



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

HYALURONOVÉ GELY PRO ŘÍZENÉ UVOLŇOVÁNÍ AKTIVNÍCH LÁTEK

HYALURONIC GELS FOR CONTROL RELEASE OF ACTIVE SUBSTANCES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Veronika Hekrlová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1623/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Veronika Hekrlová**
Studijní program: Spotřební chemie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Hyaluronové gely pro řízené uvolňování aktivních látek

Zadání diplomové práce:

1. Seznámit se s problematikou hyaluronových gelů a inkorporace aktivních látek.
2. Seznámit se s možnostmi studia uvolňování aktivních látek z gelů.
3. Na základě poznatků získaných v předchozích bodech navrhnout a provést experimenty.
4. Zhodnotit výsledky experimentů a formulovat závěry.

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

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

Bc. Veronika Hekrlová
studentka

prof. Ing. Martina Klučáková,
Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na vývoj materiálů na bázi oxidovaného derivátu kyseliny hyaluronové (HA-Ox) zesíťovaného pomocí bifunkčního alkoxyaminu POA. Hydrogely byly studovány jako potenciální matrice pro řízené uvolňování biologických léčiv. Za tímto účelem byly připraveny hydrogely s obsahem hovězího sérového albuminu (BSA) jako model aktivní látky. Vlastnosti hydrogelů byly ovlivňovány koncentrací derivátu (10 mg/ml, 20 mg/ml a 30 mg/ml). V první části práce byly u připravených hydrogelů hodnoceny viskoelastické vlastnosti, bobtnavost a obsah sušiny. Sušina výchozího derivátu hyaluronanu a hmotnost polymerní sítě v hydrogelech byla stanovena gravimetricky a pomocí TGA (ve všech případech okolo 80 hm.%). Rozdíl hmotností polymeru obsaženého v hydrogelech před a po bobtnání prokázal, že během bobtnání dochází k vyplavování nezesíťovaného solů z hydrogelu (okolo 10 až 20 hm.%). U hydrogelů o koncentraci 10 mg/ml kvůli tomuto jevu dochází k odbobtnání hydrogelů, zatímco jejich koncentrovanější analogy i po odplavení solů bobtnají. Velikosti elastických modulů potřebné pro výpočet ok polymerní sítě byly zjištěny pomocí reologických měření (amplitudový a frekvenční test). Samotná velikost ok polymerní sítě byla počítána pomocí dvou běžně užívaných teorií: Teorie rovnovážného bobtnání (TRB) a Teorie kaučukové elasticity (TKE). Velikost ok u gelů bez BSA o koncentraci derivátu 10 až 30 mg/ml byla podle TRB stanovena na 347 ± 29 nm, 319 ± 15 nm, 295 ± 6 nm a podle TKE 345 ± 30 nm, 308 ± 14 nm, 268 ± 5 nm. Pro hydrogely s BSA byly zjištěny velikosti ok polymerní sítě podle TRB 373 ± 34 nm, 307 ± 11 nm, 281 ± 7 nm a podle TKE 372 ± 32 nm, 297 ± 11 nm, 258 ± 6 nm. Velikost ok polymerní sítě klesá s vyšší koncentrací derivátu. V druhé části práce bylo sledováno uvolňování modelové aktivní látky BSA spektrofotometricky pomocí fluorescenčního značení. Použitím Korsmeyer-Peppasova modelu bylo zjištěno, že u všech tří použitých koncentrací derivátu je primárním mechanismem uvolňování difúze.

KLÍČOVÁ SLOVA

hydrogel, oxidovaný derivát HA, řízené uvolňování léčiv, velikost ok polymerní sítě, Korsmeyer-Peppasův model

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on the development of materials based on oxidized hyaluronic acid derivative (HA-Ox) crosslinked using bifunctional alkoxyamine POA. Hydrogels have been studied as potential matrices for the controlled release of biological drugs. For this purpose, hydrogels containing bovine serum albumin (BSA) as model of the active substances were prepared. The properties of the hydrogels were affected by the concentration of the derivative (10 mg / ml, 20 mg / ml and 30 mg / ml). In the first part of the work, the viscoelastic properties, swelling and dry matter content of the prepared hydrogels were evaluated. The dry matter of the starting hyaluronan derivative and the weight of the polymer network in the hydrogels were determined gravimetrically and by TGA (in all cases about 80% w/w). The difference in weight of the polymer contained in the hydrogels before and after swelling showed that the non-crosslinked sol leaches out of the hydrogel during swelling (about 10-20% w/w). Due to this phenomenon, hydrogels with a concentration of 10 mg / ml are depleted of hydrogels, while their more concentrated analogues swell even after the sol has washed off. The sizes of elastic moduli needed to calculate the mesh of the polymer network were determined using rheological measurements (amplitude and frequency test). The mesh size of the polymer network itself is calculated using two commonly used theories: Equilibrium Swelling Theory (EST) and Rubber Elasticity Theory (RET). The mesh size of BSA-free gels with a derivative concentration of 10 to 30 mg/ml was determined according to EST to 347 ± 29 nm, 319 ± 15 nm, 295 ± 6 nm and according to RET 345 ± 30 nm, 308 ± 14 nm, 268 ± 5 nm. For hydrogels with BSA, the mesh sizes of the polymer network were determined according to EST 373 ± 34 nm, 307 ± 11 nm, 281 ± 7 nm and according to RET 372 ± 32 nm, 297 ± 11 nm, 258 ± 6 nm. The mesh size of the polymer network decreases with higher derivative concentration. In the second part of the work, the release of the model active substance BSA was monitored spectrophotometrically using fluorescent labeling. Using the Korsmeyer-Peppas model, it was found that diffusion release is the primary mechanism.

KEY WORDS

hydrogel, oxidized HA derivative, drug release, mesh size, Korsmeyer-Peppas model

HEKRLOVÁ, Veronika. *Hyaluronové gely pro řízené uvolňování aktivních látek* [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-03-15]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139239>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Martina Klučáková.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární 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.

.....
Bc. Veronika Hekrlová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce prof. Ing. Martině Klučákové, PhD, za odborné vedení a zaštitění mé práce na Ústavu fyzikální a spotřební chemie. Moje velké díky patří i PharmDr. Martinu Pravdovi PhD. a Ing. Evženu Toropitsynovi z firmy Contipro a.s. za umožnění studijní stáže a za cenné rady během zpracovávání teoretické i praktické části. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za finanční, a především psychickou podporu během celého studia, bez níž by dokončení tohoto studia nebylo možné.

OBSAH

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část	9
2.1	Hydrogely.....	9
2.1.1	Typy hydrogelů	9
2.1.2	Vznik a stabilita gelů.....	10
2.1.3	Botnání	11
2.1.4	Mechanické vlastnosti hydrogelu.....	11
2.2	Strukturální analýza hydrogelu	13
2.2.1	Teorie rovnovážného botnání	13
2.2.2	Teorie gumové elasticity	14
2.3	Výpočet mesh size.....	15
2.4	Mechanismy uvolňování léčiv z polymerní matrice	16
2.4.1	Difúze	17
2.4.2	Kinetické modely pro uvolňování látek	17
3	Současný stav řešené problematiky	19
3.1	Hydrogely jako nosiče aktivních látek.....	19
3.2	<i>In situ</i> síťované hydrogely na bázi hyaluronanu	19
3.3	Biofarmaceutika	21
3.3.1	Sérový albumin	21
4	Cíl práce	24
5	Experimentální část.....	25
5.1	Chemikálie	25
5.1.1	Oxidovaný derivát kyseliny hyaluronové	25
5.2	Přístroje	26
5.3	Metody	26
5.3.1	Příprava zásobního roztoku POA	26
5.3.2	Příprava hydrogelů	26
5.3.3	Charakterizace hydrogelů.....	28
5.4	Rychlost uvolňování BSA z hydrogelů.....	28
5.4.1	Uvolňování BSA a FITC-BSA.....	28
5.4.2	Stanovení BSA metodou dle Bradfordové	29

5.4.3 Stanovení BSA pomocí UV/VIS spektrofotometrie	29
6 Výsledky a diskuze	31
6.1 Příprava hydrogelů	31
6.2 Hmotnost polymerní sítě obsažené v hydrogelech.....	31
6.3 Botnání	31
6.3.1 Viskoelastické vlastnosti	33
6.4 Výpočet velikosti ok polymerní sítě	36
6.5 Stanovení vyloučeného BSA pomocí metody dle Bradfordové	38
6.6 Stanovení uvolněného BSA pomocí fluorescenčního značení.....	38
7 Závěr	41
8 Bibliografie	43
9 Seznam zkratk	50
10 Přílohy	51
10.1Příloha č. 1 Teflonové formy pro výrobu hydrogelů	51
10.2Příloha č. 2 Lyofilizované hydrogely	51

1 ÚVOD

Makromolekulární gely jsou již řadu let využívány jako biomateriály v oblasti vývoje prostředků pro regenerativní medicínu a tkáňové inženýrství. V posledních letech roste zájem o jejich možné použití jako implantovatelných systémů pro řízené uvolňování léčiv. Gely jejichž základ je tvořen kovalentně zesítěnými deriváty hyaluronanu lze díky jejich vynikající biokompatibilitě využít jako matrice uvolňující léčiva přímo v tkáni poškozené patologickým stavem nebo v její bezprostřední blízkosti.

Diplomová práce bude věnována vývoji polymerních matric pro řízené uvolňování léčiv připravených z kovalentně zesítěných derivátů hyaluronanu. Budou hodnoceny základní parametry připravených gelů (viskoelastické vlastnosti, botnavost, obsah sušiny) a vliv způsobu přípravy hydrogelu na velikost ok polymerní sítě respektive na rychlost uvolňování léčiv.

Jako výchozí materiál bude využit oxidovaný derivát kyseliny hyaluronové (HA-Ox), ze kterého lze pomocí reakce s vhodnými vícefunkčními činidly připravit 3D polymerní síť. Reakce probíhají za fyziologických podmínek a je možné je provádět v přítomnosti biologického materiálu *in vivo* (buňky, tkáňové štepy apod.) či přímo v živé tkáni (*in situ*), aniž by došlo k jejímu poškození. Mírné podmínky síťovacích reakcí rovněž umožňují inkorporaci léčiv biologického původu (protilátky, růstové faktory, cytokiny – tzv. biofarmaceutika) do struktury hydrogelu při zachování biologické aktivity léčiva [1; 2; 3].

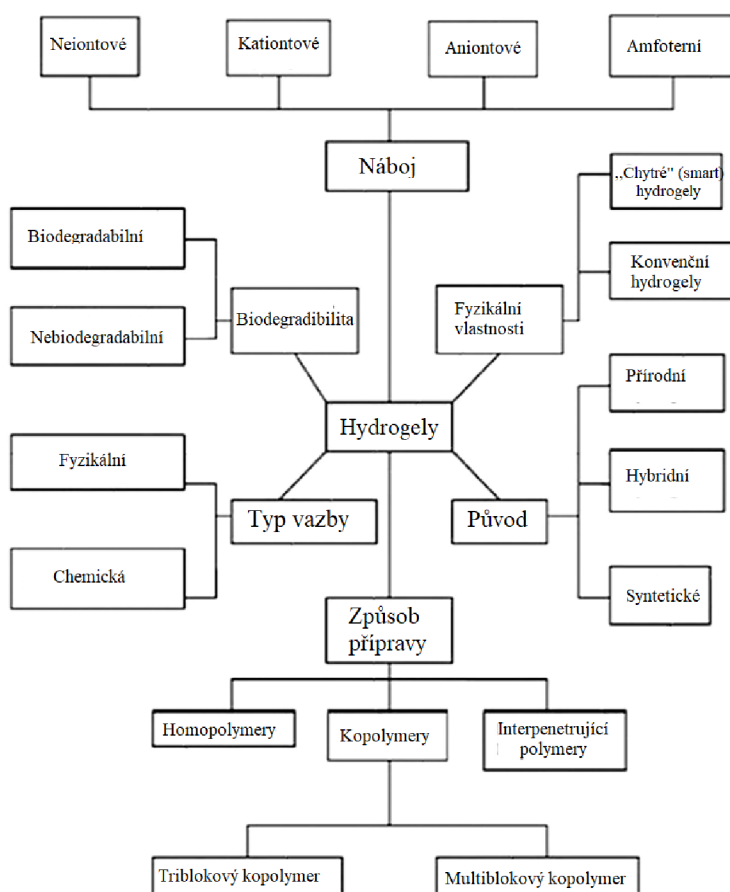
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Hydrogely

Gely jsou zvláštním typem koloidní disperze, kde je spojitě nejen disperzní prostředí, ale i disperzní podíl. Termín „gel“ lze použít pro materiály různého původu (polymerní gely, gely lyofobních solů, anorganické gely). V této práci se budeme zabývat makromolekulárními gely, jejichž disperzní podíl je tvořen makroskopickou polymerní sítí. Takový materiál označujeme v solvovaném stavu jako lyogel. Je-li jako rozpouštědlo použita voda, může být použit termín hydrogel. Jeho vysušením lze získat xerogel. Makromolekulární gely (nebo též polymerní gely) bývají označovány jako reversibilní, protože je po jejich vysušení lze znovu obnovit botnáním xerogelu (viz kapitola 2.1.3) [4; 5].

2.1.1 Typy hydrogelů

Hydrogely lze rozdělit podle různých kritérií – charakteru uzlových spojů, chemického složení a původu výchozích polymerů, náboje polymerního řetězce, odbouratelnosti v biologickém prostředí apod. Další možná dělení jsou naznačena na Obr. 1 [6; 7].



Obr. 1 Klasifikace hydrogelů [8]

2.1.1.1 Fyzikální a chemické gely

Podle způsobu síťování lze gely rozlišit na fyzikální gely, kdy jsou jednotlivé částice disperzního prostředí drženy pohromadě nekovaletními interakcemi, jako jsou například vodíkové můstky nebo hydrofobní interakce. Může také docházet k fyzickému propletení

řetězců a vzniku tzv. zapleteniny. Na vzniku chemicky síťovaných hydrogelů se podílí podstatně silnější kovalentní vazby (viz kapitola 2.1.2) [4; 5].

2.1.1.2 *Hydrogely přírodního a syntetického původu*

Polymery syntetického původu mají širokou škálu fyzikálně-chemických vlastností a jsou dobře dostupné. Nevýhodou je možná přítomnost toxických residuí z výroby. Syntetický polymer, jako každá látka tělu cizí, může vyvolat imunitní reakci. Mezi známé a v současné době hojně využívané syntetické polymery patří polyethylenglykol (PEG) či jeho kopolymery, polyvinylalkohol, polyakrylová a polymethakrylová kyselina apod. [9; 10].

Polymery přírodního původu (biopolymery), které lze využít pro přípravu hydrogelů mohou být bílkovinného charakteru (např. kolagen a jeho deriváty, fibrinogen), polysacharidy (celulóza a její deriváty, alginát, agaróza, chitosanu, hyaluronan), popřípadě i nukleové kyseliny. Jejich výhodou je biodegradabilita. U biopolymerů živočišného původu je možnou výhodou schopnost interagovat s buňkami tkání, a ovlivňovat jejich metabolismus, proliferaci, apod [7; 11].

Výhody a nevýhody biomateriálů není možné zobecňovat. Volba materiálu by měla vycházet z potřeb konkrétní aplikace. Příslušné vlastnosti lze dále ovlivnit vytvořením vhodného derivátu daného polymeru [11; 12].

2.1.1.3 *Iontový charakter gelů*

Podle charakteru polymerního řetězce lze gely dělit na ionogenní a neionogenní. Ionogenní hydrogely jsou tvořeny řetězci zesíťovaných polyelektrolytů. Nositelem náboje jsou většinou disociované funkční skupiny. V případě polyaniontů se jedná např. o soli karboxylových kyselin, soli sulfonových kyselin nebo fosfáty. Polykationty ve své struktuře obsahují většinou bazické skupiny zejména aminy. Amfoterní polymery pak nesou oba typy skupin v různém zastoupení [8].

2.1.2 **Vznik a stabilita gelů**

Gely vznikají procesem zvaným gelace, kdy dojde k tvoření trojrozměrné sítě prostupující celým disperzním prostředím. Kovalentní gely mohou vznikat zesíťováním lineárního polymeru, a to buď reakcemi mezi aktivovanými funkčními skupinami polymerních řetězců, nebo se k vytvoření příčných vazeb mezi polymerními řetězci využívají vícefunkční síťovací činidla. Další možností vzniku kovalentně zesíťovaných gelů je síťovací polymerace probíhající jako kopolymerace dvoj a více funkčních nízkomolekulárních monomerů (např. příprava polyakrylátových hydrogelů). Fyzikálně síťované gely vznikají z roztoků polymerů tak, že působením fyzikálních sil dochází k interakci mezi úseky původně volných polymerních řetězců. Takto vzniklé útvary poté plní funkci uzlových oblastí [4; 8].

Pevnost vazby v uzlových bodech polymerní sítě určuje i její stabilitu např. během botnání. V případě kovalentně zesíťovaných gelů je trojrozměrná síť v nadbytku rozpouštědla schopná pohlcovat rozpouštědlo a zvětšovat svůj objem, a to až do doby, kdy je rozdíl parciálních tlaků mezi polymerní fází a rozpouštědlem kompenzován napětím polymerní sítě (viz 2.2.1). Takové gely označujeme jako omezeně botnající. Naopak gely, jejichž polymerní síť obsahuje uzlové body tvořené relativně slabšími fyzikálními interakcemi mohou botnat neomezeně. V nadbytku

rozpouštědla postupně dochází k zániku uzlových bodů, uvolňování řetězců polymeru do roztoku a k rozrušení struktury gelu [4].

I v případě kovalentně zesíťovaných gelů může dojít k rozrušení struktury gelu. Tento proces však probíhá jen v případě, kdy dojde k degradaci polymerních řetězců tvořících síťovitou strukturu gelu, nebo chemických vazeb tvořících uzlové body polymerní sítě [4].

2.1.3 Botnání

Botnání je proces, při kterém dochází k transportu molekul rozpouštědla dovnitř polymerní sítě. Tím dochází ke zvyšování objemu a hmotnosti hydrogelu. Zároveň může docházet k přechodu látek (např. biofarmaceutik) původně poutaných uvnitř gelu do roztoku, což je jeden z principů řízeného uvolňování a předpokladů teorie rovnovážného botnání (viz kapitola 2.2.1). Pokud lze u daného hydrogelu dosáhnout rovnovážného stavu, kdy se již stupeň nabotnání nemění, hovoříme o omezeném botnání [4; 13].

Chemická struktura polymeru a jeho interakce s okolním rozpouštědlem může botnání také významně ovlivnit. Hydrogely s hydrofobními skupinami budou botnat mnohem méně ve srovnání s hydrogely obsahujícími hydrofilní skupiny [14; 15].

Dalším důležitým parametrem, který ovlivňuje rychlost botnání, je teplota. S vyšší teplotou dochází ke zvýšení intenzity tepelného pohybu a tím i rychlejšímu botnání [4; 15].

Mírou botnání hydrogelu je koeficient nabotnání Q , který lze stanovit jednoduše gravimetricky. Vzorec pro výpočet je uveden v kapitole 2.2.1.

2.1.4 Mechanické vlastnosti hydrogelu

V souvislosti s hydrogely se hovoří o tzv. viskoelasticitě. Viskoelastické chování znamená, že se hydrogely chovají částečně jako viskózní kapaliny díky kapalnému disperznímu prostředí a částečně jako elastická tělesa, kdy je materiál schopen odolávat namáhání a po ukončení působení se navrátit do původního stavu. Tuto pružnou deformaci popisuje Hookův zákon, který říká, že normálové napětí σ je přímo úměrné relativní deformaci ε a Youngovu modulu pružnosti v tahu E (1):

$$\sigma = \varepsilon \cdot E \quad (1)$$

Elasticita v tomto kontextu neodkazuje na to, zda je materiál „roztážitelný“ či nikoliv, ale zda se vrátí do svého původního tvaru, když na něj přestane daná síla působit. U hydrogelů je však tato schopnost omezena do bodu, který se označuje jako kritické napětí. Po jeho překročení dochází k nevratné deformaci [4; 5; 16].

Rozdíl mezi elastickým a viskózním materiálem je v zásadě v tom, zda deformace dosáhne limitu nebo se neustále zvyšuje v reakci na konstantní napětí. Ideální viskózní materiál mění deformaci úměrně době, po kterou působí napětí [16].

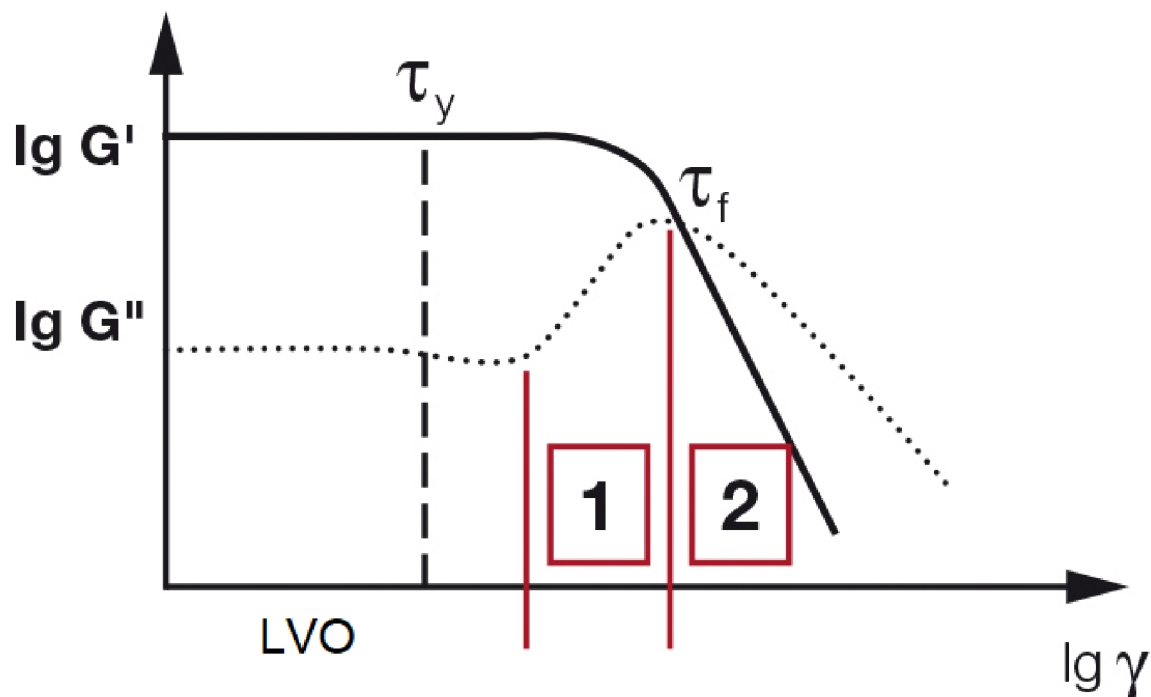
Viskoelastické vlastnosti hydrogelů lze určit pomocí rotačního reometru využitím oscilačních testů. Rotační reometr se skládá z dolní části (stator), kam je umístěn vzorek a horní oscilující části (rotor). Nástavec může buď oscilovat s proměnlivou amplitudou deformace, kdy zůstává frekvence kmitů stejná (amplitudový test) nebo se naopak může měnit frekvence se stejnou

amplitudou deformace (frekvenční test). V obou případech se na vzorek aplikuje oscilační napětí a měří se výsledná deformace [17; 18].

Odezva materiálu je vyjádřena dvěma viskoelastickými moduly. Elastický modul G' je mírou vnitřní energie ve vzorku, který je namáhán. Po odstranění vloženého napětí je tato energie využita k návratu do původního stavu. Oproti tomu viskózní modul G'' popisuje míru energie, která je během namáhání přeměněna a disipována. Amplitudovým testem lze určit oblast lineární viskoelasticity (LVO), kdy jsou oba moduly konstantní (viz Obr. 2).

Typický průběh deformace gelů při amplitudovém měření je uveden na Obr. 2. V zóně 1 se před dosažením maxima křivky pro G'' vyskytují v materiálu pouze mikrotrhliny. Zde stále platí $G' > G''$ (pevné skupenství). Po překročení maxima se v zóně 2 dochází ke zkřížení obou modulů ($G' = G''$) a nevratné deformaci; poté platí $G'' > G'$ [19].

Mez kluzu τ_y je hodnota smykového napětí (nebo deformace) na hranici oblasti LVO. Tento bod se také nazývá mez linearity. Mez toku τ_f je hodnota smykového napětí v bodě křížení viskoelastických modulů. Obě hodnoty jsou závislé na podmínkách měření, například na přednastavené úhlové frekvenci [19].



Obr. 2 Závislost velikosti viskoelastických modulů na napětí [19]

Vztah mezi moduly popisuje ztrátový úhel δ (2). Dokonale elastické materiály mají ztrátový úhel roven nule a viskózní 90° . Hydrogely mají nízké hodnoty viskózního modulu oproti

elastickému, a tedy i malé ztrátového úhlu a svým chováním se tak blíží spíše elastickým tělesům [20].

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (2)$$

2.2 Strukturní analýza hydrogelu

Hydrogely v dnešní době získávají čím dál více pozornosti v oblasti vývoje systémů pro řízené uvolňování aktivních látek a mají četné potenciální aplikace. Jakožto trojrozměrné polymerní sítě, které jsou schopné nasávat velké množství vody (případně i jiné kapaliny jako je fyziologický roztok nebo plazma) se do značné míry podobají biologickým tkáním. Do jejich sítě lze zabudovat aktivní látku, která se z gelu může postupně uvolňovat a tím lze docílit přesnějšího cílení léčiv a vyhnout se tak poškození zdravé tkáně. Uvolňování je ovlivňováno strukturou polymerní sítě, a proto je vhodně matici charakterizovat [8; 14].

Analýza struktury hydrogelové sítě je založena na dvou základních teoriích. První z nich je teorie rovnovážného bobtnání nazývaná také jako Flory-Rehnerova teorie a druhá je Teorie gumové elasticity. Jedním z nejdůležitějších parametrů použitých pro charakterizaci struktury sítě jsou objemový zlomek polymeru v rovnovážném nabobtnalém stavu $v_{2,s}$, molekulová hmotnost mezi dvěma sousedními příčnými vazbami (M_c) a lineární vzdálenost mezi dvěma sousedními příčnými vazbami tzv. velikost ok polymerní sítě (mesh size) (ζ) [21].

2.2.1 Teorie rovnovážného bobtnání

Původní Flory-Rehnerova teorie je založena na předpokladu, že na neutrální polymerní gel ponořený do rozpouštědla působí dvě protichůdné síly. Hnací silou procesu bobtnání je hlavně entalpický charakter. Jak se objem sítě zvětšuje, řetězce se natahují, což naopak způsobuje pokles entropie, protože natažená konformace řetězců je méně pravděpodobná. Míra kompatibility polymeru s rozpouštědlem je obvykle vyjádřena pomocí interakčního parametru χ . V rovnováze jsou tyto dvě síly stejné. Totéž platí pro chemický potenciál rozpouštědla uvnitř a vně gelu [14; 21].

Peppas a Merrill [14] upravili původní Flory-Rehnerovu teorii pro hydrogely připravené v přítomnosti vody. Pro výpočet M_c je možné použít následující rovnici (3) [14]:

$$\frac{1}{M_c} = \frac{2}{M_n} - \frac{v(\ln(1 - v_{2,s}) + v_{2,s} + \chi \cdot v_{2,s}^2)}{V_1 v_{2,r} \left(\left(\frac{v_{2,s}}{v_{2,r}} \right)^{\frac{1}{3}} - \left(\frac{v_{2,s}}{2 \cdot v_{2,r}} \right) \right)} \quad (3)$$

kde

M_n je průměrná molekulová hmotnost monomeru;

v je specifický objem polymeru;

$v_{2,s}$ je objemový zlomek polymeru v rovnovážném nabobtnalém stavu;

$v_{2,r}$ je objemový zlomek polymeru ve zralém stavu (24 h po přípravě před bobtnáním);

χ je interakční parametr pro polymer-rozpouštědlo;

V_1 je molární objem rozpouštědla.

Objemový zlomek polymeru v rovnovážném nabotnalém stavu a po 24hodinovém zrání lze vypočítat na základě Marsana [22]:

$$v_{2,s} = \left(1 + \frac{\rho_p}{\rho_s} \cdot (Q_{M,s} - 1) \right)^{-1} \quad (4)$$

$$v_{2,r} = \left(1 + \frac{\rho_p}{\rho_s} \cdot (Q_{M,r} - 1) \right)^{-1} \quad (5)$$

kde

ρ_p je hustota suchého polymeru;

ρ_s je hustota rozpouštědla;

$Q_{M,s}$ je koeficient nabotnění v rovnováze;

$Q_{M,r}$ je koeficient nabotnění po zrání hydrogelu;

$Q_{M,s}$ a $Q_{M,r}$ je možné vypočítat z rovnice (6) a (7):

$$Q_{M,s} = \frac{m_s}{m_d} \quad (6)$$

$$Q_{M,r} = \frac{m_r}{m_d} \quad (7)$$

kde

m_s hmotnost hydrogelu v rovnovážném nabotnalém stavu;

m_r hmotnost hydrogelu po 24hodinovém zrání;

m_d hmotnost xerogelu.

2.2.2 Teorie gumové elasticity

Hydrogely se ve svou schopností pružně reagovat na aplikované napětí podobají přírodním kaučukům. Hydrogel vystavený deformaci menší než 20 % se rychle vrací do původního tvaru. Tohoto elastického chování lze využít k objasnění jejich struktury využitím teorie kaučukové elasticity původně vyvinuté Treloarem a Florym pro vulkanizované kaučuky a modifikované pro polymery samotným Florym. Původní teorie však není platná pro hydrogely připravené v přítomnosti rozpouštědla. Úpravu pro takovéto hydrogely vytvořil Silliman a později Peppas s Merrillem [14; 21].

Molekulovou hmotnost mezi dvěma soudními příčnými vazbami tak lze vypočítat pomocí parametrů získaných měření viskoelastických vlastností (8) [14]:

$$\tau = \frac{\rho_p RT}{M_c} \left(1 - \frac{2M_c}{M_n} \right) \left(\alpha - \frac{1}{\alpha^2} \right) \left(\frac{v_{2,s}}{v_{2,r}} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (8)$$

kde

τ je smykové napětí působící na vzorek;

R je univerzální plynová konstanta;

T je absolutní teplota při které experiment probíhal;

α je poměr prodloužení.

Vztahy mezi smykovým napětím (τ) a smykovým modulem (G) jsou shrnuty v následující rovnici (9) převzaté od Anseth a spol. [23]

$$\tau = G \left(\alpha - \frac{1}{\alpha^2} \right) \quad (9)$$

Nahrazením τ pomocí G v rovnici (10), dostaneme vztah pro výpočet M_c :

$$M_c = \frac{\rho_p RT \left(\frac{v_{2,s}}{v_{2,r}} \right)^{\frac{1}{3}}}{G + \frac{2\rho_p RT}{M_n} \left(\frac{v_{2,s}}{v_{2,r}} \right)^{\frac{1}{3}}} \quad (10)$$

2.3 Výpočet mesh size

Velikost biofarmaceutik se stejně jako velikost ok pohybuje v nanometrech, takže co nej přesnější zjištění této velikosti je jedna ze zásadních informací pro určení, zda daná látka bude v matici zadržena, či se z ní uvolní [23].

Pouhé 1 % prací týkajících se hydrogelů se zaměřuje také na matematické modelování. Přitom správně navržený model dokáže ušetřit materiál i čas strávený v laboratoři [13].

Hodnota velikosti ok hydrogelové sítě se většinou pohybuje v rozmezí 5–500 nm a nelze ji detekovat pomocí zobrazovacích technik, ale může být vypočtena pomocí následující rovnice [14]:

$$\xi = l v_{2,s}^{-\frac{1}{3}} \left(\frac{2C_n M_c}{M_r} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (11)$$

kde

l je délka vazby podél kostry polymeru;

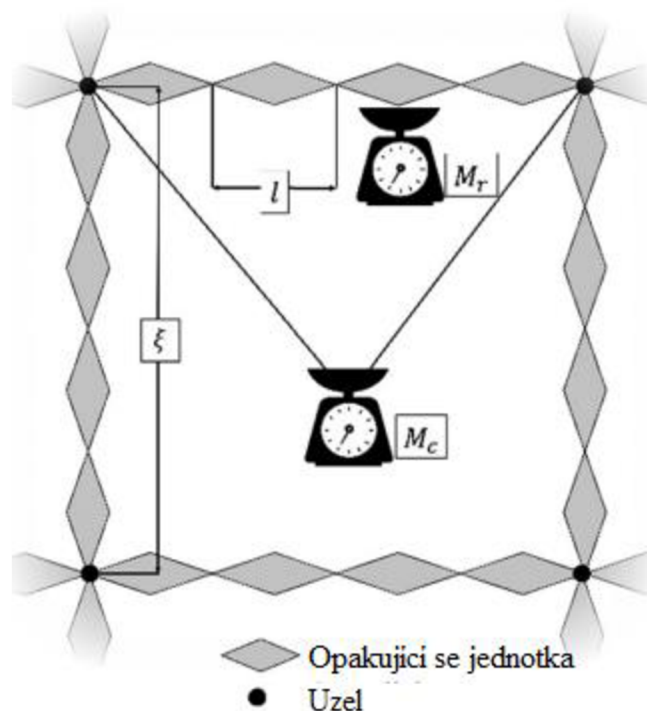
$v_{2,s}$ je objemový zlomek polymer v rovnovážném nabotnalém stavu;

C_n je Floryho charakteristický poměr pro HA;

M_r je molekulová hmotnost disacharidové jednotky;

M_c je molekulová hmotnost mezi dvěma sousedními příčnými vazbami.

Na Obr. 3 jsou některé parametry hydrogelu znázorněny.



Obr. 3 Parametry potřebné pro charakterizaci struktury a vlastností hydrogelů [13]

Nejčastěji se k výpočtu vzdálenosti ok polymerní sítě v hydrogelech používá výše uvedená Teorie rovnovážného botnání a kaučukové elasticity, ze kterých lze získat hodnotu M_c . Existuje však jen málo prací, které tyto teorie porovnávají mezi sebou. Rehmann et al. nejenže tyto teorie porovnává, ale zároveň ověřuje i ovlivňování uvolňování modelových biofarmaceutik. Ve své práci využívá hydrogely na bázi PEG a k hodnocení uvolňování byl použit koktejl levných proteinů [23].

Jednou z komplikací při predikci uvolňování je fakt, že vypočítaná velikost ok je průměrná vlastnost, která obvykle nezohledňuje účinky větších pórů a defektů v polymerní síti na rychlost ovlivňování. Tyto větší póry přitom mohou představovat klíčovou cestu pro uvolnění větších biofarmaceutik, které by jinak zůstaly zadrženy uvnitř hydrogelu. Je proto vhodné matematický model doplnit experimentem, který by měl být snadno proveditelný a cenově nenáročný [23].

K výpočtu velikosti ok lze použít například i Mackintoshovu teorii, nukleární magnetickou rezonanci, malý úhel rentgenového rozptylu, malý úhel neutronového rozptylu apod. [23].

2.4 Mechanismy uvolňování léčiv z polymerní matrice

Jedna z nejdůležitějších a nejnáročnějších oblastí při výzkumu řízeného uvolňování léčiv je předpovědět uvolňování aktivní látky jako funkci času, s využitím jednoduchých i sofistikovaných matematických modelů. Aby bylo možné navrhnout konkrétní uvolňovací mechanismus, jsou experimentální data srovnávána s řešením teoretického modelu [14].

Při uvolňování aktivní látky z hydrogelu se uplatňuje celá řada fyzikální i chemických procesů. Mezi ty dominující patří vnější a vnitřní difúze, desorpce a chemické reakce. Navíc je potřeba vzít v úvahu i štěpení řetězců a degradaci polymeru (obvykle se jedná o hydrolýzu) a botnání. [24].

2.4.1 Difúze

Primárním mechanismem uvolňování léčiv z hydrogelu je difúze. Vnější difúze probíhá v případě, že aktivní látka difunduje přímo z povrchu polymerní matrice, a proto řídí mechanismus uvolňování jen zřídka. Rychlost uvolňování závisí především na vnitřní difúzi, která je uskutečněna skrz oka polymerní sítě. Obecně platí, že difuzivita rozpuštěné látky klesá se zvyšující se hustotou zesíťení, se zvětšující se velikostí látky a s tím, jak klesá objemový podíl vody v hydrogelu [14; 24; 25].

Difúze je samovolné pronikání částic jedné látky mezi částice jiné látky v důsledku neuspořádaného Brownova pohybu. Proces přenosu hmoty, resp. doby potřebné k přenesení určitého množství hmoty při difúzi, lze popsat pomocí Fickových zákonů. První Fickův zákon (12) říká, že změna látkového množství dn za čas $d\tau$ při průchodu plochou A je dána vztahem:

$$\frac{1}{A} \frac{dn}{d\tau} = -D \frac{dc}{dx}, \quad [T, p] \quad (12)$$

kde

D je difuzní koeficient látky v prostředí;

$\frac{dc}{dx}$ je změna koncentrace složky s polohou.

Celý člen na levé straně rovnice lze souhrnně označit jako hustotu difúzního toku [24].

Pokud uvažujeme difúzi kulovitých částic, jejichž velikost je signifikantně větší, než je velikost částic rozpouštědla, lze vypočítat difúzní koeficient podle Stokes-Einsteinovy rovnice (13):

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta r} \quad (13)$$

kde

k_b je Boltzmannova konstanta;

T je teplota;

η viskozita prostředí;

R je poloměr difundující částice.

2.4.2 Kinetické modely pro uvolňování látek

Existuje celá řada matematických modelů používaných ke stanovení kinetiky uvolňování léčiva z nosičů. Pokud je možné z naměřených dat sestavit profil uvolňování látky a popsat ho pomocí matematické funkce, lze využít modelově závislé metody, mezi které patří například Higuchi, Hixson, Crowell, Baker-Lonsdale, Weibull a Korsmeyer-Peppasův model [26].

V diplomové práci byl zvolen Korsmeyer-Peppasův model (14), který je velice jednoduchý a popisuje uvolňování látky z polymerní matrice válcovitého tvaru, který odpovídá i námi použitým hydrogelům [26; 27].

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n \quad (14)$$

kde

$\frac{M_t}{M_\infty}$ je poměr uvolněného léčiva v čase t ;

k je rychlostní konstanta;

n je exponent uvolňování.

V tomto modelu hodnota n charakterizuje mechanismus uvolňování léčiva. Pokud je $n < 0,5$ probíhá uvolňování prostou difúzí [26; 27].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Hydrogely jako nosiče aktivních látek

Moderní terapeutické postupy sloužící k obnově funkce či náhradě nefunkčních tkání často vyžadují použití buněk, částí tkání či léčiv biologického původu (bifarmaceutika) jako jsou protilátky, růstové faktory, vektory genů, vakcíny apod. [28]. K úspěšné podání těchto léčiv a docílení terapeutického je často vhodné tyto látky, popř. živé buňky kombinovat s vhodnými biomateriály, které mohou sloužit jako nosiče pro cílenou distribuci účinných látek v případě systémového podání do organismu, nebo jako scaffoldy či matrice určené pro lokální aplikaci. Lokálně implantované hydrogely poskytují oporu podaným buňkám pro jejich růst, mohou zpomalit difúzi účinné látky do okolní tkáně, případně mohou ochránit tyto látky před jejich předčasným odbouráním [29]. Z praktických důvodů je výhodné, aby tyto matrice mohly být implantovány pomocí minimálně invazivních chirurgických zákroků, nebo přímo injekčně. Z tohoto důvodu jsou pro tento účel často využívány hydrogely, u nichž proces gelace může probíhat za fyziologických podmínek, přímo v místě aplikace, tzv. *in situ* [30]. V takovém případě je injekčně aplikován roztok polymeru, sol, nebo velmi slabý gel, který v požadovaném místě aplikace, na základě působení fyzikálních sil, nebo chemickou reakcí, vytvoří finální hydrogel. Gelace může být spuštěna změnou teploty, pH, nebo přítomností specifických iontů, síťovacích činidel, či katalyzátorů (např. enzymů) [31]. Podmínkou je, aby vznik hydrogelu probíhal za fyziologických podmínek a použitá síťovací činidla či jiné pomocné látky negativně neovlivňovaly viabilitu implantovaných buněk, biologickou aktivitu podaných účinných látek a nezpůsobovaly poškození okolních tkání [32].

3.2 *In situ* síťované hydrogely na bázi hyaluronanu

Kyselina hyaluronová je jakožto přírodní polysacharid hojně využívána v oblasti tkáňového inženýrství. Díky své biokompatibilitě a možnosti kovalentně síťovat je vhodná jako nosič pro řízené uvolňování různých typů látek, mezi nimiž jsou biofarmaceutika [33].

Samotná kyselina hyaluronová je velmi dobře odbouratelná, což však nemusí být při některých aplikacích žádoucí. Navíc sama o sobě nedisponuje příliš dobrými mechanickými vlastnostmi, ale existuje široká škála jejích derivátů, které mohou tento problém vyřešit. Chemické modifikace jsou zaměřeny především na reaktivní karboxylovou skupinu kyseliny glukuronové, ale lze využít i *N*-acetylovou a hydroxylovou skupinu. Kyselina hyaluronová poskytuje celou řadu derivátů s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, ať už se jedná o molekulovou hmotnost M_w , stupeň substituce apod. čímž je ovlivněna výsledná tuhost gelu a velikost polymerních ok. Gelaci je možno uskutečnit přímo *in situ* a do matrice hydrogelu lze snadno zabudovat aktivní látku. Tím lze dosáhnout časově i prostorově kontrolovaného uvolňování [7; 34].

V minulosti byla vyvinuta řada systémů určených pro přípravu hydrogelů na bázi kyseliny hyaluronové využívajících gelaci *in situ*. Konjugace HA se syntetickými polymery typu poly(*N*-isopropylacrylamidu) (PNIPAM [35]) či poloxamery [36] vedla k vývoji termoresponsivních, fyzikálně zesíťovaných hydrogelů, které vykazovaly přechod sol gel při zvýšení teploty výchozí disperze k hodnotám blízkým tělesné teplotě. Jiný způsob zesíťování polymerní řetězců nekovalentními interakcemi využívá tvorbu supramolekulárních útvarů mezi specifickými ligandy vázanými na řetězec hyaluronanu. Může se jednat např. o využití

interakce typu host-hostitel (guest-host). Ke vzniku hydrogelu je využíváno kombinace dvou typů derivátů hyaluronanu, z nichž jeden je modifikován např. vazbou β -cyklodextrinu a druhý derivátem adamantanu. Po smísení roztoků obou derivátů dochází ke vzniku inkluzního komplexu mezi cyklodextrinem a adamantanem a tím i k zesílení polymerních řetězců [37].

Kovalentně zesítené hydrogely HA, lze v místě aplikací připravit reakcemi využívajícími různé reakční mechanismy. Příkladem využití radikálové polymerace je zesílení je řetězců hyaluronanu, které jsou acylovány deriváty methakrylové kyseliny. Přídavkem vhodného iniciátoru (např. peroxodisíran amonný) lze iniciovat radikálovou polymerace vinylových skupin, což vede k zesílení hydrogelu [38]. V přítomnosti vhodného fotoiniciátoru (např. Irgacure 2959) lze obdobné deriváty hyaluronanu zesítil i fotochemicky působením UVA záření [39]. Fotochemickou iniciací reakce lze využít i pro přípravu hydrogelů na bázi tyraminovaných derivátů HA. Pokud je vhodné pro iniciaci reakce využít UVA světlo, je možné jako fotoiniciátor využít riboflavin [40]. V řadě případů může být výhodnější využití viditelného světla, které umožňuje použití eozinu Y jako fotosenzitizéru [41]. Pro přípravu hydrogelů *in situ* jsou využívány i enzymaticky katalyzované reakce. Ty mohou za fyziologických podmínek probíhat velice efektivně a díky substrátové specifitě mohou omezit výskyt nežádoucích vedlejších reakcí. Jako příklad enzymů, jejichž reakce byly využity pro síťovací reakce derivátů hyaluronanu, lze uvést křenovou peroxidázu a tyrozinázu. Oba enzymy lze použít pro zesílení tyraminovaných derivátů hyaluronanu [3; 42].

V poslední době zažívá rozvoj oblast vývoje *in situ* vznikajících hydrogelů, které ke svému zesílení využívají bioorthogonální chemické reakce. Takové reakce probíhají ve fyziologickém roztoku a v přítomnosti biologického materiálu, ale díky své vysoké selektivitě neovlivňují další molekuly v místě jejího průběhu. Biortogonální reakce se tedy vyznačují tím, že reaktanty ani produkty reakce nesmějí ovlivňovat okolní biologické prostředí. Vzniklá vazba by měla být ve fyziologickém prostředí dostatečně stabilní a průběh reakce musí být dostatečně rychlý [43]. Tyto podmínky často splňují reakce využívající postupy „click“ chemie. Takto jsou označovány reakce předem vhodně vybraných stavebních bloků molekul, které mezi sebou reagují spontánně, rychle, téměř kvantitativně a vysoce selektivně, a to za velice mírných podmínek [44]. V oblasti přípravy hydrogelů našly uplatnění click reakce typu Diels-Alderových adic, cykloadic azid-alkyn, anebo thiol-en reakcí, které v závislosti na podmínkách mohou probíhat mechanismem Michaelovské adice, nebo jako radikálový fotocoupling [45; 46]. Do této skupiny reakcí patří i reakce aldehydu s hydrazidy a alkoxyaminy [47].

Schramm et al. [48] popisují přípravu hydrogelů využívající zesílení polyadehydického derivátu hyaluronanu pomocí dvojfukčního hydrazidu, konkrétně dihydrazidu adipové kyseliny. Produktem reakce jsou deriváty hydrazonu. Hydrolyticky stabilnější formou vazby, vznikající mezi karbonylovými a dusíkatými sloučeninami, než je hydrazon, je oxim [49]. Ten vzniká z karbonylu reakcí s hydroxylaminem anebo O-alkoxyaminy. Rovněž bifunkční O-alkoxyaminy byly popsány jako možná síťovací činidla vhodná pro přípravu hydrogelů odvozených od polyaldehydických derivátů hyaluronanu [50].

Běžným způsobem přípravy polyaldehydů polysacharidů je jejich oxidace jodistanem sodným [51]. V případě hyaluronanu oxidaci jodistanem podstupují vicinální hydroxyly

v pozici 2 a 3 kyseliny glukuronové. Reakce vede k otevření sacharidového cyklu za vzniku dialdehydu. Buffa et. al [52] popisují derivát hyaluronanu selektivně oxidovaný v poloze 6 glukosaminové části polysacharidu na aldehyd (dále jen polyaldehydický derivát, HA-CHO). Šedová et al. [53] popisují přípravu hydrogelů na bázi tohoto derivátu, kdy jako síťovací činidlo využívají více funkční alkoxyaminy. Jako efektivní a komerčně dostupný bifunkční alkoxyamin je popsán O,O'-1,3-propanediylbishydroxylamin dihydrochlorid.

3.3 Biofarmaceutika

Biofarmaceutika (nebo též biologická léčiva) tvoří významnou část léčiv a zájem o jejich vývoj i přes vysoké náklady neustále roste. Pojem biofarmaceutika zahrnuje širokou škálu látek získávaných převážně rekombinantní technikou [23; 28].

Jednou ze skupin jsou terapeutické monoklonální protilátky, které se již běžně využívají například při léčbě nádorových onemocnění, ale vykazují překvapivě dobré výsledky i jiných oblastech jako jsou kardiovaskulární nebo revmatoidní onemocnění [28].

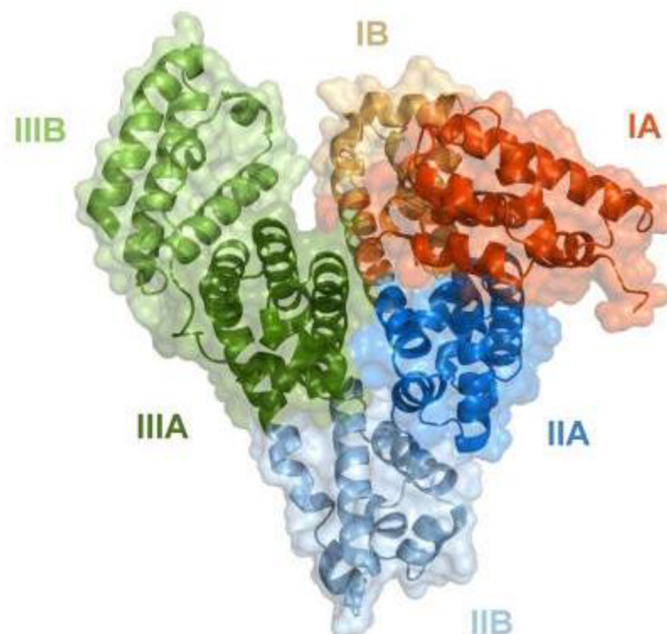
Významnou skupinu biofarmaceutik tvoří proteiny, včetně peptidických hormonů, v čele s inzulinem a jeho deriváty, který hraje nenahraditelnou roli při léčbě diabetes. Do této skupiny však patří i enzymy, růstové faktory apod. [28]

Mezi biologická léčiva se řadí i nové vakcíny. Na rozdíl od původních dobře známých vakcín, které fungují na principu podání oslabených patogenů, nové vakcíny vznikají rozmanitějšími a složitějšími způsoby jako jsou DNA a RNA vakcíny, nebuněčné a podjednotkové vakcíny, rekombinantní a terapeutické vakcíny a další [28].

Kombinací biofarmaceutik s jinými látkami (např. polymerního charakteru) lze dosáhnout výhodnější dostupnosti a prodlouženého účinku [28].

3.3.1 Sérový albumin

Albumin je jednoduchý negativně nabitý protein přítomný v buňkách a tělesných tekutinách. Jeho struktura připomíná srdce a obsahuje tři helikální domény, z nichž každá obsahuje dvě subdomény (Obr. 4). Je syntetizován v játrech. Sérový albumin (SA) je nejhojnější plazmatický protein u savců a je velmi důležitý pro udržení osmotického tlaku plazmy. SA je multifunkční protein s mimořádnou schopností vázat ligandy, což z něj dělá transportní molekulu pro rozmanitou škálu metabolitů, léků, živin, kovů (významně se podílí například na hladině Ca^{2+} a Mg^{2+} v krvi) a dalších molekul. Vzhledem ke svým ligandovým vazebným vlastnostem mají albuminy široké klinické, farmaceutické a biochemické aplikace [54].



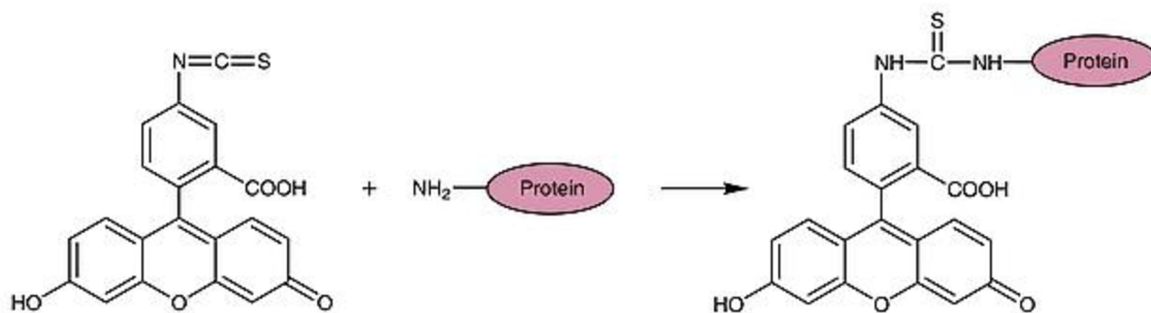
Obr. 4 Struktura SA ze tří strukturálně podobných helikálních domén (I, II a III) uspořádaných do molekuly ve tvaru srdce. Každou doménu lze rozdělit na dvě subdomény (A a B) [54]

Pro výzkumné účely je izolován zvířecí SA z těla savců (například hovězí sérový albumin (BSA), králičí sérový albumin (RSA) nebo koňský (ESA)) tzv. Cohnových procesem, který využívá rozdílné rozpustnosti v prostředích o různém pH, koncentraci ethanolu, iontové síle a teplotě [54; 55].

BSA je obecně považován za inertní protein, je snadno rozpustný ve vodě a stabilní, a proto se běžně používá v různých inkubačních a kultivačních médiích. Jeho molekulová hmotnost je přibližně 66 kDa a velikost $40 \times 40 \times 140 \text{ \AA}$ (protáhlý elipsoid, kde $a = b < c$) [54; 56; 57].

Pro použití BSA jako modelové uvolňovací látky je vhodné znát i hydrodynamický neboli Stokesův poloměr částice vyjadřující poloměr tvrdé koule, která difunduje stejnou rychlostí jako tato částice. V případě BSA se rovná 3,48 nm [58].

Existuje celá řada metod, kterou lze stanovovat koncentraci BSA. Spektrofotometricky lze stanovit proteiny s navázaným fluorescein-5-isothiokyanátem. Toto fluorescenční barvivo má absorpční maximum při 495 nm a běžně se používá pro detekci proteinů, jelikož ho lze navázat reakcí isokyanátu primárních aminoskupin aminokyselin, za vzniku thiomocovinové vazby (Obr. 5) [59].



Obr. 5 Vazba fluoresceinu isokyanátu na protein [60]

Další spektrofotometrickou metodou je metoda dle Bradfordové, založená na interakci proteinu s barvivem. Coomassie Brilliant Blue (CBB-G250) tvoří silný komplex s karboxylovou skupinou proteinu pomocí Van der Waalsových sil a aminoskupinou prostřednictvím elektrostatických interakcí. V kyselém prostředí v přítomnosti proteinu tak barvivo změni svoji barvu z červeno-hnědé na modrou a tím dochází k posunu absorpčního maxima k vyšším vlnovým délkám. Množství navázaného barviva na protein je přímo úměrné množství pozitivních nábojů v molekule proteinu, takže pro vyhodnocení lze stejně jako v předchozím případě použít Lambert-Beerův zákon (15) [61].

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (15)$$

kde

A je absorbance;

ε je molární absorpční koeficient;

c je koncentrace;

l je délka.

4 CÍL PRÁCE

Cílem této práce je příprava hydrogelů na bázi polyaldehydického derivátu hyaluronanu pomocí síťovací reakce s bifunkčním alkoxyaminem. Hydrogely mohou sloužit jako matrice pro uvolňování biologických léčiv. V rámci experimentů bude sledován vliv podmínek přípravy hydrogelu na nanostrukturu hydrogelu, zejména velikost ok polymerní sítě. Dále bude sledován vliv tohoto parametru na rychlost uvolnění bovinního albuminu ze struktury hydrogelu.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

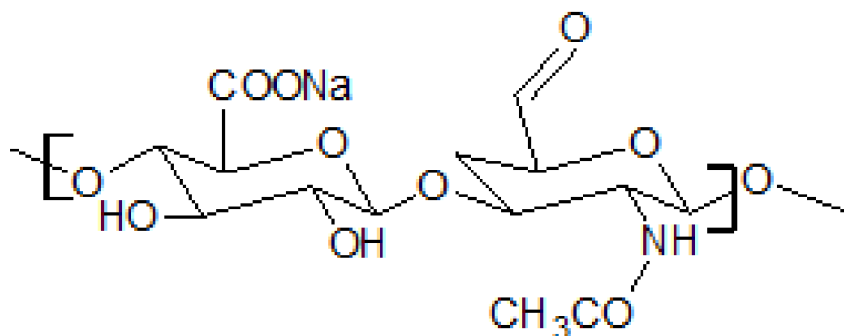
5.1 Chemikálie

Tab. 1 Použité chemikálie

Název použité chemikálie	Zkratka/vzorec použité chemikálie	Číslo šarže	Koncentrace/aktivita chemikálie/ M_w	Výrobce
chlorid sodný	NaCl	š. 2408290819	/	Penta
oxidovaný derivát kyseliny hyaluronové	HAOX5	100417	M_w 342 kDa, $DS=9\%$	Contipro a.s.
O,O'-1,3-Propandiylbishydroxyamin dichlorid	POA	š. BCCB7801	98 obj. %	Sigma Aldrich
octan sodný trihydrát	OP (octanový pufr)	š. PP/2019/05333	M_w 136,08	Lach-Ner
hydroxid sodný	NaOH	š. 2409230919	M_w 40 g/mol	Penta
hyaluronidáza (hovězí)	BTH	š. SLCC2160	400 U/mg	Sigma Aldrich
sérový albumin	BSA	š. SLBW1397	>96 obj. %	Sigma Aldrich
fluorescein isokyanát	FITC	š. SLCD685	/	Sigma Aldrich
coomassie Brilliant Blue G250	CBB G250	š. BVBR6160V	M_w 854,02 g/mol	Sigma Aldrich
Ethanol	EtOH	š. 2307300720	96 obj. %	Penta
kyselina fosforečná	H ₃ PO ₄	š. 2509150920	85 obj. %	Penta

5.1.1 Oxidovaný derivát kyseliny hyaluronové

Formyl hyaluronan sodný (oxidovaná forma HA, HA-Ox) je derivát hyaluronanu sodného – poly(sodium- β -D-glucuronate-[1-3]-(6-oxo)- β -N-acetyl-D-glucosamine-[1-4]). Jeho syntéza je založena na oxidaci primárních hydroxyskupin v poloze 6 N-acetylglukosaminu. Stupeň modifikace hyaluronanu je popsán procentuálním zastoupením aldehydem modifikovaných jednotek N-acetylglukosaminu tzv. stupněm substituce. Ten je stanoven pomocí NMR. Hmotnostně střední molekulová hmotnost byla stanovena pomocí SEC-MALLS [52].



Obr. 6 Oxidovaný derivát HA

5.2 Přístroje

Tab. 2 Použité přístroje

Název	Typ	Výrobce
Reometr	AR G2	TA instrument
Analytická váha	XS205	METTLER TOLEDO
Magnetická míchačka	MR Hei-Standard	Heidolph
pH metr	inoLab pH 7110	WTW
Konduktometr	inoLab Cond 7110	WTW
TGA	Q500	TA instrument
Lyofilizátor	Alpha 2-4 LCS plus	CHRIST
Spektrometr	V-750	JASCO
Inkubátor	Thermo Stable IG-32	Wisd
Hluboko mrazicí box	F740hi	Ependorf
Spektrometr	UV-2101 P	SHIMADZU
Membránová vývěva	KNF	LABOPORT
Laminární box	HERA SAFE KS	Thermo scientific

5.3 Metody

5.3.1 Příprava zásobního roztoku POA

Zásobní roztok POA byl připraven o koncentraci 10 mg/ml v 0,05 M octanovém pufru o pH=7 (OP). Bylo rozpuštěno 100 mg POA v 5 ml 0,05 M OP. Roztok byl titrován NaOH (1 M; 0,5 M; 0,1 M podle potřeby) na pH=7 a následně doplněn na 10 ml octanovým pufrem.

5.3.2 Příprava hydrogelů

Nejprve byly nachystány roztoky prekurzorů. Byly připraveny 3 různé roztoky o koncentraci derivátu 60 mg/ml, 40 mg/ml a 20 mg/ml fyziologického roztoku. Rozpuštění probíhalo za stálého míchání 3 h při teplotě 60 °C a následně dalších 24 hodin při laboratorní teplotě. Pro přípravu hydrogelů byla koncentrace HA-Ox a síťovací činidla POA zvolena tak, aby molární poměr aminoskupin síťovacího činidla a aldehydických skupin derivátu HA byl 1:1. Pro každý typ hydrogelu tak bylo nutné připravit roztok POA o příslušné koncentraci podle vzorce:

$$c_{\text{čin}} = \frac{c_{\text{HA-Ox}} \cdot V_{\text{HA-Ox}} \cdot M_{\text{čin}} \cdot DS_{\text{HA-Ox}}}{V_{\text{čin}} \cdot P \cdot P_P \cdot M_{\text{HA-Ox}} \cdot 100} \quad (16)$$

kde $c_{\text{čin}}$ je koncentrace činidla [mg/ml], $c_{\text{HA-Ox}}$ koncentrace HA-Ox [mg/ml], $DS_{\text{HA-Ox}}$ stupeň substituce HA-Ox [%], P poměr aldehydických skupin v derivátu ku aminoskupinám činidla, P_P počet aminoskupin v POA, $M_{\text{čin}}$ molekulová hmotnost POA [g/mol], $V_{\text{HA-Ox}}$ objem dávkovaného vzorku aldehydu [ml], $V_{\text{čin}}$ objem dávkovaného činidla [ml], $M_{\text{HA-Ox}}$ průměrná molekulová hmotnost disacharidické jednotky HA-Ox [g/mol].

Hodnoty jednotlivých veličin jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3 Hodnoty veličin použitých pro výpočet koncentrace POA

CHAOX [mg/ml]	20	40	60
DS [%]	9	9	9
P	1	1	1
P_P	2	2	2
M_{POA} [g/mol]	179	179	179
V_{HAOX} [ml]	5	5	5
V_{POA} [ml]	0,75	0,75	0,75
M_{HAOX} [g/mol]	400	400	400

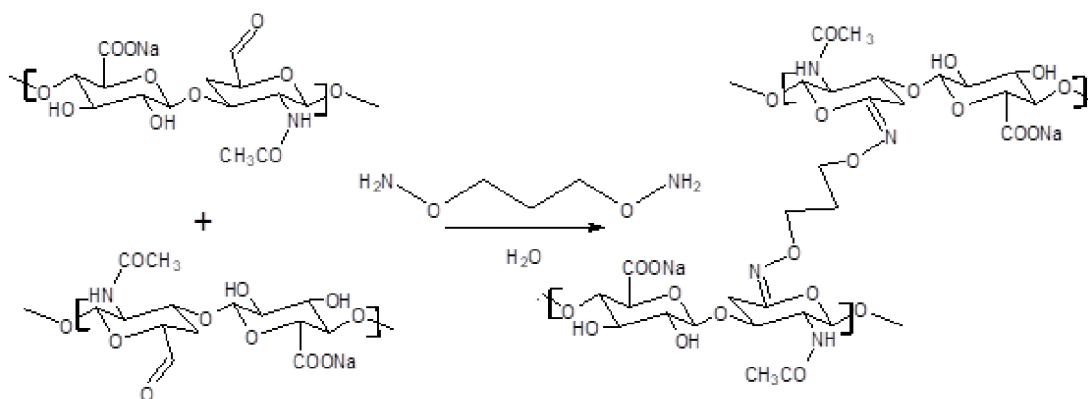
Výsledná koncentrace POA pro jednotlivé gely je uvedena v Tab. 4.

Tab. 4 Výsledná koncentrace POA pro jednotlivé gely

CHAOX [mg/ml]	10	20	30
c_{POA} [mg/ml]	2,69	5,37	8,06

Do jedné stříkačky o objemu 10 ml bylo přidáno 5 ml roztoku HA-Ox a do další stříkačky o objemu 10 ml přidáno 5 ml FR (případně stejné množství roztoku BSA při přípravě gelů s BSA). Obsah stříkaček byl pomocí adaptéru kombifix důkladně promíchán a následně probíhala 15 minut homogenizace. Vzniklá směs byla přefiltrována do další prázdné stříkačky o objemu 10 ml.

Jehlou o malém průměru (25-27 G) bylo do stříkačky se sterilním roztokem vsříknuto **750 µl roztoku POA** o příslušné koncentraci (viz Tab. 4). Hned po přidání POA byl obsah stříkačky promíchán pomocí adaptéru kombifix mezi další prázdnou stříkačkou 20krát a reakční směs byla nadávkována do teflonových forem (hmotnost jednoho hydrogelu cca 1,5 g). Tímto způsobem lze připravit až 7 gelů najednou. Formičky byly přemístěny do sterilních Petriho misek a překryty parafilmem. Hydrogely je nutné nechat zrát přes noc, jelikož ihned po přípravě stále probíhá síťovací reakce, roste počet styčných bodů a dochází k samovolné reorganizaci, která snižuje Gibbsovu energii.



Obr. 7 Reakce HA-Ox s POA

5.3.3 Charakterizace hydrogelů

Veškeré analýzy byly provedeny v triplicátu.

5.3.3.1 Hodnocení botnavosti gelů

Připravené gely byly přemístěny do sterilních zkumavek. Nejprve byly zváženy gely a poté bylo přidáno do každé zkumavky 10 ml fyziologického roztoku. Botnavost gelu byla hodnocena jako změna hmotnosti v čase. Koeficient nabotnění byl vypočítán podle rovnice (17):

$$Q = \frac{m_{po\ nabotnání}}{m_{před\ nabotnáním}} \cdot 100 [\%] \quad (17)$$

Při každém vážení byl hydrogel vyndán z média a přemístěn do sterilní zkumavky. Všechny zkumavky musely být předem zváženy kvůli odčítání hmotnosti. Termíny vážení gelů: 1 hodina, 2 hodiny, 3 hodiny, 1 den, 2 dny, 3 dny, 7 dní, 10 dní, 14 dní.

5.3.3.2 Stanovení obsahu sušiny

Sušina je obsah suchého podílu ve vzorku zbaveného těkavých složek za předepsaných podmínek a je vyjádřena v hmotnostní procentech. Hydrogely po botnání byly přemístěny do destilované vody, která byla pravidelně vyměňována. Obsah soli byl kontrolován měřením vodivosti média. Odsolené hydrogely byly přemístěny do sterilních Petriho misek a zmrazeny na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně proběhla lyofilizace. Takto zlyofilizované hydrogely byly zváženy. Obsah sušiny získaných xerogelů a vstupního derivátu byl stanoven termogravimetrickou analýzou (TGA).

5.3.3.3 Termogravimetrie

Termogravimetrická analýza byla provedena na termogravimetrickém analyzátoru Q500 (TA instrument). Vzorek byl zahříván a úbytek jeho hmotnosti byl sledován na citlivých mikrováhách. Na platinovou pánvičku bylo nadávkováno 10 mg vzorku a vzorek byl zahřát na teplotu $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ rychlostí $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Při této teplotě byl sušen v oxidační atmosféře (syntetický vzduch, průtok $60\text{ ml}/\text{min}$) po dobu 15 minut. Výsledkem analýzy je gravimetrická křivka.

5.3.3.4 Stanovení viskoelastických vlastností

Viskoelastické vlastnosti byly stanoveny pomocí reometru AR-G2 (TA Instruments) za použití geometrie se zdrsněným povrchem (crosshatch), aby bylo zamezeno vyklouznutí hydrogelu v průběhu testování (průměr 20 mm). Byl použit test s proměnlivou frekvencí (0,01–10 Hz; deformace 5 %) a amplitudou deformace (posun 0,001–2,5 rad; frekvence 1 Hz). Viskoelastické vlastnosti byl stanoveny pro gely před i po botnání.

5.4 Rychlost uvolňování BSA z hydrogelů

Na měření uvolňování byly připraveny gely podle postupu 5.3.2. Uvolňování bylo sledováno současně pro gely s čistým BSA a s FITC-BSA (5.4.2).

5.4.1 Uvolňování BSA a FITC-BSA

5.4.1.1 Uvolňování BSA z hydrogelu

Hydrogely byly přemístěny do sterilních zkumavek. Do zkumavek s hydrogely bylo přidání **1000 μl elučního média** (sterilní 0,9 hm.% NaCl). Hydrogely byly inkubovány při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Při odběru byly hydrogely přeneseny do prázdné sterilní zkumavky a do mikrozkušavky

Eppendorf bylo odebráno veškeré médium. Hydrogely byly zváženy a vráceny zpátky do původní zkumavky. Poté bylo do každé zkumavky přidáno **1000 µl** nového elučňního činidla. Vzorky v mikrozkuvkách byly zamrazeny na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Časy odběru: 1 hodina, 6 hodin, 1 den, 2 dny, 7 dní, 14 dní, 21 dní.

5.4.1.2 Degradace hydrogelů

Na degradaci hydrogelů byl připraven roztok hovězí hyaluronidázy (BTH) o koncentraci 1 mg/ml 0,9 hm.% roztoku NaCl. Do zkumavek s hydrogely bylo přidání 1000 µl degradačního média a hydrogely byly degradovány přes noc při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně odebráno 300 µl do sterilní mikrozkuvkavy.

5.4.2 Stanovení BSA metodou dle Bradfordové

Pro přípravu Bradfordova činidla bylo použito barvivo Coomassie brilliant blue-G250. Ve 100 ml odměrné baňce bylo rozpuštěno 10 mg CBB-G250 v 5 ml 100% etanolu. Po kapkách bylo přidáno 10 ml koncentrované kyseliny fosforečné (H_3PO_4) a doplněno do 100 ml destilovanou vodou. Vzniklá směs byla přefiltrována za sníženého tlaku přes papírový filtr. Bradfordovo činidlo je citlivé na světlo a je potřeba jej skladovat ve skleněných láhvích obalených alobalem v lednici.

Při měření byl vzorek naředěn na objem 1200 µl a do vzorku bylo přidáno 400 µl Bradfordova činidla. Spektrum bylo měřeno v rozsahu 500–700 nm a absorbance odečtena při 635 nm.

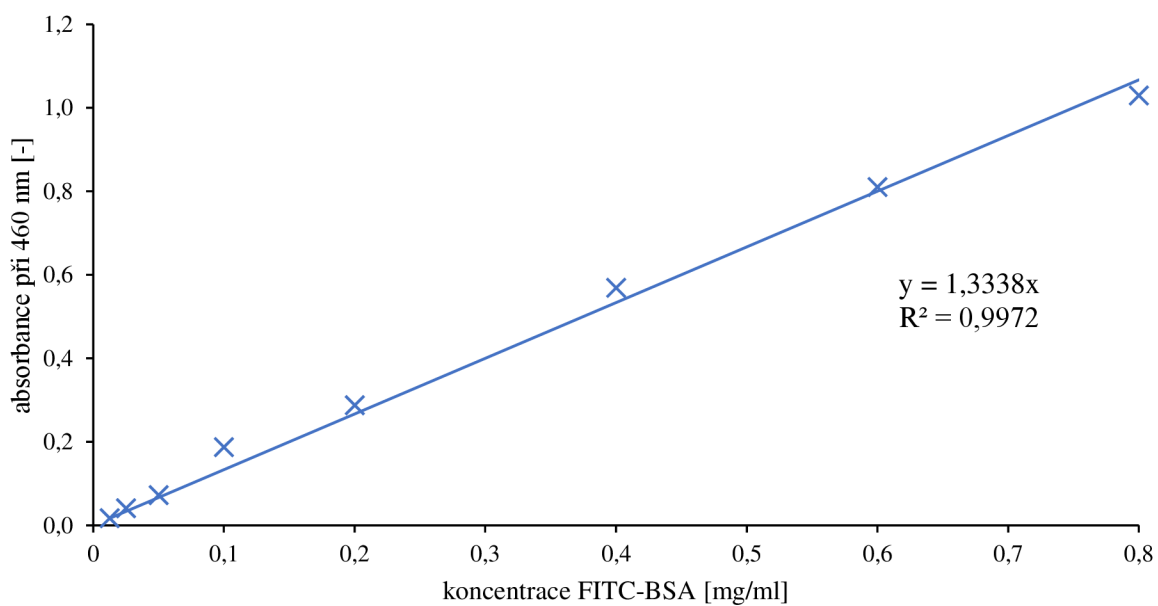
5.4.3 Stanovení BSA pomocí UV/VIS spektrofotometrie

Byla připravena kalibrační řada a naměřená absorbance

Tab. 5 Kalibrační řada pro stanovení BSA pomocí UV/VIS spektrofotometrie

koncentrace FITC-BSA [mg/ml]	absorbance při 460 nm [-]
0,0125	0,0173
0,0250	0,0410
0,0500	0,0719
0,1000	0,1969
0,2000	0,2873
0,4000	0,5690
0,6000	0,8102
0,8000	1,0294

Spektrum bylo měřeno v rozsahu 400–600 nm s krokem 0,5 nm v křemenné kyvetě, absorbance odečteny v maximu 465 nm a koncentrace byla vypočítána z lineární regrese kalibrační přímky (Obr. 8) podle rovnice (18).



Obr. 8 Závislost absorbance na koncentraci FITC-BSA

$$A = 1,3338c_{ov} \quad (18)$$

kde

A je absorbance;

c_{ov} je koncentrace v odebraném vzorku.

Při dopočítání skutečného množství BSA c_{BSA} uvolněného ze vzorku je nutné vzít v úvahu i botnání hydrogelu v médiu a ředění BSA samotným médiem:

$$c_{BSA} = c_{ov} \cdot (m_0 - m) + V_m \quad (19)$$

kde

m_0 je hmotnost gelu před botnáním (respektive hmotnost gelu při posledním odběru);

m je hmotnost gelu v čase odběru;

V_m je objem přidávaného média.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Příprava hydrogelů

Pro přípravu hydrogelů byl použit oxidovaný derivát hyaluronové kyseliny – formyl hyaluronan sodný. Jako síťovací činidlo byl využit O,O'-1,3-propandiylbishydroxylamin dichlorid (POA). Reakce této bifunkční aminosy skupin POA s aldehydickými skupinami formyl hyaluronanu vede ke vzniku hydrolyticky stabilních oximů. Reakce probíhá za fyziologických podmínek a s vysokou chemoselektivitou [30]. Díky tomu lze tuto síťovací reakci využít i pro přípravu hydrogelů obsahujících např. biofarmaceutika či biologický materiál [52].

V rámci této práce jsme připravili sérii hydrogelů o koncentraci derivátu 10 mg/ml, 20 mg/ml a 30 mg/ml. Tyto hydrogely byly charakterizovány pomocí viskoelastických vlastností, obsahu sušiny polymeru při přípravě gelu, koeficientem nabotnění a obsahem polymeru po dosažení rovnovážného stavu po rozbotnění. Zároveň byly připraveny analogické hydrogely s obsahem bovinního sérového albuminu, který sloužil jako modelová látka pro stanovení rychlosti uvolňování biofarmaceutik bílkovinného charakteru z připravených hydrogelů.

6.2 Hmotnost polymerní sítě obsažené v hydrogelech

Sušina výchozího HA-Ox byla stanovena pomocí TGA (5.3.3.2). V použitém derivátu HA-Ox byl zjištěn obsah sušiny 79,6 hm.% (cca 20,4 hm.% je tedy voda). Teoretickou hmotnost xerogelu před botněním m_0 (xerogel) dostaneme výpočtem podle rovnice:

$$m_0(\text{xerogel}) = m_0 \cdot c \cdot w \quad (20)$$

kde

m_0 je hmotnost připraveného hydrogelu;

c je koncentrace derivátu v hydrogelu;

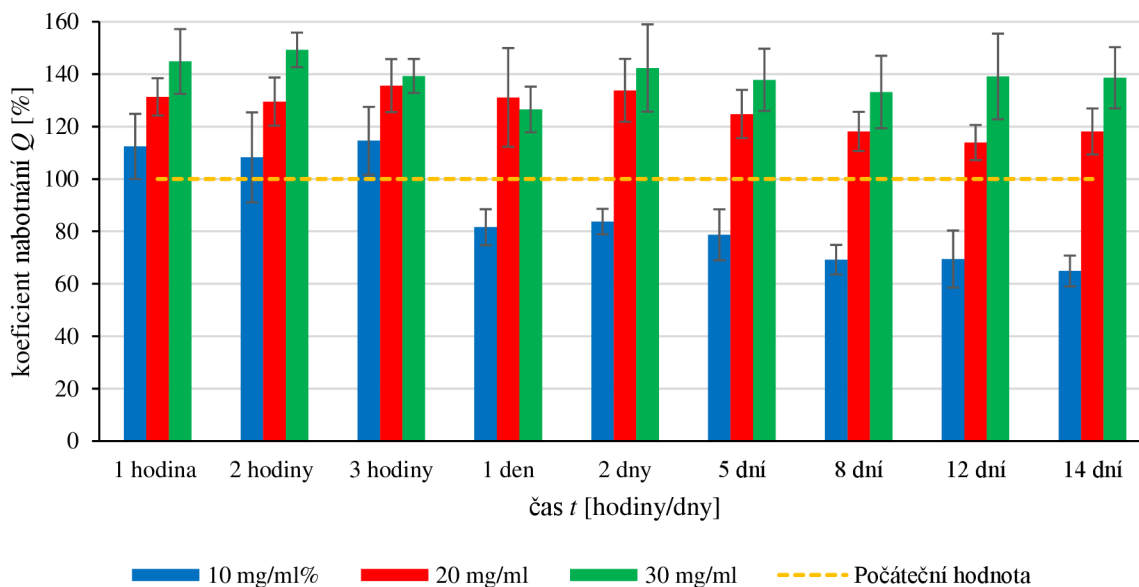
w je obsah sušiny v hydrogelu vyjádřený jako hmotnostní zlomek.

Hmotnost xerogelu po botnění dostaneme vynásobením hmotnosti lyofilizátu po botnění příslušným obsahem sušiny. Přesný obsah polymeru v gelu je důležitý pro výpočet velikosti ok polymerní sítě (mesh size). Obsah sušiny z TGA je uveden v Tab. 6 a Tab. 7.

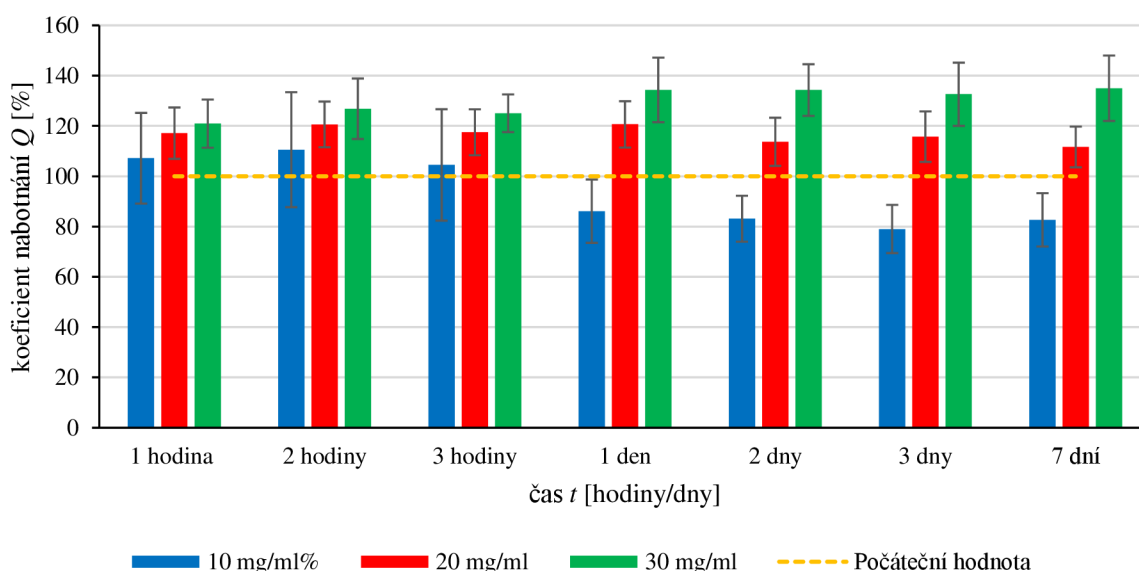
6.3 Botnění

Koeficient nabotnění byl stanoven jako podíl hmotnosti lyogelu před a po nabotněním podle rovnice (17). V grafech je znázorněna hodnota 100 %, která odpovídá počátečnímu stavu před botněním. V Obr. 9 je ukázka vlivu koncentrace derivátu na koeficient nabotnění bez přítomnosti BSA. Pro popis vlivu byly zvoleny 3 koncentrace HA-Ox (10 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml) a jako botnací médium byl zvolen fyziologický roztok (0,9 hm.% NaCl). Botnění probíhalo po dobu 14 dní, aby bylo možné určit, kdy dosáhnou hydrogely botnací rovnováhy. Na Obr. 9 je vidět, že v rámci odchylky lze považovat za dostatečné nechat hydrogel botnat 5 dní. Proto v Obr. 10, kde jsou uvedeny hydrogely s přidavkem BSA o koncentraci 1 mg/ml probíhalo botnění pouze 7 dní.

Při porovnání obou grafů lze konstatovat, že přidavek BSA o tak nízké koncentraci (1mg/ml) neovlivňuje významně v rámci směrodatné odchylky botnací rovnováhu.



Obr. 9 Koeficient nabotnání hydrogelů s různou koncentrací derivátu bez přidavku BSA



Obr. 10 Koeficient nabotnání hydrogelů s různou koncentrací derivátu s přidavkem BSA

HA-Ox je polyanion, což znamená, že čím větší je jeho koncentrace, tím více hydrofilních skupin je k dispozici. Více hydrofilních skupin znamená více příležitostí pro navázání vody. Proto hydrogely o koncentraci derivátu 30 mg/ml botnají nejvíce přesto, že tvoří hustší síť. Gely o koncentraci 10 mg/ml sice zpočátku vykazují také nárůst koeficientu nabotnání jako jejich více koncentrované analogy, ale tento nárůst je velmi nízký (okolo 10 %) a je způsoben experimentální chybou (např. nedokonalé osušení gelu před vážením). Již po prvním dni lze pozorovat pokles koeficientu nabotnání pod počátečních 100 %. Z porovnání hmotností xerogelu před a po botnání vyplývá, že se během botnání odplaví zhruba 10–20 % polymeru (solu). U gelů o koncentraci derivátu 10 mg/ml tento jev způsobuje pokles hmotností nabotnalého gelu. U více koncentrovaných analogů v gelu pořád zůstává dostatek polymeru, který je schopen vázat vodu, proto dochází i přesto k nárůstu hmotnosti.

Hmotnosti jednotlivých hydrogelů použité pro výpočet jednotlivých koeficientů nabotnění podle rovnic (6) a (7) a obsah sušiny z TGA jsou uvedeny v Tab. 6 a Tab. 7.

Tab. 6 Hmotnosti hydrogelů a obsah sušiny v jednotlivých gelech bez přídavku BSA

Vzorek	m_0 (připravený hydrogel) [g]	m_0 (xerogel) [g]	m (nabotnalý hydrogel) [g]	m (lyofilizát) [g]	Obsah sušiny [hm. %]	m (xerogel) [g]
10 mg/ml	1,6323	0,0131	0,9497	0,0146	81,2	0,0118
	1,2731	0,0102	0,9495	0,0111		0,009
	1,2726	0,0102	1,2409	0,0112		0,0091
20 mg/ml	1,5571	0,0249	1,6678	0,0272	81,1	0,0221
	1,5274	0,0244	1,5647	0,0253		0,0205
	1,5368	0,0246	1,8012	0,0229		0,0186
30 mg/ml	1,3721	0,0329	1,8253	0,0329	80,9	0,0266
	1,5664	0,0376	1,8952	0,0382		0,0309
	1,3192	0,0317	1,7728	0,0328		0,0265

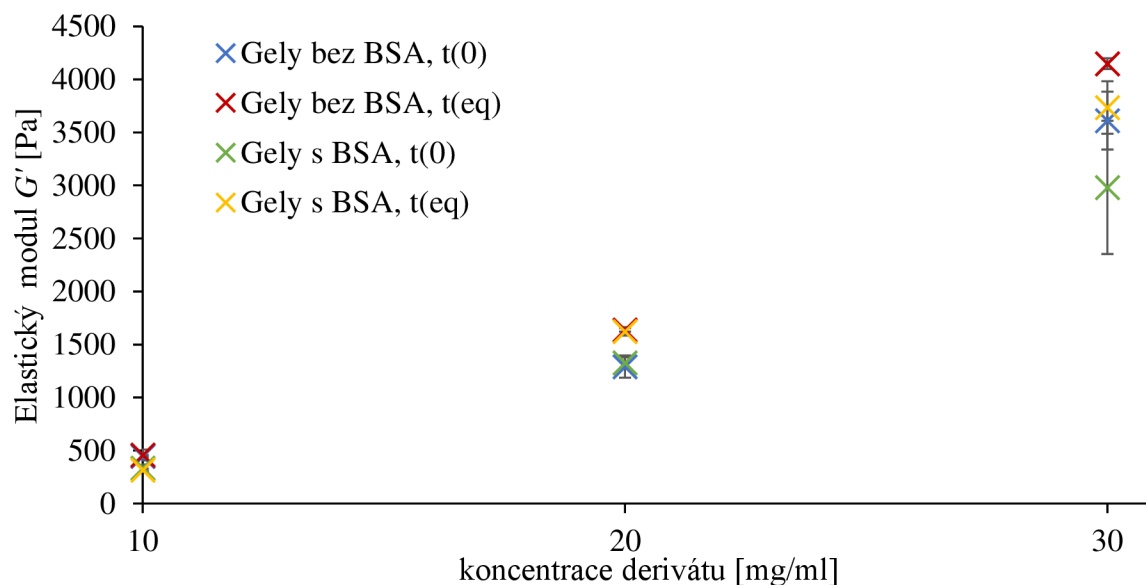
Tab. 7 Hmotnosti hydrogelů a obsah sušiny v jednotlivých gelech s přídavkem BSA

Vzorek	m_0 (připravený hydrogel) [g]	m_0 (xerogel) [g]	m (nabotnalý hydrogel) [g]	m (lyofilizát) [g]	Obsah sušiny [hm. %]	m (xerogel) [g]
10 mg/ml	0,9903	0,0079	0,9423	0,0067	84	0,0056
	1,0333	0,0083	0,836	0,009		0,0076
	1,1475	0,0092	0,9182	0,0101		0,0085
20 mg/ml	1,2581	0,0201	1,2645	0,0241	82,9	0,02
	1,106	0,0177	1,2524	0,0199		0,0165
	1,3936	0,0223	1,5231	0,0237		0,0196
30 mg/ml	1,4581	0,0350	1,8229	0,0387	81,4	0,0315
	1,2246	0,0294	1,4805	0,0306		0,0249
	1,1646	0,0280	1,4151	0,0334		0,0272

6.3.1 Viskoelastické vlastnosti

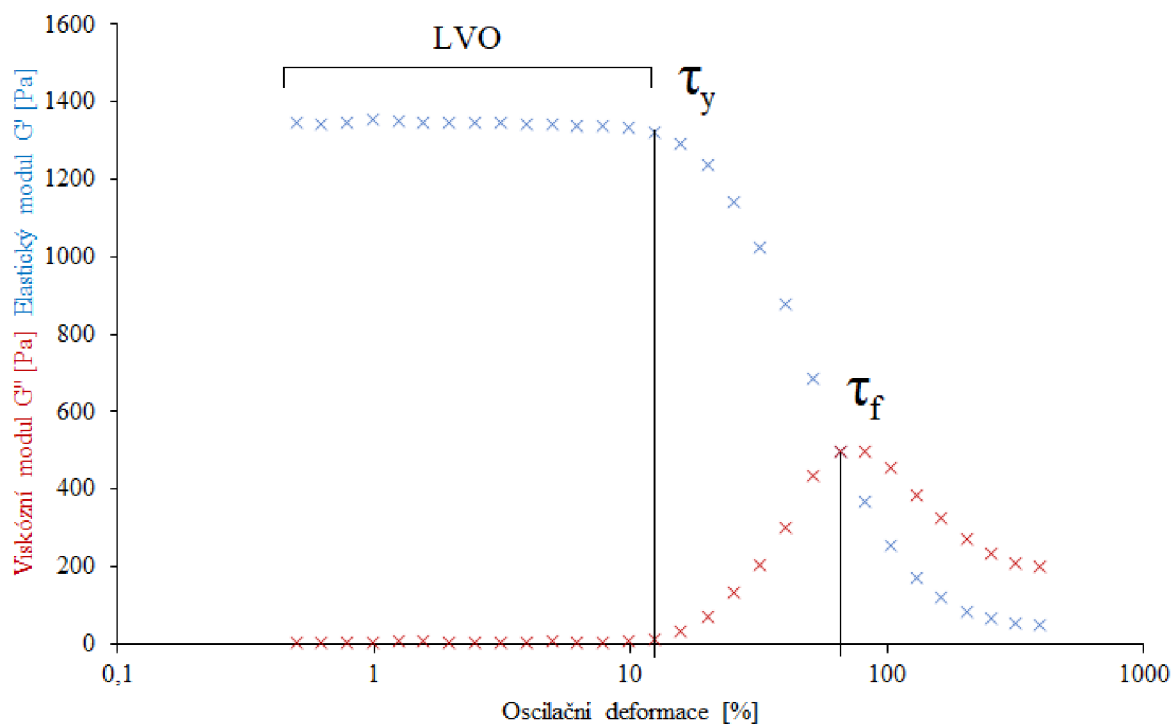
U připravených hydrogelů je v LVO velikost elastického modulu o dva řády vyšší než velikost viskózního modul (jednotky Pascalů) a proto výslednou tuhost gelu příliš neovlivňuje. Proto je v Obr. 11 uvedena pouze průměrná velikost elastického modulu v LVO. Čím větší je koncentrace derivátu, tím hustší bude polymerní síť, což má za následek i nárůst velikosti elastického modulu. Vyšší elastický modul mají hydrogely v nabotnalém stavu. Při botnění dochází k roztažení a napnutí polymerní sítě, tím se zvětšuje elasticita gelu.

U gelů s přídavkem BSA lze pozorovat snížení velikosti elastického modulu oproti analogům bez přídavku bez BSA. Přítomnost BSA může ovlivňovat efektivitu zesílení, nelze však přesně prokázat, proč k tomuto jevu dochází.



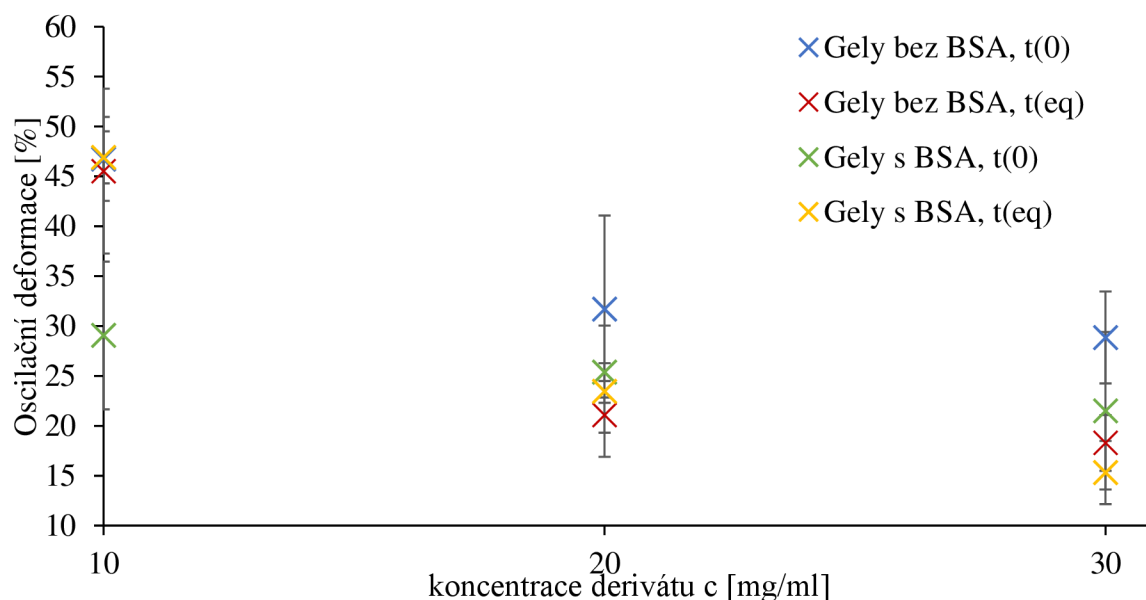
Obr. 11 Závislost velikosti elastického modulu G' na koncentraci derivátu

Na Obr. 12 jsou zobrazeny pro ukázkou výsledky z měření viskoelastických modulů pro hydrogely o koncentraci derivátu 20 mg/ml s přidavkem BSA. Podobné křivky dostáváme pro všechny koncentrace hydrogelů. V grafu je vyznačená LVO, mez kluzu τ_y , mez toku τ_f .



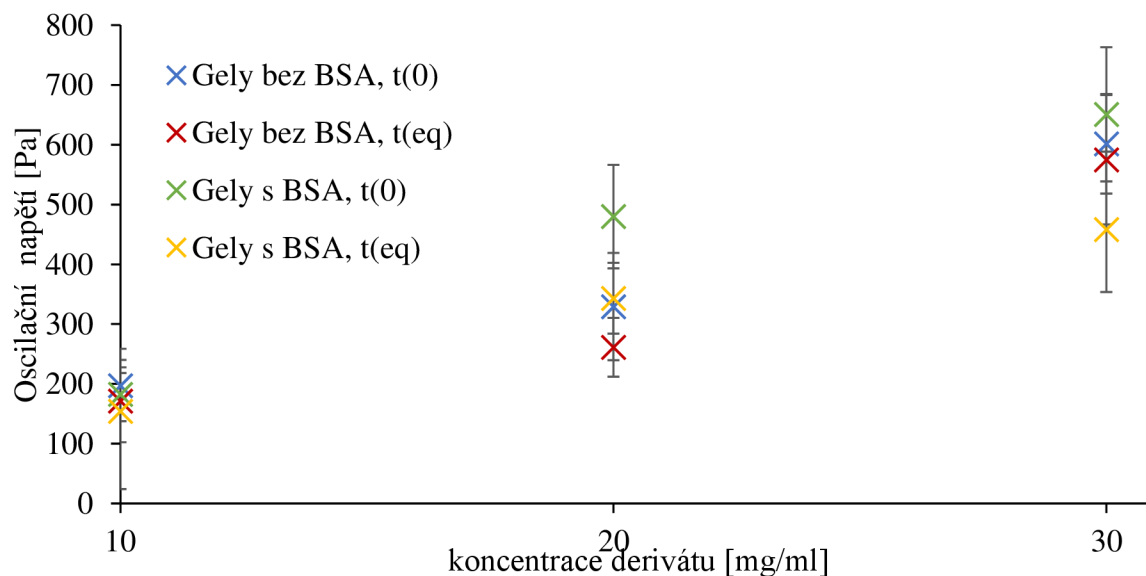
Obr. 12 Ukázká závislosti viskoelastických modulů na oscilační deformaci; mez kluzu τ_y , mez toku τ_f

Na Obr. 13 je zobrazena závislost relativní oscilační deformace na koncentraci derivátu v bodě meze tekutosti (hranice LVO). Je patrné, že hydrogely po nabtání mají sice vyšší hodnoty elastického modul G' , ale jsou také křehčí, a to tím více, čím větší je koncentrace derivátu. Při vyšších koncentracích, kdy je koeficient nabtání větší a polymerní síť nataženější. To je pro systém entropicky nevýhodné a dochází proto k deformaci sítě snadněji.



Obr. 13 Závislost oscilační deformace na koncentraci derivátu v mezi kluzu

Na Obr. 14 který zobrazuje závislost oscilačního napětí na koncentraci v bodě meze tekutosti (vyrovnání elastického a viskózního modulu) se také potvrzuje, že jsou hydrogely v nabtálním stavu křehčí, jelikož k nevratné deformaci dochází při nižších hodnotách oscilačního napětí. Největší elasticitu vykazují opět gely s největší koncentrací derivátu.



Obr. 14 Závislost oscilačního napětí na koncentraci derivátu v bodě meze tekutosti

6.4 Výpočet velikosti ok polymerní sítě

Pro výpočet velikosti ok polymerní sítě byly použity rovnice (3–12). Přehled hodnot použitých pro výpočet je uveden v Tab. 8.

Tab. 8 Hodnoty použité při výpočtech

ρ_p [g/m ³]	1 229 000
ρ_s [g/m ³]	1 009 000
R [m ³ ·Pa·K ⁻¹ ·mol ⁻¹]	8,314
T [K]	298,15
M_n (M_w HA-Ox) [g/mol]	300 000
M_r [g/mol]	400
C_n	27 [62]
l [nm]	0,52 [62]
v [g/mol]	0,764 [62]
χ	0,439 [62]
V_1	18 000 000

Z botnání bylo zjištěno, že více botnají koncentrovanější gely. To má za následek, že koeficient nabotnání po zrání hydrogelu vypočítaný z rovnice (6) je u koncentrovanějších gelů nižší. To vede k vyšším objemovým zlomkům v rovnovážném nabotnalém stavu (viz rovnice (4)), který ovlivňuje jak M_c tak ξ .

Každý z modelů zohledňuje jiné parametry. Jak bylo zobrazeno v kapitole 6.3, v rámci směrodatné odchylky není rozdíl mezi botnáním hydrogelu bez a s přidavkem BSA. Proto jsou koeficienty nabotnání a objemové zlomky z nich počítané (rovnice 4–7) velmi podobné, a tudíž se ani příliš neliší hodnota M_c vypočtená podle TRB (rovnice 2). U TKE je v rovnici pro výpočet M_c (rovnice 11) navíc zahrnuta ve jmenovateli i velikost elastického modulu. Čím vyšší je koncentrace derivátu, tím vyšší elastický modul dosahujeme a tím menší je hodnota vypočítané M_c .

V rovnici (12) pro výpočet ξ , byl použit pouze objemový zlomek polymeru v rovnovážném nabotnalém stavu, který je tím větší, čím vyšší je koncentrace derivátu v hydrogelu. Proto klesá hodnota ξ i v případě TRB, i přes stejné hodnoty M_c . Velikost ok polymerní sítě klesá strměji s koncentrací derivátu právě u TKE teorie právě kvůli klesajícím hodnotám M_c .

Rehmann et al. [23] porovnávali také teorii kaučukové elasticity a rovnovážného botnání pro PEG-norbene a závislost velikosti ok polymerní sítě na hmotnostní koncentraci. Zvýšení koncentrace PEG-4Nb ze 4 hm.% na 20 hm. % vedlo k 43% snížení velikosti ok u teorie rovnovážného bobtnání (od $11,2 \pm 0,6$ nm do $6,3 \pm 0,2$ nm) a 38% poklesu velikosti ok u teorie kaučukové elasticity (od $12,3 \pm 1,2$ nm do $7,6 \pm 0,5$ nm). V jejich případech poskytovala TKE vyšší hodnoty velikosti ok polymerní sítě než u TRB. Byla zkoumána i závislost mezi velikostí ok polymerní sítě a uvolňováním modelovým látek (viz kapitola 6.6).

Velikost ok polymerní sítě v řádu stovek nm byla zjištěna i ve studii od Dodero et al. [63]. Byly zkoumány gely na bázi HA v rozmezí M_w 90–4 000 kDa. Velikost ok polymerní sítě byla stanovena spojením nové mikroeologické techniky založené na dynamickém rozptylu světla s konvenční reometrií. Vypočtené velikosti ok se pohybovala rozmezí 200–700 nm (s rostoucí M_w klesala velikost ok polymerní sítě).

Teorie rovnovážného botnání předpovídá větší velikosti ok polymerní sítě, ačkoliv v rámci směrodatné odchylky je tento rozdíl významný pouze v případě gelů s BSA o koncentraci derivátu 30 mg/ml.

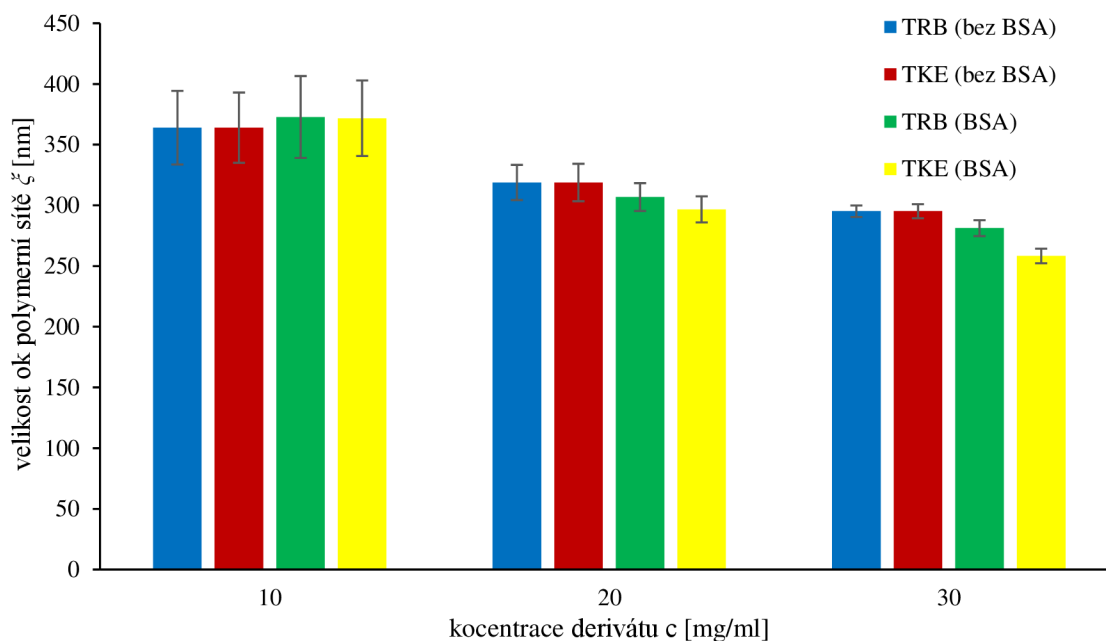
Pro výpočet velikost ok polymerní sítě podle teorie kaučukové elasticity je M_c závislá (kromě jiného) i na velikosti elastického modulu, a to nepřímo úměrně. U TKE tedy platí, že čím vyšší je koncentrace derivátu, tím vyšší jsou i elastické moduly a dostáváme tak nižší hodnoty M_c .

Tab. 9 Vypočítané hodnoty molekulové hmotnosti mezi dvěma sousedními příčnými vazbami

Koncentrace derivátu	Teorie rovnovážného botnání (TRB)				Teorie kaučukové elasticity (TKE)			
	Gely bez BSA		Gely s BSA		Gely bez BSA		Gely s BSA	
	M_c [g/mol]	Směr. odch. [g/mol]	M_c [g/mol]	Směr. odch. [g/mol]	M_c [g/mol]	Směr. odch. [g/mol]	M_c [g/mol]	Směr. odch. [g/mol]
10 mg/ml	148 890	2330	148 500	1850	146 980	260	147 800	70
20 mg/ml	148 300	140	148 280	140	138 470	240	138 630	210
30 mg/ml	148 620	90	148 540	30	122 690	430	125 330	120

Tab. 10 Vypočítané hodnoty velikosti ok polymerní sítě

Koncentrace derivátu	Teorie rovnovážného botnání (TRB)				Teorie kaučukové elasticity (TKE)			
	Gely bez BSA		Gely s BSA		Gely bez BSA		Gely s BSA	
	ζ [nm]	Směr. odch. [nm]	ζ [nm]	Směr. odch. [nm]	ζ [nm]	Směr. odch. [nm]	ζ [nm]	Směr. odch. [nm]
10 mg/ml	347	29	373	34	345	30	372	32
20 mg/ml	319	15	307	11	308	14	297	11
30 mg/ml	295	6	281	7	268	5	258	6



Obr. 15 Velikost ok polymerní sítě pro gely o různé koncentraci derivátu

Leach J et al. [64] počítali velikost ok polymerní sítě Flory-Rehnerovou teorií pro derivát kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 2000 kDa. Připravili řadu konjugátů glycidylmethakrylát-HA (GMHA), které byly následně fotopolymerizovány za vzniku zesíťovaného hydrogelu GMHA. Zvýšené množství konjugované methakrylátové skupiny (5, 7 a 11 %) odpovídalo zvýšeným hustotám síťování a menším velikostem ok polymerní sítě. Stejně jako v naší práci se hodnoty velikosti ok pohybovaly ve stovkách nanometrů (644 nm, 619 nm, 539 nm).

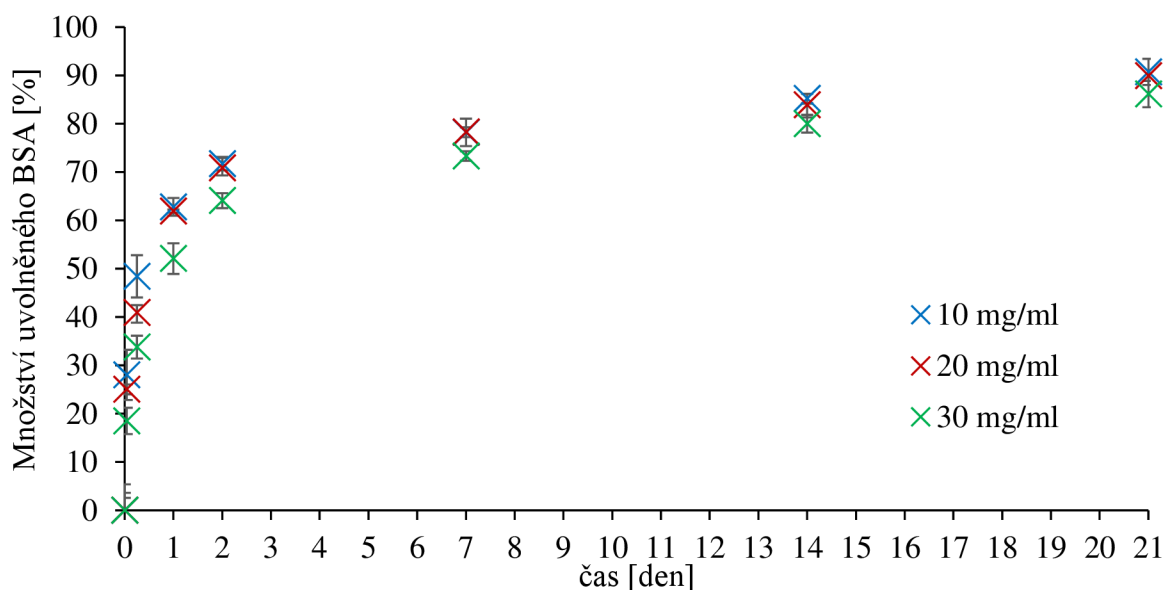
6.5 Stanovení vyloučeného BSA pomocí metody dle Bradfordové

Byla použita metoda stanovení dle Bradfordové. Výsledky z této metody nejsou bohužel vypovídající. Touto metodou není možné rozeznat hyaluronidázu použitou k degradaci hydrogelů na konci experimentů od BSA. Není tedy možné stanovit obsah neuvolněného BSA v hydrogelech. Proto byla zvolena metoda fluorescenčního značení.

6.6 Stanovení uvolněného BSA pomocí fluorescenčního značení

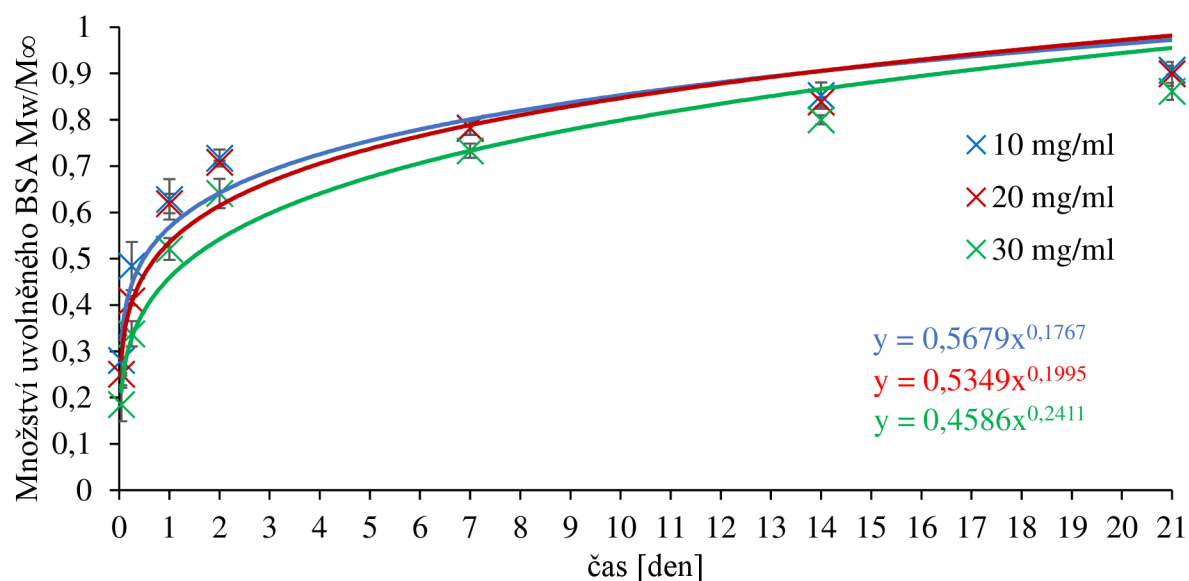
V této práci bylo množství uvolněného FITC-BSA stanoveno pomocí UV/VIS spektrofotometrie, jelikož v rámci měření kalibrační řady bylo prokázáno, že námi použité koncentrace lze takto stanovit s dostatečnou citlivostí i bez ředění vzorku, které by bylo nutné pro měření fluorescence a vnášelo by do výsledků větší odchylky. Navíc pokud by byla měřena absorpční spektra či fluorescence samotného BSA a BTH, bylo by obtížné rozeznat BSA od proteinu BTH, kterým byly gely na konci experimentu degradovány, kvůli stanovení neuvolněného BSA. Tato informace je velmi důležitá, jelikož zbývající BSA v hydrogelu na konci experimentu společně s BSA uvolněným během experimentu dohromady poskytují údaj o obsahu BSA v hydrogelu na počátku experimentu (100 %).

Z Obr. 16 je vidět, že nejvíce BSA se uvolnilo v prvních dvou dnech experimentu (u méně koncentrovaných gelů více než 70 %). Poté je už závislost lineární. Z gelů o vyšší koncentraci derivátu a tím pádem menší velikosti ok polymerní sítě se BSA uvolňuje pomaleji. Toto tvrzení bylo potvrzeno i po proložení experimentálních dat Korsmeyer-Peppasovým modelem (Obr. 17), kdy dostáváme při nižších koncentracích derivátu vyšší hodnoty rychlostní konstanty (Tab. 11). Obsah BSA v gelech zdegradovaných po 21 dnech uvolňování se pohybuje okolo 10 % (13,9 % u koncentrace 30 mg/ml). Vzhledem k rostoucímu charakteru křivky lze předpokládat, že při delším trvání experimentu by došlo k uvolnění i tohoto množství.



Obr. 16 Závislost množství uvolněného BSA na čase odběru

Rehmann at al. [23] zkoumali souvislost mezi uvolňováním a velikostí ok polymerní sítě pro koktejl proteinů. Ve své práci předpokládali, že se jim uvolní ty, které mají menší průměr než vypočítaná hodnota velikosti ok polymerní sítě a větší zůstanou v síti zadrženy. Tato hypotéza se nepotvrdila, nejspíš proto, že vypočtená velikost je pouze průměrná hodnota, v síti jsou i oka větší, která mohou představovat hlavní cestu úniku. Námí stanovená velikost ok polymerní sítě je však mnohonásobně větší, než je velikost BSA (hydrodynamický poloměr BSA je 3,48 nm), tudíž jsme předpokládali, že uvolňování bude probíhat prostou difúzí. Tato hypotéza byla potvrzena po proložení experimentálních dat Korsmeyer-Peppasovým modelem (Obr. 17). Ve všech případech je exponent uvolňování n menší než 0,5 (Tab. 11).



Obr. 17 Proložení experimentálních dat Korsmeyer-Peppasovým modelem

Tab. 11 Porovnání rychlostních konstant a exponentů uvolňování se zjištěnou velikostí ok polymerní sítě

koncentrace derivátu [mg/ml]	velikost ok ζ TRB [nm]	velikost ok ζ TKE [nm]	rychlostní konstanta k [den ⁻¹]	exponent uvolňování n [-]
10	373	372	0,5679	0,1767
20	307	297	0,5349	0,1995
30	281	258	0,4586	0,2411

7 ZÁVĚR

Pro přípravu hydrogelů byl použit formyl hyaluronan sodný o M_w 342 kDa a stupni substituce 9 % a jako síťovací činidlo byl využit POA O,O'-1,3-propandiylbishydroxylamin dichlorid.

Podařilo se připravit hydrolyticky stabilní hydrogely, jejichž vlastnosti byly korigovány koncentrací derivátu (10 mg/ml, 20 mg/ml a 30 mg/ml).

Pomocí TGA byl stanoveno, že námi použitý derivát obsahuje 79,6 hm.% polymeru. Pomocí této hodnoty byla dopočítána teoretická hmotnost xerogelu na začátku experimentu před botnáním. Po rozbotnění hydrogelů byly hydrogely lyofilizovány a stanovena sušina u všech tří použitých koncentrací derivátu po botnání (okolo 80 hm.%). Vynásobením hmotnosti lyofilizátu a obsahu sušiny byla zjištěna hmotnost xerogelu po botnání. Rozdíl hmotností před a po botnání prokázal, že během botnání dochází k vyplavování nezesítěného solu z hydrogelu (okolo 10–20 hm. %). U hydrogelů o koncentraci 10 mg/ml kvůli tomuto jevu dochází k odbotnávání hydrogelů, jelikož neobsahují dostatečné množství polymeru, který by byl schopen vázat vodu. Koncentrovanější analogy i po odplavení solu botnají.

Z botnání hydrogelů byly získány další hodnoty potřebné pro výpočet ζ (hmotnosti hydrogelů po přípravě a v rovnovážném nabotnalém stavu). Dále bylo prokázáno, že gely dosáhnou botnací rovnováhy v průběhu 5 dní a že přídavek BSA významně neovlivňuje botnací rovnováhu.

Pomocí amplitudového a frekvenčního testu byly zkoumány viskoelastické vlastnosti hydrogelů před i po botnání. Bylo prokázáno, že hydrogely po nabotnání vykazují vyšší hodnoty elastických modulů než jejich nenabotnalé analogy, ale jsou zároveň křehčí. Průměrné hodnoty velikostí elastického modulu v LVO byly použity při výpočtu velikosti ok polymerní sítě podle teorie kaučukové elasticity.

V této práci byla velikost ok polymerní sítě počítána pomocí dvou běžně užívaných teorií: Teorie rovnovážného botnání (Flory-Rehnerova teorie) a teorie kaučukové elasticity. Velikost ok u gelů bez BSA o koncentraci derivátu 10, 20 a 30 mg/ml byla podle TRB stanovena na 347 ± 29 nm, 319 ± 15 nm, 295 ± 6 nm a podle TKE 345 ± 30 nm, 308 ± 14 nm, 268 ± 5 nm. Pro hydrogely s BSA byly zjištěny velikosti ok polymerní sítě podle TRB 373 ± 34 nm, 307 ± 11 nm, 281 ± 7 nm a podle TKE 372 ± 32 nm, 297 ± 11 nm, 258 ± 6 nm. Velikost ok polymerní sítě klesá s vyšší koncentrací derivátu.

V druhé části práce bylo sledováno uvolňování modelové aktivní látky BSA. Tato látka má velmi malý hydrodynamický poloměr (3,48 nm) oproti námi vypočtené velikosti ok polymerní sítě, a proto jsme předpokládali, že bude k uvolňování z polymerní matrice docházet prostou difúzí. K ověření této hypotézy byl použit Korsmeyer-Peppasův model, který tuto hypotézu potvrdil. U všech tří použitých koncentrací derivátu byl exponent uvolňování menší než 0,5. Podle velikostí rychlostních konstant dochází k mírnému ovlivnění rychlosti uvolňování velikostí ok.

Pozorovatelná závislost mezi velikostí ok a rychlostí uvolňování by mohla usnadnit návrh systémů řízeného uvolňování pro protilátku. Hydrogely na bázi HA-Ox/POA mají však

poměrně vysoké hodnoty velikosti ok polymerní sítě a nedochází tak k významnému ovlivnění rychlosti uvolňování BSA. Hydrogely nejsou tedy vhodné při použití k řízenému uvolňování látek, mohly by však být využity v jiných oblastech, například jako scaffoldy pro buněčné kultury, u kterých je žádoucí, aby docházelo k volné difúzi látek obsažených v kultivačním médiu k buňkám inkorporovaným v zesílené matici.

8 BIBLIOGRAFIE

- [1] DVOŘÁKOVÁ, Jana, Lukáš KUČERA, Jan KUČERA et al. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a hydrogel system based on an enzymatically crosslinked tyramine derivative of hyaluronan. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2014, **102**(10), 3523-3530 [cit. 2021-07-12]. ISSN 15493296. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.35033
- [2] DOLAN, Eimear B., Björn HOFMANN, M. Hamman DE VAAL et al. A bioresorbable biomaterial carrier and passive stabilization device to improve heart function post-myocardial infarction. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2019, **103** [cit. 2021-07-12]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2019.109751
- [3] O'DWYER, Joanne, Robert MURPHY, Eimear B. DOLAN et al. Development of a nanomedicine-loaded hydrogel for sustained delivery of an angiogenic growth factor to the ischaemic myocardium. *Drug Delivery and Translational Research* [online]. 2020, **10**(2), 440-454 [cit. 2021-07-12]. ISSN 2190-393X. Dostupné z: doi:10.1007/s13346-019-00684-5
- [4] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [5] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-7080-579-x.
- [6] *Hydrogels: biological properties and applications*. Editor Rolando BARBUCCI. Milan: Springer, 2009. ISBN 978-88-470-1103-8.
- [7] BURDICK, Jason A. a Glenn D. PRESTWICH. Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications. *Advanced Materials* [online]. 2011a, **23**(12), 41-56 [cit. 2019-04-26]. ISSN 09359648. Dostupné z: doi:10.1002/adma.201003963
- [8] KHAN, Samiullah, Aziz ULLAH, Kaleem ULLAH a Nisar-ur REHMAN. Insight into hydrogels. *Designed Monomers and Polymers* [online]. 2016, **19**(5), 456-478 [cit. 2022-03-13]. ISSN 1568-5551. Dostupné z: doi:10.1080/15685551.2016.1169380
- [9] YANG, Li-Qun, Bin HE, Shu MENG et al. Biodegradable cross-linked poly(trimethylene carbonate) networks for implant applications: Synthesis and properties. *Polymer* [online]. 2013, **54**(11), 2668-2675 [cit. 2022-02-24]. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2013.03.059
- [10] NGUYEN, Minh Khanh a Doo Sung LEE. Injectable Biodegradable Hydrogels. *Macromolecular Bioscience* [online]. 2010, **10**(6), 563-579 [cit. 2022-02-24]. ISSN 16165187. Dostupné z: doi:10.1002/mabi.200900402

- [11] GUTOWSKA, Anna, Byeongmoon JEONG a Marek JASIONOWSKI. Injectable gels for tissue engineering. *The Anatomical Record* [online]. 2001, **263**(4), 342-349 [cit. 2022-02-24]. ISSN 0003-276X. Dostupné z: doi:10.1002/ar.1115
- [12] LEE, Fan, Joo Eun CHUNG a Motoichi KURISAWA. An injectable enzymatically crosslinked hyaluronic acid–tyramine hydrogel system with independent tuning of mechanical strength and gelation rate. *Soft Matter* [online]. 2008, **4**(4) [cit. 2019-04-26]. ISSN 1744-683X. Dostupné z: doi:10.1039/b719557e
- [13] CACCAVO, D., S. CASCONI, G. LAMBERTI a A. A. BARBA. Hydrogels: experimental characterization and mathematical modelling of their mechanical and diffusive behaviour. *Chemical Society Reviews* [online]. 2018, **47**(7), 2357-2373 [cit. 2022-03-11]. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/C7CS00638A
- [14] PEPPAS, N. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. **50**(1), 27-46 [cit. 2021-07-12]. ISSN 09396411. Dostupné z: doi:10.1016/S0939-6411(00)00090-4
- [15] BOUKLAS, Nikolaos a Rui HUANG. Swelling kinetics of polymer gels: comparison of linear and nonlinear theories. *Soft Matter* [online]. 2012, **8**(31) [cit. 2022-03-11]. ISSN 1744-683X. Dostupné z: doi:10.1039/c2sm25467k
- [16] JANMEY, Paul A. a Manfred SCHLIWA. Rheology. *Current Biology* [online]. 2008, **18**(15), 639-641 [cit. 2022-03-21]. ISSN 09609822. Dostupné z: doi:10.1016/j.cub.2008.05.001
- [17] MEZGER, Thomas. *Applied rheology: with Joe Flow on rheology road*. 5st edition. Graz: Anton Paar GmbH, 2015. ISBN 978-3-9504016-0-8.
- [18] WEITZ, D., H. WYSS a R. LARSEN. Oscillatory Rheology: Measuring the Viscoelastic Behaviour of Soft Materials. *G.I.T Laboratory Journal* [online]. 2001, **3-4**, 68-70 [cit. 2019-11-01]. Dostupné z: http://www.mate.tue.nl/~wyss/home/resources/publications/2007/Wyss_GIT_Lab_J_2007.pdf
- [19] Amplitude sweeps. In: *Anton Paar* [online]. [cit. 2022-03-25]. Dostupné z: <https://wiki.anton-paar.com/cz-cs/amplitudove-testy/>
- [20] BUFFA, Radovan, Martin PRAVDA, Petr SEDLÁČEK a Martin CHYTIL, ed. *Hydrogely*. Dolní Dobrouč: Contipro Biotech, 2015. ISBN 978-80-260-7866-1.
- [21] FLORY, Paul J. *Principles of polymer chemistry*. Ithaca: Cornell University Press, 1953. ISBN 9780801401343.
- [22] MARSANO, E., S. GAGLIARDI, F. GHIONI a E. BIANCHI. Behaviour of gels based on (hydroxypropyl) cellulose methacrylate. *Polymer* [online]. 2000, **41**(21), 7691-7698 [cit. 2021-10-15]. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/S0032-3861(00)00142-7

- [23] REHMANN, Matthew S., Kelsi M. SKEENS, Prathamesh M. KHARKAR, Eden M. FORD, Emanuel MAVERAKIS, Kelvin H. LEE a April M. KLOXIN. Tuning and Predicting Mesh Size and Protein Release from Step Growth Hydrogels. *Biomacromolecules* [online]. 2017, **18**(10), 3131-3142 [cit. 2021-10-18]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biomac.7b00781
- [24] ZARZYCKI, Roman, Zofia MODRZEJEWSKA a Katarzyna NAWROTEK. Drug release from hydrogel matrices. *Ecological Chemistry and Engineering S-chemia I Inzynieria Ekologiczna S* [online]. 2010 [cit. 2021-07-12]. Dostupné z: [http://tchie.uni.opole.pl/freeECE/S_17_2/Zarzycki_17\(S2\).pdf](http://tchie.uni.opole.pl/freeECE/S_17_2/Zarzycki_17(S2).pdf)
- [25] AMSDEN, Brian. Solute Diffusion within Hydrogels. Mechanisms and Models. *Macromolecules* [online]. 1998, **31**(23), 8382-8395 [cit. 2021-07-12]. ISSN 0024-9297. Dostupné z: doi:10.1021/ma980765f
- [26] DASH, S., P. N. MURTHY, L. NATH a P. CHOWDURY. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica* [online]. **67**(3), 217-223 [cit. 2022-04-22].
- [27] KORSMEYER, Richard W., Robert GURNY, Eric DOELKER, Pierre BURI a Nikolaos A. PEPPAS. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 1983, **15**(1), 25-35 [cit. 2022-04-22]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/0378-5173(83)90064-9
- [28] BENEŠ, Luděk. Biologická terapeutika – bioléciva. *Praktické lékařství*. 2008, **4**(6), 292-297.
- [29] CHRIST, George J., Justin M. SAUL, Mark E. FURTH, Karl-Erik ANDERSSON a Michael A. NADER. The Pharmacology of Regenerative Medicine. *Pharmacological Reviews* [online]. 2013, **65**(3), 1091-1133 [cit. 2022-03-18]. ISSN 0031-6997. Dostupné z: doi:10.1124/pr.112.007393
- [30] SONTYANA, Adonijah Graham, Ansuja Pulickal MATHEW, Ki-Hyun CHO, Saji UTHAMAN a In-Kyu PARK. Biopolymeric In Situ Hydrogels for Tissue Engineering and Bioimaging Applications. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* [online]. 2018, **15**(5), 575-590 [cit. 2022-03-18]. ISSN 1738-2696. Dostupné z: doi:10.1007/s13770-018-0159-1
- [31] DIMATTEO, Robert, Nicole J. DARLING a Tatiana SEGURA. In situ forming injectable hydrogels for drug delivery and wound repair. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2018, **127**, 167-184 [cit. 2022-03-18]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2018.03.007
- [32] YANG, Jeong-A., Junseok YEOM, Byung Woo HWANG, Allan S. HOFFMAN a Sei Kwang HAHN. In situ-forming injectable hydrogels for regenerative medicine. *Progress in Polymer Science* [online]. 2014, **39**(12), 1973-1986 [cit. 2019-04-26]. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2014.07.006

- [33] HUANG, Gangliang a Hualiang HUANG. Hyaluronic acid-based biopharmaceutical delivery and tumor-targeted drug delivery system. *Journal of Controlled Release* [online]. 2018, **278**, 122-126 [cit. 2021-07-12]. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2018.04.015
- [34] KHUNMANEE, Sureerat, Younghyen JEONG a Hansoo PARK. Crosslinking method of hyaluronic-based hydrogel for biomedical applications. *Journal of Tissue Engineering* [online]. 2016, **8** [cit. 2019-04-26]. ISSN 2041-7314. Dostupné z: doi:10.1177/2041731417726464
- [35] CHEN, Jyh-Ping, Yann-Lii LEU, Chia-Lang FANG, Chao-Huang CHEN a Jia-You FANG. Thermosensitive Hydrogels Composed of Hyaluronic Acid and Gelatin as Carriers for the Intravesical Administration of Cisplatin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2011, **100**(2), 655-666 [cit. 2022-03-18]. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.22309
- [36] HSU, Shu-Hui, Yann-Lii LEU, Jiuan-Wen HU a Jia-You FANG. Physicochemical Characterization and Drug Release of Thermosensitive Hydrogels Composed of a Hyaluronic Acid/Pluronic F127 Graft. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* [online]. 2009, **57**(5), 453-458 [cit. 2022-03-18]. ISSN 0009-2363. Dostupné z: doi:10.1248/cpb.57.453
- [37] RODELL, Christopher B., Adam L. KAMINSKI a Jason A. BURDICK. Rational Design of Network Properties in Guest–Host Assembled and Shear-Thinning Hyaluronic Acid Hydrogels. *Biomacromolecules* [online]. 2013, **14**(11), 4125-4134 [cit. 2022-03-18]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm401280z
- [38] TAVSANLI, Burak a Oguz OKAY. Mechanically robust and stretchable silk/hyaluronic acid hydrogels. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2019, **208**, 413-420 [cit. 2022-03-18]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2018.12.088
- [39] IBRAHIM, S., C.R. KOTHAPALLI, Q.K. KANG a A. RAMAMURTHI. Characterization of glycidyl methacrylate – Crosslinked hyaluronan hydrogel scaffolds incorporating elastogenic hyaluronan oligomers. *Acta Biomaterialia* [online]. 2011, **7**(2), 653-665 [cit. 2022-03-19]. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2010.08.006
- [40] HONG, Bo Min, Hee Cheol KIM, Jae Eun JEONG, Su A. PARK a Won Ho PARK. Visible-light-induced hyaluronate hydrogel for soft tissue fillers. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, **165**, 2834-2844 [cit. 2022-03-19]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.10.155
- [41] PETTA, Dalila, Dirk W. GRIJPMMA, Mauro ALINI, David EGLIN a Matteo D'ESTE. Three-Dimensional Printing of a Tyramine Hyaluronan Derivative with Double Gelation Mechanism for Independent Tuning of Shear Thinning and Postprinting Curing. *ACS Biomaterials Science & Engineering* [online]. 2018, **4**(8), 3088-3098 [cit. 2022-03-19]. ISSN 2373-9878. Dostupné z: doi:10.1021/acsbiomaterials.8b00416
- [42] KIM, Su-Hwan, Young-Hyeon AN, Hwan D. KIM, Kyungmin KIM, Sang-Hyuk LEE, Hyun-Gu YIM, Byung-Gee KIM a Nathaniel S. HWANG. Enzyme-mediated tissue adhesive hydrogels for meniscus repair. *International Journal of Biological Macromolecules* [online].

- 2018, **110**, 479-487 [cit. 2022-03-19]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.12.053
- [43] DEVARAJ, Neal K. The Future of Bioorthogonal Chemistry. *ACS Central Science* [online]. 2018, **4**(8), 952-959 [cit. 2022-03-19]. ISSN 2374-7943. Dostupné z: doi:10.1021/acscentsci.8b00251
- [44] GOPINATHAN, Janarthanan a Insup NOH. Click Chemistry-Based Injectable Hydrogels and Bioprinting Inks for Tissue Engineering Applications. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* [online]. 2018, **15**(5), 531-546 [cit. 2022-03-19]. ISSN 1738-2696. Dostupné z: doi:10.1007/s13770-018-0152-8
- [45] ZHAN, Henan, Heleen DE JONG a Dennis W. P. M. LÖWIK. Comparison of Bioorthogonally Cross-Linked Hydrogels for in Situ Cell Encapsulation. *ACS Applied Bio Materials* [online]. 2019, **2**(7), 2862-2871 [cit. 2022-03-19]. ISSN 2576-6422. Dostupné z: doi:10.1021/acsabm.9b00253
- [46] TROMBINO, Sonia, Camilla SERVIDIO, Federica CURCIO a Roberta CASSANO. Strategies for Hyaluronic Acid-Based Hydrogel Design in Drug Delivery. *Pharmaceutics* [online]. 2019, **11**(8) [cit. 2022-03-19]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics11080407
- [47] CHOONG, Ingrid C. a Jonathan A. ELLMAN. Synthesis of Alkoxyamines by Alkoxide Amination with 3,3'-Di-tert-butylloxaziridine. *The Journal of Organic Chemistry* [online]. 1999, **64**(18), 6528-6529 [cit. 2022-03-19]. ISSN 0022-3263. Dostupné z: doi:10.1021/jo990490h
- [48] SCHRAMM, Charlotte, Martin S. SPITZER, Sigrid HENKE-FAHLE et al. The Cross-linked Biopolymer Hyaluronic Acid as an Artificial Vitreous Substitute. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* [online]. 2012, **53**(2) [cit. 2022-03-19]. ISSN 1552-5783. Dostupné z: doi:10.1167/iovs.11-7322
- [49] KALIA, Jeet a Ronald T. RAINES. Hydrolytic Stability of Hydrazones and Oximes. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2008, **47**(39), 7523-7526 [cit. 2022-03-19]. ISSN 1433-7851. Dostupné z: doi:10.1002/anie.200802651
- [50] GROVER, Gregory N., Rebecca L. BRADEN a Karen L. CHRISTMAN. Oxime Cross-Linked Injectable Hydrogels for Catheter Delivery. *Advanced Materials* [online]. 2013, **25**(21), 2937-2942 [cit. 2022-03-19]. ISSN 09359648. Dostupné z: doi:10.1002/adma.201205234
- [51] KRISTIENSEN, Kåre A., Antje POTTHAST a Bjørn E. CHRISTENSEN. Periodate oxidation of polysaccharides for modification of chemical and physical properties. *Carbohydrate Research* [online]. 2010, **345**(10), 1264-1271 [cit. 2022-03-19]. ISSN 00086215. Dostupné z: doi:10.1016/j.carres.2010.02.011

- [52] ŠEDO VÁ, Petra, Radovan BUFFA, Sofiane KETTOU et al. Preparation of hyaluronan polyaldehyde—a precursor of biopolymer conjugates. *Carbohydrate Research* [online]. 2013, **371**, 8-15 [cit. 2022-03-19]. ISSN 00086215. Dostupné z: doi:10.1016/j.carres.2013.01.025
- [53] SEDOVA, Petra, Radovan BUFFA, Tereza KO CI, Lenka KOVAROVA, Jiri BEDNARIK, Hana VAGNEROVA a Vladimir VELEBNY. The effect of aminoxy-linkers' structure on the mechanical properties of hyaluronan-oxime hydrogels. *Express Polymer Letters* [online]. 2022, **16**(3), 265-278 [cit. 2022-03-18]. ISSN 1788618X. Dostupné z: doi:10.3144/expresspolymlett.2022.21
- [54] MAJOREK, Karolina A., Przemyslaw J. POREBSKI, Arjun DAYAL, Matthew D. ZIMMERMAN, Kamila JABLONSKA, Alan J. STEWART, Maksymilian CHRUSZCZ a Wlodek MINOR. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Molecular Immunology* [online]. 2012, **52**(3-4), 174-182 [cit. 2022-03-16]. ISSN 01615890. Dostupné z: doi:10.1016/j.molimm.2012.05.011
- [55] COHN, E. J., L. E. STRONG, W. L. HUGHES, D. J. MULFORD, J. N. ASHWORTH, M. MELIN a H. L. TAYLOR. Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. IV. A System for the Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components of Biological Tissues and Fluids 1a,b,c,d. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 1946, **68**(3), 459-475 [cit. 2022-03-16]. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja01207a034
- [56] LARRAÑAGA, Michael D., Richard J. LEWIS a Robert A. LEWIS. *Hawley's Condensed Chemical Dictionary, Sixteenth Edition* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2016 [cit. 2022-03-16]. ISBN 9781119312468. Dostupné z: doi:10.1002/9781119312468
- [57] WRIGHT, A.K. a M.R. THOMPSON. Hydrodynamic structure of bovine serum albumin determined by transient electric birefringence. *Biophysical Journal* [online]. 1975, **15**(2), 137-141 [cit. 2022-03-16]. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(75)85797-3
- [58] AXELSSON, Inge. Characterization of proteins and other macromolecules by agarose gel chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 1978, **152**(1), 21-32 [cit. 2022-03-16]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(00)85330-3
- [59] BARBERO, Nadia, Claudia BAROLO a Guido VISCARDI. Bovine Serum Albumin Bioconjugation with FITC. *World Journal of Chemical Education*. 2016, **4**(4), 80-85. Dostupné z: doi:10.12691/wjce-4-4-3
- [60] FluoroTag™ FITC Conjugation Kit. In: *Merck* [online]. [cit. 2022-03-24]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sigma/fitc1>
- [61] BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* [online].

1976, **72**(1-2), 248-254 [cit. 2021-07-12]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1006/abio.1976.9999

- [62] MARTINI, Maïke, Patricia HEGGER, Nicole SCHÄDEL et al. Charged Triazole Cross-Linkers for Hyaluronan-Based Hybrid Hydrogels. *Materials* [online]. 2016, **9**(10) [cit. 2021-10-14]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma9100810
- [63] DODERO, Andrea, Rhodri WILLIAMS, Simona GAGLIARDI, Silvia VICINI, Marina ALLOISIO a Maila CASTELLANO. *Characterization of hyaluronic acid by dynamic light scattering and rheological techniques* [online]. In: . s. 020184- [cit. 2022-04-13]. Dostupné z: doi:10.1063/1.5046046
- [64] BAIER LEACH, Jennie, Kathryn A. BIVENS, Charles W. PATRICK JR. a Christine E. SCHMIDT. Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: Natural, biodegradable tissue engineering scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 2003, **82**(5), 578-589 [cit. 2022-04-28]. ISSN 0006-3592. Dostupné z: doi:10.1002/bit.10605

9 SEZNAM ZKRATEK

HA	kyselina hyaluronová
HA-Ox	oxidovaný derivát kyseliny hyaluronové
POA	O,O'-1,3-propandiylbishydroxylamin dihydrochlorid
OP	octanový pufr
NMR	nukleární magnetická rezonance
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. Bovine Serum Albumine)
SA	sérový albumin
FITC-BSA	fluorescenčně značený hovězí albumin
FR	fyzilogický roztok
CBB-G250	Coomassie brilliant blue-G250
PEG	polyethylenglykol
TGA	termogravimetrická analýza
BTH	hyaluronidáza (hovězí)
TRB	Teorie rovnovážného botnání
TKE	Teorie kaučukové elasticity
GMHA	glycidylmethakrylát-HA
LVO	lineární viskoelastická oblast

10 PŘÍLOHY

10.1 Příloha č. 1 Teflonové formy pro výrobu hydrogelů



10.2 Příloha č. 2 Hydrogely před a po lyofilizaci (po odsolení)

