

Příprava hydrogelů hyaluronanu s nanočásticemi pro 3D tisk

Bc. et Bc. Martina Brožová

Diplomová práce
2025



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Martina Brožová
Osobní číslo: T23250
Studijní program: N0711A130023 Materiálové inženýrství a nanotechnologie
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Příprava hydrogelů hyaluronanu s nanočásticemi pro 3D tisk

Zásady pro vypracování

- Vypracovat rešerši zabývající se problematikou přípravy hydrogelů na bázi hyaluronanu kombinovanými s různými typy nanočástic a možnostmi jejich charakterizace a uplatnění.
- Provést základní experimenty přípravy hydrogelu na bázi hyaluronanu v závislosti na koncentraci polymeru, molekulové hmotnosti a molárním poměru látek a použitých nanočástic.
- Připravit hydrogely a provést jejich charakterizaci.
- Zhodnotit vliv výše zmíněných parametrů a provést diskuzi získaných výsledků.

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. HALE. Chemistry and biology of hyaluronan. Amsterdam: Elsevier, 2004. ISBN 978-0-08-044382-9.
5. Vítková L, Kazantseva N, Musilová L, Smolka P, Valášková K, Kocourková K, et al. Magneto-responsive hyaluronan hydrogel for hyperthermia and bioprinting: Magnetic, rheological properties and biocompatibility. APL Bioengineering. 2023;7.
6. Kopecká K, Vítková L, Kroneková Z, Musilová L, Smolka P, Mikulka F, et al. Synthesis and Exfoliation of Calcium Organophosphonates for Tailoring Rheological Properties of Sodium Alginate Solutions: A Path toward Polysaccharide-Based Bioink. Biomacromolecules. 2023;24:3016-31.

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

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2025**
Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Petr Smolka, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 20. ledna 2025

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že

- odevzdáním diplomové práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb., v platném znění bez ohledu na výsledek obhajoby;
- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a bude dostupná k nahlédnutí;
- jedno vyhotovení diplomové práce v listinné podobě bude ponecháno Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně k uložení;
- 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 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, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá; neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji, že

- jsem na diplomové práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem řádně citoval(a); v případě publikace výsledků budu uveden(a) jako spoluautor;
- odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne

.....
podpis autora

ABSTRAKT

Diplomová práce se zaměřuje na vývoj a charakterizaci hydrogelů pro mikroextruzní 3D tisk s potenciálním využitím v oblasti tkáňového inženýrství. Hydrogely byly připraveny z přírodních polymerů (alginát, hyaluronan, dextran a želatina), přičemž některé vzorky obsahovaly organofosfonátové nanočástice sloužící jako reologická aditiva. Sítování probíhalo buď fyzikálně pomocí multivalentních iontů (Zn^{2+} , Fe^{3+}), nebo chemicky prostřednictvím Schiffovy báze. Na základě reologických měření byly vybrány tři typy hydrogelů, pro které byly optimalizovány parametry a podmínky 3D tisku vícevrstevných scaffoldů. Všechny zesíťované scaffoldy byly hodnoceny z hlediska tuhosti, morfologie a bobtnacího chování. Nejvhodnějším systémem pro 3D tisk se ukázal být chemicky sítovaný hydrogel na bázi želatiny, oxidovaného hyaluronanu a oxidovaného dextranu, který vykazoval nejvyšší tiskovou přesnost (76 ± 4 %), porozitu kolem 65 % a viskoelastické vlastnosti ($\sim 4 \cdot 10^2 \text{ Pa}\cdot\text{s}$) srovnatelné s měkkými lidskými tkáněmi.

Klíčová slova: 3D tisk, hydrogel, biopolymery, iontové sítování, Schiffova báze

ABSTRACT

This diploma thesis focuses on the development and characterization of hydrogels for microextrusion-based 3D printing with potential applications in tissue engineering. The hydrogels were formulated from natural polymers (alginate, hyaluronan, dextran, and gelatin), with selected samples incorporating organophosphonate nanoparticles as rheological modifiers. The prepared hydrogels were crosslinked either physically using multivalent ions (Zn^{2+} , Fe^{3+}) or chemically via Schiff base reactions. Based on rheological evaluations, three hydrogel types were selected for further optimization of printing parameters and conditions for multilayer scaffold fabrication. All crosslinked scaffolds were assessed in terms of stiffness, morphology, and swelling behavior. Among the tested materials, the chemically crosslinked hydrogel composed of gelatin, oxidized hyaluronan, and oxidized dextran was identified as the most suitable for 3D printing, exhibiting the highest printing accuracy (76 ± 4 %), porosity of approximately 65 %, and a viscosity ($\sim 4 \cdot 10^2 \text{ Pa}\cdot\text{s}$) comparable to that of soft human tissues.

Keywords: 3D printing, hydrogel, biopolymers, ionic cross-linking, Schiff base

*“And I knew exactly what to do. But in a much more real sense, I had no idea
what to do.”*

Michael Scott (S5:E14)

OBSAH

ÚVOD.....	13
I TEORETICKÁ ČÁST	14
1 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	15
2 BIOPOLYMERY	17
2.1 DEFINICE A KLASIFIKACE BIOPOLYMERŮ.....	17
2.2 ALGINÁT	21
2.3 DEXTRAN	24
2.4 HYALURONAN	27
2.5 ŽELATINA.....	31
3 HYDROGELY A JEJICH PŘÍPRAVA.....	35
3.1 FYZIKÁLNÍ SÍŤOVÁNÍ HYDROGELŮ	35
3.2 CHEMICKÉ SÍŤOVÁNÍ HYDROGELŮ.....	38
3.3 HYDROGELY S KOMBINOVANOU DVOJÍ SÍTÍ	39
4 NANOKOMPOZITNÍ HYDROGELY	40
4.1 DEFINICE NANOČÁSTIC A JEJICH KLASIFIKACE V KONTEXTU HYDROGELŮ.....	40
4.2 FENYLFOSFONÁTOVÉ NANOČÁSTICE	42
5 TECHNIKY 3D TISKU HYDROGELŮ.....	45
5.1 INKJET 3D TISK	45
5.2 MIKROEXTRUZNÍ 3D TISK	46
5.3 LASEREM ASISTOVANÝ BIOTISK	48
5.4 3D TISK NUTÉ HYDROGELY V TKÁŇOVÉM INŽENÝRSTVÍ	49
6 CHARAKTERIZACE HYDROGELŮ	50
6.1 REOLOGICKÉ VLASTNOSTI.....	50
6.2 MORFOLOGIE HYDROGELŮ	51
6.3 BOBTNACÍ TESTY.....	52
6.4 TESTY BIOKOMPATIBILITY.....	52
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	54
7 POPIS EXPERIMENTU	55
7.2 MODIFIKACE VÝCHOZÍCH BIOPOLYMERŮ	56
7.3 CHARAKTERIZACE MODIFIKOVANÝCH BIOPOLYMERŮ	58
7.4 PŘÍPRAVA POLYMERNÍCH SMĚSÍ PRO 3D TISK.....	60
7.5 CHARAKTERIZACE HYDROGELŮ Z POHLEDU 3D TISKU	65
7.6 FYZIKÁLNÍ SÍŤOVÁNÍ MULTIVALENTNÍMI IONTY	73

7.7	CHARAKTERIZACE 3D VYTISKNUTÝCH HYDROGELŮ	75
8	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	77
8.1	CHARAKTERIZACE MODIFIKOVANÝCH BIOPOLYMERŮ	77
8.2	VÝBĚR VHODNÉ SMĚSI BIOPOLYMERŮ PRO 3D TISK	78
8.3	TISKNUTELNOST HYDROGELŮ	83
8.4	TUHOST 3D TISKNUTÝCH HYDROGELŮ	85
8.5	MORFOLOGIE 3D TISKNUTÝCH HYDROGELŮ	88
8.6	BOBTNACÍ TESTY.....	90
	ZÁVĚR.....	94
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	97
	SEZNAM OBRÁZKŮ	122
	SEZNAM TABULEK.....	124
	SEZNAM ROVNIC	125
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	126
	SEZNAM PŘÍLOH.....	128

ÚVOD

Tkáňové inženýrství představuje interdisciplinární obor zaměřený na vývoj biologických náhrad, které mohou obnovit, nahradit nebo zlepšit funkci poškozených tkání. Využívá přístupy z materiálového inženýrství, biologie a medicíny k vytvoření struktur, jež podporují buněčný růst a regeneraci. Jedním z nástrojů, který v posledních letech významně posunul možnosti tohoto oboru je 3D tisk, který umožňuje přesné prostorové uspořádání buněk, biomateriálů ve vrstvách, díky čemuž lze cíleně navrhovat složité tkáňové struktury [1].

V této oblasti hrají významnou roli hydrogely - zesíťované třírozměrné polymerní sítě schopné absorbovat značné množství vody. Hydrogely na bázi biopolymerů, jako alginát, dextran, hyaluronan nebo želatina, poskytují příznivé mikroprostředí pro buněčnou adhezi, proliferaci i diferenciaci, a jejich struktura umožňuje difuzi živin a metabolitů [2]. Kombinace hydrogelů a 3D tisku tak představuje slibný přístup k výrobě prostorově definovaných a rozměrově přesných scaffoldů, které lze přizpůsobit konkrétním potřebám tkáňové regenerace. Navzdory těmto výhodám čelí 3D tisk hydrogelů na bázi přírodních polymerů řadě výzev. Mezi ně patří nevhodné reologické vlastnosti, omezená tvarová stálost po tisku nebo nízká mechanická stabilita. Z toho důvodu se často přistupuje k jejich chemické modifikaci nebo kombinaci s nanomateriály [3].

V teoretické části práce byla zpracována rešerše zaměřená na vybrané přírodní biopolymery – alginát, dextran, hyaluronan a želatinu – dále na přípravu hydrogelů, jejich zpracování metodami 3D tisku a charakterizaci. Praktická část se soustředila na vývoj a hodnocení hydrogelů určených pro 3D tisk vícevrstvých scaffoldů, založených na uvedených biopolymerech. Tyto materiály byly síťovány různými mechanismy, a to buď fyzikálně pomocí iontové komplexace, nebo chemicky prostřednictvím Schiffovy báze, případně jejich kombinací. Do vybraných systémů byly navíc začleněny organofosfonátové nanočástice za účelem zlepšení jejich tiskových vlastností. Připravené materiály byly posouzeny z hlediska reologického chování, tisknutelnosti, stability vícevrstvých struktur, bobtnacích schopností a morfologie připravené struktury. Výsledky přispěly k optimalizaci složení inkoustů pro 3D tisk a jejich efektivnímu využití v regenerativní medicíně.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Přírodní polymery jako je alginát sodný, dextran, kyselina hyaluronová, želatina nebo jejich deriváty jsou díky vlastnostem jako dobrá biokompatibilita, biodegradabilita a podobnost s extracelulární matrix považovány za ideální materiály pro přípravu hydrogelů [4].

K zesíťování těchto polymerů jsou využívány různé strategie. Například Sajjadi et al. (2024) ve své práci zkoumali tzv. „self-healing“ chování hydrogelu želatiny a oxidovaného hyaluronanu síťovaným kovalentně metodou Schiffovy báze [5]. Síťování Schiffovou bází zvolili také autoři Musilová et al. (2022), kteří připravili hydrogel na bázi želatiny a oxidovaného dextranu a vyzdvihli mimo jiné i jednoduchý způsob přípravy necytotocického materiálu bez použití agresivních činidel [6]. Alginát je typicky síťovaný fyzikálně pomocí multivalentních iontů, jako jsou Ca^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} nebo Fe^{3+} , kdy každý z iontů vytváří hydrogely s rozdílnými vlastnostmi což umožňuje jejich přizpůsobení pro potenciální specifické aplikace, jak také ve svých pracích popisují autoři Hassan (2020), Kopecká et al. (2023), Jing et al. (2024) nebo Zhang et al. (2020) [7–10]. Hydrogely mohou být také síťovány několika mechanismy zároveň. Příkladem může být práce autorů Vítková et. al (2022), kteří při přípravě hydrogelu na bázi modifikovaného hyaluronanu využili kombinaci chemického způsobu síťování (Schiffova báze) a iontového síťování Fe^{3+} [11]. Přítomnost druhé sítě se projevila nárůstem souřázového modulu z 10^1 Pa na 10^3 Pa.

Přestože mají hydrogely řadu výhod pro biologické aplikace, jejich využití bývá často omezeno nízkou mechanickou pevností [12]. Začlenění nanomateriálů do polymerní matrice představuje efektivní způsob, jak tyto nedostatky kompenzovat. Jako příklad lze uvést práci Alves et al. (2023), kteří do hydrogelu na bázi oxidovaného dextranu zakomponovali nanohydroxyapatit, čímž došlo k podstatnému navýšení Youngova modulu až na 300 kPa [13]. Nanokompozitní hydrogel želatiny a oxidovaného hyaluronanu s nanohydroxyapatitem byl zkoumán i Jin et al. (2024), kteří nejen že ověřili nárůst souřázového modulu, ale také potvrdili podporu osteogeneze na myším modelu [14].

V posledním desetiletí také vzrostl zájem o 3D tisknutelné hydrogely, jelikož 3D tisk umožňuje přesné řízení geometrie a vnitřní architektury scaffoldů a tím tvorbu konstrukcí přizpůsobených specifickým potřebám jednotlivých tkání [3]. Výrazný nárůst významu této problematiky dokládají údaje z vědecké databáze Web of Science: v roce 2024 bylo publikováno 1065 odborných článků zaměřených na téma 3D tisku hydrogelů ("3D printing hydrogel"), což představuje 28násobný nárůst oproti roku 2014, kdy bylo zaznamenáno

pouze 37 publikací. Jako příklad lze uvést práci Kopecké et al. (2023), ve které se autoři zabývali syntézou organofosfonátových nanočástic a jejich aplikačním potenciálem v tkáňovém inženýrství při 3D tisku jako reologického modifikátoru v alginátové matrici [10]. Připravené materiály dosáhly dobré tvarové stálosti, nebyla u nich prokázána cytotoxicita a vykazovaly uspokojivou buněčnou životaschopnost, což bylo potvrzeno enkapsulací a tiskem fibroblastů myšího původu. 3D tiskem vícevrstevných hydrogelů na bázi alginát/želatina se zabývali Soufivand et al. (2023) [15]. Jejich práce potvrdila, že předchlazení inkoustů vede k výraznému vylepšení tisknutelnosti, což bylo potvrzeno analýzou variability reologických vlastností při porovnání se vzorky, kde byl krok chlazení vynechán. Přesnost vytisknuté struktury je zásadní zejména z důvodu homogenní prostorové distribuce buněk a reprodukovatelnosti mechanických i biologických vlastností pro potenciální aplikace. Systém alginát/kolagen zpracovaný 3D tiskem byl také popsán autory Yang et al. (2018) [16]. Výsledky jejich studie ukázaly, že přidání kolagenu k alginátu vedlo k více než dvojnásobnému zvýšení mechanické pevnosti materiálu. Přídavek kolagenu také podpořil bioaktivitu hydrogelu, což bylo prokázáno vyšší buněčnou proliferací a zvýšenou expresí genů souvisejících s tvorbou chondrocytů.

Na základě výše uvedené literatury je zřejmé, že hydrogely a jejich zpracování metodami 3D tisku je intenzivně studovaným odvětvím v rámci tkáňového inženýrství.

2 BIOPOLYMERY

Biopolymery tvoří rozmanitou skupinu materiálů, jejichž společným znakem je biologický původ nebo schopnost vznikat z obnovitelných zdrojů prostřednictvím procesů v živých organismech. Jedná se o makromolekuly sestávající z velkého množství opakujících se monomerních jednotek vázaných kovalentními vazbami. Tyto makromolekuly, které zahrnují polysacharidy (např. alginát, hyaluronan, dextran), proteiny (např. kolagen, želatina) a nukleové kyseliny (např. DNA, RNA), jsou komplexní struktury nezbytné pro biologické procesy. V živých systémech plní řadu funkcí, mezi něž patří například strukturní podpora, zásoba energie nebo přenos genetické informace [17, 18].

Na rozdíl od syntetických polymerů petrochemického původu, jsou biopolymery obvykle biodegradabilní a biokompatibilní, což umožňuje jejich široké využití při různých aplikacích, zejména v medicíně, farmacii a potravinářství. Například v biomedicíně jsou biopolymery využívány při vývoji materiálů pro tkáňové inženýrství, kde mohou sloužit jako scaffoldy („buněčné lešení“) pro regeneraci tkání. Konkrétní aplikace vybraných biopolymerů budou rozebírány dále v textu [17, 19].

Tato kapitola se zaměřuje na obecný popis a klasifikaci biopolymerů, včetně bližšího přiblížení materiálů, které byly využívány při praktické části diplomové práce – alginát, dextran, hyaluronan a želatina – a pro další orientaci v textu je jejich znalost nezbytná.

2.1 Definice a klasifikace biopolymerů

Termín „biopolymer“ je podle International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) definován jako látka složená z jednoho typu makromolekul (včetně proteinů, nukleových kyselin a polysacharidů) produkovaných živými organismy [20].

Biopolymery lze klasifikovat na základě různých kritérií, jedním z nejběžnějších způsobů je klasifikace podle chemické povahy jejich stavebních jednotek a výsledné struktury [17]. Tento přístup vymezuje tři hlavní skupiny: polysacharidy, proteiny a nukleové kyseliny, které budou podrobněji popsány v podkapitole 2.1.1. V literatuře zaměřené na materiálové vědy se však pojem „biopolymer“ používá často v širším kontextu, kdy jsou takto označovány všechny polymery, které jsou přírodního původu („bio-based“) a/nebo jsou biodegradabilní [17, 19]. Toto dělení bude uvedeno v podkapitole 2.1.2.

2.1.1 Dělení biopolymerů podle monomerní jednotky

Z biochemického hlediska jsou rozlišovány podle monomerů a tvořené struktury rozlišeny tři hlavní kategorie biopolymerů – polysacharidy, proteiny a nukleové kyseliny (Obrázek 1). Následující popis struktur vychází z publikace *Lehninger Principles of Biochemistry* [18].

Polysacharidy jsou tvořeny alespoň 20 monosacharidovými jednotkami, které jsou spojeny glykosidovou vazbou. Podle počtu typů monosacharidů ve struktuře pak můžeme rozlišovat homo- a hetropolysacharidy.

- a. Homopolysacharidy obsahují pouze jeden typ monosacharidu. Příkladem je nejdůležitější zásobní látka vyšších rostlin – škrob. Ten se skládá z amylozy (nerozvětvená α -D-glukóza vázaná (1→4) glykosidickou vazbou) a amylopektinu (rozvětvená α -D-glukóza vázaná (1→4) a (1→6) glykosidickou vazbou). Dále lze zmínit i dextran, který bude v podkapitole 2.3 blíže specifikován.
- b. Heteropolysacharidy mají v molekule více druhů monomerních jednotek, případně jejich derivátů. Nejrozšířenější skupinou jsou glykosaminoglykany (GAG), které obsahují deriváty uronových kyselin a hexosaminových zbytků. Zástupcem je kyselina hyaluronová, která bude podrobněji popsána v podkapitole 2.4.

Proteiny se skládají alespoň ze 100 aminokyselin. Při tvorbě bílkovin se u většiny živých organismů uplatňuje pouze 20 (někdy uváděno až 23) biogenních α -aminokyselin. Struktura nezbytná pro jeho správnou funkci, se popisuje ve čtyřech úrovních:

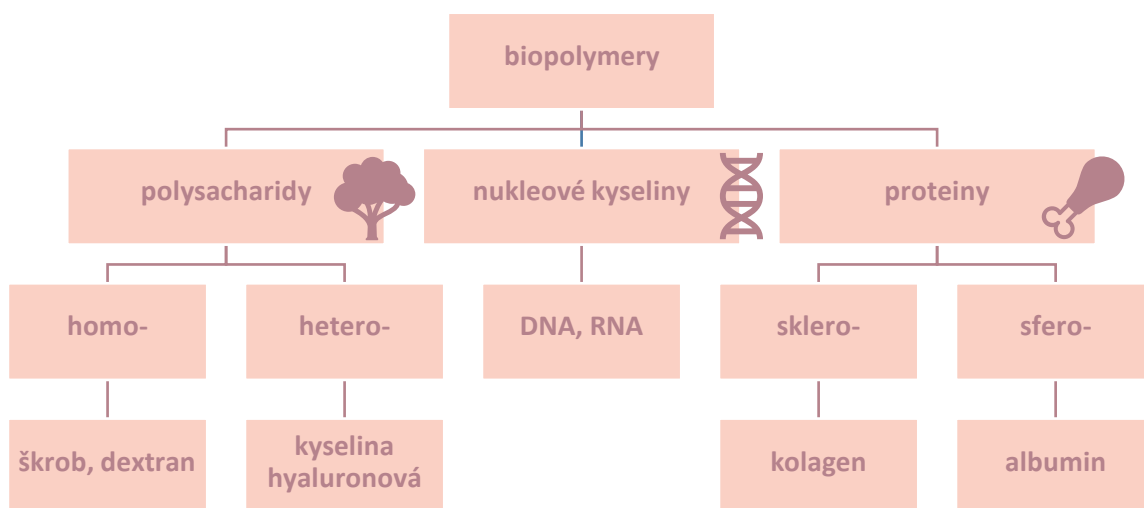
- a. Primární struktura je dána pořadím aminokyselin v polyptidovém řetězci, které jsou vázány kovalentní peptidovou vazbou (-CO-NH-). Tato vazba vzniká kondenzací jednotlivých aminokyselin.
- b. Sekundární struktura rozumíme prostorové uspořádání aminokyselin, které je stabilizováno přítomností vodíkových můstků. Základní struktury se označují jako α -helix, kdy je řetězec stočen do pravotočivé šroubovice, a β -skládaný list, kdy rovnoběžně a antiparalelně uspořádané řetězce připomínají složený list papíru.
- c. Terciální struktura popisuje prostorové uspořádání celého polyptidu, která je dána interakcemi mezi bočními skupinami řetězce. Uplatňují se Van der Waalsovy síly, vodíkové a disulfidické vazby či hydrofobní/hydrofilní interakce.
- d. Kvarterní struktura se vyskytuje u proteinů složených z více podjednotek, které mezi sebou již nejsou spojeny peptidovou vazbou.

Pokud je bílkovina tvořena pouze aminokyselinami, bez vazby nebílkovinné složky (tzv. prostetické skupiny), lze ji označit jako jednoduchý protein. Ty se dále dají rozdělit do dvou základních skupin:

- a. Skleroproteiny jsou vláknité a ve vodě nerozpustné. Příkladem je kolagen, základní stavební složka pojivových tkání. Ten bude dále přiblížen v kapitole 1.5.
- b. Mezi sferoproteiny, které mají kulovitý tvar a jsou ve vodě rozpustné, se řadí např. albumin, což je sérová bílkovina.

Nukleové kyseliny nesou genetickou informaci živých organismů. Monomer se nazývá nukleotid a je složen z dusíkaté báze, pentózy (pětiuhlíkatého monosacharidu) a zbytku kyseliny fosforečné. Jednotlivé nukleotidy jsou vázány fosfodiesterovou vazbou.

- a. 2-deoxyribonukleová kyselina (DNA) má strukturu dvojité šroubovice tvořené dvěma antiparalelními řetězci nukleotidů, které jsou spojeny vodíkovými můstky mezi komplementárními bázemi – adenin s thyminem, guanin s cytosinem. Každý nukleotid se skládá z deoxyribózy, fosfátové skupiny a jedné ze čtyř dusíkatých bází, přičemž fosfátové skupiny tvoří pevnou páteř molekuly .
- b. Ribonukleová kyselina (RNA) je tvořena jedním vláknem nukleotidů obsahující fosfátovou skupinu, sacharid ribózu a dusíkaté báze adenin, guanin, cytosin či uracil. U prokaryot a eukaryot se RNA podílí na transkripci a translaci genetické informace, u některých virů (např. viru HIV) je však přímým nosičem této informace.



Obrázek 1 Klasifikace biopolymerů na podle monomerní jednotky, upraveno dle Thomas et al. (2023) [17]

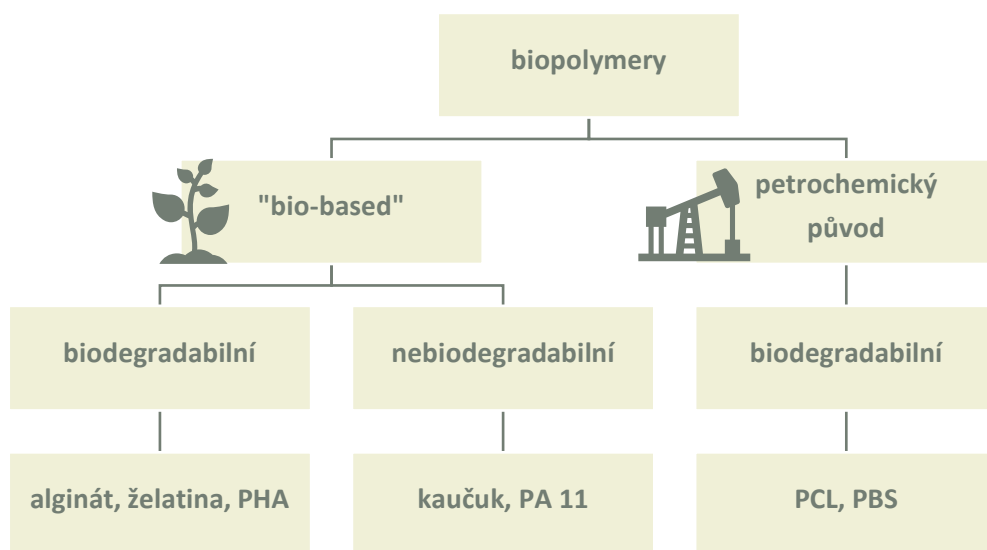
2.1.2 Dělení biopolymerů podle původu a biodegradability

Jak již bylo řečeno dříve, biopolymery lze klasifikovat nejen na základě jejich chemické struktury, ale také dle jejich původu – na přírodní („bio-based“) a petrochemické (Obrázek 2). V kombinaci i se schopností biodegradace (snižování molekulové hmotnosti vlivem biologické aktivity), takové dělení uvádí například Niaounakis (2015) [19, 20]:

„Bio-based“ biodegradabilní biopolymery jsou produkovány biologickými systémy (mikroorganismy, rostlinami či živočichy) nebo jsou chemicky syntetizovány z přírodních surovin (kukuřice, cukrová řepa). Do této skupiny lze zařadit syntetické polymery z obnovitelných zdrojů, jako je kyselina polymléčná (PLA) [21]. Dále sem patří i biopolymery produkované mikroorganismy (polyhydroxyalkanoáty, PHA) nebo biopolymery přirozeně se vyskytující v biosféře, například alginát a kolagen [22–24].

„Bio-based“ nebiodegradabilní biopolymery pochází také z obnovitelných zdrojů, ovšem oproti předchozí kategorii, nedochází k jejich biodegradaci. Jedná se o přírodní biopolymery jako jsou kaučuky, nebo syntetické polymery, kdy příkladem může být polyamid 11 (PA 11) získávaný z ricinového oleje [25].

Biodegradabilní polymery petrochemického původu, jako polykaprolakton (PCL) nebo polybutylensukcinát (PBS), jsou produkovány z ropy nebo zemního plynu, ale na rozdíl od většiny polymerů mohou být rozloženy některými kmeny bakterií nebo mikroskopických vláknitých hub [26–28].



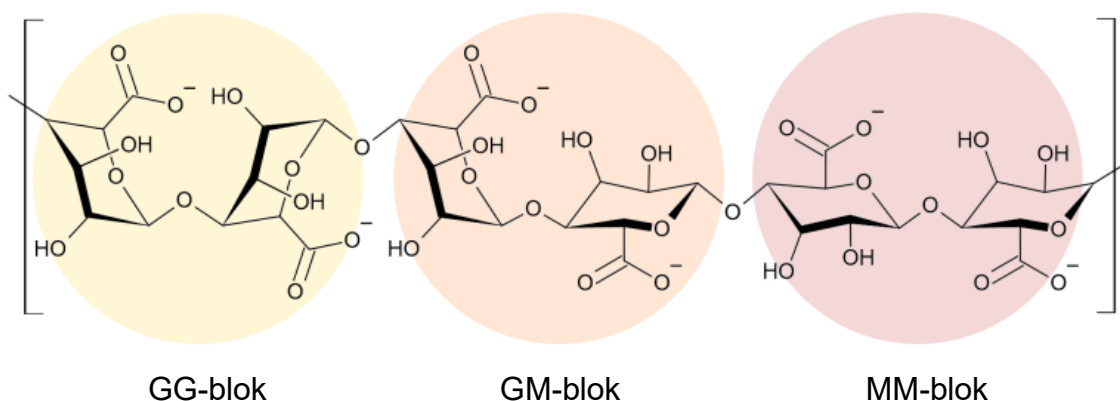
Obrázek 2 Klasifikace biopolymerů podle původu a schopnosti biodegradace; upraveno dle Thomas et al. (2023) [17]

2.2 Alginát

Algináty jsou hydrokoloidy, tedy vysokomolekulární látky schopné vázat velké množství vody (až stonásobek své hmotnosti) a tvořit stabilní gely. Jedná se o soli kyseliny alginové, které se přirozeně vyskytují v buněčných stěnách hnědých mořských řas z čeledi *Phaeophyceae* [29]. Díky své biokompatibilitě, gelotvorným a viskoelastickým vlastnostem a modifikovatelnosti nachází využití především v potravinářství, farmacii a biomedicině [23]. V následující kapitole bude tento biopolymer popsán z pohledu jeho struktury, vlastností, výskytu, produkce a konkrétních aplikačních příkladů.

2.2.1 Struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti alginátů

Algináty jsou skupina nerozvětvených, neopakujících se kopolymerů, které jsou složeny z kyseliny D-manuronové (M) a L-guluronové (G) vázaných $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidovou vazbou (Obrázek 3). Monomerní jednotky jsou upořádané do homogenních (MM nebo GG) a heterogenních (MG nebo GM) bloků, přičemž poměr a uspořádání těchto bloků závisí na biologickém zdroji, podmínkách kultivace a způsobu purifikace. Díky tomu jsou algináty také vysoce variabilní skupinou materiálů [23, 30].



Obrázek 3 Struktura alginátů s vyznačenými GG/GM/MM bloky; upraveno dle Abka-khajouei et al. (2022) [23]

Jak je také z obrázku patrné, algináty obsahují mnoho volných hydroxylových a karboxylových skupin, které jim umožňují vytvářet intramolekulární vodíkové můstky [31]. Při neutrálním pH mají polyaniontový charakter díky ionizaci karboxylových skupin. Zatímco kyselina alginová je ve vodě nerozpustná, její soli jsou naopak vodorozpustné a lze je vysrážet alkoholy [32, 33].

Pro algináty je charakteristická tvorba viskózních roztoků ve vodném prostředí. Tyto roztoky vykazují pseudoplastické chování. Viskozita je ovlivněna koncentrací, molekulovou hmotností a zastoupení G/M bloků. Molekulová hmotnost komerčně dostupných alginátů se pohybuje v rozmezí 32 až 400 kDa v závislosti na zdroji, druhu řasy a procesu extrakce, kdy vyšší molekulová hmotnost zvyšuje viskozitu a ovlivňuje gelovací vlastnosti [23, 32].

Klíčovou vlastností alginátů je pak schopnost iontového síťování, při němž divalentní kationty jako Ca^{2+} koordinují karboxylové skupiny G-bloků tzv. „egg-box“ modelem, což vede k tvorbě pevných hydrogelů [34]. Tento fenomén je blíže rozepsán v podkapitole 3.1.2. Mechanická pevnost těchto gelů se pohybuje od několika kPa do stovek kPa v závislosti na koncentraci iontů a alginátu, avšak gely jsou obecně křehké a jejich stabilita může být narušena chelatačními činidly nebo změnami pH. Vyšší obsah G-bloků zvyšuje pevnost gelu, zatímco M-bloky přispívají k pružnosti [23, 32, 35].

2.2.2 Výskyt a produkce alginátů

Kyselina alginová a její soli (především Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , K^+) se přirozeně vyskytují jako strukturální složka buněčných stěn hnědých mořských řas (*Phaeophyceae*), například u druhů *Laminaria* nebo *Sargassum* [36–39]. Tvoří kolem 40 % sušiny těchto řas v závislosti na druhu, věku rostliny a podmínkách prostředí, jako je teplota vody nebo dostupnost živin [39]. Hnědé řasy využívají alginát k zajištění mechanické pevnosti a flexibility, což jim umožňuje odolávat proudům a vlnám [38].

Kromě mořských řas mohou alginát produkovat také některé bakterie. Ty syntetizují alginát jako exopolysacharid, který jim poskytuje ochranu před nepříznivými podmínkami, jako je vysychání nebo imunitní odpověď hostitele [17]. U *Pseudomonas aeruginosa* hraje alginát roli při tvorbě biofilmů, který přispívá k jeho lepší adhezi k povrchům či tkáním a patogenitě, například u pacientů s cystickou fibrózou [40]. Naopak nepatogenní *Azotobacter vinelandii* produkuje velké množství alginátu během vegetativního růstu, kde slouží jako bariéra před difúzí těžkých kovů a kyslíku [41].

V průmyslové produkci především kvůli ceně alginátu převažuje extrakce z hnědých řas [38]. Tento proces se skládá z několika základních kroků. Nejprve jsou vysušené a rozemleté řasy extrahovány v minerální kyselině (například 0,1 M HCl), čímž dojde k separaci ve vodě nerozpustné kyseliny alginové od kontaminujících glykanů, jako je celulóza či laminarin. Nerozpustná složka biomasy je neutralizována alkalickým roztokem (Na_2CO_3 nebo NaOH), což vede ke vzniku ve vodě rozpustných solí alginátu.

Sůl je vysrážena alkoholem nebo chloridem sodným, poté následují purifikační procesy, sušení a mletí [38, 42].

2.2.3 Aplikace alginátu

Alginát je všestranný biopolymer s výrazným aplikačním potenciálem v potravinářství, farmacii, biomedicině i dalších odvětvích, jako je kosmetický průmysl, kde se díky svým reologickým vlastnostem využívá jako zahušťovadlo, koloidní stabilizátor, ale také vykazuje schopnost vytvářet trojrozměrnou síť, která umožňuje inkorporaci bioaktivních molekul či buněk [23].

Kyselina alginová a její soli (sodný, draselný, vápenatý či amonný), vedené v evropské legislativě pod kódy E400-E404 dle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008, jsou schváleny jako bezpečné potravinářské přídatné látky [43]. Využívají se zejména jako stabilizátory, emulgátory, želírující látky, zahušťovadla a odpěňovače, přičemž zlepšují texturu a stabilitu širokého spektra výrobků – ve zmrzlinách například omezují tvorbu ledových krystalů a zajišťují krémovou konzistenci, zatímco v pekařských produktech, dezertech, pudincích a želé vytvářejí pevné, ale elastické gelové struktury [23, 29].

Ve farmacii a biomedicině hraje alginát klíčovou roli díky své biokompatibilitě a schopnosti tvořit hydrogely. Mohou být využívány jako nosiče léčiv, při nichž alginát zajišťuje kontrolované uvolňování aktivních látek v cílových tkáních [23]. Například Wu et al. (2023) vytvořili perorální systém pro podání insulínu, který kombinuje arginin-insulinový komplex pro zlepšení vstřebávání, liposomy pro ochranu účinné látky a cysteinem modifikovaný alginátový hydrogel pro zvýšení adheze ke střevní sliznici [44]. Tento systém chrání insulín v kyselém prostředí žaludku a umožňuje jeho kontrolované uvolňování ve střevě.

Alginát se také řadí mezi nejpoužívanější biomateriály v oblasti 3D biotisku a konstrukci scaffoldů, jelikož vykazuje vhodné viskoelastické chování, která umožňuje jeho extruzi, následné udržení tvaru a schopnosti gelaci v přítomnosti kovových multivalentních iontů [3]. Jak uvádí studie autorů Tabriz et al. (2015), již 4hm.% roztok alginátu poskytuje dostatečnou mechanickou stabilitu vytisknutého hydrogelu [45]. Z biologického hlediska je však považován za inertní, proto je často kombinován i s dalšími biopolymery [23]. Takový systém byl popsán v práci Temirel et al. (2022), kdy byl vytvořen bioinkoust alginátu

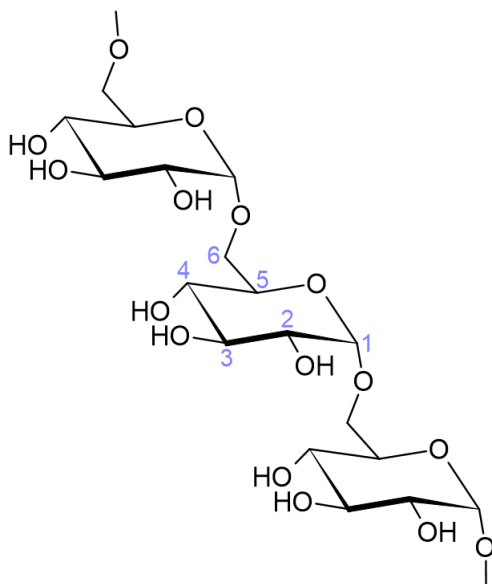
sodného a želatiny [46]. Viabilita buněk vzrostla díky přítomnosti želatiny až o 21 % v porovnáním s čistým alginátem.

2.3 Dextran

Dextran je extracelulární polysacharid tvořený glukózovými jednotkami, který vzniká mikrobiální fermentací, zejména bakteriemi rodu *Leuconostoc* a *Lactobacillus*. Tento biopolymer je dobře rozpustný ve vodě se řadí mezi funkční hydrofilní látky s širokým spektrem využití. Vzhledem ke své biokompatibilitě, netoxicitě, variabilní molekulové hmotnosti a možnostem chemické modifikace nachází uplatnění především v potravinářství, farmacii, medicíně a technických aplikacích [47]. V následující kapitole bude dextran představen z hlediska struktury, vlastností, způsobu produkce a konkrétních oblastí praktického využití.

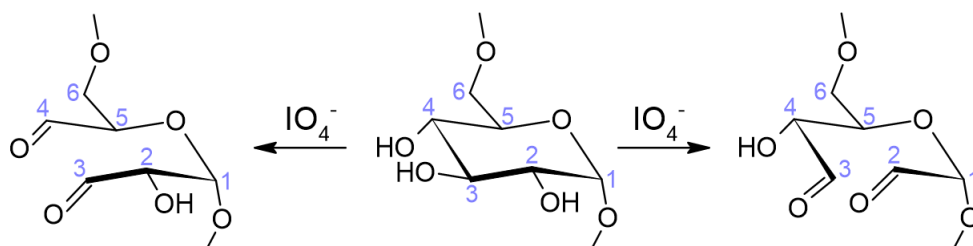
2.3.1 Struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti dextranu

Dextran je homopolymer tvořený glukózovými jednotkami, které jsou převážně spojeny α -(1 $\rightarrow$ 6)-glykosidickou vazbou, s možným větvením prostřednictvím α -(1 $\rightarrow$ 4), α -(1 $\rightarrow$ 3) nebo α -(1 $\rightarrow$ 2)-glykosidických vazeb (Obrázek 4) [48]. Stupeň větvení u nativního dextranu dosahuje přibližně 5 %, větve jsou obvykle krátké, tvořené 1–2 glukózovými jednotkami [49]. Molekulová hmotnost dextranu je vysoce variabilní a pohybuje se od několika kDa až po 440 MDa, přičemž vykazuje značnou polydisperzitu, například Ioan et al. (2000) popisují dextransy s polydisperzním indexem až 4 [49–51].



Obrázek 4 Páteří struktura dextranu, fialovými čísly je označena pozice uhlíku v glukózové jednotce; upraveno dle De Belder et al. (2000) [49]

Vlastnosti dextranu jsou úzce spojeny jak s molekulovou hmotností, tak s vysokým obsahem hydroxylových skupin, které jsou přítomné na každé glukózové jednotce. Ty zajišťují hydrofilitu a umožňují interakce prostřednictvím vodíkových vazeb s vodou i mezi jednotlivými řetězci [47]. Vysoký obsah $-OH$ skupin také umožňuje chemickou modifikaci dextranu, což je výhodné pro řadu aplikací zejména kvůli zvýšené reaktivity a možnosti navázání dalších biomolekul. Jedním z možných způsobů modifikace je oxidace periodáty (IO_4^-), která je specifická pro polysacharidy s vicinálními (sousedními) hydroxylovými skupinami [49]. Maia et al. (2011) popisují, že tento typ reakce štěpí vazby mezi uhlíky glukózových jednotek především mezi C3-C4 a C3-C2. Výsledkem jsou aldehydové skupiny, které mohou dále reagovat s N-nukleofily, jako jsou například aminy [52]. Reakce je zobrazená na Obrázku 5.



Obrázek 5 Oxidace dextranu periodátý za vzniku dialdehydu dextranu; upraveno dle Maia et al. (2011) [52]

Viskozita roztoků dextranu je primárně určena jeho molekulovou hmotností, koncentrací v roztoku a strukturálními parametry, jako je stupeň větvení či délka řetězců. Jako neutrální polysacharid dextran nevykazuje výraznou závislost viskozity na změnách pH ani na koncentraci iontů v roztoku [49]. Některé zdroje popisují, že roztoky o nízké koncentraci a nízké molekulové hmotnosti vykazují newtonské tokové chování, a naopak při vyšších koncentracích a rostoucích molekulových hmotnostech roztoků dextranu dochází k přechodu na pseudoplastické chování [48, 53]. V práci Tirtaatmadja et al. (2001) bylo však newtonské chování pozorováno u dextranů o molekulové hmotnosti 40 000 až 2 000 000 Da o koncentracích až 30 hm.%, což autoři vysvětlují vysokou rozvětveností polymeru [54].

2.3.2 Výskyt a produkce dextranu

Dextran se v přírodě vyskytuje jako extracelulární polysacharid produkovaný bakteriemi, které syntetizují dextran ze sacharózy prostřednictvím enzymu dextransukrázy [49]. Mezi hlavní producenty dextranu patří bakterie mléčného kvašení, jako *Leuconostoc* a *Lactobacillus*, ale také patogenní druh *Streptococcus mutans* [55–57].

Tyto mikroorganismy produkují dextran jako součást biofilmu nebo ochranných slizového obalu například při fermentaci rostlinných šťáv či při zrání vína a piva [17]. Dextran se také vyskytuje v ústní dutině člověka, kde ho produkuje již zmíněná bakterie *Streptococcus mutans* a přispívá ke vzniku zubního plaku [57].

Pro průmyslovou výrobu dextranu se nejčastěji využívá fermentačního procesu za použití bakterie *Leuconostoc mesenteroides*. Během fermentace dochází k syntéze vysokomolekulárního polysacharidu, zatímco vedlejším produktem je fruktóza. Pro izolaci dextranu z fermentačního média se běžně aplikuje precipitace pomocí alkoholů, jako je ethanol, která umožňuje selektivní oddělení polysacharidu od nízkomolekulárních kontaminantů, například fruktanů. Následuje čistící fáze zahrnující opakovaná promývání, filtrace a případně dialýzu, vedoucí k odstranění zbytkových solí, proteinů či jiných nečistot. Finální produkt je poté sušen do práškové formy. Podmínky sušení i předchozí purifikace umožňují cílené řízení výsledné molekulové hmotnosti dextranu [58, 59].

2.3.3 Aplikace dextranu

Jako přírodní a obnovitelná biomakromolekula vykazuje dextran nejen výbornou biodegradabilitu, ale také dobrou biokompatibilitu a netoxicitu. Díky přítomnosti velkého množství hydroxylových skupin může být také modifikován, což zvyšuje jeho aplikační potenciál především v biomedicíně, farmacii nebo potravinářském průmyslu [17].

Jednou z hlavních aplikací dextranu v medicíně je jeho použití jako plazmaexpandéru při velkých ztrátách krve. Dextran 70 (70 kDa) jako koloidní roztok osmoticky expanduje objem plazmy díky své vysoké molekulové hmotnosti a schopnosti zadržovat vodu v intravaskulárním prostoru. Vytváří zvýšený osmotický tlak v krevním řečišti, čímž podporuje přesun tekutiny z mezibuněčného prostoru zpět do cév [60]. Dextran je také využíván ke snížení rizika cévních onemocnění, jako je trombóza, díky tvorbě vazby na krevní destičky, erytrocyty a cévní endotel, čímž se snižuje jejich agregace a adheze [61].

Dextran a jeho deriváty jsou také intenzivně zkoumaným materiálem v tkáňovém inženýrství. Například v práci Alves et al. (2023) byl vyvinutý injektovatelný hydrogel na bázi dextranu společně s β -trifosfátem vápenatým a hydroxyapatitem. U tohoto systému byla pozorována rychlé uvolňování vancomycinu (antibiotikum) s dobrou biokompatibilitou s osteoblasty [13]. Musilová et al. (2022) popisují 3D tisknutelný hydrogel oxidovaného dextranu a želatiny, s homogenní distribucí fibroblastů ve struktuře scaffoldu [6].

V potravinářském průmyslu je dextran ceněný jako emulgátor, zahušťovadlo a texturizační činidlo [62]. V pekařských výrobcích zlepšuje měkkost střídky, zvyšuje objem těsta a prodlužuje trvanlivost díky své schopnosti vázat vodu [63]. V mléčných výrobcích a nápojích slouží jako stabilizátor suspenzí a pěn, a díky nízké viskozitě i ve vyšších koncentracích se uplatňuje v nízkokalorických produktech jako plnidlo nebo náhrada tuku [64, 65].

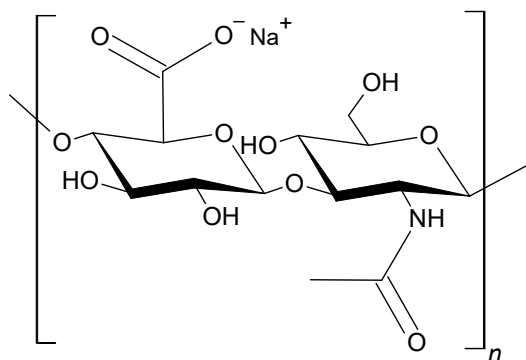
2.4 Hyaluronan

Glykosaminglykany, zkráceně GAG, jsou podstatnou součástí extracelulární matrix pojivové tkáně vícebuněčných organismů [66]. Z biochemického hlediska se jedná o skupinu lineárních heteropolysacharidů, které tvoří opakující se disacharidové jednotky. Každá disacharidová jednotka zahrnuje aminocukr, buď N-acetylglukosamin nebo N-galaktosamin, a ve většině případů uronovou kyselinu jako je D-glukuronová nebo L-iduronová kyselina. U některých GAG může být nahrazena hydroxylová skupina aminocukru sulfátovou skupinou [18]. Díky velkému množství záporně nabitých karboxylových, případně sulfátových skupin, jsou GAG schopny vázat velké množství vody, čímž je zvyšována elasticita tkání [66].

Mezi nejčastěji se vyskytující glykosaminglykany patří chondroitinsulfát, keratansulfát, heparin, heparansulfát a kyselina hyaluronová [66]. Poslední zmíněná, kyselina hyaluronová, resp. její sodná sůl – bude v následující kapitole popsána detailněji.

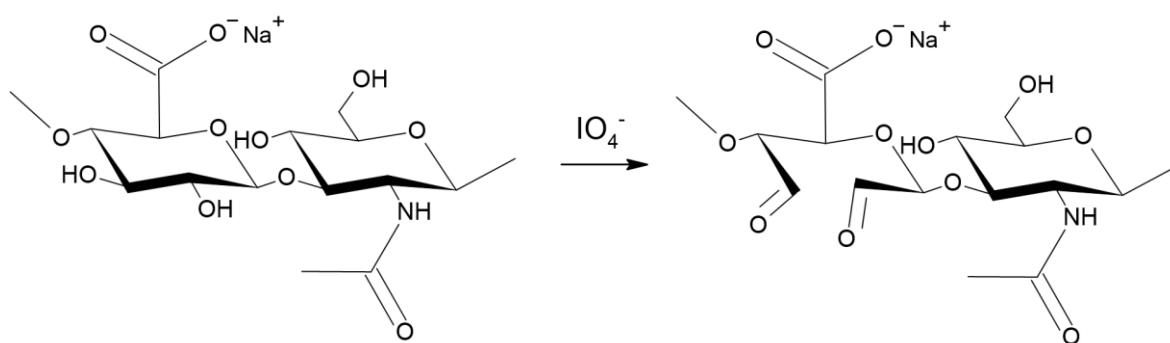
2.4.1 Struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti hyaluronanu

Hyaluronan je sodnou solí kyseliny hyaluronové. Jeho základní strukturu (Obrázek 6) tvoří alternující jednotky N-acytylglukosaminu a kyseliny D-glukuronové vázaných $\beta(1\rightarrow4)$ a $\beta(1\rightarrow3)$ glykosidickou vazbou [67]. Právě beta konformace sacharidových jednotek umožňuje, aby všechny objemné boční skupiny (hydroxyl, karboxyl, N-acetyl a anomerní uhlík sousedící jednotky) byly ve stericky výhodných ekvatoriálních polohách, vodíky naopak v polohách axiálních, což z hyaluronanu činí velmi energeticky stabilní molekulu [68].



Obrázek 6 Struktura hyaluronanu; upraveno dle Fallacara et al. (2018) [69]

Každá disacharidová jednotka HA obsahuje čtyři hydroxylové skupiny, jednu karboxylovou a acetylamidovou skupinu. Karboxylové skupiny kyseliny D-glukuronové mají při fyziologickém pH (7,35–7,45) záporný náboj, z tohoto důvodu je v biologických systémech nejvíce zastoupená právě sůl – hyaluronan, nikoliv neionizovaná forma – kyselina hyaluronová [70]. Právě přítomnost reaktivních karboxylových, zároveň ale také hydroxylových skupin, umožňuje chemické modifikace, což zvyšuje aplikační potenciál HA [69]. Příkladem takové modifikace může být, stejně jako v případě dextranu, oxidace HA periodáty za vzniku aldehydových skupin [71]. Tato reakce specificky štěpí vazbu mezi vicinálními dioly přítomnými na druhém a třetím uhlíkovém atomu. Reakce je znázorněna na Obrázku 7.



Obrázek 7 Oxidace hyaluronanu periodáty za vzniku dialdehydu hyaluronanu; upraveno dle Pandit et. al (2019) [71]

Konformace makromolekulárního řetězce v roztoku je silně ovlivněna prostředím (pH, přítomnost iontů) [72, 73]. Mezi COO^- , OH^- a H^+ vznikají vodíkové vazby, které jsou zodpovědné za šroubovicové prostorové uspořádání molekuly [74]. Polyanionická povaha hyaluronanu a jeho prostorové uspořádání zajišťují tuhý, náhodně svinutý tvar molekuly, která zaujímá velký hydrodynamický objem. Tento charakter mu umožňuje vytvářet roztoky o vysoké viskozitě [68, 69]. Meo et al. (2024) popisují, že roztoky HA s molekulovou

hmotností 60–90 kDa se chovají jako newtonské kapaliny bez ohledu na koncentraci, zatímco roztoky s vyšším M_w v intervalu 400–2500 kDa vykazují nenewtonovské, pseudoplastické chování [75]. To je způsobeno destrukcí vodíkových vazeb a hydrofobních interakcí při zvyšování smykové rychlosti. Řetězce hyaluronanu se deformují a orientují ve směru toku, což snižuje viskozitu roztoku. Tento proces je však reverzibilní, po snížení smykové rychlosti obnoví roztok svou původní strukturu a viskozitu [76].

2.4.2 Výskyt a biologické funkce hyaluronanu

Hyaluronan v organismu plní několik funkcí – může působit jako pasivní strukturální molekula, která zajišťuje mechanickou podporu a hydrataci tkání, nebo jako signální molekula regulující buněčné procesy, jako jsou zánětlivé reakce, migrace a dělení buněk [17]. HA je přirozenou součástí extracelulární matrix (ECM), kde se vyskytuje především v pojivových, epitelových a nervových tkáních. V těle savců je jeho molekulová hmotnost výrazně proměnlivá, pohybuje se intervalu od 5 kDa až do 20 MDa v závislosti na typu tkáně [77]. Biologická funkce HA je s jeho molekulovou hmotností velmi úzce spjata, přímo ovlivňuje jeho fyzikálně-chemické vlastnosti a interakce s buněčnými strukturami [17].

Vysokomolekulární hyaluronan ($M_w > 5 \cdot 10^5$ Da) působí převážně jako pasivní strukturální složka tkání, která umožňuje difúzi nízkomolekulárních molekul (např. elektrolyty, živiny) a zároveň brání prostupu vysokomolekulárních molekul jako jsou proteiny. Díky své viskoelasticitě, hygroskopickým vlastnostem a schopnosti vázat vodu zajišťuje hydrataci, stabilitu a mechanickou odolnost tkání. Jeho antiangiogenní (působící proti vzniku cév) a imunosupresivní účinky navíc přispívají k regulaci zánětlivých procesů [78]. Tato forma HA je například zásadní v synoviální tekutině kloubů, kde přispívá k rozložení mechanické zátěže během pohybu a chrání kloubní povrchy před poškozením. Podobné fyzikální vlastnosti vykazuje také v očním sklivci, kde udržuje viskozitu, hydrataci a mechanicky chrání oční tkáň [79, 80].

Středně velké molekuly hyaluronanu ($M_w = 2 \cdot 10^4$ – 10^5 Da) vykazují specifické biologické funkce, jako je podpora ovulace, embryogeneze a hojení ran. Tyto procesy jsou umožněny díky schopnosti hyaluronanu působit jako signální molekula, která interaguje s receptory na buněčných membránách, a ovlivňuje tak migraci buněk a jejich proliferaci [77, 79].

Na druhé straně **oligosacharidové fragmenty hyaluronanu**, sestávající z 15–50 disacharidových jednotek ($M_w = 6 \cdot 10^3$ – $2 \cdot 10^4$ Da), mají výrazné imunostimulační,

angiogenní a zánětlivé účinky [81]. Jejich přítomnost signalizuje tkáňové poškození, což vede k aktivaci imunitního systému a stimulaci procesů spojených s reparací tkání. Ještě menší oligomery hyaluronanu ($M_w = 400\text{--}4000$ Da) vykazují antiapoptotické vlastnosti (tzn. inhibice buněčné smrti) [79, 80].

2.4.3 Produkce hyaluronanu

Výchozí surovinou pro extrakci hyaluronanu ze živočišných tkání jsou odpady a vedlejší produkty živočišného původu, například kohoutí hřebínky, ze kterých byl izolován hyaluronan s molekulovou hmotností $1,2 \cdot 10^6$ Da v koncentraci 44 $\mu\text{g}/\text{mg}$, nebo synoviální tekutina skotu, ze které se povedlo izolovat $1,4 \cdot 10^6$ Da hyaluronan v koncentraci 250 mg/l [82, 83].

Nevýhodami extrakčního procesu je degradace hyaluronanu způsobená endogenní hyaluronidázovou aktivitou v živočišných tkáních, která polymer hydrolyticky rozkládá. Také podmínky extrakce mají velký vliv na kvalitu a množství získaného hyaluronanu [80]. Při purifikaci HA je problémová i eliminace proteinů a nukleových kyselin, které jsou součástí proteoglykanové matrice a při biomedicínských aplikacích by mohly způsobovat alergické reakce [84]. Vzhledem k tomu, že hyaluronan produkovaný živočichy i bakteriemi je chemicky identický, faktory jako obtížná kontrola kvality živočišných tkání, vysoké náklady a etické problémy podpořily rozvoj biotechnologických metod. V současnosti je průmyslová mikrobiální fermentace HA dominantním způsobem výroby [85].

Bakterie rodu *Streptococcus*, které produkují hyaluronan jako součást svého extracelulárního kapsulárního obalu, patří mezi důležité producenty. Tento obal chrání bakterie před imunitní odpovědí hostitele, podporuje adhezi a zvyšuje jejich odolnost v prostředí [86]. Zatímco některé druhy (např. *S. pyogenes*) jsou lidskými patogeny, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, který patogenem není, se stal nejčastěji využívaným kmenem pro průmyslovou syntézu hyaluronanu díky své schopnosti produkovat vysokomolekulární HA s vysokými výtěžky [87, 88]. Například biotechnologická firma Contipro a.s. prodává k lednu 2025 hyaluronan produkovaný *S. equi* subsp. *zooepidemicus* o molekulových hmotnostech 250–2300 kDa [89].

2.4.4 Aplikace hyaluronanu

Hyaluronan je biokompatibilní, neimunogenní a biodegradabilní polymer, který nachází široké uplatnění zejména v medicíně, farmacii a kosmetice. Konkrétní aplikace se odvíjí

především od molekulové hmotnosti biopolymeru. Navíc přítomnost reaktivních funkčních skupin umožňuje chemickou modifikaci, čímž se významně rozšiřuje spektrum jeho využití [67, 69, 90].

V medicíně je HA široce využíván v oftalmologii, především při operacích šedého zákalu [91]. HA díky svým viskoelastickým vlastnostem udržuje tvar oka během operace a zároveň chrání další tkán před poškozením. Také je pro své lubrikační schopnosti běžnou součástí očních kapek pro léčbu suchého oka [92, 93]. V oblasti ortopedie je HA podávána ve formě intraartikulárních injekcí k léčbě osteoartrózy [94, 95], jelikož obnovuje viskoelastické vlastnosti synoviální tekutiny, která snižuje tření mezi kloubními chrupavkami při pohybu. Dále je také častou složkou produktů pro regeneraci tkání [96], protože usnadňuje migraci a proliferaci buněk. V neposlední řadě se HA a jeho deriváty zkoumají i jako nosiče léčiv [97] nebo materiál ve tkáňovém inženýrství pro výrobu hydrogelů [98], které budou blíže popsány v kapitole 3.

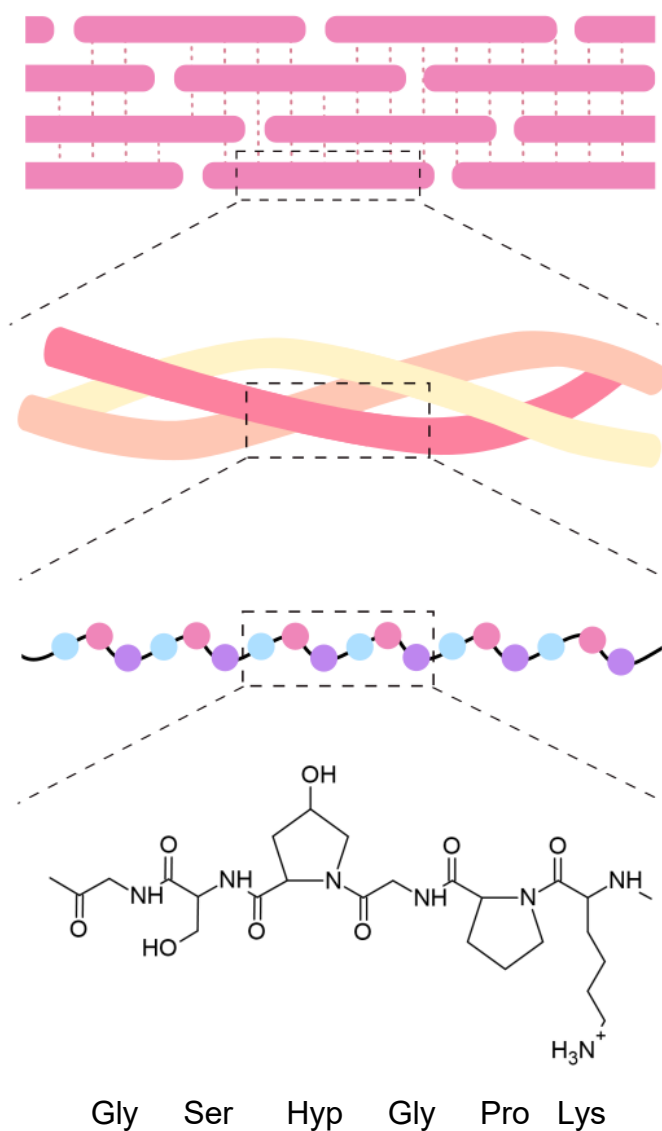
V kosmetice je HA nezastupitelný zejména pro své hydratační a regenerační vlastnosti. Nízká a střední molekulová hmotnost HA ($M_w = 10^5 - 10^3$ Da) umožňuje průnik do hlubších vrstev pokožky a díky své schopnosti aktivně vázat vlhkost zajišťuje hydrataci a zlepšuje elasticitu pleti [99–101]. Deriváty hyaluronanu se hojně využívají v dermálních výplních, kde slouží k redukci vrásek a modelaci kontur obličeje [102, 103]. Vysokomolekulární HA ($M_w > 5 \cdot 10^5$ Da) působí především jako filmotvorný polymer, který redukuje odpařování vody z pokožky a tím zajišťuje její dlouhodobou hydrataci [104].

2.5 Želatina

Želatina je odvozený protein, který se samostatně v přírodě nevyskytuje. Získává se z hlavní bílkoviny živočišných pojivových tkání – kolagenu. Je tedy jasné, že struktura i vlastnosti želatiny přímo s kolagenem souvisí [105, 106]. Kolagen nemá uniformní složení, jedná se spíše o skupinu příbuzných proteinů. V současné době je známo 28 různých typů kolagenu, nejrozšířenější jsou typy I až IV, kdy kolagen typu I tvoří více než 90 % kolagenu v lidském těle [17]. Je hlavní složkou organické hmoty kostí, šlach, kůže, vazů, rohovky a dalších pojivových tkání. Hlavní funkcí kolagenu v organismu je poskytovat strukturální podporu a pevnost tkáním a zároveň zajišťovat jejich mechanickou odolnost a elasticitu [107]. Želatina se však získává pouze ze zdrojů bohatých na právě zmíněný kolagen typu I [108].

2.5.1 Struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti kolagenu a želatiny

Primární aminokyselinová sekvence kolagenu typu I se liší v závislosti na jeho původu. Charakteristické jsou opakující se sekvence (glycin-prolin-X) nebo (glycin-X-hydroxyprolin), kde X může být kterákoli ze zbývajících 17 proteinogenních aminokyselin [15, 57]. Ty se stáčí do levotočivé šroubovice a tvoří sekundární strukturu kolagenu, tzv. α -řetězec, který obsahuje přibližně 1 000 aminokyselin. Terciální uspořádání vzniká stočením tří α -řetězců do pravotočivé šroubovice. Zesíťováním těchto fibrilárních struktur kovalentními vazbami vzniká kolagenové vlákno o vysoké pevnosti [18, 24]. Popsaná struktura je znázorněna na Obrázku 8.



Obrázek 8 Možná struktura vlákna kolagenu; Gly = glycin, Ser = serin,

Hyp = hydroxyprolin, Pro = prolin, Lys = Lysin; upraveno dle Djabourov et al. (1988)
a Milano et al. (2023) [109, 110]

Želatina se získává denaturací kolagenu, při níž dochází k narušení jeho trojitě šroubovice pomocí tepelného zpracování a chemických předúprav, což bude blíže popsáno v podkapitole 2.5.2 [111]. Tyto úpravy rozruší příčné vazby v kolagenu, čímž se uvolní jednotlivé polypeptidové řetězce, které jsou rozpustné ve vodě a tvoří želatinu [17].

Primární struktura želatiny se odvíjí od kolagenu, ze kterého se získává [106]. Molekulová hmotnost želatiny se nachází v rozmezí 15-400 kDa. Ve vodném prostředí vytváří koloidní roztok, známý jako sol, který při ochlazení pod teplotu kolem 40 °C prochází tzv. sol-gel přechodem [109]. Mechanismus tohoto procesu je popsán v podkapitole 3.1.1. Viskozita a pevnost želatinového gelu se navíc mění v závislosti na distribuci molekulové hmotnosti a mohou být ovlivněny faktory, jako jsou přítomnost elektrolytů, hodnota pH a teplota [17, 111].

2.5.2 Výroba želatiny

Tradičně je kolagen získáván z vedlejších produktů zpracování živočišných surovin, především z hovězích a vepřových kůží či kostí, případně také z rybí kůže [24]. Želatina se pak získává částečnou hydrolýzou kolagenu při níž dochází k rozštěpení příčných kovalentních vazeb, denaturací terciální struktury a hydrolytickému rozkladu peptidových vazeb [106]. V závislosti na způsobu předúpravy se komerčně produkovaná želatina dělí na typ A a typ B, jak již bylo naznačeno v předchozí kapitole.

Želatina typu A se vyrábí kyselým postupem, který se uplatňuje při zpracování vepřových a rybích kůží nebo kostí [112]. Kůže je očištěna, rozřezána a ponořena do kyselé lázně (1-5% roztok H_3PO_4 , HCl nebo H_2SO_4) na 10–30 hodin, čímž dochází k bobtnání. Následuje extrakce při teplotách stoupajících od 55 °C do 100 °C v několika krocích (každý trvající 4–8 hodin), což vede k denuraci a rozpouštění kolagenu. Vedlejším produktem je tuk [111, 112]. Finální želatina má vyšší izoelektrický bod (pH 7–9) a tvoří gely o nižší viskozitě [106].

Naopak **želatina typu B** se vyrábí alkalickým způsobem, převážně z kostí, hovězí nebo vepřové kůže. Kosti jsou rozdrčeny, zbaveny tuku a podrobeny demineralizaci 4–14 dní v 4–7% roztoku HCl . Poté jsou demineralizované kosti uchovávány ve vápenném mléce 3–16 týdnů, což způsobuje částečnou deaminaci kolagenu a uvolňování amoniaku. Po omytí (15–30 hodin) a nastavení pH na 5–7 následuje extrakce, podobná jako u typu A [111, 112]. Hlavní rozdíl spočívá v delším trvání alkalické úpravy, nižším izoelektrickém bodu (pH 4-5). Gely tvořené tímto typem želatiny jsou také viskóznější [106].

2.5.3 Aplikace želatiny

Želatina představuje materiál s řadou výhod, mezi něž patří nízké náklady, snadná dostupnost, biologická rozložitelnost a nízká imunogenita [113]. Zároveň vykazuje vysokou biokompatibilitu a přirozenou bioaktivitu díky přítomnosti specifických sekvencí arginin–glycin–asparagové kyseliny, které podporují adhezi buněk [114]. Amfifilní povaha želatiny umožňuje tvorbu emulzí, schopnost tvorby polymerní sítě je zase využívána při tvorbě filmů či jako želírující látky [115–117]. Další významnou vlastností želatiny je přítomnost různých funkčních skupin umožňujících chemické modifikace. Díky těmto vlastnostem je želatina široce využívána v biomedicině, farmaceutickém průmyslu, kosmetice i potravinářství [113].

Hlavní uplatnění nachází želatina ve farmaceutických aplikacích, například při potahování tablet za účelem maskování nepříjemné chuti léčiv v práškové podobě, případně jako pojivo pro přímou výrobu kapslí pro léčiva v tekutém stavu [118, 119]. Intenzivně jsou také zkoumány systémy na bázi želatiny pro cílené doručování léčiv díky chemické variabilitě, která umožňuje syntézu nosičů bioaktivních látek a regulaci kinetiky jejich uvolňování [120, 121]. Dále jsou studovány i kompozity pro přípravu scaffoldů a bioinků v tkáňovém inženýrství. Například studie Musilové et al. (2022) ukazuje, že želatina zesíťovaná oxidovaným dextranem s vysokou viabilitou buněk je slibným materiálem pro 3D biotisk [6].

Podle Mezinárodní nomenklatury kosmetických přísad (INCI) plní želatina v kosmetice filmotvornou a zahušťující funkci [122]. Želatina a její hydrolyzáty mohou být navíc integrovány do nutrikosmetických produktů díky jejich schopnosti podporovat kolagenovou syntézu a působit proti stárnutí kůže. Například experiment na potkanech ukázal, že orální podávání želatiny vedlo ke zvýšení tloušťky dermis a hustoty kolagenních vláken, dále došlo ke snížení poměru kolagenu typu III k typu I (kolagen typu I je dominantní v mladé kůži a je zodpovědný za její pevnost, zatímco kolagen typu III převažuje při stárnutí a je spojován s méně pevnou strukturou) [123]. Kromě toho byla významně posílena aktivita antioxidantních enzymů v kůži, zatímco obsah markeru oxidativního stresu klesl.

V potravinářském průmyslu želatina slouží především jako želírující, zahušťující, emulgační a stabilizační činidlo [106]. Díky své schopnosti vytvářet termoreverzibilní gely se hojně využívá v cukrářských výrobcích, jako jsou želatinové bonbony nebo marshmallow, kde zajišťuje pevnost a elasticitu [124, 125]. V mléčných výrobcích želatina zlepšuje texturu a stabilitu [126].

3 HYDROGELY A JEJICH PŘÍPRAVA

Hydrogely lze definovat jako chemicky a fyzikálně zesíťovanou 3D polymerní síť, která může absorbovat relativně velké množství vody (alespoň 10 % z celkové hmotnosti materiálu) a je schopna bobtnat ve vodě, díky přítomnosti hydrofilních funkčních skupin jako jsou (-COOH), (-NH₂), (-OH), (-CONH), (-CONH₂) nebo (-SO₃H). Zároveň díky zesíťované struktuře zůstávají hydrogely v roztoku stabilní [2, 127]. Svými mechanickými vlastnostmi, jako je měkkost a elasticita, dokáží napodobovat přirozené fyziologické prostředí. Dalšími důležitými charakteristikami je jejich vysoká porozita, permeabilita a biokompatibilita [3].

Hydrogely mohou být připraveny síťováním polymerních řetězců dvěma základními mechanismy. Prvním je fyzikální síťování, kdy je síť tvořena slabými intramolekulárními interakcemi. V druhém případě jsou polymerní řetězce navzájem propojeny kovalentními vazbami mezi přítomnými funkčními skupinami, nastává chemické síťování. Kombinací obou přístupů pak můžeme hydrogely síťovat tzv. hybridně [2]. Všechny zmíněné metody budou blíže přiblíženy v následujících podkapitolách.

3.1 Fyzikální síťování hydrogelů

Jak již bylo zmíněno výše, fyzikálně síťované hydrogely jsou vázány pomocí intramolekulárních interakcí, jako jsou vodíkové vazby, elektrostatické interakce, iontové interakce nebo hydrofobními interakcemi [128]. Ve srovnání s chemicky síťovanými hydrogely mají obecně horší mechanické vlastnosti, ovšem velkou výhodou je absence toxických činidel při přípravě hydrogelu, také se také vyznačují reverzibilitou [129]. V dalších řádcích budou popsány metody síťování vodíkovými vazbami a iontovými interakcemi.

3.1.1 Síťování vodíkovými vazbami

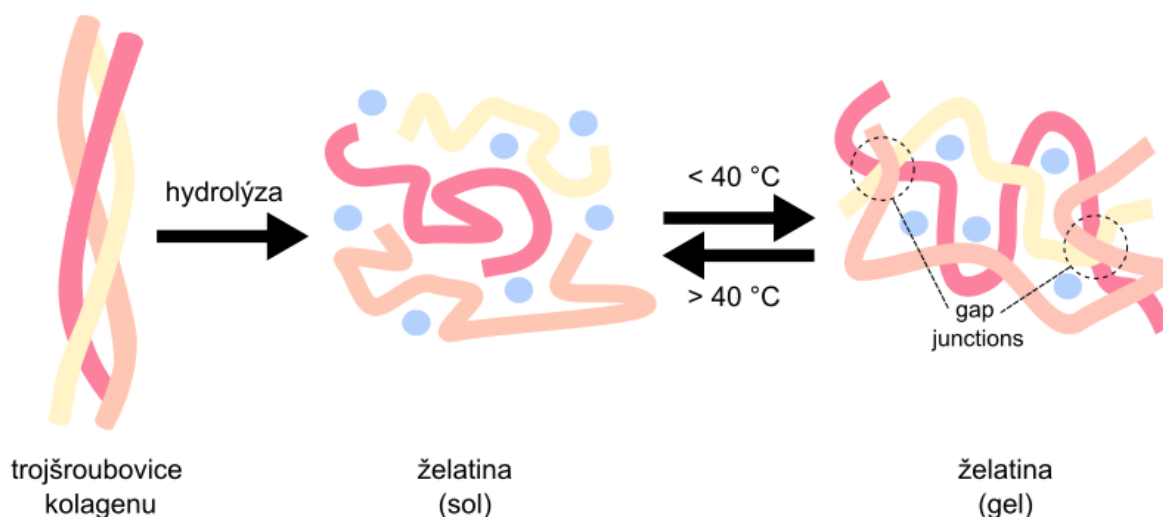
Vodíková vazba je přitažlivá interakce, která vzniká mezi atomem vodíku vázaným v molekule na elektronegativní atom, jako je kyslík nebo dusík, a jiným elektronegativním atomem [130]. Tento typ vazby tedy vzniká spontánně u polymerů, které obsahují polární skupinu, typickým příkladem je želatina.

Při teplotách nad bodem tání (kolem 40 °C) zaujímá v roztoku uspořádání tzv. polymerních klubek. Polypeptidové řetězce jsou plně rozvinuté a pohyblivé díky rozrušení vodíkových vazeb a hydrofobních interakcí, které by jinak stabilizovaly strukturu.

V tomto stavu je roztok tekutý (sol), protože molekuly vody obklopují řetězce a brání jejich organizaci. Rozpustnost je zajištěna hydrofilními skupinami na řetězcích želatiny, které interagují s molekulami vody [109, 131, 132].

Při poklesu teploty pod bod tání dochází k postupnému snižování kinetické energie molekul, což umožňuje opětovné vytváření intramolekulárních a intermolekulárních vodíkových vazeb mezi polypeptidovými řetězci. Klíčovým krokem je přechod z náhodných klubek na trojitě helikální struktury, které napodobují původní kolagenovou trojitou šroubovici. Tento proces není úplný – pouze část řetězců se reorganizuje do helikálních segmentů, zatímco zbytek zůstává v amorfním stavu [109, 131, 132].

Helikální oblasti jsou stabilizovány vodíkovými vazbami působícími mezi karbonylovými a aminoskupinami sousedních řetězců. Jak helikální segmenty rostou, začínají se navzájem propojovat díky dalším vodíkovým vazbám a slabým hydrofobním interakcím mezi nepolárními bočními řetězci (např. prolinem). Tyto propojené oblasti tvoří tzv. „gap junction“ (spojovací zóny), které fungují jako síťovací body v trojrozměrné síti. Voda je zachycena v této síti díky kapilárním silám a interakcím s hydrofilními skupinami, což vede k přechodu z tekutého solu na pevný gel [109, 131, 132]. Schematicky je sol-gel přechod popsán na Obrázku 9.



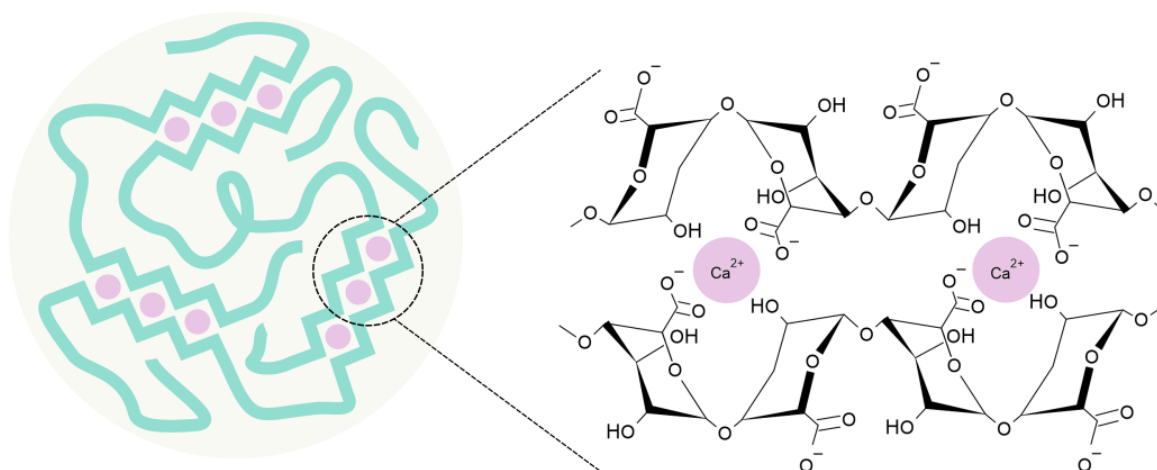
Obrázek 9 Sol-gel přechod želatiny; upraveno dle Obas et. al (2024) [133]

3.1.2 Fyzikální síťování iontovými interakcemi

Fyzikální síťování iontovými interakcemi představuje mechanismus, při kterém dochází k propojení polymerních řetězců prostřednictvím vícevalentních iontů (např. Ca^{2+} , Sr^{2+} ,

Ba^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+}) s polárními funkčními skupinami (např. $-\text{COO}^-$) polymeru za vzniku polyelektrolytického komplexu [33, 134, 135].

Jako příklad lze uvést síťování alginátu sodného za pomoci divalentního iontu Ca^{2+} , který je popsán tzv. „Egg box“ modelem (Obrázku 10) [34]. Elektrostatické interakce mezi karboxylovými skupinami alginátu (G-bloků) a ionty vápníku vedou k tvorbě tzv. „gap junctions“ – míst, kde se propojují dva nebo více polymerních řetězců. Kovové ionty zde fungují jako mosty spojující karboxylové skupiny, což stabilizuje jednotlivé řetězce alginátu a umožňuje vznik trojrozměrné síťové struktury [136].



Obrázek 10 Egg box model síťování alginátu vápenatými ionty; upraveno dle Hu et. al (2021) [137]

Tento model předpokládá, že s rostoucím množstvím iontů Ca^{2+} se pevnost sítě zvyšuje až do úplného nasycení vazebných míst [34]. V práci Donati et al. (2005) bylo však pozorováno, že při dalším zvyšování koncentrace iontů mechanická pevnost nedosáhne maximální hodnoty, ale naopak začne klesat [138]. To autoři vysvětlují tím, že dochází ke vzniku nových spojovacích uzlů mezi kyselinou guluronovou a mannuronovou, které nejsou dostatečně pevné a nakonec dochází ke zhroucení struktury polymerní sítě.

Vápenaté ionty jsou široce užívané pro svou biokompatibilitu, netoxický charakter, schopnost vytvářet stabilní trojrozměrnou síť za mírných podmínek a v neposlední řadě také dostatečnou mechanickou pevnost pro většinu aplikací [33]. Pro síťování alginátů lze použít i další multivalentní ionty, které se svými vlastnostmi liší. Například Ba^{2+} a Sr^{2+} vykazují vyšší afinitu k alginátu, čímž je zajištěna také vyšší pevnost a stabilita [139]. Navíc Sr^{2+} je netoxický divalentní iont, který podporuje růst a regeneraci kostí, naopak biokompatibilita Ba^{2+} je omezená [7, 140]. Podobně ionty Fe^{3+} umožňují tvorbu pevnější a stabilnější sítě

díky vyšší valenci a mají dobrou biokompatibilitu [141]. Možným rizikem při degradaci hydrogelu síťovaného Fe^{3+} je přechod do oxidačního stavu Fe^{2+} a uvolnění do organismu, což by mohlo ovlivnit fyziologické procesy [142]. Zatímco ionty Zn^{2+} poskytují střední mechanickou pevnost, způsobené tvorbou lokálních strukturních heterogenit při gelaci [143]. Na druhou stranu, uvolňování zinečnatých iontů z hydrogelu pozitivně podporuje buněčnou adhezi, proliferaci a diferenciaci [8].

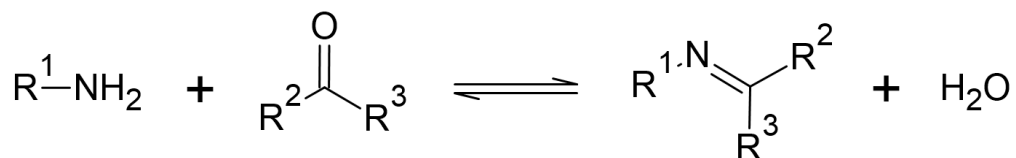
Podobný přístup lze ve specifických případech aplikovat i na iontové síťování nativního hyaluronanu. Bylo pozorováno, že divalentní ionty ovlivňují konformaci HA v roztoku, což při komplexaci nevede ke gelaci jako u alginátů, naopak dochází k významné redukci hydrodynamického poloměru, díky čemuž klesá i viskozita, jak popisuje Furth et al. (2008) [144]. Výjimka v gelaci u divalentních iontů byla pozorována při použití Cu^{2+} a Mg^{2+} iontů [145, 146]. Síťování HA bylo také prokázáno u trivalentních iontů jako Fe^{3+} a Gd^{3+} [147, 148]. Použití těchto iontů, s výjimkou především hořečnatých a železitých iontů, jako síťovacích činidel je v biologických aplikacích však kvůli toxickému charakteru omezeno.

3.2 Chemické síťování hydrogelů

Chemické síťování je proces, při kterém dochází ke spojování polymerních řetězců pomocí kovalentních vazeb. Obvykle se k tomuto účelu využívají nízkomolekulární bifunkční síťovací činidla, jako je například glutaraldehyd, která reagují s funkčními skupinami polymerní páteře [128, 149]. Jiný přístup představuje fotopolymerizace, která iniciuje síťování elektromagnetickým zářením [150]. Tato podkapitola se však zaměřuje na chemické síťování založené na dynamické kovalentní chemii (t.j. chemické reakce, které probíhají reverzibilně za podmínek řízených rovnováhou) [151], konkrétně metodou tvorby Schiffovy báze.

3.2.1 Síťování metodou Schiffovy báze

Chemické síťování metodou Schiffovy báze je založeno na tvorbě iminové vazby ($\text{R}_2\text{C}=\text{NR}'$, kde $\text{R}' \neq \text{H}$) prostřednictvím reakce mezi aminovými a aldehydovými skupinami [152]. Tato reakce je zobrazena na následujícím schématu (Obrázku 11).



Obrázek 11 Reakce aminové a aldehydové skupiny za vzniku Schiffovy báze; upraveno dle Zhang et al. (2018) [152]

Tímto způsobem mohou být připraveny hydrogely například želatiny, která obsahuje volné aminoskupiny (lysin, hydroxylysin) a modifikovanými polysacharidy s aldehydovými skupinami, jako jsou HA nebo dextran [153]. Tyto hydrogely se vyznačují zvýšenou mechanickou pevností a elasticitou. Zároveň je důležité, že dynamická kovalentní chemická reakce probíhá reverzibilně, v důsledku čehož jsou takto síťované hydrogely schopné tzv. self-healingu [154]. To je proces, při kterém dochází ke znovuoobnově vazeb, které byly v důsledku působení sil v materiálu přerušeny. Další výhodou je jejich citlivost na pH, která umožňuje reagovat na změny v okolním prostředí, což lze využít například pro řízené uvolňování léčiv [152, 155].

3.3 Hydrogely s kombinovanou dvojí sítí

Většina hydrogelů je měkká a křehká, v důsledku čehož obvykle selhávají při tahovém napětí nižším než 1 MPa a deformaci pod 100 %. Při návrhu tzv. „double network“ (DN) hydrogelů se kombinují chemické a fyzikální vazby, což umožňuje vytvořit hybridní síťované struktury s vysokou mechanickou pevností [156]. V hybridních DN hydrogelech obvykle první síť tvoří fyzikálně síťovaný polymer, který poskytuje houževnatost, zatímco druhá síť, chemicky síťovaná, zajišťuje pevnost a stabilitu [157, 158].

Například v práci Vítkové et al. (2022) byly připravovány chemicky síťované hydrogely modifikovaného hyaluronanu (popř. modifikovaného dextranu) metodou Schiffovy báze, které byly fyzikálně stabilizovány komplexací železitými ionty [11]. Bylo pozorováno, že přidáním fyzikální sítě došlo ke zlepšení strukturální integrity hydrogelů a prodloužení stability v prostředí fosfátového pufru při bobtnacích testech – zatímco bez iontového zesíťování hydrogely vydržely méně než 12 hodin, po přidání Fe^{3+} vzrostla stabilita na několik dní. Dále autoři popisují nárůst souřezového modulu, který referuje k vyšší elasticitě materiálu oproti jedné síti.

4 NANOKOMPOZITNÍ HYDROGELY

Při návrhu hydrogelů se využívají jak syntetické, tak přírodní polymery, přičemž oba typy mají své specifické výhody i nevýhody. Syntetické polymery umožňují kontrolu fyzikálně-chemických vlastností, vyznačují se vysokou mechanickou pevností a reprodukovatelností, avšak často postrádají bioaktivní domény nezbytné pro buněčnou adhezi, proliferaci a diferenciaci. Naopak pro přírodní polymery je dobrá biokompatibilita a bioaktivita charakteristická. Tyto polymery podporují adhezi a růst buněk a mohou být enzymaticky degradovány v těle. Jejich nevýhodou však bývá nižší mechanická stabilita a jejich vlastnosti mohou být proměnlivé v závislosti na původu materiálu [159]. Pro zlepšení mechanických, biologických a funkčních vlastností hydrogelů jsou tvořeny kompozitní materiály kombinující různé typy polymerů. Kromě polymerních složek lze do matrice začleňovat také nanočástice, které ve spojení se zesíťovanou polymerní sítí vytvářejí synergický efekt, jenž výrazně posiluje charakteristické vlastnosti výsledného materiálu [12].

Následující text se bude zabývat obecnou definicí a klasifikací nanočástic a jejich využití při designu hydrogelů. Zvláštní pozornost pak bude zaměřena na organofosfonátové nanočástice, které byly využívány při konstrukci nanokompozitních hydrogelů v praktické části diplomové práce.

4.1 Definice nanočástic a jejich klasifikace v kontextu hydrogelů

Nanočástice (NPs) jsou podle Mezinárodní organizace pro standardizaci (ISO) definovány jako nanoobjekty, které mají všechny vnější rozměry v nanometrovém měřítku (10^{-9} m), přičemž délka nejdelší a nejkratší osy se významně neliší. Pokud se rozměry výrazně liší (více než trojnásobně), místo termínu nanočástice se používají pojmy jako nanovlákná nebo nanodestičky [160]. V odborné literatuře jsou však nanočástice běžně označovány jednoduše jako částice s alespoň jedním rozměrem v rozmezí 1 až 100 nm [12, 161]. Díky velkému specifickému povrchu (poměr povrchu a objemu), kvantovým efektům a zvýšené reaktivě, mají nanočástice unikátní fyzikální, chemické a biologické vlastnosti, kterých je využíváno v široké škále odvětví – včetně tkáňového inženýrství [12].

Nanočástice lze klasifikovat na základě různých kritérií, jedno z nejběžnějších je dělení podle chemické kompozice. Rozlišujeme nanočástice například na bázi uhlíku, dále na anorganické nebo kovové NPs [12, 162]. Jednotlivé skupiny budou přiblíženy v následujících podkapitolách, včetně uvedení konkrétních aplikací v nanokompozitních hydrogelech.

4.1.1 Anorganické nanočástice

Mezi anorganické nanočástice spadají oxidy kovů jako je oxid titaničitý nebo oxid křemičitý, dále také keramické materiály [163, 164]. Do této kategorie lze zařadit i fosfonátové nanočástice, které budou podrobněji popsány až v kapitole 4.2. Zmíněné NPs jsou často do hydrogelové matrice přidávány za účelem zvýšení mechanických vlastností, bioaktivity nebo zlepšení tisknutelnosti [165].

Například Xavier et al. (2015) popisují, že nanočástice Laponitu (deskovitý syntetický smektitový jíl na bázi křemičitanu hořečnatého) podpořily osteogenezi u hydrogelu modifikovaného kolagenu (kolagen-metakrylát) [166]. Také bylo pozorováno, že přidavek NPs zvýšil porozitu, mechanickou pevnost v tlaku a tisknutelnost scaffoldu. V další práci byl zkoumán vliv nanohydroxyapatitu v tisknutelném systému modifikované želatiny a hyaluronanu [14]. Zde autoři poukazují na významný pozitivní vliv NPs na osteogenezi *in vivo* modelu při implantaci u potkanů.

4.1.2 Kovové nanočástice

Kovové nanočástice, jako jsou zlato, stříbro nebo železo, se vyznačují svou elektrickou vodivostí, plasmonickými vlastnostmi nebo biokompatibilitou, v případě stříbra je také vhodné zmínit jeho antibakteriální vlastnosti [167].

Stříbrné nanočástice byly inkorporovány do hydrogelu na bázi dextranu, u kterého byla pozorována výborná antibakteriální aktivita vůči *Bacillus cereus* [168]. V jiné studii byly zkoumány hydrogely polyvinylalkoholu/acetátu celulózy/želatiny s Ag nanočásticemi, kde přítomnost NPs podpořila mechanickou a teplotní stabilitu hydrogelu a stejně jako v předchozím případě došlo ke zvýšení antibakteriální schopnosti [169]. V další práci byl vyvinutý magneticky responzivní hyaluronový hydrogel s karbonylem železa. Při aplikaci magnetického pole byl pozorován nárůst modulu pružnosti až 1000x, což podle autorů otevírá nové možnosti pro mechanickou stimulaci buněk, jako jsou myocyty [11].

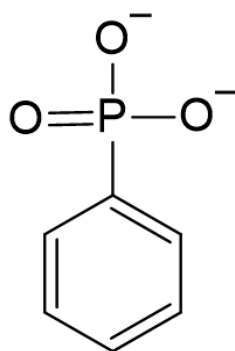
4.1.3 Nanočástice na bázi uhlíku

Jako příklad nanočástic na bázi uhlíku lze uvést grafen, uhlíkové nanotrubičky (CNT), fullereny nebo také uhlíkové tečky (CD). Tyto nanočástice jsou v biomedicíně používány především z důvodů jejich biokompatibility, fotoluminiscence, zlepšení mechanických vlastností nebo elektrické vodivosti [170].

Ku příkladu, Jia et al. popsal systém pH-responzivních nanohydrogelů na bázi hyaluronanu funkcionalizového kyselinou listovou a polyethylenglykolem, zesít'ovaných uhlíkovými tečkami pro terapii a diagnostiku nádorových buněk [171]. Autoři uvádějí, že díky výjimečným fluorescenčním vlastnostem CDs by mohl systém najít využití pro neinvazivní diagnostiku v reálném čase. Dalším příkladem aplikace nanočástic na bázi uhlíku v kontextu hydrogelů je práce Shi et al. (2015) [172]. Výzkumný tým vytvořil elektro- a pH-responzivní kompozit alginát/celulóza/CNT pro řízené uvolňování léčiv. Bylo prokázáno, že elektricky zesílené uvolňování vykazovalo selektivitu vzhledem k hodnotě pH prostředí, tj. rychlé uvolňování v neutrálním médiu, ale pomalé v kyselém a zásaditém prostředí.

4.2 Fenylofosfonátové nanočástice

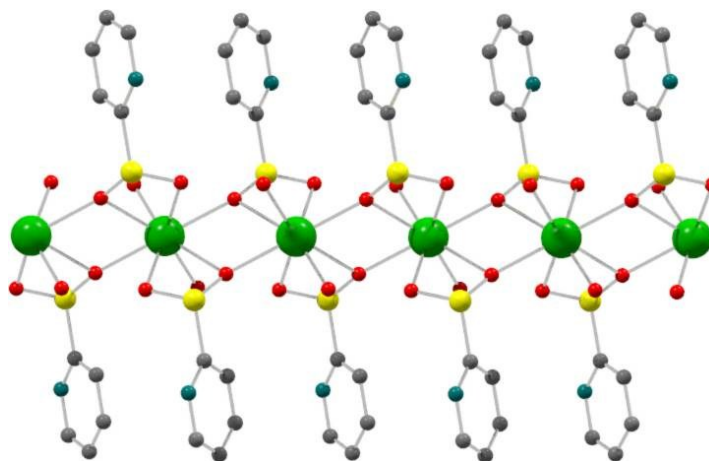
Fosfonáty jsou rozsáhlou skupinou organofosforových sloučenin, které obsahují funkční skupinu C-PO(OR)_2 , kde R může být vodík, alkyl nebo aryl. Tyto sloučeniny jsou deriváty fosfonových kyselin (C-PO(OH)_2), které se vyznačují přítomností přímé vazby mezi atomem uhlíku a fosforu (P-C). Tato vazba odlišuje fosfonáty od jiných organofosforových sloučenin, například fosfátů, kde je fosfor vázán přes kyslík (P-O-C). Struktura fosfonátové skupiny má tetraedrický tvar, atom fosforu je umístěn ve středu a je obklopen dvěma hydroxylovými (nebo alkoxylovými) skupinami, jedním organickým substituentem a dvojnou vazbou P=O . Fenylofosfonáty jsou pak podskupinou fosfonátů, u nichž je organický substituent tvořen fenylovou skupinou, struktura je zobrazená na Obrázku 12 [173, 174].



Obrázek 12 Strukturní vzorec fenylofosfonátu; upraveno dle PubChem [175]

Vápenaté fenylofosfonáty (CaPhP) vznikají reakcí fenylofosfonové kyseliny s vápenatými ionty (Ca^{2+}), čímž jsou tvořeny soli $\text{Ca}(\text{C}_6\text{H}_5\text{PO}_3)$ nebo jejich hydráty [176–178]. Struktura vápenatých fenylofosfonátů je charakteristická vrstevnatou

architekturou, kde ionty vápníku koordinačně vážou kyslíkové atomy fosfonových skupin, zatímco fenylové kruhy vyčnívají do mezivrstevného prostoru a přispívají k vyšší lipofilitě molekuly (Obrázek 13) [176]. Krystalická struktura dihydrátu vápenatých fenylfosfonátů byla v práci Kopecké et al. (2018) studována technikami jako rentgenová difrakce (XRD), která potvrzuje přítomnost pravidelně uspořádaných vrstev s typickou mezivrstevnou vzdáleností kolem 15 Å [177]. Důležitou vlastností je také anisotropie nanočástic, kdy tloušťka vrstev je v řádu nanometrů, zatímco jejich délka a šířka dosahuje až stovek nanometrů.



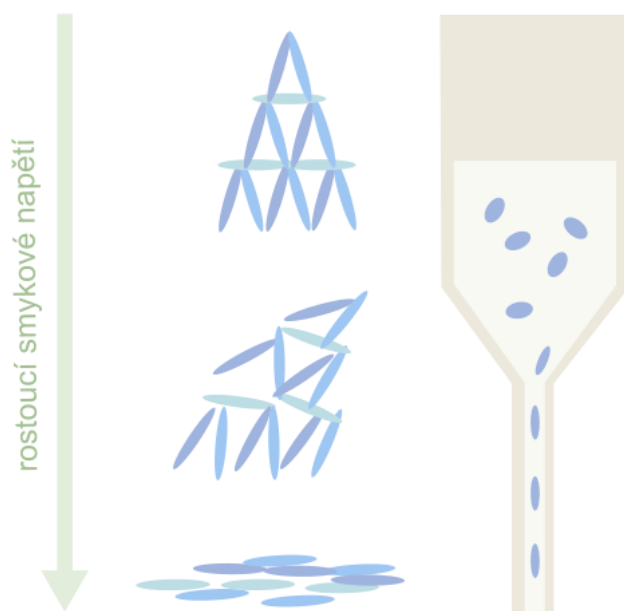
Obrázek 13 Model struktury vrstvy CaPhP; atomy vápníku jsou označené zeleně, atomy fosforu žlutě, kyslíku červeně a uhlíku šedě; převzato od Kopecké et al. (2018) [177]

4.2.1 „House of cards“ struktura

Vápenaté fenylfosfonátové a fosfát-fenylfosfonátové nanočástice mohou tvořit tzv. „house of cards“ strukturu, jak uvádí další práce Kopecké et al. (2023) [10] v kontextu jejich využití v 3D tisku alginátu sodného. Tento typ organizace je charakteristický spontánním uspořádáním nabitých vrstevnatých destiček, které jsou orientovány kolmo nebo pod úhlem vůči sobě, aniž by byly pevně spojeny kovalentními vazbami. Stabilita trojrozměrné sítě je zajištěna slabými mezimolekulárními silami [10, 179]. Mezi destičkami vznikají mikro- a nanoporézní prostory, což zvyšuje povrchovou plochu materiálu a umožňuje jeho disperzi v polymerních matricích [180].

Ačkoli přesný mechanismus tvorby této sítě u systému CaPhP/alginát není plně popsán, podobné chování bylo pozorováno například u ethylenglykolové disperze Laponitu v kombinaci s alginátem, jak uvádí Dávila et al. [179]. Laponit, vrstevnatý destičkovitý syntetický smektitový jíl na bázi křemičitanu hořečnatého, má negativně nabitě plochy a pozitivně nabitě okraje – a interaguje s alginátem prostřednictvím elektrostatických sil.

Mezi pozitivně nabitými okraji Laponitových destiček a negativně nabitými karboxylovými skupinami ($-\text{COO}^-$) alginátu vzniká vazebný mechanismus, který svým uspořádáním může připomínat domeček z karet. Díky tomu zvyšuje viskozitu a podporuje pseudoplastické chování, což je nezbytné pro snadné vytlačování a zachování tvaru po depozici během 3D tisku hydrogelů, jak je také schematicky naznačeno na Obrázku 14.



Obrázek 14 Schématické znázornění struktury „house of cards“ v kontextu 3D tisku; upraveno dle Kopecké et al. (2023) [10]

5 TECHNIKY 3D TISKU HYDROGELŮ

Aditivní výroba, běžně označovaná jako 3D tisk, představuje výrobní technologii, která umožňuje tvorbu trojrozměrných objektů na základě digitálních modelů, nejčastěji ve formátech .STL nebo .G-code. Na rozdíl od tradičních subtraktivních metod, jako je obrábění, frézování či lití, kde se materiál odebírá z pevného bloku, 3D tisk staví struktury postupným nanášením materiálu vrstvu po vrstvě [181].

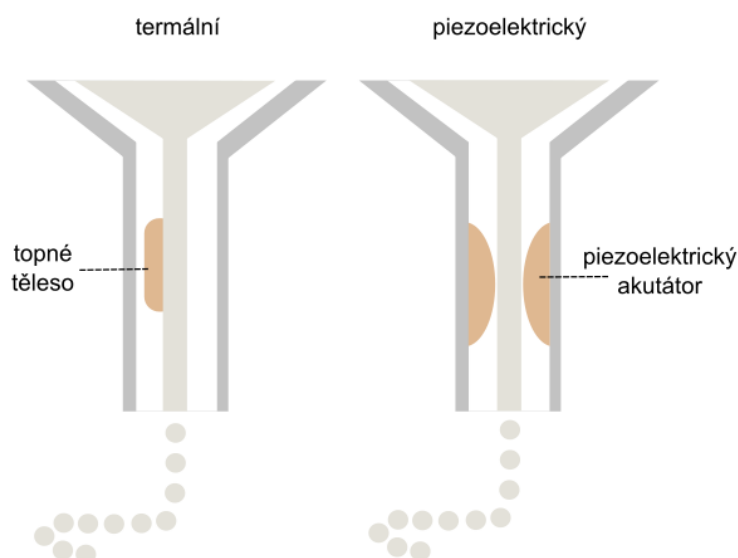
V biomedicínském kontextu byly některé metody 3D tisku přizpůsobeny specifickým požadavkům, jako je zpracování měkkých materiálů a biologicky kompatibilních systémů. Pokud proces zahrnuje přímou integraci živých buněk do tisknutého materiálu, hovoříme o biotisku a výsledné struktury označujeme jako konstrukty. Tyto konstrukty nacházejí uplatnění v tkáňovém inženýrství, regenerační medicíně či vývoji modelů pro testování léčiv. Naopak, pokud živé buňky nejsou součástí tiskového procesu, jedná se o standardní 3D tisk a tištěné struktury se nazývají scaffoldy. Ty slouží jako podpůrné matrice, které mohou být následně osídleny buňkami nebo využity jako modely pro výzkumné účely [182].

Pro tisk hydrogelů se nejčastěji využívají tři technologie: inkjetový tisk, mikroextruzní tisk a laserem asistovaný biotisk [183]. Tyto metody jsou popsány v podkapitolách 5.1 až 5.3. Kromě těchto technik se v tkáňovém inženýrství a příbuzných oblastech využívají i klasické metody aditivní výroby, například Fused Deposition Modeling (FDM) a stereolitografie (SLA). FDM, založené na vytlačování roztaveného filamentu, a SLA, využívající fotopolymerní tekuté pryskyřice pod UV zářením, jsou vhodné zejména pro anatomických modelů, avšak jejich použití pro přímý tisk hydrogelů s buňkami je omezené kvůli vyšším teplotám či agresivním chemickým podmínkám [184].

5.1 Inkjet 3D tisk

Inkjetový 3D tisk je založen na principu řízeného vypouštění drobných kapek bioinkoustu obsahujícího hydrogelový prekurzor na předem definované místo [185]. Proces využívá dva hlavní mechanismy: termální nebo piezoelektrický [186, 187]. Při termálním inkjetovém tisku je bioinkoust lokálně zahříván, což vytváří bubliny vedoucí k vypuzení kapek z trysky. Krátká doba zahřívání ($\sim 2 \mu\text{s}$) způsobuje pouze mírný nárůst teploty tiskové hlavy ($4\text{--}10^\circ\text{C}$), čímž se minimalizuje tepelný stres na tisknutý materiál [188]. Piezoelektrický systém naopak spoléhá na mechanickou deformaci krystalů (piezoelektrický akuator) v trysce, která kapalinu uvolňuje bez tepelného působení (Obrázek 15) [187, 189].

Hlavní předností inkjetového tisku je vysoké rozlišení, kdy kapky dosahují velikosti 10–50 μm , což umožňuje vytvářet jemné struktury s přesnou kontrolou nad umístěním buněk [185]. K tomu přispívá i rychlost tisku a relativně vysoká viabilita buněk, která může dosahovat až 90 %, díky šetrnému procesu bez výrazného mechanického nebo tepelného namáhání [189, 190]. Metoda však naráží na určitá omezení. Klíčovým faktorem je nutnost nízké viskozity bioinkoustu ($<10\text{--}15\text{ mPa}\cdot\text{s}$), což vylučuje zpracování hustších hydrogelů. Současně nízká generovaná deformace znemožňuje tisk materiálů s vysokou buněčnou hustotou ($>1\cdot 10^6$ buněk/ml), protože by mohlo dojít k ucpávání tiskové hlavy [183, 191]. Další nevýhodou je omezená schopnost vytvářet vysoké 3D struktury, jelikož kapkový princip neposkytuje dostatečnou stabilitu pro vícevrstvé konstrukce [183].



Obrázek 15 Termálního a piezoelektrického inkjet 3D tisku; upraveno dle Murphy et al. (2014) [183]

5.2 Mikroextruzní 3D tisk

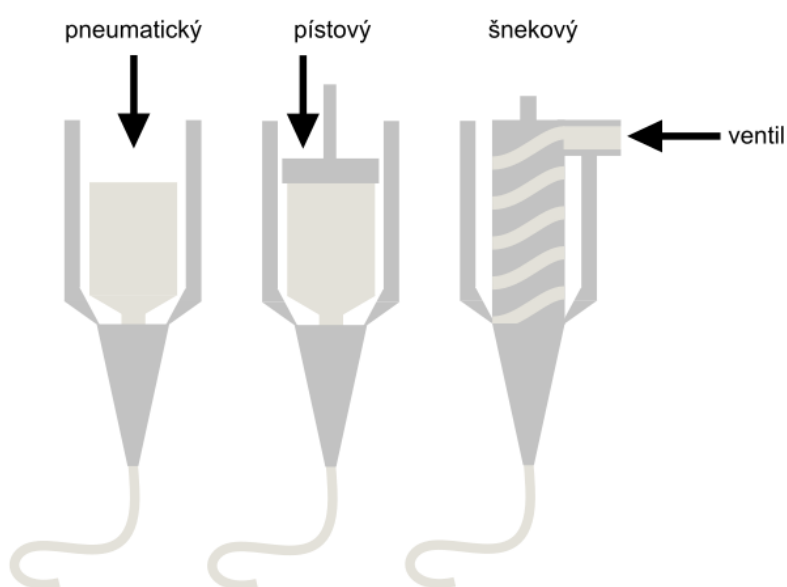
Mikroextruzní 3D tisk představuje technologii, která využívá mechanické síly k vytlačování bioinkoustu přes trysku na tiskovou platformu, kde materiál tuhne a tvoří definované trojrozměrné struktury [191]. Na rozdíl od inkjetového tisku, který nanáší materiál ve formě jednotlivých kapek, mikroextruzní tisk deponuje hydrogel kontinuálně, což umožňuje zpracování materiálů s širokým rozsahem viskozit – od 30 $\text{mPa}\cdot\text{s}$ až po více než $6\cdot 10^7\text{ mPa}\cdot\text{s}$ a zároveň zajišťuje vysokou reprodukovatelnost při tvorbě složitých struktur [183, 191]. Naopak nevýhodou oproti inkjetovému tisku je nižší rozlišení (100–500 μm) a v případě biotisku vlivem vyšší mechanické zátěže během extruze dochází ke snížení viability buněk, která se pohybuje v rozmezí 40–80 % v závislosti na podmínkách tisku [182, 184].

Tiskový systém se skládá z tiskové hlavy, tříosého polohovacího systému a tiskové platformy. Materiál je uložen v injekční stříkačce, odkud je pod počítačově řízeným pohybem hlavy vytlačován na základě digitálního modelu. Polohovací systém zajišťuje přesné umístění materiálu ve směrech X, Y a Z, což umožňuje výrobu robustních, vícevrstvých scaffoldů [192]. Mechanismus extruze se liší podle typu dávkování a zahrnuje tři základní přístupy: pneumatický, pístový a šnekový [182]. Schematicky jsou jednotlivé typy zobrazeny na Obrázku 16.

Pneumatický systém využívá stlačený vzduch k vytlačování materiálu z trysky, přičemž tlak reguluje rychlost a objem nanášeného hydrogelu. Tento přístup vyniká jednoduchou konstrukcí a snadnou údržbou, díky čemuž je oblíbený zejména pro materiály s nižší viskozitou. Jeho nevýhodou však zůstává obtížnější kontrola přesného průtoku, což může komplikovat zpracování viskóznějších hydrogelů [183].

Pístový tisk naopak spoléhá na mechanický pohyb pístu, který tlačí materiál směrem k trysce. Tento systém poskytuje lepší kontrolu nad dávkováním a je vhodný pro širší spektrum viskózních materiálů [183].

Šnekový tisk využívá rotační šnek k posunu materiálu, což zajišťuje přesné dávkování a homogenizaci, zejména u vysoce viskózních hydrogelů. Na druhou stranu tento mechanismus zvyšuje mechanický stres na buňky, což může vést k nižší buněčné viabilitě ve srovnání s pístovým nebo pneumatickým tiskem [183].

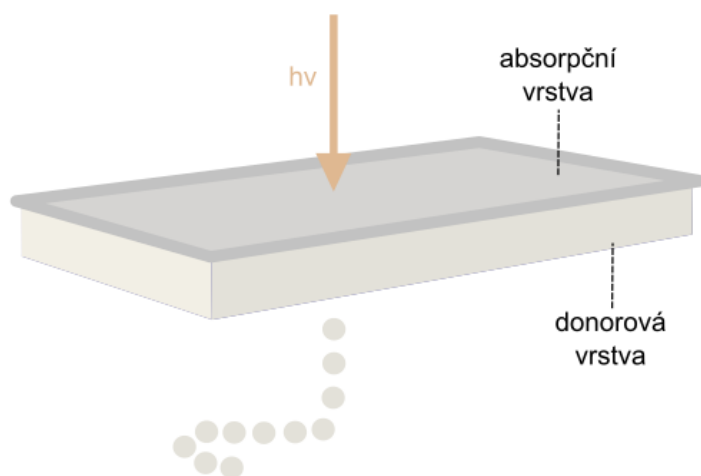


Obrázek 16 Typy dávkování mikroextruzního 3D tisku – pneumatický, pístový a šnekový; upraveno dle Murphy et al. (2014) [183]

5.3 Laserem asistovaný biotisk

Laserem asistovaný biotisk je pokročilá technologie, která využívá pulzní laser k přesnému přenosu bioinkoustu z donorové vrstvy na přijímací substrát [193]. Systém se skládá ze tří hlavních prvků: pulzního laserového zdroje, donorové vrstvy označované jako „ribbon“ a sběrného substrátu. „Ribbon“ je tvořena absorpční vrstvou a donorovou vrstvou, která obsahuje bioinkoust – typicky hydrogel s buňkami. Princip metody spočívá v zaměření laserového paprsku na absorpční vrstvu, kde energie pulsu vypařuje její část a generuje vysokotlakou bublinu. Tato bublina vytvoří tlakovou vlnu, která vystřelí kapku bioinkoustu z donorové vrstvy na cílové místo na substrátu, kde dochází k jeho uložení a následné gelaci (Obrázek 17) [183].

LAB vyniká extrémně vysokým rozlišením, kdy velikost přenesených kapek může dosahovat až 10 μm , což umožňuje tisk jemných a komplexních vzorů, včetně heterogenních tkání. Metoda je navíc šetrná k buňkám, protože eliminuje přímý mechanický kontakt s tryskou, což vede k viabilitě buněk přesahující 95 % [183]. Další výhodou je schopnost zpracovávat materiály s širokým rozsahem viskozit (1–300 $\text{mPa}\cdot\text{s}$) [192]. Mezi hlavní nevýhody patří vysoká cena zařízení a složitost přípravy „ribbon“ vrstvy, která vyžaduje pečlivou aplikaci bioinkoustu a absorpčního materiálu. Kromě toho je rychlost tisku nižší ve srovnání s inkjetovým nebo mikroextruzním tiskem, což může omezovat její využití při výrobě větších struktur [189].



Obrázek 17 Princip laserem-asistovaného biotisku;
upraveno dle Murphy et al. (2014) [183]

5.4 3D tisknuté hydrogely v tkáňovém inženýrství

Integrace technologie 3D tisku s hydrogelovými materiály umožňuje v tkáňovém inženýrství řízení zásadních parametrů, jako jsou struktura, porozita a bioaktivita výsledných konstrukcí, které nejen věrně napodobují přirozenou extracelulární matici, ale zároveň poskytují vhodné mikroprostředí pro buněčný růst, adhezi, diferenciaci a další biologické procesy [194].

Kolagen je hlavní organickou složkou kostí a chrupavek, z toho důvodu jsou pro tyto tkáně vhodné kompozity buď právě s kolagenem či želatinou [195]. Například Yang et al. (2018) vytvořili bioinkoust pro 3D tisk z kolagenu a alginátu v kombinaci s chondrocyty [16]. Výsledky ukázaly, nejen že kolagen zlepšil bioaktivitu a mechanickou pevnost tisknutých scaffoldů, ale také, že tato kombinace byla účinná při potlačování dediferenciace chondrocytů (tedy jejich přeměny na jiné typy buněk). V jiné práci byl vyvinutý a tisknutý scaffold z fibroinu a želatiny, který byl obohacený o peptid se specifickou vazbou k endogenním kmenovým buňkám kostní dřeni [196]. Tato kombinace zajistila dostatečné mechanické vlastnosti, která odpovídá nově tvořené chrupavce. Dále autoři dokládají, že scaffold podporuje buněčnou adhezi, proliferaci, diferenciaci a produkci extracelulární matrix. V již diskutované práci Kopecké et al. (2023) byl představen bioinkoust alginátu a vápenatých organofosfonátových nanočástic [10]. Zde nanočástice plní funkci nejen reologického činidla, ale autoři také poukazují na fakt, že přítomnost vápenatých a fosfátových iontů ve scaffoldu zvyšuje adhezi, migraci a diferenciaci osteoblastů [197]. Přítomnost vápenatých iontů v matici je také asociována se snížením negativního vlivu smykového napětí na buňky během tisku [198]. Jako poslední příklad můžou být uvedeni i autoři Ma et al. (2020), kteří popisují hydrogel na bázi alginátu/želatiny/HA, do něhož byly inkorporovány gliové buňky [199]. Cílem bylo vytvořit strukturu napodobující mechanické vlastnosti nativní mozkové tkáně. Studie ukázala, že přidání 7,5 % želatiny vedlo ke vzniku porézní, měkké sítě s vysokou strukturální stabilitou a zároveň příznivou buněčnou viabilitou (>85 % po 14 dnech kultivace). Vícevrstvé tisknuté konstrukce navíc vykazovaly lepší distribuci buněk a zvýšenou adhezi oproti jedné vrstvě.

6 CHARAKTERIZACE HYDROGELŮ

Pro pochopení jejich funkčních vlastností a optimalizaci pro konkrétní aplikace v tkáňovém inženýrství je nezbytná komplexní charakterizace materiálu [200]. Tato kapitola se zaměřuje na klíčové metody analýzy hydrogelů, jako je reologické chování, morfologie, bobtnací schopnosti a v neposlední řadě i jejich biokompatibilita

6.1 Reologické vlastnosti

Reologie je vědecká disciplína zabývající se prouděním a deformací materiálů pod vlivem mechanického napětí. Studuje chování látek od ideálně tekutých (viskózních) až po ideálně pevné (elastické), přičemž hydrogely představují viskoelastické materiály kombinující obě tyto vlastnosti. Reologická analýza hydrogelů umožňuje kvantifikovat jejich mechanické chování, což je nezbytné pro posouzení stability nebo zpracovatelnosti například během 3D tisku. Základním modelem pro popis chování tekutin je Newtonova rovnice (Rovnice 1), která platí pro ideální viskózní kapaliny, kde τ je smykové napětí, η je dynamická viskozita a $\dot{\gamma}$ je rychlost smykové deformace [201].

$$\tau = \eta \dot{\gamma} \quad (1)$$

Jak již bylo řečeno, hydrogely však vykazují pseudoplastické chování, kdy dochází k poklesu viskozity s rostoucí rychlostí smykové deformace, díky polymerní síťové struktuře. Proto je nezbytné využít pokročilejších modelů jako je například Herschel-Bulkley model, který popisuje tekutiny s vnitřní strukturou. To znamená, že tyto látky začínají téct jen v případě, že síla působící na tuto kapalinu je vyšší než síla, která drží vnitřní strukturu této látky. Matematicky je model dán Rovnicí 2, kde je τ je smykové napětí, τ_y je prahové napětí, K je konzistence a n je index neneutonského chování [202].

$$\tau = \tau_y + K \dot{\gamma}^n \quad (2)$$

Reologické vlastnosti hydrogelů se nejčastěji charakterizují pomocí oscilačních měření na rotačním reometru. Při těchto experimentech je vzorek podroben sinusoidální deformaci o určité frekvenci a amplitudě, přičemž je sledována odpověď materiálu v podobě napětí. Oscilační testy zahrnují frekvenční sweep (měření v závislosti na frekvenci) a amplitudový sweep (měření v závislosti na velikosti deformace), což umožňuje určit lineární viskoelastickou oblast, kde je chování materiálu nezávislé na amplitudě deformace [201].

Oscilační měření poskytuje dva základní parametry: soufázový modul (storage modulus, G') a ztrátový modul (loss modulus, G''). Soufázový modul G' reprezentuje elastickou složku materiálu, tj. energii uloženou a vrácenou během deformace, zatímco ztrátový modul G'' odráží viskózní složku, tj. energii rozptýlenou jako teplo. Pokud $G' > G''$, hydrogel vykazuje převážně elastické chování a chová se jako pevný gel; pokud $G'' > G'$, převažuje viskózní charakter a materiál je spíše tekutý. Čas ve kterém $G'' = G'$ se označuje jako čas gelace a značí moment, kdy se začíná v hydrogelu tvořit trojrozměrná síť [201, 202].

6.2 Morfologie hydrogelů

Morfologie hydrogelů představuje parametr, který zásadním způsobem ovlivňuje jejich fyzikálně-chemické, mechanické i biologické vlastnosti. Velikost pórů, stupeň zesíťování, povrchová struktura a homogenita polymerní sítě určují nejen mechanickou tuhost a elasticitu materiálu, ale i jeho biokompatibilitu, difuzní vlastnosti či schopnost interagovat s buňkami. V oblasti tkáňového inženýrství, nosičů léčiv nebo 3D biotisku tak morfologie do značné míry definuje výslednou funkčnost hydrogelového systému [203, 204].

Porézní architektura například umožňuje průnik živin a metabolitů, zatímco hustota sítě určuje rychlost degradace či uvolňování aktivních látek [204]. Dále bylo prokázáno, že velikost pórů ovlivňuje buněčnou migraci a může usnadnit nebo naopak inhibovat orientaci buněk v materiálu [205]. Nižší porozita často vede k agregaci buněk a omezené proliferaci, zatímco nadměrně velké póry mohou oslabit mechanickou stabilitu materiálu [206]. V kontextu tkáňového inženýrství jsou specifické rozměry pórů zásadní pro úspěšnou regeneraci různých typů tkání – například kostní tkáň vyžaduje póry o velikosti větší než 300 μm a chrupavka 250–500 μm [207, 208].

Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) představuje jednu z nejčastěji využívaných metod pro hodnocení mikrostruktury hydrogelů [204]. SEM funguje na principu interakce elektronového svazku s povrchem vzorku, kdy je vzorek skenován tenkým elektronovým paprskem vycházejícím z elektronového děla. Elektrony interagují s atomy vzorku, což vede k emisi sekundárních elektronů, zpětně odražených elektronů a charakteristického rentgenového záření, které jsou detekovány a využity k vytvoření obrazu povrchové topografie s vysokým rozlišením (řádově nanometry) [209]. Jelikož hydrogelové systémy obsahují vysoké procento vody, je před vlastním snímkováním nutná příprava vzorku, typicky lyofilizací, která však může strukturu částečně deformovat [203, 204].

6.3 Bobtnací testy

V tkáňovém inženýrství hraje bobtnací schopnost hydrogelů zásadní roli, neboť vytváří hydratované prostředí napodobující extracelulární matici, čímž podporuje transport živin, kyslíku a odpadních látek nezbytných pro proliferaci a diferenciaci buněk [194]. Tato schopnost hydrogelu absorbovat velké množství vody může být zkoumána pomocí tzv. swelling testů. Zřejmě nejčastěji užívaným vyjádřením bobtnacích schopností je stupeň bobtnání (SR, swelling ratio), což je poměr hmotnosti nabobtnalého hydrogelu $m_{nabobtnalý}$, k hmotnosti suchého vzorku $m_{suchý}$, jak také popisuje Rovnice 3 [210].

$$SR = \frac{m_{nabobtnalý} - m_{suchý}}{m_{suchý}} \quad (3)$$

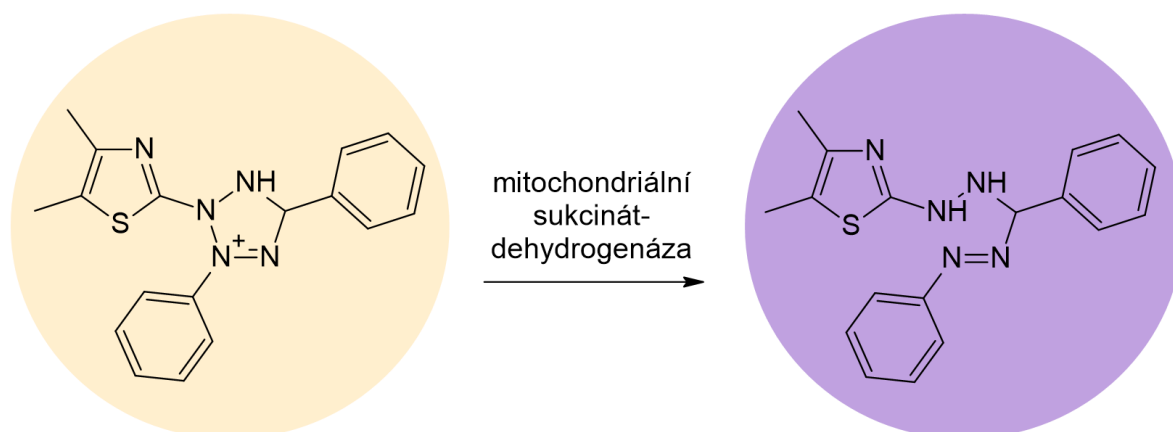
Tento ukazatel odráží pevnost struktury polymerní sítě a její kapacitu zadržet vodu nebo pufr, což závisí především na hustotě sítě. Vyšší hustota vede k většímu množství spojů, což může zvyšovat mechanickou odolnost, zatímco nižší hustota podporuje schopnost absorbovat větší objem tekutiny a tím více nabobtnat [211]. Ihned po kontaktu hydrogelu s vodným prostředím dochází k solvataci hydrofilních skupin na polymerním řetězci, což vede k rozvolnění polymerních řetězců a zvětšení vzdáleností mezi nimi. Po nasycení kapalina proniká do hydrofobnějších oblastí polymerní sítě, kde může docházet ke slabým vazebným interakcím. Dále je bobtnání ovlivněno osmotickým tlakem. Proti tomuto tlaku působí elastické síly sítě. Rovnovážný stav nastává, když se tyto síly vyrovnají [212].

6.4 Testy biokompatibility

Pro biomedicínské aplikace je nezbytné zajistit kompatibilitu s biologickými systémy, protože tyto materiály často přicházejí do přímého kontaktu s tkáněmi nebo tělesnými tekutinami [2]. Postupy hodnocení biokompatibility zdravotnických prostředků, včetně materiálů jako jsou hydrogely, stanovuje soubor mezinárodních norem vydaných Mezinárodní organizací pro normalizaci ISO 10993 [213]. Zde můžeme najít definici biokompatibility jako schopnost materiálu být při specifické aplikaci snášen živým systémem, přičemž musí dojít k odpovídající reakci příjemce.

Primárním ukazatelem biokompatibility pro kterýkoliv zdravotní prostředek je cytotoxicita, která se hodnotí obvykle pomocí MTT testu. Tento test měří metabolickou aktivitu buněk po expozici materiálu a je založen na redukci tetrazoliové soli MTT (žlutá) na formazan (fialový) živými buňkami pomocí mitochondriálního enzymu

sukcinátdehydrogenázy [214], podle reakce na Obrázku 18. Stanovení se provádí spektrofotometricky.



Obrázek 18 Mechanismus MTT testu; upraveno dle Niu et al. (2024) [215]

Další nezbytné testy zdravotnického prostředku pak určuje norma ISO 10993-1 v závislosti na času a způsobu kontaktu s organismem [213]. Například u kostního scaffoldu je kromě citlivosti, akutní toxicity nebo genotoxicity sledována podpora osteogeneze, mechanická pevnost odpovídající kosti (4-30 GPa) [216].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

7 POPIS EXPERIMENTU

Tato kapitola popisuje jednotlivé fáze experimentu, které tvoří základ pro následnou metodickou část, představení dosažených výsledků a jejich srovnání s dostupnou literaturou. Samotný experiment byl rozdělen do několika fází.

V **první fázi** experimentu probíhal vývoj a výběr vhodné polymerní směsi pro 3D tisk z následujících biopolymerů: alginát, želatina, hyaluronan/oxidovaný hyaluronan a oxidovaný dextran. Jednotlivé typy hydrogelů byly poté připraveny odlišným způsobem – chemickým a fyzikálním síťováním. Konkrétně se jednalo o následující typy hydrogelů:

- (A) chemicky zesíťované hydrogely prostřednictvím Schiffovy báze (na bázi želatiny, oxidovaného dextranu (DEX-OX) a oxidovaného hyaluronanu (HA-OX),
- (B) fyzikálně zesíťované hydrogely na bázi alginátu, HA, želatiny a nanočástice (CaPhP nebo Ca3.1), které byly po vytisknutí zesíťovány ionty Zn^{2+} nebo Fe^{3+} ,
- (C) hybridní hydrogel kombinující složky (A) i (B), tj. směs želatiny, DEX-OX, HA-OX, nanočástic a alginátu, které byly po vytisknutí dosíťovány ionty Zn^{2+} , Fe^{3+} .

U systému (A) bylo nejprve nutné připravit oxidované polysacharidy, DEX-OX a HA-OX, aby mohly reagovat s aminovými skupinami želatiny za vzniku kovalentní vazby. Modifikované polymery byly charakterizovány metodami ^1H NMR (pro ověření čistoty), GPC (pro stanovení molekulové hmotnosti a polydisperzity po oxidaci) a titrační stanovení stupně oxidace s využitím hydroxylamin-hydrochloridu. Následně byly testovány různé poměry použitých polymerů a výsledná schopnost gelace připravených hydrogelů. U směsi na bázi HA-OX a želatiny byla pozorována tvorba vláken svědčící o počínajícím síťování, avšak míra gelace byla natolik nízká, že nevznikl soudržný hydrogel vhodný pro 3D tisk a proto byly z dalšího testování vyloučeny. Kombinace hydrogelů na bázi DEX-OX a želatiny síťovala do 2 minut. Vzhledem k požadavku na zvýšení bioaktivity byly dále testovány trojkomponentní systémy DEX-OX/HA-OX/želatina, jejichž kombinace zajistila dostatečnou pevnost výsledného gelu. Vhodný poměr polymerů pro 3D tisk byl vybrán na základě oscilačního reologického měření v rozsahu 1–100 rad/s.

U systému (B) byly připraveny hydrogelové směsi na bázi alginátu, HA, želatiny a nanočástice (CaPhP nebo Ca3.1). Vhodný poměr polymerů pro 3D tisk byl opět stanoven na základě oscilačního reologického měření v rozsahu 1–100 rad/s.

U posledního systému hydrogelů (**C**) byly kombinovány dva přechozí přístupy, tzn. fyzikální i chemické síťování. Byly testovány různé poměry složek spolu se způsoby jejich homogenizace. I přesto došlo, po ponoření připravených hydrogelů do vodného prostředí s obsahem síťovacích iontů, k okamžitému rozpadu struktury. Z tohoto důvodu byl systém z dalšího testování vyloučen.

Ve druhé fázi experimentu byla u vybraných vzorků hydrogelů hodnocena míra narůstání za hubicí, tisková přesnost a šířka jeho filamentu. Poté následovala optimalizace tiskových parametrů a příprava vícevrstvých scaffoldů. U systému (**B**) bylo nezbytné tisknuté struktury následně zesíťovat ionty Zn^{2+} nebo Fe^{3+} . Hydrogely (**A**) a (**B**) byly dále podrobeny charakterizaci – z pohledu reologického měření, morfologie pomocí SEM a bobtnacím schopnostem, za účelem vyhodnocení možných aplikací v tkáňovém inženýrství.

7.1 Použité materiály

V experimentální části práce byly použity následující chemikálie a materiály: sodná sůl kyseliny hyaluronové (kosmetická čistota) o molekulové hmotnosti 1,18 MDa a 1,5 MDa (Contipro group a.s., Dolní Dobrouč, Česká republika); dextran o molekulové hmotnosti 100kDa (Merck KGaA, Darmstadt, Německo); sodná sůl kyseliny alginové z hnědých řas (střední viskozita) (Merck KGaA, Darmstadt, Německo) a farmaceutická želatina (Noventis s.r.o., Zlín, Česká republika); disperze nanočástic – dihydrát fenylofosfonát vápenatý (CaPhP) a fosfát-fenylofosfonát vápenatý (Ca3.1) v ethylenglykolu o koncentraci 5g/l (Synpo a.s., Pardubice, Česká republika); demineralizovaná voda (18,2 mS/cm; DEMI); čpavková voda 30 obj.% (NH_3); 0,1 M fosfátový pufr (pH 7,4; PBS); hydroxid sodný (NaOH); 0,25 M hydroxylamin-hydrochlorid ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$); jodistan sodný (NaIO_4); 0,1 M kyselina šťavelová ($(\text{COOH})_2$); pentahydrát thiosíranu sodného ($\text{Na}_2\text{SO}_3\cdot 5\text{H}_2\text{O}$); chlorid zinečnatý (ZnCl_2) a chlorid železitý (FeCl_3) (Merck KGaA, Darmstadt, Německo).

7.2 Modifikace výchozích biopolymerů

Jak již bylo uvedeno výše, při oxidaci nativního dextranu ($M_w = 100 \text{ kDa}$) i hyaluronan ($M_w = 1,18 \text{ a } 1,5 \text{ MDa}$) bylo jako oxidační činidlo použit jodistan sodný, za účelem získání aldehydových skupin, potřebných k následnému síťování pomocí tzv. Schiffovy báze s aminovými skupinami přítomnými na želatině. Princip oxidace dextranu je popsána v podkapitole 2.3.1 a oxidace hyaluronanu v podkapitole 2.4.1.

7.2.1 Oxidace dextranu

Pro oxidaci dextranu byl nejprve byl připraven 13 hm.% zásobní roztok dextranu (0,00309 mol; 100 kDa) rozpuštěním 5 g v 38,46 ml DEMI vody při 50 °C za stálého míchání po dobu 24 hodin. Poté byl roztok polymeru ochlazen na laboratorní teplotu. Dále byl připraven vodný roztok jodistanu sodného rozpuštěním 2,64 g v 50 ml DEMI vodě (5,3 hm.%). Takto rozpuštěný jodistan byl následně přidán k roztoku dextranu (ekvimolární poměru 0,400; 0,01235 mol), čímž byla zahájena oxidační reakce. Samotná oxidace probíhala při 25 °C po dobu 4 hodin. Reakce byla poté ukončena postupným přikapáváním 7,81 g 30 hm.% roztoku thiosíranu sodného v ekvimolárním poměru 1,2 (0,0099 mol) vůči NaIO_4 . Směs byla ponechána na míchadle po dobu jedné hodiny, aby došlo ke zreagování přebytku jodistanu. Z důvodu fotosenzibility oxidační reakce bylo použito tmavé laboratorní sklo, které bylo navíc obaleno alobalem.

Zreagovaná směs byla za účelem purifikace zředěna DEMI vodou na přibližně trojnásobek původního objemu (~300 ml) a převedena do dialyzační membrány Snake SkinTM (cut-off 3 500 g/mol). Dialýza probíhala po dobu 3 dní proti demineralizované vodě při laboratorní teplotě, kdy vodné prostředí bylo během dne 3x měněno. Purifikovaný produkt byl přelit do skleněné Petriho misky, následně zamražen na teplotu -18 °C a poté lyofilizován. Proces lyofilizace probíhal ve dvou fázích sušení. V první fázi sušení probíhalo při tlaku 0,06 mbar a teplotě -80 °C po dobu 30 hodin, následně byl vzorek dosušen v tzv. finálním sušení, probíhajícím po dobu 10 hodin při tlaku 0,001 mbar.

7.2.2 Oxidace hyaluronanu

Stejně jako v případě oxidace dextranu, byl při oxidaci hyaluronanu připraven 1 hm.% zásobní roztok (0,0075 mol; 1,18 MDa/1,5 MDa) jeho rozpouštěním 3 g v 300 ml DEMI vody při teplotě 50 °C po dobu 24 hodin za neustálého míchání. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl k roztoku polymeru přidán 11,7 hm.% roztok jodistanu sodného (1,76 g rozpuštěných v 15 ml DEMI vody) v ekvimolárním poměru 1,1 (0,0083 mol). Samotná oxidační reakce pak probíhala po dobu 10 hodin za neustálého míchání při 25 °C. Reakce byla následně ukončena postupným přikapáváním 5,22 g 30hm.% thiosíranu sodného v ekvimolárním poměru 1,2 (0,0099 mol) ku NaIO_4 . Směs byla poté ponechána na míchadle po dobu jedné hodiny, aby došlo ke zreagování veškerého přebytku jodistanu. Z důvodu fotosenzibility oxidační reakce bylo použito tmavé laboratorní sklo, které bylo navíc obaleno alobalem.

Zreagovaná směs byla za účelem purifikace zředěna DEMI vodou na přibližně trojnásobek původního objemu (~1000 ml) a převedena do dialyzační membrány Snake Skin™ (cut-off 3 500 g/mol). Dialýza probíhala po dobu 3 dní proti demineralizované vodě při laboratorní teplotě, kdy vodné prostředí bylo během dne 3x měněno. Purifikovaný produkt byl přelit do skleněné Petriho misky, následně zamražen na teplotu -18 °C a poté lyofilizován. Proces lyofilizace probíhal ve dvou fázích sušení. V první fázi sušení probíhalo při tlaku 0,06 mbar a teplotě -80 °C po dobu 30 hodin, následně byl vzorek dosušen v tzv. finálním sušení, probíhajícím po dobu 10 hodin při tlaku 0,001 mbar.

7.3 Charakterizace modifikovaných biopolymerů

Za účelem potvrzení chemické modifikace a charakterizace oxidovaných polymerů byly vzorky zkoumány pomocí metod protonové nukleární magnetické rezonance (NMR), gelové permeační chromatografie (GPC) a titrací hydroxylamin-hydrochloridem.

7.3.1 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Nukleární magnetická rezonance (NMR) je analytická metoda založená na interakci atomových jader s vnějším magnetickým polem a elektromagnetickým zářením v rádiové oblasti. Umožňuje detailní strukturní analýzu molekul na základě změn energetických stavů jader a poskytuje informace o chemickém prostředí jednotlivých atomů [217]. Jak již bylo zmíněno výše, přítomnost aldehydových skupin na oxidovaném dextranu a hyaluronanu byla ověřena právě pomocí NMR spektroskopie.

Protonové spektrum (¹H NMR) bylo změřeno na přístroji JEOL ECZ 400 (JEOL Ltd., Tokio, Japonsko), pracujícím při frekvenci ¹H 399,78 MHz a teplotě 60 °C. Vzorky byly pro analýzu rozpuštěny v D₂O v koncentraci 10 mg/ml po dobu 24 h při laboratorní teplotě za stálého míchání. Vzorky byly převedeny do speciálních NMR kyvet a měřeny při teplotě 25 °C. Naměřená data byla poté zpracována a vyhodnocena v programu *ACD/NMR Processor Academic Edition* pomocí komplexní Fourierovy transformace. Jako reference byl použit signál deuterované vody, odpovídající chemickému posunu 4,75 ppm.

7.3.2 Gelová permeační chromatografie (GPC)

Gelová permeační chromatografie (GPC) je separační technika založená na rozdělení molekul podle jejich molekulové hmotnosti v roztoku. Molekuly o větší molekulové hmotnosti jsou vylučovány z pórů stacionární fáze a eluují dříve než molekuly menší [218]. Průměrná molekulová hmotnost oxidovaných derivátů dextranu a hyaluronanu byla

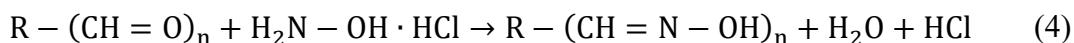
provedena na systému vysokovýkonné kapalinové chromatografie Shimadzu Prominence, vybaveném UV-Vis a refraktometrickým detektorem (Shimadzu Prominence, LC-20 series, Shimadzu, Kyoto, Japonsko).

Samotná analýza probíhala za následujících podmínek: jako mobilní fáze byl použit 0,1 M fosfátový pufr (pH 7,4), jehož průtok byl nastaven na 0,8 ml/min při teplotě 30 °C. Analýza byla provedena v sérii zapojených kolonách PL aquagel-OH 60 (8 µm, 300·7,5 mm) a PL aquagel-OH 40 (8 µm, 300·7,5 mm). Pro kalibraci molekulové hmotnosti byly využity pullulanové standardy, analýza byla založena na datech získaných refraktometrickým detektorem. Hodnota uvedená ve výsledcích je dána jako průměr z celkem dvou měření.

7.3.3 Stanovení stupně oxidace modifikovaných biopolymerů

Dle Zhao a Heindel (1991) byl u oxidovaných derivátů dextranu a hyaluronanu stanoven stupeň oxidace (SO), který udává počet nově vzniklých aldehydových skupin [219].

Nejprve bylo rozpuštěno 17,5 g hydroxylamin-hydrochloridu ve 150 ml DEMI vodě společně se 6 ml 0,05hm.% roztoku methylované, poté byl tento roztok naředěn na objem 1 l a upraven na pH 4 pomocí 0,1 M HCl. Do 25 ml připraveného roztoku hydroxylamin-hydrochloridu byl přidán 0,1 g polymeru, u něhož měl být analyzován stupeň oxidace. Byly připraveny vzorky jak s nativní formou (označené jako tzv. slepý pokus), tak s oxidovaným derivátem polymeru. Principem metody je reakce hydroxylamin-hydrochloridu ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$) s aldehydovými skupinami ($-\text{CH}=\text{O}$). Při pH 4, dochází k tvorbě oximových derivátů dextranu/hyaluronanu ($\text{R}-\text{CH}=\text{N}-\text{OH}$)_n a uvolnění jednoho ekvivalentu HCl na každou aldehydovou skupinu (Rovnice 4). Samotná reakce probíhala po dobu 2 hodin při teplotě 25 °C za stálého míchání.



Uvolněná kyselina chlorovodíková je následně neutralizována standardizovaným roztokem hydroxidu sodného (Rovnice 5). V tomto případě byla reakční směs titrována roztokem 0,1 M NaOH až do dosažení hodnoty pH 4. Titrace byla provedena s využitím automatického titrátoru Titronic® universal (SI Analytics GmbH, Mainz, Německo).



Přesná koncentrace hydroxidu sodného byla určena titrací 0,1 M kyseliny šťavelové podle Rovnice 6, opět za použití automatického titrátoru.



Spotřeba NaOH je přímo úměrná počtu aldehydových skupin v oxidovaném dextranu či hyaluronanu. Na základě toho lze vypočítat stupeň substituce dle Rovnice 7.

$$\text{SO} = c_{\text{NaOH}} \cdot (V_{\text{NaOH-ox}} - V_{\text{NaOH-nativní}}) \cdot \left(\frac{M_w}{m_i} \right) \cdot 10^{-3} \quad (7)$$

Kde c_{NaOH} je koncentrace NaOH (mol/dm^3), $V_{\text{NaOH-ox}}$ je spotřeba NaOH při titraci oxidovaného polymeru (ml), $V_{\text{NaOH-nativní}}$ je spotřeba NaOH při titraci nativního polymeru (slepý pokus; ml), M_w je molekulová hmotnost nativního biopolymeru (g/mol) a m_i je navážka (g).

7.4 Příprava polymerních směsí pro 3D tisk

Nejprve byla pozornost zaměřena na tzv. fyzikálně síťované hydrogely, jejichž příprava vycházela z práce Kopecké et al. (2023) zabývající se přípravou materiálu pro 3D tisk na bázi alginátu sodného s nanočásticemi popsány v podkapitole 4.2, dihydrát-vápenatými fenylfosfonáty (CaPhP) a vápenatými fosfát-fenylfosfonáty (Ca3.1) ve formě ethylenglykolové disperze [10]. Pro zlepšení buněčné adheze a stability během kultivace materiálu, určeného pro potenciální využití jako scaffoldu nebo bioinkoustu ve tkáňovém inženýrství, byly z pohledu 3D tisku testovány nové směsi alginátu sodného s hyaluronanem a želatinou.

Kromě fyzikálních hydrogelů byly připravovány i hydrogely síťované Schiffovouází. Tato část se odvíjí od článku Musilové et al. (2022), ve které autoři připravili tisknutelnou biopolymerní směs z želatiny a oxidovaného dextranu [6]. Za účelem zvýšení bioaktivity materiálu při současném zachování optimálních vlastností pro 3D tisk byl v rámci diplomové práce vyvinut nový biopolymerní materiál složený z želatiny, oxidovaného dextranu a oxidovaného hyaluronanu.

V poslední řadě byly připraveny tzv. hybridně síťované hydrogely. Cílem bylo vhodně zkombinovat oba dříve popsané systémy k vytvoření hydrogelu, jehož stabilita je podpořena jak chemickou sítí (tzv. Schiffova báze), fyzikální sítí (tvorba komplexů s vícevalentními ionty - iontové síťování), tak elektrostatickým silám (podpora vrstvených destičkovitých nanočástic). Přestože takový materiál se vytvořit v rámci diplomové práce

nepodařilo, jednotlivé kroky přípravy budou dále v textu popsány a ve výsledcích diskutovány.

7.4.1 Příprava polymerní směsi s nanočásticemi pro 3D tisk

Prvním krokem přípravy polymerní směsi s nanočásticemi pro 3D tisk byla příprava zásobních roztoků biopolymerů – alginátu sodného, hyaluronanu a želatiny. Roztok 3hm.% alginátu sodného byl připraven rozpuštěním odpovídajícího množství polymeru (1,5 g) v 50 ml demineralizované (DEMI) vodě při 50 °C po dobu 18 hodin v sušárně bez míchání. Dále byl připraven i 1hm.% roztok hyaluronanu sodného (1,5 MDa), tzn. 0,5 g, který byl rozpouštěn v 50 ml DEMI vodě při 50 °C po dobu 24 hodin za stálého míchání. Naopak 15hm.% roztok farmaceutické želatiny připravený rozpuštěním 7,5 g v 50 ml DEMI vodě byl rozpuštěn při 50 °C v sušárně po dobu 24 hodin bez míchání.

Roztoky biopolymerů alginátu, hyaluronanu a želatiny byly kombinovány v hmotnostních poměrech, které jsou uvedené v Tabulce 1. Pro zachování strukturální integrity vytištěného hydrogelu bylo nezbytné, aby směs biopolymerů obsahovala minimálně 50 hm.% alginátu sodného. Při nižším zastoupení alginátu docházelo k výraznému poklesu mechanické stability, což vedlo k rychlému rozpadu a deformaci struktury ihned po vytištění. Dříve popsané disperze nanočástic (CaPhP a Ca3.1) byly přidány do připravené směsi polymerů v koncentraci $2 \cdot 10^{-6}$ částic na 1 ml polymeru, což odpovídalo 400 µl disperze nanočástic o koncentraci 5 g/l na 1 g polymeru. Po přidavku částic byl výsledný roztok intenzivně promíchán skleněnou tyčinkou, aby bylo dosaženo homogenní směsi. Míchání vedlo ke zvýšení viskozity a vytvoření tzv. pastovité konzistence materiálu. Celý proces probíhal při laboratorní teplotě. Takto připravený materiál, tisková náplň, byla následně tisknuta na 3D tiskárně.

Tabulka 1a Poměrné hmotnostní zastoupení biopolymerů ve fyzikálně síťovaných hydrogelech; koncentrace nanočástic

Typ nanočástic	Alginát : Želatina : Hyaluronan	Označení vzorku
CaPhP (400 µl / 1 g polymeru)	2 : 1 : 1	<i>fyz_1_CaPhP</i>
	3 : 1 : 1	<i>fyz_2_CaPhP</i>
	4 : 2 : 1	<i>fyz_3_CaPhP</i>
	4 : 1 : 2	<i>fyz_4_CaPhP</i>
	4 : 1 : 1	<i>fyz_5_CaPhP</i>

Tabulka 1b Poměrné hmotnostní zastoupení biopolymerů ve fyzikálně síťovaných hydrogelech; koncentrace nanočástic

Typ nanočástic	Alginát : Želatina : Hyaluronan	Označení vzorku
Ca3.1 (400 µl /1 g polymeru)	2 : 1 : 1	<i>fyz_1_Ca3.1</i>
	3 : 1 : 1	<i>fyz_2_Ca3.1</i>
	4 : 2 : 1	<i>fyz_3_Ca3.1</i>
	4 : 1 : 2	<i>fyz_4_Ca3.1</i>
	4 : 1 : 1	<i>fyz_5_Ca3.1</i>

7.4.2 Příprava polymerní směsi pro 3D tisk chemickým síťováním metodou Schiffovy báze

Chemicky síťované hydrogely byly připraveny kombinací roztoků želatiny, oxidovaného hyaluronanu (1,18 MDa, 1,5 MDa) a oxidovaného dextranu (100 kDa). Pro chemické síťování byl použit 15hm.% zásobní roztok farmaceutické želatiny, stejný jako u fyzikálně síťovaných hydrogelů, připravený rozpuštěním 7,5 g želatiny v 50 ml demineralizované vody při 50 °C po dobu 24 hodin bez míchání. Roztoky obsahující 2hm.% oxidovaného dextranu nebo hyaluronanu byly připraveny rozpuštěním 0,2 g polymeru v 10 ml 0,1 M PBS (pH 7,4) za stálého míchání po dobu 10 minut. Koncentrace polymerů byly zvoleny podle Musilové et al. (2022) [6].

Před síťováním byla želatina zahřata na 45 °C v sušárně, aby byl zajištěn úplný přechod do kapalného (sol) stavu. K želatině byly přidávány roztoky oxidovaných biopolymerů v různých poměrech, čímž vznikla kovalentně vázaná trojrozměrná síť. Síťovací reakce byla iniciována přidáním 50 µl 25hm.% roztoku amoniaku na 1 g želatiny. Směs byla míchána skleněnou tyčkou, dokud nedošlo ke gelaci. Počátek gelace byl určen vizuálně podle tzv. „tahání vlákna“ a tato doba byla zaznamenána. Pokud směs ani po 10 minutách míchání nevytvořila gelovou strukturu, byla označena jako nesíťující. Přehled testovaných kombinací a poměrů biopolymerů je uveden v Tabulce 2.

Tabulka 2a Přehled testovaných kombinací a poměrů biopolymerů pro přípravu hydrogelů síťovaných Schiffovou bází

Chemické zastoupení biopolymerů	Poměrné zastoupení biopolymerů	Označení vzorků
GEL : HA-OX (1,18 MDa)	1:1	<i>chem_1</i>
GEL : HA-OX (1,5 MDa)	1:1	<i>chem_2</i>

Tabulka 2b Přehled testovaných kombinací a poměrů biopolymerů pro přípravu hydrogelů síťovaných Schiffovou bází

Chemické zastoupení biopolymerů	Poměrné zastoupení biopolymerů	Označení vzorků
GEL : DEX-OX	1:1	<i>chem_3</i>
	2:1	<i>chem_4</i>
GEL : DEX-OX : HA-OX (1,18 MDa)	2:1:1	<i>chem_5</i>
	4:1:3	<i>chem_6</i>
	4:3:1	<i>chem_7</i>

Je rovněž důležité zdůraznit, že měření času gelace pomocí vizuální metody je zatíženo značnou chybovostí. Uvedené časy v tabulkách je proto třeba chápat jako orientační hodnoty, které slouží především k odhadu vhodnosti daného systému pro 3D tisk.

7.4.3 Příprava polymerní směsi pro 3D tisk hybridně síťovaného hydrogelu

V případě tohoto systému se vycházelo z chemicky síťovaného hydrogelu, který byl popsán v předešlé kapitole, do kterého měl být zakomponován alginát sodný spolu s nanočásticemi CaPhP nebo Ca3.1. Pro přípravu materiálu byly využity: 2hm.% oxidovaný hyaluronan (1,18 MDa), 2hm.% oxidovaný dextran (100 kDa), 15hm.% želatina, 3hm.% alginát sodný, disperze nanonanočástic CaPhP a Ca3.1 o koncentraci 5 g/l v ethylenglykolu. Příprava každého z polymerních roztoků byla rozvedena již v podkapitole 7.4.1 nebo 7.4.2. Pro zakomponování jednotlivých složek do matrice byly testovány různé přístupy: jednokroková a dvoukroková příprava reakční směsi, dále také dvoukroková příprava s nanočásticemi ve formě prášku.

Jednokroková příprava

Jednokroková příprava hydrogelu byla realizována simultánním smísením všech roztoků polymerů (15hm.% želatina, 2hm.% HA-OX, 2hm.% DEX-OX, 3hm.% alginát sodný) a disperze nanočástic v jedné reakční nádobě v poměrech, které jsou uvedeny v Tabulce 3. Síťovací reakce byla iniciována 25hm.% roztoku amoniaku, testovaná množství jsou také popsána v Tabulce 3. Směs byla míchaná skleněnou tyčinkou po dobu 10 minut při laboratorní teplotě.

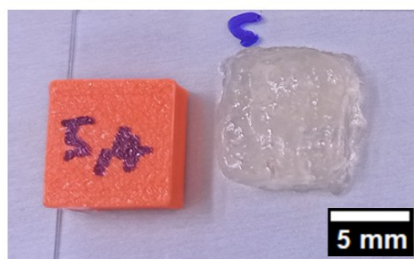
Tabulka 3 Přehled testovaných kombinací a poměrů biopolymerů pro přípravu hybridních hydrogelů

HA-OX : DEX – OX : želatina : alginát	Nanočástice (X $\mu\text{l}/1 \text{ g}$ polymeru)	NH_3 (X $\mu\text{l}/1 \text{ g}$ želatiny)
1:1:2:1	10, 25, 50, 200, 400	50, 70, 100
1:1:2:2		
1:1:1:2		

Přítomnost alginátu sodného a disperze nanočástic ve všech testovaných kombinacích neumožnila efektivní síťovací reakci pomocí Schiffovy báze, jelikož nedošlo k požadované tvorbě gelové struktury. Z toho důvodu bylo přistoupeno k tzv. dvoukrokové přípravě hydrogelu.

Dvoukroková příprava

Příprava hybridního hydrogelového systému probíhala ve dvou oddělených krocích s následným spojením komponent. V kádince A byl smíchán 3 hm.% alginát sodný s disperzí nanočástic (400 $\mu\text{l}/\text{g}$), směs měla pastovitou konzistenci. Současně v kádince B byla připravena směs pro tvorbu Schiffovy báze, 15hm.% želatina, 2hm.% HA-OX a 2hm.% DEX-OX v poměru 2:1:1, reakce byla iniciována 25hm.% roztoku amoniaku (50 $\mu\text{l}/1 \text{ g}$ želatiny). Reakční směs byla míchaná skleněnou tyčinkou do momentu, kdy bylo pozorováno tzv. „tahání vlákna“. V ten moment byl postupně mechanicky začleňován alginát s nanočásticemi, dokud nebylo dosaženo homogenního materiálu. Tímto způsobem byl vytvořen 3D tisknutelný materiál, inkoust, jehož tištěná struktura ve tvaru kostičky o rozměrech 10x10x5 mm je zobrazená na Obrázku 19.

**Obrázek 19** Vytisknutá struktura hybridního hydrogelu; přičemž oranžové těleso odpovídá modelu (10x10 mm) tisknuté geometrie.

Před další charakterizací materiálu byla ověřena schopnost komplexace alginátu s kovovými multivalentními ionty. Po ponoření vzorku hydrogelu do roztoku síťujících iontů (roztoky ZnCl_2 a FeCl_3 o iontové síle 0,1 mol/l) však došlo k okamžitému rozpadu

struktury. Identického výsledku bylo dosaženo i při postupném přikapávání síťovacího roztoku, které mělo za cíl minimalizovat tzv. mechanický a chemický šok. Ani tento šetrnější přístup však nezabránil dezintegraci struktury.

Dvoukroková příprava s nanočásticemi ve formě prášku

Na základě výsledků z jednokrokové přípravy bylo zjištěno, že přidavek alginátu sodného, disperze nanočástic nebo jejich kombinace ke směsi nezesíťovaných polymerů nevedl k vytvoření stabilní hydrogelové struktury. Proto byla dále testována varianta, ve které byly před zahájením síťovací reakce přidány nanočástice v práškové formě. Vzhledem k tomu, že nanočástice byly dostupné pouze ve formě ethylenglykolové disperze, bylo nutné je před dalším použitím izolovat. Samotná izolace probíhala následujícím způsobem.

Zásobní disperze byla nejprve důkladně zhomogenizována, poté bylo odebráno 20 ml disperze a pipetou přeneseno do Eppendorfových zkumavek, kde následovala jejich centrifugace (5000 ot./min po dobu 3 minut). Po oddělení sedimentovaných nanočástic byl supernatant (ethylenglykol) odstraněn a nahrazen ethanolem. Následovalo protřepání, opětovná centrifugace za stejných podmínek a dvoufázové promývání ethanolem za účelem odstranění zbytků ethylenglykolu z nanočástic. Izolované nanočástice byly následně převedeny do Petriho misky a sušeny při 30 °C do úplného odpaření rozpouštědla (24 h).

Takto získané nanočástice byly poté přidány (10 mg) do polymerní směsi obsahující HA-OX, DEX-OX a želatinu (poměr 1:1:2; tedy 2,5 g HA-OX a DEX-OX a 5 g želatiny). Pokusy o jejich redispergaci pomocí mechanického míchání (30 minut) ani pomocí ultrazvukové lázně (30 minut) nebyly dostatečně účinné. Až krátká sonikace (1 minuta; 20 kHz) vedla k homogenní dispergaci nanočástic, což umožnilo následné zesíťování systému. Výsledný hydrogelgel vykazoval stabilitu po dobu minimálně jedné hodiny ve vodném roztoku iontů. Dodatečný přidavek alginátu (2,5 g/ 5 g) však způsobil okamžité narušení gelové struktury a její rozpad ve vodném prostředí. Z výše uvedených důvodů byl tento hybridně síťovaný hydrogel vyhodnocen jako nevhodný a byl z dalšího testování vyřazen.

7.5 Charakterizace hydrogelů z pohledu 3D tisku

Připravené materiály byly nejprve zkoumány z pohledu jejich chování při 3D tisku. Na základě reologických oscilačních testů byly vybrány nejlepší vzorky, pro které poté byly charakterizovány tiskové parametry jako narůstání za hubicí, průměr filamentu, přesnost

tisku a samonosnost materiálu. Podle těchto informací byly optimalizovány výsledné tiskové podmínky pro jednotlivé hydrogely.

7.5.1 Reologické měření

Důležitou vlastností 3D tisknutelných hydrogelů je jejich pseudoplastické chování, tzn. chování, kdy je viskozita materiálu závislá na rychlosti smykové deformace. Nízké rychlosti smykové deformace (10^{-2} – 10^{-1} s⁻¹) reflektují stabilitu hydrogelu v klidovém stavu. Naopak, proces mikroextruze obvykle odpovídá hodnotám kolem 10^3 s⁻¹ [220].

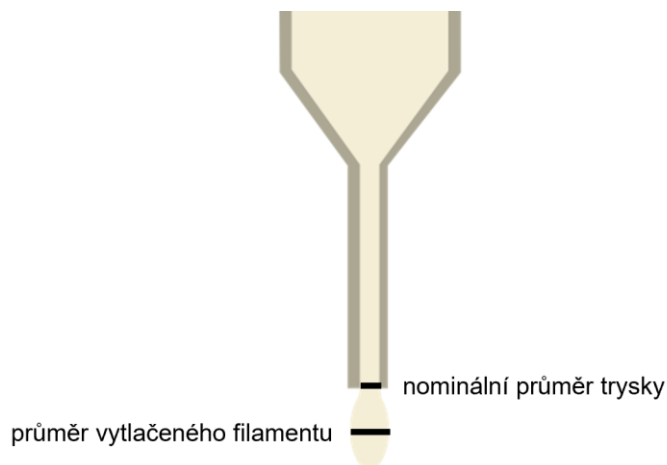
Oscilační měření byla provedena na rotačním reometru Anton Paar MCR 502 (Anton Paar, Graz, Rakousko) s využitím geometrie deska-deska o průměru 25 mm, přičemž mezera mezi geometriemi byla nastavena na 2 mm. Testy probíhaly při konstantní amplitudě 1 % (lineární oblast viskoelasticity) v rozmezí úhlové rychlosti 1–100 rad/s a teplotě 37 °C, při použití přibližně 2 ml vzorků směsi biopolymeru s nanočásticemi (*fyz_5_CaPhP*, *fyz_5_Ca3.1*). Pro chemicky síťovaný systém (*chem_6*) byla teplota měření zvolena jako 30 °C. Během měření byla sledována závislost komplexní viskozity na rychlosti smykové deformace.

7.5.2 Narůstání za hubicí

V ideálním případě by při 3D tisku měla tloušťka filamentu odpovídat průměru použité trysky, aby byla zajištěna dostatečná přesnost výsledné struktury [10]. U hydrogelů, které vykazují viskoelastické chování, však často dochází po opuštění trysky během k extruze k expanzi materiálu v důsledku relaxace normálových napětí. Průměr filamentu se tak oproti nominálnímu průměru trysky zvyšuje [201].

K posouzení narůstání za hubicí byla provedena optická analýza, která byla vyhodnocena na základě Rovnice 8 [10]. Chování materiálu při výstupu z trysky bylo zachyceno na video pomocí mobilního zařízení. Z videa bylo vybráno a exportováno 10 snímků odpovídajících toku v různých časech, ze snímků byly odečteny hodnoty nominálního průměru trysky (0,26 nebo 0,41 mm) a průměru vytlačeného filamentu (Obrázek 20) pomocí software ImageJ.

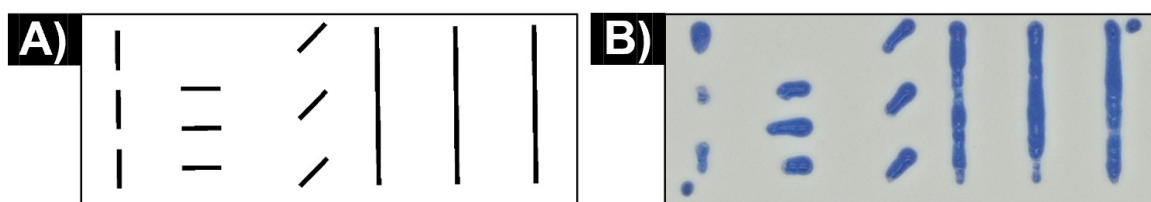
$$\text{Narůstání za hubicí} = \frac{\text{nominální průměr trysky}}{\text{průměr vytlačeného filamentu}} \quad (8)$$



Obrázek 20 Schematické zobrazení vyhodnocení narůstání za hubicí

7.5.3 Vyhodnocení přesnosti tisku

Při analýze přesnosti tisku byla využita metoda vyvinutá prof. RNDr. Petrem Ponížilem, Ph.D. (Ústav fyzikálního a materiálového inženýrství, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, nepublikováno). Princip metody vychází z porovnání trajektorie plánovaného tisku, definovanou v souboru (.gcode) (Obrázek 21A), s fotografií reálného vytisknutého vzorku (Obrázek 21B). Za definovanou šířku trajektorie vzorků byla zvolena hodnota průměru vytlačeného filamentu, která byla měřena již při analýze narůstání za hubicí. Z důvodu vytvoření vyššího kontrastu mezi výtiskem a pozadím, byla pro lepší optickou analýzu do biopolymerní směsi skleněnou tyčinkou přimíchána modrá tempera (0,5 hm.%).

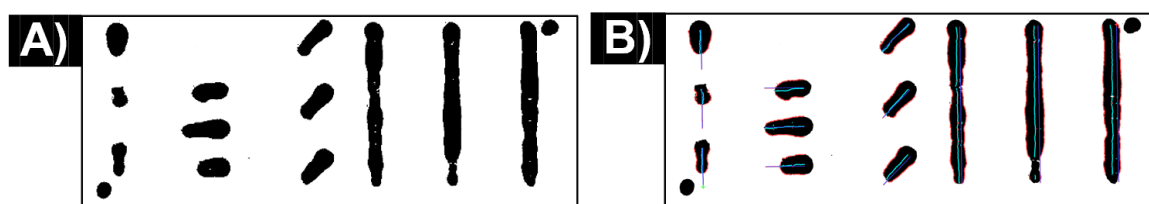


Obrázek 21 A) model trajektorie plánovaného tisku; B) fotografie reálného vytisknutého vzorku *fyz_5_CaPhP*

Jelikož (.gcode) pracuje v kartézských souřadnicích (x , y) a obrazová data jsou vyjádřena pixely, bylo nezbytné provést transformaci souřadnice mezi těmito dvěma systémy. Za tímto účelem byly na základě (.gcode) určeny souřadnice prvního a posledního tiskového bodu. Tyto body byly následně ručně identifikovány na vytištěném vzorku a na fotografii označeny. Jejich souřadnice v obou soustavách byly uloženy do textového souboru s příponou (.trn), tvořeného dvěma řádky a čtyřmi sloupci (x_gcode , y_gcode , x_img ,

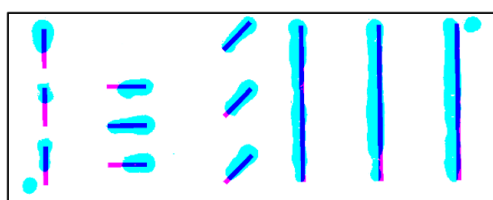
y_img). Tento soubor by použit k určení transformační matice, která definuje měřítko, natočení a posun obrazu vzhledem k plánovanému tisku.

Následně byla fotografie pomocí software ImageJ binarizována funkcí Threshold (Obrázek 22A). Na tomto obraze byly pomocí skriptu detekovány hraniční pixely (černé pixely sousedící s alespoň jedním bílým), které byly dále vyznačeny červeně (Obrázek 22B). Do stejného obrázku byla zakreslena také dráha tiskové hlavy podle (.gcode) (modře) a osa skutečného tisku, definovaná jako střed mezi levým a pravým okrajem tištěné oblasti (tyrkysově).



Obrázek 22 A) binarizovaná fotografie reálného tisku vzorku *fyz_5_CaPhP* ; B) detekované hraniční pixely (červeně), dráha tiskové hlavy (modře) a osa skutečného tisku (tyrkysově) vzorku *fyz_5_CaPhP*

Výsledné porovnání bylo vizualizováno v Obrázku 23, kde jsou barevně odlišeny tři možné případy: 1) tmavě modrá (oblast, kde tisk proběhl správně – tisk měl být a byl), 2) fialová (chybějící tisk – tisk měl být, ale nebyl) a 3) světle modrá (přetisk – tisk neměl být, ale je přítomen).



Obrázek 23 Porovnání plánovaného tisku s reálným tiskem u vzorku *fyz_5_CaPhP*

Pro kvantitativní popis byl zaveden koeficient přesnosti k , definovaný jako poměr počtu správně vytisknutých pixelů k celkovému počtu relevantních pixelů (Rovnice 9).

$$k = \frac{N_{\text{tmavě modrá}}}{N_{\text{tmavě modrá}} + N_{\text{fialová}} + N_{\text{světle modrá}}} \quad (9)$$

Koeficient k nabývá hodnot 1 v případě dokonalé shody mezi plánovaným a reálným tiskem, a hodnoty 0 v případě úplné neshody. Čím vyšší je tento koeficient, tím lépe odpovídá vytisknutá struktura modelu. Celkem byly získány koeficienty souřadnic levého

a pravého okraje tisku, označené jako (x_{k1}, y_{k1}) a (x_{k2}, y_{k2}) . Z těchto souřadnic byla následně určena osa reálného tisku jako středová souřadnice (Rovnice 10; 11)

$$x_{\text{střed}} = \frac{x_{k1} + x_{k2}}{2}; y_{\text{střed}} = \frac{y_{k1} + y_{k2}}{2} \quad (10; 11)$$

Současně, jak bylo naznačeno výše, byla určena i šířka tištěného segmentu podle Rovnice 12.

$$\text{šířka} = \sqrt{(x_{k1} - x_{k2})^2 + (y_{k1} - y_{k2})^2} \quad (12)$$

Poté byla ke každému bodu modelové trajektorie (x, y) spočtena jeho vzdálenost od středu reálného tisku, tzn. odchylka (Rovnice 13).

$$\text{odchylka} = \sqrt{(x - x_{\text{střed}})^2 + (y - y_{\text{střed}})^2} \quad (13)$$

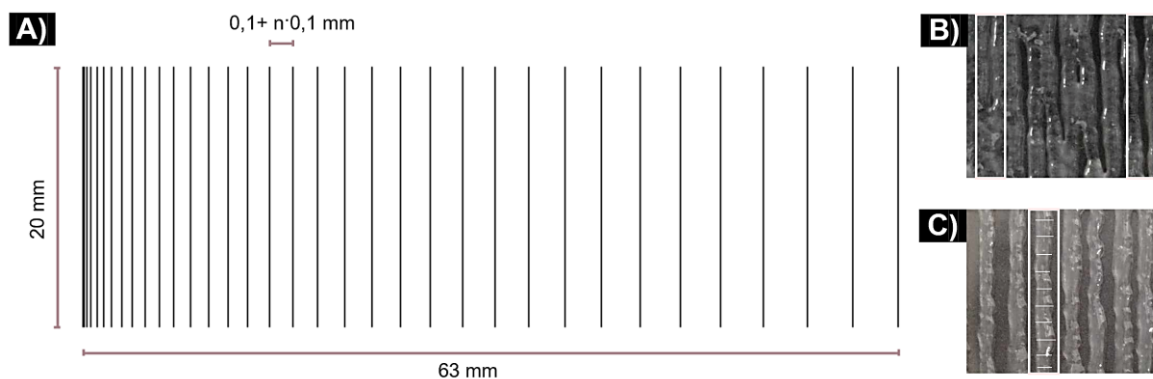
Procentuální přesnost tisku byla definovaná jako relativní vzdálenost tohoto bodu od osy tisku, vztažená k polovině šířky segmentu (Rovnice 14).

$$\text{přesnost} = \left(1 - \frac{\text{odchylka}}{\text{šířka}/2}\right) \cdot 100 \% \quad (14)$$

Celková přesnost tisku byla vyhodnocena jako aritmetický průměr lokálních procentuálních přesností. Pro každý vzorek byla analýza provedena ve dvou opakováních.

7.5.4 Test fúze filamentu

Test fúze filamentu („filament fusion test“) spočívá v tisku paralelních čar se zvyšujícím se odstupem mezi jednotlivými segmenty (Obrázek 24A). Tímto způsobem je možné analyzovat částečnou fúzi filamentu (Obrázek 24B), kterou lze popsat jako vzdálenost, při které se sousední filameny částečně spojují, ale zachovávají si část své individuality. Dále lze pozorovat úplnou separaci filamentu (Obrázek 24B), ta vypovídá o vzdálenosti, při které filameny zůstávají zcela oddělené bez jakéhokoli kontaktu. Posledním měřeným parametrem byla průměrná tloušťka tištěných filamentů (Obrázek 24C), která odráží rozlišení tisku a reologické vlastnosti materiálu [10, 221].



Obrázek 24 A) Tisknutý model testu fúze filamentu; B) částečná fúze filamentu (vlevo) a úplná separace filamentu (vpravo); C) tloušťka filamentu po depozici

Parametry částečné fúze a úplné separace byly odečteny z vytisknutého vzoru. Tloušťka filamentu byla analyzována pomocí software ImageJ, výsledná hodnota je uvedena jako průměr 10 hodnot změřené tloušťky v různých místech. Test byl pro každý materiál proveden ve 2 opakováních.

7.5.5 Nastavení parametrů 3D tisku směsi biopolymerů s nanočásticemi

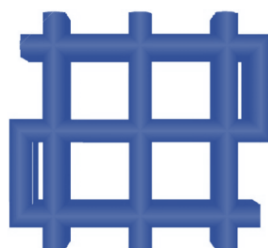
Experimenty mikroextruzního 3D tisku byly prováděny s využitím biotiskárny BioX (Cellink, Gothenburg, Švédsko). Pro tisk byla použita polypropylenová kuželová tryska, 3 ml polypropylenová stříkačka a pístová tisková hlava s vyhříváním. Podložní mikroskopické sklíčko nebo skleněná Petriho miska (průměr 9 cm) sloužily jako tisková podložka.

Výška jedné vrstvy výtisku byla stanovena na $2 \pm 0,5$ mm, to bylo určeno na základě změřené tloušťky filamentu (přibližně 1,5 mm) a zároveň s cílem zabránit kontaktu tiskové špičky s již vytisknutými vrstvami, což by mohlo vést k deformaci struktury. Rychlost vytlačování byla nastavena na 1,5 $\mu\text{l/s}$, aby byl zajištěn kontinuální tok materiálu. Nižší rychlosti vedly k přerušovanému vytlačování, při němž se tvořily mezery v důsledku nedostatečného tlaku, zatímco vyšší rychlosti (3 mm/s) způsobovaly nadměrné vytlačení materiálu, což vedlo k nerovnoměrnému rozložení. Teplota tiskové hlavy byla nastavena na 37 °C, aby odpovídala fyziologickým podmínkám, z důvodu budoucí potenciální inkorporace buněk a minimalizaci jejich stresu během tisku. Teplota podložky byla zvolena na 8 °C po předchozím testování při 4 °C, které však nebylo dlouhodobě udržitelné z důvodu technických omezení tiskárny. Nižší teplota podložky byla zvolena za účelem urychlení gelace první vrstvy a zachování tvaru scaffoldu [222]. Parametry tisku jsou pro přehlednost shrnuty v Tabulce 4.

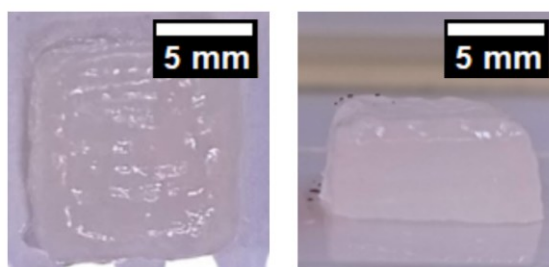
Tabulka 4 Parametry tisku pro vzorky *fyz_5_CaPhP* a *fyz_5_Ca3.1*

Parametry tisku	<i>fyz_5_CaPhP/fyz_5_Ca3.1</i>
Vnější/vnitřní průměr trysky	0,515/0,26 mm
Výška vrstvy	$2 \pm 0,5$ mm
Výška první vrstvy	66 %
Rychlost vytlačování	1,5 $\mu\text{l/s}$
Objem retrakce	1,35 $\mu\text{l/s}$
Rychlost tiskové hlavy	2 mm/s
Hustota mřížky	15 %
Teplota tiskové hlavy	37 °C
Teplota podložky	8 °C

Rozměry tisknutých hydrogelů pro analýzu morfologie a bobtnání byly nastaveny jako 10x10x5 mm s typem mřížky rectilinear (Obrázek 25).

**Obrázek 25** Použitý typ mřížky pro 3D tisk – rectilinear

Jedním z pozorovaných problémů během tisku byla nehomogenita způsobená přítomností vzduchových bublin, které se do směsi dostaly při plnění tiskové stříkačky. Přítomnost bublin vedla k lokálním nepravidelnostem ve struktuře. K minimalizaci tohoto jevu byl použit postup přetlačení materiálu mezi dvěma stříkačkami, což výrazně snížilo jejich obsah. Přes tuto optimalizaci však se ne vždy podařilo eliminovat všechny bubliny. Z toho důvodu by mohlo být vhodné v budoucnu zařadit krok centrifugace stříkačky s materiálem před samotným tiskem [223]. Výsledná struktura hydrogelu je na Obrázku 26.

**Obrázek 26** Vytisknutý hydrogel s nanočásticemi *fyz_5_CaPhP* (rozměry 10x10x5 mm)

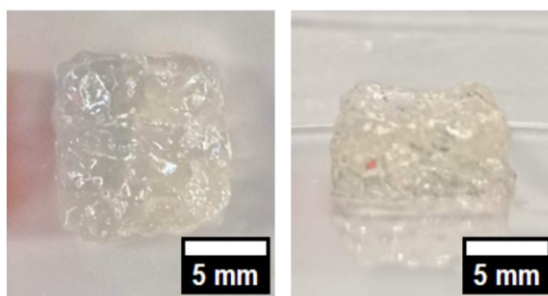
7.5.6 3D tisk chemicky síťovaného hydrogelu

Experimenty mikroextruzního 3D tisku byly i v tomto případě provedeny s využitím biotiskárny BioX. Pro tisk byla použita polypropylenová kuželová tryska, 3 ml polypropylenová stříkačka a pístová tisková hlava s vyhříváním. Podložní mikroskopické sklíčko nebo skleněná Petriho miska (průměr 9 cm) sloužily jako tisková podložka. Výška vrstvy byla nastavena na hodnotu $1,5 \pm 0,5$ mm, na základě změřené tloušťky filamentu (přibližně 1,2 mm), zároveň tato hodnota zajišťovala, aby tisková tryska nezasahovala do již vytisknutých vrstev. Optimální plynulosti toku filamentu bylo dosaženo při rychlosti vytlačování 1,47 $\mu\text{l/s}$ a nastaveném objemu retrakce 1,35 μl . Původně byla použita špička s vnitřním průměrem 0,26 mm, avšak vzhledem k jejímu častému ucpávání byla následně nahrazena špičkou s vnitřním průměrem 0,42 mm. Tisk při teplotě 37 °C nebyl uspokojivý, pravděpodobně v důsledku sol-gel přechodu želatiny, což vedlo k nekontrolovanému toku – materiál se akumuloval na kraji špičky a odděloval se až po dosažení většího objemu. Při laboratorní teplotě (~22 °C) se naopak první vrstva špatně přichytávala ke skleněné podložce a nedocházelo ke splnutí vrstev tisku, což způsobovalo snadnou delaminaci výtisku. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při nastavení teploty tiskové hlavy na 30 °C. Při této teplotě byla zajištěna dobrá přilnavost první vrstvy k podložce i dostatečná fúze mezi jednotlivými vrstvami filamentu, což vedlo ke zlepšení stability hydrogelu. Pro přehlednost jsou parametry tisku shrnuté v Tabulce 5. Stejně jako v předchozím případě byly pro morfologickou analýzu a bobtnací testy tisknuty hydrogely o rozměrech 10x10x5 mm s typem mřížky rectilinear.

Tabulka 5 Parametry tisku pro vzorek *chem_6*

Parametry tisku	<i>chem_6</i>
Vnější/vnitřní průměr trysky	0,72/0,41 mm
Výška vrstvy	$1,5 \pm 0,2$ mm
Výška první vrstvy	66 %
Rychlost vytlačování	1,47 $\mu\text{l/s}$
Objem retrakce	1,35 $\mu\text{l/s}$
Rychlost tiskové hlavy	2 mm/s
Hustota mřížky	15 %
Teplota tiskové hlavy	30 °C
Teplota podložky	8 °C

I v tomto případě jsou však patrné nehomogenity v tisknuté struktuře, které se pojí s jevem tzv. „over-gelation“ (nadměrné zesíťování). Jedná se o stav, při kterém dochází k příliš intenzivnímu nebo rychlému zesíťování hydrogelu, což vede ke ztrátě optimálních vlastností pro tisk [6]. Práce Ouyang et al. (2019) popisuje, že bioinkoust tvořený 7,5 hm.% želatinou a 1 hm.% alginátem je nutný tisknout do 10 minut od jeho přípravy, aby se tomuto chování během tisku zabránilo. Autoři také konstatují, že takové časové okno je nepraktické, pokud se tiskne více konstruktů nebo jsou tisknutá tělesa o větším objemu [224]. Vzhledem k tomu, že počátek gelace byl u vzorku označeného *chem_6* určen kolem 2 minut, je nutné provést bližší analýzu kinetiky síťovací reakce za účelem optimalizace procesu a parametrů pro tisk konstruktů o více vrstvách. Výsledná struktura je zobrazená na Obrázku 27.



Obrázek 27 Vytisknutý hydrogel připravený chemickým síťováním *chem_6* (rozměry 10x10x5 mm)

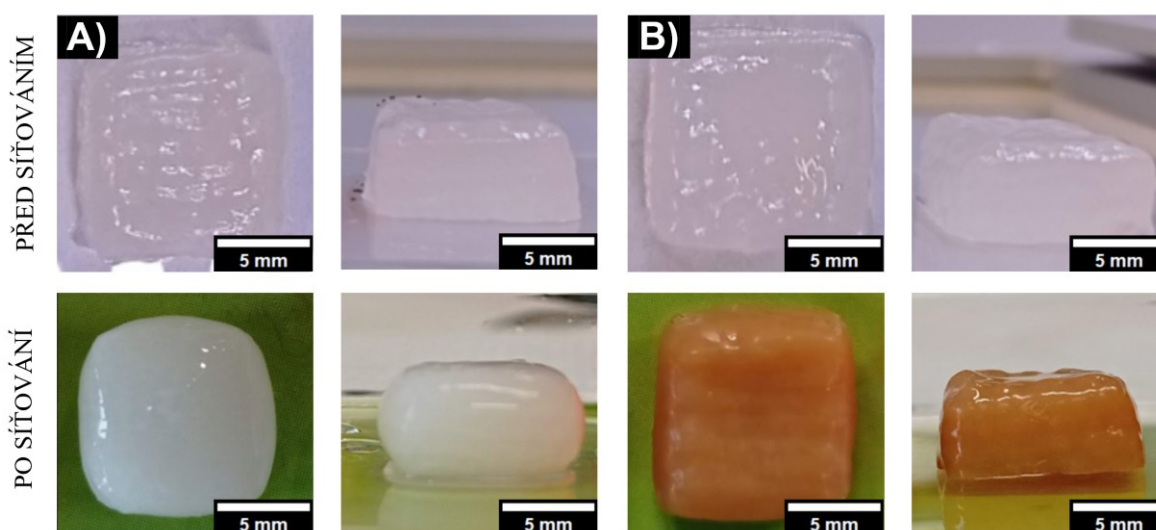
7.5.7 Samonosnost vícevrstevného hydrogelu

V neposlední řadě byla analyzována také samonosnost hydrogelu, což je vlastnost charakterizující schopnost vytištěné struktury odolávat deformaci či kolapsu pod vlivem vlastní hmotnosti [10]. Tato vlastnost byla hodnocena prostřednictvím testu, jehož cílem bylo určit maximální počet vrstev, které lze vytisknout před zhroucením struktury. Experiment byl proveden s každou testovanou tiskovou náplní ve třech opakováních za tiskových podmínek, které jsou popsány v předchozí kapitole.

7.6 Fyzikální síťování multivalentními ionty

Vzorky *fyz_5_CaPhP* a *fyz_5_Ca3.1* byly ihned po tisku následně zesíťovány multivalentními ionty, konkrétně ionty Zn^{2+} a Fe^{3+} . Pro tyto účely byly připraveny zásobní roztoky ZnCl_2 a FeCl_3 o iontové síle 0,1 mol/l rozpuštěním 0,9076 g ZnCl_2 , resp. 0,5417 g FeCl_3 , v 200 ml DEMI vody. Vytisknutý hydrogel byl ponořen do 10 ml síťovacího roztoku byl ponořen po dobu 24 h při laboratorní teplotě a bez míchání.

Srovnání mezi původní tisknutou strukturou a výsledným zesíťovaným hydrogelem je znázorněno na Obrázku 28. Hydrogely zesíťované ionty Fe^{3+} získaly charakteristickou hnědooranžovou barvu, zatímco ty zesíťované ionty Zn^{2+} vykazovaly bílé zabarvení [142]. Proces síťování vedl ke smrštění a částečné deformaci tisknutých struktur, přičemž výraznější ztráta tvarové přesnosti byla pozorována u vzorků ponořených do roztoku ZnCl_2 . Tento jev lze pravděpodobně přičíst pomalejší difuzi iontů do středu scaffoldu, která je zodpovědná za nehomogenní síť a následné mechanické deformace [225].



Obrázek 28 Fyzikálně síťované hydrogely; vzorek *fyz_5_CaPhP* A) ZnCl_2 B) FeCl_3 ; (rozměry 10x10x5 mm)

Po již zmíněném fyzikálním dosíťování hydrogelů bylo nutné odstranit přebytečné zinečnaté a železité ionty za účelem jejich purifikace [135]. Toho bylo docíleno ponořením hydrogelu do 400 ml DEMI vody, kdy byly hydrogely minimálně po dobu 6 hodin při laboratorní teplotě a za stálého míchání promývány. Během toho bylo vodné prostředí nejméně 3x měněno. Difúze iontů z hydrogelu do DEMI vody byla kontrolována konduktometricky, tzn. byl sledován nárůst vodivosti prostředí oproti vodivosti čisté DEMI vody. Jako purifikovaný byl označen takový hydrogel, u kterého minimálně po hodině promývání nebyl pozorován nárůst vodivosti oproti čistému médiu.

Purifikovaný produkt byl následně zamražen na teplotu $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ a poté lyofilizován. Proces lyofilizace probíhal ve dvou fázích sušení. V první fázi sušení probíhalo při tlaku 0,06 mbar a teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 hodin, následně byl vzorek dosušen v tzv. finálním sušení, probíhajícím po dobu 10 hodin při tlaku 0,001 mbar. Takto získané hydrogely byly následně využity pro další charakterizaci vzorků, např. pro bobtnací testy a pro

morfologickou analýzu, které budou rozepsány níže. Stejným způsobem byl připraven i vzorek pro testování tuhosti hydrogelu, ovšem s vynecháním kroku zamražení a lyofilizace.

7.7 Charakterizace 3D vytisknutých hydrogelů

Vytištěné a zesíťované hydrogely byly v poslední části diplomové práce charakterizovány z pohledu jejich mechanické stability pomocí oscilačního měření na rotačním reometru. Dále byla sledována morfologie lyofilizovaných vzorků pomocí elektronové mikroskopie. Nakonec byla zkoumána i stabilita hydrogelu za fyziologických podmínek, tedy v prostředí fosfátového pufru při 37 °C.

7.7.1 Oscilační měření – tuhost zesíťovaných hydrogelů

Oscilační měření byla provedena na rotačním reometru Anton Paar MCR 502 (Anton Paar, Graz, Rakousko) s využitím geometrie deska-deska o průměru 25 mm, přičemž mezera mezi geometriemi byla nastavena na 2 mm. Testy probíhaly při konstantní amplitudě 1 % (lineární oblast viskoelastivity) v rozmezí úhlové rychlosti 1–10 rad/s a laboratorní teplotě (22 °C). Pro tento test byly vytištěny vzorky o rozměrech 30x30x2 mm, dle parametrů popsanych v podkapitole 7.5.5 nebo 7.5.6. V případě vzorků *fyz_5_CaPhP* a *fyz_5_Ca3.1* bylo provedeno síťování podle postupu uvedeného v podkapitole 7.6 bez kroku lyofilizace.

7.7.2 Morfologie hydrogelů

Morfologie lyofilizovaných hydrogelů byla analyzována skenovacím elektronovým mikroskopem (SEM; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Příčně seříznuté vzorky byly připevněny na uhlíkovou pásku na kovovém terčíku a pokoveny v naprašovačce po dobu 60 sekund při proudu 18 mA, čímž vznikla tenká vrstva zlata na povrchu vzorku. Takto připravené vzorky byly zkoumány v SEM při urychlovacím napětí 10 kV v režimu zobrazení zpětně odražených elektronů (BSD). Analýza orientační porozity a průměrné velikosti pórů v lyofilizovaném hydrogelu, byla následně provedena v software ImageJ přes funkce Threshold a Analyse Particles. Výsledek byl zaznamenán jako průměrná hodnota z celkem 5 měření pro každý vzorek.

7.7.3 Bobtnací testy

Bobtnací testy byly provedeny za účelem stanovení množství absorbované kapaliny analyzovaným hydrogelem. Toto měření bylo provedeno gravimetricky, teplota a prostředí byly zvoleny s ohledem na podmínky v biologickém prostředí. Nejprve byly zváženy

lyofilizované hydrogely m_s , které byly vloženy do speciální cely (děrovaný košík). Zvážené vzorky byly následně ponořeny do 0,1 M fosfátového pufru (pH 7,4) a v časových intervalech 1, 2, 5, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240 a 1440 min byly vzorky váženy m_w . Test probíhal při teplotě 37 ± 1 °C ve třech opakováních. Pro vyhodnocení byl zvolen rovnovážný poměr bobtnání ES , který byl vypočítán dle Rovnice 15.

$$ES = \frac{m_w - m_s}{m_w} \cdot 100 \% \quad (15)$$

8 VÝSLEDKY A DISKUSE

Tato kapitola prezentuje a analyzuje výsledky měření provedených při vývoji biopolymerních hydrogelů pro 3D tisk s potenciálním využitím ve tkáňovém inženýrství. Zahrnuje charakterizaci modifikaci polymerů, hodnocení tisknutelnosti a nastavení parametrů 3D tisku, včetně iontové komplexace. Dále porovnává mechanické a strukturální vlastnosti vytisknutých hydrogelů. Výsledky jsou porovnány s literaturou a diskutovány s důrazem na jejich význam pro návrh funkčních scaffoldů a budoucí vývoj biomateriálů.

8.1 Charakterizace modifikovaných biopolymerů

Jak už bylo zmíněno, nejprve byly provedeny chemické modifikace tří biopolymerů – dextranu a hyaluronanu (1,18 MDa a 1,5 MDa) – za účelem jejich oxidace tzn. získání aldehydových skupin. U připravených derivátů byl hodnocen výtěžek reakce oxidovaného polymeru, který v případě dextranu odpovídal 92 %, zatímco v případě hyaluronanu (1,18 MDa, resp. 1,5 MDa), proběhla oxidační reakce s konverzí 83 %, resp. 86 %.

Porovnáním ^1H NMR spekter modifikovaných a nativních polysacharidů byla ověřena čistota a úspěšná oxidace (Příloha I). V všech případech byly pozorovány charakteristické píky v regionu 5,1-4,8 ppm, které odpovídají signálům protonů hemiacetalů (aldehydová skupina R-CHO ve vodném prostředí může částečně či plně přecházet do hemiacetalu R-CH(OH)_2) [6, 52, 71]. Výsledky z gelové permeační chromatografie (Tabulka 6) ukazují, že oxidace všech polysacharidů vedla ke značnému poklesu molekulové hmotnosti se širokou distribucí, což je v souladu s dostupnou literaturou [6, 11, 71]. Konkrétně u HA-OX (1,18 MDa) došlo k poklesu na 7 993 Da, u HA-OX (1,5 MDa) na 9 662 Da a u DEX-OX (100 kDa) na 12 387 Da.

Tabulka 6 Početní a hmotnostní střední molekulová hmotnost, index polydisperzity oxidovaných polysacharidů

Vzorek	Před oxidací	Po oxidaci		
	M_w [Da]*	M_n [Da]	M_w [Da]	PDI
HA-OX (1,18 MDa)	1 180 000	2 832	7 993	2,82
HA-OX (1,5 MDa)	1 500 000	5 100	9662	1,89
DEX-OX	100 000	5 947	12 387	2,08

* Hodnota uvedená výrobcem

Stupeň oxidace oxidovaného hyaluronanu (1,18/1,5 MDa) byl vypočten dle Rovnice 7 jako 33/70 aldehydových skupin na 100 disacharidových jednotek a pro dextran jako

48 aldehydových skupin na 100 glukózových jednotek. Vyšší stupeň oxidace znamená větší počet karbonylových skupin, které mohou reagovat se skupinami aminovými za vzniku iminových vazeb, což podporuje vznik trojrozměrné sítě a tedy tvorbu stabilního gelu. Naopak při nízkém stupni oxidace je koncentrace reaktivních skupin nedostatečná k vytvoření kontinuální polymerní sítě, což vede ke slabé nebo žádné gelaci [226]. Obdobné výsledky jako v této práci uvádí například Musilová et al. (2022), kde byl syntetizován periodáty DEX-OX s přibližně 50 aldehydovými skupinami na 100 jednotek polymerního řetězce [6]. V práci Vítkové et al. (2022) byly připraveny polyaldehydy hyaluronanu i dextranu s různými stupni oxidace – pro HA-OX autoři uvádějí 35 a 62 aldehydových skupin a pro DEX-OX 49 aldehydových skupin [11].

8.2 Výběr vhodné směsi biopolymerů pro 3D tisk

Tato část diplomové práce se zabývá výběrem materiálu, který by byl vhodný pro zpracování metodou 3D tisku s ohledem na jeho potenciální aplikace ve tkáňovém inženýrství.

8.2.1 Výběr vhodné polymerní směsi připravené chemickým síťováním pro 3D tisk

Časy odpovídající začátku gelace, stanovené na základě vizuálního pozorování tzv. „tahání vlákna“, jsou uvedeny v Tabulce 7. Tyto hodnoty jsou považovány pouze jako orientační pro posouzení vhodnosti materiálu pro 3D tisk.

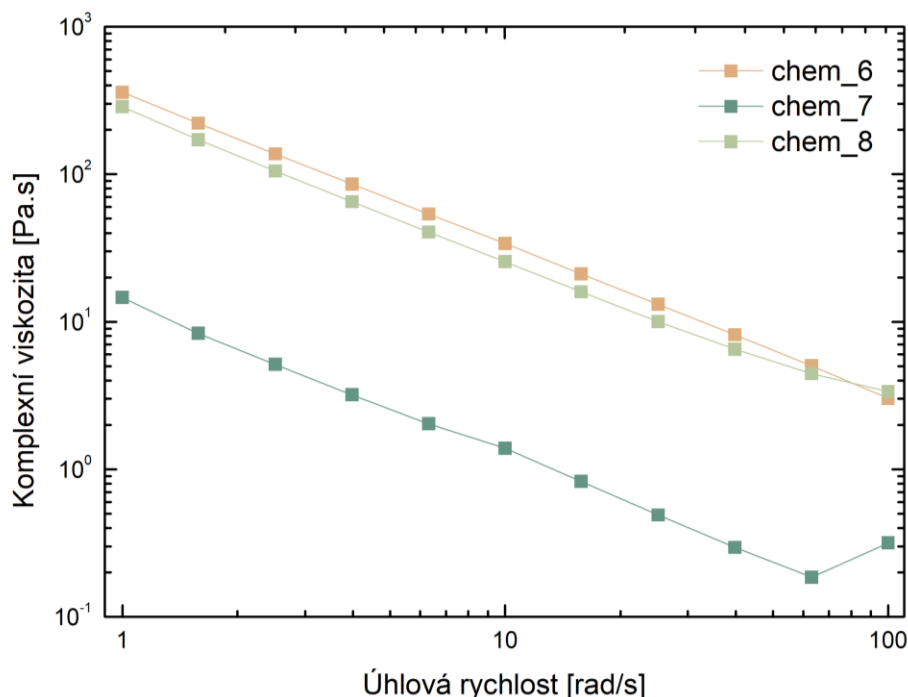
Tabulka 7 Doba do počátku gelace modifikovaného dextranu a hyaluronanu se želatinou Schiffovou bází

Označení vzorků	Chemické zastoupení biopolymerů	Poměrné zastoupení biopolymerů	Počátek gelace [min]
<i>chem_1</i>	GEL : DEX-OX	1:1	0:42
<i>chem_2</i>		1:2	-
<i>chem_3</i>		2:1	-
<i>chem_4</i>	GEL : HA-OX (1,18 MDa)	1:1	3:02
<i>chem_5</i>	GEL : HA-OX (1,5 MDa)	1:1	5:30
<i>chem_6</i>	GEL : DEX-OX : HA-OX (1,18 MDa)	2:1:1	1:40
<i>chem_7</i>		4:1:3	3:18
<i>chem_8</i>		4:3:1	1:26

Nejrychleji síťujícím systémem byla kombinace želatina a oxidovaný dextran v poměru 1:1, ten také během několika dalších minut vytvořil pevnou gelovitou strukturu. Musilová et al. (2022) ve své práci popisují, také systém DEX-OX a želatiny síťované Schiffovou bází, dobu gelace uvádí do jedné minuty [6]. Tvorba sítě nebyla pozorována u poměru 1:2 ani 2:1.

Zvýšení viskozity a tvorba vláken byly pozorovány i u kombinace želatiny s oxidovaným hyaluronanem v obou testovaných molekulových hmotnostech. Ani v jednom případě však během 10 minut míchání nedošlo k vytvoření tuhého gelu. Tvorbu Schiffovy báze mezi HA-OX a želatinou (1:1, 10 hm.%) potvrdili Sajjadi et al. (2024) pomocí NMR spektroskopie [5]. V práci Kuth et al. (2022) byl použit systém s 7,5 hm.% želatinou a HA-OX v poměru 1:1, přičemž autoři uvádějí, že vzorek byl následně inkubován 5 minut při 4 °C pro indukci termální gelace želatiny, zatímco dodatečné síťování bylo zajištěno pomocí mikrobiální transglutaminázy [227]. V kontextu tisknutelnosti byl obdobný systém popsán například u hydrogelu založeného na hyaluronanovém monoaldehydu, síťovaného Schiffovou bází s karbohydrazidovou formou želatiny [228]. Výsledky tohoto měření, spolu s dostupnou literaturou, naznačují, že daný typ systému není vhodný pro 3D tiskové aplikace.

Vzhledem k tomu, že dextran sice není považován za bioaktivní látku, ale umožňuje tvorbu pevné sítě ve spojení se želatinou, zatímco hyaluronan naopak dostatečně nepodporuje gelaci, avšak vykazuje významnou bioaktivitu, byly testovány různé kombinace těchto komponent [145, 229]. Pro další experimenty byl zvolen oxidovaný hyaluronan (HA-OX) s molekulovou hmotností 1,18 MDa, a to z důvodu rychlejší iniciace síťovací reakce. Všechny připravené kombinace (*chem_6*, *chem_7* a *chem_8*) vykazovaly dostatečně rychlou gelaci a zároveň vznik stabilní hydrogelové sítě s potenciálem využití pro 3D tisk. Tokové vlastnosti těchto vzorků byly testované také na rotačním reometru. Obrázek 29 popisuje závislost komplexní viskozity na úhlové rychlosti.



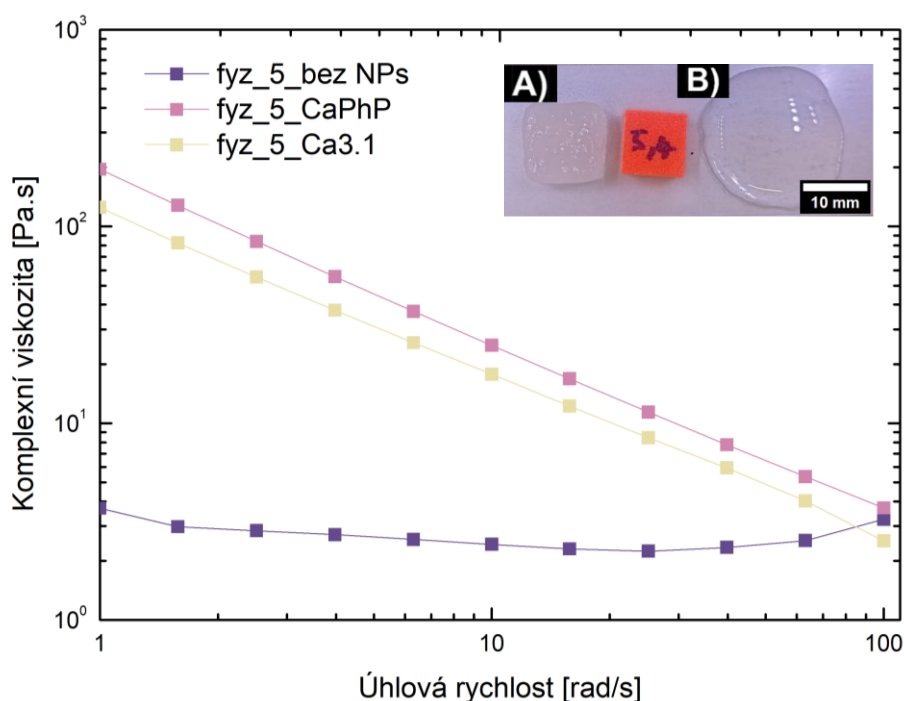
Obrázek 29 Závislost komplexní viskozity na úhlové rychlosti u chemicky síťovaných hydrogelů podle poměrného zastoupení polymerů GEL:DEX-OX:HA-OX; *chem_6* (4:1:1), *chem_7* (4:1:3), *chem_8* (4:3:1)

Výsledky oscilačního reologického měření prokázaly, že všechny testované vzorky vykazují pseudoplastické chování, které je nezbytné pro jejich zpracovatelnost metodou 3D tisku [189]. Vzorek označený jako *chem_7*, s nejvyšším zastoupením oxidovaného hyaluronanu, vykazuje oproti ostatním přibližně řádově nižší viskozitu (10^1 Pa·s), což pravděpodobně souvisí s tvorbou volnější a více hydratované polymerní sítě [154]. Dalším faktorem, který je třeba zmínit, je jistě i nižší stupeň oxidace HA-OX oproti DEX-OX. Při vyšších úhlových frekvencích, kolem 100 rad/s, dochází v důsledku slabé struktury k narušení integrity hydrogelu.

Vzorky *chem_6* a *chem_8* vykazují srovnatelné reologické chování v celém rozsahu měřených úhlových rychlostí ($3\text{--}4 \cdot 10^2$ Pa·s při deformaci 1 rad/s a $3 \cdot 10^0$ Pa·s při deformaci 100 rad/s), přičemž u vzorku *chem_8* je při vyšších frekvencích patrná mírná nestabilita. Naopak vzorek *chem_6* prokázal stabilitu napříč celým měřeným rozsahem. S ohledem na tato zjištění a vzhledem k vyššímu obsahu hyaluronanu, který podporuje biokompatibilitu, byl pro další experimenty vybrán vzorek *chem_6* (GEL:DEX-OX:HA-OX; 4:1:1), jelikož kombinuje optimální reologické chování s potenciálem pro biologické aplikace.

8.2.2 Výběr vhodné směsi biopolymerů s nanočásticemi pro 3D tisk

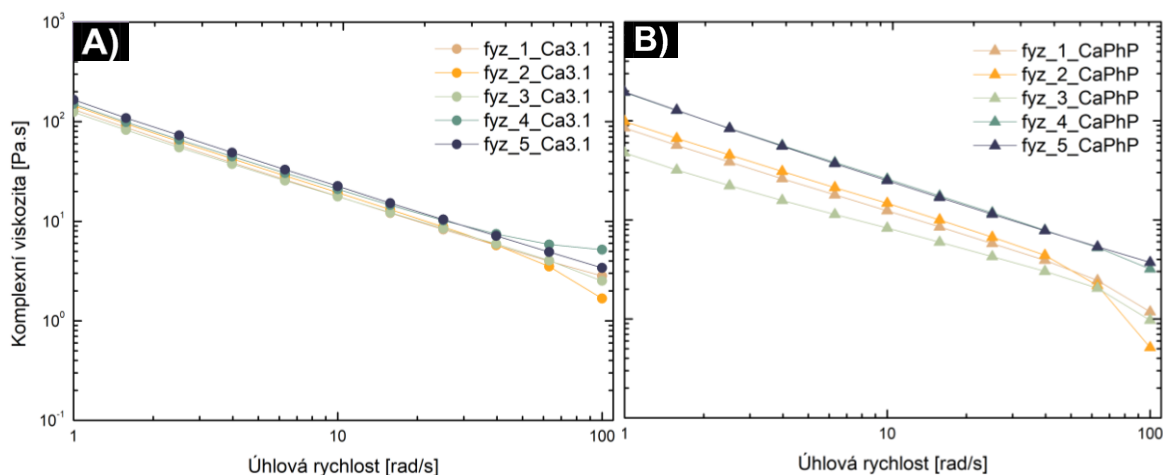
V počátku byl ověřen vliv nanočástic na reologické a tisknutelné vlastnosti polymerní matrice. K tomu bylo využito oscilační měření na rotačním reometru a 3D tisk vícevrstevného konstruktu pro tiskovou náplň s a bez nanočástic. Výsledky jsou prezentovány na Obrázku 30 pouze pro vzorky *fyz_5_CaPhP*, *fyz_5_Ca3.1* a *fyz_5_bezNPs*.



Obrázek 30 Závislost komplexní viskozity na úhlové rychlosti pro vzorky s obsahem nanočástic: *fyz_5_CaPhP* a *fyz_5_Ca3.1*; a pro tiskovou náplň bez nanočástic *fyz_5_bezNPs*. Obrázek v pravém rohu ilustruje vliv přítomnosti nanočástic na strukturu při tisku více vrstev materiálu A) s nanočásticemi CaPhP a B) bez nanočástic, přičemž oranžové těleso odpovídá počítačovému modelu (10x10 mm) tisknuté geometrie.

Vliv nanočástic na vlastnosti biopolymerní směsi pro 3D tisk je jednoznačný. Přídavek nanočástic zvyšuje komplexní viskozitu směsi až o jeden a půl řádu na hodnotu 10^2 Pa.s ve srovnání se směsí bez nanočástic. Nezbytným předpokladem pro materiál vhodný k 3D tisku je pokles viskozity s rostoucí deformací, který usnadňuje zpracování, přičemž hydrogel v klidovém stavu musí zachovávat pevnou strukturu. Tyto vlastnosti byly u obou typů nanočástic experimentálně potvrzeny. Mouser et al. (2016) také uvádí, že vyšší prahové napětí materiálu vede k lepším tiskovým vlastnostem hydrogelu [230].

Po ověření vlivu nanočástic na reologické vlastnosti polymerní matrice byly oscilačnímu testu podrobeny všechny zkoumané vzorky s oběma typy nanočástic. Závislost komplexní viskozity na úhlové rychlosti je uvedena na Obrázku 31.



Obrázek 31 Závislost komplexní viskozity na úhlové rychlosti hydrogelů s nanočásticemi v podle polymerního zastoupení A) Ca3.1 a B) CaPhP

Z Obrázku 31A, který zachycuje závislost viskozity na úhlové rychlosti u hydrogelů s obsahem nanočástic Ca3.1, vyplývá několik informací. Při nižších úhlových rychlostech je rozdíl mezi jednotlivými vzorky zanedbatelný, přičemž viskozita dosahuje hodnot kolem 10^2 Pa·s. Rozdíly mezi jednotlivými kompozitními vzorky se začínají projevovat až při úhlových rychlostech nad $3 \cdot 10^1$ rad/s, viskozita všech vzorků se nachází v intervalu 10^1 až 10^0 Pa·s. Vzorky označené jako *fyz_1_Ca3.1*, *fyz_3_Ca3.1* a *fyz_5_Ca3.1* vykazují ideálně lineární pseudoplastické chování v celém zkoumaném rozsahu úhlových rychlostí (1 až 100 rad/s). Na rozdíl od nich vzorky *fyz_2_Ca3.1* a *fyz_4_Ca3.1* prokazují toto chování pouze do úhlové rychlosti $3 \cdot 10^1$ rad/s; při vyšších rychlostech lze pozorovat mírné odchylky, které mohou signalizovat strukturální změny vyvolané namáháním materiálu. Toto chování by mohlo při 3D tisku ovlivnit stabilitu hydrogelu, zejména schopnost udržet tvar po extruzi [129].

U hydrogelů s nanočásticemi CaPhP lze na Obrázku 31B pozorovat větší rozdíly viskozit mezi testovanými vzorky než v předchozím případě, ovšem viskozita stále odpovídá přibližně 10^2 Pa·s při malé deformaci a 10^1 až 10^0 Pa·s při deformaci 100 rad/s. Ideálně lineární pseudoplastické chování v intervalu 1 až 100 rad/s vykazuje pouze vzorek *fyz_5_CaPhP*, který má zároveň nejvyšší viskozitu. Vyšší viskozita přispívá k lepší přesnosti a stabilitě 3D tisknutých struktur tím, že omezuje tok a rozptýlení materiálu po vytištění [231]. U zbývajících vzorků dochází při úhlových rychlostech kolem $2\text{--}4 \cdot 10^1$ rad/s k odchylce, což opět může poukazovat na narušení integrity hydrogelové struktury.

Zajímavým aspektem je také zmíněná variabilita viskozit v závislosti na typu nanočástic a poměrném zastoupení biopolymerů v matrici. Vyšší rozptyl viskozity

u hydrogelů s CaPhP lze pravděpodobně připsat jejich hydratované povaze, která podporuje intenzivnější interakce s hydrofilními skupinami biopolymerů [232]. Naopak u hydrogelů s fosfát-fenylfosfonátovými nanočásticemi tento efekt není pozorovaný. Toto tvrzení také podporují výsledky bobtnacích testů, kdy u hydrogelu s obsahem CaPhP byl v prvních minutách pozorována vyšší absorpce pufru než u hydrogelů s nanočásticemi Ca3.1.

Z výsledků testu se tedy jako nejvhodnější materiál pro 3D tisk jeví vzorky *fyz_5_CaPhP* a *fyz_5_CaPhP* (4:1:1; alginát: želatina: hylaronan). Z tohoto důvodu budou dále diskutovány pouze tyto polymerní směsi.

8.3 Tisknutelnost hydrogelů

V této části jsou diskutovány vybrané parametry, které ovlivňují tisknutelnost hydrogelů – narůstání za hubicí, přesnost tisku, tloušťka filamentu, částečná fúze a úplná separaci filamentu. Dosažené výsledky jsou uvedeny v Tabulce 8. V následujícím textu je rovněž popsána tzv. samonostnost tisknutých struktur.

Tabulka 8 Tiskové charakteristiky hydrogelů

Vzorek	Narůstání za hubicí [-]	Přesnost tisku [%]	Tloušťka filamentu po depozici [mm]	Částečná fúze [mm]	Úplná separace [mm]
<i>fyz_5_bez NPs</i>	$3,31 \pm 0,12$	-	$2,04 \pm 0,08$	2,1	2,4
<i>fyz_5_CaPhP</i>	$1,61 \pm 0,03$	33 ± 2	$1,53 \pm 0,11$	1,2	1,9
<i>fyz_5_Ca3.1</i>	$2,07 \pm 0,05$	31 ± 2	$1,49 \pm 0,06$	1,3	1,9
<i>chem_6</i>	$2,9 \pm 0,17$	76 ± 4	$1,21 \pm 0,19$	0,9	1,1

V práci Kopecké et al. (2023) byly zkoumány tiskové charakteristiky systémů alginát/CaPhP a alginát/Ca3.1 [10]. Autoři uvádějí, že při použití trysky o průměru 0,26 mm bylo dosaženo narůstání za hubicí v hodnotě 2,3 pro systém s nanočásticemi CaPhP, zatímco u Ca3.1 byla tato hodnota nižší, a to 1,4. Dále autoři vyslovují hypotézu, že hydrogel plněný nanočásticemi Ca3.1 je méně citlivý na vliv normálového napětí. V rámci této práce byl však pozorován opačný trend, kdy u vzorku *fyz_5_CaPhP* byla určena hodnota narůstání za hubicí $1,61 \pm 0,03$ a pro vzorek *fyz_5_Ca3.1* tato hodnota odpovídala $2,07 \pm 0,05$. Stabik et al. (2004) navíc prokázali, že přítomnost nanočástic v nízkých koncentracích obecně snižuje narůstání za hubicí, což je v souladu s výsledky prezentovanými v této práci [233]. Hydrogel připravený chemickým síťováním naopak vykazoval narůstání za hubicí $2,9 \pm 0,17$, což

souhlasí s výsledky popsány v práci Musilové et al. (2022), kde byly změřeny hodnoty 2,4 – 3,0 u hydrogelů na bázi DEX-OX a želatiny (různý původ) v poměru 1:1 [6].

Kromě narůstání za hubicí byla pozornost zaměřena i na přesnost tisku, která odpovídala u vzorku *fyz_5_CaPhP* hodnotě $(33 \pm 2) \%$ a u vzorku *fyz_5_Ca3.1* hodnotě $(31 \pm 2) \%$. Získané hodnoty jsou projevem rozlivu materiálu po depozici na skleněnou podložku, což značí omezené tixotropní chování. Tixotropní materiály vykazují snížení viskozity při smykovém namáhání, což usnadňuje jejich vytlačení, avšak pro dosažení vysokého rozlišení tisku je nutná rychlá obnova vnitřní struktury po ukončení toku [129]. Vysoké rozlévání může být také ovlivněno povrchovým napětím mezi materiálem a skleněnou podložkou [234]. U vzorku označeného *chem_6* přesnost dosahovala $(76 \pm 4) \%$, což vypovídá o jeho menší tendenci k rozlévání, pravděpodobně díky přítomným pevným kovalentním vazbám. S tímto chováním souvisí také hodnoty změřené tloušťky filamentu. Kopecká et al. (2023) uvádí tloušťku filamentu 0,45 mm pro Ca3.1 a 0,39 mm pro CaPhP, přičemž vyšší rozprostírání u Ca3.1 přisuzuje nižší viskozitě hydrogelu [10]. V této diplomové práci však byla u obou typů nanočástic naměřena obdobná tloušťka filamentu – $(1,53 \pm 0,11)$ mm pro vzorek *fyz_5_CaPhP* a $(1,49 \pm 0,66)$ mm pro vzorek *fyz_5_Ca3.1*. To naznačuje, že dominantní vliv na výslednou tloušťku má polymerní složení matrice než samotné nanočástice. Tento faktor se pravděpodobně promítá i do změřené šířky filamentu, která je až čtyřnásobně vyšší než ve zmíněné studii. Příčinou tohoto chování může být také teplotní citlivost želatiny, ale i snížená schopnost nanočástic efektivně stabilizovat síť ve vícesložkovém systému. Tloušťku filamentu po depozici Soufivand et al. (2023) uvádějí jako 0,6 mm u hydrogelu složeného z 2 hm.% alginátu a 5 hm.% želatiny, přičemž tato hodnota přibližně odpovídala průměru použité trysky [15]. Naopak kolektiv Chung et al. (2013) pozorovali tloušťku filamentu 0,32 mm při použití systému s 2 hm.% alginátem a 10 hm.% želatinou, kde byl průměr jehly 0,2 mm [235].

Parametry částečné fúze a úplné separace filamentu po tisku jsou důležité zejména pro vhodné nastavení tiskových parametrů. Pokud při tisku dochází mezi vrstvami k úplné fúzi, je důsledkem nižší rozlišení výsledného scaffoldu, naopak úplně separované filamenty mohou sice vést k přesnějšímu tisku s vyšší porozitou, ale zároveň k nižší mechanické pevnosti. Částečně spojené filamenty mohou být mechanicky pevnější, ale méně porézní [10, 129]. Naměřené hodnoty částečné fúze, resp. úplné separace, jsou pro systém *fyz_5_CaPhP* 1,2 mm, resp. 1,9 mm a pro systém *fyz_5_Ca3.1* 1,3 mm, resp. 1,9 mm. Na základě toho lze konstatovat, že typ nanočástic na tyto parametry nemá významný vliv.

Výsledky těchto parametrů předkládá i Kopecká et al. (2023) na systému alginát/CaPhP jako 1,4 mm, resp. 1,8 mm a na systému alginát/Ca3.1 jako 1,4 mm, resp. 1,8 mm [10].

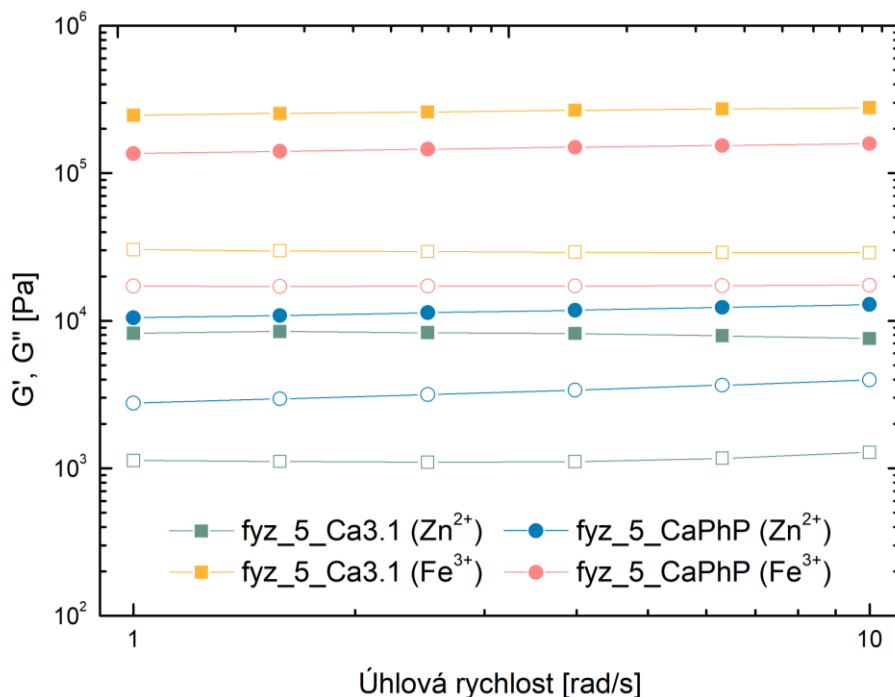
V neposlední řadě byla charakterizována i schopnost materiálu nerozpadnout se pod svou vlastní tíhou, tzv. samonosnost. U systému *fyz_5_CaPhP* bylo možné před zhroucením struktury vytisknout až 18 vrstev, a u *fyz_5_Ca3.1* 17 vrstev materiálu. Kopecká et al. (2023) popisuje, že pro alginát/CaPhP a alginát/Ca3.1 bylo možné tisknout struktury až o 25 vrstvách [10]. Lze tedy předpokládat, že přítomnost dalších biopolymerů – želatiny a hyaluronanu, je zodpovědná za nižší stabilitu a pevnost tisknutého hydrogelu, což koresponduje s tvrzeními uvedenými v předchozích odstavcích. U vzorku, který je označený *chem_6*, byla vytištěna struktura až o 23 vrstvách. To poukazuje na vyšší mechanickou stabilitu, která je důsledkem přítomnosti pevné kovalentní sítě Schiffových bazí [154]. Z hlediska potenciálních aplikací je tento parametr důležitý pro dosažení velikosti a objemu scaffoldu, které odpovídají cílené nahrazené tkáni [10].

8.4 Tuhost 3D tisknutých hydrogelů

Souřázkový modul (G') u hydrogelů představuje míru elastického chování materiálu, tedy jeho schopnosti ukládat mechanickou energii a odolávat deformaci, přičemž vyšší hodnoty G' indikují tužší a pevnější strukturu sítě. Naproti tomu G'' , ztrátový modul, reprezentuje viskózní složku a zachycuje energii disipovanou jako teplo v důsledku vnitřního tření během deformace, což odráží schopnost materiálu tlumit dynamické zatížení [202]. Studium G' a G'' je tedy nezbytné pro charakterizaci mechanických vlastností hydrogelů k zajištění jejich biokompatibility a funkčnosti při regeneraci tkání [2].

8.4.1 Tuhost 3D tisknutých fyzikálně síťovaných hydrogelů s nanočásticemi

Závislost souřázkového a ztrátového modulu fyzikálně síťovaných hydrogelů s nanočásticemi na úhlové rychlosti je zobrazená na Obrázku 32.



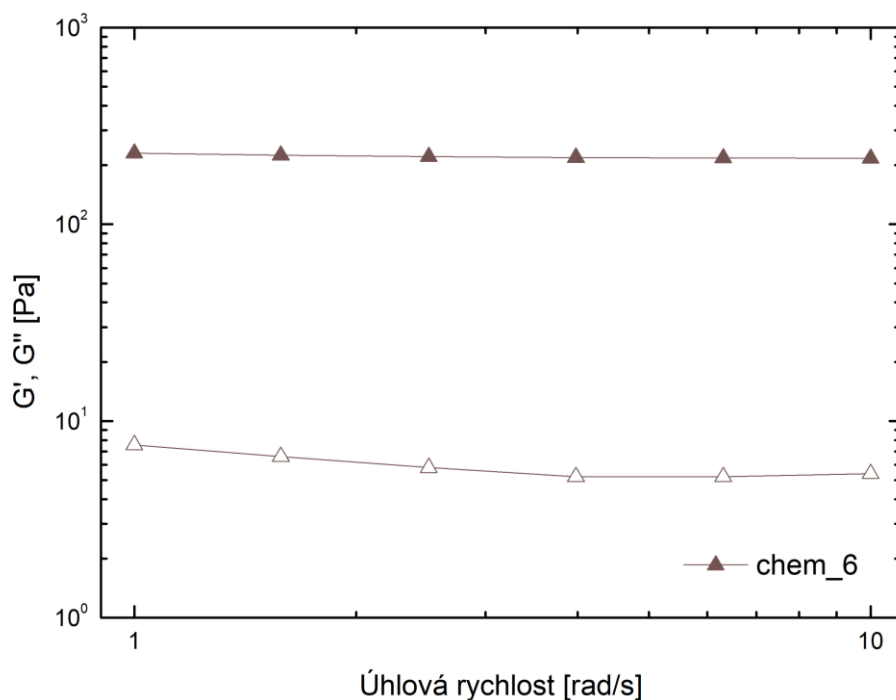
Obrázek 32 Závislost souřazového (G' , plné znaky) a ztrátového (G'' , prázdné znaky) modulu fyzikálně síťovaných hydrogelů s nanočásticemi na úhlové rychlosti

U hydrogelů zesíťovaných ionty Fe^{3+} byla zaznamenána hodnota souřazového modulu G' přibližně 10^5 Pa, přičemž v celém rozsahu měřených úhlových rychlostí (1–10 rad/s) byly oba moduly (G' i G'') prakticky lineární a nezávislé. Ztrátový modul G'' dosahoval hodnoty kolem 10^4 Pa. Toto chování svědčí o stabilní a silně zesíťované polymerní síti, což je v souladu s literaturou - alginát má vyšší afinitu k Fe^{3+} než k jiným multivalentním iontům [142, 236]. Tomu odpovídají i výsledky hydrogelů zesíťovaných ionty Zn^{2+} , které vykazovaly přibližně o řád nižší hodnoty souřazového modulu 10^4 Pa a ztrátového modulu 10^3 Pa. Frekvenční sweep alginátového hydrogelu síťovaného těmito ionty popisují i Malektaj et al. (2023) [135]. Autoři 48 hodin síťovali alginát v 1 M ZnCl_2 , přičemž naměřená hodnota G' činila 10^{-2} kPa a v případě použití 0,1 M FeCl_3 dosahoval G' hodnoty 10^{-1} kPa při frekvenci 1 Hz s amplitudou 0,5 %.

Mechanická stabilita hydrogelu je ovlivněna nejenom síťovacím iontem, hustotou sítě a přítomnými plnivy, ale také kvalitou tisku [10]. Z výsledků není možné určit, jestli rozdíl pozorovaný mezi vzorky síťovanými stejným iontem je důsledkem samotných nanočástic nebo vytisknutým tvarem hydrogelu.

8.4.2 Tuhost 3D tisknutého hydrogelu připraveného chemickým síťováním

Závislost soufázového a ztrátového modulu chemicky síťovaných hydrogelů želatiny, oxidovaného hyaluronanu a dextranu na úhlové rychlosti je zobrazená na Obrázku 33.



Obrázek 33 Závislost soufázového (G' , plné znaky) a ztrátového (G'' , prázdné znaky) modulu chemicky síťovaného hydrogelu na úhlové rychlosti

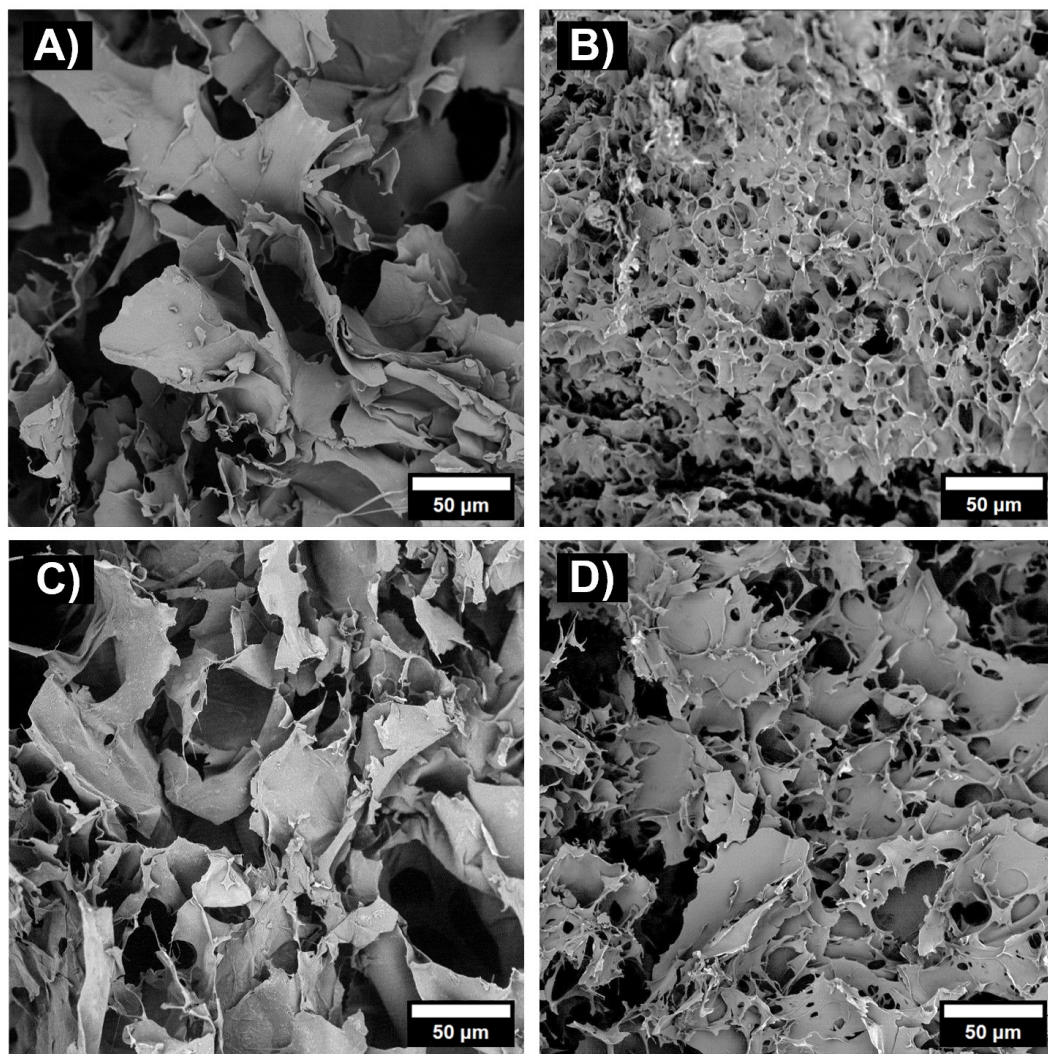
Z grafu je patrné dominantní elastické chování, což odpovídá pevné gelové struktuře. Soufázový modul o hodnotě $2 \cdot 10^2$ Pa je v celém měřeném rozsahu stabilní, tzn. není závislý na aplikované deformaci. Ztrátový modul nabývá hodnot přibližně o řád nižších (~ 10 Pa) a lze pozorovat mírný pokles s rostoucí úhlovou rychlostí, což vypovídá o situaci, kdy relaxační mechanismy (segmentální pohyb polymerních řetězců nebo restrukturalizace vnitřní sítě) nestíhají reagovat na rychlou oscilaci, a tím pádem dochází k menší disipaci energie. Musilová et al. (2022) zkoumali viskozitní chování na DEX-OX kovalentně vázaným s různými typy želatiny v poměru 1:1 [6]. Autoři popisují frekvenčně nezávislý G' hydrogelů při úhlových rychlostech 10^{-1} až 10^1 rad/s při 10 % deformaci v intervalu 10^1 - 10^2 Pa v závislosti na použité želatině. Výzkumný tým Holt et al. (2009) zkoumali vzorek lidské kůže oscilačním měřením pomocí rotačního reometru a při úhlové rychlosti 1 rad/s (konstantní napětí 0,5 %) uvádí soufázový modul $3 \cdot 10^2$ Pa, což je blízké hodnotám popisovaného hydrogelu [237].

8.5 Morfologie 3D tisknutých hydrogelů

Morfologie hydrogelu je zásadním parametrem, který určuje jeho fyzikálně-chemické, mechanické a biologické vlastnosti. Charakteristiky, jako je velikost a uspořádání pórů nebo úroveň zesíťování, ovlivňují nejen mechanickou odolnost a pružnost hydrogelu, ale také jeho schopnost podporovat buněčné interakce, biokompatibilitu a transport molekul [203, 204]. V následujících podkapitolách budou prezentovány a diskutovány výsledky morfologie lyofilizovaných hydrogelů získaných SEM analýzou.

8.5.1 Morfologie 3D tisknutých fyzikálně síťovaných hydrogelů s nanočásticemi

Morfologie lyofilizovaných 3D tisknutých hydrogelů s nanočásticemi zesíťovaných zinečnatými a železitými ionty jsou vyobrazené na Obrázku 34.

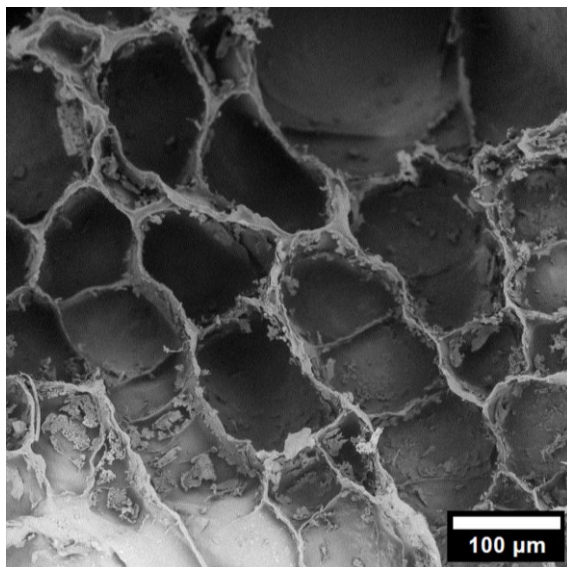


Obrázek 34 SEM snímky lyofilizovaných fyzikálně síťovaných hydrogelů s nanočásticemi; A) *fyz_5_CaPhP* síťovaný Zn^{2+} ionty, B) *fyz_5_CaPhP* síťovaný Fe^{3+} ionty, C) *fyz_5_Ca3.1* síťovaný Zn^{2+} ionty, D) *fyz_5_Ca3.1* síťovaný Fe^{3+} ionty

Snímky na podélných řezech lyofilizovaných hydrogelů naznačují, že jejich vnitřní struktura je tvořena listovitě uspořádanými vrstvami. Bylo rovněž pozorováno, že mikrostruktura pórů se významně liší v závislosti na typu iontu použitých pro fyzikální zesíťování. Hydrogelové struktury zesíťované ionty Fe^{3+} vykazovaly vyšší hustotu sítě ve srovnání se vzorky zesíťovanými ionty Zn^{2+} . Průměrná plocha pórů byla u vzorků zesíťovaných ionty Zn^{2+} určena obrazovou analýzou na přibližně $500 \mu\text{m}^2$, zatímco u vzorků zesíťovaných Fe^{3+} činila kolem $150 \mu\text{m}^2$, přičemž v obou případech byla pozorována široká distribuce velikosti pórů, což je v souladu s dostupnou literaturou [11, 142]. Stanovená porozita byla přibližně určena jako $(60 \pm 4) \%$ pro Zn^{2+} a $(40 \pm 3) \%$ pro Fe^{3+} hydrogely. Obdobné chování bylo popsáno také autory Zhang et al. (2024) při studiu čistého alginátu sodného, kde bylo pozorováno, že ionty s vyšší afinitou k alginátovým řetězcům, jako je Fe^{3+} , vedou k tvorbě kompaktnějších zesíťovaných struktur, které se vyznačují menší velikostí pórů [238]. Ze snímků se také zdá, že typ použitých nanočástic na samotnou morfologii nemá významný vliv. Ve studii Ma et al. (2020) byl analyzován vliv morfologie pórů hydrogelu na bázi alginátu, želatiny a hyaluronanu, zesíťovaného CaCl_2 , na adhezi, proliferaci a diferenciaci gliových buněk [199]. Autoři uvádějí, že inkoust tvořený pouze alginátem a hyaluronanem s listovitě uspořádanou mikrostrukturou, morfologicky připomínající strukturu hydrogelů zesíťovaných ionty Zn^{2+} v této práci, podporoval adhezi buněk, které vykazovaly relativně nízkou kruhovitost a nepravidelné tvary. Naopak hydrogely s vyšším obsahem želatiny (7,5 hm.%), vizuálně podobné morfologii hydrogelů zesíťovaných ionty Fe^{3+} , vykazovaly výrazněji protáhlou morfologii buněk a tendenci k agregaci do shluků, což podle autorů svědčí o lepší proliferaci a zvýšené mobilitě buněk.

8.5.2 Morfologie 3D tiského chemicky síťovaného hydrogelu

Vnitřní morfologie lyofilizovaného hydrogelu želatiny/HA-OX/DEX-OX vázaného skrz Schiffovy báze je zobrazená na Obrázku 35.



Obrázek 35 SEM snímek chemicky síťovaného hydrogelu

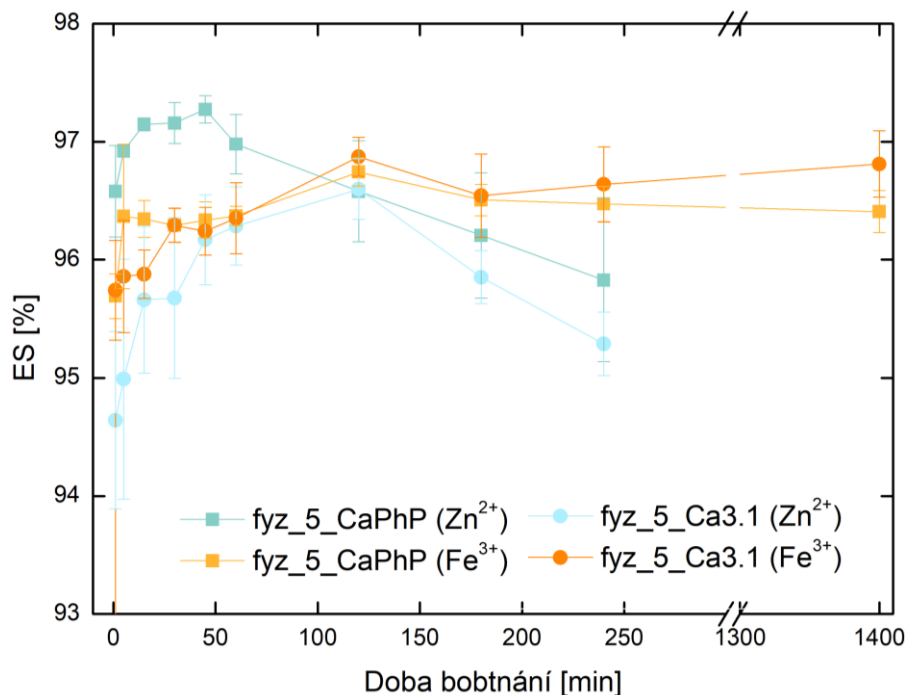
Mikrostruktura hydrogelu je charakterizována přítomností pórů s převážně polygonálním až oválným tvarem, které jsou odděleny tenkými stěnami. Tyto stěny místy vykazují nepravidelnosti, trhliny a mírnou drsnost povrchu, pravděpodobně v důsledku lyofilizačního procesu. Velikost pórů dosahuje hodnot od desítek až stovek mikrometrů, přičemž průměrná plocha pórů dosahuje přibližně $14\,000\ \mu\text{m}^2$. Celková porozita hydrogelu činí $(65 \pm 4)\%$. Musilová et al. (2022) zkoumali porozitu systémů želatina/DEX-OX a popisují hydrogely s propojenými póry jejichž rozměry se pohybují přibližně v rozmezí 50–100 μm [6]. Také uvádí relativní porozitu v intervalu 30–80 % s průměrnou plochou pórů 9 000–40 000 μm^2 v závislosti na původu želatiny a poměru polymerů. Guan et al. (2022) rovněž reportují u systému želatina/DEX-OX vnitřní rozměr pórů kolem 160 μm [239].

8.6 Bobtnací testy

Bobtnací testy hydrogelů se provádějí za účelem hodnocení schopnosti materiálu absorbovat kapalinu a zvětšit svůj objem, což je důležitá vlastnost ovlivňující jejich mechanické chování, transportní vlastnosti i biologickou interakci [240]. V této kapitole budou uvedeny a diskutovány výsledky bobtnacích testů hydrogelů připravených v rámci diplomové práce.

8.6.1 Bobtnací schopnost fyzikálně síťovaných hydrogelů s nanočásticemi

Na Obrázku 36 jsou prezentovány výsledky měření bobtnacích schopností fyzikálně síťovaných hydrogelů zinečnatými a železitými ionty s nanočásticemi v závislosti na času v prostředí fosfátového pufru.



Obrázek 36 Závislost rovnovážného stupně bobtnání (ES) fyzikálně síťovaných (Zn^{2+} , Fe^{3+}) hydrogelů s nanočásticemi (fyz_5_CaPhP , $fyz_5_Ca3.1$) na čas

Z výsledků vyplývá, že všechny vzorky absorbovaly téměř maximální množství kapaliny během prvních několika minut, což je typické chování pro alginátové hydrogely [240]. Nejvyšší bobtnací schopnost byla zaznamenána u vzorku fyz_5_CaPhP síťovaného zinečnatými ionty (Zn^{2+}), zatímco nejnižší hodnoty (s maximem 96,5 %) vykazoval vzorek $fyz_5_Ca3.1$, rovněž síťovaný Zn^{2+} ionty. Tento rozdíl může být způsoben variacemi ve struktuře, jak naznačují i výsledky SEM analýzy, která odhalila vyšší heterogenitu. Naopak, Fe^{3+} síťované hydrogely vykazovaly obdobné chování bez ohledu na typ použitých nanočástic. Malektaj et al. (2023) ve své práci zkoumali vliv různých kationtů na síťování alginátu a uvádí, že rovnovážný stupeň bobtnání je vyšší při síťování zinečnatými ionty než železitými ionty [135].

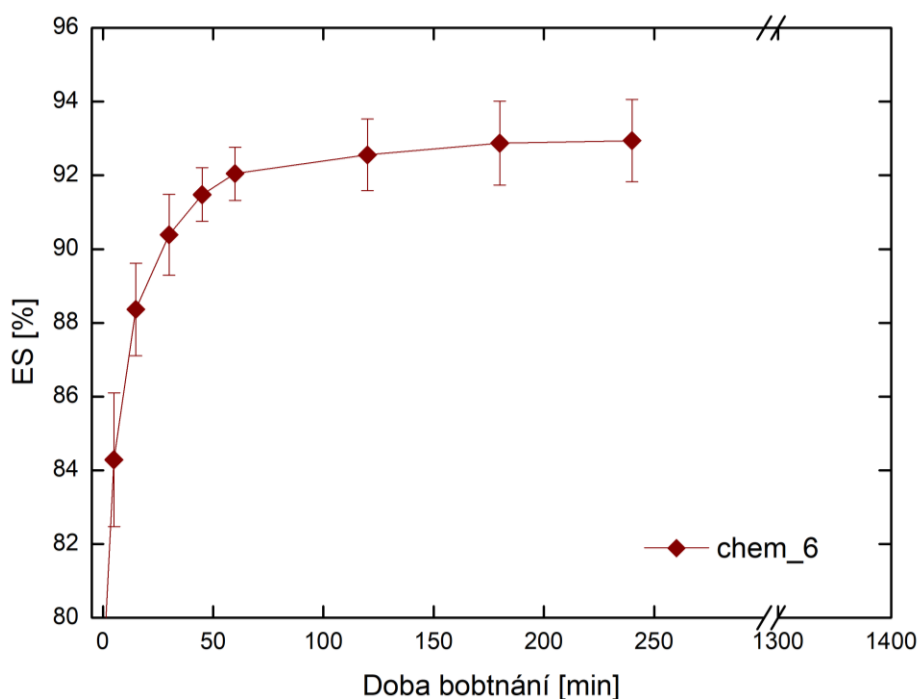
Také bylo pozorováno, že hydrogely síťované Fe^{3+} z pohledu dlouhodobé stability vydržely až 24 hodin, zatímco pro vzorky síťované Zn^{2+} ionty to byly pouze 2 hodiny, po kterých byl patrný počínající rozpad struktury, což se projevilo poklesem ES . Po 24 hodinách se Zn^{2+} hydrogely kompletně rozpustily. Takové chování je možné nalézt i v literatuře, která Fe^{3+} hydrogely popisuje jako stabilní díky své pevné síti, na rozdíl od hydrogelů síťovaných zinečnatými ionty, které tvoří řidší a méně pevnou síť [143, 240].

Další trend v počátku měření byl zaznamenán u hydrogelů s nanočásticemi $CaPhP$ (dihydrát vápenatých fenylfosfonátů), které dosahovaly mírně vyšších hodnot stupně

bobtnání (97 %) ve srovnání s hydrogely obsahujícími nanočástice Ca₃P₂O₇ (vápenaté fosfát-fenylfosfonáty), tedy přibližně 96 %. Tento rozdíl lze přičíst hydratované povaze CaPhP nanočástic, která pravděpodobně zvyšuje afinitu k vodě a usnadňuje její difuzi do gelové sítě [232].

8.6.2 Bobtnací schopnost chemicky síťovaného hydrogelu

Na Obrázku 37 jsou prezentovány výsledky měření bobtnacích schopností chemicky síťovaného hydrogelu složeného z želatiny, oxidovaného dextranu a oxidovaného hyaluronanu, síťování bylo provedeno prostřednictvím Schiffovy báze.



Obrázek 37 Závislost rovnovážného stupně bobtnání (*ES*) chemicky síťovaného hydrogelu (*chem_6*) na čase

Graf zachycuje rychlé počáteční bobtnání během prvních 15 minut, kdy hydrogel absorbuje značné množství pufru. Rovnovážný stav je dosažen přibližně po 3 hodinách, kde nabyl hodnoty $(93 \pm 1) \%$. Nicméně po 24 hodinách dochází k rozpadu struktury hydrogelu, což naznačuje omezenou dlouhodobou stabilitu materiálu ve vodném prostředí. Ve srovnání s fyzikálně síťovanými hydrogely, vykazuje tento chemicky síťovaný hydrogel nižší bobtnací kapacitu a pomalejší difuzi pufru do své struktury. Tento rozdíl lze přičíst pevným kovalentním vazbám vytvořeným Schiffovou bází, které zvyšují tuhost sítě a omezují její roztažnost, čímž klesá bobtnací schopnost [241]. Současně však nižší hustota sítě a větší póry (až stovky mikrometrů) ve struktuře, jak potvrzují snímky z elektronového mikroskopu,

mohou vysvětlit pozorovaný rozpad hydrogelu po 24 hodinách. Toto tvrzení lze podpořit i nižším stupněm oxidace hyaluronanu, který byl 33 aldehydových skupin na disacharidovou jednotku. Ve studii Musilové et al. (2022), byly zkoumány hydrogely na bázi želatiny a oxidovaného dextranu, rovněž síťované prostřednictvím Schiffovy báze. Tyto hydrogely vykazovaly vyšší bobtnací kapacitu (až 96 % ES) a zůstávaly stabilní i po 24 hodinách expozice fosfátového pufru [6].

ZÁVĚR

Cílem předložené diplomové práce bylo připravit a charakterizovat hydrogely na bázi alginátu, dextranu, hyaluronanu a želatiny pro 3D tisk s aplikačním potenciálem ve tkáňovém inženýrství. Tyto materiály byly síťovány několika mechanismy, a to buď fyzikálně pomocí multivalentních iontů, a/nebo chemicky prostřednictvím Schiffovy báze. Do vybraných systémů byly navíc začleněny organofosfonátové nanočástice za účelem zlepšení jejich tiskových vlastností.

V rámci praktické části se podařilo úspěšně oxidovat hyaluronan (1,18 MDa a 1,5 MDa) a dextran (100 kDa) reakcí s jodistanem sodným. Úspěšnost provedené oxidace byla potvrzena pomocí ^1H NMR spektroskopie, změny v molekulové hmotnosti byly stanoveny metodou gelové permeační chromatografie. U oxidovaného hyaluronanu (HA-OX) došlo k výraznému poklesu molekulové hmotnosti z 1,18 MDa na 7 993 Da a z 1,5 MDa na 9 662 Da. U dextranu (100 kDa) byla stanovena výsledná molekulová hmotnost 12 387 Da. Na základě titračního stanovení byl rovněž stanoven stupeň oxidace. U HA-OX (1,18 MDa/1,5 MDa) činil 33/70 aldehydových skupin na 100 disacharidových jednotek, zatímco u DEX-OX bylo detekováno 48 aldehydových skupin na 100 glukózových jednotek.

Síťovací reakcí metodou Schiffovy báze byly připraveny systémy obsahující želatinu, DEX-OX a HA-OX v různých poměrech (4:1:1, 4:1:3, 4:3:1). Jejich reologické vlastnosti byly hodnoceny pomocí frekvenčního sweepu v rozmezí 1–100 rad/s. Všechny vzorky vykazovaly pseudoplastické chování, což je nezbytné pro jejich zpracování pomocí 3D tisku. Pro podrobnější charakterizaci byl vybrán vzorek označený jako *chem_6* (poměr 4:1:1), který vykazoval jako jediný ideálně lineární pseudoplastické chování v celém měřeném rozmezí rychlostí smykové deformace a zároveň u něj byla pozorována nejvyšší komplexní viskozita $4 \cdot 10^2 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ při 1 % deformaci.

Vzorek *chem_6* byl následně testován z hlediska tisknutelnosti. Na základě narůstání za hubicí, testu fúze filamentu a samonosnosti bylo možné optimalizovat podmínky pro 3D tisk vícevrstvých scaffoldů. Přesnost tisku byla pro tento systém za daných podmínek určena na $(76 \pm 4) \%$. Mechanické vlastnosti vytištěného vícevrstevného scaffoldu byly dále charakterizovány pomocí frekvenčního sweepu v rozmezí 1–10 rad/s, přičemž souřadový modul (G') dosahoval hodnoty přibližně 10^2 Pa a ztrátový modul (G'') se pohyboval kolem 10 Pa, což indikuje stabilní hydrogelovou strukturu v daném rozmezí. Morfologická analýza pomocí SEM odhalila pórovitou strukturu s póry polygonálního až oválného tvaru

o velikostech v rozsahu desítek až stovek mikrometrů. Celková porozita byla kvantifikována na $(65 \pm 4) \%$. Bobtnací chování bylo sledováno při inkubaci v PBS při 37°C . Rovnovážného stupně bobtnání bylo dosaženo po 3 hodinách s hodnotou $(93 \pm 1) \%$. Avšak po 24 hodinách došlo k rozkladu struktury, což poukazuje na jeho omezenou dlouhodobou stabilitu v podmínkách napodobující biologického prostředí.

V další části diplomové práce byly připraveny hydrogely na bázi alginátu, želatiny a hyaluronanu, do jejichž polymerní matrice byly inkorporovány destičkovité vrstevnaté nanočástice dihydrátu fenylfosfonátu vápenatého (CaPhP) nebo fosfátu-fenylfosfonátu vápenatého (Ca3.1). Tyto nanočástice sloužily jako reologické plnivo, díky jejich schopnosti tvořit tzv. strukturu domečku z karet. Jejich přítomnost v polymerní matrici vedla k výraznému nárůstu komplexní viskozity z výchozí hodnoty $4 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ až na přibližně $10^2 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ při úhlové frekvenci 1 rad/s a zároveň zajistily pseudoplastické chování ($1\text{--}100 \text{ rad/s}$), které u kontrolního vzorku bez nanočástic pozorováno nebylo. Za účelem optimalizace složení tiskového materiálu byly testovány různé poměry biopolymerů (alginát:želatina:hyaluronan) – konkrétně $2:1:1$, $3:1:1$, $4:2:1$, $4:1:2$ a $4:1:1$ – a to s oběma typy nanočástic. Na základě reologických měření byly jako nejvhodnější pro 3D tisk vyhodnoceny formulace s poměrem $4:1:1$, označené jako *fyz_5_CaPhP* a *fyz_5_Ca3.1*, které vykazovaly stabilitu v celém intervalu měřených úhlových rychlostí ($1\text{--}100 \text{ rad/s}$) a zároveň také nejvyšší komplexní viskozitu ze všech testovaných poměrů ($2\cdot 10^2 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ při 1 rad/s).

Stejně jako v předchozím případě byla u vzorků *fyz_5_CaPhP* a *fyz_5_Ca3.1* hodnocena tisknutelnost na základě narůstání za hubicí, testu fúze filamentu a samonosnosti, což umožnilo optimalizovat parametry tisku vícevrstevných hydrogelů. Za daných podmínek byla stanovena přesnost tisku pro *fyz_5_CaPhP* $(33 \pm 2) \%$ a $(31 \pm 2) \%$ u vzorku *fyz_5_Ca3.1*. Nižší tisková přesnost byla způsobena rozléváním materiálu po depozici na skleněném substrátu, což signalizuje omezené tixotropní chování hydrogelu. Vytisknuté vícevrstvé scaffoldy byly následně iontově zesíťovány v roztocích ZnCl_2 a FeCl_3 . V důsledku pomalé difúze iontů do objemu gelu bylo pozorováno objemové smrštění a částečná ztráta tvarové přesnosti, přičemž tento efekt byl výraznější při síťování pomocí Zn^{2+} než u Fe^{3+} , a to nezávisle na typu přítomných nanočástic. Mechanické vlastnosti zesíťovaných scaffoldů byly charakterizovány frekvenčním sweepem v rozmezí $1\text{--}10 \text{ rad/s}$. Bylo zjištěno, že souřazový modul (G') u scaffoldů síťovaných FeCl_3 dosahoval hodnot $3\cdot 10^5 \text{ Pa}$ (*fyz_5_Ca3.1*) a $1\cdot 10^5 \text{ Pa}$ (*fyz_5_CaPhP*), zatímco u ZnCl_2 byl G' přibližně o řád nižší pro oba vzorky. Morfologická analýza pomocí SEM ukázala, že síťování Zn^{2+} vedlo ke

vzniku porézní struktury s průměrnou porozitou (60 ± 4) % a střední plochou pórů přibližně $500 \mu\text{m}^2$. Oproti tomu použití Fe^{3+} vedlo k tvorbě kompaktnějších struktur s porozitou (40 ± 3) % a střední plochou pórů přibližně $150 \mu\text{m}^2$. Nejvyšší rovnovážný stupeň bobtnání (ES) dosáhl vzorek *fyz_5_CaPhP* síťovaný ionty zinku, s hodnotou ($97,3 \pm 0,2$) %. Zatímco vzorky síťované Zn^{2+} se začaly rozpouštět již po 2 hodinách a po 24 hodinách došlo k jejich úplné degradaci, hydrogely síťované pomocí Fe^{3+} zůstaly po celou dobu experimentu strukturálně stabilní s maximem ES ($96,8 \pm 0,2$) % pro *fyz_5_Ca3.1* a ($96,7 \pm 0,12$) % pro *fyz_5_CaPhP*.

V neposlední řadě byl připraven i hybridní hydrogelový systém založený na chemicky síťovaném HA-OX/DEX-OX/želatina rozšířený o alginát sodný a nanočástice CaPhP nebo Ca3.1. Byly testovány různé strategie jeho přípravy (jedno- a dvoukroková, včetně použití nanočástic v práškové formě), nicméně žádná z nich nevedla k přípravě materiálu vhodného pro mikroextruzní tisk s následnou tvorbou druhé fyzikální sítě.

Na základě výše popsaných informací lze konstatovat, že z testovaných materiálů se pro zpracování pomocí 3D tisku jeví jako nejvhodnější vzorek *chem_6*, který se vyznačoval nejvyšší tiskovou přesností, dobrou porozitou a viskoelastickými vlastnostmi podobné měkkým tkáním. Do budoucna je však pro určení bližšího aplikačního potenciálu nutné navázat především buněčnými testy.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KASOJU, Naresh a Anagha SUNILKUMAR. Convergence of tissue engineering and sustainable development goals. online. *Biotechnology for Sustainable Materials*, roč. 1 (2024), č. 1, s. 20. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s44316-024-00021-y>.
- [2] DODDA, Jagan Mohan; Kalim DESHMUKH; Deon BEZUIDENHOUT a Yi-Cheun YEH. Hydrogels: Definition, History, Classifications, Formation, Constitutive Characteristics, and Applications. online. In: DODDA, Jagan Mohan; Kalim DESHMUKH a Deon BEZUIDENHOUT (ed.). *Multicomponent Hydrogels*, s. 1–25. 1. vyd. The Royal Society of Chemistry, 2023. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/BK9781837670055-00001>.
- [3] KALIARAJ, Gobi; Dilip SHANMUGAM; Arish DASAN a Kamalan MOSAS. Hydrogels—A Promising Materials for 3D Printing Technology. online. *Gels*, roč. 9 (2023), č. 3, s. 260. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/gels9030260>.
- [4] GOMES, Manuela; Helena AZEVEDO; Patrícia MALAFAYA; Simone SILVA; Joaquim OLIVEIRA et al. Natural Polymers in Tissue Engineering Applications. online. In: Anonym. *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*, s. 385–425. Elsevier, 2013. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2834-3.00016-1>.
- [5] SAJJADI, Madeh; Ramin JAMALI; Tahereh KIYANI; Zahra MOHAMADNIA a Ali-Reza MORADI. Characterization of Schiff base self-healing hydrogels by dynamic speckle pattern analysis. online. *Scientific Reports*, roč. 14 (2024), č. 1, s. 27950. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-79499-5>.
- [6] MUSILOVÁ, Lenka; Eva ACHBERGEROVÁ; Lenka VÍTKOVÁ; Roman KOLAŘÍK; Martina MARTÍNKOVÁ et al. Cross-Linked Gelatine by Modified Dextran as a Potential Bioink Prepared by a Simple and Non-Toxic Process. online. *Polymers*, roč. 14 (2022), č. 3, s. 391. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym14030391>.
- [7] ZHANG, Xiaolin; Lanlan WANG; Lin WENG a Bingyao DENG. Strontium ion substituted alginate-based hydrogel fibers and its coordination binding model. online. *Journal of Applied Polymer Science*, roč. 137 (2020), č. 16, s. 48571. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/app.48571>.
- [8] JING, Huan; Yun WU; Yuntao LIN; Tingting LUO; Hongsheng LIU et al. A Zn²⁺ cross-linked sodium alginate/epigallocatechin gallate hydrogel scaffold for promoting skull repair. online. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, roč. 239 (2024), s. 113971. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2024.113971>.
- [9] HASSAN, Refat M. Prospective and comparative Novel technique for evaluation the affinity of alginate for binding the alkaline-earth metal ions during formation the coordination biopolymer hydrogel complexes. online. *International Journal of Biological Macromolecules*, roč. 165 (2020), s. 1022–1028. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.155>.

- [10] KOPECKÁ, Kateřina; Lenka VÍTKOVÁ; Zuzana KRONEKOVÁ; Lenka MUSILOVÁ; Petr SMOLKA et al. Synthesis and Exfoliation of Calcium Organophosphonates for Tailoring Rheological Properties of Sodium Alginate Solutions: A Path toward Polysaccharide-Based Bioink. online. *Biomacromolecules*, roč. 24 (2023), č. 7, s. 3016–3031. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.3c00081>.
- [11] VÍTKOVÁ, Lenka; Lenka MUSILOVÁ; Eva ACHBERGEROVÁ; Roman KOLAŘÍK; Miroslav MRLÍK et al. Formulation of Magneto-Responsive Hydrogels from Dually Cross-Linked Polysaccharides: Synthesis, Tuning and Evaluation of Rheological Properties. online. *International Journal of Molecular Sciences*, roč. 23 (2022), č. 17, s. 9633. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms23179633>.
- [12] VASHIST, Arti; Ajeet KAUSHIK; Anujit GHOSAL; Jyoti BALA; Roozbeh NIKKHAH-MOSHAIE et al. Nanocomposite Hydrogels: Advances in Nanofillers Used for Nanomedicine. online. *Gels*, roč. 4 (2018), č. 3, s. 75. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/gels4030075>.
- [13] ALVES, Patrícia; Ana Filipa SIMÃO; Mariana F. P. GRAÇA; Marcos J. MARIZ; Ilídio J. CORREIA et al. Dextran-Based Injectable Hydrogel Composites for Bone Regeneration. online. *Polymers*, roč. 15 (2023), č. 23, s. 4501. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym15234501>.
- [14] LEE, Sang Jin; Han-Jun KIM; Eun Ji CHOI; Hyosung KIM; Donghyun LEE et al. Immediately injectable modified gelatin and hyaluronic acid-based hydrogel encapsulating nano-hydroxyapatite and human adipose-derived MSCs for use as a bone filler in situ therapy. online. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, roč. 8 (2024), s. 100625. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2024.100625>.
- [15] AHMADI SOUFIVAND, Anahita; Jessica FABER; Jan HINRICHSEN a Silvia BUDDAY. Multilayer 3D bioprinting and complex mechanical properties of alginate-gelatin mesostructures. online. *Scientific Reports*, roč. 13 (2023), č. 1, s. 11253. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38323-2>.
- [16] YANG, Xingchen; Zhenhui LU; Huayu WU; Wei LI; Li ZHENG et al. Collagen-alginate as bioink for three-dimensional (3D) cell printing based cartilage tissue engineering. online. *Materials Science and Engineering: C*, roč. 83 (2018), s. 195–201. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.09.002>.
- [17] THOMAS, Sabu; Ajitha AR; Cintil JOSE CHIRAYIL a Bejoy THOMAS (ed.). *Handbook of Biopolymers*. online. Singapore: Springer Nature Singapore, 2023. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/978-981-19-0710-4>.
- [18] LEHNINGER, Albert L.; David L. NELSON a Michael M. COX. *Lehninger principles of biochemistry*. 4th ed. New York: W.H. Freeman, 2005. ISBN 978-0-7167-4339-2.
- [19] NIAOUNAKIS, Michael. *Biopolymers: applications and trends*. Amsterdam Paris: Elsevier WA, 2015. ISBN 978-0-323-35399-1.

- [20] GOLD, Victor (ed.). *The IUPAC Compendium of Chemical Terminology: The Gold Book*. online. 4. Research Triangle Park, NC: International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 2019. Dostupné z: <https://doi.org/10.1351/goldbook>.
- [21] GARLOTTA, Donald. A Literature Review of Poly(Lactic Acid). online. *Journal of Polymers and the Environment*, roč. 9 (2001), č. 2, s. 63–84. Dostupné z: <https://doi.org/10.1023/A:1020200822435>.
- [22] TAN, Giin-Yu; Chia-Lung CHEN; Ling LI; Liya GE; Lin WANG et al. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. online. *Polymers*, roč. 6 (2014), č. 3, s. 706–754. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym6030706>.
- [23] ABKA-KHAJOUEL, Roya; Latifa TOUNSI; Nasim SHAHABI; Anil Kumar PATEL; Slim ABDELKAFI et al. Structures, Properties and Applications of Alginates. online. *Marine Drugs*, roč. 20 (2022), č. 6, s. 364. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/md20060364>.
- [24] LIU, Dasong; Mehdi NIKOO; Gökhan BORAN; Peng ZHOU a Joe M. REGENSTEIN. Collagen and Gelatin. online. *Annual Review of Food Science and Technology*, roč. 6 (2015), č. 1, s. 527–557. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-031414-111800>.
- [25] MARTINO, Lucrezia; Luca BASILISSI; Hermes FARINA; Marco Aldo ORTENZI; Elisa ZINI et al. Bio-based polyamide 11: Synthesis, rheology and solid-state properties of star structures. online. *European Polymer Journal*, roč. 59 (2014), s. 69–77. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.07.012>.
- [26] TOKIWA, Yutaka; Buenaventurada P. CALABIA; Charles U. UGWU a Seiichi AIBA. Biodegradability of Plastics. online. *International Journal of Molecular Sciences*, roč. 10 (2009), č. 9, s. 3722–3742. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms10093722>.
- [27] URBANEK, Aneta K.; Waldemar RYMOWICZ; Mateusz C. STRZELECKI; Waldemar KOCIUBA; Łukasz FRANCAK et al. Isolation and characterization of Arctic microorganisms decomposing bioplastics. online. *AMB Express*, roč. 7 (2017), č. 1, s. 148. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0448-4>.
- [28] CHIEN, Hsiao-Lin; Yi-Ting TSAI; Wei-Sung TSENG; Jin-An WU; Shin-Liang KUO et al. Biodegradation of PBSA Films by Elite *Aspergillus* Isolates and Farmland Soil. online. *Polymers*, roč. 14 (2022), č. 7, s. 1320. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym14071320>.
- [29] Algináty. online. In: *Informační centrum bezpečnosti potravin*. Ministerstvo zemědělství. Dostupné z: <https://bezpecnostpotravin.cz/termin/alginy/>.
- [30] REHM, B. H. A. a S. VALLA. Bacterial alginates: biosynthesis and applications. online. *Applied Microbiology and Biotechnology*, roč. 48 (1997), č. 3, s. 281–288. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s002530051051>.

- [31] FERNANDO, Ilekuttige Priyan Shanura; WonWoo LEE; Eui Jeong HAN a Ginnae AHN. Alginate-based nanomaterials: Fabrication techniques, properties, and applications. online. *Chemical Engineering Journal*, roč. 391 (2020), s. 123823. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123823>.
- [32] LEE, Kuen Yong a David J. MOONEY. Alginate: Properties and biomedical applications. online. *Progress in Polymer Science*, roč. 37 (2012), č. 1, s. 106–126. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>.
- [33] HU, Chuhuan; Wei LU; Analucia MATA; Katsuyoshi NISHINARI a Yapeng FANG. Ions-induced gelation of alginate: Mechanisms and applications. online. *International Journal of Biological Macromolecules*, roč. 177 (2021), s. 578–588. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.086>.
- [34] GRANT, Gregor T.; Edwin R. MORRIS; David A. REES; Peter J.C. SMITH a David THOM. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. online. *FEBS Letters*, roč. 32 (1973), č. 1, s. 195–198. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(73\)80770-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(73)80770-7).
- [35] COSTA, Maria J.; Arlete M. MARQUES; Lorenzo M. PASTRANA; José A. TEIXEIRA; Sanna M. SILLANKORVA et al. Physicochemical properties of alginate-based films: Effect of ionic crosslinking and mannuronic and guluronic acid ratio. online. *Food Hydrocolloids*, roč. 81 (2018), s. 442–448. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.014>.
- [36] DALAL, Shima R.; Mervat H. HUSSEIN; Noura El-Ahmady EL-NAGGAR; Sahar I. MOSTAFA a Sami A. SHAABAN-DESSUUKI. Characterization of alginate extracted from *Sargassum latifolium* and its use in *Chlorella vulgaris* growth promotion and riboflavin drug delivery. online. *Scientific Reports*, roč. 11 (2021), č. 1, s. 16741. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96202-0>.
- [37] SAVIĆ GAJIĆ, Ivana M.; Ivan M. SAVIĆ; Aleksandra M. IVANOVSKA; Jovana D. VUNDUK; Ivana S. MIHALJ et al. Improvement of Alginate Extraction from Brown Seaweed (*Laminaria digitata* L.) and Valorization of Its Remaining Ethanolic Fraction. online. *Marine Drugs*, roč. 22 (2024), č. 6, s. 280. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/md22060280>.
- [38] BOJORGES, Hylenne; Amparo LÓPEZ-RUBIO; Antonio MARTÍNEZ-ABAD a María José FABRA. Overview of alginate extraction processes: Impact on alginate molecular structure and techno-functional properties. online. *Trends in Food Science & Technology*, roč. 140 (2023), s. 104142. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.104142>.
- [39] DAVIS, Thomas A.; Francisco LLANES; Bohumil VOLESKY a Alfonso MUCCI. Metal Selectivity of *Sargassum* spp. and Their Alginates in Relation to Their α -L-Guluronic Acid Content and Conformation. online. *Environmental Science & Technology*, roč. 37 (2003), č. 2, s. 261–267. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/es025781d>.

- [40] JAIN, Sumita a Dennis E. OHMAN. Role of an Alginate Lyase for Alginate Transport in Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. online. *Infection and Immunity*, roč. 73 (2005), č. 10, s. 6429–6436. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/IAI.73.10.6429-6436.2005>.
- [41] NÚÑEZ, Cinthia; Liliana LÓPEZ-PLIEGO; Carlos Leonel AHUMADA-MANUEL a Miguel CASTAÑEDA. Genetic Regulation of Alginate Production in *Azotobacter vinelandii* a Bacterium of Biotechnological Interest: A Mini-Review. online. *Frontiers in Microbiology*, roč. 13 (2022), s. 845473. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.845473>.
- [42] RAHMAN, Md. Mostafizur; Md. Abdus SHAHID; Md. Tanvir HOSSAIN; Md. Sohan SHEIKH; Md. Sunjidur RAHMAN et al. Sources, extractions, and applications of alginate: a review. online. *Discover Applied Sciences*, roč. 6 (2024), č. 8, s. 443. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s42452-024-06151-2>.
- [43] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 ze dne 16. prosince 2008 o potravinářských přídatných látkách. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2008/1333/oj/ces>.
- [44] WU, Haishan; Jian NAN; Liu YANG; Hyun Jin PARK a Jinglei LI. Insulin-loaded liposomes packaged in alginate hydrogels promote the oral bioavailability of insulin. online. *Journal of Controlled Release*, roč. 353 (2023), s. 51–62. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.11.032>.
- [45] TABRIZ, Atabak Ghanizadeh; Miguel A HERMIDA; Nicholas R LESLIE a Wenmiao SHU. Three-dimensional bioprinting of complex cell laden alginate hydrogel structures. online. *Biofabrication*, roč. 7 (2015), č. 4, s. 045012. Dostupné z: <https://doi.org/10.1088/1758-5090/7/4/045012>.
- [46] TEMIREL, Mikail; Sajjad Rahmani DABBAGH a Savas TASOGLU. Shape Fidelity Evaluation of Alginate-Based Hydrogels through Extrusion-Based Bioprinting. online. *Journal of Functional Biomaterials*, roč. 13 (2022), č. 4, s. 225. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/jfb13040225>.
- [47] DÍAZ-MONTES, Elsa. Dextran: Sources, Structures, and Properties. online. *Polysaccharides*, roč. 2 (2021), č. 3, s. 554–565. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polysaccharides2030033>.
- [48] HEINZE, Thomas; Tim LIEBERT; Brigitte HEUBLEIN a Stephanie HORNIG. Functional Polymers Based on Dextran. online. In: KLEMM, Dieter (ed.). *Polysaccharides II*, s. 199–291. Advances in Polymer Science. Springer Berlin Heidelberg, 2006. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/12_100.
- [49] DE BELDER, Anthony N. Dextran. online. In: WILEY-VCH VERLAG GMBH & CO. KGAA (ed.). *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, s. a08_449. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/14356007.a08_449.

- [50] ZAROOUR, Kenza; M^a Goretti LLAMAS; Alicia PRIETO; Patricia RÚAS-MADIEDO; María Teresa DUEÑAS et al. Rheology and bioactivity of high molecular weight dextrans synthesised by lactic acid bacteria. online. *Carbohydrate Polymers*, roč. 174 (2017), s. 646–657. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.113>.
- [51] IOAN, Catalina E.; Thomas ABERLE a Walther BURCHARD. Structure Properties of Dextran. 2. Dilute Solution. online. *Macromolecules*, roč. 33 (2000), č. 15, s. 5730–5739. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ma000282n>.
- [52] MAIA, João; Rui A. CARVALHO; Jorge F.J. COELHO; Pedro N. SIMÕES a M. Helena GIL. Insight on the periodate oxidation of dextran and its structural vicissitudes. online. *Polymer*, roč. 52 (2011), č. 2, s. 258–265. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2010.11.058>.
- [53] ESMAEILNEJAD-MOGHADAM, Behnam; Reza Rezaei MOKARRAM; Mohammad Amin HEJAZI; Mahmoud Sowti KHIABANI a Fatemeh KEIVANINAH. Low molecular weight dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* strains: Optimization of a new culture medium and the rheological assessments. online. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, roč. 18 (2019), s. 100181. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2019.100181>.
- [54] TIRTAATMADJA, Viyada; Dave E. DUNSTAN a David V. BOGER. Rheology of dextran solutions. online. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, roč. 97 (2001), č. 2–3, s. 295–301. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0377-0257\(00\)00226-3](https://doi.org/10.1016/S0377-0257(00)00226-3).
- [55] KIM, Geonhee; Jae-Han BAE; Seongwon CHEON; Dong Hyeon LEE; Da Hye KIM et al. Prebiotic activities of dextran from *Leuconostoc mesenteroides* SPCL742 analyzed in the aspect of the human gut microbial ecosystem. online. *Food & Function*, roč. 13 (2022), č. 3, s. 1256–1267. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D1FO03287A>.
- [56] YILMAZ, Mustafa Tahsin; Hümeýra İSPIRLI; Osman TAYLAN; Anwar L. BILGRAMI a Enes DERTLI. Structural and bioactive characteristics of a dextran produced by *Lactobacillus kunkeei* AK1. online. *International Journal of Biological Macromolecules*, roč. 200 (2022), s. 293–302. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.012>.
- [57] MORISAKI, H.; T. IGARASHI; A. YAMAMOTO a N. GOTO. Analysis of a dextran-binding domain of the dextranase of *Streptococcus mutans*. online. *Letters in Applied Microbiology*, roč. 35 (2002), č. 3, s. 223–227. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01160.x>.
- [58] AL-FARGA, Ammar; Sherif ABED a Noman ANWAR. Production of dextrans and their applications in health and nutrition -Review. online. *European Academic Research*, roč. 4 (2016), č. 4. ISSN 2286-4822. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/342360695_Production_of_dextrans_and_their_applications_in_human_health_and_nutrition-Review.

- [59] CINTI, Giulia. *Method for the production of dextran*. CINTI, Giulia (vynálezce/vynálezci). Přihl.: 2014. EP3105339A1. Dostupné z: <https://patents.google.com/patent/EP3105339A1/en#nplCitations>.
- [60] MIAO, Kathleen a Kevin GUTHMILLER. Dextran. online. In: *National Library of Medicine*. StatPearls Publishing, 2025. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557631/>.
- [61] FILIPAN, Dorotea; Emil DEDIOL; Igor BLIVAJŠ a Morena MILIC. The Effects of Dextran on Postoperative Thrombosis and Hemodilution in Microvascular Head and Neck Reconstruction. online. *Annals of Plastic Surgery*, roč. 85 (2020), č. 1, s. 38–42. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/SAP.0000000000002148>.
- [62] RAMAWAT, Kishan Gopal. *Polysaccharides: bioactivity and biotechnology*. Cham: Springer Reference, 2015. ISBN 978-3-319-16298-0.
- [63] KATINA, Kati; Ndegwa Henry MAINA; Riikka JUVONEN; Laura FLANDER; Liisa JOHANSSON et al. In situ production and analysis of Weissella confusa dextran in wheat sourdough. online. *Food Microbiology*, roč. 26 (2009), č. 7, s. 734–743. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.07.008>.
- [64] MENDE, Susann; Michaela PETER; Karin BARTELS; Tingting DONG; Harald ROHM et al. Concentration dependent effects of dextran on the physical properties of acid milk gels. online. *Carbohydrate Polymers*, roč. 98 (2013), č. 2, s. 1389–1396. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.07.072>.
- [65] AWAD, S.; A.N. HASSAN a K. MUTHUKUMARAPPAN. Application of Exopolysaccharide-Producing Cultures in Reduced-Fat Cheddar Cheese: Texture and Melting Properties. online. *Journal of Dairy Science*, roč. 88 (2005), č. 12, s. 4204–4213. Dostupné z: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73106-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73106-4).
- [66] Glykosaminoglykany. online. In: *Národní zdravotnický informační portál: NZIP*. Praha: Ministerstvo zdravotnictví ČR a Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2025. ISBN 2695-0340. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/4051>.
- [67] TROMBINO, Sonia; Camilla SERVIDIO; Federica CURCIO a Roberta CASSANO. Strategies for Hyaluronic Acid-Based Hydrogel Design in Drug Delivery. online. *Pharmaceutics*, roč. 11 (2019), č. 8, s. 407. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080407>.
- [68] LAPČÍK, Lubomír; Lubomír LAPČÍK; Stefaan DE SMEDT; Joseph DEMEESTER a Peter CHABREČEK. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. online. *Chemical Reviews*, roč. 98 (1998), č. 8, s. 2663–2684. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/cr941199z>.
- [69] FALLACARA, Arianna; Erika BALDINI; Stefano MANFREDINI a Silvia VERTUANI. Hyaluronic Acid in the Third Millennium. online. *Polymers*, roč. 10 (2018), č. 7, s. 701. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym10070701>.
- [70] GARG, Hari G. a Charles A. HALES. *Chemistry and biology of hyaluronan*. 1st ed. Amsterdam Boston: Elsevier, 2004. ISBN 978-0-08-044382-9.

- [71] PANDIT, Ashiq Hussain; Nasreen MAZUMDAR a Sharif AHMAD. Periodate oxidized hyaluronic acid-based hydrogel scaffolds for tissue engineering applications. online. *International Journal of Biological Macromolecules*, roč. 137 (2019), s. 853–869. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.014>.
- [72] DEA, I. C. M.; R. MOORHOUSE; D. A. REES; S. ARNOTT; J. M. GUSS et al. Hyaluronic Acid: A Novel, Double Helical Molecule. online. *Science*, roč. 179 (1973), č. 4073, s. 560–562. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.179.4073.560>.
- [73] INGR, Marek; Eva KUTÁLKOVÁ a Josef HRNČIŘÍK. Hyaluronan random coils in electrolyte solutions—a molecular dynamics study. online. *Carbohydrate Polymers*, roč. 170 (2017), s. 289–295. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.054>.
- [74] EWURUM, Anthony; Abhishek Ashok ALUR; Margaret GLENN; Abigail SCHNEPF a Douglas BORCHMAN. Hyaluronic acid–lipid binding. online. *BMC Chemistry*, roč. 15 (2021), č. 1, s. 36. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13065-021-00763-0>.
- [75] DI MEO, Celeste; Antonietta STELLAVATO; Maria D’AGOSTINO; Antonella D’AGOSTINO; Chiara SCHIRALDI et al. Hyaluronan size and concentration: Effect on key biophysical and biochemical features. online. *International Journal of Biological Macromolecules*, roč. 282 (2024), s. 137125. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.137125>.
- [76] PISÁRČIK, Martin; Dušan BAKOŠ a Michal ČEPPAN. Non-Newtonian properties of hyaluronic acid aqueous solution. online. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, roč. 97 (1995), č. 3, s. 197–202. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0927-7757\(95\)03097-W](https://doi.org/10.1016/0927-7757(95)03097-W).
- [77] TAMMI, Raija; Ulla M. ÅGREN; Anna-Liisa TUHKANEN a Markku TAMMI. Hyaluronan Metabolism in Skin. online. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, roč. 29 (1994), č. 2, s. III–77. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0079-6336\(11\)80023-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6336(11)80023-9).
- [78] AKATSUKA, Masahiro; Yumiko YAMAMOTO; Kenji TOBETTO; Tadashi YASUI a Takao ANDO. Suppressive Effects of Hyaluronic Acid on Elastase Release from Rat Peritoneal Leucocytes. online. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, roč. 45 (1993), č. 2, s. 110–114. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1993.tb03693.x>.
- [79] SELYANIN, Mikhail A.; Petr Ya. BOYKOV; Vladimir N. KHABAROV a Felix POLYAK. *Hyaluronic Acid: Preparation, Properties, Application in Biology and Medicine*. online. 1. Wiley, 2015. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9781118695920>.
- [80] BOERIU, Carmen G.; Jan SPRINGER; Floor K. KOOY; Lambertus A. M. VAN DEN BROEK a Gerrit EGGINK. Production Methods for Hyaluronan. online. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, roč. 2013 (2013), s. 1–14. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2013/624967>.

- [81] ØSTERHOLT, Helene C. D.; Ingrid DANNEVIG; Myra H. WYCKOFF; Jie LIAO; Yucel AKGUL et al. Antioxidant Protects against Increases in Low Molecular Weight Hyaluronan and Inflammation in Asphyxiated Newborn Pigs Resuscitated with 100% Oxygen. online. *PLoS ONE*, roč. 7 (2012), č. 6, s. e38839. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038839>.
- [82] NAKANO, Takuo; Kayo NAKANO a Jeong S. SIM. A Simple Rapid Method To Estimate Hyaluronic Acid Concentrations in Rooster Comb and Wattle Using Cellulose Acetate Electrophoresis. online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, roč. 42 (1994), č. 12, s. 2766–2768. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf00048a022>.
- [83] MATSUMURA, G.; M. DE SALEGUI; A. HERP a Ward PIGMAN. The preparation of hyaluronic acid from bovine synovial fluid. online. *Biochimica et Biophysica Acta*, roč. 69 (1963), s. 574–576. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(63\)91314-3](https://doi.org/10.1016/0006-3002(63)91314-3).
- [84] MURADO, M.A.; M.I. MONTEMAYOR; M.L. CABO; J.A. VÁZQUEZ a M.P. GONZÁLEZ. Optimization of extraction and purification process of hyaluronic acid from fish eyeball. online. *Food and Bioprocess Processing*, roč. 90 (2012), č. 3, s. 491–498. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.11.002>.
- [85] ZHANG, Yongjie; Jinjun DONG; Guochao XU; Ruizhi HAN; Jieyu ZHOU et al. Efficient production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* using two-stage semi-continuous fermentation. online. *Bioresource Technology*, roč. 377 (2023), s. 128896. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128896>.
- [86] WAYAN TEGUH WIBAWAN, I.; F.H. PASARIBU; I.H. UTAMA; A. ABDULMAWJOOD a C. LÄMMLER. The role of hyaluronic acid capsular material of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* in mediating adherence to HeLa cells and in resisting phagocytosis. online. *Research in Veterinary Science*, roč. 67 (1999), č. 2, s. 131–135. Dostupné z: <https://doi.org/10.1053/rvsc.1998.0287>.
- [87] HURST, Jacklyn R.; Blake A. SHANNON; Heather C. CRAIG; Aanchal RISHI; Stephen W. TUFFS et al. The *Streptococcus pyogenes* hyaluronic acid capsule promotes experimental nasal and skin infection by preventing neutrophil-mediated clearance. online. *PLOS Pathogens*, roč. 18 (2022), č. 11, s. e1011013. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011013>.
- [88] SERRA, Mónica; Ana CASAS; Duarte TOUBARRO; Ana Novo BARROS a José António TEIXEIRA. Microbial Hyaluronic Acid Production: A Review. online. *Molecules*, roč. 28 (2023), č. 5, s. 2084. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules28052084>.
- [89] *Farmaceutická kyselina hyaluronová*. Dostupné z: Contipro a.s., <https://www.contipro.cz/portfolio/farmaceuticka-kyselina-hyaluronova>.

- [90] RODRIGUEZ-MARQUEZ, Carlos Dariel; Susana ARTEAGA-MARIN; Andrea RIVAS-SÁNCHEZ; Renata AUTRIQUE-HERNÁNDEZ a Roberto CASTRO-MUÑOZ. A Review on Current Strategies for Extraction and Purification of Hyaluronic Acid. online. *International Journal of Molecular Sciences*, roč. 23 (2022), č. 11, s. 6038. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms23116038>.
- [91] NEUMAYER, Thomas; Ana PRINZ a Oliver FINDL. Effect of a new cohesive ophthalmic viscosurgical device on corneal protection and intraocular pressure in small-incision cataract surgery. online. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, roč. 34 (2008), č. 8, s. 1362–1366. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2008.04.018>.
- [92] JOHNSON, Michael E.; Paul J. MURPHY a Mike BOULTON. Effectiveness of sodium hyaluronate eyedrops in the treatment of dry eye. online. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, roč. 244 (2006), č. 1, s. 109–112. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00417-005-0028-1>.
- [93] LAFFLEUR, Flavia a Sabrina DACHS. Development of Novel Mucoadhesive Hyaluronic Acid Derivate As Lubricant for the Treatment of Dry Eye Syndrome. online. *Therapeutic Delivery*, roč. 6 (2015), č. 10, s. 1211–1219. Dostupné z: <https://doi.org/10.4155/tde.15.55>.
- [94] SUN, Shu-Fen; Chien-Wei HSU; Huey-Shyan LIN; I-Hsiu LIOU; Yin-Han CHEN et al. Comparison of Single Intra-Articular Injection of Novel Hyaluronan (HYA-JOINT Plus) with Synvisc-One for Knee Osteoarthritis: A Randomized, Controlled, Double-Blind Trial of Efficacy and Safety. online. *Journal of Bone and Joint Surgery*, roč. 99 (2017), č. 6, s. 462–471. Dostupné z: <https://doi.org/10.2106/JBJS.16.00469>.
- [95] GHOSH, Peter a Diego GUIDOLIN. Potential mechanism of action of intra-articular hyaluronan therapy in osteoarthritis: Are the effects molecular weight dependent? online. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, roč. 32 (2002), č. 1, s. 10–37. Dostupné z: <https://doi.org/10.1053/sarh.2002.33720>.
- [96] AYA, Kessiena L. a Robert STERN. Hyaluronan in wound healing: Rediscovering a major player. online. *Wound Repair and Regeneration*, roč. 22 (2014), č. 5, s. 579–593. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/wrr.12214>.
- [97] MANGANO, Katia; Franca VERGALITO; Santa MAMMANA; Andrea MARIANO; Rocco DE PASQUALE et al. Evaluation of hyaluronic acid-P40 conjugated cream in a mouse model of dermatitis induced by oxazolone. online. *Experimental and Therapeutic Medicine*, roč. 14 (2017), č. 3, s. 2439–2444. Dostupné z: <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4810>.
- [98] OUYANG, Liliang; Christopher B. HIGHLEY; Christopher B. RODELL; Wei SUN a Jason A. BURDICK. 3D Printing of Shear-Thinning Hyaluronic Acid Hydrogels with Secondary Cross-Linking. online. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, roč. 2 (2016), č. 10, s. 1743–1751. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00158>.

- [99] JANIŠ, Rahula; Vladimír PATA; Pavlína EGNER; Jana PAVLAČKOVÁ; Andrea ZAPLETALOVÁ et al. Comparison of metrological techniques for evaluation of the impact of a cosmetic product containing hyaluronic acid on the properties of skin surface. online. *Biointerphases*, roč. 12 (2017), č. 2, s. 021006. Dostupné z: <https://doi.org/10.1116/1.4985696>.
- [100] KAWADA, Chinatsu; Takushi YOSHIDA; Hideto YOSHIDA; Wakako SAKAMOTO; Wataru ODANAKA et al. Ingestion of hyaluronans (molecular weights 800 k and 300 k) improves dry skin conditions: a randomized, double blind, controlled study. online. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, roč. 56 (2015), č. 1, s. 66–73. Dostupné z: <https://doi.org/10.3164/jcbtn.14-81>.
- [101] NOBILE, Vincenzo; Daniela BUONOCORE; Angela MICHELOTTI a Fulvio MARZATICO. Anti-aging and filling efficacy of six types hyaluronic acid based dermo-cosmetic treatment: double blind, randomized clinical trial of efficacy and safety. online. *Journal of Cosmetic Dermatology*, roč. 13 (2014), č. 4, s. 277–287. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jocd.12120>.
- [102] BRAVO, Bruna; Priscila CORREIA; José Euzébio GONÇALVES JUNIOR; Beatriz SANT'ANNA a Delphine KEROB. Benefits of topical hyaluronic acid for skin quality and signs of skin aging: From literature review to clinical evidence. online. *Dermatologic Therapy*, roč. 35 (2022), č. 12. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/dth.15903>.
- [103] CZUMBEL, László Márk; Sándor FARKASDI; Noémi GEDE; Alexandra MIKÓ; Dezső CSUPOR et al. Hyaluronic Acid Is an Effective Dermal Filler for Lip Augmentation: A Meta-Analysis. online. *Frontiers in Surgery*, roč. 8 (2021), s. 681028. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fsurg.2021.681028>.
- [104] JUNCAN, Anca Maria; Dana Georgiana MOISĂ; Antonello SANTINI; Claudiu MORGOVAN; Luca-Liviu RUS et al. Advantages of Hyaluronic Acid and Its Combination with Other Bioactive Ingredients in Cosmeceuticals. online. *Molecules*, roč. 26 (2021), č. 15, s. 4429. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules26154429>.
- [105] WARD, A.G. The Chemical Structure and Physical Properties of Gelatin. online. *The Journal of Photographic Science*, roč. 3 (1955), č. 2, s. 60–67. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/13682199.1955.11736512>.
- [106] SCHRIEBER, Reinhard a Herbert GAREIS. *Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice*. online. 1. Wiley, 2007. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9783527610969>.
- [107] GELSE, K. Collagens—structure, function, and biosynthesis. online. *Advanced Drug Delivery Reviews*, roč. 55 (2003), č. 12, s. 1531–1546. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.002>.
- [108] PIGNATELLO, Rosario (ed.). *Biomaterials: Applications for Nanomedicine*. Erscheinungsort nicht ermittelbar: IntechOpen, 2011. ISBN 978-953-307-661-4.

- [109] DJABOUROV, Madeleine; Jacques LEBLOND a Pierre PAPON. Gelation of aqueous gelatin solutions. I. Structural investigation. online. *Journal de Physique*, roč. 49 (1988), č. 2, s. 319–332. Dostupné z: <https://doi.org/10.1051/jphys:01988004902031900>.
- [110] MILANO, Francesca; Annalia MASI; Marta MADAGHIELE; Alessandro SANNINO; Luca SALVATORE et al. Current Trends in Gelatin-Based Drug Delivery Systems. online. *Pharmaceutics*, roč. 15 (2023), č. 5, s. 1499. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051499>.
- [111] ALIPAL, J.; N.A.S. MOHD PU'AD; T.C. LEE; N.H.M NAYAN; N. SAHARI et al. A review of gelatin: Properties, sources, process, applications, and commercialisation. online. *Materials Today: Proceedings*, roč. 42 (2021), s. 240–250. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.922>.
- [112] MIHAI, Sebastian. Industrial Gelatin Manufacture- Theory and Practice. online. 2014. Dostupné z: https://www.academia.edu/8410348/Industrial_Gelatin_Manufacture_Theory_and_Practice.
- [113] MILANO, Francesca; Annalia MASI; Marta MADAGHIELE; Alessandro SANNINO; Luca SALVATORE et al. Current Trends in Gelatin-Based Drug Delivery Systems. online. *Pharmaceutics*, roč. 15 (2023), č. 5, s. 1499. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051499>.
- [114] WANG, Fen; Yuanyuan LI; Yingqiang SHEN; Anming WANG; Shuling WANG et al. The Functions and Applications of RGD in Tumor Therapy and Tissue Engineering. online. *International Journal of Molecular Sciences*, roč. 14 (2013), č. 7, s. 13447–13462. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms140713447>.
- [115] ZHANG, Ting; Jiamin XU; Yangyi ZHANG; Xichang WANG; José M. LORENZO et al. Gelatins as emulsifiers for oil-in-water emulsions: Extraction, chemical composition, molecular structure, and molecular modification. online. *Trends in Food Science & Technology*, roč. 106 (2020), s. 113–131. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.10.005>.
- [116] LIMA, Álvaro M.; Miguel A. CERQUEIRA; Bartolomeu W.S. SOUZA; Ed Carlos M. SANTOS; José A. TEIXEIRA et al. New edible coatings composed of galactomannans and collagen blends to improve the postharvest quality of fruits – Influence on fruits gas transfer rate. online. *Journal of Food Engineering*, roč. 97 (2010), č. 1, s. 101–109. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.09.021>.
- [117] MUTLU, Ceren; Sultan Arslan TONTUL a Mustafa ERBAŞ. Production of a minimally processed jelly candy for children using honey instead of sugar. online. *LWT*, roč. 93 (2018), s. 499–505. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.064>.

- [118] NURILMALA, Mala; Sendy Chrisman ADINUGRAHA; Agoes Mardiono JACOB; Susi SUSILAWATI a Yoshihiro OCHIAI. Evaluation of the properties of tuna skin gelatin as a hard capsule material. online. *Fisheries Science*, roč. 86 (2020), č. 5, s. 917–924. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12562-020-01457-7>.
- [119] AL-NIMRY, Suhair; Alaa Abu DAYAH; Inas HASAN a Rawand DAGHMASH. Cosmetic, Biomedical and Pharmaceutical Applications of Fish Gelatin/Hydrolysates. online. *Marine Drugs*, roč. 19 (2021), č. 3, s. 145. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/md19030145>.
- [120] DE CLERCQ, Kaat; Feifan XIE; Olivier DE WEVER; Benedicte DESCAMPS; Anne HOORENS et al. Preclinical evaluation of local prolonged release of paclitaxel from gelatin microspheres for the prevention of recurrence of peritoneal carcinomatosis in advanced ovarian cancer. online. *Scientific Reports*, roč. 9 (2019), č. 1, s. 14881. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51419-y>.
- [121] NARAYANAN, Dhanya; Geena M.G.; Lakshmi H.; Manzoor KOYAKUTTY; Shantikumar NAIR et al. Poly-(ethylene glycol) modified gelatin nanoparticles for sustained delivery of the anti-inflammatory drug Ibuprofen-Sodium: An in vitro and in vivo analysis. online. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, roč. 9 (2013), č. 6, s. 818–828. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.02.001>.
- [122] Gelatin. online. In: *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients (INCI)*. Dostupné z: <https://incibeauty.com/en/ingredients/10814-gelatin>.
- [123] WANG, Lin; Xiaoxiao WANG; Fan BAI; Yong FANG; Jinlin WANG et al. The anti-skin-aging effect of oral administration of gelatin from the swim bladder of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). online. *Food & Function*, roč. 10 (2019), č. 7, s. 3890–3897. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C9FO00661C>.
- [124] ČIŽAUSKAITĖ, Ugnė; Greta JAKUBAITYTĖ; Virgilijus ŽITKEVIČIUS a Giedrė KASPARAVIČIENĖ. Natural Ingredients-Based Gummy Bear Composition Designed According to Texture Analysis and Sensory Evaluation In Vivo. online. *Molecules*, roč. 24 (2019), č. 7, s. 1442. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules24071442>.
- [125] TAN, Johanna M. a Miang H. LIM. Effects of gelatine type and concentration on the shelf-life stability and quality of marshmallows. online. *International Journal of Food Science & Technology*, roč. 43 (2008), č. 9, s. 1699–1704. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01756.x>.
- [126] MUDGIL, Priti; Balsam JUMAH; Mudasir AHMAD; Fathalla HAMED a Sajid MAQSOOD. Rheological, micro-structural and sensorial properties of camel milk yogurt as influenced by gelatin. online. *LWT*, roč. 98 (2018), s. 646–653. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.008>.
- [127] HO, Tzu-Chuan; Chin-Chuan CHANG; Hung-Pin CHAN; Tze-Wen CHUNG; Chih-Wen SHU et al. Hydrogels: Properties and Applications in Biomedicine. online. *Molecules*, roč. 27 (2022), č. 9, s. 2902. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules27092902>.

- [128] EL-SHERBINY, Ibrahim M. a Magdi H. YACOUB. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. online. *Global Cardiology Science and Practice*, roč. 2013 (2013), č. 3, s. 38. Dostupné z: <https://doi.org/10.5339/gcsp.2013.38>.
- [129] HÖLZL, Katja; Shengmao LIN; Liesbeth TYTGAT; Sandra VAN VLIERBERGHE; Linxia GU et al. Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. online. *Biofabrication*, roč. 8 (2016), č. 3, s. 032002. Dostupné z: <https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/3/032002>.
- [130] SZALEWICZ, Krzysztof. Hydrogen Bond. online. In: Anonym. *Encyclopedia of Physical Science and Technology*, s. 505–538. Elsevier, 2003. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B0-12-227410-5/00322-7>.
- [131] DJABOUROV, Madeleine; Katsuyoshi NISHINARI a Simon B. ROSS-MURPHY. *Physical Gels from Biological and Synthetic Polymers*. online. 1. Cambridge University Press, 2013. Dostupné z: <https://doi.org/10.1017/CBO9781139024136>.
- [132] BIGI, A; G COJAZZI; S PANZAVOLTA; K RUBINI a N ROVERI. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. online. *Biomaterials*, roč. 22 (2001), č. 8, s. 763–768. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00236-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00236-2).
- [133] OBAS, Frantz-Lairy; Leonard C. THOMAS; Maxwell W. TERBAN a Shelly J. SCHMIDT. Characterization of the thermal behavior and structural properties of a commercial high-solids confectionary gel made with gelatin. online. *Food Hydrocolloids*, roč. 148 (2024), s. 109432. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109432>.
- [134] MAKAROVA, Anastasiya O.; Svetlana R. DERKACH; Tahar KHAIR; Mariia A. KAZANTSEVA; Yuriy F. ZUEV et al. Ion-Induced Polysaccharide Gelation: Peculiarities of Alginate Egg-Box Association with Different Divalent Cations. online. *Polymers*, roč. 15 (2023), č. 5, s. 1243. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym15051243>.
- [135] MALEKTAJ, Haniyeh; Aleksey D. DROZDOV a Jesper DECLAVILLE CHRISTIANSEN. Mechanical Properties of Alginate Hydrogels Cross-Linked with Multivalent Cations. online. *Polymers*, roč. 15 (2023), č. 14, s. 3012. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym15143012>.
- [136] FERNANDO, Ilekkutige Priyan Shanura; WonWoo LEE; Eui Jeong HAN a Ginnah AHN. Alginate-based nanomaterials: Fabrication techniques, properties, and applications. online. *Chemical Engineering Journal*, roč. 391 (2020), s. 123823. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123823>.
- [137] HU, Tingyu a Amy C. Y. LO. Collagen–Alginate Composite Hydrogel: Application in Tissue Engineering and Biomedical Sciences. online. *Polymers*, roč. 13 (2021), č. 11, s. 1852. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym13111852>.

- [138] DONATI, Ivan; Synnøve HOLTAN; Yrr A. MØRCH; Massimiliano BORGOGNA; Mariella DENTINI et al. New Hypothesis on the Role of Alternating Sequences in Calcium–Alginate Gels. online. *Biomacromolecules*, roč. 6 (2005), č. 2, s. 1031–1040. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/bm049306e>.
- [139] MØRCH, Yrr A.; Ivan DONATI; Berit L. STRAND a Gudmund SKJÅK-BRÆK. Effect of Ca^{2+} , Ba^{2+} , and Sr^{2+} on Alginate Microbeads. online. *Biomacromolecules*, roč. 7 (2006), č. 5, s. 1471–1480. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/bm060010d>.
- [140] KOVRLIJA, Ilijana; Janis LOCS a Dagnija LOCA. Incorporation of Barium Ions into Biomaterials: Dangerous Liaison or Potential Revolution? online. *Materials*, roč. 14 (2021), č. 19, s. 5772. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ma14195772>.
- [141] GIAMMANCO, Giuseppe E.; Bitá CARRION; Rhima M. COLEMAN a Alexis D. OSTROWSKI. Photoresponsive Polysaccharide-Based Hydrogels with Tunable Mechanical Properties for Cartilage Tissue Engineering. online. *ACS Applied Materials & Interfaces*, roč. 8 (2016), č. 23, s. 14423–14429. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsami.6b03834>.
- [142] MASSANA ROQUERO, Daniel; Ali OTHMAN; Artem MELMAN a Evgeny KATZ. Iron(III)-cross-linked alginate hydrogels: a critical review. online. *Materials Advances*, roč. 3 (2022), č. 4, s. 1849–1873. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D1MA00959A>.
- [143] MAIRE DU POSET, Aline; Adrien LERBRET; François BOUÉ; Andrea ZITOLO; Ali ASSIFAOUİ et al. Tuning the Structure of Galacturonate Hydrogels: External Gelation by Ca, Zn, or Fe Cationic Cross-Linkers. online. *Biomacromolecules*, roč. 20 (2019), č. 7, s. 2864–2872. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00726>.
- [144] FURTH, Guido; Robert KNIERIM; Volker BUSS a Christian MAYER. Binding of bivalent cations by hyaluronate in aqueous solution. online. *International Journal of Biological Macromolecules*, roč. 42 (2008), č. 1, s. 33–40. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.09.001>.
- [145] SCHMUT, O. a H. HOFMANN. Preparation of gels from hyaluronate solutions. online. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, roč. 218 (1982), č. 6, s. 311–314. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF02150446>.
- [146] PRAKASH, Gayatri; Aaron CLASKY; Kunal GADANI; Mohammad NAZERI a Frank GU. Ion-mediated crosslinking of hyaluronic acid into hydrogels without chemical modification. online. *Chemistry*. 2024-08-19. Dostupné z: <https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2024-rjwq5>.
- [147] XU, Changlu; Chengli HUNG; Yue CAO a Huinan H. LIU. Tunable Crosslinking, Reversible Phase Transition, and 3D Printing of Hyaluronic Acid Hydrogels via Dynamic Coordination of Innate Carboxyl Groups and Metallic Ions. online. *ACS Applied Bio Materials*, roč. 4 (2021), č. 3, s. 2408–2428. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01300>.

- [148] SAHINER, Nurettin; Evrim UMUT; Selin S. SUNER; Mehtap SAHINER; Mustafa CULHA et al. Hyaluronic acid (HA)-Gd(III) and HA-Fe(III) microgels as MRI contrast enhancing agents. online. *Carbohydrate Polymers*, roč. 277 (2022), s. 118873. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118873>.
- [149] MUGNAINI, Giulia; Rita GELLI; Leonardo MORI a Massimo BONINI. How to Cross-Link Gelatin: The Effect of Glutaraldehyde and Glyceraldehyde on the Hydrogel Properties. online. *ACS Applied Polymer Materials*, roč. 5 (2023), č. 11, s. 9192–9202. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsapm.3c01676>.
- [150] POLDERVAART, Michelle T.; Birgit GOVERSEN; Mylene DE RUIJTER; Anna ABBADESSA; Ferry P. W. MELCHELS et al. 3D bioprinting of methacrylated hyaluronic acid (MeHA) hydrogel with intrinsic osteogenicity. online. *PLOS ONE*, roč. 12 (2017), č. 6, s. e0177628. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177628>.
- [151] ROWAN, Stuart J.; Stuart J. CANTRILL; Graham R. L. COUSINS; Jeremy K. M. SANDERS a J. Fraser STODDART. Dynamic Covalent Chemistry. online. *Angewandte Chemie International Edition*, roč. 41 (2002), č. 6, s. 898–952. Dostupné z: [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020315\)41:6<898::AID-ANIE898>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020315)41:6<898::AID-ANIE898>3.0.CO;2-E).
- [152] ZHANG, Zhen; Chaoliang HE a Xuesi CHEN. Hydrogels based on pH-responsive reversible carbon–nitrogen double-bond linkages for biomedical applications. online. *Materials Chemistry Frontiers*, roč. 2 (2018), č. 10, s. 1765–1778. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C8QM00317C>.
- [153] SCHACHT, E.; M. NOBELS; S. VANSTEENKISTE; J. DEMEESTER; J. FRANSSEN et al. Some aspects of the crosslinking of gelatin by dextran dialdehydes. online. *Polymer Gels and Networks*, roč. 1 (1993), č. 4, s. 213–224. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0966-7822\(93\)90001-X](https://doi.org/10.1016/0966-7822(93)90001-X).
- [154] LI, Shangzhi; Minjie PEI; Tingting WAN; Hongjun YANG; Shaojin GU et al. Self-healing hyaluronic acid hydrogels based on dynamic Schiff base linkages as biomaterials. online. *Carbohydrate Polymers*, roč. 250 (2020), s. 116922. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116922>.
- [155] BEHROOZI KOHLAN, Taha; Yanru WEN; Carina MINI a Anna FINNE-WISTRAND. Schiff base crosslinked hyaluronic acid hydrogels with tunable and cell instructive time-dependent mechanical properties. online. *Carbohydrate Polymers*, roč. 338 (2024), s. 122173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122173>.
- [156] CHEN, Qiang; Dandan WEI; Hong CHEN; Lin ZHU; Caicai JIAO et al. Simultaneous Enhancement of Stiffness and Toughness in Hybrid Double-Network Hydrogels via the First, Physically Linked Network. online. *Macromolecules*, roč. 48 (2015), č. 21, s. 8003–8010. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.5b01938>.

- [157] HAN, Chenggang; Hua ZHANG; Yidong WU; Xiuchao HE a Xianwu CHEN. Dual-crosslinked hyaluronan hydrogels with rapid gelation and high injectability for stem cell protection. online. *Scientific Reports*, roč. 10 (2020), č. 1, s. 14997. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71462-4>.
- [158] ZHANG, Wanping; Simin CHEN; Wen JIANG; Qianjie ZHANG; Ningning LIU et al. Double-network hydrogels for biomaterials: Structure-property relationships and drug delivery. online. *European Polymer Journal*, roč. 185 (2023), s. 111807. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111807>.
- [159] EL SAYED, Marwa M. Production of Polymer Hydrogel Composites and Their Applications. online. *Journal of Polymers and the Environment*, roč. 31 (2023), č. 7, s. 2855–2879. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10924-023-02796-z>.
- [160] *Nanotechnology — Nanoparticles in powder form — Characteristics and measurements* online. International Standardization Organization (ISO). 2020. Dostupné z: <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/115635ee-6544-4b54-82b4-f7ac865faafb/iso-17200-2020>.
- [161] JOUDEH, Nadeem a Dirk LINKE. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. online. *Journal of Nanobiotechnology*, roč. 20 (2022), č. 1, s. 262. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8>.
- [162] BARRETT-CATTON, Emma; Murial L. ROSS a Prashanth ASURI. Multifunctional Hydrogel Nanocomposites for Biomedical Applications. online. *Polymers*, roč. 13 (2021), č. 6, s. 856. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym13060856>.
- [163] BRANDES, Ricardo; Leticia DE SOUZA; Vanessa VARGAS; Eliana OLIVEIRA; Alexandre MIKOWSKI et al. Preparation and Characterization of Bacterial Cellulose/TiO₂ Hydrogel Nanocomposite. online. *Journal of Nano Research*, roč. 43 (2016), s. 73–80. Dostupné z: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/JNanoR.43.73>.
- [164] CHEN, Xiuqiong; Lili SUN; Hongcai WANG; Shanshan CAO; Ting SHANG et al. Nano-SiO₂ reinforced alginate-chitosan-gelatin nanocomposite hydrogels with improved physicochemical properties and biological activity. online. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, roč. 228 (2023), s. 113413. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113413>.
- [165] TIPA, Cezar; Maria T. CIDADE; João P. BORGES; Luis C. COSTA; Jorge C. SILVA et al. Clay-Based Nanocomposite Hydrogels for Biomedical Applications: A Review. online. *Nanomaterials*, roč. 12 (2022), č. 19, s. 3308. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nano12193308>.
- [166] XAVIER, Janet R.; Teena THAKUR; Prachi DESAI; Manish K. JAISWAL; Nick SEARS et al. Bioactive Nanoengineered Hydrogels for Bone Tissue Engineering: A Growth-Factor-Free Approach. online. *ACS Nano*, roč. 9 (2015), č. 3, s. 3109–3118. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/nn507488s>.

- [167] MODY, VickyV; Rodney SIWALE; Ajay SINGH a HardikR MODY. Introduction to metallic nanoparticles. online. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, roč. 2 (2010), č. 4, s. 282. Dostupné z: <https://doi.org/10.4103/0975-7406.72127>.
- [168] MA, Yu-Qian; Ju-Zhen YI a Li-Ming ZHANG. A Facile Approach to Incorporate Silver Nanoparticles into Dextran-Based Hydrogels for Antibacterial and Catalytical Application. online. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, roč. 46 (2009), č. 6, s. 643–648. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10601320902852031>.
- [169] ABD EL-MOHDY, H. L. Radiation synthesis of nanosilver/poly vinyl alcohol/cellulose acetate/gelatin hydrogels for wound dressing. online. *Journal of Polymer Research*, roč. 20 (2013), č. 6, s. 177. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10965-013-0177-6>.
- [170] MAITI, Debabrata; Xiangmin TONG; Xiaozhou MOU a Kai YANG. Carbon-Based Nanomaterials for Biomedical Applications: A Recent Study. online. *Frontiers in Pharmacology*, roč. 9 (2019), s. 1401. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01401>.
- [171] JIA, Xu; Yu HAN; Mingliang PEI; Xubo ZHAO; Kun TIAN et al. Multi-functionalized hyaluronic acid nanogels crosslinked with carbon dots as dual receptor-mediated targeting tumor theranostics. online. *Carbohydrate Polymers*, roč. 152 (2016), s. 391–397. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.109>.
- [172] SHI, Xiangning; Yudong ZHENG; Cai WANG; Lina YUE; Kun QIAO et al. Dual stimulus responsive drug release under the interaction of pH value and pulsatile electric field for a bacterial cellulose/sodium alginate/multi-walled carbon nanotube hybrid hydrogel. online. *RSC Advances*, roč. 5 (2015), č. 52, s. 41820–41829. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C5RA04897D>.
- [173] KREČMEROVÁ, Marcela; Pavel MAJER; Rana RAIS a Barbara S. SLUSHER. Phosphonates and Phosphonate Prodrugs in Medicinal Chemistry: Past Successes and Future Prospects. online. *Frontiers in Chemistry*, roč. 10 (2022), s. 889737. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.889737>.
- [174] MONTCHAMP, Jean-Luc (ed.). *Phosphorus Chemistry I: Asymmetric Synthesis and Bioactive Compounds*. online. Topics in Current Chemistry. Cham: Springer International Publishing, 2015. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-15473-2>.
- [175] Phenylphosphonate. online. In: *PubChem*. National Center for Biotechnology Information. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenylphosphonate>.
- [176] MAHMOUDKHANI, Amir H a Vratislav LANGER. Layered calcium phenylphosphonate: Synthesis and properties. online. *Solid State Sciences*, roč. 3 (2001), č. 4, s. 519–525. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1293-2558\(01\)01161-X](https://doi.org/10.1016/S1293-2558(01)01161-X).

- [177] KOPECKÁ, Kateřina; Ludvík BENEŠ; Klára MELÁNOVÁ; Vítězslav ZIMA; Petr KNOTEK et al. Layered calcium phenylphosphonate: a hybrid material for a new generation of nanofillers. online. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, roč. 9 (2018), s. 2906–2915. Dostupné z: <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.269>.
- [178] SVOBODA, Jan; Vítězslav ZIMA; Ludvík BENEŠ; Klára MELÁNOVÁ a Milan VLČEK. Synthesis and Characterization of New Calcium Phenylphosphonates and 4-Carboxyphenylphosphonates. online. *Inorganic Chemistry*, roč. 44 (2005), č. 26, s. 9968–9976. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ic051606x>.
- [179] DÁVILA, José Luis a Marcos Akira D'ÁVILA. Rheological evaluation of Laponite/alginate inks for 3D extrusion-based printing. online. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, roč. 101 (2019), č. 1–4, s. 675–686. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00170-018-2876-y>.
- [180] LV, Xian-Wei; Chen-Chen WENG; Yun-Pei ZHU a Zhong-Yong YUAN. Nanoporous Metal Phosphonate Hybrid Materials as a Novel Platform for Emerging Applications: A Critical Review. online. *Small*, roč. 17 (2021), č. 22, s. 2005304. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/sml.202005304>.
- [181] REDWOOD, Ben; Brian GARRETT a Filemon SCHÖFFER. *The 3D printing handbook: technologies, design and applications*. Amsterdam: 3D Hubs, 2017. ISBN 978-90-827485-0-5.
- [182] CHEN, X.B.; A. FAZEL ANVARI-YAZDI; X. DUAN; A. ZIMMERLING; R. GHARRAEI et al. Biomaterials / bioinks and extrusion bioprinting. online. *Bioactive Materials*, roč. 28 (2023), s. 511–536. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.06.006>.
- [183] MURPHY, Sean V a Anthony ATALA. 3D bioprinting of tissues and organs. online. *Nature Biotechnology*, roč. 32 (2014), č. 8, s. 773–785. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nbt.2958>.
- [184] ROSSI, Arianna; Teresa PESCARA; Alberto Maria GAMBELLI; Francesco GAGGIA; Amish ASTHANA et al. Biomaterials for extrusion-based bioprinting and biomedical applications. online. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, roč. 12 (2024), s. 1393641. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1393641>.
- [185] QIU, Xinbo; Xiliang GONG; Xiaoyu ZHANG a Weitao ZHENG. Ink-Jet Printing towards Ultra-High Resolution: A Review. online. *Coatings*, roč. 12 (2022), č. 12, s. 1893. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/coatings12121893>.
- [186] CUI, Xiaofeng; Guifang GAO a Yongjun QIU. Accelerated myotube formation using bioprinting technology for biosensor applications. online. *Biotechnology Letters*, roč. 35 (2013), č. 3, s. 315–321. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10529-012-1087-0>.
- [187] GANTUMUR, Enkhtuul; Miyu KIMURA; Masahito TAYA; Masanobu HORIE; Makoto NAKAMURA et al. Inkjet micropatterning through horseradish peroxidase-mediated hydrogelation for controlled cell immobilization and microtissue fabrication. online. *Biofabrication*, roč. 12 (2019), č. 1, s. 011001. Dostupné z: <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab3b3c>.

- [188] CUI, Xiaofeng; Delphine DEAN; Zaverio M. RUGGERI a Thomas BOLAND. Cell damage evaluation of thermal inkjet printed Chinese hamster ovary cells. online. *Biotechnology and Bioengineering*, roč. 106 (2010), č. 6, s. 963–969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bit.22762>.
- [189] MANDRYCKY, Christian; Zongjie WANG; Keekyoung KIM a Deok-Ho KIM. 3D bioprinting for engineering complex tissues. online. *Biotechnology Advances*, roč. 34 (2016), č. 4, s. 422–434. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.011>.
- [190] CUI, Xiaofeng; Kurt BREITENKAMP; Martin LOTZ a Darryl D'LIMA. Synergistic action of fibroblast growth factor-2 and transforming growth factor-beta1 enhances bioprinted human neocartilage formation. online. *Biotechnology and Bioengineering*, roč. 109 (2012), č. 9, s. 2357–2368. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bit.24488>.
- [191] UDOFIA, Edidiong Nseowo a Wenchao ZHOU. Microextrusion Based 3D Printing – A Review. online. *University of Texas at Austin*. 2018. Dostupné z: <https://doi.org/10.26153/TSW/17201>.
- [192] MOBARAKI, Mohammadmahdi; Maryam GHAFARI; Abolfazl YAZDANPANAH; Yangyang LUO a D.K. MILLS. Bioinks and bioprinting: A focused review. online. *Bioprinting*, roč. 18 (2020), s. e00080. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2020.e00080>.
- [193] DOU, Chaoran; Victoria PEREZ; Jie QU; Andrew TSIN; Ben XU et al. A State-of-the-Art Review of Laser-Assisted Bioprinting and its Future Research Trends. online. *ChemBioEng Reviews*, roč. 8 (2021), č. 5, s. 517–534. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/cben.202000037>.
- [194] KALIARAJ, Gobi; Dilip SHANMUGAM; Arish DASAN a Kamalan MOSAS. Hydrogels—A Promising Materials for 3D Printing Technology. online. *Gels*, roč. 9 (2023), č. 3, s. 260. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/gels9030260>.
- [195] WANG, Xiaohong; Qiang AO; Xiaohong TIAN; Jun FAN; Hao TONG et al. Gelatin-Based Hydrogels for Organ 3D Bioprinting. online. *Polymers*, roč. 9 (2017), č. 9, s. 401. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym9090401>.
- [196] SHI, Weili; Muyang SUN; Xiaoqing HU; Bo REN; Jin CHENG et al. Structurally and Functionally Optimized Silk-Fibroin–Gelatin Scaffold Using 3D Printing to Repair Cartilage Injury In Vitro and In Vivo. online. *Advanced Materials*, roč. 29 (2017), č. 29, s. 1701089. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/adma.201701089>.
- [197] JUNG, Gil-Yong; Yoon-Jeong PARK a Jung-Suk HAN. Effects of HA released calcium ion on osteoblast differentiation. online. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, roč. 21 (2010), č. 5, s. 1649–1654. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10856-010-4011-y>.
- [198] FISCHER, Lena; Mojtaba NOSRATLO; Katharina HAST; Emine KARAKAYA; Nadine STRÖHLEIN et al. Calcium supplementation of bioinks reduces shear stress-induced cell damage during bioprinting. online. *Biofabrication*, roč. 14 (2022), č. 4, s. 045005. Dostupné z: <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ac84af>.

- [199] MA, Liang; Yuting LI; Yutong WU; Mengfei YU; Abdellah AAZMI et al. 3D bioprinted hyaluronic acid-based cell-laden scaffold for brain microenvironment simulation. online. *Bio-Design and Manufacturing*, roč. 3 (2020), č. 3, s. 164–174. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s42242-020-00076-6>.
- [200] CADAMURO, Francesca; Francesco NICOTRA a Laura RUSSO. 3D printed tissue models: From hydrogels to biomedical applications. online. *Journal of Controlled Release*, roč. 354 (2023), s. 726–745. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.01.048>.
- [201] HERRADA-MANCHÓN, Helena; Manuel Alejandro FERNÁNDEZ a Enrique AGUILAR. Essential Guide to Hydrogel Rheology in Extrusion 3D Printing: How to Measure It and Why It Matters? online. *Gels*, roč. 9 (2023), č. 7, s. 517. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/gels9070517>.
- [202] PAVLÍNEK, Vladimír; Martin STĚNIČKA a Miroslav MRLÍK. *Reologie potravin a kosmetických přípravků*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. ISBN CZ.1.07/2.2.00/28.0132.
- [203] PRIYA, Arumugasamy Sathiya; Rajaraman PREMANAND; Indhumathi RAGUPATHI; Vijayabhaskara Rao BHAVIRIPUDI; Radhamanohar AEPURU et al. Comprehensive Review of Hydrogel Synthesis, Characterization, and Emerging Applications. online. *Journal of Composites Science*, roč. 8 (2024), č. 11, s. 457. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/jcs8110457>.
- [204] MARTINEZ-GARCIA, Francisco Drusso; Tony FISCHER; Alexander HAYN; Claudia Tanja MIERKE; Janette Kay BURGESS et al. A Beginner's Guide to the Characterization of Hydrogel Microarchitecture for Cellular Applications. online. *Gels*, roč. 8 (2022), č. 9, s. 535. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/gels8090535>.
- [205] TAKAHASHI, Yoshitake a Yasuhiko TABATA. Effect of the fiber diameter and porosity of non-woven PET fabrics on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. online. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, roč. 15 (2004), č. 1, s. 41–57. Dostupné z: <https://doi.org/10.1163/156856204322752228>.
- [206] ROOSA, Sara M. Mantila; Jessica M. KEMPPAINEN; Erin N. MOFFITT; Paul H. KREBSBACH a Scott J. HOLLISTER. The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an *in vivo* model. online. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, roč. 92A (2010), č. 1, s. 359–368. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32381>.
- [207] KARAGEORGIOU, V a D KAPLAN. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. online. *Biomaterials*, roč. 26 (2005), č. 27, s. 5474–5491. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.02.002>.
- [208] LIEN, Sio-Mei; Liang-Yu KO a Ta-Jen HUANG. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. online. *Acta Biomaterialia*, roč. 5 (2009), č. 2, s. 670–679. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.09.020>.

- [209] KOCH, Marcus a Małgorzata K. WŁODARCZYK-BIEGUN. Faithful scanning electron microscopic (SEM) visualization of 3D printed alginate-based scaffolds. online. *Bioprinting*, roč. 20 (2020), s. e00098. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2020.e00098>.
- [210] CHEN, Yu (ed.). *Hydrogels based on natural polymers*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2020. ISBN 978-0-12-816618-5.
- [211] AHMED, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. online. *Journal of Advanced Research*, roč. 6 (2015), č. 2, s. 105–121. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>.
- [212] FOUDAZI, Reza; Ryan ZOWADA; Ica MANAS-ZLOCZOWER a Donald L. FEKE. Porous Hydrogels: Present Challenges and Future Opportunities. online. *Langmuir*, roč. 39 (2023), č. 6, s. 2092–2111. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c02253>.
- [213] ČESKÁ AGENTURA PRO STANDARDIZACI. Biologické hodnocení zdravotnických prostředků - Část 1: Hodnocení a zkoušení v rámci procesu managementu rizik. 2021, částka 855220.
- [214] VAN MEERLOO, Johan; Gertjan J. L. KASPERS a Jacqueline CLOOS. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. online. In: CREE, Ian A. (ed.). *Cancer Cell Culture*, s. 237–245. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20.
- [215] NIU, Jingyi; Minai LI a Ying WANG. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays, The Fundamentals for Drug Discovery. online. *International Journal of Drug Discovery and Pharmacology*. 2024-08-20. s. 100013. Dostupné z: <https://doi.org/10.53941/ijddp.2024.100013>.
- [216] FOROUGHI, Ali H. a Mir Jalil RAZAVI. Multi-objective Shape Optimization of Bone Scaffolds: Enhancement of Mechanical Properties and Permeability. online. *Acta Biomaterialia*, roč. 146 (2022), s. 317–340. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.04.051>.
- [217] VEEMAN, W.S. Nuclear magnetic resonance, a simple introduction to the principles and applications. online. *Geoderma*, roč. 80 (1997), č. 3–4, s. 225–242. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s0016-7061\(97\)00054-2](https://doi.org/10.1016/s0016-7061(97)00054-2).
- [218] Basic polymer concepts II. online. In: UMOREN, Saviour A.; Moses M. SOLOMON a Viswanathan S. SAJI. *Polymeric Materials in Corrosion Inhibition*, s. 49–81. Elsevier, 2022. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823854-7.00025-4>.
- [219] ZHAO, Huiru a Ned D. HEINDEL. Determination of Degree of Substitution of Formyl Groups in Polyaldehyde Dextran by the Hydroxylamine Hydrochloride Method. online. *Pharmaceutical Research*, roč. 08 (1991), č. 3, s. 400–402. Dostupné z: <https://doi.org/10.1023/a:1015866104055>.

- [220] VARAPRASAD, Kokkarachedu; Chandrasekaran KARTHIKEYAN; Murali M. YALLAPU a Rotimi SADIKU. The significance of biomacromolecule alginate for the 3D printing of hydrogels for biomedical applications. online. *International Journal of Biological Macromolecules*, roč. 212 (2022), s. 561–578. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.05.157>.
- [221] BOM, Sara; Ricardo RIBEIRO; Helena M. RIBEIRO; Catarina SANTOS a Joana MARTO. On the progress of hydrogel-based 3D printing: Correlating rheological properties with printing behaviour. online. *International Journal of Pharmaceutics*, roč. 615 (2022), s. 121506. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121506>.
- [222] BOCIAGA, Dorota; Mateusz BARTNIAK; Krzysztof SOBCZAK a Karolina ROSINSKA. An Integration of a Peristaltic Pump-Based Extruder into a 3D Bioprinter Dedicated to Hydrogels. online. *Materials*, roč. 13 (2020), č. 19, s. 4237. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ma13194237>.
- [223] JIA, Jia; Dylan J. RICHARDS; Samuel POLLARD; Yu TAN; Joshua RODRIGUEZ et al. Engineering alginate as bioink for bioprinting. online. *Acta Biomaterialia*, roč. 10 (2014), č. 10, s. 4323–4331. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.06.034>.
- [224] 3D Bioprinting of Thermal-Sensitive Bioink. online. In: OUYANG, Liliang. *Springer Theses*, s. 63–80. Singapore: Springer Singapore, 2019. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-981-13-9455-3_5.
- [225] DONATI, Ivan a Bjørn E. CHRISTENSEN. Alginate-metal cation interactions: Macromolecular approach. online. *Carbohydrate Polymers*, roč. 321 (2023), s. 121280. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121280>.
- [226] NGUYEN, Nghi Thi-Phuong; Long Vuong-Hoang NGUYEN; Nam Minh-Phuong TRAN; Dat Tan NGUYEN; Tien Ngoc-Thuy NGUYEN et al. The effect of oxidation degree and volume ratio of components on properties and applications of in situ cross-linking hydrogels based on chitosan and hyaluronic acid. online. *Materials Science and Engineering: C*, roč. 103 (2019), s. 109670. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.049>.
- [227] KUTH, Sonja; Emine KARAKAYA; Nina REITER; Laura SCHMIDT; Friedrich PAULSEN et al. Oxidized Hyaluronic Acid-Gelatin-Based Hydrogels for Tissue Engineering and Soft Tissue Mimicking. online. *Tissue Engineering Part C: Methods*, roč. 28 (2022), č. 7, s. 301–313. Dostupné z: <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2022.0004>.
- [228] KAMEDANI, Momoko; Masashi OKAWA; Athira Sreedevi MADHAVIKUTTY; Ching-Cheng TSAI; Arvind K. SINGH CHANDEL et al. Injectable Extracellular Matrix-Inspired Hemostatic Hydrogel Composed of Hyaluronan and Gelatin with Shear-Thinning and Self-Healing. online. *Biomacromolecules*, roč. 25 (2024), č. 3, s. 1790–1799. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.3c01251>.

- [229] NIKPOUR, Parisa; Hamed SALIMI-KENARI a Sayed Mahmood RABIEE. Biological and bioactivity assessment of dextran nanocomposite hydrogel for bone regeneration. online. *Progress in Biomaterials*, roč. 10 (2021), č. 4, s. 271–280. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40204-021-00171-6>.
- [230] MOUSER, Vivian H M; Ferry P W MELCHELS; Jetze VISSER; Wouter J A DHERT; Debby GAWLITTA et al. Yield stress determines bioprintability of hydrogels based on gelatin-methacryloyl and gellan gum for cartilage bioprinting. online. *Biofabrication*, roč. 8 (2016), č. 3, s. 035003. Dostupné z: <https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/3/035003>.
- [231] ZHANG, Zhengyi; Yifei JIN; Jun YIN; Changxue XU; Ruitong XIONG et al. Evaluation of bioink printability for bioprinting applications. online. *Applied Physics Reviews*, roč. 5 (2018), č. 4, s. 041304. Dostupné z: <https://doi.org/10.1063/1.5053979>.
- [232] SANII, Rana; Ewa PATYK-KAŻMIERCZAK; Carol HUA; Shaza DARWISH; Tony PHAM et al. Toward an Understanding of the Propensity for Crystalline Hydrate Formation by Molecular Compounds. Part 2. online. *Crystal Growth & Design*, roč. 21 (2021), č. 9, s. 4927–4939. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.1c00353>.
- [233] STABIK, J. Influence of Filler Particle Geometry on Die Swell. online. *International Polymer Processing*, roč. 19 (2004), č. 4, s. 350–355. Dostupné z: <https://doi.org/10.3139/217.1840>.
- [234] LAMBERGER, Zan; Dirk W. SCHUBERT; Margitta BUECHNER; Nathaly Chicaiza CABEZAS; Stefan SCHRÜFER et al. Advanced optical assessment and modeling of extrusion bioprinting. online. *Scientific Reports*, roč. 14 (2024), č. 1, s. 13972. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-64039-y>.
- [235] CHUNG, Johnson H. Y.; Sina NAFICY; Zhilian YUE; Robert KAPSA; Anita QUIGLEY et al. Bio-ink properties and printability for extrusion printing living cells. online. *Biomaterials Science*, roč. 1 (2013), č. 7, s. 763. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/c3bm00012e>.
- [236] MENAKBI, Chemseddine; Francoise QUIGNARD a Tzonka MINEVA. Complexation of Trivalent Metal Cations to Mannuronate Type Alginate Models from a Density Functional Study. online. *The Journal of Physical Chemistry B*, roč. 120 (2016), č. 15, s. 3615–3623. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b00472>.
- [237] HOLT, Brian; Anubhav TRIPATHI a Jeffrey MORGAN. Viscoelastic response of human skin to low magnitude physiologically relevant shear. online. *Journal of Biomechanics*, roč. 41 (2008), č. 12, s. 2689–2695. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2008.06.008>.
- [238] ZHANG, Haomiao; Ye LU; Lei HUANG; Ping LIU; Jun NI et al. Scalable and Versatile Metal Ion Solidified Alginate Hydrogel for Skin Wound Infection Therapy. online. *Advanced Healthcare Materials*, roč. 13 (2024), č. 18. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/adhm.202303688>.

- [239] GUAN, Shuaimeng; Kun ZHANG; Longlong CUI; Jiaheng LIANG; Jingan LI et al. Injectable gelatin/oxidized dextran hydrogel loaded with apocynin for skin tissue regeneration. online. *Biomaterials Advances*, roč. 133 (2022), s. 112604. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112604>.
- [240] LEE, Kuen Yong; Jon A. ROWLEY; Petra EISELT; Erick M. MOY; Kamal H. BOUHADIR et al. Controlling Mechanical and Swelling Properties of Alginate Hydrogels Independently by Cross-Linker Type and Cross-Linking Density. online. *Macromolecules*, roč. 33 (2000), č. 11, s. 4291–4294. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ma9921347>.
- [241] AHMED, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. online. *Journal of Advanced Research*, roč. 6 (2015), č. 2, s. 105–121. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Klasifikace biopolymerů na podle monomerní jednotky, upraveno dle Thomas et al. (2023) [17].....	19
Obrázek 2 Klasifikace biopolymerů podle původu a schopnosti biodegradace; upraveno dle Thomas et al. (2023) [17].....	20
Obrázek 3 Struktura alginátů s vyznačenými GG/GM/MM bloky; upraveno dle Abkakhajouei et al. (2022) [23].....	21
Obrázek 4 Páteční struktura dextranu, fialovými čísly je označena pozice uhlíku v glukózové jednotce; upraveno dle De Belder et al. (2000) [49]	24
Obrázek 5 Oxidace dextranu periodáty za vzniku dialdehydu dextranu; upraveno dle Maia et al. (2011) [52].....	25
Obrázek 6 Struktura hyaluronanu; upraveno dle Fallacara et al. (2018) [69]	28
Obrázek 7 Oxidace hyaluronanu periodáty za vzniku dialdehydu hyaluronanu; upraveno dle Pandit et. al (2019) [71]	28
Obrázek 8 Možná struktura vlákna kolagenu; Gly = glycin, Ser = serin, Hyp = hydroxyprolin, Pro = prolin, Lys = Lysin; upraveno dle Djabourov et al. (1988) a Milano et al. (2023) [109, 110]	32
Obrázek 9 Sol-gel přechod želatiny; upraveno dle Obas et. al (2024) [133]	36
Obrázek 10 Egg box model síťování alginátu vápenatými ionty; upraveno dle Hu et. al (2021) [137]	37
Obrázek 11 Reakce aminové a aldehydové skupiny za vzniku Schiffovy báze; upraveno dle Zhang et al. (2018) [152]	39
Obrázek 12 Strukturní vzorec fenylfosfonátu; upraveno dle PubChem [175]	42
Obrázek 13 Model struktury vrstvy CaPhP; atomy vápníku jsou označené zeleně, atomy fosforu žlutě, kyslíku červeně a uhlíku šedě; převzato od Kopecké et al. (2018) [177]	43
Obrázek 14 Schématické znázornění struktury „house of cards“ v kontextu 3D tisku; upraveno dle Kopecké et al. (2023) [10].....	44
Obrázek 15 Termálního a piezoelektrický inkjet 3D tisk; upraveno dle Murphy et al. (2014) [183]	46
Obrázek 16 Typy dávkování mikroextruzního 3D tisku – pneumatický, pístový a šnekový; upraveno dle Murphy et al. (2014) [183]	47
Obrázek 17 Princip laserem-asistovaného biotisku; upraveno dle Murphy et al. (2014) [183]	48
Obrázek 18 Mechanismus MTT testu; upraveno dle Niu et al. (2024) [215].....	53
Obrázek 19 Vytisknutá struktura hybridního hydrogelu; přičemž oranžové těleso odpovídá modelu (10x10 mm) tisknuté geometrie.	64
Obrázek 20 Schematické zobrazení vyhodnocení narůstání za hubicí	67
Obrázek 21 A) model trajektorie plánovaného tisku; B) fotografie reálného vytisknutého vzorku <i>fyz_5_CaPhP</i>	67

Obrázek 22 A) binarizovaná fotografie reálného tisku vzorku <i>fyz_5_CaPhP</i> ; B) detekované hraniční pixely (červeně), dráha tiskové hlavy (modře) a osa skutečného tisku (tyrkysově) vzorku <i>fyz_5_CaPhP</i>	68
Obrázek 23 Porovnání plánovaného tisku s reálným tiskem u vzorku <i>fyz_5_CaPhP</i>	68
Obrázek 24 A) Tisknutý model testu fúze filamentu; B) částečná fúze filamentu (vlevo) a úplná separace filamentu (vpravo); C) tloušťka filamentu po depozici	70
Obrázek 25 Použitý typ mřížky pro 3D tisk – rectilinear.....	71
Obrázek 26 Vytisknutý hydrogel s nanočásticemi <i>fyz_5_CaPhP</i> (rozměry 10x10x5 mm)	71
Obrázek 27 Vytisknutý hydrogel připravený chemickým síťováním <i>chem_6</i> (rozměry 10x10x5 mm).....	73
Obrázek 28 Fyzikálně síťované hydrogely; vzorek <i>fyz_5_CaPhP</i> A) ZnCl_2 B) FeCl_3 ; (rozměry 10x10x5 mm)	74
Obrázek 29 Závislost komplexní viskozity na úhlové rychlosti u chemicky síťovaných hydrogelů podle poměrného zastoupení polymerů GEL:DEX-OX:HA-OX; <i>chem_6</i> (4:1:1), <i>chem_7</i> (4:1:3), <i>chem_8</i> (4:3:1).....	80
Obrázek 30 Závislost komplexní viskozity na úhlové rychlosti pro vzorky s obsahem nanočástic: <i>fyz_5_CaPhP</i> a <i>fyz_5_Ca3.1</i> ; a pro tiskovou náplň bez nanočástic <i>fyz_5_bezNPs</i> . Obrázek v pravém rohu ilustruje vliv přítomnosti nanočástic na strukturu při tisku více vrstev materiálu A) s nanočásticemi CaPhP a B) bez nanočástic, přičemž oranžové těleso odpovídá počítačovému modelu (10x10 mm) tisknuté geometrie.	81
Obrázek 31 Závislost komplexní viskozity na úhlové rychlosti hydrogelů s nanočásticemi v podle polymerního zastoupení A) Ca3.1 a B) CaPhP	82
Obrázek 32 Závislost souřazového (G' , plné znaky) a ztrátového (G'' , prázdné znaky) modulu fyzikálně síťovaných hydrogelů s nanočásticemi na úhlové rychlosti	86
Obrázek 33 Závislost souřazového (G' , plné znaky) a ztrátového (G'' , prázdné znaky) modulu chemicky síťovaného hydrogelu na úhlové rychlosti.....	87
Obrázek 34 SEM snímky lyofilizovaných fyzikálně síťovaných hydrogelů s nanočásticemi; A) <i>fyz_5_CaPhP</i> síťovaný Zn^{2+} ionty, B) <i>fyz_5_CaPhP</i> síťovaný Fe^{3+} ionty, C) <i>fyz_5_Ca3.1</i> síťovaný Zn^{2+} ionty, D) <i>fyz_5_Ca3.1</i> síťovaný Fe^{3+} ionty	88
Obrázek 35 SEM snímek chemicky síťovaného hydrogelu	90
Obrázek 36 Závislost rovnovážného stupně bobtnání (ES) fyzikálně síťovaných (Zn^{2+} , Fe^{3+}) hydrogelů s nanočásticemi (<i>fyz_5_CaPhP</i> , <i>fyz_5_Ca3.1</i>) na čase	91
Obrázek 37 Závislost rovnovážného stupně bobtnání (ES) chemicky síťovaného hydrogelu (<i>chem_6</i>) na čase.....	92
Obrázek 38 ^1H NMR spektra A) dextranu (DEX) a oxidovaného dextranu (DEX-OX); B) hyaluronanu (HA) a oxidovaného hyaluronanu (HA-OX)	129

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1a Poměrné hmotnostní zastoupení biopolymerů ve fyzikálně síťovaných hydrogelech; koncentrace nanočástic.....	61
Tabulka 1b Poměrné hmotnostní zastoupení biopolymerů ve fyzikálně síťovaných hydrogelech; koncentrace nanočástic.....	62
Tabulka 2a Přehled testovaných kombinací a poměrů biopolymerů pro přípravu hydrogelů síťovaných Schiffovou bází	62
Tabulka 2b Přehled testovaných kombinací a poměrů biopolymerů pro přípravu hydrogelů síťovaných Schiffovou bází	63
Tabulka 3 Přehled testovaných kombinací a poměrů biopolymerů pro přípravu hybridních hydrogelů	64
Tabulka 4 Parametry tisku pro vzorky <i>fyz_5_CaPhP</i> a <i>fyz_5_Ca3.1</i>	71
Tabulka 5 Parametry tisku pro vzorek <i>chem_6</i>	72
Tabulka 6 Početní a hmotnostní střední molekulová hmotnost, index polydisperzity oxidovaných polysacharidů.....	77
Tabulka 7 Doba do počátku gelace modifikovaného dextranu a hyaluronanu se želatinou Schiffovou bází	78
Tabulka 8 Tiskové charakteristiky hydrogelů	83

SEZNAM ROVNIC

Rovnice 1 Newtonova rovnice pro ideálně viskózní kapaliny	50
Rovnice 2 Herschel-Bulkley model	50
Rovnice 3 Stupeň bobtnání	52
Rovnice 4 Reakce hydroxylamin-hydrochloridu s aldehydovými skupinami	59
Rovnice 5 Neutralizace kyseliny chlorovodíkové hydroxidem sodným	59
Rovnice 6 Standardizace hydroxidu sodného kyselinou šťavelovou	60
Rovnice 7 Stupeň oxidace	60
Rovnice 8 Narůstání za hubicí	66
Rovnice 9 Koeficient přesnosti	68
Rovnice 10 Osa x reálného tisku	69
Rovnice 11 Osa y reálného tisku	69
Rovnice 12 Šířka tištěného segmentu	69
Rovnice 13 Modelová trajektorie	69
Rovnice 14 Přesnost tisku	69
Rovnice 15 Rovnovážný poměr bobtnání	76

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

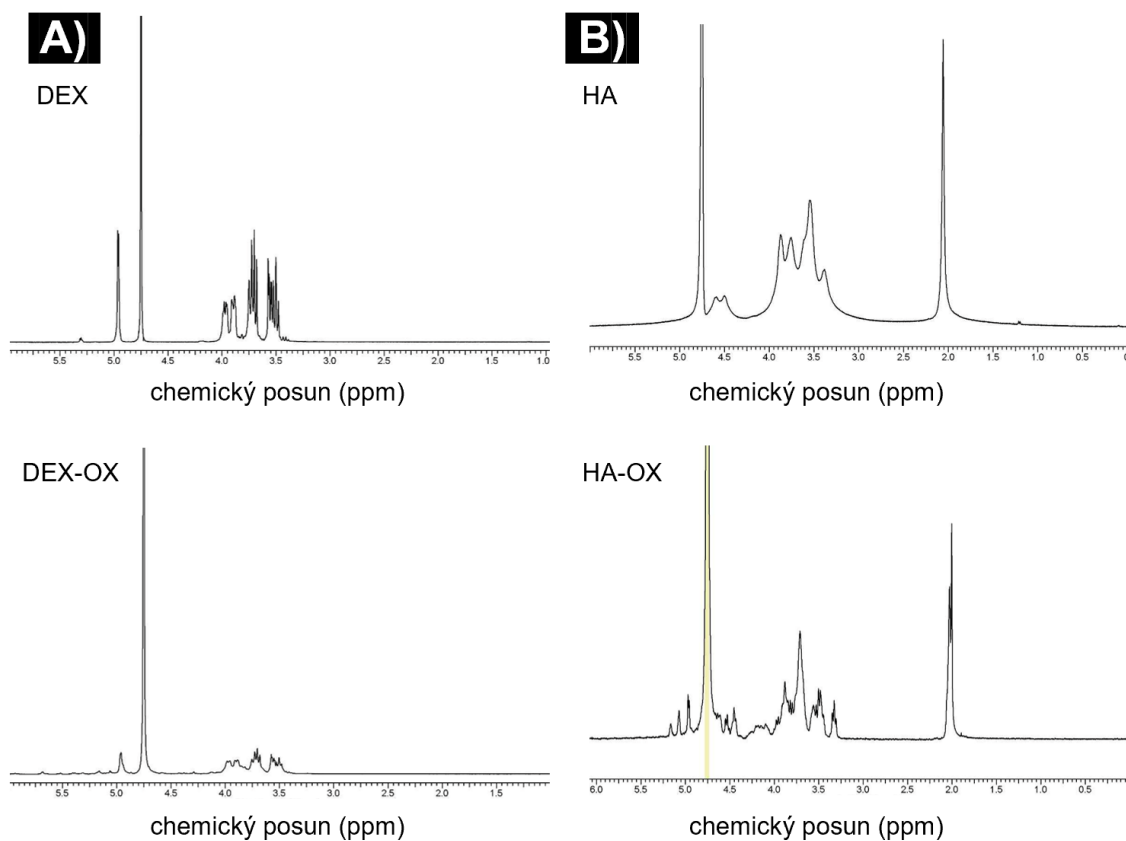
ES	rovnovážný stupeň bobtnání
Ca ₃ .1	vápenatý fosfát-fenylfosfonát
CaPhP	vápenatý fenylfosfonát dyhydrát
CD	uhlíkové tečky
CNT	uhlíkové nanotrubičky
DEMI	demineralizovaná voda
DEX-OX	dextran dialdehyd
DN	dvojitá síť („double network“)
DNA	2-deoxy-ribonukleová kyselina
ECM	extracelulární matric
FDM	fused depositoin modeling
GAG	glykosaminglykany
GPC	gelová permeační chromatografie
HA	hyaluronan
HA-OX	hyaluronan dialdehyd
INCI	Mezinárodní nomenklatura kosmetických přísad
ISO	Mezinárodní organizace pro standardizaci
NMR	nukleární magnetická rezonance
NPs	nanočástice
PA	polyamid
PBS	polybutylensukcinát
PBS	fosfátový pufr
PCL	polykaprolakton
PHA	polyhydroxyalkanoáty
PLA	kyselina polymléčná

RNA	ribonukleová kyselina
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
SLA	stereolitografie
SR	bobtnací schopnost
UIPAC	Mezinárodní unie čisté a aplikované chemie
XRD	rentgenová difrakce

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I ^1H NMR spektra oxidovaného dextranu a hyaluronanu

PŘÍLOHA P I: ^1H NMR SPEKTRA OXIDOVANÉHO DEXTRANU A HYALURONANU



Obrázek 38 ^1H NMR spektra A) dextranu (DEX) a oxidovaného dextranu (DEX-OX); B) hyaluronanu (HA) a oxidovaného hyaluronanu (HA-OX)