

Příprava hydrogelu na bázi hyaluronanu

Barbora FILOVÁ

Bakalářská práce
2017



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav fyziky a mater. inženýrství
akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Barbora Filová**
Osobní číslo: **T14382**
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Materiálové inženýrství**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Příprava hydrogelů na bázi hyaluronanu**

Zásady pro vypracování:

1. Nejprve vypracujte rešerši zaměřenou na základní vlastnosti hyaluronanu a jeho chování v roztocích. Popište chemické a fyzikální vlastnosti hydrogelů a jejich přípravu se zaměřením na hyaluronan (HA) včetně jeho využití (například v tkáňovém inženýrství).
2. V praktické části připravte hydrogely HA s EDC a proveďte jejich základní charakterizaci z hlediska struktury a mechanického chování.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. Kogan G. Šoltés, L., Stern R., Mendichi R. Hyaluronic acid: a biopolymer With versatile physico-chemical and biological properties. Chapter 31-Handbook 2007, ISBN:978-1-60021-652-0.
2. Cowman M. K., Matsuoka S.. Experimental approaches to hyaluronan structure. Carbohydrate Research. 2005, 340, ps: 791-809.
3. Collins, M. N., & Birkinshaw, C. (2013). Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering A review. Carbohydrate Polymers, 92, 12621279.
4. Collins, M. N., & Birkinshaw, C. (2008). Physical properties of crosslinked hyaluronic acid hydrogels. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 19, 33353343.
5. Gřundělová, L., Gregorová, A., Mráček, A., Vícha, R., Smolka, P., Minařík, A.: Viscoelastic and mechanical properties of hyaluronan films and hydrogels modified by carbodiimide. Carbohydrate Polymers, 119 142-148 (2015).

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Mgr. Aleš Mráček, Ph.D.

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

3. února 2017

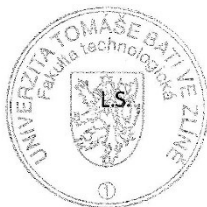
Termín odevzdání bakalářské práce:

19. května 2017

Ve Zlíně dne 10. února 2017



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



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

Příjmení a jméno: FIKOVÁ BARBORA

Obor: MZ

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské 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.

Ve Zlíně 9.5.2017

FZ

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

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

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

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

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

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

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

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

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

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

ABSTRAKT

Tato práce je zaměřena na přípravu hydrogelů z kyseliny hyaluronové pomocí síťovacích činidel EDC (1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)-propyl]-karbodiimid) a ADH (dihydrazid kyseliny adipové) s cílem porovnání vlivu použitého síťovacího činidla a molární hmotnosti kyseliny hyaluronové na vlastnosti hydrogelu. Hydrogely byly charakterizovány pomocí DMA (dynamiccko-mechanická analýza), SEM (rastrovací elektronová mikroskopie) a FTIR (infračervená spektroskopie a Furierovou transformací).

Hydrogely připravené pomocí ADH mají menší velikost jednotlivých vrstev nebo pórů a nižší souřazový modul, což souvisí s odlišnou chemickou strukturou mezimolekulárních vazeb. Bylo zjištěno, že mechanické vlastnosti hydrogelů významně závisí na molární hmotnosti použité kyseliny hyaluronové, tudíž hydrogely připravené z kyseliny hyaluronové s vyšší molární hmotností vykazují vyšší tuhost a mají odlišnou strukturu než hydrogely připravené z kyseliny hyaluronové s nižší molární hmotností.

Klíčová slova: kyselina hyaluronová, hydrogel

ABSTRACT

This work is focused on the preparation of hyaluronan based hydrogels crosslinked by EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) or ADH (Adipic acid dihydrazide). The aim of this work is to compare the influence of the crosslinking agent and the molar mass of hyaluronic acid on the hydrogel properties. Hydrogels were characterized by DMA (Dynamic mechanical analysis), SEM (Scanning electron microscopy) and FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy).

The hydrogels prepared by using ADH have a smaller size of individual layers or pores and a lower storage modulus, which is contributed to a different chemical structure of intermolecular bonds. It was found, that the mechanical properties of hydrogels are significantly dependent on molar mass of used hyaluronic acid, thus the hydrogels prepared from higher molar mass of hyaluronic acid exhibit improved stiffness and different structure than hydrogel from hyaluronic acid with lower molar mass.

Keywords: hyaluronic acid, hydrogel

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce doc. Mgr. Aleši Mráčkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a čas, který mi věnoval během této práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Lence Musilové, Ph.D., která mi pomáhala při praktické části bakalářské práce.

*„V životě můžete dosáhnout čehokoliv, máte-li odvahu o tom snít, inteligenci vytvořit
realistický plán a vůli dotáhnout tento plán do konce.“*

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 KYSELINA HYALURONOVÁ	12
1.1 STRUKTURA	12
1.2 MOLÁRNÍ HMOTNOST	13
1.3 PŘÍPRAVA.....	13
1.4 DEGRADACE.....	13
1.5 CHOVÁNÍ V ROZTOCÍCH.....	14
1.6 VYUŽITÍ	15
2 HYDROGELY	16
2.1 GELY.....	16
2.1.1 Hydrogely.....	16
2.2 VLASTNOSTI.....	17
2.3 METODY PŘÍPRAVY	17
2.4 SÍŤOVÁNÍ HYDROGELU	18
2.4.1 Modifikace skupiny –COOH	18
2.4.1.1 Amidace	19
2.4.1.2 Esterifikace	20
2.4.2 Modifikace skupiny –OH.....	21
2.4.2.1 Etherifikace.....	21
2.4.2.2 Esterifikace	22
2.4.2.3 Oxidace	23
2.4.3 Modifikace skupiny –NHCOCH ₃	23
2.4.3.1 Deacetylace s následnou amidací	24
2.5 VYUŽITÍ	24
3 METODY A PŘÍSTROJE NA MĚŘENÍ VLASTNOSTÍ	26
3.1 INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE	26
3.2 RASTROVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE	27
3.3 DYNAMICKO-MECHANICKÁ ANALÝZA.....	28
II PRAKTICKÁ ČÁST	29
4 PŘÍPRAVA VZORKŮ	30
4.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	30
4.2 PŘÍPRAVA HYDROGELŮ	30
4.3 VZORKY	30
4.4 VLIV SÍŤOVACÍHO ČINIDLA NA VLASTNOSTI	32
5 MECHANICKÉ CHOVÁNÍ – DMA	34
5.1 POUŽITÝ PŘÍSTROJ.....	34
5.2 REŽIM MĚŘENÍ.....	34
5.3 VÝSLEDKY	34
5.4 DISKUZE VÝSLEDKŮ Z DMA	37
6 VNITŘNÍ STRUKTURA - SEM	38

6.1	POUŽITÝ PŘÍSTROJ.....	38
6.2	REŽIM MĚŘENÍ.....	38
6.3	SNÍMKY ZE SEM	39
6.4	DISKUZE VÝSLEDKŮ ZE SEM	43
7	INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE	44
7.1	POUŽITÝ PŘÍSTROJ.....	44
7.2	REŽIM MĚŘENÍ.....	44
7.3	VÝSLEDKY	44
7.4	DISKUZE VÝSLEDKŮ Z FTIR.....	47
	ZÁVĚR	48
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	49
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	53
	SEZNAM OBRÁZKŮ	54
	SEZNAM TABULEK.....	55
	SEZNAM GRAFŮ	56

ÚVOD

Kyselina hyaluronová je polysacharid složený ze dvou střídajících se sacharidových jednotek, kyseliny glukuronové a N-acetylglukosiaminu. Nachází se v lidském těle, konkrétně v mezibuněčné hmotě, kůži či v očním sklivci. Vzhledem ke své sktruktuře je schopna vázat a udržovat velké množství vody, proto je často používána ve zdravotnictví a kosmetice, například jako přísada do hydratačních krémů.

Tato práce je zaměřena na přípravu hydrogelů na bázi kyseliny hyaluronové, které jsou tvořeny trojrozměrnou strukturou zesíťovaných řetězců. Tyto struktury mohou přijmout velké množství rozpouštědla, aniž by došlo k rozpadu sktruktury. Hydrogely se kvůli své struktuře využívají především ve zdravotnictví, například jako scaffoldy pro růst buněk, médium pro transport léků s řízeným uvolňováním či jako náplasti pro urychlení hojení ran. Lze je využít také v zemědělství pro rovnoměrné zvlhčování půdy v kořenovém systému.

Cílem této práce je porovnat vliv různých síťovacích činidel a vliv molární hmotnosti kyseliny hyaluronové na vlastnosti hydrogelu.

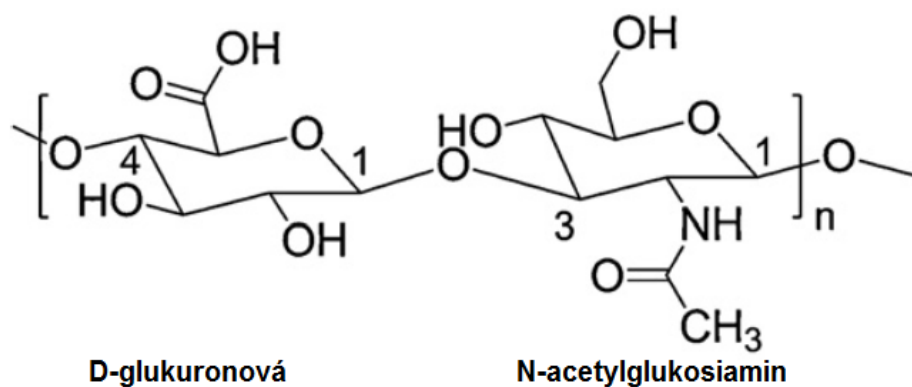
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KYSELINA HYALURONOVÁ

V roce 1934 izoloval Karel Meyer se svým asistentem Johnem Palmerem ze sklivce kravského oka neznámou polymerní látku, která byla tvořena z disacharidových jednotek. Jednou disacharidovou jednotkou byla kyselina uronová, látka pocházela ze sklivce (řeky „hyalos“ – čirá hmota, sklo), proto byla pojmenována jako kyselina hyaluronová (anglicky hyaluronic acid). [1] [2]

Kyselina hyaluronová se nachází jako extracelulární tekutina ve většině lidských tkání. Nejvíce se jí nachází v pokožce, plicích, střevech a synoviální tekutině (kloubní maz). [3] [4]

Kyselina hyaluronová se v organismu nachází především jako sodná sůl, proto se označuje také jako hyaluronan či hyaluronát sodný. [1]



Obrázek 1: Struktura kyseliny hyaluronové [5]

1.1 Struktura

Kyselina hyaluronová je polysacharid složený ze dvou střídajících se sacharidových jednotek, kyseliny glukuronové a N-acetylglukosiaminu. Sekundární struktura udává geometrické uspořádání sousedních jednotek řetězce. Na obrázku 1 lze vidět β -D-anomerní strukturu, která je znázorněna β -1,4 a β -1,3 glykosidickými vazbami. Prostorové uspořádání sacharidových jednotek má velký vliv na tuhost polysacharidového řetězce, především přítomnost objemné N-acetylové skupiny blízko glykosidické vazby. Terciární struktura určuje prostorové uspořádání řetězce. Díky pravidelnému střídání sacharidových jednotek v primární struktuře a β -glykosidickým vazbám v sekundární struktuře dochází k vytvoření šroubovice. V kvartérní struktuře se jedná o shlukování řetězců nekovalentní interakcí. U kyseliny hyaluronové byla pozorována struktura neparalelní dvoušroubovice, při malých koncentracích šestiúhelníková struktura. [1] [3]

1.2 Molární hmotnost

V jedné molekule kyseliny hyaluronové může být více než 10000 opakujících se disacharidových jednotek. Molární hmotnost disacharidové jednotky je přibližně 400 Da, proto molární hmotnost takové molekuly může být až 4 MDa. Průměrná délka jedné disacharidové jednotky je přibližně 1 nm. Běžná molární hmotnost řetězce v živých organismech je 2–5 MDa. Molární hmotnost synteticky připravených řetězců se pohybuje v rozmezí 0,1–10 MDa. [1] [6] [7]

Roztoky kyseliny hyaluronové zpravidla nejsou monodisperzní. Podle použité metody je lze popsat průměrnou molární hmotností a distribucí molární hmotnosti. Hmotnostní průměr molární hmotnosti lze získat pomocí metody rozptylu světla. Naproti tomu metodou jako je osmometrie nebo analýza koncových skupin lze získat číselný průměr molární hmotnosti. Poměr hmotnostního a číselného průměru se nazývá stupeň polydisperzity. Molární hmotnost lze také určit pomocí viskozimetrie, elektroforézy nebo gelové chromatografie. [8] [9]

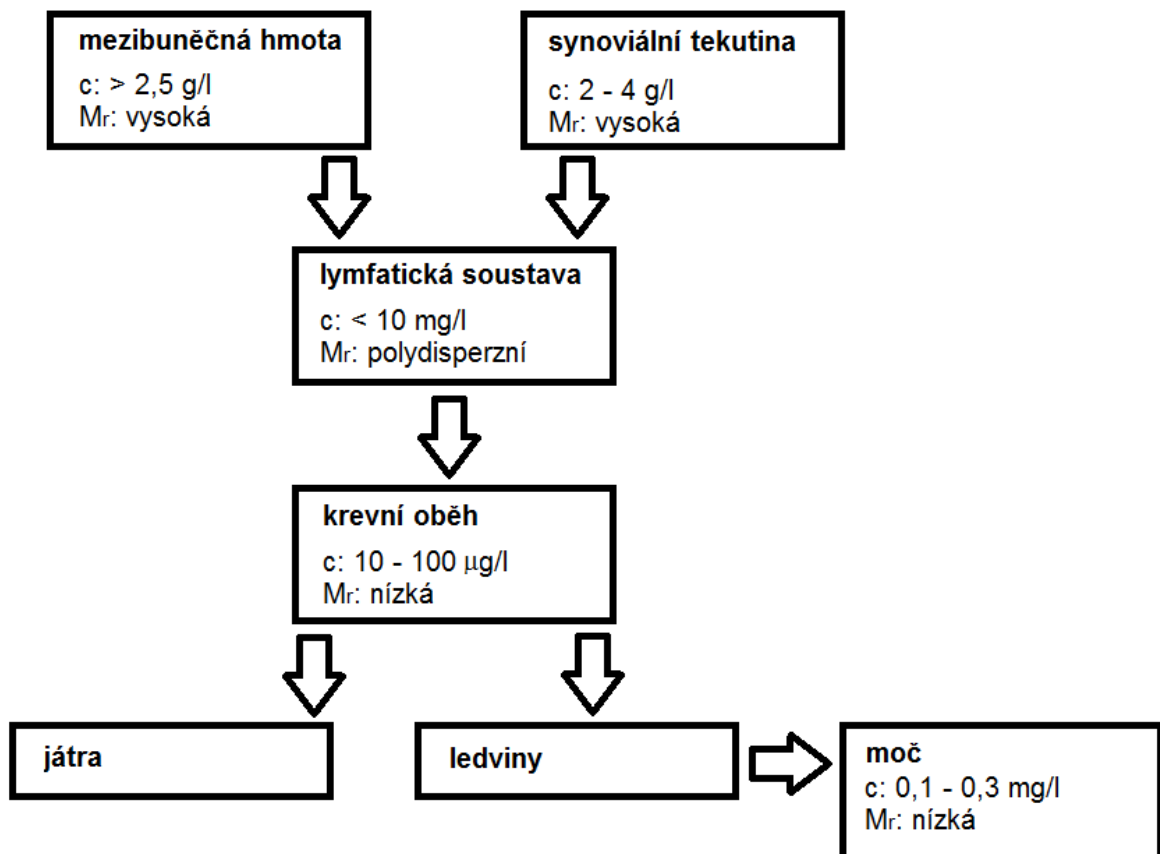
1.3 Příprava

V minulosti se kyselina hyaluronová získávala izolací z hovězích očí, později z kohoutích hřebenů a lidských pupečních šňůr. Díky pokročilým technologiím došlo k rozvoji genetických modifikací bakterií, které nyní produkují vyšší podíl kyseliny hyaluronové. Dále byl proveden výzkum na přípravu oligosacharidů kyseliny hyaluronové s definovanou molární hmotností.

Syntéza kyseliny hyaluronové v buňkách se proces, který je řízen třemi typy membránových enzymů nazývaných hyaluronan syntázy. Tyto enzymy syntetizují dlouhé lineární polymery, ve kterých se pravidelně střídá kyselina glukuronová s acetylglukosaminem. [1] [5] [7] [10]

1.4 Degradace

Poločas rozpadu kyseliny hyaluronové, vpravené do lidského těla injekcí, není více než 24 hodin [11]. Kyselina hyaluronová je v organismu přirozeně degradována složitým enzymatickým mechanismem. V mezibuněčné hmotě kyselina hyaluronová s vysokou molární hmotností přispívá k tvorbě pevné sítě, proto musí být částečně degradována, aby mohla být z této sítě uvolněna. V první části tohoto procesu je kyselina hyaluronová štěpena na středně dlouhé řetězce pomocí receptorů nebo endocytózou. Dále v lysozomech hydrolyzuje na oligosacharidy a následně je degradována na monosacharidy. [3] [5] [12]



Obrázek 2: Schéma rozpadu kyseliny hyaluronové v lidském těle [11]

1.5 Chování v roztocích

Vodný roztok kyseliny hyaluronové se chová jako neneutonská kapalina, viskozita roztoku je závislá na smykovém napětí, vykazuje pseudoplastické chování. V roztoku dochází k interakci mezi řetězci kyseliny hyaluronové za vzniku vodíkových můstků. Kyselina hyaluronová je polyelektrolyt, její vlastnosti jsou značně ovlivněny iontovými silami. V neposlední řadě klíčovou roli v chování hraje molární hmotnost a její polydisperzita. [1] [3] [13]

Jednou z charakteristik polymerů je vnitřní viskozita. Jedná se o poměr specifické viskozity a koncentrace roztoku extrapolovaný na nulovou koncentraci. V rozmezích teplot 25–60 °C klesá vnitřní viskozita se zvyšující se teplotou. [9]

Pro následné síťování kyseliny hyaluronové je nutné, aby byly řetězce plně rozpuštěny v roztoku. Měřením viskozity v závislosti na čase lze vidět průběh rozpouštění. Vztah mezi limitním viskozitním číslem $[\eta]$ a molární hmotností polymeru M popisuje Mark-Houwinkova rovnice:

$$[\eta] = KM^\alpha \quad (1)$$

kde K a α jsou parametry rovnice. Parametry Mark-Houwinkovy rovnice K a α , gyrační poloměr a hydratace byly měřeny v závislosti na době rozpouštění. Viskozita je úměrná vzdálenosti konců řetězců, se zvyšujícím se parametrem α dochází k rozplétání řetězce. Měřením bylo dokázáno, že proces solvatace molekul probíhá 24 hodin. [14]

1.6 Využití

Kyselina hyaluronová se využívá především v medicíně a farmaceutickém průmyslu. Poprvé byla kyselina hyaluronová využita v medicíně jako ochrana tkání v oční chirurgii a v současné době se zkoumá možnost léčby šedého zákalu aplikacemi na bázi kyseliny hyaluronové. [3] [15]

Dále se kyselina hyaluronová používá k obnovení synoviální tekutiny v kloubech. Byl proveden výzkum na pacientech trpících osteoartrózou kolene, kdy polovině pacientů byly podávány injekce s kyselinou hyaluronovou a druhé polovině injekce s placebem – fyziologickým roztokem. Byla hodnocena úleva od bolesti po podání těchto injekcí. Výsledky ukázaly, že podání injekce s kyselinou hyaluronovou má srovnatelné výsledky jako placebo, vykazuje pouze okrajovou účinnost. Kyselina hyaluronová není zabudována do tkáně a postupně dochází k jejímu odplavení. [3] [16]

Neméně důležitá je možnost síťování kyseliny hyaluronové a následné využití těchto produktů při hojení ran či ve tkáňovém inženýrství, jak je podrobněji popsáno v kapitole 2.5.

2 HYDROGELY

2.1 Gely

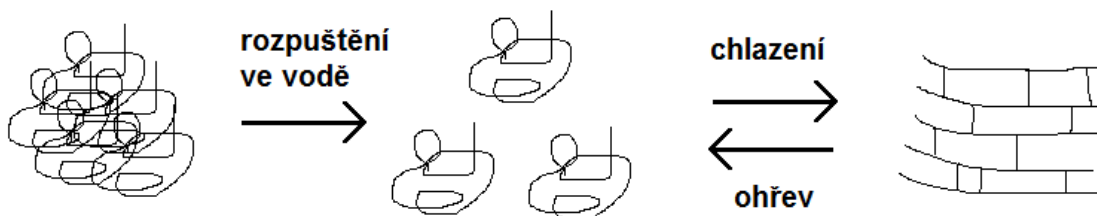
Jako gely jsou označovány disperzní soustavy, ve kterých skrz disperzní prostředí prostupuje trojrozměrná síť dispergovaných částic. Disperzní prostředí i dispergované částice tvoří spojitou fázi. Pojem lyogel označuje systém, který obsahuje dispergované částice v kapalném disperzním prostředí. Jestliže je disperzním prostředím voda, jedná se o hydrogel, když je disperzním prostředím organická látka, jedná se o organogel. Odstraněním disperzního prostředí vzniká xerogel.

Podle schopnosti opakovaného vysoušení a následného nabotnutí je možné dělit gely na reverzibilní a nereverzibilní. Reverzibilní gely lze opakovaně vysušet a následně nabotnat, ireverzibilní gely po vysušení již nebotnají.

Gely mají mnoho vlastností odpovídající jejich kapalnému disperznímu prostředí, například hustotu a transportní vlastnosti, nicméně mechanické vlastnosti mají charakteristické pro pevné látky. Rychlost tvorby gelu a jeho vlastnosti zásadně ovlivňuje teplota. [19] [20]

2.1.1 Hydrogely

Jako hydrogel je označována síť polymeru ve vodném disperzním prostředí. Část vody je volná, část vázaná na řetězec polymeru. Volnou vodu lze odpařit, v přítomnosti vody opět nabotná. Takovéto látky mohou tvořit prostorové struktury, které mohou sloužit jako konstrukce („scaffold“) pro růst buněčné tkáně. Této vlastnosti lze využít například ve tkáňovém inženýrství. [17] [18]



Obrázek 3: Schéma vzniku pórovité struktury hydrogelu

Hydrogely mohou vznikat přechodem sol-gel, jedná se o transformaci koloidního roztoku na gel. Jde o inverzní přeměnu, avšak děje probíhají za různých teplot. Vlastnosti gelu jsou určeny rychlostí chlazení a stupněm pH, nižší pH snižuje teplotu tání gelu. [18]

2.2 Vlastnosti

Mechanické a fyzikální vlastnosti gelu jsou závislé na interakci polymeru s vodou. Přestože většinu objemu materiálu tvoří vodné prostředí, díky struktuře mají hydrogely vlastnosti typické pro pevné látky. Při tahové zkoušce vykazují do určité hodnoty napětí elastické chování. Hodnota tohoto napětí je dána typem vazeb a jejich pevností. Čím vyšší je koncentrace vazeb, tím je nižší elasticita materiálu. [21]

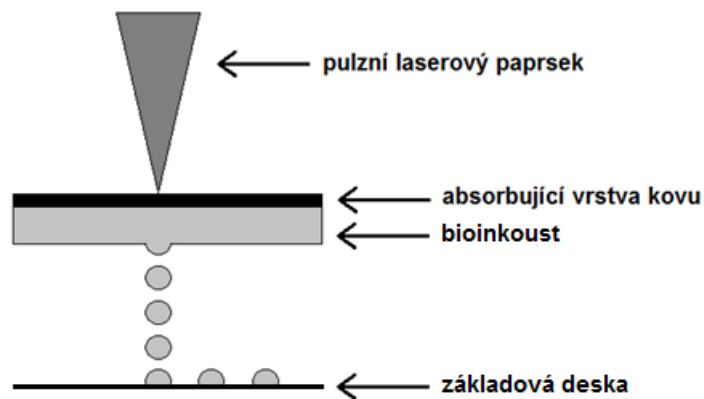
Se vzrůstajícím množstvím absorbované vody klesá propustnost gelu pro kyslík. Vysoký stupeň nabotnění podporuje difuzi živin a odvod odpadních látek. Zesíťovaná struktura hydrogelů je tvořena chemickými vazbami nebo fyzikálními interakcemi. [18] [22]

2.3 Metody přípravy

Hydrogely jsou ceněny zvláště kvůli své porozitě. Bylo vyvinuto mnoho různých postupů pro přípravu hydrogelů s požadovanými vlastnostmi, jedná se zejména o velikost pórů a procentuální porozitu.

Hlavním směrem výzkumu v tomto odvětví je vývoj 3D porézních matic metodami rapid prototyping a bioprinting. Metoda 3D tisku využívá jako inkoust práškové pojivo na bázi kyseliny hyaluronové vhodné pro nanesení v jednotlivých vrstvách. Pojivo je v požadovaných místech nanášeno na základní desku a následně při nanesení další vrstvy dojde k zesílení. Rychlost posunu, pokles a rychlost proudění pojiva lze řídit, proto lze vytvořit součástky o požadovaném tvaru a porozitě. Nevýhodou je složitý a zdlouhavý proces. [14] [23]

Jedním z příkladů 3D biotisku je laserem asistovaný bioprinting (LIFT). LIFT (viz obrázek 4) je složen z pulzního laserového paprsku a donorového substrátu, který je tvořen tenkou absorbující vrstvou kovu a vrstvou bioinkoustu. Laserem je způsobeno lokální odpaření absorbující vrstvy, dochází k vytvoření bubliny v bioinkoustu, pomocí které jsou dávkovány malé porce inkoustu směrem k základové desce. Výhodou této metody je, že nepoužívá trysku ani jehlu, nemůže dojít k jejímu ucpání či vytvoření smykového napětí v materiálu. Rozlišení metody je ovlivněno použitým laserem, tloušťkou vrstvy vzduchu mezi substrátem a základní deskou, tloušťkou a viskozitou bioinkoustu. [24] [25] [26]



Obrázek 4: Schéma laserem asistovaného bioprintingu [24]

Porózní materiál lze připravit zmrazením hydrogelu na teplotu v rozmezí -20 až -80 °C. Voda obsažená v hydrogelu vytvoří malé krystaly ledu, která způsobí výslednou porozitu. Tyto jádra lze odstranit sublimací ve vakuu za vzniku porézní houbové sítě. Změnou teploty chlazení lze ovlivnit velikost pórů. Výhodou této metody je snadné zpracování a vytvoření trojrozměrného scaffoldu. [14] [27]

Poměrně novou metodou přípravy pórovité struktury hydrogelu je elektrospining. Elektrostatickým zvlákňováním lze připravit trojrozměrné scaffoldy z vláken a nanovláken na bázi kyseliny hyaluronové. Nevýhodou této metody je omezená kontrola tvaru a porozitě vzorku a jeho špatné mechanické vlastnosti. [14] [28] [29]

2.4 Síťování hydrogelu

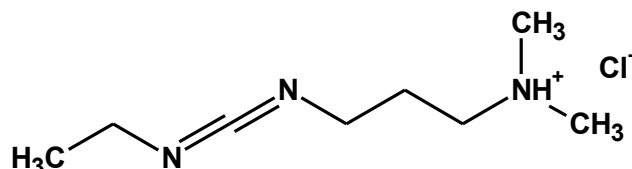
Špatné mechanické vlastnosti kyseliny hyaluronové a její rychlá degradace limitují širší aplikace a vyžadují zlepšení vlastností. Ke zlepšení mechanických vlastností lze využít modifikaci kyseliny hyaluronové či její zesíťování za vzniku hydrogelu. Síťování probíhá na funkčních skupinách, což v případě kyseliny hyaluronové jsou hydroxylové a karboxylové skupiny. Hydroxylové skupiny lze síťovat prostřednictvím etherové vazby, karboxylové pomocí esterové vazby. Kyselinu hyaluronovou lze také modifikovat, například částečným odstraněním aldehydových skupin ($-CHO$), což vede k vytvoření volných aminoskupin, které lze síťovat přes amidovou ($-C(O)-NH-$), iminovou ($-N=CH-$) nebo sekundární aminovou vazbu ($-NH-CH-$). [3] [14] [22]

2.4.1 Modifikace skupiny $-COOH$

Skupina $-COOH$ se nachází na pátém uhlíku kyseliny glukuronové. Síťovat ji lze vícero způsoby, například amidací, kondenzací, esterifikací či oxidací.

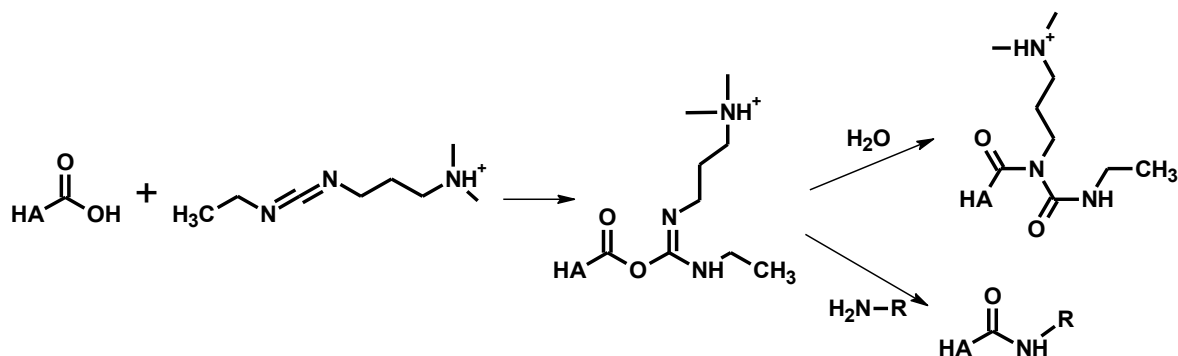
2.4.1.1 Amidace

Nejrozšířenější modifikací kyseliny hyaluronové je amidace ve vodném prostředí pomocí karbodiimidů. Jako karbodiimid se nejčastěji používá 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)-propyl]-karbodiimid (EDC) kvůli své rozpustnosti ve vodě.



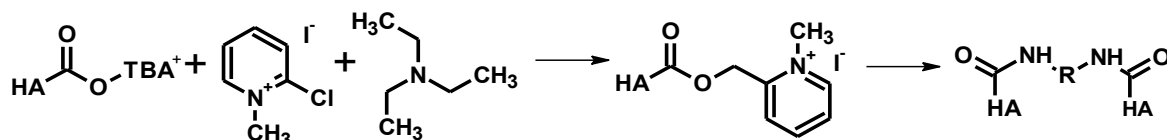
Obrázek 5: Struktura EDC

Poprvé byla tato reakce provedena v laboratoři Danishefskyho a Siskovice [30], kde byly kyselým pH 4,75 aktivovány karboxylové skupiny a následně navázáno EDC. Přítomnost amidových vazeb byla detekována infračervenou spektroskopií a chromatografií. Bylo vypočítáno, že k přeměně došlo z 38,6 %. Reakční mechanismus byl studován v laboratoři Nakajimy a Ikady [31], v prvním kroku reaguje EDC s kyselinou hyaluronovou za vzniku meziprojektu O-acyl-isomočoviny. Ve druhém kroku reakce dochází k navázání aminu skrz amidovou vazbu. Nicméně O-acyl-isomočovina je velmi reaktivní, v přítomnosti vody přeskupí svou strukturu na N-acyl-močovinu, která s aminem již nereaguje. [5]



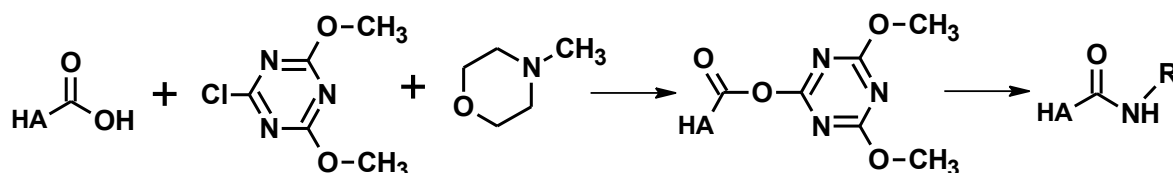
Obrázek 6: Mechanismus amidace pomocí EDC

Další možností je amidace pomocí 2-chloro-1-methylpyridinijodidu (CMPI). Tato reakce probíhá v bezvodém organickém rozpouštědle dimethylformamidu (DMF), aby nedocházelo k hydrolyze CMPI. Kyselina hyaluronová musí být nejprve převedena na tetrabutylamoniovou sůl, aby ji bylo možné rozpustit v organickém rozpouštědle. V prvním kroku reaguje CMPI s karboxylovou skupinou kyseliny hyaluronové. Pro vytvoření vazeb mezi jednotlivými řetězci kyseliny hyaluronové je používán 1,3-diaminopropan. Analýzy NMR ukázaly, že je tato metoda síťování vysoce účinná, stupeň konverze se blíží 100 %. [5] [32]



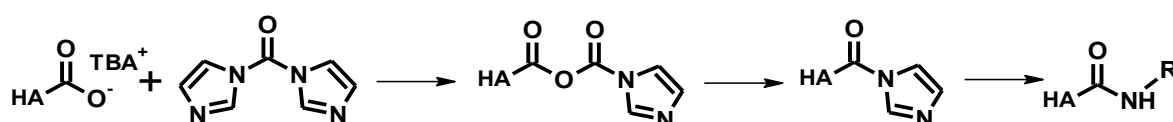
Obrázek 7: Mechanismus amidace pomocí CMPI

Další způsob amidace pomocí 2-chloro-dimethoxy-1,3,5-triazinu (CDMT) popsal Bergman se svými spolupracovníky [33]. Reakce probíhá ve směsi vody a acetonitrilu v poměru 3:2. Napřed CDMT reaguje s karboxylovou skupinou na kyselině hyaluronové za vzniku meziproductu. Pro neutralizaci chloridových iontů se ke směsi přidává N-methylmorpholin. Reakcí meziproductu s aminem vzniká amidová vazba. Stupeň konverze je přibližně 25 % při poměru kyseliny hyaluronové a CDMT 2:1. [5]



Obrázek 8: Mechanismus amidace pomocí CDMT

Amidace karbonyldiimidazolem, konkrétně 1,1'-karbonyldiimidazolem, byla patentována společností Fidia [34]. Reakce tetrabutylamoniové soli kyseliny hyaluronové probíhá v prostředí organického rozpouštědla dimethylsulfoxidu přes dva meziproducty. Tento proces je oproti ostatním amidačním reakcím poměrně dlouhý, nicméně vedlejší produkty reakce jsou CO₂ a imidazol, což jsou netoxické produkty. [5]

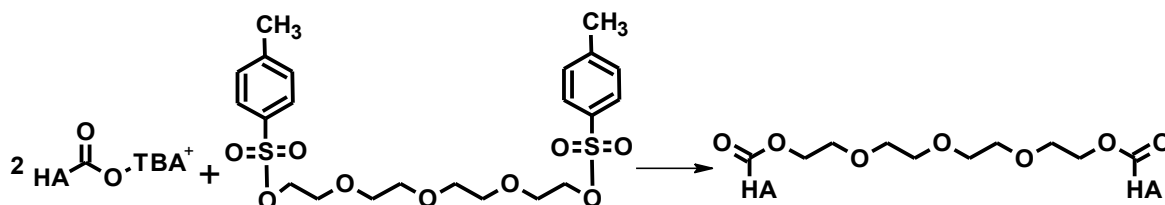


Obrázek 9: Mechanismus amidace pomocí 1,1'-karbonyldiimidazolu

2.4.1.2 Esterifikace

Esterifikované hydrogely jsou připravovány reakcí -COOH skupiny s alkoholem za vzniku esteru. Jednou z možností přípravy esterů je použití alkylhalogenů. Patent na tuto metodou získali vědci Della Valle a Romeo [35]. Vědci Pelletier a kol. [36] syntetizovali amfifilní estery kyseliny hyaluronové použitím alkylbromidu, reakci prováděli v dimethylsulfoxidu, sodná sůl kyseliny hyaluronové byla napřed převedena na její tetrabutylamoniovou sůl. [5]

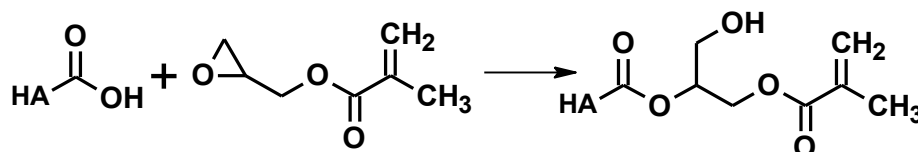
Další možností, jak připravit esterifikované hydrogely, je použití látky s tosylátovou skupinou. Reakce probíhá v dimethylsulfoxidu z tetrabutylamoniové soli kyseliny hyaluronové a tetraethylglykolu se dvěma skupinami tosylátu. [5]



Obrázek 10: Mechanismus esterifikace tosylátovými skupinami

Esterové hydrogely lze také připravit pomocí diazomethanu. Reakce, kterou poprvé uvedli Jeanloz a Forchielli [37], probíhá také v dimethylsulfoxidu z tetrabutylamoniové soli kyseliny hyaluronové za vzniku methylesteru. [5]

Poslední možností esterifikace je použití epoxidů. Byla popsána příprava methylakrylátu kyseliny hyaluronové pomocí glycidylmethakrylátu ve vodě s přebytkem triethylaminu jako katalyzátoru. [5]



Obrázek 11: Mechanismus esterifikace epoxidy

Estery kyseliny hyaluronové mohou být vytlačovány pro výrobu membrán či elektrostaticky zvláknovány pro výrobu vláken. Hydrogely připravené esterifikací mají lepší mechanickou pevnost v suché stavu než v hydratovaném. [14] [38]

2.4.2 Modifikace skupiny –OH

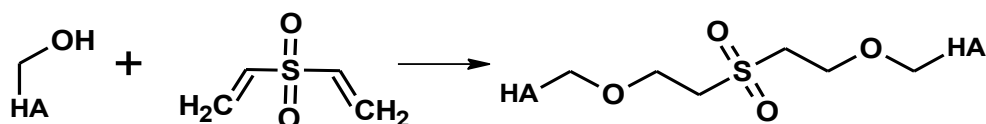
Skupiny –OH se nachází na obou sacharidech. Síťování těchto skupin lze provést etherifikací, poloacetalovou vazbou, esterifikací či karbamátovou vazbou.

2.4.2.1 Etherifikace

Etery mohou vznikat reakcí s epoxidy. Laurent, Hellsing a Gelotte [39] použili jako síťovací činidlo 1,2,3,4-diepoxybutan, reakce byla prováděna v silně alkalickém prostředí při pH 13–14 a teplotě 50 °C po dobu 2 hodin. Další možností je použít jako síťovadlo butandiol-diglycidylether v 0,25M roztoku hydroxidu sodného [40]. Při reakci dochází k otevření epoxidového kruhu za vzniku esterové vazby s hydroxylovými skupinami.

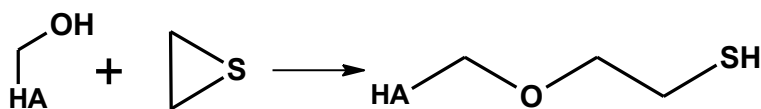
Jestliže reakce probíhá v zásaditém prostředí s pH vyšším než hodnota pK_a hydroxylových skupin (přibližně 10), dochází k deprotonování většiny $-OH$ skupin a výsledkem reakce je etherová vazba. Nicméně probíhá-li reakce v prostředí s pH nižším než hodnota pK_a hydroxylových skupin, vytvoří se esterová vazba. V současné době je butandiol-diglycidylether jedno z nejrozšířenějších síťovacích činidel pro výrobu etherů kyseliny hyaluronové. Disponuje snadnou a rychlou reakcí a jeho produkty při degradaci nevykazují žádnou cytotoxicitu. [5] [41]

Další možností vzniku etherů je reakce s divinylsulfonem. Tento postup byl patentován Balaszem a Leshchinerem [42]. Při vysokých hodnotách pH lze vytvořit sulfonyl-bis-ethylové vazby mezi hydroxylovými skupinami. Výhodou oproti jiným způsobům je možnost reakce při pokojové teplotě, v porovnání s vyššími teplotami nedochází k tak rozsáhlé degradaci kyseliny hyaluronové v zásaditém prostředí. Bylo dokázáno, že reakce začíná krátce po přidání síťovadla a trvá přibližně hodinu. Přítomnost soli jako je chlorid sodný zvyšuje stupeň zesítnění. Hydrogely připraveny síťováním divinylsulfonem jsou náchylnější k degradaci ve srovnání s hydrogely připravenými síťováním karboxylové skupiny. Přestože výchozí materiál divinylsulfonyl je toxický, u hydrogelů byla potvrzena biokompatibilita. [5] [43]



Obrázek 12: Mechanismus etherifikace divinylsulfonem

Etherovou vazbu lze připravit také použitím ethylensulfidu, sulfidickou variantou ethylenoxidu. Ethylensulfidový kruh je otevřen hydroxylovou skupinou kyseliny hyaluronové za přítomnosti dithiothreitolu v alkalickém prostředí. [5] [44]

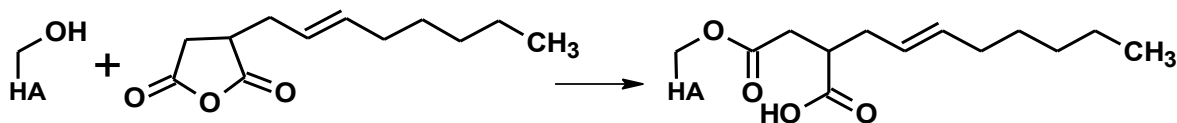


Obrázek 13: Mechanismus etherifikace ethylensulfidem

2.4.2.2 Esterifikace

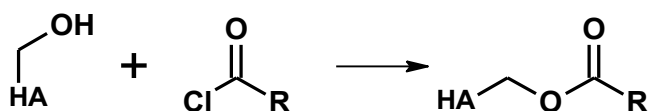
Hydroxylové skupiny lze modifikovat alkylnhydridem kyseliny jantarové za vzniku esterové vazby. Tato reakce byla patentována Toemmeraasem a Eenschootenem [45],

v alkalickém prostředí byla kyselina hyaluronová modifikována oktenylanhydridem kyseliny jantarové za vzniku esterové vazby. [5]



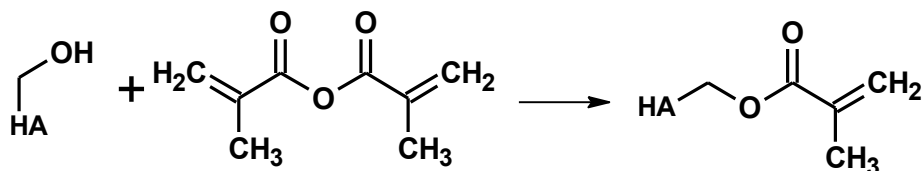
Obrázek 14: Mechanismus esterifikace pomocí oktenylanhydridu kyseliny jantarové

Poměrně novou metodu přípravy esterů kyseliny hyaluronové popsal Pravata se svým kolektivem [46], kdy je kyselina hyaluronová roubována aktivovaným acylchloridovým karboxylátem. Sloučeniny s karboxylovou skupinou jsou aktivovány chloroacylátem s thionylchloridem v organickém rozpouštědle dimethylsulfoxidu. [5]



Obrázek 15: Mechanismus esterifikace aktivovaným acylchloridovým karboxylátem

Esterifikací kyseliny hyaluronové anhydridem kyseliny methakrylové lze získat methakrylovanou kyselinu hyaluronovou. Reakce se provádí při nízkých teplotách v zásaditém prostředí po dobu 12 hodin. Díky přítomnosti methakrylátových skupin lze tyto deriváty síťovat UV zářením o vlnové délce 365 nm. [5] [47] [48]



Obrázek 16: Mechanismus esterifikace anhydridem kyseliny methakrylové

2.4.2.3 Oxidace

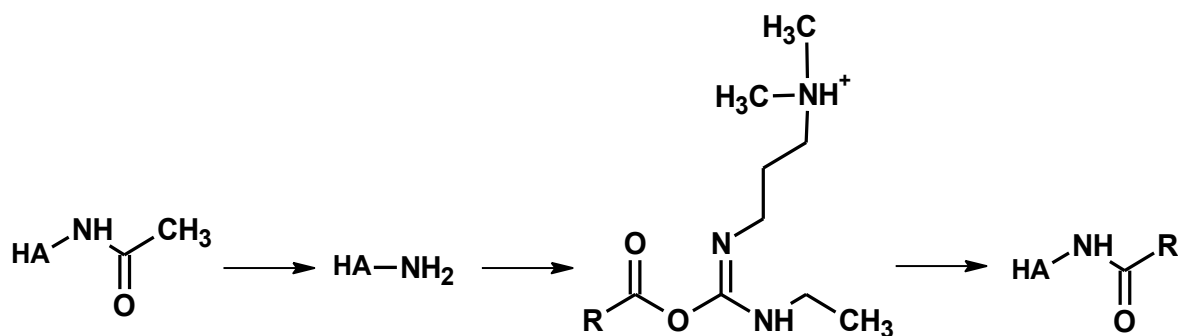
Hydroxylové skupiny lze oxidovat na skupiny aldehydové. Sacharidový kruh kyseliny glukuronové lze reakcí s jodistanem sodným otevřít a následně oxidovat na dialdehyd. Bylo zjištěno, že reakce vede k významnému poklesu molární hmotnosti. [5] [49] [50]

2.4.3 Modifikace skupiny –NHCOCH₃

Skupina –NHCOCH₃ se nachází na druhém uhlíku acetylglukosaminu. Tuto skupinu lze modifikovat deacetylací a následnou amidací.

2.4.3.1 Deacetylace s následnou amidací

Deacetylací N-acetylové skupiny lze obnovit aminovou skupinu, která může reagovat za vzniku amidové vazby. Deacetylace prováděna mícháním s hydrazinsulfátem po dobu 5 dnů při teplotě 55 °C způsobuje fragmentaci řetězce. Mírnější způsob deacetylace je β -eliminace glukuronové části. [5] [51] [52]



Obrázek 17: Mechanismus deacetylace s následnou amidací

2.5 Využití

Hydrogely na bázi kyseliny hyaluronové jsou obzvláště atraktivní pro biomedicínské aplikace. Produkty na bázi kyseliny hyaluronové získávají stále větší uplatnění i v kosmetickém průmyslu. Kyselina hyaluronová zesíťovaná butandiol-diglycidyletherem nebo divinyl sulfonem je využívána v produktech na dočasné odstranění obličejových vrásek.

Hydrogely na bázi kyseliny hyaluronové se také využívají při hojení ran. Matrice tvořená zesíťovanými řetězci kyseliny hyaluronové přispívá k ulpívání buněk a růstu obnovené tkáně. [3]

Deriváty kyseliny hyaluronové je možné využít při obnově spoje mezi chrupavkou a kostí. Na toto téma byla provedena studie, v níž byl porovnáván vliv hydrogelu na obnovu chrupavkového spoje na kost králíka. Hydrogel na bázi kyseliny hyaluronové vykazuje mnohonásobně lepší výsledky než hydrogel na bázi polyethylenglykolu. [38] [53]

Modifikované hydrogely kyseliny hyaluronové hrají významnou roli při obnově kostí. Hydrogely na bázi kyseliny hyaluronové lze využít jako scaffoldy pro regeneraci kosti, výhodou je schopnost hydrogelu řízeně uvolňovat růstové hormony. Hydrogel lze také použít jako nosič částic fosforečnanu vápenatého. Podle studie byl zaznamenán značný

nárůst kostní hmoty po jednom týdnu, nicméně po čtyřech týdnech již nebyl rozdíl ve srovnání s kostí bez hydrogelu. [38]

Další aplikací hydrogelů na bázi kyseliny hyaluronové jsou povrchové úpravy implantátů. Materiály implantátů jako je keramika či titan mají dobré mechanické vlastnosti, nicméně je možno zlepšit jejich začlenění do kostní tkáně. Úpravy povrchu vrstvou hydrogelu zlepšuje interakci s kostními buňkami, jak bylo již výše napsáno, hydrogely slouží také jako scaffold pro růst buněk. [38]

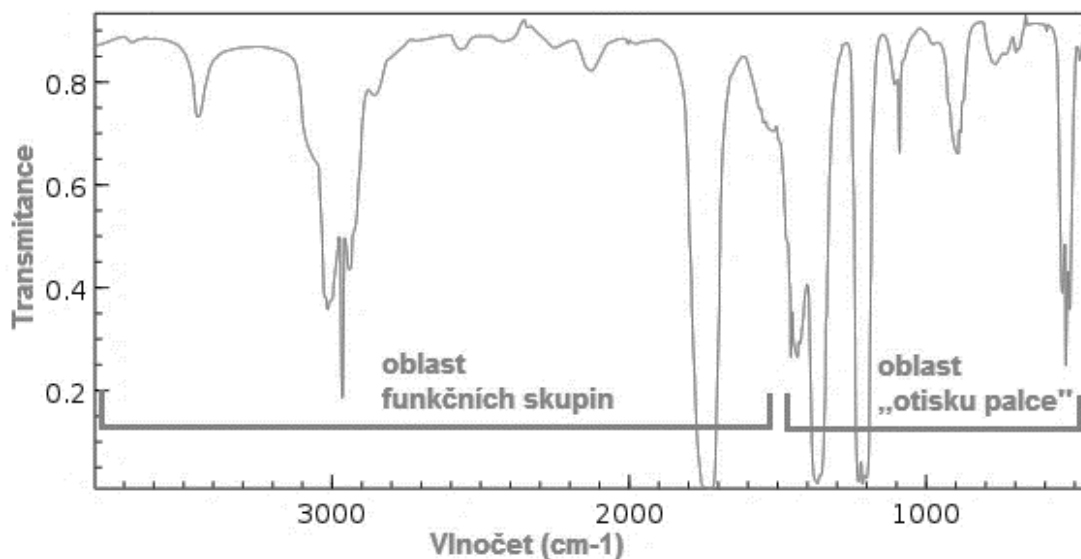
Hydrogely jsou díky svým vlastnostem, jako je měkkost, poréznost a elasticita, vhodnými materiály pro opravy v nervové soustavě, zejména pro regeneraci mozku a míchy. Zesíťovaná struktura hydrogelu byla zkoumána jako možný prostředek pro obnovu nervů po mrtvici. Výsledky studie ukázaly, že přežití buněk se výrazně zlepšilo, lokální záněty byly minimalizovány v porovnání s buňkami bez scaffoldu hydrogelu. [17]

3 METODY A PŘÍSTROJE NA MĚŘENÍ VLASTNOSTÍ

Hydrogely lze charakterizovat z hlediska chemického složení, morfologie či jejich fyzikálních vlastností. Chemické složení lze měřit nukleární magnetickou rezonancí (NMR) a infračervenou spektroskopií (FTIR). Pomocí NMR lze určit množství navázaných skupin. Morfologii hydrogelů lze charakterizovat pomocí mikroskopických metod. Pro rastrovací elektronovou mikroskopii (SEM) a transmisní elektronovou mikroskopii (TEM) je nutné hydrogel lyofilizovat. Pro mikroskopii atomárních sil (AFM) je možné použít vodný stav hydrogelu. Fyzikální vlastnosti jako je zesíťování hydrogelu lze měřit pomocí nasákavosti (swelling test) a komprese hydrogelu. Charakteristika termodynamického chování hydrogelů lze měřit diferenční skenovací kalorimetrií (DSC). Pomocí dynamicko-mechanické analýzy (DMA) je možné porovnat vliv síťovadla na mechanické vlastnosti hydrogelu. Molární hmotnost lze určit pomocí měření velikosti částic metodou rozptylu světla nebo měřením viskozity. [5]

3.1 Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie je nedestruktivní analytická technika, pomocí které lze určit složení organických sloučenin. Podstatou této techniky je interakce infračerveného záření se vzorkem. Jednotlivé molekuly vzorku vibrují na určitých frekvencích. Při interakci záření s vazbami dochází k jeho absorpci ve vzorku, což má za následek změnu vibrace molekuly v závislosti na změně dipólového momentu molekuly. Každá vazba má své charakteristické frekvence vibrací, lze tedy podle frekvence absorbovaného záření určit, jaké funkční skupiny jsou ve vzorku obsaženy. K charakteristice organických látek se nejčastěji se používá střední infračervené záření v rozsahu vlnočtů $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$. Výsledkem měření je závislost transmitance nebo absorbance záření na vlnočtu, tato závislost je nazývána infračervené spektrum. Transmitance je definována jako poměr intenzity záření prošlého vzorkem k intenzitě vycházející ze zdroje. Absorbance je definována jako dekadický logaritmus převrácené hodnoty transmitance. Infračervené spektrum lze rozdělit do dvou oblastí. V rozmezí vlnočtů $4000\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ se nacházejí absorpční pásy, pomocí kterých lze identifikovat funkční skupiny. Druhá oblast v rozmezí vlnočtů $1500\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ se nazývá oblast „otisku palce“.



Obrázek 18: Infračervené spektrum acetonu [58]

Touto metodou lze měřit kapalné a pevné vzorky. Kapalné vzorky lze měřit v kyvetě o dané tloušťce, nebo pomocí totálního odrazu na krystalu (ATR metoda). Nejčastější možností je měření tablet, které jsou připraveny homogenizací vzorku s KBr. Tenké průhledné vzorky lze měřit spekulární reflexí, kdy dochází k odrazu záření od lesklého povrchu, na kterém je vzorek nanesen. Práškové nebo silně absorbující vzorky lze měřit metodou difúzní reflektance. [54] [55]

Infračervenou spektroskopií lze u modifikované kyseliny hyaluronové pozorovat pokles intenzity charakteristických absorpčních pásů oproti čisté kyselině hyaluronové, nebo naopak přítomnost absorpčních pásů nově vytvořených vazeb. Touto metodou lze také kvantifikovat stupeň konverze. [5]

3.2 Rastrovací elektronová mikroskopie

Rastrovací elektronovou mikroskopií lze charakterizovat strukturu povrchu vzorku. Malá plocha o rozměrech v řádu stovek nanometrů až stovek mikrometrů je ozařována svazkem urychlených elektronů. Základní dva módy SEM jsou režim zpětně odražených paprsků a režim sekundárních elektronů, při kterém urychlené elektrony interagují s materiálem a vyvolávají emisi sekundárních elektronů, ze kterých je následně vytvořen trojrozměrný obraz. Elektrony jsou generovány v elektronovém dělu a následně urychleny na energii v rozsahu 0,1–50 keV. Tento proud elektronů je zaostřen a směřován pomocí elektrostatických a elektromagnetických čoček na vzorek, kde snímá plochu o průměru menší než 10 nm. Tato velikost definuje nejmenší rozměr, který lze získat z měření SEM.

Nezbytnou podmínkou pro měření je přítomnost vysokého vakua až 10^{-4} – 10^{-6} Pa, aby se zabránilo interakcí elektronů s plyny v tubusu mikroskopu. [56]

Hydrogely s vysokým obsahem vodné fáze nelze měřit pomocí SEM bez úpravy, vzorky musí být napřed vysušeny mrazem a následně pokoveny kvůli zajištění vodivosti. Nicméně existuje environmentální elektronový mikroskop, u kterého není nutné vzorek pokovit. SEM bývá používána pro charakterizaci struktury povrchové vrstvy či vrstvy řezu vzorku. Lze také určit tvar či velikost pórů. [5]

3.3 Dynamicko-mechanická analýza

Dynamicko-mechanickou analýzou lze charakterizovat mechanické chování materiálu v oblasti elastické deformace. Na vzorek je přivedeno malé oscilační napětí a jsou sledovány změny ve viskoelastickém chování. Díky tomu, že je napětí oscilační, lze odezvu prezentovanou komplexním modulem E^* rozdělit na dvě části, reálnou složku E' a imaginární složku E'' . Tyto dvě složky představují dva nezávislé děje uvnitř materiálu. Reálná část představená soufázovým modulem E' je dána vratnou elastickou složkou. Imaginární část je dána ztrátovým modulem E'' a představuje útlumovou viskozitní složku, která závisí na disipované energii použité k relaxaci řetězce.

$$E^* = E' + iE'' \quad (2)$$

Pro charakterizaci schopnosti tlumení materiálu je zaveden ztrátový činitel $\tan\delta$, což je podíl ztrátového a soufázového modulu.

$$\tan \delta = \frac{E''}{E'} \quad (3)$$

Materiál lze měřit v závislosti na teplotě nebo frekvenci. Měřením DMA lze stanovit teplotu skelného přechodu, teplotu měknutí a tání, stupeň krystalizace či teplotu síťování. [57]

DMA analýza je používána k porovnávání vlivu síťovacích činidel a obsahu vodné fáze na mechanické vlastnosti hydrogelů, jako jsou modul pružnosti, soufázový modul a ztrátový modul. [5]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 PŘÍPRAVA VZORKŮ

4.1 Použité chemikálie

Pro přípravu hydrogelů byla použita kyselina hyaluronová o molárních hmotnostech 73,8 kDa, 370 kDa, 500 kDa, 1180 kDa a 1690 kDa od firmy Contipro a.s.

Jako síťovací činidlo byly použity 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)-propyl]-karbodiimid (EDC) a dihydrazid kyseliny adipové (ADH) od firmy Sigma-Aldrich s.r.o.

4.2 Příprava hydrogelů

Hydrogely byly připraveny z kyseliny hyaluronové, síťovacího činidla a následně stabilizovány kyselinou chlorovodíkovou.

V prvním kroku přípravy bylo při teplotě 50 °C po dobu 24 hodin rozpouštěno za stálého míchání 0,1 g kyseliny hyaluronové v 10 ml deionizované vody, jedná se o 1 hm. % roztok. Dále bylo přidáno 0,19 g EDC a mícháno po dobu 1 hodiny při teplotě 25 °C. Poté bylo upraveno pH na 4,5–4,75 pomocí 0,1M HCl a po dobu 1 hodiny v tomto intervalu udržováno. Takto připravený vzorek byl přelit do válcové formy o průměru 2,8 cm a mražen při teplotě -19 °C po dobu 72 hodin, aby získal svou finální makroskopickou strukturu.

Druhý typ hydrogelu byl připraven rozpuštěním 0,1 g 500 kDa kyseliny hyaluronové v 10 ml deionizované vody při teplotě 50 °C po dobu 24 hodin. Následně bylo přidáno 0,92 g ADH a po 30 minutách upraveno pH na 4,8 pomocí 0,1M HCl. Poté bylo přidáno 0,083 g EDC a po rozpuštění bylo pH udržováno na hodnotě 4,8. Takto připravený hydrogel byl přelit do válcové formy o průměru 2,8 cm a mražen při teplotě -19 °C po dobu 72 hodin.

4.3 Vzorky

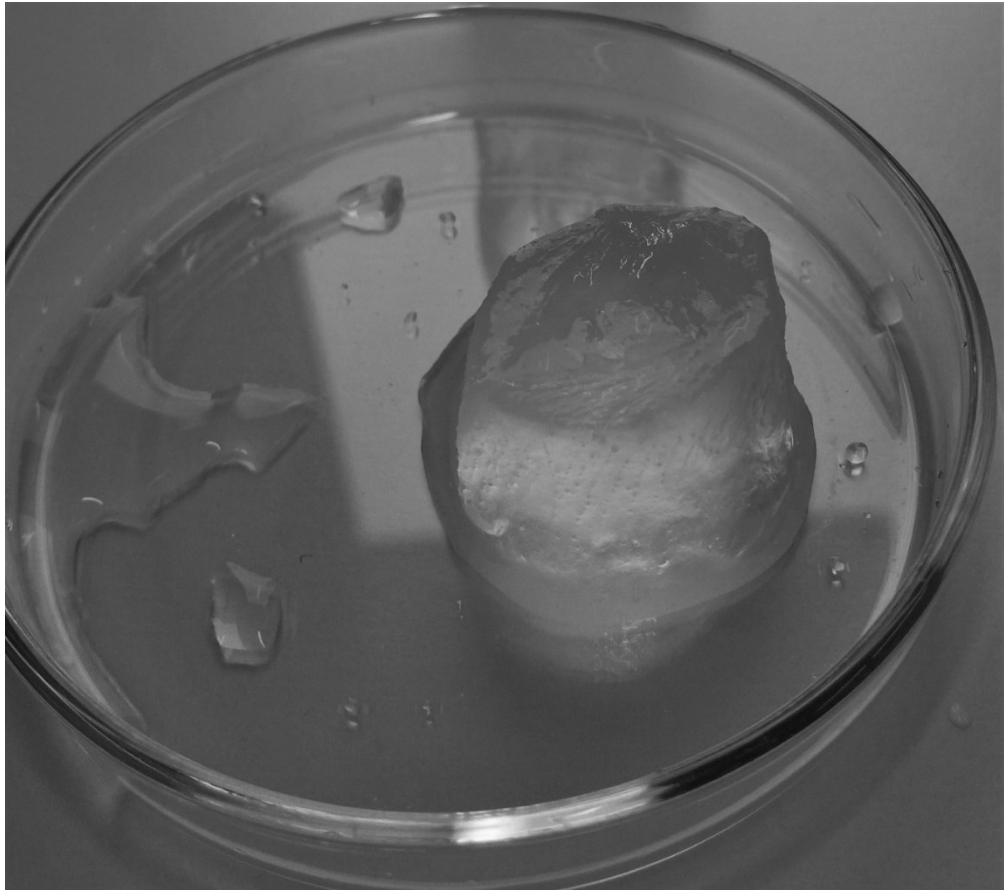
Pro přípravu hydrogelů se síťovacím činidlem EDC byly použity různé molární hmotnosti kyseliny hyaluronové. V následující tabulce (Tabulka 1) je vidět srovnání tvaru výsledného hydrogelu a jeho schopnosti absorpce vody.

Tabulka 1: Přehled připravených hydrogelů

Molární hmotnost	Sítovací činidlo	Tvar hydrogelu	Absorpce vody
73,8 kDa	EDC	kraje kompaktní střed velmi propadlý	nízká
370 kDa	EDC	kraje kompaktní střed velmi propadlý	nízká
500 kDa	EDC	kraje kompaktní střed propadlý	střední
1180 kDa	EDC	kraje kompaktní střed mírně propadlý	vysoká
1690 kDa	EDC	celý vzorek kompaktní	vysoká
500 kDa	ADH	celá vzorek kompaktní	minimální

Vzhledem ke špatným mechanickým vlastnostem a výrazné nehomogenitě hydrogelů připravených s nižšími molárními hmotnostmi kyseliny hyaluronové byly pro měření vlastností vybrány tyto hydrogely:

- **1690** – 1690 kDa kyselina hyaluronová síťovaná EDC
- **1180** – 1180 kDa kyselina hyaluronová síťovaná EDC
- **500** – 500 kDa kyselina hyaluronová síťovaná EDC
- **ADH** – 500 kDa kyselina hyaluronová síťovaná ADH

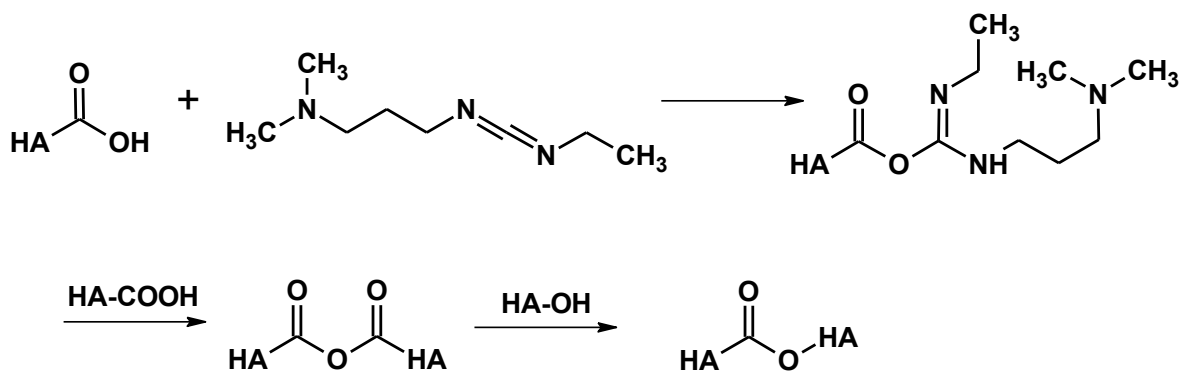


Obrázek 19: Připravený zesíťovaný hydrogel – vzorek 1690

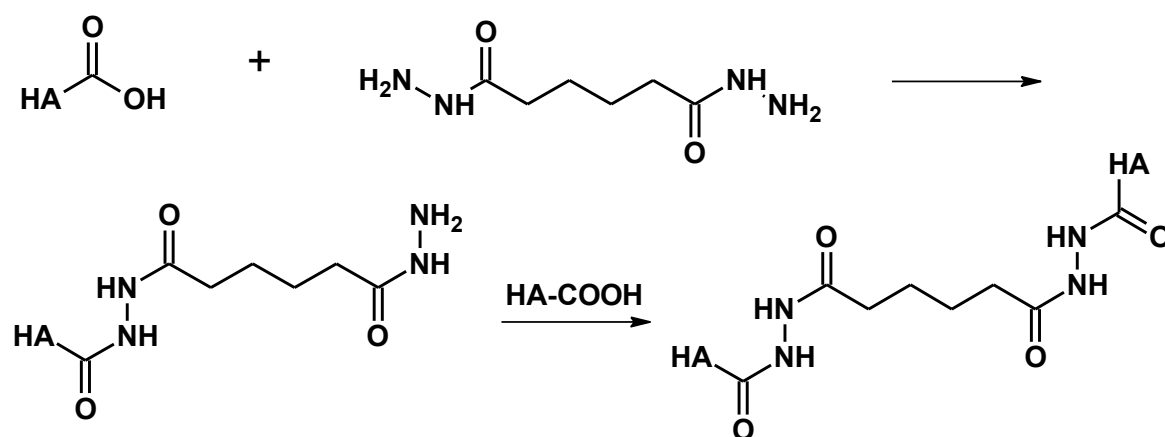
4.4 Vliv síťovacího činidla na vlastnosti

Hydrogely v této bakalářské práci byly připravovány pomocí dvou různých síťovacích činidel. Různá síťovací činidla poskytují odlišnou strukturu hydrogelu, což se odráží ve výsledných vlastnostech.

Při reakci kyseliny hyaluronové se síťovacím činidlem EDC dochází k vytvoření esterové vazby mezi dvěma řetězci (Obrázek 20). Naopak při síťování síťovacím činidlem ADH dochází k vytvoření můstku mezi dvěma řetězci (Obrázek 21). Lze předpokládat, že hydrogel připravený s EDC bude mít lepší mechanické vlastnosti – bude pevnější a tužší.



Obrázek 20: Schéma síťování pomocí EDC [60]



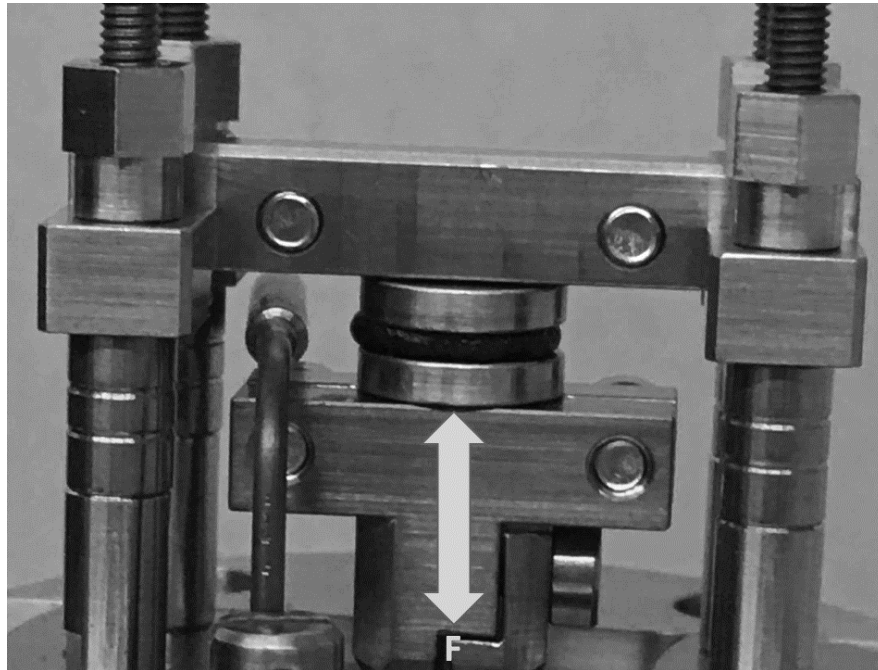
Obrázek 21: Schéma síťování pomocí ADH [61]

Hydrogely jsou ceněny také kvůli tomu, že jsou schopny absorbovat vodu. Hydrogely připravené se síťovacím činidlem EDC po vymačkání vody, která není pevně vázaná ve sktruktuře hydrogelu, tuto vodu opět přijmou. Hydrogely připravené se síťovacím činidlem ADH této vody přijmou výrazně méně. Kyselinu hyaluronovou tvoří dvě opakující se sacharidové jednotky, obsahuje tedy na sacharidových kruzích více $-OH$ skupin, a jednu skupinu $-COOH$. Při síťování s ADH probíhá reakce na $-COOH$ skupinách. Je možné, že voda je v hydrogelech vázána právě na těchto $-COOH$ skupinách, proto hydrogely připravené s ADH absorbují vodu výrazně méně než hydrogely, které jsou připravené s EDC.

5 MECHANICKÉ CHOVÁNÍ – DMA

5.1 Použitý přístroj

Měření bylo prováděno na přístroji DMA1 od firmy Mettler Toledo.



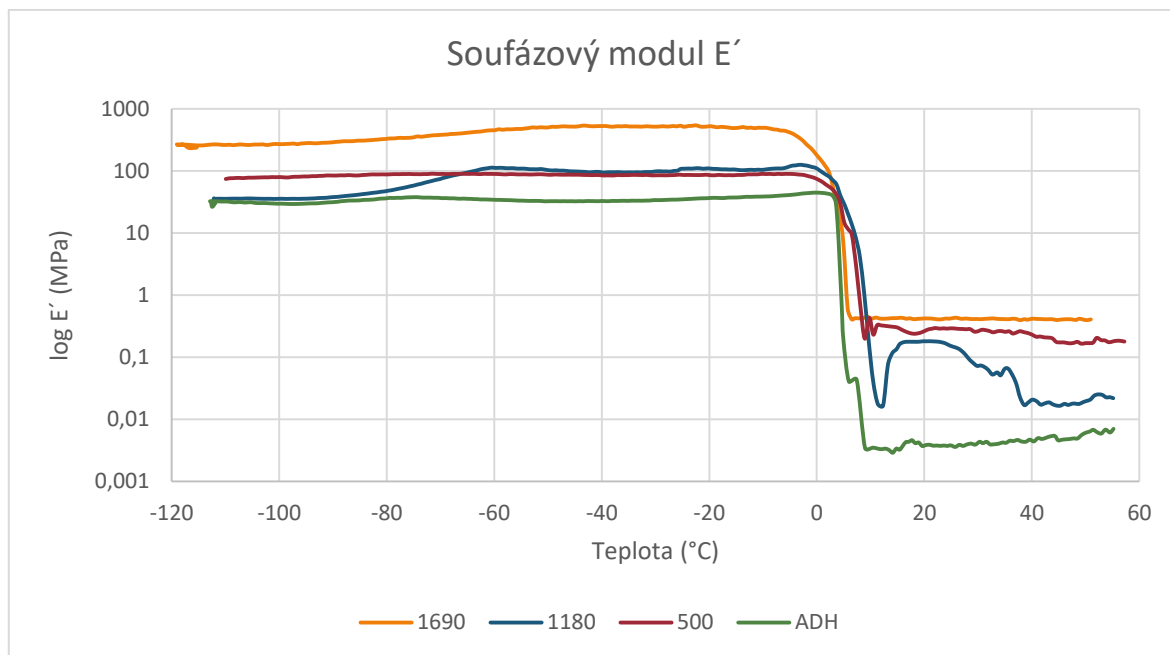
Obrázek 22: Uchycení vzorku na přístroji DMA1 [59]

5.2 Režim měření

Hydrogely byly zbaveny přebytečné vody a následně z nich byla vyražena válcová tělíska o průměru 9 mm a výšce 2 mm. Tato tělíska byla vložena do čelistí přístroje. Měření bylo prováděno v tlaku při frekvenci 1 Hz. Teplotní režim měření byl ohřev o 4 K/min v intervalu od -110 do 60 °C.

5.3 Výsledky

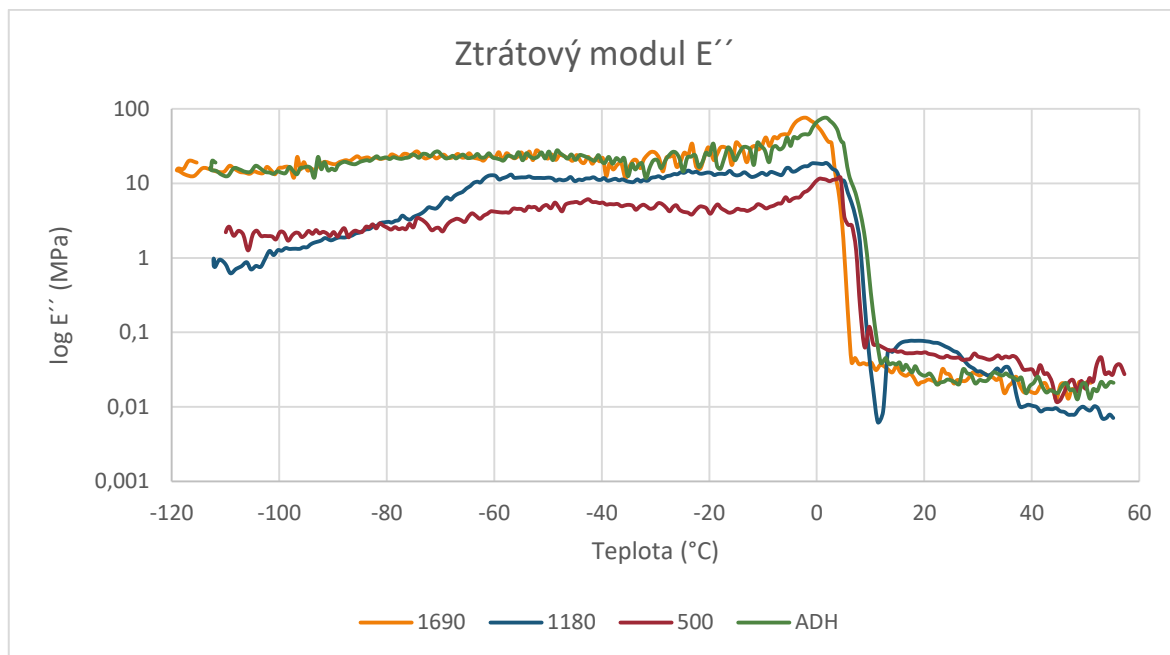
Byl měřen soufázový modul E' , ztrátový modul E'' a ztrátový činitel $\tan\delta$ v závislosti na teplotě.



Graf 1: Závislost souřadného modulu E' na teplotě

V přechodové oblasti okolo teploty skelného přechodu dochází k prudkému poklesu souřadného modulu E' . Toto chování je způsobeno vyšší pohyblivostí částí makromolekul a porušením mezimolekulárních vazeb.

Na grafu 1 lze vidět, že hydrogel připravený z kyseliny hyaluronové s nejvyšší molární hmotností má nejvyšší hodnotu souřadného modulu. Oproti tomu vzorek připravený se síťovacím činidlem ADH má nejnižší hodnotu souřadného modulu a pokles o 4 řády při přechodu ze skelného stavu. U vzorků připravených síťováním s EDC lze vidět pokles přibližně o 3 řády.



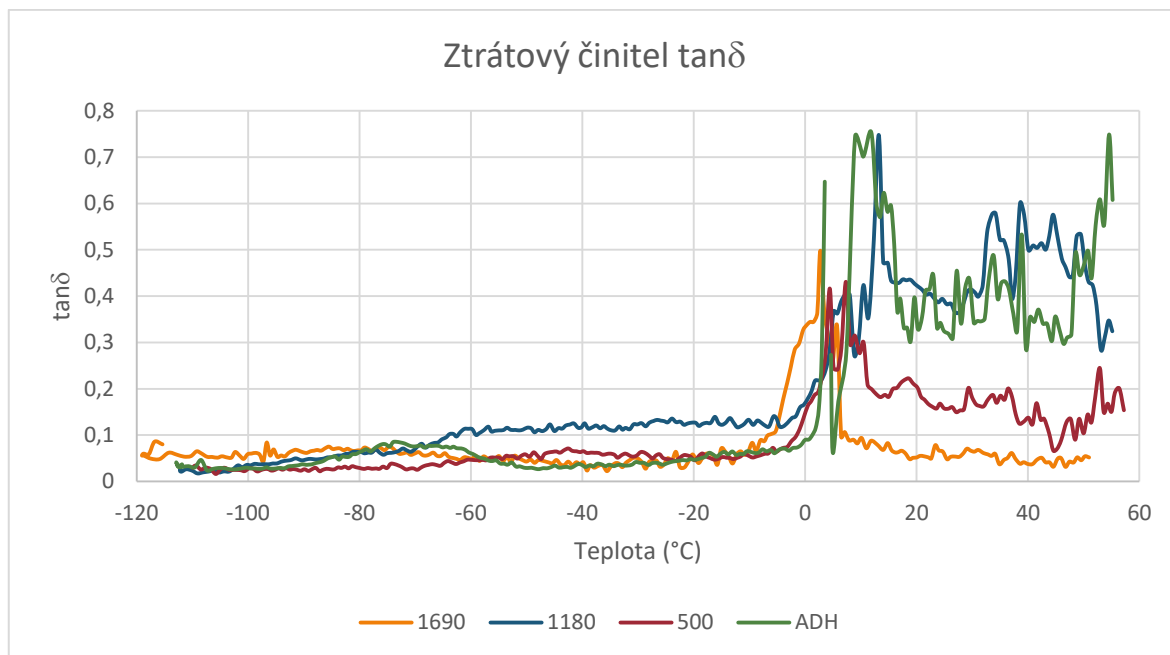
Graf 2: Závislost ztrátového modulu E'' na teplotě

Ztrátový modul E'' vyjadřuje mechanické ztráty a určuje množství energie, které se přemění na teplo. Z maximální hodnoty píku ztrátového modulu lze určit teplotu skelného přechodu. Nad teplotou skelného přechodu všechny vzorky vykazují výrazný pokles ztrátového modulu E'' o tři řády, v případě vzorku s nejnižší molární hmotností až o 4 řády.

Tabulka 2: T_g z maximální hodnoty ztrátového modulu E''

Název vzorku	T_g [$^{\circ}\text{C}$]
1690	-2,3
1180	4,2
500	4,2
ADH	1,3

V tabulce 2 jsou shrnuty teploty skelného přechodu pro jednotlivé vzorky určené z maximální hodnoty ztrátového modulu. Je vidět, že tyto teploty leží blízko teploty tání ledu. S ohledem na obsah vody ve vzorcích nelze tedy jednoznačně určit, zda se jedná o teplotu skelného přechodu hydrogelové sítě či tání vody obsažené v hydrogelu.



Graf 3: Závislost ztrátového činitele $\tan\delta$ na teplotě

Ztrátový činitel $\tan\delta$ vyjadřuje míru vnitřního tření mezi makromolekulami. V grafu 3 lze vidět, že ve skelném stavu je ztrátový činitel dosahuje nízkých hodnot a je konstantní. Znamená to, že v materiálu nedochází k vnitřnímu tření. Oproti tomu nad teplotou skelného přechodu lze pozorovat zvýšení ztrátového činitele způsobené větším pohybem molekul.

5.4 Diskuze výsledků z DMA

DMA měření ukazuje, že hydrogely připravené pomocí ADH mají nižší hodnotu soufázového modulu, čili mají nižší tuhost než hydrogely připravené pomocí EDC. Je to dáno především jejich chemickou strukturou, protože hydrogely připravené pomocí ADH mají řetězce kyseliny hyaluronové spojené můstkem.

Vliv molární hmotnosti na hydrogely připravené pomocí síťovacího činidla EDC je značný. Lze předpokládat, že hydrogely s delšími řetězci kyseliny hyaluronové by měly mít vyšší tuhost a pevnost. Tento předpoklad potvrzuje měření DMA, kde z teplotní závislosti soufázového modulu (Graf 1) lze vidět, že vzorek 1690 má vyšší hodnotu soufázového modulu než vzorky 1180 a 500 a to pod i nad teplotou skelného přechodu.

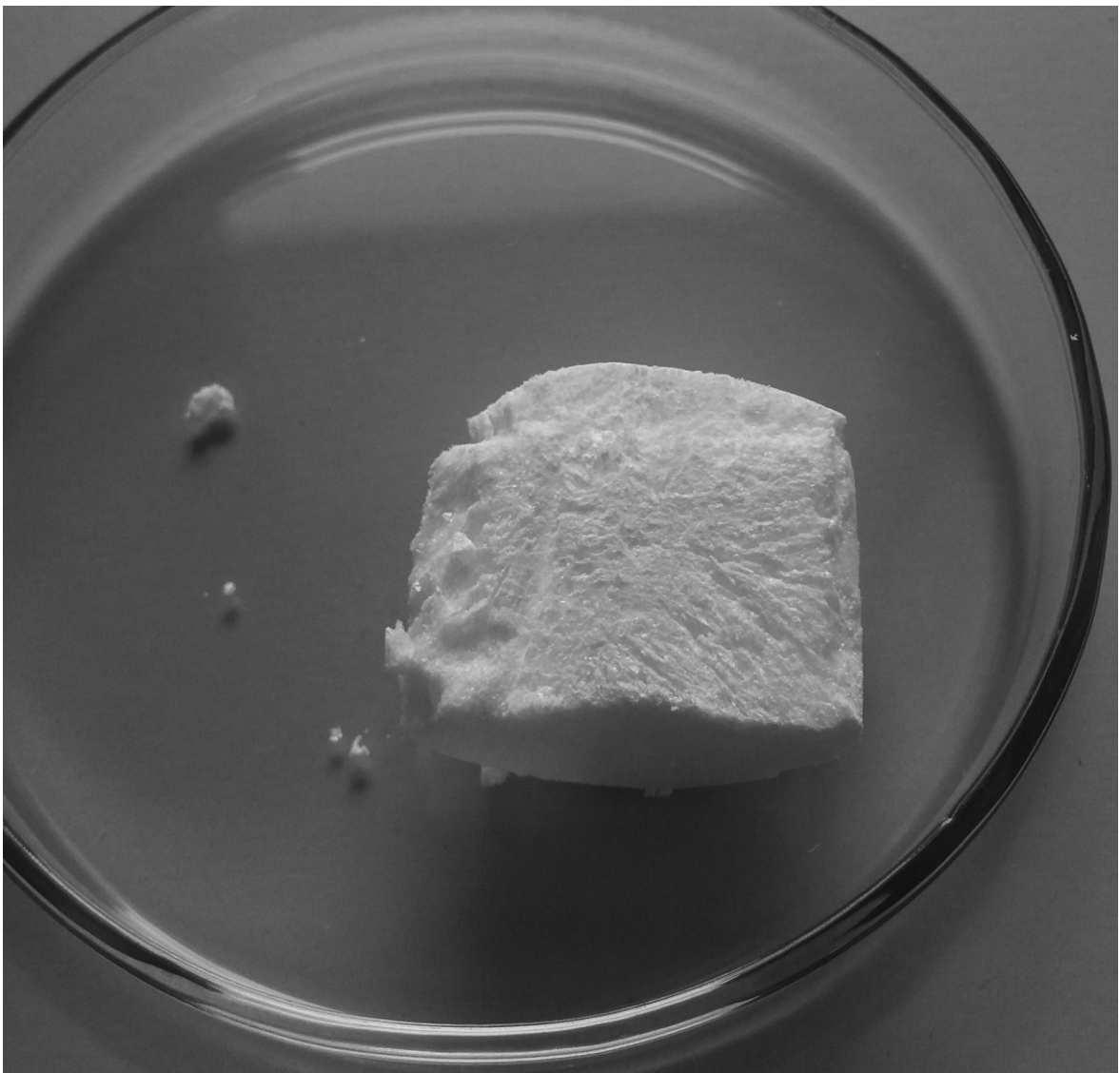
6 VNITŘNÍ STRUKTURA - SEM

6.1 Použitý přístroj

Měření bylo prováděno na přístroji Phenom Pro-X.

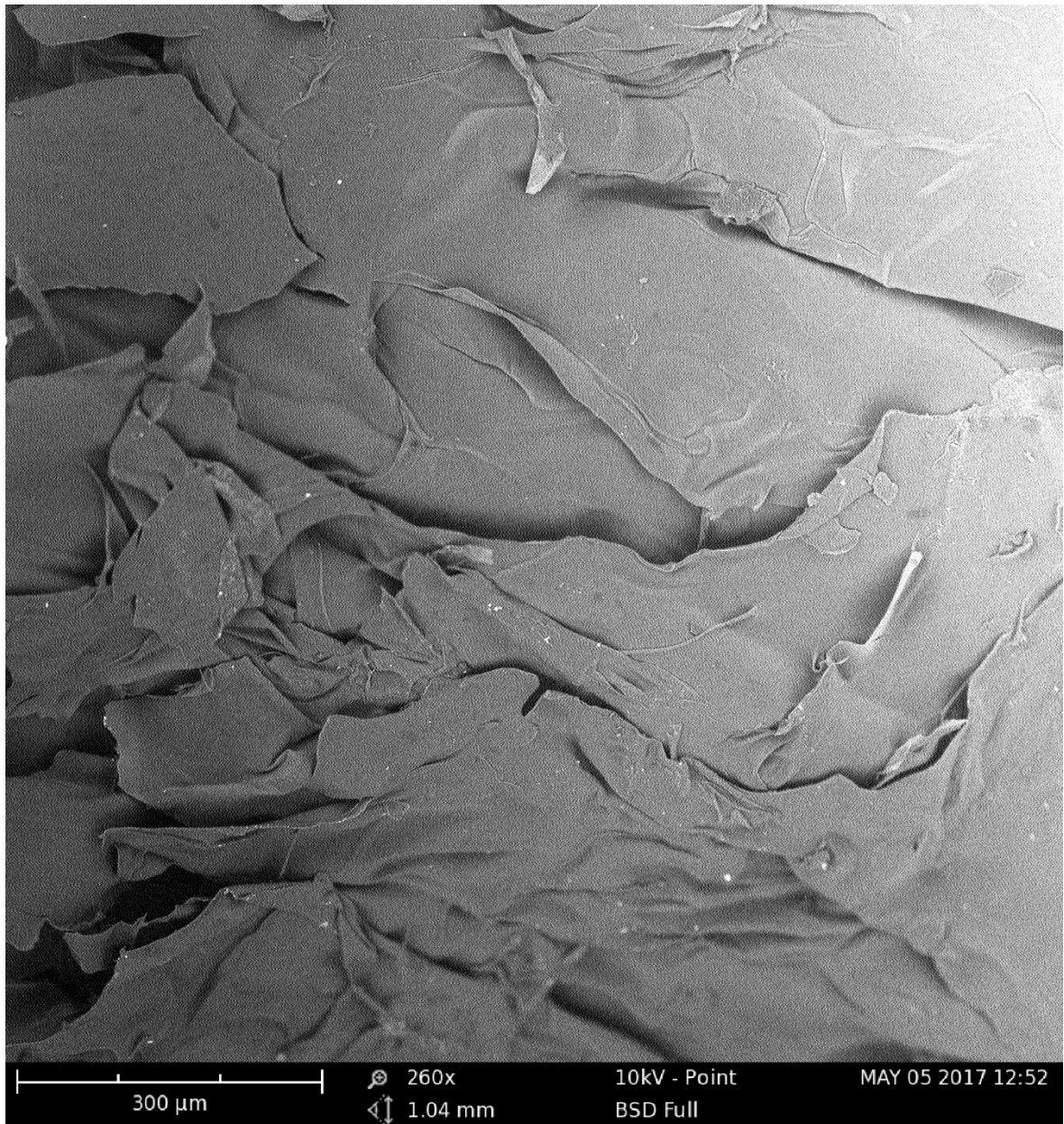
6.2 Režim měření

Hydrogely byly lyofilizovány (lyofilizace – sušení mrazem) a následně z nich byly připraveny vzorky o tloušťce 0,5–2 mm. Bylo měřeno při urychlovacím napětí 10 keV. Byla snímána čtvercová plocha o straně 1 mm při zvětšení 255–270x.

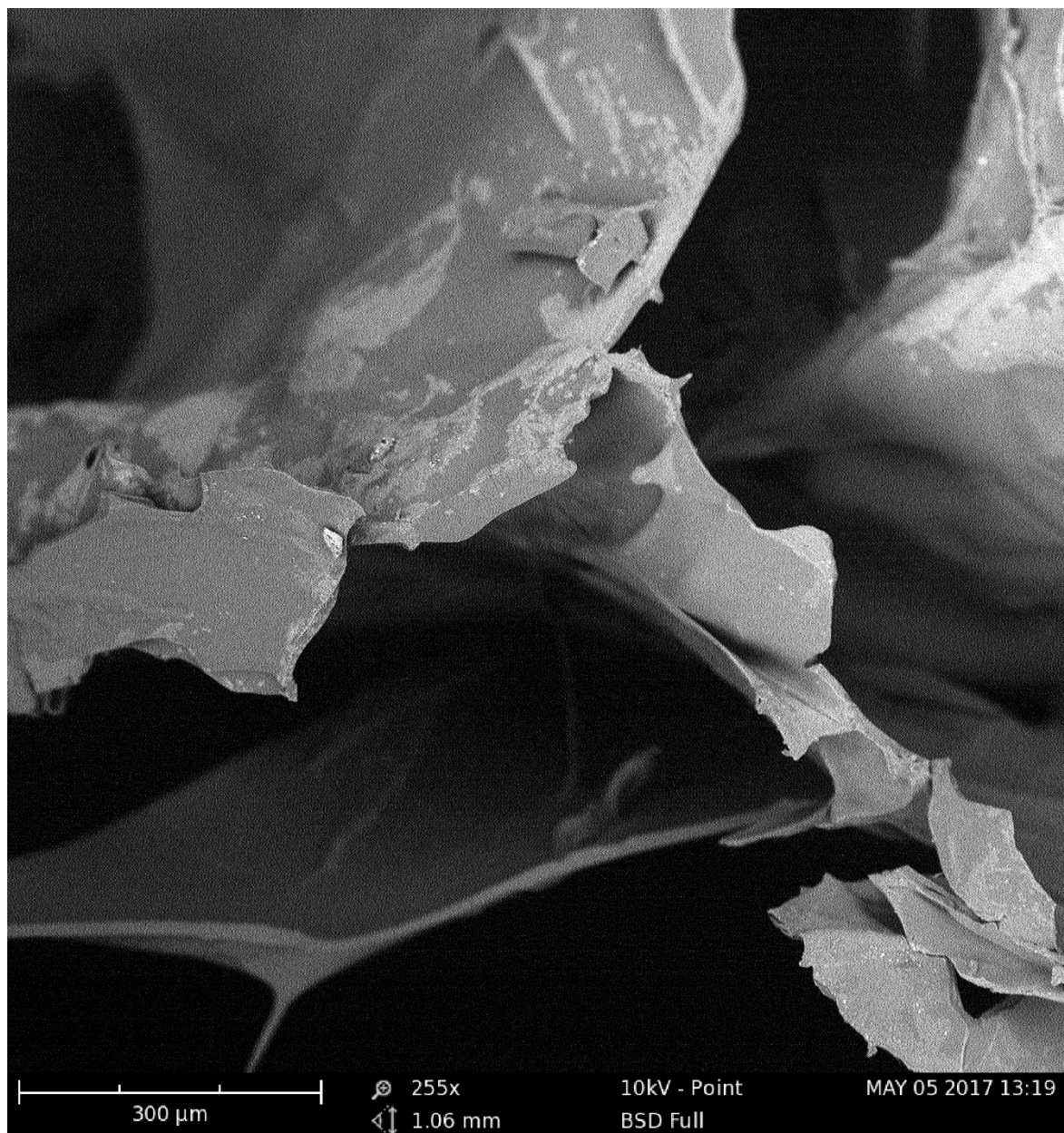


Obrázek 23: Lyofilizovaný hydrogel na řezu – vzorek ADH

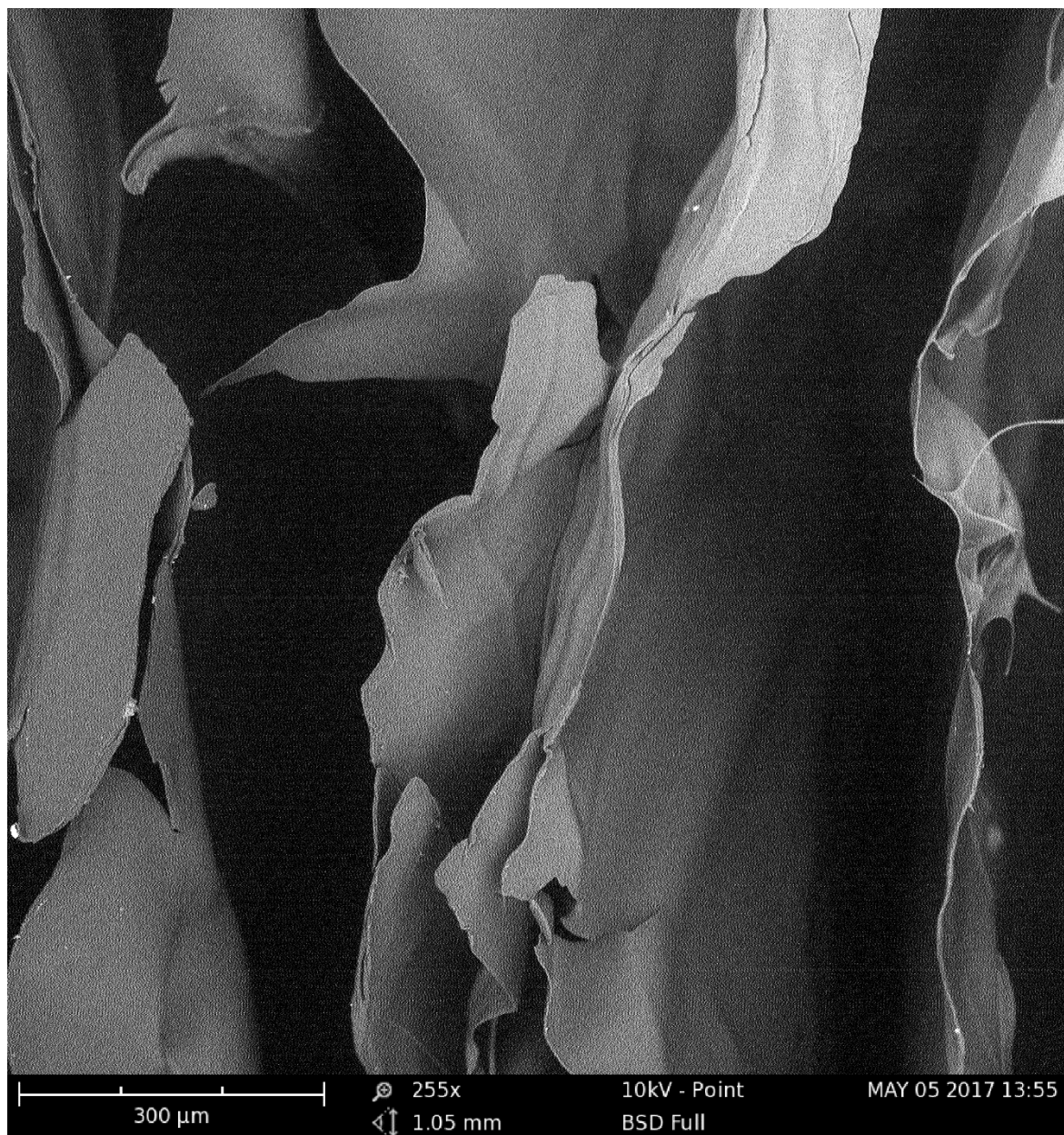
6.3 Snímky ze SEM



Obrázek 24: Vrstevnatá struktura vzorku 1690 pod SEM



Obrázek 25: Pórovitá struktura vzorku 1180 pod SEM



Obrázek 26: Vrstevnatá struktura vzorku 500 pod SEM



Obrázek 27: Struktura vzorku ADH pod SEM

Snímky ze SEM ukazují vrstevnatou strukturu hydrogelů. Na první pohled je vidět, že hydrogel připravený se síťovacím činidlem ADH (Obrázek 27) má odlišnou strukturu. Jednotlivé vrstvy mají mnohem menší rozměr než vrstvy hydrogelů připravených síťovacím činidlem EDC. U vzorků 1180 a 500 je vidět podobná vrstevnatá struktura tvořící póry. V horní části snímku vzorku 1180 (Obrázek 25) lze pozorovat řez vrstev a odhadnout jejich tloušťku na 10 až 20 μm. Struktura vzorku 1690 (Obrázek 24) je také vrstevnatá, ale lze vidět, že vzdálenost mezi jednotlivými vrstvami je v porovnání se vzorky 1180 a 500 menší.

6.4 Diskuze výsledků ze SEM

Struktura, konkrétně velikost a vzdálenost jednotlivých vrstev, má vliv na pevnost hydrogelů. Při porovnání snímku hydrogelu připraveného pomocí ADH (Obrázek 27) se snímkem hydrogelu připraveného pomocí EDC (Obrázek 24), kdy oba zobrazují stejně velkou čtvercovou oblast o straně 1 mm, lze vidět, že na snímku hydrogelu připraveného pomocí ADH je velké množství malých vrstev, kdežto na snímku hydrogelu připraveného pomocí EDC lze vidět podstatně méně vrstev. Z toho lze usuzovat, že hydrogel připravený pomocí EDC bude pevnější.

Předpoklad, že hydrogely s delšími řetězci kyseliny hyaluronové by měly mít vyšší tuhost a pevnost, potvrzují také snímky ze SEM. Na snímku vzorku 1690 (Obrázek 24) lze vidět, že vzdálenost mezi jednotlivými vrstvami je v porovnání se vzorky 1180 a 500 menší, proto vzorky s nižší molární hmotností mají nižší tuhost.

7 INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE

7.1 Použitý přístroj

Měření bylo prováděno na přístroji FTIR-8601 od firmy Shimadzu.

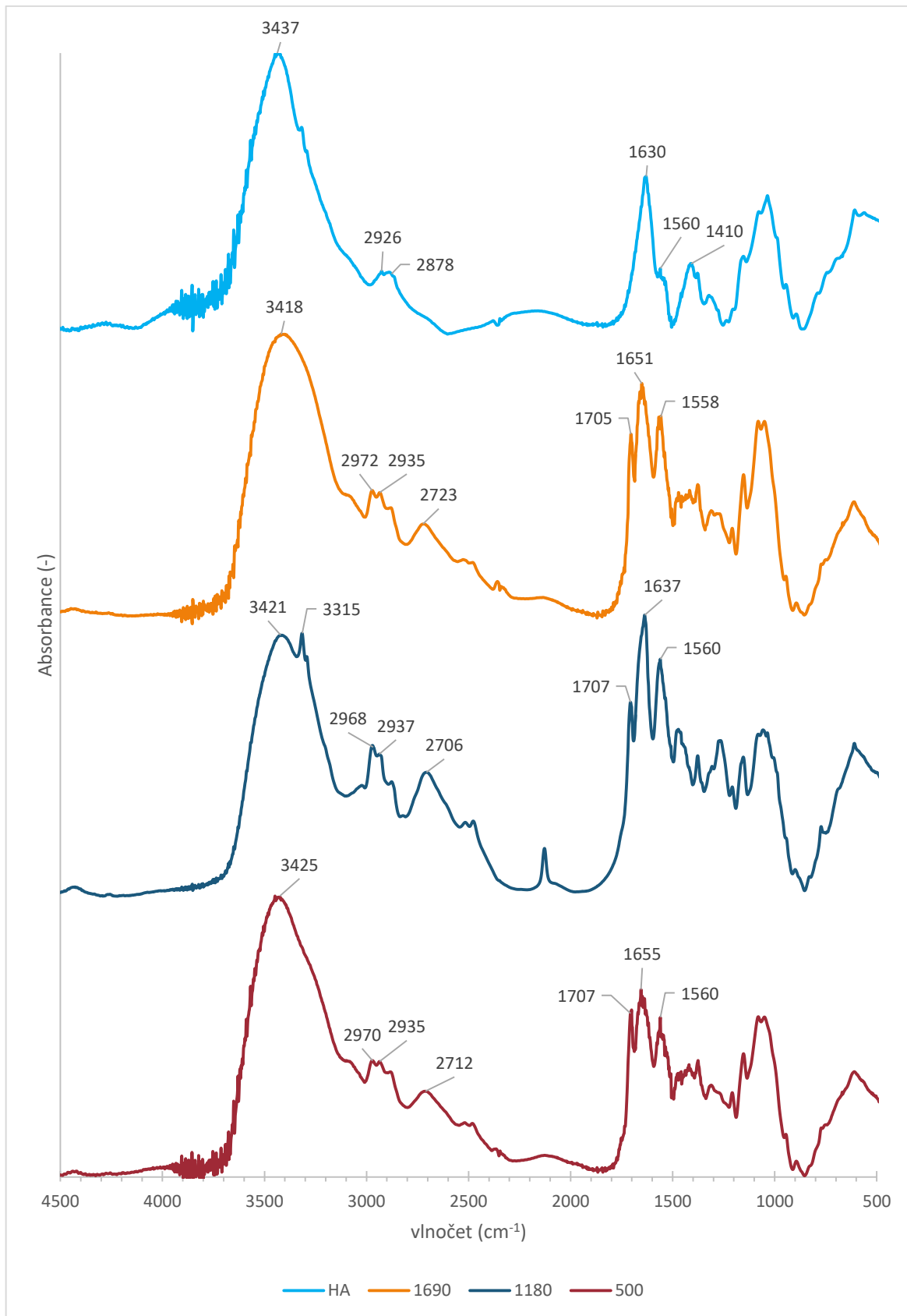
7.2 Režim měření

Byly smíchány 2 mg lyofilizovaného hydrogelu nebo prášku kyseliny hyaluronové s 200 mg KBr, zhomogenizováno ve třecí misce a následně byla z prášku vylisována tableta. Bylo měřeno v režimu absorpance v intervalu vlnočtů od 400 do 4600 cm^{-1} .

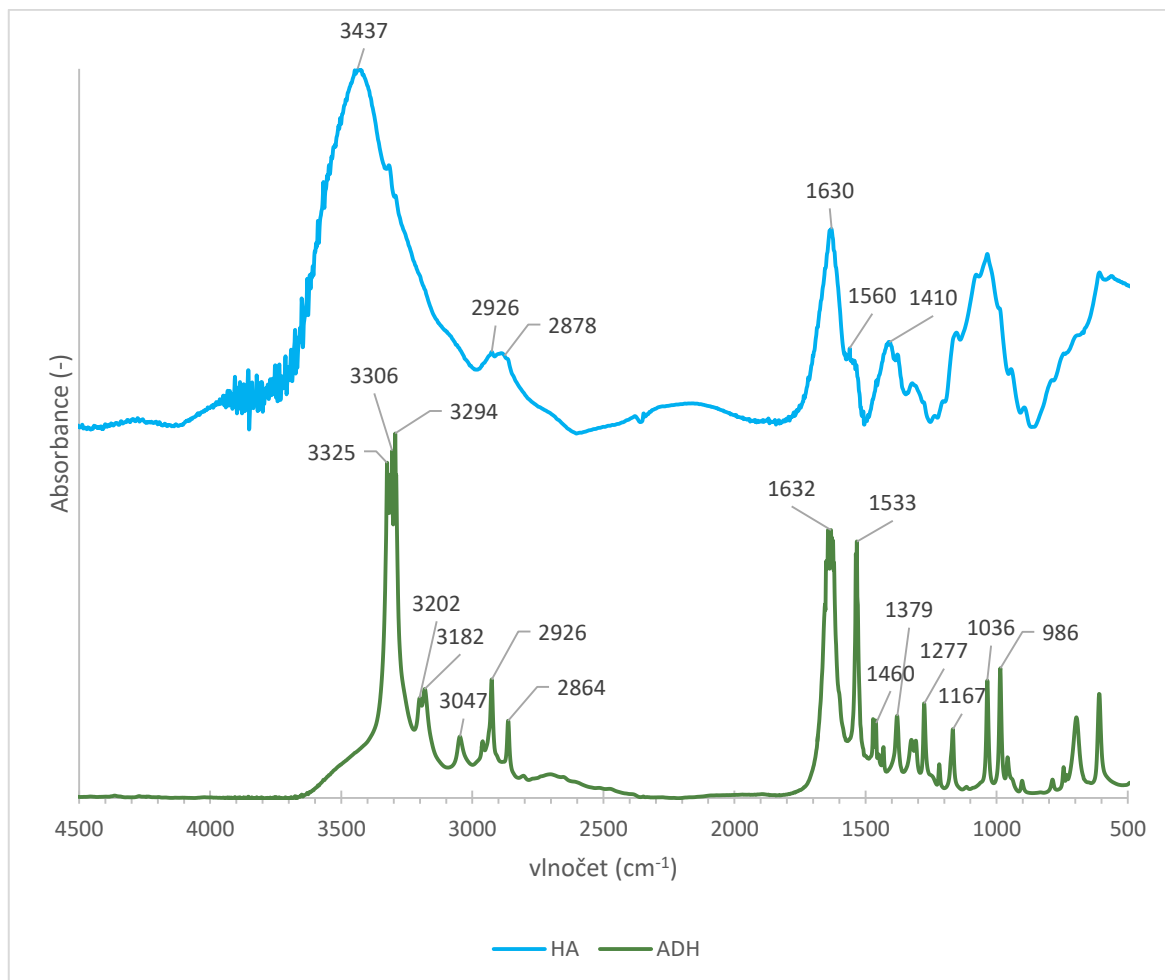
7.3 Výsledky

Na grafu 4 lze vidět spektra připravených hydrogelů v porovnání s čistou kyselinou hyaluronovou. Na spektru čisté kyseliny hyaluronové (světle modrá křivka) je výrazný široký pás na vlnočtu 3437 cm^{-1} , který představuje valenční vibrace $-\text{OH}$ a $-\text{NH}-$ skupin. Na vlnočtech 2926 a 2878 cm^{-1} jsou asymetrické a symetrické vibrace skupin $-\text{CH}_2-$ a $-\text{CH}_3$. Výrazný pás na vlnočtu 1630 cm^{-1} a nižší pás 1560 cm^{-1} odpovídá amidové skupině $-\text{CO}-\text{NH}-$. Pás na vlnočtu 1410 cm^{-1} odpovídá valenčním vibracím vazby $-\text{C}-\text{N}-$ v amidové skupině.

Spektra hydrogelů připravených se síťovacím činidlem EDC nejsou příliš odlišné. Výrazné široké pásy s maximem na vlnočtech 3418 cm^{-1} odpovídají valenčním vibracím skupin $-\text{OH}$ a $-\text{NH}-$. Oproti čisté kyselině hyaluronové jde o posun k nižším vlnočtům, což může být způsobeno úbytkem $-\text{OH}$ vazeb, které se podílejí na vzniku esterové vazby při síťování. Ve vzorku 1180 se nachází úzký pás 3315 cm^{-1} , který je způsoben valenčními vibracemi v amidové skupině. Charakteristické pásy pro symetrické a asymetrické vibrace skupin $-\text{CH}_2-$ a $-\text{CH}_3$ se nacházejí na vlnočtech 2970 a 2935 cm^{-1} , v porovnání s čistou kyselinou hyaluronovou jde o posun k vyšším vlnočtům a nárůst intenzity těchto pásů. Ve spektrech hydrogelů se objevuje navíc pás na vlnočtech 2706–2723 cm^{-1} , jde o valenční vibraci vazby $-\text{CH}$ v aldehydicke skupině, pravděpodobně při síťovací reakci dochází k oxidaci $-\text{OH}$ skupin. Pás na vlnočtu 1705 cm^{-1} je způsoben vazbou $-\text{C}=\text{O}$ v esterové skupině, která vznikla během síťování. Výrazný pás na vlnočtech 1637–1655 cm^{-1} a pás 1560 cm^{-1} odpovídá amidové skupině $-\text{CO}-\text{NH}-$.



Graf 4: Spektra hydrogelů síťovaných EDC a čisté kyseliny hyaluronové



Graf 5: Spektrum hydrogelu síťovaného ADH a čisté kyseliny hyaluronové

Spektrum hydrogelu připraveného se síťovacím činidlem ADH je už na první pohled výrazně odlišné od spektra čisté kyseliny hyaluronové. Výrazný úzký pás na vlnočtu 3300 cm^{-1} odpovídá valenčním vibracím -NH- vazeb v amidové skupině. Dvojitý pás na vlnočtu 3200 cm^{-1} odpovídá deformačním vibracím vazby -HN_2 . Přítomnost skupin $\text{-CH}_2\text{-}$ a -CH_3 dokazují pásy na vlnočtech 2926 a 2864 cm^{-1} , které jsou důsledkem asymetrických a symetrických vibrací těchto skupin. Amidy jsou charakterizovány tzv. amidickými pásy, které vystihují silné spřežení vibrací vazeb v amidech. První amidický pás na vlnočtu 1632 cm^{-1} představuje valenční vibrace skupiny -C=O . Druhý amidický pás leží na vlnočtu 1533 cm^{-1} a odpovídá složení vlivu deformačních vibrací skupiny -NH- a valenčních vibrací vazby -C-N- . Třetí amidický pás na vlnočtu 1277 cm^{-1} představuje spojení deformačních vibrací skupiny -C-N- a valenčních vibrací skupiny -NH- . Dva pásy na vlnočtech 1036 a 986 cm^{-1} odpovídají symetrickým a asymetrickým valenčním vibracím etherové skupiny -C-O-C- .

7.4 Diskuze výsledků z FTIR

Ve spektrech FTIR nejsou u hydrogelů síťovaných EDC příliš velké rozdíly (Graf 4). Ve vzorku 1180 (tmavě modrá křivka) dosahují pásy pro symetrické a asymetrické vibrace skupin $-\text{CH}_2-$ a $-\text{CH}_3$ vyšší intenzity než u vzorků 1690 a 500. Výrazné rozdíly mezi jednotlivými vzorky lze pozorovat na pásu 1705 cm^{-1} , který odpovídá vibračním vazby $-\text{C}=\text{O}$ v esterové skupině vzniklé díky síťování. Plochy pod tímto pásem by bylo možné porovnat a určit, kolik $-\text{COOH}$ skupin bylo přeměněno na esterovou skupinu, čili stupeň zesíťení. Potvrzení této hypotézy by však vyžadovalo přípravu nových vzorků a především kvantitativní měření FTIR spekter.

V hydrogelech síťovaných ADH je vysoké zastoupení ADH vůči kyselině hyaluronové (0,92 g vůči 0,1 g). Proto ve spektru tohoto hydrogelu jsou pásy typické pro kyselinu hyaluronovou překryty pásy ADH, což pravděpodobně znamená, že přebytečné ADH, které se neúčastnilo síťovací reakce, nebylo dokonale odstraněno ze vzorku.

ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na přípravu hydrogelů z kyseliny hyaluronové a následné měření a porovnání jejich vlastností.

Dle měření DMA má hydrogel připravený pomocí ADH nižší hodnotu souřazového modulu než hydrogely připravené pomocí EDC. Z toho lze usuzovat na jejich nižší tuhost, která je dána především jejich chemickou strukturou, jednotlivé řetězce jsou spojeny můstkem. Na snímcích SEM lze také vidět odlišnou strukturu hydrogelů připravených pomocí ADH. Velikost jejich vrstev je výrazně menší, než vrstvy hydrogelů připravených pomocí EDC. Lze předpokládat, že velikost jednotlivých vrstev má také vliv na výsledné mechanické vlastnosti.

Při přípravě hydrogelů se síťovacím činidlem EDC byly použity různé molární hmotnosti kyseliny hyaluronové. Homogenita a kompaktnost hydrogelů připravených pomocí EDC roste se zvyšující se molární hmotnosti. To bylo potvrzeno měřením DMA, kde souřazový modul vzorku 1690 dosahuje v celém rozsahu teplot vyšších hodnot než u vzorků 1180 a 500, zatímco vzorky 370 a 73,8 se nepodařilo připravit. Také snímky SEM ukazují rozdílnou strukturu, vzdálenosti mezi jednotlivými vrstvami jsou ve vzorku 1690 výrazně menší než u vzorků 1180 a 500. Spektra FTIR neukazují příliš velké rozdíly mezi jednotlivými vzorky, síťovací reakce poskytují stejné produkty. Liší se pouze intenzity jednotlivých pásů, z čehož lze usuzovat na stupeň zesílení jednotlivých vzorků.

Všechna měření potvrdila, že použitím jiného síťovacího činidla má připravený hydrogel jiné vlastnosti. Molární hmotnost má také velký vliv, hydrogely připravené s vyšší molární hmotností kyseliny hyaluronové mají odlišné vlastnosti, které byly analyzovány.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] J. Necas et al., "Hyaluronic Acid (Hyaluronan): A Review," *Veterinarni Medicina* 53, no. 8 (2008): 397–411.
- [2] W Palmer and Karl Meyer John, "Polysaccharide of Vitreous Humor," *Ophthalmology*, 1934, 629–34.
- [3] J.-W. Kuo and G.D. Prestwich, *Hyaluronic Acid, Comprehensive Biomaterials* (Elsevier Ltd., 2011), doi:10.1016/B978-0-08-055294-1.00073-8.
- [4] T. C. Laurent, "In Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix"; Balazs, E. A., Ed.; *Academic Press*: London, 1970; Vol. 2, pp 703–732.
- [5] Carole E. Schanté et al., "Chemical Modifications of Hyaluronic Acid for the Synthesis of Derivatives for a Broad Range of Biomedical Applications," *Carbohydrate Polymers* 85, no. 3 (2011): 469–89, doi:10.1016/j.carbpol.2011.03.019.
- [6] Grigorij Kogan et al., "Hyaluronic Acid: A Natural Biopolymer with a Broad Range of Biomedical and Industrial Applications," *Biotechnology Letters* 29, no. 1 (2007): 17–25, doi:10.1007/s10529-006-9219-z.
- [7] Paul H. Weigel, "The Hyaluronan Synthases," in *CHEMISTRY AND BIOLOGY OF HYALURONAN*, ed. H.G. Garg and C.A. Hales (Elsevier Ltd, 2004), 553–87, doi:10.1007/978-90-481-8531-3_25.
- [8] Mary K Cowman and Raniero Mendichi, "Methods for Determination of Hyaluronan Molecular Weight," in *CHEMISTRY AND BIOLOGY OF HYALURONAN*, ed. H.G. Garg and C.A. Hales (Elsevier Ltd, 2004), 41–69, doi:10.1016/B978-0-08-044382-9.50034-0.
- [9] Mary K. Cowman and Shiro Matsuoka, "Experimental Approaches to Hyaluronan Structure," *Carbohydrate Research* 340, no. 5 (2005): 791–809, doi:10.1016/j.carres.2005.01.022.
- [10] Aviva Shiedlin et al., "Evaluation of Hyaluronan from Different Sources: Streptococcus Zooepidemicus, Rooster Comb, Bovine Vitreous, and Human Umbilical Cord," *Biomacromolecules* 5, no. 6 (2004): 2122–27, doi:10.1021/bm0498427.
- [11] Günter Lepperdinger, Christine Fehrer, and Stephan Reitinger, "Biodegradation of Hyaluronan," in *Chemistry and Biology of Hyaluronan*, ed. H.G. Garg and C.A. Hales, 2004, 2–4, doi:10.1016/B978-0-08-044382-9.50035-2.
- [12] Brown, T., Laurent, U., & Fraser, J., "Turnover of hyaluronan in synovial joints: Elimination of labelled hyaluronan from the knee joint of the rabbit," *Experimental Physiology* 76, no. 1 (1991): 125–134.
- [13] Tim Hardingham, "Solution Properties of Hyaluronan," in *Library Technology Reports*, ed. H.G. Garg and C.A. Hales, vol. 40 (Elsevier Ltd, 2004), 2–67, doi:10.1016/B978-0-08-044382-9.50032-7.
- [14] Maurice N. Collins and Colin Birkinshaw, "Hyaluronic Acid Based Scaffolds for Tissue Engineering - A Review," *Carbohydrate Polymers* 92, no. 2 (2013): 1262–79, doi:10.1016/j.carbpol.2012.10.028.
- [15] Lubomir Lapcik et al., "Physicochemical Analysis of Hyaluronic Acid Powder for Cosmetic and Pharmaceutical Processing," in *Hyaluronic Acid for Biomedical and Pharmaceutical Applications*, 2014, 89–101.
- [16] Lo G.H., LaValley M., McAlindon T., Felson D.T. "Intra-articular hyaluronic acid in treatment of knee osteoarthritis: a meta-analysis," *JAMA*, no. 23 (2003): 3115–3121.

- [17] Ying Wang and Qunyuan Xu, "Hyaluronic Acid Hydrogel: A Favourable Niche for Neural Stem Cells," in *Hyaluronic Acid for Biomedical and Pharmaceutical Applications*, 2014, 1–19.
- [18] Pavel Mokrejš and Ferdinand Langmaier, "Aplikace přírodních polymerů", *Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně*, Zlín: 2008. ISBN 9788073186746 8073186748.
- [19] Josef Novák, *Fyzikální Chemie Bakalářský a Magisterský Kurz* (Praha: VŠCHT Praha, 2016). ISBN 978-80-7080-675-3.
- [20] Bartovská Lidmila, Šišková Marie: "Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav," 5th ed. Praha: VŠCHT Praha, 2005. P. 199. ISBN 80-7080-579-X.
- [21] "TEPLOTA PŘECHODU SOL - GEL ŽELATINOVÉHO HYDROGELU," [online]. [cit. 2.4.2017]. Dostupný na WWW: https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/5849/mod_resource/content/2/CV_1_želatina_ZS2016.pdf.
- [22] Maurice N. Collins and Colin Birkinshaw, "Physical Properties of Crosslinked Hyaluronic Acid Hydrogels," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 19, no. 11 (2008): 3335–43, doi:10.1007/s10856-008-3476-4.
- [23] Hutmacher, D. W., "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage," *Biomaterials* 21, no. 24 (2000): 2529–2543.
- [24] Katja Hölzl et al., "Bioink Properties Before, during and after 3D Bioprinting," *Biofabrication* 8, no. 3 (2016): 32002, doi:10.1088/1758-5090/8/3/032002.
- [25] Guillotin B et al., "Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization," *Biomaterials* 31, (2010): 7250–6.
- [26] Guillemot F, Souquet A, Catros S and Guillotin B., "Laserassisted cell printing: principle, physical parameters versus cell fate and perspectives in tissue engineering," *Nanomedicine* 5, (2010): 507–15.
- [27] O'Brien, F., Harley, B., Yannas, I., & Gibson, L., "The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds," *Biomaterials* 26, no. 4 (2005): 433–441.
- [28] Ji, Y., Ghosh, K., Shu, X. Z., Li, B., Sokolov, J. C., Prestwich, G. D., et al., "Electrospun three-dimensional hyaluronic acid nanofibrous scaffolds," *Biomaterials* 27, no. 20, (2006): 3782–3792.
- [29] Brenner, E. K., Schiffman, J. D., Thompson, E. A., Toth, L. J., & Schauer, C. L., "Electrospinning of hyaluronic acid nanofibers from aqueous ammonium solutions," *Carbohydrate Polymers* 87, no. 1 (2012): 926–929.
- [30] Danishefsky, I., & Siskovic, E., "Conversion of carboxyl groups of mucopolysaccharides into amides of amino acid esters," *Carbohydrate Research* 16, no. 1 (1971): 199–205.
- [31] Nakajima, N., & Ikada, Y. (1995). "Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media," *Bioconjugate Chemistry* 6, no. 1 (1995): 123–130.
- [32] Magnani, A., Rappuoli, R., Lamponi, S., & Barbucci, R., "Novel polysaccharide hydrogels: Characterization and properties," *Polymers for Advanced Technologies* 11, no. 8–12 (2000): 488–495.
- [33] Bergman, K., Elvingson, C., Hilborn, J., Svensk, G., & Bowden, T., "Hyaluronic acid derivatives prepared in aqueous media by triazine-activated amidation," *Biomacromolecules* 8, no. 7 (2007): 2190–2195.
- [34] Bellini, D., & Topai, A. (2000). WO200001733.
- [35] Della Valle, F., & Romeo, A. (1986). US4851521.

- [36] Pelletier, S., Hubert, P., Lopicque, F., Payan, E., & Dellacherie, E., "Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate: Synthesis and physico-chemical properties of aqueous dilute solutions," *Carbohydrate Polymers* 43, no. 4 (2000): 343–349.
- [37] Jeanloz, R., & Forchielli, E., "Studies on hyaluronic acid and related substances. I. Preparation of hyaluronic acid and derivatives from human umbilical cord," *The Journal of biological chemistry* 186, no. 2 (1950): 495–511.
- [38] Abhijith K Kudva, Jennifer Patterson, and Cartilage Biology, "Hyaluronic Acid Incorporation into Scaffolds for Bone and Cartilage Regeneration," in *Hyaluronic Acid for Biomedical and Pharmaceutical Applications* (2014): 21–55.
- [39] Laurent, T., Hellsing, K., & Gelotte, B., "Cross-linked gels of hyaluronic acid," *Acta Chemica Scandinavia* 18, no. 1 (1964): 274–275.
- [40] Malson, T., & Lindqvist, B. (1986). "Gels of crosslinked hyaluronic acid for use as a vitreous humor substitute," WO1986000079.
- [41] Nishi, C., Nakajima, N., & Ikada, Y., "In vitro evaluation of cytotoxicity of diepoxy compounds used for biomaterial modification," *Journal of Biomedical Materials Research* 29, no. 7 (1995): 829–834.
- [42] Balazs, E., & Leshchiner, A. (1968). US4582865.
- [43] Eun, J., Kang, S., Kim, B., Jiang, G., Il, H., & Sei, K., "Control of the molecular degradation of hyaluronic acid hydrogels for tissue augmentation," *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 86, no. 3 (2008): 685–693.
- [44] Serban, M., Yang, G., & Prestwich, G., "Synthesis, characterization and chondroprotective properties of a hyaluronan thioethyl ether derivative," *Biomaterials* 29, no. 10 (2008): 1388–1399.
- [45] Toemmeras, K., & Eenschooten, C. (2007). "Aryl/alkyl succinic anhydride hyaluronan derivatives," WO/2007/033677.
- [46] Pravata, L., Braud, C., Boustta, M., El Ghzaoui, A., Tømmeras, K., Guillaumie, F., et al., "New amphiphilic lactic acid oligomer–hyaluronan conjugates: Synthesis and physicochemical characterization," *Biomacromolecules* 9, no. 1 (2008): 340–348.
- [47] Burdick, J., Chung, C., Jia, X., Randolph, M., & Langer, R., "Controlled degradation and mechanical behavior of photopolymerized hyaluronic acid networks," *Biomacromolecules* 6, no. 1 (2005): 386–391.
- [48] Leach, J., Bivens, K., Patrick, C., Jr., & Schmidt, C., "Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: Natural, biodegradable tissue engineering scaffolds," *Biotechnology and Bioengineering* 82, no. 5 (2003): 578–589.
- [49] Xinqiao Jia et al., "Prolongation of Sciatic Nerve Blockade by in Situ Cross-Linked Hyaluronic Acid," *Biomaterials* 25, no. 19 (2004): 4797–4804, doi:10.1016/j.biomaterials.2003.12.012.
- [50] James R. Glass et al., "Characterization of a Hyaluronic Acid-Arg-Gly-Asp Peptide Cell Attachment Matrix," *Biomaterials* 17, no. 11 (1996): 1101–8, doi:10.1016/0142-9612(96)85911-4.
- [51] Bellini, D., & Topai, A. (2000). WO200001733.
- [52] Crescenzi, V., Francescangeli, A., Segre, A., Capitani, D., Mannina, L., Renier, D., et al., "NMR structural study of hydrogels based on partially deacetylated hyaluronan," *Macromolecular Bioscience* 2, no. 6 (2002): 272–279.

- [53] L.A. Solchaga, J.E. Dennis, V.M. Goldberg and A. Caplan, "Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage," *Journal of Orthopaedic Research* 17, no. 2 (1999): 205.
- [54] Patrik Kania, *Infračervená Spektrometrie* (VŠCHT Praha).
- [55] Pavel Urbánek and Barbora Hanulíková, *Návody K Laboratornímu Cvičení Aplikovaná Spektroskopie* (Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně).
- [56] Roman Kubínek, Klára Šafářová, and Milan Vůjtek, *Elektronová Mikroskopie* (Univerzita Palackého v Olomouci, 2006).
- [57] Jiří Vaniček, *Metody Termické Analýzy* (Technická univerzita Liberec).
- [58] COBLENTZ SOC. *NIST* [online]. [cit. 21.4.2017]. Dostupný na WWW: <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?Spec=C67641&Index=2&Type=IR>
- [59] WU, Joy. *Pinnacle Materials Laboratory* [online]. [cit. 27.4.2017]. Dostupný na WWW: http://www.pinmatlab.com/wp-content/uploads/2017/03/DMA_compression_pic.png
- [60] Gřundělová, L., Gregorova, A., Mráček, A., Vícha, R., Smolka, P., Minařík, A., "Viscoelastic and mechanical properties of hyaluronan films and hydrogels modified by carbodiimide," *Carbohydrate Polymers* 119, no. 2 (2015): 142–148.
- [61] Venkatraman, S., Howden, T., Widjaja, L. K., (2014). "Hyaluronic acid-based drug delivery systems," WO2014039012A1.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

Da	Dalton
Mr	relativní molekulová hmotnost
$[\eta]$	limitní viskozitní číslo
K	parametr Mark-Houwinkovy rovnice
M	molární hmotnost
α	parametr Mark-Houwinkovy rovnice
pH	potenciál vodíku
3D	prostorový
LIFT	laserem asistovaný bioprinting
EDC	1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)-propyl]-karbodiimid
CMPI	2-chloro-1-methylpyridinjodid
DMF	dimethylformamid
NMR	spektroskopie nukleární magnetické resonance
CDMT	2-chloro-dimethoxy-1,3,5-triazin
CO ₂	oxid uhličitý
pK _a	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty kyseliny
UV	ultrafialové záření
FTIR	infračervená spektroskopie s Furierovou transformací
SEM	rastrovací elektronová mikroskopie
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
AFM	mikroskopie atomárních sil
DSC	diferenční skenovací kalorimetrie
DMA	dynamicko-mechanická analýza
ATR	technika zeslabené totální reflektance
KBr	bromid draselný
E*	komplexní modul
E'	souřázový modul
E''	ztrátový modul
ADH	dihydrazid kyseliny adipové
HCl	kyselina chlorovodíková
tan δ	ztrátový činitel

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Struktura kyseliny hyaluronové [5].....	12
Obrázek 2: Schéma rozpadu kyseliny hyaluronové v lidském těle [11].....	14
Obrázek 3: Schéma vzniku pórovité skruktury hydrogelu	16
Obrázek 4: Schéma laserem asistovaného bioprintigu [24].....	18
Obrázek 5: Struktura EDC	19
Obrázek 6: Mechanismus amidace pomocí EDC	19
Obrázek 7: Mechanismus amidace pomocí CMPI	20
Obrázek 8: Mechanismus amidace pomocí CDMT.....	20
Obrázek 9: Mechanismus amidace pomocí 1,1'-karbonyldiimidazolu	20
Obrázek 10: Mechanismus esterifikace tosylátovými skupinami.....	21
Obrázek 11: Mechanismus esterifikace epoxidy	21
Obrázek 12: Mechanismus etherifikace divinylsulfonem	22
Obrázek 13: Mechanismus etherifikace ethylensulfidem.....	22
Obrázek 14: Mechanismus esterifikace pomocí oktenylanhydridu kyseliny jantarové	23
Obrázek 15: Mechanismus esterifikace aktivovaným acylchloridovým karboxylátem	23
Obrázek 16: Mechanismus esterifikace anhydridem kyseliny methakrylové	23
Obrázek 17: Mechanismus deacetylace s následnou amidací	24
Obrázek 18: Infračervené spektrum acetonu [58].....	27
Obrázek 19: Připravený zesíťovaný hydrogel – vzorek 1690	32
Obrázek 20: Schéma síťování pomocí EDC [60]	33
Obrázek 21: Schéma síťování pomocí ADH [61].....	33
Obrázek 22: Uchycení vzorku na přístroji DMA1 [59].....	34
Obrázek 23: Lyofilizovaný hydrogel na řezu – vzorek ADH.....	38
Obrázek 24: Vrstevnatá struktura vzorku 1690 pod SEM.....	39
Obrázek 25: Pórovitá struktura vzorku 1180 pod SEM.....	40
Obrázek 26: Vrstevnatá struktura vzorku 500 pod SEM.....	41
Obrázek 27: Struktura vzorku ADH pod SEM.....	42

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Přehled připravených hydrogelů.....	31
Tabulka 2: T_g z maximální hodnoty ztrátového modulu E''	36

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Závislost soufázového modulu E' na teplotě	35
Graf 2: Závislost ztrátového modulu E'' na teplotě	36
Graf 3: Závislost ztrátového činitele $\tan\delta$ na teplotě	37
Graf 4: Spektra hydrogelů síťovaných EDC a čisté kyseliny hyaluronové	45
Graf 5: Spektrum hydrogelu síťovaného ADH a čisté kyseliny hyaluronové	46