

Využití dopaminu při přípravě hydrogelů na bázi thiolovaného hyaluronanu

Bc. et Bc. Viktorie Daňková

Diplomová práce
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. et Bc. Viktorie Daňková
Osobní číslo: T22325
Studijní program: N0711A130023 Materiálové inženýrství a nanotechnologie
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Využití dopaminu při přípravě hydrogelů na bázi thiolovaného hyaluronanu

Zásady pro vypracování

- Vypracovat rešerši zabývající se problematikou polymerních crosslinkerů, thiolovaného hyaluronanu, přípravy hydrogelů a možnostmi jejich charakterizace.
- Provést základní experimenty přípravy polymerního crosslinkeru (např. v závislosti na velikosti částic) a hydrogelu na bázi thiolovaného hyaluronanu v závislosti na koncentraci polymeru, molekulové hmotnosti a molárním poměrem látek.
- Připravit hydrogely a provést jejich charakterizaci.
- Zhodnotit vliv výše zmíněných parametrů.

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

Seznam doporučené literatury:

1. Ebnesajjad, 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. Pharmaceutics. 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 diplomové práce: **Ing. Lenka Musilová, Ph.D.**
Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2024**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Petr Smolka, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 20. února 2024

Příloha č. 4 – Prohlášení autorky DP

**PROHLÁŠENÍ AUTORKY
DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou 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 – diplomovou 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 diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky:

.....
podpis studentky

ABSTRAKT

V diplomové práci je představena syntéza crosslinkeru (polydopaminu) pro přípravu hydrogelů na bázi thiolovaného hyaluronanu (HA-SH), ale také syntéza hyaluronanu konjugovaného dopaminem (HA-DA) jako dalšího způsobu využití dopaminu při vývoji inovativních materiálů pro biomedicínské aplikace. Dílčím cílem práce bylo zhodnotit vliv parametrů přípravy polydopaminu (PAD) ve formě částic i trubiček, optimalizovat podmínky syntézy a provést charakterizaci PAD, následně připravit hydrogely na bázi syntetizovaných hyaluronových derivátů a PAD částic/trubiček a provést jejich charakterizaci pomocí dostupných metod. Úspěšné navázání thiolových a katecholových skupin na řetězec hyaluronanu byla potvrzena pomocí NMR spektroskopie. Velikost polymerních klubek HA-SH a HA-DA, a také velikost PAD byla stanovena metodou DLS. Připravené hydrogely byly charakterizovány reologickým měřením z pohledu doby gelace, tuhosti hydrogelů a reverzibility reologického chování po uvolnění napětí. Morfologie PAD částic a trubiček a morfologie a porozita hydrogelů byla studována pomocí SEM. V neposlední řadě byla stanovena botnací kapacita hydrogelů. Na základě měření NMR byla potvrzena úspěšnost navázání thiolových, resp. katecholových, skupin na řetězci HA(Na) se stupněm substituce 9 %, resp. 29 %. Byly připraveny PAD částice s úzkou distribucí velikosti, jejichž velikost byla 627 ± 10 nm. Nejvyšší tuhost vykazovaly hydrogely síťované PAD ve formě trubiček. Dobrou reverzibilitu vykazovaly hydrogely připravené z thiolovaného hyaluronanu HA-SH (z 64 Pa (1%) na 58 Pa (100%) a zpět na 68 Pa (1%)) a hydrogely připravené z hyaluronanu konjugovaného dopaminem HA-DA (ze 45 Pa (1%) na 40 Pa (100%) a zpět na 44 Pa (1%)). Nejnižší reverzibilitu vykazovaly hydrogely síťované PAD (ve formě částic i trubiček, a to pouze 84, resp. 91 %). Nejvyšší porozita byla pozorována u hydrogelů na bázi HA-DA, v jejichž struktuře byly detekovány póry o velikosti (> 100 μ m).

Klíčová slova: Dopamin, hyaluronan, thiolace, hydrogel, reologie, reverzibilita, SEM, botnací kapacita.

ABSTRACT

The synthesis of a crosslinker (polydopamine) for the preparation of hydrogels based on thiolated hyaluronan (HA-SH), but also the synthesis of dopamine-conjugated hyaluronan (HA-DA) as another way to use dopamine in the development of innovative materials for biomedical applications is presented in the thesis. The sub-objectives of this work were to evaluate the influence of polydopamine (PAD) preparation parameters in the form of particles and tubes, to optimize the synthesis conditions and to characterize PAD, and then to prepare hydrogels based on the synthesized hyaluronan derivatives and PAD particles/tubes and to characterize them using available methods. The successful attachment of thiol and catechol groups to the hyaluronan chain was confirmed by NMR spectroscopy. The size of the polymeric HA-SH and HA-DA clubs, as well as the size of the PAD, was determined by DLS. The prepared hydrogels were characterized by rheological measurements in terms of gelation time, hydrogel stiffness and reversibility of rheological behavior after stress release. The morphology of PAD particles and tubes and the morphology and porosity of hydrogels were studied by SEM. Finally, the botnation capacity of the hydrogels was determined. NMR measurements were used to confirm the successful attachment of thiol and catechol groups on the HA(Na) chain with a degree of substitution of 9% and 29%, respectively. PAD particles with a narrow size distribution were prepared with a size of 627 ± 10 nm. The highest stiffness was exhibited by the crosslinked PAD hydrogels in the form of tubes. Hydrogels prepared from thiolated HA-SH hyaluronan (from 64 Pa (1%) to 58 Pa (100%) and back to 68 Pa (1%)) and hydrogels prepared from dopamine-conjugated HA-DA hyaluronan (from 45 Pa (1%) to 40 Pa (100%) and back to 44 Pa (1%)) showed good reversibility. The hydrogels cross-linked with PAD (in the form of particles and tubes, only 84 and 91%, respectively) showed the lowest reversibility. The highest porosity was observed for HA-DA-based hydrogels, in which pores of the size ($> 100 \mu\text{m}$) were detected in the structure.

Keywords: Dopamine, hyaluronan, thiolation, hydrogel, rheology, reversibility, SEM, botnation capacity.

Ráda bych tímto poděkovala paní Ing. Lence Musilové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a vstřícný přístup při konzultacích, které mi v průběhu zpracování diplomové práce věnovala. Dále bych chtěla poděkovat panu Ing. Romanu Kolaříkovi, Ph. D. za jeho cenné rady během konzultací týkajících se reologických měření. Můj velký dík patří také mé nejdražší, která mi byla v průběhu vysokoškolských let velkou oporou a rádcem, a jejíž trpělivost nezná mezí.

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

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	13
SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	14
1 BIOPOLYMERY	16
1.1 DEFINICE A KLASIFIKACE BIOPOLYMERŮ.....	16
1.2 VLASTNOSTI A VYUŽITÍ BIOPOLYMERŮ	18
1.3 KYSELINA HYALURONOVÁ	21
2 HYALURONAN	22
2.1 STRUKTURA HA(Na)	22
2.1.1 Konformace HA(Na) v pevném stavu.....	24
2.1.2 Konformace HA(Na) v roztoku	26
2.2 VÝSKYT HA(Na)	27
2.3 SYNTÉZA A DEGRADACE HA(Na)	28
2.3.1 Syntéza a degradace HA(Na) v lidském těle.....	28
2.3.2 Průmyslová produkce HA(Na).....	29
2.4 VLASTNOSTI A FUNKCE HA(Na).....	30
2.4.2 Biologické funkce HA(Na)	32
2.5 APLIKACE HA(Na)	33
2.6 MODIFIKACE HA(Na).....	33
2.6.1 Modifikace N-acetylové skupiny	34
2.6.2 Modifikace hydroxylové skupiny	35
2.6.3 Modifikace karboxylové skupiny.....	38
2.7 THIOLOVANÝ HYALURONAN	39
2.7.1 Syntéza a struktura HA-SH	40
2.7.2 Vlastnosti thiolovaného hyaluronanu (HA-SH)	42
2.7.3 Využití HA-SH.....	44
2.8 HYALURONAN KONJUGOVANÝ DOPAMINEM (HA-DA)	44
2.8.1 Syntéza HA-DA	44
2.8.2 Vlastnosti HA-DA.....	46
3 CROSSLINKERY	48
4 POLYDOPAMIN	51
4.1 MONOMER DOPAMIN	51
4.2 SYNTÉZA PAD	54
4.3 STRUKTURA PAD.....	55
4.4 VLASTNOSTI PAD	57
4.5 VYUŽITÍ PAD.....	59

5	PŘÍPRAVA HYDROGELŮ A JEJICH VYUŽITÍ.....	61
5.1	KLASIFIKACE HYDROGELŮ	61
5.2	PŘÍPRAVA HYDROGELŮ	62
5.2.1	Fyzikální síťování	62
5.2.2	Chemické síťování	65
5.2.3	Příprava hydrogelů na bázi thiolovaného hyaluronanu.....	67
5.2.4	Příprava hydrogelu na bázi hyaluronanu konjugovaného dopaminem	69
5.3	VYUŽITÍ HYDROGELŮ	70
5.3.1	Využití hydrogelů na bázi thiolovaného hyaluronanu	70
5.3.2	Využití hydrogelů na bázi polydopaminu	72
6	METODY CHARAKTERIZACE	74
6.1	NUKLEÁRNÍ MAGNETICKÁ REZONANCE (NMR)	74
6.2	DYNAMICKÝ ROZPTYL SVĚTLA (DLS).....	76
6.3	ROTAČNÍ REOMETR	78
6.4	SKENOVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE (SEM).....	82
II	PRAKTICKÁ ČÁST	84
7	POPIS EXPERIMENTU	85
8	POUŽITÉ MATERIÁLY A METODY	87
8.1	POUŽITÉ MATERIÁLY	87
8.2	SYNTÉZA THIOLOVANÉHO HYALURONANU (<i>JEDNOKROKOVÁ</i>).....	87
8.3	SYNTÉZA DOPAMINEM KONJUGOVANÉHO HYALURONANU (HA-DA).....	88
8.4	SYNTÉZA POLYDOPAMINU	89
8.4.1	Syntéza polydopaminu ve formě nanočástic (PAD-NP).....	89
8.4.2	Syntéza polydopaminu ve formě nanotrubiček (PAD-NT).....	90
8.5	PŘÍPRAVA HYDROGELŮ NA BÁZI HA-SH-PAD, HA-DA A HA-SH-HA-DA	92
8.5.1	Příprava HA-SH-PAD.....	92
8.5.2	Příprava HA-DA a HA-SH-HA-DA	92
8.6	METODY CHARAKTERIZACE PŘIPRAVENÝCH PRODUKTŮ (PAD, HA-SH A HA-DA).....	93
8.6.1	NMR.....	93
8.6.2	DLS	95
8.6.3	Rotační reometr	95
8.6.4	SEM.....	96
8.6.5	Botnací testy (swellingy).....	96
9	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	97
9.1	SYNTÉZA HA-SH	97
9.2	SYNTÉZA HA-DA	97
9.3	SYNTÉZA PAD	98

9.3.1	Syntéza PAD-NP.....	98
9.3.2	Syntéza PAD-NT	100
9.5	STANOVENÍ VELIKOSTI POLYMERNÍCH ŘETĚZCŮ A PAD ČÁSTIC A TRUBIČEK.....	104
9.6	PŘÍPRAVA HYDROGELŮ	107
9.6.1	HA-SH hydrogely	107
9.6.2	HA-SH-PAD hydrogely	108
9.6.3	HA-DA a HA-SH-HA-DA hydrogely	109
9.7	REOLOGIE	111
9.7.1	Doba gelace	111
9.7.2	Oscilační testy – stanovení tuhosti hydrogelů.....	113
9.7.3	Reverzibilita reologického chování hydrogelů	121
9.8	POROZITA HYDROGELŮ A MORFOLOGIE PAD-NP A PAD-NT	123
9.9	BOTNACÍ TESTY (<i>SWELLING</i>)	126
ZÁVĚR		130
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....		134
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....		147
SEZNAM OBRÁZKŮ		149
SEZNAM TABULEK.....		152
SEZNAM PŘÍLOH.....		153

ÚVOD

Biopolymery, přírodní polymery produkované živými organismy, si v posledních letech získaly značnou pozornost díky svému potenciálnímu využití v různých oblastech, jako je zemědělství, medicína, obalový průmysl či environmentální udržitelnost. Navzdory jejich slibným vlastnostem (biodegradabilita, biokompatibilita či nízká žádná toxicita) zůstávají problémy s využitím jejich plného potenciálu, zejména pokud jde o jejich mechanické vlastnosti, rychlost degradace či jejich přípravu v průmyslovém měřítku. Z pohledu této práce se jako nejzajímavější jeví právě ty biopolymery, jejichž unikátní vlastnosti je činí atraktivními pro biomedicínské aplikace. Příkladem takových biopolymerů může být chitosan, kolagen či hyaluronan. **Hyaluronan** (HA(Na)) nebo-li sodná sůl kyseliny hyaluronové je lineární polysacharid, který je v současné době stále v popředí zájmů mnoha vědeckých skupin, což dokládá také graf na obr. 1, ve kterém je uvedeno množství patentů či patentových přihlášek hydrogelů (mimo jiné i na bázi hyaluronanu). Masové uplatnění hyaluronanu, však bohužel brzdí např. jeho slabé mechanické vlastnosti a paradoxně velmi dobrá rozpustnost ve vodě. Tyto nedostatky lze řešit např. modifikací řetězce, ke které bylo přistoupeno i v předložené práci. Konkrétně byla v práci modifikována karboxylová skupina D-glukuronové kyseliny HA(Na), a to hned dvěma způsoby. Prvním ze zmíněných způsobů představuje příprava thiolovaného hyaluronanu (HA-SH), který byl syntetizován již v bakalářské práci, a v této práci se na dosažené výsledky navazuje. Druhý způsob modifikace zahrnuje použití neurotransmiteru dopaminu, který byl navázán na místo karboxylové skupiny za vzniku dopaminem konjugovaného hyaluronanu (HA-DA). Dopamin jako monomer byl také využit k přípravě biopolymeru **polydopaminu** ve formě částic či trubiček, který je známý svými velmi dobrými adhezivními vlastnostmi, a který představuje tzv. síťovací činidlo (tzv. **crosslinker**) pro alternativní způsob síťování HA-SH matrice za vzniku nerozpustné 3D struktury, tzv. hydrogelu. **Hydrogely** lze připravit fyzikálním či chemickým síťováním, tedy spojením polymerních řetězců prostřednictvím příčných vazeb. Hydrogely na bázi thiolovaného hyaluronanu lze připravit různými síťovacími reakcemi, nejčastěji však oxidací polymerních řetězců za vzniku disulfidové vazby mezi thioly. V případě využití polydopaminu jako crosslinkeru HA-SH matrice, dochází vlivem Michaelově adice působící mezi volnými thiolovými skupinami a katecholovými skupinami, ke vzniku nerozpustného hydrogelu. Kromě již zmíněného thiolovaného hydrogelu byl připraven i hydrogel na dopaminem konjugovaného hyaluronanu (HA-DA), který vzniká síťováním katecholových skupin, a v neposlední řadě i

hydrogelový komplex thiolovaného a dopaminem konjugovaného hyaluronanu (HA-SH-HA-DA).

Uvedené produkty byly v práci charakterizovány různými metodami. Tak například účinnost provedené syntézy HA-SH a HA-DA byla spektrálně potvrzena pomocí nukleární magnetické rezonance (**NMR**). Velikost polymerních klubek řetězců HA-SH a HA-DA, včetně velikosti PAD částic byla studována metodou dynamického rozptylu světla (**DLS**). Připravené hydrogely byly rovněž charakterizovány z hlediska viskoelastických vlastností pomocí **reologických měření**. Jedním z nich byla doba gelace, která udává čas, kdy dojde ke vzniku zesíťované struktury. Neméně důležitá je také znalost tuhosti hydrogelů z důvodu zamýšlených aplikací. Z hlediska zpracování hydrogelů metodou 3D tisku je žádoucí charakterizovat schopnost materiálu vykazovat reverzibilitu reologického chování po uvolnění aplikovaného napětí. Pro další experimenty musela být hydratovaná forma hydrogelu převedena na lyofilizovanou a ta byla následně pomocí skenovací elektronové mikroskopie (**SEM**) studována z hlediska jejich morfologie a porozity. Pomocí SEM byla charakterizována také morfologie PAD částic či trubiček. V neposlední řadě byly u lyofilizovaných vzorků provedeny **botnačí testy**, kterými byla potvrzena botnačí kapacita připravených materiálů.

Cílem diplomové práce byla příprava crosslinkeru (PAD) a jeho využití při alternativním způsobu přípravy hydrogelů na bázi thiolovaného hyaluronanu pro biomedicínské aplikace. Dílčím cílem bylo dále zhodnotit vliv jednotlivých parametrů (směs rozpouštědel, jejich poměr, pH reakční směsi) na velikost připravených PAD částic a připravit hydrogely síťováním prostřednictvím PAD jako crosslinkeru a provést jejich charakterizaci. Kromě využití polydopaminu ve formě částic, bylo přistoupeno k využití dopaminu přímo při modifikaci hyaluronanu, jejíž výsledkem byl tzv. konjugovaný hyaluronan. Následně byly ze získaných derivátů připraveny hydrogely, jak samostatně či v jejich kombinaci tzv. komplex obsahujícího thiolovaný hyaluronan a dopaminem konjugovaný hyaluronan. V neposlední řadě byl zhodnocen vliv jednotlivých parametrů na přípravu zmíněných derivátů a byla provedena jejich charakterizaci. Předložený výzkum se snažil vytvořit půdu pro vývoj inovativních materiálů s vlastnostmi připravených na míru pro různé aplikace, jako jsou různé scaffoldy, nosiče léčiv, obvazy ran atd.

I. TEORETICKÁ ČÁST

SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Hyaluronan je přírodní lineární polysacharid, který se řadí do skupiny nesulfátových glykosaminoglykanů (GAG), tvořený *disacharidovou* jednotkou, která se skládá z opakujících se jednotek D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu. Díky svým unikátním vlastnostem (např. biodegradabilita, biokompatibilita, vysoká hydrofilita, minimální či žádná imunogenita atd. [1]) a jeho přirozenému výskytu nejen v lidském těle, je stále v popředí zájmu mnoha výzkumných skupin zabývajících se přípravou materiálů pro aplikace v kosmetickém či farmaceutickém průmyslu nebo tkáňovém inženýrství [2; 3]. Jako nativní polymer nachází uplatnění např. při léčbě osteoartritidy (degenerativní onemocnění kloubů) [2] nebo jako terapeutický prostředek pro léčbu kožních ran (popálenin, diabetických vředů atd.) [3]. V současné době existuje několik komerčních produktů na bázi HA(Na), které se využívají právě k léčbě kožních ran např. HYIODINE (Contipro), HYALOMATRIX (Anika) a IALUSET (Laboratoires Genévrier) [4]. I přes všechny zmíněné vlastnosti, které jej činí zajímavým pro různé aplikace, vykazuje hyaluronan řadu nedostatků např. rychlá degradace *in vivo* nebo slabé mechanické vlastnosti. Ke zlepšení těchto nedostatků se přistupuje k různým modifikacím polymerního řetězce, tedy úpravám jeho struktury, tak aby bylo dosaženo požadovaných vlastností [5; 6]. Jednou z možností, jak modifikovat hyaluronový řetězec za současného zachování jeho biokompatibility a nulové toxicity, je zavedení thiolové skupiny do jeho struktury [7; 8]. Aktuálnost problematiky thiolovaného hyaluronanu podtrhuje řada vědeckých publikací, které se věnují přípravě a charakterizaci materiálů na bázi thiolovaného hyaluronanu. Tak například přípravou thiolovaného hyaluronanu pro aplikaci v tkáňovém inženýrství se ve práci zabývali autoři Cao et al. (2019) a Hong et. (2020). Dle autorů Cao et al. (2019) má thiolovaný hyaluronan velký potenciál k využití jako chirurgický antiadhezivní materiál či jako bioinertní tkáňová výplň [9]. Zatímco autoři Hong et al. (2021) ve své práci zkoumali využití thiolovaného hyaluronanu v kombinaci s nanočásticemi fosforečnanu vápenatého jako injektovatelného hydrogelu. Tento typ hydrogelu by mohl najít uplatnění jako výplň kostních defektů při léčbě poranění kostí [10]. Nedávné výzkumy také vyzdvihují modifikaci řetězce HA(Na) pomocí dopaminu, respektive katecholu, jehož přítomnost zvyšuje adhezi materiálu k hostitelské tkáni, což je považováno za klíčovou vlastnost pro aplikaci do lidského těla. Autoři Nejati et al. (2023) se ve své práci zabývali syntézou dopaminem konjugovaného hyaluronanu pro přípravu adhezivního injektovatelného hydrogelu, který by mohl zlepšit invazivní podávání léků a zároveň udržet aplikované látky v místě podání a zabránit jejich odtržení od

hostitelské tkáně, např. při léčbě hlasivek [11]. Jako biodegradabilní systém pro podávání léčiv byl HA-DA studován také autory Melnik et al. (2022), kteří vyzdvihují jeho silnou adhezi, dobrou biokompatibilitu a optimální uvolňování léčiva pro léčbu cévních onemocnění [12]. Zajímavou studii prezentovali autoři Pandey et al. (2022), kteří ve své práci zabývali přípravou bioadhezivních nanokompozitních vrstev pro rychlou a účinnou nápravu tkáňových funkcí po zranění nebo operaci (tzv. tkáňové lepidlo). Kompozitní materiál byl tvořen hned dvěma polymery obsahující dopamin – první z nich je již zmíněný dopaminem konjugovaný hyaluronan, zatímco druhý je tzv. polydopamin (PAD), který vzniká autooxidací jeho monomeru (dopaminu) za alkalického pH [13]. Polydopamin je syntetický polymer, který se svou strukturou podobá L-DOPA, látkou vyskytující se u mlžů, která představuje zdroj jejich velmi silné adheze k různým substrátům, a kterou polydopamin kopíruje. Mezi jeho další unikátní vlastnosti patří např. vysoká reaktivita, schopnost fototermické konverze, antioxidační vlastnost, elektrické vodivosti atd [14]. První zmínka o polydopaminu pochází z roku 2007 a od té doby bylo publikováno mnoho článků zabývajících problematikou polydopaminu [15; 16]. Tak například v práci Rong et al. (2023) byl zkoumán materiál obsahující částice polydopaminu, které představují fotosenzitivní složku kompozitní materiálu pro kombinovanou léčbu rakoviny – chemoterapií a fototermální terapií [17]. Díky jeho elektrické vodivosti byl také předmětem zkoumání ve studii Li et al. (2023), kteří připravili senzory pro snímání pohybu lidského těla a současného transdermálního podávání léků [18].

Z výše uvedeného je patrné, že problematika uvedených materiálů, které jsou předmětem zkoumání v předložené práci, je velice aktuální, a díky uvedeným vlastnostem a potenciálním využitím se jeví jako perspektivní a žádoucí materiál.

1 BIOPOLYMERY

Biopolymer lze obecně definovat jako makromolekulu, která se skládá z velkého množství opakujících se jednotek – monomerů, které jsou produkovány živými organismy [19; 20]. Monomery jsou k sobě vázány kovalentní vazbou a vytvářejí tak velké makromolekulární struktury. Mezi biopolymery lze zařadit například DNA, RNA, keratin, celulózu, škrob, chitosan atd. Některé biopolymery (např. DNA, RNA) fungují jako přenašeče genetické informace, jiné jsou zase základními stavebními jednotkami buněčných stěn (např. celulóza) nebo plní funkci zásobní látky jako (např. škrob). Obecně mají biopolymery, ve srovnání se syntetickými polymery, nižší vazebnou energii mezi uhlíky, a proto dochází k jejich snadnějšímu rozkladu na menší řetězce vlivem působení například enzymů, vlhkosti, tepla atd [19].

1.1 Definice a klasifikace biopolymerů

Dle **Niaounakis (2015)** lze biopolymery definovat na základě dvou různých kritérií. Prvním kritériem je zdroj původu biopolymerů a druhým kritériem je schopnost jejich biodegradability [21]. Biodegradabilitou je myšlena vlastnost materiálu rozkládat se na nižší strukturální jednotky (např. methan, CO₂, voda atd.) vlivem působení různých faktorů (např. teplota, enzymy atd.), které nevykazují toxicitu [22; 23]. Z výše uvedených kritérií pak vyplývá, že biopolymery lze rozdělit na 3 typy:

- 1) Do prvního typu (**typ A**) patří biopolymery, jejichž zdrojem jsou přírodní materiály a zároveň jsou biodegradabilní. Mohou být produkovány biologickými systémy (např. mikroorganismy, rostlinami a živočichy) nebo mohou být syntetizovány z biologických materiálů (např. z kukuřice a škrobu). Mezi biopolymery typu A patří např. polymléčná kyselina (PLA), hyaluronan, kolagen a alginát.
- 2) Mezi biopolymery druhého typu (**typ B**) lze zařadit ty, jejichž zdrojem jsou přírodní materiály, ale již nejsou biodegradabilní. Do této skupiny patří syntetické polymery z obnovitelných přírodních zdrojů jako např. polyamid 11 nebo biopolyetylen, ale také přírodní polymery jako např. přírodní kaučuk.
- 3) Biopolymery spadající do poslední skupiny (**typ C**) se získávají z fosilních paliv a jsou biodegradabilní. V této skupině biopolymerů jsou zahrnuty např. polybutylen sukcinát (PBS) a polykaprolakton [21].

Autoři Mazuki et al. (2022) přistupují k definici biopolymerů trochu jinak. Podle nich lze biopolymery definovat jako typ přírodních materiálů, které jsou označeny jako „přírodní“ kvůli svému původu. Jsou produkovány živými organismy (rostlinami a živočichy), kteří jsou na základě své biochemie schopni vytvářet opakující se řetězce monomerů. Biopolymery lze poté dělit do 4 základních kategorií: polymery na přírodní bázi, biodegradabilní polymery, polymery z opakujících se jednotek a páteřní jednotky polymerů, přičemž uvedené kategorie se značně prolínají, a tedy jeden biopolymer může patřit do více kategorií [24].

Polymery na přírodní bázi jsou obecně produkovány biologickými systémy a mohou, ale i nemusí být biodegradabilní. Tuto kategorii lze dále dělit podle jejich zdrojů na (1) polymery na přírodní bázi produkované výhradně agropolymery (např. chitosan, lignin, celulóza), ty mohou být dále chemicky či fyzikálně modifikovány, (2) polymery na přírodní bázi produkované geneticky modifikovanými organismy nebo mikroorganismy (např. polyhydroxyalkanoáty) a (3) polymery na přírodní bázi získávané ze zemědělských nebo ropných zdrojů prostřednictvím fermentace nebo konvenční chemie (např. PLA, polyurethany).

Definice **biodegradabilních polymerů** souvisí s pojmem biodegradabilita, který byl definován již dříve v textu, a který poukazuje na možné výhody biodegradabilních polymerů. Jednou z klíčových výhod představuje jejich použití při řešení některých environmentálních problémů, např. skládkování, globální oteplování, uvolňování toxických látek do ovzduší, půdy či vody. Navíc tyto biopolymery mohou přispět k překonání bezpečnostních a environmentálních problémů v různých aplikačních oblastech zemědělství, medicíny, řízení dopravování léčiv a farmaceutického průmyslu. Zdrojem biodegradabilních polymerů mohou být jednak přírodní materiály (PLA, škrob), ale také materiály z fosilních paliv (PBS, polykaprolakton).

Další kategorii představují polymery s opakujícími se jednotkami, které lze rozdělit do tří základních skupin právě podle jejich opakujících se strukturních jednotek na (a) polysacharidy (celulóza, alginát, škrob, kyselina hyaluronová atd.), (b) proteiny (kolagen, želatina atd.) a (c) nukleové kyseliny (DNA, RNA).

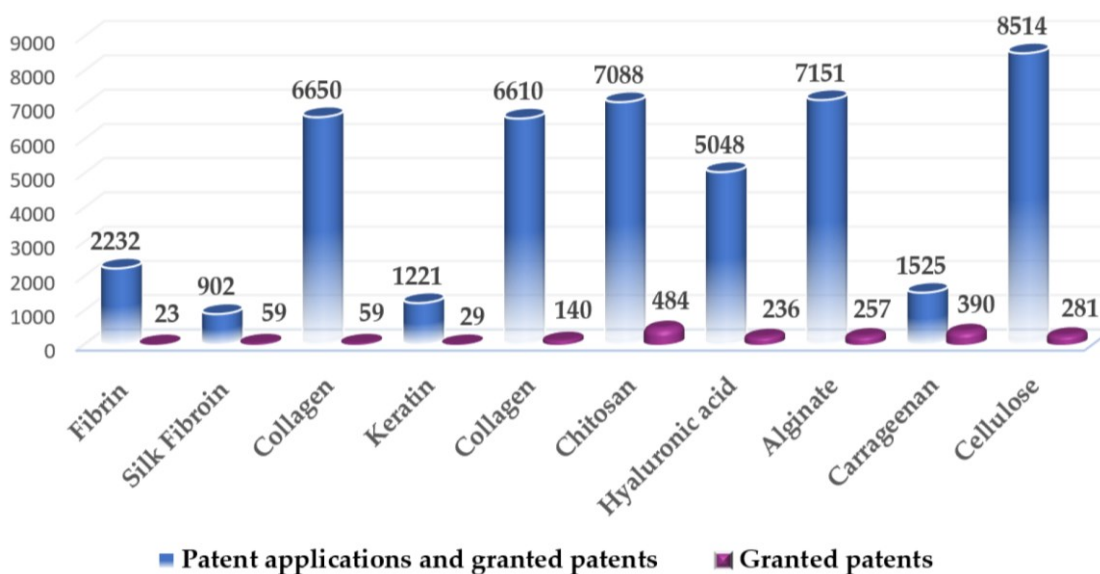
Tou poslední kategorií podle autorů Mazuki et al. (2022) jsou tzv. **páteřní jednotky polymerů**. Toto dělení je založeno na strukturním uspořádání biopolymerů, tedy na jejich hlavním řetězci, tzv. páteři. Biopolymery mohou být podle jejich hlavního řetězce děleny na: polyester, polykarbonáty, polyamidy, vinylové polymery a polysacharidy [24].

Dle autorů Singh et al. (2021) je možné biopolymery rozdělit na biopolymery (1) přírodní (např. celulóza, škrob, želatina), (2) syntetické (atd. chitosan, polykaprolakton, polyvinylalkohol) a biopolymery (3) založené na opakujících se jednotkách (např. proteiny, nukleové kyseliny, keratin) [19; 25].

Z výše uvedeného lze usoudit, že existují různé kategorie pro klasifikaci biopolymerů. Definice ani klasifikace biopolymerů nejsou jednotné a lze k nim přistupovat různě v závislosti na různých faktorech, např. na zdroji původu daných biopolymerů nebo na struktuře biopolymeru či následné aplikaci.

1.2 Vlastnosti a využití biopolymerů

V posledních letech se čím dál více diskutuje o potenciálních aplikacích biopolymerů v různých oblastech, což dokazuje obr. 1, který odráží množství podaných či udělených patentů, zabývajících se hydrogely na bázi vybraných biopolymerů v časovém rozmezí od roku 1915 do května 2023 [26]. Z množství patentů je patrné, že biopolymery představují ucházející se a udržitelnou náhradu konvenčních plastů a zájem o ně permanentně vzrůstá.



Obr. 1 – Počet patentových dokumentů (patentové přihlášky, udělené patenty) hydrogelů na bázi různých biopolymerů od roku 1915 do května 2023 [26]

Vzhledem k jejich vlastnostem jako je biodegradabilita, biokompatibilita, nízká nebo lépe zanedbatelná toxicita atd., lze o biopolymerech hovořit jako o slibných materiálech v mnoha různých aplikacích jako je zemědělství, medicína, kosmetika, potravinářství či obalový průmysl atd. [27].

Jednu z možných aplikací biopolymerů představuje **obalový průmysl**. Nejběžněji používané polymery jako obalové materiály jsou polymery z fosilních paliv tedy např. PVC, PET, PS, PP atd. Nízká pořizovací cena, výborné fyzikální (hustota, molární hmotnost), mechanické (pevnost v tahu) a bariérové vlastnosti (O_2 , CO_2) činí výše uvedené polymery vhodné pro obalový průmysl. Jediný problém, který představují, je jejich složitá degradabilita (odbouratelnost) v přírodě [23]. Zároveň se v poslední době objevuje snaha snižovat emise CO_2 a tím i závislost na fosilních zdrojích, což lze uskutečnit používáním recyklovaných materiálů nebo materiálů z obnovitelných zdrojů [28]. Z toho důvodu se do popředí dostávají biopolymery jako například škrob, který lze pomocí vodní páry přeměnit na pěnový materiál. Napěněný škrob lze pak následně zpracovat lisováním, do formy různých táček nebo jednorázových misek, které se po použití mohou rozpustit ve vodě a případně je znovu použít. Díky tomu nedochází k hromadění odpadu a produkci toxických látek [29]. V potravinářském průmyslu se jako obalové materiály již využívají biologicky odbouratelné materiály na bázi škrobu, který právě podporuje celkovou biodegradabilitu obalového materiálu [30]. Dalším příkladem materiálu, který je díky svým vlastnostem (především dobrá transparentnost, lepší bariérové schopnosti v porovnání s PS či UV odolnost) uplatňován v obalovém průmyslu je PLA [31].

V **zemědělství** lze využít hydrogely na bázi biopolymerů (např.), např. k přenášení a řízenému uvolňování živin či hnojiv do půdy, díky čemuž lze docílit efektivního využití půdy a vody, a zároveň tím omezit přidávání syntetických látek do životního prostředí (při zachování stejných požadovaných vlastností výsledných produktů). Příkladem těchto biopolymerů jsou např. chitosan, PVA, celulóza atd. [32]. Potenciální aplikaci v zemědělství by mohly mít také hydrogely na bázi želatiny, chitosanu a PVA ve formě tzv. reservoárů agrochemikálií pro ošetření odolnosti rostlin [33]. Biopolymery aplikované v zemědělství nemusí mít pouze formu hydrogelu, ale mohou to být například nanočástice chitosanu, které lze použít jako nosiče pro řízené uvolňování agrochemikálií (především díky prokázaným adsorpčním schopnostem, biokompatibilitě a biodegradabilitě) [34]. Dále se chitosan uplatňuje jako stimulant růstu rostlin, komplexy na bázi chitosanu jako fungicidy nebo společně s kovy (Cu, Zn, Ag) chitosan působí proti bakteriím, které napadají rostliny [35].

V nedávně době se do popředí zájmu **medicíny** a souvisejícím oblastem (**farmacie, kosmetika**) dostávají biopolymery, právě díky jejich unikátním vlastnostem, které napodobují vlastnosti materiálů v živých systémech. Mnoho z nich se v živých organismech přímo vyskytuje (kyselina, hyaluronová, kolagen). Biopolymery se v rámci medicíny

využívají v tkáňovém inženýrství, při hojení ran či jako nosiče léčiv. Mezi nejzajímavější biopolymery zkoumané pro aplikace v těchto oblastech patří např. chitosan, kolagen, polykaprolakton, PLA a kyselina hyaluronová [36; 37]. **Chitosan** např. vykazuje protinádorové účinky a má vysoký potenciál v léčbě karcinomů (např. žaludku [38]), zároveň má také dobré antibakteriální účinky, podporuje adhezi erytrocytů (tzn. červených krvinek), adsorpci fibrinogenů, urychluje agregaci krevních destiček a vykazuje dobré hemostatické vlastnosti, což lze využít při léčbě různých forem zranění [39]. Oproti tomu **kolagen** se v současné době využívá při hojení ran jako obvaz při popáleninách či poškozeních kůže způsobené infekcí či při operacích. Důvodem jeho využití spočívají především v jeho regulovatelné biodegradabilitě, nízké toxicitě a vysoké biokompatibilitě, jelikož se jedná o biopolymer izolovaný z živých organismů [40]. Ovšem tzv. „čistý“ kolagen má pro použití při regeneraci kostí, chrupavek, kůže, kardiovaskulárních opravách atd., řadu omezení a to zejména z hlediska fyzikálně-chemických vlastností, proto se přistupuje k jeho modifikacím či jiným úpravám tak, aby lépe splňoval specifické požadavky jako biomateriál při obnově tkání [41]. I **poly-ε-kaprolakton** (PCL), který je zástupcem syntetických biopolymerů, lze uplatnit v biomedicínských aplikacích stejně jako výše uvedené biopolymery. Vyniká dobrou stabilitou (za normálních podmínek, tj. 20 °C a 101 325 Pa) a jednoduchou zpracovatelností (taveniny i z roztoku), tudíž lze biopolymer upravovat do různých tvarů v závislosti na konkrétní aplikaci [42]. Například pomocí technologie elektrostatického zvlákňování lze připravit nanovlákná Mg/PCL, která by mohla být aplikována ve formě scaffoldu pro tkáňové inženýrství [43].

I přesto, že se biopolymery jeví jako vhodné materiály pro přípravu pokročilých materiálů pro biomedicínské aplikace, mají řadu nevýhod – např. nízké biomechanické vlastnosti či dobrou rozpustnost ve vodě. Limitům jednotlivých biopolymerů lze předejít vytvářením kompozitů (směsí) těchto biopolymerů. Jejich vlastnosti se tímto kombinují, vzájemně se doplňují a představují tak ještě výhodnější materiály pro použití v různých aplikacích. Příkladem takového kompozitního materiálu jsou core-shell nanovlákná z PCL/Kolagen nebo z PCL/PVA s potenciálním využitím při hojení ran či přenosu léčiv [44], dále hydrogely na bázi chitosanu a kyseliny hyaluronové lze využít jako tzv. bioinkousty v regenerativní medicíně [45], tenké filmy na bázi kyseliny hyaluronové s albuminem, lze zase použít jako adhezivní materiály v medicíně či kosmetice [46], a v neposlední řadě hydrogely na bázi thiolovaného hyaluronanu a nanočástic polydopaminu představují slibný materiál pro řízené uvolňování léčiv [47].

Jak už bylo naznačeno výše v textu, neméně významný biopolymer představuje kyselina hyaluronová, které je díky svému strukturnímu uspořádání vnímána jako velký potenciál pro využití v medicíně, kosmetice nebo farmaceutickém průmyslu.

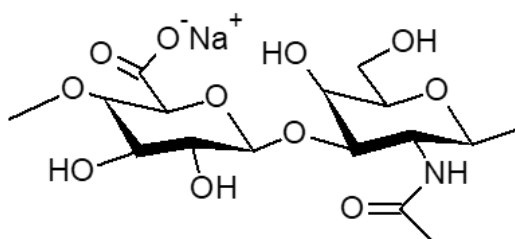
1.3 Kyselina hyaluronová

V roce 1934 Karl Meyer a John Palmer izolovali z očního sklivce skotu polysacharid o vysoké molekulové hmotnosti, který ve své struktuře obsahoval uronovou kyselinu a aminosacharid. Nově objevenou látku pojmenovali **kyselina hyaluronová** [48] (název byl odvozen od slova "hyaloid" (sklovitý vzhled) a "kyselina uronová") [49; 50].

„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. 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 nabitě kationty (Na^+) a vytváří soli, obecně nazývané jako hyaluronan nebo hyaluronát sodný“ [51].

2 HYALURONAN

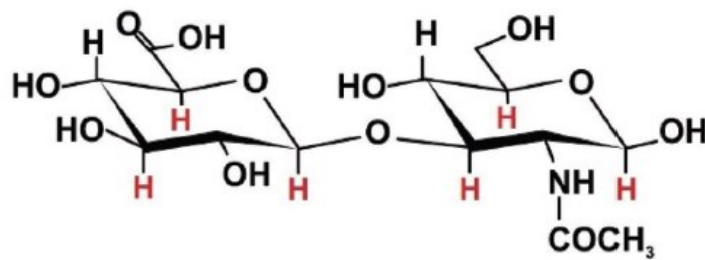
Hyaluronan, nebo-li hyaluronát sodný (HA(Na)) je tedy sodnou solí kyseliny hyaluronové. Jedná se o přírodní lineární polysacharid, který patří do skupiny nesulfátových glykosaminoglykanů (GAG). Hyaluronan je tvořen disacharidovou jednotkou, která se skládá z opakujících se jednotek D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu (obr. 2) [52-54]. Počet disacharidových jednotek v makromolekule hyaluronanu může dosahovat až 10 000. Molární hmotnost jedné disacharidové jednotky odpovídá přibližně 400 Da a její délka je aproximována na hodnotu 1 nm. Pokud by byl hyaluronan tvořen 10 000 opakujícími se jednotkami, jeho délka by se rovnala 10 μm , což odpovídá průměru lidského erytrocytu [50; 53]



Obr. 2 – Strukturální vzorec hyaluronanu

2.1 Struktura HA(Na)

Trvalo téměř 20 let, než Meyer a Palmer dokázali přesně popsat chemickou strukturu objeveného polymeru. V průběhu těchto let se ukázalo, že uronová kyselina a aminosacharid jsou ve skutečnosti D-glukuronová kyselina a N-acetyl-D-glukosamin [50], které jsou navzájem spojeny střídající se β -(1,3) a β -(1,4) glykosidickou vazbou [5; 54; 55]. Popis prostorového uspořádání hyaluronanu je důležitý pro pochopení jeho biologických funkcí. Sacharidové kruhy obsahují objemné funkční skupiny (hydroxylovou, karboxylovou a N-acetylovou), které omezují volnou rotaci kruhů kolem glykosidických vazeb páteře polymeru, což zvyšuje tuhost celého polymerního řetězce. Tyto funkční skupiny se na řetězci hyaluronanu uspořádají do energeticky výhodnější ekvatoriální roviny, čímž se sníží sterické pnutí řetězce, a naopak atomy vodíků zaujímají polohu v axiální rovině (obr. 3), která se jeví jako méně stericky výhodná [5]. Uspořádání vodíků v axiální rovině přispívá k hydrofobizaci disacharidové jednotky (nepolární část molekuly) [5; 50], zatímco ekvatoriální strana řetězce představuje více polární hydrofilní část řetězce hyaluronanu [50].

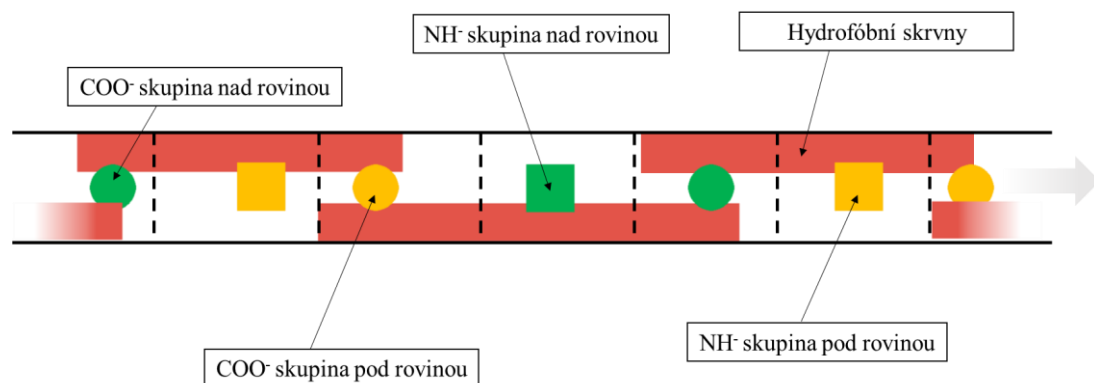


Obr. 3 – Axiální rovina hyaluronanu s vodíky [5]

Samotnou strukturu a její uspořádání lze rozdělit na tzv. strukturu primární, sekundární, a terciální. **Primární struktura** hyaluronanu je dána uspořádáním disacharidových jednotek, která je složená z [-β-D-glukuronové kyseliny -β-(1→3)-N-acetyl-β-D-glukosaminu-β-(1→4)] v poměru 1:1 [50; 54; 56].

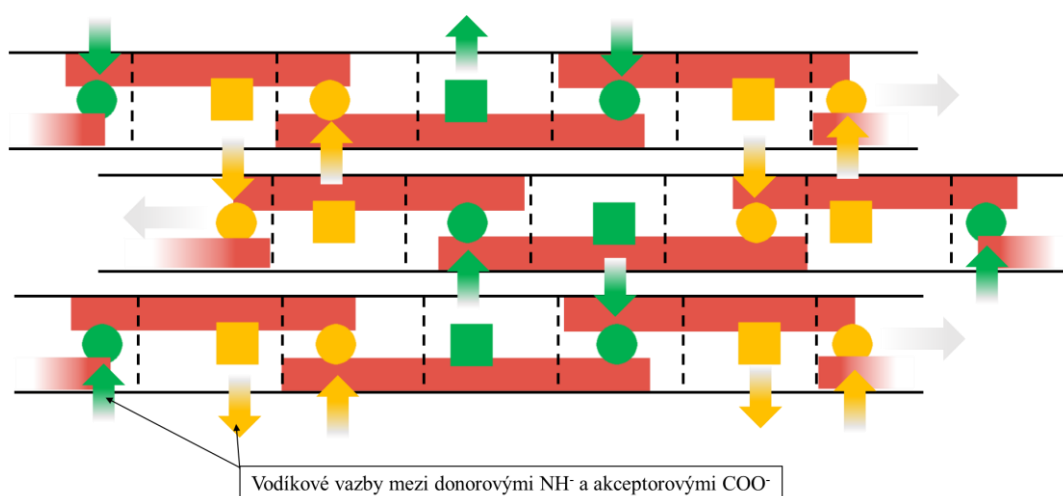
Hyaluronan jak už bylo naznačeno, tvoří vodíkové můstky, které na jednu stranu stabilizují makromolekulu v roztocích, na druhou stranu však zvyšují tuhost polymerního řetězce, což ovlivňuje vlastnosti roztoků hyaluronanu. Vodíkové můstky mohou vznikat v rámci jedné makromolekuly, ale i mezi sousedními molekulami. V konečném důsledku, primární struktura a vodíkové vazby pomáhají utvářet sekundární a terciální strukturu hyaluronanu [56].

V makromolekule hyaluronanu se každá následující disacharidová jednotka v řetězci od té předchozí i následující liší potočením o 180°. Po dvou otočeních (celkem 360°) se struktura vrací do původní orientace, čímž vzniká dvojnásobná šroubovice nazývaná jako *sekundární struktura*. Jak již bylo zmíněno, přítomnost vodíkových vazeb mezi N-acetylovou a karboxylovou skupinou na řetězci sekundární strukturu stabilizuje. Sekundární strukturu hyaluronanu ve své práci experimentálně dokázali pánové Heatley a Scott v roce 1988 [57]. Na obr. 4 je schematicky znázorněna sekundární struktura hyaluronanu [5; 58; 59].



Obr. 4 - Sekundární struktura hyaluronanu [5]

Terciární struktura je tvořena dvěma jednoduchými šroubovicemi hyaluronanu v antiparalelním (opačně orientovaném) uspořádání, čím vzniká dvoušroubovice (obr. 5). V antiparalelním uspořádání, které je energeticky nejvýhodnější, jsou N-acetylové a karboxylové skupiny vůči sobě uspořádány v poloze trans, čímž mezi nimi mohou vznikat vodíkové vazby směrem od donorových (NH^-) k akceptorovým (COO^-) skupinám, které stabilizují strukturu řetězce. Navíc se mezi hydrofobními oblastmi interagujících řetězců HA(Na) nebo sousedními molekulami utváří hydrofobní interakce, které také stabilizují terciární strukturu hyaluronanu [5; 55; 58]. Tato struktura je formálně ekvivalentní struktuře β -skládanému listu, jež představuje velmi typické uspořádání proteinů [58; 59].

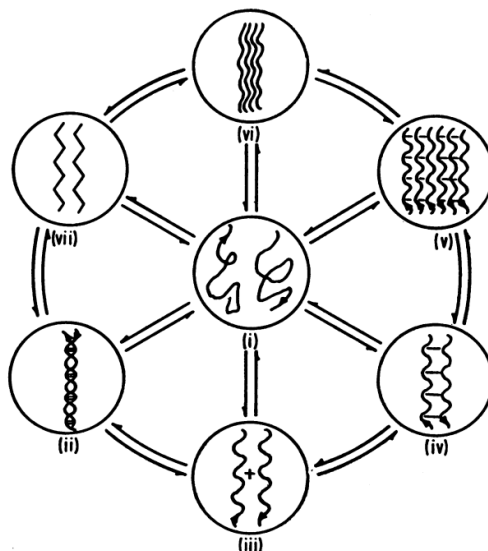


Obr. 5 - Terciární struktura HA(Na) [5]

Různá konformace hyaluronanu a jejich vzájemný vztah je důležitým předpokladem k pochopení jeho fyzikálních vlastností a také biologických funkcí v živých organismech [60]. Struktura HA(Na) byla studována v pevném stavu, ale i v roztoku.

2.1.1 Konformace HA(Na) v pevném stavu

Konformaci řetězce HA v pevném stavu studovali Sheehan a Atkins (1973), kteří pomocí rentgenové difrakce sledovali přeměnu dvoušroubovice hyaluronanu na jedno-vlákenné útvary. Přeměna se odvíjela od různých faktorů, jako např. relativní vlhkost, teplota a přiložené napětí [60].



Obr. 6 – Schématické znázornění různých konformací HA(Na) a jejich vzájemných vztahů [60]

Na obr. 6 je znázorněno schéma popisující vzájemnou souvislost mezi jednotlivými konformacemi hyaluronanu. Schéma řetězce označené jako (i) představuje řetězec HA(Na) ve zředěném roztoku; (ii) dvoušroubovici; (iii) dvě antiparalelní šroubovice bez vzájemného vynutí; (iv) dvě jedno-vlákně šroubovice v těsnějším uspořádání; (v) šest stejných řetězců uspořádaných blíže k sobě rozdělených do dvou skupin s podobnou polaritou, přičemž každý řetězec má čtyři blízké sousedící řetězce; (vi) ještě více kompaktní uspořádání, kdy každý řetězec má pět sousedících řetězců a poslední schéma (vii) znázorňuje volnou formu HA(Na) ve formě kyseliny, která byla získána snížením pH roztoku. Z uvedeného schématu je patrné, že mezi všemi konformacemi existuje vztah a že všechny možné konformace řetězce HA lze dosáhnout v roztoku [60].

V roce 1983 stejní autoři zjistili, že uspořádání řetězce hyaluronanu je závislé na přítomnosti kationtů přítomné soli a na pH prostředí. Levotočivá čtyřnásobná (čtyřikrát stočená) šroubovice byla potvrzena u jedno-vlákně šroubovice v prostředí sodného iontu (Na^+) v oblasti pH 4,0–11,0, a také u dvou-šroubovice v přítomnosti draselného iontu (K^+) v oblasti pH 3,0–4,0, zatímco při hodnotě pH 2,0 byla v přítomnosti K^+ pozorována dvojnásobná (dvojitě stočená) šroubovice. V přítomnosti vápenatého iontu (Ca^{2+}) byla potvrzena levotočivá trojnásobná (tříkrát stočená) šroubovice (při pH 4,0–10,0). Pod pH 4,0 v přítomnosti Na^+ a K^+ odpovídá konformace HA(Na) zcela jinému uspořádání. Sodný iont způsobuje, že řetězec polymeru je nejvíce natažený, zatímco u draselného iontu je tomu přesně naopak, je sbalený. Nicméně je potřeba zdůraznit, že všechny zmíněné konformace

jsou vždy více či méně stabilizovány vodíkovými vazbami [61]. Z provedeného experimentu bylo prokázáno, že konformace hyaluronanu je velmi flexibilní a závislá na rozložení kationtů kolem makromolekuly. Rovněž je zřejmé, že při měření v pevném stavu se řetězce uspořádají do preferovaných konformací, které odpovídají stavu s nejnižší energií. [62].

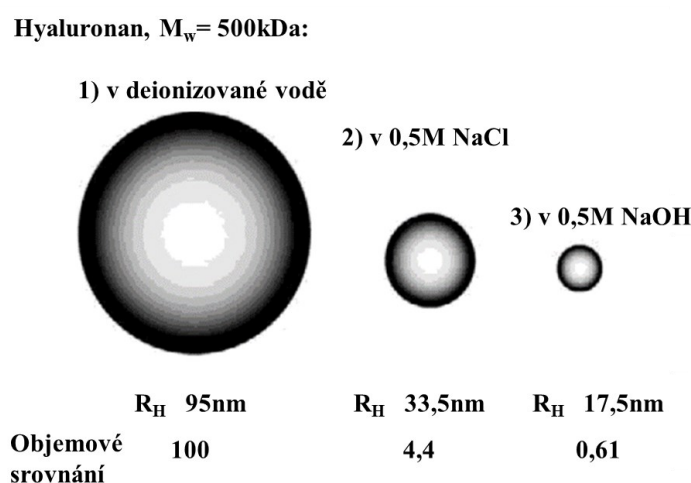
I přesto, že data získaná rentgenovou difrakcí jsou velmi cenná, poskytují informace pouze o konformaci řetězce hyaluronanu v pevném stavu, jelikož provedená měření byla realizována na tenkých filmech, jež jsou výsledkem vysušení roztoku hyaluronanu v požadované soli a pH. Jedná se tedy o statickou konformaci HA(Na). Informace o dynamické konformaci řetězce lze získat přímým měřením z roztoku.

2.1.2 Konformace HA(Na) v roztoku

Na základě hydrodynamických studií HA(Na) řetězce, které probíhají již desítky let, bylo zjištěno, že hyaluronan se ve zředěném roztoku chová jako tuhá náhodná spirála. Stejnou strukturu zaujímá i v koncentrovaném roztoku ovšem s tím rozdílem, že řetězce vytváří zapleteniny, tzn. že hyaluronan v roztoku vykazuje viskoelastické chování, ale nikdy netvoří gely [63]. Toto zjištění představovalo spíše neočekávaný výsledek, vzhledem k již známému pravidelnému a těsnému uspořádání řetězce. Dle předchozích experimentů se totiž předpokládalo, že řetězce hyaluronanu se budou spíše skládat na sebe (stejným způsobem jako alginátové a agarózové řetězce), jehož výsledkem budou celkem tuhé gely. Tento předpoklad se ovšem nepodařilo potvrdit [62].

Ve zředěném roztoku je páteř řetězce hyaluronanu (disacharidové jednotky) fixována vlivem chemické struktury disacharidu, vnitřních vodíkových vazeb a vzájemnou interakcí s rozpouštědlem. Atomy vodíku v axiální rovině, které představují hydrofobní část makromolekuly, společně s hydrofilní částí v ekvatoriální rovině, vytvářejí strukturu tzv. stočené „stuhý“. V důsledku toho, zaujímá řetězec hyaluronanu ve zředěném roztoku strukturu expandované náhodné spirály [50; 62]. A právě proto lze zředěný roztok hyaluronanu využít k detekci velikosti a také konformaci jeho řetězce, která má vliv na biologické vlastnosti. Hydrodynamická velikost hyaluronanu o nízké molekulové hmotnosti (řádově jednotky kDa) byla zjištěna měřením difúzních koeficientů pomocí disperzní techniky, kterou vynalezl Taylor v roce 1953 [64], a která byla později zdokonalena simulacemi molekulární dynamiky [65]. Velikost řetězce o vyšších molekulových hmotnostech lze zjistit na základě měření difúzních koeficientů pomocí dynamického

rozptylu světla. Experimenty provedené s vyšší molekulovou hmotností řetězce hyaluronanu byly provedeny na roztocích o pH 6,0, ve kterých se HA(Na) chová spíše jako polyelektrolyt, a při hodnotě pH 2,0, je v prakticky neutrální. Při stanovení poměru molekulové hmotnosti řetězce a jeho velikosti lze získat informace o přibližném tvaru (konformaci) makromolekuly v roztoku. Výsledky měření řetězců při nízké molekulové hmotnosti ukázaly, že konformace HA(Na) odpovídá spíše ztuhlým tyčinkovitým řetězcům, zatímco při rostoucí vysoké molekulové hmotnosti se jeho konformace ztuhle mění a odpovídá spirálovité struktuře [62].



Obr. 7 – Porovnání hydrodynamického poloměru hyaluronanu v deionizované vodě (vlevo), roztoku NaCl (uprostřed) a roztoku NaOH (vpravo)

Velikost řetězce v roztoku, tedy jeho hydrodynamický poloměr (R_H), bude záviset na složení roztoku, ve kterém se řetězec HA(Na) vyskytuje. Na obr. 7 je znázorněn hydrodynamický poloměr řetězce hyaluronanu o molekulové hmotnosti 500 kDa v různých roztocích. Nejvyšší R_H má řetězec v deionizované vodě, z čehož lze usoudit, že ve vodě zbavené všech iontů, je řetězec nejvíce rozbalený a natažený. Menší R_H lze poté změřit v roztoku 0,5M NaCl a nejmenší pak v roztoku 0,5M NaOH [63]. Pravděpodobná příčina změny konformace je taková, že ionty konkrétních solí zastíní elektrostatické odpuzování mezi náboji na řetězci HA(Na), čímž se zmenší R_H řetězce. Snížení R_H je doprovázeno snížením viskozity roztoku [66]. Změna konformace řetězce v alkalickém roztoku (NaOH) je pravděpodobně způsobena zvýšenými elektrostatickými interakcemi a tvorbou vodíkových vazeb v rámci řetězce [63].

2.2 Výskyt HA(Na)

Hyaluronan je přírodní polymer, který se vyskytuje nejen ve zvířecím a lidském těle. Je také součástí celé řady bakterií (např. *Streptococcus equi*, *Streptococcus zooepidermicus*,

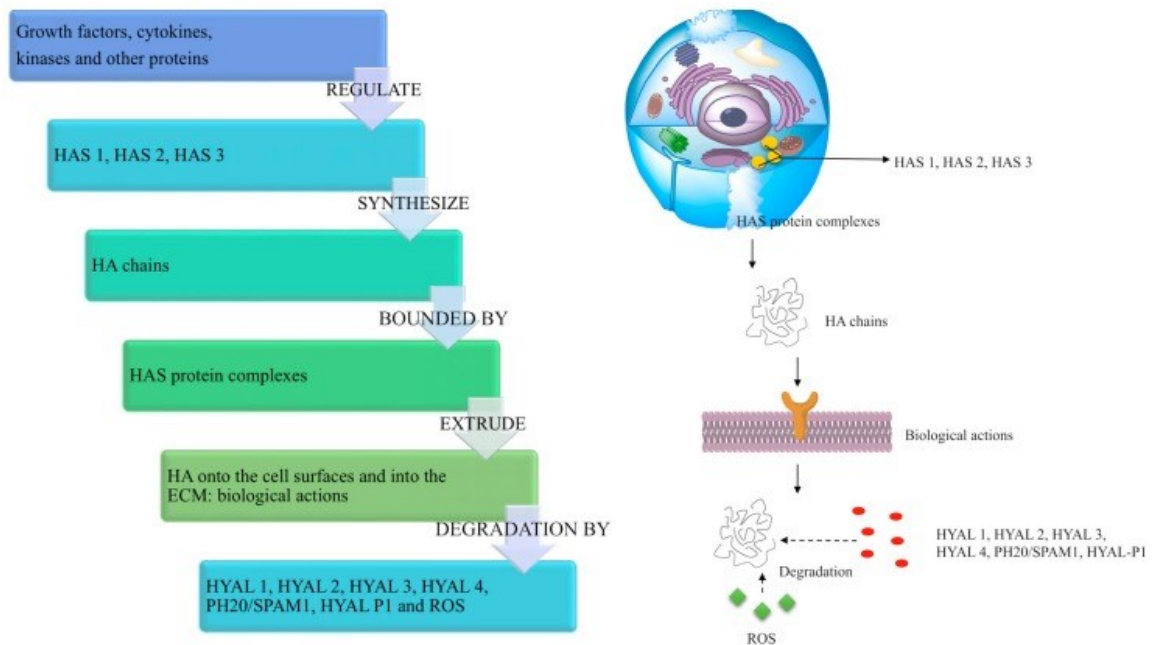
Streptococcus equisimilis, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, *Pasteurella multocida*, zelených řas (*Chlorella* infikovaná *chloroviry*), kvasinek (*Cryptococcus neoformans*) a měkkýšů. Avšak v rostlinách, houbách či hmyzu nebyla jeho přítomnost prokázána [67].

Vysoká koncentrace HA(Na) v lidském těle se vyskytuje v pojivových tkáních, jako je pupeční šňůra, synoviální (kloubní) tekutina, kůže a oční sklivec. Menší množství HA(Na) lze nalézt také v plicích, ledvinách, mozku a svalech. Naopak nejnižší koncentrace HA(Na) byla potvrzena v krevním séru [68]. Tělo dospělého člověka o průměrné hmotnosti 70 kg obsahuje až 15 g HA(Na) [5; 69], přičemž téměř polovina se nachází v kůži [68; 69]. Většina hyaluronanu je součástí extracelulární matrix, ve které vykonává spoustu funkcí, jak bude naznačeno v další kapitole (viz kap. Vlastnosti a funkce HA(Na)) [59; 69]. Ve velkém množství jej lze nalézt také v kohoutím hřebínku (7,5 mg/g).

2.3 Syntéza a degradace HA(Na)

2.3.1 Syntéza a degradace HA(Na) v lidském těle

Syntéza hyaluronanu probíhá na vnitřní straně plazmatické membrány prostřednictvím tří transmembránových enzymů nazývaných *hyaluronan-syntázy* (HAS1, HAS2 a HAS3) [69]. Rostoucí řetězec HA(Na) je vytlačován na povrch buňky nebo přímo do ECM. Aktivita HAS je řízena růstovými faktory, cytokiny a dalšími proteiny jako jsou kinázy, avšak kvůli různé sekvenci genů jsou HAS řízeny různým způsobem, což vede k odlišné reakci HAS na transkripční signály. Například ve fibroblastech se při transformaci růstového faktoru zvyšuje exprese HAS1 a zároveň se snižuje exprese HAS3. Mimo to se jednotlivé HAS liší také v biochemických a syntetických vlastnostech. HAS1 představuje nejméně aktivní formu a syntetizuje HA(Na) o molekulové hmotnosti 10^5 až 10^6 Da. HAS2 je aktivnější než předchozí forma a syntetizuje HA(Na) o M_r větší než 10^6 Da. A nakonec neaktivnější enzym HAS3 produkuje řetězce HA(Na) s M_r menší než 10^5 [67; 69]. Na obr. 8 jsou naznačeny klíčové kroky HA(Na) od jeho syntézy až po jeho degradaci v lidském těle.



Obr. 8 – Schématický obrázek naznačující klíčové kroky HA(Na) od jeho syntézy až po jeho degradaci v lidském těle [67]

K degradaci HA nejčastěji dochází na základě 2 rozdílných mechanismů: (1) specifická degradace, která je zprostředkována enzymy hyaluronidázami a (2) nespecifická degradace, jež je podmíněná oxidačně-redukční reakcí způsobenou kyslíkovými radikály [5; 67]. Zajímavé je, že pomocí zmíněných mechanismů se rozloží pouze 30 % HA(Na) z celkových 15 g, které se průměrně v lidském těle vyskytuje. Zbýlých 70 % je lymfou transportováno do lymfatických uzlin, kde dochází k jeho katalýze endotelovými buňkami lymfatických cév. Malá část se krevním oběhem transportuje do jater, kde také dochází k postupnému odbourávání řetězce HA(Na) endotelovými buňkami. Odhaduje se, že poločas rozpadu řetězce hyaluronanu v kůži je 24 h, v chrupavce 1 – 3 týdny a ve sklivci 70 dní [67].

2.3.2 Průmyslová produkce HA(Na)

V současné době, je průmyslová produkce hyaluronanu je založena na dvou hlavních procesech: na (a) extrakci z živočišných tkání a (b) mikrobiální fermentaci pomocí bakteriálních kmenů. Obě zmíněné metody poskytují polydisperzní hyaluronan, jejíž molekulová hmotnost leží v rozmezí hodnot ($M_w > 10^6$ Da, PDI = 1,2 – 2,3) [70].

V 50. letech byl hyaluronan izolován především z pupeční šňůry, hovězího sklivce nebo kohoutího hřebenu, přičemž nejběžnějším zdrojem byl kohoutí hřebínek, protože obsahoval největší množství hyaluronanu (7,5 mg/g). Velkou nevýhodou procesu extrakce ale byla nevyhnutelná degradace hyaluronanu způsobená endogenní aktivitou hyaluronidázy

v živočišných tkáních, která rozkládá polymerní řetězec enzymatickou hydrolyzou, a také drsnými podmínkami extrakce [70]. Izolace hyaluronanu z živočišných zdrojů sebou nesla obavy z nežádoucích účinků na lidské zdraví, zejména v důsledku potenciálního rizika kontaminace proteiny a viry přítomných v samotných extraktech [70; 71]. Tomu šlo předejít jak použitím tkání zdravích zvířat ale také rozsáhlým čištěním. Každopádně možné riziko kontaminace zvýšilo zájem o biotechnologickou produkci, jejíž pokroky vedly k vývoji geneticky modifikovaných bakterií produkujících velké množství hyaluronanu [70; 72].

Produkce hyaluronanu bakteriální fermentací začala v 60. letech minulého století, kdy se zjistilo, že hyaluronan produkovaný živočišnými tkáněmi je shodný s HA(Na) produkovaným bakteriemi. Ale na rozdíl od živočišného, bakteriální HA(Na) není imunogenní, a proto se více hodí pro využití v oblasti medicíny [70]. Hyaluronan tvoří bakteriální kapsuly, která chrání bakterie před reaktivními oxidy, jež jsou uvolňovány leukocyty jako obrana proti infekci. HA(Na) kapsule pravděpodobně znemožňuje imunitnímu systému rozpoznat bakterii jako cizí entitu v těle. Zároveň HA(Na) napomáhá bakteriím v migraci přes epiteliální vrstvy [1].

Mikrobiální fermentace je v zásadě jednoduchý proces s vysokými výtěžky nativního HA(Na). Mikrobiální buňky lze fyziologicky nebo metabolicky řídit tak, aby produkovaly více hyaluronanu o vysoké molekulové hmotnosti, což je nespornou výhodou při jeho produkci [70].

2.4 Vlastnosti a funkce HA(Na)

Jak už bylo zmíněno, hyaluronan je biopolymer s unikátní kombinací vlastností jako je např. biodegradabilita, biokompatibilita, vysoká hydrofilita, minimální či žádná imunogenicita a jiné biologické vlastnosti [73; 74], které úzce souvisí s jeho funkcemi v živých organismech a také s možnou aplikací. Fyzikálně-chemické vlastnosti i biologická aktivita hyaluronanu jsou silně závislé na molekulové hmotnosti řetězce, což značně ovlivňuje následné aplikace HA(Na). Například HA(Na) s nižší molekulovou hmotností stimuluje proliferaci endoteliálních buněk a imunologické reakce a také proces tvorby nových cév [75], zatímco HA(Na) s vyšší molekulou hmotností jsou nezbytnou součástí synoviální tekutiny, kde zajišťují lubrikaci kloubů ale také funguje jako tzv. tlumič vibrací a nárazů [69].

2.4.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti HA(Na)

Ve vodném prostředí jako je např. synoviální tekutina či oční sklivec, hyaluronan existuje jako záporně nabitá makromolekula o vysoké molekulové hmotnosti (MDa). Právě díky vysoké M_r a nataženému řetězci HA(Na) vykazuje unikátní viskoelastické chování, které lze dobře popsat pomocí reologických veličin [69].

Chování roztoků HA(Na) přechází z Newtonského na ne-Newtonské v závislosti na molekulové hmotnosti, koncentraci či smykové rychlosti [59]. Při namáhání se řetězce HA(Na) s rostoucí smykovou rychlostí deformují a organizují v proudových liniích ve směru toku, což vede ke snížení viskozity. Toto chování se uplatňuje například při aplikování HA(Na) lékařskými jehlami [55]. Mimo to, roztoky HA(Na) nevykazují tixotropní chování, (viskozita se při zvyšování rychlosti smykové deformace neliší od viskozity měřené při snižování rychlosti smykové deformace) což znamená, že po ukončení namáhání dochází k návratu struktury řetězce do původní konformace. Viskozita roztoků HA(Na) je velmi důležitým parametrem ve fyziologických a biochemických procesech, a také při terapeutických, lékařských, bioinženýrských, kosmetických a potravinářských aplikacích [56].

Viskoelastické chování roztoku HA(Na) závisí na mnoha parametrech, jako jsou: struktura řetězce, molekulová hmotnost, koncentrace, pH roztoku, iontová síla prostředí či teplota [76].

Je známo, že s rostoucí molekulovou hmotností a koncentrací HA(Na) roste viskoelastické chování roztoku [56; 63]. S rostoucí koncentrací roztoku HA(Na) roste také jeho viskozita. Zároveň ale, při nízkých smykových rychlostech viskozita roste s rostoucí molekulovou hmotností hyaluronanu. Ovšem při vysokých smykových rychlostech (1000 s^{-1}), viskozita roztoku HA(Na) nezávisí na jeho molekulové hmotnosti (při konstantní koncentraci) [77].

Jak již bylo zmíněno, viskoelastická závisí na pH roztoku a také na teplotě [59; 76]. Teplota úzce souvisí s hydrodynamickým objemem, který závisí na tuhosti daného řetězce. Ta je způsobena sterickým bráněním rotace kolem vazby mezi sacharidovými kruhy a dynamicky se tvořícími vodíkovými můstky na řetězci HA(Na). Se zvyšující se teplotou je otáčení kruhů kolem vazeb snazší a řetězce získávají na pružnosti, čímž se následně snižuje objem, a i výsledná viskozita. Tedy s rostoucí teplotou klesá viskozita roztoku HA(Na). Bylo prokázáno, že při změně teploty z 25 na 65 °C dochází ke snížení viskozity až o 25 % [76].

Hodnota disociační konstanty (pKa) hyaluronanu se pohybuje kolem hodnoty 3,0, což znamená, že jakákoli drobná změna pH bude mít vliv na ionizaci řetězců HA(Na). Při změně disociace se budou měnit i intramolekulární interakce mezi jednotlivými řetězci, a tedy i reologické vlastnosti roztoků [59]. Za normálních podmínek při neutrálním pH (pH 6,0-8,0) se závislost viskozity na pH příliš neprojeví. Ovšem při vysokém pH (např. pH 11,0) se zvyšuje rotace kolem glykosidických vazeb v důsledku přerušení vodíkových můstků, hydrodynamický objem řetězce se snižuje a tím i viskozita roztoku. Naopak při velmi nízkém pH (např. pH 2,5), kdy dochází k asociaci řetězců HA(Na), vzniká viskoelastický roztok připomínající gel [76].

2.4.2 Biologické funkce HA(Na)

Jak už bylo zmíněno, hyaluronan v rámci živých organismů, včetně lidského těla, vykonává řadu biologických funkcí, které jsou spojeny s jeho vlastnostmi. Například napomáhá hojení ran tím, že podporuje migraci a proliferaci buněk, usnadňuje pronikání bílých krvinek na místo postižení, zlepšuje hydrataci tkáně a tím rovněž přispívá k její obnově. [73; 78]. HA(Na) rovněž vykazuje antioxidační účinky, což znamená, že v kůži vycytává volné kyslíkové radikály, které vznikají působením UV záření ze slunce a které mají škodlivý účinek na lidský organismus, a převádí je na méně reaktivní formy [69; 73]. K jeho dalším funkcím v živých organismech patří schopnost regulace vody v kožní tkáni (hydratace), čímž mění její objem a stlačitelnost [63; 69; 78], ale i interakce s různými molekulami extracelulární matrix z něj dělá nepostradatelnou součást mezibuněčné hmoty. Hyaluronan také interaguje s různými receptory na povrchu buněk, čímž může aktivovat nitroibuněčnou komunikaci a stimulovat tak proliferaci a migraci buněk [63]. Také reguluje buněčnou adhezi a motilitu prostřednictvím receptorů, které interagují s cytoskeletem [2]. A jak již bylo řečeno, své nepostradatelné uplatnění nachází také v kloubní tekutině, kde působí jako tzv. tlumič vibrací a nárazů při zatížení, čímž snižuje tření pohybujících se kloubů a opotřebení kloubního aparátu.

Mimo výše uvedené funkce, které HA(Na) v živém organismu zastává a které jsou spjaty především s pojivovými tkáněmi a s ECM, bylo na základě studií proteinů s navázaným HA(Na) a specifických receptorů odhaleno, že biopolymer hraje významnou roli v procesu embryogeneze [69] a také dvojroli při vývoji nádoru. Vysokomolekulární hyaluronan se vyskytuje ve zdravé tkáni, kde udržuje homeostázu a zároveň omezuje buněčnou proliferaci. Ovšem při procesech jako je např. hojení ran, dochází ke snižování molekulové hmotnosti HA(Na) a konečná délka řetězce odpovídající oligosacharidům, které podporují angiogenezi

(novotvorba krevních kapilár), čehož využívají i nádorové buňky při transportu krve bohaté na kyslík a živiny. Na druhou stranu, zvýšená produkce vysokomolekulárního HA(Na) naopak souvisí s rezistencí vůči nádorům [78; 79].

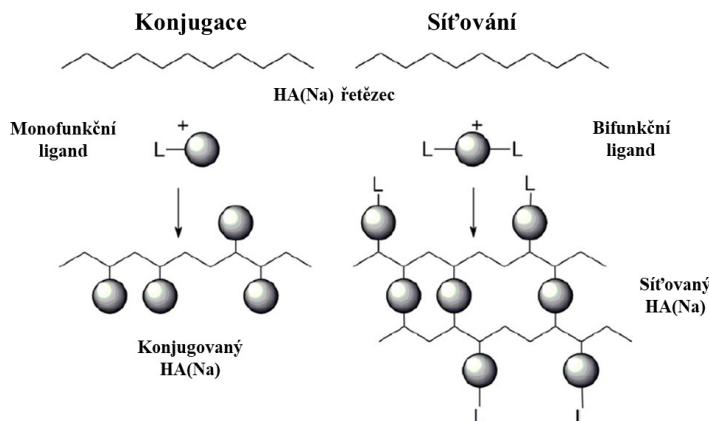
2.5 Aplikace HA(Na)

Aplikace hyaluronanu se odvíjí od jeho molekulové hmotnosti, jelikož ta ovlivňuje jeho vlastnosti i biologické funkce, které byly podrobně rozebrány v předchozí kapitole. Kromě biologických funkcí, které plní přirozeně v lidském těle, lze izolovaný hyaluronan využít v celé řadě aplikací v medicíně, kosmetice, farmacii atd. [2; 3].

Přírodní hyaluronan se využívá při léčbě **osteoartritidy** (degenerativní onemocnění kloubů), která je charakterizována změnami v buňkách i ECM vedoucí k měknutí až ztrátě kloubní chrupavky, synoviálnímu zánětu a jiným potížím spojených s kloubním aparátem. V synoviální tekutině dochází ke snížené syntéze HA(Na), zvýšené degradaci a snížení koncentraci i molekulové hmotnosti HA(Na). Při léčbě tohoto onemocnění se používá tzv. intraartikulární terapie HA(Na), tj. injekční aplikace HA(Na) do místa postižení, známá jako *viskosuplementace*. Aplikace HA(Na) do nemocného kloubu má za následek podporu hojení a obnovu kloubní chrupavky, udržení vitality a inhibici rozpadu chondrocytů (buňky tvořící chrupavku), stimulaci syntézy složek tvořící ECM (např. kolagen, proteoglykany) atd. [2]. Hyaluronan lze rovněž využít jako terapeutický prostředek pro léčbu patologických stavů souvisejících s **hojením kožních ran** jako jsou různé popáleniny, diabetické vředy, hypertrofické a keloidní jizvy [3]. V současné době se úspěšně používá jako součást řady obvazů na rány, které byly studovány a prokázaly klinickou účinnost u různých typů ran. Komerční produkty na bázi HA(Na) využívané při léčbě kožních ran jsou např. HYIODINE (Contipro), HYALOMATRIX (Anika) a IALUSET (Laboratoires Genévrier) [4].

2.6 Modifikace HA(Na)

Chemická modifikace HA(Na) může být v principu provedena dvěma různými způsoby – konjugací nebo síťováním (Obr. 9). Při konjugaci dochází k navázání substituentu na řetězec HA(Na) jednou vazbou, zatímco při síťováním se k sobě vážou různé řetězce HA(Na) dvěma nebo více vazbami [72].



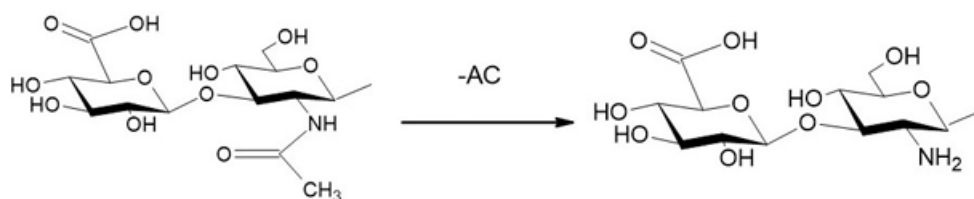
Obr. 9 – Schéma chemické konjugace a síťování řetězce HA(Na) [72]

Metodou síťování je docíleno zlepšení mechanických, botnacíh a viskoelastických vlastností hyaluronanu. Síťováním lze rovněž ovlivnit degradaci materiálů na bázi hyaluronanu a jejich setrvání v místě aplikace. Ze zesíťovaného hyaluronanu lze připravit např. hydrogely, scaffoldy či nosiče léčiv, aniž by došlo k omezení jeho biologické funkčnosti polymeru po dobu, kterou je možné řídit. Konjugace zahrnuje celou řadu chemických modifikací, při nichž v podstatě dochází k zavedení nových funkčních skupin na hyaluronový řetězec [80; 81]. Primárními místy na řetězci HA(Na), které podléhají chemické modifikaci, jsou karboxylová, hydroxylová a N-acetylová skupina, sekundárním místem modifikace pak mohou být tzv. sekundární hydroxylové skupiny na D-glukuronové kyselině. Většinou se tyto modifikace realizují ve vodném prostředí, pokud ovšem může během reakce dojít k hydrolýze, přistupují se k modifikacím v organických rozpouštědlech (např. DMSO). V takovém případě musí být sodná sůl kyseliny hyaluronové převedena buď na kyselou formu nebo na tetrabutylamoniovou sůl (TBA), která je rozpustná v organických rozpouštědlech [67; 72].

V následujících podkapitolách jsou uvedeny možné nejčastější způsoby chemické modifikace HA(Na).

2.6.1 Modifikace N-acetylové skupiny

Jednou z možných a patrně nejčastěji prováděných modifikací je modifikace N-acetylové skupiny tzv. *deacetylace*. Při ní nedochází k navázání nové funkční skupiny na řetězec hyaluronanu, ale k odštěpení N-acetylů z N-acetyl-D-glukosaminu jak je vidět níže na přiloženém schématu (obr. 10) [72].



Obr. 10 – Odštěpení N-acetylu z řetězce hyaluronanu [81]

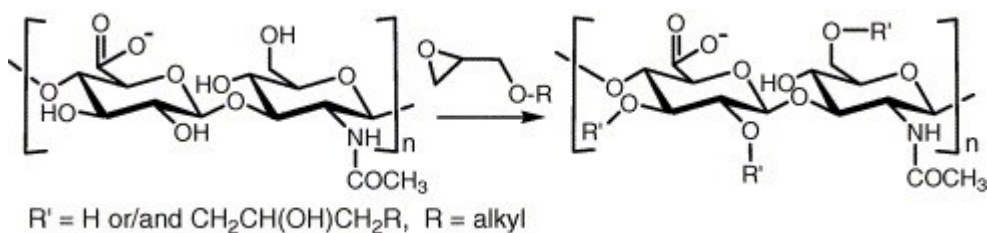
Výsledkem deacetylace je aminoskupina, která může reagovat s karboxylovou skupinou na D-glukuronové kyselině, a to stejným mechanismem jako níže popsané amidace karboxylové skupiny. Výsledkem reakce je tzv. samozesítný (auto-crosslinked) hydrogel [72]. Hydrogel lze připravit také reakcí aminoskupiny vzniklé deacetylací na jednom řetězci a karboxylovou skupinou na druhém řetězci hyaluronanu [81].

2.6.2 Modifikace hydroxylové skupiny

Jak už bylo uvedeno, kromě modifikace N-acetylové skupiny lze provést modifikaci hydroxylové skupiny, která představuje jednu z dalších možností, jak chemicky modifikovat hyaluronový řetězec. Hydroxylové skupiny na hyaluronovém řetězci lze rozdělit na primární, které jsou lokalizované na N-acetyl-D-glukosaminu, a sekundární, které se nachází na D-glukuronové kyselině [80]. Mezi způsoby modifikace této skupiny patří například *etherifikace*, *esterifikaci* nebo *oxidace* [72].

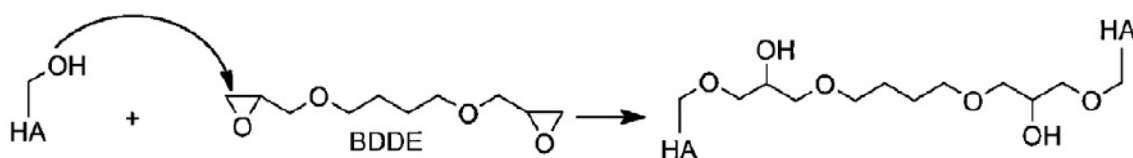
Etherifikace

Etherifikace zprostředkovaná alkylačními činidly je jednou z běžných modifikací hydroxylové skupiny mnoha polysacharidů. V případě hyaluronanu se tyto reakce využívají k vytvoření zesíťované struktury a přípravě hydrogelů či scaffoldů [80]. Rozpustné HA-ethery byly připraveny reakcí 2-alkyloxymethyloxiranu s hyaluronanem za alkalických podmínek (Obr. 11). Dle výsledků autorů Mlčochová et al. (2007) tyto deriváty vykazovaly vysokou biokompatibilitu a vhodnou dobu enzymatické degradability v závislosti na délce alkalického řetězce a stupni substituce [82].



Obr. 11 – Příprava HA-etherů [82]

Ke vzniku zesíťovaných struktur prostřednictvím etherových vazeb na hydroxylových skupinách HA(Na) lze využít také epoxidy, např. 1,4-butandioldiglycidyl ether (BDDE), jako síťovací činidlo, které zprostředkuje vazbu mezi řetězci HA(Na) za vzniku hydrogelu (obr. 12). Reakce spočívá v otevření epoxidového kruhu BDDE, který dále reaguje s hydroxylovými skupinami HA(Na) [72].

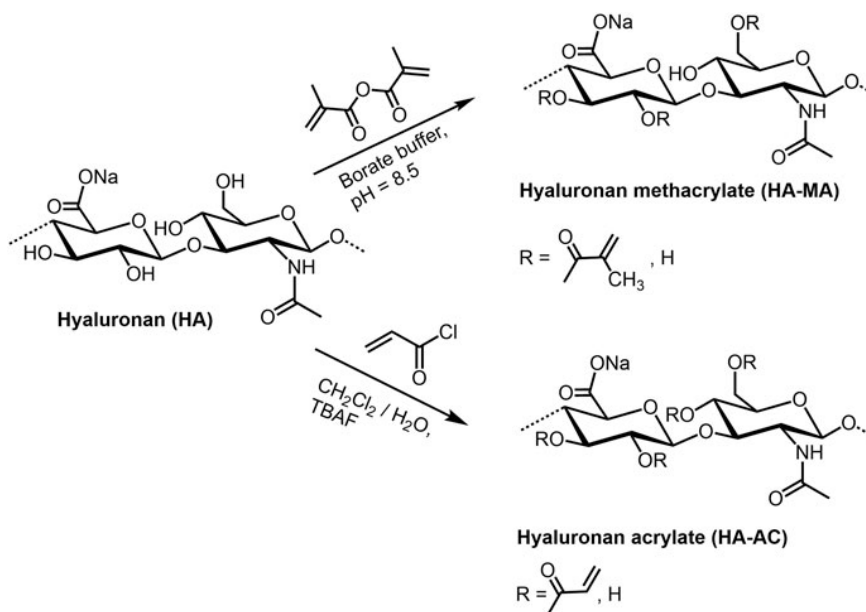


Obr. 12 – Reakce HA(Na) s BDDE za vzniku zesíťované struktury [72]

Kromě BDDE, lze pro síťování HA(Na) využít také butandiol-diglycidylether, ethylenglykol-diglycidylether [80] či divinylsulfon v alkalickém prostředí [72].

Esterifikace

Esterifikace hydroxylových skupin nebývá často realizovanou modifikací kvůli nepříliš dobré rozpustnosti HA(Na) řetězce v rozpouštědlech vhodných pro acylační reakce a také kvůli nižší reaktivitě sekundárních hydroxylových skupin [80]. K esterifikaci hydroxylových skupin patří např. reakce HA(Na) s anhydridem kyseliny methakrylové nebo akryloylchloridem za specifických podmínek (obr. 13). Methakrylátový či akrylátový derivát lze následně zesíťovat pomocí UV záření za vzniku hydrogelu [83; 84].

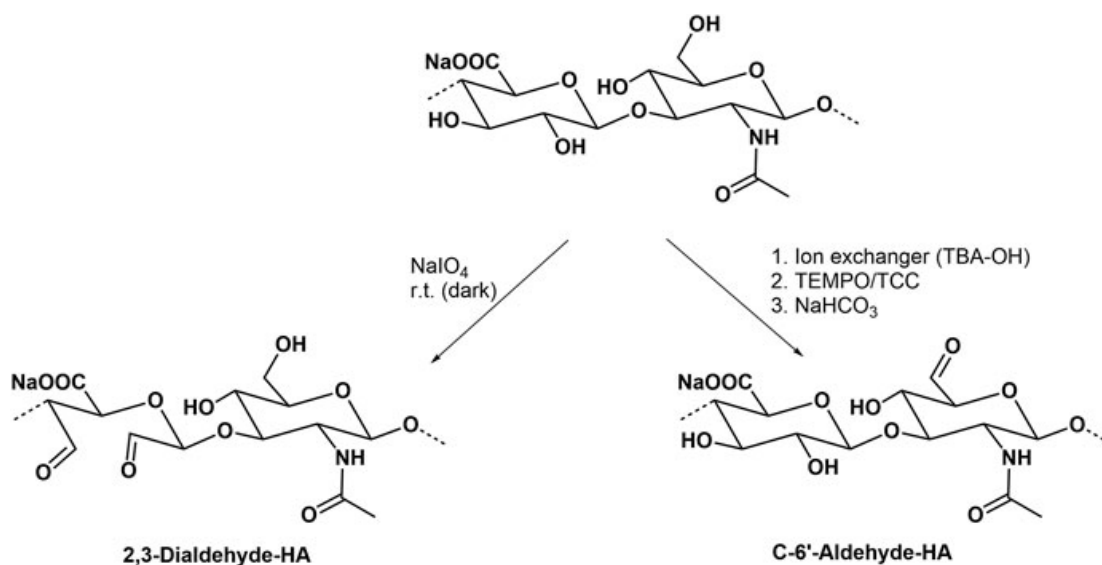


Obr. 13 – Příprava (meth)akrylátového derivátu HA(Na) [80]

Výsledky práce Seidlits et al. (2010) ukazují, že mechanické vlastnosti takto připravených hydrogelů mají rozhodující vliv na diferenciaci neurálních progenitorových buněk (tj. nediferencované neurální buňky), což má velký klinický význam, jelikož tyto buňky mohou dozrát v dopaminergní neurony, tedy buňky, které degenerují u pacientů trpících Parkinsonovou chorobou [83].

Oxidace

Oxidace je další možností, jak modifikovat hydroxylové skupiny na hyaluronovém řetězci. Slibnou modifikací sekundárních hydroxylových skupin představuje oxidace pomocí jodistanu sodného (NaIO_4). Reakcí s jodistanem dochází k rozštěpení vazby mezi uhlíky na sacharidovém kruhu za vzniku dvou aldehydických skupin (obr. 14). Tyto mohou dále reagovat se zbylými hydroxylovými skupinami na sousedních řetězcích, které nebyly zoxidovány, za vzniku cyklických hemiacetalů. Aldehydické skupiny na oxidovaném HA(Na) řetězci s aminovou skupinou vytváří tzv. Schiffovu bázi ($\text{R}_2\text{C}=\text{NR}'$, $\text{R}' \neq \text{H}$), čímž vzniká zesíťovaná struktura (hydrogel) [85; 86].



Obr. 14 – Možnosti oxidace HA(Na) řetězce [80]

Alternativou NaIO_4 je oxidace primární hydroxylové skupiny zprostředkovaná 2,2,6,6-tetramethylpiperidinyl-1-oxy radikálem (TEMPO) za vzniku aldehydické skupiny na N-acetyl-D-glukosaminu (obr. 15). V tomto případě zůstávají sekundární hydroxylové skupiny, a tím i sacharidový kruh D-glukuronové kyseliny, nedotčeny. I z takto oxidovaného HA(Na) lze připravit hydrogely, které lze využít jako nosiče léčiv nebo na konjugaci proteinů.

2.6.3 Modifikace karboxylové skupiny

Mezi modifikace karboxylové skupiny na řetězci hyaluronanu patří např. *esterifikace* a *amidace*, které se provádějí po předchozí aktivaci karboxylové skupiny pomocí různých aktivačních činidel [67], nejčastěji karbodiimidů (např. EDC, DMTMM) [72].

Esterifikace

Esterifikací karboxylové skupiny D-glukuronové kyseliny pomocí různých typů alkoholů lze připravit deriváty hyaluronanu, které se souhrnně označují zkratkou HYAFF. Do této skupiny patří například benzylester (HYAFF 11) nebo ethylester (HYAFF 7) hyaluronanu [80; 87]. Esterifikací dochází ke snížení hydrofilních záporně nabitých karboxylových skupin, a tím ke zvýšení hydrofobního charakteru polymerního řetězce, čímž vzniká pevnější a stabilnější polymerní řetězec, který je méně náchylný k degradaci zprostředkované enzymy [87; 88].

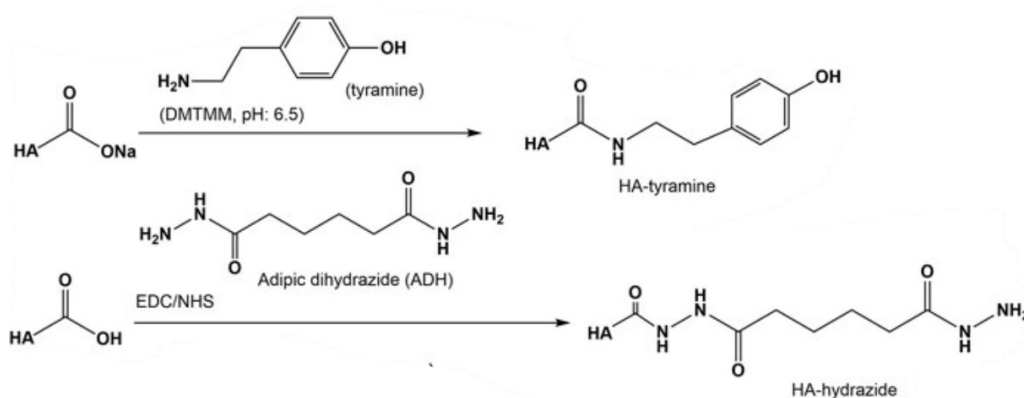
Jiný přístup přípravy esterových derivátů využili autoři Hirano et al. (2005), kteří připravili methyl-esterový derivát reakcí hyaluronanu s trimethylsilyldiazomethanem [89]. Autoři Huerta-Angeles et al. (2014) pak zase ve své práci popsali metodu přípravy amfifilního hyaluronanu esterifikací zprostředkované alkyly vyšších mastných kyselin s různou délkou řetězce (např. stearová, lineolová nebo kyselina arachidová) [90].

Amidace

Metodou amidace dochází k nahrazení karboxylové skupiny na HA(Na) skupinou amidovou ($-NH_2$). Samotné amidaci předchází aktivace karboxylové skupiny různými aktivačními činidly, jako jsou např. karbodiimidy, 2-chlor-1-methylpyridinium jodid nebo 1,1-karbonyldiimidazol [67; 72]. Aktivace pomocí jodidu nebo imidazolu se provádí v organických rozpouštědlech (dimethylsulfoxid (DMSO), dimethylformamid (DMF)), ve kterých je HA(Na) nerozpustný, a proto je před aktivací nutná konverze HA(Na) na TBA sůl, včetně dalších purifikačních kroků. Z tohoto důvodu se při amidaci častěji využívají jako aktivační činidla karbodiimidy. S výhodou lze tyto reakce provádět ve vodě, čímž odpadá převádění HA(Na) na TBA sůl [67].

Nejběžněji používané karbodiimidy jsou N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid (EDC) spolu s koaktivátorem N-hydroxysukcinimidem (NHS) nebo 1-hydroxybenzotriazolem (HOBt) [67; 80]. Mechanismus amidace pomocí EDC popsali ve své práci Nakajima a Ikada (1995). Prvním krokem je již zmíněná aktivace karboxylové skupiny pomocí EDC, přičemž vzniká meziproduct zvaný O-acylizomočovina. Ta je vysoce

reaktivní a za přítomnosti vody dochází k jejímu přeskupení na stabilní N-acylmočovinu, která brání jakékoli další reakci s aminy [91]. K potlačení vzniku stabilní N-acylmočoviny se do reakce právě přidává zmíněný NHS nebo HOBt [92]. Druhým krokem je poté samotný nukleofilní atak aktivovaného HA(Na) aminovou skupinou, kdy dochází ke vzniku amidové vazby [91]. Na aktivovanou karboxylovou skupinu se mohou poté vázat látky jako je např. dihydrazid kyseliny adipové, tyramin, aminoacetaldehyd dimethylacetal nebo poly-N-isopropylakrylamid (obr. 15) [93].



Obr. 15 - Schéma amidace pomocí EDC/NHS a DMTMM [80]

Autoři D'Este, Eglin a Alini (2014) ve své studii navrhli možnou alternativu k výše uvedené aktivaci pomocí EDC/NHS. Alternativa spočívá v nahrazení EDC/NHS za látku 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorfolinium-chlorid (DMTMM), díky které vzniká HA-ester, na který se mohou vázat aminové skupiny. Výsledky experimentu prokázaly vyšší účinnost vzniku amidových vazeb u vzorků aktivovaných DMTMM oproti EDC/NHS. Také bylo zjištěno, že reakce s DMTMM není tolik citlivá na změnu pH, na rozdíl od reakce s EDC/NHS. A za další výhodu aktivace pomocí DMTMM lze považovat menší množství reaktivních látek, a s tím související složitější dočišťovací proces [93].

Mechanismem amidace lze na HA(Na) řetězec navázat přes amidovou vazbu také látky obsahující thiolové skupiny, např. cysteamin [8], cystein [7] nebo hydrazidy obsahující thiolovou skupinu [94], čímž lze připravit thiolované deriváty hyaluronanu.

2.7 Thiolovaný hyaluronan

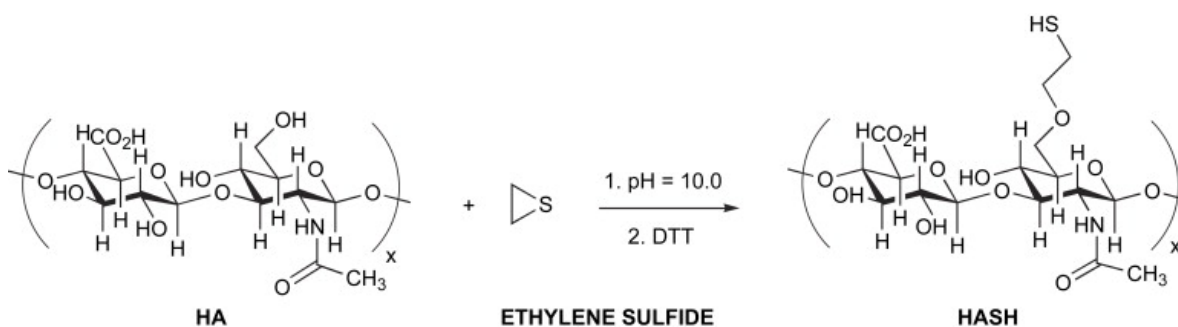
Za thiolované polymery nebo-li „thiomery“ lze považovat polymery, které vznikly kovalentním navázáním thiolových skupin na páteř polymerního řetězce. V 80. letech minulého století bylo zjištěno, že jsou vysoce mukoadhezivní a jsou schopny vytvářet disulfidovou vazbu s glykoproteiny bohatých na cystein, keratinem nebo mezi sebou za

vzniku zesíťované struktury. Přítomnost thiolových skupin významně ovlivňuje vlastnosti těchto polymerů [95].

2.7.1 Syntéza a struktura HA-SH

Struktura thiolovaného hyaluronanu se odvíjí od použitého thiolačního činidla a také od místa navázání tohoto činidla či jeho části na řetězec hyaluronanu. Jinak řečeno, struktura HA-SH je závislá na způsobu přípravy. Polymer lze připravit několika způsoby za použití různých thiolačních činidel. Níže je uveden výčet některých z nich.

Jednu z takových metod použili ve své práci autoři Serban et. al (2008) a Agrahari et al. (2016), kteří připravili 2-thioethyletherový derivát hyaluronanu pomocí ethylensulfidu (obr. 16) [96; 97].

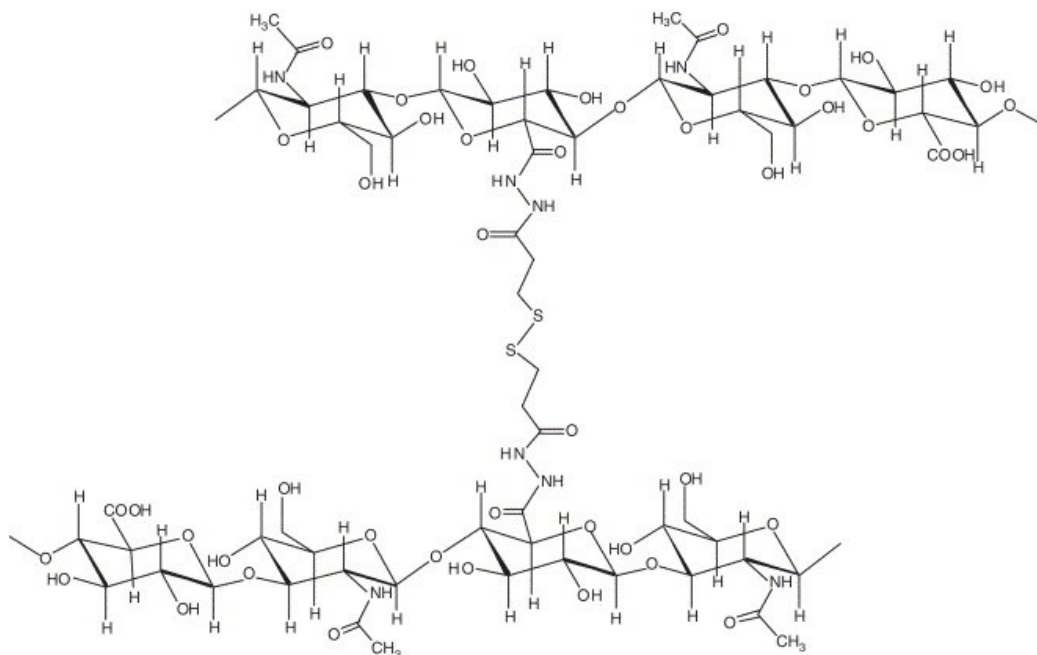


Obr. 16 – Příprava thiolovaného hyaluronanu pomocí ethylensulfidu [96]

Serban et al. (2008) však nebyly schopni tento derivát zesíťovat disulfidovou vazbou ani bivalentními elektrofilů, a připravit tak hydrogelovou strukturu. Tento fakt přisuzují jednak nízkému stupni substituce thiolové skupiny, a jednak stérické zábraně, která blokuje thiolové skupiny a znemožňuje jim tak vytvářet bivalentní vazby nezbytné pro vznik sítě [96].

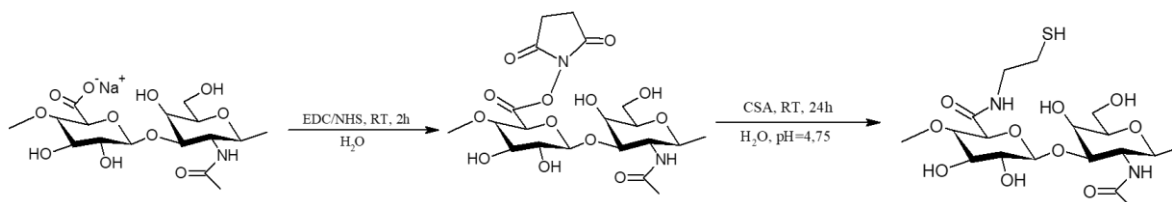
Autoři Abrahari et al. (2016) ve své práci sice použili stejný mechanismus přípravy HA-SH, ale nezpracovávali jej ve formě hydrogelu, nýbrž ve formě vláken, které připravili metodou elektrostatického zvláknění za podpory polyethylenglykolu [97].

Thiolovaný hyaluronan lze připravit i pomocí dithiobis-propanového dihydrazidu (DTP) (obr. 17), který ve své studii použili autoři Liu, Shu a Prestwich (2005). Výsledkem jejich práce byl zesíťovaný hydrogelový film na bázi thiolovaného hyaluronanu, který lze potenciálně jako substrát pro růst buněk [98].



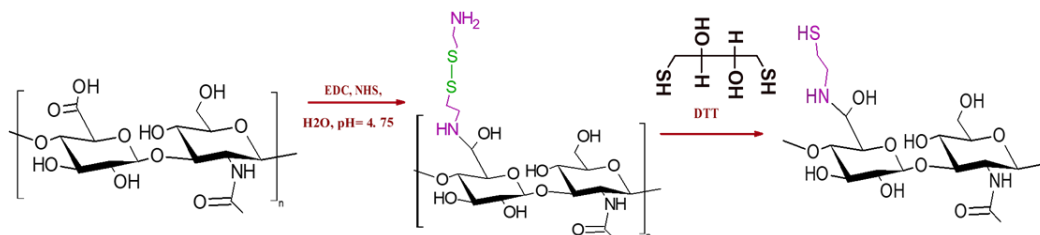
Obr. 17 – Thiolovaný hyaluronan připravený pomocí DTP [98]

V rámci experimentální části diplomové práce byl připraven thiolovaný hyaluronan dle autorů Bian et al. (2016), kteří jako thiolační činidlo použili cysteamin (obr. 18). Prvním krokem syntézy je již zmíněná aktivace karboxylové kyseliny pomocí EDC a následná stabilizace pomocí NHS [8].



Obr. 18 – Syntéza thiolovaného hyaluronanu pomocí cysteaminu [8]

V přítomnosti vzdušného kyslíku přednostně vznikají disulfidové vazby mezi thiolovými skupinami na řetězci hyaluronanu, čímž předčasně vzniká nerozpustná zesíťovaná struktura. Kromě nízkého pH, které blokuje vznik disulfidových vazeb, se k jejich redukci využívá dithiothreitol (DTT). Ten při syntéze funguje jako redukční činidlo, které štěpí vzniklé disulfidové vazby, a umožňuje tak přípravu thiolovaného hyaluronanu s volnými thiolovými skupinami (obr. 19) [8; 99].



Obr. 19 - Redukce disulfidových vazeb na HA-SH pomocí DTT

2.7.2 Vlastnosti thiolovaného hyaluronanu (HA-SH)

Mukoadheze

Mukoadheze je definována jako adheze mezi dvěma materiály, z nichž alespoň jeden je povrch sliznice [100]. Hydrogely na bázi thiolovaných polysacharidů (př. hyaluronan, chitosan, dextran) obecně vykazují lepší mukoadhezivní vlastnosti než hydrogely na bázi polymerů bez thiolových skupin [101]. Thiolovaný hyaluronan není výjimkou. Dle studie autorů Kafedjiiski et al. (2007) jsou mukoadhezivní vlastnosti thiolovaného hyaluronanu 6,5krát vyšší než mukoadheze čistého hyaluronanu [7]. Vyšší mukoadheze HA-SH je důsledkem disulfidových můstků mezi thiolovými skupinami polymerního řetězce a mucinů bohatých na cystein, které jsou produkovány buňkami epitelu [102]. Schopnost mukoadheze thiolovaných polymerů zvyšuje u těchto polymerů pevnost v tahu, bobtnání, prodlužuje dobu setrvání a také zlepšuje biologickou dostupnost [100].

Koheze

Adhezivní a kohezivní vlastnosti polymerů mají zásadní vliv na jejich botnací schopnost. Botnací kapacitu polymeru lze obecně určit měřením absorbované vody v závislosti na čase [102]. Na základě literatury bylo zjištěno, že HA-SH má vyšší botnací kapacitu než polymery bez thiolových skupin, např. hyaluronan modifikovaný L-cysteinem má 3,5krát lepší botnací schopnost než čistý hyaluronan [103]. Mimo jiné bylo zjištěno, že není nutné dosáhnout maximální botnací kapacity thiolovaných polymerů, ale je potřeba najít rovnováhu mezi celkovou stabilitou a botnací kapacitou polymeru. Při botnání se totiž zvětšuje plocha polymeru/hydrogelu, kterou je potřeba rozložit, čímž se stává přístupnější pro enzymy štěpící hyaluronan (hyaluronidázy). Jinak řečeno, čím vyšší je botnací schopnost polymeru, tím rychleji dochází k degradaci hydrogelu, protože dochází ke zvětšení jeho povrchu, a tím i rychlejšímu přístupu přítomných enzymů. Hyaluronidázy tak mohou rychleji štěpit hyaluronan za vzniku fragmentů kyseliny D-glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu [102]. Dle Bian et al. (2016) vyšší stabilitu vykazuje HA-SH s vyšším stupněm

substituce (DS) thiolových skupin (nad 50 %), jelikož při botnácích testech nedošlo k zřetelnému nárůstu průměru HA-SH hydrogelu [8].

Stabilita vůči degradaci

Jak již bylo zmíněno výše, mezi stabilitou a botnáním HA-SH existuje závislost, kterou je potřeba brát při přípravě HA-SH v úvahu. Protože příliš velká botnací schopnost může negativně ovlivnit stabilitu polymeru a vést k rychlejší degradaci [102]. Dle výsledků autorů Laffleur, Wagner a Barthelmes (2015) je stabilita thiolovaného hyaluronanu 1,5krát vyšší než stabilita nemodifikovaného HA(Na) [103]. Kromě stability testovali tito autoři o zkoušky dezintegrace, kterými lze charakterizovat stupeň rozložení zkoumaného materiálu. Zjistili, že ve slinném médiu o pH 6,75 se čistý HA(Na) rozpadne po 1 hod, zatímco HA-SH až po 23 hod. Příčina vyšší stability HA-SH oproti čistému HA(Na) pravděpodobně souvisí s přítomností intra- a inter- disulfidové vazby mezi thiolovými skupinami [103]. Stabilitu hydrogelů na bázi HA-SH navíc posiluje vysoký stupeň thiolových skupin, který zvyšuje hustotu zesíťování a tím i stabilitu celé struktury [8].

Biokompatibilita

Biokompatibilita, která byla podrobněji rozebrána již dříve v textu, představuje důležitou vlastnost při vývoji nových materiálů s cílenou aplikací do lidského těla, ať už ve formě struktury pro podporu proliferace a diferenciaci buněk či nosiče léčiv. Po implantaci materiálu do těla by biopolymer neměl vyvolávat žádnou nežádoucí reakci (např. alergické či zánětlivé reakce) [102]. Dle výsledků prací několika autorů, thiolovaný hyaluronan není toxický a neovlivňuje životaschopnost (viabilitu) různých typů buněk. Například testy viability buněčné linie *Caco-2* (buňky epitelu tlustého střeva) inkubované v matrici HA-SH potvrdily vysoké hodnoty životaschopnosti i proliferace testovaných buněk (po 24 hod byla viabilita buněk cca 80 – 90 %) [104-106]. Mimo buněk epitelu tlustého střeva, byly na HA-SH matrici testovány např. buněčné linie 3T3 (myší embryonální fibroblasty), HMEC (lidské epitelové buňky mléčné žlázy) a RAW 264.7 (myší makrofágy). U všech zmíněných buněčných linií byly zaznamenány vysoké hodnoty jejich životaschopnosti i proliferace [107].

Viskoelastická

Vzhledem k tomu, že tuhost hydrogelů má zásadní vliv na diferenciaci a proliferaci buněk, je znalost viskoelastických vlastností HA-SH matrice velmi důležitá [106]. Z výsledků práce Bian et al. (2016) je patrné, že tuhost hydrogelů roste s rostoucím stupněm substituce

thiolových skupin, zároveň však při stejném stupni substituce roste tuhost matrice HA-SH a to s rostoucí molekulovou hmotností [8]. Vyšší tuhost HA-SH oproti HA(Na) ve své práci potvrdili i Asim et al. (2020). Čím vyšší je elastický modul, tím lepší je schopnost polymeru pružně uchovávat deformační energii. A čím vyšší bude stupeň zesíťování HA-SH, tím vyšší bude elastický modul, tedy i tuhost výsledného hydrogelu na bázi HA-SH [106]. Trochu jiným způsobem zkoumali kinetiku enzymatické degradace HA(Na) a HA-SH Kafedjiiski et al. (2007), a to na základě změny viskoelastického chování. Zjistili, že pokles viskozity HA-SH probíhal, ve srovnání s HA(Na), mnohem pomaleji. Navíc u čistého hyaluronanu došlo během enzymatické reakce k úplné hydrolyze, zatímco u HA-SH jen z 80 %. Na druhou stranu pokles viskozity HA-SH byl zase rychlejší ve srovnání se zesíťovanou formou HA-SH, u které během 60 min nebyla zaznamenána výraznější změna viskozity [7].

2.7.3 Využití HA-SH

Thiolovaný hyaluronan lze díky jeho vlastnostem využít v celé řadě aplikací. Tak například HA-SH ve formě vláken připravených elektrostatickým zvlákňováním, lze využít jako **nosič léčiva tenofovir**, jenž se využívá při prevenci vaginálního přenosu viru HIV [97]. Většinou se ale HA-SH aplikuje ve formě hydrogelů [108], proto jsou další možné aplikace uvedeny v kapitole 5, která se této problematice věnuje podrobněji .

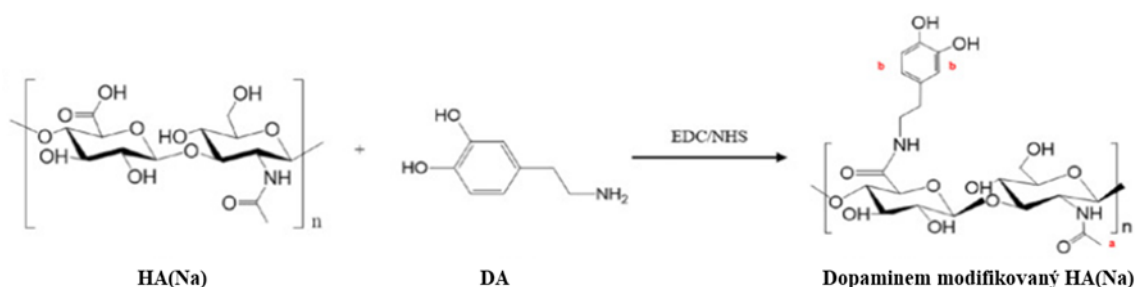
2.8 Hyaluronan konjugovaný dopaminem (HA-DA)

Dobrá adheze hydrogelu k hostitelské tkáni je klíčová pro aplikaci připraveného biomateriálu do lidského těla. Adhezivní injektovatelné hydrogely mohou zlepšit invazivní podávání léků, udržet aplikované látky v místě podání a zároveň zabránit jejímu odtrhnutí z tkáně. Tato vlastnost je důležitá například pro injekční aplikaci *in situ* do hlasivkových záhybů, jelikož nedostatečná adheze hydrogelu ke tkáni může vést k tzv. okluzi (uzavření) dýchacích cest a k možnému úmrtí pacienta. Adhezivní vlastnosti nativního hyaluronanu může zvýšit přítomnost katecholové skupiny na jeho řetězci [11]. Zmíněnou katecholovou skupinu obsahuje např. dopamin, který byl v této práci využit mimo jiné i k modifikaci řetězce samotného hyaluronanu.

2.8.1 Syntéza HA-DA

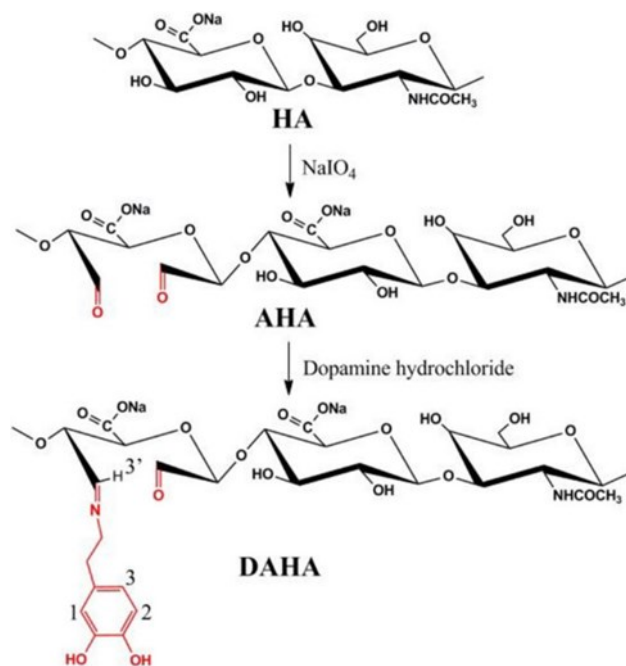
Jedním z mechanismů přípravy HA-DA je modifikace karboxylové kyseliny na řetězci hyaluronanu, kdy dochází ke vzniku amidové vazby mezi aminovou skupinou dopaminu a karboxylovou skupinou hyaluronanu prostřednictvím EDC/NHS chemie (v prostředí

s kontrolovaným pH (MES pufr) MES (obr. 20) [109]. Tímto způsobem přípravy nicméně nelze získat příliš vysoký stupeň substituce katecholových skupin (~10 %), což je pravděpodobně způsobeno nežádoucí autooxidací dopaminu za vzniku polydopaminu. Navíc *in vitro* testy ukázaly, že HA-DA s nízkou substitucí dopaminu poměrně rychle degraduje, čímž se snižuje doba potřebná pro regeneraci tkáně a hojení ran [110].



Obr. 20 – Schéma syntézy HA-DA pomocí EDC/NHS chemie

Uvedené nedostatky konjugace dopaminu prostřednictvím EDC/NHS chemie lze vyřešit využitím jiného způsobu přípravy HA-DA, kterým je oxidace disacharidového kruhu D-glukuronové kyseliny prostřednictvím jodistanu sodného, který je schopen rozštěpit vazbu mezi uhlíky za vzniku dvou aldehydových skupin v prostředí fosfátového pufru (pH 5,0). Na ty se pak může s využitím reakce Schiffovy báze navázat dopamin, tak jak je naznačeno na obr. 21 [11; 110]. Takto připravené HA-DA vykazovaly vyšší stupeň substituce katecholových skupin (~25 %). Kromě toho vzniklé di-aldehydových skupiny mohou poskytnout vyšší účinnost navázání dopaminu na řetězec HA(Na) ve srovnání s monofunkčními karboxylovými skupinami u syntézy s EDC/NHS [110].



Obr. 21 – Schéma syntézy HA-DA oxidací D-glukuronové kyseliny na řetězci HA(Na)

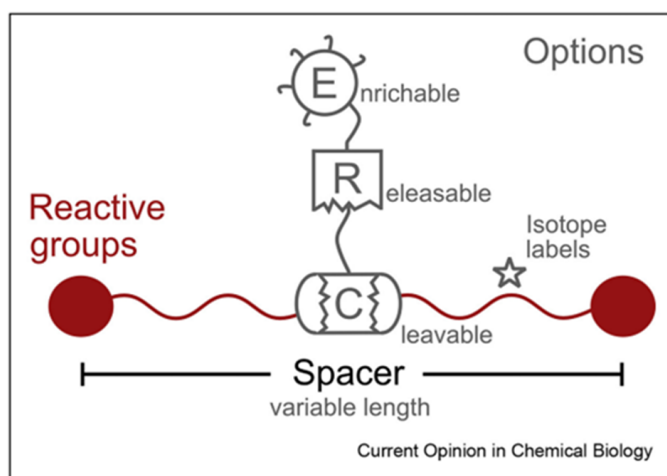
2.8.2 Vlastnosti HA-DA

Jednou z nejdůležitějších vlastností HA-DA produktu je výsledná **adheze**. Tkáňová lepidla na bázi hyaluronanu, která jsou prostřednictvím fotoreaktivní skupiny na jeho řetězci (např. azidofenylová nebo methakrylová skupina) síťována UV světlem za vzniku adhezivního hydrogelu, již byla vyvinuta [111; 112]. Nicméně tyto hydrogely nevykazují příliš dobrou adhezi k povrchu tkáně, což je zapříčiněno zejména nedostatečným zesíťováním v důsledku slabého pronikání UV světla, ale také kvůli jeho škodlivé povaze vůči lidské tkáni. Možné řešení těchto nedostatků s UV světlem nabízí právě dopaminem konjugovaný hyaluronan (HA-DA) [110]. Dopaminem konjugovaný hyaluronan vykazuje mnohem vyšší adhezi k hostitelské tkáni (~ 90 kPa) než hydrogely síťované UV světlem (~ 13 kPa) nebo komerční fibrinová lepidla (16 – 68 kPa) [13; 112; 113]. Adhezivní vlastnosti HA-DA navíc ovlivňuje způsob přípravy konjugátu. Vyšší adheze ke tkáni byla změřena u HA-DA připraveného navázáním dopaminu na aldehydovou skupinu vzniklou rozštěpením vazby mezi uhlíky na D-glukuronové kyselině hyaluronanu (zmíněných ~ 90 kPa) oproti HA-DA připraveného prostřednictvím EDC/NHS chemie (~ 20 kPa) [110]. Adheze hydrogelu je také závislá na stupni substituce dopaminu - čím vyšší je stupeň navázání katecholových skupin na polymerním řetězci, tím vyšší adhezi hydrogely vykazují [114]. Dopamin také hyaluronanu propůjčuje **antioxidační schopnost**, která je žádoucí např. při léčbě poraněné tkáně [110]. Jelikož konjugát podporuje viabilitu buněk a vykazuje zanedbatelnou až žádnou

cytotoxicitu, lze hovořit o **biokompatibilním** materiálu [115]. Optimální **mechanické vlastnosti** připravených hydrogelů na bázi HA-DA představují další z důležitých parametrů pro následné aplikace. Podle výzkumu Melnik et al. (2022) se tuhost připraveného konjugátu HA-DA odvíjí dle stupně substituce dopaminu, na čase, kdy byla tuhost po zesíťování změřena a také na typu iniciátoru síťování (NaIO_4 nebo NaOH) [12]. Z výše uvedeného je zřejmé, že problematika a využití dopaminu je poměrně rozsáhlé, a proto bude detailněji dopamin jako monomer polydopaminu rozebrán v kapitole 4.

3 CROSSLINKERY

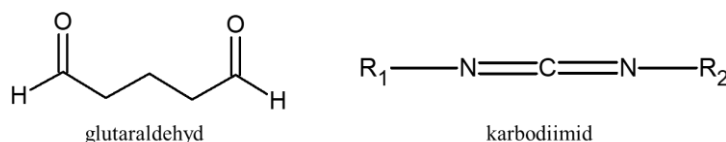
Nativní polymery většinou nedosahují požadovaných mechanických, biologických a degradačních vlastností, které by materiály aplikované jako scaffolds či nosiče léčiv měly splňovat. Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, jejich vlastnosti lze upravit modifikací (konjugací) polymerního řetězce nebo přímým síťováním, při kterém se vytváří příčné vazby mezi polymerními řetězci za vzniku 3D struktury (hydrogelu). Proces síťování lze iniciovat pomocí malých molekul, které se nazývají crosslinkery [116]. Crosslinkery (síťovací činidla) lze definovat jako molekuly obsahující ve své struktuře dvě nebo více reaktivních skupin, které jsou schopny se vázat ke specifickým funkčním skupinám (např. aminy, thioly) na polymerních řetězcích nebo jiným molekulách a mohou tak přeměnit viskózní (lineární, popř. rozvětvené) polymerní řetězce v nerozpustnou síť [117]. Při přípravě hydrogelu pro dané aplikace by měl být brán v potaz, vedle výběru vhodného materiálu, mechanických vlastností a biologické funkčnosti, také typ a chemicko-fyzikální vlastnosti zvoleného síťovacího činidla [116]. Crosslinkery musí ve své struktuře obsahovat minimálně dvě reaktivní skupiny (obr. 22). Navíc mohou být součástí struktury také štěpitelné, uvolnitelné nebo obohacující funkční skupiny, které dodávají crosslinkerům jejich specifické vlastnosti pro konkrétní aplikace. Tzv. *spacer* je potom skupina, které odděluje reaktivní skupiny a funguje jako tzv. distanční vložka, která omezuje délku molekuly crosslinkeru, jelikož délka tohoto *spaceru* podstatně ovlivňuje samotné síťování. Nejjednodušším příkladem crosslinkeru je *bis(2,5-dioxypyrrolidin-1-yl)oktan-dioát* (DSS), ve kterém je *spacer* tvořen alkylovým řetězcem [118].



Obr. 22 – Schématické znázornění struktury obecného crosslinkery. Červeně jsou uvedeny povinné vlastnosti, šedě potom volitelné [118].

Výběr síťovacích činidel probíhá na základě jejich chemické reaktivity, tj. dle jejich specifčnosti pro dané funkční skupiny, a také zamýšlené aplikace. Kritéria pro volbu vhodného crosslinkeru jsou např. zmíněná chemická specifčnost, délka *spaceru* (vzdálenost mezi reakčními skupinami, viz obr. 22), rozpustnost ve vodě, propustnost buněčnými membránami, spontánní reaktivita, štěpitelnost, stejné nebo různé reaktivní skupiny atd. [119].

Asi nejpoužívanější skupinou crosslinkerů jsou *chemické crosslinkery*, kterými lze ovlivnit fyzikálně-chemické vlastnosti polymerní sítě, včetně mechanických vlastností (pevnost v tlaku, tuhost), interakci s buňkami, odolnost vůči enzymatické a chemické degradaci či zachování tvarové paměti. Výsledný materiál by však neměl vykazovat toxické účinky [116]. Mezi síťovací činidla lze zařadit také *iontové crosslinkery*, které mohou spojit polymerní řetězce s jinými částmi polymeru prostřednictvím iontových interakcí. Iontové crosslinkery mají oproti chemickým tu výhodu, že vykazují vyšší biokompatibilitu. Příkladem takového iontového crosslinkeru je kationt vápníku (Ca^{2+}), který může s aniontovým polymerem vytvořit 3D síť prostřednictvím působení elektrostatických interakcí [120]. Vazba mezi polymerními řetězci nemusí být selektivní, ale lze využít také fotoreaktivních skupin (př. azidofenyl), jejichž prostřednictvím dochází k síťování, které je iniciováno specifickým zářením (UV světlo) [112]. Chemické crosslinkery mohou být dále rozděleny do dvou kategorií: na (1) *zero-length crosslinkery* a (2) *non-zero-length crosslinkery*. Do první kategorie jsou zahrnuty takové crosslinkery, které iniciují vazbu mezi jednotlivými funkčními skupinami na polymerních řetězcích (např. *acylazidy* nebo *karbodiimidy*). Do druhé kategorie se řadí *bi-* nebo *multi-*funkční molekuly, které tvoří jakýsi „most“ mezi polymerními řetězci prostřednictvím např. $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$ nebo $-\text{OH}$ skupinami. Mezi tyto molekuly/látky patří např. *glutaraldehyd*, *polyepoxydy* nebo *izokyanáty* [121].



Obr. 23 – Chemická struktura glutaraldehydu a obecného karbodiimidu

Jak již bylo zmíněno, do skupiny *zero-length crosslinkerů* patří *karbodiimidy* (obr. 23), které ve své struktuře obsahují funkční skupinu $\text{N}=\text{C}=\text{N}$, na kterou jsou navázány různé substituenty. Mezi karbodiimidy využívané jako crosslinkery patří např. *1-ethyl-3-(3-*

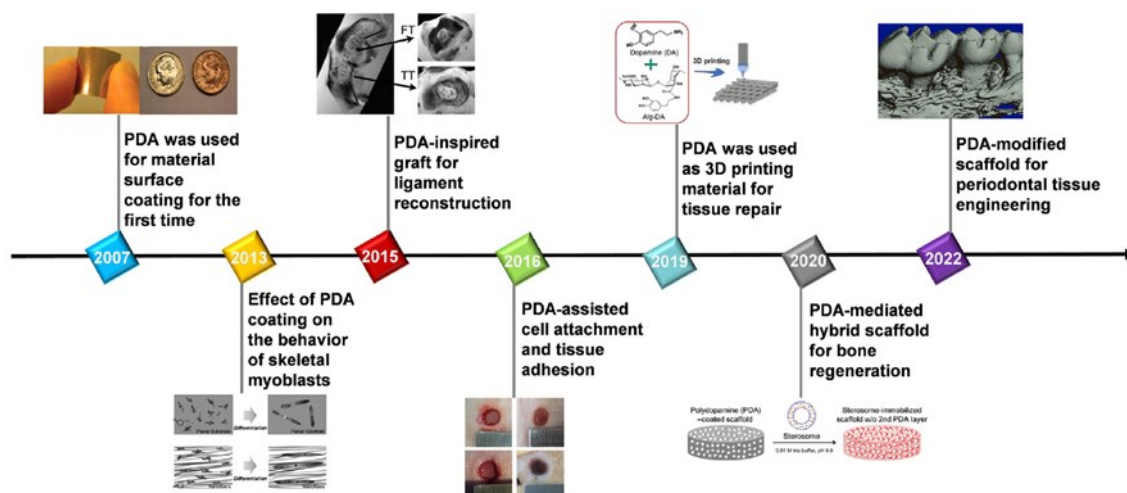
dimethylaminopropyl) karbodiimid (EDC), který reaguje s celou řadou funkčních skupin jako je hydroxylová, karboxylová nebo thiolová. Síťovací aktivita EDC probíhá většinou při nízkém pH (pH 4,5) a v pufru neobsahující karboxylové a aminové skupiny (např. 4-morpholinoethansulfonová kyselina). K aktivaci karboxylové skupiny lze také použít EDC v kombinaci s N-hydroxysukcinimidem (NHS) v prostředí neutrálního pH. Výhodou tohoto způsobu síťování je výborná rozpustnost přítomných látek ve vodě, čímž mohou být nezreagované látky ze struktury snadno odstraněny. Ve srovnání s glutaraldehydem je EDC méně toxický, na druhou stranu pomocí něj není možné dosáhnout tak vysokého stupně síťování [116]. EDC jako crosslinker byl použit k zesíťování hydrogelu na bázi extracelulární matrice (ECM) získaného decelularizací tkáně (konkrétně pupeční šňůry) pro regeneraci nervové tkáně [122], také k síťování kolagenu [123] nebo přípravu zesíťovaných želatinových nanočástic pro stabilizaci Pickeringovy emulze (emulze, jejichž mezifázové rozhraní je stabilizované pomocí částic, nikoliv povrchově aktivních látek) v potravinářském průmyslu [124].

Glutaraldehyd (GA), jako zástupce *non-zero-length* crosslinkerů (obr. 23), patří mezi široce používané crosslinkery, které spojují biopolymerní řetězce kovalentní vazbou mezi přítomnými aminovými a hydroxylovými skupinami (prostřednictvím tzv. Schiffovy báze) [116]. Svou přítomností v polymerní síti může zlepšit její mechanické vlastnosti, čehož bylo využito například při síťování scaffoldu na bázi chitosanu a nanokrystalů celulózy. Scaffold síťovaný prostřednictvím GA měl vyšší pevnost v tlaku oproti nezesíťované struktuře a současně vykazoval podporu buněčné proliferace a buněčné adheze [120]. Mezi výhody použití GA patří především levná pořizovací cena, vysoký stupeň síťování a schopnost snížit imunogenitu materiálů. Navíc jej lze považovat za tzv. univerzální crosslinker, jelikož se používá při síťování různých typů polymerů (př. chitosan/celulóza). I přes tyto výhody je GA vysoce toxický nejen pro buňky, ale i pro celé organismy, kvůli přítomnosti aldehydické skupiny, a proto musí být hydrogely po síťování promyty specifickými roztoky obsahující volné aminové skupiny nebo roztoky aminokyselin jako je glycin [116; 120]. Do skupiny *non-zero-length* crosslinkerů lze zařadit také *polydopamin*, který byl v této práci využit mimo jiné i jako síťovací činidlo k přípravě hydrogelů na bázi thiolovaného hyaluronanu [47] a jehož, struktura, vlastnosti a použití budou dále podrobněji rozebrány.

4 POLYDOPAMIN

Polydopamin (PAD) je hnědočerný nerozpustný biopolymer, který vzniká tzv. autooxidací jeho monomeru – dopaminu. Jedná se také o syntetický analog přirozeně se vyskytujícího pigmentu melaninu (eumelaninu) [16].

Do popředí zájmu materiálových věd se polydopamin dostal na základě zjištění, že jeho struktura se podobá dihydroxy-L-fenylalaninu (L-DOPA), který je zdrojem mimořádně silné adheze mlžů na různých substrátech. Tuto vlastnost má i polydopamin, proto jej lze využít pro přípravu adhezivních vrstev s kontrolovatelnou tloušťkou na prakticky všech typech anorganických i organických materiálech, včetně těch superhydrofobních. Objevením polydopaminu tak započala nová cesta povrchovým modifikací různých substrátů [14].

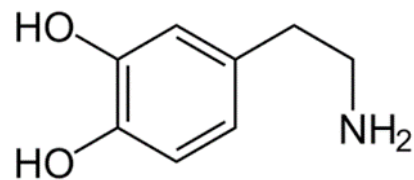


Obr. 24 – Časová osa zahrnující první použití polydopaminu a další významné milníky [125]

4.1 Monomer dopamin

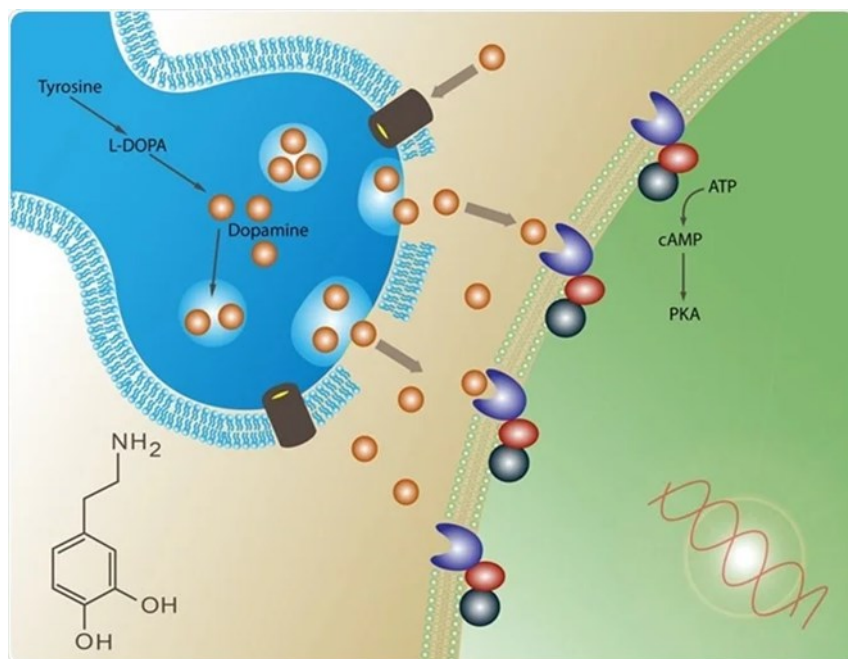
Jak už bylo řečeno, polydopamin vzniká oxidační reakcí jeho monomeru, který se nazývá dopamin. Dopamin je neurotransmitter, to znamená, že jeho funkcí, nejen v lidském mozku, je přenášet nervové vzruchy z jedné nervové buňky na druhou. Dopamin jako neurotransmitter byl objeven Arvidem Carlssonem v roce 1957. Společně s Paulem Greengardem, který k objevu přispěl pochopením mechanismů buněčné signalizace spouštěné právě dopaminem, obdrželi v roce 2000 Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství. I přestože byl dopamin poprvé syntetizován už v roce 1910, za samostatnou látku jej vědci začali brát až v roce 1957. Do té doby byl známí pouze jako meziprodukt při tvorbě noradrenalinu. Dnes je považován za jeden z hlavních neurotransmiterů v mozku [126; 127].

Podle struktury lze dopamin zařadit do skupiny neurotransmiterů nazývané katecholaminy. Mezi charakteristické strukturální znaky katecholaminů (dopaminu nevyjímaje) patří (1) jedna aminová skupina, (2) katecholové jádro (benzenový kruh s dvěma sousedícími hydroxylovými skupinami) a (3) postranní řetězec z ethylaminu nebo jeho derivátu [128]. Struktura dopaminu je znázorněna na obr. 25.



Obr. 25 – Struktura dopaminu

Dopamin vzniká přeměnou tyrosinu, která probíhá ve dvou krocích. První reakce je katalyzovaná enzymem tyrosinhydroxylázou, která přeměňuje tyrosin na L-DOPA. Druhá reakce zahrnuje dekarboxylaci L-DOPA katalyzovanou enzymem dekarboxylázou aromatických L-aminokyselin, při níž vzniká samotný dopamin [128]. Dopamin představuje 80 % všech katecholaminů vyskytujících se v centrální nervové soustavě obratlovců [128]. V centrální nervové soustavě je uvolňován neurony některých nervových drah (tzv. dopaminergní dráhy) v závislosti na vápenatých iontech do synaptické štěrbině, kde se váže na specifické receptory (D1 až D5) a umožňuje tak přenos nervového vzruchu z jedné nervové buňky na druhou, jak je znázorněno na (obr. 26).



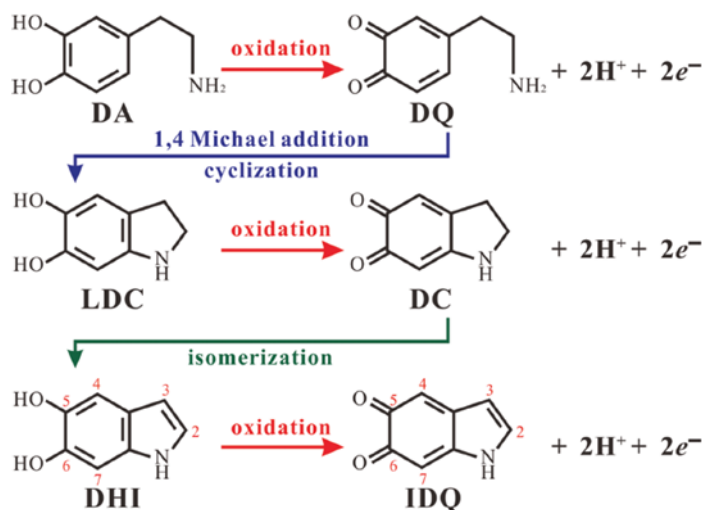
Obr. 26 – Schéma vzniku dopaminu a přenosu nervového vzruchu

Vzápětí je jeho aktivita ukončena tím, že dojde k jeho vtažení zpět do dopaminergních neuronů systémem zpětného vychytávání v presynaptických membránách. Zde dochází k jeho přeměně na 3,4-dihydroxyfenyloctovou kyselinu (DOPAC), která již není synapticky aktivní [129]. Mezi hlavní dopaminergní dráhy, ve kterých je dopamin produkován, patří *nigrostriatální*, *mezolimbický*, *mezokortikální* a *tuberoinfundibulární* systém, které hrají zásadní roli v regulaci mnoha důležitých fyziologických funkcí [130]. V *nigrostriatální* dráze se dopamin podílí na řízení pohybu. Poškození dopaminergních neuronů je patologickým znakem Parkinsonovy choroby, která je charakterizována bradykinezi a akinezi (poruchy hybnosti těla a končetin) a svalovou rigiditou [128; 130]. *Mezolimbická* dráha se podílí na poznávání, odměňování, motivaci a emoční stabilitě. Zvýšením nebo snížením aktivity dopaminu v *mezolimbické* dráze vede k různým příznakům schizofrenie. Zvýšení dopaminu je spojeno s pozitivními příznaky schizofrenie (halucinace). Tyto příznaky lze léčit pomocí tzv. neuroleptik (antagonisté receptoru D2), zatímco na negativní příznaky schizofrenie (apatie, ztráta zájmů atd.) nemají tyto léky téměř žádný vliv. Zvýšené uvolnění dopaminu způsobují také některé drogy (např. kokain) [130]. *Mesokortikální* dráha je poté spojena s učením a pamětí [128]. Vliv dopaminu na učení či paměť byl podrobně studován a bylo prokázáno, že mezi pamětí a aktivací receptoru D1, který je spojován s pamětí a učením, je vztah obráceného „U“. To znamená, že příliš malá či velká stimulace receptoru D1 v prefrontální kůře v mozku může způsobit zhoršení paměti. S pamětí a učením je spojována také stimulace receptoru D2, u kterého nebyl prokázán v prefrontální kůře podobný vztah jako u receptoru D1, ale jeho aktivita je spojena s hypokampem. Na základě výzkumů obou receptorů, D1 v prefrontální kůře a D2 v hypokampu, bylo zjištěno, že mohou souviset s kognitivními poruchami, které jsou spojovány s Alzheimerovou a Parkinsonovou chorobou. A nakonec v *tuberoinfundibulární* dráze dopamin inhibuje uvolňování hormonu prolaktinu hypofýzou. Tento hormon stimuluje produkci mléka v mléčných žlázách. Uvolňování prolaktinu je spojeno s dopaminovým receptorem D2. Některé studie naznačují, že dopamin by mohl hrát také určitou roli při regulaci uvolňování hormonu stimulujícího štítnou žlázu, folikuly stimulujícího hormonu či luteinizačního hormonu z hypofýzy [128; 130]. Závěrem lze o dopaminu prohlásit, že se podílí na řadě důležitých funkcí v lidském těle, a je tudíž nepostradatelnou látkou nervového systému nejen člověka. Jeho nerovnováha v mozku je dávana do souvislosti s celou řadou nemocí jako je např. Parkinsonova a Alzheimerova choroba či schizofrenie.

4.2 Syntéza PAD

Jak napovídá název, polydopamin lze získat autooxidací a následnou spontánní polymerizací dopaminu, a to 3 různými metodami: (1) enzymatickou oxidací, (2) oxidací z roztoku nebo (3) elektropolymerizační metodou. Nejběžnějším způsobem přípravy polydopaminu je zmiňovaná oxidace z roztoku [14; 16; 131].

Příprava polydopaminu oxidací z roztoku je v zásadě jednoduchou reakcí, kterou lze uskutečnit bez nároků na složité podmínky nebo náročnou techniku. V principu se jedná o oxidaci a následnou spontánní polymerizaci dopaminu za alkalických podmínek ($\text{pH} > 7,5$) v přítomnosti vzdušného kyslíku. Oxidace dopaminu v alkalickém pH je doprovázena změnou barvy z bezbarvého roztoku na světle hnědý a časem až na tmavě hnědý roztok [14]. Prvním krokem syntézy PAD je oxidace dopaminu na tzv. dopamine–chinon (DQ) za alkalických podmínek. U DQ může dojít k reverzibilní cyklizaci prostřednictvím 1,4–Michaelovy adice a v důsledku deprotonace primárního aminu pak vzniká leukodopaminechrom (LDC), který může být oxidován na dopaminechrom (DC). Dopaminechrom podléhá přesmyku na redukovanou formu 5,6–dihydroxyindol (DHI) nebo oxidovanou formu 5,6–indolchinon (IDQ), které lze považovat za monomery polydopaminu [14; 132; 133]. Oxidační reakce dopaminu je naznačena na obr. 27.

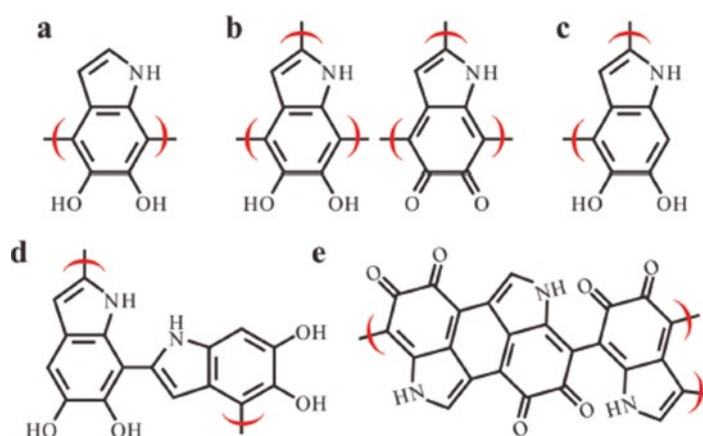


Obr. 27 – Oxidační reakce dopaminu [132]

Na atomech uhlíku v poloze 2, 3, 4 a 7 na DHI (IDQ) dochází k reakci mezi monomery za vzniku různých izomerů oligomerů a následně samotného polydopaminu [14; 132; 133]. PAD lze připravit v různých formách, jako jsou např. nanočástice [47; 134], nanovlákná [135], nanotrubičky [136], nanosheets [137], tenké filmy [138] nebo duté kapsle [139; 140].

4.3 Struktura PAD

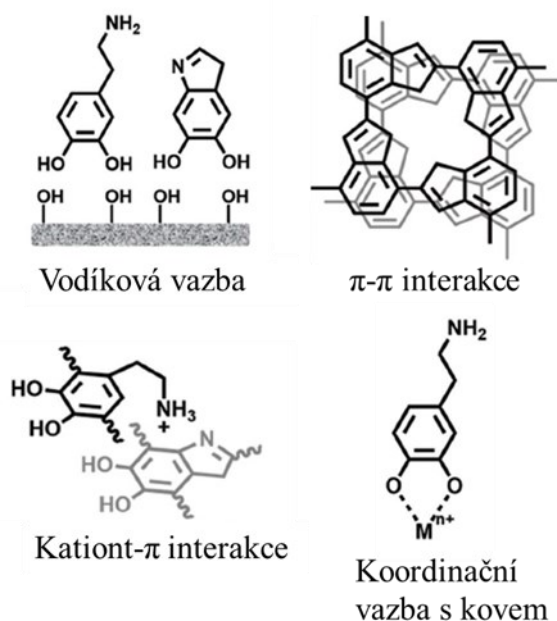
I přestože struktura monomeru je dobře známá již od minulého století, mechanismus vzniku, a tudíž i samotná chemická struktura polydopaminu dosud nebyla zcela objasněna. Některé teorie naznačují podobnost polydopaminu s eumelaninem, pigmentem nacházejícím se v lidské kůži, vlasech i očích, který je tvořen dvěma monomery – kyselinou 5,6-dihydroxyindol-2-karboxylovou (oxidační produkt DOPA) a 5,6-dihydroxyindolem (DHI) nebo 5,6-indolchinonem (DQI). Vznik biopolymeru eumelaninu, a tedy i polydopaminu je podle této teorie, dán kovalentní vazbou mezi jejich monomery [132]. Obecně nejuznávanější model chemické struktury PAD je kovalentní adice DHI (IDQ) zprostředkované prostřednictvím jednoduché sigma vazby. Existuje několik kovalentně adičních modelů vzniku PAD. Na obr. 28 jsou uvedeny návrhy chemické struktury PAD, ve kterých jsou znázorněny možné kovalentní vazby v polohách uhlíků 2, 3, 4, a 7 na DHI nebo DIQ [14; 132].



Obr. 28 – Navržené struktury PAD vzniklé prostřednictvím kovalentní adice: (a) reakce v poloze uhlíku 4 a 7 DHI; (b) reakce v poloze uhlíku 2, 4 a 7 DHI a IDQ; (c) 2 a 4 DHI; (d) 4 a 2 vázaného dimeru 4–7 DHI; (e) 3,4 a 7 IDQ [132]

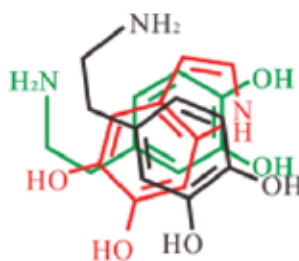
I přesto, že pochopení struktury polydopaminu ztěžuje heterogenita monomerní jednotky (DA, DHI, IDQ), za obecně nejuznávanější stavební jednotku PAD je považován 5,6-dihydroxyindol, který vzniká spontánní řadou oxidačních reakcí z dopaminu, jak již bylo zmíněno. Existence DHI v polydopaminu byla experimentálně dokázána detekcí pyrrolových derivátů vznikajících při rozkladu PAD způsobeným peroxidem vodíku. Nevylučuje se také přítomnost necyklické formy oxidovaného dopaminu s primární aminovou skupinou [133]. Podle jiné teorie lze strukturu PAD chápat jako heterogenní supramolekulární agregát oligomerů DHI, DA, popř. IDQ, spojených prostřednictvím

nekovalentních vazeb, např. vodíkovou vazbou, koordinační vazbou s kationtem kovu, π - π interakce atd. (obr. 29) [14; 132].



Obr. 29 – Struktury PAD vzniklé prostřednictvím nekovalentních interakcí [133]

V literatuře se také popisuje skupina tzv. samouspořádaných fyzikálních trimerů tzv. (Dopamin)₂/DHI, které se chovají jako nízkomolekulární supramolekulární monomery začleněné do polydopaminových řetězců. [132; 133]



Obr. 30 – (Dopamin)₂/DHI trimer [14]

Uvedený (Dopamin)₂/DHI komplex pak může hrát roli při popisu další teorie, která kombinuje oba modely, a to kovalentní adici a nekovalentní samouspořádání. Dopamin, DHI, popř. IDQ, se mezi sebou vážou kovalentní vazbou a tyto kovalentně vázané jednotky pak vytváří paralelní nebo antiparalelní uspořádání, které se pojí na základě nekovalentních interakcí (vodíkové můstky) mezi katecholem a quinonem, čímž vytváří polymerní síť [14; 132].

4.4 Vlastnosti PAD

Jako polymer podobající se svou strukturou L-DOPA, látkou vyskytující se u mlžů, která představuje zdroj jejich velmi silné adheze k různým substrátům, byl dlouhou dobu považován pouze za materiál kopírující tuto schopnost. V posledních několika letech se proto výzkum polydopaminu ubíral směrem k přípravě funkčních substrátů potažených polydopaminem právě díky jeho přirozené adhezivní vlastnosti. Ovšem jeho funkce se neomezují pouze na adhezi. Mezi vlastnosti polydopaminu, které z něj dělají unikátní materiál pro využití v různých oblastech jako je např. biomedicína, energetika či environmentální oblast, patří zmiňovaná silná adheze k různým substrátům, dále biokompatibilita, vysoká reaktivita, schopnost fototermické konverze, antioxidační vlastnost atd. [14]. Níže jsou konkrétněji popsány některé z nich.

Adheze

Jedna z nejdůležitějších vlastností polydopaminu je již zmiňovaná vysoká adheze, která umožňuje PAD přilnout k různým typům povrchů, anorganickým či organickým, včetně ušlechtilých kovů, polovodičů, oxidu kovů, polymerů apod. [141], a to bez ohledu na jejich tvar či velikost. Vysoká adhezivní schopnost PAD je dána přítomností primárního aminu a katecholové skupiny. Obecně je adheze PAD závislá na povrchových vlastnostech substrátů, na který se může vázat buď přes kovalentní nebo nekovalentní vazbu. Kovalentně se PAD může vázat na specifické substráty obsahující thiolové nebo aminové skupiny prostřednictvím 1,4-Michaelovy adice nebo Schiffovy báze (za alkalických podmínek). Za okolních podmínek může mezi substrátem a PAD působit nekovalentní interakce jako jsou vodíkové vazby, kationt- π interakce, koordinační vazby s kovem atd [14; 131]. Polydopamin se může vázat také na přechodné kovy či radioizotopy, čehož lze využít v zobrazovacích technikách v medicíně. Pokud by se na materiál na bázi PAD navázal iont kovu prostřednictvím koordinační vazby, mohl by PAD získat kontrastní vlastnosti pro zobrazování v medicíně nebo radioizotopové terapii při léčbě rakoviny [131]. Za silně bazických podmínek ($\text{pH} > 10$) dochází k degradaci PAD z povrchu substrátu v důsledku přerušení kationt- π interakcí, jelikož se NH_3^+ deprotonuje. Ovšem v přítomnosti jiných kationtů (př. Na^+ , K^+) může vzniknout silná nekovalentní interakce s těmito kationty. PAD vrstva na povrchu substrátu může tímto přerušením a následným obnovením kationt- π interakce zanikat a zase vznikat. A jelikož katechol DHI není silně π -konjugovaný systém, je tento proces silně závislý na existenci NH_3^+ kationtů v polydopaminovém řetězci [142].

Biokompatibilita

Biokompatibilita je zásadním faktorem určujícím aplikační možnosti v oblasti biomedicíny [14]. Jelikož je PAD biopolymer, jehož monomer je pro lidský mozek nepostradatelnou látkou a jeho syntéza není zprostředkována žádnými reakčními činidly, o jeho biokompatibilitě není pochyb. Samozřejmě byla i experimentálně prokázána *in vitro* i *in vivo* studii, které tyto účinky potvrdily [47; 141; 143].

Mechanické vlastnosti

Autoři Li et al. (2019) ve své práci mimo jiné zkoumali mechanické vlastnosti tenkých polydopaminových filmů (570 nm) a to prostřednictvím analýzy Youngova modulu. Youngův modul PAD filmů dle jejich výsledků činil 2,3 GPa. Tyto filmy byly poté podrobeny tepelné úpravě při teplotě 600 °C, kdy hodnota Youngova modulu PAD filmů vzrostla z původní hodnoty až na hodnotu 14,7 GPa. Zvýšení Youngova modulu po tepelné úpravě autoři přisuzují karbonizaci vzorku doprovázené změnou barvy (ze světle hnědé na černou), úbytkem hmotnosti a zvýšením elektrické vodivosti PAD filmů [144]. Jiní autoři studovali, jak přítomnost polydopaminových částic v hydrogelu ovlivňuje jeho tuhost. Například Yegappan et. al (2019) zjistili, že PAD nanočástice zvyšují tuhost hydrogelu na bázi thiolovaného hyaluronanu téměř dvojnásobně [47]. Nebo Han et al. (2016) porovnávali tuhost hydrogelů na bázi PNIPAM (Poly-N-isopropylakrylamid) *bez* a *s* PAD částicemi, přičemž PNIPAM hydrogely s inkorporovanými PAD částicemi vykazovaly vyšší tuhost, která rostla spolu s vyšším obsahem částic v hydrogelu [143].

Fototermální vlastnosti

Fotosenzibilizátor je materiál, který přeměňuje absorbované světlo, zpravidla laser v oblasti blízkého infračerveného záření (NIR), na teplo, čímž je schopen ničit nádorové buňky ve svém okolí. Proto se fotosenzibilizátory využívají při léčbě rakoviny. Ukázalo se, že mezi fototermální terapeutická činidla mimo známé Au, grafen, uhlíkové nanotrubičky (CNT) atd., lze zařadit i PAD [15; 145]. PAD má dokonce vyšší účinnost fototermální konverze než např. nanočástice Au, Pt nebo grafen-oxidu, čehož lze využít při řízeném uvolňování léčiva. Vysoká schopnost fototermální konverze (~40 %) umožňuje PAD vyvolat rychlé zvýšení teploty a spustit tak uvolňování léčiva vlivem působení NIR záření pro hypertermickou terapii rakoviny [125; 145].

4.5 Využití PAD

Jak již bylo naznačeno, PAD lze využít pro modifikaci a funkcionalizaci povrchu všech různých materiálů. Navíc jej lze připravit v různých formách (tenké filmy, nanočástice, nanotrubičky, kapsle atd.), což ještě rozšiřuje oblasti jeho použití. Na základě výše uvedených vlastností lze předpokládat široké využití polydopaminu v různých oblastech (např. regenerativní medicína nebo ochrana životního prostředí).

Biomedicínské aplikace

Vzhledem k jeho adhezivní a fototermální schopnosti, lze PAD využít k přípravě funkčních nanokompozitů potahováním s využitím různých typů nanočástic např. Fe_3O_4 , mezoporézní částice SiO_2 , oxid grafenu, zlaté nanočástice atd. pro **diagnostiku a rakovinovou terapii** [16]. Při přípravě *core-shell* struktur, ve kterých byly Au nanočástice modifikované nanovrstvou PAD, řešili vědci Liu et al. (2013) otázku stability PAD obalu *in vivo*. Ukázalo se, že *core-shell* struktury Au/PAD byly stabilní po dobu 6 týdnů, kdy nevykazovaly výraznou histologickou toxicitu *in vivo* [146]. Na jejich výzkum pak mohli navázat další, ve kterých již byla experimentálně ověřena funkce Au/PAD struktury jako nanokompozitů pro diagnostiku a fototermální terapii nádorů [145; 147]. Jako modifikátor povrchu byl PAD aplikován také k přípravě scaffoldů na bázi PCL/CNT nanotrubiček pro **regeneraci periferních nervů** [148]. Fototermální vlastnosti PAD využili ve své práci také autoři Xu et al. (2021), kteří navrhli tzv. nanovlákněný kompozit PAD/kurkumin pro **léčbu diabetických ran** infikovaných bakteriemi. Diabetické rány je totiž velmi obtížně léčit, jelikož při diabetes dochází k narušení hojivých procesů, a proto jsou tyto rány náchylnější k bakteriální infekci. To by mohl vyřešit nanovlákněný PAD/kurkumin, který vykazoval dobrou fototermickou konverzi a antibakteriální účinky, právě díky PAD obalu. Studie *in vivo* prokázaly, že nanokompozit nejen že inhiboval infekci bakteriálního kmene, ale také urychloval proces regenerace diabetické rány. PAD/kurkumin by tedy mohl představovat slibný materiál pro léčbu diabetických ran náchylných k bakteriální infekci [149]. Polydopamin lze využít také k modifikaci povrchů **bionsenzorů**. Elektrody bionsenzorů musí být biokompatibilní a specificky funkcionalizované pro detekci biomolekul. Často jsou detekovanými biomolekulami proteiny skládající se z aminokyselin, které ve své struktuře obsahují funkční skupiny jako je aminová či thiolová a které se ochotně vážou na velmi reaktivní chinon ve struktuře PAD prostřednictvím 1,4-Michaelovy adice či Schiffovy báze. Při vývoji bionsenzorů tak může PAD vytvářet vhodné mikroporézní prostředí pro imobilizaci vysoké

hustoty biomolekul na povrchu elektrody [150]. Konkrétním příkladem takového biosenzoru je oxid zinečnatý funkcionalizovaný polydopaminem pro detekci glukózy [151].

Aplikace v enviromentální oblasti

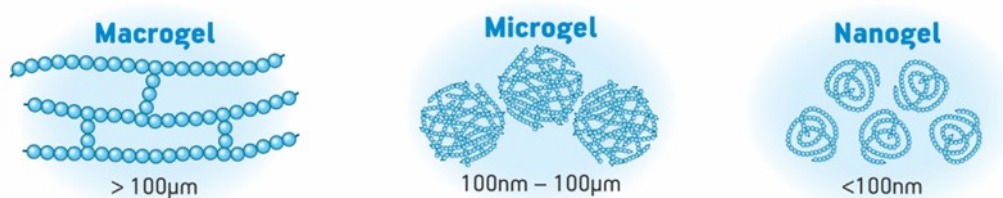
Zajímavé potenciální využití polydopaminu představuje oblast ochrany životního prostředí. Autoři Lu et al. (2019) připravili nanotrubičky na bázi polydopaminu s Ag (popř. Pt, Pd, Au) nanočásticemi, přítomnými na vnitřním i vnějším povrchu dutých nanotrubiček PAD, díky čemuž došlo k nárůstu absorpčních a desorpčních vlastností, ale i a katalytické aktivity, jenž lze využít při **redukci organických polutantů z vod** [152]. Jeden z nejnovější výzkumů využití polydopaminu (článek z roku 2024) byl věnován přípravě **přenosných elektrochemických biosenzorů** na bázi kvasinkových buněk v biokompatibilní PAD matici, pomocí kterých je možné monitorovat stav znečištění životního prostředí např. pesticidem CuSO_4 [153].

5 PŘÍPRAVA HYDROGELŮ A JEJICH VYUŽITÍ

Hydrogely jsou ve vodě nerozpustné trojrozměrné struktury tvořené polymerními řetězci s hydrofilními funkčními skupinami jako je např. karboxylová, hydroxylová, aminová nebo sulfátová skupina. Díky přítomnosti těchto skupin jsou hydrogely schopny absorbovat velké množství vody [154; 155]. Hydrogely vznikají procesem síťování, které lze definovat jako vytváření nových chemických nebo fyzikálních příčných vazeb mezi funkčními skupinami polymerních řetězců, jehož důsledkem se stává materiál nerozpustný [116]. Kromě polymerního řetězce je součástí struktury hydrogelu také rozpouštědlo (nejčastěji voda) a může nebo nemusí být přítomné síťovací činidlo iniciující vznik příčné vazby. Hydrogely mají zajímavé biomimetické vlastnosti, např. vysokou pružnost, vynikající absorpční schopnost v nabotnalém stavu, žádnou nebo nízkou toxicitu, biokompatibilitu, biodegradabilitu a nastavitelné mechanické vlastnosti [155]. Díky svým vlastnostem jsou vhodné k přípravě různých typů materiálů, jako jsou kontaktní čočky, hydrogely pro kontakt s krví, scaffoldy, bioadhezivní materiály pro hojení ran, umělé ledvinové membrány, náhrady hlasivek, umělá kůže či šlachy [156].

5.1 Klasifikace hydrogelů

Existují různé typy hydrogelů, které lze klasifikovat podle několika kritérií. První z nich je dělení na základě **způsobu přípravy** (1), a to na homopolymerní, kopolymerní a multipolymerní hydrogely. Druhou možností dělení je podle **náboje přítomného na polymerním řetězci** (2), a to na aniontové, kationtové, amfolytické hydrogely a hydrogely s neutrálním nábojem. Dle **struktury polymerní sítě** (3) se hydrogely dělí na amorfní, semikrystalické, hydrogely s vodíkovou vazbou, supramolekulární a hydrokoloidní agregáty. Podle **velikosti** (4) lze hydrogely rozdělit na makrogely, mikrogely a nanogely (obr. X).



Obr. 31 – Rozdělení hydrogelů podle velikosti [156]

V neposlední řadě lze hydrogely klasifikovat na základě povahy **příčné vazby** (5) mezi polymerními řetězci, a to na fyzikálně nebo chemicky síťované hydrogely [157].

5.2 Příprava hydrogelů

Hydrogely lze připravit různými metodami síťování v závislosti na typu a povaze biopolymeru. Při síťování dochází k interakci funkčních skupin přítomných na polymerním řetězci prostřednictvím síťovacích činidel za vzniku trojrozměrné sítě [116]. Obecně lze hydrogely připravit 2 mechanismy podle vznikající příčné vazby mezi polymery - fyzikálním a chemickým síťování [158].

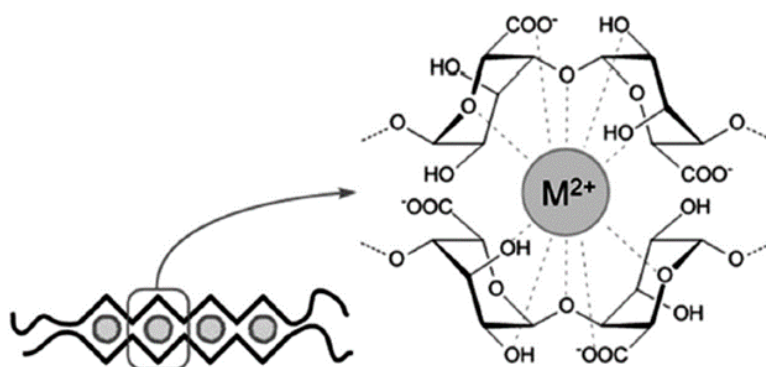
5.2.1 Fyzikální síťování

Podstatou fyzikálního síťování je interakce polymerních řetězců prostřednictvím obecně slabých sekundárních vazeb (např. krystalizace, iontové interakce, hydrofobní interakce, vodíkové vazby nebo jejich kombinace) za vzniku fyzikální sítě. Tyto interakce jsou reverzibilní a mohou se měnit na základě změny prostředí (např. pH a teplota) [155]. Fyzikálně síťované hydrogely se staly předmětem zájmu zejména kvůli snadné přípravě a nízké toxicitě, která souvisí s tím, že při jejich přípravě není potřeba síťovacích činidel, které jsou často toxickými látkami, a pro zamýšlenou aplikaci hydrogelů v biomedicině by mohly představovat určité riziko [157]. Mezi nevýhody fyzikálně síťovaných hydrogelů lze zařadit horší mechanické vlastnosti než u chemicky síťovaných hydrogelů, jelikož fyzikální interakce jsou slabší než kovalentní vazby, dále také delší doba gelace, nižší stupeň síťování nebo nedostatečná kontrola reakční kinetiky při procesu síťování [116]. Níže jsou popsány některé metody přípravy fyzikálně zesíťovaných hydrogelů.

Síťování iontovými interakcemi

Jednou z možných metod přípravy fyzikálních hydrogelů je síťování **iontovými interakcemi**. Přípravu hydrogelů iontovými interakcemi lze rozdělit do dvou podskupin, a to na (i) *elektrostatické interakce mezi dvěma polyelektrolyty s opačným nábojem na řetězci* a na (ii) *elektrostatické interakce mezi polyelektrolytem a opačně nabitým iontem*. V prvním případě spolu reagují kladně nabitý polykationt (př. chitosan) a záporně nabitý polyaniont (př. hyaluronan, alginát) za vhodných podmínek bez přítomnosti chemických síťovadel za vzniku fyzikální sítě. Připravený fyzikální hydrogel tak nese vlastnosti obou (nebo i více) polyelektrolytů, čímž lze do určité míry řídit jeho konečné vlastnosti [159]. Příkladem hydrogelu, který byl připraven výše zmíněnou metodou je polyelektrolytový kompozit chitosan/alginát/polyglutamová kyselina [160]. Ovšem tyto hydrogely tvoří strukturně nehomogenní matici, proto se tento způsob síťování běžně nevyužívá [161].

Častěji se využívá metoda síťování podmíněna reakcí polymerního řetězce s ionty, které jsou schopny vytvářet iontové můstky mezi řetězci nebo chelatační interakce s funkčními skupinami polymerů. K těmto reakcím se obecně využívají jednomocné, dvojmocné nebo trojmocné kationty, jako jsou např. Ag^+ , Zn^{+2} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} nebo Al^{3+} . Uvedené kationty nejčastěji reagují s funkčními skupinami jako je karboxylová, hydroxylová, aminová nebo atomem kyslíku v etherové skupině polymerů a vytvářejí tak fyzikální uzly síťování [159]. Tímto způsobem se připravují například hydrogely na bázi alginátu sodného, který interaguje s bivalentními kationty (př. Ca^{2+}) za vzniku hydrogelu s tzv. *egg-box* strukturou (obr. 32) [158]. Je zajímavé, že touto metodou lze síťovat i polymery bez náboje (neutrální polymery). Jedním z takových polymerů je dextran, který může vytvářet fyzikální síť krystalizací za vzniku vodíkových vazeb nebo reakcí s draselným kationtem (K^+), kdy vzniká tzv. *cage-like* struktura, ve které jsou uzavřeny ionty K^+ [161]

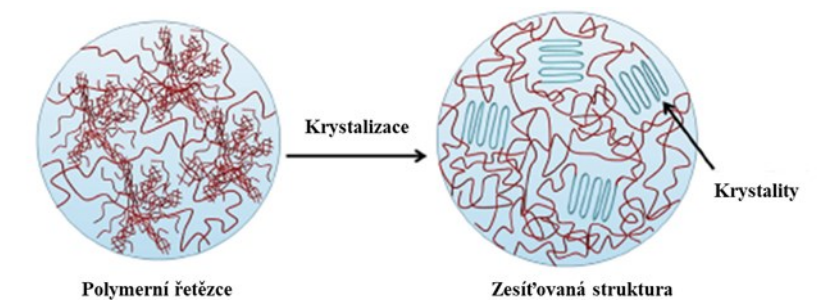


Obr. 32 – *Egg-box* struktura [159]

I přestože příprava hydrogelů síťováním iontovými interakcemi je jednoduchou jednokrokovou metodou, slabé mechanické vlastnosti vzniklých hydrogelů jsou velkou nevýhodou při následných aplikacích. Jedním z možných řešení je kombinace kovalentně a fyzikálně síťovaných hydrogelů [158].

Síťování krystalizací

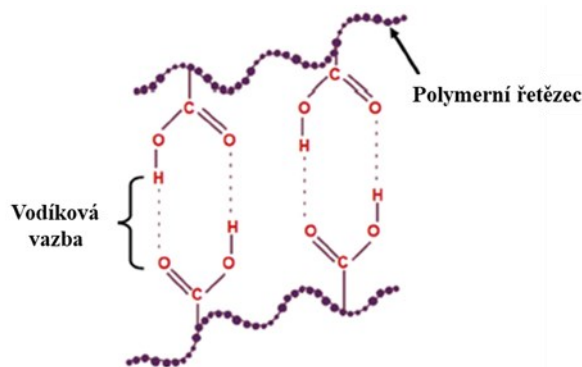
Krystalizace je metoda fyzikálního síťování, která je založena na principu zmrazování a rozmrazování, tzv. *freeze-thaw* metoda (obr. 3). Při zmrazení dochází ke krystalizaci a tvorbě krystalitů, které se chovají jako fyzikální uzly a které způsobují fyzikální zesílení a asociaci polymerních řetězců vedle sebe. Po rozmrznutí si řetězce zachovávají svou strukturu polymerní sítě, která vznikla během krystalizace [161].

Obr. 33 – Síťování metodou *freeze-thaw* [161]

Krystalizace není běžnou metodou přípravy fyzikálních hydrogelů, ale používá se například k přípravě hydrogelů na bázi polyvinylalkoholu (PVA). PVA hydrogely jsou fyzikálně zesíťované prostřednictvím krystalitů vytvořených při zmrazení a vodíkových vazeb vznikajících mezi řetězci PVA [158]. Při skladování PVA při pokojové teplotě, dochází k jeho spontánnímu gelování s nízkou mechanickou pevností. Ovšem procesem zmrazení a rozmrazení se tento hydrogel s nízkou mechanickou pevností mění na tuhý a pružný [162]. Tvorba příčných vazeb mezi polymerními řetězci metodou krystalizace byla pozorována také u polysacharidů (chitosan, celulóza). Při vysoké teplotě se předpokládá konformace náhodné spirály, ovšem při nízkých teplotách řetězce tvoří dvoušroubovice a následně i agregáty, které se chovají jako uzly síťování [159].

Síťování vodíkovými vazbami

Jedním z hlavních mechanismů přípravy fyzikálních hydrogelů je síťování vodíkovými vazbami (obr. 34). Vodíková vazba vzniká mezi atomem vodíku a elektronegativním atomem (O, F nebo N). Inter- i intramolekulární vodíková vazba může při přípravě hydrogelů představovat bod fyzikálního síťování. Přírodní polymery ve své struktuře obsahující funkční skupiny (hydroxylová, karboxylová nebo aminová) schopné tyto vodíkové vazby vytvářet [159].



Obr. 34 – Schématické znázornění síťování vodíkovými vazbami [161]

Jedním z příkladů přírodních polymerů, které mohou vytvářet fyzikální sítě prostřednictvím vodíkových vazeb, je agaróza. Hydrogely na bázi agarózy se připravují tak, že se nejprve pevná forma agarózy rozpustí ve vroucí vodě a ta se následně ochladí na pokojovou teplotu, čímž se iniciuje síťování. Při síťování se v polymerním roztoku vytváří inter- a intramolekulární vodíkové vazby, které drží 3D strukturu vzniklého hydrogelu. Stabilitu hydrogelu lze narušit dodáním vnější tepelné energie, čímž dojde k přechodu z pevné fáze na kapalnou [161].

5.2.2 Chemické síťování

Další možnost přípravy hydrogelů představuje chemický způsob síťování. Příprava hydrogelů chemickým síťováním vede k vytvoření příčných vazeb mezi polymerními řetězci, které mají povahu kovalentních vazeb [163]. Obecně mají chemické hydrogely lepší chemickou, mechanickou i tepelnou stabilitu než výše popsané fyzikální hydrogely, což lze přisuzovat silné kovalentní vazbě [164]. Na druhou stranu se k přípravě hydrogelů chemickým síťováním často používají látky podporující samotné síťování (crosslinkery), které mohou být toxické, což následně může způsobit problém s aplikací těchto hydrogelů v biomedicině. Řešením může být promytí produktu, aby se odstranil zbytek crosslinkeru, čímž se ale prodlužuje příprava samotného hydrogelu [116]. I přes vysokou cenu některých činidel a vysoké nároky na přípravu, jsou chemicky síťované hydrogely mezi vědeckou komunitou zabývající se přípravou hydrogelů na bázi přírodních polymerů oblíbené [163]. Mezi metody chemického síťování lze zařadit např. síťování pomocí vysokofrekvenčního záření, chemických síťovadel (crosslinkery), enzymatického síťování, případně síťování s využitím modifikovaných polymerů na základě chemické reakce atd. [158; 162].

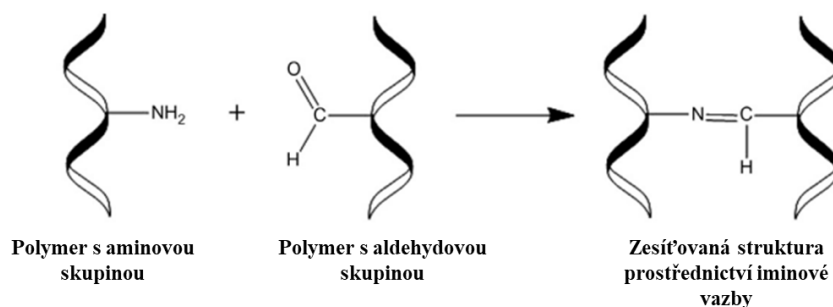
Síťování vysokofrekvenčním zářením

Síťování vysokofrekvenčním zářením (radiací) představuje jednu z metod chemického síťování, zahrnující přípravu hydrogelů zářením o vysoké energie (např. elektronového svazku, gama záření) bez použití chemických síťovadel. Navíc lze síťovací reakci vyvolat při různých teplotách či fázích výchozí látky (plynné, kapalná či pevná) [165]. Síťování radiací představuje relativně jednoduchou metodou, u které nejsou potřeba žádná síťovadla, a u které lze snadno řídit síťovací, polymerační a roubovací reakce [158]. Alternativním způsobem je tzv. síťování pomocí elektronového svazku, pomocí kterého lze síťovat např. vysokohustotní polyethylen (HDPE), čímž lze docílit zvýšení jeho mechanické a tepelné stability. Problémem u HDPE je jeho rychlá mechanická degradace a tepelné smršťování při

teplotách blízkých jeho teplotě tání (130 °C). Tento nedostatek lze řešit právě pomocí síťování radiací, během kterého na větvích řetězce HDPE vznikají radikály v důsledku odštěpení vodíku, čímž se vytváří místa síťování. Tímto způsobem autoři Lee et al. (2021) připravili směs HDPE s ethylenvinylacetátu (dobrá pružnost) a polyuretanu (dobré tepelné vlastnosti a odolnost proti opotřebení), která byla zesíťována elektronovým paprskem, za účelem zvýšení mechanické a tepelné stability. Zesíťovaná směs vykazovala 4krát lepší stabilitu ve srovnání s nezesíťovaným HDPE a 9krát lepší odolnost proti opotřebení než u zesíťovaného HDPE [165]. Jiným zdrojem vysokofrekvenčního záření (gama zářením) byly připraveny hydrogely na bázi želatiny vyztužené celulózovými nanokrystaly (CNC). Studie prokázaly, že přítomnost CNC zvyšuje tepelné i mechanické vlastnosti hydrogelů, které zároveň nevykazují toxicitu, a navíc jsou schopné ze své struktury uvolnit až 70 % léčiva při 12 hod. Zmíněné hydrogely mají velký potenciál pro využití v systémech pro podávání léčiv [166]. Prostřednictvím gama záření byly připraveny také super-absorpční hydrogely na bázi Tara gumy/akrylové kyseliny pro využití v dětských plenkách [167].

Síťování chemickými reakcemi

Jiným přístupem chemického síťování je síťování chemickými reakcemi prostřednictvím komplementárních funkčních skupin, které patří mezi nejčastější metody kovalentně síťovaných hydrogelů. Tyto reakce obvykle vyžadují vodné prostředí. Typickým příkladem síťování chemickými reakcemi je reakce Schiffovy báze, Michaelova adice, thiol-ene reakce, azido-alkynová cykloadice atd. [158; 163; 168]. Například principem reakce Schiffovy báze je interakce mezi polymerním řetězcem obsahujícím aminovou, hydrazidovou nebo oximovou funkční skupinu a polymerním řetězcem s aldehydovou funkční skupinou, která vede k vytvoření iminové, resp. hydrazonové či oximové, kovalentní vazby a vzniku zesíťované struktury (obr. 35) [6; 163; 168; 169].



Obr. 35 – Znázornění reakce Schiffovy báze mezi polymerními řetězci obsahující aminovou a aldehydovou skupinu [163]

Polymery, které ve své nativní formě neobsahují jednu z výše uvedených funkčních skupin, lze modifikovat a inkorporovat tyto skupiny do struktury polymeru, čímž se stávají atraktivními pro síťování reakcí Schiffovy báze [163]. Hydrogely síťované Schiffovou bází přitahují velkou pozornost zejména kvůli možnosti vytvářet vazby *in situ* (přímo v organismu) s buňkami, tkáněmi nebo bioaktivními látkami za fyziologických podmínek [168], dále také kvůli biokompatibilitě, lehce kontrolovatelným reakčním rychlostem a jejich uplatnění jako injektovatelné hydrogely [158]. Touto metodou přípravy hydrogelů se ve své práci zabývali Wang et al. (2023), kteří připravili *in situ* injektovatelný hydrogel na bázi aminy modifikovaného hyaluronanu a β -cyclodextrinu s aldehydovou skupinou jako maticí pro dlouhodobé řízené uvolňování léčiva [170]. Kromě již zmíněného síťování, je možné připravit hydrogely na bázi thiolovaných polymerů včetně thiolovaného hyaluronanu prostřednictvím Michaelovy adice i thiol-ene reakce, proto je jejich popis uveden v následující kapitole.

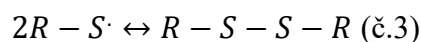
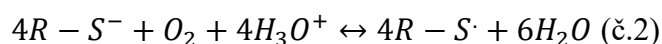
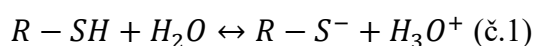
5.2.3 Příprava hydrogelů na bázi thiolovaného hyaluronanu

První zmínka o hydrogelu na bázi thiolovaného hyaluronanu je z roku 2002, kdy autoři Shu et. al (2002) vydali článek, ve kterém popisují tehdy nový způsob síťování hyaluronanu modifikovaného thioly prostřednictvím disulfidového můstku. Ten vznikl oxidační reakcí mezi thiolovými skupinami na řetězcích hyaluronanu za přítomnosti vzdušného kyslíku bez použití síťovacího činidla [94]. Od té doby byla publikována celá řada článků zabývajících se přípravou hydrogelů na bázi thiolovaného hyaluronanu. Obecně lze jejich přípravu rozdělit na thiol-disulfidovou výměnu, oxidační reakci, thiol-Michaelovu adici či thiol-ene, popř. thiol-yne reakci [171].

Oxidace

Oxidační reakce za vzniku disulfidových můstků mezi thiolovými skupinami je pravděpodobně nejčastějším způsobem přípravy hydrogelů thiolovaných polymerů. Výhoda tohoto způsobu síťování spočívá v jejím snadném provedení za fyziologických podmínek, možné reverzibilitě a vysoké biokompatibilitě, jelikož k síťování dochází za přítomnosti oxidačního činidla (př. vzdušného kyslíku), které nepředstavuje toxickou hrozbu pro následné aplikace připraveného hydrogelu např. do lidského či zvířecího organismu [164; 171]. Za další výhodu lze považovat to, že tato metoda síťování je tělu vlastní, jelikož napodobuje způsob síťování proteinů (př. glykoproteiny sliznice, které vytváří tuhý a stabilní hydrogel na povrchu slizničních membrán prostřednictvím disulfidových můstků s muciny

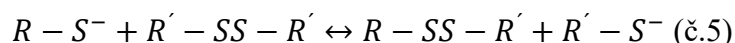
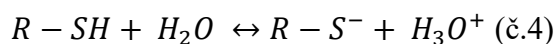
bohatých na cystein) [171]. Hydrogely síťované prostřednictvím disulfidových můstků se dostaly do popředí zájmu i kvůli jejich rozložitelnosti v organismu, jelikož podléhají enzymatickému štěpení hyaluronidázou či redukčním činidlům jako je cystein a glutation. Nicméně za nevýhodu síťování oxidací lze považovat přítomnost silných oxidačních činidel (CuSO_4), čemuž lze ale předejít použitím vzdušného kyslíku, nebo nesnadnou reakční kontrolou [106; 164]. Proces oxidace zahrnuje deprotonizaci thiolových skupin, čímž vznikají thiolátové ionty ($R-S^-$). Ty následně reagují s kyslíkem za vzniku radikálů, které jsou velmi reaktivní a tvoří tak disulfidovou vazbu, jak naznačují níže uvedené rovnice (Rov. 1-3) [99].



Jelikož má disociační konstanta (pK_a) thiolů hodnotu mezi 8 – 10, je při reakci vyžadováno prostředí o $pH > 7-8$. Jiná strategie tvorby disulfidových můstků zahrnuje použití radikálových iniciátorů (např. peroxidu vodíku), které zvyšují rychlost tvorby disulfidových můstků [99]. Tento způsob přípravy thiolovaných hydrogelů ve své práci využili např. Bian et al. (2016) [8], Bermejo-Velasco et al. (2019) [99], Hong et al. 2021 [10] a další.

Výměna thiol-disulfid

Thiol-disulfidová výměna představuje alternativní způsob vzniku disulfidové vazby. Stejně jako oxidace, i reakce thiol-disulfidové výměny zahrnuje deprotonaci thiolových skupin za vzniku thiolátových iontů, které následně podléhají mechanismu nukleofilní substituce s disulfidovou vazbou (Rov. 4 a 5) [99; 171]:



Jedná se o reverzibilní reakci, během které se tvoří disulfidová vazba bez použití oxidačního činidla. Thiol-disulfidová výměna je následně závislá na sulfhydrylovém ligandu. Jako disulfidické sloučeniny se používají polymery s reaktivní „pyridin-disulfidovou“ skupinou (např. kyselina merkaptopnikotinová a amid merkaptopnikotinu, které urychlují thiol-disulfidovou výměnu [99; 171]. Thiol-disulfidovou výměnu k přípravě hydrogelů na bázi HA-SH ve své práci využili autoři Asim et al. (2020). Ti připravili tzv. *S-protected* thiolovaný hyaluronan, který byl síťován thiol-disulfidovou výměnou buď *in situ*

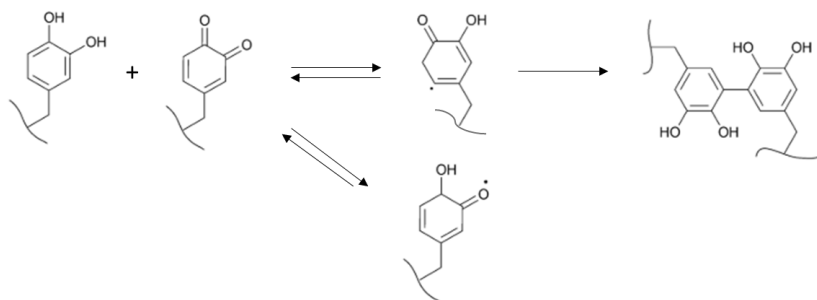
s glykoproteiny bohatých na cystein s volnými thiolovými skupinami, nebo s N-acetylcysteinem [106].

Michaelova adice

Další síťovací reakce, pomocí které lze připravit HA-SH hydrogely, je Michaelova adice, během které thiolové skupiny reagují s násobnými vazbami (alkeny). Jedná se o nukleofilní adici, při které se deprotonovaná thiolová skupina (tzv. Michaelův donor) váže na řetězce s funkční skupinou, která vykazuje záporný indukční efekt (tzv. Michaelův akceptor) za alkalických podmínek [6]. Michaelovou adicí byly připraveny např. hydrogely na bázi thiolovaného hyaluronanu a polydopaminu, kdy se thiolová skupina aduje na chinonovou skupinu polydopaminu [47; 172]. Injektovatelné hydrogely na bázi HA-SH a polyethylenglykolu funkcionalizovaného vinylsulfonem byly zase připraveny jako biodegradabilní matrice pro využití v tkáňovém inženýrství [173]

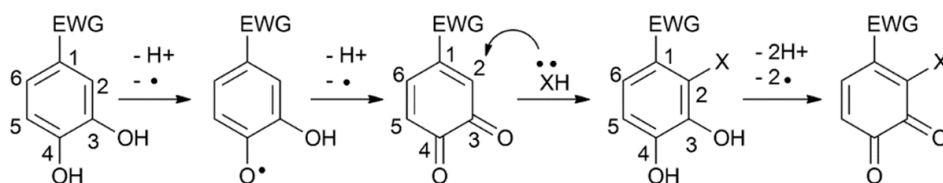
5.2.4 Příprava hydrogelu na bázi hyaluronanu konjugovaného dopaminem

Jak již bylo naznačeno, v nedávné době bylo velké úsilí věnováno napodobení přírodních proteinů mlžů pomocí syntetických polymerů jejich modifikací katecholem. I přesto, že vědci zaznamenali úspěchy při vývoji těchto polymerů, chemie síťování katecholových skupin zůstává stále neobjasněna. Obecně se katecholy snadno oxidují (viz kap. Polydopamin) na nestabilní chinonovou formu, která je vysoce reaktivní elektrofilní molekula a která se může následně účastnit sekundárních reakcí za vzniku kovalentních příčných vazeb (chemické síťování). Mezi tyto sekundární reakce patří např. reakce s aminovými a thiolovými skupinami nebo aryloxy (arylový zbytek s navázaným kyslíkem) radikály [174]. Chinon může reagovat zpětnou disproportionací za vzniku vysoce reaktivních „semichinonových“ radikálů, které mohou následně reagovat spolu a vytvářet tak příčné vazby. Mechanismus tohoto způsobu síťování katecholových skupin je naznačen na obr. 36. Kinetika těchto reakcí závisí na přítomnosti dalších oxidačních činidel.



Obr. 36 – Síťování prostřednictvím vazby mezi katecholy [174]

Předpokládá se tedy, že dopaminem konjugovaný HA(Na) tvoří hydrogely prostřednictvím reakcí mezi katecholy (konkrétně tedy jejich radikály), což lze připodobnit polymerní reakci dopaminu za vzniku polydopaminu. Tento předpoklad vychází také se změny barvy během vzniku sítě, která se děje i při přípravě polydopaminu [175]. Hydrogely na bázi HA-DA připravené síťováním prostřednictvím jednoduché vazby mezi monomery dopaminu zkoumali různí autoři [12; 13; 110; 114]. Tak například Melnik et al. (2022) ve své práci zohledňovali vliv oxidačních činidel (NaIO₄ a NaOH) na síťování HA-DA a zjistili, že kratší gelační čas a zároveň vyšší tuhost vykazují hydrogely, jejichž síťování bylo iniciováno NaIO₄ [12]. Jinou možností přípravy HA-DA hydrogelů je reakce katecholu s thiolovými skupinami. Vysoce reaktivní elektrofilní chinon může reagovat s nukleofilní thiolovou skupinou prostřednictvím Michaelovy adice. Navržený mechanismus je znázorněn na obr. 37. Jak již bylo několikrát zmíněno, katechol a jeho deriváty (dopamin nevyjímaje) snadno oxidují na chinonovou formu a ta pak může podléhat nukleofilnímu útoku thiolové skupiny v poloze 2, což vede k reorganizaci chinonu zpět na katecholovou skupinu [174].



Obr. 37 – Navržený mechanismus reakce katecholu (EWG = skupina přitahující elektrony, př. COOH, COOMe, CN) s thiolovou skupinou (X = SR⁻) [174]

Kromě polohy 2 na chinonu, může nukleofilnímu útoku thiolů podléhat také poloha 5. Primární thioly (např. *furan-2-yl-methanthiol*) s menšími sterickými překážkami navíc vykazují vyšší reaktivitu oproti sekundárním (*3-mercaptohexan-1-ol*) či terciárním (*4-mercapto-4-methylpentan-2-on*) thiolům [174].

5.3 Využití hydrogelů

5.3.1 Využití hydrogelů na bázi thiolovaného hyaluronanu

Hydrogely na bázi thiolovaného hyaluronanu nachází uplatnění v široké oblasti aplikací jako např. v oftalmologii, při pooperačních procesech, v tkáňovém inženýrství či při hojení ran [108]. Často se však HA-SH využívá v kombinaci s jinými materiály zejména z důvodu zlepšení vlastností hydrogelů a zvýšení aplikovatelnosti v různých oblastech. Například 3D tištěné hydrogely na bázi thiolovaného hyaluronanu v kombinaci s hyaluronanem

konjugovaným methakrylátem lze uplatnit jako **obvazy při hojení ran** [176]. Pro **hojení diabetických ran** byla testována také struktura vícevrstevných filmů složená z chitosanu modifikovaného maleinem a hyaluronanu modifikovaného thioly (síťované prostřednictvím Michaelovy adice) na substrátu z polymléčné kyseliny ve formě nanovláken. Z vícevrstvé struktury byl uvolňován inzulín, u něž byl prokázán podpůrný účinek při hojení ran (podpora růstu a migrace keratinocytů a inhibice tvorby a migrace endotelových buněk, což napomáhá znovuvytvoření epitelové tkáně a také zvyšuje její angiogenezi). Dle *in vivo* studií by mohla mít uvedená vícevrstvá struktura potenciální využití při hojení diabetických ran [177].

Thiolovaný hyaluronan nachází uplatnění také při náročnějších léčebných procesech. Jedním z nich je např. terapie pomocí nervových kmenových buněk, která představuje slibný přístup k **léčbě míšních poranění**. Terapie má však řadu omezení jako je viabilita buněk, jejich lokalizace v cílovém místě či kontrola diferenciaci. Tento problém by do jisté míry mohl vyřešit thiolem modifikovaný hyaluronan/želatina hydrogel, který byl navržen vědci Kwokdinata et al. (2023). Mechanické vlastnosti hydrogelu i hustota enkapsulace buněk byly optimalizovány tak, aby se zvýšila jejich životaschopnost a proliferace. *In vitro* testy ukázaly, že měkčí hydrogely vedly k vyššímu stupni diferenciaci neuronů s rozšířenými vláknitými strukturami. Při *in vivo* testech bylo prokázáno, že buňky enkapsulované v hydrogelu vykazovaly vyšší životaschopnost i lokalizaci v místě transplantace ve srovnání s buňkami, které nebyly uloženy v matrici. Obecně lze konstatovat, že připravený hydrogel po transplantaci do míchy podporoval životaschopnost a nervovou diferenciaci lidských kmenových buněk, a díky čemuž jej lze vnímat jako potenciální materiál pro léčbu míšních poranění a obecně kmenovou terapii [178]. Terapii kmenovými buňkami lze uplatnit také při regeneraci chrupavky poškozené při osteoporóze (degenerativní onemocnění kloubů), při kterém má kloubní chrupavka v důsledku nedostatečné vaskularizace omezenou schopnost regenerace. Při této terapii se využívají materiály (scaffoldy), které napodobují vlastnosti mezibuněčné hmoty chrupavky. Navržený materiál pro opravu a regeneraci chrupavky musí mít vysokou adhezi ke tkáni a stabilní mechanické vlastnosti při cyklickém zatížení. Vědci Cui et al. (2023) ve své práci připravili injektovatelný hydrogel na bázi akrylovaného 8-ramenného hvězdicového silsesquioxanového polyethylethylenfosfátu (AC-POSS-8-PEEP) s thiolovaným hyaluronanem. Hydrogel podporoval růst a diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk, a navíc měl vysokou adhezi ke krysí chrupavce, na které byl schopen odolávat mechanickému zatížení. Testy *in vivo* také prokázaly, že kmenové buňky

zapouzdřené v AC-POSS-8-PEEP/HA-SH hydrogelu zvýšily regeneraci poškozené chrupavky. Z výsledků práce uvedených autorů je patrné, že AC-POSS-8-PEEP/HA-SH scaffoldy by mohly představovat slibný materiál pro **léčbu osteoporózy** [179].

5.3.2 Využití hydrogelů na bázi polydopaminu

V této kapitole bude využití polydopaminu navazovat na předchozí text o jeho využití z kapitoly 4.5, avšak jeho aplikovatelnost bude zaměřena převážně na hydrogely. Jeden z nejnovějších výzkumů polydopaminu řeší jeho využití při léčbě rakoviny fototermální terapií. Fototermální terapie se dostala do popředí zájmů, především kvůli rychlému ničení nádorů vlivem lokálně působící vysoké teploty, a také kvůli inhibici růstu nádorů prostřednictvím ozařování fotosenzitivních nanomateriálů NIR zářením. Jak už bylo naznačeno výše, polydopamin je právě jedním z fotosenzitivních materiálů, který je schopen absorbovat NIR záření a přeměnit jej na teplo. V práci Rong et al. (2023) byl zkoumán materiál pro kombinovanou léčbu rakoviny – **chemoterapií a fototermální terapií**. K tomu byl připraven injektovatelný kompozitní hydrogel na bázi oxidovaného hyaluronanu a hydroxypropyl chitosanu (síťované Schiffovou bázi) s inkorporovanými částicemi polydopaminu jako vysoce účinného fototermálního činidla a zároveň jako nosiče léčiva doxorubicin (DOX). Při tomto typu terapie může v okolí zasažené tkáně vznikat zánět, který vědci vyřešili přidávkem kurkuminu a derivátu cyklodextrinu pro zmírnění projevů zánětu. Výsledky jejich studie ukázaly, že kompozitní hydrogel dosahoval vysoké fototermální konverze při současném uvolňování léčiva a přítomnost kurkuminu vedla ke snížení zánětu způsobeného fototermální terapií. Dle *in vitro* a *in vivo* studií na nádorech Hepa 1–6 (model hepatocelulárního karcinomu) má připravený kompozitní hydrogel velký potenciál pro využití při kombinované (fototermo/chemoterapie) léčbě rakoviny [17]. Léčba rakoviny není jedinou oblastí, kde lze PAD využít. Jako biopolymer s celou škálou zajímavých vlastností (elektrická vodivost, adheze, biokompatibilita) byl uplatněn pro přípravu multifunkčních hydrogelů jako **senzorů pro snímání pohybu lidského těla a transdermální (přes kůži) podávání léků**. Autoři Li et al. (2023) se například zabývali hydrogely na bázi hemicelulózy (s akrylamidem a kyselinou akrylovou) vyztužené PAD nanočásticemi. Přítomnost PAD v matici zvyšovala mechanické vlastnosti, elektrickou vodivost a adhezivní vlastnosti. Vysokou adhezi měl hydrogel především ke kožné tkáni i po různém mechanickém namáhání (kroucení, ohýbání), a to díky různým typům interakcím jako jsou např. elektrostatické interakce, kovalentní vazby s thiolovými a aminovými skupinami přítomných na povrchu kůže, vodíkové vazby či interakce π -kationt. Materiál navíc

vykazoval stabilní elektrochemické vlastnosti, které byly přeneseny z vlastní vodivosti polydopaminu a podpořeny porézní strukturou a vlivem polydopaminu na hydrogelovou síť (vodivostní dráha). Díky tomu může hydrogelový kompozit monitorovat různé lidské pohyby, vč. vibrací, v reálném čase (př. ohýbání prstů, kolen, polykání atd.). Navíc při naplnění hydrogelu kationtovým léčivem, je materiál schopen toto léčivo uvolňovat transdermálně řízeným triboelektrickým nanogenerátorem, který přeměňuje biomechanickou energii na elektrickou. Tu lze poté využít jako hnací sílu pro uvolnění léčiva do kůže. Z výše uvedeného je patrné, že připravený kompozitní hydrogel s PAD se jeví jako flexibilní materiál pro využití v biomedicínských aplikacích [18]. Další možnou aplikací PAD je příprava bioadhezivních nanokompozitních vrstev pro rychlou a účinnou nápravu tkáňových funkcí po zranění nebo operaci. Takovým systémem je tvořen hned dvěma polymery obsahujícím dopamin. Prvních z nich je polydopamin ve formě nanočástic, který byl inkorporován do hydrogelu na bázi HA(Na) konjugovaného dopaminem. Společně tak tvoří nanokompozitní **tkáňové lepidlo** pro biomedicínské aplikace [13].

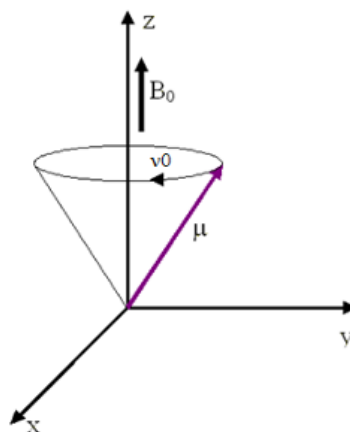
6 METODY CHARAKTERIZACE

6.1 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Nukleární magnetická rezonanční spektroskopie (NMR) je nedestruktivní fyzikálně-chemická analytická metoda využívající magnetických vlastností atomových jader některých izotopů. Umožňuje uživateli pozorovat jednotlivé atomy a molekuly v roztoku, ale i v pevném stavu. NMR je nepostradatelným nástrojem (nejen) organických chemiků, kteří pomocí ní sledují průběh chemických reakcí a ověřují struktury produktů, tedy objasňují strukturu a zároveň ji kvantifikují. Za rozvoj metody NMR a první detekci NMR signálu byla v roce 1952 Millsu Purcellovi a Felixu Blochovi udělena Nobelova cena za fyziku [180; 181].

Jak již bylo řečeno, pomocí NMR lze studovat struktury chemických látek, a to na základě absorpce radiofrekvenčního záření jádrem izotopu v silném magnetickém poli. Studovat lze jen jádra takových izotopů, které mají nenulové tzv. *spinové kvantové číslo (spin)* [180]. Jádro je tvořeno kladně nabitými částicemi (protony) a nenabitými částicemi (neutrony), přičemž každá z nich má svůj vnitřní úhlový moment neboli spin. Nicméně, dvojice protonů či neutronů se vyrovnají tak, že se jejich spiny vyruší a celkový jaderný spin je tak nulový. Takové jádro by bylo NMR neaktivní, tj. metodou NMR by nebylo možné změřit. Aby bylo jádro izotopu NMR aktivní, musí mít liché nukleonové číslo [182]. Snadno pozorovatelné izotopy v NMR jsou ty, jejichž jaderný spin odpovídá $\frac{1}{2}$ ($I = \frac{1}{2}$). Do této skupiny se řadí jádra izotopů ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F atd. Nejčastěji měřeným izotopem je izotop vodíku ^1H , který je v přírodě ze všech izotopů vodíku nejvíce zastoupen (přibližně 99,7 %). Pomocí NMR lze pozorovat i jádra s $I > \frac{1}{2}$, ovšem ty jsou jen obtížně měřitelná, kvůli elektrickému kvadrupólovému momentu [180].

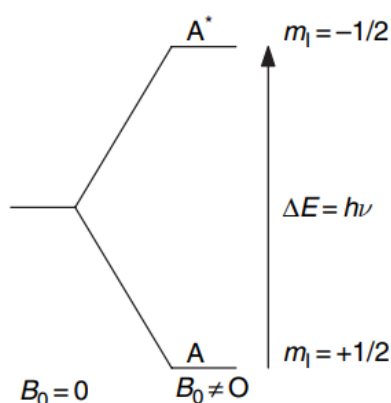
Pokud se jádro izotopu nenachází ve vnějším magnetickém poli, jaderný magnetický moment se nijak neprojeví. Ovšem pokud je jádro s $I \neq 0$ vloženo do vnějšího magnetického pole, začne vektor magnetického momentu μ jádra vykonávat precesní pohyb okolo osy z s tzv. *Larmorovou frekvencí* ν_0 (obr. 38). Precesní pohyb magnetického momentu je výsledkem silové interakce magnetického momentu jádra s magnetickou indukcí pole, která se snaží přimět vektor magnetického momentu, aby se zorientoval ve směru vektoru působení magnetického pole B_0 . Proti vektoru magnetického pole působí síly, které udržují vektor magnetického momentu v rotaci kolem osy z [180].



Obr. 38 - Schematické znázornění sílového působení vnějšího magnetického pole B_0 a magnetického momentu jádra μ

Larmorova precesní frekvence je závislá na gyromagnetickém poměru jádra, což lze označit za konstantu, která charakterizuje jádro každého izotopu a je dána jeho vnitřní strukturou, a na velikosti magnetické indukce. Mimo to je také přímo úměrná rozdílu energií dvou spinových stavů [180; 183].

Jinými slovy, bez vnějšího magnetického pole jsou oba kvantové stavy protonu ($m = \pm 1/2$) ekvivalentní (jejich energie se sobě rovnají), a proto u nich není možná excitace. Ovšem při působení vnějšího magnetického pole dojde k rozdělení základního energetického stavu jader na dva energetické stavy A a A^* , jejichž rozdíl roste úměrně s intenzitou vnějšího magnetického pole (obr. 39). Na horní hladině A^* má spin vyšší energii, než byla energie spinů na původní hladině a na spodní hladině A tomu bude naopak. Tento energetický rozdíl jednotlivých stavů je dán právě Larmorovou frekvencí precesního pohybu, která je rezonanční podmínkou NMR [184].

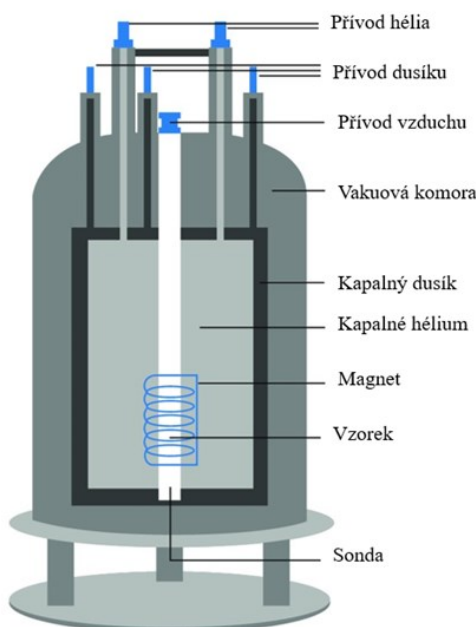


Obr. 39 – Energetické hladiny spinových stavů A a A^* [184]

Na druhou stranu vyšší zastoupení jader zůstává na spodní hladině A, což způsobuje, že přebytečný počet spinů na spodní hladině A může být excitován na vyšší hladinu A*.

Pokud je tedy splněna rezonanční podmínka, tak po ozáření jádra studovaného izotopu radiofrekvenčním zářením, dochází k rezonanci. Při rezonanci vzniká velmi silná interakce mezi spiny a tímto zářením, přičemž výsledkem interakce je přechod spinů z hladiny A na hladinu A* za současné absorpce energie [180; 183; 184]. Po vypnutí magnetického pole dochází k de-excitaci, která se při měření zaznamenává.

Nejdůležitějšími částmi spektrometru jsou zdroj radiofrekvenčního záření a magnet, který vytváří homogenní magnetické pole (obr. 40) [183].



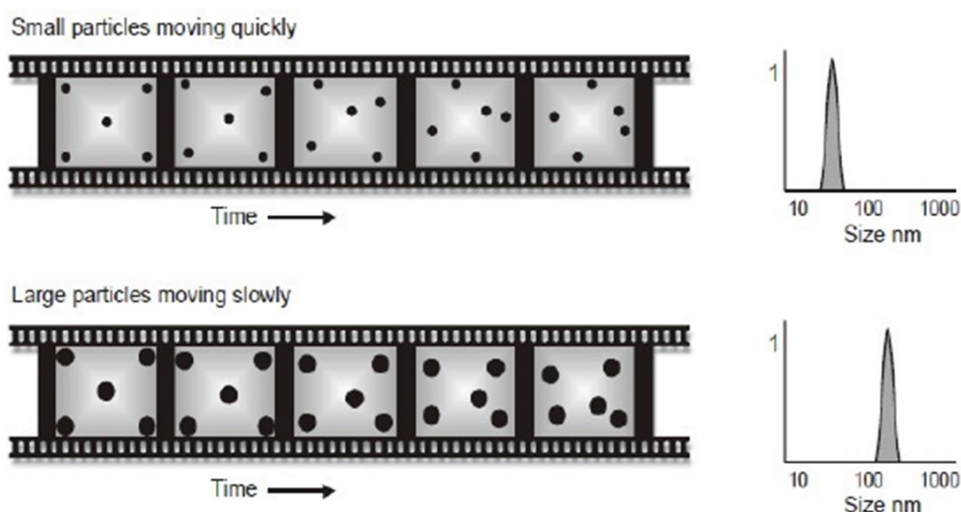
Obr. 40 – Schéma NMR spektrometru [185]

Strukturu molekul (především tedy biomolekul) lze pozorovat za podmínek odpovídající podmínkám v lidském těle, tj. v roztoku o určitém pH, teplotě a iontové síle, což se jeví jako nesporná výhoda při pozorování tkání a orgánů v lidském těle, a tudíž ji lze aplikovat v medicíně (MR tomografie). NMR spektroskopie tedy nachází uplatnění nejen v organické chemii, ale i v medicíně, materiálové chemii, farmaceutickém průmyslu či ve fyzice pevných látek [180].

6.2 Dynamický rozptyl světla (DLS)

Dynamický rozptyl světla (DLS) nebo-li fotonová korelační spektroskopie je nedestruktivní a neinvazivní metoda, díky níž je možné studovat difúzní chování roztoků částic,

makromolekul, koloidů nebo biologických suspenzí. Detekce rozptylu světla materiálem je velmi užitečná technika využívaná v celé řadě vědních disciplín, kde lze v závislosti na zdroji světla a detektoru studovat specifické vlastnosti molekul [186; 187]. Základním principem metody je měření fluktuací intenzity rozptýleného světla částicemi okolo průměrné hodnoty [188]. Částice dispergované v roztoku vykonávají tzv. Brownův pohyb, který vzniká v důsledku vzájemného narážení molekul, a který se vztahuje k velikosti studovaných částic. Při průchodu monochromatického záření (laser) roztokem s částicemi, které vykonávají Brownův pohyb, dochází k tzv. Dopplerovu posunu, kdy záření dopadající na částice je těmito částicemi rozptýleno s jinou vlnovou délkou, než má záření ze zdroje. Tato změna souvisí s velikostí částic a je zaznamenána detektorem. Čím je částice v roztoku menší, tím rychleji se pohybuje, a tím rychleji se mění intenzita rozptýleného záření kolem průměrné hodnoty (obr. 41).



Obr. 41 – Závislost rychlosti pohybu částic v roztoku na jejich velikosti [187]

Změna intenzity tedy závisí jednak na velikosti molekul, ale i na teplotě a viskozitě kapalné fáze, ve které jsou částice dispergovány [186]. Pohyb molekul je definován tzv. translačním koeficientem difúze (D_0), který je nepřímo úměrný hydrodynamickému průměru částice (R_H) a jejich vztah je popsán *Stokesovou-Einsteinovou rovnicí* (rov. 6) [187-189]:

$$R_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta \cdot D_0} \quad (\text{č.6})$$

kde k_B ($\text{J}\cdot\text{K}^{-1}$) je Boltzmannova konstanta, T (K) termodynamická teplota a η (Pa.s) viskozita disperzního prostředí. Měřením translačního difuzního koeficientu částice a použitím autokorelační funkce je možné vypočítat distribuci velikosti částic a podat popis jejich pohybu v roztoku [187].

DLS patří mezi nejčastěji využívané metody k měření velikosti částic v rozmezí od 1 nm do několika μm [188; 189]. Při charakterizaci částic a jejich vzájemném srovnávání je důležité brát na zřetel skutečnost, že chování molekul v roztoku se výrazně liší od chování molekul v pevném stavu (nejčastěji pomocí SEM). Výjimkou není ani charakterizace částic pomocí rentgenového záření, jelikož měřené roztoky jsou málo koncentrované nato, aby poskytly přesné výsledky měření a v důsledku případného zvýšení jejich koncentrace, může dojít ke změně jejich vlastností [187]. Rychlé měření (řádově do několika min) za použití malého množství vzorku, lze označit za výhody zmíněné metody DLS. Experimenty lze navíc provádět v širokém rozsahu teplot i koncentrací [186; 188]. Jak již bylo řečeno, DLS se ve většině případů využívá ke stanovení distribuce velikosti částic. Pomocí DLS lze také stanovit funkcionalizaci povrchu, charakterizovat stabilitu částic v různých médiích nebo při různých hodnotách pH. Konkrétními aplikacemi mohou být například stanovení zeta-potenciálu studovaných částic, potvrzení modifikace povrchového náboje či potvrzení elektrostatické interakce mezi nanočásticemi a buňkami [190].

6.3 Rotační reometr

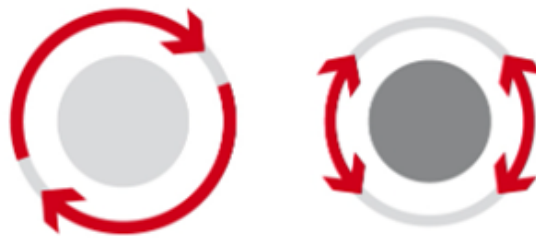
Rotační reometr je přístroj, pomocí kterého lze charakterizovat reologické a viskoelastické vlastnosti polymerních tavenin, disperzí, suspenzí atd.. Dříve než bude popsán jeho princip a instrumentace, je potřeba si definovat některé důležité pojmy. Jedním z nich je reologie, která je definována jako věda zabývající se studiem toku a deformací materiálu. Podle chování během toku lze látky rozdělit na *Newtonské* (př. voda, silikonový olej) a *ne-Newtonské* (př. polymerní taveniny a roztoky). Z pohledu reologie vykazují polymerní materiály tzv. *pseudoplastické chování* (*shear thinning*), během kterého smyková viskozita materiálu s rostoucí rychlostí smykové deformace klesá. Chování polymerních látek lze popsat také pomocí tzv. *viskoelasticity*, která je definována jako časově proměnná vlastnost, při níž materiál reaguje jako viskózní kapalina nebo elastická pevná látka v závislosti na časové deformaci [191; 192]. Nejdůležitější veličinou, která popisuje chování materiálu během toku, je *smyková viskozita* (η). Smyková viskozita je definována jako odpor materiálu proti tečení a udává se jako vztah mezi smykovým napětím (τ) a rychlostí smykové deformace ($\dot{\gamma}$). Pro Newtonské látky platí, že viskozita je materiálovou konstantou a nezávisí na rychlosti smykové deformace. Newtonské látky lze popsat tzv. Newtonovým zákonem (rov. 7)

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (\text{č. 7})$$

Z pohledu polymerních látek, které patří mezi ne-Newtonské, již smykový viskozita není konstantou. Během namáhání se dlouhé a propletené řetězce polymerů rozplétají a orientují ve směru toku. Viskozita polymerů je tedy silně závislá na rychlosti deformace [191]. Matematický popis ne-Newtonských látek je mnohem komplexnější než popis Newtonských. Mezi používané reologické modely patří Mocninový zákon (rov. X), Carreau-Yasuda model, Hershel-Buckley atd., jelikož s jejich pomocí je možné zjednodušeně popsat pseudoplastické chování materiálu [193].

$$\eta = K \cdot \dot{\gamma}^{n-1} \quad (\text{č. 8})$$

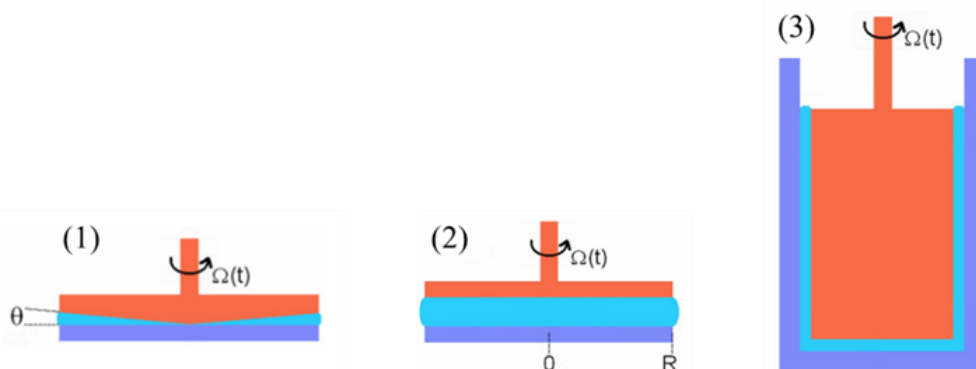
Mezi další důležité reologické veličiny patří modul pružnosti (G') a ztrátový modul (G''), které přímo souvisí s viskoelastickými vlastnostmi polymerních látek. Modul pružnosti souvisí s elastickou složkou a představuje tu část energie, která se v materiálech ukládá při deformaci, zatímco ztrátový modul souvisí s viskózní složkou a představuje energii, která se ztrácí disipací. Vztah mezi moduly ukazuje, která ze dvou složek převládá, jestli elastická či viskózní. Hodnoty těchto modulů lze zjistit pomocí lineárních viskoelastických měření při dynamických oscilacích [191; 194]. Jak již bylo zmíněno, k charakterizaci viskoelastických vlastností pomocí reologických veličin, slouží přístroje zvané reometry. Na rozdíl od viskozimetrů, pomocí kterých je možné hodnotit pouze viskozitu měřeného vzorku, reometry jsou schopné měřit více reologických parametrů (např. viskozitu, G' , G'' , ztrátový faktor v závislosti na čase, teplotě, frekvenci, nebo relaxační modul či poddajnost při tečení atd.) [194; 195]. I když existuje několik typů reometrů, které se vzájemně liší jednotlivým uspořádáním, a tedy i základním principem, na jehož základě probíhá samotné měření (rotace, kríp, relaxace atd.), níže bude popsán pouze tzv. rotační reometr, jelikož byl použit k měření reologických veličin v experimentální části diplomové práce. Princip rotačního reometru spočívá v měření točivého (kroučícího) momentu, který je vyvolán odporem vzorku proti toku [194; 195]. Měřený točivý moment se poté přepočítává pomocí senzorů na geometriích na reologické veličiny (napětí, deformaci, moduly, viskozitu...), které se zaznamenávají optickým dekodérem a následně vyhodnocují v softwaru pro analýzu dat [194]. Reometr se skládá ze dvou geometrií – *dolní*, která je stacionární, a *horní*, která je pohyblivá. Mezi tyto dvě geometrie je umístěn vzorek, jehož měření probíhá buď v rotačním či oscilačním režimu, jak je naznačeno na (obr. 42) [194].



Obr. 42 – Měřicí režimy rotačního reometru – rotační (vlevo) a oscilační (vpravo)

Samotné měření lze realizovat na různých geometriích (kužel-deska, deska-deska, válec-válec, double gap) v závislosti na typu vzorku (obr. 43). V případě geometrie **(1) kužel-deska** je vzorek rovnoměrně smýkán mezi horním rotujícím kuželem a spodní fixní deskou, čímž se vytváří vodorovné vrstvy kapaliny. K měření je potřeba velmi malý objem vzorku, což lze považovat za výhodu. Další výhodou jsou přesně definované rychlosti smykové deformace, při kterých se vzorky měří. Nicméně na tomto typu geometrie nelze příliš dobře měřit málo viskózní kapaliny nebo vzorky s částicemi, protože by mohly uvíznout v úzké štěrbině mezi kuželem a deskou, kde by mohlo dojít k jejich kumulaci [196].

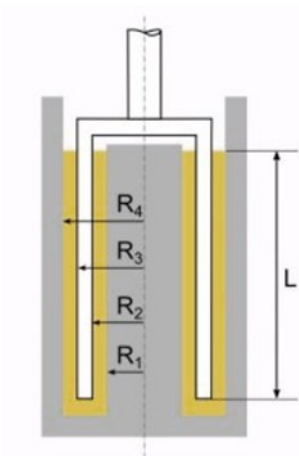
Další dalším typem uspořádání geometrie představuje **(2) deska-deska**, kde je kapalina smýkána mezi horní pohyblivou a spodní nepohyblivou deskou. Na rozdíl od geometrie kužel-deska se, mezi paralelními deskami nevytváří rovnoměrné vrstvy. Při uspořádání deska-deska je možné měřit i vzorky s částicemi, ovšem smykové rychlosti jsou závislé na vzdálenosti mezi deskami.



Obr. 43 - Typy geometrií – (1) kužel-deska, (2) deska-deska, (3) válec-válec [196]

V neposlední řadě lze vzorky měřit na geometrii **(3) válec-válec**, ve které je vzorek umístěn mezi dvěma soustřednými válci, vnitřním pohyblivým a vnějším nepohyblivým. Vrstvy kapaliny zaujímají tvar válců a smykové napětí tak působí na velkou povrchovou plochu ve srovnání s geometrií kužel-deska. S výhodou se geometrie válec-válec využívá pro málo

viskózní kapaliny, ovšem pro jejich měření jsou potřeba velké objemy [196]. Speciálním typem geometrie válec-válec je tzv. *double gap*, který byl navržen pro měření při malém objemu (3 ml) kapalin s velmi nízkou viskozitou. Horní geometrie se otáčí v prstencové mezeře mezi vnější a vnitřní stěnou dolní geometrie a jejich tvary jsou k sobě navzájem inverzní (obr. 44). Konstrukce *double gap* je navržena tak, aby se maximalizovala plocha dotyku horní geometrie s měřenou kapalinou, čímž lze získat větší smykovou plochu než u standardních geometrií válec-válec. Proto lze touto geometrií zaznamenat i nízké hodnoty kroutícího momentu generovaného vzorkem s nízkou viskozitou [197].

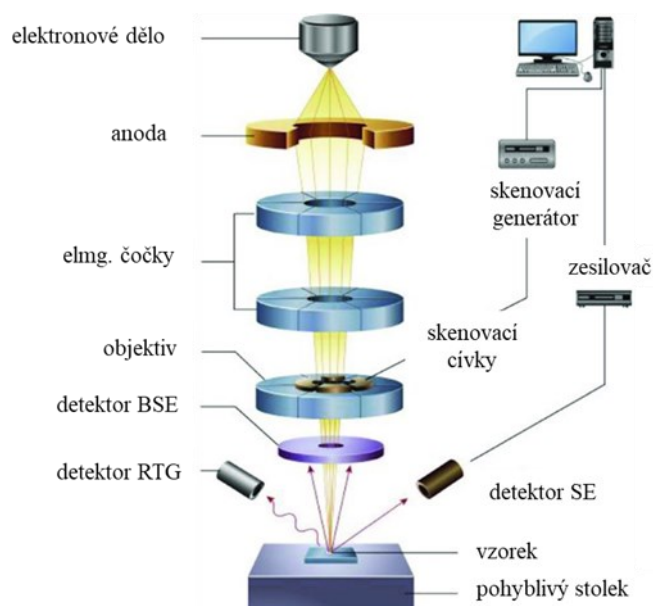


Obr. 44 – Speciální typ geometrie válec-válec, tzv. *double gap* [197]

Jak už bylo naznačeno, reologie je nedílnou součástí mnoha průmyslových odvětví. V plastikářském průmyslu je znalost reologických parametrů a jejich pochopení klíčové pro úspěšné zpracování polymerních tavenin/suspenzí [198]. V kosmetickém průmyslu je kvantifikace reologických vlastností důležitá z hlediska aplikace (př. roztíratelnost) nebo se s jejich pomocí stanovuje např. dlouhodobá stabilita krémů. Bez reologie se neobjede ani optimalizace výrobního procesu, stabilita disperze a konečné použití produktů (gelů, krémů, pleťových vod) ve farmaceutickém průmyslu [199]. Neméně důležitá je také pro biomedicínské aplikace. Při přípravě materiálů pro aplikace do lidského těla jako náhrady orgánů nebo jejich částí, musí být tyto materiály co nejvíce podobné nativní tkáni z hlediska viskoelastických vlastností. Příkladem může být příprava plně funkční srdeční chlopně, která je neustále mechanicky namáhána. Chlopně musí na celou řadu těchto mechanických podnětů (dynamických i statických, včetně pevnosti v tahu a viskoelastických vlastností) reagovat okamžitě a přesně [200]. Reologické chování materiálů pro biomedicínské aplikace má velký význam z hlediska 3D tisku (popř. 3D biotisku), zachování tvaru materiálu nebo viability buněk [201].

6.4 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Skenovací elektronová mikroskopie je jednou z nejběžnějších metod zobrazení morfologie materiálu, ale také je schopna poskytnout uživateli základní náhled do chemického složení povrchu [202-204]. Zobrazování vzorků pomocí SEM je založené na interakci elektronového svazku (tzv. primárního svazku) se vzorkem. Při dopadu primárního svazku na povrch vzorku dochází k několika typům interakcí, během kterých může dojít k vyzáření/emisi fotonů nebo elektronů z povrchu vzorku. Emitované elektrony, popř. fotony, dopadají na detektor, který přeměňuje kinetickou energii z elektronů na elektrický signál, pomocí kterého je pak vytvořen obraz povrchu vzorku [202]. Emitované elektrony pak poskytují informace o topografii, morfologii, složení materiálu, orientaci zrn, krystalografické informace atd. [205]. Elektrony mohou být zachyceny různými typy detektorů v závislosti na měřicím režimu SEM (např. zobrazování sekundárními elektrony, rentgenové mapování, zobrazování zpětně rozptýlenými elektrony nebo Augerova elektronová mikroskopie) [202]. Mezi dva nejběžněji používané režimy patří zobrazování sekundárními (SE) a zpětně odraženými (BSE) elektrony. Detekcí sekundárních elektronů lze získat popis topografie vzorku, zatímco zpětně odražené elektrony poskytují informace o materiálovém složení povrchu [205; 206]. Pomocí SEM lze zobrazovat pouze pevné vzorky, které jsou vodivé. Vzorky, které tuto podmínku nesplňují, je potřeba před měřením pokovit, tj. na jejich povrch nanést tenkou vrstvu vodivého kovu, např. zlata [204].



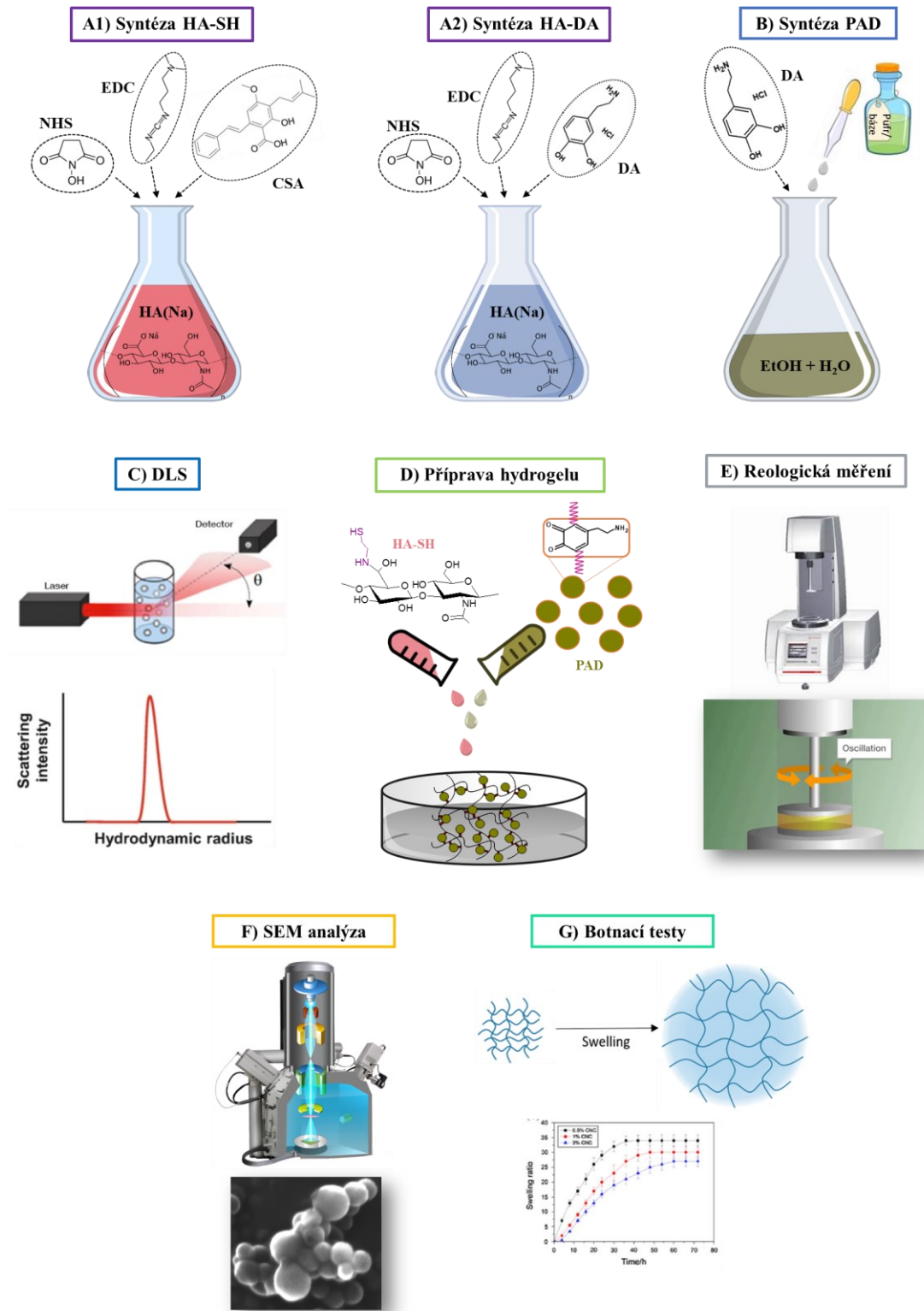
Obr. 45 - Instrumentace skenovacího elektronového mikroskopu [204]

Na obr. 45 je uveden popis hlavních částí skenovacího elektronového mikroskopu. K nejdůležitějším patří **elektronové dělo**, které je umístěno v horní části přístroje a z kterého jsou emitovány elektrony s energií v rozmezí od 0,1 - 30 keV. Elektronový svazek je dále fokusován sérií **elektronové optiky** (např. elektromagnetické čočky, skenovací cívky), která je konstruována tak, aby energie svazku byla co nejvyšší a zároveň aby svazek dopadal na co nejmenší plochu zkoumaného vzorku. Odražené elektrony, popř. fotony, jsou poté detekovány již zmíněným **detektorem**. Měření probíhá v prostředí hlubokého vakua, které zaručuje, že se mohou elektrony pohybovat, aniž by byly rozptýleny či absorbovány vzduchem [202; 205]. Skenovací elektronová mikroskopie je nepostradatelnou součástí různých vědních disciplín či průmyslových odvětví. Zvláštní význam představuje pro tkáňové inženýrství, ve kterém se SEM užívá pro zobrazování morfologie scaffoldů a charakterizaci velikosti jejich pórů. Také umožňuje stanovit přilnavost buněk a jejich migraci a proliferaci na scaffoldech [207].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

7 POPIS EXPERIMENTU

V uvedené kapitole jsou rozebrány jednotlivé kroky experimentu, na které následně navazují další kapitoly s popisem použitých metod, dosažených výsledků a jejich porovnání s literaturou. **Prvním krokem** experimentu byla syntéza thiolovaného hyaluronanu (HA-SH), které byla optimalizována v bakalářské práci [51], a na kterou tato diplomová práce navazuje. Navíc byla připravena tzv. *jednokroková* HA-SH, při které byly syntéza a následná redukce provedeny v jednom reakčním kroku (bez mezifáze, ve kterém byl produkt po syntéze lyofilizován a k redukci znovu rozpuštěn). Dále byl také připraven dopaminem konjugovaný hyaluronan (HA-DA). **Druhý krok** experimentu zahrnoval syntézu polydopaminu ve formě částic (PAD-NP) a tyčinek (PAD-NT) v závislosti na jejich velikosti a polydisperzitě. Struktura modifikovaného hyaluronanu (HA-SH a HA-DA) byla ve **třetím kroku** potvrzena nukleární magnetickou rezonancí (^1H NMR). Pomocí NMR spekter byl také spočítán stupeň substituce (DS %) volných thiolových a katecholových (dopaminu) skupin navázaných na matici HA(Na). Velikost polymerních klubek (HA-DA, HA-SH) a PAD částic, popř. tyčinek, byla ve **čtvrtém kroku** experimentu stanovena metodou dynamického rozptylu světla (DLS). Následně byly připraveny hydrogely na bázi HA-SH pomocí PAD částic a tyčinek, které představují tzv. chemické uzly síťování, a také hydrogely na bázi HA-DA (**pátý krok**). **Šestým krokem** bylo měření doby gelace a také tuhost připravených hydrogelů, které byly provedeny na rotačním reometru. Gelační čas byl staven, jako průsečík křivek představují elastickou složku a složku viskózní, tedy měřením byl určen čas, za který dojde k převaze elastické složky nad viskózní, tedy ke vzniku 3D sítě. Tuhost hydrogelů byla stanovena oscilačními testy, během kterých byl měřen elastický modul (*storage modulus*) v závislosti na úhlové frekvenci. Pro případnou aplikaci a zpracování hydrogelů metodou 3D tisku byly také provedeny testy reverzibility reologického chování hydrogelů, a to testováním cyklického působení smykové deformace na vzorek (z 1% na 100 % a naopak). Struktura a porozita hydrogelů, a zároveň také velikost a morfologie PAD částic i trubiček byla poté studována skenovacím elektronovým mikroskopem (SEM) (**sedmý krok**). V neposlední řadě byla ověřena bobtnací schopnost lyofilizovaných hydrogelů prostřednictvím bobtnacích testů (tzv. *swellings*) (**osmý krok**). Na základě všech výše uvedených experimentů byly připravené materiály vyhodnoceny z hlediska jejich využití v biomedicínských aplikacích. Pro přehlednost, byly jednotlivé kroky experimentu graficky shrnuty do níže přiloženého schématu (obr. 46).



Obr. 46- Schématické znázornění jednotlivých kroků experimentu

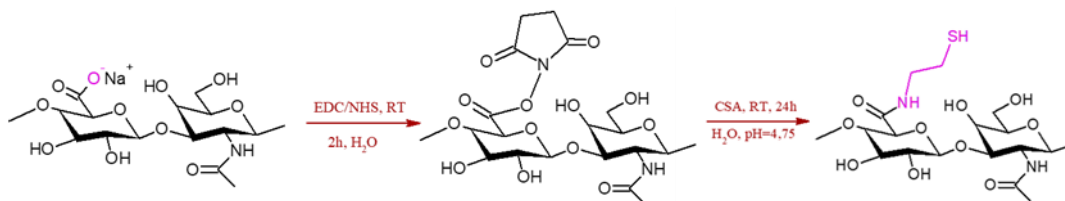
8 POUŽITÉ MATERIÁLY A METODY

8.1 Použité materiály

V experimentální práci diplomové práce byly využity níže uvedené chemické látky. Hyaluronan (**HA(Na)**, kosmetická čistota, $M_w = 243$ a 600 kDa) byl získán od společnosti Contipro group, a.s. (Dolní Dobrouč, Česká Republika). Dále 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid hydrochlorid (**EDC**, 98 %, $M = 191,7$ g/mol), N-hydroxysukcinimid (**NHS**, 98 %, $M = 115,09$ 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) byly zakoupeny od firmy Carl Roth (Karlsruhe, Německo). Dopamine hydrochlorid (**DA**); kurkumin, kyselina 4-morfolinetansulfonová (**MES**, $M = 195,24$ g/mol), TRIS HCl, amoniak Dialyzační membrána SnakeSkin™ (MWCO 3500, vnitřní průměr 35 mm).

8.2 Syntéza thiolovaného hyaluronanu (jednokroková)

Příprava thiolovaného hyaluronanu zahrnuje aktivaci karboxylové skupiny pomocí EDC/NHS, na jejíž místo se přes amidovou následně naváže cysteamin (obr. 47). Prvním krokem syntézy byla příprava roztoku hyaluronanu o koncentraci 0,5 hm. %. Konkrétně byl 1 g nativního HA(Na) ($M_w = 243$ kDa) rozpuštěn ve 200 ml Qmili vody (1 mmol) 24 hod. Po uplynulé době bylo do roztoku přidáno 0,5755 g (2 mmol) látky N-hydroxysukcinimid (NHS) a po 5 min 1,917 g (4 mmol) látky 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid (EDC) ve formě prášku. Uvedená reakční směs byla míchána (RPM = 250) při laboratorní teplotě po dobu 2 hod. Mezitím byl v 5 ml Qmili vodě, která byla probublána vzdušným N_2 , rozpuštěno 1,136 g (4 mmol) látky cysteamin (CSA). Následně bylo pH reakční směsi upraveno pomocí 2M roztoku HCl na hodnotu 4,75. Připravená směs byla modifikována 24 hod za stálého míchání (RPM = 250) při laboratorní teplotě.

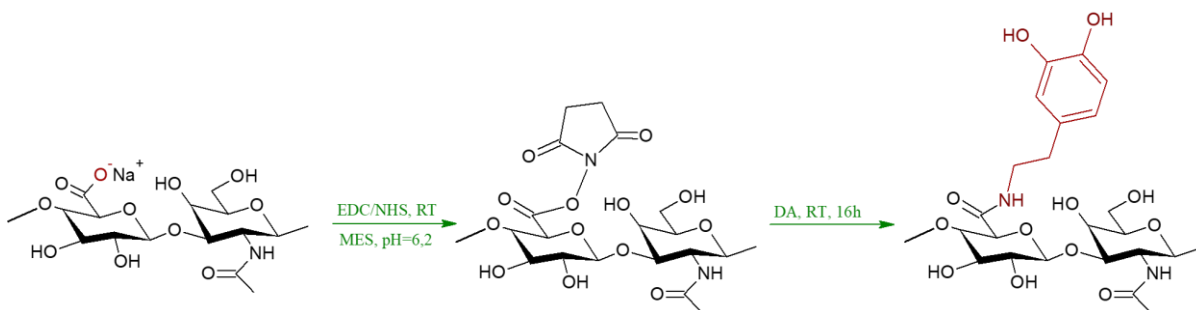


Obr. 47 – Schéma syntézy thiolovaného hyaluronanu

Po 24 hod bylo do reakční směsi naváženo redukční činidlo dithiotreitol (DTT) v ekvimolárním poměru 1:3 (HA:DTT), aby bylo zabráněno předčasnému vytvoření disulfidových vazeb iniciované vzdušným kyslíkem. Konkrétně bylo do reakční směsi přidáno 1,157 g DTT a pH roztoku bylo pomocí 1M roztoku NaOH zvednuto na $\text{pH} > 8,0$, při kterém byla zaznamenána nejvyšší účinnost DTT jako redukčního činidla. Tato reakční směs byla míchána ($\text{RPM} = 250$) 2 hod při laboratorní teplotě. Po uplynulé době bylo pH směsi sníženo na hodnotu 4,0 pomocí 2M HCl. Následně byla směs převedena do dialyzační membrány (SnakeSkin™, MWCO 3500), ve které byla purifikována proti Qmili vodě ($\text{pH} 4,0$) po dobu 72 hod. Obměna dialyzačního roztoku byla realizována 3krát denně. Po 72 hod bylo pH směsi upraveno na hodnotu 6,0–7,0 a zamraženo na teplotu $-18\text{ }^\circ\text{C}$. Takto připravené vzorky byly poté sušeny v lyofilizátoru při teplotě $-80\text{ }^\circ\text{C}$ a tlaku 0,06 mbar. Hlavní sušení probíhalo 30 hod, po kterém následovalo finální sušení při tlaku 0,001 mbar do úplného vysušení vzorku. Výsledný produkt (HA-SH) byl zvážen a byl spočítán jeho výtěžek.

8.3 Syntéza dopaminem konjugovaného hyaluronanu (HA-DA)

Jak již bylo zmíněno v teoretické části, dopamin se na řetězec hyaluronanu váže na místo původní karboxylové skupiny, jak je naznačeno na níže uvedeném schématu (Obr. 48).



Obr. 48 – Syntéza HA-DA [13]

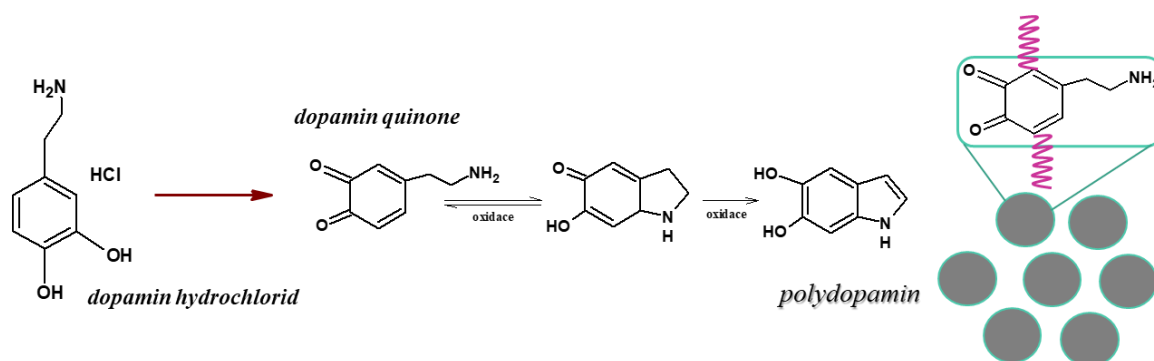
Prvním krokem syntézy HA-DA bylo rozpustit 0,3 g HA(Na) v 30 ml MES pufru ($\text{pH} = 6,2$, $T = 25^\circ\text{C}$). Po 30 min bylo do roztoku HA(Na) přidáno 0,493 g EDC (0,3 mmol) a po 5 min 0,291 g (0,3 mmol) NHS. Mezitím bylo ve 2 ml MES rozpuštěno 0,5 g DA (0,3 mmol), které bylo po 30 min od rozpuštění přidáno k reakční směsi. Nádoba s reakční směsí byla obalena hliníkovou fólií (ochrana před světlem). Po celou dobu modifikace byla reakční směs probublávána N_2 a míchána na magnetickém míchadle podobu 16 hod za laboratorní teploty. Po uplynutí reakční doby bylo pH reakční směsi hyaluronanu sníženo na $\text{pH} = 5,30$, převedena do dialyzační membrány (MWCO 3500), ve které byla purifikována proti DEMI vodě ($\text{pH} = 5,30$) po dobu 48 hod. Obměna dialyzačního roztoku probíhala 3krát denně. Po

48 hod byla reakční směs přelita na skleněnou petriho misku a následně zmrazena na teplotu $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zmražené vzorky byly následně lyofilizovány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a tlaku $0,06\text{ mbar}$ po dobu 72 hod. Lyofilizované vzorky byly poté zváženy a určen jejich výtěžek.

8.4 Syntéza polydopaminu

8.4.1 Syntéza polydopaminu ve formě nanočástic (PAD-NP)

Syntéza polydopaminu ve formě nanočástic (PAD-NP) byla realizována na základě postupů navržených níže uvedenými autory. Tyto postupy se liší pouze v parametrech syntézy (tab.1), principálně je syntéza PAD-NP stejná. Jedná se o oxidaci monomeru dopaminu rozpuštěného ve směsi voda/ethanol (popř. voda/acetón) v různých poměrech za přítomnosti alkalického pH ($\text{pH} < 8$) (obr. 49). Níže budou popsány dva postupy syntézy PAD-NP, a to podle Ai et al. (2013) [134] a Xue et al. (2016) [136].



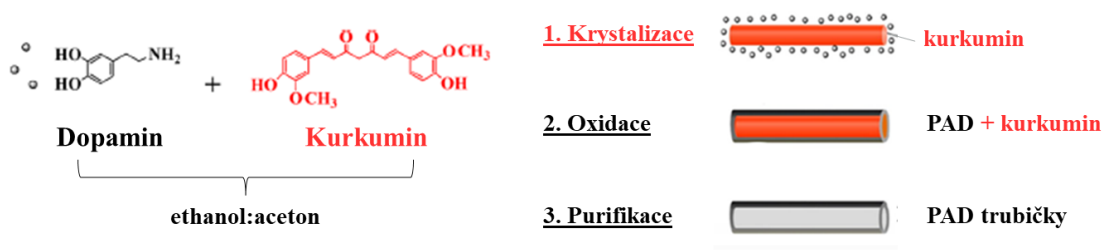
Obr. 49 – Schéma syntézy polydopaminu

Prvním krokem syntézy dle Ai et al. (2013) bylo smíchání vody s ethanolem (EtOH) v poměru 1:2,25 na celkový objem 130 ml. Do vodné směsi bylo přidáno 30% vodného roztoku NH_3 v závislosti na pH, které určuje velikost syntetizovaných částic. Takto připravená směs ($\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}/\text{NH}_3$) byla míchána po dobu 30 min při pokojové teplotě. Mezitím bylo v 10 ml Qmili vody rozpuštěno 0,5 g DA, které bylo po rozpuštění přidáno do reakční vodné směsi. Oxidace dopaminu byla doprovázena barevným přechodem z čiré na tmavě hnědou až černou barvu. Reakce probíhala 24 hod [134]. Syntetizované PAD-NP částice byly po uplynutí reakční doby stočeny na centrifuze ($\text{RPM} = 12\ 000$, 20 min) a promyty destilovanou vodou tak, aby došlo k odstranění nezreagovaných zbytků reakčních látek. Promyté disperze částic byly poté sušeny v sušárně při $40 - 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ do úplného vysušení.

Alternativní způsob přípravy polydopaminu byl navržena na základě práce **Xue et al. (2016)**, kteří ve své studii nesyntetizovali PAD ve formě částic, ale trubiček. Tento postup přípravy PAD ve formě částic je tedy totožný s přípravou PAD ve formě trubiček, ovšem s tím rozdílem, že v postupu přípravy PAD-NP chybí kurkumin. Postup přípravy je uveden níže v kap. 8.3.2.

8.4.2 Syntéza polydopaminu ve formě nanotrubiček (PAD-NT)

Jak již bylo zmíněno, syntéza PAD-NT byla provedena podle Xue et al. (2016). Jednotlivé kroky jsou znázorněny pomocí schématu na obr. 50. Nejprve bylo odváženo 0,5 g dopaminu a 0,1 g kurkuminu a rozpuštěno ve směsi EtOH/aceton o objemu 100 ml (v/v 1:1). Po rozpuštění obou látek, bylo do směsi s charakteristickou žlutou barvou postupně přilito 400 ml Qmili vody, čímž došlo k vysrážení ve vodě nerozpustného kurkuminu ve formě krystalků. Po jeho kompletním vysrážení byly následně do směsi přidány 3 ml TRIS·HCl pufru (1,5 M, pH 8,8), a pH směsi bylo upraveno pomocí 30% roztoku amoniaku na hodnotu 8,8. Zvýšení hodnoty pH ve směsi iniciovalo autooxidační reakci dopaminu, jejíž výsledkem je vznik PAD, který byl deponován na povrch krystalů vysráženého kurkuminu. Oxidace dopaminu byla doprovázena barevným přechodem ze žluté na tmavě hnědou až černou barvu. Reakce probíhala po dobu 24 hod [136].



Obr. 50 – Schéma syntézy PAD trubiček [136]

Po uplynutí reakční doby byla směs dále purifikována v dialyzační membráně (MWCO 3500) proti dialyzačnímu roztoku (Qmili voda, pH = 7), tak aby došlo, ke kompletnímu vymytí nezreagovaného kurkuminu. Po ukončení dialýzy byl výsledný produkt (promyté PAD trubičky zbavené kurkuminu) vysušeny v sušárně při teplotě 40 – 60 °C do úplného vysušení. Vysušený produkt byl poté zvážen a vypočítán jeho výtěžek.

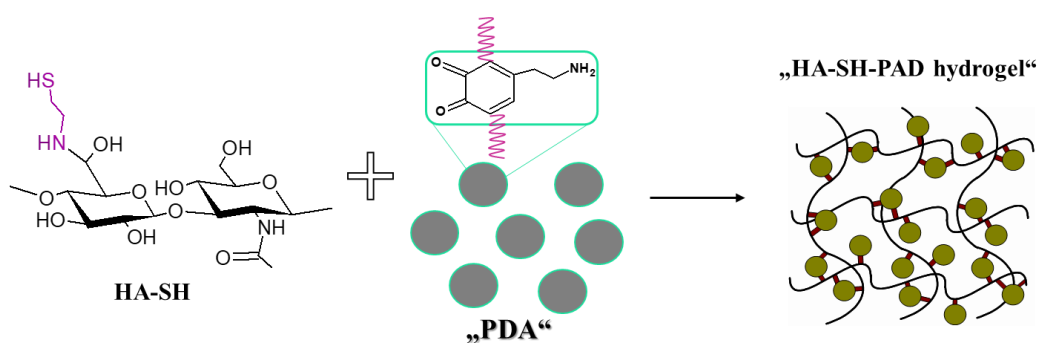
Tab. 1 – Přehled zvolených podmínek syntézy PAD pro její optimalizaci

Kód reakce	Tvar	DA [g]	EtOH:voda	aceton [ml]	amoniak [um]	pufr (TRIS-HCl) [ml]	pH
PAD-1	nepravidelný	0.5	1:2.25 (40:90 ml)	/	100	/	8.65
PAD-2	kulovitý	0.5	1:2.25 (40:90 ml)	/	100	/	8.65
PAD-3	nepravidelný	1.5	1:2.25 (115.4:359.6 ml)	/	100	/	8.60
PAD-4	tubes/kulovitý	0.5/ 0.1 kurkumin	1:8 (50:400 ml)	50	150	3	8.33
PAD-5	nepravidelný	1.5	1:2.25 (115.4:359.6 ml)	/	50	/	8.50
PAD-6	kulovitý	0.5	1:8 (50:400 ml)	50	0	3	8.31
PAD-7	tubes	0.5/ 0.1 kurkumin	1:8 (50:400 ml)	50	180	3	8.80
PAD-8	neúspěšná syntéza						
PAD-9	neurčené	0.5	1:8 (50:400 ml)	50	140	3	8.81
PAD-10	kulovitý	0.5	1:8 (50:400 ml)	50	0	3	8.36
PAD-11	nepravidelné (spečené)	0.5	1:2.25 (40:90 ml)	/	20	1	8.37
PAD-12	kulovité	0.08	1:9 (40:90 ml)	/	20	0.24	9.04
PAD-13	kulovitý	0.08	1:1 (50:50 ml)	/	20	0.24	9.05/8.50
PAD-14	kulovitý	0.5	1:2.25 (40:90 ml)	/	750	/	9.60
PAD-15	tyčinky/kulovitý	0.5/ 0.1 kurkumin	1:8 (50:400 ml)	50	180	3	8.84
PAD-16	kulovitý	0.5	1:8 (50:400 ml)	50	0	3	8.36
PAD-17	kulovitý	0.5	1:2.25 (40:90 ml)	/	750	/	9.60

8.5 Příprava hydrogelů na bázi HA-SH-PAD, HA-DA a HA-SH-HA-DA

8.5.1 Příprava HA-SH-PAD

Hydrogely na bázi thiolovaného hyaluronanu byly síťovány prostřednictvím polydopaminu jako crosslinkeru, který spojuje řetězce HA-SH prostřednictvím kovalentní vazby mezi thiolovými skupinami HA-SH a chinonem PAD, jak je znázorněno na přiloženém schématu (obr. 51).



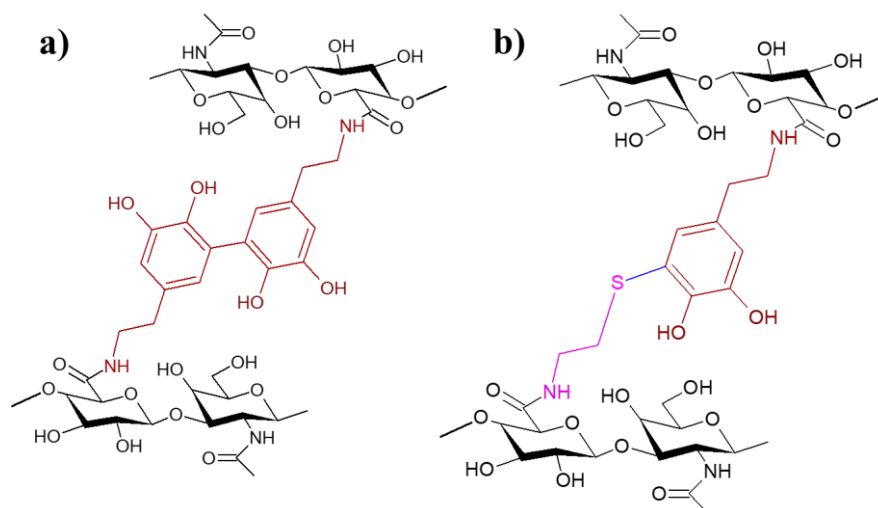
Obr. 51 – Schématické znázornění přípravy hydrogelu na bázi thiolovaného hyaluronanu a polydopaminu

Lyofilizovaný produkt thiolovaného hyaluronanu (HA-SH) byl rozpuštěn v Qmili vodě ($T = 25^{\circ}\text{C}$) ve 2% a 3% koncentraci (w/w) při teplotě $T=25^{\circ}\text{C}$ a po dobu 2h míchání na magnetickém míchadle. Po kompletním rozpuštění polymeru k němu byly přidány PAD částice/trubičky, a to v různém poměru vzhledem k HA-SH matici: HA-SH:PAD = 1:0,25, 1:0,34, 1:0,5; 1:0,75 a 1:1. Po přidavku částic k polymeru byl roztok po dobu 15 min sonifikován v ultrazvukové lázni, tak aby se předešlo vzniku nežádoucích agregátů PAD. Následné síťování bylo podpořeno přidavkem 1M NaOH (zvýšení pH z hodnoty 4,6 na hodnotu 8), které iniciovalo vznik vazby mezi thioly a chinonem.

8.5.2 Příprava HA-DA a HA-SH-HA-DA

Jak již bylo naznačeno v teoretické části, mechanismus síťování katecholů, a tedy i dopaminu, zatím nebyla zcela popsán a objasněn. Na obr. 52 jsou uvedeny možné mechanismy síťování hyaluronanu konjugovaného dopaminem, a to buď vznikem příčných vazeb mezi katecholy (a) nebo navázáním thiolové skupiny HA-SH na chinon HA-DA (b). V zásadě se tento princip síťování shoduje s přípravou polydopaminu a hydrogelů HA-SH-PAD, který byl popsán výše. Při přípravě HA-DA hydrogelů, je lyofilizovaný produkt HA-DA rozpuštěn v Qmili vodě o různých koncentracích (1% a 2%, popř. 3% (w/w)). Po úplném

rozpuštění bylo přidavkem 1M NaOH upraveno pH z původní hodnoty 7,0 na hodnotu 8,0. Zvýšením pH dochází k iniciaci vzniku příčné vazby mezi chinonovými skupinami dopaminu za vzniku nerozpustné hydrogelové matrice (sítě).



Obr. 52 – Síťování hyaluronanu konjugovaného dopaminem (a) a síťování thiolovaného hyaluronanu a hyaluronanu konjugovaného dopaminem

V případě HA-SH-HA-DA kompozitních hydrogelů, jsou produkty (HA-SH a HA-DA) opět rozpuštěny v Qmili vodě o 2% koncentraci (w/w) v různých poměrech výchozích modifikovaných polymerů (HA-SH:HA-DA = 1:1; 0,5:1 a 1:0,5). Navíc byly připraveny také hydrogely, které vznikly kombinací HA-SH a HA-DA roztoků o různé koncentraci (2% a 3% (w/w)). I v tomto případě bylo síťování podpořeno přidavkem 1M NaOH. Všechny připravené hydrogely byly následně charakterizovány z hlediska reologie, botnacích schopností a morfologie a porozity.

8.6 Metody charakterizace připravených produktů (PAD, HA-SH a HA-DA)

8.6.1 NMR

Struktura nativního i modifikovaného hyaluronanu (HA-SH i HA-DA) byla potvrzena pomocí protonové nukleární magnetické rezonance ($^1\text{H-NMR}$), jejíž princip a instrumentace byly popsány v teoretické části diplomové práce. K popisu struktury byl konkrétně použit přístroj *JEOL ECZ 400* (JEOL Ltd., Tokio, Japonsko), který pracuje při frekvenci 399,78 MHz. Analyzované vzorky byly rozpuštěny v deuterované vodě (D_2O) s výslednou

koncentrací 8,6 mg/ml. Vzorky byly převedeny do speciálních NMR kyvet a měřeny při teplotě 25 °C. Naměřená data vzorků byla následně vyhodnocena v programu *ACD/NMR Processor Academic Edition* pomocí komplexní Fourierovy transformace na NMR spektrum, ve kterém byly následně odečteny hodnoty charakteristických píků odpovídajícím signálům protonů jednotlivých funkčních skupin přítomných ve struktuře měřených vzorků. Referenčním píkem byl v oblasti 4,75 ppm signál protonů D₂O, ve které byly vzorky rozpuštěny. Pomocí NMR spekter byl stanoven také stupeň substituce (DS) thiolových skupin navázaných na hyaluronovém řetězci. DS byl určen pomocí integrace charakteristických píků odpovídajícím signálům protonů navázaných thiolů a referenčního píku, kterým byl zvolen signál protonů skupiny N-acetyl, jelikož tato skupina se během modifikace HA(Na) řetězce nemění. Stupeň substituce byl tedy spočítán jako relativní poměr integrace referenčního píku (I_{NAC}) v oblasti $\delta = 2,0$ ppm a píků volné thiolové skupiny (I_{SH}) v oblasti $\delta = 2,4$ ppm, popř. píků disulfidové vazby (I_{SS}) v oblasti $\delta = 2,8 - 2,9$ ppm, jak je uvedeno na příkladové rovnici (rov. 9 a 10).

$$DS(\%) = \frac{I_{SH}}{\frac{4}{I_{NAC}}} \cdot 100 \text{ (č.9)}$$

$$DS(\%) = \frac{I_{SS}}{\frac{8}{I_{NAC}}} \cdot 100 \text{ (č.10)}$$

Uvedená čísla v rov. 9 a 10 odpovídají počtu protonů, které tvoří NMR signál funkčních skupin (N-acetylů odpovídají 3 protony, volné thiolové skupině 4 a disulfidové vazbě 8). Skutečný stupeň substituce je tedy dán poměrem relativní integrace signálu protonů funkční skupiny a čísla, které určuje počet protonů. Obdobně byla potvrzena také přítomnost *dopaminu na řetězci HA(Na)*. Charakteristický pík se nachází v oblasti $\delta = 7$ ppm a odpovídá aromatickým protonům katecholové skupiny. Úspěšnou konjugaci lze potvrdit také pomocí píků methylenových protonů katecholu v oblasti $\delta = 2,8 - 3,1$ ppm. Stupeň substituce katecholových skupin byl poté spočítán z následující rovnice (rov. 11), ve které I_{DA} odpovídá integraci píku charakterizující signál methylenových protonů katecholu a číslo 4 zase počtu protonů tvořících signál [11]:

$$DS(\%) = \frac{I_{DA}}{\frac{4}{I_{NAC}}} \cdot 100 \text{ (č.11)}$$

8.6.2 DLS

Velikost polymerních řetězců (HA-DA, HA-SH) a připravených částí (st PAD trubičky a kuličky) byla charakterizována dynamickým rozptylem světla na přístroji *Zetasizer Nano ZS90* (Malvern, Velká Británie), jenž poskytuje intenzitně váženou distribuci velikostí všech populací částic přítomných v analyzovaném vzorku. Výsledný velikost byla vyjádřena jako hydrodynamického průměr (R_H), tzv. *z-average* (nm). Analýzy byly provedeny na zředěných v roztocích příslušných vzorků při úhlu rozptylu 173° . Přístroj je vybaven 4mW helium-neonovým laserem, který pracuje při vlnové délce 633 nm. Roztoky vzorků HA-DA a HA-SH byly připraveny jejich rozpuštěním v 0,1M NaCl o koncentraci 1,0 mg/ml a 2,5 mg/ml a následně přefiltrovány přes 0,45 μm filtry z PTFE (Millipore, UK). PAD částice a tyčinky byly dispergovány v Qmili vodě, která byla předtím přefiltrována přes 0,45 μm filtry z PTFE (Millipore, UK). Po přefiltrování byl roztok ponechán v klidu po dobu asi 5-10 minut, aby se uvolnila polymerní klubka. Měření každého ze vzorků bylo provedeno 3krát. Disperze částic a tyčinek byly připraveny o stejné koncentraci jako polymerní roztoky, tj. 1 mg/ml a 2,5 mg/ml. Měření vzorků bylo provedeno ve třech opakováních a z nich byl stanoven hydrodynamický průměr a index polydisperzity (PDI).

8.6.3 Rotační reometr

Doba gelace a tuhost připravených hydrogelů byla studována na základě reologických veličin, které byly zjištěny měřením na rotačním reometru *Anton-Paar MCR 502* (Anton Paar, Rakousko) při teplotě 25°C za normálního tlaku ve vzdušné atmosféře. K měření doby gelace připravených vzorků byla použita geometrie „válec-válec“ tzv. *double gap* (DG 26.7), který byl zvolen kvůli nízké viskozitě a malému objemu připravených polymerních roztoků (HA-SH, popř. HA-SH-PAD). Geometrie se skládá ze dvou soustředných válců, do kterých je umístěn vzorek o objemu 3,2 ml. Vlastní měření probíhalo 14 hod při 10% konstantní deformaci a konstantní úhlové frekvenci 10 rad/s. Výstupem měření byla závislost reologických veličin elastického (*storage*) modulu G' , ztrátového (*loss*) modulu G'' a komplexní viskozity η^* v závislosti na čase t . Doba gelace byla následně z uvedené závislosti odečtena jako průsečík *storage* a *loss* modulu. Kromě doby gelace byly na rotačním reometru měřeny také oscilační testy. Ty byly provedeny na geometrii „deska-deska“ při o průměru 25 mm při 10% konstantní deformaci s úhlovou frekvencí v rozmezí od 0,1 do 100 rad/s. Při oscilačních testech byly sledovány stejné reologické veličiny jako při měření doby gelace, ale v závislosti na úhlové frekvenci. Z naměřených výsledků lze zjistit výslednou tuhost hydrogelů na bázi HA-SH-PAD, HA-DA a HA-SH-HA-DA. Na rotačním reometru

byla z pohledu 3D tisku studována také reverzibilita reologického chování připravených 3% (w/w) hydrogelů po uvolnění napětí (deformace). Měření reverzibility bylo realizováno za použití geometrie „deska-deska“ při cyklické změně deformace za následujícího nastavení: z 1% na 100 %, ze 100 % na 1%, z 1% na 500 %, 500 % na 1% při konstantním nastavení úhlové frekvence 10 rad/s. V jednom cyklu bylo měřeno 11 bodů po 30 s. Během měření byla sledována závislost elastického (G') (komplexní viskozity (η^*)) a ztrátového (G'') modulu na čase (t).

8.6.4 SEM

Velikost připravených PAD částic/trubiček a celková morfologie hydrogelů byla charakterizována s využitím skenovacího elektronového mikroskopu (*TermoFisher Scientific*). K měření byly využity lyofilizované vzorky, které byly seříznuty v příčném řezu a nalepeny na uhlíkovou pásku na kovovém terčíku a pokoveny v naprašovačce, po dobu 60 s a při proudu 18 mA, čímž byla na povrchu vzorku vytvořena tenká vrstva zlata. Pokovené vzorky byly v SEM pozorovány při urychlovacím napětí 15 kV v režimu zobrazení sekundárních elektronů (SE). Vzorky PAD částic a trubiček se v tenké vrstvě nanasly na kovový terčík a pokovily v naprašovačce stejně jako lyofilizované hydrogely.

8.6.5 Botnací testy (swellingy)

Ke stanovení botnací schopnosti připravených hydrogelů byl použit gravimetrický protokol měření. Lyofilizované vzorky hydrogelů o známé hmotnost (m_s) byly vloženy do speciální cely (děrovaný košík o průměru 3 cm a výšce 3 cm), která byla následně ponořena do kádinky s roztokem fosfátového pufru (PBS) (0,1 M, pH 7,4). Kádinka s roztokem byla po celou dobu měření umístěna v temperační lázni při 37 °C. Ve stanoveném časovém intervalu (1, 2, 6, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360 a 1440 min) byla cela se vzorkem vytažena z roztoku, osušena a zvážena (m_w). Zjištěná hmotnost byla zapsána do tabulky. Každý vzorek byl změřen 3krát a výsledná hodnota byla vyjádřena jako průměrná hodnota s příslušnou chybou. Rovnovážný poměr botnání (ES %) byl vypočítán pomocí rovnice (rov. 12):

$$ES (\%) = \frac{m_w - m_s}{m_w} \cdot 100 \quad (\text{č.12})$$

9 VÝSLEDKY A DISKUZE

9.1 Syntéza HA-SH

Thiolovaný hyaluronan, jak již bylo zmíněno v kapitole *materiály a metody*, byl připraven aktivací karboxylové skupiny prostřednictvím karbodiimidu EDC. Na aktivovanou karboxylovou skupinu byl navázán NHS za vzniku HA-NHS esteru. Za daných podmínek (pH=4,75) byl NHS nahrazen CSA, který se na aktivované místo navázal přes amidovou skupinu, za vzniku thiolovaného hyaluronanu HA-SH. Syntéza HA-SH byla vyšetřena již v bakalářské práci a v této práci se na ni navazuje. Optimální ekvimolární poměr výchozích látek (HA:EDC:NHS:CSA) byl zvolen 1:2:4:4, jelikož u něj byl zaznamenán nejvyšší stupeň substituce thiolových skupin. V práci byl k syntéze HA-SH využit hyaluronan o molekulové hmotnosti s $M_w = 243$ kDa, jelikož v předchozí práci byl u této molekulové hmotnosti dosažen nejvyšší DS(%). Syntéza HA-SH byla provedena dle studie Bian et al. (2016) [8], ovšem oproti jejich práci nebyla syntéza a následná redukce pomocí redukčního činidla DTT provedena ve dvou krocích (*dvoukroková syntéza*) s mezifází lyofilizace produktu po syntéze, ale syntéza a redukce probíhaly současně v jednom reakčním kroku (tzv. *jednokroková syntéza*). Důvodem přípravy HA-SH *jednokrokovou* syntézou bylo urychlení procesu modifikace HA-SH. Výsledkem byl sice produkt s vyšším stupněm substituce disulfidových vazeb, což ovlivnilo následnou tuhost připravených hydrogelů, ale dle NMR spekter byl takto produkt čistší bez přítomných nezreagovaných zbytků (viz dále). Bylo také zjištěno, že k redukci disulfidových vazeb postačí přidat redukční činidlo (DTT) v ekvimolárním poměru 1:3 vůči hyaluronanu, což jednak snížilo spotřebu redukčního činidla, ale i snížilo nároky na následnou purifikaci produktu. Navíc byl tímto způsobem připraven derivát hyaluronanu, jehož rozpustnost v Qmili vodě byla pro další aplikace výrazně rychlejší (do 10 min) (oproti produktu připraveného *dvoukrokovou* reakcí).

9.2 Syntéza HA-DA

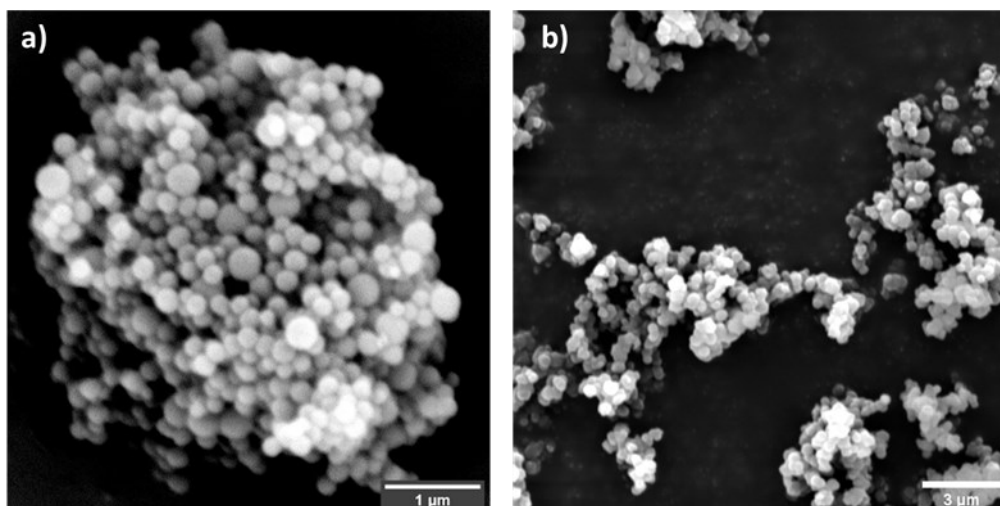
Obdobně byl také připraven dopaminem konjugovaný hyaluronan. Karboxylová skupina na řetězci HA(Na) byla opět aktivována EDC/NHS za vzniku meziprojektu HA-NHS esteru. Následně byl NHS nahrazen dopaminem, který se stejně jako v případě CSA váže na aktivovanou karboxylovou skupinu přes amidovou vazbu. Výsledkem je dopaminem konjugovaný hyaluroan HA-DA. Při k syntéze HA-DA byl rovněž využit hyaluronan o molekulové hmotnosti s $M_w = 243$ kDa. První pokus o syntézu HA-DA byl realizován dle

popisu syntézy v práci Melnik et al. (2022) [12]. Ovšem po přidání dopaminu do reakční směsi HA/EDC/NHS došlo ke změně barvy směsi z transparentní na tmavě hnědou až černou. Příčinou byla pravděpodobně autooxidace dopaminu za vzniku PAD, která byla nežádoucí, vzhledem ke snaze navázat dopamin na strukturu hyaluronanu. Další úskalí syntézy představovala fluktuace pH při samotné reakci. Z toho důvodu bylo k syntéze přistoupeno jinak, a to na základě práce Pandey et al. (2022) [13]. Nový způsob přípravy HA-DA zahrnoval rozpuštění výchozích látek v MES pufru (0,5 M, pH = 6), díky čemuž se podařilo dostatečně zastabilizovat hodnotu pH, při které probíhala samotná reakce. Reakční směs byla po celou dobu modifikace uchována v tmavé nádobě obalené hliníkovou fólií, za současného probublávání dusíkem, tak aby se předešlo již zmíněné nežádoucí autoxidaci dopaminu. Výsledkem syntézy byl světle hnědý produkt HA-DA. Reprodukovatelnost syntézy HA-DA byla následně potvrzena syntézou druhého konjugátu, který byl připraven za stejných podmínek jako první konjugát. Úspěšnost obou syntéz byla potvrzena pomocí NMR spektroskopie (viz dále).

9.3 Syntéza PAD

9.3.1 Syntéza PAD-NP

Jak již bylo zmíněno, parametry (tj. hodnota pH, poměr rozpouštědel voda/EtOH, popř. aceton) byly při syntéze PAD ve formě částic obměňovány za účelem nalezení co nejefektivnějšího způsobu syntézy PAD-NP a zároveň získání monodisperzního systému. Celkově bylo připraveno 14 odlišných reakcí, při nichž byla řešena optimalizace podmínek syntézy PAD-NP obměnou uvedených parametrů. Na základě výsledků provedených analýz všech připravených vzorků se za nejvhodnější ukázala syntéza částic autorů Ai et al. (2013) a Xue et al. (2016), jelikož příprava částic jejich postupem vedla k téměř úzké distribuci velikosti částic (viz výsledky DLS), a to v obou případech. Obecně bylo zjištěno, že se velikost částic odvíjí na základě pH disperzního prostředí, a to tak, že čím vyšší hodnota pH reakční směsi byla, tím menší velikosti částic byla připravena. Při prvních pokusech syntézy vznikaly částice různého tvaru (kulovité, ale i různě deformované) o široké distribuci jejich velikosti, která se pohybovala v rozmezí 200 – 800 nm, jak je patrné ze snímku z elektronového mikroskopu (obr. 53).



Obr. 53 - Snímek SEM PAD částic (a) částice s širokou distribucí velikosti částic, (b) částice s nepravidelným tvarem.

Široká distribuce velikosti i nepravidelný tvar částic byl přisuzován právě kolísavé hodnotě pH v průběhu reakce, která byla následně vyřešena syntézou částic na základě práce Xue et al. (2016) (*PAD-10*) [136]. V jejich práci byla sice popsána příprava PAD trubiček, ale jejich princip syntézy byl převzat k přípravě PAD částic, s tím rozdílem, že byl vynechaný kurkumin (sloužil jako prekurzor k přípravě trubiček), díky čemuž byly namísto tyčinek připraveny kuličky. Problém s kolísajícím pH byl vyřešen provedením syntézy v TRIS pufru (1,5 M, pH 8,8), díky kterému bylo pH po celou dobu reakce stabilní (pH 8,3). Mimo to byl dopamin rozpuštěn ve směsi EtOH/acetone/ H₂O (1:1:8) oproti ostatním reakcím, které byly realizovány pouze ve směsi EtOH/H₂O v různých poměrech (1:1; 1:2,25 a 1:9). Vlivem konkrétní použité směsi rozpouštědla na syntézu PAD částic, se ve své práci zabývali autoři Jiang, Wang a Li (2014). Na základě jejich výsledků je zřejmé, že PAD částice není možné syntetizovat v čistém ethanolu, ale při syntéze musí být vždy použita směs rozpouštědel EtOH/ H₂O, popř. v čistá voda, ovšem monodisperzní systém lze připravit výhradně ve směsi EtOH/ H₂O. Rovněž bylo zjištěno, že příprava PAD částic je silně závislá na poměru směsi, přičemž nejlepších výsledků bylo dosaženo při poměru EtOH/ H₂O 1:3 až 1:1,5. Autoři rovněž zminili možnost nahradit ethanol jiným alkoholem jako je např. methanol nebo 2-propanol. U směsi ve které byl použit MetOH, by totiž mohlo být dosaženo více než 50 % konverze dopaminu, a znamená to, že alkoholová složka směsi je hlavním faktorem určujícím stupeň konverze dopaminu na polydopamin [208]. Příkladem může být směs EtOH/ H₂O, ve které byla realizována syntéza PAD částic (*PAD-14*) dle Ai et al. (2013) [134]. U tohoto způsobu reakce nebyla upravena hodnota pH pomocí roztoku NH₃ na konkrétní hodnotu pH, jak tomu bylo u syntézy PAD částic podle Xu et al. (2016), ale

naopak bylo do směsi přidáno konkrétní množství roztoku NH_3 , které odpovídalo určité velikosti částic bez ohledu na hodnotu pH. V práci těchto autorů bylo do reakční směsi přidáno přesně 0,75 ml roztoku NH_3 , které by dle autorů Ai et al (2013) mělo odpovídat částicím o průměru 380 nm. Dle tohoto způsobu byla připravena celá řada vzorků o různé velikosti částic odvíjející se od přídatku 28-30% roztoku NH_3 a to následujícím způsobem (0,4 ml (780 nm); 0,6 ml (520 nm); 0,75 ml (380 nm); 1,0 ml (290 nm); 1,5 ml (180 nm); 2,0 ml (120 nm) NH_3). Po celou dobu reakce byla hodnota pH stabilní (pH 9,6), i přestože syntéza neprobíhala v pufru. Dle literatury, která říká, že s rostoucím pH reakční směsi klesá velikost syntetizovaných částic, by měly být částice (*PAD-10*) připravené podle Xue et al. větší, než částice (*PAD-14*) připravené dle práce Ai et al. (viz výsledky DLS a SEM). Velkou výzvou při přípravě PAD-NP představoval samotný proces čištění, konkrétně stáčení částic pomocí centrifugy za účelem promytí produktu. V důsledku důsledného a opakovaného promývání částic, totiž došlo k velkým ztrátám syntetizovaných částic. Výtěžek reakce se tak pohyboval v rozmezí 30 – 50 %. Na druhou stranu se v důsledku důkladného stáčení podařilo zastabilizovat výslednou polydisperzitu připravených částic.

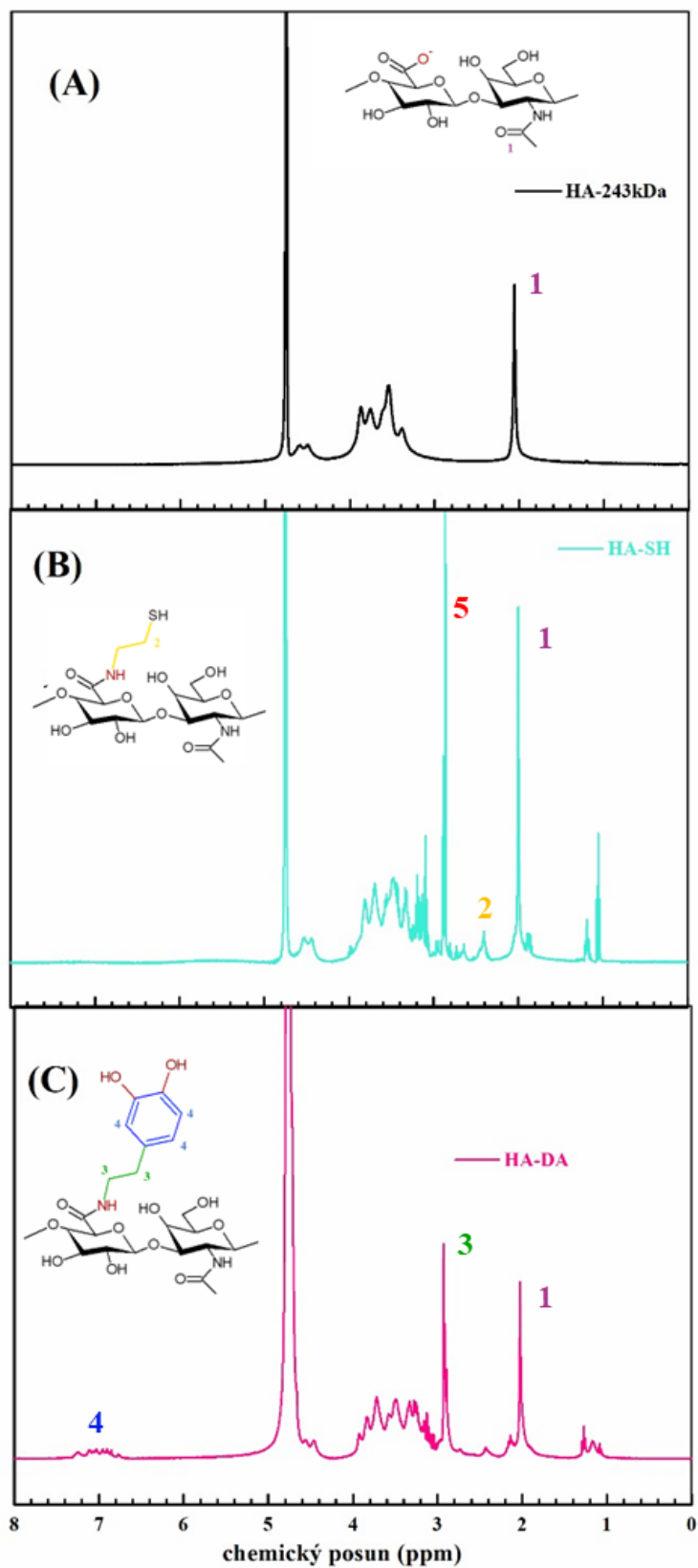
9.3.2 Syntéza PAD-NT

Jak už bylo zmíněno výše, kromě kulovitých částic, byla provedena i příprava polydopaminu ve formě trubiček, a to na základě práce již zmíněných autorů Xue et al. (2016) [136]. Při reakci byl jako prekurzor použit ve vodě nerozpustný kurkumin, který byl rozpuštěn ve směsi EtOH/aceton společně s dopaminem (v poměru 1:5). Po přidání vody byl běžně ve vodě nerozpustný kurkumin vysrážen do formy krystalků, na které byly po zvýšení pH (nad 8,8) deponovány částice polydopaminu. Po následném vymytí kurkuminu ethanolem byl získán produkt ve formě dutých PAD trubiček (PAD-NT). Dle práce uvedených autorů je vysrážení kurkuminu kritickým parametrem přípravy dutých trubiček PAD-NT. Navíc použití směsi rozpouštědel EtOH/aceton zvyšuje kvalitu připravených PAD-NT, ve srovnání s použitím samotného ethanolu. PAD trubičky připravené pouze v ethanolu vykazovaly více defektů jako například různé praskliny, díry ve struktuře atd.. Kvalita syntézy PAD-NT je také závislá na reakční době. Zmínění autoři připravili řadu vzorků PAD-NT v různých časech (2,5; 5; 12 a 24 hod), přičemž PAD-NT po 24 hod vykazovala dokonalou strukturu [136]. Proto byly v této práci zvoleny následující parametry na základě kterých autoři pozorovali nejlepší výsledky přípravy dutých PAD trubiček (*PAD-7*): směs rozpouštědel (ethanol/aceton v poměru 1:1 s přídatkem vody v poměru 1:1:8), doba reakce (24 hod). Připravené PAD-NT byly následně charakterizovány z hlediska velikosti a morfologie

pomocí metod SEM a DLS. Stejně jako v případě polydopaminových nanočástic, tak i v případě tyčinek (PAD-NT), docházelo v důsledku důsledného a opakovaného promývání částic k velkým ztrátám syntetizovaných tyčinek. Cílem purifikace bylo vymytí přebytečného kurkuminu z disperze PAD-NT. Vzhledem ke skutečnosti, že při purifikaci tyčinek byl získán malý výtěžek PAD-NT, byla purifikace realizována s využitím dialýzy proti Qmili vodě.

9.4 Potvrzení struktury HA-SH a HA-DA

Jak už bylo zmíněno výše, úspěšné navázání thiolové a katecholové skupiny na řetězec HA(Na), a zároveň také stupeň substituce thiolů a katecholů, bylo potvrzeno pomocí ^1H NMR spektroskopie. Jako referenční vzorek byl zvolen nativní HA(Na), jehož spektrum je uvedeno na obr. 54a. Ve spektru je pozorovatelný charakteristický pík v oblasti 2,0 ppm (ve spektru č. 1), který reflektuje signál protonů N-acetylové skupiny a který byl brán jako referenční pík pro výpočet DS(%). Dále lze ve spektru pozorovat oblast píků od 3,5 do 4,5 ppm, která odpovídá signálům protonů sacharidového kruhu HA(Na). V případě spektra thiolu modifikovaného hyaluronau (HA-SH) (obr. 54b) byly pozorovány nové píky, a to konkrétně v oblasti 2,36 – 2,53 ppm (ve spektru č. 2), které odpovídají signálu methylových protonů tvořících alkylový řetězec, který připojuje thiolovou skupinu k HA(NA) ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$). V oblasti 2,92 – 2,98 ppm (ve spektru č. 5) jsou detekovány píky charakterizující signál methylových protonů tvořící disulfidovou vazbu ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}-\text{SCH}_2\text{CH}_2-$). Signál protonů volných thiolových skupin v podobné oblasti ve své práci detekovali také Bian et al. (2016) (2,45 a 2,63 ppm) [8], Xu et al. (2021) (2,6 ppm) [209] i Xia et al. (2021) (2,52 ppm) [210]. V NMR spektrech HA-SH vzorků uvedených v bakalářské práci [51] byly pozorovány také signály protonů v oblasti 2,62 – 2,71 ppm, které byly chybně interpretovány jako signály protonů disulfidové vazby. Po změření spektra samotného redukčního činidla DTT, pomocí kterého byly disulfidové vazby štěpeny, bylo zjištěno, že zmíněné signály v oblasti chemického posunu 2,62 – 2,71 ppm ve spektru HA-SH náleží reziduálnímu DTT, který nebyl v procesu purifikace z roztoku dostatečně vymyt. Nicméně při jedнокrokové syntéze HA-SH, při které byla modifikace a redukce $\text{S}-\text{S}$ vazby provedena v jednom reakčním kroku, již píky náležící protonům DTT nejsou pozorovány. Z toho vyplývá, že jedнокroková syntéza HA-SH je z hlediska čistoty produktu účinnější. Toto zjištění také ovlivnilo hodnotu stupně substituce thiolových skupin.



Obr. 54 – NMR spektra s charakteristickými píky: a) nativní hyaluronanu, b) thiolovaný hyaluronanu, c) dopaminem konjugovaný hyaluronan

Jak již bylo zmíněno, DS (%) volných thiolových skupin a disulfidické vazby byl spočítán dle rov. 9 a 10. Stupeň substituce byl realizován pomocí integrace píků zkoumaných skupin. Jako referenční pík byl zvolen signál protonů N-acetylové skupiny, jelikož ta se během modifikace neměnila. Výsledné hodnoty DS(%) jsou uvedeny v tab. 2.

Tab. 2 - Dosažené stupně substituce thiolových a katecholových skupin

Molekulová hmotnost M_w	Název reakce	Typ protonů	Stupeň substituce DS(%)
243 kDa	HA-SH-27	methylové protony thiolů + disulfidová vazba	23
	HA-SH-29	methylové protony thiolů + disulfidová vazba	19
	HA-DA-1	aromatické protony	9
		methylové protony	29
	HA-DA-2	aromatické protony	7
		methylové protony	29

K porovnání charakteristických píků ve spektru HA(Na) konjugovaného dopaminem bylo změřeno spektrum čistého dopaminu, ve kterém jsou pozorovány píky v oblasti 7,0 – 7,3 ppm (ve spektru č. 4) odpovídající signálům aromatických protonů katecholu (konkrétně se jedná o dva duplety a jeden singlet) a signály v alkalické oblasti 3,2 – 3,6 (ve spektru č. 3) ppm pak náležejí methylovým protonům (dva triplety) dopaminu. Vzorek Na(HA) konjugovaného dopaminem musel být změřen při vyšší teplotě ($T=50^{\circ}\text{C}$), oproti HA-SH, který byl měřen při teplotě 25°C . Důvodem byla pravděpodobně vysoká viskozita roztoku, která vedla k tomu, že ve spektru vzorku byl pozorován šum a oblasti charakteristických píků nebyly dobře rozlišitelné. Řešením bylo jednak zvýšení teploty měření z 25°C na 50°C , čímž výrazně poklesla viskozita vzorku HA-DA, a také zvýšením počtu skenů měření (z 64 na 128 skenů). Výsledné spektrum konjugátu je znázorněno na obr. 54c. Ve spektru jsou detekovány píky v oblasti 6,7 – 7,3 ppm, které by mohly odpovídat aromatickým protonům, a píky v oblasti 3,1 – 3,2 ppm zase signálu methylových protonů katecholové skupiny, jelikož se shodují s píky pozorovanými ve spektru čistého dopaminu. Dosažené výsledky byly potvrzeny také na základě práce Melnik et al. (2022), kteří připravili dopaminem konjugovaný hyaluronan prostřednictvím EDC/NHS chemie. Signál aromatických protonů detekovali v oblasti 6,7 – 7,0 ppm, tedy ve velmi podobné oblasti chemického posunu jako je uveden v této práci [12]. Navíc lze v NMR spektrech v jejich studii pozorovat píky, které by mohly reflektovat signály protonů methylových skupin (2,7 – 3,0 ppm), ale ty nejsou

předmětem zájmu jejich práce na rozdíl od práce autorů Nejati et al. (2023). Ti ve své studii sledovali právě píky odpovídající methylovým protonům, a to ve stejných oblastech chemického posunu, jak jsou uvedeny v této práci, a následně je použili k výpočtu stupně substituce katecholových skupin [11]. Výpočet DS(%) byl dle rov. 11 realizován integrací píků odpovídajícím methylovým i aromatickým protonům. Jako referenční pik byl zvolen signál protonů N-acetylu, protože u něj nedochází během syntézy HA-DA k žádným změnám. Dosažené stupně substituce jsou uvedeny v tab. 2. Melnik et al. (2022) počítali DS(%) pomocí integrace píků aromatických protonů katecholu a při poměru reaktantů EDC:NHS:DA = 5:1,5:1,5 dosáhli nejvyššího DS(%), a to 19 %. Dosažený DS(%) v předložené práci odpovídá spíše výsledkům získaným autory Melnik et al. (2022) pro ekvimolární poměr 3:1,3:1,3 (EDC:NHS:DA). Jiným způsobem k výpočtu DS(%) přistupovali autoři Nejati et al. (2023). Jak již bylo uvedeno, tito autoři k výpočtu DS(%) integrovali píky methylenových protonů katecholu a dosáhli vyššího DS(%) než Melnik et al., konkrétně 36 %. Jimi dosažený stupeň substituce může souviset také se způsobem syntézy HA-DA. Konjugát připravili oxidací disacharidového řetězce za vzniku dialdehydových skupin, na které byl následně navázán dopamin. Dle autorů Zhou et al. (2020) lze tímto způsobem dosáhnout vyšší účinnosti reakce (až 45 %) ve srovnání s modifikací monofunkční karboxylové skupiny na HA(Na) řetězci.

9.5 Stanovení velikosti polymerních řetězců a PAD částic a trubiček

Velikost polymerního klubka HA-DA a HA-SH byla určena pomocí metody dynamického rozptylu světla. Studované vzorky byly rozpuštěny v 0,1M NaCl (koncentrace 1 mg/ml (0,1 %), 2,5 mg/ml (0,25 %)) a byly experimentálně stanoveny a vyhodnoceny jako optimální pro měření velikosti polymerních řetězců. Při samotném měření bylo zjištěno, že velikost polymerního klubka se při koncentraci 1,0 mg/ml a 2,5 mg/ml výrazně neliší, a proto je ve výsledcích uvedena hodnota velikosti pouze při koncentraci 1,0 mg/ml. Vzorky byly rozpuštěny v 0,1 M NaCl, z toho důvodu, že polymerní řetězec je ve vodě nejvíce rozbalený a natažený a je tudíž velmi obtížné změřit jeho hydrodynamický průměr (R_H). V roztoku 0,1M NaCl vykazuje HA(Na) konformaci spíše sbaleného klubka, z čehož lze usoudit, že přítomnost iontů zastíní elektrostatické odpuzování mezi náboji na řetězci HA(Na) [66]. Chování řetězce HA(Na) v roztoku NaCl je tedy stabilnější a z pohledu měření hydrodynamického průměru se jeví jako vhodnější. Střední velikost klubka (hydrodynamický průměr) byla stanovena z intenzitně vážením distribuční křivky. Výsledky

dosažených středních velikostí polymerních řetězců (*z-average*) a jejich index polydisperzity (PDI) jsou uvedeny v tab. 3.

Tab. 3 - Dosažené výsledky *z-average* a PDI studovaných polymerních řetězců

Vzorek	M_w [kDa]	Koncentrace [mg/ml]	Z-average [nm]	PDI
HA(Na)			38.1±0.9	0.45
HA-SH	243	1.0	55.3±1.5	0.72
HA-DA			za hranicí detekce	

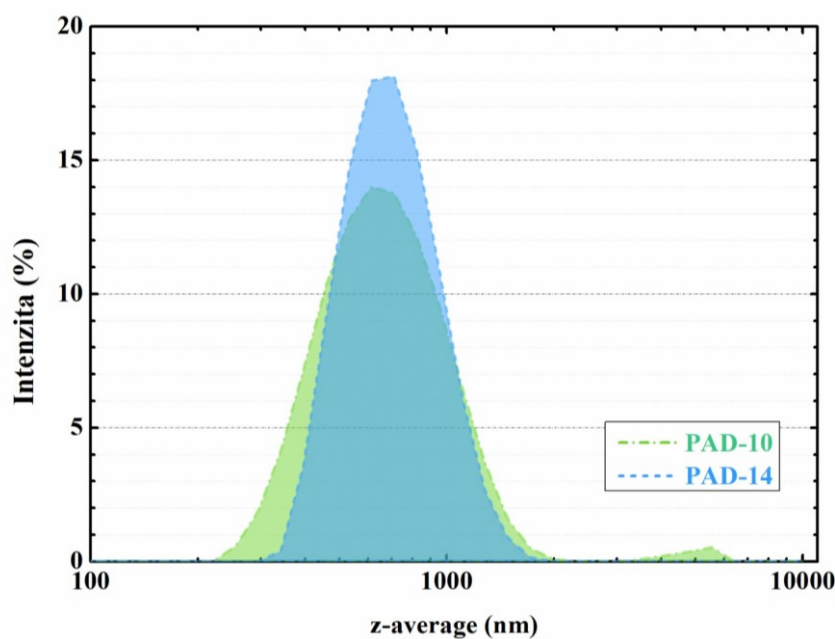
Jak vyplývá z tab. 3, nejprve byla změřena velikost referenčního vzorku, kterým byl zvolen právě nativní hyaluronan HA(Na). Velikost hyaluronového klubka v 0,1M NaCl odpovídá hodnotě $38,1 \pm 0,9$ nm ($M_w = 243$ kDa) s PDI 0,45. Jakmile byl stejný vzorek připraven v čisté vodě, pohybovala se hodnota velikosti klubka za hranicí detekce přístroje *Zetasizer* (více jak 1 μ m). Tyto výsledky tudíž potvrzují, že HA(Na) se v roztoku soli chová jako sbalené klubko. Podobné velikosti polymerního klubka HA(Na) dosáhli ve své práci také autoři Gründelová et al. (2013), kteří ovšem pracovali s hyaluronanem o jiné molekulové hmotnosti ($M_w = 350$ kDa a 1,8 MDa), proto jsou jejich hodnoty střední velikosti vyšší úměrně použité molekulové hmotnosti (pro 350 kDa ($R_H = 46$ nm), 1,8 MDa ($R_H = 70$ nm)) [211]. Hyaluronový řetězec byl modifikován za vzniku thiolovaného hyaluronanu (HA-SH) a hyaluronanu konjugovaného dopaminem (HA-DA). Jak bylo očekáváno, *z-average* u obou vzorků, oproti nativnímu HA(Na) narostl, v případě HA-DA dokonce tak, že metodou DLS nebylo možné tuto hodnotu stanovit, jelikož byla za hranicí detekce přístroje *Zetasizeru* (> 1 μ m). Nárůst velikosti polymerního klubka bude pravděpodobně souviset s navázáním objemné funkční skupiny na řetězec hyaluronanu, která tak přispívá k celkovému zvýšení velikosti hydrodynamického průměru R_H . Velikost polymerního klubka thiolovaného hyaluronu HA-SH odpovídá hodnotě $55,3 \pm 1,5$ nm. Metodou DLS byla kromě střední velikosti částic polymerního klubka, stanovena mimo jiné i velikost PAD částic. Na základě výsledku analýzy velikosti částic byly vybrány dva reprezentativní vzorky (*PAD-10* a *PAD-14*) vykazující úzkou distribuci velikosti částic (monodisperzní systém) oproti ostatním syntetizovaným PAD částicím, které byly použity k samotnému síťování připravených hydrogelů. Disperze částic byla připravena při koncentraci 1 mg/ml, která byla stejně jako u polymerních řetězců, experimentálně ověřena jako nejvhodnější, a to z hlediska kvality měření. Měření bylo opakováno pouze třikrát, jelikož při delším času měření docházelo k

následné sedimentaci částic disperze na dno měřící kyvety. Výsledné velikosti zmíněných PAD částic jsou uvedeny v tab. 4. V přehledu není uvedena velikost PAD ve formě tyčinek, protože podobně jako v případě HA-DA byla jejich hodnota za hranicí detekce přístroje ($> 1\mu\text{m}$).

Tab. 4 - Dosažené výsledky *z-average* a PDI studovaných PAD částic

Vzorek	Koncentrace [mg/ml]	Z-average [nm]	PDI
PAD-10		627±10	0.19
PAD-14	1.0	693±13	0.10
PAD - 7		za hranicí detekce	

Střední velikost *PAD-10* částic připravené podle práce Xue et al. (2016) odpovídá hodnotě 627 ± 10 nm. Dle výsledků však tento vzorek částic vykazuje vyšší polydisperzitu než *PAD-14*, a proto byl ve všech následujících experimentech označen za vzorek částic s širokou distribucí velikosti. Velikost částic *PAD-14* připravených podle postupu Ai et al. (2013) odpovídá hodnotě 693 ± 13 nm a je považován za vzorek s úzkou distribucí velikosti částic. Úzkou distribucí *PAD-14* částic lze potvrdit závislostí přiloženou na grafu (obr. 55), ve kterém je distribuční křivka srovnána s distribuční křivkou *PAD-10*, tedy se širokou distribucí.



Obr. 55 – Distribuce velikosti částic PAD 10 a *PAD-14*

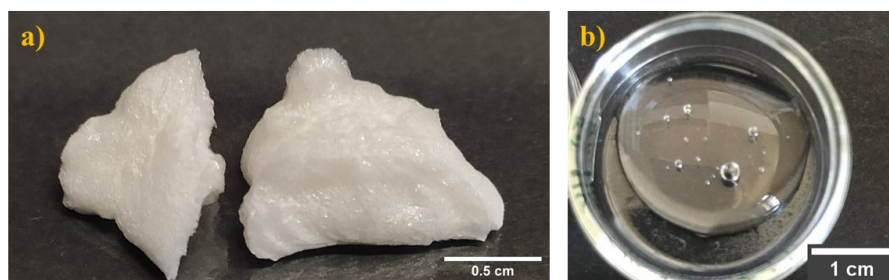
Podle výsledků Ai et al. (2013) by se měla velikost částic *PAD-14* odpovídat hodnotě ~ 380 nm, a to na základě přidaného množství NH_3 , pomocí kterého bylo pH reakční směsi upraveno na hodnotu 9,6 [134]. Střední velikost částic však dosahovala téměř dvojnásobné velikosti. Velikost PAD částic ve své práci charakterizovali také Pandey et al. (2022), kteří připravili PAD částice o různé velikosti (150 až 1030 nm). Před samotným měřením, autoři stanovili pomocí výpočtu očekávanou velikost částic, a to na základě rovnice obsahující parametry, které ovlivňují velikost PAD částic (např. koncentrace dopaminu, pH roztoku, poměr rozpouštědel, atd). Velikost získaná výpočtem a experimentálně pomocí DLS se v rámci chyby shodovala [13]. Dále se charakterizací velikosti částic zabývali Yegappan et al. (2019), kteří připravili 124 ± 8 nm částice o PDI 0,067 [47].

9.6 Příprava hydrogelů

V této kapitole budou rozebrány připravené 2% a 3% hydrogely na bázi thiolovaného hyaluronanu (HA-SH), thiolovaného hyaluronanu a polydopaminu (HA-SH-PAD), dopaminem konjugovaného hyaluronanu (HA-DA) a vzájemné kombinace tzv. hydrogelového komplexu HA-SH- HA-DA.

9.6.1 HA-SH hydrogely

V bakalářské práci bylo zjištěno, že u 1% (w/w) roztoku HA-SH nedošlo k zesíťování struktury a to u žádné z použitých M_w . Tyto výsledky byly vzaty v potaz i v předložené práci, a proto byly připraveny hydrogely pouze z HA-SH roztoků o koncentraci 2 % (w/w) a 3 % (w/w). Jak již bylo zmíněno, roztok HA-SH připravený *jednokrokovou* syntézou byl rozpuštěn rychleji (do 10 min) oproti HA-SH, který byl připraven *dvoukrokovou* syntézou (roztok byl rozpouštěn přes noc). Po rozpuštění bylo pH roztoku zvýšeno na hodnotu 7,0 – 8,0 pomocí 1M NaOH, čímž bylo iniciováno síťování HA-SH v přítomnosti vzdušného kyslíku za vzniku disulfidových vazeb mezi thiolovými skupinami (síťování oxidací) (obr. 56).

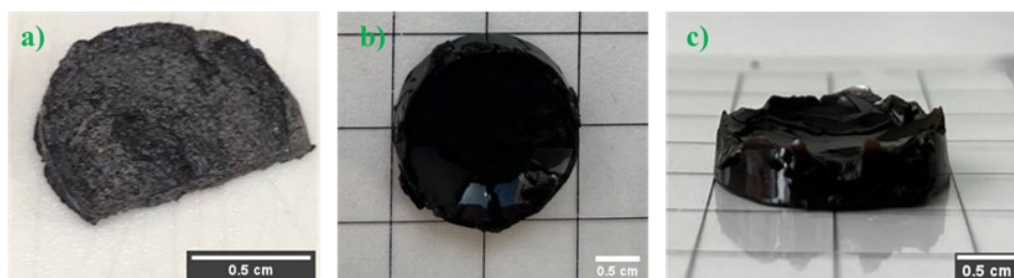


Obr. 56 - HA-SH hydrogely – a) lyofilizovaná forma, b) hydratovaná forma zesíťovaného hydrogelu

Postupem *jednokrokové* syntézy (HA-SH-27) ovšem nebylo možné připravit ani 2% hydrogel, pravděpodobně z důvodu nízkého stupně substituce volných thiolových skupin. Druhá *jednokroková* syntéza (HA-SH-29) již byla úspěšnější z hlediska DS(%), ale ani z roztoku HA-SH-29 nebylo možné připravit stabilní 2% hydrogel. Nicméně, pokud byl polymerní řetězec HA-SH síťován pomocí PAD, bylo možné připravit dokonce i 2% hydrogely (na bázi HA-SH-PAD).

9.6.2 HA-SH-PAD hydrogely

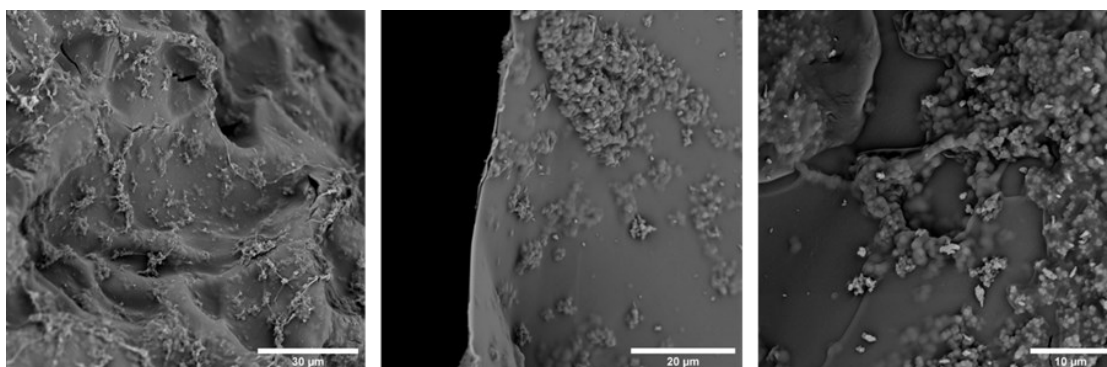
Jak už bylo zmíněno výše, příprava hydrogelů na bázi HA-SH oxidací byla rozšířena o přípravu hydrogelů na bázi HA-SH, síťované s využitím polydopaminu (ať už ve formě částic nebo trubiček), tzv. crosslinker tvořící „most“ mezi thiolovými skupinami, které se prostřednictvím Michaelovy adice vážou na chinonovou skupinu polydopaminu za vzniku zesíťované 3D struktury (obr. 57). Na základě tohoto pozorování, lze polydopamin považovat za tzv. chemický uzel v 3D síti tvořené maticí HA-SH.



Obr. 57 – HA-SH-PAD hydrogely – a) lyofilizovaná forma, b),c) hydratovaná forma hydrogelu

Zmíněné hydrogely s polydopaminem byly připraveny tak, že po rozpuštění HA-SH ve vodě bylo do roztoku přidáno určité množství polydopaminu a sonifikováno v ultrazvukové lázni, čímž bylo částečně zabráněno vzniku agregátu částic, popř. trubiček, které by tak snížily množství dostupných katecholových skupin na povrchu PAD částic, popř. trubiček.

Hydrogely HA-SH-PAD, které byly připraveny za použití prvních syntetizovaných částic (PAD-1 až PAD-6), jejichž příprava nebyla zdaleka tak optimalizována, vykazovaly nehomogenitu v rozložení částic v matrici hydrogelu, což vedlo k vytváření lokálních shluků (agregátů) částic v matrici (obr. 58). Z tohoto důvodu je možné se domnívat, že v prvních případech nebyl polydopamin součástí sítě hydrogelu (nevznikla vazba mezi thioley a chinonem), ale spíše sehrál roli jakéhosi plniva/aditiva obsaženého v HA-SH matrici, který měnil vlastnosti připravených hydrogelů (především tedy jejich tuhost).



Obr. 58 - HA-SH-PAD hydrogel s nehomogenním rozložením PAD částic v matrici

Optimalizace podmínek syntézy PAD částic vedla k přípravě hydrogelů, ve kterých již bylo pozorováno homogenní rozložení částic a zároveň minimální přítomnost tzv. shluků narušující homogenitu (viz SEM). Jak již bylo naznačeno v předchozí kapitole, na rozdíl od hydrogelů na bázi HA-SH bylo možné připravit HA-SH-PAD i o 2% koncentraci (w/w). Tento fakt podpořil tvrzení, že dochází k vazbě mezi chinonem na PAD a thiolovou skupinou HA-SH, a to i s vyšší pravděpodobností, než je vznik vazby mezi thiolovými skupinami.

9.6.3 HA-DA a HA-SH-HA-DA hydrogely

Příprava hydrogelů na bázi HA-DA byla obdobná s přípravou thiolových (HA-SH) hydrogelů. Konjugát byl rozpuštěn v Qmili vodě o dané koncentraci (1% a 2% (w/w)) a síťován zvýšeným pH přidavkem 1M NaOH (z hodnoty 6,0 – 7,0 na hodnotu 7,0 – 8,0) za vzniku vazby mezi chinonovými skupinami dopaminu vázaného přímo na hyaluronový řetězec. V případě konjugátu, již samotné rozpuštění nebylo zdaleka tak rychlé jako rozpouštění HA-SH, pravděpodobně z důvodu vysoké viskozity konjugátu. Tedy oproti HA-SH bylo rozpouštění HA-DA realizováno přibližně 1 den. Přidavkem 1M NaOH po rozpuštění konjugátu bylo pH zvýšeno na hodnotu 7,0 – 8,0, čímž byl iniciován vznik vazby mezi chinony katecholů. Výsledkem síťováním byl pak hnědý hydrogel (obr. 59), který od pohledu vykazoval nižší tuhost než hydrogely na bázi HA-SH a HA-SH-PAD. Zajímavé je,

že na rozdíl od výše uvedených typů hydrogelů bylo HA-DA hydrogely možné připravit i o koncentraci 1 % (w/w), i když nebyly tak tuhé.



Obr. 59 - HA-DA hydrogely – a) lyofilizovaná forma, b), c) hydratovaná forma hydrogelu

Vzhledem k tomu, že je možné docílit vazby mezi thiolovými skupinami HA-SH a chinonovými skupinami PAD za vzniku hydrogelu, byl tento princip přenesen i k přípravě hydrogelových komplexů na bázi HA-SH a HA-DA polymerů, jejichž struktura obsahuje stejné skupiny jako při síťování HA-SH polydopaminem. Takto byla připravena celá řada vzorků o různých poměrech a koncentracích HA-SH:HA:DA (viz tab. 5), které byly následně podrobeny dalším testům. Také bylo zjištěno, že rozpouštění HA-DA je v přítomnosti HA-SH mnohem rychlejší oproti rozpouštění v čisté Qmili vodě. Hydrogelový komplex HA-DA a HA-SH nebyl nalezen nikde v literatuře, proto lze tento materiálový koncept považovat za originální.

Tab. 5 – Přehled připravených kombinací HA-SH-HA-DA hydrogelů

HA-SH	Koncentrace [%]	HA-DA	Koncentrace [%]	Poměr HA-SH/HA-DA
HA-SH-29	2	HA-DA-2	2	1:1
	2		3	1:1
	3		2	1:1
	2		2	0.5:1
	2		2	1:0.5

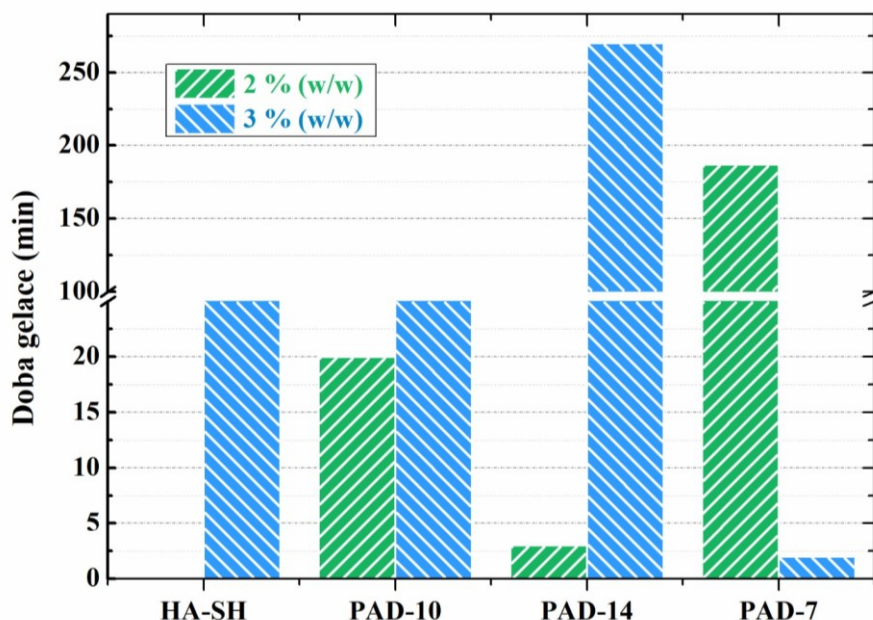
Obecně všechny připravené 3 % hydrogely vykazovaly již na první pohled pevnější respektive tužší, což pravděpodobně souvisí s použitím vyšší koncentrace modifikovaného hyaluronanu v roztoku. Tvrzení bylo podpořeno změřením tuhosti připravených hydrogelů pomocí rotačního reometru, jak bude zmíněno níže. Tuhost nebyla jediným experimentem, pomocí kterého byly hydrogely charakterizovány. Hydrogely byly podrobeny také dalším experimentům z hlediska doby gelace, botnací kapacity a morfologie (reologická měření, botnací testy, topografie).

9.7 Reologie

Doby, kdy dochází ke vzniku zesíťované struktury, její tuhost a reverzibilita reologického chování po uvolnění napětí jsou důležité parametry pro přípravu hydrogelů, a bezpochyby souvisí s jejich následnou aplikací např. jako scaffoldy nebo nosiče léčiv. Uvedené parametry byly studovány prostřednictvím reologických měření, konkrétně se jednalo o stanovení gelačního času, hodnoty tuhosti a reverzibility reologického chování připravených hydrogelů.

9.7.1 Doba gelace

Nejprve byla u připravených hydrogelů stanovena doba, za kterou dojde k zesíťování struktury a vzniku hydrogelu, tzv. gelační čas. Při měření byl sledován elastický (G') a ztrátový (G'') modul a komplexní viskozita (η^*) v závislosti na čase (t) (příloha P1). Gelační čas byl určen z bodu, při kterém dochází k průniku křivek elastického a ztrátového modulu (tj. *bod gelace*). Bod gelace definuje čas, při kterém ve vzorku začne převládat elastická složka nad viskózní, což vede ke vzniku nerozpustného hydrogelu. Výsledky gelačních časů jsou uvedeny v grafu na obr. 60.



Obr. 60 - Závislost doby gelace na typu připravených vzorků HA-SH, popř. HA-SH-PAD (koncentrace polymeru 2 a 3 % (w/w), poměr HA-SH:PAD = 1:0,5)

V bakalářské práci bylo zjištěno, že doba gelace 3% vzorků HA-SH o $M_w = 243$ kDa připravené *dvoukrokovou* syntézou byla 25 min. Oproti tomu doba gelace vzorku připraveného *jednokrokovou* syntézou byla mnohem delší, téměř 60 min. Důvodem je

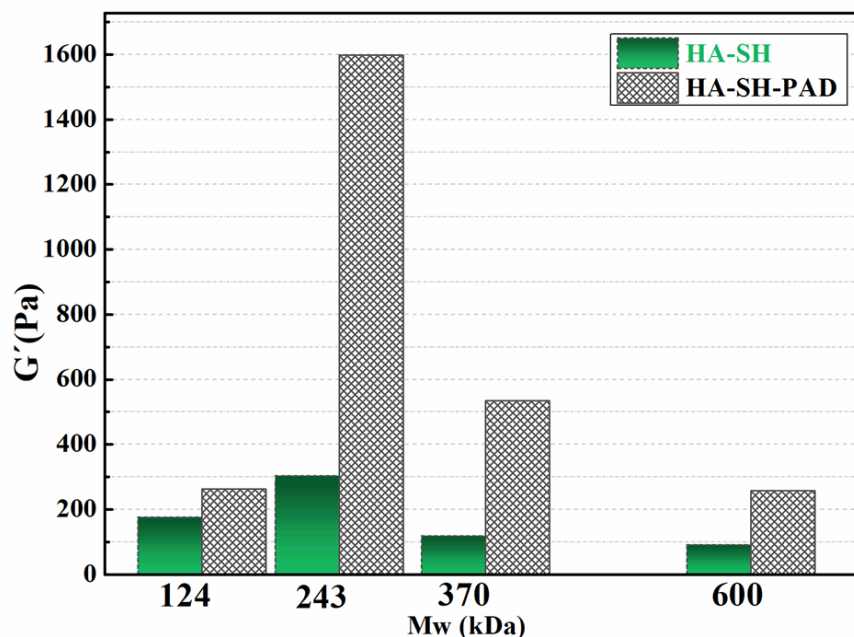
pravděpodobně nižší dosažený stupeň volných thiolových skupin a naopak dosažený vysoký stupeň disulfidových vazeb ve struktuře HA-SH připraveného *jednokrokovou* syntézou. Pro thiolové skupiny tak není snadné k sobě najít jinou thiolovou skupinou, se kterou by vytvořili disulfidovou vazbu. V bakalářské práci bylo také zjištěno, že gelační čas nezávisí na koncentraci thiolovaného hyaluronanu, avšak v diplomové práci byly předchozí výsledky rozšířeny o síťování thiolovaného hyaluronanu (HA-SH) s polydopaminem (PAD), u nichž byla naopak pozorována silná závislost na koncentraci polymeru, a tím i množství PAD částic, popř. trubiček, ve vzorku v poměru HA-SH:PAD (1:0,5). Z výsledků uvedených na obr. 60 je patrné, že doba gelace 2% (w/w) hydrogelů, které obsahovaly PAD částice (PAD-NP) je kratší, než doba gelace 3% (w/w) vzorků bez částic. Tento jev může pravděpodobně souviset s menším množstvím přítomných částic ve 2 % (w/w) vzorku, díky kterému je omezený počet dostupných chinonových skupin PAD a ty poté mohou mnohem snadněji interagovat s thiolovými skupinami HA-SH za vzniku příčných vazeb. Všechny vzorky navíc zesíťovaly do 270 min (tj. 4,5h). Doba gelace 2% (w/w) vzorku hydrogelu obsahující částice s užší distribucí velikosti (HA-SH-PAD-14) byla výrazně kratší (3 min), ve srovnání s dobou gelace vzorku obsahujícího částice s širší distribucí (HA-SH-PAD-10), která byla 21 min. Pravděpodobnou příčinou pozorovaného chování je velikost částic a její distribuce, která je v případě HA-SH-PAD-14 více homogenní, což může vést k rychlejšímu vzniku vazby mezi thiolovými skupinami HA-SH a chinonem PAD. Pozorovaný trend narušují 3% vzorky, jejichž doba gelace je kratší u vzorku HA-SH-PAD-10 (80 min) oproti 3% HA-SH-PAD-14 (270 min). Výjimku tvoří vzorek HA-SH s PAD trubičkami (PAD-NT), u kterého je uvedená závislost přesně obrácená, tedy že 3% vzorky HA-SH s PAD-NT síťují mnohem rychleji (do 2 min), než 2% vzorky (do 190 min). Z výsledků tedy vyplývá, že 2% vzorky s PAD částicemi (s širokou i úzkou distribucí) síťují rychleji, než 3% vzorky, zatímco v případě vzorků s PAD-NT je tomu přesně naopak. Dobu gelace thiolovaného hyaluronanu (HA-SH) síťovaného pomocí PAD částicemi ve své práci zkoumali také Yu et al. (2020). V jejich případě byl připraven vzorek HA-SH o koncentraci 1, 10 a 20 mg/ml, a ukázalo se, že u HA-SH ($M_w = 4-10$ kDa) s nízkou koncentrací (1 a 10 mg/ml) nepozorovali žádný vznik zesíťované struktury. Naopak zvýšením koncentrace HA-SH (20 mg/ml), která odpovídá 2% vzorkům HA-SH připravených v této práci, pozorovali vznik sítě přibližně po 24 hod. Po přidání PAD o koncentraci 1 mg/ml však byly schopni připravit zesíťovanou strukturu i z HA-SH o koncentraci 10 mg/ml (1% vzorek) za více než 24 hod. A nakonec HA-SH (20 mg/ml) byla PAD částicemi zesíťována přibližně za 12 min. Stejný experiment zopakovali také pro HA-SH o molekulové hmotnosti $M_w = 20 - 40$ kDa, u které byly zaznamenány

mnohem příznivější výsledky doby gelace (v případě 10 mg/ml struktura samotného HA-SH zesíťovala za 48 hod (po přidání PAD do 5 min), v případě 20 mg/ml byla doba gelace HA-SH 1 hod (s PAD 5 min)) [172]. Z jejich výsledků tedy vyplývá, že gelační schopnost HA-SH ovlivňuje jednak koncentrace PAD ve vzorku, ale také molekulová hmotnost hyaluronanu použitá k přípravě HA-SH, jelikož s vyšší koncentrací a vyšší M_w dochází k nárůstu viskozity vzorku. Rostoucí viskozita vzorku snižuje mobilitu volných thiolových skupin vázaných na HA-SH řetězci, což se projeví nižší reaktivitou, a tedy i nižším gelačním časem. V případě vzorků hydrogelů HA-DA nebyla doba gelace změřena z důvodu rychlého síťování, které se děje ihned po rozpuštění vzorků, což potvrzuje také práce autorů Melnik et al. (2022), jejichž připravené HA-DA vzorky síťovaly v řádech sekund (v závislosti na použitém iniciátoru (NaIO_4 a NaOH)). Vzorek s NaIO_4 začal síťovat již po 30 s, zatímco vzorek s NaOH až po 150 s [12]. I autoři Guo et al. (2018) potvrdili rychlý vznik sítě u dopaminem konjugovaného hyaluronanu (HA-DA). Tito autoři ve své práci charakterizovali gelační čas HA-DA v závislosti na pH a zjistili, že s rostoucím pH, iniciujícím vznik hydrogelu, klesá doba gelace. Nejnižší doba byla zaznamenána při pH 9,0 (řádově jednotky sekund). Na základě jejich práce bude v budoucnu navržen experiment ke stanovení doby gelace i vzorků HA-DA, případně i HA-SH-HA-DA [212].

9.7.2 Oscilační testy – stanovení tuhosti hydrogelů

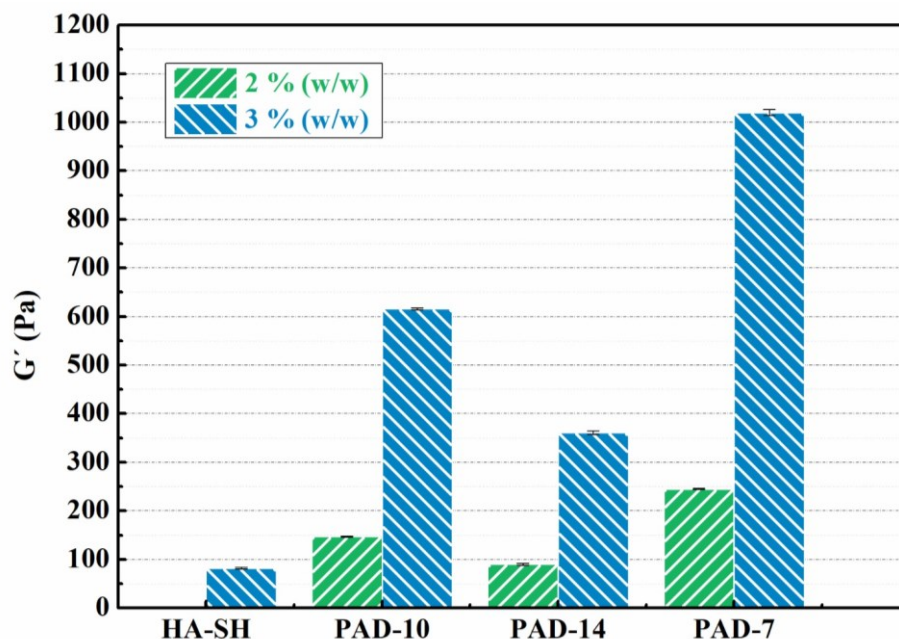
Tuhost připravených hydrogelů na bázi HA-SH, HA-SH-PAD, HA-DA a hydrogelového komplexu HA-SH-HA-DA je další neméně důležitou vlastností, která byla v této práci analyzována. Tuhost hydrogelů s potenciálním využitím v tkáňovém inženýrství má vliv např. na migraci a proliferaci buněk [106]. Tuhost připravených hydrogelů byla určena jako průměr hodnot elastického modulu (G'), který byl měřen v závislosti na úhlové frekvenci v rozmezí 0,1 – 100 rad/s při 10% konstantní deformaci. Tato oblast úhlové frekvence byla zvolena na základě zkušenosti s měřením hydrogelů na bázi HA-SH realizovaných v bakalářské práci, a kterou lze z pohledu stability hydrogelu označit za „bezpečnou“.

Nejprve byla charakterizována tuhost hydrogelů na bázi HA-SH-PAD z pohledu molekulové hmotností HA-SH, která byla připravená s využitím *dvoukrokové* syntézy (obr. 61).



Obr. 61 – Graf závislosti elastického modulu (G') na molekulové hmotnosti HA-SH hydrogelů (o 2% (w/w) koncentrace) *bez částic (zelené sloupce)* a *s PAD částicemi (černobílé sloupce)*

Z přiloženého grafu jasně vyplývá, že nejvyšší hodnotu elastického modulu, a tedy i nejvyšší tuhost, vykazují 2% (w/w) HA-SH-PAD hydrogely připravené z *dvoukrokové* syntézy o $M_w = 243$ kDa ($G' = 1,6$ kPa). Tak mimořádně vysoký elastický modul HA-SH je přisuzován velmi úspěšné syntéze HA-SH s dosaženým vysokým stupněm substituce volných thiolových skupin ($DS = 50\%$). Z tohoto důvodu, tedy na základě výsledků oscilačních testů (ale i dosažených $DS(\%)$) byla HA-SH o $M_w = 243$ kDa zvolena jako optimální pro přípravu HA-SH *jednokrokovou* syntézou. V případě *jednokrokové* syntézy byla nejprve stanovena tuhost u vzorků HA-SH-PAD hydrogelů s poměrem HA-SH:PAD = 1:0,5 (obr. 62). Jako referenční vzorek je uveden 3% (w/w) hydrogel na bázi HA-SH, jehož tuhost odpovídala hodnotě 82 Pa. Z výsledků tuhosti dosažených v bakalářské práci je patrné, že tuhost hydrogelu připraveného *jednokrokovou* syntézou HA-SH (82 Pa) nedosahuje ani zdaleka tak vysokých hodnot jako 3% HA-SH hydrogely z *dvoukrokové* syntézy (1,6 kPa) [51]. Jak již bylo zmíněno, příčinou takového chování bude pravděpodobně souviset s nízkým stupněm substituce volných thiolových skupin na řetězci *jednokrokové* HA-SH, což ve své práci potvrdili i autoři Bian et al. (2016) [8]. Proto se *jednokroková* syntéza HA-SH nejeví jako vhodná z pohledu tuhosti hydrogelů a následné aplikace např. jako scaffoldy.

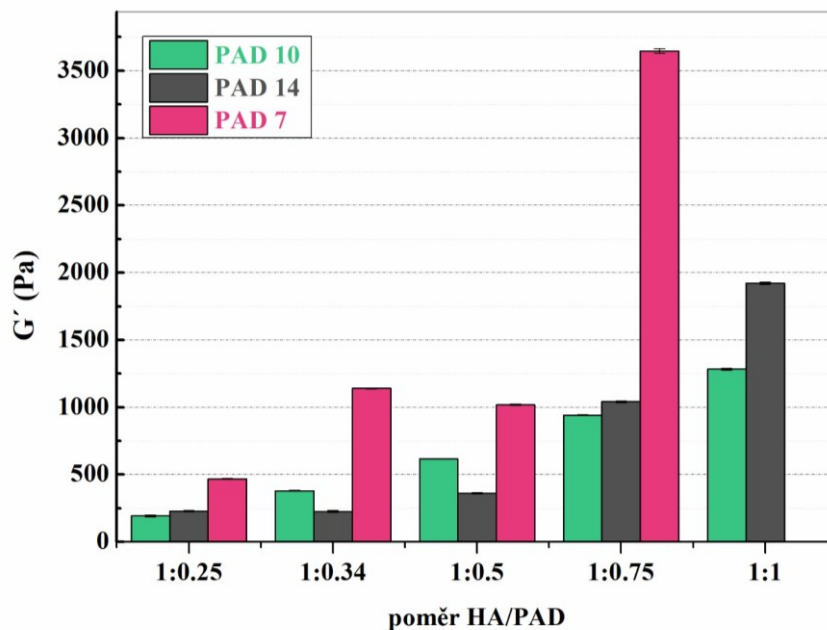


Obr. 62 – Závislost elastického modulu (G') na typu připravených vzorků HA-SH, popř.

HA-SH-PAD (koncentrace polymeru 2 a 3 % (w/w), poměr HA-SH:PAD = 1:0,5)

Tuhost těchto hydrogelů lze ovšem zvýšit dosíťováním HA-SH pomocí polydopaminu ve formě částic i trubiček. Tuhost HA-SH-PAD hydrogelů byla srovnána se vzorky s PAD částicemi s úzkou i širokou distribucí a s PAD trubičkami. Jak vyplývá z přiložené závislosti, nejvyšší tuhost vykazují 3% hydrogely, jelikož obsahují vyšší množství polymeru, což přispívá ke zvýšení hustoty sítě HA-SH, projevující se vyšší tuhostí. U tohoto vzorku je v matici přítomno větší množství polydopaminu PAD-NP nebo PAD-NT, které zvyšuje přítomnost dostupnost funkčních skupin, s kterými mohou volné thiohy interagovat za vzniku hustší sítě, a tedy pevnějšího hydrogelu. Z těchto výsledků je tedy patrné, že nejvyšší tuhost (1020 Pa) vykazuje hydrogel na bázi HA-SH-PAD-7, který ve své struktuře obsahuje PAD ve formě trubiček. V případě hydrogelů s PAD ve formě částic má nejvyšší tuhost (616 Pa) 3% (w/w) vzorek HA-SH-PAD-10, který obsahuje částice s širší distribucí velikosti částic. Téměř poloviční tuhost (361 Pa) má 3% (w/w) vzorek HA-SH-PAD-14 s částicemi s úzkou distribucí. Zajímavé také je, že u hydrogelů s částicemi i s trubičkami vzroste jejich tuhost s rostoucí koncentrací HA-SH asi 4krát, tj. ze 147 Pa (2%) na 616 Pa (3%) u hydrogelu s PAD-10; z 90 Pa (2%) na 361 Pa (3%) u hydrogelu s PAD-14; z 245 Pa (2%) a 1020 Pa (3%) u hydrogelu s PAD-NT. Každopádně na základě uvedených výsledků lze konstatovat, že přítomnost PAD jednoznačně zvyšuje tuhost připravených hydrogelů a to výrazně. Například 3% (w/w) hydrogel HA-SH-PAD-10 má 7,5krát vyšší tuhost než HA-SH hydrogel bez přídavku PAD částic. Problematikou charakterizace hydrogelů na bázi HA-

SH-PAD v poměru 1:0,5 (HA-SH:PAD) se zabývali také autoři Yegappan et al. (2019), kteří potvrdili, že tuhost HA-SH hydrogelu se zvyšuje s přítomností PAD částic. Dle jejich výsledků odpovídala hodnota elastického modulu HA-SH hydrogelu 99 Pa, zatímco tuhost hydrogelu s PAD částicemi byla 163 Pa. Jejich dosažené výsledky ovšem nelze zcela porovnat s výsledky dosaženými v této práci, jelikož zmínění autoři využili k syntéze thiolovaného hyaluronanu, nativní HA(Na) s nižší molekulovou hmotností (150 kDa). I přesto lze konstatovat, že pozorovali stejný trend nárůstu tuhosti hydrogelů po začlenění PAD částic do matrice hydrogelu, i když hydrogely připravené v předložené práci dosahovaly vyšších hodnot G' , což může být způsobeno právě vyšší molekulovou hmotností HA(Na), který byl v této práci použit k syntéze HA-SH (tj. 243 kDa). Zmínění autoři navíc podrobili hydrogely testům teplotní stability, při kterých byly hydrogely vystaveny různým teplotám v rozmezí 25 – 40 °C a při kterých byl jejich G' i G'' stabilní. Z jejich výsledků rovněž vyplývá, že během teplotního namáhání nedošlo ke změně mikrostruktury hydrogelu, z čehož lze usoudit, že takto připravené hydrogely jsou za fyziologických podmínek stabilní [47]. Hydrogel na bázi thiolovaného hyaluronanu síťovaného PAD částicemi připravili také Yu et al. (2020), ale v jejich studii se nezabývali charakterizací hydrogelů z pohledu jejich tuhosti [172]. V rámci experimentu byl mimo jiné studován vliv koncentrace PAD částic (*PAD-10* a *PAD-14*) i PAD trubiček (*PAD-7*) na tuhosti hydrogelů (obr. 63). Proto byla připravena řada 3% hydrogelů HA-SH-PAD s rostoucím poměrem PAD vůči HA-SH, a to konkrétně: HA-SH:PAD (1:0,25; 1:0,34; 1:0,5; 1:0,75; 1:1).



Obr. 63 - Graf závislosti elastického modulu hydrogelu na poměru HA-SH ku *PAD-10*, *PAD-14* a *PAD-7*

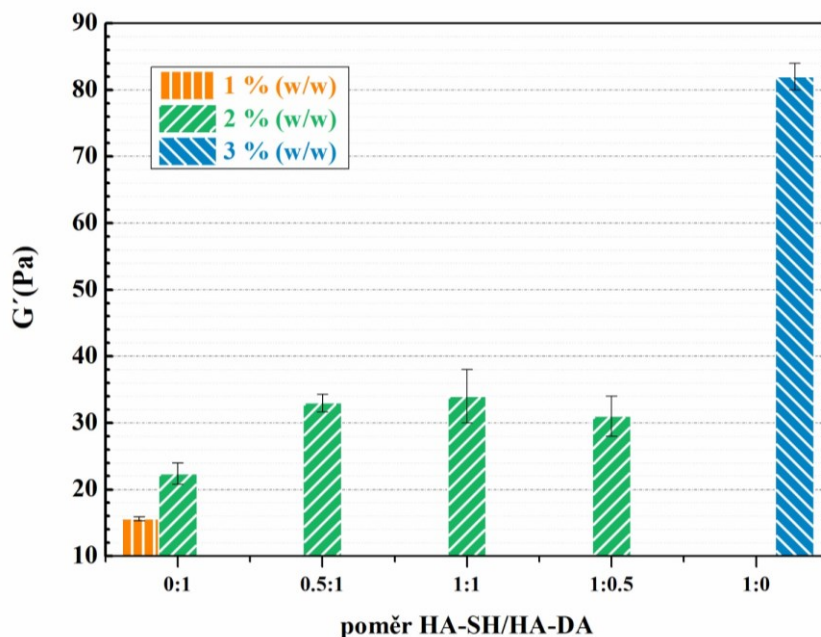
Výsledky této závislosti, tedy závislosti G' (Pa) hydrogelu na koncentraci částic *PAD-10* shrnuje obr. 63 závislosti. Z těchto výsledků je patrné, že s rostoucí koncentrací částic PAD ve vzorku roste také jeho tuhost. Nejvyšší tuhost (1284 Pa) dosahoval hydrogel s poměrem PAD vůči HA-SH (1:1), nejnižší poté hydrogel s poměrem HA-SH:PAD (1:0,25) (193 Pa). Což znamená, že nebyla nalezena hodnota stupně nasycení HA-SH matrice PAD částicemi, při kterém se již nemění tuhost připravených hydrogelů. Pozorovaný trend však nemusí být vypovídající, jelikož se předpokládá, že vysoké zastoupení PAD částic nemá k sobě tolik thiolových skupin, se kterými by chinonové skupiny PAD mohly interagovat za vzniku příčných vazeb. Většina částic ve vzorku tak může plnit pouze funkci jakéhosi plniva, čímž by se vysvětlila stále narůstající tuhost hydrogelů.

Tab. 6 – Přehled stanovených hodnot tuhosti hydrogelů s různým zastoupení PAD částic

HA	Koncentrace [%]	PAD	Poměr HA/PAD	Tuhost [Pa]
HA-SH	3	10	1:0.25	193
			1:0.34	380
			1:0.5	616
			1:0.75	942
			1:1	1284
	3	14	1:0.25	229
			1:0.34	226
			1:0.5	361
			1:0.75	1041
			1:1	1922
	3	7	1:0.25	469
			1:0.34	1141
			1:0.5	1020
			1:0.75	3647

Obdobný trend byl pozorován i v případě hydrogelů s *PAD-14* (tab. 6). Maximální tuhost byla dosažena u hydrogelů s poměrem HA-SH:PAD (1:1), a to konkrétně 1922 Pa. Nicméně u těchto vzorků bylo zjištěno, že hydrogely s poměrem HA-SH:PAD (1:0,25) a (1:0,34) vykazovali téměř shodnou tuhost. Z toho lze usoudit, že byla nalezena spodní hranice koncentrace částic s úzkou distribucí, pod kterou už nedochází ke změně tuhosti připravených hydrogelů. Experiment byl realizován také pro hydrogely s PAD ve formě trubiček (*PAD-7*) (tab. 6), u nichž byl pozorován významný nárůst tuhosti při poměru 1:0,75 (HA-SH:PAD) (z 1020 Pa na 3647 Pa). Z toho důvodu již nebyla měřena tuhost vzorku s poměrem 1:1, jelikož by trubičky, stejně jako v případě částice, představovaly spíše plnivo než síťovací činidlo. Získané výsledky odpovídají závěrům autorů Yu et al. (2020), kteří potvrdili, že gelační schopnost HA-SH je ovlivněna koncentrací PAD ve vzorku [172].

V rámci experimentální části předložené práce, byla tuhost charakterizována i u hydrogelů na bázi konjugátu HA-DA a hydrogelových komplexů HA-SH-HA-DA. V grafu na obr. 64 jsou uvedeny dosažené hodnoty tuhosti HA-DA hydrogelů. Tuhost těchto hydrogelů byla obecně nižší než tuhost hydrogelů thiolovaného hyaluronanu *bez* i *s* přidavkem PAD diskutovaných výše.



Obr. 64 - Závislost elastického modulu hydrogelů na koncentraci polymeru a vzájemném poměru jednotlivých složek HA-DA a HA-SH-HA-DA

Jak již bylo zmíněno výše, z konjugátu se podařilo připravit i 1% hydrogely, na rozdíl od thiolovaného hyaluronanu, což bude pravděpodobně souviset s vysokou viskozitou, kterou dopaminem konjugované hydrogely vykazují. Pozorovaný viskozitní nárůst zapříčinil, že 3% roztok HA-DA nebylo možné rozpustit, a tím pádem ani připravit 3% hydrogely. Z výsledků vyplývá, že tuhost hydrogelů roste s rostoucí koncentrací polymeru (z 16 Pa na 22 Pa), i když nárůst tuhosti nebyl příliš výrazný. Důvodem nižší tuhosti těchto hydrogelů je zapříčiněn nízkým stupněm substituce katecholových skupin vázaných na řetězci hyaluronanu. Toto tvrzení bylo mimo jiné založeno na výzkumu Melnik et al. (2022), podle kterých je tuhost HA-DA závislá na DS(%) dopaminu, na čase, kdy byla tuhost po zesíťování změřena a v neposlední řadě i na typu iniciátoru síťování (NaIO_4 nebo NaOH). S rostoucím DS(%) rostla i tuhost HA-DA. Nejvyšších hodnot dosáhli při DS 21 % (~ 70 Pa), zároveň při použití NaOH došlo ke zvýšení hodnoty tuhosti po 48 hod (pro DS 21 % ~ 120 Pa). V případě, že byl jako iniciátor použit NaIO_4 , tuhost HA-DA hydrogelů dosahovala přibližně 9krát vyšších hodnot (z 70 na 630 Pa). Na druhou stranu u hydrogelů síťovaných přísadkou NaIO_4 se objevil problém s toxicitou připravených hydrogelů. Z toho vyplývá, že NaIO_4 není vhodným iniciátorem síťování hydrogelů na bázi HA-DA [12]. Guo et al. (2019) ve své práci zkoumali velikost elastického modulu HA-DA hydrogelů v závislosti na pH, při kterém byl konjugát síťován. Zjistili, že nejvyšší tuhosti HA-DA hydrogelů lze dosáhnout síťováním vzorku při $\text{pH} = 8,0$, kdy se hodnota elastického modulu pohybovala kolem hodnoty 200 Pa.

Nejati et al. (2023) ve své práci také charakterizovali tuhost hydrogelů na bázi dopaminem konjugovaného hyaluronanu, který byl navázán na aldehydové skupiny HA(Na) připravené oxidací sacharidové kruhu D-glukuronové kyseliny. Výsledná tuhost takto připravených hydrogelů dosahovala mnohonásobně vyšších hodnot, ve srovnání s výsledky uvedených v této práci (1,66 kPa). Důvodem je odlišný způsob syntézy HA-DA, který se z pohledu autorů jeví jako efektivnější a to jak z pohledu dosaženého stupně substituce (36 %), tak z pohledu tuhosti hydrogelů [11].

Vzájemnou kombinací HA-DA a HA-SH připravených polymerů byly připraveny hydrogely za účelem zvýšení elastického modulu samotných HA-DA hydrogelů. Dle dosažených výsledků (tab. 7) lze konstatovat, že vzájemnou kombinací připravených polymerů se podařilo dosáhnout zvýšení tuhosti, které jak se ukázalo je závislé na koncentraci polymerních řetězců, z kterých byly hydrogely připraveny. Nejlepších výsledků tuhosti bylo dosaženo kombinací 3% (w/w) thiolovaného hyaluronanu s 2% (w/w) hyaluronanem konjugovaným dopaminem (105 Pa). Naopak při kombinaci polymerů o stejné koncentraci, ale jiném množství výchozích polymerů, nebyla pozorována téměř žádná změna v hodnotě elastického modulu (33 Pa, resp. 31 Pa). Výsledky tuhosti dosažené v této práci nelze potvrdit ani vyvrátit, jelikož nebyla nalezena žádná odborná literatura, ve které by byly hydrogely na bázi HA-SH-HA-DA diskutovány.

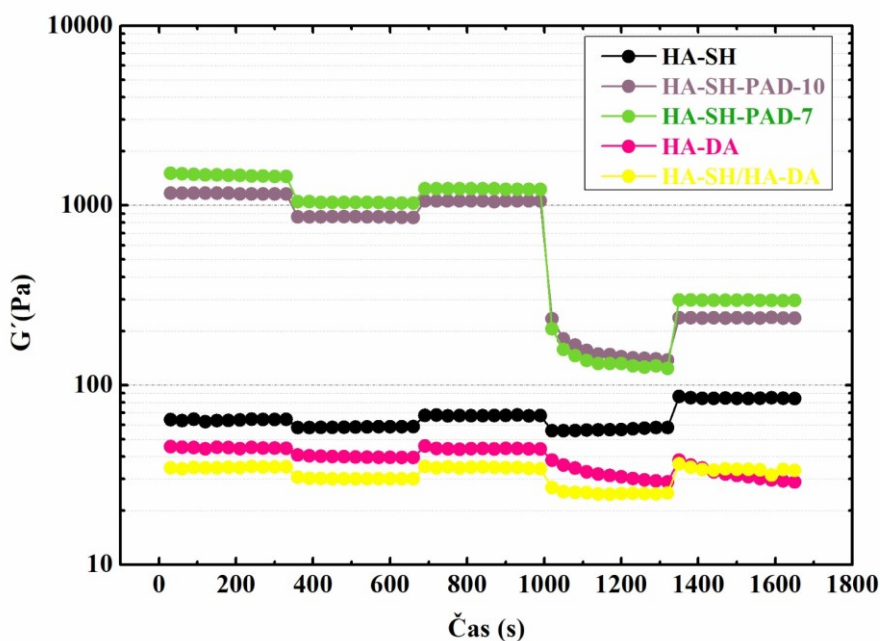
Tab. 7 – Přehled výsledných hodnot tuhosti hydrogelových komplexů v závislosti na koncentraci a vzájemném poměru použitých polymerů

Polymer	Koncentrace [%]	Polymer	Koncentrace [%]	Poměr HA-SH/HA-DA	Tuhost [Pa]
HA-SH	2	HA-DA-2	2	1:1	36
	2		3	1:1	95
	3		2	1:1	105
	2		2	0.5:1	33
	2		2	1:0.5	31

Tuhost hydrogelů je velmi důležitým parametrem z hlediska migrace a proliferace buněk, jelikož buňky jsou velmi citlivé na mechanické vlastnosti substrátu a ke svému správnému fungování vyžadují specifickou tuhost tohoto substrátu. Tak například optimální tuhost pro migraci embryonálních buněk předního mozku je ~1kPa, zatímco optimální tuhost pro adhezi buněk fibroblastů je >2 kPa. Z toho vyplývá, že tuhost hydrogelu ovlivňuje morfologii a chování buněk, a tudíž je velmi důležitým faktorem určující následné aplikace připravených materiálů [213].

9.7.3 Reverzibilita reologického chování hydrogelů

Všechny materiály či hydrogely u kterých je zamýšlené zpracování metodou 3D tisku musí vykazovat nejen pseudoplastické chování, při kterém dochází vlivem působení smykové deformace k poklesu viskozity, ale také rychlé zotavení materiálu po uvolnění působícího napětí. Od připravených hydrogelů se tak očekává, že po ukončení namáhání se hodnota elastického modulu, tedy jejich tuhost, vrátí na původní hodnotu, nebo alespoň se k této hodnotě přiblíží [214]. Na obr. 65 je uveden graf závislosti elastického (komplexní viskozity (η^*)) (G') a ztrátového (G'') modulu na čase (t), při kterém byly cyklicky měněny hodnoty deformace (z 1% na 100% a 500%), jak je uvedeno v popisu experimentu.



Obr. 65 – Závislost elastického modulu (G') na čase, při kterém byly měněny hodnoty deformace (z 1% na 100% a 500%)

Z uvedeného grafu je patrné, že připravené hydrogely po uvolnění 100% deformace prokázaly schopnost rychlé změny (za 30 s) reologického chování. Výsledky z grafu jsou navíc podpořeny hodnotami reverzibility elastického modulu vyjádřených v procentech vůči původní hodnotě elastického modulu, které jsou uvedeny v tab. 8. Nejnižší reverzibilitu vykazovaly hydrogely síťované PAD (ve formě částic i trubiček), i když u nich došlo k nejvýraznějšímu poklesu elastického modulu (komplexní viskozity (η^*)). Nižší reverzibilita může být zapříčiněna mírným rozrušením struktury hydrogelu, u které nedošlo k úplné relaxaci, což se projevilo na výsledné hodnotě $G'(\eta^*)$. Nicméně makroskopicky pozorovatelné defekty hydrogelu nebyly po vyjmutí vzorku z geometrie detekovány. Dobrou reverzibilitu vykazovaly hydrogely připravené z thiolovaného hyaluronanu HA-SH

(z 64 Pa (1%) na 58 Pa (100%) a zpět na 68 Pa (1%)) a rovněž hydrogely připravené z hyaluronanu konjugovaného dopaminem HA-DA (ze 45 Pa (1%) na 40 Pa (100%) a zpět na 44 Pa (1%)).

Tab. 8 – Výsledky reverzibility elastického modulu při cyklické deformaci připravených hydrogelů

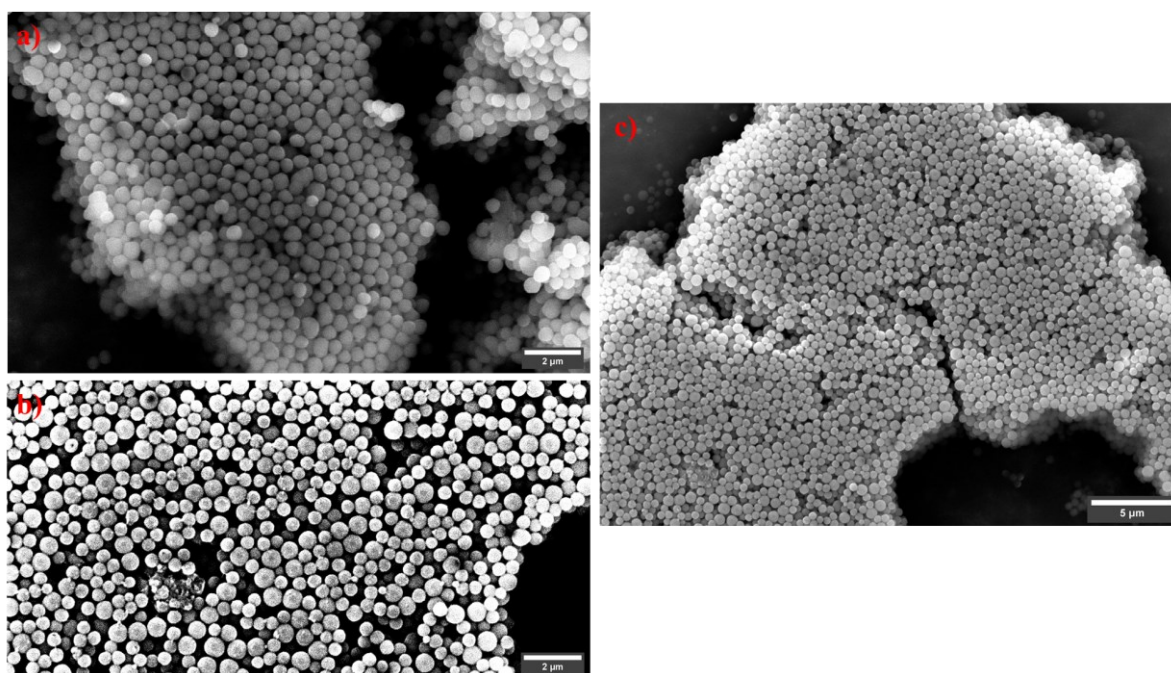
Vzorek/ Deformace	Reverzibilita [%]				
	1%	100%	1%	500%	1%
HA-SH	100	91	106	89	132
HA-SH-PDA-NP	100	74	91	14	20
HA-SH-PDA-NT	100	70	84	10	20
HA-DA	100	89	99	72	79
HA-SH-HA-DA	100	100	100	72	98

Po uvolnění deformace o hodnotě 100 % dochází tedy k téměř úplnému návratu hydrogelu na jeho původní hodnotu $G'(\eta^*)$ (vyjma hydrogelů s PAD), zatímco úplná reverzibilita reologického chování po uvolnění deformace o hodnotě 500 % není pozorována u žádných vzorků. Výjimku tvoří hydrogel na bázi HA-SH, u kterého byl dokonce pozorován nárůst $G'(\eta^*)$ nad původní hodnotu (z původních 64 Pa na 85 Pa). Nejvyšší hodnota deformace (500 %) byla zvolena na základě experimentu, který ve své práci popsali autoři Nejati et al. (2023), i když je pravděpodobné, že při tak vysoké deformaci dochází k rozrušení struktury hydrogelu a porušení adheze. Neočekávaný výsledek byl pozorován u hydrogelového komplexu HA-SH-HA-DA, který nevykazoval žádný pokles $G'(\eta^*)$ při 100 % deformace. Na druhou stranu při 500 % deformaci u stejného vzorku k poklesu již došlo $G'(\eta^*)$ a po uvolnění napětí/deformace se tuhost $G'(\eta^*)$ vrátila na původní hodnotu. Reverzibilitu reologického chování HA-DA hydrogelů ve své práci zkoumali také Nejati et al. (2023) a zjistili, že tyto hydrogely vykazovaly okamžité zotavení a po uvolnění deformace došlo k obnovení jejich původní tuhosti ($G'(\eta^*)$). Tuto regeneraci tuhosti hydrogelů přisuzují koordinační vazbě mezi ionty Fe^{3+} a dopaminem, která je reverzibilní, čímž dochází ke snadné reorganizaci síťové struktury za opětovného vzniku hydrogelu [11]. V práci Yegappan et al. (2019) zase testovali reverzibilitu hydrogelu na bázi HA-SH a HA-SH-PAD. Z jejich výsledků vyplývá, že pozorovali přesně opačný trend než je uveden v této práci. Po uvolnění 100 % zatížení HA-SH hydrogelu pozorovali pouze 75% návrat původní viskozity (elastického modulu), zatímco u HA-SH-PAD hydrogelu byl zaznamenán úplný návrat na

původní hodnotu viskozity [47]. Příčinou rozdílných výsledků může pravděpodobně souviset s nižší tuhostí hydrogelů na bázi HA-SH-PAD, které ve své práci autoři dosáhli (~163 Pa), což může vést k flexibilnější hydrogelové struktuře. I přestože reverzibilita po uvolnění 100 % deformace není u všech vzorků úplná, dosažené výsledky poukazují na to, že minimálně na HA-SH a HA-DA hydrogely by mohly být zpracovány metodou 3D tisku. Uvedený experiment je prvním pokusem o získání informací o reverzibilitě reologického chování hydrogelů. Následující mohou být doplněny např. o studování hydrogelů na bázi HA-SH-PAD v jiném poměru látek než je 1:0,5. To by mohlo vést k vyšší reverzibilitě G' (η^*) po uvolnění 100 % deformace.

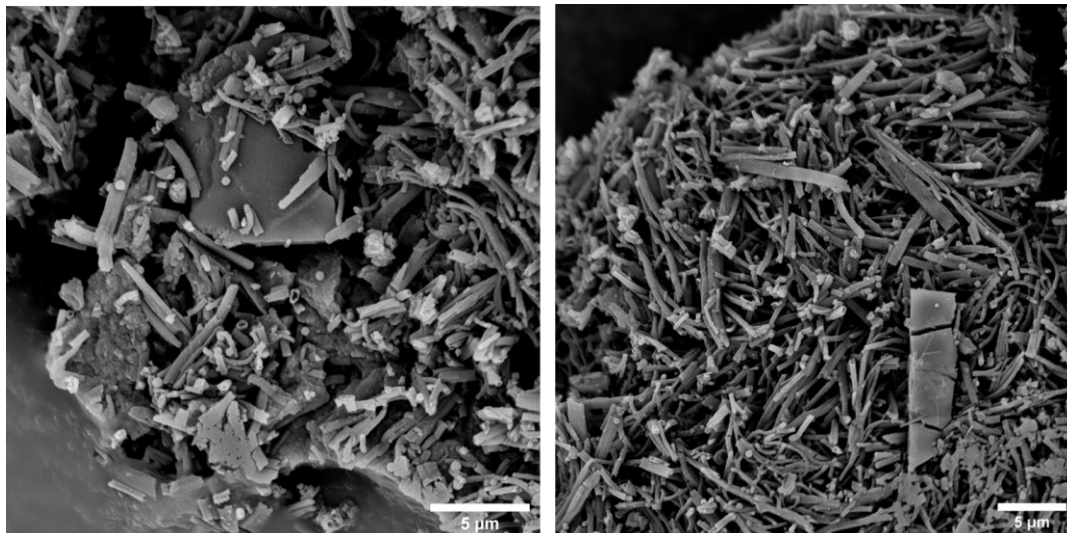
9.8 Porozita hydrogelů a morfologie PAD-NP a PAD-NT

Popis morfologie a povrchové struktury hydrogelů, ale také PAD částic (popř. trubiček) byl realizován prostřednictvím analýzy SEM snímků jednotlivých vzorků pořízených skenovací elektronovou mikroskopií při urychlovacím napětí 15 kV v režimu zobrazení sekundárních elektronů. V případě PAD částic, analýza SEM snímků potvrdila přítomnost kulovitých částic s různou distribucí velikosti částic. Jak již bylo zmíněno, první pokusy o syntézu PAD částic vedly k přípravě částic s širokou distribucí jejich velikosti, ale také k částicím různého tvaru (kulovité či deformované) (viz v kapitole 9.3). Po optimalizaci podmínek syntézy, se podařilo připravit kulovité částice s úzkou distribucí velikosti (*PAD-10* a *PAD-14*), které jsou uvedeny na obr. 66.



Obr. 66 – SEM snímek PAD částic – a) *PAD-14*, b) a c) *PAD-10*

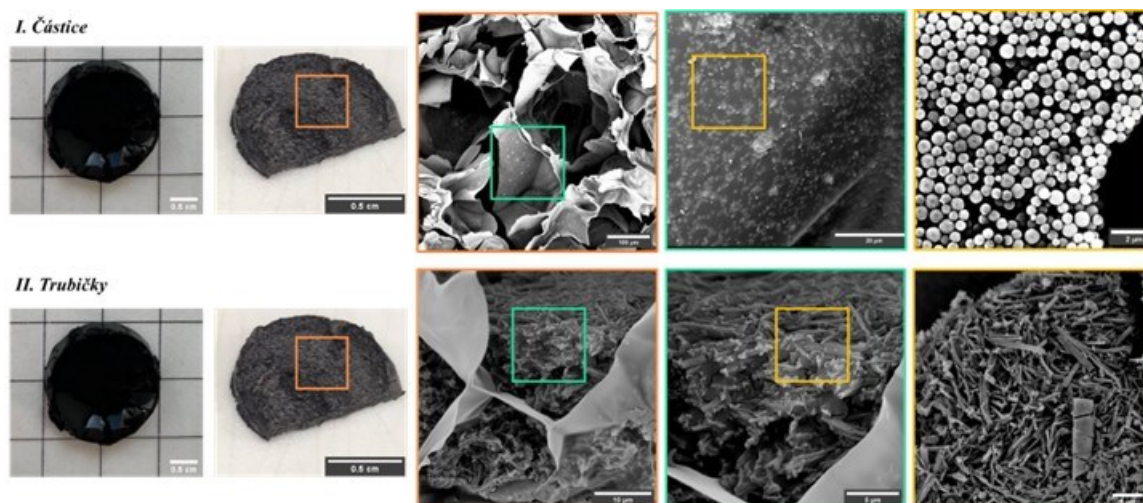
Kromě PAD částic byla v této práci představena také syntéza PAD ve formě dutých trubiček (PAD-NT), jejichž morfologie je uvedena na obr. 67. Na SEM snímcích si lze všimnout, že PAD-NT jsou opravdu duté trubičky o délce několik jednotek mikrometrů (5 – 10 μm).



Obr. 67 – SEM snímky připravených PAD trubiček (PAD-7)

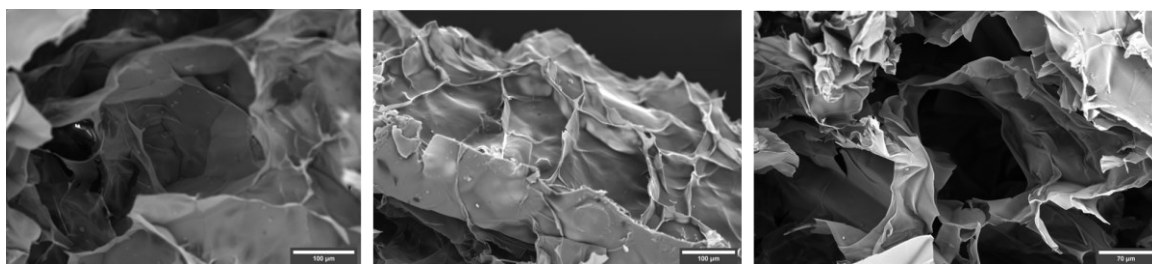
Pomocí metod uvedených v této práci nebylo možné přesně určit tloušťku stěny připravených trubiček, jelikož pomocí SEM analýzy nebylo možné dosáhnout takového rozlišení, aby bylo možné tloušťku přesně stanovit. Nicméně Fang et al. (2020) ve své práci (mimo jiné) analyzovali tloušťku stěny PAD-NT, které syntetizovali trubičky prostřednictvím prekurzoru molybdenanu amonného. K této analýze využili transmisní elektronový mikroskop a zjistili, že tloušťka stěny PAD-NT je závislá na délce polymerační reakce: 1 hod (43 nm); 2 hod (65 nm) a 3 hod (82 nm). Což znamená, že čím delší byl čas polymerace, tím větší byla tloušťka stěny připravených PAD trubiček. [215]. Pomocí SEM byla studována také morfologie a porozita připravených hydrogelů. Porozita připravených hydrogelů na bázi HA-SH byla analyzovaná již v bakalářské práci. V předložené práci byla analýza rozšířena o hydrogely na bázi HA-SH-PAD, dále také o HA-DA a HA-SH-HA-DA. Jak již bylo zmíněno v kapitole 9.3, první syntetizované PAD částice, prostřednictvím kterých byla síťována matrice thiolovaného hyaluronanu (HA-SH) za vzniku hydrogelu HA-SH-PAD, byly v matrici výsledného hydrogelu distribuovány nerovnoměrně, jak je vidět na obr. 58. Na základě tohoto zjištění se lze tedy domnívat, že představovaly spíše jakési plnivo, nikoliv síťovací činidlo. Nicméně částice připravené již po optimalizaci podmínek syntézy, byly v matrici HA-SH hydrogelu rozděleny rovnoměrně s minimální přítomností agregátů (obr. 68). Obdobně byly připraveny hydrogely na bázi HA-SH-PAD s PAD s přidavkem trubiček (obr. 68). V obou případech (PAD-NP i PAD-NT) byla struktura vysoce porézní a

velikost detekovaných pórů odpovídala široké distribuci. Průměrná velikosti pórů dosažených u HA-SH hydrogelů se pohybovala kolem hodnoty (tj. $\sim 50 \mu\text{m}$).



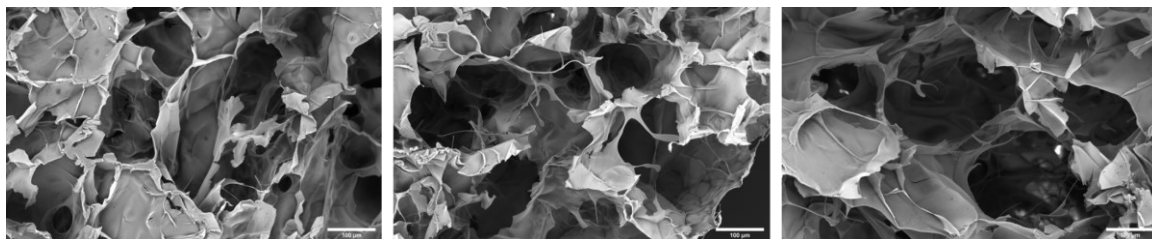
Obr. 68 – SEM snímky připravených hydrogelů HA-SH-PAD; (I) matrice s přídavkem PAD částic, (II) matrice s přídavkem PAD trubičky

Nejvyšší porozita však byla pozorována u hydrogelů na bázi HA-DA (obr. 69). Ve struktuře hydrogelu byly pozorovány póry s velikostí $\geq 100 \mu\text{m}$. Porozita hydrogelů, konkrétně velikost jejich pórů, je důležitým parametrem, který ovlivňuje difuzi látek přes vnitřní i vnější strukturu hydrogelů, a navíc jak už bylo zmíněno, také úzce souvisí s buněčnou proliferací a diferenciací [9]. Požadovaná velikost pórů se také liší podle typu buněk a tkání. Tak například 100 - 200 μm póry jsou vhodné pro diferenciaci chondrocytů (buňky chrupavky) [213]. Velké póry jsou také pravděpodobnou příčinou nejvyšší absorpce vody HA-DA hydrogelů (viz kap. 9.9).



Obr. 69 – SEM snímky hydrogelů na bázi HA-DA

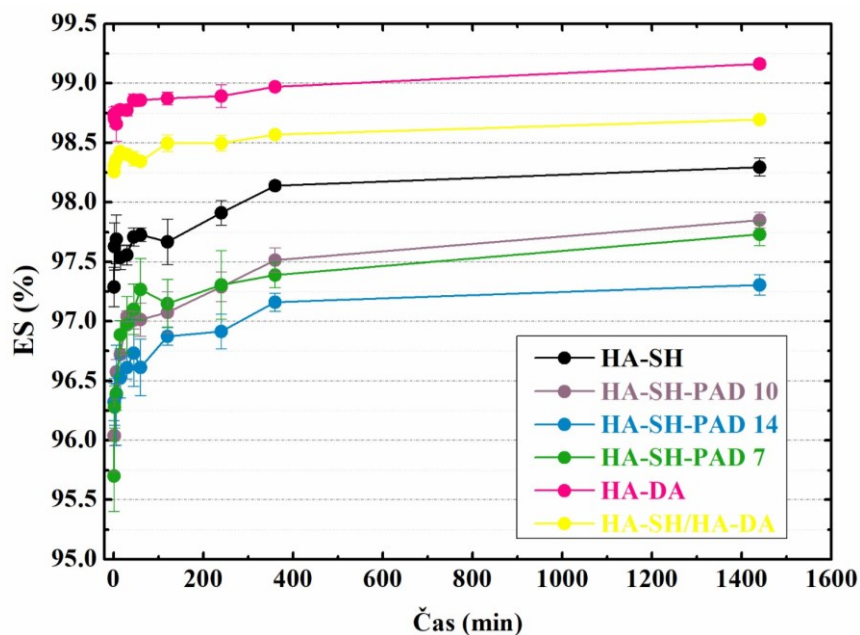
Širší distribuce velikosti pórů byla dosažena přídavkem HA-SH řetězce k HA-DA, čímž byl připraven HA-SH-HA-DA hydrogelový komplex. U samotného HA-SH hydrogelu byla se průměrná velikost pórů pohybovala kolem hodnoty $\sim 50 \mu\text{m}$. Ve struktuře hydrogelového komplexu byla spíše pozorována kombinace větších pórů i pórů menších než 100 μm (obr. 70), která byla přenesena z matrice HA-SH i HA-DA hydrogelů.



Obr. 70 – SEM snímky hydrogelového komplexu HA-SH-HA-DA

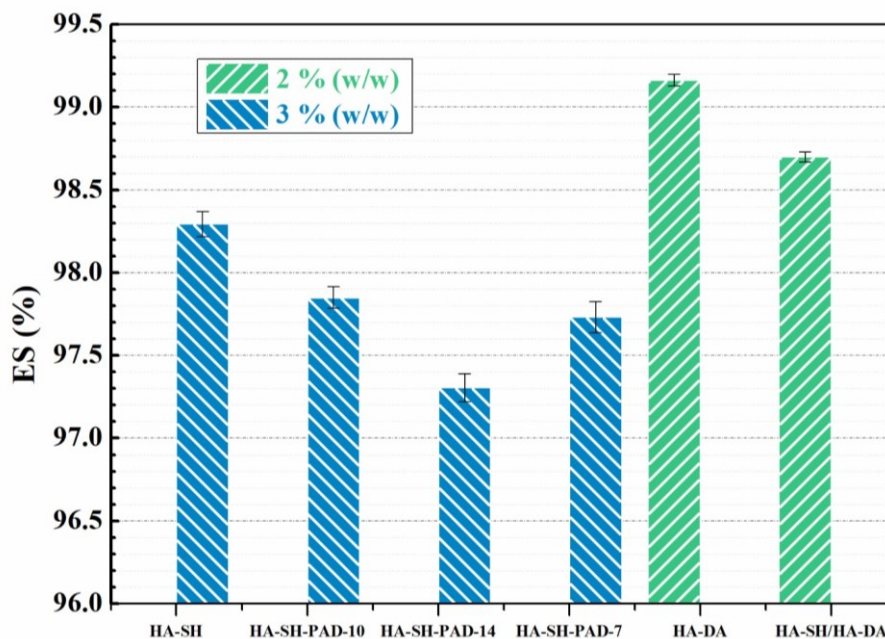
9.9 Botnací testy (*swelling*)

Bobtnací schopnost hydrogelů představuje důležitý parametr hydrogelů z hlediska difúze biaktivních molekul napříč hydrogelovou strukturou. Pro zamýšlené aplikace je nutné vyhodnotit botnací schopnost hydrogelů, jelikož hydrogely s ohledem na hustotu zesíťování vykazují různou schopnost zadržovat vodu ve své struktuře [47]. Podle Nejati et al. (2023) se botnací schopnost hydrogelů na bázi HA(Na) může lišit v závislosti na faktorech, jako je stupeň zesíťování hydrogelu, přítomnost dalších složek nebo funkčních skupin v matici hydrogelu [11]. Botnací schopnost hydrogelů byla experimentálně stanovena na základě měření hmotnostních změn hydrogelů ve fosfátovém pufru (PBS) (0,1 M, pH 7,4) v daných časových intervalech. Při samotném vyhodnocení bobtnacích testů, respektive určení rovnovážného poměru botnaní (ES(%)) botnací kapacita) panují v literatuře zmatky, jelikož autoři článků ne vždy určují botnací kapacitu stejně. V této práci byl proto zvolen standardní způsob výpočtu, který popisuje kolik vody bylo během uplynulé doby vzorkem hydrogelu naabsorbováno. Výpočty ES(%) byly realizovány podle rov. 12 a vyneseny do grafu v závislosti na čase, při kterém byla změřena změna hmotnosti (obr. 71).



Obr. 71 – Závislost bobtnací kapacity (*swelling %*) na čase pro všechny připravené kombinace hydrogelů

Jak je uvedeno v grafu na obr. 71, nejvyšší bobtnací schopnost vykazovaly HA-DA hydrogely. Tyto hydrogely během prvních minut v prostředí pufru naabsorbovaly téměř maximální množství kapaliny, které jsou schopny pojmout a dosáhly tak téměř maximální hodnoty ES (%), přičemž v posledním čase (24 hod), se hodnota ES (%) již prakticky nezměnila. Na druhou stranu z výsledků získaných měření ES (%) hydrogelů doplněných o polydopaminové částice (HA-SH-PAD) vyplývá, že nárůst absorpce vody byl postupný a s narůstajícím časem dosáhl své bobtnací rovnováhy.



Obr. 72 – Graf znázorňující botnací kapacitu připravených hydrogelů

Hodnoty rovnovážných poměrů botnání na konci měření, tj. po 24 hod, jsou uvedeny v grafu na obr. 72. Z grafu je patrné, že nejvyšší botnací kapacitu vykázaly hydrogely hyaluronanu konjugované dopaminem (HA-DA) (99.163 ± 0.035 %). To může být zapříčiněno velikostí pórů HA-DA hydrogelů [11], která dle SEM analýze odpovídají hodnotě ($> 100\mu\text{m}$). V porovnání s ostatními připravenými hydrogely byly póry HA-DA hydrogelů největší. Botnací kapacita hydrogelu na bázi thiolovaného hyaluronan dosáhla hodnoty 98.30 ± 0.08 %. Hodnota botnací kapacity vzájemného komplexu hydrogelů (HA-SH-HA-DA) se dle očekávání pohybovala mezi hodnotou botnací kapacity hydrogelu HA-DA a HA-SH, tj. 98.70 ± 0.03 %, jelikož kombinuje velikosti pórů obou hydrogelů. Výrazně nižší botnací kapacitu vykazovaly hydrogely na bázi thiolovaného hyaluronanu a polydopaminu, ať už ve formě částic nebo trubiček (97.85 ± 0.07 % (částice s širší distribucí); 97.306 ± 0.085 (částice s úzkou distribucí a 97.732 ± 0.094 % (tyčinky)). Hydrogely na bázi HA-SH-PAD vykazují mnohem kompaktnější strukturu s vysokým stupněm zesílení (podpořené vysokou tuhostí – viz oscilační testy), která je možnou příčinou nízké botnací schopnosti, jelikož zamezuje hydrogelové struktuře absorbovat vodu. Autoři Yegappan et al. (2019) ve své práci srovnávali bobtnací schopnost hydrogelů na bázi thiolovaného hyaluronanu a thiolovaného hyaluronanu síťovaného polydopaminem ve formě částic. Jejich výsledky botnací kapacity HA-SH-PAD hydrogelů lze srovnat s výsledky dosaženými v této práci. Nicméně, dle jejich zjištění, se thiolovaný hyaluronan (bez PAD) po 1 hod v PBS pufru zcela rozpadl. Na tomto výsledku potvrzují fakt, že částice PAD působí jako síťovací činidlo HA-SH polymerů [47].

V předložené práci však rozpad hydrogelu HA-SH pozorován nebyl, z čehož lze usoudit, že syntéza HA-SH v předložené práci byla úspěšnější než syntéza HA-SH uvedená v práci Yegappan et al. (2019). Tým autorů Nejati et al. (2023) [11] ve své práci zkoumali botnací kapacitu hydrogelů na bázi HA-DA na základě procentuálního nárůstu hmotnosti vzorku. Z jejich výsledků vyplývá, že botnací schopnost HA-DA hydrogelů dosažená v předložené práci je již po 24 hod vyšší, než jaká byla dosažena uvedenými autory po 48 hod (a to téměř 3krát). Nižší botnací schopnost je přisuzována především nižší hustotě zesílení připravených hydrogelů. Zároveň také nižší botnací schopnost může pravděpodobně souviset s odlišnou syntézou HA-DA, kterou autoři Nejati et al. (2023) ve své práci použili.

ZÁVĚR

Jak už bylo zmíněno, hlavním záměrem této diplomové práce byla syntéza crosslinkeru (polydopaminu) pro přípravu hydrogelů na bázi thiolovaného hyaluronanu (HA-SH), ale také syntéza hyaluronanu konjugovaného dopaminem (HA-DA), jako dalšího způsobu využití dopaminu při vývoji inovativních materiálů pro biomedicínské aplikace. V experimentální části bylo připraveno celkem 17 vzorků polydopaminu (PAD) ve formě částic v závislosti na parametrech syntézy (např. směs rozpouštědel, jejich poměr a pH reakční směsi), z kterých byly následně vybrány dva reprezentativní vzorky představující PAD částice s nejlepší stabilitou a morfologií o užší (*PAD-14*) a širší distribuci (*PAD-10*). Tyto vybrané částice byly následně využity k síťování HA-SH za vzniku hydrogelu. Obecně byl PAD připraven autooxidační reakcí jeho monomeru dopaminu v alkalickém ($\text{pH} > 8$) ve směsi rozpouštědel EtOH/voda, popř. aceton (různé poměry), v případě vzorku *PAD-10*: EtOH/voda (1:2,25) a v případě *PAD-14*: EtOH/aceton/voda (1:1:8). PAD byl připraven také ve formě trubiček za použití ve vodě nerozpustného prekursoru kurkuminu, který byl ve vodě vysrážen do formy krystalků, na které se deponoval vznikající polydopamin. Kurkumin byl následně vymyt ethanolem, díky čemuž vznikly duté PAD trubičky. Kromě samotného polydopaminu byly také syntetizovány dva různé deriváty hyaluronanu (HA(Na)), a to konkrétně thiolovaný hyaluronan (HA-SH) a dopaminem konjugovaný hyaluronan (HA-DA). Oba deriváty byly připraveny aktivací karboxylové skupiny prostřednictvím karbodiimidu EDC. Na aktivovanou karboxylovou skupinu se následně navázal NHS za vzniku HA-NHS esteru. Připravený ester byl následně nahrazen CSA (při $\text{pH} 4,75$ v případě HA-SH) či dopaminem (při $\text{pH} 6,2$ v případě HA-DA) za vzniku thiolovaného hyaluronanu a dopaminem konjugovaného hyaluronanu. Thiolovaný hyaluronan byl připraven pomocí tzv. *jednokrokové* syntézy, která navazovala na experiment provedený v bakalářské práci, během které byla syntéza a redukce provedena v jednom reakčním kroku. Optimální ekvimolární poměr výchozích látek při přípravě HA-SH odpovídal takovému nastavení HA:EDC:NHS:CSA (1:2:4:4), u kterého byl v bakalářské práci zaznamenán nejvyšší stupeň substituce thiolových skupin (49 %). Ekvimolární poměr výchozích látek pro přípravu dopaminem konjugovaného hyaluronanu byl zvolen podle práce autorů Pandey et al. (2022), a to HA:EDC:NHS:DA (1:0,3:0,3:0,3). Reakční směs byla po celou dobu syntézy proplublována dusíkem, aby se předešlo nežádoucí autooxidaci dopaminu. Úspěšné navázání thiolovým a katecholovým skupin bylo potvrzeno pomocí NMR spektroskopie. Charakteristické píky odpovídající protonům volné thiolové skupiny byly detekovány

v oblasti chemického posunu 2,36 – 2,53 ppm a signál protonů disulfidové vazby byl pozorován v oblasti 2,92 – 2,98 ppm. Přítomnost katecholové skupiny byla ve spektru derivátu HA-DA stanovena na základě detekce píků v aromatické oblasti o chemickém posunu 6,7 – 7,3 ppm, která reflektuje aromatické protony dopaminu. Ve spektru byly dále pozorovány píky v alkalické oblasti odpovídající methylenovým protonům, kterými je dopamin připojen k řetězci HA(Na). Pomocí NMR spekter byl spočítán také stupeň substituce DS(%), a to integrací píků odpovídajících studovaným skupinám vztažených k referenčnímu píky signálů protonu N-acetylové skupiny na řetězci HA(Na). Nejvyšší dosažený stupeň thiolových skupin odpovídal hodnotě 23 %. V případě katecholových skupin bylo možné k výpočtu DS(%) použít integraci píků aromatických protonů (DS = 9 %) nebo methylenových protonů (DS = 29 %). Kromě NMR byla u připravených derivátů stanovena velikost polymerních klubek, i velikost PAD částic/tyčinek, a to pomocí metody dynamického rozptylu světla (DLS). Na základě dosažených výsledků bylo zjištěno, že po modifikaci hyaluronanu thiolovými skupinami došlo k nárůstu hydrodynamické průměru (R_h) hyaluronanu z hodnoty $R_H = 38,1 \pm 0,9$ nm (nativní HA(Na)) na hodnotu $R_H = 5,3 \pm 1,5$ nm (thiolovaný hyaluronan). Velikost HA-DA nebylo možné touto metodou stanovit, jelikož jeho hodnota se pohybovala za hranicí detekce přístroje ($> 1 \mu\text{m}$). Z měření velikosti částic bylo mimo jiné zjištěno, že připravené *PAD-10* částice vykazují širší distribuci velikosti částic oproti *PAD-14*. Střední velikost polydopaminových částic *PAD-10* odpovídaly hodnotě 627 ± 10 nm, zatímco v případě částic vzorku *PAD-14* hodnotě 693 ± 13 nm.

Z uvedených polymerů byly následně připraveny hydrogely o různé koncentraci polymeru (1 % (w/w), 2 % (w/w) a 3 % (w/w)). U hydrogelů na bázi *jednokrokové* HA-SH nebylo možné připravit 2% (w/w) hydrogely z důvodu nízkého DS(%) volných thiolových skupin. Nicméně, pokud byl polymerní řetězec HA-SH síťován pomocí PAD, bylo možné připravit dokonce i 2% (w/w) hydrogely (na bázi HA-SH-PAD). Hydrogely o koncentraci 1 % (w/w) bylo možné připravit pouze síťování konjugovaného derivátu HA-DA, pravděpodobně kvůli vysoké viskozitě, kterou roztoky HA-DA po rozpuštění vykazovaly. Navíc bylo zjištěno, že vzájemným smícháním obou připravených derivátů HA-SH a HA-DA docházelo mezi thiolovými a katecholovými skupinami ke vzniku příčné vazby, jejímž výsledkem byl zesíťovaný hydrogelový komplex HA-SH-PAD. Připravené hydrogely byly charakterizovány z hlediska reologických vlastností. Konkrétně byla studována doba gelace u HA-SH vzorků a vzorků síťovaných PDA, při které bylo zjištěno, že 2% (w/w) hydrogely

síťované PAD částice síťují rychleji než 3% (w/w) hydrogely, zároveň však hydrogely síťované PAD ve formě částic vykazovaly opačný trend. Dále výsledky naznačily, že 2% (w/w) hydrogely síťované částicemi s užší distribucí vykazují kratší dobu gelace (3 min) v porovnání s 2% (w/w) hydrogely s částicemi s širší distribucí velikosti (21 min). Hydrogely na bázi *jednokrokové* HA-SH síťují pomaleji (60 min), než hydrogely připravené *dvoukrokovou* syntézou HA-SH, která byla řešena v bakalářské práci. Všechny vzorky navíc zesíťovaly do 270 min (tj. 4,5h). Z pohledu tuhosti připravených hydrogelů se obecně nejvíce tuhé jeví hydrogely síťované s využitím PAD, které byly připraveny v poměru HA-SH:PAD (1:0,5). Konkrétně nejvyšší tuhost byla dosažena u vzorků HA-SH síťované PAD trubičkami (1020 Pa). Oproti hydrogelům na bázi HA-SH (82 Pa) byla jejich tuhost cca 12krát vyšší. U všech síťovaných hydrogelů pomocí PAD došlo k nárůstu tuhosti v závislosti na rostoucí koncentrací HA-SH asi 4krát, tj. ze 147 Pa (2%) na 616 Pa (3%) u hydrogelu s *PAD-10*; z 90 Pa (2%) na 361 Pa (3%) u hydrogelu s *PAD-14*; z 245 Pa (2%) a 1020 Pa (3%) u hydrogelu s *PAD-NT*. V rámci experimentu byl studován také vliv koncentrace PAD na tuhost připravených hydrogelů. Tyto výsledky prokázaly, že s rostoucí koncentrací PAD ve vzorcích roste tuhost hydrogelů, z čehož lze usoudit, že nebyl nalezen stupeň nasycení HA-SH matrice PAD částicemi, při kterém se již nemění tuhost připravených hydrogelů. Ovšem při tak velkém zastoupení částic v matrici může PDA plnit funkci pouze jakéhosi plniva, čímž lze vysvětlit stále narůstající tuhost hydrogelu. Mnohonásobně nižší tuhost pak vykazovaly hydrogely na bázi HA-DA (36 Pa), což může být způsobeno nízkým stupněm substituce katecholových skupin na řetězci HA(Na). Vzájemným smícháním derivátu HA-SH a HA-DA, došlo k mírnému nárůstu tuhosti hydrogelů na bázi HA-SH-HA-DA (až na 105 Pa), ovšem při obměně poměrů výchozích polymerů se tuhost hydrogelů příliš nezměnila (max. na 95 Pa při kombinaci 3% (w/w) HA-SH s 2% (w/w) HA-DA. Z pohledu aplikace hydrogelů metodou 3D tisku byla ověřena také reverzibilita reologického chování. Dobrou reverzibilitu vykazovaly hydrogely připravené z thiolovaného hyaluronanu HA-SH (z 64 Pa (1%) na 58 Pa (100%) a zpět na 68 Pa (1%)) a hydrogely připravené z hyaluronanu konjugovaného dopaminem HA-DA (ze 45 Pa (1%) na 40 Pa (100%) a zpět na 44 Pa (1%)). Nejnižší reverzibilitu vykazovaly hydrogely síťované PAD (ve formě částic i trubiček, a to pouze 84, resp. 91 %). Morfologie PAD částic a trubiček a také morfologie a porozita hydrogelů byla studována pomocí SEM. Na základě SEM snímků lze konstatovat, že byly připraveny kulovité PAD částice úzké distribucí velikosti a skutečně duté PAD trubičky o délce několik jednotek mikrometrů (5 – 10 μm). Z pohledu morfologie bylo pozorováno homogenní rozdělení PAD částic a tyčinek v HA-SH matrice, což potvrdilo tvrzení o PAD

jako tzv. crosslinkeru HA-SH. Všechny připravené hydrogely vykazovaly slušnou porozitu, ovšem ta nejvyšší porozita byla pozorována u hydrogelů na bázi HA-DA, v jejichž struktuře byly detekovány póry o velikosti ($> 100 \mu\text{m}$), což se z hlediska možné aplikace jako scaffoldy jeví jako nesporná výhoda. V neposlední řadě byla provedena charakterizace botnací schopnosti, tedy míra absorpce vody připravených hydrogelů. Nejvyšší byla zaznamenána u hydrogelů na bázi HA-DA ($99.163 \pm 0.035 \%$), což je pravděpodobně zapříčiněno velkými póry ve struktuře HA-DA hydrogelů. Naopak výrazně nižší botnací kapacitu vykazovaly hydrogely na bázi thiolovaného hyaluronanu a polydopaminu, ať už ve formě částic nebo trubiček ($97.85 \pm 0.07 \%$ (částice s širší distribucí); 97.306 ± 0.085 (částice s úzkou distribucí) a $97.732 \pm 0.094 \%$ (tyčinky)).

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SCHIRALDI, C., LA GATTA, A. and DE ROSA, M. Biotechnological production and application of hyaluronan. In *Biopolymers*, 2010, 20(10.5772), 10271.
- [2] VALACHOVÁ, K. and ŠOLTĚS, L. Hyaluronan as a Prominent Biomolecule with Numerous Applications in Medicine. In *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13), 7077.
- [3] KING, I. C. and SOROOSHIAN, P. Hyaluronan in skin wound healing: therapeutic applications. In *Journal of Wound Care*, 2020, 29(12), 782-787. doi 10.12968/jowc.2020.29.12.782.
- [4] FRENKEL, J. S. The role of hyaluronan in wound healing. In *International Wound Journal*, 2014, 11(2), 159-163. doi <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2012.01057.x>.
- [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, 5, 2841-2855. doi 10.1002/adhm.201600316.
- [6] PÉREZ, L. A., et al. Hyaluronic acid hydrogels crosslinked in physiological conditions: Synthesis and biomedical applications. In *Biomedicines*, 2021, 9. doi 10.3390/biomedicines9091113.
- [7] KAFEDJIISKI, K., et al. Synthesis and in vitro evaluation of thiolated hyaluronic acid for mucoadhesive drug delivery. In *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, 343(1-2), 48-58. doi 10.1016/j.ijpharm.2007.04.019.
- [8] BIAN, S., et al. The self-crosslinking smart hyaluronic acid hydrogels as injectable three-dimensional scaffolds for cells culture. In *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2016, 140, 392-402. doi 10.1016/j.colsurfb.2016.01.008.
- [9] CAO, W., et al. The preparation and biocompatible evaluation of injectable dual crosslinking hyaluronic acid hydrogels as cytoprotective agents. In *Journal of Materials Chemistry B*, 2019, 7(28), 4413-4423. doi 10.1039/c9tb00839j.
- [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. In *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2021, 32(3), 337-354. doi 10.1080/09205063.2020.1833816.
- [11] NEJATI, S. and MONGEAU, L. Injectable, pore-forming, self-healing, and adhesive hyaluronan hydrogels for soft tissue engineering applications. In *Scientific Reports*, 2023, 13(1), 14303. doi 10.1038/s41598-023-41468-9.
- [12] MELNIK, T., et al. Bioadhesive Hyaluronic Acid/Dopamine Hydrogels for Vascular Applications Prepared by Initiator-Free Crosslinking. In *Int J Mol Sci*, 2022, 23(5706). doi 10.3390/ijms23105706.
- [13] PANDEY, N., et al. Polydopamine nanoparticles and hyaluronic acid hydrogels for mussel-inspired tissue adhesive nanocomposites. In *Biomaterials Advances*, 2022, 134, 112589. doi 10.1016/j.msec.2021.112589.
- [14] LIU, Y., AI, K. and LU, L. Polydopamine and its derivative materials: synthesis and promising applications in energy, environmental, and biomedical fields. In *Chem Rev*, 2014, 114(9), 5057-5115. doi 10.1021/cr400407a.
- [15] LI, H., et al. Polydopamine-based nanomaterials and their potentials in advanced drug delivery and therapy. In *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2021, 199, 111502. doi 10.1016/j.colsurfb.2020.111502.
- [16] MOUSAVI, S. M., ZAREI, M. and HASHEMI, S. A. R. Polydopamine for Biomedical Application and Drug Delivery System. In *Medicinal Chemistry*, 2018, 08(08). doi 10.4172/2161-0444.1000516.

- [17] RONG, L., et al. Injectable nano-composite hydrogels based on hyaluronic acid-chitosan derivatives for simultaneous photothermal-chemo therapy of cancer with anti-inflammatory capacity. In *Carbohydrate Polymers*, 2023, 310, 120721. doi 10.1016/j.carbpol.2023.120721.
- [18] LI, Y., et al. Polydopamine-Reinforced Hemicellulose-Based Multifunctional Flexible Hydrogels for Human Movement Sensing and Self-Powered Transdermal Drug Delivery. In *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2023, 15(4), 5883-5896. doi 10.1021/acsami.2c19949.
- [19] SINGH, R., et al. Chapter 2 - Biopolymers and their classifications. In THOMAS, S., et al. eds. *Biopolymers and their Industrial Applications*. Elsevier, 2021, p. 21-44, ISBN 978-0-12-819240-5.
- [20] HERNÁNDEZ, N., WILLIAMS, R. C. and COCHRAN, E. W. The battle for the "green" polymer. Different approaches for biopolymer synthesis: Bioadvantaged vs. bioreplacement. In *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2014, 12(18), 2834-2849. doi 10.1039/c3ob42339e.
- [21] NIAOUNAKIS, M. *Biopolymers: Applications and Trends*. Edition ed.: Elsevier Science, 2015. ISBN 9780323354332.
- [22] GOUDOURI, O. M., BALASUBRAMANIAN, P. and BOCCACCINI, A. R. 6 - Characterizing the degradation behavior of bioceramic scaffolds. In TOMLINS, P. ed. *Characterisation and Design of Tissue Scaffolds*. Woodhead Publishing, 2016, p. 127-147, ISBN 978-1-78242-087-3.
- [23] MANGARAJ, S., et al. Application of Biodegradable Polymers in Food Packaging Industry: A Comprehensive Review. In *Journal of Packaging Technology and Research*, 2019, 3(1), 77-96. doi 10.1007/s41783-018-0049-y.
- [24] MAZUKI, N. F., et al. Basic Aspects and Properties of Biopolymers. In GOPI, S., et al. eds. *Biopolymers in Nutraceuticals and Functional Foods*. The Royal Society of Chemistry, 2022, p. 1-35, ISBN 978-1-83916-781-2.
- [25] BARANWAL, J. A.-O., et al. Biopolymer: A Sustainable Material for Food and Medical Applications. LID - 10.3390/polym14050983 [doi] LID - 983. In (2073-4360 (Electronic)).
- [26] ILIĆ-STOJANOVIĆ, S. Š., NIKOLIĆ, L. Ā. and ČAKIĆ, S. A Review of Patents and Innovative Biopolymer-Based Hydrogels. In *Gels*, 2023, 9(7), 556.
- [27] IBRAHIM, S., et al. Biopolymers From Crop Plants. In., 2019, ISBN 9780128035818.
- [28] MALATHI, A., SANTHOSH, K. and NIDONI, U. Recent trends of biodegradable polymer: biodegradable films for food packaging and application of nanotechnology in biodegradable food packaging. In *Current Trends in Technology and Science*, 2014, 3(2), 73-79.
- [29] LU, D., XIAO, C. and XU, S. Starch-Based Completely Biodegradable Polymer Materials. In *eXPRESS Polymer Letters*, 2009, 3, 366-375. doi 10.3144/expresspolymlett.2009.46.
- [30] CHENG, H., et al. Starch-based biodegradable packaging materials: A review of their preparation, characterization and diverse applications in the food industry. In *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 114, 70-82. doi <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.017>.
- [31] SWETHA, T. A., et al. A comprehensive review on polylactic acid (PLA) ŌĆō Synthesis, processing and application in food packaging. In *Int J Biol Macromol*, 2023, 234, 123715. doi <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123715>.
- [32] KLEIN, M. and POVERENOV, E. Natural biopolymer-based hydrogels for use in food and agriculture. In *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020, 100(6), 2337-2347. doi <https://doi.org/10.1002/jsfa.10274>.

- [33] LÓPEZ-VELÁZQUEZ, J. C., et al. Gelatin-chitosan-PVA hydrogels and their application in agriculture. In *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2019, 94(11), 3495-3504. doi <https://doi.org/10.1002/jctb.5961>.
- [34] KASHYAP, P. L., XIANG, X. and HEIDEN, P. Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. In *Int J Biol Macromol*, 2015, 77, 36-51. doi <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.039>.
- [35] ZHANG, M., et al. Application of Chitosan and Its Derivative Polymers in Clinical Medicine and Agriculture. *Polymers* [Type of Work]. 2022, vol. 14, no. 5. ISSN 2073-4360.
- [36] VEEMAN, D., et al. Additive Manufacturing of Biopolymers for Tissue Engineering and Regenerative Medicine: An Overview, Potential Applications, Advancements, and Trends. In *International Journal of Polymer Science*, 2021, 2021, 4907027. doi 10.1155/2021/4907027.
- [37] DEB, P. K., et al. Chapter 6 - Pharmaceutical and Biomedical Applications of Polymers. In TEKADE, R.K. ed. *Basic Fundamentals of Drug Delivery*. Academic Press, 2019, p. 203-267, ISBN 978-0-12-817909-3.
- [38] LUO, Z., et al. Downregulation of CD147 by chitooligosaccharide inhibits MMP-2 expression and suppresses the metastatic potential of human gastric cancer. In *Oncol Lett*, 2014, 8(1), 361-366. doi 10.3892/ol.2014.2115.
- [39] HE, Q., et al. Positive charge of chitosan retards blood coagulation on chitosan films. In *Journal of Biomaterials Applications*, 2011, 27(8), 1032-1045. doi 10.1177/0885328211432487.
- [40] SHEKHETER, A. B., et al. Medical Applications of Collagen and Collagen-Based Materials. In *Current Medicinal Chemistry*, 2019, 26(3), 506-516. doi 10.2174/0929867325666171205170339.
- [41] ZHU, J., et al. Advanced application of collagen-based biomaterials in tissue repair and restoration. In *Journal of Leather Science and Engineering*, 2022, 4(1), 30. doi 10.1186/s42825-022-00102-6.
- [42] MONDAL, D., GRIFFITH, M. and VENKATRAMAN, S. S. Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: Current scenario and challenges. In *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 2016, 65(5), 255-265. doi 10.1080/00914037.2015.1103241.
- [43] ADHIKARI, U., et al. Embedding magnesium metallic particles in polycaprolactone nanofiber mesh improves applicability for biomedical applications. In *Acta Biomater*, 2019, 98, 215-234. doi 10.1016/j.actbio.2019.04.061.
- [44] MORADIPOUR, P., et al. Core-Shell Nanofibers Based on Polycaprolactone/Polyvinyl Alcohol and Polycaprolactone/Collagen for Biomedical Applications. In *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 2022, 17(3), 911-920. doi 10.1007/s12247-021-09568-z.
- [45] VIEIRA DE SOUZA, T., MALMONGE, S. M. and SANTOS, A. R., JR. Development of a chitosan and hyaluronic acid hydrogel with potential for bioprinting utilization: A preliminary study. In *J Biomater Appl*, 2021, 36(2), 358-371. doi 10.1177/08853282211024164.
- [46] GADOMSKA, M., MUSIAL, K. and SIONKOWSKA, A. New materials based on hyaluronic acid and egg albumin mixture. In *Engineering of Biomaterials*, 2021, (160), 15-21. doi 10.34821/eng.biomat.160.2021.15-21.
- [47] YEGAPPAN, R., et al. Nano polydopamine crosslinked thiol-functionalized hyaluronic acid hydrogel for angiogenic drug delivery. In *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019, 177, 41-49. doi 10.1016/j.colsurfb.2019.01.035.
- [48] MEYER, K. and PALMER, J. W. THE POLYSACCHARIDE OF THE VITREOUS HUMOR. In *Journal of Biological Chemistry*, 1934, 107(3), 629-634. doi 10.1016/S0021-9258(18)75338-6.

- [49] SELYANIN, M. A., et al. *Hyaluronic acid*. Edition ed.: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. ISBN 1118633792.
- [50] HASCALL, V., C., LAURENT, T., C. *Hyaluronan: Structure and Physical Properties*. In 1997. Available from: <<http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>>. [cited 3. 1. 2022]
- [51] DAŇKOVÁ, V. *Příprava a modifikace derivátu kyseliny hyaluronové thioly*. MUSILOVÁ, L. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2022.
- [52] MENAA, F. Hyaluronic Acid and Derivatives for Tissue Engineering. In *Journal of Biotechnology & Biomaterials*, 2013, s3. doi 10.4172/2155-952X.S3-001.
- [53] NECAS, J., et al. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. In *Veterinarni medicina*, 2008, 53(8), 397-411.
- [54] LAURENT, T. C. and FRASER, J. R. E. Hyaluronan1. In *The FASEB Journal*, 1992, 6(7), 2397-2404. doi <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.7.1563592>.
- [55] LAPČÍK, L., et al. Hyaluronan: Preparation, structure, properties, and applications. In *Chem Rev*, 1998, 98(8). doi 10.1021/cr941199z.
- [56] SNETKOV, P. A.-O., et al. Hyaluronic Acid: The Influence of Molecular Weight on Structural, Physical, Physico-Chemical, and Degradable Properties of Biopolymer. In *Polymers (Basel)*, 2020, 12(8), 1-33. doi 10.3390/polym12081800.
- [57] HEATLEY, F. and SCOTT, J. E. A water molecule participates in the secondary structure of hyaluronan. In *Biochemical Journal*, 1988, 254(2), 489-493. doi 10.1042/bj2540489.
- [58] SCOTT, J. E. and HEATLEY, F. Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: A ¹³C NMR study. In *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96(9), 4850-4855. doi doi:10.1073/pnas.96.9.4850.
- [59] BROWN, M. B. and JONES, S. A. 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, 19, 308-318. doi 10.1111/j.1468-3083.2004.01180.x.
- [60] ATKINS, E. D. T. and SHEEHAN, J. K. Hyaluronates: Relation between Molecular Conformations. In *Science*, 1973, 179(4073), 562-564. doi 10.1126/science.179.4073.562.
- [61] SHEEHAN, J. K. and ATKINS, E. D. T. X-ray fibre diffraction study of conformational changes in hyaluronate induced in the presence of sodium, potassium and calcium cations. In *Int J Biol Macromol*, 1983, 5(4), 215-221. doi [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(83\)90005-3](https://doi.org/10.1016/0141-8130(83)90005-3).
- [62] SHEEHAN, J. and ALMOND, A. Hyaluronan: static, hydrodynamic and molecular dynamic views. In *Glycoforum*, 2001, 5, A8.
- [63] GARG, H. G. and HALES, C. A. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*. Edition ed.: Elsevier Science, 2004. ISBN 9780080472225.
- [64] TAYLOR, G. I. Dispersion of soluble matter in solvent flowing slowly through a tube. In *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, 1953, 219(1137), 186-203. doi doi:10.1098/rspa.1953.0139.
- [65] ALMOND, A., BRASS A FAU - SHEEHAN, J. K. and SHEEHAN, J. K. Deducing polymeric structure from aqueous molecular dynamics simulations of oligosaccharides: predictions from simulations of hyaluronan tetrasaccharides compared with hydrodynamic and X-ray fibre diffraction data. In (0022-2836 (Print)).
- [66] WYATT, N. B., GUNTHER, C. M. and LIBERATORE, M. W. Increasing viscosity in entangled polyelectrolyte solutions by the addition of salt. In *Polymer*, 2011, 52(11), 2437-2444. doi <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2011.03.053>.
- [67] FALLACARA, A., et al. Hyaluronic acid in the third millennium. In *Polymers*. MDPI AG, 2018, vol. 10.

- [68] FRASER, J. R. E., LAURENT, T. C. and LAURENT, U. B. G. Hyaluronan: Its nature, distribution, functions and turnover. In *Journal of Internal Medicine*. Blackwell Publishing Ltd, 1997, vol. 242, p. 27-33.
- [69] VOLPI, N., et al. Role, Metabolism, Chemical Modifications and Applications of Hyaluronan. 2009. <<http://www.glycoforum.gr.jp/>>.
- [70] BOERIU, C. G., et al. Production Methods for Hyaluronan. In *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2013, 2013, 1-14. doi 10.1155/2013/624967.
- [71] GUNASEKARAN, V., D, G. and V, P. Role of membrane proteins in bacterial synthesis of hyaluronic acid and their potential in industrial production. In *Int J Biol Macromol*, 2020, 164, 1916-1926. doi <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.077>.
- [72] 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, 85, 469-489. doi 10.1016/j.carbpol.2011.03.019.
- [73] FERGUSON, E. L., et al. Evaluation of the physical and biological properties of hyaluronan and hyaluronan fragments. In *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, 420(1), 84-92. doi <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.08.031>.
- [74] SCHIRALDI, C., LA GATTA, A. and DE ROSA, M. Biotechnological Production and Application of Hyaluronan. In., 2010, vol. 20, ISBN 978-953-307-109-1.
- [75] CUI, X., et al. Evaluation of angiogenic activities of hyaluronan oligosaccharides of defined minimum size. In *Life Sciences*, 2009, 85(15), 573-577. doi <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.08.010>.
- [76] COWMAN, M. K., et al. Viscoelastic Properties of Hyaluronan in Physiological Conditions. In (2046-1402 (Print)).
- [77] BOTHNER, H. and WIK, O. Rheology of Hyaluronate. In *Acta Oto-Laryngologica*, 1987, 104(sup442), 25-30. doi 10.3109/00016488709102834.
- [78] GONZALEZ RICO, J., et al. The role of versican in the skin ECM and its interaction with hyaluronic acid. In *Biomecánica*, 2019, 27(1). doi 10.5821/sibb.27.1.9279.
- [79] TOOLE, B. P. Hyaluronan: From extracellular glue to pericellular cue. In *Nature Reviews Cancer*, 2004, 4, 528-539. doi 10.1038/nrc1391.
- [80] HINTZE, V., SCHNABELRAUCH, M. and ROTHER, S. Chemical Modification of Hyaluronan and Their Biomedical Applications. In *Frontiers in Chemistry*, 2022, 10. doi 10.3389/fchem.2022.830671.
- [81] MARDINI, S., et al. *Deacetylated Hyaluronan : Exploration of deacetylation techniques for hyaluronan (oligo and polysaccharides)*. MORSSING VILÉN, E. AND SALAZAR ALVAREZ, G. Student thesis. 2023.
- [82] MLČOCHOVÁ, P., et al. Preparation and characterization of biodegradable alkylether derivatives of hyaluronan. In *Carbohydrate Polymers*, 2007, 69(2), 344-352. doi <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.10.015>.
- [83] SEIDLITS, S. K., et al. The effects of hyaluronic acid hydrogels with tunable mechanical properties on neural progenitor cell differentiation. In *Biomaterials*, 2010, 31(14), 3930-3940. doi <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.125>.
- [84] SCHNABELRAUCH, M., et al. Chemically modified glycosaminoglycan derivatives as building blocks for biomaterial coatings and hydrogels. In 2021, 402(11), 1385-1395. doi doi:10.1515/hsz-2021-0171.
- [85] PANDIT, A. H., MAZUMDAR, N. and AHMAD, S. Periodate oxidized hyaluronic acid-based hydrogel scaffolds for tissue engineering applications. In *Biological Macromolecules*, 2019, 137(1879-0003 (Electronic)), 853-869. doi 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.014.

- [86] LI, L., et al. Biodegradable and injectable in situ cross-linking chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for postoperative adhesion prevention. In *Biomaterials*, 2014, 35(12), 3903-3917. doi 10.1016/j.biomaterials.2014.01.050.
- [87] CAMPOCCIA, D., et al. Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. In *Biomaterials*, 1998, 19(23), 2101-2127. doi [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00042-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00042-8).
- [88] PRESTWICH, G. D. Biomaterials from chemically-modified hyaluronan. In *Glycoforum*, 2001, 5, A4.
- [89] HIRANO, K., et al. Preparation of the methyl ester of hyaluronan and its enzymatic degradation. In *Carbohydrate research*, 2005, 340(14), 2297-2304. doi 10.1016/j.carres.2005.07.016.
- [90] HUERTA-ANGELES, G., et al. Novel synthetic method for the preparation of amphiphilic hyaluronan by means of aliphatic aromatic anhydrides. In *Carbohydrate Polymers*, 2014, 111, 883-891. doi <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.035>.
- [91] NAKAJIMA, N. and IKADA, Y. Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media. 1995.
- [92] BULPITT, P. and AESCHLIMANN, D. New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: Preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels. 1999.
- [93] D'ESTE, M., EGLIN, D. and ALINI, M. A systematic analysis of DMTMM vs EDC/NHS for ligation of amines to Hyaluronan in water. In *Carbohydrate Polymers*, 2014, 108(1), 239-246. doi 10.1016/j.carbpol.2014.02.070.
- [94] SHU, X. Z., et al. Disulfide Cross-Linked Hyaluronan Hydrogels. In *Biomacromolecules*, 2002, 3(6), 1304-1311. doi 10.1021/bm025603c.
- [95] LEICHNER, C., JELKMANN, M. and BERNKOP-SCHNURCH, A. Thiolated polymers: Bioinspired polymers utilizing one of the most important bridging structures in nature. In *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, 151-152, 191-221. doi 10.1016/j.addr.2019.04.007.
- [96] SERBAN, M. A., YANG, G. and PRESTWICH, G. D. Synthesis, characterization and chondroprotective properties of a hyaluronan thioethyl ether derivative. In *Biomaterials*, 2008, 29(10), 1388-1399. doi 10.1016/j.biomaterials.2007.12.006.
- [97] AGRAHARI, V., et al. Stimuli-sensitive thiolated hyaluronic acid based nanofibers: Synthesis, preclinical safety and in vitro anti-HIV activity. In *Nanomedicine*, 2016, 11(22), 2935-2958. doi 10.2217/nmm-2016-0103.
- [98] LIU, Y., ZHENG SHU, X. and PRESTWICH, G. D. Biocompatibility and stability of disulfide-crosslinked hyaluronan films. In *Biomaterials*, 2005, 26(23), 4737-4746. doi <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.01.003>.
- [99] 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. In *Biomacromolecules*, 2019, 20(3), 1412-1420. doi 10.1021/acs.biomac.8b01830.
- [100] SHAIKH, R., et al. Mucoadhesive drug delivery systems. In *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 2011, 3(1), 89-100. doi 10.4103/0975-7406.76478.
- [101] GAJENDIRAN, M., RHEE, J.-S. and KIM, K. Recent developments in thiolated polymeric hydrogels for tissue engineering applications. In *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 2018, 24(1), 66-74.
- [102] GRIESSER, J., HETÉNYI, G. and BERNKOP-SCHNÖRCH, A. Thiolated Hyaluronic Acid as Versatile Mucoadhesive Polymer: From the Chemistry Behind to Product Developments - What Are the Capabilities? In *Polymers*, 2018, 10(3), 243. doi 10.3390/polym10030243.

- [103] LAFFLEUR, F., WAGNER, J. and BARTHELMES, J. A potential tailor-made hyaluronic acid buccal delivery system comprising rotigotine for Parkinson's disease? In *Future Medicinal Chemistry*, 2015, 7(10), 1225-1232. doi 10.4155/fmc.15.66.
- [104] NOWAK, J., LAFFLEUR, F. and BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Preactivated hyaluronic acid: A potential mucoadhesive polymer for vaginal delivery. In *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, 478(1), 383-389. doi <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.11.048>.
- [105] PEREIRA DE SOUSA, I., et al. Totally S-protected hyaluronic acid: Evaluation of stability and mucoadhesive properties as liquid dosage form. In *Carbohydrate Polymers*, 2016, 152, 632-638. doi <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.051>.
- [106] ASIM, M. H., et al. S-protected thiolated hyaluronic acid: In-situ crosslinking hydrogels for 3D cell culture scaffold. In *Carbohydr Polym*, 2020, 237, 116092. doi 10.1016/j.carbpol.2020.116092.
- [107] PEDROSA, S. S., et al. Biocompatibility of a Self-Assembled Crosslinkable Hyaluronic Acid Nanogel. In *Macromolecular Bioscience*, 2016, 16(11), 1610-1620. doi <https://doi.org/10.1002/mabi.201600221>.
- [108] NOREEN, S. and BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Thiolated Poly- and Oligosaccharide-Based Hydrogels for Tissue Engineering and Wound Healing. In *Advanced Functional Materials*, 2023, 34(4). doi 10.1002/adfm.202310129.
- [109] HONG, B. M., et al. Self-crosslinkable hyaluronate-based hydrogels as a soft tissue filler. In *International Journal Biological Macromolecules*, 2021, 185, 98-110. doi 10.1016/j.ijbiomac.2021.06.047.
- [110] ZHOU, D., et al. Dopamine-Modified Hyaluronic Acid Hydrogel Adhesives with Fast-Forming and High Tissue Adhesion. In *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(16), 18225-18234. doi 10.1021/acsami.9b22120.
- [111] WOO, H.-D., et al. Injectable photoreactive azidophenyl hyaluronic acid hydrogels for tissue augmentation. In *Macromolecular Research*, 2014, 22(5), 494-499. doi 10.1007/s13233-014-2069-y.
- [112] CHANDRASEKHARAN, A., et al. In situ photocrosslinkable hyaluronic acid-based surgical glue with tunable mechanical properties and high adhesive strength. In *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2018, 57(4), 522-530. doi 10.1002/pola.29290.
- [113] CHEN, L. X., et al. Investigation of surgical adhesives for vocal fold wound closure. In *Laryngoscope*, 2019, 129(9), 2139-2146. doi 10.1002/lary.27769.
- [114] ZHANG, K., et al. Efficient catechol functionalization of biopolymeric hydrogels for effective multiscale bioadhesion. In *Materials Science and Engineering: C*, 2019, 103, 109835. doi <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109835>.
- [115] SHIN, J., et al. Tissue Adhesive Catechol-Modified Hyaluronic Acid Hydrogel for Effective, Minimally Invasive Cell Therapy. In *Advanced Functional Materials*, 2015, 25(25), 3814-3824. doi 10.1002/adfm.201500006.
- [116] ORYAN, A., et al. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds. In *Int J Biol Macromol*, 2018, 107(Pt A), 678-688. doi 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.184.
- [117] TOLINSKI, M. Chapter 15 - Crosslinking. In TOLINSKI, M. ed. *Additives for Polyolefins*. Oxford: William Andrew Publishing, 2009, p. 215-220, ISBN 978-0-8155-2051-1.
- [118] BELSOM, A. and RAPPSILBER, J. Anatomy of a crosslinker. In *Current Opinion in Chemical Biology*, 2021, 60, 39-46. doi <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.07.008>.
- [119] *Crosslinking Reagents - Technical Handbook*. edited by SCIENTIFIC, T.F. Edition ed. USA, 2006.

- [120] DOUSTDAR, F., OLAD, A. and GHORBANI, M. Effect of glutaraldehyde and calcium chloride as different crosslinking agents on the characteristics of chitosan/cellulose nanocrystals scaffold. In *Int J Biol Macromol*, 2022, 208, 912-924. doi <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.193>.
- [121] *Chemistry of Crosslinking*. In (c)2024. Available from: <<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemistry-crosslinking.html>>. [cited 24. 04. 2024]
- [122] VÝBORNÝ, K., et al. Genipin and EDC crosslinking of extracellular matrix hydrogel derived from human umbilical cord for neural tissue repair. In *Scientific Reports*, 2019, 9(1), 10674. doi 10.1038/s41598-019-47059-x.
- [123] NAIR, M., et al. Tunable bioactivity and mechanics of collagen-based tissue engineering constructs: A comparison of EDC-NHS, genipin and TG2 crosslinkers. In *Biomaterials*, 2020, 254. doi 10.1016/j.biomaterials.2020.120109.
- [124] GONG, H., et al. Preparation of food-grade EDC/NHS-crosslinked gelatin nanoparticles and their application for Pickering emulsion stabilization. In *Food Chemistry*, 2024, 436, 137700. doi <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137700>.
- [125] CAI, S., et al. The versatile applications of polydopamine in regenerative medicine: Progress and challenges. In *Smart Materials in Medicine*, 2023, 4, 294-312. doi 10.1016/j.smaim.2022.11.005.
- [126] MARSDEN, C. A. Dopamine: the rewarding years. In *Br J Pharmacol*, 2006, 147 Suppl 1(Suppl 1), S136-144. doi 10.1038/sj.bjp.0706473.
- [127] IVERSEN, S. D. and IVERSEN, L. L. Dopamine: 50 years in perspective. In *Trends Neurosciences*, 2007, 30(5), 188-193. doi 10.1016/j.tins.2007.03.002.
- [128] VALLONE, D., PICETTI, R. and BORRELLI, E. Structure and function of dopamine receptors. In *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2000, 24(1), 125-132. doi [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(99\)00063-9](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(99)00063-9).
- [129] SMITH, C. U. M. *Elements of Molecular Neurobiology*. Edition ed.: Wiley, 2003. ISBN 9780470857175.
- [130] HABIBI, M. Dopamine Receptors. In *Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology*. Elsevier, 2017, ISBN 978-0-12-809324-5.
- [131] CHENG, W., et al. Versatile Polydopamine Platforms: Synthesis and Promising Applications for Surface Modification and Advanced Nanomedicine. In *ACS Nano*, 2019, 13(8), 8537-8565. doi 10.1021/acsnano.9b04436.
- [132] HO, C. C. and DING, S. J. Structure, properties and applications of mussel-inspired polydopamine. In *J Biomed Nanotechnol*, 2014, 10(10), 3063-3084. doi 10.1166/jbn.2014.1888.
- [133] LEE, H. A., PARK, E. and LEE, H. Polydopamine and Its Derivative Surface Chemistry in Material Science: A Focused Review for Studies at KAIST. In *Adv Mater*, 2020, 32(35), e1907505. doi 10.1002/adma.201907505.
- [134] AI, K., et al. Sp² C-dominant N-doped carbon sub-micrometer spheres with a tunable size: a versatile platform for highly efficient oxygen-reduction catalysts. In *Adv Mater*, 2013, 25(7), 998-1003. doi 10.1002/adma.201203923.
- [135] JIAN, N., et al. Preparation of polydopamine nanofibers mat as a recyclable and efficient adsorbent for simultaneous adsorption of multiple tetracyclines in water. In *Journal of Cleaner Production*, 2021, 320, 128875. doi 10.1016/j.jclepro.2021.128875.
- [136] XUE, J., et al. Scalable Fabrication of Polydopamine Nanotubes Based on Curcumin Crystals. In *ACS Biomater Sci Eng*, 2016, 2(4), 489-493. doi 10.1021/acsbomaterials.6b00102.

- [137] HE, X., et al. A trace amount of MXene@PDA nanosheets for low-temperature zinc phosphating coatings with superb corrosion resistance. In *Applied Surface Science*, 2022, 603, 154455. doi 10.1016/j.apsusc.2022.154455.
- [138] SZEWCZYK, J., et al. In-situ thickness control of centimetre-scale 2D-Like polydopamine films with large scalability. In *Materials Today Chemistry*, 2022, 24, 100935. doi 10.1016/j.mtchem.2022.100935.
- [139] TRAN, H. Q., et al. Synthesis of Polydopamine Hollow Capsules via a Polydopamine Mediated Silica Water Dissolution Process and Its Application for Enzyme Encapsulation. In *Front Chem*, 2019, 7, 468. doi 10.3389/fchem.2019.00468.
- [140] CUI, J., et al. Immobilization and intracellular delivery of an anticancer drug using mussel-inspired polydopamine capsules. In *Biomacromolecules*, 2012, 13(8), 2225-2228. doi 10.1021/bm300835r.
- [141] ZHAO, Y., et al. Skin-Inspired Antibacterial Conductive Hydrogels for Epidermal Sensors and Diabetic Foot Wound Dressings. In *Advanced Functional Materials*, 2019, 29(31). doi 10.1002/adfm.201901474.
- [142] LEE, H. A., et al. Material-Independent Surface Chemistry beyond Polydopamine Coating. In *Acc Chem Res*, 2019, 52(3), 704-713. doi 10.1021/acs.accounts.8b00583.
- [143] HAN, L., et al. Polydopamine Nanoparticles Modulating Stimuli-Responsive PNIPAM Hydrogels with Cell/Tissue Adhesiveness. In *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(42), 29088-29100. doi 10.1021/acsami.6b11043.
- [144] LI, H., et al. Mechanical properties of polydopamine (PDA) thin films. In *MRS Advances*, 2019, 4(7), 405-412. doi 10.1557/adv.2019.52.
- [145] WEI, C., et al. Construction of Surface-Modified Polydopamine Nanoparticles for Sequential Drug Release and Combined Chemo-Photothermal Cancer Therapy. In *Mol Pharm*, 2021, 18(3), 1327-1343. doi 10.1021/acs.molpharmaceut.0c01164.
- [146] LIU, X., et al. Mussel-inspired polydopamine: a biocompatible and ultrastable coating for nanoparticles in vivo. In *ACS Nano*, 2013, 7(10), 9384-9395. doi 10.1021/nn404117.
- [147] LI, C., LIU, Z. and YAO, P. Gold nanoparticles coated with a polydopamine layer and dextran brush surface for diagnosis and highly efficient photothermal therapy of tumors. In *RSC Adv*, 2016, 6(39), 33083-33091. doi 10.1039/c6ra02684b.
- [148] PI, W., et al. Polydopamine-coated polycaprolactone/carbon nanotube fibrous scaffolds loaded with brain-derived neurotrophic factor for peripheral nerve regeneration. In *Biofabrication*, 2022, 14(3). doi 10.1088/1758-5090/ac57a6.
- [149] XU, Z., et al. Nanofiber-mediated sequential photothermal antibacteria and macrophage polarization for healing MRSA-infected diabetic wounds. In *J Nanobiotechnology*, 2021, 19(1), 404. doi 10.1186/s12951-021-01152-4.
- [150] SALAZAR, P., MARTÍN, M. and GONZÁLEZ-MORA, J. Polydopamine-modified surfaces in biosensor applications. In MÉNDEZ-VILAS, A. AND SOLANO, A. eds. *Polymer science: research advances, practical applications and educational aspects*. FORMATEX RESEARCH CENTER, 2016, p. 385-396.
- [151] FEDORENKO, V., et al. Application of Polydopamine Functionalized Zinc Oxide for Glucose Biosensor Design. In *Polymers*, 2021, 13(17). doi 10.3390/polym13172918.
- [152] LU, J., et al. Polydopamine Nanotubes Decorated with Ag Nanoparticles as Catalyst for the Reduction of Methylene Blue. In *ACS Applied Nano Materials*, 2019, 3(1), 156-164. doi 10.1021/acsanm.9b01861.
- [153] BENJAMIN OCHEJA, O., et al. Polydopamine-immobilized yeast cells for portable electrochemical biosensors applied in environmental copper sensing. In *Bioelectrochemistry*, 2024, 157, 108658. doi 10.1016/j.bioelechem.2024.108658.

- [154] CHAMKOURI, H. A Review of Hydrogels, Their Properties and Applications in Medicine. In *American Journal of Biomedical Science & Research*, 2021, 11(6), 485-493. doi 10.34297/ajbsr.2021.11.001682.
- [155] SANCHEZ-CID, P., et al. Novel Trends in Hydrogel Development for Biomedical Applications: A Review. In *Polymers (Basel)*, 2022, 14(15). doi 10.3390/polym14153023.
- [156] LIMA, C. S. A., et al. An Updated Review of Macro, Micro, and Nanostructured Hydrogels for Biomedical and Pharmaceutical Applications. In *Pharmaceutics*, 2020, 12(10). doi 10.3390/pharmaceutics12100970.
- [157] MAHINROOSTA, M., et al. Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications. In *Materials Today Chemistry*. Elsevier Ltd, 2018, vol. 8, p. 42-55.
- [158] LI, J., JIA, X. and YIN, L. Hydrogel: Diversity of Structures and Applications in Food Science. In *Food Reviews International*, 2021, 37(3), 313-372. doi 10.1080/87559129.2020.1858313.
- [159] TANG, S., et al. Physical hydrogels based on natural polymers. In 2020, 51-89. doi 10.1016/b978-0-12-816421-1.00003-3.
- [160] CHEN, Y., et al. Preparation of the chitosan/poly(glutamic acid)/alginate polyelectrolyte complexing hydrogel and study on its drug releasing property. In *Carbohydrate Polymers*, 2018, 191, 8-16. doi <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.065>.
- [161] QURESHI, D., et al. Introduction of biopolymers: Food and biomedical applications. In *Biopolymer-Based Formulations: Biomedical and Food Applications*. Elsevier, 2020, p. 1-45.
- [162] ULLAH, A. and LIM, S. I. Bioinspired tunable hydrogels: An update on methods of preparation, classification, and biomedical and therapeutic applications. In *Int J Pharm*, 2022, 612, 121368. doi 10.1016/j.ijpharm.2021.121368.
- [163] GHORPADE, V. S. Chapter 4 - Preparation of hydrogels based on natural polymers via chemical reaction and cross-Linking. In CHEN, Y. ed. *Hydrogels Based on Natural Polymers*. Elsevier, 2020, p. 91-118, ISBN 978-0-12-816421-1.
- [164] TROMBINO, S., et al. Strategies for hyaluronic acid-based hydrogel design in drug delivery. In *Pharmaceutics*. MDPI AG, 2019, vol. 11.
- [165] LEE, J. G., et al. Radiation-Based Crosslinking Technique for Enhanced Thermal and Mechanical Properties of HDPE/EVA/PU Blends. In *Polymers (Basel)*, 2021, 13(16). doi 10.3390/polym13162832.
- [166] WAN ISHAK, W. H., et al. Drug delivery and in vitro biocompatibility studies of gelatin-nanocellulose smart hydrogels cross-linked with gamma radiation. In *Journal of Materials Research and Technology*, 2021, 15, 7145-7157. doi 10.1016/j.jmrt.2021.11.095.
- [167] ABD ALLA, S. G., SEN, M. and EL-NAGGAR, A. W. Swelling and mechanical properties of superabsorbent hydrogels based on Tara gum/acrylic acid synthesized by gamma radiation. In *Carbohydr Polym*, 2012, 89(2), 478-485. doi 10.1016/j.carbpol.2012.03.031.
- [168] XU, J., LIU, Y. and HSU, S. H. Hydrogels Based on Schiff Base Linkages for Biomedical Applications. In *Molecules*, 2019, 24(16). doi 10.3390/molecules24163005.
- [169] REDAELLI, F., SORBONA, M. and ROSSI, F. 10 - Synthesis and processing of hydrogels for medical applications. In PERALE, G. AND HILBORN, J. eds. *Bioresorbable Polymers for Biomedical Applications*. Woodhead Publishing, 2017, p. 205-228, ISBN 978-0-08-100262-9.
- [170] WANG, W., et al. An injectable hydrogel based on hyaluronic acid prepared by Schiff base for long-term controlled drug release. In *Int J Biol Macromol*, 2023, 245, 125341. doi <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125341>.

- [171] SUMMONTE, S., et al. Thiolated polymeric hydrogels for biomedical application: Cross-linking mechanisms. In *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V., 2021, vol. 330, p. 470-482.
- [172] YU, Q. H., et al. Mussel-Inspired Adhesive Polydopamine-Functionalized Hyaluronic Acid Hydrogel with Potential Bacterial Inhibition. In *Glob Challenges*, 2020, 4(2), 1900068. doi 10.1002/gch2.201900068.
- [173] JIN, R., et al. Synthesis and characterization of hyaluronic acid-poly(ethylene glycol) hydrogels via Michael addition: An injectable biomaterial for cartilage repair. In *Acta Biomater*, 2010, 6(6), 1968-1977. doi 10.1016/j.actbio.2009.12.024.
- [174] YANG, J., COHEN STUART, M. A. and KAMPERMAN, M. Jack of all trades: versatile catechol crosslinking mechanisms. In *Chemical Society Reviews*, 2014, 43(24), 8271-8298. doi 10.1039/C4CS00185K.
- [175] PARK, H.-J., et al. Catechol-Functionalized Hyaluronic Acid Hydrogels Enhance Angiogenesis and Osteogenesis of Human Adipose-Derived Stem Cells in Critical Tissue Defects. In *Biomacromolecules*, 2016, 17(6), 1939-1948. doi 10.1021/acs.biomac.5b01670.
- [176] SI, H., et al. 3D Bioprinting of the Sustained Drug Release Wound Dressing with Double-Crosslinked Hyaluronic-Acid-Based Hydrogels. In *Polymers (Basel)*, 2019, 11(10). doi 10.3390/polym11101584.
- [177] GAO, X., et al. Enhanced wound healing in diabetic mice by hyaluronan/chitosan multilayer-coated PLLA nanofibrous mats with sustained release of insulin. In *Applied Surface Science*, 2022, 576, 151825. doi 10.1016/j.apsusc.2021.151825.
- [178] KWOKDINATA, C., et al. Encapsulation of Human Spinal Cord Progenitor Cells in Hyaluronan-Gelatin Hydrogel for Spinal Cord Injury Treatment. In *ACS Appl Mater Interfaces*, 2023. doi 10.1021/acsami.3c07419.
- [179] CUI, L., et al. Injectable and Degradable POSS-Polyphosphate-Polysaccharide Hybrid Hydrogel Scaffold for Cartilage Regeneration. In *ACS Appl Mater Interfaces*, 2023, 15(17), 20625-20637. doi 10.1021/acsami.2c22947.
- [180] DRAČÍNSKÝ, M. *NMR spektroskopie pro chemiky*. edited by BELLOŇ, T. Edition ed. Praha: Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, 2021. ISBN 978-80-7444-085-4.
- [181] HOLZGRABE, U., WAWER, I. and DIEHL, B. NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis. In.: Elsevier.
- [182] PYKETT, I. L., et al. Principles of nuclear magnetic resonance imaging. In *Radiology*, 1982, 143(1), 157-168. doi 10.1148/radiology.143.1.7038763.
- [183] ATKINS, P. W. and DE PAULA, J. *Fyzikální chemie*. Edition ed. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2013. 944 p. ISBN 9788070808306.
- [184] DIEHL, B. Chapter 1 - Principles in NMR Spectroscopy. In HOLZGRABE, U., et al. eds. *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*. Amsterdam: Elsevier, 2008, p. 1-41, ISBN 978-0-444-53173-5.
- [185] ANTCLIFFE, D. and GORDON, A. C. Metabonomics and intensive care. In *Crit Care*, 2016, 20, 68. doi 10.1186/s13054-016-1222-8.
- [186] STETEFELD, J., MCKENNA, S. A. and PATEL, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. In *Biophysics reviews*, 2016, 8, 409-427. doi 10.1007/s12551-016-0218-6.
- [187] ARZNŠEK, D., PODGORNIK, R. and KUZMAN, D. *Dynamic light scattering and application to protein solutions*. University of Ljubljana, 2010.
- [188] ŠEVČÍKOVÁ, P., et al. Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů In *Chemické Listy*, 2014, 108, 479-482.
- [189] MISONO, T. Dynamic Light Scattering (DLS). In ABE, M. ed. *Measurement Techniques and Practices of Colloid and Interface Phenomena*. Springer, 2019, p. 65-69, ISBN 9978-981-13-5930-9.

- [190] CARVALHO, P. M., et al. Application of Light Scattering Techniques to Nanoparticle Characterization and Development. In *Frontiers in Chemistry*, 2018, 6. doi 10.3389/fchem.2018.00237.
- [191] AHO, J., et al. Rheology as a tool for evaluation of melt processability of innovative dosage forms. In *Int J Pharm*, 2015, 494(2), 623-642. doi 10.1016/j.ijpharm.2015.02.009.
- [192] HACKLEY, V. A. and FERRARIS, C. F. *The Use of Nomenclature in Dispersion Science and Technology*. Edition ed.: U.S. Department of Commerce, Technology Administration, National Institute of Standards and Technology, 2001.
- [193] CHERIZOL, R., SAIN, M. and TJONG, J. Review of Non-Newtonian Mathematical Models for Rheological Characteristics of Viscoelastic Composites. In *Green and Sustainable Chemistry*, 2015, 05, 6-14. doi 10.4236/gsc.2015.51002.
- [194] WANG, Q., SHI, A. and SHAH, F. 18 - Rheology instruments for food quality evaluation. In ZHONG, J. AND WANG, X. eds. *Evaluation Technologies for Food Quality*. Woodhead Publishing, 2019, p. 465-490, ISBN 978-0-12-814217-2.
- [195] MEZGER, T. G. *Applied rheology : with Joe Flow on Rheology Road*. Edition ed. Graz, Austria: Anton Paar, 2015. ISBN 9783950401608; 3950401601.
- [196] ØSTERGÅRD, A. L. *Different Types of Rheometers*. In Fluidan - Rheology on track. 2021. Available from:<<https://fluidan.com/different-types-of-rheometers/>>. [cited 23. 04. 2024]
- [197] *How to measure viscosity*. In (c)2024. Available from:<<https://wiki.anton-paar.com/en/how-to-measure-viscosity/#spring-instruments>>. [cited 23. 04. 2024]
- [198] ZHANG, W., CHEN, J. and ZENG, H. Chapter 8 - Polymer processing and rheology. In NARAIN, R. ed. *Polymer Science and Nanotechnology*. Elsevier, 2020, p. 149-178, ISBN 978-0-12-816806-6.
- [199] *Rheology applications* In Rheology Glossary. (c)2024. Available from:<<https://wiki.anton-paar.com/en/basics-of-rheology/rheology-glossary/#rheology-applications>>. [cited 23. 04. 2024]
- [200] ROSTAMI, S. and GARIPCAN, B. Rheological Properties of Biological Structures, Scaffolds and Their Biomedical Applications. In ARTMANN, G., ARTMANN, A., ZHUBANOVA, A., DIGEL, I. ed. *Biological, Physical and Technical Basics of Cell Engineering*. Singapore: Springer, 2018, p. 119-140, ISBN 978-981-10-7903-0.
- [201] MUSILOVÁ, L., et al. Cross-Linked Gelatine by Modified Dextran as a Potential Bioink Prepared by a Simple and Non-Toxic Process. In *Polymers*, 2022, 14(3), 391. doi 10.3390/polym14030391.
- [202] OMIDI, M., et al. Characterization of biomaterials. In 2017, 97-115. doi 10.1016/b978-0-08-100961-1.00007-4.
- [203] ZHOU, W., et al. Fundamentals of Scanning Electron Microscopy (SEM). In ZHOU, W. AND WANG, Z.L. eds. *Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications*. New York, NY: Springer New York, 2007, p. 1-40, ISBN 978-0-387-39620-0.
- [204] ALI, A. S. Application of Nanomaterials in Environmental Improvement. In *Nanotechnology and the Environment*, 2020.
- [205] AKHTAR, K., et al. Scanning Electron Microscopy: Principle and Applications in Nanomaterials Characterization. In SHARMA, S.K. ed. *Handbook of Materials Characterization*. Cham: Springer International Publishing, 2018, p. 113-145, ISBN 978-3-319-92955-2.
- [206] VERNON-PARRY, K. D. Scanning electron microscopy: an introduction. In *III-Vs Review*, 2000, 13(4), 40-44. doi 10.1016/S0961-1290(00)80006-X.

- [207] SANTANA, B. P., et al. Comparing different methods to fix and to dehydrate cells on alginate hydrogel scaffolds using scanning electron microscopy. In *Microsc Res Tech*, 2015, 78(7), 553-561. doi 10.1002/jemt.22508.
- [208] JIANG, X., WANG, Y. and LI, M. Selecting water-alcohol mixed solvent for synthesis of polydopamine nano-spheres using solubility parameter. In *Scientific Reports*, 2014, 4(1). doi 10.1038/srep06070.
- [209] XU, K., et al. Hyaluronic acid thiol modified injectable hydrogel: Synthesis, characterization, drug release, cellular drug uptake and anticancer activity. In *Carbohydr Polym*, 2021, 254, 117286. doi 10.1016/j.carbpol.2020.117286.
- [210] XIA, D., et al. Redox/pH-Responsive Biodegradable Thiol-Hyaluronic Acid/Chitosan Charge-Reversal Nanocarriers for Triggered Drug Release. In *Polymers (Basel)*, 2021, 13(21). doi 10.3390/polym13213785.
- [211] GRUNDĚLOVÁ, L., et al. The influence of quarternary salt on hyaluronan conformation and particle size in solution. In *Carbohydrate Polymers*, 2013, 98(1), 1039–1044. doi 10.1016/j.carbpol.2013.06.057.
- [212] GUO, Z., MI, S. and SUN, W. The multifaceted nature of catechol chemistry: bioinspired pH-initiated hyaluronic acid hydrogels with tunable cohesive and adhesive properties. In *J Mater Chem B*, 2018, 6(39), 6234-6244. doi 10.1039/c8tb01776j.
- [213] MA, Y., et al. Recent Advances in Macroporous Hydrogels for Cell Behavior and Tissue Engineering. In *Gels*, 2022, 8(10). doi 10.3390/gels8100606.
- [214] VITKOVA, L., et al. Magneto-responsive hyaluronan hydrogel for hyperthermia and bioprinting: Magnetic, rheological properties and biocompatibility. In *APL Bioeng*, 2023, 7(3), 036113. doi 10.1063/5.0147181.
- [215] FANG, Y., et al. Polydopamine nanotube for dual bio-inspired strong, tough, and flame retarding composites. In *Composites Part B: Engineering*, 2020, 197, 108184. doi 10.1016/j.compositesb.2020.108184.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

Ag	stříbro
Ca ²⁺	vápenatý aniont
CO ₂	oxid uhličitý
COO ⁻	karboxylový aniont
Cu	měď
DA	jednotka dalton
DLS	dynamický rozptyl světla
DMSO	dymethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOPAC	3,4-dihydroxyfenyloctová kyselin
DS	stupeň substituce
DSS	bis(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oktan-dioát
ECM	extracelulární matrice
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid
GAG	glykosaminoglykany
HAS1	hyaluronan-syntázy
HAS2	hyaluronan-syntázy
HAS3	hyaluronan-syntázy
HA-DA	dopaminem konjugovaný hyaluronan
HA(Na)	hyaluronan
HA-SH	thiolovaný hyaluronan
K ⁺	kationt draslíku
L-DOPA	dihydroxy-L-fenylalanin
Mg	hořčík
MES	

Mr	molární hmotnost
M _w	molekulová hmotnost
Na ⁺	kationt sodíku
NH ⁻	aminový aniont
NHS	N-hydroxysukcinimid
nm	nanometry
NMR	nukleární magnetická rezonance
O ₂	molekula kyslík
Pa	jednotka Pascal
PAD	polydopamin
PAD-NP	polydopamin ve formě částic
PAD-NT	polydopamin ve formě tyčinek
PBS	polybutylen sukcinát
PCL	poly-ε-kaprolakton
PET	polyethylentereftalát
PLA	polymléčná kyselina
PP	polypropylen
PS	polystyren
PVA	polyvinylalkohol
PVC	polyvinylchlorid
RNA	ribonukleová kyselina
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
TBA	tetrabutylamoniovou sůl
UV	ultrafialové záření
Zn	zinek

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 – Počet patentových dokumentů (patentové přihlášky, udělené patenty) hydrogelů na bázi různých biopolymerů od roku 1915 do května 2023 [26].....	18
Obr. 2 – Strukturní vzorec hyaluronanu	22
Obr. 3 – Axiální rovina hyaluronanu s vodíky [5].....	23
Obr. 4 - Sekundární struktura hyaluronanu [5].....	23
Obr. 5 - Terciární struktura HA(Na) [5]	24
Obr. 6 – Schématické znázornění různých konformací HA(Na) a jejich vzájemných vztahů [60].....	25
Obr. 7 – Porovnání hydrodynamického poloměru hyaluronanu v deionizované vodě (vlevo), roztoku NaCl (uprostřed) a roztoku NaOH (vpravo).....	27
Obr. 8 – Schématický obrázek naznačující klíčové kroky HA(Na) od jeho syntézy až po jeho degradaci v lidském těle [67].....	29
Obr. 9 – Schéma chemické konjugace a síťování řetězce HA(Na) [72].....	34
Obr. 10 – Odštěpení N-acetylů z řetězce hyaluronanu [81]	35
Obr. 11 – Příprava HA-etherů [82]	35
Obr. 12 – Reakce HA(Na) s BDDE za vzniku zesíťované struktury [72]	36
Obr. 13 – Příprava (meth)akrylátového derivátu HA(Na) [80]	36
Obr. 14 – Možnosti oxidace HA(Na) řetězce [80].....	37
Obr. 15 - Schéma amidace pomocí EDC/NHS a DMTMMM [80].....	39
Obr. 16 – Příprava thiolovaného hyaluronanu pomocí ethylensulfidu [96]	40
Obr. 17 – Thiolovaný hyaluronan připravený pomocí DTP [98]	41
Obr. 18 – Syntéza thiolovaného hyaluronanu pomocí cysteaminu [8].....	41
Obr. 19 - Redukce disulfidových vazeb na HA-SH pomocí DTT	42
Obr. 20 – Schéma syntézy HA-DA pomocí EDC/NHS chemie.....	45
Obr. 21 – Schéma syntézy HA-DA oxidací D-glukuronové kyseliny na řetězci HA(Na) ..	46
Obr. 22 – Schématické znázornění struktury obecného crosslinkery. Červeně jsou uvedeny povinné vlastnosti, šedě potom volitelné [118].	48
Obr. 23 – Chemická struktura glutaraldehydu a obecného karbodiimidu	49
Obr. 24 – Časová osa zahrnující první použití polydopaminu a další významné milníky [125]	51
Obr. 25 – Struktura dopaminu	52
Obr. 26 – Schéma vzniku dopaminu a přenosu nervového vzruchu	52
Obr. 27 – Oxidační reakce dopaminu [132]	54
Obr. 28 – Navržené struktury PAD vzniklé prostřednictvím kovalentní adice: (a) reakce v poloze uhlíku 4 a 7 DHI; (b) reakce v poloze uhlíku 2, 4 a 7 DHI a IDQ; (c) 2 a 4 DHI; (d) 4 a 2 vázaného dimeru 4–7 DHI; (e) 3,4 a 7 IDQ [132]	55

Obr. 29 – Struktury PAD vzniklé prostřednictvím nekovalentních interakcí [133].....	56
Obr. 30 – (Dopamin) ₂ /DHI trimer [14].....	56
Obr. 31 – Rozdělení hydrogelů podle velikosti [156]	61
Obr. 32 – <i>Egg-box</i> struktura [159].....	63
Obr. 33 – Síťování metodou <i>freeze-thaw</i> [161].....	64
Obr. 34 – Schématické znázornění síťování vodíkovými vazbami[161]	64
Obr. 35 – Znázornění reakce Schiffovy báze mezi polymerními řetězci obsahující aminovou a aldehydovou skupinu [163].....	66
Obr. 36 – Síťování prostřednictvím vazby mezi katecholy [174]	69
Obr. 37 – Navržený mechanismus reakce katecholu (EWG = skupina přitahující elektrony, př. COOH, COOMe, CN) s thiolovou skupinou (X = SR-) [174]	70
Obr. 38 - Schematické znázornění sílového působení vnějšího magnetické pole B_0 a magnetického momentu jádra μ	75
Obr. 39 – Energetické hladiny spinových stavů A a A* [184].....	75
Obr. 40 – Schéma NMR spektrometru [185].....	76
Obr. 41 – Závislost rychlosti pohybu částic v roztoku na jejich velikosti [187]	77
Obr. 42 – Měřicí režimy rotačního reometru – rotační (vlevo) a oscilační (vpravo)	80
Obr. 43 - Typy geometrií – (1) kužel-deska, (2) deska-deska, (3) válec-válec [196].....	80
Obr. 44 – Speciální typ geometrie válec-válec, tzv. <i>double gap</i> [197].....	81
Obr. 45 - Instrumentace skenovacího elektronového mikroskopu [204]	82
Obr. 46- Schématické znázornění jednotlivých kroků experimentu.....	86
Obr. 47 – Schéma syntézy thiolovaného hyaluronanu	87
Obr. 48 – Syntéza HA-DA [13]	88
Obr. 49 – Schéma syntézy polydopaminu	89
Obr. 50 – Schéma syntézy PAD trubiček [136].....	90
Obr. 51 – Schématické znázornění přípravy hydrogelu na bázi thiolovaného hyaluronanu a polydopaminu	92
Obr. 52 – Síťování hyaluronanu konjugovaného dopaminem (a) a síťování thiolovaného hyaluronanu a hyaluronanu konjugovaného dopaminem	93
Obr. 53 - Snímek SEM PAD částic (a) částice s širokou distribucí velikosti částic, (b) částice s nepravidelným tvarem.....	99
Obr. 54 – NMR spektra s charakteristickými píky: a) nativní hyaluronanu, b) thiolovaný hyaluronanu, c) dopaminem konjugovaný hyaluronan.....	102
Obr. 55 – Distribuce velikosti částic PAD 10 a <i>PAD-14</i>	106
Obr. 56 - HA-SH hydrogely – a) lyofilizovaná forma, b) hydratovaná forma zesíťovaného hydrogelu	108
Obr. 57 – HA-SH-PAD hydrogely – a) lyofilizovaná forma, b),c) hydratovaná forma hydrogelu	108

Obr. 58 - HA-SH-PAD hydrogel s nehomogenním rozložením PAD částic v matrici	109
Obr. 59 - HA-DA hydrogely – a) lyofilizovaná forma, b), c) hydratovaná forma hydrogelu	110
Obr. 60 - Závislost doby gelace na typu připravených vzorků HA-SH, popř. HA-SH-PAD (koncentrace polymeru 2 a 3 % (w/w), poměr HA-SH:PAD = 1:0,5).....	111
Obr. 61 – Graf závislosti elastického modulu (G') na molekulové hmotnosti HA-SH hydrogelů (o 2% (w/w) koncentrace) <i>bez částic (zelené sloupce)</i> a s PAD částicemi (černobílé sloupce)	114
Obr. 62 – Závislost elastického modulu (G') na typu připravených vzorků HA-SH, popř. HA-SH-PAD (koncentrace polymeru 2 a 3 % (w/w), poměr HA-SH:PAD = 1:0,5).....	115
Obr. 63 - Graf závislosti elastického modulu hydrogelu na poměru HA-SH ku <i>PAD-10</i> , <i>PAD-14</i> a <i>PAD-7</i>	117
Obr. 64 - Závislost elastického modulu hydrogelů na koncentraci polymeru a vzájemném poměru jednotlivých složek HA-DA a HA-SH-HA-DA	119
Obr. 65 – Závislost elastického modulu (G') na čase, při kterém byly měněny hodnoty deformace (z 1% na 100 % a 500 %).......	121
Obr. 66 – SEM snímek PAD částic – a) <i>PAD-14</i> , b) a c) <i>PAD-10</i>	123
Obr. 67 – SEM snímky připravených PAD trubiček (<i>PAD-7</i>)	124
Obr. 68 – SEM snímky připravených hydrogelů HA-SH-PAD; (I) matrice s přidavkem PAD částic, (II) matrice s přidavkem PAD trubičky	125
Obr. 69 – SEM snímky hydrogelů na bázi HA-DA.....	125
Obr. 70 – SEM snímky hydrogelového komplexu HA-SH-HA-DA.....	126
Obr. 71 – Závislost bobtnací kapacity (<i>swelling %</i>) na čase pro všechny připravené kombinace hydrogelů.....	127
Obr. 72 – Graf znázorňující bobtnací kapacitu připravených hydrogelů	128
Obr. 73 – Závislost elastického modulu (G') a ztrátového modulu (G'') na čase	154

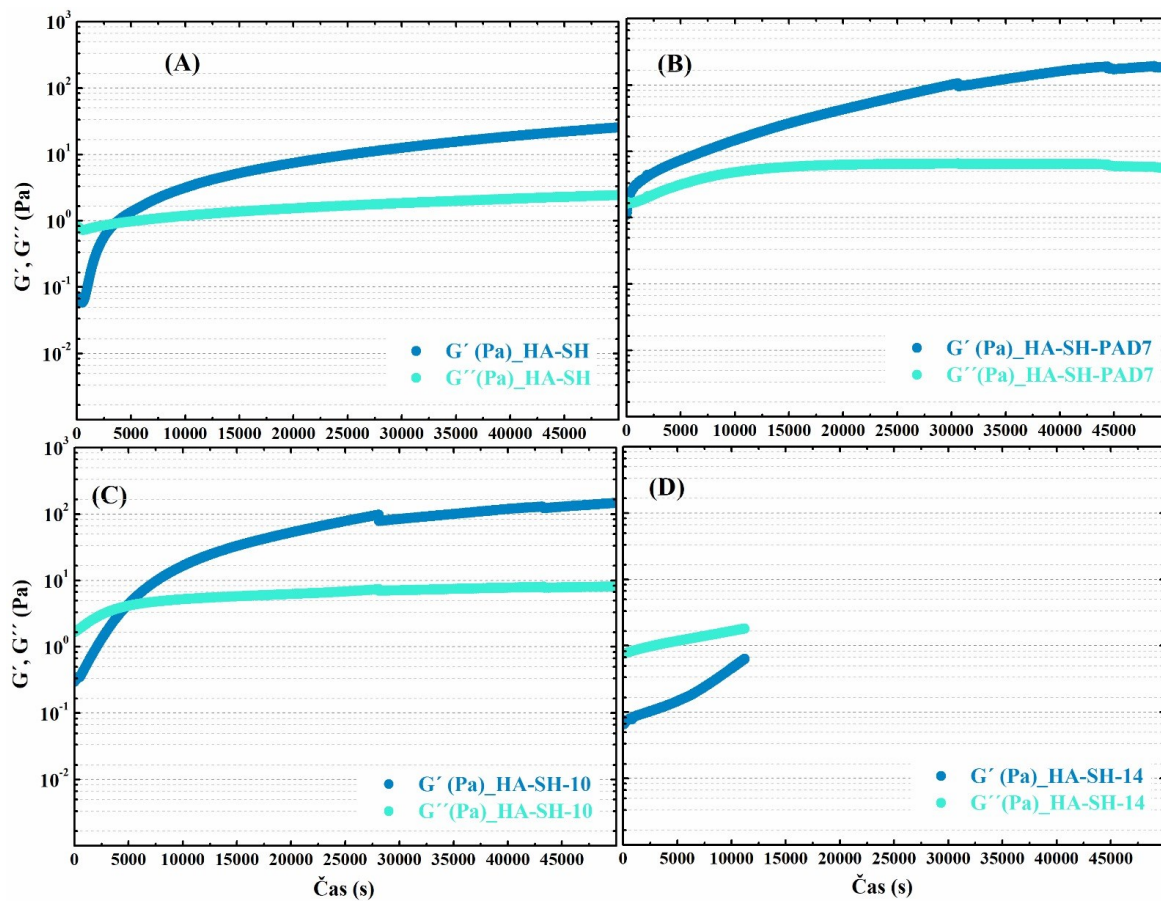
SEZNAM TABULEK

Tab. 1 – Přehled zvolených podmínek syntézy PAD pro její optimalizaci	91
Tab. 2 - Dosažené stupně substituce thiolových a katecholových skupin	103
Tab. 3 - Dosažené výsledky <i>z-average</i> a PDI studovaných polymerních řetězců	105
Tab. 4 - Dosažené výsledky <i>z-average</i> a PDI studovaných PAD částic.....	106
Tab. 5 – Přehled připravených kombinací HA-SH-HA-DA hydrogelů	110
Tab. 6 – Přehled stanovených hodnot tuhosti hydrogelech s různým zastoupení PAD částic	118
Tab. 7 – Přehled výsledných hodnot tuhosti hydrogelových komplexů v závislosti na koncentraci a vzájemném poměru použitých polymerů	120
Tab. 8 – Výsledky reverzibility elastického modulu při cyklické deformaci připravených hydrogelů	122

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Doba gelace HA-SH a HA-SH-PAD

PŘÍLOHA P I: DOBA GELACE HA-SH A HA-SH-PAD



Obr. 73 – Závislost elastického modulu (G') a ztrátového modulu (G'') na čase