

Biologické vlastnosti hydrogelů na bázi kyseliny hyaluronové

Marie Schrammová

Bakalářská práce
2022

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Marie Schrammová
Osobní číslo:	T19638
Studijní program:	B0711A130009 Materiály a technologie
Specializace:	Biomateriály a kosmetika
Forma studia:	Prezenční
Téma práce:	Biologické vlastnosti hydrogelů na bázi kyseliny hyaluronové

Zásady pro vypracování

Studentka se seznámí s metodami přípravy a charakterizace hydrogelů, zejména založených na kyselině hyaluronové. Zvláštní důraz bude kladen na biologické vlastnosti a využití hydrogelů v oblasti regenerativní medicíny. V praktické části studentka připraví hydrogely na bázi kyseliny hyaluronové a provede charakterizaci materiálových a biologických vlastností.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M.J., RELICHOVÁ, J. et al. Genetika. Brno: Masarykova univerzita, 2009.
- [2] ALBERTS B. et al. Molecular Biology of the Cell 5th ed. Garland Science.
- [3] DAVID A.P. BIZIOS R. Biological Interactions on Material Surfaces. ISBN 978-0-387-98160-4.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Simona Káčerová**
Centrum polymerních systémů

Datum zadání bakalářské práce: **25. února 2022**
Termín odevzdání bakalářské práce: **20. května 2022**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

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

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji 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;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užit své dílo – 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);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem 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.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Cílem této bakalářské práce bylo hodnocení biologických vlastností hydrogelů na bázi kyseliny hyaluronové. Teoretická část práce shrnuje hydrogely na bázi přírodních polymerů a jejich vlastnosti, využití v tkáňovém inženýrství a transportu léčiv a charakteristiku kyseliny hyaluronové. Experimentální část se zabývá testováním biologických vlastností hydrogelu na bázi thiolovaného derivátu hyaluronanu. U tohoto hydrogelu byla testovaná cytotoxicita extraktu vyhodnocena metodou MTT a dále byla studována schopnost buněk proliferovat především uvnitř hydrogelu.

Klíčová slova: biomateriál, hydrogel, kyselina hyaluronová, přírodní polymer, tkáňové inženýrství

ABSTRACT

The main goal of this bachelor thesis was to evaluate the biological properties of hyaluronic acid-based hydrogels. The theoretical part of the thesis summarizes natural polymer-based hydrogels and their properties, applications in tissue engineering and drug delivery, and the characterization of hyaluronic acid. The experimental part deals with the testing of the biological properties of hydrogel based on thiolated hyaluronan. This material was tested in the terms of cytotoxicity of the extract and evaluated by the MTT method and also the ability of cell proliferation especially inside the hydrogel was tested.

Keywords: biomaterial, hydrogel, hyaluronic acid, natural polymer, tissue engineering

Velice ráda bych poděkovala své vedoucí bakalářské práce Ing. Simoně Káčerové za odborné vedení, pomoc při práci v laboratoři a velkou trpělivost při vedení této práce.

Dále mé poděkování patří panu prof. Ing. Petru Humpolíčkovi, Ph.D. za cenné rady a konzultace a také kolektivu Cellab za jejich ochotu mi s čímkoliv v laboratoři pomoci.

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

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 HYDROGELY.....	11
1.1 ROZDĚLENÍ HYDROGELŮ	11
2 PŘÍRODNÍ POLYMERY	13
2.1 HYDROGELY NA BÁZI PROTEINŮ.....	14
2.1.1 Kolagen	14
2.1.2 Želatina.....	15
2.1.3 Fibroin	16
2.2 HYDROGELY NA BÁZI POLYSACHARIDŮ	16
2.2.1 Alginát.....	17
2.2.2 Chitosan.....	17
3 VLASTNOSTI HYDROGELŮ	19
3.1 BIODROPATIBILITA	19
3.1.1 <i>In vitro</i> testování biodropatibility.....	20
3.1.2 <i>In vivo</i> testování biodropatibility.....	20
3.2 BIODEGRADABILITA	20
3.3 ARCHITEKTURA.....	22
3.4 SWELLING	23
3.5 MECHANICKÉ VLASTNOSTI.....	23
4 APLIKACE HYDROGELŮ.....	25
4.1 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ	25
4.1.1 Hydrogely na bázi hyaluronanu v tkáňovém inženýrství.....	26
4.2 TRANSPORT LÉČIV	26
4.2.1 Hydrogely na bázi hyaluronanu pro transport léčiv	27
5 KYSELINA HYALURONOVÁ.....	29
5.1 HISTORIE	29
5.2 ROLE HYALURONANU <i>IN VIVO</i>	30
5.3 ZDROJ.....	32
5.4 VYUŽITÍ	33
5.5 CHEMICKÁ MODIFIKACE.....	33
5.5.1 Modifikace karboxylové skupiny.....	34
5.5.2 Modifikace hydroxylové skupiny	34
5.5.3 Modifikace <i>N</i> -acetylové skupiny	35

II PRAKTICKÁ ČÁST	36
6 MATERIÁL A METODIKA	37
6.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	37
6.2 PŘÍPRAVA HYDROGELU	37
6.3 POUŽITÁ BUNĚČNÁ LINIE A KULTIVAČNÍ MÉDIUM	38
6.4 PASÁŽOVÁNÍ BUNĚK	38
6.5 TESTOVÁNÍ CYTOTOXICITY HYDROGELU.....	38
6.5.1 Příprava extraktu	38
6.5.2 MTT test.....	39
6.6 PROLIFERACE BUNĚK UVNITŘ HYDROGELU	39
6.6.1 Barvení buněčné DNA a aktinových vláken.....	40
7 VÝSLEDKY A DISKUZE	41
7.1 VÝSLEDKY CYTOTOXICITY HYDROGELU	41
7.2 VÝSLEDKY PROLIFERACE BUNĚK UVNITŘ HYDROGELU	42
ZÁVĚR	45
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	46
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	53
SEZNAM OBRÁZKŮ	54

ÚVOD

Nedostatek dárců orgánů motivoval vědce po celém světě, aby hledali alternativy k boji proti stále rostoucí poptávce po orgánech. Poslední dvě desetiletí se tento rozšířený problém řeší vývojem a integrací vysoce biokompatibilních materiálů pro regeneraci tkání. Tkáňové inženýrství a sestavování funkčních struktur, které jsou schopny obnovit či zachovat poškozené tkáně a orgány, ovlivnily celé spektrum medicíny a zdravotní péče. Metody kombinující biomimetické materiály, buňky a bioaktivní molekuly hrají rozhodující roli při podpoře regenerace poškozených tkání nebo také se využívají jako terapeutické systémy [1].

Hydrogely jsou jedinečnou skupinou biokompatibilních trojrozměrných polymerních materiálů, které mohou fungovat jako tkáňové nosiče (scaffoldy) pro růst buněk. Poskytují mechanickou podporu buňkám v konstruovaných tkáních a díky vysokému obsahu vody v hydrogelu vytváří ideální prostředí pro přežití buněk a strukturu, která napodobuje nativní tkáň. Dnes jsou hojně využívány v biomedicíně výzkumu, především v oblastech transportu léčiv, regenerativní medicíně a tkáňovém inženýrství [1, 2].

Hyaluronan je přírodní polymer který je zároveň vhodným stavebním prvkem pro výrobu scaffoldů pro tkáňové inženýrství, díky jeho vlastnostem jako je biokompatibilita, biodegradabilita, bioaktivita a neimunogenita. Aby bylo možné získat hydrogely na bázi hyaluronanu s vhodnými mechanickými vlastnostmi a rychlostí degradace při současném zachování jejich přirozených biologických funkcí, je často nutná řízená chemická modifikace a kovalentní síťování. Hydrogely na bázi hyaluronanu jsou makroskopické sítě které jsou tvořené z náhodně propojených řetězců, které postrádají strukturní komplexnost a funkční rozmanitost pozorovanou v nativní extracelulární matrix [3].

V praktické části byly hodnoceny biologické vlastnosti hydrogelu na bázi chemicky modifikovaného hyaluronanu. U hydrogelu byl proveden test cytotoxicity extraktu a následně hodnocení proliferace buněčné linie NIH/3T3 uvnitř hydrogelu.

I. TEORETICKÁ ČÁST

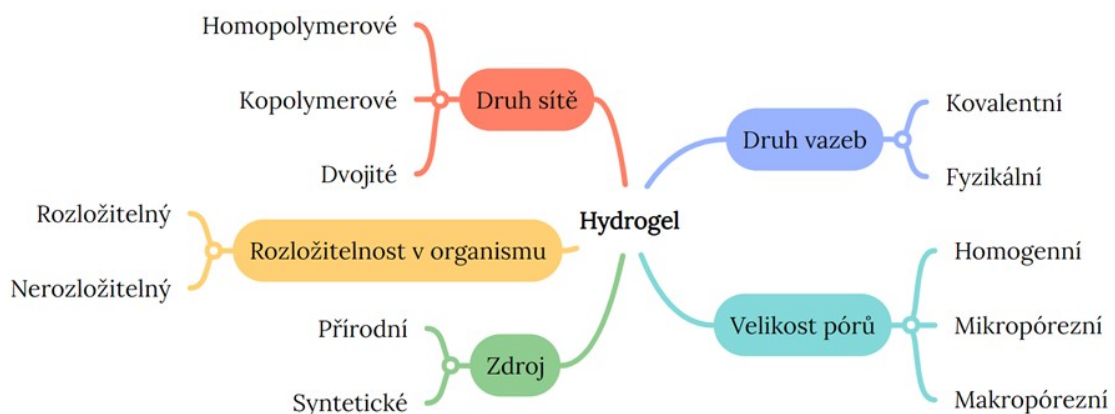
1 HYDROGELY

Na počátku 50. let Otto Wichterle a Drahošlav Lím navrhli nový biomateriál pro aplikaci v oftalmologii, hydrogel na bázi poly(2-hydroxyethylmethakrylátu). Po tomto materiálu požadovali nejen tvarovou stabilitu a elastické vlastnosti podobné okolní tkáni, ale také chemickou, biochemickou stabilitu a vysokou propustnost pro živiny rozpustné ve vodě a metabolity [4]. První aplikace hydrogelu se uskutečnila v roce 1960, kdy Wichterle a Lím jej použili jako materiál pro výrobu měkkých kontaktních čoček [5]. V oftalmologii byly hydrogely používány také na mikrokapilární drenáže zeleného zákalu, výplně pro obnovu sítnice a výplně po enukleaci. Dále byly aplikovány také jako prevence tvorby jizev po chirurgickém zákroku, jako ochrana perforovaných ušních bubínků, při problémech s hlasivkami či při plastikách nosu. Tyto aplikace odstartovaly studie vztahu mezi strukturou zesíťovaných hydrofilních polymerů a jejich biokompatibilitou a následně byly jejich výsledky přeneseny do klinické praxe [4].

Hydrogely jsou definovány jako ve vodě nerozpustné trojrozměrné polymerní sítě, které mají schopnost absorbovat velké množství vody nebo tělní tekutiny. Přítomnost hydrofilních skupin v jejich struktuře umožňuje vazbu vody a finální materiál jí může obsahovat přes 99,9 % [6, 7]. Pokud je použit pro výrobu hydrogelu vhodný materiál, může se vyznačovat vlastnostmi jako je biokompatibilita, elasticita, porézní struktura, schopnost působit jako růstové médium a také napodobovat extracelulární matrix, což jim zajišťuje široké uplatnění [2]. Zjednodušeně řečeno, jejich mechanismus spočívá v začlenění buněk do jejich struktury, přičemž hydrogel nakonec v těle degraduje a zanechá po sobě zdravou tkáň [1].

1.1 Rozdělení hydrogelů

Hydrogely jsou obecně klasifikovány dle několika kritérií viz Obrázek 1.



Obrázek 1: Klasifikace hydrogelů; upraveno podle [4]

Pokud se zaměříme na rozdělení hydrogelů podle zdroje polymerní látky, kterou využíváme k jejich výrobě, můžeme je rozdělit na syntetické a přírodní. Každá skupina má však své výhody i nevýhody [8].

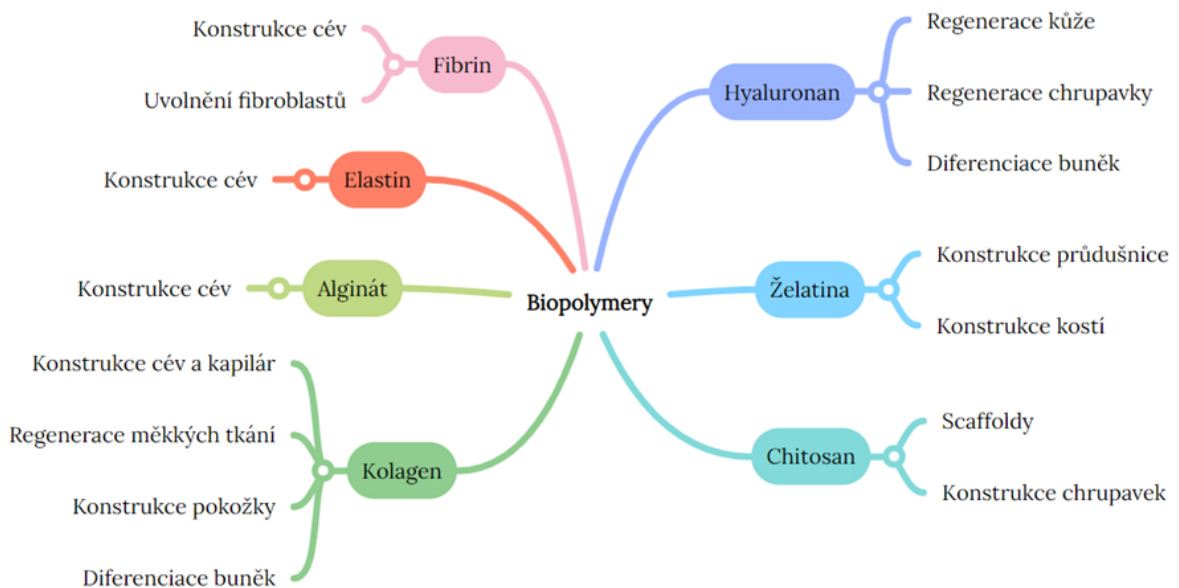
Syntetické polymery jsou vysoce univerzální materiály se snadno kontrolovatelnými fyzikálními a chemickými vlastnostmi. Tyto syntetické polymery a jejich směsi jsou obecně lépe zpracovatelné a můžeme přesněji předvídat výsledné vlastnosti hydrogelu. Naopak, ve srovnání s přírodními polymery jsou ty syntetické méně biokompatibilní a bioaktivní [5]. Do syntetických biologicky odbouratelných polymerů využívaných pro výrobu hydrogelů, můžeme zařadit například polyethylenglykol (PEG), poly(N-isopropylakrylamid) (PNIPAm), kyselinu polyglykolovou (PGA), a kyselinu poly(mléčnou a glykolovou) (PLGA) [9].

Hydrogely vyrobené z přírodních polymerů jsou hojně využívány v tkáňovém inženýrství díky svým vynikajícím vlastnostem, které budou podrobněji popsány v následujících kapitolách.

Přírodní a syntetické polymery se také mohou kombinovat za vzniku hybridních hydrogelů. Ty mohou získat vlastnosti, kterých nelze docílit použitím pouze jedné skupiny polymerů [8]. Každá medicínská aplikace vyžaduje jedinečnou kombinaci komponentních materiálů, s cílem sladit požadované strukturální i funkční vlastnosti. Jeden z nejrelevantnějších příkladů je kombinace proteinu a jiného polymeru [10].

2 PŘÍRODNÍ POLYMERY

Přírodní materiály se evolučně vyvíjely po dobu milionu let v odlišném prostředí, a proto lze pozorovat rozmanitost v makromolekulárním složení, což má za následek mnoho strukturálních i biologických vlastností [11]. Mnoho polymerů používaných k výrobě hydrogelů pochází právě z přírody, jedná se například o alginát, fibrin, chitosan, kolagen a z něj odvozená želatina, hyaluronan sodný a mnoho dalších [2]. Přírodní polymery lze rozdělit do 2 skupin: na bázi proteinů a na bázi polysacharidů. Hydrogely jsou většinou vytvořené z proteinů a složek extracelulárního matrixu, což je činí vhodnými pro mnoho biomedicínských aplikací [12]. Například hydrogely připravené z kolagenu a kyseliny hyaluronové velmi dobře napodobují strukturu a funkci extracelulárního matrixu, a proto se na jejich vývoj zaměřila řada studií [13]. Přírodní polymery mají několik výhod oproti syntetickým polymerům: 1) vykazují vyšší biokompatibilitu; 2) mohou obsahovat složky podporující buněčnou adhezi a ovlivňující chování buňky; 3) mohou být tělem rozpoznány a metabolicky degradovány, umožňují remodelaci buňkami a zároveň ukládání buněčně produkovaného extracelulárního matrixu [11]; 4) mohou vykazovat strukturu napodobující extracelulární matrix původní tkáně, díky které dokáže podporovat přichycení buněk, jejich následnou proliferaci a diferenciaci. Mezi jejich nevýhody patří: 1) náchylnost k mechanickému narušení [14]; 2) nekontrolovatelnost jejich degradace a struktury; 3) potenciální imunogenita [8].



Obrázek 2: Typy biopolymerů používaných v tkáňovém inženýrství; upraveno podle [15]

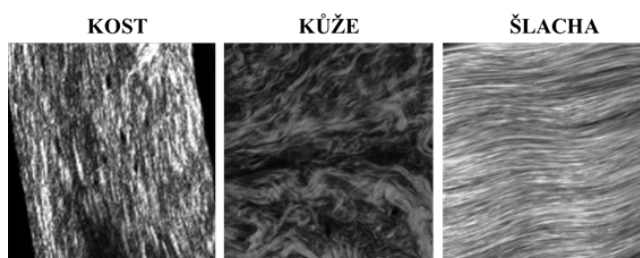
2.1 Hydrogely na bázi proteinů

V nativním prostředí hrají proteiny zásadní strukturální a signální roli extracelulárního matrixu. Není divu, že z tohoto důvodu jsou polymery na bázi peptidů a proteinů široce využívány k výrobě hydrogelů pro tkáňové inženýrství [15]. I přestože hydrogely na bázi přírodních proteinů vynikají svou biokompatibilitou, často vykazují špatné mechanické vlastnosti, což je omezující při aplikacích, kde jsou požadovány hydrogely s vysokou pevností [16].

Jelikož jsou proteinové substráty běžně získávány z přírodních zdrojů, dosažení vysoké čistoty je často náročné. Kontaminace a heterogenní substráty totiž omezují použití v klinické praxi. Použití rekombinantních proteinů částečně řeší tento problém a navíc se dají snadno produkovat ve velkém množství [15].

2.1.1 Kolagen

Kolagen je nejrozšířenějším proteinem v extracelulárním matrixu savců. Buňky interagují s kolagenem prostřednictvím různých povrchových receptorů, jako jsou například integriny. Kolagen může být degradován matrixovými metaloproteinázami, které hrají důležitou roli při přestavbě extracelulárního matrix a vývoji tkání. Doposud bylo identifikováno 28 typů kolagenu. Označují se římskými číslicemi I až XXVIII v pořadí od jejich objevení. Skládají se z různých kombinací nejméně 46 typů polypeptidových řetězců. Kolageny jsou na základě své struktury a funkce rozděleny do těchto podskupin: 1) fibrilární kolageny (typy I, II, III, V, XI, XXIV a XXVII); 2) fibrilární kolageny s přerušenými trojitými šroubovicemi (typy IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI a XXII); 3) kolageny tvořící koráلكová vlákna (typ VI); 4) kolageny bazální membrány (typy IV, VII, XV a XVIII); 5) transmembránové kolageny (typy XIII, XVII, XXIII a XXV); 6) kolageny hexagonální sítě (typy VIII a X). V tkáňovém inženýrství je nejvíce využívána skupina fibrilárních kolagenů. Kolageny I, II a III jsou nejvíce zastoupeny v extracelulárním matrix tkání a nejhojněji se vyskytují v kostech, cévách, kůži, šlachách a vláknitých pouzdrech orgánů [13].



Obrázek 3: SHG snímky myší tkáně na bázi kolagenu; upraveno podle [18]

Kolagen lze získat z různých druhů zvířat a tkání, a je tak široce dostupný pro výzkumné a klinické aplikace [13]. Nevýhodou kolagenu pocházejícího ze zvířecích tkání je potenciální imunologická a alergická reakce. Proto může bezpečný zdroj kolagenu, který neobsahuje živočišné složky, snížit riziko postimplantačních negativních reakcí. Rekombinantní lidský kolagen je slibným materiálem právě proto, že není živočišného původu, je získáván ve vysoké čistotě a nepředstavuje riziko kontaminace priony či viry [17].

Hydrogely na bázi kolagenu mohou být připraveny buď samovolným zesíťováním kolagenních vláken, nebo přidáním chemických síťovacích činidel. Modifikace kolagenu jsou však omezeny vzhledem ke složitosti jeho struktury a také požadavkům na biokompatibilitu výsledných materiálů [13].

Komerční aplikace kolagenových matic zahrnují hojení ran a kůže či regeneraci kloubů [13]. Například kolagenový hydrogel s přidavkem kyseliny hyaluronové od firmy Dr. Derm Professional je kosmetický přípravek, který pomáhá regenerovat a obnovovat jemnost, pružnost a hydrataci pokožky. Dále se kolagen v kombinaci s alginátem sodným nebo agarózou používá pro výrobu bioinků, které jsou součástí 3D bio tisku [18].

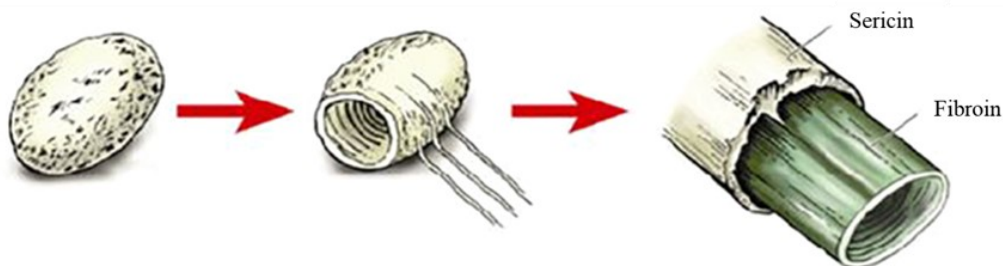
2.1.2 Želatina

Želatina je získávána částečnou hydrolýzou a denaturací kolagenu [15]. Proto si želatina zachovává své bioaktivní vlastnosti, jako je výskyt RGD sekvencí, citlivost na degradaci metaloproteinázami [5] a snadno podléhá biodegradaci za vzniku dobře tolerovaných peptidických trávicích produktů [15]. Stejně jako většina hydrogelů na bázi přírodních polymerů, ani ty ze želatiny nemají významnou mechanickou pevnost a podléhají rychlé enzymatické degradaci [5].

Hydrogely na bázi želatiny se mohou využívat jako nosiče léčiv, bioinky, při transdermální terapii, hojení ran a regeneraci tkání kostí či průdušnice [19]. Vědecká skupina Hong a spol. vyrobila silně adhezivní hemostatický hydrogel pro ošetření tepenných a srdečních krvácení, který je na bázi želatiny a zesíťuje pomocí UV záření. Nicméně testování tohoto hydrogelu se zatím provádělo pouze na zvířatech, ale činí z něj slibné "biolepidlo" pro použití v chirurgii a nouzové zastavení krvácení [20].

2.1.3 Fibroin

Hedvábí je vysoce kvalitní přírodní vlákno získávané z kokonů bource morušového (*Bombyx Mori*). Skládá se ze 75 % hedvábného fibroinu a sericinu [21]. Fibroin tvoří kostru hedvábného vlákna a sericin ho obklopuje a spojuje dohromady. Aby vlákno získalo měkkost, přilnavost, lesk a hladkost, musí být z fibroinu odstraněn sericin. Ten je buď odpadním produktem, nebo může být formován do podoby gelu [22].



Obrázek 4: Strukturální součásti hedvábí; upraveno podle [25]

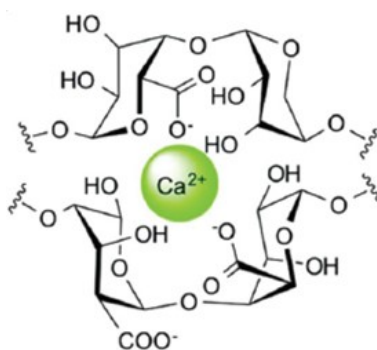
Hydrogely na bázi fibroinu lze použít v tkáňovém inženýrství zaměřeném na chrupavky, ale také jako nosiče léčiv, scaffoldy, umělou kůži, kontaktní čočky či enkapsulační matrice pro Langerhansovy ostrůvky [22].

2.2 Hydrogely na bázi polysacharidů

Hydrogely na bázi polysacharidů jsou také široce využívanou třídou přírodních materiálů pro tkáňové inženýrství. Polysacharidy se buď přirozeně vyskytují v extracelulárním matrixu, kde hrají důležitou roli v chování buněk a adsorpci bílkovin, nebo jsou derivovány z hojně se vyskytujících přírodních zdrojů, a to z rostlin, řas či zvířat. Vlastnosti konkrétního polysacharidu jsou dány substitučními vzorci na jednotlivých cukerných stavebních blocích, které jsou pak spojeny pomocí O-glykosidických vazeb a mohou tvořit lineární, nebo rozvětvené polymery s vysokou molární hmotností. Tyto polymery jsou obvykle vysoce polydisperzní, a to jak z hlediska struktury, tak sekvence. Ve srovnání s materiály na bázi proteinů vykazují značně menší imunitní odpověď, vysokou rozpustnost, hydrofilitu, která vede k vysokému bobtnání hydrogelů, a také obsahují množství reaktivních skupin pro chemickou modifikaci a síťování [15].

2.2.1 Alginát

Alginát je polysacharidová složka buněčných stěn hnědých řas a některých bakterií. Jeho struktura je založena na dvou různých monomerech: β -D-mannuronátu (M) a α -L-guluronátu (G) uspořádaných do bloků [12]. Pořadí a poměr těchto bloků určuje vlastnosti konkrétního alginátu, což zase závisí na druhu, ve kterém se vyrábí. Alginát dokáže snadno zgelovatět pomocí přidání dvojmocných kationtů. Předpokládá se, že ke gelaci dochází prostřednictvím "egg-box" modelu, kdy se vápenaté ionty nacházejí mezi poly-G sekvencemi [15].



Obrázek 5: "Egg-box" model pomocí vápenatých kationtů; upraveno podle [16]

Z biologického hlediska je alginát netoxický, nezáňtlivý, *in vivo* nedochází k degradaci, nicméně tendence buněk adherovat je slabá a mechanické vlastnosti jsou nedostačující. Aplikace alginátu byly zkoumány na různých tkáních, jako jsou játra, nervy, srdce a chrupavka [12]. Vývoj mikrofabrikačních technologií umožnil výrobu alginátových hydrogelů se složitější strukturou. Jia a spol. [23] vyrobili pomocí mikrofluidiky superhelikální dutá hydrogelová mikrovlákna, která jsou schopna rekonstruovat složitou architekturu šroubovicových krevních cév. Tyto hydrogely se podařilo vyrobit s působivým rozlišením (v μm) a použít je k podpoře tubulárního růstu lidského endotelu [15].

2.2.2 Chitosan

Chitosan je kationtový lineární polysacharid obsahující *N*-acetyl-D-glukosamin a D-glukosamin. Vzniká deacetylací chitinu, který se nachází v exoskeletech a schránkách členovců. Strukturálně je chitosan podobný GAG obsažených v extracelulární matrix. Je antibakteriální, snadno sterilizovatelný, netoxický, biokompatibilní, biodegradabilní a také je citlivý na pH, kdy se snadno rozpouští při nízkém pH, zatímco při vysokém pH je nerozpustný. Vzhledem k těmto vlastnostem je chitosan používán v biomedicínských

oborech ve formě nanočástic, vláken, filmů nebo hydrogelů. Chitosan snadno vytváří komplexy se záporně nabitými polysacharidy, jako je kyselina hyaluronová nebo chondroitin sulfát, což z něj činí vhodnou strukturní složku kompozitních gelů [12, 15, 24].

Například Müller a spol. [25] použili N,O-karboxymethylchitosan k výrobě polymerů rozpustných ve vodě, které jsou schopny vytvářet komplexy s polyfosfátem a při působení iontů Ca^{2+} vytvářet s alginátem kompozitní, tisknutelné hydrogely. Bylo zjištěno, že přítomnost polyfosfátu podporuje osteogenezi implantovaných gelů *in vivo*, což z těchto scaffoldů činí nadějně materiály pro kostní tkáňové inženýrství [15].

3 VLASTNOSTI HYDROGELŮ

Hydrogely jsou v současné době typem materiálu, který se těší velkému zájmu v řadě různých oborů. V oblasti tkáňového inženýrství však neexistuje ideální hydrogel, který by bylo možné použít ve všech jeho odvětvích. Místo toho je třeba přizpůsobit vlastnosti hydrogelu dané aplikaci, tedy typu buněk, tkáni a požadovanému výsledku. Například hydrogel, který bude použit jako trvalý scaffold pro růst náhradní kosti, se bude velmi lišit od toho, který dodává dočasnou zásobárnu buněk pro regeneraci tkáně. Pro použití hydrogelu je důležité zjistit jeho vlastnosti, jako jsou například mechanické parametry, bobtnání, tepelná stabilita, rychlost degradace a také biologická odezva na materiál [15, 26].

3.1 Biokompatibilita

Biokompatibilita je nejčastěji používaný termín pro popis vhodných biologických požadavků na biomateriál nebo biomateriály použité ve zdravotnickém prostředí [27]. Biokompatibilita poprvé upoutala pozornost vědců ve 40. letech 20. století v souvislosti s lékařskými implantáty a jejich příznivými a škodlivými interakcemi s organismem. V roce 1987 byla biokompatibilita definována jako "schopnost biomateriálu fungovat s vhodnou odezvou hostitele při konkrétní aplikaci" [5]. Tato definice spojuje vlastnosti materiálu s biologickými požadavky, s konkrétní aplikací, konkrétním zdravotnickým prostředkem nebo biomateriálem používaným jako zdravotnický prostředek. "Vhodná reakce hostitele" znamená charakterizaci reakcí tkáně, které by se mohly ukázat jako škodlivé pro hostitele a/nebo by mohly vést ke konečnému selhání biomateriálu, zdravotnického prostředí nebo protézy prostřednictvím biologických mechanismů [27].

Obecně platí, že po implantaci biomateriálu reaguje tělo jednou nebo více pozitivními a/nebo negativními reakcemi. Mezi ně můžeme zařadit interakci s krví, interakci s kmenovými buňkami, tvorba provizorní matrix, dočasný zánět, hojení ran, tvorba granulační tkáně, imunitní reakce na cizí těleso či oxidační stres. Dále se může vytvořit fibrózní pouzdro, které obklopuje implantát nebo prostupuje porézním materiálem. Kromě toho by se v těle mohla vyvinout získaná nebo vrozená imunitní reakce na biologickou složku zařízení, což by mohlo způsobit, že biomateriál nebude dále již použitelný [5].

Mezinárodní normy, jako je ISO 10993-1, se používají k prokázání shody s právními předpisy, která je nutná pro povolení k uvedení na trh nebo pro zahájení klinických zkoušek. V části 1 je popsán racionální výběr testů, v části 2 jsou podrobně popsána doporučení

týkající se dobrých životních podmínek zvířat a části 3 až 20 se týkají specifických aspektů postupů testování biokompatibility nebo specifických postupů testování materiálů [28].

3.1.1 *In vitro* testování biokompatibility

Nejběžnějším typem testu je použití buněčných kultur ke zjištění cytotoxicity, buněčné adheze nebo buněčné smrti. *In vitro* testy se hojně používají při posuzování biokompatibility biomateriálů, zdravotnických prostředků a protéz. Pro hodnocení biokompatibility se běžně používají tři typy testů – extrakt, přímý a nepřímý kontakt. Při těchto typech testů může zkoušející použít konkrétní typ buněk, pro který je zkoumaný biomateriál určen v klinické aplikaci [27].

Při testování cytotoxicity *in vitro* se mohou objevit dva nejčastější problémy. První problém nastává, pokud je doba testu příliš krátká, tj. několik hodin až několik dní. V takovém případě nemusí být poskytnuta dostatečná doba k adekvátnímu stanovení proliferace buněk, nebo smrti buněk nekrózou či apoptózou. Druhý problém spočívá ve výběru typu buněk pro test. Běžně se používají immortalizované buněčné linie získané z nádorů hlodavců nebo lidí, přičemž se prakticky neví, jaké jsou pozitivní nebo negativní znaky fenotypové exprese příslušné immortalizované buněčné linie ve srovnání s primární buňkou určenou pro hodnocení biologické odpovědi a cytotoxicity [27].

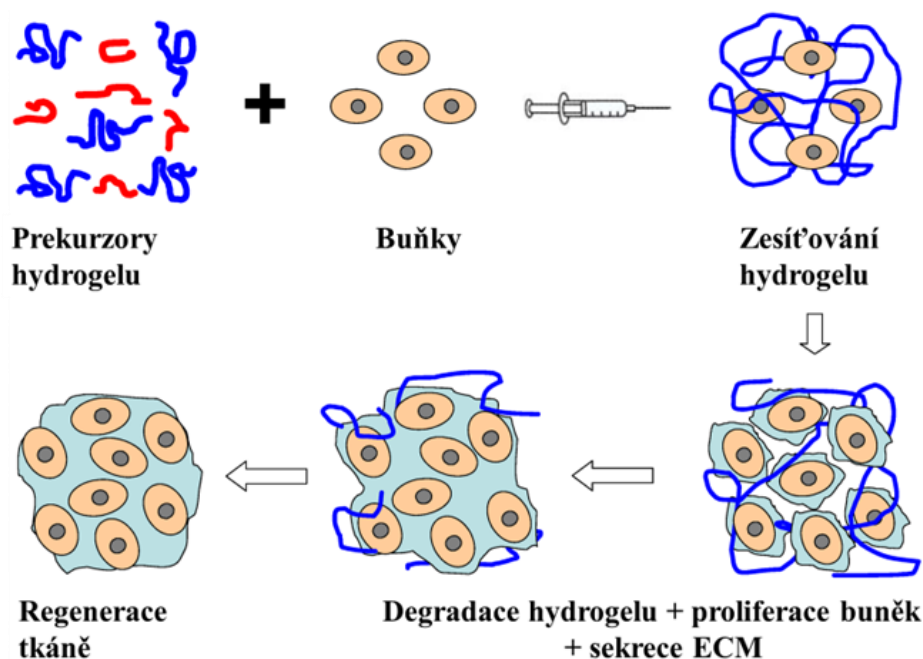
3.1.2 *In vivo* testování biokompatibility

Z praktického hlediska se hodnocení biokompatibility biomateriálů a zdravotnických prostředků *in vivo* provádí s cílem zjistit, zda prostředek funguje tak, jak má, tj. jak je navržen, a zda nepředstavuje pro pacienta žádné významné poškození. Cílem posouzení biokompatibility *in vivo* je tedy předpovědět, zda zdravotnický prostředek představuje potenciální poškození pacienta. Hodnocení se provádí v podmínkách simulujících klinické použití. Běžné *in vivo* testování zahrnuje testy například na citlivost, podráždění, systémovou či chronickou toxicitu, mutagenitu, karcinogenitu, reprodukční toxicitu, hemokompatibilitu či imunotoxicitu. Konečný výběr testů pro hodnocení *in vivo* je založen na vlastnostech a konečném použití uvažovaného biomateriálu. [27, 29].

3.2 Biodegradabilita

Degradaci můžeme definovat jako chemický proces, při kterém se štěpí kovalentní vazby. Pokud je degradace způsobena biologickým činitelem, jako je enzym, buňka nebo mikroorganismus, označujeme ji jako biodegradace.

V klinické praxi se často vyžaduje použití implantátů, které slouží spíše dočasně, ale u některých typů implantátů degradace žádoucí není. Proto je vhodné pro jejich výrobu použít degradabilní polymery, protože tyto implantáty není nutné chirurgicky odstranit s čímž se předchází riziku vzniku další rány či infekce. Kromě toho lze použitím rozložitelných biomateriálů někdy obejít problémy spojené s dlouhodobým odmítnutím imunitním systémem, chronickým zánětem na rozhraní implantátu a tkáně a selháním samotného zařízení. U degradabilních biomateriálů se musí brát v potaz toxicita jejich degradačních produktů a předčasné selhání implantátu v důsledku degradace. Návrh degradovatelného implantátu proto vyžaduje pečlivé testování potenciální toxicity jeho degradačních produktů a pečlivé zvážení mechanické integrity implantátu během požadované životnosti implantátu [29]. Biodegradabilní, injekčně aplikovatelné hydrogely mohou být využity jako systémy pro transport léčiv nebo jako nosiče buněk pro tkáňové inženýrství. Injektovatelné hydrogely jsou vhodné jako scaffoldy, protože jsou strukturálně podobné extracelulární matrix mnoha tkání, poskytují vysoce hydratované prostředí, jsou zpracovávány za relativně mírných podmínek a mohou být podávány minimálně invazivním způsobem. Degradaci hydrogelu lze upravit začleněním hydrolyticky nebo enzymaticky nestálých segmentů do struktury nebo použitím přírodních biopolymerů (chitosan, hyaluronát sodný, chondroitin sulfát, syntetické analogy extracelulární matrix, kopolymer alginátu a želatiny, ...), které jsou náchylné k enzymatické degradaci [30, 31].



Obrázek 6: Schematické znázornění injektovatelného biodegradabilního hydrogelu použitého k regeneraci tkání; upraveno podle [33]

Jak znázorňuje Obrázek 6, buňky jsou izolovány z malé biopsie a zapouzdřeny do hydrogelových prekurzorů, které jsou následně injekčně transplantovány pacientovi. Hydrogel udržuje buňky v místě poškozené tkáně a poskytuje počáteční strukturální podporu pro jejich růst, metabolismus a syntézu nové ECM. Hydrogel rychle degraduje, jakmile buňky začínají vylučovat ECM. Takto lze transplantovat kombinaci buněk, růstové faktory a hydrogel minimálně invazivním způsobem [30].

3.3 Architektura

Pórovitost biomateriálů hraje důležitou roli při usměrňování tvorby a funkce tkání. Značné procento pórovitosti scaffoldu je často nezbytné k tomu, aby bylo zajištěné homogenní rozložení a propojení buněk v celé konstruované tkáni. Zvýšená pórovitost má vliv na difúzi živin a kyslíku, zejména při absenci funkčního cévního systému a také proliferaci a migraci buněk [32, 33].

Ke tvorbě pórovitosti ve struktuře hydrogelu mohou být použity metody jako je vyluhování částic, lyofilizace, elektrospinning či pění plynem, díky kterým lze dosáhnout vytvoření makrostruktur o rozměrech v rozmezí 100 nanometrů až několik centimetrů [33].

Vyluhování částic začíná rozptýlením pórogeneru v polymerní fázi. Vhodnou technikou se polymer zpevní, čímž vznikne síť polymeru a pórogeneru. Rozpuštěné částice se následně vyluhují ponořením materiálu do selektivního rozpouštědla, což vede k vytvoření porézní sítě. Jako porogeny se při této technice běžně používají soli, cukry a želatina, které jsou všechny rozpustné ve vodě [32, 33].

Lyofilizace se hojně využívá k výrobě porézních hydrogelů pro tkáňové inženýrství. Tato metoda využívá rychlého ochlazení, které způsobí termodynamickou nestabilitu systému a oddělení fází. Rozpouštědlo se poté odstraní sublimací ve vakuu a v místech, které předtím vyplňovalo, zůstávají dutiny [32].

Při *electrospinningu* se polymery rozpouštějí v dostatečně vysoké koncentraci, aby došlo k určitému stupni fyzikálního zesíťování řetězců. Roztok polymeru se přivádí kapilární trubicí, ve které je nabit vysokým napětím. Vytváří se Taylorův kužel, který se natahuje a je přitahován k opačně nabitě sběrné terčové desce. Některé důležité metody konstruování 3D nanovláknenných struktur zahrnují vertikální pokládání nanovláknenných membrán, zabudování nanovláken do hydrogelů, svinování nanovláknenných podložek

do trubicové struktury či kombinace nanovláken s 3D tiskem. Kromě toho lze pomocí elektrospinningu vytvořit 3D strukturu mikrovláken [33, 34].

Zpěňování plynem vzniká pórovitost nukleací a růstem bublinek plynu uvnitř 3D struktury hydrogelu. Plynové bubliny mohou vznikat buď chemickou reakcí (NaHCO_3 vytváří CO_2 ; NH_4HCO_3 se rozkládá na CO_2 a NH_3), nebo přidáním inertního plynu (CO_2) k prekurzoru hydrogelu za vysokého tlaku [32, 33].

3.4 Swelling

Další vlastností hydrogelů je schopnost vykazovat měřitelnou změnu objemu v reakci na vnější podněty. Některé hydrogely vykazují tuto změnu objemu bobtnáním (swelling), zatímco jiné přecházejí mezi fázemi sol a gel. Stupeň zesíťování má vliv na plochu, která umožňuje difúzi napříč hydrogelovou sítí, a následně na schopnost hydrogelu přijímat vodu [35].

$$\text{poměr bobtnání} = \frac{M_h - M_d}{M_d} \times 100 \%$$

Obrázek 7: Poměr bobtnání; upraveno podle [39]

Rovnovážné bobtnání hydrogelu (swelling ratio) uvedeného na Obrázku 7 se znázorňuje jako poměr hmotnosti plně nabobtnalého hydrogelu M_h k hmotnosti dehydratovaného hydrogelu M_d . V hydrogelových systémech dochází k uvolňování léčiva především bobtnáním nebo smršťováním hydrogelu a difúzí léčiva polymerní sítí [6].

3.5 Mechanické vlastnosti

Mechanické vlastnosti scaffoldů v makroskopickém i mikroskopickém měřítku hrají důležitou roli při regulaci chování buněk. Biomechanické signály a interakce mezi buňkami a extracelulární matrix přímo ovlivňují tvar buněk [6]. Například mezenchymální kmenové buňky kultivované v hydrogelu s tuhostí nižší, střední a vyšší diferenciovaly do neurálního, myogenního či osteogenního fenotypu. Jinou morfologii vykazovaly bovinní kloubní chondrocyty kultivované v různě tuhých hydrogelech. Chondrocyty zapouzdřené v hydrogelu s vysokou tuhostí vykazovaly kulatou buněčnou morfologii a vysokou expresi chondrogenních genů, zatímco chondrocyty kultivované s nízkou tuhostí vykazují protáhlou morfologii a nízkou expresi chondrogenních genů [36].

Mechanické chování hydrogelů lze popsat pomocí teorie elasticity a viskoelasticity pryže, které jsou založeny na časově nezávislém a časově závislém obnovení orientace řetězce a struktury. Pomocí nich je možné analyzovat strukturu polymeru a určit efektivní molekulovou hmotnost mezi příčnými vazbami a také objasnit informace o počtu elasticky aktivních řetězců a tendenci k cyklizaci versus síťování [37].

4 APLIKACE HYDROGELŮ

Hydrogely jsou používány napříč různými obory zahrnující biomedicínské inženýrství, výroby osobní péče a kosmetiky, environmentální aplikace, těžby přírodních zdrojů a zemědělství. Důraz je kladen na mechanismus, jakým mohou hydrogely řešit klíčové aplikační potřeby v každé oblasti, a na to, jak lze vlastnosti hydrogelů účinně upravovat, aby se optimalizovala jejich výkonnost v každé aplikaci [38].



Obrázek 8: Aplikace hydrogelů v různých průmyslových odvětvích; upraveno podle [21]

Jak je patrné z Obrázku 8, biomedicínské aplikace hydrogelů, kam můžeme zařadit transport léčiv, tkáňové inženýrství, kontaktní čočky, či hojení ran, zastupují velkou část z celkových aplikací [38].

4.1 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství (angl. Tissue Engineering) je interdisciplinární obor, který využívá buněčné kultury, biomateriály, biochemické (např. růstové faktory) a fyzikální (např. mechanické zatížení) signály a jejich kombinace k vytváření struktur podobných tkáním. Cílem tkáňového inženýrství je poskytnout biologické náhrady, které mohou zachovávat, obnovovat nebo zlepšovat funkci poškozených tkání. Tkáňové inženýrství se často zaměřuje s regenerativní medicínou. Rozdíl je v tom, že tkáňové inženýrství obvykle

zahrnuje konstrukci tkáně *in vitro*, zatímco regenerativní medicína označuje nástroje, které pomáhají tělu regenerovat poškozenou tkáň *in vivo* [39].

V tomto odvětví se hydrogely používají k vyplnění prostoru, jako nosiče bioaktivních látek nebo jako trojrozměrné struktury, které jsou vyplněny buňkami a poskytují podněty k zajištění vývoje požadované tkáně. Hydrogely vyplňující prostor jsou nejčastěji používanou skupinou scaffoldů a používají se pro zvětšení objemu, k zabránění adheze a jako biologické "lepidlo". Kromě toho se hydrogelové scaffoldy používají také k transplantaci buněk a ke tvorbě mnoha tkání v těle, včetně chrupavek, kostí a hladkého svalstva [40].

4.1.1 Hydrogely na bázi hyaluronanu v tkáňovém inženýrství

Ve tkáňovém inženýrství bylo použití hydrogelů na bázi HA intenzivně studováno např. pro vytvoření umělé chrupavky. HA byla k přípravě využita hlavně z důvodu vysoké distribuce v chrupavčité ECM a její schopnosti zachovat morfologii chondrocytů, které hojně vylučují kolagen typu II a glykosaminoglykany v ECM nativní chrupavčité tkáně. Požadavek na vývoj vhodného biomateriálu se opírá o omezenou schopnost regenerace kloubní chrupavky. Tyto hydrogely se využívají pro individuální implantaci pupečnickových mezenchymálních kmenových buněk do kloubního místa. Studie regenerace chrupavčité tkáně na králičích modelech odhalily lepší efekt na opravu chrupavky při použití hydrogelu. Regenerovaná tkáň měla podobnou buněčnou architekturu a uspořádání kolagenu typu II jako tkáň přirozená [41].

Dále byl studován vliv hydrogelu na bázi kyseliny hyaluronové a chitosanu na regeneraci chrupavky u králíků. Do kloubních kolenních defektů byl aplikován hydrogel samotný nebo hydrogel se zapouzdřenými králičími chondrocyty. Po 12 týdnech od implantace se ukázalo, že regenerovaná tkáň u neléčených zvířat vypadala vláknitě a neprůhledně, zatímco u těch, u kterých byl aplikován samotný hydrogel, měla tkáň strukturu podobnou okolní nativní chrupavce a v přítomnosti gelu se zapouzdřenými chondrocyty nedošlo k významnému zlepšení kvality regenerované chrupavky [42].

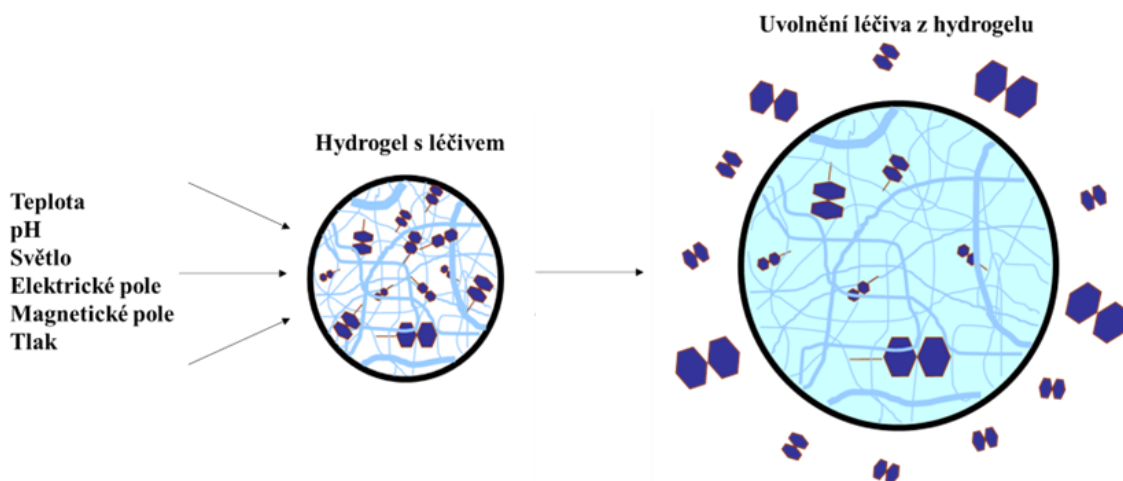
4.2 Transport léčiv

Systém cíleného podávání léčiv (angl. Drug Delivery System) je definován jako přípravek nebo zařízení, které umožňuje terapeutické látky selektivně dosáhnout místa účinku, aniž by se dostala k necílovým buňkám, orgánům nebo tkáním [43].

Vysoká vnitřní pórovitost hydrogelů umožňuje ukládání léčiv do scaffoldu a řízenou difúzi těchto léčiv ze scaffoldu rychlostí závislou na tortuozitě (tj. kombinaci velikosti pórů a jejich propojení) hydrogelové sítě. Chemická flexibilita hydrogelů může být také použita k zavedení afinitních míst pro nabité, hydrofobní nebo jiné specifické typy malých molekul za účelem zlepšení navázání léčiva nebo prodloužení kinetiky uvolňování. Vysoký obsah vody v hydrogelech vede obecně k nízkým zánětlivým reakcím v důsledku nízké nespecifické adsorpce proteinů, přinejmenším ve srovnání s jinými typy biomateriálů použitelných pro podávání léčiv. Biodegradabilitu nebo rozpustnost lze rovněž zajistit výběrem síťovadla nebo stavebního materiálu. Hlavním cílem většiny hydrogelových systémů pro podávání léčiv je udržet lokální koncentraci léčivé látky mezi hranicí toxicity a hodnotou, pod níž látka nemá žádnou funkčnost. Toto rozmezí se označuje jako terapeutické okno (také označován jako terapeutický index, TI) a u dlouhodobého podávání je cílem prodloužit dobu, po kterou dochází k uvolňování v tomto okně [29, 38].

4.2.1 Hydrogely na bázi hyaluronanu pro transport léčiv

Hydrogely na bázi kyseliny hyaluronové umožňují řízené a cílené uvolňování léčiv v reakci na různé podněty (pH, teplota, světlo, biochemické molekuly,...; viz Obrázek 9), což je velice výhodná vlastnost při cílené terapii [44].



Obrázek 9: Schematické znázornění uvolňování léčiva z hydrogelu reagujícího na podněty; upraveno podle [49, 50]

Hyaluronan hraje určitou roli při nádorovém bujení (viz kapitola 5.2.) a proto se v poslední době jeví jako slibná molekula pro návrh protinádorových systémů pro aktivní cílení na zhoubné nádory. V posledních letech bylo studováno několik hydrogelů na bázi HA

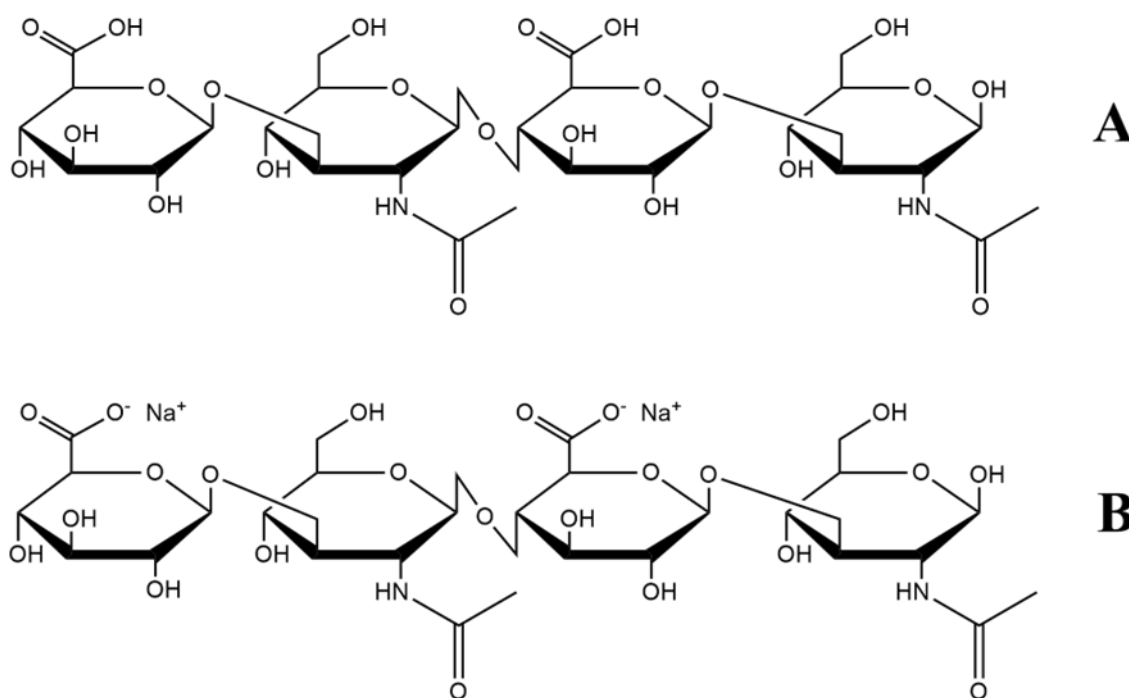
pro cílené podávání protinádorových léčiv, jako je doxorubicin, paklitaxel, cisplatina atd., s cílem zlepšit jejich protinádorovou aktivitu, lépe cílit protinádorová léčiva do nádorových buněk a efektivněji tyto buňky usmrcovat a zároveň snižovat systémové vedlejší účinky těchto léčiv [44, 45].

Například pro léčbu osteoartrózy kolenního kloubu se hojně používají hydrogely na bázi kyseliny hyaluronové ve formě intraartikulárních injekcí. Výhodou je jejich minimálně invazivní způsob podávání a prodloužená doba uchování léčiva. HA působí díky své viskoelasticitě jako lubrikant kloubu a jako tlumič, který umožňuje oddělení kloubních ploch při zátěži, dále má také chondroprotektivní a protizánětlivé účinky. Z těchto důvodů jsou hydrogely na bázi HA široce zkoumány a používány jako viskosuplementy a nosiče léčiv pro léčbu osteoartrózy [44, 46].

5 KYSELINA HYALURONOVÁ

Kyselina hyaluronová (HA) (viz Obrázek 10A) je polysacharid, konkrétně mukopolysacharid, který se přirozeně vyskytuje ve všech živých organismech [47]. Při fyziologickém pH má každá karboxylová skupina aniontový náboj, který může být vyvážen kationtem, např. Na^+ , K^+ , Ca^{2+} a Mg^{2+} . Proto je kyselina hyaluronová ve vodném roztoku záporně nabitá a tvoří soli obecně označované jako hyaluronan nebo hyaluronát (nejčastěji sodný; viz Obrázek 10B), které jsou vysoce hydrofilní, a tedy obklopené molekulami vody [48].

Hyaluronan je lineární polysacharid vyskytující se v extracelulární matrix tkání všech obratlovců a zařazujeme jej do skupiny glykosaminoglykanů (GAG). Má jednoduchou chemickou strukturu, ale od ostatních GAG se liší vysokou molekulovou hmotností, absencí sulfátových skupin a nepřítomností kovalentní vazby na jádrové proteiny [49].



Obrázek 10: (A) kyselina hyaluronová; (B) hyaluronát sodný

5.1 Historie

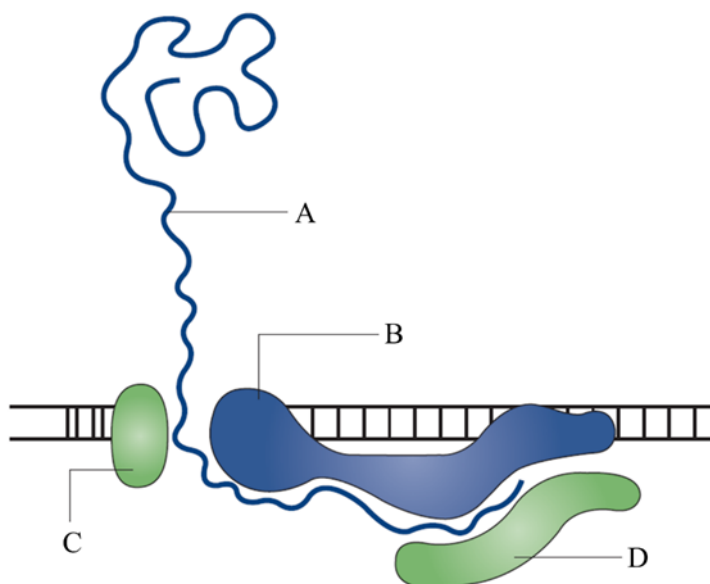
V roce 1934 izolovali Karl Meyer a jeho kolega John Palmer ze sklivce skotu dosud neznámou chemickou látku. Název "kyselina hyaluronová" odvodili od slova "*hyalos*" (z řeč. sklo) a kyseliny uronové, protože je to jedna z molekul cukru, která se v této látce nachází. HA byla poprvé komerčně využita v roce 1942, kdy Endre Balazs požádal o patent na její použití jako náhradu vaječného bílku v pekařských výrobcích [47].

První lékařské použití hyaluronanu pro člověka bylo na konci 50. let 20. století, kdy byl použit jako náhrada sklivce při operaci očí. Použitý hyaluronan byl původně izolován z lidské pupeční šňůry a krátce poté z kohoutích hřebenů ve vysoce přečištěné a vysokomolekulární formě [47]. Kromě toho bylo zjištěno, že HA je prospěšná také při léčbě kloubních a kožních onemocnění, při hojení ran a při augmentaci měkkých tkání. Od konce 80. let 20. století se HA používá také k formulaci systémů pro transport léčiv a dodnes pokračuje vývoj nosičů na bázi HA s cílem zlepšit terapeutickou efektivitu [48].

Chemickou strukturu hyaluronanu objasnil také Karl Mayer v 50. letech 20. století. Nejprve byl izolován jako kyselina, ale za fyziologických podmínek se choval jako sůl (hyaluronát sodný). Termín "hyaluronan" byl zaveden v roce 1986, aby odpovídal mezinárodnímu názvosloví polysacharidů, a připisuje se Endre Balazsovi, který jej zavedl, aby zahrnoval různé formy, kterých může tato molekula nabývat (v kyselém prostředí – kyselina hyaluronová, jako sůl – hyaluronát sodný) [47].

5.2 Role hyaluronanu *in vivo*

V buňkách je syntetizován pomocí jedné ze tří různých, ale příbuzných hyaluronanových syntetáz (HAS1, HAS2 a HAS3) jako velký nevětvený polymer opakujících se disacharidů kyseliny D-glukuronové a *N*-acetylglukosaminu. Hyaluronan se za fyziologických podmínek skládá z 2 000 - 25 000 jednotek těchto disacharidů, což odpovídá délce polymeru 2-25 μm . Hyaluronanové syntetázy jsou víceprůchodové transmembránové enzymy, jejichž aktivní místa vystupují z vnitřní strany plazmatické membrány. Hyaluronan je během své syntézy bez dalších úprav vylučován přes plazmatickou membránu na povrch buňky nebo do prostoru extracelulárního matrixu. V extracelulárním matrixu většiny tkání vysokomolekulární hyaluronan (až několik milionů daltonů) přispívá spolu s dalšími strukturními makromolekulami (například kolagen) k mechanické integritě sítě. Hyaluronan reguluje mnoho procesů prostřednictvím vazby s povrchovými buněčnými receptory, jako jsou CD44 a RHAMM za účelem vyvolání přenosu řady intracelulárních signálů, a to buď přímo, nebo aktivací jiných receptorů. Hyaluronan se také může udržet na povrchu buňky díky trvalým transmembránovým interakcím s jeho syntetázami. Oba způsoby navázání mohou vytvářet objemnou pericelulární matrix nebo "plášť", který obsahuje několik dalších molekul vázajících hyaluronan [3, 49, 50].

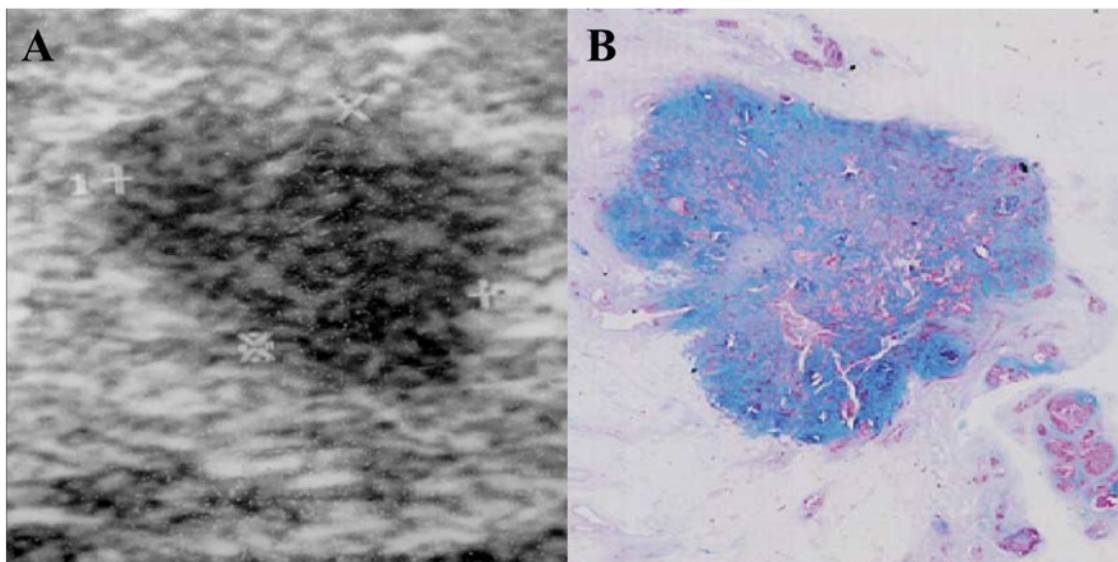


Obrázek 11: Syntéza hyaluronanu na vnitřní straně membrány; (A) hyaluronan, (B) hyaluronan syntetáza, (C) a (D) předpokládané regulační proteiny; upraveno podle [56]

Hyaluronan je v těle rychle degradován enzymem hyaluronidáza či reaktivními formami kyslíku, přičemž poločas rozpadu se pohybuje v rozmezí minut v krvi a v kůži či kloubech hodiny až dny. U člověka existuje šest hyaluronidázových genů, které kódují hyaluronidázy s různými vlastnostmi a umístěním v buňkách [3, 50].

Hyaluronan je u člověka přítomen zejména v extracelulární matrix pojivových, epiteliálních a nervových tkání. Zvláště hojně se vyskytuje v synoviální tekutině, chrupavkách, kůži, sklivci oka, hlasívkách a pupečníku [51]. Předpokládalo se, že hlavní funkce hyaluronanu spočívají pouze v lubrikaci kloubů, homeostázi tkání a udržování pojivových tkání pohromadě. Vysoká molekulová hmotnost hyaluronanu mu však přiřazuje viskózní vlastnosti, které přesahují rámec těchto funkcí. Hyaluronan se podílí na řadě fyziologických procesů včetně embryonálního vývoje, zánětu, regenerace tkání, migrace a proliferace buněk. Podporuje proces novotvorby krevních kapilár a hraje také určitou roli při rakovinovém bujení [49]. Obsah hyaluronanu odpovídá agresivitě nádorového bujení, kdy je výraznější zastoupení hyaluronanu ve stromatu (podpurná tkáň která obklopuje nádory) než v parenchymu (funkční tkáň orgánů). U pacientů jsou koncentrace hyaluronanu obvykle vyšší v maligních nádorech než v odpovídajících benigních nebo normálních tkáních a u některých typů nádorů je hladina hyaluronanu ukazatelem pro malignitu. Například u pacientů s karcinomy prsu a vaječníků jsou vysoké hladiny hyaluronanu ve stromatu spojeny s nízkým procentem přežití. Zajímavé je, že tvar invazivních lidských karcinomů prsu, jak

je zobrazen sonograficky (viz Obrázek 12A), přesně odpovídá tvaru zóny obohacené hyaluronanem, která je s těmito nádory spojena (viz Obrázek 12B). Z tohoto důvodu bylo navrženo, že sonografie by mohla být spolehlivější technikou pro detekci invazivních nádorů než mamografie, která někdy tyto nádory nedokáže odhalit [50].



Obrázek 12: Invazivní duktální karcinom prsu s negativním mamografickým nálezem; (A) sonografický obraz nádoru, (B) histologický obraz s alciánovou modří pro zobrazení hyaluronanu; upraveno podle [58]

5.3 Zdroj

Tradičně se hyaluronan získával z kohoutího hřebenu, žraločí kůže, hovězích očních bulv nebo lidské pupeční šňůry. Tyto produkty se však lišily mezi jednotlivými šaržemi, chyběla kontrola molekulové hmotnosti a její distribuce, a také byly přítomny bílkovinné nečistoty, které mohou být potenciálně imunogenní [3]. Kromě obratlovců jsou schopny produkovat hyaluronan také některé bakterie, zejména streptokoky např. *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* a kokobacily *Pasteurella multocida* jako extracelulární kapsuli. Tyto mikroorganismy jsou patogenní pro člověka a/nebo hospodářská zvířata a předpokládá se, že kapsule klame imunitní systém hostitele, který ji nerozpozná jako cizorodou. Kromě toho také kapsule pomáhá těmto bakteriím migrovat z epiteliálních vrstev do tkáně a chrání je před reaktivními formami kyslíku [51].

Moderní technologie umožnily výrobu vysokomolekulárního (obvykle $>1,0$ MDa) hyaluronanu ve velkém množství a vysoké čistotě pomocí bakteriální fermentace. V současné době je mikrobiálně vyráběný hyaluronan schválen pro široké použití v různých klinických léčebných postupech [3]. Streptokoky jsou přirozeně patogenní a mohou během

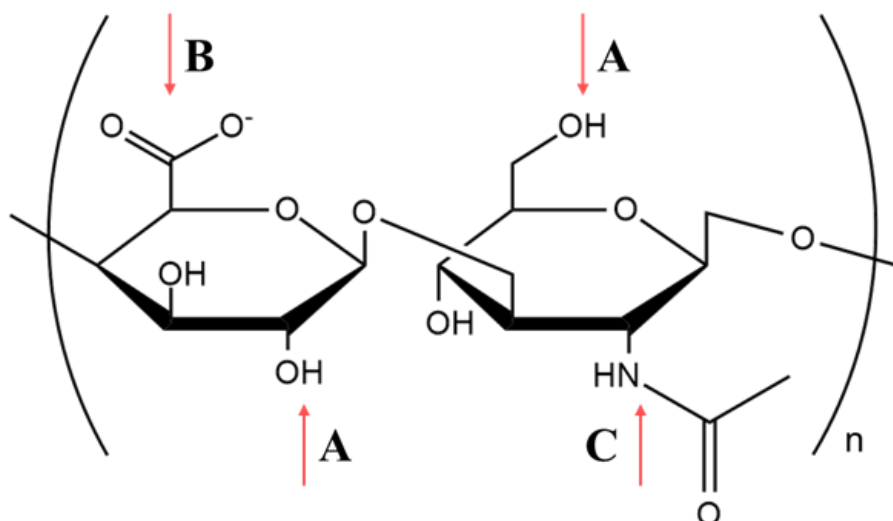
výroby uvolňovat exotoxiny nebo imunogeny, proto je nutný pečlivý proces získávání a čištění produktů, zejména pro lékařské a kosmetické aplikace, ale také v případě produktů podávaných injekčně [51].

5.4 Využití

Hyaluronan je vhodným stavebním prvkem pro výrobu umělých matic pro tkáňové inženýrství, protože je biokompatibilní, biodegradabilní, bioaktivní, neimunogenní a netrombogenní. Aby bylo možné získat hydrogely na bázi hyaluronanu s vhodnými mechanickými vlastnostmi a rychlostí degradace při současném zachování jejich přirozených biologických funkcí, je často nutná řízená chemická modifikace a kovalentní síťování. Změnou molekulové hmotnosti, stupně modifikace a koncentrace reaktivních prekurzorů hyaluronanu lze snadno vyrobit hydrogely s různou tuhostí, velikostí pórů a rychlostí degradace. Těmto hydrogelům můžeme přidat další biologické vlastnosti navázáním různých biologických molekul, cytokinů a terapeutických léčiv. Biokompatibilní a chemicky selektivní síťovadla umožňují zapouzdření buněk během gelování, čímž vznikají 3D buněčno-gelové konstrukce s těsnými interakcemi mezi buňkami a maticí [3].

5.5 Chemická modifikace

Hyaluronan je vysoce rozpustný ve vodných roztocích, což brání dlouhodobému použití *in vivo*. Proto se chemicky modifikuje, aby se zlepšily mechanické, biologické vlastnosti a biodegradace. Tyto deriváty mohou mít funkce a vlastnosti zcela odlišné od nativního hyaluronanu, ale stále si zachovávají vynikající cytocompatibilitu a biodegradabilitu. Široce používanou metodou modifikace hyaluronanu je jeho zesíťování za účelem výroby hydrogelů. Tyto hydrogely jsou však stále náchylné k biodegradaci prostřednictvím hyaluronidáz a reaktivních forem kyslíku. Proto se funkční skupiny hyaluronanu často modifikují ještě před zesíťováním. Funkční skupiny, jako je hydroxylová, karboxylová a N-acetylová (viz Obrázek 13), lze modifikovat různými chemickými reakcemi [52].



Obrázek 13: Struktura hyaluronanu s vyznačenými místy pro chemickou modifikaci: (A) hydroxylová skupina, (B) karboxylová skupina, (C) N-acetylová skupina; upraveno podle [60]

5.5.1 Modifikace karboxylové skupiny

Činidla, jako je například karbonyldiimidazol, karboimid či N-hydroxysukcinimid, se používají pro kondenzaci karboxylové skupiny a aminoskupiny za vzniku amidové vazby. Společným rysem těchto činidel je počáteční aktivace karboxylové skupiny, na kterou se poté může navázat ligand díky kterému dochází ke zesíťování. Připojením ligandu obsahující volné thiolové skupiny na polymerní řetězec HA vzniká thiolovaná kyselina hyaluronová (HA-SH), výsledný hydrogel je tedy zesíťován pomocí disulfidových vazeb. Tato modifikace je vědci velmi využívaná jak pro systémy podávání léčiv, tak ke tvorbě scaffoldů pro tkáňové inženýrství a hojení ran. Hydrogel zesíťovaný disulfidovou vazbou je také oblíbený díky jednoduché syntéze a metodě gelování, vlastnosti gelování *in situ* a biokompatibilitě [53–55].

Například Bian a spol. [54] připravili samosíťovací hydrogel pomocí jediné složky, thiolovaného derivátu hyaluronanu (HA-SH), a použili jej jako scaffold napodobující extracelulární matrix pro kultivaci fibroblastů a chondrocytů.

5.5.2 Modifikace hydroxylové skupiny

Chemickou modifikaci hydroxylových skupin lze provést pomocí tvorby etherů epoxidy nebo divinyl sulfonu, tvorby esterů např. pomocí anhydridu kyseliny methakrylové, tvorby hemiacetalů či oxidace pomocí jodistanu sodného [53, 56].

5.5.3 Modifikace *N*-acetylové skupiny

Deacetylací *N*-acetylové skupiny se získá aminoskupina, která pak může reagovat s karboxylovou kyselinou stejnými amidačními metodami popsanými v kapitole 5.5.1. Deacetylace se provádí například pomocí síranu hydrazinu [56].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 MATERIÁL A METODIKA

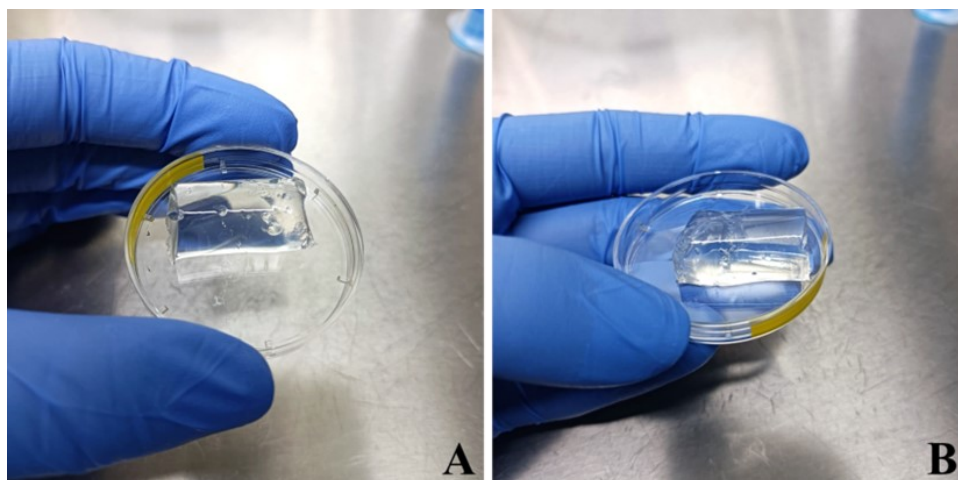
6.1 Použité chemikálie

ActinRedTM 555 (Thermo Fisher Scientific, USA); Calf serum (BioSera, Francie); Dimethylsulfoxid (DMSO) (Penta, Česká republika); Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (PAA Laboratories GmbH, Rakousko); Formaldehyd 36-38 % (Penta, Česká republika); Fosfátový pufr (PBS) (BioSera, Francie); Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, USA); MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) (Duchefa Biochemie, Nizozemsko); Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Rakousko); Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA); Trypsin (BioSera, Francie)

6.2 Příprava hydrogelu

Chemická modifikace hyaluronanu na jeho thiolovaný derivát (HA-SH) byla provedena na pracovišti Centrum polymerních systémů ve Zlíně postupem podle Bian a spol. [54] Ing. Simonou Káčerovou.

Hydrogely obsahující 1 % a 2 % HA-SH byly připraveny následujícím způsobem. Ve 3 ml UPW (ultrapure water, ultračistá voda) bylo rozpuštěno 30 mg HA-SH (pro 1% hydrogel) a 60 mg HA-SH (pro 2% hydrogel). Po rozpuštění HA-SH bylo upraveno pH roztoku pomocí 1M a 0,1M NaOH přibližně na 7,4. Při tomto pH začíná HA-SH samovolně síťovat. Roztok HA-SH byl vpraven do vhodné formy překrytou alobalem a následně vystaven působení vzduchu při pokojové teplotě po dobu 24 hodin v digestoři. Výsledkem bylo vytvoření dvou hydrogelů samozesíťovaných pomocí volných thiolových skupin v 1% a 2% koncentraci. Oba hydrogely se před testováním biologických vlastností vypíraly v PBS po dobu 24 h.



Obrázek 14: (A) 1% HA-SH hydrogel, (B) 2% HA-SH hydrogel

6.3 Použitá buněčná linie a kultivační médium

Testování biologických vlastností HA-SH hydrogelu v *in vitro* podmínkách bylo provedeno za použití buněčné linie myších embryonálních fibroblastů s označením NIH/3T3 (ATCC CRL-1658, USA). Jako kultivační médium bylo použito DMEM s přidavkem 10% Calf séra a 1% Penicillin/Streptomycin.

Buněčná linie byla kultivována v polystyrenových kultivačních nádobách T-75 (TPP, Švýcarsko) za stálých podmínek v inkubátoru Heracell 150i (Thermo Scientific, USA) při teplotě 37 °C s řízenou atmosférou (5 % CO₂) a za stálé relativní vlhkosti 90 %.

6.4 Pasážování buněk

Buňky v kultivační nádobě byly před pasážováním zkontrolovány mikroskopem. Z kultivační nádoby bylo odsáto médium a buňky byly propláchnuty pomocí PBS, které bylo následně odsáto. Poté byl k buňkám přidán trypsin, který enzymaticky přerušil vazby mezi buňkami a mezi buňkami a kultivační nádobou a dochází k uvolnění přisedlých buněk. Kultivační nádoba byla umístěna do inkubátoru po dobu 5-10 minut. Následně bylo přidáno stejné množství média jako trypsinu pro jeho neutralizaci. Celý obsah kultivační nádoby byl převeden do zkumavky. Zkumavka se vzniklým roztokem byla vložena do centrifugy Eppendorf 5702 R, kde odstředění probíhalo po dobu 3 minut, při otáčkách 1100 rpm a při teplotě 37 °C. Po odstředění se buňky usadily na dně zkumavky a supernatant byl odsán. K těmto buňkám byl do zkumavky přidán 1 ml média, díky čemuž vznikla koncentrace 2×10^7 buněk v 1 ml média.

6.5 Testování cytotoxicity hydrogelu

Cytokompatibilita hydrogelu byla stanovena dvěma metodami. Pomocí testování cytotoxicity extraktu dle normy ČSN EN ISO 10993-5 a také pomocí adheze, proliferace a růstu buněk uvnitř hydrogelu viz kapitola 6.6. Proliferace buněk uvnitř hydrogelu.

6.5.1 Příprava extraktu

Extrakty z hydrogelu byly připraveny dle normy ČSN EN ISO 10993-12, kdy extrakční poměr byl 0,1 g vzorku hydrogelu na 1 ml kultivačního média (DMEM). Zkumavky s extrakty byly vloženy na temperovanou třepačku při 37 °C po dobu 24 hodin. Dále byly do 96 jamkové destičky vysazeny buňky o koncentraci 10^5 na 1 ml média a následně byly 24 hodin inkubovány.

Než byl extrakt přidán k buňkám, byl pro sterilizaci ošetřen pomocí stříkačkového mikrofiltru s velikostí pórů 0,22 μm . Extrakt byl přidáván k buňkám v koncentracích 100 %, 75 % a 50 %. Koncentrace byly připraveny naředěním pomocí kultivačního média (DMEM). U části buněk bylo pouze vyměněno kultivační médium a sloužily jako reference. Takto byly buňky kultivovány po dobu 24 hodin. Po této době byla vyhodnocena cytotoxicita extraktů pomocí MTT testu.

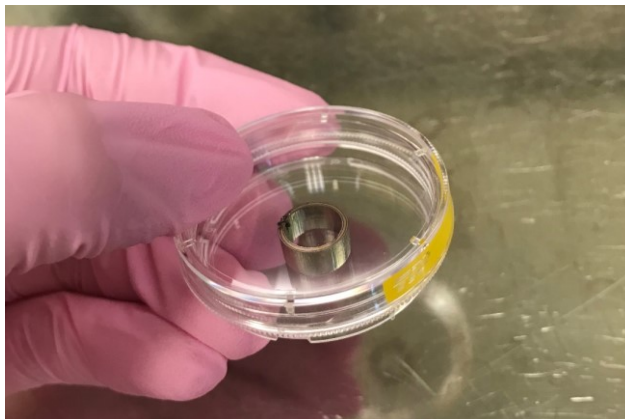
6.5.2 MTT test

MTT test se používá k měření metabolické aktivity buněk jako ukazatele jejich viability. Tento kolorimetrický test je založen na redukci žluté tetrazoliové soli (MTT) na fialové krystaly formazanu metabolicky aktivními buňkami. Mrtvé buňky nemají schopnost přeměnit MTT na formazanové krystaly, tedy čím je roztok tmavší, tím větší je počet životaschopných, metabolicky aktivních buněk. Nerozpustné krystaly formazanu se rozpustí pomocí solubilizačního roztoku a výsledný barevný roztok se kvantifikuje měřením absorbance při vlnové délce 500-600 nm pomocí spektrofotometru.

Nejdříve byl připraven roztok MTT rozpuštěním 5 mg MTT v 1 ml UPW. U všech buněk bylo vyměněno médium. Poté bylo do jednotlivých jamek napipetováno 10 μl roztoku MTT. Roztok MTT působil po dobu 4 hodin a následně byl obsah jamek odsát. Dále bylo k buňkám napipetováno 80 μl DMSO, pomocí kterého byly rozpuštěny formazanové krystaly. Po 15 minutách byla změřena absorbance při vlnové délce 570 nm pomocí přístroje Infinite M200 a dále byla nastavena referenční vlnová délka na 690 nm. Srovnání výsledků extraktů bylo provedeno s referencí, což byly buňky kultivované v čistém médiu, která odpovídá 100 % buněčné viabilitě, tedy hodnotě 1.

6.6 Proliferace buněk uvnitř hydrogelu

Do 24 jamkové destičky byl umístěn sterilizovaný kovový kroužek z chirurgické oceli, který byl vyplněn 2% HA-SH hydrogelem. Na povrch hydrogelu byly napipetovány buňky o koncentraci 2×10^5 a do úrovně kroužku bylo napipetováno DMEM médium. Předpokládalo se, že buňky z povrchu budou migrovat dovnitř hydrogelu, kde začnou proliferovat. Do další jamky byly napipetovány buňky, které byly kultivovány bez přítomnosti hydrogelu a sloužily jako reference. Takto byly buňky kultivovány po dobu 5 dnů v inkubátoru a každých 24 hodin bylo u nich vyměněno médium a pomocí mikroskopu se kontroloval jejich růst. Po uplynutí této doby byla nabarvena buněčná jádra a aktinová vlákna.



Obrázek 15: Kovový kroužek z chirurgické oceli

6.6.1 Barvení buněčné DNA a aktinových vláken

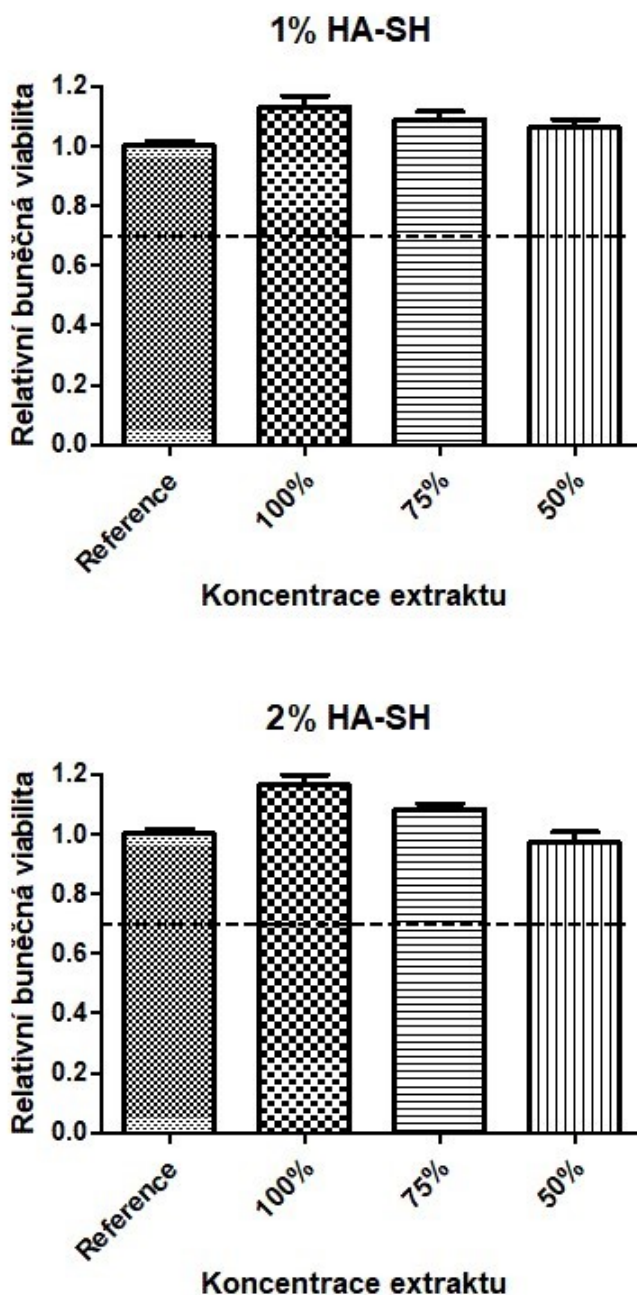
Jako první byla provedena fixace buněk. Nejdříve bylo odsáto médium z misky, která poté byla propláchnuta PBS. Následně byl přidán 4% roztok formaldehydu a nechal se působit po dobu 15 minut. Po odsátí formaldehydu byla miska opět propláchnuta PBS. Dále byl k buňkám přidán 0,5% Triton X-100 a po 5 minutách byl odsán. Poté byla miska třikrát promyta pomocí PBS, kdy při posledním promytí se již PBS neodsálo, ale ponechalo se v misce.

Následující barvení buněk probíhalo za tmy. K buňkám byly přidány 2 kapky barviva ActinRed™ 555, které obarvují aktinová vlákna cytoskeletu červeně a dále barvivo Hoechst v koncentraci 10 µg/ml, které obarvuje jadernou DNA modře. Miska byla zabalena do alobalu, aby nedocházelo k vysvícení barviva a byla vložena do inkubátoru po dobu 30 minut. V posledním kroku byl obsah misky odsán, bylo přidáno PBS a následně byly pořízeny fotografie buněk proliferujících uvnitř hydrogelu pomocí konfokálního mikroskopu Olympus FV 3000.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Výsledky cytotoxicity hydrogelu

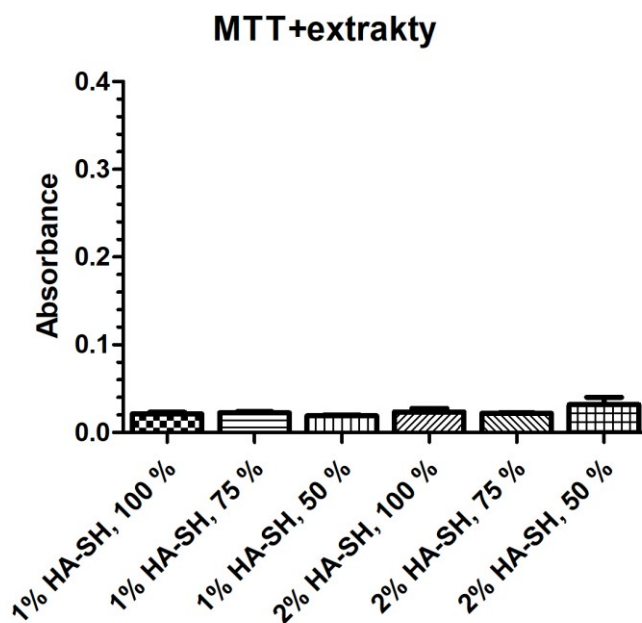
Obecně se při hodnocení biokompatibility materiálů provádí test stanovení cytotoxicity jako první, a proto byl test proveden u dvou hydrogelů, a to s 1% a 2% obsahem HA-SH. Stanovení cytotoxicity extraktu bylo provedeno metodou MTT u buněčné linie NIH/3T3.



Obrázek 16: Graf relativní buněčné viability v závislosti na koncentraci extraktu hydrogelu s obsahem 1% a 2% HA-SH

Podle normy ČSN EN ISO 10993-5 bylo určeno, že referenci odpovídá hodnota relativní buněčné viability rovno 1. Pro hodnocení bylo dále určeno že nad 0,7 relativní buněčné viability považujeme extrakt za netoxický.

Z grafů na Obrázku 16 lze vidět, že extrakty nebyly cytotoxické ani při 100% koncentraci. Buňky tedy dokázaly růst při všech koncentracích extraktu 1% i 2% HA-SH hydrogelu. Dále je patrné, že relativní buněčná viabilita vzrostla u buněk, které rostly v přítomnosti extraktu oproti referenci. Z tohoto důvodu byl proveden kontrolní test, zda samotný hydrogelový extrakt neinteraguje s MTT a neovlivňuje konečný výsledek. Ukázalo se, že tyto dvě složky spolu neinteragují. Hodnoty absorbancí extraktů se průměrně pohybovaly okolo hodnoty 0,02 viz Obrázek 17. Předpokladem tedy je, že samotné extrakty výrazně nenavýšovaly konečný výsledek relativní buněčné viability.

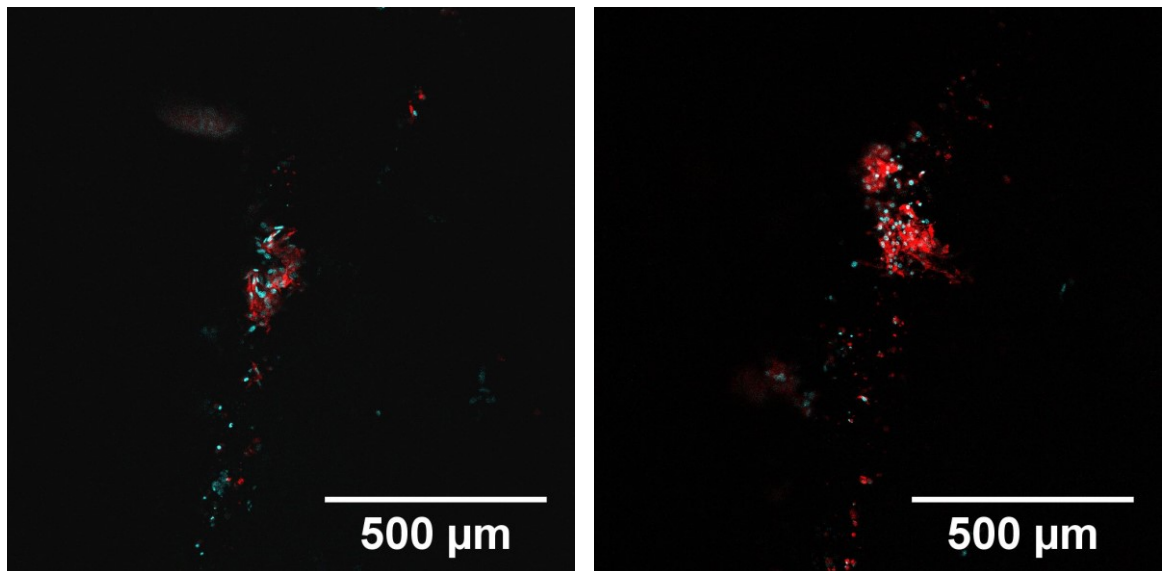


Obrázek 17: Absorbance jednotlivých extraktů hydrogelu

7.2 Výsledky proliferace buněk uvnitř hydrogelu

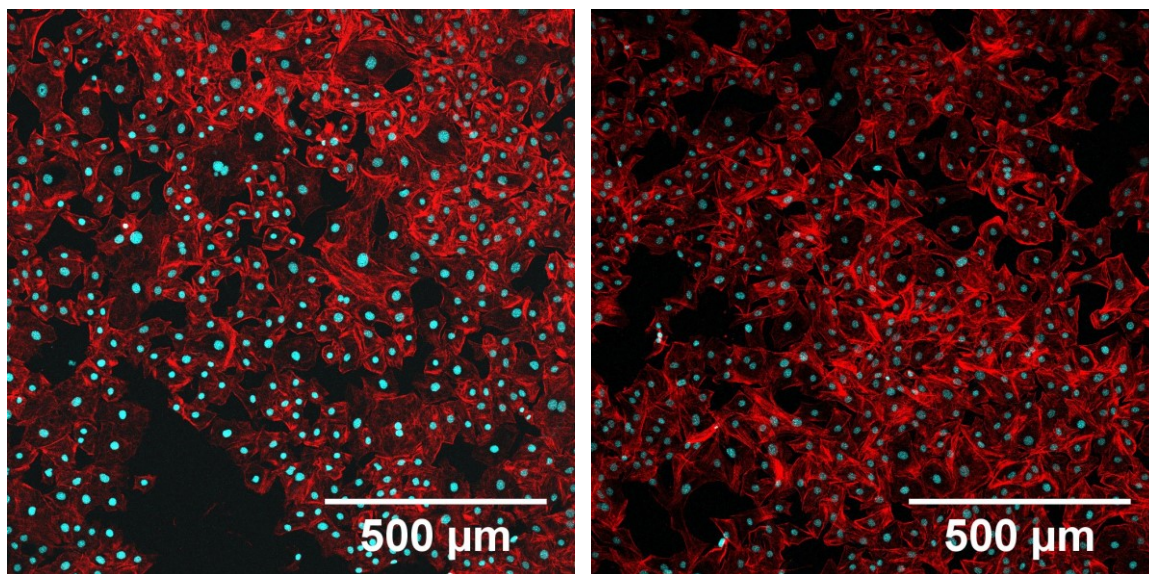
Dále bylo hodnoceno, zda buňky dokážou proliferovat uvnitř hydrogelu. Poprvé byly buňky nasazeny do hydrogelu pomocí injekční stříkačky. Tento pokus nebyl úspěšný, protože buňky nerostly uvnitř hydrogelu, ale v médiu z něj vyplavaly ven a proliferovaly na tkáňovém plastiku který se nacházel pod hydrogelem.

Proto při dalším pokusu byl 2% HA-SH hydrogel vložen do kovového kroužku z chirurgické oceli, aby se zabránilo vyplavání média s buňkami z hydrogelu. Takto dokázala část buněk prorůst z povrchu hydrogelu a začít proliferovat uvnitř hydrogelu, ale i přes použití kovového kroužku buňky rostly pod hydrogelem na tkáňovém plastiku. Snímky byly pořízeny konfokálním mikroskopem Olympus FV 3000.



Obrázek 18: Proliferace buněk v objemu hydrogelu

Na Obrázku 18 můžeme vidět buňky rostoucí v objemu hydrogelu. Protože rostou ve 3D struktuře, morfologicky se odlišují od těch, které rostou na 2D povrchu např. na tkáňovém plastiku (viz Obrázek 19). Dobře jsou rozlišitelná hlavně jádra buněk, která jsou nabarvena modře barvivem Hoechst.



Obrázek 19: Proliferace buněk na tkáňovém plastiku v přítomnosti hydrogelu

Naopak na Obrázku 19 vidíme buňky, které proliferovaly na tkáňovém plastiku pod hydrogelem. Proliferovaly velmi dobře a po 5 dnech byla zvýšená buněčná populace. Morfologicky se odlišují od těch, co proliferovaly v objemu hydrogelu, což je samozřejmě dáno, na jaké struktuře rostou.

Pokud bychom chtěli, aby buňky lépe proliferovaly v námi připraveném HA-SH hydrogelu, bylo by vhodné zvážit možnosti začlenění biologicky aktivních látek do struktury např. kolagenu [57], peptidu [58] či katecholu [59], které by mohly podpořit adhezi a proliferaci uvnitř hydrogelu.

ZÁVĚR

V teoretické části byla provedena literární rešerše na téma biologických vlastností hydrogelů na bázi kyseliny hyaluronové. V první kapitole byl stručně charakterizován hydrogel a jak jej můžeme dále klasifikovat, přičemž druhá kapitola se zabývá klasifikací hydrogelů na základě původu polymeru, který je použit pro jejich výrobu. Kapitola je zaměřená na přírodní polymery a jsou v ní charakterizovány hydrogely na bázi proteinů a polysacharidů včetně příkladů v jakém odvětví je můžeme aplikovat. Ve třetí kapitole byly popsány nejdůležitější vlastnosti hydrogelů jako je biokompatibilita a jaké jsou možnosti testování *in vitro* či *in vivo*, biodegradabilita, architektura, swelling a mechanické vlastnosti. Čtvrtá kapitola pojednává o aplikacích hydrogelů v oblasti tkáňového inženýrství a transportu léčiv, zejména těch na bázi hyaluronanu. Poslední pátá kapitola se zabývala charakteristikou hyaluronanu. Tato kapitola byla obsáhlejší, protože hydrogely na bázi hyaluronanu byly hlavním tématem experimentální části práce, a proto nebyla zařazena do části o hydrogelech na bázi polysacharidů.

V experimentální části byly sledovány biologické vlastnosti hydrogelu na bázi hyaluronanu, který byl modifikován na pracovišti Centrum polymerních systémů ve Zlíně. Tento hydrogel, který síťuje pomocí disulfidických můstků, byl testován na cytotoxicitu a proliferaci buněk. Test cytotoxicity extraktu byl proveden podle normy ČSN EN ISO 10993-5. Žádný z extraktů hydrogelů nebyl cytotoxický což byl námi očekávaný výsledek. Dále byla sledována proliferace buněčné linie NIH/3T3 na i uvnitř hydrogelu. Přes mírné komplikace se nakonec podařilo, že buňky proliferovaly v objemu hydrogelu. Buňky byly nabarveny a pozorovány pomocí konfokálního mikroskopu. Závěrem lze tedy říci, že hyaluronan může být chemicky modifikován tak, aby výsledný produkt nebyl cytotoxický a zároveň byly buňky schopny proliferace na jeho povrchu. V budoucnu bude studována možnost začlenění vybraných bioaktivních látek, jako například kolagenu za účelem podpory buněčné proliferace uvnitř hydrogelu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MANTHA, Somasundar, Sangeeth PILLAI, Parisa KHAYAMBASHI, Akshaya UPADHYAY, Yuli ZHANG, Owen TAO, Hieu M. PHAM a Simon D. TRAN. Smart Hydrogels in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Materials* [online]. 2019, **12**(20), 3323 [vid. 2021-08-18]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma12203323
- [2] TSOU, Yung-Hao, Joe KHONEISSER, Ping-Chun HUANG a Xiaoyang XU. Hydrogel as a bioactive material to regulate stem cell fate. *Bioactive Materials* [online]. 2016, **1**(1), 39–55 [vid. 2021-08-19]. ISSN 2452199X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioactmat.2016.05.001
- [3] XU, Xian, Amit K. JHA, Daniel A. HARRINGTON, Mary C. FARACH-CARSON a Xinqiao JIA. Hyaluronic acid-based hydrogels: from a natural polysaccharide to complex networks. *Soft Matter* [online]. 2012, **8**(12), 3280 [vid. 2021-11-17]. ISSN 1744-683X, 1744-6848. Dostupné z: doi:10.1039/c2sm06463d
- [4] KOPEČEK, Jindřich a Jiyuan YANG. Hydrogels as smart biomaterials. *Polymer International* [online]. 2007, **56**(9), 1078–1098 [vid. 2021-08-19]. ISSN 09598103, 10970126. Dostupné z: doi:10.1002/pi.2253
- [5] NAAHIDI, Sheva, Mousa JAFARI, Megan LOGAN, Yujie WANG, Yongfang YUAN, Hojae BAE, Brian DIXON a P. CHEN. Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances* [online]. 2017, **35**(5), 530–544 [vid. 2021-08-18]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2017.05.006
- [6] CHAMKOURI, Hossein. A Review of Hydrogels, Their Properties and Applications in Medicine. *American Journal of Biomedical Science & Research* [online]. 2021, **11**(6), 485–493 [vid. 2021-08-19]. ISSN 26421747. Dostupné z: doi:10.34297/AJBSR.2021.11.001682
- [7] FRANCIS, Raju a D. Sakthi KUMAR, ed. *Biomedical applications of polymeric materials and composites*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017. ISBN 978-3-527-69094-7.
- [8] ANNABI, Nasim, Ali TAMAYOL, Jorge Alfredo UQUILLAS, Mohsen AKBARI, Luiz E. BERTASSONI, Chaenyung CHA, Gulden CAMCI-UNAL, Mehmet R. DOKMECI, Nicholas A. PEPPAS a Ali KHADEMHOSEINI. 25th Anniversary Article: Rational Design and Applications of Hydrogels in Regenerative Medicine. *Advanced Materials* [online]. 2014, **26**(1), 85–124 [vid. 2021-08-27]. ISSN 09359648. Dostupné z: doi:10.1002/adma.201303233
- [9] GUAN, Xiaofei, Meltem AVCI-ADALI, Emine ALARÇIN, Hao CHENG, Sara Saheb KASHAF, Yuxiao LI, Aditya CHAWLA, Hae Lin JANG a Ali KHADEMHOSEINI. Development of hydrogels for regenerative engineering. *Biotechnology Journal* [online]. 2017, **12**(5), 1600394 [vid. 2021-09-06]. ISSN 18606768. Dostupné z: doi:10.1002/biot.201600394

- [10] VASILE, Cornelia, Daniela PAMFIL, Elena STOLERU a Mihaela BAICAN. New Developments in Medical Applications of Hybrid Hydrogels Containing Natural Polymers. *Molecules* [online]. 2020, **25**(7), 1539 [vid. 2021-09-06]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25071539
- [11] GOMEZ-FLORIT, Manuel, Alberto PARDO, Rui M. A. DOMINGUES, Ana L. GRAÇA, Pedro S. BABO, Rui L. REIS a Manuela E. GOMES. Natural-Based Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Molecules* [online]. 2020, **25**(24), 5858 [vid. 2021-09-07]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25245858
- [12] CATOIRA, Marta Calvo, Luca FUSARO, Dalila DI FRANCESCO, Martina RAMELLA a Francesca BOCCAFOSECHI. Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2019, **30**(10), 115 [vid. 2021-09-06]. ISSN 0957-4530, 1573-4838. Dostupné z: doi:10.1007/s10856-019-6318-7
- [13] XU, Qinghua, Jessica E. TORRES, Mazin HAKIM, Paulina M. BABIAK, Pallabi PAL, Carly M. BATTISTONI, Michael NGUYEN, Alyssa PANITCH, Luis SOLORIO a Julie C. LIU. Collagen- and hyaluronic acid-based hydrogels and their biomedical applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports* [online]. 2021, **146**, 100641 [vid. 2021-10-13]. ISSN 0927796X. Dostupné z: doi:10.1016/j.mser.2021.100641
- [14] LI, Shangzhi, Minjie PEI, Tingting WAN, Hongjun YANG, Shaojin GU, Yongzhen TAO, Xin LIU, Yingshan ZHOU, Weilin XU a Pu XIAO. Self-healing hyaluronic acid hydrogels based on dynamic Schiff base linkages as biomaterials. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2020, **250**, 116922 [vid. 2021-08-18]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2020.116922
- [15] SPICER, Christopher D. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: the importance of polymer choice. *Polymer Chemistry* [online]. 2020, **11**(2), 184–219 [vid. 2021-09-08]. ISSN 1759-9954, 1759-9962. Dostupné z: doi:10.1039/C9PY01021A
- [16] LIU, Zhao, Ziqing TANG, Lin ZHU, Shaoping LU, Feng CHEN, Cheng TANG, Huan SUN, Jia YANG, Gang QIN a Qiang CHEN. Natural protein-based hydrogels with high strength and rapid self-recovery. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2019, **141**, 108–116 [vid. 2021-09-08]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.08.258
- [17] YANG, Yang, Alastair CAMPBELL RITCHIE a Nicola M. EVERITT. Recombinant human collagen/chitosan-based soft hydrogels as biomaterials for soft tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2021, **121**, 111846 [vid. 2021-10-13]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2020.111846
- [18] ASWATHY, S.H., U. NARENDRAKUMAR a I. MANJUBALA. Commercial hydrogels for biomedical applications. *Heliyon* [online]. 2020, **6**(4), e03719 [vid. 2021-10-14]. ISSN 24058440. Dostupné z: doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03719
- [19] PETROS, Seblewongel, Tamrat TESFAYE a Million AYELE. A Review on Gelatin Based Hydrogels for Medical Textile Applications. *Journal of Engineering* [online].

- 2020, **2020**, 1–12 [vid. 2021-11-16]. ISSN 2314-4912, 2314-4904. Dostupné z: doi:10.1155/2020/8866582
- [20] HONG, Yi, Feifei ZHOU, Yujie HUA, Xianzhu ZHANG, Chengyao NI, Dihao PAN, Yiqing ZHANG, Deming JIANG, Long YANG, Qiuning LIN, Yiwei ZOU, Dongsheng YU, David E. ARNOT, Xiaohui ZOU, Linyong ZHU, Shufang ZHANG a Hongwei OUYANG. A strongly adhesive hemostatic hydrogel for the repair of arterial and heart bleeds. *Nature Communications* [online]. 2019, **10**(1), 2060 [vid. 2021-11-16]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-019-10004-7
- [21] ZHENG, Haiyan a Baoqi ZUO. Functional silk fibroin hydrogels: preparation, properties and applications. *Journal of Materials Chemistry B* [online]. 2021, **9**(5), 1238–1258 [vid. 2021-11-16]. ISSN 2050-750X, 2050-7518. Dostupné z: doi:10.1039/D0TB02099K
- [22] WANG, Hai-Yan a Yu-Qing ZHANG. Processing silk hydrogel and its applications in biomedical materials. *Biotechnology Progress* [online]. 2015, **31**(3), 630–640 [vid. 2021-11-17]. ISSN 87567938. Dostupné z: doi:10.1002/btpr.2058
- [23] JIA, Luanluan, Fengxuan HAN, Huili YANG, Gareth TURNBULL, Jiayuan WANG, Jon CLARKE, Wenmiao SHU, Mingyu GUO a Bin LI. Microfluidic Fabrication of Biomimetic Helical Hydrogel Microfibers for Blood-Vessel-on-a-Chip Applications. *Advanced Healthcare Materials* [online]. 2019, **8**(13), 1900435 [vid. 2021-12-01]. ISSN 2192-2640, 2192-2659. Dostupné z: doi:10.1002/adhm.201900435
- [24] SHARIATINIA, Zahra a Azin Mazloom JALALI. Chitosan-based hydrogels: Preparation, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2018, **115**, 194–220 [vid. 2021-12-01]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.04.034
- [25] MÜLLER, Werner E. G., Emad TOLBA, Heinz C. SCHRÖDER, Meik NEUFURTH, Shunfeng WANG, Thorben LINK, Bilal AL-NAWAS a Xiaohong WANG. A new printable and durable N,O-carboxymethyl chitosan–Ca²⁺–polyphosphate complex with morphogenetic activity. *Journal of Materials Chemistry B* [online]. 2015, **3**(8), 1722–1730 [vid. 2021-12-01]. ISSN 2050-750X, 2050-7518. Dostupné z: doi:10.1039/C4TB01586J
- [26] KACZMAREK, B., K. NADOLNA a A. OWCZAREK. The physical and chemical properties of hydrogels based on natural polymers. In: *Hydrogels Based on Natural Polymers* [online]. B.m.: Elsevier, 2020 [vid. 2022-01-21], s. 151–172. ISBN 978-0-12-816421-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816421-1.00006-9
- [27] ANDERSON, J.M. Biocompatibility. In: *Polymer Science: A Comprehensive Reference* [online]. B.m.: Elsevier, 2012 [vid. 2022-01-20], s. 363–383. ISBN 978-0-08-087862-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-53349-4.00229-6
- [28] BERNARD, Mélisande, Emile JUBELI, Michael D. PUNGENTE a Najet YAGOUBI. Biocompatibility of polymer-based biomaterials and medical devices – regulations, *in vitro* screening and risk-management. *Biomaterials Science* [online]. 2018, **6**(8), 2025–2053 [vid. 2022-01-20]. ISSN 2047-4830, 2047-4849. Dostupné z: doi:10.1039/C8BM00518D

- [29] RATNER, B. D., ed. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 3rd ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic Press, 2013. ISBN 978-0-12-374626-9.
- [30] TAN, Huaping a Kacey G. MARRA. Injectable, Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Materials* [online]. 2010, **3**(3), 1746–1767 [vid. 2022-01-21]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma3031746
- [31] NICODEMUS, Garret D. a Stephanie J. BRYANT. Cell Encapsulation in Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Tissue Engineering Part B: Reviews* [online]. 2008, **14**(2), 149–165 [vid. 2022-01-21]. ISSN 1937-3368, 1937-3376. Dostupné z: doi:10.1089/ten.teb.2007.0332
- [32] ANNABI, Nasim, Jason W. NICHOL, Xia ZHONG, Chengdong JI, Sandeep KOSHY, Ali KHADEMHOSEINI a Fariba DEGHANI. Controlling the Porosity and Microarchitecture of Hydrogels for Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews* [online]. 2010, **16**(4), 371–383 [vid. 2022-01-24]. ISSN 1937-3368, 1937-3376. Dostupné z: doi:10.1089/ten.teb.2009.0639
- [33] DEGHANI, Fariba a Ali FATHI. Hydrogel Architecture. In: [online]. 2016 [vid. 2022-01-20], s. 81–129. Dostupné z: doi:10.1142/9789813140370_0005
- [34] TAN, George Z. a Yingge ZHOU. Tunable 3D Nanofiber Architecture of Polycaprolactone by Divergence Electrospinning for Potential Tissue Engineering Applications. *Nano-Micro Letters* [online]. 2018, **10**(4), 73 [vid. 2022-01-24]. ISSN 2311-6706, 2150-5551. Dostupné z: doi:10.1007/s40820-018-0226-0
- [35] HOLBACK, H., Y. YEO a K. PARK. Hydrogel swelling behavior and its biomedical applications. In: *Biomedical Hydrogels* [online]. B.m.: Elsevier, 2011 [vid. 2022-01-24], s. 3–24. ISBN 978-1-84569-590-3. Dostupné z: doi:10.1533/9780857091383.1.3
- [36] LI, Xiaomeng, Qingqing SUN, Qian LI, Naoki KAWAZOE a Guoping CHEN. Functional Hydrogels With Tunable Structures and Properties for Tissue Engineering Applications. *Frontiers in Chemistry* [online]. 2018, **6**, 499 [vid. 2022-01-24]. ISSN 2296-2646. Dostupné z: doi:10.3389/fchem.2018.00499
- [37] ANSETH, Kristi S., Christopher N. BOWMAN a Lisa BRANNON-PEPPAS. Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. *Biomaterials* [online]. 1996, **17**(17), 1647–1657 [vid. 2022-01-24]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/0142-9612(96)87644-7
- [38] MAJCHER, Michael J. a Todd HOARE. Applications of Hydrogels. In: Mohammad Abu JAFAR MAZUMDER, Heather SHEARDOWN a Amir AL-AHMED, ed. *Functional Biopolymers* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2019 [vid. 2022-02-02], Polymers and Polymeric Composites: A Reference Series, s. 453–490. ISBN 978-3-319-95989-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-95990-0_17
- [39] MHANNA, Rami a Anwarul HASAN. Introduction to Tissue Engineering. In: Anwarul HASAN, ed. *Tissue Engineering for Artificial Organs* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017 [vid. 2022-02-02], s. 1–34. ISBN 978-3-527-68993-4. Dostupné z: doi:10.1002/9783527689934.ch1

- [40] CALÓ, Enrica a Vitaliy V. KHUTORYANSKIY. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal* [online]. 2015, **65**, 252–267 [vid. 2022-02-02]. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024
- [41] RAO, N. Vijayakameswara. Hyaluronic acid–based hydrogels for tissue engineering. In: *Biomaterials for Organ and Tissue Regeneration* [online]. B.m.: Elsevier, 2020 [vid. 2022-02-02], s. 551–565. ISBN 978-0-08-102906-0. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-102906-0.00014-3
- [42] MOHAN, Neethu, Pv MOHANAN, A SABAREESWARAN a Prabha NAIR. Chitosan-hyaluronic acid hydrogel for cartilage repair. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2017, **104**, 1936–1945 [vid. 2022-02-02]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.03.142
- [43] ROJO, J., A. SOUSA-HERVES a A. MASCARAQUE. Perspectives of Carbohydrates in Drug Discovery. In: *Comprehensive Medicinal Chemistry III* [online]. B.m.: Elsevier, 2017 [vid. 2022-02-02], s. 577–610. ISBN 978-0-12-803201-5. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.12311-X
- [44] TROMBINO, Sonia, Camilla SERVIDIO, Federica CURCIO a Roberta CASSANO. Strategies for Hyaluronic Acid-Based Hydrogel Design in Drug Delivery. *Pharmaceutics* [online]. 2019, **11**(8), 407 [vid. 2022-02-02]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics11080407
- [45] HUANG, Gangliang a Hualiang HUANG. Hyaluronic acid-based biopharmaceutical delivery and tumor-targeted drug delivery system. *Journal of Controlled Release* [online]. 2018, **278**, 122–126 [vid. 2022-02-02]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2018.04.015
- [46] HE, Zhiwei, Beiyue WANG, Changmin HU a Jianning ZHAO. An overview of hydrogel-based intra-articular drug delivery for the treatment of osteoarthritis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2017, **154**, 33–39 [vid. 2022-02-02]. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2017.03.003
- [47] NECAS, J., L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER a J. KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinární Medicína* [online]. 2008, **53**(No. 8), 397–411 [vid. 2021-12-01]. ISSN 03758427, 18059392. Dostupné z: doi:10.17221/1930-VETMED
- [48] FALLACARA, Arianna, Erika BALDINI, Stefano MANFREDINI a Silvia VERTUANI. Hyaluronic Acid in the Third Millennium. *Polymers* [online]. 2018, **10**(7), 701 [vid. 2021-12-01]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym10070701
- [49] SOLIS, Mairim Alexandra, Ying-Hui CHEN, Tzyy Yue WONG, Vanessa Zaiatz BITTENCOURT, Yen-Cheng LIN a Lynn L. H. HUANG. Hyaluronan Regulates Cell Behavior: A Potential Niche Matrix for Stem Cells. *Biochemistry Research International* [online]. 2012, **2012**, 1–11 [vid. 2021-11-17]. ISSN 2090-2247, 2090-2255. Dostupné z: doi:10.1155/2012/346972

- [50] TOOLE, Bryan P. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2004, **4**(7), 528–539 [vid. 2021-11-17]. ISSN 1474-175X, 1474-1768. Dostupné z: doi:10.1038/nrc1391
- [51] FERREIRA, Rafael G., Adriano R. AZZONI, Maria Helena Andrade SANTANA a Demetri PETRIDES. Techno-Economic Analysis of a Hyaluronic Acid Production Process Utilizing Streptococcal Fermentation. *Processes* [online]. 2021, **9**(2), 241 [vid. 2021-11-17]. ISSN 2227-9717. Dostupné z: doi:10.3390/pr9020241
- [52] FANG, Yu, Lele SHI, Zhiwei DUAN a Saeed ROHANI. Hyaluronic acid hydrogels, as a biological macromolecule-based platform for stem cells delivery and their fate control: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2021, **189**, 554–566 [vid. 2022-02-03]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.08.140
- [53] KHUNMANEE, Sureerat, Younghyen JEONG a Hansoo PARK. Crosslinking method of hyaluronic-based hydrogel for biomedical applications. *Journal of Tissue Engineering* [online]. 2017, **8**, 204173141772646 [vid. 2021-12-05]. ISSN 2041-7314, 2041-7314. Dostupné z: doi:10.1177/2041731417726464
- [54] BIAN, Shaoquan, Mengmeng HE, Junhui SUI, Hanxu CAI, Yong SUN, Jie LIANG, Yujiang FAN a Xingdong ZHANG. The self-crosslinking smart hyaluronic acid hydrogels as injectable three-dimensional scaffolds for cells culture. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2016, **140**, 392–402 [vid. 2021-08-18]. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2016.01.008
- [55] GRIESSER, Janine, Gergely HETÉNYI a Andreas BERNKOP-SCHNÜRCH. Thiolated Hyaluronic Acid as Versatile Mucoadhesive Polymer: From the Chemistry Behind to Product Developments—What Are the Capabilities? *Polymers* [online]. 2018, **10**(3), 243 [vid. 2022-02-03]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym10030243
- [56] SCHANTÉ, Carole E., Guy ZUBER, Corinne HERLIN a Thierry F. VANDAMME. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2011, **85**(3), 469–489 [vid. 2022-02-03]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2011.03.019
- [57] SEGURA, Tatiana, Brian C ANDERSON, Peter H CHUNG, Rebecca E WEBBER, Kenneth R SHULL a Lonnie D SHEA. Crosslinked hyaluronic acid hydrogels: a strategy to functionalize and pattern. *Biomaterials* [online]. 2005, **26**(4), 359–371 [vid. 2022-05-02]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2004.02.067
- [58] CHEN, Feng, Yunzhou NI, Bing LIU, Tongtong ZHOU, Chunyang YU, Yue SU, Xinyuan ZHU, Xiaowei YU a Yongfeng ZHOU. Self-crosslinking and injectable hyaluronic acid/RGD-functionalized pectin hydrogel for cartilage tissue engineering. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2017, **166**, 31–44 [vid. 2022-05-02]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2017.02.059

- [59] ZHANG, Wei, Ruixing WANG, ZhengMing SUN, Xiangwei ZHU, Qiang ZHAO, Tengfei ZHANG, Aleksander CHOLEWINSKI, Fut (Kuo) YANG, Boxin ZHAO, Rattapol PINNARATIP, Pegah Kord FOROOSHANI a Bruce P. LEE. Catechol-functionalized hydrogels: biomimetic design, adhesion mechanism, and biomedical applications. *Chemical Society Reviews* [online]. 2020, **49**(2), 433–464 [vid. 2022-05-02]. ISSN 0306-0012, 1460-4744. Dostupné z: doi:10.1039/C9CS00285E

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extracelulární matrix
GAG	Glykosaminoglykan
HA	Hyaluronan
HA-SH	Thiolovaný derivát hyaluronanu
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
PBS	Fosfátový pufr
PEG	Poly(ethylenglykol)
PGA	Kyselina polyglykolová
PLGA	Kyselina poly(mléčná a glykolová)
PNIPAm	Poly(N-isopropylakrylamid)
RGD	Arginin-glycin-aspartát
TI	Terapeutický index
UPW	Ultrapure water (ultračistá voda)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Klasifikace hydrogelů; upraveno podle [4].....	11
Obrázek 2: Typy biopolymerů používaných v tkáňovém inženýrství; upraveno podle [15]	13
Obrázek 3: SHG snímky myší tkáně na bázi kolagenu; upraveno podle [18].....	14
Obrázek 4: Strukturní součásti hedvábí; upraveno podle [25]	16
Obrázek 5: "Egg-box" model pomocí vápenatých kationtů; upraveno podle [16].....	17
Obrázek 6: Schematické znázornění injektovatelného biodegradabilního hydrogelu použitého k regeneraci tkání; upraveno podle [33]	21
Obrázek 7: Poměr bobtnání; upraveno podle [39].....	23
Obrázek 8: Aplikace hydrogelů v různých průmyslových odvětvích; upraveno podle [21]25	
Obrázek 9: Schematické znázornění uvolňování léčiva z hydrogelu reagujícího na podněty; upraveno podle [49, 50]	27
Obrázek 10: (A) kyselina hyaluronová; (B) hyaluronát sodný.....	29
Obrázek 11: Syntéza hyaluronanu na vnitřní straně membrány; (A) hyaluronan, (B) hyaluronan syntetáza, (C) a (D) předpokládané regulační proteiny; upraveno podle [56]..	31
Obrázek 12: Invazivní ductální karcinom prsu s negativním mamografickým nálezem; (A) sonografický obraz nádoru, (B) histologický obraz s alciánovou modří pro zobrazení hyaluronanu; upraveno podle [58]	32
Obrázek 13: Struktura hyaluronanu s vyznačenými místy pro chemickou modifikaci: (A) hydroxylová skupina, (B) karboxylová skupina, (C) N-acetylová skupina; upraveno podle [60].....	34
Obrázek 14: (A) 1% HA-SH hydrogel, (B) 2% HA-SH hydrogel	37
Obrázek 15: Kovový kroužek z chirurgické oceli	40
Obrázek 16: Graf relativní buněčné viability v závislosti na koncentraci extraktu hydrogelu s obsahem 1% a 2% HA-SH	41
Obrázek 17: Absorbance jednotlivých extraktů hydrogelu	42
Obrázek 18: Proliferace buněk v objemu hydrogelu	43
Obrázek 19: Proliferace buněk na tkáňovém plastiku v přítomnosti hydrogelu.....	44