



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**HYDROGELY HYDROFOBIZOVANÉHO HYALURONANU A
MICEL**

HYDROGELS PREPARED FROM HYDROPHOBIZED HYALURONAN AND MICELLES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Kristýna Daňková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

BRNO 2021

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1488/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Kristýna Daňková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.**

Název diplomové práce:

Hydrogely hydrofobizovaného hyaluronanu a micel

Zadání diplomové práce:

1. Provést rešerši na téma hydrofobizovaný hyaluronan a jeho využití v medicíně, popř. kosmetice. Zaměřit se zejména na hyaluronan modifikovaný palmitolem.
2. Seznámit se se základními principy přípravy hydrogelů kombinací hydrofobizovaných (bio)polymerů a micelárních roztoků.
3. Na základě rešerše navrhnout laboratorní postupy přípravy hydrogelů z palmitoyl–hyaluronanu a micelární formy vhodného tenzidu. Zaměřit se především na tzv. biotenzidy na bázi sacharidů (např. (do)decylglukosid).
4. Ověřit navržené postupy, navrhnout a provést charakterizaci získaných gelů.
5. Zhodnotit možnosti využití palmitoyl–hyaluronanu k přípravě hydrogelů zadaným postupem; vytýčit případné další směry bádání v dané oblasti.

Termín odevzdání diplomové práce: 30.7.2021:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Kristýna Daňková
student(ka)

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na přípravu hydrogelů hydrofobizovaného derivátu kyseliny hyaluronové palmitoyl hyaluronanu v přítomnosti micel biotenzidu decyl glukosidu, tenzidu triton X-100 a jejich následnou charakterizaci pomocí vybraných testů reologie a infračervené spektrometrie. Byl pozorován vliv metody přípravy, druhu a koncentrace tenzidu a celkově přítomnosti micel na vlastnosti výsledného hydrogelu. Mimo jiné byla provedena zkouška na botnání, která přinesla pozitivní výsledky pro budoucí výzkum.

ABSTRACT

This Master's thesis is focused on the preparation of hydrogels based on a hydrophobic derivative of hyaluronic acid palmitoyl hyaluronan in presence of biosurfactant decyl glucoside's micelles and micelles of surfactant triton X-100. For followed characterization were chosen rheological tests and infrared spectrometry. There was observed influence of preparation method, type and concentration of surfactant and presence of micelles on final features of the hydrogel. Moreover, an experimental test of swelling was performed with interesting results for future research.

KLÍČOVÁ SLOVA

hydrogel, palmitoyl hyaluronan, decyl glukosid, micely, reologie, botnání

KEY WORDS

hydrogel, palmitoyl hyaluronan, decyl gslucoside, micelles, rheology, swelling

DAŇKOVÁ, Kristýna. *Hydrogely hydrofobizovaného hyaluronanu a micel*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131367>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Miloslav Pekař.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
Daňková Kristýna

Poděkování patří v první řadě vedoucímu této diplomové práce prof. Ing. Miroslavu Pekařovi, CSc. za odborný dohled a vedení, čas strávený na konzultacích, zpětnou vazbu a pozitivní a přátelskou atmosféru. Dále Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D. za mé uvedení do tajů reologie a ochotu při experimentálním měření. Děkuji také své rodině za podporu a zázemí během celého studia. A v neposlední řadě patří velký dík i mým skvělým spolužákům za pět krásných společných let.

OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Biopolymery	8
2.1.1	Polysacharidy	8
2.1.2	Kyselina hyaluronová	11
2.1.3	Modifikace kyseliny hyaluronové	14
2.1.4	Využití HA a jejich derivátů.....	16
2.2	Tenzidy	17
2.2.1	Stanovení kritické micelární koncentrace.....	19
2.2.2	Vliv tenzidů na absorpci léčiva.....	20
2.2.3	Biotenzidy.....	21
2.3	Interakce hydrofobizovaných biopolymerů a micel.....	21
2.4	Hydrogely	23
2.4.1	Způsoby přípravy hydrogelů	24
2.4.2	Využití hydrogelů v medicíně.....	24
2.5	Reologie	25
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	27
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
4.1	Použité chemikálie	32
4.2	Příprava zásobních roztoků.....	32
4.2.1	Zásobní roztoky palmitoyl hyaluronanu	32
4.2.2	Zásobní roztoky tenzidů triton X-100 a decyl glukosid	32
4.3	Pracovní postupy přípravy vybraných hydrogelů	32
4.3.1	Metoda smíchání dvou roztoků.....	32
4.3.2	Metoda rozpuštění palmitoyl hyaluronanu v roztoku tenzidu.....	32
4.4	Metodika charakterizace hydrogelů	33
4.4.1	Vizuální stanovení toku	33
4.4.2	Reologie	33
4.4.3	Infračervená spektrometrie	35
4.4.4	Ověření schopnosti botnání.....	36
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	37
5.1.1	Výběr palmitoyl hyaluronanu s vyhovujícím stupněm substituce.....	37
5.1.2	Výběr vhodných koncentrací palmitoyl hyaluronanu a tenzidů.....	38
5.2	Reologie.....	39
5.2.1	Porovnání dvou vybraných metod pro přípravu hydrogelů.....	39

5.2.2	Srovnání gelů dvou různých tenzidů stejné koncentrace	41
5.2.3	Srovnání gelů s měnící se koncentrací tenzidu decyl glukosid	43
5.2.4	Srovnání gelů s/bez přítomnosti micel	44
5.2.5	Tokový test.....	46
5.3	Infračervená spektrometrie	46
5.4	Schopnost botnání	49
5.4.1	Reologie zpětně nabobtnalých gelů.....	49
6	ZÁVĚR	51
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	52

1 ÚVOD

Biomateriály zahrnující hydrogely jsou a budou nedílnou součástí medicíny. Jejich využití je zaměřeno na nosiče pro cílený přenos léčiv, matrice pro tkáňové inženýrství a regenerativní medicínu a spoustu dalších. Jelikož jde o materiály určené pro přímý kontakt s lidským tělem, jsou na ně kladeny vysoké nároky nejen z hlediska biokompatibility a biodegradability. Jejich vývoj proto může být mnohdy náročnou a velkou výzvou.

Hydrogely tvoří trojrozměrná síť vzájemně propojených řetězců polymeru. Kromě této sítě zaujímá většinu objemu hydrogelu voda, díky které má tento materiál své specifické viskoelastické vlastnosti a předpoklad biokompatibility. Přípravu hydrogelů je možné provádět fyzikálními i chemickými metodami. V rámci této práce byly připraveny fyzikálně síťované hydrogely bez vzniku kovalentních vazeb.

Palmitoyl hyaluronan je hydrofobně modifikovaný derivát kyseliny hyaluronové. Hydrofobní řetězce tohoto polymeru jsou ve vodném roztoku schopny interagovat a vést k agregaci a případně až tvorbě gelu. Stejně tak jsou schopny inkorporace do vnitřní části micel, kde se nachází preferované hydrofobní prostředí. Právě interakce palmitových řetězců tohoto hyaluronanu s micelami a s tím související gelace jsou předmětem výzkumu předložené diplomové práce.

Cíle této diplomové práce zahrnují teoretické zpracování dostupných informací o hydrofobizovaném hyaluronanu s konkrétním zaměřením na palmitoyl hyaluronan, seznámení se obecně s principy interakcí hydrofobizovaných biopolymerů a micel a možnostmi přípravy hydrogelů síťováním pomocí těchto interakcí.

Dále se práce zabývá experimentálním ověřením dvou navržených způsobů přípravy hydrogelů palmitoyl hyaluronanu a micel vybraných tenzidů vycházejících ze získaných teoretických poznatků. Zástupci tenzidů jsou decyl glukosid a triton X-100. Oba tenzidy byly cíleně vybrány díky svému neiontovému charakteru, aby průběh gelace nenarušovaly elektrostatické interakce. Pozornost je věnována hlavně decyl glukosidu, který je označován jako biotenzid s předpokladem využití pro medicínské aplikace.

V rámci experimentální části byla provedena charakterizace vzniklých gelů navrženými analytickými metodami reologie a infračervená spektrometrie z jejichž výsledků bylo cílem odvození vlastností připravených gelů a vyhodnocení vhodnosti postupu jejich přípravy zvolenou metodou. Na závěr jsou uvedeny návrhy pro budoucí směřování výzkumu této problematiky.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Biopolymery

Polymer je makromolekulární látka složená z mnohonásobně se opakujících molekul jednoho či více druhů atomů nebo jejich skupin spojených do řetězce v takovém množství, že přidáním nebo odebráním jedné či více jednotek se nezmění fyzikální ani chemické vlastnosti této látky [1].

Pojem biopolymery charakterizují dvě základní kritéria: (1) zdroj surového materiálu a (2) schopnost biodegradability neboli rozkladu pomocí přirozených biologických procesů. Na základě těchto kritérií mohou být biopolymery rozděleny do následujících tří kategorií.

- Biopolymery A, tvořeny obnovitelnými surovinami, biodegradabilní.
- Biopolymery B, tvořeny obnovitelnými surovinami, nejsou biodegradabilní.
- Biopolymery C, vyrobeny z fosilních paliv, biodegradabilní [2].

Biopolymery kategorie A jsou buď produkovány biologickými systémy (zvířata, rostliny, mikroorganismy) nebo vznikají syntézou z materiálů biologického původu. Patří zde veškeré proteiny (např. kolagen, albumin), polysacharidy (např. škrob, chitosan, hyaluronan) a nukleové kyseliny (DNA, RNA), ale i například mikroorganismy produkované polyhydroxyalkanoáty (PHA) nebo synteticky připravená kyselina polymléčná [2].

Do kategorie Biopolymery B mohou být zařazeny polyamidy z ricinového oleje, bio-PVC (biopolyvinyl chloridy) nebo přírodní pryž a jantar [2].

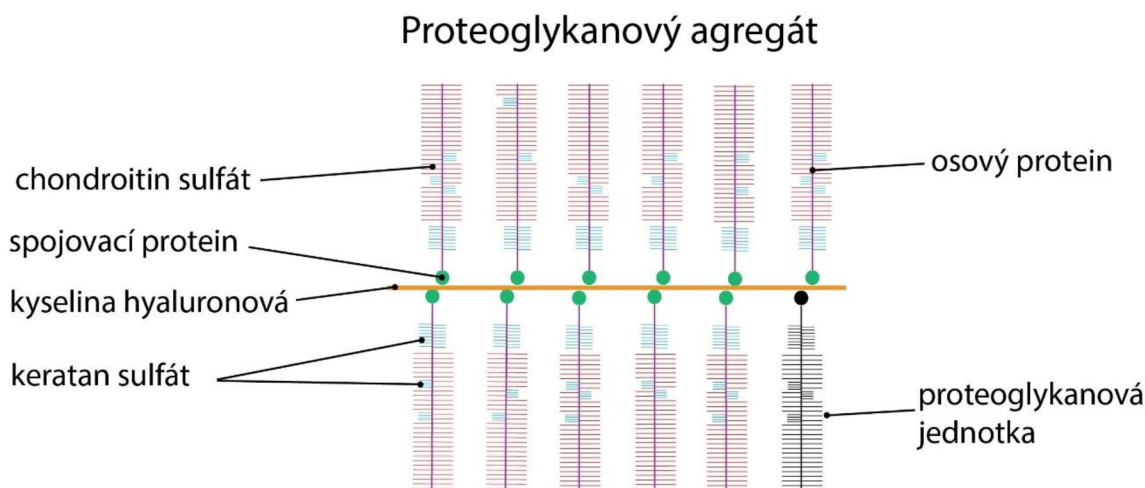
Biopolymery C jsou vyrobeny z ropy nebo zemního plynu a jsou certifikovány jako biodegradabilní a kompostovatelné. Patří zde například polykaprolakton (PCL) a polybutylen sukcinát (PBS) [2], [3].

2.1.1 Polysacharidy

Polysacharidy (spadající do biopolymerů kategorie A) jsou vysokomolekulární látky tvořené monosacharidovými jednotkami spojenými glykosidickou vazbou do dlouhého řetězce. Díky více druhům opakujících se podjednotek, různým typům glykosidické vazby a stupni větvení jsou strukturně rozmanité. V živých organismech plní důležitou zásobní a stavební funkci. Mnoho polysacharidů může také obsahovat necukerné složky anorganického či organického původu, tyto struktury se pak dále nazývají heteroglykosidy. Patří mezi ně například glykosaminoglykany [2], [4].

Glykosaminoglykany (GAG) neboli mukopolysacharidy jsou deriváty složené z disacharidových jednotek hexosaminů (N-acetylglukosamin nebo N-acetylgalaktosamin) a uronových kyselin (glukuronová a iduronová). Patří mezi ně kyselina hyaluronová, chondroitinsulfáty, dermatosulfáty, keratansulfáty a heparansulfáty. Navázáním GAG na takzvané proteinové jádro vznikají strukturně složitější proteoglykany. Zmíněné glykosaminoglykany tvoří až 95 % molekuly proteoglykanů. Zbylé procenta zaujímá bílkovinná složka. Podrobnější struktura je vyobrazena na obrázku 1. Samotné GAG i od nich odvozené proteoglykany jsou důležitými složkami mezibuněčné hmoty a pojivových tkání. Jakožto vysoce hydrofilní molekuly na sebe vážou značné množství vody a zajišťují tak nezbytnou hydrataci tkání [4], [5], [6].

Polysacharidy obecně mají vhodné reologické vlastnosti, schopnost zadržovat vodu a tvořit souvislý film. Tyto a jejich další fyzikální a chemické vlastnosti umožňují široké využití polysacharidů v potravinářství a průmyslu jako emulgátory, stabilizátory a zahušťovadla. Jejich původ z živých organismů navíc ve většině případů zajišťuje netoxický charakter a biodegradabilitu, což jsou jedny z důležitých hodnot udržitelného rozvoje. Polysacharidy jsou proto v dnešní době hojně využívány při vývoji materiálů vhodných pro farmacii a kosmetiku [2].



Obrázek 1: Struktura proteoglykanu [4]

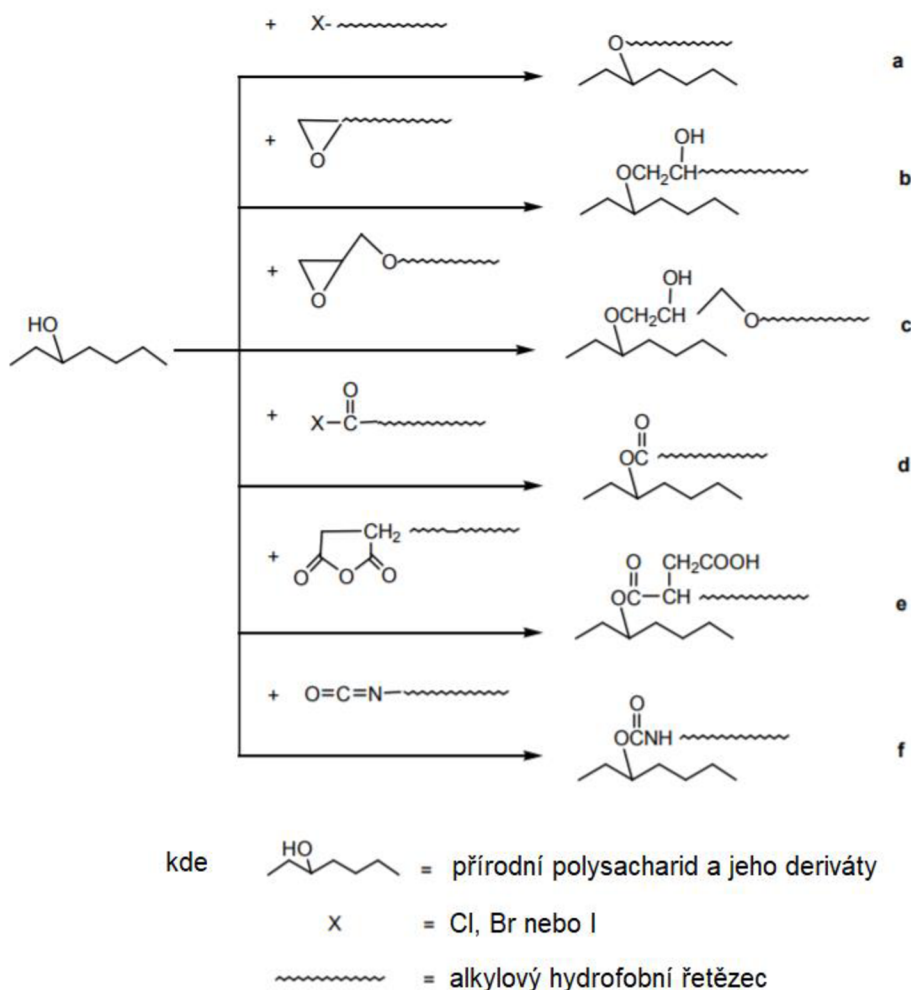
2.1.1.1 Hydrofobizované polysacharidy

Polysacharidy mohou být chemicky nebo fyzikálně modifikovány za účelem změny/vylepšení vlastností nativního materiálu, ke kterým může patřit viskozita, hydrofilní/hydrofobní charakter, povaha polyelektrolytu, schopnost gelace, aktivita biologicky aktivních (např. antikoagulačních) polysacharidů a další. Atraktivní medicínské aplikace selektivně upravených polysacharidů zahrnují přípravu permeabilních membrán, matic pro cílený přenos a řízené uvolňování léčiv, procesy související s obnovením biologického materiálu po použití afinitní chromatografie, elektroforézy či imobilizaci enzymů a buněk [7].

Zatímco hydrofilní kostra činí polysacharid ve vodném prostředí rozpustným, u hydrofobních skupin dochází k intramolekulárním asociacím a tvorbě reversibilních trojrozměrných sítí či micelárních struktur. Tyto asociace jsou mimo jiné místem s vysokou afinitou k interakci s povrchově aktivními látkami (PAL). Bylo dokázáno, že po přidání PAL do roztoku obsahujícího hydrofobizovaný polysacharid, dochází k markantní změně reologických vlastností. Tento jev je však silně závislý na množství přidané PAL. Téma interakce hydrofobizovaných polysacharidů a PAL je dále rozvedeno v kapitole 2.3 Interakce hydrofobizovaných biopolymerů a micel [8].

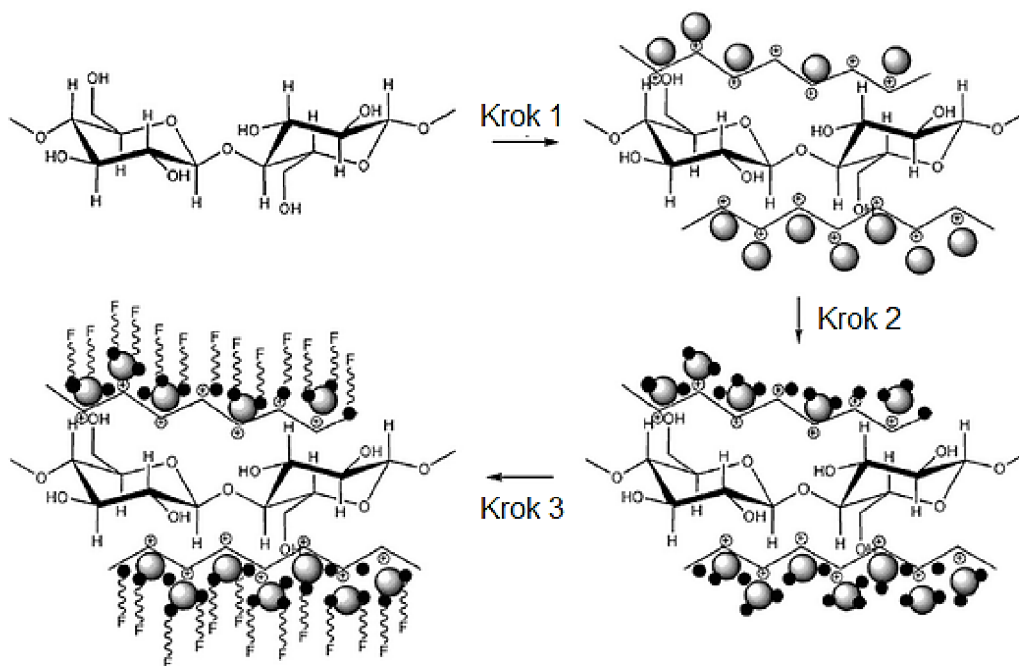
Existuje více způsobů, jakými lze hydrofobně modifikované polysacharidy připravit. U chemické modifikace jde obecně o navázání hydrofobních skupin do postranního řetězce či koncového úseku řetězce hlavního [8]. Příprava polysacharidů s hydrofobním charakterem zahrnuje reakce různých derivátů uhlovodíků. Příklady takových reakcí zobrazuje schéma na obrázku 2, kde s polysacharidem reaguje:

- Halogenderivát a výsledná molekula je ether (Obrázek 2 a).
- Epoxid a výsledná molekula ether (Obrázek 2 b, c).
- Halogenderivát a výsledná molekula ester (Obrázek 2 d).
- Anhydrid a výsledná molekula ester (Obrázek 2 e).
- Isokyanát (Obrázek 2 f) [9].



Obrázek 2: Syntéza hydrofobně modifikovaných polysacharidů za použití různých derivátů uhlovodíků s hydrofobním charakterem [9]

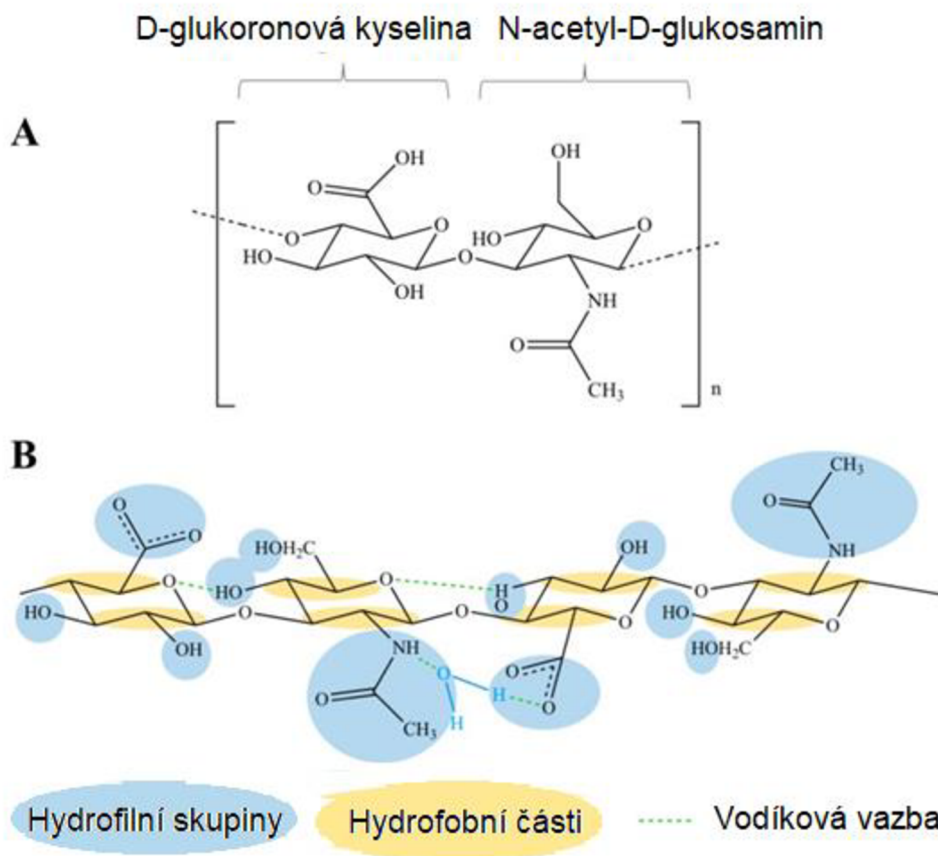
U fyzikálních postupů dochází k povrchové úpravě polysacharidu, a to například použitím studeného plazmatu nebo laseru. Cílem je zvýšení drsnosti povrchu a snížení jeho povrchové energie. Povrch lze taktéž potahovat různými polymery, kde jsou na polysacharid navrstveny další molekuly a upevněny pomocí nevazebných interakcí. Na rozdíl od chemické úpravy zde nedochází ke vzniku kovalentních vazeb. Jedna z technik nekovalentního navázání polymeru je zobrazena na obrázku 3, kde v prvním kroku je použita "layer by layer" depozice polyelektrolytu, následuje sol-gel srážení oxidu křemičitého a poté připojení perfluorovaných molekul [10].



Obrázek 3: Metoda "layer by layer" depozice využitá k modifikaci celulózy [10]

2.1.2 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová (HA) je lineární polysacharid tvořený opakující se disacharidovou jednotkou složenou z kyseliny D-glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu. Chemická struktura této jednotky je zobrazena na obrázku 4 v části A. Jednotky jsou do řetězce spojeny β -1,4-glykosidickou vazbou. Její fyzikální vlastnosti a biologický účinek závisí na molekulární hmotnosti, která může dosahovat až 10^8 Da. Při fyziologickém pH mají karboxylové skupiny aniontový náboj, který může být vyvážen kationty prvků Na, K, Ca a Mg [11]. Ve vodném prostředí tedy nese HA negativní náboj a tvoří silně hydrofilní soli, které se označují jako hyaluronan nebo hyaluronát. Mimo jiné molekuly vody obklopující molekulu HA spojují karboxylové a acetamidové skupiny pomocí vodíkových můstků a stabilizují tak sekundární strukturu do jednořetězcové levotočivé šroubovice. Díky hydrofobním interakcím a mezimolekulárním vodíkovým vazbám dochází zejména u vysokomolekulární HA k agregaci a tvorbě rozšířených síťových struktur. Hydrofobní a hydrofilní části molekuly jsou spolu s vodíkovými vazbami naznačeny na obrázku 4 v části B [11].



Obrázek 4: A. Chemická struktura disacharidové jednotky HA, B. Zobrazení vodíkových vazeb v molekule [11]

2.1.2.1 Biosyntéza a degradace

Kyselina hyaluronová patří do skupiny GAG, které již byly zmíněny v textu výše. Na rozdíl od ostatních GAG neprobíhá buněčná syntéza HA v Golgiho aparátu, ale pomocí integrálních membránových proteinů zvaných hyaluronan syntázy (HAS1, HAS2 a HAS3). Tyto enzymy tvoří dlouhé polymerní řetězce střídavým připojováním kyseliny glukuronové a N-acetylglukosaminu v jejich aktivované formě obsahující molekulu UDP. Naopak degradace je u savců zajištěna působením tří enzymů: hyaluronidáza, β -D-glukuronidáza a β -N-acetylhexosaminidáza [12]. V těle se tyto enzymy nachází v různých formách, intracelulárně, ale i v séru. V prvním kroku štěpí hyaluronidáza molekuly HA o vysoké molekulové hmotnosti na menší oligosacharidy, které jsou dále degradovány účinkem dalších dvou zmíněných enzymů. Hydrolýzou HA, jakožto hlavní složky mezitkáňové bariéry, snižuje hyaluronidáza její viskozitu a tím zvyšuje permeabilitu tkáně. Z tohoto důvodu se v medicíně využívá ve spojení s některými léky, aby došlo k urychlení jejich dodání a disperze. Některé bakterie jako například *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes et pneumoniae* a *Clostridium perfringens* produkují hyázu za účelem zvýšení mobility v tělních tkáních a zároveň jako antigenní maskování před účinkem fagocytózy buňkami imunitního systému [12].

2.1.2.2 Biologický význam a mechanismus účinku

Hyaluronan je v lidském těle téměř všudypřítomný a je významnou součástí synoviální tekutiny a extracelulární matrice (ECM). Jakožto vysoce hydrofobická molekula hraje důležitou roli v zajištění hydratace tkání a osmotické rovnováhy. Zajímavostí je, že jeho podstatné množství se kromě ECM měkkých pojivových tkání a kůže nachází také v očním sklivci a pupeční šňůře. Navzdory jednotné a jednoduché primární struktuře mají polymery HA mimořádně rozsáhlé a mnohdy protichůdné biologické funkce v závislosti na velikosti molekuly. Zatímco vysokomolekulární HA má imunosupresivní a anti angiogenní vlastnosti, středně velké molekuly obsahující 25–50 disacharidových jednotek jsou zánětlivé, imunostimulační a vysoce angiogenní, tj. podporují tvorbu/remodelaci krevní kapilární sítě. V kůži se význam HA mimo její hydrataci zaměřuje na zachytávání volných radikálů vznikajících působením UV záření, které způsobují kožním buňkám oxidační stres, případně poškození jejich genetického materiálu a následnou degeneraci a zánik. V chrupavce funguje HA jako strukturální komponent ECM, konkrétně tvoří pomocí specifických interakcí HA-bílkovina agregací centrum velkého chondroitinsulfátového proteoglykanu agrekanu [12], [13]. Agrekan získává díky této interakci gelovou strukturu a zajišťuje tak chrupavce důležitou odolnost v tlaku. Jeho schopnost vázat hyaluronan hraje důležitou roli při zprostředkování interakcí chondrocyt-chondrocyt a chondrocyt-ECM [14]. Samovolné molekuly vysokomolekulární HA vyskytující se v synoviální tekutině poskytují nezbytné promazání kloubů, tlumí nárazy, snižují tření pohyblivých se kostí a celkové opotřebení kloubu. U zánětlivých stavů při artritických onemocněních je vysokomolekulární HA degradován reaktivními formami kyslíku a ztrácí potřebnou viskozitu k promazání kloubu a tlumení nárazů, což vede k zhoršení pohyblivosti a bolesti kloubů [13].

Kromě pasivní funkce strukturální molekuly, působí HA také jako signální molekula interagující s povrchovými receptory buněk a má vliv na jejich proliferaci, diferenciaci, migraci a celkovou regeneraci tkání. Hlavním receptorem HA je multifunkční transmembránový glykoprotein CD44, který je součástí téměř všech druhů lidských buněk a existuje v mnoha izoformách [11]. Mimo HA může CD44 interagovat také s růstovými faktory, cytokiny a ECM proteiny. Uvnitř buňky je CD44 spojen s cytoskeletem a umožňuje tak propojení HA právě se strukturou cytoskeletu. Interakce HA-CD44 je součástí mnoha intracelulárních signálních drah řídících výše zmíněné procesy a vlastnosti buněk a hraje důležitou roli při zánětu a hojení ran. V případě abnormální aktivity těchto signálních kaskád může naopak dojít k maligní transformaci buněk a tvorbě nádoru, jak je například známo u rakoviny slinivky břišní, prsu či plic [11].

2.1.2.3 Produkce a izolace HA

Poprvé byl hyaluronan izolován v roce 1934 z hovězí oční bulvy. Na konci 50. let 20. století následovalo první medicínské využití HA (izolovaného z pupeční šňůry) jako náhrada sklivce při operaci očí. Mezi další biologické tkáně, ze kterých byla HA extrahována patří kohoutí hřebínky a žraločí kůže. Jelikož se HA v biologickém materiálu nachází většinou v komplexu s jinými biopolymery vyžaduje izolace vedoucí k získání čisté molekuly mnoho separačních kroků, a přestože došlo během posledních let k jejich zdokonalení, výsledkem byl vždy polydisperzní a neuspokojivý výtěžek. Navíc existuje riziko kontaminace proteiny, které by mohly způsobit imunitní reakci, nebo nukleovými kyselinami, priony či viry, které mohou vést k přenosu infekčních chorob. Nehledě na to, že jde také o vysoce nákladný proces [11], [15].

Díky jedinečným vlastnostem (biokompatibilita/biodegradabilita, mukoadhezivita, viskoelastičita, hydroskopičnost a jiné) a účinkům (protizánětlivé a imunosupresivní) roste zájem o aplikaci HA v různých směrech exponenciálním způsobem a stejně tak její spotřeba. Cílem dnešní doby, a zároveň i velkou výzvou pro výzkum, je optimalizace výrobních procesů HA za účelem získání produktů, které budou splňovat vysoké nároky na čistotu a bezpečnost, dostatečnou výtěžnost a zároveň budou dosažitelné z hlediska nákladů [11], [15].

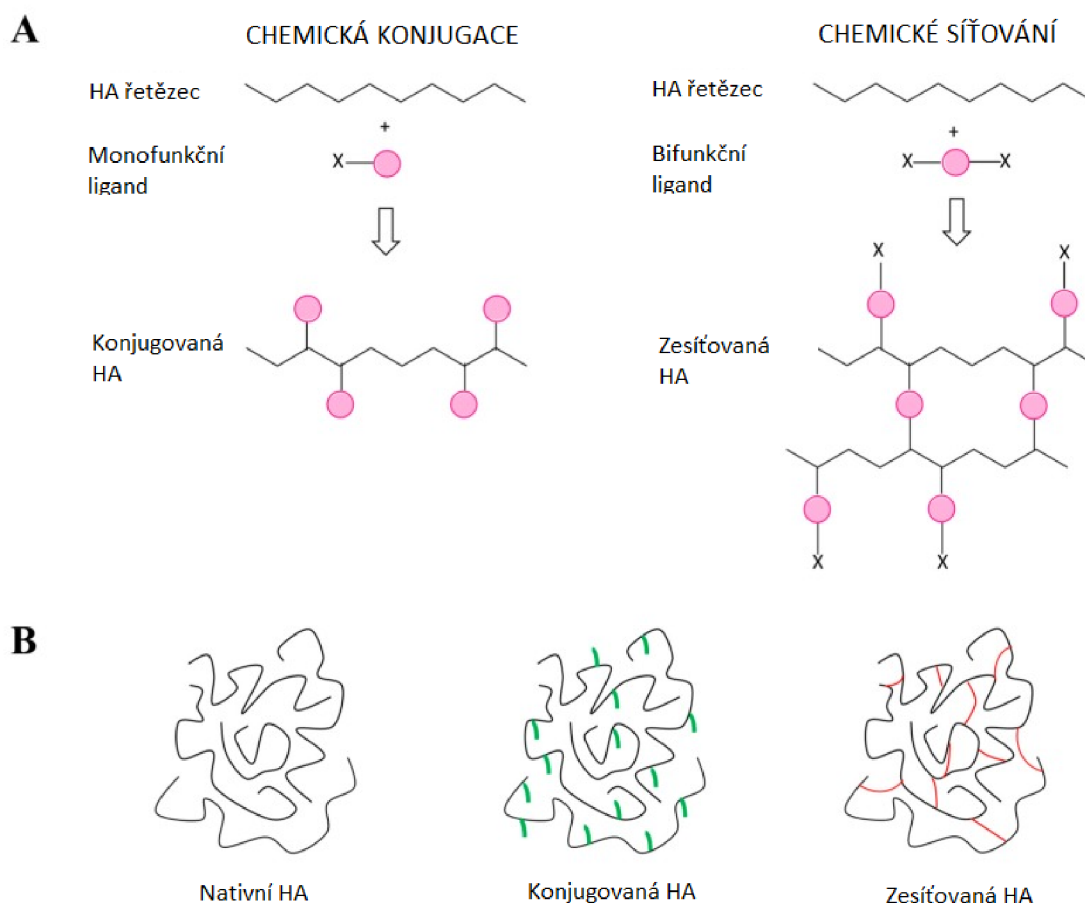
V současnosti je komerční produkce HA, kromě udstupující izolace ze zvířecích tkání, pokryta zejména biotechnologicky mikrobiální fermentací. Prvními bakteriemi, které byly k produkci využívány, jsou streptokoky, konkrétně například kmen *Streptococcus equi*. Optimální podmínky fermentace pro dosažení vysokomolekulární HA o hodnotě $3,5\text{--}3,9\cdot 10^6$ Da zahrnují teplotu 37 °C, pH 7 a přítomnost laktózy nebo sacharózy. Aplikaci HA v medicíně získanou touto metodou umožňuje její konzervovanost neboli vysoká mezidruhová podobnost. Nicméně jelikož jsou tyto bakterie producenty řady toxinů, přednost dostávají jiné, rekombinantně upravené kmeny bakterií (*Bacillus*, *Agrobacterium*, *E. coli*, *Lactococcus*). Ani ty však v porovnání s metodou izolace nejsou o moc výhodnější. Při fermentaci zvyšuje HA viskozitu média, což ve velkých objemech vede k nedostatečnému promíchávání a nízkému přenosu kyslíku. Často je tedy obtížné dosáhnout vyššího výtěžku, než je 6–7 g/l. Velkou výzvou v tom případě zůstává i polydisperzita, které je vysoce závislá na podmínkách kultivace. A stejně tak jako u živočišných tkání, i u bakteriální buňky je možná kontaminace vyvolávající imunitní reakci. Proto je současný vývoj soustředěn na možnost nebuněčného produkčního systému (*in vitro*) za využití izolovaných HAS enzymů. Tímto způsobem lze produkovat vysokomolekulární HA s nízkou polydisperzitou, nicméně výtěžek zůstává velmi nízký [11], [15].

2.1.3 Modifikace kyseliny hyaluronové

Nativní HA má od určité koncentrace schopnost pomocí fyzikálních interakcí samovolně tvořit gelové struktury, které by mohly být díky své biokompatibilitě, biodegradabilitě a afinitě k receptoru CD44 ideálním materiálem nosičových systémů zejména pro léky na rakovinu. Nevýhodou nativních sítí je však jejich nízká stabilita. Ve vodném prostředí se rychle rozpouštějí a v prostředí fyziologickém jsou vysoce citlivé vůči enzymu hyaluronidáza. V lidském těle je přibližně jedna třetina celkového obsahu hyaluronanu denně degradována a přeformována. Plazmatický poločas nativní HA je u zdravých jedinců je 2,5–5,5 minut [16]. Vylepšení těchto nedostatků pro specifické potřeby a aplikace umožňují chemické modifikace struktury HA. Zároveň se ale při navrhování nových syntetických derivátů dbá zejména na zachování pozitivních vlastností přirozené formy HA jako je již zmíněná biokompatibilita, biodegradabilita a schopnost mukoadheze [11]. Hydrofobní modifikace umožňují v závislosti na stupni substituce úpravu hydrofilního charakteru a rychlosti degradace. Například připojení aminokyselin do struktury HA značně zvyšuje rezistenci vůči enzymatické degradaci. Důkazem toho je studie porovnávající eliminační poločas nativní a modifikované HA v nádorové tkáni. Zatímco distribuce byla po 5 min pro obě látky téměř identická, k eliminaci nativní HA došlo přibližně v intervalu 8 hodin, zatímco modifikovaná HA byla v nádorové tkáni identifikovatelná ve vysoké koncentraci i po uplynutí 48 hodin [16].

Chemické modifikace primárně zahrnují dvě aktivní místa molekuly, a to hydroxylové a karboxylové funkční skupiny, které umožňují připojení lipidů, léčiv, polymerů či dalších bioaktivních molekul [16]. Kromě toho lze dále provést chemickou modifikaci aminoskupiny, kterou lze aktivovat pomocí deacetylace N-acetylových skupin. Všechny tři tyto funkční skupiny lze modifikovat pomocí dvou metod, které jsou založeny na stejných chemických reakcích, ale vedou k různým produktům. Tyto reakce se nazývají konjugace a síťování. Konjugace spočívá v navázání monofunkční molekuly do jednoho řetězce pomocí jedné

chemické vazby, zatímco k síťování se využívají polyfunkční sloučeniny za účelem propojení více řetězců nativní nebo konjugované HA dvěma nebo více kovalentními vazbami. Obě metody, včetně konečné struktury výsledných derivátů, jsou schematicky zobrazené na obrázku 5 a jsou obecně využívány k různým účelům. Konjugace umožňuje modifikaci HA různými molekulami s cílem získání nosičových systémů pro cílený přenos léčiv s vylepšenými vlastnostmi a ohledem na nativní molekulu. Zatímco účelem síťování je zlepšení mechanických a reologických vlastností a snížení rychlosti degradace ve srovnání s nativní HA. Síťováním vznikají deriváty s delší časovou odolností v místě aplikace a lepším uvolňováním. Tyto metody modifikace lze využít například i s bioaktivními molekulami pro aplikace zahrnující tkáňové inženýrství a vývoj nosičových systémů [11].



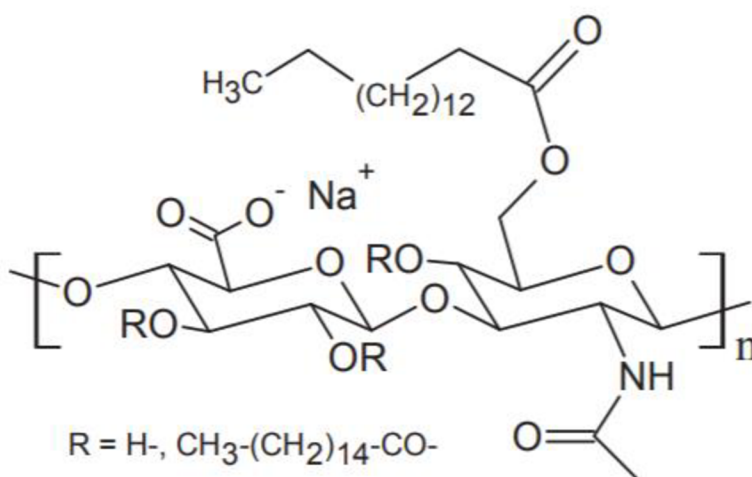
Obrázek 5: Modifikace pomocí konjugace a síťování, B. Nativní, konjugovaná a zesíťovaná struktura HA [11]

Obecně se chemická modifikace HA provádí v kapalně fázi. Jelikož je ale HA silně hydrofilní, vycházejí některé reakce z jejich konjugátů. Ty jsou však závislé na hodnotě pH roztoku a vyžadují kyselé nebo alkalické prostředí, které však nemůže být příliš silné, aby nedošlo k degradaci HA struktury. Pokud jsou použité reagenty citlivé na hydrolýzu, provádí se reakce v bezvodých organických rozpouštědlech jako je dimethylsulfoxid (DMSO) nebo dimethylformamid (DMF) [11]. K tomu je však potřeba převést nativní HA na tetrabutylamoniovou (TBA) sůl, která je rozpustná v organickém prostředí a zvyšuje se tím reakční čas a náklady. Další nevýhodou použití organických rozpouštědel jsou příliš dlouhé procesy čištění. Pro výrobu produktů k injekčnímu podání, implantátových nosičů, systému s přenosem léčiv a 3D struktur pro enkapsulaci živých buněk je potřeba zajistit efektivní, levné a bezpečné metody vývoje HA derivátů o vysoké kvalitě a čistotě [11].

K charakterizaci derivátů lze uplatnit různé metody v závislosti na zkoumaných vlastnostech. K určení stupně substituce je možné využít spektroskopické metody zahrnující infračervenou spektroskopii s Fourierovou transformací (FTIR) nebo nukleární magnetickou rezonanci (NMR). Hodnocení mechanických vlastností obsahuje charakterizaci mikrostruktury, reologii, schopnost botnání a zadržování vody, vyhodnocení stability v závislosti na pH, teplotě a čase. Biokompatibilitu lze testovat přímo na živých buňkách nebo pomocí imunochemických metod [16].

2.1.3.1 Palmitoyl hyaluronan

Alkyl deriváty HA hydrofobního charakteru lze obecně připravit metodou acylace, ke které se využívají zejména anhydridy mastných kyselin, jejich chloridy nebo kyseliny samotné v přítomnosti katalyzátoru. Palmitoyl hyaluronan, jehož struktura je zobrazena na obrázku 6, tedy vzniká navázáním alkylového řetězce kyseliny palmitové na hydroxylové skupiny HA.



Obrázek 6: Struktura derivátu palmitoyl hyaluronanu [18]

Stupeň substituce je závislý na podmínkách reakce. Rozpustnost tohoto biopolymeru ovlivňují dva parametry: a) molekulová hmotnost, b) stupeň substituce. S rostoucí hodnotou těchto parametrů rozpustnost ve vodě klesá. Testy biokompatibility provedené na myších buněčných liniích nevykazují vliv na životaschopnost buněk. Výrobce Contipro uvádí možné využití tohoto derivátu k biomedicínským aplikacím, jako je dodání léčiv, membrány a nosiče na bázi mikrovláken a zajištění anti-adheze membrán pro vnitřní chirurgii [17], [18].

2.1.4 Využití HA a jejich derivátů

Jak již bylo zmíněno, nativní HA má díky svým unikátním biologickým, fyzikálním a chemickým vlastnostem široké možnosti využití v medicíně, farmacii, potravinářství a kosmetice. To samé se týká i vylepšených derivátů této látky. Jednou z možných aplikací jsou systémy pro přenos léčiv. Ať už samostatně nebo v kombinaci s jinými látkami vznikají proléčiva, povrchově upravené liposomy, nanočástice, hydrogely a jiné [11]. Cílem konjugace farmakologicky aktivních látek na HA je příprava proléku s vyšší stabilitou a terapeutickou účinností ve srovnání s volně podaným léčivem. Účinku se dosáhne ve chvíli, kdy dojde k porušení vazby spojující lék s HA, v ideálním případě v konkrétním cílovém bodě. Na HA mohou být navázány látky s místním i systémovým účinkem. Například s antidiabetickými peptidy jako exendin

vykazuje derivát při testování na myších prodloužený biologický poločas a hypoglykemický účinek a zlepšenou inzulinotropní aktivitu oproti volné formě léčiva. Konjugací s fosfolipidy lze docílit přípravy povrchově modifikovaných liposomů [11]. Chemickou modifikací lze provést buď před formulací samotných liposomů, nebo i po ní na vnějším obalu. Na povrch liposomu lze kromě toho navázat HA i nekovalentně pomocí iontových interakcí nebo technikou hydratace lipidového filmu. Takto upravené liposomy vykazují slibné vlastnosti pro přenos léčiv. Zvyšují stabilitu léčiva v krevním řečišti, prodlužují jejich biologický poločas, redukuje systémovou toxicitu, zvyšují jejich prostupnost přes tkáň a zajišťují prodloužené uvolňování. Potenciál mají zejména v protirakovinné terapii, kde by mohly zajistit bezpečné a účinné dodání léčiva do místa potřeby [11].

Výše zmíněné systémy mohou najít své uplatnění v různých oblastech medicíny. Nadměrná exprese CD44 v nádorové tkáni a fakt, že jde o přirozený receptor HA, znamená potenciál pro aktivní cílení léčiv proti rakovině. Nanonosičové systémy lipidového a polymerního charakteru nebo léčiva navázané přímo na řetězec HA se zaměřením konkrétně proti CD44 jsou předmětem zkoumání. Schopnost rozlišení nádorových a zdravých buněk slibuje účinnější a přesnější usmrcení nádorové tkáně a zároveň minimalizaci vedlejších účinků a toxicity mimo cílovou oblast [19].

V dermatologii může být HA a její deriváty ve formě obvazů, filmů nebo hydrogelů přínosné zejména při léčbě podrážděné pokožky, hojení ran, vředů a popálenin. S procesem stárnutí ztrácí kůže hydrataci, pružnost, objem a přibývají vrásky. HA se proto mimo jiné v posledních letech široce využívá k přípravě dermálních výplní, které po injekčním zavedení do kůže nebo pod ni opravují nedokonalosti pleti [11]. Podobný účel mají i kosmetické přípravky obsahující HA nebo její deriváty, a navíc díky schopnosti odstraňovat volné radikály i částečně chrání pokožku před škodlivým účinkem UV záření. Jelikož je HA taktéž přirozenou součástí oka, i zde se hojně využívá při léčbě onemocnění, chirurgických zákrocích nebo nošení očních čoček. Je součástí mnoha očních přípravků a kapek. Využití derivátů HA má v tomto směru taktéž potenciál, zejména pro svou větší odolnost k degradaci, nicméně tyto látky jsou prozatím teprve ve fázi výzkumu [11].

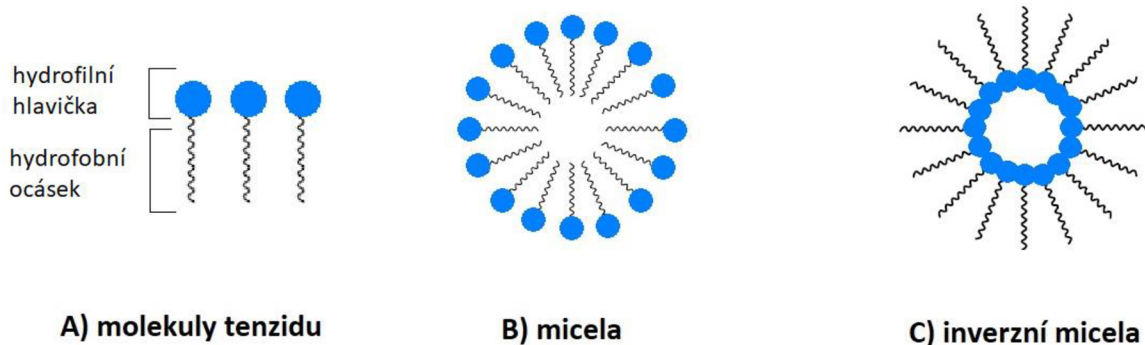
V případě onemocnění kloubů, jako je například artritida, je HA podána intraartikulární injekcí (podání přímo do kloubu), kde mimo dočasného obnovení viskozity synoviální tekutiny (HA je v těle degradována do 24 hodin) pozitivně podporuje syntézu nové HA synoviálními buňkami, stimuluje proliferaci chondrocytů a snižuje degradaci chrupavky. Jako látky podporující viskozitu kloubní tekutiny jsou s delším biologickým poločasem a tím i terapeutickým účinkem aplikovány některé deriváty HA [11].

Vysokomolekulární HA má v těle příznivý vliv na správnou funkci horních i dolních dýchacích cest a své místo má tedy i při léčbě zánětlivých onemocnění, alergické rýmě, astmatu a dalších [11].

2.2 Tenzidy

Tenzidy nebo taky povrchově aktivní látky (PAL) jsou sloučeniny organického původu, které jsou schopny se již při nízkých koncentracích hromadit (adsorbovat) na fázovém rozhraní a snižovat tak povrchové napětí soustavy kapalina-vzduch nebo mezifázové napětí v soustavách obsahující kapaliny/pevné látky/vzduch. Mezifázové/povrchové napětí udává množství práce, které je potřeba k zvětšení plochy rozhraní [20], [21]. PAL jsou specifické svým amfifilním charakterem, tj. část molekuly je lyofilní (rozpuštěná v dané kapalině) a druhá část lyofobní (nerozpuštěná v dané kapalině). Ve vztahu k vodě lze potom části označit jako hydrofilní a hydrofobní, jak je uvedeno i na obrázku 7. V soustavě olej ve vodě (za běžných podmínek dvě vzájemně nemísitelné fáze) se PAL adsorbuje na rozhraní hydrofilní hlavičkou ve vodné části a hydrofobním ocáskem v oleji, dojde tak ke snížení mezifázového napětí, což

umožňuje rozptýlení oleje ve vodě ve formě malých kapek a vzniká takzvaná emulze. Svou adsorpcí zamezují PAL tendenci shlukování kapek do větších celků a oddělení obou fází. Jinak řečeno emulze stabilizují a jsou proto v praxi označovány jako emulgátory či stabilizátory [20], [21].



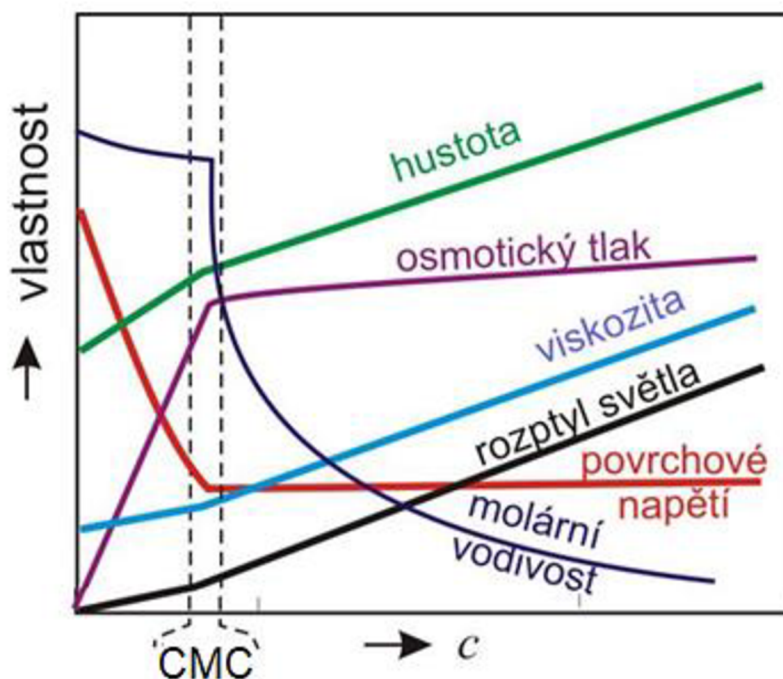
Obrázek 7: A) Struktura molekuly tenzidu, B) uspořádání micely v polárním prostředí (například voda), C) uspořádání inverzní micely v nepolárním prostředí (například olej)

Hydrofobní část molekuly je tvořena alkylovým řetězcem o délce 8–18 atomů uhlíku, který může být lineární i větvený. Na jednom z konců řetězce je navázaná hydrofilní hlavička. Délka řetězce, stupeň větvení a umístění hydrofilní části jsou parametry určující fyzikálně-chemické vlastnosti PAL. Podle iontového charakteru polární části molekuly lze tenzidy rozdělit na:

- Iontové
 - Aniontové ($-\text{COO}^-$, $-\text{SO}_4^{2-}$, $-\text{SO}_3^-$, $-\text{PO}_4^{2-}$)
 - Kationtové ($-\text{NH}_3^+$, $-\text{NH}_2^+$)
 - Zwitteriontové ($-\text{COO}^-$, $-\text{NH}_3^+$)
- Neiontové [20].

Další charakteristickou vlastností tenzidů je, kromě jejich schopnosti adsorpce na fázovém rozhraní, specifická schopnost agregace. Koncentrace, při které dochází ke vzniku takzvaných micel, se nazývá kritická micelární koncentrace (CMC). Jde o mechanismus, při kterém se molekuly shluknou tak, aby zabránily lyofobním skupinám kontaktu s rozpouštědlem a došlo ke snížení volné energie systému [20]. Uspořádání micely je tedy dáno povahou rozpouštědla, v polárním prostředí jsou s ním v kontaktu hydrofilní hlavičky, kdežto v nepolárním prostředí zaujímá micela inverzní strukturu, kde jsou v kontaktu s rozpouštědlem hydrofobní části. Obě struktury jsou nastíněny na obrázku 7. Molekuly PAL mají ve formě micel odlišné vlastnosti v porovnání s molekulami osamocenými. Po dosažení CMC lze tedy pozorovat fyzikální změny roztoku. Pouze volné molekuly PAL jsou schopny snižovat povrchové/mezifázové napětí a jevy jako smáčení či pění jsou na koncentraci těchto molekul závislé. Po dosažení CMC dochází k zastavení poklesu povrchového napětí a nárůstu osmotického tlaku a hodnoty těchto parametrů zůstávají konstantní. Zatímco hodnota rozptylu světla díky tvorbě micel narůstá, hodnota molární vodivosti klesá. Uvedené vlastnosti jsou spolu s dalšími graficky zobrazeny na obrázku 8 [20].

Stejně tak jako PAL, jsou i amfifilní kopolymery schopny po dosažení své CMC tvořit micely. Průměr těchto micel se pohybuje v rozmezí od několika desítek po stovky nanometrů. Oproti PAL micelám mají polymerní micely vyšší stabilitu, pomalejší disociaci a nízké hodnoty CMC [20].



Obrázek 8: Změna fyzikálních vlastností roztoku po dosažení CMC tenzidu [22]

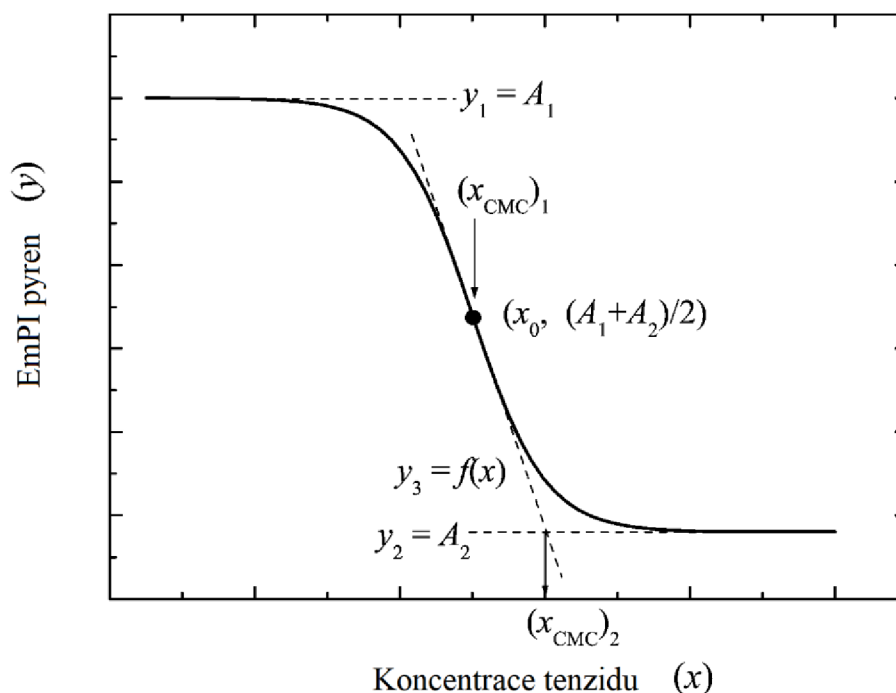
2.2.1 Stanovení kritické micelární koncentrace

Výrazné změny některých fyzikálních vlastností roztoků při dosažení CMC lze využít u řady metod ke stanovení hodnoty této koncentrace. Mezi nejběžnější metody, které dokážou změnu některé z vlastností zaznamenat a změřit, lze zahrnout měření vodivosti, povrchového napětí a fluorescenční spektroskopii, ale lze využít i kapilární elektroforézu, IR spektrometrii, NMR, měření solubilizace barviva a jiné [23].

PAL jsou schopny snižovat mezifázové napětí do dosažení kompletní saturace povrchu. Poté dochází k jejich shlukování v roztoku a hodnota napětí se dále nemění. Bod zlomu v závislosti napětí na koncentraci tedy udává hodnotu CMC. Metodu měření povrchového napětí lze obecně využít pro všechny druhy tenzidů [24].

Omezení pouze na iontové tenzidy má metoda pro stanovení vodivosti. Iontové PAL se pod hodnotou CMC chovají jako silný elektrolyt, jsou plně disociovány a vedou elektrický proud. Při tvorbě micel se množství nabitých částic schopných přenosu náboje sníží, což se projeví snížením vodivosti. Z grafického vyjádření závislosti vodivosti na koncentraci lze opět odečíst hodnotu CMC v bodě zlomu [24].

Další běžnou metodou ke stanovení CMC je fluorescenční spektroskopie s použitím fluorescenčního barviva. Nejčastěji využívaný je pyren, organická sloučenina s nízkou rozpustností ve vodě. Intenzita emisního spektra pyrenu je závislá na polaritě okolního prostředí, emisní polaritní index EmPI klesá s poklesem polarity rozpouštědla. Hodnota tohoto parametru tedy s rostoucí koncentrací PAL klesá. Nad CMC dochází k zabudování pyrenu do struktury micel a hodnota zůstává téměř konstantní. Grafické vyjádření EmPI jako funkce koncentrace PAL vykazuje sigmoidální charakter, jak je vidět i na obrázku 9 a lze jej využít ke stanovení CMC [25].



Obrázek 9: Závislost emisního polaritního indexu EmPI pyrenu na koncentraci tenzidu [25]

2.2.2 Vliv tenzidů na absorpci léčiva

Povrchově aktivní látky mohou mít značný vliv na absorpci léčiva. Svým účinkem mohou zvyšovat či snižovat jeho prostup skrz biologickou membránu a dále mohou ovlivňovat i jeho biologickou aktivitu díky působení na receptory vázající léčivo nebo enzymy zodpovědné za jeho degradaci [21]. V gastrointestinálním traktu může narušení membrány vést k usnadnění prostupnosti. Pokud však dojde k agregaci PAL a inkorporaci léčiva, které je jinak v gastrointestinální tekutině snadno rozpustné, do micel, prostupnost je naopak inhibována. Příznivý efekt na absorpci má inkorporace do micel naopak u léčiv se špatnou rozpustností, protože je absorpce na rychlosti rozpouštění závislá. Uvolňování takových léčiv z tablet či tvrdých želatinových tobolek lze urychlit přidáním PAL do jejich obsahu [21].

Snížení mezifázového napětí účinkem PAL přispívá k rychlejší rozpustnosti pevných lékových forem, a tedy i k následné absorpci, nejen v gastrointestinálním traktu. Absorpce jodidu sodného, obsaženého v čípku pro rektální podání, byla v přítomnosti PAL rychlejší a zdá se i přímo úměrná míře snížení mezifázového napětí. PAL navíc narušuje hlenovou vrstvu a lépe tak zpřístupňuje rektální membránu pro přestup léčiva touto bariérou. Účinek PAL je však závislý na povaze léčiva. V některých případech, jako například u fenolových látek, může docházet k tvorbě komplexu PAL-léčivo, což míru absorpce snižuje. PAL neiontové povahy podobné polyethylenglykolům lze využít jako čípkové základy pro léčiva rozpustná jak ve vodě, tak v oleji [21].

I u transdermálního způsobu podání léčiva mají PAL svůj význam. Penetraci látek přes kůži brzdí bariérová vrstva pokožky, která tělo chrání před průnikem toxinů, bakterií a nadměrnou ztrátou vody. Narušením a solubilizací lipidové vrstvy pokožky a interakcí s keratinem zvyšují iontové PAL transdermální absorpci léčiv a usnadňují jejich průchod do systémového oběhu. To, zda je účinek žádoucí či nežádoucí, závisí na typu PAL, její koncentraci, typu a délce expozice a individuálnímu stavu pokožky [26].

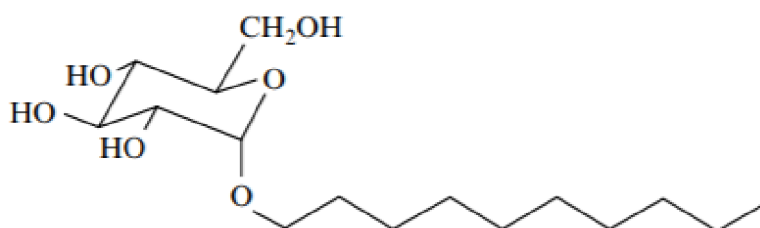
2.2.3 Biotenzidy

Povrchově aktivní látky přírodního původu zahrnují amfifilní molekuly z rostlinných, živočišných a mikrobiálních zdrojů. Patří mezi ně glykolipidy, lipoproteiny, komplexy polysacharidů s proteiny a fosfolipidy. V organismech jsou kromě stavebních jednotek biomembrán, stejně tak jako v průmyslu, využívány ke zlepšení rozpustnosti, jako emulgátory, k úpravě povrchů apod. [27]. K dodržení označení „biotenzid“ by měly k získání produktu vést separační metody bez použití organické syntézy. Příkladem zcela přírodního tenzidu může být fosfolipid lecitin, který lze izolovat z vaječného žloutku či sóji. Jako biotenzidy však mohou být označeny i PAL, kde pouze jedna část (hydrofobní nebo hydrofilní) je zcela přírodního původu. Patří mezi ně například alkyglukosidy složené ze sacharidové jednotky přírodního původu a mastného alkoholu, který se připravuje převážně z rostlinných olejů transesterifikací triglyceridů a následnou redukcí metylesteru na alkohol [27].

Přírodní PAL byly objeveny koncem 60. let minulého století při výzkumu uhlovodíkové fermentace a byla jim věnována pozornost jako alternativním látkám k syntetickým tenzidům, oproti kterým jsou méně toxické a lépe rozložitelné, ale taktéž vykazují biologickou aktivitu. A právě fermentace je nejčastější metoda využívaná k výrobě biotenzidů [28]. Bakterie mohou vytvářet PAL nízkomolekulární, které snižují povrchové/mezifázové napětí, nebo vysokomolekulární schopné se pevně vázat k povrchu. Mikrobiální původ a způsob syntézy charakterizuje jednotlivé molekuly a umožňuje vznik rozmanitých struktur s variabilními vlastnostmi [29].

2.2.3.1 Decyl glukosid

Decyl glukosid je neionogenní biotenzid řadící se do skupiny již zmíněných alkyl glukosidů. Vzniká kondenzací mastného alkoholu dekanolu a glukózy. Alkyl glykosidy obecně mohou být zcela odvozeny z přírodních obnovitelných zdrojů, pokud mastné alkoholy pocházejí z kokosového či palmového oleje a glukóza nebo příslušný polysacharid z kukuřičného, bramborového nebo obilného škrobu. Struktura molekuly je uvedena na obrázku 10. Decyl glukosid je považován za nedráždivou sloučeninu, nevysušující pokožku a využívá se v zejména kosmetice do přípravků na pleť a vlasy, opalovacích krémů, dezinfekčních prostředků aj. Byl posouzen i jako vhodný pro lidi s citlivou pokožkou a děti. Nicméně od roku 2003 jsou alkyl glykosidy s rostoucími případy alergie jako vedlejších účinků považovány za potenciální kožní alergeny způsobující kontaktní dermatitidu [30], [31].

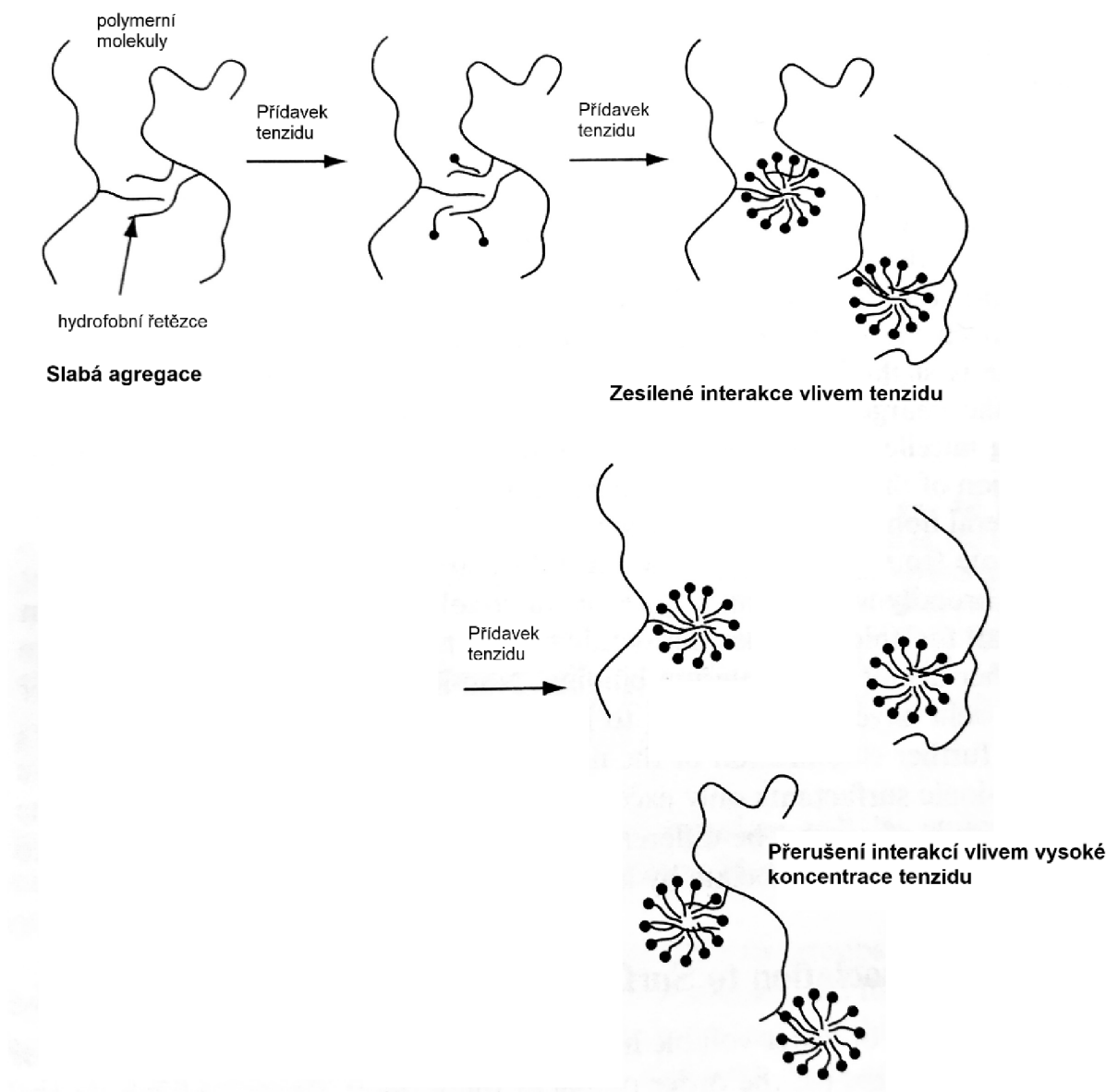


Obrázek 10: Struktura decyl glukosidu [20]

2.3 Interakce hydrofobizovaných biopolymerů a micel

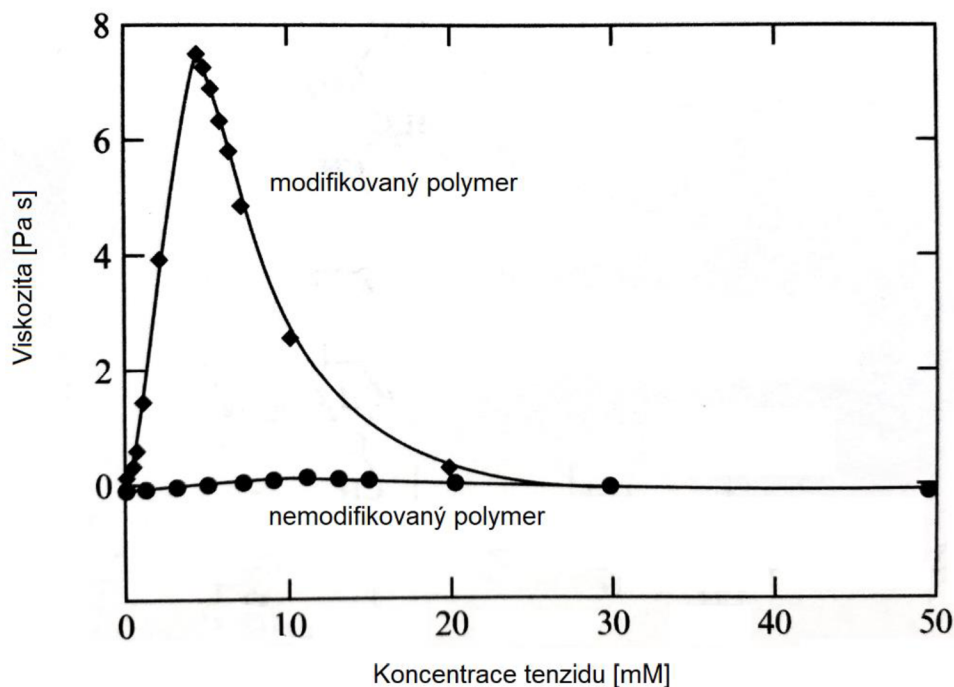
Navázáním hydrofobních skupin do struktury polysacharidu vede k vytvoření amfifilní molekuly, která je následně schopna samovolné asociace pomocí hydrofobních interakcí. Dochází tak ke slabé agregaci a nárůstu viskozity. Agregaci, a tím zlepšení reologických vlastností, lze však ještě zesílit přidáním povrchově aktivní látky, která má tendenci interagovat

s hydrofobními skupinami polysacharidu s stabilizovat tak asociace mezi jeho řetězci. Nicméně tento efekt je silně závislý na poměru koncentrací použitého tenzidu a polysacharidu. Tato závislost je pěkně znázorněna na obrázku 11, kde při vhodném poměru koncentrací vytvořené micely tenzidu upevňují spojení řetězců a umožňují tak vznik sítě. A naopak v případě nadměrného množství micel dochází k blokaci hydrofobních skupin a k síťování nedochází [20].



Obrázek 11: Způsob interakce hydrofobně modifikovaného polysacharidu a micel [20]

Tento fakt dokazuje i grafické vyjádření závislosti viskozity na koncentraci tenzidu na obrázku 12. Přídavek dodecylsulfátu sodného (SDS) do roztoku hydrofobně modifikované ethyl(hydroxyhyethyl)celulózy způsobil nejprve vysoký nárůst viskozity, což dokazuje schopnost interakcí a síťování, a hned následně její strmý pokles, jelikož nadměrné množství micel poruší vazby a zabraňuje vzájemnému navázání řetězců. Tímto způsobem mohou být připraveny hydrogelové struktury, které mají velký potenciál v medicíně jako nosičové systémy léčiv či v tkáňovém inženýrství pro kultivaci buněk nebo případně jako kosmetické základy [20].



Obrázek 12: Grafické vyjádření změny viskozity roztoku v závislosti na koncentraci tenzidu [20]

2.4 Hydrogely

Polymerní trojrozměrné sítě dvou nebo více složek obsahující v řetězci silně hydrofilní skupiny, díky kterým jsou schopny vázat velké množství vody, aniž by došlo k jejich rozpouštění, se nazývají hydrogely. Voda může být přímo vázaná na polymerní řetězec nebo volně zachycena v struktuře sítě a v závislosti na vlastnostech polymeru, povaze a hustotě vazeb může zaujímat až 99 % obsahu. Díky takto vysokému obsahu vody jsou hydrogely biokompatibilní [32]. Jako první jsou při kontaktu s vodou hydratovány hydrofilní skupiny a vytváří se takzvaná primárně vázaná voda. Následkem toho struktura nabobtná a dochází k vystavení hydrofobních skupiny interakcím s vodou za vzniku sekundárně vázané vody. Zbývá voda vyplňující meziprostor sítě se označuje jako volná voda [33]. V některých případech může být bobtnání gelu reverzibilní a může docházet k dramatickým změnám objemu v závislosti na fyzikálních (teplota, elektrické/magnetické pole, světlo, tlak, zvuk) a chemických (hodnota pH, složení rozpouštědla, iontová síla) podmínkách prostředí. V reakci na tuto vlastnost lze připravit gely s kontrolovatelnou odezvou [34]. Trojrozměrnou strukturu drží pohromadě kovalentní příčné vazby, iontové síly, vodíkové vazby, hydrofobní interakce, fyzické propletení řetězců nebo kombinace uvedených interakcí [35]. Hydrogely jsou vícefázové materiály složené z porézní pevné látky vyplněné velkým množstvím kapalného rozpouštědla, ale vykazují mechanické vlastnosti typické pro materiály pevného skupenství. Do určité hodnoty tečného napětí, která závisí na počtu a pevnosti vazeb, jsou hydrogely elastické a k jejich deformaci není potřeba vynaložit velkou sílu. Čím více vazeb se na soudržnosti struktury podílí, tím méně prostoru zůstává pro pružnost materiálu a elasticita se snižuje [36].

Hydrogely lze rozdělit podle různých kritérií (původ, složení polymeru, konfigurace, druh síťování, elektrický náboj) do několika kategorií. Nejzákladnější rozdělení je podle původu na přírodní a syntetické. V závislosti na typu monomeru se dělí na homopolymerní, kopolymerní nebo multipolymerní. Podle uspořádání struktury na krystalické, semi-krystalické a amorfní. A jednou z dalších možností je rozdělení do dvou kategorií podle chemické či fyzikální povahy síťových uzlů a následně podle jejich pevnosti [34].

2.4.1 Způsoby přípravy hydrogelů

Obecně lze hydrogely připravit ze syntetických nebo přírodních polymerů takzvanou gelací, kdy dochází k postupnému navazování makromolekulárních řetězců a zvětšování struktury. Zpočátku si rozvětvený polymer zachovává rozpustnost a označuje se jako sol. Postupně však s narůstající velikostí a větvením rozpustnost klesá až do kritického bodu, kdy se začne vytvářet samotný gel. Přejít z izolovaných rozvětvených molekul polymeru do jedné velké molekuly tvořící strukturu hydrogelu se nazývá sol-gel přechod. Gelace může probíhat dvěma způsoby, a to buď fyzikálním nebo chemickým síťováním [33]. Fyzikální gely lze dále dělit na silné nebo slabé. Slabé fyzikální gely mají nestálé reverzibilní vazby tvořené slabými vazebnými interakcemi, které se neustále různě rozpadají a znovu formují. Oproti tomu silné fyzikální gely mají mezi polymerními řetězci za daných experimentálních podmínek silné a stálé vazby a jsou analogy chemicky síťovaných gelů, kde dochází k tvorbě pevných kovalentních vazeb a taktéž vzniku pevného hydrogelu. Tři procesy, které chemická gelace zahrnuje je kondenzace, vulkanizace a adiční polymerizace [33]. V ideálním případě zesíťováním vzniká elastický materiál s vyváženou rychlostí degradace a dostatečnou pevností pro cílené aplikace [34].

2.4.2 Využití hydrogelů v medicíně

Hydrogel obecně je považován za biokompatibilní materiál, jelikož díky nízké mezifázové volné energii hydrofilního povrchu při styku s tělní tekutinou nemají okolní proteiny a buňky tendenci na jeho povrchu ulpívat a zároveň měkká a elastická struktura omezuje možné podráždění okolních tkání. Zároveň musí být daný gel a jeho produkty degradace kompatibilní s imunitním systémem [33].

Prvním hydrogelem pro biomedicínské aplikace se stal v roce 1960 poly(hydroxyethyl)methakrylát (PHEMA) synteticky připravený dvěma českými vědci Wichterlem a Límem. Tento materiál byl využit k výrobě prvních kontaktních čoček [37].

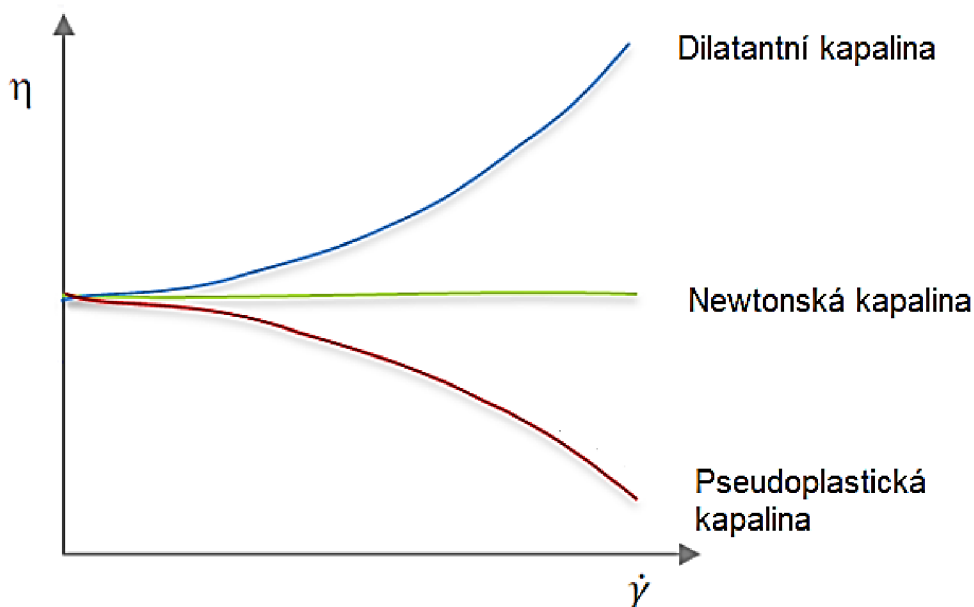
Kromě biokompatibility dělá hydrogely vhodným materiálem pro kontakt s lidským tělem i podobnost vlastností s ECM. V tkáňovém inženýrství je *in vivo* regenerace tkání jednou z možných aplikací, které toho využívají. Vlastní buňky pacienta jsou vpraveny do struktury hydrogelu obsahující růstové faktory, živiny a další potřebné látky pro proliferaci buněk a růst tkáně. Tento systém buňkám zajišťuje dokonalou náhradu přirozeného prostředí a je udržován *in vitro*, dokud nejsou buňky připraveny k transplantaci [38]. Hydrogely pro tkáňové inženýrství však musí splňovat řadu parametrů jako je dostatečná velikost pórů pro inkorporaci a růst buněk, umožnění jejich adheze, dostatečná pevnost, schopnost degradace či rozpuštění, uvolňování potřebných látek, sterilizovatelnost aj. Konkrétní aplikace a výzkum jsou zaměřeny například na hojení ran na kůži, regeneraci zubní dřevě, náprav srdečního onemocnění a regeneraci kostí. Kromě využití v regenerativní medicíně pro vývoj přirozených náhrad tkání a orgánů umožňuje prostředí hydrogelu bližší fyziologické podmínky pro biologické testování *in vitro* a tím zajišťuje výsledky bližší *in vivo* experimentům oproti tradičním *in vitro* metodám. Mimo jiné *in vitro* testovací modely založené na lidských buňkách mohou být přínosné pro vývoj a výzkum ve farmaceutickém průmyslu, jednak z etického hlediska jako náhrady testování na zvířatech, ale i k umožnění důkladnějších a přesnějších studií toxicity, metabolismu a životního cyklu léčiv před jejich vpuštěním do klinických studií a tím snížení časové náročnosti, nákladů a rizika klinického testování [38].

Hydrogely mohou dále sloužit jako matrice pro přenos léčiv, pomocí které lze řídit rychlost uvolňování léčiva, jeho zacílení, omezení degradace během distribuce a zamezení vzniku vedlejších účinků. Cílem je kontrolované a neinvazivní podávání zejména agresivních léčiv jako jsou například chemoterapeutika při léčbě nádorového onemocnění [38].

Kromě výše uvedených příkladů jsou hydrogely dále využívány či studovány například jako alternativy pro plastickou chirurgii, materiály ke kultivaci bakterií či jako matrice pro gelovou elektroforézu [38].

2.5 Reologie

Reologie je věda zabývající se abnormálním chováním kapalných, pevných či kombinovaných materiálů, na které se díky jejich vlastnostem nevztahují modely Hookova zákona o deformaci a Newtonova zákona o viskozitě. Takovým chováním je myšlena deformace a tok materiálu jako reakce na působení vnější síly. Předmětem reologie jsou látky jejichž závislost deformace na působícím napětí není lineární [39], [40]. Takové látky jsou v případě kapalin označovány jako neneutonské kapaliny. Podle toho, zda jejich viskozita s rostoucím rychlostním gradientem klesá nebo roste mohou být dále rozděleny na (pseudo)plastické a dilatantní, viz. obrázek 13. Oproti tomu newtonské kapaliny jsou ideálně viskózní, jejich viskozita je charakteristikou dané kapaliny a hodnota je nezávislá na velikosti tečného napětí a rychlostním gradientu. V případě pevných látek je ideálním chováním dokonale elastická odezva, tj. deformace je úměrná napětí a po působení síly opět zmizí. Chování reálných materiálů však zahrnuje jak viskózní, tak elastickou složku a označují se proto jako viskoelastické. Reologie je multidisciplinární věda s vazbou na fyziku z hlediska vysvětlení a předpovědi reologických vlastností na základě molekulární struktury a zákonů fyziky a s vazbou na chemii skrz chemické parametry (molekulová hmotnost a její distribuce, chemická struktura, mezimolekulární interakce) přímo ovlivňující reologické vlastnosti, čímž je umožněno syntetizovat materiály s požadovanými vlastnostmi [39], [40].



Obrázek 13: Tokové křivky závislosti viskozity na smykové rychlosti pro různé charakter materiálu [41]

Základní reologické vlastnosti (viskozita, mez toku, modul pružnosti) se měří pomocí technik reometrie a jsou důležité nejen pro charakterizaci technických vlastností materiálu, ale i ke kvalitativnímu stanovení. Matematickým vyjádřením tokových vlastností kapalin jsou reologické stavové rovnice a tokové křivky. Jak kapaliny, tak pevné látky mohou být podrobeny měření pomocí rotačních a oscilačních reometrů. K stanovení vlastností látek s viskoelastickým chováním, mezi které patří i hydrogely, slouží tokový test, relaxační test a oscilační testy [40], [42].

- **Oscilační amplitudový test:** slouží k popisu deformačního chování v nedestruktivním deformačním rozsahu a na stanovení horní hranice tohoto rozsahu. Měření probíhá při konstantní frekvenci a rostoucí amplitudě deformace. Výsledkem je stanovení limitu lineární viskoelastické oblasti LVO, do kterého je materiál schopný odolávat deformační síle. Z hodnot elastického a viskózního modulu lze určit, zda v materiálu převažuje charakter pevné látky nebo kapaliny [43].
- **Oscilační frekvenční test:** slouží k popisu časově závislého chování vzorku v nedestruktivní deformační oblasti. Tento test probíhá při rostoucí frekvenci a konstantní hodnotě amplitudy deformace stanovené z LVO oscilačního amplitudového testu, který by měl samotnému frekvenčnímu testu předcházet. Vysoké frekvence simulují rychlou pohyblivost během krátkých časových úseků a nízké frekvence pomalý pohyb při dlouhých časových úsecích. Mimo jiné slouží tento test k určení, zda se materiál chová jako kapalina a teče nebo má stabilní pevnou konzistenci [43].
- **Tokový test:** slouží stanovení závislosti viskozity na smykové rychlosti, ze které lze odvodit, zda má materiál charakter pseudoplastický, dilatantní či newtonské kapaliny [43].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Cílem této kapitoly je nastínění rozvoje výzkumu hydrofobně upravených biopolymerů, který sahá až do minulého století, ale aktivně pokračuje i v dnešní době. Výběr je zaměřen hlavně na úpravu kyseliny hyaluronové a následné využití jejich derivátů v medicíně a dále také na interakce hydrofobních biopolymerů s tenzidy, potažmo micelami.

Námětem pro téma této práce byl článek SAU, et al. [44] z knihy *Polymers in Aqueous Media* o hydrofobně modifikované hydroxyethylcelulóze a mimo jiné interakcích tohoto derivátu s tenzidy. V publikaci je uvedeno, že v závislosti na iontové povaze tenzidu a jeho koncentraci mají interakce vliv na výslednou viskozitu systému. V experimentu s oleátem sodným došlo se vzrůstající koncentrací tohoto tenzidu nejprve k prudkému nárůstu viskozity a poté k prudkému poklesu. Velikost píku byla závislá na koncentraci polymeru, avšak jeho maximum bylo spojeno s konkrétní koncentrací tenzidu. Z toho vyplývá, že nárůst viskozity nebyl způsoben specifickými interakcemi polymeru s tenzidem, ale souvisí s kritickou micelární koncentrací a tvorbou micel. Navázáním hydrofobních řetězců více molekul do jedné micely vznikne polymerní síť, což způsobí prudký nárůst viskozity. S nárůstem micel však ubývá propojení a dojde naopak k zablokování hydrofobních řetězců, jako již bylo vysvětleno na obrázku 11 [44].

Cílem práce MLČOCHOVÁ, et al. [45] byla příprava lyofilních derivátů HA navázáním alkylového řetězce na hydroxylové skupiny a zároveň zanechání neporušené karboxylové skupiny. Dále zkoumání vlivu reakčních podmínek na výsledné fyzikální a chemické vlastnosti produktu. Deriváty byly připraveny reakcí HA s alkylaminu a hydroxylové skupiny aktivovány bromkyanem. Během studie se podařilo docílit přípravy několika alkylderivátů hyaluronanu s požadovaným stupněm substituce a zachovanou karboxylovou skupinou. Stupeň substituce lze regulovat pomocí reakčních podmínek, například hodnotou pH. V případě aktivace polysacharidu bromkyanem může následná reakce například s peptidy či proteiny trvat několik hodin. V tomto případě nebyl prokázán výrazný vliv reakční doby na molekulovou hmotnost produktu nebo stupeň substituce. V obou případech došlo pouze k mírnému poklesu, ale zároveň došlo i k mírnému zvýšení rozpustnosti. Byla prokázána biologická odbouratelnost srovnatelná s nativním HA a částečná rozpustnost ve vodě. Materiály jsou považovány za potenciálně vhodné kandidáty k tvorbě cílených doručovacích systémů [45].

Studie OH, PARK, KIM, et al. [46] se zaměřila na zkoumání vlivu chemické modifikace HA struktury na její následnou distribuci v těle. Měření bylo provedeno pro cílenou, dlouhotrvající distribuci terapeutik na bázi nukleotidů, peptidů a proteinů s využitím *in vivo* metody *bioimaging* v reálném čase pomocí konjugace HA a kvantových teček. Výsledek testování na myších ukazuje, že deriváty se stupněm substituce 35 mol. % byly přítomny zejména v okolí hrudníku, zatímco deriváty se stupněm distribuce 68 mol. % byly rozdělovány rovnoměrně po celém těle. To znamená, že deriváty HA s nízkou modifikací mají dostatečnou vazebnou afinitu k HA receptorům, a proto docházelo k jejich hromadění zejména v játrech, kde probíhá degradace HA. Závislost distribuce derivátů v těle na jejich stupni substituce může hrát důležitou roli v přípravě systému pro podávání léčiv. Deriváty s nízkou modifikací mohou být využity k cílenému dodání léčiva do tkání obsahující receptory HA, tj. játra, ledviny, nádorová tkáň. Zatímco vysoce modifikované deriváty mají potenciál pro dlouhotrvající konjugaci s léčivem a možnost opožděného uvolňování. Každopádně je metoda *bioimaging* v reálném čase vhodným nástrojem ke zkoumání biologického fungování různých derivátů a jejich následnému porozumění a využití pro medicínské aplikace 0.

Cílem výzkumu FOGLAROVÁ et al. [47] byla příprava palmitoyl hyaluronanu s různou molekulovou hmotností a stupněm substituce pro následnou přípravu ve vodě nerozpustných tenkých filmů pro medicínské aplikace. Vybraný derivát HA byl připraven esterifikací kyseliny palmitové s hydroxylovou skupinou HA. Výsledné produkty byly analyzovány pomocí NMR

dále využity k přípravě tenkého filmu. Konečný materiál byl podroben několika zkouškám zahrnující vizualizaci struktury a drsnost povrchu, měření tloušťky, stanovení mechanických vlastností, schopnost botnání a interakce s živými buňkami. Výsledkem je úspěšné vytvoření filmů z několika vzorků palmitoyl hyaluronanu jednoduchou a nákladově nenáročnou metodou bez použití síťovacích činidel či nebezpečných rozpouštědel. Připravené filmy byly pružné a homogenní s velmi hladkým povrchem a jejich mechanické vlastnosti a schopnost botnání bylo dáno povahou použitého palmitoyl haluronanu, což do budoucna umožňuje získání žádoucích vlastností výběrem vhodného derivátu HA. V případě molekulové hmotnosti okolo 80 kDa byl výsledný materiál příliš křehký. Vzorky s vysokým stupněm substituce vykazovaly dobré tahové vlastnosti a nižší botnání. Stupeň substituce naopak neměl vliv na cytotoxicitu a přilnavost buněk. Výsledky potvrzují vhodné vlastnosti filmů pro aplikaci v tkáňovém inženýrství nebo hojení ran [47].

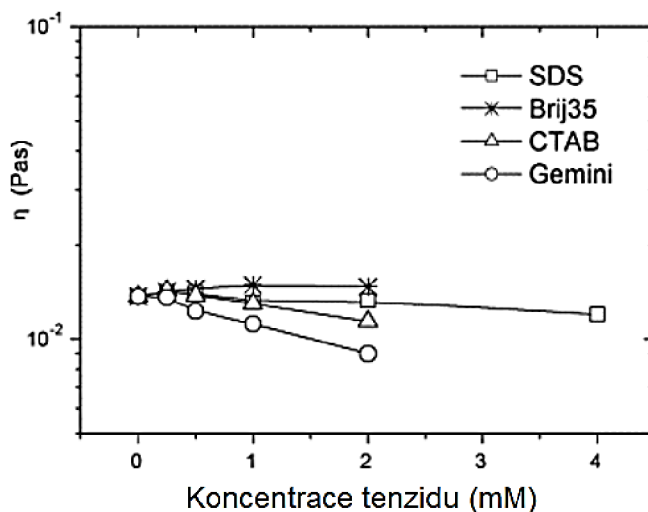
Taktéž tým *SOGORKOVÁ et al.* [48] pracoval s palmitoyl hyaluronanem s cílem získat materiál pro tkáňové inženýrství. V tomto případě však nešlo o přípravu tenkých filmů, ale přípravu ve vodě nerozpustných, biodegradabilních textilních vláken spletených do nosné struktury. Připravený materiál byl sice biokompatibilní, ale nevykazoval dostatečnou povrchovou interakci s buňkami, jelikož je palmitoyl hyaluronan vysoce hydrofobní a negativně nabitý a buňky preferují spíše mírně hydrofilní a pozitivně nabitě substráty. Cílem práce proto byla úprava povrchu vláken různými biomateriály (fibronektin fibrinogen, laminin, methakrylovaná želatina, kolagen) a vylepšení buněčné afinity a adheze. Adsorpce byla zajištěna hydrofobními interakcemi proteinů s palmitoyl hyaluronanem. Stabilita, tloušťka povlaků a biologická rozložitelnost celého systému byla vyhodnocena a porovnána u všech vzorků. Pro testování adheze byly použity lidské dermální fibroblasty a mezenchymální kmenové buňky. Přilnavost buněk byla u stejných materiálů významně rozdílná. Adheze povlaku fibronektinu byla navíc úspěšně zkoumána pro účel obnovy srdeční tkáně. Materiál by tedy mohl být vhodný jako buněčný nosič pro tkáňové inženýrství zaměřené na infarkt myokardu [48].

PANMAI et al. [49] se věnovali studiu interakcí hydrofobně modifikovaného polymeru (konkrétně celulózy) s tenzidy CTAB a TTAB. Přítomnost hydrofobního polymeru způsobila agregaci tenzidů a tvorbu micel v koncentraci přibližně dvakrát nižší, než je jejich standardní CMC. Zároveň s přibytkem tenzidu zpočátku postupně narůstala viskozita roztoku díky zapojení hydrofobních řetězců do tvorby smíšených micel a tím vznikajícímu propojení molekul. Později byly s nárůstem koncentrace tenzidu smíšené micely narušeny a viskozita se značně snížila. Měření zahrnovala fluorescenční spektroskopii a reologii [49].

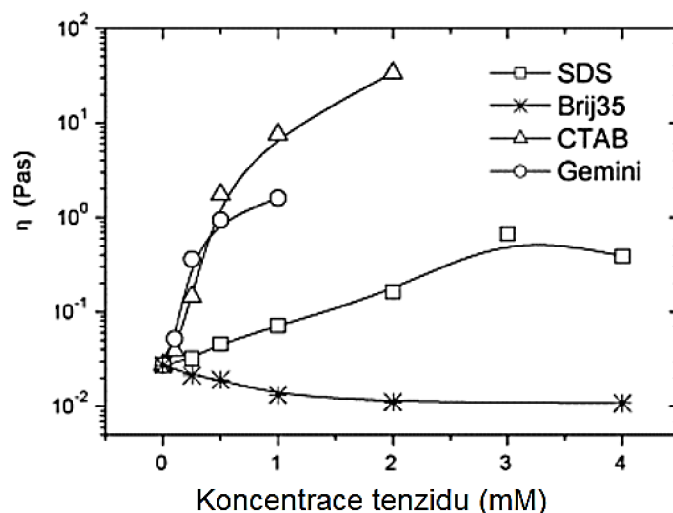
Práce *BU et al.* [50] je zaměřená na charakterizaci interakcí hydrofobně modifikovaného alginátu s různými typy tenzidů v porovnání s interakcemi nativního alginátu. Cílem práce bylo objasnit faktory, které na tyto interakce mají vliv. Pro zaznamenání změn dynamických vlastností směsí a jejich porovnání bylo provedeno reologické měření viskozity a turbidity. Pro strukturální změny systémů na úrovni molekul byl využit malouhlový rozptyl neutronů (SANS). Pro stanovení vlivu náboje na interakce polymeru s tenzidem byly postupně provedeny experimenty s aniontovým (SDS), kationtovým (CTAB, Gemini) a neutrálním (Brij 35) tenzidem. Čistý alginát i jeho modifikace mají náboj záporný. U nativního roztoku alginátu došlo po přidání tenzidů k poklesu viskozity. Hlavně v případě kationtových tenzidů viskozita klesala s rostoucí koncentrací tenzidu. Došlo k tomu pravděpodobně kvůli tvorbě velkých agregátů s nízkým stupněm propojení (totéž prokazovalo i měření turbidity a SANS). Mírný pokles nastal i v případě přídavku SDS. Oproti tomu neutrální tenzid Brij 35 způsobil v nízkých koncentracích mírný nárůst viskozity, pravděpodobně díky tvorbě micel, které následně propojily řetězce. Grafické porovnání pro jednotlivé tenzidy lze najít na obrázku 14. Zcela jiné výsledky bylo možné pozorovat v případě hydrofobního derivátu alginátu. Po přídavku SDS došlo k nárůstu viskozity s maximem v koncentraci 3 mM. Důvodem byly silné interakce, které

jsou však následně s vyšší koncentrací tenzidu narušeny, a proto poté došlo opět k mírnému poklesu. Výraznější nárůst viskozity byl pozorován v případě kladně nabitých tenzidů. Příčinou jsou kromě hydrofobních interakcí i elektrostatické síly způsobující společně agregaci a tvorbu propojených komplexů. V případě SDS díky stejnému náboji dochází k odpuzování a elektrostatické interakce chybí, proto lze pozorovat hodnotu viskozity nižší. Na obrázku 15 lze vidět, že oproti nativnímu alginátu, kde vznikají spojením s kladnými tenzidy již zmíněné agregáty s nízkým propojením, interakce stejných tenzidů u derivátu pouze zvyšují sílu asociací, zatímco struktura není narušena. U hydrofobního alginátu přítomnost Brij 35 pravděpodobně způsobil rozpad a zamezení vzniku nových hydrofobních asociací svými dlouhými hydrofilními řetězci, které u micel tvoří hydrofilní obal, jak je znázorněno na obrázku 15, což ve výsledku způsobilo pokles viskozity [49].

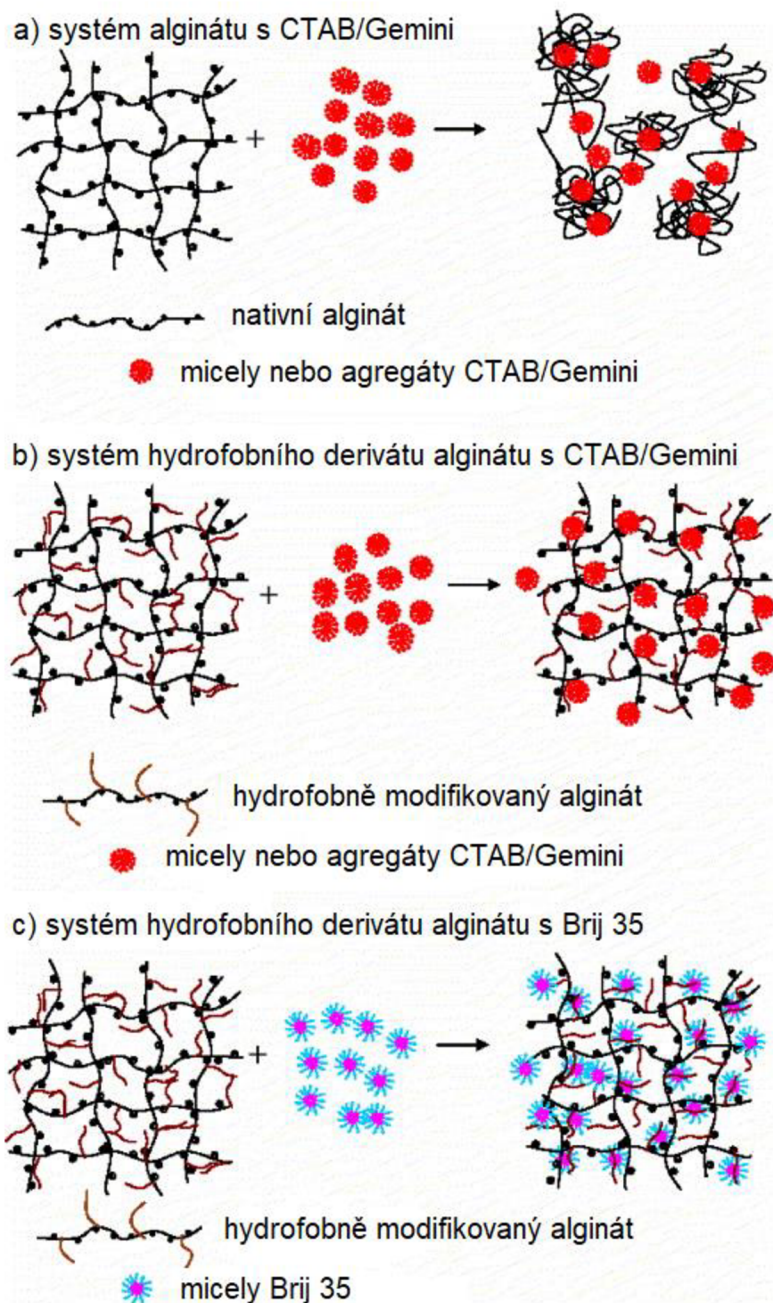
a) nativní alginát



b) hydrofobní derivát alginátu



Obrázek 14: Grafické porovnání naměřené viskozity pro systémy alginátu a jeho hydrofobního derivátu s různým typem tenzidů [49]



Obrázek 15: Schématické zobrazení tvorby a povahy komplexů alginátu a jeho hydrofobního derivátu s různými druhy tenzidů [49]

Li et al. [51] se ve své práci zabírali studiem reologických vlastností hydrofobně modifikované hydroxyethyl celulózy (HEC) připravené reakcí s bromdodekanem. V průběhu experimentu byla měřena viskozita roztoku, vztah viskozity a smykové rychlosti, povrchové napětí, molekulová hmotnost, FTIR analýza, teplota skelného přechodu a mikromorfologie. Z měření zdánlivé viskozity byla stanovena agregační koncentrace systému na 0,25 g/dl. Systém je schopen tvořit intramolekulární a intermolekulární hydrofobní asociace. Nad hodnotou agregační koncentrace převládají intermolekulární interakce zajišťující vznik molekulárních sítí, které zlepšují hydrodynamická objem a vedou k prudkému nárůstu viskozity. Při měření smykové rychlosti vykazoval materiál zpočátku pseudoplastické vlastnosti. Prudký pokles zdánlivé viskozity znamenal narušení slabých hydrofobních interakcí, které držely pohromadě strukturu sítí. Po odstranění tlaku se hydrofobní asociace obnovily,

a navíc i vylepšily. Po přidavku NaCl do roztoku došlo k zvýšení polarity a vzniku silnějších interakcí. Při koncentraci přibližně 6 hm. % NaCl byla viskozita roztoku maximální. Poté začalo docházet k fázové separaci a viskozita opět klesla. Taktéž bylo dokázáno, že nejprve docházelo k tvorbě mikro agregací a zvyšování lokální viskozity před nárustem celkové viskozity systému. Mimo jiné byla prokázána dobrá tepelná stabilita a povrchová aktivita tohoto materiálu [51].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

<i>Palmitoyl hyaluronan sodný</i>	DS 11 %, MW 216 kDa Obsah vody: 17,39 %	CAS: 600-08-12, Contipro a.s. Číslo šarže: E16-310118-B
<i>Palmitoyl hyaluronan sodný</i>	DS 44 %, MW 55 kDa Obsah vody: 12,62 %	CAS: 600-08-05, Contipro a.s. Číslo šarže: E16-190618-B
<i>Palmitoyl hyaluronan sodný</i>	DS 37 %, MW 990 kDa Obsah vody: 12,81 %	CAS: 600-08-15, Contipro a.s. Číslo šarže: M16-280817-B
<i>Decyl β-D-glukopyranosid</i>	CMC: 2,2 mM	CAS: 58846-77-8, Sigma-Aldrich Číslo šarže: SLCC2090
<i>Triton X-100</i>	CMC: 0,209 mM	CAS: 9002-93-1, Sigma-Aldrich Číslo šarže: STBG1336V
<i>Deionizovaná voda</i>	Elga, Purelab	

4.2 Příprava zásobních roztoků

Vybrané koncentrace palmitoyl hyaluronanu byly 0,5; 5; 10 g/l rozpouštědla. Koncentrace tenzidů byly vybrány jako násobky příslušné hodnoty kritické micelární koncentrace, jelikož je předpokládáno, že je vznik gelu závislý na poměru micel vůči množství polymeru. Během experimentů bylo pracováno s následujícími násobky: 2x; 2,5x; 5x; 7,5x; 10x; 15x; 20x; 25x; 30x; 50x; 100x.

4.2.1 Zásobní roztoky palmitoyl hyaluronanu

Pro dosažení vybraných koncentrací byly vypočítány navážky příslušných palmitových derivátů hyaluronanu s ohledem na jejich obsah vody. Ty byly následně naváženy na analytických vahách a k látce byl napipetován potřebný objem vody. Roztok byl umístěn na magnetickou míchačku po dobu 24 hodin při 250–300 otáčkách. Poté byl skladován v lednici při 5 °C.

4.2.2 Zásobní roztoky tenzidů triton X-100 a decyl glukosid

Vypočítané množství bylo naváženo na analytických vahách. Následně byl k navážce napipetován stanovený objem vody. Roztok byl míchán skleněnou tyčinkou do úplného rozpuštění a skladován při laboratorní teplotě v případě tritonu X-100 a v lednici při 5 °C pro decyl glukosid.

4.3 Pracovní postupy přípravy vybraných hydrogelů

4.3.1 Metoda smíchání dvou roztoků

Do vialky byly napipetovány 3 ml roztoku tenzidu a následně přidány 3 ml roztoku palmitoyl hyaluronanu. Směs byla ponechána pro pozorování při laboratorní teplotě a poté uložena do lednice při 5 °C.

4.3.2 Metoda rozpuštění palmitoyl hyaluronanu v roztoku tenzidu

Do vialky bylo na analytických vahách naváženo vypočítané množství palmitoyl hyaluronanu s ohledem na příslušný obsah vody a poté byl napipetován požadovaný objem vybraného roztoku tenzidu. Směs byla na 24 h umístěna na magnetickou míchačku s 250–300 otáčkami. Poté byl vzorek skladován v lednici při 5 °C.

4.4 Metodika charakterizace hydrogelů

4.4.1 Vizualní stanovení toku

Vzorky připraveny *Metodou smíchání dvou roztoků* byly sledovány v časech 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, a 24 h. Vizualní vyhodnocení toku bylo provedeno po 24 h, jak je zobrazeno i na obrázku 16 a zaznamenáno do tabulky. Vzorky připraveny *Metodou rozpouštění palmHya v roztoku tenzidu* byly vizualně vyhodnoceny po 24 h na míchačce. Výsledky byly taktéž zaznamenány do excelové tabulky. Podle výsledků byl následně stanoven užší výběr vzorků pro další charakterizaci.

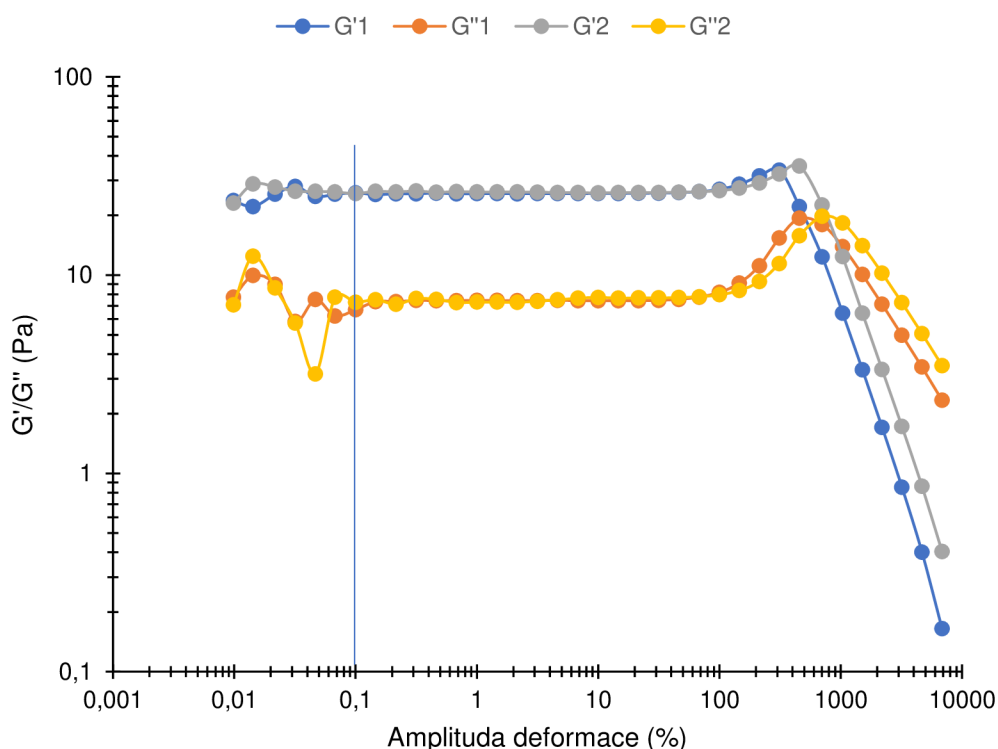


Obrázek 16: Porovnání toku dvou vzorků lišících se v koncentraci tritonu X-100

4.4.2 Reologie

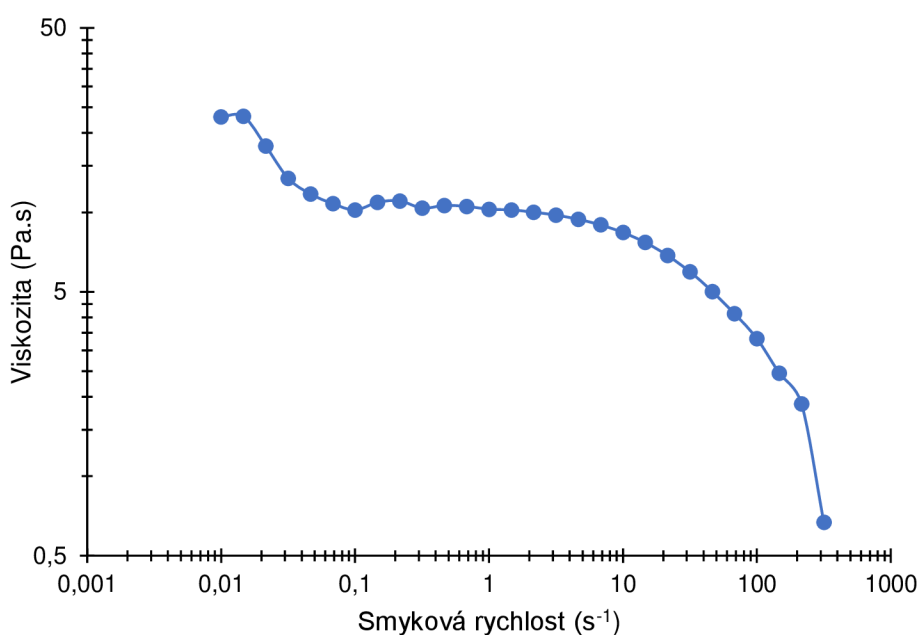
Vybrané vzorky byly podrobeny reometrickému měření na přístroji *Discovery HR-2* od firmy TA Instruments. K měření byla využita geometrická sestava ocelová deska-deska o průměru 20 mm s definovaným zdrsňením, pevnou spodní částí a pohyblivým senzorem v horní části. K charakterizaci byl nejprve vybrán oscilační amplitudový test s konstantní hodnotou frekvence 1 Hz a amplitudou deformace v rozmezí 0,01–10 000 %. Amplituda deformace je dána poměrem dráhy otočení senzoru ku výšce gelové vrstvy mezi deskami, která byla pro měření nastavena na hodnotu 500 μm . Před každým měřením byl vzorek temperován po dobu dvou minut na 25 °C. Při této teplotě tedy probíhaly i samotné experimenty. Každý vzorek byl měřen dvakrát, z hodnot byla vypočítána střední hodnota a byly sestaveny grafy závislosti viskózního a elastického modulu na amplitudě deformace. Rozmezí vnesených bodů bylo díky nepřesnosti měření při nízkých hodnotách amplitudy deformace, jak je vidět i na obrázku 17, upraveno na 0,1–10 000 %. Jako odchylky byly do grafu vyneseny rozdíly střední hodnoty od naměřených hodnot. Dále byl pomocí výpočtu procentuálního růstu křivky stanoven konec lineární viskoelastické oblasti (LVO) do 5 % změny v bodě v porovnání s prvním bodem křivky a rozmezí této oblasti je v grafech naznačeno šipkou.

Z LVO byla poté vybrána hodnota amplitudy deformace 10 % pro oscilační frekvenční test. Tato hodnota byla v průběhu měření konstantní a hodnoty frekvence byly nastaveny v rozmezí 0,01–20 Hz. Naměřená data byla opět exportována a zpracována do grafické podoby v MS Excelu stejným způsobem jako u testu amplitudového. Na základě vynesení parametrů bylo možné usuzovat, zda má měřený vzorek charakter gelu a jak velká je pevnost jeho uzlů. Výsledky byly následně porovnány pro měnící se koncentraci v rámci jednoho tenzidu, pro stejné koncentrace dvou odlišných tenzidů, v rámci dvou způsobů přípravy hydrogelů a pro porovnání charakteru hydrogelu bez přítomnosti micel ve srovnání s gely s micelami.



Obrázek 17: Závislost viskozitního a elastického modulu na amplitudě deformace stanovená oscilačním amplitudovým testem

Pro vybrané vzorky byly dále měřeny i tokové křivky pro newtonovské stanovení charakteru materiálu. První měření bylo provedeno v širokém rozmezí smykové rychlosti 0,01–1000 s⁻¹, zobrazeno na obrázku 18, ze kterého bylo následně podle výsledku vybráno užší rozmezí vhodné pro měření připravených hydrogelových vzorků. Při smykové rychlosti vyšší než 100 s⁻¹ docházelo kvůli odstředivé síle k vytečení vzorku z měřicích destiček a měření tím pádem nebylo dostatečně přesné. Smyková rychlost nižší než 0,1 s⁻¹ byla pro měření příliš nízká, což se projevilo nepravidelnostmi v grafickém zobrazení výsledků. Proto byla smyková rychlost pro tento typ testu stanovena na rozmezí 0,1–100 s⁻¹. Vzorek byl před samotným měřením temperován na 25 °C po dobu dvou minut. Naměřená data byla taktéž exportována a zpracována do grafů v MS Excelu. Z naměřených dat tokového testu byly sestaveny grafické závislosti viskozity materiálu na smykové rychlosti. Podle povahy křivky (rostoucí, klesající, konstantní) byl vyhodnocen charakter připravených gelů.



Obrázek 18: Grafické zobrazení tokové křivky pro široké rozmezí smykové rychlosti

4.4.3 Infračervená spektrometrie

Tato analytická metoda slouží k získání informací o struktuře látek, jejich složení a dynamice vazeb. Podstatou měření je absorpce infračerveného záření vzorkem, jehož energie sice není dostačující k excitaci elektronu, jako tomu je u UV-VIS spektrometrie, ale způsobí změnu vibračního či rotačního stavu molekuly. Absorbované záření energeticky odpovídá přechodu mezi vibračními hladinami. Výsledkem detekce jsou u této metody časové interferogramy, které je následně nutné převést Fourierovou transformací na klasické spektrum závislosti absorpance na vlnočtu.

Vybrané vzorky uvedené v tabulce 1 byly podrobeny infračervené spektrometrii na přístroji *Nicolet iS50 FT-IR* od firmy ThermoFischer. Měření probíhalo na diamantovém krystalu v rozmezí vlnočtu odpovídající střední infračervené oblasti 4000–400 cm⁻¹ s rozlišením 8 cm⁻¹ a celkovým počtem skenů 32. Jako pozadí pro měření byl stanoven vzduch a krystal. Na měřicí plochu krystalu bylo napipetováno 2,5 µl vzorku. Měření bylo provedeno ihned po nadávkování vzorku a poté bylo provedeno znovu po odpaření vody po čase cca 5 minut od prvního měření. Výsledné interferogramy byly Fourierovou transformací převedeny na data, ze kterých bylo možné po exportování do MS Excel sestavit a vyhodnotit výsledná spektra.

Tabulka 1: Vzorky vybrané pro měření infračervené spektrometrie

vzorek	metoda	palmitoyl hyaluronan DS = 11 %	decyl glukosid	triton X-100
1	-	10 g/l	-	-
2	M1	5 g/l	-	10x CMC
3	M2	5 g/l	-	10x CMC
4	M2	5 g/l	10x CMC	-

4.4.4 Ověření schopnosti botnání

Do malých Petriho misek byly připraveny gely Metodou rozpuštění palmitoyl hyaluronanu v roztoku tenzidu pro koncentrace 5 g/l rozpouštědla palmHya a 10x CMC decyl glukosidu. Připravené vzorky byly zváženy a na 24 h umístěny do sušárny nastavené na 50 °C. Poté byly vzorky opět zváženy a byl vizuálně vyhodnocen vzhled a povaha sušiny. Následně byly do každé Petriho misky napipetovány 3 ml vody a vzorky byly na 24 h ponechány k samovolnému botnání. Tři zvlášť připravené vzorky byly podrobeny reologickému měření amplitudového a frekvenčního testu. Naměřená data byla exportována do MS Excelu a graficky zpracována. Schopnost opětovného nabotnání připravených gelů po vysušení byla vyhodnocena podle porovnání výsledků reologie s gely původními. Naměřené hmotnosti jsou zaznamenány v tabulce a uvedeny jako příloha.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro přípravu hydrogelů z hydrofobizovaného hyaluronanu s přítomností micel byly navrženy dvě metody, jejichž postup je zaznamenán v kapitole 4.3. Obě metody byly využity při experimentální přípravě gelů v různých koncentracích palmitoyl hyaluronanu i různých koncentrací tenzidů. Kromě decyl glukosidu byl z důvodu vysoké finanční nákladnosti pro experimentální část využit taktéž necukerný tenzid triton X-100 a to zejména v první části výzkumu, která sloužila ke získání prvních poznatků s daným systémem a k výběru optimálních koncentrací jak právě tenzidu, tak i palmitoyl hyaluronanu a ověření účinnosti vybraných metod. Až pro konečný výběr metody a koncentrací zvolených pro následnou charakterizaci gelů byl do experimentů zařazen i decyl glukosid jakožto zástupce cukerných biotenzidů. Taktéž palmitoyl hyaluronan je finančně nákladná látka, a proto bylo ke všem experimentům přistupováno s rozvahou, postupně po malých krocích a malých objemech.

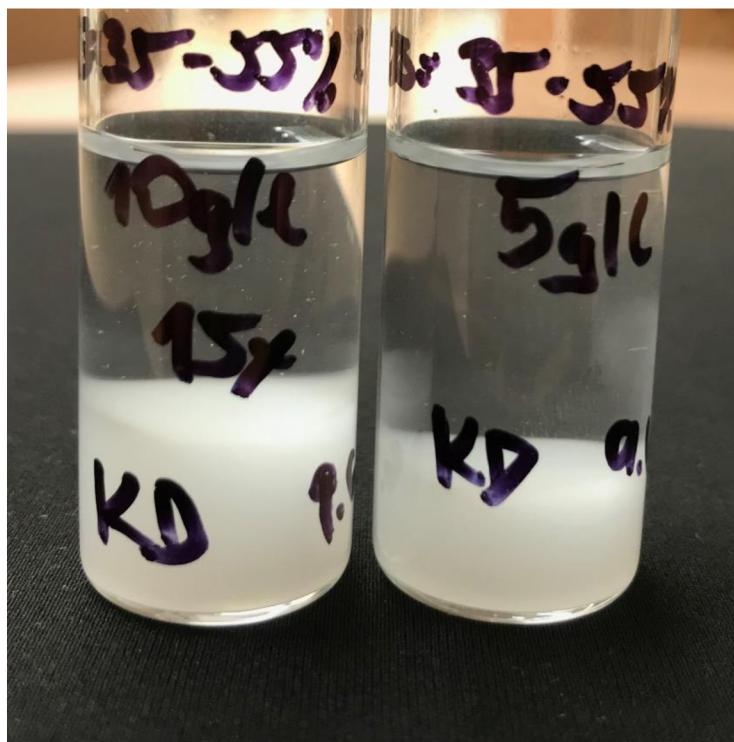
Cílem práce bylo mimo jiné kromě přípravy hydrogelů navržení způsobu jejich charakterizace. Počáteční vyhodnocení probíhalo vizuálně a zahrnovalo posouzení homogenity, míry tekutosti a přítomnosti vzduchových bublin. Pro analytické kvalitativní hodnocení byla vybrána charakterizace pomocí vybraných reologických testů a infračervené spektrometrie. Na závěr byly vzorky vysušeny a testovány na schopnost botnání po přidání vody. Veškeré výsledky z experimentálního měření, jejich vzájemné porovnání a vytyčení možných cílů pro budoucí experimenty jsou uvedeny níže v této kapitole.

5.1.1 Výběr palmitoyl hyaluronanu s vyhovujícím stupněm substituce

Kyselina hyaluronová je polysacharid hydrofilní povahy. Tuto vlastnost lze změnit například navázáním hydrofobního řetězce kyseliny palmitové na hydroxylové skupiny této látky za vzniku palmitoyl hyaluronanu. Počet navázaných řetězců vyjadřuje procentuální hodnota stupeň substituce (DS) udávající průměrné zastoupení substituovaných hydroxylových skupin. S rostoucí hodnotou DS se zvyšuje hydrofobní charakter upraveného hyaluronanu a zároveň klesá jeho rozpustnost ve vodě.

Pro experimentální část této práce byl jako hlavní zástupce zvolen palmitoyl hyaluronan s DS 11 % a ze zajímavosti bylo pár experimentů provedeno i s DS 37 % a DS 44 %. DS 11 % je bez problému rozpustný ve vodě a od určité koncentrace je schopný samovolné agregace pomocí hydrofobních interakcí. DS 37 % se podařilo částečně rozpustit při koncentraci 5 g/l a 10 g/l rozpouštědla, nicméně většina látky zůstala nerozpuštěna ve formě disperze. Ani po naředění na 0,5 g/l nedošlo k úplnému rozpuštění. DS 44 % se nepodařilo rozpustit vůbec. Žádná vizuální změna v rozpustnosti nebyla zaznamenána ani po zahřátí na 50 °C ve vodní lázni. Řešením by mohlo být například přidání organické rozpouštědla (DMSO, ethanol atd.), nicméně protože jsou hydrogely připravovány s cílem pro využití v medicíně, musely by si zachovat biokompatibilní a netoxický charakter.

U DS 37 % byla i přesto na zkoušku provedena Metoda rozpuštění palmitoyl hyaluronanu v roztoku tenzidu pro koncentrace 5 g/l a 10 g/l palmitoyl hyaluronanu a 15x CMC triton X-100. Podle očekávání ani zde nedošlo k úplnému rozpuštění, nicméně se v roztoku vytvořila velmi jemná bílá sraženina, jak lze vidět na obrázku 19, která se na první pohled jevila jako kompaktní s náznakem částečné gelace avšak po protřepání se dala lehce rozmíchat. V experimentech s palmitoyl hyaluronanem o DS 37 % se dále nepokračovalo a výzkum byl zaměřen pouze na DS 11 %.



Obrázek 19: Sraženina palmitoyl hyaluronanu s DS 37 % a micel tritonu X-100

5.1.2 Výběr vhodných koncentrací palmitoyl hyaluronanu a tenzidů

Optimalizace vhodných koncentrací probíhala přípravou vzorků pomocí Metody smíchání dvou roztoků. Počáteční koncentrace roztoků palmitoyl hyaluronanu s DS 11 % byly 0,5; 5; 10 g/l rozpouštědla. U koncentrace 10 g/l došlo k samovolné agregaci čistého palmitoyl hyaluronanu již při přípravě zásobního roztoku bez přítomnosti tenzidu a vzniku lehce tekoucího, průhledného, kompaktního hydrogelu v celém objemu roztoku. Tento zásobní roztok nebyl dále smíchán s roztokem tenzidu, ale byl uchován a následně podroben reologickému a FT-IR měření a porovnání se vzorky s přítomností micel tenzidů tritonu X-100 a decyl glukosidu. Koncentrace 0,5 g/l byla pro vznik gelu příliš nízká, po přidání do roztoku tritonu X-100 s koncentracemi 5x a 10x CMC nedošlo v roztoku k žádným viditelným změnám viskozity a s touto koncentrací se proto v experimentech dále nepokračovalo.

Pozornost byla zaměřena na koncentraci 5 g/l, která nevykazovala samovolnou gelaci při tvorbě zásobního roztoku, ale po smíchání s některými roztoky tenzidů došlo k viditelnému nárůstu viskozity již po promíchání a u některých se během 2 hodin vytvořil relativně dost tekoucí gel. Podrobnější výsledky vizuálního hodnocení po 24 h jsou uvedeny v tabulce 2. Protože hydrogely připraveny metodou M1 byly značně tekoucí a nesplňovaly očekávání, byl navržen druhý způsob přípravy gelů pomocí metody M2, pro kterou byly z předchozích výsledků vybrány koncentrace 5x; 15x; 20x; 25x pro oba tenzidy. Jelikož byly násobky stanoveny pro zásobní roztok tenzidu, který byl poté smíchán 1:1 s roztokem polymeru u metody M1, jeho výsledná koncentrace byla v celém objemu vzorku poloviční. Proto, aby byla zachována stejná výsledná koncentrace tenzidu u obou metod, byly zásobní roztoky tenzidů pro M2 připraveny v koncentracích 2,5x; 7,5x; 10x; 12,5x. U všech vzorků docházelo k vytvoření na první pohled homogenního, průhledného gelu v celém objemu vzorku, stejně jako u metody M1. Hydrogely připraveny metodou M2 však byly při stejných koncentracích viditelně méně tekuté. Tuto skutečnost pravděpodobně umožnilo přímé rozpouštění polymeru v roztoku tenzidu tím, že inkorporace hydrofobních řetězců do micel (a tím zpevnění síťových uzlů) mohla probíhat již během rozpouštění, než došlo k tvorbě hydrofobními interakcemi mezi

řetězci a zaujmutí struktury s potenciálně zhoršenou přístupností pro micely. Předpokladem je více micel podílejících se na tvorbě uzlů a více řetězců v jedné micelle zajišťující početnější propojení řetězců. Tento předpoklad by mohl být předmětem budoucího zkoumání, aby došlo k lepšímu porozumění procesu gelace s přítomností micel a jejich celkovému vlivu na strukturu a pevnost sítě.

Co se týká rozdílu v rámci tenzidů, gely s decyl glukosidem se jeví na pohled pevnější, ale po bližším zkoumání pomocí špachtle vykazovali oproti gelům s tritonem X-100 větší lepivost a tažnost. U gelů s 2,5x CMC decyl glukosidem došlo k vytvoření bublin v celém objemu, které se nepodařilo odstranit zahříváním ani ultrazvukem. Vzorky s touto koncentrací nebyly dále vybrány pro charakterizaci.

K charakterizaci a dalším experimentům bylo vybráno 9 vzorků, konkrétně tedy koncentrace 15x; 20x; 25x pro triton X-100 M1, 7,5x; 10x; 12,5x pro triton X-100 M2 a decyl glukosid M2.

Tabulka 2: Vizuální hodnocení připravených vzorků metodami M1 a M2

CMC	5 g/l DS 11 % + triton X-100			5 g/l DS 11 % + decyl glukosid
	M1	CMC	M2	M2
5x	viskózní kapalina	2,5x	tekutý gel	pevný homogenní gel, přítomnost bublin
7,5x	viskózní kapalina	-	-	-
10x	tekutý gel	-	-	-
15x	tekutý gel	7,5x	pevný homogenní gel	pevný homogenní gel, přítomnost bublin na povrchu
20x	tekutý gel	10x	pevný homogenní gel	pevný homogenní gel, přítomnost bublin na povrchu
25x	viskózní kapalina	12,5x	tekutý gel	tekutý gel, bez bublin
30x	kapalina	-	-	-
50x	kapalina	-	-	-
100x	kapalina	-	-	-

5.2 Reologie

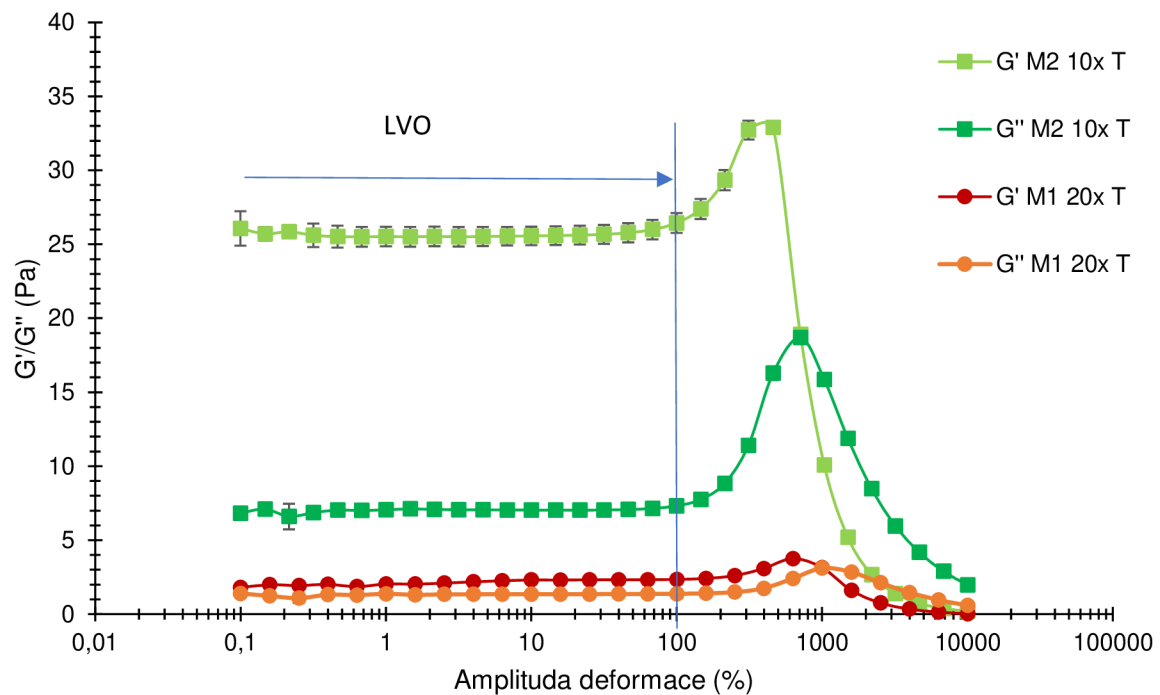
Vzorky byly během měření reologie podrobeny celkem třem testům: oscilačnímu amplitudovému, oscilačnímu frekvenčnímu a tokovému testu. Naměřená data byla zpracována v MS Excelu a vynesena do grafické podoby. Níže jsou vyhodnoceny výsledky a vzájemně porovnány v rámci různých podmínek přípravy.

5.2.1 Porovnání dvou vybraných metod pro přípravu hydrogelů

Pro přípravu palmitoyl hyaluronových hydrogelů byly v experimentální části této práce testovány dvě odlišné metody. Metoda M1 založena na smíchání roztoku palmHya s roztokem tenzidu a metoda M2 zahrnující rozpuštění pevného palmHya ve formě prášku v roztoku tenzidu. Z vizuálního porovnání vzorků o stejných koncentracích se jevila vhodnější metoda M2. Pro potvrzení tohoto odhadu bylo vytvořeno srovnání pomocí reologických testů.

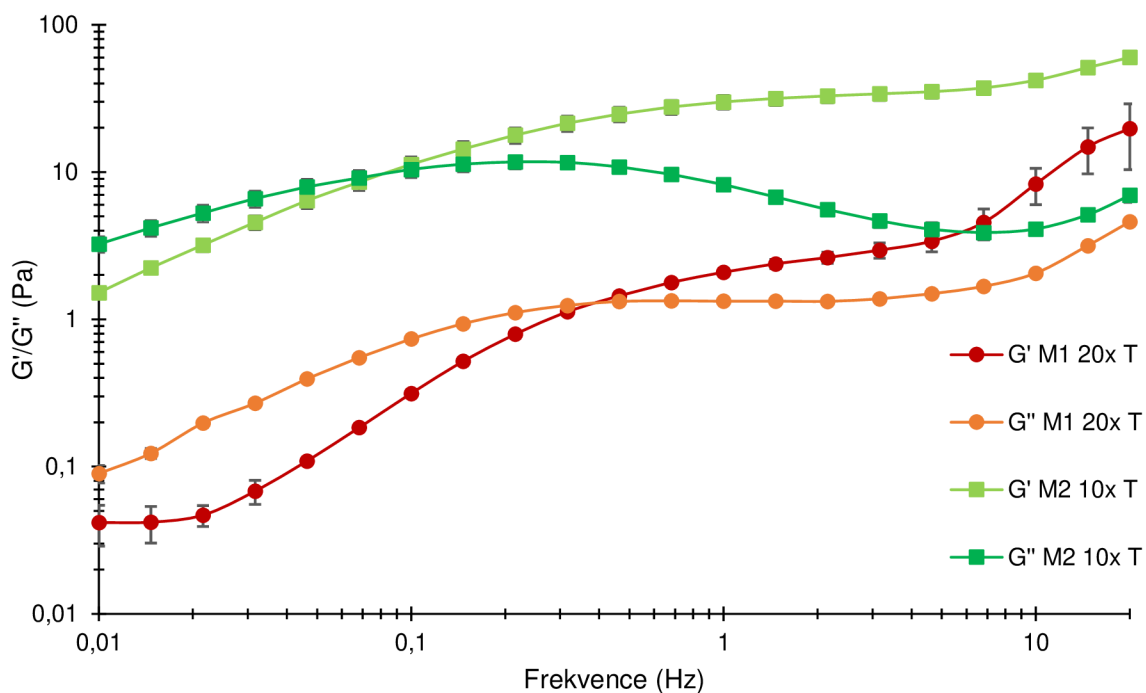
Ze závislosti viskozitního modulu G'' a elastického modulu G' na amplitudě deformace na obrázku 20 lze vyčíst následující. V obou případech převládá elasticita materiálu nad viskozitou, takže lze říct, že výsledným materiálem je viskoelastická látka s převahou elastické deformace, konkrétně gel. Nicméně u metody M1 je to dost hraniční. S rostoucí hodnotou elastického modulu roste tuhost gelu. Vyšší hodnota elastického modulu u metody M2 proto dokazuje vyšší pevnost materiálu, což potvrzuje fakt, že gel metody M1 byl již na první pohled

více tekutý. Odolnost materiálu charakterizuje délka LVO, během které je struktura materiálu schopna odolávat deformační síle. Ve chvíli, kdy dojde k trvalému porušení vazeb 3D sítě, dochází k poklesu elastického modulu, nárůstu modulu viskóznímu a jejich protnutí, které se nazývá bod překřížení. Z pevné viskoelastické látky se stává viskoelastická kapalina. V případě gelu metody M1 se bod překřížení nachází přibližně v 1000 % amplitudy deformace a u M2 700 %. Nelze říct, zda jsou hodnoty kvůli nízkým hodnotám G' a G'' metody M1 porovnatelné, ale pokud ano, vyšší odolnost gelu vůči mechanické deformaci by měl gel připravený metodou M1.



Obrázek 20: Závislost viskózního (G'') a elastického (G') modulu na amplitudě deformace pro srovnání dvou metod přípravy hydrogelů

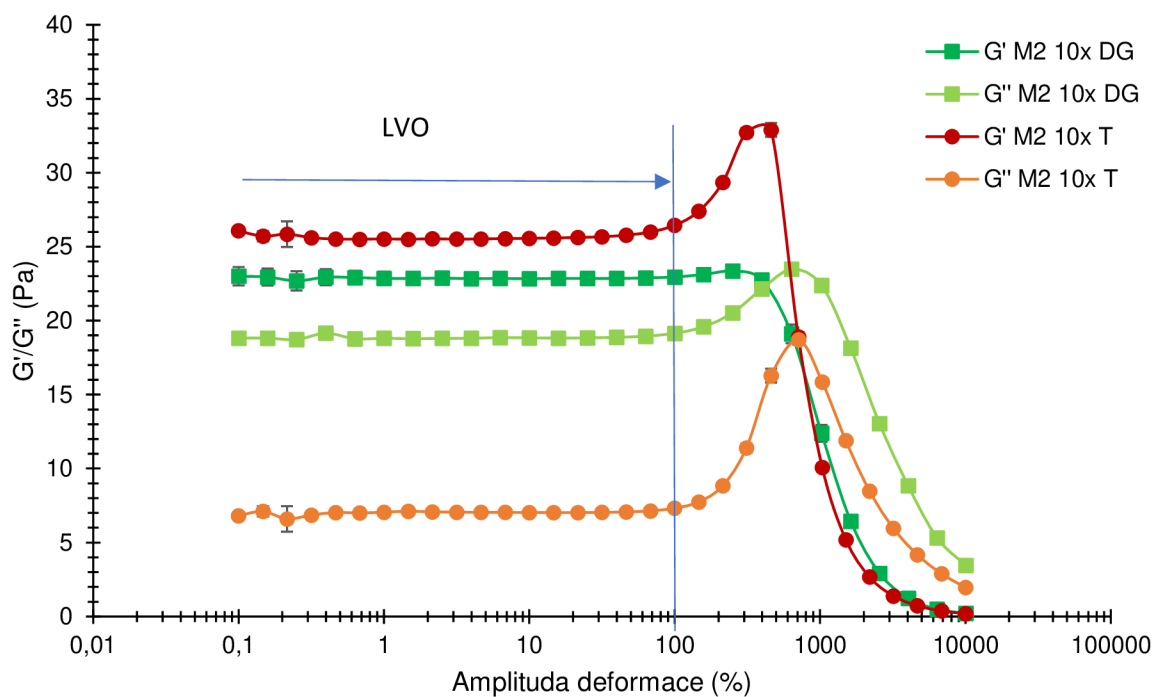
Na obrázku 21 je uvedena druhá závislost elastického modulu G' a viskózního modulu G'' tentokrát na frekvenci. Při nízkých frekvencích převažuje v obou případech modul viskózní, deformační energie způsobena třením je převedena na teplo, což se projeví poklesem viskozity. Naopak při vysokých hodnotách frekvence převažuje elastická deformace materiálu, proto dominuje modul G' . Takové chování je typické pro viskoelastické tekutiny. Z bodu protnutí obou modulů lze odvodit pevnost gelu. Čím dříve začne převažovat modul elastický (protnutí více vlevo) tím je gel pevnější. I v tomto měření bylo tedy potvrzeno, že pevnější gely vznikají přípravou pomocí metody M2.



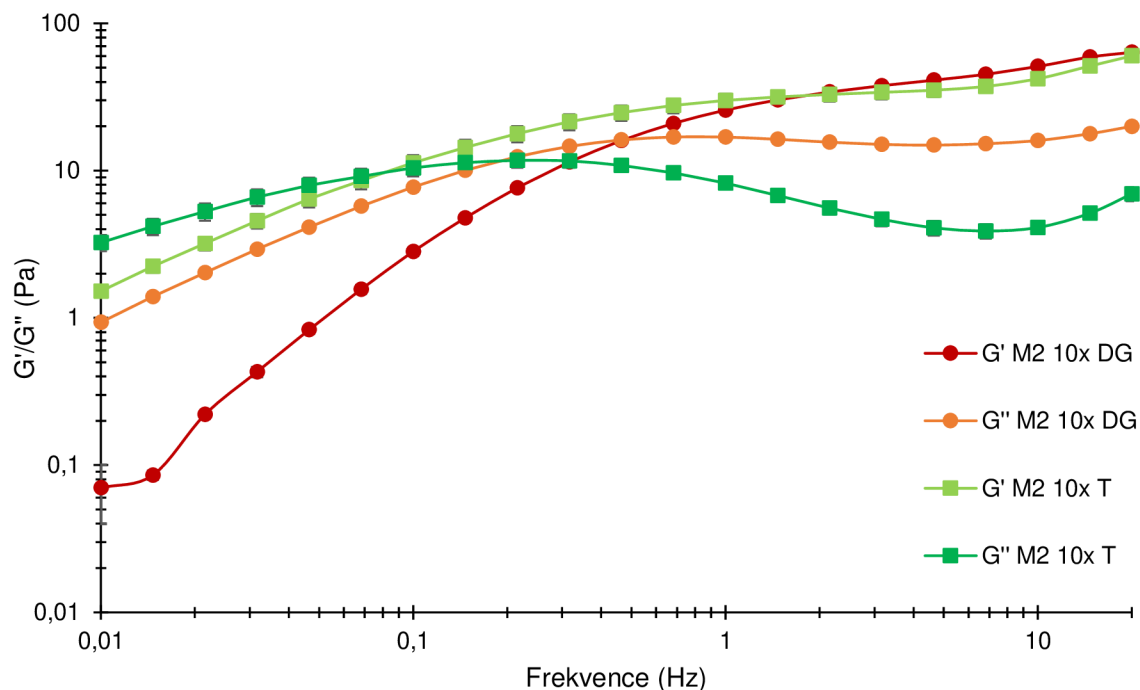
Obrázek 21: Závislost viskózního (G'') a elastického (G') modulu na frekvenci pro srovnání dvou metod přípravy hydrogelů

5.2.2 Srovnání gelů dvou různých tenzidů stejné koncentrace

Výběr tenzidu má vliv na vlastnosti výsledného hydrogelu, nejen v souvislosti s jeho nábojem, ale i velikostí a prostorovým uspořádáním. To potvrzují i výsledky měření dvou neiontových tenzidů decyl glukosidu a tritonu X-100 při stejné koncentraci. Křivky závislosti modulů G' a G'' na amplitudě deformace na obrázku 22 se liší jednak v rozmezí mezi G' a G'' , kde v případě tenzidu triton X-100 jednoznačně převažuje modul elastický nad viskózním, ale i v samotné hodnotě G' . Obě skutečnosti naznačují větší pevnost gelů v přítomnosti micel tritonu X-100. Z grafu na obrázku 23 vyplývá stejná skutečnost. Protnutí modulů G' a G'' nastalo v případě tritonu X-100 při nižší frekvenci a dříve začal převažovat elastický model charakteristický pro pevné látky. Bod překřížení gelů s decyl glukosidem má hodnotu okolo 400 %, gel s tritonem X-100 přibližně 700 %. Vyšší odolnost vůči mechanické deformaci má stejně jako vyšší pevnost hydrogel obsahující triton X-100.



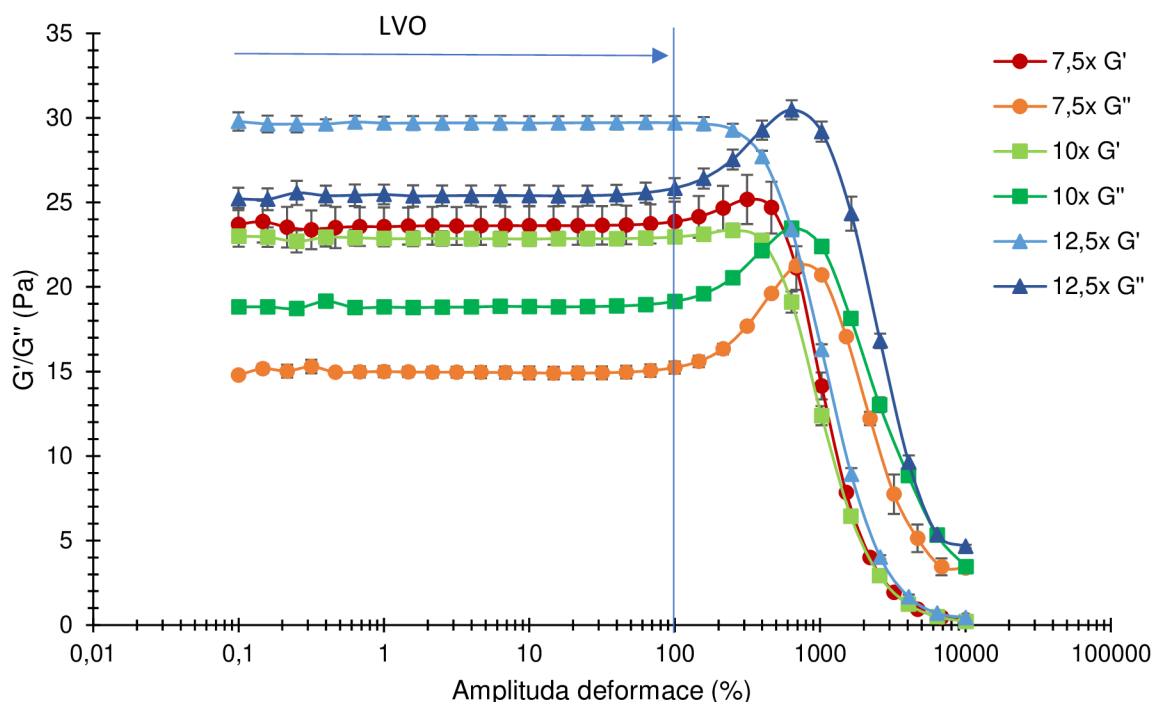
Obrázek 22: Závislost viskózního (G'') a elastického (G') modulu na amplitudě deformace pro srovnání dvou tenzidů o stejné koncentraci



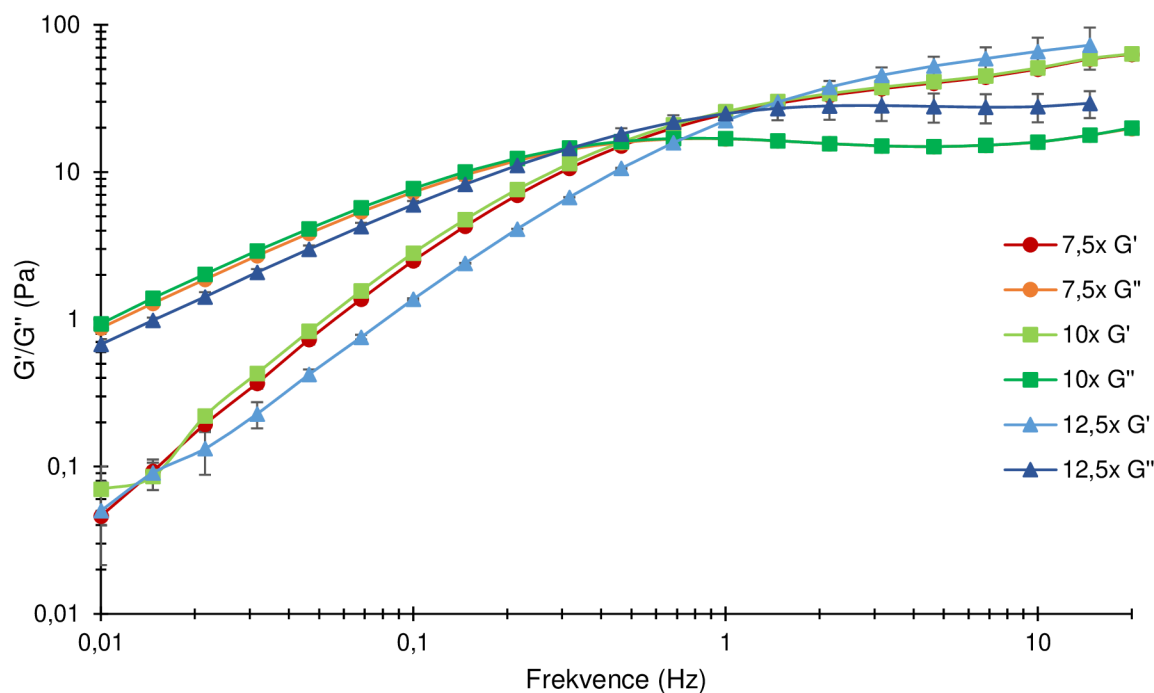
Obrázek 23: Závislost viskózního (G'') a elastického (G') modulu na frekvenci pro srovnání dvou tenzidů o stejné koncentraci

5.2.3 Srovnání gelů s měnící se koncentrací tenzidu decyl glukosid

Koncentrace tenzidu byla považována jako jeden z parametrů ovlivňující vlastnosti vzniklých hydrogelů. Z vizuálního srovnání byl odhalen prvotní nárůst pevnosti a poté pokles s rostoucí koncentrací. Pro potvrzení, zda hraje koncentrace tenzidu v přípravě opravdu nějakou roli, byly provedeny reologické testy pro decyl glukosid v třech vybraných koncentracích 7,5x; 10x a 12,5x CMC. Ze závislosti modulů G' a G'' na amplitudě deformace na obrázku 24 lze říct, že koncentrace tenzidu má vliv na pevnost i odolnost gelu. Nejvyšší pevnost má podle hodnoty G' gel s koncentrací tenzidu 12,5x CMC a podle rozdílu modulů 7,5x CMC. Nejdolnější gel podle hodnoty bodu překřížení okolo 1000 % obsahuje 7,5x CMC tenzidu (přibližně 400 % pro 10x CMC; 325 % pro 12,5x CMC). Druhá závislost se v hodnotách i tvaru křivek téměř překrývá, jak je vidět na obrázku 25. Pouze protnutí G' a G'' u koncentrace 12,5x CMC naznačuje možnost menší pevnosti oproti dvěma ostatním vzorkům. Celkově tedy nebyly zaznamenány markantní rozdíly, což může být dáno výběrem sobě dosti blízkých koncentrací. Pro lepší srovnatelnost by bylo při dalším měření vhodné vybrat koncentrace nižší a vyšší, aby byl případný rozdíl více výrazný a dalo se s větší přesností říct, zda má koncentrace tenzidu v tomto případě opravdu nějaký vliv.



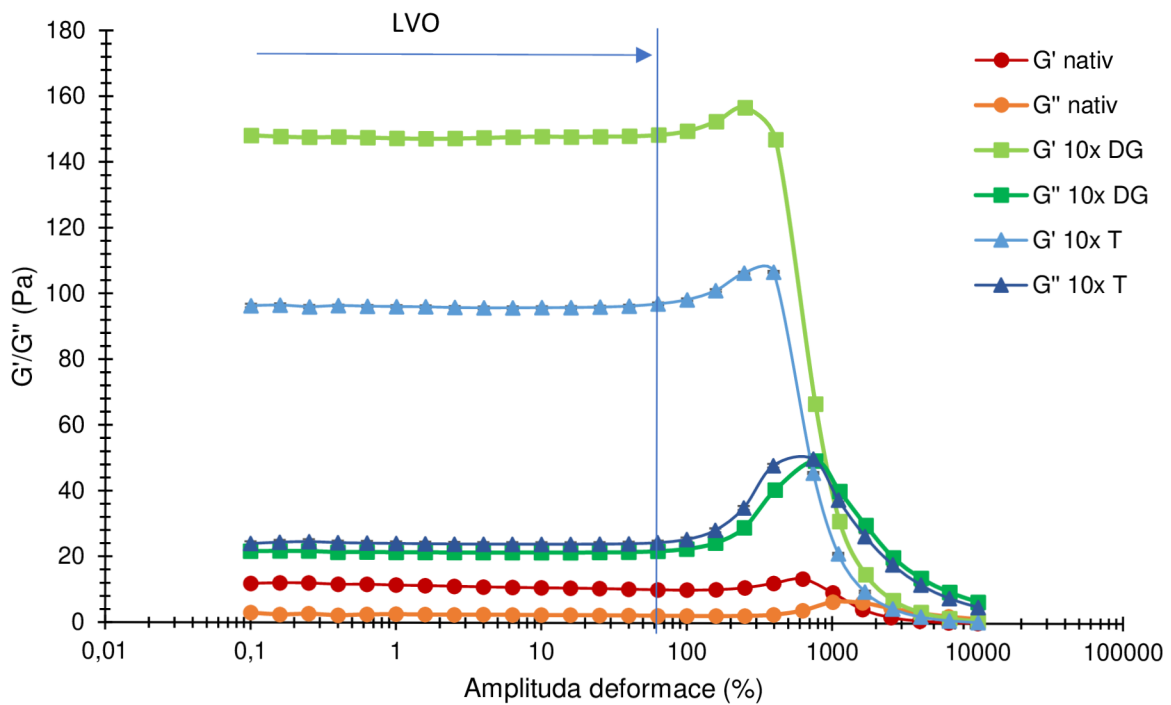
Obrázek 24: Závislost viskózního (G'') a elastického (G') modulu na amplitudě deformace pro srovnání měnící se koncentrace tenzidu



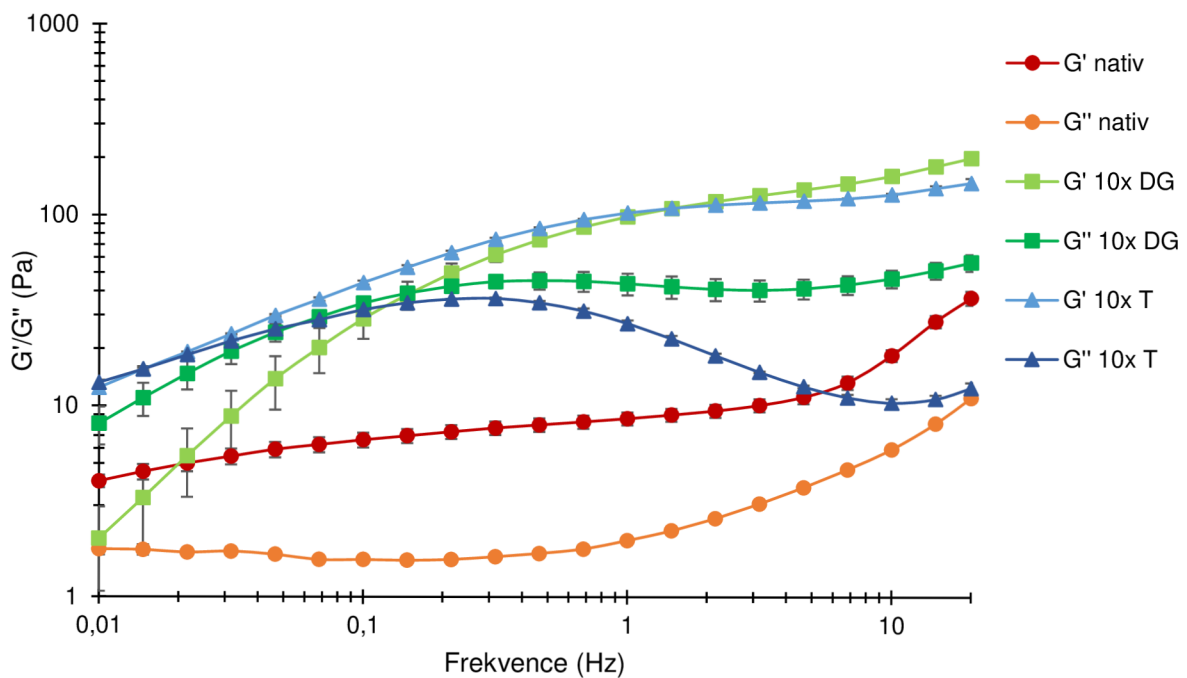
Obrázek 25: Závislost viskózního (G'') a elastického (G') modulu na frekvenci pro srovnání měnící se koncentrace tenzidu

5.2.4 Srovnání gelů s/bez přítomnosti micel

Palmitoyl hyaluronan je od určité koncentrace sám o sobě schopný agregovat a tvořit hydrogely. Otázkou tedy je, má nějaký význam k této látce přidávat micely? Pokud ano, jak to výsledné hydrogely ovlivní? Odpovědi lze nalézt v níže uvedených závislostech pro hydrogely s koncentrací 10 g/l vody palmitoyl hyaluronanu a koncentracemi 10x CMC tenzidů. Hned na prvním grafu na obrázku 26 je jednoznačný rozdíl modulů G' pro gely s micelami oproti G' gelu bez nich. Taktéž rozdíly G' a G'' jsou mnohem vyšší. Lze tedy předpokládat, že micely zvyšují pevnost gelu. Charakter křivek závislosti G' a G'' na frekvenci zůstal u vzorků s micelami stejný jako u předchozích, a i zde protnutí modulů naznačuje převahu pevnosti u gelu s tritonem X-100, viz. obrázek 27. Změnu lze zaznamenat u hydrogelu bez micel, zde převažuje elastický modul již při nízkých frekvencích. Oba moduly jsou však dost nízké. Vizualně byl nativní gel hodně křehký.



Obrázek 26: Závislost viskózního (G'') a elastického (G') modulu na amplitudě deformace pro srovnání gelů bez a s micelami

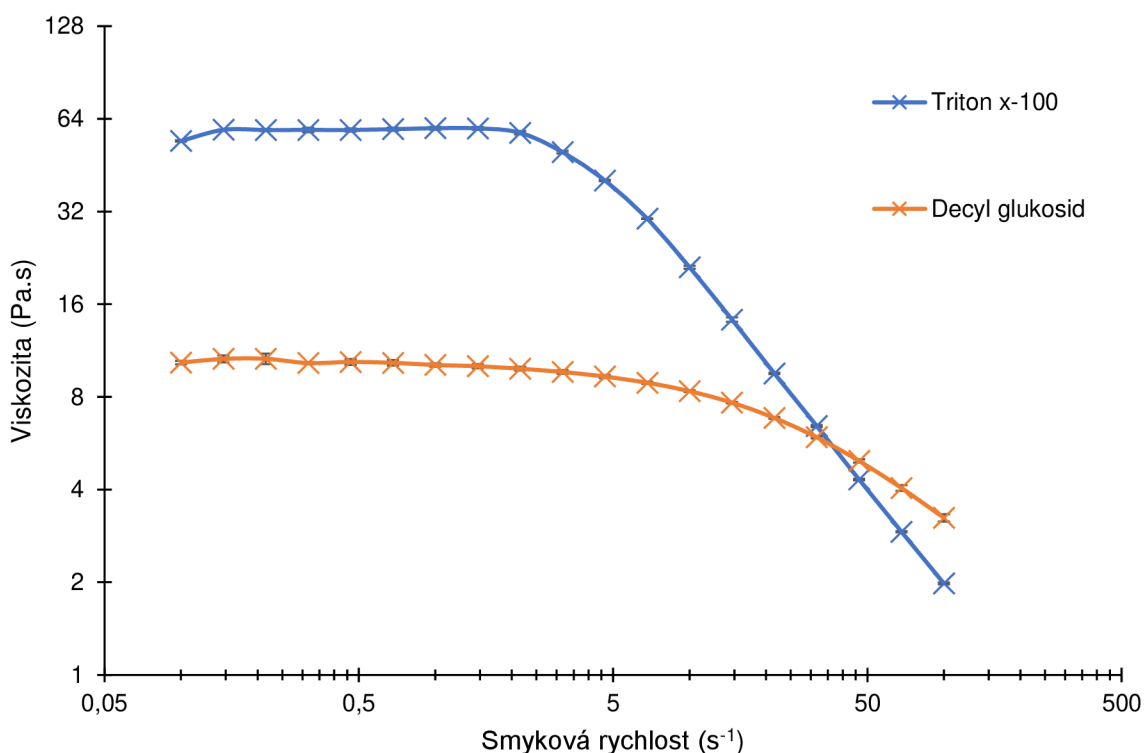


Obrázek 27: Závislost viskózního (G'') a elastického (G') modulu na frekvenci pro srovnání gelů bez a s micelami

5.2.5 Tokový test

Tokový test byl proveden s cílem zjistit viskozitní chování připravených hydrogelů při jejich namáhání pomocí aplikace rostoucí smykové rychlosti. Na obrázku 28 jsou znázorněny výsledné viskozitní tokové křivky vzorků 5 g/l palmHya + 12,5x CMC triton X-100/decyl glukosid. Do grafu byly vyneseny střední hodnoty dvou měření každého vzorku. Rozdíl střední hodnoty od naměřených hodnot byl do grafu vnesen ve formě chybových úseček. Ze závislosti lze na první pohled vyčíst, že počáteční viskozita vzorku s tritonem X-100 je násobně vyšší ve srovnání se vzorkem obsahující stejné množství decyl glukosidu. Do hodnoty smykové rychlosti přibližně 2 s^{-1} gel odolával smykovému tlaku a viskozita zůstala konstantní, poté nastal zlom a s narůstající smykovou rychlostí začala viskozita klesat. Důvodem bylo porušení síťových uzlů, které držely strukturu pohromadě a zajišťovali soudržnost hydrogelu. U decyl glukosidových vzorků není zaznamenán podobně rapidní pokles viskozity. To může znamenat, že počáteční viskozita je sice značně nižší v porovnání s druhými gely, avšak jejich síť je při namáhání odolnější.

Klesající křivky navíc potvrzují předpokládaný pseudoplastický charakter připravených hydrogelů. Při namáhání tedy nevykazují chování ideálně viskózní kapaliny.



Obrázek 28: Tokové křivky hydrogelů s 0,5 g/l vody palmitoyl hyaluronanu a 12,5x CMC tenzidů triton X-100 a decyl glukosid

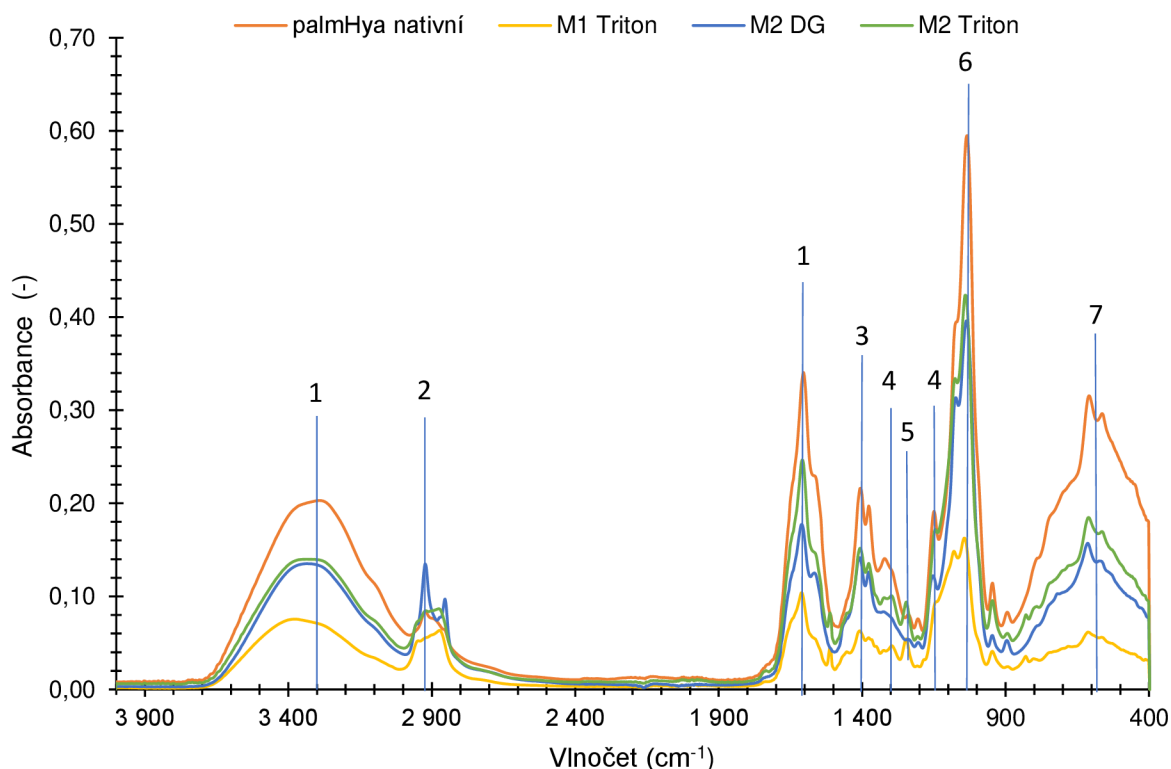
5.3 Infračervená spektrometrie

Z naměřených dat převedených Fourierovou transformací byla sestavena spektra pro vzorky obsahující vodu a vzorky suché po odpaření volně vázané vody. Cílem tohoto analytického měření bylo odhalení chemicko-strukturální podstaty vznikajících hydrogelů. Předpokladem byla inkorporace hydrofobních palmitových řetězců do vnitřního prostředí micel použitých tenzidů a posílení vazebných uzlů tvořících trojrozměrnou síť hydrogelu. Přímou spojitost, která by inkorporaci řetězců dokazovala, se ve spektrech vzorků s micelami v porovnání s gelem

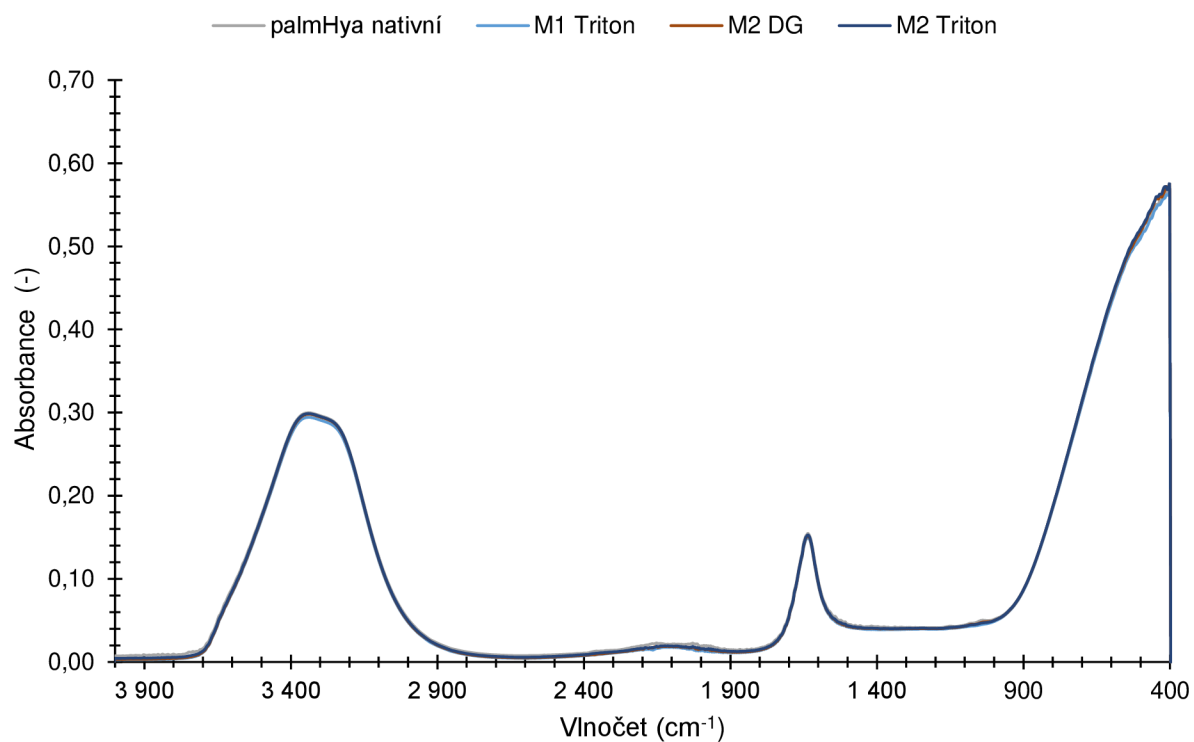
čistého palmitoyl hyaluronanu bohužel najít nepodařilo. Spektra byla i přesto vyhodnocena a níže v odstavci jsou popsány vyskytující se píky a porovnání spekter hydratovaných a suchých vzorků. K identifikaci jednotlivých píků byla využita online tabulka pro FT-IR od Merck [52].

Na obrázku 29 lze vidět, že spektra všech suchých vzorků jsou si velmi podobná, vesměs se až na pár detailů liší pouze intenzitou naměřených pásů, jinak se píky svou polohou vzájemně překrývají. Široké píky označené jako 1 v oblasti od 3000 cm^{-1} patří společně s píky v oblasti okolo 1600 cm^{-1} pevně vázané vodě ve struktuře hydrogelu, která nebyla samovolně odpařena jako tomu bylo v případě volné vody. Pík označený číslem 3 v oblasti kolem 1400 cm^{-1} patří COO^- skupině, která je důkazem, že se v látce nachází hyaluronan čili sodná sůl a nikoli kyselina hyaluronová. Nicméně píky označeny jako 4 v oblastech 1150 a 1300 cm^{-1} patří skupině COOH , takže existuje určitá pravděpodobnost, že ne všechny karboxylové skupiny jsou Na^+ obsazeny. Číslem 6 jsou označeny výrazné píky pro hydroxylové skupiny primárních a sekundárních alkoholů. Vyčnívající pík u decyl glykosidu v oblasti 2920 cm^{-1} patří vibracím C-H vazeb v jeho dlouhém uhlovodíkovém řetězci. Méně výrazné píky v oblasti kolem 1250 cm^{-1} značně zejména u vzorků obsahující triton X-100 pravděpodobně patří C-O vibracím etherových skupin. Oblast $400\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ je špatně čitelná, což můžeme být způsobeno převažující absorpcí záření krystalem.

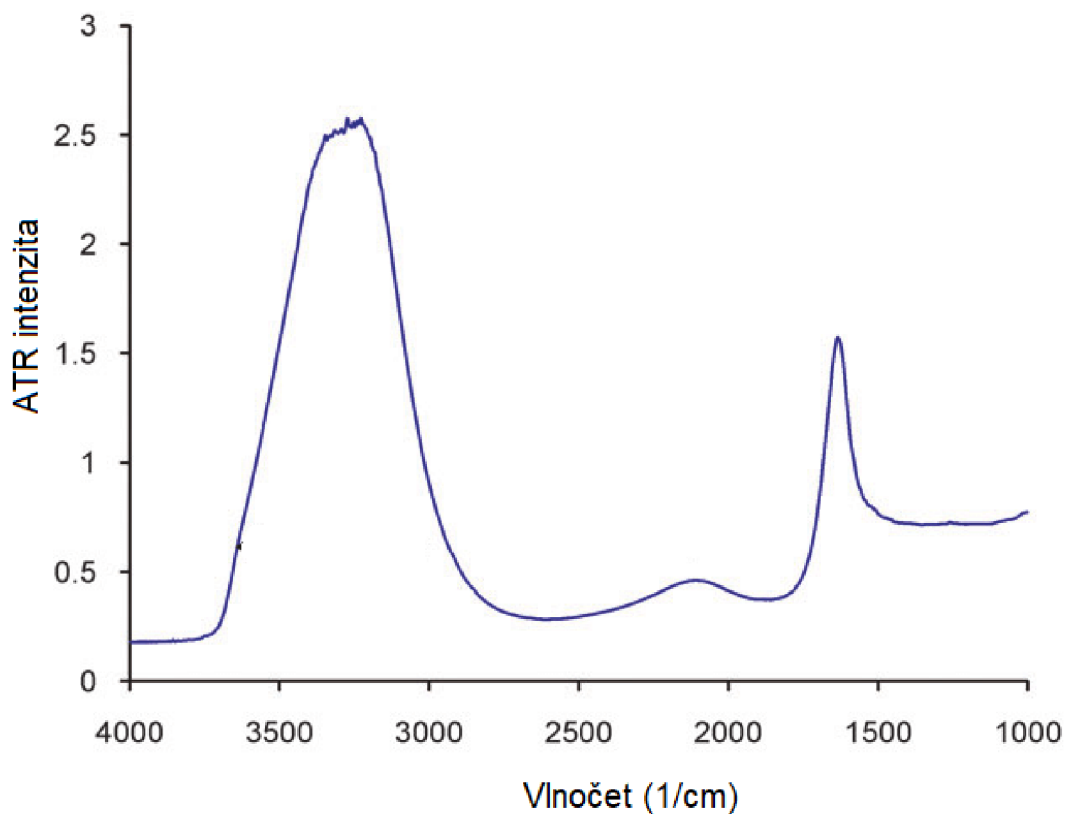
Obrázek 30 obsahuje spektra hydratovaných vzorků, která zcela odpovídají spektru vody uvedenému na obrázku 31. Signál vody ve všech případech jednoznačně překryl píky ostatních vibrací, a proto nelze z takového spektra vyčíst žádné relevantní informace. Do budoucna by mohlo být přínosné FT-IR měření vzorku v průběhu jeho vysychání, po vzoru *ENEV et. al.* [53], které by mohlo přinést více informací jak o struktuře, tak i povaze samotného vysychání a obsahu a rozložení vody ve struktuře hydrogelu.



Obrázek 29: FT-IR spektra pro vysušené vzorky připravených hydrogelů



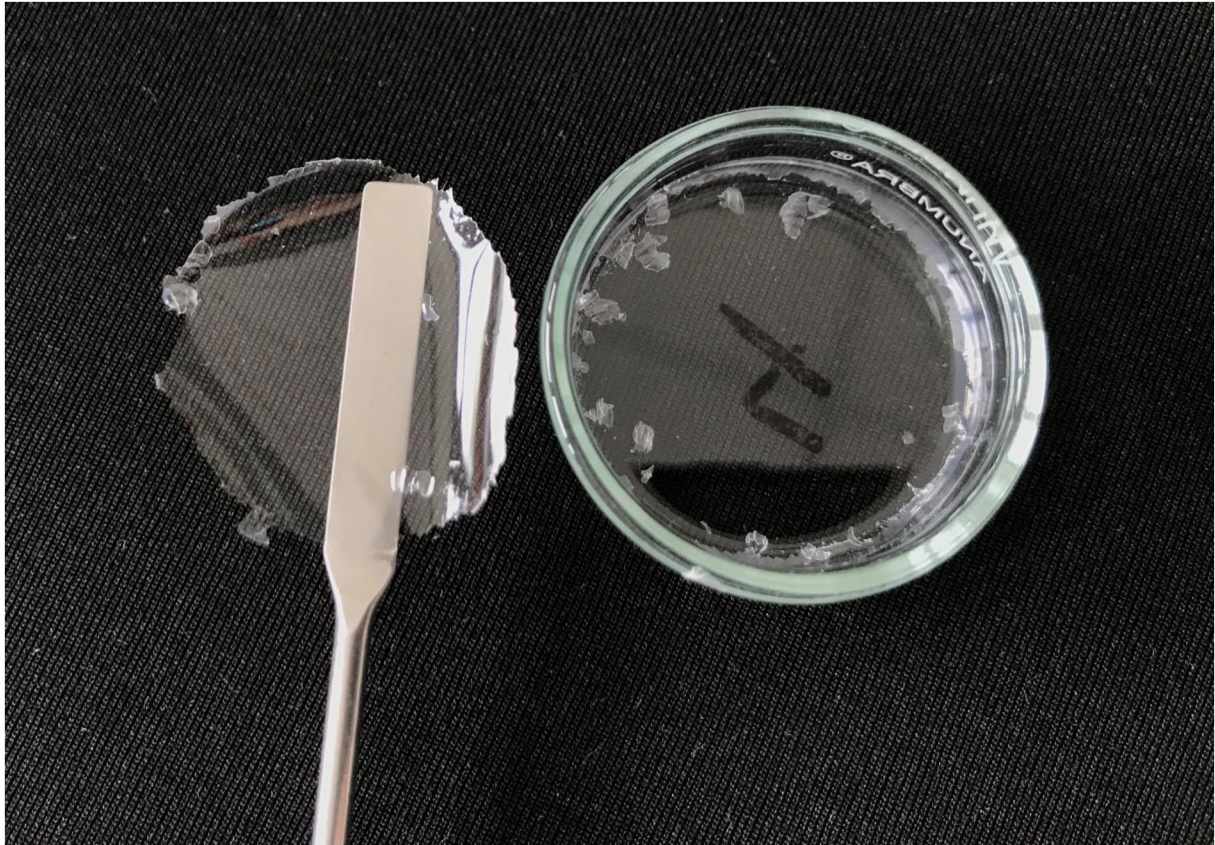
Obrázek 30: FT-IR spektrum vzorků v hydratované formě



Obrázek 31: FT-IR spektrum vody [54]

5.4 Schopnost botnání

Ze čtyř připravených vzorků byl jeden vybrán k vizuální charakterizaci sušiny. Po vysušení se na dně Petriho misky vytvořil průhledný rovnoměrný tenký film, který se při odebrání špachtlí lehce drolil, jak lze vidět na obrázku 32. Jinak byl pevný, nepružný a bylo možné jej snadno natrhnout.

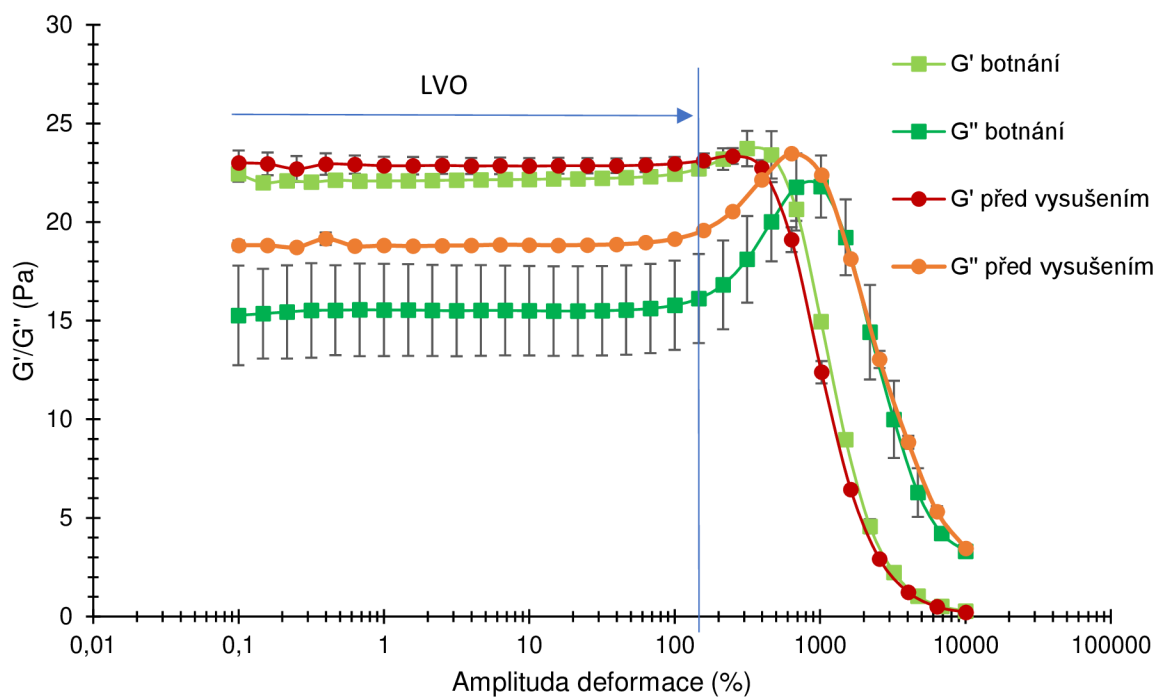


Obrázek 32: Tenký film připravený vysušením hydrogelu

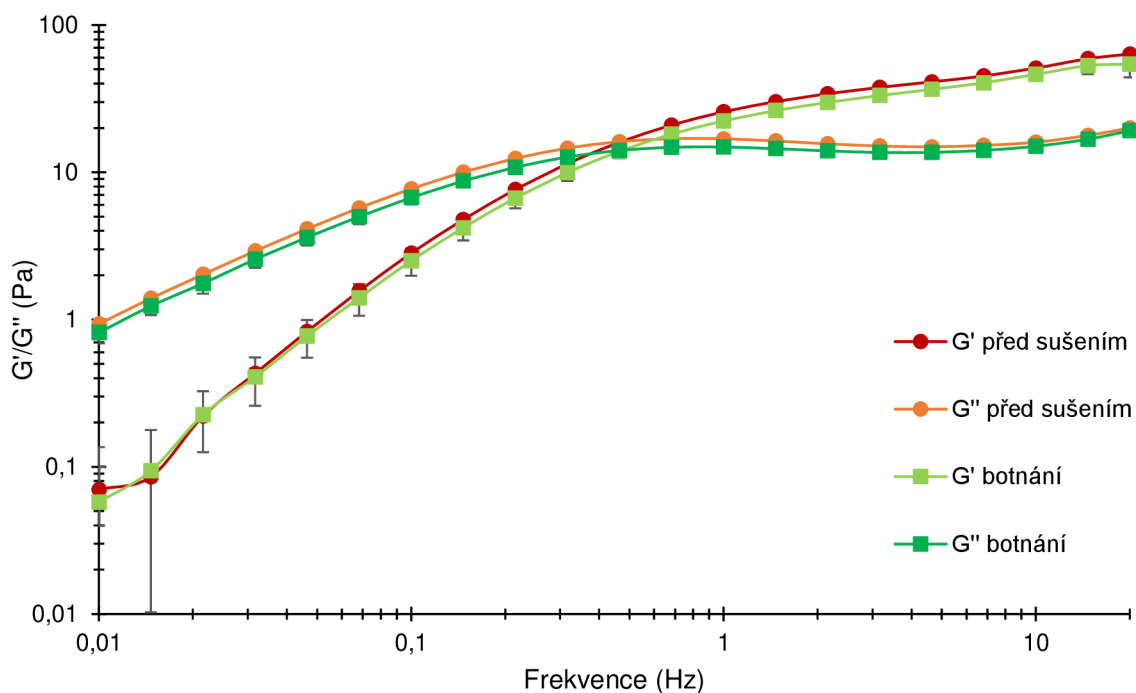
Zbylé tři vzorky byly po přidání 3 ml deionizované vody ponechány k samovolnému botnání po dobu 24 h. U všech vzorků došlo k absorpci veškerého objemu vody a vzniku na první pohled homogenního, průhledného, pevného gelu s velkou podobností gelu původnímu. Pomocí reologie byly všechny vzorky podrobeny amplitudovému a frekvenčnímu testu.

5.4.1 Reologie zpětně nabotnalých gelů

Pro detailnější ověření schopnosti hyaluronových gelů nabotnat po vysušení do původní podoby byly z výsledku reologických testů sestaveny závislosti G' a G'' modulů na amplitudě deformace na obrázku 33 a frekvenci na obrázku 34. Odchytky modulu G'' v amplitudovém testu mohou naznačovat, že dva připravené vzorky nebyly srovnatelně homogenní. Na druhou stranu křivky frekvenčního testu se téměř zcela překrývají. Celkově lze tedy říct, že jsou gely palmitoyl hyaluronanu schopny po vysušení absorbovat vodu a nabotnat do stejné podoby.



Obrázek 33: Závislost viskózního (G'') a elastického (G') modulu na amplitudě deformace pro ověření schopnosti botnáni



Obrázek 34: Závislost viskózního (G'') a elastického (G') modulu na frekvenci pro ověření schopnosti botnáni

6 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala možnostmi přípravy hydrogelů hydrofobně modifikovaného hyaluronanu v micelárním roztoku. Samotná práce je rozdělena na dvě části. Teoretická část pojednává o obecných informacích polysacharidů, jejich hydrofobních modifikacích, kyselině hyaluronové a palmitoyl hyaluronanu, tenzidech a jejich interakcích s polymery, hydrogelech a jejich využití v medicíně.

Experimentální část vychází ze získaných teoretických poznatků z literatury. V experimentech byl k přípravě hydrogelů použit hydrofobní derivát palmitoyl hyaluronan, tenzid triton X-100 a sacharidový biotenzid decyl glukosid. Triton X-100 byl zahrnut z důvodu finanční náročnosti decyl glukosidu k počátečním optimalizačním experimentům a později pro porovnání výsledků dvou tenzidů. Příprava hydrogelů probíhala pomocí dvou navržených metod: metoda smíchání dvou roztoků (M1) a metoda rozpuštění palmitoyl hyaluronanu v roztoku tenzidu (M2). S využitím první metody probíhala nejprve optimalizace koncentrací. Po vizuálním vyhodnocení byly pro charakterizaci vybrány koncentrace palmHya 5 a 10 g/l vody a koncentrace tenzidů 15x; 20x; 25x CMC. Jelikož gely připraveny metodou M1 byly dost tekoucí, byla pro přípravu navržena metoda M2. Gely připraveny metodou M2 byly na první pohled pevnější a méně tekly.

K charakterizaci gelů byly vybrány tři reologické testy (oscilační amplitudový, oscilační frekvenční a tokový), infračervená spektrometrie (IR) a test na schopnost botnání. Výsledky reologie i IR byly zpracovány do grafické podoby. V rámci oscilačních testů byly srovnány výsledky podle metod, typu tenzidu, měnící se koncentrace jednoho tenzidu a ne/přítomnosti micel. Výsledky potvrdily, že pevnější gely vznikají metodou M2, výběr tenzidu a následně i jeho koncentrace hraje v pevnosti a odolnosti roli a přítomnost micel má vliv na výsledný charakter hydrogelu. Jaký vliv přesně micely na hydrogel mají v porovnání s hydrogelem bez micel by mohlo být předmětem dalšího zkoumání. Ze souběžných výsledků Bc. Elišky Gruberové [55] to zatím vypadá, že hydrogely připraveny bez micel se projevují vyšší tuhostí a moduly charakteristickými spíše pro pevné látky, oproti modulům typickým spíše pro látky tekoucí, které se objevily u hydrogelů této práce. Pomocí tokových testů bylo odhaleno pseudoplastické chování gelů s micelami obou tenzidů.

Metoda IR byla vybrána s cílem odhalení principu interakcí tvorby gelu v přítomnosti micel. Cestou měření suchých vzorků se bohužel tento princip nepodařilo odhalit. Přínosnější informace by mohlo přinést měření v průběhu vysychání.

Za účelem zkoušky na schopnost botnání byly vzorky připravených gelu vysušeny. Zajímavým zjištěním byla podoba, do které gel vyschnul. Došlo k vytvoření rovnoměrného tenkého, průhledného a relativně pevného filmu. Po přidání vody byl gel schopen obnovit svou strukturu do původní podoby, což dokazují i výsledky reologických testů.

Pomocí experimentálního měření byla prokázána možnost přípravy hydrogelů založená na interakcích biopolymeru palmitoyl hyaluronanu s micelami. Povaha xerogelu a schopnost botnání, které byly navíc v průběhu měření odhaleny, by mohla mít do budoucna přínos při tvorbě biomateriálu pro medicínské aplikace například v tkáňovém inženýrství pro hojení ran. Výhodou je přítomnost micel, které mohou sloužit k inkorporaci a řízenému uvolňování léčivých či jinak bioaktivních látek. Dalším možným směrem bádání je ověření, zda hydrogel vzniká i v jiném než vodném prostředí například fyziologickém roztoku či kultivačním médiu, za účelem testování hydrogelu jako nosiče pro farmakologii či ke kultivaci buněk. Zajímavý by byl i výzkum vlivu náboje zvoleného tenzidu na samotnou gelaci výsledný hydrogel.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] BENEŠ, M., P. ČEFELÍN, J. KÁLAL, P. KRATOCHVÍL, M. KUČERA, B. MEISSNER, J. POUCHLÝ a J. ZACHOVAL. Základní definice termínů vztahujících se k polymerům. *Chemické listy*. 1985, (79), 281-295.
- [2] NIAOUNAKIS, Michael. *Biopolymers: Applications and Trends*. UK: Elsevier, 2015, 604 s. ISBN 9780323354332.
- [3] Biodegradable fossil-based polymers. *Bioplastics Guide* [online]. 2016 [cit. 2020-10-30]. Dostupné z: <http://www.bioplastics.guide/ref/fossil-based/biodegradable>
- [4] Funkce buněk a lidského těla: 1. Chemie živin. *Word Press* [online]. 2003 [cit. 2020-10-30]. Dostupné z: <http://fbt.cz/skripta/ii-premena-latek-a-energie-v-bunce/140-2/>
- [5] Funkce buněk a lidského těla: 2. Metabolismus pojivových tkání. *Word Press* [online]. 2003 [cit. 2020-11-03]. Dostupné z: <http://fbt.cz/skripta/iv-pohybova-soustava/2-metabolismus-pojivovych-tkani/>
- [6] Svatopluk Čech, Drahomír Horký, Ladislav Ilkovics, Irena Lauschová: Obecná histologie. Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů :: Portál Lékařské fakulty Masarykovy univerzity [online] , [cit. 03. 11. 2020]. Dostupný z WWW: <https://portal.med.muni.cz/clanek-371-obecna-histologie.html>. ISSN 1801-6103.
- [7] YALPANI, Manssur. A survey of recent advances in selective chemical and enzymic polysaccharide modifications. *Tetrahedron*. 1985, **41**(15), 2957-3020. ISSN 00404020. Dostupné z: doi:10.1016/S0040-4020(01)96652-9
- [8] TANAKA, R., J. MEADOWS, P. A. WILLIAMS a G. O. PHILLIPS. Interaction of hydrophobically modified hydroxyethyl cellulose with various added surfactants. *Macromolecules*. 1992, **25**(4), 1304-1310. ISSN 0024-9297. Dostupné z: doi:10.1021/ma00030a016
- [9] Xia Miao. Synthesis and characterization of hydrophobically modified derivatives of polysaccharides. Other [q-bio.OT]. Université de Grenoble; Sichuan University, 2011. English. Dostupné z: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00666983/>
- [10] CUNHA, Ana Gisela a Alessandro GANDINI. Turning polysaccharides into hydrophobic materials: a critical review. Part 1. Cellulose. *Cellulose*. 2010, **17**(5), 875-889. ISSN 0969-0239. Dostupné z: doi:10.1007/s10570-010-9434-6
- [11] FALLACARA, Arianna, Erika BALDINI, Stefano MANFREDINI a Silvia VERTUANI. Hyaluronic Acid in the Third Millennium. *Polymers*. 2018, **10**(7). ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym10070701
- [12] NECAS, J., L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER a J. KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinární Medicína*. 2008, **53**(8), 397-411. ISSN 03758427. Dostupné z: doi:10.17221/1930-VETMED
- [13] KOGAN, Grigorij, Ladislav ŠOLTÉS, Robert STERN a Peter GEMEINER. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*. 2006, **29**(1), 17-25. ISSN 0141-5492. Dostupné z: doi:10.1007/s10529-006-9219-z
- [14] KIANI, Chris, Liwen CHEN, Yao Jiong WU, Albert J YEE a Burton B YANG. Structure and function of aggrecan. *Cell Research*. 2002, **12**(1), 19-32. ISSN 1001-0602. Dostupné z: doi:10.1038/sj.cr.7290106
- [15] SZE, Jun Hui, Jeremy C. BROWNLIE a Christopher A. LOVE. Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review. *3 Biotech*. 2016, **6**(1). ISSN 2190-572X. Dostupné z: doi:10.1007/s13205-016-0379-9

- [16] TIWARI, Sanjay a Pratap BAHADUR. Modified hyaluronic acid based materials for biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019, **121**, 556-571. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.10.049
- [17] ŠLEZINGROVÁ, Klára, Daniela ŠMEJKALOVÁ, Martin BOBEK a Vladimír VELEBNÝ. Syntéza a charakterizace palmitoyl hyaluronanu. *Chemické listy*. 2012, **106**(S3), 554-567. ISSN 1213-7103 (on-line).
- [18] Speciality hyaluronan chemicals: Product catalog. Dolní Dobrouč: Contipro.
- [19] MATTHEOLABAKIS, George, Lara MILANE, Amit SINGH a Mansoor M. AMIJI. Hyaluronic acid targeting of CD44 for cancer therapy: from receptor biology to nanomedicine. *Journal of Drug Targeting*. 2015, **23**(7-8), 605-618. ISSN 1061-186X. Dostupné z: doi:10.3109/1061186X.2015.1052072
- [20] HOLMBERG, Krister, Bo JÖNSSON, Bengt KRONBERG a Björt LINDMAN. *Surfactants and polymers in aqueous solution*. 2nd ed. Chichester: Wiley, 2002. ISBN 9780471498834.
- [21] MISHRA, Manisha, P. MUTHUPRASANNA a K. SURYA PRABHA. Basics and Potential Applications of Surfactants - A Review. *International Journal of PharmTech Research*. CODEN (USA), 2009, 1(No.4), 1354-1365. ISSN 0974-4304.
- [22] BARTOVSKÁ, Lidmila. *Koloidní chemie: Micelární (asociativní) koloidy*. VŠCHT Praha, 2017. Dostupné také z: <http://fch-ped.bartovsky.eu/>
- [23] MÜLLEROVÁ, Martina, Marek ŠVÁB a Manuela MOREIRA DOS SANTOS. Měření kritických micelárních koncentrací tenzidů ve vedných roztocích. *Chemické listy*. 2007, **101**(6), 509-514
- [24] CHAKRABORTY, Tanushree, Indranil CHAKRABORTY, Soumen GHOSH a C. CARNERO RUIZ. The methods of determination of critical micellar concentrations of the amphiphilic systems in aqueous medium: 3 ratio method. *Arabian Journal of Chemistry*. 2011, **4**(3), 265-270. ISSN 18785352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2010.06.045
- [25] AGUIAR, J., P. CARPENA, J.A. MOLINA-BOLÍVAR a C. CARNERO RUIZ. On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1: 3 ratio method. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2003, **258**(1), 116-122. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9797(02)00082-6
- [26] MOHD. YASIR, Iti SOM a Kashish BHATIA. Status of surfactants as penetration enhancers in transdermal drug delivery. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 2012, **4**(1). ISSN 0975-7406. Dostupné z: doi:10.4103/0975-7406.92724
- [27] HOLMBERG, Krister. *Natural surfactants*. 2001, **6**(2), 148-159. ISSN 13590294. Dostupné z: doi:10.1016/S1359-0294(01)00074-7
- [28] KITAMOTO, Dai, Hiroko ISODA a Tadaatsu NAKAHARA. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants — from energy-saving materials to gene delivery carriers —. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2002, **94**(3), 187-201. ISSN 13891723. Dostupné z: doi:10.1016/S1389-1723(02)80149-9
- [29] JAHAN, Ruksana, Andrew M. BODRATTI, Marina TSIANOU a Paschalis ALEXANDRIDIS. Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2020, **275**. ISSN 00018686. Dostupné z: doi:10.1016/j.cis.2019.102061
- [30] FIUME, Monice M., Bart HELDRETH, Wilma F. BERGFELD, et al. Safety Assessment of Decyl Glucoside and Other Alkyl Glucosides as Used in Cosmetics. *International Journal of Toxicology*. 2013, **32**(5_suppl), 22S-48S. ISSN 1091-5818. Dostupné z: doi:10.1177/1091581813497764

- [31] ALFALAH, Maisa, Camille LORANGER, Denis SASSEVILLE, et al. Alkyl Glucosides. *Dermatitis*. 2017, **28**(1), 3-4. ISSN 2162-5220. Dostupné z: doi:10.1097/DER.0000000000000234
- [32] OYEN, M. L. Mechanical characterisation of hydrogel materials. *International Materials Reviews*. 2013, **59**(1), 44-59. ISSN 0950-6608. Dostupné z: doi:10.1179/1743280413Y.00000000022
- [33] H. GULREZ, Syed K., Saphwan AL-ASSAF a Glyn O. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications*. InTech, 2011, 2011-08-01. ISBN 978-953-307-268-5. Dostupné z: doi:10.5772/24553
- [34] AHMED, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. *Journal of Advanced Research*. 2015, **6**(2), 105-121. ISSN 20901232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jare.2013.07.006
- [35] PEPPAS, Nicholas A. a Allan S. HOFFMAN. Hydrogels. *Biomaterials Science*. Elsevier, 2013, 2013, 166-179. ISBN 9780123746269. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-087780-8.00020-6
- [36] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVA. *Co je co v povrchové a koloidní chemii* [online]. Vydavatelství VŠCHT Praha, 2005 [cit. 2021-04-16]. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/
- [37] WICHTERLE, O. a D. LÍM. Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature*. 1960, **185**(4706), 117-118. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/185117a0
- [38] YAHIA, LHocine. History and Applications of Hydrogels. *Journal of Biomedical Sciences*. 2015, **04**(02). ISSN 2254609X. Dostupné z: doi:10.4172/2254-609X.100013
- [39] MALKIN, Alexander Ya. a Avraam ISAYEV. *Rheology: Concepts, Methods and Applications*. 3. vydání. Toronto: ChemTec Publishing, 2017. ISBN 978-1-927885-22-2.
- [40] MEZGER, Thomas G. *The Rheology Handbook: For users of rotational and oscillatory rheometers*. 5. vydání. Německo: Vincentz Network, 2020. ISBN 978-3866305328.
- [41] FLOW PROPERTIES OF POLYMERS. *Polymer Properties Database* [online]. [cit. 2021-7-23]. Dostupné z: <https://polymerdatabase.com/polymer%20physics/Viscosity2.html>
- [42] HOLUBOVÁ, Renata. *Základy reologie a reometrie kapalin*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-4178-8.
- [43] MEZGER, Thomas G. *Applied Rheology: With Joe Flow on Rheology Road*. Graz, Rakousko: Anton Paar, 2015. ISBN 978-3-9504016-0-8.
- [44] SAU, Arjun C. a Leo M. LANDOLL. Synthesis and Solution Properties of Hydrophobically Modified (Hydroxyethyl)cellulose. *Polymers in Aqueous Media*. Washington, DC: American Chemical Society, 1989, 1989-05-05, , 343-364. *Advances in Chemistry*. ISBN 9780841215481. Dostupné z: doi:10.1021/ba-1989-0223.ch018
- [45] MLČOCHOVÁ, Petra, Slavomír BYSTRICKÝ, Bohumil STEINER, Eva MACHOVÁ, Miroslav KOŮŠ, Vladimír VELEBNÝ a Martin KRČMÁŘ. Synthesis and characterization of new biodegradable hyaluronan alkyl derivatives. *Biopolymers*. 2006, **82**(1), 74-79. ISSN 0006-3525. Dostupné z: doi:10.1002/bip.20461

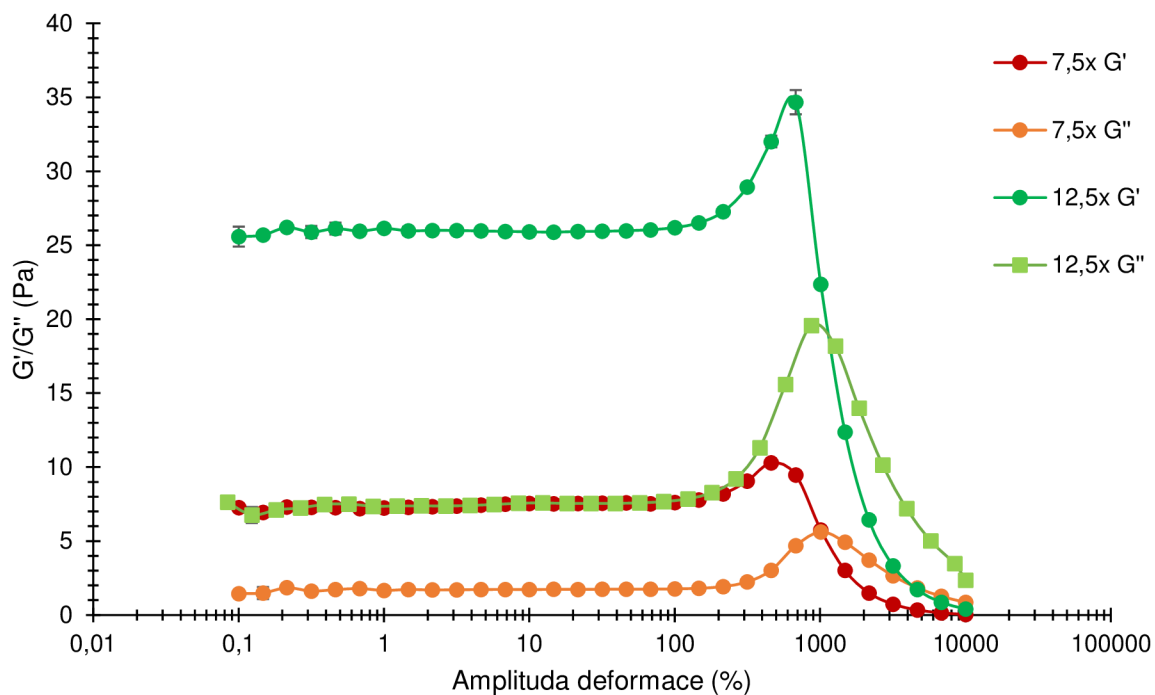
- [46] OH, Eun Ju, Kitae PARK, Ki Su KIM, et al. Target specific and long-acting delivery of protein, peptide, and nucleotide therapeutics using hyaluronic acid derivatives. *Journal of Controlled Release*. 2010, **141**(1), 2-12. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2009.09.010
- [47] FOGLAROVÁ, Marcela, Josef CHMELAR, Gloria HUERTA-ANGELES, Hana VÁGNEROVÁ, Jaromír KULHÁNEK, Kateřina BARTOŇ TOMÁNKOVÁ, Antonín MINAŘÍK a Vladimír VELEBNÝ. Water-insoluble thin films from palmitoyl hyaluronan with tunable properties. *Carbohydrate Polymers*. 2016, **144**, 68-75. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2016.02.027
- [48] SOGORKOVA, Jana, Vojtech ZAPOTOCKY, Martin CEPA, et al. Optimization of cell growth on palmitoyl-hyaluronan knitted scaffolds developed for tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2018, **106**(6), 1488-1499. ISSN 15493296. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.36353
- [49] PANMAI, Santipharp, Robert K. PRUD'HOMME, Dennis G. PEIFFER, Steffen JOCKUSCH a Nicholas J. TURRO. Interactions between Hydrophobically Modified Polymers and Surfactants: A Fluorescence Study. *Langmuir*. 2002, **18**(10), 3860-3864. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la020165g
- [50] BU, Hwaitian, Anna-Lena KJØNIKSEN, Kenneth D. KNUDSEN, Bo NYSTRÖM a Nicholas J. TURRO. Characterization of interactions in aqueous mixtures of hydrophobically modified alginate and different types of surfactant: A Fluorescence Study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2007, **293**(1-3), 105-113. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2006.07.028
- [51] LI, Qin, Lin YE, Yi CAI a Ronghua HUANG. Study of rheological behavior of hydrophobically modified hydroxyethyl cellulose. *Journal of Applied Polymer Science*. 2006, **100**(4), 3346-3352. ISSN 0021-8995. Dostupné z: doi:10.1002/app.23593
- [52] IR Spectrum Table & Chart. *Merck* [online]. [cit. 2021-7-23]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ir-spectrum-table>
- [53] ENEV, Vojtěch, Petr SEDLÁČEK, Sabína JARÁBKOVÁ, Tomáš VELCER a Miloslav PEKAŘ. ATR-FTIR spectroscopy and thermogravimetry characterization of water in polyelectrolyte-surfactant hydrogels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2019, **575**, 1-9. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2019.04.089
- [54] MOJET, Barbara Louise, Sune Dalgaard EBBESEN a Leon LEFFERTS. Light at the interface: the potential of attenuated total reflection infrared spectroscopy for understanding heterogeneous catalysis in water. *Chemical Society Reviews*. 2010, **39**(12). ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/c0cs00014k
- [55] GRUBEROVÁ, Eliška. Gelace hydrofobizovaného hyaluronanu [online]. Brno, 2021 [cit. 2021-07-28]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131382>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Miloslav Pekař.

8 SEZNAM PŘÍLOH

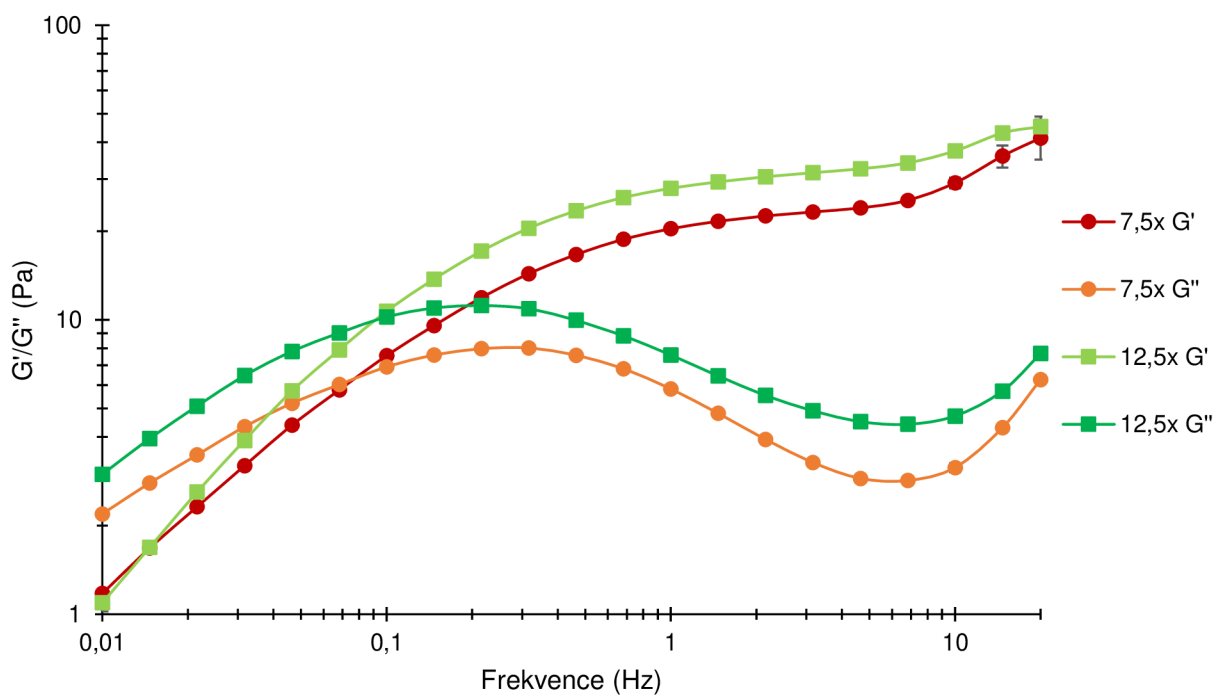
Příloha 1 Závislost G' a G'' modulů na amplitudě deformace pro tenzid triton x-100 a metodu M2	57
Příloha 2 Závislost G' a G'' modulů na frekvenci pro tenzid triton X-100 a metodu M2.....	57
Příloha 3 Závislost G' a G'' modulů na amplitudě deformace pro triton x-100 a metodu M1 ..	58
Příloha 4 Závislost G' a G'' modulů na frekvenci pro triton X-100 a metodu M1	58
Příloha 5 Tabulka hmotností pro test botnání	59

9 PŘÍLOHY

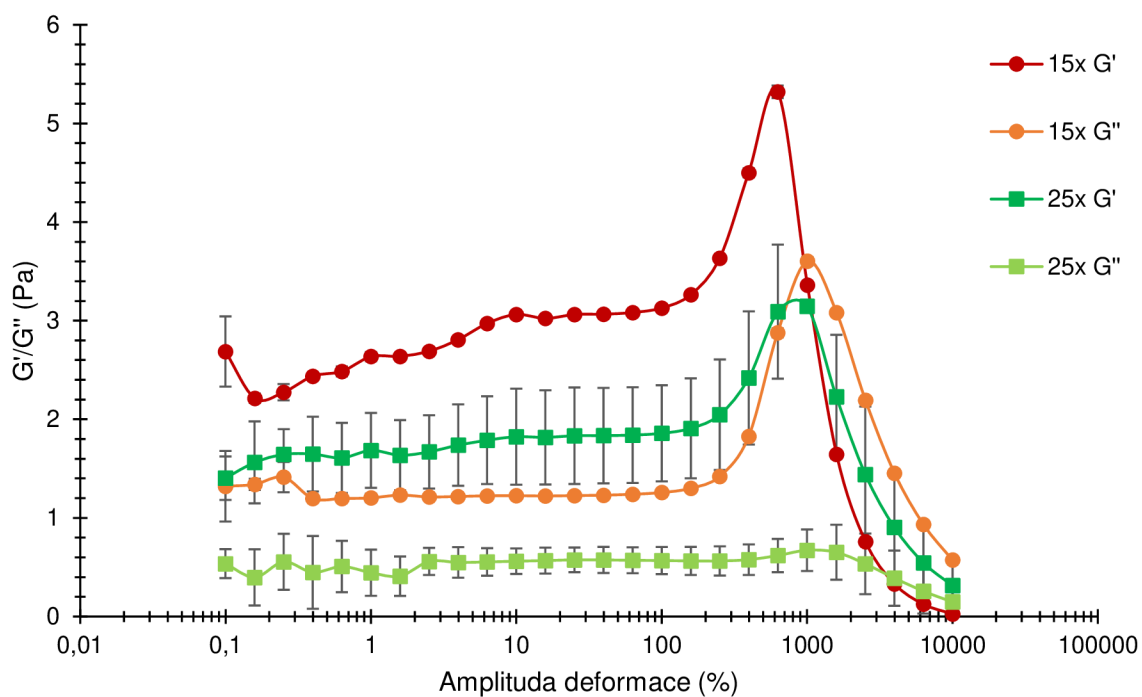
9.1 Doplnující výsledky reologie



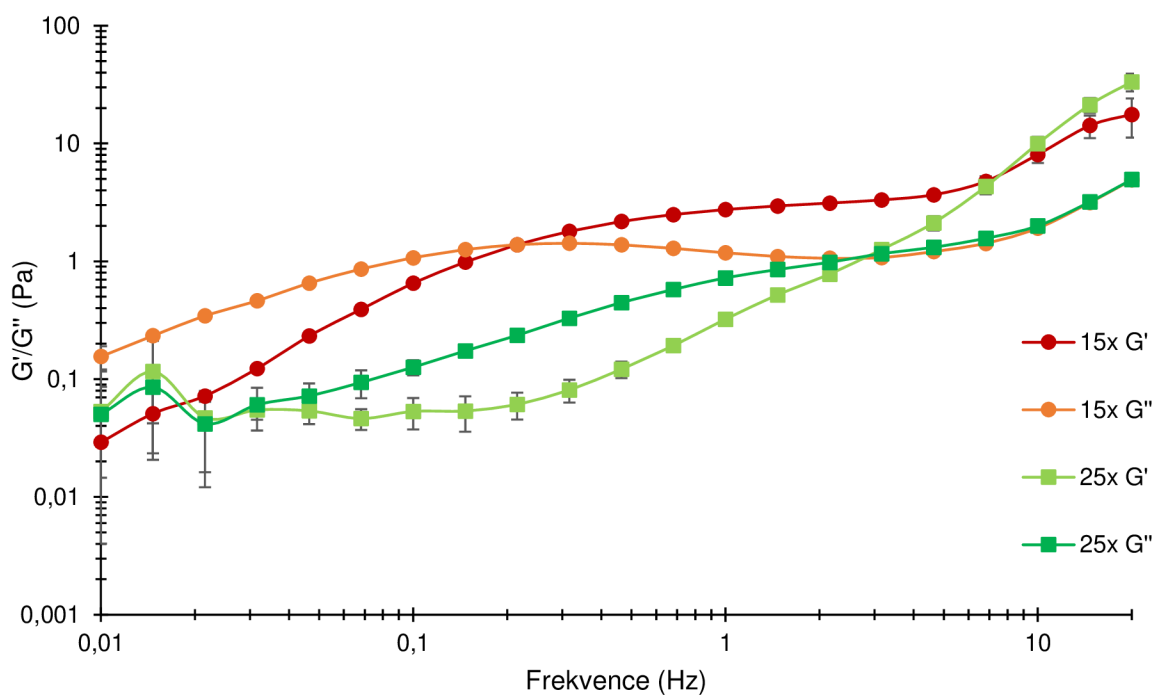
Příloha 1: Závislost G' a G'' modulů na amplitudě deformace pro tenzid triton x-100 a metodu M2



Příloha 2: Závislost G' a G'' modulů na frekvenci pro tenzid triton X-100 a metodu M2



Příloha 3: Závislost G' a G'' modulů na amplitudě deformace pro triton x-100 a metodu M1



Příloha 4: Závislost G' a G'' modulů na frekvenci pro triton X-100 a metodu M1

Příloha 5: Tabulka hmotností pro test botnání

vzorek	hmotnost (g)					
	palimotyl hyaluronan DS = 11 %	roztok decyl glukosid 10x CMC	hydrogel	sušina	voda	hydrogel
1	0,0181	2,9806	2,4056	0,0307	3,0172	2,7982
2	0,0186	3,0161	2,8101	0,0289	3,0142	3,0185
3	0,0172	3,0088	2,6896	0,0247	0,0208	2,987
4	0,0176	3,0065	2,7763	0,0332	3,0096	3,0048