

Syntéza a modifikace fyzikálně-chemických vlastností gelových soustav pro terapeutické aplikace

Ing. Ivana Kupská, Ph.D.

Teze disertační práce



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Teze disertační práce

**Syntéza a modifikace fyzikálně-chemických
vlastností gelových soustav pro terapeutické aplikace**

**Synthesis and modification of physico-chemical properties of gel
systems for therapeutic applications**

Autor: **Ing. Ivana Kupská**

Studijní program: P2808 Chemie a technologie materiálů

Studijní obor: 2808V009 Chemie a technologie materiálů

Školitel: prof. Ing. Lubomír Lapčík, Ph.D.

Oponenti: prof. Ing. Marián Valko, DrSc.
prof. RNDr. Vladimír Čech, Ph.D.
prof. Ing. Petr Svoboda, Ph.D.

Zlín, říjen 2017

© Ivana Kupská

Vydala **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně** v edici **Doctoral Thesis Summary**.
Publikace byla vydána v roce 2017.

Klíčová slova: kyselina hyaluronová (HA), deriváty kyseliny hyaluronové, viskozita, Hugginsova konstanta, limitní viskozitní číslo, prášková reologie, povrchové vlastnosti.

Key words: hyaluronic acid (HA), derivatives hyaluronic acid, viscosity, Huggin's constant, intrinsic viscosity, powder rheology, surface properties.

Plná verze disertační práce je dostupná v Knihovně UTB ve Zlíně.

ISBN 978-80-7454-691-4

ABSTRAKT

Tato práce v teoretické části popisuje čtyři základní kapitoly, kde v první byl popsán obecný přehled gelových soustav. Dále navazuje na hlavní kapitolu o kyselině hyaluronové (HA) jakož to významného zástupce biopolymerů se širokým významem jak v biologii tak i v praktických terapeutických a biomedicínských aplikacích. V této kapitole je podrobně popsáno chemické složení HA a jeho struktura v roztoku, ale také chování polymerního klubka spolu s polyelektrolytickým a reologickým chováním. Další podstatná kapitola se zabývá základními typy derivátů této kyseliny, postupu syntézy a jejich materiálově a fyzikálně-chemické charakterizace. Poslední kapitola teoretického rámce je zaměřena na viskozitu a charakteristiku viskozimetrického měření, kterou byly studovány polymerní roztoky HA.

Předložená práce je v praktické části zaměřena na studium reologických vlastností roztoků hyaluronátu sodného. Předmětem studie bylo pomocí fyzikálně chemických metod sledovat chování hyaluronových roztoků v závislosti na koncentraci. Pro bližší zkoumání vlivu prostředí byly testovány různé iontové složení rozpouštědla. Z důvodu termodynamických parametrů toku je dále popisován vliv rostoucí teploty na viskozitu roztoků a také vliv měnícího se pH. Na základě získaných dat z viskozimetrického měření byly určeny hodnoty limitního viskozitního čísla a Hugginsovy konstanty, které jsou důležité pro pochopení chování polymerního klubka a jeho konformačních změn.

Součástí praktické části byla také charakterizace povrchové energie pomocí inverzní plynové chromatografie (SEA), charakterizace práškové formy kyseliny hyaluronové na základě reologického měření, analýza povrchu prášku HA metodou SEM a studování procesu probíhajícího ve struktuře pomocí termogravimetrie.

ABSTRACT

This thesis is divided into 4 theoretical basic parts. Gels systems in general are described into first part followed by main part regarding hyaluronic acid as significant biopolymers with wide range of use in biology and also in therapeutic fields in biomedical applications. There is a chemistry description and its structure in solution study, but also approach of polymeric coil behaviour with respect to polyelectrolytical and rheological behaviour aspects. Next part deals with basic HA derivates, syntethesis description and physico-chemical characterization. Last theoretical part is mainly focused HA polymeric solution, by studying of viscosimetric measurement.

Submitted thesis is deeply focused on rheological properties of studied sodium hyaluronate solution. The main body of practical part is solved by polymer concentration dependence to rheological sodium hyaluronate solution study from methodical point of view with respect to physico-chemical characterization. Therefore, a viscometric measurement is also discussed as a basic of polymer solution study. Influence of increasing temperature and effect of pH change to viscosity solution is described further due to thermodynamic parameters of flow. Ionic composition of solvents and chemical modification by acid and alkaline substances are also mentioned. Based on viscosimetric measurement data of polymeric coil and conformation changes, intrinsic viscosity and Huggin's constant were calculated.

Surface energy characterization by inverse gas chromatography (SEA) approach is also mentioned. HA topography study by scanning electron microscopy and structure processes by thermogravimetry are described as well.

OBSAH

1.	ÚVOD.....	7
2.	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	8
3.	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	9
4.	TEORETICKÝ RÁMEC.....	11
4.1	Makromolekulární gelová forma hmoty	11
4.1.1	Chemicky a fyzikálně síťované gely	11
4.2	Kyselina hyaluronová.....	11
4.2.1	Použitelnost a význam v průmyslu.....	12
4.2.2	Chemické složení a struktura.....	12
4.2.3	Struktura v roztoku a reologické chování.....	12
4.2.4	Konformace polymerního klubka a polyelektrolytické chování	13
4.3	Chemické modifikace hyaluronanu	13
4.4	Viskozita a viskozimetrie.....	14
4.4.1	Limitní viskozitní číslo a Hugginsova konstanta	14
5.	ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ.....	15
5.1	Měření viskozity na Ubbelohdeho viskozimetru, výpočet limitního viskozitního čísla a Hugginsovy konstanty.....	15
5.1.1	Stanovení pH.....	15
5.2	Inverzní plynová chromatografie- SEA.....	15
5.3	Prášková reologie.....	16
5.4	Elektronová mikroskopie (SEM).....	16
5.5	Termogravimetrie (TG).....	16
6.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	17
6.1	Příprava vzorků- specifikace roztoků pro viskozimetrii.....	17
6.2	Inverzní plynová chromatografie (SEA).....	17
6.3	Prášková reologie.....	17
6.4	Elektronová mikroskopie SEM.....	17

6.5	Termogravimetrie	17
7.	VÝSLEDKY A DISKUZE	18
7.1	Viskozimetrické měření.....	18
7.2	Inverzní plynová chromatografie (SEA)	18
7.3	Prášková reologie.....	19
7.4	SEM	20
7.1	Termogravimetrie	20
8.	PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI	21
9.	ZÁVĚR	22
10.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	23
11.	SEZNAM OBRÁZKŮ A GRAFŮ	28
12.	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	29
13.	PUBLIKAČNÍ ČINNOST	30
14.	ŽIVOTOPIS	32

1. ÚVOD

Samotná aplikace gelů nebo gelových soustav v materiálovém inženýrství spadá do velice širokého spektra různých oborů. Používají se především inteligentní materiály, jako jsou hydrogely, které mají své uplatnění například v lékařství, jak při výrobě kontaktních čoček, či jako nosiče léčiv s řízeným uvolňováním v oblasti dávkování léčiv [1, 2]. Aplikace polymerních biomateriálů je v současné době trendem v rekonstrukční medicíně tzv. tkáňové inženýrství. Tento obor se zaměřuje na postupy, které regenerují poškozené či nemocné tkáně a také náhradní tkáně uměle připravenou cestou. V regenerativní medicíně je aplikace hydrogelu nedílnou součástí ošetření míst, které se těžce zacelují a chronických ran tzv. hydrogelovým krytím. Krytí je schopno absorbovat sekret z ran ale především rehydratovat suchou tkáň. Kyselina hyaluronová (HA) je čím dál tím více studována vzhledem k její aktivní využitelnosti v praxi, což také dokazuje vysoká četnost odborných publikací. Vývoj a výzkum pramení z potřeb dnešní doby, proto se tento lineární polysacharid, vyskytující se v živých organizmech drží na špičce popularnosti v mnoha oborech lékařství [3, 4, 5].

V průmyslu se tato kyselina používá především na bakteriálním základu, ale v prvopočátcích výzkumu byla získávána extrakcí, především ze zvířecích tkání. Pro komerční využití se HA vyskytuje v řadě forem, kde odlišnost je dána jednak molekulovou hmotností, původem, ale také chemickou modifikací. K novým aplikacím přispívá samotná modifikace, která mění biologické vlastnosti. S užitím chemických modifikací je dosaženo např. zlepšení reologických vlastností. V současné literatuře je jen z části zastoupeno studování reologického chování HA, a proto se tato práce z větší části zabývá problematiku fyzikálních vlastností biologické a fyziologické funkce roztoku kyseliny hyaluronové. Získané výsledky z praktického měření viskozit mohou být užitečné pro vývoj v biomedicínském průmyslu, který se intenzivně zabývá vývojem nanovláken HA. Efektivnost produkce hyaluronových vláken nese veliké množství faktů, které jsou předmětem dalších studií s uplatněním v tkáňovém inženýrství [6, 7].

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Viskozimetrické vlastnosti roztoků jsou velice významným okruhem pro zdroj informací o chování molekul. Na základě měření viskozity je možné získat parametry jako je např.: molekulová hmotnost, limitní viskozitní číslo, průměrná molekulová hmotnost aj. Pro určující parametry reologických vlastností jako je závislost redukované viskozity na koncentraci polymerního roztoku se používají rovnice, ať už empirické či odvozené od různých teoretických modelů. Aplikací rovnic, které se používají při extrapolaci ze získaných dat viskozimetrického měření jsou: Hugginsova rovnice (Huggins eq.), Kraemerova rovnice (Kraemer eq.), Schulz-Blaschkeho rovnice (Schulz-Blaschke eq.) a Martinova rovnice (Martin eq.) [8, 9, 10].

V současné době se uplatňuje v hojném zastoupení pro vyjádření závislosti viskozity na koncentraci Hugginsova rovnice, ze které se pro interpretaci používá tzv. Hugginsova konstanta k_H a limitní viskozitní číslo $[\eta]$. V publikacích se můžeme běžně setkat s konstantami odvozenými z rovnic, kde se v mnoha případech diskutuje právě hodnota k_H [9, 11, 12, 13, 14]. U výpočtu Hugginsovy konstanty se jedná o lineární závislost redukované viskozity na koncentraci, kde nám tato konstanta popisuje interakce mezi polymerními klubky a rozpouštědlem. Teoretická hodnota k_H byla stanovena již mnoha odbornými články na přibližnou hodnotu 0,4, ale odchylky od této hodnoty mohou být způsobeny neideálním chováním polymerů [15-20].

V literatuře lze najít řadu odborných publikací, které se zabývají reologickým chováním kyseliny hyaluronové. V publikacích jsou jako měřicí přístroje především využívány kapilární nebo rotační viskozimetry [12, 21, 22]. Pro konkrétní aplikaci ve farmakologii na cílenou distribuci léčiv se hyaluronan využívá jako nosič léčiva, kde jsou hlavní interakce mezi karboxylovými a hydroxylovými skupinami na řetězci. Tato aplikace je nyní ve fázi výzkumu a vývoje pro léčbu rakoviny pomocí chemoterapie za využití cytostatik [23].

Vzhledem k praktickému využití také práškové formy kyseliny hyaluronové v různých průmyslových odvětvích, je důležité sledovat nestabilitu v jejím toku. Vzniklé problémy toku, což je již uvedená nestabilita, kdy volně tekoucí prášek přestane téct, jsou v současné době běžné zádrhly komplikující jejich zpracování. Vlastní manipulace s práškovými materiály, je běžnou součástí chemického, farmaceutického, biotechnologického průmyslu [24].

3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cíle disertační práce jsou rozdělené do dvou sekcí. Kde v konečném výsledku se jedná o pochopení kolektivního chování makromolekul HA v kapalné a tuhé fázi- práškové formě.

V první sekci bylo cílem sledování změn reologického chování roztokové formy kyseliny hyaluronové. Konformační změny přírodních biopolymerů ovlivňují řadu fyziologických procesů živých organismů. Tyto změny jsou modulovány např.: změnou iontového složení, pH, teplotou, přičemž tyto změny probíhají jak na mikro škále, tak v některých případech i makroskopických dimenzích. Jedná se zejména o změny terciálních a kvartérních nadmolekulárních struktur. Pro struktury biopolymerů konkrétně glykosaminoglykanů jsou to degradační procesy primárních a sekundárních struktur. Tyto změny konformace případně i konfigurace se projevují ve změně reologického chování jednak v přímé blízkosti primární a sekundární struktury biopolymeru v důsledku např.: kontrakce nebo expanze makromolekulárního klubka případně změnou terciální struktury např.: změnou dvojitě šroubovice v klubko.

V druhé sekci se studovala prášková forma této kyseliny. Tato problematika se jeví z hlediska praktické aplikace jako velice zajímavá k výše uvedeným roztokovým formám. Znalost povrchových charakteristik tj. např.: smáčivost a povrchová energie práškových forem, najdou své praktické využití pro formy inhalačních kompozic, pro přípravu a výrobu tablet doplňků stravy. Pro problematiku směsování práškových forem je důležitá detailní znalost povrchových charakteristik pro různé stupně pokrytí povrchu. Pokrytí povrchu pak zásadním způsobem ovlivňuje tokové vlastnosti a schopnost tabletování v konečné aplikační formě.

Hlavním cílem plánované disertační práce je získání široké škály experimentálních údajů změn kinematické viskozity vodných roztoků HA a jejich změn vlivem teploty a koncentrace. Na základě Hugginsovy rovnice charakterizovat tokové vlastnosti a rozměr makromolekulárních klubek při daných experimentálních podmínkách. Výsledky budou dále teoreticky zpracovány a statisticky vyhodnoceny. Pro dosažení cílů k disertační práci bylo nezbytné stanovit následující dílčí cíle:

- Prostudovat základní problematiku chování HA v roztoku.
- Zvládnout metodiku viskozimetrického měření na Ubbelohdeho viskozimetru.
- Vypočítat kinematickou a redukovanou viskozitu pro všechny sady vzorků.
- Graficky zpracovat Hugginsovu rovnici.
- Vypočítat Hugginsovu konstantu a limitní viskozitní číslo pro všechny sady vzorků ve 2 rozpouštědlech (0,01 M KCl a demi- vodě) při 3 různých teplotách (25 °C, 30 °C a 35°C).
- Pozorovat změny chování makromolekulárních klubek na základě přísad kyselého a zásaditého prostředí.
- Naměřit pH všech sad vzorků, které byly sledovány.

Jako další cíle vedoucí k prostudování tokových vlastností práškové formy HA a její povrchové energie, identifikaci dějů spojených s výměnou tepla a analyzování povrchu bylo nezbytné stanovit následující dílčí cíle:

- Provést charakterizaci povrchové energie pomocí inverzní plynové chromatografie (SEA).
- Studovat tokové vlastnosti práškových vzorků pomocí práškového reometru.
- Sledovat povrch pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM).
- Studovat proces probíhající ve vnitřní struktuře pomocí termogravimetrie.

4. TEORETICKÝ RÁMEC

4.1 Makromolekulární gelová forma hmoty

Definice gelu jsou různé a liší se podle autora, ale jednoduše se dá popsat jako systém, který je tvořený trojrozměrnou sítí o makroskopické velikosti. Tato síť vytváří strukturu tvořenou z řetězců makromolekul, která souvisle prostupuje disperzním prostředím. Za vznik polymerního gelu je tedy považováno samovolné bobtnání polymerní sítě ve vhodném rozpouštědle, když je rozpouštědlem vodné prostředí vzniká polymerní hydrogel. Pro přípravu hydrogelů jsou zajímavé především materiály přirozeně se vyskytující, jako je např.: kolagen, želatina, kyselina hyaluronová. [25, 26, 27].

4.1.1 Chemicky a fyzikálně síťované gely

Uzly sítě vzniklé chemickou reakcí nazýváme kovalentními sítěmi nebo přesněji kovalentně síťované gely. Tyto gely jsou tedy vzniklé v důsledku primárních vazeb, kde za obecnou chemickou vazbu uvažujeme vazbu kovalentní, iontovou a také kovovou. Kovalentní gel můžeme brát jako síťovou strukturu tvořenou chemickými vazbami, kde tato nekonečná trojrozměrná struktura se může chápat jako makromolekula velikých rozměrů [28]. V případě fyzikálně síťovaného gelu vzniká za pomoci fyzikálních sil, kde samotná struktura je tvořena útvary, které vznikají spojováním úseků polymerních řetězců do uzlových oblastí. Makromolekulární řetězce jsou tedy působením buď van der Waalsových sil, vodíkových vazeb a, nebo polárních sil sdružovány do úseků, které plní funkci uzlů charakteristické pro fyzikální spoje [1].

4.2 Kyselina hyaluronová

Hyaluronan nebo také hyaluronát, je sodná sůl kyseliny hyaluronové která patří do skupiny glykosaminoglykanů (GAG). Tato molekula je vysokomolekulárním lineárním polysacharidem, který se přirozeně vyskytuje v živých organismech a je nejdůležitější složkou mezibuněčné hmoty. V lidském těle se účastní v celé škále biologických procesů např.: proliferace a diferenciací buněk, kde jsou tyto imunomodulační procesy využívány při procesech hojení ran. Díky struktuře je vysoká hydrofilita jednou z nejdůležitějších vlastností, která ukazuje na neobvyklé reologické vlastnosti a lubrikační účinky [29, 30, 31].

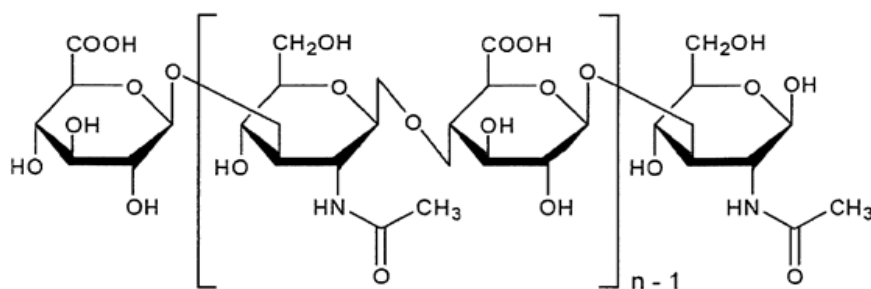
4.2.1 Použitelnost a význam v průmyslu

Obecně se dá říci, že hydrofilní chování, snadná biodegradovatelnost ve tkáních a především možnost chemické modifikace, staví tento biopolymer na přední příčky ve využitelnosti v mnoha odvětvích. Běžně se dnes HA využívá při chirurgických operacích v oftalmologii jako ochrana jemných očních tkání a také k zajištění potřebného prostoru během zákroku. Další z aplikací je v ortopedii a revmatologii, kde se používá při léčbě revmatoidní artritidy.

Produkty na bázi kyseliny hyaluronové nesou svoji prestiž také ve veterinární sféře pro technické veterinární prostředky. V tomto odvětví slouží stejně jako pro lidské tělo k léčbě pohybového aparátu, hojení ran a při oftalmologických problémech. Hitem poslední doby jsou produkty s obsahem kyseliny hyaluronové pro perorální podání [32, 33, 34].

4.2.2 Chemické složení a struktura

Z chemického hlediska se jedná o nevětvený mukopolysacharid, který je složený z D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu v přesném poměru 1:1. Skupinu složených sacharidů (mukopolysacharidů). Samotný řetězec kyseliny vzniká postupným spojováním disacharidových jednotek kyseliny D-glukuronové (*GlcA*) a N-acetyl-D-glukosaminem (*GlcNAc*). Celková struktura biopolymeru je výsledkem pravidelně se opakujících disacharidových jednotek, které jsou vzájemně spojeny střídající se β -1,3 a β -1,4 glykosidickou vazbou [35, 36].



Obrázek 1: Chemická struktura kyseliny hyaluronové [37].

4.2.3 Struktura v roztoku a reologické chování

Chování HA ve fyziologickém roztoku je výčetem mnoha okolností a to především kombinací chemické struktury disacharidových jednotek, vnitřních vodíkových vazeb a v neposlední řadě interakce s rozpouštědlem. Vodný roztok je závislý na viskozitě, která je silně závislá na molekulové hmotnosti a koncentraci roztoku, což jsou další faktory, které ovlivňují výslednou strukturu.

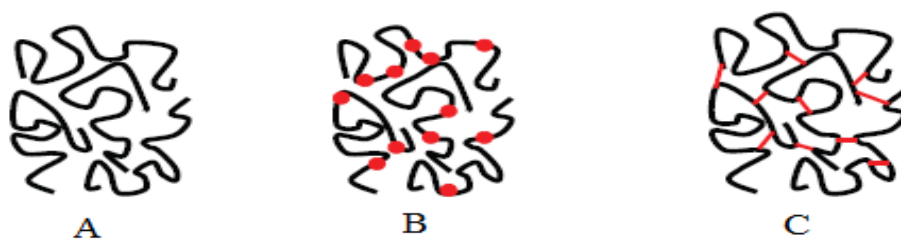
Sekundární strukturu tvoří polymerní řetězce zaujímající v roztoku helikální konformaci, kde obě dvě strany řetězce jsou totožné, ale protisměrně orientované tzv. antiparalelní. Molekula HA zaujímá v roztoku strukturu ve formě náhodně svinutého klubka [31, 38, 39]. Kyselina hyaluronová je známá svými unikátními reologickými vlastnostmi. Reologické chování je úzce spjata s molekulovou hmotností a koncentrací rozpuštěné HA. Roztoky kyseliny hyaluronové vykazují pseudoplastické chování již při nízkých koncentracích, to znamená, že roztoky mají vysokou viskozitu, která se postupně snižuje ze zvyšující se smykovou rychlostí [40, 41].

4.2.4 Konformace polymerního klubka a polyelektrolytické chování

Řetězec HA obsahuje vazby o různých typech. Vyskytující se kovalentní vazby v glukózových kruzích jsou poměrně pevné a tím udržují stálý tvar cukernatých zbytků. Terciální struktura molekuly není náhodná a to především ze sterických důvodů. Každá disacharidová jednotka je pootočená o 180° , kde dvěma pootočeními se dostává do původní konfigurace. Struktura této molekuly se označuje jako dvakrát stočená šroubovice („two-fold helix“) [40, 42]. Molekula HA se ve vodných roztocích zachovává jako záporně nabitý polyelektrolyt a toto chování se projevuje změnou konformace, která závisí na stupni disociace, který je charakterizován pH a iontovou silou [40, 43].

4.3 Chemické modifikace hyaluronanu

Na základě chemické modifikace se dají připravit deriváty HA o požadovaných vlastnostech, čímž je možno cíleně dosáhnout specifického chování při jednotlivých aplikacích. Fyzikální vlastnosti, biokompatibilitu derivátu a rychlost degradace lze řídit typem chemické vazby, stupněm substituce, umístěním ligandu na hyaluronan, volbou substituentů na ligandu a v neposlední řadě použitým typem síťovací reakce. Záměrem chemických modifikací u biopolymerů je hlavně zvýšit afinitu k nepolárním účinným látkám [6, 32, 44].



Obrázek 2: Lineární (A), derivovaná (B) a zesíťovaná podoba HA (C) [6].

Strategie k získání derivátů se dají popsat třemi způsoby: Esterifikací, pomocí karbodiimidů, sulfatací. Tyto základní modifikační postupy jsou používány k vytvoření HA derivátů, které jsou vhodné pro přímé aplikace nebo pro následující síťovací procesy. Chemická modifikace může být prováděna na více funkčních místech a to na karboxylové skupině (–COOH), hydroxylové skupině (–OH) a aminoskupině (–NH₂) ve vodném prostředí. Některé modifikace musí být uskutečňovány v organických rozpouštědlech, jako je například dimethylsulfoxid (DMSO), nebo dimethylformamid (DMF) [45].

4.4 Viskozita a viskozimetrie

Viskozita je základní fyzikální veličina, která se tuto práci využila k charakterizaci kapalin. Tato materiálová konstanta vyjadřuje vnitřní tření kapaliny neboli míru odporu tekutiny vůči tečení. Viskozimetrie je tedy instrumentální metoda, která se zabývá měřením viskozity tekutin. Na základě viskozimetrického měření se dále stanovilo limitní viskozitní číslo a Hugginsova konstanta. K charakterizaci viskozit disperzních systémů s kapalným disperzním prostředím se využívají tyto následující veličiny: Relativní viskozita η_{rel} , specifická viskozita η_{sp} , redukovaná viskozita η_{red} , limitní viskozitní číslo $[\eta]$ [46, 47].

4.4.1 Limitní viskozitní číslo a Hugginsova konstanta

Samotné určení limitního viskozitního čísla $[\eta]$ vychází z grafického zpracování redukované viskozity a koncentrace, kde následuje extrapolace na nulovou koncentraci měřeného polymeru. Limitní viskozitní číslo je úsekem na ose pořadnic, kde po extrapolaci přímka tento úsek protne. Pro výpočet limitního viskozitního čísla byla zvolena Hugginsova rovnice, která vyjadřuje závislosti limitního viskozitního čísla na koncentraci, jejíž definice je popsána následující rovnicí (1).

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + k_H[\eta]^2c \quad (1)$$

Hodnota limitního viskozitního čísla roste působením faktorů, které zvětšují objem polymerního klubka. Rozpouštědlo je hlavním atributem pro ovlivnění hodnoty $[\eta]$. Hugginsovu konstantu k_H určíme z rovnice přímky a to ze směrnice $K_H[\eta]^2$. Tato veličina popisuje hydrodynamické a termodynamické interakce mezi molekulami rozpouštědla a jednotlivými polymerními klubky [8, 9]. Obecně vzato Hugginsova rovnice nám dává přímou informaci o konfiguraci a konformaci polymerních řetězců ve zředěných rozpouštědlech [48].

5. ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ

5.1 Měření viskozity na Ubbelohdeho viskozimetru, výpočet limitního viskozitního čísla a Hugginsovy konstanty

Měření viskozity bylo prováděno pomocí kapilárního viskozimetru typu Ubbelohde (Technosklo, Držkov, Česká Republika). Z naměřených průtokových dob jednotlivých roztoků byla dále vypočítána kinematická viskozita ν , ze které se dále vypočítala specifická viskozita η_{sp} , na základě dosažených výsledků se stanovila hodnota limitního viskozitního čísla $[\eta]$ a Hugginsovy konstanty k_H z rovnice (1).

5.1.1 Stanovení pH

Pro přesné měření pH jednotlivých koncentrací byl použit pH metr typu Seven Easy s elektrodou InLab Routine (Metler Toledo, Švýcarsko). Byly proměřeny všechny koncentrace základních roztoků ve vodném tak i v 0,01 M KCl rozpouštědle, a také všechny koncentrace modifikovaných roztoků upravované 0,1 M NaOH a 0,1 M HCl. Přidávky byly přikapávány do roztoku o objemu 40 ml mikropipetou, kde objem kapek byl- 15, 30, 75, 150, 225, 300 μ l.

5.2 Inverzní plynová chromatografie- SEA

Princip této experimentální metody spočívá ve sledování adsorpce množství plynu na povrchu vzorku. Na základě množství zachyceného plynu na povrchu zkoumaného vzorku se určí specifický povrch námi zkoumaného materiálu. Plyn je vstříkovan do kolony tyčového tvaru, ve které se nachází pevný vzorek a zde dochází k interakci par se zkoumaným materiálem. Retence je sledována pomocí odezvy detektoru plynového chromatografu. Detektor reaguje na přítomnost složky v nosném plynu a vysílá signál, který zaregistroval. Přítomnost složky je indikována měřením určité vlastnosti plynu přicházejícího z kolony [49]. Povrchová energie byla charakterizována pomocí této metody, kde disperzní složka povrchové energie γ_S^D byla vypočítána na základě retenčního času získaného z měření inverzní plynové chromatografie pro sérii n-alkanů: Nonan, oktan, hexan, heptan (Sigma Aldrich USA).

5.3 Prášková reologie

Studium tokových vlastností bylo pozorováno pomocí FT4 práškového reometru (Freeman Technology, UK). Tokové vlastnosti partikulárních látek jsou definovány pomocí hodnoty tokové funkce- ff_c , která udává poměr mezi hlavním napětím σ_1 a tlakovou pevností (mezi kluzu) σ_c [50]. Experimenty byly prováděny při pokojové teplotě 24° C a relativní vlhkosti 43 %. Jedná se o patentovanou dynamickou metodu, která byla speciálně vyvinuta pro pochopení chování práškových materiálů, kde vyhodnocení je automatické.

5.4 Elektronová mikroskopie (SEM)

Princip skenovací elektronové mikroskopie je založený na získání obrazu interakce primárního svazku s povrchem prohlíženého vzorku. Primární paprsek elektronů produkovaných žhavenou katodou se pohybuje po řádcích na preparátu a vyráží sekundární elektrony. Sekundární elektrony jsou snímány sondou a převáděny na videosignál, který je zobrazený na monitoru [51]. Pro pozorování povrchu práškové formy HA byl použit skenovací elektronový mikroskop (Hitachi 6600 FEG, Japonsko).

5.5 Termogravimetrie (TG)

Jedná se o základní metodu termické analýzy, která studuje hmotnost nebo změny hmotnosti v závislosti na teplotě, kde výsledkem je termogravimetrická křivka. Vybavení přístroje pro termogravimetrii obsahuje elektrickou pec, analytické váhy, nosič vzorků, zařízení pro řízení a měření teploty, registrační zařízení- počítač. Obecně přístroj k měření TG může být označován jako termováha, která se skládá z pánvičky (platinová/korundová) a je zavěšena na citlivých vahách, které zaznamenávají změnu hmotnosti daného vzorku. Metodika slouží především k studování složení, tepelné stability, rozkladu, absorpce nebo desorbce, odpařování aj. [52]. Pro naše účely byly připraveny vzorky pro charakterizaci obsahu vlhkosti pomocí DTA-TG, kde analýza byla prováděna na termogravimetru (Shimadzu DTG 60, Japonsko).

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1 Příprava vzorků- specifikace roztoků pro viskozimetrii

Pro přípravu roztoků se používala prášková forma HA o molekulové hmotnosti 0,7-0,9 MDa (CPN, Česká Republika) mikrobiologického původu. Byly použity 2 druhy rozpouštědel, kde první řadě byla demineralizovaná voda (A) a v druhém případě se jednalo o 0,01 M KCl (B). Celkově bylo namícháno pro tyto dvě rozpouštědla 5 různých koncentrací (1 g/l; 0,7 g/l, 0,6 g/l; 0,5 g/l; 0,4 g/l). Jednotlivé roztoky byly dále modifikovány, pomocí přísad kyselých a zásaditých roztoků konkrétně 0,1 M NaOH a 0,1 M HCl, které se přikapávaly v počtu 1, 2, 5, 10, 15, 20 kapek.

6.2 Inverzní plynová chromatografie (SEA)

Vzorek byl nastříknut do komory temperované nástřikové kolony (injektoru), kde se odpaří a je dále ve formě par unášen nosným plynem až do kolony o vnitřním průměru 4 mm a o celkové ploše přibližně 0,5 m². Okamžitou koncentraci separovaných látek v nosném plynu indikuje detektor, kde signál detektoru je vyhodnocován z časového průběhu za určení druhu kvantitativního zastoupení složek.

6.3 Prášková reologie

Pro naše měření byla použita smyková cela složená z misky, která je vodorovně položená a na ní umístěné víčko, které je v případě FT4 reometru pohyblivou částí. Vzorek materiálu v cele je tedy upevněný a působí na něj vertikálně normálová síla F_N , která se přepočítává na normálové napětí σ . Víčko se pohybuje rotačním pohybem, který tvoří v materiálu smykové napětí τ .

6.4 Elektronová mikroskopie SEM

Vzorek práškové formy HA byl suchý bez cizorodých částic, prachu přichycen na podložku. Při expozici primárními elektrony nedocházelo k nabíjení a vzorek produkoval dostatečné množství sekundárních elektronů.

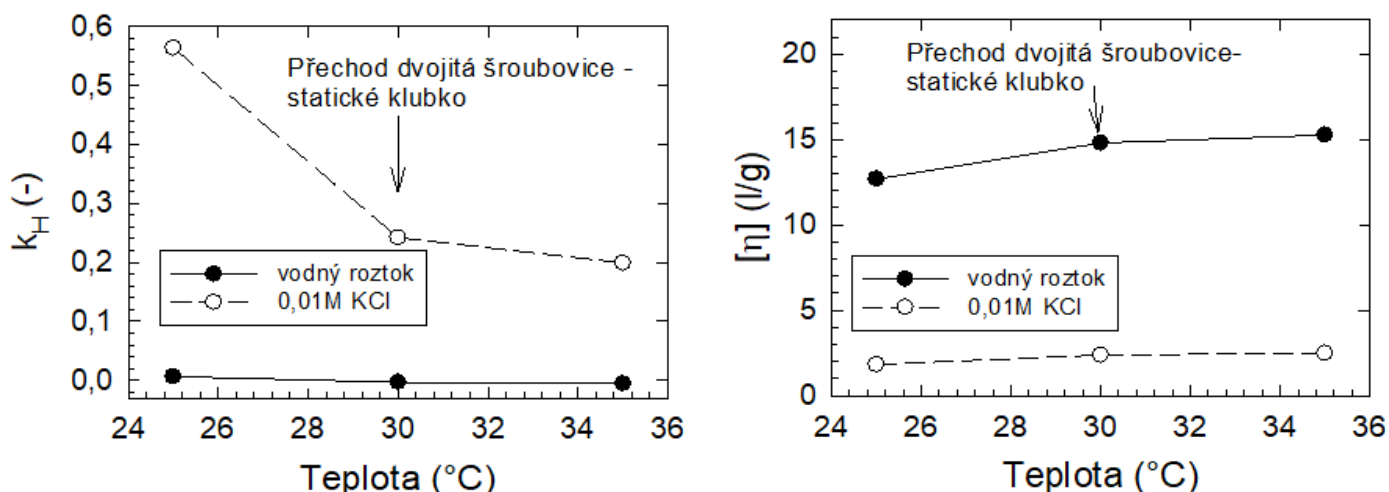
6.5 Termogravimetrie

Měření bylo prováděno v dynamické atmosféře a inertním prostředí dusíku (N₂-50 ml/min) s teplotním programem 10°C/min v intervalu 40°C - 500 °C. U vzorku dochází vlivem ohřevu definovanou rychlostí k lineárnímu růstu teploty s časem.

7. VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Viskozimetrické měření

Výsledky studovaných roztokových forem vypovídají o chování makromolekulárního klubka, které jsou vlivem pH, iontového složení rozpouštědla a teploty zapříčiněny o změnu charakteru s projevem rozbalení nebo stažení klubka. Na následujícím grafu č. 1 vlevo je zřejmá změna viskozitního chování na základě změny Hugginsovy konstanty v roztoku 0,01 M KCl. Z grafu je jasně viditelná skoková změna reologického chování odrážející se v konformační změně ze zdvojené šroubovice na statické klubko při 30°C. Souběžně ze zmíněnými změnami Hugginsovy konstanty jsou také korespondující změny limitním viskozitním číslem, které jsou evidentní pro konformační změny makromolekulárních řetězců (graf č. 1 vpravo). Z hodnot limitního viskozitního čísla je patrné, že k nárůstům dochází s rostoucí teplotou u obou sledovaných vzorků a to v konečném výsledku svědčí o zvětšování hydrodynamického rozměru makromolekulárního klubka.

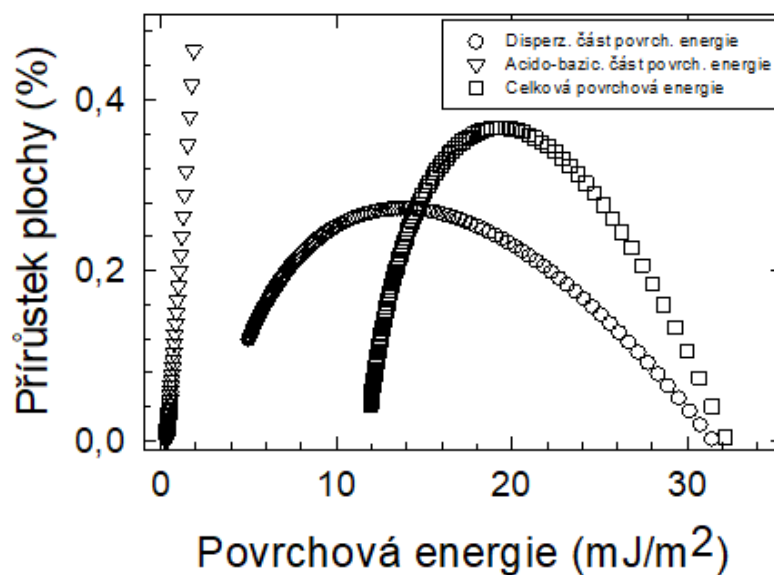


Graf 1: Závislost Hugginsovy konstanty na teplotě pro 2 roztoky HA (vlevo) a závislost limitního viskozitního čísla na teplotě pro 2 roztoky HA (vpravo).

7.2 Inverzní plynová chromatografie (SEA)

Na základě plynové chromatografie byl stanovený průběh povrchové energie pro práškovou formu HA. Pro lepší ilustraci heterogenity vzorku je vynášena do grafu přírůstek plochy v závislosti na povrchové energii (grafu č. 3), kde povrchová energie je charakteristická širokou distribucí celkové povrchové energie v rozsahu 10-34 mJ/m^2 s maximem v 18,5 mJ/m^2 a disperzní část povrchové energie je v distribuční křivce od 3,3-34,1 mJ/m^2 . Je evidentní, že

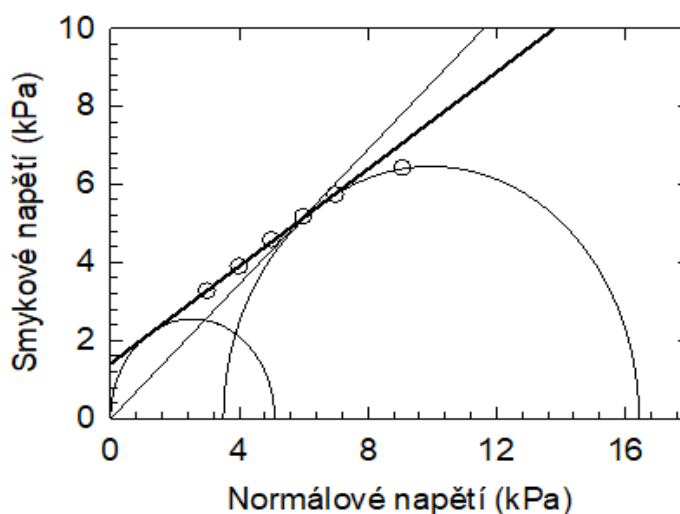
polarita povrchu HA je nízká a za chování odpovídá především disperzní složka povrchové energie, která zaujímá širokou distribuci.



Graf 2: Distribuční křivka celkové povrchové energie a její komponent pro HA.

7.3 Prášková reologie

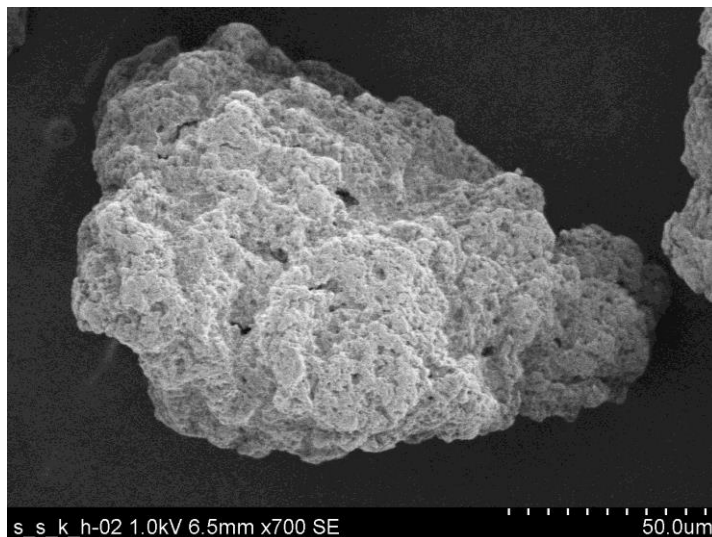
Výsledkem měření je graf závislosti smykového napětí (τ) na normálovém napětí (σ) viz graf č. 4, kde k vyhodnocení je nutné sestavit Mohrovy kružnice, které charakterizují rozložené napětí v konsolidovaném vzorku. Index toku = tokovost, je vypočítaná na $ff_c = 3,24$, sypkost prášku HA se tedy zařazuje do kategorie soudržných materiálů.



Graf 3: Toková křivka spolu s Mohrovými kružnicemi pro práškovou formu HA.

7.4 SEM

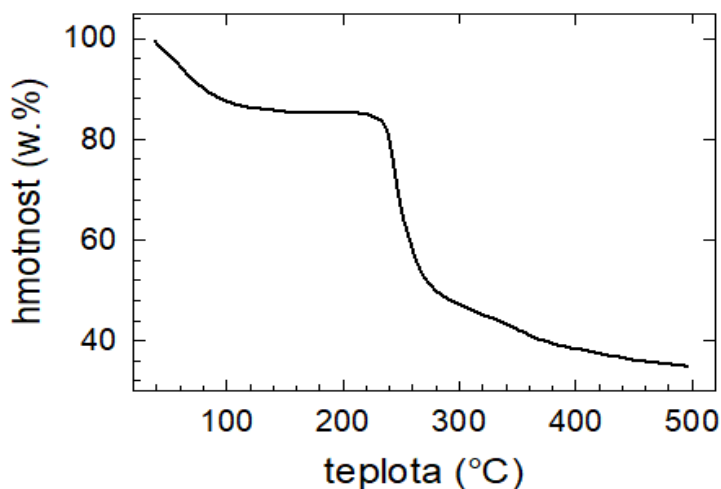
Snímek ze skenovacího rastrovacího mikroskopu je na obrázku 3, kde se vzorek HA vyznačuje především kulovitým a válcovitým tvarem přibližně 70 μm širokým v průměru.



Obrázek 3: Snímek práškové formy HA ze SEM.

7.1 Termogravimetrie

Výsledkem je termogravimetrická křivka rozdělena na tři regiony, kde se stoupající teplotou je prvně viditelný úbytek hmotnosti, který začíná s počátkem samotné termogravimetrické analýzy a končí při 180°C (voda zaujímala 13,72 hm. %). Poté probíhá termický rozklad pro degradaci polysacharidů v regionu 2 180°C- 300°C, kde je dílčí úbytek hmotnosti je 38,55 hm. %.



Graf 4: Termogravimetrická křivka pro práškovou formu HA.

8. PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI

Disertační práce představuje přínos v oblasti vědního oboru a oblasti praxe především v odvětví klinické medicíny. Obecné množství hyaluronanu v lidském těle je přibližně 10 g u dospělého jedince, kde se z 50% nachází v kožní tkáni (dermis a epidermis) a dále v synoviální tekutině v kloubech, pupeční šňůře a očním sklivci. Úloha hyaluronanu v organismu je silně závislá na molekulové hmotnosti a tedy i na jeho koncentraci. Je vědecky dokázáno, že biologická aktivita HA roste se snižující se molekulovou hmotností. Vysokomolekulární HA (nad 1,5 mil. Da) představuje hlavně organizační a strukturní jednotku pro zajištění mechanické odolnosti právě v synoviální tekutině nebo očním sklivci. Naproti tomu nízkomolekulární HA (od 0,5-0,7 mil. Da) je spojováno s biologickou aktivitou a má vliv na pochody v tkáních a buňkách. Vzhledem k důležité roli HA jakožto složky mezibuněčné hmoty, jsou její vlastnosti s ohledem na lidské tělo především zabraňovat nežádoucímu tření a udržování vlhkosti [31, 53, 54].

Pro konkrétní přímou aplikaci HA může být například viskosuplementace, která redukuje tření v chrupavce zničené osteoartritidou za pomoci intraartikulární injekce, zde dochází k zlepšení lubrikace mezi povrchy chrupavky. V dermatologii se setkáváme s velkou četností použití HA ve formě vnější aplikace v podobě krémů ale také ve formě tzv. hydrogelového krytí, které pomáhá hydratovat, regenerovat a hojit poškozenou tkáň především jizev a ran. V oftalmologické chirurgie slouží k ochraně tkání při chirurgickém zákroku a v estetické medicíně se hojně využívají produkty na bázi HA pro dermální výplně [6, 44].

Nativní molekula HA má výborné výchozí vlastnosti, ale pro použití v lékařství jsou nutné modifikace buď fyzikální, nebo chemické. Vzhledem k uplatnění této disertační práce, se nabízí použitelnost výsledků především pro ne vazebné fyzikální modifikace polymerního řetězce HA. Pochopení kolektivního chování studované v této práci napomůže například při vlastní studii ne vazebné interakce s dalšími molekulami, kterými mohou být třeba amfifilní aminokyseliny, tenzidy, proteiny. Tyto interakce jsou podstatné právě pro stabilizaci chrupavkové mezibuněčné hmoty (extracelulárního matrixu), dále také v buněčné proliferaci, v morfogenezi ale také při zánětech a rakovině. Při terapii rakoviny se HA zkoumá z hlediska nosiče bioaktivní látky, pro cílenou distribuci léčiva k rakovinotvorným buňkám [55, 56].

9. ZÁVĚR

Předmětem této disertační práce bylo studium jak kapalně, tak tuhé fáze kyseliny hyaluronové. Pro sledování konformačních změn byly stanoveny parametry- limitní viskozitní číslo $[\eta]$ a Hugginsova konstanta k_H pro vodný roztok HA a roztok HA v 0,01 M KCl. Pro charakterizaci práškové formy kyseliny hyaluronové byly použity experimentální techniky, které jsou popsány a diskutovány v experimentální části, lze vyvodit následující závěry:

- Z provedených viskozimetrických měření je možno konstatovat, že na základě již zmíněných parametrů je evidentní změna rozměru makromolekulárního klubka a to především vlivem teploty, iontového rozpouštědla ale i pH.
- Z experimentálních dat byl zjištěn nárůst hodnot limitního viskozitního čísla pro oba studované čisté roztoky HA, který zcela jistě vypovídá o zvětšování hydrodynamického rozměru makromolekulárního klubka.
- Z komplexnějšího pozorování konformačních změn struktury HA, při které se upravovalo pH přídavky kyselá a zásadité sloučeniny svědčí o schopnosti expanze nebo kolapsu makromolekulárního klubka.
- Z výsledků Hugginsovy konstanty vyplývá, že nastala transformace ze zdvojené šroubovice do expandovaného polymerního klubka, kde tento fakt vyplývá ze skokové změny interakčního parametru k_H při 30°C.
- V experimentální části zaměřené na analýzu práškové formy HA, byla za použití inverzní plynové chromatografie (SEA) definována povrchová energie, kde na základě výsledků dominuje především disperzní část povrchové energie a podíl polární složky je velice nízký.
- Bylo zjištěno pro 0% pokrytí povrchu, že celková povrchová energie byla 30 mJ/m². Povrchová struktura polymerního prášku HA byla vyhodnocena jako relativně nehomogenní.
- Pomocí práškového reometru byla vyhodnocena toková křivka, kde byl zjištěn parametr tokovosti $ff_c=3,24$ a také, že prášková forma HA má charakter kohezivní látky.
- Z termogravimetrické analýzy bylo zjištěno, že voda v nesusušeném vzorku, který je práškové konzistence zaujímal 13, 72 hm. %. Termický rozklad HA nastal v oblasti termogravimetrické křivky v oblasti od 180°C až 300°C.
- Při pozorování povrchu prášku pomocí SEM byl vyhodnocen válcovitý a kulovitý tvar částic s průměrnou velikostí přibližně 70 μm.

10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] DJABOUROV, Madeleine and NISHINARI Katsuyoshi and S ROSS-MURPHY. *Physical Gels from Biological and Synthetic Polymer*. Cambridge University Press, 2013, ISBN 978-0-521-76964-8.
- [2] LAPČÍK, Lubomír a Miroslav RAAB. *Nauka o materiálech II*. Vyd. 2., rozš. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2004, 133 s. ISBN 80-7318-229-7.
- [3] ANDRADE, J. *Hydrogels for Medical and Related Applications*. ACS Symposium Series, American Chemical Society: Washington, DC, 1976 Chapter 1: RATNER, Buddy D. and HOFFMAN, Allan S. *Synthetic Hydrogels for Biomedical Applications*.
- [4] LEE, Kven Yong and David J. MOONEY. Hydrogels for tissue engineering. *Chemical Reviews*. 2001, 101(7), 1870-1879.
- [5] COLLINS, Maurice N. and Colin BIRKINSHAW. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review. *Carbohydrates Polymers*. 2013, vol. 92, issue 2, pp. 1262– 1279.
- [6] ELNASHAR, Magdy: *Biopolymers. Chapter 20- Biotechnological production and application of hyaluronan*. 2010, Sciyo, ISBN 978-953-307-109-1.
- [7] LINHARTOVÁ, B. : *Nanovlákná na bázi hyaluronanu*, bakalářská práce. 2008. Vysoké učení technické v Brně, fakulta chemická, Brno.
- [8] ŠIMEK, Lubomír a Josef HRNČIŘÍK. *Fyzikální chemie II: (koloidní a makromolekulární systémy)*. Vyd. 3. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005, 94 s. ISBN 80-7318-325-0.
- [9] KWAAMBWA, H. M., et al. Viscosity, molecular weight and concentration relationships at 298K of low molecular weight cis-polyisoprene in a good solvent. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2007, vol. 294, issue 1, pp. 14-19.
- [10] MAŠURA, Vlado. Vzťah medzi viskozitou roztokov nitrocelulózy a hraničnou viskozitou pri miešaní vysokomolekulových a nízkomolekulových polymérov. *Chemické zvesti*. 1961 ročník XV, číslo 10, ČSAV.
- [11] PAMIES, Ramón, et al. Determination of intrinsic viscosities of macromolecules and nanoparticles. Comparison of single-point and dilution procedures. *Colloid and Polymer Science*, 2008, vol. 286, issue 11, pp. 1223-1231.

- [12] GARCÍA-ABUÍN, A., et al. Viscosimetric behaviour of hyaluronic acid in different aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*. 2011, vol. 85, no. 3, pp. 500–505. ISSN: 0144-8617.
- [13] MA, Juntao, et al. Dilute solution properties of hydrophobically associating polyacrylamide: fitted by different equations. *Polymer*. 2003, vol. 44, issue 4, pp. 1281-1286.
- [14] CHYTIL, Martin a Miloslav PEKAŘ. Effect of new hydrophobic modification of hyaluronan on its solution properties: evaluation of selfaggregation. *Carbohydrate Polymers*. 2009, vol. 76, no. 3, pp. 443–448. ISSN: 0144-8617.
- [15] GRUNDĚLOVÁ, Lenka: *Stabilita a chování hyaluronanu v roztocích pro technologii výroby farmaceutických přípravků*, disertační práce. 2014. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, fakulta technologická, Zlín.
- [16] SHIMADA, E., MATSUMURA G. Viscosity and molecular weight of hyaluronic acid. *Journal of Biochemistry*. 1975, vol. 78, issue 3, pp. 513–517.
- [17] GAMNI, A. and S. PAOLETTI and F. ZANETTI, in: HARDING, S.E. ; SATELLE, D.B. and BLOOMFIELD V. A. (Eds.) *Laser Light Scattering in Biochemistry*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1992, pp. 294–311.
- [18] HAYASHI, Kanako, Kikuko TSUTSUMI, Fumio NAKAJIMA, Takashi NORISUYE, Akio TERAMOTO. *Macromolecules*. 1995, vol. 28, issue 11, pp. 3824–3830. DOI: 10.1021/ma00115a012.
- [19] BERRIAUD, N. , MILAS, M., RINAUDO, M. Rheological study on mixtures of different molecular weight hyauluronates. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1994, vol. 16, pp. 137–142.
- [20] MILAS M. and M. RINAUDO, at al. Comparative rheological behavior of hyaluronan from bacterial and animal sources with cross-linked hyaluronan (hylan) in aqueous solution. *Biopolymers*. 2001, vol. 59, issu 4, pp. 191–204.
- [21] PODZIMEK, Štěpán a Martina HERMANNOVÁ, Helena BILEROVÁ at 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, pp. 3013–3020.
- [22] 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.

- [23] MANICH, Gupta and VIMUKTA, Sharma.: Targeted drug delivery system: A Review. *Research Journal of Chemical Science*, vol. 1, issu.2, pp. 135-138.
- [24] LAPČÍK, L. and OTYEPKOVÁ E., B. LAPČÍKOVÁ, M. OTYEPKA. Surface energy analysis (SEA) study of hyaluronan powders. *Colloids and A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2013, vol. 436, pp. 1170-1174.
- [25] WEISS, Richard G. and TERECH, Pierre. *Molecular gels*. 2006, Springer, ISBN-10 1-4020-3352-4.
- [26] OSADA, Yoshihito and Kanji KAJIWARA. *Gels handbook*. San Diego: Academic Press, c2001, ISBN 0-12-394690-5.
- [27] SCHACHT, E. H.. Polymer chemistry and hydrogel systems. *Journal of Physics: Conference Series* 3. 2004, vol. 3, pp. 22–28.
- [28] TOKITA, M. and K. NISHINARI: Progres in colloid and polymer science, *Gels: Structures, properties, and functions*, Fundamentals and Applications, Springer-Verlag Berlín Heidelberg 2009, ISBN: 978-3-642-00864-1.
- [29] LEHNINGER, Albert L, David L NELSON and Michael M COX. *Lehninger principles of biochemistry*. 4th ed. New York: W.H.Freeman, c2005, 1 ISBN: 978-0716743392.
- [30] SVANOVSKÝ, Evžen. Fyziologie a farmakologie kyseliny hyaluronové. *Česká a slovenská farmacie*. 2007, roč. 56, č. 6, s. 264-268. ISSN: 1210-7816.
- [31] NECAS, Jiri and L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER, J. KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan):a review. *Veterinarni Medicina*. 2008, vol. 53, issue 8, pp. 397-411. Dostupné z: <https://www.vri.cz/docs/vetmed/53-8-397.pdf>
- [32] VELEBNÝ, Vladimír.: *Hyaluronan – biopolymer pro tkáňové inženýrství*, Teze habilitační práce. 2012. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Brno, 29s.
- [33] PERCIVAL, S. L., KNOTTENBELT, D.C., COCHRANE CH. A. *Biofilms and veterinary medicine*, Springer-Verlag Berlín Heidelberg 2011, ISBN: 978-3-642-21288-8.
- [34] PITARRESI, Giovanna and PALUMBO, F. S. et al. Medicated hydrogels of hyaluronic acid derivatives for use in orthopedic field. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013, vol. 449, issue 1-2, pp 84-94.

- [35] SLÍVA, Jiří a Juraj MINÁRIK. Hyaluronát-nejen pasivní pozorovatel nýbrž aktivní modulátor imunitních reakcí. *New EU Magazine of Medicine*. 2009, roč. 1, č. 2, s. 75-79.
- [36] KALIA and Luc AVEROUS. Polysaccharides. *Biopolymers: Biomedical and enviromental applications*. Hoboken: Wiley, c2011, pp. 3-34. ISBN: 978-0-470-63-923-8.
- [37] WU Tsung-Chung: Mixture of hyaluronic acid for treating and preventing inflammatory bowel disease. *European patent application*. EP 2 292 243 A1.
- [38] SCOTT, John E.; HEATLEY, Frank; HULL, W. E. Secondary structure of hyaluronate in solution. A 1H-nmr investigation at 300 and 500 MHz in [2H6] dimethyl sulphoxide solution. *Biochemical Journal*. 1984, vol. 220, issue 1, pp. 197-205.
- [39] ATKINS, E. D. T.; PHELPS, C. F.; SHEEHAN, J. K. The conformation of the mucopolysaccharides. Hyaluronates. *Biochemical Journal*. 1972, vol. 128, issue 5, pp. 1255-1263.
- [40] LAPČÍK, Lubomír; LAPČÍK, Lubomír; SMEDT, Stefaan DE; DEMEESTER, Joseph and Peter CHABREČEK. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. *Chemical Reviews*. 1998, vol. 98, issue 8, pp. 2663-2684.
- [41] HLISNIKOVSÁ, Kristýna: *Reologie roztoků hyaluronanů*. Diplomová práce. 2008. Vysoké učení technické v Brně, fakulta chemická, Brno.
- [42] SCOTT, John E., et al. 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, issue 3, pp. 699-705.
- [43] BUHLER, Eric a François BOUÉ. Chain Persistence Length and Structure in Hyaluronan Solutions: Ionic Strength Dependence for a Model Semirigid Polyelectrolyte. *Macromolecules*. 2004, vol. 37, issue 4, s. 1600-1610.
- [44] GARG, H. G., HALES, CH. A.: *Chemistry and biology of hyaluronan*, 2004, Elsevier Ltd, Oxford, 605 s., ISBN 0-08-044382-6. SHU, XIAO ZHENG; PRESTWICH, GLENND. D. Therapeutic biomaterials from chemically modified hyaluronan, pp. 475 – 504.
- [45] SCHANTÉ, Carole E., Guy ZUBER, Corinne HERLIN a Thierry F. VANDAMME. Chemical modifications of hyaluronic acid for the

- synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*. 2011, vol. 85, issue 3, pp. 469-489.
- [46] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 3. vyd. Praha: VŠCHT, Praha, 2008, 205 s. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [47] VISWANATH, Dabir S., et al. Introduction. In: *Viscosity of Liquids*. Springer Netherlands, 2007. p. 1-8. ISBN-10 1-4020-5481-5 (HB).
- [48] NAIR A., John. *Polymer Characterization* [online]. Material Science and Engineering 5473, Spring 2003 [cit. 2014-10-08]. Chapter 6.- Viscosity, pp. 77-88. Dostupné z: http://www.ias.ac.in/initiat/sci_ed/resources/chemistry/Viscosity.pdf
- [49] MOHAMMADI-JAM, S.; WATERS, K. E. Inverse gas chromatography applications: A review. *Advances in colloid and interface science*. 2014, vol. 212, pp. 21-44.
- [50] SCHULZE, D. Properties exhibited by some bulk solids-flow agents. In: *Powders and Bulk Solids-Behavior C, Storage and Flow* ISBN 978-3-540-73767-4. Springer Berlin Heidelberg, New York, 2008. p. 211-215.
- [51] Laboratoř NMR Spektroskopie: *Elektronová mikroskopie* - přednáška. VŠCHT Praha [on-line] 2009 [cit. 2010-04-10]. Dostupné z: http://www.vscht.cz/nmr/mol_model_bioinfo/lekce/mikroskopie.pdf
- [52] GABBOTT, Paul (ed.). *Principles and applications of thermal analysis*. John Wiley & Sons, 2008. ISBN 978-140-5131-711.
- [53] ITANO, Naoki. Simple primary structure, Complex Turnover Regulation and Multiple Roles of Hyaluronan. *Journal of Biochemistry*. 2008, vol. 144, issue 2, pp 131-137.
- [54] ALMOND, A. Hyaluronan. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007, vol. 64, issue 13, pp 1591-1596.
- [55] GANDHI, Neha S. and Ricardo L. MANCERA. The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. *Chemical Biology*. 2008, vol. 72, issue 6, pp 455-482.
- [56] PRESTWICH, Glenn D. and Koen P. VERCRUYSSSE. Therapeutic applications of hyaluronic acid and hyaluronan derivatives. *Pharmaceutical Science and Technology Today*. 1998, vol. 1, No. 1, pp. 42-43.

11. SEZNAM OBRÁZKŮ A GRAFŮ

<i>Obrázek 1: Chemická struktura kyseliny hyaluronové.</i>	12
<i>Obrázek 2: Lineární (A), derivovaná (B) a zesíťovaná podoba HA (C).</i>	13
<i>Obrázek 3: Snímek práškové formy HA ze SEM.</i>	20

<i>Graf 1: Závislost Hugginsovy konstanty na teplotě pro 2 roztoky HA (vlevo) a závislost limitního viskozitního čísla na teplotě pro 2 roztoky HA (vpravo). .</i>	18
<i>Graf 2: Distribuční křivka celkové povrchové energie a její komponent pro HA.</i>	19
<i>Graf 3: Toková křivka spolu s Mohrovými kružnicemi pro práškovou formu HA.</i>	19
<i>Graf 4: Termogravimetrická křivka pro práškovou formu HA.</i>	20

12. SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
ff_c	index toku=tokovost [-]
GAG	Glykosaminoglykany
GlcA	kyselina D-glukuronová
GlcNAc	N-acetyl-D-glukosamin
HA	kyselina hyaluronová [Da=Dalton]
k_H	Hugginsova konstanta [-]
SEA	Surface Energy Analyser
SEM	Scanning Electron Microscope
TG	termogravimetrie
γ_S^D	disperzní složka povrchové energie pevné látky
$[\eta]$	limitní viskozitní číslo [l/g]
ν	kinematická viskozita [m ² .s ⁻¹]
η_{red}	redukováná viskozita [l/g]
η_{rel}	relativní viskozita [-]
η_{sp}	specifická viskozita [-]
σ_c	prostá mez kluzu [Pa]
σ_1	konsolidační napětí [Pa]
σ	normálové napětí [Pa]
τ	smykové napětí [Pa]

13. PUBLIKAČNÍ ČINNOST

Impaktované publikace

I. Kupská, L. Lapčík, B. Lapčíková, K. Žáková, J. Juříková: „The viscometric behaviour of sodium hyaluronate in aqueous and KCl solutions.” *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 454, 32–37 (2014).

L. Lapčík, B. Lapčíková, I. Krásný, I. Kupská, R.W. Greenwood, K.E. Waters: „Effect of low temperature air plasma treatment on wetting and flow properties of kaolinite powders.” *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 32 (4), 845-858 (2012).

Kapitola v knize

L. Lapčík, E. Otyepková, B. Lapčíková, M. Otyepka, J. Vlček, I. Kupská: „Physicochemical Analysis of hyaluronic acid powder for cosmetic and pharmaceutical processing.” *Hyaluronic acid for biomedical and pharmaceutical applications*, Ed.: Maurice N. Collins: Smithers Rapra, Shrewsbury (2014), 89-101. ISBN 978-19-090-3077-0.

Neimpaktované recenzované publikace

I. Krásný, I. Kupská, L. Lapčík: „Effect of Glow-Discharge Air Plasma Treatment on Wettability of Synthetic Polymers.” *Journal of Surface Engineered Materials and Advanced Technology*, 32 (4), 142-148 (2012).

Účast na konferencích

Plasma Surface Engineering 2012, 13th International Conference on Plasma Surface Engineering, Garmisch-Partenkirchen, Německo, 2012.

ICEAF 2013, 3rd International Conference of Engineering Against Failure, Kos, Řecko, 2013.

Studijní a pracovní pobyty

2011 University of Birmingham, Birmingham, Anglie. 3 měsíce

2012 Université de Rennes, Rennes, Francie. 1 měsíc

Projekty řešené v rámci IGA projektů na FT UTB ve Zlíně

- 2012 **IGA/FT/2012/020** (člen řešitelského týmu)
- Studium a modifikace fyzikálně-chemických vlastností nanokaolinu.
- 2013 **IGA/FT/2013/001** (člen řešitelského týmu)
- Studium vlivu plniva na bázi kaolinitu na fyzikálně-chemicko-mechanické vlastnosti polyethylenových kompozitů.

14. ŽIVOTOPIS

OSOBNÍ ÚDAJE

Jméno a příjmení: Ing. Ivana Kupská
Datum narození: 23. 5. 1986, Jindřichův Hradec
Adresa: 9. května 605/II, 377 01, Jindřichův Hradec
E-mail: ivana.kupska@email.cz

VZDĚLÁNÍ

2010- doposud **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická**
doktorské studium; obor Chemie a technologie materiálů.
2008- 2010 **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická**
navazující magisterské studium; obor Chemie a technologie
materiálů; specializace: Materiálové inženýrství.
2005- 2008 **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická**
bakalářské studium; obor Chemie a technologie materiálů.

VZDĚLÁVACÍ KURZY

2010 Letní škola SPM mikroskopie VUT a MU Brno.
2011 Školení infračervené a molekulové spektroskopie, měření a
interpretace vibračních spekter VŠCHT Praha, Nicolet CZ.
2015 Řízení projektů s důrazem na plánování projektů a Ganttův
diagram.

ZAHRANIČNÍ STÁŽE A POBYTY

2011 University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom.
2012 Universite de Rennes, Rennes, France.

PRACOVNÍ ZKUŠENOSTI

2017- doposud	Aircraft Industries, a.s. , Kunovice Technolog pro zvláštní procesy
2015- 2017	Evektor, spol. s.r.o. , Kunovice Technolog / Projektový manažer

JAZYKOVÉ ZNALOSTI

Anglický jazyk	Pokročilá znalost – aktivně
Německý jazyk	Pasivní znalost

OSTATNÍ DOVEDNOSTI

Práce s PC	OS Windows, MS Office (Word, Excel, PowerPoint, Outlook).
Řidičský průkaz	Skupina B

Ing. Ivana Kupská

**Syntéza a modifikace fyzikálně-chemických vlastností gelových
soustav pro terapeutické aplikace**

Synthesis and modification of physico-chemical properties of gel systems for
therapeutic applications

Teze disertační práce

Vydala Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně,
nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín.

Náklad: vyšlo elektronicky

Sazba: Ing. Ivana Kupská

Publikace neprošla jazykovou ani redakční úpravou.

Rok vydání 2017

Pořadí vydání: první

ISBN 978-80-7454-691-4

