

Charakterizace samoorganizovaných biopolymer- ních systémů

Magdalena Koutná

Bakalářská práce
2018



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav fyziky a mater. inženýrství

akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Magdalena Koutná**

Osobní číslo: **T15667**

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

Studijní obor: **Materiálové inženýrství**

Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Charakterizace samoorganizovaných biopolymerních systémů**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na charakterizaci samoorganizovaných biopolymerních systémů pomocí mikroskopie skenující sondou.
2. Imobilizujte vybraný biopolymerní systém na povrch slídy.
3. Připravené vzorky charakterizujte pomocí mikroskopie skenující sondou.
4. Výsledky přehledně diskutujte a zhodnoťte v závěrech bakalářské práce.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. Cowman, M., Li, M., Balazs, E., Tapping mode atomic force microscopy of hyaluronan: Extended and intramolecularly interacting chains, *Biophysical Journal* 1998, 75, 2030–2037.
2. Kirby, A., Gunning P., Morris, V., Ridout, M., Observation of the Helical Structure of the Bacterial Polysaccharide Acetan by Atomic Force Microscopy, *Biophysical Journal* 1995, 68, 360–363.
3. Kubínek, R., *Mikroskopie skenující sondou, Univerzita Palackého v Olomouci* 2003, ISBN 80–244–0602–0.
4. Minarik, A., Smolka, P., Lapcik, L., Preliminary Investigation of Factors Determining Self-Organised Structures Preparation in Polymer Layers. *Int. J. Heat Mass Transfer* 2011, 54 (17–18), 4135–4142.
5. Temenoff, J.S., *Biomaterials, The Intersection of Biology and Materials Science, Rice University* 2009, ISBN-13: 9780130097101.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Antonín Minařík, Ph.D.

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

2. února 2018

Termín odevzdání bakalářské práce:

18. května 2018

Ve Zlíně dne 28. února 2018



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



doc. Mgr. Aleš Mráček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Koutná Magdalena

Obor: Materiálové inženýrství

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, považuji 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 Zlíně17.5.2018

.....

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Byly studovány agregační schopnosti hyaluronanu sodného na povrchu slídy. Hyaluronan sodný (HA) byl deponován na povrch kladně nabitého substrátu ze srovnatelně zředěných roztoků obsahujících během rozpouštění rozdílný hmotnostní podíl polymeru. Byl zkoumán vliv rozdílných přístupů přípravy roztoku, střední teploty, teplotního spádu a doby jeho skladování před jeho nanesením na povrch. Imobilizované vrstvy HA byly charakterizovány pomocí mikroskopie atomárních sil. Získané záznamy byly podrobeny obrazové analýze, která ukázala, jak se mění schopnost HA tvořit tenké povrchové sítě a shluky polymerních klubek.

Klíčová slova: hyaluronan sodný, rozpouštění, modifikace, imobilizace, agregace, mikroskopie atomárních sil

ABSTRACT

Subject of study were aggregation abilities of hyaluronate sodium on mica surface. Hyaluronate sodium (HA) was deposited on positively charged substrate from comparably diluted solutions consisting of different amount of polymer. Diverse sample preparation approaches were studied together with medium temperature, temperature gradient and storage time before their deposition on surface. Immobilised layers of HA were characterised by atomic force microscopy (AFM). Gained results were subjected to image analysis, that showed changes in ability of HA to form thin surface networks and polymer coils aggregation on surface.

Keywords: hyaluronate sodium, dissolution, modification, immobilization, aggregation, atomic force microscopy.

Ráda bych poděkovala vedoucímu své bakalářské práce Ing. Antonínu Minaříkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a čas, který mi věnoval při zpracování této práce. Děkuji také své rodině za podporu během studia.

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

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 BIOPOLYMERNÍ SYSTÉMY	11
1.1.1 Proteiny	11
1.1.2 Nukleové kyseliny.....	12
1.1.3 Polysacharidy	12
2 KYSELINA HYALURONOVÁ	14
2.1 STRUKTURA	14
2.2 VLASTNOSTI.....	17
2.3 VYUŽITÍ	20
3 CHARAKTERIZACE KYSELINY HYALURONOVÉ POMOCÍ MIKROSKOPIE ATOMÁRNÍCH SIL	22
3.1 MIKROSKOPIE ATOMÁRNÍCH SIL.....	22
3.2 CHARAKTERISTIKA HA POMOCÍ AFM	23
II PRAKTICKÁ ČÁST	28
4 MATERIÁLY A METODY	29
4.1 MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE	29
4.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ A VZORKU HA NA POVRCHU SLÍDY	29
4.3 POUŽITÝ MIKROSKOP ATOMÁRNÍCH SIL A PROGRAM NA VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ.....	30
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	32
5.1 ROZTOK HA PŘIPRAVOVANÝ ZA ZVÝŠENÉ TEPLoty MÍCHÁNÍM.....	32
5.2 ROZTOKY PŘIPRAVOVANÉ V TFFC ZAŘÍZENÍ	34
5.2.1 Vliv střední teploty na změnu vzhledu imobilizované vrstvy HA	34
5.2.2 Vliv velikosti teplotního spádu na změnu vzhledu imobilizované vrstvy HA	36
5.2.3 Vliv hmotnostního podílu HA v roztoku na změnu vzhledu imobilizované vrstvy HA rozpuštěné při 50/7 °C a 60/17 °C.....	38
5.3 ROZTOK HA PŘIPRAVOVANÝ PŘI POKOJOVÉ TEPLotĚ NA TŘEPACÍM ZAŘÍZENÍ	42
5.4 VLIV DOBY SKLADOVÁNÍ ROZTOKŮ Z FILMŮ HA NA ZMĚNU VZHLEDU IMOBILIZOVANÝCH VRSTEV	44
5.5 POROVNÁNÍ ROZDÍLNÝCH PŘÍSTUPŮ PŘÍPRAVY POLYMERNÍHO ROZTOKU HA	47
ZÁVĚR	50
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	52
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	56
SEZNAM OBRÁZKŮ	57

ÚVOD

Terciální struktura hyaluronanu sodného (HA) podmiňuje jeho fyzikálně chemické vlastnosti a s tím související aplikační potenciál v řadě medicínských oborů, tkáňovém inženýrstvím a kosmetice. Jeho vlastnosti se využívají pro léčbu a regeneraci buněk, vyplňování mezibuněčných prostorů atd. Nové studie se zaměřují i na možné využití v distribuci léčiv. K širokému aplikačnímu potenciálu přispívá možností modifikace jeho struktury a vývojem různých typů hydrogelů.

Ke zkoumání struktury hyaluronanu bylo v posledních desítkách let použito velké množství metod. Tato bakalářská práce se zaměřuje na studium HA pomocí mikroskopie atomárních sil v semikontaktním režimu na vzduchu s deponovanými vzorky na povrchu modifikované slídy.

S ohledem na zaměření práce se teoretická část zabývá popisem biomateriálů a jejich rozdělením. Větší prostor je věnován samotnému hyaluronanu, jeho struktuře, fyzikálním a chemickým vlastnostem, které stojí za jeho velkým potenciálním využitím. Další část se zabývá literárně popsanými poznatky ze studia hyaluronanu sodného pomocí mikroskopie atomárních sil. Jsou zde uvedeny pozorované strukturní konformace tohoto biopolymeru na povrchu slídy v závislosti na způsobu přípravy daného vzorku.

Praktická část práce se zabývá studiem vlivu procesních parametrů přípravy roztoků HA na jejich agregační schopnosti na povrchu kladně nabitě slídy. Je zde ukázáno, jak se mění tyto vlastnosti se změnou hmotnostního podílu polymeru v roztoku, způsobem a střední teplotou rozpuštění, teplotním spádem a dobou skladování připraveného polymerního roztoku. Podle hmotnostního podílu tak vznikala buď polymerní síť, nebo agregáty, jejichž velikost a počet se lišily podle parametrů přípravy. Dopad těchto vlivů byl poté porovnán mezi roztoky s rozdílnými hmotnostními podíly. Dále byla sledována změna ve struktuře imobilizované HA v řádu několika dnů.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOPOLYMERNÍ SYSTÉMY

Jedná se o biodegradabilní materiály tvořené monomerními jednotkami kovalentně spojenými do větších makromolekulárních celků. Jejimi největšími producenty jsou živé organismy, z nichž nejvíce se získává z rostlin, stromů a mikroorganismů. Za biopolymery jsou také označovány produkty chemické syntézy z přírodních zdrojů. Jedná se o tuky, cukry, pryskyřice a mnoho dalších. Biopolymery se vyznačují složitým molekulárním uskupením zaujímajícím přesné 3D tvary a struktury klíčových pro jejich funkčnost. Příkladem toho je hemoglobin, u něhož je schopnost přenášet kyslík v krvi dána jeho kvartérní strukturou, bez níž by toho nebyl schopen. Na základě povahy opakujících se jednotek lze biopolymery rozdělit do tří skupin; proteiny, jejichž monomerními jednotkami jsou aminokyseliny, nukleové kyseliny tvořené nukleotidy a nakonec polysacharidy, jejichž strukturními jednotkami jsou monosacharidy.¹

1.1.1 Proteiny

Makromolekuly, mající zásadní roli ve všech nezbytných biologických procesech jsou proteiny. Pro živé systémy jsou důležité svou všestranností, jelikož zastávají velkou řadu funkcí, jako katalyzátory, přenášče nervových impulzů, zajišťují imunitní ochranu, mechanickou oporu, přenos a ukládání jiných molekul. Tato rozsáhlá funkčnost je podmíněna jejich strukturou. Proteiny jsou lineární polymery, u nichž dochází k samovolnému uspořádání do 3D struktury na základě pořadí aminokyselin v řetězci. Funkce proteinu pak přímo závisí na této 3D struktuře. Dále má vliv uspořádání funkčních skupin (alkoholy, karboxylové kyseliny, thiohy atd.), které jsou ve struktuře zastoupeny ve velkém množství. Důležitou roli má také interakce v rámci proteinových řetězců a interakce s jinými biologickými makromolekulami vedoucí ke vzniku složitějších uskupení.

Jak již bylo zmíněno, monomerními jednotkami proteinů jsou aminokyseliny, jejichž polymerací vznikají polypeptidy. Spojením několika z nich vzniká komplexní struktura proteinu. V tomto uspořádání se střídá 20 různých aminokyselin, pro které je charakteristická přítomnost aminoskupiny, karboxylové skupiny a postranního řetězce typického pro určitou aminokyselinu. Podle chemické struktury postranního řetězce se rozlišují aminokyseliny polární, hydrofobní a s nábojem. U polárních aminokyselin dochází k interakci postranního řetězce s vodou. Důsledkem je přítomnost skupiny tvořící vazbu s vodíkem. Příkladem polárních aminokyselin jsou serin, cystein a tyrosin. Hydrofobní aminokyseliny obsahují nepolární postranní řetězce, které s vodou neinteragují nebo jen velmi slabě. Do této skupiny

aminokyselin patří například valin, leucin a fenylalanin. U aminokyselin s nábojem jsou postranní řetězce za fyziologických podmínek vždy nabitě a to buď kladně (lysin, arginin), nebo záporně (kyselina asparagová, kyselina glutamová).^{2,3}

1.1.2 Nukleové kyseliny

Biomakromolekuly odpovědné za přenos dědičné informace jsou nukleové kyseliny. Jedná se o kyselinu deoxyribonukleovou (DNA) a kyselinu ribonukleovou (RNA). Jejich struktura obsahuje dusíkaté báze (purinové a pyrimidinové), cukr (v DNA 2-deoxy-D-ribosu, v RNA ribosu) a fosfát. Jejich kombinací vzniká několik složitějších útvarů, tzv. nukleotidů, jenž jsou monomerními jednotkami nukleových kyselin a mají významnou roli při uchování a expresi genetické informace. Nukleotidy a jejich deriváty se podílejí téměř na všech biochemických procesech. Kromě stavební funkce zastávají v buňce role, jako jsou usměrňování enzymové aktivity nebo zprostředkovávání buněčného signalizování, čímž je regulována řada metabolických procesů. Ve spojení s vitamíny jsou nukleotidy a jejich deriváty schopny tvořit velké množství koenzymů. Příkladem jsou nukleotidtrifosfáty a nukleotiddifosfáty, jako ATP a ADP, které slouží jako akceptory fosfátové skupiny a významně se tak podílejí na transportu energie ve všech fázích metabolismu.

DNA je nositelem genetické informace a je tvořena dvěma opačně orientovanými řetězci stočenými do dvoušroubovice. Celkem je známo až 6 různých forem dvoušroubovicového uspořádání DNA. Mezi oběma řetězci jsou vodíkové vazby spojující vždy dvě komplementární báze. Ve struktuře je dále charakteristická přítomnost tzv. velkých a malých žlábků, jenž jsou nezbytné pro specifickou interakci s proteiny. DNA také slouží k syntéze RNA, která je na rozdíl od DNA tvořena jedním řetězcem. V rámci tohoto jednoho řetězce může vzniknout dvouvláknová struktura zvaná vlásenka. Je známo několik typů RNA, jako je mediátorová mRNA, ribosomální rRNA a transferová tRNA. Všechny typy RNA mají důležitou roli při syntéze proteinů.³⁻⁵

1.1.3 Polysacharidy

Polysacharidy jsou struktury vzniklé spojením monomerních jednotek monosacharidů, které jsou vzájemně propojeny glykosidickými vazbami. Monosacharidy jsou malé útvary, aldehydy nebo ketony obsahující dvě nebo více hydroxylových skupin. V řetězci je obsaženo 3 až 9 uhlíkových atomů. Jejich počet pak udává název sacharidu; pro 3 atomy se mluví o trióze, pro 5 atomů o pentóze atd. Nejrozšířenějším sacharidem je glukóza, která je stejně jako

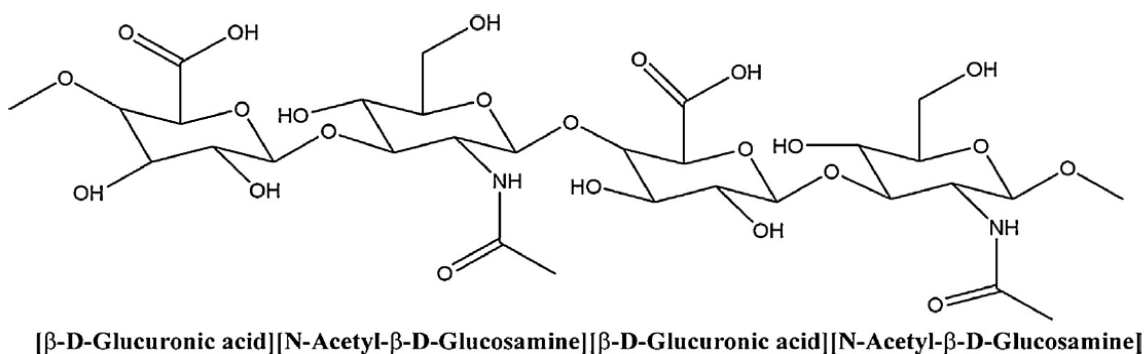
téměř všechny sacharidy chirální sloučenina. To znamená, že má ve své struktuře několik uhlíkových atomů, na nichž jsou čtyři různé substituenty. Každý monosacharid dále obsahuje několik volných OH skupin. Ty se podílejí na kondenzačních reakcích, které poskytují řadu různých možností navázání bočních skupin (větvení).

Polysacharidy jsou významné pro svou roli v ukládání energie a udržování strukturní integrity organismů. Spojením velkého množství monosacharidových zbytků je efektivní způsob ukládání glukózy. Dochází tak ke vzniku polysacharidů, jako jsou celulóza nebo glykogen. Celulóza je součástí buněčné stěny u rostlin a je jedna z nejrozšířenějších organických sloučenin.

V živočišných buňkách je zásobárnou glukózy glykogen, ve kterém z každého asi dvanáctého glukózového zbytku polysacharidu vychází větev a ve výsledku tak vzniká vysoce rozvětvená struktura. Důsledkem toho dochází k rychlému skládání nebo rozbalování této makromolekuly, které se odvíjí od metabolických potřeb buňky.^{2,3}

2 KYSELINA HYALURONOVÁ

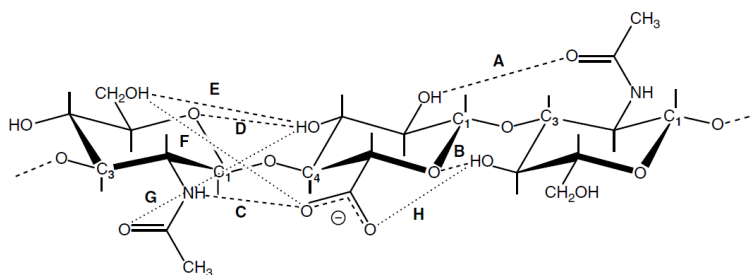
2.1 Struktura



Obr. 1: Chemická struktura kyseliny hyaluronové⁶

Kyselina hyaluronová (HA) je přirozeně se vyskytující polysacharid složený ze střídajících se jednotek N-acetyl-D-glukosaminu a kyseliny D-glukoronové spojených glykosidickou vazbou ve směru (1→4). V kompletní molekule HA dosahuje počet opakujících se disacharidů až 10 000 a více. Molární hmotnost je pak přibližně $4 \cdot 10^6$ Da, kde na každý disacharid připadá asi 400 Da. Průměrná délka jednoho disacharidu se odhaduje na 1 nm. Z toho vyplývá, že molekula obsahující 10 000 takto dlouhých jednotek bude sama v nataženém stavu dosahovat délky 10 μm. Struktura HA, viz Obr. 1, je nerozvětvená a neobsahuje žádné sulfátové skupiny. To z ní činí jediný nesulfátový glykosaminoglykan hojně se vyskytující v extracelulárním matrixu, plicích, synoviálních tekutinách, kůži a střevech. V lidském těle je obsaženo téměř 15 g HA,⁶⁻⁸ z nichž 1/3 je denně recyklována.⁹

Páteř molekuly HA je ve fyziologických roztocích zpevněna kombinací vzájemných působení disacharidové chemické struktury, vnitřních vodíkových vazeb a interakcí s rozpouštědlem. Axiální vodíkové atomy tvoří nepolární, relativně hydrofobní část molekuly zatímco ekvatoriální postranní atomy jsou více polární a tvoří hydrofilní část molekuly. Vytvořením vodíkových vazeb mezi hydroxylovými skupinami vzniká konformace tvaru klubka, která je ve své struktuře schopna uzavřít až tisícinásobek své hmotnosti vody.



Obr. 2: Schéma HA trisacharidu¹⁰

Chování vodíkové vazby ve struktuře HA je možno predikovat použitím molekulárního modelování dynamiky disacharidů HA ve vodných roztocích. Na Obr. 2 je uvedena geometrie vodíkových vazeb mezi jednotlivými monosacharidy. Označení A-E mají běžné intramolekulární vodíkové vazby získané modelováním. Písmeny F, G a H jsou pak označeny vazby spojované s nízkoenergetickými konformacemi HA.

Další výzkumy zabývající se podobnou tematikou studující HA tetrasacharidy předpokládají přítomnost dalších minimálních energetických hladin s alternativním uspořádáním intramolekulárních vodíkových vazeb, které nebyly dříve brány v potaz (vazby F, G a H). Měření provedená pomocí NMR poukazují na skutečnost, že rozpouštědla spolu s délkou řetězce mají vliv na dynamiku konformace. Za tento efekt jsou odpovědné přechodné intramolekulární vodíkové vazby, které také ovlivňují ohebnost jinak tuhého řetězce HA v roztocích. Na tyto vazby má negativní dopad přítomnost NaOH a teplota. Roztoky HA se dále vyznačují neobvyklými reologickými vlastnostmi, které závisí na působení molekulové hmotnosti a koncentraci. Kromě toho, že jsou vysoce hydrofilní, mají významné lubrikační účinky a HA je v roztoku přítomna ve formě expandovaného náhodného klubka. Na tuto konformaci má vliv několik faktorů. Jsou to podmínky prostředí, ve kterých se molekula polymeru vyskytuje, např.:

- přítomnost proteinů,
- iontová síla,
- pH,
- iontové interakce.

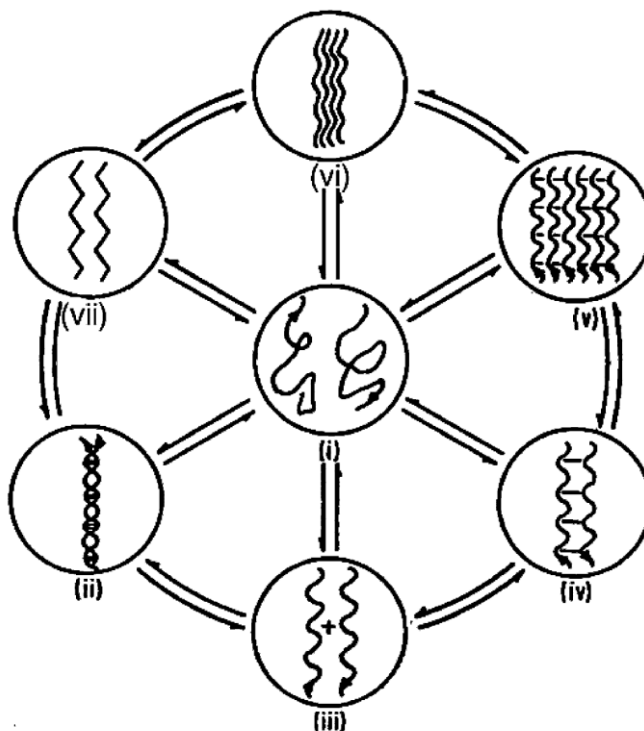
Dále mají významnou roli fyzikální vlivy jako:

- tlak,
- smyk,
- teplota.

Pro roztoky s vyšší koncentrací HA platí, že mají i vysokou viskozitu. U vysokomolekulární vzorků obsahujících 1 % polymeru v roztoku lze pak pozorovat konzistenci podobající se želatině. HA je také považována za pseudoplastický materiál.^{8,10-12}

HA je schopna vytvořit velké množství struktur na základě odlišných experimentálních podmínek přípravy vzorku. Možné typy uspořádání prezentované v rámci jedné studie jsou vyobrazeny na Obr. 3:

- (i) uspořádání řetězců, které HA zaujímá ve vodném roztoku,
- (ii) stočení řetězců do dvojitého šroubovice,
- (iii) dvě antiparalelní šroubovice, mezi nimiž nedochází k vzájemnému propletení,
- (iv) jednotlivé šroubovice s těsnějším uspořádáním,
- (v) vzájemné uspořádání šesti řetězců vůči sobě,
- (vi) několik řetězců v bližším seřazení vedle sebe,
- (vii) uskupení natažených řetězců.¹³



Obr. 3: Změny uspořádání HA v závislosti na podmínkách přípravy vzorku¹³

2.2 Vlastnosti

Kyselina hyaluronová je jedna z nejvíce hydrofilních molekul v přírodě. Pokud není vázána k jiným molekulám. V těle se kromě extracelulárního matrixu nachází ve velkém množství v tkáních plodu, kde je během dalšího vývoje částečně nahrazena kolagenem a proteoglykany, jež jsou schopny vykonávat mechanicky náročnější úkony. Vyskytuje se také mimo buňky, a to v tělesných tekutinách. Příkladem je oční sklivec, kde udržuje viskoelasticitu. Mezi další biologické funkce HA patří kontrola hydratace tkání, transport vody^{7,11}, dále je důležitá pro propustnost malých nebo objemných molekul. Ovlivňuje fyziologické vlastnosti tkání a uplatňuje se v několika signálních drahách.¹⁴

V tělesných tekutinách se HA objevuje v koncentracích od 0,01 $\mu\text{g/g}$ v krevním séru až do 1 400-3 600 $\mu\text{g/g}$ v synoviálních tekutinách. V měkkých pojivých tkáních je v koncentraci 8,5-18 $\mu\text{g/g}$.⁷ HA se objevuje s molární hmotností od 10^5 Da v séru do $8 \cdot 10^7$ Da ve sklivci. Nejvíce distribuovanou formou HA v tkáních je vysokomolekulární HA (HMWHA) s molární hmotností do $\sim 10^7$ Da.^{15,16} Nízkomolekulární HA (LMWHA) vzniká rozpadem HMWHA v důsledku poranění tkáně. Její molární hmotnost se pohybuje do $\sim 10^5$ Da. Tělesné buňky jsou schopny rozlišit LMWHA a HMWHA, na základě čehož vykonávají odlišné funkce.¹⁷ HMWHA má imunopresivní účinky, je antiangiogenní (působí proti vzniku cév), protizánětlivá, pomáhá v léčbě poranění a prevenci proti vzniku jizev. LMWHA stimuluje různé signální kaskády zprostředkované interakcí řadou rozdílných receptorů.¹⁸

Faktory ovlivňující fyzikálně chemické vlastnosti HA jsou:

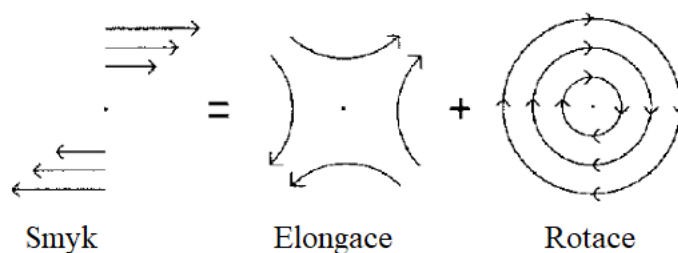
- molární hmotnost,
- koncentrace,
- teplota,
- pH,
- iontová kompozice,
- rozpouštědla,
- vazebnost či nevazebnost proteinů.

Viskoelastické vlastnosti roztoku HA závisí na hodnotě pH. Při extrémních hodnotách, kdy je pH v rozmezí hodnot 2,5-3,5 nebo nad 12,5, nastává výrazný pokles viskozity zapříčiněný úbytkem vazeb mezi uhlíky. Při neutrálním pH hodnota viskozity dosahuje přijatelných hodnot. Na viskoelastické vlastnosti má dále vliv frekvence aplikovaného napětí. Za vysoké

frekvence je pozorováno elastické chování, zatímco při nízkých frekvencích se projevuje chování viskózní.¹² Dále je pro tyto vlastnosti důležitý vznik velkých síťových struktur v roztocích HA. V případě HMWHA lze v závislosti na koncentraci polymeru rozlišit 3 odlišné strukturní oblasti. Jsou to oblasti zředěné, částečně zředěné a koncentrované, které se liší hlavně mírou, do jaké dochází k překryvu řetězců a distribuci polymerních řetězců.¹⁹

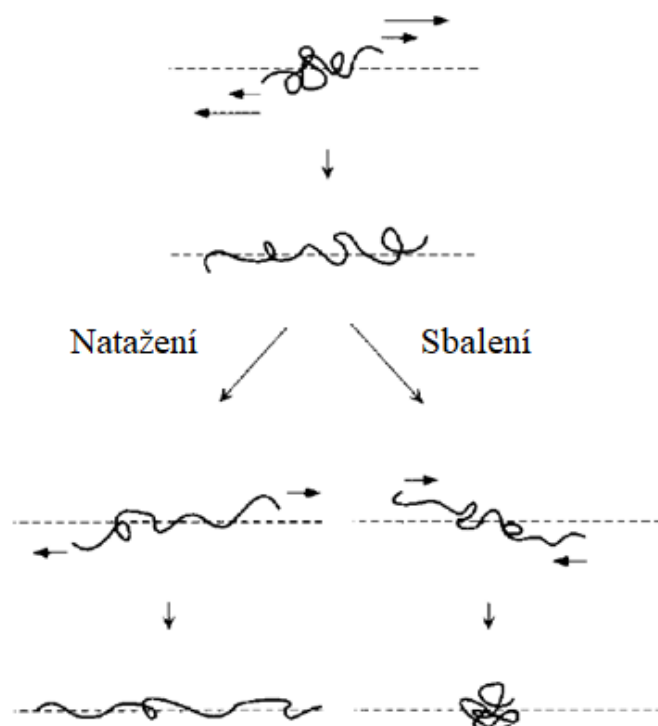
Roztoky HMWHA mají vysokou viskozitu s neNewtonovským tokovým chováním, jenž je projevem mikroskopického smykového napětí uvnitř molekuly vznikajícím při jejím natažení. Smykové napětí má pro flexibilní polymery velký význam a to z důvodu, že toto napětí vzniká vždy při toku roztoku po povrchu. Na natažení řetězce mají vliv dvě složky:

- elongační,
- rotační.



Obr. 4: Schéma jednoduchého smykového toku složeného z elongační a rotační složky²⁰

Ostatní toky se pak skládají z obou těchto složek a závisí na velikosti uhlové rychlosti, charakterizující rotační tok a rychlosti deformace pro elongační tok. Obě složky musí mít nenulové hodnoty. Při toku dále vznikají hydrodynamické síly převažující nad entropickými silami odpovědnými za uspořádání polymerních řetězců do klubka. Tím je dosaženo natažení klubka, po kterém dochází k relaxaci. Polymer poté může zaujímat dvě možné konformace, jak ukazuje schéma na Obr. 5. Buď může být ve formě téměř lineárního řetězce, nebo se může sbalit do podoby náhodného klubka²⁰



Obr. 5: Schéma chování polymeru ve smykovém toku²⁰

Kromě vysoké molární hmotnosti je důležitým faktorem vedoucím k vysoké viskozitě tohoto systému skutečnost, že se skládá ze semiflexibilních řetězců. Tyto řetězce expandují do velkých objemů, kde je meziprostor vyplněn vodou, která není pevně vázána, ale uzavřena uvnitř struktury klubka. Voda je vždy přítomná a podílí se na velikosti každé molekuly, zatímco její tvar podléhá neustálým změnám. To je dáno tím, že pohyb rozpouštědla je ovlivněn třením s blízce rozmístěnými polymerními segmenty. Vzhledem k rychlosti pohybu segmentů lze tvar molekuly v průměrné době popsat jako kulový, v němž je nejvyšší hustota segmentů řetězce koncentrována poblíž středu. Pro roztok HA v dobrém rozpouštědle platí, že objem HA roste přibližně jako molární hmotnost umocněná na 1,8. Z této skutečnosti plyne, že čím větší je polymer, tím menší je průměrná hustota, jelikož objem narůstá rychleji než hmotnost. Pro HA s molární hmotností v řádu milionů tak dosahují řetězce extrémních objemů.²¹

Za fyziologických podmínek se HA vyskytuje ve formě sodné soli se záporným nábojem,²² který v závislosti na pH nese každý druhý monomer.¹¹ Při úplné ionizaci karboxylové skupiny v kyselině D-glukoronové jsou od sebe náboje ve vzdálenosti 1 nm. Tyto náboje jsou ovlivněny iontovou silou a již dříve uvedeným pH prostředí. Samy pak mají vliv na tvar

molekuly a na interakci s okolními molekulami.²³ Díky zápornému náboji HA snadno interaguje s kladnými povrchově aktivními látkami.²⁴

Jak bylo zmíněno dříve, na konformaci HA působí obsah iontů v roztoku (NaCl, KCl, MgCl₂, MnCl₂). V roztocích podléhá klubko elektrostaticky indukovanému smrštění, jež se zvyšuje s rostoucí koncentrací elektrolytu. Studium HA metodou FRAP byl prokázán vliv přítomnosti elektrolytu na difúzní koeficient FA-HA, kdy v přítomnosti dvoumocných kationtů (Ca²⁺) dochází k mnohem většímu nárůstu hodnoty koeficientu, než jak je tomu v přítomnosti jednomocných kationtů (Na⁺). Tento nárůst hodnoty koeficientu difúze FA-HA s koncentrací elektrolytu je předpokládán v důsledku redukce elektrostatických interakcí, jež vedou ke smrštění polyaniontového klubka a následné redukci interakcí mezi řetězci v semikoncentrovaných roztocích.²⁵

2.3 Využití

Přítomnost HA téměř ve všech buňkách ve spojení s její biokompabilitou a biodegradabilitou vedla k tomu, že HA našla využití ve vývoji materiálů napomáhajícím růstu tkání, jejich opravám a regeneraci. To vedlo ke vzniku hydrogelových struktur na bázi HA, tzv. scaffoldů, jejichž vlastnosti je činí vhodnými pro použití v tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně. HA hydrogely se mohou uplatnit v léčbě např. hlasivek, chrupavek nebo slinných žláz.⁷ Jedná se o zesíťované polymery vyznačující se vysokým obsahem vody a dobrou elasticitou. Jsou schopny tvořit vysoce nabobtnalé 3D prostředí, podobné přirozeným tkáním. Tato vlastnost umožňuje zapouzdření buněk a zprostředkování buněčné aktivity za fyziologických podmínek. Tím je podporována rychlost množení buněk, jejich migrace, specifická diferenciací,²⁶ adheze a pohyblivost. HA svými biologickými vlastnostmi také ovlivňuje všechny fáze léčení ran.¹²

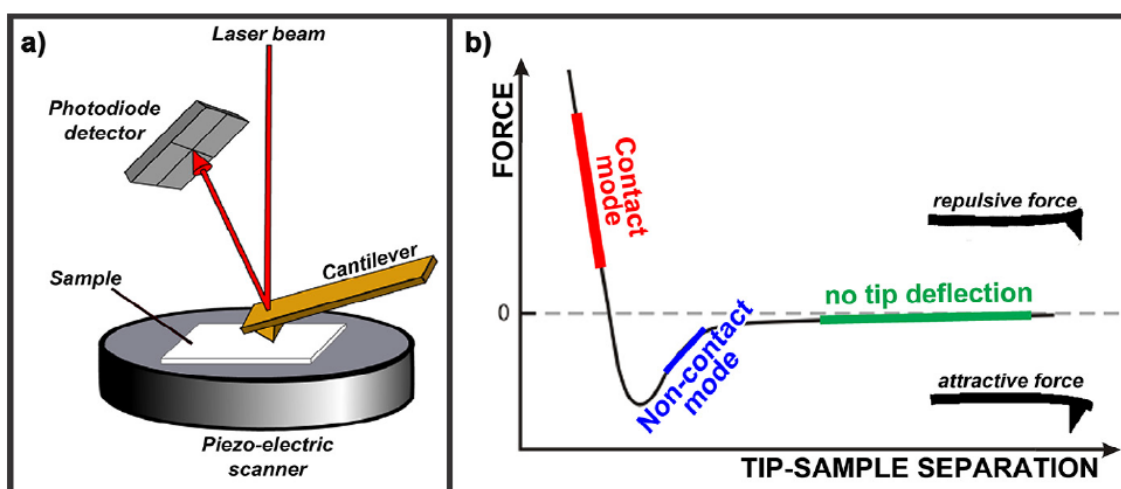
HA je možné různě chemicky modifikovat, což vede k získání odlišných vlastností výsledného materiálu. Chemické modifikace se zaměřují na tři funkční skupiny. První jsou skupiny kyseliny karboxylové a glukoronové, dále N-acetylová skupiny a poslední jsou primární a sekundární hydroxylové skupiny. K modifikaci slouží velké množství postupů. Z nich lze pro karboxyláty použít esterifikaci či amidaci. Pro hydroxaly lze dosáhnout modifikace třeba etherifikací a esterifikací divinylsulfonovým zesíťováním. Příkladem takto upraveného materiálu je thiol-modifikovaný HA. Jeho výsledné vlastnosti spolu s biologickým rozkladem závisí na několika parametrech. Z nich je možné jmenovat obsah thiolu v materiálu, procento thiolové modifikace, počáteční molekulovou hmotnost HA atd.¹⁶

Modifikované HA hydrogely jsou následně integrovány s dalšími biomateriály ke zvýšení adheze buněk. Tím lze v praxi zlepšit regeneraci nervů, pro něž jsou vhodné scaffoldy připravené smícháním HA s kolagenem. Svými vlastnostmi jsou tak HA hydrogely významným nástrojem právě pro léčbu nervových tkání, zejména se uplatňují pro regeneraci mozku a míchy.^{6,26} HA je také využívána v estetické medicíně, oftalmologii nebo při distribuci léčiv,¹⁴ kde má spolu se svými deriváty velké potenciální využití. Poslední výzkumy využívají schopnosti HA rozpoznat receptory na povrchu tumoru a uplatňuje se tak v distribuci léčiv proti rakovině. HA zde plní roli nosiče reagujícího s ostatními látkami za vzniku konjugátů. Tyto konjugáty mají schopnost řízeného a kontrolovaného uvolnění léků. Tím je možné dopravit řadu léčiv na různá patologická místa tak, aby bylo dosaženo uvolnění léku v požadovaném čase na určeném místě.²⁷

3 CHARAKTERIZACE KYSELINY HYALURONOVÉ POMOCÍ MIKROSKOPIE ATOMÁRNÍCH SIL

3.1 Mikroskopie atomárních sil

Mikroskopie atomárních sil (AFM) je metoda umožňující pozorovat objekty v řádu nanometrů. Skenuje povrch objektu a umožňuje vytvořit 3D obraz biologických struktur, jež zahrnují filmy lipidů, biomolekuly, 2D krystaly proteinů, DNA, RNA, atd.²⁸⁻³⁰



Obr. 6: a) Schéma AFM, b) Silové působení v AFM měření³¹

Princípem metody je pohyb ostrého hrotu nad nebo po povrchu vzorku. Mezi hrotem a vzorkem dochází ke vzniku přitažlivých nebo odpudivých sil, jejichž působení je snímáno hrotem upevněným na ramínku. Velikost silové interakce se projevuje mírou ohybu ramínka. Schéma AFM je uvedeno na Obr 6 a). Na Obr 6 b) je ukázán průběh působících sil a jsou zde vyznačeny oblasti charakteristické pro rozdílné režimy skenování.³²

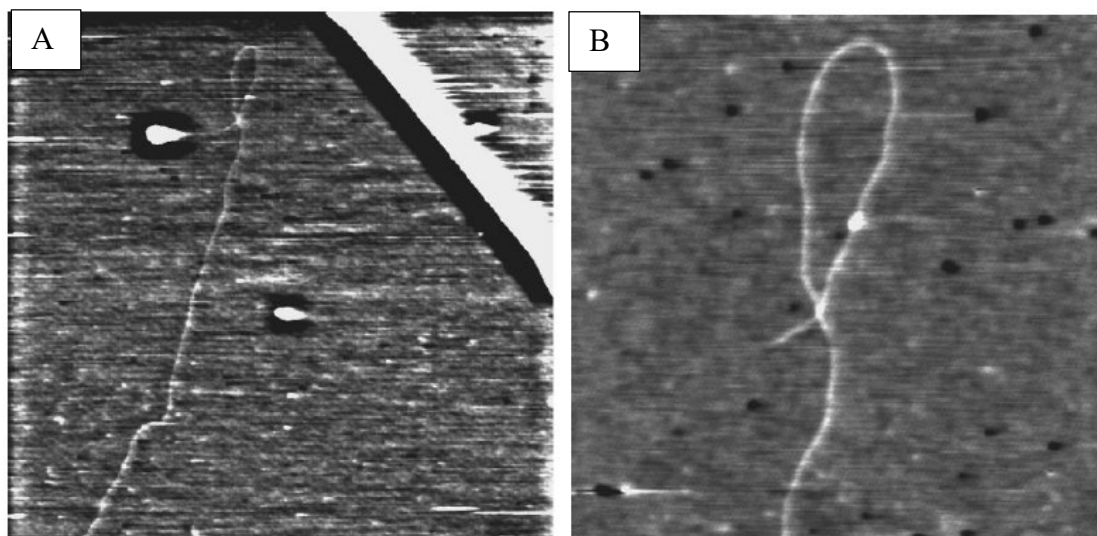
Měření pomocí AFM je prováděno nejčastěji ve dvou z těchto třech režimů - kontaktním a dynamickém - semikontaktním. Nevýhodou kontaktního režimu je, že hrot je se vzorkem neustále v kontaktu a v důsledku působení odpudivých sil může dojít až k poškození vzorku či sondy.

Mezi dynamické režimy měření lze zahrnout i bezkontaktní. Oba tyto režimy (semikontaktní a bezkontaktní) byly vyvinuty za účelem co nejvíce snížit třecí síly působící mezi hrotem a povrchem vzorku.³³

3.2 Charakteristika HA pomocí AFM

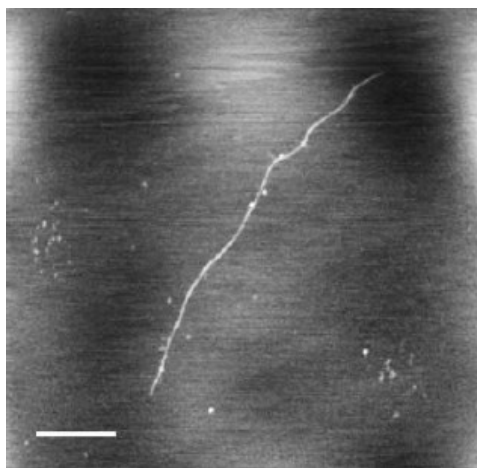
AFM je metoda poskytující reprodukovatelné obrazy polysacharidů. Pro jejich úspěšné získání má důležitou roli příprava vzorku. Před tím, než lze biologické struktury sledovat v jejich nativním stavu, musí být polymer uchyceny k pevnému a hladkému substrátu. Substrát musí být odolný vůči laterálním silám vyvíjeným skenovacím hrotem. Tuto podmínku splňuje slída, jenž je také nejvíce používaným substrátem. Jedná se o nevodivý minerál tvořený vrstevnatou, snadno dělitelnou strukturou. Tyto vrstvy lze od sebe oddělit použitím například lepicí pásky, přičemž obnažená vrstva je záporně nabitá. Dalšími vhodnými substráty jsou třeba sklo a oxid křemičitý. Množství materiálů použitelných jako substrát je jedna z předností AFM v porovnání s jinými metodami. Další výhodou je například možnost kontroly zobrazovací síly a jednoduchá interpretace získaných obrazů.^{29,34} Pro pozorování molekul v nativním stavu je přitom zapotřebí jen jednoduchá příprava vzorku a jeho poškození je minimální.³³

Různými metodami přípravy a analýzy vzorků zaměřených na pozorování izolovaných molekul může AFM poskytovat řadu odlišných pohledů na konformaci HA. Použitím poklepo-
vého režimu byl získat obraz izolovaného prodlouženého řetězce viditelný na Obr 7. K tomu byl použit extrémně zředěný roztok HA o koncentraci 1-5 $\mu\text{g/ml}$, ke kterému byl v malé koncentraci přidán roztok MgCl_2 . Jeho přidání přispělo ke zlepšení adheze zředěného roztoku HA k povrchu slídy. K tomuto zlepšení došlo v důsledku snížením elektrostatické repulze mezi povrchem slídy a polysacharidem. Přebytné ionty na povrchu substrátu byly následně omytím odstraněny a povrch byl osušen proudem dusíku. Tyto kroky vedly k tomu, že na povrchu slídy vznikla tenká vrstva absorbovaných plynů a vody. Ve výsledku se pak HA nachází ve více hydratovaném stavu, než je tomu například během měření AFM v organických roztocích. Takto připravený vzorek nelze snímat kontaktním režimem AFM na vzduchu a to z důvodu, že adhezivní síly mezi hrotem a vodou na povrchu vzorku skenování značně komplikují. Měření proto probíhá v režimu semikontaktním, který umožňuje hrotu prorazit přes vrstvu vody a tím získat obraz vzorku s vysokým rozlišením.



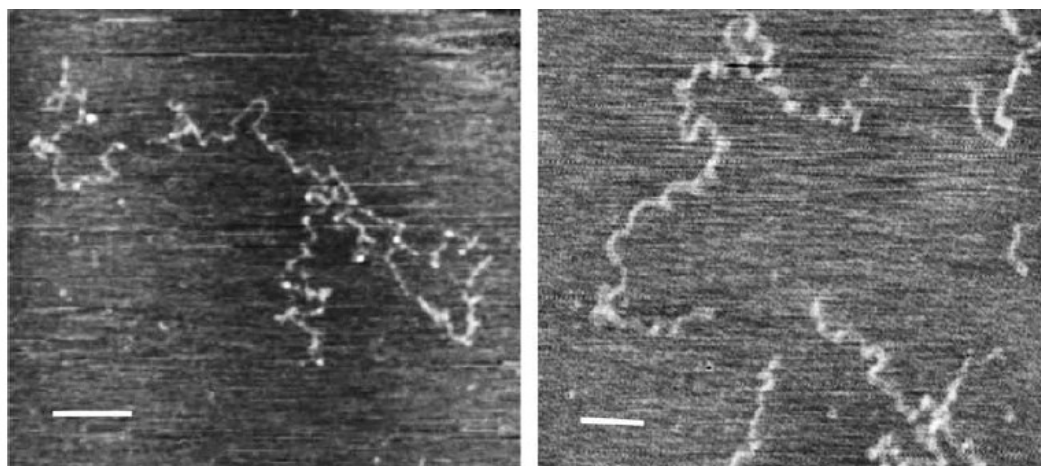
Obr. 7: Obrázek nataženého HA řetězce získaný poklepovým režimem AFM na povrchu slídy: A) Měřená plocha o velikosti $5,1 \times 5,1 \mu\text{m}$ a výšce řetězce $1,5 \text{ nm}$, B) Obrázek řetězce se smyčkou na ploše o velikosti $5,1 \times 5,1 \mu\text{m}$ a výšce řetězce $1,5 \text{ nm}$ ³⁵

Pokud je nějakým způsobem umožněna specifická interakce mezi HA, povrchem a vrstvou vody, pak má HA možnost zaujímat řadu molekulárních konformací. Pozorovány tak mohou být formy natažené, relaxované a kondenzované.^{35,36}



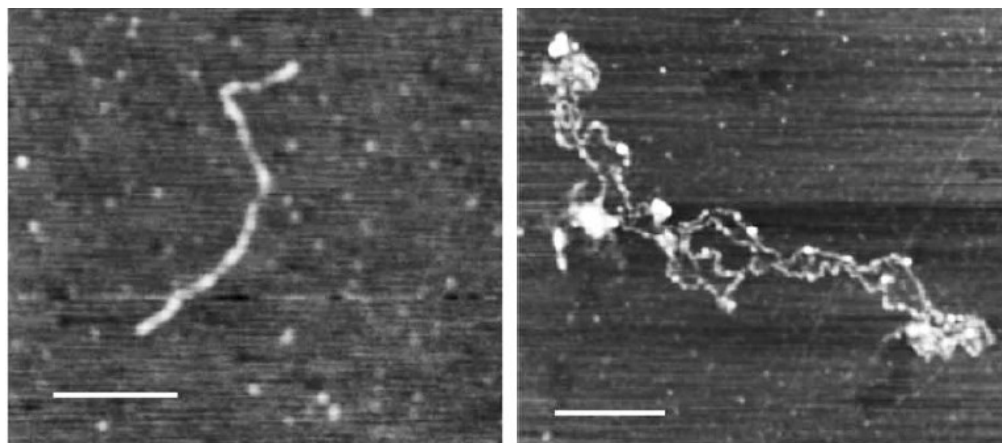
Obr. 8: Natažená forma bakteriální LMWHA získána skenováním AFM v poklepovém režimu³⁶

V natažené formě uvedené na Obr. 8, tvoří HA téměř lineární řetězec. K pozorování této formy často dochází při dodržení určitých podmínek přípravy vzorku, vedoucí k vynucenému natažení řetězce HA. Toho je dosaženo silovým působením kapek vody po povrchu substrátu, dochází k tzv. molekulové česání. Od molekuly HA by se mohlo očekávat odražení od povrchu, ale v důsledku dostatečně silných interakcí se utváří vrstva vody podobná ledu, která tomuto odskoku zabrání.



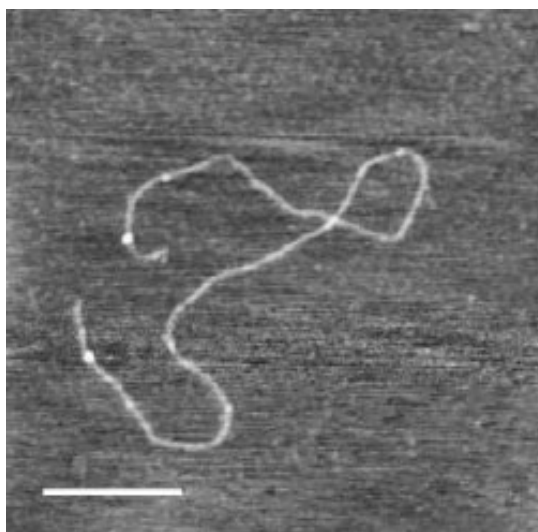
Obr. 9: Relaxovaná forma HA³⁷

V případě deponování HA na povrch slídy s čerstvě odštipnutým povrchem, kde byla předem vytvořena vrstvička vody, se molekula polymeru do vody okamžitě ponoří a tvoří se tak relaxovaná forma HA. Pro ni je typická přítomnost úseků šroubovicového tvaru (Obr. 9), což je ve vodném prostředí konformace s nejmenší energií. Kondenzované formy zaujímají tvary podobající se řadě perel nebo tyčinek s různým stupněm kondenzace (Obr. 10). Důvodem je nízká afinita HA k záporně nabitému povrchu slídy.



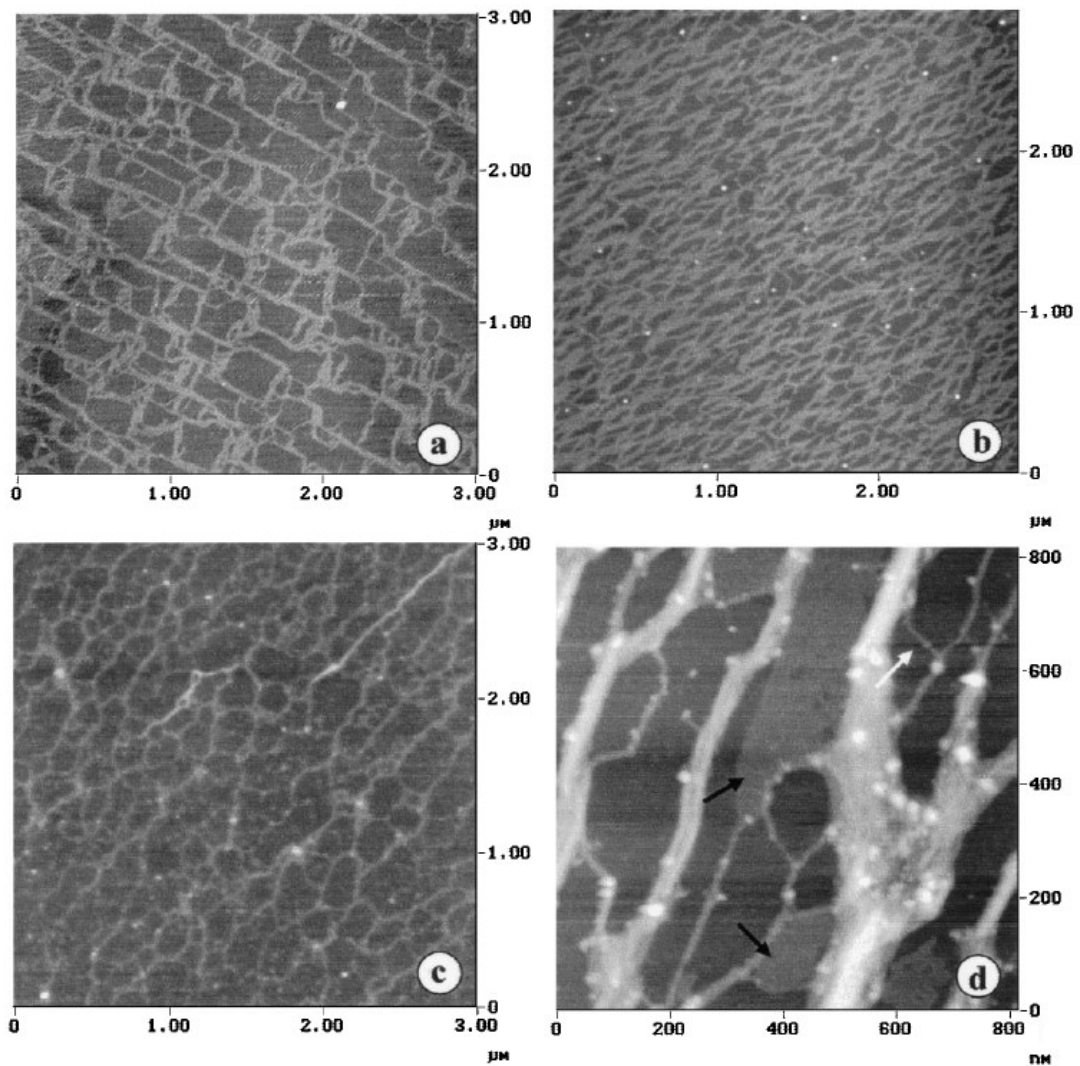
Obr. 10: Relaxované a částečně kondenzované HA řetězce³⁷

Dále se může utvářet volně zatočená forma HA deponovaná na předem vysušenou slídu. Na rozdíl od natažené formy není podrobena takovým silám, aby u ní došlo k natažení řetězce. Naopak může podléhat významné relaxaci a stáčení segmentů do smyček, jak lze vidět na Obr. 11.



Obr. 11: Částečně relaxovaná LMWHA na povrchu slídy skenovaná semikontaktním režimem AFM³⁶

U vodných roztoků HMWHA bylo experimentálně prokázáno formování polymerní sítě na povrchu substrátu během procesu přípravy vzorku. Distribuce HA ani oka sítě na povrchu substrátu nejsou homogenní, na což neměla vliv koncentrace deponovaného roztoku ani sedimentace před sušením vzorku. Tuto skutečnost ukazuje Obr. 12, na snímcích byl semikontaktním mode AFM měřen deponovaný roztok HMWHA ($2 \cdot 10^6$ Da) – (a), (b) s koncentrací 1 mg/ml a (c) o koncentraci 0,1 mg/ml. Na snímku (d) bylo pozorováno zvětšení struktury, kde černé šipky poukazují na přítomné ploché struktury s přibližnou výškou 0,3 nm. Bílé šipky ukazují na jednotlivé řetězce.



Obr. 12: HMWHA ($2 \cdot 10^6$ Da) snímána poklepovým režimem AFM na povrchu slídy: (a), o koncentraci 1 mg/ml (b) a 0,1 mg/ml (c), na (d) je zvětšený snímek struktury HA³⁸

U vzorků s nižší molekulovou hmotností (170 000 a 640 000) nebyl pozorován vznik sítě. Naopak byly zaznamenány izolované molekuly nebo shluky polymeru. Odlišný byl také tvar molekuly. Čím kratší byly řetězce, tím větší byla tendence samovolně vytvářet větší agregáty a náhodné kruhové struktury.^{36–38}

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 MATERIÁLY A METODY

Cílem práce bylo studium struktury kyseliny hyaluronové imobilizované na povrchu modifikované slídy. K tomu účelu byly použity odlišné přístupy přípravy roztoků HA o různých výchozích hmotnostních podílech polymeru v roztoku. Přichystané roztoky byly následně zředěny na nižší koncentraci a deponovány na povrch slídy modifikované malým množstvím $MgCl_2$. Takto připravené vzorky byly zobrazovány pomocí mikroskopie atomárních sil. Získány byly snímky utvořených agregátů či sítě řetězců HA.

4.1 Materiály a chemikálie

Použitá byla kyselina hyaluronová o střední molekulové hmotnosti 370 kDa zakoupená od společností Contipro a.s. v kosmetické kvalitě. Všechny roztoky byly připraveny rozpuštěním v ultračisté vodě ($18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$). Substrátem pro AFM měření byla slída o rozměrech $10 \times 10 \text{ mm}$ typu V-5 od společnosti SPi Supplies modifikována $0,1 \text{ M}$ roztokem $MgCl_2$. Modifikační roztok byl připraven rozpuštěním $MgCl_2$ zakoupeným od společnosti SigmaAldrich v p.a. čistotě.

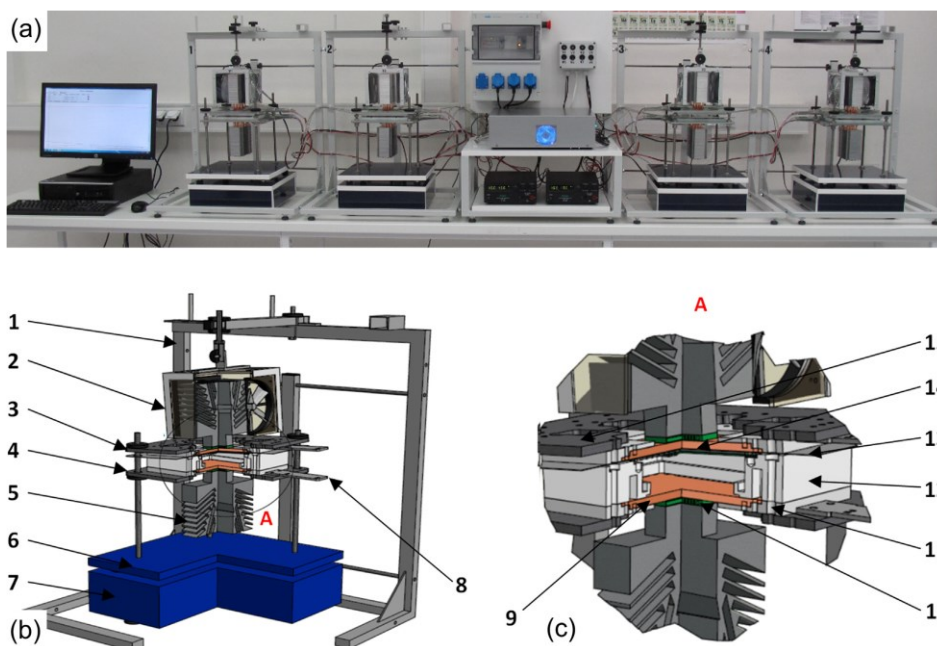
4.2 Příprava roztoků a vzorku HA na povrchu slídy

Byla rozpuštěna HA v ultračisté vodě. Obsah HA v roztoku byl $0,1 \text{ hm. \%}$, $0,5 \text{ hm. \%}$ a 1 hm. \% . Roztoky byly rozpuštěny na třepacím zařízení při pokojové teplotě $23 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 24 hodin. Další roztoky byly připravovány na laboratorním magnetickém míchadle s temperovanou lázní vyhřátou na $46 \text{ }^\circ\text{C}$ opět 24 hodin. Z vybraných typů třepaných roztoků ($0,1 \text{ hm. \%}$ a 1 hm. \% HA v roztoku) byly připravovány polymerní filmy sušením v laboratorní sušárně při teplotě 50°C po dobu 24 hodin. Byla použita sušárna značky Memmert bez nucené cirkulace vzduchu. Filmy byly solidifikovány na skleněných Petriho miskách o průměru $11,5 \text{ cm}$ (na misky bylo odléváno 47 g roztoku). Takto připravené filmy byly opětovně rozpouštěny na původní koncentrace $0,1 \text{ hm. \%}$ a 1 hm. \% HA v roztoku.

Poznámka: Veškeré rozpuštěné vzorky HA byly před ředěním a depozicí na povrch slídy uloženy na 24 hodin do lednice (teplota cca $5 \text{ }^\circ\text{C}$)

Poslední část roztoků byla připravována ve speciální TFFC zařízení, Obr. 13, vyvinutém na UFMI, UTB ve Zlíně.³⁹ Jedná se soustavu samostatně pracujících jednotek umožňujících vystavovat polymerní roztoky definovanému teplotnímu spádu. Úprava roztoků v tomto za-

řízení probíhala v Petriho miskách průměru 11,5 cm (bylo upravováno 47 g roztoku). Roztoky obsahující 0,5 hm. % HA byly přímo rozpouštěny v TFFC zařízení po dobu 22-24 hodin. Roztoky obsahující 0,1 hm. % nebo 1 hm. % HA byly v prvním kroku rozpuštěny na třepacím zařízení a následně upravovány v TFFC zařízení pod dobu 24 hodin. V TFFC zařízení byly voleny režimy konstantní teploty 46/46 °C nebo 58/58 °C a režimy teplotního spádu 50/7 °C nebo 60/17 °C.



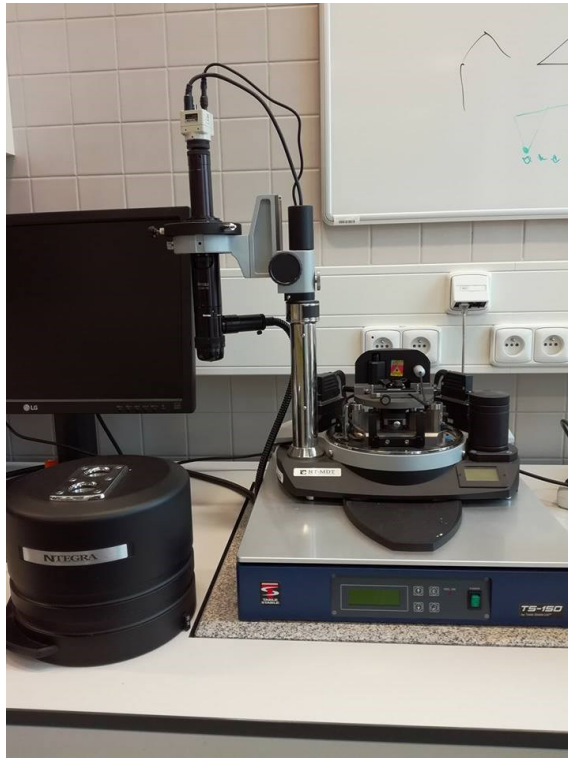
Obr. 13: TFFC: a) experimentální přístroj pro definovanou modifikaci polymerních roztoků, b) funkční subjednotka, c) náhled na střední část funkční subjednotky³⁹

Před imobilizací HA na povrch čerstvě odštipnuté slídy byly veškeré roztoky naředěny na koncentraci 0,01 hm. % (pokud není uvedeno jinak). Povrch slídy byl před depozicí HA modifikován nanesením 50 μ l 0,1 M vodného roztoku $MgCl_2$, který působil na povrch 60 sekund. Po uplynutí této doby byl povrch slídy vysušen proudem vzduchu a bylo na něj nanášeno 50 μ l měřeného roztoku. Ten byl na substrátu ponechán 120 sekund, než byl opět osušen proudem vzduchu. Vzorek byl poté připraven k měření.

4.3 Použitý mikroskop atomárních sil a program na vyhodnocení výsledků

Skenování vzorků probíhalo mikroskopem atomárních sil AFM - NTEGRA Prima od společnosti NT-MDT, Obr. 14. Pro měření byly použity křemíkové sondy NSG01 s výškou hrotu 14-16 μ m také od společnosti NT-MDT. Měřená plocha vzorku byla 3 x 3 μ m nebo

1,5 x 1,5 μm s rozlišením 512 x 512 dpi a rychlostí skenování v 0,5 Hz. Měření byla prováděna při laboratorní teplotě 23°C v prostředí vzduchu.



Obr. 14: Použitý mikroskop atomárních sil NTEGRA Prima

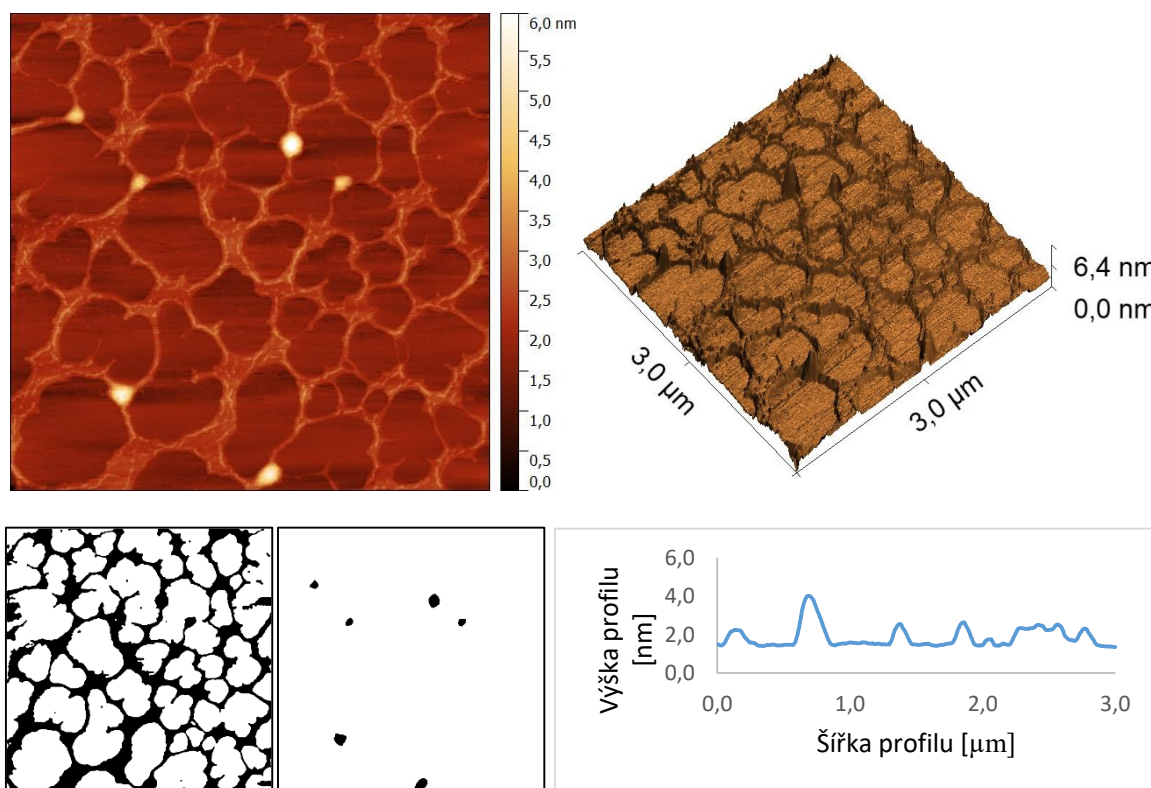
Snímky získané pomocí AFM měření byly zpracovány v programu Gwyddion verze 2.50. Jedná se program sloužící k zobrazení a úpravě dat z SPM měření. Pro další obrazovou analýzu byl použit program ImageJ, ve kterém byly analyzovány zachycené struktury HA na povrchu slídy.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

V experimentální části práce byly srovnávány rozdílné postupy přípravy polymerních roztoků s ohledem na změnu vzniku charakteristických agregovaných vrstev HA (hyaluronan sodný) na povrchu slídy. Byly zkoumány roztoky obsahující tři rozdílné hmotnostní podíly HA (0,1 hm. %, 0,5 hm. % a 1 hm. %). Na přípravě srovnávaných roztoků se podílely čtyři rozdílné zařízení (třepací zařízení, míchadlo s temperační lázní, TFFC zařízení pro generaci teplotních spádů a laboratorní sušárny bez nucené cirkulace vzduchu). Byly studovány a níže diskutovány vlivy teploty rozpouštění, teplotního spádu, hmotnostního podílu v roztoku, víceetapové přípravy polymerního roztoku (roztok-film-roztok) a časového vývoje přípravných roztoků (jejich stárnutí).

5.1 Roztok HA připravovaný za zvýšené teploty mícháním

V rámci prvotních experimentů byly připravovány roztoky HA na magnetickém míchadle temperovaném pomocí lázně na 46 °C. Charakteristický vzhled polymerní sítě s agregovanými kluby pro tento systém je uveden na Obr. 15.



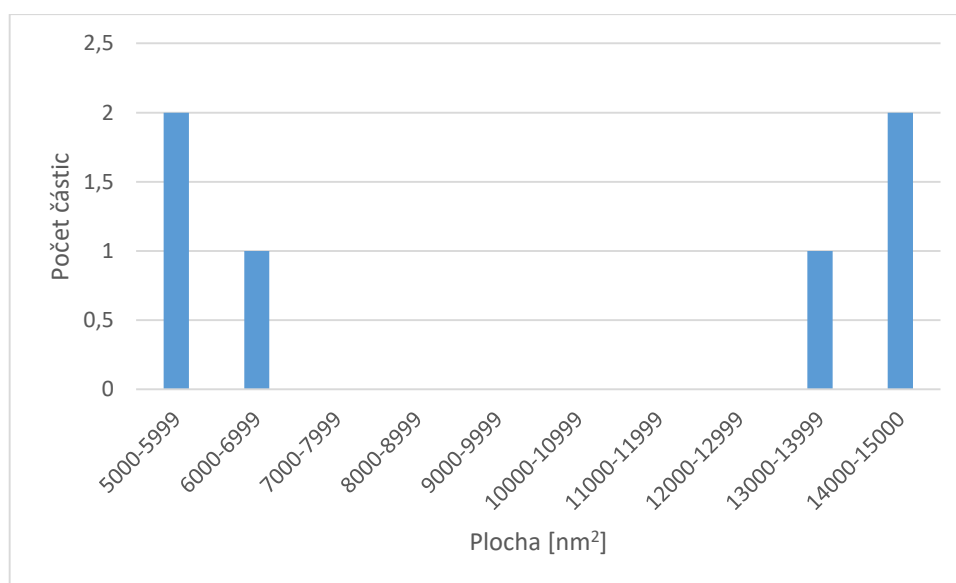
Celkové pokrytí: 28,3% Pokrytí agregáty: 0,6% $R_a = (0,16 \pm 0,03) \text{ nm}$ $R_z = (1,4 \pm 0,3) \text{ nm}$

Obr. 15: Vzhled imobilizované vrstvy HA na povrchu slídy. Zásobní roztok 0,5 hm. % HA ve vodě byl připravován na míchadle při 46°C.

Poznámka: Většina skupinových obrázků je členěna následovně. Vlevo 2D náhled na změnu povrchového reliéfu, vpravo 3D náhled na povrch. Vlevo dole prahované obrázky pro polymerní síť s agregáty (celkové pokrytí) a agregáty. Vpravo dole profilový řez středem zobrazené plochy.

Každá plocha naměřená pomocí AFM, obsahující polymerní síť a agregované struktury HA, byla podrobena obrazové analýze. Výsledky z obrazové analýzy jsou uvedeny pod 2D obrázkem z AFM. Byly analyzovány dvě proměnné. Celkovým pokrytím je zamýšlena plocha obsahující jak polymerní síť, tak agregované struktury. Nad polymerní sítí byl z AFM dat proveden řez. To znamená, že všechny částice, které detekujeme těsně na povrchovou polymerní síť lze považovat za agregáty klubek HA. Tyto agregáty „kruhového“ průřezu byly podrobeny obrazové analýze a byl z nich vytvořen histogram, viz Obr. 16. Mimo to jsou vybrané obrázky doplněny o profilové řezy pořízené ze středu nasnímané plochy, 3D náhledem na povrch snímané plochy a vyhodnocení statistických veličin vztahujících se ke změnám povrchových nerovností.

Z dat uvedených na Obr. 15 plyne, že povrch je pokryt polymerní sítí z 28,3 %. Z této hodnoty zaujímají agregáty klubek hodnotu pouze 0,6 %. To znamená, že na povrchu převládá tenká vrstva síťově propojených polymerních řetězců HA.



Obr. 16: Rozdělení plošných průřezu agregovaných klubek ve výšce 3,2 až 3,5 nm nad povrchem slídy pro vzorek prezentovaný na Obr. 15.

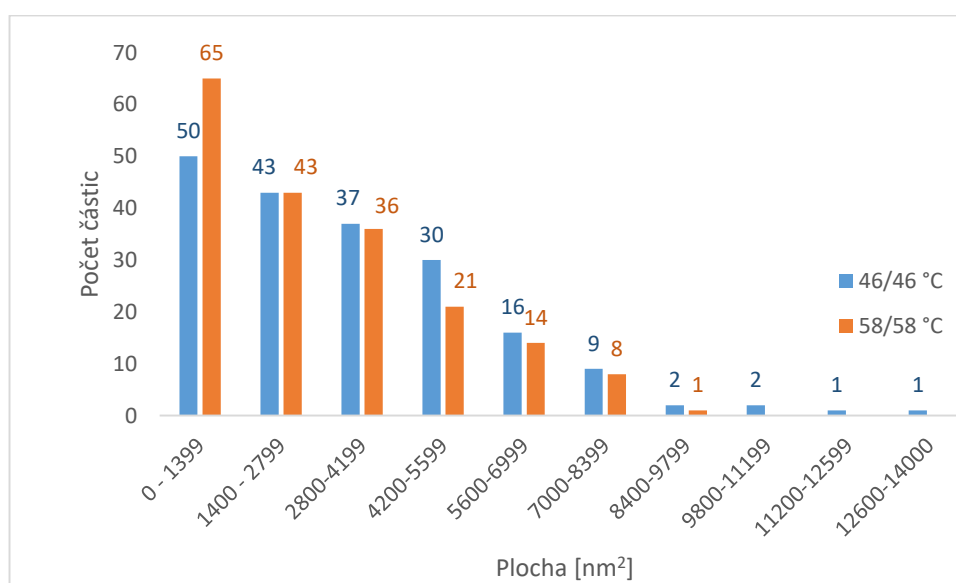
5.2 Roztoky připravované v TFFC zařízení

5.2.1 Vliv střední teploty na změnu vzhledu imobilizované vrstvy HA

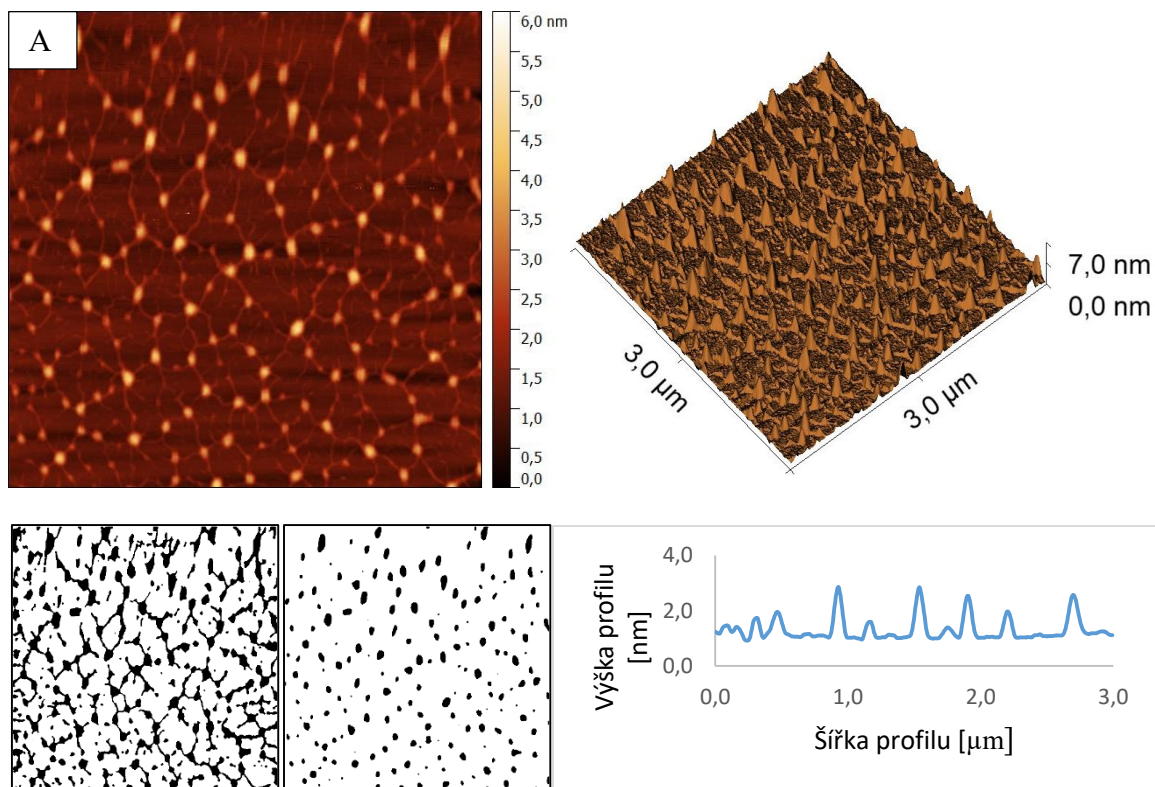
V předešlém případě byly vzorky připravovány na magnetickém míchadle v uzavřené temperované lázni. To znamená, že polymerní systém byl vystaven zvýšené teplotě a smykovému namáhání míchadlem. V následujících experimentech je diskutován vliv působení jiného způsobu rozpouštění polymerního roztoku a to ve speciálním TFFC zařízení, které umožňuje vystavit polymerní systém účinkům teplotního spádu. V případě tohoto zařízení byly polymerní roztoky rozpouštěny v Petriho miskách umístěných mezi topnou a chladicí plochu TFFC zařízení. Princip funkce tohoto zařízení uveden v práci A. Minaříka a kol.³⁹

První experiment v TFFC zařízení byl věnován vlivu střední teploty na změnu charakteru agregovaných struktur na povrchu slídy. Srovnatelné vzorky byly vystaveny teplotě 46/46 °C a 58/58 °C. Výsledky porovnávající tento vliv jsou uvedeny na Obr. 17 a 18. Z Obr. 18 plyne, že jediným faktorem, který se výrazněji mění, je pokrytí povrchu polymerní sítí. Vzorky připravované při vyšší teplotě jsou polymerní sítí kryté o 11% více. Dále pak mírně narůstá počet nejmenších agregátů, viz Obr. 17.

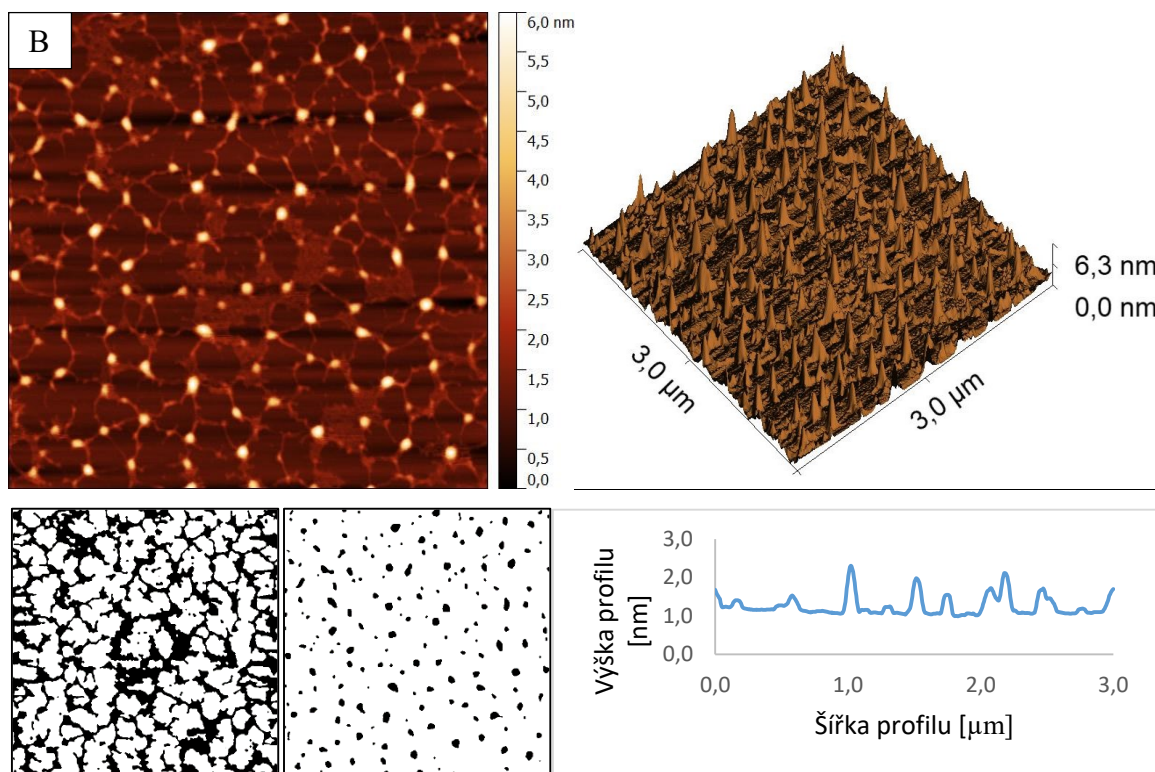
Poznámka: Zápis teploty 46/46 °C nebo 58/58 °C značí teplotu spodní topné plochy (první číslo před lomítkem) a horní chladicí plochy (druhé číslo za lomítkem) v TFFC zařízení.



Obr. 17: Rozdělení plošných průřezů agregovaných klubek ve výšce 2,0 až 2,3 nm nad povrchem slídy pro vzorek prezentovaný na Obr. 18A a 18B.



Celkové pokrytí: 23 % Pokrytí agregáty: 7 % $R_a = (0,25 \pm 0,08) \text{ nm}$ $R_z = (2,0 \pm 0,4) \text{ nm}$



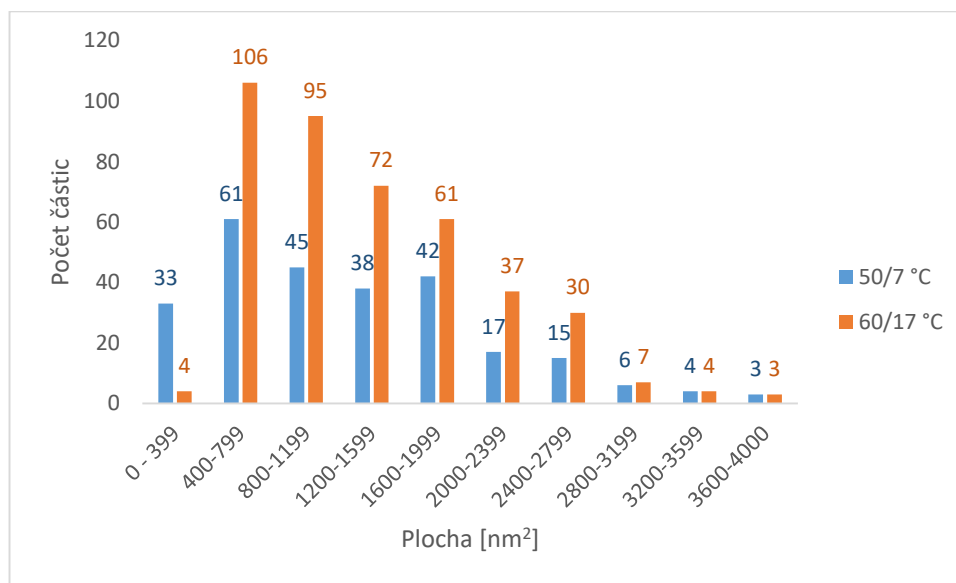
Celkové pokrytí: 34 % Pokrytí agregáty: 6 % $R_a = (0,22 \pm 0,04) \text{ nm}$ $R_z = (2,2 \pm 0,4) \text{ nm}$

Obr. 18: Vliv střední teploty na změnu vzhledu imobilizované vrstvy HA na povrchu slídy. Zásobní roztok 0,5 hm. % HA ve vodě byl připravován v TFCC zařízení při A) 46/46 °C; B) 58/58 °C.

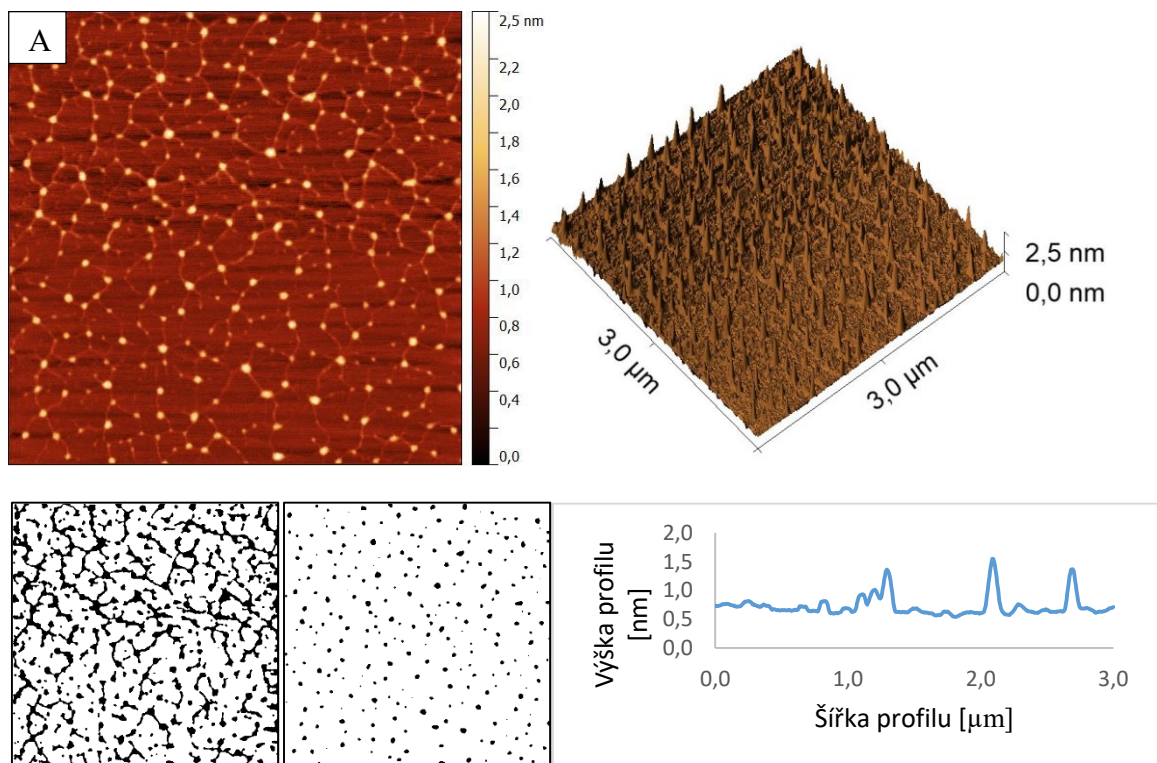
5.2.2 Vliv velikosti teplotního spádu na změnu vzhledu imobilizované vrstvy HA

V předešlé kapitole byl prezentován vliv střední teploty. Výše uvedené teploty (46/46 °C a 58/58 °C) byly voleny záměrně tak, aby odpovídaly střední teplotě v roztoku při nastaveném teplotním spádu 50/7 °C a 60/17 °C, jehož vliv je diskutován v této části. To znamená, že při teplotní spádu 50/7 °C byla naměřena střední teplota roztoku 46 °C a při teplotním spádu 60/17 °C byla naměřena střední teplota v roztoku 58 °C.

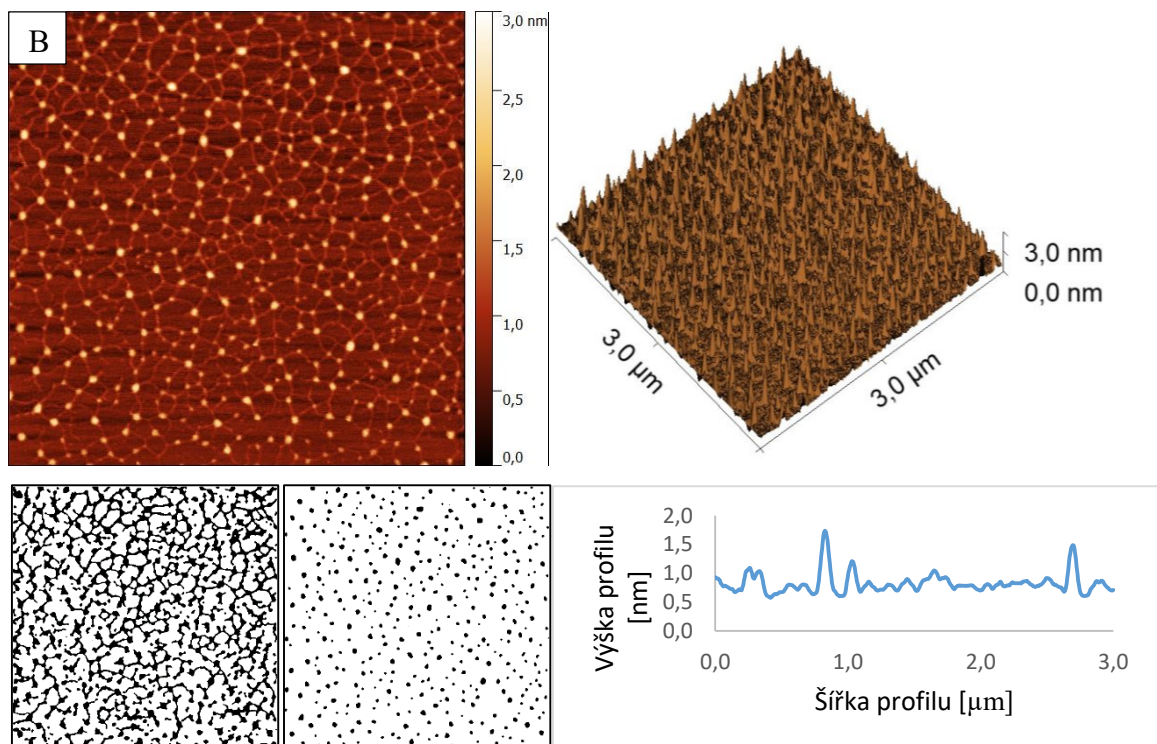
Z dat prezentovaných na Obr. 19 a 20 plyne, že při vyšším teplotním spádu 60/17 °C a vyšší střední teplotě 58 °C lze pozorovat větší pokrytí povrchu polymerní sítí podobně jako při konstantních teplotních podmínkách 58/58 °C. Z těchto výsledků by se mohlo zdát, že teplotní spád nemá výraznější vliv na změnu formovaných struktur na povrchu slídy. Nicméně je třeba se podívat na výšku agregovaných polymerních klubek, viz porovnání Obr. 18 a 20. Z tohoto porovnání plyne, že vzorky vystavené účinkům teplotního spádu tvoří na povrchu agregáty poloviční výšky. Výška agregátu je do 3 nm oproti 6 nm pro systémy připravované při konstantních teplotních podmínkách. Mimo to se zmenšuje průměrná velikost agregovaných klubek, jak opět plyne z porovnání Obr. 18 a 20, respektive histogramů uvedených na Obr. 17 a 19.



Obr. 19: Rozdělení plošných průřezu agregovaných klubek ve výšce 1,3 až 1,5 nm nad povrchem slídy pro vzorek prezentovaný na Obr. 20A a 20B.



Celkové pokrytí: 22% Pokrytí agregáty: 4% $R_a = (0,11 \pm 0,03) \text{ nm}$ $R_z = (1,0 \pm 0,2) \text{ nm}$

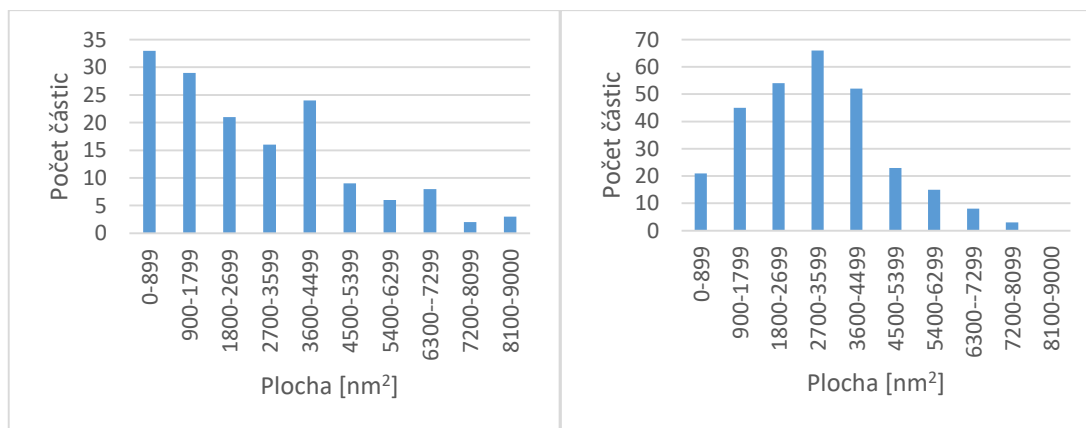


Celkové pokrytí: 29 % Pokrytí agregáty: 6 % $R_a = (0,2 \pm 0,05) \text{ nm}$ $R_z = (1,6 \pm 0,4) \text{ nm}$

Obr. 20: *Vliv velikosti teplotního spádu na změnu vzhledu imobilizované vrstvy HA na povrchu slídy. Zásobní roztok 0,5 hm. % HA ve vodě byl připravován v TFFC zařízení při A) 50/7 °C, B) 60/17 °C.*

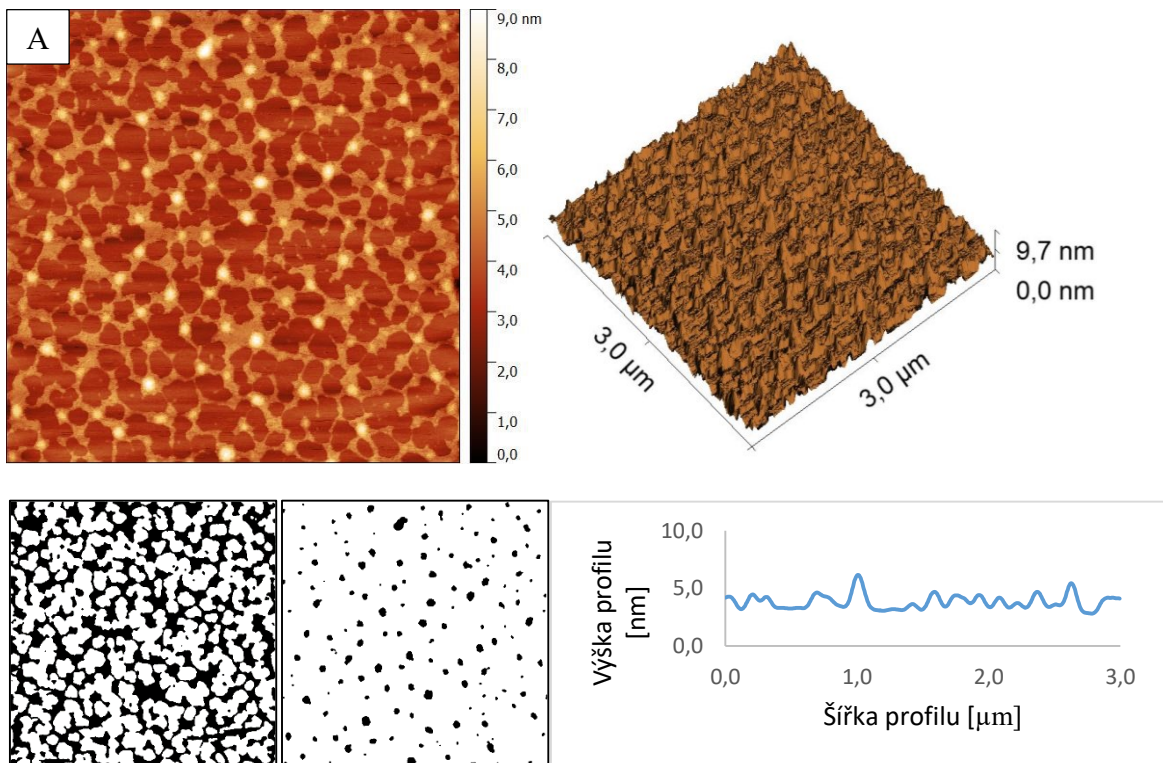
5.2.3 Vliv hmotnostního podílu HA v roztoku na změnu vzhledu imobilizované vrstvy HA rozpuštěné při 50/7 °C a 60/17 °C

Výše uvedená srovnání byla získána z výchozích roztoků obsahujících srovnatelné množství polymeru (0,5 hm. %). V následující části bude řešeno, jaký vliv má hmotnostní podíl polymeru v roztoku na změnu agregační schopnosti HA na povrchu kladně nabitě slídy. V rámci těchto srovnání byly připravovány dva typy roztoků obsahující 0,1 hm. % a 1 hm. % HA rozpuštěné ve vodě. Tyto roztoky byly opět vystaveny účinkům dvou rozdílných teplotních spádů a to 50/7 °C (střední teplota v roztoku 46 °C) a 60/17 °C (střední teplota v roztoku 58 °C). Výsledky z těchto experimentů uvedené na Obr. 21 až 24 ukazují, jak podstatnou proměnnou je hmotnostní podíl polymeru v roztoku, střední teplota a teplotní spád. V případě systému s nižším výchozím hmotnostním podílem polymeru v roztoku (0,1 hm. %), pozorujeme na povrchu hustou síťovou strukturu HA bez agregovaných polymerních klubek. S rostoucím teplotním spádem a střední teplotou se výrazně mění velikost a výška agregovaných polymerních klubek a jejich počet, jak plyne z histogramu uvedeném na Obr. 21. Mimo to se v případě systémů s vyšším hmotnostním podílem polymeru v roztoku (1 hm. %) mění míra pokrytí povrchu polymerní sítí. Při vyšším teplotním spádu klesá téměř na polovinu. Na Obr. 24 jsou vyobrazeny stejné vzorky jako na Obr. 23, jediný rozdíl je v celkovém zvětšení. Obr. 24 zobrazují menší plochu ve větším rozlišení.



Obr. 21: Rozdělení plošných průřezů agregovaných klubek: ve výšce 5,2 až 5,5 nm nad povrchem slídy pro vzorek prezentovaný na Obr. 22A – spád 50/7 °C (vlevo); ve výšce 2,0 až 2,3 nm nad povrchem slídy pro vzorek prezentovaný na Obr. 23A – spád 60/17 °C (vpravo)

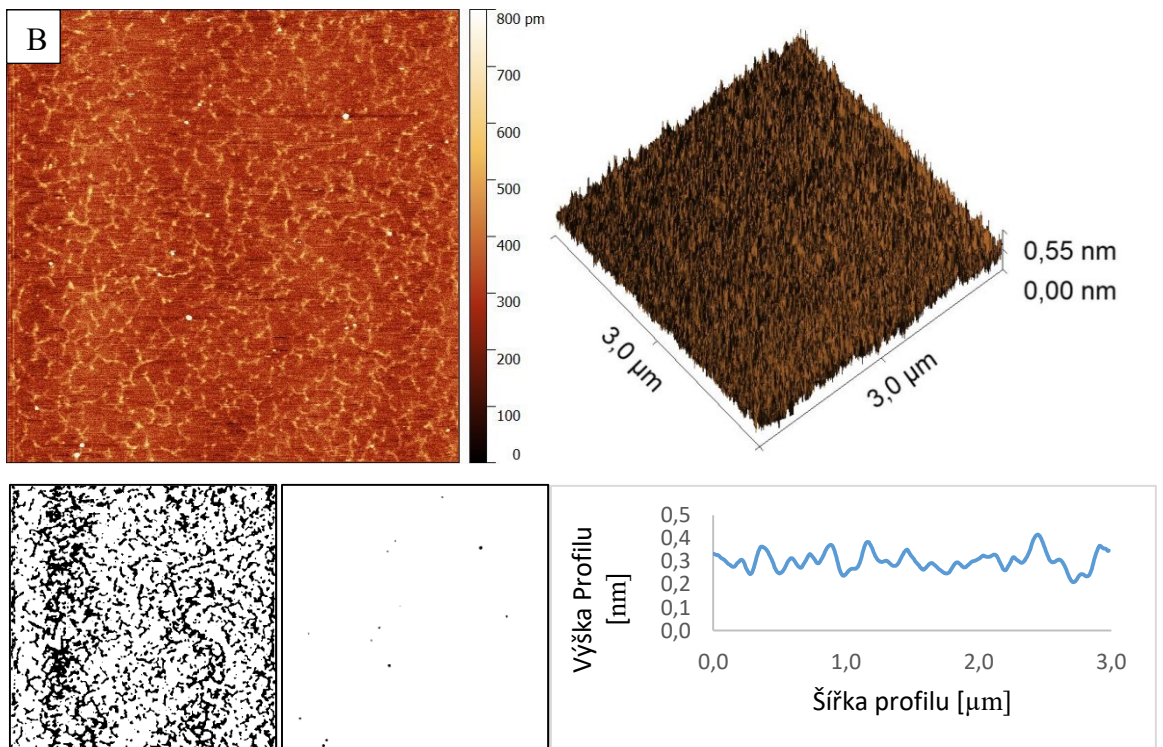
Poznámka: V případě vzorku s obsahem 0,1 hm. % HA na Obr. 23B bylo nezbytné roztok naředit na 0,0025 hm. %, z důvodu přílišného pokrytí povrchu polymerem. Všechny ostatní vzorky byly před deposicí na povrch ředěny, tak aby obsahovaly na 0,01 hm. % HA.



Celkové pokrytí: 38,7 % Pokrytí agregáty: 4,8 %

$R_a = (0,48 \pm 0,05) \text{ nm}$

$R_z = (2,9 \pm 0,2) \text{ nm}$

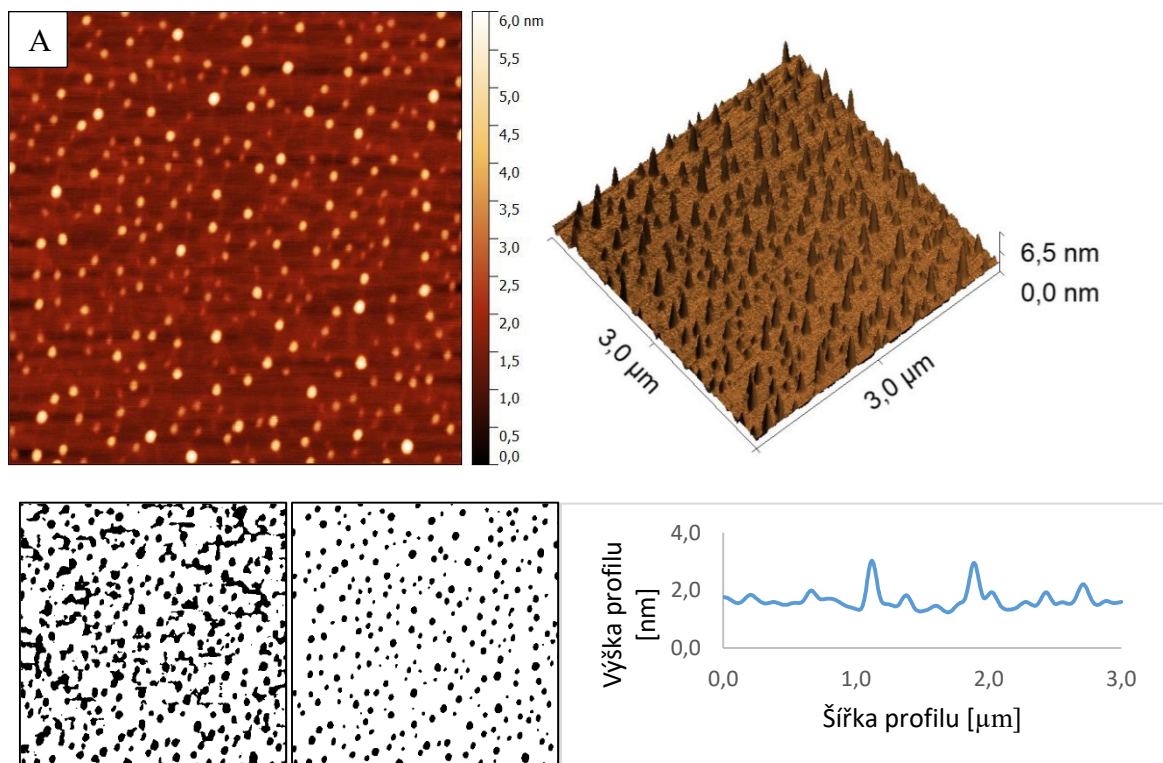


Celkové pokrytí: 27,4 % Pokrytí agregáty: 0,1 %

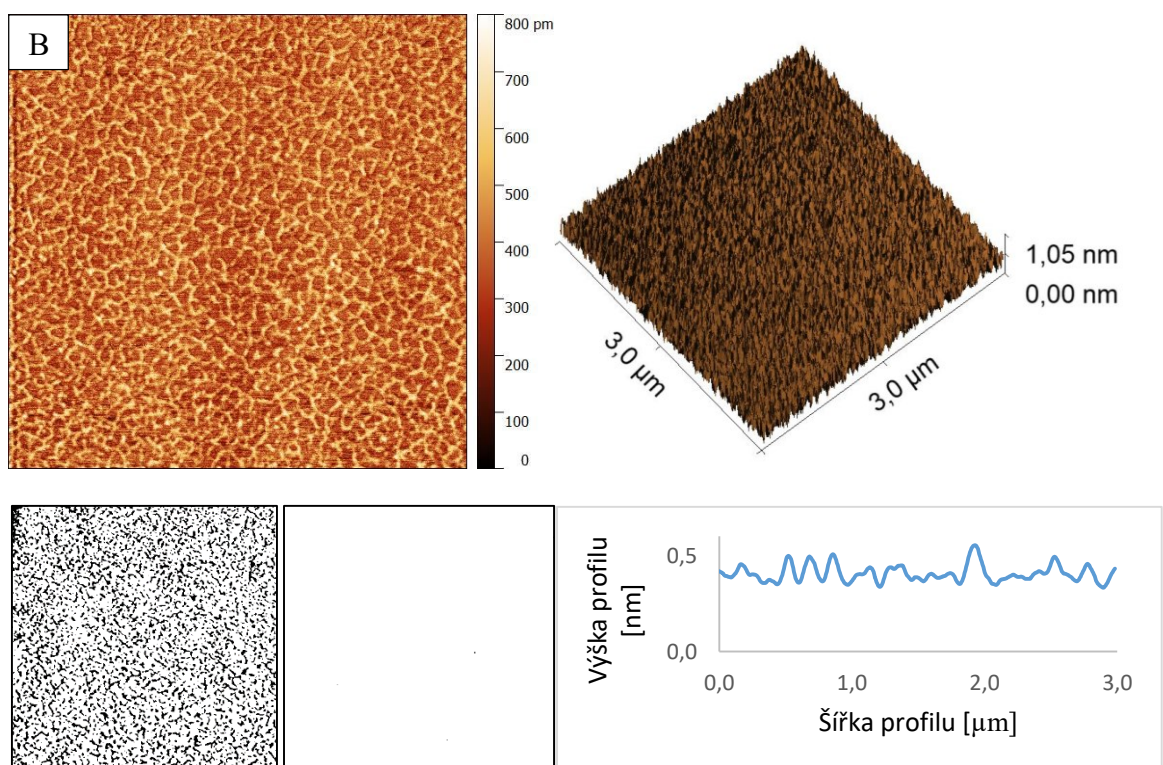
$R_a = (0,04 \pm 0,004) \text{ nm}$

$R_z = (0,42 \pm 0,09) \text{ nm}$

Obr. 22: Vliv hmotnostního podílu HA v roztoku na změnu vzhledu imobilizované vrstvy HA na povrchu slídy. Zásobní roztok byl připraven v TFFC zařízení při 50/7 °C při hmotnostním podílu A) 1 hm. %; B) 0,1 hm. % HA.

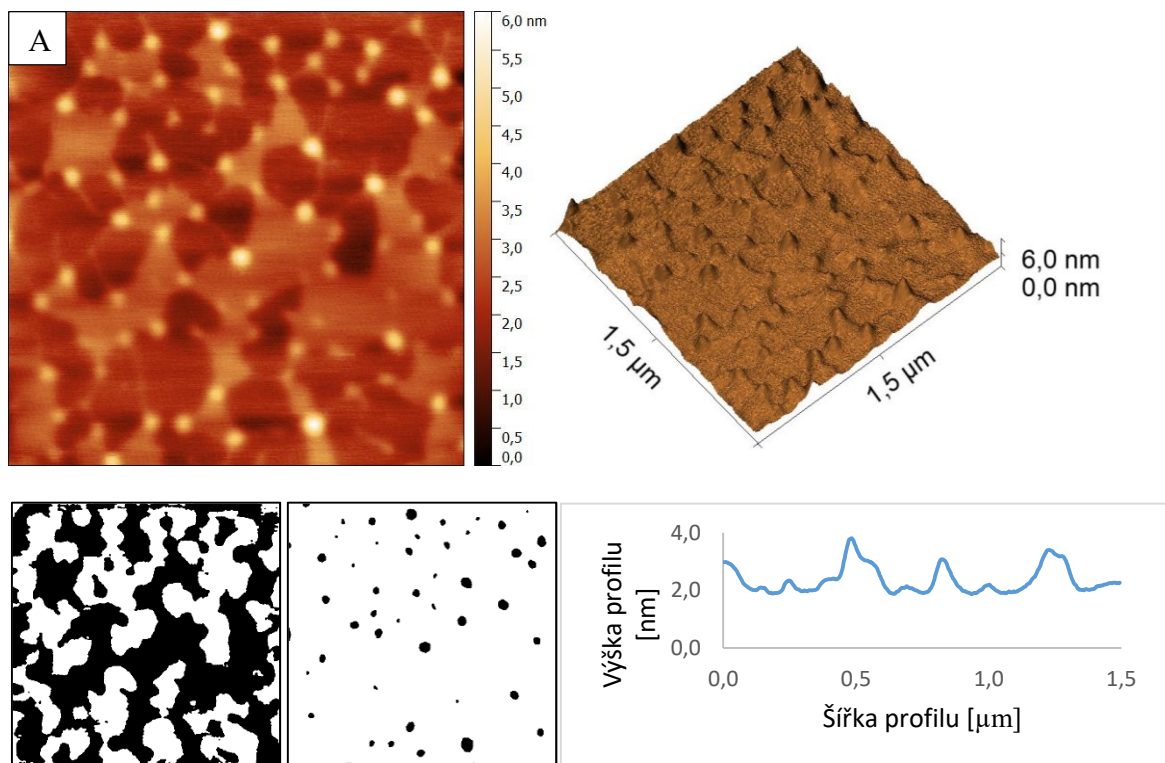


Celkové pokrytí: 23,8 % Pokrytí agregáty: 10,2 % $R_a = (0,27 \pm 0,08) \text{ nm}$ $R_z = (2,0 \pm 0,8) \text{ nm}$

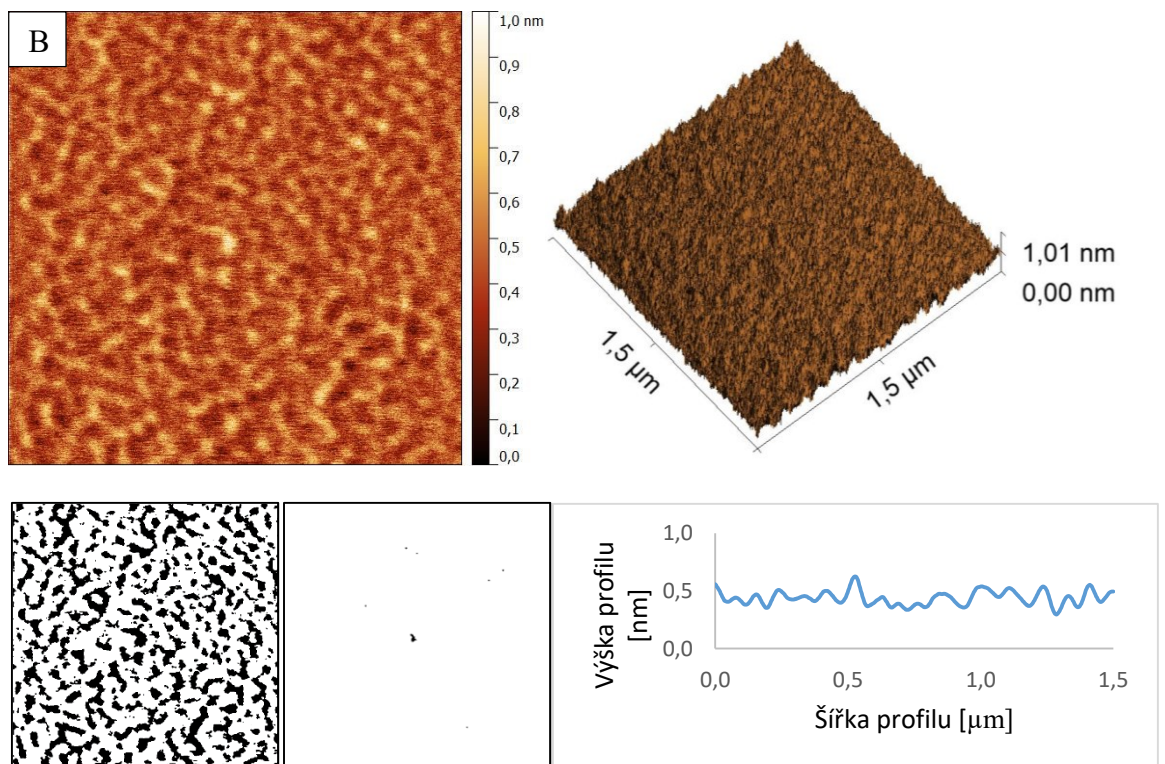


Celkové pokrytí: 22,1 % Pokrytí agregáty: 0,1 % $R_a = (0,068 \pm 0,005) \text{ nm}$ $R_z = (0,47 \pm 0,09) \text{ nm}$

Obr. 23: Vliv hmotnostního podílu HA v roztoku na změnu vzhledu imobilizované vrstvy HA na povrchu slidy. Zásobní roztok byl připraven v TFCC zařízení při 60/17 °C při hmotnostním podílu A) 1 hm. %; B) 0,1 hm. % HA. Plochy o rozměru 3 x 3 μm.



Celkové pokrytí: 54,3 % Pokrytí agregáty: 2,9 % $R_a = (0,15 \pm 0,03) \text{ nm}$ $R_z = (0,93 \pm 0,03) \text{ nm}$

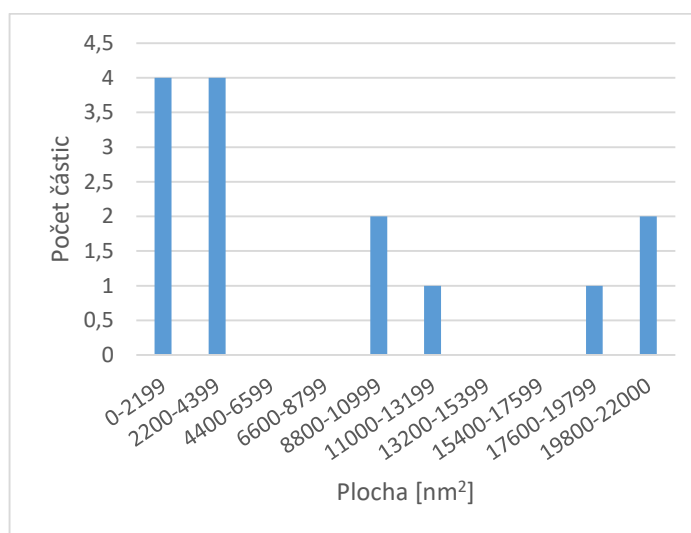


Celkové pokrytí: 30,7 % Pokrytí agregáty: 0,1 % $R_a = (0,062 \pm 0,03) \text{ nm}$ $R_z = (0,37 \pm 0,01) \text{ nm}$

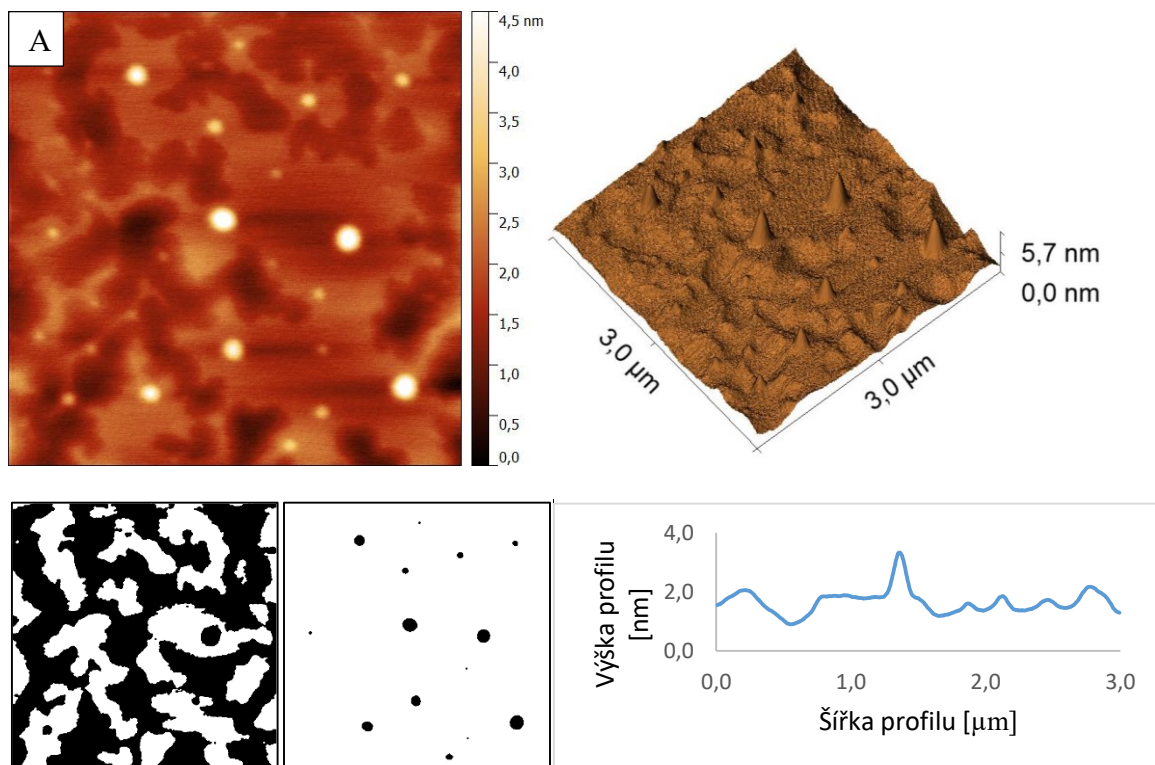
Obr. 24: Vliv hmotnostního podílu HA v roztoku na změnu vzhledu imobilizované vrstvy HA na povrchu slídy. Zásobní roztok byl připravován v TFCC zařízení při 60/17 °C při hmotnostním podílu A) 1 hm. %; B) 0,1 hm. % HA. Plochy o rozměru 1,5 x 1,5 μm.

5.3 Roztok HA připravovaný při pokojové teplotě na třepacím zařízení

Z výsledků uvedených výše plyne, že kromě teplotního spádu hraje významnou úlohu velikost střední teploty v roztoku. Jak moc je tato proměnná důležitá, ukazuje experiment, v němž byly polymerní roztoky rozpouštěny na třepacím zařízení při pokojové teplotě. Výsledky těchto experimentů jsou uvedeny na Obr. 25 a 26. Z těchto srovnání je opět vidět, že rozhodující je hmotnostní podíl polymeru v roztoku. Při této nejnižší teplotě rozpouštění (23 °C) vznikají na povrchu pro (1 hm. % HA) nejvíce rozlehlé síťové struktury polymerních řetězců kryté menším počtem agregovaných klubek, viz Obr. 26. Struktury imobilizované z výchozích roztoků obsahujících 0,1 hm. % HA jsou podobné strukturám připraveným při vyšší teplotě.



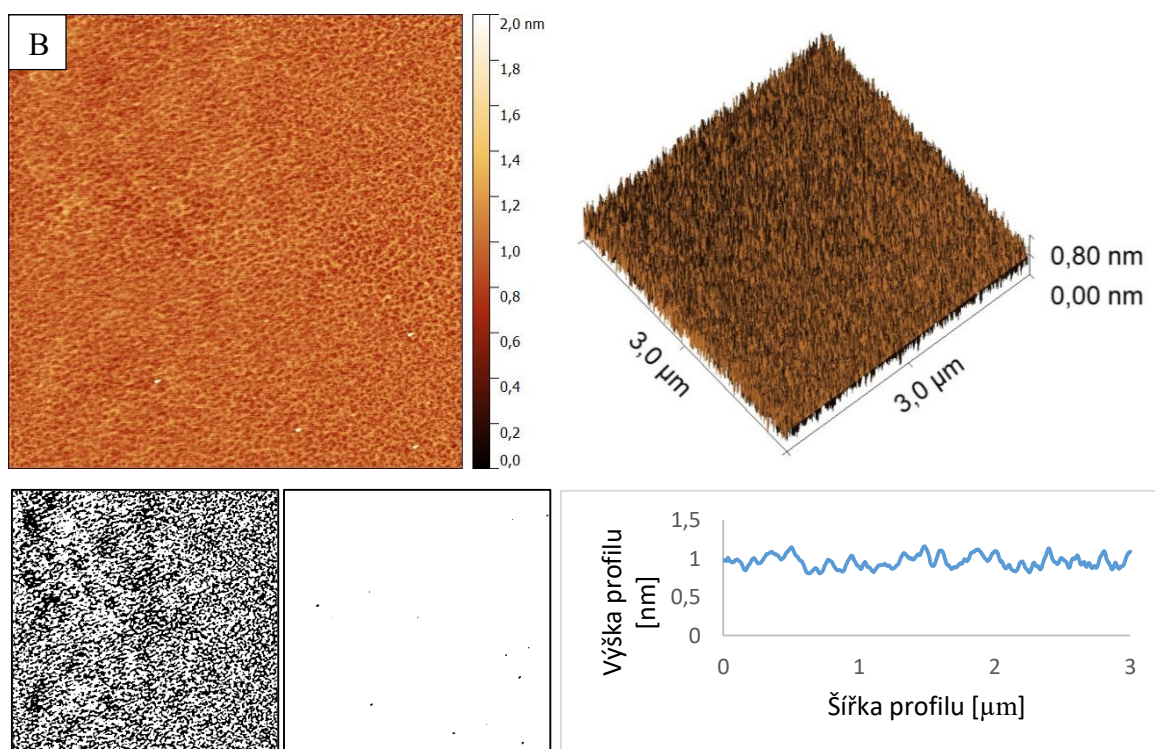
Obr. 25: Rozdělení plošných průřezu agregovaných klubek ve výšce 2,6 až 2,9 nm nad povrchem slídy pro vzorek prezentovaný na Obr. 26A.



Celkové pokrytí: 57,4 % Pokrytí agregáty: 1,2 %

$R_a = (0,08 \pm 0,02) \text{ nm}$

$R_z = (0,55 \pm 0,14) \text{ nm}$



Celkové pokrytí: 43,3 % Pokrytí agregáty: 0,1 %

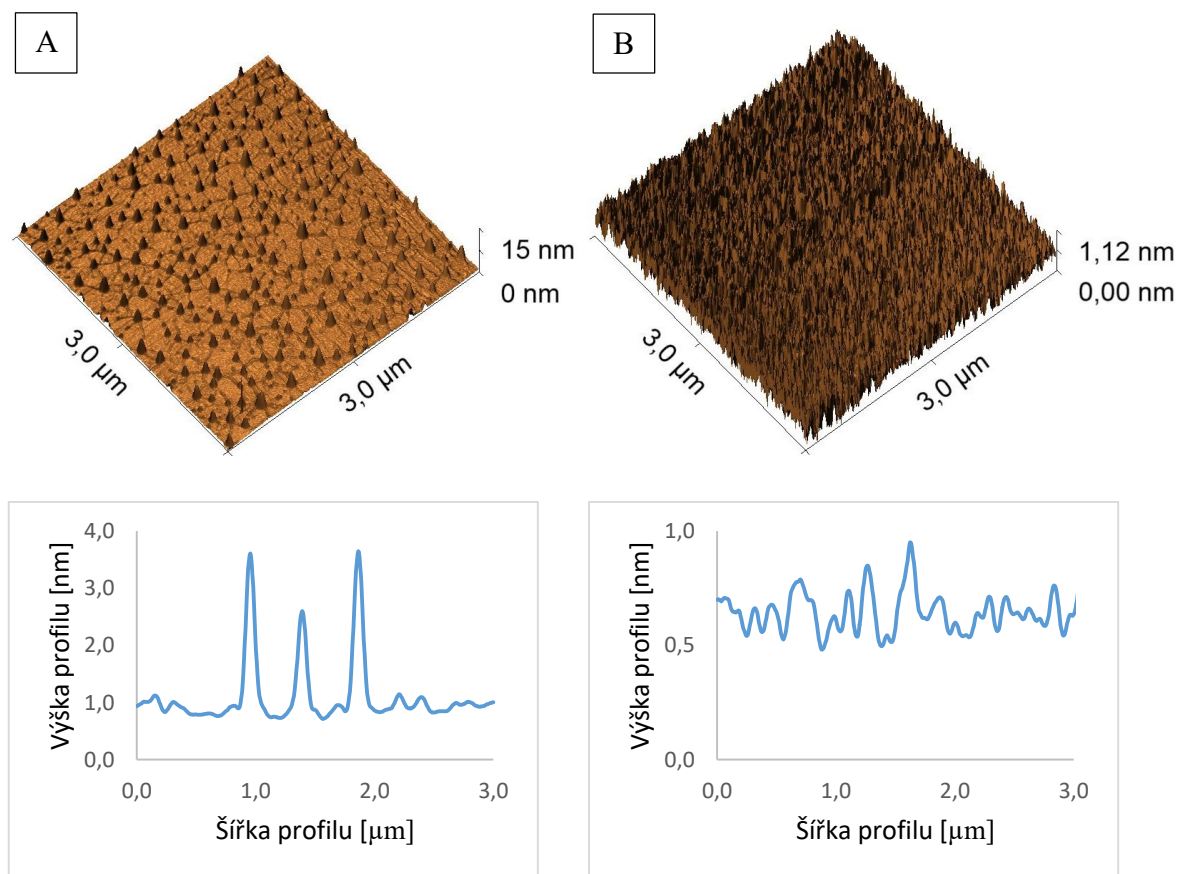
$R_a = (0,09 \pm 0,01) \text{ nm}$

$R_z = (0,56 \pm 0,04) \text{ nm}$

Obr. 26: *Vliv hmotnostního podílu HA v rozpouštěném vodném roztoku na změnu vzhledu imobilizované vrstvy na povrchu slídy. Zásobní roztoky byly připravovány na třepacím zařízení při 23°C: A) 1 hm. %; B) 0,1 hm. % HA ve vodě.*

5.4 Vliv doby skladování roztoků z filmů HA na změnu vzhledu imobilizovaných vrstev

Další proměnou, která byla v rámci experimentální části práce studována, byl vliv stárnutí připravené polymerního roztoku. Pro účely tohoto experimentu byl připravován speciální systém „roztok-film-roztok“. To znamená, že roztok použitý pro depozici na povrch byl připraven z filmu solidifikovaného při 50 °C do podoby filmu. Pro odlévání filmu byl použit roztok třepaný při pokojové teplotě po dobu 22 hodin. I v tomto případě byly porovnávány dva systémy lišící se hmotnostním podílem polymeru v roztoku. Na Obr. 27 jsou uvedeny 3D náhledy na imobilizovanou síť polymerních řetězců a klubek HA spolu s profilovými řezy. Na Obr. 28 lze pozorovat vývoj povrchových struktur s dobou skladování roztoku v lednici při 5-7 °C.

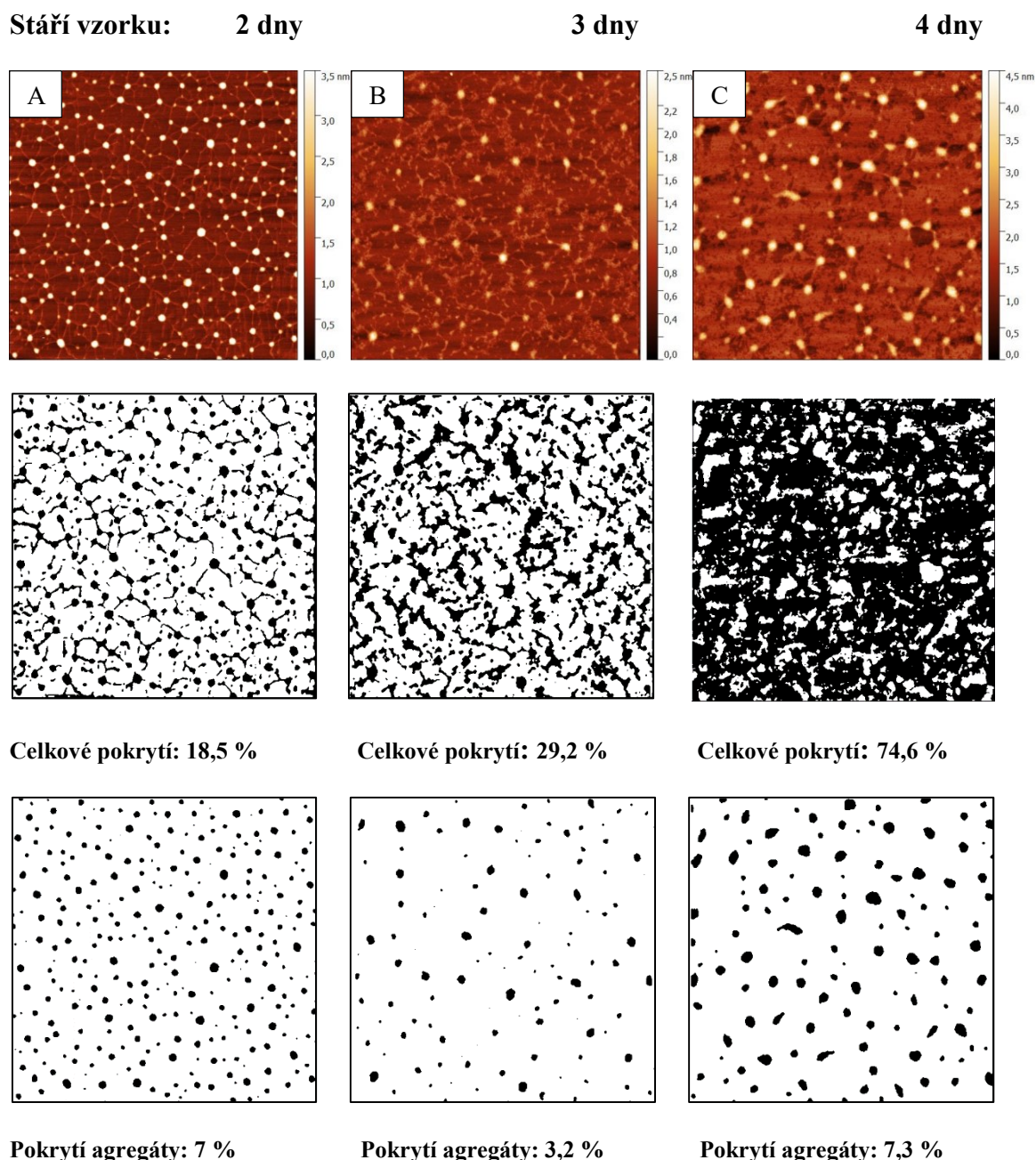


$R_a = (0,22 \pm 0,07) \text{ nm}$ $R_z = (1,9 \pm 0,3) \text{ nm}$

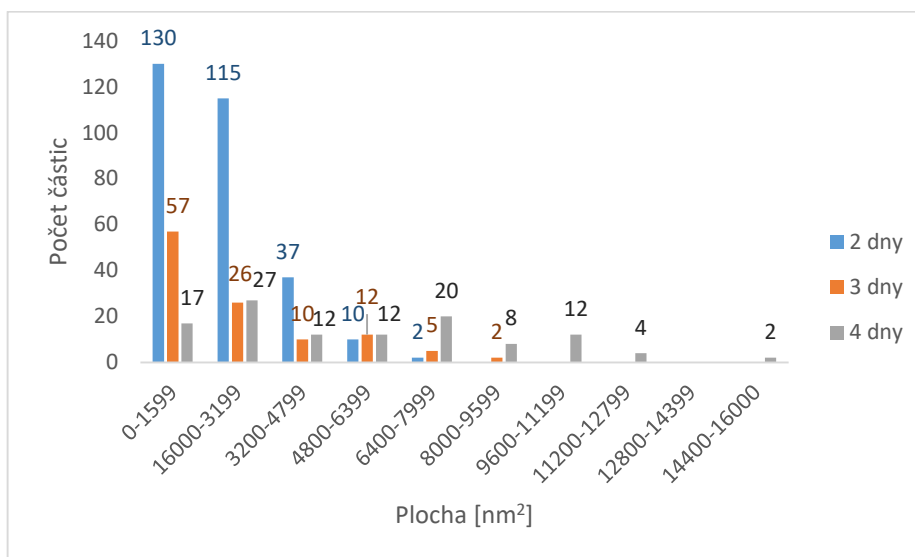
$R_a = (0,12 \pm 0,02) \text{ nm}$ $R_z = (0,70 \pm 0,05) \text{ nm}$

Obr. 27: Vzhledu imobilizované vrstvy HA na povrchu slídy z roztoků připravených prostřednictvím **solidifikovaných filmů**. Zásobní roztoky z filmů solidifikovaných z roztoků o hmotnostním podílu HA ve vodě: **A) 1 hm. % a B) 0,1 hm. %**. Nahoře 3D náhled na povrch vzorků druhý den od rozpuštění filmů. Dole profilové řezy ze středu vyobrazených ploch.

Na Obr. 28 můžeme pozorovat postupné rozpadání agregovaných polymerních klubek ve prospěch plošné síťové struktury řetězců HA třetí a čtvrtý den. Z Obr. 28 a 29 plyne, že klesá počet malých agregovaných shluků klubek. Na místo toho vznikají větší agregované celky v menší počtu. Povrchy byly připravovány tak, že prvotně rozpuštěný polymer byl skladován 4 dny v lednici a v daných časových intervalech byly odebrány vzorky roztoku.



Obr. 28: **Změny vzhledu** imobilizované vrstvy HA na povrchu slídy v čase pro roztok připravený z filmu solidifikovaného z 1 hm. % HA. Polymer deponován na povrch slídy: **A) 2 den; B) 3 den; C) 4 den** po rozpuštění. Nahoře 2D náhled na změnu povrchového reliéfu. Dole ve sloupcích prahované obrázky pro polymerní síť s agregáty (celkové pokrytí) a agregáty.

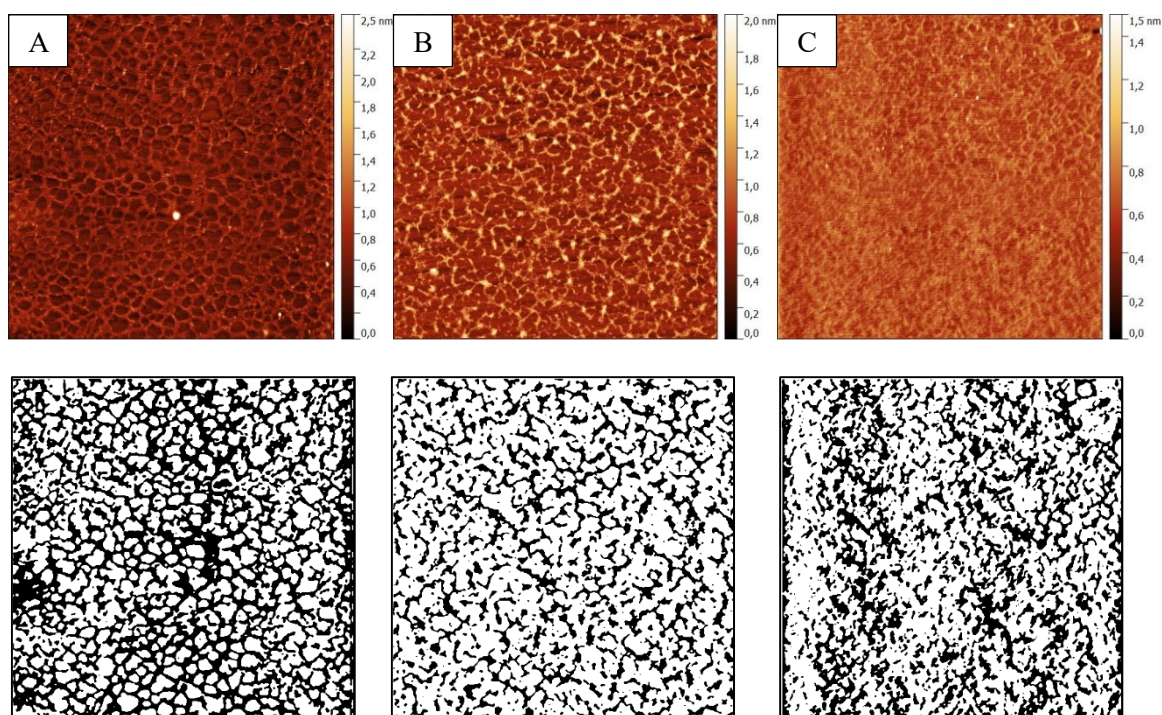


Obr. 29: Rozdělení plošných průřezu agregovaných klubek ve výšce 1,5 až 1,8 nm nad povrchem slídy pro vzorek prezentovaný na Obr. 28.

Stáří vzorku: 2 dny

3 dny

4 dny



Celkové pokrytí: 44,7 %

Celkové pokrytí: 26,8 %

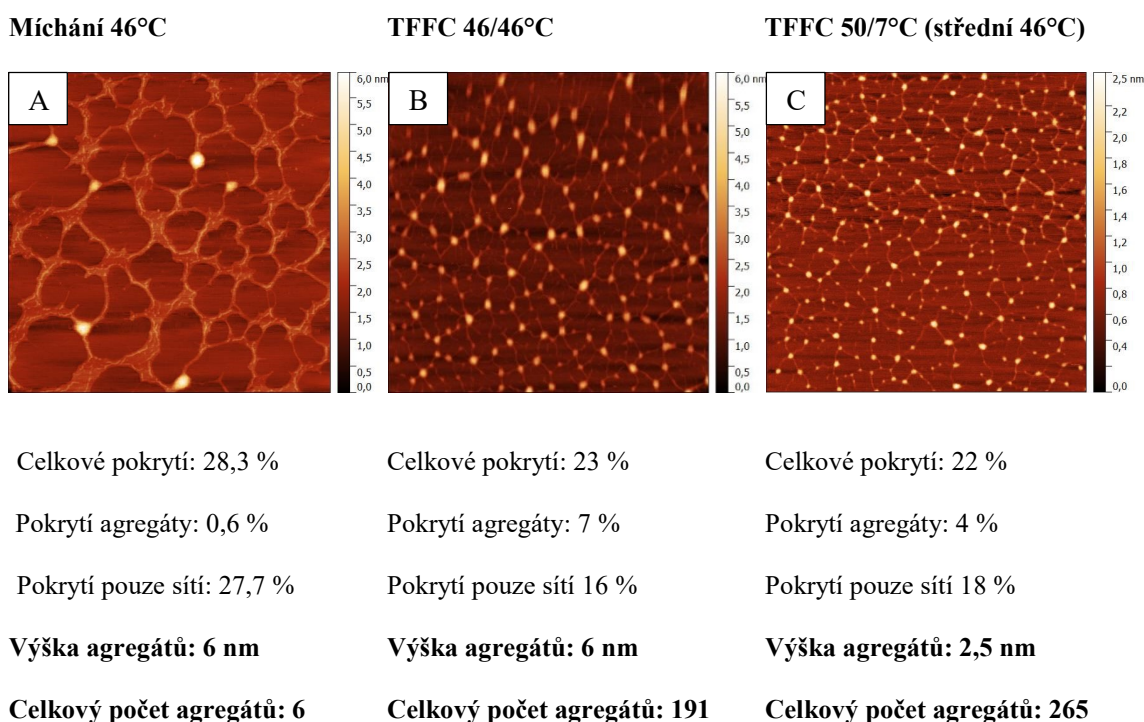
Celkové pokrytí: 33,8 %

Obr. 30: Změny vzhledu imobilizované vrstvy HA na povrchu slídy v čase pro roztok připravený z filmu solidifikovaného z 0,1 hm. % HA. Polymer deponován na povrch slídy: A) 2 den; B) 3 den; C) 4 den po rozpuštění. Nahoře 2D náhled na změnu povrchového reliéfu. Dole ve sloupcích zpracované obrázky pro polymerní síť s agregáty (celkové pokrytí). V případě tohoto typu vzorku nevnikaly žádné agregáty, proto zde nebyla prováděna obrazová analýza.

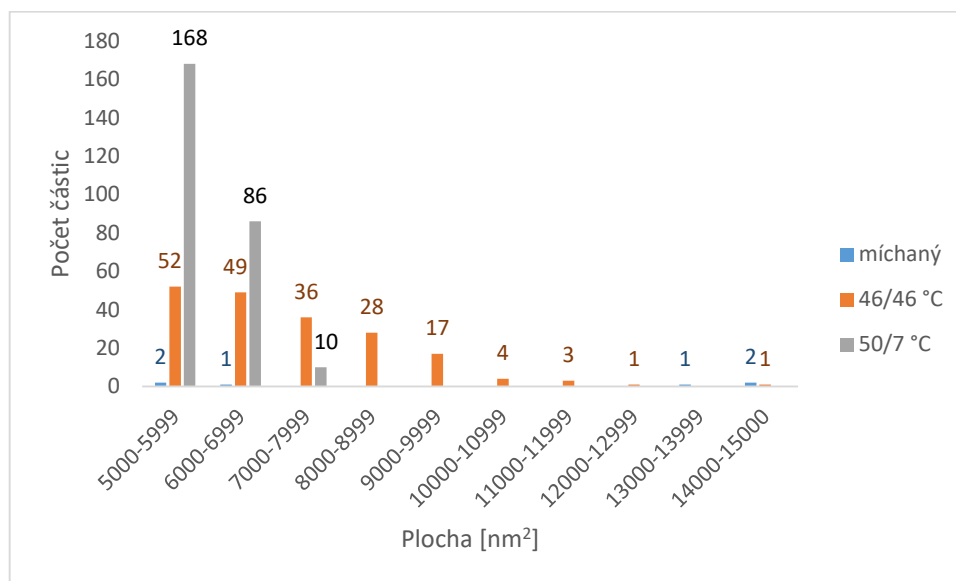
Stejně jako pro systém obsahující 1 hm. % HA ve výchozím roztoku, Obr. 28, lze v případě vzorků obsahujících pouze 0,1 hm. % HA pozorovat ne příliš výrazný rozpad síťové struktury HA, který se projevuje především v poklesu výšky zaznamenaných polymerních řetězců, viz Obr. 30.

5.5 Porovnání rozdílných přístupů přípravy polymerního roztoku HA

V prvním souhrnu, viz Obr. 31 jsou porovnávány rozdílné přístupy polymerního roztoku obsahujícího 0,5 hm. % HA. Z tohoto pozorování plyne, že přes srovnatelnou střední teplotu roztoku se změnou způsobu přípravy roztoku mění zejména počet agregátů a jejich výška. Podrobné rozdělení počtu agregátů podle jejich průměru je uvedeno na Obr. 32.

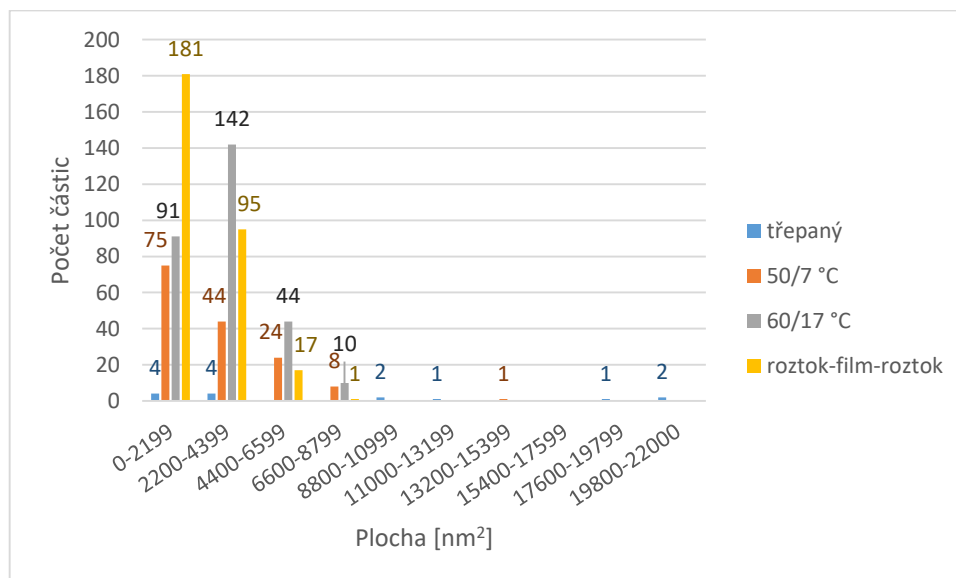


Obr. 31: Souhrnné srovnání vliv rozdílných způsobů přípravy na změnu vzhledu imobilizovaného vrstvy HA na povrchu slídy. Srovnávané vzorky obsahovaly 0,5 hm. % HA a byly rozpouštěny při srovnatelné střední teplotě roztoku 46 °C na: A) míchadle; B) v TFCC zařízení na 46/46 °C; C) v TFCC zařízení na 50/7 °C (střední teplota 46°C). Zobrazené obrázky pomocí AFM - 2D náhled na změnu povrchového reliéfu. Data uvedená pod obrázky byly získány z obrazové analýzy.

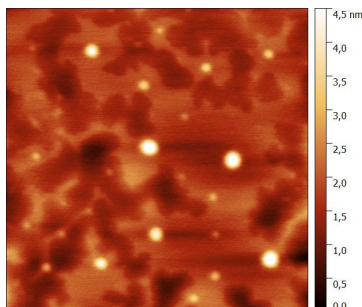


Obr. 32: Rozdělení plošných průřezu agregovaných klubek ve výšce 3,2 až 3,5 nm nad povrchem slídy pro vzorek prezentovaný na Obr. 31.

V druhém souhrnu výsledků jsou srovnávány systémy obsahující shodné množství polymeru v zásobním roztoku (1 hm. %), viz Obr. 33 a 34. Proměnou v tomto srovnání jsou střední teploty, velikosti teplotních spádů a případné mezikroky přípravy roztoků přes filmy. Tyto výsledky opět jasně ukazují, jak významný vliv mají tyto proměnné na změnu agregačních schopností HA na povrchu kladně nabitě slídy.



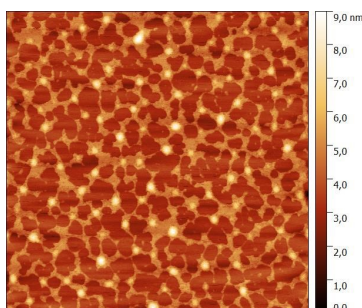
Obr. 33: Rozdělení plošných průřezu agregovaných klubek ve výšce 2 až 5 nm nad povrchem slídy pro vzorek prezentovaný na Obr. 34.

Třepání při 23°C

Celkové pokrytí: 57,4 %

Pokrytí agregáty: 1,2 %

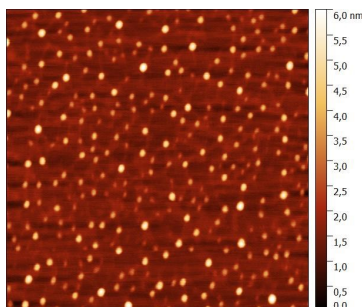
Pokrytí pouze sítí 56,2 %

Výška agregátů: 4,5 nm**Celkový počet agregátů: 14****TFFC spád 50/7 °C**

Celkové pokrytí: 38,7 %

Pokrytí agregáty: 4,8 %

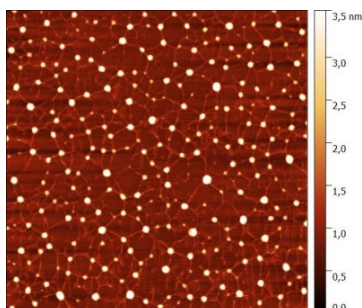
Pokrytí pouze sítí 33,9 %

Výška agregátů: 9 nm**Celkový počet agregátů: 152****TFFC spád 60/17 °C**

Celkové pokrytí: 23,8 %

Pokrytí agregáty: 10,2 %

Pokrytí pouze sítí 13,6 %

Výška agregátů: 6 nm**Celkový počet agregátů: 288****25°C třepaný roztok - 50°C sušený film - 25°C rozpouštěno**

Celkové pokrytí: 18,5 %

Pokrytí agregáty: 7 %

Pokrytí pouze sítí 11,5 %

Výška agregátů: 3,5 nm**Celkový počet agregátů: 295**

Obr. 34: Souhrnné srovnání vlivu rozdílných přístupů přípravy polymerního roztoku na změnu vzhledu imobilizované HA na povrchu slídy. Všechny vzorky obsahovaly 1 hm. % HA ve vodném roztoku před ředěním a depozicí na povrch slídy.

ZÁVĚR

Byl studován vliv rozdílných přístupů přípravy polymerních roztoků na agregační schopnost HA na povrchu kladně nabitě slídy. Zkoumán byl vliv teploty, teplotního spádu, hmotnostního podílu polymeru a doby skladování roztoků HA.

Vzorky připravované za vyšší teploty na míchadle se vyznačují zvýšenou schopností pokrývat povrch slídy polymerní sítí. V případě těchto systémů pozorujeme minimální množství agregovaných struktur.

Systémy připravované v TFFC zařízení při vyšší konstantní teplotě (58 °C) obsahují více menších agregovaných struktur a jsou více kryty polymerní sítí oproti vzorkům připravovaným při nižší teplotě (46 °C).

Vystavení (0,5 hm. %) roztoku HA účinkům teplotního spádu (50/7 °C a 60/17 °C) v průběhu rozpouštění má za následek pokles ve výšce a průměru agregovaných klube na povrchu slídy. Míra pokrytí povrchu síťovou strukturou izolovaných řetězců HA se v tomto případě výrazně nemění a odpovídá systémům připravovaným při za konstantních teplotních podmínek v TFFC zařízení.

Z experimentů věnovaných vlivu hmotnostního podílu polymeru na agregační schopnosti HA na povrchu kladně nabitě slídy vyplynulo, že tato proměnná má zásadní vliv na typ vznikající struktury. Systémy obsahující nejnižší hmotnostní podíl polymeru ve výchozím roztoku (0,1 hm. %) tvoří tenké polymerní sítě bez agregovaných polymerních klubek. Zatímco systémy s nejvyšším hmotnostním podílem polymeru v roztoku (1 hm. %) tvoří středně hustou síť polymerních řetězců s vysokým obsahem agregovaných polymerních klubek. Velikost těchto struktur je mimo jiné závislá na velikosti teplotního spádu a střední teploty jak bylo zmíněno výše.

V případě přípravy studovaných roztoků přes mezikrok tvorby filmu, lze na srovnávaných systémech pozorovat podobné struktury jako v případě systémů vystavených teplotním spádům. Výsledky věnované vlivu stárnutí na agregační schopnosti HA ukázaly, že bez ohledu na hmotnostní podíl polymeru se studovaný systém v čase vyvíjí. Mění se počet agregovaných struktur, plocha pokrytí povrchu sítí HA a výška zaznamenávaných agregátů a sítí.

Závěrečná srovnání ukázala, jaký vliv mají rozdílné přístupy přípravy na polymerní roztoky s daným hmotnostním podílem HA. Vystavení systému rozdílným účinkům smykového namáhání má za následek vznik rozdílného počtu a velikosti agregovaných klubek HA na úkor jejich tenkých polymerních sítí.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Mohan S, Oluwafemi OS, Kalarikkal N, Thomas S, Songca SP. Biopolymers – Application in Nanoscience and Nanotechnology. In: Perveen FK, ed. *Recent Advances in Biopolymers*. IntechOpen; 2016:47-72. doi:10.5772/62225.
2. Berg J, Tymoczko J, Stryer L. *Biochemistry*. fifth. W. H. Freeman; 2002.
3. Pratt CW, Cornely K. *Essential Biochemistry*. third. JOHN WILEY & SONS, INC.; 2012. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
4. Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. fourth. JOHN WILEY & SONS, INC.; 2011. http://www.americanbanker.com/issues/179_124/which-city-is-the-next-big-fintech-hub-new-york-stakes-its-claim-1068345-1.html%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15003161%5Cnhttp://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/cid/cir991%5Cnhttp://www.scielo.
5. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ. *Harperova Ilustrovaná Biochemie*. první. (Houdek L, ed.). Galén; 2012.
6. Oommen OP, Wang S, Hilborn J, Varghese OP. Chemical Modifications of Hyaluronan for Therapeutic Applications. In: Collins MN, ed. *Hyaluronic Acid for Biomedical and Pharmaceutical Applications*. Smithers Rapra Technology; 2014:149-176.
7. Dicker KT, Gurski LA, Pradhan-Bhatt S, Witt RL, Farach-Carson MC, Jia X. Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomater*. 2014;10(4):1558-1570. doi:10.1016/j.actbio.2013.12.019.
8. Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan): A review. *Vet Med (Praha)*. 2008;53(8):397-411.
9. Maytin E V. Hyaluronan: More than just a wrinkle filler. *Glycobiology*. 2016;26(6):553-559. doi:10.1093/glycob/cww033.
10. Day AJ, Sheehan JK. Hyaluronan: Polysaccharide chaos to protein organisation. *Curr Opin Struct Biol*. 2001;11(5):617-622. doi:10.1016/S0959-440X(00)00256-6.
11. Ström A, Larsson A, Okay O. Preparation and physical properties of hyaluronic acid-based cryogels. *J Appl Polym Sci*. 2015;132(29):1-11. doi:10.1002/app.42194.
12. Vasile D, Iancu R, Bogdanici C, Ungureanu E, Ciobotea D, Ciuluvica R. Chemo-physical Properties and Biomedical Applications of Hyaluronic Acid in Medicine.

- Rev Chim.* 2017;68(2):384-386.
13. Hargittai I, Hargittai M. Molecular structure of hyaluronan: An introduction. *Struct Chem.* 2008;19(5):697-717. doi:10.1007/s11224-008-9370-3.
 14. Robert L. Hyaluronan, a truly “youthful” polysaccharide. Its medical applications. *Pathol Biol.* 2015;63(1):32-34. doi:10.1016/j.patbio.2014.05.019.
 15. Yang C, Cao M, Liu H, et al. The high and low molecular weight forms of hyaluronan have distinct effects on CD44 clustering. *J Biol Chem.* 2012;287(51):43094-43107. doi:10.1074/jbc.M112.349209.
 16. Burdick JA, Prestwich GD. Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications. *Adv Mater.* 2013;23(12):H14-H56. doi:10.1002/adma.201003963.Hyaluronic.
 17. Maharjan AS, Pilling D, Gomer RH. High and low molecular weight hyaluronic acid differentially regulate human fibrocyte differentiation. *PLoS One.* 2011;6(10). doi:10.1371/journal.pone.0026078.
 18. Hemshekhar M, Thushara RM, Chandranayaka S, Sherman LS, Kemparaju K, Girish KS. Emerging roles of hyaluronic acid bioscaffolds in tissue engineering and regenerative medicine. *Int J Biol Macromol.* 2016;86:917-928. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.02.032.
 19. Kluge T, Masuda A, Yamashita K, Ushida K. Effects of Charge and Structure of Hyaluronic Acid on the Luminescence Quenching in Aqueous Solution. *Photochem Photobiol.* 1998;68(5):771-775. doi:10.1111/j.1751-1097.1998.tb02543.x.
 20. Smith DE, Babcock HP, Chu S. Single Polymer Dynamics in steady shear flow. *Science (80-).* 1999;283:1724-1727.
 21. Cowman MK, Schmidt TA, Raghavan P, Stecco A. Viscoelastic Properties of Hyaluronan in Physiological Conditions. *F1000Research.* 2015;(May):1-13. doi:10.12688/f1000research.6885.1.
 22. Schanté CE, Zuber G, Herlin C, Vandamme TF. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydr Polym.* 2011;85(3):469-489. doi:10.1016/j.carbpol.2011.03.019.
 23. Lapčík L, Lapčík L, De Smedt S, Demeester J, Chabreček P. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications †. *Chem Rev.* 1998;98(8):2663-2684. doi:10.1021/cr941199z.

24. Halasová T, Krouská J, Mravec F, Pekař M. Hyaluronan-surfactant interactions in physiological solution studied by tensiometry and fluorescence probe techniques. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2011;391(1-3):25-31. doi:10.1016/j.colsurfa.2011.05.035.
25. GRIBBON P, HENG BC, HARDINGHAM TE. The analysis of intermolecular interactions in concentrated hyaluronan solutions suggest no evidence for chain–chain association. *Biochem J.* 2000;350(1):329. doi:10.1042/0264-6021:3500329.
26. Wang Y, Xu Q. Hyaluronic Acid Hydrogel: A Favourable Niche for Neural Stem Cells. In: *Hyaluronic Acid for Biomedical and Pharmaceutical Applications.* Smithers Rapra Technology; 2014:1-19.
27. Huang G, Huang H. Application of hyaluronic acid as carriers in drug delivery. *Drug Deliv.* 2018;25(1):766-772. doi:10.1080/10717544.2018.1450910.
28. Schwartz GA, Jaume N. Encyclopaedia Imaging by touching: Atomic force microscopy. *Philos Photogr.* 2018;9(1):41-52. doi:10.1386/pop.9.1.41.
29. El Kirat K, Burton I, Dupres V, Dufrene YF. Sample preparation procedures for biological atomic force microscopy. *J Microsc.* 2005;218(3):199-207. doi:10.1111/j.1365-2818.2005.01480.x.
30. Lyubchenko YL, Gall a a, Shlyakhtenko LS, et al. Atomic force microscopy imaging of double stranded DNA and RNA. *J Biomol Struct Dyn.* 1992;10(3):589-606. doi:10.1080/07391102.1992.10508670.
31. Maver U, Velnar T, Gaberšček M, Planinšek O, Finšgar M. Recent progressive use of atomic force microscopy in biomedical applications. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2016;80:96-111. doi:10.1016/j.trac.2016.03.014.
32. Kubínek R, Mašláň M, Vůjtek M. *Mikroskopie Skenující Sondou.* první. Universita Palackého; 2003.
33. Wang J, Nie S. Application of atomic force microscopy in microscopic analysis of polysaccharide. *Trends Food Sci Technol.* 2018;(February):0-1. doi:10.1016/j.tifs.2018.02.005.
34. Kirby AR, Gunning AP, Morris VJ, Ridout MJ. Observation of the helical structure of the bacterial polysaccharide acetan by atomic force microscopy. *Biophys J.* 1995;68(1):360-363. doi:10.1016/S0006-3495(95)80195-5.
35. Cowman MK, Li M, Balazs EA. Tapping mode atomic force microscopy of

- hyaluronan: Extended and intramolecularly interacting chains. *Biophys J.* 1998;75(4):2030-2037. doi:10.1016/S0006-3495(98)77645-3.
36. Cowman MK, Spagnoli C, Kudasheva D, et al. Extended, relaxed, and condensed conformations of hyaluronan observed by atomic force microscopy. *Biophys J.* 2005;88(1):590-602. doi:10.1529/biophysj.104.049361.
37. Cowman MK, Matsuoka S. Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydr Res.* 2005;340(5):791-809. doi:10.1016/j.carres.2005.01.022.
38. Jacoboni I, Valdrè U, Mori G, Quaglino D, Pasquali-Ronchetti I. Hyaluronic acid by atomic force microscopy. *J Struct Biol.* 1999;126(1):52-58. doi:10.1006/jsbi.1999.4090.
39. Minařík A, Smolka P, Minařík M, et al. A special instrument for the defined modification of polymer properties in solutions and polymer layers. *Meas J Int Meas Confed.* 2017;97:218-225. doi:10.1016/j.measurement.2016.11.006.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

DNA	Deoxyribonukleová kyselina
RNA	Ribonukleová kyselina
HA	Kyselina hyaluronová (hyaluronan sodný, hyaluronan)
NMR	Nukleární magnetická rezonance
HMWHA	Vysokomolekulární kyselina hyaluronová
LMWHA	Nízkomolekulární kyselina hyaluronová
FRAP	Obnovení fluorescence po fotovybělení
FA-HA	Hyaluronan označený fluorescein aminem
AFM	Mikroskopie atomárních sil
SPM	Mikroskopie skenující sondou
Ra	Střední drsnost
Rz	Střední nejvyšší výška profilu

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1: Chemická struktura kyseliny hyaluronové</i> ⁶	14
<i>Obr. 2: Schéma HA trisacharidu</i> ¹⁰	15
<i>Obr. 3: Změny uspořádání HA v závislosti na podmínkách přípravy vzorku</i> ¹³	16
<i>Obr. 4: Schéma jednoduchého smykového toku složeného z elongační a rotační složky</i> ²⁰	18
<i>Obr. 5: Schéma chování polymeru ve smykovém toku</i> ²⁰	19
<i>Obr. 6: a) Schéma AFM, b) Silové působení v AFM měření</i> ³¹	22
<i>Obr. 7: Obrázek nataženého HA řetězce získaný poklepovým režimem AFM na povrchu slídy: A) Měřená plocha o velikosti 5,1 x 5,1 μm a výšce řetězce 1,5 nm, B) Obrázek řetězce se smyčkou na ploše o velikosti 5,1 x 5,1 μm a výšce řetězce 1,5 nm</i> ³⁵	24
<i>Obr. 8: Natažená forma bakteriální LMWHA získána skenováním AFM v poklepovém režimu</i> ³⁶	24
<i>Obr. 9: Relaxovaná forma HA</i> ³⁷	25
<i>Obr. 10: Relaxované a částečně kondenzované HA řetězce</i> ³⁷	25
<i>Obr. 11: Částečně relaxovaná LMWHA na povrchu slídy skenovaná semikontaktním režimem AFM</i> ³⁶	26
<i>Obr. 12: HMWHA (2·10⁶ Da) snímána poklepovým režimem AFM na povrchu slídy: (a), o koncentraci 1 mg/ml (b) a 0,1 mg/ml (c), na (d) je zvětšený snímek struktury HA</i> ³⁸	27
<i>Obr. 13: TFFC: a) experimentální přístroj pro definovanou modifikaci polymerních roztoků, b) funkční subjednotka, c) náhled na střední část funkční subjednotky</i> ³⁹	30
<i>Obr. 14: Použitý mikroskop atomárních sil NTEGRA Prima</i>	31
<i>Obr. 15: Vzhled imobilizované vrstvy HA na povrchu slídy. Zásobní roztok 0,5 hm. % HA ve vodě byl připravován na míchadle při 46°C</i>	32
<i>Obr. 16: Rozdělení plošných průřezu agregovaných klubek ve výšce 3,2 až 3,5 nm nad povrchem slídy pro vzorek prezentovaný na Obr. 15.</i>	33
<i>Obr. 17: Rozdělení plošných průřezu agregovaných klubek ve výšce 2,0 až 2,3 nm nad povrchem slídy pro vzorek prezentovaný na Obr. 18A a 18B.</i>	34
<i>Obr. 18: Vliv střední teploty na změnu vzhledu imobilizované vrstvy HA na povrchu slídy. Zásobní roztok 0,5 hm. % HA ve vodě byl připravován v TFFC zařízení při A) 46/46 °C; B) 58/58 °C.</i>	35

- Obr. 19: Rozdělení plošných průřezu agregovaných klubek ve výšce 1,3 až 1,5 nm nad povrchem slídy pro vzorek prezentovaný na Obr. 20A a 20B.36
- Obr. 20: **Vliv velikosti teplotního spádu** na změnu vzhledu imobilizovaného vrstvy HA na povrchu slídy. Zásobní roztok **0,5 hm. % HA** ve vodě byl připravován v **TFFC** zařízení při **A) 50/7 °C, B) 60/17 °C**.37
- Obr. 21: Rozdělení plošných průřezu agregovaných klubek: ve výšce 5,2 až 5,5 nm nad povrchem slídy pro vzorek prezentovaný na Obr. 22A – spád 50/7 °C (vlevo); ve výšce 2,0 až 2,3 nm nad povrchem slídy pro vzorek prezentovaný na Obr. 23A – spád 60/17 °C (vpravo)38
- Obr. 22: **Vliv hmotnostního podílu HA v roztoku** na změnu vzhledu imobilizovaného vrstvy HA na povrchu slídy. Zásobní roztok byl připravován v **TFFC** zařízení při 50/7 °C při hmotnostním podílu **A) 1 hm. %; B) 0,1 hm. % HA**.39
- Obr. 23: **Vliv hmotnostního podílu HA v roztoku** na změnu vzhledu imobilizovaného vrstvy HA na povrchu slídy. Zásobní roztok byl připravován v **TFFC** zařízení při 60/17 °C při hmotnostním podílu **A) 1 hm. %; B) 0,1 hm. % HA**. Plochy o rozměru **3 x 3 μm**.40
- Obr. 24: **Vliv hmotnostního podílu HA v roztoku** na změnu vzhledu imobilizovaného vrstvy HA na povrchu slídy. Zásobní roztok byl připravován v **TFFC** zařízení při 60/17 °C při hmotnostním podílu **A) 1 hm. %; B) 0,1 hm. % HA**. Plochy o rozměru **1,5 x 1,5 μm**.41
- Obr. 25: Rozdělení plošných průřezu agregovaných klubek ve výšce 2,6 až 2,9 nm nad povrchem slídy pro vzorek prezentovaný na Obr. 26A.42
- Obr. 26: **Vliv hmotnostního podílu HA v rozpouštěném vodním roztoku** na změnu vzhledu imobilizovaného vrstvy na povrchu slídy. Zásobní roztoky byly připravovány na třepacím zařízení při 23°C: **A) 1 hm. %; B) 0,1 hm. % HA** ve vodě.43
- Obr. 27: Vzhledu imobilizovaného vrstvy HA na povrchu slídy z roztoků připravených prostřednictvím **solidifikovaných filmů**. Zásobní roztoky z filmů solidifikovaných z roztoků o hmotnostním podílu HA ve vodě: **A) 1 hm. % a B) 0,1 hm. %**. Nahoře 3D náhled na povrch vzorků druhý den od rozpuštění filmů. Dole profilové řezy ze středu vyobrazených ploch.44
- Obr. 28: **Změny vzhledu imobilizovaného vrstvy HA na povrchu slídy v čase pro roztok připravený z filmu solidifikovaného z 1 hm. % HA**. Polymer deponován

- na povrch slídy: **A) 2 den; B) 3 den; C) 4 den** po rozpuštění. Nahoře 2D náhled na změnu povrchového reliéfu. Dole ve sloupcích prahované obrázky pro polymerní síť s agregáty (celkové pokrytí) a agregáty.....45
- Obr. 29: Rozdělení plošných průřezu agregovaných klubek ve výšce 1,5 až 1,8 nm nad povrchem slídy pro vzorek prezentovaný na Obr. 28.46
- Obr. 30: **Změny vzhledu** imobilizovaného vrstvy HA na povrchu slídy **v čase pro roztok připravený z filmu** solidifikovaného z **0,1 hm. % HA**. Polymer deponován na povrch slídy: **A) 2 den; B) 3 den; C) 4 den** po rozpuštění. Nahoře 2D náhled na změnu povrchového reliéfu. Dole ve sloupcích prahované obrázky pro polymerní síť s agregáty (celkové pokrytí). V případě tohoto typu vzorku nevznikaly žádné agregáty, proto zde nebyla prováděna obrazová analýza. ...46
- Obr. 31: Souhrnné srovnání vliv rozdílných způsobů přípravy na změnu vzhledu imobilizovaného vrstvy HA na povrchu slídy. Srovnávané vzorky obsahovaly **0,5 hm. % HA** a byly rozpouštěn při srovnatelné **střední teplotě roztoku 46 °C** na: **A) míchadle; B) v TFFC zařízení na 46/46 °C; C) v TFFC zařízení na 50/7 °C** (střední teplota 46°C). Zobrazené obrázky pomocí AFM - 2D náhled na změnu povrchového reliéfu. Data uvedená pod obrázky byly získány z obrazové analýzy.47
- Obr. 32: Rozdělení plošných průřezu agregovaných klubek ve výšce 3,2 až 3,5 nm nad povrchem slídy pro vzorek prezentovaný na Obr. 31.48
- Obr. 33: Rozdělení plošných průřezu agregovaných klubek ve výšce 2 až 5 nm nad povrchem slídy pro vzorek prezentovaný na Obr. 34.48
- Obr. 34: Souhrnné srovnání vlivu rozdílných přístupů přípravy polymerního roztoku na změnu vzhledu imobilizované HA na povrchu slídy. Všechny vzorky obsahovaly **1 hm. % HA** ve vodném roztoku před ředěním a depozicí na povrch slídy.49