

Amidace hyaluronanu a její využití při přípravě hydrogelů

Kateřina Korpasová

Bakalářská práce
2022



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav fyziky a mater. inženýrství

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kateřina Korpasová**
Osobní číslo: **T19723**
Studijní program: **B0711A130009 Materiály a technologie**
Specializace: **Materiálové inženýrství**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Amidace hyaluronanu a její využití při přípravě hydrogelů**

Zásady pro vypracování

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

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

Seznam doporučené literatury:

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

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

Datum zadání bakalářské práce: **31. prosince 2021**
Termín odevzdání bakalářské práce: **20. května 2022**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

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

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že

- odevzdáním bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – bakalářskou práci - nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům.

Prohlašuji, že

- elektronická a tištěná verze bakalářské práce jsou totožné;
- na bakalářské práci jsem pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.

Ve Zlíně

.....

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

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

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

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

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

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

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

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst.

3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

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

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

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá přípravou hydrogelů na bázi modifikovaných hyaluronanů (HA) sesítovaných *Schiffovou* bází. Připravené vzorky hydrogelů se liší svým chemickým složením a koncentrací modifikovaných hyaluronanů (1%, 2%, 3%). Hydrogel je složen z amidovaného hyaluronanu připraveného za přítomnosti aktivačního činidla DMTMM nebo EDC a oxidovaného hyaluronanu. Cílem této práce bylo provést modifikace hyaluronanu a následně jeho kombinace amidované a oxidovaného formy sesítovat za přípravy 3D hydrogelové sítě. Následnou charakterizací hydrogelů se diskutoval vliv jednotlivých parametrů (molekulové hmotnosti vstupních látek, stupně modifikace a oxidace). Výsledky této bakalářské práce potvrdily, že celková porozita hydrogelů na bázi modifikovaných hyaluronanů se liší v závislosti na koncentraci jejich vstupních amidovaných a oxidovaných forem hyaluronanu. Hydrogel na bázi modifikovaných hyaluronanů představuje materiál o širokém využití v 3D biotisku a medicíně.

Klíčová slova: modifikace hyaluronanu, amidace, oxidace, hydrogel

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the preparation of hydrogels based on modified HA crosslinked by the Schiff base. The prepared hydrogel samples differ in their chemical composition and concentration of modified HA (1%, 2%, 3%). The hydrogel is composed of amidated hyaluronan prepared in the presence of an activating agent DMTMM or EDC and oxidized hyaluronan. The aim of this work was to modify the hyaluronan and crosslink its combination of amidated and oxidized forms to prepare a 3D hydrogel network. Subsequent characterization of hydrogels discussed the influence of individual parameters (molecular weight of starting materials, degree of modification and oxidation). The results of this bachelor thesis confirmed that the overall porosity of hydrogels based on modified hyaluronans varies depending on the concentration of their input amidated and oxidized forms of hyaluronan. The hydrogel based on modified HA is a material with a wide range of uses in 3D bioprinting and medicine.

Keywords: hyaluronan modification, amidation, oxidation, hydrogel

Těmito řádky bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce, paní Ing. Lence Musilové, Ph.D. za pevnou vůli, velké množství věnovaného času a podpory při práci a za příkladné vedení spojené s velkou dávkou trpělivosti. Dále bych chtěla poděkovat své kamarádce a kolegyni, slečně Viktorii Daňkové, za podporu při psaní této práce a za pomoc během studia. Nemalé díky patří mé rodině, která mě podporuje celý můj život.

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

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| ÚVOD..... | 10 |
| I TEORETICKÁ ČÁST | 12 |
| 1 BIOMATERIÁLY | 13 |
| 2 BIOPOLYMERY | 16 |
| 3 POLYSACHARIDY | 17 |
| 4 KYSELINA HYALURONOVÁ..... | 18 |
| 4.1 STRUKTURA A MOLEKULOVÁ HMOTNOST HA | 18 |
| 4.2 VÝSKYT A JEJÍ VÝROBA | 19 |
| 4.3 VLASTNOSTI HA | 20 |
| 4.4 MODIFIKACE HA..... | 20 |
| 4.4.1 Modifikace skupiny COOH | 21 |
| 4.4.2 Modifikace skupiny OH..... | 23 |
| 4.4.3 Příprava dalších funkčních skupin na polymerním řetězci HA..... | 25 |
| 4.4.4 Síťování HA | 25 |
| 4.5 HYDROGELY..... | 26 |
| 4.5.1 Typy hydrogelů | 26 |
| 4.5.2 Vlastnosti..... | 28 |
| 4.5.3 Aplikace | 29 |
| 4.5.4 Charakterizace a její metody | 30 |
| II PRAKTICKÁ ČÁST..... | 34 |
| 5 POPIS EXPERIMENTU | 35 |
| 5.1 POUŽITÉ MATERIÁLY | 36 |
| 5.2 SYNTÉZY HA | 36 |
| 5.2.1 Příprava amidované formy hyaluronanu (HA-ADH) pomocí DMTMM..... | 37 |
| 5.2.2 Příprava amidované formy hyaluronanu (HA-ADH) pomocí EDC..... | 38 |
| 5.2.3 Příprava oxidované formy hyaluronanu (HA-OX) | 39 |
| 5.3 METODY PŘÍPRAVY A POUŽITÉ PŘÍSTROJE | 40 |
| 5.3.1 Charakterizace modifikovaného hyaluronanu..... | 40 |
| 5.4.1 Příprava hydrogelů metodou <i>Schiffovy báze</i> | 42 |
| 5.4.2 Charakterizace hydrogelů..... | 43 |
| 6 VÝSLEDKY A DISKUZE..... | 44 |
| 6.1 MODIFIKACE HA-ADH A HA-OX | 44 |
| 6.2 OVĚŘENÍ MODIFIKACE..... | 45 |
| 6.2.1 NMR..... | 45 |
| 6.2.2 FT-IR..... | 49 |
| 6.2.3 Stanovení molekulové hmotnosti pomocí GPC | 51 |
| 6.2.4 Stanovení stupně oxidace (SO) | 52 |

| | | |
|---|--------------------------------|-----------|
| 6.3 | CHARAKTERIZACE HYDROGELŮ | 53 |
| 6.3.1 | SEM..... | 54 |
| ZÁVĚR | | 58 |
| SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | | 59 |
| SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK | | 62 |
| SEZNAM OBRÁZKŮ | | 64 |
| SEZNAM TABULEK | | 66 |

ÚVOD

Biomateriály představují v současné době hojně používané materiály. Mezi historicky první biomateriály lze zařadit uhlíkové částice aplikované tetováním (před 5000 lety) nebo lněné nitě používané při hojení ran (před 4000 lety) [1]. Od té doby, co bylo prokázáno, že nemají negativní vliv na stav hostitele, se hojně využívají převážně pro interakce s biologickými systémy. Lze je extrahovat z přírody (kolagen, elastin) nebo vyrábět synteticky (kovy, polymery). Pro konkrétní aplikace je lze různě modifikovat [2; 3].

V mnoha aplikacích došlo k náhradě polymerů za biopolymery. Tato skupina materiálu je součástí rostlin (celulóza) i živočichů (želatina). Jejich průmyslová výroba využívá obnovitelné zdroje a je tím tedy součástí tzv. zelených technologií. Mimo rozsáhlé využití v biomedicině (hojení ran) jsou součástí i obalového (polylaktid, PLA) průmyslu a kosmetiky (kyselina hyaluronová) [4]. Bipolymery interagující s živým organismem jsou z velké části polysacharidy.

Polysacharidy mají jednotnou strukturu řetězce, který tvoří opakující se monosacharidové jednotky, které jsou spojeny glykosidickou vazbou. Na základě složení řetězce se dělí na homoglykany a heteroglykany. V určitých koncentracích tvoří přirozenou součást lidského těla. Zástupce ze skupiny homoglykanem představuje škrob, součástí skupiny heteroglykanů jsou glukosaminoglykany (GAG), do kterých patří i tolik populární hyaluronan [5; 6].

Hyaluronan je nenahraditelnou součástí extracelulární matrix pojivových tkání živých organismů. V závislosti na složitosti polymerního řetězce lze jeho strukturu rozdělit na primární, sekundární a terciární. I přes dlouhou dobu používání je hyaluronan stále předmětem výzkumných projektů. Průmyslová výroba je založena na extrakci z určitých druhů bakterií (př. *Streptococci A*). Významné vlastnosti (např. vysoká hydrofilita) mu zajistily rozsáhlé využití. Některé aplikace ale vyžadují úpravu nativních vlastností HA [7; 8].

Hyaluronan je díky přítomnosti hydrofilních skupin na svém řetězci velmi dobře rozpustný ve vodě. To se ale u některých aplikací nemusí hodit, proto se provádí chemické modifikace HA. Modifikacemi hyaluronanu se zabývá široké množství autorů. Tato práce konkrétně čerpala zdroje ze studií provedených autory Bulpittem a spol. (1999) [9], D'Estem (2014) [10] a Kedariou (2017) [11]. Cílovými funkčními skupinami na polymerním řetězci HA jsou karboxylová a hydroxylová skupina [7]. V této práci se připravuje tzv. amidace a oxidace hyaluronanu. Provedené modifikace byly charakterizovány nukleární magnetickou

rezonancí (NMR), infračervenou spektroskopií (FT-IR) a výpočty stupně modifikace (DS) a stupně oxidace (SO).

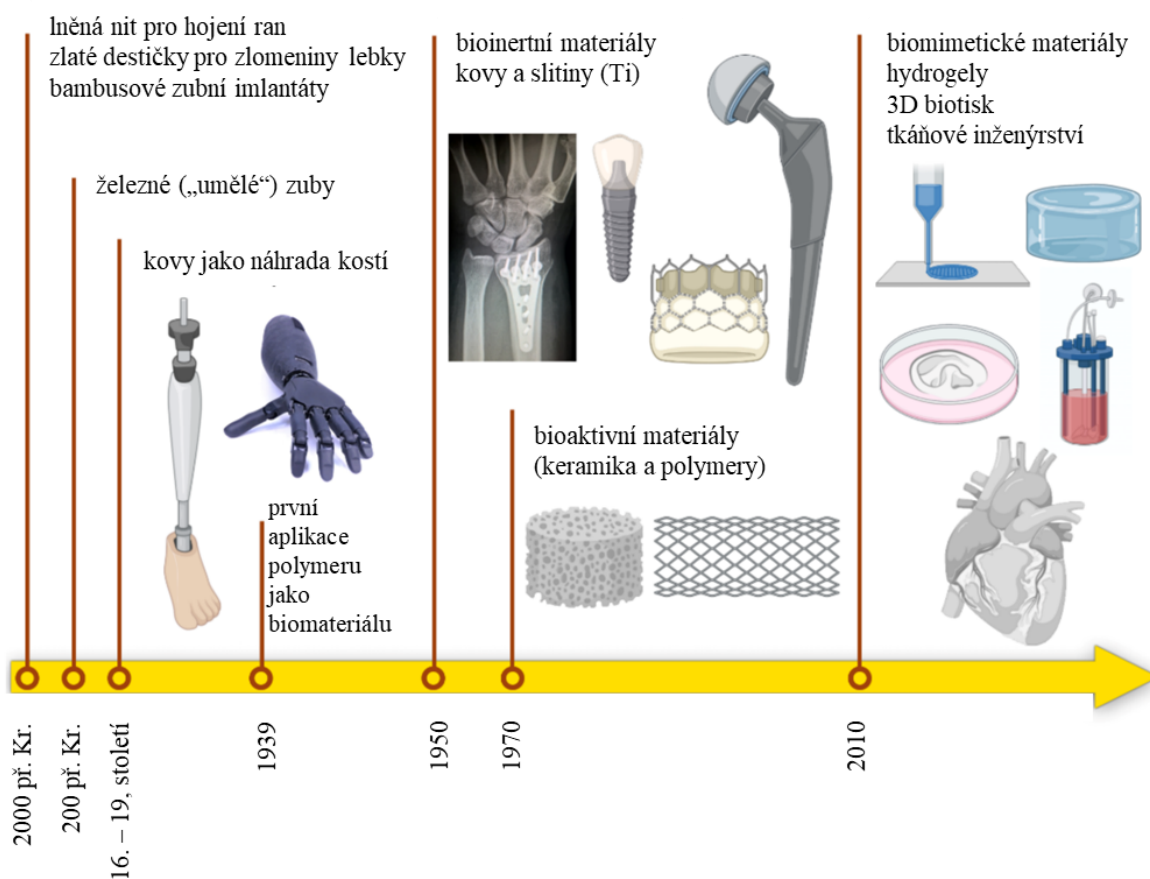
Vzájemným spojením produktů těchto modifikací lze připravit základní maticí tzv. hydrogel (metodou *Schiffovy báze*). Hydrogel lze označit za tzv. 3D polymerní síť. Za účelem vytvoření hydrogelu na bázi amidovaného a oxidovaného hyaluronanu byly provedeny síťovací reakce těchto vstupních roztoků. Následkem vzniku 3D hydrogelové sítě se materiálu mimo jiné změnila molekulová hmotnost a botnací vlastnosti [12]. Skenovací elektronový mikroskop (SEM) byl využit při charakterizaci vnitřní struktury připravených hydrogelů.

Cílem této práce bylo popsat problematiku modifikace funkčních skupin polymerního řetězce hyaluronanu oxidací a amidací. U amidace HA byl řešen vliv aktivačních činidel DMTMM a EDC na výsledný produkt. Obě modifikace byly provedeny v závislosti na proměnných podmínkách reakce, konkrétně molekulové hmotnosti a koncentraci polymeru, molárním poměru reagujících látek a podmínek reakce (čas, teplota, pH). Úspěšnost provedené modifikace byla dále charakterizována pomocí NMR a FT-IR spektroskopie. Modifikace byly určitými metodami charakterizace analyzovány.

I. TEORETICKÁ ČÁST

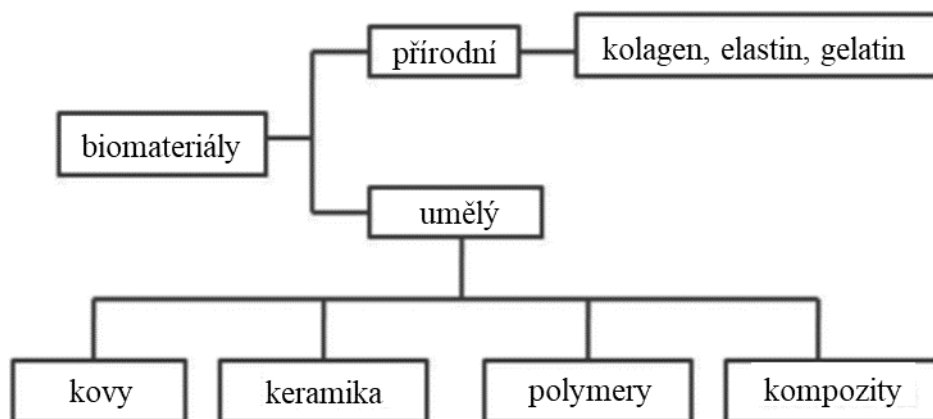
1 BIOMATERIÁLY

Biomateriály lze považovat za působivé materiály, které se v medicíně využívají při interakci s biologickými systémy [1]. Dokážou léčit a nahrazovat tkáně či orgány a nevyvolají přitom negativní reakci hostitelského organismu, jako např. alergický nebo zánětlivý proces. Mohou být přírodního či syntetického původu a i přesto být kompatibilní s živým organismem. Do této skupiny materiálů lze zařadit např. kovy, keramiku a její kompozity, či polymery. Prvotní využití některých biomateriálů shrnuje níže uvedený Obrázek 1 [2; 3].



Obrázek 1: Aplikace biomateriálů v průběhu let

Dle literatury lze biomateriály rozdělit na základě několika různých kritérií např. podle konkrétních vlastností (např. bioinertní, bioaktivní, biokompatibilní, biodegradabilní) a zamýšlené aplikace jak je uvedeno na obrázku 2.



Obrázek 2: Klasifikace biomateriálů [4]

Nejčastěji lze biomateriály rozdělit na *vstřebatelné* a *nevstřebatelné* materiály.

V případě *vstřebatelných materiálů* dochází po jejich implantaci do organismu k pomalé degradaci s následnou resorpcí okolním prostředím, tkáněmi a tekutinami. Tyto materiály se poté zcela rozpustí v tělní tekutině. *Nevstřebatelné materiály* po implantaci do těla degradaci nepodléhají.

Původ biomateriálů je variabilní. Některé mohou být nalezeny v přírodě (v pevné i kapalné formě), jiné se mohou připravovat synteticky. Samotnému zavedení biomateriálu do praxe předchází dlouhý proces, který závisí na důkladné diagnostice (z pohledu výzkumu). Jejich výrobu lze rozdělit do několika kroků: (1) technický návrh, (2) testování *in vitro* a *in vivo*, (3) požadavky trhu, (4) realizace průmyslové výroby a (5) uvedení na trh [2].

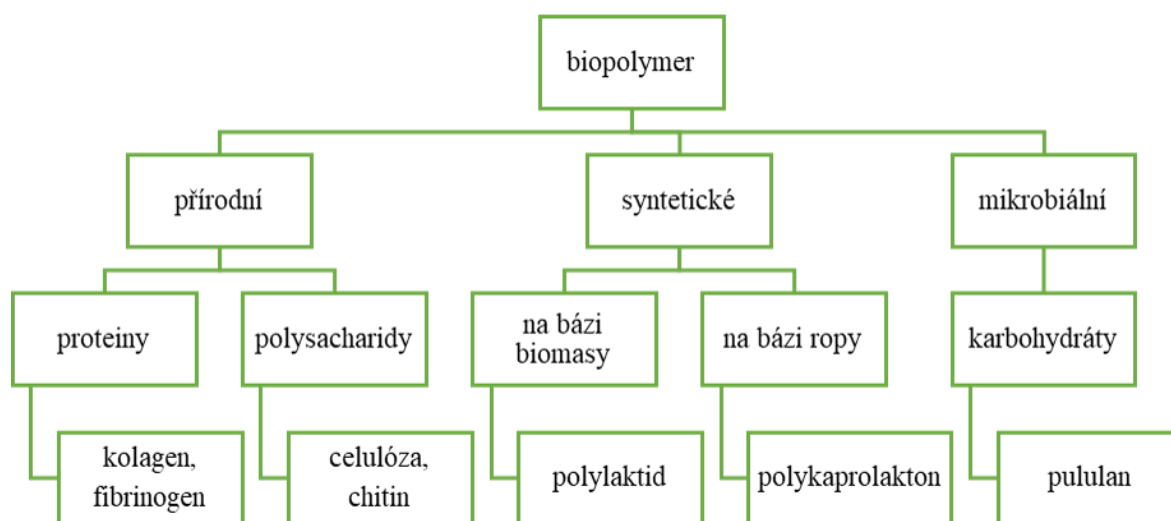
Velkou skupinu biomateriálů tvoří bioinertní kovy (např. titan), který lze použít při náhradě kloubu (rameno, koleno, kyčel) v ortopedii. Kovy nachází své uplatnění ve formě zubních implantátů ve stomatologii stejně jako keramika. Keramika v těle dokáže nahradit části poškozené kosti. Neméně rozsáhlou skupinu biomateriálů tvoří polymery. Jejich aplikace je rozsáhlá, např. v medicínských aplikacích se jedná převážně o tzv. *biopolymery*, které Yadav a spol. (2015) považují za makromolekuly, izolované z živých systémů (rostliny, mikroorganismy a zvířata) [5]. Představují klíčovou složku některých hydrogelů (např. hyaluronan), mohou se podílet na přenosu léčiv, hojení kůže (kolagen) či výživě chrupavky [1; 6]. Kompozity se využívají jako biosenzory a mikroelektrody. Dá se říct, že dnešní doba postupně nahrazuje tradiční materiály za ty udržitelné a tzv. pokročilé, jejichž vlastnosti se mohou podle potřeby řídit. Často se jedná o fyzikální, elektrické a biologické

vlastnosti materiálu, (konkrétně ty biologické vlastnosti) které usnadňují léčbu poškozeného orgánu [7].

Některé biomateriály (přírodní i syntetické) je potřeba pro určité aplikace modifikovat tak, aby vyhovovaly náročným požadavkům zamýšlených bioaplikací [2]. Příkladem použití biomateriálu může být náplň do 3D biotiskárny. Takovým materiálem může být syntetický polyuretan, který díky své povaze vyniká spolehlivou biokompatibilitou, nízkou biodegradabilitou a variabilní teplotou přechodu solů v gel. Jeho nevýhodou je naopak horší adheze aplikovaných buněk na jeho povrch. Dalším příkladem biopolymeru potencionálně aplikovaného pomocí metody 3D tisku je hyaluronan (HA), kterým se tato práce zabývá. Jedná se o biokompatibilní polymer, který díky svému strukturnímu uspořádání a jeho přirozenému výskytu v lidském těle je netoxický. Příprava takového materiálu, ale v jeho případě vyžaduje modifikaci některých vlastností (např. omezení rozpustnosti ve vodě) tak, aby si materiál během tisku zachoval svůj tvar a přitom nedošlo ke zhoršení jeho biokompatibility a toxicity. [8].

2 BIOPOLYMERY

Biopolymery můžeme definovat jako polymery biologického původu, které postupem času nahrazují polymery, jejichž monomery je nezbytné extrahovat z ropy. Kromě ušetření této suroviny v petrochemickém průmyslu, je jejich další výhodou i nízká energetická náročnost výroby, např. mikrobiální biotechnologií zemědělských plodin (cukrová třtina, škrob) s využitím obnovitelných zdrojů energie. Biopolymery jsou netoxické a biokompatibilní, mohou se tedy vyskytovat i v živých systémech, kde se často podílejí na kontrole činnosti tkání [9; 10]. Jsou součástí rostlin (celulóza, chitosan) i živočichů (želatina). Rozdělení biomateriálů není úplně jednoduché, mezi jednotlivými zástupci se porovnává plno aspektů. Jejich základní rozdělení uvádí Obrázek 3. Biopolymery lze rovněž klasifikovat podle rozložitelnosti (biodegradovatelné a nebiodegradovatelné) či podle typu vstupního monomeru (polysacharid, protein a nukleová kyselina) [10]. I když jsou průběžně objevovány jejich nedostatky (problémy se stabilitou, optimální molární hmotností) [11], jejich využití se stále zvyšuje, zejména v oblastech obalového průmyslu (např. polylaktid - obaly potravin), biomedicíny (želatina - obvazy ran) a zemědělství (řízené uvolňování pesticidů). Jistě se v budoucnu zapojí i do vývoje léčiv v oblasti personalizované medicíny (formování podle individuální biologie člověka). Odhaduje se, že v roce 2023 přesáhne globální produkce biopolymerů 2,5 milionu tun [10; 11].



Obrázek 3: Tradiční rozdělení biopolymerů

3 POLYSACHARIDY

Polysacharidy tvoří spolu s proteiny a polynukleotidy podskupinou biopolymerů. Jedná se o uhlovodíkové řetězce složené z monosacharidových jednotek spojených glykosidickou vazbou. Některé polysacharidy slouží tělu jako energetická rezerva, jiné zajišťují ochrannou funkci. Monosacharidové jednotky mohou být totožné (homoglykany), nebo vzájemně odlišné (heteroglykany). Z homoglykanů je nejznámější škrob, který obsahuje opakující se jednotky glukózy. Díky jejich slabému propojení je škrob rozpustný ve vodě. Nejvíce zastoupenými heteroglykany jsou glykosaminoglykany (GAG) [5; 12; 13]. Všechny GAG mají jednotnou základní strukturu, a to opakující se disacharidové jednotky N-acetylglukosaminu a D-glukuronové kyseliny [14]. GAG řetězce jsou docela krátké (většinou do 20 kDa). Jejich výrobu mají v buňce na starosti tzv. *Golgiho* tělíska a endoplazmatické retikulum. V jádrech peptidů jsou substituovány za vzniku proteoglykanů. Zástupci GAG, keratin, heparin a hyaluronan, jsou nejvíce zastoupeny v pojivových tkání obratlovců [15]. Běžné polysacharidy mohou být eventuálním zdrojem návrhu biomimetických materiálů (napodobují přírodní struktury). Jejich zástupci spolu s oblastí využití shrnuje Obrázek 3 [16].



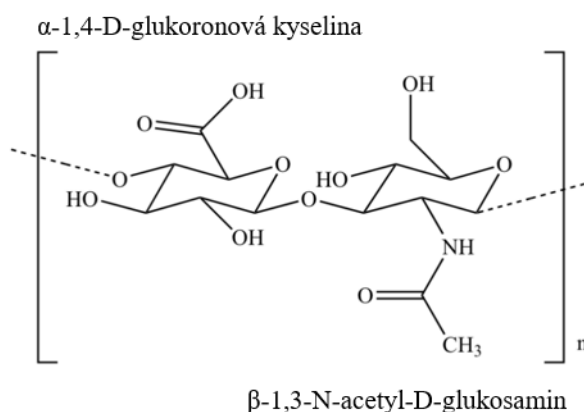
Obrázek 4: Vybrané aplikace konkrétních polysacharidů a jejich zdrojů

4 KYSELINA HYALURONOVÁ

Kyselina hyaluronová je významný přírodní polysacharid. V živém organismu se vyskytuje ve formě soli, proto se i v literatuře přednostně používají názvy hyaluronan (HA), hyaluronát sodný či sodná sůl kyseliny hyaluronové. Patří mezi hlavní složky extracelulární matrix pojivových tkání, je tedy součástí všech živých organismů [17; 18]. První izolace HA byla provedena již roku 1934 Karlem Meyerem a Johnem Palmerem z očního sklivce skotu. Později ve 20. století se podařilo HA získat také z lidské pupeční šňůry a streptokoků (*Streptococcus bacterium*) [6; 14]. Od té doby prošla mnoha výzkumy v různých vědeckých sférách, na základě kterých byla např. odhalena její významná role v buněčné signalizaci a regeneraci tkání. Díky svým vlastnostem, jakými jsou třeba viskoelastická, biokompatibilita a vysoká hydrofilita, má široké využití. Uplatňuje se převážně v medicínských, farmaceutických a kosmetických aplikacích [14; 17].

4.1 Struktura a molekulová hmotnost HA

Hyaluronan patří spolu s keratinem do skupiny glykosaminoglykanů, která jim udává jednotnou základní strukturu. Strukturální jednotku hyaluronanu tvoří β -1,3-N-acetyl-D-glukosamin a α -1,4-D-glukoronová kyselina vzájemně propojených glykosidickou vazbou (viz Obrázek 5).



Obrázek 5: Strukturální jednotka kyseliny hyaluronové

Chemickou strukturu HA popsali jako první v roce 1954 Bernard Weissmann a Karl Meyer [14; 19]. Obě disacharidové jednotky mají hydroxylové skupiny natočené v poloze *trans* a karboxylové skupiny jsou v poloze *gauche* +. Intramolekulární stabilitu každého řetězce zajišťují 4 vodíkové vazby. Dvě mezimolekulární vodíkové vazby působí mezi sousedními řetězci [19]. Oproti jiným biopolymerům je primární rozvětvení hyaluronanu jednodušší,

reprezentují ho opakující se disacharidové jednotky spojené β -1,4-glykosidickými vazbami. Funkční skupiny na řetězci jsou hydrofilního a hydrofobního charakteru (viz Obrázek 6 [20]). Díky β poloze obou jednotek je struktura HA uložena do energeticky stabilní polohy [14; 15]. Sekundární (intramolekulární) strukturu tvoří vodíkové vazby, které jsou natolik podobné vodíkovým vazbám vody, že je lze ve vodném prostředí jen stěží odlišit. Terciární struktura HA zaujímá různé konformace makromolekuly v závislosti na okolním prostředí polymeru (přítomnost solí, pH, teplota). Rotační volnost konformace je do určité míry limitována tuhostí přítomné glykosidické vazby a intramolekulárních vazeb, které ji spíše omezují [14; 21]. Struktura má schopnost větvení i nevětvení. Dokáže vytvářet hustou síť řetězců, které jsou propojeny vazbami slabšími, než jsou vazby kovalentní. HA lze rovněž označit za polymer nerozvětvený, kdy jsou jeho řetězce propojeny právě vazbami kovalentními [21].



Obrázek 6: Hydrofilní a hydrofobní místa hyaluronanu

Délka nataženého řetězce HA o molekulové hmotnosti 6 MDa dosahuje přibližně 15 μm (průměr 0,5 nm) [22]. HA může oproti jiným zástupcům ze skupiny GAG, kteří mají molekulovou hmotnost většinou menší než $5 \cdot 10^4$ Da, dosáhnout molekulové hmotnosti až 10 MDa [14; 23].

4.2 Výskyt a její výroba

HA je významnou složkou extracelulární matrix (ECM) u obratlovců, která jako jediná z GAG neobsahuje sulfátovou skupinu [24]. Jeho syntéza probíhá v plazmatických membránách buněk. Nejvyšší koncentraci hyaluronanu obsahují pojivové tkáně, konkrétně sklivec lidského oka, pupeční šňůra, kůže a synoviální kloubní tekutina (3-4 mg/ml). Jeho velké množství obsahuje i kohoutí hřebínek (nad 7,5 mg/ml). Všechny odběry z takových biologických zdrojů (zvířecí materiál) musí procházet důkladným čištěním [25]. Vyskytuje se také v plicích, ledvinách a mozku. Jeho nejnižší množství bylo naopak nalezeno v krvi. Tělo dospělého člověka obsahuje přibližně 15 g HA [20]. Analýza těla krysy odhalila vysoký

výskyt HA v kůži (33,8 mg HA z celkové váhy kůže 40,2 mg) a kostech, menší pak ve svalech [15; 23]. Zajímavou extrakcí HA představuje izolace z kůže žraloků, která v současnosti klesá z důvodu podpory prodloužení života těchto paryb [25].

Molekuly hyaluronanu se do ECM dostanou z cytoplazmy prostřednictvím pórů HA syntázy (transmembránový enzym, který zprostředkovává obousměrný přechod HA do/z ECM), které jsou na hranici mezi intracelulárním a extracelulárním prostorem [24].

Narůstající poptávku hyaluronanu v současné době zaštiťuje jeho průmyslová výroba. Velkou část produkce HA zabírá mikrobiální fermentace za použití kmenů *Streptococci A* a *C*. V posledních letech se využívají i geneticky modifikované kmeny bakterií (*Halomonas smyrnensis AAD6T*) [20; 26].

4.3 Vlastnosti HA

Nativní vlastnosti hyaluronanu jsou hlavním důvodem jeho širokého využití. Vysoká molekulová hmotnost hyaluronanu, se řádně projeví na makroskopických i mikroskopických vlastnostech polymeru, přímou úměrou ovlivňuje viskozitu. Díky svým funkčním skupinám je silně hydrofilní. V prostředí vody může svůj objem zvětšit až na 1000x původního objemu [21; 27]. HA si dokáže zachovat svoji viskoelasticitu i v případě, že obsahuje 99 % vody [21]. Mezi pH prostředím a viskozitou roztoků HA byla zjištěna úzká souvislost. V kyselé oblasti pH (pH \approx 2,5) HA totiž vytváří tzv. mezimolekulární síť. Čím je ale prostředí zásaditější, tím rychleji její viskozita klesá [19]. Jak už bylo naznačeno výše, rozdílné molekulové hmotnosti HA, zapříčiňují chod různých biologických dějů a buněčného chování. Krátké řetězce např. usnadňují průběhy buněčné proliferace a migrace, zatímco delší řetězce vykazují spíše protizánětlivé účinky. Hyaluronan hydratuje ECM, čímž přispívá k jeho fyziologické rovnováze. Dokáže buňce regulovat distribuci plazmatických proteinů a zajišťovat výměnu iontů. Interaguje s receptory, např. s *CD44* (transmembránový receptor glykoproteinu) [23; 24]. V tkáních člověka a zvířat se čas rozpadu HA pohybuje v rozmezí hodin až dnů [15].

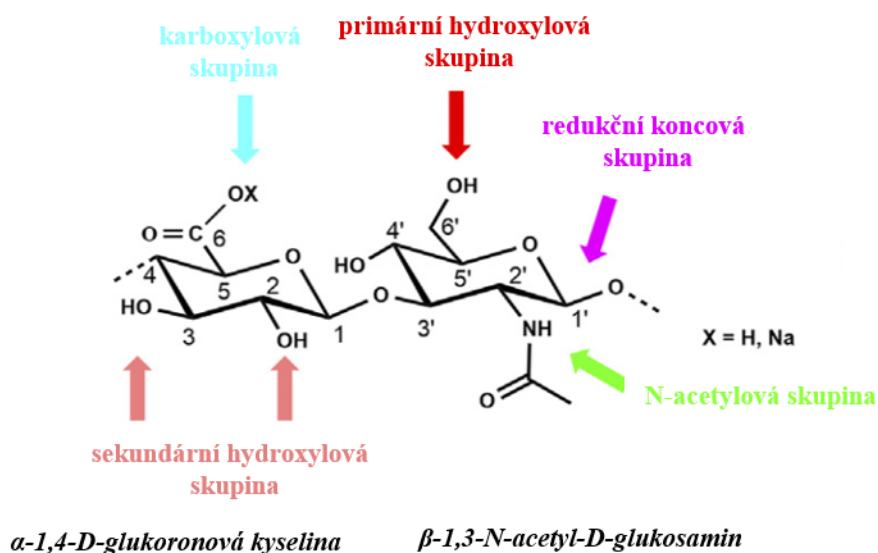
4.4 Modifikace HA

Prostý polymerní řetězec hyaluronanu nelze, zejména z důvodu výrazné degradace, vysoké rozpustnosti ve vodě a špatným mechanickým vlastnostem, použít pro některé aplikace jako biomateriál [18]. Pro úpravu nejen zmíněných vlastností se provádí jeho modifikace [28]. Chemické modifikace HA jsou nejčastěji realizovány na dvou funkčních místech

hyaluronového řetězce, a to na jeho hydroxylové a karboxylové skupině (ve vodném prostředí). Jedná se o navázání monofunkční molekuly jednoduchou kovalentní vazbou na řetězec HA [14]. Cílené funkční skupiny pro chemickou oxidaci jsou uvedeny na Obrázku 7 [20].

4.4.1 Modifikace skupiny COOH

Při modifikaci karboxylové skupiny se tyto skupiny musí nejprve aktivovat pomocí různých činidel. V závislosti na způsobu provedené modifikace rozlišujeme jednotlivé typy modifikací.

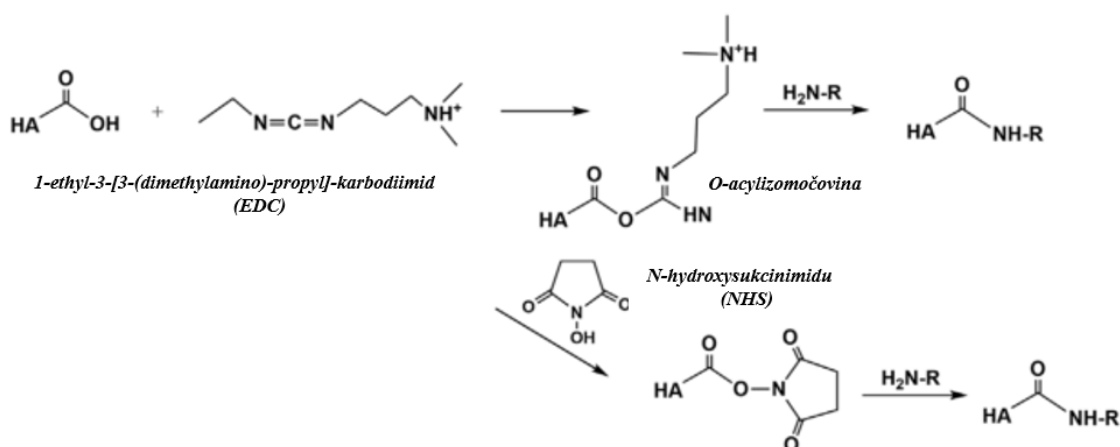


Obrázek 7: Klíčové funkční skupiny HA

Amidace

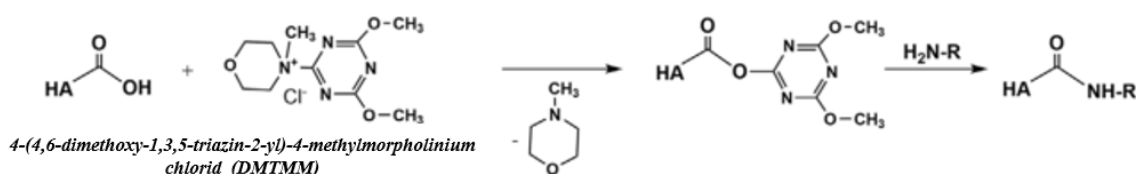
Amidace představuje chemickou reakci karboxylové skupiny s aminoskupinou prostřednictvím aktivačního činidla (karbodiimidu) ve vodném prostředí. Amidace je považována za nejrozšířenější metodou modifikace hyaluronanu. Nejčastěji používaným karbodiimidem je, díky jeho rozpustnosti ve vodě, 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)-propyl]-karbodiimid (EDC). První, komu se podařilo aktivovat karboxylovou skupinu na HA řetězci byli pánové Danishefsky a Siskovic (1971). Přítomnost amidových funkčních skupiny (stupeň substituce 38,6%) potvrdili pomocí infračervené spektroskopie a chromatografie. Mechanismus reakce podrobněji prozkoumali autoři Nakajimaou a Ikadaou (1995). Potvrdili, že klíčovou podmínkou aktivace karboxylové skupiny řetězce HA je kyselé pH prostředí (3,5 – 4,5), v průběhu kterého vzniká meziprodukt O-acyl-izomočovina. Ten se

pak přes vytvořené amidové vazby naváže na amin. O-acylizomočovina v důsledku své vysoké reaktivity reaguje s okolním prostředím (vodou) dochází k přesmyku na stabilnější verzi, N-acylmočovinu, která se již dalších reakcí neúčastní. Bulpitt a Aeschlimann (1999) zabránili při aktivaci karboxylové skupiny HA vzniku vedlejšího produktu (N-acylmočoviny) použitím 1-hydroxybenzotriazolu (HoBt) nebo N-hydroxysukcinimidu (NHS). Použitím esteru HoBt namísto NHS bylo prokázán vyšší stupeň substituce NHS [28-30] (Obrázek 8 [20]).



Obrázek 8: Reakční schéma amidace s aktivačním činidlem EDC

Později se mezi běžná aktivační činidla zařadil i 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chlorid (DMTMM), neboť nevyžaduje kontrolu pH v průběhu reakce. Autoři D'Esteho, Eglina a Aliniho (2014) provedli modifikaci karboxylové skupiny HA s pomocí DMTMM a to v jednotkovém stechiometrickém poměru vůči ostatním reaktantům (Obrázek 9 [20]).



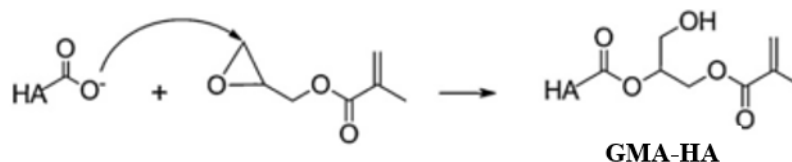
Obrázek 9: Schéma amidace za použití DMTMM

Souběžně v různých nádobách byly ve vodě rozpuštěny vstupní látky, dihydrazid kyseliny adipové (ADH) v roli aminu pro ligaci HA a HA. Oba roztoky smíchali a pomocí hydroxidu sodného a kyseliny chlorovodíkové upravili pH požadované na požadovanou hodnotu 6,5. Následně přidali DMTMM v prášku (v poměru 4:1 vůči ADH, jinak 1:1 k HA), čímž začala 5 denní chemická reakce probíhající za laboratorní teploty. Produkty byly získány srážením, a poté důkladně promyty ethanolem a sušily se ve vakuu za 38 °C po dobu 3 dnů. Jedna z možností jak dosáhnout vyššího stupně substituce ($DS \geq 80\%$) spočívala ve výměně vodního prostředí za dimethylsulfoxid (DMSO, organické rozpouštědlo), díky které dochází k eliminaci hydrolyzy EDC nebo vysoce hydrofobního substituentu.

Esterifikace

Esterifikace představuje chemickou modifikaci karboxylové skupiny za vzniku esterů pomocí diazomethanu, jejímiž průkopníky se stali Jeanloz a Forchielli (1950). Jednalo se o reakci, která probíhala v prostředí DMSO z výstupní tetrabutylamoniové soli kyseliny hyaluronové (HA-TBA). Hirano a spol. (2005) později prezentovali přípravu methylesteru HA v přítomnosti trimethylsilyldiazomethanu (TMSD) jako aktivačního činidla karboxylové skupiny. Při aktivaci HA dochází ke vzniku meziprojektu, který následně podléhá reakci s kyselinou octovou za vzniku produktu ve formě methylesteru.

Tvorba esterů může probíhat i s pomocí epoxidů, kdy HA reaguje s glycidylmethakrylátem (GMA) a katalyzátorem triethylaminem ve vodném prostředí za vzniku produktu methakrylátového HA (Obrázek 10). Esterifikace, kdy je výsledným produktem méně hydrofilní ester, představuje oceněnou strategií při snížení rozpustnosti HA ve vodě.



Obrázek 10: Reakční schéma esterifikace za produktu GMA-HA

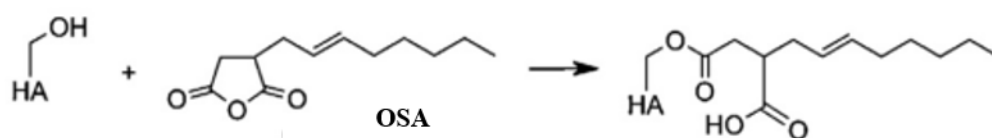
4.4.2 Modifikace skupiny OH

Vedle probíhajících modifikací hydroxylových skupin HA se karboxylové skupiny stejného řetězce nemění. V experimentech této metody se, díky probíhajícím reakcím mezi

hydroxylovými skupinami polymeru a mono-/bifunkčními, činidly, dosahuje různých derivátů HA (estery, ethery, poloacetalu).

Esterifikace

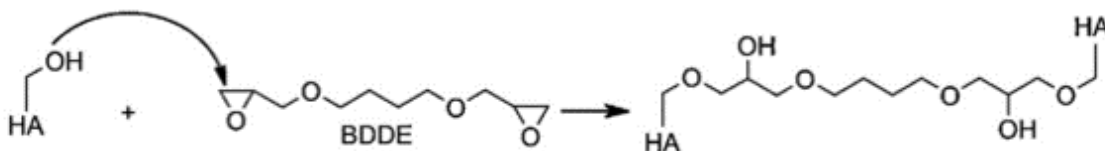
Mezi významné modifikace hydroxylových skupin hyaluronového řetězce lze zařadit esterifikaci. K přípravě esteru se využívá třeba oktenylsuknicidanhydridu (OSA) ve vodném prostředí (při zásaditém pH), kdy hydroxylové skupiny HA reagují s OSA za vzniku esterových vazeb, jak je znázorněno na Obrázku 11 [29].



Obrázek 11: Reakční schéma esterifikace HA za vzniku esterových vazeb

Eterifikace

Modifikací hydroxylových skupin HA epoxidy dochází ke vzniku etherových vazeb. HA je při této reakci vystaven silně zásaditému pH ($\text{pH} > 13$), jeho hydroxylové skupiny podléhají deprotonaci. Když se tedy epoxidový kruh otevře, reaguje s hydroxylovými skupinami za vzniku etherových vazeb, viz Obrázek 12, kde HA reaguje s butandiol-diglycidylether (BDDE) [14; 29].

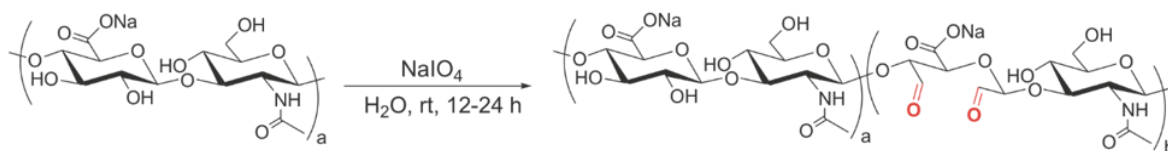


Obrázek 12: Reakční schéma eterifikace

4.4.3 Příprava dalších funkčních skupin na polymerním řetězci HA

Příprava oxo skupin

Bao a spol. (2021) popsal oxidaci hyaluronanu použitého při výrobě hydrogelového filmu na bázi glykol-chitosanu/hyaluronan s možností jeho aplikace v oftalmologii. Oxidovanou formu HA ($M_w = 800$ kDa) připravili jejím rozpuštěním v destilované vodě při 4 °C (přes noc), s následným přidavkem oxidačního činidla (jodistanu sodného (NaIO_4)). Reakční nádobu zakryli pro nulovou interakci jodu se světlem. Reakci nechali běžet v závislosti na čase (2 hodiny, 4 hodiny a 8 hodin). Reakce byla poté ukončena přidavkem ekvimolárního množství ethylenglykolu za účelem vychytání nezreagovaného NaIO_4 (Obrázek 13). Připravený produkt byl purifikován pomocí dialýzy v destilované vodě s následnou lyofilizací (prášková forma produktu). Ověření syntézy bylo podloženo charakterizací produktu prostřednictvím NMR spektroskopie [31]. NaIO_4 zde působí jako modifikátor hydroxylové skupiny řetězce za následku přerušení vazeb mezi uhlíky a vytvoření dvou aldehydových skupin [32].



Obrázek 13: Reakční schéma oxidace hyaluronanu

4.4.4 Síťování HA

Alternativní způsob modifikace HA představuje proces síťování, který je založený na vzájemném propojování řetězců HA (výchozích či konjugovaných), přes polyfunkční sloučeniny minimálně dvěma kovalentními vazbami, za vzniku 3D sítě. Síťovacím procesem se mění molekulová hmotnost, mechanické vlastnosti a tepelná odolnost polymeru [14; 33]. Zlepší se hlavně jeho reologické a botnací vlastnosti. Na druhou stranu síťovací proces může snížit rychlost degradace, což nemusí být vždy žádoucí. Dnešní výzkumy se snaží do role adované monofunkční molekuly dosazovat bioaktivní molekuly pro vývoj derivátů s přizpůsobenými vlastnostmi pro charakteristické aplikace, např. v tkáňovém inženýrství. [14; 34]. Pro některé síťovací reakce je důležitá přítomnost síťovacího činidla. V reakci s deriváty HA-aminů se pracuje s bis(sulfosukcinimidyl)suberátem (BS3) nebo 2-methylsuberimidátem (DMS), které vyžadují zásadité prostředí ($\text{pH} > 8$). V reakci s proteiny je nejrozšířenějším síťovadlem glutaraldehyd (GA), který se podílí na vytvoření sítě, vysoce

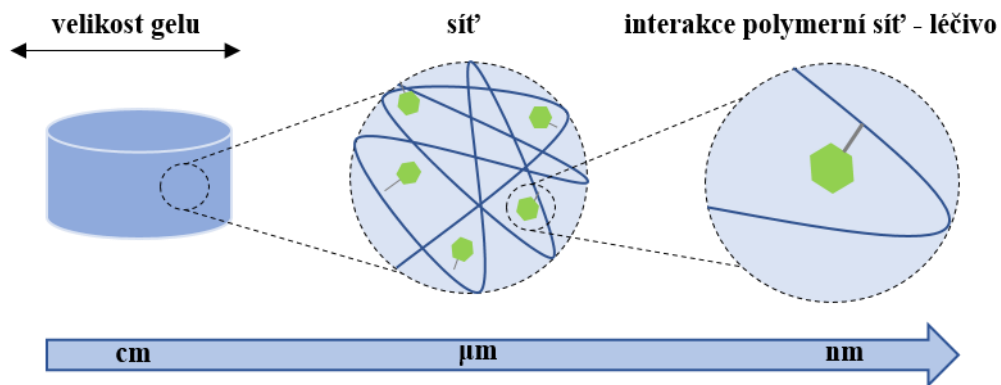
odolné proti jejímu rozpuštění (degradaci) ve vodě [34; 35]. Přítomnost syntetického síťovadla ale není pravidlem, neboť existují i procesy síťování, které bez použití síťovacího činidla pracují stejně efektivně. Příkladem je výzkum Shua a spol. (2002), ve kterém připravili hydrogel pomocí síťování HA-disulfidových derivátů z výchozího thiolovaného hyaluronanu [29].

4.5 Hydrogely

Hydrogely tvoří spolu s organogely (gely jejichž disperzní prostředí tvoří organická kapalina) podskupinou gelů, které se dělí na základě charakteru obklopujícího prostředí. Organogely se nachází v prostředí organické kapaliny, zatímco hydrogely ve vodném disperzním prostředí [36]. Hydrogely jsou viskoelastické 3D polymerní sítě se schopností vázat na sebe velké množství vody (až na 40 násobek své suché hmotnosti), aniž by došlo k jejich úplnému rozpuštění [7; 37]. Tato síť vzniká vzájemným propojením zesíťovaných polymerních řetězců, které nejčastěji zajišťují *kovalentní vazby, fyzikální interakce, vodíkové vazby a van der Waalsovy vazby* prostřednictvím určitých funkčních skupin (např. -OH, CONH₂, -COOR) [7]. Pro své přizpůsobivé vlastnosti a snadnou přípravu, např. z kolagenu, hyaluronanu a heparinu, nachází rozsáhlé využití převážně v biomedicínských aplikacích. Hydrogely mohou být součástí systémů pro podávání léků [38; 39]. Přírozeně podléhá vývoji i tato sféra technologií, a to ve formě upřednostňování syntetických hydrogelů před hydrogely čistě na bázi přírodních polymerů. Využívané jsou i hydrogely na bázi přírodních a syntetických polymerů. Důvodem neutuchajícího vývoje pokročilých hydrogelů, jsou delší životnost a zvýšení pevnosti gelu [37; 40].

4.5.1 Typy hydrogelů

Na základě literatury lze hydrogely rozdělit podle různých kritérií např. dle výchozích materiálů použitých při jejich přípravě na hydrogely přírodní nebo syntetické. Mezi přírodní hydrogely se řadí kolagen, hedvábný fibroin, kyselina hyaluronová, chitosan a další. Do syntetických se řadí třeba N-isopropylakrylamid (NIPAAm) a kyselina methylenjantarová (IA) [40]. Hydrogely lze rozdělit i na základě způsobu vzniku trojrozměrné sítě - síťování, na hydrogely fyzikální a chemické. Právě síťovanou strukturu hydrogelu lze využít při záchytu a uvolňování léků či biomolekul (Obrázek 14) [33; 41].



Obrázek 14: Zobrazení hydrogelu z pohledu velikosti

Fyzikální síťování

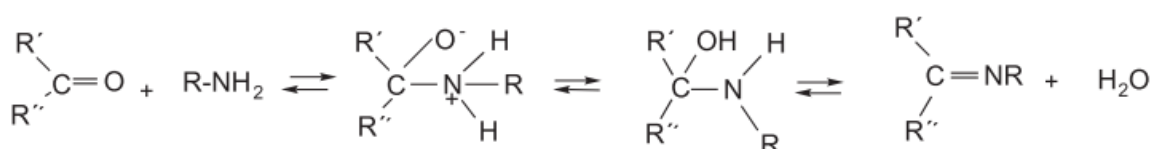
Je založeno na nekovalentních interakcích, kdy spolu polymerní řetězce interagují po určité délce. Toto síťování zprostředkovávají intramolekulární síly, konkrétně vodíkové vazby, hydrofobní interakce a elektrostatické iontové síly. Hydrofobní interakce jsou založeny na spojení hydrofobních bloků s těmi hydrofilními za vzniku polymerního amfifilu. Při zvýšení teploty podléhají hydrofobní bloky agregaci a jeho výsledná délka tak spolu s koncentrací polymeru ovlivňuje teplotu, kdy dochází k fázové změně v gel. Zajímavý experiment byl realizován Ohanou a spol. (2001), kde síťovali kolagenový film za působení UV záření. Tento katalyzátor dočasně vylepšil fyzikální vlastnosti analyzovaných kolagenových filmů, což se promítlo do zvýšení stupně zesíťování a snížení botnacího poměru. Dalším krokem však bylo vytvoření podmínek inkubace v kolagenáze (enzym rozkládající kolagen), kde filmy zcela degradovaly, a fyzikální vlastnosti kolagenových filmů se vrátily do těch původních [34; 42].

Chemické síťování

Spojuje polymerní řetězce prostřednictvím kovalentní vazby. Patří sem optické a radikálové polymerace, enzymatické reakce a další. I když jsou kovalentní interakce silnější než ty nekovalentní a dosahuje se jimi lepší mechanické stability gelu, jsou fyzikálně síťované hydrogely, hlavně v oblasti biologických aplikací, upřednostňovány. Součástí chemického síťování bývají totiž síťovadla, která zvyšují toxicitu výsledného hydrogelu (př. glutaraldehyd) a není jim umožněno podílet se na biomedicínských aplikacích [18; 41]. Další možností síťování je i kombinace zmíněných procesů síťování [33; 37].

Metoda Schiffovy báze

Tato síťovací technika zprostředkovává reakci mezi makromolekulami, které na svém polymerním řetězci mají alkoholové, aminové nebo hydrazidové funkční skupiny, jejíž výsledkem je polymerní síť. Na Obrázku 15 níže je znázorněn průběh kondenzační reakce karbonylové sloučeniny s primárním aminem. Dusík aminové složky se aduje na tzv. chirální uhlík (uhlík s vzájemně odlišnými substituenty) karbonylové skupiny a reverzibilně přechází do karbinolaminu (meziproduktu). Následná eliminace vody vede ke vzniku vazby C=N, tedy *Schiffovy báze* [43; 44].



Obrázek 15: Názorný vznik *Schiffovy báze*

Jelikož tato metoda nevyžaduje náročné reakční podmínky, dá se použít i pro interakce s buňkami [43].

4.5.2 Vlastnosti

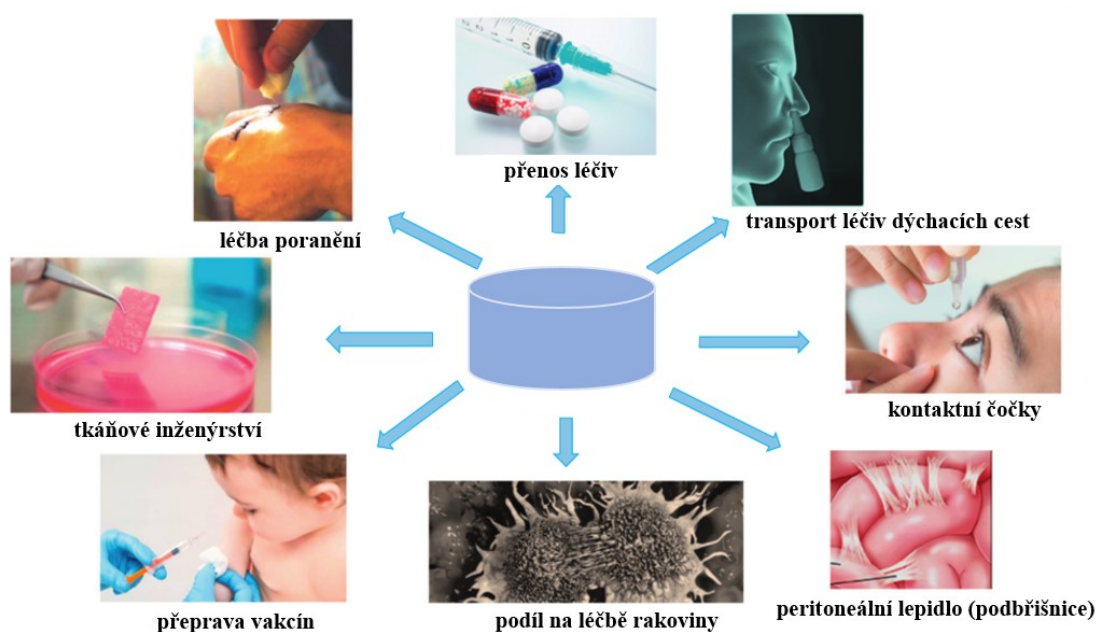
Mezi významné vlastnosti přírodních hydrogelů se řadí jejich biokompatibilita, biodegradabilita a nízká toxicita [37]. Vlastnosti syntetických hydrogelů se formují na základě jejich objemové struktury. Hydrogely mají obecně, ve srovnání s jinými biomateriály, vyšší obsah vody a vyvinutější porézní strukturu, což se spolu s botnatelností a stabilitou dá regulovat (pro specifické aplikace). V oblasti biomedicíny jsou injekční hydrogely obohaceny ještě o dobrou viskozitu a biologickou odbouratelnost [33]. Jejich porozitu lze řídit změnou hustoty zesílení gelu. Při porovnání hydrogelů připravených metodami fyzikálního a chemického síťování, mají ty chemicky injektovatelné lepší mechanické vlastnosti a déle trvající stabilitu. Použití toxických síťovacích činidel však může negativně ovlivnit biokompatibilitu výsledného produktu, což nemusí být vždy žádoucí. Syntetické hydrogely vykazují stabilitu i za nestandardních podmínek, jakou je vysoká teplota nebo vysoce kyselé či příliš zásadité prostředí [7; 40].

Díky fyzikálním interakcím v polymerní síti mohou hydrogely nabývat různých tvarů a velikostí. O tom, jaké množství vody mohou tyto sítě díky své hydrofilní povaze absorbovat a zadržovat, rozhodují určité parametry. Jedná se o stupeň zesílení, strukturu hydrogelu a složení roztoku. Důležitý je i objemový podíl v nabobtnalém stavu, který udává, jaké

maximální množství tekutiny může být absorbováno a zadrženo. Jejich aplikace je rozsáhlá, neboť dokážou imitovat některé vlastnosti biologických tkání, jako jsou třeba ty fyzikální, elektrické a biologické [7]. Konkrétně biologickým vlastnostem napomáhá nízké mezipovrchové napětí s vodou a biologickými tekutinami. Hydrogel je možné upravit pro reakci na určité podněty v těle, jako je pH, iontová síla a teplota (aplikace viz Obrázek 16 [45]), na základě jeho chemické struktury a sítě. Hydrogely, které reagují na změnu pH závisí tyto vlastnosti na navázaných skupinách polymerního řetězce. Takové hydrogely totiž mají požadované fyzikální a chemické vlastnosti jen v daných oblastech pH. Kyselé adované skupiny při vysokém pH podléhají deprotonaci (odstranění protonu za vzniku konjugované báze), zatímco ty zásadité protonují za nízkého pH. Díky asociacím, disociacím a vazbám různých iontů probíhajících na polymerních řetězcích, hydrogel ve vodném roztoku botná [40].

4.5.3 Aplikace

Hydrogely se vyskytují v široké oblasti aplikací. Od kontaktních čoček, přes obvazy pro regeneraci tkání a 3D regenerační sítě. Porézní struktura hydrogelů zajišťuje hladší průběh transportu léčiv a biomolekul, neboť díky pórům nedochází k poškození přenášeného léku.



Obrázek 16: Využití termosenzitivních hydrogelů

Uvolňování léčiva a jejich difuze jsou stále omezené. V souvislosti s tím se provádí modifikace založená na kovalentním zesílení se sacharidovou nebo aminovou funkční skupinou za účelem snížení naředění polymeru ve vodě. Dalším přístupem k získání

požadovaných vlastností hydrogelu je použití směsí různých polymerů. Vytvoří se 3D struktura *scaffoldů* ze směsi např. kolagen/chitosan za přítomnosti GA, tak aby došlo ke zlepšení jejich stability a mechanických vlastností [34]. Technologickým pokrokem v oblasti hydrogelů, jsou hydrogely obohacené o nanočástice, které zvyšují jeho mechanickou pevnost, a využívají se v systémech pro přenos léčiva s řízeným profilem uvolňování [7; 37; 40]. V oblasti bioinženýrství, našly využití i hydrogely citlivé na světlo, konkrétně v oblastech dodávání léků, mikročoček a senzorů. Tato úprava se týká např. reverzibilního přechodu sol – gel, kdy po ozáření světlem o vlnové délce 355 nm přejde gel do své fáze solu. Opačný přechod (ze solu v gel) se uskuteční při ozáření světlem o vlnové délce 450 nm [40]. Vysoce hydratované hydrogely, s mechanickými vlastnostmi podobným tkáním, jsou schopné vyhovět požadavkům tkáňového inženýrství v kombinaci buněk a různých tkání *in vitro* a *in vivo* za sestrojení 3D regenerační sítě. Tam zvládnou vytvořit prostředí, které umožňuje buňkám růst a interakce s okolním prostředím [40]. Hyaluronan je považován za důležitý vstupní materiál pro oblast přítomné i budoucí regenerativní medicíny [46].

4.5.4 Charakterizace a její metody

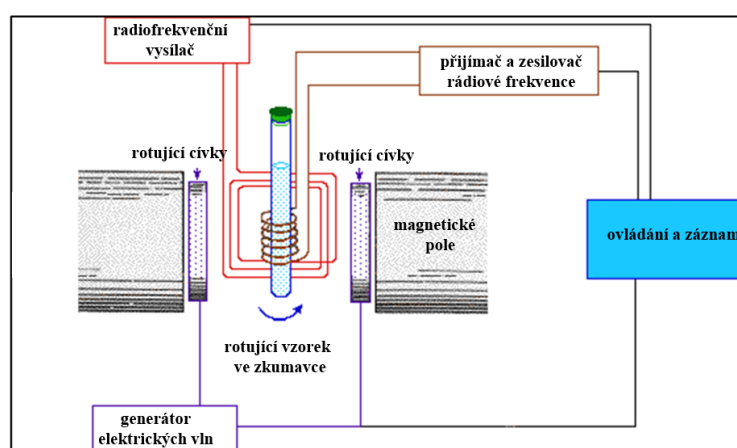
Hydrogely lze charakterizovat na základě jejich využití, a to přednostně podle velikosti gelu a jeho schopnosti botnat. Důsledkem objemových změn hydrogelu může být změna vnějších podnětů, příkladem teplota a pH. Bylo zjištěno, že pevnost gelu závisí na hustotě sítě. Tedy čím je síť hustější, tím je hydrogel pevnější a může absorbovat méně vody. Na stupeň botnání má vliv i elastická síť hydrogelu, která udává horní hranici rozpustnosti hydrogelu. Absorpci vody ovlivňuje také poréznost a chemické složení hydrogelu. Síť hydrogelu připravená z hydrofilních monomerů přejde ze stavu sol do gelu po překročení bodu gelace, který lze určit pomocí reologie (bod, ve kterém hodnota storage modul (G') dosahuje stejné hodnoty jako má loss modul (G'')). Následně probíhá proces do síťování, během kterého probíhají úpravy parametrů, tak aby měl hydrogel požadovanou strukturu [37].

Metody analýzy hydrogelu lze obecně rozdělit do 5 skupin, a to na charakterizace fyzikálních, mechanických, reologických, biologických a chemických vlastností. Rozbor fyzikálních vlastností zahrnuje analýzu např. botnacího poměru, tepelné stability, porozity atd. Výsledky z těchto analýz nachází využití v biomedicínských a inženýrských aplikacích. U hydrogelu se rovněž analyzují mechanické vlastnosti, kterých se využívá např. u senzorů, neboť při manipulaci s elektronikou je potřeba dodržovat určité mechanické požadavky. Mechanické vlastnosti lze nejčastěji popsat pomocí modulu pružnosti (z měření Youngova

modulu pružnosti), nebo zkoušky pevnosti v tahu a tlaku [37; 47]. Cílem analýzy reologických vlastností je charakterizace viskoelastického chování hydrogelů. Měření probíhá nejčastěji na rotačním reometru, pomocí tzv. dynamického oscilačního testu. Výsledky testů biologických vlastností *in vitro* a *in vivo* představují pro plno aplikací stěžejní informace. Popisují zejména interakci hydrogelu s buňkami či bakteriemi, (v případě *in vitro*) spolu s cytotoxicitou a antibakteriálními vlastnostmi testovaného hydrogelu. Charakterizace chemických vlastností je založena především na analýze chemického složení sítě. Výsledky této práce byly charakterizovány výhradně touto metodou, neboť bylo potřeba potvrdit přítomnost nových funkčních skupin zavedených na polymerní řetězec HA. Mezi její základní techniky se řadí spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR) a skenovací elektronová mikroskopie (SEM). Často se využívá také infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR) [47-49].

Nukleární magnetická rezonance (NMR)

NMR představuje nedestruktivní metodu používanou pro spektrální potvrzení chemického složení látek. Princip NMR měření (viz Obrázek 17 [50]) spočívá ve sledování reakce jader atomů vzorku na vložené neionizující záření v magnetickém poli, konkrétně absorpci elektromagnetické energie jádra neradioaktivního izotopu. Role takového izotopu je podmíněna vlastností magnetického momentu nebo spinu, z velké části se jedná o všechny izotopy vodíku (^1H , ^2H , ^3H). Metoda nachází využití zejména u polymerů, které byly mimo svou primární strukturu obohaceny o funkční skupiny podléhající síťování.



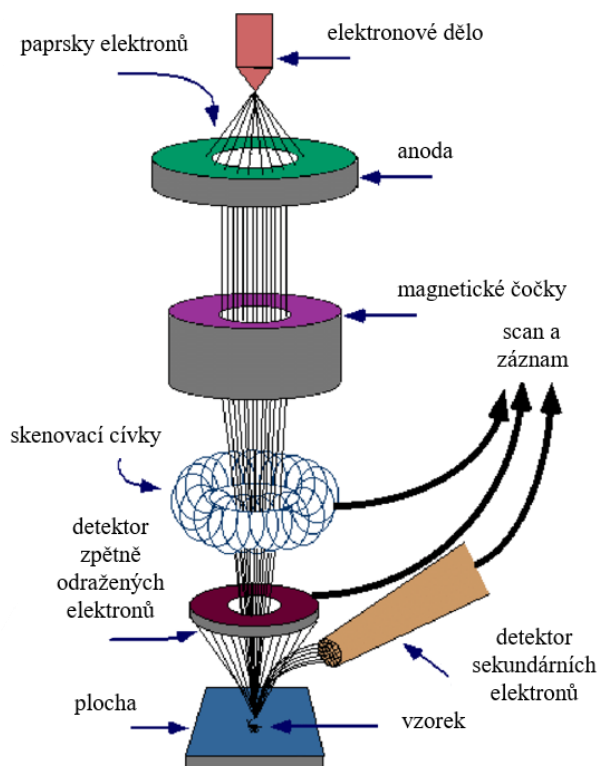
Obrázek 17: Princip měření NMR spektroskopie

Výsledkem měření je NMR spektrum reflektující chemické složení vzorku (přítomnost konjugovaných skupin) i jejich množství (*substitution degree*, DS). Pro stanovení DS

hyaluronanu, se do role reference většinou používají protony methyly (-CH₃) N-acetylové skupiny HA o definované hodnotě píku 1,95 ppm (*parts per million*). Při syntéze různých derivátů HA totiž probíhá modifikace na tomto místě polymerního řetězce jen ve výjimečných případech. Pro polymerní síť spojené *Schiffovou bází* se stanovuje molární poměr aminových/aldehydových skupin [29; 47; 51].

Skenovací elektronová mikroskopie

Analýza pomocí SEM poskytuje informaci o morfologii povrchu vzorku (př. suchého HA derivátu) za jeho nedestruktivního skenování, viz obrázek 18 [29; 52]. Měření probíhá v hlubokém vakuu, kdy se pozorují sekundární (odražené) elektrony. Skenovací elektronový mikroskop umožňuje kvalitně zaostřený pohled i v případě velkého přiblížení. Parametry přístroje se většinou pohybují v rozmezí 1 μm až 1 nm. Na rozdíl od optického mikroskopu u něj nezáleží na charakteru povrchu vzorku. Dosahuje taky znatelně efektivnějšího zvětšení, a to až 1·10⁶x s konečným rozlišením cca 5 nm (záleží na hraničních parametrech používaného přístroje).



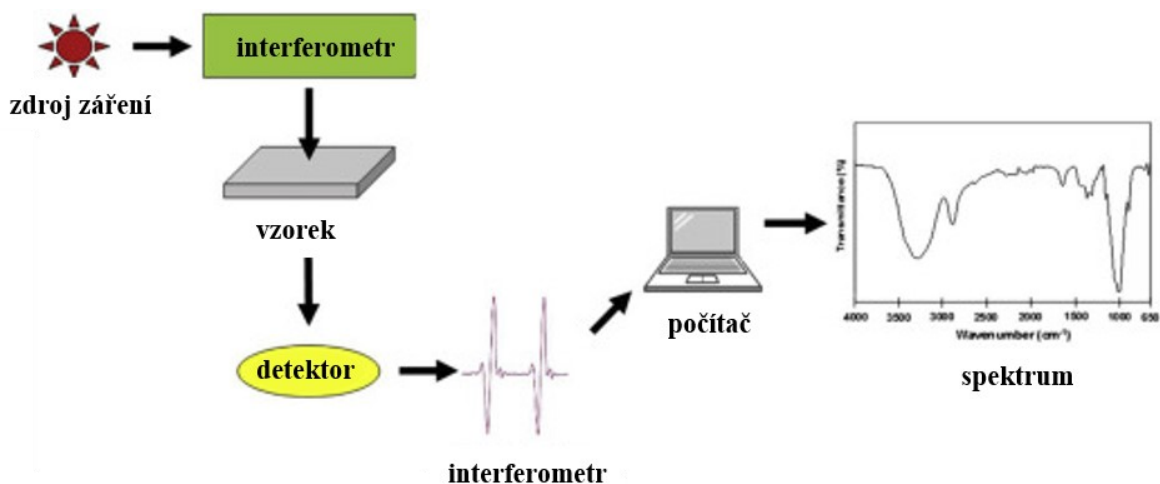
Obrázek 18: Schéma elektronového mikroskopu

Příprava vzorku na SEM analýzu začíná jeho lyofilizací či sušením, následuje provedení příčného řezu (pro odhalení pórovité struktury) a nalepení vzorku (vnitřní části směrem ven)

na oboustrannou lepicí pásku na kovový terčik. Vzorek nemusí být dokonale vyhlazený, ale pro jeho neporušení a kvalitnější zobrazení je lepší, pokud se před měřením pokryje vrstvou kovu (Au, Pt). Do SEM se vloží prostřednictvím nástavce pro vodivý vzorek, nastaví se požadované podmínky měření a začíná vlastní analýza. SEM metoda se často využívá pro charakterizaci porézní struktury materiálu. Mezi další informace, kterých lze s využitím této metody získat patří např. popis krystalové struktury, chemického složení a elektrických vlastností vzorku. Pokud je třeba sledovat průběh chování materiálu v závislosti na tepelných změnách prostředí, je možné tyto podmínky (horké/chladné) nastavit připojením příslušného zařízení [53].

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

Jedná se o základní analýzu struktury proteinů, kdy se vibrující vazby atomů promítají v infračervené oblasti spektra (IR) $\lambda \approx 750 - 1100$ nm. Výstupem této metody je spektrum, díky jehož zpracování se přes charakteristické spektrální absorpční pásy (rozdělené podle typů vibrace a skupin atomů, které tento pohyb provádí) dají určit funkční skupiny (typ vytvořené vazby) přítomné v polymerní síti, které vznikly modifikací. Pro měření povrchové vrstvy vzorku se z FT-IR analýz používá metoda *Attenuated total reflectance* (ATR). [29; 47; 54]. Postup při měření vzorku je uveden na Obrázku 19 [55].

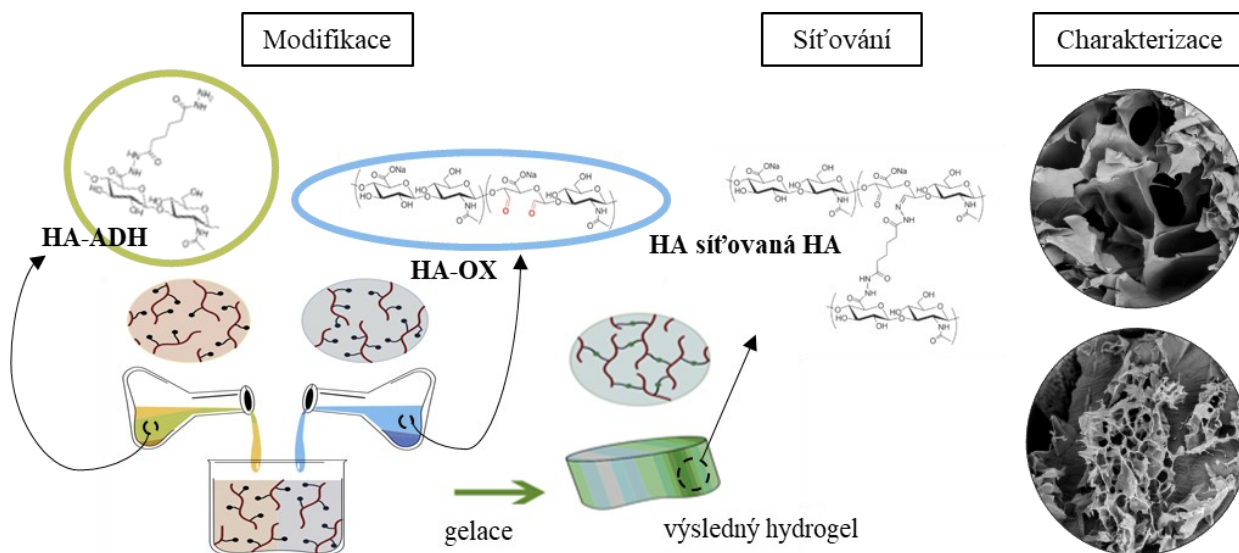


Obrázek 19: Princip měření vzorku pomocí metody FT-IR

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 POPIS EXPERIMENTU

Experimentální část této práce se zabývá přípravou hydrogelů na bázi modifikované kyseliny hyaluronové (amidace a oxidace HA) za vzniku tzv. *Schiffovy báze* a jejich následné charakterizaci. Navržený experiment je možné rozdělit do několika fází, jak je naznačeno na obrázku Obrázek 20 [43]. Na samém začátku (první fáze) byla provedena modifikace hyaluronanu z důvodu zavedení funkčních skupin (oxo, amino) na polymerní řetězec HA. Zisk (NH₂) skupin na HA byl zprostředkován pomocí navázání dihydrazidu kyseliny adipové (ADH) na nativní řetězec HA, které probíhalo v přítomnosti různých aktivačních činidel (DMTMM a EDC). Tato činidla byla vybrána za účelem jejich vzájemného srovnání (čistota produktu, jednoduchost reakce, účinnost modifikace (DS)). Příprava oxo skupiny do polymerního řetězce HA bylo zprostředkováno pomocí oxidační reakce. Modifikace HA byly provedeny v závislosti na molekulové hmotnosti HA, molárním poměru jednotlivých složek a podmínek reakce obou modifikací. Zesíťovaný hyaluronan (druhá fáze) byl připraven v poměru 1:1 za vzniku hydrogelu. Výsledný hydrogel byl poté lyofilizován a charakterizován (gelační čas, SEM) (třetí fáze).



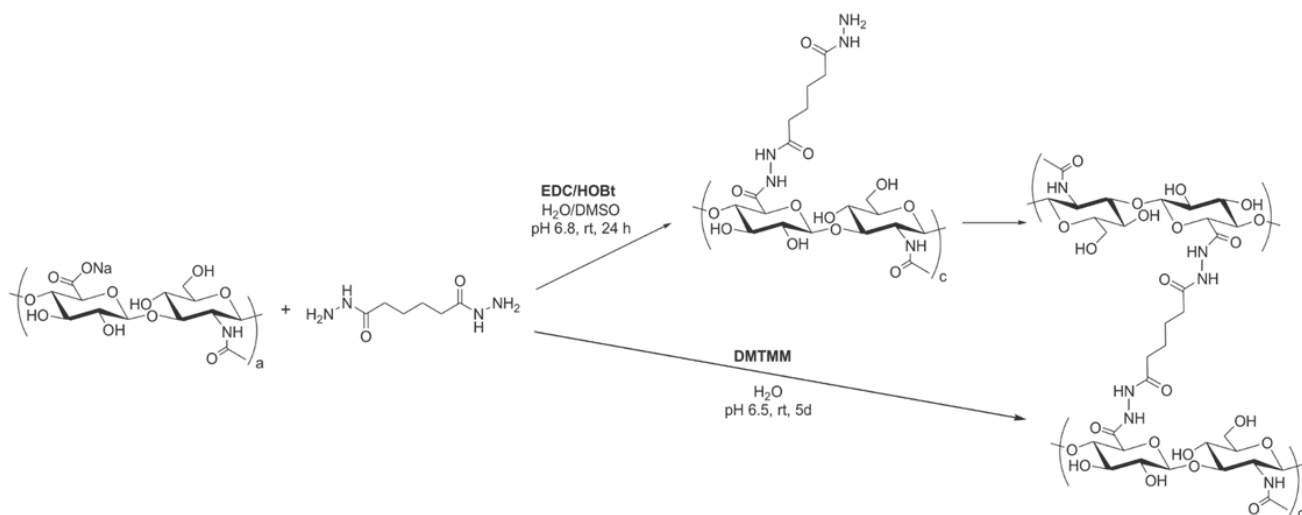
Obrázek 20: Návrh prováděného experimentu

5.1 Použité materiály

K přípravě hydrogelů byla použita kyselina hyaluronová (kosmetické čistoty) o různé molekulové hmotnosti (124 kDa, 243 kDa, 1,18 MDa a 1,5 MDa) – od firmy Contipro group, a.s. (Dolní Dobrouč, Česká republika). Při modifikacích byly použity tyto materiály: deionizovaná voda (demi), dihydrazid kyseliny adipové (ADH), 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chlorid (DMTMM), 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)-propyl]-karbodiimid (EDC), hydrogenuhličitan sodný (NaHCO_3), chlorid sodný (NaCl), 1-hydroxybenzotriazol (HoBt), dimethylsulfoxid (DMSO) a dialyzační membrány (SnakeSkin™ (MWCO 3500, vnitřní průměr 35 mm), Spectra/Por 4 (MWCO 12-14kDa, vnitřní průměr 32 mm)). Pro úpravu pH se používaly roztoky kyseliny chlorovodíkové (HCl) a hydroxidu sodného (NaOH). Na přípravě oxidované formy HA bylo použito oxidační činidlo jodistan sodný (NaIO_4), pentahydrát thiosíranu sodného ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Při stanovení stupně oxidace (HA-OX) byl použit 0,25N roztok hydroxylamin hydrochloridu (p.a), 0,1M NaOH (p.a), 0,1 M kyseliny šťavelové (COOH)₂ a fenolftaleinem (barevný indikátor). Modifikovaná HA byla pro další analýzu rozpuštěna ve 0,1M fosfátovém pufru (pH=7,4

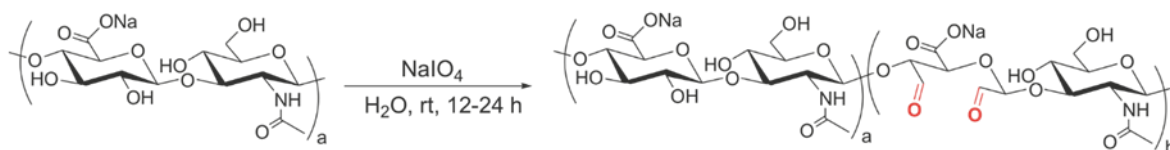
5.2 Syntézy HA

Z důvodu přípravy hydrogelu na bázi HA síťovaného pomocí *Schiffovy báze*, bylo potřeba nejprve připravit dvě modifikace hyaluronanu (amidace a oxidace). Zavedení aminoskupiny (NH_2) do nativního HA bylo dosaženo navázáním ADH, různými aktivačními činidly DMTMM a EDC (viz Obrázek 21), tedy tzv. amidace, jejíž schéma popisuje obrázek 21.



Obrázek 21: Schéma amidace HA pomocí různých aktivačních činidel

Druhým typem modifikace HA byla oxidace, díky které došlo k „rozevření kruhu“ disacharidové jednotky, jehož výsledkem byl získ aldehydické (oxo) skupiny (CHO), jak je uvedeno na obrázku (viz Obrázek 22).



Obrázek 22: Reakční schéma oxidace HA

5.2.1 Příprava amidované formy hyaluronanu (HA-ADH) pomocí DMTMM

Před samotnou modifikací hyaluronanu byly nejprve navoleny podmínky vlastní reakce (ekvimolární poměry reaktantů, navážka a koncentrace polymeru, podmínky reakce (teplota, čas, pH). Amidaci HA pomocí DMTMM byl nejprve připraven 2,2% (w/w) HA (5g; 0,0125 mol; 1 ekvimolární množství, $M_w = 124$ kDa, $M_w = 243$ kDa) jeho rozpuštěním v demineralizované vodě (25 °C, po dobu 24 hodin). Do připraveného roztoku bylo poté přidáno ADH (2,18 g ADH v 25 ml demineralizované vody; 0,0125 mol; 1 ekv. mn.) a pH roztoku bylo upraveno na hodnotu pH = 6,5 (pomocí 0,1M HCl a 0,1M NaOH) a udržováno po dobu 2h. Po uplynutí potřebné doby bylo k reakční směsi přidáno 0,86 g DMTMM (ve formě prášku; 0,00313 mol; 0,25 ekv. mn.). Tato reakční směs byla ponechána za stálého míchání při laboratorní teplotě 24 hodin. Po ukončení reakce byla reakční směs přelita do dialyzační membrány za účelem její purifikace. Prvních 24 hodin probíhala dialýza proti roztoku soli (12,5 g NaHCO_3 a 12,5 g NaCl do 10 l demi vody). Další 2-3 dny se reakční směs dialyzovala proti demi vodě. Výsledný roztok byl zamražen na teplotu -18 °C zamražen a následně na teplotu -79°C. Takto připravené vzorky byly vloženy do lyofilizátoru a po ustálení teploty na -80 °C byla zahájena hlavní fáze sušení při tlaku 0,06 mbar. Hlavní sušení probíhalo 30 hodin, po něm ihned začala druhá fáze konečného sušení při tlaku 0,001 mbar v délce trvání 10 hodin. Výsledným produktem byla pevná (vláknitá) forma amidovaného hyaluronanu (HA-ADH). Na základě výše uvedeného postupu tak byly připraveny 4 modifikace HA-ADC s aktivačním činidlem DMTMM jak uvádí Tabulka 1.

Tabulka 1: Amidace HA s aktivačním činidlem DMTMM

| pořadí modifikace | aktivační činidlo | M _w (kDa) | původní m (g) | čas reakce (h) | výtěžnost reakce (%) |
|-------------------|-------------------|----------------------|---------------|----------------|----------------------|
| 1 | DMTMM | 124 | 0,1 | 24 | 113,0 |
| 2 | DMTMM | 243 | 0,3 | 24 | 97,7 |
| 3 | DMTMM | 243 | 5,0 | 24 | 101,5 |
| 4 | DMTMM | 124 | 5,0 | 24 | 92,3 |

5.2.2 Příprava amidované formy hyaluronanu (HA-ADH) pomocí EDC

Při amidaci HA pomocí EDC bylo postupováno následovně. Nejprve byl připraven 2,2% (w/w) HA (5g; 0,0125 mol; 1 ekvimolární množství, M_w = 124 kDa, M_w = 243 kDa) jeho rozpuštěním v demineralizované vodě (25 °C, po dobu 24 hodin). Do připraveného roztoku bylo poté přidáno 26,13g ADH (ve formě prášku; 0,15 mol; 30 ekv. mn.) a pH roztoku bylo upraveno na hodnotu pH = 6,8 (pomocí 0,1M HCl a 0,1M NaOH). Následně bylo k HA směsi za stálého míchání přidáno 3,834 g EDC (0,02 mol; 4 ekv. mn.) a 2,7024 g (ve formě roztoku (14 ml DMSO:voda, poměr 1:1), 0,02 mol; 4 ekv. mn.) HoBt. Přídavek HoBtu vyvolal prudké snížení pH, které bylo potřeba okamžitě upravit na původní hodnotu pH= 6,8 (pomocí 0,1M HCl a 0,1M NaOH) a udržováno po dobu 2 h. Takto připravená reakční směs byla ponechána za stálého míchání při laboratorní teplotě v průběhu dalších 21 hodin. Po ukončení reakce byla reakční směs přelita do dialyzační membrány za účelem její purifikace. Prvních 24 hodin probíhala dialýza proti roztoku soli (12,5 g NaHCO₃ a 12,5 g NaCl do 10 l demi vody). Další 2-3 dny se reakční směs dialyzovala proti demi vodě. Výsledný roztok byl zamražen na teplotu -18 °C zamražen a následně na teplotu -79 °C. Takto připravené vzorky byly vloženy do lyofilizátoru a po ustálení teploty na -80 °C byla zahájena hlavní fáze sušení při tlaku 0,06 mbar. Hlavní sušení probíhalo 30 hodin, po něm ihned začala druhá fáze konečného sušení při tlaku 0,001 mbar v délce trvání 10 hodin. Výsledným produktem byla pevná (vláknitá) forma amidovaného hyaluronanu (HA-ADH). Na základě výše uvedeného postupu tak bylo připraveno 6 modifikací HA-ADC s aktivačním činidlem EDC jak uvádí Tabulka 2.

Tabulka 2: Amidace HA s aktivačním činidlem EDC

| pořadí modifikace | aktivační činidlo | M_w (kDa) | původní m (g) | čas reakce (h) | výtěžnost reakce (%) |
|-------------------|-------------------|-------------|---------------|----------------|----------------------|
| 1 | EDC | 124 | 0,1 | 21 | 104,9 |
| 2 | EDC | 243 | 0,1 | 21 | 105,7 |
| 3 | EDC | 243 | 1,0 | 21 | 101,3 |
| 4 | EDC | 243 | 2,0 | 21 | 103,1 |
| 5 | EDC | 243 | 2,0 | 21 | 115,9 |
| 6 | EDC | 124 | 2,0 | 21 | 89,4 |

5.2.3 Příprava oxidované formy hyaluronanu (HA-OX)

Z důvodu zisku aldehydických (oxo) skupin na řetězci HA byla provedena její oxidace. Nejprve byl připraven 1 % (w/w) HA (1g; 0,0125 mol; 1 ekvimolární množství, $M_w = 1,5\text{MDa}$, $M_w = 1,18\text{MDa}$) jeho rozpuštěním v demineralizované vodě (50 °C, po dobu 24 hodin). K připravenému roztoku HA byla dále přidána směs rozpuštěného oxidačního činidla NaIO_4 (0,5882 g v 10 ml destilované vody; 0,0028 mol; 1,1 ekv. mn.). Reakční směs byla poté ponechána za stálého míchání na míchadle v závislosti na čase reakce (7,5 h; 10 h; 12 h) při laboratorní teplotě (zakryto alobalem z důvodu eliminace interakce jódu se světlem). Po ukončení reakce se do směsi přidalo 4,78 ml 10% roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Přítomnost jódu se během 1 hodiny kontrolovala jodoškrobovým papírkem. Po ukončení reakce byla reakční směs přelita do dialyzační membrány za účelem její purifikace proti demi vodě. Výsledný roztok byl zamražen na teplotu -18 °C zamražen a následně na teplotu -79°C. Takto připravené vzorky byly vloženy do lyofilizátoru a po ustálení teploty na -80 °C byla zahájena hlavní fáze sušení při tlaku 0,06 mbar. Hlavní sušení probíhalo 30 hodin, po něm ihned začala druhá fáze konečného sušení při tlaku 0,001 mbar v délce trvání 10 hodin. Výsledným produktem byla pevná (vláknitá) forma oxidovaného hyaluronanu (HA-OX). Na základě výše uvedeného postupu tak bylo připraveno několik různých oxidací HA v závislosti na M_w a čase reakce jak uvádí Tabulka 3.

Tabulka 3: Parametry oxidace HA (1,5 MDa)

| pořadí modifikace | M _w (MDa) | původní m (g) | čas reakce (h) | výtěžnost reakce (%) |
|----------------------|-------------------------|------------------|----------------------|----------------------------|
| 1 | 1,5 | 0,5 | 7,5 | 95,6 |
| 2 | 1,5 | 0,5 | 10 | 56,0 |
| 3 | 1,5 | 0,5 | 12 | 109,3 |
| 4 | 1,5 | 1,0 | 10 | 71,0 |
| 5 | 1,5 | 1,5 | 10 | 67,6 |

Tabulka 4: Parametry oxidace HA (1,18 MDa)

| pořadí modifikace | M _w (MDa) | původní m (g) | čas reakce (h) | výtěžnost reakce (%) |
|----------------------|-------------------------|------------------|----------------------|----------------------------|
| 1 | 1,18 | 1,0 | 7,5 | 89 |
| 2 | 1,18 | 0,5 | 10 | 88 |
| 3 | 1,18 | 0,5 | 12 | 111,9 |
| 4 | 1,18 | 1,5 | 10 | 65 |
| 5 | 1,18 | 1,5 | 10 | 69,8 |

5.3 Metody přípravy a použité přístroje

5.3.1 Charakterizace modifikovaného hyaluronanu

Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Funkčnost provedené modifikace byla provedena pomocí nukleární magnetické rezonance (¹H-NMR) za použití spektrometru JEOL ECZ 400 (JEOL Ltd., Tokio, Japonsko). V případě stanovení ¹H je měření realizováno při frekvenci 399,78 MHz (25 °C). Všechny vzorky byly před analýzou rozpuštěny (24h T=25°C) v těžké vodě (D₂O) v koncentraci 8-9 mg/ml a poté převedeny do speciální skleněné NMR kyvety. Naměřená NMR spektra byla vyhodnocena v programu ACD/NMR Processor Academic Edition. Chemické posuny byly vztaženy k internímu standardu těžké vody (D₂O 4,75 ppm).

Z naměřených spekter byl dále určen stupeň substituce (SD %), který odpovídá molárnímu množství vázaných funkčních skupin vztažených k molárnímu množství všech dimerů HA. Stupeň substituce byl určen jako relativní poměr signálu píku N-acetylové skupiny D-glukosaminu HA(Na) odpovídající oblasti $\delta = 2$ ppm (3H protony) k signálu píku odpovídající nově vázané (-CH₂) z ADH ($\delta = 1,63$ ppm) (2H protony) dle rovnice č. 1 D'Esteo a spol. (2014).:

$$DS(\%) = \frac{\frac{HA-ADH}{2}}{\frac{HA}{2}} \cdot 100 \quad (1)$$

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR)

Přítomnost nových funkčních skupin a vazeb vytvořených na nativním řetězci HA bylo ověřeno i pomocí metody Infračervené spektroskopie (FT-IR). Analýza modifikovaného hyaluronanu byla provedena na spektrometru FT-IR Nicolet iS5 za použití ATR nástavce na germaniovém krystalu. Před vlastním měřením byl vzorek formováním v třecí misce pomocí hmoždíře, aby došlo k eliminaci vzduchových bublin ve vzorku projevujícím se tzv. „šumem“ v FT-IR spektru. Parametry samotného měření byly následující: metoda ATR, úhel dopadu záření: standardní 45°, rozsah měření: 4000-400 cm⁻¹, počet skenů: 64, rozlišení: 4cm⁻¹. Výsledné spektru bylo poté vyhodnoceno (plocha pod píkem, detekce jednotlivých pásů ve spektru).

Gelová permeační chromatografie (GPC)

Chromatografie je známý proces separace polymeru podle velikosti částic (jejich poloměru), která stanovuje jejich distribuci a molekulovou hmotnost. Proces měření je založen na průchodu materiálu porézní kolonou. Platí, že čím menší jsou částice analyzovaného vzorku, tím rychleji kolonou projdou. K jejich určení se používá detektor (viskozitní, refraktometrický, rozptylu světla) [56].

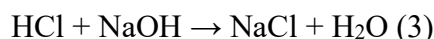
Průměrná molekulová hmotnost (M_w) modifikovaného hyaluronanu (HA-ADH, HA-OX) byla určena pomocí (SEC-MALS). Měření bylo provedeno na kapalinovém chromatografu (Shimadzu Prominence, řada LC-20, Shimadzu corporation, Kjóto, Japonsko) vybaveného UV-Vis a RI detektory. Při stanovení (M_w) byly všechny vzorky (včetně pululanových standardů, které byly použity pro sestavení kalibrační křivky založené na RI signálu) rozpuštěny (24 h, T=25 °C) v 0,15 M PBS roztoku (pH 7,4). Zbylé podmínky byly následující: mobilní fáze 0,15M PBS (pH=7,4), průtok mobilní fáze 0,8 ml/min, teplota sušárny 25 °C, kolony PL aquagel-OH 60 8 m, 300 7,5 mm a PL aquagel-OH 40 8 m, 300 7,5 mm byly zapojeny do série. Měření byla nezávisle opakována.

Stanovení stupně oxidace (SO)

Stupeň oxidace byl stanoven na základě hydroxylamin hydrochloridové metody dle autorů Zhao a Heindel (1991) [57], které probíhá dle reakce č. 2:



Aby bylo možné stanovit, na základě (rovnice č. 2), množství aldehydových (CHO) skupin, je důležité znát skutečné množství kyselin chlorovodíkové, např. na základě její neutralizace:



Při vlastním stanovení SO byly nejprve připraveny vzorky výchozího polymeru (HA, HA-OX) jeho rozpuštěním (0,1g) v objemu 25 ml 0,25N roztoku hydroxylaminhydrochloridu s přidavkem methylované (pH = 4) za stálého míchání na magnetickém míchadle po dobu min. 2h (T=25°C). Rozpuštěné vzorky byly ztitrovány pomocí 0,2M NaOH na pH 4. SO byl poté určen na základě spotřeby NaOH potřebného ke zvýšení pH měřeného roztoku na hodnotu (pH 4) dle rovnice (4):

$$SO = C_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}} \cdot \frac{M_w(\text{HA})}{m_{(\text{HA})}} \cdot \frac{100}{\frac{M_w(\text{HA})}{M_r(\text{HA})}} \cdot 10^{-3} \quad (4)$$

Kde C je skutečná koncentrace NaOH a V jeho spotřeba, M_w je molekul. Hmotnost HA (HA, HA-OX), M_r je molární hmotnost jednotky HA a m_{HA} navážka polymeru.

Skutečná koncentrace NaOH použitého při titraci byla určena pomocí 0,1M kyseliny šťavelové. Z důvodu eliminace lidské chyby při titračním stanovení, byl při titraci použit automatický titrátor Titronic® universal (SI Analytics GmbH, Mainz, Německo).

5.4 Síťování hyaluronanu

5.4.1 Příprava hydrogelů metodou Schiffovy báze

Hydrogelu na bázi modifikovaného hyaluronanu byly připraveny na základě *Schiffovy báze* mezi aminovými (HA-ADH) a aldehydovými (HA-OX) skupinami za vzniku iminové vazby (C=N). Síťovací reakce metodou *Schiffovy báze* zpravidla nevyžaduje přítomnost žádného síťovacího činidla, které zvyšuje toxicitu celého systému. Hydrogely byly připraveny smícháním roztoků (1%, 2% a 3%) HA-ADH a HA-OX vždy v ekvimolárním poměru (1:1). U takto připravených směsí byl analyzován čas potřebný k jejich plnému zesíťování (tzn. okamžik, ve kterém došlo k vytvoření pevného gelu). Na základě provedené zkoušky síťování byly vybrány nejlepší kombinace modifikovaných HA (viz Tabulka 5).

Tabulka 5: Navržené materiálové kombinace připravených hydrogelů

| Matrice | M_w |
|-------------|------------------|
| DMTMM/HA-OX | 124 kDa/1,5 MDa |
| DMTMM/HA-OX | 124 kDa/1,18 MDa |
| DMTMM/HA-OX | 243 kDa/1,5 MDa |
| DMTMM/HA-OX | 243 kDa/1,18 MDa |
| EDC/HA-OX | 124 kDa/1,5 MDa |
| EDC/HA-OX | 124 kDa/1,18 MDa |
| EDC/HA-OX | 243 kDa/1,5 MDa |
| EDC/HA-OX | 243 kDa/1,18 MDa |

5.4.2 Charakterizace hydrogelů

Skenovací elektronový mikroskop (SEM)

K určení porozity výsledných hydrogelů (v závislosti na koncentraci a M_w HA), byl využit elektronový mikroskop *Phenom G2 Pro (Phenom World)*. Všechny měřené vzorky byly před vlastním měřením lyofilizovány (viz, podmínky lyofilizace, kap. 5.2.1), seříznuty v příčném řezu (nalepeny na kovový terčík (opatřený uhlíkovou páskou)) a pokoveny palladiem v naprašovačce (po dobu 60 s, při proudu 18 mA, v atmosféře Ar). Takto připravené vzorky byly zobrazeny el. mikroskopem při urychlovacím napětí 10kV. Celková porozita výsledných snímků byla analyzovaná pomocí funkce *threshold* v PC programu *ImageJ*. Velikost pórů a jejich rozprostření vyhodnotil program *Image J*.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Jak se již uvádí výše, připravovaly se dva typy modifikace hyaluronanu. Amidace v přítomnosti DMTMM nebo EDC a oxidace. Míra efektivity těchto modifikací se vyhodnotila charakterizacemi pomocí metod NMR, FT-IR, GPC a titrace (jen HA-OX). Na základě výsledků z těchto měření a posouzením časů gelace se vybraly jednotlivé kombinace HA-ADH a HA-OX pro síťovací reakce za vzniku hydrogelů. Charakterizace připravených hydrogelů zahrnovala SEM.

6.1 Modifikace HA-ADH a HA-OX

Jak už bylo uvedeno v předchozí části práce, cílem experimentální části bylo připravit hydrogely na bázi hyaluronanu na základě *Schiffovy báze*. Z toho důvodu byly provedeny 2 různé způsoby jeho modifikace (amidace, oxidace), jejichž schéma shrnuje obrázek 21, respektive obrázek 22. V případě amidace bylo postupováno na základě rozdílných přístupů za použití DMTMM a EDC. Při samotném porovnání použitých aktivačních látek je zásadní zmínit, že DMTMM je látka, ve srovnání s klasickými vazebnými činidly, jako je např. EDC (poločas rozpadu ve vodě 3,9h při pH 5,0), velmi dobře rozpustná a stabilní ve vodě při pokojové teplotě [58]. Lze navíc předpokládat, že amidace hyaluronanu zprostředkovaná pomocí DMTMM probíhá prostřednictvím aromatické substituce za vzniku meziproductu *s-triazinového esteru HA* reaktivního vůči aminům, jak v kyselém tak zásaditém pH oblasti. Naopak jedním z hlavních omezení konjugace HA pomocí EDC/HoBt je nutnost přesné kontroly pH v průběhu reakce. Což souvisí se skutečností, že iniciace NHS/HoBt esteru HA vyžaduje kyselé pH, zatímco nukleofilní útok aminu pouze neutrálním nebo alkalickým pH, ve kterém je NHS/HoBt ester HA hydrolyticky labilní [29]. V případě nedodržení nebo posunu hodnoty pH do jiné oblasti, často dochází ke vzniku zesítěvané struktury HA nerozpustné ve vodě. Naproti tomu konjugace HA pomocí DMTMM přesnou kontrolu pH nevyžaduje a reakce se tak stává (z pohledu provedení) jednodušší. U všech syntéz provedených pomocí DMTMM, uvedených v této práci, bylo pH reakce na začátku reakcí upraveno na hodnotu $6,5 \pm 0,2$. Nakajima a Ikada (1995) potvrdili, že klíčovou podmínkou aktivace karboxylové skupiny řetězce HA je kyselé pH prostředí (3,5 – 4,5), v průběhu kterého vzniká meziproduct O-acyl-izomočovina [30]. Ten se pak přes vytvořené amidové vazby naváže na amin. O-acyl-izomočovina v důsledku své vysoké reaktivity reaguje s okolním prostředím (vodou) dochází k přesmyku na stabilnější verzi, N-acylmočovinu, která se již dalších reakcí neúčastní. Bulpitt a Aeschlimann (1999) zabránili

při aktivaci karboxylové skupiny HA vzniku vedlejšího produktu (N-acylmočoviny) použitím 1-hydroxybenzotriazolu (HOBt) nebo N-hydroxysukcinimidu (NHS).

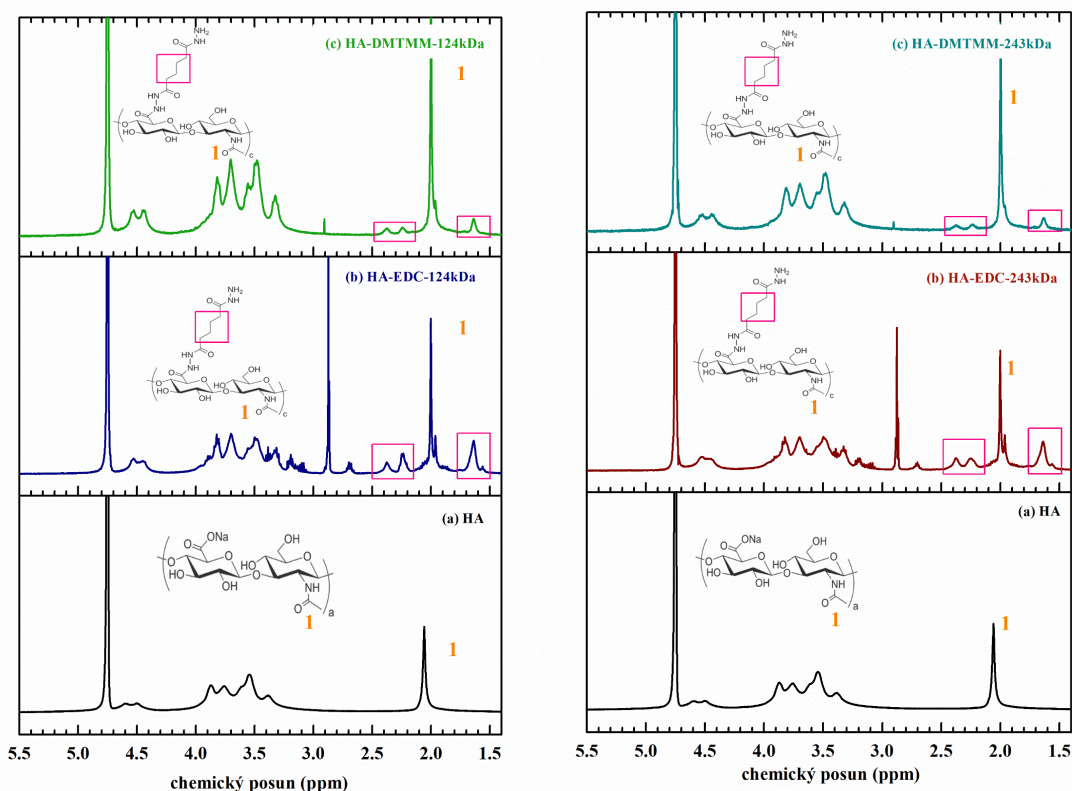
Druhým typem modifikace, která byla provedena, byla oxidace HA za vzniku aldehydicke skupiny. Z literatury je dobře známo, že cukry lze oxidovat pomocí jodistanu, jehož výsledkem je oxidace proximální hydroxylové skupiny (na atomech uhlíku C2 a C3 zbytku kyseliny glukuronové) na aldehydy, čímž dochází k otevření cukerného kruhu za vzniku lineárního řetězce. Zatímco velkou výhodou oxidace pomocí jodistanu je vznik velkého množství funkčních skupin, jeho nevýhoda spočívá ve ztrátě nativní páteřní struktury typické pro hyaluronan. V důsledku toho nemusí být připravené HA-OX deriváty rozpoznány buňkami a hydrogely vytvořené na bázi HA-OX/HA-ADH, kde HA-OX zaujímá roli síťovadla, vykazují velmi omezenou tkáňovou transformaci a špatná buněčnou infiltraci u kosti potkanů [28].

6.2 Ověření modifikace

Všechny metody této podkapitoly se zabývají potvrzením provedené modifikace a charakterizací připravených hydrogelů v závislosti na molekulové hmotnosti a koncentraci polymeru, použitého aktivačního činidla či podmínek provedené reakce.

6.2.1 NMR

Spektrální potvrzení chemické struktury navázaných a připravených funkčních skupin na řetězci HA bylo provedeno pomocí NMR spektroskopie. Na samém počátku byla provedena analýza nativního HA a jeho srovnání s HA modifikovaným. Výsledné NMR spektrum (HA, HA-ADH) v závislosti na použitém činidle a molekulové hmotnosti je uvedeno na obrázku 23.

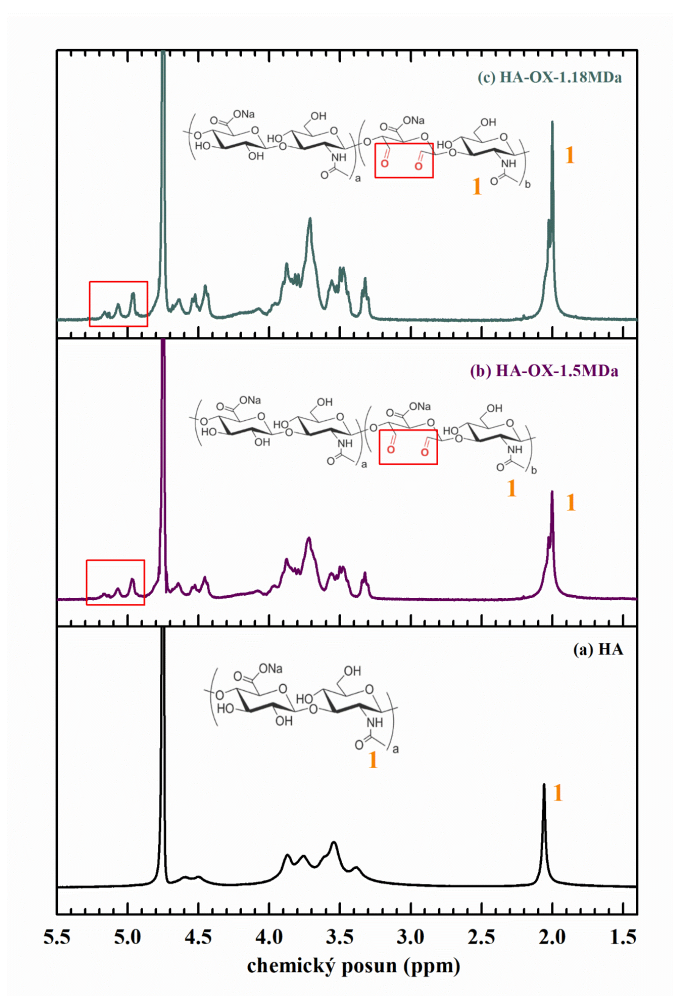


Obrázek 23: Vyhodnocení ^1H NMR spekter modifikované a nativní HA v závislosti na molekulové hmotnosti ($M_w = 124\text{kDa}$ (vlevo), 243kDa (vpravo)) a aktivačního činidla (EDC, DMTMM).

V levé části obrázku 22 nativní HA znázorňuje (a) černá křivka, amidovaný HA (HA-EDC), (b) modrá křivka, a amidovaný HA (HA-DMTMM) (c) zelená křivka. Z prvního pohledu je zřejmé, že v případě amidovaného HA se ve spektru objevily nové oblasti. Vedle neměnných píků typických pro nativní hyaluronan, jako např. oblast $4,75\text{ ppm}$, která je charakteristickou oblastí pro rozpouštědlo (D_2O), oblast $3,3\text{--}4\text{ ppm}$, jež patří sacharidové jednotce HA, oblast $4,4\text{--}4,6\text{ ppm}$ (anomerní vodíky) či oblast $1,9\text{--}2,0\text{ ppm}$ (N-acetyl HA) označená číslem 1. N-acetyl není ve většině případů cílem modifikace, a proto může být použit při stanovení stupně substituce (DS) jako reference. Amidaci HA ve NMR spektru potvrzuje přítomnost nových oblastí $2,5\text{--}1,5\text{ ppm}$. Konkrétně jde o oblast $2,20\text{ ppm}$ (2H, NHNHCO.CH_2), $2,10\text{ ppm}$ (2H, CH_2NHNH_2), $1,6\text{--}1,63\text{ ppm}$ (2H, CH_2CH_2). Na základě provedeného měření, lze konstatovat, že v případě zvýšení molekulové hmotnosti nativního HA (z 124kDa na 243kDa) nemá velký vliv na podobu ^1H NMR spektra. Kromě vlivu M_w nativního HA byl řešeno srovnání vlivu dvou typů aktivačních činidel. Na základě výsledků lze potvrdit, že u obou činidel došlo k úspěšnému navázání HN_2 skupiny na řetězec HA (4 barevné křivky). Výraznějším rozdílem je čistota zobrazeného spektra. V případě HA-EDC jsou spektra významně znečištěná, což by se mohlo projevit na síťovací reakci či evaluaci toxicity

připraveného hydrogelu. Syntéze provedená pomocí DMTMM nepotvrzuje přítomnost nečistot (např. nezreagované zbytky činidel) a jeví se tak efektivnější. V případě konjugace HA prostřednictvím EDC by po modifikaci mělo proběhnout dočištění výsledného produktu. Podobnou problematikou konjugace HA se zabývalo plno autorů např. D'Esteho a spol. (2014), kteří připravili amidovanou HA pomocí stejných aktivačních činidel. Při analýze NMR spektra potvrdili přítomnost námi určených oblastí (1,9 ppm a 1,65 ppm) a při porovnání obou použitých aktivačních činidel vyhodnotili DTMMM jako činidlo efektivnější [30].

Mimo NMR charakterizace amidovaného derivátu HA, byla porovnána účinnost oxidace HA (v závislosti na M_w), zobrazené na obrázku 25.

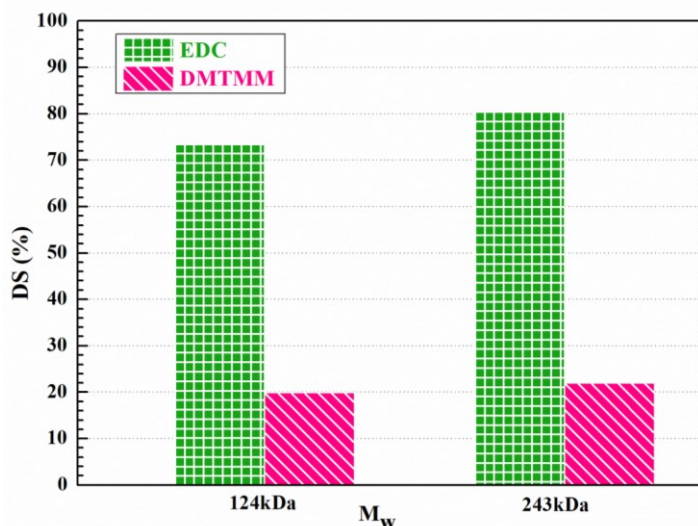


Obrázek 24: Vyhodnocení ^1H NMR spekter oxidované HA v závislosti na M_w HA (1,5MDa-tmavě zelenošedá (horní) křivka, 1,18MDa – fialová (prostřední) křivka, nativní HA-černá (spodní) křivka)

Jak je patrné z obrázku 25, v případě oxidace byla potvrzena přítomnost nových oblastí, jenž lze přisoudit nově vytvořeným aldehydickým skupinám. Jak už bylo zmíněno v předchozí části textu, oblasti, které odpovídají nativnímu HA, jsou 4,8 ppm (pás rozpouštědlo D₂O), 3,3-4 ppm (sacharidová jednotka HA) a 2,01 ppm (ozn. 1. N-acetyl). Nové oblasti odpovídají rozsahu 5,3-5,0 ppm, čímž potvrzují přítomnost aldehydů. Pro detailnější porovnání vlivu molekulových hmotností HA, použitých při oxidaci HA (příprava CHO skupin) byl stanoven i stupeň oxidace, jenž je uveden v další části práce. Oxidaci hyaluronanu se zabýval tým autorů Bao a spol. (2021). Při analýze NMR spekter oxidovaného HA potvrdili přítomnost nových píků v oblasti chemického posunu 4,82 ppm, 4,98 ppm a v 5,08 ppm, jenž odpovídá přítomnosti aldehydů na polymerním řetězci HA. Na základě porovnání intenzity signálů aldehydů se signálem N-acetylu (2,01 ppm) potvrdili nejvyšší SO (31,8%) u reakce, která trvala 8 h [31].

Stupeň modifikace DS

Na základě provedených NMR spekter byl určen i stupeň modifikace. Výsledné hodnoty DS (%) jsou uvedeny na Obrázek 26.



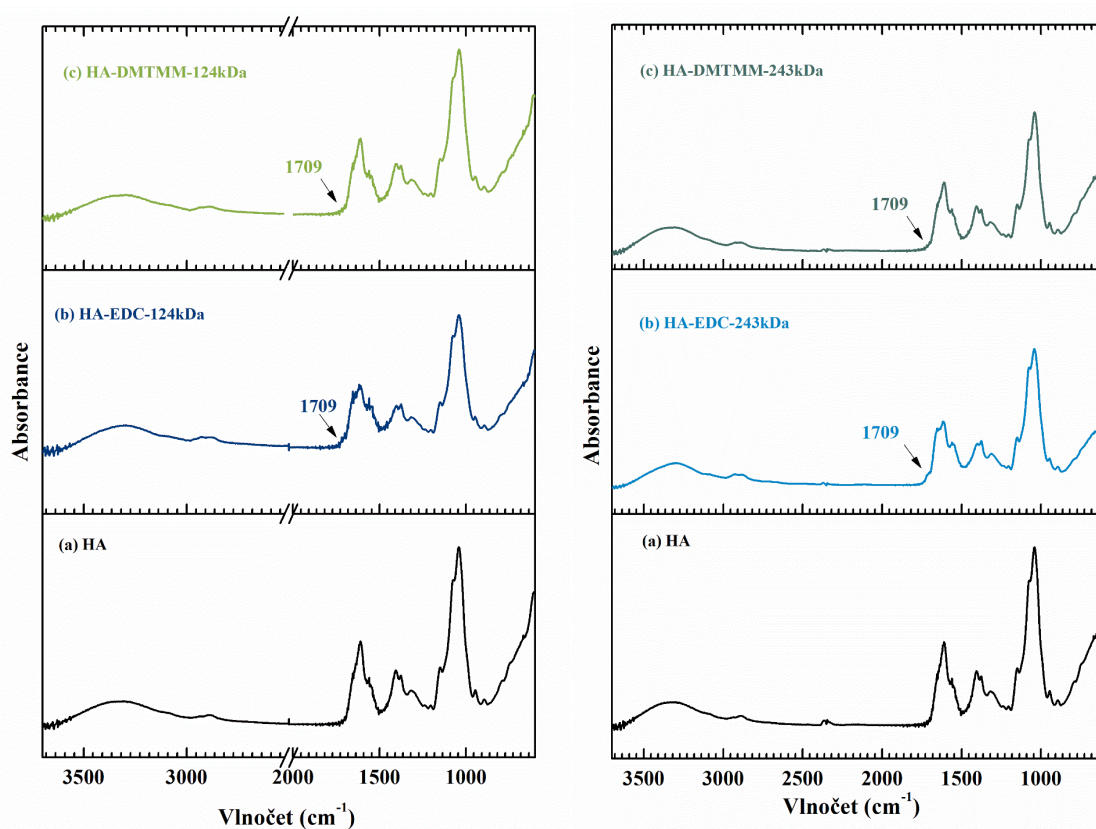
Obrázek 25: Srovnání aktivačních činidel EDC a DMTMM v závislosti na stupni modifikace

Při porovnání dosaženého stupně substituce se ukázalo, že při modifikaci HA pomocí EDC lze dosáhnout výrazně vyšších hodnot DS. DS odpovídá hodnotě 72% v případě (124kDa) a 80,6% u M_w (243kDa), zatímco při konjugaci HA pomocí DMTMM bylo dosaženo pouze 20,5% (124kDa) a 22,0% v případě (243kDa). Autoři D'Este a spol (2014) potvrdily opačný trend, a to v případě konjugace HA s DMTMM (DS_{mol} = 35 %), zatímco (DS_{mol} = 18 %)

v případě EDC/NHS. Tato nesrovnalost může souviset s rozdílnou M_w , která byla v jejich případě použita. Na základě literatury je totiž zřejmé, že s rostoucí molekulovou hmotností polymeru klesá stupeň substituce v důsledku nárůstu viskozity polymerního roztoku. Na základě Obrázku 26 lze konstatovat, že z pohledu reaktivity by aktivační činidlo EDC mělo fungovat mnohem lépe.

6.2.2 FT-IR

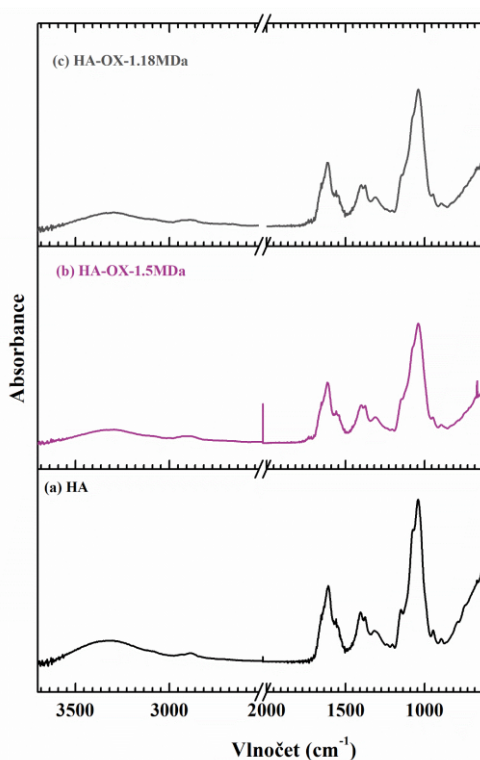
Jak už bylo zmíněno výše, FT-IR metoda analyzuje chemické složení vzorku, jehož výsledkem je FT-IR spektrum. Obrázek 27 srovnává chemické složení nativního a modifikovaného HA, rozdělených dle použitého aktivačního činidla a molekulové hmotnosti HA.



Obrázek 26: Srovnání FT-IR spekter čistého HA a amidovaných HA ($M_w=124$ kDa-vlevo, $M_w=243$ kDa-vpravo)

Při prvním pohledu na FT-IR spektra je zřejmé, že všechny křivky jsou si velice podobné. Nepatrnou změnou spektra lze vyčíst v oblasti 1709 cm^{-1} , která prezentuje vazbu $\text{C}=\text{O}$, což potvrzuje provedenou amidaci HA. Dle práce autorů Mlčochová a spol. (2006), by u amidované HA měly být potvrzeny nové oblasti $2850\text{--}2930\text{ cm}^{-1}$, které souvisí s přítomností $(-\text{CH})$ a $(-\text{CH}_2)$ skupin na řetězci HA (alkylový řetězec na HA) [29]. Obdobných závěrů dosáhli D'Este a spol. (2014), kteří při charakterizaci použili diamantový krystal. Mezi průkazné změny patřila oblast vlnočtu $4000\text{--}500\text{ cm}^{-1}$ a oblast 1650 cm^{-1} , jenž odpovídá $(\text{C}=\text{O})$ [29].

Vliv molekulové hmotnosti HA byl řešen i v případě provedené oxidace, který shrnuje obrázek 29.



Obrázek 27: Srovnání FT-IR spekter čistého HA (černá křivka) a oxidovaných HA (1,5MDa-fialová (prostřední) křivka, 1,18MDa-šedá (horní) křivka).

Při letmém posouzení spekter se zdají vcelku stejná, ovšem výsledky experimentu Kedariay a Vasily (2017) zmiňují $(-\text{OH})$ vibraci v oblasti 3500 cm^{-1} u oxidovaného dextranu [59]. Na základě tohoto článku lze oblast $(-\text{OH})$ potvrdit v oblasti vlnočtu $3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$.

6.2.3 Stanovení molekulové hmotnosti pomocí GPC

Za účelem zjištění vlivu jednotlivých modifikací na molekulovou hmotnost připraveného produktu bylo provedeno měření GPC. Molekulové hmotnosti se počítaly u obou modifikací HA (amidace i oxidace). Tabulka 6 představuje molekulové hmotnosti výchozích produktů po jejich modifikace aktivačními činidly DMTMM a EDC.

Porovnáním průměrné molekulové hmotnosti u obou činidel je na první pohled patrný nárůst konečné M_w a to v případě DMTMM z hodnoty 124kDa na 158kDa, a z hodnoty 243kDa na 356kDa. V případě konjugace HA pomocí EDC došlo v případě nižší molekulové hmotnosti k poklesu z hodnoty 124kDa na 79kDa, zatímco u vyšší molekulové hmotnosti došlo k jejímu nepatrnému nárůstu z hodnoty 243kDa na hodnotu 257kDa. Pozorovaný nárůst molekulové hmotnosti bude patrně souviset s navázáním nových funkčních skupin na řetězec HA

Tabulka 6 Stanovené hodnoty M_w v závislosti na použitém činidle (DMTMM, EDC) konjugované HA

| | M_w | | | |
|--------|---------|---------|---------|---------|
| | DMTMM | | EDC | |
| | 124 kDa | 243 kDa | 124 kDa | 243 kDa |
| 1 | 156964 | 355787 | 81810 | 253630 |
| 2 | 160028 | 355787 | 76302 | 259543 |
| průměr | 158496 | 355787 | 79056 | 256587 |
| chyba | 1532 | 0 | 2754 | 2957 |

Molekulová hmotnost byla analyzována i v případě oxidované HA, jejíž výsledky shrnuje tabulka 7.

Tabulka 7 Stanovené hodnoty M_w v závislosti na čase provedené reakce (7,5h, 8h, 10h) oxidované HA

| Hyaluronan | čas reakce | 7.5h | 10h | 12h |
|------------|------------|------|------|------|
| HA-1.5MDa | 1 | 9021 | 8429 | 4878 |
| | 2 | 9054 | 8567 | 4886 |
| | průměr | 9038 | 8498 | 4882 |
| | chyba | 17 | 69 | 4 |
| HA-1.18MDa | 1 | 6747 | 7554 | 4393 |
| | 2 | 6782 | 7865 | 4293 |
| | průměr | 6765 | 7710 | 4343 |
| | chyba | 18 | 156 | 50 |

Při oxidace HA pomocí jodistanu, dochází k postupnému štípaní polymerního řetězce, jehož výsledkem je pokles M_w . Při porovnání času oxidační reakce na molekulové hmotnosti je vidět, že pokud reakce probíhala 7,5 h výchozí M_w klesla z hodnoty 1,5 MDa na 9 kDa,

respektive na 4,9 kDa v případě 12 h. Výraznější pokles M_w byl pozorován u molekulové hmotnosti HA 1,18MDa a to z výchozí hodnoty 1,18 MDa na 6,8 kDa, respektive na 4,3 kDa v případě 12h. Na základě provedeného měření, byla za nejlepší čas oxidace zvolena doba 10h, protože nedošlo k tak výraznému poklesu molekulové hmotnosti. Problematikou stanovení molekulové hmotnosti se zabývali i Chen a spol. (2017), kteří připravili hydrogel, jehož výsledná molekulová hmotnost (HA-ADH) odpovídala $M_w = 6,3$ MDa. Zároveň tito autoři potvrzují, že čím nižší je molekulová hmotnost, tím pomaleji probíhá síťování hydrogelu [58].

6.2.4 Stanovení stupně oxidace (SO)

V případě oxidované HA, byl kromě molekulové hmotnosti, posuzován i stupeň oxidace (SO) který udává počet substituovaných aldehydických skupin na 100 jednotek HA, jehož výsledky shrnuje Tabulka 8.

Tabulka 8: Hodnoty SO pro HA-OX v závislosti na čase reakce a M_w polymeru (Kde: *počet aldehydických skupin (CHO) /100 jednotek HA)

| Oxidovaný HA | čas reakce | 7,5 h | 10 h | 12 h |
|----------------|------------|-------|------|------|
| HA-OX-1,5 MDa | stupeň | 66,2 | 82,5 | 57,5 |
| HA-OX-1,18 MDa | oxidace* | 53,2 | 65,1 | 53,1 |

Na základě stanovení SO byla za nejefektivnější čas reakce pro obě molekulové hmotnosti HA (HA-OX-1,5 MDa a HA-OX-1,18 MDa) 10 h (viz Tabulka 8).

Tabulka 9 Hodnoty SO pro finální derivát HA-OX v závislosti M_w polymeru v čase reakce 10h (Kde: *počet aldehydických skupin (CHO) /100 jednotek HA)

| Hyaluronan | čas reakce | * 10 h |
|------------|------------|--------|
| HA-1.5MDa | 1 | 68,9 |
| | 2 | 70,4 |
| | průměr | 69,7 |
| | chyba | 0,8 |
| HA-1.18MDa | 1 | 92,2 |
| | 2 | 93,7 |
| | průměr | 93,0 |
| | chyba | 0,8 |

SO hodnoty tedy potvrdily závěr metody GPC, na jejichž výsledcích bylo rozhodnuto, že neoptimálnější čas reakce je 10h. Oxidovaná HA v čase 10h byla dále použita pro přípravu hydrogelů. Tabulka 9 shrnuje stupně oxidace pro reakční čas 10 h dvou dalších provedených modifikací (HA-OX-1,5 MDa a HA-OX-1,18 MDa), který prokázal, že jsme schopni připravit HA-OX se srovnatelným SO. Provedené modifikace (1 a 2) lze z pohledu stanovené chyby měření u SO považovat za velmi podobné.

6.3 Charakterizace hydrogelů

Na základě stanoveného SO byl za nejefektivnější čas reakce zvolen čas (10 h), proto byla u všech provedených zkoušek síťování použita právě tato reakce. Jak už bylo zmíněno výše, při síťování *Schiffovou* bází dochází k reakci aminové funkční skupiny (HA-ADH) s aldehydickou (oxo) skupinou (HA-OX) za vzniku iminové vazby. Oba deriváty byly smíchány v poměru 1:1 v závislosti na koncentraci (1%, 2%, 3%). Ihned po smíchání obou roztoků byl, zaznamenám čas potřebný k plnému zesíťování materiálu do podoby tuhého gelu. Výsledky gelačních času v závislosti na koncentraci připraveného roztoku shrnuje Tabulka 10.

Tabulka 10: Hodnoty stanoveného gelačního času pro jednotlivé kombinace připravených hydrogelů

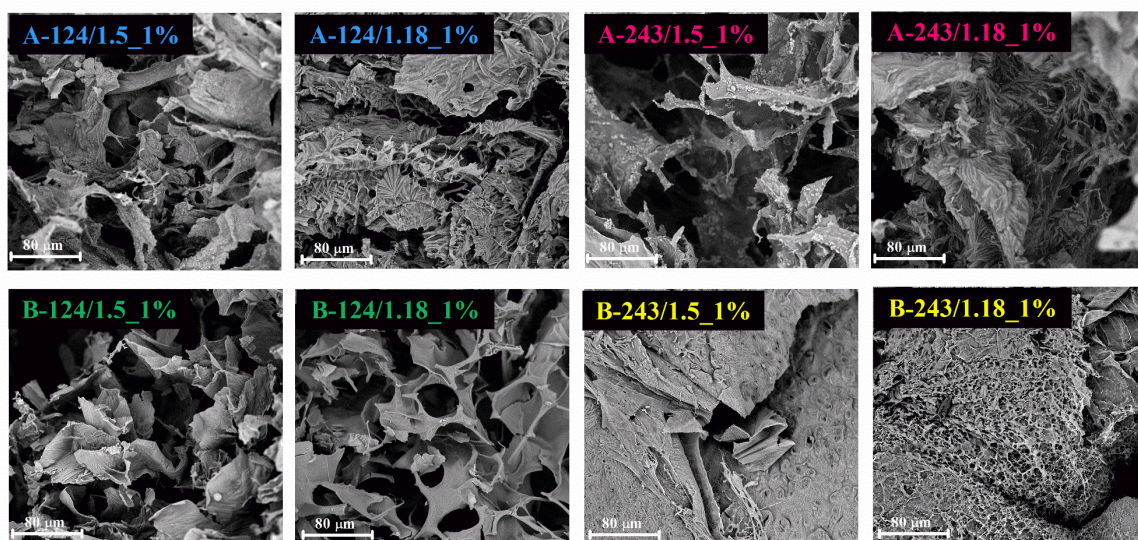
| Matrice | Mw | čas gelace (h) | | |
|-------------|------------------|----------------|------|------|
| | | 1% | 2% | 3% |
| DMTMM/HA-OX | 124 kDa/1,5 MDa | 24,0 | 2,8 | 24,0 |
| DMTMM/HA-OX | 124 kDa/1,18 MDa | 24,0 | 24,8 | 24,0 |
| DMTMM/HA-OX | 243 kDa/1,5 MDa | 24,0 | 8,4 | 24,0 |
| DMTMM/HA-OX | 243 kDa/1,18 MDa | 24,0 | 16,8 | 24,0 |
| EDC/HA-OX | 124 kDa/1,5 MDa | 24,0 | 24,0 | 0,33 |
| EDC/HA-OX | 124 kDa/1,18 Mda | 24,0 | 24,0 | 0,37 |
| EDC/HA-OX | 243 kDa/1,5 MDa | 24,0 | 0,5 | 0,07 |
| EDC/HA-OX | 243 kDa/1,18 MDa | 24,0 | 5,0 | 0,09 |

Příprava hydrogelů byla časově variabilní s ohledem na chemické složení hydrogelu. V případě, že nedošlo k dosíťování hydrogelu do 2 hodin od začátku reakce, ponechal se hydrogel reagovat 24 hodin. Po uplynutí této doby byla provedena vizuální charakterizace. Konkrétně jestli je hydrogel tvárný, lepkavý, průhledný, vysoce/nízce viskózní apod. Nejlepších výsledky byly dosaženy v případě 3% roztoků. Naopak u většiny 1% roztokům hydrogelů nestačilo do finálního zatuhnutí ani 24 hodin. Příliš dlouhý čas gelace, tak pravděpodobně souvisí s množstvím polymeru v roztoku a tedy množstvím potencionálních míst (funkčních skupin podléhajících síťovací reakci) vhodných k vytvoření síťové struktury.

U připravených hydrogelů bylo dále přistoupeno k jejich charakterizaci z pohledu vytvořených pórů. Předpokládalo se, že u 1% hydrogelů bude potvrzena nižší porozita, ve srovnání s hydrogely připravenými z 3% roztoků.

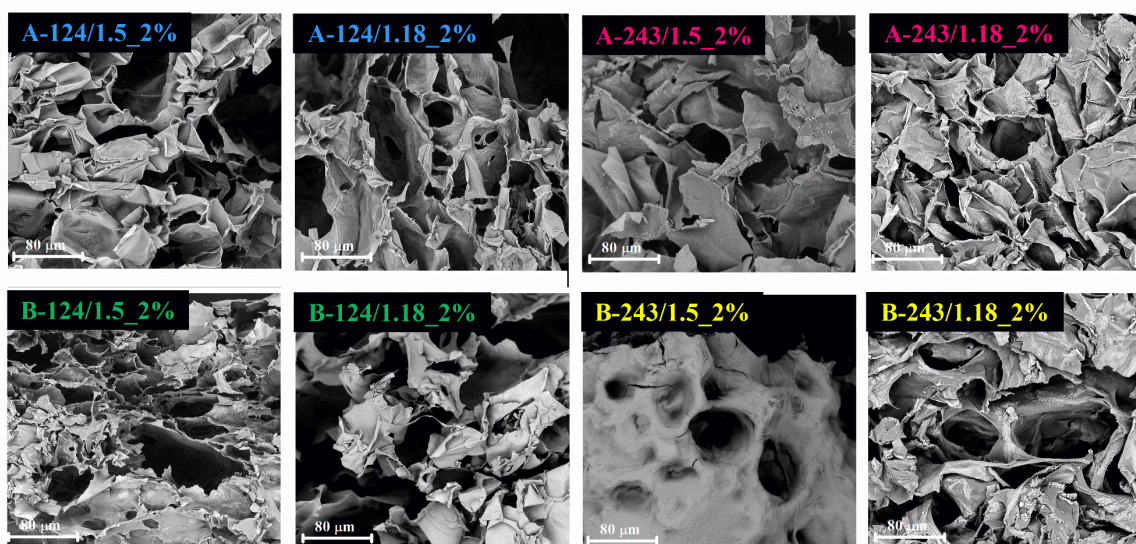
6.3.1 SEM

Jednotlivé snímky hydrogelů pořízené SEM jsou rozděleny do skupin podle koncentrací svého chemického složení, na 1% (Obrázek 28), 2% (Obrázek 29) a 3% (Obrázek 30). Použité zkratky i jejich umístění je neměnné pro všechny tři skupiny. Příklad: označení A-124/1.5_1% zobrazuje 1% hydrogel s matricí HA-ADH s EDC (124 kDa) a HA-OX (1,5 MDa). Všechny snímky se pochopitelně vzájemně liší, jejich zobrazení a procentuální porovnání distribuce velikostí pórů se uvádí níže. U některých snímků byl potvrzen tzv. bílý povlak na vnitřní struktuře matrice, který je zřejmě pozůstatkem soli fosfátového pufru, jenž byl použit při přípravě roztoků.

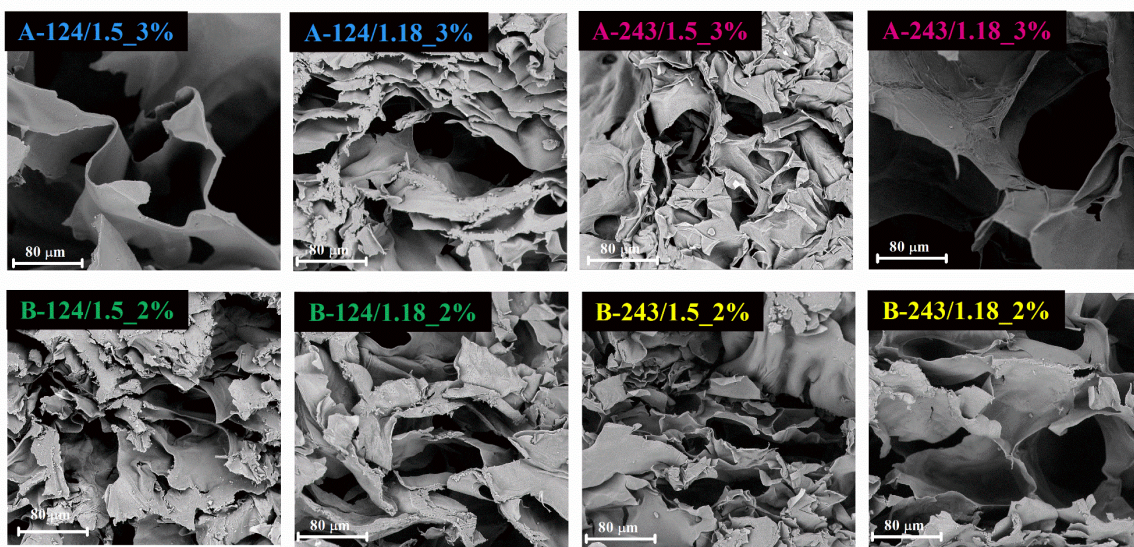


Obrázek 28 SEM snímky struktury připraveného hydrogelu (z 1% roztoků) v závislosti na molekulové hmotnosti (124kDa-modrá a zelená barva, 243kDa-růžová a žlutá barva) a aktivační činidla (EDC-značení A, DMTMM-značení B)

Při porovnání všech SEM snímků, z pohledu použitého aktivačního činidla, jeví snímky B větší porozitu, i když jednotlivé póry odpovídají spíše menším rozměrům (viz např. B-243/1,18_1%). Velikost ostře ohraničených pórů odpovídají hodnotě pod 80 μm (B-124/1,18_1%). Na snímku A-243/1.5_1% byl detekován zmíněný bílý povlak, který pravděpodobně odpovídá soli PBS pufru, který byl použit jako rozpouštědlo.



Obrázek 29 SEM snímky struktury připraveného hydrogelu (z 2% roztoků) v závislosti na molekulové hmotnosti (124kDa-modrá a zelená barva, 243kDa-růžová a žlutá barva) a aktivační činidla (EDC-znač. A, DMTMM-znač. B)

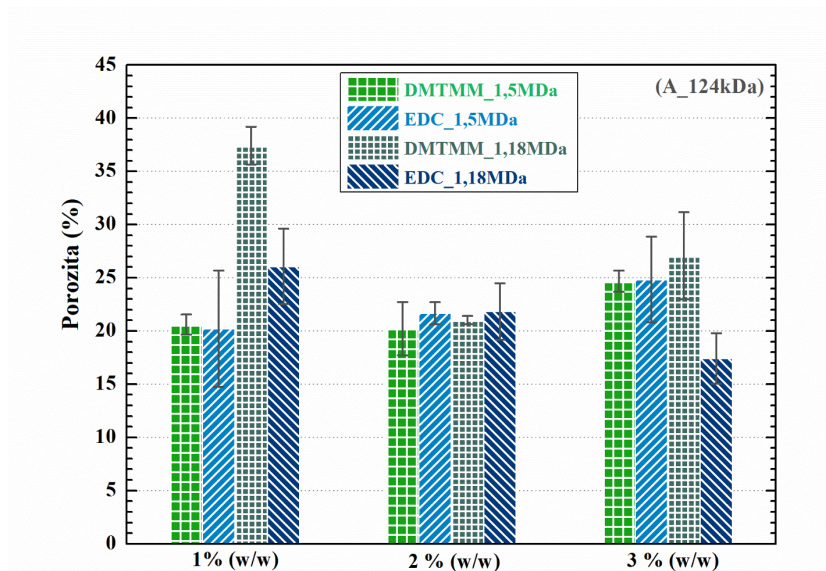


Obrázek 30 SEM snímky struktury připraveného hydrogelu (z 3% roztoků) v závislosti na molekulové hmotnosti (124kDa-modrá a zelená barva, 243kDa-růžová a žlutá barva) a aktivační činidla (EDC-znač. A, DMTMM-znač. B)

Na první pohled se zdá, že zbylé koncentrace polymeru (2% a 3%) vykazují větší porozitu, než vzorky připravené z 1% roztoků. Některé ze vzorků dokonce přesahují rozměr 80 μm (př. B-243/1.18_2%). Od ostatních snímků se výrazně liší snímek s označením B-243/1.5_2%, protože místo řezu vzorku byl analyzován spíše povrch vzorku, pro který je

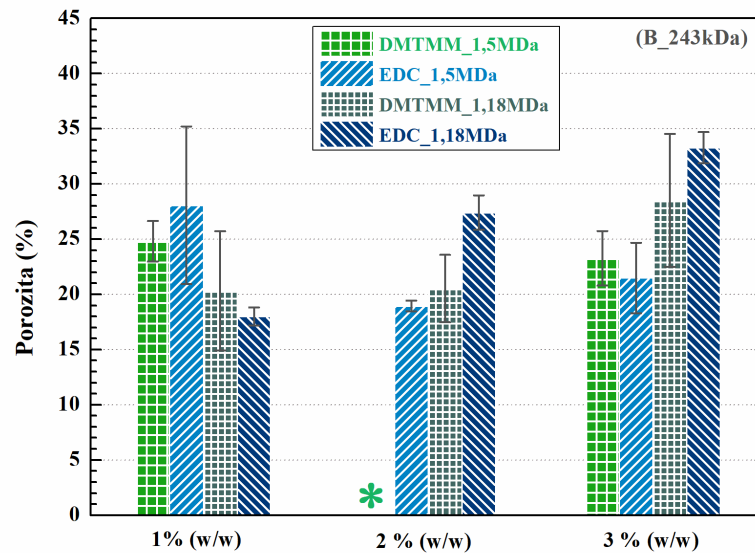
typický tzv. slinutý povrch bez přítomných pórů (špatně provedený řez vzorku). Proto byla tato kombinace vyražena i u stanovení celkové porozity. U hydrogelů připravených z 3% roztoků se dalo očekávat, že výsledná distribuce pórů bude dosahovat větších rozměrů, což bylo do jisté míry splněno. Ne všechny póry však překonaly velikost póru 80 μm . I přesto mají 3% hydrogely nejhustější porozitu ze všech analyzovaných hydrogelů.

Na základě provedené analýzy SEM snímků pomocí programu *Image J*, byla na závěr hodnocena celková porozita připravených hydrogelů, jejíž výsledky jsou uvedeny na obrázku 31, respektive 32.



Obrázek 31 Závislost porozity připraveného hydrogelu na koncentraci HA (1% (w/w), 2% (w/w) a 3% (w/w) vzorků), použitým aktivačním činidlem (EDC, DMTMM) a molekulové hmotnosti oxidované HA (1,5MDa, 1,18MDa) pro molekulovou hmotnost HA-ADH 124kDa.

Ze závislosti porozity HA-ADH (124kDa) na molekulové hmotnosti HA-OX pro použitá činidla DMTMM a EDC, lze potvrdit, že s rostoucí koncentrací polymeru nepatrně roste celková porozita matrice (pro obě aktivační činidla), což patrně souvisí s vyšším zastoupením polymeru v roztoku. V části grafu 1% hydrogelů, se výrazně odlišuje kombinace HA-ADH (DMTMM (124kDa) a HA-OX (1,18MDa)), u které byla potvrzena nejvyšší porozita (37%), která již byla zmíněna u Obrázku 28.



Obrázek 32 Závislost porozity připraveného hydrogelu na koncentraci HA (1% (w/w), 2% (w/w) a 3% (w/w) vzorků), použitým aktivačním činidlem (EDC, DMTMM) a molekulové hmotnosti oxidované HA (1,5MDa, 1,8MDa) pro molekulovou hmotnost HA-ADH 243kDa.

Obrázek 32 pro molekulovou hmotnost HA-ADH (B_{243kDa}), že s rostoucí koncentrací se porozita příliš nemění. Zelená hvězdička zastupuje snímek B-243/1.5_2%, tedy 2% hydrogel o matrici DMTMM (243kDa) s HA-OX (1,5MDa), který z důvodu špatně provedeného řezu nemohl být do vyhodnocení zahrnut.

Na základě zobrazených snímků lze tvrdit, že molekulová hmotnost matrice (HA-ADH a HA-OX) nemá vliv na výslednou porozitu zkoumaných hydrogelů, tak jako koncentrace vstupních roztoků HA. Oba grafy potvrzují předpoklad, že hydrogely o matrici z 3% roztoků HA-ADH a HA-OX měly svou vnitřní strukturu nejvíce porézní. Problematikou porozity připravených hydrogelů se zabýval i tým Kedaria a Vasita (2017), kteří charakterizovali hydrogel na bázi oxidovaného dextranu v závislosti na jeho koncentraci (3%, 4%, 5%). Na základě jejich pozorování je možné konstatovat, že v případě 3% hydrogelů odpovídala velikost pórů hodnotám 190 a 200 μm . Naopak velikost pórů u roztoků s vyšší koncentrací dextranu (4% a 5%) odpovídala mnohem menším rozměrům, konkrétně se jednalo o oblast 160-170 μm . Rostoucí koncentraci polymeru lze považovat za příčinu zvýšené hustoty síťování, které se projevila poklesem detekované velikosti pórů [57].

ZÁVĚR

Experimentální část této práce se zabývá přípravou hydrogelů na bázi modifikované kyseliny hyaluronové (amidace a oxidace HA) za vzniku tzv. *Schiffovy báze* a jejich následné charakterizaci. Na samém začátku byla provedena modifikace hyaluronanu z důvodu zavedení funkčních skupin (oxo, amino) na polymerní řetězec HA. Zisk (NH_2) skupin na HA byl zprostředkován pomocí navázání dihydrazidu kyseliny adipové (ADH) na nativní řetězec HA, které probíhalo v přítomnosti různých aktivačních činidel (DMTMM a EDC). Tato činidla byla vybrána za účelem jejich vzájemného srovnání (čistota produktu, jednoduchost reakce, účinnost modifikace (DS)). Příprava oxo skupiny do polymerního řetězce HA bylo zprostředkováno pomocí oxidační reakce. Modifikace HA byly provedeny v závislosti na molekulové hmotnosti HA, molárním poměru jednotlivých složek a podmínek reakce obou modifikací. Zesíťovaný hyaluronan byl připraven v poměru 1:1 za vzniku hydrogelu. Výsledný hydrogel byl poté lyofilizován a charakterizován (SEM, gelační čas). Funkčnost provedené modifikace byla potvrzena pomocí NMR spektroskopie. Kromě toho bylo u všech připravených derivátů HA provedeno stanovení M_w .

Při oxidaci HA jodistanem dochází k rozevření kruhu sacharidové jednotky HA, jehož výsledkem je vytvoření aldehydové skupiny na řetězci HA. Nejlepší výsledky oxidace byly potvrzeny (na základě SO a GPC) pro reakční čas 10 h (HA-OX-1,5 MDa (SO 69,7) měl $M_w = 8498$ s průměrným časem gelace 50,5 s; HA-OX-1,18 MDa měl $M_w = 7710$ s časem gelace 132 s (SO 93,0)). Rovněž bylo zjištěno, že molekulová hmotnost HA-OX ovlivňuje výsledný čas gelace hydrogelu. Navázaná ($-\text{NH}_2$) skupina byla potvrzena NMR i FT-IR spektroskopii, konkrétně v případě FT-IR spektra, se jednalo o oblast vlnočtu 1709 cm^{-1} jenž odpovídá $\text{C}=\text{O}$. Při porovnání účinnosti jednotlivých aktivačních činidel bylo zjištěno, že při použití EDC lze dosáhnout vysokého stupně substituce (8%), ale NMR spektra připraveného derivátu jsou silně znečištěna pravděpodobnými zbytky nezreagovaných činidel. Naopak při použití DMTMM výsledná spektra znečištění nepotvrdila, ale bohužel vykazala nízký stupeň substituce (20,5%). U připravených hydrogelů byla rovněž porovnána celková porozita. Každý analyzovaný hydrogel měl porézní vnitřní strukturu. Míru porozity neovlivňovala molekulová hmotnost, chemické složení, ani koncentrace jednotlivých vstupních roztoků.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] RATNER, B. D., HOFFMAN ALLAN S., SCHOEN, FREDERICK J., LEMONS, JACK E. *The Nature of Matter and Materials* 2013, 6-9.
- [2] BISWAL, T., S. K. BADJENA AND D. PRADHAN. Sustainable biomaterials and their applications: A short review. In *Materials Today: Proceedings*. Elsevier Ltd, 2020, vol. 30, p. 274-282.
- [3] TODROS, S., M. TODESCO AND A. BAGNO *Biomaterials and Their Biomedical Applications: From Replacement to Regeneration*. Processes, 2021, 9(11), 1949.
- [4] MATHEW, A., R. AUGUSTINE, N. KALARIKAL AND S. THOMAS. *Tissue Engineering: Principles, Recent Trends and the Future: State of the Art and Recent Trends*. In., 2016, p. 31-82.
- [5] QURESHI, D., S. K. NAYAK, A. ANIS, S. S. RAY, et al. Introduction of biopolymers: Food and biomedical applications. In *Biopolymer-Based Formulations: Biomedical and Food Applications*. Elsevier, 2020, p. 1-45.
- [6] OLIVEIRA, J. T. AND R. L. REIS. Hydrogels from polysaccharide-based materials: Fundamentals and applications in regenerative medicine. In *Natural-Based Polymers for Biomedical Applications*. Elsevier Ltd., 2008, p. 485-514.
- [7] CONTE, R., A. DE LUISE, A. VALENTINO, F. DI CRISTO, et al. Hydrogel Nanocomposite Systems. In *Nanocarriers for Drug Delivery*. Elsevier, 2019, p. 319-349.
- [8] FU, Z., L. OUYANG, R. XU, Y. YANG, et al. Responsive biomaterials for 3D bioprinting: A review. *Materials Today*, 2022.
- [9] MACGREGOR, A. E. Biopolymers. *Encyklopedia of Physical Science and Technology*, 2003, 3, 207-245.
- [10] IBRAHIM, S., O. RIAHI, S. M. SAID, M. F. M. SABRI, et al. *Biopolymers From Crop Plants* 2019.
- [11] SMITH, A. M., S. MOXON AND G. A. MORRIS *Biopolymers as wound healing materials* 2016, 261-287.
- [12] VICKRAMJEET SINGH, S. I., K.J. JISHA AND RAMESH L. GARDAS *Structure and Solubility of Polysaccharides*. Scrivener Publishing LLC, 2021, 325-336.
- [13] INAMUDDIN, M. I. A., RAJENDER BODDULA AND TARIQ ALTALHI *Polysaccharides : properties and applications*. Publishers at Scrivener, 2021.
- [14] FALLACARA, A., E. BALDINI, S. MANFREDINI AND S. VERTUANI. Hyaluronic acid in the third millennium. In *Polymers (Basel)*. MDPI AG, 2018, vol. 10.
- [15] FRASER, J. R. E., LAURENT, T. C., LAURENT, U. B. G. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*, 1997, 242, 27-33.
- [16] SILVA, R. D., L. T. CARVALHO, R. M. MORAES, S. D. F. MEDEIROS, et al. Biomimetic Biomaterials Based on Polysaccharides: Recent Progress and Future Perspectives. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2022, 2100501.
- [17] NECAS, J., L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER AND J. KOLAR. *Hyaluronic acid (hyaluronan): a review*. 2008.
- [18] KACZMAREK, B., K. NADOLNA AND A. OWCZAREK. The physical and chemical properties of hydrogels based on natural polymers. In *Hydrogels Based on Natural Polymers*. Elsevier, 2019, p. 151-172.
- [19] MITRA, A. K., RAGHUNATHAN, S., SHEEHAN, J. K. AND STRUTHER, A. *Hyaluronic Acid: Molecular Conformations and Interactions in the Orthorhombic and Tetragonal Forms Containing Sinuous Chains*. 169, 1983, 829-859.
- [20] HINTZE, V., M. SCHNABELRAUCH AND S. ROTHER *Chemical Modification of Hyaluronan and Their Biomedical Applications*. *Front Chem*, 2022, 10, 830671.

- [21] HARGITTAI, I. AND M. HARGITTAI Molecular structure of hyaluronan: an introduction. *Structural Chemistry*, 2008, 19(5), 697-717.
- [22] COWMAN, M. K. AND S. MATSUOKA. Experimental approaches to hyaluronan structure. In *Carbohydr Res*. Elsevier BV, 2005, vol. 340, p. 791-809.
- [23] COLLINS, M. N. AND C. BIRKINSHAW. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering - A review. In *Carbohydrate Polymers*. 2013, vol. 92, p. 1262-1279.
- [24] AMORIM, S., C. A. REIS, R. L. REIS AND R. A. PIRES Extracellular Matrix Mimics Using Hyaluronan-Based Biomaterials. *Trends Biotechnol*, Jan 2021, 39(1), 90-104.
- [25] VOLPI, N., SCHILLER, J., STERN, R., ŠOLTÉS, L. Role, Metabolism, Chemical Modifications and Applications of Hyaluronan. Bentham Science Publishers Ltd., 2009, 16, 1718-1745.
- [26] MORADALI, M. F. AND B. H. A. REHM Bacterial biopolymers: from pathogenesis to advanced materials. *Nat Rev Microbiol*, Apr 2020, 18(4), 195-210.
- [27] GARANTZIOTIS, S. AND R. C. SAVANI Hyaluronan biology: A complex balancing act of structure, function, location and context. *Matrix Biol*, May 2019, 78-79, 1-10.
- [28] BULPITT PAUL, A. D. New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: Preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels 1999, 152-169.
- [29] SCHANTÉ, C. E., G. ZUBER, C. HERLIN AND T. F. VANDAMME Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 85(3), 469-489.
- [30] D'ESTE, M., D. EGLIN AND M. ALINI A systematic analysis of DMTMM vs EDC/NHS for ligation of amines to Hyaluronan in water. *Carbohydrate Polymers*, 2014/8// 2014, 108(1), 239-246.
- [31] BAO, Z., A. YU, H. SHI, Y. HU, et al. Glycol chitosan/oxidized hyaluronic acid hydrogel film for topical ocular delivery of dexamethasone and levofloxacin. *Int J Biol Macromol*, Jan 15 2021, 167, 659-666.
- [32] PANDIT, A. H., N. MAZUMDAR AND S. AHMAD Periodate oxidized hyaluronic acid-based hydrogel scaffolds for tissue engineering applications. *Int J Biol Macromol*, Sep 15 2019, 137, 853-869.
- [33] CHAMKOURI, H. A Review of Hydrogels, Their Properties and Applications in Medicine. *American Journal of Biomedical Science & Research*, 2021/2// 2021, 11(6), 485-493.
- [34] REDDY, N., R. REDDY AND Q. JIANG Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends Biotechnol*, Jun 2015, 33(6), 362-369.
- [35] TOMIHATA, K., IKADA, Y. Crosslinking of Hyaluronic Acid with Glutaraldehyde. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 1997, 35, 3553-3559.
- [36] BARTOVSKÁ LIDMILA, Š. M. Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav 2005, 132.
- [37] CATOIRA, M. C., L. FUSARO, D. DI FRANCESCO, M. RAMELLA, et al. Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications. *J Mater Sci Mater Med*, Oct 10 2019, 30(10), 115.
- [38] PEPPAS, N. A., HOFFMAN, ALLAN S. *Hydrogels*. A. PRESS, 2020.
- [39] WANG, K., Y. HAO, Y. WANG, J. CHEN, et al. Functional Hydrogels and Their Application in Drug Delivery, Biosensors, and Tissue Engineering. In *International Journal of Polymer Science*. Hindawi Limited, 2019, vol. 2019.
- [40] CHAI, Q., Y. JIAO AND X. YU. Hydrogels for biomedical applications: Their characteristics and the mechanisms behind them. In *Gels*. MDPI AG, 2017, vol. 3.
- [41] HOARE, T. R. AND D. S. KOHANE Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*, 2008, 49(8), 1993-2007.

- [42] OHAN, M. P., K. S. WEADOCK AND M. G. DUNN Synergistic effects of glucose and ultraviolet irradiation on the physical properties of collagen. *J Biomed Mater Res*, Jun 5 2002, 60(3), 384-391.
- [43] REDAELLI, F., M. SORBONA AND F. ROSSI Synthesis and processing of hydrogels for medical applications 2017, 205-228.
- [44] HERNÁNDEZ-MOLINA, R., MEDEROS, A. Acyclic and Macrocyclic Schiff Base Ligands. *Comprehensive Coordination Chemistry II* 2003, 411-446.
- [45] RAHMANIAN-DEVIN, P., V. BARADARAN RAHIMI AND V. R. ASKARI Thermosensitive Chitosan-beta-Glycerophosphate Hydrogels as Targeted Drug Delivery Systems: An Overview on Preparation and Their Applications. *Adv Pharmacol Pharm Sci*, 2021, 2021, 6640893.
- [46] TOGNANA, E. Scaffolds based on hyaluronan derivatives in biomedical applications. In *Natural-Based Polymers for Biomedical Applications*. Elsevier Ltd., 2008, p. 291-314.
- [47] WANG, W., R. NARAIN AND H. ZENG. Hydrogels. In *Polymer Science and Nanotechnology*. Elsevier, 2020, p. 203-244.
- [48] LUO, Y., K. R. KIRKER AND G. D. PRESTWICH. Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery. 2000.
- [49] PIZZETTI, F., A. MASPES, A. ROSSETTI AND F. ROSSI The addition of hyaluronic acid in chemical hydrogels can tune the physical properties and degradability. *European Polymer Journal*, 2021, 161, 110843.
- [50] ALQAHEEM, Y. AND A. A. ALOMAIR Microscopy and Spectroscopy Techniques for Characterization of Polymeric Membranes. *Membranes (Basel)*, Feb 24 2020, 10(2).
- [51] NEIL, J. AND J. J. H. ACKERMAN Magnetic Resonance (MR); Overview 2014, 971-972.
- [52] BILLAH, A. Investigation of multiferroic and photocatalytic properties of Li doped BiFeO₃ nanoparticles prepared by ultrasonication. 2016.
- [53] VERNON-PARRY, K. D. Scanning Electron Microscopy: an introduction Elsevier Science Ltd., 2000, 13, 40-44.
- [54] BARRERA, F. N. The advance that realized the potential of protein Fourier-transform infrared spectroscopy. *Arch Biochem Biophys*, Dec 29 2021, 109114.
- [55] UNDAVALLI, V. K., C. LING AND B. KHANDELWAL. Chapter 6 - Impact of alternative fuels and properties on elastomer compatibility. In B. KHANDELWAL ed. *Aviation Fuels*. Academic Press, 2021, p. 113-132.
- [56] HUSSAIN, Z. *Gel permeation Chromatography*. Edition ed., 2021.
- [57] ZHAO, H. AND N. D. HEINDEL Determination of degree of substitution of formyl groups in polyaldehyde dextran by the hydroxylamine hydrochloride method. *Pharm Res*, Mar 1991, 8(3), 400-402.
- [58] GILLES, M. A., A. Q. HUDSON AND C. L. BORDERS, JR. Stability of water-soluble carbodiimides in aqueous solution. *Anal Biochem*, Feb 1 1990, 184(2), 244-248.
- [59] KEDARIA, D. AND R. VASITA Bi-functional oxidized dextran-based hydrogel inducing microtumors: An in vitro three-dimensional lung tumor model for drug toxicity assays. *J Tissue Eng*, Jan-Dec 2017, 8, 2041731417718391.
- podle použité citační normy

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|--------|---|
| 3D | trojdimenzionální |
| ADH | dihydrazid kyseliny adipové |
| ATR | Attenuated total reflectance |
| BDDE | butandiol-diglycidylether |
| BS3 | bis(sulfosukcinimidyl)suberát |
| CD44 | transmembránový receptor glykoproteinu |
| DMS | 2-methylsuberimidát |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| DMTMM | 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chlorid |
| DS | stupeň modifikace = stupeň substituce |
| ECM | extracelulární matrix |
| EDC | 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)-propyl]-karbodiimid |
| FT-IR | infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací |
| G' | storage modul |
| G'' | loss modul |
| GA | glutaraldehyd |
| GAG | glukosaminoglykany |
| GMA | glicidylmethakrylát |
| GPC | gelová permeační chromatografie |
| HA | hyaluronan |
| HA-ADH | amidovaný hyaluronan |
| HA-OX | oxidovaný hyaluronan |
| HA-TBA | tetrabutylamoniová sůl kyseliny hyaluronové |
| HoBt | 1-hydroxybenzotriazol |
| IA | kyselina methylenjantarová |

IR infračervené spektrum
NHS N-hydroxysukcinimidu
NIPAAm N-isopropylakrylamid
NMR nukleární magnetická rezonance
OSA oktenylsuknicidanhydrid
PLA polylaktid
ppm parts per million
SEM skenovací elektronový mikroskop
SO stupeň oxidace
UV ultrafialové

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| Obrázek 1: Aplikace biomateriálů v průběhu let | 13 |
| Obrázek 2: Klasifikace biomateriálů [4]..... | 14 |
| Obrázek 3: Tradiční rozdělení biopolymerů | 16 |
| Obrázek 4: Vybrané aplikace konkrétních polysacharidů a jejich zdrojů | 17 |
| Obrázek 5: Strukturní jednotka kyseliny hyaluronové | 18 |
| Obrázek 6: Hydrofilní a hydrofobní místa hyaluronanu..... | 19 |
| Obrázek 7: Klíčové funkční skupiny HA | 21 |
| Obrázek 8: Reakční schéma amidace s aktivačním činidlem EDC | 22 |
| Obrázek 9: Schéma amidace za použití DMTMM | 22 |
| Obrázek 10: Reakční schéma esterifikace za produktu GMA-HA..... | 23 |
| Obrázek 11: Reakční schéma esterifikace HA za vzniku esterových vazeb | 24 |
| Obrázek 12: Reakční schéma esterifikace..... | 24 |
| Obrázek 13: Reakční schéma oxidace hyaluronanu | 25 |
| Obrázek 14: Zobrazení hydrogelu z pohledu velikosti | 27 |
| Obrázek 15: Názorný vznik <i>Schiffovy báze</i> | 28 |
| Obrázek 16: Využití termosenzitivních hydrogelů..... | 29 |
| Obrázek 17: Princip měření NMR spektroskopie..... | 31 |
| Obrázek 18: Schéma elektronového mikroskopu | 32 |
| Obrázek 19: Princip měření vzorku pomocí metody FT-IR..... | 33 |
| Obrázek 20: Návrh prováděného experimentu | 35 |
| Obrázek 21: Schéma amidace HA pomocí různých aktivačních činidel..... | 36 |
| Obrázek 22: Reakční schéma oxidace HA | 37 |
| Obrázek 23: Vyhodnocení ¹ H NMR spekter modifikované a nativní HA v závislosti na molekulové hmotnosti ($M_w = 124\text{kDa}$ (vlevo), 243 kDa (vpravo)) a aktivačního činidla (EDC, DMTMM)..... | 46 |
| Obrázek 24: Vyhodnocení ¹ H NMR spekter oxidované HA v závislosti na M_w HA ($1,5\text{MDa}$ -tmavě zelenošedá (horní) křivka, $1,18\text{MDa}$ – fialová (prostřední) křivka, nativní HA-černá (spodní) křivka)..... | 47 |
| Obrázek 25: Srovnání aktivačních činidel EDC a DMTMM v závislosti na stupni modifikace | 48 |
| Obrázek 26: Srovnání FT-IR spekter čistého HA a amidovaných HA ($M_w=124\text{ kDa}$ -vlevo, $M_w=243\text{kDa}$ -vpravo) | 49 |
| Obrázek 27: Srovnání FT-IR spekter čistého HA (černá křivka) a oxidovaných HA ($1,5\text{MDa}$ -fialová (prostřední) křivka, $1,18\text{MDa}$ -šedá (horní) křivka)..... | 50 |

| | |
|--|----|
| Obrázek 28 SEM snímky struktury připraveného hydrogelu (z 1% roztoků) v závislosti na molekulové hmotnosti (124kDa-modrá a zelená barva, 243kDa-růžová a žlutá barva) a aktivační činidla (EDC-značení A, DMTMM-značení B)..... | 54 |
| Obrázek 29 SEM snímky struktury připraveného hydrogelu (z 2% roztoků) v závislosti na molekulové hmotnosti (124kDa-modrá a zelená barva, 243kDa-růžová a žlutá barva) a aktivační činidla (EDC-znač. A, DMTMM-znač. B) | 55 |
| Obrázek 30 SEM snímky struktury připraveného hydrogelu (z 3% roztoků) v závislosti na molekulové hmotnosti (124kDa-modrá a zelená barva, 243kDa-růžová a žlutá barva) a aktivační činidla (EDC-znač. A, DMTMM-znač. B) | 55 |
| Obrázek 31 Závislost porozity připraveného hydrogelu na koncentraci HA (1% (w/w), 2% (w/w) a 3% (w/w) vzorků), použitím aktivačním činidlem (EDC, DMTMM) a molekulové hmotnosti oxidované HA (1,5MDa, 1,18MDa) pro molekulovou hmotnost HA-ADH 124kDa..... | 56 |
| Obrázek 32 Závislost porozity připraveného hydrogelu na koncentraci HA (1% (w/w), 2% (w/w) a 3% (w/w) vzorků), použitím aktivačním činidlem (EDC, DMTMM) a molekulové hmotnosti oxidované HA (1,5MDa, 1,18MDa) pro molekulovou hmotnost HA-ADH 243kDa..... | 57 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|---|----|
| Tabulka 1: Amidace HA s aktivačním činidlem DMTMM..... | 38 |
| Tabulka 2: Amidace HA s aktivačním činidlem EDC..... | 39 |
| Tabulka 3: Parametry oxidace HA (1,5 MDa)..... | 40 |
| Tabulka 4: Parametry oxidace HA (1,18 MDa)..... | 40 |
| Tabulka 5: Navržené materiálové kombinace připravených hydrogelů | 43 |
| Tabulka 6 Stanovené hodnoty M_w v závislosti na použitém činidle (DMTMM, EDC) konjugované HA | 51 |
| Tabulka 7 Stanovené hodnoty M_w v závislosti na čase provedené reakce (7,5h, 8h, 10h) oxidované HA | 51 |
| Tabulka 8: Hodnoty SO pro HA-OX v závislosti na čase reakce a M_w polymeru (Kde: *počet aldehydických skupin (CHO) /100 jednotek HA) | 52 |
| Tabulka 9 Hodnoty SO pro finální derivát HA-OX v závislosti M_w polymeru v čase reakce 10h (Kde: *počet aldehydických skupin (CHO) /100 jednotek HA)..... | 52 |
| Tabulka 10: Hodnoty stanoveného gelačního času pro jednotlivé kombinace připravených hydrogelů | 53 |