

# Testování povrchové aktivity hyaluronanu sodného

Tereza Dehnerová

---

Bakalářská práce  
2018

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky  
akademický rok: 2017/2018

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Tereza Dehnerová**  
Osobní číslo: **T15203**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie výroby tuků, kosmetiky a detergentů**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Testování povrchové aktivity hyaluronanu sodného**

Zásady pro vypracování:

- 1. Povedte literární rešerši na dané téma.**
- 2. Připravte vodné roztoky hyaluronanu sodného za rozdílných fyzikálních podmínek.**
- 3. Dostupnými technikami otestujte změny povrchové aktivity dispergovaného polymerního systému.**
- 4. Získané výsledky přehledně diskutujte a uveďte v závěrech bakalářské práce.**

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. Jones R. A. L., *Polymers at Surfaces and Interfaces*, Cambridge University Press, 1999, ISBN-13-978-521-47965-3
2. Temenoff, J.S.: *Biomaterials: The Intersection of Biology and Materials Science*, Rice University, 2009, ISBN-13:9780130097101
3. Sanchez I.C., *Physics of Polymer Surfaces and Interfaces*, Butterworth-Heinemann, 1992, ISBN 0-7506-9214-6
4. Teraoka I., *Polymer Solutions: An Introduction to Physical Properties*, John Wiley & Sons, 2002, ISBN:0-471-38929-3

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Antonín Minařík, Ph.D.**

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

**5. února 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**18. května 2018**

Ve Zlíně dne 5. února 2018



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



doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: Dehnerová Tereza      Obor: Technologie výroby tuků, kosmetiky a detergentů

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 15.5.2018.....

  
.....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **ABSTRAKT**

Bakalářská práce se zabývá hyaluronanem sodným s ohledem na jeho strukturu, vlastnosti a následné praktické aplikace nejen v kosmetice. Praktická část práce řeší problematiku chování hyaluronanu na fázových rozhraních. Je zde studován vliv procesních parametrů přípravy roztoků hyaluronanu sodného na změnu jeho povrchové aktivity. Studovanými procesními parametry byly způsob rozpouštění, teplota, teplotní spád, hmotnostní podíl polymeru v roztoku, čas, sušení polymerního roztoku a jeho rozpouštění. Připravené vzorky byly charakterizovány s ohledem na změnu povrchového napětí pomocí tenziometrie. Změny ve střední velikosti polymerních klubek byly charakterizovány pomocí dynamického rozptylu světla. Z experimentálních výsledků vyplynulo, že studovaný systém, hyaluronan sodný o střední molekulové hmotnosti 370 kDa, může za určitých podmínek vykazovat zvýšenou povrchovou aktivitu, která je přímo spojena se změnami střední velikosti jeho klubek.

Klíčová slova: hyaluronan sodný, rozpouštění, sušení, povrchové napětí, velikost klubek

## **ABSTRACT**

The bachelor thesis deals with sodium hyaluronate with respect to its structure, properties and subsequent practical applications, not only in cosmetics. The practical part deals with hyaluronan behavior at the phase interfaces. The influence of processing parameters of the preparation of sodium hyaluronate solutions on the change of its surface activity has been studied. These studied processing parameters were dissolution method, temperature, temperature gradient, mass portion of the polymer in the solution, time, drying of the polymer solution and its dissolution. Prepared samples were characterized by changes in the surface tension using tensiometry. Changes in the average size of the polymer coils were characterized by dynamic light scattering. Experimental results show that the studied system, sodium hyaluronate of an average molecular weight of 370 kDa, might, under certain conditions, exhibit an increased surface activity which is directly related to changes in the average size of its coils.

Keywords: sodium hyaluronate, dissolution, drying, surface tension, size of the coils

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Antonínu Minaříkovi, Ph.D. za ochotu, čas a péči, které mi věnoval po celou dobu její realizace.

Dále bych ráda poděkovala Ing. Lence Musilové za její ochotu a čas, který mi věnovala při práci se Zetasizerem a následným zpracováním naměřených dat.

Poděkování bych ráda věnovala i celé mé rodině, a to za podporu při studiu.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 HYALURONAN SODNÝ</b> .....	<b>12</b>
1.1 Vliv molekulové hmotnosti HA na její funkci.....	14
1.2 Vlivy působící degradace na HA.....	15
1.2.1 UV záření a HA.....	16
1.3 Povrchové vlastnosti polysacharidů.....	17
<b>2 HYALURONAN SODNÝ V SOUVISLOSTI S LIDSKÝM TĚLEM</b> .....	<b>21</b>
2.1 Stárnutí a změny obsahu HA v kůži.....	21
2.2 HA a <i>STRATUM CORNEUM</i> .....	21
2.2.1 HA a kosmetická tkáňová augmentace.....	22
2.2.2 HA a hojení ran.....	22
2.2.3 HA a léčba kožních onemocnění.....	23
2.3 Zvýšení vlhkosti pokožky modulací hyaluronanu.....	23
2.3.1 $\alpha$ -hydroxykyseliny.....	23
2.3.2 Kyselina retinová a její vliv na přítomnost HA.....	24
2.4 Perspektivy HA v kosmetice.....	24
2.5 Další praktické aplikace HA.....	24
2.5.1 Deriváty HA pro mazání kloubů.....	24
2.5.2 Deriváty HA pro oční léčbu.....	26
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>27</b>
<b>3 PŘÍPRAVA VZORKŮ</b> .....	<b>28</b>
3.1 Použité chemikálie.....	28
3.2 Čistění skla.....	28
3.3 Technologické způsoby přípravy roztoků HA.....	29
3.3.1 Třepací zařízení.....	29
3.3.2 Míchací zařízení.....	29
3.3.3 Přístroj generující samoorganizovaný pohyb tekutiny (TFFC).....	30
3.3.4 Speciální přístroj pro přesné ovládání samoorganizované přípravy staveb v polymerních vrstvách (MCDS).....	31
3.3.5 Sušící zařízení Memmert.....	32
3.4 Zařízení pro kontrolu teploty během přípravy vzorků.....	33
<b>4 POUŽITÉ MĚŘÍCÍ TECHNIKY A ZAŘÍZENÍ</b> .....	<b>35</b>
4.1 Charakterizace změn povrchové aktivity.....	35
4.1.1 Tenzimetrie – Wilhelmyho destičková metoda.....	35
4.2 Charakterizace změn střední velikosti polymerních klubek.....	36
4.2.1 Dynamický rozptyl světla.....	36
<b>5 VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>38</b>
5.1 Vlivy procesních parametrů přípravy roztoku HA na změnu povrchové aktivity polymeru.....	38
5.1.1 Porovnání rozdílných režimů přípravy roztoku.....	39
5.1.2 Roztoky připravované třepáním.....	40



5.1.3	Roztoky připravované v teplotním spádu .....	41
5.1.3.1	Vliv hmotnostního podílu polymeru v roztoku.....	42
5.1.3.2	Vliv velikosti teplotního spádu .....	43
5.1.3.3	Vliv velikosti teplotního spádu při rovnoměrném přestupu tepla.....	45
5.1.4	Změny povrchové aktivity roztoků připravených z vysušených filmů .....	47
5.2	URČENÍ VELIKOSTI POLYMERNÍCH KLUBEK V ROZTOKU.....	48
<b>ZÁVĚR</b>	.....	<b>50</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b>	.....	<b>51</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b>	.....	<b>56</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b>	.....	<b>58</b>
<b>SEZNAM TABULEK</b>	.....	<b>61</b>

## ÚVOD

Hyaluronan sodný (HA) je přírodní polysacharid. Jako látka tělu vlastní dokáže vytvářet vysoce viskózní roztoky a vázat na sebe velké množství vody. Proniká kůží, přičemž je tato penetrace závislá na jeho molekulové hmotnosti. Tento polymer se široce využívá v řadě kosmetických a farmaceutických aplikací. Lze jej aplikovat v mnoha formách, jako jsou polymerní roztoky, hydrogely, filmy a vlákna. Jak je známo, funkce tohoto polymeru je podmínována jeho molekulovou hmotností a konformací, ve které se nachází.

Teoretická část této práce se zabývá hyaluronanem sodným, jeho vlastnostmi, a chováním za rozdílných podmínek. Druhá část práce pojednává o aplikacích hyaluronanu sodného v kosmetice a farmacii, jeho přínosy a perspektivami při léčbě kožních onemocnění, hojení ran atd.

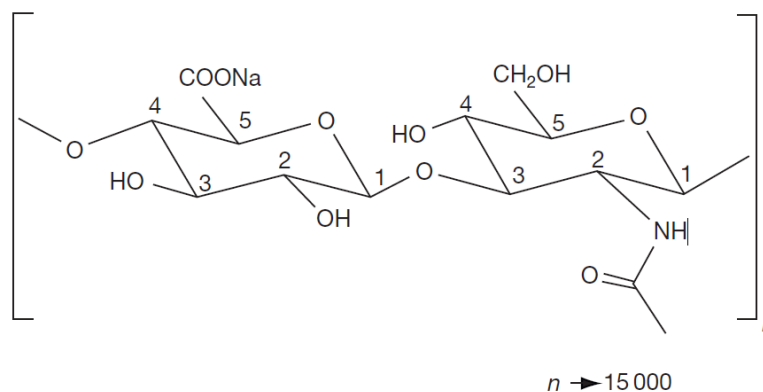
Praktická část je věnována testování změn povrchové aktivity polymerních roztoků hyaluronanu sodného o střední molekulové hmotnosti 370 kDa pomocí Wilhelmyho destičkové metody. Mimo to byly charakterizovány změny střední velikosti polymerních klubek pomocí dynamického rozptylu světla.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 HYALURONAN SODNÝ

Obecný termín hyaluronan zahrnuje volnou kyselinu a soli kyseliny hyaluronové bez ohledu na stupeň disociace nebo identitu protiiontu (např. sodíku, draslíku, vápníku). Zkratka HA nyní označuje kyselinu hyaluronovou, hyaluronát nebo hyaluronan v závislosti na kontextu, ve kterém je uveden. Hyaluronan, jako aniontový polymer, polyelektrolyt, polysacharid s vysokou molekulovou hmotností, spadá mezi glykosaminoglykany (GAG). Na rozdíl od jiných GAG je nesulfátovaný. Jeho molekulová hmotnost může být řádově několik milionů, což má za následek vznik velmi viskózních vodných roztoků s výrazným viskoelastickým charakterem i při nízké koncentraci. [1, 2, 3, 4, 5, 6]

Hyaluronan je aniontový lineární polysacharid s disacharidovými opakujícími se jednotkami kyseliny D-glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu spojených střídavými glykosidickými vazbami  $\beta$  (1/4) a  $\beta$  (1/3), viz Obr. 1. [7]



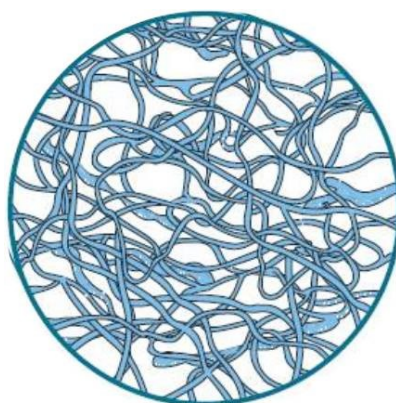
Obr. 1: Struktura HA. [1]

K samotné izolaci HA došlo poprvé v roce 1934 ze sklivce očí. V počátečním stádiu byla pro biomedicínské aplikace bez dalších změn použita HA izolovaná z lidské pupeční šňůry a hřebenů kohoutů. Podle lékařských potřeb, pro různé terapeutické aplikace, byly vyvinuty deriváty HA pro konstrukci různých platforem, jako jsou hydrogely, nanočástice, lékové konjugáty atd. První prakticky používané produkty byly komercializovány až po schválení FDA ve formě dermálního plniva, injekce, oftalmologického roztoku. Vysoká biologická kompatibilita a aplikační potenciál vedl k intenzivnímu výzkumu jeho fyzikálně-chemických vlastností, a to jak ve vodném roztoku chloridu sodného, tak i v tuhém stavu. Za fyziologických podmínek existují prakticky všechny molekuly HA ve formě jejich solí. [1, 7, 8, 9]

HA je silný humektant, který absorbuje tisícinásobek hmotnosti vody. Efekt absorpce vody je důležitý pro jeho zvlhčující schopnost, která je využívána v kosmetických produktech potlačujících známky stárnutí pleti.

Ve vodném prostředí vytváří HA především silně hydratovaná náhodná klubka, jejichž tvar a rozměry jsou ovlivněny složením roztoku. Reologické chování HA v roztoku bez přídavku soli je odlišné od roztoku s přídavkem soli. Obecně platí, že přidání soli k roztoku polysacharidu vede ke změně velikosti polymerního klubka, čímž se může snižovat viskozita roztoku. [4, 6, 10, 11]

HA je důležitou složkou komplexní sítě extracelulární matrice, Obr. 2, která obklopuje a podporuje buňky v tkáních, je snadno rozložitelný v lidském těle pomocí enzymatické degradace hyaluronidázou. Přírodně je přítomen v synoviální tekutině, kde zastává roli maziva a tlumiče nárazů. Vyznačuje se vysokou biokompatibilitou, biologickou odbouratelností, neimunogenicitou, schopností hydratace tkání a hojení ran. [7, 10, 11, 12]



Obr. 2: HA jako hustá pružná síť. [13]

Jak bylo uvedeno výše, HA lze zařadit mezi polysacharidy, tj. skupinu přírodních polymerů, jejichž mechanické vlastnosti jsou podmiňovány polysacharidovou kostrou a bočními substituenty. Polysacharidy se široce používají jako zahušťovací, emulgační, stabilizační nebo flokulační činidla ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. [14, 15, 16]

HA je polyelektrolytem, jinak řečeno je polymerem, který je ve vodě rozpustný a nese náboj, který obsahuje jeho boční skupina. Chování takových polymerů je závislé na iontové síle prostředí a na pH. [17]

K degradaci HA dochází při hodnotách  $\text{pH} < 4$  a  $\text{pH} > 11$  bez přítomnosti soli. V rozmezí  $4 < \text{pH} > 11$  prakticky nedochází k narušení řetězců HA. Hodnota pH, při které dochází ke štěpení HA, je přičítána štěpení glykosidických vazeb. V různých částech lidského těla

se prostředí liší svým pH. Proto je důležité získat přehled o vlivu této proměnné na fyzikálně-chemické vlastnosti HA. Dále bylo také zjištěno, že k degradaci v přítomnosti soli dochází při hodnotách pH pod 1,5 a nad 11. [18]

Vlastnosti HA jako polymerního materiálu jsou podmiňovány jeho molekulovou hmotností, ohebností jeho řetězců, možnostmi jejich přeuspořádání a interakcemi mezi sebou navzájem a mezi okolím.

### 1.1 Vliv molekulové hmotnosti HA na její funkci

Fyzikálně-chemické vlastnosti a biologické funkce hyaluronanu úzce souvisejí s jeho molekulovou hmotností (MW). Dá se říci, že jsou přímo závislé na jeho molekulové hmotnosti. HA může dosahovat velikosti 6 až 8 MDa. Navzdory své nadměrně jednoduché primární struktuře má extrémně rozsáhlou a často protichůdnou biologickou aktivitu v závislosti na své molekulové hmotnosti. [3, 12, 19, 20, 21]

Vysokomolekulární HA plní funkce založené na jejím viskoelastickém charakteru při snižování tření, adsorpce nárazů, vyplňování prostoru, organizaci extracelulární matrix a hydrataci. Během homeostázy se ukládá do normálních tkání a podporuje jejich stabilitu.

Fragmenty HA s nízkou molekulovou hmotností mohou pocházet z enzymatických nebo chemických aktivit. Účastní se mnoha fyziologických a patologických procesů. Mohou být považovány za faktory, které dokáží navodit angiogenezi, buněčný růst a vyvolávají apoptózu buněk. Takový typ hyaluronanu lze nalézt ve zraněných tkáních nebo v nádorech. [12, 19, 20]

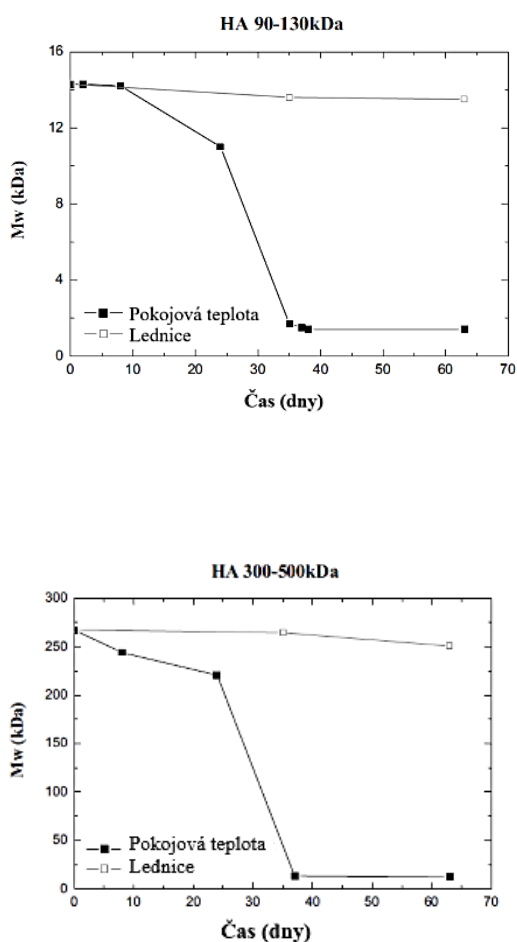
HA je označována jako viskoelastická tekutina, tedy tekutina, která do určité míry teče a pamatuje si svůj tvar, po odstranění napětí se částečně vrací do původního stavu, viz Obr. 3. [1, 2, 3]



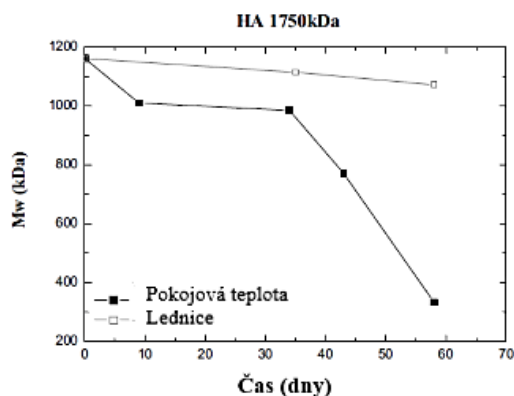
Obr. 3: Chování viskoelastického materiálu. [22]

## 1.2 Vlivy působící degradace na HA

Pro praktické aplikace je nezbytné identifikovat, jak dlouho mohou být roztoky skladovány bez významné degradace. Z důvodu rozdílných vlastností HA o různých molekulových hmotnostech byla V. Simulescu a kol. [20] zkoumána degradace vysoko a nízkomolekulárních hyaluronanů ve vodných roztocích bez přidání jiných sloučenin, které brání růstu mikroorganismů. Bylo zjištěno, že vodné roztoky kyseliny hyaluronové by mohly být uchovávány při pokojové teplotě po dobu 8 dnů bez ochrany před mikroorganismy. Po tomto období se již mikroorganismy vyvinou natolik, že velmi rychle rozkládají hyaluronan. Vzorky HA uchovávané v chladničce jsou velmi stabilní vůči degradaci i po dobu až 60 dnů skladování. Toto je potvrzené pro vzorek HA 1750 kDa stejně jako pro čerstvý roztok vzorku HA 300–500 kDa, viz Obr. 4 a 5.



Obr. 4: Hmotnostní pokles molekulové hmotnosti HA 90–130 kDa (výše), 300–500 kDa (níže) při pokojové teplotě a chlazení. [20]



Obr. 5: Hmotnostní pokles molekulové hmotnosti HA 1750 kDa při pokojové teplotě a chlazení. [20]

Vzorek HA 90–130 kDa byl nejstabilnější vůči degradaci ze všech vzorků použitých ve studii. Po přibližně 10 dnech při pokojové teplotě se mikroorganismy začaly intenzivně vyvíjet a polymer rychle rozkládaly až k molekulové hmotnosti 1,7 kDa po 35 dnech a 1,4 kDa po 60 dnech. Pro vzorek HA 300–500 kDa byla zaznamenána rychlejší degradace. U vzorků HA 90–130 kDa a HA 300–500 kDa se degradace téměř po 40 dnech zastavila (Obr. 4). V případě vzorku HA 1750 kDa (Obr. 5), degradace byla zpočátku pomalejší. Jeho degradace se později zvýšila, a po 60 dnech vykazovala procentuální změnu průměrné molekulové hmotnosti 71 % počáteční hodnoty. Druhé rovině pro HA 1750 kDa bylo dosaženo po více než 2 měsících skladování při pokojové teplotě. [20]

### 1.2.1 UV záření a HA

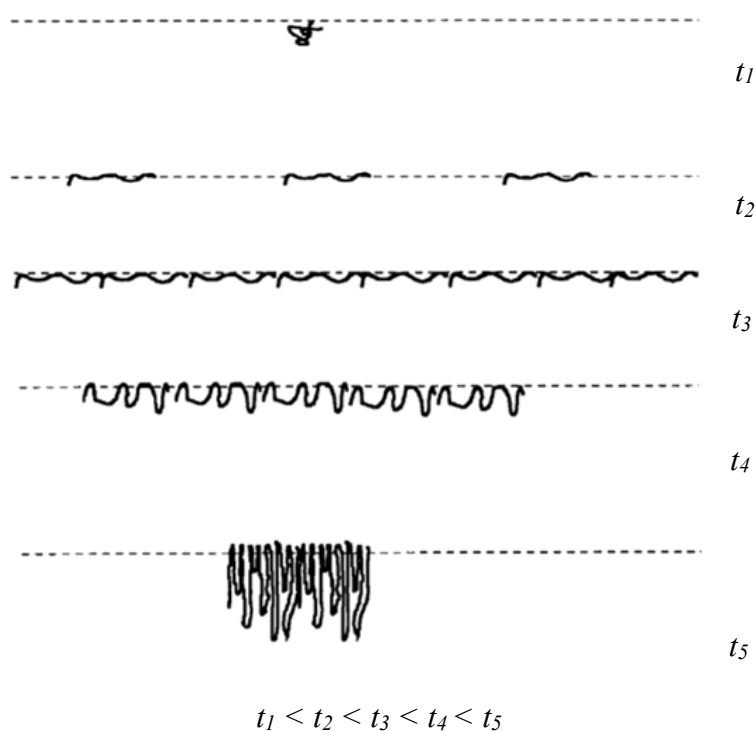
Je známo, že ultrafialové záření (UV) má širokou škálu škodlivých účinků na lidskou pokožku, od jednoduchého spálení kůže až po rakovinu kůže. Hlavní příčinou těchto nežádoucích účinků je buněčná smrt epidermálních buněk (zejména keratinocytů) nebo imunitní odpovědi stejných buněk, což vede k zánětu. UV záření má schopnost proniknout do epidermis a dosáhnout dermální vrstvy, což způsobuje řadu škodlivých reakcí včetně stárnutí pokožky. Studie zjistily rozdílné výsledky při použití HA. Z publikace M. Hasova a kol. [23] vyplývá, že HA zlepšila životaschopnost buněk narušených tímto zářením, z čehož vyšel terapeutický potenciál použití HA pro léčbu kožních poruch indukovaných UV zářením. Ve studii od M. Averbberca a kol. [24] se životnost buněk po expozici kerati-



nocytů UVB zářením nezměnila. Zdá se, že epidermální odezva na UVB záření závisí na čase. UV záření tedy ovlivňuje metabolismus HA, ale jsou potřebné další studie, aby bylo možné plně určit úlohu HA v cytotoxicitě související s UV zářením. [12]

### 1.3 Povrchové vlastnosti polysacharidů

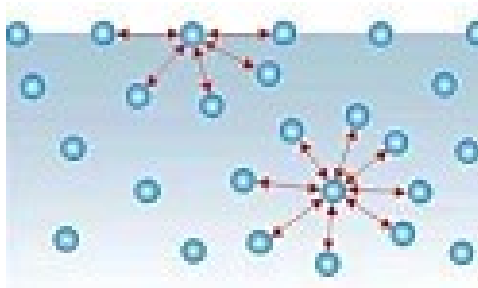
Z literatury je známo, že některé typy polysacharidů se dokáží separovat na fázovém rozhraní kapalina-plyn. To znamená, že vykazují povrchovou aktivitu. Mírný pokles povrchového napětí v čase u takovýchto systémů je přímo spojen s molekulovou hmotností polymeru, jeho hmotnostním podílem v roztoku, flexibilitou a uspořádáním polymerních řetězců, které se separují na fázové rozhraní. Proces obsazování fázového rozhraní polymerem je spojen s difúzí polymeru k fázovému rozhraní, vyplněním fázového rozhraní neuspořádaným polymerem a jeho následnou reorganizací v čase (viz Obr. 6). [15, 17]



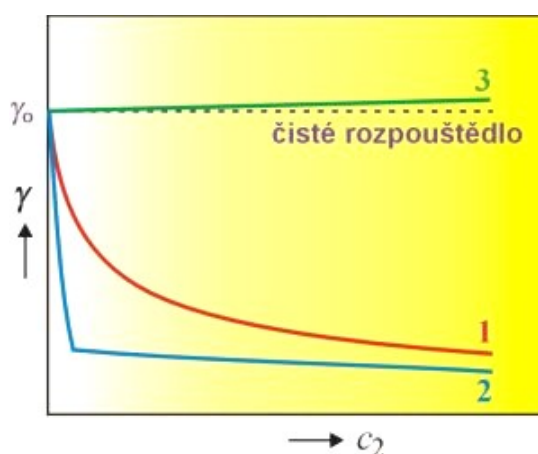
Obr. 6: Schématické znázornění průběhu reorganizace polymeru na fázovém rozhraní v čase: a) transport (difúze); b) vyplňování (obsazování); c) reorganizace polymeru na fázovém rozhraní. [15]

Atomy a molekuly nacházející se na povrchu materiálu se vyskytují ve stavu nevyrovnaných silových účinků z okolí, z čehož plyne jejich zvýšená reaktivita, vliv na specifickou adsorpci proteinů, buněčný růst, kompatibilita s krví atd. [25]

Soudržné síly mezi molekulami v objemové fázi jsou sdíleny se všemi sousedními molekulami (Obr. 7). Povrchové molekuly mají jen část sousedních molekul, a proto vykazují silnější přitažlivé síly se svými nejbližšími sousedy na povrchu. Povrchové molekuly tedy vytvářejí povrchový „film“, který ztěžuje pohyb předmětu skrze povrch. Toto zvýšení intermolekulárních přitažlivých sil se nazývá povrchové napětí ( $\gamma$ ;  $\sigma$ ), které lze také definovat jako snahu kapaliny zaujmout co nejmenší povrch. Tloušťka povrchové vrstvy (rozhraní mezi dvěma různými fázemi), kde již soustava není homogenní, má tloušťku  $10^{-9}$ – $10^{-8}$  m. U roztoků se povrchové napětí mění s jejich koncentrací (Obr. 8) a závisí na teplotě, čistotě kapaliny a na tom, s jakým plynem je povrch kapaliny ve styku. Pro vodu při 20 °C se povrchové napětí pohybuje okolo 73 mN/m. [26, 27, 28]



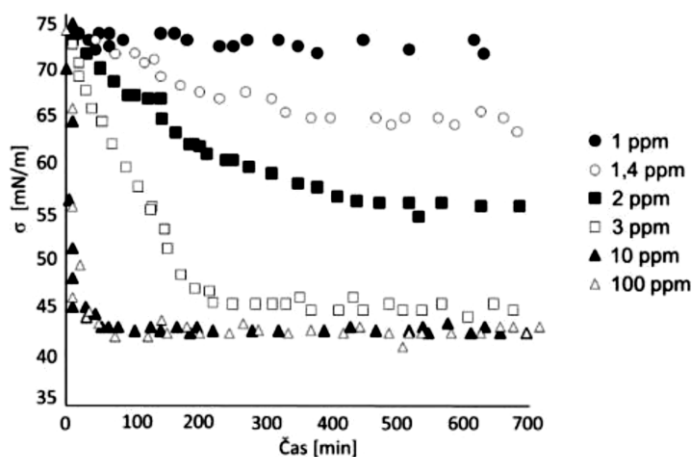
Obr. 7: Molekuly na povrchu a v objemové fázi. [27]



Obr. 8: Závislost povrchového napětí na koncentraci u vodných roztoků. [27]

Obr. 8 znázorňuje tři křivky. Křivka 1 je typická pro vodné roztoky povrchově aktivních ve vodě rozpustných organických sloučenin – povrchově aktivní látky. Křivka 2 představuje chování vysoce povrchově aktivních látek – micelárních koloidů. Křivka 3 platí pro sys-

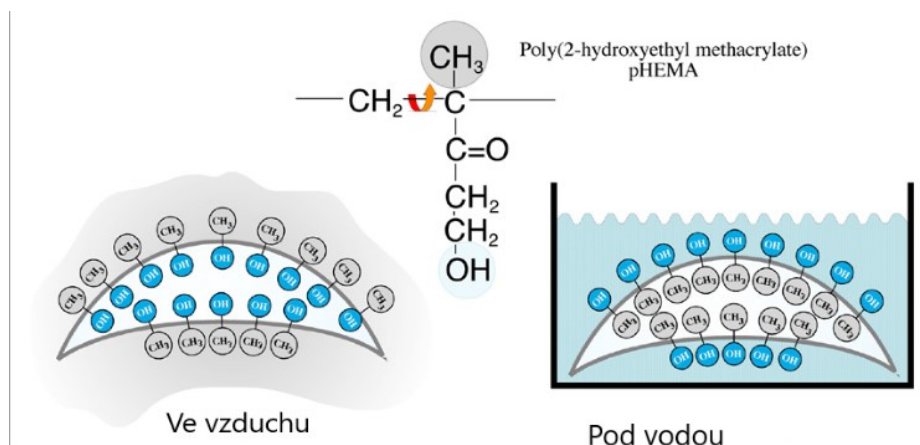
témy, u kterých je pozorováno zvýšení povrchového napětí – povrchově inaktivní látky. [27] Na Obr. 9 je uveden literárně popsáný příklad poklesu povrchového napětí pro daný polysacharid v závislosti na jeho koncentraci v roztoku. Tento obrázek ukazuje, že pokles povrchového napětí u polysacharidů je pozvolný proces, tyto látky lze tedy považovat za určitých podmínek za mírně až vysoce povrchově aktivní.



Obr. 9: Závislost povrchového napětí na čase pro různé koncentrace polymeru (polysacharidu) v roztoku. [29]

U polymeru může mít jedinečná povrchová zóna rozsah od 10 nm do 100 nm, v závislosti na polymerním systému a molekulové hmotnosti řetězce.

Například v reakci na vodné prostředí může dojít v povrchu polymeru na fázovém rozhraní k reorganizaci makromolekulárních klubek. Hydrofilní skupiny budou směřovat ven a hydrofóbní naopak dovnitř, tak aby systém dosahoval minimální energie. Příklad tohoto procesu v rámci praktické aplikace na kontaktních čočkách je znázorněn na Obr. 10. [25]



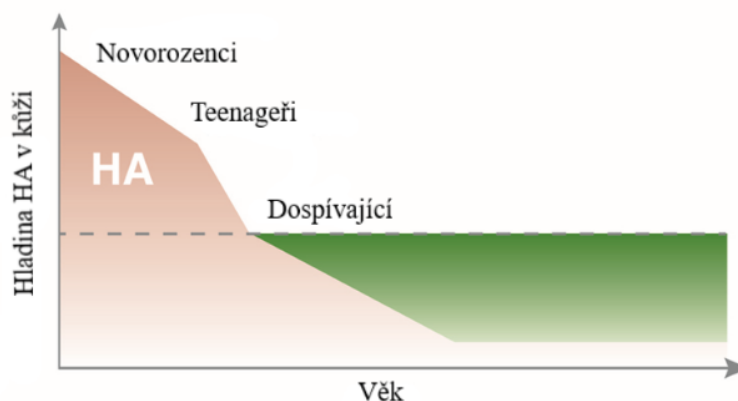
Obr. 10: Reorganizace hydroxylovaného polymeru v přítomnosti vodného prostředí, aplikace na kontaktní čočku pHEMA. [25]

## 2 HYALURONAN SODNÝ V SOUVISLOSTI S LIDSKÝM TĚLEM

HA jako jedna z hlavních složek extracelulární matrice má důležitou roli při regulaci poškození a opravy tkání. Nezanedbatelnou úlohu hraje při migraci kmenových buněk během embryogeneze. Jak bylo uvedeno výše, funkce hyaluronanu závisí na jeho MW, ale i na umístění a na interakcích s vazebnými partnery. Hyaluronan s vazebnými proteiny se účastní patogeneze mnoha lidských onemocnění. Studium chování hyaluronanu s buňkami a bílkoviny může poskytnout nové poznatky vedoucí k vývoji různých typů terapeutik. [30, 31]. HA je přítomen v kůži, velké a složité tkáni s rozsáhlou paletou funkcí, udržující homeostázu uvnitř organismu. Je známo, že kůže je schopna uchovávat velké množství vody a snáší mnoho vnějších traumat, kterým je neustále vystavována. [31]

### 2.1 Stárnutí a změny obsahu HA v kůži

Hladina kyseliny hyaluronové v kůži je nejvyšší v období vývoje plodu a klesá krátce po narození, viz Obr. 11. [31]



Obr. 11: Úbytek hladiny HA v kůži s věkem. [32]

### 2.2 HA a *Stratum corneum*

HA podporuje změny v sekundární struktuře keratinu. Tyto změny jsou spojeny se sníženou bariérovou funkcí a pronikáním HA do hlubších vrstev pokožky. Nanostrukturované materiály, jako jsou micely, nanočástice, nanoemulze a polymerní suspenze, jsou často využity pro zlepšení penetrace HA do jinak nepropustné *Stratum corneum*, tj. nejvyšší bariérové vrstvy pokožky. Z tohoto důvodu jsou právě takovéto koloidní nanostrukturované systémy vyvíjeny a studovány za účelem aplikace v kosmetických a farmaceutických přípravcích. Přes značnou výhodu nanočástic v podobě snazšího pronikání přes svrchní vrstvy

pokožky je vždy třeba posoudit zdravotní riziko, a to zejména v případě dlouhodobé expozice kůže těmto nanostrukturovaným systémům. Řada pokusů pro nastavení obecných pravidel týkajících se pronikání nanočástic poukázala na zjevné nesrovnalosti mezi závěry v publikovaných výsledcích. Důvodem rozporu dat je pravděpodobně rozmanitost složek nanomateriálů, použité modely kůže a použité metodiky charakterizace. Je známo, že interakci kůže s nanomateriálem ovlivňují fyzikálně-chemické vlastnosti systému včetně povrchových vlastností, tvaru, náboje, pórovitosti, agregačních schopností a elasticity. Další riziko, které je potřeba minimalizovat, je akumulace cizích částic v těle, proto se vyvíjené systémy pro dodávání léčiv vybírají tak, aby byly snadno biologicky rozložitelné. Právě kvůli tomu hyaluronan představuje zajímavý materiál jako nosič léku a hydratační prostředek. [19]

### 2.2.1 HA a kosmetická tkáňová augmentace

HA jako dermální plnivo pro kosmetickou tkáňovou augmentaci získává zvýšenou popularitu. Zesíťované produkty HA Restylane (zesíťované s BDDE – butandiol diglycidylether) a Hylaform (zesíťované s divinylsulfonanem (DVS)) byly poprvé komerčně aplikovány ve Spojených státech pro dočasnou korekci vrásek na obličej v počátku roku 2000.

V kontrolovaných klinických studiích přípravku Restylane (6 měsíců) a Hylaform (12 týdnů) byly oba přípravky stejně účinné jako přípravky Zypplast na bázi kolagenu při korekci středně těžkých až těžkých vrásek a záhybů na obličejí. Obecně platí, že produkty založené na bázi HA nabízejí více zřetelných výsledků než obličejové krémy a chemické peelings. [1]

### 2.2.2 HA a hojení ran

Je známo, že HA spolu s vazebnými proteiny se podílí na regulaci procesu opravy tkání. Bylo zjištěno, že existují značné odlišnosti při procesu hojení ran u plodu oproti hojení ran u dospělých. Důležité je, že krátce po zahájení procesu hojení ran, tedy v nejranějších fázích hojení ran, obsahuje zraněná oblast zvýšené hladiny HA a dochází k vysokému přílivu bílých krvinek, leukocytů a neutrofilů. HA je z počátku do místa poranění dotována migrací keratinocytů. [12, 30, 31]

Při hojení ran u dospělých po počátečním maximálním ukládání HA lze pozorovat pokles jeho výskytu v okamžiku proliferace fibroblastů v místě rány, což usnadňuje ukládání chondroitinsulfátu a kolagenu. U dospělého člověka hojení ran často vede k tvorbě jizev.

U plodu se nános HA zvyšuje na počátku hojení ran, ale jeho hladiny zůstávají zvýšené až do ukončení „procesu opravy plodu bez jizev“. [12, 31]

### 2.2.3 HA a léčba kožních onemocnění

Dlouhodobým pozorováním metabolismu HA bylo zjištěno, že chronický zánět a poškození slunečními paprsky (UV zářením), způsobují předčasné stárnutí pokožky. Tyto procesy, stejně jako normální stárnutí, doprovází ztráta vlhkosti a změny distribuce HA. [31]

HA jako důležitá složka pokožky se v současné době používá k léčbě několika kožních onemocnění, mezi které patří například atopická dermatitida. Ta se vyskytuje u velkého počtu pacientů a je doprovázena lézemi, viditelnými změnami kůže zahrnující zesílení, zarudnutí atd. Pacienti mají snížené množství ceramidů v kůži. Používají se léčivé prostředky, které mají za cíl zvýšit účinnost kožní bariéry. Emolienty odstraňují symptomy, zatímco báze s obsahem ceramidu mají za cíl obnovit poškozené složky lipidových dvojvrstev modulací struktury *Stratum corneum*. Produkty s obsahem hyaluronan-ceramidu usnadňují transport účinných látek přes epidermis do dermis. Dále byly zjištěny pozitivní počáteční odezvy při použití gelu HA proti seboroické dermatitidě v obličeji. HA se velmi často používá v kosmetické chirurgii jako kožní výplň pro eliminování vrásek nebo zvyšování objemu, ke kterému dochází při stárnutí. Nutno podotknout, že v některých případech bylo hlášeno, že injekce HA-plniva způsobují takzvané skvrnkovité krvácení do kůže a sliznic vytvářející větší podkožní výron – ekchymózu, edém, erytém a bolest. Nicméně ve většině případů HA gel, zaměřující se na problematiku buněk, prokázal pozoruhodnou míru účinnosti bez vedlejších účinků. [12]

## 2.3 Zvýšení vlhkosti pokožky modulací hyaluronanu

### 2.3.1 $\alpha$ -hydroxykyseliny

Ovocné kompozice bývají aplikovány na obličej, protože napomáhají zkrášlování, a to již po tisíciletí.  $\alpha$ -hydroxykyseliny obsažené v ovocných extraktech jako je kyselina vinná v hroznech, kyselina citronová v citrusových plodech, kyselina jablečná v jablkách a kyselina mandlová v mandlových květinách a meruňkách, jsou považovány za aktivní složky pro omlazení pokožky. Jako takové stimulují produkci HA v kultivovaných dermálních fibroblastech. Některé z mírně kyselých přípravků (pH 3,7 až 4,0) mohou mít svou účinnost na peeling a na adstringentní vlastnosti. Kosmetické účinky přípravků  $\alpha$ -hydroxykyselin, včetně kyseliny mléčné, zahrnují zvýšenou hladkost pokožky se ztrátou

jemných vrásek. Dlouhodobé použití však vede k zesílení pokožky v epidermálních a papilárních kožních vrstvách kvůli mírné fibrózní reakci. Toto je důsledkem reakce podobné rozptýlenému hojení ran a vysvětluje zvýšenou tloušťku a pevnost dermis a epidermis. Kyselina askorbová je také přítomna v ovoci a mohla by být základem některých účinků přiřazených výtažkům z ovoce. Má výrazné účinky stimulační HA při fibroblastovém testu. [31]

### **2.3.2 Kyselina retinová a její vliv na přítomnost HA**

Aplikace derivátů kyseliny retinové redukuje viditelné známky stárnutí. Počáteční zlepšení jemných vrásek a struktury pokožky koreluje s ukládáním HA v epidermis. Ačkoli vitamín D je považován za „sluneční vitamin“, vitamín A byl přijat jako zjevná protilátka pro nepříznivé účinky expozice slunečnímu záření a předpokládá se, že brání a opravuje kožní fotodamáž. Aplikace derivátů vitamínu A způsobuje zvrácení některých slunečních poškození kůže (zdrsnění, zvrásnění a nepravidelné pigmentace). Aplikace derivátů vitamínu A se tedy jeví jako zjevná léčba. Místní aplikace tohoto vitamínu zvyšuje hladinu HA v epidermální vrstvě a zvyšuje tloušťku sítě HA po prodloužené léčbě. [31]

## **2.4 Perspektivy HA v kosmetice**

Přirozená vlhkost pokožky je dána obsahem HA v pokožce. Jak bylo popsáno, tak hlavní vlastností HA je její schopnost zadržovat vodu, a to více než jakákoliv známá syntetická nebo přirozeně se vyskytující sloučenina. I při velmi nízkých koncentracích se používají vodné roztoky HA, které mají velmi vysokou viskozitu. Mnohé z kosmetických přípravků, které obsahují HA, mají koncentraci 0,025 % až 0,050 %, což je dostatečné k tomu, aby přípravky zajistily velmi hladký a viskózní pocit. V současné době probíhá výzkum úpravy HA tak, aby byl stabilnější a poskytl velmi specifické vlastnosti. Vzhledem k tomu, že fragmenty HA s nízkou molekulovou velikostí jsou vysoce angiogenní, mělo by být hlavním cílem tohoto výzkumu definovat optimální velikost polymeru HA pro kosmetické účely. [31]

## **2.5 Další praktické aplikace HA**

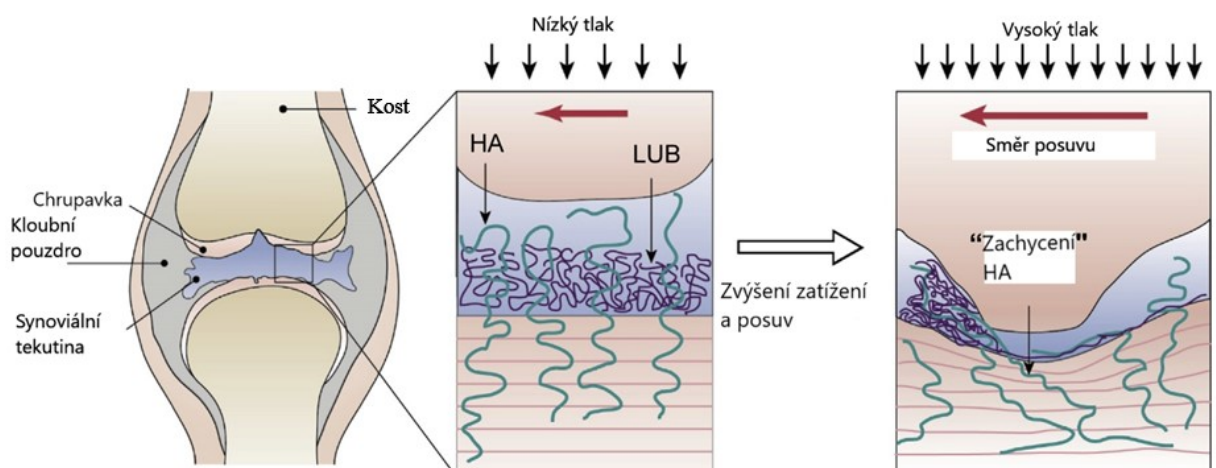
### **2.5.1 Deriváty HA pro mazání kloubů**

Mazání kloubů je důležitým procesem ke snížení třecí síly mezi dvěma protilehlými povrchy tkáně, napomáhá se tak snížení opotřebení. Kloubní maziva jsou klíčovou látkou



při léčbě osteoartrózy (OA). Rozsáhle byl studován mazací mechanismus s ohledem na úlohu různých složek v synoviální tekutině. Bylo zjištěno, že zejména HA je fyzicky prospěšná pro zlepšení mazacích schopností synoviální tekutiny, a to díky svým jedinečným viskoelastickým vlastnostem. Zejména pak vysokomolekulární HA obsažená ve velkých koncentracích může vytvářet molekulární sítě vznikající v důsledku interakcí uvnitř a mezi řetězci. Hydrofobní oblasti jednoho HA řetězce mohou reverzibilně interagovat s jinými. Při dlouhotrvajícím namáhání se řetězce HA pomalu pohybují a vyrovnávají své sítě (vykazují viskózní vlastnosti). Po krátkou dobu řetězce HA odolávají rychlému smykovému namáhání a pak se vrací do původního stavu (vykazující elastické vlastnosti). Kromě toho může HA interagovat s bílkoviny na povrchu tkání. Byla zkoumána řada formulací HA k vývoji účinného maziva. Bylo zjištěno, že volného HA injektovaného do místa bolesti snižuje tuto bolest. [7]

Na Obr. 12 je schematicky znázorněn zachycovací mechanismus komplexu HA v chrupavce pro mazání kloubů. HA působí jako hraniční mazivo v kloubu a poskytuje ochranu proti opotřebení. Při použití fyziologického tlaku je deformace tkání chrupavky snížena. Molekuly HA spojené s komplexem maziv jsou volně zapleteny a roztaženy v kolagenu a synoviální tekutině za nízkého tlaku. Nicméně při vysokém zatěžovacím tlaku může deformace tkáně, způsobená zatížením a střížnou silou, způsobit zachycení HA v úzkém pásmu kolagenní sítě. Obecně platí, že terapie HA pro mazání kloubů má za cíl posílit viskoelasticitu synoviální tekutiny v kloubu. [7]



Obr. 12: Schematické znázornění mechanického zachycování hyaluronátu v oblasti styku pár během fyziologického posuvu pod nízkým (vlevo) a vysokým (vpravo) tlakem. LUB znamená mazivo. [7]

### 2.5.2 Deriváty HA pro oční léčbu

HA se vyskytuje ve sklivci, slzné žláze, rohovkovém epitelu, spojivce a slzné tekutině v oku. Je známo, že HA stimuluje migraci epiteliálních buněk rohovky, což napomáhá hojení rány rohovky. Jak již bylo několikrát zmíněno, HA má jedinečnou schopnost zadržovat vodu v důsledku karboxylových skupin. Tato vlastnost činí HA užitečnou při léčbě syndromu suchého oka. Předpokládá se také hypotéza, že HA snižuje oxidační poškození sítnicových buněk tím, že odstraňuje volné radikály. HA byla použita k léčbě retinitidy pigmentózy, makulární dystrofie, diabetické retinopatie. Vzhledem k tomu, že HA interaguje s buněčným receptorem CD44 na lidské rohovce a spojivce, usnadňuje internalizaci léčiv do buněk rohovky. Bezpečnost použití HA do očních tkání byla potvrzena v mnoha studiích. Biokompatibilní, hygroskopické a viskoelastické vlastnosti HA předurčují tento systém jako nosič očních léčiv. Jedním z reprezentativních komercializovaných produktů HA pro oční chirurgii je Healon®, který se skládá z 1% sodné soli HA. Healon® poskytuje během keratoplastiky velkou průhlednost a chrání rohovku před mechanickým stresem během operace. Mimo jiné se HA aplikuje při výrobě kontaktních čoček (Blink Contacts®, což je kontaktní čočka obsahující 0,15 % hyaluronátu sodného). [7]

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

### 3 PŘÍPRAVA VZORKŮ

Změny povrchové aktivity hyaluronanu sodného byly studovány u řady roztoků připravovaných za rozdílných procesních a fyzikálních podmínek.

#### 3.1 Použité chemikálie

Pro přípravu studovaných systémů byly použity následující chemické látky:

- Hyaluronan sodný v kosmetické čistotě o střední molekulové hmotnosti 370 kDa od společnosti Contipro a. s.
- 0,9% NaCl p.a. – Bioextra od společnosti Sigma-Aldrich.
- Ultračistá voda s odporem 18,2 M $\Omega$ ·cm připravená pomocí reverzní osmózy na zařízení Direct-Q.

#### 3.2 Čistění skla

Pro zajištění minimální kontaminace studovaných systémů bylo nezbytné kontrolovat čistotu použitého laboratorního skla. Veškeré laboratorní sklo bylo čištěno v destilované vodě, etanolu a sérii lázní zředěných kyselin, viz Obr. 13:



Obr. 13: Série lázní pro čištění laboratorního skla.

KROK 1 - chromosírová kyselina zředěná s vodou v poměru 1 : 1 s následným oplachem v destilované vodě nebo kyselina sírová zředěná s vodou v poměru 1 : 1 s následným oplachem v destilované vodě,

KROK 2 - chlorovodíková kyselina zředěná s vodou v poměru 1 : 1 s následným oplachem v destilované vodě,

KROK 3 - oplach v 5% roztoku peroxidu vodíku.

V každé lázni bylo laboratorní sklo umístěno po dobu 20 minut. Konečný oplach laboratorního skla byl prováděn pomocí destilované vody, acetonu a etanolu. Pro zajištění maximální čistoty bylo laboratorní sklo sterilizováno při 120 °C po dobu 20 minut v sušícím zařízení Memmert s nucenou cirkulací vzduchu.

### 3.3 Technologické způsoby přípravy roztoků HA

Pro přípravu polymerních roztoků a filmů bylo použito pěti rozdílných typů zařízení:

- třepací stroj LT 2,
- magnetické míchací zařízení typu IKA RCT basic s temperační lázní,
- TFFC zařízení,
- MCDS sušící zařízení,
- sušárna značky Memmert bez nebo s nucenou cirkulací vzduchu.

#### 3.3.1 Třepací zařízení

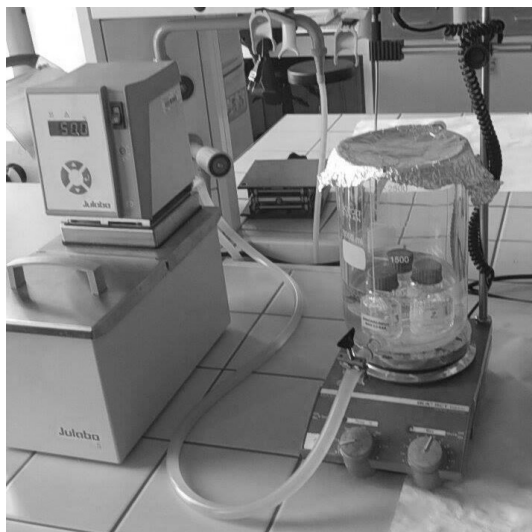
Třepací stroj, Obr. 14, LT 2 s proměnlivou rychlostí pohybu v horizontálním směru při laboratorní teplotě ( $25 \pm 1$ ) °C.



Obr. 14: Třepací stroj LT 2.

#### 3.3.2 Míchací zařízení

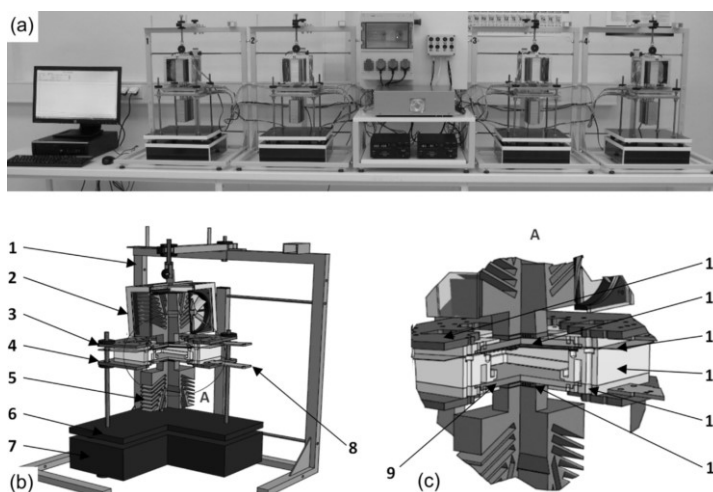
Magnetické míchací zařízení typ IKA RCT basic, na kterém je umístěna temperovaná průtoková lázeň připojena na termostat značky Julabo, viz Obr. 15. Rozpouštění v tomto zařízení probíhalo při 50 °C.



Obr. 15: Použité magnetické míchadlo s temperační lázní a připojeným termostatem.

### 3.3.3 Přístroj generující samoorganizovaný pohyb tekutiny (TFFC)

Roztoky HA byly dále připravovány ve speciálním zařízení TFFC, viz Obr. 16, umožňující cílenou modifikaci fyzikálně-chemických vlastností disperzních systémů pomocí samoorganizovaného toku kapaliny (Bénard-Marangoni nebo Railegh-Bénardovy konvektivní nestability). Přístroj obsahuje dvě plochy s rovnoměrným rozvodem či odvodem tepla, pomocí níž lze za určitých podmínek generovat samoorganizované procesy vedoucí ke změně konformace makromolekul v roztoku. Tyto změny mohou následně podmiňovat povrchovou aktivitu polymerního systému na fázových rozhraních. [33]



Obr. 16: TFFC: a) experimentální přístroj pro definovanou modifikaci a solidifikaci polymerních roztoků, b) funkční subjednotka, c) náhled na střední část funkční subjednotky.

Podrobnější popis jednotlivých částí zařízení a jeho funkce lze nalézt v práci

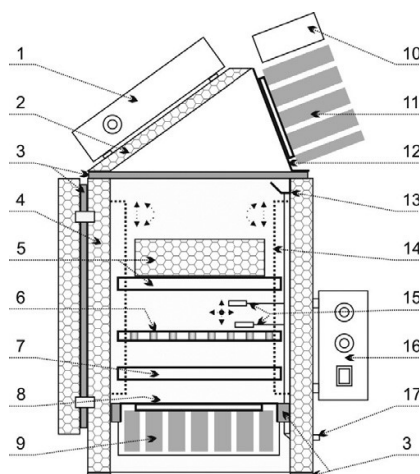
A. Minaříka a kol. [33]

### 3.3.4 Speciální přístroj pro přesné ovládání samoorganizované přípravy staveb v polymerních vrstvách (MCDS)

Pro přípravu polymerních filmů byly použity dva typy zařízení. Prvním z nich je speciální mikrokondenzační sušící zařízení (MCDS), viz Obr. 17 a 18. V tomto zařízení lze připravovat polymerní filmy za rozdílných teplotních spádů bez výměny vnitřní atmosféry uvnitř zařízení – systém pracuje na kondenzačním principu. Přístroj respektuje potřeby přesné regulace teploty, teplotního gradientu a rychlosti odpařování rozpouštědel, tlumení vibrací, bezprašného prostředí. [34]



Obr. 17: Použité MCDS zařízení sestávající z osmi podjednotek a podpůrných systémů [34].



Obr. 18: Schéma konstrukce dílčích jednotek MCDS, podrobněji je popis jednotlivých konstrukčních částí subjednotky MCDS popsán v práci A. Minaříka a kol. [34]

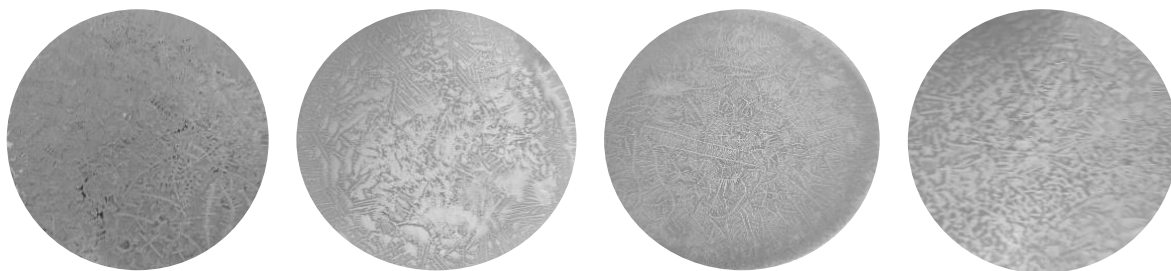
### 3.3.5 Sušící zařízení Memmert

Druhým typem zařízení pro přípravu polymerních filmů, z nichž byly opětovně připravovány polymerní roztoky, bylo zařízení značky Memmert bez a s nucenou cirkulací vzduchu, viz Obr. 19.



*Obr. 19: Použité sušící zařízení značky Memmert.*

Připravené filmy na výše zmíněných zařízeních (MCDS, Memmert) se vyznačovaly rozdílným povrchovým reliéfem v závislosti na nastavení procesních parametrů sušení, viz Obr. 20. Souhrnný přehled použitých zařízení, teplot časů a hmotnostních podílů polymeru v roztoku je uveden v Tab. 1.



*Obr. 20: Typický vzhled povrchů filmů HA připravených v rozdílných typech zařízení.*

*Průměr zobrazených kruhových výsečí je 5 cm.*

**Pozn.:** Vzhled připravených polymerních filmů nebyl podrobněji charakterizován. Tato problematika nebyla předmětem této práce.



Tab. 1: Přehled použitých zařízení, teplot, časů a hmotnostních podílů HA v roztoku.

Zařízení	Vzorek	T [°C]	t [hod]	w [hm. %]
Třepací zařízení	Roztok	25	24 nebo 48	0,05 až 4
Míchací zařízení	Roztok	50	24	
TFFC	Roztok	50/5 až 60/60	18,5 až 24	
MCDS	Film	40/36 až 60/50	24	
Memmert	Film	40, 50, 55	24	

### 3.4 Zařízení pro kontrolu teploty během přípravy vzorků

Kritickým parametrem, který je nezbytný kontrolovat při přípravě roztoků, filmů a měření změn povrchové aktivity HA na fázových rozhraních, je teplota. Tato proměnná byla kontrolována řadou zařízení. Prvním byla termokamera značky FLIR E6, viz Obr. 21. Toto zařízení bylo použito pro kontrolu homogenního rozložení teploty na misce obsahující polymerní roztok v TFFC zařízení. Druhým zařízením umožňujícím bezkontaktně kontrolovat teplotu je bezdotykový digitální teploměr s laserovým zaměřovačem značky Testo, viz Obr. 22. Třetím typem použitého zařízení umožňujícího kontaktní měření teploty bylo Testo 735, viz Obr. 23. K tomuto zařízení byla připojena vysoce citlivá sonda (Pt100) umožňující stanovení teploty s přesností 0,05 °C, viz Obr. 24.



Obr. 21: Použitá termokamera FLIR E6.



Obr. 22: Použitý bezkontaktní teploměr značky Testo 845.



*Obr. 23: Použité Testo 735.*



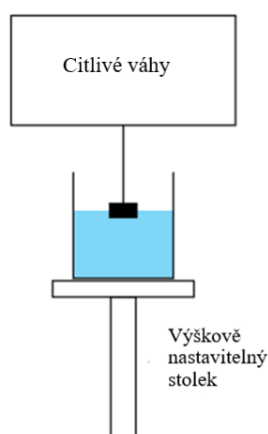
*Obr. 24: Ponorná měřicí ohebná sonda pro zařízení Testo 735.*

## 4 POUŽITÉ MĚŘÍCÍ TECHNIKY A ZAŘÍZENÍ

### 4.1 Charakterizace změn povrchové aktivity

#### 4.1.1 Tenziometrie – Wilhelmyho destičková metoda

Hlavní částí tenziometru je destička definované velikosti, která je zavěšena na vysoce citlivou váhu. Pod váhou je umístěna nádoba s kapalinou, která se posunuje směrem k destičce. V okamžiku kontaktu destičky s hladinou kapaliny dochází k nárůstu její hmotnosti, viz Obr. 25 a 26. [26]



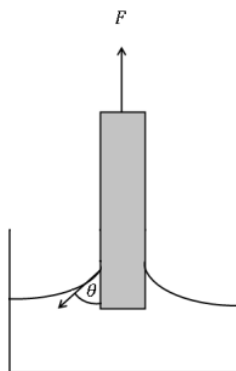
Obr. 25: Základní části tenziometru. [35]

Když se svisle zavěšená destička dotýká povrchu nebo rozhraní kapaliny, pak působí na tuto destičku síla  $F$ , která koreluje s povrchovým napětím nebo mezifázovým napětím  $\sigma$  a se spojovacím úhlem  $\theta$  podle následující rovnice:

$$\sigma = \frac{F}{L \cdot \cos\theta} \quad (1)$$

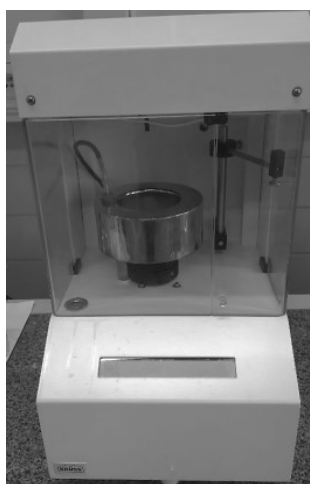
Délka  $L$  destičky odpovídá jejímu obvodu.

Při měření povrchového nebo mezifázového napětí se používá platinová destička. Tento materiál se volí záměrně s ohledem na jeho chemickou inertnost, snadné čištění a vysokou povrchovou energii. [36]



Obr. 26: Wilhelmyho destičková metoda. [26]

V rámci této bakalářské práce byl použit K100MK3 (Krüss), viz Obr. 26. Měření probíhala při  $(37,0 \pm 0,1)$  °C. Před měřením byly polymerní roztoky temperovány po dobu 30 minut v sušícím zařízení Memmert při teplotě 40 °C. Samotné měření probíhalo po dobu 300 sekund.



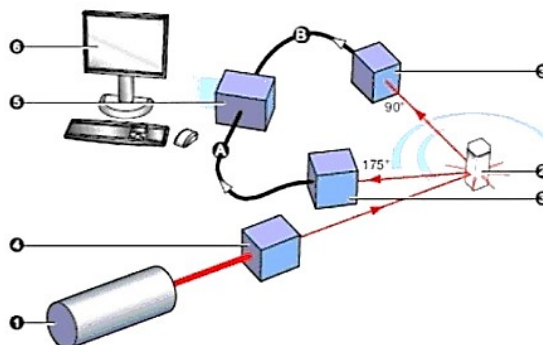
Obr. 27: Použitý tenziometr K100MK3 (Krüss).

## 4.2 Charakterizace změn střední velikosti polymerních klubek

### 4.2.1 Dynamický rozptyl světla

Metoda dynamického rozptylu světla (DLS) slouží k měření velikosti částic disperzních soustav a jejich rozložení v submikronové oblasti. DLS je také nazývána jako kvazielastický rozptyl světla (QELS) nebo fotonová korelační spektroskopie (PCS). Jedná se o techniku neinvazivní s minimálními nároky na přípravu vzorků. [37, 38, 39, 40, 41]

Principem metody je měření změn intenzity rozptýleného světla molekulami / částicemi vzorku v průběhu času, viz Obr. 28.



Obr. 28: DLS – Popis – laser (1), měřicí cela (2), detektor (3), atenuátor (4), korelátor (5), počítač pro zpracování dat (6). [41]

Pro charakterizaci změn střední velikosti polymerních klubek v roztoku bylo použito zařízení značky Malvern Zetasizer, viz Obr. 29. [42]



Obr. 29: Použitý DLS – Malvern Zetasizer nano. [42]

Měření velikosti částic probíhalo při laboratorní teplotě ( $25 \pm 1$ ) °C. Před měřením byly srovnávací roztoky HA ředěny fyziologickým roztokem a filtrovány pro odstranění hrubých nečistot, které by mohly negativně ovlivnit výsledky měření.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci experimentální části práce byl studován vliv rozdílných přístupů přípravy polymerních roztoků z jednoho typu polymerního materiálu (jedna šarže, srovnatelná distribuce molekulových hmotností). Všechny diskutované roztoky byly připravovány z hyaluronanu sodného o střední molekulové hmotnosti 370 kDa ve fyziologickém roztoku (0,9% vodný roztok NaCl). Měření a experimenty byly minimálně třikrát opakovány z důvodu ověření správnosti získaných výsledků.

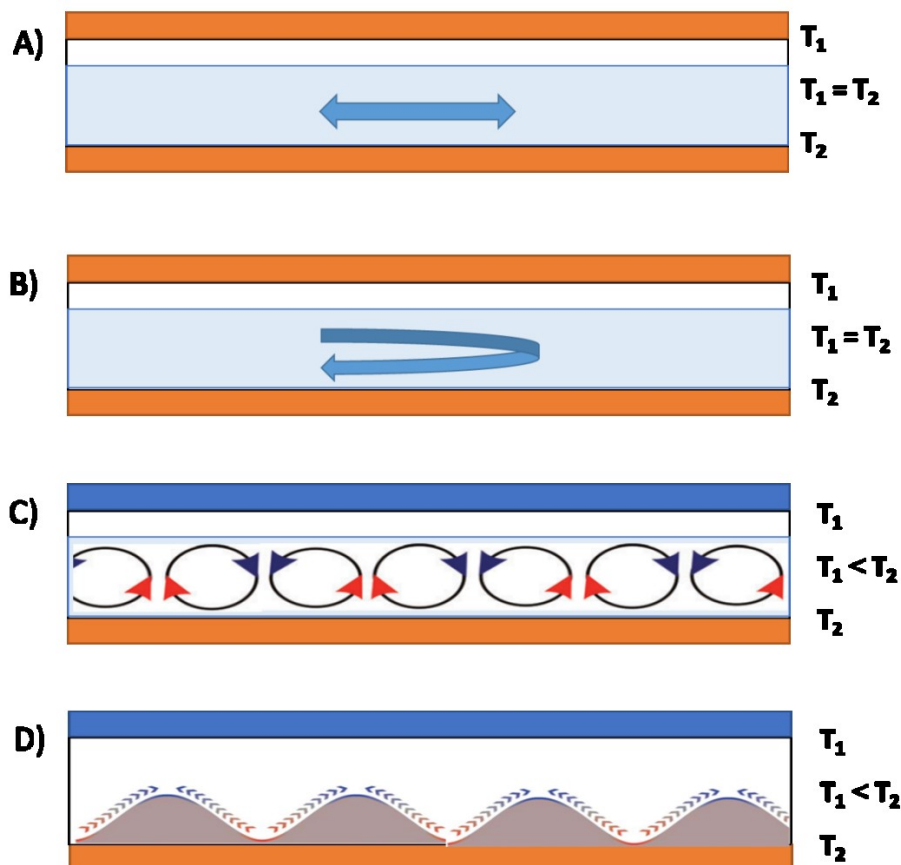
V následujících podkapitolách bude diskutován vliv teploty, teplotního spádu, času, smykového namáhání a více krokového zpracování disperzního systému na změnu povrchové aktivity polymerních řetězců na fázovém rozhraní kapalina-plyn, respektive změnu střední velikosti polymerních klubek v roztoku.

### 5.1 Vlivy procesních parametrů přípravy roztoku HA na změnu povrchové aktivity polymeru

Mimo teplotního a časového vlivu byl studován faktor smykového namáhání disperzního systému jako celku. Z literatury je známo, že makromolekulární systémy vystavené smykovému namáhání mohou měnit svou konformaci [43], s čímž následně souvisí změny povrchové aktivity makromolekulárního systému na fázovém rozhraní kapalina-plyn-pevná látka [27]. Na Obr. 30 jsou schematicky znázorněny jednotlivé režimy rozpouštění vybraného biopolymerního systému (HA).

**Pozn.:** V níže uvedených tabulkách a popiscích se T myslí teplotní režim přípravy polymerního roztoku. Z hlediska změn povrchové aktivity byly všechny roztoky temperovány a charakterizovány při teplotě 37 °C.

**Pozn.:** K vyhodnocení uvedených v tabulkách. Měřený pokles  $\sigma$  v intervalu 16 až 300 s [mN/m] se rozumí rozdíl mezi hodnotou povrchového napětí daného systému na konci a po 16 s charakterizace na tenziometru. Celkovou změnou  $\sigma$  v intervalu 0 až 300 s oproti vodě [mN/m] se rozumí pokles / nárůst  $\sigma$  oproti hodnotě  $\sigma$  disperzního prostředí ( $71,00 \pm 0,01$ ) mN/m při 37 °C. To znamená hodnoty, ve kterých bychom měli za ideálních podmínek začít sledovat pozvolný pokles hodnoty povrchového napětí u systému obsahujícího dispergovaný polymerní systém. Případná záporná hodnota poklesu povrchového napětí znamená, že toto napětí naopak nerostlo.

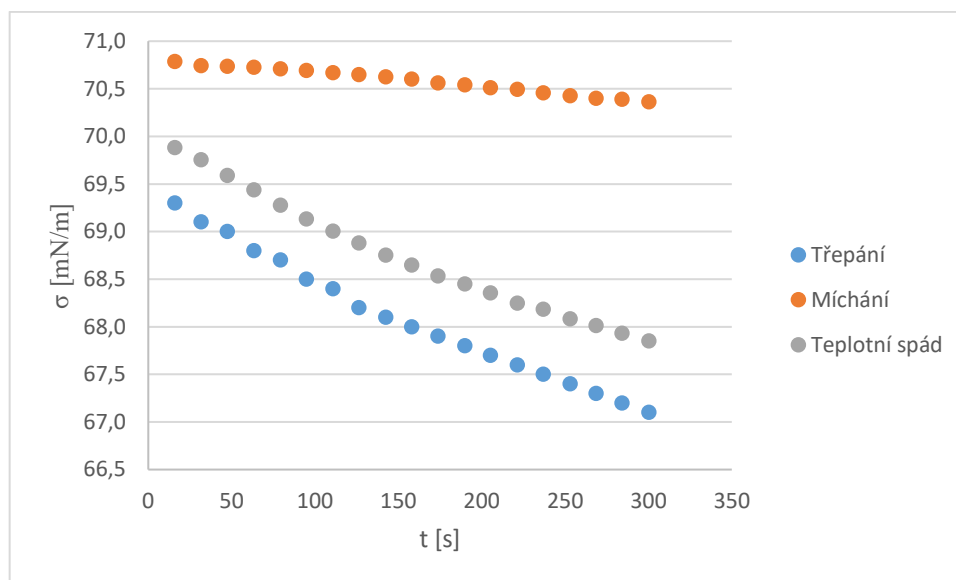


Obr. 30: Schémata znázorňující rozdílné přístupy rozpouštění hyaluronanu sodného: A) třepání – oscilace, B) míchání – rotace, C) samo-organizované proudění kapaliny TFFC zařízení, D) solidifikace polymerního systému v teplotním spádu (s opětovným rozpouštěním v TFFC).

### 5.1.1 Porovnání rozdílných režimů přípravy roztoku

Na Obr. 31 a Tab. 2 je porovnán vliv rozdílných režimů přípravy polymerních roztoků. Z tohoto srovnání plyne, že pro zvolený polymerní systém a hmotnostní podíl HA v roztoku vykazují zvýšenou povrchovou aktivitu vzorky, které byly připraveny třepáním a v teplotním spádu. Tyto poklesy jsou statisticky významné, ale přesto nedosahují maximálních hodnot v porovnání s jinými hmotnostními podíly HA v roztoku rozpouštěnými za optimálních podmínek na TFFC, jak bude diskutováno níže.

Příprava roztoků v režimu míchání, viz Obr. 31, probíhala pouze okrajově, nebyla předmětem hlavního studia. Z Obr. 31 a Tab. 2 plyne, že pro vybraný hmotností podíl HA v roztoku, teplotu rozpouštění a čas u vybraného systému nepozorujeme výraznější pokles povrchové aktivity v případě přípravy na temperovaném míchadle.



Obr. 31: Grafická závislost povrchového napětí na čase pro 0,1 hm. % polymerní roztoky HA rozpouštěné v různých režimech přípravy demonstrováných na Obr 30.

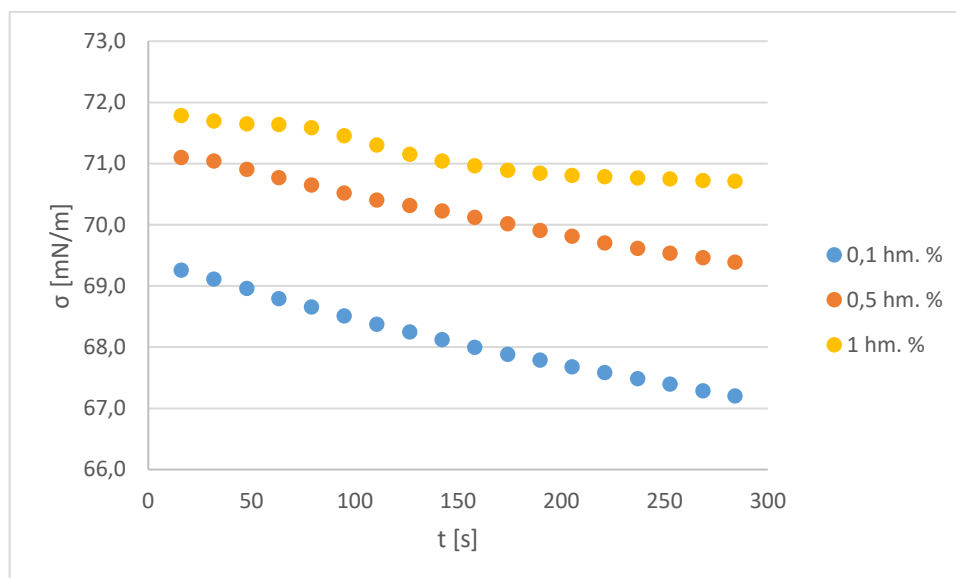
Tab. 2: Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 31.

w [hm. %]	Příprava	T [°C]	t [hod]	Měřený pokles $\sigma$ v intervalu 16 až 300 s [mN/m]	Celková změna $\sigma$ v intervalu 0 až 300 s oproti vodě [mN/m]
0,1	Třepání	25	22–24	$2,20 \pm 0,20$	$3,89 \pm 0,10$
	Míchání	50		$0,42 \pm 0,03$	$0,64 \pm 0,01$
	TFFC	50/10		$2,00 \pm 0,20$	$3,57 \pm 0,10$

### 5.1.2 Roztoky připravované třepáním

Vliv hmotnostního polymeru v roztoku připravovaného třepáním na změnu povrchové aktivity HA na fázovém rozhraní je uveden na Obr. 32 a v Tab. 3. Z těchto výsledků plyne, že s rostoucím hmotnostním podílem HA v roztoku klesá jeho povrchová aktivita. Tato skutečnost je způsobena vzájemným proplétáním a interakcí řetězců a klubek HA ve fyziologickém roztoku, což následně znemožňuje jejich reorganizaci na fázovém rozhraní. Vliv třepání podobně jako míchání na změnu povrchové aktivity HA byl studován okrajově. Největší pozornost byla věnována vlivu samo-organizovaného proudění, jak bude diskutováno v následujících podkapitolách.





Obr. 32: Grafická závislost povrchového napětí na čase pro 0,1; 0,5; 1 hm. % polymerní roztoky HA vyznačující se historií uvedenou v Tab. 3.

Tab. 3: Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 32.

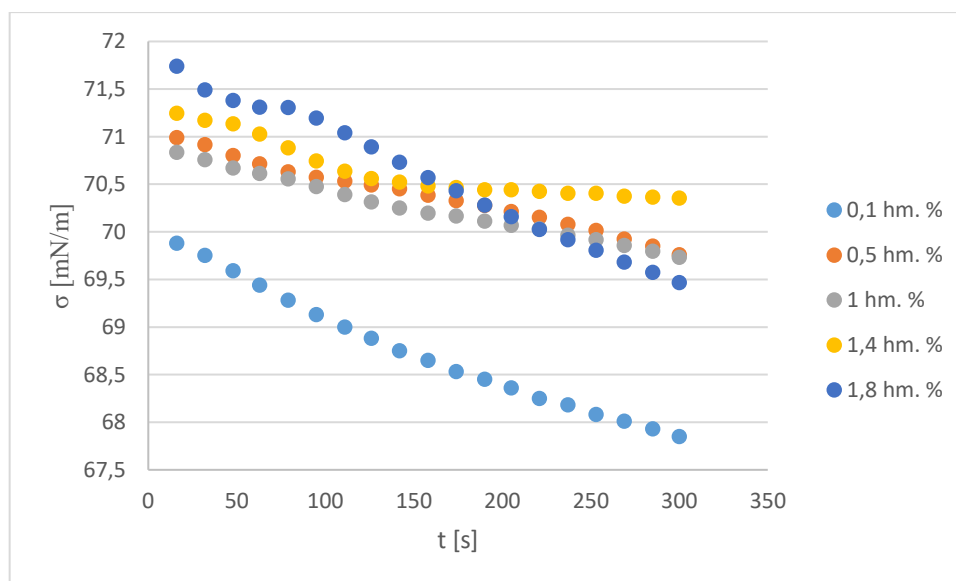
Příprava	w [hm. %]	T [°C]	t [hod]	Měřený pokles $\sigma$ v intervalu 16 až 300 s [mN/m]	Celková změna $\sigma$ v intervalu 0 až 300 s oproti vodě [mN/m]
Třepání	0,1	25	24	$2,20 \pm 0,20$	$3,89 \pm 0,10$
	0,5			$1,80 \pm 0,20$	$1,70 \pm 0,10$
	1			$1,10 \pm 0,10$	$0,32 \pm 0,10$

### 5.1.3 Roztoky připravované v teplotním spádu

Vystavení roztoku polymeru teplotnímu spádu má za následek vznik organizovaného proudění v podobě Bénard-Marangoniho konvektivní nestability. Pro vznik takového proudění je nezbytné dosáhnout určité hodnoty Marangoniho čísla. Mezi parametry mající vliv na hodnotu této veličiny patří viskozita roztoku a velikost teplotního spádu spolu s výškou vrstvy roztoku. Výška vrstvy roztoku byla udržována na konstantní úrovni 7 mm. Z tohoto důvodu bude v další diskuzi rozebírán vliv hmotnostního podílu polymeru a teplotního spádu na změny povrchové aktivity HA na fázovém rozhraní.

### 5.1.3.1 Vliv hmotnostního podílu polymeru v roztoku

Z porovnání vlivu hmotnostního podílu HA v roztoku vystaveném účinkům teplotního spádu v TFFC zařízení, Obr. 33 a Tab. 4, plyne, že nejvyšší povrchovou aktivitu můžeme u daného systému sledovat pro nejnižší hmotnostní podíl polymeru, tj. 0,1 hm. %. Tento pokles nepřekračuje hodnotu povrchové aktivity pro obdobný roztok připravený třepáním, viz Obr. 32 a v Tab. 3.



Obr. 33: Grafická závislost povrchového napětí na čase pro rozdílné hmotnostní podíly HA v roztoku vystaveném teplotnímu spádu 50/10 °C.

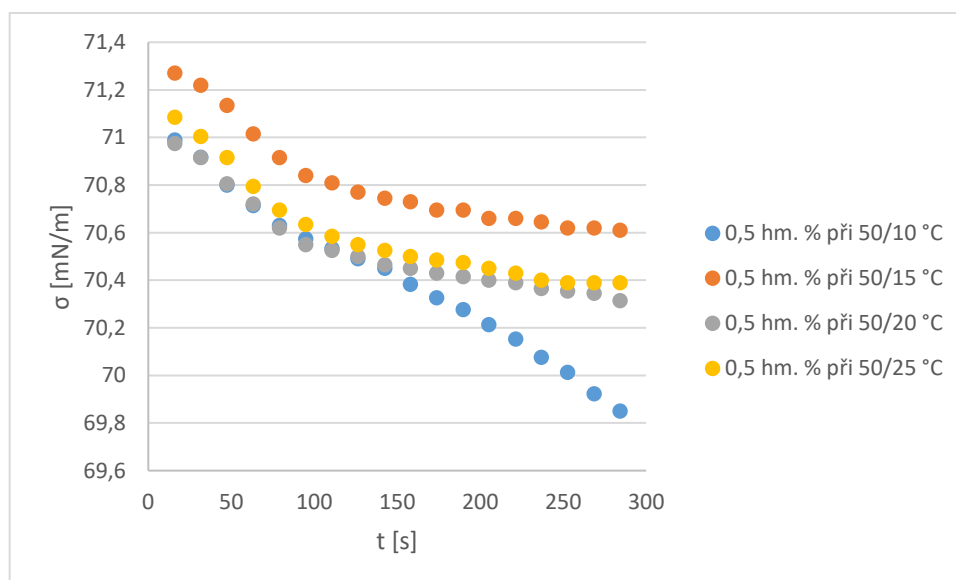
Tab. 4: Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 33.

Příprava	w [hm. %]	T [°C]	t [hod]	Měřený pokles $\sigma$ v intervalu 16 až 300 s [mN/m]	Celková změna $\sigma$ v intervalu 0 až 300 s oproti vodě [mN/m]
TFFC	0,1	50/10	22–24	$2,00 \pm 0,20$	$3,57 \pm 0,10$
	0,5			$1,23 \pm 0,09$	$1,24 \pm 0,04$
	1			$1,10 \pm 0,08$	$1,27 \pm 0,04$
	1,4			$0,89 \pm 0,07$	$0,60 \pm 0,03$
	1,8			$2,30 \pm 0,20$	$1,60 \pm 0,10$

**Pozn.:** Teplotní spád značí teplotu spodní topné a horní chladicí desky. Neuvádí střední teplotu polymerního roztoku.

### 5.1.3.2 Vliv velikosti teplotního spádu

Významnou proměnnou je velikost teplotního spádu. Vliv této proměnné lze pozorovat na Obr. 34 a Tab. 5. Z těchto výsledků vykazuje největší nárůst povrchové aktivity systém upravovaný při nejvyšší hodnotě teplotního spádu 50/10 °C. Absolutní hodnota poklesu povrchového napětí není nikterak významná s ohledem na výše diskutované vlivy.



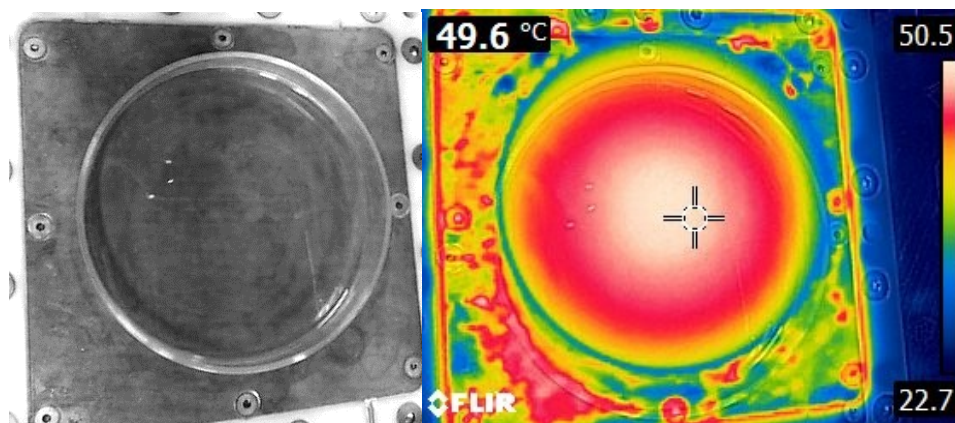
Obr. 34: Grafická závislost povrchového napětí na čase pro rozdílné nastavené teplotní spády v TFFC zařízení.

Tab. 5: Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 34.

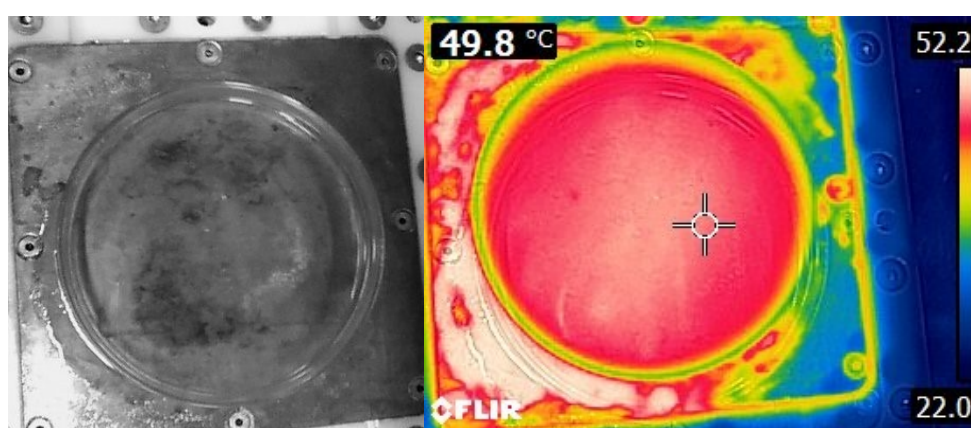
Příprava	w [hm. %]	T [°C]	t [hod]	Měřený pokles $\sigma$ v intervalu 16 až 300 s [mN/m]	Celková změna $\sigma$ v intervalu 0 až 300 s oproti vodě [mN/m]
TFFC	0,5	50/10	21–24	$1,23 \pm 0,09$	$1,24 \pm 0,04$
		50/15		$0,67 \pm 0,05$	$0,04 \pm 0,02$
		50/20		$0,66 \pm 0,05$	$0,68 \pm 0,02$
		50/25		$0,72 \pm 0,05$	$0,63 \pm 0,02$

Z výše uvedených pozorování pro výsledky získané z TFFC zařízení uvedené na Obr. 31 až 34 se na první pohled může zdát, že teplotní spád přítomný při rozpouštění polymerního systému nemá větší význam na změnu povrchové aktivity. Z dalších experimentů a pozorování vyplynulo, že byla zanedbána jedna z významných proměnných

při umísťování skleněné Petriho misky do TFFC zařízení, a to je kontakt mezi dnem misky a topnou plochou. Některé skleněné misky nemají z výroby ideálně rovné dno, z tohoto důvodu existuje určitá pravděpodobnost nerovnoměrného rozložení teploty přes plochu nosné misky, viz Obr. 35. Tento problém byl vyřešen jednoduše nalitím několika desítek mililitrů rostlinného oleje mezi dno misky a topnou plochu. Po této úpravě dochází k rovnoměrnému přestupu tepla do nádoby, což je nezbytnou podmínkou pro generaci samo-organizovaného proudění ve vrstvě kapaliny (vodného roztoku HA). Dále diskutované experimenty pro TFFC zařízení byly prováděny s touto úpravou a mnohem jasněji ukazují vliv samo-organizovaného proudění na změnu povrchové aktivity HA na fázovém rozhraní kapalina-plyn-pevná látka.



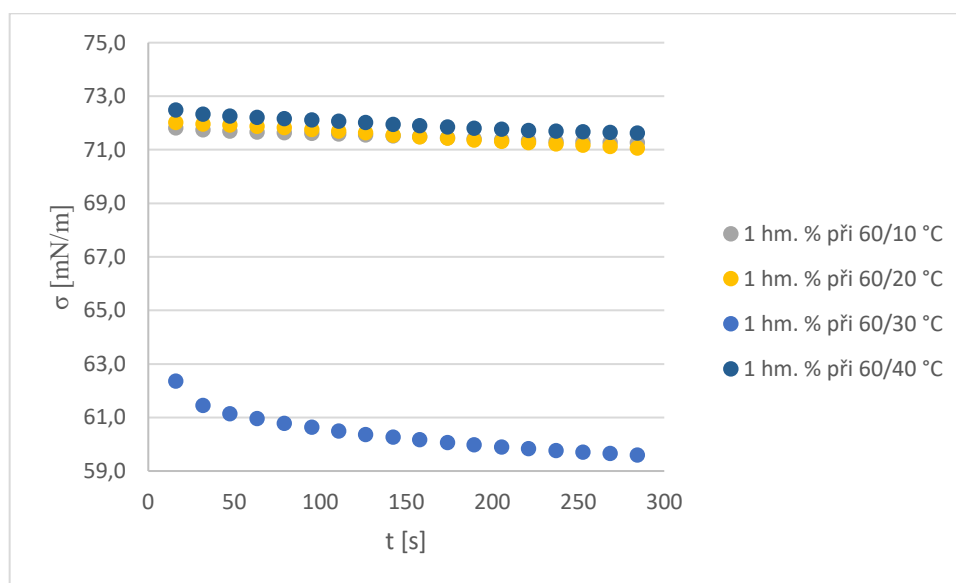
Obr. 35: Rozložení teploty na skleněné Petriho misce umístěné v TFFC zařízení. Vlevo náhled na misku, vpravo rozložení teplot.



Obr. 36: Rozložení teploty na skleněné Petriho misce umístěné v TFFC zařízení s mezivrstvou tvořenou olejem mezi dnem misky a topnou plochou. Vlevo náhled na misku, vpravo rozložení teplot.

### 5.1.3.3 Vliv velikosti teplotního spádu při rovnoměrném přestupu tepla

Na základě výše uvedených zjištění byl optimalizován postup umístění nosných Petriho misek do TFFC zařízení na vrstvu oleje. Z dodatečných experimentálních výsledků prezentovaných na Obr. 37 a Tab. 6 plyne, že pro daný hmotnostní podíl polymeru lze nalézt nejvhodnější velikost teplotního spádu (60/30 °C), při němž bude systém vykazovat nejvyšší povrchovou aktivitu, pokles povrchového napětí o 11 mN/m. Tento nárůst je téměř trojnásobný oproti výše diskutovaným výsledkům.

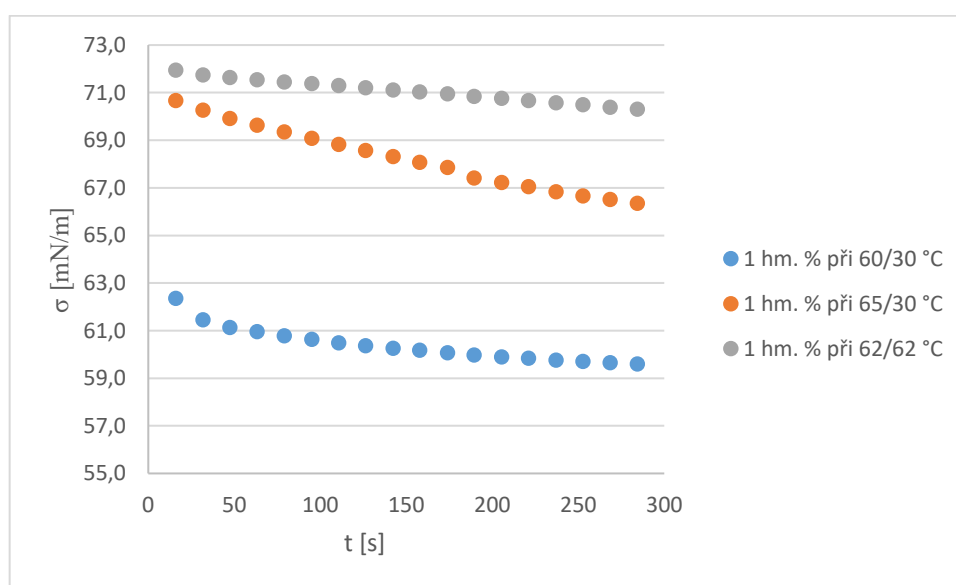


Obr. 37: Grafická závislost povrchového napětí na čase pro 1 hm. % polymerní roztoky HA připravené za rozdílných teplotních spádů v TFFC zařízení – při rovnoměrném přenosu tepla.

Tab. 6: Vyhodnocení závislosti uvedených na Obr. 37.

Příprava modifikací	w [hm. %]	Teplotní spád [°C]	t [hod]	Měřený pokles $\sigma$ v intervalu 16 až 300 s [mN/m]	Celková změna $\sigma$ v intervalu 0 až 300 s oproti vodě [mN/m]
TFFC	1	60/10	18,5	$0,58 \pm 0,04$	$- 0,20 \pm 0,02$
		60/20		$1,00 \pm 0,08$	$0,00 \pm 0,04$
		60/30		$2,80 \pm 0,20$	$11,47 \pm 0,10$
		60/40		$0,90 \pm 0,06$	$- 0,60 \pm 0,03$

Otázkou zůstává, zda za nárůst povrchové aktivity nemůže zvýšení střední teploty v roztoku. Z výsledků uvedených na Obr. 38 a Tab. 7 vyplývá, že zvýšení teploty spodní topné plochy na 65 °C nemá za následek růst povrchové aktivity HA na fázovém rozhraní. Stejně tak nastavení konstantní teploty mezi topnou a chladicí plochou na 62/62 °C nezapříčiňuje nárůst povrchové aktivity (aktivita HA klesá). Toto pozorování potvrzuje dominantní vliv volby optimální hodnoty teplotního spádu na nárůst povrchové aktivity HA na fázovém rozhraní. Tento nárůst je spojen s vyššími reorganizačními schopnostmi polymeru na rozhraních kapalina-plyn, jak je známo z literatury [15].



Obr. 38: Grafická závislost povrchového napětí na čase pro 1 hm. % polymerní roztoky HA vyznačující se 18,5 hod modifikací při daných teplotních spádech (podpora zahřívání spodní desky olejem).

Tab. 7: Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 38.

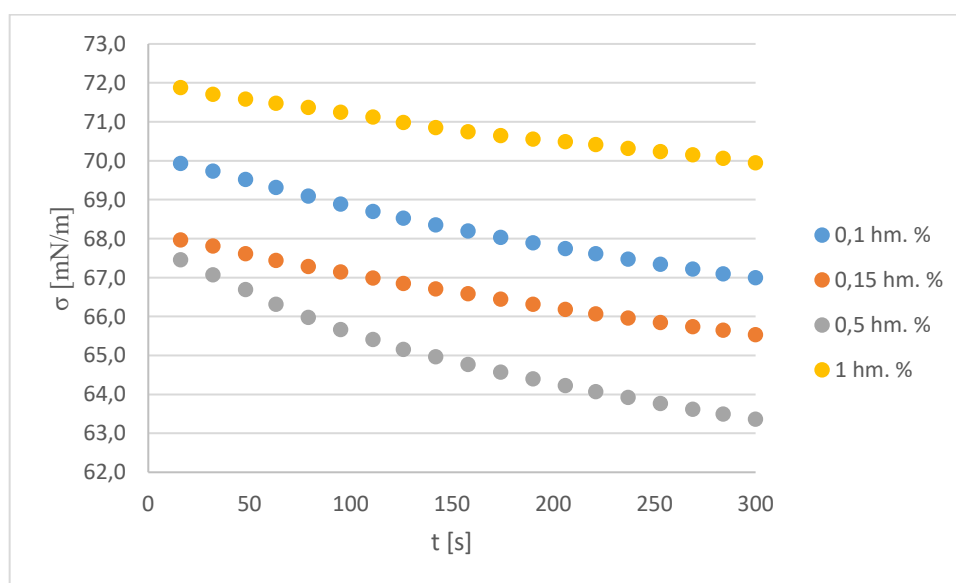
Příprava modifikací	w [hm. %]	Teplotní spád [°C]	t [hod]	Měřený pokles $\sigma$ v intervalu 16 až 300 s [mN/m]	Celková změna $\sigma$ v intervalu 0 až 300 s oproti vodě [mN/m]
TFFC	1	60/30	18,5	2,80 ± 0,20	11,47 ± 0,10
		65/30		3,60 ± 0,30	4,80 ± 0,20
		62/62		1,70 ± 0,20	0,80 ± 0,10

#### 5.1.4 Změny povrchové aktivity roztoků připravených z vysušených filmů

Z literatury [44] je známo, že v průběhu sušení polymerního roztoku za přítomnosti teplotního spádu může za určitých podmínek docházet ke vzniku zvrásnění polymerní vrstvy. Jakým způsobem ovlivňuje taková historie polymerního systému jeho aktivitu v roztoku demonstrují níže uvedené výsledky.

**Pozn.:** V rámci tohoto experimentu byly připraveny polymerní roztoky o rozdílném hmotnostním podílu polymeru v roztoku. Z těchto roztoků byly následně solidifikovány polymerní filmy. Z filmů byly opětovně připraveny polymerní roztoky, které byly charakterizovány z hlediska změny povrchové aktivity.

Z výsledků prezentovaných na Obr. 39 a Tab. 8: plyne, že výsledná povrchová aktivita HA převedeného do roztoku ve více krocích (roztok-film-roztok) se mění v závislosti na hmotnostním podílu polymeru v roztoku, nejvyšší povrchové aktivity za daných podmínek dosahuje systém obsahující 0,5 hm. % HA v roztoku.



Obr. 39: Grafická závislost povrchového napětí na čase pro rozdílné hmotnostní podíly polymeru v roztoku, ze kterých byl připravován film a následně opět roztok o totožném hmotnostním podílu polymeru.

Tab. 8: Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 39.

w [hm. %]	Příprava	T [°C]	t [hod]	Měřený pokles $\sigma$ v intervalu 16 až 300 s [mN/m]	Celková změna $\sigma$ v intervalu 0 až 300 s oproti vodě [mN/m]
0,1	Třepaní	25	24	2,90 ± 0,30	4,00 ± 0,20
	Sušení	55	24		
	TFFC	50/25	1,5		
0,15	Třepaní	25	24	2,4 ± 0,20	5,7 ± 0,10
	Sušení	55	24		
	TFFC	50/25	5,5		
0,5	Třepaní	25	24	4,10 ± 0,30	7,60 ± 0,20
	Sušení	55	24		
	TFFC	50/25	1,5		
1	Třepaní	25	24	1,90 ± 0,20	1,00 ± 0,10
	Sušení	55	24		
	TFFC	50/25	1,5		

## 5.2 Určení velikosti polymerních klubek v roztoku

Pomocí metody dynamického rozptylu světla byly studovány vybrané typy roztoků HA. Výsledky z měření uvedené v Tab. 9 demonstrují vliv dvou rozdílných způsobů přípravy polymerního roztoku na změnu střední velikosti dispergovaných polymerních klubek. V rámci tohoto srovnání byl charakterizován roztok obsahující 1 hm. % HA v roztoku.

**Pozn.:** Uvedený hmotnostní podíl polymeru v roztoku značí obsah polymeru v roztoku, který byl podroben patřičnému způsobu rozpouštění za rozdílných podmínek. Pro vlastní měření na DLS byl zásobní roztok ředěn (0,1 hm.%) a filtrován přes filtr s velikostí pórů 0,45  $\mu\text{m}$ .

Z Tab. 9 lze pozorovat, že po vystavení polymeru organizovanému proudění dochází k nárůstu střední velikosti polymerních klubek, tato skutečnost je spojena s reorganizací polymeru do protaženějších struktur.



Tab. 9: Změny středních velikostí polymerních klubek pro 1 hm. % polymerní roztok HA připravovaný v teplotním spádu a na třepacím zařízení.

w [hm. %]	Příprava	T [°C]	t [hod]	Střední velikost polymerních klubek [nm]
1	TFFC	50/15	24	106 ± 2
	Třepání	25		60 ± 1

Vliv teplotního spádu na změnu střední velikosti polymerních klubek pro daný hmotnostní podíl HA v roztoku je shrnut v Tab. 10. Z výsledků uvedených v této tabulce plyne, že s klesajícím teplotním spádem klesá střední velikost polymerních klubek. Tento pozorovaný pokles lze přičíst nižší intenzitě smykového namáhání polymeru v průběhu organizovaného proudění kapaliny.

Tab. 10: Změny středních velikostí polymerních klubek pro 0,1 hm. % polymerní roztok HA připravovaný za rozdílných teplotních spádů.

w [hm. %]	Příprava	T [°C]	t [hod]	Střední velikost polymerních klubek [nm]
0,1	TFFC	50/10	22	100 ± 1
		50/30		77 ± 6

## ZÁVĚR

Byly testovány rozdílné přístupy a podmínky přípravy polymerních roztoků na změnu povrchové aktivity rozpouštěného hyaluronanu sodného o jedné střední molekulové hmotnosti. Studovanými proměnnými byly: způsob smykového namáhání polymerního roztoku, vliv teploty a teplotního spádu, vliv přestupu tepla, hmotnostního podílu polymeru a více-krokové přípravy polymerního roztoku (roztok-film-roztok).

Z experimentů věnovaných rozdílným způsobům smykového namáhání vyplynulo, že zvýšenou povrchovou aktivitu vykazují systémy připravované na třepacím zařízení a v teplotním spádu. Nicméně tento pozorovaný nárůst povrchové aktivity není tak výrazný jako v případě systémů, u kterých byl kontrolován přestup tepla z topné plochy do Petriho misky nebo u systémů převedených do roztoku ve více krocích (roztok-film-roztok).

Experimenty věnované zhodnocení vlivu organizovaného proudění kapaliny na změnu povrchové aktivity HA na fázových rozhraních ukázaly, že pro maximální zvýšení povrchové aktivity není rozhodující dosažení co největšího teplotního spádu nebo teploty. Naopak zvýšenou aktivitu vykazují roztoky připravené při nižší střední teplotě a středním teplotním spádu.

Hyaluronan sodný převedený do roztoku z dříve solidifikovaného filmu se vyznačuje rozdílnou povrchovou aktivitou v závislosti na historii přípravy filmu. Zejména pak výchozí koncentrací polymeru v roztoku, z něhož byl film připravován.

Z charakterizace změn střední velikosti polymerních klubek pomocí dynamického rozptylu světla vyplynulo, že organizované proudění kapaliny zásadně mění střední velikost polymerních klubek v roztoku, což má přímou souvislost s rostoucí povrchovou aktivitou takto upravovaných systémů.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] DUCHEYNE, Paul; HEALY, Kevin; KIRKPATRICK, C. James; HUTMACHER, Dietmar E; GRAINGER, David W. *Comprehensive Biomaterials*. 2011, 240-252. ISBN 9780080553009.
- [2] RIBEIRO, Walkíria; ORFÃO, Marta; MATA, José Luís; SARAMAGO, Benilde. Behaviour of wetting films of sodium hyaluronate saline solutions. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. Elsevier, 2008, **317**(2), 536. DOI: 10.1016/j.jcis.2007.09.074.
- [3] RAMAKRISHNA, S.; SURESH, B.; BAEK, K.H. Biological functions of hyaluronan and cytokine-inducible deubiquitinating enzymes. *Biochimica Et Biophysica Acta-reviews on Cancer* [online]. Elsevier Science Bv, 2015, **1855**(1), 85. DOI: 10.1016/j.bbcan.2014.11.006. ISSN: 0304419X.
- [4] YU, FY. F. ZHANG; LUAN, T.; ZHANG, ZN.; ZHANG, HB. Rheological studies of hyaluronan solutions based on the scaling law and constitutive models. *POLYMER* [online]. Elsevier Sci, 2014, **55**(1), 295-296. DOI: 10.1016/j.polymer.2013.11.047.
- [5] LU, Karen W.; GOERKE, Jon; CLEMENTS, John A.; TAEUSCH, H. William. Hyaluronan decreases surfactant inactivation in vitro. *Pediatric Research* [online]. Int Pediatric Research Foundation, 2005, **57**(2), 237. DOI: 10.1203/01.PDR.0000150726.75308.22.
- [6] INGR, Marek; KUTÁLKOVÁ, Eva; HRNČIŘÍK, Josef. Hyaluronan Random Coils in Electrolyte Solutions—a Molecular Dynamics Study. *Carbohydrate Polymers*. 2017, vol. 170, 289-290. DOI:10.1016/j.carbpol.2017.04.054.
- [7] ALTMAN, Gregory H.; DIAZ, Frank; JAKUBA, Caroline; et al. Silk-based biomaterials. *Biomaterials* [online]. Elsevier, 2003, **24**(3), 155-159. DOI: 10.1016/S0142-9612(02)00353-8.
- [8] MO, Y.; TAKAYA, T.; NISHINARI, K.; KUBOTA, K.; OKAMOTO, A. Effects of Sodium Chloride, Guanidine Hydrochloride, and Sucrose on the Viscoelastic Properties of Sodium Hyaluronate Solutions. *Biopolymers*. 1999, vol. 50, no. 1, 24. ISSN: 0006-3525.
- [9] HALASOVÁ, T.; KROUSKÁ, J.; MRAVEC, F.; PEKAŘ, M. Hyaluronan-surfactant Interactions in Physiological Solution Studied by Tensiometry and Fluorescence

Probe Techniques. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2011, vol. 391, no. 1-3, 27. ISSN:0927-7757.

[10] VERÍSSIMO, Luís M.P.; VALADA, Teresa I.C.; SORBAL, Abilio J.F.N.; AZEVEDO, Eduarda E.F.G.; AVEZEDO, Maria L.G.; RIBEIRO, Ana C.F. Obituary for J. Chem Thermodynamics. *The Journal of Chemical Thermodynamics* [online]. Elsevier, 2002, **34**(10), 14. DOI: 10.1016/S0021-9614(02)00258-6.

[11] GARCÍA-ABUÍN, A.; GÓMEZ-DÍAZ, D; NAVAZA, J.M.; REGUEIRO, L; VIDAL-TATO, I. Viscosimetric behaviour of hyaluronic acid in different aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers* [online]. Elsevier, 2011, **85**(3), 500-505. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.02.028.

[12] HEINEMANN, Jack A. Food and chemical toxicology. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* [online]. Pergamon-elsevier Science, 2013, **53**, 128-134. DOI: 10.1016/j.fct.2012.10.055. ISSN: 02786915.

[13] HA jako hustá pružná síť. In: *Ostenil.trbchemedica* [online]. Dostupné z: <http://ostenil.trbchemedica.co.uk/patient-information/sodium-hyaluronate-hyaluronic-acid>.

[14] BAIS, D.; TREVISAN, A.; LAPASIN, R.; PARTAL, P.; GALLEGOS, C. Rheological characterization of polysaccharide–surfactant matrices for cosmetic O/W emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. Elsevier, 2005, **290**(2), 546-547. DOI: 10.1016/j.jcis.2005.04.044.

[15] NAHRINGBAUER, I. Dynamic Surface Tension of Aqueous Polymer Solutions. 1: Ethyl(hydroxyethyl)cellulose (BERMOCOLL Cst-103). *Journal of Colloid and Interface Science*. 1995, vol. 176, no. 2, 318-319. ISSN:0021-9797.

[16] GIERSZEWSKA, M.; OSTROWSKA-CZUBENKO, J.; CHRZANOWSKA, E. pH-responsive chitosan/alginate polyelectrolyte complex membranes reinforced by triphosphate, *European Polymer Journal*, 2018, s. 2, 1-27. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2018.02.031.

[17] KREJČÍ, Jiří. Kosmetika a kosmetologie. Zlín: UTB. *Skriptum*. Str. 71-80. *Projekt registrační číslo CZ.1.07/2.2.00/28.0132*.

- [18] MALEKI, Atoosa; KJØNIKSEN, Anna-Lena; NYSTRÖM, Bo. Effect of pH on the behavior of hyaluronic acid in dilute and semidilute aqueous solutions. *Macromolecular Symposia* [online]. 2008, **274**(1), 131. DOI: 10.1002/masy.200851418.
- [19] MUZZARELLI, Riccardo A.A.; BOUDRANT, Joseph; MEYER, Diederick; MANNO, Nicola; DEMARCHIS, Marta; PAOLETTI, Maurizio G. Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin. *Carbohydrate Polymers* [online]. Elsevier Sci, 2012, **87**(2), 86-87, 500-505. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.09.063.
- [20] SIMULESCU, V.; KALINA, M.; MONDEK, J.; PEKAR, M. Long-term degradation study of hyaluronic acid in aqueous solutions without protection against microorganisms. *Carbohydrate Polymers* [online]. Elsevier Sci, 2016, **137**, 664-668. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.10.101.
- [21] STERN, Robert; KOGAN, Grigorij; JEDRZEJAS, Mark J.; ŠOLTÉS, Ladislav. Many ways to cleave hyaluronan. *Biotechnology Advances* [online]. Elsevier, 2007, **25**(6), 538. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.07.001.
- [22] Viskoelastická. In: Hyaluronic Acid Provides the Ideal Hydration in a Sunscreen For Rich Complexions [online]. 2012. Dostupné z: <http://extrashade.com/wp-content/uploads/2012/06/hyaluronic-acid-sm.jpg>.
- [23] HASOVA, M.; CRHAK, T.; DVORAKOVA, J.; MUTHNY, T.; VELEBNY, V.; KUBALA, L. Hyaluronan minimized effects of uv irradiation on human keratinocytes. *Arch. Dermatol Res.* 303 (4), 2011, 277-284. DOI: 10.1007/s00403-011-1146-8
- [24] AVERBECK, M.; GEBHARDT, C.A.; VOIGT, S.; ANDEREGG, U.; TERMEER, C.C.; SLEEMAN, J. P.; SIMON, J. J. Differential regulation of hyaluronan metabolism in the epidermal and dermal compartments of human skin by uvb irradiation. *J. Invest Dermatol* 127 (3), 2007, 687-697. DOI: 10.1038/sj.jid.5700614
- [25] RATNER, Buddy D.; HOFFMAN, Allan S.; SCHOEN, Frederick J.; LEMONS, Jack E.; YASZEMSKI, Michael. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 2013, 34-37. ISSN: 978-0-12-374626-9.
- [26] SEDLAŘÍKOVÁ, J. *Chemie a technologie tuků II*. Zlín: UTB. *Skriptum*. S. 16, 17, 20, 38. *Projekt registrační číslo CZ.1.07/2.2.00/28.0132*.

- [27] BARTOVSKÁ L., vydavatelství VŠCHT, Co je co v koloidní chemii, 2005. S. 13, 52, 80. Dostupné z: [http://147.33.74.135/knihy/uid\\_isbn-80-7080-579-X/pages-pdf/001.html](http://147.33.74.135/knihy/uid_isbn-80-7080-579-X/pages-pdf/001.html).
- [28] Surface Tension. *Hyperphysics* [online]. Dostupné z: <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/surten.html>.
- [29] GAU, C.S.; YU, H.; ZOGRAFI, G. *Surface viscoelasticity of hydroxypropyl cellulose and hydroxyethyl cellulose monolayers at the air/water interface*. *Macromolecules*, 1993. 26(10): 2524-2529. DOI: 10.1021/ma00062a021.
- [30] LIANG, J.R.; JIANG, D.H.; NOBLE, P.W. Hyaluronan as a therapeutic target in human diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. Elsevier Science Bv, 2016, 97, 186-190. DOI: 10.1016/j.addr.2015.10.017.
- [31] STERN, Robert; MAIBACH, I. Howard. Hyaluronan in skin. *Clinics in Dermatology* [online]. Elsevier, 2008, 26(2), 106-118. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2007.09.013. ISSN 0738081X.
- [32] Úbytek hladiny HA v kůži s věkem. In: Allbeautifulmommies [online]. Dostupné z: <http://www.allbeautifulmommies.com/blog/entry/3922105/-miraskin-hyaluronic-serum-review>.
- [33] MINARIK, A.; SMOLKA, P.; MINARIK, M.; et al. Special instrument for the defined modification of polymer properties in solutions and polymer layers. *Measurement* [online]. Elsevier Sci, 2017, 97, 218-220. DOI: 10.1016/j.measurement.2016.11.006.
- [34] MINAŘÍK, Antonín; PERŮTKA, Martin; URBAN, Pavel; LAPČÍK, Lubomír; JUŘIČKA, Martin. Special instrument for exact control of self-organized structures preparation in polymer layers. *International Journal of Heat and Mass Transfer* [online]. Elsevier, 2010, 53(23), 5472-5474. DOI: 10.1016/j.ijheatmasstransfer.2010.07.010.
- [35] Wilhelmy. *DATAPHYSICS* [online]. Dostupné z: <http://www.dataphysics.de/2/start/understanding-interfaces/tensiometry/wilhelmy-plate-method/>.
- [36] Wilhelmy Plate Method. *KRÜSS GmbH* [online]. Dostupné z: <http://www.kruss.de/services/education-theory/glossary/wilhelmy-plate-method>.
- [37] ŠEVČÍKOVÁ, Petra; KAŠPÁRKOVÁ, Věra; KREJČÍ, Jiří; VLTAVSKÁ, Palvína. Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chemické listy* [online]. 2014,

vol. 108, iss. 5, 479. ISSN 1213-7103. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/common/content-issue\\_5-volume\\_108-year\\_2014.html](http://www.chemicke-listy.cz/common/content-issue_5-volume_108-year_2014.html).

[38] BHATTACHARJEE, S. DLS and Zeta Potential - What They Are and What They Are Not?. *Journal of Controlled Release*. 2016, vol. 235, 337-338. ISSN:0168-3659.

[39] EGNER, Pavlína. Kosmetické technologie. Zlín: UTB. *Skriptum*. S. 80,82. *Projekt registrační číslo CZ.1.07/2.2.00/28.0132*.

[40] DLS. *MALVERN* [online]. Dostupné z: <https://www.malvern.com/en/products/technology/dynamic-light-scattering>.

[41] DLS. *Azonano* [online]. Dostupné z: <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=3662>.

[42] Zetasizer nano range. *MALVERN* [online]. Dostupné z: <https://www.malvern.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/defaultb.html>.

[43] MALEKI, A., A. KJØNIKSEN a B. NYSTRÖM. Anomalous Viscosity Behavior in Aqueous Solutions of Hyaluronic Acid. *Polymer Bulletin*. 2007, **59**(2), 217-226. DOI: 10.1007/s00289-007-0760-2.

[44] SINGER, P., J. Thermocapillary Approaches to the Deliberate Patterning of Polymers. *Journal of Polymer Science* [online]. 2017, 1651. DOI: 10.1002/polb.24298.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

BDDE	butandiol diglycidylether
CD44	receptor pro HA
DLS	dynamický rozptyl světla
DVS	divinyl sulfonan
FDA	Food and Drug Administration – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GAG	glykosaminoglykany
HA	kyselina hyaluronová / hyaluronát sodný / hyaluronan sodný
LUB	mazivo
MCDS	přístroj se speciálním systémem mikrokondenzace
MW	molární hmotnost
NaCl	chlorid sodný
OA	osteoartróza
PCS	fotonová korelační spektromie
pH	potenciál vodíku
pHEMA	Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)
QELS	kvazielastický rozptyl světla
TFFC	přístroj generující samoorganizovaný pohyb tekutiny
UV	ultrafialové záření
UVB	beta ultrafialové záření
T	teplota
t	čas
w	hmotnostní zlomek
$\sigma$ ; $\gamma$	povrchové napětí
F	síla



L	délka destičky
c	koncentrace
$\cos \theta$	kontaktní úhel

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1:	<i>Struktura HA. [1]</i> .....	12
Obr. 2:	<i>HA jako hustá pružná síť. [13]</i> .....	13
Obr. 3:	<i>Chování viskoelastického materiálu. [22]</i> .....	14
Obr. 4:	<i>Hmotnostní pokles molekulové hmotnosti HA 90–130 kDa (výše), 300–500 kDa (níže) při pokojové teplotě a chlazení. [20]</i> .....	15
Obr. 5:	<i>Hmotnostní pokles molekulové hmotnosti HA 1750 kDa při pokojové teplotě a chlazení. [20]</i> .....	16
Obr. 6:	<i>Schématické znázornění průběhu reorganizace polymeru na fázovém rozhraní v čase: a) transport (difúze); b) vyplňování (obsazování); c) reorganizace polymeru na fázovém rozhraní. [15]</i> .....	17
Obr. 7:	<i>Molekuly na povrchu a v objemové fázi. [27]</i> .....	18
Obr. 8:	<i>Závislost povrchového napětí na koncentraci u vodných roztoků. [27]</i> .....	18
Obr. 9:	<i>Závislost povrchového napětí na čase pro různé koncentrace polymeru (polysacharidu) v roztoku. [29]</i> .....	19
Obr. 10:	<i>Reorganizace hydroxylovaného polymeru v přítomnosti vodného prostředí, aplikace na kontaktní čočku PHEMA. [25]</i> .....	20
Obr. 11:	<i>Úbytek hladiny HA v kůži s věkem. [32]</i> .....	21
Obr. 12:	<i>Schématické znázornění mechanického zachycování hyaluronátu v oblasti styku spár během fyziologického posuvu pod nízkým (vlevo) a vysokým (vpravo) tlakem. LUB znamená mazivo. [7]</i> .....	25
Obr. 13:	<i>Série lázní pro čištění laboratorního skla. ....</i>	28
Obr. 14:	<i>Třepací stroj LT 2. ....</i>	29
Obr. 15:	<i>Použité magnetické míchadlo s temperační lázní a připojeným termostatem. ....</i>	30
Obr. 16:	<i>TFFC: a) experimentální přístroj pro definovanou modifikaci a solidifikaci polymerních roztoků, b) funkční subjednotka, c) náhled na střední část funkční subjednotky. Podrobnější popis jednotlivých částí zařízení a jeho</i>	

	<i>funkce lze nalézt v práci A. Minaříka a kol. [33]</i> .....	30
Obr. 17:	<i>Použité MCDS zařízení sestávající z osmi podjednotek a podpůrných systémů. [34]</i> .....	31
Obr. 18:	<i>Schéma konstrukce dílčích jednotek MCDS, podrobněji je popis jednotlivých konstrukčních částí subjednotky MCDS popsán v práci A. Minaříka a kol. [34]</i> .....	31
Obr. 19:	<i>Použité sušící zařízení značky Memmert.</i> .....	32
Obr. 20:	<i>Typický vzhled povrchů filmů HA připravených v rozdílných typech zařízení. Průměr zobrazených kruhových výsečí je 5 cm.</i> .....	32
Obr. 21:	<i>Použitá termokamera FLIR E6.</i> .....	33
Obr. 22:	<i>Použitý bezkontaktní teploměr značky Testo 845.</i> .....	33
Obr. 23:	<i>Použitá Testo 735.</i> .....	34
Obr. 24:	<i>Ponorná měřicí ohebná sonda pro zařízení Testo 735.</i> .....	34
Obr. 25:	<i>Základní části tenziometru. [35]</i> .....	35
Obr. 26:	<i>Wilhelmyho destičková metoda [26]</i> .....	36
Obr. 27:	<i>Použitý tenziometr K100MK3 (Krüss).</i> .....	36
Obr. 28:	<i>DLS – Popis – laser (1), měřící cela (2), detektor (3), atenuátor (4), korelátor (5), počítač pro zpracování dat (6) [41]</i> .....	37
Obr. 29:	<i>Použitý DLS – Malvern Zetasizer nano [42]</i> .....	37
Obr. 30:	<i>Schémata znázorňující rozdílné přístupy rozpouštění hyaluronanu sodného: A) třepání – oscilace, B) míchání – rotace, C) samo-organizované proudění kapaliny TFFC zařízení, D) solidifikace polymerního systému v teplotním spádu (s opětovným rozpouštěním v TFFC).</i> .....	39
Obr. 31:	<i>Grafická závislost povrchového napětí na čase pro 0,1 hm. % polymerní roztoky HA rozpouštěné v různých režimech přípravy demonstrovaných na Obr. 30.</i> .....	40
Obr. 32:	<i>Grafická závislost povrchového napětí na čase pro 0,1; 0,5; 1 hm. % polymerní roztoky HA vyznačující se historií uvedenou v Tab. 3.</i> .....	41

- Obr. 33: Grafická závislost povrchového napětí na čase pro rozdílné hmotnostní podíly HA v roztoku vystaveném teplotnímu spádu 50/10 °C. .... 42
- Obr. 34: Grafická závislost povrchového napětí na čase pro rozdílné nastavené teplotní spády v TFFC zařízení. .... 43
- Obr. 35: Rozložení teploty na skleněné Petriho misce umístěné v TFFC zařízení. Vlevo náhled na misku, vpravo rozložení teplot. .... 44
- Obr. 36: Rozložení teploty na skleněné Petriho misce umístěné v TFFC zařízení s mezivrstvou tvořenou olejem mezi dnem misky a topnou plochou. Vlevo náhled na misku, vpravo rozložení teplot. .... 44
- Obr. 37: Grafická závislost povrchového napětí na čase pro 1 hm. % polymerní roztoky HA připravené za rozdílných teplotních spádů v TFFC zařízení – při rovnoměrném přenosu tepla. .... 45
- Obr. 38: Grafická závislost povrchového napětí na čase pro 1 hm. % polymerní roztoky HA vyznačující se 18,5 hod modifikací při daných teplotních spádech (podpora zahřívání spodní desky olejem). .... 46
- Obr. 39 Grafická závislost povrchového napětí na čase pro rozdílné hmotnostní podíly polymeru v roztoku, ze kterých byl připravován film a následně opět roztok o totožném hmotnostním podílu polymeru. .... 47

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tab. 1: Přehled použitých zařízení, teplot, časů a hmotnostních podílů HA v roztoku. ....</i>	<i>33</i>
<i>Tab. 2: Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 31. ....</i>	<i>40</i>
<i>Tab. 3: Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 32. ....</i>	<i>41</i>
<i>Tab. 4: Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 33. ....</i>	<i>42</i>
<i>Tab. 5: Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 34. ....</i>	<i>43</i>
<i>Tab. 6: Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 37. ....</i>	<i>45</i>
<i>Tab. 7: Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 38. ....</i>	<i>46</i>
<i>Tab. 8: Vyhodnocení závislostí uvedených na Obr. 39. ....</i>	<i>48</i>
<i>Tab. 9: Změny středních velikostí polymerních klubek pro 1 hm. % polymerní roztok HA připravovaný v teplotním spádu a na třepacím zařízení. ....</i>	<i>49</i>
<i>Tab. 10: Změny středních velikostí polymerních klubek pro 0,1 hm. % polymerní roztok HA připravovaný za rozdílných teplotních spádů. ....</i>	<i>49</i>