

Příprava hydrogelů na bázi hyaluronanu a jejich zpracování pomocí 3D tisku

Bc. Kateřina Korpasová

Diplomová práce
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Bc. Kateřina Korpasová
Osobní číslo:	T22448
Studijní program:	N0711A130023 Materiálové inženýrství a nanotechnologie
Forma studia:	Prezenční
Téma práce:	Příprava hydrogelů na bázi hyaluronanu a jejich zpracování pomocí 3D tisku

Zásady pro vypracování

- Vypracovat rešerši zabývající se problematikou přípravy hydrogelů na bázi hyaluronanu a možnostmi jejich charakterizace.
- Provést základní experimenty přípravy hydrogelů hyaluronanu v závislosti na koncentraci polymeru, molekulové hmotnosti, molárním poměrem látek a různém způsobu síťování.
- Připravené hydrogely zpracovat pomocí 3D tisku do definovaného tvaru a následně zhodnotit vliv tiskových parametrů na tištěnou strukturu.
- Získané výsledky přehledně diskutovat a uvést hlavní závěry práce.

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

Seznam doporučené literatury:

1. EbnesaJJad, Sina. Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics – Properties, Processing and Applications. Elsevier, 2013. ISBN 978-1-4557-2834-3.
2. Chen, Yu. Hydrogels Based on Natural Polymers. Elsevier, 2020. ISBN 978-0-1281-6421-1.
3. TROMBINO, Sonia, Camilla SERVIDIO, Federica CURCIO a Roberta CASSANO. Strategies for Hyaluronic Acid-Based Hydrogel Design in Drug Delivery. *Pharmaceutics* 2019, 11(8). ISSN 1999-4923.
4. GARG, Hari G. a Charles A. HALES. Chemistry and biology of hyaluronan. Amsterdam: Elsevier, 2004. ISBN 978-0-08-044382-9.
5. Murphy, S.V., Atala, A., 3D Bioprinting of Tissues and Organs, *Nature Biotechnology*, 2014, 32, 8,773-785.
6. Ligon, S.C., et.al, Polymers for 3D printing and Customized Additive Manufacturing, *ChemicalReviews*, 2017, 117, 15, 10212-10290.

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

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

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Petr Smolka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příloha č. 4 – Prohlášení autorky DP

**PROHLÁŠENÍ AUTORKY
DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky:

.....
podpis studentky

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zaměřuje na přípravu hydrogelů na bázi modifikovaných forem hyaluronanu (HA), které jsou vzájemně síťovány metodou Schiffovy báze, a následně vytisknuty na 3D tiskárně do podoby hydrogelových mřížek. Připravené hydrogelové sítě se liší svým chemickým složením a koncentrací modifikovaných hyaluronanů (1%, 2%, 3%). Každý vzorek hydrogelu je složen ze dvou derivátů modifikované HA. Amidovaného hyaluronanu, připraveného za použití aktivačního činidla DMTMM nebo EDC, a oxidovaného hyaluronanu. Hlavním cílem této práce bylo připravit hydrogely na bázi hyaluronanu (amidací a oxidací HA) tak, aby je bylo možné tisknout na 3D tiskárně do požadovaného tvaru. Následná charakterizace 3D tištěných mřížek diskutuje vliv jednotlivých parametrů na tištěnou strukturu, jako jsou chemické složení hyaluronanových hydrogelů, čas gelace hydrogelů a tiskové parametry. Výsledky této diplomové práce potvrdily tisknutelnost připravených hydrogelů na bázi hyaluronanu. Hydrogel na bázi modifikovaných hyaluronanů lze považovat za perspektivní materiálem pro aplikace v oblasti 3D biotisku a medicíny.

Klíčová slova: Hyaluronan, hydrogel, Schiffova báze, 3D tisk

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on the preparation of hydrogels based on modified forms of hyaluronan (HA), which are cross-linked using the Schiff base method, and subsequently printed on a 3D printer to form hydrogel grids. The prepared hydrogel networks differ in their chemical composition and concentration of modified hyaluronan (1%, 2%, 3%). Each hydrogel sample is composed of two derivatives of modified HA. Amidated hyaluronan, prepared using the activating agent DMTMM or EDC, and oxidized hyaluronan. The main objective of this work was to prepare hyaluronan-based hydrogels (by amidation and oxidation of HA) so that they could be printed on a 3D printer to the desired shape. The subsequent characterization of the 3D printed grids discusses the influence of different parameters on the printed structure, such as the chemical composition of the hyaluronan hydrogels, the gelation time of the hydrogels and the printing parameters. The results of this thesis confirmed the printability of the prepared hyaluronan-based hydrogels. The modified

hyaluronan-based hydrogel can be considered as a promising material for applications in 3D bioprinting and medicine.

Keywords: Hyaluronan, hydrogel, Schiff base, 3D printing

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí mé diplomové práce, paní Ing. Lence Musilové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a podporu během výzkumu. Její cenné rady a sdílené nadšení mi pomohly naplnit cíle této práce. Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. Lence Vítkové, Ph.D. za přínosné konzultace týkající se prováděných modifikací a 3D tisku hydrogelů.

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

OBSAH

ÚVOD	2
I TEORETICKÁ ČÁST	4
1 BIOPOLYMERY	5
1.1 STRUKTURA BIOPOLYMERŮ	5
1.2 VLASTNOSTI A APLIKACE BIOPOLYMERŮ	6
1.3 ROZDĚLENÍ BIOPOLYMERŮ	6
2 BIO-BASED POLYMERY	8
3 KYSELINA HYALURONOVÁ	9
3.1 STRUKTURA A MOLEKULOVÁ HMOTNOST HA	9
3.2 VÝSKYT A VÝROBA	10
3.3 VLASTNOSTI HYALURONANU A JEJICH VYUŽITÍ V PRAXI	12
3.4.1 Modifikace funkční skupiny –COOH.....	13
3.4.2 Modifikace funkční skupiny –OH	15
3.4.3 Příprava oxo skupiny na polymerním řetězci HA.....	16
3.4.4 Síťování HA	16
4 HYDROGELY	18
4.1 METODY PŘÍPRAVY HYDROGELŮ	18
4.1.1 Fyzikální síťování	19
4.1.2 Chemické síťování	20
4.2 VLASTNOSTI A APLIKACE HYDROGELŮ	21
4.3 DĚLENÍ HYDROGELŮ	23
4.3.1 pH responzivní hydrogelové sítě	23
4.3.2 Termoresponzivní hydrogelové sítě	23
4.3.3 Elektricky responzivní hydrogelové sítě	24
4.4 CHARAKTERIZACE HYDROGELŮ	24
4.4.1 Nukleární magnetická rezonance (NMR)	24
4.4.2 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)	26
4.4.3 Tahové zkoušky	26
4.4.4 Botnací testy	27
4.4.5 Testy biokompatibility	27
4.5 3D TISK	29
4.5.1 Rozdělení technologie 3D tisku	30
4.5.2 Aplikace aditivní technologie 3D tisku	31
II PRAKTICKÁ ČÁST	33
5 POPIS EXPERIMENTU	34
5.1 POUŽITÉ MATERIÁLY	35
5.2 PŘÍPRAVA DERIVÁTŮ HA	35

5.2.1	Příprava amidované formy hyaluronanu (HA-ADH) pomocí DMTMM.....	36
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
5.3.2	Síťování HA	42
5.4	3D TISK	43
5.4.1	Parametry tisku.....	44
5.4.2	Tisk hydrogelů.....	45
5.4.3	Charakterizace 3D tištěných mřížek	45
5.5	STABILIZACE ROZTOKY SOLÍ	46
5.6	CHARAKTERIZACE HYDROGELŮ	47
5.6.1	Skenovací elektronový mikroskop (SEM)	47
6	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	48
6.1	MODIFIKACE HA-ADH A HA-OX.....	48
6.2	OVĚŘENÍ MODIFIKACE.....	49
6.2.1	FT-IR.....	49
6.2.2	NMR.....	51
6.3	3D TISK	56
6.4	CHARAKTERIZACE 3D TIŠTĚNÝCH MŘÍŽEK.....	57
6.4.1	Reologické měření.....	57
6.4.2	Botnací testy	58
6.5	STABILIZACE HYDROGELŮ ROZTOKY SOLÍ.....	59
6.6	CHARAKTERIZACE HYDROGELŮ	60
6.6.1	Gelační čas hydrogelů	60
6.6.2	SEM.....	62
7	ZÁVĚR.....	64
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	66
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	72
	SEZNAM OBRÁZKŮ	74
	SEZNAM TABULEK.....	76

ÚVOD

Biopolymery jsou přírodní polymery produkované živými organismy. Stejně jako ostatní polymery se skládají z monomerních jednotek, které jsou kovalentně spojeny do řetězců a tvoří větší molekuly. Biopolymery mají využití v mnoha oblastech, včetně biomedicíny, průmyslu a životního prostředí. Souhrnně lze říci, že biopolymery jsou pozoruhodné materiály s jedinečnými vlastnostmi a jejich studium nadále přispívá k lepšímu pochopení živých organismů a jejich využití v různých oblastech. V dnešní době se takové materiály cíleně vyhledávají k dalšímu využití, neboť svou povahou neohrožují stav životního prostředí. Právě tato vlastnost přidává biopolymerům na potenciálu k zařazení do stávajících a budoucích aplikací. Z pohledu struktury, lze biopolymeru vnímat jako řetězce nebo-li řadu monomerních jednotek, které umožňují i několik dimenzionálních rozmístění v prostoru [2] a jejich konformace je dána podmínkami okolního prostředí (teplota, rozpouštědlo, přítomností dalších komponentů), ve kterém se vyskytují. Různorodost zastoupených monomerů v řetězci zajišťuje heterogenní charakter biopolymeru. Struktura a chemické složení polymeru přirozeně předávají výstupnímu biopolymeru většinu jeho vlastností. S mírou zastoupení krystalické fáze v biopolymeru se mění jejich přechodové teploty a rozpustnost. Mezi další vlastnosti biopolymerů, díky kterým nacházejí své místo v různých oblastech jako např. biomedicínské aplikace (chirurgické stehy, *drug delivery*, zubní implantáty, tkáňové inženýrství), obaly na potraviny, zemědělské produkty a farmacie, patří biokompatibilita, nízká toxicita, biologická odbouratelnost či transparentnost. Ovšem např. nízká pevnost a špatná stabilita či větší spotřeba energie při výrobě biopolymerů jim brání jejich uplatnění v širších oblastech využití, kde stále převládají materiály syntetizované z ropy. Proto se pracuje na jejich úpravě využitím vhodných modifikací [1-3]. Velmi populárním biopolymerem je kyselina hyaluronová. Kyselina hyaluronová je lineární přírodní polysacharid. Ve formě své sodné soli je přirozenou součástí všech živých organismů, konkrétně je hlavní složkou extracelulárního matrixu (ECM). Hyaluronan je v mnoha aplikacích využíván pro svou silně hydrofilní povahu (zvládne na sebe vázat velké množství molekul vody), díky které se mu přezdívá přírodní zvlhčovač. K dlouhé řadě aplikací mu pomáhají i další nativní vlastnosti jako jsou biokompatibilita a viskoelastičita.

Nativní řetězec hyaluronanu ovšem stále nedisponuje takovými vlastnostmi, jak by některé oblasti aplikací uvítaly. Je velmi dobře rozpustný ve vodě, má omezenou rozpustnost v organických rozpouštědlech a je příliš citlivý na působení tepla, podléhá tím degradaci. Různé typy modifikací polymerního řetězce a techniky síťování jsou řízeny variabilními

požadavky na výstupní charakter. Podstata síťování jednoduše spočívá ve spojování různých polymerních řetězců vyšším počtem vazeb. Naproti tomu modifikace polymerního řetězce představuje proces, při kterém jsou na polymerní řetězec navázány konkrétní funkční skupiny (např. NH_2 , SH , atd.), v důsledku čehož má připravený derivát jiné vlastnosti. Vhodným použitím připravených derivátů HA s jejich následným síťováním dochází k řešení přirozených problémů nativního HA (např. s jeho nízkou mechanickou stabilitou a náchylností k degradaci), které mu podstatně zužují oblast konečných aplikací.

V důsledku síťování lze vytvořit trojrozměrnou síť, hydrogel, mezi jehož hlavní přednosti patří schopnost absorbovat a udržet v sobě velké množství vody. První písemná zmínka o hydrogelech se datuje do roku 1960, kdy Wichterle a Lim představují hydrogel z polyhydroxyethylmethakrylátu (PHEMA) [18; 44]. Hydrogely se díky svým flexibilním vlastnostem a jednoduchým způsobům přípravy dostaly do různých oblastí biomedicínského a inženýrského prostředí (tkáňové inženýrství, senzory, měkká robotika a čištění odpadních vod) [18]. Jak už bylo zmíněno, nativní vlastnosti hydrogelů rozhodují o jejich konkrétním využití, ať už se jedná o průmyslové či lékařské aplikace [48]. Např. hydrogel připravený metodou *Schiff base* dokáže obnovovat své původní vlastnosti, což mu otevírá nové možnosti v životnosti a jeho odolnosti v různých aplikacích, například byl prokázán jeho účinek při opravě centrálního nervového systému [49]. Pro zvážení konkrétních aplikací je nutné hydrogel příslušně charakterizovat z různých pohledů. Stěžejní požadavky formují mimo jiné velikost a morfologii hydrogelu, jeho chemické složení, rychlost absorpce, mechanické vlastnosti a biokompatibilitu. Charakterizují se tedy fyzikální (degradace, porozita, tepelná stabilita), chemické (chemické složení), mechanické (pevnost v tahu/tlaku, houževnatost), reologické (viskozita) a biologické vlastnosti [18; 55]. V současné době se do popředí zájmu dostávají hydrogely, které jsou zpracovány pomocí metody 3D tisku, jenž spočívá v postupném skládání vrstev materiálu v 3D objekt o definovaných rozměrech.

Cílem diplomové práce byla modifikace nativního hyaluronanu tak, aby ze získaných derivátů bylo možné připravit vhodnou síťovací reakcí hydrogely užitečné v oblasti biomedicínských aplikací. Dílčím cílem bylo dále zhodnotit vliv jednotlivých parametrů (molekulová hmotnost, aktivační činidlo, ekvimolární poměr, koncentrace polymeru, atd.) provedených modifikací (amidace, oxidace). Následně byly ze získaných derivátů připraveny hydrogely pomocí 3D tisku do definovaného tvaru. V neposlední řadě byl zhodnocen vliv jednotlivých parametrů na jejich přípravu zmíněnými deriváty a byla provedena jejich charakterizace.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOPOLYMERY

Jelikož je definice biopolymeru řízena dvěma kritérii, povahou zdroje a biologickou rozložitelností (biodegradabilitou), nelze ji jednoznačně určit. Lze je, ale podle těchto faktorů rozdělit, a to na (1) biopolymery, jejichž zdroj pochází z biologických zdrojů a jsou biologicky odbouratelné (př. kyselina polymléčná, PLA); (2) biopolymery vyrobené z obnovitelných surovin, které nejsou biologicky odbouratelné (př. bio-polyethylen, bio-LDPE) a (3) biopolymery vyrobené z fosilních paliv, které lze biologicky rozložit (př. polykaprolakton, PCL) [1; 2]. Biodegradabilita je proces, kdy se daný polymer zcela rozloží vlivem mikroorganismů (bakterie, plísně) nebo působením fotodegradace, tzn., že se materiál rozloží vlivem působení slunečního záření na přírodní složky (biomasu, oxid uhličitý). Ideálním zástupcem biopolymeru je materiál přírodního původu, který je přirozeně biodegradabilní, např. celulóza [2; 3]. V dnešní době se takové materiály cíleně vyhledávají k dalšímu využití, neboť svou povahou neohrožují stav životního prostředí. Právě tato vlastnost přidává biopolymerům na potenciálu k zařazení do stávajících a budoucích aplikací.

1.1 Struktura biopolymerů

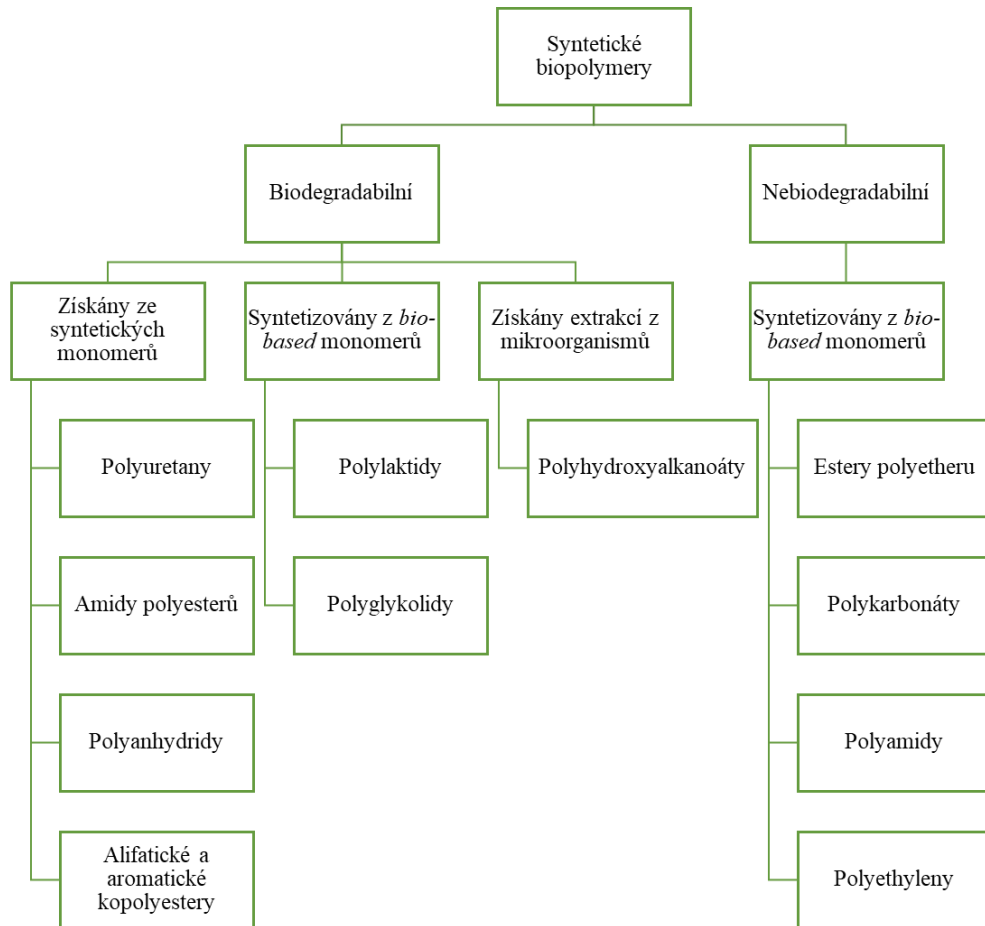
Z pohledu struktury, lze biopolymeru vnímat jako řetězce nebo-li řadu monomerních jednotek, které umožňují i několik dimenzionálních rozmístění v prostoru [2] a jejich konformace je dána podmínkami okolního prostředí (teplota, rozpouštědlo, přítomností dalších komponentů) ve kterém se vyskytují. Různorodost zastoupených monomerů v řetězci zajišťuje heterogenní charakter biopolymeru. Monomerními jednotkami biomakromolekul mohou být nukleové kyseliny (př. RNA) [1; 4; 5], proteiny (albumin, želatina) či polysacharidy (celulóza, chitosan, kyselina hyaluronová) [1]. Primární struktura respektive uspořádání monomerních jednotek v řetězcích, představuje základní stavební kámen, který určuje vlastnosti a chování polymerů. Jinými slovy polymer je dlouhý řetězec, ve kterém každý článek tvoří monomerní jednotku. Všechny monomery jsou vzájemně spojeny vazbami, jež tvoří polymerní řetězec. Specifickou primární strukturu mají syntetické polymery, což jim umožňuje různé vlastnosti, jako je pevnost, pružnost, teplotní stabilita a další. Jak už bylo naznačeno, každá skupina monomerů má jinou primární skupinu. Tak například u nukleových kyselin je základem sekvence bází připojených na cukerný kruh, u proteinů jsou to charakteristické aminokyseliny, zatímco polysacharidy tvoří monosacharidové jednotky propojené glykosidickou vazbou [6].

1.2 Vlastnosti a aplikace biopolymerů

Struktura a chemické složení polymeru přirozeně předávají výstupnímu biopolymeru většinu jeho vlastností. S mírou zastoupení krystalické fáze v biopolymeru se mění jejich přechodové teploty a rozpustnost. Právě vyšší zastoupení krystalické fáze v řetězci zajišťuje materiálu větší odolnost proti rozpouštění. Toho se využívá například při přípravě polymerních filmů, které díky řízené krystalinitě mohou vykazovat rozdílnou propustnost vůči vodní páře a kyslíku. Můžeme je rozdělit poté na ty (1) méně propustné pro vodní páru i kyslík, (2) málo propustné pro vodní páru, ale vysoce propustné pro kyslík, (3) a méně propustné pro kyslík a zároveň dobře propustné pro vodní páru. Další specifickou vlastností polymerů vycházející z jejich struktury je molekulová hmotnost polymeru, která přímo úměrně ovlivňuje modul pružnosti a pevnosti v tahu. Mezi další vlastnosti biopolymerů, díky kterým nacházejí své místo v různých oblastech jako např. biomedicínské aplikace (chirurgické stehy, *drug delivery*, zubní implantáty, tkáňové inženýrství), obaly na potraviny, zemědělské produkty a farmacii, patří biokompatibilita, nízká toxicita, biologická odbouratelnost či transparentnost. Ovšem např. nízká pevnost a špatná stabilita či větší spotřeba energie při výrobě biopolymerů jim brání jejich uplatnění v širších oblastech využití, kde stále převládají materiály syntetizované z ropy. Proto se pracuje na jejich úpravě [1-3]. Příkladem jejich modifikací může být například přidavek vhodného plniva, díky kterému může výrazně dojít k celkovému zlepšení horších mechanických vlastností. Konkrétní plniva je vždy vybíráno na základě konkrétní aplikace biopolymerního kompozitu, kde biopolymerní složka přispívá v nano/mikro zastoupení. Tyto kompozity lze připravit různými procesy, např. vytlačováním, elektrostatickým zvlákňováním nebo různými typy lisování. Produkty jsou poté tepelně stabilnější, tužší a zároveň ekologičtější [1; 3]. Příkladem takové úpravy může být použití vláken termoplastického biopolymeru tzv. *sugar palm starch* (SPS) jako formy výztuže [1; 7] případně vyztužením ligninové matrice pomocí vláken z celulózy [1; 8].

1.3 Rozdělení biopolymerů

Biopolymery lze rozdělit na základě různých kritérií jako např. podle původu (zdroje) biodegradability, přípravy, složení apod. Příklad rozdělení syntetických biopolymerů podle jejich biodegradability je zobrazen na Obrázku 1.



Obrázek 1: Rozdělení skupiny syntetických biopolymerů na základě biodegradability [3]

Ovšem existují i typy biopolymerů, které jsou sice vyrobeny z biomasy, tedy z látek tvořících těla všech organismů, včetně rostlin, bakterií, sinic, hub a živočichů či obnovitelných zdrojů, ale v konečné fázi biodegradabilní přesto nejsou (např. přírodní kaučuk). Důležité je také rozdělení podle původu vstupních surovin, tedy na tzv. „*petroleum-based*“ a „*bio-based*“ biopolymery.

2 BIO-BASED POLYMERY

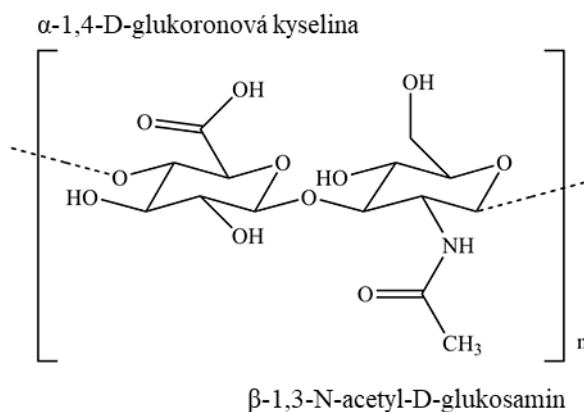
Jedná se o polymery, které byly připraveny biotechnologickým postupem (např. nebo jejíž surovina pochází z biomasy [3]. Mohou tak vznikat jako produkty činností řasa mikroorganismů. Díky zdroji původu se jedná o tzv. biodegradabilní polymery což znamená, že jsou schopné se biologicky rozkládat, což je jeden z důvodů proč se o nich uvažuje jako o možné náhradě další skupiny tzv. *petroleum-based* polymerů, které mají pro životní prostředí příliš zatěžující životní cyklus. Na základě kombinace širokého využití polyesterů a jejich nulové schopnosti biodegradability [2; 9; 10], jsou pro svou podobnost ve struktuře nejvíce studovány tzv. *bio-based* polyestery. Používají se např. při výměně např. poly(ethylenetereftalátu) a poly(butylensukcinátu). V některých aplikacích by to totiž mohlo mít znatelný vliv na stav životního prostředí. Jedním z následků může být snížení znečištění vody a půdy. Prvotní výsledky použití těchto polymerů pomohli s vývojem zcela nové skupiny materiálů, tzv. *bio-based* kopolymerům. Může se jednat např. o řadu polyesterů, jejichž stavebními jednotkami jsou *bio-based* monomery [9; 10]. Do skupiny *bio-based* polymerů lze zařadit např. kyselinu polymléčnou (PLA). Jedná se o termoplast, který se získává bakteriální fermentací (nejčastěji z kmenu *Lactobacilli*). Na jeho vlastnosti mají primární vliv molekulová hmotnost a stupeň krystalinity. Právě pro svou přirozenou biodegradabilitu je hojně zastoupen jako obalový produkt pro balení potravin. Vedle biodegradace to jsou také přizpůsobivé mechanické vlastnosti (pevnost a pružnost) co tomuto materiálu zajistily místo v medicínských aplikacích, konkrétně jako součást implantátů a stentů [2; 3; 9]. Dalšími zástupci jsou alginát, hedvábný protein, kolagen, hyaluronan a další [2].

3 KYSELINA HYALURONOVÁ

Kyselina hyaluronová je lineární přírodní polysacharid. Ve formě své sodné soli je přirozenou součástí všech živých organismů, konkrétně je hlavní složkou extracelulárního matrixu (ECM) [11]. Velké zastoupení má také v očním sklivci, pojivových tkáních a pokožce, zatímco nízké koncentrace lze najít např. ve svalech a mozku. Proto je v literatuře zmíněna spíše pod názvy hyaluronan (HA), hyaluronát sodný nebo sodná sůl kyseliny hyaluronové. Hyaluronan je v mnoha aplikacích využíván pro svou silně hydrofilní povahu (zvládne na sebe vázat velké množství molekul vody), díky které se mu přezdívá přírodní zvlhčovač. K dlouhé řadě aplikací mu pomáhají i další nativní vlastnosti jako jsou biokompatibilita a viskoelasticita. V těle má mimo jiné funkci přirozeného hydrátování tkáně, lubrikování pohyblivých částí (např. kloubů) a zajišťovat transport vody. Právě tím, že dokáže zadržovat vlhkost a naplnit tak svůj hydratační potenciál, je součástí kosmetických produktů péče o pleť. V chirurgii usnadňuje hojení ran a regeneraci. První lékařská aplikace HA byla uskutečněna v oblasti oční chirurgie v 50. letech 20. století. Tehdy byl izolován z pupeční šňůry či z kohoutích hřebínků [12]. Od té doby se důkladně studuje jeho struktura, vlastnosti a funkce v živých organismech [13].

3.1 Struktura a molekulová hmotnost HA

HA patří do skupiny glykosaminoglykanů (GAG). Strukturní jednotka hyaluronanu se tedy skládá z β -1,3-N-acetyl-D-glukosaminu a α -1,4-D-glukoronové kyseliny [11; 12], jak je uvedeno na Obrázku 2 [14]. Spojení těchto disacharidových jednotek zajišťují střídající se typy β -1,3 a β -1,4 glykosidické vazby. Zmíněná konfigurace β udržuje tuto makromolekulu v energeticky stabilní poloze, ve které je hyaluronový řetězec ve svém primárním větvení (disacharidové jednotky spojeny β -1,4 glykosidickými vazbami). Vodíkové vazby tvoří sekundární (intramolekulární) strukturu a terciární struktura HA zahrnuje různé konformace makromolekuly v závislosti na podmínkách prostředí polymeru (přítomnost solí, pH). V prostorovém rozložení je ovšem molekula HA na pohled spirálovitá. To je dáno rozmístěním nepolárních (hydrofobních) atomů vodíku a polárních (hydrofilních) postranních řetězců, konkrétně hydroxylové a karboxylové funkční skupiny. Ty spojují intramolekulární i mezimolekulární vodíkové vazby [15]. Jelikož jsou karboxylové skupiny přítomné na D-glukoronové kyselině záporně nabitě (za fyziologického pH a iontové síly), je hyaluronan aniontem [16] a přírodním polyelektrolytem [17; 18].



Obrázek 2: Strukturální jednotka kyseliny hyaluronové

I přesto, že je primární rozvětvení HA oproti jiným zástupcům GAG považováno za primitivnější (relativně lineární řetězec s minimálním větvením), jeho molekulová hmotnost může dosahovat hodnoty od několika jednotek Da až k 10 MDa. Molekulová hmotnost jedné disacharidové jednotky odpovídá přibližně 400 Da, zatímco její průměrná délka se pohybuje kolem 1 nm [15; 16]. Za normálních fyziologických podmínek může řetězec hyaluronanu tvořit až 17 500 jednotek a celková délka takového polymerního řetězce dosahuje až 17,5 μ m [19]. Ve vodném roztoku se řetězce hyaluronanu vzájemně stáčí a zaujímají uspořádání tzv. dvoušroubovice [17], jejíž stabilitu primárně zajišťují vodíkové vazby mezi acetamidem N-acetyl-D-glukosaminu a karboxylovou skupinou D-glukoronové kyseliny [13]. Takové rozložení se mění vlivem podmínek prostředí a umožňuje makromolekule ve vodném prostředí zachytit až 1000 násobek své původní hmotnosti [20; 21], např. 1 g HA může pojmout až 6 l vody [19]. Vodný roztok i extracelulární matrix (ECM) představují prostředí, kde se hyaluronanový řetězec projevuje jako náhodně expandované klubko s velkým hydrodynamickým objemem [12; 16]. Tato molekula se vyskytuje v různých polydisperzních formách s různými molekulovými hmotnostmi (M) [15]. Tzv. oligomerní HA (oligo-HA) představuje HA, jejíž molekulová hmotnost je menší než 10 kDa. Naopak v případě nízkomolekulární HA (LMW-HA) se hodnota M pohybuje v rozmezí 10 a 250 kDa, středně molekulární HA (MMW-HA) dosahuje na 1 MDa. HA, jehož hodnoty molekulové hmotnosti převyšují hodnotu nad 1 MDa patří mezi tzv. vysokomolekulární HA (HMW-HA) a hodnoty vyšší než 6 MDa patří unikátním HA s velmi vysokou molekulovou hmotností (HMW-HA) [19].

3.2 Výskyt a výroba

Hyaluronan se nachází se jak uvnitř buněk, tak v ECM, kde ho nekovalentně vážou proteoglykany (versikan a neurokan) za účelem zvýšení hydratace. Tělo dospělého člověka

může obsahovat až 15 g HA, z nichž se více než polovina tohoto množství vyskytuje v kůži [14; 19; 22]. Mimo ni se dá izolovat také ze svalů a tkání [21], ovšem konkrétně v epidermálních tkáních se jeho poločas rozpadu pohybuje kolem 24 h [16]. Přirozeně se nachází i v chrupavkách, pupeční šňůře a synoviální tekutině obratlovců. V kůži a chrupavkách tvoří HA trojrozměrnou strukturu, která slouží jako síť pro buňky, často nazývaná *scaffolds*. Většinou je tam zastoupena ve své vysokomolekulární formě [13]. U hlodavce rypose lysého bylo zjištěno, že ve srovnání s jinými zástupci této skupiny, má výjimečně vysoké zastoupení HMW hyaluronanu. Díky relativně vysokému obsahu HA u něj byla prokázána mimořádná odolnost vůči rakovině a zajišťuje mu také delší střední délku života. Zmíněná vlastnost dělá tento druh hlodavce důležitým objektem ve výzkumech zaměřených na pochopení mechanismů vzniku nemocí, jako je například rakovina [19; 23]. Hyaluronan je jedním z přirozených produktů živočišných buněk a některých bakterií (*Streptococcus zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*) [16; 24]. První bezbuněčné studie biosyntézy HA byly provedeny v půlce 20. století Markovitzem a jeho spolupracovníky, kteří tímto odhalili roli HA syntázy v buněčné membráně [25]. HA syntáza (HAS) je protein, který spolu s hořečnatými ionty a dvěma substráty cukrů (*uridine diphosphate glucuronic acid*, *uridine diphosphate N-acetylglucosamine*) umožňuje polymeraci hyaluronových řetězců [26], má zde funkci katalyzátoru [16]. Po klonování prvního genu kódujícího HA syntázu v roce 1993 z koku *Streptococcus pyogenes* byly geny podobné HAS identifikovány i u savců (myši, člověka). Expres těchto genů v bakterii *E. coli* vedla k prvním purifikačním procesům [26]. S narůstajícími požadavky na úpravy používaných materiálů v ohledu na životní prostředí, roste také zájem o industriální výrobu *bio-based* materiálu, jakým hyaluronan je. Jeho chemické syntézy ale není lehké dodržet a tradiční extrakce z kohoutích hřebínků nemusí být pro velkokapacitní výrobu dostatečná, zejména díky nízkému výtěžku. Na vzestupu je proto příprava na bázi bakteriálních expresních systémů, např. z kmene *Streptococcus* či z *Bacillus subtilis*. Je potřeba zde zamezit jakékoli hrozcí kontaminaci toxiny přidáním důkladných purifikačních procesů. Nulové znečištění výsledného produktu lze dosáhnout metodou bakteriální fermentace za použití geneticky modifikovaných kmenů bakterií (př. *Lactococcus*) [27; 28]. Různé druhy extrakce HA jsou jinak přínosné, např. izolace HA z kohoutích hřebínků přinese pouhých 7 mg/ml hyaluronanu [29] zatímco *S. zooepidemicus* produkuje až 7 g/l HA [28].

3.3 Vlastnosti hyaluronanu a jejich využití v praxi

Výzkumný tým Vincenta C. Hascalla studoval změny v konformaci intracelulárních řetězců matrice na bázi HA za působení vnějšího patogenu (odezva formou tzv. buněčného stresu) [15]. Byly zkoumány i interakce HA s receptory buněčných povrchů (např. *CD44* – transmembránový receptor glykoproteinu) a tím jeho role v dynamice chování zahrnutých buněk (proliferace, migrace), které se podílejí na terapii hojení ran [23] a vývoji kostry [13; 30]. S ohledem na přirozenou produkci HA v živém organismu se oblast genetického inženýrství zabývá umělým řízením buněčného chování prostřednictvím jejich metabolismu [13]. Stěžejní proměnnou se ukázala velikost molekul HA, které se následně účastní buněčné signalizace za normálních a patologických stavů, kam se řadí i zánětlivé procesy a rakovina [23]. Kvantita konformací hyaluronanové makromolekuly je zřejmě spjata s biologickými vlastnostmi [21] jako jsou přirozeně vysoká hydrofilita (přednostní vliv míry hydrofilních funkčních skupin na polymerním řetězci HA), biokompatibilita a viskoelasticita. HA se pak může uplatňovat v široké škále medicínských aplikací [12; 24]. Ať už se jedná o hojení ran, regulaci buněčného metabolismu [13], ochranu nitroočních tkání v oftalmologii (např. ve formě očních kapek, umělé slzy atd.) [16], 3D tištěné scaffoldy [24]. Různorodost reologických vlastností je dána větvením polymerního řetězce a hodnotou molekulové hmotnosti [12]. HA se řadí mezi pseudoplastické materiály, u kterých v proudění dochází k úměrnému zvyšování smykové rychlosti v závislosti na smykovém napětí. Spolu s dilatantními materiály jsou součástí tzv. Nenevtonských kapalin (jsou charakteristické nelineárním vztahem mezi smykovou rychlostí a smykovým napětím). Dilatantní materiály vykazují při vyšším smykové rychlosti pokles smykového napětí [31]. Díky povaze synoviální tekutiny může HA plnohodnotně tlumit vibrace a případné otřesy a bránit tak možnému poškození kloubních jamek, které hrozí v důsledku stárnutí či nemoci. V případě jeho nedostatku nebo postupného úbytku (v okolí kloubů), což závisí na faktorech jako je metabolismus, obnova tkání a degradace, se ve formě injekcí (s HMW-HA) vpravuje na potřebná místa, čímž pacientovi krátkodobě uleví od bolesti [16]. Molekuly jeho vysoce koncentrovaných roztoků se dokáží formovat do elastické síťovité struktury, která může být základem trojrozměrné sítě [13]. První úspěšné pokusy o síťování HA byly provedeny v roce 1964 Torvard C. Laurentem a jeho týmem ve Švédsku. Experiment byl založen na propojení řetězců hyaluronanu za zvýšení výstupní molekulové hmotnosti do formy trojrozměrné gelové sítě [11; 32].

3.4 Modifikace hyaluronanu

Nativní řetězec hyaluronanu ovšem stále nedisponuje takovými vlastnostmi, jak by některé oblasti aplikací uvítaly. Je velmi dobře rozpustný ve vodě, má omezenou rozpustnost v organických rozpouštědlech a je příliš citlivý na působení tepla, podléhá tím degradaci. Různé typy modifikací polymerního řetězce a techniky síťování jsou řízeny variabilními požadavky na výstupní charakter. Podstata síťování jednoduše spočívá ve spojování různých polymerních řetězců vyšším počtem vazeb. Naproti tomu modifikace polymerního řetězce představuje proces, při kterém jsou na polymerní řetězec navázány konkrétní funkční skupiny (např. NH_2 , SH , atd.), v důsledku čehož má připravený derivát jiné vlastnosti. Vzájemným použitím připravených derivátů může následně dojít k jejich zesíťování, tedy ke vzniku nerozpustné 3D sítě. Cílem většiny modifikací je snaha o vylepšení mechanických, botnavých a reologických vlastností HA. Výhodou je, že dochází k prodloužení doby degradace a k delšímu setrvání na aplikovaném místě. Modifikace jak už bylo naznačeno, převážně založena na chemické reakci konjugací, kdy se prostřednictvím kovalentní vazby na řetězec HA naváže specifická funkční skupina. Tímto způsobem se mohou na řetězec HA implementovat speciální funkční skupiny (esterové, amidové skupiny), bioaktivní látky, ale i barviva (tzv. markery) [33]. Při modifikaci patří mezi nejčastěji využívané funkční skupiny ta karboxylová (přítomna na D-glukoronové kyselině) nebo hydroxylová (součástí N-acetyl-D-glukosaminu) [34]. Volbu mezi zmíněnými technikami řídí požadavky na výstupní produkt [33].

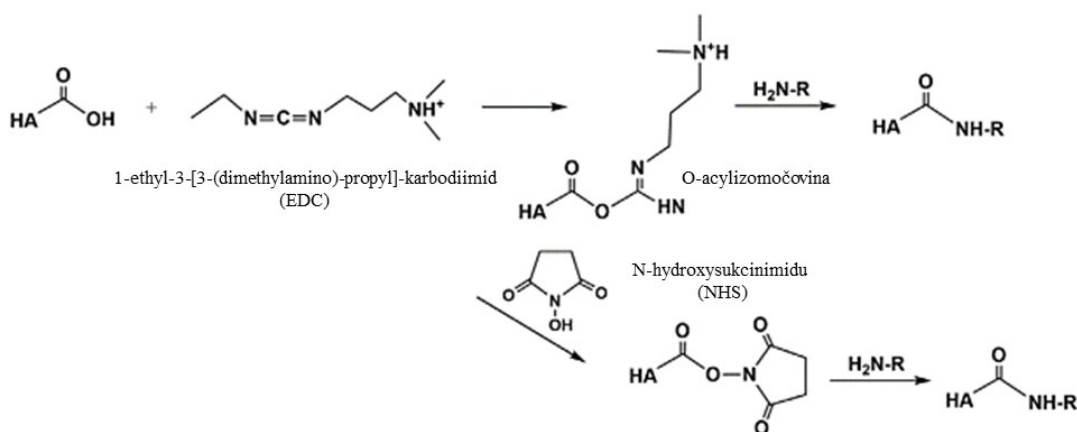
3.4.1 Modifikace funkční skupiny $-\text{COOH}$

Nedílnou součástí jakékoli metody modifikace karboxylové skupiny na polymerním řetězci hyaluronanu je zahrnutí tzv. aktivačního činidla do konjugačního procesu za účelem aktivace zmíněné funkční skupiny. Během procesu se prostřednictvím jednoduché kovalentní vazby naváže na polymerní řetězec monofunkční molekula [33].

Amidace

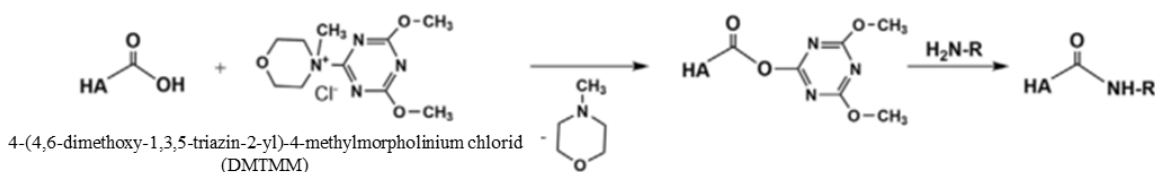
Příkladem modifikace karboxylové skupiny HA představuje amidace. Ta je založena na chemické reakci zmíněné funkční karboxylové skupiny a aminoskupiny, která je součástí přidaného aktivačního činidla, respektive karbodiimidu rozpustného ve vodě (reakční schéma na Obrázku 3). V této roli se používá *1-ethyl-3-(3-(dimethylamino)-propyl)-carbodiimide* (EDC) v časté kombinaci s *1-hydroxybenzotriazole monohydrate* (HOBt)

nebo *N*-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS) [35]. Aktivátorem karboxylové skupiny na HA může být taky *1,1'*-carbonyldiimidazole [33; 36]. Výzkumný tým Chena a Ni (2017) připravil amidovaný hyaluronan reakcí nativního HA s dihydrazidem kyseliny adipové (*Adipic acid dihydrazide*, ADH) za přítomnosti *N*-ethyl-*N'*-[3-(dimethylamino)-propyl]-carbodiimide (EDC·HCl) a HOBt v pufru (0,1M *4*-morpholino ethanesulfonic acid (MES), pH = 6,5, při 25 °C). Výstupní roztok byl nejprve dialyzován a poté lyofilizován (zbaven své vodné složky). Úspěšnou modifikaci OH skupiny a vytvoření nové amidové skupiny potvrdila následná analýza pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR). Pomocí NMR byl rovněž stanoven i stupeň amidace HA, který odpovídal hodnotě 41,5 % [37].



Obrázek 3: Reakční schéma aktivace karboxylové skupiny na polymerním řetězci HA v přítomnosti EDC [33]

Jiný z autorů, který se touto problematikou zabýval D'Este (2014), ve svých experimentech vyměnil EDC za *4*-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMTMM), díky čemuž nemuseli kontrolovat pH během reakce. Amidovaný produkt byl potvrzen pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR) a NMR [36].

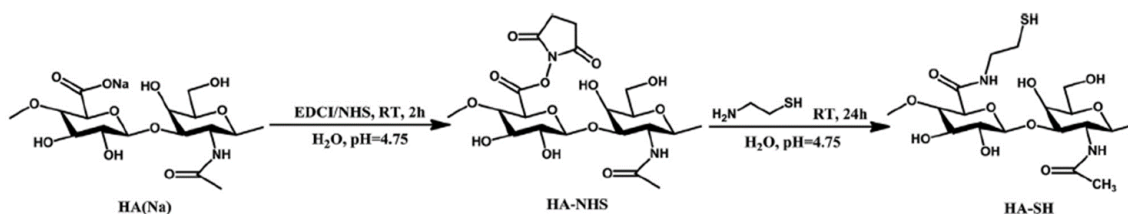


Obrázek 4: Reakční schéma aktivace karboxylové skupiny na polymerním řetězci HA v přítomnosti DMTMM [33]

Thiolace

Další z modifikací HA může být thiolace, jež představuje chemickou reakce, která modifikuje přítomnou karboxylovou skupinu [33]. Bian a spol. (2016) provedli tuto

modifikaci za podmínek, kdy polymerní řetězec hyaluronanu reagoval s přítomným cysteamine hydrochloridem v přítomnosti 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid hydrochlorid (EDCI)/ N-Hydroxysukcinimid (NHS) (pH prostředí bylo 4,75) (viz Obrázku 5). Připravený produkt byl následně dočištěn dialýzou (po dobu alespoň 48 h) proti kyselině chlorovodíkové a chloridu sodném (pH = 3,5). Thiolace hyaluronanu byla potvrzena pomocí NMR, kdy stupeň substituce nových funkčních skupin převyšoval i 60 % [38].



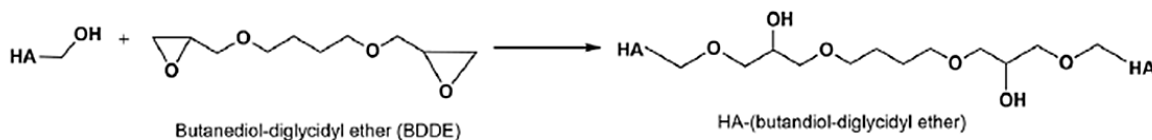
Obrázek 5: Reakční schéma thiolace hyaluronanu kde: HA(Na) je hyaluronan HA-NHS reprezentuje aktivní ester (meziprodukt) a HA-SH je zástupce thiolovaného produktu modifikace hyaluronanu

3.4.2 Modifikace funkční skupiny –OH

Jak už bylo naznačeno výše, další funkční skupinu přítomnou ve struktuře HA, kterou lze při modifikaci použít, představuje skupina hydroxylová. Příkladem konkrétní modifikace může být etherifikace.

Etherifikace

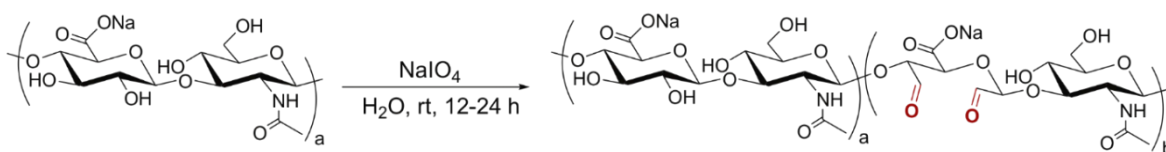
Jedná se o přípravu etherů použitím epoxidů (např. epichlorhydrin). Reakce spočívá v otevírání epoxidového kruhu pro vytvoření etherových vazeb s hydroxylovými skupinami HA. Aby se hydroxylové skupiny HA deprotonovaly (potřeba se dostat nad jejich hodnotu pKa, což je kolem 10), probíhá chemická reakce v silně zásaditém prostředí (pH > 13). V opačném případě, tedy nastavením pH podmínek nižších než je pKa hydroxylových funkčních skupin HA, se sníží počet deprotonovaných –OH skupin a převahou aniontové karboxylové skupiny se vytvoří spíše vazby esterové. Zhao et al. (2000) použil při modifikaci HA dvojitou metodu křížení, jejíž základ byl v postupných reakcích prvně epoxidů za alkalických podmínek (pH = 10) a následně za kyselých podmínek (pH = 4) [34]. Reakční mechanismus této modifikace je znázorněn na Obrázku 6 [33], kde BDDE (zkratka pro *1,4-butanediol diglycidyl ether* představuje činidlo, které je pro svou biodegradabilitu hojně využíváno v kosmetickém průmyslu jako součást hyaluronových výplní [39].



Obrázek 6: Reakční mechanismus etherifikace s –OH skupinou hyaluronanu

3.4.3 Příprava oxo skupiny na polymerním řetězci HA

Působením jodistanu sodného se hydroxylové funkční skupiny dochází k oxidaci na dialdehydové skupiny na polymerním řetězci HA, konkrétně na části D-glukoronové kyseliny. Tímto zásahem se tzv. otevírá cukerný kruh, jak je znázorněno na schématu Obrázku 7. Tento způsob reakce má ovšem za následek významný pokles molekulové hmotnosti [34].

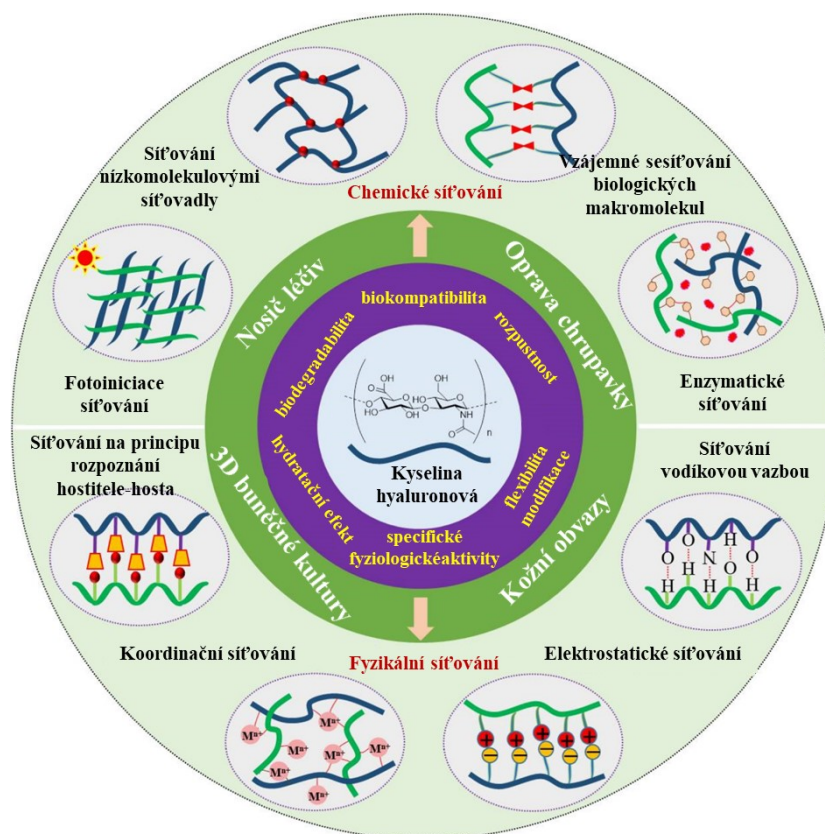


Obrázek 7: Reakční mechanismus přípravy oxo skupiny na polymerním řetězci HA [40]

3.4.4 Síťování HA

Síťovací reakce polymerních řetězců představuje vytvoření síťovité respektive trojrozměrné struktury prostřednictvím chemických vazeb mezi zastoupenými molekulami. Výsledkem síťování je tzv. hydrogel, tedy příčně zesíťované polymerní řetězce nerozpustné ve vodě. Jednotlivé molekuly mohou být vázány chemicky (např. kovalentními nebo iontovými vazbami), nebo fyzikálně, např. zapletením polymerních řetězců. Existuje několik typů hydrogelů, které se liší v jejich vlastnostech a použití. Důležité ovšem je, že síťovací reakce obecně zlepšují mechanické, reologické a botnací vlastnosti připraveného produktu [33]. Vhodným použitím připravených derivátů HA s jejich následným síťováním dochází k řešení přirozených problémů nativního HA (např. s jeho nízkou mechanickou stabilitou a náchylností k degradaci), které mu podstatně zužují oblast konečných aplikací. Obecně se typy síťování HA mohou dělit na dvě skupiny, a to na fyzikální síťování a síťování chemické. Podstatou fyzikálního síťování je síťování např. hyaluronanu prostřednictvím slabých fyzikálních interakcí, např. mezimolekulární vodíkové vazby a elektrostatické interakce. Je to proces snadno kontrolovatelný, reverzibilní, ale také méně pevný. V případě fyzikálního způsobu síťování není potřeba přítomnost síťovacích činidel, což je velká výhoda, neboť právě chemická činidla bývají často toxická pro zdraví člověka. Při přípravě hyaluronových hydrogelů pomocí chemického způsobu síťování, je žádoucí přítomnost

iniciátoru síťovacího procesu. Takovým iniciátorem mohou být např. síťovací látky (glutaraldehyd), světlo (viditelné světlo s fotoiniciátorem riboflavinem) nebo různé enzymy (křenová peroxidáza). Takto připravené hydrogely mají obecně lepší stabilitu a mechanické vlastnosti [41]. V případě plánovaného použití připravených hydrogelů v biomedicínských aplikacích, musí být u hydrogelu hlídána jeho biokompatibilita a toxicita [35; 42]. Schéma rozdílného přístupu síťování hydrogelů na bázi kyseliny hyaluronové s případnými aplikacemi v oblasti zdravotnictví a jejich požadujícími vlastnostmi shrnuje Obrázek 8.



Obrázek 8: Schéma metod síťování a biomedicínských aplikací hydrogelů na bázi kyseliny hyaluronové

Jak už bylo uvedeno, iniciátorem síťování může být podle Bencherif a spol. (2008) i UV světlo (365 nm) spolu s potřebným fotoiniciátorem 2-oxo-ketoglutarová kyselina [43]. Při přípravě hydrogelu na bázi thiolovaného hyaluronanu dochází ke vznikudisulfidické vazby právě následkem oxidace přítomných thiolových skupin. Ve studii výzkumného týmu Biana et al (2016) byl prokázán vliv použité molekulové hmotnosti hyaluronanu na výsledný stupeň substituce thiolované funkční skupiny. Čím vyšší molekulová hmotnost HA byla použita, tím nižší byl stupeň substituce, který významně ovlivňuje výslednou gelaci thiolovaného hydrogelu a to tak, že čím vyšší molekulová hmotnost HA byla použita, tím nižší byl stupeň modifikace, který se následně projevil nízkým časem gelace hydrogelu [38].

4 HYDROGELY

Hydrogely můžeme definovat jako polymerní struktury propojené v trojrozměrnou síť. Mezi jejich hlavní přednosti patří schopnost absorbovat a udržet v sobě velké množství vody. Struktura hydrogelu drží pohromadě díky působení kovalentních či vodíkových vazeb, afinitním nebo hydrofobním interakcím a zapleteninám, č či v neposlední řadě jejich vzájemných kombinací [44]. První písemná zmínka o hydrogelech se datuje do roku 1960, kdy Wichterle a Lim představují hydrogel z polyhydroxyethylmethakrylátu (PHEMA) [18; 44]. Ideální sítě s tetra-funkčními uzly jsou ovšem pozorovány jen zřídka, reálné hydrogelové sítě mají spíše multifunkční místa křížení. Uzly představují místa kovalentních nebo sekundárních spojovacích bodů několika řetězců, které nabývají mnohem menších molekulových hmotností než křížené polymerní řetězce. Svou přítomností se podílejí na fyzikálních vlastnostech výsledného hydrogelu [44]. Hydrogely na bázi PHEMA našly své využití při výrobě kontaktních čoček zejména díky své biokompatibilitě. Hydrogely díky svým flexibilním vlastnostem a jednoduchým způsobům přípravy se dostaly do různých oblastí biomedicínského a inženýrského prostředí (tkáňové inženýrství, senzory, měkká robotika a čištění odpadních vod) [18].

4.1 Metody přípravy hydrogelů

Jak už bylo naznačeno výše, hydrogely lze připravit síťováním polymerních řetězců. Síťovací reakce může probíhat buď fyzikálně (fyzikální síťování), tedy s využitím mezimolekulárních interakcí (vodíkové vazby, elektrostatické interakce), nebo prostřednictvím chemického síťování. V tom případě se polymerní řetězce vzájemně propojují kovalentními vazbami mezi přítomnými funkčními skupinami [18]. Výsledkem konkrétního způsobu síťování, se může výrazně projevit na hodnotě gelačního času, tedy času, během kterého dochází k fázovému přechodu, při kterém se polymerní řetězce začínají vzájemně propojovat a tvořit síťovou strukturu. Obecně lze říci, že gelační čas je velmi závislý na teplotě, koncentraci polymeru, pH reakce atd.. Při síťování polymeru tedy jeho gelaci, dochází k nárůstu viskozity, v důsledku čehož se mění jeho mechanické vlastnosti. Gelace hraje klíčovou roli při výrobě hydrogelů pro lékařské nebo potravinářské aplikace [37].

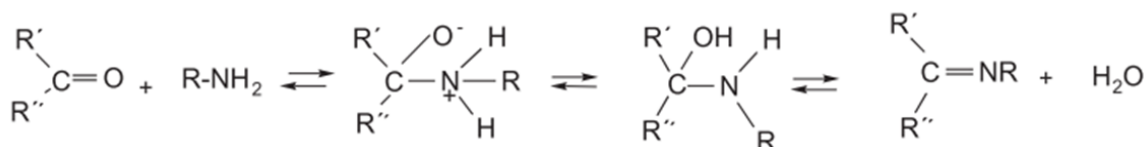
4.1.1 Fyzikální síťování

Polymerní řetězce umožňují přípravu hydrogelů fyzikálním síťováním na základě slabých/silných mezimolekulárních interakcí. Mezi ně patří vodíkové vazby, které vznikají spojením atomu vodíku s vysoce elektronegativním atomem (např. dusík, kyslík či fluor), který na sobě nese pár elektronů. Vodíková vazba je slabým příkladem mezimolekulárních vazeb, ovšem zesiluje se s vyšším počtem zapojených funkčních částí polymerního řetězce [18], což jde vidět právě u polymerního řetězce HA. Jeho součástí je totiž plno funkčních skupin hydroxylové, karboxylové a amidové povahy, které prostřednictvím mezimolekulárních vodíkových vazeb lehce síťují s jinými funkčními skupinami. Proto se tento typ síťování stal nejčastěji využívaným způsobem přípravy hydrogelů na bázi hyaluronanu. V případě nízké stability hydrogelové sítě se dá materiál stabilizovat i nevazebnou interakcí. Např. koordinačním síťováním, kde se sdílí elektronový pár mezi ligandem a kovovým iontem [41]. Díky tomu, že vytvořené koordinační vazby kovů mají stabilitu blízkou kovalentním vazbám, jsou tyto výsledné hydrogely obvykle stabilnější než ty, které vznikají pomocí vodíkových vazeb, elektrostatických interakcí apod. Jelikož je hyaluronový řetězec bohatý na kyslík a dusík, může vytvářet koordinační vazby s různými kovovými ionty (př. Fe^{3+} , Ca^{2+}) a rozšiřovat tak zvýšením své stability oblast potenciálních aplikací [41; 45].

Metoda Schiffovy báze

Princip způsobu síťování s využitím Schiffovy báze spočívá ve spojení aminové a aldehydové funkční skupiny přítomných na polymerním řetězci, jehož výsledkem je iminová vazba (Obrázek 9, kde $\text{R}_2\text{C}=\text{NR}'$, $\text{R}' \neq \text{H}$). Konkrétním příkladem může být takto řízená síťovací reakce mezi glutaraldehydem (zástupce aldehydů) a chitosanem (zástupce aminů). Použitý ekvimolární poměr, stupeň síťování, pH reakce, teplota, koncentrace polymeru, stupeň substituce atd. následně ovlivňuje mechanické vlastnosti hydrogelové sítě. Zvolenou koncentrací glutaraldehydu v připraveném hydrogelu lze také měnit mechanické vlastnosti a poměr absorpce vody. To má významný vliv na chování buněk. Iminová vazba vytvořená mezi aminovou a aldehydovou skupinou je mimo jiné citlivá na pH, (v kyselém prostředí nebo v přítomnosti aminokyselin se může rozpadat). Proces síťování s využitím tzv. Schiffovy báze umožňuje využít dynamiku rovnováhy mezi iminovými vazbami a reaktanty aldehydové a aminové povahy tak, že bude mít výsledný hydrogel schopnost tzv. *self-healingu*, tzn. procesu, při kterém dochází ke znovu obnovení vazeb, které byly v důsledku působení síly či zatížení v materiálu přerušeny. Tvorbu těchto tzv. nových vazeb

je řízenou strukturou hydrogelu spolu s elektrostatickými silami. Tyto tzv. samoregenerační hydrogely vykazují vlastnosti podobné tělu, díky čemuž jsou vhodné pro různé aplikace. Reverzibilní charakter hydrogelů připravených touto metodou může být vyvolán různými podněty (pH, přítomností enzymů) [18].



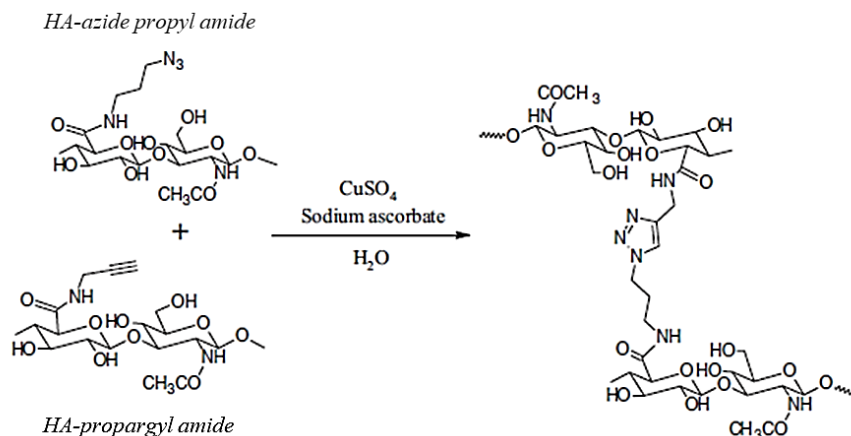
Obrázek 9: Schéma přípravy Schiffovy báze

4.1.2 Chemické síťování

Jak už bylo naznačeno výše chemické síťování hraje klíčovou roli při úpravě vlastností polymerů, od zvýšení tuhosti až po zlepšení jejich aplikovatelnosti, představuje základní koncept ve vývoji nových polymerů. [18]. Jedním z velmi atraktivních způsobů chemického síťování patří tzv. *click-chemistry*.

Click-chemistry

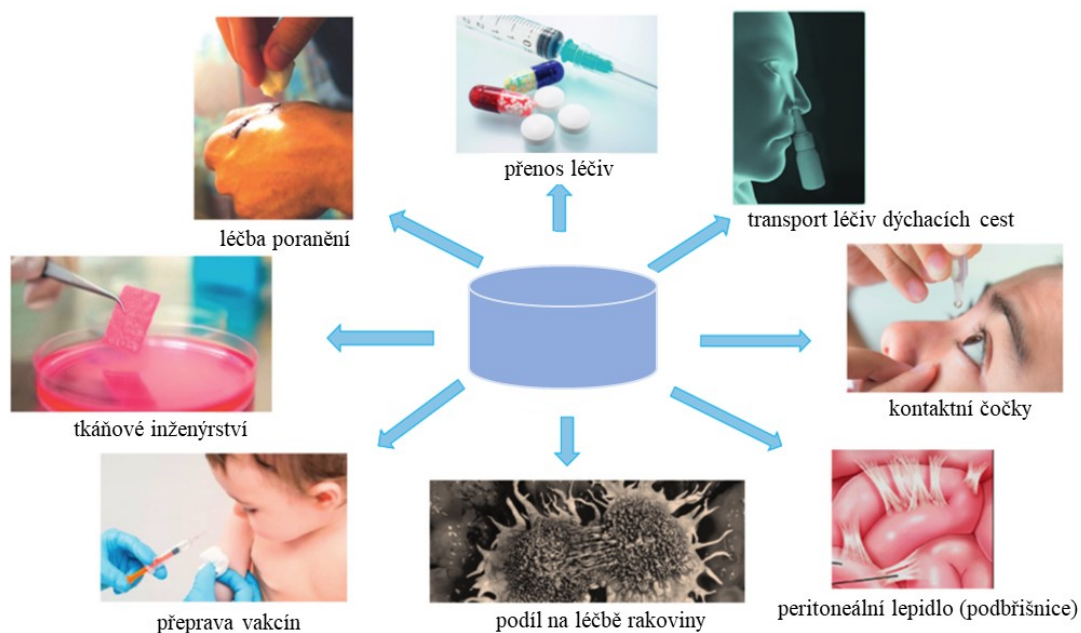
Click-chemistry lze představit jako metodu síťování dvou komponent, která je založena na 1,3-dipolární cykloadici mezi azidem a alkyne (princip je zobrazen na Obrázku 10) [46]. Výhodami tohoto způsobu síťování jsou vysoká reakční rychlost, minimální zatížení hlavní reakce vedlejšími produkty, vysokým stupněm substituce či vysoké výtěžky reakce. Tato metoda byla poprvé představena Barrym Sharplessem v roce 2001. Byla vyzkoušena i Pilusem a jeho týmem při síťování hyaluronanu modifikovaného alkyne s diazidem v roli síťovacího činidla a Cu^{2+} jako katalyzátorem. Použití takto připraveného hydrogelu je ale v biomedicínských aplikacích omezené, neboť je měďnatý katalyzátor cytotoxický (škodlivý pro buňky). Z těchto důvodů sílí tlak na obměnu použitých reaktantů, tak aby došlo k eliminaci přísadky toxického katalyzátoru. Tým Truonga et al. se zabývali přípravou hydrogelové sítě z chitosanu (zástupce azidu) a polyethylenglykolu (PEG, zástupce alkyne) bez zahrnutí měďnatého kationtu, která se následně uchytila v tkáňovém inženýrství [18]. Touto metodou se jim podařilo připravit jak hydrogely, tak mikrogely a nanogely [47].

Obrázek 10: Princip *click chemistry*

4.2 Vlastnosti a aplikace hydrogelů

Nativní vlastnosti hydrogelů rozhodují o jejich konkrétním využití, ať už se jedná o průmyslové či lékařské aplikace [48]. Např. hydrogel připravený metodou *Schiff base* dokáže obnovovat své původní vlastnosti, což mu otevírá nové možnosti v životnosti a jeho odolnosti v různých aplikacích, například byl prokázán jeho účinek při opravě centrálního nervového systému [49]. Vlastnost biologické rozložitelnosti (přirozeně, působením enzymů či mikroorganismů) činí přírodní gely vhodnými pro použití v roli implantátů, neboť se nemusí chirurgicky odstraňovat. Kyselina polymlečná (PLA) či polyvinylalkohol (PVA) se často používají jako nosiče léčiv, protože jsou schopné se přirozeně rozložit. I díky své hydrofilní povaze jsou hydrogely hlavními zdroji pro výrobu biomateriálů, kde je rozhodující kompatibilita s imunitním systémem těla. Hydrofilní povrch hydrogelu totiž zajišťuje minimalizaci mezifázového napětí, které hrozí v prostředí tělních tekutin. Síťová struktura řídí míru bobtnání a to ji dělá zodpovědnou za viskoelastické a elastické vlastnosti. Výsledná pružnost zajistí podobnost se strukturou tkání, zatímco tuhost (pevnost) hydrogelů se stává důležitou v případě aplikace v tkáňovém inženýrství, proto, že pevnost materiálu ve *scaffoldech* určuje buněčné prostředí a ovlivňuje jejich morfologii a adhezi. Na druhou stranu hydrogel s nízkou hodnotou pevnosti nachází využití ve formě nosičů v injekčních terapiích [48]. Slabá mechanická odolnost, může podstatně překážet při použití ve formě různých senzorů [18]. Ovšem třeba výzkumný tým H. Y. Cheunga (2007) vyřešil nízkou mechanickou pevnost tak, že připravil lešení na bázi hydrogelu a kompozitu pro růst kostní chrupavky [50]. V biomedicínských aplikacích kvůli nutnému být v kontaktu s lidským tělem, je důležité tepelná stabilita hydrogelu při teplotě 37 °C. Takovým příkladem mohou být termoresponzivní hydrogely, tedy materiály, které mění své fyzikální nebo chemické

vlastnosti v závislosti na teplotě. Tyto materiály reagují na změny teploty například tak, že se mohou různě stahovat, rozpouštět nebo měnit svoji strukturu. Příčinou takového chování souvisí s přítomností specifické struktury, které jim umožňují reagovat na konkrétní teplotní změny. Při zvýšení nebo snížení teploty dochází k fázovým přechodům, změnám konformace nebo rozpouštění polymeru. Jedním z nejznámějších termoresponzivních polymerů je Poly(N-isopropylakrylamid) (PNIPAm), který se při teplotě kolem 32 °C stává hydrofilním (rozpuštěným ve vodě), zatímco při teplotě se naopak stává hydrofobním (nerozpuštěným). Termoresponzivní hydrogely lze využít například pro řízené uvolňování léčiv, jako nosiče pro cílenou léčbu ať už ve formě různých hydrogelů, mikrokapslí a inteligentních povlaků. [36]. Různé směry medicínských aplikací, ve kterých se může realizovat termosenzitivní hydrogel na bázi *chitosan-β-glycerophosphate* zobrazuje Obrázek 11 níže [51].



Obrázek 11: Konkrétní aplikace termoresponzivních hydrogelů na bázi *chitosan-β-glycerophosphate*

PHEMA (Poly (2-hydroxyethyl methacrylate)) je polymer, který ve vodě vytváří nerozpustný hydrogel. Tento materiál byl původně syntetizován pro použití v kontaktních čočkách Drahoslavem Limem a Ottou Wichterlem a stále představuje jeden z nejvíce používaných hydrogelů v oblastech hojení ran, kontaktních čoček a regenerace kostní tkáně. Svoji povahou neovlivňuje průběh biologických procesů, je odolný vůči degradaci, biokompatibilní a tvárný do různých forem. Kvalita jeho vlastností závisí stupni botnání a metodě na základě které byl hydrogel připraven [44; 52]. Další skupinu hydrogelů

představují tzv. elektricky citlivé hydrogely, které se uplatňují v oblastech přenosů léčiv a umělého svalstva [53]. Hydrogely na bázi PEG (polyethylenglykolu) získaly místo v biomedicínských aplikacích přednostně díky své nulové toxicitě, která je dostala až do skupiny tzv. *smart nanogels* potřebných v diagnostice rakoviny [54].

4.3 Dělení hydrogelů

Vlastnost hydrogelů reverzibilně reagovat na podmínky prostředí, ve kterém se právě nacházejí, se dostala mezi základní požadavky hydrogelových sítí využitých v různých oblastech aplikací. Teplota, iontová síla, pH, světelné podmínky a elektrické, respektive magnetické stimuly jsou dostatečnými proměnnými pro reakci skupiny gelů v tzv. *smart hydrogels*. Při výběru jakékoli z uvedených možností obvykle existuje kritický bod, který dosahuje limitní odezvy příslušného hydrogelu. Na základě zmíněných podnětů se hydrogely dělí na pH responzivní, termoresponzivní a elektricky responzivní hydrogely [44; 53].

4.3.1 pH responzivní hydrogelové sítě

Jedná se o hydrogely, které reagují na změnu pH prostředí a patří mezi nejvíce zkoumanou skupinu hydrogelů s fyziologickou odezvou. Jejich sítě mají přítomné na hlavním polymerním řetězci kyselé nebo zásadité vedlejší skupiny. Hydrogely citlivé na pH jsou většinou schopné reagovat i na změny iontové síly. A to přednostně v oblasti pK hodnoty funkční skupiny citlivé na pH. Reakce na prostředí s odpovídajícím pH a iontovou silou vede k náhlému zvýšení botnací schopnosti. Do ionizovatelných vedlejších skupin se mohou řadit karboxylové kyseliny nebo aminové skupiny [44]. Poly(kyselina methakrylová) (PMAA) patří mezi často zkoumané polymery, konkrétně v oblasti uvolňování léčiv [53].

4.3.2 Termoresponzivní hydrogelové sítě

Pro výraznou reakci termoresponzivního hydrogelu na teplotu okolního prostředí, je potřeba cílenou síť dostat do podmínek konkrétního teplotního rozmezí, které určuje polymerní matrice hydrogelu. Je klíčové se zde řídit charakteristickou hodnotou polymerního roztoku, a to nižší kritickou teplotou roztoku (LCST). Pod LCST je hydrogel nabotnalý (vliv navázaných molekul vody), po překročení této teplotní hranice může dojít k fázovému rozdělení hydrogelové sítě a oddělených molekul vody [44]. Zástupcem teplotně citlivého polymeru je poly(N-izopropylakrylamid) (PNIPAAm) s LCST kolem 34 °C [53].

4.3.3 Elektricky responzivní hydrogelové sítě

Schopnost těchto materiálů reagovat na působení elektromagnetického pole představuje zajímavou vlastnost, pozorovatelnou u libovolného polyelektrolytového gelu, např. u PHEMA. Neutrální hydrogely samy o sobě žádnou reakci nevykazují, avšak stávají se elektromagneticky citlivými, pokud jsou propojeny s dielektrickými kapalinami nebo elektricky reagujícími částicemi. Umístění polyelektrolytového gelu do elektrického pole s potenciálním gradientem má za následek buď nárůst objemu nebo smrštění hydrogelu, a to s ohledem na jeho náboj. Míra odezvy hydrogelu je proměnlivá v závislosti na podmínkách/parametrech působícího pole (velikosti napětí, dielektrických vlastnostech a iontové síle okolního média), tak vybraného polymeru (stupni zesítnění hydrogelu, hustotě náboje). Tyto variabilní podmínky ovlivňují sílu a pravděpodobnost elektrických interakcí v hydrogelu, což formuje celkové chování tohoto materiálu v elektromagnetickém poli [53].

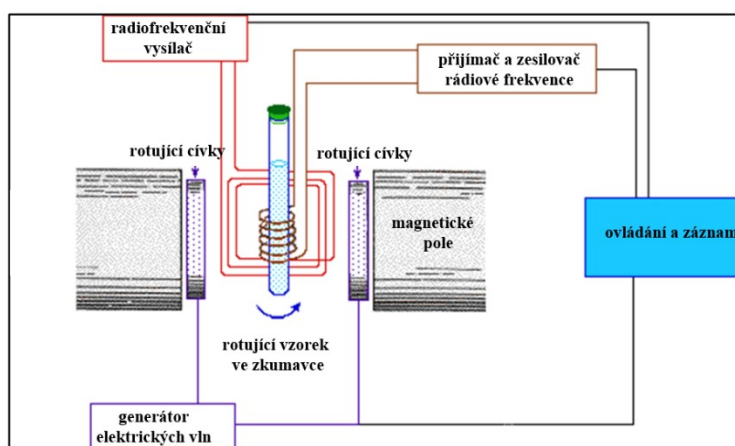
4.4 Charakterizace hydrogelů

Pro zvážení konkrétních aplikací je nutné hydrogel příslušně charakterizovat z různých pohledů. Stěžejní požadavky formují mimo jiné velikost a morfologii hydrogelu, jeho chemické složení, rychlost absorpce, mechanické vlastnosti a biokompatibilitu. Charakterizují se tedy fyzikální (degradace, porozita, tepelná stabilita), chemické (chemické složení), mechanické (pevnost v tahu/tlaku, houževnatost), reologické (viskozita) a biologické vlastnosti [18; 55]. Existuje ale řada funkčních vlastností, které mohou být u obecně ideálního hydrogelu požadovány, například vysoká absorpční kapacita ve fyziologickém roztoku, téměř dokonalá biodegradabilita, nízká cena a vysoká odolnost proti botnání během skladování. K dosažení nejvíce kompaktních hydrogelů v praxi přispívá optimalizace výroby, která se postará o vyvážení požadovaných vlastností hydrogelu. Hydrogely se nejvíce liší s ohledem na aplikaci, např. hydrogely používané v *drug delivery* musí být porézní a citlivé na změny pH, respektive na teplotu prostředí [56]. Výsledky v této práci byly charakterizovány výhradně metodami, které obecně reflektují chemické složení analyzovaného hydrogelu za účelem potvrzení úspěšné syntézy nových funkčních skupin na polymerní řetězec hyaluronanu.

4.4.1 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Nukleární magnetická rezonance představuje metoda poskytující informace i spektrálním složení analyzovaného vzorku (kvalitativní, kvantitativní). Jedná se o nedestruktivní

metodu, která se využívá u analýzy chemického složení polymerů, jejichž nativní polymerní řetězce byly obohaceny o nové funkční skupiny. Ve formě magnetické rezonance (*magnetic resonance imaging*, MRI) se používá v nemocnicích na zobrazení hustoty vody v těle pacienta. Jelikož jsou tyto energetické účinky velmi malé (mnoho řádově nižší než energie slabých chemických vazeb), jedná se o pro člověka bezpečnou metodu. Základem NMR analýzy (sestava na Obrázku 12) je mít homogenní magnetické pole, kde měření probíhá. Samotná analýza chemické látky probíhá na základě absorpce elektromagnetické energie jádry neradioaktivního izotopu, tedy vloženém neionizující záření v magnetickém poli. Příkladem může být vložení sklenice vody do magnetického pole a připojení radiofrekvenčního impulzu. Tím se stimulují atomová jádra přítomného vodíku k přechodu mezi svým základním a excitovaným stavem. Informace o chemickém prostředí studovaného izotopu nesou frekvence a intenzity, za kterých elektromagnetické pole se vzorkem atomů reaguje. NMR detekuje pouze ta atomová jádra, která mají nenulový jaderný úhlový moment nebo spin. Řadí se sem např. všechny izotopy vodíku, ^1H (protium), ^2H (deuterium) a ^3H (tritium). Jelikož má každý z nich v magnetickém poli svou vlastní rezonanční frekvenci, mohou být v NMR měřeních rozlišeny. NMR analýza může být použita i k určení struktury biomolekul, např. proteinů a nukleových kyselin [57; 58]. Výsledek měření bývá zaznamenán v podobě spekter, na základě jehož analýzy se dají určit jak přítomné funkční skupiny (kvalitativní analýza), tak jejich kvantitativní zastoupení v měřeném vzorku (*substitution degree*, DS) [18].

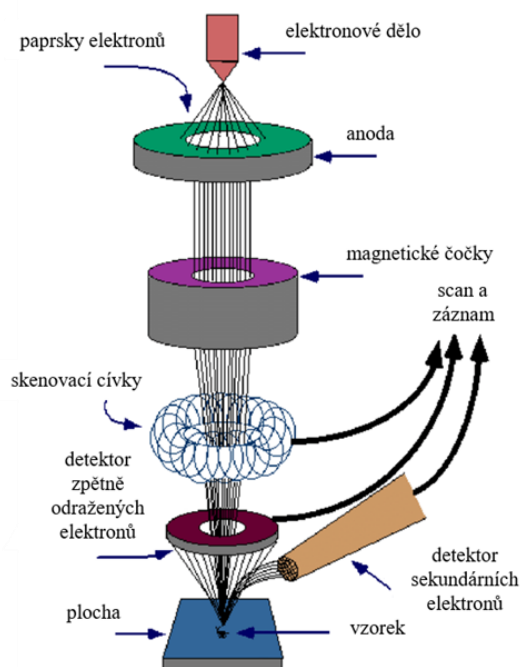


Obrázek 12: Princip NMR analýzy

V případě kvantitativní analýzy hyaluronového polymerního řetězce se do jeho reference používají protony methyly, který se nachází na N-acetylové skupině HA. Má definovaný pík v oblasti 1,95 ppm (*parts per million*) chemického posunu [34].

4.4.2 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Mezi další nedestruktivní metodu lze zařadit skenovací elektronovou mikroskopii. SEM informuje o morfologii povrchu, krystalové struktuře i chemickém složení měřeného vzorku. Záznam bývá s ohledem na parametry přístroje kvalitně zaostřený, ať už se jedná o rozlišení v řádech μm až nm . Vzorek (např. hydrogel) musí být před charakterizací SEM lyofilizován a v případě nutnosti skenování jeho vnitřní struktury opatrně příčně rozříznut. Takto připravený vzorek je následně nalepen na uhlíkovou pásku na kovový terčik a za daných podmínek pokoven (Ar, Pt) tak aby bylo zajištěno co nejkvalitnější zobrazení. Princip metody SEM spočívá v detekci sekundárních elektronů za vysokého vakua, tedy zachycení interakce vloženého vzorku s elektronovým svazkem [59]. V případě hydrogelů je stěžejní přítomnost a případná míra porozity, která je důležitá pro *drug delivery* a scaffoldy, neboť je třeba v těchto oblastech biomedicínských aplikací počítat s velikostí buněk, které by se případné kultivace účastnily [18]. Instrumentace skenovacího elektronového mikroskopu je uvedena na Obrázku 13.



Obrázek 13: Náčrt SEM

4.4.3 Tahové zkoušky

K získání informace o mechanických vlastnostech hydrogelu se používá tzv. tahový tester. Toto měření vyžaduje, aby měřené vzorky hydrogelů měly definované rozměry délky, šířky a tloušťky. Hydrogel během zkoušky podléhá jednoosému tahu při definované rychlosti do

té doby, než se protrhne. Vyhodnocená hodnota Youngova modulu poskytne míru tuhosti, respektive pružnosti příslušného hydrogelu. Zacyklení těchto zkoušek v principu zatěžování a následného ulehčování s nastavenými parametry deformace poskytne informaci o únavové odolnosti materiálu. Tímto způsobem se dá vyhodnotit i již zmíněný *self-healing* hydrogelové sítě. Tedy srovnáním účinnosti hydrogelu před první zkouškou a toho, který už zkouškou prošel a jeho struktura je porušena. Takové mechanické požadavky využívají např. senzory [18].

4.4.4 Botnací testy

Hodnota tzv. stupně botnání hraje důležitou roli při hodnocení stabilizace hydrogelu. Informuje o stabilitě definované struktury hydrogelové sítě a o množství zadržené vody či pufry [38], což je mimo jiné určeno i hustotou hydrogelové sítě. Vysoké hustota zajišťuje vysoký počet uzlů, jež se může projevit např. vysokou pevností, naopak nízká hustota sítě se projeví zejména ve schopnosti hydrogelu pojmout více kapaliny, tedy botnat (za účelem snížení vnitřního objemu sítě). Stupeň botnání (SB) je možné definovat jako množství vody (m_{voda} v gramech), které může daná polymerní síť ($m_{sít}$ v gramech) v dehydratovaném stavu a rovnovážných podmínkách absorbovat (Rovnice 1) [60]:

$$SB = \frac{m_{voda}}{m_{sít}} \quad (1)$$

4.4.5 Testy biokompatibility

Vzhledem k rozsáhlému využití hydrogelů v oblasti biomedicíny, je důležité zhodnotit, jak na ně reagují buňky, tkáně a bakterie. Biologické vlastnosti hydrogelů mohou být obecně studovány jak *in vivo*, tak *in vitro*. Konkrétně cytotoxicita, kompatibilita s krví a antibakteriální vlastnosti mohou být zkoumány *in vitro*. K hodnocení cytotoxicity hydrogelů lze využít dva různé přístupy. Buď se zvolí test přímého kontaktu, nebo se rozhodne na základě provedených extraktů hydrogelu. V prvním případě je hydrogel umístěn do přímého kontaktu s vybranými buňkami. V druhém případě je potřeba nechat vzorky hydrogelu po určitou dobu ve zvoleném fyziologickém roztoku, které se k buňkám následně přidají. Každý test cytotoxicity pak pokračuje stejně, hydrogel je buňky osázen o známé hustotě, proběhne kultivace ať už přímo či nepřímo (ve specifickém kultivačním roztoku po určitou dobu a konkrétní teploty) a následně je test vyhodnocen [18]. Životaschopnost buněk a jejich případnou proliferaci lze sledovat pod fluorescenčním mikroskopem. Buňky jsou obarvené speciálními barvivy, tak aby bylo možné rozlišit zdravé

(živé) od těch poškozených (mrtvých). Používají se fluorescenční barviva, např. calcein-AM a propidium jodid. Vyhodnocuje se na základě reference, tedy známého množství adovaných buněk. Další důležitou informací je degradace chemické struktury hydrogelu či matrice biomateriálu. Biokompatibilní hydrogel by měl být schopen rozkladu na monomery, které nejsou toxické, ale metabolicky upravitelné a jsou rozpustné ve vodě. Žádný z degradačních procesů by neměl negativně ovlivnit své okolní prostředí (např. poškodit tkáň). Proces rozpadu vazeb, může nastat vlivem probíhající hydrolyzy či působením enzymů. Na dobu degradace má vliv několik faktorů. Mezi ně patří poměr zastoupení buňka/polymer. Při vyšším zastoupení polymeru než buněk se sice docílí snížení rychlosti degradace a tím prodloužení degradačního procesu, ale zároveň se to může projevit špatnou regenerací tkání. Mezi další klíčové faktory degradace patří koncentrace polymeru a taktéž citlivost vybrané modifikace matrice 3D hydrogelové sítě na enzymatickou degradaci [61]. Většina hydrogelů je díky svým hydrofilním funkčním skupinám kompatibilní s imunitním systémem lidského těla. Přirozená hydrofilita totiž minimalizuje mezifázové napětí mezi hydrogely a oběhem tělních tekutin. Měkkost povrchu hydrogelových sítí zase zajišťuje pouze nepatrný kontakt s okolními tkáněmi a případného povrchového napětí. V případě hydrogelů zavedených do živých systémů (např. dialyzační membrány, rozložitelné stehy, dočasné cévní štěpy [48]) je potřeba sledovat reakci imunitního systému na jeho přítomnost. Proto se provádí test imunogenity, tzn. hodnocení imunitní odpovědi organismu na terapeutické proteiny nebo biologické léčiva. Když pacient dostane léčivo, jeho imunitní systém může reagovat tvorbou anti-lékových protilátek tzv. ADAs, které mohou ovlivnit účinnost a bezpečnost léčiva. [61]. Zavedený biomateriál může v negativním případě vyvolat přirozenou reakci imunitního systému a izolovat implantovaný materiál do fibrotického pouzdra. Taková imunitní odpověď může vést k výraznému zkrácení doby degradace, ne-li k úplnému konci [61].

4.4.6 Reologické vlastnosti

Reologie představuje vědní obor zabývající se studium toku a deformačního chování kapalin i pevných látek. Z pohledu hydrogelů tak reologie představuje ideální metodou k pochopení jejich mechanických vlastností, mechanismů gelace a chování hydrogelů během toku a po něm. Jak už bylo uvedeno hodnocení reologického chování hydrogelů během toku a po něm má zásadní význam např. při analýze chování během injekčního vstříkávání, například pokud se plánuje jako metoda jeho zpracování např. 3D tiskem. Reologická (toková) povaha je dána odporem, který vůči toku působí. Jejich vztah je obecně zakomponován v poměru smykového napětí a smykové rychlosti, který informuje o hodnotě viskozity hydrogelu.

Viskozita má přímý vliv na tisknutelnost (velikost indukované síly). Tok je významně ovlivněn koncentrací zastoupeného biomateriálu/ jeho složek, teplotou a případnou metodou syntézy buněk a biomateriálu [61]. Jak už bylo naznačeno, z pohledu hydrogelu je klíčovým parametrem tzv. bod gelace, tedy stav ve kterém materiál přechází ze stavu gelu do stavu solu a obráceně. V reologii lze tento přechod poznat podle totožné hodnoty *storage* (G') a *loss* modulu (G''). Polymerní roztoky jsou charakteristické viskozitou za nízkých frekvencí a elasticitou za vyšších frekvencí. Elasticita je stav, kdy *storage* modul dosahuje vyšších hodnot než *loss* modul [55].

4.5 3D tisk

Metoda 3D tisku respektive metoda aditivní technologie, spočívá v postupném skládání vrstev materiálu v 3D objekt o definovaných rozměrech. Tato metoda pracuje na principu vytváření objektů pomocí kontrolovaného přidávání materiálu. Z původního zaměření 3D tisku jako metody zaměřené převážně na rychlou přípravu prototypů (výrobu fyzických modelů) se technologie vyvinula tak, že nyní už dokáže vyrobit produkty náročnějších požadavků. Tím se tato tisková metoda rozšířila do mnoha oblastí.. 3D tisk se za uplynulé roky vypracoval na takovou úroveň, že se jeho produkty liší ve vlastnostech, designu, ale i v samotném využití, které lze nalézt od medicíny (3D zobrazování) [62] po stavební průmysl (mosty) [63]. Princip aditivní technologie je pro všechny metody 3D tisku téměř totožný, a je tvořen 3 kroky. První krok zahrnuje vytvoření budoucího modelu pomocí příslušného programu, například CAD (počítačem podporovaný design), Catia nebo Inventor. Tento model by měl odpovídat požadovanému výtisku ve svém tvaru, velikosti, počtu vrstev, stupně plnění atd. Ve druhém následujícím kroku je připravený model převeden do rozhraní tiskárny, kde je rozřezán na jednotlivé řezy, jedná se o tzv. slicování. Během procesu slicování je navržený 3D model rozložen na 2D řezy, podle kterých tiskárna postupně tiskne jednotlivé vrstvy materiálu (výška tisku určuje posun tiskové hlavy ve směru osy z). Ve třetím a tedy posledním kroku dochází k samotnému tisku požadovaného výrobku, což vede k vytvoření reálného výtisku odpovídajícího použitému modelu. Použití konkrétních tiskových materiálů závisí na metodě tisku. Mezi nejběžnější a nejpoužívanější materiály patří polymery (syntetické nebo přírodní). Tyto materiály mají výhodné vlastnosti, jako je snadná zpracovatelnost, mechanická odolnost a nízké náklady na výrobu, což je předurčuje k vysokému uplatnění v 3D tisku. Chování tiskových materiálů se liší v závislosti na jejich molekulové hmotnosti, plnivu a typu polymeru (termoplast, termoset, krystalický nebo amorfní polymer). [64].

4.5.1 Rozdělení technologie 3D tisku

Norma ASTM F2792-12A [65] dělí technologii 3D tisku do 7 kategorií: *Binder jetting*, *Directed energy deposition*, *Materials jetting*, *Powder bed fusion*, *Sheet lamination*, *Vat Photopolymerization*, *Materials extrusion*. Každá z uvedených technologií má své specifické využití, bylo by tedy unáhlené je vzájemně srovnávat.

Binder jetting

Jedná se o rychlý proces tisku ve 3D, který se upřednostňuje v oblasti výroby prototypů [66]. Tato technologie využívá selektivní nanášení chemického pojiva pomocí trysky na práškový materiál, čímž se vytváří jednotlivé vrstvy [65]. Jelikož jde o propojování práškových částic, lze tisknout i velké objekty. *Binder jetting* může být použit k výrobě surových sintrovaných výrobků a forem pro odlévání. Pomocí této metody lze zpracovávat materiály, jako jsou kovy, písky, polymery a keramika [67].

Directed energy deposition

Volně přeloženo jako řízené nanášení energie, kdy je cílená tepelná energie (laser) zdrojem tavení materiálu během jeho nanášení [65]. Obvykle se používá k opravám nebo přidání dalšího materiálu k již vytvořeným součástem. Technologie si zakládá na důkladné kontrole struktury zrn, očekávají se tedy produkty o vysoké kvalitě. Vstupním materiálem zde může být keramika, polymery i kovy (prášek, drát) [68]. Konkrétně laserové nanášení je oblíbené u oprav dílů (v oblastech ropného i leteckého odvětví) jejíž rozměry se pohybují v rozsahu milimetrů až metrů [66].

Materials jetting

Jedná se o metodu aditivní výroby, která pracuje podobně jako standardní injektová tiskárna. Při tomto tiskovém procesu tisková hlava (podobná těm, které se používají pro tisk textu a obrázků na papír) aplikuje kapky materiálu na tiskovou plochu a následně jsou tyto kapky vytvrzeny pomocí ultrafialového světla nebo tepla, čímž se vytváří 3D objekt, vrstvou po vrstvě [65; 66]. Takto se dají připravit produkty s hladkým povrchem a přesných rozměrů. Mezi tisknutelné materiály lze zařadit keramika, polymery a kompozity [68].

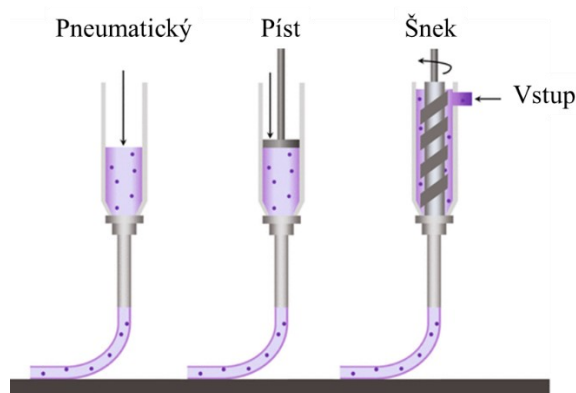
Vat Photopolymerization

Fotopolymerizace patří do skupiny nejvíce využívaných metod 3D tisku. Součástí jsou fotoreaktivní polymery, které jsou vytvrzeny pomocí laseru, světla nebo UV záření [66; 69].

Klíčovými parametry při tomto druhu polymerizace jsou vlnová délka použitého zdroje světla, doba expozice a množství dodaného světla. Na tomto principu fungují aditivní technologie typu stereolitografie (SLA, *stereolithography*) a digitální zpracování světlem (DLP, *digital light processing*). U SLA je mnoho vlivných faktorů, mezi něž patří volba fotoiniciátoru a přítomnost pigmentů či barviv. Tento druh vytváření je ideální volbou pro výrobu produktů o kvalitním povrchu [66].

Materials extrusion

Tato technologie představuje metodu 3D tisku, která pracuje na principu selektivního dávkování materiálu skrze trysku či jiný otvor [65]. Díky jednoduchosti, nízkým provozním nákladům a schopnosti vytvářet složité geometrie, se jedná o nejvíce rozšířenou metodu aditivní technologie. Příkladem takové metody tisku je *Fused deposition modeling* (FDM). Jedná se o technologii umožňující extruzní tisk, kdy je proces tisku řízen tiskovou hlavou, která pracuje na základě aplikace síly nebo tlaku. Tlak potřebný k vytlačování materiálu lze generovat s využitím (1) stlačeného plynu (pneumatický), (2) pístu (princip injekční stříkačky) anebo (3) šneku (posuvná vnitřní spirála) [70]. Uvedené tiskové hlavy jsou pro lepší představu načrtnuty na Obrázku 14 níže. Úkolem systému FDM je zahřát materiál do polotekutého stavu, skládat ho vrstvu po vrstvě směrem zdola nahoru podél vytlačovací dráhy a tam, kde je zapotřebí model vyrovnat, přidat tzv. podpěry. Ty se po ukončení tisku odstraní [66]. Funkci hlavního materiálu zde může mít polymer syntetického původu [66] (PEG, PVA), biopolymer (kolagen, želatina, hyaluronan) či hydrogel [61; 69].



Obrázek 14: Příklady 3 typů tiskových hlav pro extruzní tisk [71]

4.5.2 Aplikace aditivní technologie 3D tisku

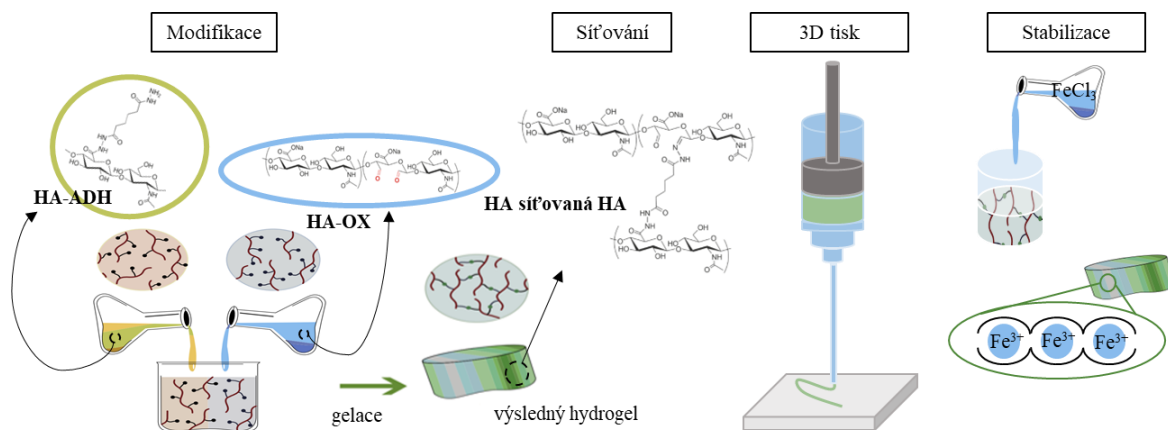
Neustálý vývoj 3D tisku dostává tuto technologii do stále širších oblastí [66]. Letecký průmysl jej využívá pro výrobu lehkých dílů klidně i složitějších geometrických tvarů, čímž

se mohou podstatně snížit nároky na spotřebu paliva. Je často žádán k výrobě náhradních dílů motoru, které jsou náchylné k častým výměnám [72]. V oblasti stavebnictví je známý 3D tištěný dům zvaný *Apis Cor Printed House* v Rusku [73]. 3D tištěné zařízení odhalují potenciál i v podobě elektrod, které mohou být vyrobeny podle konkrétních požadavků. Proces 3D tisku 3D elektrod je v dnešní době už tak automatizovaný, že dosahuje vysoké míry přesnosti a umožňuje dokončit proces tisku příkladných 8 elektrod za pouhých 30 minut [74]. Rozsáhlejšího využití ovšem 3D tisk nabývá v oblasti medicíny. Ať už se jedná o 3D modely s účelem nauky klinických procedur a simulaci patologického stavu pacienta [66], tisku 3D kůže (k testování farmaceutických a kosmetických výrobků) [75], kostí a chrupavek (formou náhrady po úrazu, nemoci) [76; 77], tkání [78] nebo přímo tkáňového inženýrství [61]. Rozmachu personalizované medicíny jistě pomohla i 3D technologie. Ta v této sféře dokáže po zpracování dat z počítačové tomografie (CT) či ultrazvuku (US) a jejich převedením do formátu DICOM (*Digital imaging and communications in medicine*) vytisknout pomůcky „ušité na míru“ jednotlivým pacientům (implantáty, ortézy) [77].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 POPIS EXPERIMENTU

V návaznosti na předchozí výzkum provedený v rámci bakalářské práce, která byla zaměřena na modifikace hyaluronanu a jeho využití při přípravě hydrogelů, byly provedeny experimenty, které vedly k aplikaci hyaluronanovým hydrogelů do oblasti 3D tisku. Navazující experiment diplomové práce je tvořen několika klíčovými kroky, jak je naznačeno na Obrázku 15.



Obrázek 15: Schéma navrženého experimentu [40; 61; 79]

V první fázi samotného experimentu byla provedena modifikace hyaluronanu za účelem zavedení funkčních skupin (oxo, amino) na polymerní řetězec HA, které byla optimalizována v bakalářské práci [80], a na kterou tato diplomová práce navazuje. Příprava oxo skupiny na polymerním řetězci HA byla provedena oxidační reakcí. Připojením dihydrazidu kyseliny adipové (ADH) na nativní řetězec HA se za přidání různých aktivačních činidel (DMTMM a EDC) podařilo úspěšně navázat aminové funkční skupiny na HA. Tato aktivační činidla byla vybrána s cílem je vzájemně srovnat z pohledu čistoty produktu, jednoduchosti reakce a účinnosti modifikace (DS). Všechny modifikace HA (oxidace, amidace) byly provedeny s ohledem na molekulovou hmotnost HA, ekvimolární poměr jednotlivých složek a podmínky reakce obou modifikací. Získané deriváty HA byly následně analyzovány pomocí metod NMR, a FT-IR. Druhá fáze experimentu byla založena na přípravě zesíťovaného hyaluronanu využitím metody Schiffovy báze (poměr použitých derivátu HA 1:1), za vzniku nerozpustného hydrogelu. Hydrogely síťované Schiffovou bází totiž stále více přitahují pozornost zejména kvůli možnosti vytvářet vazby přímo v organismu s buňkami, tkáněmi nebo bioaktivními látkami za fyziologických podmínek, dále také kvůli biokompatibilitě, lehce kontrolovatelným reakčním rychlostem a jejich

uplatnění jako injektovatelné hydrogely. Připravený hydrogel byl z důvodů následné charakterizace (porozita pomocí SEM) lyofilizován a charakterizován. Během třetí fáze experimentu byly laděny optimální parametry zpracování připravených derivátů s využitím metody 3D tisku (rychlost pohybu tiskové hlavy, počet vrstev nanášeného materiálu, rychlost vytlačování, teplota podložky apod.) a samotný 3D tisk definovaných mřížek hyaluronanových hydrogelů. Vytisknuté mřížky byly následně charakterizovány (reologické měření, botnání) a ve finálním kroku experimentu stabilizovány vybranými roztoky solí (chlorid strontnatý, chlorid vápenatý, chlorid železitý) v různých časových intervalech za účelem eliminace jejich degradace v roztoku. V průběhu řešení diplomové práce byly některé ze získaných výsledků publikovány [40], jak dokládá přiložená citace.

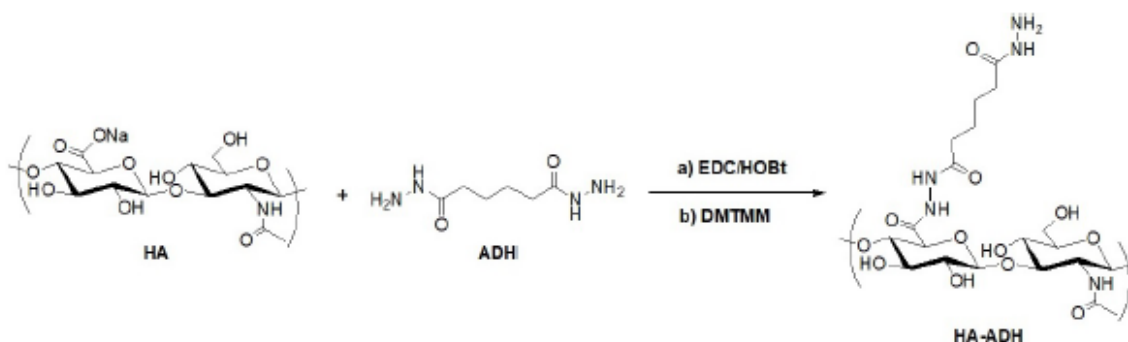
5.1 Použité materiály

K přípravě hydrogelů byla použita sodná sůl kyseliny hyaluronové (kosmetická čistota) o molekulových hmotnostech 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 12-14 kDa, vnitřní průměr 32 mm)). Pro úpravu pH se používaly roztoky kyseliny chlorovodíkové (0,1M HCl) a hydroxidu sodného (0,1M NaOH). Na přípravě oxidované formy HA bylo použito oxidační činidlo jodistan sodný (NaIO_4), a 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), 0,1M kyseliny šťavelové (COOH)₂ spolu s barevným indikátorem (fenolftalein). Připravené deriváty HA byly při síťování rozpuštěny ve 0,1M fosfátovém pufru (pH=7,4) a to za laboratorní teploty. Ke zvýšení stability hydrogelů byly použity roztoky solí hexahydrátu strontnaté soli ($\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), chloridu vápenatého (CaCl_2) a chloridu železitého (FeCl_3).

5.2 Příprava derivátů HA

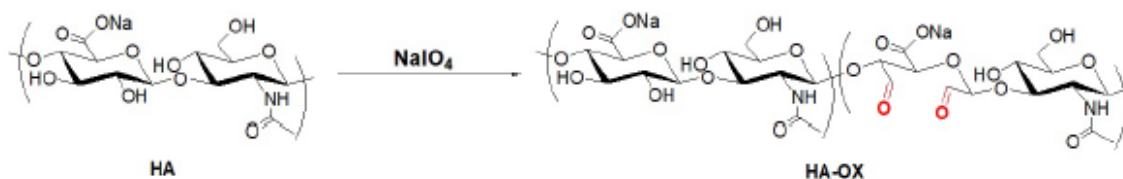
Jak už bylo zmíněno v teoretické části práce, zvolená metoda síťování, Schiffova báze funguje na principu spojení aminových a aldehydových funkčních skupin za vzniku iminové vazby mezi zvolenými polymerními řetězci, čímž vzniká zesíťovaná struktura (hydrogel).

Aby bylo možné tuto síťovací reakci provést, bylo nutné připravit dva odlišné deriváty hyaluronanu, tedy jeho amidaci a oxidaci. Podstatou první chemické modifikace, tedy amidace bylo na polymerní řetězec HA navázat aminové funkční skupiny (NH_2) a to prostřednictvím navázáním adipové kyseliny na nativní polymerní řetězec HA za přítomnosti aktivačního činidla DMTMM nebo EDC. Důvod použití dvou rozdílných aktivačních činidel spočíval v porovnání jejich účinnosti (z pohledu stupně substituce), jednoduchosti provedené reakce a v neposlední řadě i čistotě výsledného produktu. Reakční schéma amidace hyaluronanu popisuje Obrázek 16.



Obrázek 16: Schéma amidace HA v přítomnosti aktivačních činidel DMTMM a EDC [40]

Aldehydové funkční skupiny, bez kterých by nebylo možné realizovat zamýšlenou síťovací reakci, byly připraveny druhým typem modifikace HA, tedy oxidací. Důležitým faktorem oxidace hyaluronanu je přidavek oxidačního činidla, jodistanu sodného. Za jeho přítomnosti totiž dochází k oxidaci. Při oxidaci dochází k tzv. rozštěpení vazby mezi uhlíky na sacharidovém kruhu za vzniku dvou aldehydických skupin, jak je vidět na níže přiloženém schématu (Obrázek 17). Vytvořené aldehydické skupiny následně reagují s přítomnými hydroxylovými skupinami na sousedních řetězcích, které nepodlehly oxidaci, jejímž výsledkem jsou tzv. cyklické hemiacetaly.

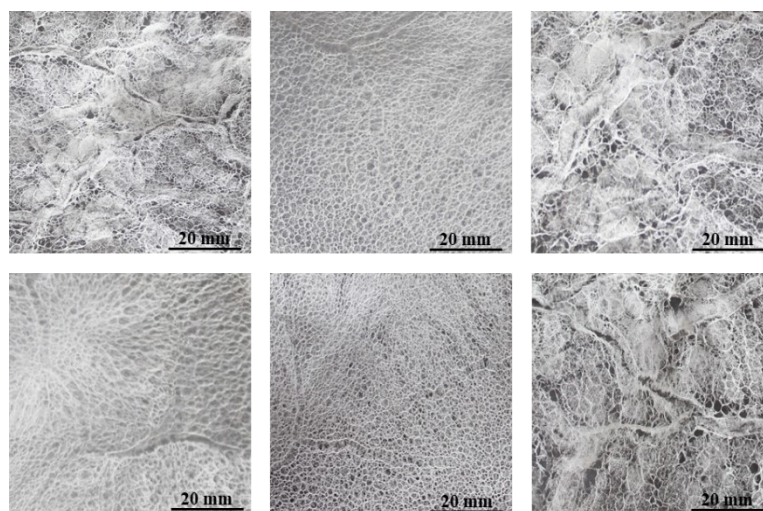


Obrázek 17: Reakční schéma provedené oxidace HA [40]

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

Na základě experimentu provedeném v bakalářské práci byly optimalizovány následující parametry samotné reakce (amidace): (1) množství a koncentrace polymeru, (2) ekvimolární

poměry reaktantů, (3) podmínky reakce (teplota, doba, a pH). První amidace HA byly provedeny pro rozdílné molekulové hmotnosti nativního hyaluronanu ($M_w = 124$ kDa a $M_w = 243$ kDa). Jako aktivační činidlo bylo DMTMM. Samotná modifikace probíhala následujícím způsobem. Nejprve byl připraven 2,2% (w/w) roztok hyaluronanu jeho rozpuštění v demineralizované vodě (5 g ve formě prášku; 0,0125 mol; 1 ekvimolární množství). K rozpuštěnému roztoku HA byl poté přidán připravený roztok ADH (2,18 g prášku ADH bylo rozpuštěno v 25 ml demineralizované vody; 0,0125 mol; 1 ekv. mn.). Po jejich vzájemném smíchání bylo upraveno pH roztoku na hodnotu (pH = 6,5) (pomocí 0,1M HCl a 0,1M NaOH), a to po dobu 2 h. Po uplynutí uvedené doby bylo k reakční směsi přidáno ve formě prášku DMTMM (0,86g; 0,00313 mol; 0,25 ekv. mn.). Takto připravená reakční směs byla na magnetickém míchadle kontinuálně míchána po dobu 24 h při laboratorní teplotě. Po uplynutí reakční doby byla reakční směs přelita do dialyzační membrány za účelem její purifikace pomocí dialýzy. Prvních 24 h probíhala dialýza proti roztoku soli (12,5 g NaHCO_3 a 12,5 g NaCl na 10 l demi vody), aby došlo k co nejefektivnějšímu vymytí nezreagovaných zbytků použitých reakčních činidel. V následujících 2-3 dnech se reakční směs dále dialyzovala pouze proti demi vodě. Dialyzovaný roztok byl poté převeden do skleněné petriho misky a dále zamražen nejprve na teplotu -18 °C, dále pak na teplotu -79 °C. Zamražené produkty byly následně vloženy do lyofilizátoru a sušeny za těchto podmínek (hlavní fáze sušení probíhala při tlaku 0,06 mbar, teplotě -80 °C, po dobu 30 h, finální sušení (2. fáze) probíhalo při tlaku 0,001 mbar v délce trvání 10 h). Výsledným produktem byla pevná (vláknitá) forma amidovaného hyaluronanu (HA-ADH), jak je vidět na příloženém Obrázku 18. Produkt byl poté ihned zvážen a určen výsledný výtěžek reakce.



Obrázek 18: Lyofilizovaná forma HA-ADH

Na základě zmíněné reakce byly připraveny 4 modifikace HA-ADH (proměnné hodnoty M_w a vstupních navážek) s aktivačním činidlem DMTMM jež jsou shrnuté v Tabulce 1.

Tabulka 1: Parametry produktů amidace HA při použití aktivačního činidla 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

Jak už bylo zmíněno, při amidaci hyaluronanu byly využity a porovnány 2 rozdílná aktivační činidla (DMTMM a EDC). Samotná modifikace probíhala následujícím způsobem. Nejprve byl připraven 0,3% (w/w) roztok hyaluronanu HA jeho rozpuštění v demineralizované vodě (2 g ve formě prášku; 0,005 mol; 1 ekvimolární množství; $M_w = 124$ kDa, $M_w = 243$ kDa). K rozpuštěnému roztoku HA byl poté přidán ADH ve formě prášku (26,13 g ADH; 0,15 mol; 30 ekv. mn.). Po kompletním rozpuštění přidaného ADH bylo upraveno a pH roztoku na hodnotu (pH = 6,8) (pomocí 0,1M HCl a 0,1M NaOH). Za stálého míchání bylo k reakční směsi přidáno 3,84 g EDC (0,02 mol; 4 ekv. mn.) a 2,70 g HoBt (ve formě 12 ml roztoku DMSO:voda v poměru 1:1), 0,02 mol; 4 ekv. mn.). 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 udržovat po dobu 2 h, za kterých se pH ustálilo na danou hodnotu. Takto připravená reakční směs byla na magnetickém míchadle kontinuálně míchána po dobu 21 h při laboratorní teplotě. Po uplynutí reakční doby Závěrem reakce byla reakční směs přelita do dialyzační membrány za účelem její purifikace pomocí dialýzy. Prvních 24 h probíhala dialýza proti roztoku soli (12,5 g NaHCO₃ a 12,5 g NaCl na 10 l demi vody), aby došlo k co nejefektivnějšímu vymytí nezreagovaných zbytků použitých reakčních činidel. V následujících 2-3 dnech se reakční směs dále dialyzovala pouze proti demi vodě. Dialyzovaný roztok byl nejprve poté převeden do skleněné petriho misky a dále zamražen nejprve na teplotu -18 °C, dále pak na teplotu -79 °C. Zamražené produkty byly následně vloženy do lyofilizátoru a sušeny za těchto podmínek (hlavní fáze sušení probíhala při tlaku 0,06 mbar, teplotě -80°C, po dobu. 30 h, finální sušení (2. fáze) probíhalo při tlaku 0,001 mbar v délce trvání 10 h). Výsledným produktem byla pevná (vláknitá) forma amidovaného hyaluronanu (HA-ADH), který byl ihned zvážen a určen výsledný výtěžek

reakce. Na základě těchto kroků zmíněné reakce bylo připraveno 6 produktů HA-ADH. Tabulka 2 shrnuje všechny vstupní (pořadí modifikace, aktivační činidlo, M_w , navážku a čas reakce) a výstupní (výtěžnost reakce) parametry reakce.

Tabulka 2: Souhrn dat z amidace HA s využitím aktivačního činidla 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)

Za účelem přípravy aldehydových funkčních skupin na řetězci HA byla provedena oxidace nativního řetězce hyaluronanu. Nejprve byl připraven 1% (w/w) roztok HA (1,01 g; 0,0025 mol; 1 ekvimolární množství; $M_w = 1,5$ MDa, $M_w = 1,18$ MDa) rozpuštěním v demineralizované vodě (50 °C, po dobu 24 h). K připravenému roztoku HA byla dále přidána směs ve vodě rozpuštěného oxidačního činidla NaIO_4 (0,594 g ve 4 ml destilované vody; 0,0028 mol; 1,1 ekv. mn.). Tato reakční směs byla následně kontinuálně míchána po zvolenou dobu (7,5 h; 10 h; 12 h) při laboratorní teplotě (byla použita tmavá nádoba nebo se směs zakryla alobalem z důvodu eliminace interakce jódu se světlem). Po ukončení reakce se do směsi přidalo 5 ml 10% roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, za účelem zreagování případného nezreagovaného oxidačního činidla. Přítomnost jódu se v průběhu 1 h kontrolovala jodoškrobovým papírkem. Po ukončení reakce byla reakční směs přelita do dialyzační membrány s prostředím demineralizované vody za účelem její purifikace. Dialyzovaný roztok byl poté převeden do skleněné petriho misky a dále zamražen nejprve na teplotu -18 °C, dále pak na teplotu -79 °C. Zamražené produkty byly následně vloženy do lyofilizátoru a sušeny za těchto podmínek (hlavní fáze sušení probíhala při tlaku 0,06 mbar, teplotě -80°C, po dobu. 30 h, finální sušení (2. fáze) probíhalo při tlaku 0,001 mbar v délce trvání 10 h). Výsledným produktem byla pevná (vláknitá) forma amidovaného hyaluronanu (HA-OX), který byl ihned zvážen a určen výsledný výtěžek reakce. Na základě výše uvedeného postupu tak bylo připraveno několik různých oxidací HA v závislosti na M_w a času reakce, jak uvádí Tabulky 3 ($M_w = 1,5$ MDa) a 4 ($M_w = 1,18$ MDa).

Tabulka 3: Vstupní a výstupní parametry oxidace HA ($M_w = 1,5$ 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: Vstupní a výstupní parametry oxidace HA ($M_w = 1,18$ 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

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR)

Ověření navázání nových funkčních skupin na hyaluronový řetězec bylo potvrzeno s využitím metody infračervené spektroskopie (FT-IR). Při měření byl použit spektrometr *Nicolet iS5* s využitím metody ATR (zeslabený úplný odraz) na germaniovém krystalu. Každý lyofilizovaný vzorek byl před samotným měřením rozetřen v třecí misce pomocí hmoždíře a vrstven, tak aby byla měřená vrstva vzorku dostatečně homogenizována. Před měřením byly nastaveny základní parametry měření, jež mohou ovlivnit kvalitu výsledného spektra (poměr signálu k šumu). Rozlišení spektra bylo nastaveno na 4 cm^{-1} (vzájemná vzdálenost výstupních pásů), spektrum bylo měřeno 64 skeny a rozsah vlnových délek pro měření byl určen na rozmezí $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$. Měření probíhalo při standardním úhlu dopadu záření, 45° . Výsledné spektrum (závislost absorpance na vlnočtu) bylo poté vyhodnoceno softwarem *Omnic* (plocha pod píkem, detekce jednotlivých pásů ve spektru a konkrétní přiřazení funkčních skupin).

Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Kromě metody FT-IT byla při spektrálním potvrzení funkčních skupiny využita metoda protonové nukleární magnetické rezonance (^1H NMR) za použití spektrometru *JEOL ECZ 400* (*JEOL Ltd., Tokio, Japonsko*). V případě stanovení ^1H bylo měření realizováno při frekvenci 399,78 MHz za laboratorní teploty (25 °C). Všechny vzorky byly před analýzou rozpuštěny (24 h; T = 25 °C) v deuteriované vodě (D_2O), a výsledná koncentrace vždy odpovídala hodnotě 8-9 mg/ml. Po rozpuštění byly vzorky převedeny do speciální skleněné NMR kyvety. Naměřená NMR spektra byla vyhodnocena v programu *ACD/NMR Processor Academic Edition*, kde se charakteristické posuny přiřadily odpovídajícím funkčním skupinám. Chemické posuny byly vztaženy k referenci, těžké vodě (D_2O , 4,75 ppm).

Stanovení stupně disociace

Z naměřených ^1H -NMR spekter byl stanoven stupeň substituce (DS %), 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 ($-\text{CH}_2$) z ADH ($\delta = 1,63$ ppm) (2H protony) dle Rovnice 2 D'Esteho a spol. (2014) [36]:

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

Stanovení stupně oxidace (SO)

U produktů oxidace hyaluronanu byl stanoven tzv. stupeň oxidace, a to na základě metody autorů Zhao a Heindel (1991) [81], kteří při stanovení použili hydroxylamin hydrochloridu (Reakce 1):



Aby bylo možné stanovit množství aldehydových (CHO) skupin z Rovnice 1, je důležité znát skutečné množství kyseliny chlorovodíkové, např. na základě její neutralizace (Rovnice 2):



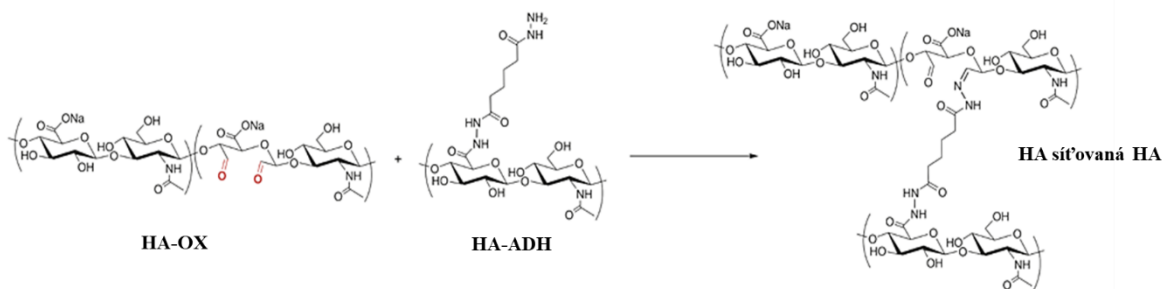
Stanovení SO bylo založeno na přípravě vzorků (1) nativního polymeru (HA) a (2) oxidací modifikovaného HA (HA-OX) a rozpuštěním daného množství vzorku (0,1 g) v objemu 25 ml 0,25N roztoku hydroxylaminhydrochloridu s přidavkem methyloranže (pH = 4) za stálého míchání na magnetickém míchadle po dobu nejméně 2 h (T = 25 °C). Rozpuštěné vzorky byly titrovány 0,2M NaOH do dosažení hodnoty pH 4. SO byl poté určen na základě spotřeby NaOH potřebného ke zvýšení pH měřeného roztoku na hodnotu (pH 4) dle Rovnice 3:

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

Kde: C_{NaOH} a V_{NaOH} představují skutečnou koncentraci (mol/l) a spotřebu (l) NaOH, $M_{w(HA)}$ je molekulová hmotnost HA (vždy jednotná pro srovnávané vzorky HA a HA-OX), M_r představuje molární hmotnost jednotky HA a $m_{(HA)}$ navážka titrovaného polymeru. Hodnota skutečné koncentrace NaOH použitého při titraci byla určena na základě titrace 0,1M kyseliny šťavelové. Za účelem eliminace lidské chyby při titračním stanovení, byl při titraci použit automatický titrátor *Titronic® universal* (SI Analytics GmbH, Mainz, Německo).

5.3.2 Síťování HA

Příprava hydrogelů metodou Schiffovy báze Síťovacími reakcemi zvolenou metodou Schiffovy báze byly připraveny hydrogely na bázi modifikovaného hyaluronanu. Reakce se uskutečňovala mezi aminovými (HA-ADH) a aldehydovými (HA-OX) funkčními skupinami za přípravy iminové vazby (C=N), které lze vidět na reakčním schématu na Obrázku 19.



Obrázek 19: Reakční schéma síťování hyaluronanu (HA-OX) hyaluronanem (HA-ADH) za přípravy hyaluronanové hydrogelové sítě (HA síťovaná HA) [40]

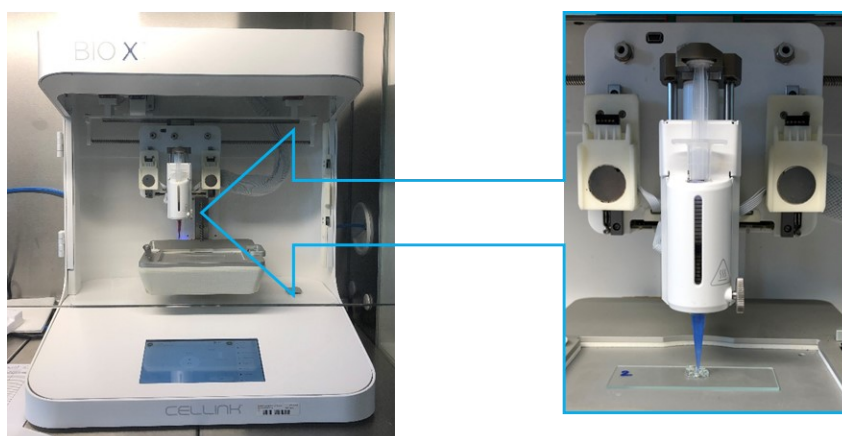
Síťovací reakce metodou Schiffovy báze zpravidla funguje bez nutnosti přidavku síťovacího činidla, které by mohlo negativně ovlivnit celý systém z pohledu toxicity. Hydrogely byly připraveny smícháním roztoků připravených derivátů (1%, 2% a 3%) HA-ADH a HA-OX v neměnném ekvimolárním poměru (1:1). U takto připravených hydrogelových sítí byl sledován čas potřebný k jejich plnému zesíťování (tzn. stav pevného gelu). Na základě provedených zkoušek síťování byly vybrány nejlepší kombinace modifikovaných HA (viz Tabulka 5).

Tabulka 5: Konkrétní 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 3D tisk

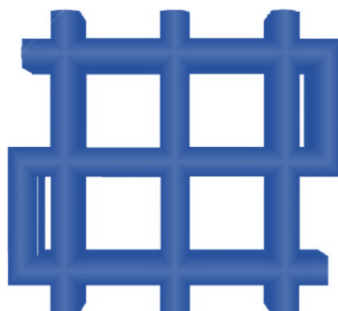
Pro 3D tisk připravených vzorků hydrogelů byla použita tiskárna *Bio X* firmy *Cellink* (jak je vidět na Obrázku 20). Tiskárna disponuje celkem třemi porty určenými k připojení různých typů tiskových hlav (mechanická, termoregulační a pneumatická), které se volí s ohledem na tiskový materiál. Ten je vkládán v injekční stříkačce do sestavy tiskové hlavy, která zajistí jeho kontinuální vytlačování za laboratorní teploty. Zvolená mikroextruze pístem je zajištěna stlačováním pístu stříkačky, který se pohybuje nastavenou rychlostí.



Obrázek 20: 3D tiskárna *Bio X* *Cellink* s detailem na extruzní tiskovou hlavu *Syringe pump*

5.4.1 Parametry tisku

Tiskovým modelem pro každý výtisk byla mřížka (Obrázek 21), která byla navolena přímo v softwaru zabudovaném v tiskárně.



Obrázek 21: Vybraný tiskový model mřížky pro 3D tisk

U tiskárny byla všechny parametry navoleny tak, jak je v Tabulce 6:

Tabulka 6: Parametry 3D tisku hydrogelových mřížek

rozměry výtisku	10x10x5 mm
hustota mřížky <i>infill density</i>	10-25 %
počet vrstev	5-9
výška nastavených vrstev	0,2-0,58 mm
výška první vrstvy <i>first layer high</i>	66%
materiál trysky	polypropylen
průměr trysky	0,41-0,58 mm
rychlost posunu tiskové hlavy <i>printhead speed</i>	2-5 mm/s
rychlost vytlačování <i>extrusion rate</i>	1-4 μ l/s
objem retrakce <i>retraction volume</i>	1-10 μ l
teplota podložky	25 °C
teplota tiskové hlavy	30 °C

Procesem optimalizace jednotlivých parametrů během tiskových úloh bylo vytipováno ideální nastavení extruzního tisku na 3D tiskárně s ohledem na povahu materiálu hydrogelových sítí (hodnoty rozměru výtisku; výšky první vrstvy; materiálu trysky; teploty podkladu i tiskové hlavy uvedené v Tabulce 6 zůstaly zachovány). Hustota mřížky 10 %; počet vrstev 5 (tím se automaticky nastavila výška výtisku na 0,2 mm); průměr trysky 0,41 mm a objem retrakce 1 μ l. Parametry jako průměr rychlosti posunu tiskové hlavy většinou začínal na hodnotě 2 mm/s, ale s narůstajícím časem (a tuhnutí hydrogelové sítě

uvnitř injekční stříkačky) bylo třeba ho měnit. Stejně tak se operativně upravovala i rychlost vytlačování materiálu (začátek probíhal vždy při 3 $\mu\text{l/s}$).

5.4.2 Tisk hydrogelů

Začátku procesu 3D tisku hydrogelových směsí vždy předcházela kontrola čistoty v okolí tiskárny, aby se tiskový materiál neznečistil. Obecně tiskový proces zahrnuje několik fází. Nejprve je tiskárna zapnuta spolu s nastavením teploty ve flowboxu, kde je umístěna, a spustí se software pro ovládání tiskárny. Do volného nástavce se vsadí tisková hlava a provede se kalibrace přístroje. Dalším krokem je výběr modelu nastavení parametrů plánovaného tiskového procesu spolu s naplněním injekční stříkačky, nasazením trysky a upevněním do tiskové hlavy 3D tiskárny. Po spuštění tiskového procesu lze sledovat postupné skládání tiskového materiálu vrstvu po vrstvě dle navrženého modelu mřížky. Průběh tisku se kontroluje za účelem případné úpravy parametrů nebo nutného zastavení procesu (nekontinuální extruze, přítomnost bublin, vyčerpání tiskového materiálu). Bez zásahu trvá proces 3D tisku hydrogelů přibližně 2 minuty (v závislosti na náročnosti nastavených parametrů). V náplni injekční stříkačky bylo vždy 10 ml 2% (w/w) roztoku hydrogelu (v poměru 1:1 (HA-ADH:HA-OX)), toto množství se použilo k vytištění 5 různých hydrogelových mřížek, které se mezi sebou lišily časem gelace. Tímto způsobem bylo vytisknuto 19 sad vzorků.

5.4.3 Charakterizace 3D tištěných mřížek

Reologické měření

Jelikož byly hydrogelové sítě na bázi modifikovaných hyaluronanů použity jako náplně pro 3D tisk, bylo nutné analyzovat jejich reologické chování. Všechna měření byla provedena na rotačním reometru *Anton-Paar MCR 502* (*Anton Paar, Graz, Rakousko*) při teplotě 25 °C za normálního tlaku. Viskozita 2ml roztoku hydrogelové sítě byla měřena pomocí Peltierova měřicího systému *P-PTD200/62/TG s PP/25* za oscilaci při konstantní 1% deformaci s úhlovým rozptylem frekvence rostoucím od 0,1 do 100 $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$. Vzorky hydrogelů byly připraveny 12 h předem pro síťování Schiffovou bází jejich odléváním do skleněných nádob o průměru 30 mm a tloušťce 2 mm. Kromě viskozity byl na reometr stanoven i tzv. gelační čas. K měření doby gelace připravených vzorků byla použita geometrie „válec-válec“ tzv. *double gap* (*DG 26.7*), který byl zvolen kvůli nízké viskozitě a malému objemu připravených polymerních roztoků. Výstupem měření byla závislost reologických veličin elastického

(*storage*) modulu G' , ztrátového (*loss*) modulu G'' v závislosti na čase. Doba gelace byla následně z uvedené závislosti odečtena jako průsečík *storage* a *loss* modulu.

Botnací testy

Cílem provedeného testu botnání bylo stanovit, jak rychle dochází u měřeného vzorku k na absorbování určitého množství kapaliny, ale také jak rychle dojde k ustálení procesu botnání. Botnání zesíťovaných hydrogelů bylo založeno na tzv. gravimetrickém stanovení, při kterém jsou lyofilizované vzorky o známé hmotnosti vloženy do speciální cely (děrovaný košík) a ty následně ponořeny do fosfátového pufru (0,1M, pH 7,4). Jednotlivé hmotnostní navážky vzorků jsou určeny ve zvolených časových intervalech (1, 2, 6, 15, 30, 60, 120, 240, 360 a 1440 min). Výsledné hodnoty byly uvedeny jako průměr 3 provedených měření. Vzorky byly po celou dobu měření udržovány při teplotě 37 °C. Pufr a teplota byly zvoleny s ohledem na simulaci biologického prostředí.

5.5 Stabilizace roztoky solí

Síťování připravených HA derivátů pomocí metody Schiffovy báze, může být v některých prostředích nestabilní (např. pH, iontová síla), proto za účelem zvýšení stability připravených hydrogelových mřížek byla použita doplňující metoda fyzikálního síťování, prostřednictvím vybraných iontů (1) Fe^{3+} (z roztoku FeCl_3), (2) Ca^{2+} (z CaCl_2) a (3) Sr^{2+} (z $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Tyto roztoky byly vždy 2% (w/w) a měly jednotnou hodnotu iontové síly ($I = 0,6\text{M}$), a stabilizace hydrogelu probíhala za laboratorní teploty (25°C). Jedna sada vzorků (5 typů lišících se časem tisku a hmotností) byla vždy zvážena a ve stejném čase naložena do příslušného roztoku soli, kde pobyla danou dobu (0,5h; 1 h; 2 h). V této části probíhala adsorpce iontů z roztoků na povrch příslušného vzorku hydrogelu. Po uplynulém čase se vzorky zvážily (navýšení hmotnosti vlivem navázání iontů) a nechaly propláchnout v roztoku ultračisté vody (referenční hodnota vodivosti), která se v průběhu stále měnila. Aby bylo možné ověřit účinnost procesu vymývání přebytečné soli z hydrogelu, měřila se vodivost promývacího roztoku. Jakmile hodnota vodivosti klesla na hodnotu, která byla naměřena u čisté vody, proces promývání byl ukončen. Pokles vodivosti se sledoval v časových intervalech (1 h; 2 h; 20 h od pobytu v daném roztoku soli), a po každém měření vodivosti, byl roztok vody vždy obnoven. Změna hmotnosti vzorků hydrogelů byla sledována srovnáním hmotnosti příslušné hydrogelové mřížky (1) před procesem stabilizace, (2) po vyjmutí vzorku z roztoku soli a (3) na konci stabilizace, tedy v čase 20 h od pobytu v roztoku soli.

5.6 Charakterizace hydrogelů

5.6.1 Skenovací elektronový mikroskop (SEM)

K důkladné analýze porozity výsledných hydrogelů byl využit elektronový mikroskop *Phenom G2 Pro (Phenom World)*. Výhodným nástrojem SEM je vysoké optické rozlišení, které umožňuje nahlédnout do různých hloubek struktury analyzovaných vzorků. Všechny měřené vzorky byly před vlastním měřením lyofilizovány, seříznuty v příčném řezu, nalepeny na kovový terčik uhlíkovou páskou a pokoveny v naprašovačce po dobu 60 s a při proudu 18 mA, v atmosféře Ar, čímž byla na povrchu vzorku vytvořena tenká vrstva zlata. Pokovené vzorky byly v SEM pozorovány při urychlovacím napětí 10kV a 15 kV v režimu zobrazení sekundárních elektronů (SE). Celková porozita výsledných snímků byla analyzována pomocí funkce *threshold* v programu *ImageJ*. Velikost pórů a jejich rozprostření vyhodnotil program *Image J*.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Experimentální část této práce navazuje na experimentální část bakalářské práce, proto jsou některé klíčové výsledky připomenuty. Všechny klíčové výsledky, jsou shrnuty v následující kapitole.

6.1 Modifikace HA-ADH a HA-OX

Součástí cílů této práce bylo připravit hydrogely na bázi hyaluronanu prostřednictvím Schiffovy báze. Tomu předcházely dva různé postupy modifikace hyaluronanového polymerního řetězce, a to amidace a oxidace, jejichž schéma lze vidět na Obrázku 15. První přístup modifikace byl založen na kovalentní vazbě ADH na řetězce HA prostřednictvím dvou různých aktivátorů karboxylových skupin HA (DMTMM a EDC). S ohledem na vzájemné srovnání vybraných aktivačních činidel je nutné zdůraznit, že DMTMM je dobře rozpustný a stabilní ve vodě při běžné teplotě, což není případ u obvyklých vazebných činidel, jako je EDC, které mají kratší poločas rozpadu ve vodě při pH 5,0 (3,9 h) [40; 82]. V případě amidace hyaluronanu je doporučeno použít aktivační činidlo EDC a spolu s HOBt, aby mohlo dojít ke karbodiimidová aktivace karboxylové skupiny HA. Při použití EDC jako aktivačního činidla je v průběhu celé reakce udržovat konkrétní hodnotu pH, aby nedošlo ke vzniku nežádoucích vedlejších produktů, zejména k navázání N-acylmočoviny. I z tohoto důvodu bylo k syntéze HA použito alternativní činidlo, DMTMM. Již v experimentech bakalářské práce se potvrdilo, že amidace hyaluronanu za přítomnosti DMTMM probíhá prostřednictvím aromatické substituce, kdy vzniká meziprodukt s-triazinový ester HA, který je reaktivní jak v kyselém, tak v zásaditém pH prostředí. U všech syntéz provedených prostřednictvím DMTMM, uvedených v této práci, bylo pH na začátku reakce upraveno na hodnotu $6,5 \pm 0,2$. Při použití obou aktivačních činidel, EDC i DMTMM, se podařilo úspěšně navázat NH_2 skupinu přímo na HA řetězec.

Kromě amidovaného derivátu HA bylo k síťování potřeba připravit i oxidovanou formu HA za vzniku aldehydické skupiny na polymerním řetězci HA. Oxidační reakce byla provedena pomocí již zmíněného NaIO_4 , které vedly ke vzniku polysacharidových polyaldehydů [40]. Oxidace pomocí jodistanu poskytuje výhodu tvorby rozsáhlého spektra funkčních skupin, avšak její nevýhoda spočívá v narušení přirozené struktury hyaluronanu. To může být problém v případě aplikace buněk, neboť nemusí připravené HA-OX derivátů správně rozpoznat. Hydrogely založené na vzájemném kombinování derivátů HA-OX/HA-ADH, ve které má HA-OX funkci síťovadla, mohou vykazovat omezenou schopnost transformace

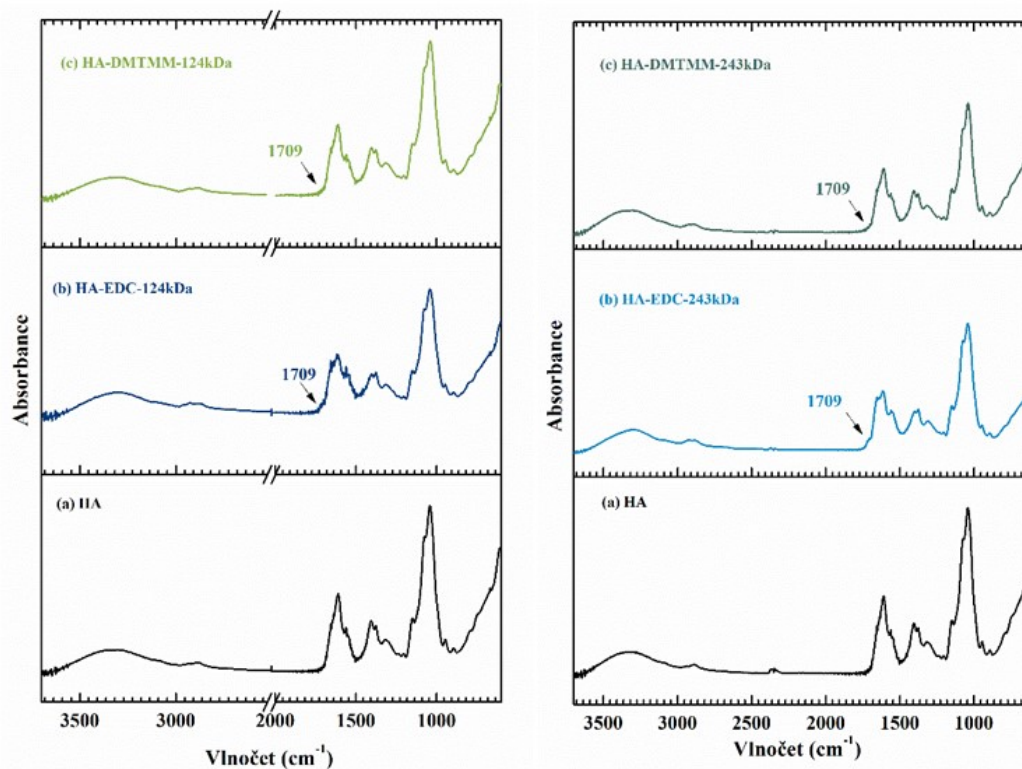
tkáně a slabou adhezi buněk [35]. Oxidovaný HA (HA-OX) byl připraven s různým stupněm oxidace. Výchozí molekulová hmotnost nativního hyaluronanu se v průběhu oxidace významně snížila [40]. Přítomnost vytvořených karbonylových skupin v řetězcích HA dále umožnila využití HA-OX pro reakci s HA-ADH pro cílenou přípravu hydrogelu.

6.2 Ověření modifikace

Všechny metody uvedené v této podkapitole se zabývají ověřením provedených modifikací hyaluronanu a charakterizací připravených hyaluronanových hydrogelů v závislosti na molekulové hmotnosti a koncentraci polymeru, použitém aktivačním činidle, podmínkách provedené reakce a způsobu síťování.

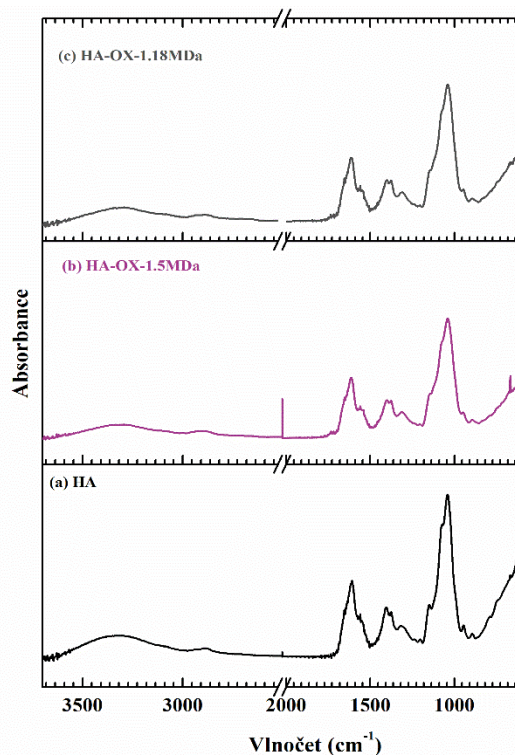
6.2.1 FT-IR

Jednou z metod použitých při ověření modifikace HA byla FT-IR spektroskopie. Jak již bylo popsáno v sekci 5.3.1, tato nedestruktivní metoda analyzuje chemické složení vzorku, jejichž výstupní spektrum informuje, zdali došlo k úspěšné modifikaci HA. Cílem tohoto měření bylo sledovat znatelné rozdíly výstupních spekter nativního HA a modifikovaného HA (HA-ADH a HA-OX), jelikož zmíněnými modifikacemi HA došlo ke změně chemické struktury polymeru. Obrázek 22 srovnává chemické složení nativního HA a amidovaných derivátů HA v závislosti na molekulové hmotnosti ($M_w = 124$ kDa; $M_w = 243$ kDa) a použitém aktivačním činidle (DMTMM; EDC).



Obrázek 22: Srovnání FT-IR spekter čistého HA (černá křivka) a amidovaných HA ($M_w = 124$ kDa, vlevo; $M_w = 243$ kDa, vpravo)

Při prvotním srovnání FT-IR spekter nelze charakteristické rozdíly jistě odhalit. Jemná variace spektra je pozorovatelná ve vyznačené oblasti 1709 cm^{-1} , což odpovídá vazbě C=O, tato informace potvrzuje úspěšné provedení amidace HA. Dle práce autorů Mlčochová a spol. (2006) by měly být u amidované HA identifikovány nové oblasti v rozmezí vlnočtu $2850\text{--}2930\text{ cm}^{-1}$, které signalizují přítomnost (-CH) a (-CH₂) skupin na řetězci HA (alkylový řetězec na HA). Vliv molekulové hmotnosti HA byl analyzován i v případě provedené oxidace HA, který je zobrazen na Obrázku 23.

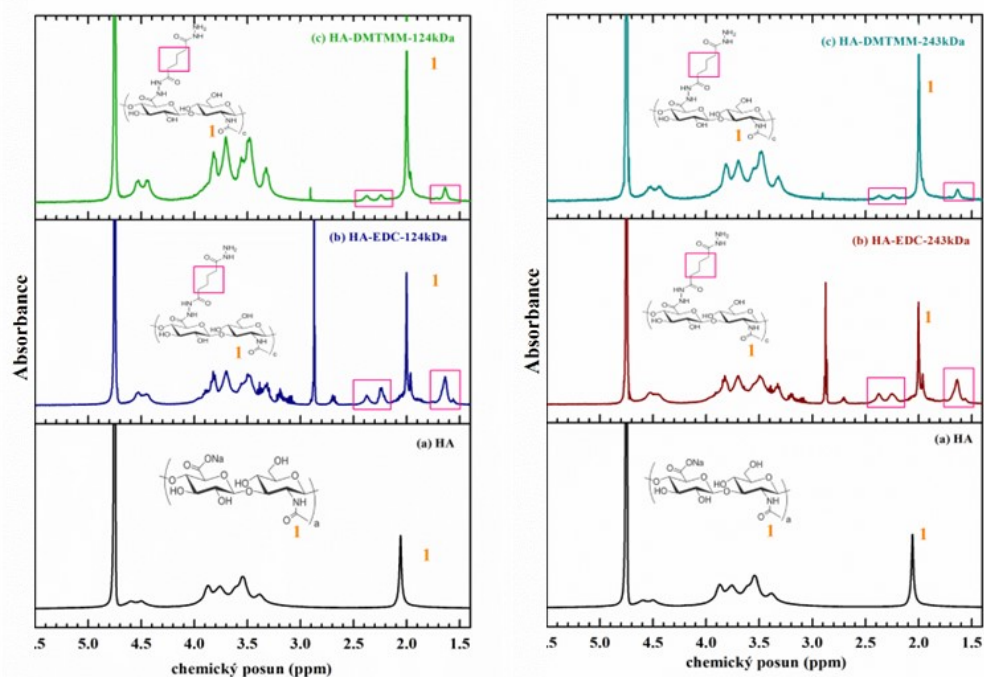


Obrázek 23: Srovnání FT-IR spekter čistého HA (černá křivka) a oxidovaných HA ($M_w = 1,5\text{MDa}$, střední křivka; $M_w = 1,18\text{MDa}$ horní křivka)

I v případě srovnání těchto spekter, se nelze na interpretaci z FT-IR plně spolehnout. Nicméně výsledky experimentu Kedariay a Vasily (2017) zmiňují pozici (-OH) vibrace v oblasti 3500 cm^{-1} u oxidovaného dextranu [83]. Na základě této informace lze stejnou oblast pozorovat v oblasti vlnočtu $3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$. Na základě správného srovnání změřených FT-IR spekter s literaturou lze konstatovat, že modifikace byly provedeny úspěšně, nicméně pro detailnější analýzu změny chemického složení HA modifikacemi byly provedeny i analýzy NMR.

6.2.2 NMR

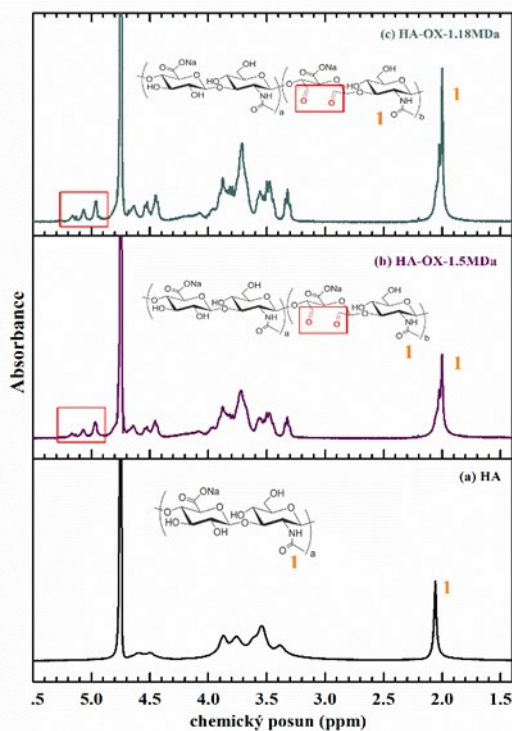
Spolehlivější ověření chemické struktury nově navázaných funkčních skupin na řetězec HA poskytuje NMR spektroskopie. Nativní HA měl funkci reference, se kterou se následně srovnávala spektra připravených derivátů HA. Výsledné ^1H NMR spektrum (HA, HA-ADH) v závislosti na použitém činidle (DMTMM, EDC) a molekulové hmotnosti je uvedeno na Obrázku 24.



Obrázek 24: Vyhodnocení ^1H NMR spekter nativní (poslední řádek) a modifikované HA v závislosti na molekulové hmotnosti ($M_w = 124$ kDa, vlevo; $M_w = 243$ kDa, vpravo) a aktivačního činidla (DMTMM, první řádek; EDC, druhý řádek)

Nativní hyaluronan (HA) je znázorněn (a) černou křivkou; amidovaný HA (HA-EDC), (b) modrou a červenou křivkou; amidovaný HA (HA-DMTMM) (c) zelenou a tyrkysovou křivkou. Z prvního pohledu je zřejmé, že v případě amidovaného HA se ve spektru objevily nové oblasti chemického posunu, které reprezentují nově připravené funkční skupiny. Vedle neměnných píků typických pro nativní hyaluronan, je přítomen i pás v oblasti 4,75 ppm, který je charakteristickou oblastí pro rozpouštědlo (D_2O). Oblast 3,3-4 ppm pak patří sacharidové jednotce HA, oblast 4,4-4,6 ppm (anomerní vodíky) či oblast 1,9-2,0 ppm (N-acetyl HA) označená číslem 1. N-acetyl není ve většině případů cílem modifikace, a proto může být použit jako referenční pík při stanovení stupně substituce (DS). Úspěšně provedenou amidaci HA potvrzuje v NMR spektru přítomnost nových oblastí 2,5-1,5 ppm. Konkrétně jde o oblast 2,20 ppm (2H, NHNHCO.CH_2), 2,10 ppm (2H, CH_2NHNH_2), 1,6-1,63 ppm (2H, CH_2CH_2). Na základě provedené analýzy výstupních NMR spekter lze konstatovat, že případné zvýšení molekulové hmotnosti nativního HA (z 124 kDa na 243 kDa) nebude mít velký vliv na výsledné ^1H NMR spektrum. Kromě toho byl řešen rozdílný vliv dvou typů aktivačních činidel použitých při amidaci HA a získaná spektra byla vzájemně porovnána, aby mohlo dojít k posouzení, které aktivační činidlo je efektivnější.

Na základě zjištěných výsledků lze potvrdit, že u obou činidel (DMTMM i EDC) došlo k úspěšnému navázání NH_2 skupiny na polymerní řetězec HA (4 barevné křivky na Obrázku 23). Výraznějším rozdílem ve srovnání spekter zmíněných činidel je čistota zobrazeného spektra. V případě HA-EDC jsou spektra významně znečištěná, což by se mohlo projevit na síťovací reakci či testování cytotoxicity připraveného hydrogelu. V případě cíle použít takto připravený produkt amidace pro aplikaci živých buněk, je nutné zařadit do experimentů proces dočištění výsledného produktu. Amidace HA provedená pomocí DMTMM dle NMR spekter vyvrací přítomnost nečistot (např. nezreagované zbytky činidel) a jeví se z tohoto pohledu jako výhodnější. Podobnou problematikou konjugace HA se zabývalo plno autorů [36; 40]. Výzkumný tým D'Esteho a spol. (2014) připravili amidovanou formu HA za přídavku 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 DMTMM jako činidlo efektivnější. Vedle NMR charakterizace amidovaného derivátu HA, bylo třeba ověřit stejnou metodou i oxidaci HA, kde byl zároveň sledován rozdíl zastoupených molekulových hmotností, viz Obrázek 25.

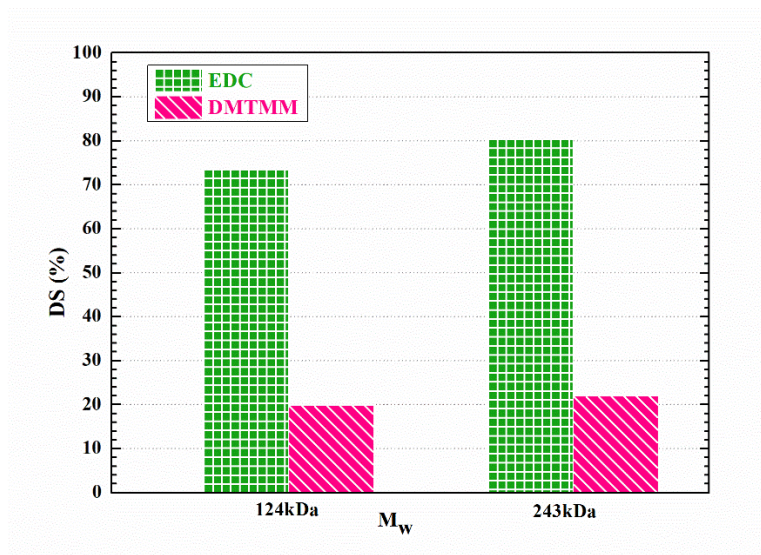


Obrázek 25: Vyhodnocení ^1H NMR spekter oxidované HA v závislosti na M_w HA (nativní HA spodní křivka; oxidovaná HA s $M_w = 1,5$ MDa, prostřední křivka; oxidovaná HA s $M_w = 1,18$ MDa, horní křivka)

Jak je patrné z Obrázku 24, modifikace oxidací HA byla provedena úspěšně, neboť jsou na první pohled ve spektrech produktů oxidace HA viditelné nové oblasti, které jsou vlastní vytvořeným aldehydickým skupinám (referencí např. pás v 2,01 ppm (ozn. jako 1; N-acetyl). Srovnáním a vyhodnocením oblasti odpovídají rozsahu 5,3-5,0 ppm, byla potvrzena 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 části 6.2.3 této práce. Oxidaci hyaluronanu se rovněž zabýval tým autorů Bao a spol. (2021). Při zkoumání NMR spekter oxidovaného HA zaznamenali přítomnost nových píků v oblastech chemického posunu 4,82 ppm, 4,98 ppm a 5,08 ppm, což indikuje přítomnost aldehydových skupin na polymerním řetězci HA. Porovnáním intenzity signálů aldehydů se signálem N-acetylu (2,01 ppm) potvrdili nejvyšší hodnotu SO dosahující 31,8 % u reakce trvající 8 hodin [84].

Stupeň modifikace DS

Na základě měření NMR spekter byl v rámci analýzy chemického složení připravených modifikovaných HA produktů určen i stupeň modifikace, jehož matematický výpočet uvádí Rovnice 2 v části 5.3.1 této práce, který pracoval s daty zaznamenaných píků na NMR spektrech. Výsledné hodnoty DS (%) jsou uvedeny na Obrázku 26.



Obrázek 26: Srovnání aktivačních činidel EDC a DMTMM v závislosti na stupni modifikace amidace HA

Analýzou získaných hodnot stupně substituce během modifikace HA pomocí EDC bylo zjištěno, že ve srovnání s daty z amidace HA činidlem DMTMM lze dosáhnout významně

vyšších DS hodnot a to v obou případech molekulových hmotností srovnávaných produktů amidace. Konkrétně byly dosaženy hodnoty 72 % (pro $M_w = 124$ kDa) a 80,6 % (pro $M_w = 243$ kDa), zatímco při konjugaci HA pomocí DMTMM byly zaznamenány nižší hodnoty 20,5 % (pro $M_w = 124$ kDa) a 22,0 % (pro $M_w = 243$ kDa). Studie provedená autory D'Este a spol. (2014) však potvrdila trend opačný. Dosáhli vyšších hodnot DS při konjugaci HA s DMTMM ($DS_{mol} = 35$ %) oproti amidaci HA s EDC/NHS ($DS_{mol} = 18$ %) [36]. Tato nesrovnalost může být zapříčiněna použitím jiné molekulové hmotnosti HA. Z literárních zdrojů je totiž zřejmé, že se stupeň substituce snižuje s narůstající molekulovou hmotností polymeru kvůli vzrůstající viskozitě polymerního roztoku. Úspěšnost modifikace byla tedy potvrzena i stupněm substituce aminových funkčních skupin. Analýza Obrázku 26 podporuje aktivační činidlo EDC v reaktivitě reakcí prováděných za účelem modifikace HA.

6.2.3 Stanovení stupně oxidace

Produktům oxidace HA byl kromě molekulové hmotnosti určen i stupeň oxidace (SO). Udává počet substituovaných aldehydických skupin na 100 jednotek HA. Výsledky této části ověření modifikace shrnuje pro každou z vybraných molekulových hmotností HA a každý čas reakce Tabulka 7, kde * značí počet aldehydických skupin (CHO) /100 jednotek HA.

Tabulka 7: Hodnoty SO pro HA-OX v závislosti na M_w polymeru a času reakce

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 tohoto stanovení SO byl nejefektivnějším časem reakce pro obě molekulové hmotnosti HA (HA-OX-1,5 MDa; HA-OX-1,18 MDa) vybrán reakční čas 10 h. Data z Tabulky 8 jsou prezentována za účelem prokázání schopnosti provedení oxidace HA s produkty vcelku srovnatelných hodnot SO. Provedené modifikace (ozn. 1 a 2) lze z pohledu příslušné chyby měření u SO považovat za velmi podobné.

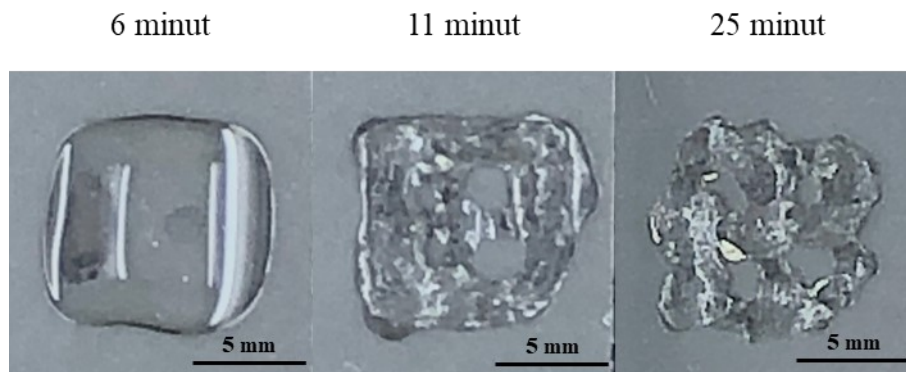
Tabulka 8: Hodnoty SO pro finální produkt HA-OX v závislosti na M_w polymeru v reakčním čase 10 h

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 určily jako neoptimálnější čas reakce 10 h, neboť vysoká hodnota SO je klíčová pro přípravu hyaluronanových hydrogelů metodou Schiffovy báze. Produkty oxidace HA s reakčním časem 10 h byly tedy v dalších částech experimentu použity pro přípravu hydrogelových mřížek metodou 3D tisku.

6.3 3D tisk

Součástí cílů této práce bylo připravit hydrogelu metodou 3D tisku. Následující části shrnují dosažené výsledky. Jako tisková náplň byly vždy použity 2% (w/w) roztoky polymerů ve stálém poměru 1:1 (HA-OX:HA-ADH). Díky ověření připravených derivátů HA-ADH a HA-OX z pohledu stupně substituce, byly tištěny pouze produkty modifikací s vyššími molekulovými hmotnostmi, tedy HA-ADH ($M_w = 243$ kDa) a HA-OX ($M_w = 1,5$ MDa). V případě HA-OX byly vybrány ty produkty, které byly přepraveny v reakčním čase 10 h (detailněji v části 6.2.3). Postupnou optimalizací parametrů tisku (popsáno v části 5.4.1) se připravilo 19 sad vzorků hydrogelových mřížek. V každé sadě připravených hydrogelových mřížek na bázi modifikovaných HA byl sledován vliv času gelace na míru zesílení hydrogelu. Jednotlivé zástupce z jedné sady hydrogelových mřížek HA-OX:HA-ADH v závislosti na vzrůstajícím času gelace polymerů zobrazuje Obrázek 27. Uvedené časy jsou vzdálené od času 0, tedy od počátku síťovací reakce. To znamená, že zmíněný gelační čas 6 minut představuje 6 minut od začátku síťování hydrogelu (HA-ADH/HA-OX) metodou Schiffovy báze. Tisknutelnost mřížky s nízkým časem gelace byla snadnější, nicméně se natištěné vrstvy v důsledku krátkého gelačního času, slily dohromady a výtisk tak neodpovídal modelové předloze. Vyšší čas gelace vzorku hydrogelu bylo mnohem náročnější tisknout (případně zásahy do procesu tisku za účelem úpravy parametrů, např. zvýšení rychlosti vytlačování materiálu z trysky), ale výtisk se mnohem více blížil reálnému modelu.



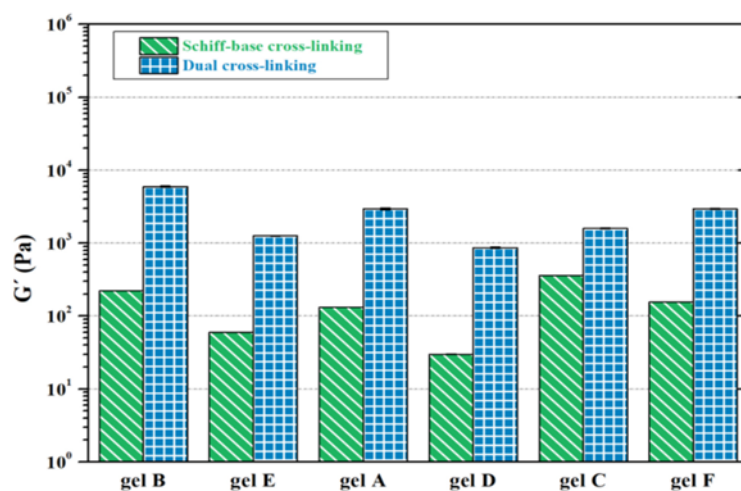
Obrázek 27: Vliv času gelace na míru zesítnění hydrogelu

6.4 Charakterizace 3D tištěných mřížek

Tato část práce analyzovala a charakterizovala použitý materiál, hyaluronanové hydrogelu připravené metodou Schiffovy báze, z pohledu tiskového materiálu.

6.4.1 Reologické měření

Pro posouzení mechaniky hydrogelu bylo zvoleno v rámci zpracování článku [40] reologické měření na oscilačním reometru. Konkrétně se provedla charakterizace ustáleného viskoelastického chování při smykovém toku, na jehož principu pracuje 3D tiskárna. Každý vzorek byl měřen třikrát a výsledky byly uvedeny jako průměr s příslušnou chybou. Měření potvrdilo souvislost mezi stupněm modifikace (DS) a tuhostí příslušného hydrogelu, což lze pozorovat na Obrázku 28, kde je G' tzv. *storage modul*.



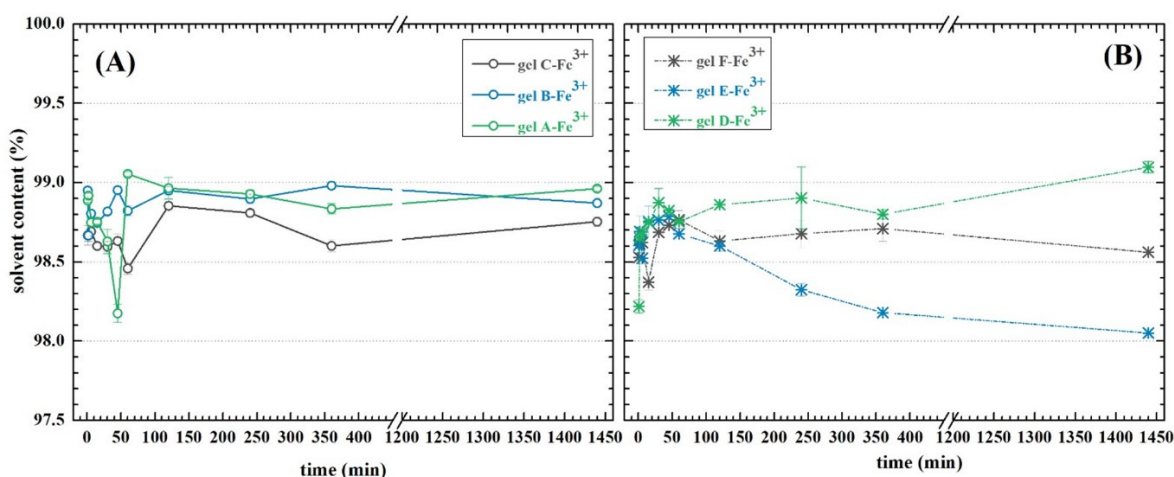
Obrázek 28: Srovnání ztrátových modulů hydrogelů připravených dvěma různými metodami síťování, kde gel B – (HA-ADH s EDC + HA-OX s DO 62); gel E – (HA-ADH

s DMTMM + HA-OX s DO 62); gel A – (HA-ADH s EDC + HA-OX s DO 35); gel D – (HA-ADH s DMTMM + HA-OX s DO 35); gel C – (HA-ADH s EDC + HA-OX s DO 49); gel F – (HA-ADH s DMTMM + HA-OX s DO 49)

Data z měření HA hydrogelů, které byly připraveny metodou fyzikálního síťování pomocí Schiffovy báze, byly srovnány s hydrogely připravenými tzv. dvojitým síťováním (po přípravě hydrogelů stejného chemického složení metodou Schiffovy báze se stabilita sítě zvýšila druhým typem síťování, pomocí síťování iontů Fe^{3+}). Bylo zjištěno, že vzorky HA-ADH s vyšší hodnotou DS mají pevnější strukturu hydrogelové sítě (gely A-C). Lze předpokládat, že nižší hodnoty DS dosažené při amidaci HA, při které bylo použito aktivační činidlo DMTMM vede k nižší hustotě zesíťování, což se pravděpodobně projevuje v oslabené struktuře hydrogelu.

6.4.2 Botnací testy

Za účelem simulace biologického prostředí (PBS s pH 7,4, 37 °C), byly u připravených HA hydrogelů testována botnací schopnost. Jelikož nebyly všechny HA hydrogely připravené pouze metodou Schiffovy báze dostatečně stabilní (u některých vzorků došlo k rozpadnutí hydrogelu na menší části) proto se u všech připravených hydrogelů provedla jejich stabilizace pomocí solí (tzv. dvojitý způsob síťování). Výsledky botnacích testů jsou přiloženy na Obrázku 29.

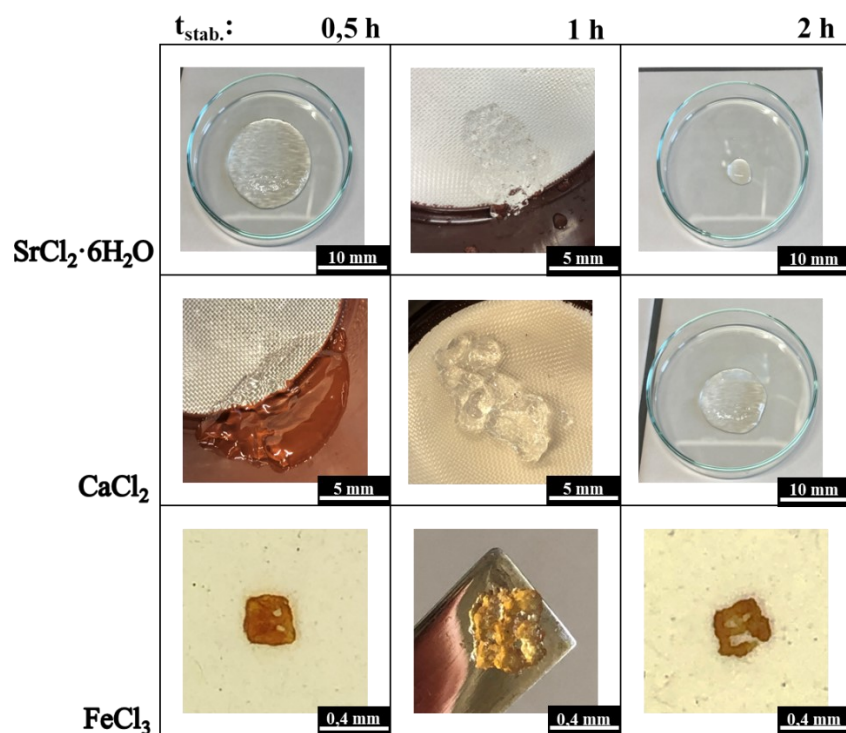


Obrázek 29: Botnání duálně zesíťovaných hydrogelů (A) Hydrogely na bázi HA-ADH (EDC); (B) Hydrogely na bázi HA-ADH modifikované pomocí DMTMM

Z přiložených výsledků je vidět, že všechny hydrogely dosáhly rovnovážného botnání a to už během jedné hodiny. Všechny zkoumané hydrogely, s výjimkou gelu D, se jevily po celou dobu sledování jako stabilní. Gel D se začal rozpadat po dvou hodinách botnání, což pravděpodobně souvisí se slabou sítí Schiffových bází, která se ukázala jako nedostatečná i za zvýšení stability hydrogelové sítě sekundárním iontovým síťováním. Při porovnání obou aktivačních činidel můžeme také vidět, že v případě činidla DMTMM, naabsorbovaly hydrogely mnohem méně kapaliny než v případě EDC. Nejmenší množství kapaliny pojmul vzorek E, zatímco nejvíce vzorek D, který se po 2 h testu rozpadal. V případě činidla EDC, bylo chování všech tří hydrogelu v podstatě obdobné.

6.5 Stabilizace hydrogelů roztoky solí

V této části experimentu bylo cílem vyřešit jednu z nevýhod fyzikálního síťování dynamické metody Schiffovy báze, kterou představuje právě nízká stabilita hydrogelové sítě, jenž se může projevit např. rozpadem vytvořené vazby např. vlivem změn podmínek prostředí (pH, teplota, přítomnost aminokyselin) atd. Na základě literatury [40; 85; 86] byl vytvořen postup stabilizace (popsán v části 5.5) s vybranými roztoky solí, jejichž ionty se adsorbovaly na povrch příslušného hydrogelu a tím zvýšili pevnost vazeb v síti ($\text{FeCl}_3 \rightarrow$ ionty Fe^{3+} ; $\text{CaCl}_2 \rightarrow$ ionty Ca^{2+} ; $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Sr}^{2+}$). Výsledky byly zpracovány do podoby Obrázku 30.



Obrázek 30: Vyhodnocení stability roztoků solí hyaluronanových 3D tištěných mřížek, kde horní řádek tabulky ($t_{\text{stab.}}$) představuje dobu pobytu hydrogelových mřížek v roztocích; levý sloupec odkazuje na použité ionty soli

Na základě uvedeného Obrázku 30 je zřejmé, že nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití železité soli. Hydrogely v přítomnosti trojmocného železa si dokázaly zachovat svůj tvar. Při použití železa bylo rovněž zřejmé, že došlo k určitému smrštění vzorku. Naopak nejhůře z vybraných solí dopadla strontnatá sůl. Hydrogel se již po půl hodině stabilizace začal roztékat, a nebylo vůbec možné rozpoznat jeho původní tvar. Na konci stabilizace zbylo z hydrogelu již jen nepatrné množství. Účinek poslední vápenaté soli byl velmi podobný soli strontnaté.

6.6 Charakterizace hydrogelů

6.6.1 Gelační čas hydrogelů

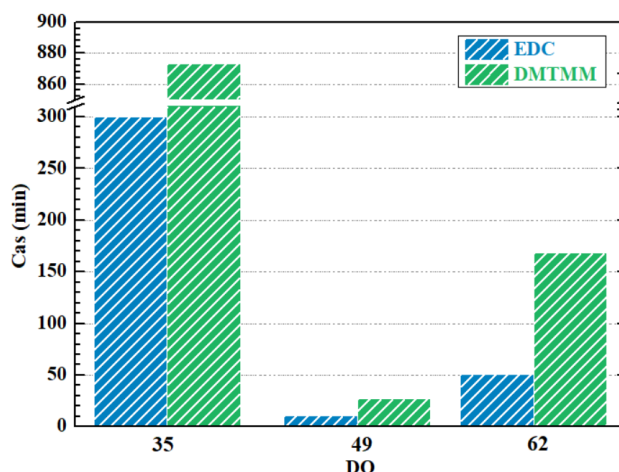
Jak už bylo zmíněno výše, při síťování hydrogelů Schiffovou bází dochází k reakci aminové funkční skupiny (HA-ADH) s aldehydickou (oxo) skupinou (HA-OX) za vzniku iminové vazby. Oba deriváty zmíněných modifikací HA byly vzájemně smíchány v poměru 1:1 v závislosti na koncentraci (1% (w/w), 2% (w/w), 3% (w/w)) za přípravy hydrogelových sítí. U takto připravených hydrogelů byla následně určena doba, za kterou dojde k vytvoření

zesíťované struktury a vzniku hydrogelu, tato doba je pak označena jako tzv. gelační čas. Jinými slovy jedná se o čas, při kterém ve vzorku začne převládat elastická složka nad viskózní, což se projeví ve vytvoření nerozpustného hydrogelu. Souhrny gelačních časů v závislosti na koncentraci připravených roztoků shrnuje Tabulka 9.

Tabulka 9: Hodnoty stanoveného gelačního času pro jednotlivé kombinace připravených hydrogelů

Matrice	M _w	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

Na základě výsledků gelačního času v závislosti na použitém činidle, a koncentraci je vidět, že nejdelších časů bylo dosaženo v případě 1% hydrogelů. Vůbec se zde neprojevil vliv molekulové hmotnosti, ani aktivačního činidla. Zcela jiná situace byla v případě 3% hydrogelů. Zde už se na gelačním čase projevil i výběr aktivačního činidla. Nejrychleji totiž zesíťovaly hydrogely, při jejichž syntéze bylo použito EDC. V případě DMTMM se gelační čas shodně pohyboval kolem 24h. Nejlépe dopadly hydrogely připravené z 2% roztoků, a proto byla tato materiálová kombinace použita při 3D tisku. Kromě závislosti molekulové hmotnosti, koncentraci a aktivačního činidla, byla porovnána i jeho závislost na stupni oxidace (viz Obrázek 31).

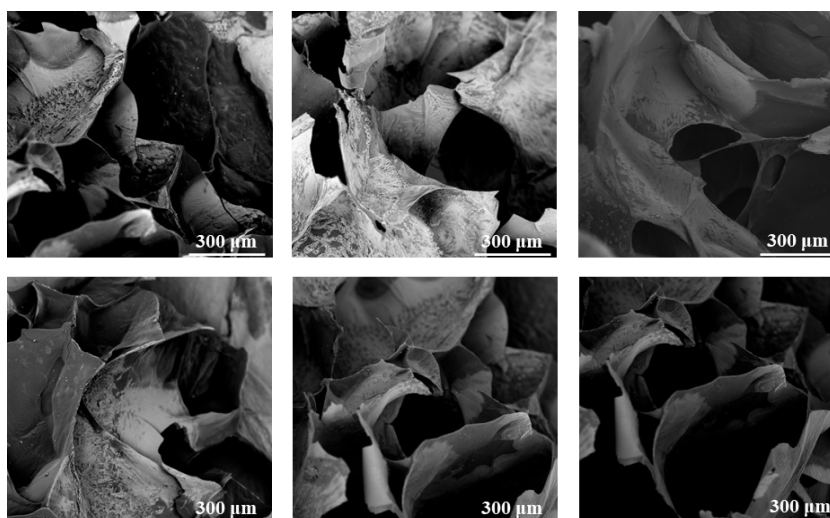


Obrázek 31: Gelační časy výsledných hydrogelů s různými hodnotami stupně oxidace (DO) oxidovaného derivátu HA

Ze závislosti gelačního času na stupni oxidaci je vidět že výsledný gelační čas hydrogelu je ovlivněn i stupněm oxidace HA-OX. Ukázalo se, že čím vyšší hodnoty stupně oxidaci byly stanoveny, tím rychleji dany hydrogel síťoval. Při porovnání použitých aktivačních činidel se rovněž potvrdilo, že rychleji síťují deriváty připravené pomocí aktivačního činidla DMTMM.

6.6.2 SEM

Popis morfologie a povrchové struktury hydrogelů byla provedena prostřednictvím analýzy SEM snímků jednotlivých vzorků lišících se zejména na koncentraci (1%; 2%; 3%) připravených hydrogelů na bázi HA. Nejlepší snímky jsou zobrazeny na níže uvedeném Obrázku 32.



Obrázek 32: Snímky SEM s vzhledem do vnitřní struktury analyzovaných vzorků hyaluronanových hydrogelů Kde: horní řádek reprezentuje použití EDC (z pohledu v levo)

se jedná o 1%, 2% a 3% koncentraci), spodní řádek reprezentuje použití DMTMM (z pohledu v levo se jedná o 1%, 2% a 3% koncentraci)

Při bližším pohledu na pořízené snímky je vidět, že velikost pórů se nijak neliší na použité molekulové hmotnosti matrice (HA-ADH; HA-OX), aktivačního činidla ani na koncentraci HA derivátu. Podle výzkumného týmu Kedaria a Vasita (2017) [83] má ovšem rostoucí koncentrace hydrogelů vliv na zvýšení hustoty sítě vnitřní struktury, to bylo pozorováno zastoupením pórů řádově menších rozměrů [83]. V průběhu výzkumu, který tato práce popisuje, nedošlo k bližší analýze vnitřní struktury vzorků hyaluronanových hydrogelů. Ve struktuře všech připravených hydrogelů byly pozorovány póry s velikostí $\geq 50 \mu\text{m}$. Porozita hydrogelů, konkrétně velikost jejich pórů, představuje jeden z klíčových parametrů, který ovlivňuje difuzi látek přes vnitřní i vnější strukturu hydrogelů, a mimo to přímo souvisí s buněčnou proliferací a diferenciací. Mimo to se velikost pórů, které by měly být v hydrogelech zastoupeny, bude lišit i podle použitého typu buněk a tkání. Kromě biologických vlastností bude velikost pórů v matrice dozajista ovlivňovat i botnací vlastnost hydrogelů.

7 ZÁVĚR

V rámci experimentální části této diplomové práce byl jedním z prvotních cílů připravit deriváty hyaluronanu pro jejich další využití jako hydrogely. Z toho důvodu byly provedeny dvě rozdílné modifikace HA (amidace a oxidace HA) s cílem propojit výsledné deriváty skrze metodu Schiffovy báze a následně tyto materiály zpracovat metodou 3D tisku. Modifikace hyaluronanu byly provedeny za účelem zavedení nových funkčních skupin (oxo, amino) na polymerní řetězec HA. Amidace hyaluronanu byla realizována navázáním dihydrazidu kyseliny adipové (ADH) na nativní řetězec HA pomocí vybraných aktivačních činidel (DMTMM a EDC), jejímž výstupem byl polymerní řetězec HA s nově navázanými (NH_2) funkčními skupinami (HA-ADH). U modifikace byla provedena vhodná optimalizace možných reakčních parametrů (M_w , teplota, čas, pH, atd.), a to především z pohledu jednoduchosti reakce, čistoty produktu a účinnosti modifikace (DS). Kromě amidace, byla provedena oxidace HA (HA-OX), jejímž výsledkem bylo zavedením aldehydových funkčních skupin do polymerního řetězce HA. Princip oxidace HA spočíval v rozevření kruhu sacharidové jednotky vlivem působení přidaného jodistanu sodného (oxidačního činidla). Z připravených derivátů HA (HA-ADH, HA-OX) byly v poměru 1:1 připraveny hydrogely. Síťovací reakce probíhala mezi aminovými (HA-ADH) a aldehydovými (HA-OX) skupinami za vzniku iminové vazby ($\text{C}=\text{N}$). Funkčnost provedených modifikací byla následně ověřena pomocí FT-IR a NMR spektroskopie. Na základě výsledků NMR se v případě amidovaného HA se podařilo potvrdit přítomnost nových oblastí chemického posunu, které reprezentují nově připravené funkční skupiny. Konkrétně se jednalo o oblasti 2,5-1,5 ppm. Rovněž bylo zjištěno, že zvýšení molekulové hmotnosti nativního HA (z 124 kDa na 243 kDa) nemělo vliv na výsledné NMR spektrum. U derivátů HA-OX byly kromě toho stanoveny i stupně oxidace. Stejně jako u amidace, byla úspěšnost modifikace ověřena i u oxidace HA. Po oxidaci se v NMR spektru objevily nové oblasti, které jsou vlastní vytvořeným aldehydickým skupinám (oblast odpovídá rozsahu 5,3-5,0 ppm). U připravených hydrogelů byl rovněž charakterizován čas gelace. Pro posouzení mechaniky hydrogelu byla provedena charakterizace ustáleného viskoelastického chování při smykovém toku, na jehož principu pracuje 3D tiskárna. Data z měření HA hydrogelů, které byly připraveny metodou fyzikálního síťování pomocí Schiffovy báze, byly srovnány s hydrogely připravenými tzv. dvojitým síťováním. Ukázalo se, že vzorky HA-ADH s vyšší hodnotou stupně substituce mají pevnější strukturu hydrogelové sítě. Proto bylo přistoupeno ke zpracování hydrogelů pomocí 3D tiskárny metodou extruze do podoby mřížky. Extruzní

tisk probíhal za jednotného nastavení parametrů pro každou mřížku, celkem bylo vytisknuto přes 90 vzorků hydrogelových mřížek, u kterých se hodnotil čas gelace na míru zesítnění hydrogelu. Na základě výsledků gelačního času v závislosti na použitém činidle a koncentraci lze vidět, že nejdelších časů bylo dosaženo u 1% hydrogelů. Vůbec se zde neprojevil vliv molekulové hmotnosti, ani aktivačního činidla. Naopak nejlépe dopadly hydrogely připravené z 2% roztoků. Rovněž bylo zjištěno, že výsledný gelační čas hydrogelu je ovlivněn i stupněm oxidace HA-OX. V neposlední řadě následovala charakterizace 3D tištěných produktů z pohledu reologického chování a botnacích vlastností. Jelikož může být vybraný typ síťovací reakce (Schiffova báze) v některých podmínkách nestabilní, hydrogelová síť byla zpevněna dalším typem síťování, pomocí iontů (Fe^{3+} ; Ca^{2+} ; Sr^{2+}). Na principu adsorpce vybraných iontů na povrch hydrogelů, byly tyto vzorky tzv. stabilizovány. Výsledkem tohoto kroku měla být zpevněná hydrogelová mřížka, nicméně to se povedlo pouze v případě stabilizace roztokem FeCl_3 .

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] UDAYAKUMAR, G. P., S. MUTHUSAMY, B. SELVAGANESH, N. SIVARAJASEKAR, et al. Biopolymers and composites: Properties, characterization and their applications in food, medical and pharmaceutical industries. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2021, 9(4), 105322. [10.1016/j.jece.2021.105322](https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105322).
- [2] NIAOUNAKIS, M. Definitions of Terms and Types of Biopolymers 2015, 10.1016/b978-0-323-35399-1.00001-6, 1-90. [10.1016/b978-0-323-35399-1.00001-6](https://doi.org/10.1016/b978-0-323-35399-1.00001-6).
- [3] GEORGE, A., M. R. SANJAY, R. SRISUK, J. PARAMESWARANPILLAI, et al. A comprehensive review on chemical properties and applications of biopolymers and their composites. *Int J Biol Macromol*, Jul 1 2020, 154, 329-338. [10.1016/j.ijbiomac.2020.03.120](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.120).
- [4] ZHANG, L., Y. YANG, J. TAN AND Q. YUAN Chemically modified nucleic acid biopolymers used in biosensing. *Materials Chemistry Frontiers*, 2020, 4(5), 1315-1327. [10.1039/d0qm00026d](https://doi.org/10.1039/d0qm00026d).
- [5] LI, H., T. LEE, T. DZIUBLA, F. PI, et al. RNA as a stable polymer to build controllable and defined nanostructures for material and biomedical applications. *Nano Today*, Oct 1 2015, 10(5), 631-655. [10.1016/j.nantod.2015.09.003](https://doi.org/10.1016/j.nantod.2015.09.003).
- [6] VAN DER MAAREL, J. R. C. *Introduction To Biopolymer Physics*. Edition ed.: World Scientific Publishing Company, 2007. ISBN 9789813101432.
- [7] ILYAS, R. A., S. M. SAPUAN, A. KADIER, S. KRISHNAN, et al. Chapter 7 - Mechanical Testing of Sugar Palm Fiber Reinforced Sugar Palm Biopolymer Composites. In F.M. AL-OQLA AND S.M. SAPUAN eds. *Advanced Processing, Properties, and Applications of Starch and Other Bio-Based Polymers*. Elsevier, 2020, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819661-8.00007-X>, p. 89-110.
- [8] JOHN, M. J. AND S. THOMAS Biofibres and biocomposites. *Carbohydrate Polymers*, 2008/02/08/ 2008, 71(3), 343-364. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.05.040>.
- [9] MERALDO, A. Introduction to Bio-Based Polymers 2016, 10.1016/b978-0-323-37100-1.00004-1, 47-52. [10.1016/b978-0-323-37100-1.00004-1](https://doi.org/10.1016/b978-0-323-37100-1.00004-1).
- [10] ZHANG, Q., M. SONG, Y. XU, W. WANG, et al. Bio-based polyesters: Recent progress and future prospects. *Progress in Polymer Science*, 2021, 120, 101430. [10.1016/j.progpolymsci.2021.101430](https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2021.101430).
- [11] HARGITTAI, I. AND M. HARGITTAI Molecular structure of hyaluronan: an introduction. *Structural Chemistry*, 2008, 19(5), 697-717. [10.1007/s11224-008-9370-3](https://doi.org/10.1007/s11224-008-9370-3).
- [12] NECAS, J., L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER AND J. KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. 2008.
- [13] KOBAYASHI, T., T. CHANMEE AND N. ITANO Hyaluronan: Metabolism and Function. *Biomolecules*, Nov 7 2020, 10(11). [10.3390/biom10111525](https://doi.org/10.3390/biom10111525).
- [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] HASCALL, V. C., A. K. MAJORS, C. A. DE LA MOTTE, S. P. EVANKO, et al. Intracellular hyaluronan: a new frontier for inflammation? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2004/07/06/ 2004, 1673(1), 3-12. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.02.013>.
- [16] HASCALL V, E. J. Hyaluronan. In C.R. VARKI A, ESKO JD, ET AL. ed. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press Copyright 2015-2017 by The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California. All rights reserved., 2017, [10.1101/glycobiology.3e.016](https://doi.org/10.1101/glycobiology.3e.016).
- [17] KUTÁLKOVÁ, E., J. HRNČIŘÍK, R. WITASEK AND M. INGR Effect of solvent and ions on the structure and dynamics of a hyaluronan molecule. *Carbohydrate Polymers*, 2020/04/15/ 2020, 234, 115919. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115919>.

- [18] WANG, W., R. NARAIN AND H. ZENG. Hydrogels. In *Polymer Science and Nanotechnology*. Elsevier, 2020, 10.1016/B978-0-12-816806-6.00010-8, p. 203-244.
- [19] BOHAUMILITZKY, L., A. K. HUBER, E. M. STORK, S. WENGERT, et al. A Trickster in Disguise: Hyaluronan's Ambivalent Roles in the Matrix. *Front Oncol*, 2017, 7, 242. 10.3389/fonc.2017.00242.
- [20] KHUNMANEE, S., Y. JEONG AND H. PARK Crosslinking method of hyaluronic-based hydrogel for biomedical applications. *J Tissue Eng*, 2017/1// 2017, 8. 10.1177/2041731417726464.
- [21] COWMAN, M. K. AND S. MATSUOKA. Experimental approaches to hyaluronan structure. In *Carbohydr Res*. Elsevier BV, 2005, vol. 340, p. 791-809.
- [22] REED, R. K., K. LILJA AND T. C. LAURENT Hyaluronan in the rat with special reference to the skin. *Acta Physiologica Scandinavica*, 1988, 134(3), 405-411. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1988.tb08508.x>.
- [23] TAVIANATOU, A. G., I. CAON, M. FRANCHI, Z. PIPERIGKOU, et al. Hyaluronan: molecular size-dependent signaling and biological functions in inflammation and cancer. *FEBS J*, Aug 2019, 286(15), 2883-2908. 10.1111/febs.14777.
- [24] MORADALI, M. F. AND B. H. A. REHM Bacterial biopolymers: from pathogenesis to advanced materials. *Nat Rev Microbiol*, Apr 2020, 18(4), 195-210. 10.1038/s41579-019-0313-3.
- [25] MARKOVITZ, A., J. A. CIFONELLI AND A. DORFMAN The Biosynthesis of Hyaluronic Acid by Group A Streptococcus: VI. BIOSYNTHESIS FROM URIDINE NUCLEOTIDES IN CELL-FREE EXTRACTS. *Journal of Biological Chemistry*, 1959/09/01/ 1959, 234(9), 2343-2350. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)69812-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)69812-6).
- [26] WEIGEL, P. H. Hyaluronan Synthase: The Mechanism of Initiation at the Reducing End and a Pendulum Model for Polysaccharide Translocation to the Cell Exterior. *International Journal of Cell Biology*, 2015/09/10 2015, 2015, 367579. 10.1155/2015/367579.
- [27] SZE, J. H., J. C. BROWNLIE AND C. A. LOVE Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review. *3 Biotech*, Jun 2016, 6(1), 67. 10.1007/s13205-016-0379-9.
- [28] LIU, L., Y. LIU, J. LI, G. DU, et al. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microb Cell Fact*, Nov 16 2011, 10, 99. 10.1186/1475-2859-10-99.
- [29] VOLPI, N., SCHILLER, J., STERN, R., ŠOLTÉS, L. Role, Metabolism, Chemical Modifications and Applications of Hyaluronan. Bentham Science Publishers Ltd., 2009, 16, 1718-1745.
- [30] PENDYALA, M., S. J. STEPHEN, D. VASHISHTH, E. A. BLABER, et al. Loss of hyaluronan synthases impacts bone morphology, quality, and mechanical properties. *Bone*, 2023/07/01/ 2023, 172, 116779. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2023.116779>.
- [31] ŻOLEK-TRYZNOWSKA, Z. Rheology of Printing Inks 2016, 10.1016/b978-0-323-37468-2.00006-3, 87-99. 10.1016/b978-0-323-37468-2.00006-3.
- [32] TORVARD C LAURENT, K. H. A. B. G. Cross-linked Gels of Hyaluronic Acid *Acta Chem. Scand.*, 1964, 18(No. 1), 274-275.
- [33] HINTZE, V., M. SCHNABELRAUCH AND S. ROTHER Chemical Modification of Hyaluronan and Their Biomedical Applications. *Front Chem*, 2022, 10, 830671. 10.3389/fchem.2022.830671.
- [34] 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. 10.1016/j.carbpol.2011.03.019.

- [35] 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.
- [36] 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. [10.1016/j.carbpol.2014.02.070](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.070).
- [37] CHEN, F., Y. NI, B. LIU, T. ZHOU, et al. Self-crosslinking and injectable hyaluronic acid/RGD-functionalized pectin hydrogel for cartilage tissue engineering. *Carbohydr Polym*, Jun 15 2017, 166, 31-44. [10.1016/j.carbpol.2017.02.059](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.059).
- [38] BIAN, S., M. HE, J. SUI, H. CAI, et al. The self-crosslinking smart hyaluronic acid hydrogels as injectable three-dimensional scaffolds for cells culture. *Colloids Surf B Biointerfaces*, Apr 1 2016, 140, 392-402. [10.1016/j.colsurfb.2016.01.008](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.01.008).
- [39] DE BOULLE, K., R. GLOGAU, T. KONO, M. NATHAN, et al. A Review of the Metabolism of 1,4-Butanediol Diglycidyl Ether-Crosslinked Hyaluronic Acid Dermal Fillers. *Dermatologic Surgery*, 2013, 39(12), 1758-1766. [10.1111/dsu.12301](https://doi.org/10.1111/dsu.12301).
- [40] VITKOVA, L., L. MUSILOVA, E. ACHBERGEROVA, R. KOLARIK, et al. Formulation of Magneto-Responsive Hydrogels from Dually Cross-Linked Polysaccharides: Synthesis, Tuning and Evaluation of Rheological Properties. *Int J Mol Sci*, Aug 25 2022, 23(17). [10.3390/ijms23179633](https://doi.org/10.3390/ijms23179633).
- [41] LUO, Y., J. TAN, Y. ZHOU, Y. GUO, et al. From crosslinking strategies to biomedical applications of hyaluronic acid-based hydrogels: A review. *Int J Biol Macromol*, Mar 15 2023, 231, 123308. [10.1016/j.ijbiomac.2023.123308](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123308).
- [42] AL-SIBANI, M., A. AL-HARRASI AND R. H. H. NEUBERT Study of the effect of mixing approach on cross-linking efficiency of hyaluronic acid-based hydrogel cross-linked with 1,4-butanediol diglycidyl ether. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016/08/25/ 2016, 91, 131-137. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.06.010>.
- [43] BENCHERIF, S. A., A. SRINIVASAN, F. HORKAY, J. O. HOLLINGER, et al. Influence of the degree of methacrylation on hyaluronic acid hydrogels properties. *Biomaterials*, 2008/04/01/ 2008, 29(12), 1739-1749. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.11.047>.
- [44] PEPPAS, N. A., HOFFMAN, ALLAN S. *Hydrogels*. A. PRESS, 2020.
- [45] KOPECKA, K., L. VITKOVA, Z. KRONEKOVA, L. MUSILOVA, et al. Synthesis and Exfoliation of Calcium Organophosphonates for Tailoring Rheological Properties of Sodium Alginate Solutions: A Path toward Polysaccharide-Based Bioink. *Biomacromolecules*, Jul 10 2023, 24(7), 3016-3031. [10.1021/acs.biomac.3c00081](https://doi.org/10.1021/acs.biomac.3c00081).
- [46] HUERTA-ANGELES, G., M. NEMCOVA, E. PRIKOPOVA, D. SMEJKALOVA, et al. Reductive alkylation of hyaluronic acid for the synthesis of biocompatible hydrogels by click chemistry. *Carbohydr Polym*, Nov 6 2012, 90(4), 1704-1711. [10.1016/j.carbpol.2012.07.054](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.054).
- [47] 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. [10.34297/ajbsr.2021.11.001682](https://doi.org/10.34297/ajbsr.2021.11.001682).
- [48] MEHTA, P., M. SHARMA AND M. DEVI Hydrogels: An overview of its classifications, properties, and applications. *J Mech Behav Biomed Mater*, Nov 2023, 147, 106145. [10.1016/j.jmbbm.2023.106145](https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2023.106145).
- [49] TSENG, T.-C., L. TAO, F.-Y. HSIEH, Y. WEI, et al. An Injectable, Self-Healing Hydrogel to Repair the Central Nervous System. *Advanced Materials*, 2015, 27(23), 3518-3524. <https://doi.org/10.1002/adma.201500762>.

- [50] HOI-YAN, C., L. KIN-TAK, L. TUNG-PO AND H. DAVID A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. *Composites Part B: Engineering*, 2007, 38(3), 291-300. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2006.06.014>.
- [51] 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. 10.1155/2021/6640893.
- [52] ZARE, M., A. BIGHAM, M. ZARE, H. LUO, et al. pHEMA: An Overview for Biomedical Applications. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(12), 6376.
- [53] KOETTING, M. C., J. T. PETERS, S. D. STEICHEN AND N. A. PEPPAS Stimulus-responsive hydrogels: Theory, modern advances, and applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 2015/07/01/ 2015, 93, 1-49. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2015.04.001>.
- [54] OISHI, M. AND Y. NAGASAKI Stimuli-responsive smart nanogels for cancer diagnostics and therapy. *Nanomedicine*, 2010, 5(3), 451-468. 10.2217/nmm.10.18.
- [55] 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. 10.1007/s10856-019-6318-7.
- [56] AHMED, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J Adv Res*, Mar 2015, 6(2), 105-121. 10.1016/j.jare.2013.07.006.
- [57] NEIL, J. AND J. J. H. ACKERMAN Magnetic Resonance (MR); Overview 2014, 10.1016/b978-0-12-385157-4.00198-6, 971-972. 10.1016/b978-0-12-385157-4.00198-6.
- [58] PYKETT IL, N. J., BUONANNO FS, BRADY TJ, GOLDMAN MR, KISTLER JP, POHOST GM Principles of nuclear magnetic resonance imaging. *Radiology*, 1982, 143(1)(157-68). 10.1148/radiology.143.1.7038763.
- [59] VERNON-PARRY, K. D. Scanning Electron Microscopy: an introduction Elsevier Science Ltd., 2000, 13, 40-44.
- [60] ALAVARSE, A. C., E. C. G. FRACHINI, R. DA SILVA, V. H. LIMA, et al. Crosslinkers for polysaccharides and proteins: Synthesis conditions, mechanisms, and crosslinking efficiency, a review. *Int J Biol Macromol*, Mar 31 2022, 202, 558-596. 10.1016/j.ijbiomac.2022.01.029.
- [61] CHEN, X. B., A. FAZEL ANVARI-YAZDI, X. DUAN, A. ZIMMERLING, et al. Biomaterials / bioinks and extrusion bioprinting. *Bioact Mater*, Oct 2023, 28, 511-536. 10.1016/j.bioactmat.2023.06.006.
- [62] SHILO, D., O. EMODI, O. BLANC, D. NOY, et al. Printing the Future-Updates in 3D Printing for Surgical Applications. *Rambam Maimonides Med J*, Jul 30 2018, 9(3). 10.5041/RMMJ.10343.
- [63] LIU, D., Z. ZHANG, X. ZHANG AND Z. CHEN 3D printing concrete structures: State of the art, challenges, and opportunities. *Construction and Building Materials*, 2023, 405, 133364. 10.1016/j.conbuildmat.2023.133364.
- [64] GEBHARDT, A., J. KESSLER AND L. THURN Basics of 3D Printing Technology 2018, 10.3139/9781569907030.001, 1-32. 10.3139/9781569907030.001.
- [65] ASTM F2792-12a, Standard terminology for additive manufacturing technologies. ASTM International. West Conshohocken, PA, 2012. In., 10.1520/f2792-12a.
- [66] SHAHRUBUDIN, N., T. C. LEE AND R. RAMLAN An Overview on 3D Printing Technology: Technological, Materials, and Applications. *Procedia Manufacturing*, 2019, 35, 1286-1296. <https://doi.org/10.1016/j.promfg.2019.06.089>.
- [67] ZE-XIAN, L., C. YEN THIEN, R. BRIAN MICHAEL, M. DAVIDE, et al. Perspective on 3D printing of separation membranes and comparison to related unconventional

fabrication techniques. *Journal of Membrane Science*, 2017, 523, 596-613. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2016.10.006>.

[68] SYED, A. M. T., P. K. ELIAS, B. AMIT, B. SUSMITA, et al. Additive manufacturing: scientific and technological challenges, market uptake and opportunities. *Materials Today*, 2018, 21(1), 22-37. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2017.07.001>.

[69] PRADHAN, R. A., S. S. RAHMAN, A. QURESHI AND A. ULLAH *Biopolymers* 2021, 10.1016/b978-0-12-819240-5.00012-2, 281-303. 10.1016/b978-0-12-819240-5.00012-2.

[70] OZBOLAT, I. T. *3D Bioprinting: Fundamentals, Principles and Applications*. Edition ed.: Elsevier Science, 2016. ISBN 9780128030301.

[71] KEY, A. *3D Bioprinting for Tissue Engineering*. In., 2016, <https://abdominalkey.com/3d-bioprinting-for-tissue-engineering/>.

[72] JOSHI, S. AND A. SHEIKH 3D printing in aerospace and its long-term sustainability. *Virtual and Physical Prototyping*, 2015, 10, 1-11. 10.1080/17452759.2015.1111519.

[73] MEHMET, S. AND K. YUSUF CANER 3D Printing of Buildings: Construction of the Sustainable Houses of the Future by BIM. *Energy Procedia*, 2017, 134, 702-711. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.09.562>.

[74] FOO, C. Y., H. N. LIM, M. A. MAHDI, M. H. WAHID, et al. Three-Dimensional Printed Electrode and Its Novel Applications in Electronic Devices. *Scientific Reports*, 2018/05/09 2018, 8(1), 7399. 10.1038/s41598-018-25861-3.

[75] MOHD, J. AND H. ABID 3D bioprinting applications for the printing of skin: A brief study. *Sensors International*, 2021, 2, 100123. <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2021.100123>.

[76] BOGUE, R. 3D printing: The dawn of a new era in manufacturing? *Assembly Automation*, 2013, 33. 10.1108/AA-06-2013-055.

[77] GEBHARDT, A., J. KESSLER AND L. THURN Applications of Additive Manufacturing 2018, 10.3139/9781569907030.004, 101-136. 10.3139/9781569907030.004.

[78] LIU, Y., Q. HAMID, J. SNYDER, C.-Y. WANG, et al. Evaluating fabrication feasibility and biomedical application potential of in situ 3D printing technology. *Rapid Prototyping Journal*, 2016, 22, 947-955.

[79] REDAELLI, F., M. SORBONA AND F. ROSSI Synthesis and processing of hydrogels for medical applications 2017, 10.1016/b978-0-08-100262-9.00010-0, 205-228. 10.1016/b978-0-08-100262-9.00010-0.

[80] KORPASOVÁ, K. Amidace hyaluronanu a její využití při přípravě hydrogelů. *Bakalářská práce Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati*, 2022.

[81] 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. 10.1023/a:1015866104055.

[82] 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. 10.1016/0003-2697(90)90675-y.

[83] 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. 10.1177/2041731417718391.

[84] 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. 10.1016/j.ijbiomac.2020.11.214.

[85] LEE, J., K. CHANG, S. KIM, V. GITE, et al. Phase Controllable Hyaluronic Acid Hydrogel with Iron(III) Ion–Catechol Induced Dual Cross-Linking by Utilizing the Gap of

Gelation Kinetics. *Macromolecules*, 2016, 49(19), 7450-7459.
10.1021/acs.macromol.6b01198.

[86] LUO, Y., K. R. KIRKER AND G. D. PRESTWICH. Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery. 2000.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

3D	trojdimenzionální
ADAs	anti-lékové protilátky
ADH	dihydrazid kyseliny adipové
ATR	<i>attenuated total reflectance; zeslabený úplný odraz</i>
bio-LDPE	bio-polyethylen
BDDE	butandiol-diglycidylether
C	uhlík
Ca ²⁺	vápenatý kationt
CaCl ₂	chlorid vápenatý
CD44	transmembránový receptor glykoproteinu
(COOH) ₂	kyselina šťavelová
DG	<i>double gap</i>
DICOM	<i>digital imaging and communications in medicine</i>
DLP	<i>digital light processing</i>
DMSO	dimethylsulfoxid
DMTMM	4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chlorid
D ₂ O	těžká voda
DS	stupeň modifikace = stupeň substituce
ECM	extracelulární matrix
EDC	1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)-propyl]-karbodiimid
EDC·HCl	N-ethyl-N'-(3-(dimethylamino)-propyl)-karbodiimid
Fe ³⁺	železitý kationt
FeCl ₃	chlorid železitý
FDM	<i>dused deposition modeling</i>
FT-IR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
G'	<i>storage</i> modul
G''	<i>loss</i> modul
GAG	glukosaminoglykany
GMA	glicidylmethakrylát
HA	hyaluronan
HA-ADH	amidovaný hyaluronan
HA-OX	oxidovaný hyaluronan
HCl	kyselina chlorovodíková
HMW-HA	hyaluronan s velmi vysokou molekulovou hmotností
HOBt	1-hydroxybenzotriazol
LMW-HA	nízkomolekulární hyaluronan
MMW-HA	středně molekulární hyaluronan
MRI	<i>magnetic rezonance imaging</i>
NaIO ₄	jodistan sodný

NaOH	hydroxid sodný
Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	pentahydrát thiosíranu sodného
NH ₂	aminová funkční skupina
NHS	N-hydroxysukcinimid
NIPAAm	N-isopropylakrylamid
NMR	nukleární magnetická rezonance
O	kyslík
OH	hydroxylová funkční skupina
oligo-HA	oligomerní hyaluronan
p.a.	pro analýzu
PEG	polyethyleglykol
pH	záporný dekadický logaritmus H ₃ O ⁺ iontů
PHEMA	polyhydroxyethylmethakrylát
PCL	polykaprolakton
PLA	kyselina polyléčná
PMAA	poly(kyselina methakrylová)
PNIPAAm	poly(N-izopropylakrylamid)
ppm	parts per million
PVA	polyvinylalkohol
RNA	ribonukleová kyselina
SE	sekundární elektrony
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SH	thiolová funkční skupina
SLA	stereolitografie
SO	stupeň oxidace
Sr ²⁺	strontnatý kationt
SrCl ₂ ·6H ₂ O	hexahydrát chloridu strontnatého
SPS	<i>sugar palm starch</i> , palmový škrob
sulfo-NHS	<i>N-hydroxysulfosuccinimide</i>
UV	ultrafialové

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Rozdělení skupiny syntetických biopolymerů na základě biodegradability [3] .7	
Obrázek 2: Strukturní jednotka kyseliny hyaluronové	10
Obrázek 3: Reakční schéma aktivace karboxylové skupiny na polymerním řetězci HA v přítomnosti EDC [33]	14
Obrázek 4: Reakční schéma aktivace karboxylové skupiny na polymerním řetězci HA v přítomnosti DMTMM [33]	14
Obrázek 5: Reakční schéma thiolace hyaluronanu kde: HA(Na) je hyaluronan HA-NHS reprezentuje aktivní ester (meziprodukt) a HA-SH je zástupce thiolovaného produktu modifikace hyaluronanu	15
Obrázek 6: Reakční mechanismus etherifikace s –OH skupinou hyaluronanu	16
Obrázek 7: Reakční mechanismus přípravy oxo skupiny na polymerním řetězci HA [40]	16
Obrázek 8: Schéma metod síťování a biomedicínských aplikací hydrogelů na bázi kyseliny hyaluronové	17
Obrázek 9: Schéma přípravy Schiffovy báze.....	20
Obrázek 10: Princip <i>click chemistry</i>	21
Obrázek 11: Konkrétní aplikace thermoresponzivních hydrogelů na bázi <i>chitosan-β-glycerophosphate</i>	22
Obrázek 12: Princip NMR analýzy.....	25
Obrázek 13: Náčrt SEM.....	26
Obrázek 14: Příklady 3 typů tiskových hlav pro extruzní tisk [71].....	31
Obrázek 15: Schéma navrženého experimentu [40; 61; 79].....	34
Obrázek 16: Schéma amidace HA v přítomnosti aktivačních činidel DMTMM a EDC [40]	36
Obrázek 17: Reakční schéma provedené oxidace HA [40]	36
Obrázek 18: Lyofilizovaná forma HA-ADH	37
Obrázek 19: Reakční schéma síťování hyaluronanu (HA-OX) hyaluronanem (HA-ADH) za přípravy hyaluronanové hydrogelové sítě (HA síťovaná HA) [40].....	42
Obrázek 20: 3D tiskárna <i>Bio X Cellink</i> s detailem na extruzní tiskovou hlavu <i>Syringe pump</i>	43
Obrázek 21: Vybraný tiskový model mřížky pro 3D tisk.....	44
Obrázek 22: Srovnání FT-IR spekter čistého HA (černá křivka) a amidovaných HA ($M_w = 124$ kDa, vlevo; $M_w = 243$ kDa, vpravo).....	50
Obrázek 23: Srovnání FT-IR spekter čistého HA (černá křivka) a oxidovaných HA ($M_w = 1,5$ MDa, prostřední křivka; $M_w = 1,18$ MDa horní křivka).....	51
Obrázek 24: Vyhodnocení ^1H NMR spekter nativní (poslední řádek) a modifikované HA v závislosti na molekulové hmotnosti ($M_w = 124$ kDa, vlevo; $M_w = 243$ kDa, vpravo) a aktivačního činidla (DMTMM, první řádek; EDC, druhý řádek).....	52

Obrázek 25: Vyhodnocení ^1H NMR spekter oxidované HA v závislosti na M_w HA (nativní HA spodní křivka; oxidovaná HA s $M_w = 1,5$ MDa, prostřední křivka; oxidovaná HA s $M_w = 1,18$ MDa, horní křivka)	53
Obrázek 26: Srovnání aktivačních činidel EDC a DMTMM v závislosti na stupni modifikace amidace HA	54
Obrázek 27: Vliv času gelace na míru zesítnění hydrogelu.....	57
Obrázek 28: Srovnání ztrátových modulů hydrogelů připravených dvěma různými metodami síťování, kde gel B – (HA-ADH s EDC + HA-OX s DO 62); gel E – (HA-ADH s DMTMM + HA-OX s DO 62); gel A – (HA-ADH s EDC + HA-OX s DO 35); gel D – (HA-ADH s DMTMM + HA-OX s DO 35); gel C – (HA-ADH s EDC + HA-OX s DO 49); gel F – (HA-ADH s DMTMM + HA-OX s DO 49).....	57
Obrázek 29: Botnání duálně zesíťovaných hydrogelů (A) Hydrogely na bázi HA-ADH (EDC); (B) Hydrogely na bázi HA-ADH modifikované pomocí DMTMM.....	58
Obrázek 30: Vyhodnocení stability roztoků solí hyaluronanových 3D tištěných mřížek, kde horní řádek tabulky ($t_{\text{stab.}}$) představuje dobu pobytu hydrogelových mřížek v roztocích; levý sloupec odkazuje na použité ionty soli	60
Obrázek 31: Gelační časy výsledných hydrogelů s různými hodnotami stupně oxidace (DO) oxidovaného derivátu HA	62
Obrázek 32: Snímky SEM s vzhledem do vnitřní struktury analyzovaných vzorků hyaluronanových hydrogelů Kde: horní řádek reprezentuje použití EDC (z pohledu v levo se jedná o 1%, 2% a 3% koncentraci), spodní řádek reprezentuje použití DMTMM (z pohledu v levo se jedná o 1%, 2% a 3% koncentraci)	62

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Parametry produktů amidace HA při použití aktivačního činidla DMTMM	38
Tabulka 2: Souhrn dat z amidace HA s využitím aktivačního činidla EDC.....	39
Tabulka 3: Vstupní a výstupní parametry oxidace HA ($M_w = 1,5$ MDa)	40
Tabulka 4: Vstupní a výstupní parametry oxidace HA ($M_w = 1,18$ MDa)	40
Tabulka 5: Konkrétní materiálové kombinace připravených hydrogelů	43
Tabulka 6: Parametry 3D tisku hydrogelových mřížek	44
Tabulka 7: Hodnoty SO pro HA-OX v závislosti na M_w polymeru a času reakce.....	55
Tabulka 8: Hodnoty SO pro finální produkt HA-OX v závislosti na M_w polymeru v reakčním čase 10 h.....	56
Tabulka 9: Hodnoty stanoveného gelačního času pro jednotlivé kombinace připravených hydrogelů	61

