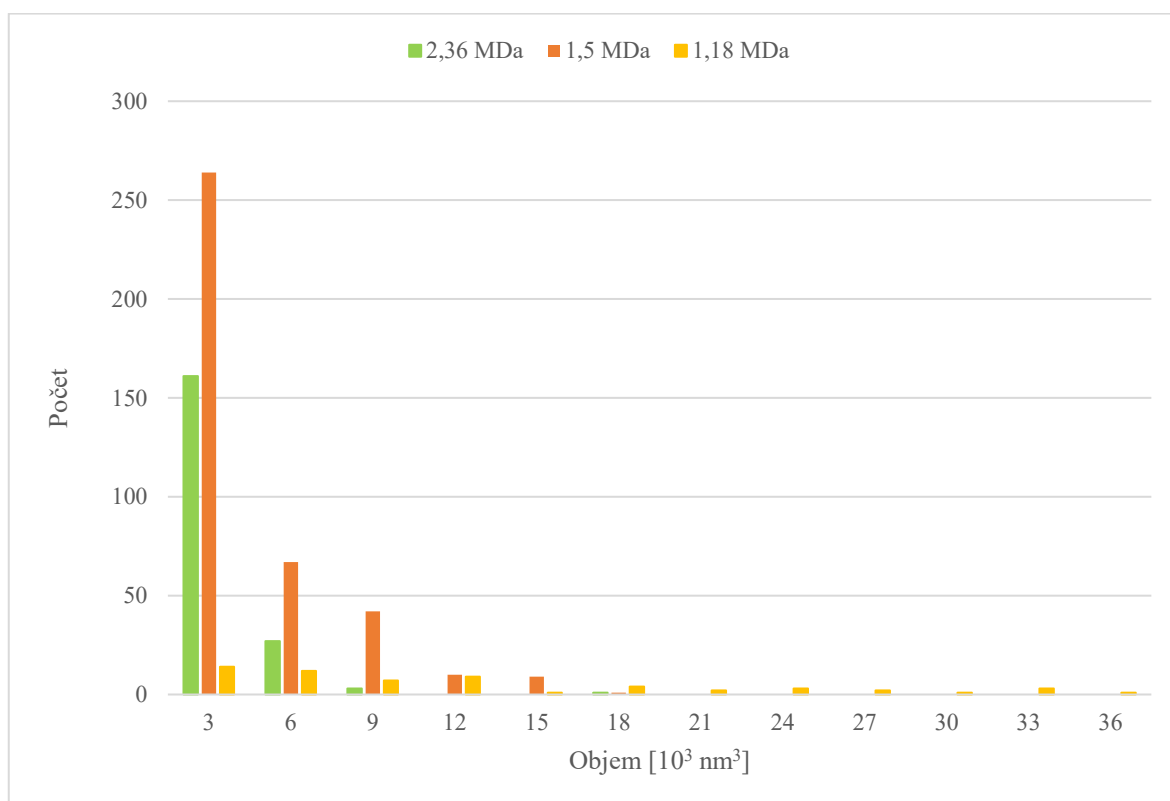
Obr. 16: Porovnání vlivu střední M_w , A) 2,36 MDa, B) 1,5 MDa, C) 1,18 MDa na změnu vzhledu imobilizované HA na povrchu slídy. HA deponována z 0,01 hm % vodného roztoku, připravovaného 22 h. Záznamy pořízeny pomocí TMAFM, velikost zobrazených ploch $3 \times 3 \mu\text{m}$.



Obr. 17: Výškové profily imobilizované HA na povrchu slídy pro různé střední M_w
A) 2,36 MDa, B) 1,5 MDa, C) 1,18 MDa. Data odpovídají Obr. 16.

Tab. 2: Statistické veličiny charakterizující imobilizovanou HA deponovanou na povrchu slídy z vodného roztoku. Byly analyzovány plochy 3x3 μm uvedené na Obr. 16:

| Statistické veličiny | 2,36 MDa | 1,5 MDa | 1,18 MDa |
|---|----------|---------|----------|
| Maximum [nm]: | 3,9 | 3,7 | 5,8 |
| Medián [nm]: | 0,7 | 0,5 | 0,6 |
| R _a [nm]: | 0,1 | 0,2 | 0,2 |
| R _{ms} [nm]: | 0,2 | 0,4 | 0,6 |
| Šikmost: | 2,8 | 3,1 | 4,8 |
| Špičatost: | 11,9 | 10,9 | 25,5 |
| Plocha povrchu [μm^2]: | 8,7 | 9,0 | 9,0 |
| Počet zrn | 192 | 393 | 59 |
| Celková kolmá plocha (rel.) [%]: | 2,0 | 6,5 | 2,6 |
| Celkový objem zrn (nula) [10^3 nm^3]: | 299 | 1080 | 610 |
| Průměrný objem jednoho zrna [10^3 nm^3]: | 1,6 | 2,8 | 10,3 |
| Chyba průměrného objemu zrna [10^3 nm^3]: | 0,2 | 0,2 | 1,2 |



Obr. 18: Distribuce velikostí agregátů HA na povrchu slídy pro rozdílné M_w A) 2,36 MDa, B) 1,5 MDa, C) 1,18 MDa. Data získána z obrazové analýzy záznamů uvedených na Obr. 16 pro plochy 3x3 μm .

4.1.2 Vzorčky deponované z roztoku obsahujícího 0,1 hm. % HA

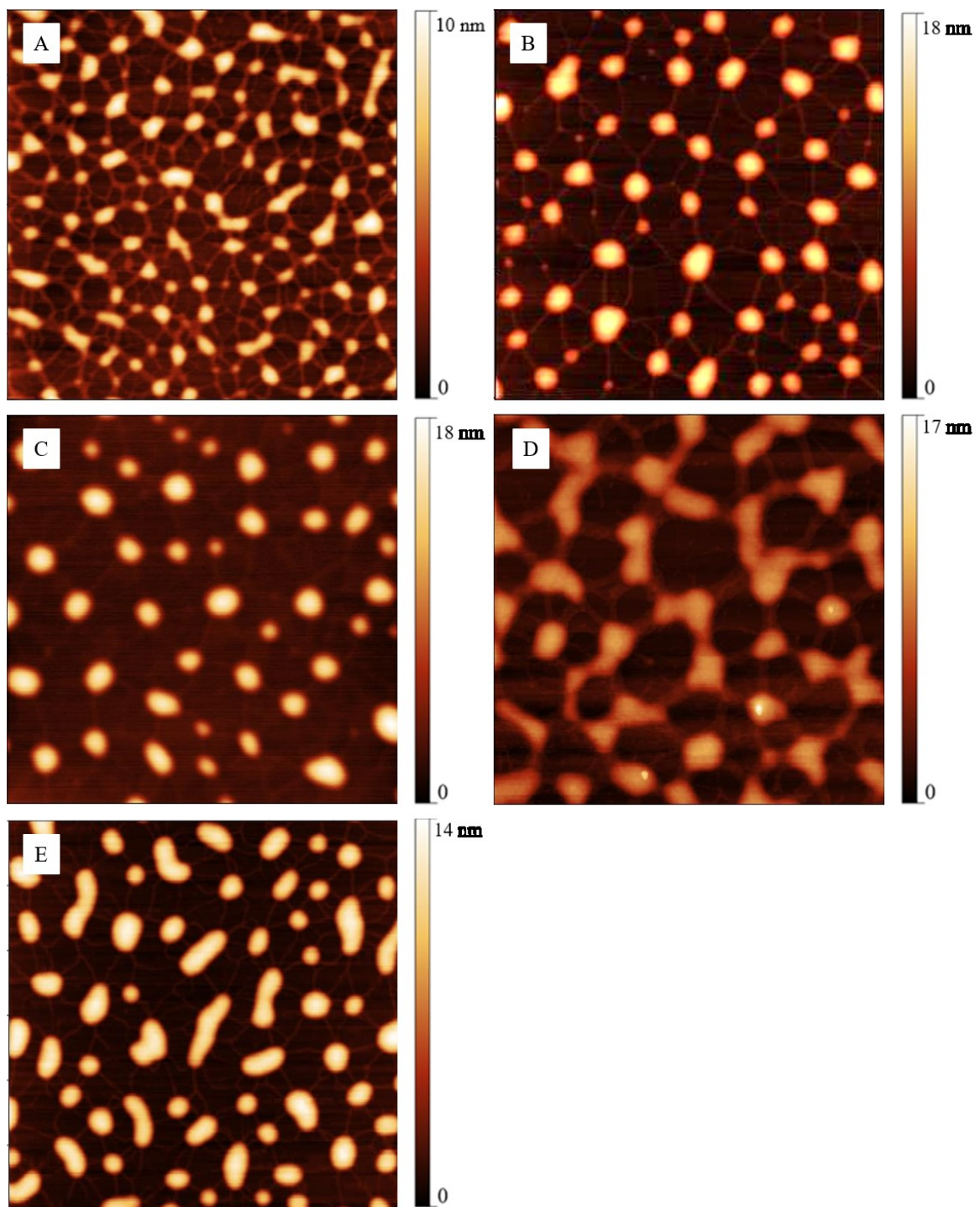
V rámci dalších experimentů byly pro depozici na povrch slídy používány roztoky obsahující 0,1 hm. % HA o rozdílných středních molekulových hmotnostech M_w 1,5 MDa, 600 kDa, 370 kDa, 243 kDa a 124 kDa rozpouštěné ve vodě na třepačce při laboratorní teplotě 20 °C po dobu 22 h. Z experimentálních výsledků a srovnání této a předešlé podkapitoly vyplynulo, že zvláště u vzorků s nižší střední M_w je lepší používat více koncentrované roztoky určené pro nanášení na povrch slídy.

Podobně jako v předešlém srovnání, tak i v tomto lze pozorovat změny v počtu a velikosti agregátů, viz. srovnání dat na Obr. 16 a 19, respektive v Tab. 2 a 3. Z těchto srovnání rovněž plyne, že z roztoků s větším hmotnostním podílem polymeru v roztoku vznikají větší a objemnější agregáty.

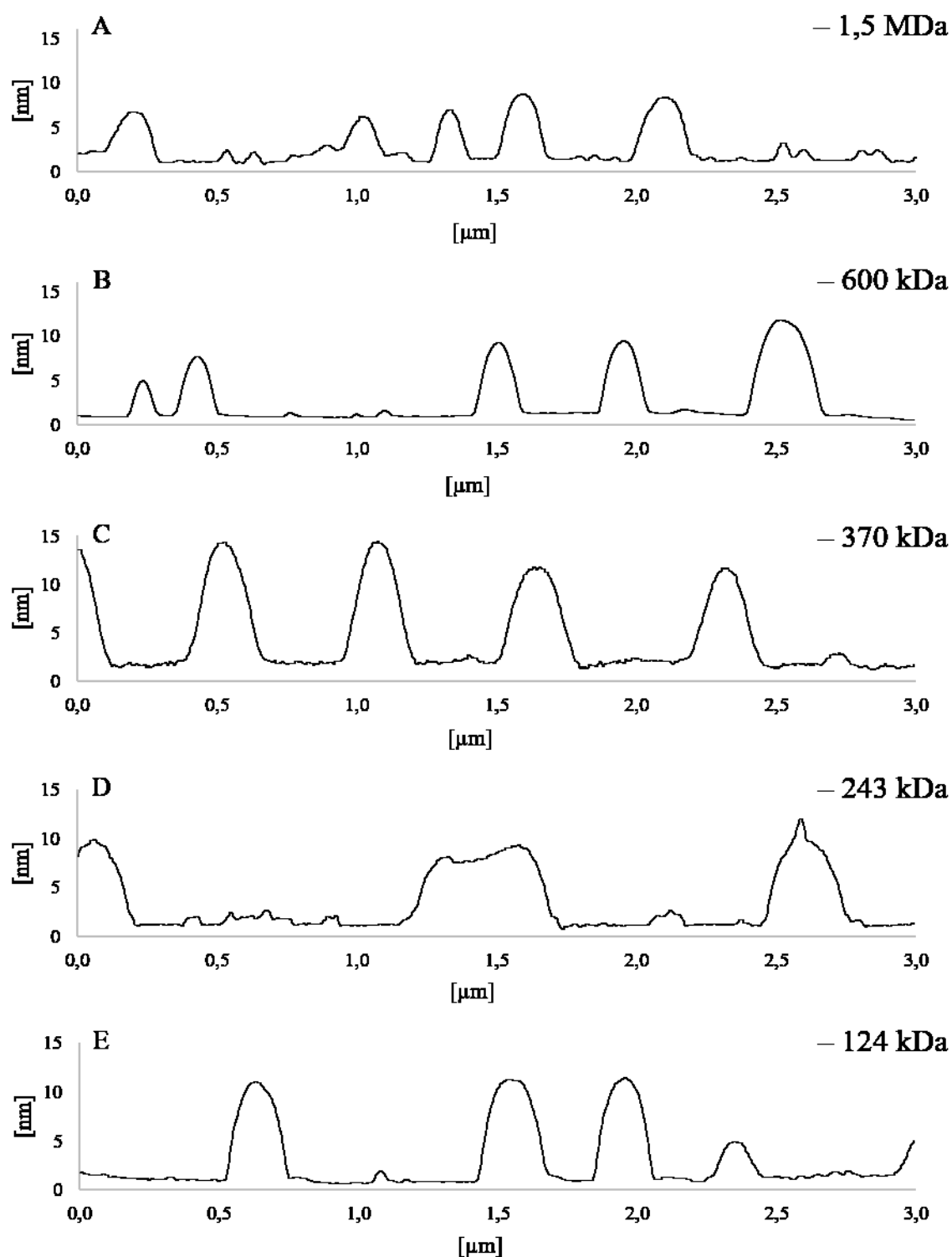
Na Obr. 20 jsou porovnány výškové profily. Na profilu A můžeme pozorovat nejnižší výšky agregátů s výraznější členitostí ve srovnání s ostatními profily.

Maximální hodnota na ose z se pohybuje přes maximum 18,2 nm u HA se střední M_w 370 kDa (Tab. 3). Hodnota RMS mírně roste, šikmost se opět pohybuje přes maximum u HA se střední M_w 370 kDa. Počet agregovaných shluků je výrazně vyšší u HA s M_w 1,5 MDa. Minimální počet agregátů byl detekován u HA s M_w 243 kDa, přičemž tato HA má největší průměrný objem agregátu a druhý největší celkový objem povrchových útvarů. Rostoucí trend lze pozorovat u celkového objemu agregátů, objemy jednotlivých agregátů jsou zatíženy příliš velkou chybou z důvodu omezené velikosti analyzované plochy (3x3 μm), nicméně lze konstatovat, že výrazně menší je průměrný objem agregátu u HA s M_w 1,5 MDa.

Distribuce velikosti agregovaných shluků je pro HA s M_w 1,5 MDa a 370 kDa posunuta doleva. Pro HA s M_w 600 kDa a 124 kDa se posunuje mírně doprava a pro HA s M_w 243 kDa dosahuje dvou maxim, viz. Obr. 21.



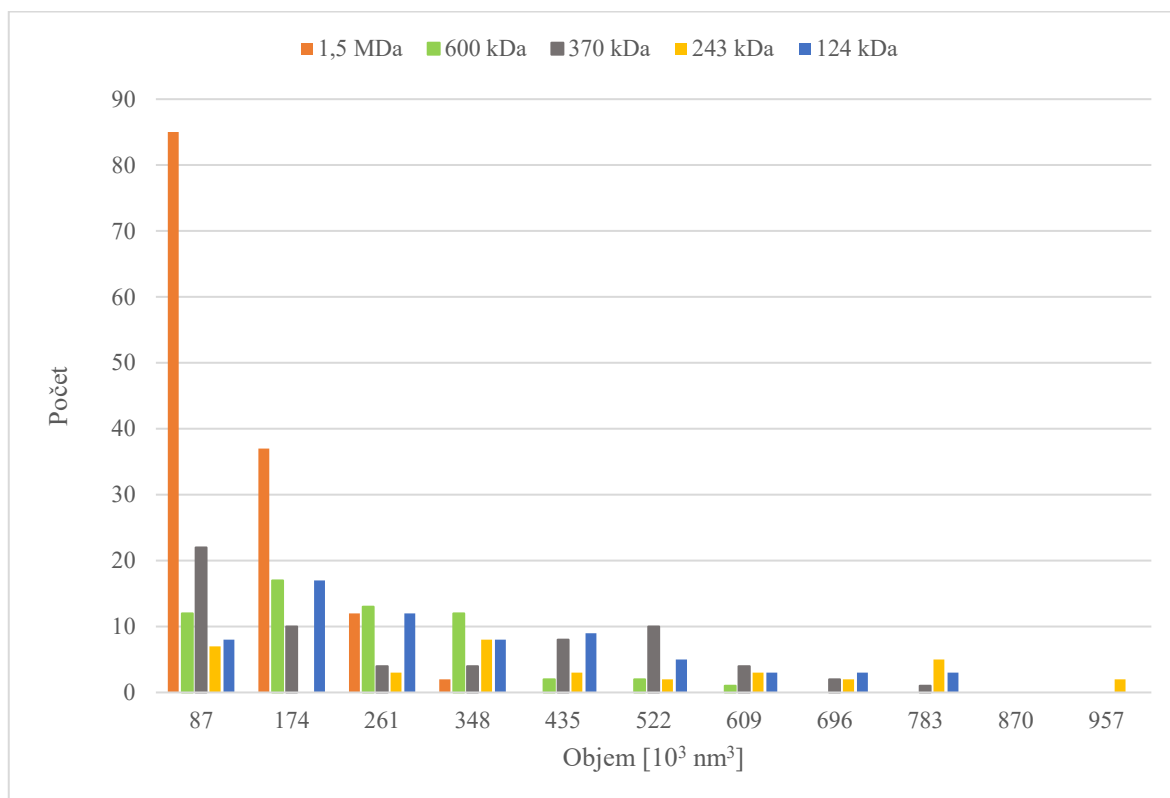
Obr. 19: Porovnání vlivu střední M_w , A) 1,5 MDa, B) 600 kDa, C) 370 kDa, D) 243 kDa, E) 124 kDa na změnu vzhledu imobilizované HA na povrchu slídy. HA deponována z 0,1 hm.% vodného roztoku, připravovaného 22 h. Záznamy pořízeny pomocí TMAFM, velikost zobrazených ploch $3 \times 3 \mu\text{m}$.



Obr. 20: Výškové profily imobilizované HA na povrchu slídy pro různé střední M_w
A) 1,5 MDa, B) 600 kDa, C) 370 kDa, D) 243 kDa, E) 124 kDa. Data odpovídají Obr. 19.

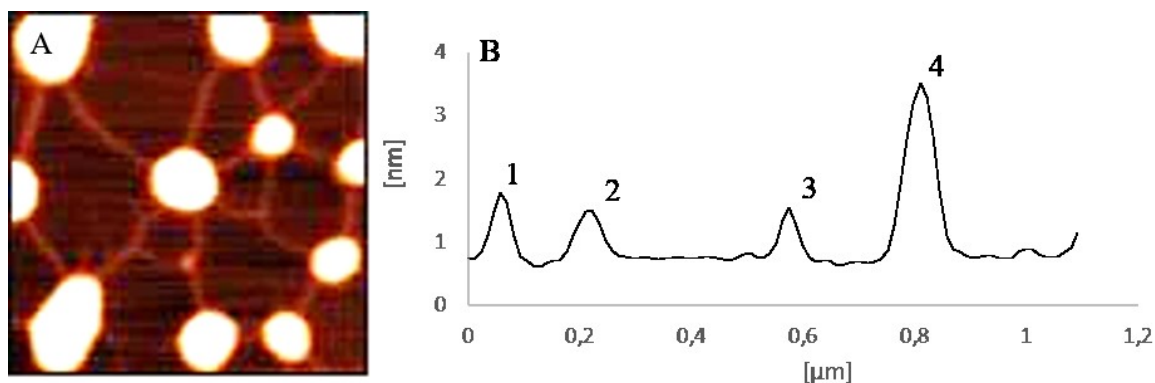
Tab. 3: Statistické veličiny charakterizující imobilizovanou HA deponovanou na povrchu slídy z vodného roztoku. Byly analyzovány plochy 3x3 μm uvedené na Obr. 19:

| Statistické veličiny | 1,5 MDa | 600 kDa | 370 kDa | 243 kDa | 124 kDa |
|---|---------|---------|---------|---------|---------|
| Maximum [nm]: | 9,5 | 18,0 | 18,2 | 16,5 | 13,6 |
| Medián [nm]: | 1,9 | 1,3 | 2,2 | 2,2 | 1,3 |
| R _a [nm]: | 1,4 | 1,8 | 2,1 | 2,2 | 2,8 |
| Rms [nm]: | 1,9 | 2,5 | 3,1 | 2,6 | 3,4 |
| Šikmost: | 1,6 | 2,2 | 2,3 | 1,0 | 1,4 |
| Špičatost: | 1,5 | 4,0 | 4,6 | 0,4 | 0,4 |
| Plocha povrchu [μm^2]: | 9,1 | 9,1 | 9,0 | 9,1 | 9,1 |
| Počet zrn | 136 | 59 | 65 | 37 | 68 |
| Celková kolmá plocha (rel.) [%]: | 19,5 | 16,5 | 20,3 | 25,05 | 24,78 |
| Celkový objem zrn (nula) [10^3 nm^3]: | 10400 | 11200 | 15800 | 16800 | 19400 |
| Průměrný objem jednoho zrna [10^3 nm^3]: | 77 | 190 | 240 | 450 | 290 |
| Chyba průměrného objemu zrna [10^3 nm^3]: | 6 | 20 | 30 | 60 | 30 |



Obr. 21: Distribuce velikostí agregátů HA na povrchu slídy pro rozdílné M_w A) 1,5 MDa, B) 600 kDa, C) 370 kDa, D) 243 kDa, E) 124 kDa. Data získána z obrazové analýzy záznamů uvedených na Obr. 19 pro plochy $3 \times 3 \mu\text{m}$.

Ze srovnání výše uvedených výsledků pro rozdílné střední molekulové hmotnosti a hmotnostní podíly polymeru v roztoku plyne následující. Nižší podíl polymeru v roztoku má za následek tvorbu menších agregátů, což je přímo spojeno s nižším obsahem polymeru v roztoku. Porovnáme-li tyto výsledky s tím co je prezentováno v odborné literatuře, viz. teoretická část práce, musíme konstatovat, že pro zobrazení izolovaných řetězců by bylo nezbytné připravit ještě více zředěné roztoky HA. Nicméně síťová struktura propojující jednotlivé agregáty rozměrově odpovídá průměru izolovaných řetězců HA, viz. Obr. 22, podobně jak je prezentováno v odborné literatuře [24; 26; 28].



Obr. 22: Charakteristický vzhled izolovaných řetězců HA propojujících agregáty HA na povrchu modifikované slídy. A) náhled na plochu, B) profilový řez přes izolované řetězce (1-3), okraj agregovaného shluku (4). Zobrazená plocha $1,1 \times 1,1 \mu\text{m}$. Obrázek pořízen pomocí TMAFM.

Při studiu vlivu střední molekulové hmotnosti na vznik agregovaných shluků HA imobilizovaných na povrchu MgCl_2 modifikované slídy pro HA o vyšších středních molekulových hmotnostech M_w 2,36 MDa, 1,5 MDa a 1,18 MDa bylo zjištěno, že velikost a počet agregovaných shluků se při různých středních molekulových hmotnostech liší. S klesající střední M_w dochází ke zvětšování průměrného objemu agregátů. Tento růst objemu při poklesu střední M_w byl zaznamenán i u nižších středních molekulových hmotností. Z výsledků vyplývá, že se snižující se střední M_w mají řetězce HA větší tendenci ke shlukování se, což může být způsobeno větší ohebností řetězce, menšími sterickými zábranami a nižší sekundární stabilizací pomocí vodíkových vazeb, jak je popsáno v literatuře pro HA s vysokou molekulovou hmotností [3]. Z výše uvedených porovnání jednoznačně plyne, že lze pozorovat rozdíly mezi vzhledem povrchů připravených z různých středních M_w .

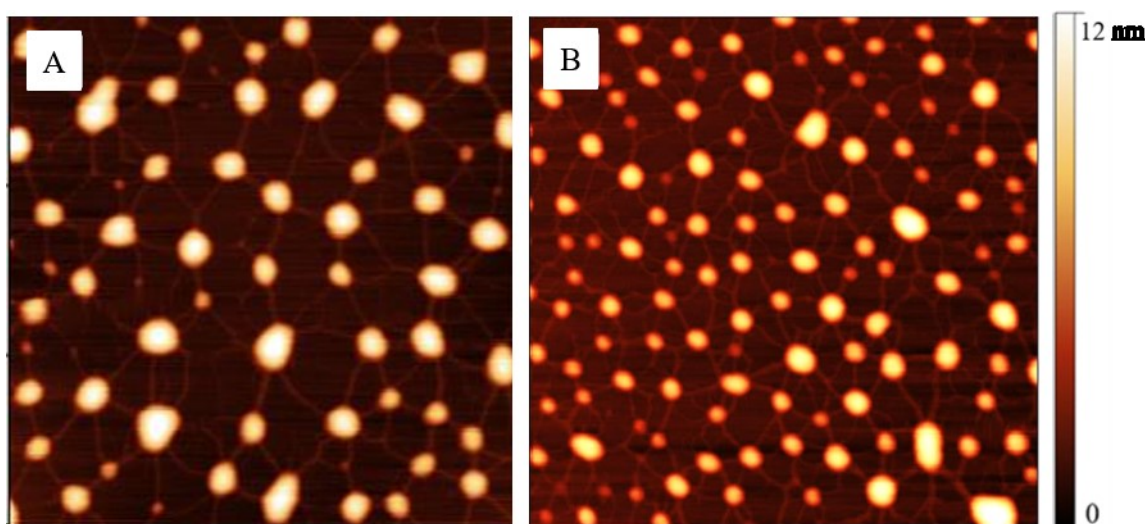
4.2 Vliv doby přípravy roztoku na změnu vzhledu agregovaných struktur HA na povrchu slídy

Dalším nezanedbatelným parametrem je doba, po kterou probíhá rozpouštění práškové formy HA v roztoku, jak ukazují níže uvedené experimenty. Pro vystižení tohoto vlivu byly připravovány roztoky HA s obsahem 0,1 hm. %, o střední molekulové hmotnosti M_w 600 kDa na třepačce po dobu 22 h nebo 44 h. Z porovnání výsledků na Obr. 23 až 25 a v Tab. 4 plyne, že s rostoucí dobou přípravy roztoku můžeme pozorovat větší počet agregátů na povrchu podobně, jak tomu bylo u dříve diskutovaných vzorků s vysokou molekulovou hmotností.

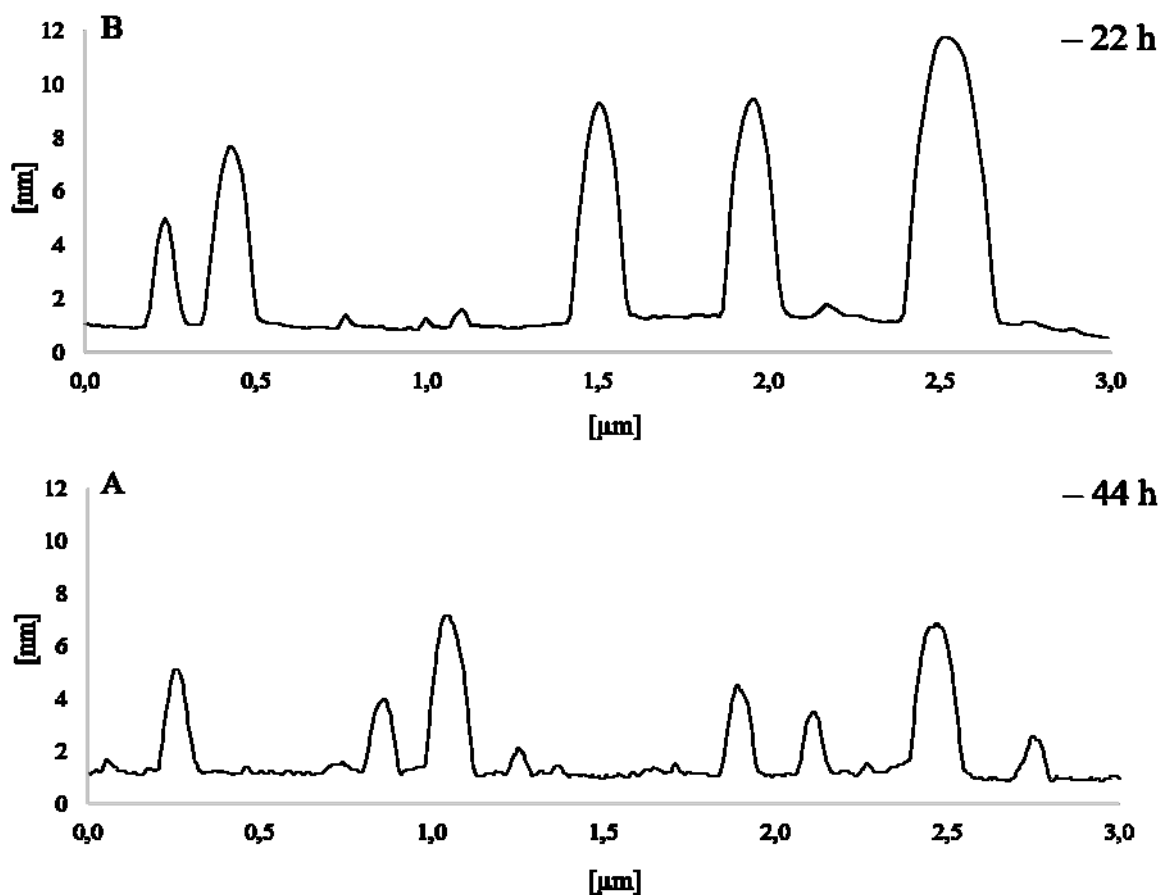
Profilové řezy, viz. Obr. 24, ukazují na skutečnost, že rostoucí doba přípravy roztoků HA má za následek rovněž pokles ve výšce a objemu pozorovaných agregátů.

V Tab. 4 jsou uvedeny výsledky z plošné analýzy. Z těchto výsledků je opět patrné, že vyššího maxima (výšky agregátů) je dosaženo u HA třepané 22 h, hodnota RMS je zde rovněž vyšší. Z tabulky dále vyplývá, že při delším třepání dochází k nárůstu počtu zrn, ke zmenšení jejich celkového objemu i ke zmenšení průměrného objemu zrna.

Distribuce HA třepané 22 hodiny je širší, má více maxim. Distribuce HA třepané 44 hodin je posunuta výrazně doleva a je výrazně užší, viz. Obr. 25.



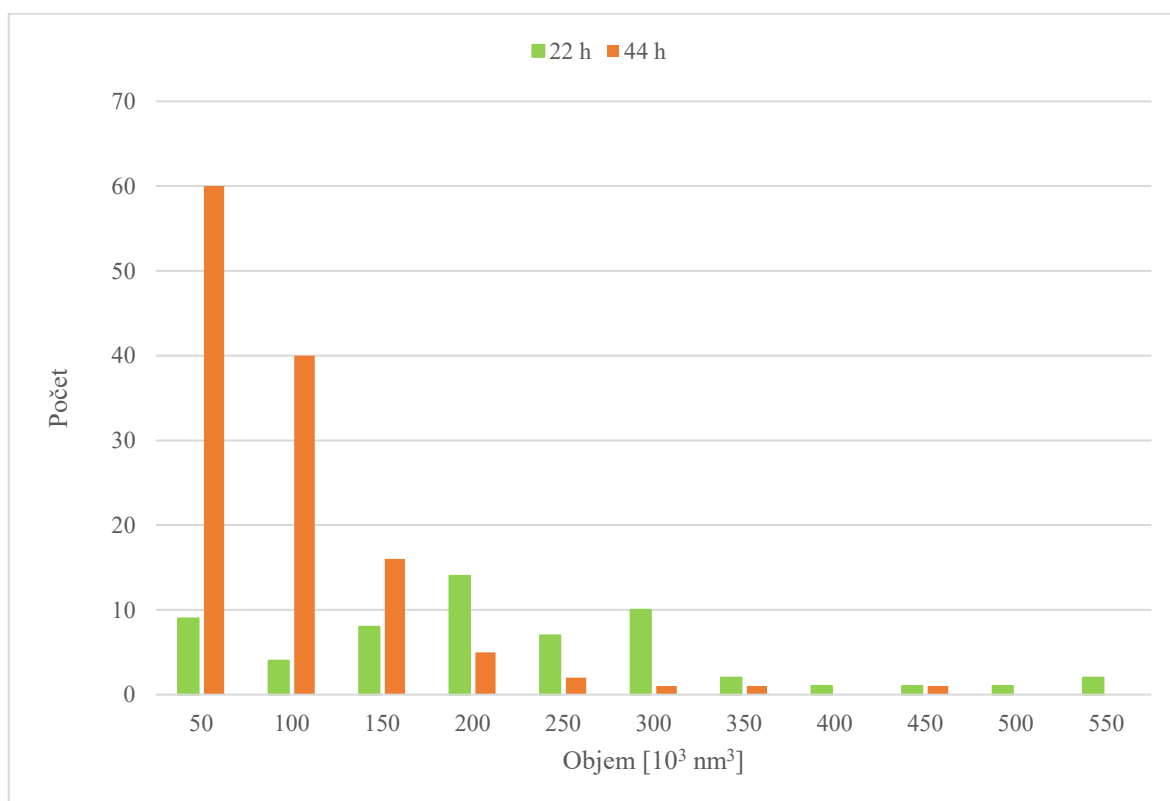
Obr. 23: Porovnání vlivu doby přípravy na třepačce A) 22 h, B) 44 h na změnu vzhledu imobilizované HA na povrchu slídy. HA deponována z 0,1 hm.% vodného roztoku, $M_w=600\text{kDa}$. Záznamy pořízeny pomocí TMAFM, velikost zobrazených ploch $3 \times 3 \mu\text{m}$.



Obr. 24: Výškové profily imobilizované HA na povrchu slídy pro různé doby přípravy na třepačce A) 44 h, B) 22 h. Data odpovídají Obr. 23.

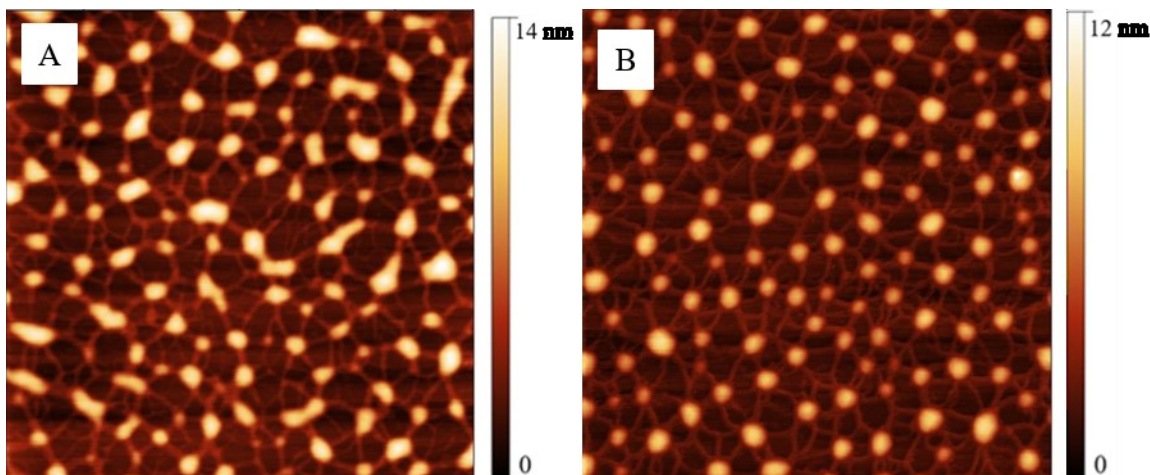
Tab. 4: Statistické veličiny charakterizující imobilizovanou HA deponovanou na povrchu slídy z vodného roztoku. Byly analyzovány plochy 3x3 μm , uvedené na Obr. 23:

| Statistické veličiny | 22 h | 44 h |
|---|-------|------|
| Maximum [nm]: | 18,0 | 12,6 |
| Medián [nm]: | 1,3 | 1,8 |
| R _a [nm]: | 1,8 | 1,2 |
| Rms [nm]: | 2,5 | 1,8 |
| Šikmost: | 2,2 | 2,3 |
| Špičatost: | 4,0 | 5,0 |
| Plocha povrchu [μm^2]: | 9,1 | 9,1 |
| Počet zrn | 59 | 126 |
| Celková kolmá plocha (rel.) [%]: | 16,5 | 16,4 |
| Celkový objem zrn (nula) [10^3 nm^3]: | 11200 | 8600 |
| Průměrný objem jednoho zrna [10^3 nm^3]: | 191 | 68 |
| Chyba průměrného objemu zrna [10^3 nm^3]: | 16 | 6 |

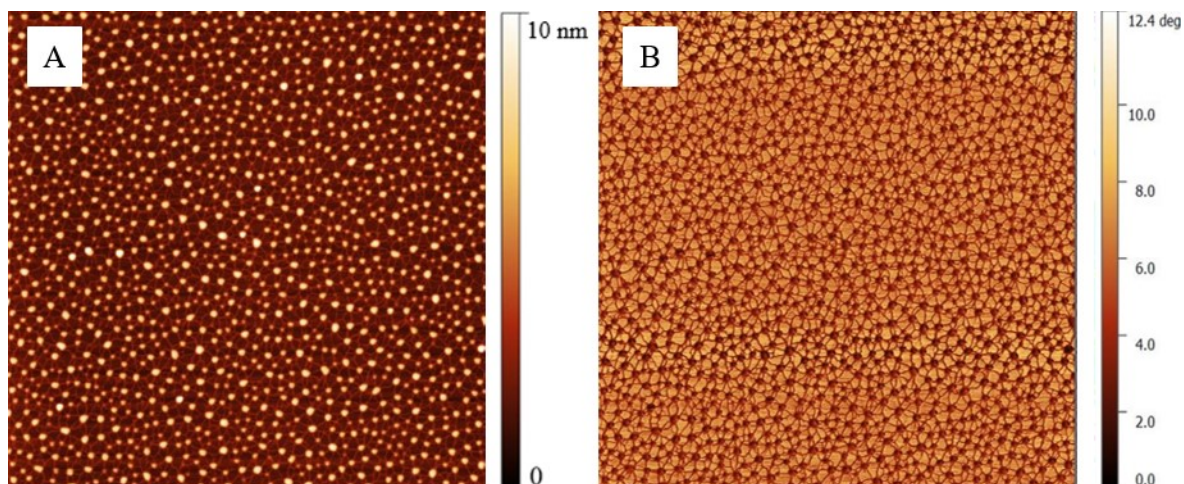


Obr. 25: Distribuce velikostí agregátů HA na povrchu slídy pro rozdílné **doby přípravy na třepačce** A) 22 h, B) 44 h. Data získána z obrazové analýzy záznamů uvedených na Obr. 23 pro plochy 3x3 μm .

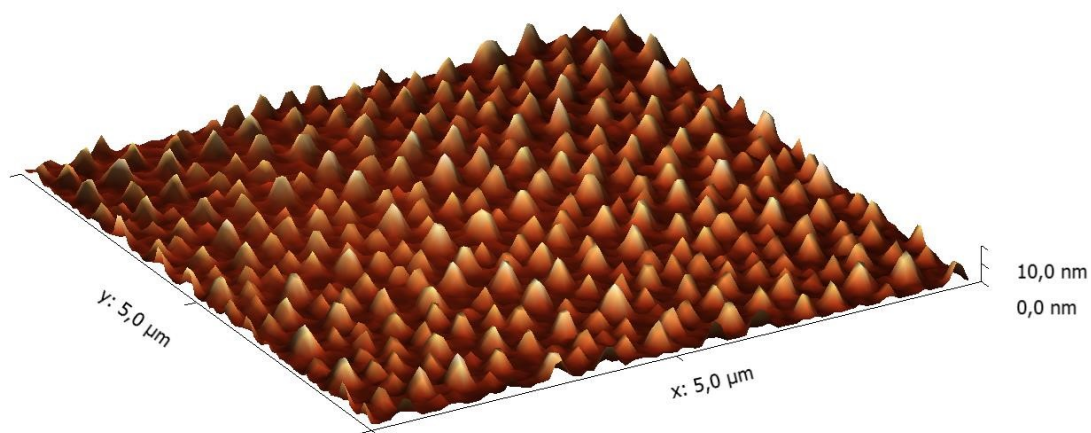
Stejný trend růstu počtu agregátů spojený se zmenšováním jejich objemu v důsledku delší doby přípravy vodného roztoku HA byl rovněž pozorován u systému s vyšší střední M_w 1,5 MDa, viz. porovnání na Obr. 26. Statistická data pro tyto obrázky jsou uvedena v Tab. 3 a 5. Pro potvrzení symetričnosti vznikajícího vzoru deponované HA na povrchu slídy je na Obr. 27 vyobrazen pohled na plochu $10 \times 10 \mu\text{m}$ ve výškovém zobrazení a fázi, která ukazuje, že na povrchu slídy pozorujeme síťovou monovrstvu s rozdílnými mechanickými vlastnostmi. Na Obr. 28 je uveden 3D pohled na deponované agregáty HA na povrchu slídy.



Obr. 26: Porovnání vlivu doby přípravy na třepačce A) 22 h, B) 67 h na změnu vzhledu imobilizované HA na povrchu slídy. HA deponována z 0,1 hm.% vodného roztoku, $M_w=1,5$ MDa. Záznamy pořízeny pomocí TMAFM, velikost zobrazených ploch $3 \times 3 \mu\text{m}$.



Obr. 27: Vzhled HA o střední M_w 1,5 MDA na povrchu slídy imobilizované z vodného roztoku s hmotnostním podílem polymeru 0,1 hm. % připraveného na třepačce po dobu 67 hodin. A) výškové zobrazení, B) zobrazení fázových změn na ploše $10 \times 10 \mu\text{m}$, Záznamy pořízeny pomocí TMAFM.



Obr. 28: 3D náhled na imobilizovanou HA o střední M_w 1,5 MDA na povrchu slídy. Data odpovídají vzorku uvedeném na Obr. 27.

Z výše uvedených výsledků plyne, že doba přípravy polymerního roztoku je jedním ze zásadních parametrů, jenž mají vliv na vzhled vznikající povrchové struktury HA jak u středních, tak velkých molekulových hmotností. Nárůst počtu agregátů a pokles jejich objemu s rostoucí dobou rozpouštění může napovídat o dvou souvisejících skutečnostech. Buďto dochází k úplnému rozpuštění částečně nerozpuštěných agregovaných makromolekul nebo dochází k reorganizaci a stabilizaci makromolekulárního řetězce v čase.

4.3 Vliv doby skladování roztoku na změnu vzhledu agregovaných struktur HA na povrchu slídy

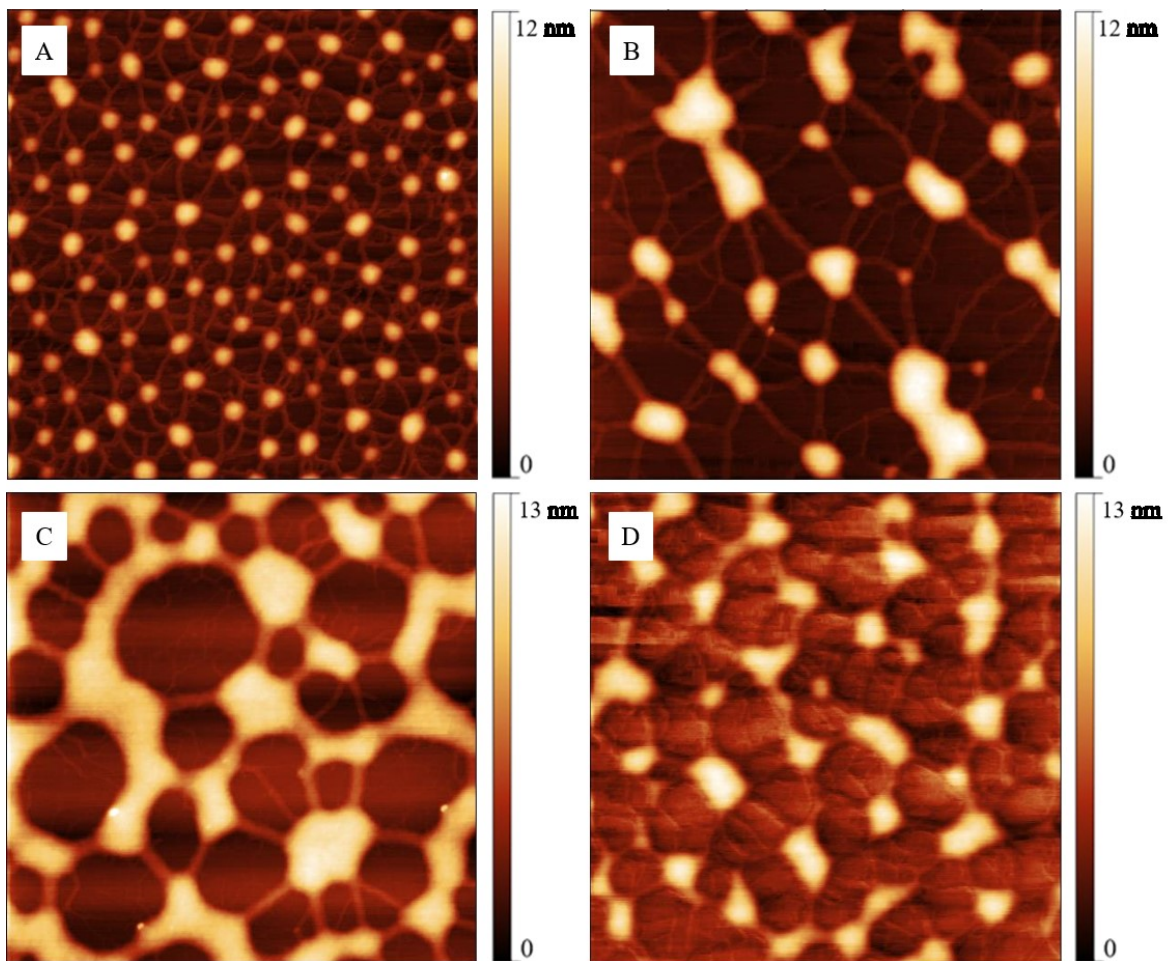
Jedním z dalších parametrů mající vliv na změnu vzhledu agregovaných struktur na povrchu slídy je doba skladování (1 až 5 dnů) připravených roztoků v lednici při 5 °C. Pro demonstraci tohoto vlivu byla zvolena HA o střední molekulové hmotnosti M_w 1,5 MDa. Byly připraveny vodné roztoky s obsahem 0,1 hm. % HA, které byly třepány při laboratorní teplotě po dobu 67 hodin. Takto dlouhá doba prvotní přípravy byla zvolena záměrně s ohledem na zjištěnou skutečnost, že čím déle je roztok třepán, tím lépe se výsledné struktury zobrazují.

Výsledky prvního měření uvedené na Obr. 29A pochází z druhého dne po ukončení přípravy roztoku na třepačce. V následujících dvou dnech bylo pozorováno zvětšování agregátů (Obr. 29B a C). Nicméně poslední den měření, Obr. 29D, došlo ke změně trendu, vzorek s největší pravděpodobností začal degradovat. Postupný růst agregátů lze pozorovat na změně výškových profilů viz. Obr. 30, kde nejnižší maxima vykazuje profil A.

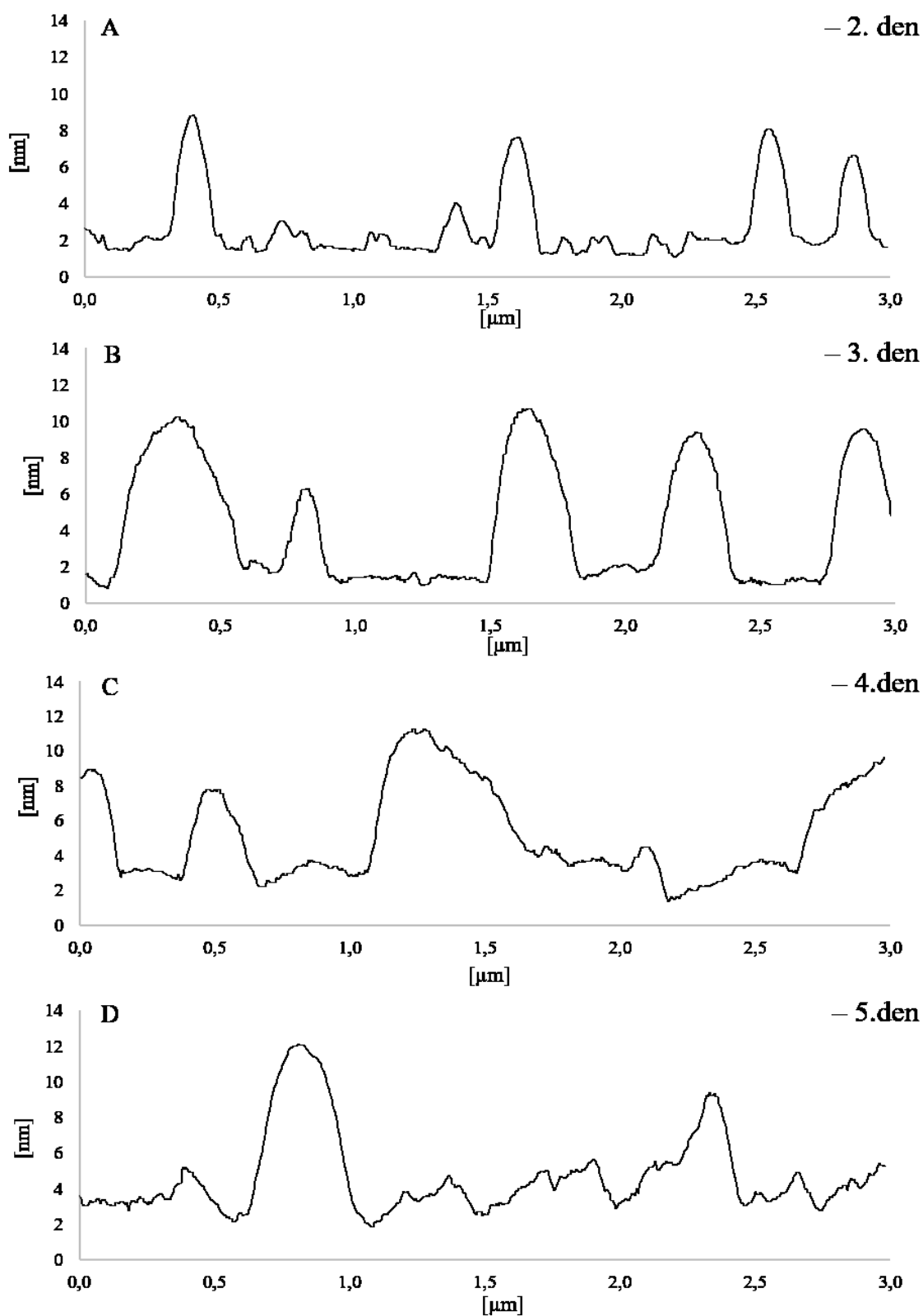
Nejvyšší maximum na ose z bylo změřeno u vzorků ze 4. dne, viz. Tab. 5. Z tabulky dále vyplývá, že u většiny hodnot dochází po 4. dnu ke změně trendu. Drsnost při stárnutí roste, počet zrn do 4. dne naopak klesá. Roste však celkový objem agregátů i průměrný objem agregátu. Průměrné objemy agregátů pro 3. a 4. den jsou zatíženy velkou chybou z důvodu jejich nízkého počtu na analyzované ploše $3 \times 3 \mu\text{m}$.

Na Obr. 31 lze pozorovat, že vzorek deponovaný z roztoku ze 2. dne má velmi úzkou distribuci velikosti agregátů ve srovnání s ostatními výsledky, všechny hodnoty se nachází v prvním intervalu. Roztok ze 3. dne má distribuci širší a posunutou doleva, roztok ze 4. dne má širokou distribuci se dvěma maximy. Roztok z 5. dne má distribuci posunutou vlevo, dochází však k nárůstu počtu hodnot v 1. intervalu od 0 do $200 \cdot 10^3 \text{ nm}^3$.

Z těchto výsledků plyne, že i při stacionárním umístění roztoku v lednici dochází k reorganizaci řetězců a ke zvětšování objemu agregovaných shluků, vyjma posledního dne měření, kde již nelze vyloučit možnost degradace připraveného roztoku. Zajímavou skutečností je fakt, že tato pozorování jsou v rozporu s výsledky věnovanými vlivu doby rozpouštění HA na třepačce. Tuto skutečnost lze přičíst na vrub výraznému rozdílu teplot přípravy roztoku a jeho skladování a rovněž mechanickému namáhání HA v třepajícím se roztoku oproti statickému uložení v lednici.



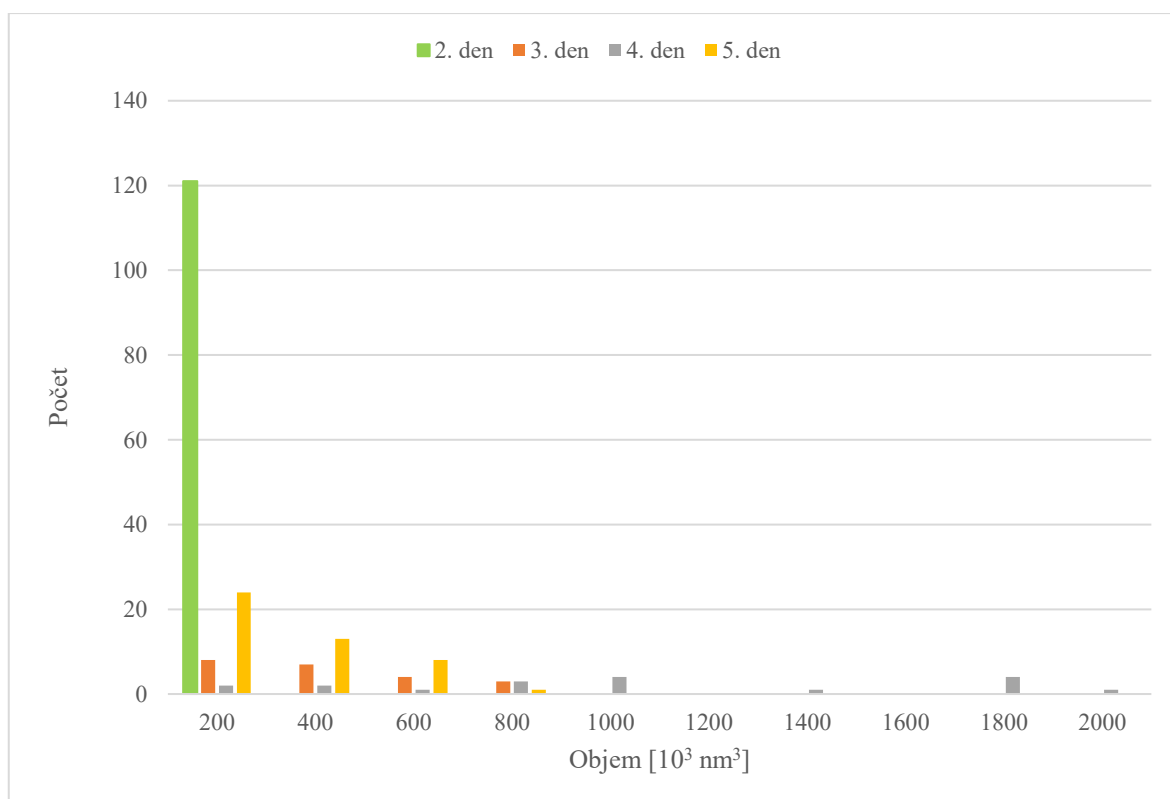
Obr. 29: Porovnání vlivu doby skladování roztoku, příprava vzorku A) 2. den, B) 3. den, C) 4. den, D) 5. den po sundání ze třepačky, HA deponována z 0,1 hm.% vodného roztoku, $M_w=1,5$ MDa, délka prvotní přípravy na třepačce 67 h. Záznamy pořízeny pomocí TMAFM, velikost zobrazených ploch $3 \times 3 \mu\text{m}$.



Obr. 30: Výškové profily imobilizované HA na povrchu slídy pro různé doby skladování roztoku, příprava vzorku A) 2. den, B) 3. den, C) 4. den, D) 5. den po sundání ze třepačky. Data odpovídají Obr. 29.

Tab. 5: Statistické veličiny charakterizující imobilizovanou HA deponovanou na povrchu slídy z vodného roztoku. Byly analyzovány plochy 3x3 μm , uvedené na Obr. 29:

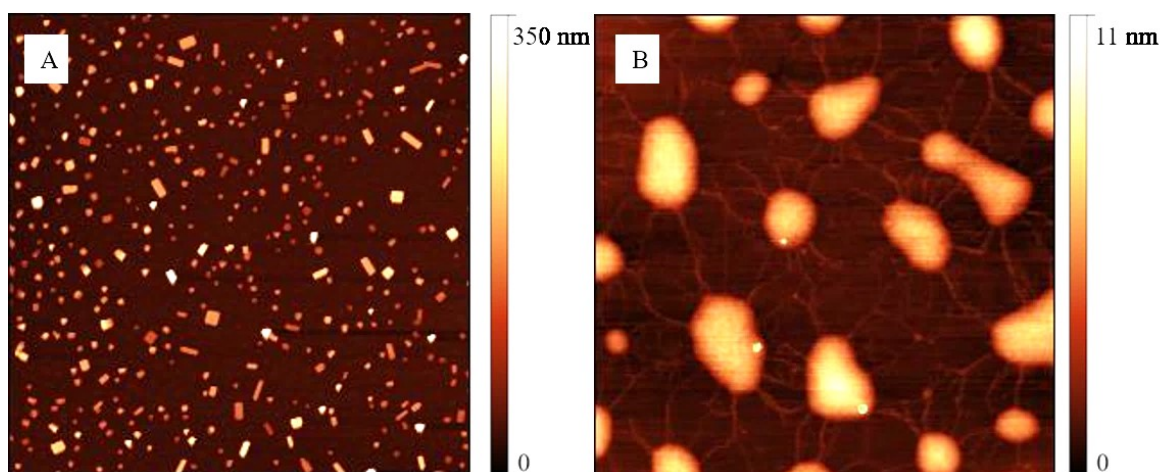
| Statistické veličiny | 2. den | 3. den | 4. den | 5. den |
|--|--------|--------|--------|--------|
| Maximum [nm]: | 11,7 | 12,1 | 16,2 | 12,7 |
| Medián [nm]: | 2,0 | 1,7 | 4,9 | 3,9 |
| R _a [nm]: | 1,2 | 1,9 | 2,5 | 1,6 |
| Rms [nm]: | 1,7 | 2,6 | 2,9 | 2,2 |
| Šikmost: | 1,9 | 1,9 | 0,7 | 1,3 |
| Špičatost: | 2,8 | 2,2 | 0,9 | 1,3 |
| Plocha povrchu [μm^2]: | 9,1 | 9,1 | 9,1 | 9,1 |
| Počet zrn | 121 | 24 | 20 | 46 |
| Celková kolmá plocha (rel.) [%]: | 10,3 | 14,8 | 27,0 | 11,3 |
| Celkový objem zrn (nula) [10^3 nm^3]: | 6200 | 10400 | 25400 | 9700 |
| Průměrný objem jednoho zrna [10^3 nm^3]: | 52 | 400 | 1300 | 210 |
| Chyba průměrného objemu zrna [10^3 nm^3]: | 4 | 100 | 400 | 30 |



Obr. 31: Distribuce velikostí agregátů HA na povrchu slídy pro rozdílné **dobu skladování roztoku**, příprava vzorku A) 2. den, B) 3. den, C) 4. den, D) 5. den po sundání ze třepáčky. Data získána z obrazové analýzy záznamů uvedených na Obr. 29 pro plochy 3x3 μm .

4.4 Vliv přítomnosti solí na změnu vzhledu agregovaných struktur HA na povrchu slídy

Výše popsané výsledky byly získány z depozice vodných roztoků HA na povrch slídy. Vodné roztoky bez jakýchkoliv příměsí či obsahu solí byly voleny záměrně, protože se jedná o relativně jednoduchý systém, co se složení týká. Otázkou však zůstává, zda je možné imobilizovat a zobrazit řetězce HA a jejich agregáty z prostředí fyziologického roztoku (roztok s obsahem 0,9 hm. % NaCl). Pro odpověď na tuto otázku bylo rozpuštěno 0,1 hm. % HA o střední molekulové hmotnosti M_w 600 kDa ve fyziologickém roztoku. Rozpouštění probíhalo na laboratorní třepačce po dobu 22 h při laboratorní teplotě 20 °C. Z měření provedených na AFM lze pozorovat na větší ploše 20x20 μm vznik krystalů soli, viz. útvary s ostrými hranami na Obr. 32A. Při prvním pohledu na tento obrázek se může zdát, že zde nevidíme jakoukoliv HA, nicméně nesmíme zapomenout, že zde pozorované útvary vykazují převýšení v řádech 100 nm (měřítko 0 až 350 nm na Obr. 32A) oproti vzorkům připraveným z čistě vodných roztoků, kde maximální výšky útvarů dosahovaly 20 nm. Při bližším pohledu mezi jednotlivé krystalky (zobrazená plocha 3x3 μm , viz. Obr. 32B) můžeme pozorovat podobné struktury jako na předešlých površích připravených z čistě vodných disperzí bez přítomnosti solí. To znamená, že opět pozorujeme velké agregáty HA propojené do vzájemné sítě izolovanými skupinami řetězců.



Obr. 32: Vzhled povrchu slídy po depozici HA rozpuštěné ve **fyziologickém roztoku**. Na povrch slídy byl deponována roztok s obsahem **0,1 hm. % HA** o střední $M_w=600$ kDa po dobu 22 hodin na třepačce. Záznamy pořizeny pomocí TMAFM, velikost zobrazených ploch A) 20x20 μm B) 3x3 μm .

Tab. 6: Porovnání statistických veličin charakterizujících přichycenou HA na povrchu slídy z fyziologického a vodného roztoku. Data byla získána z analyzovaných ploch $3 \times 3 \mu\text{m}$, uvedených na Obr. 32B a 19B:

| Statistické veličiny | Fyziologický roztok | Vodný roztok |
|---|---------------------|--------------|
| Maximum [nm]: | 11,0 | 18,0 |
| Medián [nm]: | 1,2 | 1,3 |
| R _a [nm]: | 1,4 | 1,8 |
| Rms [nm]: | 1,9 | 2,5 |
| Šikmost: | 1,8 | 2,2 |
| Špičatost: | 2,0 | 4,0 |
| Plocha povrchu [μm^2]: | 9,1 | 9,1 |
| Počet zrn | 24 | 59 |
| Celková kolmá plocha (rel.) [%]: | 19,8 | 16,5 |
| Celkový objem zrn (nula) [10^3 nm^3]: | 9800 | 11200 |
| Průměrný objem jednoho zrna [10^3 nm^3]: | 410 | 190 |
| Chyba průměrného objemu zrna [10^3 nm^3]: | 80 | 20 |

Z porovnání Obr. 32B a 19B a Tab. 6 plyne, že u vzorků připravených z fyziologického roztoku pozorujeme menší počet agregátů o větším objemu oproti vzorkům připraveným z čistě vodného prostředí.

Z poznatků prezentovaných v literatuře je známo, že klubko HA v roztoku soli (fyziologickém roztoku) zaujímá mnohem sbalenější konformaci. To znamená, že bychom měli pozorovat daleko menší útvary na povrchu slídy. Místo toho pozorujeme daleko menší počet agregátů o větším objemu. Jediné logické vysvětlení tohoto jevu je, že opět pozorujeme větší skupinu agregovaných makromolekulárních klubek a řetězců, které se snadněji spojují do větších celků. Nutno dodat, že v těchto agregátech je zcela jistě přítomné nemalé množství NaCl, které může ovlivňovat velikost pozorovaných struktur.

ZÁVĚR

V rámci této bakalářské práce byl optimalizován proces přípravy vrstev hyaluronanu sodného na povrchu slídy tak, aby byla možná jejich charakterizace pomocí mikroskopie atomárních sil.

V prvním kroku práce byl upraven povrch slídy pomocí $MgCl_2$ tak, aby byla možná imobilizace studovaného polymeru na vybraný typ atomárně rovného povrchu. Následně byly prostudovány vlivy střední molekulové hmotnosti, hmotnostního podílu, času přípravy, času skladování a přítomnosti soli na změnu zobrazované HA na povrchu nosného substrátu.

Bylo zjištěno, že s klesající střední molekulovou hmotností má HA větší tendenci k tvorbě agregovaných struktur na povrchu slídy. Mimo to bylo téměř ve všech případech pozorováno vzájemné propojení agregovaných struktur pomocí skupin izolovaných řetězců HA podobně, jak je popsáno v literatuře. S rostoucím hmotnostním podílem polymeru v roztoku roste velikost agregovaných struktur, což zásadně neovlivňuje dominantní vliv střední molekulové hmotnosti na velikost agregovaných struktur.

V další části experimentální práce byl analyzován vliv času rozpouštění HA ve vodném roztoku při laboratorní teplotě a vliv doby skladování roztoku v lednici. Bylo zjištěno, že tyto jevy jsou protichůdné – v průběhu rozpouštění na třepačce dochází ke zvětšování počtu zrn za současného zmenšování jejich objemu, oproti tomu během skladování v lednici byl sledován růst agregátů na úkor snižování jejich počtu.

Mimo to byl charakterizován povrch slídy s imobilizovanou HA rozpuštěnou ve fyziologickém roztoku. Ve srovnání se strukturami získanými z vodných roztoků bylo možné v prvním přiblížení pozorovat velké krystaly NaCl. Po dalším přiblížení byly mezi těmito krystaly nalezeny podobné struktury HA jako na površích připravených z roztoků bez přítomnosti soli. Bylo zjištěno, že ve srovnání se systémy připravenými z vodných roztoků o stejné střední molekulové hmotnosti byly zobrazené agregáty navzdory očekávání objemnější a jejich počet byl menší.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] I. Hargittai, M. Hargittai, Molecular structure of hyaluronan: an introduction, *Structural Chemistry*. 19 (2008) 697-717. doi:10.1007/s11224-008-9370-3.
- [2] H. Garg, C. Hales, *Chemistry and biology of hyaluronan*, 1st ed., Elsevier, Amsterdam, 2004, ISBN 978-0-08-044382-9.
- [3] M. Cowman, S. Matsuoka, Experimental approaches to hyaluronan structure, *Carbohydrate Research*. 340 (2005) 791-809. doi:10.1016/j.carres.2005.01.022.
- [4] P. Matteini, L. Dei, E. Carretti, N. Volpi, A. Goti, R. Pini, Structural Behavior of Highly Concentrated Hyaluronan, *Biomacromolecules*. 10 (2009) 1516-1522. doi:10.1021/bm900108z.
- [5] A. Almond, J. Sheehan, A. Brass, Molecular dynamics simulations of the two disaccharides of hyaluronan in aqueous solution, *Glycobiology*. 7 (1997) 597-604. doi:10.1093/glycob/7.5.597.
- [6] P. Gribbon, B. Heng, T. Hardingham, The analysis of intermolecular interactions in concentrated hyaluronan solutions suggest no evidence for chain-chain association, *Biochemical Journal*. 350 (2000) 329-335.
- [7] M. Litwiniuk, A. Krejner, T. Grzela, Hyaluronic Acid Inflammation and Tissue Regeneration, *WOUNDS - a Compendium of Clinical Research and Practice*. 28 (2016) 78-88.
- [8] V. Hascall, Intracellular hyaluronan: a new frontier for inflammation?, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1673 (2004) 3-12. doi:10.1016/j.bbagen.2004.02.013.
- [9] K. Dicker, L. Gurski, S. Pradhan-Bhatt, R. Witt, M. Farach-Carson, X. Jia, Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions, *Acta Biomaterialia*. 10 (2014) 1558-1570. doi:10.1016/j.actbio.2013.12.019.

- [10] J. Monslow, P. Govindaraju, E. Puré, Hyaluronan - A Functional and Structural Sweet Spot in the Tissue Microenvironment, *Frontiers in Immunology*. 6 (2015) -. doi:10.3389/fimmu.2015.00231.
- [11] H. Hansma, Polysaccharide Helices in the Atomic Force Microscope, *Biophysical Journal*. 68 (1995) 3-4.
- [12] S. Furlan, G. La Penna, A. Perico, A. Cesàro, Hyaluronan chain conformation and dynamics, *Carbohydrate Research*. 340 (2005) 959-970. doi:10.1016/j.carres.2005.01.030.
- [13] A. Almond, P. DeAngelis, C. Blundell, Hyaluronan: The Local Solution Conformation Determined by NMR and Computer Modeling is Close to a Contracted Left-handed 4-Fold Helix, *Journal of Molecular Biology*. 358 (2006) 1256-1269. doi:10.1016/j.jmb.2006.02.077.
- [14] P. Matteini, L. Dei, E. Carretti, N. Volpi, A. Goti, R. Pini, Structural Behavior of Highly Concentrated Hyaluronan, *Biomacromolecules*. 10 (2009) 1516-1522. doi:10.1021/bm900108z.
- [15] J. Wu, X. Deng, Y. Zhang, L. Wang, B. Tian, B. Xie, Application of Atomic Force Microscopy in the Study of Polysaccharide, *Agricultural Sciences in China*. 8 (2009) 1458-1465. doi:10.1016/S1671-2927(08)60359-4.
- [16] L. Gřundělová, A. Mráček, V. Kašpárková, A. Minařík, P. Smolka, The influence of quarternary salt on hyaluronan conformation and particle size in solution, *Carbohydrate Polymers*. 98 (2013) 1039-1044.
- [17] A. Minařík, Studium transportu hmoty v gelových fázích biopolymerů, disertační práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Zlín, 2008.
- [18] A. Round, N. Rigby, A. MacDougall, S. Ring, V. Morris, Investigating the nature of branching in pectin by atomic force microscopy and carbohydrate analysis, *Carbohydrate Research*. 331 (2001) 337-342. doi:10.1016/S0008-6215(01)00039-8.
- [19] A. Gunning, T. Giardina, C. Faulds, N. Juge, S. Ring, G. Williamson, V. Morris, Surfactant-mediated solubilisation of amylose and visualisation by atomic force

- microscopy, *Carbohydrate Polymers*. 51 (2003) 177-182. doi:10.1016/S0144-8617(02)00126-1.
- [20] A. Kirby, P. Gunning, V. Morris, M. Ridout, Observation of the Helical Structure of the Bacterial Polysaccharide Acetan by Atomic Force Microscopy, *Biophysical Journal*. 68 (1995) 360-363.
- [21] S. Ikeda, Y. Nitta, T. Temsiripong, R. Pongsawatmanit, K. Nishinari, Atomic force microscopy studies on cation-induced network formation of gellan, *Food Hydrocolloids*. 18 (2004) 727-735. doi:10.1016/j.foodhyd.2003.11.009.
- [22] M. Iijima, M. Shinozaki, T. Hatakeyama, M. Takahashi, H. Hatakeyama, AFM studies on gelation mechanism of xanthan gum hydrogels, *Carbohydrate Polymers*. 68 (2007) 701-707. doi:10.1016/j.carbpol.2006.08.004.
- [23] D. Tang, A. Li, P. Attar, E. Dowell, Reduced order dynamic model for polysaccharides molecule attached to an atomic force microscope, *Journal of Computational Physics*. 201 (2004) 723-752. doi:10.1016/j.jcp.2004.06.016.
- [24] M. Cowman, M. Li, E. Balazs, Tapping mode atomic force microscopy of hyaluronan: Extended and intramolecularly interacting chains, *Biophysical Journal*. 75 (1998) 2030-2037.
- [25] A. Gunning, V. Morris, S. Al-Assaf, G. Phillips, Atomic force microscopic studies of hylan and hyaluronan, *Carbohydrate Polymers*. 30 (1996) 1-8. doi:10.1016/S0144-8617(96)00094-X.
- [26] C. Spagnoli, A. Korniaikov, A. Ulman, E. Balazs, Y. Lyubchenko, M. Cowman, Hyaluronan conformations on surfaces: effect of surface charge and hydrophobicity, *Carbohydrate Research*. 340 (2005) 929-941. doi:10.1016/j.carres.2005.01.024.
- [27] E. Balnois, K. Wilkinson, Sample preparation techniques for the observation of environmental biopolymers by atomic force microscopy, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 207 (2002) 229-242. doi:10.1016/S0927-7757(02)00136-X.
- [28] M. Cowman, C. Spagnoli, D. Kudasheva, M. Li, A. Dyal, S. Kanai, E. Balazs, Extended, Relaxed, and Condensed Conformations of Hyaluronan Observed by

Atomic Force Microscopy, *Biophysical Journal*. 88 (2005) 590-602.
doi:10.1529/biophysj.104.049361.

[29] M. Giannotti, M. Rinaudo, G. Vancso, Force Spectroscopy of Hyaluronan by Atomic Force Microscopy: From Hydrogen-Bonded Networks toward Single-Chain Behavior, *Biomacromolecules*. 8 (2007) 2648-2652. doi:10.1021/bm700592j.

[30] A. Zellermann, D. Bergmann, C. Mayer, Cation induced conformation changes in hyaluronate solution, *European Polymer Journal*. 49 (2013) 70-79.
doi:10.1016/j.eurpolymj.2012.09.025.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|----------|--|
| HA | kyselina hyaluronová, resp. hyaluronan sodný |
| AFM | mikroskopie atomárních sil |
| M_w | distribuce molární hmotnosti polymeru |
| ECM | extracelulární matrix |
| MD | molekulární dynamika |
| NMR | nukleární magnetická rezonance |
| FTIR | infračervená spektroskopie |
| DSC | diferenční kompenzační kalorimetrie |
| TEM | transmisní elektronová mikroskopie |
| XRD | rentgenová difrakční analýza |
| DLS | dynamický rozptyl světla |
| SPM | mikroskopie skenující sondou |
| TMAFM | poklepový mód mikroskopie atomárních sil |
| APTES | 3-aminopropyltrimetoxysilan |
| TMSPTA | N-trimetoxysilylpropyl-N,N,N-trimetylamonium |
| AFM-SMFS | technika silové spektroskopie mikroskopie atomárních sil |
| hm. | hmotnostní podíl |
| RMS | střední kvadratická drsnost |
| R_a | průměrná drsnost |

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1: Schématické znázornění trisacharidu hyaluronanu zahrnuje disacharidovou jednotku sestávající z *N*-acetyl-*D*-glukosaminu a *D*-glukoronové kyseliny [4].
.....12
- Obr. 2: Princip AFM pracujícího v kapalině v poklepovém režimu s fixovanou sondou a pohyblivým vzorkem [17].17
- Obr. 3: Pracovní režimy AFM, kontaktní (vlevo), semikontaktní (uprostřed) a bezkontaktní (vpravo) [17].17
- Obr. 4: Vzhled řetězců HA na povrchu slídy zobrazený pomocí AFM. Široké smyčky na zdánlivém konci řetězce vznikají antiparalelním uspořádáním segmentů řetězce do stabilizované kmenové struktury [24].19
- Obr. 5 Struktura silanových derivátů použitých k modifikaci slídy [26].20
- Obr. 6: TMAFM obraz vysoko- M_w HA deponované na nemodifikované slídě z 10 μ g/ml roztoku v H₂O, velikost (1,3x1,3) μ m x 2,5 nm (A), na TMSPTA-modifikované slídě z 10 μ g/ml roztoku v H₂O, velikost (1x1) μ m x 1 nm (B), TMAFM obraz středně- M_w HA deponované na grafitu z 10 μ g/ml roztoku v H₂O, velikost (2,75x2,75) μ m x 4 nm (C), TMAFM obraz vysoko- M_w HA deponované na grafitu z 10 μ g/ml roztoku v H₂O, velikost (3x3) μ m x 2,7 nm (D) [26].22
- Obr. 7: Možné kondenzované konformace HA v polyelektrolytu [28].23
- Obr. 8: TMAFM obraz vysoko- M_w HA deponované na grafitu z 10 μ g/ml roztoku v H₂O bez oplachu před sušením, velikost (3x3) μ m x 4 nm (A), TMAFM obraz vysoko- M_w HA deponované na grafitu z 10 μ g/ml roztoku v H₂O bez oplachu před sušením, velikost (1,5x1,5) μ m x 1,6 nm (B) [26].24
- Obr. 9: TMAFM obraz středně- M_w HA deponované na slídě z 10 μ g/ml roztoku v H₂O bez oplachu před sušením, velikost (1,5x1,5) μ m x 1,6 nm (A), TMAFM obraz vysoko- M_w HA deponované na slídě z 10 μ g/ml roztoku v H₂O bez oplachu před sušením, velikost (3x3) μ m x 3 nm (B) [26].25
- Obr. 10: Síť HA (A) deponované na čerstvě štípané slídě bez oplachu před sušením se stočenými vlákny (C) mezi globulárními strukturami [28].25
- Obr. 11: Tahové křivky pro různé teploty měření (a) 29 °C, (c) 46 °C, (b), (d) normalizované délky [29].27
- Obr. 12: Graf závislosti viskozity HA na koncentraci barnatých kationtů, srovnání s dextranem, na který nemá přítomnost bivalentního kationtu vliv [30].28

- Obr. 13: TMAFM zobrazení HA imobilizované z roztoku bez bivalentních kationtů [30].....29
- Obr. 14: TMAFM zobrazení HA imobilizované z roztoku s bivalentními kationty [30].29
- Obr. 15: Náhled na povrch slídy A) před modifikací B) po modifikaci pomocí $MgCl_2$. Obrázky pořízeny pomocí TMAFM. Rozměr zobrazené plochy $3 \times 3 \mu m$32
- Obr. 16: Porovnání vlivu střední M_w , A) 2,36 MDa, B) 1,5 MDa, C) 1,18 MDa na změnu vzhledu imobilizované HA na povrchu slídy. HA deponována z 0,01 hm % vodného roztoku, připravovaného 22 h. Záznamy pořízeny pomocí TMAFM, velikost zobrazených ploch $3 \times 3 \mu m$34
- Obr. 17: Výškové profily imobilizované HA na povrchu slídy pro různé střední M_w A) 2,36 MDa, B) 1,5 MDa, C) 1,18 MDa. Data odpovídají Obr. 16.35
- Obr. 18: Distribuce velikostí agregátů HA na povrchu slídy pro rozdílné M_w A) 2,36 MDa, B) 1,5 MDa, C) 1,18 MDa. Data získána z obrazové analýzy záznamů uvedených na Obr. 16 pro plochy $3 \times 3 \mu m$36
- Obr. 19: Porovnání vlivu střední M_w , A) 1,5 MDa, B) 600 kDa, C) 370 kDa, D) 243 kDa, E) 124 kDa na změnu vzhledu imobilizované HA na povrchu slídy. HA deponována z 0,1 hm.% vodného roztoku, připravovaného 22 h. Záznamy pořízeny pomocí TMAFM, velikost zobrazených ploch $3 \times 3 \mu m$38
- Obr. 20: Výškové profily imobilizované HA na povrchu slídy pro různé střední M_w A) 1,5 MDa, B) 600 kDa, C) 370 kDa, D) 243 kDa, E) 124 kDa. Data odpovídají Obr. 19.39
- Obr. 21: Distribuce velikostí agregátů HA na povrchu slídy pro rozdílné M_w A) 1,5 MDa, B) 600 kDa, C) 370 kDa, D) 243 kDa, E) 124 kDa. Data získána z obrazové analýzy záznamů uvedených na Obr. 19 pro plochy $3 \times 3 \mu m$41
- Obr. 22: Charakteristický vzhled izolovaných řetězců HA propojujících agregáty HA na povrchu modifikované slídy. A) náhled na plochu, B) profilový řez přes izolované řetězce. Zobrazená plocha $0,6 \times 0,6 \mu m$. Obrázek pořízen pomocí TMAFM.42
- Obr. 23: Porovnání vlivu doby přípravy na třepačce A) 22 h, B) 44 h na změnu vzhledu imobilizované HA na povrchu slídy. HA deponována z 0,1 hm.% vodného roztoku, $M_w=600kDa$. Záznamy pořízeny pomocí TMAFM, velikost zobrazených ploch $3 \times 3 \mu m$43

- Obr. 24: Výškové profily imobilizované HA na povrchu slídy pro různé **dobu přípravy na třepačce** A) 44 h, B) 22 h. Data odpovídají Obr. 23.44
- Obr. 25: Distribuce velikostí agregátů HA na povrchu slídy pro rozdílné **dobu přípravy na třepačce** A) 22 h, B) 44 h. Data získána z obrazové analýzy záznamů uvedených na Obr. 23 pro plochy 3x3 μm45
- Obr. 26: Porovnání **vlivu doby přípravy na třepačce** A) 22 h, B) 67 h na změnu vzhledu imobilizované HA na povrchu slídy. HA deponována z **0,1 hm.%** vodného roztoku, $M_w=1,5$ MDa. Záznamy pořízeny pomocí TMAFM, velikost zobrazených ploch 3x3 μm46
- Obr. 27: Vzhled HA o střední M_w 1,5 MDA na povrchu slídy imobilizované z vodného roztoku s hmotnostním podílem polymeru 0,1 hm. % připraveného na třepačce po dobu 67 hodin. A) výškové zobrazení, B) zobrazení fázových změn na ploše 10x10 μm , Záznamy pořízeny pomocí TMAFM.47
- Obr. 28: 3D náhled na imobilizovanou HA o střední M_w 1,5 MDA na povrchu slídy. Data odpovídají vzorku uvedeném na Obr. 27.47
- Obr. 29: Porovnání **vlivu doby skladování roztoku**, příprava vzorku A) 2. den, B) 3. den, C) 4. den, D) 5. den po sundání ze třepačky, HA deponována z **0,1 hm.%** vodného roztoku, $M_w=1,5$ MDa, délka prvotní přípravy na třepačce 67 h. Záznamy pořízeny pomocí TMAFM, velikost zobrazených ploch 3x3 μm49
- Obr. 30: Výškové profily imobilizované HA na povrchu slídy pro různé **dobu skladování roztoku**, příprava vzorku A) 2. den, B) 3. den, C) 4. den, D) 5. den po sundání ze třepačky. Data odpovídají Obr. 29.50
- Obr. 31: Distribuce velikostí agregátů HA na povrchu slídy pro rozdílné **dobu skladování roztoku**, příprava vzorku A) 2. den, B) 3. den, C) 4. den, D) 5. den po sundání ze třepačky. Data získána z obrazové analýzy záznamů uvedených na Obr. 29 pro plochy 3x3 μm51
- Obr. 32: Vzhled povrchu slídy po depozici HA rozpuštěné ve **fyzilogickém roztoku**. Na povrch slídy byl deponována roztok s obsahem **0,1 hm.%** HA o střední $M_w=600$ kDa po dobu 22 hodin na třepačce. Záznamy pořízeny pomocí TMAFM, velikost zobrazených ploch A) 20x20 μm B) 3x3 μm52

SEZNAM TABULEK

| | |
|---|----|
| Tab. 1: Hodnoty kontaktních úhlů a drsnosti pro nemodifikovanou slídu, APTES- a TMSPTA- slídu a grafit [26]: | 21 |
| Tab. 2: Statistické veličiny charakterizující imobilizovanou HA deponovanou na povrchu slídy z vodného roztoku. Byly analyzovány plochy 3x3 μm uvedené na Obr. 16:..... | 36 |
| Tab. 3: Statistické veličiny charakterizující imobilizovanou HA deponovanou na povrchu slídy z vodného roztoku. Byly analyzovány plochy 3x3 μm uvedené na Obr. 19:..... | 40 |
| Tab. 4: Statistické veličiny charakterizující imobilizovanou HA deponovanou na povrchu slídy z vodného roztoku. Byly analyzovány plochy 3x3 μm, uvedené na Obr. 23:..... | 45 |
| Tab. 5: Statistické veličiny charakterizující imobilizovanou HA deponovanou na povrchu slídy z vodného roztoku. Byly analyzovány plochy 3x3 μm, uvedené na Obr. 29:..... | 51 |
| Tab. 6: Porovnání statistických veličin charakterizujících přichycenou HA na povrchu slídy z fyziologického a vodného roztoku. Data byla získána z analyzovaných ploch 3x3 μm, uvedených na Obr. 32B a 19B: | 53 |