



# 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

# DERIVATIZACE HYALURONANU SODNÉHO JAKOŽTO NÁSTROJ PRO ZVÝŠENÍ STABILITY MODELOVÉ ARTIFICIÁLNÍ SYNOVIÁLNÍ KAPALINY

DERIVATIZATION OF SODIUM HYALURONATE AS A POSSIBLE TOOL FOR INCREASING OF THE  
STABILITY OF MODEL ARTIFICIAL SYNOVIAL FLUID

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Eliška Hrochová

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Michal Kalina, Ph.D.

BRNO 2021

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1499/2020 Akademický rok: 2020/21  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Eliška Hrochová**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Michal Kalina, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Derivatizace hyaluronanu sodného jakožto nástroj pro zvýšení stability modelové artifiční synoviální kapaliny

### Zadání diplomové práce:

- 1) Zaměřit se na rešerši metod využitelných pro cílenou modifikaci hyaluronanu sodného pro účely zvýšení jeho stability vůči enzymatické degradaci.
- 2) Na základě literární rešerše zvolit optimální metodiku cílené modifikace struktury hyaluronanu sodného.
- 3) Optimalizovat přípravu artifiční synoviální kapaliny se zvýšenou stabilitou vůči enzymatické degradaci při současném zachování mechanických vlastností a stability připraveného vzorku v porovnání se synoviální kapalinou připravenou z nemodifikovaného hyaluronanu.
- 4) Prostudovat stabilitu připravených synoviálních kapalin a porovnat jejich charakteristiky s reálnou synoviální kapalinou.
- 5) Zhodnotit získaná experimentální data a formulovat závěry s ohledem na možné praktické využití.

### Termín odevzdání diplomové práce: 28.5.2021:

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

Bc. Eliška Hrochová  
student(ka)

Ing. Michal Kalina, Ph.D.  
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 se zabývá optimalizací postupu modifikace kyseliny hyaluronové pro přípravu umělého synoviálního kapalin. Na základě literární rešerše byla pro modifikaci zvolena aminokyselina alanin. Hlavním cílem bylo zlepšení mechanických a stabilitních vlastností umělého synoviálního kapalin. Charakterizace byla provedena pomocí DLS mikrorheologie, makrorheologie, termogravimetrické analýzy (TGA), víceúhlového rozptylu světla spojeného s asymetrickou frakcionací tokem pole (AF4-MALS) a infračervené spektroskopie (FTIR). Teoretická část této práce se zaměřuje na pohybový aparát, popis synoviálního kapalin a roli hyaluronanu v metabolismu. V rámci diplomové práce byla modifikována umělého synoviálního kapalin, jejíž příprava byla stěžejním bodem předešlé bakalářské práce. Experimentální část se zaměřuje na postup modifikace hyaluronanu, srovnání vzorků umělého synoviálního kapalin bez modifikace, obsahující modifikovaný hyaluronan a s modifikovaným hyaluronanem i chondroitin sulfátem. Připravené vzorky byly hodnoceny z hlediska viskoelastických vlastností, časové a enzymatické stability. Pro srovnání byl použit i volně dostupný viskosuplement Orthovisc® a reálná koňská synovie.

## **Abstract**

This master thesis deals with the optimization of the procedure of modification of hyaluronic acid structure for the use in the artificial synovial liquids. Based on the literature research, the amino acid alanine was used for the modification of carboxylic group in the glucuronic acid. The main subject of study is the improvement of the stability and mechanical properties of synovial liquid. DLS microrheology, macrorheology, thermogravimetric analysis (TGA), multi-angle light scattering with flow-field flow fractionation (AF4-MALS) and infrared spectroscopy (FTIR) were used for characterization. The theoretical part of this theses submits review of the musculoskeletal system, role of hyaluronic acid in metabolism and summary of synovial liquid. The experimental part focuses on the measurement of the stability and mechanical properties of three artificial samples (first with no modification, second with modified hyaluronic acid and third with modified hyaluronic acid and chondroitin sulphate). These samples were compared with real horse synovial fluid and artificial viscosupplement Orthovisc®.

## **Klíčová slova**

umělého synoviálního kapalin, reologie, termogravimetrie, modifikace hyaluronanu, chondroitin sulfát, mikrorheologie, alanin, viskoelastické vlastnosti

## **Keywords**

artificial synovial liquid, rheology, thermogravimetric analysis, modification of the hyaluronic acid, chondroitin sulphate, microrheology, alanine, viscoelastic properties

HROCHOVÁ, Eliška. *Derivatizace hyaluronanu sodného jakožto nástroj pro zvýšení stability modelové umělé synoviální kapaliny*. Brno, 2021. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Michal Kalina.

## **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 VUT.

.....

Bc.Eliška Hrochová

## **Poděkování:**

Hlavní poděkování patří Ing. Michalu Kalinovi Ph.D., vedoucímu mé diplomové práce, za odborné vedení, trpělivost, ochotu a vytrvalost, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnoval. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Jiřímu Smilkovi Ph.D za možnosti konzultace v oblasti reologické problematiky.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Pohybový aparát .....	8
2.1.1	Svaly .....	8
2.1.2	Klouby .....	8
2.1.3	Chrupavka .....	8
2.1.4	Synoviální membrána .....	8
2.1.5	Synoviální kapalina .....	9
2.2	Onemocnění pohybového aparátu .....	9
2.3	Proteoglykany.....	10
2.3.1	Zástupci GAG.....	11
2.4	Syntéza hyaluronanu .....	12
2.5	Degradace hyaluronanu .....	13
2.5.1	Fyzikální faktory degradace .....	13
2.5.2	Chemické faktory degradace .....	14
2.6	Modifikace hyaluronanu.....	15
2.7	Detekce hyaluronidázové aktivity .....	16
2.7.1	Chemické metody.....	16
2.7.2	Fyzikálně chemické metody .....	16
2.8	Biologické účinky hyaluronanu.....	16
2.9	Viskosuplementy dostupné na trhu .....	17
3	STAV SOUČASNÉ ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	18
4	CÍLE PRÁCE .....	20
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	21
5.1	Použité chemikálie a přístroje .....	21
5.1.1	Použité chemikálie .....	21
5.1.2	Použité přístroje.....	21
5.2	Příprava modifikované synoviální kapaliny .....	21
5.2.1	Vzorek reálné koňské synovie .....	22
5.2.2	Příprava modifikovaného hyaluronanu sodného (pro vzorek synovie B a C).....	22
5.2.3	Příprava umělé kapaliny inspirovaná patentem US 8716204 (pro vzorek A) .....	23
5.2.4	Příprava synoviální kapaliny s přidáním chondroitin sulfátu .....	23
5.3	Podmínky měření v rámci použitých metod.....	23
5.3.1	TGA.....	23
5.3.2	FTIR .....	24
5.3.3	MALS.....	24

5.3.4	Makroreologie .....	25
5.3.5	DLS Mikroreologie .....	26
5.3.6	UV-VIS spektrometrie .....	27
6	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	28
6.1	Základní materiálová charakterizace .....	28
6.1.1	Charakterizace hyaluronanu pomocí AF4-MALS.....	28
6.1.2	Ověření modifikace hyaluronanu pomocí FTIR.....	28
6.1.3	Ověření modifikace hyaluronanu pomocí TGA .....	29
6.2	Charakterizace připravených vzorků synoviálních kapalin.....	31
6.2.1	Mikroreologie .....	31
6.2.2	Makroreologie .....	32
6.2.3	Srovnání výstupu makroreologie a mikroreologie .....	35
6.2.4	Ověření opakovatelnosti přípravy synoviálních kapalin .....	36
6.2.5	Izotermická termogravimetrie .....	37
6.2.6	Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR) .....	37
6.3	Sledování stability vzorku .....	40
6.3.1	Enzymatická stabilita .....	40
6.3.2	Časová stabilita.....	41
6.4	Srovnání artifiční synovie se vzorkem reálné synoviální kapaliny a přípravkem Orthovisc® .....	50
6.4.1	Srovnání s reálnou koňskou synovií.....	51
6.4.2	Srovnání s artifičním přípravkem Orthovisc® .....	52
7	ZÁVĚR A DISKUZE.....	54
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	57

# 1 ÚVOD

Kostra a svaly tvoří funkční prvek umožňující tělu pohyb. Klouby představují pohyblivé spojení kostí obsahující synoviální kapalinu, jejíž „základním stavebním kamenem“ je hyaluronan, který se běžně vyskytuje v extracelulární matrix (ECM). Synoviální kapaliny v kloubech zajišťují plynulost pohybu, zabraňují nežádoucímu opotřebenému kloubních hlavic, přenášejí síly působící na kloub v pohybu a zabraňují poranění kloubu.

Neukojitelná potřeba plnění každodenních povinností vycházející z naladění společnosti často v důsledku nežádoucím způsobem ovlivňuje lidské zdraví. Člověk se snaží stíhat zvyšující se společenské nároky na úkor kvality a množství spánku, pohybu a výživy. Tyto prvky jsou nezbytné pro zdraví mysli a těla. Pokud je člověk dlouhodobě vystavován nedostatku výživy, odpočinku a pohybu, pak je vysoce pravděpodobné, že dojde ke vzniku onemocnění pohybového aparátu. Dalším nežádoucím faktorem ohrožujícím zdraví je genetické zatížení dědičnými onemocněními. Prvotně je jedinec limitován během sportovních aktivit. V progresivní fázi onemocnění kloubů je dotčený omezován i v rámci každodenního života, finálně je výrazně ovlivněna základní schopnost sebeobsluhy. Praktickým příkladem je aktivní sportovec neschopný na počátku onemocnění podávat patřičné výkony, následně pociťuje obtíže při běžné chůzi (na úřad, do obchodu) a nakonec se bolesti ozývají při každém pohybu (vstávání ze židle, dřep, předklon). Při léčbě kloubních obtíží je důležité pamatovat i na proces hojení. Podpora organismu představuje širokou škálu možností, jimiž je možno regulovat omezené, pozastavené nebo blokováné samo obnovující funkce organismu. Pro zdravý pohyb jsou krom kloubů důležité i synoviální kapaliny, na které se tato práce zaměřuje. Je třeba cílit na zlepšení funkčních vlastností poškozených kloubů. Je žádoucí zapracovat na zdokonalení funkčních vlastností umělé synovie ve smyslu její časové stability, biokompatibility a následně přiblížení výrobního procesu směrem k aplikaci do kloubů. Jedním z limitujících faktorů umělé synoviální kapaliny je degradace hyaluronanu. Ta se reologicky okamžitě projevuje poklesem komplexní viskozity a ztrátou viskoelastických vlastností, což v reálu znamená, že se synoviální kapalina posouvá od tekutiny schopné reagovat při silovém působení jako pevný materiál k tekutině, která svým chováním připomíná olej. Pro léčbu mechanického opotřebeného kloubu je v momentálně v České republice povolena injekce viskosuplementů popř. látek ovlivňujících intraartikulární prostředí pouze do kolenního kloubu. Důvodem je zatím nepodchycený postup aplikace. Kolen je jedním z největších kloubů, obsahuje nejvíce synoviální kapaliny. Během aplikace je třeba jehlou proniknout až do kloubu, což je velmi bolestivý proces. Produkty dostupné pro tyto účely na trhu mají nevýhodu v četnosti opakované aplikace. Proto vidím vyšší stabilitu umělé synovie jako velkou výhodu jednak ve smyslu snazšího uchování před aplikací, tak delší výdrže během působení v kloubu. To by mohlo snížit počet aplikací, tedy počet vpichů do kloubu.



## **2 TEORETICKÁ ČÁST**

### **2.1 Pohybový aparát**

Pohybový aparát tvoří kostra a svaly. Kostra představuje pevnou oporu těla, na kterou se svaly napojují a zajišťují dynamický pohyb. Jednotlivé kosti jsou propojeny pojivovou tkání nebo klouby. Propojení pomocí pojivové tkáně lze rozlišit na další tři typy, a to vazivové propojení (švy na lebce novorozenců), chrupavčité (meziobratlová ploténka) nebo pomocí kostí (švy na lebce dospělého člověka) [1].

#### **2.1.1 Svaly**

Svaly se pevně upínají na kostru a téměř okamžitě poskytují odpovědi na impulzy z mozku. To zajišťuje ochranu těla před úrazem (popáleny, dislokace). Svaly je možno rozdělit do tří kategorií dle způsobu provedení pohybu.

Agonisté jsou nejsilnější svaly pro většinu základních pohybů. Synergisté samostatně pohyb neprovádějí, a proto se označují jako pomocné svaly. Jsou schopny přispět k provedení pohybu uskutečňovaného primárně agonisty. Poslední skupinu tvoří antagonisté, kteří působí silově proti pohybu proto, aby byly pohyby plynulé a netrhavé [2].

#### **2.1.2 Klouby**

Obecně lze říct, že je kloub složen z dvou hlavních komponent, a to kloubní hlavice a kloubní jamky. Na koncích kostí v oblasti kloubu se nachází chrupavka, celý kloub je uzavřen v kloubním pouzdře obsahujícím synoviální kapalinu. Flexibilita kloubu je omezena jeho geometrií, pokud dojde k pohybu mimo rozsah kloubu, pak hrozí jeho dislokace, což je bolestivý stav. Nebezpečím při vykloubení je porušení měkkých tkání v okolí kloubu. Klouby je možno dělit na jednoduché (styk pouze dvou kostí) a složené (styk více kostí)[1], [3].

#### **2.1.3 Chrupavka**

Chrupavka obsahuje strukturně pojivovou tkáň, podobá se vazivu, ale díky přítomnosti proteoglykanů je mnohem pevnější. Chrupavky je třeba rozdělit do tří kategorií, které se rozlišují typem kolagenu na elastickou, hyalinní a fibrózní.

Elastická chrupavka, jak z názvu vyplývá, poskytuje organismu pružnost a nachází se například v sluchovém ústrojí. Hyalinní chrupavka je velmi pevná, vyskytuje se v průdušnici nebo v kloubech a u embryí obratlovců předchází vzniku kostí. Fibrózní chrupavka poskytuje organismu největší oporu, je složena z kolagenních vláken, tudíž odolává velkému namáhání. Fibrózní chrupavky se vyskytují v kloubech s velkými nároky na silové působení jako jsou meziobratlové ploténky nebo menisky v kolenních kloubech [4].

#### **2.1.4 Synoviální membrána**

Synoviální membrána je fibrózním, velmi prokrveným povlakem kloubu. Hlavní funkcí této membrány je udržení stálého složení synovie. Membrána obsahuje synoviocyty, které kontinuálně syntetizují hyaluronan pro synoviální kapalinu [5].

### 2.1.5 Synoviální kapalina

Synoviální kapalina představuje esenciální součást kloubu, která slouží pro jeho ochranu a výplň. U zdravého pacienta bez patologického stavu se množství synovie pohybuje v rozmezí několika mililitrů. Tato žlutá čirá kapalina svou hustotou asociuje vaječný bílek.

#### *Funkce synoviální kapaliny v organismu*

Kloub je konstrukčně uzpůsoben k pohybu, během kterého na něj působí různé síly (například třecí nebo tíhová). Dlouhodobé působení síly spolu se změnami materiálu (kost, chrupavka) vede k poškození kloubu [6]. Jak z výše zmíněného textu vyplývá, synoviální kapalina musí kloubům poskytovat ochranu při mechanickém namáhání. Unikátní viskoelastické vlastnosti se projevují již při mírném zvýšení silového působení (zátěže). Pojem „viskoelastický“ zahrnuje kapaliny, které se bez vnějšího zásahu chovají jako volně tekoucí látky, ale při působení síly vykazují povahu elasticky pevného tělesa. Během pohybu jsou na klouby kladeny vysoké nároky, protože dochází k silovému působení a přenosu sil pohybovým aparátem. Synoviální kapalina vyplňuje prostor mezi chrupavčitými konci jednotlivých kostí. Zde dle aktuálních nároků snižuje tření nebo zpevňuje kloub pro jeho ochranu (pevnost kolenního kloubu při doskoku) [5].

#### *Složení synoviální kapaliny*

Po biochemické stránce synovie představuje filtrát krevní plazmy a tím napomáhá při výživě kloubu, který není cévně zásoben. Majoritní složku synoviální kapaliny tvoří kyselina hyaluronová. Tento polysacharid je složený z disacharidových jednotek (1→3)-β *N*-acetyl-D-glukosaminu střídajícího se s (1→4)-β D-glukuronovou kyselinou. Distribuce molekulových hmotností synoviálního hyaluronanu je poměrně široká (v rozmezí od 4 kDa do 8 MDa) [7], [8] Krom hyaluronanu synovie obsahuje ještě bílkoviny a lipidy. Synoviální proteiny jsou albumin a γ-globulin. Povrchově aktivní fosfolipidy zprostředkovávají mazací funkci. Lubrikačně obalují povrchy chrupavek a vnitřního prostředí kloubu, a tím přispívají ke snížení tření [9].

## 2.2 Onemocnění pohybového aparátu

Sklon k onemocnění kloubů může být podmíněn geneticky, ale také může být získán v důsledku nesprávné životosprávy. Tyto degenerativní změny se projevují z pravidla v průběhu 5. dekády života a výrazně snižují kvalitu života postižené osoby.

#### *Osteoartróza (OA)*

Konkrétní příčiny vzniku tohoto onemocnění stále nejsou přesně určeny, ale předpokládá se, že OA je výsledek kombinace hned několika faktorů. U nemocných dochází k poruše výživy chrupavek, dochází ke zvýšení vodnatého podílu v kloubech. Dochází k masivnímu úbytku proteoglykanů, což se projeví na snížení elasticity kloubních složek. Organismus ztrácí chrupavčitou hmotu, tomu může následovat zánět kostí. Fyzicky nemocný pociťuje bolesti kloubů spojené následně se zánětem, což vede k pohybovým diskomfortům až k imobilitě. Výskyt onemocnění je pravděpodobnější u starších lidí, protože klouby vlivem stárnutí ztrácí schopnost obnovy chrupavčité tkáně. Dalším faktorem inklinujícím k OA je nadváha a s tím spojené přetěžování kloubů [10].

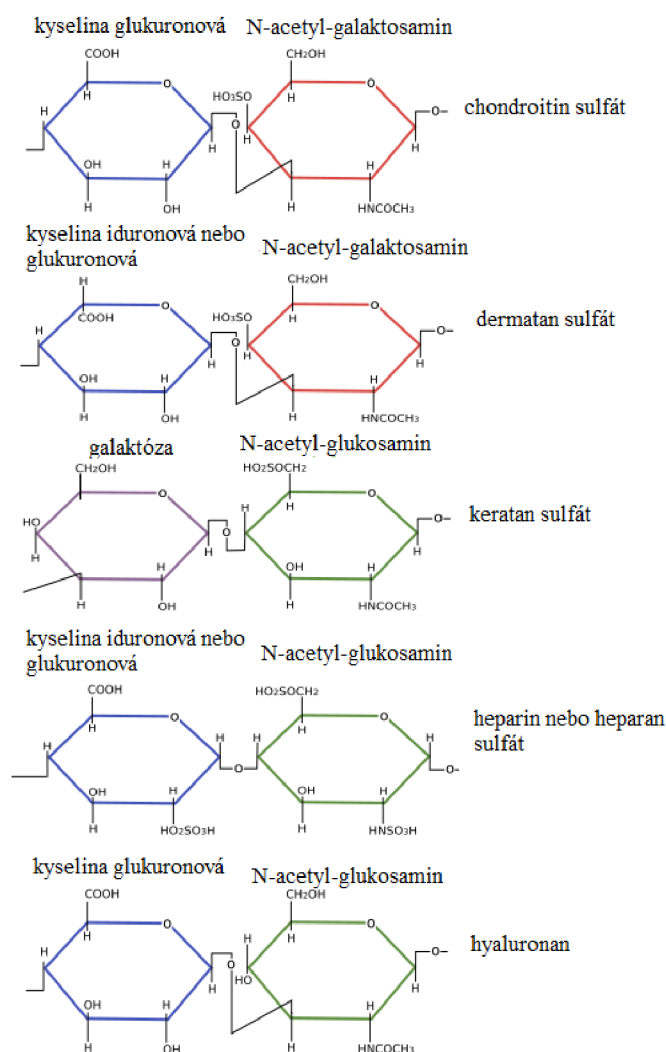
## **Artritida**

Artritida je všeobecným pojmem zahrnující desítky autoimunitně podmíněných chorob kloubů vedoucích k jejich bolestivosti a snížené mobilitě.

Revmatoidní artritida je závažné zánětlivé autoimunitní onemocnění, při kterém dochází k úbytku chrupavčité tkáně [4]. Toto onemocnění se vyskytuje až 5x častěji u žen než u mužů. Psoriatická artritida je přidružené zánětlivé onemocnění, které postihuje klouby pacientů trpících autoimunitním onemocněním zvaným lupénka, při kterém dochází ke vzniku šupinatých ložisek všude po těle [11]. Roční přírůstek je počítán na 1 až 10 nemocných na 100 000 obyvatel. Septická artritida je způsobena bakteriálními původci a může nastat i u pacientů po výměně kloubů. Bakterie se přemnoží a aktivují imunitní reakci vedoucí k otoku a bolestivosti postiženého kloubu [12], [13]. Ve článku [14] sledovali změny hyaluronanu v závislosti na míře progresu onemocnění revmatoidní artritidou a zjistili, že koncentrace hyaluronanu je u pacientu nižší než u zdravých lidí, ale nejsou mezi nimi rozdíly. Nemocní pacienti se v koncentraci hyaluronanu pohybují mezi 0,17 až 1,32 g/l. Nebyl pozorován žádný vliv léčiv na strukturu hyaluronanu (porovnávána nesteroidní a steroidní léčba).

## **2.3 Proteoglykany**

Proteoglykany jsou nezbytnou strukturální složkou tkání, zajišťující organizaci hmoty v celém organismu, hojně se vyskytují v extracelulární matrix a jejich vliv sahá až k organizaci fibrilárních vláken kolagenu. Jsou složeny z hlavního proteinového vlákna ubikvitinové dráhy, na kterém jsou navázány glykosaminoglykany (GAG), které zajišťují specifickou organizaci jednotlivých proteoglykanových vláken. Hlavní proteinové vlákno dosahuje rozměrů od 10 do 500 kDa [15]. GAG jsou polyanionty, proto jsou schopné vázat opačně nabitě částice ( $K^+$  a  $Na^+$ ). Tím jsou schopny osmoticky přitahovat molekuly vody a udržovat je v ECM. Záporný náboj GAG jim propůjčuje přítomný sulfát a hydroxylové skupiny [16], [17].



Obrázek 1: Přehled GAG [15]

### 2.3.1 Zástupci GAG

Chondroitin sulfát (CS) se hojně vyskytuje v chrupavkách a je nedílnou součástí ECM. Díky zápornému náboji je CS schopen v kloubech zadržovat vodu, která napomáhá kloubům v odpovědi na silové působení. Výhodou podání CS jako léčiva je jeho pozitivní vliv na mírnění příznaků OA [4].

Dermatan sulfát (DS) je typickou součástí fibrózní pojivové tkáně [18]. DS má vliv na srážení krve, aktivuje růstové faktory hepatocytů v játrech a účastní se i protoonkogeneze. Protoonkogeny se běžně nachází v organismu, kde jsou zodpovědné za proliferaci buněk. Nebezpečí představuje abnormální aktivace těchto genů, která vede k nekontrolovatelnému a nadměrnému buněčnému dělení [19], [20].

Keratan sulfát (KS) se nachází v rohovce, kloubech a kostech. KS je schopen udržovat tkáň hydratovanou, a proto se používá jako přísada očních kapek. Miyamoto a kolektiv zjistili, že KS je možno použít i jako biomarker při stanovení rakoviny ženského pohlavního ústrojí [21], [22]. Podávání KS stejně jako DS v rámci léčebně preventivního procesu hraje významnou roli při ochraně chrupavek proti poškození [23].

Primárním úkolem heparinu je antikoagulace. V dnešní době je získáván ze střevní sliznice prasat a hovězího dobytka, následně přečištěn a hojně používán v léčbě vysoké srážlivosti krve. Heparin produkují žírné buňky umístěné v pojivové tkáni nebo kapilárách. Heparan sulfát (HS) se nachází na membránách buněk a v extracelulární matrix. Stejně jako heparin je HS schopen antikoagulovat, avšak v nižší míře oproti heparinu [24], [25].

Kyselina hyaluronová (HA) se v organismech nachází ve formě sodné soli a je lineárním polysacharidem složeným z disacharidových jednotek N-acetylglukosaminu a kyseliny glukuronové. [26]. Průměrný dospělý 70 kg jedinec obsahuje přibližně 15 gramů HA, která vyplňuje většinu extracelulárního prostoru, v organismu hraje výraznou roli v embryogenezi, ale i při vzniku rakovinného bujení [27]. HA se vyskytuje například v očním sklivci, ECM nebo v synoviální kapalině. Průmyslově se získává z bakterií rodu *Streptococcus* fermentačním procesem, byť je ho možno získávat i z kohoutích hřebínků nebo osrdečnickové tekutiny králíků [28].

## 2.4 Syntéza hyaluronanu

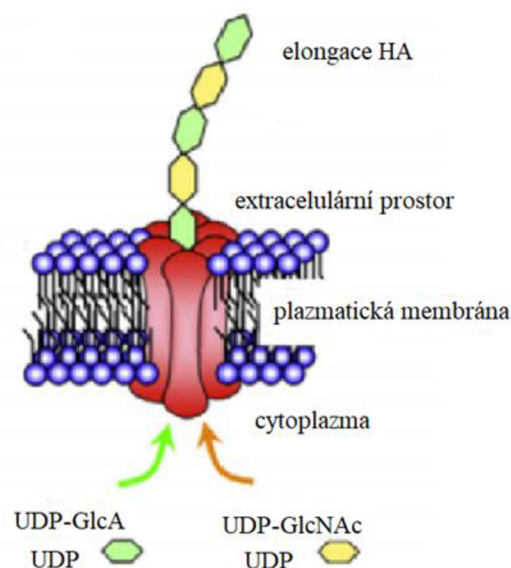
Hyaluronan je syntetizován na vnitřní straně plazmatické membrány, ve formě lineárního polymeru. Tím se odlišuje od ostatních glykosaminoglykanů, které jsou syntetizovány v Golgiho aparátu [29], [30]. Následně je vytlačen membránou do okolního prostředí, protože by jinak hrozilo zničení buňky, a to hned ze dvou důvodů. Prvním důvodem jsou nově vznikající řetězce hyaluronanu o desetitisících disacharidových jednotek, které zabírají velké množství prostoru. Druhým důvodem, proč je nezbytné nově nasyntetizovaný hyaluronan vytlačit z buněk je jeho viskozita. Ta představuje jednu z velmi důležitých a hojně využívaných vlastností hyaluronanu. Rapidní růst viskozity uvnitř buňky je opět nežádoucím faktorem pro zachování přirozeného intracelulárního prostředí [27].

### *Hyaluronansyntázy*

Syntéza hyaluronanu je zajištěna enzymy hyaluronansyntázami (HAS). Ty jsou rozděleny do tří tříd. Strukturně jsou téměř identické, přesto však poskytují rozdílný finální produkt lišící se molekulovou hmotností hyaluronanu. Délka řetězců hyaluronanu je odlišná vzhledem k jeho funkcím v různých částech organismu, proto je nezbytné produkovat hyaluronan o různých molekulových hmotnostech.

První dvě třídy HAS1 a HAS2 produkují hyaluronan o vyšších molekulových hmotnostech (nad 2 MDa). Oproti tomu třída HAS3 je schopna produkovat hyaluronan v rozmezí 100 až 1000 kDa. HAS3 je oproti prvním dvěma aktivnější, je schopen rychlejší produkce hyaluronanu [30], [31].

Během syntézy jsou střídavě zapojovány jednotky uridindifosfát-glukuronové kyseliny (UDP-GlcA) a uridindifosfát-N-acetylglukosaminové jednotky (UDP-GlcNAc) na redukující konce polymeru. Neredukující konec je orientován vně a tak dochází k vypuzování hotového hyaluronanu [30], [32].



Obrázek 2: Syntéza hyaluronanu [30]

## 2.5 Degradace hyaluronanu

Degradace hyaluronanu může být jak žádoucí, tak nežádoucí. Z hlediska organismu je nezbytné, aby docházelo k obnově buněčné hmoty, a to se výrazně projeví i na tzv. obratu hyaluronanu. V kůži a kloubech je 20 až 30 % odbouráno hned na místě, zbytek zajišťuje lymfatický systém. Většina hyaluronanu je odbourána játry (kolem 90 %), ledviny pročišťují přibližně 10 %, ale je zajímavé, že v moči z těla odchází maximálně 2 % z celkového množství hyaluronanu [33]. Rychlost zpracování a následného odbourání hyaluronanu v synoviální kapalině (stejně jako v celém těle) úzce souvisí s jeho molekulovou hmotností. Čím je delší řetězec (vyšší molekulová hmotnost), tím větší čas je třeba na jeho zpracování. V podstatě věci je třeba rozlišovat mezi degradací fyzikální a chemickou. Do fyzikální degradace patří vlivy prostředí jako UV záření, ultrazvuk nebo teplota. Chemická degradace zahrnuje působení enzymů jako jsou například hyaluronidázy.

### 2.5.1 Fyzikální faktory degradace

Mezi fyzikální faktory je možno zařadit teplotu, volné radikály nebo například ultrazvuk. Se zvyšující se teplotou klesá viskozita hyaluronanových roztoků, což je nežádoucí projev v rámci viskoelastických vlastností pro aplikaci do kloubů. Pokud klesne viskozita v kloubech, pak dochází k uvolnění, klouby ztrácí na pevnosti a hrozí nebezpečí poranění.

Ultrazvukové působení nedokáže hyaluronanový řetězec rozštěpit na monomerní jednotky, ale dokáže snížit jejich molekulovou hmotnost. S molekulovou hmotností je spojena i stabilita a mechanická odolnost matrice. Nízkomolekulární hyaluronan není schopen poskytnout dostačující viskoelastický profil, který by byl srovnatelný s vlastnostmi reálných kloubních matric [34].

Volné radikály v těle vznikající po absorpci ultrafialového záření (například ze Slunce). Existuje studie, kde účinky oxidativního stresu na hyaluronan tlumily přidavkem mannitolu. Výsledkem byl odolnější hyaluronan [35].

## 2.5.2 Chemické faktory degradace

Hlavní doménu ovlivňující degradaci hyaluronanu z chemického hlediska vyplňují enzymy. Tyto bílkovinné molekuly specificky interagují s vhodným substrátem a pomocí vytvoření enzym-substrátového komplexu degradují makromolekuly na méně organizované struktury, což je nezbytnou součástí funkčního metabolismu.

### *Transmembránové receptory CD44 a RHAMM*

Transmembránový glykoprotein CD44 je hlavním receptorem pro hyaluronan. Strukturně variabilní CD44 reguluje metabolismus hyaluronanu, aktivaci leukocytů a snižování cytokinů (důležité pro imunitní odpověď). Zajímavé je, že kromě spouštění imunitní reakce pomocí leukocytů, také figuruje v nádorovém bujení [36]. Slouží pro aktivaci imunitní reakce, zajišťuje komunikaci mezi buňkami samotnými a komunikaci buňky s matrix.

Druhý transmembránový receptorový protein RHAMM (pro mobilitu hyaluronanu) kontroluje přesun materiálu v rámci buněčné hmoty a nachází se jak uvnitř buněk, tak na membráně. RHAMM kontroluje dělení buněk. V rámci degradace hyaluronanu figurují oba receptory (CD44, RHAMM). Při kontaktu molekuly hyaluronanu s receptory dochází k tvorbě lyzozomálního váčku se štěpeným hyaluronanem [31].

### *Hyaluronidázy*

Hyaluronidázy (HYAL) jsou bílkovinné enzymy zodpovědné za štěpení polymerních řetězců hyaluronanu na kratší segmenty. Označení hyaluronidázy je nepřesné, neboť jsou tyto enzymy schopny štěpit i chondroitin, chondroitin sulfát, i když v menší míře než hyaluronan. HYAL je více typů, jsou děleny dle organismů, z nichž pocházejí.

Bakteriální HYAL je možno označit jako  $\beta$ -endo-N-acetylglukosaminidázy a mechanismem svého účinku spadají do lyáz. Jejich působení je detekovatelné spektrofotometricky. Produktem bakteriálních HYAL jsou disacharidové jednotky [37], [38].

Savčí HYAL jsou také  $\beta$ -endo-N-acetylglukosaminidázy, ale řadí se do hydroláz. Původní problém v detekci jejich aktivity byl vyřešen s ELISA testy. Savčí HYAL bylo možno detekovat pouze změnou viskozity nebo novým vznikem N-acetyl-glykosidových jednotek, všechny tyto parametry byly nespecifické. Obecně lze definovat rozdílnou účinnost těchto enzymů v závislosti na pH. HYAL obratlovců zahrnuje dvě skupiny, první obsahuje HYAL dosahují nejvyšší aktivity při neutrálním pH. Druhá skupina zahrnuje lyzozomální enzymy nejlépe pracující při pH pod 4. Hlavním produktem jsou tetrasacharidové jednotky [38].

HYAL pijavic, některých parazitů a koryšů reaktivitou připomínají HYAL obratlovců a také se řadí mezi hydrolázy. Stejně jako u savčích HYAL dochází ke vzniku tetrasacharidů [38].

### *Peroxinitrodový anion ONOO<sup>-</sup>*

Tato stabilní molekula působí na buňky nežádoucím způsobem. Jakožto oxidační činidlo směřuje buňky buď k apoptóze (buněčné smrti) nebo minimálně ztrátě funkčních vlastností. Ve článku [40] dokázali,

že přítomnost tohoto aniontu zkracuje délku hyaluronanových řetězců, což ve větším měřítku vzbuzuje imunitní reakci.

## 2.6 Modifikace hyaluronanu

Modifikace hyaluronanu představují možnost vylepšení jeho „slabších“ vlastností v závislosti na dané aplikaci. Díky přítomnosti enzymatického aparátu je tělo schopno odbourat hyaluronan bez větších problémů s rychlostí úměrnou jeho molekulové hmotnosti nebo specifickým modifikacím.

Síra hraje zásadní roli v síťování hyaluronanu. Autoři publikace [41] popisují, jak modifikovat hyaluronanový gel pomocí divinyl sulfátu, kterým hyaluronan získá na stabilitě i pevnosti a je vhodnější pro adhezi buněk v rámci tkáňového inženýrství. Thiolem modifikovaný hyaluronan vykazoval *in vitro* na buňkách myších fibroblastů pomalejší degradaci než bez modifikace, a to i za přítomnosti hyaluronidáz [42].

Použití benzylových derivátů je aktuální pro tkáňové inženýrství umělých chrupavek. Takto modifikovaný hyaluronan je hydrofobní a dá se řídit rychlost jeho degradace [43]. Stejně tak je pro tkáňové inženýrství slibná kombinace hyaluronanu s hydrazidovými deriváty. Představují dobrý potenciál pro cílené uvolňování léčiv a pro studium role hyaluronanu v buněčné signalizaci a adhezi [44].

Pozitivním přínosem může být i spojení hyaluronanu s kyselinou taninovou (TA). TA se řadí mezi třísloviny, což jsou polyfenoly běžně se vyskytující v rostlinách nebo ovoci. Jsou zodpovědné za trpkost nezralých plodů a běžně se přidávají do kávy čaje nebo vína pro obohacení chuti. Ve článku [45] zmiňují hyaluronanový hydrogel síťovaný pomocí polyethylen glykol diglycidyl etheru (PEGDE). TA je schopna fyzikálně síťovat za přítomnosti PEGDE a tvořit tak pevnou vodíkovou vazbu. To má za následek zvýšení pevnosti hydrogelu, lepší proliferaci buněk bez cytotoxického rizika. Přítomnost TA zároveň pozitivně ovlivňuje odolnost hydrogelu vůči enzymatickému působení hyaluronidáz. Dalším benefitem je antioxidační aktivita matrice, protizánětlivé vlastnosti a větší reologická stabilita.

Na degradaci ECM se podílejí dvě hlavní skupiny enzymů a to hyaluronidázy (viz kapitola 2.5 Degradace hyaluronanu) a metaloproteinázy. Tyto proteolytické enzymy, zodpovědné za proces hojení a vznik jizev, ke své aktivitě vyžadují přítomnost kovu. Štěpí kolagenová vlákna a patří mezi ně kolagenázy nebo gelatinázy [46]. Alkylové deriváty hyaluronanu jsou schopny inhibovat funkci výše zmíněných skupin enzymů a to tak, že pomocí alkylového řetězce prostorově zabrání metaloproteinázám interagovat s přítomnými ionty kovu, čímž tyto enzymy zůstanou v inaktivní formě [47].

Hyaluronan se dá také použít jako substrát pro zabudování léčiva. V případě mitomycinu C (chemoterapeutikum s antitumorickou aktivitou) slouží pro prevenci peritoneální adheze a lepšího cílení na rakovinu prsu nebo vaječníků. Při operaci dutiny břišní v místě rány dochází k okamžitému hojení tkáně, a to ne na okrajích řezu, jak je běžné na kůži, ale na celé ploše poranění (chirurgickém řezu) bezprostředně po jeho vzniku. Peritoneální srůsty jsou nežádoucí z hlediska pooperačních komplikací ve smyslu zvýšení imunitní reakce a rozvinutí zánětlivého stavu, což je nežádoucí. Dále jsou peritoneální srůsty nebezpečné pro zastavení průchodnosti tenkého střeva a fertilitu (početí) u žen [48], [49].



## 2.7 Detekce hyaluronidázové aktivity

Hyaluronidázy jsou velmi aktivní enzymy běžně se vyskytující v tělech živých organismů, kde mají za úkol zpracování hyaluronanového substrátu. Způsoby, jak detekovat míru jejich aktivity, lze rozdělit hned do několika kategorií. Metod pro stanovení hyaluronidázové aktivity je velmi mnoho, proto bych následně uvedla pouze vybrané příklady.

### 2.7.1 Chemické metody

Kolorimetrické stanovení redukujícího N-acetyl-glukosaminu Morgan-Elsonovou reakcí je vhodným postupem pro detekci terminálního N-acetyl-hexosaminu. Tyto produkty jsou výsledkem aktivity hydroláz ve vzorku s červeným p-dimethylbenzaminoaldehydem [50].

Další možností je použití ELISA testů, kde je přítomen hyaluronanový substrát s volnými karboxylovými skupinami. Ty jsou biotinizovány pomocí biotin hydrazinu. Výhodou této metody je preciznost a přesnost a relativní rychlost analýzy. Ve výsledku se aktivita projeví jako snížení absorbance oproti kontrole [51].

### 2.7.2 Fyzikálně chemické metody

Viskozitně redukční metoda vychází ze změn molekulové hmotnosti. Působením enzymu se molekulová hmotnost hyaluronanu snižuje a s tím klesá i viskozita matrice. Pro stanovení je možno použít viskozimetr. Další možností je měření molekulové hmotnosti v čase, protože je po proložení možno sledovat kinetiku degradace [52].

Turbidimetrické metody se také zaměřují na změnu viskozity roztoku. Zeslabení intenzity paprsku procházejícího vzorkem signalizuje nižší viskozitu, tedy aktivitu hyaluronidáz [53].

## 2.8 Biologické účinky hyaluronanu

Hyaluronan se vyskytuje hojně v tělech organismů a je zapojen do mnoha pochodů. Tím ovlivňuje organismus vizuálně, metabolicky, zapojuje se do imunitní odpovědi nebo se stává nezbytnou součástí chemických pochodů v organismu.

### *Kůže (stárnutí, hojení ran)*

Hyaluronan je základní a nepostradatelnou složkou extracelulární matrix. Spolu s kolagenem zodpovědným za pevnost a elastinem zajišťujícím pružnost, představuje hyaluronan hlavní hybnou sílu v kosmetickém boji proti známkám stárnutí kůže. Díky svým hygrokopickým vlastnostem je schopen dobře vázat vodu, a tudíž pleť působí svěží a mladistvá [54], [55].

Syntézou inhibitorů tkáňových metalloproteinů hyaluronan přispívá ke snížení degradace kolagenu, tedy snížení projevů stárnutí kůže, to však může mít i negativní dopad. Pokud není syntéza kolagenu přiměřeně korigována, pak dochází k jeho hromadění v ráně a vznikají nevzhledné keloidní jizvy. V místě vzniku keloidní jizvy kůže ztrácí pružnost, což je komplikací například při rozsáhlejších popáleninách [56], [57].

### ***Imunitní ukazatel***

Je všeobecně známo, že organismus je velmi citlivý na délku hyaluronanových řetězců. Pokud se v určitém místě hromadí krátké hyaluronanové sekvence, spouští to okamžitě imunitní odpověď organismu. Nízkomolekulární hyaluronan signalizuje přítomnost zánětu a ten je potřeba eliminovat. Proto jsou do oblasti výskytu nízkomolekulárního hyaluronanu vyslány buňky imunitního systému pro eliminaci nežádoucích vlivů. To lze použít v léčebném procesu u diabetiků. Vlivem nízkého prokrvení periférií u nich vzniká fenomén obecně známý jako „diabetická noha“. Dochází k odumírání nervového systému a cévního zásobení na periférii způsobeného nadměrnou koncentrací glukózy v krvi. To způsobuje infekci. Nedostatečně včasné podchycení začátku onemocnění ve většině případů končí amputací končetiny, aby bylo zabráněno celkové systémovou zánětlivé reakci organismu neboli sepsi. Pokud je takovému pacientovi do postižené periférie vpíchnuta injekce nízkomolekulárního hyaluronanu, pak dojde k zvýšení prokrvené této oblasti, s vyšším průtokem krve jsou transportovány imunitní látky a ty zahajují samo hojící proces organismu. Tímto způsobem je možno předcházet amputacím a s nimi spojenou sníženou kvalitou života pacientů [58], [59].

### ***Konjugáty hyaluronanu a léčiv***

Hyaluronan je výborným nástrojem v boji proti nádorovému bujení. Je ho možno spojit s léčivem a cíleně ho dopravit do místa nádoru. Rakovinné buňky mají vlastnost nadměru zpracovávat extracelulární hyaluronan. Využitím této znalosti je možno dopravit léčivo navázané na hyaluronan až do nádorové buňky, jejíž intracelulární aparát našťípe hyaluronanové řetězce, ale zároveň se do buňky dostane i léčivo, a tím ji deaktivuje. Takto je možno zefektivnit léčbu onemocnění a eliminovat plošné škody, které by vznikly například při celkovém ozařování [60], [61].

### ***Chondroprotektiva***

Buňky chrupavčité tkáně (chondrocyty) kultivované v přítomnosti hyaluronanu jsou schopny vyšší produkce extracelulární hmoty a vykazují vyšší proliferaci DNA. Hyaluronan je schopen regulovat nervový vjem a tím snižovat intenzitu bolesti [62], [63].

## **2.9 Viskosuplementy dostupné na trhu**

Na trhu existuje široká škála přípravků (některých i volně dostupných bez lékařského předpisu), které obsahují hyaluronan a mají mít pozitivní účinek na regeneraci kloubů nebo zamezovat bolestivému stavu spojenému s kloubními onemocněními. V článku [64] jich je hned několik uvedených, hlavním rozdílem je molekulová hmotnost hyaluronanu, způsob a četnost aplikace přípravků. Například přípravek Hyalgan® obsahuje hyaluronan o molekulové hmotnosti 500 až 730 kDa a aplikuje se 1x týdně po dobu 5 týdnů. Oproti tomu přípravek Euflexxa® obsahuje hyaluronan o molekulové hmotnosti 2400 až 3600 kDa a aplikace je vyžadována 1x týdně, 3 týdny celkem v rámci jedné kúry. Orthovisc® o molekulové hmotnosti 1000 až 3000 kDa odpovídá molekulové hmotnosti hyaluronanu používaného v rámci mojí BP, na kterou touto prací navazuji. Výhodou toho přípravku je, že je registrován jako doplněk stravy, tudíž je volně prodejny a nebude komplikované ho pořídit jako srovnávací materiál pro artificiální vzorky. Tento přípravek dle výrobce obsahuje 15 mg/ml hyaluronanu sodného a měl by se aplikovat 1x týdně po dobu maximálně 4 týdnů, po půl roce je třeba léčbu zopakovat [27].

### 3 STAV SOUČASNÉ ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Hyaluronan má v těle širokou škálu funkcí a je také aktuálním předmětem zájmu pro tkáňové inženýrství stejně tak pro systémy na cílenou distribuci léčiva. Hyaluronan je organismy rychle odbouráván, a to je v případě medicínských aplikací převážně nežádoucí, proto je vhodné ho modifikovat. Dostupná literatura předkládá hned několik možností modifikací.

Jednou z variant použitelných pro medicínské aplikace je síťování hyaluronanu s polyethylen glykolem (PEG). Tato polymerní síť dokáže tvořit 3D struktury, a proto nachází uplatnění jako vhodný materiál pro různé náhrady tkání. V tomto článku [65] dokázali, že specifický postup přípravy scaffoldu poskytuje vhodné prostředí pro osídlení buňkami, a proto má potenciál v tkáňovém inženýrství.

Pro aplikaci do kloubů, jako náhrada synoviální kapaliny, více vyhovuje modifikace pomocí aminokyselin. Výhodnost této strategie spočívá zejména v tom, že se aminokyseliny přirozeně vyskytují v těle, tudíž po jejich aplikaci nepředpokládáme nežádoucí imunitní reakce a po metabolickém zpracování mohou být aminokyseliny organismem zcela využity. V článku [66] byly hyaluronanu modifikovány volné karboxylové skupiny navázáním aminoskupin, což ve výsledku zvyšuje odolnost modifikovaného hyaluronanu proti působení hyaluronidáz. Působení enzymů je hlavním problémem při injekční aplikaci hyaluronanu do těla. Modifikovaný hyaluronan byl srovnáván s jeho nativním ekvivalentem. Hyaluronan byl izolován po bakteriální fermentaci (*Streptococcus equi*). Sodná sůl hyaluronanu byla pro lepší zpracovatelnost převedena na tetrabutylamonium a následně byla pod argonem po dobu 6 hodin a ve vodní lázni připravena pro následnou lyofilizaci a další úpravy. Systém byl charakterizován velikostně-vylučovací chromatografií, spektrofotometricky, reologicky a pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR). V závěru bylo zjištěno, že díky přítomnosti organického rozpouštědla došlo k četnému roubování. Kombinace hyaluronanu s tyrozinem se z hlediska bobtnání nejvíce blížila nativnímu stavu. Výborných výsledků z hlediska odolnosti vůči enzymatické degradaci vykazoval hyaluronan v kombinaci s kyselinou asparagovou, valinem, fenylalaninem, threoninem a serinem. Zajímavé je, že viskozita finální matrice nemá vliv na enzymatickou degradaci.

Další možností modifikace hyaluronanu je úprava řetězců pomocí alaninu [67]. V tomto článku byl použit hyaluronan (ve formě sodné soli) v kombinaci s l-alanin ethylesterem a N-hydroxysukcinimidem (NHS) a 1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)-propyl]-karboimidem (EDC), během výrobního procesu je třeba neustále kontrolovat hodnotu pH (obecně můžeme říct, že je třeba pohybovat okolo hodnoty 7,5). Poté je směs třeba purifikovat pomocí dialýzy, aby byly odstraněny nízkomolekulární složky, které jsou v tomto případě nežádoucí. Prvně je třeba dialyzovat 24 proti vodě, následně 2 hodiny proti 0,05M NaOH, poté 40 hodin proti 0,1M NaCl. Následuje 72hodinová dialýza proti vodě a finální lyofilizace. Výtěžek byl v článku určen na 86 až 88 %.

Úspěšnost modifikace hyaluronanu je třeba potvrdit jednak pomocí vhodných instrumentálních technik a dále také prostřednictvím sledování kinetiky degradace pomocí aplikace enzymu hyaluronidázy. Pomocí UV-VIS je třeba sledovat kinetiku enzymatické reakce a srovnat, základartificiální matrice bez modifikace a modifikovanou synovii pomocí aminokyseliny.

Princip stanovení aktivity hyaluronidáz pomocí UV-VIS je následující. Barvivo označované Stains-all reaguje s HA za vzniku komplexu. Samotné barvivo má dvě absorpční maxima v 532 a 571 nm.

Přídavkem HA vzniká nový pík v oblasti 650 nm. Měření sleduje pokles intenzity v oblasti 650 nm po aplikaci enzymu [68].

Barvivo Stains-all je schopna zaznamenávat nejen degradaci hyaluronanu, ale i změny na chondroitin sulfátu, což je substrát, který jsou hyaluronidázy taky schopné štěpit. Konkrétně se jedná o savčí hyaluronidázu HYAL 4, která je jedna z pěti základních hyaluronidáz savčího typu [69].

Autoři publikace [70] studovali hyaluronidázovou aktivitu při subkutánní aplikaci streptokoků u myši. V různých fázích růstu byly odebírány vzorky, ty byly centrifugovány a promyty dvakrát deionizovanou vodou. Pelety byly rozsuspendovány ve vodě s trichlormethanem a vortexovány po dobu 2 hodin. Pak bylo použito 0,1 ml substrátu s 0,7 ml barviva Stains-All. Absorbance byla staticky snímána při 640 nm.

Po zdařilé modifikaci HA je žádoucí do směsi přidat CS. Ten má schopnost zabudovávat se přímo v místě aplikace (oproti HA), tudíž by v kloubu mohl ihned nastartovat proces hojení a výživy poškozené chrupavky [70]. Pokud je, dle literatury, do matrice přidán chondroitin současně s hyaluronanem v jednom kroku, pak dochází ke zvýšení tvorby vodíkových můstků, což vede ke zlepšení pevnosti celé matrice oproti situaci, kdy by byl přidán hyaluronan a chondroitin postupně [71]. Dle článku [72] je CS schopen stimulovat synoviocyty pro tvorbu hyaluronanu. Principem je stimulace hyaluronansyntáz. Synoviocyty lze rozdělit na dvě skupiny. Typ A má fagocytující funkci, což znamená, že slouží k likvidaci nežádoucích látek v kloubu. Typ B představuje specializované mezenchymální buňky produkující proteoglykany nebo imunitně významné cytokiny [73]. CS je klíčový pro léčbu osteoartritidy. V průmyslovém měřítku je CS získáván z hovězích, kuřecích nebo rybích chrupavek. Surový CS má velikost mezi 50 až 100 kDa. Po extrakčním průmyslovém zpracování dochází ke snížení molekulové hmotnosti mezi hodnoty 10 a 40 kDa [74]. Literatura se velmi liší v množství intraartikulárně aplikovaného chondroitinu. Některé přípravky na trhu se snaží cílit na kvantitu, obsahují méně bohatou směs hyaluronanu a chondroitinu v množství desítek mg/ml [75]. Tato práce cílí na komplexní náhradu synoviální kapaliny s pozitivním vlivem na kloubní části, proto je množství chondroitinu ve směsi směřováno k hodnotě odpovídající množství v reálné synovii. Zde chondroitin tvoří jen velmi malou část směsi (20 µg/ml) [76], [77]. CS je možno získat z několika různých zdrojů jako jsou žraločí a hovězí chrupavka nebo hovězí průdušnice. Z dostupných zdrojů se jako nejvhodnější jeví CS z hovězí trachey, neboť se právě tento používá i v klinických studiích, a tudíž nejlépe odpovídá realu [76].

I když je nazýván sulfátem, molekula strukturně odpovídá sodné soli chondroitinu, sulfát je zde kovalentně navázán na molekulu, a to iontovou vazbou mezi sulfátem a sodnými ionty [78]. V článku [79] se zmiňují o podání warfarinu spolu s CS intravenózně. To má za následek navýšení antikoagulační účinku warfarinu. To ovšem nebylo možno dokázat při orálním podání CS.

## 4 CÍLE PRÁCE

- Zaměřit se na rešerši metod využitelných pro cílenou modifikaci hyaluronanu sodného pro účely zvýšení jeho stability vůči enzymatické degradaci.
- Na základě literární rešerše zvolit optimální metodiku cílené modifikace struktury hyaluronanu sodného.
- Optimalizovat přípravu umělé synoviální kapaliny se zvýšenou stabilitou vůči enzymatické degradaci při současném zachování mechanických vlastností a stability připraveného vzorku v porovnání se synoviální kapalinou připravenou z nemodifikovaného hyaluronanu.
- Prostudovat stabilitu připravených synoviálních kapalin a porovnat jejich charakteristiky s reálnou synoviální kapalinou.
- Zhodnotit získaná experimentální data a formulovat závěry s ohledem na možné praktické využití.

## 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 Použité chemikálie a přístroje

#### 5.1.1 Použité chemikálie

- $\gamma$ -globulin (Sigma Aldrich, 97 %, CAS: 900-83-4)
- albumin (Sigma Aldrich, >96 %, CAS: 9048-46-8)
- dipalmitoyl fosfatidylcholin (Sigma Aldrich, > 99 %, CAS: 63-89-8)
- kyselina hyaluronová (1200 kDa, Contipro a.s., CAS: 9067-32-7)
- chlorid sodný (Lach Ner, 99,5 %, CAS: 7647-14-5)
- chlorid draselný (Lach Ner, 99,5 %, CAS: 231-211-8)
- hydrogenfosforečnan sodný dihydrát (Penta Chrudim, 99 %, CAS: 10028-24-7)
- dihydrogenfosforečnan draselný (Penta Chrudim, 99 %, CAS: 7778-77-0)
- ultra čistá voda (Elga)
- azid sodný (Sigma Aldrich, >99,5 %, CAS: 26628-22-8)
- l-alanin ethyl ester (Sigma Aldrich, 99 %, CAS: 1115-59-5)
- N-hydroxysukcinimid (Sigma Aldrich, 98 %, CAS: 6066-82-6)
- 1-ethyl-3,3 dimethylaminopropyl-karboimid (Sigma Aldrich, 98 %, CAS: 25952-53-8)
- barvivo Stains-all (Sigma Aldrich, 95 %, CAS: 7423-31-6)
- hyaluronidáza (Sigma Aldrich, 400-1000 U/mg, CAS: 37326-33-3)
- chondroitin sulfid (Sigma Aldrich, CAS: 9082-07-9)
- polystyrenové nanočástice PS 100nm (Sigma Aldrich, CAS: 9003-53-6)

#### 5.1.2 Použité přístroje

- ultrazvuková čistička (Bandelin)
- pH metr (Greisinger)
- výrobek na ultračistou deionizovanou vodu (Elga)
- Zetasizer Nano ZS (Malvern Pananalytical)
- magnetická míchačka (Thermo Scientific)
- termogravimetrický analyzátor-TGA Q5000 (TA Instruments)
- FTIR spektrometr-Nicolet iS50 (Thermo Fisher Scientific)
- lyofilizátor VirTis – BenchTop™ “K” Series
- konduktometr (Mettler Toledo Seven Easy)
- rotační odparka (Laborota 4000) Heidolph
- chladič těleso Huber TC40E
- UV-VIS spektrofotometr U-3900/3900H Hitachi High-Technologies Global
- Asymetrická frakcionace tokem pole (AF4) s víceúhlovým rozptylem světla (MALS) a diferenčním refraktometrem (dRI) (sestava v kombinaci od Agilent Technologies a Wyatt Technology)

### 5.2 Příprava modifikované synoviální kapaliny

Základní příprava umělé synoviální kapaliny bez modifikace a přídavku chondroitin sulfátu je popsána v patentu US 8716204. V rámci této práce byl hyaluronan před použitím v synovii modifikován. Modifikace spočívá v úpravě řetězců HA tvořícího strukturní základ synovie. HA byl

upravován pomocí aminokyseliny alaninu. Pro srovnání byl připraven i vzorek obohacený o chondroitin sulfát důležitý pro regeneraci poškozených kloubů.

Tabulka 1: Přehled vzorků synovií dle jejich úpravy/obohacení

vzorek	derivatizace hyaluronanu	přídavek chondroitin sulfátu
synovie A	Ne	Ne
synovie B	Ano	Ne
synovie C	Ano	Ano
Orthovisc®	Ne	Ne
Reálná koňská synovie	Ne	Ne

### 5.2.1 Vzorek reálné koňské synovie

V rámci předešlé bakalářské práce (na kterou tato diplomová práce navazuje) byl získán vzorek reálné koňské synovie díky Veterinární a farmaceutické univerzitě Brno (VFU). Klinika chorob koní odebrala vzorek synovie z hlezna do sterilní injekční stříkačky a tato synovie byla do několika hodin po odběru proměřena, aby bylo zabráněno neobjektivnímu zkreslení výsledku vlivem vlastní degradace reálné matrice. Výstup tohoto měření byl použit i v rámci diplomové práce, a to pro porovnání úspěšnosti modifikace hyaluronanu v artifiční synoviální kapalině.

### 5.2.2 Příprava modifikovaného hyaluronanu sodného (pro vzorek synovie B a C)

Modifikace neboli úprava hyaluronanových řetězců cílí na zlepšení vlastností polysacharidu ve vztahu k viskoelastickým parametrům kompletní synovie, kde je hlavním kritériem hodnocení mimo jiné i stabilita v čase. Tento variabilní proces, kde je možno vybírat z velké škály funkčních reakčních komponent, se zaměřil na modifikaci hyaluronanu pomocí aminokyseliny alaninu.

#### *Před dialyzační úpravy*

Sodná sůl hyaluronanu o hmotnosti 2344 mg byla rozpuštěna v 773 ml deionizované ultračisté vody. Po hodinovém míchání na magnetické míchačce bylo přidáno 4150 mg l-alanin ethyl esteru (AlaOEt-HCl). Následovala pH kontrola a pomocí 0,1 M NaOH byla hodnota pH upravena na 7,5.

Poté byl připraven čerstvý roztok tvořený 2699,95 mg N-hydroxysukcinimidu (NHS) s 4494 mg 1-ethyl-3,3 dimethylaminopropyl-karboimidem (EDC) a to celé bylo rozpuštěno v 10 ml deionizované ultračisté vody. Opět proběhla kontrola pH, kdy bylo třeba upravit hodnotu pomocí 0,1 M NaOH na 7,5. Celá směs byla následně ponechána přes noc na magnetické míchačce (300 rpm).

#### *Dialýza*

Směs byla kvantitativně převedena do dialyzační celulózy membrány (průměr 22 mm). V první fázi byla směs dialyzována 24 hodin proti destilované vodě. Následovala dialýza proti 0,05 M NaOH po dobu 2 hodin. Pak byl roztok vyměněn za 0,1 M NaCl a ponechán dialyzovat 40 hodin. Posledním krokem byla dialýza proti vodě po dobu 72 hodin.

### ***Příprava pro lyofilizaci***

Směs byla kvantitativně převedena z dialyzační membrány do lyofilizační nádoby, která byla upevněna na rotační odparku. Ta sloužila pouze pro upevnění vzorku a jeho soustavné otáčení v ethanolové lázni za přítomnosti chladícího tělesa. Došlo ke zmražení vzorku do tenké vrstvy po obvodu nádoby, takto připravený vzorek byl uložen do mrazáku a následně lyofilizován. Po lyofilizaci bylo získáno 2,1452 g, výtěžek odpovídal 92 hm. %.

### **5.2.3 Příprava umělé kapaliny inspirovaná patentem US 8716204 (pro vzorek A)**

Prvním krokem je příprava fosfátového pufru. Na 50 ml roztoku byly použity následující chemikálie  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2 mM),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (10 mM), NaCl (137 mM), KCl (2,7 mM). Vše bylo smícháno s ultračistou deionizovanou vodou a promícháno na magnetické míchačce. Dále byly přidány fosfolipidy (dipalmytoil fosfatidylcholin) o koncentraci 0,1 mg/ml. Vzorek musí být pro další kroky bez zákalu a drobných částic. Toho je možno docílit umístěním vzorku do temperovatelné ultrazvukové lázně s nastavením teploty na 50 °C po dobu aspoň 30 minut. Následně je třeba zkontrolovat pH a případně ho upravit 0,1 M NaOH na hodnotu 7,4.

Takto připravený základ synovie byl doplněn 2 mg/ml kyselinou hyaluronovou o průměrné molekulové hmotnosti 1200 kDa 12 mg/ml albuminem a 7 mg/ml  $\gamma$ -globulinem. Mezi jednotlivými přísadami je třeba směs precizně promíchat do úplného propojení jednotlivých složek (vizuální kontrola). Finálně je třeba upravit pH stejným způsobem, jak bylo výše zmíněno, tentokrát na hodnotu 7,1.

Identický postup byl použit pro přípravu vzorku B jen s rozdílným použitím hyaluronanu. Pro vzorek B byl čistý hyaluronan nahrazen modifikovaným hyaluronanem připravovaným v předešlých kapitolách v navázce odpovídající nemodifikovanému hyaluronanu.

### **5.2.4 Příprava synoviální kapaliny s přísadou chondroitin sulfátu**

Umělá synoviální kapalina připravená v předchozím bodu byla ve fázi přísady modifikované kyseliny hyaluronové obohacena 20  $\mu\text{g/ml}$  chondroitin sulfátem. Tak byl vytvořen vzorek C.

## **5.3 Podmínky měření v rámci použitých metod**

Pro určení efektivity modifikace hyaluronanu a přísady chondroitin sulfátu byly použity metody termogravimetrické analýzy (TGA), víceúhlového rozptylu světla spojeného s asymetrickou frakcionací tokem pole (AF4-MALS) pro určení molekulové hmotnosti, reologie, dynamického rozptylu světla (DLS mikrorologie), infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR), UV-VIS spektrometrie.

### **5.3.1 TGA**

Metoda termogravimetrie byla v rámci diplomové práce využita ve dvou rozdílných nastaveních. V prvním případě byly získány klasické termogravimetrické záznamy, které sloužily pro určení vlhkosti analyzovaných vzorků hyaluronanu (modifikovaný i nemodifikovaný), obsahu organické hmoty a tzv. popela (nespalitelný anorganický podíl). Při stoupající teplotě byl sledován hmotnostní úbytek vzorku. Derivace této funkce pak ukazuje stav, kdy se vypařila nevázaná voda vzorku (vlhkost) a začalo docházet ke spalování organických složek. Konkrétní teplotní rozmezí bylo 20 až 200 °C, navážka byla



přibližně 1 mg vzorku. Měření probíhalo v případě určování vlhkosti vzorků v dusíkové inertní atmosféře za použití teplotní rampy 5 °C za minutu, v případě určování obsahu organické hmoty a popela v atmosféře tvořené atmosférickým vzduchem za použití teplotní rampy 10 °C za minutu.

V druhém tzv. izotermickém uspořádání experimentu bylo přibližně 50 mg vzorku skokově ohřáto na 70 °C. Tato teplota byla 30 minut konstantní, poté došlo k navýšení teploty na 200 °C. Úbytek hmotnosti vzorku byl zaznamenáván v závislosti na čase. Zvýšení na 200 °C bylo nezbytné pro stanovení množství popela.

### 5.3.2 FTIR

Principem této metody je sledování změn vibračně rotačních stavů molekul indukovaných aplikací infračerveného záření na vzorek. Tato nedestruktivní metoda definuje závislost absorbance nebo transmitance na převrácené hodnotě vlnové délky (vlnočtu). Výhodou této metody je detailní výstup dat obsahující podrobné informace o složení vzorku a možnost porovnání modifikovaného a nemodifikovaného hyaluronanu

Vzorky hyaluronanu a modifikovaného hyaluronanu byly charakterizovány na FTIR spektrometru Nicolet iS50 pomocí jednodrázového ATR krystalu (diamant). Rozetřené vzorky byly nanášeny přímo na ATR krystal a přichyceny držákem. Spektra byla zaznamenána v rozsahu vlnočtů 4000–500 cm<sup>-1</sup> pomocí softwaru Omnic (1 měření představovalo průměr z 64 skenů při rozlišení 4 cm<sup>-1</sup>).

Analýza synoviálních kapalin byla provedena na jednodrázovém ATR krystalu (diamant). Kapka (5 µl) vzorku byla použita pro časově rozlišené měření. Toto nepatrné množství stačí pro zaznamenání spekter v softwaru Omnic Series (1x za 10 sekund měření spektra, tvorba průměru z 8 dílčích měření s rozlišením 1 cm<sup>-1</sup>). Měření probíhalo po dobu 1 hodiny. Hodnoty se pohybovaly v rozpětí nejčastěji používané střední infračervené oblasti (4000 až 500 cm<sup>-1</sup>). Oblast od 4000 cm<sup>-1</sup> do přibližně 1500 cm<sup>-1</sup> je vhodná pro popis funkčních skupin vzorku. Hodnoty odpovídající rozpětí 1500 cm<sup>-1</sup> až 500 cm<sup>-1</sup> se nazývají oblast otisku prstu a je zde možno nalézt charakteristické pásy identifikující specifické molekuly typické pro jednotlivé vzorky.

### 5.3.3 MALS

Tato metoda detekuje molekulovou hmotnost pomocí víceúhlového rozptylu světla. Jedná se o absolutní metodu určení molekulové hmotnosti bez nutnosti použití standardů. Částice vzorku jsou snímány z různých úhlů. Měření je následně extrapolováno na nulový úhel a pomocí přepočtu je možno získat gyrační poloměr (druhá odmocnina hmotnostního průměru). Detekce MALS se často propojuje s metodami umožňujícími předseparaci vzorku dle velikosti částic. Využívá se nejčastěji metod vylučování chromatografie (SEC) nebo frakcionace tokem v poli (AF4). Po hodinovém rozmíchání hyaluronanových vzorků o koncentraci 1 g/l byl použit stříkačkový filtr (velikost pórů byla 0,45 µm) [80], [81].

#### ***AF4-MALS***

*Asymetric flow field flow fractionation* pracuje na principu frakcionace vzorku unášeného proudem kapaliny aplikací vnějšího silového pole kolmo na protékající kapalinu se vzorkem. Nejprve jsou eluovány nejmenší částice. Výhodou této metody je široký rozptyl detekovatelných velikostí (od

nanometrů po mikrometry), vhodné pro komplexní vzorky (matrice), vysoké rozlišení. Asymetrická *field flow fractionation* se od klasické *field flow fractionation* liší nahrazením spodní části analyzátoru, kterou netvoří kompaktní stěna, ale semipermeabilní membrána, která se specifickou *cut off* hodnotou propustí menší částice pryč, a naopak zadrží částice větší, než je velikost pórů [82].

Metoda AF4-MALS byla v rámci diplomové práce využita pro ověření molekulové hmotnosti hyaluronanu (modifikovaného i nemodifikovaného) a pro sledování změn v agregaci a distribuci hmoty ve vzorcích synoviálních kapalin. Analýza probíhala na systému kombinující AF4 frakcionaci tokem pole s víceúhlovým rozptylem světla a diferenčním refraktometrem. Objem nástřiku vzorku do systému byl 100  $\mu$ l, rychlost průtoku mobilní fáze byla 4 ml/min (1 ml/min průtok do detektorů, 3 ml/min použito jako tangenciální tok mobilní fáze na separačním kanálu).

### 5.3.4 Makroreologie

Klasická reologie na přístroji Anton Paar byla použita k charakterizaci vzorků z makroskopického měřítka. Bylo sledováno chování jednotlivých vzorků A, B, C při namáhání. Reologické měření lze vyhodnocovat dvěma způsoby. První možností jsou tokové testy popisující závislost smykového napětí a smykové rychlosti. Dalším možným výstupem tokových testů jsou viskozitní křivky znázorňující závislost dynamické viskozity na smykové rychlosti [83], [84]. Druhou možností nastavení měření představují oscilační testy, které lze rozdělit na frekvenční a amplitudové. V rámci frekvenčních testů dochází k zaznamenávání viskoelastických modulů na základě rostoucí frekvence oscilace senzoru. V amplitudových testech je naopak frekvence oscilací konstantní a narůstá amplituda deformace vzorku. Nastavení jednotlivých testů je přesně popsáno v Tabulka 2: Parametry nastavení měření reologie.

Tabulka 2: Parametry nastavení měření reologie

Test	amplitudový	frekvenční	tokové	
Teplota	25 °C, 37 °C	25 °C, 37 °C	37 °C	
Senzor	8 mm flate plate	8 mm flate plate	double wall concentric cylinders	
Uspořádání	deska–deska	deska–deska	válec–válec	
měřicí štěrba	500 $\mu$ m	500 $\mu$ m	2000 $\mu$ m	
Temperace	2 minuty na teplotu měření	2 minuty na teplotu měření	2 minuty na teplotu měření	
frekvence oscilací	1 Hz	0,1–100 Hz	smyková rychlost	1–100 s <sup>-1</sup>
rozsah amplitud deformace	0,01–10 %	0,50 %		
počet bodů na dekádu	6	6	17	
počet opakování	3	3	2	

Synoviální kapaliny spadají do kategorie Neneutonovských pseudoplastických kapalin. První přívlastek získaly díky nelineární odezvě při silovém působení, druhý přívlastek popisuje snižování viskozity s rostoucí silou. Obecně lze u těchto materiálů předpokládat, že s narůstající působící silou dochází ke snižování viskozity materiálu. Pokud by tato odezva byla lineární, pak látka spadá do kategorie Newtonovských kapalinách. Komplexní modul popisuje celkovou odolnost materiálu vůči namáhání a je dán oscilační funkcí. Ta zahrnuje reálnou část (dynamická viskozita) a imaginární část (ztrátový modul). Ztrátový modul je popsán Youngovým elastickým modulem a úhlovou rychlostí [85].

Makroreologická měření byla provedena pro hodnoty do 100 Hz u frekvenčních testů, amplitudové testy měly maximální amplitudu deformace v 10 % . Amplituda deformace popisuje procentuální změnu výchylky ku původní výšce vzorku. Je nutné nadefinovat rozmezí silového působení na vzorky, aby laboratorní měření mohla být srovnatelná s reálným namáháním vzorků v kloubech.

Meehan a kolektiv ve článku [86] popisuje změny synoviální kapaliny po aplikaci vnějšího tlaku na kolenní kloub. Měření probíhalo pomocí přístroje připomínajícího manžetu na měření krevního tlaku, která se umístila na mírně pokrčené koleno. Postupně docházelo ke kompresi a dekompresi kloubu pomocí manžetového vaku a pomocí ultrazvuku byl skenován stav synoviální kapaliny uvnitř kloubu. Naměřené hodnoty byly zpracovány pomocí programu MatLab. Toto měření ukazovalo změny „výšky sloupce synovie v kloubu“ maximálně do 50 %, což odpovídá amplitudě deformace.

Při odběru reálných vzorků není možno získat objem větší než 10 ml. Ten je třeba rozdělit mezi všechny zařízení pro stanovení požadované charakteristiky matrice, proto byla pro měření použita geometrie vhodnější pro tužší vzorky. Zde se nároky na spotřebu vzorku pohybují do 1 ml. To ovšem limitovalo měření jako takové, docházelo k zanášení chyby při měření elastického modulu, a proto bylo nutno snížit použitelný rozsah amplitudy deformace do 10 %, což stále odpovídá reálným změnám v kloubu.

Frekvenční testy byly naměřeny pro frekvence do 100 Hz. Frekvence pohybu kolene si lze představit jako množství ohnutí za jednotku času. Proto je pochopitelné, že vyšších frekvencí není v reálném systému možno dosáhnout. Stejně frekvenční rozmezí uvádí i práce Thurston, G. B., & Greiling, H. [87] nebo práce Wang Junbo a kolektiv [88].

### 5.3.5 DLS Mikroreologie

Dynamický rozptyl světla využívá detekci Brownova pohybu molekul v analyzovaném vzorku. V rámci mikroreologického měřicího modulu jsou do vzorku umístěny předem definované částice (polystyrenové částice o nominální velikosti 100 nm). Do kyvety s přibližně 1 ml vzorku synoviální kapaliny bylo nadávkováno 5  $\mu$ l polystyrenových nanočástic. Pomocí laserového paprsku procházejícího průsvitným vzorkem je zaznamenávána změna intenzity záření na detektoru. Tato data jsou pomocí přepočtu převedena na viskoelastickou charakteristiku prostředí obklopujícího definované polystyrenové částice. Na přístroji Zetasizer Nano ZS byly stanoveny viskoelastické moduly ( $G'$ ,  $G''$ ) a komplexní viskozita ( $\eta^*$ ) v závislosti na frekvenci oscilace paprsku (částic). Měření byla opakována celkem 3x, celkem 15 měřených hodnot po 10 sekundách. Pro přiblížení se fyziologické teploty bylo měření krom laboratorní teploty (25 °C) prováděno i při 37 °C. Stejně tak jako v makroreologickém měření byla v mikroreologickém vyhodnocení stanovena hodnota 100 Hz jako maximální [89].

### 5.3.6 UV-VIS spektrometrie

Tato metoda byla použita pro určení hyaluronidázové aktivity a jejího vlivu na komplexní matrice vzorků A, B a C. Tato analytická metoda využívá Lambert–Beerova zákona a za pomoci změn intenzity laserového paprsku procházejícího vzorek je schopna vypočítat koncentraci sledované látky (za předpokladu přítomnosti standardu pro určení absolutního množství).

Pro měření byly do měřicí kyvety nadávkovány 2 ml fosfátového pufru, 1 ml vzorku synovie (A, B, C), 25  $\mu$ l roztoku hyaluronidázy a 20  $\mu$ l barviva Stain-all. Roztok hyaluronidázy byl připraven smícháním 2 ml fosfátového pufru s 200 mg lyofilizovaného enzymu. Měření probíhalo 150 minut s krokem 15 minut, snímáno bylo celé spektrum [90], [91].

Enzymy degradující synoviální kapaliny primárně cílí na základní strukturu matrice, kterou v tomto případě představuje již zmíněný hyaluronan. Ten je degradován pomocí enzymu hyaluronidázy. Byť byl čistý roztok hyaluronanu s vodou použit jako model pro nastavení vhodného časového průběhu měření, tak zde není uveden, protože pro tuto práci samostatně bez dalších složek synovie nemá vypovídací hodnotu. Enzym je schopen cílit krom hyaluronanu i na chondroitin sulfát a další složky synovie, jejichž kombinací vzniká stabilnější matrice, než kdyby reagovaly samostatně. Roztok hyaluronanu byl použit pro určení hlavního sledovaného píku a ověření informací z literatury, že pík 650 nm odpovídá hyaluronanu [68].

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato diplomová práce cílí na zlepšení vlastností umělého synoviálního kapalinu, jejíž příprava byla inspirována patentem US 8716204. Hlavní strukturální jednotkou synoviálního kapalinu tvoří sodná sůl kyseliny hyaluronové, která byla v této práci modifikována a byly sledovány strukturálně funkční změny chování matrice primárně z reologického pohledu. Všechny dříve popsané vzorky (nemodifikovaná synovie, synovie s modifikovaným hyaluronanem a přísadkou chondroitin sulfátu) byly opakovaně proměřovány v širokém časovém intervalu (5 měsíců), aby mohly být podrobně pozorovány změny viskoelastických vlastností matrice.

### 6.1 Základní materiálová charakterizace

V úvodní části práce bylo nutné ověřit experimentálně, že provedená modifikace hyaluronanu sodného byla úspěšná. Pro tyto účely byly využity metody infračervené spektrometrie, termogravimetrie a AF4-MALS. Na základě těchto metod byly sledovány u použitého vzorku hyaluronanu a jeho připraveného modifikovaného ekvivalentu pomocí infračervené spektrometrie základní strukturální prvky obou vzorků, pomocí termogravimetrie změny v termické stabilitě obou vzorků a následně bylo rovněž ověřeno pomocí AF4-MALS, že modifikací nedošlo k zásadnímu poklesu molekulové hmotnosti modifikovaného hyaluronanu, což by mohlo naznačovat jeho destrukci (hydrolyzu) během provedené modifikace jeho struktury. Definice výchozího stavu byla nezbytná pro porovnání s dalšími úpravami jednotlivých látek.

#### 6.1.1 Charakterizace hyaluronanu pomocí AF4-MALS

Jak již bylo zmíněno výše, metoda AF4-MALS byla využita stěžejní metoda pro určení molekulové hmotnosti, polydisperzity a gyračního poloměru hyaluronanu a jeho modifikovaného ekvivalentu. Oba vzorky představovaly vstupní materiály pro výrobu umělých synovií.

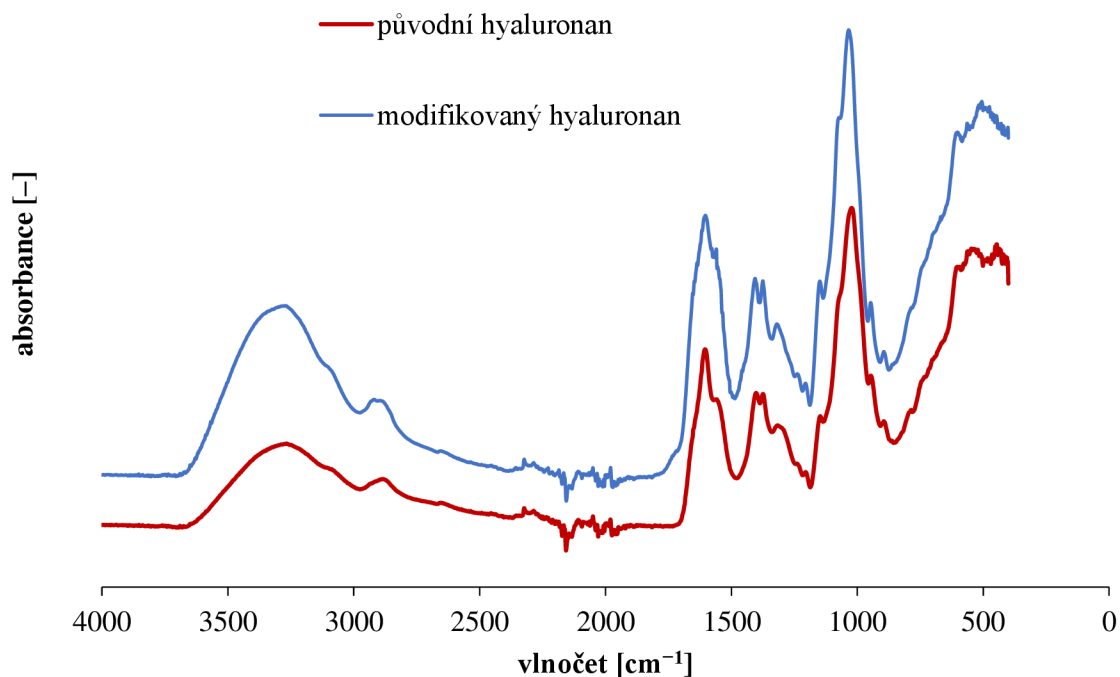
Tabulka 3: Vlastnosti hyaluronanu určené pomocí AF4-MALS

typ hyaluronanu	molekulová hmotnost [kDa]	PDI[-]	rw [nm]
nemodifikovaný	(1193,0 ±39,1)	(1,284 ±0,073)	(142,2 ±0,3)
modifikovaný	(1261,8 ±34,9)	(2,328±0,194)	(86,7 ±3,1)

Z Tabulky 3: Vlastnosti hyaluronanu vyplývá, že se molekulová hmotnost hyaluronanu po modifikaci příliš nezměnila. Derivatizací hyaluronanu dochází k zavedení poměrně malé molekuly alaninu do výrazně větší molekuly hyaluronanu, což dle očekávání způsobilo pouze drobný nárůst molekulové hmotnosti derivatizovaného hyaluronanu. Oproti tomu došlo ke změně polydisperzity (PDI) a gyračního poloměru (rw). Výsledky této analýzy potvrzují, že nedošlo k výraznějšímu rozštěpení hyaluronanu sodného, což je pozitivní zpráva, vzhledem k jeho využití v následujících částech práce. Naměřené změny v polydisperzitě a gyračním poloměru naopak naznačují jisté konformační změny. To by mohlo zvýšit stabilitu matrice, což je pozitivní, vzhledem k dalším experimentálním částem této diplomové práce.

### 6.1.2 Ověření modifikace hyaluronanu pomocí FTIR

Druhou metodou využitou v rámci diplomové práce pro ověření úspěšnosti modifikace hyaluronanu byla FTIR spektrometrie.



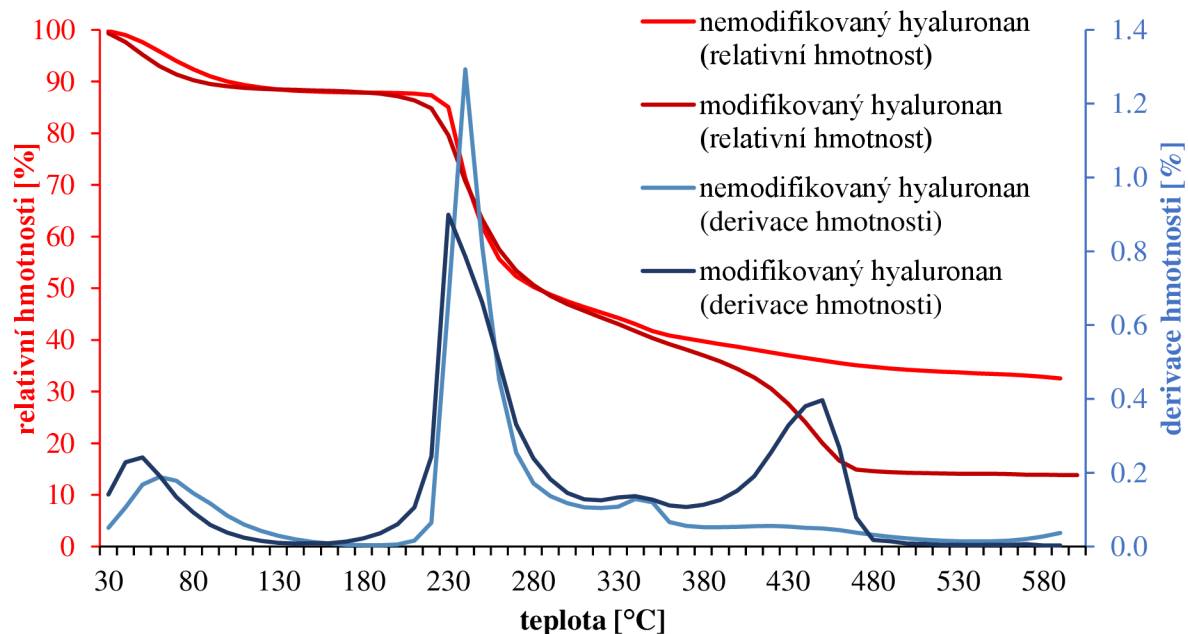
Obrázek 3: Absorpční FTIR spektrum modifikovaného a nemodifikovaného hyaluronanu

Záznam na Obrázek 3 obsahuje několik charakteristických píků vycházejících ze struktury hyaluronanu. První pík oblasti 3280 cm<sup>-1</sup> charakterizuje přítomnost hydroxylové skupiny, následuje větší pík oblasti 1630 cm<sup>-1</sup> pro hyaluronový amid. Záznam potvrdil, že modifikací došlo ke změně signálu, a tudíž strukturální změně. Mírné rozdíly strmostí křivek modifikované a nemodifikované formy odpovídají očekáváním, protože přidavek aminokyseliny alaninu zvýšil množství hydroxyskupin i amidoskupin. Křivky se zásadně (průběhem neliší), protože funkční skupiny dodaného alaninu se vyskytují i v synovii jako takové (amino, karboxyskupiny)

### 6.1.3 Ověření modifikace hyaluronanu pomocí TGA

Poslední metodou využitou v rámci DP pro ověření úspěšnosti modifikace struktury hyaluronanu byla TGA. Měření probíhalo na přístroji Instrument TGA Q5000 při teplotní rampě 10 °C za minutu do 600 °C. Měření probíhalo v atmosféře tvořené vzduchem (25 ml za minutu).

Z této analýzy byly získány pro vzorky hyaluronanu termogravimetrické křivky popisující úbytek hmoty mezi jednotlivými vzorky v závislosti na teplotě. Obrázek 4 zobrazuje krom úbytku relativní hmotnosti jednotlivých vzorků i jejich derivace.



Obrázek 4: Derivační termogravimetrická analýza modifikovaného a nemodifikovaného hyaluronanu

První změna hmotnosti do 100 °C je způsobena vypařením vody ze vzorku, jak volné, tak vázané pomocí vodíkových můstků. Oblast okolo 200 až 300 °C nejpravděpodobněji zobrazuje rozplétání řetězců hyaluronanové makromolekulární sítě. Hodnoty kolem 400 °C zobrazují rozpad základních funkčních jednotek a zde je možno pozorovat změny mezi jednotlivými vzorky. Nemodifikovaný hyaluronan nevykazuje zásadní úbytek, tudíž je možno říct, že jeho odolnost vůči tepelnému působení je nižší než u modifikovaného hyaluronanu, který poskytuje výraznější signál. Finální oblast okolo 600 °C reprezentuje množství popela (anorganických složek). Hyaluronan ve vodě tvoří sodnou sůl, tudíž při takto vysoké teplotě zůstává pouze hlavně sodík. Tyto hodnoty jsou nejvyšší pro nemodifikovaný vzorek. U modifikovaného hyaluronanu bylo naměřeno menší množství popela, což je způsobeno modifikací hyaluronanu. Na místo karboxylové skupiny glukuronátu v hyaluronanu, kam se ve vodném roztoku vážou sodné ionty, byla v případě modifikace navázána aminokyselina alanin (pomocí methylesteru). Tím se snížilo množství anorganického podílu u modifikovaného hyaluronanu, a naopak vzrostlo množství organické hmoty. Pomocí termogravimetrie byla stanovena vlhkost hyaluronanů (modifikovaného i nemodifikovaného), což je zásadní pro výpočet přesných navážek. Dále byl určen obsah organické hmoty a popela, konkrétní hodnoty znázorňuje Tabulka 4: Hmotnostní analýza vzorků.

Tabulka 4: Hmotnostní analýza vzorků

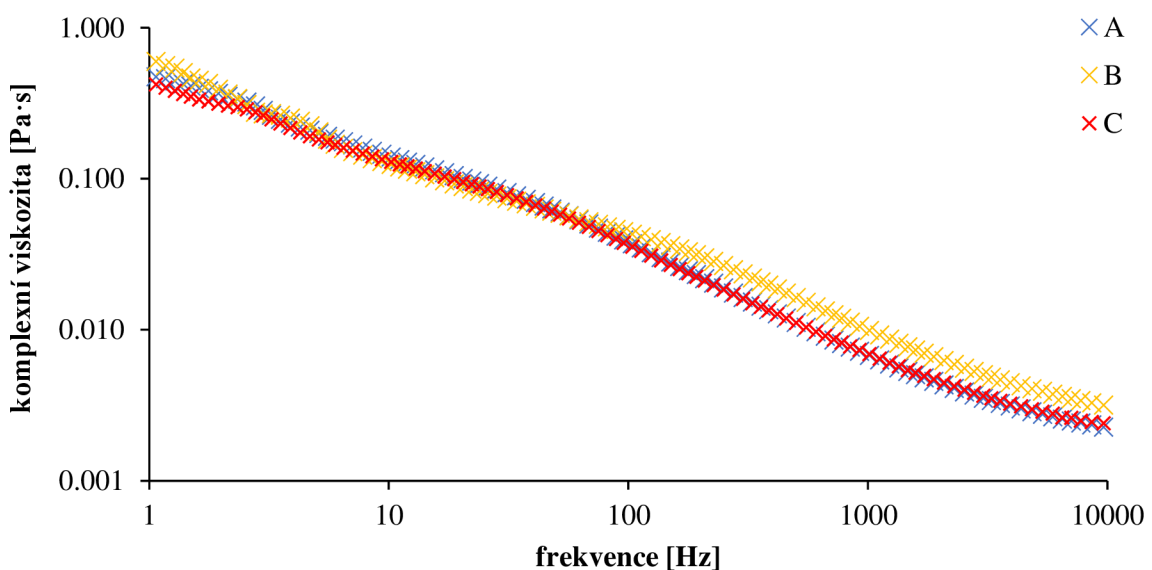
vzorek	vlhkost [hm. %]	organická hmota [hm. %]	popel [hm. %]
Nemodifikovaný hyaluronan	12,11	54,45	33,44
Modifikovaný hyaluronan	8,33	79,65	12,02

## 6.2 Charakterizace připravených vzorků synoviálních kapalin

Všechny připravené vzorky synoviálních kapalin byly charakterizovány vzhledem k jejich potenciálnímu využití zejména z hlediska jejich viskoelastických vlastností, a to jednak pomocí reometru (makroreologie) a dále také dynamického rozptylu světla (mikroreologie). Jednotlivé synoviální kapaliny byly dále v diplomové práci charakterizovány rovněž pomocí termogravimetrie (TGA) a infračervené spektrometrie (FTIR). Charakterizace byla důležitá pro stanovení povahy připravených matric pro jejich další srovnání jak mezi sebou, tak jednotlivých z hlediska jejich stability v čase.

### 6.2.1 Mikroreologie

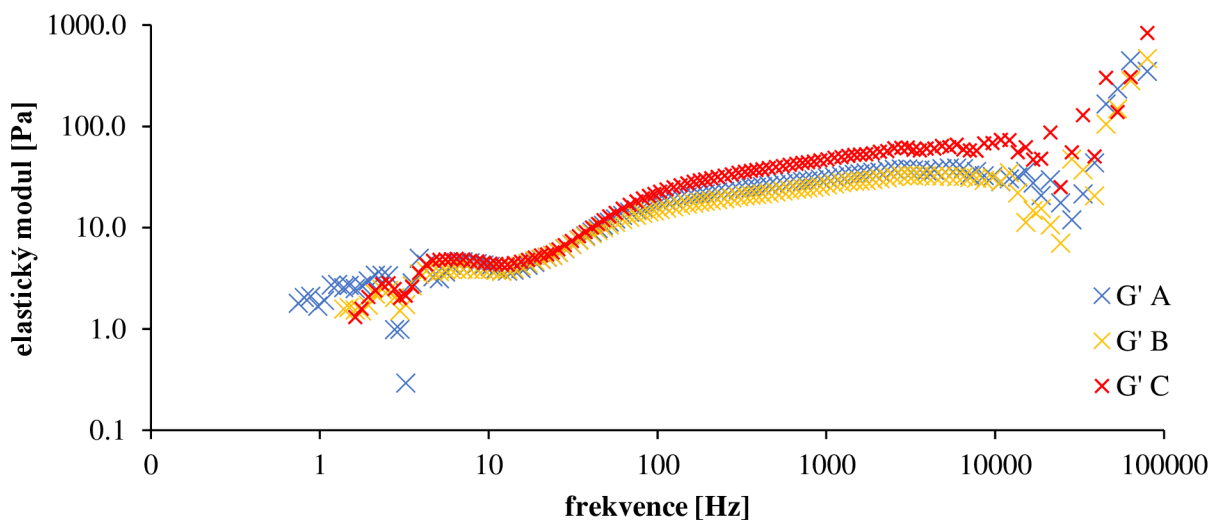
Mikroreologický měřicí modul používá předem definované částice neboli *tracer* (konkrétně polystyren o velikosti 100 nm). Paprsek procházející přibližně 1 ml vzorku s rozmíchaným *tracerem* zaznamenává oscilační pohyb částic. Principem měření je dynamický rozptyl světla na částicích, který se liší v závislosti na rychlosti jejich pohybu (velikosti Brownova pohybu). Pohyb částic *traceru* je ve vzorku omezován přítomností strukturálních komponent synoviálních kapalin tvořících 3D strukturu. Výsledky z provedeného mikroreologického měření se zaznamenávají jako korelační funkce, kde je definována míra viskózního a elastického chování vzorku.



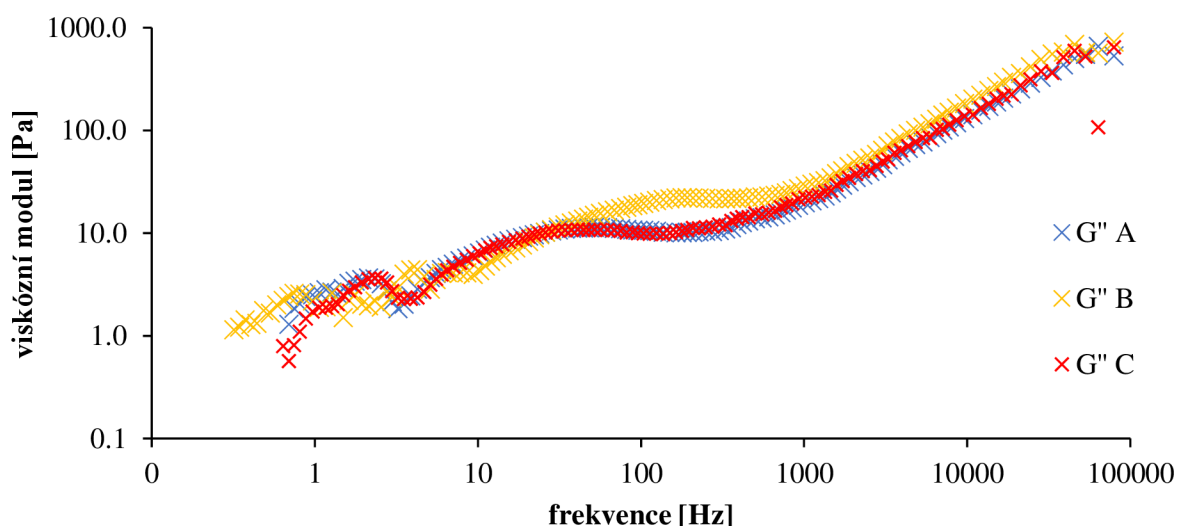
Obrázek 5: Srovnání komplexní viskozity uměle připravených vzorků A, B, C pro 25 °C

Jak již bylo zmíněno v kapitole 5.3.4, komplexní viskozita popisuje chování materiálu jako celku. Zahnutím viskózních i elastických složek byl určen klesající trend viskozitní funkce. Proto je možno říct, že se zvyšujícím se namáháním dochází k ztekutění matrice. To ovšem platí pro mikroskopický pohled na jednotlivé sledované částice *traceru* ve vzorku. Lepší formulací je to, že se zvyšujícím se napětím po sobě částice lépe kloužou, a tím minimalizují nebezpečí poškození matrice jako celku.





Obrázek 6: Srovnání elastických modulů uměle vytvořených synoviálních vzorků pro 25 °C



Obrázek 7: Srovnání viskózních modulů uměle vytvořených synoviálních vzorků pro 25 °C

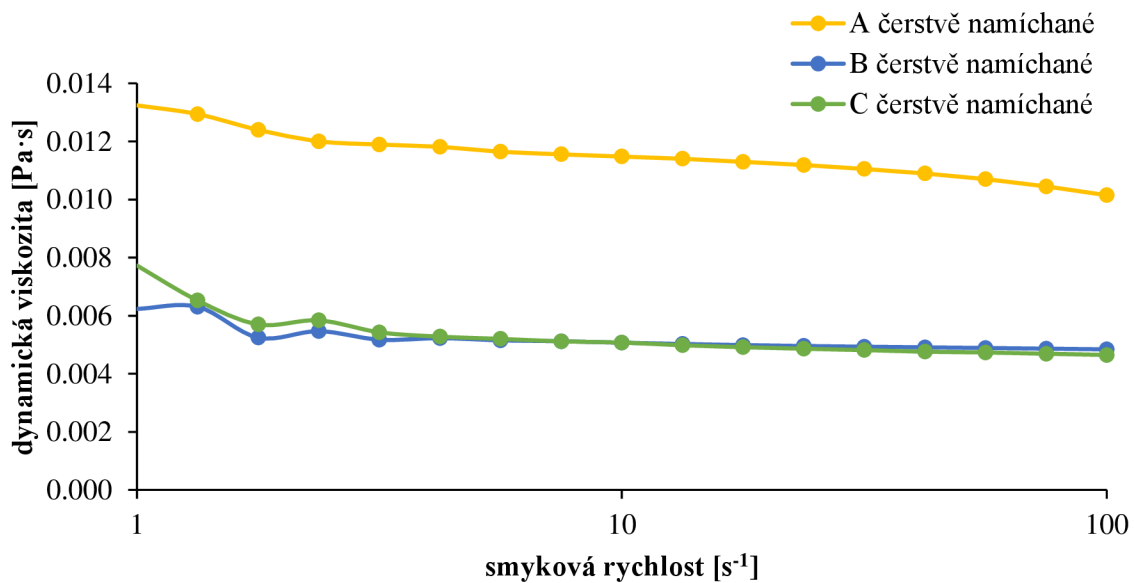
Obrázek 6: Srovnání elastických modulů uměle vytvořených synoviálních vzorků pro 25 °C a Obrázek 7: Srovnání viskózních modulů uměle vytvořených synoviálních vzorků pro 25 °C dokazují, že se vzorky mezi sebou na počátku nijak neodlišují a poskytují viskoelastické charakteristiky. Stejně tomu bylo při teplotě měření 37 °C. Zvyšující se hodnota jednotlivých modulů poukazuje na odpor materiálu vůči namáhání. To je žádoucí, protože synoviální kapalina kromě výživy kloubu plní funkci ochrannou. Její přítomnost je nezbytná pro absorpci působící síly (doskok, běh) a snížení otřesů pro ochranu kloubů před mechanickým poškozením.

## 6.2.2 Makroreologie

Makroreologie se zaměřuje na reologickou charakteristiku vzorku z hlediska celé matrice, jak bylo blíže specifikováno v kapitole 5.3.4. Oproti mikroreologii, která popisuje vzorek dle chování jednotlivých částic, makroreologie sleduje matrice komplexně jako provázanou síť funkčních komponent, které se vzájemně ovlivňují. V rámci měření byly provedeny jednak tokové testy a dále také dva druhy oscilačních testů (frekvenční a amplitudové).

### *Tokové testy*

Tokové testy jsou první z nástrojů reologie využitých pro charakterizaci vzorků synoviálních kapalin. V rámci měření je zaznamenávána změna viskozity v závislosti na smykové rychlosti.

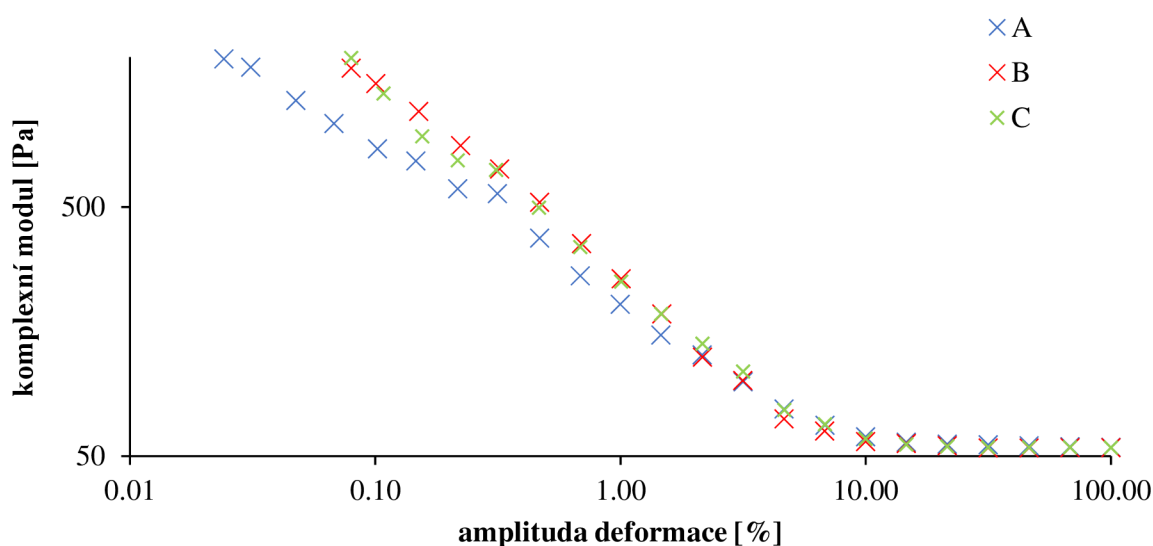


Obrázek 8: Viskozitní křivka artifiálních synoviálních vzorků A, B, C

Obrázek 8: Viskozitní křivka artifiálních synoviálních vzorků A, B, C zobrazuje mírný pokles viskozity všech vzorků při nízkých hodnotách smykové rychlosti. Při vyšších rychlostech trendy křivek odpovídají Newtonovským kapalinám, protože je jejich viskozita s namáháním konstantní. Rozdílné hodnoty viskozity poukazují na strukturální odlišnosti vzorků způsobené modifikací.

### *Oscilační testy*

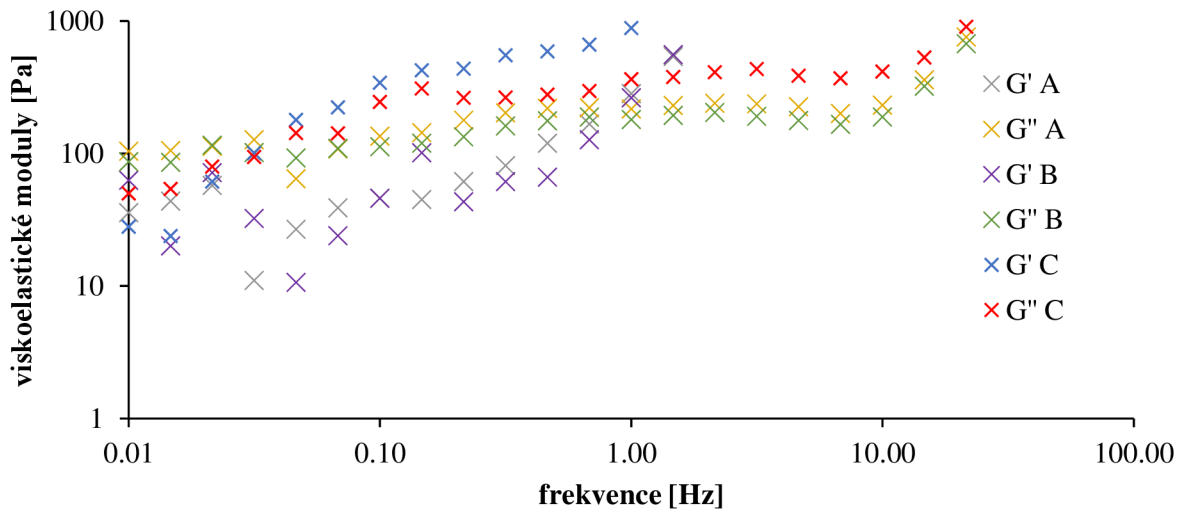
V druhé části makroreologického měření byly vzorky podrobeny oscilačním testům. Při amplitudovém testu dochází k namáhání vzorku s rostoucím smykovým napětím a konstantní oscilační frekvencí.



Obrázek 9: Amplitudový test umělé synoviální vzorků pro 37 °C

Obrázek 9 odpovídá očekávání výsledků pro viskózní kapalinu. Komplexní modul zahrnuje viskózní i elastické vlastnosti materiálu. Pokud by byly jeho dílčí složky děleny úhlovou rychlostí, pak by bylo možno získat komplexní viskozitu materiálu. Pokles komplexního modulu vypovídá o snížení viskózní i elastické odpovědi materiálu, tím je potvrzeno, že synovie spadá do kategorie pseudoplastických neneutronovských kapalin. Výsledky amplitudových testů různých vzorků A, B, C potvrdily, že čerstvě namíchané vzorky se ani v makroměřítku nijak zásadně neliší. Mírně nižší hodnota komplexního modulu pro synoviální kapalinu A naznačuje nižší rigiditu a částečně nižší provázání této synoviální kapaliny, což může souviset s tím, že pouze v této synoviální kapalině je nemoifikovaný hyaluronan oproti vzorků B a C, ve kterých již byl využit hyaluronan modifikovaný. Každopádně pozorované rozdíly mezi vzorky nejsou nijak zásadní a z hlediska viskoelastického chování jsou tyto materiály prakticky totožné. To je žádoucí, protože modifikace struktury primárně cílí na stabilitu, a ne na změnu charakteru synoviální matrice.

Druhým použitým oscilačním testem využitým v rámci práce byl frekvenční test. Výsledky jsou znázorněny na Obrázek 10. Při frekvenčním testu je oproti amplitudovým testům konstantní smyková rychlost a mění se frekvence oscilace.

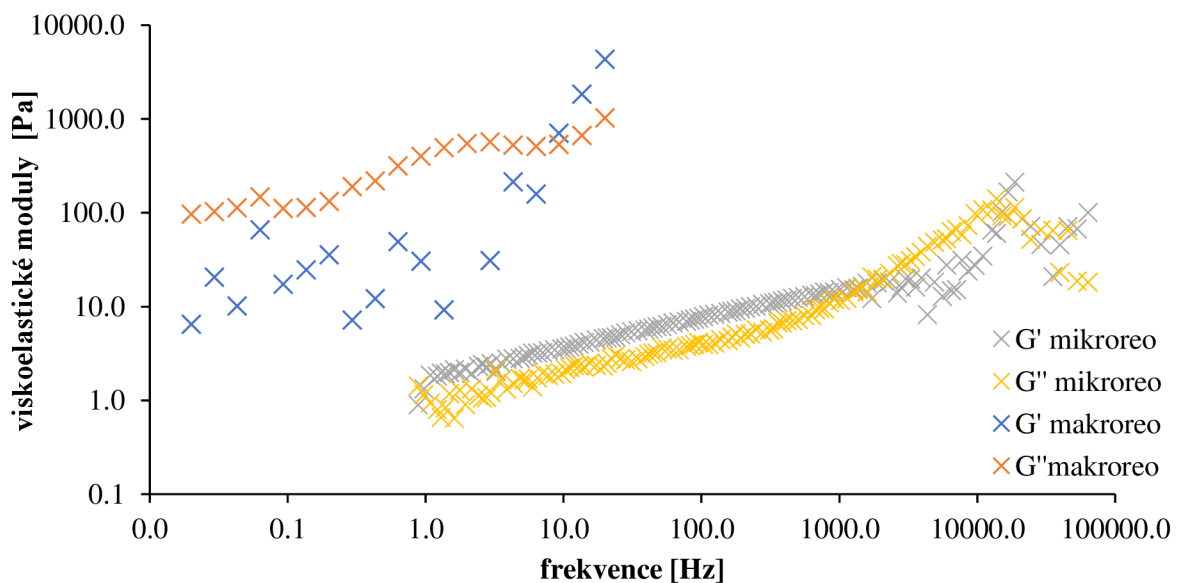


Obrázek 10: Frekvenční test umělých synoviálních kapalin při 37 °C

Výše znázorněná závislost viskoelastických modulů na frekvenci poukazuje na mírně rozdílný trend mezi jednotlivými vzorky. Z grafu je patrné, že vzorek A a B jsou si blízké, ale vzorek C se od nich odlišuje, a to zejména v případě elastického modulu. Přidavek chondroitin sulfátu tedy způsobil změnu průběhu viskoelastických funkcí, což by mohlo vést k vyšší odolnosti matrice.

### 6.2.3 Srovnání výstupu makroreologie a mikroreologie

Získaná data z makroreologického a mikroreologického přístupu k frekvenčním viskoelastickým testům byla následně korelována pro jednotlivé vzorky synoviálních kapalin. Příklad porovnání získaných závislostí viskoelastických modulů na frekvenci pro vzorek synoviální kapaliny A, připravený z nemodifikovaného hyaluronanu pro měření při 37 °C je zobrazen na Obrázek 11.



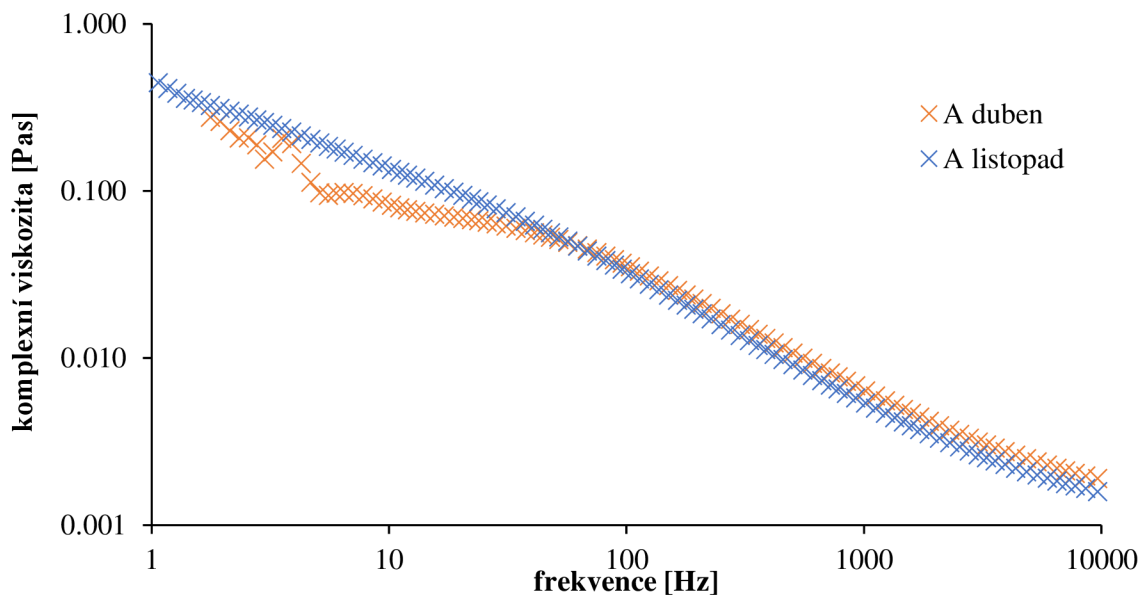
Obrázek 11: Srovnání viskoelastických modulů pro nemodifikovaný vzorek A při 37 °C

Jak je z Obrázek 11 patrné, byť jsou průběhy jednotlivých funkcí podobné, kombinace obou závislostí neposkytuje kontinuální průběh viskoelastických modulů. Data získaná z makroreologických měření byla naměřena pro vyšší hodnoty modulů než u mikroreologie. I když obě techniky působí velmi podobně, pracují na různých principech.

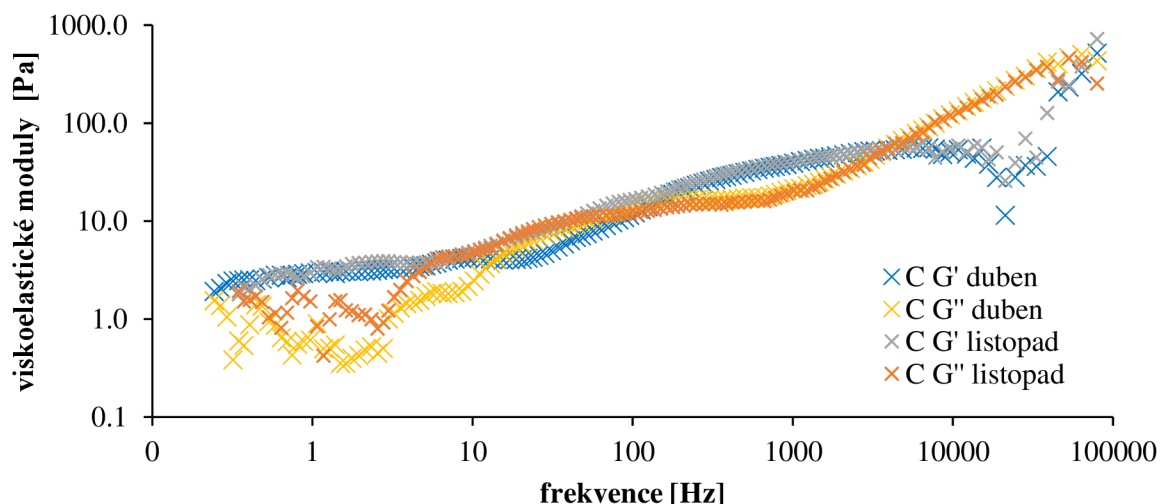
V makroreologii je sledována komplexní odezva materiálu na působení vnější síly. Na kontaktní plochu vzorku působí síla určenou geometrií (deska nebo válec) a materiál poskytuje odezvu jako celek. Toto měření spíše odpovídá reálnému působení sil v kolenním kloubu a lze zde očekávat vyšší hodnoty modulu než v mikroreologii, protože během měření dochází k silovému působení na vzorek. U mikroreologického měření naopak dochází k přepočtu působení prostředí na přesně definovanou částici, která je umístěna volně v prostoru matrice. Tuto částici ovlivňuje vnitřní struktura matrice, síla vazeb mezi jednotlivými komponentami a hustota jejich zesílení. Proto není možno tyto dvě měření slučovat, ale je třeba na ně nahlížet jako na samostatné měřicí výstupy.

#### 6.2.4 Ověření opakovatelnosti přípravy synoviálních kapalin

Pro ověření, zda je při opakovaném nachystání vzorku možno dosáhnout srovnatelných viskoelastických charakteristik připraveného materiálu byla použita DLS mikroreologie. Pro stanovení opakovatelnosti byly připraveny nové umělé synovie s odstupem 5 měsíců (v dubnu a listopadu). Měřením, jehož výstup je na Obrázek 12 Obrázek 13, se potvrdilo, že metoda přípravy má dobrou opakovatelnost a je možno eliminovat zanášení chyby nestejným vstupním materiálem (za podmínek striktního dodržení postupu přípravy). Pro příklad uvedeny grafy komplexní viskozity nemodifikovaného vzorku A a viskoelastických modulů modifikovaného vzorku C.



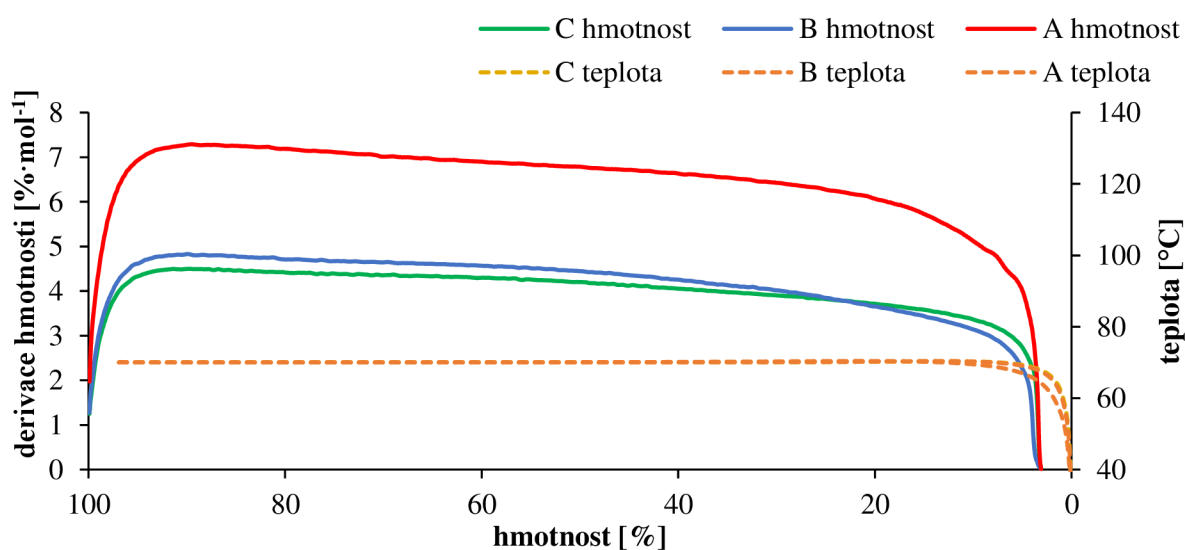
Obrázek 12: Srovnání komplexní viskozity vzorku A připraveného v dubnu a listopadu pro 37 °C



Obrázek 13: Srovnání viskoelastických modulů vzorku C připraveného v dubnu a listopadu pro 37 °C

### 6.2.5 Izotermická termogravimetrie

Charakteristiky umělých vzorků i reálného vzorku byly proměřeny v izotermickém nastavení, což znamená, že za udržování konstantní teploty po zahřátí je měřen úbytek hmotnosti vzorků.

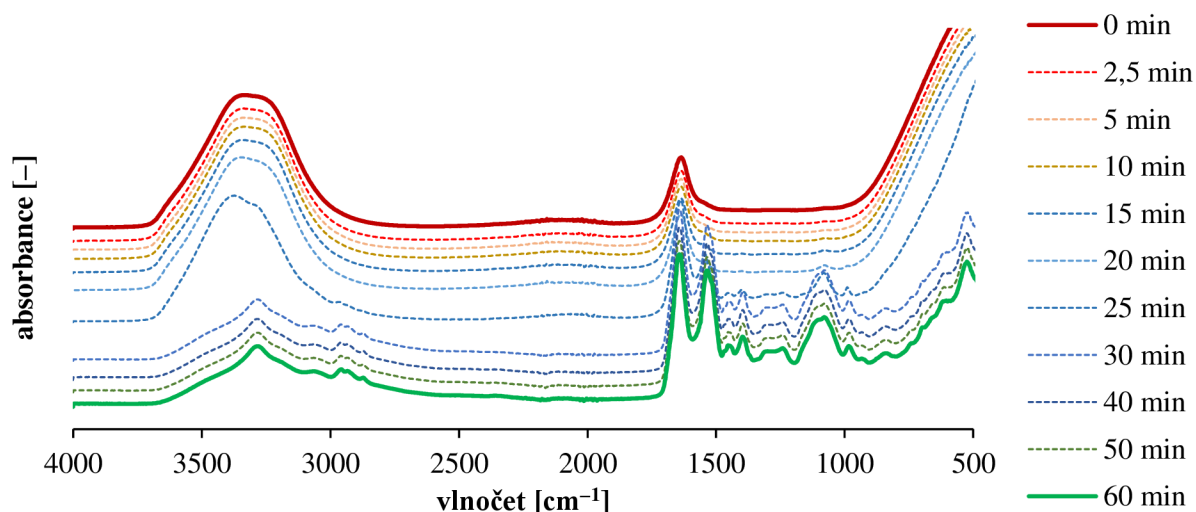


Obrázek 14: Derivační termogravimetrická analýza umělých vzorků

Obrázek 14 zobrazuje rozdíly v úbytku hmotnosti hlavně mezi modifikovanými (B, C) a nemodifikovaným vzorkem A. Ve vzorku A je patrné vyšší množství vázané vody. Modifikovaný hyaluronan má na karboxylovou skupinu glukuronátu navázanou aminokyselinu, což snižuje strukturní prostor pro hydrataci.

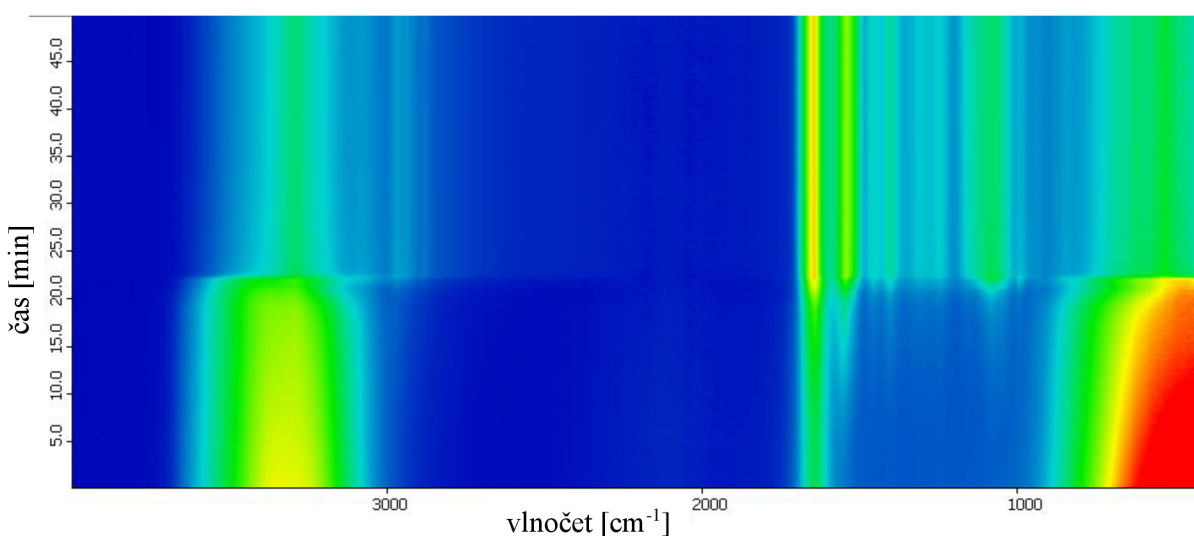
### 6.2.6 Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR)

V rámci FTIR byly vyhodnoceny 2D časově rozlišené ATR záznamy sušení a absorpční FTIR spektra všech umělých vzorků.

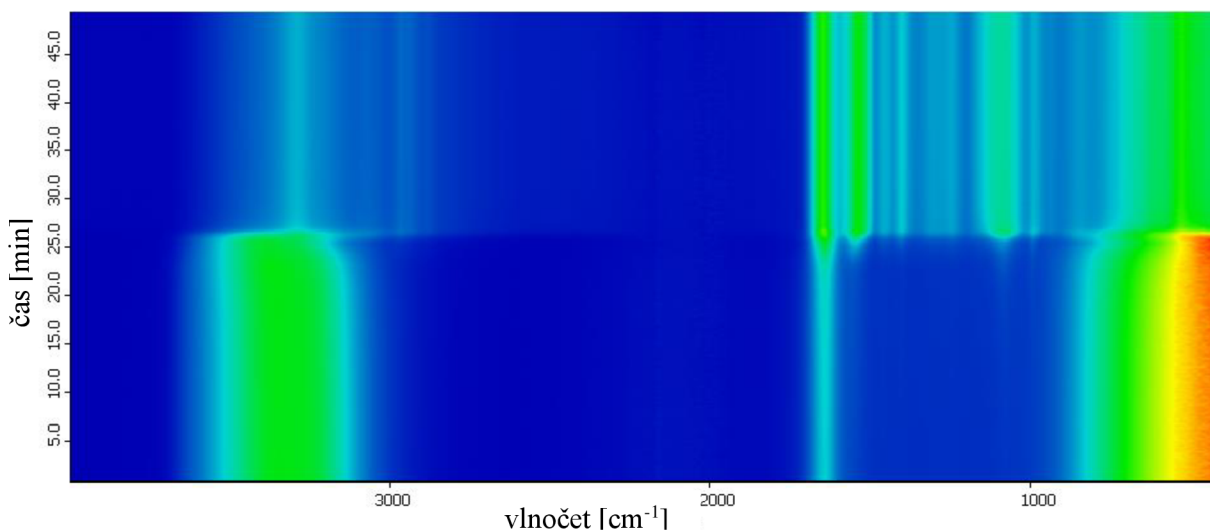


Obrázek 15: Časová změna FTIR spekter vzorku C v průběhu sušení

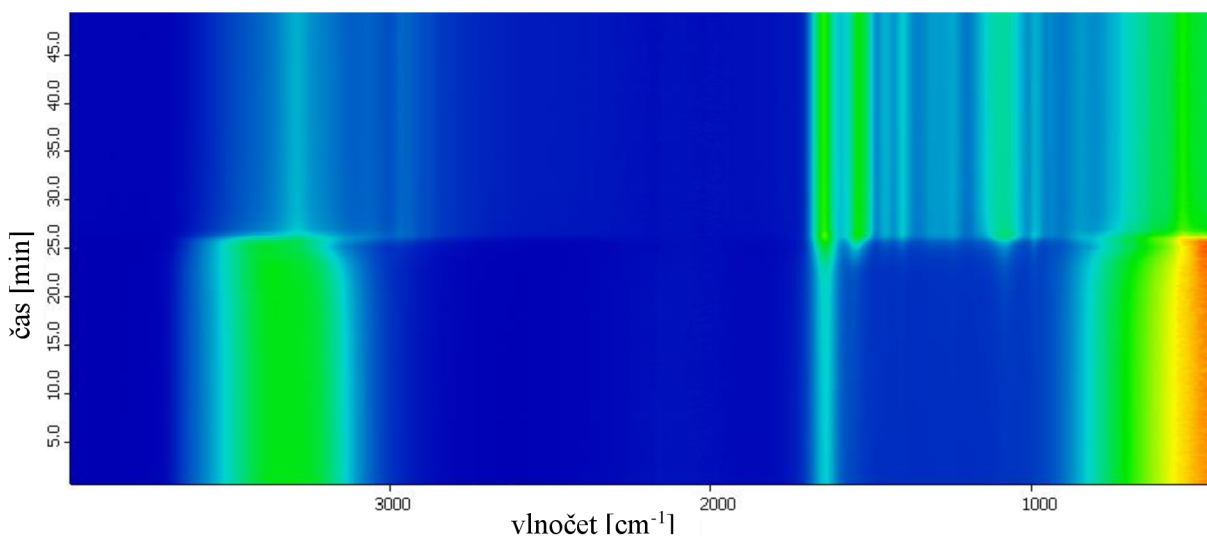
Obrázek 15 zobrazuje časovou změnu absorpčního FTIR spektra vzorku C. Jednotlivé vzorky A, B, C se v oblasti vibrační skupiny mezi sebou shodují z hlediska polohy píků, protože modifikace byla provedena pomocí funkčních skupin, které se ve vzorku vyskytovaly již před modifikací. První pík v oblasti kolem  $3300\text{ cm}^{-1}$  reprezentuje přítomnost hydroxylových a aminoskupin, které jsou součástí hyaluronanu a proteinů a vody ve vzorku. Další výraznou oblast tvoří přibližně  $1600\text{ cm}^{-1}$ . Tento pík představuje přítomnost amidové skupiny v postranním řetězci hyaluronanu a karbonylovou skupinu. Tu je možno spolu s hydroxylovou skupinou detekovat v karboxylových sloučeninách. O  $100\text{ cm}^{-1}$  dál, tedy v oblasti  $1500\text{ cm}^{-1}$  se nachází pík pro polypeptidové řetězce, které je možno v rámci synoviální kapaliny detekovat díky přítomným bílkovinám (albumin,  $\gamma$ -globulin). Pík v blízkosti  $1000\text{ cm}^{-1}$  reprezentuje fosfát přítomný v použitém fosfolipidu (DPPC) a ve fosfátovém pufru. Poslední pík reprezentující disulfidické můstky stabilizující terciální strukturu proteinů byl zaznamenán na konci měření v oblasti  $500\text{ cm}^{-1}$ . Tento pík byl nejvýraznější pro vzorek C, protože krom modifikace obsahoval i chondroitin sulfát.



Obrázek 16: 2D časově rozlišený ATR záznam sušení vzorku A



Obrázek 17: 2D časově rozlišený ATR záznam sušení vzorku B



Obrázek 18: 2D časově rozlišený ATR záznam sušení vzorku C

2D časově rozlišené FTIR záznamy ukazují rozdíly v množství a způsobu vody vázané v uměle vytvořených vzorcích synoviálních kapalin (modrá barva ve spektrech uvedených na Obrázku 16–18 značí nejnižší intenzitu ve spektru, s přechodem barvy od zelené přes žlutou k červené narůstá intenzita v dané oblasti spektra). Ve spektru vzorku A na Obrázek 16 je vidět oproti zbylým dvěma vzorkům intenzivnější pik v oblasti vlnocetů 3600 až 3300  $\text{cm}^{-1}$  (žlutá barva u vzorku A, u B a C pouze zelená). Dále je možno pozorovat rozdílné časy mezi nemodifikovaným vzorkem A a modifikovanými vzorky B a C na Obrázek 17 a Obrázek 18. Přestože byly dodrženy stejné podmínky měření došlo u vzorku A k odparu vody ve 20 minutě měření, a to velmi postupně. U modifikovaných vzorků B a C byl odpar patrný až v 25 minutě a změna nastala skokově oproti vzorku A. Z těchto výsledků tedy vyplývá, že v synoviální kapalině A bylo vázáno ve struktuře více vody (v souladu s výsledky izotermické TGA) a rovněž docházelo k rychlejšímu a pozvolnějšímu odparu ze struktury oproti synoviálním kapalinám B a C.



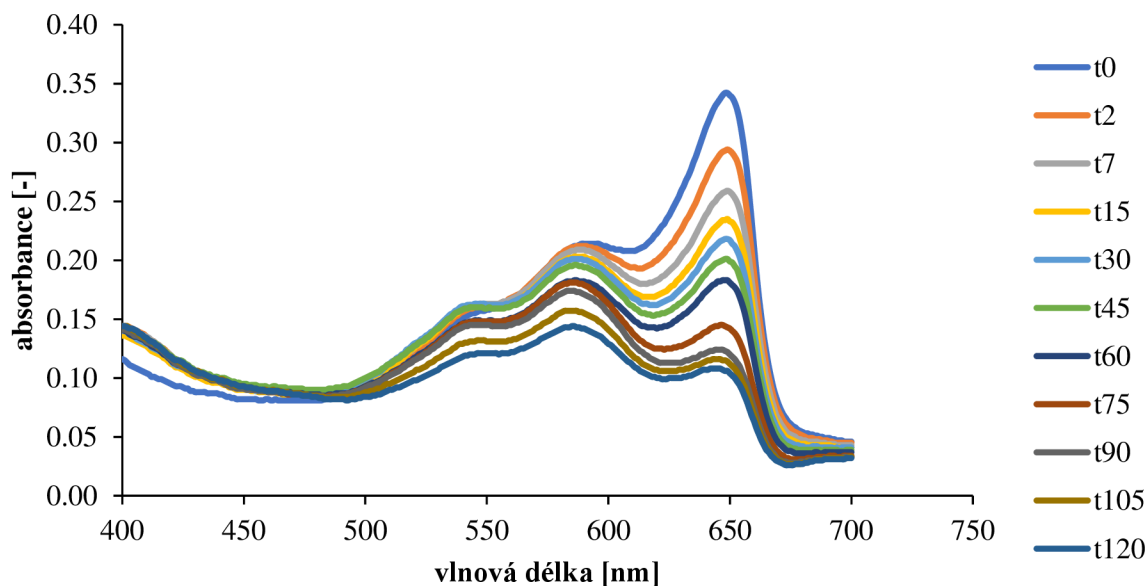
### 6.3 Sledování stability vzorku

Důležitou vlastností připravených vzorků synoviálních kapalin je jejich stabilita. V rámci diplomové práce bylo studium stability vzorku posuzováno z pohledu více parametrů. Synoviální kapaliny jsou vlivem metabolických změn nebo vlivem patogenů degradovány pomocí enzymů. Tyto změny byly pozorovány pomocí UV-VIS spektrometrie na základě postupu publikovaném ve článku [68]. Dalším důležitým aspektem a významným průmyslovým parametrem je časová stabilita vzorků. Ta byla opakovaně stanovena pomocí dynamického rozptylu světla na přístroji Zetasizer Nano ZS za využití mikroreologického měřicího modulu v kombinaci s makroreologií.

#### 6.3.1 Enzymatická stabilita

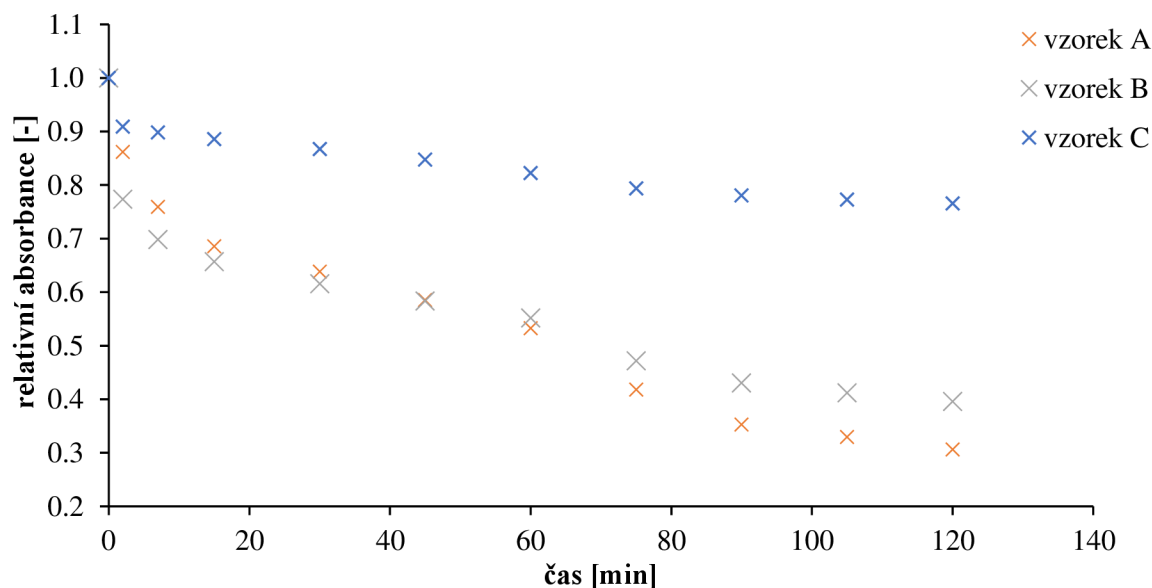
Jedním z hlavních cílů této diplomové práce bylo připravit umělé synoviální kapalinu se zvýšenou odolností vůči enzymatické degradaci. Pro tyto účely byla v rámci této části práce porovnávána stabilita tří připravených synoviálních kapalin, které byly založeny na původním vysokomolekulárním hyaluronanu (vzorek A), modifikovaném hyaluronanu (vzorek B) a modifikovaném hyaluronanu s přidáním chondroitin sulfátu (vzorek C). Jednotlivé vzorky synoviálních kapalin byly cíleně degradovány pomocí enzymu hyaluronidázy.

Kyveta se vzorkem synovie (ředěným fosfátovým pufrům), barvivem a hyaluronidázou byla proměřena pomocí UV-VIS spektrofotometru U-3900/3900H Hitachi High-Technologies Global v rozmezí vlnových délek 400 až 700 nm. Měření probíhalo po dobu 2 hodin s měřicím krokem 15 minut. Bylo získáno 11 absorpčních spekter pro jednotlivé vzorky.



Obrázek 19: Absorpční spektra nemodifikovaného vzorku A

Obrázek 19 ukazuje změny složení matrice vyvolané působením hyaluronidázy. Patrný je pokles v oblasti 650 nm. Tato vlnová délka odpovídá hyaluronanu v synoviální kapalině. I u ostatních vzorků docházelo k snížení intenzity absorbance v čase, pro porovnání byl použit relativní pokles znázorněný na následujícím grafu.



Obrázek 20: Kinetika relativního poklesu absorbance v čase

Obrázek 20 ukazuje změny absorbance u vzorků A, B, C pro vlnovou délku 650 nm. Jak je z grafu patrné, všechny vzorky odpovídají stejně klesajícímu exponenciálnímu trendu. Relativní absorbance byla získána odečtením absorbance v počátečním stavu od absorbance v konkrétním čase. Díky průběhu jednotlivých funkcí bylo možno dopočítat rychlostní konstantu  $k$  pomocí rovnice (1).

$$A_{(t)} = A_{(0)} \cdot e^{-kt} \quad (1)$$

Úpravou tohoto výrazu (linearizací) bylo možno získat hodnotu rychlostní konstanty  $k$  jako směrnici lineárně regresní přímky. Hodnoty pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v Tabulka 5: Rychlostní konstanty vzorků A, B, C.

Tabulka 5: Rychlostní konstanty vzorků A, B, C

vzorek	rychlostní konstanta [ $\text{min}^{-1}$ ]
A	(0,00870 $\pm$ 0,00040)
B	(0,00550 $\pm$ 0,00030)
C	(0,00150 $\pm$ 0,00008)

Z výpočtu vyplývá, že největší hodnotu rychlostní konstanty degradace má vzorek A, což znamená, že má největší sklon regresní přímky, a proto u něj degradace probíhá nejrychleji. Oproti tomu vzorek C, obsahující modifikovaný hyaluronan a chondroitin sulfát, degraduje nejpomaleji, protože má nejnižší hodnotu rychlostní konstanty (sklon přímky). Vzorek B odolává působení enzymu lépe než vzorek A, a hůře než vzorek C. Zde je možno zaznamenat vliv modifikace hyaluronanu na odolnost matrice vůči enzymu bez přítomnosti chondroitin sulfátu.

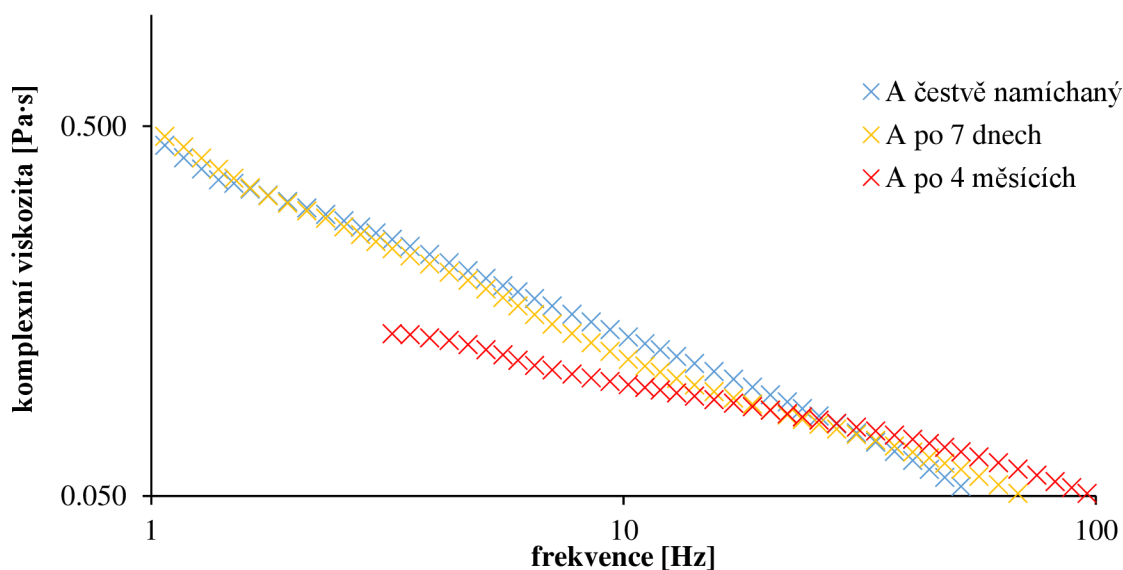
### 6.3.2 Časová stabilita

Důležitou charakteristikou připravených umělých synoviálních kapalin je bezesporu jejich časová stabilita a s tím související schopnost těchto materiálů udržovat si v čase konstantní užitkové vlastnosti.

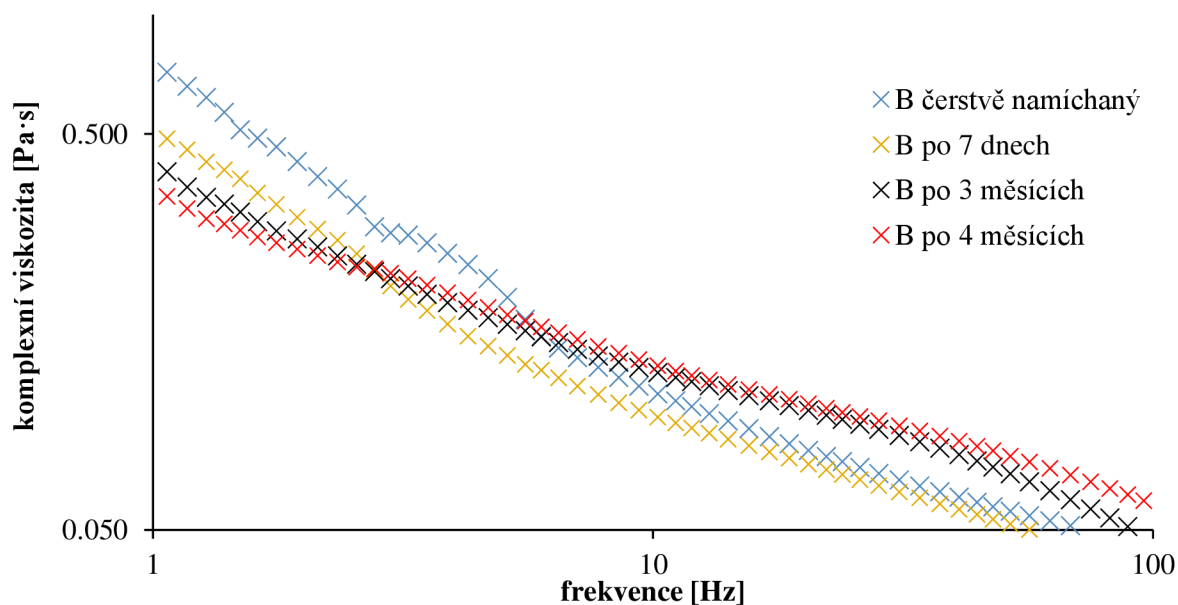
Časová stabilita připravených vzorků synoviálních kapalin byla v rámci práce studována pomocí makroreologických i mikroreologických měření. Následně byly rovněž studovány změny v agregačním chování a distribuci hmoty v jednotlivých vzorcích synoviálních kapalin využitím metody AF4-MALS.

### ***DLS mikroreologie***

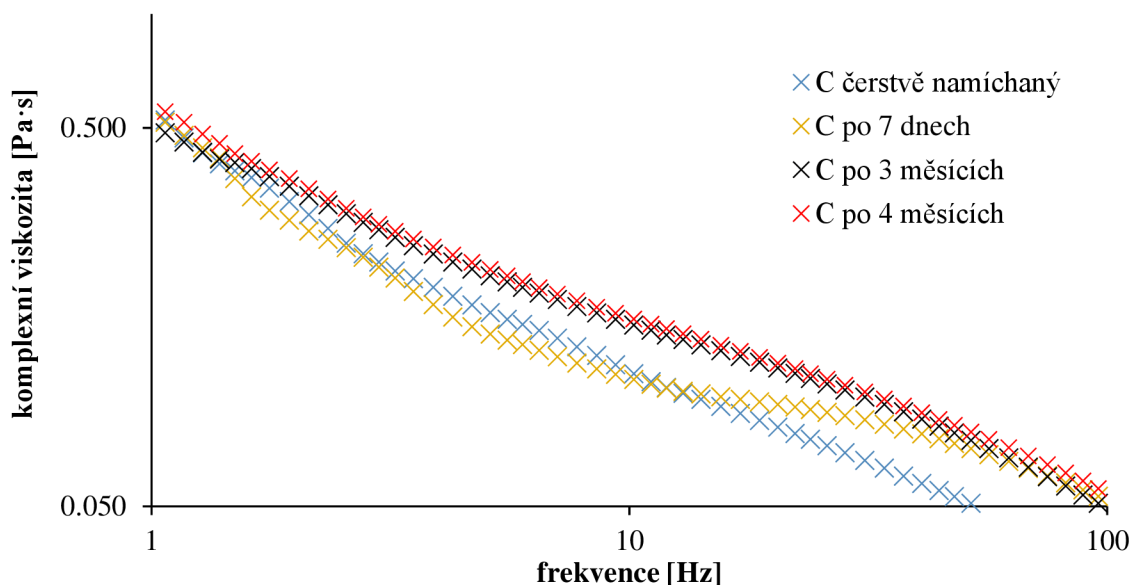
První metodou využitou pro posouzení časové stability vzorků byla DLS mikroreologie, kdy byla posuzována pro jednotlivé synoviální kapaliny stálost naměřených viskoelastických charakteristik. Naměřená data pro porovnání časové změny komplexní viskozity všech tří vzorků synoviálních kapalin jsou zobrazeny na následujících Obrázek 21, Obrázek 22 a Obrázek 23.



Obrázek 21: Závislost komplexní viskozity na frekvenci u vzorku A pro 37 °C

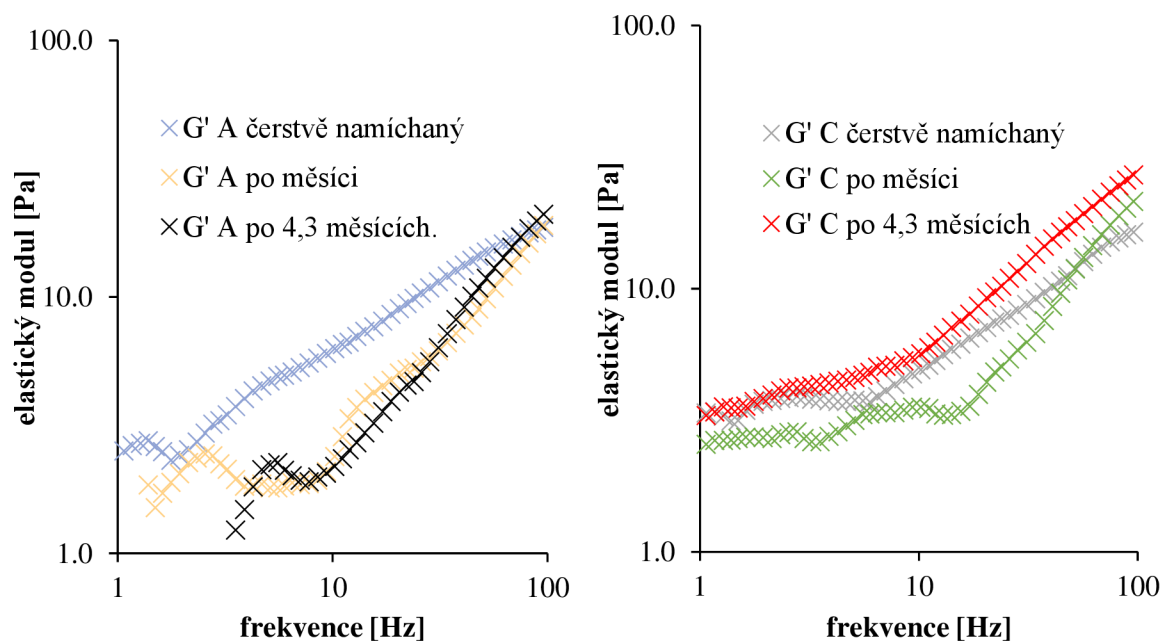


Obrázek 22: Závislost komplexní viskozity na frekvenci u vzorku B pro 37 °C

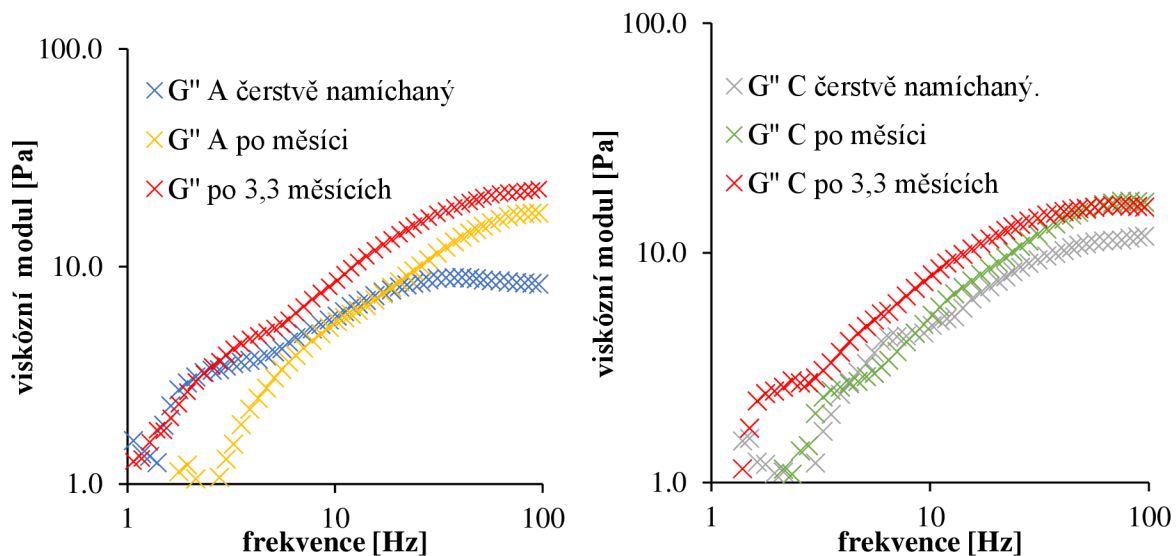


Obrázek 23: Závislost komplexní viskozity na frekvenci u vzorku C pro 37 °C

Mezi vzorky A, B, C ve výše uvedených grafech je možno pozorovat změny ve směrnicích jednotlivých funkcí. Obecně platí to, že čím nižší je hodnota směrnice závislosti komplexní viskozity na frekvenci, tím více se tento materiál podobá Newtonovské kapalině. To znamená, že čím méně je tato závislost „strmá“, tím hůře vzorek odolává působení sil a ztrácí své specifické viskoelastické vlastnosti. Stejnou strmost v závislosti na čase (zachování viskoelasticity) poskytuje vzorek C, proti němu je třeba postavit vzorek A, kde je možno v průběhu času pozorovat pokles strmosti, a tudíž přibližování se charakteru Newtonovské kapaliny. Vzorek A tedy vykazoval v čase největší pozorované změny z pohledu DLS mikroeologie a lze ho označit za nejméně časově stálý. Následující grafy zobracují rovněž časový vývoj pro elastické a viskózní moduly pro synoviální kapalinu A a C.



Obrázek 24 a 25: Elastické moduly vzorků A (vlevo) a C (vpravo) pro 37 °C

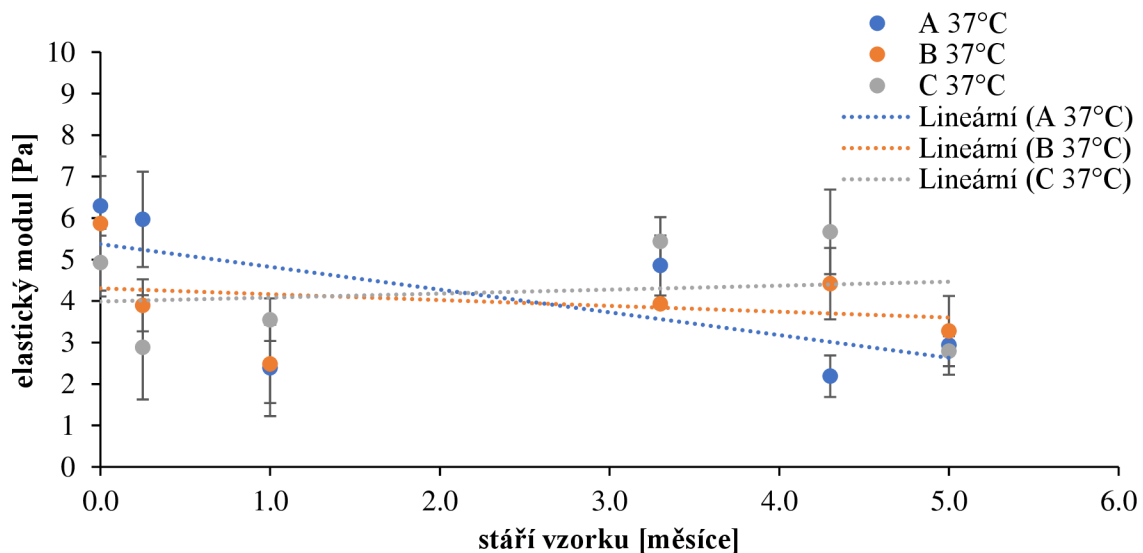


Obrázek 26 a 27: Viskózní modul pro vzorek A (vlevo) a C (vpravo) při 37 °C

Grafy viskózních a elastických modulů byly uvedeny pro vzorky A a C. U Elastických modulů vzorku A na Obrázku 24 je možno v průběhu času sledovat snížení jednotlivých hodnot, což se dá vysvětlit jako ztrácení charakteru pevného tělesa a snížení mechanické odolnosti. Elastický modul vzorku C na Obrázek 24 a 25: Elastické moduly vzorků A (vlevo) a C (vpravo) pro 37 °C se po měsíci mírně snížil, ale další měření ukázala opět vyšší hodnoty podobné původně naměřeným.

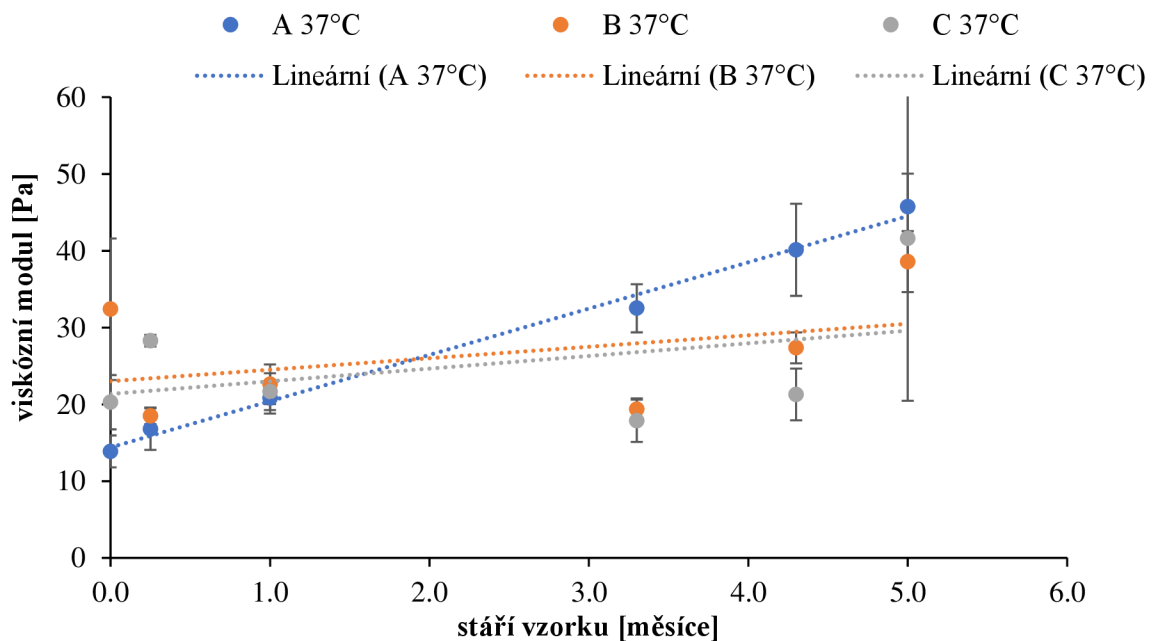
Viskózní moduly na Obrázek 26 a 27: Viskózní modul pro vzorek A (vlevo) a C (vpravo) při 37 °C v průběhu času naopak rostou. To znamená, že je matrice má více viskózní charakter a je tedy více tekutá. U vzorku A došlo k výraznějšímu růstu hodnot v čase oproti vzorku C, kde byl zachován i původní trend (průběh funkce).

Pro větší průkaznost dat byla porovnána pouze hodnota viskózního a elastického modulu pro velmi malou (10 Hz) a velkou (1000 Hz) frekvenci u jednotlivých vzorků. Pro lepší ilustraci výsledků byly body proloženy lineární směrnici trendu. Z Obrázek 28 a Obrázek 29 na následující straně je zřejmé, že v průběhu několika měsíců vzorky B a C, které byly oproti vzorku A modifikovány aminokyselinou odolaly lépe působení degradačních vlivů a hodnoty jejich modulů v průběhu času zůstala téměř neměnná. Oproti tomu u vzorku A je možno sledovat pokles elastického modulu pro frekvence okolo 10 Hz, což má simulovat synoviální kapalinu, která je v klidu. Z těchto výsledků tedy vyplývá, že synoviální kapalina A je při nízkém namáhání po uvedeném časovém horizontu od přípravy vykazuje menší elasticitu své struktury (je tedy poměrně více viskózní – tekutější), naopak synoviální kapaliny B a C, které jsou založeny na modifikovaném vzorku hyaluronanu vykazují neměnné vlastnosti.



Obrázek 28: Srovnání elastických modulů uměle připravených vzorků A, B, C pro 10 Hz

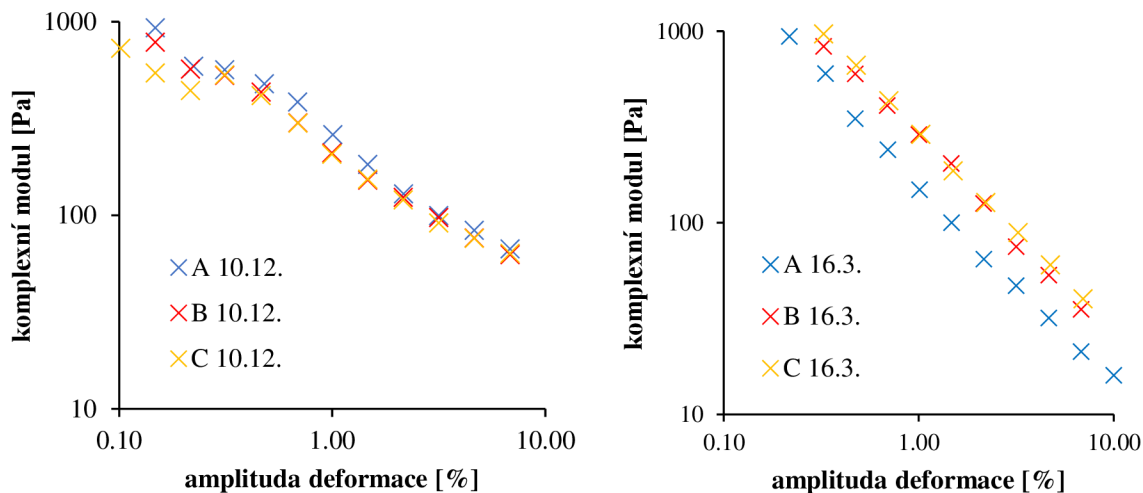
Vyšší frekvence na Obrázek 29 má simulovat velké namáhání kapaliny v kolením kloubu. Při námaze je možno pozorovat rostoucí trend viskózního modulu u vzorku A, což znamená, že má více tekutou povahu a tudíž ztrácí mechanické vlastnosti pevného tělesa.



Obrázek 29: Srovnání viskózních modulů uměle připravených vzorků A, B, C pro 1000 Hz

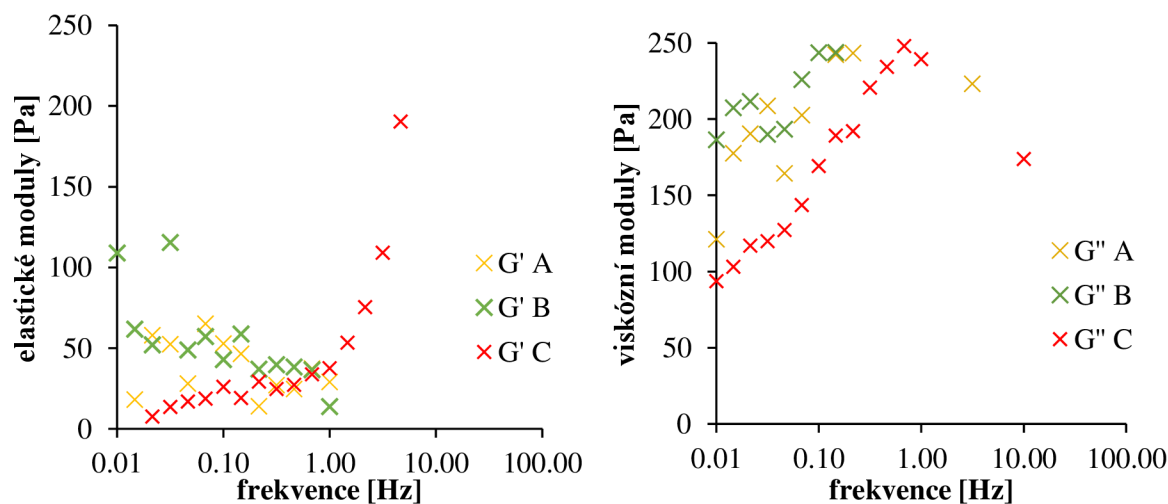
### Makroreologie

Pro makroreologické posouzení časové stability připravených synoviálních kapalin byly opět využity dva typy měření. Jednak byly vzorky charakterizovány z hlediska tokových měření, kdy byla posuzována závislost dynamické viskozity na smykové rychlosti. Následně byly využity taky oscilační testy (amplitudové i frekvenční).



Obrázek 30 a 31: Amplitudový test umělých vzorků vlevo čerstvě namíchané, vpravo po 3 měsících pro 25°C

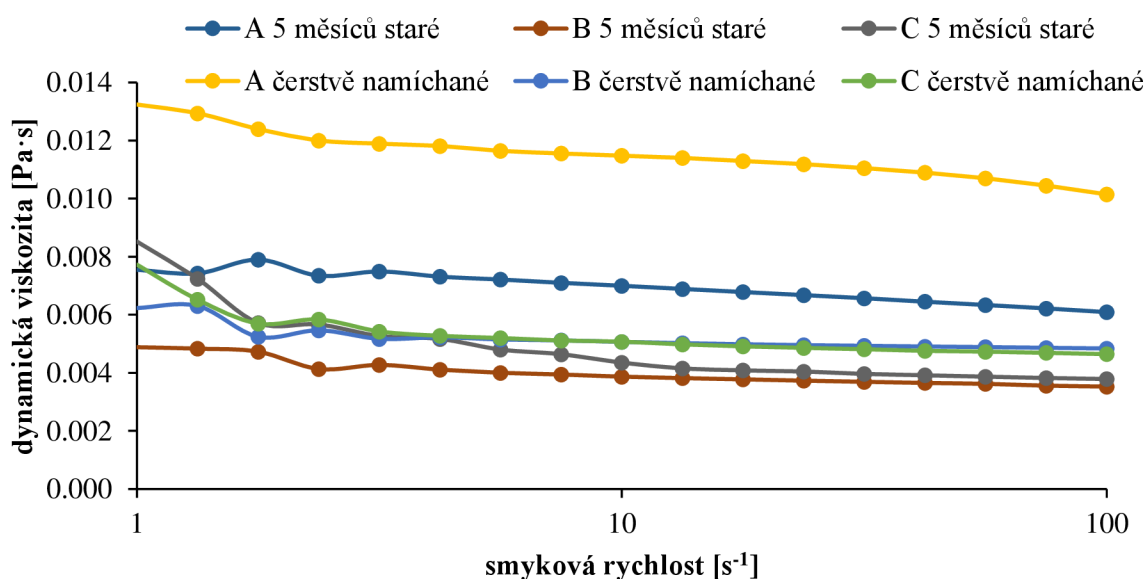
Výše uvedené Obrázek 30 a 31: Amplitudový test umělých vzorků vlevo čerstvě namíchané, vpravo po 3 měsících zobrazují makroreologickou závislost komplexního modulu na amplitudě deformace. Komplexní modul je možno dopočítat jako odmocninu ze součtu druhých mocnin viskózního a elastického modulu. Při měření čerstvě namíchaných vzorků nebylo možno pozorovat rozdíly, což zobrazuje Obrázek 30 a 31: Amplitudový test umělých vzorků vlevo čerstvě namíchané, vpravo po 3 měsících pro 25°C. Po třech měsících na Obrázek 30 a 31: Amplitudový test umělých vzorků vlevo čerstvě namíchané, vpravo po 3 měsících pro 25°C došlo u vzorku A ke změnám. Komplexní modul vyjadřuje míru provázanosti vzorku a vzájemných interakcí komponent synoviální kapaliny. Snížení hodnoty komplexního modulu značí rozpad struktury u vzorku A. U vzorku B,C nebyla zaznamenána změna.



Obrázek 32 a 33: Frekvenční test umělých vzorků při 25 °C pro elastické moduly vlevo a viskózní moduly vpravo

Z Obrázek 10: Frekvenční test umělé synoviální kapaliny pro 37 °C lze určit nejvyšší hodnoty viskozitního i elastického modulu pro vzorek C. Porovnání Obrázek 32 a 33: Frekvenční test umělé synoviální kapaliny při 25 °C pro elastické moduly vlevo a viskozitní moduly vpravo lze říci, že pouze vzorek C si zachoval původní trend ve smyslu průběhu funkce. Z obrázku „po třech měsících“ byly nejnižší hodnoty pro viskozitní modul naměřeny u vzorku C, ten je tedy nejméně tekutý a mechanicky odolnější než zbylé dva vzorky. To potvrzuje i graf s elastickými moduly, kde je možno pozorovat odlišný průběh funkce vzorku C, oproti vzorkům A, B.

Tokové testy jsou posledním nástrojem reologické charakterizace vzorků synoviálních kapalin, které byly v diplomové práci využity pro charakterizaci vlivu času na mechanické charakteristiky vzorků synoviálních kapalin. V rámci měření je zaznamenávána změna dynamické viskozity v závislosti na smykové rychlosti.



Obrázek 34: Viskozitní křivka umělých vzorků

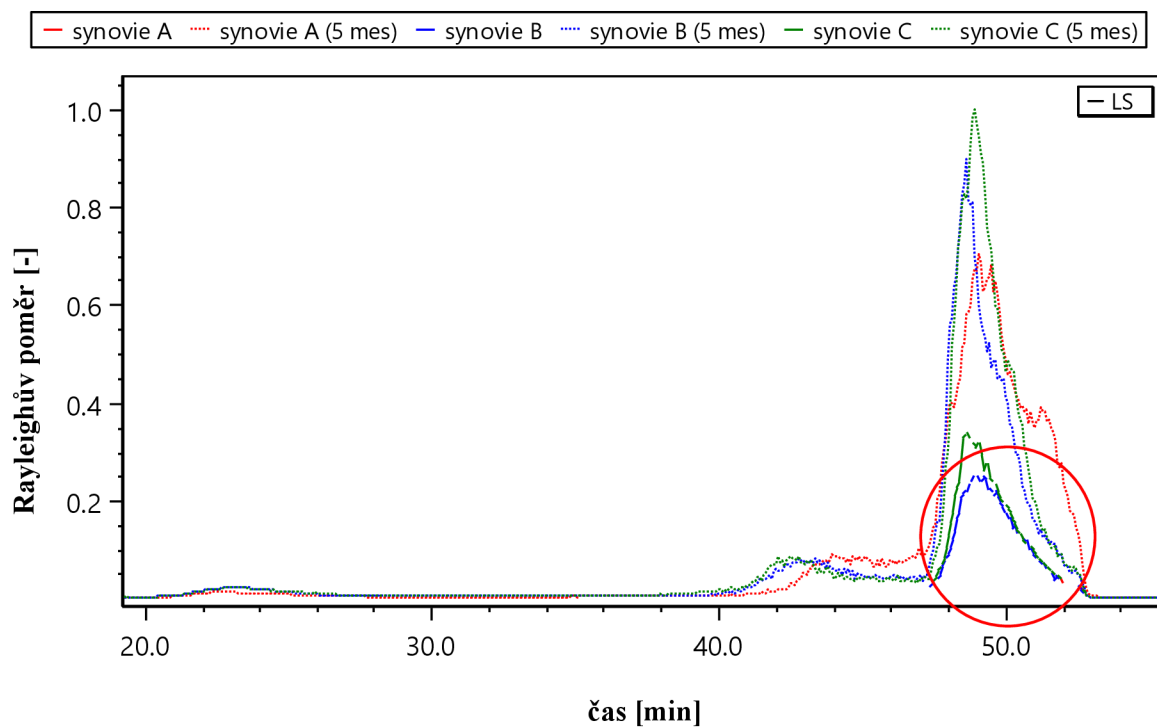
Dle viskozitních křivek čerstvě namíchaných i 5 měsíců starých umělých kapalin na Obrázek 34 dochází při nízkých smykových rychlostech k poklesu viskozity (pseudoplastické chování). Vzorek A vykazuje výraznější pokles viskozity v čase (čerstvé a 5 měsíců staré) než zbylé dva modifikované vzorky B a C. Časová stabilita vzorku B, C by mohla být vysvětlena modifikací hyaluronanu v těchto vzorcích. Ten je více chráněn, nepodléhá tak výrazné změně jako nemodifikovaný hyaluronan ve vzorku A.

### **Stabilitní změny určené pomocí AF4-MALS**

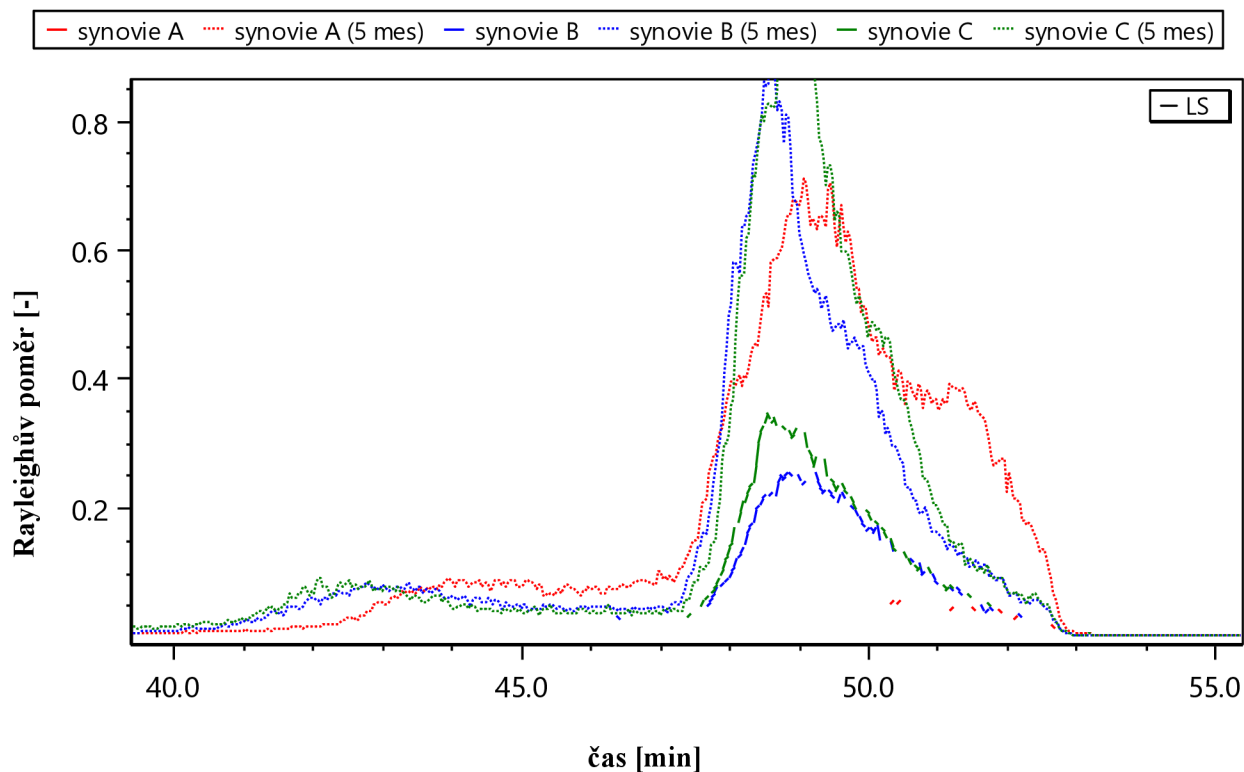
Vzhledem ke komplexnosti jednotlivých vzorků připravených umělých synoviálních kapalin byla pro posouzení změn v distribuci hmoty a rozdílnosti v agregačním chování mezi vzorky a zároveň dle vlivu stáří vzorků využita metoda AF4-MALS. Tato metoda využívá asymetrické frakcionace charakterizovaného vzorku na základě tangenciálního toku pole (realizováno řízeným tangenciálním prouděním mobilní fáze), čímž jsou získány fragmenty vzorku matrice rozdělené podle velikosti částic [92]. Takto fragmentovaný vzorek je následně charakterizován pomocí detektorů MALS a dRI.



U jednotlivých vzorků synovii byly posuzovány změny v distribuci hmoty (dRI detektor) a agregačním chování měřením Rayleighova poměru (MALS detektor). Z výsledků měření Rayleighova poměru byl pozorován rozdíl mezi synoviální kapalinou A a zbylými dvěma vzorky (B a C). Dle Obrázek 35 je možno pozorovat rozdílnou distribuci částic u vzorku A (červeně zakroužkovaná oblast), B a C a to jak v případě nových vzorků čerstvě připravených synoviální kapalin (plné čáry na Obrázek 35), tak v případě vzorků měření po 5 měsících od přípravy (čárkovaně označené vzorky).



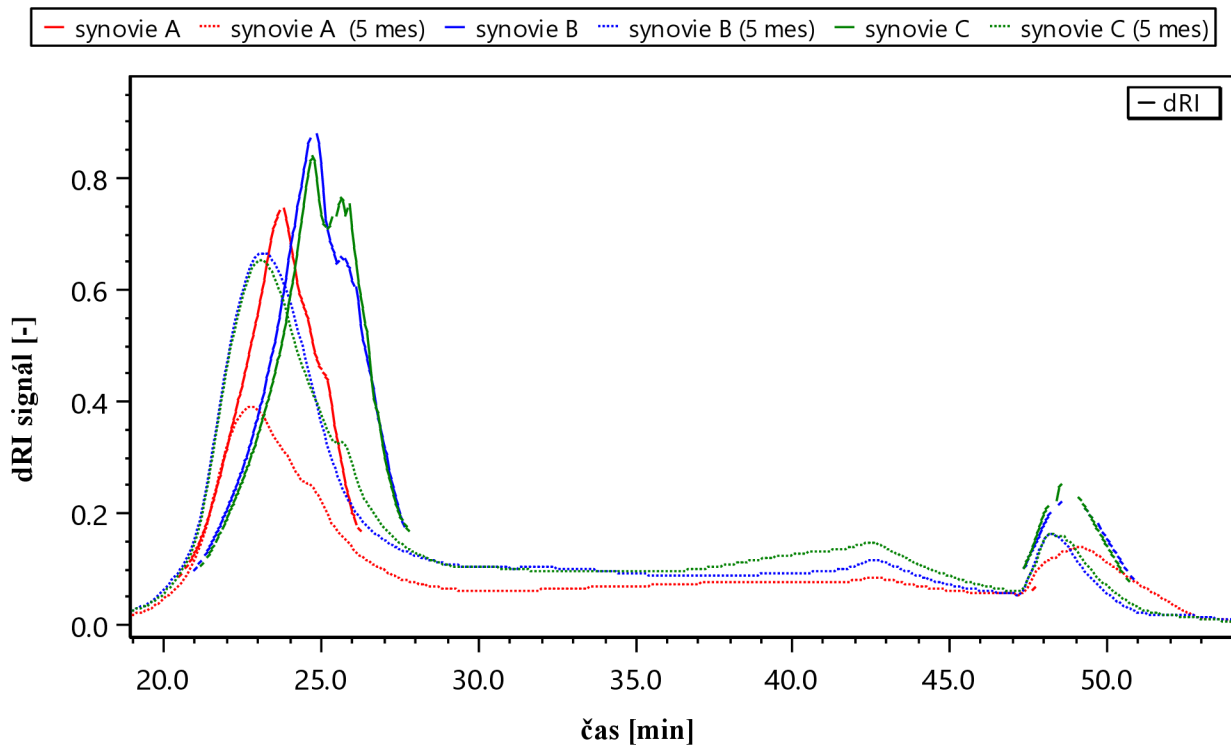
Obrázek 35: Závislost Rayleighova poměru na čase



Obrázek 36: Závislost Rayleighova poměru na čase (přiblížení předchozího grafu)

Z Obrázek 36, který představuje výřez Obrázek 35 v oblasti fraktogramů odpovídajícím distribuci hyaluronanu a větších agregátů, je zřejmé, že již v případě nově připraveného vzorku A je možné pozorovat výrazné rozdíly hlavně v oblasti mezi 40. a 53. minutou. Zde je třeba také zmínit fakt, že před analýzou bylo nutné vzorky zfiltrovat, což by mohlo naznačovat, že v případě vzorku A byly částice agregovány do větších shluků, které byly odfiltrovány, a proto je signál v této části fraktogramu méně intenzivní. Toto pozorování je v souladu s výsledky tokových testů z makroreologického porovnání synoviálních kapalin, kde byla pozorována u vzorku A výrazně vyšší dynamická viskozita, a to jak v případě čerstvého vzorku, tak v případě vzorku starého 5 měsíců od přípravy, což by potvrdovalo přítomnost větších agregátů či shluků ve vzorku A.

Pro ověření této domněnky, byly sledovány rovněž změny v distribuci hmoty pomocí dRI detektoru. Z Obrázek 37 byly potvrzeny závěry pozorované měřením Rayleighova poměru, kdy v oblasti piku hyaluronanu a agregátů (cca mezi 35–55. minutou ve fraktogramu) je zřejmá rozdílná distribuce hmoty ve vzorcích. U synovií A byla v této oblasti detekována výrazně nižší koncentrace, což naznačuje přítomnost větších agregátů v tomto vzorku synovie, které byly následně před analýzou odfiltrovány (použit stříkačkový filtr o velikosti pórů 5  $\mu\text{m}$ ).



Obrázek 37: Časový záznam distribuce hmoty v uměle vytvořených vzorcích

Tabulka 6: Výstup AF4-MALS

vzorek	1. pík		2. pík	
	Mw [kDa]	Mw [kDa]	Mw [kDa]	PDI [-]
A (čerstvě namíchaný)	(67,77 ±0,25)	(1427,10 ±74,77)	(5,68 ±0,30)	
A (5 měsíců starý)	(64,75 ±0,25)	(215,20 ±16,90)	(2,01 ±0,12)	
B (čerstvě namíchaný)	(67,67 ±0,42)	(1314,80 ±72,40)	(2,85 ±0,59)	
B (5 měsíců starý)	(64,30 ±0,60)	(405,40 ±3,20)	(1,59 ±0,06)	
C (čerstvě namíchaný)	(67,47 ±0,31)	(1326,13 ±88,26)	(3,69 ±0,22)	
C (5 měsíců starý)	(65,8 ±0,90)	(554,6 ±12,30)	(2,96 ±0,03)	

Dle Tabulka 6 je patrné, že první pík je shodný pro všechny vzorky. Tato hodnota Mw odpovídá albuminu. 2.pík se u jednotlivých vzorků liší. Je možno pozorovat klesající trend polydisperzity (PDI) od vzorku A k C, což znamená, že v modifikovaných vzorcích jsou částice uniformnější a lépe provázané než v nemodifikovaném vzorku A. To potvrzuje fakt, že vzorky B, C jsou oproti vzorku A modifikovány, proto je jejich základní skelet zaujímá jinou konformaci.

Po 5 měsících se hodnoty píku pro albumin téměř nezměnily, oproti tomu byla zaznamenána výrazná změna u druhého píku. U vzorku A byla molekulová hmotnost určena na (215,20 ±16,90) kDa, což patrně odpovídá zbytkové molekulové hmotnosti hyaluronanu. Ve vzorku je ovšem přítomno více větších agregátů částic, které přesahovaly detekční limit. Zároveň byly tyto větší fragmenty významně zachyceny na filtru při přípravě vzorku pro analýzu, což je zřejmé z výrazného poklesu koncentrace u vzorku A měřeného po 5 měsících od přípravy. U vzorku B a C byla určena hodnota molekulové hmotnosti 2. píku na (405,40 ±3,20) kDa pro B a (554,6 ±12,30) kDa pro vzorek C. Zároveň v oblasti píku odpovídajícím hyaluronanu a větším agregátům byl detekován menší pokles v distribuci hmoty oproti nově připraveným vzorkům těchto synoviálních kapalin. Z naměřených hodnot tedy jasně vyplývají rozdíly v pozorovaných charakteristikách po 5 měsících od přípravy, což naznačuje rozdílnou stabilitu synoviální kapaliny A a zbylých dvou vzorků (B a C) připravených z modifikovaného hyaluronanu.

#### 6.4 Srovnání umělé synovie se vzorkem reálné synoviální kapaliny a přípravkem Orthovisc®

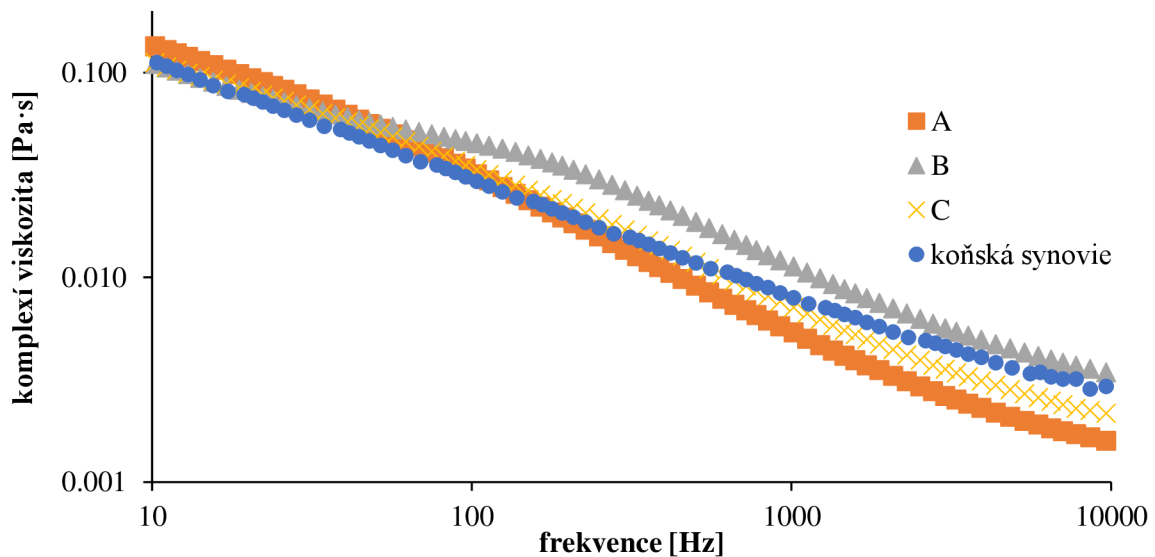
V této části práce byly připravené vzorky umělých synoviálních kapalin porovnány jednak se vzorkem reálné synoviální kapaliny (pro tyto účely využit reálný vzorek koňské synoviální kapaliny naměřen v rámci předchozí bakalářské práce [93]) a následně také s přípravkem Orthovisc®. Srovnávací testy byly provedeny pomocí mikroreologicky stanovených viskoelastických modulů a komplexní viskozity a v případě přípravy Orthovisc® byla rovněž využita metoda AF4-MALS.

### 6.4.1 Srovnání s reálnou koňskou synovií

Připravené umělé synovie byly porovnány s reálným vzorkem koňské synovie proměřeným v rámci předchozí bakalářské práce [93].

#### Mikroreologické porovnání

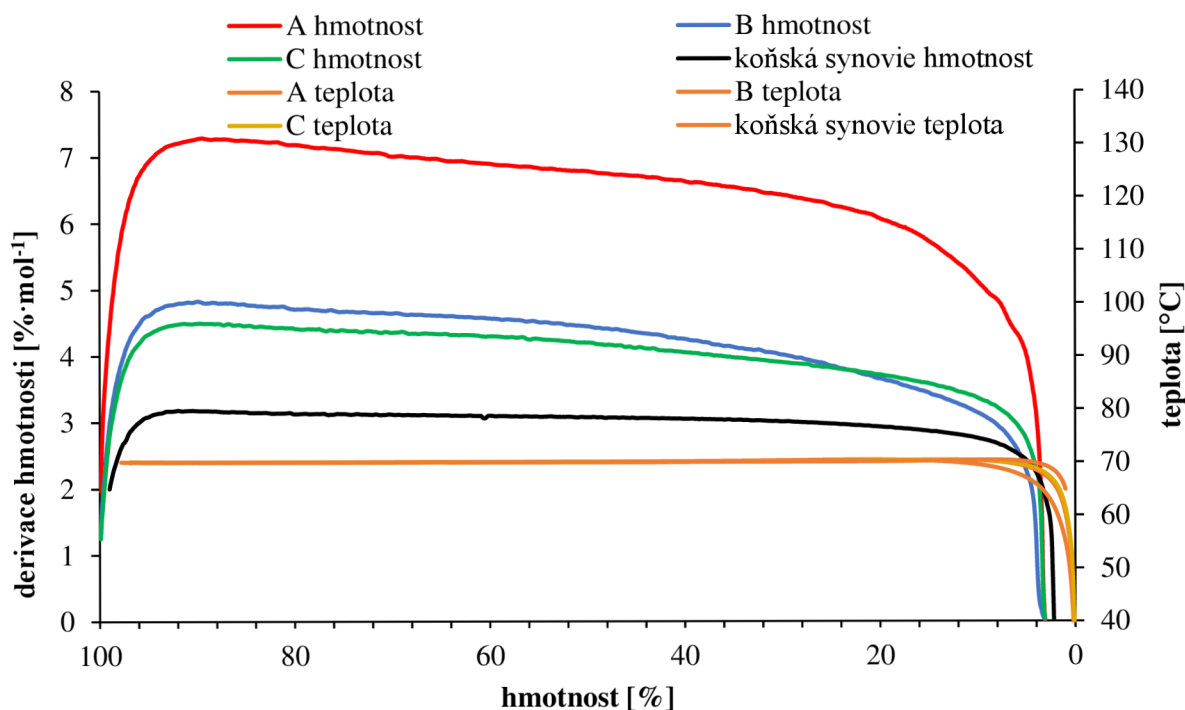
Z Obrázek 38 níže není možno při nižších frekvencích posoudit rozdíly mezi jednotlivými vzorky. Při vyšších frekvencích je možno určit největší shodu mezi reálnou koňskou synovií a umělým vzorkem C.



Obrázek 38: Srovnání komplexních viskozit umělých vzorků a reálné koňské synovie

#### Termogravimetrická analýza

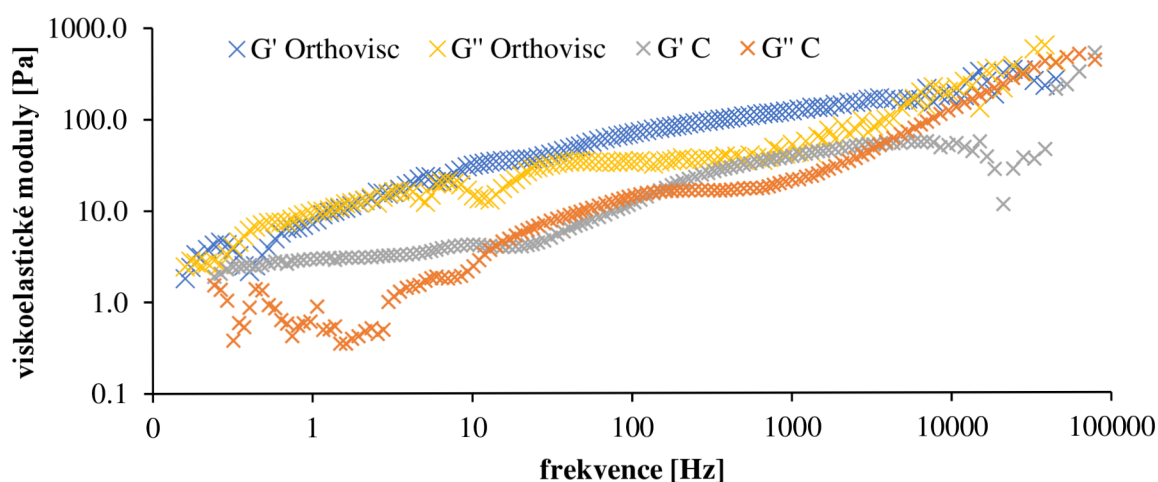
Z Obrázek 39 jsou patrné rozdíly mezi reálným vzorkem a jednotlivými umělými vzorky. Funkce, jejichž průběh je rovnoběžný s hlavní vodorovnou osou, představují odpar z volné vodní hladiny. Tento trend je možno pozorovat u reálného vzorku koňské synovie a velmi podobný trend vykazují modifikované synovie B a C. Obrázek 39 poukazuje na pozitivní přínos modifikace hyaluronanových řetězců (ve smyslu přiblížení se reálným hodnotám) oproti nemodifikované synovii A.



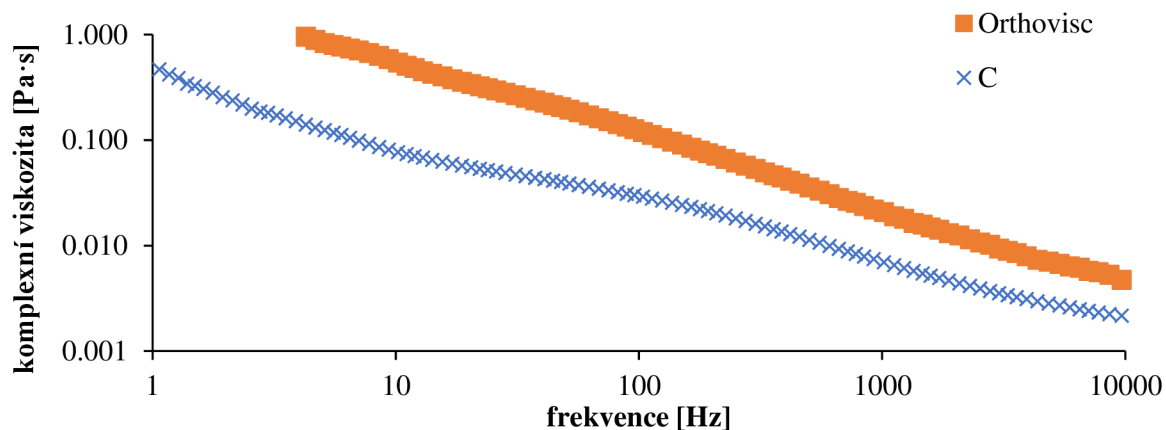
Obrázek 39: Derivační termogravimetrická analýza umělých vzorků a reálné koňské synovie

#### 6.4.2 Srovnání s umělým přípravkem Orthovisc®

Pro porovnání byly použity viskoelastické moduly a komplexní viskozita při obou teplotách (25  $^{\circ}\text{C}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$ ). Nižší uvedený Obrázek 40 určil velmi podobný trend pro křivky umělé synovie (modifikovaný vzorek C s chondroitin sulfátem) a Orthoviscu®. Rozdíl mezi těmito kapalinami tvoří jejich makroskopická povaha. Orthovisc® chováním připomíná tekutý gel (tužší med), oproti tomu umělá synovie svou tekutostí připomíná neodtučněné mléko. Proto Orthovisc® nabývá vyšších hodnot (je tužší, gelovější). Přesto jsou takto odlišné materiály schopny poskytovat velmi podobné výsledky. Takto naměřené hodnoty potvrdilo měření komplexní viskozity (Obrázek 41). Při 25  $^{\circ}\text{C}$  byly pozorovány stejné trendy.



Obrázek 40: Porovnání viskoelastických modulů umělého vzorku C a přípravku Orthovisc®



Obrázek 41: Srovnání komplexních viskozit umělého vzorku C a přípravku Orthovisc® při 37 °C

Přípravek Orthovisc® obsahuje dle příbalové informace hyaluronan sodný, ale dle popisu je efekt tohoto volně prodejného přípravku v injekční aplikaci srovnatelný s komplexní synoviální matricí.

Tabulka 7: Charakterizace Orthoviscu pomocí AF4-MALS

vzorek	Mw [kDa]	PDI [-]
Orthovisc®	(1392,6 ±14,6)	(1,47 ±0,23)

Dle Tabulka 7: Charakterizace Orthoviscu pomocí AF4-MALS je patrné, že molekulová hmotnost odpovídá hyaluronanu používanému pro přípravu umělých synoviálních kapalin. Ze získaného fraktogramu naměřeného pomocí AF4-MALS je bylo zřejmé, že složení bylo uniformní a přípravek obsahoval pouze hyaluronan bez dalších příměsí.

## 7 ZÁVĚR A DISKUZE

Tato diplomová práce si klade za cíl modifikování struktury hyaluronanu používaného pro přípravu umělého synoviálního kapalin. Postup přípravy optimalizovaný v rámci předešlé bakalářské práce [93] byl upraven pro dosažení výsledků více odpovídajících reálné synoviální kapalině.

Prvním cílem této práce byla poměrně obsáhlá rešerše možností modifikace hyaluronanu sodného pro aplikaci v rámci synoviálních kapalin. V rámci rešerše byly jako hlavní technologické problémy zdůrazněny enzymatické vlivy a časová nestabilita umělé matrice. Na základě rešerše byla nejvhodnější metodou zvolena modifikace hyaluronanu pomocí aminokyseliny alaninu. Výhodou modifikace biomolekul pomocí aminokyselin je jejich přirozený výskyt v organismu. Degradací takto upravené umělé kapaliny jsou tělu známy a nevyvolávají tvorbu nežádoucích produktů, které by mohly vyvolat nadměrnou imunitní odezvu. Chondroitin sulfát byl zvolen jako další prvek pro zlepšení vlastností umělé synovie, protože je dle literatury schopen vázat vodu a napomáhá tak odolnosti umělé matrice vůči mechanickému namáhání. Na základě těchto poznatků byly připraveny tři vzorky umělé synovie. První vzorek A umělé kapaliny obsahoval hyaluronan bez jakékoli modifikace. Druhý vzorek B obsahoval hyaluronan modifikovaný pomocí aminokyseliny alaninu a třetí vzorek C obsahoval modifikovaný hyaluronan a chondroitin sulfát.

Dalším z cílů bylo prostudování stability připravených vzorků. Ta byla posuzována z hlediska enzymatického a časového. Enzymatická stabilita byla proměřena za použití hyaluronidázy a barviva Stain-all pomocí UV-VIS spektrofotometru. Měření poklesu absorbance v závislosti na čase (po aplikaci enzymu) a jeho přepočtu na relativní pokles absorbance bylo možno dopočítat rychlostní konstanty degradace jednotlivých vzorků A, B, C. Nejvyšší hodnota rychlostní konstanty byla určena pro vzorek A. To znamená, že sklon jeho regresní přímky byl největší, a tudíž u tohoto vzorku degradace probíhala nejrychleji. Následně byla dle očekávání nejmenší hodnota rychlostní konstanty dopočítána pro vzorek C (5,8 krát menší hodnota než u vzorku A a 3,7 krát menší než u vzorku B). Tento vzorek byl vyhodnocen jako nejodolnější vůči působení enzymu hyaluronidázy. Časová stabilita byla vyhodnocena pomocí DLS mikrorheologie, makrorheologie a víceúhlového rozptylu světla spojeného s asymetrickou frakcionací polem (AF4-MALS).

Mikrorheologická měření byla vyhodnocena pomocí stanovení komplexní viskozity vzorku a viskoelastických modulů. Komplexní viskozita se u modifikovaných vzorků ustanovila na mírně vyšších hodnotách, než byly naměřeny u čerstvě namíchaných vzorků. Oproti tomu je možno pozorovat pokles viskozity nemodifikovaného vzorku A. Z měření viskoelastických modulů byly vybrány mezní hodnoty frekvencí (10 a 1000 Hz) odpovídající extrémům namáhání reálného kloubního aparátu. Tyto hodnoty po proložení spojnicí trendu poukázaly na rozdíly mezi jednotlivými vzorky. U vzorku A došlo k nárůstu viskózního modulu, a naopak poklesu elastického modulu. To značí, že nemodifikovaný vzorek A ztrácí pevnost a je více tekutý. U vzorku B a C byl pozorován vzájemně srovnatelný trend. Směrnice jejich přímků byla velmi malá u obou modulů, tudíž je možno říci, že v závislosti na čase vzorky B a C neztráceli viskózní ani elastický charakter.

Další metodou pro vyhodnocení časové stability byla makrorheologie. Zde byly stanoveny oscilační (amplitudové, frekvenční) a tokové testy. U amplitudových testů byl zaznamenán pokles komplexního modulu u vzorku C. Komplexní modul se skládá z viskózního a elastického modulu, tudíž ke změně



mohlo dojít u jedné nebo obou proměnných. Proto byly použity frekvenční testy. Zde byl určen nejnižší viskózní modul pro vzorek C, a naopak odlišnost jeho trendu elastického modulu v porovnání se vzorky A a B s časovým rozestupem měření 3 měsíců. Výsledky frekvenčních testů určily vzorek C jako nejméně kapalný, tudíž je možno očekávat, že bude nejméně ochotně podléhat změnám vyvolaným silovým působením na jednotlivé vzorky. Poslední částí makroreologického sledování stability vzorků umělého synoviálního kapalin byly tokové testy. Tyto testy představují závislost viskozity vzorků na smykové rychlosti. U vzorku A došlo k výraznějšímu poklesu viskozity než u modifikovaných vzorků B a C. Při nižších smykových rychlostech vykazovaly všechny materiály pokles viskozity, což odpovídá předpokladu pseudoplastického charakteru. Při vyšších smykových rychlostech byla viskozita všech vzorků téměř konstantní, což znamená, že vykazovaly chování Newtonovských kapalin. Tento výsledek je žádoucí, protože v rámci pohybu působí synoviální kapalina i kloub jako provázaná soustava. Při nižším namáhání poskytuje ochranu kloubu proti poškození samotná synovie, která je schopná v mikroskopickém měřítku kompenzovat namáhání kloubu. Při větším namáhání dochází k profiltrování synovie skrz póry do chrupavky, čímž dojde k jejímu zpevnění. Proto je žádoucí, aby synovie při vyšších rychlostech vykazovaly chování Newtonovské kapaliny.

V rámci víceúhlového rozptylu světla spojeného s frakcionací tokem pole byl stanoven Rayleighův poměr popisující agregáční chování vzorků a koncentrační dRI signál definující distribuci hmoty ve vzorcích. Vzorky byly před měřením zfiltrovány (velikost pórů 5 μm, z důvodu ochrany membrány v přístroji). Nejnižší intenzity v distribuci Rayleighova poměru byly určeny pro vzorek A. Tento výsledek poukazoval na možnost přítomnosti agregátů, které byly před samotným měřením odfiltrovány. Vzorek B a C vykazoval vyšší hodnoty v intenzitách Rayleighova poměru, proto je možné tvrdit, že množství agregátů v těchto vzorcích bylo nižší než u vzorku A. Tato hypotéza byla potvrzena pomocí koncentračního dRI signálu, kde u vzorku A byly detekovány výrazně nižší hodnoty, což potvrdilo přítomnost agregátů a rovněž v časovém horizontu došlo k významnějším změnám v distribuci hmoty. Z hlediska polydisperzitivního indexu byla nejmenší změna určena u vzorku C, proto je možno tvrdit, že u něj byla stanovena nejnižší tendence agregovat oproti vzorku A nebo B.

Dalším z cílů bylo porovnání umělého vzorku s reálnou synoviální kapalinou. Pro tyto účely byl použit vzorek reálné koňské synovie proměřený v rámci předešlé bakalářské práce a volně dostupný viskosuplement Orthovisc®. Vzorky byly porovnávány mikreologicky a termogravimetricky.

Mikreologické měření komplexní viskozity určilo vzorek C jako nejvíce podobný reálné koňské synovii. Stejný závěr potvrdila i izotermická termogravimetrie. Průběh funkce odpovídající derivaci hmotnosti v čase byl nejvíce podobný mezi koňskou synovií a vzorkem C. Z měření je patrné, že v reálné synovii způsob vazby jednotlivých funkčních komponent (voda, organická a anorganická část) odpovídal z připravených umělých kapalin nejvíce vzorku C.

Při porovnání umělého vzorku C a Orthoviscu® byl pozorován rozdíl již při vizuálním porovnání a manipulaci se vzorkem. Orthovisc® svou tuhostí připomínal pastu, zatímco synovie lze připodobnit k velmi zředěnému medu. Proto byly i naměřené hodnoty viskoelastických modulů a komplexní viskozity vyšší u Orthoviscu®. Velkou výhodou synovií oproti Orthoviscu® je jejich komplexní charakter. Orthovisc® obsahuje pouze hyaluronan, proto jsou umělé synoviální kapaliny jako

komplexní matrice vhodnější pro aplikaci do kloubů než přípravek Orthovisc®, který obsahuje pouze jednu jejich funkční komponentu.

Ze získaných dat je možno říct, že modifikace hyaluronanu měla pozitivní vliv na chování celé umělé synoviální kapaliny. Nejlepších výsledků dosahoval vzorek C, který obsahoval modifikovaný hyaluronan a chondroitin sulfát. Vzorek B nedosahoval tak dobrých výsledků jako vzorek C, ale byl lepší než vzorek A bez modifikace hyaluronanu. Viskosuplementy volně dostupné na trhu jako zde používaný Orthovisc® nedokážou poskytnout komplexní funkční náhradu a jejich přínos je s umělou synoviální maticí nesrovnatelný. Výhodou umělé synoviální kapaliny je její komplexnost. Dokáže viskoelasticky napodobit reálnou synoviální kapalinu a její obohacení chondroitin sulfátem má krom předpokládaného vlivu na regeneraci chondrocytů význam pro stabilitu a zlepšení mechanických vlastností celé matrice.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] ELIŠKOVÁ, Miloslava a Ondřej NAŇKA. Přehled anatomie. 2. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1216-X
- [2] DUNGL, Pavel. Ortopedie. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada Publishing, 2014. ISBN 9788024793375
- [3] ČIHÁK, Radomír. Anatomie. Třetí, upravené a doplněné vydání. Praha: Grada, 2016. ISBN 978-80-247-4788-0
- [4] JEROSCH, Jörg. Effects of Glucosamine and Chondroitin Sulfate on Cartilage Metabolism in OA: Outlook on Other Nutrient Partners Especially Omega-3 Fatty Acids. *International Journal of Rheumatology*. 2011, 2011(1), 1-17. ISSN 1687-9260. Dostupné z: doi:10.1155/2011/969012
- [5] TAMER, Tamer Mahmoud. Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing. *Interdisciplinary Toxicology*. 2013, 6(3), 111-125. ISSN 1337-9569. Dostupné z: doi:10.2478/intox-2013-0019
- [6] PREKASAN, D. a K.K. SAJU. Review of the Tribological Characteristics of Synovial Fluid. *Procedia Technology*. 2016, 25(5), 1170-1174. ISSN 22120173. Dostupné z: doi:10.1016/j.protcy.2016.08.235
- [7] ANDRYSIAK, Tomasz, Piotr BELDOWSKI, Jacek SIÓDMIĄK, Piotr WEBER a Damian LEDZIŃSKI. Hyaluronan-Chondroitin Sulfate Anomalous Crosslinking Due to Temperature Changes. *Polymers*. 2018, 10(5), 2-5. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym10050560
- [8] TEMPLE-WONG, Michele M., Shuwen REN, Phu QUACH, et al. Hyaluronan concentration and size distribution in human knee synovial fluid: variations with age and cartilage degeneration. *Arthritis Research & Therapy*. 2016, 18(1), 7-8. ISSN 1478-6362. Dostupné z: doi:10.1186/s13075-016-0922-4
- [9] KOSINSKA, Marta Krystyna, Gerhard LIEBISCH, Guenter LOCHNIT, et al. A Lipidomic Study of Phospholipid Classes and Species in Human Synovial Fluid. *ARTHRITIS & RHEUMATISM*. 2013, 65(9), 2323-2333. ISSN 00043591. Dostupné z: doi:10.1002/art.38053
- [10] GLYN-JONES, S, A J R PALMER, R AGRICOLA, A J PRICE, T L VINCENT, H WEINANS a A J CARR. Osteoarthritis. *The Lancet*. 2015, 386(9991), 376-387. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(14)60802-3
- [11] MOLL, J.M.H. a V. WRIGHT. Psoriatic arthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 1973, 3(1), 55-78. ISSN 00490172. Dostupné z: doi:10.1016/0049-0172(73)90035-8
- [12] GOLDENBERG, Don L. Septic arthritis. *The Lancet*. 1998, 351(9097), 197-202. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(97)09522-6

- [13] BALAZS, Endke A., Donald WATSON, Ivan F. DUFF a Saul ROSEMAN. Hyaluronic acid in synovial fluid. I. Molecular parameters of hyaluronic acid in normal and arthritic human fluids. *ARTHRITIS AND RHEUMATIS*. 1967, **10**(4), 357-376. ISSN 00043591. Dostupné z: doi:10.1002/art.1780100407
- [14] DAHL, L B, I M DAHL, A ENGSTROM-LAURENT a K GRANATH. Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1985, **44**(12), 817-822. ISSN 0003-4967. Dostupné z: doi:10.1136/ard.44.12.817
- [15] LAMOUREUX, François, Marc BAUD'HUIN, Laurence DUPLOMB, Dominique HEYMANN a Françoise RÉDINI. Proteoglycans: key partners in bone cell biology. *BioEssays*. 2007, **29**(8), 758-771. ISSN 02659247. Dostupné z: doi:10.1002/bies.20612
- [16] KUMARI, Asha. Mucopolysaccharidoses. *Sweet Biochemistry*. Elsevier, 2018, 2018, **5**(2), 75-84. ISBN 9780128144534. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814453-4.00015-7
- [17] MURRAY, Robert K. *Harperova ilustrovaná biochemie*. 5. české vyd., 1. v nakl. Galén. Praha: Galén, c2012. ISBN 978-80-7262-907-7.
- [18] ULDBJERG, N, A MALMSTRÖM, G EKMAN, J SHEEHAN, U ULMSTEN a L WINGERUP. Isolation and characterization of dermatan sulphate proteoglycan from human uterine cervix. *Biochemical Journal*. 1983, **209**(2), 497-503. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj2090497
- [19] TROWBRIDGE, J. M. a R. L. GALLO. Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. *Glycobiology*. 2002, **12**(9), 117R-125R. ISSN 0959-6658. Dostupné z: doi:10.1093/glycob/cwf066
- [20] DUESBERG, P. H. Cancer genes: rare recombinants instead of activated oncogenes (a review). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1987, **84**(8), 2117-2124. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.84.8.2117
- [21] MIYAMOTO, Tsutomu, Keiko ISHII, Ryouichi ASAKA, Akihisa SUZUKI, Akiko TAKATSU, Hiroyasu KASHIMA a Tanri SHIOZAWA. Immunohistochemical expression of keratan sulfate: a possible diagnostic marker for carcinomas of the female genital tract. *Journal of Clinical Pathology*. 2011, **64**(12), 1058-1063. ISSN 0021-9746. Dostupné z: doi:10.1136/jclinpath-2011-200231
- [22] POMIN, Vitor H. Keratan sulfate: An up-to-date review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015, **72**(3), 282-289. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.08.029
- [23] HAYASHI, Masatoshi, Kenji KADOMATSU a Naoki ISHIGURO. Keratan sulfate suppresses cartilage damage and ameliorates inflammation in an experimental mice arthritis

model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010, **401**(3), 463-468. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2010.09.082

- [24] GRIFFIN, Charles C., Robert J. LINHARDT, Cornelius L. VAN GORP, Toshihiko TOIDA, Ronald E. HILEMAN, Robert L. SCHUBERT a Sharon E. BROWN. Isolation and characterization of heparan sulfate from crude porcine intestinal mucosal peptidoglycan heparin. *Carbohydrate Research*. 1995, **276**(1), 183-197. ISSN 00086215. Dostupné z: doi:10.1016/0008-6215(95)00166-Q
- [25] WEISS, Ryan J., Jeffrey D. ESKO a Yitzhak TOR. Targeting heparin and heparan sulfate protein interactions. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2017, **15**(27), 5656-5668. ISSN 1477-0520. Dostupné z: doi:10.1039/C7OB01058C
- [26] HANDLEY, C, D LOWTHER a D MCQUILLAN. Mini-review: The structure and synthesis of proteoglycans of articular cartilage. *Cell Biology International Reports*. 1985, **9**(9), 753-782. ISSN 03091651. Dostupné z:doi:10.1016/0309-1651(85)90095-5
- [27] VOLPI, Nicola, Juergen SCHILLER, Robert STERN a Ladislav SOLTES. Role, Metabolism, Chemical Modifications and Applications of Hyaluronan. *Current Medicinal Chemistry*. 2009, **16**(14), 1718-1745. ISSN 09298673. Dostupné z: doi:10.2174/092986709788186138
- [28] KOGAN, Grigorij, Ladislav ŠOLTÉS, Robert STERN, Jürgen SCHILLER a Raniero MENDICHI. Hyaluronic Acid: Its Function and Degradation in in vivo Systems. *Bioactive Natural Products (Part N)*. Elsevier, 2008, 2008, **34**(2), 789-882. Studies in Natural Products Chemistry. ISBN 9780444531803. Dostupné z: doi:10.1016/S1572-5995(08)80035-X
- [29] DE OLIVEIRA, Juliana Davies, Lucas Silva CARVALHO, Antônio Milton Vieira GOMES, Lúcio Rezende QUEIROZ, Beatriz Simas MAGALHÃES a Nádia Skorupa PARACHIN. Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. *Microbial Cell Factories*. 2016, **15**(1), 1-19. ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/s12934-016-0517-4
- [30] DICKER, Kevin T., Lisa A. GURSKI, Swati PRADHAN-BHATT, Robert L. WITT, Mary C. FARACH-CARSON a Xinqiao JIA. Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomaterialia*. 2014, **10**(4), 1558-1570. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2013.12.019
- [31] MISRA, Suniti, Vincent C. HASCALL, Roger R. MARKWALD a Shibnath GHATAK. Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer. *Frontiers in Immunology*. 2015, **6**(2), 1-31. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2015.00201
- [32] PREHM, P. Hyaluronate is synthesized at plasma membranes. *Biochemical Journal*. 1984, **220**(2), 597-600. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj2200597

- [33] LAURENT, Ulla B.G. a Rolf K. REED. Turnover of hyaluronan in the tissues. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1991, **7**(2), 237-256. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/0169-409X(91)90004-V
- [34] PRIETO, J.G., M.M. PULIDO, J. ZAPICO, A.J. MOLINA, M. GIMENO, P. CORONEL a A.I. ALVAREZ. Comparative study of hyaluronic derivatives: rheological behaviour, mechanical and chemical degradation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2005, **35**(1-2), 63-69. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2004.12.003
- [35] BELDA, José I., Alberto ARTOLA, María D. GARCÍA-MANZANARES, et al. Hyaluronic acid combined with mannitol to improve protection against free-radical endothelial damage: Experimental Model. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*. 2005, **31**(6), 1213-1218. ISSN 0886-3350. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcrs.2004.11.055
- [36] SENBANJO, Linda T. a Meenakshi A. CHELLAIAH. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2017, **5**(2), 1-6. ISSN 2296-634X. Dostupné z: doi:10.3389/fcell.2017.00018
- [37] STERN, Robert a Mark J. JEDRZEJAS. Hyaluronidases: Their Genomics, Structures, and Mechanisms of Action. *Chemical Reviews*. 2006, **106**(3), 818-839. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr050247k
- [38] BORDON, Karla C F, Gisele A. WIEZEL, Fernanda G. AMORIM a Eliane C. ARANTES. Arthropod venom Hyaluronidases: biochemical properties and potential applications in medicine and biotechnology. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2015, **21**(1), 1-12. ISSN 1678-9199. Dostupné z: doi:10.1186/s40409-015-0042-7
- [39] FROST, Gregory I. a Robert STERN. A Microtiter-Based Assay for Hyaluronidase Activity Not Requiring Specialized Reagents. *Analytical Biochemistry*. 1997, **251**(2), 263-269. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1006/abio.1997.2262
- [40] LI, Min, Louis ROSENFELD, Rolondo E. VILAR a Mary K. COWMAN. Degradation of Hyaluronan by Peroxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1997, **341**(2), 245-250. ISSN 00039861. Dostupné z: doi:10.1006/abbi.1997.9970
- [41] RAMAMURTHI, Anand a Ivan VESELY. Ultraviolet light-induced modification of crosslinked hyaluronan gels. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2003, **66A**(2), 317-329. ISSN 0021-9304. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.10588
- [42] LIU, Yanchun, Xiao ZHENG SHU a Glenn D. PRESTWICH. Biocompatibility and stability of disulfide-crosslinked hyaluronan films. *Biomaterials*. 2005, **26**(23), 4737-4746. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2005.01.003
- [43] CAMPOCCIA, D. Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. *Biomaterials*. 1998, **19**(23), 2101-2127. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(98)00042-8

- [44] PRESTWICH, Glenn D, Dale M MARECAK, James F MARECEK, Koen P VERCRUYSSÉ a Michael R ZIEBELL. Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. *Journal of Controlled Release*. 1998, **53**(1-3), 93-103. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-3659(97)00242-3
- [45] LEE, Ho-Yong, Chang-Ha HWANG, Hyoun-Ee KIM a Seol-Ha JEONG. Enhancement of bio-stability and mechanical properties of hyaluronic acid hydrogels by tannic acid treatment. *Carbohydrate Polymers*. 2018, **186**(2), 290-298. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2018.01.056
- [46] KANTH, Ravi a Reddy NAGESHWAR. Role of matrix metalloproteinases in physiological processes & disease. *The Indian journal of medical research*. 2014, **140**(5), 585-587.
- [47] PAVAN, Mauro, Devis GALESSO, Cynthia SECCHIERI a Cristian GUARISE. Hyaluronic acid alkyl derivative: A novel inhibitor of metalloproteases and hyaluronidases. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016, **84**(5), 221-226. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.12.003
- [48] WEINBERGER, Vít and Igor CRHA. Hojení peritonea, tvorba adhezí a možnosti jejich prevence (Peritoneal healing, adhesions and their preventionPraP). *Praktická gynekologie*. Praha: Medica Publishing, 2005, vol. 2005, No 1, p. 9-12. ISSN 1211-6645.
- [49] *Ortopedie*. 12. 2018. ISSN 1802-1727.
- [50] TAKAHASHI, Tomoko, Mayumi IKEGAMI-KAWAI, Ryozeu OKUDA a Kaori SUZUKI. A fluorimetric Morgan–Elson assay method for hyaluronidase activity. *Analytical Biochemistry*. 2003, **322**(2), 257-263. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2003.08.005
- [51] NAWY, Susan Stair, Antonei B CSÓKA, Kazuhiro MIO a Robert STERN. Hyaluronidase Activity and Hyaluronidase Inhibitors: Assay Using a Microtiter-Based System. *Proteoglycan Protocols*. New Jersey: Humana Press, 2001, **8**(2), 383-389. ISBN 1-59259-209-0. Dostupné z: doi:10.1385/1-59259-209-0:383
- [52] MAYER, G. Hyaluronidase in Ocular Tissues: I. Sensitive Biological Assay for Small Concentrations of Hyaluronidase. *British Journal of Ophthalmology*. 1955, **39**(12), 747-750. ISSN 0007-1161. Dostupné z: doi:10.1136/bjo.39.12.747
- [53] KASS, E. H. a C. V. SEASTONE. THE RÔLE OF THE MUCOID POLYSACCHARIDE (HYALURONIC ACID) IN THE VIRULENCE OF GROUP A HEMOLYTIC STREPTOCOCCI. *Journal of Experimental Medicine*. 1944, **79**(3), 319-330. ISSN 1540-9538. Dostupné z: doi:10.1084/jem.79.3.319
- [54] OXLUND, Hans, Jan MANSCHOT a A. VIIDIK. The role of elastin in the mechanical properties of skin. *Journal of Biomechanics*. 1988, **21**(3), 213-218. ISSN 00219290. Dostupné z: doi:10.1016/0021-9290(88)90172-8

- [55] SUDHA, Prasad N. a Maximas H. ROSE. Beneficial Effects of Hyaluronic Acid. *Marine Carbohydrates: Fundamentals and Applications, Part A*. Elsevier, 2014, 2014, **72**(2), 137-176. Advances in Food and Nutrition Research. ISBN 9780128002698. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800269-8.00009-9
- [56] HOFFMANN, Andrea, Jessica Lynn HOING, Mackenzie NEWMAN a Richard SIMMAN. Role of Hyaluronic Acid Treatment in the Prevention of Keloid Scarring. *Journal of the American College of Clinical Wound Specialists*. 2012, **4**(2), 23-31. ISSN 22135103. Dostupné z: doi:10.1016/j.jccw.2013.06.001
- [57] TAN, KT, DA MCGROUTHER, AJ DAY, CM MILNER a A BAYAT. Characterization of hyaluronan and TSG-6 in skin scarring: differential distribution in keloid scars, normal scars and unscarred skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2011, **25**(3), 317-327. ISSN 0926-9959. Dostupné z: doi:10.1111/j.1468-3083.2010.03792.x
- [58] VAZQUEZ, J.R., Brian SHORT, Andrew H. FINDLOW, Brent P. NIXON, Andrew J.M. BOULTON a David G. ARMSTRONG. Outcomes of hyaluronan therapy in diabetic foot wounds. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2003, **59**(2), 123-127. ISSN 01688227. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-8227(02)00197-3
- [59] JIANG, Dianhua, Jiurong LIANG a Paul W. NOBLE. Hyaluronan as an Immune Regulator in Human Diseases. *Physiological Reviews*. 2011, **91**(1), 221-264. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00052.2009
- [60] KIM, Jin, Myeong MOON, Dong KIM, Suk HEO a Yong JEONG. Hyaluronic Acid-Based Nanomaterials for Cancer Therapy. *Polymers*. 2018, **10**(10), 1-15. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym10101133
- [61] LEE, So Yun, Moon Sung KANG, Woo Yeup JEONG, Dong-Wook HAN a Ki Su KIM. Hyaluronic Acid-Based Theranostic Nanomedicines for Targeted Cancer Therapy. *Cancers*. 2020, **12**(4), 1-17. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers12040940
- [62] OLIVEIRA, Marcello Zaia, Mauro Batista ALBANO, Mario Massatomo NAMBA, Luiz Antônio Munhoz da CUNHA, Renan Rodrigues de Lima GONÇALVES, Edvaldo Silva TRINDADE, Lucas Ferrari ANDRADE a Leandro VIDIGAL. Efeito dos ácidos hialurônicos como condroprotetores em modelo experimental de osteoartrose. *Revista Brasileira de Ortopedia*. 2014, **49**(1), 62-68. ISSN 01023616. Dostupné z: doi:10.1016/j.rbo.2013.04.006
- [63] BAUER, Christoph, Eugenia NICULESCU-MORZSA, Vivek JEYAKUMAR, Daniela KERN, Stephan S. SPÄTH a Stefan NEHRER. Chondroprotective effect of high-molecular-weight hyaluronic acid on osteoarthritic chondrocytes in a co-cultivation inflammation model with M1 macrophages. *Journal of Inflammation*. 2016, **13**(1), 1-9. ISSN 1476-9255. Dostupné z: doi:10.1186/s12950-016-0139-y
- [64] BOWMAN, Steven, Mohamed E. AWAD, Mark W. HAMRICK, Monte HUNTER a Sadanand FULZELE. Recent advances in hyaluronic acid based therapy for



osteoarthritis. *Clinical and Translational Medicine*. 2018, **7**(1), 1-11. ISSN 2001-1326. Dostupné z: doi:10.1186/s40169-017-0180-3

- [65] CHRISTOFFERSSON, Jonas, Christopher ARONSSON, Michael JURY, Robert SELEGÅRD, Daniel AILI a Carl-Fredrik MANDENIUS. Fabrication of modular hyaluronan-PEG hydrogels to support 3D cultures of hepatocytes in a perfused liver-on-a-chip device. *Biofabrication*. 2019, **11**(1), 1-19. ISSN 1758-5090. Dostupné z: doi:10.1088/1758-5090/aaf657
- [66] SCHANTÉ, Carole E., Guy ZUBER, Corinne HERLIN a Thierry F. VANDAMME. Improvement of hyaluronic acid enzymatic stability by the grafting of amino-acids. *Carbohydrate Polymers*. 2012, **87**(3), 2211-2216. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2011.10.050
- [67] SCHANTÉ, Carole, Guy ZUBER, Corinne HERLIN a Thierry F. VANDAMME. Synthesis of N-alanyl-hyaluronamide with high degree of substitution for enhanced resistance to hyaluronidase-mediated digestion. *Carbohydrate Polymers*. 2011, **86**(2), 747-752. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2011.05.017
- [68] HOMER, K.A., L. DENBOW a D. BEIGHTON. Spectrophotometric Method for the Assay of Glycosaminoglycans and Glycosaminoglycan-Depolymerizing Enzymes. *Analytical Biochemistry*. 1993, **214**(2), 435-441. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1006/abio.1993.1520
- [69] HOMER, K A, L DENBOW, R A WHILEY a D BEIGHTON. Chondroitin sulfate depolymerase and hyaluronidase activities of viridans streptococci determined by a sensitive spectrophotometric assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993, **31**(6), 1648-1651. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.31.6.1648-1651.1993
- [70] RIVERA STARR, Clarise a N. Cary ENGLEBERG. Role of Hyaluronidase in Subcutaneous Spread and Growth of Group A Streptococcus. *Infection and Immunity*. 2006, **74**(1), 40-48. ISSN 0019-9567. Dostupné z: doi:10.1128/IAI.74.1.40-48.2006
- [71] ANDRYSIAK, Tomasz, Piotr BELDOWSKI, Jacek SIÓDMIK, Piotr WEBER a Damian LEDZIŃSKI. Hyaluronan-Chondroitin Sulfate Anomalous Crosslinking Due to Temperature Changes. *Polymers*. 2018, **10**(5), 1-11. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym10050560
- [72] RAOUDI DAVID, Maha, Brigitte DESCHREVEL, Sylvain LECLERCQ, Philippe GALÉRA, Karim BOUMEDIENE a Jean-Pierre PUJOL. Chondroitin sulfate increases hyaluronan production by human synoviocytes through differential regulation of hyaluronan synthases: Role of p38 and Akt. *ARTHRITIS & RHEUMATISM*. 2009, **60**(3), 760-770. ISSN 00043591. Dostupné z: doi:10.1002/art.24302
- [73] TANAKA, Yoshiya. Rheumatoid arthritis. *Inflammation and Regeneration*. 2020, **40**(1), 1-8. ISSN 1880-8190. Dostupné z: doi:10.1186/s41232-020-00133-8

- [74] TAT, STEEVE KWAN, JEAN-PIERRE PELLETIER, FRANÇOIS MINEAU, NICOLAS DUVAL a JOHANNE MARTEL-PELLETIER. Variable Effects of 3 Different Chondroitin Sulfate Compounds on Human Osteoarthritic Cartilage/Chondrocytes: Relevance of Purity and Production Process. *The Journal of Rheumatology*. 2010, **37**(3), 656-664. ISSN 0315-162X. Dostupné z: doi:10.3899/jrheum.090696
- [75] RIVERA, Fabrizio, Luca BERTIGNONE, Giancarlo GRANDI, et al. Effectiveness of intra-articular injections of sodium hyaluronate-chondroitin sulfate in knee osteoarthritis: a multicenter prospective study. *Journal of Orthopaedics and Traumatology*. 2016, **17**(1), 27-33. ISSN 1590-9921. Dostupné z: doi:10.1007/s10195-015-0388-1
- [76] HENROTIN, Yves, Mariane MATHY, Christelle SANCHEZ a Cecile LAMBERT. Chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis: from in vitro studies to clinical recommendations. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*. 2010, **2**(6), 335-348. ISSN 1759-720X. Dostupné z: doi:10.1177/1759720X10383076
- [77] HUI, James H., Shzu-Wei CHAN, Jun LI, James C. H. GOH, Li LI, X. F. REN a Eng Hin LEE. Intra-articular delivery of chondroitin sulfate for the treatment of joint defects in rabbit model. *Journal of Molecular Histology*. 2007, **38**(5), 483-489. ISSN 1567-2379. Dostupné z: doi:10.1007/s10735-007-9120-7
- [78] BARNHILL, Jamie G., Carol L. FYE, David W. WILLIAMS, Domenic J. REDA, Daniel O. CLEGG a Crystal L. HARRIS. Chondroitin Product Selection for the Glucosamine/Chondroitin Arthritis Intervention Trial. *Journal of the American Pharmacists Association*. 2006, **46**(1), 14-24. ISSN 15443191. Dostupné z: doi:10.1331/154434506775268616
- [79] ROZENFELD, Vitalina, Judy L. CRAIN a A. KEVIN CALLAHAN. Possible augmentation of warfarin effect by glucosamine-chondroitin. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 2004, **61**(3), 306-307. ISSN 1079-2082. Dostupné z: doi:10.1093/ajhp/61.3.306
- [80] BROWER A., Mark, A. Patel, BHUMIT, Adrian GOSPODAREK a Michael LARKIN. Multi-angle light scattering as a process analytical technology measuring real-time molecular weight for downstream process control. *MAbs*. Taylor & Francis, 2018, **6**(6), 945-950. Dostupné z: doi:10.1080/19420862.2018.1505178
- [81] Coupling Multi-Angle Light Scattering to Reverse-Phase UltraHigh-Pressure Chromatography (RP-UPLC-MALS) for the characterization monoclonal antibodies. *SCIENTIFIC REPOST*. 2019, **9**(2), 1-8. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-51233-6
- [82] ZHANG, Haiying a David LYDEN. Asymmetric-flow field-flow fractionation technology for exomere and small extracellular vesicle separation and characterization. *Nature Protocols*. 2019, **14**(4), 1027-1053. ISSN 1754-2189. Dostupné z: doi:10.1038/s41596-019-0126-x
- [83] HOLUBOVÁ, Renata. *Základy reologie a reometrie kapalin*. 2. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-4178-8.

- [84] *Applied Rheology*. 6. Austria: Anton Paar, 2019. ISBN 9783950401608
- [85] DE VICENTE, Juan. *Rheology*. 2. Croatia: IntechOpen, 2012. ISBN 978-9535101871.
- [86] MEEHAN, Richard, Chris WILSON, Eric HOFFMAN, Lynne ALTIMIER, Maryanne KAESSNER a Elizabeth A. REGAN. Ultrasound measurement of knee synovial fluid during external pneumatic compression. *Journal of Orthopaedic Research*. 2019, **37**(3), 601-608. ISSN 0736-0266. Dostupné z: doi:10.1002/jor.24216
- [87] THURSTON, G. B. a H. GREILING. Viscoelastic properties of pathological synovial fluids for a wide range of oscillatory shear rates and frequencies. *Rheologica Acta*. 1978, 17(4), 433-445. ISSN 0035-4511. Dostupné z: doi:10.1007/BF01525959
- [88] JUNBO, Wang, Liu SIJIA, Chen HONGYING, Liu LEI a Wang PU. Effect of low-magnitude different-frequency whole-body vibration on subchondral trabecular bone microarchitecture, cartilage degradation, bone/cartilage turnover, and joint pain in rabbits with knee osteoarthritis. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2017, **18**(1), 1-11. ISSN 1471-2474. Dostupné z: doi:10.1186/s12891-017-1579-0
- [89] CHEN, Yin-Quan, Pei-lun CHOU, Chen-Yu CHENG, Chia-Chun CHIANG, Ming-Tzo WEI, Chin-Ting CHUANG, Yi-Lin Sophia CHEN a Arthur CHIOU. Microrheology of human synovial fluid of arthritis patients studied by diffusing wave spectroscopy. *Journal of Biophotonics*. 2012, **5**(10), 777-784. ISSN 1864063X. Dostupné z: doi:10.1002/jbio.201100128
- [90] HOMER, K. A., M. C. GROOTVELD, J. HAWKES, D. P. NAUGHTON a D. BEIGHTON. Degradation of hyaluronate by *Streptococcus intermedius* strain UNS 35. *Journal of Medical Microbiology*. 1994, **41**(6), 414-422. ISSN 0022-2615. Dostupné z: doi:10.1099/00222615-41-6-414
- [91] HOMER, K. A., KAREN, LAWRENCE DENBOW, ROBERT A. WHILEY a DAVID BEIGHTON. Chondroitin Sulfate Depolymerase and Hyaluronidase Activities of Viridans Streptococci Determined by a Sensitive Spectrophotometric Assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993, **31**(6), 1648-1651
- [92] PODZIMEK, Stepan. *Light scattering, size exclusion chromatography, and asymmetric flow field flow fractionation: powerful tools for the characterization of polymers, proteins and nanoparticles*. Hoboken, N.J.: Wiley, c2011. ISBN 978-047-0386-170
- [93] HROCHOVÁ, Eliška. Příprava a charakterizace mechanických vlastností umělých synoviálních kapalin. Brno, 2019. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Michal Kalina