

Příprava a modifikace derivátu kyseliny hyaluronové thioly

Viktorie Daňková

Bakalářská práce
2022

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Bc. Viktorie Daňková
Osobní číslo:	T19077
Studijní program:	B0711A130009 Materiály a technologie
Specializace:	Materiálové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Téma práce:	Příprava a modifikace derivátu kyseliny hyaluronové thiolu

Zásady pro vypracování

1. Vypracovat rešerši zabývající se problematikou modifikace hyaluronanu pomocí thiolů, přípravy hydrogelů a možnostmi jejich charakterizace.
2. Provést základní experimenty modifikace hyaluronanu pomocí thiolů v závislosti na koncentraci polymeru, molekulové hmotnosti a molárním poměrem látek.
3. Z připravených derivátů připravit hydrogely a provést jejich charakterizaci.
4. Zhodnotit vliv výše zmíněných parametrů.

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

Seznam doporučené literatury:

1. Ebnasajjad, Sina. Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics – Properties, Processing and Applications. Elsevier, 2013. ISBN 978-1-4557-2834-3.
2. Chen, Yu. Hydrogels Based on Natural Polymers. Elsevier, 2020. ISBN 978-0-1281-6421-1.
3. TROMBINO, Sonia, Camilla SERVIDIO, Federica CURCIO a Roberta CASSANO. Strategies for Hyaluronic Acid-Based Hydrogel Design in Drug Delivery. Pharmaceuticals. 2019, 11(8). ISSN 1999-4923.
4. GARG, Hari G. a Charles A. HALES. Chemistry and biology of hyaluronan. Amsterdam: Elsevier, 2004. ISBN 978-0-08-044382-9.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Lenka Musilová, Ph.D.**
Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání bakalářské práce: **31. prosince 2021**

Termín odevzdání bakalářské práce: **20. května 2022**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

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

Ve Zlíně dne 21. února 2022

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 užít 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, 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.

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: 20. 5. 2022

Jméno a příjmení studenta: Viktorie Daňková

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

V rámci experimentální části bakalářské práce byl syntetizován thiolovaný hyaluronan, jako potencionální materiál pro přípravu hydrogelů pro biomedicínské aplikace. V experimentální části byla připravena řada vzorků thiolovaného hyaluronanu (HA-SH) lišící se koncentrací a molekulovou hmotností polymeru. Dílčím úkolem bylo zhodnotit vliv uvedených parametrů HA-SH, následně připravit hydrogely a provést jejich charakterizaci. Úspěšné navázání thiolové skupiny na řetězce hyaluronanu (HA(Na)) bylo potvrzeno pomocí FTIR a NMR spektroskopie. Reologické vlastnosti připravených hydrogelů na bázi thiolovaného hyaluronanu byly charakterizovány rotačním reometrem a pomocí SEM byla stanovena porozita výsledného materiálu. Na základě NMR spektroskopie bylo potvrzeno, že stupeň substituce (DS) ovlivňuje reologické vlastnosti materiálu. Zároveň bylo potvrzeno, že doba gelace nezávisí na koncentraci polymeru, ale s rostoucí molekulovou hmotností roste. Kromě gelace byla porovnávána tuhost výsledného hydrogelu. Nejvyšší tuhost gelů („storage“ modul) byla potvrzena u vzorků s vyšší koncentrací i molekulové hmotnosti polymeru. Nejvyšší dosažená tuhost byla 1710 Pa. Nejnižší koncentrace, při které dochází ke vzniku zesíťované struktury je 2 % (w/w). Viskozita hydrogelu při smykové rychlosti 100 rad/s byla v rozmezí 0,1 – 10 Pa. Většina pórů výsledného materiálu odpovídala velikosti $\leq 50 \mu\text{m}$. Na základě dosažených výsledků lze konstatovat, že hydrogely na bázi thiolovaného hyaluronanu představují potenciálně slibný materiál pro metodu 3D tisku v oblasti tkáňového inženýrství nebo jako platforma pro aplikaci léků do lidského těla.

Klíčová slova: thiolace, hyaluronan, hydrogel, FTIR, SEM, reologické chování, porozita

ABSTRACT

In the experimental part of the bachelor thesis, thiolated hyaluronan was synthesized as a potential material for the preparation of hydrogels for biomedical applications. In the experimental part, a number of samples of thiolated hyaluronan (HA-SH) with different polymer concentration and molecular weight were prepared. A partial task was to evaluate the influence of the mentioned HA-SH parameters, and subsequently prepare hydrogels and perform their characterization. The successful attachment of the thiol group to the hyaluronan (HA (Na) chains was confirmed by FTIR and NMR spectroscopy. At the same time, it was confirmed that the gelation time does not depend on the polymer concentration but increases with increasing molecular weight. In addition, the hydrogel stiffness was evaluated. The highest achieved stiffness was 1710 Pa. The lowest concentration at which the crosslinked structure is formed is 2 % (w/w). The viscosity of the hydrogel at a shear rate of 100 rad/s was in the range of 0,1 - 10 Pa. Most of the pores of the resulting material corresponded to a size $\leq 50 \mu\text{m}$. Based on the results obtained, it can be stated that hydrogels based on thiolated hyaluronan represent a potentially promising material for the 3D printing method in the field of tissue engineering or as a platform for the application of drugs to the human body.

Keywords: thiolation, hyaluronan, hydrogel, FTIR, SEM, rheological behavior, porosity

Ráda bych tímto poděkovala paní Ing. Lence Musilové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a vstřícný přístup při konzultacích, které mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala. Dále bych chtěla poděkovat panu Ing. Romanu Kolaříkovi, Ph.D. za cenné rady během konzultací týkajících se reologických měření. Můj dík patří i studentce doktorského studia Ing. Lence Vítkové za ochotnou pomoc při realizaci experimentální části.

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

OBSAH

ÚVOD	10
SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	12
I TEORETICKÁ ČÁST	14
1 BIOMATERIÁLY	15
1.1 BIOPOLYMERY	17
1.1.1 Kyselina hyaluronová	17
2 SODNÁ SŮL KYSELINY HYALURONOVÉ	19
2.1 STRUKTURA HA(NA)	19
2.2 VÝSKYT A SYNTÉZA HA(NA)	20
2.3 VLASTNOSTI HA(NA).....	22
2.4 VYUŽITÍ HA(NA).....	23
2.5 MODIFIKACE HA(NA).....	24
2.5.1 Modifikace hydroxylové skupiny.....	25
2.5.2 Modifikace karboxylové skupiny	27
2.6 THIOLOVANÝ HA(NA)	30
2.6.1 Syntéza thiolovaného HA(Na)	31
2.6.2 Vlastnosti thiolovaného HA(Na).....	33
3 SÍŤOVÁNÍ A PŘÍPRAVA HYDROGELŮ	35
3.1 SÍŤOVÁNÍ.....	35
3.2 HYDROGELY	35
3.2.1 Klasifikace hydrogelů.....	36
3.3 PŘÍPRAVA HYDROGELŮ.....	38
3.3.1 Fyzikálně síťované hydrogely	38
3.3.2 Chemicky síťované hydrogely	40
3.4 VYUŽITÍ HYDROGELŮ	44
3.4.1 Využití hydrogelů na bázi thiolovaného hyaluronanu.....	44
4 METODY CHARAKTERIZACE HYALURONANU	46
4.1 INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE S FOURIEROVOU TRANSFORMACÍ (FTIR)	47
4.2 NUKLEÁRNÍ MAGNETICKÁ REZONANCE NMR	49
4.3 SKENOVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE (SEM).....	52
4.4 ROTAČNÍ REOMETR	53
II PRAKTICKÁ ČÁST	56
5 POPIS EXPERIMENTU	57
5.1 POUŽITÉ MATERIÁLY	58

5.2	SYNTÉZA THIOLOVANÉHO HYALURONANU (HA-SH)	58
5.2.1	Zavedení thiolové funkční skupiny na řetězec HA(Na)	58
5.2.2	Redukce disulfidické vazby pomocí DTT	61
5.3	PŘÍPRAVA HYDROGELU NA BÁZI THIOLOVANÉHO HYALURONANU	62
5.4	METODY CHARAKTERIZACE PŘIPRAVENÝCH VZORKŮ HA-SH.....	63
5.4.1	FTIR.....	63
5.4.2	NMR	64
5.4.3	Rotační reometr	65
5.4.4	SEM.....	65
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	67
6.1	SYNTÉZA HA-SH.....	67
6.2	CHARAKTERIZACE HA-SH	68
6.2.1	FTIR.....	68
6.2.2	NMR	69
6.3	PŘÍPRAVA HYDROGELŮ NA BÁZI HA-SH.....	72
6.4	REOLOGIE	73
6.4.1	Reakční kinetika	73
6.4.2	Oscilační testy	75
6.5	POROZITA HYDROGELŮ NA BÁZI HA-SH.....	78
	ZÁVĚR.....	81
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	83
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	91
	SEZNAM OBRÁZKŮ	94
	SEZNAM TABULEK	96
	SEZNAM GRAFŮ.....	97
	SEZNAM PŘÍLOH	98

ÚVOD

V současné době se do popředí zájmu vědeckých studií dostali materiály, které lze využít k přípravě struktur, jejichž úkolem je nahradit část lidského těla nebo jeho funkci [1]. Zároveň musí tyto materiály (pro možné aplikace do lidského těla) splňovat přísné podmínky, mezi které patří především biokompatibilita a biodegradabilita. Biokompatibilitu lze definovat jako schopnost daného materiálu být kompatibilní s živým organismem, naopak biodegradabilita vyjadřuje schopnost materiálu rozpadat se na jednodušší strukturní jednotky, které nejsou pro organismus toxické [2]. Obecně se takové materiály označují jako **biomateriály** a jak je patrné z textu, na jejich výrobu se kladou velmi přísné nároky. Mezi materiály, které splňují tyto vysoké nároky patří, např. kromě kovů a keramiky, také **biopolymery**. Jak už název napovídá, jedná se o polymery, které mohou být z přírodních i fosilních zdrojů a mohou nebo nemusí být biodegradabilní [3]. Z pohledu této práce jsou nejzajímavější ty, jež se získávají z přírodních zdrojů a zároveň jsou biodegradabilní. Mezi takové lze zařadit např. **sodnou sůl kyseliny hyaluronové (HA(Na))**. Hyaluronan nebo-li sodná sůl kyseliny hyaluronové je přírodní biopolymer, který se v současné době řadí k velmi populárním materiálům a který je díky svým unikátním vlastnostem (např. biokompatibilita, minimální imunogenicita, biodegradabilita) hojně využíván např. v kosmetice či tkáňovém inženýrství. Vzhledem k tomu, že hyaluronan je přirozenou součástí lidského těla (např. pokožka, synoviální tekutina), jeví se jako vhodný materiál pro aplikace v biomedicíně. Velkou nevýhodou hyaluronanu, může být z pohledu jejího použití např. v tkáňovém inženýrství, dobrá rozpustnost ve vodě, slabé mechanické vlastnosti atd. Proto se ke zlepšení jeho vlastností nejčastěji přistupuje k modifikaci hydroxylové a karboxylové skupiny disacharidové jednotky HA(Na). V bakalářské práci byla řešena **modifikace hyaluronanu pomocí thiolových skupin**. Hlavní výhody thiolace totiž spočívají především v jednoduché syntéze, která nevyžaduje použití chemických aditiv a toxických síťovacích činidel, ale i ve výsledných vlastnostech thiolovaného hyaluronanu (vyšší mukoadheze, stabilita proti degradaci za fyziologických podmínek, viskoelasticita oproti čistému HA(Na)).

Z pohledu biomedicínských aplikací je thiolovaný HA(Na) nejčastěji využíván pro přípravu **hydrogelů**. Obecně lze hydrogely připravit fyzikálním (např. síťování vodíkovými vazbami, iontové síťování) nebo chemickým (př. radiací, pomocí enzymů) síťováním. Síťování lze definovat jako spojování polymerních řetězců příčnými kovalentními vazbami za vzniku 3D struktury (polymerní sítě). V případě, že volná místa zesíťované polymerní struktury

vyplňuje voda, lze tuto struktur označit za hydrogel. **Hydrogely na bázi thiolovaného hyaluronanu** lze připravit nukleofilní (Michaelova adice) nebo radikálovou reakcí (oxidace). Thiolové polymery, síťované v přítomnosti vzdušného kyslíku či oxidačních činidel (H_2O_2), síťují za vzniku disulfidové vazby. Mechanismus jejich síťování připomíná síťování proteinů, které představují jednu ze základních složek lidského těla. A právě to může být jeden z důvodů, proč je thiolace polymerů v současné době tak populární. Hydrogely na bázi thiolovaného hyaluronanu se používají např. v oftalmologii, ortopedii a chirurgii (hojení poškozených kloubních chrupavek), estetické medicíně (vyhlazování vrásek) nebo v onkologii (řízené uvolňování léčiva při léčbě lokálního tumoru).

Úspěšnou modifikaci hyaluronanu thiolů lze potvrdit pomocí infračervené spektroskopie (**FTIR**) nebo nukleární magnetickou rezonancí (**NMR**), která poskytuje přesnější výsledky. Pro aplikaci připravených thiolovaných hydrogelů je důležité znát některé **reologické parametry**. Nejčastěji se jedná o dobu gelace, kterou lze definovat jako časový okamžik, ve kterém se z viskózní kapaliny stává elasticky tuhá látka. Po lyofilizaci thiolovaného hydrogelu získáme porézní strukturu, kterou lze charakterizovat na skenovacím elektronovém mikroskopu (**SEM**). Tato metoda poskytuje informace o povrchu analyzovaného vzorku, počet a velikost pórů atd. Na základě získaných parametrů je možné posoudit, zda-li z thiolovaného hyaluronanu lze připravit hydrogel metodou 3D tisku.

Cílem bakalářské práce bylo připravit derivát kyseliny hyaluronové (HA) pomocí thiolů (HA-SH), který by byl vhodný k přípravě hydrogelů pro biomedicínské aplikace. V rámci experimentální části byla připravena řada vzorků modifikovaného hyaluronanu (HA(Na)) lišící se koncentrací polymeru, molekulovou hmotností a molárním poměrem látek. Dílčím úkolem bylo zhodnotit vliv výše uvedených parametrů syntézy HA-SH na přípravu hydrogelů, následně hydrogely připravit a provést jejich charakterizaci.

SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Hyaluronan (HA(Na)) je lineární polysacharid patřící do skupiny glukosaminoglykanů, jehož struktura se skládá z opakující se disacharidové jednotky – kyseliny D-glukoronové a N-acetyl-D-glukosaminu navzájem spojených střídající se β -(1,3) a β -(1,4) glykosidickou vazbou [4]. Díky své vysoké biokompatibilitě a nízké imunogenicitě je HA(Na) běžně využíván např. jako materiál k léčbě poranění a osteoartrózy (onemocnění kloubů), v očním lékařství, v tkáňovém inženýrství či jako materiál pro transport léčiv. I přes všechny unikátní vlastnosti, kterými čistý HA(Na) disponuje, je jeho využití pro různé aplikace značně omezeno např. jeho výbornou rozpustností ve vodě [5], rychlou degradací ve fyziologickém prostředí nebo slabými mechanickými vlastnostmi [6]. Aby bylo dosaženo požadovaných vlastností je třeba HA(Na) modifikovat, tzn. upravit, ať už chemicky či fyzikálně, jeho strukturu. Jednou z možností, jak chemicky modifikovat HA(Na), aniž by došlo k narušení jeho biokompatibility a nulové cytotoxicity, je navázat na jeho strukturu např. thiolovou skupinu (-SH). V současné době se problematikou modifikace hyaluronanu thioly věnuje celá řada vědeckých studií [5]. Například autoři Kafedjiiski et al. (2007) syntetizovali thiolovaný hyaluronan (HA-SH), který má 6,5krát lepší mukoadhezivní vlastnosti (17 hod) a výrazně nižší rychlost degradace než čistý HA(Na). Na základě výsledků jejich studie představuje thiolovaný polymer slibný materiál pro vývoj různých systémů podávání léčiv [7]. Thiolovaný hydrogel jako nosič protirakovinových léčiv zkoumali ve své práci Xu et al. (2021). Oxidačním činidlem syntézy hydrogelu bylo DMSO, (a) iniciující vznik disulfidové vazby, ale i (b) podílející se na rozpuštění protirakovinného léku (XY) uloženého v porézní struktuře thiolovaného hydrogelu. Díky botnací schopnosti a degradabilitě thiolovaného hydrogelu, lze následně lék z jeho struktury řízeně uvolnit. Díky tomu představuje hydrogel na bázi thiolovaného hyaluronanu slibný materiál pro přípravu tzv. „platformy pro různé léky“ při léčbě lokálních tumorů [8].

Další autoři Cao et al. (2019) a Hong et al. (2020) se ve svých studiích zabývali přípravou thiolovaných hydrogelů, které lze aplikovat v oblasti tkáňového inženýrství. Thiolovaný hydrogel (v kombinaci s akrylátovými skupinami) má podle studie Cao et al. (2019) velký aplikační potenciál jako nový chirurgický antiadhezivní materiál, cytoprotektivní činidlo a bioinertní tkáňovou výplň [9]. Hong et al. (2020) se zase ve své práci zaměřili na přípravu injektovatelných HA-SH hydrogelů, jež byly obohaceny nanočásticemi fosforečnanu vápenatého (BCP). Díky poddajnosti thiolovaného hydrogelu usnadňující např. výplň kostních defektů, a BCP nanočástic, vynikající zejména osteoinduktivní (svou přítomností

vyvolává růst kostních buněk) a osteokonduktivní (schopnost materiálu sloužit jako scaffold pro tvorbu nové tkáně) funkcí, lze tento kompozitní materiál (HA-SH/BCP) uplatnit při léčbě poraněných kostí [10].

Zabudováním nanočástic do struktury thiolovaného hyaluronanu se zabývali také Yegappan et al. (2019). Tito autoři prokázali, že HA-SH hydrogely obsahující nanočástice polydopaminu (PDA), vykazují výrazně vyšší tuhost (163 Pa), než hydrogely HA-SH bez přídavku PDA nanočástic (99 Pa). U hydrogelů s přídavkem PDA nanočástic byla prokázána zvýšená migrace a proliferace buněk. PDA částice plněné léčivem, rovněž vykazovaly kontinuální uvolňování léčiva po dobu 7 dnů. Z uvedených informací vyplývá, že thiolované hydrogely s přídavkem PDA nanočástic lze využít při řízeném uvolňování léčiv v tkáňovém inženýrství [11]. Chování PDA nanočástic ve struktuře HA-SH hydrogelu pozorovali také autoři Qu-Hang Yu (2020), kteří studii PDA nanočástic Yegappan et al. (2019) rozšířili o poznatek, že zavedením PDA částic do struktury HA-SH se zvýšila buněčná afinita, tkáňová adheze, ale i schopnost hydrogelu pohlcovat volné radikály. Díky kombinaci výhod HA-SH (např. biokompatibilita) s PDA (schopnost zachycovat volné radikály), tento materiál splňuje požadavky na přípravu antimikrobiálních lékařských obvazů [12].

Všechny studie zabývající problematikou thiolace hyaluronanu uvádí, že syntézu HA-SH lze provést jednoduchým způsobem a za fyziologických podmínek. Thiolace představuje jeden z mnoha způsobů, jak modifikovat HA(Na). Za její nespornou výhodu lze považovat skutečnost, že např. k přípravě zesíťované struktury se jako tzv. crosslinker využívá vzdušný kyslík na rozdíl od modifikace HA(Na) např. divinyl sulfonem (DVS) [13], který může představovat potenciální riziko, díky své možné toxicitě. Další výhodou tohoto způsobu modifikace hyaluronanu je možnost řízeného procesu síťování HA-SH pomocí pH. Nízké hodnoty pH ($\text{pH} < 7$) totiž blokují thiolové skupiny a tím brání síťování, zatímco při zvýšení pH nad 7 dochází k tzv. self-crosslinku za vzniku zesíťované struktury [14].

I přestože se problematikou thiolovaného hyaluronanu zabývá celá řada odborných článků a studií, jak je patrné z výše uvedeného textu, tak problematika přípravy thiolovaných hydrogelů na bázi hyaluronanu pomocí metody 3D tisku (popř. biotiskem), se v literatuře příliš nezmiňuje.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOMATERIÁLY

Biomateriály lze definovat jako materiály využívané k přípravě struktur, jejichž úkolem je nahradit část těla nebo jeho funkci bezpečným, spolehlivým, ekonomickým a fyziologicky přijatelným způsobem. Dle Park a Lakes (2007) lze biomateriály chápat jako: „*systemově a farmakologicky inertní látky, které jsou navrženy pro implantaci nebo začlenění do živých systémů.*“ [1]. Jedná se tak o materiály, které umožňují komunikaci s biologickým systémem s cílem léčit nebo nahradit příslušnou tkáň, orgán, popřípadě specifickou funkci v lidském těle [2].

Problematikou interakce biomateriálů s biologickým organismem se zabývají **materiálové vědy**. Mezi oblastí jejich zájmu lze zahrnout např. mechanické vlastnosti materiálu (houževnatost, křehkost, pevnost v tahu atd.), modifikaci povrchů, a biologické disciplíny (imunologie, toxikologie, proces hojení ran atd.). Pokud má být připravovaný materiál použit v oblasti tkáňového inženýrství, nesmí být opomenuty ani další aspekty jako např. **biokompatibilita** a **biodegradabilita materiálu**. Biokompatibilita je obecný pojem vyjadřující schopnost materiálu být kompatibilní, tedy vzájemně slučitelný, s živou tkání [2]. Naopak biodegradabilita popisuje schopnost materiálu rozpadat se tzn. degradovat, na jednodušší strukturní jednotky, které jsou pro živý organismus netoxické.

Jak už bylo zmíněno v předchozí části textu, připravený biomateriál musí splňovat několik podmínek (při jeho aplikaci do lidského těla):

- 1) implantát (biomateriál aplikovaný do organismu) není vyloučen biologickým systémem, tedy je biokompatibilní,
- 2) při aplikaci do systému nevykazuje toxicitu, nezpůsobuje alergické ani imunologické reakce, není karcinogenní atd.,
- 3) je chemicky inertní a stálý (degradace nezávisí na čase),
- 4) materiál má adekvátní mechanické vlastnosti (pevnost, hmotnost, hustota atd.),
- 5) relativně levná, reprodukovatelná a lehká výroba, s možností následné velkovýrobní produkce atd.

Za předpokladu, že materiál splňuje tyto parametry, lze jej využít např. při výrobě analytických přístrojů (biosenzory), zdravotnických materiálů (krevní vaky, chirurgické nástroje a zařízení) a v oblasti **tkáňového inženýrství** a **regenerativní medicíny** (náhrada kůže, scaffoldy, chrupavky apod.) [15].

Obecně lze biomateriály rozdělit do tří kategorií: kovy, keramika a polymery [15, 16].

První kategorii tvoří **kovy**, řadí se mezi biomateriály především díky jejich výborné elektrické a teplotní vodivosti a mechanickým vlastnostem. Některé kovy jsou využívány jako náhrady tvrdých tkání, tj. kolenní a kyčelní klouby, kostní dlahy a šrouby pro hojení zlomenin, fixační prostředky páteře, nebo zubní implantáty. Důvodem jsou již zmiňované mechanické vlastnosti, ale také jejich odolnost proti korozi. Kovové slitiny rovněž nachází uplatnění při přípravě specifických materiálů jako např. cévní stenty, vodící dráty katetrů nebo ortodontické obloukové dráty [16]. Mezi nejvíce využívané kovy a jejich slitiny v biomedicínských aplikacích lze zařadit slitinu kobaltu a chromu, zlato, platinu, nerezovou ocel a slitiny titanu [2].

Druhou kategorií biomateriálů tvoří **keramika**. Jedná se o třídu anorganických pevných látek s iontovou nebo kovalentní vazbou, která se zpracovává při vysoké teplotě [2, 17]. Keramika může obsahovat krystalickou a amorfni fázi. Oproti kovům má tu výhodu, že je odolnější vůči degradaci v různých prostředích. Na druhou stranu díky iontové vazbě má výrazněji křehčí strukturu. Vzhledem chemické podobnosti keramiky s kostmi lidského těla, ji lze uplatnit v ortopedických implantátech nebo zubařských materiálech. Do této skupiny patří např. oxidy hliníku, bioaktivní skla nebo fosforečnan vápenatý [2].

Do třetí kategorie spadají polymery. Jedná se o organické látky, které jsou charakteristické velkou molekulovou hmotností a jejich hlavní řetězec je tvořen prvky C, H, O a N spojených kovalentní vazbou [2, 17]. Dle původu se polymery dělí na syntetické a přírodní polymery. Poly(etylen), poly(2-hydroxyethylmetakrylát) nebo například poly(etylglykol) se řadí mezi syntetické polymery využívané jako biomateriály a mezi přírodní polymery lze zařadit například fibrin, kolagen, nebo kyselinu hyaluronovou [2].

Mezi hlavní výhody polymerních biomateriálů, ve srovnání s biomateriály kovovými a keramickými, patří jejich snadná výroba (latexy, filmy, vlákna atd.), sekundární zpracovatelnost, cenová dostupnost nebo požadované mechanické a fyzikální vlastnosti [16]. Díky těmto výhodám se polymery řadí k materiálům hojně využívaným v biomedicínských aplikacích.

1.1 Biopolymery

Podle Niaounakise (2015) lze biopolymery klasifikovat dvěma různými způsoby. Dle prvního přístupu jsou biopolymery děleny dle zdroje původu, zatímco u druhého přístupu dle schopnosti jejich biodegradability.

Na základě těchto kritérií můžeme biopolymery rozlišit na: biopolymery, z obnovitelných přírodních zdrojů, které jsou biodegradabilní (př. hyaluronan, kolagen, celulóza, alginát); biopolymery z obnovitelných zdrojů, které nejsou biodegradabilní (př. polyamid 11, biopolyethylen, bio-polyvinylchlorid) a biopolymery z fosilních paliv, které se v biologickém systému rozloží (př. polybutylen sukcinát, polyvinylalkohol) [3].

Bez ohledu na zdroj původu lze polymery dále klasifikovat do menších podskupin, a to na základě vhodného využití pro určité typy tkání. Příkladem takové podskupiny mohou být např. **elastomery**. Díky jejich schopnosti odolat vysoké deformaci, byly vyhodnoceny jako vhodné materiály pro kardiovaskulární aplikace (např. jako membrána pro krevní pumpy [18] nebo jako srdeční náplast pro regeneraci tkáně po infarktu myokardu [19]), kde hraje důležitou roli především pružnost. Mezi další kategorii polymerů, patří **hydrogely**, které představují zesíťované polymerní materiály disponující schopností bobtnat ve vodě a zadržovat ve své struktuře významnou část vody, aniž by došlo k jejich degradaci. Vzhledem k vysokému obsahu vody, se hydrogely staly předmětem zkoumání pro možné materiálové náhrady do měkkých tkáních. Ke zlepšení objemových nebo povrchových vlastností biomateriálů se také vytváří tzv. **kompozitní materiály** [2] tedy materiály složené ze dvou či více látek s odlišnými vlastnostmi [20].

Zdrojem polymerů na přírodní bázi mohou být rostliny, mikroorganismy, ale i samotné lidské tělo. Jedny z nejvíce běžných biomateriálů získávaných z lidského těla jsou kolagen a kyselina hyaluronová.

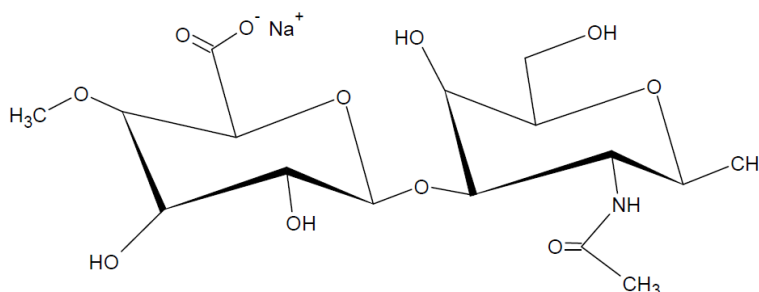
1.1.1 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová (HA) představuje nejvíce využívané materiály pro přípravu hydrogelů pro biomedicínské aplikace, a to především díky její biokompatibilitě, biodegradabilitě a přirozené biologické funkci (např. zachytávání volných radikálů, distribuci látek v těle (kolagen)). Zároveň nepředstavuje pro organismus hrozbu ve formě imunologické toxicity [2].

Aby HA existovala jako kyselina, musí se nacházet v prostředí se silně kyselým pH. Ve fyziologickém pH nese každá karboxylová skupina záporný náboj a vyrovnává jej volnými kationty např. Na^+ , K^+ , Ca^{2+} nebo Mg^{2+} . Ve vodných roztocích, a tedy i v lidském organismu, na sebe záporně nabitá kyselina hyaluronová váže kladně nabité kationty a vytváří soli, obecně nazývané jako hyaluronan nebo hyaluronát sodný [2, 15]. V rámci bakalářské práce byly všechny experimenty prováděny právě se sodnou solí kyseliny hyaluronové.

2 SODNÁ SŮL KYSELINY HYALURONOVÉ

Hyaluronan nebo-li sodná sůl kyseliny hyaluronové HA(Na) je přírodní lineární polysacharid patřící do skupiny heteropolysacharidů nazývané glukosaminoglykany (GAS). Konkrétně se jedná o nesulfátový glukosaminoglykan, ve kterém se střídají disacharidové jednotky, kyselina D-glukoronová a N-acetyl-D-glukosamin (obr. 1) navzájem spojeny střídající se β -(1,3) a β -(1,4) glykosidickou vazbou [4, 5, 21, 22]. Přestože je polymer tvořen jednoduchým polysacharidovým řetězcem, jeho molekulová hmotnost může dosahovat několik milionů Daltonů. Jeho průměrná molekulová hmotnost se pohybuje okolo 10^6 až 10^7 Daltonů [4, 21, 22].



Obr. 1 Opakující se disacharidové jednotky hyaluronanu

2.1 Struktura HA(Na)

Pro pochopení biologických funkcí hyluronanu je důležité znát prostorové uspořádání jeho molekuly. Na disacharidových jednotkách se vykytují objemné funkční skupiny (hydroxylová, karboxylová a N-acetylová) [5]. Pokud se oba monosacharidy nacházejí v β konfiguraci vzniká energeticky velmi stabilní struktura. To je dáno především tím, že se hlavní funkční skupiny (hydroxylová, karboxylová, N-acetylová) uspořádají do stericky výhodné tzv. ekvatoriální roviny, a tím minimalizují energii, která způsobuje pnutí v molekule. Naopak atomy vodíku se nachází v tzv. axiální rovině, která se jeví jako energeticky méně výhodná [5, 23]. Objemné boční skupiny tvoří polární, hydrofilní část molekuly, zatímco atomy vodíku v axiální rovině tvoří hydrofobní části molekuly [5].

Primární struktura hyaluronanu je dána již zmíněnou disacharidovou jednotkou, která se skládá z kyseliny D-glukoronové a N-acetyl-D-glukosaminu spojených střídajícími se glykosidickými vazbami [24-26].

V řetězci je každá strukturní jednotka pootočená o 180° vůči následující i předchozí jednotce. Dva monomery jsou tedy vzájemně pootočeny o 360° , což znamená, že následující

disacharidová jednotka, tedy třetí v pořadí, se vrací do stejné polohy jako jednotka první. Taková posloupnost tvoří elementární šroubovici, kterou lze nazvat jako tzv. sekundární struktura [24, 25, 27].

Terciární sktruktura hyaluronanu je tvořena dvoušroubovicí, kdy řetězce šroubovice vytváří antiparalelní (opačně orientovanou) strukturu, ve které vznikají vazby mezi hydrofobními oblastmi sousedního řetězce. Ve dvoušroubovici je amidová skupina vůči karboxylové skupině v poloze trans. Tuto strukturu stabilizují mezimolekulární síly (vodíkové můstky), které působí mezi amidovými a karboxylovými skupinami. Terciární struktura je formálně ekvivalentní struktuře β -listu (konformace skládaného listu) [24-27].

2.2 Výskyt a syntéza HA(Na)

Výskyt HA(Na)

Jak je uvedeno výše, hyaluronan se přirozeně vyskytuje v měkkých tkáních všech obratlovců [4, 5, 22, 28]. Tělo dospělého člověka o hmotnosti 70 kg obsahuje asi 15 g HA(Na). Téměř polovina tohoto množství se vyskytuje v kůži (epidermis i dermis), přičemž většina je součástí extracelulární matrice [5, 28, 29]. HA(Na) je nepostradatelnou součástí extracelulární matrice, ve které zastává roli řízení a distribuce důležitých látek (např. proteoglykany, kolagen, elastin) [4]. Kromě toho se podílí na buněčné signalizaci, proliferaci, diferenciaci a adhezi buněk [30].

Hyaluronan můžeme ve vyšších koncentracích najít také v pupeční šňůře ($M_w = 3-4$ MDa), synoviální tekutině a očním sklivci [4, 5, 22, 31]. Právě synoviální (kloubní) tekutinu tvoří tzv. vysokomolekulární ($M_w = 6$ MDa) HA(Na) [31], který díky svému složení a vysoké viskozitě pomáhá tlumit nárazy, snižovat tření mezi klouby, a snižovat jejich opotřebení [28, 32]. Nezanedbatelné množství HA(Na) se vyskytuje ve svalech, plicích, ledvinách a mozku. Naopak její vůbec nejnižší množství bylo zjištěno v játrech či v krevním séru [4]. Jedním z dalších klíčových zdrojů výskytu hyaluronanu jsou kohoutí hřebínky (7,5 mg/ml) [5] či povrch bakterií rodu *Pasteurella multocida* a *Streptococcus* skupiny A a C [22]. *Streptococcus pyogenes* (lidský patogen), *Streptococcus equi* a *Streptococcus uberis* (zvířecí patogeny), patří mezi bakterie rodu *Streptococcus*. Schopnost syntetizovat hyaluronan pravděpodobně získaly okopírováním enzymatického aparátu od svých hostitelů, tj. obratlovců. Tyto mikroorganismy využívají hyaluronan k enkapsulaci (zapouzdření) svých buněk, čímž se pro obranný systém hostitele stávají neviditelnými. Hyaluronan také zlepšuje adhezi a kolonizaci bakteriálních buněk [31].

Biosyntéza HA(Na)

K syntéze hyaluronanu nedochází jako u většiny glukosaminoglykanů v Golgiho aparátu nebo endoplazmatickém retikulu [4, 21, 22]. HA(Na) se syntetizuje na vnitřní straně plazmatické membrány jako volný lineární polymer. Biosyntéza HA probíhá za přítomnosti kontroly tří trans-membránových enzymů, které jej produkují při současném vytlačování na povrch buňky nebo do extracelulární matrice [21, 22, 28, 33].

Izolace HA(Na)

Jednou z prvních možností, jak izolovat hyaluronan, byla izolace z odpadních živočišných tkání (např. kohoutí hřebínky, prasečí kůže, žraločí chrupavky, rybí sklivec) [31], jehož výsledkem byl, vlivem neřízené rychlosti degradace a přirozené polydisperzity hyaluronanu, vysoce polydisperzní polymer. Výtěžek polymeru byl, vzhledem k malé koncentraci hyaluronanu v živočišných tkáních, velmi nízký. Velkou nevýhodou extrakce HA z živočišných tkání je zvýšené riziko kontaminace HA(Na) například viry [5]. Alternativou dle Swanna (1968) je tzv. dočištění produktu srážením pomocí látky zvané cetylpyridiniumchlorid (CPC), jehož výsledkem je pokles viskozity (LVČ = 2200 ml/g) hyaluronanu, zapříčiněný degradací HA, aniž by došlo ke změně její molekulové hmotnosti [34].

Další metodou průmyslové produkce hyaluronanu je bakteriální fermentace [5, 29]. Výtěžky prvních izolací hyaluronanu z povrchu bakterií činily 300–400 mg/L. Od té doby došlo k výraznému posunu a zlepšení metod získávání HA(Na), zahrnující optimalizaci procesu extrakce, adaptaci kultivačního média a selekci kmenů s vysokou produktivitou biopolymeru. Díky tomu se podařilo navýšit množství izolovaného hyaluronanu až na 6–7 g/L, což je technický limit způsobený vysokou viskozitou živného média. Mezi bakterie, schopné produkovat HA(Na) patří *Streptococcus* skupiny A a C, gram-pozitivní bakterie a *Pasteurella*, gram-negativní bakterie [29]. Bakterie *Streptococcus* skupiny C, které nejsou patogenními organismy (na rozdíl od *Streptococcus A* nebo *Pasteurella*) a neohrožují zdraví člověka, se hojně využívají k izolaci hyaluronanu. Nejpoužívanějšími kmeny jsou *Streptococcus equi* subsk. *equi* a *S. equi* subsk. *zooepidemicus* [31]. Kromě zmíněných bakterií byla z mléčných potravin izolována bakterie kmene *S. thermophilus* produkující HA(Na), a která po genetické modifikaci je schopná produkovat až 1,2 g/L tohoto biopolymeru. HA(Na) získaný z geneticky upraveného kmene bakterií má srovnatelnou průměrnou molekulovou hmotnost s hyaluronanem produkovaným přírodními kmeny bakterií.

Jak už bylo zmíněno, průmyslová výroba HA stojí především na (1) extrakci z živočišných tkání a (2) bakteriální fermentaci, které shodně produkují polydisperzní vysokomolekulární hyaluronan ($M_w \geq 1 \times 10^6$ Da, polydisperzita od 1,2 do 2,3) využitelný v biomedicínských i kosmetických aplikacích [31].

2.3 Vlastnosti HA(Na)

Vzhledem k výjimečným vlastnostem hyaluronanu, kterými jsou např. vysoká hydroskopicita (1), viskoelasticita (2), minimální imunogenicita (3), biodegradabilita (4), biokompatibilita či vstřebatelnost, nachází HA(Na) uplatnění v široké škále biomedicínských aplikací [24, 29]. Výsledné vlastnosti HA(Na) jsou silně závislé na její molekulové hmotnosti.

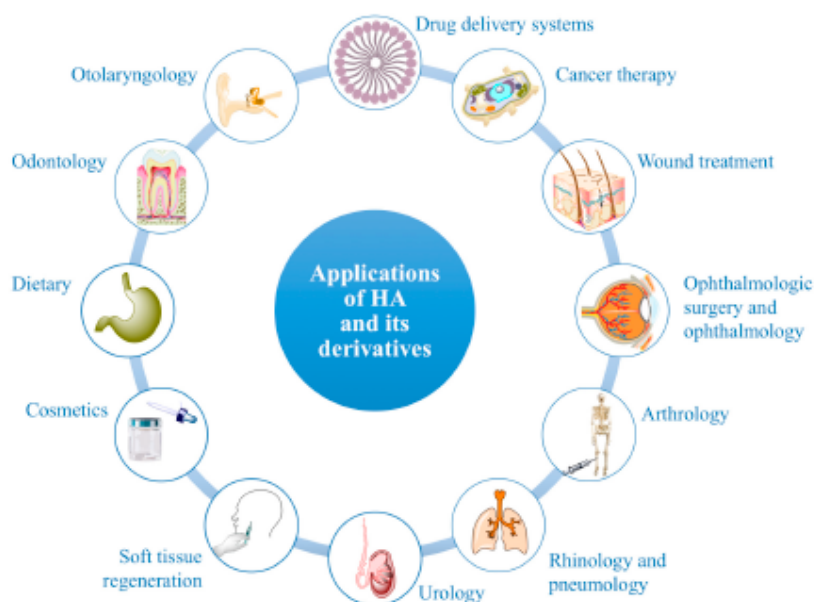
- (1) HA(Na) dokáže, díky hydrofilitě molekuly, výborně zadržovat vodu, a to až na 1000násobek svého původního objemu a tvořit tak volné hydratované domény. Hyaluronan je polyelektrolytem, tj. látkou, která ve své struktuře obsahuje postranní karboxylovou skupinu, schopnou elektrolytické disociace (při fyziologickém pH) [29].
- (2) Hyaluronan přítomný např. v synoviální tekutině nebo očním sklivci, propůjčuje těmto tělním tekutinám jejich viskoelastické vlastnosti. To znamená, že v částech těla, kde se tyto tekutiny vyskytují (např. klouby), jsou schopné pohlcovat mechanickou energii (náraz) elasticitou nebo ji rozptýlit viskózním tokem [35]. Viskozita roztoku se s rostoucí molekulovou hmotností a koncentrací polymeru zvyšuje [24]. Roztoky hyaluronanu lze označit za tzv. pseudoplastické kapaliny, u kterých viskozita klesá s rostoucí smykovou rychlostí [29]. Reologické vlastnosti závisí na molekulové hmotnosti a koncentraci polymeru, ale i podmínkách prostředí jako je pH či teplota [29]. Viskoelastických vlastností hyaluronanu se využívá v celé řadě lékařských aplikací (např. v oftalmologii, nitrooční injekce při operacích oka atd.) [27].
- (3) Jelikož se jedná o přírodní biopolymer přítomný v lidských tkání, nelze pochybovat o jeho vysoké biokompatibilitě či nulové toxicitě. Navíc se v každé tkáni vyskytuje molekula hyaluronanu se stejnou strukturou, takže nedojde k vyvolání reakce imunitního systému [29].
- (4) Degradace HA(Na) v biologickém prostředí je způsobena hydrolýzou katalyzovanou enzymy zvanými hyaluronidázy [27, 29]. Enzymy rozkládají hyaluronan na nízkomolekulární látky, které nejsou toxické, a stejně jako samotná molekula,

nevyvolávají imunitní odpověď organismu. V kůži se poločas rozpadu hyaluronanu pohybuje okolo 24 hod, v oku 24-36 hod, v chrupavce 1-3 týdny a ve sklivci až 70 dní [29].

2.4 Využití HA(Na)

Dle výše uvedených vlastností, hyaluronan, včetně jeho možných derivátů, představuje perspektivní biomateriál pro různé lékařské, farmaceutické, kosmetické (dermální výplně) i potravinářské aplikace [22, 36]. Na obr. 2 je přehled možných aplikací HA(Na).

Stejně jako biologické funkce, tak i využití hyaluronanu je silně závislé na jeho molekulové hmotnosti. (1) Vysokomolekulární hyaluronan ($M_w > 5 \cdot 10^5$ Da) je součástí extracelulární matrice, vykazuje antiangiogenní (působí proti tvorbě krevních kapilár, které hrají důležitou roli při tvorbě nádorů) a imunosupresivní účinky, (2) hyaluronan se střední molekulovou hmotností (M_w mezi $2 \cdot 10^4$ a $2 \cdot 10^5$ Da) se uplatňuje při ovulaci, embryogenezi a procesu hojení ran, (3) HA(Na) s 15 – 50 opakujícími se disacharidovými jednotkami (M_w mezi $6 \cdot 10^3$ a $2 \cdot 10^4$ Da) působí naopak zánětlivě, angiogenně a imunostimulačně, (4) a hyaluronan s malou molekulovou hmotností (M_w od 400 do 4000 Da) vykazuje antiapoptotické účinky (působí proti apoptóze, tj. buněčná smrt) [31].



Obr. 2 Možné aplikace HA(Na) a jeho derivátů

Jedno z mnoha využití HA(Na) je např. při léčbě **osteoartrózy** (degenerativní onemocnění kloubů). Přítomnost hyaluronanu v kloubech podporuje mechanické spoje (mezi klouby a

kostmi) a lubrikaci kloubů. Při osteoartróze dochází ke snížení koncentrace a molekulové hmotnosti HA(Na) v kloubu, což má za následek snížení jejich lubrikace, které přispívá k vyššímu opotřebení kloubů. Při léčbě osteoartrózy se hyaluronan (o různé M_w) vpravuje tzv. intra-artikulární injekcí, tj. vpravením injekce přímo do postiženého kloubu [22]. Bylo dokázáno, že aplikace hyaluronanu snižuje opotřebení chrupavky, přispívá ke zlepšení viskoelastických vlastností synoviální tekutiny a k redukci jejich bolesti [32, 37].

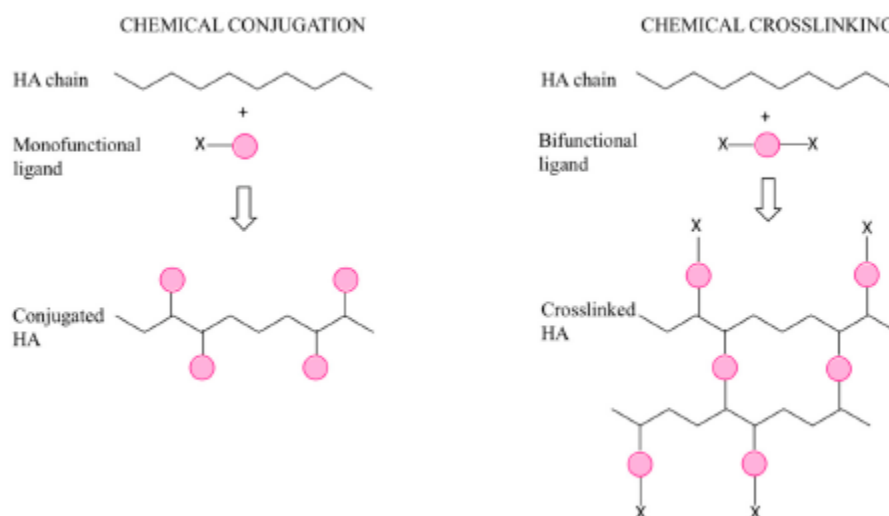
Hyaluronan lze dále využít v **očním lékařství**, konkrétně v oční chirurgii, kde napomáhá implantaci umělé nitrooční čočky [25, 27]. Jeho uplatnění lze nalézt i ve formě viskoelastického gelu urychlující hojení a regeneraci poraněné tkáně po operačních zákrocích v **obecné chirurgii** [5, 25].

2.5 Modifikace HA(Na)

Využití samotného polymerního řetězce hyaluronanu je pro různé aplikace značně omezeno např. jeho výbornou rozpustností ve vodě [5], slabými mechanickými vlastnostmi či rychlou degradací (vliv oxidace, enzymy) [6] a pro dosažení požadovaných vlastností, aniž by došlo ke změně její biokompatibility, je třeba jej chemicky modifikovat [5].

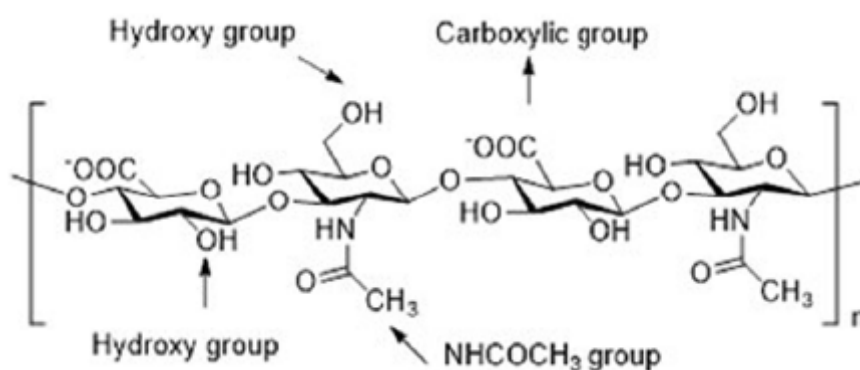
Z pohledu chemické modifikace rozlišujeme dva základní typy – konjugaci a síťování. V případě konjugace dochází k navázání substituentu přímo na řetězec hyaluronanu jednoduchou vazbou. Zatímco při síťování se různé řetězce polymeru HA(Na) pojí navzájem dvěma nebo více vazbami (obr. 3) [38].

Většina chemických modifikací hyaluronanu se provádí ve vodném prostředí. V případech zvýšeného rizika hydrolýzy se využívají organická rozpouštědla jako je DMSO (dimethylsulfoxid) či DMF (dimethylformamid) [38].



Obr. 3 Rozdíly mezi síťováním a konjugací polymeru [36]

Z pohledu strukturního uspořádání HA(Na), které je naznačeno na obr. 4, je zřejmé, že mezi funkční skupiny vhodné k modifikaci hyaluronanu patří primárně skupina karboxylová a hydroxylová. Sekundárně je možné provést i deacetylaci N-acetylů a získat tak funkční aminoskupinu nebo například také oxoskupinu selektivní oxidací C₆—OH. [39]. V následujících kapitolách je uveden přehled nejčastějšího navázání možných substituentů na požadované funkční skupiny.



Obr. 4 Funkční skupiny vhodné k modifikaci hyaluronanu [39].

2.5.1 Modifikace hydroxylové skupiny

K modifikaci hydroxylové skupiny se nejčastěji přistupuje pomocí etherifikace, esterifikace nebo síťování pomocí divinylsulfonu (DVS) či bis-epoxidu [39, 40]. a také oxidací jodistanem sodným [41]. Mezi funkční skupiny, které mohou být zavedeny na hydroxylové zbytky, patří např. aldehydy, methakryláty, thioly nebo halogenacetáty [40].

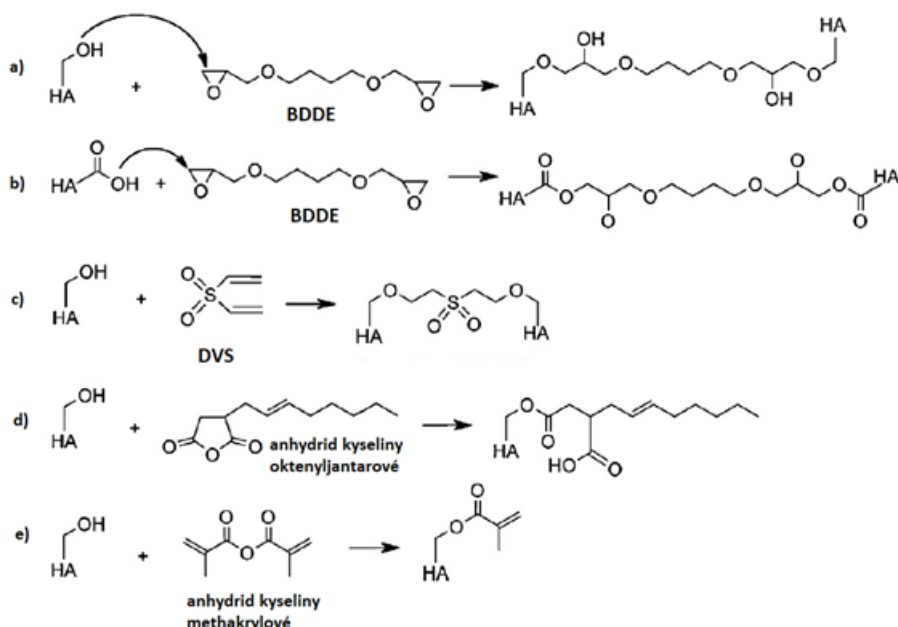
Etherifikace

Etherifikací lze souhrnně nazvat reakci (za přítomnosti báze) mezi alkoholy a tzv. „alkylating agent“, jako jsou například halidy (např. chloridy, bromidy, iodidy) nebo méně používané alkyl sulfonáty [42]. K syntéze etherových derivátů hyaluronanu se často využívají bis-epoxidy, popř. epoxidy (především tedy 1,4-butandioldiglycidyl ether (BDDE), ethylenglykoldiglycidyl ether, epichlorohydrin atd.), které při současném otevírání epoxidového kruhu reagují s hydroxyem HA(Na) za vzniku etherové vazby (obr. 5a) [36, 38, 43]. Další alternativou přípravy etherových derivátů HA(Na) je využití např. DVS (za přítomnosti báze) (obr. 5c) [36]. V kyselém prostředí dochází k deprotonaci menšího množství hydroxylových skupin (přebytek aniontové karboxylové skupiny), což vede ke vzniku esterové vazby (obr. 5b).

Hyaluronan modifikovaný pomocí BDDE nebo DVS lze využít při intra-artikulární terapii při léčbě osteoartrózy (degenerativní onemocnění kloubu) [13].

Esterifikace

Esterifikací, tedy reakcí alkoholové funkční skupiny HA(Na) s tzv. „acylating agent“ jako [42] např. s anhydridem kyseliny oktenyljantarové (obr. 5d), nebo anhydridem kyseliny methakrylové (obr. 5e), které probíhají za alkalických podmínek ve vodě [36].



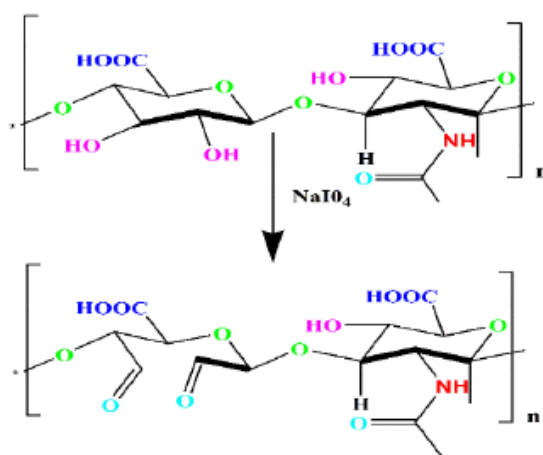
Obr. 5 Schéma reakcí s hydroxylovou skupinou na hyaluronanu – a) reakce s BDDE v alkalickém prostředí, b) reakce BDDE v kyselém prostředí, c) reakce s DVS, d) reakce s anhydridem kyseliny oktenyljantarové, e) reakce s anhydridem kyseliny methakrylové [36]

Například hydrogel připravený smícháním hyaluronanu modifikovaného anhydridem kyseliny methakrylové (HA-MA) a hyaluronanu modifikovaného 3,3-dithiobis(propionylhydrazid) (DTP) (HA-DTP) lze využít při povrchovém hojení ran [44].

Oxidace jodistanem

Oxidace jodistanem reprezentuje další z možných modifikací hydroxylové skupiny. Jako oxidační činidlo se používá jodistan sodný (NaIO_4). Mechanismus oxidace jodistanem je znázorněn na obr. 6. Principiálně se jedná o oxidaci vicinálních hydroxylových skupin umístěných na druhém a třetím uhlíku za současného rozštěpení vazby mezi těmito uhlíky. Na rozštěpených uhlících vznikají aldehydicke vazby. Na aldehydicke skupiny se mohou vázat sousední hydroxylové skupiny polymerního řetězce, které nepodléhají oxidaci, za vzniku cyklických polyacetalů [41].

Injektovatelný síťovaný hydrogel na bázi oxidovaného HA(Na) a N,O-karboxymethyl chitosanem lze využít při snižování tvorby intraperitoneálních adhezí po operacích [45].



Obr. 6 Mechanismus oxidace HA(Na) jodistanem sodným [41]

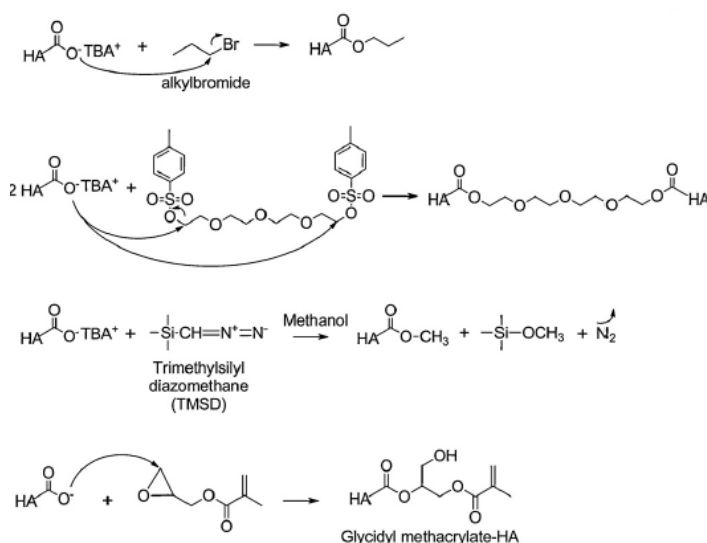
2.5.2 Modifikace karboxylové skupiny

Karboxylovou funkční skupinu lze nejčastěji modifikovat s využitím karbodiimidů, esterifikací nebo amidací [39]. Na aktivovanou (deprotonovanou) karboxylovou skupinu se mohou vázat např. hydrazidové, thiolové nebo aminové funkční skupiny [40].

Esterifikace

Možným způsobem modifikace karboxylové skupiny je esterifikace, tedy vznik esterové vazby, mezi které lze zařadit např. přípravu esterů alkylací pomocí alkylhalogenidů nebo

tosylátu, dále přípravu esterů za použití derivátů diazomethanu nebo epoxidů [38]. Schéma esterifikací za použití výše uvedených látek je uvedeno na obr. 7.



Obr. 7 Schéma esterifikací hyaluronanu za použití alkyhalogenidů, tosylátu, derivátu diazomethanu a epoxidu [38]

Polymerní síť na bázi alginátu vápenatého a methylmethakrylátem modifikovaného hyaluronanu studovali D'Arrigo a kolektiv (2012). Výsledky testů potvrdily jeho možné využití jako matrice pro dodávání bioaktivních léků [46].

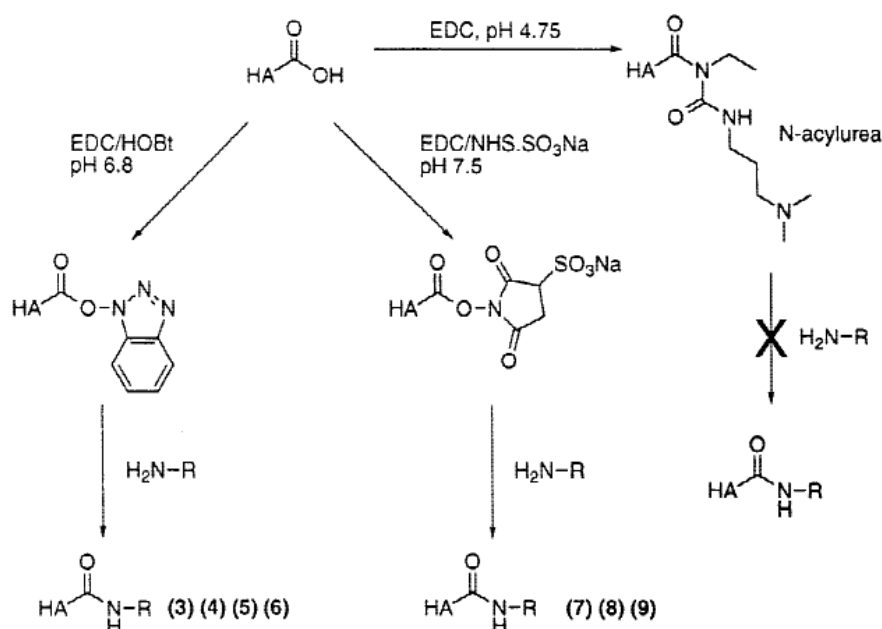
Amidace

Reakce karboxylové skupiny s aminoskupinou za přítomnosti karbodiimidů ve vodném prostředí je jednou z nejpoužívanějších metod modifikace polymerního řetězce HA(Na). Nejběžnějšími činidly jsou právě karbodiimidy, především tedy 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid (EDC), díky jeho rozpustnosti ve vodě [38, 43]. Výhodou použití EDC je, že reakce může být provedena ve vodě a bez předchozí úpravy hyaluronanu [38].

Prvním krokem amidace dle autorů Nakajima a Ikada (1995) je již zmíněná aktivace karboxylové skupiny na řetězci HA(Na) za vzniku meziprojektu nazývaného O-acyl izomočovina. Tato látka je vysoce reaktivní a v přítomnosti vody se přeskupuje na stabilní N-acylmočovinu, jenž blokuje jakékoli další reakce s aminem. Aktivace karboxylové skupiny probíhá pomocí EDC v prostředí kyselého pH (pH = 4,75). Nevýhoda amidace hyaluronanu prostřednictvím EDC spočívá v jeho vysoké citlivosti na změny pH, a případný vznik stabilního produktu (N-acylmočoviny) [47]. Bulpitt a Aeschlimann (1999) zamezili vzniku stabilní N-acylmočoviny přidávkem N-hydroxysuckcinimidu (NHS) nebo 1-

hydroxybenzotriazolu (HOBt) které snižují pravděpodobnost výskytu hydrolyzy a přeskupení meziproduktů. Posledním krokem amidace je vlastní nukleofilní reakce s aminovou skupinou, která je zobrazena na obr. 8 [48].

Přes aminovou skupinu se na hyaluronan může vázat např. dihydrazid kyseliny adipové. Kolektiv autorů Su, Chen a Lin (2010) navrhl tzv. injektovatelný hydrogel na bázi oxidovaného hyaluronanu a dihydrazidu kyseliny adipové, který je kompatibilní s buňkami pulpozního jádra (NP) (centrum meziobratlové ploténky) a podporuje genovou expresi agrekanu (proteoglykan) a kolagenu, které představují hlavní složku extracelulární matrice obklopující NP buňky. Takový hydrogel lze proto využít jako buněčný nosič pro buňky NP při léčbě degenerace pulpozního jádra [49].

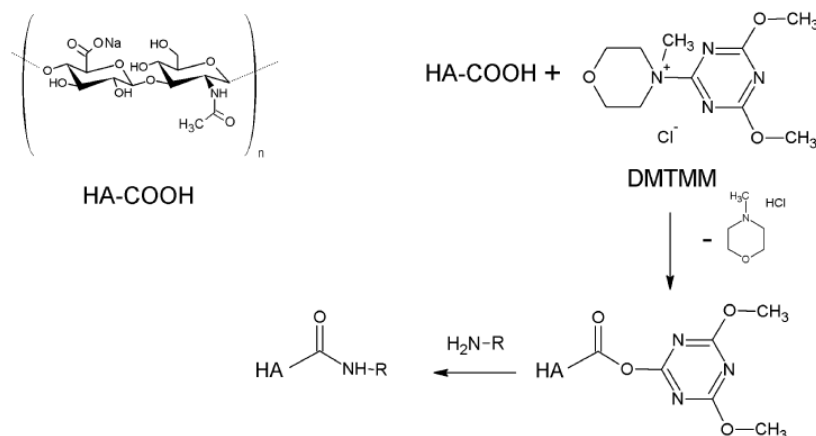


Obr. 8 Reakční mechanismus amidace s EDC [48]

Při amidaci hyaluronanu využívají autoři Schneider et al. (2007) místo vody dimethylsulfoxid (DMSO), který jednak zaručuje získání vyššího stupně substituce (60–80 %) hyaluronanu, ale zároveň eliminuje hydrolyzu EDC [48, 50].

Autor D'este a kol. (2014) aktivovali při amidaci hyaluronanu karboxylovou skupinu pomocí látky 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-N-methylmorfolinium-chlorid (DMTMM), jehož výsledkem je HA-aktivovaný ester, na který se mohou pohodlně vázat aminované skupiny (obr. 9) [51].

Za výhodu aktivace karboxylové skupiny pomocí DMTMM, na rozdíl od reakce s EDC/NHS, lze považovat eliminaci úpravy pH, jednodušší syntézu díky použití menšího množství chemikálií, a s tím související méně intenzivní dočišťovací proces produktu [51].



Obr. 9 Schéma reakce HA(Na) s DMTMM [51]

Jiným derivátem, který lze připravit za pomoci reduktivní aminace, je derivát hyaluronanu nesoucí cystein, cysteamin či podobnou thiolovou sloučeninu.

2.6 Thiolovaný HA(Na)

Jako thiomery, tj. thiolované polymery, lze označit hydrofilní makromolekuly obsahující volné thiolové skupiny v polymerním řetězci [52].

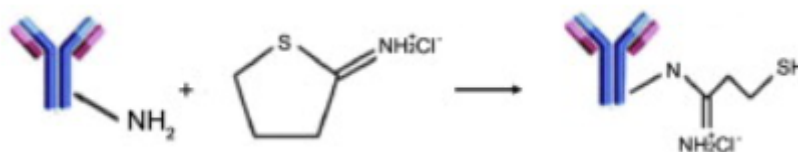
Thiolové funkční skupiny se běžně vyskytují v biologických systémech (např. v podobě aminokyseliny cystein). Proto polymery s vázanými thioly dosahují vyšší chemoselektivity k biologickým složkám a podněcují síťovací reakce. Ve srovnání s aminovou skupinou, má thiolová funkční skupina 1000krát vyšší nukleofilitu (při fyziologickém pH), a tím i vyšší chemoselektivitu [6].

Polymery, které na svém polymerním řetězci obsahují volné thiolové skupiny, dosahují vyšší mukoadheze (ve srovnání s polymery bez -SH skupiny). Čím více thiolových skupin polymerní řetězec obsahuje, tím vyšší má polymer kohezi a adhezi. Mukoadhezivní polymery nejsou toxické, nedochází k jejich adsorpci v gastrointestinálním traktu (trávicí soustava), zvyšují přilnavou dobu na sliznici a zároveň ji nedráždí [53].

2.6.1 Syntéza thiolovaného HA(Na)

Syntézu thiolovaného hyaluronanu lze realizovat s ohledem na různá thiolační činidla. Výčet některých metod je uveden níže.

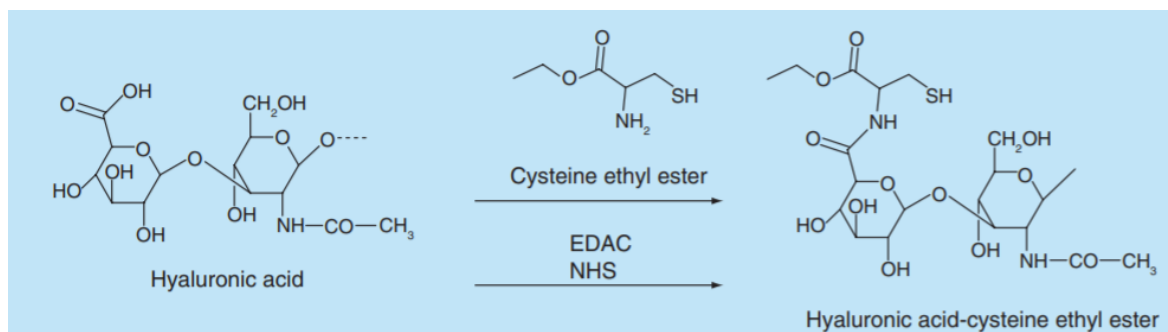
Jednu z možností, jak připravit thiolovaný hyaluronan, představuje využití tzv. **Trautova činidla**, tedy cyklické sloučeniny 2-iminothiolanu. Princip této modifikace spočívá v reakci činidla s aminovou skupinou hyaluronanu, jehož výsledkem je na polymerní řetězec vázaná sulfhydrylová funkční skupina (obr. 10) [54, 55].



Obr. 10 Reakce 2-iminothiolanu s biopolymerem [55]

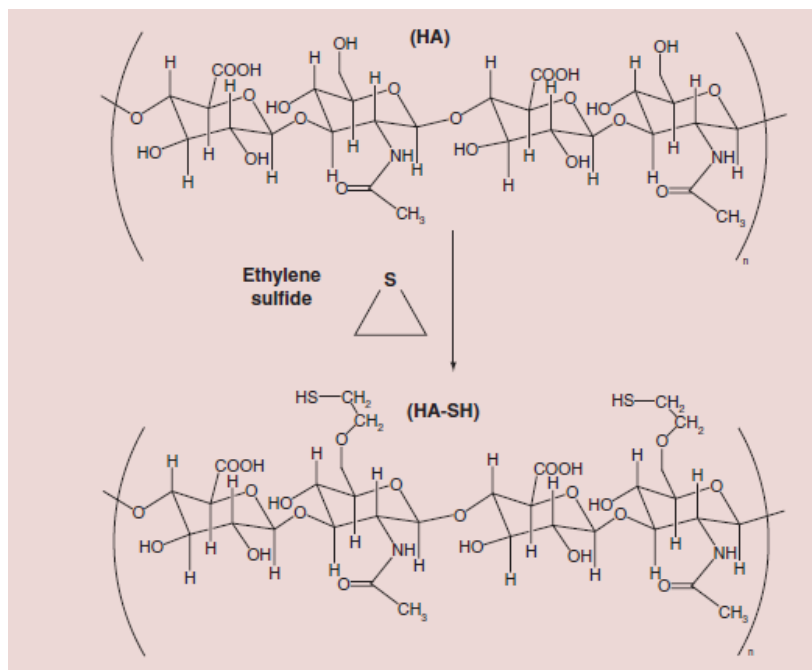
Přesněji řečeno, biopolymer se rozpustí v pufru o pH = 7,4. Následně je k němu přidáno Trautovo činidlo a EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová), jejichž množství se určuje v závislosti na koncentraci biopolymeru [54, 55]. EDTA se při modifikaci používá z důvodu prevence oxidace navázaných $-SH$ skupin. Nezreagované zbytky reakčních činidel se odfiltrují, případně odstraní během dialýzy proti destilované vodě. Množství navázaných sulfhydrylových skupin se zjišťuje s využitím Ellmanovy metody [55].

Navázat $-SH$ funkční skupinu na hyaluronan lze například s využitím **L-cysteinu** za vzniku amidové vazby mezi primární aminoskupinou L-cysteinu a karboxylovou skupinou HA(Na) (obr. 11). Reakce je zprostředkována karbodiimidem a NHS [54, 56, 57].



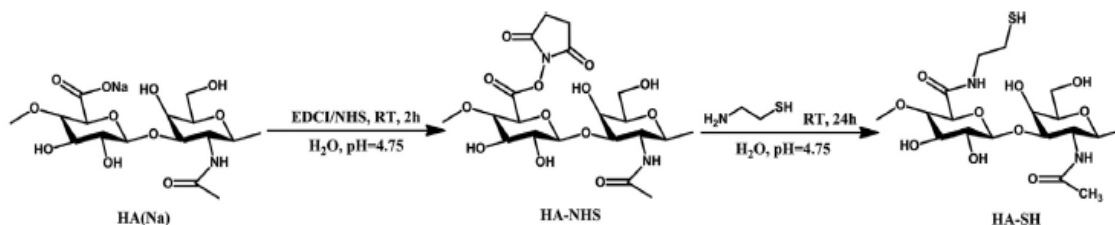
Obr. 11 Syntéza thiolovaného HA(Na) L-cysteinem [56]

Další činidlo, které lze při syntéze thiolovaného HA(Na) využít je **ethylensulfid**. Během nukleofilní reakce následně dochází jednak k otevření kruhu ethylensulfidu, ale i k jeho navázání na hydroxylovou skupinu hyaluronanu (obr. 12) [7].



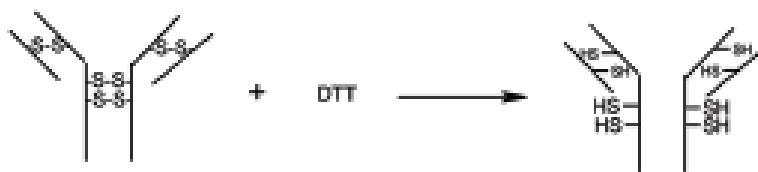
Obr. 12 Reakce ethylensulfidu s HA(Na) [7]

V rámci bakalářské práce byla řešena syntéza thiolovaného hyaluronanu pomocí **cysteaminu (CSA)**. Karboxylová skupina byla aktivována pomocí EDC a následně stabilizována pomocí NHS [14, 58]. Schéma syntézy thiolovaného hyaluronanu je uvedena obr. 13.



Obr. 13 Schéma syntézy thiolovaného hyaluronanu cysteaminem [14]

K zamezení předčasného vzniku disulfidické vazby mezi thiolovými skupinami na polymerních řetězcích se kromě nízkého pH využívá **dithiothreitolu (DTT)**. Redukcí disulfidické vazby na polymerním řetězci dochází ke vzniku volných thiolových skupin (obr. 14), tedy thiolovaného polymeru, využívaného například k vývoji hydrogelů [7, 57, 59, 60].



Obr. 14: Redukce disulfidické vazby pomocí DTT za vzniku thiolovaného polymeru [59]

2.6.2 Vlastnosti thiolovaného HA(Na)

Ve srovnání s přírodním hyaluronanem má thiolovaný HA(Na) řadu unikátních vlastností, mezi které patří např. mukoadheze, koheze (popř. adheze), stabilita proti degradaci atd., při současném zachování své biokompatibility a biodegradability.

Mukoadheze

Mukoadhezi můžeme definovat jako přilnavost přírodního (biologického) nebo syntetického materiálu na vrstvu slizu, který pokrývá slizniční epitel [61].

Polymery, které na svém řetězci obsahují volné thiolové skupiny, vykazují vyšší mukoadhezi (ve srovnání s polymery bez $-SH$ skupiny). K té dochází v důsledku vzniku kovalentní disulfidické vazby mezi ($-SH$) skupinami polymerního řetězce a subdominálních mucinů bohatých na cystein přítomných na sliznici. Většina ostatních mukoadhezivních polymerů je vázaná vodíkovou vazbou nebo iontovými interakcemi [62, 63].

Koheze

Na adhezi (neboli přilnavost) a kohezi (tedy soudržnost) thiolovaného hyaluronu má velký vliv jeho bobtnací kapacita. Tu lze stanovit ze závislosti absorbovaného množství vody na čase. Dle výzkumu Laffleura, Wagnera a Barthelmes (2015), vykazuje cysteaminem modifikovaný hyaluronan, až 3,5krát vyšší bobtnací kapacitu, než HA(Na) nemodifikovaný [64].

Stabilita proti degradaci

Proces thiolace má mimo jiné i zásadní vliv na mechanickou stabilitu polymeru, a to v důsledku disulfidické vazby, která vzniká při síťování mezi thiolovými skupinami. Ve srovnání s nemodifikovaným hyaluronanem, vykazuje thiolovaný hyaluronan až 1,5krát větší mechanickou stabilitu [64].

Přírodní hyaluronan podléhá degradaci především z důvodu působení reaktivních forem kyslíku na polymer. Reaktivní formy kyslíku štěpí řetězec HA(Na), což má za následek

redukci molekulové hmotnosti polymeru projevující se poklesem viskoelastivity tekutin, ve kterých je HA(Na) přítomný. Serban, Yang a Prestwich (2008) ve své práci pozorovali, že thiolovaný derivát HA(Na) snižuje degradaci hyaluronanu způsobenou volnými radikály kyslíku. Thiolovaný hyaluronan má schopnost zhášet (*self-quench*) volné radikály, a tím zabránit štěpení řetězce HA(Na) [65].

Viskoelastická

Jelikož má tuhost připraveného hydrogelu podstatný vliv na proliferaci a migraci buněk, je důležité neopomenout charakterizaci reologických vlastností hydrogelů na bázi modifikovaného hyaluronanu pro aplikace do tkáňového inženýrství. Asim a kolektiv (2020) srovnávali viskoelastické vlastnosti přírodního hyaluronanu a hyaluronanu modifikovaného thiolovými skupinami. Dle jejich pozorování je zřejmé, že thiolovaný HA(Na) vykazuje mnohem vyšší modul pružnosti (téměř 20krát) než čistý HA(Na), s tím související mechanickou pevnost a tuhost modifikovaného polymeru. Kromě toho vyšší modul pružnosti také značí, že thiolovaný hyaluronan má schopnost ukládat deformační energii elastickým způsobem [66].

3 SÍŤOVÁNÍ A PŘÍPRAVA HYDROGELŮ

Modifikací polymerního řetězce hyaluronanu vznikají deriváty HA(Na), určené k přímé aplikaci, nebo k následnému síťování a přípravě hydrogelů či tkáňových nosičů tzv. scaffoldů.

Při použití HA(Na) např. ve formě scaffoldu, je potřeba upravit rychlost degradace scaffoldu tak, aby byla ekvivalentní rychlosti tvorby nové tkáně. Toho lze docílit chemickým nebo fyzikálním zesíťováním.[6].

3.1 Síťování

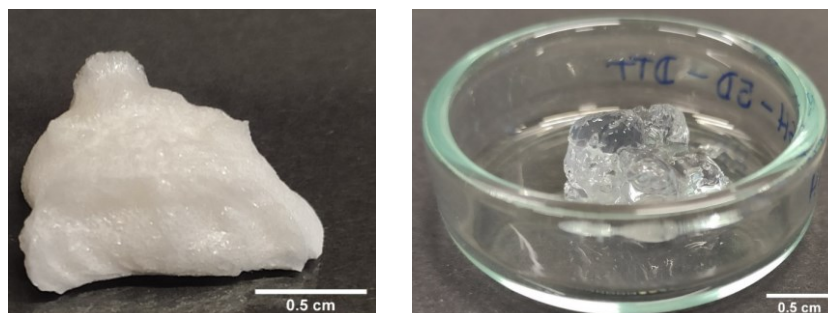
Jak už bylo naznačeno v předchozí části textu, mimo konjugace existuje i síťování, které spočívá ve spojování polymerních řetězců kovalentní vazbou, jehož výsledkem jsou tzv. 3D struktury. Technologie síťování se stala zajímavou oblastí tkáňového inženýrství při vývoji scaffoldů. Výsledkem síťování je pevná síť polymerní matrice, která zlepšuje biomechanické vlastnosti syntetizovaného materiálu. Vazba vznikající při síťování může být fyzikální nebo chemická. Vzájemné spojování funkčních skupin částí polymerních řetězců, za vzniku husté polymerní sítě, probíhá prostřednictvím kovalentních (chemických) nebo supramolekulárních interakcí, tj. iontové interakce, vodíkové vazby atd. [67].

Síťování hyaluronanu může probíhat několika způsoby. Nejčastěji se při síťování využívá tzv. síťovací činidlo, po jehož přidání k polymernímu roztoku, dochází ke spojování jednotlivých částí polymerního řetězce do trojrozměrné 3D sítě. Další způsob, jak připravit síťovaný hyaluronan, spočívá v modifikaci polymerního řetězce, jehož výsledkem je navázání potřebných funkčních skupin na polymer, které následně podléhají zesíťování tzv. „self-crosslinku“ [6].

3.2 Hydrogely

Hydrogely se definují jako trojrozměrně síťované polymerní sítě, které mají schopnost absorbovat velké množství vody. 3D polymerní síť tvoří polymerní řetězec a voda, jenž vyplňuje volná místa v makromolekule. Takový hydrogel není ve vodě rozpustný. Hydrogel nejčastěji tvoří hydrofilní polymer, jehož řetězec se pojí příčnými kovalentními nebo nekovalentními mezimolekulovými (např. iontové síly, hydrofobní interakce či vodíkové můstky) vazbami, za vzniku již zmiňované 3D polymerní sítě. Další složkou takového hydrogelu může být síťovací činidlo, které se chová jako iniciátor samotného síťování.

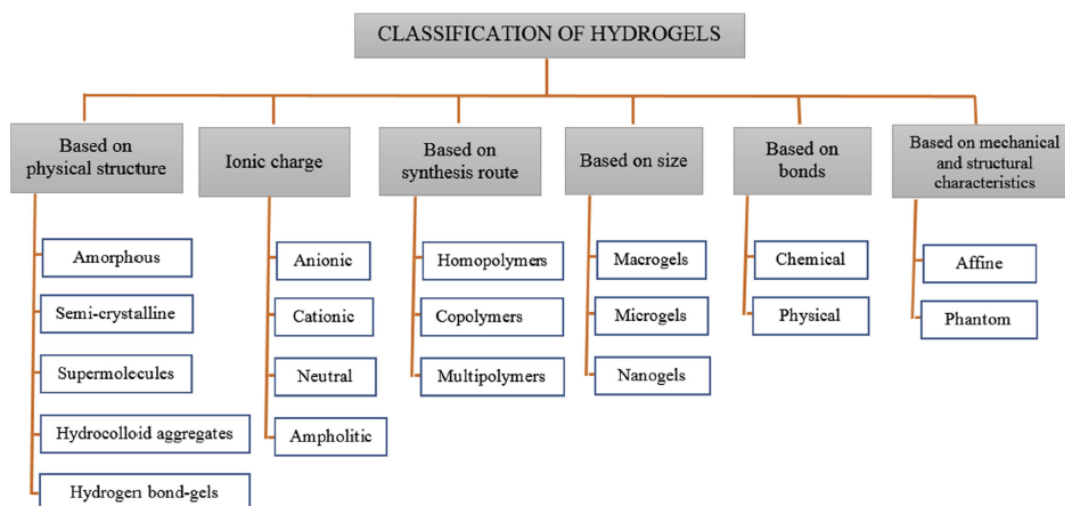
Před vznikem hydrogelu může nastat fáze, kdy dochází vlivem pronikání molekul rozpouštědla do struktury polymeru k otevírání polymerního řetězce, což lze označit jako **botnání**. Při lyofilizaci připraveného hydrogelu se odpaří molekuly rozpouštědla, přičemž nedochází k porušení polymerní sítě. Výsledný materiál je lehký a jeho porozita může dosahovat až 98 % (obr. 15) [68].



Obr. 15: Příklad vysušeného hydrogelu pomocí lyofilizace (vlevo) a hydratované formy hydrogelu (vpravo)

3.2.1 Klasifikace hydrogelů

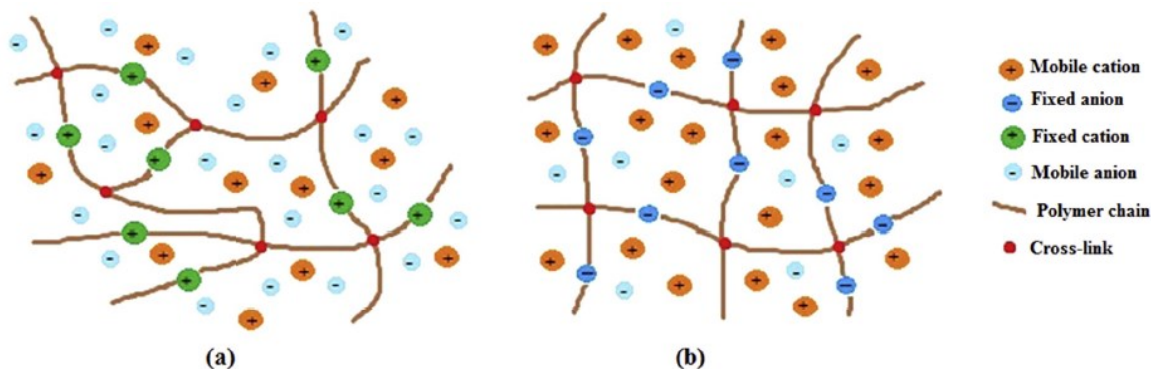
Hydrogely lze rozdělit dle několika různých kritérií, jejichž základní přehled shrnuje obr. 16 [69]. Níže uvedené dělení hydrogelů tvoří jen nepatrnou část, na kterou lze v literatuře narazit.



Obr. 16 Klasifikace hydrogelů podle různých kritérií [69].

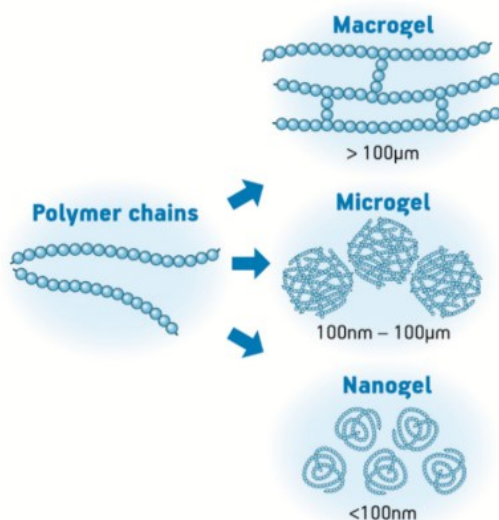
Podle **struktury** polymerní sítě, lze hydrogely rozdělit na amorfni [70], semi-krystalické [71], supramolekuly [72], hydrokoloidní agregáty a hydrogely s vodíkovými vazbami [73]. Podle **iontového náboje** na polymerním řetězci, rozlišujeme hydrogely aniontové [74],

kationtové [75], hydrogely s neutrálním nábojem [76] a amfolytické hydrogely [77]. Aniontové hydrogely jsou takové hydrogely, které vznikají spojováním polymerních řetězců obsahujících záporné ionty, zatímco hydrogely kationtové ionty kladné [69] (obr. 17). Nopak hydrogel s nulovým nábojem (neutrální náboj) musí mít ve svém řetězci vyrovnaný počet kladných a záporných iontů. Amfolytický hydrogel zase obsahuje jak kationty, tak i anionty [78].



Obr. 17 Příklad (a) kationtového a (b) aniontového hydrogelu [69].

Podle **původu** se hydrogely dělí na syntetické a přírodní [69, 78, 79]. Mezi přírodní polymery, ze kterých se hydrogely dají připravit, patří např. celulóza, chitosan, dextran, [74]. Polyethylenglykol (PEG) naopak řadíme mezi polymery syntetické [75]. Hydrogely lze klasifikovat také na základě jejich **velikosti** (obr. 18), tedy na tzv. makrogely (více než 100 μm), mikrogely (100 nm–100 μm) nebo nanogely (méně než 100 nm) [69, 80, 81].



Obr. 18 Rozdělení hydrogelů podle velikosti [81]

Na základě příčných **vazeb** vyskytujících se mezi polymerními řetězci, lze hydrogely rozdělit na zesíťované fyzikálně, chemicky anebo jejich kombinaci [69, 78, 79].

3.3 Příprava hydrogelů

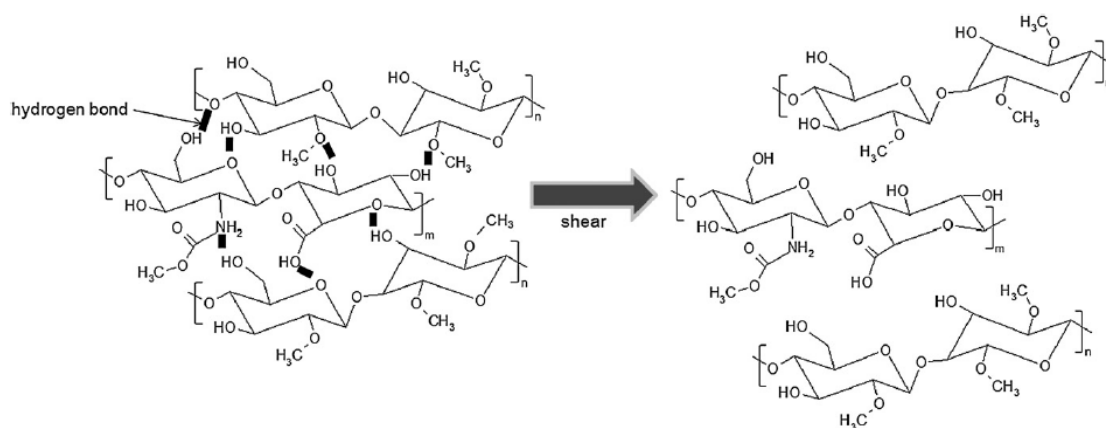
Hydrogely lze připravit několika různými metodami. V bakalářské práci jsou diskutovány především dva způsoby jejich přípravy, a to fyzikální a chemické síťování. Metodou chemického síťování vznikají mezi různými polymerními řetězci kovalentní vazby. Ve fyzikálně síťovaných gelech jsou jednotlivé polymerní řetězce propojeny sekundárními vazbami, tj. obecně slabými silami, jako např. iontové interakce nebo van der Waalsovy síly [82].

3.3.1 Fyzikálně síťované hydrogely

Stabilita fyzikálně síťovaného hydrogelu, tedy fyzikálních sítí (např. zbotnalých gelů), kde uzlové body sítě jsou tvořeny fyzikálními interakcemi, působícími mezi jednotlivými polymerními řetězci. V poslední době lze pozorovat rostoucí zájem o fyzikálně zesíťované hydrogely, který patrně souvisí s jejich jednoduchou přípravou a minimální toxicitou, protože při přípravě fyzikálně síťovaných hydrogelů většinou není potřeba používat toxická síťovací činidla [82, 83]. Proces fyzikálního síťování lze ovlivnit vlastnostmi prostředí (pH, teplota, iontová síla) nebo i fyzikálně-chemickými interakcemi (hydrofobní interakce, vodíkové vazby). Nevýhody fyzikálně síťovaných materiálů spočívají, především v jejich přechodné vazbě, nízké mechanické pevnosti (modul pružnosti) a soudržnosti, či slabší stabilitě v podmínkách *in vivo* [84]. Existuje několik způsobů přípravy fyzikálně zesíťovaných hydrogelů – rozlišujeme síťování vodíkovými vazbami [85, 86], elektrostatickými silami [85, 87] a hydrofobními interakcemi [88, 89].

Síťování vodíkovými vazbami

Síťování hydrogelů pomocí vodíkových vazeb, lze využít při výrobě tzv. injektovatelných hydrogelů. Mezi vzájemně biokompatibilními polymerními řetězci, dochází ke vzniku vodíkové vazby. Příkladem takového síťování je síťování hyaluronanu a methylcellulózy, vzájemně spojených vodíkovými vazbami, které popisuje obr. 18. Při působení relativně slabých vodíkových vazeb mezi polymery dochází k jejich štěpení, které následně usnadňuje průchod hydrogelové (polymerní) směsi jehlou při vytlačování. Po vytlačení, polymerní směs zrelaxuje do své výchozí gelové struktury [90].



Obr. 19 Fyzikální síťování pomocí vodíkové vazby hyaluronanu a methylcelulózy [84].

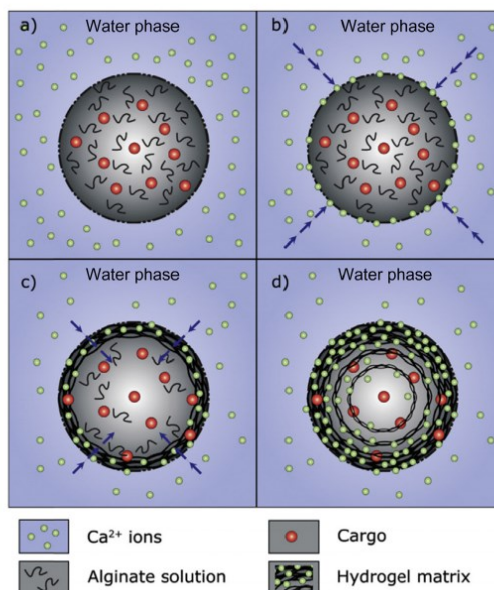
Jiný přístup síťování zvolil kolektiv autorů Bell a Peppas (1996). Podařilo se jim připravit hydrogel na bázi komplexu kyseliny metakrylové a ethylenglykolu (tzv. poly-metakrylový-g-ethylenglykol). Vodíková vazba, vytvořená mezi etherovou skupinou ethylenglykolu a karboxylovou skupinou metakrylové kyseliny, je podmíněna deprotonací karboxylové kyseliny (závislost tvorby komplexu na pH) [85].

Určitým omezením hydrogelů, síťovaných pomocí vodíkových vazeb, může být jejich rychlá degradace ve vodném prostředí (řádově několik hodin), která může přispívat k omezení jejich použití v oblasti tkáňového inženýrství (např. krátkodobé uvolňování léčiva) [84].

Elektrostatické interakce (iontové síťování)

Další variantu přípravy hydrogelů představuje síťování polymerních řetězců na základě působení elektrostatických interakcí. Ty lze rozdělit na skupinu elektrostatických sil působících mezi (a) polymerním řetězcem a nízkomolekulární látkou (molekula, iont) nebo (b) mezi dvěma opačně nabitými polymerními řetězci, tzn. polymer-polymer. Příkladem síťování mezi polymerním řetězcem a nízkomolekulární látkou může být síťování alginátu sodného s dvojmocným iontem, (nejčastěji vápenatý kationt (Ca^{2+}) chloridu vápenatého). Kationt Ca^{2+} interaguje s karboxylovou skupinou alginátu za vzniku hydrogelu (obr. 20) [87]. Naopak příkladem síťování mezi dvěma opačně nabitými polymerními řetězci jsou peptidy (amfifilní molekuly). Na jejich řetězci se střídají kladně a záporně nabitě části a samovolně tak vytváří prostorovou síť – hydrogel. Tyto hydrogely lze použít např. jako matrice pro přenos léku nebo jako zahušťovadla v kosmetice [91]. Například Zang et al. (2018) připravili elektrostatickou interakcí hydrogel na bázi chitosanu, heparinu a kyseliny

(γ -glutamové), který podporuje léčbu chronické diabetické rány (např. diabetický vřed na noze) [92].



Obr. 20 Mechanismus přípravy hydrogelu na bázi alginátu a Ca^{2+} [93]

Hydrofobní interakce

Neméně významnou skupiny hydrogelů představují hydrogely síťované hydrofobními interakcemi. Princip hydrofobního síťování probíhá na základě působení interakcí mezi hydrofobní a hydrofilní částí amfifilního polymeru. Vlivem rostoucí teploty dochází k agregaci hydrofobních částí, díky které klesá množství hydrofilních částí, jehož výsledkem je vytvoření tzv. hydrofobního bloku [93]. Autoři Toncaboylu et al. (2012) zkoumali strukturální parametry tzv. „self-healing“ hydrogelů, připravených na základě působení hydrofobních interakcí dodecylsulfátu sodného (SDS) s akrylamidy ve vodném prostředí. Samotná syntéza probíhala micelární kopolymerací akrylamidů s n-alkyl(meth)akryláty (hydrofobní látka s alkylovým řetězcem o 12-22 uhlících). Výsledkem jejich práce bylo zjištění, že přítomnost hydrofobní látky v hydrogelu zvyšuje účinnost tzv. self-healing procesu, tedy po jeho poškození (rozbití), se hydrogel vlivem působení hydrofobních interakcí snáze pojí dohromady [88].

3.3.2 Chemicky síťované hydrogely

V chemicky síťovaných hydrogelech jsou polymerní řetězce síťovány kovalentními vazbami, které vznikají buď chemickými reakcemi komplementárních funkčních skupin (např. polymery nebo mezi polymery a síťovacími činidly), radikálovou polymerací (např.

vinylové monomery v přítomnosti síťovacích činidel), či kopolymerizací monomeru a přidaného síťovadla v roztoku atd. Jak už bylo naznačeno, při chemickém síťování dochází mezi jednotlivými polymerními řetězci ke vzniku kovalentní vazby [94]. Právě díky chemické vazbě, mají výsledné hydrogely, ve srovnání s hydrogely fyzikálně síťovanými, lepší mechanickou, chemickou a teplotní stabilitu [95, 96]. Na druhou stranu síťování polymerů s využitím chemických síťovadel může zvýšit jejich toxicitu, a zamezit tak jejich použití např. v medicínských aplikacích [97].

Síťování radiací

Další možností chemického síťování je tzv. radiační síťování. Síťovací reakce probíhá na základě působení vysokoenergetického záření (např. elektronový paprsek, gama záření, rentgenové záření) [98] bez použití síťovacího činidla, jehož výsledkem jsou volné radikály. Radiační síťování lze mimo jiné využít i při polymeraci nenasycených sloučenin [99].

Přípravu superabsorpčních hydrogelů na bázi Tara gumy a kyseliny akrylové, pomocí vysokoenergetického gama záření, zkoumali autoři Alla, Sen a el-Naggar (2012). Připravené hydrogely byly navrženy pro aplikaci do dětských plen [100]. Hydrogely na bázi želatiny vyztužené nanokrystaly celulózy, síťované radiačním zářením, řešil tým autorů Wan Ishak a kolektiv (2021). Jejich *in vitro* studie prokázaly, že tento typ hydrogelů, lze použít při řízeném podávání léčiv [101].

Síťování pomocí enzymů

Kromě radiačního síťování, lze hydrogely připravit pomocí enzymů, fungujících jako tzv. katalyzátory iniciující tvorbu kovalentních vazeb mezi molekulami proteinů [102]. Síťování pomocí enzymů se jeví jako strategicky výhodné, protože samotné enzymy jsou tělu vlastní a katalyzují řadu jeho reakcí. Mezi takové enzymy patří např. trans-glutaminy (thiolové enzymy), které způsobují tvorbu fibrinových sraženin a zrohovatěle pokožky při hojení ran, nebo tyrozinázy (enzymy obsahující měď), které se podílí na tvorbě melaninu, či tuhnutí kutikuly u hmyzu [103].

Enzymy katalyzované proteinové sítě byly zkoumány v různých aplikacích. Například při úpravě textury potravinářských produktů, při řešení biomimetických tkáňových scaffoldů nebo ke zpevnění vláken na bázi proteinů pro textilní průmysl [102].

Sít'ování komplementárními skupinami chemické reakce

Jak již bylo řečeno, v důsledku chemického sít'ování mezi jednotlivými funkčními skupinami (tzv. komplementárními skupinami) polymerního řetězce, vznikají kovalentní vazby. Nejčastěji je lze připravit např. Michaelovou adicí, formací Schiffovy báze (vznik skupin aldehydů a primárních aminů, mezi kterými vzniká kovalentní vazba) voda, či fotopolymerací thiolu a termálních alkenů atd. [104].

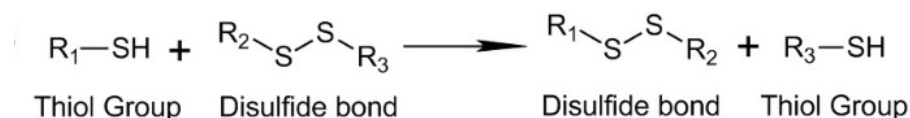
Formací Schiffovy báze byly připraveny injektovatelné hydrogely na bázi karbodihydrazidem modifikované želatiny a aldehydy modifikované kyseliny hyaluronové. Tyto hydrogely podléhaly degradaci daleko méně než hydrogely na bázi nativní želatiny a kyseliny hyaluronové. Díky pomalejší degradaci, je lze uplatnit při procesu angiogeneze a také jako scaffoldy pro tkáňové inženýrství [105].

3.3.3 Příprava hydrogelů pomocí thiolovaného HA(Na)

Jak už bylo naznačeno v předchozích částech práce, thiolovaný hyaluronan lze připravit různými způsoby. Nejčastěji se jedná o nukleofilní (výměna thiol-disulfid [106], Michaelova adice [107]) nebo radikálovou (thiol-ene adice [106], oxidace [14]) reakci.

Výměna thiol-disulfid

Při thiol-disulfidové výměně dochází k nukleofilnímu ataku disulfidické vazby thiolátovými anionty. V případě, že disulfidická vazba bude symetrická, výsledná vazba vznikne bez jakékoli preference (obr. 21). Ovšem v případě, že cílem nukleofilního ataku bude vazba asymetrická, bude upřednostňován vznik stabilnějších, a pro thiomery výhodnějších, vazeb [106].

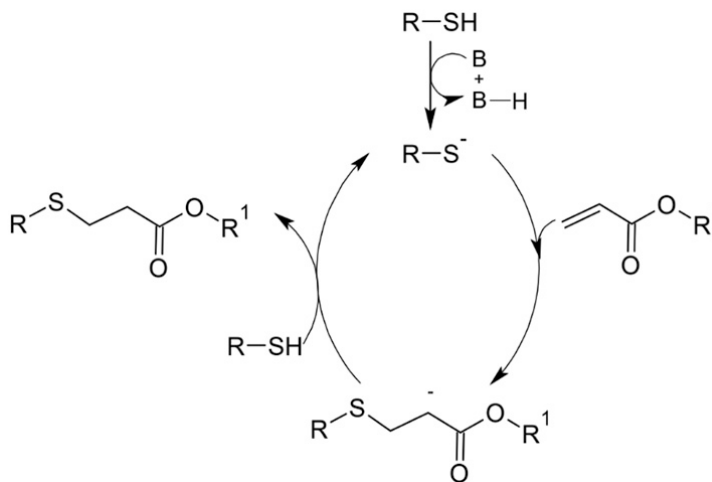


Obr. 21 Příklad nukleofilního ataku symetrické disulfidické vazby [6].

Michaelova adice

Michaelova adice je nukleofilní reakce, při které se za přítomnosti malého množství katalyzátoru (nejčastěji báze), thiolové skupiny adují na alkeny. Z průběhu Michaelovy adice, znázorněné na obr. 22 je vidět, že přítomnost báze katalyzuje thiolátový anion, který působí jako tzv. nukleofil a atakuje dvojnou vazbu alkenu, za vzniku aniontového

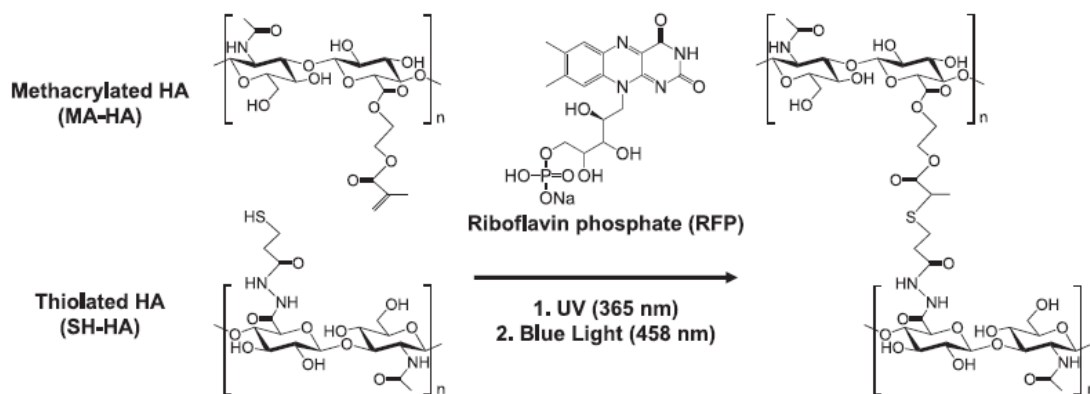
meziproduktu (karbaniontu). V dalším kroku reakce přijímá karbaniont od thiolovaného reaktantu proton, jehož výsledkem je vytvoření tzv. thiol-Michaelova adičního produktu [107].



Obr. 22 Princip Michaelovy adice [107].

Thiol-ene adice

Thiol-ene adici můžeme popsat jako reakci mezi thiolovou skupinou a alkenem, za vzniku alkylsulfidové vazby, zprostředkované volnými radikály [108, 109]. Thiol-ene adicí hyaluronanu, probíhající v přítomnosti riboflavinofosfátu (RFP) jako fotoiniciátoru, se ve své práci zabýval tým autorů Lee, Fernandez a Myung (2018). Výsledkem jejich práce byl hydrogel na bázi HA(Na) síťovaný viditelným modrým světlem (obr. 23). Při thiol-ene reakci methakrylovaného a thiolovaného hydrogelu, indukované modrým světlem, došlo k vytvoření zmíněné alkylsulfonové vazby [108].

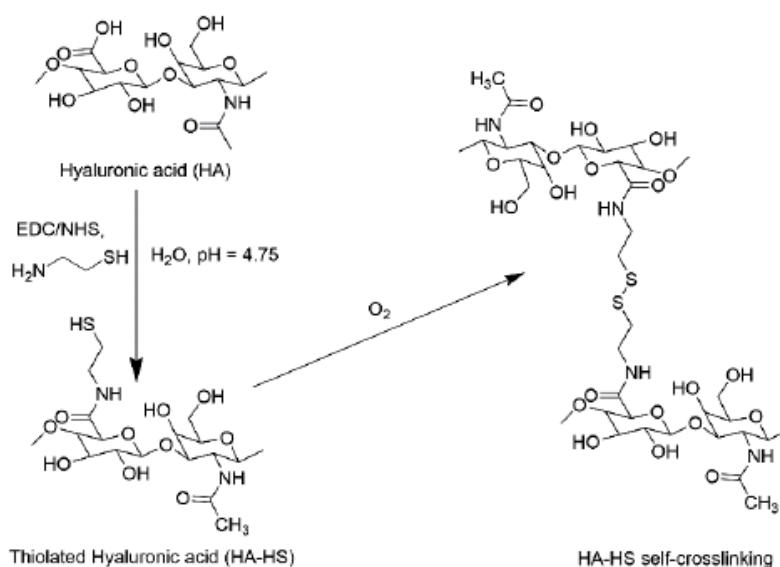


Obr. 23 Průběh thiol-ene adice hyaluronanu [108].

Oxidace

Při oxidaci thioemerů dochází ke vzniku disulfidové vazby. Mechanismus síťování vycházející z oxidace, připomíná síťování proteinů. Příkladem takového síťování mohou být tzv. glykoproteiny (vyskytující se na povrchu slizničních epitelů), které spolu s cysteinem vytváří stabilní hydrogely. Obdobně je tomu i u vlasových keratinů, které síťují skrze disulfidovou vazbu [110].

Nejběžnějším oxidačním činidlem, používaným při oxidaci thiolových skupin, je kyslík, jak ve formě vzdušného kyslíku nebo přidaného oxidačního činidla (např. H_2O_2). Touto problematikou se zabývali i Kafedjiiski et al. (2007), Bian et al. (2016) a Cao et al. (2019), kteří ve své práci popsali přípravu samo-síťujícího thiolovaného hydrogelu na bázi HA(Na), jehož reakční schéma popisuje obr. 24 [7, 9, 14].



Obr. 24 Mechanismus síťování thiolovaného hyaluronanu pomocí vzdušného kyslíku [10].

3.4 Využití hydrogelů

Obecně hydrogely našly uplatnění v mnoha aplikačních oblastech jako je zemědělství [111], potravinářství [112], biomedicínské aplikace [113], tkáňové inženýrství [114], systém podávání léků [115] atd.

3.4.1 Využití hydrogelů na bázi thiolovaného hyaluronanu

Jednou z oblastí, ve které hydrogely na bázi thiolovaného hyaluronanu (HA-SH hydrogely) našly své využití, je **oftalmologie**. Oftalmologická terapeutika kladou na používané hydrogely speciální požadavky, které ne vždy všechny hydrogely splní. Mezi tyto požadavky

patří například rychlost gelace *in situ*, cytokompatibilita a biokompatibilita. Ukázalo se, že právě hydrogely na bázi thiolovaného hyaluronanu, jsou pro takové použití vhodné, a to především díky kratší době gelace, která ovlivňuje pokles (případně úplnou ztrátu) léčiva na povrchu oka [116].

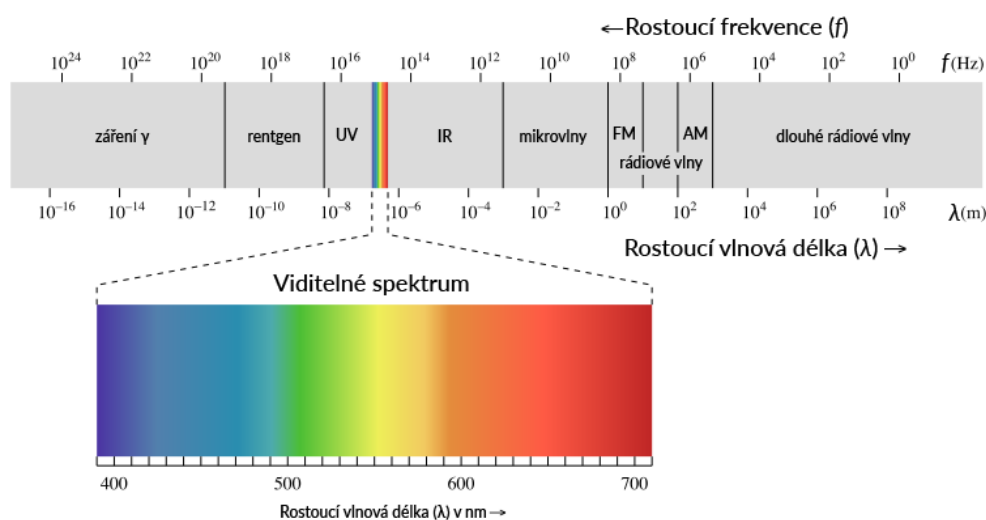
HA-SH hydrogely lze využít např. v podobě injekční implantace při **hojení poškozených kloubních chrupavek**. Studie založené na implantaci těchto hydrogelů (kombinace gelu a matrice) *in vivo* na laboratorních zvířatech, prokázaly jejich účinnost při regeneraci kloubní chrupavky [117]. Aplikačními možnostmi injekční podoby thiolovaného hyaluronanu se zabývali také autoři Cao et al. (2019). Při přípravě hydrogelu využili metodu síťování pomocí thiol-enové reakce (Michaelovy adice) mezi thiolovými a akrylátovými skupinami, kombinovanou s tvorbou disulfidové vazby mezi volnými thiolovými skupinami v přítomnosti vzdušného kyslíku. Výsledky testů provedených v podmínkách *in vitro* a *in vivo*, potvrdily, že připravený hydrogel lze využít jako **antiadhezivní pooperační materiál v chirurgii**, bionerní tkáňové plnivo nebo cytoprotektivní činidlo [9].

Autoři Choh, Cross a Wang (2011) potvrdili, že hydrogel připravený na bázi thiolovaného hyaluronanu (využití thiol-disulfid výměnné reakce pomocí polyethylenglykoldithiolem (PEG)), lze rovněž použít **při enkapsulaci buněk** (několika typů) a **přenosu léčiva** [118].

4 METODY CHARAKTERIZACE HYALURONANU

Základním předpokladem pro správnou charakterizaci modifikovaného polymeru je vhodné zvolení metody charakterizace. Mezi nejpoužívanější techniky pro potvrzení modifikace patří nukleární magnetická rezonance a infračervená spektroskopie.

Základem spektrofotometrie je elektromagnetické záření (obr. 25), které částice hmoty emitují (molekuly, atomy) nebo s ním interagují [119]. K přenosu energie elektromagnetického záření dochází prostřednictvím fotonů [119].



Obr. 25 Elektromagnetické spektrum a jeho rozdělení [120]

K interakci částice s elektromagnetickým zářením může dojít pouze při zcela specifických, a pro danou částici charakteristických, hodnotách frekvence, popřípadě energií. Výsledkem této interakce je spektrum částice vzorku, vyjádřené jako závislost intenzity měřené veličiny na vlnové délce (popř. vlnočtu) záření [119]. Získané spektrum lze využít při analýze a následné identifikaci látky (struktura a koncentrace látky). Na základě pozorované interakce částice se zářením, můžeme spektrofotometrické metody rozdělit do dvou skupin.

První skupinu metod charakterizují interakce, při kterých nedochází (při průchodu záření vzorkem) k výměně energie, ale pouze ke změně některých parametrů např. směr a rychlost záření (metody měření indexu lomu, tj. refraktometrie a interferometrie), stáčení roviny polarizovaného záření (polarimetrie) či difrakce záření (rentgenová difraktometrie) [120].

Druhou skupinu metod lze naopak charakterizovat interakcemi, při kterých dochází (při průchodu záření vzorkem) k výměně energie. Podstatou těchto interakcí je schopnost atomu

měnit svůj energetický stav, přijetím nebo vyzářením energie ve formě fotonů. V rámci této skupiny lze spektrofotometrické metody dále rozdělit:

- a) pokud látka absorbuje nebo emituje záření (absorpční nebo emisní spektrofotometrie),
- b) pokud při absorpci nebo emisi záření dochází k výměně energie atomů nebo celých molekul (atomová nebo molekulová spektrofotometrie),
- c) nebo podle zkoumané oblasti vlnových délek elektromagnetického záření (rentgenová, ultrafialová, viditelná a infračervená spektrometrie) [120].

4.1 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR)

Infračervenou spektroskopii lze definovat jako nedestruktivní analytickou metodu, která měří a vyhodnocuje absorpční spektra molekul o vlnových délkách v rozsahu 700 nm – 100 μm (tj. vlnočty 14 000 – 10 cm^{-1}), které se nazývá spektrum infračervené oblasti [120].

Infračervené spektrum bylo objeveno sirem William Herschelem v roce 1800, když zkoumal energetické hladiny spojené s vlnovými délkami viditelného světla. Při studiu teplot ve viditelném spektru totiž předpokládal, že při měření teploty lehce pod červenou oblastí spektra, již nedochází k jejímu nárůstu. Následně bylo zjištěno, že k nárůstu teploty v oblasti s kratšími vlnovými délkami, i přesto dochází. Paprsky, nacházející se pod červenými paprsky, nazval tzv. „nebarevnými, neviditelnými paprsky“, které byly později přejmenovány na infračervené [121].

Infračervená (IR - *infrared*) oblast má ve srovnání s oblastí viditelného světla, menší energii a delší vlnovou délku, zatímco při srovnání s oblastí mikrovln, má energii vyšší a vlnou délku kratší [122]. Oblast infračerveného spektra tvoří tři užší oblasti: oblast blízká (NIR) s rozsahem vlnočtů 14 000 – 4000 cm^{-1} , střední (MIR) o vlnočtech 4000 – 400 cm^{-1} a vzdálená (FIR) v oblasti 400 – 10 cm^{-1} [121-123].

Princip

Princip metody je založen na prostupu elektromagnetického záření hmotou a jejich vzájemné interakci. Záření interaguje s polaritou chemické vazby molekul. Pokud molekula nemá polaritu, tj. dipólový moment, je v infračerveném spektru inaktivní [121, 122]. To znamená, že aby mohlo dojít k určení funkčních skupin, musí být molekula aktivní v IR oblasti spektra. Infračervené záření nemohou pohlcovat samotné atomy, protože neobsahují chemickou vazbu, ani symetrické molekuly, které mají nulový dipólový moment [122].

Chemické vazby vibrují na charakteristických frekvencích, což znamená, že každá molekula v základním stavu vykazuje energii (frekvenci, vlnočet vibrace). Po dopadu IR záření na povrch vzorku, absorbuje molekula záření o stejné energii (frekvenci), které odpovídá vibraci dané funkční skupiny (při splnění podmínky změny dipólového momentu) [123]. Frekvence záření absorbované vzorkem musí odpovídat frekvenci vibrace dané molekuly [120]. Výsledkem je IR spektrum zkoumané látky s charakteristickými absorpčními oblastmi, které odpovídají frekvenčním vibracím chemické vazby. Těmto charakteristickým oblastem se říká „otisk prstu“, který je pro každou funkční skupinu jedinečný, a proto žádné dvě molekuly (odlišné struktury) nemohou mít stejné IR spektrum [122, 123].

Počet vibrací molekuly lze definovat počtem vibračních stupňů volnosti. Molekula s počtem N atomů v 3D prostoru má $3N$ stupňů volnosti a může vykonávat tři translační pohyby (ve směru tří os). Tři rotační pohyby jsou určeny pro rotaci nelineární molekuly a dva pro lineární molekuly. Počet vibrací je následně určen jako rozdíl celkového počtu pohybů molekuly a počet translačních rotačních pohybů. Pro nelineární struktury platí $3N-6$ a pro lineární struktury $3N-5$ vibrací [120, 121].

Instrumentace

Rozeznáváme dva typy IR spektrometrů: disperzní infračervený spektrometr a infračervený spektrometr s Fourierovou transformací (FTIR) [120, 121].

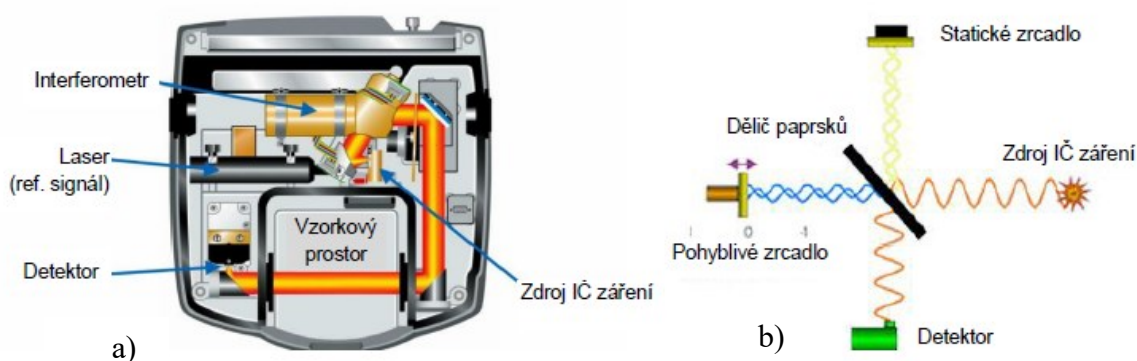
Princip disperzního spektrometru je založen na rozkladu světla dopadajícího na monochromátor (mřížkový monochromátor). Oproti FTIR obsahuje více zrcadel, difrakční mřížku a šterbinu, na které dochází k větším ztrátám energie procházejícího světla. Infračervený spektrometr pracuje na principu [120] Fourierovy transformace, jehož základní součástí je Michelsonův spektrometr, získaný signál převede matematickou operací, tj. Fourierovou transformací, na infračervené spektrum. FTIR spektrometru má řadu výhod, např. rychlejší měření spekter, vyšší citlivost při měření, vyšší poměr signálu k šumu (to vede ke kvalitnějšímu a detailnějšímu spektru), či možnost měření všech frekvencí najednou [120].

Mezi hlavní komponenty FTIR patří: zdroj IR záření, interferometr, detektor, zesilovač signálu a počítač [122]. Zásadní součástí přístroje je tzv. Michelsonův interferometr (obr. 26), který je složen z děliče paprsků, statického a pohyblivého zrcadla [121-123].

Ze IR zdroje vychází záření dopadající na polopropustný dělič paprsků, na kterém dochází k rozdělení paprsků. Jednu část paprsku dělič propustí směrem k pohyblivému zrcadlu,

zatímco je druhá část odražena do statického zrcadla. Následně dochází k odrazu paprsků od obou zrcadel a návratu zpět do děliče paprsků. Dle polohy pohyblivého zrcadla, jsou na děliči paprsky sčítány nebo rušeny, dochází k interferenci, díky které se jeden paprsek dostává z interferometru a prochází vzorkem. Naopak paprsek, který nebyl absorbován, dopadá na detektor [120, 122], jeho signál je zesílen a převeden na digitální signál. Výsledkem měření je tzv. interferogram, tj. závislost napětí na detektoru na pozici pohyblivého zrcadla. Interferogram je následně převeden pomocí Fourierovi transformace na tzv. „single beam“ spektrum, vyjadřující závislost intenzity záření na vlnočtu (cm^{-1}). Termín „single beam“ byl odvozen ze skutečnosti, že FTIR využívá pouze jednopaprskového záření [122].

Před samotnou analýzou vzorku je důležité změřit spektrum pozadí, díky kterému je normalizováno spektrum měřeného vzorku [122].



Obr. 26 a) FTIR spektrometr, b) schéma Michelsonova interferometru

Aplikace

Infračervenou spektroskopii lze využít v rámci chemických analýz nebo i v průmyslu pro stanovení a charakterizaci molekul. Jelikož se jedná o nedestruktivní metodu, poskytuje možnost zkoumat složité sekundární struktury komplikovaných molekul, jako jsou např. proteiny nebo DNA [121].

4.2 Nukleární magnetická rezonance NMR

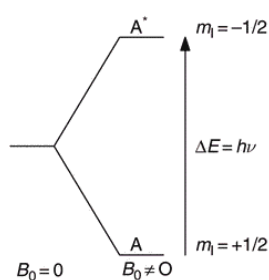
Nukleární magnetickou rezonanční spektroskopie (NMR) lze definovat jako nedestruktivní analytickou metodu, kterou lze využít při analýze (kvantitativní i kvalitativní) struktury dané látky, na základě absorpce radiofrekvenčního záření vzorkem umístěným v silné magnetickém poli [124, 125]. Díky tomu dochází k zobrazení atomů a molekul v roztoku i v pevném stavu. NMR metodu nízkomolekulárních látek lze využít i k popisu složitějších

struktur, jako jsou sekundární a terciární struktury biopolymerů, proteiny, DNA, RNA atd. [126].

Princip

Jak napovídá název metody, její princip spočívá ve studiu interakce atomového jádra s magnetickým polem [125]. Zjednodušeně lze říct, že atomové jádro se skládá z nukleonů, tj. z kladně nabitých protonů a nenabitých neutronů, přičemž obě elementární části mají tzv. **spinové kvantové číslo (spin)**. Spin udává směr rotačního pohybu této částice (vlastní moment hybnosti). Součet spinů všech částic, které se nachází v jádře atomu, lze označit za jaderný spin. Díky tomu lze určit, jestli bude zvolený atom či molekula vhodná k analýze pomocí NMR metody. Obecně jsou nejlépe měřitelné atomy se spinem rovným $1/2$, např. ^1H , ^{13}C , ^{19}F atd. [126].

Spiny elementárních částic mají v rovnovážném stavu náhodné uspořádání a jejich energie se sobě rovnají. Pokud na atomy začne působit magnetické pole, dojde k rozštěpení základního energetického stavu jádra na dvě diskretní hladiny (obr. 27). Na jedné hladině budou mít spiny energii nižší než původní hladina a zároveň bude mít mírný nadbytek spinů, zatímco druhá hladina bude mít energii hladiny vyšší a počet spinů bude menší. Platí, že čím je magnetické pole, působící na jádra atomů, silnější, tím jsou větší energetické rozdíly mezi jednotlivými hladinami a zároveň i větší rozdíl v zastoupení spinů na daných hladinách [125-127].



Obr. 27 Energetické hladiny rozštěpené působením vnějšího magnetického pole [125]

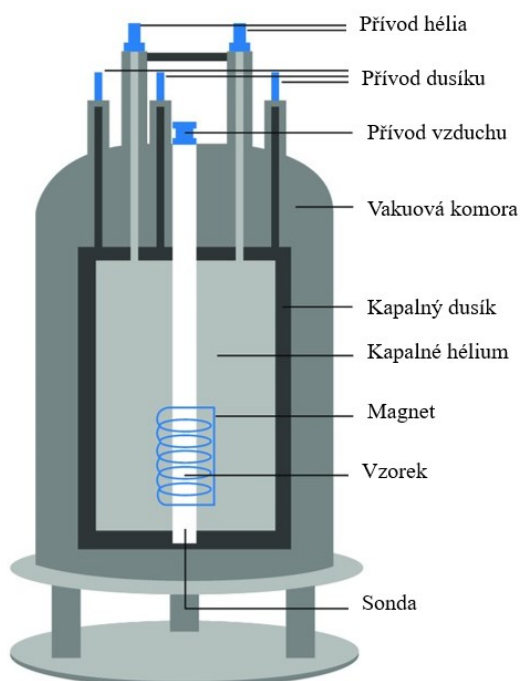
Podmínkou interakce atomového jádra s magnetickým polem je nenulový magnetický moment. Ten vykazují jádra s lichým počtem protonů i neutronů nebo lichým počtem nukleonů.

Při ozáření atomu radiofrekvenčním zářením dojde k tzv. magnetické rezonanci. Ta je definována jako energetický přechod mezi rozštěpenými hladinami, ke kterému dochází při

absorpci nebo emisi záření o frekvenci, která odpovídá rozdílu energetických hladin. Jinými slovy u takto rozštěpeného spinového systému, může dojít k absorpci nebo emisi jednotlivých spinů na vyšší hladinu [126, 128]. Záření odpovídá vlnovým délkám v radiofrekvenční oblasti [127]. Při měření se zaznamenává tzv. de-excitace, ke které dochází při ukončení působení elektromagnetického záření na atomová jádra [124].

Instrumentace

Nezbytnou součástí NMR spektroskopie je supravodivý magnet, zdroje radiofrekvenčního záření a detektor [127, 128]. Supravodivý magnet vytváří homogenní magnetické pole [126, 128]. V podstatě se jedná o cívku s nulovým ohmickým odporem tvořenou několika tisíci závitů. Cívkou teče proud o velikosti 100 A [126], zároveň generuje magnetické pole řádu 10 T a více [128]. Supravodivý magnet musí být při svém provozu chlazen na nízké teploty (4 K), proto je ponořen do kapalného hélia [126, 128]. Nádoba s cívkou a kapalným héliem je, v důsledku omezených zásob a vysokým pořizovacím nákladům hélia, od okolního prostředí izolovaná další vrstvou s kapalným dusíkem (obr. 28) [126, 127]. Součástí NMR spektrometru je i tzv. NMR sonda, která je složena z (1) přijímacích a vysílacích cívek, (2) článku regulující teplotu vzorku a (3) cívkou generující gradient magnetického pole [126].



Obr. 28 Hlavní části NMR spektrometru [129]

Aplikace

Všechny uvedené komponenty tvoří NMR spektrometr, který lze využít v celé řadě aplikací. Jednou z nejzajímavějších je její použití v medicíně, tzv. **zobrazování magnetickou rezonancí (MRI)**. Výhoda MRI spočívá v zobrazování měkkých tkání či oblastí se zvýšenou hustotou (např. nádory), které například pomocí rentgenového záření (primárně pro kosti) zobrazit nejde [128]. NMR metoda je široce využívána i v chemii při studiu **struktury** nízkomolekulárních nebo i vysokomolekulárních látek [126].

4.3 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Skenovací elektronová mikroskopie patří mezi techniky umožňující zobrazení povrchu. SEM poskytuje informace o topografii povrchu, krystalové struktuře nebo chemickém složení vzorku [130].

Princip

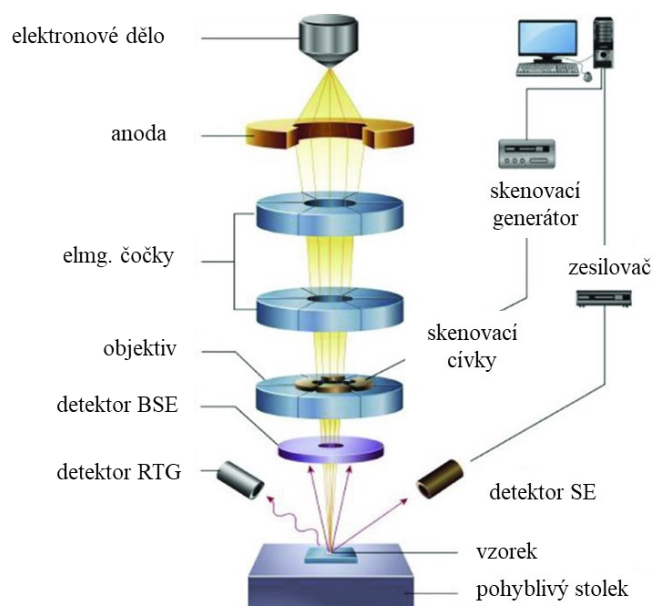
Princip SEM metody spočívá v interakci elektronového svazku se vzorkem. Elektrony urychlené vysokým napětím dopadají na vzorek, pronikají do jeho struktury, kde dochází k různým interakcím, které vedou např. k emisi fotonů a elektronů ze struktury materiálu. Aby došlo k zobrazení povrchu vzorku, jsou signály vzniklé při interakci elektronu s povrchem zachyceny různými detektory v závislosti na použitém režimu SEM (např. rentgenové mapování, sekundární zobrazení elektronů, zobrazení zpětně odražených elektronů nebo Auger elektronová mikroskopie) [131].

Strukturu většiny materiálů lze pozorovat pomocí SEM bez větších obtíží – analyzovaný vzorek stačí aplikovat na uhlíkovou pásku nanesenou na kovovém terčíku. Ovšem důležitým předpokladem k zobrazení povrchu vzorku pomocí SEM je, aby daný materiál byl vodivý. Proto příprava nevodivých vzorků vyžaduje nanesení tenké kovové vrstvy (palladium) na jejich povrch, tzv. pokovení [132].

Instrumentace

Hlavní části SEM jsou uvedeny na obr. 29. Zdrojem primárních elektronů je **elektronové dělo**. To nejen že zajistí produkci elektronů, ale současně je urychlí na energetickou hladinu až 30 keV. **Elektromagnetické čočky** a **apertury** usměrní elektronový svazek na vzorek a zaostří jej na požadovanou velikost. Dále pak **snímací cívky** elektronového paprsku, **detektory signálu** a **systém zpracování** poskytují záznam obrazu povrchu vzorku

v reálném čase. Celé prostředí elektronového mikroskopu je udržováno ve vysokém vakuu, kvůli pohybu elektronů bez rozptylu, který je způsoben vzduchem [131, 132].



Obr. 29 Hlavní komponenty SEM [133]

Aplikace

Jak již bylo zmíněno výše, skenovacím elektronovým mikroskopem může být zobrazena topografie povrchu, ale také lze pomocí SEM identifikovat chemické složení, či elektrické vlastnosti materiálu [130]. Z pohledu hydrogelů, slouží SEM k charakterizaci jejich struktury a velikosti pórů a morfologie scaffoldů. SEM také umožňuje studium adheze buněk nebo jejich proliferaci na scaffoldech [134].

4.4 Rotační reometr

Reologie je věda, která se zabývá tokem a deformací hmoty, newtonských a neneutonských kapalin ((a) časově nezávislé, (b) časově závislé, (c) viskoelastické kapaliny) mezi které se řadí např. roztoky nebo taveniny polymerů. Polymery při toku vykazují smykové chování (tzv. pseudoplasticitu), což znamená, že jejich viskozita s rostoucím gradientem rychlosti klesá. Mimo to se polymery chovají viskoelasticky, tzn., že vykazují vlastnosti viskózních kapalin, ale i elastických látek (v závislosti na časové deformaci). Nejdůležitější reologická veličina charakterizující tok materiálu je dynamická viskozita. Viskozitu lze definovat jako odpor kapaliny vůči toku, tedy jako vztah smykového napětí k rychlosti smykové deformace. Pro newtonské kapaliny (lineární viskózní kapaliny, které lze popsat lineárním Newtonovým modelem) viskozita nezávisí na rychlosti smykové deformace. Naopak kapaliny neneutonské, jak již bylo uvedeno, není možné popsat lineárním Newtonovým zákonem.

V případě těchto kapalin označujeme viskozitu jako zdánlivou jejíž hodnota je obecně závislá na rychlosti smykové deformace v kapalině či předchozí deformační historii kapaliny. Zapletené makromolekuly polymerního řetězce se rozplétají a orientují se ve směru toku (při dostatečně velké deformaci) [135].

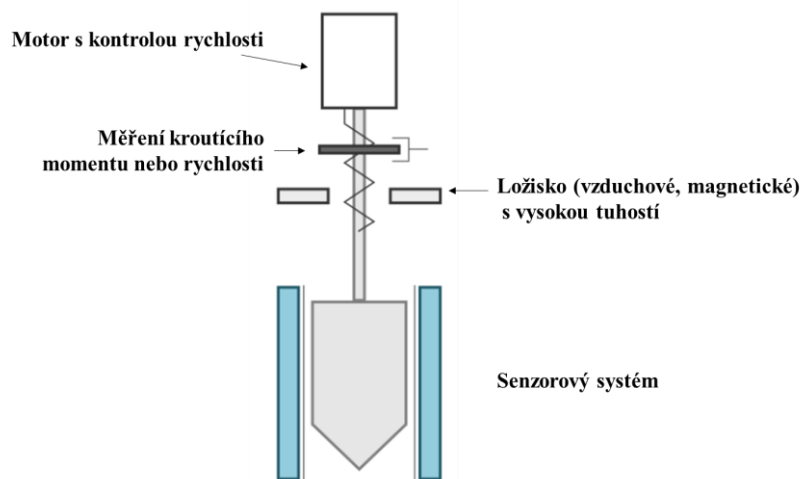
Významný vliv na zpracování polymerních materiálů má způsob, jakým materiál reaguje na smykovou a tahovou deformaci [136]. Proto je studium reologických vlastností biopolymerů velmi důležité např. z pohledu 3D tisku (biotisku) či pro jejich následné využití, např. v tkáňovém inženýrství (scaffoldy).

K charakterizaci reologických a viskoelastických vlastností polymerních tavenin, roztoků, suspenzí atd. slouží rotační reometr. Rotační reometry umožňují měřit jak v ustáleném poli (viskozita, smykové napětí, rychlost smykové deformace) tak i v oscilačním poli (komplexní viskozita, viskoelastické moduly). Skládá se z horní (většinou pohyblivá) a dolní (statická) geometrie, mezi kterými je umístěn měřený vzorek materiálu. Tyto geometrie mohou být v konfiguraci deska-deska, válec-válec, kužel-deska. Viskozita je určována na základě znalosti kroutícího momentu určeného z pohyblivé části geometrie, ze kterého se spočítá smykové napětí. Rychlost smykové deformace je vypočítána z úhlové rychlosti pohyblivé části geometrie [137].

Mezi základní měřené veličiny tedy patří komplexní modul G^* , který lze rozdělit na tzv. „storage“ modul G' (Pa), který představuje soufázovou (elastickou) složku oscilačního pole a tzv. „loss“ (ztrátový) modul G'' (Pa), který představuje imaginární složku. Dále komplexní viskozita η^* (Pa·s), tj. frekvenčně závislá viskozitní funkce při harmonické oscilaci smykového napětí [135]. Uvedené veličiny jsou měřeny v závislosti na čase t (s) nebo úhlové frekvenci ω (rad/s).

Instrumentace

Hlavní části rotačního reometru jsou uvedeny na obr. 30.



Obr. 30 Hlavní části rotačního reometru [137]

Pomocí rotačního reometru lze provést dva základní typy měření – první typ měření lze označit jako tzv. rotační testy, při kterých se horní geometrie otáčí jedním směrem. Druhým typem měření jsou tzv. oscilační testy, při kterých horní geometrie kmitá kolem osy.

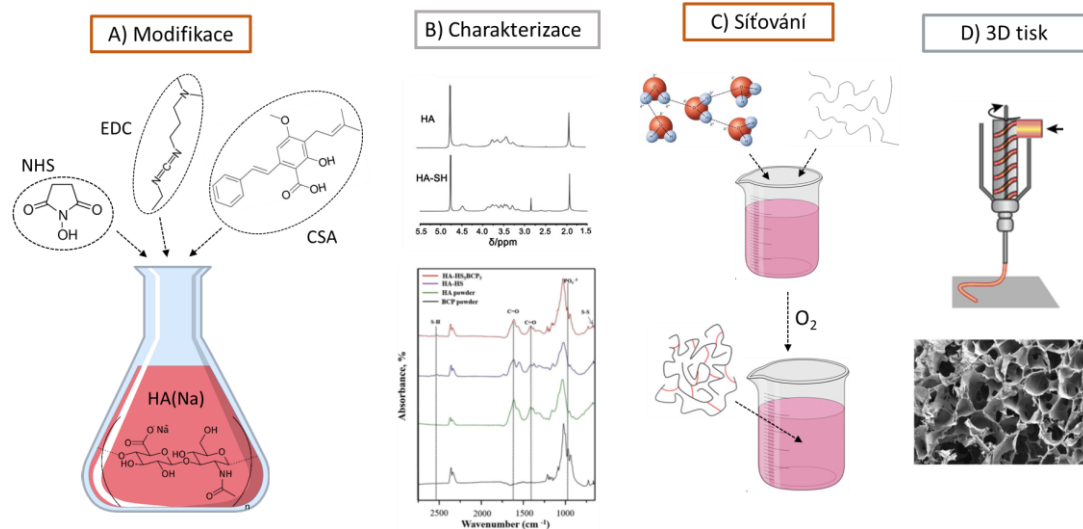
Aplikace

Reologii lze využít v celé řadě průmyslových odvětví. V **kosmetickém průmyslu** hraje reologie důležitou roli z hlediska aplikace a dlouhodobé stability krémů. Studují se parametry jako je např. roztíratelnost. Ve **farmaceutickém průmyslu** lze reologii využít při optimalizaci výrobních procesů, pro dlouhodobou stabilitu disperze a také pro následné konečné použití různých krémů, pleťových vod atd. Reologie nachází uplatnění také v **potravinářském průmyslu** – charakterizuje tok např. klasických omáček (např. kečup), vín atd. [138]. A v rámci možných **biomedicínských aplikací** je důležité znát také reologické vlastnosti materiálů z hlediska 3D tisku (biotisku) struktur, zachování tvaru materiálu a také životaschopnosti buněk [139].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 POPIS EXPERIMENTU

V následující kapitole jsou popsány jednotlivé kroky navrženého experimentu včetně konkrétních postupů práce (obr. 31). Prvním krokem experimentu byla syntéza thiolovaného hyaluronanu (HA-SH) a optimalizace podmínek této reakce (molekulová hmotnost HA(Na), ekvimolární poměr reagujících látek, koncentrace modifikovaného HA-SH). K potvrzení modifikace byl získaný produkt charakterizován (druhý krok) pomocí FTIR a NMR spektroskopie. Následně byly za přítomnosti vzdušného kyslíku připraveny hydrogely (třetí krok) na bázi HA-SH (tzv. self-crosslinking). Charakterizace gelačního času a tuhosti thiolovaných hydrogelů (čtvrtý krok) byla provedena pomocí rotačního reometru, konkrétně se jednalo o oscilační testy a testy reakční kinetiky. Při oscilačních testech byla studována tuhost gelu, tzn. závislost komplexní viskozity a modulu pružnosti (*storage module*) na úhlové frekvenci (rychlosti). Na základě testů reakční kinetiky byl stanoven gelační čas, tedy za jak dlouho po rozpuštění polymeru dochází k převaze elastické složky nad složkou viskózní. Viskozita a modul pružnosti byly stanoveny v závislosti na čase. Na základě znalosti gelačního času je totiž možné posoudit, jestli 3D tisk (popř. biotisk) je vhodnou metodou k přípravě hydrogelů na bázi thiolovaného hyaluronanu. Hotový zesíťovaný produkt byl dále lyofilizován, aby mohla být provedena charakterizace (pátý krok) na skenovacím elektronovém mikroskopu (SEM), za účelem získání informací o porositě výsledného materiálu. Aby bylo možné s připravenými hydrogely dále pracovat a uvažovat jejich aplikaci do živých organismů, musí být provedeny i testy cytotoxicity, popř. proliferace buněk, v daném materiálu. Těm předcházela příprava hydrogelu a následné zkoušky stability v systému ethanol → voda → DMEM (kultivační činidlo) v předem stanoveném časovém intervalu. Na základě všech provedených testů a analýz bylo provedeno samotné zhodnocení připraveného materiálu z pohledu jeho využití v oblasti tkáňového inženýrství.



Obr. 31 Schéma jednotlivých kroků navrženého experimentu

5.1 Použité materiály

V experimentální části byly použity níže uvedené materiály. Hyaluronan (**HA(Na)**, kosmetická čistota, $M_w = 124, 243, 370$ kDa) byl obdržen od společnosti Contipro group, a.s. (Dolní Dobrouč, Česká republika); 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid hydrochlorid (**EDC**, 98 %, $M = 191,7$ g/mol), N-hydroxysukcinimid (**NHS**, 98 %, $M = 115,09$ g/mol), 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chlorid (**DMTMM**, 96,3 %, $M = 276,72$ g/mol) a 1-hydroxybenzotriazol hydrát (**HoBt**, 97 %, $M = 135,12$ g/mol) byly zakoupeny od firmy Sigma–Aldrich (St. Louis, USA). Cysteamin hydrochlorid (**CSA**, biochemická čistota, 99 %, $M = 113,661$ g/mol) a 1,4-dithiothreitol (**DTT**, 99 %, p.a., $M = 154,2$ g/mol) dodala firma Carl Roth (Karlsruhe, Německo). Dialyzační membrána SnakeSkin™ (MWCO 3500, vnitřní průměr 35 mm).

5.2 Syntéza thiolovaného hyaluronanu (HA-SH)

5.2.1 Zavedení thiolové funkční skupiny na řetězec HA(Na)

Před samotnou modifikací byly navoleny základní podmínky reakce:

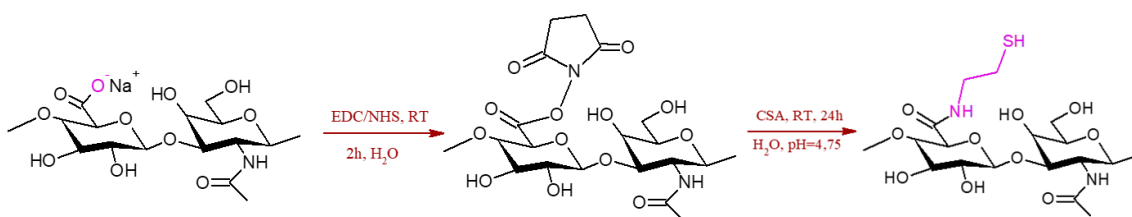
- navážka polymeru,
- molekulová hmotnost polymeru,
- koncentrace polymeru,
- molární poměr reagujících látek.

Tyto parametry byly při experimentu obměňovány za účelem nalezení nejefektivnější kombinace vstupních podmínek k úspěšné syntéze thiolovaného hyaluronanu. Parametry charakterizující provedené reakce jsou vypsány v tabulce níže (tab. 1).

Tab. 1 Navolené podmínky syntézy thiolovaného HA(Na)

Značení produktu	Molukulová hmotnost HA(Na) [kDa]	Výchozí látky	Ekvimolární poměr výchozích látek	Rozdělení produktu na dialýzu	Podmínky dialýzy
HA-SH-1	243	HA, EDC/NHS, CSA	1:2:4:4	HA-SH-1	voda (pH=3,5), 24h
HA-SH-2	243	HA, EDC/NHS, CSA	1:2:4:4	HA-SH-2	voda (pH=3,5), 24h
HA-SH-3	370	HA, EDC/NHS, CSA	1:2:4:4	HA-SH-3A	bez dialýzy
				HA-SH-3B	voda (pH=3,5), 2h
				HA-SH-3C	voda (pH=3,5) + 0,1M NaCl, 2h
				HA-SH-3D	voda (pH=3,5), 72h
HA-SH-4	124	HA, EDC/NHS, CSA	1:2:4:4	HA-SH-4A	bez dialýzy
				HA-SH-4C	voda (pH=3,5) + 0,1M NaCl, 2h
				HA-SH-4D	voda (pH=3,5), 72h
HA-SH-5	370	HA, EDC/NHS, CSA	1:2:4:4	HA-SH-5A	bez dialýzy
				HA-SH-5B	voda (pH=3,5), 2h
				HA-SH-5C	voda (pH=3,5) + 0,1M NaCl, 2h
				HA-SH-5D	voda (pH=3,5), 72h
HA-SH-6	124	HA, EDC/NHS, CSA	1:3:3:2	HA-SH-6A	bez dialýzy
				HA-SH-6C	voda (pH=3,5) + 0,1M NaCl, 2h
				HA-SH-6D	voda (pH=3,5), 72h
HA-SH-7	370	HA, EDC/NHS, CSA	1:2:4:4	HA-SH-7B	voda (pH=3,5) + 0,02M NaCl, 2h
				HA-SH-7C	voda (pH=3,5) + 0,1M NaCl, 2h
				HA-SH-7D	voda (pH=3,5), 1h + 0,1M NaCl, 2h + voda (pH=3,5), 1h
HA-SH-8	370	HA, EDC/NHS, CSA	1:2:4:4	HA-SH-8B	voda (pH=3,5) + 0,02M NaCl, 2h
				HA-SH-8C	0,1M NaCl, 1h + 0,02M NaCl, 1h
HA-SH-9	124	HA, EDC, HOBt, CSA	1:4:3:4	HA-SH-9	voda (pH=4), 48h, V_{roztok} 40krát > $V_{\text{HA(Na)}}$, 3krát obměna roztoku
				HA-SH-9-DTT	voda (pH=4), 48h, V_{roztok} 40krát > $V_{\text{HA(Na)}}$, 3krát obměna roztoku
HA-SH-10	124	HA, DMTMM, CSA	1:0:5:1,5	HA-SH-10	voda (pH=4), 48h, V_{roztok} 40krát > $V_{\text{HA(Na)}}$, 3krát obměna roztoku
				HA-SH-10-DTT	voda (pH=4), 48h, V_{roztok} 40krát > $V_{\text{HA(Na)}}$, 3krát obměna roztoku
HA-SH-11	370	HA, EDC, HOBt, CSA	1:4:4:4	HA-SH-11	voda (pH=4), 48h, V_{roztok} 40krát > $V_{\text{HA(Na)}}$, 3krát obměna roztoku
HA-SH-12	370	HA, EDC, NHS, CSA	1:2:4:4	HA-SH-12	voda (pH=4), 48h, V_{roztok} 40krát > $V_{\text{HA(Na)}}$, 3krát obměna roztoku
HA-SH-13	370	HA, EDC, NHS, CSA	1:2:4:4	HA-SH-13	voda (pH=4), 48h, V_{roztok} 40krát > $V_{\text{HA(Na)}}$, 3krát obměna roztoku
HA-SH-14	124	HA, EDC, NHS, CSA	1:2:4:4	HA-SH-14	voda (pH=4), 48h, V_{roztok} 40krát > $V_{\text{HA(Na)}}$, 3krát obměna roztoku
HA-SH-15	600	HA, EDC, NHS, CSA	1:2:4:4	HA-SH-15	voda (pH=4), 48h, V_{roztok} 40krát > $V_{\text{HA(Na)}}$, 3krát obměna roztoku
HA-SH-16	243	HA, EDC, NHS, CSA	1:2:4:4	HA-SH-16	voda (pH=4), 48h, V_{roztok} 40krát > $V_{\text{HA(Na)}}$, 3krát obměna roztoku

Jak již bylo zmíněno v teoretické části práce, místem modifikace hyaluronanu a následného navázání $-SH$ je karboxylová skupina. Při modifikace hyaluronanu dochází k navázání thiolové skupiny na původní karboxylovou skupinu prostřednictvím skupiny aminové. Prvním krokem syntézy thiolovaného derivátu kyseliny hyaluronové (HA-SH) bylo rozpuštění 0,4 g hyaluronanu v 80 ml deionizované vody (Qmili) (1 mmol). Po 24 hod rozpouštění bylo k roztoku HA(Na) přidáno 0,230 g (2 mmol) látky N-hydroxysukcinimid (NHS) a 0,767 g (4 mmol) látky 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid (EDC) ve formě prášku. Tato reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 2 hod, aby došlo k aktivaci karboxylové skupiny na řetězci HA(Na). Po uplynutí reakční doby bylo ke směsi přidáno 0,454 g (4 mmol) cysteaminu (CSA), který byl před přidáním rozpuštěn v 5 ml Qmili vody probublané N_2 z důvodu eliminace vzdušného kyslíku, jenž iniciuje samovolný vznik disulfidické vazby. Hodnota pH reakční směsi byla upravena na hodnotu 4,75 a modifikována 24 hod. Reakce probíhala za stálého míchání a při laboratorní teplotě [14, 58].



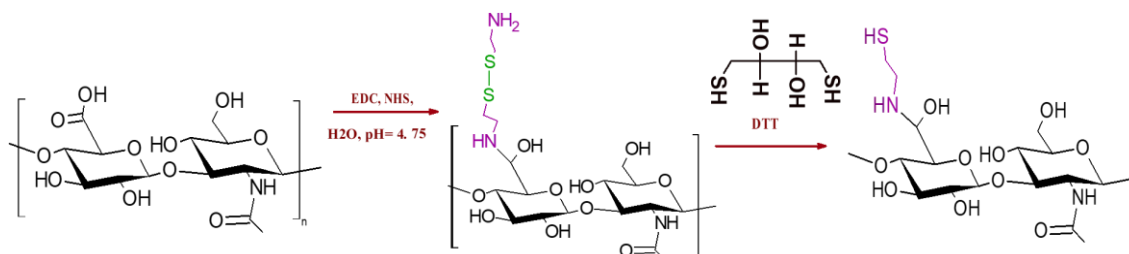
Obr. 32 Schéma modifikace hyaluronanu thiolu [14].

Po 24h byla reakce ukončena s následnou purifikací připraveného roztoku pomocí dialýzy. Roztok byl převeden do dialyzační membrány (cut-off 3,5kDa), kde byl důkladně purifikován proti vodě (pH = 4) po dobu 48 hod. Obměna dialyzačního roztoku byla realizována 3krát. Po dialýze byl produkt zamražen na teplotu -18°C a následně na -79°C . Takto připravené vzorky byly vloženy do lyofilizátoru a po ustálení teploty na -80°C byla zahájena hlavní fáze sušení při tlaku 0,06 mbar. Hlavní sušení probíhalo 30 hodin, po něm ihned začala druhá fáze konečného sušení při tlaku 0,001 mbar v délce trvání 10 hodin. Výsledkem byla pevná forma HA-SH [14, 58].

5.2.2 Redukce disulfidické vazby pomocí DTT

V průběhu purifikace modifikovaného hyaluronanu často docházelo k nežádoucímu zesíťování thiolovaného produktu tzn. k předčasnému vytvoření disulfidické vazby, jejímž výsledkem byl zisk ve vodě nerozpustného produktu HA-SH. Eliminaci disulfidické vazby

vytvořené mezi thiolovými skupinami na polymerních řetězcích HA-SH, která brání rozpuštění polymeru ve vodě a následnému síťování pomocí vzdušného kyslíku, byly redukovány s využitím dithiotreitol (DTT) (obr. 33). Samotná redukce disulfidové vazby probíhala následovně.



Obr. 33 Redukce disulfidické vazby pomocí DTT

K vodnému roztoku HA-SH ($w = 0,5\%$) bylo DTT přidáno v poměru 1:4 a pH roztoku bylo následně upraveno na hodnotu 8, při které DTT vykazuje nejvyšší účinnost. Po 2 hod intenzivního míchání byla reakční směs znovu dialyzována po dobu 24 hod. Purifikovaný roztok byl následně zmražen a lyofilizován, dle výše zmíněných podmínek. Podmínky redukce disulfidické vazby modifikovaných HA-SH pomocí DTT jsou uvedeny v tab. 2.

Tab. 2 Shrnutí podmínek reakce HA-SH s DTT

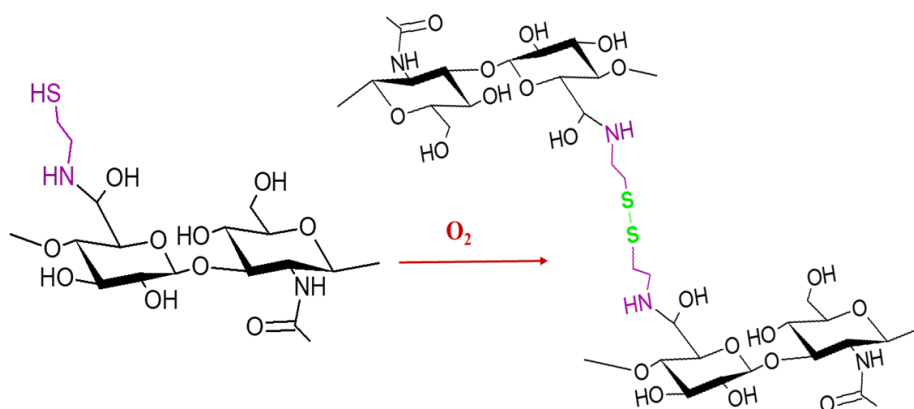
Značení produktu	$M_{\text{HA-SH}}$ [kDa]	M_{DTT} [g/mol]	Ekvimolární poměr vychozích látek	Doba rozpuštění	Podmínky dialýzy
HA-SH-9	124				DTT bylo přidáno při zavedení thiolových skupin na řetězec HA(Na)
HA-SH-10	124				
HA-SH-11	370				voda (pH=4), 24h, V_{roztok} 40krát > $V_{\text{HA-SH}}$, 2krát obměna roztoku
HA-SH-12	370	154,3	HA-SH:DTT = 1:4	2h/25°C	
HA-SH-13	370				
HA-SH-14	124				
HA-SH-15	600				
HA-SH-16	243				

5.3 Příprava hydrogelu na bázi thiolovaného hyaluronanu

Hydrogel na bázi thiolovaného hyaluronanu byl připraven technikou tzv. samozesítnění (tzv. self-crosslinking) za přítomnosti vzdušné kyslíku jako oxidačního činidla reakce.

Lyofilizovaný produkt o různé koncentraci polymeru (1 %, 2 % nebo 3 % (w/w)) byl rozpuštěn v Qmili ($T = 25^\circ\text{C}$). Po rozpuštění byl roztok vystaven vzdušnému kyslíku za vzniku disulfidické vazby, která se vytvořila mezi thiolovými skupinami, za vzniku 3D

polymerní síť (hydrogelu) (obr. 34). Výsledný hydrogel byl dále lyofilizován za účelem další charakterizaci pomocí skenovací elektronové mikroskopie.



Obr. 34 Síťování thiolovaného hyaluronanu vzdušným kyslíkem

5.4 Metody charakterizace připravených vzorků HA-SH

5.4.1 FTIR

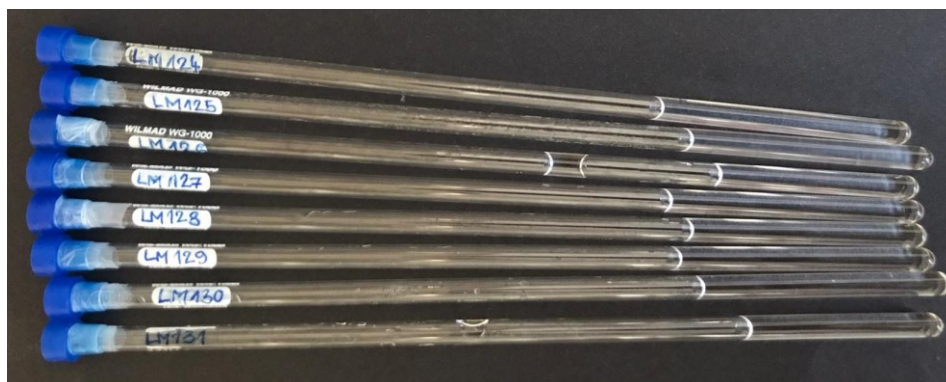
Pomocí infračerveného spektrometru *Nicolet iS5* byly jednoduchou nedestruktivní metodou stanoveny funkční skupiny, které jsou vázané na disacharidovou jednotku hyaluronanu.

Měření probíhalo **technikou ATR** (zeslabený úplný odraz) na **germaniovém krystalu**. Vzorky HA-SH byly před samotným měřením lyofilizovány, rozetřeny v třecí misce pomocí tloučku a několikrát přehnuty, aby nedošlo k protlačení materiálu přitlačkou, kterou se vzorek upevňuje ke krystalu.

Před samotnou analýzou bylo potřeba navolit si základní parametry měření, kterými lze ovlivnit rychlost měření spektra nebo jeho kvalitu. **Rozlišení spektra** je prvním parametrem a byl nastaven na hodnotu 4 cm^{-1} . Tento parametr udává, že aby byly ve spektru od sebe rozlišitelné dva pásy, musí být vzdáleny minimálně 4 cm^{-1} . Druhým důležitým parametrem je **počet skenů**, který definuje kolikrát bude dané spektrum změřeno. V rámci měření spekter HA(Na) bylo zvoleno 64 skenů. Software *Omnic* pak finální spektrum vytvoří jako průměr všech 64 naměřených spekter. Počet skenů ovlivňuje kvalitu spektra, tedy zvyšuje poměr signálu k šumu. Výsledkem měření je spektrum vyjadřující závislost absorbance na vlnočtu (cm^{-1}). Rozsah vlnových délek, resp. vlnočtů, pro měření bylo od 4000 do 600 cm^{-1} . Software *Omnic* také uživateli dovoluje určit plochu pod píkem (**peak area**) na základě které lze určit, zda-li došlo ke změně ve spektru thiolovaného hyaluronanu oproti čistému HA(Na).

5.4.2 NMR

Detailnější popis struktury thiolovaného hyaluronanu byl popsán pomocí protonové nukleární magnetické rezonance (1H-NMR) za použití spektrometru JEOL ECZ 400 (JEOL Ltd., Tokio, Japonsko). Přístroj pracuje při 1H frekvenci 399,78 MHz při 25 °C. Analyzované vzorky byly rozpuštěny v těžké vodě (D₂O), kdy výsledná koncentrace roztoku polymeru byla rovna 8,6 mg/ml. Rozpuštěné vzorky byly přeneseny do speciálních NMR kyvet zobrazovaných na obr. 35.



Obr. 35 NMR kyvety

V programu *ACD/NMR Processor Academic Edition* byla surová data z NMR spektrometru převedena pomocí Fourierovy transformace na NMR spektrum s charakteristickými píky odpovídající jednotlivým funkčním skupinám. Signál vody (D₂O) byl využit jako reference a byla mu přidělena hodnota 4,75 ppm.

Pomocí 1H-NMR byl stanoven stupeň substituce (DS) thiolové skupiny vázané na disacharidové jednotce hyaluronanu (DS, %). Stupeň substituce lze spočítat jako relativní poměr integrace referenčního píku, tj. píku ($\delta = 2$ ppm) ($I_{HA(Na)}$), který odpovídá protonům N-acetylové skupiny D-glukosaminu HA(Na), a píku volné thiolové skupin ($\delta = 2,4$ ppm) (I_{SH}), popř. píku odpovídající disulfidické vazbě ($\delta = 2,8 - 2,9$ ppm) (I_{S-S}), za použití rovnice:

$$DS(\%) = \frac{\frac{I_{SH}}{4}}{\frac{I_{HA(Na)}}{3}} \cdot 100 \quad (1)$$

nebo

$$DS(\%) = \frac{\frac{I_{S-S}}{8}}{\frac{I_{HA}}{3}} \cdot 100 \quad (2)$$

Číslo 4 odpovídá počtu protonů, které tvoří volnou thiolovou skupinu, číslo 8 zase počtu protonů tvořící disulfidickou vazbu a číslo 3 počtu protonů tvořící N-acetyl HA(Na). Skutečný stupeň substituce DS je tedy podílem relativního poměru integrace daných píků a číslu odpovídajícímu počtu protonů ve vazbě [140].

5.4.3 Rotační reometr

Reakční kinetika a výsledná tuhost připravených hydrogelů byla studována na základě reologických měření s využitím rotačního reometru *Anton-Paar MCR 502* při teplotě 25 °C za normálního tlaku ve vzdušné atmosféře.

Pro měření reakční kinetiky roztoku HA-SH (3,2 ml) byla využita geometrie „válec-válec“. Touto geometrií se měří větší objemy roztoku polymerů (až 16 ml), ale kvůli malému množství analyzovaných vzorků, byla využita speciální geometrie válec-válec, tzv. double gap, který tvoří dva soustředné válce a dovoluje uživateli měřit při menších objemech (3,2 ml). Měření probíhalo při konstantní 10% deformaci s konstantní úhlovou frekvencí 10 rad/s. Byly sledovány reologické veličiny, tj. komplexní viskozita η , elastický modul G' a ztrátový modul G'' v závislosti na čase měření, které probíhalo 14 hod. Výsledkem měření byla informace o gelačním čase, tedy místě průniku křivek storage G' a loss G'' modulu.

Oscilační testy byly uskutečněny na připravených kompletně zesíťovaných hydrogelech. Měření byla provedena na systému „deska-deska“, který osciloval při konstantní 10% deformaci s úhlovou frekvencí v rozmezí od 0,1 do 100 rad/s. Při měření byly sledovány stejné reologické veličiny jako při měření reakční kinetiky, ale v závislosti na úhlové frekvenci. Na základě oscilačního měření lze určit výslednou tuhost připravených HA-SH hydrogelů.

5.4.4 SEM

Pro detekci pórů v připravených lyofilizovaných vzorcích hyaluronanu byl použit skenovací elektronový mikroskop (SEM) *Phenom G2 Pro (Phenom World)*. Pomocí SEM lze dosáhnout vysokého optického rozlišení a měnit různé optické parametry (podsvícení, kontrast nebo hloubka ostrosti). Vzorky byly seříznuty příčně a pomocí uhlíkové pásky připevněny na kovový terčík. Vzorky pozorované v SEM musí být vodivé, aby došlo k interakci vzorku s elektronovým svazkem. Proto byla na vzorky předem nanesena vrstva palladia pomocí naprašovačky. Samotné pokovení probíhalo po dobu 60 s, při proudu 18 mA. Pozorování v SEM bylo realizováno při urychlovacím napětí 10 kV.

Velikost pórů a celková porozita byla stanovena pomocí funkce *threshol*d v programu *ImageJ*. Tento program dokáže snímek pořízený z mikroskopu převést z pixelů na mikrometry a přes funkci *threshol*d spočítat porozitu měřeného vzorku. Aby byla chyba měření eliminována na co nejnižší hodnotu, byla celková porozita materiálu určena jako průměr z porozity změřené na 3 snímcích téhož vzorku s příslušnou chybou měření.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Následující kapitola shrnuje dosažené výsledky při naplňování cíle bakalářské práce.

6.1 Syntéza HA-SH

Schéma syntézy HA-SH je uvedena na obr. 33. Na aktivovanou karboxylovou skupinu byl navázán NHS za vzniku aktivního esteru HA-NHS. K aktivaci karboxylové skupiny byl použit karbodiimid (EDC). Následně byl NHS nahrazen cysteaminem, který se na aktivní místo HA(Na) navázal přes aminovou skupinu, za vzniku **thiolovaného hyaluronanu (HA-SH)**.

Tímto způsobem bylo připraveno celkem 16 reakcí, při kterých byla řešena optimalizace podmínek syntézy, na základě obměněných různých parametrů (ekvimolární poměr, podmínky dialýzy, přidání redukčního činidla atd.), tak jak je uvedeno v tab. 1.

Na základě pochopení mechanismu thiolace hyaluronanu HA-SH byly připraveny 4 deriváty thiolovaného hyaluronanu v závislosti na molekulové hmotnosti (124 kDa, 243 kDa, 370 kDa a 600 kDa) a s konstantním ekvimolárním poměru 1:2:4:4 reagujících látek (HA(Na):NHS:EDC:CSA). Uvedený ekvimolární poměr byl zvolen na základě studie autorů Bian et. al. (2016), kteří u tohoto poměru dosáhli nejvyššího stupně substituce thiolové skupiny na HA(Na). Nezbytnou součástí přípravy HA-SH byla purifikace reakční směsi pomocí dialýzy, která probíhala po dobu 48 hod a frekvence obměny dialyzačního roztoku činila 2krát denně. Dialýza probíhala v kyselém pH, aby bylo zabráněno vzniku disulfidické vazby během čištění. Poté následovala lyofilizace produktu.

I přestože byly thiolové skupiny blokovány pomocí kyselého pH dialyzačního roztoku, došlo k „samozesítní“ produktu již v membráně (nebo před rozpuštěním), proto dalším krokem syntézy byla redukce disulfidické vazby pomocí redukčního činidla (DTT). Po přidání DTT bylo pozorováno zvýšení stupně substituce volných thiolových skupin, což potvrdilo úspěšné štěpení disulfidické vazby. Po redukční reakci následovala další dialýza, za účelem dočištění produktu po přidání DTT. Tato dialýza trvala jen 24 hod při zachování stejné frekvence obměny dialyzačního roztoku jako u předchozí dialýzy. Shrnutí definovaných parametrů syntézy jsou uvedeny v tab. 3. Všechny zde uvedené deriváty HA-SH byly použity k další charakterizaci uvedené v následující části této práce.

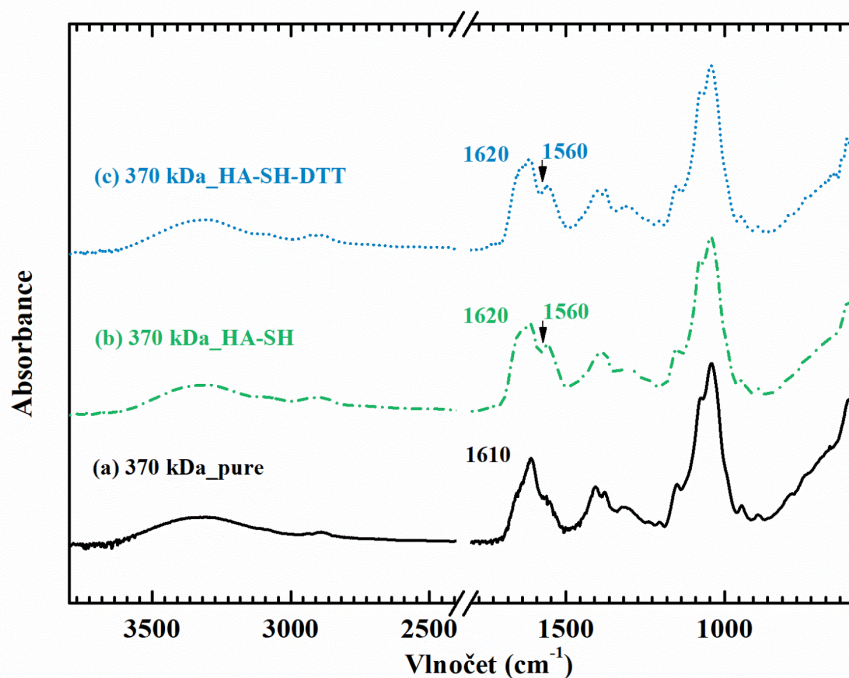
Tab. 3 Shrnutí parametrů syntézy HA-SH

Název reakce	Molekulová hmotnost M_w [kDa]	Ekvimolární poměr	Purifikace	DTT	Purifikace
HA-SH-14-DTT	124				
HA-SH-16-DTT	243	HA:NHS:EDC:CSA	48 hod/2krát denně	HA-SH:DTT	24 hod/2krát denně
HA-SH-13-DTT	370	=		=	
HA-SH-15-DTT	600	1:2:4:4		1:4	

6.2 Charakterizace HA-SH

6.2.1 FTIR

Jednou z metod použitých při ověření modifikace HA(Na) byla FTIR spektroskopie. Tato jednoduchá a nedestruktivní metoda umožnila zjistit k jakým změnám ve spektru čistého HA(Na) došlo po jeho modifikaci pomocí thiolových skupin. Spektra čistého hyaluronanu (HA(Na)), thiolovaného hyaluronanu (HA-SH) a thiolovaného hyaluronanu po reduci pomocí DTT (HA-SH-DTT) ($M_w = 370$ kDa) jsou uvedeny v grafu 1. Spektra vzorků zbylých molekulových hmotností jsou součástí přílohy této práce.



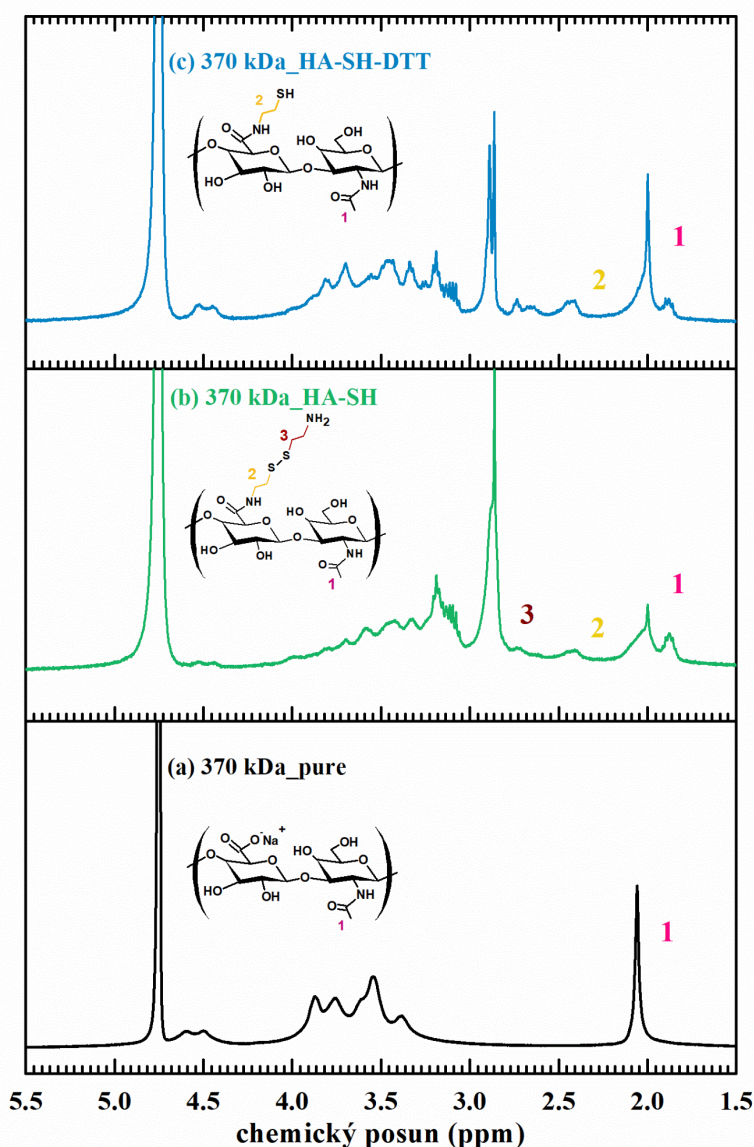
Graf 1 FTIR spektrum čistého (a) HA(Na), (b) HA-SH a (c) HA-SH-DTT pro molekulovou hmotnost $M_w = 370$ kDa

Při porovnání spektra čistého HA(Na) a HA-SH byla zaznamenána změna v oblasti pásů 3000 cm^{-1} až 3600 cm^{-1} . V této oblasti se překrývají $-NH$ a $-OH$ skupiny. V čistém spektru

je pozorován širší a zároveň nižší pás, jelikož HA(Na) obsahuje více *-OH* skupin než HA(Na) modifikovaná thioly. Po navázání thiolové skupiny na místo karboxylové, dochází k redukci *-OH* skupin a k současnému nárůstu *-NH* skupin, což se ve FTIR spektru projeví zúžením a zároveň zvýšením pásu v oblasti $3000 - 3600 \text{ cm}^{-1}$. Dle autorů Xu et al. (2021) [8], Hong et al. (2020) [10] a Yegappan et al. (2019) [11] přítomnost thiolové skupiny potvrzuje i pás, který se nachází v okolí vlnočtu 2500 cm^{-1} . Absorpce tohoto píku není příliš velká, a proto na potvrzení byla určena i „plocha pod píkem“ (tab. 5 a 6 v příloze), která skutečně prokazuje absorpci v této oblasti vlnočtů. Čistý HA(Na) vykazuje absorpci v oblasti vlnočtu 1610 cm^{-1} , která odpovídá asymetrické vibraci v *-C=O* (karbonylové) skupiny, zatímco ve spektru modifikovaného HA(Na) došlo k rozštěpení tohoto pásu na dva – 1560 a 1620 cm^{-1} (viz obr. 35-38). Pás v oblasti vlnočtu 1560 cm^{-1} odpovídá vibraci skupiny *-CO-NH*, která potvrzuje vznik amidové vazby, a pás v oblasti 1620 cm^{-1} reprezentuje *-SH* skupinu navázanou na *-NH*. Tento pás byl potvrzen studií Qi-Hang et al. (2020), kteří rozštěpené pásy přisuzují vazbě amid I a amid II [12]. Rozštěpené pásy v této oblasti vlnočtu pozorovali ve své studii také Cao et al. (2019) [9]. Si et al. (2019) v čistém spektru Ha(Na) detekují pás v 1600 cm^{-1} , který je po modifikaci HA(Na) thioly rozložen na další dva (1558 cm^{-1} a 1640 cm^{-1}). Mimo to ve svých spektrech pozorovali absorpci v oblasti $2500 - 2600 \text{ cm}^{-1}$ [44]. Na základě porovnání změřených FTIR spekter s literaturou lze konstatovat, že modifikace HA(Na) thioly proběhla úspěšně.

6.2.2 NMR

Detailnější a přesnější potvrzení úspěšné modifikace HA(Na) thioly a zároveň stanovení stupně substituce thiolových skupin, ať už volných *-SH* či vázaných v disulfidové vazbě *-S-S-*, bylo realizováno pomocí ^1H NMR. Nejprve bylo změřeno spektrum čistého HA(Na), ze kterého je patrný výrazný pík v oblasti 2,0 ppm, která odpovídá N-acetylové skupině (ve spektru označené jako č. 1), zatímco oblasti píků od 3,5 do 4,3 ppm, jsou přisuzovány sacharidovému kruhu HA(Na). Pozorované píky jsou uvedeny v grafu 2, který obsahuje spektrum čisté (a) HA(Na), (b) thiolovaného hyaluronanu (HA-SH) a (c) thiolovaného hyaluronanu po reduci pomocí DTT (HA-SH-DTT) pro molekulovou hmotnost $M_w = 370 \text{ kDa}$. NMR spektra zbylých molekulových hmotností jsou uvedena v příloze této bakalářské práce.



Graf 2 NMR spektrum čistého (a) HA(Na), (b) HA-SH a (c) HA-SH-DTT pro molekulovou hmotnost $M_w = 370$ kDa

Po modifikaci thiolovými skupinami byly ve spektru HA-SH detekovány nové píky, a to v oblasti 2,92–2,98 ppm; 2,62–2,71 ppm a 2,36–2,53 ppm, jak je naznačeno v grafu 1 a 2. Píky v oblasti 2,92–2,98 ppm a 2,62–2,71 ppm odpovídají chemickému posunu methylových protonů tvořící disulfidickou vazbu ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}-\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), zatímco oblast 2,36–2,53 ppm je přisuzována chemickému posunu methylových protonů, kterými je thiolová skupina vázána na disacharidový kruh hyaluronanu ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$). Po přidání DTT došlo k rozštěpení disulfidové vazby, která způsobila jednak nárůst intenzity v oblasti chemického posunu odpovídajícímu methylovým protonům $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$ a jednak zvýšení stupně substituce (DS) volné thiolové skupiny.

Autoři Yu et al. (2020) u thiolovaného hyaluronanu v NMR spektru detekovaly nové píky ve velmi podobných oblastech chemického posunu, jako jsou uvedeny v této práci. Ovšem po přidání DTT detekovali chemický posun píků 2,68 až 2,94 ppm do oblasti 2,45 ppm a ve zmíněných oblastech (2,68 až 2,94 ppm) již žádné píky nepozorovali [12]. To může být způsobeno odlišným způsobem syntézy, jelikož autory thiolovaný HA(Na) připravovali Michaelovou adicí. Svou roli při syntéze, a tedy i v dosažených výsledcích, hraje jistě i zvolený ekvimolární poměr, který v jejich případě odpovídal 2:1,5:4 (EDC:HOBt:CSA). Kolektiv autorů Bian et al. (2016) ve své studii zabývající se přípravou thiolovaného hyaluroanu pozorovali nové píky v oblastech 2,45 ppm a 2,63 ppm, které souvisí s přítomnou disulfidickou vazbou [14]. Stejně píky detekovali v oblasti 2,52 ppm po syntéze HA(Na) thioly autoři Xia et al. (2021) [141].

Po srovnání výsledků NMR s výše uvedenými autory lze konstatovat, že modifikace HA(Na) thioly proběhla úspěšně, jelikož nové píky jsou pozorovány ve stejných oblastech chemického posunu. Mimo to se ve spektrech objevují i píky odpovídající nečistotám (např. nezreagované zbytky vstupních látek, redukční činidlo atd.), které během dialýzy nebyly dostatečně odstraněny (vymyty), i po dvojnásobné dialýze. Úspěšnost modifikace byla dále potvrzena stupněm substituce thiolových skupin (DS, %). Výpočet stupně substituce byl realizován pomocí píků NMR spektra. Jako reference byl zvolen pík odpovídající N-acetyl skupině vázané na disacharidovém kruhu Na(HA), protože během modifikace u zmíněné skupiny nedochází k jeho žádné změně. Přehled dosažených výsledků DS u zkoumaných molekulových hmotností je uveden v tab. 4

Tab. 4 Dosažené stupně substituce (DS) thiolových skupin pro zkoumané molekulové hmotnosti hyaluronanu

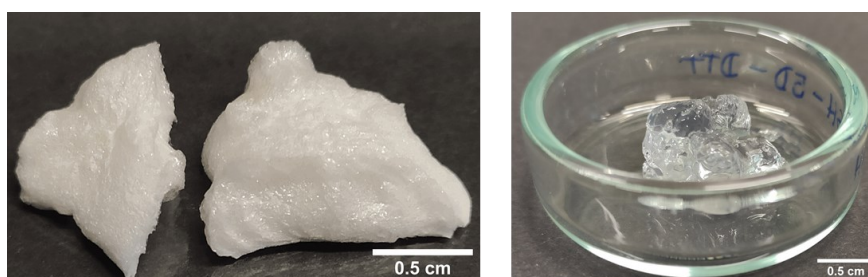
Název reakce	Molekulová hmotnost M_w [kDa]	Stupeň substituce DS [%]
HA-SH-14-DTT	124	30,9
HA-SH-16-DTT	243	49,6
HA-SH-13-DTT	370	33,8
HA-SH-15-DTT	600	46,9

Ekvimolární poměr (1:2:4:4) látek vstupujících do reakce byl zvolen podle článku autorů Bian et al. (2016), kteří u tohoto poměru zaznamenali nejvyšší dosažený stupeň substituce (50 - 60 % dle molekulové hmotnosti HA(Na)) [14]. Z jejich výsledku je zřejmé, že s rostoucím poměrem reagujících látek roste i stupeň substituce. V našem případě odpovídá

DS výsledkům získaných autory Bian et al. spíše pro ekvimolárním poměr (1:2:3:2) namísto použitých (1:2:4:4). Odlišný trend byl nalezen i v případě závislosti DS na molekulové hmotnosti HA-SH. Stupeň substituce dle autorů Bian et al. (2016), s rostoucí molekulovou hmotností klesá, zatímco u našeho pozorování je tomu přesně naopak. Příčina pozorovaného jevu bude pravděpodobně souviset s nárůstem molekulové hmotností, která se projeví omezenou mobilitou řetězců HA(Na) jehož výsledkem bude vyšší gelační čas [14]. Výrazně nižší stupeň substituce ve svých studiích potvrdili např. autoři Guo, Mi a Sun (2018) (DS 21% (M_w 100 – 200 kDa) [142], Xu et al. (2021) (DS 17% (M_w 30 kDa) [8], Xia et al (2021) (DS 35 % (M_w 4-6 kDa)) [141]. Odlišný DS lze ovlivnit např.: vstupními reaktanty, poskytující thiolovou skupinu (např. CSA, L-cystein atd.), ekvimolární poměr reagujících látek a dostatečně homogenní mícháním reakční směsi atd.

6.3 Příprava hydrogelů na bázi HA-SH

V experimentální části bakalářské práce byly připraveny hydrogely na bázi HA-SH o různé koncentraci HA(Na): 1 % (w/w), 2 % (w/w) a 3 % (w/w). Nejprve byl rozpuštěn lyofilizovaný produkt HA-SH-DTT v Qmili vodě na příslušnou koncentraci. Po rozpuštění byla hodnota připraveného pH roztoku zvýšena na hodnotu pH 8 a takto upravený roztok byl ponechán samovolně síťovat za přítomnosti vzdušného kyslíku. Výsledkem byla zesíťovaná struktura HA-SH-DTT (obr. 36).



Obr. 36 Příklad lyofilizovaného vzorku a hydrogelu na bázi HA-SH-DTT

U připraveného 1% (w/w) roztoku thiolovaného hyaluronanu nedošlo k vytvoření zesíťované struktury a to u žádné M_w . Tato skutečnost pravděpodobně souvisí s příliš nízkou koncentrací HA-SH-DTT v roztoku (jen 10 mg/ml). Ke všem připraveným roztokům thiolovaného hyaluronanu o vyšších koncentracích (2%, tj. 20 mg/ml a 3%, tj. 30 mg/ml) byly přidány 3 μ l NaOH (na 1 ml roztoku) z důvodu výšení pH, díky kterému dochází k iniciaci vzniku disulfidové vazby a tedy k vytvoření 3D struktury. Již na první pohled se 3% (w/w) vzorky HA-SH-DTT jeví pevnější, pravděpodobně z důvodu vyšší koncentrace

polymeru v roztoku. Pro určení přesné hodnoty tuhosti hydrogelů byly změřeny oscilační testy. Stejně tak nebyl znám přesný čas, kdy došlo k vytvoření příčných vazeb, proto byly vzorky podrobeny i testů reakční kinetiky, jejímž výsledkem je stanovená doba gelace.

Dalším možným důvodem, proč vzorky o nižší koncentraci nesíťují je nízká hustota thiolových skupin, které nejsou schopny vytvořit pevnou stabilní strukturu (Bian et al. 2016).

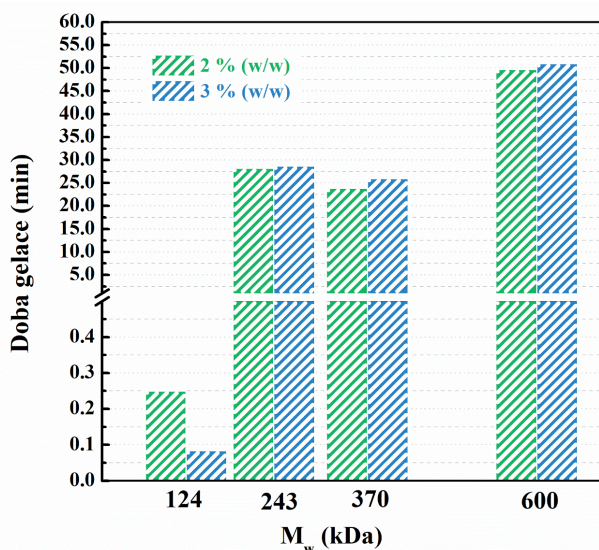
6.4 Reologie

Pro přípravu hydrogelů je důležité znát dobu, vzniku zesíťované struktury modifikovaného hyaluronanu (gelační čas), ale i výslednou tuhost hydrogelů pro jejich následné aplikace např. v tkáňovém inženýrství. Reakční kinetika a tuhost hydrogelů byly studovány na základě reologických měření.

Reakční kinetika i tuhost hydrogelů byly měřeny v závislosti na molekulové hmotnosti (124 kDa, 243 kDa, 370 kDa a 600 kDa) a koncentraci hyaluronanu (2 % a 3 % w/w). Vzorky s koncentrací 1 % (w/w) (pro všechny M_w nebyly charakterizovány, protože nedošlo k jejich zesíťování. Příčinou byla pravděpodobně příliš nízká koncentrace polymeru v roztoku, jak je uvedeno v předchozí kapitole.

6.4.1 Reakční kinetika

Nejprve byla provedena charakterizace doby gelačního, tedy tzv. reakční kinetiky thiolovaného hyaluronanu z pohledu různé molekulové hmotnosti a koncentrace. Výsledky reakční kinetiky jsou uvedeny v grafu 3.



Graf 3 Závislost doby gelace na molekulové hmotnosti HA-SH (124 kDa, 243 kDa, 370 kDa, 600 kDa) thiolovaného hyaluronanu (koncentrace polymeru 2 a 3 % w/w)

Bod gelace lze definovat jako místo, ve kterém dochází k vyrovnání hodnoty „storage“ a „loss“ modulu (průsečík křivek „storage“ (G') a „loss“ (G'')) v závislosti na čase t měření (viz příloha). Za tímto bodem, tedy bodem kdy „storage“ modul dosahuje vyšších hodnot než „loss“ modul, již ve vzorku převažuje elastická část nad částí viskózní a gel se stává tuhým. Z výsledků grafu 3 je tedy patrné, že bod gelace nezávisí na koncentraci polymeru a u všech vzorků došlo k jejich zesíťování do 60 min. V případě 2% vzorků, gelační čas s rostoucí molekulovou hmotností roste a to z hodnoty 0,25 min ($M_w = 124\text{kDa}$) až na hodnotu 49,67 min ($M_w = 600\text{kDa}$). Obdobné chování bylo pozorováno i u 3% vzorků, kde gelační čas s rostoucí M_w roste z hodnoty 0,08 min ($M_w = 124\text{kDa}$) na hodnotu 50,50 min ($M_w = 600\text{kDa}$). Pozorovaný trend narušují vzorky s $M_w = 370\text{ kDa}$, které mají prakticky srovnatelnou dobu gelace se vzorky $M_w = 243\text{ kDa}$. Pravděpodobnou příčinou pozorovaného chování je dosažený nižší stupeň substituce (DS) vzorků s $M_w = 370\text{ kDa}$ (viz tab. 4). Odlišný výsledek byl pozorován také u vzorků s $M_w = 124\text{ kDa}$, jejichž gelační čas byl naopak nejkratší (i když viskozita odpovídala nejvyšší hodnotě 291 mPa.s). Krátký čas gelace vzorku může být způsoben nízkým stupněm substituce, díky kterému je počet $-SH$ skupin ve vzorku omezený a přítomné skupiny spolu poměrně jednoduše interagují za vzniku disulfidické vazby.

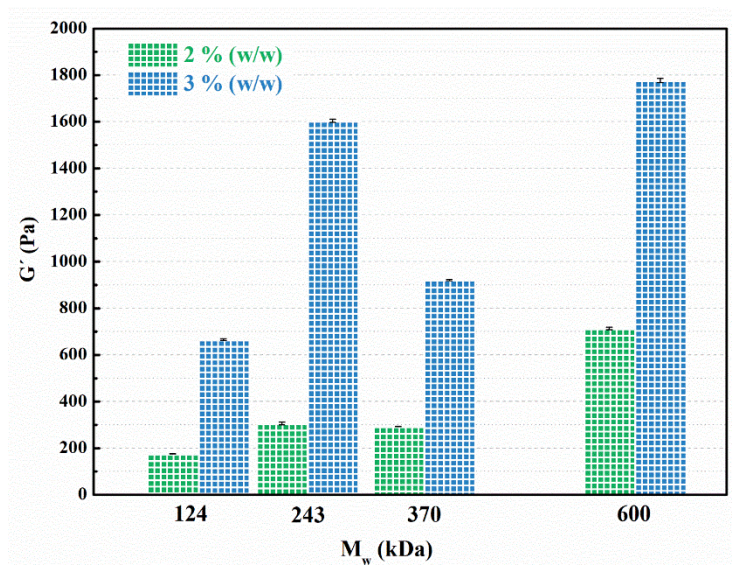
Jak už bylo jednou naznačeno, s rostoucí molekulovou hmotností thiolovaného hyaluronanu roste gelační čas. S rostoucí M_w totiž dochází k nárůstu viskozity roztoku, a tedy k poklesu mobility volných thiolových skupin vázaných na řetězci hyaluronanu, projevující se nižší reaktivitou, tedy gelačním časem. Guo et al. (2018) se ve své práci zaměřili na charakterizaci závislosti gelačního času hydrogelů na bázi thiolovaného hyaluronanu (HA-SH) s hyaluronanem modifikovaným pomocí katecholuna hodnotě pH. Dle těchto autorů doba gelace klesá v řadě: z tzv. „nekonečného“ bodu, tj. bodu kdy vzorek *nesítuje vůbec* (pH <7), 70 s (pH 7), 25 s (pH 8), 30 s (pH 10). Nejnižší gelační čas byl zjištěn v případě hydrogelu síťovaného při pH = 8 [142]. Na základě výsledků autorů Guo et al. (2018) lze zdůvodnit, proč bylo při síťování HA-SH hydrogelů v rámci experimentální části bakalářské práce upraveno pH na hodnotu 8. Při kyselém pH (pH <7) jsou totiž $-SH$ skupiny blokovány, tak aby nedošlo k jejich předčasnému zesíťování za vzniku disulfidové vazby. Po úpravě pH na hodnotu 8, dochází ke vzniku zesíťované polymerní struktury (za přítomnosti vzdušného kyslíku), jejíž výsledkem je hydrogel.

Po ukončení měření reakční kinetiky a následném vyjmutí vzorků z geometrie reometru bylo pozorováno, že vzorek je měkký, tzn. že jeho struktura není zcela zesíťovaná. Thiolovaný

HA(Na) totiž síťuje za přítomnosti vzdušného kyslíku, a i přestože geometrie reometru není zcela uzavřená, nebyl vzorek pravděpodobně vystaven potřebnému množství oxidačního činidla, protože již po pár minutách jeho vystavení vzdušnému kyslíku (při laboratorní teplotě) došlo k jeho okamžitému dosíťování. Kinetiku připravených hydrogelů na bázi thiolovaného hyaluronanu zkoumali ve své práci i autoři Asim et al. (2020), kteří zjistili, že s rostoucí koncentrací reaktivní látky N-acetylcystein roste elastický modul G' výsledného hydrogelu (max 165 Pa, M_w 10–50 kDa), projevující se vysokou elasticitou a tuhostí materiálu, naopak s rostoucí koncentrací se snižuje doba gelace (z 20 min pro 0,1 % (m/v) na 5 min pro 1 % (m/v), M_w 10–50 kDa) [66].

6.4.2 Oscilační testy

Vzhledem k tomu, že výsledná **tuhost hydrogelů** má vliv na migraci a proliferaci buněk, je charakterizace reologických vlastností materiálů využívaných jako scaffoldy velmi důležitá [66]. V grafu 4 je uvedena závislost „storage“ modulu (G') na molekulové hmotnosti HA-SH, v rozsahu úhlové frekvence 0,1-100 rad/s.



Graf 4 Závislost „storage“ modulu na molekulové hmotnosti HA-SH, „storage“ modul byl měřen v rozsahu úhlové frekvence 1-10 rad/s

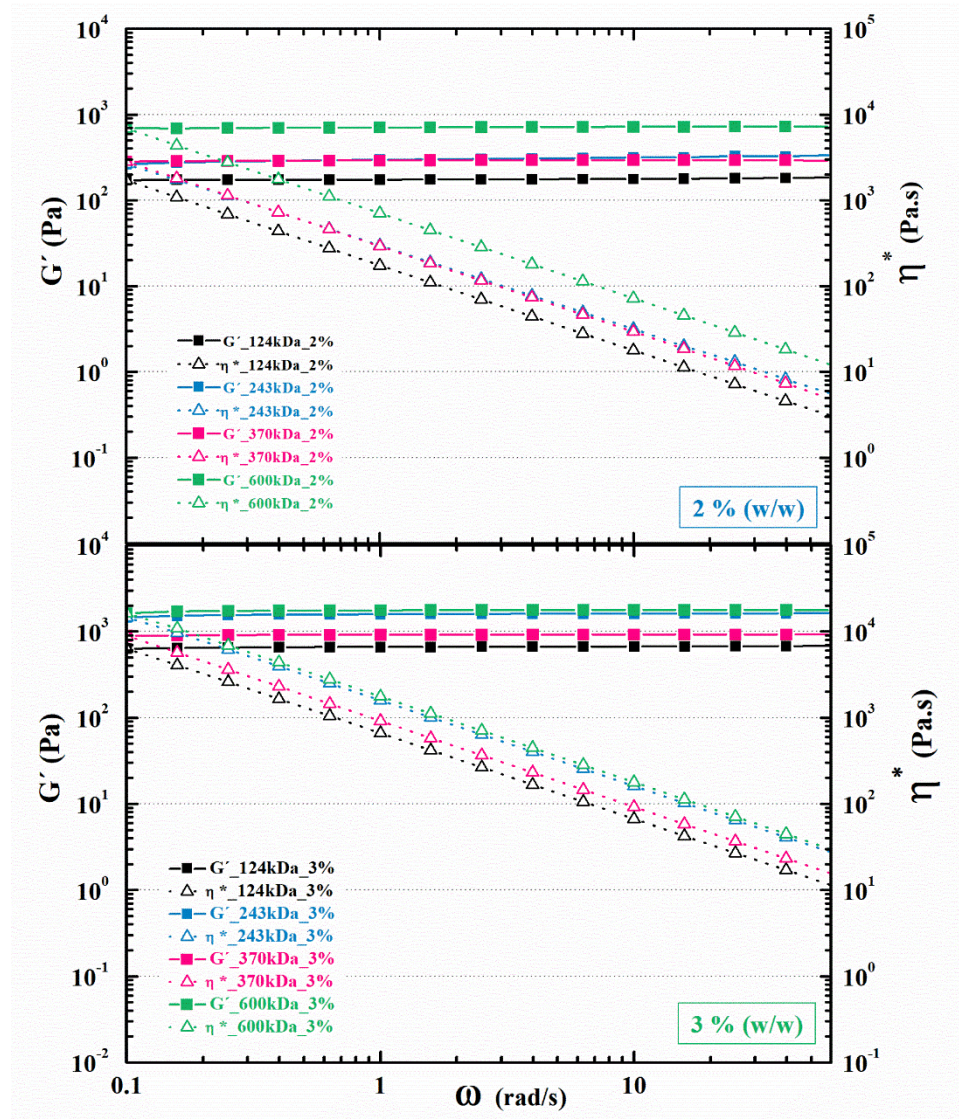
Tuhost vzorků byla určena jako průměr hodnot „storage“ modulu v oblasti úhlové frekvence 1 – 10 rad/s. Tuto oblast hodnot úhlové frekvence lze označit za tzv. bezpečnou z pohledu struktury gelu, ve které nedošlo k porušení struktury hydrogelu v měřící geometrii. Z výsledků uvedených v grafu 4 je patrné, že vyšší tuhost vykazují hydrogely s vyšší koncentrací polymeru HA-SH. Tedy tuhost u 2% vzorků roste z hodnoty 185 Pa (124kDa) na hodnotu 716 Pa (600kDa), zatímco v případě 3% vzorků roste z hodnoty 700 Pa (124kDa)

na hodnotu 1710 Pa (600kDa). Z grafu je rovněž vidět, že tuhost hydrogelů roste i s rostoucí molekulovou hmotností. Pozorovaný trend pravděpodobně souvisí s délkou polymerního řetězce, která roste s vyšší molekulovou hmotností. Z toho vyplývá, že čím vyšší M_w , tím hustější je polymerní síť HA-SH projevující se vyšší tuhostí. Výjimku v pozorovaném trendu představuje vzorek o $M_w = 370$ kDa, jehož výsledná tuhost je, v případě 3% (w/w) koncentrace, výrazně nižší než vzorek s molekulovou hmotností ($M_w = 243$ kDa). Důvodem (stejně jako v případě reakční kinetiky), může být, jednak jeho nižší DS, tak i srovnatelná výchozí molekulová hmotnost hyaluronanu deklarovaná materiálovým listem výrobce. Také si lze všimnout, že vzorky o $M_w = 243$ kDa a $M_w = 600$ kDa mají podobnou hodnotu G' modulu, projevující se podobnou tuhostí těchto vzorků. U obou vzorků byl rovněž potvrzen podobný stupeň substituce (viz tab. 4).

Touto problematikou se zabývali i autoři Bian et al. (2016), kteří potvrdili, že s vyšším stupněm substituce elastický modul G' roste. Tuto skutečnost nelze dle námi zjištěných výsledků zcela potvrdit, protože u 2% i 3% (w/w) sady vzorků storage modul G' roste v řadě: M_w 124kDa, 370kDa, 243kDa, 600kDa. U vzorků s koncentrací 2% (w/w) není rozdíl v tuhosti mezi jednotlivými vzorky tak výrazný jako v případě 3% (w/w) [14].

Bian et al. (2016) dále tvrdí, že při stejném DS roste G' s rostoucí molekulovou hmotností. Tento výsledek nelze potvrdit ani vyvrátit, jelikož při námi provedené modifikaci hyaluronanu byl dosažen 2krát nižší DS [14]. Rovněž při porovnání výsledné tuhosti thiolovaných hydrogelů bylo zjištěno, že v případě srovnatelné molekulové hmotnosti a DS (100kDa (DS 37,5 %) a 300 kDa (DS 33,5 %)) vykazují hydrogely autorů Bian et al. (2016) vyšší tuhost ($G' = 12$ kPa (124kDa), $G' = 15$ kPa (300kDa)) v porovnání s námi připravenými hydrogely ($G' = 0,7$ kPa (124kDa), $G' = 0,9$ kPa (370kDa)).

Závislost G' modulu a viskozity η^* na úhlové frekvenci analyzovaných vzorků popisuje graf 5.



Graf 5 Závislost „storage“ modulu (G') a komplexní viskozity (η^*) na úhlové frekvenci (ω), která byla měřena v rozsahu 0,1-100 rad/s

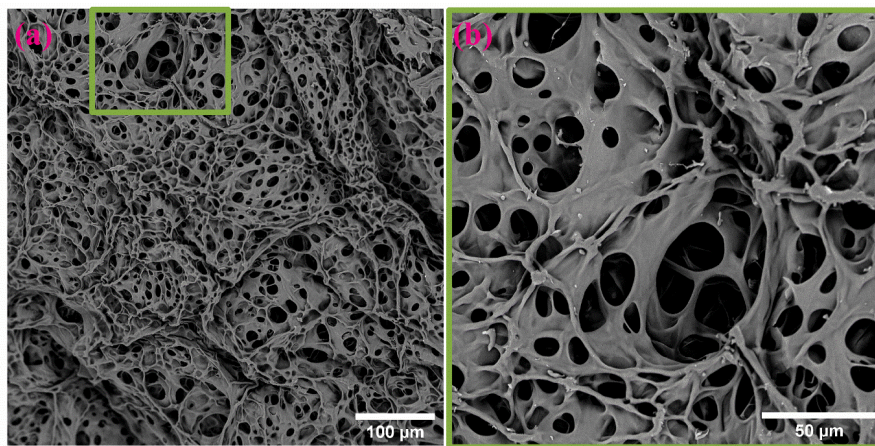
Na základě technické specifikace 3D tiskárny *Bio X* od firmy *Cellink* leží viskozita tisknutého materiálu v intervalu 0,1 – 10 Pa.s (při smykové rychlosti $\omega = 100$ rad/s). Na základě grafu 5 výsledná viskozita všech 2% vzorků o daných molekulových hmotnostech splňuje požadavky viskozity na extruzní tisk. Jediný 3% vzorek o molekulové hmotnosti 600 kDa se vymyká z trendu a nesplňuje tak podmínky na přípravě hydrogelu metodou 3D tisku

Z tohoto grafu lze říci, že „storage“ modul je s rostoucí úhlovou frekvencí ω konstantní. To tedy znamená, že během oscilace nedochází k porušení pevnosti připravených hydrogelů. Tuhostí hydrogelů byla rovněž zkoumána autory Guo et al. (2019). Na základě jejich výsledků lze konstatovat, že nejvyšší tuhost (storage modul) thiolovaného hydrogelu byla zjištěna u vzorku síťovaného při pH 8 – 8,5. Hodnota storage modulu (G') tedy roste do pH 8-8,5, kde je tuhost hydrogelu nejvyšší. Při překročení hodnoty pH =8,5 mají naopak

hydrogely tendenci být měkčí, storage modul (G') klesá [142]. Elastický modul (G') thiolovaného hydrogelu závisí kromě pH i na stupni substituce. Viskoelastické chování hydrogelů zkoumali také autoři Yegappan et al. (2019), kteří ve své studii porovnávali tuhost 3% vzorků hydrogelů na bázi HA-SH (150 kDa) a hydrogelů na bázi HA-SH s nanočásticemi polydopaminu (PDA). Tuhost hydrogelů bez přídavku PDA částic odpovídala hodnotě $G' = 99$ Pa ($M_w = 150$ kDa), zatímco tuhost hydrogelů s přídavkem PDA částic byla podstatně vyšší, tj. $G' = 163$ Pa ($M_w = 150$ kDa) [11]. Při porovnání hodnot storage modu ($G' = 99$ Pa ($M_w = 150$ kDa)) zjištěného u vzorků autorů Yegappan et al. (2019) je patrné, že v rámci našeho experimentu byly připraveny tužší hydrogely ($G' = 700$ Pa ($M_w = 124$ kDa)). Námi připravené hydrogely vykazovaly vyšší tuhost i při porovnání s hydrogely s přídavkem PDA částic.

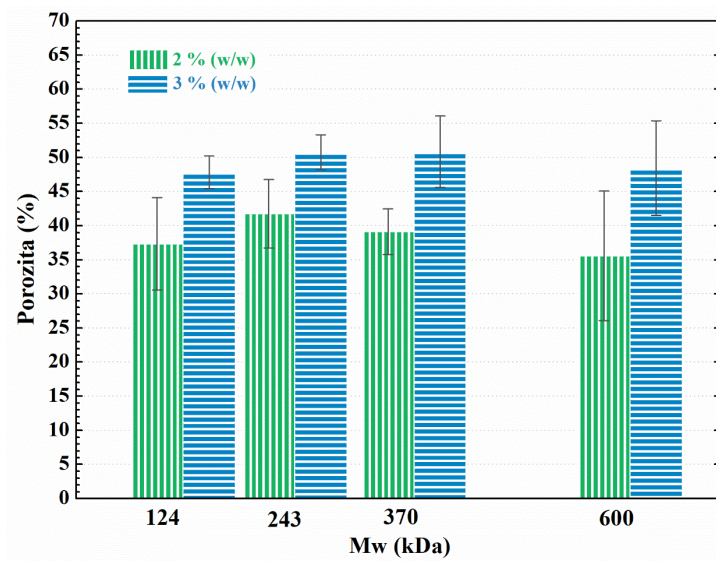
6.5 Porozita hydrogelů na bázi HA-SH

Pro charakterizaci morfologie a povrchové struktury připravených hydrogelů byla použita skenovací elektronová mikroskopie (SEM). Jak je uvedeno v popisu experimentu, vzorky byly po lyofilizaci příčně seříznuty a pozorovány při urychlovacím napětí 10 kV. Analýza SEM snímků ukázala vysoce porézní strukturu hydrogelů s širokou distribucí velikosti pórů, jejíž výsledky reflektuje obr. 37.



Obr. 37 (a) SEM snímek porézní struktury thiolovaného hydrogelu ($M_w = 124$ kDa) a (b) detailní výřez pórovité struktury thiolovaného hydrogelu ($M_w = 124$ kDa)

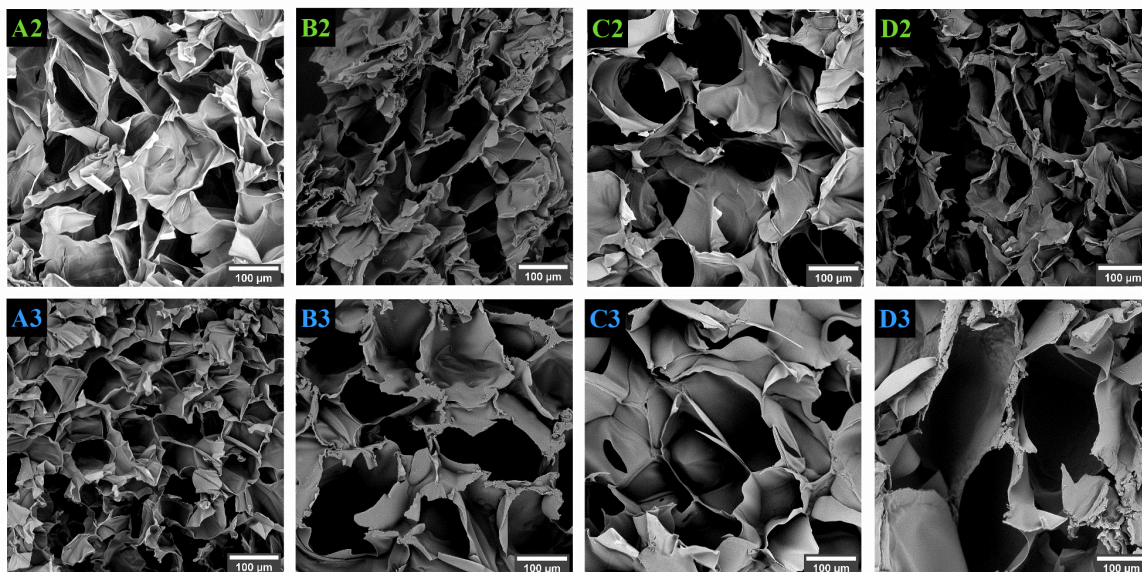
Dle analýzy SEM snímků pomocí programu *Image J* byla potvrzena skutečnost, že velikost většiny pórů ≤ 50 µm. Dosažené výsledky porozity jsou shrnuty v grafu 6.



Graf 6 Závislost porozity HA-SH-DTT na molekulové hmotnosti a koncentraci (2% (w/w) a 3% (w/w) vzorků

Z grafu 6 je patrné, že porozita roste s rostoucí koncentrací polymeru, zatímco pravděpodobně nezávisí na molekulové hmotnosti. Koncentrovanější vzorky (3 %) mají vyšší porozitu (47,8 % (M_w 124kDa), 50,8 % (M_w 243kDa), 50,9 % (M_w 370kDa), 48,4 % (M_w 600kDa)) než vzorky s 2 % (w/w) koncentrací HA-SH-DTT (37,3 % (M_w 124kDa), 41,7 % (M_w 243kDa), 39,1 % (M_w 370kDa), 35,6 % (M_w 600kDa)), což je pravděpodobně dáno vyšší koncentrací polymeru ve vzorku thiolovaného HA(Na).

Na obr. 38 jsou uvedeny SEM snímky porézní struktury HA-SH-DTT hydrogelů s různou molekulovou hmotností a koncentrací hydrogelů.



Obr. 38 Snímky SEM struktury analyzovaných hydrogelů s různou molekulovou hmotností – číslo (2 a 3) označuje koncentraci HA-SH-DTT hydrogelu a písmeno (A-D) rostoucí molekulovou hmotnost polymeru (124 - 600 kDa)

Velikost pórů je důležitým parametrem 3D struktury biopolymeru, ovlivňuje výměnu látek uvnitř i vně porézního materiálu, a mimo to má vliv i na buněčnou proliferaci [9].

Na porozitu produktu má vliv také teplota zamražení připraveného hydrogelu. Collinse a Birkinshawa (2010) zjistili, že na velikost pórů hydrogelu na bázi hyaluronanu má vliv teplota zamražení materiálu před lyofilizací. S poklesem teploty zamražení se snižuje velikost pórů. V rámci experimentu byly vzorky zamrazeny při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, to podle studie uvedených autorů znamená, že velikost pórů by měla být okolo $210\text{ }\mu\text{m}$. Protože ve své studii ale neřeší hydrogely na bázi thiolovaného hyaluronanu, mohou být jejich výsledky mírně odlišné. Dále pozorovali vliv řezu materiálu (pro přípravu na pozorování v SEM) a teploty zamražení produktů na výslednou velikost pórů, přičemž zjistili, že při zamražení na teplotu okolo $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nemá způsob řezu vzorku vliv na velikost pórů. Naopak při zamražení na nižší teplotu ($-10\text{ }^{\circ}\text{C}$) byl pozorován rozdíl ve velikosti pórů při příčném a rovinném řezu [143].

ZÁVĚR

V rámci experimentální části bakalářské práce byl připraven derivát hyaluronanu pomocí thiolů (HA-SH). Prvním krokem syntézy hyaluronanu byla aktivace karboxylové skupiny na řetězec HA(Na) látkou EDC. Druhým krokem bylo navázání thiolové skupiny poskytnuté cystaminem na aktivovanou karboxylovou skupinu HA(Na). Po optimalizaci podmínek reakce byly připraveny reakce o 4 různých molekulových hmotnostech (124 kDa, 243 kDa, 370 kDa, 600 kDa) při ekvimolárním poměru výchozích látek 1:2:4:4 (HA(Na):NHS:EDC:CSA).

Ke vzniku disulfidické vazby a tedy zesíťování thiolovaného hyaluronanu za vzniku 3D polymerní sítě dochází při $\text{pH} > 7$ (za přítomnosti vzdušného kyslíku). I když byla reakční směs udržována při nízkém pH ($\text{pH} < 7$), došlo k samozesíťování a vzniku hydrogelu již v dialyzační membráně. Proto byla důležitým krokem syntézy HA-SH redukce disulfidických vazeb, které vznikají přednostně před volnými thiolovými skupinami. Redukčním činidlem byla látka DTT, která tedy štěpí vzniklé disulfidické vazby. Po jejímž přidání bylo pozorováno zvýšení stupně substituce volných thiolových skupin (potvrzeno pomocí NMR spektroskopie).

Úspěšné navázání thiolových skupin na řetězec hyaluronanu bylo potvrzeno FTIR a NMR spektroskopii. Ve spektrech FTIR se pásy, které potvrzují thiolovou skupinu, objevují v oblastech $3000 - 3600$, 2500 a 1620 cm^{-1} . V oblasti $3000 - 3600 \text{ cm}^{-1}$ se překrývají pásy náležící OH a NH skupině. Thiolová skupina se na řetězec HA(Na) váže přes NH skupinu, jenž se projeví zúžením a zvýšením pásu v oblasti ($3000 - 3600 \text{ cm}^{-1}$). V oblasti 2500 cm^{-1} se projevila absorpce thiolové skupiny. Pás v této oblasti je těžce detekovatelný, proto byla určena i plocha pod píkem, která je uvedena v příloze této práce. Nárůst hodnoty plochy pod píkem u HA-SH je nepatrný, ale přesto potvrzuje přítomnost thiolové skupiny na HA(Na). Detailnější charakterizace syntetizovaného HA-SH byla provedena pomocí NMR spektroskopie. Charakteristické píky, které odpovídají volné thiolové skupině, byly detekovány v oblasti chemického posunu $2,36 - 2,53 \text{ ppm}$, a píky reflektující disulfidickou vazbu byly pozorovány v oblasti $2,62 - 2,71 \text{ ppm}$ a $2,92 - 2,98 \text{ ppm}$. Pomocí NMR spekter byl spočítán také stupeň substituce thiolových skupin (DS)_m vztažený k referenčnímu píku detekovaného v oblasti $2,00 \text{ ppm}$ (odpovídá chemickému posunu N-acetylmu na řetězci HA(Na)). Nejvyšších hodnot stupně substituce bylo dosaženo u molekulové hmotnosti $M_w = 243 \text{ kDa}$ (49,6 %) a $M_w = 600 \text{ kDa}$ (46,9 %). Dosažené stupně substituce výrazně ovlivňují reologické vlastnosti.

V rámci experimentu byly připraveny hydrogely o různé koncentraci polymeru (1 % (w/w), 2 % (w/w) a 3 % (w/w)), přičemž u 1 % vzorků nedošlo ke vzniku zesíťované struktury. Tato skutečnost pravděpodobně souvisí s příliš nízkou koncentrací HA-SH-DTT v roztoku a nízkou hustou sítě. Na základě provedených reologických měření bylo zjištěno, že doba gelace nezávisí na koncentraci polymeru (2 % a 3 % (w/w)), ale roste s rostoucí molekulovou hmotností polymeru. Z provedených oscilačních testů bylo rovněž zjištěno, že „storage“ modul (G') roste s rostoucí koncentrací i rostoucí molekulovou hmotností polymeru a to z hodnoty 185 Pa (124 kDa) na hodnotu 716 Pa (600 kDa) u 2% vzorků, a z hodnoty 700 Pa (124 kDa) na hodnotu 1710 Pa (600 kDa) v případě 3%. Z výsledků oscilačních testů tedy vyplynulo, že čím vyšší je molekulová hmotnost polymeru (ve vzorku je více řetězců), tím vyšší je viskozita daného vzorku. Z důvodu předpokládané přípravy hydrogelů pomocí metody 3D tisku, bylo klíčové, aby viskozita síťovaného roztoku ležela v oblasti hodnot (0,1-10Pa.s). Při překročení této maximální hodnoty, totiž může dojít k porušení tiskového materiálu, případně jeho nevytlačení z tiskové hlavy. Na základě provedených oscilačních testů je možné konstatovat, že všechny zvolené molekulové hmotnosti (vyjma $M_w = 600\text{kDa}$) HA-SH (v případě série 2% koncentrace vzorků), lze pravděpodobně použít pro aplikaci 3D tisku. V případě koncentrace (3%) dané viskozitní oblasti vyhovuje pouze vzorek s $M_w = 124\text{kDa}$. V neposlední řadě byla provedena charakterizace porozity připravených vzorků pomocí SEM. Velikost detekovaných pórů odpovídala hodnotě ≤ 50 μm . Mimo to lze zkonstatovat, že porozita se nemění s rostoucí molekulovou hmotností thiolovaného polymeru. Na základě všech provedených analýz lze předpokládat, že hydrogel připravený na bázi thiolovaného hyaluronanu, lze díky jeho výsledným vlastnostem (porozita, reologické chování, úspěšnost modifikace a replikace výsledků) považovat za potencionálně slibný materiál pro tkáňové inženýrství.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Park, J.B. and R. Lakes, *Biomaterials: An Introduction*. 3 ed. 2007, New York: Springer.
2. Temenoff, J.S. and A.G. Mikos, *Biomaterials: The Intersection of Biology and Materials Science*. 2008: Pearson/Prentice Hall.
3. Niaounakis, M., *Biopolymers: Applications and Trends*. 2015: Elsevier Science.
4. Fraser, J.R.E., T.C. Laurent, and U.B.G. Laurent. *Hyaluronan: Its nature, distribution, functions and turnover*. in *Journal of Internal Medicine*. 1997. Blackwell Publishing Ltd.
5. Knopf-Marques, H., et al., *Hyaluronic Acid and Its Derivatives in Coating and Delivery Systems: Applications in Tissue Engineering, Regenerative Medicine and Immunomodulation*, in *Advanced Healthcare Materials*. 2016, Wiley-VCH Verlag. p. 2841-2855.
6. Pérez, L.A., et al., *Hyaluronic acid hydrogels crosslinked in physiological conditions: Synthesis and biomedical applications*, in *Biomedicines*. 2021, MDPI.
7. Kafedjiiski, K., et al., *Synthesis and in vitro evaluation of thiolated hyaluronic acid for mucoadhesive drug delivery*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007. **343**(1-2): p. 48-58.
8. Xu, K., et al., *Hyaluronic acid thiol modified injectable hydrogel: Synthesis, characterization, drug release, cellular drug uptake and anticancer activity*. *Carbohydr Polym*, 2021. **254**: p. 117286.
9. Cao, W., et al., *The preparation and biocompatible evaluation of injectable dual crosslinking hyaluronic acid hydrogels as cytoprotective agents*. *Journal of Materials Chemistry B*, 2019. **7**(28): p. 4413-4423.
10. Hong, S.Y., et al., *Synthesis and characterization of biphasic calcium phosphate laden thiolated hyaluronic acid hydrogel based scaffold: physical and in-vitro biocompatibility evaluations*. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2021. **32**(3): p. 337-354.
11. Yegappan, R., et al., *Nano polydopamine crosslinked thiol-functionalized hyaluronic acid hydrogel for angiogenic drug delivery*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019. **177**: p. 41-49.
12. Yu, Q.H., et al., *Mussel-Inspired Adhesive Polydopamine-Functionalized Hyaluronic Acid Hydrogel with Potential Bacterial Inhibition*. *Glob Chall*, 2020. **4**(2): p. 1900068.
13. Soato, M., et al., *A versatile and robust analytical method for hyaluronan quantification in crosslinked products and complex matrices*. *Carbohydr Res*, 2021. **503**: p. 108314.
14. Bian, S., et al., *The self-crosslinking smart hyaluronic acid hydrogels as injectable three-dimensional scaffolds for cells culture*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2016. **140**: p. 392-402.
15. Ebnesajjad, S., *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics: Properties, Processing and Applications*. 2012: Elsevier Science.
16. Wong, J.Y., J.D. Bronzino, and D.R. Peterson, *Biomaterials: Principles and Practices*. 2012: CRC Press.
17. Basu, B., *Biomaterials Science and Tissue Engineering: Principles and Methods*. 2017: Cambridge University Press.
18. Yoda, R., *Elastomers for biomedical applications*. *J Biomater Sci Polym Ed*, 1998. **9**(6): p. 561-626.

19. Cesur, S., et al., *Production and characterization of elastomeric cardiac tissue-like patches for Myocardial Tissue Engineering*. *Polymer Testing*, 2020. **90**: p. 106613.
20. Amir, S.M.M., et al., *Nondestructive testing method for Kevlar and natural fiber and their hybrid composites*. 2019: p. 367-388.
21. Toole, B.P., *Hyaluronan: From extracellular glue to pericellular cue*, in *Nature Reviews Cancer*. 2004, Nature Publishing Group. p. 528-539.
22. Girish, K.S. and K. Kemparaju, *The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview*, in *Life Sciences*. 2007. p. 1921-1943.
23. Hascall, V., C., Laurent, T., C. *Hyaluronan: Structure and Physical Properties*. 1997 22. 2. 2018 [cited 2018 22. 2.]; Available from: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>.
24. Brown, M.B. and S.A. Jones, *Hyaluronic acid: A unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin*, in *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2005. p. 308-318.
25. Liao, Y.H., et al., *Hyaluronan: Pharmaceutical characterization and drug delivery*, in *Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents*. 2005. p. 327-342.
26. Scott, J.E. and F. Heatley, *Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: A 13 C NMR study*. 1999. p. 4850-4855.
27. Lapčák, L., et al., *Hyaluronan: Preparation, structure, properties, and applications*. *Chemical Reviews*, 1998. **98**(8).
28. Volpi, N., et al., *Role, Metabolism, Chemical Modifications and Applications of Hyaluronan*, in *Current Medicinal Chemistry*. 2009. p. 1718-1745.
29. Schiraldi, C., A.L. Gatta, and M. De Rosa, *20 Biotechnological Production and Application of Hyaluronan*.
30. Gonzalez Rico, J., et al., *The role of versican in the skin ECM and its interaction with hyaluronic acid*. *Biomecánica*, 2019. **27**(1).
31. Boeriu, C.G., et al., *Production Methods for Hyaluronan*. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2013. **2013**: p. 1-14.
32. Altman, R.D., *Intra-articular Sodium Hyaluronate in Osteoarthritis of the Knee*. 2000.
33. Prehm, P., *Hyaluronate is synthesized at plasma membranes*. *Biochem J*, 1984. **220**(2): p. 597-600.
34. Swann, D.A., *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA 17 BBA 25903 STUDIES ON HYALURONIC ACID I. THE PREPARATION AND PROPERTIES OF ROOSTER COMB HYALURONIC ACID*.
35. Balazs, E.A., *Viscoelastic Properties of Hyaluronan and Its Therapeutic Use*, in *Chemistry and Biology of Hyaluronan*, H. Garg, G., Hales, C., A., Editor. 2004, Elsevier Science. p. 415-456.
36. Fallacara, A., et al., *Hyaluronic acid in the third millennium*, in *Polymers*. 2018, MDPI AG.
37. Uthman, I., *Intra-articular therapy in osteoarthritis*.
38. Schanté, C.E., et al., *Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications*, in *Carbohydrate Polymers*. 2011. p. 469-489.
39. Burdick, J.A. and G.D. Prestwich, *Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications*. *Advanced Materials*, 2011. **23**(12).
40. Serban, M.A. and A. Skardal, *Hyaluronan chemistries for three-dimensional matrix applications*, in *Matrix Biology*. 2019, Elsevier B.V. p. 337-345.

41. Pandit, A.H., N. Mazumdar, and S. Ahmad, *Periodate oxidized hyaluronic acid-based hydrogel scaffolds for tissue engineering applications*, in *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019, Elsevier B.V. p. 853-869.
42. Cumpstey, I., *Chemical modification of polysaccharides*. ISRN Org Chem, 2013. **2013**: p. 417672.
43. Khunmanee, S., Y. Jeong, and H. Park, *Crosslinking method of hyaluronic-based hydrogel for biomedical applications*. *Journal of Tissue Engineering*, 2017. **8**.
44. Si, H., et al., *3D Bioprinting of the Sustained Drug Release Wound Dressing with Double-Crosslinked Hyaluronic-Acid-Based Hydrogels*. *Polymers (Basel)*, 2019. **11**(10).
45. Li, L., et al., *Biodegradable and injectable in situ cross-linking chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for postoperative adhesion prevention*. *Biomaterials*, 2014. **35**(12): p. 3903-17.
46. D'Arrigo, G., et al., *Hyaluronic acid methacrylate derivatives and calcium alginate interpenetrated hydrogel networks for biomedical applications: physico-chemical characterization and protein release*. *Colloid and Polymer Science*, 2012. **290**(15): p. 1575-1582.
47. Nakajima, N. and Y. Ikada, *Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media*, in *Bioconjugate Chem.* 1995. p. 30-30.
48. Bulpitt, P. and D. Aeschlimann, *New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: Preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels*. 1999.
49. Su, W.Y., Y.C. Chen, and F.H. Lin, *Injectable oxidized hyaluronic acid/adipic acid dihydrazide hydrogel for nucleus pulposus regeneration*. *Acta Biomater*, 2010. **6**(8): p. 3044-55.
50. Schneider, A., et al., *Layer-by-layer films from hyaluronan and amine-modified hyaluronan*. *Langmuir*, 2007. **23**(5): p. 2655-2662.
51. D'Este, M., D. Eglin, and M. Alini, *A systematic analysis of DMTMM vs EDC/NHS for ligation of amines to Hyaluronan in water*. *Carbohydrate Polymers*, 2014. **108**(1): p. 239-246.
52. Bernkop-Schnürch, A., *Thiomers: A new generation of mucoadhesive polymers*, in *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005. p. 1569-1582.
53. Puri, V., et al., *Thiolation of Biopolymers for Developing Drug Delivery Systems with Enhanced Mechanical and Mucoadhesive Properties: A Review*. *Polymers (Basel)*, 2020. **12**(8).
54. Ma, X., A. Bussoniere, and Q. Liu, *A facile sonochemical synthesis of shell-stabilized reactive microbubbles using surface-thiolated bovine serum albumin with the Traut's reagent*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2017. **36**: p. 454-465.
55. Wang, X., et al., *Gold nanorod biochip functionalization by antibody thiolation*. *Talanta*, 2015. **136**: p. 1-8.
56. Laffleur, F., J. Wagner, and A. Mahmood, *In vitro and ex vivo evaluation of biomaterials' distinctive properties as a result of thiolation*. *Future Medicinal Chemistry*, 2015. **7**(4): p. 449-457.
57. Wang, X., et al., *Comparison of four methods for the biofunctionalization of gold nanorods by the introduction of sulfhydryl groups to antibodies*. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 2017. **8**(1): p. 372-380.
58. Liu, Y., et al., *Development of an injectable thiolated icariin functionalized collagen/hyaluronic hydrogel to promote cartilage formation: In vitro and in vivo*. *Journal of Materials Chemistry B*, 2019. **7**(17): p. 2845-2854.

59. Agrahari, V., et al., *Stimuli-sensitive thiolated hyaluronic acid based nanofibers: Synthesis, preclinical safety and in vitro anti-HIV activity*. *Nanomedicine*, 2016. **11**(22): p. 2935-2958.
60. Bermejo-Velasco, D., et al., *Modulating Thiol p K a Promotes Disulfide Formation at Physiological pH: An Elegant Strategy to Design Disulfide Cross-Linked Hyaluronic Acid Hydrogels*. *Biomacromolecules*, 2019. **20**(3): p. 1412-1420.
61. Muselík, J., *Pharmaceutical Applications of Near-Infrared Spectroscopy*. Chemické Listy, 2012. **106**: p. 10-15.
62. Kast, C.E., A. Bernkop-Schnu, and K. Rch, *Thiolated polymers * thiomers: development and in vitro evaluation of chitosan}thioglycolic acid conjugates*.
63. Oh, S., et al., *Optimal design for studying mucoadhesive polymers interaction with gastric mucin using a quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D): Comparison of two different mucin origins*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2015. **96**: p. 477-483.
64. Laffleur, F., J. Wagner, and J. Barthelmes, *A potential tailor-made hyaluronic acid buccal delivery system comprising rotigotine for Parkinson's disease?* *Future Medicinal Chemistry*, 2015. **7**(10): p. 1225-1232.
65. Serban, M.A., G. Yang, and G.D. Prestwich, *Synthesis, characterization and chondroprotective properties of a hyaluronan thioethyl ether derivative*. *Biomaterials*, 2008. **29**(10): p. 1388-99.
66. Asim, M.H., et al., *S-protected thiolated hyaluronic acid: In-situ crosslinking hydrogels for 3D cell culture scaffold*. *Carbohydr Polym*, 2020. **237**: p. 116092.
67. Oryan, A., et al., *Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds*. *Int J Biol Macromol*, 2018. **107**(Pt A): p. 678-688.
68. Park, K., H. Park, and S.W.S. Waleed, *Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery*. 1. ed. 1993: Taylor and Francis Group, LLC. 1-254.
69. Mahinroosta, M., et al., *Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications*, in *Materials Today Chemistry*. 2018, Elsevier Ltd. p. 42-55.
70. Bale, S., et al., *A comparison of two amorphous hydrogels in the debridement of pressure sores*. *J Wound Care*, 1998. **7**(2): p. 65-8.
71. Zhang, K., et al., *Self-recoverable semi-crystalline hydrogels with thermomechanics and shape memory performance*. *Science China Materials*, 2019. **62**(4): p. 586-596.
72. Li, Y., et al., *Supramolecular hydrogels: Mechanical strengthening with dynamics*. *Polymer*, 2020. **210**.
73. Oh, K.S., et al., *Hydrogen-bonded polymer gel and its application as a temperature-sensitive drug delivery system*. *Biomaterials*, 2004. **25**(12): p. 2393-2398.
74. Zhang, H., et al., *Cellulose Anionic Hydrogels Based on Cellulose Nanofibers As Natural Stimulants for Seed Germination and Seedling Growth*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017. **65**(19): p. 3785-3791.
75. Du, H., et al., *Injectable cationic hydrogels with high antibacterial activity and low toxicity*. *Polymer Chemistry*, 2016. **7**(36): p. 5620-5624.
76. Clough, H.C., et al., *Neutrally charged self-assembling peptide hydrogel recapitulates in vitro mechanisms of breast cancer progression*. *Materials Science and Engineering C*, 2021. **127**.
77. Baker, J.P., H.W. Blanch, and J.M. Prausnitz, *~UTTERWQORTH ~'~E I N E M A N N Swelling properties of acrylamide-based ampholytic hydrogels: comparison of experiment with theory*. 1995. p. 1061-1069.

78. Ahmed, E.M., *Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review*, in *Journal of Advanced Research*. 2015, Elsevier B.V. p. 105-121.
79. Ullah, F., et al., *Classification, processing and application of hydrogels: A review*, in *Materials Science and Engineering C*. 2015, Elsevier Ltd. p. 414-433.
80. Ullah, A. and S.I. Lim, *Bioinspired tunable hydrogels: An update on methods of preparation, classification, and biomedical and therapeutic applications*. *Int J Pharm*, 2022. **612**: p. 121368.
81. Lima, C.S.A., et al., *An Updated Review of Macro, Micro, and Nanostructured Hydrogels for Biomedical and Pharmaceutical Applications*. *Pharmaceutics*, 2020. **12**(10).
82. Hennink, W.E. and C.F. van Nostrum, *Novel crosslinking methods to design hydrogels*, in *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012. p. 223-236.
83. Qureshi, D., et al., *Introduction of biopolymers: Food and biomedical applications*, in *Biopolymer-Based Formulations: Biomedical and Food Applications*. 2020, Elsevier. p. 1-45.
84. Hoare, T.R. and D.S. Kohane, *Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges*, in *Polymer*. 2008, Elsevier BV. p. 1993-2007.
85. Bell, C.L. and N.A. Peppas, *Modulation of drug permeation through interpolymer complexed hydrogels for drug delivery applications*, in *Journal of Controlled Release*. 1996. p. 201-207.
86. Tian, Y., et al., *A facile approach to prepare tough and responsive ultrathin physical hydrogel films as artificial muscles*. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2017. **9**(39): p. 34349-34355.
87. Wang, X. and H.G. Spencer, *Calcium alginate gels: formation and stability in the presence of an inert electrolyte*. 1998. p. 2759-2764.
88. Tuncaboylu, D.C., et al., *Structure optimization of self-healing hydrogels formed via hydrophobic interactions*. *Polymer*, 2012. **53**(24): p. 5513-5522.
89. Zhang, Y., et al., *Mechanically redox-tunable hydrogels reinforced by hydrophobic association and metal ion coordination*. *Materials Chemistry and Physics*, 2018. **207**: p. 175-180.
90. Gupta, D., C.H. Tator, and M.S. Shoichet, *Fast-gelling injectable blend of hyaluronan and methylcellulose for intrathecal, localized delivery to the injured spinal cord*. *Biomaterials*, 2006. **27**(11): p. 2370-2379.
91. Nowak, A.P., et al., *Rapidly recovering hydrogel scaffolds from self-assembling diblock copolypeptide amphiphiles*. *Nature*, 2002. **417**(6887): p. 424-428.
92. Zhang, L., et al., *A composite hydrogel of chitosan/heparin/poly (gamma-glutamic acid) loaded with superoxide dismutase for wound healing*. *Carbohydr Polym*, 2018. **180**: p. 168-174.
93. Tang, S., et al., *Chapter 3 - Physical hydrogels based on natural polymers*, in *Hydrogels Based on Natural Polymers*, Y. Chen, Editor. 2020, Elsevier. p. 51-89.
94. Hoffman, A.S., *Hydrogels for biomedical applications*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012. **64**: p. 18-23.
95. Trombino, S., et al., *Strategies for hyaluronic acid-based hydrogel design in drug delivery*, in *Pharmaceutics*. 2019, MDPI AG.
96. Jiang, Y., et al., *Click hydrogels, microgels and nanogels: Emerging platforms for drug delivery and tissue engineering*, in *Biomaterials*. 2014, Elsevier Ltd. p. 4969-4985.
97. Jiang, W., et al., *Cell-laden microfluidic microgels for tissue regeneration*, in *Lab on a Chip*. 2016, Royal Society of Chemistry. p. 4482-4506.

98. Pekel, N., *Radiation crosslinking of biodegradable hydroxypropylmethylcellulose*. Carbohydrate Polymers, 2004. **55**(2): p. 139-147.
99. Lee, J.G., et al., *Radiation-Based Crosslinking Technique for Enhanced Thermal and Mechanical Properties of HDPE/EVA/PU Blends*. Polymers (Basel), 2021. **13**(16).
100. Abd Alla, S.G., M. Sen, and A.W. El-Naggar, *Swelling and mechanical properties of superabsorbent hydrogels based on Tara gum/acrylic acid synthesized by gamma radiation*. Carbohydr Polym, 2012. **89**(2): p. 478-85.
101. Wan Ishak, W.H., et al., *Drug delivery and in vitro biocompatibility studies of gelatin-nanocellulose smart hydrogels cross-linked with gamma radiation*. Journal of Materials Research and Technology, 2021. **15**: p. 7145-7157.
102. Heck, T., et al., *Enzyme-catalyzed protein crosslinking*. Appl Microbiol Biotechnol, 2013. **97**(2): p. 461-75.
103. Teixeira, L.S., et al., *Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: emerging strategies for tissue engineering*. Biomaterials, 2012. **33**(5): p. 1281-90.
104. Akhtar, M.F., M. Hanif, and N.M. Ranjha, *Methods of synthesis of hydrogels ... A review*, in *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2016, Elsevier B.V. p. 554-559.
105. Hozumi, T., et al., *Injectable Hydrogel with Slow Degradability Composed of Gelatin and Hyaluronic Acid Cross-Linked by Schiff's Base Formation*. Biomacromolecules, 2018. **19**(2): p. 288-297.
106. Lechner, C., M. Jelkmann, and A. Bernkop-Schnürch, *Thiolated polymers: Bioinspired polymers utilizing one of the most important bridging structures in nature*, in *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2019, Elsevier B.V. p. 191-221.
107. Summonte, S., et al., *Thiolated polymeric hydrogels for biomedical application: Cross-linking mechanisms*, in *Journal of Controlled Release*. 2021, Elsevier B.V. p. 470-482.
108. Lee, H.J., G.M. Fernandes-Cunha, and D. Myung, *In situ-forming hyaluronic acid hydrogel through visible light-induced thiol-ene reaction*. Reactive and Functional Polymers, 2018. **131**: p. 29-35.
109. Mergy, J., et al., *Modification of polysaccharides via thiol-ene chemistry: A versatile route to functional biomaterials*. Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry, 2012. **50**(19): p. 4019-4028.
110. Gyarmati, B., Á. Némethy, and A. Szilágyi. *Reversible disulphide formation in polymer networks: A versatile functional group from synthesis to applications*. in *European Polymer Journal*. 2013.
111. Das, D., et al., *Synthesis and Characterization of Superabsorbent Cellulose-Based Hydrogel for Agriculture Application*. Starch - Stärke, 2020. **73**(1-2): p. 1900284.
112. Li, J., X. Jia, and L. Yin, *Hydrogel: Diversity of Structures and Applications in Food Science*. Food Reviews International, 2021. **37**(3): p. 313-372.
113. Saxena, A.K., *Synthetic biodegradable hydrogel (PleuraSeal) sealant for sealing of lung tissue after thoracoscopic resection*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2010. **139**(2): p. 496-7.
114. Hunt, J.A., et al., *Hydrogels for tissue engineering and regenerative medicine*. J Mater Chem B, 2014. **2**(33): p. 5319-5338.
115. Kesharwani, P., et al., *Biomedical applications of hydrogels in drug delivery system: An update*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2021. **66**: p. 102914.
116. Zarebinski, T.I., et al., *Thiolated hyaluronan-based hydrogels crosslinked using oxidized glutathione: an injectable matrix designed for ophthalmic applications*. Acta Biomater, 2014. **10**(1): p. 94-103.

117. Bauer, C., et al., *Hyaluronan thiomers gel/matrix mediated healing of articular cartilage defects in New Zealand White rabbits-a pilot study*. J Exp Orthop, 2017. **4**(1): p. 14.
118. Choh, S.Y., D. Cross, and C. Wang, *Facile synthesis and characterization of disulfide-cross-linked hyaluronic acid hydrogels for protein delivery and cell encapsulation*. Biomacromolecules, 2011. **12**(4): p. 1126-36.
119. Čůta, F., *Instrumentální analýza: celostátní vysokoškolská učebnice pro studenty vysokých škol technických skupin oborů 27-Technická chemie silikátů, 28-Technická chemie, 31-Textil a oděvnictví*. 1986, Praha: Státní nakladatelství technické literatury.
120. Němcová, I., L. Čermáková, and P. Rychlovský, *Spektrometrické analytické metody I*. 2004: Univerzita Karlova.
121. Theophanides, T., *Introduction to Infrared Spectroscopy*, in *Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology*. 2012, InTech.
122. Khan, S.A., et al., *Fourier transform infrared spectroscopy: Fundamentals and application in functional groups and nanomaterials characterization*, in *Handbook of Materials Characterization*. 2018, Springer International Publishing. p. 317-344.
123. Dutta, A., *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, in *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization*. 2017, Elsevier. p. 73-93.
124. Pykett, I.L., et al., *Principles of nuclear magnetic resonance imaging*. Radiology, 1982. **143**(1): p. 157-68.
125. Holzgrabe, U., I. Wawer, and B. Diehl, *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*. Elsevier.
126. Dračinský, M., *NMR spektroskopie pro chemiky*. První vydání ed, ed. T. Belloň. 2021, Praha: Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta.
127. Günther, H., -, *NMR spectroscopy : basic principles, concepts, and applications in chemistry*. 3rd, completely rev. and updated ed. ed. 2013, Weinheim: Wiley-VCH.
128. Atkins, P.W.-. *Fyzikální chemie*. Vyd. 1. ed. 2013, Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze.
129. Antcliffe, D. and A.C. Gordon, *Metabonomics and intensive care*. Crit Care, 2016. **20**: p. 68.
130. Vernon-Parry, K.D., *Scanning electron microscopy: an introduction*. III-Vs Review, 2000. **13**(4): p. 40-44.
131. Omidí, M., et al., *Characterization of biomaterials*. 2017: p. 97-115.
132. Zhou, W., et al., *Fundamentals of Scanning Electron Microscopy (SEM)*, in *Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications*, W. Zhou and Z.L. Wang, Editors. 2007, Springer New York: New York, NY. p. 1-40.
133. Ali, A.S., *Application of Nanomaterials in Environmental Improvement*. Nanotechnology and the Environment, 2020.
134. Santana, B.P., et al., *Comparing different methods to fix and to dehydrate cells on alginate hydrogel scaffolds using scanning electron microscopy*. Microsc Res Tech, 2015. **78**(7): p. 553-61.
135. Hackley, V.A. and C.F. Ferraris, *The Use of Nomenclature in Dispersion Science and Technology*. 2001: U.S. Department of Commerce, Technology Administration, National Institute of Standards and Technology.
136. Aho, J., et al., *Rheology as a tool for evaluation of melt processability of innovative dosage forms*. Int J Pharm, 2015. **494**(2): p. 623-642.
137. *Seminář reologie* 2015; Available from: https://www.pragolab.cz/files/download/Seminar_reologie_2015.pdf.

138. *Rheology in use*. (c)2022; Available from: <https://wiki.anton-paar.com/en/basics-of-rheology/rheology-in-use/>.
139. Musilová, L., et al., *Cross-Linked Gelatine by Modified Dextran as a Potential Bioink Prepared by a Simple and Non-Toxic Process*. *Polymers*, 2022. **14**(3): p. 391.
140. Hong, B.M., et al., *Self-crosslinkable hyaluronate-based hydrogels as a soft tissue filler*. *Int J Biol Macromol*, 2021. **185**: p. 98-110.
141. Xia, D., et al., *Redox/pH-Responsive Biodegradable Thiol-Hyaluronic Acid/Chitosan Charge-Reversal Nanocarriers for Triggered Drug Release*. *Polymers (Basel)*, 2021. **13**(21).
142. Guo, Z., S. Mi, and W. Sun, *The multifaceted nature of catechol chemistry: bioinspired pH-initiated hyaluronic acid hydrogels with tunable cohesive and adhesive properties*. *J Mater Chem B*, 2018. **6**(39): p. 6234-6244.
143. Collins, M.N. and C. Birkinshaw, *Morphology of crosslinked hyaluronic acid porous hydrogels*. *Journal of Applied Polymer Science*, 2011. **120**(2): p. 1040-1049.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ATR	zeslabený úplný odraz (technika měření FTIR spektroskopie)
BCP	nanočástice fosforečnanu vápenatého
BDDE	1,4-butandioldiglycidyl ether
C	uhlík
Ca ²⁺	vápenaté kationty
CPC	cetylpyridiniumchlorid
CSA	cysteaminu
C=O	karbonylová skupina
Da	jednotka dalton (kDa, MDa)
DMEM	kultivační činidlo
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DMTMM	4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-N-methylmorfolinium-chlorid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DS	stupeň substituce (%)
DTP	3,3-dithiobis (propionylhydrazid)
DTT	dithiothreitol
DVS	divinylsulfon
D ₂ O	těžká voda
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FIR	vzdálená oblast infračerveného záření
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GAS	glukosaminoglykany
G*	komplexní modul (Pa)

G'	soufázový („storage“) modul (Pa)
G''	ztrátový („loss“) modul (Pa)
H	vodík
HA	kyselina hyaluronová
HA-DTP	hyaluronan modifikovaný 3,3-dithiobis (propionylhydrazid)
HA-MA	hyaluronan modifikovaný anhydridem kyseliny methakrylové
HA(Na)	hyaluronan (sodná sůl kyseliny hyaluronové)
HA-SH	thiolovaný hyaluronan
HA-SH-DTT	thiolovaný hyaluronan s přídavkem DTT
HOBt	1-hydroxybenzotriazolu
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
I _{HA(Na)}	integrace referenčního píku (N-acetylu)
I _{SH}	hodnota integrace píku volné thiolové skupiny
I _{s-s}	hodnota integrace píku disulfidové vazby
IR	infrared (infračervené)
K ⁺	draselné kationty
LVČ	limitní viskozitní číslo
Mg ²⁺	hořečnaté kationty
M _w	molekulová hmotnost (kDa, popř. MDa)
MIR	střední oblast infračerveného záření
N	dusík
Na ⁺	sodné kationty
NaIO ₄	jodistan sodný
NIR	blízká oblast infračerveného záření
NH	aminová skupina
NHS	N-hydroxysuckcinimidu

NMR	nukleární magnetická rezonance
NP	pulpozní jádro
O	kyslík
OH	hydroxylová skupina
PEG	polyethylenglykol
pH	záporný dekadický logaritmus H_3O^+ iontů
Qmili	deionizovaná voda
RFP	riboflavinfosfát
RNA	ribonukleová kyselina
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SH	thiolová skupina
S-S	disulfidová vazba
t	čas (s)
η^*	komplexní viskozita (Pa·s)
ω	úhlová frekvence (rad/s)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Opakující se disacharidové jednotky hyaluronanu.....	19
Obr. 2 Možné aplikace HA(Na) a jeho derivátů.....	23
Obr. 3 Rozdíly mezi síťováním a konjugací polymeru [36].....	25
Obr. 4 Funkční skupiny vhodné k modifikaci hyaluronanu [39].....	25
Obr. 5 Schéma reakcí s hydroxylovou skupinou na hyaluronanu – a) reakce s BDDE v alkalickém prostředí, b) reakce BDDE v kyselém prostředí, c) reakce s DVS, d) reakce s anhydridem kyseliny oktenyljantarové, e) reakce s anhydridem kyseliny methakrylové [36].....	26
Obr. 6 Mechanismus oxidace HA(Na) jodistanem sodným [41].....	27
Obr. 7 Schéma esterifikací hyaluronanu za použití alkyhalogenidů, tosylátu, derivátu diazomethanu a epoxidu [38].....	28
Obr. 8 Reakční mechanismus amidace s EDC [48].....	29
Obr. 9 Schéma reakce HA(Na) s DMTMM [51].....	30
Obr. 10 Reakce 2-iminothiolanu s biopolymerem [55].....	31
Obr. 11 Syntéza thiolovaného HA(Na) L-cysteinem [56].....	31
Obr. 12 Reakce ethylensulfidu s HA(Na) [7].....	32
Obr. 13 Schéma syntézy thiolovaného hyaluronanu cysteaminem [14].....	32
Obr. 14: Redukce disulfidické vazby pomocí DTT za vzniku thiolovaného polymeru [59].....	33
Obr. 15: Příklad vysušeného hydrogelu pomocí lyofilizace (vlevo) a hydratované formy hydrogelu (vpravo).....	36
Obr. 16 Klasifikace hydrogelů podle různých kritérií [69].	36
Obr. 17 Příklad (a) kationtového a (b) aniontového hydrogelu [69].....	37
Obr. 18 Rozdělení hydrogelů podle velikosti [81].....	37
Obr. 19 Fyzikální síťování pomocí vodíkové vazby hyaluronanu a methylcelulózy [84]. ..	39
Obr. 20 Mechanismus přípravy hydrogelu na bázi alginátu a Ca^{2+} [93].....	40
Obr. 21 Příklad nukleofilního ataku symetrické disulfidické vazby [6].	42
Obr. 22 Princip Michaelovy adice [107].	43
Obr. 23 Průběh thiol-ene adice hyaluronanu [108].....	43
Obr. 24 Mechanismus síťování thiolovaného hyaluronanu pomocí vzdušného kyslíku [10].	44
Obr. 25 Elektromagnetické spektrum a jeho rozdělení [120].....	46
Obr. 26 a) FTIR spektrometr, b) schéma Michelsonova interferometru.....	49
Obr. 27 Energetické hladiny rozštěpené působením vnějšího magnetického pole [125] ...	50
Obr. 28 Hlavní části NMR spektrometru [129].....	51
Obr. 29 Hlavní komponenty SEM [133].....	53

Obr. 30 Hlavní části rotačního reometru [137].....	55
Obr. 31 Schéma jednotlivých kroků navrženého experimentu.....	58
Obr. 32 Schéma modifikace hyaluronanu thioly [14].	61
Obr. 33 Redukce disulfidické vazby pomocí DTT	62
Obr. 34 Síťování thiolovaného hyaluronanu vzdušným kyslíkem.....	63
Obr. 35 NMR květy.....	64
Obr. 36 Příklad lyofilizovaného vzorku a hydrogelu na bázi HA-SH-DTT	72
Obr. 37 (a) SEM snímek porézní struktury thiolovaného hydrogelu ($M_w = 124$ kDa) a (b) detailní výřez pórovité struktury thiolovaného hydrogelu ($M_w = 124$ kDa)	78
Obr. 38 Snímky SEM struktury analyzovaných hydrogelů s různou molekulovou hmotností – číslo (2 a 3) označuje koncentraci HA-SH-DTT hydrogelu a písmeno (A-D) rostoucí molekulovou hmotnost polymeru (124 - 600 kDa).....	80

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Navolené podmínky syntézy thiolovaného HA(Na)	61
Tab. 2 Shrnutí podmínek reakce HA-SH s DTT.....	63
Tab. 3 Shrnutí parametrů syntézy HA-SH.....	69
Tab. 4 Dosažené stupně substituce (<i>DS</i>) thiolových skupin pro zkoumané molekulové hmotnosti hyaluronanu	72
Tab. 5 Plocha pod píkem spočítaná v oblasti 3000 – 3700 cm ⁻¹ pomocí FTIR spektra	101
Tab. 6 Plocha pod píkem spočítaná v oblasti 2400 – 2600 cm ⁻¹ pomocí FTIR spektra	101

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 FTIR spektrum čistého (a) HA(Na), (b) HA-SH a (c) HA-SH-DTT pro molekulovou hmotnost $M_w = 370$ kDa.....	69
Graf 2 NMR spektrum čistého (a) HA(Na), (b) HA-SH a (c) HA-SH-DTT pro molekulovou hmotnost $M_w = 370$ kDa.....	71
Graf 3 Závislost doby gelace na molekulové hmotnosti HA-SH (124 kDa, 243 kDa, 370 kDa, 600 kDa) thiolovaného hyaluronanu (koncentrace polymeru 2 a 3 % w/w)	74
Graf 4 Závislost „storage“ modulu na molekulové hmotnosti HA-SH, „storage“ modul byl měřen v rozsahu úhlové frekvence 1-10 rad/s	76
Graf 5 Závislost „storage“ modulu (G') a komplexní viskozity (η^*) na úhlové frekvenci (ω), která byla měřena v rozsahu 0,1-100 rad/s	78
Graf 6 Závislost porozity HA-SH-DTT na molekulové hmotnosti a koncentraci (2% (w/w) a 3% (w/w) vzorků.....	80
Graf 7 FTIR spektrum čistého HA(Na), HA-SH a HA-SH-DTT ($M_w = 243$ kDa)	100
Graf 8 FTIR spektrum čistého HA(Na), HA-SH a HA-SH-DTT ($M_w = 370$ kDa).....	100
Graf 9 FTIR spektrum čistého HA(Na), HA-SH a HA-SH-DTT ($M_w = 600$ kDa).....	101
Graf 10 NMR spektrum čistého HA(Na), HA-SH a HA-SH-DTT (124 kDa -vpravo, 243kDa – vlevo).....	102
Graf 11 NMR spektrum čistého HA(Na), HA-SH a HA-SH-DTT (600 kDa).....	102
Graf 12 Závislost „storage“ (G') a „loss“ (G'') modulu na čase (t)	103

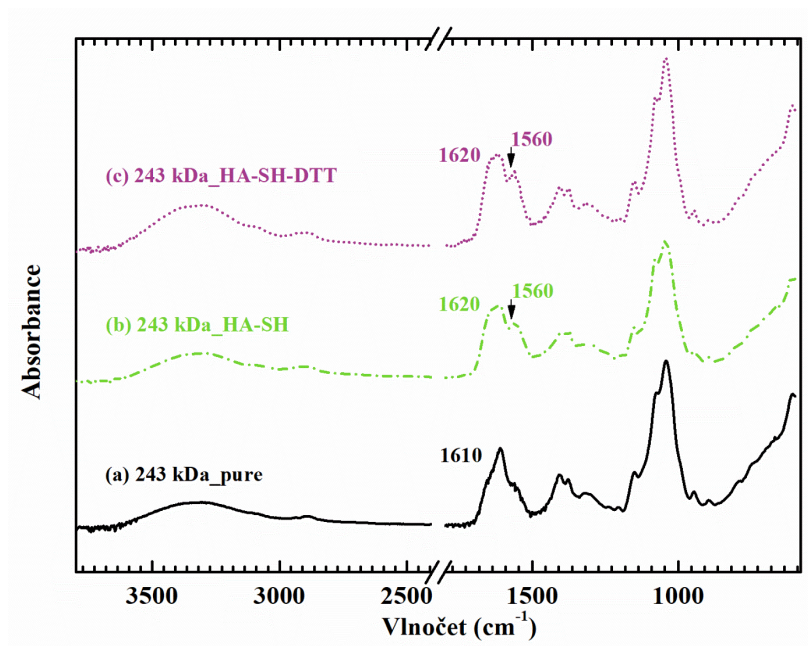
SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: FTIR spektra thiolovaného hyaluronanu HA-SH

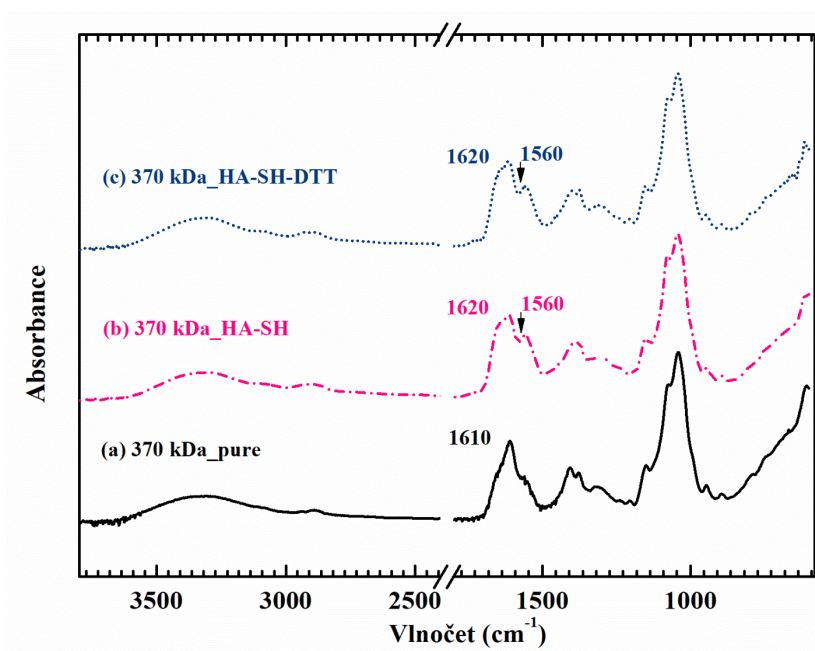
Příloha P II: NMR spektra thiolovaného hyaluronanu HA-SH

Příloha P III: Reakční kinetika thiolovaného hyaluronanu HA-SH

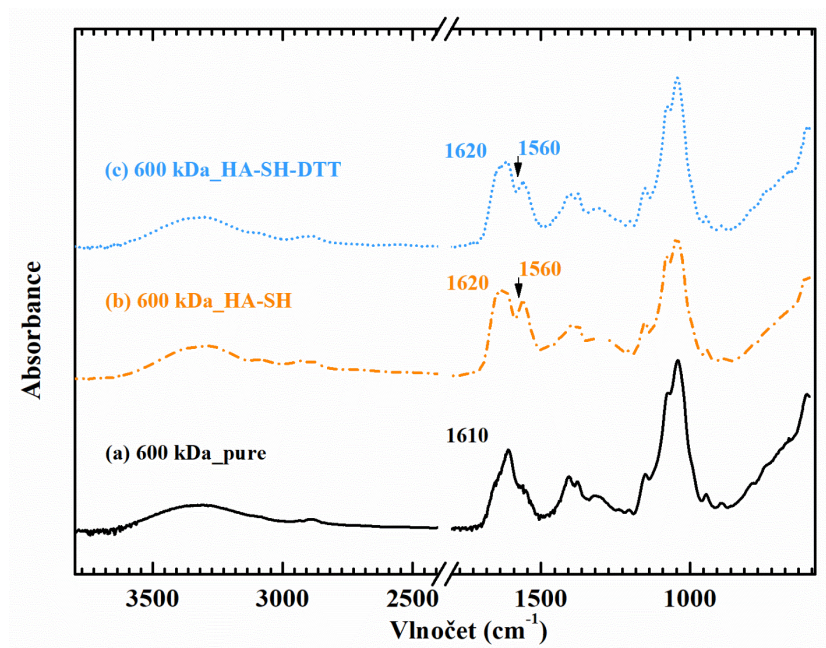
PŘÍLOHA PI: FTIR SPEKTRA THIOLOVANÉHO HYALURONANU HA-SH



Graf 7 FTIR spektrum čistého HA(Na), HA-SH a HA-SH-DTT ($M_w = 243$ kDa)



Graf 8 FTIR spektrum čistého HA(Na), HA-SH a HA-SH-DTT ($M_w = 370$ kDa)



Graf 9 FTIR spektrum čistého HA(Na), HA-SH a HA-SH-DTT ($M_w = 600$ kDa)

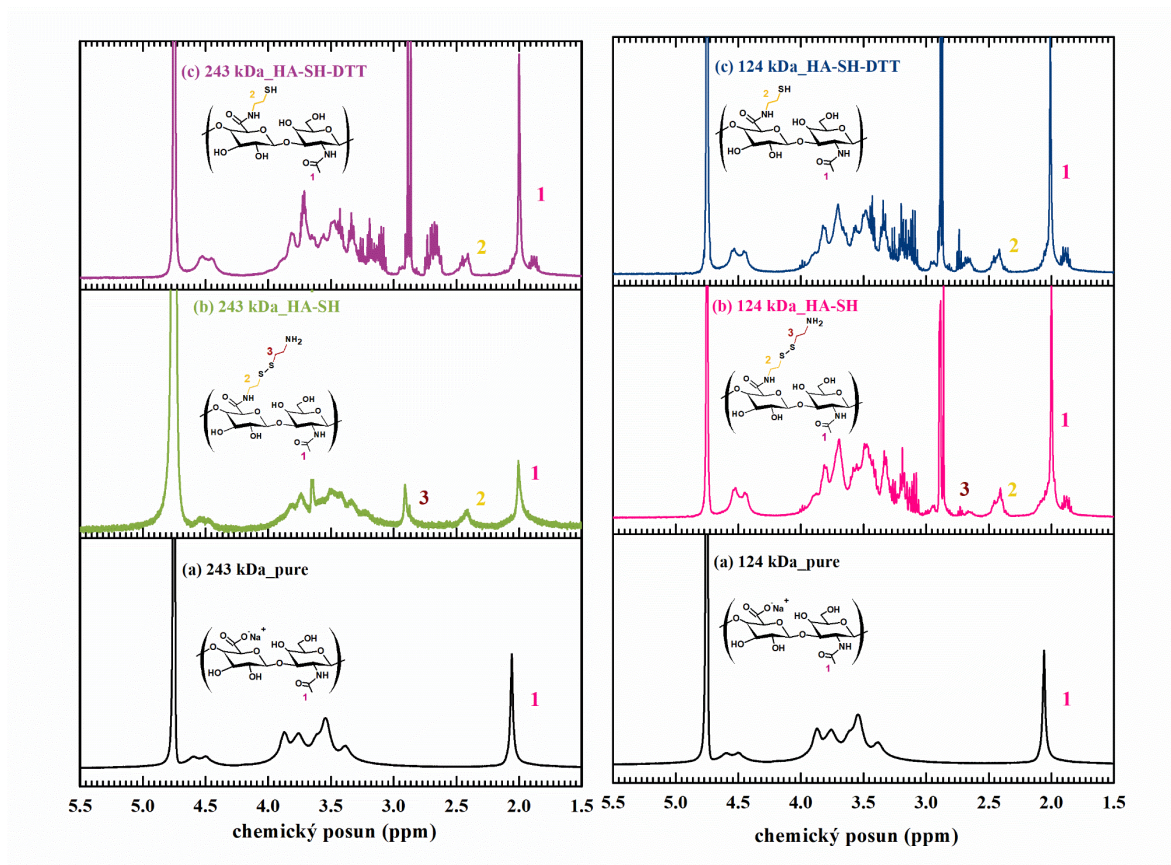
Tab. 5 Plocha pod píkem spočítaná v oblasti 3000 – 3700 cm^{-1} pomocí FTIR spektra

Molekulová hmotnost [kDa]	Plocha pod píkem		
	HA(Na)_pure	HA-SH	HA-SH-DTT
124	2,459	2,670	2,931
243	1,074	2,508	4,671
370	0,689	2,373	2,702
600	1,125	2,695	2,979

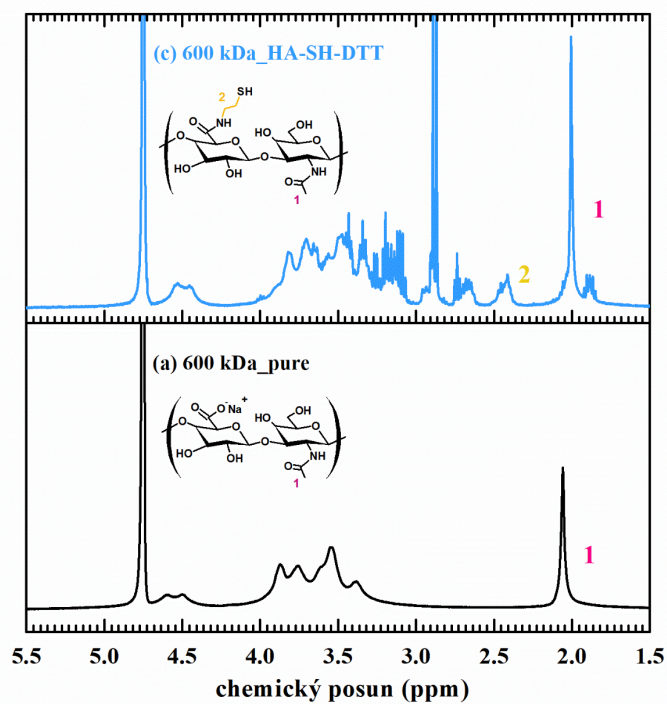
Tab. 6 Plocha pod píkem spočítaná v oblasti 2400 – 2600 cm^{-1} pomocí FTIR spektra

Molekulová hmotnost [kDa]	Plocha pod píkem		
	HA(Na)_pure	HA-SH	HA-SH-DTT
124	0	0,044	0,012
243	0	0,017	0,012
370	0	0,029	0,033
600	0	0,082	0,017

P II: NMR SPEKTRA THIOLOVANÉHO HYALURONANU HA-SH

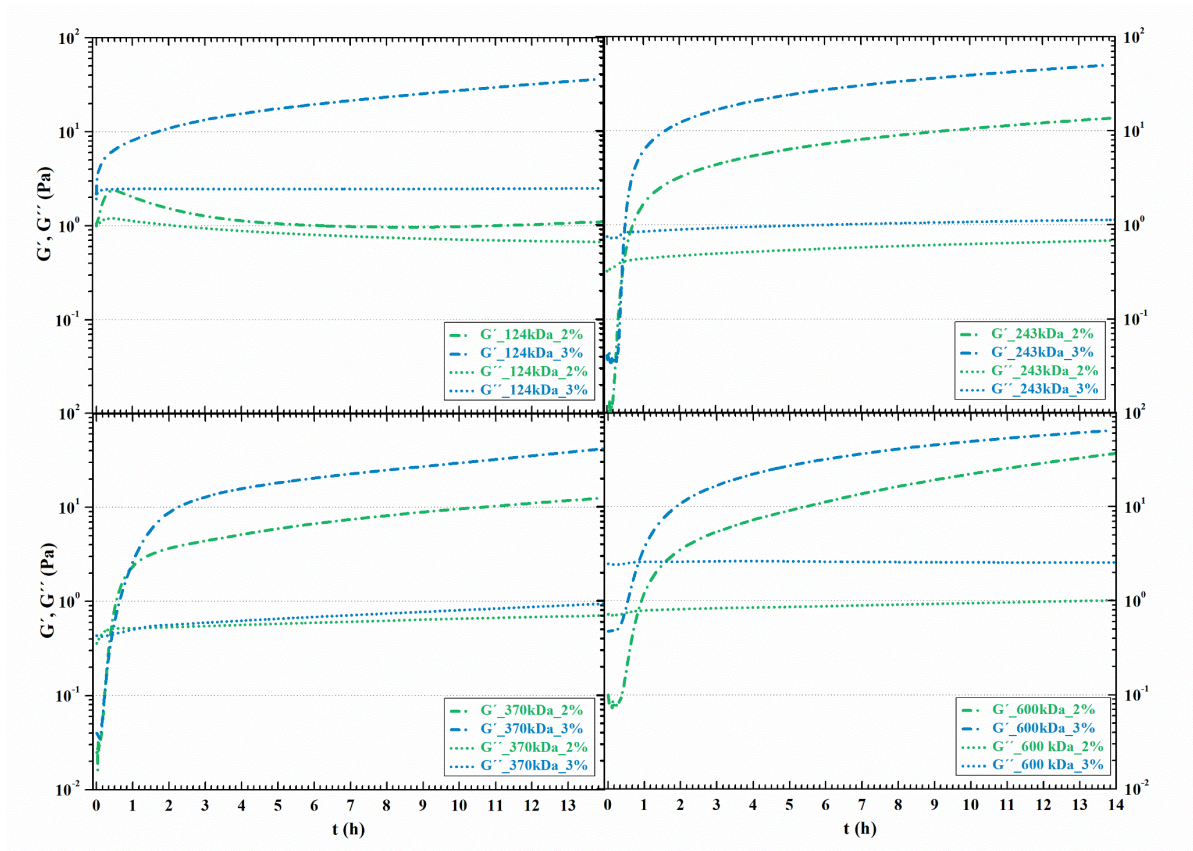


Graf 10 NMR spektrum čistého HA(Na), HA-SH a HA-SH-DTT (124 kDa -vpravo, 243kDa – vlevo)



Graf 11 NMR spektrum čistého HA(Na), HA-SH a HA-SH-DTT (600 kDa)

P III: REAKČNÍ KINETIKA THIOLOVANÉHO HYALURONANU HA-SH



Graf 12 Závislost „storage“ (G') a „loss“ (G'') modulu na čase (t)