



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

**VÝVOJ MATERIÁLU NA BÁZI HYDROGELŮ KYSELINY
HYALURONOVÉ PRO REGENERACI MYOKARDU**

DEVELOPMENT OF MATERIAL BASED ON HYALURONIC ACID S HYDROGELS FOR MYOCARDIAL
REGENERATION

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Lenka Kovářová

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

BRNO 2020

Zadání dizertační práce

Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie Akademický rok: 2019/20
Studentka: **Ing. Lenka Kovářová**
Studijní program: Fyzikální chemie
Studijní obor: Fyzikální chemie
Vedoucí práce: **prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.**

Název dizertační práce:

Vývoj materiálu na bázi hydrogelů kyseliny hyaluronové pro regeneraci myokardu

Zadání dizertační práce:

Charakterizace hydrogelů na bázi kyseliny hyaluronové pro využití v tkáňovém inženýrství, především pro regeneraci srdeční tkáně po infarktu myokardu. Literární rešerše na dané téma, návrh vlastních hydrogelových systémů (jejich chemického složení) v souladu se souvisejícími výzkumnými projekty. U vyvíjených materiálů sledovat mechanické a viskoelastické vlastnosti, podmínky síťovacích reakcí a kinetiku gelace. U hydrogelů navržených jako opora („scaffold“) pro vybraný typ buněk sledovat také jejich biologické vlastnosti (buněčná viabilita a adheze). U výsledného materiálu testovat kompatibilitu s vhodným a dostupným aplikačním zařízením in vitro a in vivo.

Termín odevzdání dizertační práce: 20.5.2020:

Ing. Lenka Kovářová
student(ka)

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.9.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato disertační práce je zaměřena na vývoj materiálů na bázi kyseliny hyaluronové (HA) využitelných v regenerativní medicíně, především pro léčbu srdeční tkáně po infarktu myokardu. Předmětem studia je oxidovaná forma HA (HA-Ox) a hydroxyfenyl derivát HA (HA-TA). HA-Ox lze zesíťovat pomocí bifunkčního alkoxyaminu POA a HA-TA podstupuje ve vodném prostředí v přítomnosti peroxidu vodíku enzymatickou reakci katalyzovanou křenovou peroxidázou, vedoucí k tvorbě gelu. Cílem bylo studium chemických a fyzikálních vlastností, kinetiky gelace a podmínek síťovací reakce vyvíjených materiálů. U hydrogelů byly charakterizovány mechanické a viskoelastické vlastnosti, degradabilita či stabilita v simulovaných tělních tekutinách. Tyto hydrogely slouží jako scaffoldy pro vybraný typ buněk. Pro podporu buněčné adheze a viability byla do struktury hydroxyfenyl derivátu HA navázána RGD sekvence. Tento finální materiál byl také kompatibilní s vybranými aplikačními zařízeními. Jeho viskozita a výtlačná síla byla dostatečně nízká, aby umožnila aplikaci pomocí katetru s velmi malým vnitřním průměrem. Také byla zajištěna aplikovatelnost materiálu přes přívodní hadičku do nosné kapsy druhého zařízení SPREADS s dobrou homogenitou, buněčnou distribucí a viabilitou. V neposlední řadě byl materiál aplikován pomocí těchto zařízení *in vivo* během preklinické studie.

KLÍČOVÁ SLOVA

Hydrogel, hyaluronan, gelace, reologie, infarkt myokardu, regenerace srdeční tkáně, kmenové buňky

ABSTRACT

The thesis is focused on material development based on hyaluronic acid usable in regenerative medicine, especially for heart tissue regeneration after myocardial infarction. The object of the study is the oxidized form of hyaluronic acid (HA-Ox) and hydroxyphenyl derivative of HA (HA-TA). HA-Ox can be crosslinked with a bifunctional alkoxyamine POA and HA-TA undergoes an enzymatic reaction in the presence of hydrogen peroxide catalysed by horseradish peroxidase leading to gel formation. To describe the materials, chemical and physical properties, gelation kinetics and conditions of crosslinking reactions were studied. Hydrogels were characterized by mechanical and viscoelastic properties, degradability or stability in simulated body fluids. These hydrogels serve as scaffolds for the selected cell type. To promote cell adhesion and viability, an RGD sequence has been bonded to the structure of HA-TA. This resulting material is also compatible with selected applicators. Its viscosity and extrusion force are low enough to allow application with a catheter with a very small internal diameter. The applicability of the material through the supply tube to the hydrogel reservoir of the second SPREADS device showed good homogeneity, cell distribution and viability. Finally, the material was applied *in vivo* using these devices during a preclinical study.

KEY WORDS

Hydrogel, hyaluronan, gelation, rheology, myocardial infarction, heart regeneration, stem cells

KOVÁŘOVÁ, Lenka. *Vývoj materiálu na bázi hydrogelů kyseliny hyaluronové pro regeneraci myokardu* [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-05-05]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/127917>. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Miloslav Pekař.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala.

.....

Podpis studenta

Poděkování

Ráda bych poděkovala Fakultě chemické VUT a společnosti Contipro a.s. za to, že mi umožnili ve spolupráci provedení této disertační práce. Také by tato práce nemohla vzniknout bez Evropského projektu AMCARE.

Za odborný dohled a zaštitění disertační práce děkuji vedoucímu mé práce prof. Ing. Miloslavu Pekařovi CSc a konzultantovi této práce PharmDr. Martinu Pravdovi, Ph. D. Dále za přínosnou spolupráci srdečně děkuji kolegyni Mgr. Ivaně Ščigalkové. Děkuji jim za čas, jež mi věnovali a pevné nervy. Také jsem ocenila poskytnuté užitečné informace, náměty, komentáře či kreativní rady.

Mé poděkování rovněž patří mému manželi a rodině za jejich podporu v průběhu mé práce.

OBSAH

1	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	7
2	ÚVOD	8
3	TEORETICKÁ ČÁST	9
	3.1 Gely	9
	3.2 Kyselina hyaluronová (HA)	17
4	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	20
	4.1 Hydrogely jako scaffoldy v tkáňovém inženýrství	20
	4.2 Regenerace tkáně po infarktu myokardu	27
	4.3 Využití buněčné terapie při regeneraci srdeční tkáně po infarktu myokardu	28
	4.4 Využití hydrogelů při regeneraci srdeční tkáně po infarktu myokardu	29
	4.5 Metody aplikace	31
	4.6 Preklinické a klinické studie	32
5	METODICKÁ KONCEPCE PRÁCE	33
6	MATERIÁLY A METODY	34
	6.1 Materiály	34
	6.2 Metody	41
	6.3 Přístroje a zařízení	63
7	VÝSLEDKY	64
	7.1 Hydrogely na bázi oxidované formy HA	65
	7.2 Hydrogely na bázi hydroxyfenyl derivátů HA	80
	7.3 Buněčná interakce s hydrogely	100
	7.4 Detekce hydrogelů	107
	7.5 Kompatibilita vybraného materiálu s aplikačními zařízeními	109
	7.6 Preklinická studie	116
8	DISKUZE	118
	8.1 Hydrogely na bázi oxidované formy HA	119
	8.2 Hydrogely na bázi hydroxyfenyl derivátu HA	121
	8.3 Hydrogely na bázi hydroxyfenyl derivátu HA nesoucí RGD sekvenci	125
	8.4 Buněčná interakce s hydrogely	126
	8.5 Aplikace materiálu pomocí katetru	128
	8.6 Aplikace materiálu pomocí SPREADS zařízení	129
	8.7 Detekce hydrogelů	130
	8.8 Preklinická studie	130

9	ZÁVĚR	131
10	LITERATURA	133
11	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	145
12	PŘÍLOHY	148
12.1	Příloha 1: Kultivace buněk	148
12.2	Příloha 2: Katetr (AMCath).....	150
12.3	Příloha 3: Životopis	151
12.4	Příloha 4: Publikační činnost.....	153
12.5	Příloha 5: Přehled aktivit	156

1 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem této disertační práce je charakterizace hydrogelů na bázi kyseliny hyaluronové pro využití v tkáňovém inženýrství, především pro regeneraci srdeční tkáně po infarktu myokardu.

U vyvíjených materiálů bylo sledováno jejich chemické složení, mechanické a viskoelastické vlastnosti, podmínky síťovacích reakcí a kinetika gelace. Za tímto účelem bylo nutné navrhnout množství dostupných experimentů, které budou vhodné ke stanovení fyzikálně-chemických parametrů.

Připravené hydrogely by měly sloužit jako scaffoldy pro vybraný typ buněk, a proto byly sledovány také biologické vlastnosti těchto materiálů z hlediska buněčné viability a adheze. U finálně zvoleného materiálu byla testována kompatibilita s vhodným aplikačním zařízením *in vitro* a *in vivo*.

2 ÚVOD

Mezi nejčastější příčinu úmrtí ve vyspělých zemích patří kardiovaskulární onemocnění, které jsou spojeny především s obezitou, kouřením či stresem. Revaskularizační terapie je sice účinnou léčbou při obnovení toku krve v srdci, ale jizva vzniklá po infarktu myokardu je permanentní. Současná regenerace myokardu zahrnuje chirurgickou či farmakologickou léčbu. Bohužel pomocí dostupných metod léčby lze ovlivnit pouze funkční tkáň srdce. V pokročilém stádiu srdečního selhání je jedinou možností transplantace srdce, která je omezená počtem dárců.

V posledních několika dekadách byl zaznamenán obrovský vzestup zájmu o tkáňové inženýrství a kombinaci jeho metod s terapeutickými postupy využívajícími buněčné terapie např. implantaci mesenchymálních kmenových buněk. I přes velký potenciál buněčné terapie při léčbě různých typů onemocnění, nedosahují dosavadní klinické studie očekávaných výsledků. Jako možné příčiny těchto neúspěchů byly identifikovány nedostatečná doba setrvání buněk v místě implantace spolu s jejich nízkou viabilitou *in vivo*. Tyto problémy vyvolaly zájem mnoha vědeckých pracovišť o nosič, do kterého by mohly být buňky inkorporovány, a jenž by prodloužil dobu jejich setrvání v místě aplikace a podpořil jejich viabilitu případně i diferenciaci v požadovaný typ buněk. Pro tento účel jsou za nadějně materiály považovány hydrogely, které se v minulosti ukázaly jako vhodné prostředí pro růst a diferenciaci buněk *in vitro*. Díky svým mechanickým vlastnostem navíc mohou bránit nežádoucímu úniku buněk z místa aplikace a do značné míry mohou poskytnout i oporu okolní tkáni, např. ischemické srdeční stěně. Výhodou hydrogelů je možnost jejich snadné aplikace, kdy ke vzniku finální struktury gelu dochází až v místě aplikace (*in situ*) a to za fyziologických podmínek. To je velmi důležitý parametr kvůli možným způsobům aplikace materiálu do srdeční tkáně, zahrnující obvykle podání prostřednictvím katetru.

Vývoj hydrogelů na bázi kyseliny hyaluronové, které lze připravit za fyziologických podmínek, patří mezi moderní trend ve výzkumu biomateriálů. Takové hydrogely umožňují aplikaci materiálu přímo do místa postižení, a to i v přítomnosti buněk a tkáně. Kyselina hyaluronová je lineární polysacharid nacházející se v pojivové, epiteliální či nervové tkáni obratlovců. V oblasti tkáňového inženýrství je tento polymer široce využíván především pro svou biokompatibilitu a biodegradabilitu. Jako farmaceutická ingredience je daná makromolekula již využívána v mnoha aplikacích, jako je viskosuplementace či oční chirurgie.

Tato práce je zaměřena na přípravu hydrogelů na bázi kyseliny hyaluronové (HA-Ox oxidovaný derivát HA, HA-TA tyraminovaný derivát HA), do kterých lze enkapsulovat buňky především pro potenciální regeneraci srdeční tkáně po infarktu myokardu. Charakter hydrogelů musí být přizpůsoben jak buněčnému typu, tak i možnostem aplikace materiálu do místa určení. Musí splňovat řadu kritérií, jako je snadná inkorporace buněk či možnost zesílení *in situ*.

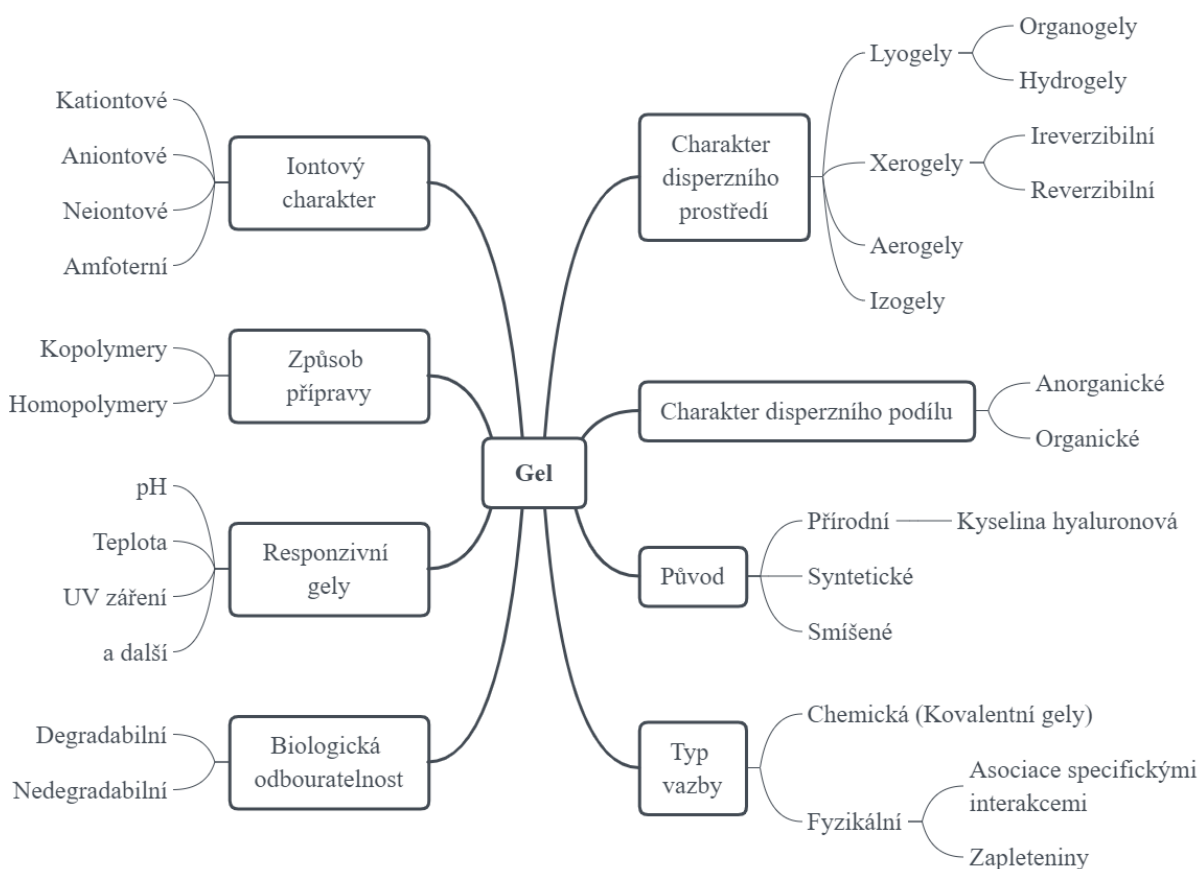
3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Gely

Gely jsou tvořeny trojrozměrnou makromolekulární sítí a médiem, kterým je až na některé výjimky kapalina (lyogely). Pokud se jedná o vodu, jsou gely nazývány hydrogely. Přestože je disperzní prostředí gelů kapalné, tak svým charakterem, a především soudržností, odpovídají spíše tuhému stavu. Svou hmotností a objemem se více podobají kapalinám. Tato charakteristika mezi kapalnou a pevnou látkou je dána trojrozměrnou sítí, tvořící opěrnou strukturu schopnou zadržet velké množství vody – až 99,9 % z celkové hmotnosti gelu. Hydrogely se proto vyznačují vysokou hydrofilitou – mohou pojmout 1 000krát více vody v porovnání s hmotností jejich sušiny [1, 2, 3].

3.1.1 Klasifikace hydrogelů

Gely mohou být rozděleny do mnoha podskupin (Obr. 1).



Obr. 1 Schéma klasifikace hydrogelů.

Na základě původu lze hydrogely rozdělit na gely přírodní, syntetické či „smíšené“ (kapitola 3.1.4.1). S původem gelů mnohdy souvisí také jejich biologická odbouratelnost, podle níž můžeme gely rozdělit na degradovatelné či nedegradovatelné [1, 2, 3].

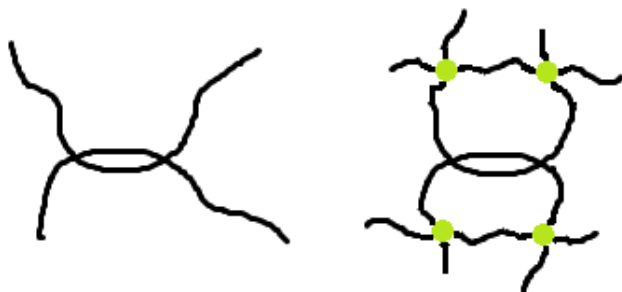
Gely mohou být klasifikovány také podle chování v suchém stavu na reverzibilní a ireverzibilní. U prvně uvedeného typu je gel schopen přecházet do původního stavu při přijímání disperzního prostředí (botnání). Tento typ gelů lze připravit botnáním xerogelů či z roztoků lineárních polymerů. Naproti tomu přeměna ireverzibilního gelu na xerogel je nevratná a tento typ gelu dokáže přijmout jen část disperzního prostředí. Lze jej připravit z lyofobních solí [3].

Na základě povahy disperzního prostředí lze gely rozdělit na organogely s disperzním prostředím tvořeným organickou kapalinou a hydrogely s vodným disperzním prostředím. Pokud je disperzním prostředím monomer disperzního podílu, nazýváme gely izogely, příkladem může být polystyren ve styrenu [3].

Gely je možné klasifikovat i podle řady dalších hledisek, např. dle iontového charakteru lze gely rozdělit na neiontové, kationtové, aniontové či amfoterní [1, 2, 3]. Na základě způsobu zesítnění dělíme gely na fyzikální a kovalentní (kapitola 3.1.2) a dle přípravy na homopolymery či kopolymery. Gelace může být iniciována teplotou, UV světlem či pH, dle čehož také lze gely členit [2].

3.1.2 Fyzikální a kovalentní gely

K vytvoření sítě gelu může docházet chemickou reakcí (vznik chemických vazeb) či působením fyzikálních sil (Coulombické síly, vznik vodíkových vazeb či hydrofobních interakcí). Dle těchto dvou základních typů zesítnění jsou gely klasifikovány na kovalentní a fyzikální. Vzniku gelu lze také dosáhnout tvorbou zapletenin (Obr. 2). K zaplétání řetězců dochází, pokud je molekulová hmotnost polymeru dostatečně velká, či se jedná o větvený polymer. Síla vazby je však slabá, a proto je tato konfigurace nestálá [2].



Obr. 2 Ukázka zapletenin.

Fyzikální vazby, vzniklé např. změnou teploty, pH či složením rozpouštědla, jsou vratné. Do kategorie fyzikálních gelů spadá mnoho přírodních polymerních materiálů, jako jsou polysacharidy či proteiny, u nichž je zesítnění založeno na tvorbě vodíkových vazeb. Mechanické vlastnosti a chemická stabilita fyzikálních gelů je obvykle slabší v porovnání s kovalentními gely, jejichž výsledná 3D struktura je většinou velmi pevná a stálá. Na druhou stranu, při vzniku dostatečného množství fyzikálních vazeb lze dosáhnout pevných vazeb srovnatelných se silou kovalentních vazeb. Obecně gely síťované pomocí chemických vazeb nelze znovu rozpustit, a proto jsou nazývány ireverzibilní. Kovalentní typ vazeb se uplatňuje u syntetických materiálů a mezi reakce využívané k jejich vzniku patří polymerizace (polykondenzační a radikálová), zesítnění funkčních skupin, zesítnění na základě radiace, UV záření či síťování plazmou [2].

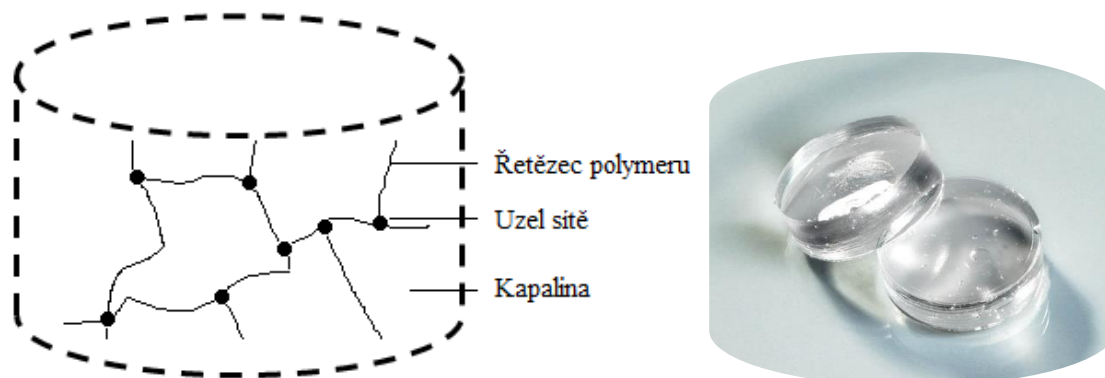
3.1.3 Vznik gelu – bod gelace

Proces vzniku gelu je obecně nazýván gelace. Ta nastává při vytvoření dostatečného počtu spojů mezi makromolekulami [2]. Bod gelace je charakterizován vznikem nekonečné trojrozměrné struktury – v tomto bodě se objevuje v systému jediná bohatě rozvětvená molekula makroskopických rozměrů (polymerní síť) a původně kapalná směs se stává pevnou látkou – gelem. Reakce není ukončena ihned po dosažení tohoto bodu, ale pokračuje, obvykle jsou zbývající malé molekuly s nezreagovanými skupinami dále připojovány k polymerní síti [1, 3, 4].

3.1.4 Polymerní gely

Mezi skupinu materiálů, ze kterých je možné připravit hydrogel, schopný zadržet velké množství vody v 3D struktuře, patří polymery, ať už přírodního či syntetického původu. Polymerní gely, jak je vidět i

na Obr. 3, jsou tvořeny řetězci polymeru, které jsou spojeny v místech nazývaných uzly sítě. S rostoucím počtem uzlů roste i rigidita struktury gelu. Počet řetězců, vycházejících z uzlu, nám udává funkčnost uzlu f , při síťování lineárních polymerů vznikají v ideálním případě čtyřfunkční uzly [1].



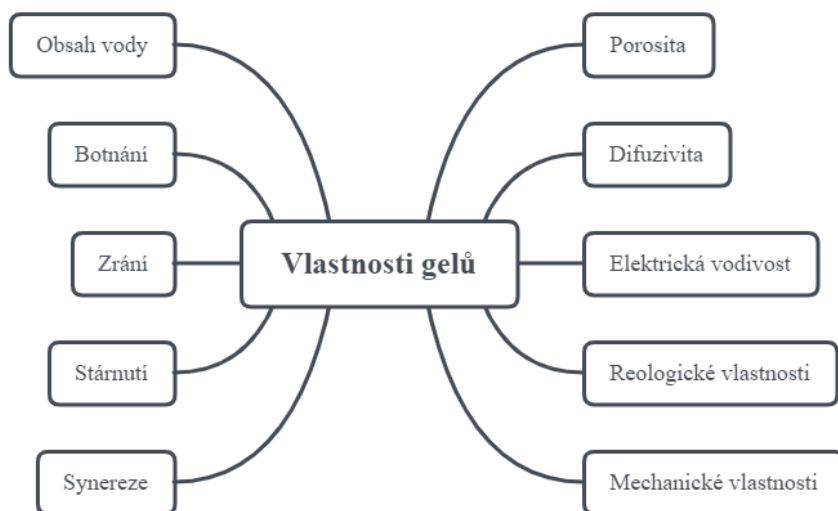
Obr. 3 Vlevo: struktura polymerního gelu. Vpravo: ukázka připraveného hydrogelu na bázi tyraminovaného derivátu HA.

3.1.4.1 Přírodní a syntetické polymery využívané pro přípravu gelů

Pro přípravu hydrogelů lze využít polymery syntetické, přírodní či různé deriváty přírodních polymerů (biopolymerů). Výhodou biopolymerů, vzhledem k syntetickým materiálům, je obecně lepší biodegradabilita a biokompatibilita, na druhou stranu materiálové vlastnosti či degradaci lze snáze kontrolovat u syntetických materiálů. Mezi syntetické materiály využívané pro přípravu scaffoldů patří polyethylenglykol či jeho kopolymery s poly(mléčnou-co-glykolovou) kyselinou, polyvinylalkohol, polymery a kopolymery akrylové kyseliny (např. 2-hydroxyethyl-methakrylát tvořící základ očních čoček). Z přírodních polymerů se hojně využívá kolagen, alginát, agaróza, chitosan, fibrinové lepidlo, dextran nebo např. **kyselina hyaluronová (HA)** [5, 6, 7, 8].

3.1.5 Vlastnosti gelů

Vlastnosti polymerních gelů (Obr. 4) úzce souvisí s typem polymeru, jeho interakcí s rozpouštědlem a také se strukturou polymerní sítě [2].



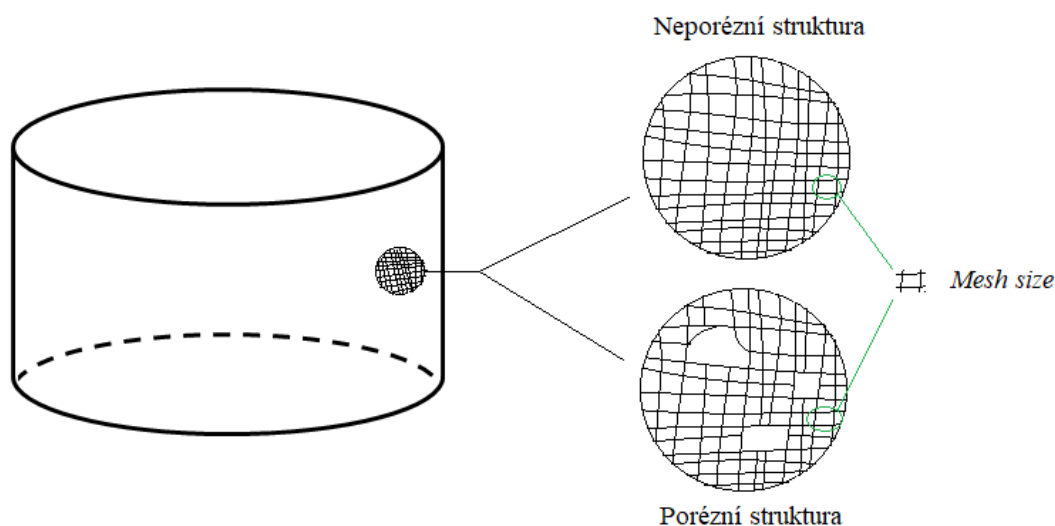
Obr. 4 Vybrané vlastnosti hydrogelů.

Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.1.4.1, mezi výhody hydrogelů připravených z biopolymerů patří biodegradabilita, biokompatibilita. Na druhou stranu u syntetických polymerů lze lépe kontrolovat výsledný charakter gelu – jeho materiálové vlastnosti či rychlost degradace [9].

Hustota zesítení hydrogelů ovlivňuje mnoho vlastností, jako je difúzní či botnací koeficient, mechanické vlastnosti, rychlost degradace, a také má efekt na chování buněk, především adhezi. Hustotu zesítení hydrogelu lze obvykle ovlivnit koncentrací roztoku polymeru, molekulovou hmotností řetězců (M_w), použitím lineárního či větveného polymeru [9].

3.1.5.1 Porosita a velikost ok sítě hydrogelu (mesh size)

Velikost ok hydrogelové sítě (mesh size), někdy nazývaná také molekulární porosita, představuje vzdálenost mezi sousedními polymerními molekulami v síti hydrogelu v hydratovaném stavu. Velikost ok sítě u hydrogelů se pohybuje v jednotkách až stovkách nanometrů, obvykle 5–500 nm a významně ovlivňuje prostupnost především vysokomolekulárních látek v hydrogelu. Ukázka velikosti ok hydrogelu je znázorněna v Obr. 5 u porézního i neporézního hydrogelu. Hydrogely mohou být tedy porézní či neporézní nezávisle na velikosti ok sítě gelu. Vznik a velikost pórů je ovlivněna procesem přípravy hydrogelu a může být podpořena využitím porogenů (plyny oxidu uhličitého, krystaly anorganických látek apod.) [10, 11]. Pro umožnění snadné migrace buněk v hydrogelu se často připravují hydrogely s póry o velikosti 100–500 μm [12, 13, 14].



Obr. 5 Schematická ukázka porézní a neporézní struktury hydrogelu a velikosti ok hydrogelu (mesh size).

Velikost ok hydrogelové sítě nelze detekovat pomocí běžných zobrazovacích technik, jako je např. skenovací elektronová mikroskopie (SEM). Je spojena se stupněm zesítení hydrogelu, proto se mnohdy k jejímu určení využívá nepřímé metody výpočtem ze stanoveného smykového [15, 16,] či Youngova modulu [17] či stupně nabotnění [18]. Ve většině případů platí, že s rostoucí tuhostí hydrogelu a klesajícím stupněm nabotnění, se zmenšuje i velikost ok hydrogelu. Teoretickou hodnotu velikosti ok hydrogelové sítě (mesh size) pomocí smykového modulu hydrogelu lze stanovit dle tohoto vzorce:

$$r_{mesh} = \left(\frac{6 \cdot R \cdot T}{\pi \cdot N_{Av} \cdot G^*} \right)^{1/3} \quad (1)$$

kde R je plynová konstanta, T je absolutní teplota, N_{Av} je Avogadrova konstanta a G^* představuje modul smykový [19].

3.1.5.2 Elektrická vodivost a difuzivita

Difúze nízkomolekulárních látek uvnitř gelu je obvykle poměrně dobrá, jelikož polymerní síť je solvatovaná velkým množstvím rozpouštědla [2] a malé molekuly a ionty rozpuštěných látek se pohybují napříč disperzním prostředím téměř stejně rychle jako v solu. Nerušená difúze v gelech umožňuje vznik velmi známých Liesegangových obrazců [3]. Difúze v hydrogelu je závislá na struktuře gelu, především na stupni zesítnění. Obecně méně zesítněné hydrogely mají větší velikost ok hydrogelové sítě, což umožňuje rychlejší difúzi živin a odpadních látek do i z gelu (k a od enkapsulovaných buněk) [2, 9].

Elektrická vodivost hydrogelů je závislá na obsahu disociovaných nízkomolekulárních elektrolytů v disperzním prostředí, obvykle je srovnatelná s elektrickou vodivostí solu, z něhož gel vznikl [3].

3.1.5.3 Obsah vody v hydrogelu, botnání

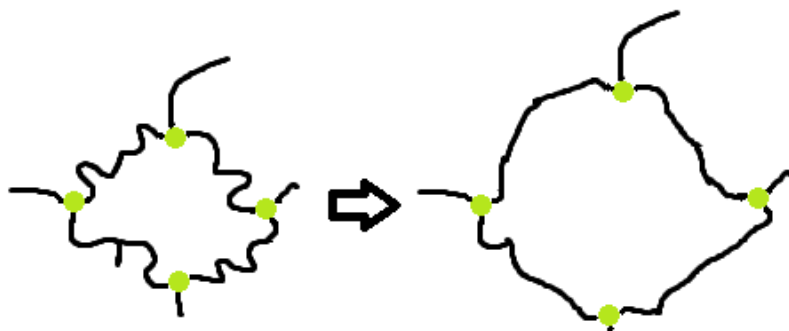
Voda v hydrogelu se nachází v několika formách – voda, která nemůže být zmrazena ani za velmi nízkých teplot, dále vázaná voda, jež mrzne při -10 až -20 °C a volná voda, která má vlastnosti podobné „normální“ vodě [2].

Mezi nejdůležitější charakteristiky gelu patří zádržnost vody. Při kontaktu xerogelu s vodou jsou nejdříve hydratovány polární hydrofilní skupiny, což vytváří primárně vázanou vodu. Dále se síť gelu rozpíná, gel botná a hydrofobní skupiny se dostávají do kontaktu s vodou a mohou s ní také interagovat, což vede k tvorbě hydrofobně navázané vody, též nazývané sekundárně vázaná voda. Dohromady primární a sekundární voda tvoří celkovou vázanou vodu. Kromě ní hydrogely také absorbují vodu díky osmotickým silám, proti nimž působí elastická retrakční síla 3D sítě gelu. Tato tzv. volná voda vyplňuje mezery mezi řetězci a póry. Následně pokud jsou vazby degradabilní, dochází k rozpadu sítě. Labilní vazby mohou být degradovány fyziologickými podmínkami, enzymaticky či chemicky, nejčastěji hydrolýzou [20, 21, 22].

Zádržnost vody gelem závisí na hustotě zesítnění, přičemž při její nižší hodnotě je množství zadržené vody vyšší. Navíc v přítomnosti polárních skupin na monomeru je voda zadržována na základě statické potenciální energie. Existují dva parametry, které zajišťují absorpci vody: kompatibilita mezi polyelektrolytem a vodou (hydrogely zadržují vodu díky hydrofilitě polymeru) a osmotický tlak vytvářený vysokou koncentrací iontů v gelu. Čím jsou tyto parametry vyšší, tím je zádržnost vody vyšší [2].

3.1.5.4 Botnání kovalentních gelů

Trojozměrná síť kovalentního gelu při styku s rozpouštědlem (vodou) botná. Jedná se o kinetický proces zahrnující transport hmoty a mechanickou deformaci (Obr. 6). Závisí na interakci mezi polymerní sítí a rozpouštědlem. Při procesu botnání dochází k pohlcování okolní kapaliny 3D strukturou gelu a ke zvyšování jeho objemu [1, 23].



Obr. 6 Makroskopická deformace sítě gelu: vlevo původní stav sítě gelu, vpravo po nabotnání.

Stupeň nabotnění zesíťených polymerů je limitován strukturou 3D sítě gelu a je úměrný stupni zesíťení, který snižuje mobilitu polymerních řetězců, a tudíž jejich síť méně botná. Nabotnalé gely, které absorbovaly velké množství vody, se nachází ve stádiu mezi pevnými a kapalnými látkami a jejich vlastnosti se pohybují od viskózních kapalin až po pevné látky [2]. Zvýšená botnavost je obvykle negativním jevem a ve většině případů vede ke snížení mechanických vlastností především Youngova modulu [9].

Botnění kovalentně zesíťených polymerů je závislé na mnoha faktorech, jako jsou interakce polymeru s rozpouštědlem, již zmíněná hustota zesíťení, podmínky při procesu gelace a tvorbě sítě, či chemická struktura polymeru. Obecně bude botnavost vyšší u hydrogelů na bázi polymerů obsahujících hydrofilní skupiny v porovnání s hydrofobními skupinami, které minimalizují svůj styk s molekulami vody. Přítomnost aditiv, povaha rozpouštědla a jeho složení či teplota patří mezi další parametry ovlivňující proces botnění. V případě ionogenních gelů je botnění značně ovlivněno stupněm ionizace polyiontového systému a také přítomností externích polyelektrolytů. Tyto hydrogely často obsahují skupiny zvyšující hydrofilitu polymeru a tím i botnavost. Mezi skupiny schopné elektrolytické disociace patří např. karboxylové skupiny a u takového typu hydrogelu dochází v kontaktu s vodným roztokem po čase k ustanovení botnací rovnováhy [1].

Pokud gelace probíhá v přítomnosti rozpouštědla v dostatečném množství a následně je rozpouštědlo odpařováno, začne elastická retrakční síla působit proti odbotnávání, což vede k tomu, že si gely zachovávají paměť na tvar v době vzniku [1].

3.1.5.5 Stabilita hydrogelu

U gelů reverzibilních i ireverzibilních dochází ke zrání a s časem roste počet spojů, přičemž síť hydrogelu se smršťuje a nastává synereze, kdy část přítomné kapaliny v hydrogelu vytéká ven [1, 3].

3.1.5.6 Mechanické vlastnosti gelů

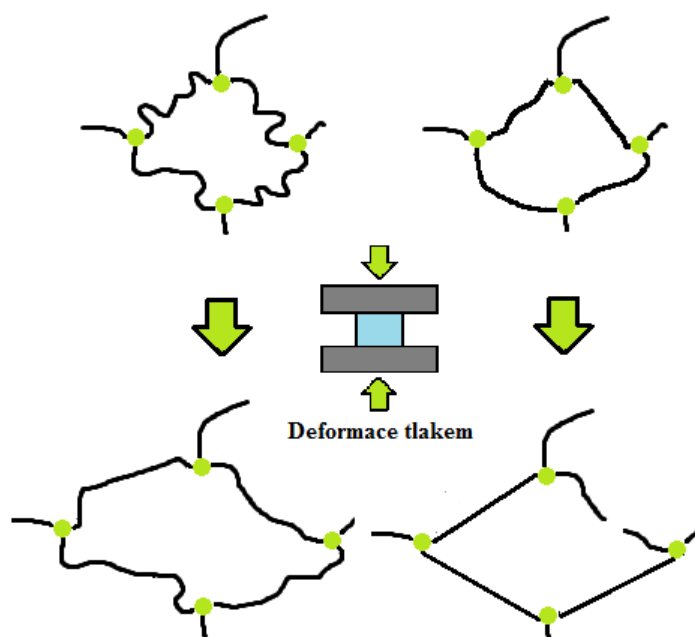
Hydrogely jsou viskoelastické látky. Mají charakter kapalin, jelikož jejich disperzní prostředí je kapalné, a také se vyznačují vlastnostmi tuhých těles díky jejich 3D struktuře. Při aplikaci namáhání u ideálně elastického tělesa je veškerá energie uchována a využita při odlehčení namáhání pro návrat materiálu do původního stavu. Na druhou stranu u viskoelastických materiálů, mezi které patří i hydrogely, je jen část energie uchována a zbytek energie je disipován a nenávratně přeměněn na tepelnou energii. Tyto materiály jsou schopny odolávat tečnému napětí jen do určité hodnoty tzv. kritického napětí. Před dosažením této meze, se chovají jako tuhá elastická tělesa a platí pro ně Hookův zákon ve tvaru [1, 3]:

$$\sigma_e = E \cdot \varepsilon_e \quad (2)$$

kde σ_e představuje napětí, ε_e relativní deformaci a E Youngův modul [24].

Hodnota kritického napětí závisí na mnoha faktorech, především na hustotě zesíťení, tedy koncentraci vazeb a také na jejich pevnosti. S rostoucím počtem vazeb mezi jednotlivými řetězci vzrůstá i rigidita sítě, jelikož klesá možnost změny tvaru makromolekuly.

Na Obr. 7 je vidět deformace části sítě dvou stejných hydrogelů lišících se pouze v počtu vytvořených spojů. Youngův modul představující tuhost materiálu bude vyšší u hydrogelu s vyšším počtem spojů, na druhou stranu u tohoto typu materiálu dojde vlivem namáhání dříve k narušení vazby – možnost změny tvaru makromolekuly i napínání řetězců je nižší ve srovnání s hydrogelem s menším počtem spojů.



Obr. 7 Deformace sítě hydrogelu tlakem. Vlevo – nižší stupeň zesítnění, při deformaci tlakem dochází prvně k napínání řetězců. Vpravo – vyšší stupeň zesítnění, prvně dochází k napínání řetězců a následně k jejich narušení (breaku) dříve než u prvně uvedeného hydrogelu.

3.1.5.7 Aplikační forma hydrogelů

Charakter a vlastnosti hydrogelů hrají důležitou roli při jejich uplatnění v konkrétní aplikaci. I přes optimalizaci těchto parametrů musí být vzaty v potaz další aspekty, jako je například forma hydrogelu, dle níž můžeme hydrogely rozdělit na [25, 26]:

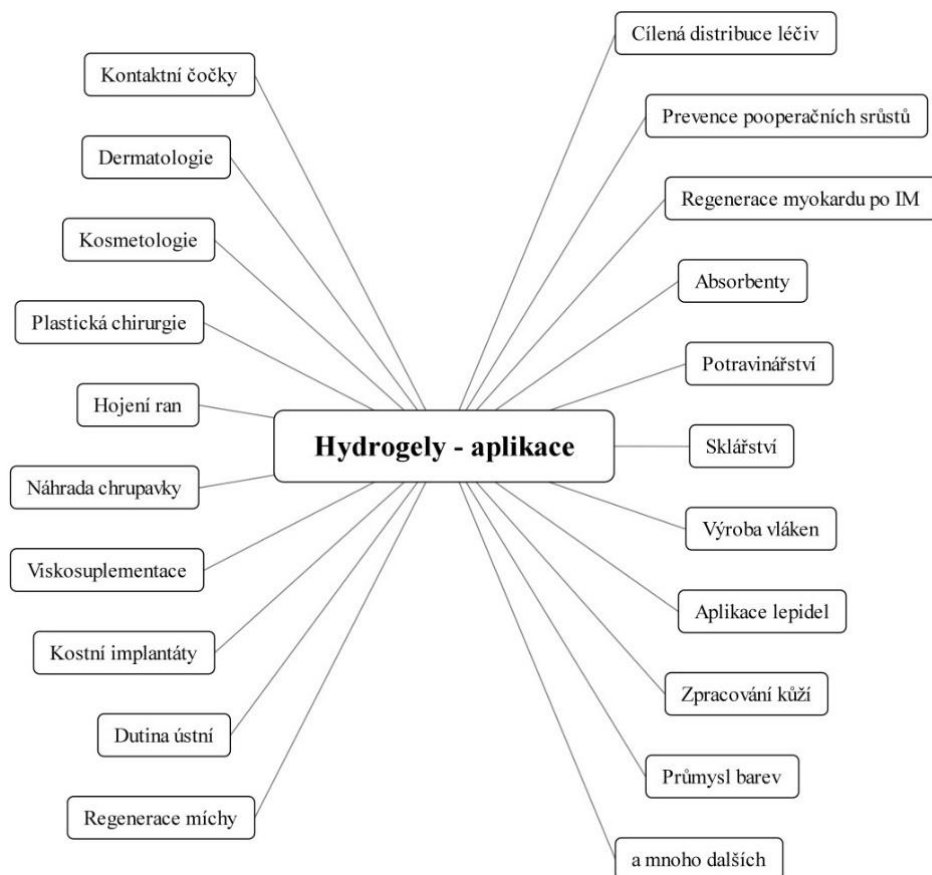
- Zesítněné hydrogely
- Hydrogely vznikající v místě aplikace (*in situ*)

V oblasti medicínských aplikací se stále více využívá *in situ* gelace. Výhodou těchto hydrogelů je minimální invazivní zákrok a obvykle jednoduchost aplikace. Také možnost inkorporace buněk, biologicky aktivních látek či jiných látek před vlastním zesítněním, je velkou předností. Polymerní roztok podléhá rychlému sol-gel přechodu v místě aplikace, přičemž je výhodou možné přesné zaplnění tvaru defektu [25, 26].

V případě *in situ* vznikajících hydrogelů je důležitým parametrem rychlost gelace, kterou je nutné optimalizovat tak, aby nedocházelo k vytékání materiálu z místa aplikace, ale zároveň nesmí docházet ke gelaci materiálu v jehle či katetru. S tím souvisí i nízká viskozita výchozích roztoků kvůli průchodnosti skrz dané transportní zařízení. Při *in situ* gelaci musí být zajištěno, že probíhající proces nesmí negativně ovlivňovat okolní tkáň, např. vznikem nadměrného tepla, výkyvy v lokálním pH, či vznikem toxických vedlejších produktů reakce. Stejně jako u již zesítněných hydrogelů, také zde mechanické vlastnosti a stabilita hydrogelu musí vyhovovat dané aplikaci. Degradace by měla být kontrolovatelná a přijatelná pro danou aplikaci. V neposlední řadě je velmi důležité zajištění možnosti sterilizace materiálu a všech komponent [25, 26].

3.1.6 Aplikace gelů

Gely hrají důležitou roli v mnoha odvětvích průmyslu už desítky let. Již v roce 1961 byla poprvé úspěšně provedena klinická aplikace hydrogelu v podobě kontaktních čoček a od té doby gely zaujaly významnou pozici i v mnoha dalších odvětvích medicíny (Obr. 8) [1]. V potravinářství, v průmyslu lepidel a barev se využívá zahušťovadel s výslednou tvorbou gelu. Proces gelace je důležitý při výrobě vláken, zpracování kůží a mnoha dalších. Hydrogely mohou být využity jako absorbenty např. pro tvorbu granulí pro udržení vlhkosti půdy v suchých oblastech či jako náplň dětských plenek. Využívá se jedinečné vlastnosti hydrogelů pojmout velké množství vody až 1 000krát více než je hmotnost jejich sušiny. V následujícím schématu jsou znázorněny možné aplikace hydrogelů, ať už na poli medicínském či průmyslovém [3].



Obr. 8 Schéma možných aplikací hydrogelu.

3.1.6.1 Medicínské aplikace

3.1.6.1.1 Kontaktní čočky

Již v roce 1954, v tehdejší Československu, vědci Wichterle a Lím vyvinuli kopolymer 2-hydroxyethyl-methakrylát a ethylen dimethakrylát, který byl základem pro vznik kontaktních čoček. V roce 1961 byla provedena první úspěšná aplikace tohoto hydrogelu v praxi. V dnešní době se k přípravě čoček stále využívá 2-hydroxyethyl-methakrylát zesíťovaný s ethylenglykol dimethakrylátem, polyakrylamidy či silikonové hydrogely [25].

3.1.6.1.2 Dermatologie, kosmetologie a plastická chirurgie

Hydrogely jsou využívány k augmentaci v plastické chirurgii, ať už jako prsní implantáty nebo k výplni vrásek či jizev. Pro svůj vysoký obsah vody a schopnosti hydratovat, mohou být gely na bázi hyaluronanu využity pro kosmetické účely. Nevýhodou přípravků na jejich bázi je dočasný efekt [28].

3.1.6.1.3 Hojení ran

Dalším odvětvím, ve kterém hrají hydrogely důležitou roli, je hojení ran. Udržují optimální vlhkost, jsou schopny absorbovat přebytečný exsudát a také podporují odloučení nekrotické tkáně. Krytí s obsahem hydrogelů chrání místo poranění a vlastní ránu před sekundární infekcí. K hojení ran lze využít speciální polštářky či přímo gely. Jedním z komerčně dostupných přípravků k hojení ran je Hyiodine, který obsahuje hyaluronan s velmi dobrou regenerační schopností a vysokou afinitou k vodě zajišťující vhodné vlhké prostředí pro správné hojení ran. Díky jodovému komplexu působí přípravek desinfekčně a přítomnost I₂ a KI zabraňuje předčasnému rozkladu hyaluronanu [27].

3.1.6.1.4 Ortopedie

Aplikace nativní vysokomolekulární kyseliny hyaluronové či její zesítené formy do synoviální tekutiny kolena zasaženého osteoartrózou je dnes velmi rozšířenou alternativou při léčbě tohoto onemocnění. Pro úspěšnost léčby má vliv více faktorů. Jedná se o charakter a viskoelastické vlastnosti vstříkovaného materiálu, které by se měly co nejvíce blížit vlastnostem synoviální tekutiny. V této oblasti je využito dobrých lubrikačních vlastností kyseliny hyaluronové. Důležitá je také doba degradace, která by měla být co nejdelší, bohužel hydrolytická či enzymatická degradace materiálu je obvykle značně rychlá. V případě široce využívaných materiálů na bázi hyaluronanu je problémem vysoký obsah hyaluronidáz v místě aplikace. Na druhou stranu na základě výsledků klinických studií byl prokázán delší terapeutický efekt, než bylo setrvání vlastního materiálu v místě aplikace [29]. V neposlední řadě samotný zákrok ovlivňuje léčbu, jelikož aplikace do postiženého místa není chirurgicky snadná. Dále je možné hydrogely využít pro regeneraci chrupavky a náhradu její části [9].

3.1.6.1.1 Řízené uvolňování a cílená distribuce léčiv

Hydrogely byly v minulosti využity při vývoji řady lékových forem určených pro postupné uvolňování léčiv, kdy slouží jako matrice zajišťující pozvolné uvolňování aktivní látky například v průběhu pasáže tablety gastrointestinálním traktem a zajišťují relativně stabilní plazmatickou hladinu léku. Na druhou stranu cílený transport do určeného místa je stále problematický v mnoha aplikacích. V některých případech je možné využít hydrogel či hydrogelové nanočástice jako nosiče léčiv. Mezi vhodné polymery pro přípravu hydrogelových nanočástic patří chitosan, alginát, polyvinylalkohol, polyethylenglykol a mnoho dalších [30].

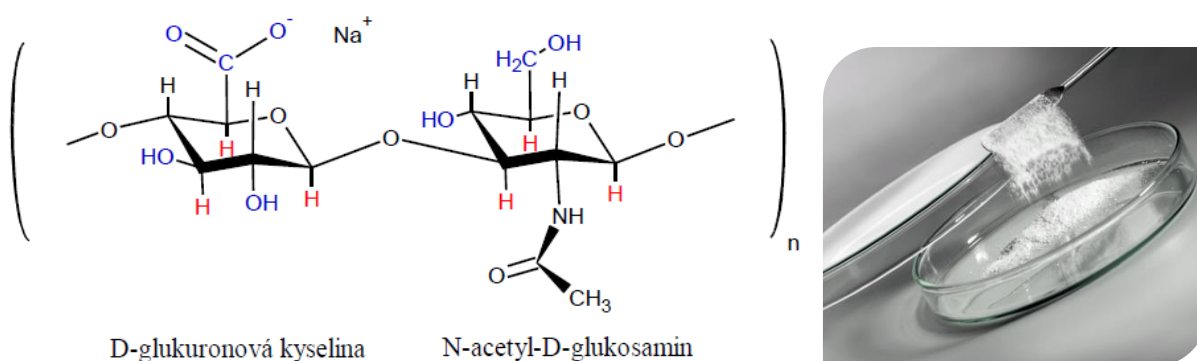
3.1.6.1.2 Další aplikace

Hydrogelů je možné též využít pro prevenci tvorby pooperačních srůstů, v praxi je aplikován např. Hyalobarrier gel – vysoce viskózní gel na bázi hyaluronanu [31]. Zavedený do praxe je také přípravek Gengigel na léčbu parodontitidy či aftózní stomatitidy [32] a mnoho dalších aplikací a produktů.

3.2 Kyselina hyaluronová (HA)

Tento polymer, ale především jeho deriváty, lze využít jako výchozí materiál pro přípravu hydrogelů. Kyselina hyaluronová je unikátní lineární polysacharid, objevený Karlem Meyerem a Johnem Palmerem v roce 1934. Tato makromolekula patří do skupiny glykosaminoglykanů. Je tvořena neustále se opakující disacharidovou jednotkou složenou z D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu, jež jsou spojeny pravidelně se střídajícími β -1,4 a β -1,3 glykosidickými vazbami (Obr. 9) [6, 28].

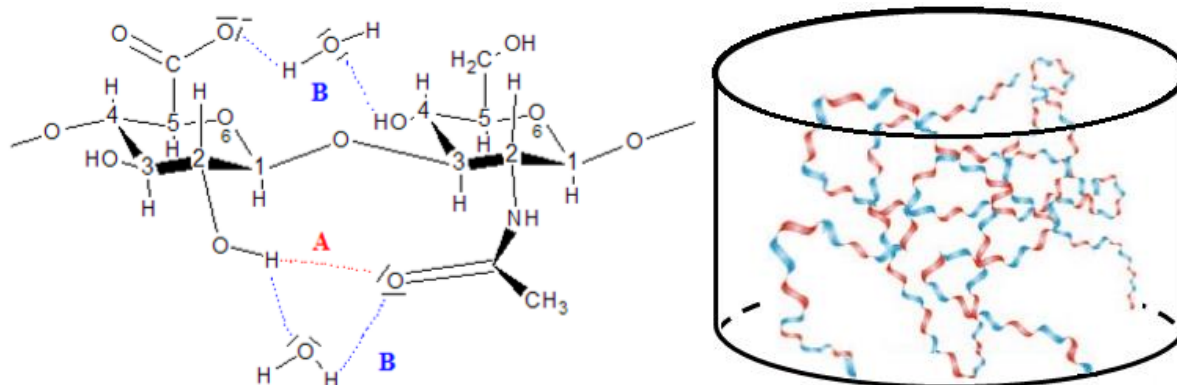
Karboxylové skupiny tohoto polyaniontu jsou za neutrálního pH ionizovány, a každá disacharidová jednotka nese záporný náboj. Daná makromolekula se nachází ve formě sodné či draselné soli, a proto je nazývána hyaluronan [28].



Obr. 9 Struktura kyseliny hyaluronové složená z D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu s axiálními uhlíky (červeně) a skupinami v ekvatoriální poloze (modře) (vlevo). Ukázka prášku kyseliny hyaluronové (vpravo).

Molekulová hmotnost disacharidové jednotky je přibližně 400 daltonů (Da) a její průměrná délka je 1 nm. [6, 28]. Každá disacharidová jednotka je rotací kolem O-glykosidické vazby pootočená o 180° vůči jednotce předchozí a dalším pootočením o 180° se dostává molekula do původní orientace. Z tohoto důvodu je struktura hyaluronanu nazývána jako *two fold helix* neboli dvakrát stočená šroubovice.

Chování hyaluronanu v roztoku je ovlivněno interakcí s vodou pomocí vodíkových vazeb, což je také příčinou značné hydrofility této makromolekuly, vlastní strukturou disacharidové jednotky (primární struktura) a vnitřními vodíkovými můstky mezi hydroxylovou skupinou D-glukuronové kyseliny a acetylovou skupinou D-acetyl-N-glukosaminu stabilizujícími danou molekulu (Obr. 10). Nepochopitelná část molekuly hyaluronanu je tvořena axiálními atomy vodíku, přičemž druhá polární hydrofilní strana molekuly je tvořena skupinami v ekvatoriální oblasti [33]. Molekula hyaluronanu tak nabývá ve fyziologickém roztoku konformace náhodně svinuté stuhý (Obr. 10) [34]. Celkově tato struktura nahodilého klubka zaujímá velkou doménu [35].



Obr. 10 Vlevo: Vnitřní vodíkové můstky mezi hydroxylovou skupinou D-glukuronové kyseliny a acetylovou skupinou D-acetyl-N-glukosaminu (A) Vodíkové vazby – interakce s rozpouštědlem (vodou) (B). Vpravo: Konformace náhodně svinuté stuhý, červená strana představuje hydrofobní části, hydrofilní části jsou znázorněny modře. Celá doména hyaluronanu v roztoku je znázorněna prostorem válce.

Díky chování v roztoku tvoří tento polymer vysoce viskózní roztoky, které se vyznačují mimo jiné adhezí na povrch sliznic. HA hraje důležitou roli v mnoha biologických procesech a nachází uplatnění při přípravě scaffoldů v tkáňovém inženýrství, jelikož je biokompatibilní, biodegradabilní, bioaktivní, neimunogenní a netromboidní [28].

3.2.1 Výskyt HA

Jedná se o polysacharid tělu vlastní, který tvoří přirozenou složku extracelulární matrix. Hyaluronan se vyskytuje v největší míře v kůži, díky její značné ploše, dále se nalézá v hojném množství ve skeletu a kloubech, a také je obsažen ve svalech a vnitřních orgánech. Molekulová hmotnost hyaluronanu se liší v rámci tkáně, ve které se nachází, od 100 kDa až po 8 MDa, které dosahuje např. ve sklivci. Přítomnost hyaluronanu je nezbytná pro funkci specializovaných orgánů (hlasivky) a tělních tekutin (kloubní tekutina, sklivce) [6].

3.2.2 Biosyntéza a degradace HA

Buněčná syntéza HA je unikátní proces, který probíhá v plazmatické membráně pomocí specifických membránových proteinů, hyaluronansyntáz. Syntéza hyaluronanu je obvykle vyvážena degradací – metabolismus hyaluronanu je vysoce vyvážený, velmi dynamický proces, kdy téměř třetina celkového množství hyaluronanu přítomného v organismu je přeměněna během jednoho dne. Rychlost degradace v lidském těle závisí na typu tkáně. V krvi je hyaluronan velmi rychle degradován v rámci minut díky vysokému obsahu enzymů hyaluronidáz [36] a reaktivních oxidačních částic [37]. V málo prokrvených částech těla, jako je např. chrupavka, trvá degradace až 3 týdny. Přebytný hyaluronan v chrupavce je uvolňován do synoviální tekutiny pro dosažení optimálních viskoelastických vlastností [33]. Pro možné využití tohoto polymeru, např. v tkáňovém inženýrství, je nutné tento polymer modifikovat, mimo jiné kvůli prodloužení doby setrvání v místě aplikace a času degradace.

3.2.3 Extrakce

Poprvé byl hyaluronan extrahován z lidského pupečníku, následně byl získán z kohoutích hřebínků s vysokou molekulovou hmotností [33]. Od těchto způsobů se již opustilo a kyselina hyaluronová je získávána ze stěn bakterií *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus pyogenes* či *Pasteurella multocida*. V České republice je HA extrahována ve vysoké čistotě z bakterie *Streptococcus zooepidemicus* společností Contipro a.s. [38].

3.2.4 Aplikace

Tento biokompatibilní, biodegradabilní, bioaktivní, neimunogenní a netromboidní materiál hraje důležitou roli v mnoha biologických procesech a nachází uplatnění v řadě aplikací. Již v 50. letech byl hyaluronan použit při operaci k udržení tvaru přední komory oka a také se v oblasti oftalmologie stále využívá [25].

Je třeba si uvědomit, že typ aplikace kyseliny hyaluronové úzce souvisí s její molekulovou hmotností. Obecně platí princip aplikace HA s molekulovou hmotností odpovídající M_w přirozené HA v dané tkáni. Nejkratší řetězce oligomery HA (4–18 merů) jsou využívány při detekci nádorů. Dále se také uvažuje o možnosti jejich využití v cílené distribuci léčiv – např. založené na nanočásticích. Předpokládá se, že oligosacharidy mohou v rakovinové buňce indukovat apoptózu, a tím inhibovat růst tumoru a zabránit metastázování. Tyto krátké řetězce by také mohly stimulovat tvorbu nových cév a sloužit k léčbě žilní nedostatečnosti. Polymer s molekulovou hmotností do 250 kDa může najít uplatnění na poli protirakovinné léčby pro zvýšení imunitní odezvy na bakteriální infekce, protizánětlivé preparáty, k léčbě poranění či popálenin, jako materiál pro regeneraci míchy a další. Vyšších molekulových hmotností od 250 do 2 200 kDa lze využít v oční chirurgii, pro přípravu biologicky aktivních bandáží, při léčbě poranění šlach či regeneraci chrupavky, jako intra-artikulární injekce, umělé kožní a kostní štěpy, jako materiál pro náhradu tukových či měkkých tkání a v mnoha dalších aplikacích [39].

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

4.1 Hydrogely jako scaffoldy v tkáňovém inženýrství

Hydrogely jsou nejčastěji tvořeny trojrozměrnou sítí hydrofilních řetězců polymeru, které mohou absorbovat mnohonásobně více vody, než je jejich hmotnost sušiny. Díky jejich strukturní podobnosti s extracelulární matrix jsou extenzivně zkoumány pro možné využití v medicínských aplikacích, jako je regenerace chrupavky [40], kostí, zubů, meziobratlových plotének, svalů, kůže, srdce, hlasivek či regenerace míchy [5, 6, 41, 42].

Výhodou hydrogelů je možnost inkorporace léčiv, biologicky aktivních látek či růstových faktorů do jejich struktury a možnost postupného uvolňování těchto látek (kontrolovatelná difúze) po implantaci do okolní tkáně. Uvolňování látek z hydrogelu je většinou založeno na velikosti ok hydrogelové sítě (*mesh size*), botnání v místě aplikace či kontrolované degradaci (obvykle hydrolýza či enzymatické štěpení). Tento proces je mimo jiné ovlivněn nábojem polymeru, z něž je hydrogel připraven [42].

Hydrogely mohou být také vhodné pro enkapsulaci buněk. Klíčovým parametrem je opět velikost ok sítě gelu, která umožňuje snadnou difúzi malých molekul, především kyslíku, živin či metabolitů produkovaných buňkami [41].

Snad nejdůležitějším parametrem při výběru vhodného materiálu v dané aplikaci je bezpečnost. Obecně jsou hydrogely díky podobnosti s extracelulární matrix a hydrofilní povaze dobře snášeny organismem – jsou „biokompatibilní“. Legislativní hodnocení biokompatibility materiálu ale není tak snadné. Na základě místa aplikace (povrch kůže/implantáty/styk s krví) a délky setrvání v něm, jsou materiály rozděleny do kategorií pro hodnocení biokompatibility. Dle ISO norem tyto kategorie musí splňovat zadané parametry, aby byly hodnoceny jako biokompatibilní. Kromě cytotoxicity to dle určené kategorie také může být senzibilizace, dráždivost, akutní systémová toxicita, pyrogenita materiálu, subakutní/subchronická toxicita, genotoxicita, hemokompatibilita, chronická toxicita a karcinogenita [43].

Velmi důležitým aspektem při výběru materiálu jsou možnosti jeho podání. Hydrogely mohou být předem připraveny před vlastní aplikací („*pre-formed*“ hydrogel) či ve formě scaffoldů – bez buněk či již s předkultivovanými buňkami. Tyto materiály je potřeba chirurgicky implantovat do požadovaného místa (invazivní metoda). V některých případech, např. pro viskosuplementaci či dermální filery, je možné i „*pre-formed*“ hydrogely aplikovat injekčně. Mezi minimálně invazivní techniky patří endoskopy, katetry či jehly. Injektovatelné hydrogely, vyznačující se *in situ* gelací, mohou být aplikovány do místa určení a vyplnit celý defekt nezávisle na jeho tvaru. Výhoda využití tohoto typu materiálu tkví také v jeho snadném použití [41].

4.1.1 Materiály pro přípravu hydrogelů využitelné v tkáňovém inženýrství

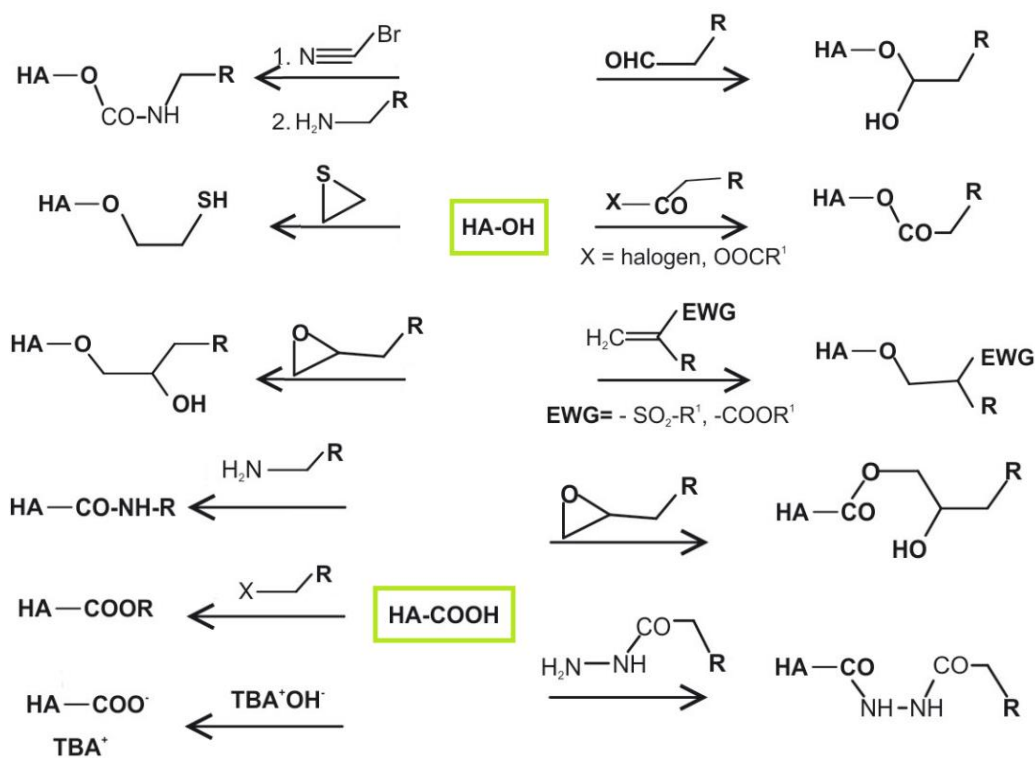
Velkou výhodou hydrogelů je jejich strukturní rozmanitost. Pro přípravu hydrogelů jako scaffoldů v tkáňovém inženýrství je využíváno mnoho typů syntetických či přírodních materiálů [5]. Obecně mezi výhody hydrogelů připravených z biopolymerů patří jejich biodegradabilita a biokompatibilita, jelikož mnoho z nich se vyskytuje v lidském těle [40, 5]. Na druhou stranu u syntetických polymerů je možné lépe kontrolovat a reprodukovat materiálové vlastnosti [40]. Lze velmi dobře řídit molekulovou hmotnost, strukturu blokových polymerů, síťování či degradaci. Doba setrvání materiálu v tkáni je důležitá kvůli zajištění účinku, ale ve většině aplikací je důležitá také degradace po určité době. V ideálním případě dochází k postupné degradaci a materiál je nahrazován plynule novou funkční tkání [5]. Čas degradace *in vivo* je také klíčový pro klasifikaci materiálů do kategorií v rámci hodnocení biokompatibility [43]. Dalším důležitým parametrem je adheze materiálu k tkáni (bioadhezivní vlastnosti) ovlivňující setrvání materiálu v místě aplikace. Pouze některé polymery mají bioadhezivní vlastnosti bez chemické modifikace – například chitosan či polyakrylová kyselina [42]. Také schopnost

buněk adherovat na povrch scaffoldu je kritériem ovlivňující výběr vhodného materiálu využitelného ve tkáňovém inženýrství. V tkáni buňky adherují přímo k extracelulární matrici, proto je výhodné připravit scaffold napodobující danou tkáň, do které je aplikován. Mezi procesy regulované buněčnou adhezí patří vlastní komunikace mezi buňkami, migrace buněk či vývoj tkáně. Narušení buněčné adheze může vést ke změně buněčných procesů. Adheze buněk na materiálu ovlivňuje také proliferaci či diferenciaci buněk [44].

Mezi využívané syntetické materiály pro přípravu hydrogelů patří polyethylenglykol, polyvinyl alkohol, polyakrylová kyselina, kopolymer polypropylen fumarátu a ethylen glykolu [5], polyesterů a různé typy polypeptidů [41]. Mezi využívané přírodní polymery a jejich deriváty patří agaróza, alginát, methylcelulóza [5], Matrigel [45], chitin, dextran, pektin, heparin, chitosan, kolagen, fibrin, želatina a **kyselina hyaluronová (HA)** [5, 45, 41].

4.1.1.1 Kyselina hyaluronová a její modifikace

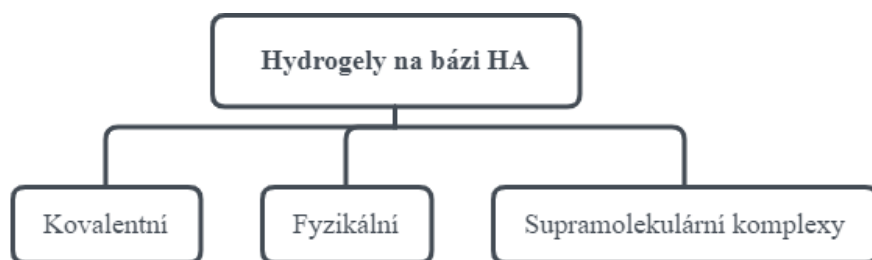
Kyselina hyaluronová je po desetiletí využívána v medicíně, ale navzdory mnoha výhodným vlastnostem, se tento polysacharid nevyznačuje dobrými mechanickými vlastnostmi [46] či dlouhým setrváním v místě aplikace díky rychlé degradaci způsobené především přítomností hyaluronidáz v těle [47]. Možností je chemická modifikace samotného polymeru, která je zaměřena na 3 funkční skupiny řetězce HA: N-acetylovou skupinu, ale především na reaktivnější karboxylovou skupinu glukuronové kyseliny a primární a sekundární hydroxylové skupiny [48], za vzniku modifikací, z nichž nejběžnější jsou zobrazeny v následujícím Obr. 11 [49].



Obr. 11 Chemická modifikace HA – modifikace hydroxylové a karboxylové skupiny [49] (použito s dovolením autora).

4.1.1.2 Hydrogely na bázi HA

Hydrogely na bázi derivátů kyseliny hyaluronové [50] jsou použitelné jako perspektivní materiál pro přípravu scaffoldů v oblasti tkáňového inženýrství. HA hydrogely mohou také sloužit jako scaffoldy pro inkorporaci buněk či růstových faktorů. Hydrogely na bázi HA lze rozdělit na základě povahy vznikající vazby na fyzikální či kovalentní [51] a zvláště jsou uvedeny supramolekulární komplexy (Obr. 12).



Obr. 12 Schematické dělení hydrogelů na bázi HA dle typu vazby

4.1.1.2.1 Fyzikálně zesítěné hydrogely na bázi HA

Fyzikálně zesítěné hydrogely na bázi HA vznikají na základě Coulombických sil, vodíkových vazeb, hydrofobních interakcí, stereokomplexací, změnou teploty, iontové síly či pH [50]. V praxi jsou využívány k zesítnění kyseliny hyaluronové železité kationty [52] či vápenaté [53]. Wang a spol. připravili dvakrát zesítněný kompozitní hydrogel na bázi směsi alginátu s kyselinou hyaluronovou zesítněný přísadkou chloridu vápenatého vedoucí k iontové vazbě a využitím 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)-propyl]-karbodiimidu a dihydrazid adipátu vedoucí k vazbě chemické [53]. Dále jsou rozšířené termoresponsivní kompozitní hydrogely na bázi HA a pluronové kyseliny vedoucí k sol-gel přechodu při 37 °C, tedy teplotě lidského těla, dále v kombinaci s methylcelulózou [54], polyethylenglykolem či poly(*N*-isopropylakrylamidem) [55].

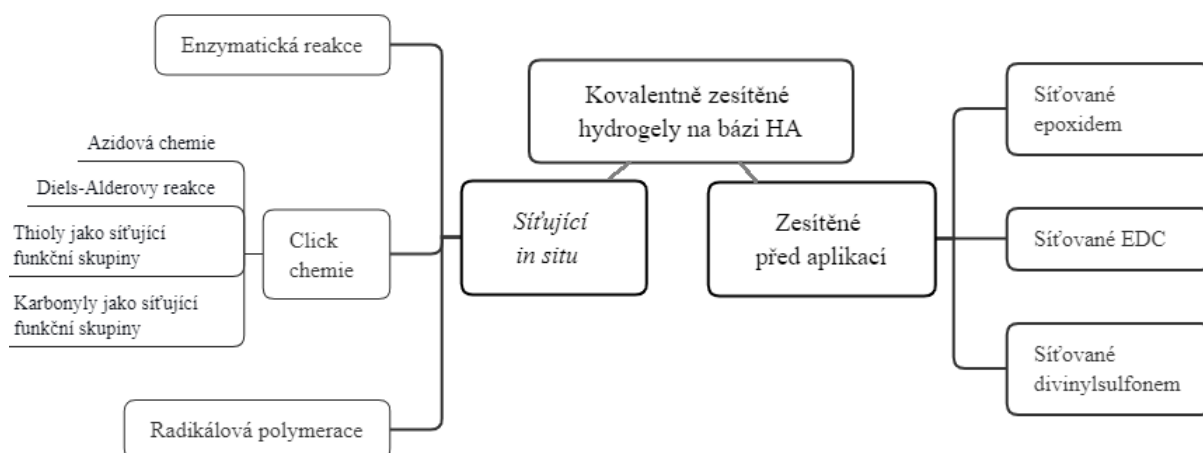
4.1.1.2.2 Supramolekulární komplexy na bázi HA

Příkladem tvorby supramolekulárního komplexu je hydrogel na bázi derivátů hyaluronanu s navázaným adamantanem a cyklodextrinem vyvinutý skupinou Rodella a spol. Tento typ hydrogelu obsahuje „guest-host“ vazby vykazující velmi zajímavou schopnost zřídnutí při toku (*shear-thinning*), kdy dochází k narušení vazeb působením namáhání vedoucí ke snížení viskozity, což usnadňuje aplikovatelnost materiálu pomocí jehly. Po odeznění napětí dochází zpětně ke znatelnému zvýšení viskozity či elastického modulu, tedy ke gelaci materiálu v místě aplikace. Výhodou je, že tvorba komplexu na supramolekulární úrovni probíhá velmi rychle, což je nezbytným kritériem při *in situ* aplikaci [56].

4.1.1.2.3 Kovalentně zesítěné hydrogely na bázi HA

Pro přípravu kovalentně zesítněných hydrogelů na bázi HA a jejich derivátů mohou být využity kondenzační, radikálové či adiční reakce. Nejběžnější způsoby přípravy hydrogelů, vycházející z nemodifikovaného hyaluronanu, jsou reakce elektrofilních dvojfunkčních činidel (bisepoxidy, divinylsulfon) s nukleofilními skupinami polysacharidového řetězce HA (hydroxyly, karboxyl). Pro zesítnění řetězců hyaluronanu lze rovněž využít kondenzační reakci karboxylu HA s bifunkčními aminy za vzniku amidů, nebo s hydroxyly dalších jednotek řetězce HA za vzniku vnitřních esterů. Tyto reakce ovšem probíhají za nefyziologických podmínek, použitá činidla vykazují značnou toxicitu, a proto nejsou vhodné pro přípravu hydrogelů *in situ* [46, 49].

Pro přípravu kovalentně zesítněných hydrogelů HA za fyziologických podmínek či přímo v organismu příjemce (Obr. 13 Síťující *in situ*) je nutné využít reakce vycházející z chemicky modifikovaného hyaluronanu. Akrylované deriváty hyaluronanu podstupují radikálové síťovací reakce, které mohou být iniciovány elektromagnetickým zářením (UV/VIS) nebo přísadkou redoxních činidel. V případě využití vhodně modifikované HA lze zvolit i metody z oblasti *click* chemie (Huisgenova adice, Diels-Alderovy reakce, thiol-en reakce), nebo např. enzymaticky katalyzované reakce [6] [41].



Obr. 13 Schematické třídění kovalentně zesítěných hydrogelů na bázi HA využitelných v tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně.

4.1.1.2.3.1 Hydrogely zesítěné před aplikací

Hydrogely zesítěné před aplikací jsou využívány především jako viskosuplementační či augmentační materiály a v dalších aplikacích, kde je výhodné použít již zesítěný hydrogel. Mezi nejrozšířenější hydrogely na bázi HA tohoto typu, patří materiály zesítěné epoxidy [57] 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)-propyl]-karbodiimidem (EDC) [58] či divinylsulfonem [59] (Obr. 13 Zesítěné před aplikací).

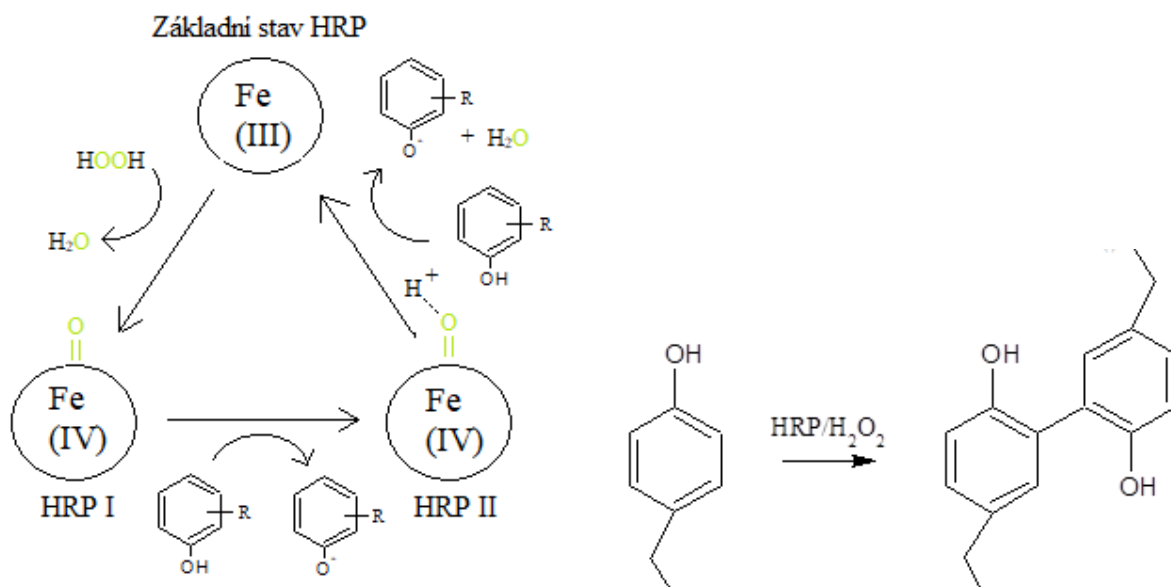
Hyaluronan lze zesítit pomocí epoxidu 1,4-butandiol diglycidyl etheru za vzniku hydrogelu vyznačující se nízkou tuhostí umožňující aplikaci pomocí tenké jehly (27–29 G) vhodného jako dermální filer [57]. K tvorbě gelů dochází také interakcí HA s EDC, kdy dochází k vytvoření esterové vazby mezi dvěma řetězci. EDC je využíváno jako síťovací činidlo pro přípravu gelů využitelných v tkáňovém inženýrství na bázi kombinace HA [58]. Hydrogely lze připravit také na bázi HA s divinylsulfonem. Nejvyššího elastického modulu (300 Pa) bylo dosaženo při nejnižším poměru HA:divinylsulfonu 2,5:1. Hydrogely s nižším elastickým modulem do 100 Pa by mohly být využity jako viskosuplementační materiál či dermální filer. Dle výsledků nebyly vlastnosti těchto gelů (elastický modul) ovlivněny injekcí materiálu přes jehlu [59].

4.1.1.2.3.2 Hydrogely sít'ující in situ

Enzymatické sít'ování

Z pohledu chemického je enzym bílkovinou, která vykazuje katalytickou aktivitu s vysokou substrátovou specifitou. V reakcích určuje její rychlost i povahu. Tento typ sít'ovacích reakcí je čím dál více využíván v tkáňovém inženýrství, jelikož mohou probíhat za fyziologických podmínek a vykazují dobrou kompatibilitu s buňkami a tkání [60, 61, 62].

Kurisawa připravil derivát na bázi kyseliny hyaluronové konjugovaný s tyraminem. Cílem bylo připravit jednoduchý enzymaticky katalyzovaný systém, schopný tvořit biokompatibilní hydrogely *in situ* [63]. Daná enzymatická reakce je založena na katalytické dekompozici peroxidu vodíku (H_2O_2) pomocí křenové peroxidázy (HRP – *horseradish peroxidase*). Jedná se o jednořetězcový hemoprotein, jehož základem je porfyrinová struktura obsahující železo. Katalyzuje množství fenolových a anilinových derivátů za využití H_2O_2 jako oxidantu (Obr. 14). Během enzymatické reakce dochází díky vazbě H_2O_2 na atom železa k vytvoření oktahedrál ní konfigurace okolo atomu železa. Vzniká tak reaktivní enzym, který interaguje se substrátem. Katalyzovanou reakcí dochází ke vzniku fenolových radikálů, které izomerizují a dimerizují, a vytváří se tak C-C (Obr. 14), případně C-O-C vazby [64, 65] vedoucí k tvorbě gelu.



Obr. 14 Křenová peroxidáza HRP katalyzující fenolový substrát za využití peroxidu vodíku (H_2O_2) jako oxidantu (vlevo). Schéma síťovací reakce iniciované přítomností peroxidu vodíku a katalyzované křenovou peroxidázou (vpravo) [61].

Reakci lze připravit scaffoldy bez buněk či hydrogely se zabudovanými buňkami. Kurisawa i mnoho dalších výzkumných týmů se zabývá systémem HRP/ H_2O_2 /substrát obsahující fenolovou skupinu, které mohou být využity v cílené distribuci léčiv či v tkáňovém inženýrství [63, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79]. Například skupina Calabra využila hydrogely na bázi HA připravené danou reakcí pro regeneraci chrupavky [47]. Výzkumem spojeným s tyraminovaným derivátem kyseliny hyaluronové se zabýval také tým Claudie Loebel. Opakovaným přidávkem 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloridu a tyraminu k HA docílila skupina zvýšení funkcionalizace tyraminu až k 20 % a tím i zvýšení Youngova modulu připravených hydrogelů. Do hydrogelů s různou koncentrací peroxidu vodíku (0,68 mM a 1,1 mM) byly inkorporovány lidské mesenchymální buňky hMDS s viabilitou 85–98 % po 6 dnech. Adheze buněk byla detekována pouze u hydrogelů s nižším stupněm zesítení (0,68 mM H_2O_2), kdežto u hydrogelů s vyšším stupněm zesítení měly buňky morfologii zakulacenou [75]. Mechanické vlastnosti hydrogelů na bázi tyraminovaného derivátu HA (HA-TA) mohou být také zvýšeny přidávkem HRP [76]. Je potřeba si uvědomit, že vliv aktivity HRP či koncentrace H_2O_2 na rychlost reakce jsou na sobě závislé. Pokud zvolíme nízkou aktivitu HRP a zvyšujeme pouze přidávek H_2O_2 , dochází k urychlení reakce a zvýšení mechanických či viskoelastických vlastností hydrogelů jen do jisté koncentrace H_2O_2 , poté již přidávek nemá na dané vlastnosti vliv. Stejný princip platí i v případě zvolení příliš nízké koncentrace H_2O_2 , kdy zvýšení aktivity HRP má vliv pouze do jisté hodnoty a pak již se nemění [75, 76].

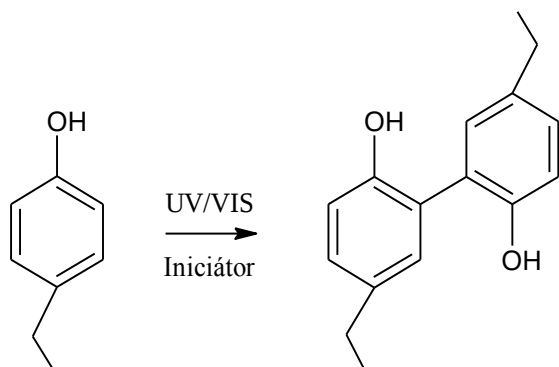
Do reakce nemusí být H_2O_2 přidáván přímo, ale lze jej generovat například při oxidaci glukózy, pomocí enzymu glukózo-oxidázy (GluO). Rychlost reakce a vlastnosti hydrogelů lze kontrolovat přidávkem enzymů (HRP či GluO) či substrátu (glukózy) nezávisle na tom, jestli je polymerem HA či jiný polymer [80].

Obecně je adheze buněk k hydrogelům na bázi HA termodynamicky nevýhodná díky hydrofilní a polyaniontové povaze polymeru [82]. Ke zvýšení buněčné adheze je možné využít adhesivních molekul jako je fibronektin [81], laminin, fibrinogen, kolagen [83, 84], či peptidové sekvence – IKVAV, YIGSR [85], RGDS [86] či RGD, které mohou být navázány na polymerní řetězec HA [82, 87, 88, 89, 90]. Pravda a jeho tým popsali syntézu derivátu na bázi kyseliny hyaluronové nesoucí hydroxyfenylovou skupinu a RGD. Hydrogely mohou být připraveny enzymatickou reakcí s HRP a H_2O_2 na stejném principu popsaném výše [88].

Kromě křenové peroxidázy je možné využít i transglutaminázu k zesílení derivátu HA a polymeru polyethylenglykolu s navázanou peptidovou sekvencí umožňující rychlou gelaci v rámci minut [91]. Dále je využívána také tyrozináza k zesílení makromolekul nesoucích hydroxyfenylové skupiny. Obdobně jako u enzymaticky katalyzované reakce vznikají C-C a C-O-C vazby. V tomto případě je tyrozináza aktivovaná vlivem přítomnosti kyslíku [92]. Hydroxyfenyl derivát HA (tyramin) byl také enzymaticky zesíten v kombinaci s furanem s rychlostí gelace v řádu minut [93].

Fotochemická příprava hydrogelů

Mnoho publikací se také zabývá fotosíťováním derivátů na bázi kyseliny hyaluronové, jako je např. metakrylovaná HA. Síťování je možné docílit působením UV světla v přítomnosti fotoiniciátoru [94, 95], např. Irgacure [94, 96]. Tento přístup umožňuje kontrolovat stupeň zesílení trváním UV expozice, koncentrací monomeru či funkcionalizací [95]. Mezi výhody derivátu GMHA (*glycid methacrylate hyaluronic acid*) patří, kromě dobré kontrolovatelnosti vlastností hydrogelů, také možnost navázání adhezivního peptidu RGD [94]. Dalším vhodným derivátem je hydroxyfenyl derivát HA, stejný jako v případě enzymaticky síťovaného systému. Systém lze kombinovat s řadou iniciátorů například riboflavinem [97] či eosinem [98], kdy dochází také k tvorbě C-C či C-O-C vazeb působením UV záření či viditelného světla (Obr. 15).



Obr. 15 Schéma hydroxyfenyl derivátu HA působením UV záření či viditelného světla za přítomnosti iniciátoru vedoucí k tvorbě C-C vazby [97, 98].

Click chemie

Pro přípravu hydrogelů na bázi derivátů hyaluronanu je velmi rozšířené využití *click* chemie. Postupy *click* chemie zahrnují vysoce efektivní reakce, které vycházejí z předem syntetizovaných stavebních bloků (např. specifických funkčních skupin). Reakce jsou vysoce chemoselektivní a relativně nezávislé na vnějších vlivech – čili probíhají rychle a efektivně např. i ve vodném prostředí za fyziologických podmínek v přítomnosti biomolekul apod. (tzv. bioorthogonální reakce). Pro tyto účely jsou využívány některé cykloadiční reakce (Huisgenova cykloadice, Diels Alderova cykloadice), dále thiol-en reakce a řazeny jsou sem i některé nukleofilní adice na karbonylu. Výhodou těchto reakcí je, že jsou biokompatibilní, u nichž nedochází ke vzniku toxických vedlejších produktů a vzniklý produkt se tak nemusí přečišťovat [99, 100, 101].

Cykloadice

Tradiční *click* reakcí využívanou pro přípravu *in situ* síťujících hydrogelů je 1,3-dipolární cykloadice azidů s alkyny, typicky probíhající za katalýzy měďných iontů (Huisgenova cykloadice). Během let se objevila řada variant této reakce využívajících derivátů cyklooktynů, kdy k usnadnění průběhu reakce je namísto katalyzátoru využito např. sterické napětí cykloalkynového kruhu [99]. Hydrogely s gelací 30 minut lze také připravit *click* chemií Diels-Alderovou reakcí na bázi furanového derivátu HA v kombinaci s dimaleimidovým derivátem polyethylenglykolu [100].

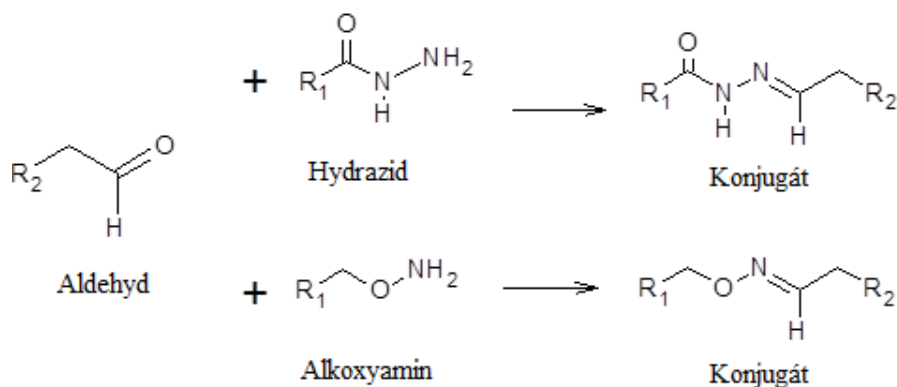
Thioly jako síťovací funkční skupiny

Tento typ síťovacích reakcí nastává u derivátu HA obsahující thiolové skupiny. Principem thiol-en reakcí je interakce derivátu mající nukleofilní skupiny (thiolu) s polymerem nesoucím elektrofilní skupiny, jako jsou vinylsulfon, maleinimid, norbornen, akrylát a alyl ether. Kromě derivátů na bázi kyseliny hyaluronové tak lze síťovat i deriváty jiných polymerů, např. polyethylenglykol, dextran či chitosan [101].

Příkladem thiol-en *click* chemie je norbornenova reakce cyklohexanového kruhu s methylenovými můstky reagující s thiol v přítomnosti volných radikálů. K tvorbě gelace dochází během několika minut působením UV světla v přítomnosti fotoiniciátoru Irgacure [94, 96] či viditelného světla s využitím eosinu-Y jako fotoiniciátoru [98]. K *in situ* gelaci využitelné v tkáňovém inženýrství by mohly sloužit také hydrogely na bázi HA zesílené thiol-en reakcí, která je iniciována viditelným modrým světlem s obsahem fosfátovaného riboflavinu či UV zářením [102]. Ke vzniku disulfidických vazeb za vzniku gelu dochází také například u derivátu pyridyl disulfid HA s dithiolem polyethylenglykolu. Gelace je poměrně rychlá do 5 minut od iniciace reakce [103]. Výhodou polymerů obsahující ve struktuře S-S vazbu je jejich přirozený mukoadhezivní charakter daný stejným procesem probíhajícím v lidském těle u mucinu [104].

Karbonyly jako síťovací funkční skupiny

Další možností modifikace kyseliny hyaluronové je příprava její oxidované formy (aldehyd HA) [105]. Tento polymer lze zesíť pomocí hydrazidů či alkoxyaminů [106]. Obecně aldehydy dobře reagují s hydrazidy a dochází k tvorbě hydrazonové vazby (Schiffova báze). Obdobně jako hydrazidy, také alkoxyaminy reagují s aldehydem s výslednou oximovou vazbou (Obr. 16).



Obr. 16 Reakce hydrazidu/alkoxyaminu s aldehydem vedoucí k tvorbě stabilního konjugátu.

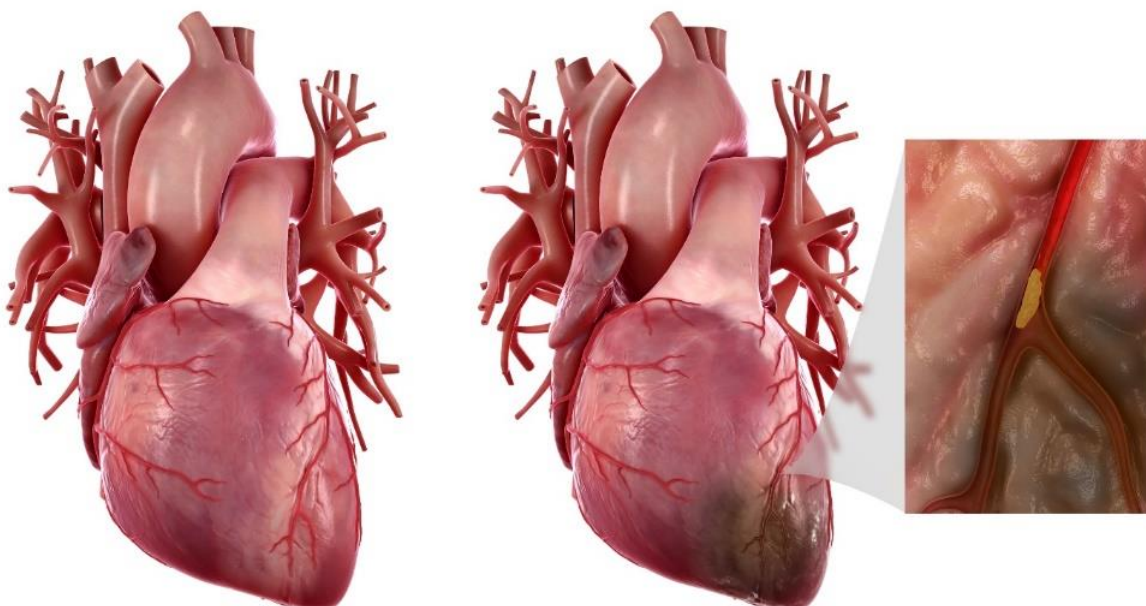
In situ gelující hydrogely na bázi aldehydu HA síťované genipinem byly připraveny týmem autora Tana. Na základě histologických dat z *in vivo* experimentu na modelu malých zvířat (myši) nebyla zjištěna žádná negativní reakce organismu na daný materiál [107]. Skupina stejného autora také připravila hydrogely na bázi oxidované kyseliny hyaluronové s N-sukcinylním chitosanem využívající reakce aldehydické a amino skupiny [108].

4.2 Regenerace tkáně po infarktu myokardu

Kardiovaskulární onemocnění jsou jednou z hlavních příčin úmrtí ve vyspělých zemích [45, 109, 110, 111]. Kromě vysoké mortality tvořící až 1/3 všech úmrtí v USA [109, 110], jsou tyto nemoci také spojené s enormními náklady na zdravotní péči [45, 109, 110, 111].

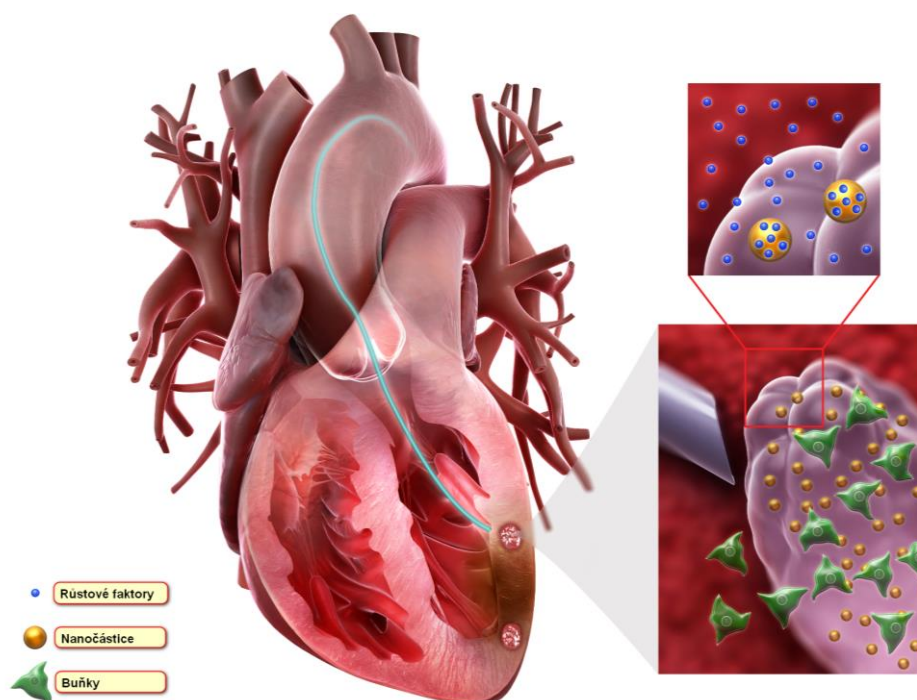
Při tomto onemocnění dochází k náhlému přerušení krevního zásobení části srdce. Příčinou je uzavření srdeční artérie, což vede k úmrtí kardiomyocytů. Do postižené oblasti poté migrují buňky zodpovědné za imunitní odpověď, jako jsou makrofágy, monocyty a neutrofily. Secernované metaloproteinázy degradují extracelulární matrix, což způsobuje odplavení myocytů, celkové oslabení struktury kolagenového scaffoldu vedoucí ke ztenčení srdeční stěny a tvorbě jizvy. Tento proces je nazýván remodelace levé komory [45, 112] (Obr. 17).

Pomocí dostupných metod léčby lze ovlivnit pouze funkční tkáň srdce. Obvykle je využívána farmakologická terapie či stenty k rozšíření ucpaných cév. Revaskularizační terapie je účinná při obnovení krevního toku do srdce, nicméně zbytkové zjizvení myokardu zůstává natrvalo. Zlepšení zjizvení po infarktu a obnovení srdeční funkce může eliminovat kaskádu událostí, která vede k srdečnímu selhání. V pokročilém stádiu srdečního selhání je jedinou možností transplantace srdce. Nevýhodou je samozřejmě omezené množství dárců [113].



Obr. 17 Vlevo: Zdravé srdce s průchodnými cévami, které zásobují srdeční sval krví. Vpravo: blokáce koronární artérie způsobující infarkt myokardu [114] (použito s dovolením koordinátora projektu AMCARE).

Jednou z možností regenerace nekrotické tkáně po infarktu myokardu je využití buněčné terapie [115, 116, 117]. Buňky samotné mohou být aplikovány pomocí katetru jako minimálně invazivního nástroje [118]. Na druhou stranu s rozvojem tkáňového inženýrství se výzkum stále více zaměřuje na přípravu scaffoldu s inkorporovanými buňkami či růstovými faktory (Obr. 18). Výhodou využití scaffoldu je jeho prostředí vhodné pro inkorporované buňky, a především prodloužení setrvání v daném místě aplikace pro zvýšení účinnosti léčby. Kromě samotných buněk či kombinace s vhodným scaffoldem lze využít k regeneraci i samotný hydrogel bez přítomnosti buněk [112, 116, 119, 120].



Obr. 18 Aplikace injektovatelného materiálu s obsahem nanočástic s inkorporovanými růstovými faktory či jinými biologicky aktivními látkami a obsahem buněk (kmenové buňky, kardiomyocyty či jiný buněčný typ) do srdeční stěny [114] (použito s dovolením koordinátora projektu AMCARE).

4.3 Využití buněčné terapie při regeneraci srdeční tkáně po infarktu myokardu

Buněčný typ by měl být zvolen dle typu tkáně, která je cílená k regeneraci. Lidské srdce obsahuje dva typy buněk: kardiomyocyty a buňky převodního srdečního systému (*cardio pacemaker cells*). Kardiomyocyty jsou schopny se smršťovat a natahovat, což je důležité pro pumpování srdce. Druhý typ buněk je zodpovědný za přenos elektrických impulzů stimulujících srdeční stah a komunikaci mezi buňkami. Donedávna bylo srdce považováno za postmitotický orgán s terminálně diferencovanými myocyty neschopné sebeobnovy. Nicméně tento pohled byl změněn při objevu srdečních progenitorových buněk [121, 122, 123], které jsou schopné diferenciaci do kardiomyocytů, buněk hladkého svalstva a endoteliálních buněk. Tyto buňky tvoří přechodné stádium mezi kmenovými a zralými, specializovanými buňkami [45].

Při infarktu myokardu dochází k smrti kardiomyocytů. Jedna z možností léčby srdeční tkáně po infarktu myokardu tkví ve využití kmenových buněk. Pro své unikátní vlastnosti sebeobnovy a diferenciaci mají velký potenciál při terapii kardiovaskulárních onemocnění [115, 124].

Na základě původu lze kmenové buňky rozdělit do dvou typů: embryonální (ESC) a somatické. Využití embryonálních kmenových buněk se potýká s etickými, právními, biologickými a imunologickými problémy. Prozatím je jejich využití v klinických studiích odloženo díky nedostatečnému prozkoumání [115, 124].

Dospělé kmenové buňky (ASC) mají schopnost se diferenciovat do zralých buněk s charakteristickou morfologií a specializovanou funkcí, navíc jsou schopné sebeobnovy po dlouhou dobu. Mezi tyto kmenové buňky patří srdeční kmenové buňky (CSC), hematopoietické pluripotentní kmenové buňky (HSC), endoteliální progenitorové buňky (EPC) a mesenchymální kmenové buňky (MSC) [115, 120, 124]. U CSC buněk je velkou nevýhodou problém s identifikací, izolací a kultivací. Naproti tomu HSC buňky jsou již využívány v klinických studiích. Ke zlepšení angiogeneze a vaskularizace srdeční tkáně by mohly být využity endoteliální progenitorové buňky [115, 124].

Další možností je využití buněk kostní dřeně (BMSC – *bone marrow stem cells*, BMMSC – *bone marrow-derived mesenchymal stem cells*, BMMNC – *bone marrow mononuclear cells*). Výhodou těchto kmenových buněk je možnost získání jejich velkého množství (velká výtěžnost), a také obsahují důležité buněčné typy, jako jsou hematopoietické kmenové buňky (HSC), mesenchymální buňky (MSC) a endoteliální progenitorové buňky (EPC), které mají potenciál diferencovat do kardiomyocytů. [115, 124]. Výhodou BMMSC je produkce růstových faktorů VEGF (*vascular endothelial growth factors*) a FGF (*fibroblast growth factor*), které zlepšují angiogenezi. Tuto schopnost mají také buňky získané z tukové tkáně (*adipose-derived stem cells*, ADSC) [125].

Dále lze k léčbě využít kmenové buňky periferní krve (PBSC – *peripheral blood stem cells*). Na rozdíl od BMMNC neobsahují MSC. S nízkou dostupností zdrojového materiálu a malým množstvím kmenových buněk se vědci potýkají při využití kmenových buněk pupečnickové krve (UBC – *umbilical cord blood cells*) [116]. V neposlední řadě se výzkum ubírá směrem k využití indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPSC – *induced pluripotent stem cells*) [126].

Obecně je u kmenových buněk diskutován problém s kontrolovanou diferenciací do specifické linie. Je předpokládáno, že buňky nacházející se v prostředí napodobující tkáň srdce, budou diferenciovat do této buněčné linie. Z tohoto důvodu je důležité zvolit vhodné mikroprostředí, kterým by mohl být právě hydrogel [120].

4.4 Využití hydrogelů při regeneraci srdeční tkáně po infarktu myokardu

Jednou z možností regenerace myokardu je využití hydrogelů. Ty mohou být acelulární či sloužit jako nosiče buněk či jiných látek podporujících angiogenezi. Při regeneraci srdce, obdobně jako u většiny tkání (kromě chrupavky a rohovky), je vaskularizace velmi důležitým hlediskem, jelikož je nutné zajištění krevního zásobení do postižených míst [42, 118].

4.4.1 Materiály pro přípravu hydrogelů

Mezi materiály, využitelné pro přípravu hydrogelů pro regeneraci myokardu, patří přírodní či syntetické deriváty či přímo přírodní materiály [112, 119], jako je alginát, agaróza, chitosan, decelularizovaná extracelulární matrix, fibrin, kyselina hyaluronová či její modifikace, keratin, Matrigel [45], kolagen, želatina či laminin [120]. Jejich přítomnost či podobnost s molekulami nacházejícími se v lidském těle snižuje možnost nežádoucí imunologické odpovědi po implantaci [120]. Ze syntetických materiálů by mohly být využity deriváty polyethylenglykolu, termoresponsivní poly(N-isopropyl)akrylamid [45], polylaktát, kopolymer kyseliny mléčné a polyglykolové, polykaprolakton či polyuretan. Obecně u syntetických polymerů existuje větší riziko cytotoxicity. Pouze jen některé ze syntetických materiálů (polyethylenglykol, polylaktát, kopolymer kyseliny mléčné a polyglykolové) byly uznány FDA pro klinické použití. Další možností je použití hybridních hydrogelů složených ze syntetického a přírodního polymeru [120].

4.4.2 Acelulární hydrogely

Využití samotných hydrogelů bez buněk či jiných atraktantů pro léčbu infarktu myokardu spočívá v tvorbě mechanické opory ischemického srdce. Z tohoto důvodu bylo provedeno mnoho preklinických studií zaměřených na porovnání vlivu mechanických vlastností (Youngova modulu) hydrogelu a času jeho setrvání v místě aplikace na regenerační schopnost srdeční tkáně po infarktu myokardu. Předpokladem je využití hydrogelů s mechanickými vlastnostmi srovnatelnými se srdeční tkání. Tuhost srdeční tkáně se pohybuje od 10–20 kPa (konec diastoly) do 200–500 kPa (konec systoly) [127].

Dle práce Dobnera je rychlost degradace důležitá pro regeneraci srdeční tkáně. Na příkladu nedegradabilního hydrogelu na bázi polyethylenglykolu ukázal pozitivní vliv delšího setrvání materiálu v místě aplikace [128]. Zlepšení opory srdeční tkáně po 8 týdnech po implantaci díky pomalejší degradaci bylo zaznamenáno i u metakrylového derivátu HA [121]. Byl také zkoumán vliv

mechanických vlastností. Za tímto účelem byly připraveny hydrogely s Youngovým modulem 8 kPa a 43 kPa. Pozitivní vliv byl zjištěn při implantaci obou typů materiálu na modelu velkého zvířete (ovce). Statisticky menší velikost tkáně postižené po infarktu myokardu, byla zaznamenána pouze u hydrogelů s vyšším Youngovým modulem [129]. Obdobně byly do srdeční tkáně u ovcí injektovány hydrogely na bázi HA také s různou tuhostí – 1 kPa a 41 kPa. U hydrogelu se zvýšenou tuhostí bylo dosaženo zlepšení remodelace LVEF (ejekční frakce levé komory) v porovnání s méně zesíťným hydrogelem a kontrolou [130]. Obdobných výsledků bylo docíleno i u dalších studií [131]. V klinické studii se nachází hydrogel bez buněk na bázi alginátu (Algisyl). Terapeutický účinek byl lepší u pacientů léčených pomocí Algisylu se standardní farmakologickou léčbou v porovnání se skupinou léčenou pouze farmakologickou léčbou [132, 133].

Také typ hydrogelu hraje svou roli při regeneraci myokardu po infarktu myokardu, především pokud hydrogely přirozeně obsahují ve své struktuře peptidové sekvence, kolagen, glykosaminyglykany, které mohou podporovat buněčnou komunikaci neboli *crosstalk*, což může poté vést k migraci buněk, vaskularizaci a regeneraci myokardu [134]. Přednost acelulárních hydrogelů tkví v jednoduchosti aplikace a manipulovatelnosti, jelikož není nutná zdlouhavá příprava, jako je tomu při inkorporaci buněk. Navíc z legislativního hlediska spadají hydrogely bez buněk do jiné kategorie pro registraci produktu. Obecně je snazší převést acelulární hydrogely do praxe než hydrogely obsahující buňky.

4.4.3 Inkorporace buněk do hydrogelu

I přes velký potenciál, nemají terapie pomocí kmenových buněk v klinických studiích uspokojivé výsledky kvůli lokalizaci do místa aplikace, životaschopnosti a nízké účinnosti inkorporovaného graftu. Mezi faktory ovlivňující životaschopnost buněk patří netěsnost v místě vpichu, únik materiálu z místa aplikace, generace neadekvátní extracelulární matrix či následná apoptóza [135]. Buněčná viabilita po aplikaci je časově omezená – v závislosti na buněčném typu se pohybuje od 24 do 48 hod. Pro dosažení lepších výsledků je nezbytné zvýšit životaschopnost kmenových buněk. Jednou z možností je využití hydrogelu jako matrice pro inkorporaci buněk, ať už bez nebo s dalšími podpůrnými látkami. Hydrogel tvoří mechanickou oporu i vytváří vhodné prostředí pro růst či diferenciaci buněk. Jako možný buněčný zdroj mohou být použity všechny buněčné typy uvedené v kapitole 4.3. Ke zlepšení komunikace (*crosstalk*) mezi buňkami by mohly být využity speciální materiály s různou povrchovou úpravou či využity peptidové sekvence, jako je RGD [134].

4.4.4 Inkorporace růstových faktorů či jiných látek do scaffoldu

Do scaffoldu lze inkorporovat množství léčiv s farmakologickým účinkem anebo růstové faktory. Vzhledem k aplikaci je vhodné využití proangiogenních růstových faktorů, jako jsou VEGF (*vascular endothelial growth factors*), FGF (*fibroblast growth factor*), intermedin, angiopoetin či erytropoetin. Proliferace kardiomyocytů může být podpořena přidavkem periostinu či neuregulin-1. IGF-1 (*Insulin-like growth factor 1*) je využíván spolu s kmenovými či progenitorovými buňkami pro zlepšení jejich viability. Proti apoptóze působí například HGF (*hepatocyte growth factors*), PDGF (*Platelet-derived growth factor*) či G-CSF (*Granulocyte-colony stimulating factor*) faktory [136].

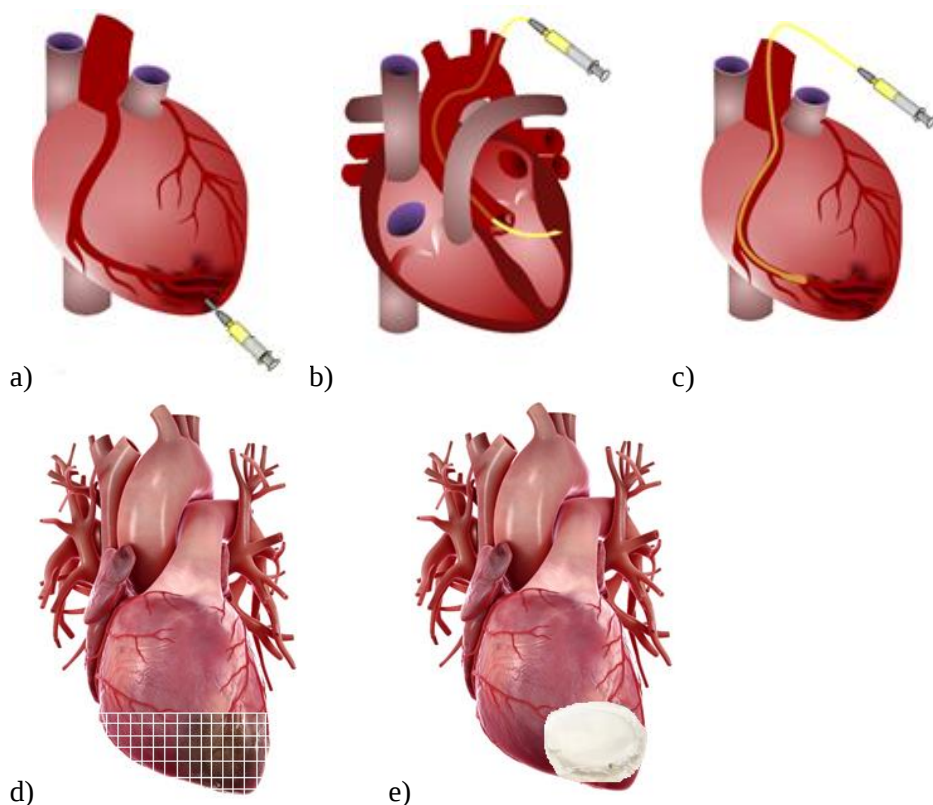
4.5 Metody aplikace

Velmi důležitým aspektem, ovlivňujícím výběr materiálu a jeho formy, je způsob aplikace. Obecně existují 3 metody pro injektaci materiálů do srdeční stěny [117] či lze aplikovat tenkou vrstvu biomateriálu (*patch*) na povrch epikardu [112, 119].

Jednou z možností aplikace je přímá injekce do epikardu (Obr. 19 a), ale tato metoda je invazivní a vyžaduje otevření hrudníku. Proto je cílem nalézt techniku, která by byla minimálně invazivní. K tomuto lze využít katetr představující „hadičku“, která je zavedena do artérie (arteriální katetr) a to buď transendokardiálně (Obr. 19 b) do oblasti postižené po infarktu myokardu či intrakoronárně (Obr. 19 c) za pomoci koronárního balónku [45, 112, 117, 119, 137, 138].

Polymerní struktura *patch* materiálu může vytvářet podpůrnou strukturu pro ischemické srdce (Obr. 19 d) nebo může být materiál připevněn pomocí adhezivního materiálu na postižené místo srdce (Obr. 19 e). Mezi komerčně dostupná a využívaná tkáňová lepidla patří BioGlu založené na kombinaci bovinního sérového albuminu (BSA) a glutaraldehydu [139]. Vazba je založena na interakci amino a aldehydické skupiny. Dále je možné využít komerčně dostupný produkt CoSeal [140]. Nevýhodou využití *patch* materiálu je nutnost otevření hrudníku během jeho aplikace.

Na základě možných metod aplikace hydrogelů je vhodné využití *in situ* gelujících materiálů (injektovatelných hydrogelů) [45, 141, 142]. Cílem je připravit materiál, který by zgeloval ihned při aplikaci do požadovaného místa. Na druhou stranu ke gelaci nesmí docházet v aplikátoru (katetru/jehle), abychom se vyhnuli jeho blokaci [42, 45, 142]. Důležité je si uvědomit velikost jehly (26–28 G) a vnitřního poloměru katetru, který je velmi malý, což značně ovlivňuje vlastnosti vybraného materiálu [142].



Obr. 19 Metody aplikace hydrogelů do srdce sířujících *in situ*: a) přímá epikardiální injekce b) intrakoronární aplikace c) transendokardiální injekce [141] d-e) epikardiální aplikace patch materiálu [138] (použito s dovolením koordinátora projektu AMCARE).

4.6 Preklinické a klinické studie

Buněčná terapie tkáně po infarktu myokardu bez buněčného nosiče byla studována v rámci řady preklinických studií a postoupila i do fáze klinického testování. Naproti tomu kombinace scaffoldu s inkorporovanými buňkami je především ve stádiu preklinických studií.

Srdeční progenitorové buňky byly použity v mnoha preklinických a už i také v klinických studiích, jako jsou CADUCEUS, SCPIO, ALCADIA. U studie SCPIO byli pacienti rozděleni do více skupin – na základě velikosti a lokalizace tkáně postižené po infarktu myokardu a bylo jim aplikováno odlišné množství buněk. Bylo zaznamenáno snížení velikosti infarktu u pacientů, kteří podstoupili buněčnou terapii. V případě studie ALCADIA byl v kombinaci s buňkami použit růstový faktor FGF. Po 6 měsících od aplikace byl zaznamenán nárůst LVEF a snížení velikosti infarktu. Terapeutický účinek srdečních progenitorových buněk izolovaných z endokardiálních biopsií, které byly následně dodány u pacientů po infarktu myokardu, byl zkoumán v rámci studie CADUCEUS. Ve studii byla zaznamenána redukce velikosti místa postiženého po infarktu myokardu a také zvýšení zdravé srdeční části. Na základě všech tří studií (CADUCEUS, SCPIO, ALCADIA) nebylo možné stanovit terapeutický efekt léčby, jelikož se jednalo pouze o Fázi I klinické studie, kde byl zkoumán malý počet subjektů. Více průkazné výsledky budou získány z Fáze II klinické studie [143].

Kardiopoietické kmenové buňky byly také použity v klinické studii C-CURE. Nebyla zjištěna systémová toxicita či zhoršení stavu pacientů. Byl zaznamenán nárůst LVEF, ale je nutné další klinické testování [144]. Bezpečnost aplikace kardiopoietických kmenových buněk byla prokázána také v klinické studii (CHART-1) stejného autora, který poukazuje na nutnost dalších studií pro prokázání terapeutického efektu [145]. V rámci jiné klinické studie byly také aplikovány BMC. Během terapie došlo ke zvýšení ejekční frakce LV a snížení velikosti infarktu. Byl zaznamenán pozitivní účinek na ventrikulární arytmií, recidivu infarktu myokardu a mortalitu pacientů [146].

Jak již bylo popsáno v kapitole 4.4.3, léčba pomocí kmenových buněk v klinických studiích nedosahuje uspokojivých výsledků, především kvůli nízké životaschopnosti buněk. Zvýšením retence buněk v místě aplikace se zabývá studie skupiny autorky Roche, ve které jsou diskutovány možné buněčné nosiče. Byly zde testovány 2 typy hydrogelů na bázi chitosanu a alginátu a 2 různé matrice (*patch*) na bázi alginátu a kolagenu. V porovnání s kontrolou (0,9% roztok NaCl) bylo u konstruktů dosaženo zlepšení retence buněk (hMSCs) v místě aplikace. U hydrogelů a matric bylo zachováno v místě aplikace 50–60 % buněk, kdežto v případě solného roztoku pouze 10 % [116].

Z těchto důvodů je množství preklinických studií zaměřeno na testování hydrogelů, ať už s inkorporovanými buňkami či acelulárních hydrogelů. V rámci *in vivo* experimentu byl na modelu mini prasete testován hydrogel na bázi HA obsahující oligopeptidové vazby (GGRMSMPV), které mohou být rozštěpeny působením metaloproteináz [147]. V jiné práci byl využit injektabilní fibrinový scaffold. Na modelu malých zvířat došlo u skupiny, u které byl použit *in situ* síťující hydrogel, ke snížení úmrtnosti, zmenšení velikosti oblasti postižené po infarktu myokardu a zvýšení průtoku krve oproti kontrole [148]. Srdeční progenitorové buňky byly také inkorporovány do *patch* materiálu na bázi želatiny a HA připraveného pomocí 3D tisku [149]. Do injektabilních hydrogelů také na bázi HA byly enkapsulovány endoteliální progenitorové buňky. Signifikantní zvýšení vaskulogeneze a zlepšení ventrikulární funkce v porovnání s kontrolou byly zaznamenány po aplikaci konstruktů v rámci klinické studie [150].

5 METODICKÁ KONCEPCE PRÁCE

Disertační práce je zaměřena na vývoj a charakterizaci fyzikálních vlastností hydrogelů na bázi derivátů kyseliny hyaluronové (HA) pro regeneraci srdeční tkáně po infarktu myokardu. Mezi vybrané konjugáty patří hydroxyfenyl deriváty HA (HA-TA, HA-PH-RGD, HA-PH-FITC) a oxidovaná forma HA (HA-Ox). V prvním případě lze gely připravit reakcí hydroxyfenyl derivátu HA a peroxidu vodíku, která je katalyzována křenovou peroxidázou HRP. Hydrogely na bázi druhého derivátu HA-Ox lze připravit reakcí s alkoxyaminy.

Rychlost gelace od pár sekund až po několik minut lze regulovat vlastnostmi HA derivátu, jako je molekulová hmotnost (M_w) či stupeň substituce (DS), koncentrací roztoku derivátu a v neposlední řadě také množstvím síťovacích činidel (koncentrací peroxidu vodíku a aktivitou enzymu HRP, resp. koncentrací alkoxyaminu POA při zesítnění HA-Ox derivátu). Obdobně i stanovované mechanické, viskoelastické vlastnosti či botnění hydrogelů jsou ovlivněny těmito parametry. Rychlost gelace a vlastnosti hydrogelů jsou v případě reakce HA-Ox s alkoxyaminem značně ovlivněny také pH roztoku či iontovou silou.

Charakter hydrogelů musí být přizpůsoben pro možnou inkorporaci buněk a *in situ* aplikaci materiálu do místa určení. Jednou možností minimálně invazivní aplikace hydrogelu je využití katetru, což však má i mnoho úskalí. Viskozita prekurzorových roztoků derivátu HA musí být uzpůsobena malému profilu jehly a délce katetru s malým vnitřním poloměrem. Gelace musí být dostatečně rychlá, aby bylo zamezeno úniku materiálu z místa aplikace způsobující možnou embolizaci. Na druhou stranu nesmí být příliš rychlá, aby nedošlo k zatuhnutí materiálu v katetru či jehle. U druhého zařízení pro aplikaci hydrogelů – zařízení SPREADS, musí být vhodnými vlastnostmi prekurzorových roztoků a hydrogelu zajištěna aplikovatelnost do vnitřního prostoru této „kapsy“.

6 MATERIÁLY A METODY

6.1 Materiály

V tabulce je uveden souhrn materiálů a šarží použitých v této práci. Chemikálie pro potřebné pro kultivaci (není předmětem této disertační práce) jednotlivých buněčných typů a k vyhodnocení růstu/viability buněk jsou uvedeny v příloze 12.1.

Tab. 1 Souhrn materiálů a šarží

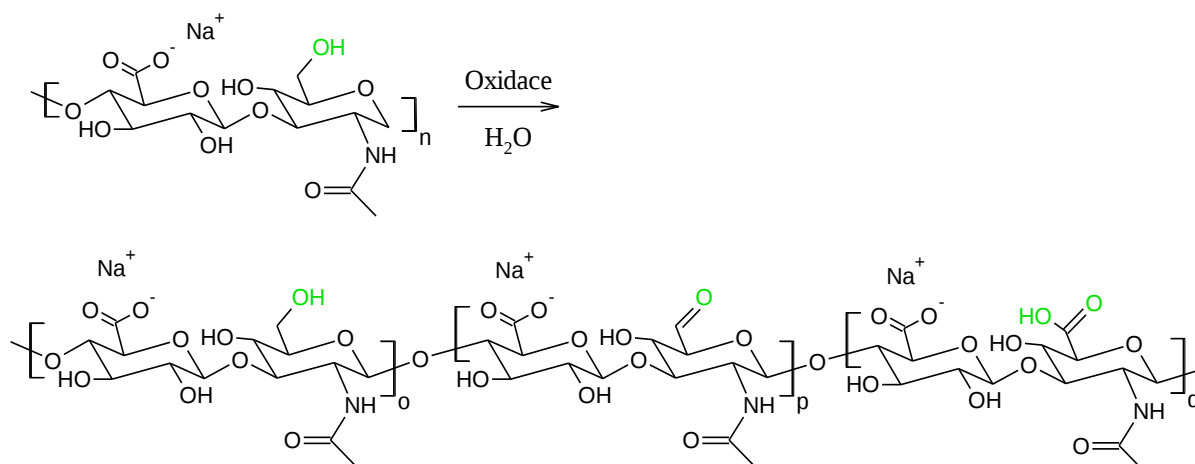
Skupina	Název použité chemikálie	Zkratka/ vzorec použité chemikálie	Číslo šarže	CAS	Konc./ aktivita	Dodavatel
Deriváty HA	Aldehyd HA/oxidovaná forma HA	HA-Ox	Kapitola 6.1.1.1	-	-	Contipro a.s.
	Tyraminovaný/ hydroxyfenyl derivát HA	HA-TA	Kapitola 6.1.1.2.1	-	-	Contipro a.s.
	Hydroxyfenyl derivát HA s navázanou RGD sekvencí	HA-PH-RGD	Kapitola 0	-	-	Contipro a.s.
	Hydroxyfenyl derivát HA s navázanou FITC skupinou	HA-PH-FITC	Kapitola 6.1.1.2.3	-	-	Contipro a.s.
Enzymy	Křenová peroxidáza	HRP	PL001201211 PL001061014 PL001091215	-	310 U/mg 253 U/mg 256 U/mg	Enzymo plus
	Glukózo- oxidáza (<i>Glucose Oxidase from Aspergillus niger</i>)	GluO	1345292V	9001-37-0	160–240 (207) U/mg	Sigma- Aldrich
	Galaktózo- oxidáza (<i>Galactose Oxidase from Dactylium dendroides</i>)	GaO	SLBB1701	9028-79-9	500–1500 (506) U/ml	Sigma- Aldrich
	Hyaluronidáza	BTH	SLCC2160	37326-33- 3	-	Sigma- Aldrich
Stanovení sterility	<i>Tryptone Soya Broth</i>	-	1572001	-	-	OXOID
	<i>Thioglycollate Medium U.S.P.</i>	-	1215607	-	-	OXOID
Příprava prasečí palzmy	Prasečí plazma	-	-	6132-04-3	-	jatka MASOEKO Letohrad
	Citronan sodný dihydrát	$C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$	1904110414	6132-04-3	-	PENTA
Barviva	Sirius Red	$C_{45}H_{26}N_{10}Na_6O_{21}S_6$	1369139	2610-10-8	-	Fluka
	Methylenová modř (<i>Erioglaucine Disodium Salt</i>)	$C_{37}H_{34}Na_2N_2O_9S_3$	MKCG5403	3844-45-9	-	Sigma- Aldrich

Skupina	Název použité chemikálie	Zkratka/ vzorec použité chemikálie	Číslo šarže	CAS	Konc./ aktivita	Dodavatel
Příprava a stanovení aktivity HRP	Chlorid vápenatý dihydrát	CaCl ₂ ·2H ₂ O	A0746382	10035-04-8	-	MERCK
	Octan sodný trihydrát	C ₂ H ₃ NaO ₂ ·3H ₂ O	PP/2016/13207	6131-90-4	0,2M	LACHNER
	Kyselina octová	CH ₃ COOH	-	64-19-7	99%	PENTA
	Pyrogallol	C ₆ H ₆ O ₃	2012111217	87-66-1	5%	PENTA
	Bovinní sérový albumin	BSA	SLBW 1397	9048-46-8	-	Sigma-Aldrich
Stanovení aktivity GluO	O-Dianisidin	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂	MKBG4002V	119-90-4	-	Sigma-Aldrich
	Glukóza (D-(+)-Glucose)	Glu	E1591	50-99-7	-	Sigma-Aldrich
Příprava a stanovení konc. H ₂ O ₂	Peroxid vodíku	H ₂ O ₂	1909120917	7722-84-1	30%	PENTA
	Manganistan draselný	KMnO ₄	2206090617	7722-64-7	0,0117M	PENTA
	Kyselina šťavelová	C ₂ H ₂ O ₄ ·2H ₂ O	1004950100	6153-56-6	0,0294M	Sigma-Aldrich
	Kyselina sírová	H ₂ SO ₄	-	7664-93-9	96%	PENTA
Titrace POA	O,O'-1,3-propandiyl-bishydroxylamin dihydrochlorid	POA	BCBV2416 BCBT7173 1356536V	10485-82-1	-	Sigma-Aldrich
	Methylčerven, 4'-(dimethylamino)azobenzen-2-karboxylová kyselina		05912ME	493-52-7	-	Sigma-Aldrich
	Kyselina chlorovodíková	HCl	PP/2013/12952	7647-01-0	35%	Lach:ner
	Hydroxid sodný mikroperly	NaOH	PP/2017/01183	1310-73-2	-	Lach:ner
	Hydrogenuhličitan sodný	NaHCO ₃	PP/2010/13518	144-55-8		Lach:ner
Degradace	Nativní HA (1,91 MDa)	-	-	-	-	Contipro a.s.
	Hyaluronidáza	BTH	190115	37326-33-3	1753,5 IU/mg	Finepharm S.A.
	4-(Dimethylamino)benzaldehyd	C ₉ H ₁₁ NO	BCBR2575V	100-10-7		Sigma-Aldrich
Ostatní	Galaktóza (D-(+)-Galactose)	Ga	SLBH4735V	59-23-4	-	Sigma-Aldrich
	Fluorescein isothiokyanát isomer I	C ₂₁ H ₁₁ NO ₅ S	SLBN3614V	3326-32-7	-	Sigma-Aldrich
Solventy	Demineralizovaná voda	DEMI	-	-	-	Contipro a.s.
	Injekční voda	-	-	-	-	Contipro a.s.
	Chlorid sodný	NaCl	-	7647-14-5	-	Baxter

6.1.1 Deriváty kyseliny hyaluronové

6.1.1.1 Formyl hyaluronan sodný (HA-Ox)

Formyl hyaluronan sodný (oxidovaná forma HA, aldehyd HA, HA-Ox) je chemicky modifikovaný hyaluronan sodný – poly(sodium-β-D-glucuronate-[1-3]-(6-oxo)-β-N-acetyl-D-glucosamine-[1-4])). Jeho syntéza je založena na oxidaci primárních hydroxyskupin v poloze 6 N-acetylglukosaminu. Oxidace primárních hydroxyskupin vede k požadovaným aldehydickým skupinám a karboxylovým skupinám jako vedlejší produkt (Obr. 20). Obsah aldehydu a karboxylových skupin je popsán jako stupeň substituce pomocí NMR [151, 152]. V Tab. 2 a Tab. 3 je popsána specifikace daného derivátu.



Obr. 20 Schéma přípravy a struktura formyl hyaluronanu sodného (HA-Ox).

Tab. 2 Specifikace HA-Ox – vlastnosti

Analyzá	Specifikace
Vzhled	Bílý nebo téměř bílý prášek nebo granule
Identifikace pomocí NMR	Detekce substance
Molekulová hmotnost (SEC-MALLS) (kDa)	55–1050*
Stupeň substituce (NMR) (%)	3–12*
Ztráta sušením (%)	≤ 15
Popel (%)	≤ 10
Mikrobiální kontaminace (CFU/g)	≤ 100
Bakteriální endotoxiny (IU/mg)	< 0,06

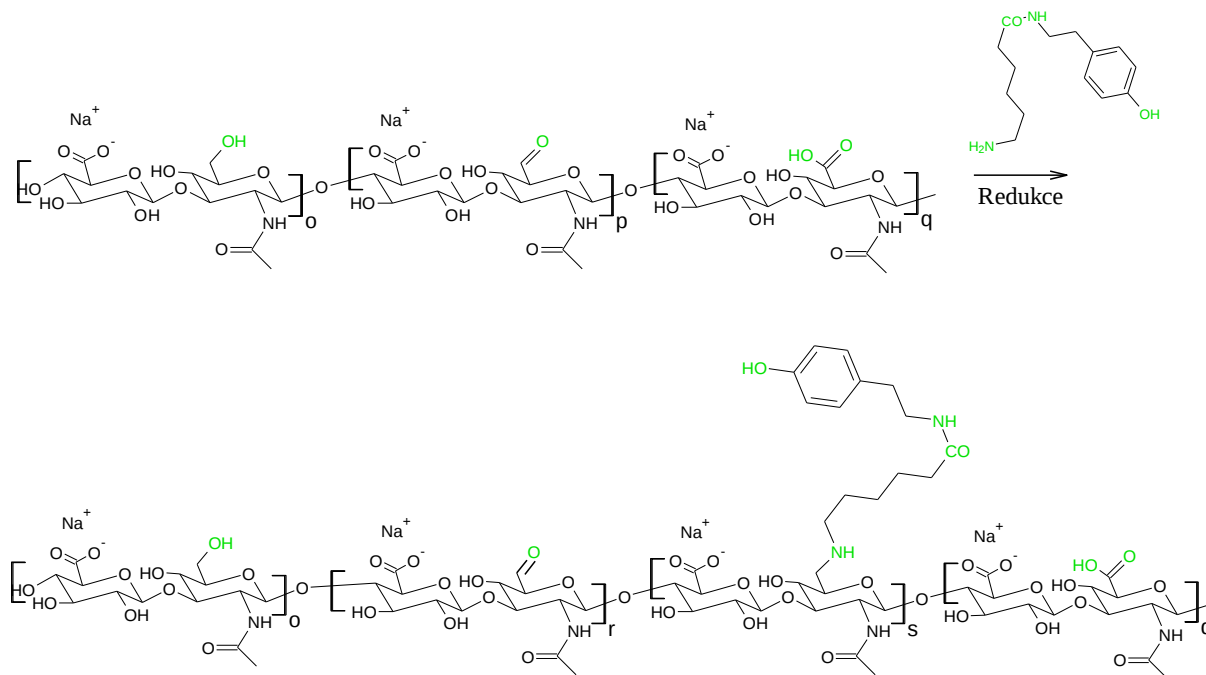
***Tab. 3** Specifikace HA-Ox – parametry standardně připravovaných HA-Ox derivátů

	A	B	C	D
Molekulová hmotnost (SEC-MALLS) (kDa)	55–85	250–350	420–630	750–1050
Stupeň substituce (NMR) (%)	7–12	7–12	7–12	3–8

6.1.1.2 Hydroxyfenyl deriváty HA

6.1.1.2.1 Tyraminovaný derivát HA (HA-TA)

Tyraminovaný derivát HA je chemicky modifikovaný hyaluronan (Obr. 21), který je tvořen reaktivní aminací oxidované formy kyseliny hyaluronové (formyl hyaluronát sodný HA-Ox) s využitím 6-amino-*N*-(2-(4-hydroxyfenyl)ethyl)hexanamidu [77]. Specifikace produktu tyraminovaného derivátu je popsána v Tab. 4 a Tab. 5.



Obr. 21 Struktura tyraminovaného derivátu HA.

Tab. 4 Specifikace HA-TA – vlastnosti

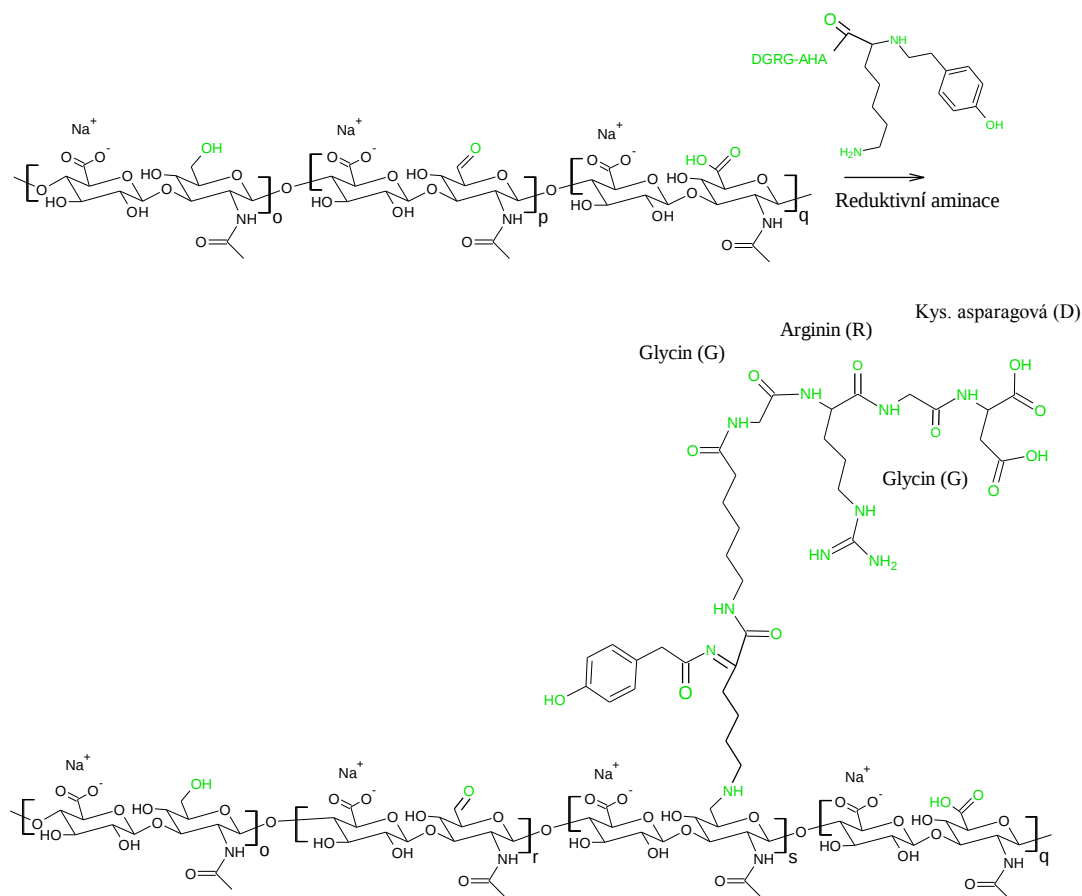
Analýzy	Specifikace
Vzhled	Bílý nebo téměř bílý prášek nebo granule
Identifikace pomocí NMR	Detekce substance
Molekulová hmotnost (SEC-MALLS) (kDa)	60–1080*
Stupeň substituce (NMR/ UV/VIS) (%)	0,5–4*
Ztráta sušením (%)	≤ 15
Obsah isopropanolu (%) (w/w))	≤ 0,5
pH	5–8
Bakteriální endotoxiny (IU/mg)	< 0,05
Mikrobiální kontaminace (CFU/g)	≤ 100
Tyramin (μg/ml)	≤ 0,7
Pikolin (%) (w/w))	≤ 0,03
Hyaluronát sodný (%)	≥ 90,0

***Tab. 5** Specifikace HA-TA – parametry standardně připravovaných HA-TA derivátů

	A	B	C	D	E
Molekulová hmotnost (SEC-MALLS) (kDa)	60–90	240–360	400–600	720–1080	240–360
Stupeň substituce (NMR/UV/VIS) (%)	2–4	2–3	1–2	0,5–1,5	1–2

6.1.1.2.2 Hydroxyfenyl derivát nesoucí RGD sekvenci (HA-PH-RGD)

Tento derivát HA-PH-RGD vzniká reduktivní aminací formyl hyaluronanu sodného (HA-Ox) navázáním hydroxyfenylové části nesoucí RGD (HPA-RGD) [88], jak je vidět na Obr. 22.



Obr. 22 *Reakční schéma přípravy HA-PH-RGD.*

Tab. 6 Specifikace HA-PH-RGD – vlastnosti

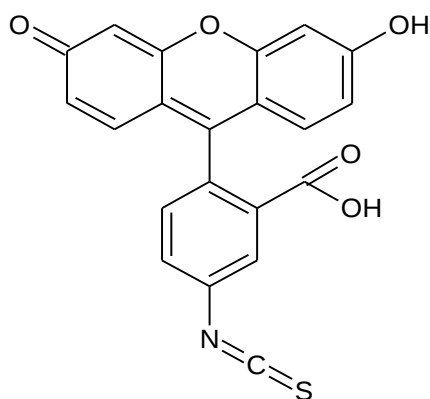
Analýzy	Specifikace
Vzhled	Bílý nebo téměř bílý prášek
Identifikace pomocí NMR	Detekce substance
Molekulová hmotnost (SEC-MALLS) (kDa)	60–360*
Stupeň substituce (NMR, UV/VIS) (%)	2–4*
Ztráta sušením (%)	≤ 15,0
Obsah isopropanolu (% (w/w))	≤ 0,5
pH	5–8
Bakteriální endotoxiny (IU/mg)	< 0,05
Mikrobiální kontaminace (CFU/g)	≤ 100
Pikolin (% (w/w))	≤ 0,03
Hyaluronát sodný (%)	≥ 90,0

***Tab. 7** Specifikace HA-TA – parametry standardně připravovaných HA-TA derivátů

	A	B
Molekulová hmotnost (SEC-MALLS) (kDa)	60–90	240–360
Stupeň substituce (NMR, UV/VIS) (%)	2–4	2–3

6.1.1.2.3 Fluorescenčně značený hydroxyfenyl derivát HA (HA-PH-FITC)

Pro přípravu fluorescenčně značeného hydroxyfenyl derivátu HA byl použit fluorescein-5-isothiokyanát s molekulovou hmotností 389,4 g/mol. Tato fluorescenční značka má absorpční maximum při 495 nm a emituje záření (fluoreskuje – zelený fluorofor) při vlnové délce 525 nm. Obecně se jedná o široce využívanou fluorescenční látku pro detekci proteinů, u kterých se váže na přítomné amino skupiny [153]. V dané práci je použit Izomer I FITC (Obr. 23), který byl navázán na tyraminovaný derivát HA-TA (šarže MK-244, spec. B, M_w 240–360 kDa, DS 2–3 %) přes isothiokyanát.



Obr. 23 Struktura izomeru I FITC [153].

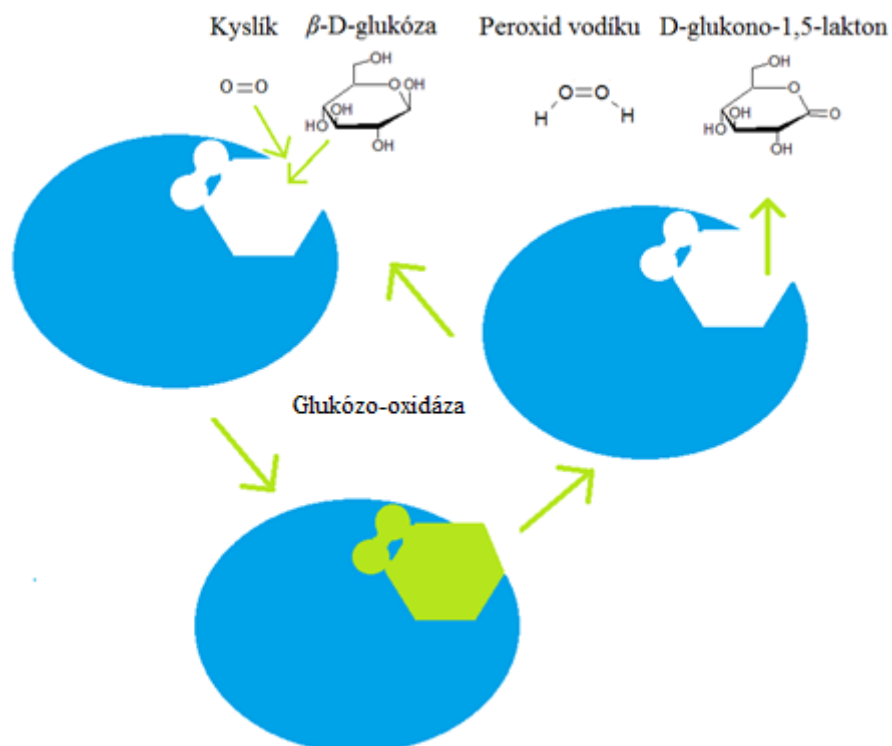
6.1.2 Enzymy

6.1.2.1 Křenová peroxidáza (HRP)

Jedná se o alfa-helikální protein o molekulové hmotnosti přibližně 44 Da, který se získává ze selského křenu, odkud pochází i jeho název. Tento metaloenzym vázající hem jako kofaktor má snadno dostupné aktivní místo. V molekulární biologii se využívá její schopnosti zesílit slabý signál a zvýšit odhalitelnost cílové molekuly. Používá se k určení malých množství specifických proteinů ve western blot dále v ELISA či imunohistochemii [61] a je široce využíván v enzymatických reakcích vedoucí ke vzniku gelu (4.1.1.2.3.2 podkapitola Enzymatické síťování).

6.1.2.2 Glukózo-oxidáza

Tento enzym mikrobiálního původu spadá do třídy oxidoreduktáz. Kofaktorem je flavinadenindinukleotid FAD sloužící jako akceptor elektronů. Během reakce dochází k redukci na FADH₂ a kyslík je redukován na peroxid vodíku. Tato oxidoreduktáza umožňuje oxidaci β-D-glukózy na glykoprotein D-glukono-1,5-lakton, který poté hydrolyzuje na glukonovou kyselinu za současné produkce peroxidu vodíku (Obr. 24). Jedna jednotka enzymu oxida 1,0 mikromol beta-D-glukózy na D-glukonolakton a peroxid vodíku za 1 minutu při pH 5,0 a teplotě 55°C. Používá se ke stanovení glukózy v klinické biochemii, v potravinářství k odstraňování zbytků kyslíku a glukózy či k výrobě kyseliny glukonové [80].



Obr. 24 Schéma enzymatické aktivity glukózo-oxidázy umožňující v přítomnosti kyslíku oxidaci β -D-glukózy na glykoprotein D-glukono-1,5-lakton.

6.1.2.3 Galaktózo-oxidáza

Tato oxidoreduktáza potřebuje pro funkci měď jako kofaktor. Katalyzuje oxidaci D-galaktózy na D-galaktohexodialdózu v přítomnosti kyslíku za současné produkce H_2O_2 [154] schematicky obdobně jako v případě glukózo-oxidázy.

6.2 Metody

Základem této práce je popis a charakterizace hydrogelů s využitím ve tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně. Opakovatelnost přípravy a vlastností hydrogelů, ale nelze docílit bez popisu vlastností jednotlivých komponent, jako je samotný polymer a síťovací činidla a jejich prekurzorové roztoky. Především se jedná o stanovení parametrů derivátů – stupeň substituce DS či molekulová hmotnost M_w viz kapitola 6.1. V případě využití enzymu při síťovací reakci je nutné stanovení jeho aktivity či určení koncentrace peroxidu vodíku spektrofotometricky. Stabilita jednotlivých složek je velmi důležitá pro vývoj případného produktu, proto je aktivita roztoku HRP či koncentrace roztoku H_2O_2 sledována v čase. Důležitým parametrem pro snadnou aplikovatelnost prekurzorových roztoků je jeho viskozita a výtlačná síla, která je především ovlivněna molekulovou hmotností polymeru, obsahem sušiny derivátu v roztoku a typem rozpouštědla. V neposlední řadě je sledována cytotoxicita jednotlivých komponent.

Při síťovací reakci je stanovována závislost elastického a viskózního modulu na čase a je určován bod, kdy se jejich hodnoty rovnají, tedy čas gelace. Popisované systémy jsou vícesložkové – finální gel vzniká smísením dvou roztoků. Pro homogenní smísení dvou roztoků je využit směšovač a hydrogely jsou připraveny do teflonových formiček pro vznik srovnatelně velkých hydrogelů s porovnatelnými vlastnostmi. Gely jsou charakterizovány stanovením viskoelastických či mechanických vlastností v kompresi. Velikost ok sítě (*mesh size*) gelu byl stanoven výpočtem a struktura hydrogelu v bezvodém stavu (lyofilizátu) byla zachycena pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Ve většině aplikací je důležité zachování nízké botnavosti hydrogelů. Metodou pro stanovení botnacího koeficientu je gravimetrie. Délku setrvání materiálu ve tkáni lze simulovat degradačním procesem pomocí hyaluronidáz.

Pro regeneraci tkáně po infarktu myokardu jsou velmi důležité buňky a jejich interakce s příslušným materiálem. Byla sledována adheze buněk ve dvoudimenzionálním provedení a dále byly buňky inkorporovány do struktury hydrogelu. Viabilita buněk byla hodnocena pomocí ATP testu a vizuálním hodnocením (*Live dead staining*). Pro detekci materiálu v tkáni lze použít přídavek barviv (Sirius Red, methylenová modř) nebo fluorescenčně značeného derivátu (HA-PH-FITC). V neposlední řadě byla u finálně zvoleného materiálu testována kompatibilita se speciálně vyvinutými aplikačními zařízeními.

6.2.1 Roztoky a jejich příprava

Příprava jednotlivých roztoků potřebných pro analýzy je součástí kapitol daných metodik.

6.2.1.1 Roztoky polymerů

Roztoky polymerů (HA-TA, HA-Ox, HA-PH-RGD, HA-PH-FITC) jsou vždy míchány přes noc po dobu minimálně 12 hodin na magnetické míchačce. Roztoky jsou připravovány v různých rozpouštědlech (fosfátový pufr PBS, fyziologický roztok 0,9% chlorid sodný...) o různé koncentraci od 10 do 50 mg na 1 ml.

6.2.1.2 Roztok alkoxyaminu POA

Zásobní roztok POA byl připraven o koncentraci 10 mg/ml. Tento alkoxyamin je hydrochlorid, a proto je jeho pH nízké a je nutné roztok titrovat na požadované pH pomocí roztoku hydroxidu sodného (0,5 M). Příslušné roztoky POA byly poté připravovány ředěním z daného zásobního roztoku POA v příslušném rozpouštědle.

6.2.1.3 Roztok peroxidu vodíku

Zásobní roztok peroxidu vodíku o koncentraci 0,1 % (w/w) pro následnou přípravu hydrogelů na bázi hydroxyfenyl derivátů HA je připraven naředěním komerčně dostupného 30% roztoku peroxidu vodíku. Jako rozpouštědlo je použita DEMI či injekční voda bez přídavku stabilizačního činidla.

6.2.1.4 Příprava prasečí plazmy

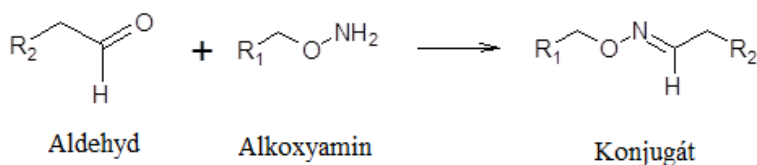
Odběr proveden do roztoku citronanu sodného dihydrátu z důvodu tvorby krevní sraženiny v přítomnosti vzduchu. 3,8 g citronanu sodného dihydrátu je naváženo a zalito 100 ml DEMI do zásobní láhve. Po rozpuštění je k roztoku při odběru krve přidáno 900 ml prasečí krve. Ta je dále zpracovávána v laboratoři, kde je centrifugována. Získaná plazma se uchovává při teplotě -20 °C.

6.2.2 Gely na bázi derivátů kyseliny hyaluronové

Práce je zaměřena na hydrogely na bázi oxidované formy kyseliny hyaluronové (HA-Ox) a hydroxyfenyl derivátů kyseliny hyaluronové (HA-TA, HA-PH-RGD, HA-PH-FITC).

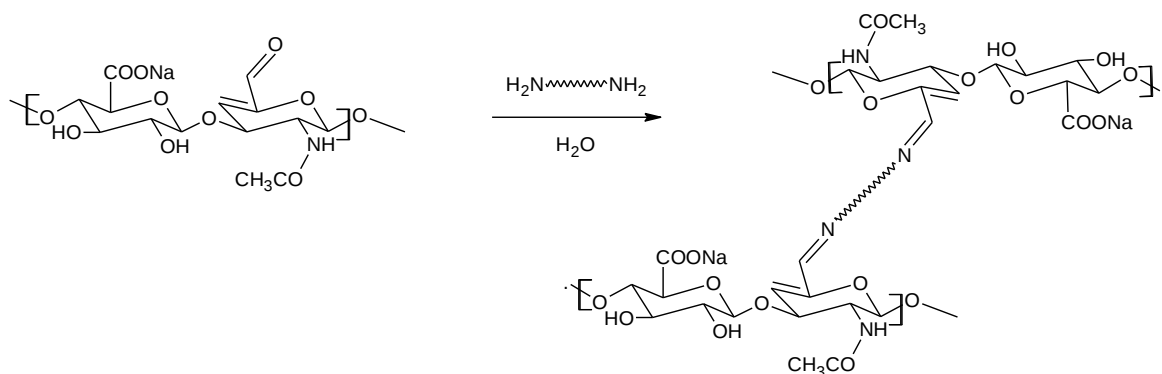
6.2.2.1 Oxidovaný derivát HA (aldehyd HA, HA-Ox)

Tento polymer lze zesíť pomocí alkoxyaminů s výslednou oximovou vazbou [105, 106] (Obr. 25).



Obr. 25 Reakce alkoxyaminu s aldehydem vedoucí k tvorbě stabilního konjugátu.

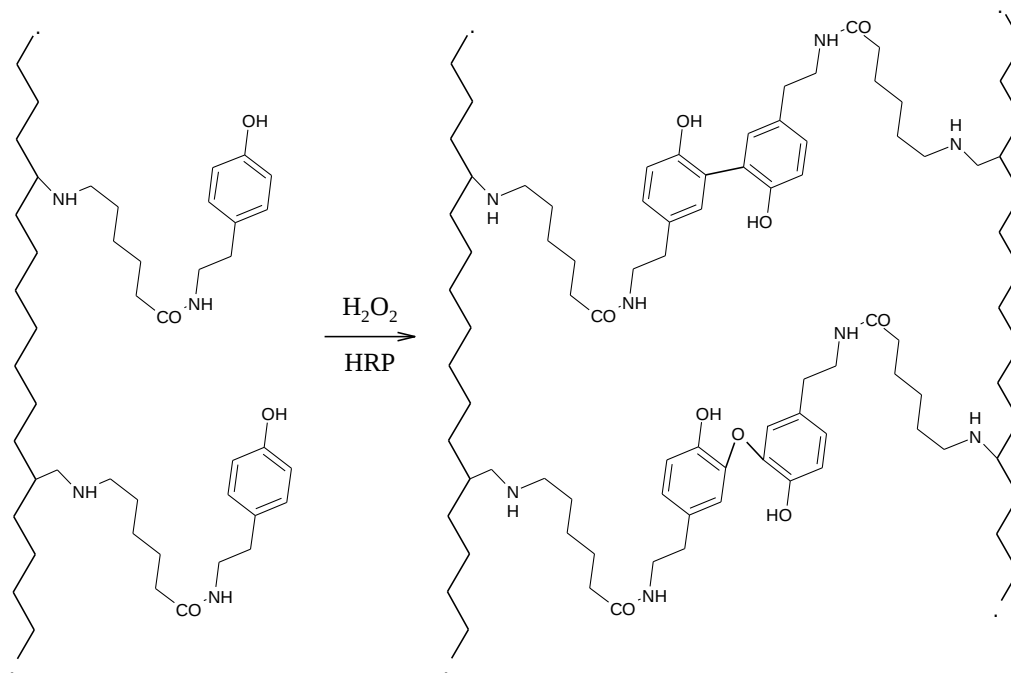
V dané práci byl z alkoxyaminů vybrán O,O'-1,3-propandiylbishydroxylamin dihydrochlorid (POA). Schéma vazby tohoto bifunkčního alkoxyaminu na nasycený HA-aldehyd je ukázáno na Obr. 26. Předpokladem je vznik kovalentní vazby mezi amino skupinami síťovadla a aldehydickými skupinami polymeru.



Obr. 26 Vazba bisoxoaminu *O,O'*-1,3-propandiylbishydroxylamin dihydrochlorid (POA) a derivátu HA-Ox.

6.2.2.2 Hydroxyfenyl derivát (HA-TA, HA-PH-RGD, HA-PH-FITC)

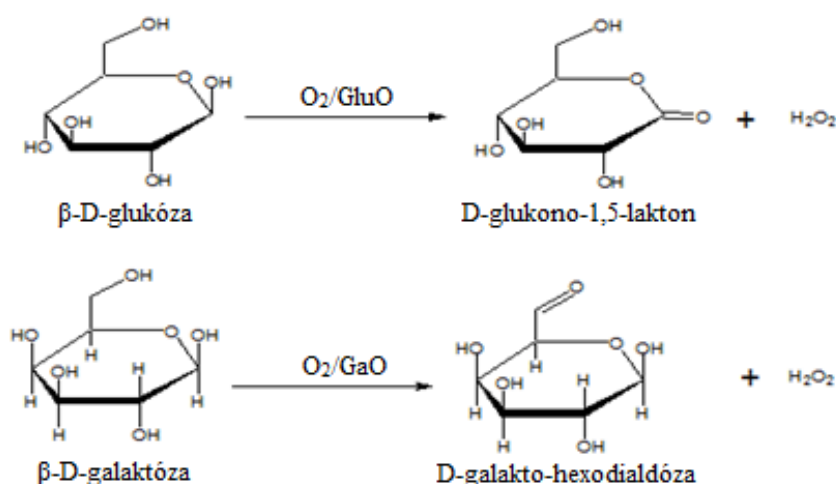
Gely byly připravovány na bázi hydroxyfenyl (tyraminovaného) derivátu HA (HA-TA), hydroxyfenyl derivátu HA nesoucí RGD sekvenci (HA-PH-RGD^{pure}) nebo fluorescenčně značeného derivátu FITC (HA-PH-FITC^{pure}) či jejich kombinací s HA-TA derivátem (HA-PH-RGD^{MIX}, HA-PH-FITC^{MIX}). Reakce je iniciována přidavkem peroxidu vodíku (H_2O_2) a katalyzovaná křenovou peroxidázou (HRP). Prvně dochází k navázání reaktivního H_2O_2 do aktivního místa enzymu HRP za vzniku reaktivního enzymu, který interaguje s tyraminem navázaným na HA za vzniku hydroxylového radikálu a následně dochází ke vzniku dityraminových vazeb (vazba mezi dvěma uhlíky C-C či v menší míře vzniká C-O-C vazba) a za vhodných podmínek i k tvorbě gelů (Obr. 27).



Obr. 27 Schéma přípravy gelů na bázi HA-TA derivátu.

Peroxid vodíku je možné přidat do reakce:

- 1) Přímo – roztok peroxidu vodíku s velmi nízkou koncentrací
- 2) Generací pomocí další enzymatické reakce (Obr. 28), např. oxidací glukózy Glu (resp. galaktózy Ga) za přítomnosti enzymu glukózo-oxidázy GluO [80] (resp. galaktózo-oxidázy GaO [154]).



Obr. 28 Schematické znázornění enzymatických reakcí, při kterých vzniká peroxid vodíku využitelný v reakci s hydroxyfenyl derivátem HA v přítomnosti enzymu HRP za vzniku gelu.

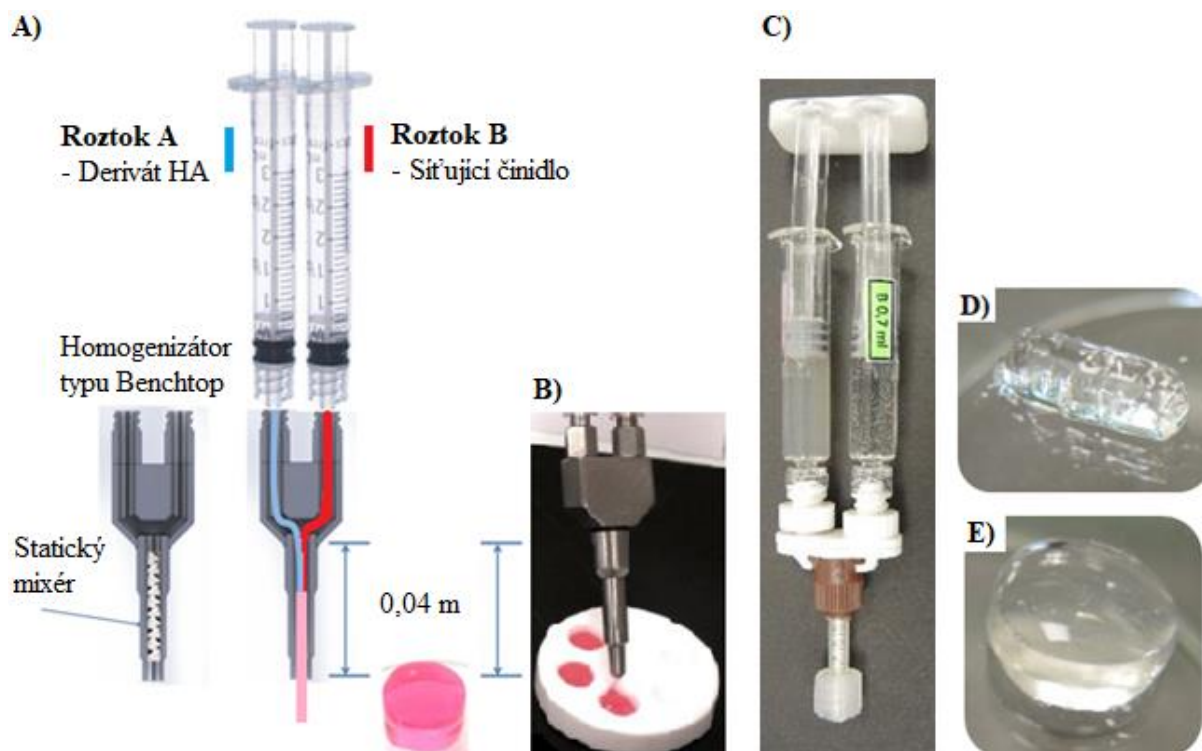
Rychlost gelace od pár sekund až po několik minut lze regulovat vlastnostmi derivátu (M_w , DS), koncentrací roztoku HA-TA a v neposlední řadě také množstvím síťovacích činidel (koncentrací peroxidu vodíku a aktivitou enzymu HRP). Velmi rychlá gelace umožňuje *in situ* aplikaci. Obdobně i mechanické, viskoelastické vlastnosti či botnání jsou ovlivněny těmito parametry. Lze připravit méně zesítěné gely, až po gely velmi tuhé [77].

Ke zvýšení buněčné adheze lze použít hydroxyfenyl derivát HA s navázanou peptidovou sekvencí RGD (HA-PH-RGD), který lze zesítit stejným způsobem [88]. Hydroxyfenyl derivát HA s navázaným fluoresceinem FITC (HA-PH-FITC) lze využít k detekci gelů či prekursorových roztoků v tkáni.

6.2.3 Příprava hydrogelů

Hydrogely lze připravovat mnoha způsoby. Důležitým aspektem při výběru postupu přípravy hydrogelu je jeho homogenita. Výhodného uspořádání pro přípravu hydrogelů je dosaženo u homogenizátoru typu Benchtop ve dvoucestném provedení (Obr. 29 A). Byl využit kovový homogenizátor připravený ve společnosti Contipro a.s. (Obr. 29 B) sterilizovatelný v parním autoklávu (131 °C, 20 minut) pro opakované použití a komerčně dostupný homogenizátor společnosti MEDMIX (<https://www.medmix.ch/>, MEDMIX MA 15-00M-L Adapter L-System, 15mm ML 3.2-16-LLM, MEDMIX Mixer, DN3.2x16, 1:1, light green, Luer Lock) (Obr. 29 C). Do stříkačky je nabit roztok A a do druhé stříkačky roztok B. Stříkačky jsou našroubovány na dvousložkový homogenizátor a následně jsou roztoky do něj vytlačovány, kde pomocí šneku dochází k homogenizaci 2 složek. Vzniklá směs je aplikována např. do teflonových forem (Obr. 29 B) či kultivačních panelů, kde dochází ke vzniku transparentních gelů.

V případě buněčných testů, botnání hydrogelů a *in vivo* testů, je nutné připravit vzorky sterilně. Sterilizace byla provedena filtrací přes 0,22 μm PES filtr. Sterilita byla kontrolována kvalitativně. Malé množství vzorku (roztoku) bylo přidáno do 5 ml kultivačních médií (30 g/l Tryptone soya broth, 29,75 g/l Thioglycollate medium U.S.P.). Kultivace je provedena v termostatu při 37 °C. Pro vyloučení kontaminace média je kultivován roztok samotných médií. Po 7 dnech jsou vizuálně a případně pomocí densitometru zkontrolovány vzorky, pokud nedochází k tvorbě zákalu, vzorky nejsou kontaminovány a lze je považovat za sterilní.



Obr. 29 Schéma dvousložkového homogenizátoru (směšovače) typu Benchtop pro přípravu hydrogelů (A). Homogenizátor připravený společností Contipro a.s. s teflonovou formou pro přípravu hydrogelu (B). Homogenizátor od společnosti MEDMIX (C). Ukázka připravených hydrogelů s vyšším (E) a nižším (D) stupněm zesítnění.

6.2.4 Reologické parametry a metody

Reologie je jedna z mála disciplín, u které je známé přesné datum jejího vzniku – 29. dubna 1929. Při svém založení definovala společnost na podnět E. C. Binghamu a M. Reinara reologii jako nauku o toku a deformaci všech forem hmoty založené na výroku Heraklita „παντα ρει“ (*Panta Rhei*) neboli „vše teče“ [155, 156].

Reologie charakterizuje odezvu materiálů na působení vnější síly, kdy dochází k jejich toku či deformaci. Pokud se po odeznění vnější síly materiál vrací do původního stavu, jedná se o ideální pevnou látku a odezva tohoto materiálu se řídí Hookovým zákonem. Na druhou stranu při působení vnější síly na ideálně viskózní materiál dochází k disipaci energie díky přeměně práce vynaložené na překonání třecích sil na teplo. Tato deformace je trvalá. Oba případy jsou ideálními typy látek, ale většina reálných materiálů vykazuje vlastnosti ležící mezi těmito dvěma extrémy, tedy viskoelastické. Odezva materiálu závisí také na čase, což vystihuje výrok Debory „Hory tečou před Hospodinem“, a proto parametr popisující tento jev byl pojmenován po prorokyni, jako Debořino číslo:

$$De = \frac{t_R}{t_P} \quad (3)$$

kde t_R (čas relaxační) představuje dobu potřebnou k přizpůsobení daného materiálu na aplikované napětí či deformaci, t_P odpovídá době trvání experimentu. Debořino číslo může nabývat hodnot od 0 do nekonečna. Pokud je hodnota relaxačního času 0, tak i Debořino číslo je rovno nule, což platí pro ideálně viskózní kapaliny. Naproti tomu pro ideálně elastické těleso je t_R rovno nekonečnu. Ostatní materiály vyznačující se viskózním i elastickým modulem mají hodnoty Debořina čísla mezi těmito extrémy a dle velikosti lze stanovit, který charakter převažuje pro daný materiál [156].

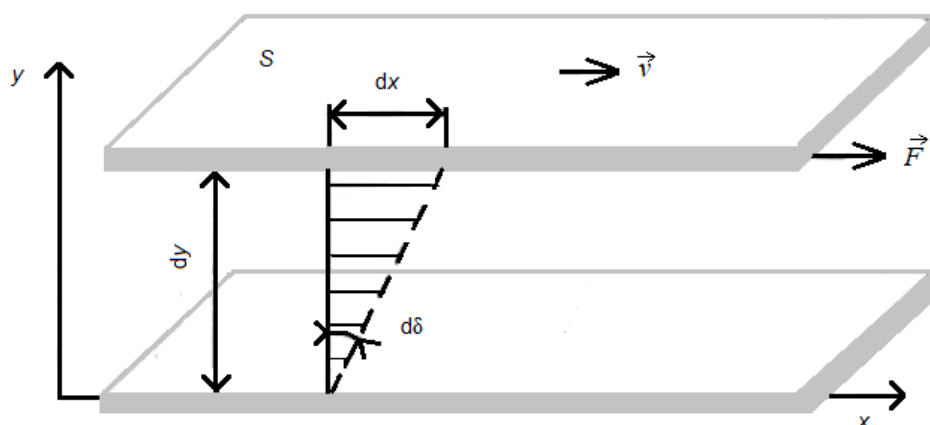
6.2.4.1 Viskozita

Viskozita patří mezi základní reologické parametry. Vyjadřuje míru odporu proti vnějšímu zatížení, resp. míru odporu proti toku [156, 157].

Mezi dvěma paralelními vrstvami kapaliny vzniká tečné napětí v důsledku chaotického tepelného pohybu částic a mezimolekulárních sil. Tento jev lze popsat pomocí modelu sestávající ze dvou paralelních desek ve vzdálenosti y , kdy vrchní z nich s plochou S se pohybuje v tečném směru rychlostí v (Obr. 30). Spodní deska i vrstva kapaliny k ní přilnutá je nehybná a rychlost je tedy nulová. Vznikající tečné napětí lze vyjádřit podílem síly F_x působící na plochu S . Viskozita vytváří napětí v jednotlivých vrstvách a nehybná deska tak brzdí desku horní, zpomaluje její rychlost. Vzniklý gradient rychlosti dv_x/dy mezi paralelními rovinami je přímo úměrný tečnému napětí τ_{xy} :

$$\tau_{xy} = \frac{F_x}{S} = \eta \cdot \frac{dv_x}{dy} = \eta \cdot \dot{\gamma} = \eta \cdot \frac{d\gamma}{dt} = \eta \cdot \frac{dx}{dy \cdot dt} \quad (4)$$

kde τ_{xy} je tečné napětí, F je síla působící na plochu S ve směru pohybu vrchní desky x , dv_x je vzájemná rychlost pohybu smykových rovin ve vzdálenosti dy a jejich podíl nám dává gradient rychlosti představující smykovou rychlost $\dot{\gamma}$. Smyková rychlost představuje změnu deformace/smyku v čase $d\gamma/dt$ a samotná deformace čili smyk lze vyjádřit jako podíl dx/dy . Konstantou úměrnosti je dynamická viskozita η s jednotkou Pa·s. Podílem dynamické viskozity a hustoty získáme viskozitu kinematickou ν [156, 157].



Obr. 30 Dvě paralelní vrstvy kapaliny představené jako spodní stacionární a horní pohyblivá deska [156, 157].

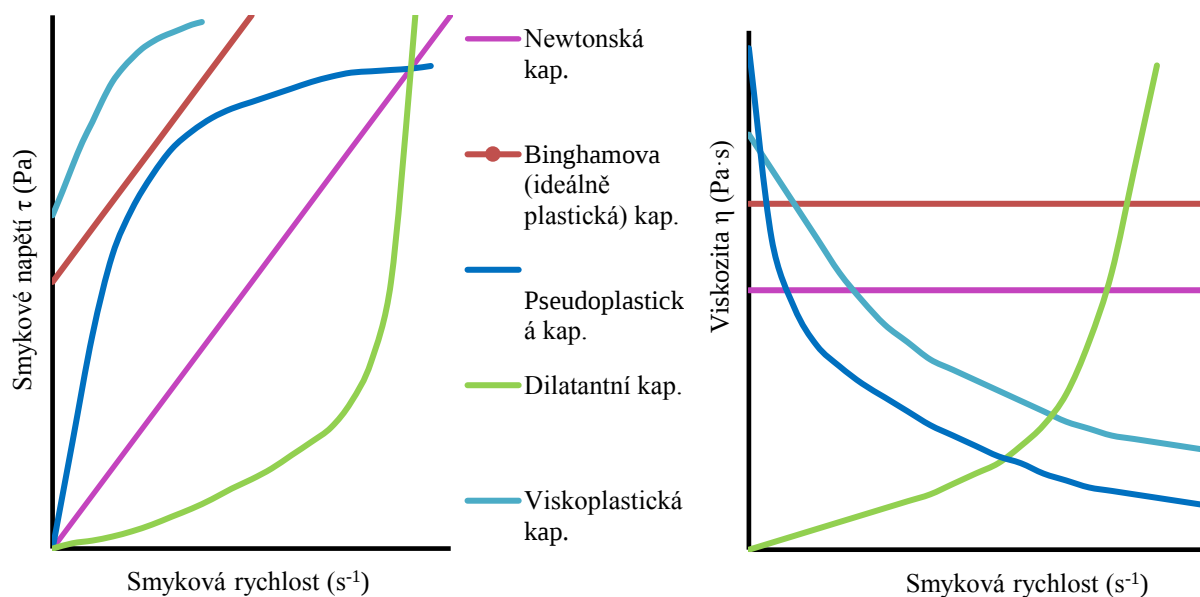
Vyjádření viskozity ze vzorce 2 získáme Newtonův zákon viskozity:

$$\eta = \frac{\tau_{xy}}{\dot{\gamma}} \quad (5)$$

Newtonův zákon platí pro všechny plyny, mnoho čistých kapalin a roztoků nízkomolekulárních látek. Dynamická viskozita je konstantní a platí pro newtonské materiály, naproti tomu nenewtonské látky jsou charakteristické zdánlivou viskozitou závislou na smykové rychlosti. Zdánlivá viskozita nám tedy vyjadřuje podíl okamžitého smykového napětí a smykové rychlosti [156, 157].

Nenewtonské kapaliny můžeme rozdělit na základě chování při působení vnějšího napětí (smykové rychlosti) na 4 hlavní typy (Obr. 31):

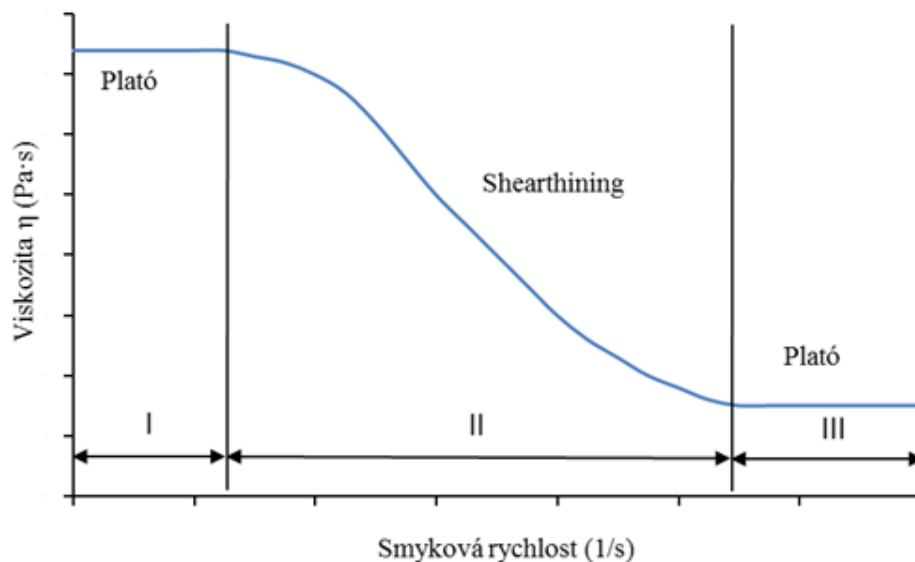
- Pseudoplastické (*shear-thinning*)
- Dilatantní (*shear-thickening*)
- Binghamovy (ideálně plastické)
- Viskoplastické (reálně plastické)



Obr. 31 Závislost smykového napětí a viskozity na smykové rychlosti. Odezva různých materiálů na namáhání [156, 157].

Pseudoplastické kapaliny jsou nejběžnějším typem, u kterých zdánlivá viskozita klesá s rostoucí smykovou rychlostí. Dochází k zřednutí při toku (*shear-thinning*). Jedná se o nejběžnější typ chování, kterým se vyznačují například polymerní roztoky či emulze [156, 157].

Průběh viskozitní křivky polymerního roztoku nativní kyseliny hyaluronové se v logaritmickém měřítku vyznačuje 3mi oblastmi (Obr. 32). Obě dvě platy jsou charakteristická konstantní viskozitou, přičemž v první části křivky je viskozita nejvyšší a při aproximaci k nulové smykové rychlosti je nazývána *zero shear rate viscosity*, a v poslední části je hodnota nejnižší (*infinity shear rate viscosity*) [155]. V druhé části dochází k charakteristickému poklesu viskozity s rostoucí smykovou rychlostí, tedy je zřednutí při toku (*shear-thinning*).



Obr. 32 Chování roztoků nativní HA a dalších polymerních roztoků. Zřednutí při toku nativní HA.

Suspenze mohou být pseudoplastické, ale také dilatantní. Tato vlastnost je poměrně vzácná, kdy dochází k nárůstu viskozity v závislosti na smykové rychlosti (*shear-thickening*) [155]. Některé materiály vykazují mez toku neboli *yield stress*. Nejznámějším materiálem vykazující tuto vlastnost je kečup.

Pokud materiál namáháme, nedochází zpočátku k toku, ale až po překročení jisté hranice napětí, tedy meze toku [156, 157].

Viskozitu lze stanovit pomocí viskozimetrů. Existuje několik typů, jako jsou průtokové, pádové a rotační viskozimetry. Poslední typ je vhodný pro stanovení i zdánlivé viskozity nelineárních látek, jelikož umožňuje měření celé tokové a viskozitní křivky (závislost napětí a viskozity na smykové rychlosti). Rotační reometr je složen z pohyblivé obvykle horní geometrie a spodní stacionární desky (**Obr. 33 A**). Stanovení viskozity pomocí rotačního reometru je založeno na nastavení rychlosti otáčení vrchní geometrie neboli smykové rychlosti (**Obr. 33 B**) [156, 157].



Obr. 33 Schematické zobrazení horní a spodní geometrie reometru (A). Směr otáčení geometrie (B).

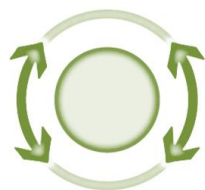
$$\eta = A \cdot \frac{M}{\omega} \quad (6)$$

kde η je zdánlivá viskozita, M představuje moment síly, ω úhlovou rychlost a A je konstanta zahrnující parametry přístroje a zvolené geometrie [156, 157].

6.2.4.2 Stanovení viskoelastických vlastností polymerních gelů

Viskoelastické vlastnosti gelů lze stanovit pomocí statického a dynamického testu. V praxi se více využívají testy dynamické – oscilační [158].

Využitím oscilační reologie je možné kvantifikovat viskózní i elastické vlastnosti materiálů, což je velmi důležité pro správnou charakterizaci nejenom gelů. Během experimentu je vzorek vložen mezi dvě desky (**Obr. 34**). Jedna z desek je stacionární a druhá se pohybuje a působí časově závislou deformací na vzorek. Současně časově závislé napětí je kvantifikováno měřením krouticího momentu, který se přenáší přes vzorek na nehybnou (statickou) desku [4, 159].



Obr. 34 Schéma oscilace horní pohyblivé geometrie.

Základem lineární oscilační reologie je aplikace malé oscilační deformace (SAOS – *Small Amplitude Oscillatory Shear*) ve formě [159, 160]:

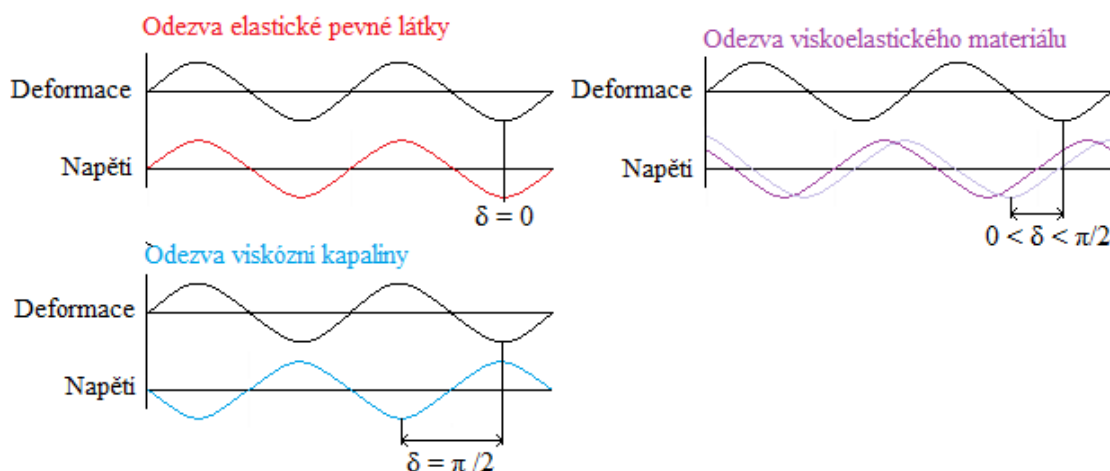
$$\gamma = \gamma_0 \cdot \sin(\omega t) \quad (7)$$

kde γ je deformace (*strain*), γ_0 je amplituda, ω je frekvence oscilace, přičemž je v závislosti na frekvenci stanovována odezva materiálu ve tvaru:

$$\sigma = \sigma_0 \cdot \sin(\omega t + \delta) \quad (8)$$

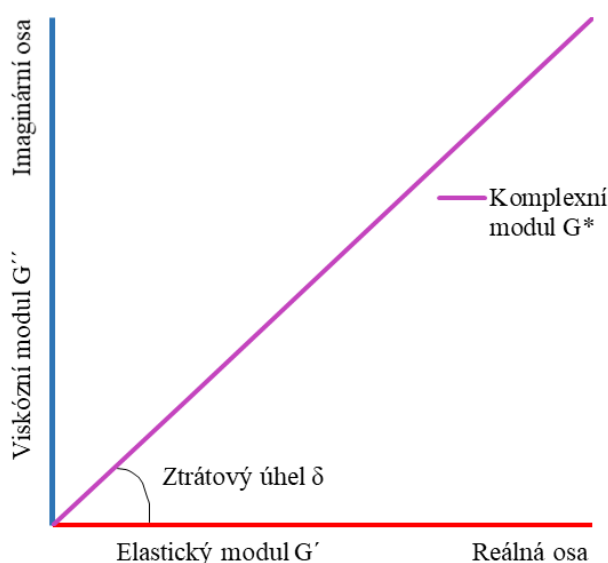
kde σ je napětí a δ je fázový posun. Tato odezva materiálu nám dává vypovídající hodnotu o rozdílu mezi jednotlivými materiály. Odezvy různých materiálů jsou znázorněny na **Obr. 35**. Odezva (napětí) ideálně elastické látky je vždy ve fázi s aplikovaným namáháním (deformací), kdežto u ideálně viskózní

kapaliny je tomu naopak. Odezva materiálů, jako jsou např. i gely, leží v oblasti mezi těmito dvěma extrémy (tedy mezi ideálně elastickou pevnou látkou a viskózní kapalinou). Takovéto materiály se tedy vyznačují viskoelastickými vlastnostmi [158, 159, 160].



Obr. 35 Odezva materiálu v závislosti na aplikovaném namáhání pro ideálně elastickou pevnou látku, ideální viskózní kapalinu a viskoelastický materiál.

Komplexní modul pružnosti ve smyku G^* je složen ze dvou částí: viskózního (ztrátového) G'' a elastického (paměťového) modulu G' . Viskózní modul není ve fázi s deformací a udává fluidní příspěvek viskózní kapaliny, naproti tomu ve fázi s deformací je paměťový modul, jenž je charakteristikou ideálně elastické pevné látky [4]. Vztah mezi moduly lze znázornit pomocí dvouosé závislosti, kde reálná osa představuje elastický modul a imaginární osa modul viskózní (Obr. 36).



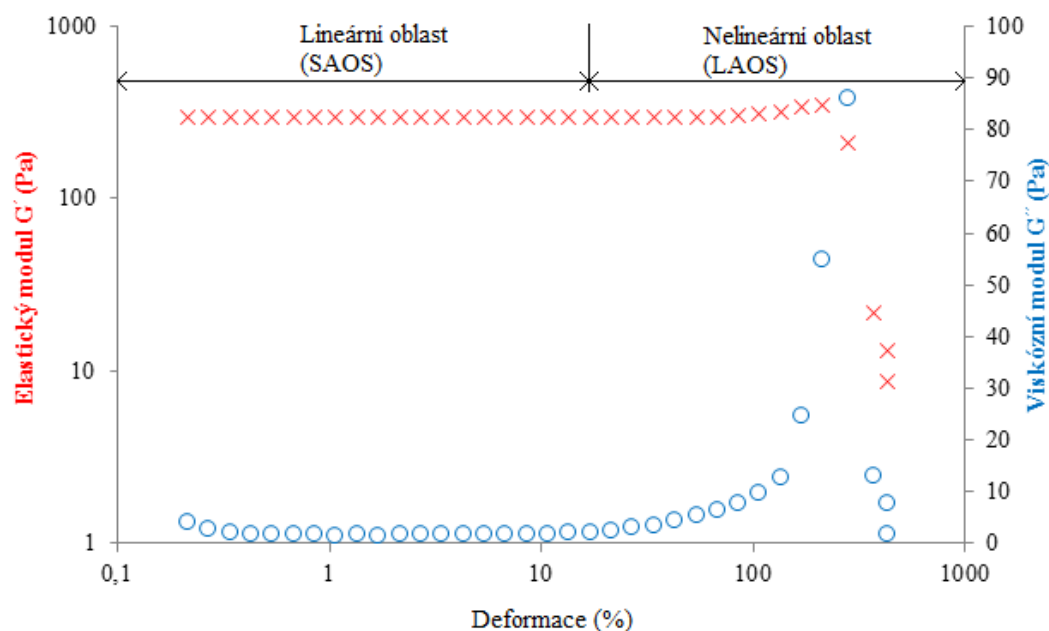
Obr. 36 Schematické znázornění komplexního, elastického a viskózního modulu a ztrátového úhlu pomocí imaginární a reálné osy.

Vztah mezi moduly lze vyjádřit také pomocí ztrátového úhlu následujícím vztahem:

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (9)$$

kde δ je ztrátový úhel, G'' je viskózní a G' je elastický modul [4]. Jak je patrné ze vzorce, pokud je hodnota modulu stejná, tak $\tan \delta$ je roven 1 a úhel pak nabývá 45° . Nízká hodnota ztrátového úhlu připadá pro tuhé materiály a naopak.

Viskoelastické vlastnosti lze určit pomocí deformačního testu (*strain sweep*), při kterém je udržována konstantní frekvence, přičemž dochází ke změně deformace (Obr. 37) [162].

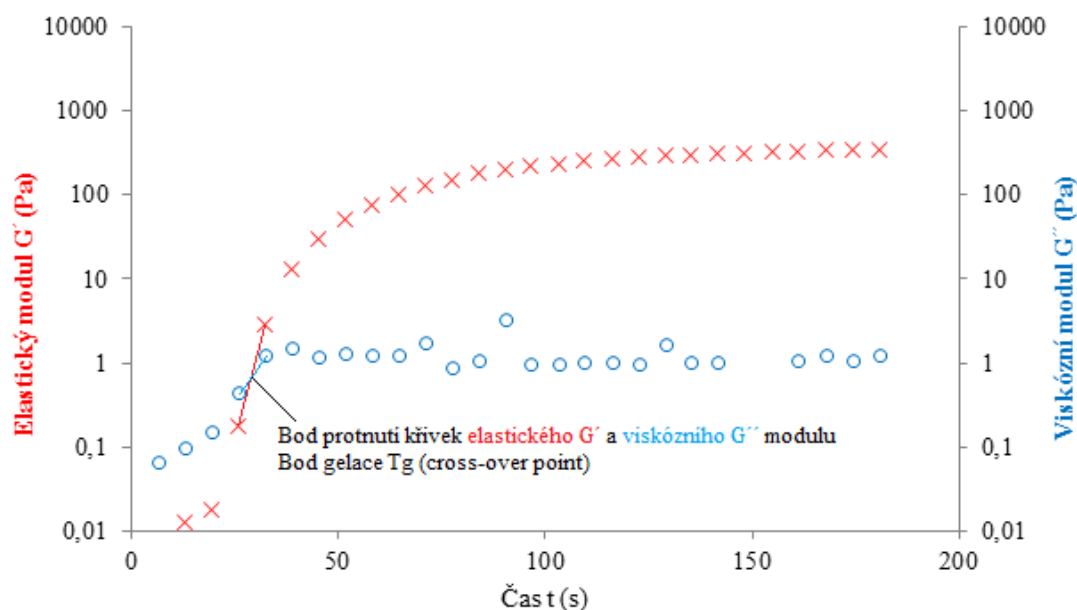


Obr. 37 Závislost elastického a viskózního modulu na deformaci (*strain*).

Aby nedošlo k narušení vzorku, musí být aplikována nízká deformace, což znamená pracovat v lineární viskoelastické oblasti (LVR – *linear viscoelastic region*). V této oblasti jsou hodnoty modulů konstantní a struktura materiálu je nenarušená. Po dosažení příliš vysokého napětí (kritická hodnota deformace) nastane deformace či destrukce materiálu (tedy i gelu) a hodnoty elastického modulu začnou klesat. Délka LVR je také důležitým parametrem, jelikož je ukazatelem pevnosti a stability materiálů. Důležité je si uvědomit, že následující oscilační měření musí být provedeno také v oblasti LVR – jakmile je určena oblast lineární viskoelastivity, lze stanovit závislost modulů na použité frekvenci (metoda *frequency sweep*) při konstantní hodnotě deformace určené z LVR [160, 161, 162]. V uvedeném grafu je elastický modul konstantní až do hodnot deformace (*strain*) 100 %, na druhou stranu viskózní modul se mění již dříve a pro správné nastavení frekvenčního testu (*frequency sweep*) je vhodné si zvolit hodnotu deformace mnohem nižší, např. 1 %.

6.2.4.3 Stanovení rychlosti gelace (kinetika gelace)

Bod gelace lze určit ze závislosti elastického (paměťového) G' a viskózního (ztrátového) G'' modulu na čase [19] (Obr. 38). Na začátku reakce jsou hodnoty obou modulů velmi nízké a následně dochází k jejich nárůstu. Hodnota elastického modulu je nižší v porovnání s viskózním modulem G'' až do bodu gelace známého jako *cross-over point*, kdy dochází k vyrovnání hodnot obou modulů a dále již převyšuje modul elastický, jehož hodnota nadále roste [4]. Ke konci reakce elastický modul dosahuje rovnovážných hodnot tzv. *plata* a již by nemělo docházet k jeho změně. Hodnota elastického modulu v platu je také důležitým parametrem určujícím charakter gelu. Čím je hodnota vyšší, tím je gel elastičtější a odolává lépe deformaci. Podstatným faktorem je také čas, kdy dochází k vytvoření plata, jenž nám vypovídá o dozrávání gelu. Pokud je doba velmi dlouhá a elastický modul narůstá pomalu, tak gely dozrávají delší dobu.



Obr. 38 Kinetika gelace – závislost elastického a viskózního modulu na čase.

Hodnoty ztrátového úhlu se pohybují od 0° do 90° . Při vysoké hodnotě ztrátového úhlu se materiály chovají jako viskózní (*liquid-like*, kapalné). Při stanovení gelace tomuto stavu odpovídá začátek reakce (stav před iniciací reakce). Dále během síťovací reakce dochází k poklesu ztrátového úhlu. Při vyrovnání obou modulů dochází ke gelaci a ztrátový úhel je roven 45° . Poté obvykle dochází k dalšímu poklesu ztrátového úhlu. U velmi tuhých gelů je hodnota elastického modulu mnohonásobně vyšší než hodnota viskózního modulu a ztrátový úhel tak dosahuje velmi nízkých hodnot. Ztrátový úhel δ menší než 1 je charakteristický pro elastické (*solid-like*, pevné) materiály [4].

Proces gelace je ovlivněn mnoha faktory, mezi které patří teplota, iontová síla, pH roztoku, koncentrace roztoku, koncentrace síťovacích činidel [3, 4], u polymerních gelů také parametry derivátu jako je molekulová hmotnost (M_w) či stupeň substituce (DS). pH obvykle ovlivňuje amfoterní polyelektrolyty (při hodnotě pH odpovídající izoelektrolytickému bodu probíhá gelace nejlépe) či např. enzymy u enzymatických reakcí. Gely, u kterých dochází při změně pH, teploty či při působení UV ke gelaci, se nazývají pH-responsivní gely, resp. termoresponsivní či UV-responsivní [4].

6.2.4.4 Instrumentace

Ke stanovení reologických vlastností jsou používány rotační reometry (Obr. 39). Skládají se ze dvou částí – rotoru a statoru. První jmenovaná se otáčí konstantní úhlovou rychlostí a druhá je statická. S rozvojem reologie je používáno čím dál více typů geometrií. Každá z konfigurací je vhodná pro různou konzistenci vzorku a typ měření. Mezi nejběžnější geometrie patří kužel-deska, deska-deska či soustava dvou válců. Povrch geometrií lze také volit dle typu materiálu. Pro stanovení viskozit se používají hladké plochy, kdežto například pro stanovení viskoelastických vlastností hydrogelů se více využívá hrubších povrchů (*crosshatch geometrie*).



Obr. 39 Reometr AR-G2 (vlevo). Crosshatch geometrie (vpravo).

6.2.4.5 Metodika

6.2.4.5.1 Stanovení zdánlivé viskozity

Zdánlivá viskozita (**dále v práci jen viskozita**) prekurzorových roztoků pro přípravu hydrogelů byla měřena na reometru TA Instruments AR-G2 s vrchní pohyblivou geometrií – kuželem (průměr 60 mm, úhel 1°). Dávkovací objem měřeného vzorku je 1000 μl . Měření byla prováděna při různých teplotách, především pokojové teplotě RT 25°C a teplotě lidského těla 37°C . Viskozita byla měřena v módu *peak hold step*, kdy je udržována konstantní smyková rychlost během měření v čase ($1,9\text{ s}^{-1}$) a dále stanovována viskozitní křivka závislosti viskozity na smykové rychlosti v rozmezí 0,01–3000 $1/\text{s}$.

6.2.4.5.2 Stanovení viskoelastických vlastností

Z praktického hlediska lze zvolit dvě nastavení pro stanovení viskoelastických vlastností. V prvním režimu je zvolena konstantní rychlost smykové deformace a stanovujeme smykové napětí, u druhého typu nastavení je tomu naopak. Z úhlové rychlosti lze vypočítat rychlost smykové deformace a krouticí moment udává smykové napětí [156]. Viskoelastické vlastnosti byly stanoveny pomocí přístroje AR-G2 (TA Instruments) za použití geometrie se zdrsňelým povrchem (*crosshatch*), aby bylo zamezeno vyklouznutí hydrogelu během oscilace horní pohyblivé geometrie (průměr 20 mm). Pro porovnání viskoelastických vlastností byl použit test v módu *strain sweep* s nastavenou konstantní frekvencí 1 Hz a posunem (*displacement*) v rozmezí od 10^{-3} do 2 rad. Hodnoty elastického případně viskózního modulu a ztrátového úhlu byly odečítány z LVR oblasti, tedy plata, kde jsou hodnoty obou modulů konstantní – v dané disertační práci při hodnotě deformace 1 %.

6.2.4.5.3 Stanovení kinetiky gelace

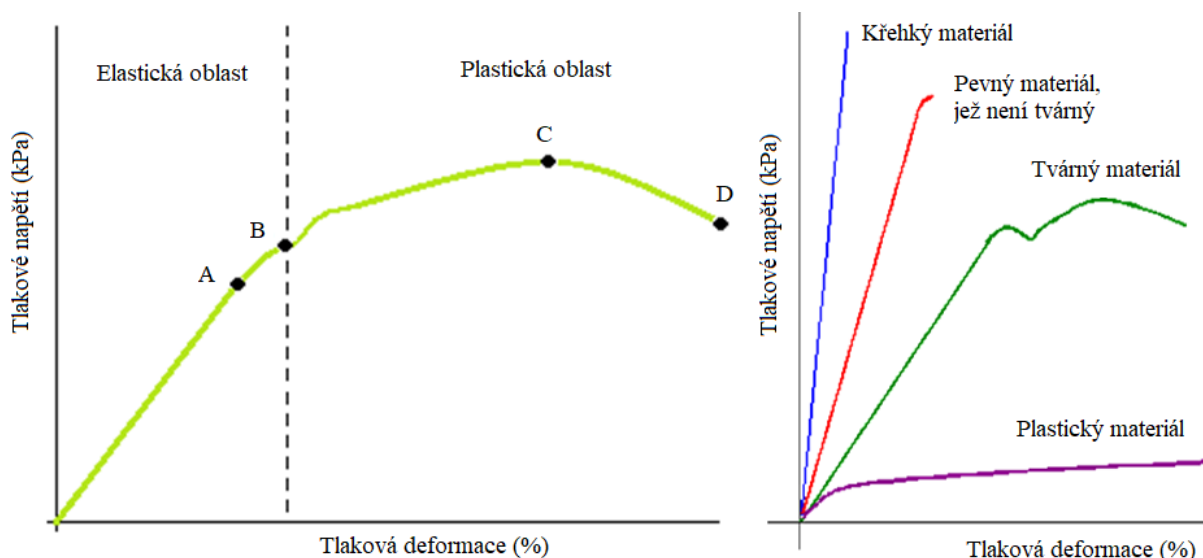
Kinetika gelace byla stanovena za použití paralelních desek s horní pohyblivou deskou (40 mm) s nastavenou fixní mezerou 400 μm . Pro homogenní smísení nadávkovaných prekurzorových roztoků derivátu a síťovacího činidla bylo nastaveno promíchání (*pre-shear*) o rychlosti 2000 $1/\text{s}$ po dobu 1 sekundy. Byla využita oscilační metoda v závislosti na čase (*oscillation time sweep*) při frekvenci 1 Hz a posunu 0,001 rad. Teplota byla volena dle typu experimentu, především 25°C představující RT a 37°C odpovídající teplotě lidského těla. Byla sledována závislost elastického, viskózního modulu a ztrátového úhlu na čase neboli průběh gelace. Pro porovnání jednotlivých materiálů mezi sebou byla odečtena hodnota elastického případně viskózního modulu a ztrátového úhlu v jednom čase 3 minut. Čas gelace T_g byl odečten jako průsečík křivek elastického a viskózního modulu na čase.

6.2.5 Stanovení vlastností v kompresi

6.2.5.1 Mechanické vlastnosti gelů

Základní statickou zkouškou pro měření gelů je zkouška tlakem, při které je materiál vystaven tlakové deformaci, jež pozvolně roste až do doby, kdy se naruší trvale celistvost vzorku. Mechanické vlastnosti materiálů jsou stanovovány z tzv. *stress-strain* křivek materiálu získaných z těchto kompresních testů.

Stress-strain křivka představuje závislost napětí na deformaci. Přičemž, jak je vidět v grafu (Obr. 40), zpočátku roste deformace lineárně s působícím napětím. V této tzv. elastické oblasti platí Hookův zákon a při odstranění napětí se vzorek vrátí na původní velikost a tvar. Čím je lineární část křivky delší, tím je materiál elastičtější. Ze směrnice lineární části *stress-strain* křivky lze zjistit Youngův modul pružnosti, jenž nám udává tuhost materiálu – čím je tato hodnota vyšší, tím je materiál tužší. Mezi prvním bodem A (mezí úměrnosti) a mezí pružnosti B (elasticity neboli *Yield point*) se projevují elastické vlastnosti, ale křivka již není lineární a neplatí zde tedy Hookův zákon. Při překročení bodu *Yield point*, tedy při zvýšení napětí nad mez pružnosti, dochází k plastické deformaci vzorku – při odstranění napětí se nevrátí materiál do původního stavu. Křivka dosahuje maxima v bodě nazývaném mez pevnosti (C), kterému odpovídá maximální napětí, jenž materiál absorbuje, aniž by došlo k jeho destrukci. Trvalá deformace materiálu nastává vzápětí v bodě D, jenž je nazýván *break point*. Pokud má materiál vysokou hodnotu meze pevnosti, snese o to větší zatížení [45].

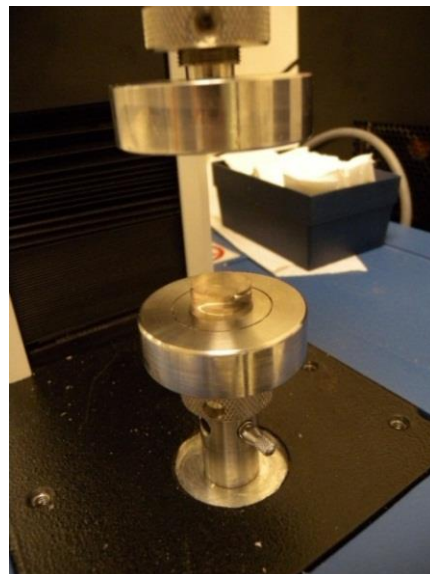
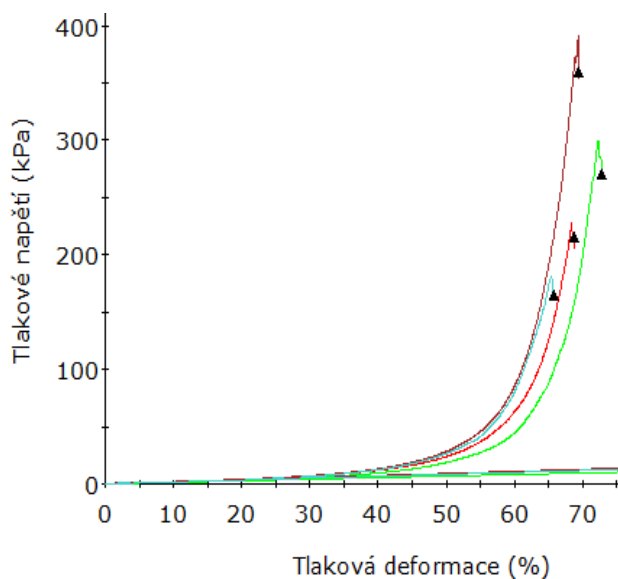


Obr. 40 *Stress-strain křivka: závislost napětí na deformaci. Vlevo: A mez úměrnosti, B mez pružnosti neboli Yield point, C mez pevnosti, D Break point. Vpravo: odlišný tvar křivky připadající pro materiály.*

Důležitou materiálovou vlastností charakterizující mechanické vlastnosti vzorků je houževnatost, jejímž protikladem je křehkost. Při vyšších hodnotách houževnatosti je materiál schopen zůstat při namáhání vcelku bez narušení. Pevnost v tahu houževnatých materiálů je menší, na druhou stranu vydrží větší zatížení a jsou schopny absorbovat nárazy před trvalou destrukcí. Houževnatost materiálu je přímo úměrná velikosti plochy pod *stress-strain* křivkou [45].

Dalším důležitým parametrem pro charakterizaci mechanických vlastností gelů je Youngův modul. Vyšší hodnotu modulu pružnosti mají materiály, které potřebují na dosažení stejné deformace vyšší napětí. Jak již bylo uvedeno, Youngův modul odpovídá směrnici dané *stress-strain* křivky a na základě jejího sklonu a tvaru lze stanovit charakter daného materiálu [45]. Křivka křehkého materiálu je strmá, kdežto tlakové napětí na deformaci plastického materiálu narůstá pomalu (Obr. 40).

Z teoretického hlediska *stress-strain* křivka hydrogelu (Obr. 40) prochází výše uvedenými body A, B, C, D. *Stress-strain* křivka reálného hydrogelu může vypadat jako v Obr. 41.



Obr. 41 Závislost tlakového napětí na deformaci (stress-strain křivka) hydrogelů (vlevo). Kompresní desky analyzátoru INSTRON 3342 pro stanovení mechanických vlastností.

6.2.5.2 Stanovení výtlačné síly

Výtlačná síla u prekurzorových roztoků derivátů je měřena v kompresi plynulým stlačováním pístu vrchní pohyblivou geometrií stříkačky uchycené v nástavci, čímž dochází k extruzi daného materiálu přes zvolenou jehlu. Výsledkem měření je počáteční, průměrná či maximální síla potřebná k vytlačení daného objemu roztoku ze stříkačky.

6.2.5.3 Instrumentace a metodika

Mechanické vlastnosti hydrogelů a výtlačná síla prekurzorových roztoků derivátů byly měřeny pomocí přístroje *Single Column Materials Testing System* INSTRON 3342 a 3343 (*Bluehill software*) v kompresním módu. Kapacita zařízení je 500 N a kapacita kompresní desky 100 N. Testovací rychlosti je možné nastavit v rozmezí 0,05–1000 mm/min.

Testovací rychlost použita pro stanovení mechanických vlastností hydrogelů v této práci byla 2 mm/min. Testovací rychlost použita pro stanovení výtlačné síly prekurzorových roztoků v této práci byla 50 mm/min. Pro uchycení stříkaček o objemu 3 ml s vnitřním průměrem 8,9 mm obsahující měřený roztok byl využit speciální nástavec. Vnitřní průměr zvolených jehel (25 a 27 G) odpovídal průměru kónické jehly u katetru využitého v dané práci (0,24 mm). Dráha jednoho testu byla 10 mm.

6.2.6 Botnění – gravimetrie

Pro medicínské aplikace hydrogelů je botnění jednou z velmi důležitých vlastností. Stupeň nabotnění Q lze stanovit gravimetricky.

Hydrogely byly po přípravě zváženy a vloženy do lékovek a zality roztokem 0,9 % NaCl, PBS nebo prasečí krevní plazmy – desetinásobkem hmotnosti hydrogelu. Lékovky se vzorky byly uchovávány při 37 °C v inkubátoru a v daných intervalech byly hydrogely po osušení zváženy. Botnáci síla je kompenzována retrakční silou. Hydrogel se dostane do rovnovážného stavu při vyrovnání těchto dvou sil a poté je již hodnota koeficientu nabotnění konstantní.

Obvykle je koeficient nabotnění vyjadřován jako rozdíl hmotnosti gelu po a před nabotněním podělený váhou gelu v nenabotněném stavu v procentech dle následujícího vztahu:

$$Q = \frac{m(\text{po nabotnění}) - m_0(\text{před nabotněním})}{m_0(\text{před nabotněním})} \cdot 100 (\%) \quad (10)$$

kde m představuje váhu hydrogelu po nabotnění a m_0 váhu hydrogelu před nabotněním [1].

Pro zjednodušení lze vyjádřit v procentech jen jako podíl hmotnosti gelu po a před nabotněním:

$$Q = \frac{m(\text{po nabotnění})}{m_0(\text{před nabotněním})} \cdot 100 (\%) \quad (11)$$

V tomto případě stupeň nabotnění hydrogelu před nabotněním je rovno 100 % a hodnota nad 100 % představuje nabotnělý podíl.

6.2.7 Degradace hydrogelové matrice

Mechanismem degradace hydrogelů je hydrolyza spojená s enzymatickou katalýzou či degradací pomocí reaktivních forem kyslíku [37]. Hydrogely na bázi HA jsou nejčastěji v lidském těle štěpeny hyaluronidázami, kdy polymerní řetězec je během procesu štěpen na menší podjednotky [36]. Rychlost degradace lze nepřímo stanovit pomocí reologických metod – tedy stanovením viskozity či viskoelastických vlastností hydrogelové sítě v časových intervalech či gravimetricky z úbytku hmotnosti hydrogelu a dále pak spektroskopickým stanovením koncentrace N-Acetyl-D-glukosaminových konců.

6.2.7.1 Enzymatická degradace

Enzymatická degradace byla provedena pomocí hyaluronidáz BTH (1753,5 IU/mg) u finální matrice hydrogelu na bázi HA-PH-RGD^{MIX} a porovnána s degradací roztoku nativní HA.

6.2.7.1.1 Příprava a degradace nativní HA

48 mg nativní HA (1,91 MDa) bylo rozpouštěno ve 25 ml 0,1% roztoku BSA v octanovém pufru (pH 5,3) po dobu 24 hod. Degradací proces byl započat přidáním 5 ml roztoku BTH (288 U/ml) s finální aktivitou v roztoku HA 30 U/mg, roztok byl zahřát na 37 °C a míchán. 1 ml média bylo převedeno do 2 ml lahvičky a zahřáto na 95 °C po dobu 10 minut pro inaktivaci enzymu a ukončení reakce. Precipitát byl po vychladnutí centrifugován (12500 rpm, 10 min, 25 °C) a supernatant převeden do 1,5 ml lahvičky a zmrazen.

6.2.7.1.2 Příprava a degradace hydrogelové matrice

Hydrogely byly zváženy (400 ± 20 mg) a vloženy do degradačního média (BTH roztok, 0,01M octanový pufr, pH 5,3) s finální aktivitou BTH 30 U/ml hydrogelu v suchém stavu. 1,5 ml média bylo převedeno do 2 ml lahvičky a zahřáto na 95 °C po dobu 10 minut pro inaktivaci enzymu a ukončení reakce. Precipitát byl po vychladnutí centrifugován (12500 rpm, 10 min, 25 °C) a supernatant převeden do 1,5 ml lahvičky a zmrazen. Hydrogely byly osušeny, zváženy a vloženy do vialky a přidáno čerstvé degradační médium (celkové množství 5 g).

6.2.7.1.3 Spektroskopické stanovení N-Acetyl-D-glukosaminových konců polymeru

Rychlost enzymatické reakce byla určena spektroskopicky stanovením koncentrace N-Acetyl-D-glukosaminových konců polymeru. Metoda je založena na barevné změně reakce s Ehrlichovým činidlem (20 g 4-(Dimethylamino)benzaldehydu, 26,4 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové (35 %) a 173,6 ml koncentrované kyseliny octové (99%)).

200 μ l testovaného roztoku bylo smíseno se 75 μ l 0,8 mol/l roztoku BORAXu (oktahydrátu tetraboritanu sodného). Směs byla zahřívána 10 minut na 100 °C. Po ochlazení na pokojovou teplotu bylo přidáno 1,5 ml 10% roztoku 4-(Dimethylamino)benzaldehydu. Po 15 minutách bylo možné spektroskopicky stanovit *N*-Acetyl-D-glukosaminové konce při 585 nm.

6.2.8 Skenovací elektronová mikroskopie

Rastrovací elektronový mikroskop se využívá pro zobrazení a analýzu povrchu vzorku. Důležitým parametrem je zvětšení, které se pohybuje v rozmezí 10 až 500 000krát [22]. Tato metoda byla využita pro zachycení struktury hydrogelu v suchém stavu, tedy lyofilizátu. Strukturu ve formě lyofilizátu nelze srovnávat s hydratovaným stavem, tedy hydrogelem.

6.2.8.1 Příprava lyofilizátu

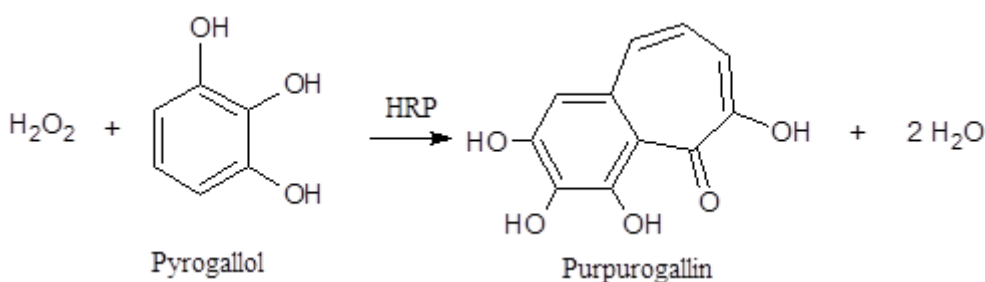
Dle postupu v kapitole 6.2.3 byl připraven hydrogel na bázi derivátu HA. Hydrogel byl zmrazen při teplotě od -25 do -35 °C po dobu 24 hodin. Následovala lyofilizace do úplného vysušení vzorku. Byl zvolen následující cyklus: 1. fáze 100 minut při 10 °C a tlaku 200 mT, 2. fáze 30 minut při 20 °C a tlaku 100 mT. Následovala sekundární sušení po dobu 5 minut při teplotě 20 °C a tlaku 50 mT. Lyofilizát je rozdělen na dvě poloviny k porušení vzorku pro zobrazení vnitřní struktury a jeho povrch je značen zlatem.

6.2.9 UV-VIS spektroskopie

Patří mezi elektromagnetické spektroskopické metody. Využívá měření útlumu intenzity světla při průchodu roztokem. Umožňuje stanovit koncentraci v roztoku při známém koeficientu absorpce měřené látky pomocí Lambert-Beerova zákona. V dané práci je metoda využita ke stanovení aktivity enzymu HRP a GluO, koncentrace peroxidu vodíku či stanovení *N*-Acetyl-D-glukosaminových konců polymeru po enzymatické degradaci.

6.2.9.1 Stanovení aktivity roztoku HRP

Aktivita roztoku HRP je stanovena pomocí pyrogallolu, který slouží jako substrát oxidovaný za přítomnosti peroxidu vodíku na purpurogallin dle schématu uvedeného v Obr. 42. Rychlost růstu koncentrace purpurogallinu se detekuje spektrofotometricky na základě barevné změny s absorpčním maximem při 420 nm [163].



Obr. 42 Chemická reakce sloužící ke stanovení aktivity HRP.

6.2.9.1.1 Příprava roztoků HRP

Zásobní roztok HRP pro přípravu gelů o teoretické aktivitě 8 U/ml (ZR1) je připraven ze zásobního roztoku HRP o koncentraci 1 mg/ml (ZR0) v 0,1% roztoku BSA (bovinní sérový albumin) s obsahem vápenatých iontů pro zvýšení stability HRP v roztoku během filtrace a prodloužení stability při skladování.

1. Příprava ZR0 – zásobní roztok HRP o koncentraci 1 mg/ml
 - 5 mg HRP je naváženo do lékovky a zalito 5 ml 0,1 % roztok BSA (1 mg/ml).
2. Příprava ZR1 – zásobní roztok HRP o aktivitě 8 U/ml
 - 4 ml ZR0 HRP napipetovat do 100 ml odměrné baňky, kvantitativně převést 14,7 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ do odměrné baňky pomocí 0,1% roztoku BSA a doplnit po rysku 0,1% roztokem BSA.
3. Příprava měřeného roztoku ZR2 o aktivitě 0,16 U/ml
 - 0,1 ml ZR1 napipetovat do odměrné baňky o objemu 5 ml a doplnit po rysku 0,1% roztokem BSA.

6.2.9.1.2 Vlastní provedení zkoušky

Roztoky HRP jsou proměřeny spektrofotometricky v jednorázových polystyrenových kyvetách při vlnové délce 420 nm po dobu 180 s. Roztok pyrogallolu je připraven vždy čerstvý před měřením. Blank je proměřen vždy před měřením vzorku HRP. Pokud je hodnota absorbance blanku vyšší než 0,07, musí být roztok pyrogallolu připraven znovu.

Do kyvet dávkujeme roztoky dle Tab. 8., měření je provedeno 3krát.

Tab. 8 Dávkování jednotlivých roztoků do kyvet

	DEMI	0,2 M octanový pufr pH6	H ₂ O ₂	HRP ZR2	Pyrogallol
	(ml)	(ml)	(ml)	(ml)	(ml)
Blank (+zero)	2	0,52	0,16	0	0,32
Kalibrace	2	0,32	0,16	0,2	0,32

Nárůst absorbance je detekován v čase A_{420} při 420 nm. Aktivita enzymového roztoku je vyjádřena v jednotkách pyrogallolu. Aktivitu HRP spočítáme dle vzorce:

$$A_{HRP} = \frac{(A_{40s} - A_{20s}) \cdot V_{kyvety} \cdot \frac{V_{ZR2}}{V_{ZR1}}}{\epsilon_{\text{purpurogalin}} \cdot V_{ZR2}} = \frac{(A_{40s} - A_{20s}) \cdot 3 \cdot \frac{5}{0,1}}{12 \cdot 5} = 2,5 \cdot (A_{40s} - A_{20s}) \quad (12)$$

- V_{ZR2} objem dávkovaného ZR2 do kyvet (ml)
- V_{ZR1} objem nadávkovaného ZR1 do roztoku ZR2 (ml)
- V_{kyvety} celkový objem kyvety (ml)
- $\epsilon_{\text{purpurogalin}}$ extinkční koeficient 1 mg/ml purpurogallinu při 420 nm – určený dodavatelem pyrogallolu (Sigma Aldrich)
- A_{40s} absorbance ve 40 s
- A_{20s} absorbance ve 20 s

6.2.9.2 Stanovení aktivity enzymu glukózo-oxidázy pomocí dianisidinu

Stanovení aktivity enzymu glukózo-oxidázy GluO je provedeno pomocí dianisidinu na UV-VIS spektrometru při vlnové délce 460 nm každý po dobu 5 minut (odečítání po 1 s). Jednotlivé roztoky jsou pipetovány do 3 ml kyvet pro spektrofotometrické stanovení dle uvedené tabulky.

Tab. 9 Objemy jednotlivých roztoků, které jsou pipetovány do kyvet pro spektrofotometrické stanovení aktivity glukózo-oxidázy reakcí s dianisidinem

	Fosfátový pufr PBS + dianisidin (ml)	Glukóza (ml)	HRP (ml)	Vzorek (ml)	Fosfátový pufr PBS (ml)
Zero	0	0,3	0,1	-	2,5
Blank	2,5	0,3	0,1	0,1	-
Vzorek	2,5	0,3	0,1	0,1	-

1% roztok dianisidinu: 10 mg dianisidinu bylo rozpuštěno v 10 ml etanolu. 1 ml tohoto roztoku byl zředěn 12 ml 0,1 mol/l fosfátového pufru PBS.

18% roztok glukózy: 18 g glukózy bylo rozpuštěno ve 100 ml DEMI. Roztok byl ponechán minimálně 1 hodinu stát, aby došlo k ustálení rovnováhy mezi alfa a beta glukózou.

Roztok HRP 16,6 U/mg

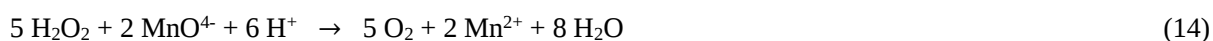
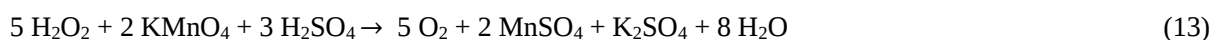
8 mg HRP (52 U/mg) bylo rozpuštěno v 0,1% roztoku BSA

Roztok GluO 0,4 U/ml

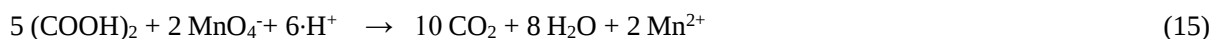
2 mg GluO (200 U/mg) bylo naředěno 1 ml 0,1% BSA. 50 µl daného roztoku bylo napipetováno do 10 ml odměrné baňky a doplněno 0,1% roztokem BSA připravený v PBS (pH 7,4).

6.2.9.3 Stanovení koncentrace peroxidu vodíku

Obsah peroxidu vodíku je stanoven na základě úbytku manganistanu draselného, který je stanoven spektrofotometricky. V kyselém prostředí zředěné kyseliny sírové se peroxid vodíku oxiduje silným oxidačním činidlem manganistanem draselným na kyslík podle uvedených rovnic. Významnou vlastností reakce je barevná změna: fialově zbarvené ionty MnO_4^- se při redukci odbarvují a mění na bezbarvé ionty Mn^{2+} .



Základem stanovení kalibrační křivky je reakce manganistanu draselného s kyselinou šťavelovou v kyselém prostředí dle uvedené rovnice:



6.2.9.3.1 Příprava roztoků

6.2.9.3.1.1 Příprava ředěného roztoku kyseliny sírové

Do skleněné lahve se závitkem o objemu 1000 ml předložíme 400 ml DEMI a pomalu přiléváme 100 ml 96 % kyseliny sírové.

6.2.9.3.1.2 Příprava 0,0117M kalibračního roztoku manganistanu draselného K1

Do 250ml kádinky navážíme manganistan draselný a zalijeme zhruba polovičním množstvím potřebného objemu DEMI. Roztok mícháme přikrytý hodinovým sklem 15 minut, po rozpuštění roztok přefiltrujeme přes skleněnou fritu do 250ml odměrné baňky. Fritu promyjeme DEMI a baňku doplníme po rysku a promícháme. Roztok necháme do druhého dne, chráníme před světlem v uzavřené nádobě. Navážku zaznamenáme.

6.2.9.3.1.3 Příprava 0,0294M kalibračního roztoku kyseliny šťavelové K2

Na porcelánovou váženku navážíme kyselinu šťavelovou s přesností na 4 desetinná místa, navážku zcela převedeme do 250ml odměrné baňky, doplníme po rysku, rozmícháme a necháme do druhého dne. Přesnou navážku zaznamenáme.

6.2.9.3.2 Příprava roztoku peroxidu vodíku

Příprava měřeného roztoku peroxidu vodíku: do 10ml odměrné baňky předložíme 5 ml ředěného roztoku kyseliny sírové, napipetujeme 0,5 ml roztoku manganistanu draselného K1 a poté 0,3 ml vzorku peroxidu vodíku (koncentrace zásobního roztoku pro přípravu hydrogelů je 0,1 %). Odměrná baňka je doplněna po rysku roztokem kyseliny sírové.

6.2.9.3.3 Kalibrační řada

K přípravě kalibrační řady se použije kalibrační roztok K1, do kterého se přidává podle Tab. 10 kalibrační roztok K2. Do 10ml odměrné baňky je nejprve předloženo asi 5 ml ředěného roztoku kyseliny sírové a do ní je nadávkováno 0,5 ml roztoku K1 a teprve poté roztok K2. Odměrná baňka je doplněna po rysku ředěným roztokem kyseliny sírové. Kalibrační roztok se nechá stát 15 minut, reakce manganistanu s kyselinou šťavelovou je pomalá.

Tab. 10 Příprava roztoků kalibrační řady

Kalibrační roztok	Objem roztoku K1 (ml)	Objem roztoku K2 (ml)	Objem ředěného roztoku kyseliny sírové (ml)
1	0,5	0,1	9,4
2	0,5	0,2	9,3
3	0,5	0,3	9,2
4	0,5	0,4	9,1

6.2.9.3.4 Vlastní provedení zkoušky

Kalibrační řada i roztoky vzorku jsou proměřeny spektrofotometricky v jednorázových polystyrenových kyvetách při vlnové délce 545 nm. Kalibrační křivka je vyhodnocena jako závislost absorbance na počtu zreagovaných molů manganistanu draselného. Korelační koeficient této závislosti musí být vyšší než **0,99**.

6.2.9.3.5 Vyhodnocení dat a vyjádření výsledku

Kalibrace se vyhodnocuje jako lineární závislost absorbance kalibračního roztoku měřeného při 545 nm na množství zreagovaných molů manganistanu draselného:

$$A = k \cdot n_{KMnO_4} + B \quad (16)$$

- A absorbance při 545 nm
- k směrnice
- B úsek
- n_{KMnO_4} počet zreagovaných molů manganistanu draselného (mol)

Počet zreagovaných molů manganistanu draselného lze vyjádřit pomocí zreagovaných molů kyseliny šťavelové. Molární hmotnost kyseliny šťavelové je 126,07 g/mol podle vzorce:

$$n_{KMnO_4} = \frac{C_{OA} \cdot V_{OA} \cdot 2}{5} = \frac{\frac{m_{OA}}{V_{OA} \text{ zásobní roztok}} \cdot M_{OA} \cdot V_{OA-K2} \cdot 2}{5} \quad (17)$$

- m_{OA} přesná navážka (hmotnost) kyseliny šťavelové (g)
- $V_{OA \text{ zásobní roztok}}$ objem zásobního roztoku kyseliny šťavelové (ml)
- M_{OA} molární hmotnost kyseliny šťavelové (g/mol)
- C_{OA} koncentrace kalibračního roztoku kyseliny šťavelové (M)
- V_{OA-K2} objem dávkovaného kalibračního roztoku kyseliny šťavelové K2 (ml)
- 2/5 stechiometrický koeficient

Korelační koeficient závislosti musí být vyšší než **0,99**.

Výpočet koncentrace peroxidu vodíku ve vzorku:

$$c_{H_2O_2} = \frac{\left(A - B \cdot \frac{V_{K1}}{V_{K1 \text{ vzorek}}}\right) \cdot 5}{k \cdot V_{H_2O_2} \cdot 2} (M) \quad (18)$$

- A absorbance při 545 nm
- k směrnice
- B úsek
- V_{K1} – objem roztoku manganistanu draselného použitý v rámci kalibrační řady – 0,5 ml
- $V_{K1 \text{ vzorek}}$ – objem roztoku manganistanu draselného (K1) přidávaný k testovanému vzorku peroxidu vodíku – 0,3 ml
- $c_{H_2O_2}$ – koncentrace vzorku (M)
- $V_{H_2O_2}$ – dávkovaný objem vzorku (ml)
- Stechiometrický koeficient 5/2

Přepočet na koncentraci peroxidu vodíku v %:

$$c_{H_2O_2} = \frac{c_{H_2O_2}(M) \cdot M}{1000} \cdot 100 = \frac{c_{H_2O_2} \cdot 34,0147}{1000} \cdot 100 (\%) \quad (19)$$

Výsledná hodnota koncentrace peroxidu vodíku je získána jako aritmetický průměr ze 3 měření vzorků.

6.2.10 Titrace

6.2.10.1 Stanovení obsahu kyseliny chlorovodíkové ve vzorku POA titrací

Do titračních baněk je předloženo POA a provedena titrace pomocí roztoku 0,2M hydroxidu sodného se stanoveným faktorem a zaznamenáno pH.

6.2.10.1.1 Příprava 0,2M roztoku hydroxidu sodného

Do 250ml odměrné baňky je předloženo 100 ml DEMI a do ní přidány 2 g hydroxidu sodného a doplněno po rysku DEMI vodou.

6.2.10.1.2 Kalibrace hydroxidu sodného – stanovení faktoru

Do titračních baněk je předloženo 10 ml 0,2M roztoku hydroxidu sodného a postupným přidavkem roztoku kyseliny chlorovodíkové se stanoveným faktorem zaznamenáváno pH. Vyhodnocením v MS Excelu lze stanovit bod ekvivalence.

6.2.10.1.3 Příprava 0,2M roztoku kyseliny chlorovodíkové

Do odměrné baňky (objem 1000 ml) bylo předloženo 300 ml DEMI vody a napipetováno 17,5 ml 35% roztoku kyseliny chlorovodíkové a doplněno po rysku DEMI vodou.

6.2.10.1.4 Kalibrace 0,2M roztoku kyseliny chlorovodíkové – stanovení faktoru

Do titračních baněk je předloženo 200 mg bezvodého uhličitanu sodného, přidána methylčerven jako indikátor a titrováno do červeného zabarvení a přivedeno k varu.

6.2.11 Biologická část

V rámci této práce byla stanovována cytotoxicita testovaných vzorků, adheze buněk na vrstvě hydrogelu a také viabilita buněk inkorporovaných v hydrogelu.

6.2.11.1 Buňky

Buňky byly kultivovány dle protokolů za standardních podmínek v inkubátoru – kultivace buněk není předmětem této disertační práce.

Buněčné typy:

- 3T3-Swiss albino – linie, myší embryonální fibroblasty (ATCC® CCL-92™)
- ADSC – kardiopoietické buňky z tukové tkáně dárců. Poskytovatelem byla společnost Celyad (<https://www.celyad.com/>), jeden z partnerů EU projektu AMCARE.
- SC – mezenchymální kmenové buňky z kostní dřeně (Lonza, PT-2501).
- HCT-116 – linie karcinomu tlustého střeva (ATCC® CCL-247™)

6.2.11.2 Cytotoxicita

Byla stanovena cytotoxicita prekurzorových roztoků, výluhů z gelů a degradačních produktů. V rámci této disertační práce byly k testům cytotoxicity použity myší embryonální fibroblasty linie 3T3 a u finálního materiálu použity kardiopoietické buňky z tukové tkáně dárců (ADSC). Buňky byly nasazeny na 24jamkové kultivační panely a následující den k nim byly přidány testované vzorky. Cytotoxicita byla stanovována po 24–72 hod. metodou ATP.

6.2.11.2.1 Příprava testovaného vzorku

Testovaná látka: je rozpuštěna v kultivačním médiu. Pokud je použito jiné rozpouštědlo, látka je rozpuštěna v 10krát vyšší koncentraci, než je testována. Ke zředění na výslednou koncentraci dojde následným smísením s kultivačním médiem.

Extrakty: hydrogely jsou připraveny dle kapitoly 6.2.3 sterilně a zváženy. 1 g hydrogelu je zalit 9 ml testovacího média. Temperace probíhá při 37 °C na třepacím inkubátoru (200 rpm) po dobu 72±2 hodiny. Stejným způsobem je připraven blank bez přítomného hydrogelu. Po 72 hodinách jsou hydrogely vyjmuty a testována cytotoxicita extraktu.

6.2.11.3 Adheze buněk k povrchu

K testu 2D adheze buněk na vrstvu hydrogelu bylo v rámci této práce využito kmenových buněk (SC a ADSC). Prekurzorové roztoky hydrogelů jsou aplikovány do jamek dle postupu uvedeném v kapitole 6.2.3, kde následně dochází ke zgelování materiálu. Vzniklá hydrogelová vrstva je ponechána dozrát. Na takto „pocoatované“ jamky jsou aplikovány buňky v uvedené nasazovací hustotě pro SC 13 tisíc a pro ADSC 10 tisíc. Počet jamek je $n = 4$, z toho 1 je použita na stanovení *Live/Dead* a růst buněk na zbylých jamkách je hodnocen metodou ATP po 24 a 96 hod.

6.2.11.4 Inkorporace buněk do hydrogelové matrice

Suspenze buněk je přidána v případě enzymatického systému do roztoku hydroxyfenyl derivátu HA s obsahem enzymu HRP a v případě reakce HA-Ox/POA do roztoku HA-Ox. Následně jsou z prekurzorových roztoků připraveny hydrogely do teflonových formiček dle postupu v kapitole 6.2.3. Po gelaci jsou (maximálně 15 minut) hydrogely přeneseny do jamky kultivačního panelu a zality vhodným médiem.

Pro inkorporaci buněk do hydrogelu byly použity buňky SC, HCT-116 a ADSC.

6.2.11.5 Testovací metody

6.2.11.5.1 Barvení Live/Dead

Barvení se provádí za účelem zaznamenání růstu, distribuce a morfologie buněk na jamkách kultivačního panelu nebo v hydrogelech.

Barvení je provedeno pomocí fluorescenčního barviva propidium jodidu (PI) (1 mg/ml v DEMI) a lipofilního nefluorescenčního barviva acetomethoxyester kalceinu (calcein-AM, 1 mg/ml v DMSO). Obě barviva jsou přidána do jamky se vzorkem (1 µl barvicího roztoku/1 ml média) a inkubovány 15 min ve tmě. Snímky jsou pořízeny pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse Ti.

Metoda je založena na základě rozdílné propustnosti membrány pro různá barviva a na základě aktivity vnitrobuněčných enzymů esteráz. Propidium jodid proniká pouze do buněk s porušenou cytoplazmatickou membránou a interkaluje do molekuly DNA (neviabilní, ve snímcích červené). Calcein-AM proniká do viabilních buněk a po odštěpení acetomethoxy skupin (AM) esterázami v buněčné cytoplazmě fluoreskuje (ve snímcích zelené).

6.2.11.5.2 Metoda ATP

Metoda je založena na detekci luminiscenčního signálu na přístroji *TECAN Infinite*, který je emitován v přítomnosti ATP uvolněného z živých, metabolicky aktivních buněk. K detekci ATP se používá titrační činidlo *CellTiter Glo assay* (Promega).

Podstatou metody je měření intenzity luminiscenčního záření vytvořeného chemickou reakcí luciferinu s luciferázou, která probíhá pouze v přítomnosti ATP. Po přidání barvicího roztoku dojde ve vzorku k indukované lyzi buněk, z nichž se uvolní ATP. Uvolněné ATP umožní přeměnu luciferinu na oxyluciferin doprovázenou vznikem luminiscenčního záření. Intenzita záření je úměrná původnímu množství ATP, a tedy množství živých buněk ve vzorku.

Postup: vzorek je promyt od kultivačního média pomocí PBS. Následně je přidán PBS a roztok činidla *CellTiter Glo* v poměru 5:1 (obvykle 1000 µl + 200 µl pro buňky inkorporované v hydrogelech, nebo 200 µl + 40 µl pro testy cytotoxicity a 2D adheze). Vzorek je třepán ve tmě po dobu 30 minut, následně je měřena luminiscence roztoku.

6.3 Přístroje a zařízení

Název	Značka/zkratka	Výrobce
Magnetická míchačka	MR Hei-Standard	Heidolph
Hřídelová míchačka	Hei-TORQUE 200	Heidolph
Váhy	XS205	METTLER TOLEDO
pH metr	inoLab pH 7110	WTW
Konduktometr	inoLab Cond 7110	WTW
UV-VIS spektrofotometr	UV-2401PC	SHIMADZU
Single Column Materials Testing System	3342	Instron
	3343	Instron
Reometr	AR-G2	TA Instruments
Laminární box	HERA SAFE KS	Trigon plus
Mikroskop	Eclipse Ti	Nikon
Multifunkční reader	Infinite m200	TECAN

7 VÝSLEDKY

První část práce se zabývá obecnou charakterizací různých typů hydrogelových maticí. Prvně jsou uvedeny výsledky charakterizace oxidované formy HA (HA-Ox) zesíťené pomocí alkoxyaminu POA a tyraminovaného derivátu HA (HA-TA) síťovaného pomocí přídavku peroxidu vodíku v přítomnosti křenové peroxidázy. Následně je ukázána možnost generace peroxidu vodíku pomocí dalších enzymatických reakcí, jako je reakce enzymu glukózo-oxidázy se substrátem glukózou či galaktózo-oxidázy s galaktózou.

Pro zvýšení buněčné adheze a viability je možné využít přídavku adhezivních molekul, jako je například fibrinogen nebo lze do strukturu tyraminovaného derivátu HA zakomponovat RGD sekvenci za vzniku derivátu HA-PH-RGD, který lze obdobně jako v případě tyraminovaného derivátu HA (HA-TA) zesíťit enzymaticky.

Kvůli plánované aplikaci materiálů pomocí katetru s velmi malým vnitřním průměrem a speciálního zařízení SPREADS byla stanovována viskozita a výtlačná síla prekurzorových roztoků derivátů. Velmi důležitým faktorem je také rychlost gelace, aby nedocházelo k zatuhnutí materiálu v aplikačním zařízení, ale na druhou stranu materiál setrval v místě aplikace. Vytvoření první makroskopické sítě neboli bod gelace byl určován z kinetiky gelace měřené pomocí rotačního reometru. U hydrogelů byly stanoveny viskoelastické a mechanické vlastností a koeficient nabotnění. Charakter připraveného hydrogelu byl ovlivněn především typem výchozího polymeru, jeho koncentrací a molekulovou hmotností M_w a stupněm substituce DS , dále koncentrací síťovacích činidel, pH a iontovou silou roztoku či teplotou.

Druhá, biologická část disertační práce je zaměřena na testy cytotoxicity, buněčnou adhezi a inkorporaci buněk do hydrogelů. Tato část práce byla provedena ve spolupráci s kolegyní Mgr. Ivanou Ščigalkovou.

V poslední části, zabývající se možnostmi aplikace materiálu pomocí dvou typů aplikačních zařízení, katetru a SPREADS, byl již aplikován pouze finálně zvolený materiál. Byla testována kompatibilita daných zařízení s vybraným materiálem *in vitro* i v rámci preklinické studie.

7.1 Hydrogely na bázi oxidované formy HA

Oxidovaná forma HA (HA-Ox) s aldehydickou skupinou v poloze 6 glukosaminové části polysacharidu je schopna vázat sloučeniny obsahující amino skupinu a v případě použití bifunkčních aminů (případně polyfunkčních) lze připravit síťované materiály – tedy gely (Obr. 43). Jako síťovací činidlo byl použit bifunkční alkoxyamin POA (O,O'-1,3-propandiylbishydroxylamin dihydrochlorid). Příprava hydrogelu je popsána v kapitole 6.2.3.



Obr. 43 Ilustrativní foto hydrogelů na bázi systému HA-Ox/POA s různým stupněm zesíťení (vlevo nižší, vpravo vyšší stupeň zesíťení hydrogelu).

7.1.1 Výpočet koncentrace síťovacího činidla POA dle poměru vazných skupin

V rámci dané práce je koncentrace POA počítána dle poměru vazných skupin aldehydu HA-Ox (CHO) a amino skupin alkoxyaminu POA (NH₂). Výpočet koncentrace síťovacího činidla POA je proveden dle následujícího vzorce:

$$c_{POA} = \frac{c_{HA-Ox} \cdot V_{HA-Ox} \cdot M_{POA} \cdot \frac{DS_{HA-Ox}}{100} \cdot P_{NH_2:CHO}}{V_{POA} \cdot P_{POA} \cdot M_{HA-Ox}} \quad (20)$$

- c_{POA} – koncentrace POA po naředění (mg/ml)
- c_{HA-Ox} – koncentrace HA-Ox (mg/ml)
- V_{HA-Ox} – objem dávkovaného vzorku aldehydu (ml)
- M_{POA} – molekulová hmotnost POA – 179,05 g/mol
- DS – stupeň substituce aldehydu (%)
- $P_{NH_2:CHO}$ – poměr CHO skupin ku aminoskupinám (-)
- V_{POA} – objem dávkovaného POA (ml)
- P_{POA} – počet aminoskupin – 2
- M_{HA-Ox} – molekulová hmotnost disacharidové jednotky – 400 g/mol

Výpočet koncentrace POA ve finálním gelu při DS HA-Ox 9 %, koncentraci HA-Ox v gelu 20 mg/ml:

$$c_{POA} = \frac{20 \cdot 179,05 \cdot \frac{9}{100} \cdot P_{NH_2:CHO}}{2 \cdot 400} \cong 0,4 \cdot P_{NH_2:CHO} \quad (21)$$

Tab. 11 Koncentrace POA v hydrogelu pro zvolené poměry aldehydických skupin HA-Ox a amino skupin POA při DS HA-Ox 9 % a koncentraci HA-Ox v gelu 20 mg/ml.

NH ₂ :CHO	c _{POA} (mg/ml)
2:1	0,8
1:1	0,4
1:2	0,2
1:4	0,1
1:8	0,05
1:16	0,025

7.1.2 Titrace síťovadla POA

Dané síťovadlo POA je hydrochlorid, a proto je pH roztoků z něj připravených silně kyselé především s rostoucí koncentrací látky a využitím rozpouštědla bez dostatečné pufrací kapacity. Ani roztok fosfátového pufru PBS (pH 7,4) nemá dostatečnou pufrací kapacitu, aby zásobní roztok POA o koncentraci 10 mg/ml dosahoval neutrálního pH.

Každá šarže této látky obsahuje jiné množství kyseliny chlorovodíkové. Pro snadnou a opakovatelnou přípravu roztoků POA je výhodné znát obsah kyseliny chlorovodíkové (bod ekvivalence) v dané látce a při přípravě roztoku POA již přidávat téměř stejné množství neutralizačního činidla například hydroxid sodný.

Pro zjištění obsahu kyseliny chlorovodíkové byly roztoky POA (různé šarže) titrovány roztokem hydroxidu sodného a stanoven bod ekvivalence. Tato acidobazická titrace je charakteristická titrační křivkou (závislost pH na přidaném objemu titračního činidla). V bodě ekvivalence dochází ke skokové změně hodnoty. Jelikož je v reakci přítomna pouze jednosytná kyselina chlorovodíková, je nalezen pouze jeden zlom. Pro určení bodu ekvivalence bylo využito pH-metrické stanovení.

Pro správné stanovení bodu ekvivalence je nutné standardizovat roztok hydroxidu sodného, a to titrací pomocí kyseliny chlorovodíkové, u které je zjištěn průměrný faktor titrací na uhličitán sodný s indikátorem methylčervení. Faktor představuje číslo udávající poměr mezi skutečnou a požadovanou koncentrací. Faktorem je pak vynásobeno spotřebované množství přibližného odměrného roztoku. Číselná hodnota faktoru se pohybuje kolem hodnoty 1. Je-li roztok silnější, má faktor hodnotu vyšší, pokud je slabší, tak má faktor hodnotu nižší.

7.1.2.1 Stanovení faktoru 0,2M kyseliny chlorovodíkové a hydroxidu sodného

Dle postupu v kapitole 6.2.10.1 byl připraven a titrován roztok kyseliny chlorovodíkové. Hodnota průměrného faktoru je **0,9383** (SD 0,0012).

Dle postupu v kapitole 6.2.10.1 byl připraven a titrován roztok hydroxidu sodného. Během měření bylo zaznamenáno pH a vyhodnocením v MS Excelu stanoven bod ekvivalence. Průměrný bod ekvivalence byl stanoven na 10,45 ml. Faktor hydroxidu sodného je roven **0,9805**.

7.1.2.2 Titrace vzorků POA

Pro titraci byly zvoleny 3 různé šarže vzorků POA. Do titračních baněk bylo předloženo přibližně 200 mg POA označených jako POA1, POA2 a POA3 viz tabulka a byla provedena titrace pomocí roztoku 0,2M hydroxidu sodného ($f = 0,9805$) a zaznamenáno příslušné pH.

Tab. 12 Bod ekvivalence pro jednotlivé šarže POA

Označení	Šarže	Navážka (mg)	Bod ekvivalence (ml)	n_{POA} (mmol)	n_{NaOH} (mmol)	Poměr $n_{\text{NaOH}}/n_{\text{POA}}$	pH
POA1	BCBT7173	191,1	10,42	1,07	2,04	1,91	7,71
POA2	1356536V	207,7	11,55	1,16	2,26	1,95	7,60
POA3	BCBV2416	192,3	10,36	1,07	2,03	1,89	7,28

Ukázka výpočtu:

Bod ekvivalence je shodný s inflexním bodem na titrační křivce. V inflexním bodě jakékoliv funkce platí, že druhá derivace této funkce je rovna nule.

Výpočet hodnot první derivace je proveden z každých dvou sousedních bodů titrační křivky dle vzorce:

$$pH' = \frac{dpH}{dV} = \frac{pH_2 - pH_1}{V_2 - V_1} \quad (22)$$

Pro výpočet objemu platí:

$$V^* = \frac{V_1 + V_2}{2} \quad (23)$$

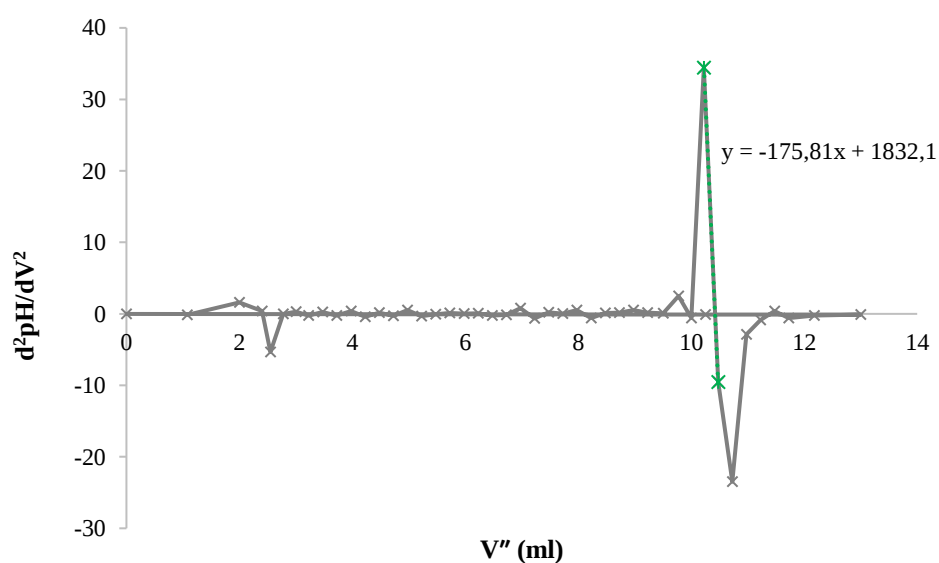
Výpočet hodnot druhé derivace z každých dvou sousedních bodů křivky 1. derivace dle vzorce:

$$pH'' = \frac{d^2pH}{dV^2} = \frac{pH'_2 - pH'_1}{V_2^* - V_1^*} \quad (24)$$

Pro výpočet objemu platí:

$$V^{**} = \frac{V_1^* + V_2^*}{2} \quad (25)$$

Vypočtené hodnoty – křivka 2. derivace, jsou vyneseny do Obr. 44:



Obr. 44 Křivka druhé derivace titrační křivky – určení bodu ekvivalence.

Z křivky 2. derivace titrační křivky je určen bod ekvivalence jako průsečík této křivky s osou objemu (2. derivace, $y = 0$).

$$y = -175,81x + 1832,1 \quad (26)$$

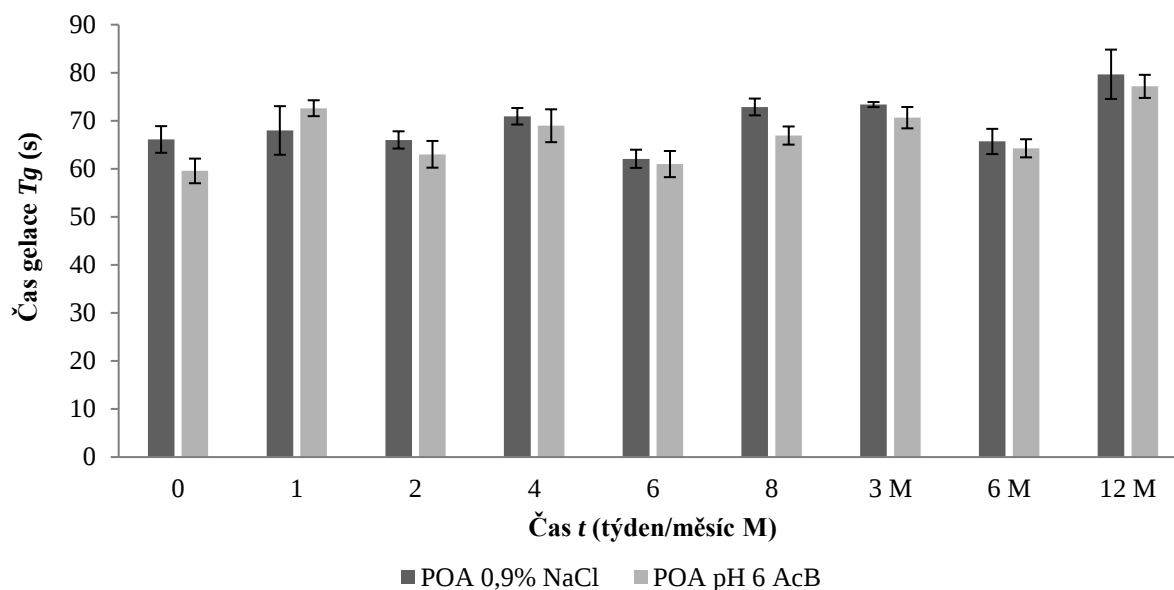
$$0 = -175,81x + 1832,1 \quad (27)$$

$$x = \frac{1832,1}{175,81} = 10,42 \text{ ml} \quad (28)$$

Stejným způsobem byly získány hodnoty pro další 2 šarže síťovadla POA.

7.1.3 Stabilita síťovadla POA

Pro možné využití materiálu v téměř jakékoli aplikaci je důležitá také jeho dlouhodobá stabilita, tedy jestli si daný produkt zachovává vhodné vlastnosti i po delší době skladování. Dlouhodobá stabilita (12 měsíců) roztoku síťovadla POA byla testována pomocí kinetiky gelace. Roztoky POA o koncentraci 10 mg/ml v roztoku 0,9% NaCl a octanového pufru (0,05 M) byly titrovány pomocí 0,2M roztoku hydroxidu sodného pro dosažení pH 6 a následně sterilizovány filtrací přes 0,2 μ m PES filtr. Roztok byl uchováván při RT po dobu 12 měsíců, kdy v jednotlivých časech byl vzorek sterilně odebrán a stanovována kinetika gelace v kombinaci s připraveným roztokem derivátu HA-Ox (spec. B, 20 mg/ml) v octanovém pufru 0,05 M pH 6 (Obr. 45). Zvolený poměr vazných skupin NH₂:CHO byl 1:1 (POA o koncentraci 0,4 mg/ml).



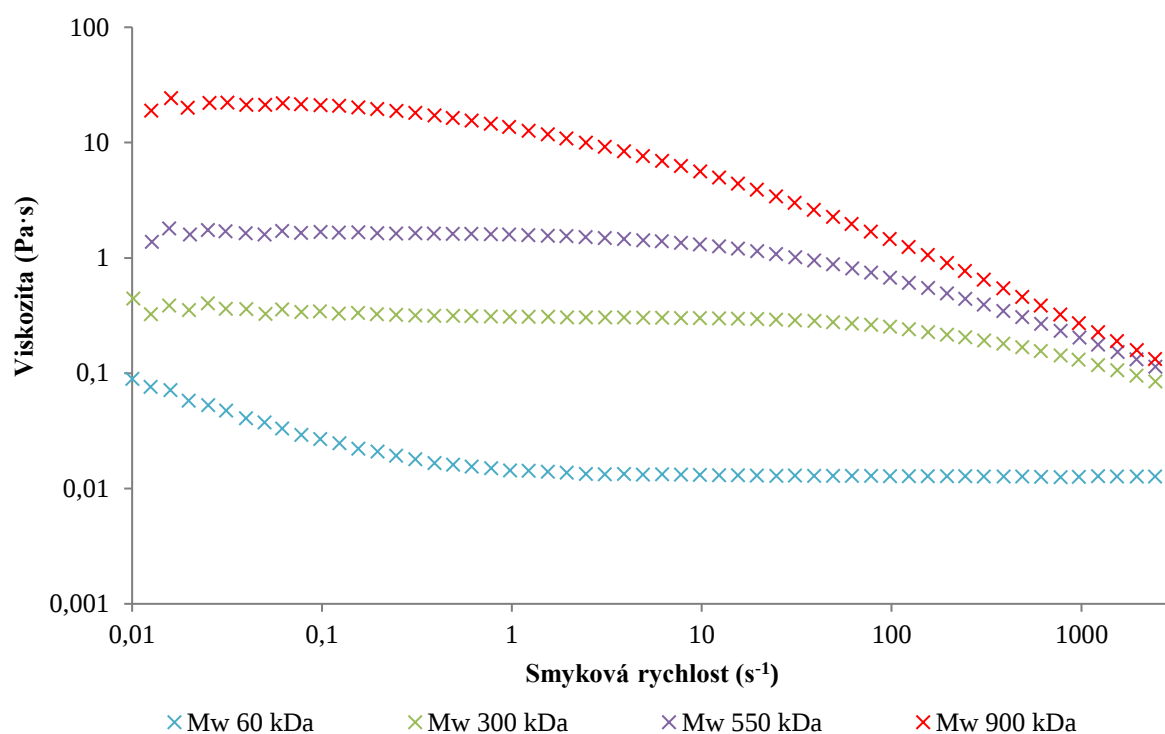
Obr. 45 Stabilita POA v 0,9% roztoku NaCl a octanovém pufru s pH 6. Čas gelace stanoven v průběhu 12 měsíců z průběhu kinetiky gelace.

7.1.4 Zdánlivá viskozita roztoku HA-Ox

Zdánlivá viskozita (dále jen viskozita) roztoku HA-Ox byla stanovena pomocí rotačního reometru AR-G2 dle metodiky popsané v kapitole 6.2.4.5. HA-Ox prášek (20 mg/ml) byl rozpuštěn ve fyziologickém roztoku 0,9% NaCl. Roztoky HA-Ox o koncentraci 20 mg/ml byly zvoleny pro porovnání viskozity roztoků lišící se molekulovou hmotností výchozího derivátu. Viskozita polymeru HA-Ox je závislá na smykové rychlosti a s její zvyšující se hodnotou dochází k poklesu viskozity neboli ke zřednutí při toku (*shear-thinning*) (Obr. 46). Hodnoty viskozit jednotlivých roztoků HA-Ox byly odečteny při smykové rychlosti 1,9 s⁻¹ z viskozitní křivky (Tab. 13).

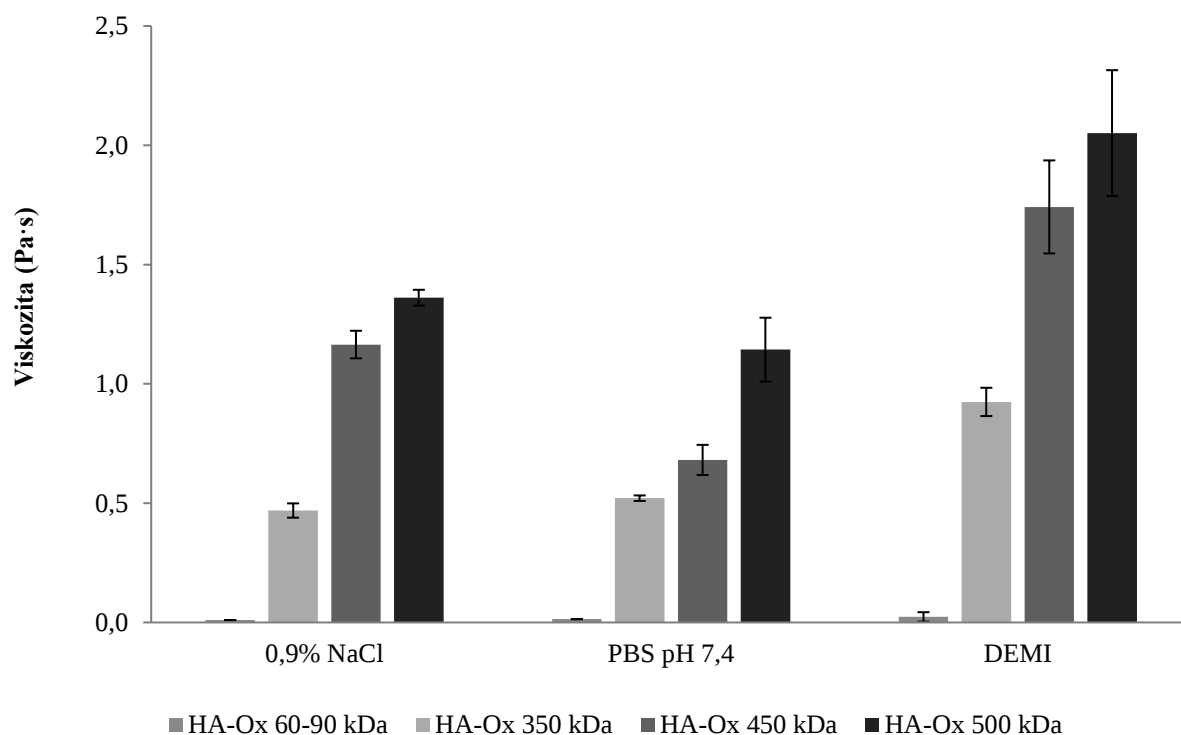
Tab. 13 Viskozita a pH HA-Ox roztoků

Specifikace HA-Ox derivátů	M_w (kDa)	DS (%)	Viskozita (Pa·s) při smykové rychlosti 1,9 s ⁻¹	SD viskozity (Pa·s)
A	60	9	0,011	0,001
B	300	9	0,312	0,005
C	550	9	1,581	0,053
D	900	6	11,688	0,216



Obr. 46 Závislost viskozity na smykové rychlosti HA-Ox roztoků o různé molekulové hmotnosti.

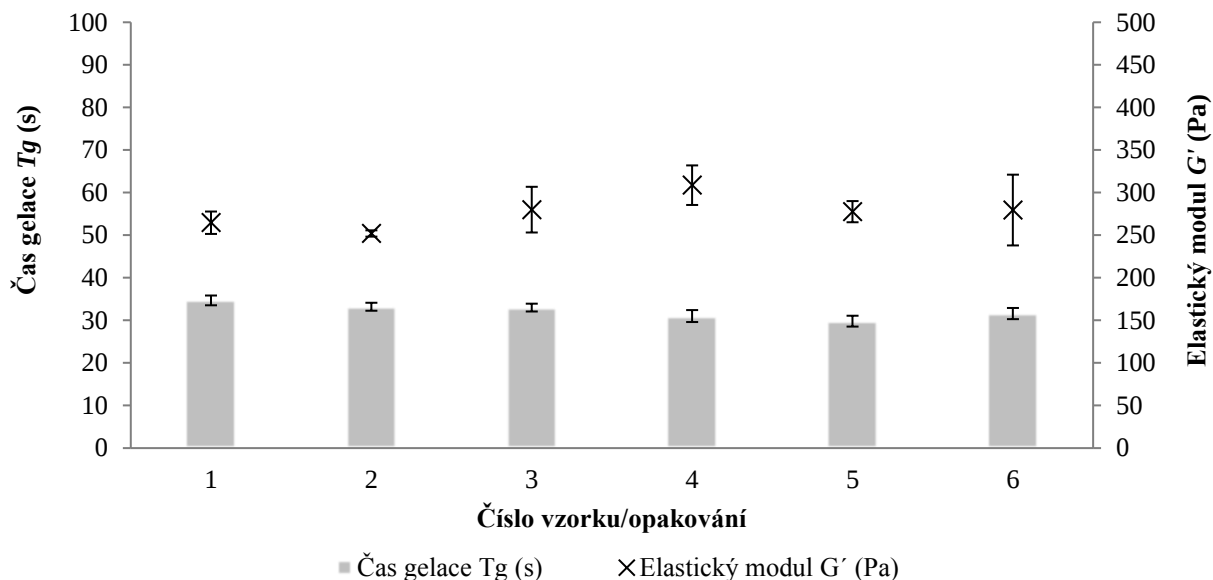
Viskozita roztoků závisí také na typu rozpouštědla. Byla stanovena viskozita HA-Ox o koncentraci 20 mg/ml v roztoku 0,9% NaCl, PBS pH 7,4 a demineralizované vodě (Obr. 47). Molekulová hmotnost byla volena nižší do 500 kDa vzhledem k aplikaci materiálu pomocí katetru či aplikačního zařízení SPREADS, kde je nutné zachovat nízkou viskozitu roztoku.



Obr. 47 Závislost viskozity na molekulové hmotnosti HA-Ox a typu rozpouštědla odečtena z viskozitní křivky při smykové rychlosti $1,9 \text{ s}^{-1}$.

7.1.5 Opakovatelnost přípravy gelů

Byla stanovena opakovatelnost přípravy gelů (Obr. 48) měřením času gelace a elastického modulu u vzorků na bázi HA-Ox spec. B v 0,9% roztoku NaCl při pH 6. Koncentrace síťovadla POA byla zvolena tak, aby finální poměr amino a aldehydických skupin byl 1:1. Elastický modul byl získán z kinetiky gelace a jeho hodnota odečtena ve 3 minutách od počátku měření.

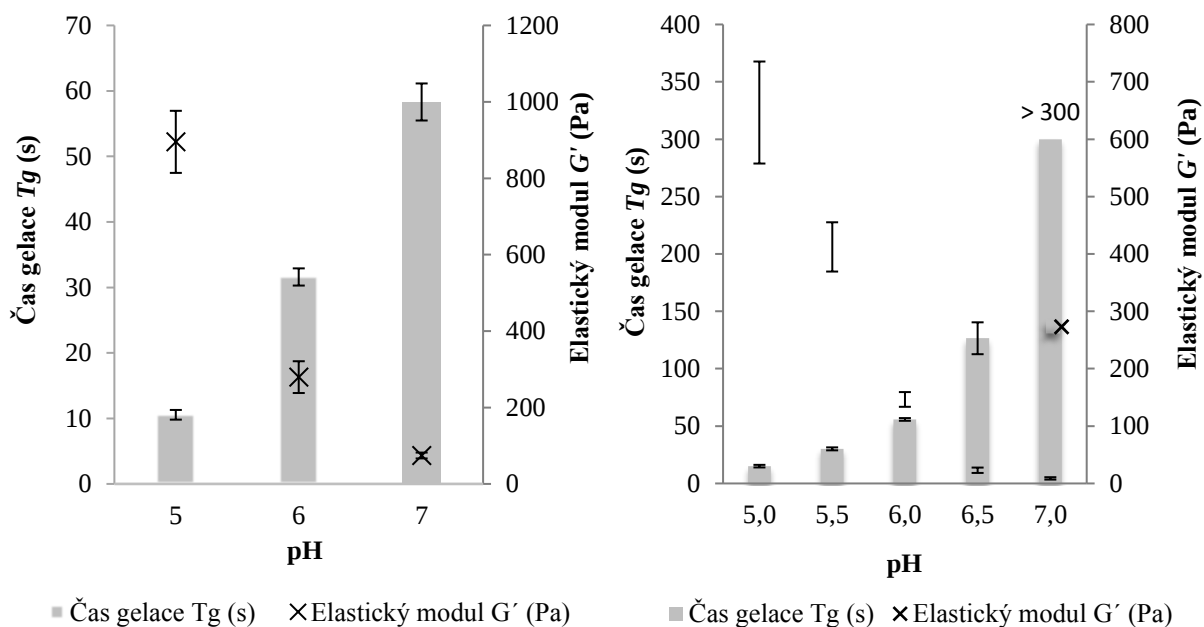


Obr. 48 Kinetika gelace – opakovatelnost přípravy vzorků jednotlivých šarží.

7.1.6 Vliv pH na charakter gelu

7.1.6.1 Kinetika gelace

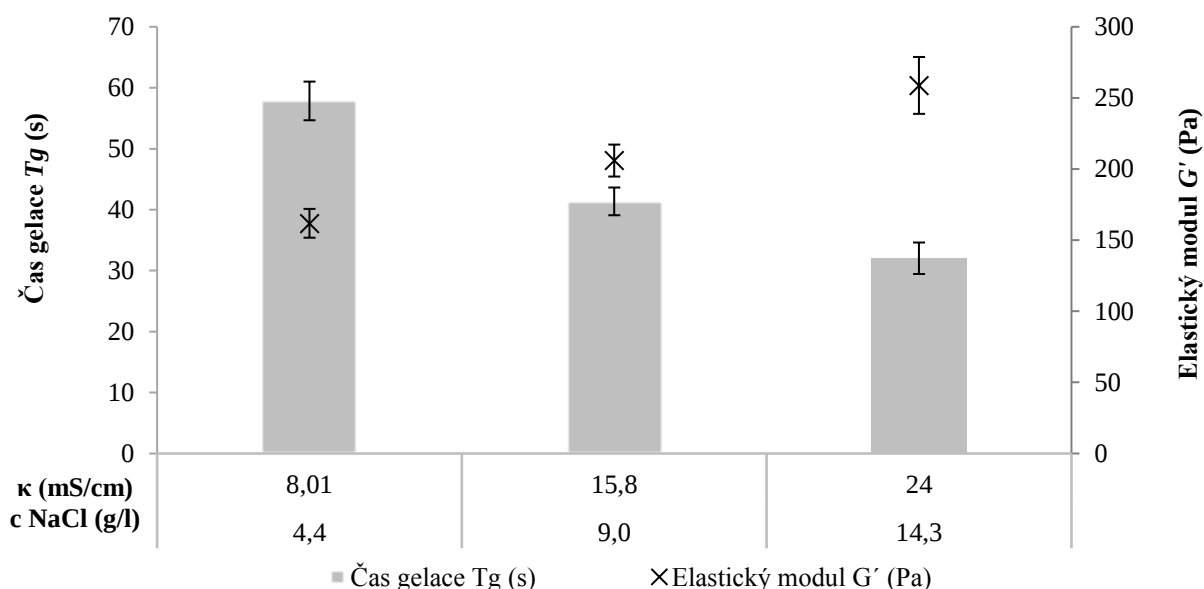
Byl sledován vliv pH na čas gelace a elastický modul u vzorků na bázi HA-Ox spec. B o koncentraci 20 mg/ml v 0,9% roztoku NaCl či 0,05 M octanovém pufru (Obr. 49). Koncentrace síťovadla POA byla zvolena tak, aby finální poměr amino a aldehydických skupin byl 1:1. Elastický modul byl získán z kinetiky gelace a jeho hodnota odečtena ve 3 minutách od počátku měření.



Obr. 49 Vliv pH na kinetiku gelace v 0,9 % NaCl (vlevo) a v 0,05M octanovém pufru (vpravo).

7.1.7 Vliv iontové síly

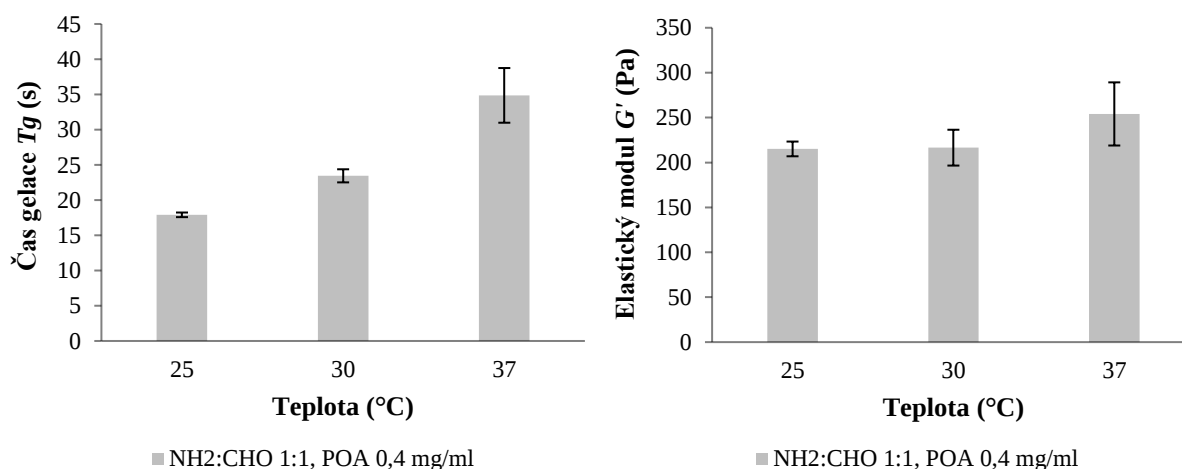
V testovaném rozmezí koncentrací roztoku NaCl 4,0–15 g/l byla stanovována vodivost, aby bylo docíleno přibližných hodnot vodivosti 8, 16 a 24 mS/cm. Tomu odpovídají koncentrace chloridu sodného 4,4; 9 a 14,3 g/l. Elastický modul byl získán z kinetiky gelace a jeho hodnota odečtena ve 3 minutách od počátku měření (Obr. 50). Pro stanovení vlivu iontové síly byl využit derivát HA-Ox spec. B (M_w 250–350 kDa, DS 7–12 %) 20 mg/ml a roztok POA pH 6 (0,4 mg/ml).



Obr. 50 Vliv iontové síly roztoku NaCl na kinetiku gelace – čas gelace a elastický modul odečten ve 3 minutách.

7.1.8 Vliv teploty

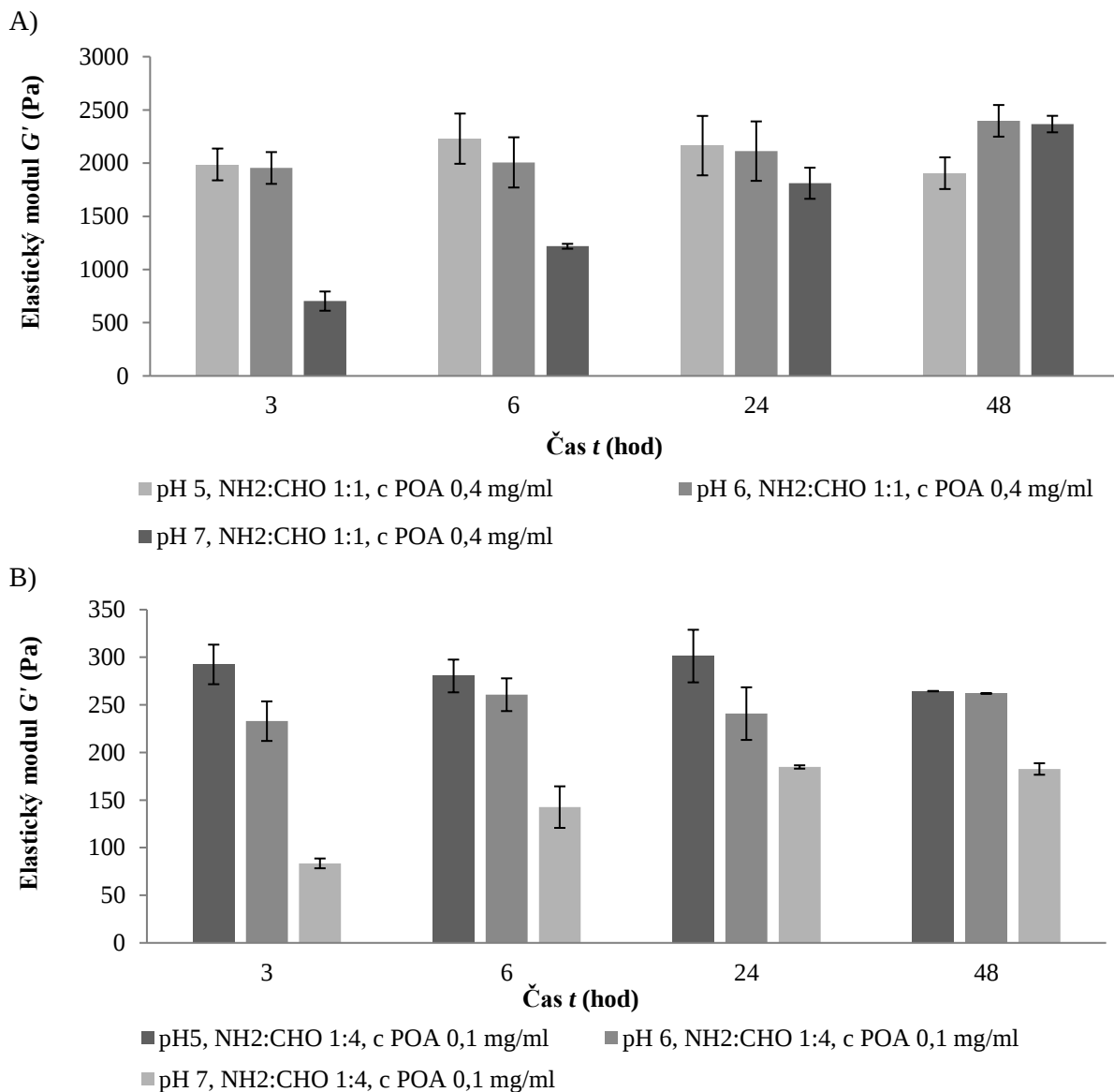
Byl sledován vliv teploty na rychlost gelace. Čas gelace byl stanoven jako bod průtnutí křivky elastického a viskózního modulu. Hodnota elastického modulu byla určena ve 3 minutách od počátku měření (Obr. 51). Měření bylo provedeno u derivátu HA-Ox specifikace B (M_w 250–350 kDa, DS 7–12 %) o koncentraci roztoku 20 mg/ml v 0,9% NaCl při pH 6 a koncentraci POA 0,4 mg/ml (poměr $NH_2:CHO$ 1:1). Teplotní rozmezí bylo stanoveno na základě teploty lidského těla 37 °C, jelikož je materiál cílen do živé tkáně a laboratorní teploty (25 °C), jež je přibližnou teplotou roztoku před aplikací.



Obr. 51 Vliv teploty na kinetiku gelace – čas gelace (vlevo), elastický modul odečten ve 3 minutách (vpravo).

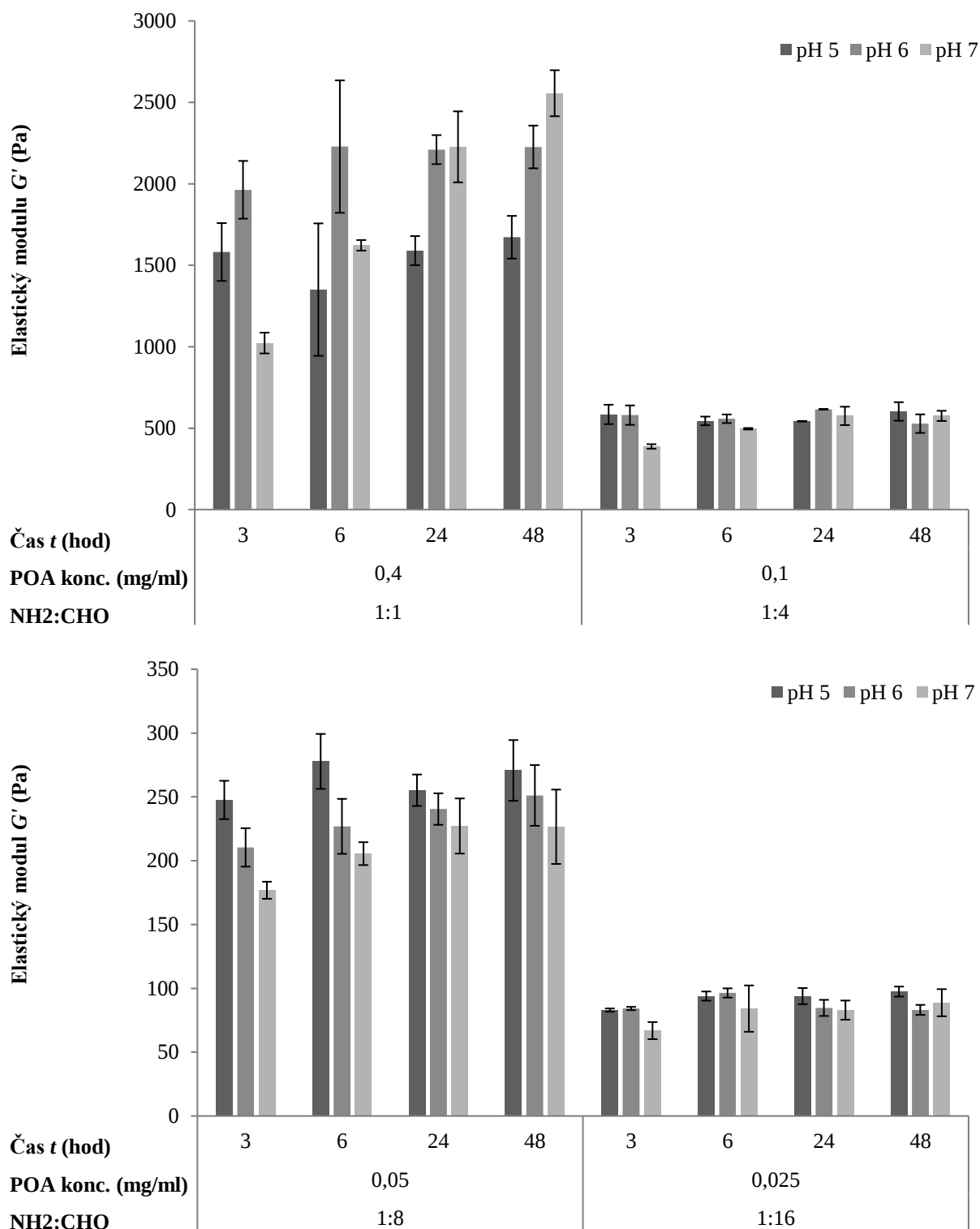
7.1.9 Zrání hydrogelů v čase

Viskoelastické vlastnosti gelů byly stanoveny v časových intervalech v průběhu 48 hodin. Dozrávání bylo testováno u dvou typů derivátů HA-Ox o koncentraci 20 mg/ml lišících se molekulovou hmotností spec. A (55–85 kDa, Obr. 52) a spec. B (250–350 kDa, Obr. 53). Testování bylo provedeno pro 3 vzorky s různým pH a odlišné poměry vazných skupin NH₂:CHO neboli různé koncentrace alkoxyaminu POA. Pro testování bylo použito stejné rozpouštědlo – octanový pufr 0,05 M pro udržení konstantního pH roztoku. Roztoky HA-Ox i POA byly titrovány pomocí 0,2 M roztoku NaOH či 0,2 M HCl na cílené pH 5, 6 nebo 7. Následně byly připraveny gely dle postupu uvedeném v kapitole 6.2.3. V časových intervalech 3, 6, 24 a 48 hodin byly stanoveny viskoelastické vlastnosti pomocí metody *strain sweep* (6.2.4.5.2.).



Obr. 52 Dozrávání hydrogelu v čase. Vliv pH (5–7) na elastický modul. Poměr vazných skupin NH₂:CHO je 1:1 (A) a 1:4 (B). Derivát HA-Ox spec. A, M_w 55–85 kDa.

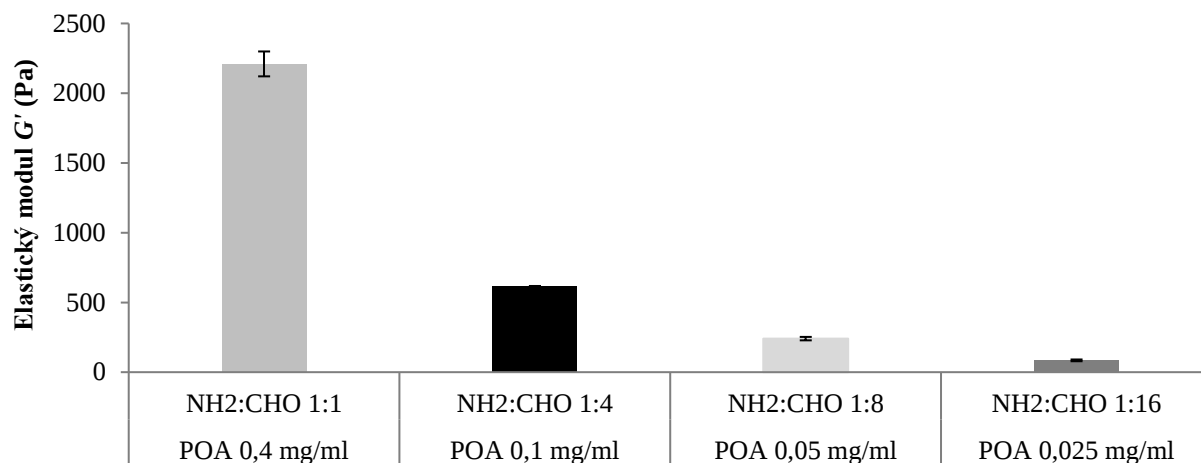
Při přípravě hydrogelů spec. B (250–350 kDa, Obr. 53), poměru NH₂:CHO 1:1 a pH 5 nastal technický problém s přípravou hydrogelu, jelikož ke gelaci dochází již v rámci sekund a hydrogely bylo problém nadávkovat do teflonových forem, čímž došlo k narušení jeho struktury a homogenity. Tento fakt se projevil i na hodnotě elastického modulu, který byl nižší v porovnání se vzorky, jež byly připraveny při pH 6 a 7.



Obr. 53 Dozrávání hydrogelů v čase. Vliv pH (5–7) a poměru vazných skupin NH₂:CHO na elastický modul stanovený v čase. Derivát HA-Ox spec. B. M_w 250–350 kDa.

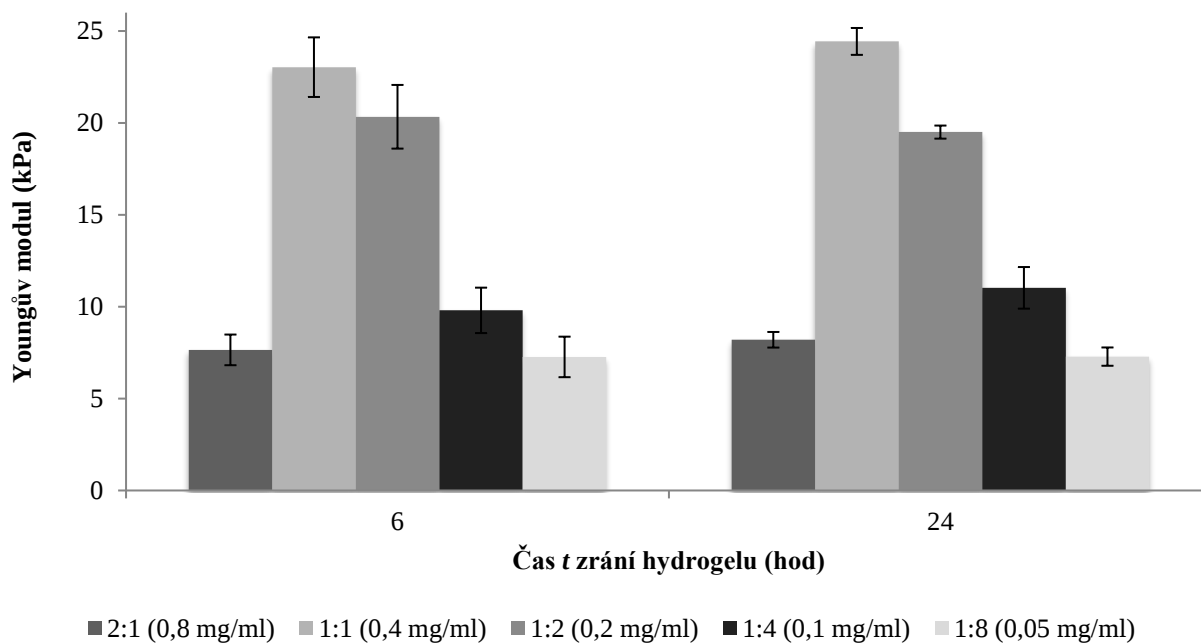
7.1.10 Vliv poměru vazných skupin NH₂:CHO

Vliv poměru vazných skupin je součástí kapitoly 7.1.9, kde je vliv vazných skupin testován pro 2 molekulové hmotnosti HA-Ox derivátu specifikace A a B při různém pH 5, 6 a 7 v průběhu dozrávání hydrogelů. V Obr. 54 je znázorněn elastický modul v závislosti na různém poměru vazných skupin NH₂:CHO pro hydrogely po 24 hodinách zrání a využití roztoku HA-Ox spec. B (M_w 250–350 kDa) o koncentraci 20 mg/ml v octanovém pufru (0,05 M).



Obr. 54 Vliv poměru vazných skupin POA (NH₂) a derivátu HA-Ox (CHO) na elastický modul.

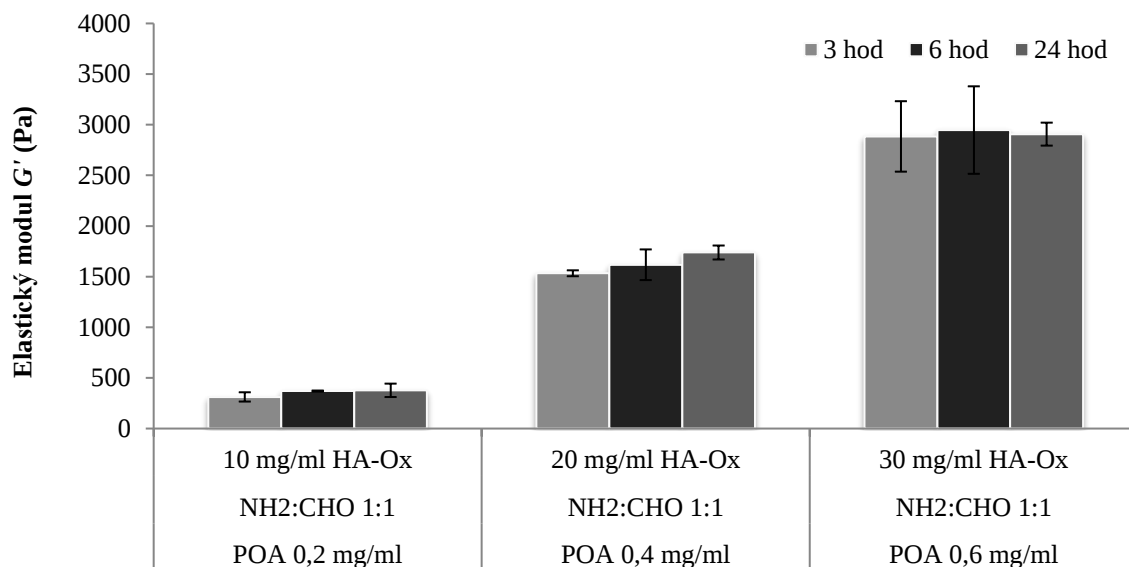
Vliv vyšší koncentrace POA než odpovídá poměru 1:1 na charakter gelu je ukázán na Youngově modulu stanoveném po 6 a 24 hodinách (Obr. 55). Použitý derivát HA-Ox měl M_w 650 kDa, DS 9 %, koncentraci 20 mg/ml, rozpouštědlo 0,9% roztok NaCl (pH 6).



Obr. 55 Vliv poměru vazných skupin POA (NH₂) a derivátu HA-Ox (CHO) na Youngův modul.

7.1.11 Vliv koncentrace prekurzorového roztoku HA-Ox

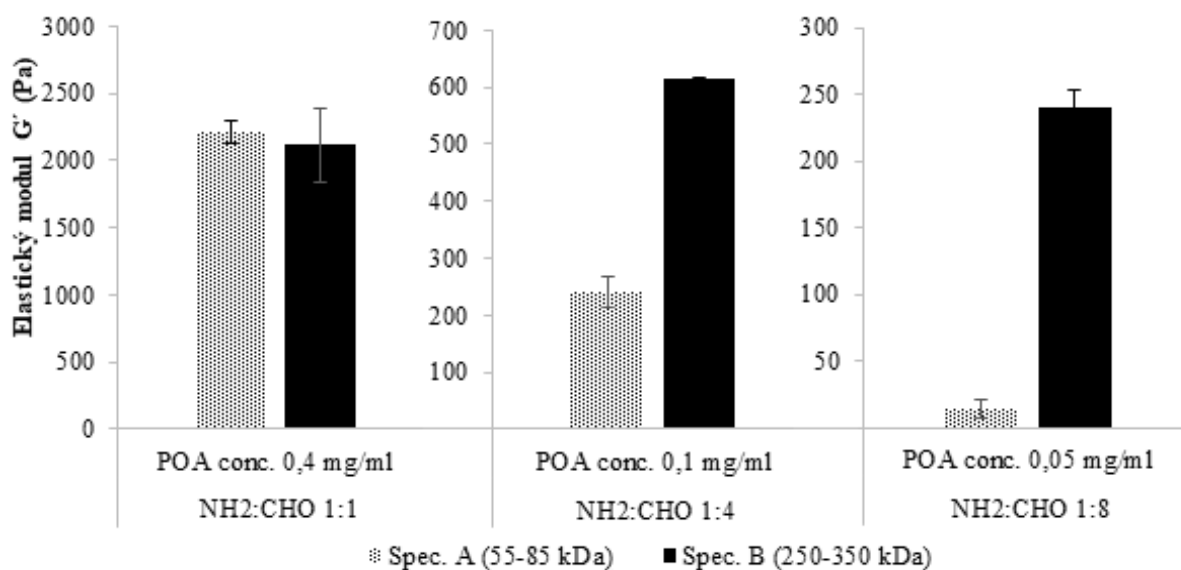
Koncentrace roztoku HA-Ox neboli obsah sušiny ve vzorku (10–30 mg/ml) ovlivňuje znatelně tuhost hydrogelové sítě. V Obr. 56 je ukázán vliv sušiny na elastický modul. Pro přípravu vzorků byl využit fyziologický 0,9 % roztok NaCl při pH 6 a poměru vazných skupin NH₂:CHO 1:1, tedy poměru, který je pro reakci nejvýhodnější, tedy reakce probíhá nejrychleji a hydrogely dosahují nejvyšší tuhosti.



Obr. 56 Vliv koncentrace HA-Ox derivátu na elastický modul hydrogelů, při zachování stejného poměru vazných míst NH₂:CHO.

7.1.12 Vliv molekulové hmotnosti derivátu HA-Ox

Vliv molekulové hmotnosti na elastický modul je součástí výsledků v kapitole 7.1.9. V následujícím Obr. 57 je ukázán vliv molekulové hmotnosti na elastický modul hydrogelů po 24 hodinách zrání s různým poměrem vazných míst. K demonstraci vlivu M_w na elastický modul hydrogelu byly použity deriváty HA-Ox spec. A (M_w 55–85 kDa) a B (M_w 250–350 kDa), o koncentraci 20 mg/ml v octanovém pufru pH 6.

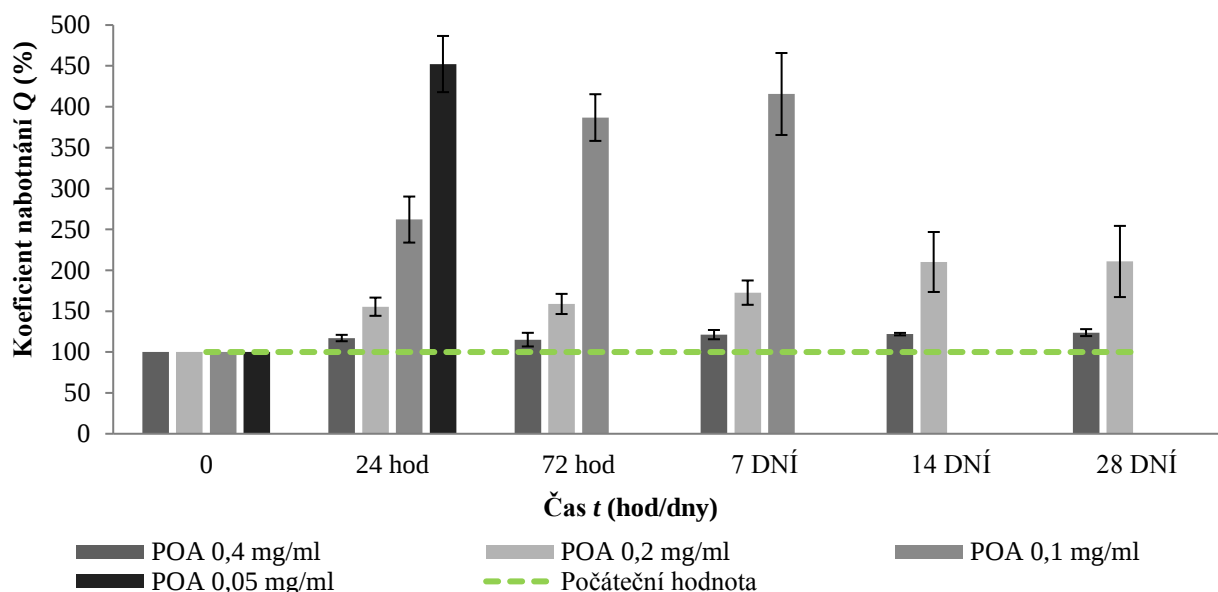


Obr. 57 Vliv molekulové hmotnosti na elastický modul připravených hydrogelů. Poměr NH₂:CHO je 1:1, 1:4 a 1:8.

7.1.13 Botnání hydrogelů

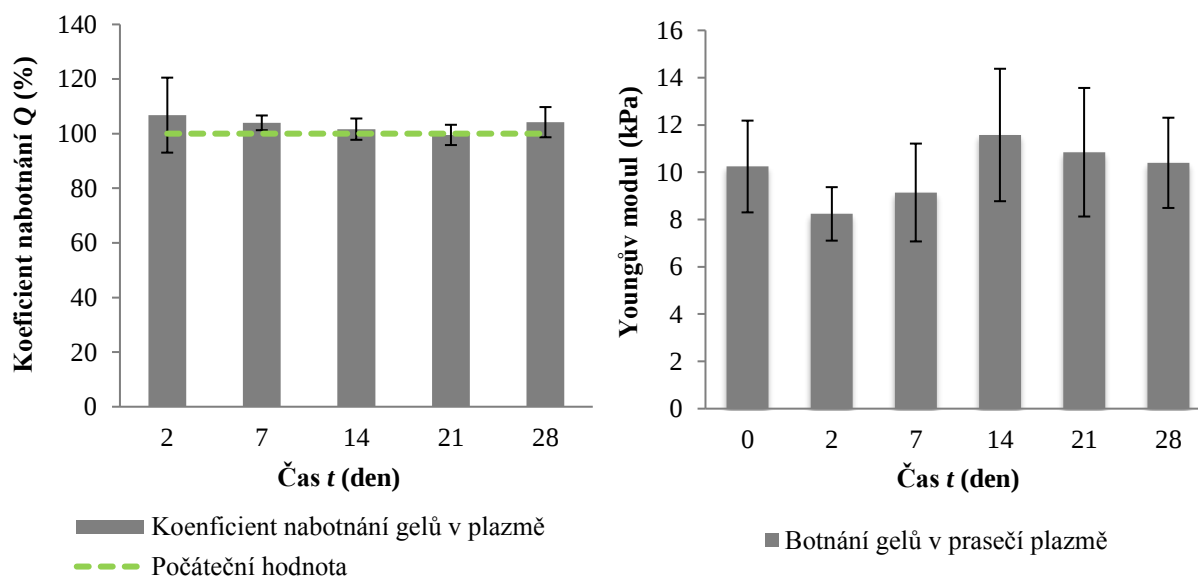
Botnací koeficient byl stanoven jako podíl hmotnosti gelu po nabotnění a před nabotněním dle kapitoly 6.2.6. Hodnota je vyjádřena v procentech a v grafech je znázorněna počáteční hodnota 100 % čarou představující vyjádření koeficientu nabotnění hydrogelu před nabotněním.

V prvním Obr. 58 je ukázka vlivu stupně zesíťení hydrogelů daný různou koncentrací síťovadla POA. Pro popis vlivu byly zvoleny 4 koncentrace POA (0,05–0,4 mg/ml), derivát HA-Ox spec. A s nízkou molekulovou hmotností (M_w 55–85 kDa, DS 9 %) o koncentraci 20 mg/ml v 0,9% roztoku NaCl, pH 6. Jako botnací médium byl zvolen 0,9% roztok NaCl.



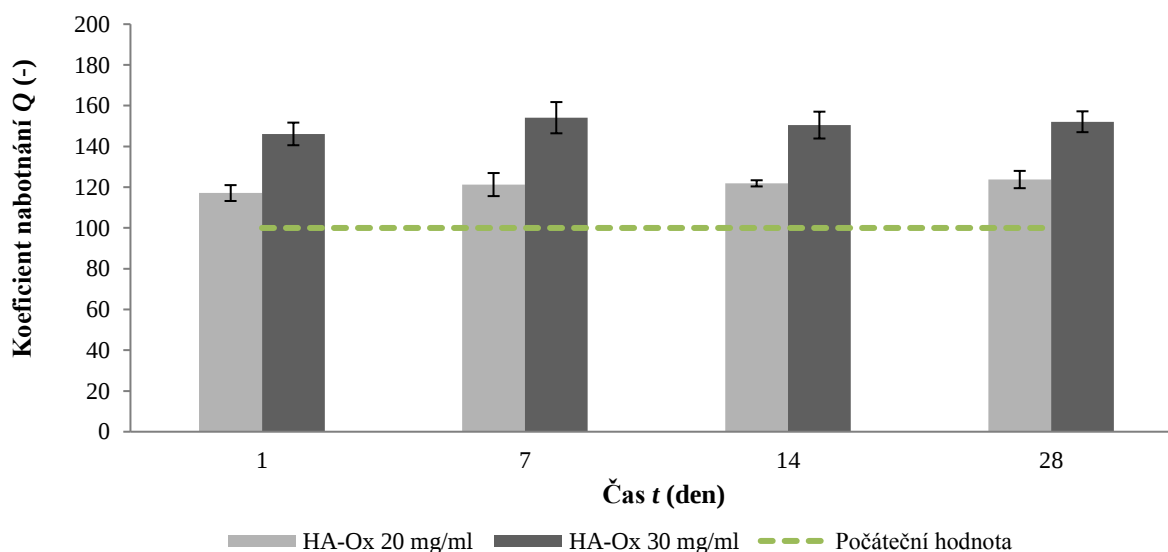
Obr. 58 Koefficient nabotnění u hydrogelů s různým stupněm zesíťení, který je určen odlišným poměrem vazných míst NH₂:CHO resp. různou koncentrací POA.

V následujících grafech (Obr. 59) je znázorněn koeficient nabotnění a Youngův modul hydrogelů na bázi derivátu HA-Ox spec. A (M_w 55–85 kDa) o koncentraci 20 mg/ml v 0,9% roztoku NaCl, pH 6. Jako botnací médium byl zvolen roztok prasečí plazmy simulující lépe *in vivo* podmínky ve srovnání s roztoky 0,9 % NaCl či PBS.



Obr. 59 Koefficient nabotnění a Youngův modul hydrogelů botnaných v prasečí plazmě.

V následujícím Obr. 60 je vidět vliv koncentrace polymeru na botnací koeficient u derivátu HA-Ox spec. A (M_w 55–85 kDa) o koncentraci 20 či 30 mg/ml v 0,9% roztoku NaCl (pH 6). Poměr vazných míst $NH_2:CHO$ byl zvolen 1:1, což odpovídá koncentraci POA 0,4 mg/ml pro vzorek obsahující 20 mg/ml HA-Ox a 0,6 mg/ml pro vzorek s 30 mg/ml HA-Ox.



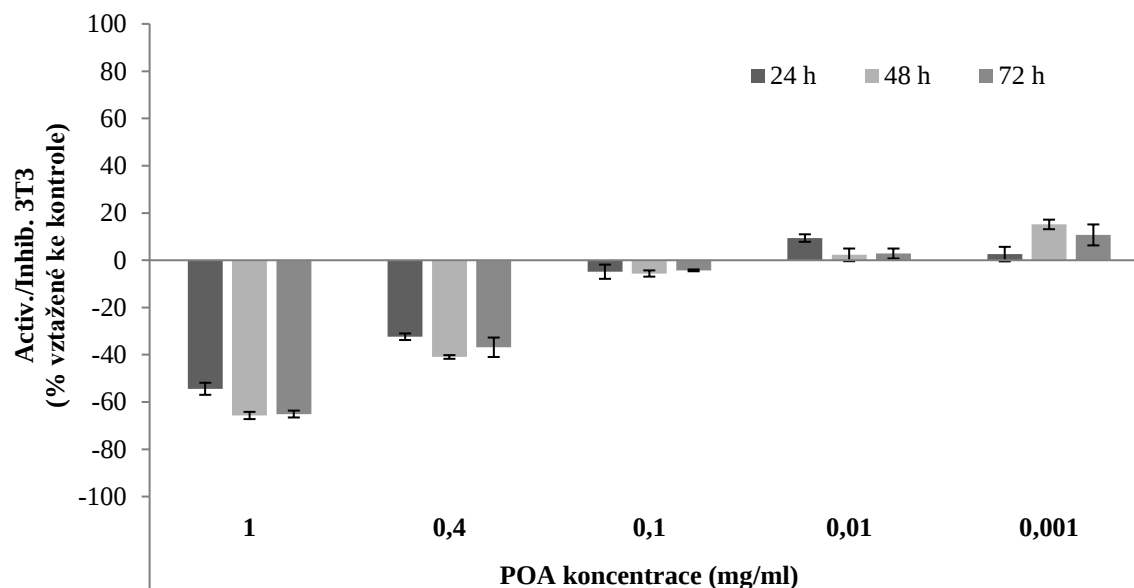
Obr. 60 Koefficient nabotnutí u hydrogelů botnaných v prasečí plazmě.

7.1.14 Cytotoxicita

Stanovení cytotoxicity je popsáno v kapitole 6.2.11.2. Postup stanovení cytotoxicity roztoků testovaných látek a výluhů z hydrogelů vychází z normy ISO 10993-5 [164].

7.1.14.1 Cytotoxicita síť'ovadla POA

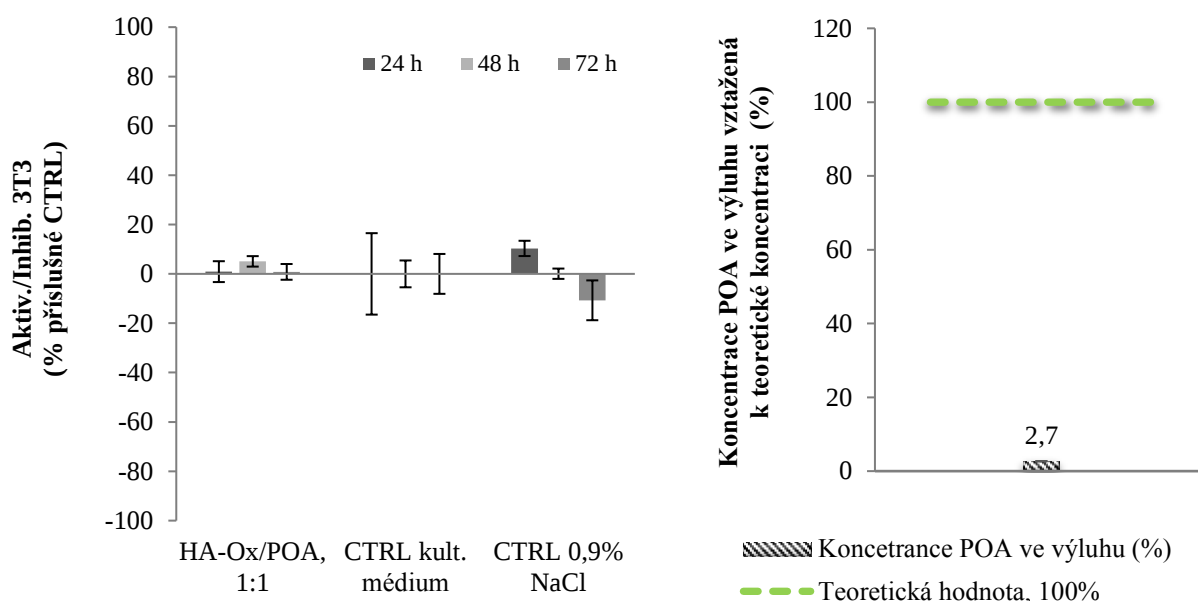
Byla testována cytotoxicita roztoků POA s různou koncentrací od 0,001 až 1 mg/ml (Obr. 61). K testu byly použity embryonální myší buňky linie 3T3 p25. Násada buněk byla $2,2 \cdot 10^4$ /ml/jamku 24jamkového kultivačního panelu. Stanovení ATP bylo provedeno po 24, 48 a 72 hodinách.



Obr. 61 Viabilita 3T3 buněk vztahovaná ke kontrole (buňky bez ovlivnění) u roztoků POA o různé koncentraci.

7.1.14.2 Cytotoxicita výluhů z hydrogelů

Pro testování cytotoxicity výluhů (Obr. 62) byl vybrán hydrogel na bázi HA-Ox spec. A (M_w 55-85 kDa), v 0,9% roztoku NaCl pH 6 s finální koncentrací POA v gelu 0,4 mg/ml. Hydrogel byl inkubován v desetinásobku objemu jeho hmotnosti (např. k 1 g hydrogelu připipetováno 9 ml 0,9% roztoku NaCl). Teoretická koncentrace POA po naředění ve výluhu je 0,04 mg/ml. Pro průkaz vazby alkoxyaminu v hydrogelu byl stanoven obsah POA ve výluhu hydrogelů pomocí HPLC metody. Dle stanovení nepřesahuje koncentrace POA ve výluhu 2 μ g/ml, tedy méně než 5 % oproti teoretické hodnotě ve výluhu hydrogelů (Obr. 62).



Obr. 62 Aktivace/inhibice 3T3 buněk vztaženo k buňkám ovlivněných médii, které bylo uchovávalo za stejných podmínek jako testovací vzorky (vlevo). Koncentrace POA v extraktu (výluhu). Hodnota vztažená k teoretické koncentraci POA ve výluhu (0,04 mg/ml) (vpravo).

7.1.14.3 Cytotoxicita produktů degradace

Dle ISO normy 10993-5:2009 kapitoly 4.2.1 principy extrakce by měly extrakční podmínky co nejlépe simulovat podmínky klinického použití nebo být oproti podmínkám při klinickém využití „horší“ [164]. Z tohoto důvodu byly testovány degradační produkty hydrogelů, které byly degradovány pomocí hyaluronidáz (BTH), jelikož také v lidském těle dochází k degradaci vzorků.

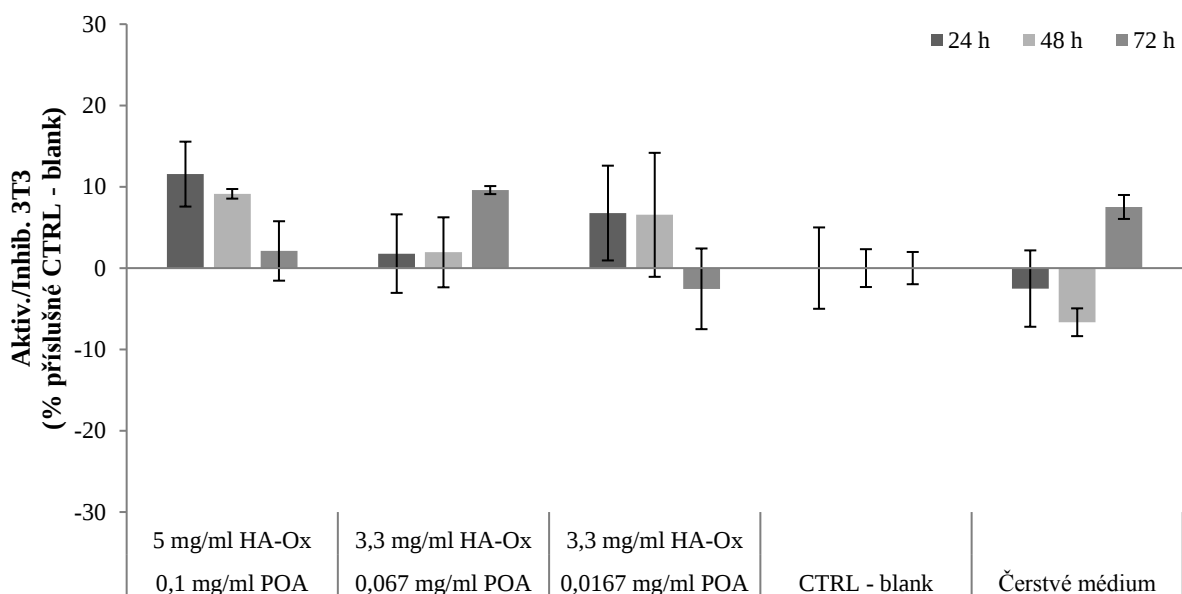
Testovány byly hydrogely na bázi HA-Ox připravené dle postupu v kapitole 6.2.3 lišící se koncentrací HA-Ox a POA (Tab. 14). Degradace probíhala v roztoku média určeného pro 3T3 buňky (DMEM+FBS) s obsahem BSA (boviní albumin) o koncentraci 1 mg/ml v hmotnostním poměru 1:3 (1 díl hydrogel a 3 díly média). Hydrogely byly degradovány po dobu 72 hodin v roztoku hyaluronidáz BTH o aktivitě 500 U/ml (aktivita prášku 1753,5 U/mg). Následovalo zahřátí roztoku na 60 °C po dobu 60 minut pro inaktivaci hyaluronidáz, tedy pro ukončení procesu degradace. U připravených produktů degradace (roztoků) byla stanovena cytotoxicita pomocí ATP (6.2.11.5.2) po 24, 48 a 72 hodinách.

V prvním experimentu byl roztok ještě zředěn médiem 1:1 a výsledná koncentrace HA-Ox a POA byla tak 6krát nižší než v původním gelu.

Jako buněčný typ byly využity liniové myší fibroblasty 3T3 p20 s nasadou buněk na jednu jamku $1,5 \cdot 10^4$ s využitím 24 jamkového panelu. Výsledky znázorněné v Obr. 63 jsou vztaženy vůči blanku. Jako blank bylo zvoleno médium s obsahem hyaluronidáz o stejné aktivitě a zpracované stejným způsobem jako testované vzorky.

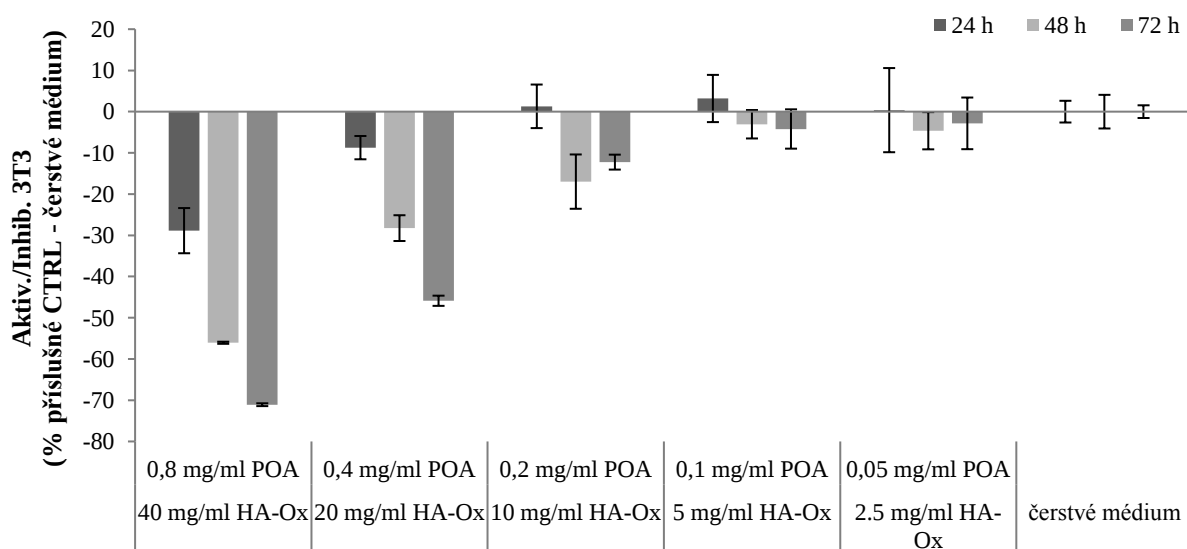
Tab. 14 Popis použitého materiálu

HA-Ox M_w (kDa)/ DS (%)	Poměr vazných míst NH ₂ /CHO	Koncentrace HA-Ox (mg/ml)	Koncentrace POA (mg/ml)	Rozpouštědlo	Koncentrace POA po naředění (mg/ml)
55–90/ 7–12	1:1	30	0,6	0,9% roztok NaCl	0,1
	1:1	20	0,4		0,067
	1:4	20	0,1		0,0167



Obr. 63 Aktivace/Inhibice 3T3 buněčné linie vztažené vůči příslušné kontrole v daný den. Studován vliv koncentrace POA a HA-Ox na cytotoxicitu vzorků.

Dle postupu výše byly připraveny a degradovány hydrogely na bázi HA-Ox o koncentraci 20 mg/ml v DEMI vodě pH 6 s koncentrací POA 0,4 mg/ml. Pro zvýšení koncentrace POA v testovaném vzorku byl zdegradovaný hydrogel (roztok) zamrazen (-25 až -35 °C po dobu 24 hodin) a následně zlyofilizován. Vzniklý prášek byl rozpuštěn v příslušném kultivačním médiu, aby bylo dosaženo koncentrační řady POA a HA-Ox uvedené v Obr. 64.



Obr. 64 Aktivace/Inhibice 3T3 buněčné linie vztažené vůči příslušné kontrole v daný den. Studován vliv koncentrace POA a HA-Ox na cytotoxicitu vzorků.

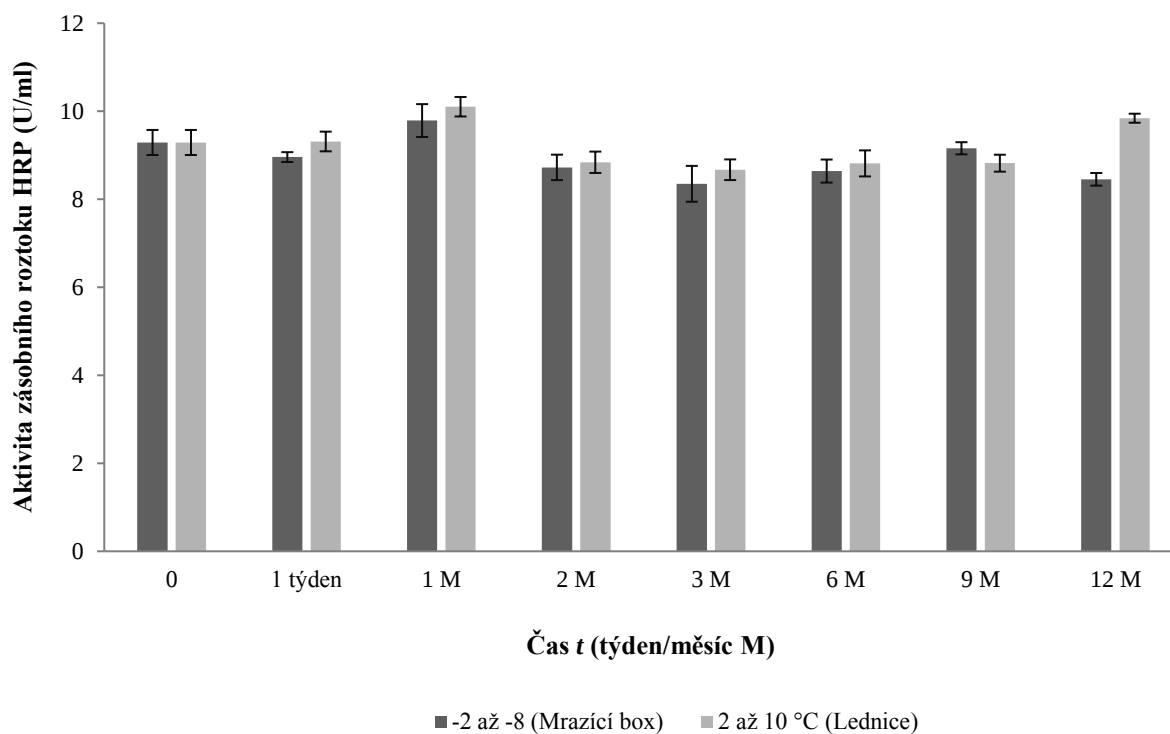
7.2 Hydrogely na bázi hydroxyfenyl derivátů HA

Jak již bylo popsáno v kapitole 6.2.2.2, gelace je založena na enzymatické reakci, kde je substrátem hydroxyfenyl derivát HA, enzymem HRP a gelace je iniciována peroxidem vodíku. Peroxid vodíku je přidán do reakce přímo, či jej lze generovat pomocí další enzymatické reakce.

Reakcí tyraminovaného derivátu HA s peroxidem vodíku a enzymem HRP lze připravit gely s rychlostí gelace pohybující se od několika minut až po velmi rychlou gelaci v řádu sekund. Kinetiku gelace lze ovlivnit parametry derivátu především molekulovou hmotností M_w či stupněm substituce DS , dále koncentrací HA-TA roztoků a v neposlední řadě množstvím síťovacích činidel (koncentrací peroxidu vodíku H_2O_2 či aktivitou enzymu HRP). Veškeré tyto parametry bylo nutné během experimentů sledovat pomocí příslušných analytických metod. Jedná se jednak o stanovení aktivity HRP a koncentrace peroxidu vodíku, v případě jeho přímého přidavku. Dále byla stanovována viskozita prekurzorových roztoků, která je ovlivněna především molekulovou hmotností derivátu a koncentrací polymerního roztoku – obsahem sušiny.

7.2.1.1 Stabilita roztoku křenové peroxidázy HRP

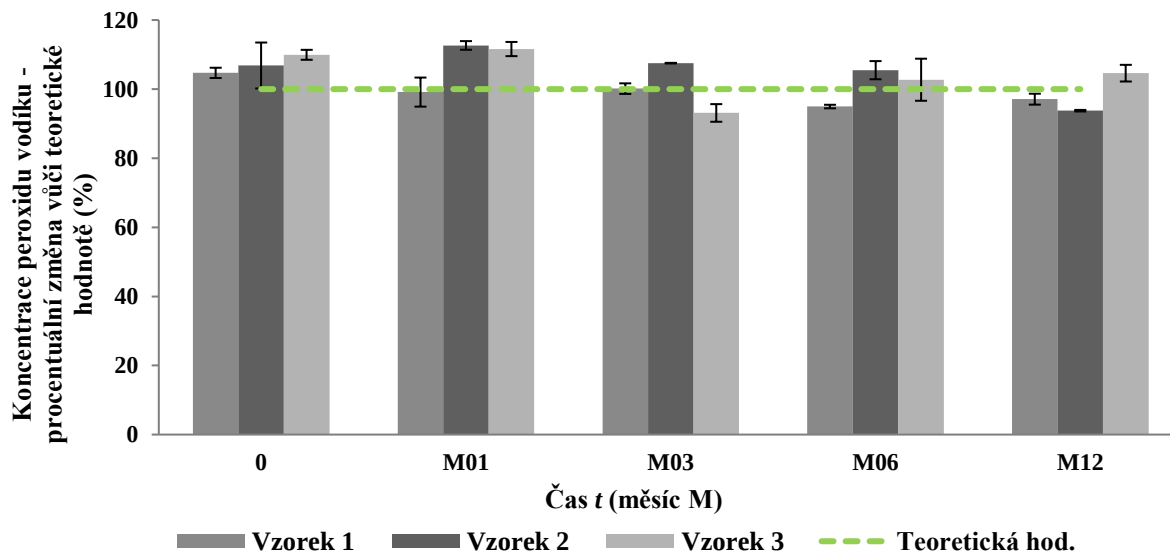
Dle postupu uvedeného v kapitole 6.2.9.1 byla určena aktivita křenové peroxidázy o teoretické aktivitě 8 U/ml v časových intervalech po dobu 12 měsíců (Obr. 65). Ve sledovaném období nedošlo k poklesu aktivity křenové peroxidázy při snížené teplotě, kdy byly vzorky uloženy v lednici (2 až 10 °C) či v mrazicím boxu (-2 až -8 °C).



Obr. 65 Stabilita zásobního roztoku HRP – stanovení aktivity roztoku v čase.

7.2.1.2 Stabilita roztoku peroxidu vodíku

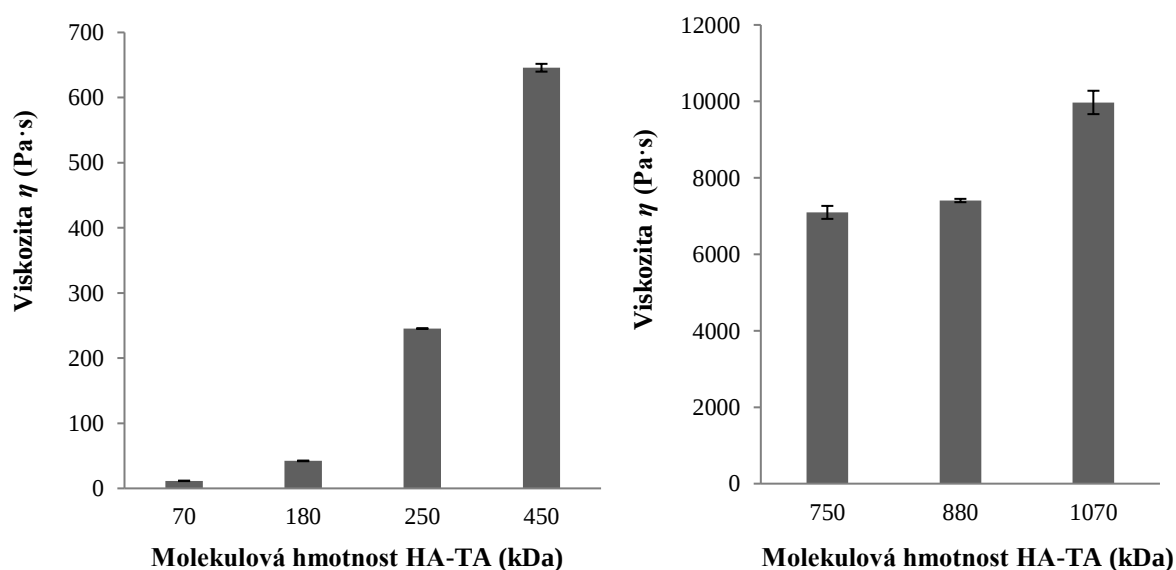
Dle postupu v kapitole 6.2.9.3 je stanovována absorbance měřeného roztoku peroxidu vodíku. Dle uvedeného vzorce je vypočtena přesná koncentrace roztoku peroxidu vodíku o teoretické hodnotě 0,1 %. Vzorky lze uchovávat sterilní dlouhodobě při snížené teplotě v lednici minimálně po dobu 12 měsíců (Obr. 66).



Obr. 66 Koncentrace peroxidu vodíku – procentuální změna vůči teoretické hodnotě (%).

7.2.1.3 Viskozita prekursorového roztoku tyraminovaného derivátu HA

Viskozita roztoku HA-TA byla stanovena pomocí rotačního reometru AR-G2 dle metodiky popsané v kapitole 6.2.4.5. Roztoky HA-TA o koncentraci 20 mg/ml byly zvoleny pro porovnání viskozity roztoků lišící se molekulovou hmotností výchozího derivátu. HA-TA prášek (20 mg/ml) byl rozpuštěn ve fyziologickém 0,9% roztoku NaCl. Hodnoty viskozit jednotlivých roztoků HA-TA byly odečteny při smykové rychlosti $1,9 \text{ s}^{-1}$ z viskozitní křivky (Obr. 67), která má stejně jako v případě roztoků na bázi HA-Ox klesající průběh (zřednutí při toku – *shear-thinning*). Dle předpokladu dochází k nárůstu viskozity s rostoucí molekulovou hmotností.



Obr. 67 Závislost viskozity při smykové rychlosti $1,9 \text{ s}^{-1}$ na molekulové hmotnosti HA-TA derivátu.

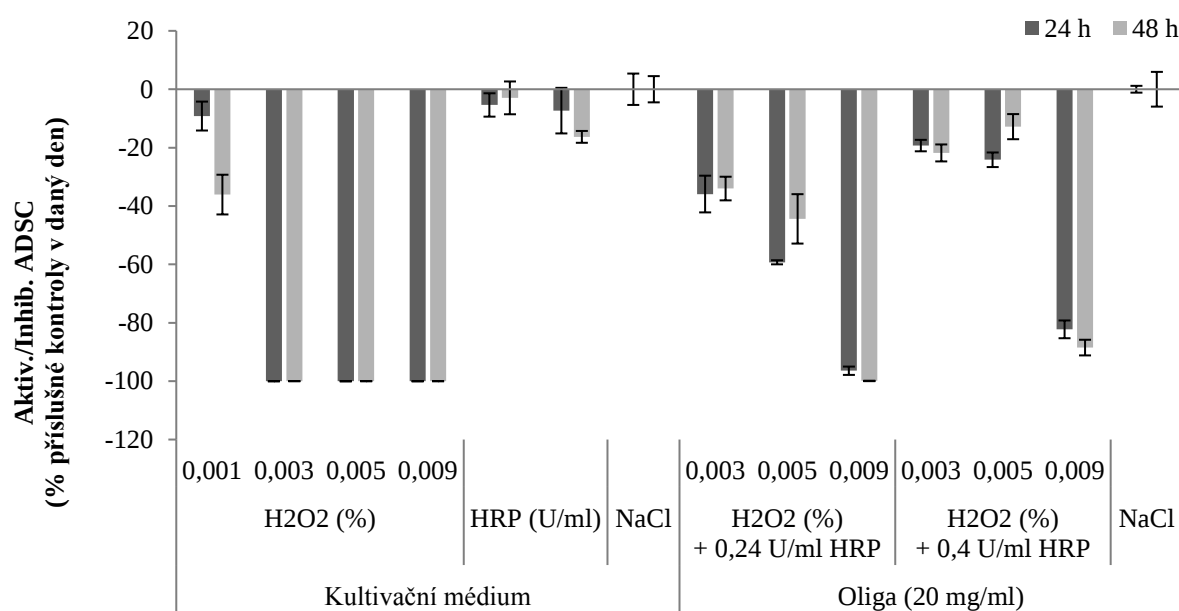
7.2.1.4 Cytotoxicita

7.2.1.4.1 Cytotoxicita prekurzorového roztoku tyraminovaného derivátu HA (HA-TA)

Cytotoxicita prekurzorového roztoku HA-TA je demonstrována v rámci kapitoly 7.2.5.5.

7.2.1.4.2 Cytotoxicita síťovacích činidel

Materiál není cytotoxický, pokud buněčná viabilita neklesne o 30 % vůči kontrole dle ISO 10993-5. Síťovací reakce za přítomnosti enzymu HRP je iniciována přidavkem peroxidu vodíku. Roztok HRP o dané aktivitě není cytotoxický. Samotný roztok peroxidu vodíku je cytotoxický pro buňky v koncentraci 0,003 % a vyšší. Při reakci ale dochází k jeho rychlé dekompozici. Při zvolené finální koncentraci H_2O_2 (0,005 %) a HRP (0,4 U/ml) s obsahem oligo-HA není vzorek cytotoxický (Obr. 68).

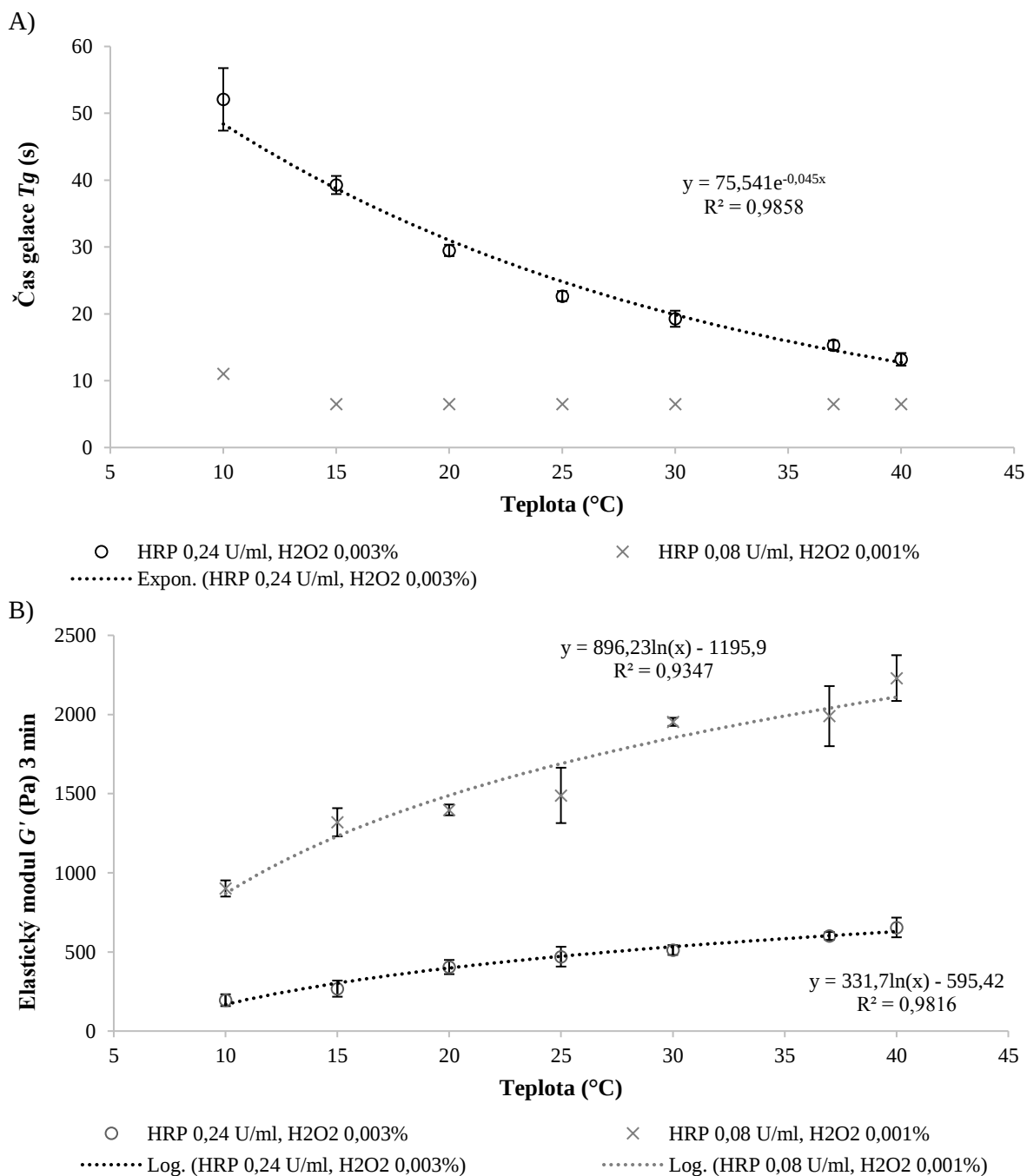


Obr. 68 Cytotoxicita síťovacích činidel – aktivace/inhibice ADSC.

7.2.2 Přímý přídavek peroxidu vodíku

7.2.2.1 Vliv teploty na rychlost gelace a charakter gelu

Byl sledován vliv teploty na rychlost gelace (6.2.4.5.3). Čas gelace byl stanoven jako bod protnutí křivky elastického a viskózního modulu. Hodnota elastického modulu byla určena ve 3 minutách od počátku měření. Měření bylo provedeno u derivátu HA-TA specifikace B (M_w 240–360 kDa a DS 2–3 %) o koncentraci roztoku 20 mg/ml v 0,9% roztoku NaCl. Byly testovány 2 typy vzorků lišících se aktivitou HRP (0,08 a 0,24 U/ml) a koncentrací peroxidu vodíku (0,001 a 0,003 %). Měření bylo provedeno od 10 do 40 °C (Obr. 69).



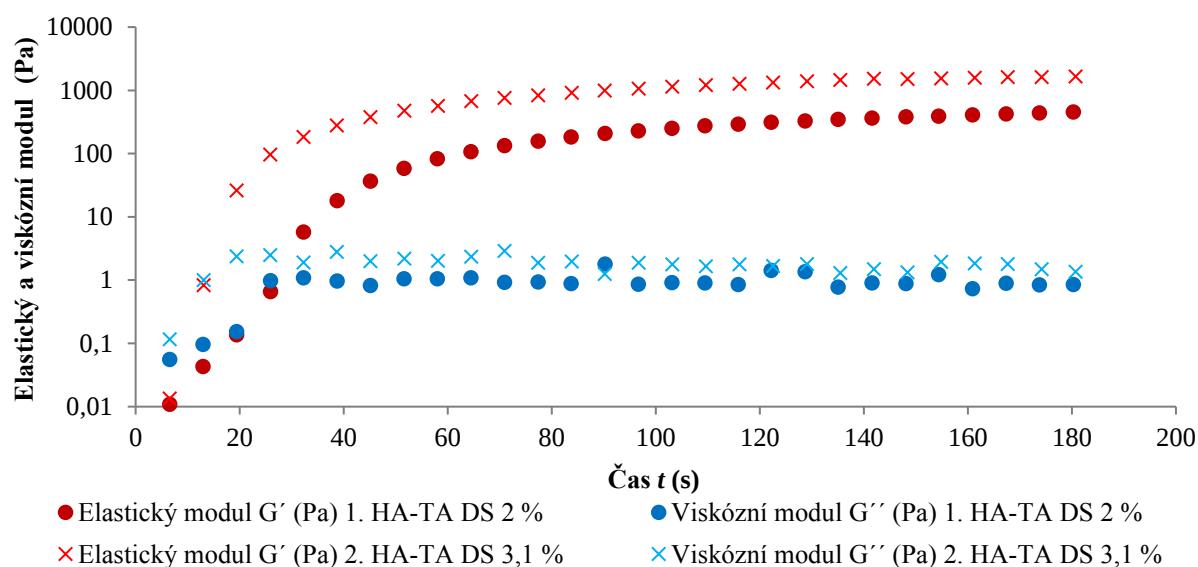
Obr. 69 Vliv teploty na kinetiku gelace materiálu na bázi HA-TA derivátu. Závislost času gelace T_g (A) a elastického modulu G' (B) na teplotě.

7.2.2.2 Vliv stupně substituce tyraminovaného derivátu HA

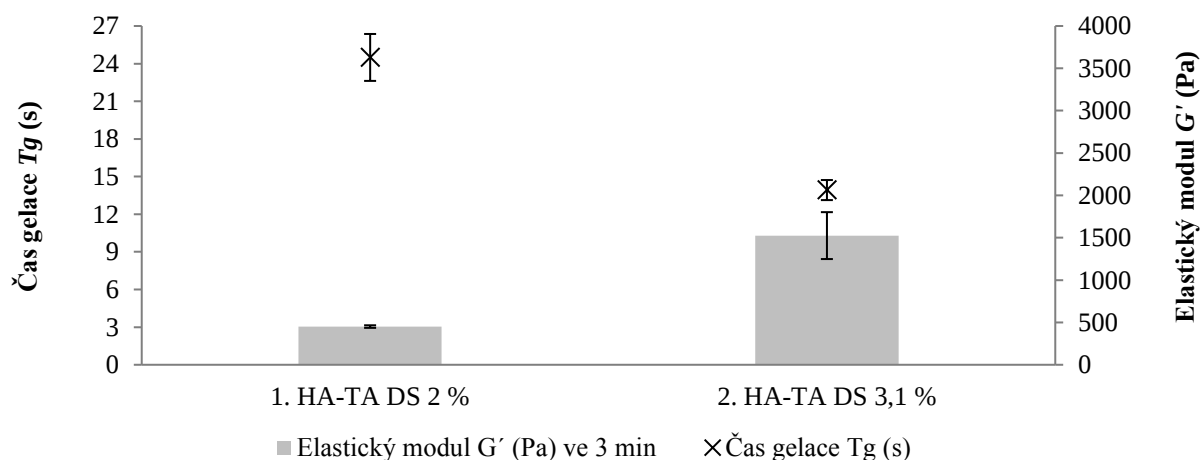
Stupeň substituce má také znatelný vliv na rychlost gelace a charakter gelu. Měření bylo provedeno při 37 °C představující teplotu lidského těla. V Tab. 15 jsou uvedeny parametry HA-TA derivátů, prekursorového roztoku, koncentrace peroxidu vodíku a aktivity HRP. V Obr. 70 je ukázán průběh závislosti elastického a viskózního modulu na čase u derivátu HA-TA spec. A (M_w 60–90 kDa) a v následujícím Obr. 71 čas gelace a elastický modul daného materiálu. Vliv stupně substituce na čas gelace a elastický modul u derivátu HA-TA spec. B (M_w 240–360 kDa) je znázorněn v Obr. 72.

Tab. 15 Parametry HA-TA derivátů, roztoků a gelů z nich připravených.

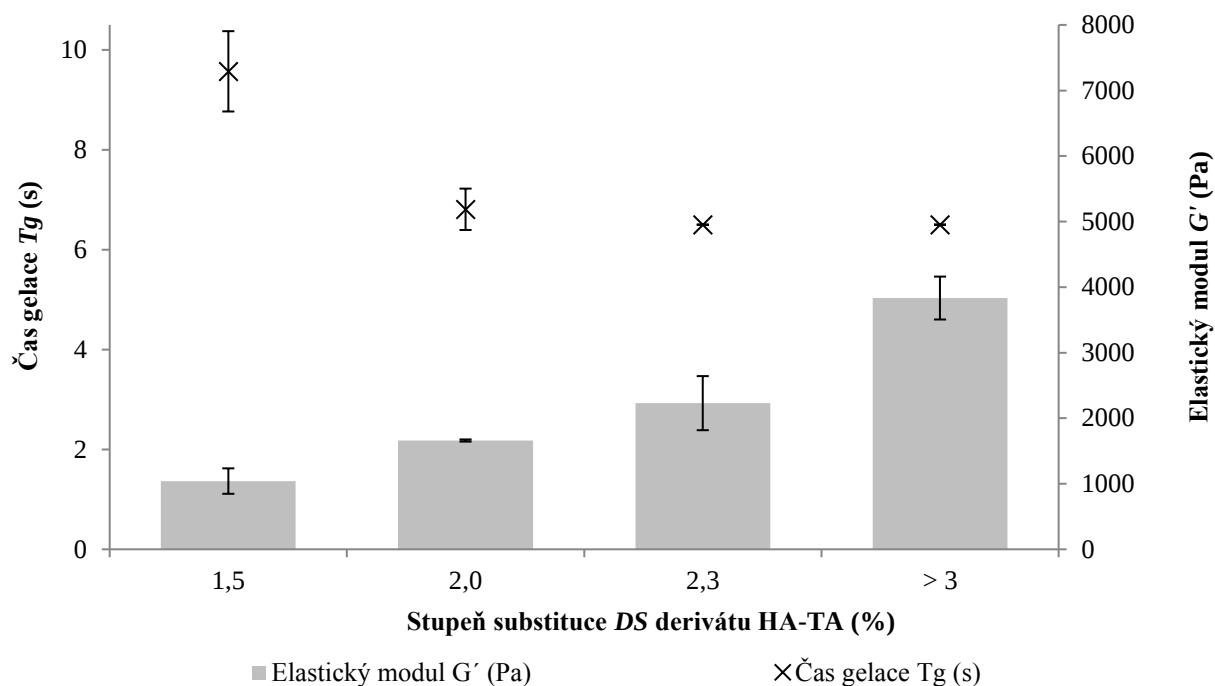
Označení vzorku	DS (%)	M_w (kDa)	Rozpouštědlo	Konc. roztoku HA-TA (mg/ml)	Konc. H ₂ O ₂ (%)	Aktivita HRP (U/ml)	Teplota (°C)
1	2	60–90	PBS, pH 7,4	20	0,003	0,24	37
2	3,1						
3	1,5	240–360	0,9% NaCl				
4	2						
5	2,3						
6	> 3						



Obr. 70 Kinetika gelace: závislost elastického a viskózního modulu na čase. Vliv stupně substituce derivátu HA-TA na rychlost gelace u vzorků s nízkou M_w (60–90 kDa) číslo 1 (DS 2 %) a 2 (DS 3 %).

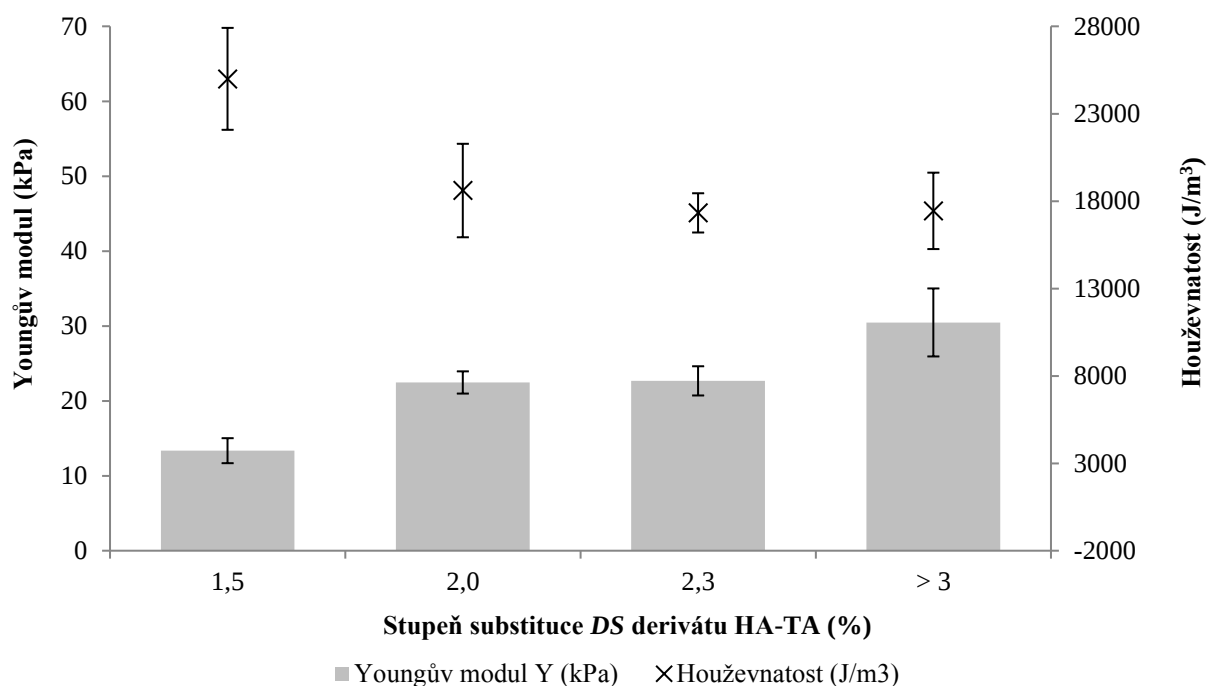


Obr. 71 Vliv stupně substituce derivátu HA-TA na rychlost gelace a elastický modul (odečtený ve 3 minutách od začátku měření) u vzorků s M_w (60–90 kDa) číslo 1 (DS 2 %) a 2 (DS 3,1 %).



Obr. 72 Vliv stupně substituce derivátu HA-TA na rychlost gelace a elastický modul (odečtený ve 3 minutách od začátku měření) u vzorků s M_w (240–360 kDa) číslo 3 (DS 1,5 %), 4 (DS 2 %), 5 (DS 2,3 %) a 6 (DS > 3 %).

Mechanické vlastnosti hydrogelů byly měřeny dle postupu v kapitole 6.2.5.1 a příprava hydrogelů proběhla dle návodu v kapitole 6.2.3. Test byl proveden 1 hodinu od přípravy hydrogelu. Výsledkem je Youngův modul a houževnatost v závislosti na stupni substituce DS derivátu HA-TA (Obr. 73).



Obr. 73 Vliv stupně substituce derivátu HA-TA na Youngův modul a houževnatost připravených hydrogelů u vzorků s M_w (240–360 kDa) číslo 3 (DS 1,5 %), 4 (DS 2 %), 5 (DS 2,3 %) a 6 (DS > 3 %).

7.2.2.3 Vliv molekulové hmotnosti

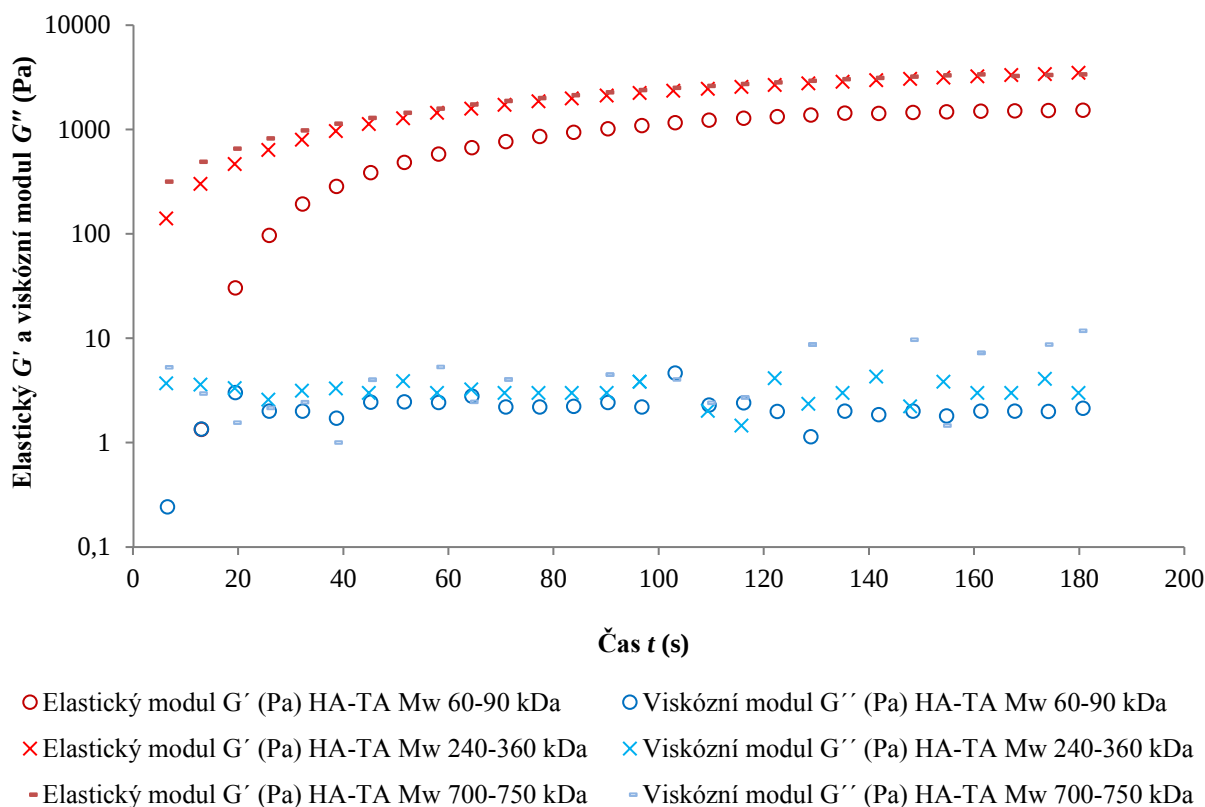
7.2.2.3.1 Kinetika gelace

Vliv molekulové hmotnosti HA-TA derivátu na rychlost gelace byl stanoven u derivátů lišících se M_w při shodných či srovnatelných hodnotách ostatních parametrů (Tab. 16). Vliv molekulové hmotnosti byl sledován u vzorků HA-TA se stupněm substituce DS 1,5, 2 a 3 % (Obr. 75).

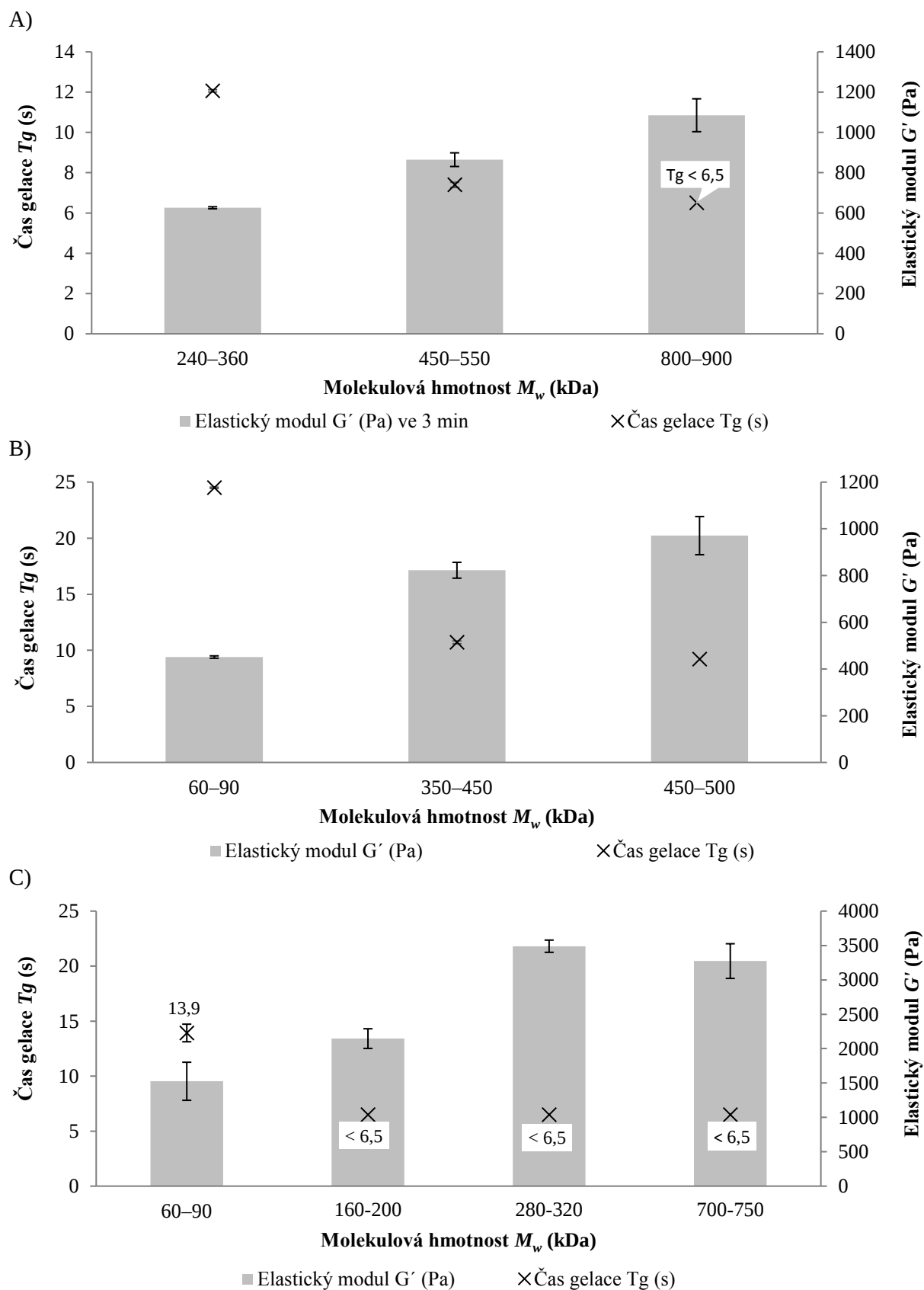
Tab. 16 Parametry HA-TA derivátů, roztoků a gelů z nich připravených.

Označení vzorku	DS (%)	M_w (kDa)	Konc. roztoku HA-TA (%)	Konc. H_2O_2 (%)	Aktivita HRP (U/ml)	Teplota (°C)
1	1,5	240–360	2	0,003	0,24	37
2		450–550				
3		800–900				
4	2	60–90				
5		350–400				
6		450–500				
7	3	60–90				
8		160–200				
9		240–360				
10		700–750				

Průběh kinetiky gelace v závislosti na molekulové hmotnosti je ukázán v následujícím grafu (Obr. 74).



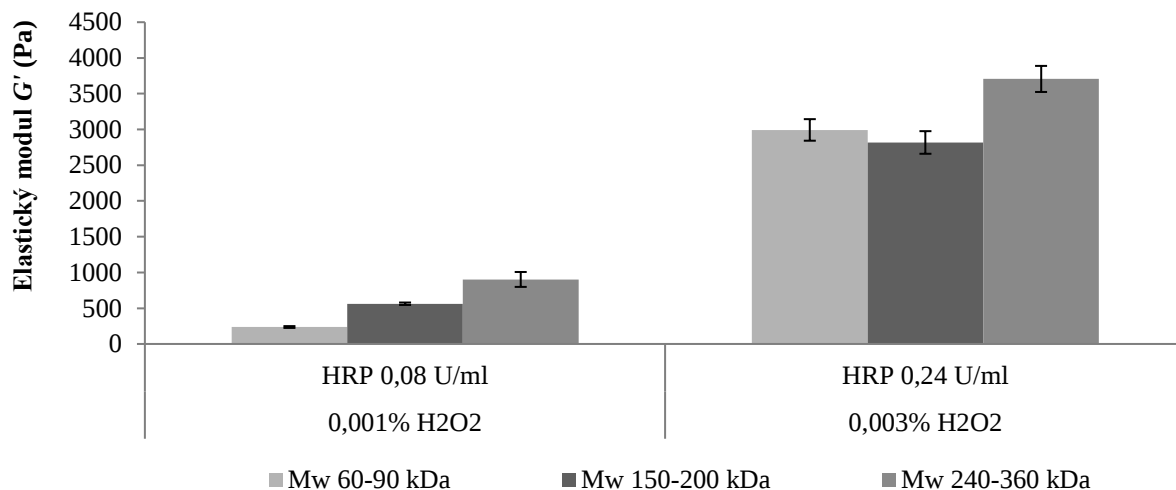
Obr. 74 Kinetika gelace: závislost elastického a viskózního modulu na čase. Vliv M_w tyraminovaného derivátu HA na rychlost gelace u vzorků 7, 9 a 10 při srovnatelném stupni substituce DS 3 %.



Obr. 75 Vliv molekulové hmotnosti na čas gelace a elastický modul odečtený v čase 3 minut. 20 mg/ml roztok HA-TA s DS 1,5 % (A), DS 2 % (B) a DS 3 % (C).

7.2.2.3.2 Viskoelastické vlastnosti

Viskoelastické vlastnosti hydrogelů byly měřeny dle postupu v kapitole 6.2.4.5.2 a příprava hydrogelů proběhla dle postupu v kapitole 6.2.3. Hydrogely byly připraveny a ponechány zrát 1 hodinu před vlastním stanovením. Výsledkem je závislost elastického modulu na deformaci. Z oblasti plata (konstantní hodnoty elastického modulu) je odečtena hodnota elastického modulu a porovnává u jednotlivých vzorků lišících se molekulovou hmotností výchozího derivátu HA-TA (Obr. 76).



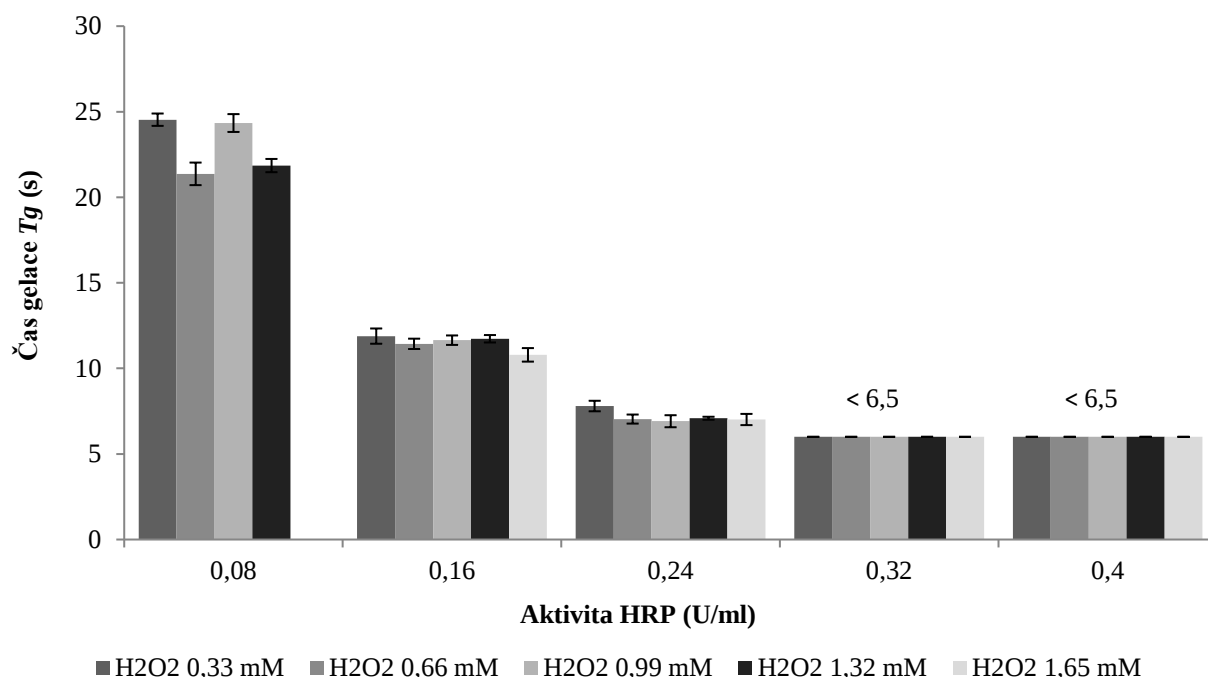
Obr. 76 Vliv molekulové hmotnosti tyraminovaného derivátu HA (HA-TA) na elastický modul G' .

7.2.2.4 Vliv síťovacích činidel na rychlost gelace a charakter gelu

Byl studován vliv koncentrace peroxidu vodíku a aktivity enzymu HRP na rychlost gelace a elastický a Youngův modul. V Tab. 17 jsou uvedeny parametry HA-TA derivátu, prekursorového roztoku a sledované koncentrace peroxidu vodíku a aktivity HRP.

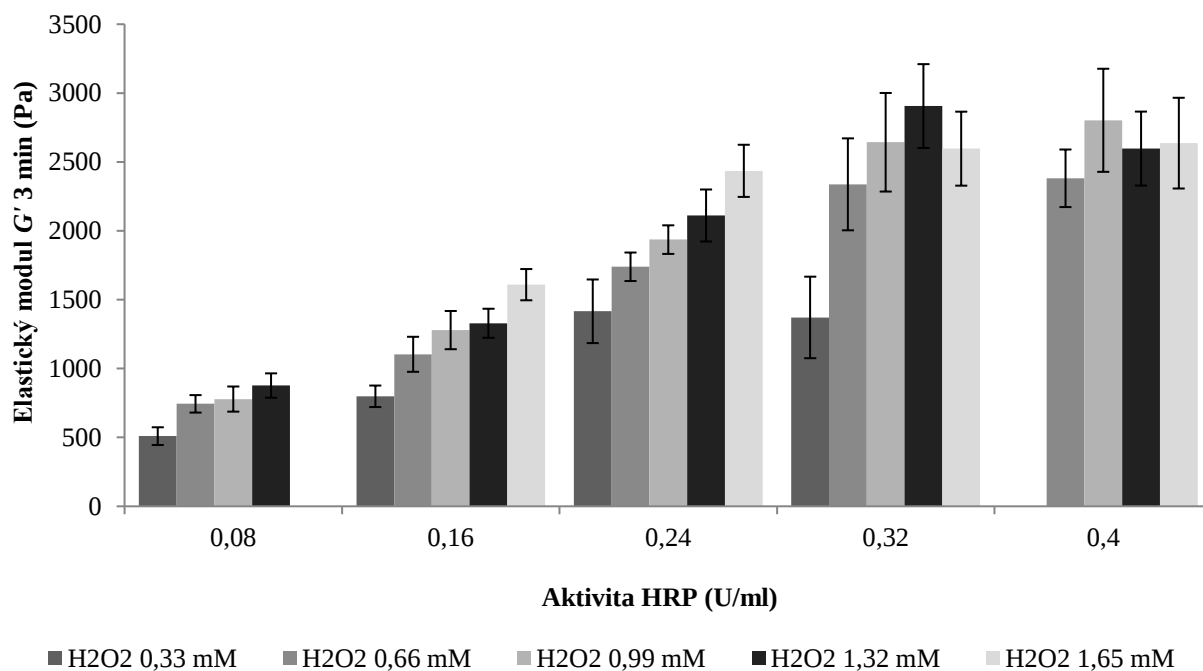
Tab. 17 Parametry HA-TA derivátů, roztoků a gelů z nich připravených. Čas gelace T_g HA-TA gelů.

	DS (%)	M_w (kDa)	Konc. roztoku HA-TA (mg/ml)	Rozpouštědlo	H ₂ O ₂ (%)	H ₂ O ₂ (mM)	HRP (U/ml)
HA-TA/ HRP/ H ₂ O ₂	2–3	240–360	20	0,9% NaCl	0,001	0,33	0,08
							0,16
							0,24
							0,32
					0,002	0,66	0,08
							0,16
							0,24
							0,32
							0,4
					0,003	0,99	0,08
							0,16
							0,24
							0,32
							0,4
					0,004	1,32	0,08
							0,16
							0,24
							0,32
							0,4
					0,005	1,65	0,16
							0,24
							0,32
							0,4

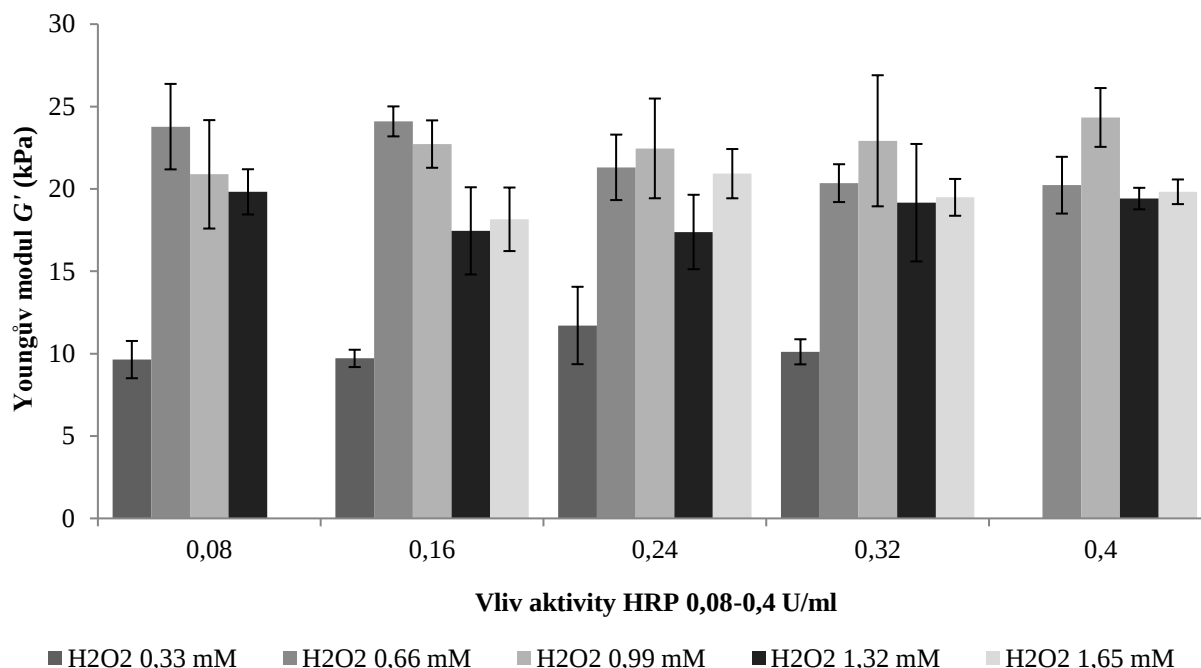


Obr. 77 Závislost času gelace na koncentraci H_2O_2 a aktivitě HRP.

V Obr. 77 je hodnocen vliv síťovacích činidel na rychlost gelace. Čas gelace je především ovlivněn aktivitou HRP, kdy s její rostoucí hodnotou dochází k urychlení gelace a při aktivitě HRP vyšší než 0,32 U/ml nebyl bod gelace již zachycen (velmi rychlá gelace pod 6,5 s). Vliv koncentrace peroxidu vodíku na rychlost gelace je malý za daných koncentrací a podmínek reakce, ale na druhou stranu ovlivňuje tuhost hydrogelu (Obr. 78, Obr. 79). Elastický modul odečtený ve 3 minutách od počátku gelace je signifikantně ovlivněn aktivitou HRP (Obr. 78), ale tuhost „dozrálého“ gelu již není za daných podmínek reakce ovlivněn aktivitou HRP – hodnoty Youngova modulu jsou srovnatelné (Obr. 79).



Obr. 78 Závislost elastického modulu G' (odečtena hodnota ve 3 minutách od počátku měření) na koncentraci H_2O_2 a aktivitě HRP.



Obr. 79 Závislost Youngova modulu na koncentraci H_2O_2 a aktivitě HRP.

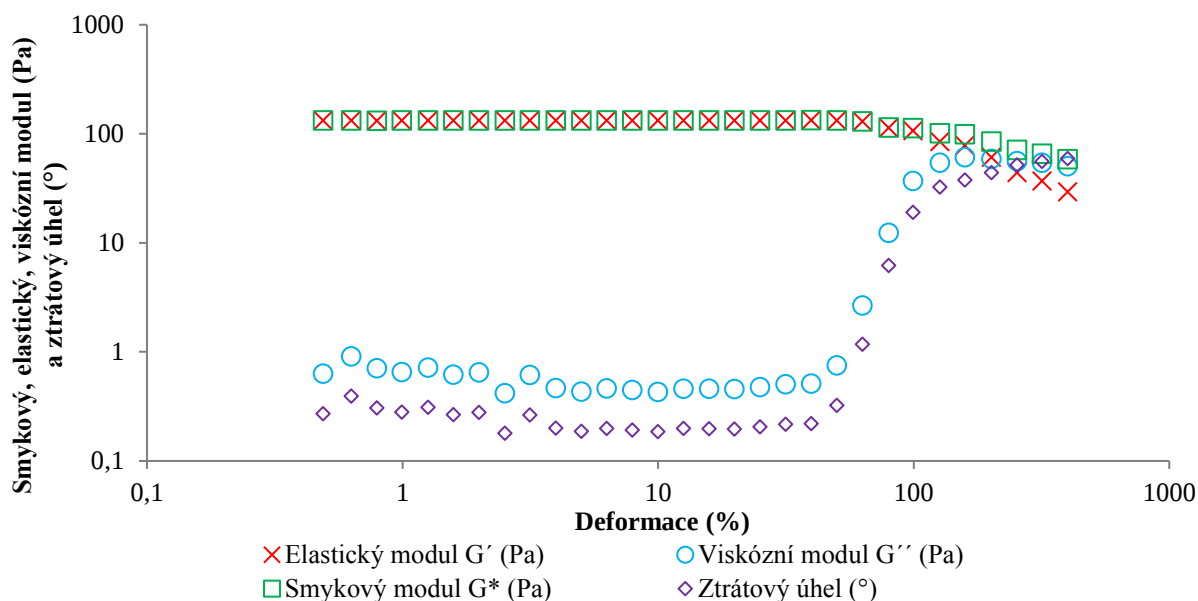
7.2.2.5 Porosita, struktura vs. velikost ok sítě

Přibližnou průměrnou teoretickou hodnotu velikosti ok hydrogelové sítě neboli *mesh size* lze určit výpočtem z koeficientu nabotnění v rovnovážném stavu či z hodnot smykového modulu připraveného hydrogelu. Pokud hydrogely vykazují vyšší tuhost, jejich viskózní modul je v porovnání s elastickým modulem velmi nízký a ztrátový úhel nabývá také nízkých hodnot, zároveň smykový a elastický modul jsou číselně téměř srovnatelné a do výpočtu lze použít elastický modul dle vzorce:

$$r_{mesh} = \left(\frac{6 \cdot R \cdot T}{\pi \cdot N_{Av} \cdot G'} \right)^{1/3} \quad (29)$$

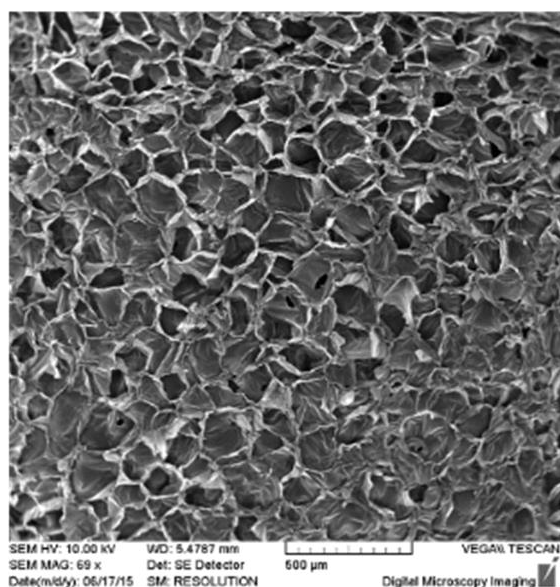
kde R je plynová konstanta, T je absolutní teplota, N_{Av} je Avogadrova konstanta a G' představuje elastický modul [19].

Hydrogely na bázi HA popsané v této práci vykazují elastický modul od 100–4000 Pa na základě volby derivátu a jeho M_w , DS , koncentrace roztoku a síťovacích činidel a dalších parametrů. Hodnota viskózního modulu připravovaných hydrogelů je velmi nízká vůči elastickému modulu, stejně i hodnota ztrátového úhlu nabývá velmi nízkých hodnot (ve většině případů $< 1^\circ$). Elastický a smykový modul hydrogelů popsaných v této práci jsou srovnatelné. Metoda *strain sweep* byla použita pro stanovení těchto parametrů a jejich hodnota odečtena z lineární oblasti viskoelasticity (LVR) při hodnotě deformace 1 %. V Obr. 80 je znázorněn elastický, viskózní a smykový modul a ztrátový úhel v závislosti na deformaci hydrogelu vykazující velmi nízkou a srovnatelnou hodnotu smykového a elastického modulu ($G^* \approx G' \approx 130$ Pa).



Obr. 80 Závislost smykového, elastického a viskózního modulu a ztrátového úhlu na deformaci.

Velikost *mesh size* připravovaných hydrogelů dle výpočtu je v hydratovaném stavu pouze **10–50 nm**. Jedná se o průměrnou hodnotu danou z výpočtu dle uvedeného vzorce pomocí elastického modulu celého hydrogelu. Obecně se v hydrogelové síti budou nacházet i oka větší v jednotkách až stovkách nanometrů. Zatímco hodnota velikosti ok (*mesh size*) popisuje strukturu polymerní sítě na molekulární úrovni, porosita charakterizuje mikroskopické uspořádání hydrogelu nebo případně z něj připravených xerogelů. Pro detekci struktury lyofilizátů hydrogelů (xerogelu) je široce využívána metoda skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Je potřeba si uvědomit, že struktura představuje pouze materiál v suchém stavu. V hydratovaném a nabotnalém stavu je velikost pórů mnohem menší. Velikost vzniklých pórů je značně ovlivněna mnoha faktory např. teplotou a délkou mrazení, využitím porogenů. Metodu lze použít pouze k porovnání jednotlivých vzorků mezi sebou v suchém stavu při zachování konstantních podmínek přípravy lyofilizátu. Na Obr. 81 je vidět velikost pórů lyofilizátu připraveného z hydrogelu na bázi HA-TA spec. A o koncentraci 20 mg/ml v PBS zesítěného pomocí HRP (0,24 U/ml) a přímého přidavku H_2O_2 (0,003 %). Velikost pórů se pohybuje v desítkách až stovkách mikrometrů, přestože je dle výpočtu průměrná velikost *mesh size* menší než 50 nm.



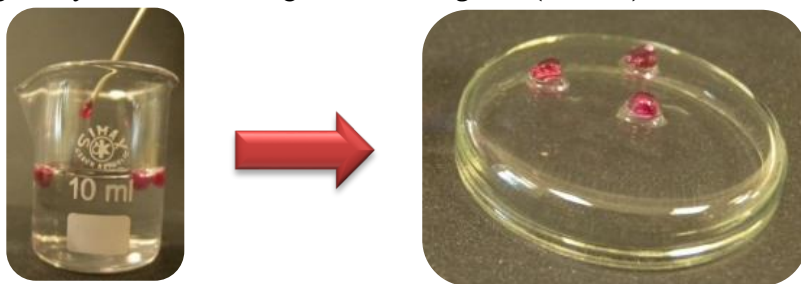
Obr. 81 SEM – zobrazení struktury lyofilizátu připraveného z HA-TA hydrogelu.

7.2.3 Využití enzymatické reakce jako zdroje peroxidu vodíku

Peroxid vodíku je možné do systému na bázi tyraminovaného derivátu HA přidat přímo v podobě ředěného roztoku, anebo může být H_2O_2 uvolněn během enzymatické reakce glukózy s glukózo-oxidázou či galaktózy s galaktózo-oxidázou (Obr. 28). Oba systémy umožňují řídit kinetiku gelace a charakter gelu rychlostí vzniku peroxidu vodíku během těchto enzymatických reakcí. Předpokladem přidavku další reakce do systému je možnost lépe regulovat rychlost gelace i charakter gelu. Například lze využít zpomalení gelace při zachování viskoelastických a mechanických vlastností srovnatelných se systémem s přímým přidavkem H_2O_2 (kapitola 7.2.2). V neposlední řadě je uvažováno lokální zvýšení koncentrace galaktózy v místě aplikace a následná aplikace roztoku HA-TA s obsahem enzymů GaO a HRP do daného místa. Také je možné využití gelace roztoku HA-TA obsahující GluO a HRP v přítomnosti krve, kde koncentrace glukózy u člověka (glykemie) dosahuje 4–6 mmol/l, tedy v průměru 0,9 g/l.

7.2.3.1 Systém glukóza – glukózo-oxidáza

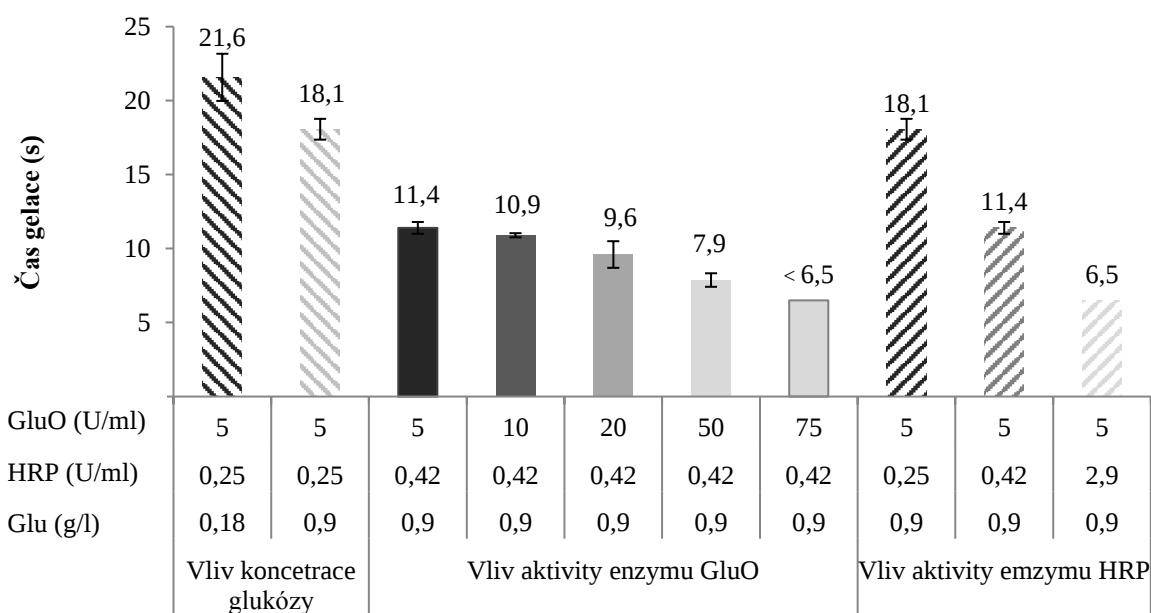
Tento systém by mohl být vhodný pro *in situ* aplikace z důvodu přítomnosti glukózy v krvi. Tento substrát pro danou reakci je komponentou lidské krve v koncentraci 9 g/l (5 mmol/l – glykémie). Dle *in vitro* experimentu při přidavku roztoku obsahující hydroxyfenyl derivát HA, HRP a GluO do roztoku glukózy o koncentraci 9 g/l dochází ke gelaci (Obr. 82).



Obr. 82 Ukázka gelace materiálu na bázi HA-TA s obsahem HRP a H_2O_2 v roztoku glukózy (9 g/l).

7.2.3.1.1 Charakteristika gelu

Dle postupu popsaném v kapitole 6.2.4.5.3 byla stanovena kinetika gelace v závislosti na koncentraci glukózy a aktivitě enzymů GluO a HRP (Obr. 83).



Obr. 83 Závislost času gelace na koncentraci glukózy, aktivitě enzymů HRP a GluO.

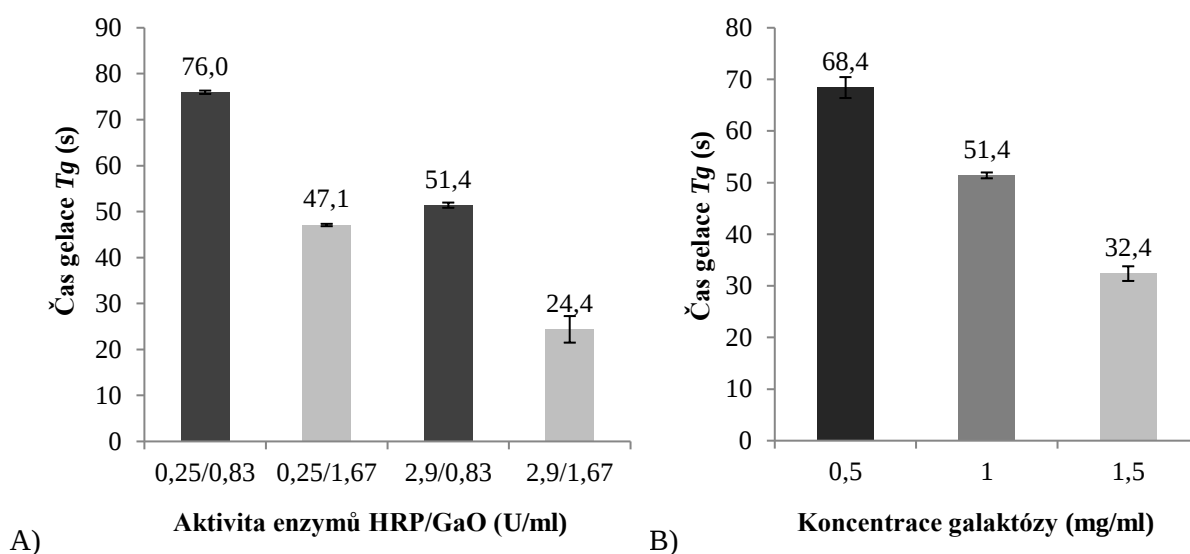
Pro testování vlivu koncentrace glukózy, aktivity enzymů HRP a GluO na kinetiku gelace byl použit derivát HA-TA s molekulovou hmotností M_w 360 kDa a stupněm substituce DS 1,6 %. Koncentrace prekurzorového roztoku byla zvolena 20 mg/ml. Aktivita glukózo-oxidázy byla stanovena dle postupu popsaného v kapitole 6.2.9.2. Obdobně jako v případě systému HA-TA/HRP/ H_2O_2 popsaného v kapitole 7.2.2 je rychlost gelace a charakter gelu také ovlivněna parametry derivátu, jako jsou molekulová hmotnost, stupeň substituce či koncentrace prekurzorového roztoku HA-TA, přičemž trend závislosti je stejný.

7.2.3.2 Systém galaktóza – galaktózo-oxidáza

Galaktóza je také přítomna v lidském organismu, ale pouze v malém množství nedostatečném pro gelaci. Tento substrát lze přidat přímo do prekurzorového roztoku anebo zvýšit lokálně koncentraci galaktózy v místě aplikace. Předpokladem je využití daného systému pro oddálení gelace při zachování vhodných mechanických a viskoelastických vlastností a nízkého stupně nabotnění.

7.2.3.2.1 Charakteristika gelu

Dle postupu popsaném v kapitole 6.2.4.5.3 byla stanovena kinetika gelace v závislosti na aktivitě enzymu GaO a HRP. Pro testování vlivu je použit derivát s molekulovou hmotností M_w 360 kDa a stupněm substituce DS 1,6 %. Koncentrace prekurzorového roztoku byla zvolena 20 mg/ml. Čas gelace byl v tomto případě prodloužen až na 80 s (Obr. 84), přesto Youngův modul pružnosti hydrogelů stanovený dle postupu v kapitole 6.2.5.1 dosahuje i při nejvyšší zvolené aktivitě HRP a GaO nízkých hodnot 6 kPa.



Obr. 84 Vliv aktivity enzymů HRP a GaO (A) a koncentrace galaktózy (B) na čas gelace.

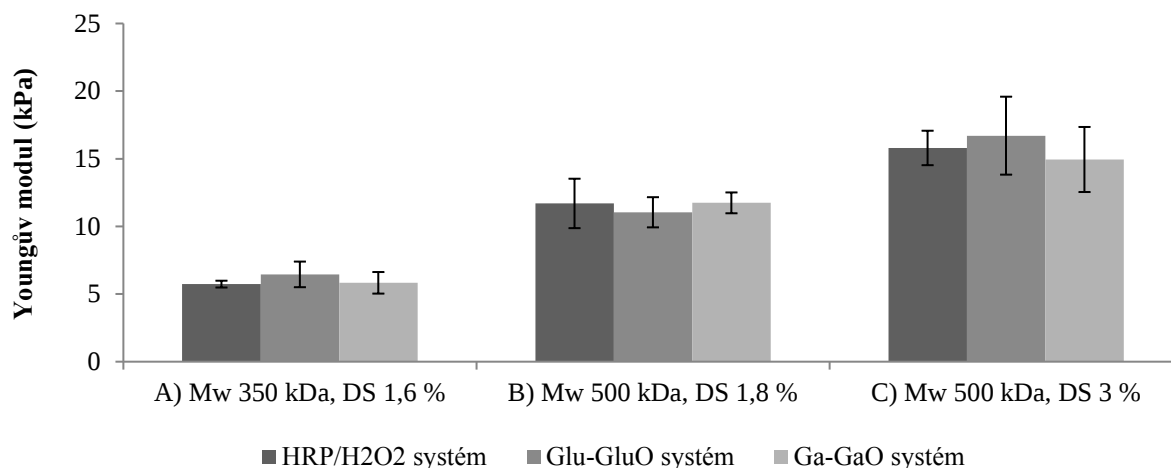
Prodloužení gelace bylo docíleno snížením aktivity GaO u derivátu HA-TA s vyšším stupněm substituce 2,7 % zvoleného pro docílení vyšší tuhosti hydrogelové sítě (Tab. 18).

Tab. 18 Čas gelace a mechanické vlastnosti hydrogelů systému Ga-GaO

M_w (kDa)/ DS (%)	370/2,7		
Koncentrace HA-TA (mg/ml)	20		
Aktivita HRP (U/ml)	0,25	2,90	2,90
Aktivita GaO (U/ml)	0,25	0,63	0,13
Koncentrace Ga (mg/ml)	8	8	8
Youngův modul pružnosti (kPa)	8	18	5
Tlakové napětí v mezi pevnosti (Pa)	51	79	924
Houževnatost (kJ/m^3)	5398	8460	65210
Čas gelace T_g (s)	80	25	115

7.2.4 Porovnání charakteru gelů s přímým přidavkem a generací peroxidu vodíku

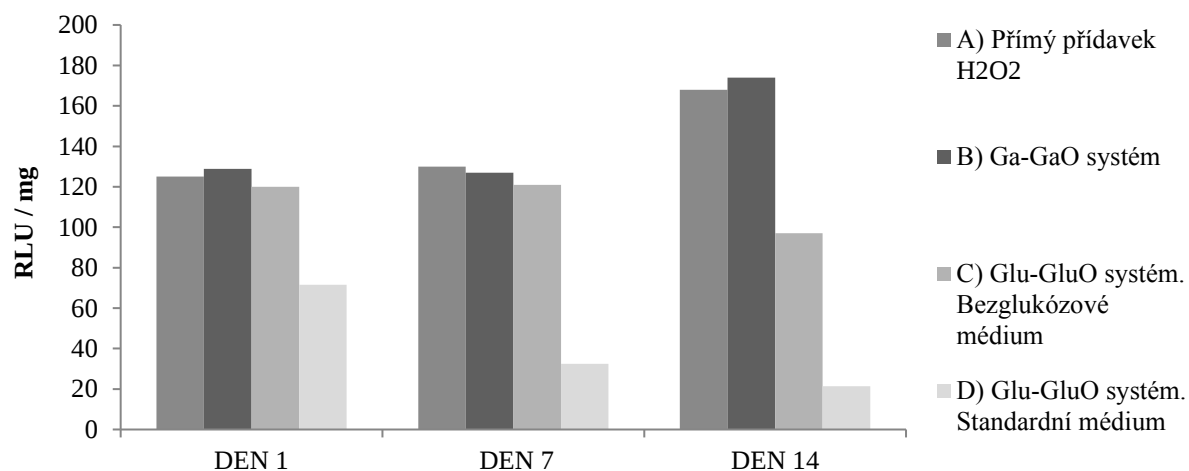
Za jistých podmínek – vysoké koncentrace enzymů a substrátu se budou systémy Glu-GluO a Ga-GaO chovat obdobně jako systém s jednou enzymatickou reakcí s přímým přidavkem peroxidu vodíku. Tento jev je ukázán v grafu na Youngovu modulu hydrogelů připravených těmito třemi systémy. U standardního systému s přímým přidavkem peroxidu vodíku byla zvolena aktivita HRP 0,24 U/ml a koncentrace peroxidu vodíku 0,003 %. Pro dosažení srovnatelných vlastností se standardním systémem byla aktivita enzymu HRP navýšena pro další dva systémy na hodnotu 2,9 U/ml. Koncentrace glukózy byla zvolena 0,9 mg/ml, resp. galaktózy 8 mg/ml. Aktivita GluO byla zvolena 5 U/ml (Obr. 85 A a B) a 1 U/ml (Obr. 85 C) a GaO 25 (Obr. 85 A), 15 (Obr. 85 B) a 5 U/ml (Obr. 85 C).



Obr. 85 Srovnání Youngova modulu systémů s přímým přidavkem a generací H₂O₂ enzymatickou reakcí Glu-GluO či Ga-GaO. Srovnání provedeno u tří derivátů HA-TA s různou molekulovou hmotností M_w a stupněm substituce DS.

7.2.4.1 Cytotoxicita

Viabilita 3T3 buněk zabudovaných do hydrogelu byla hodnocena pomocí metody *Cell Titter Glo Assay* (stanovení množství ATP – 6.2.11.5). Srovnání všech 3 systémů je uvedeno v daném grafu (Obr. 86). U systému Glu-GluO je vidět pokles viability při použití standardního kultivačního média obsahující glukózu, která je hlavní živinou buněk a navíc dochází k neustálé produkci peroxidu vodíku reakcí enzymu GluO s glukózou.



Obr. 86 Viabilita buněk zabudovaných v hydrogelech pro systém s přímým přidavkem H₂O₂ (A), generací H₂O₂ pomocí enzymatických reakcí Ga-GaO (B) a Glu-GluO s bezglukózovým médiem (C) a standardním médiem obsahující glukózu (D).

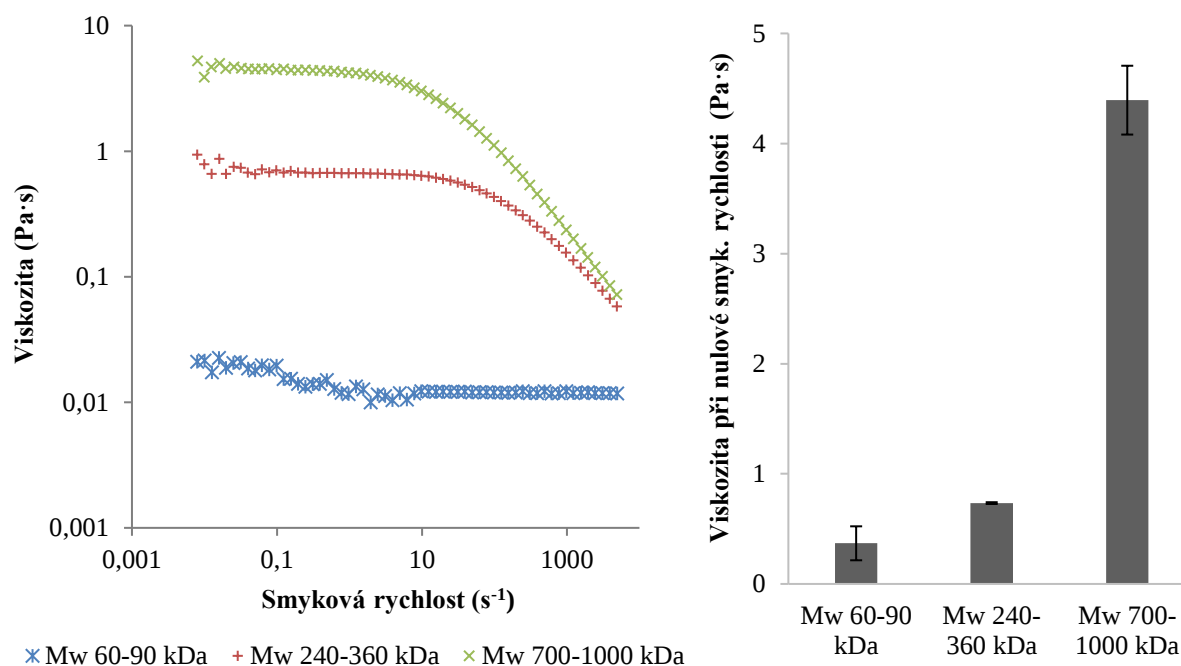
7.2.5 HA-PH-RGD a jeho směsi s HA-TA derivátem

Byl připraven a charakterizován hydrogel na bázi HA-TA derivátu vhodný jako vehiculum pro inkorporované buňky. Daný systém vykazuje rychlou gelaci umožňující zesílení materiálu *in situ* při zachování vhodných vlastností hydrogelu.

Pro podporu buněčné viability a adheze je žádoucí přídavek biomolekuly podporující buněčnou adhezi. Jednou z možností je využití RGD sekvence, která lze navázat na derivát kyseliny hyaluronové. Výsledný derivát obsahuje RGD sekvenci i hydroxyfenylovou skupinu (HA-PH-RGD^{PURE}) možnou zesílit pomocí peroxidu vodíku a křenové peroxidázy HRP stejně jako u tyraminovaného derivátu HA (HA-TA). Reakce je pomalejší ve srovnání s tyraminovaným derivátem HA, a proto je žádoucí kombinace těchto dvou derivátů (HA-PH-RGD^{MIX}) pro dosažení vhodné rychlosti gelace a viskoelastických či mechanických vlastností. Hydrogely obsahující RGD sekvence jsou připravovány dle postupu uvedeném v kapitole 6.2.3.

7.2.5.1 Viskozita

Viskozita byla stanovena pomocí rotačního reometru AR-G2 dle metodiky popsané v kapitole 6.2.4.5.1. Roztoky HA-PH-RGD^{MIX} o koncentraci 20 mg/ml (hmotnostní poměr HA-PH-RGD^{PURE}:HA-TA byl 1:1, 10 mg/ml HA-PH-RGD^{PURE} a 10 mg/ml HA-TA) v PBS pH 7,4 byly zvoleny pro porovnání viskozity roztoků lišící se molekulovou hmotností výchozího derivátu. V grafech (Obr. 87) je znázorněna závislost viskozity na smykové rychlosti a hodnoty viskozit při nulové smykové rychlosti získané z viskozitních křivek aproximací k nulové smykové rychlosti.

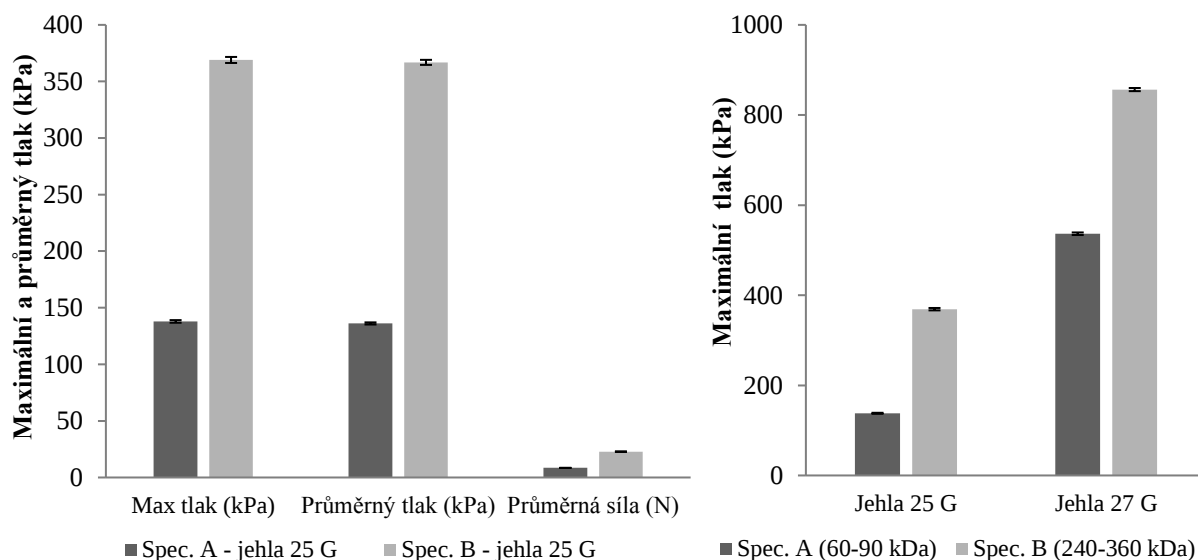


Obr. 87 Závislost viskozity na smykové rychlosti (vlevo) a viskozita při nulové smykové rychlosti (vpravo) pro různé molekulové hmotnosti derivátu při koncentraci 20 mg/ml.

7.2.5.2 Výtlačná síla

Výtlačná síla byla stanovena dle metodiky popsané v kapitole 6.2.5.2. Pro aplikaci materiálu byly použity 2 typy velmi tenkých jehel 25 G a 27 G s délkou 40 mm a vnitřním průměrem 0,26 mm (25 G) a 0,21 mm (27 G). Jehly byly zvoleny na základě parametrů aplikačního zařízení AMCath katetr. Vnitřní průměr 1,2 m dlouhého dvoucestného katetru (0,5 mm) i jehly zakončující katetr ($0,24 \pm 0,01$ mm) jsou velmi malé.

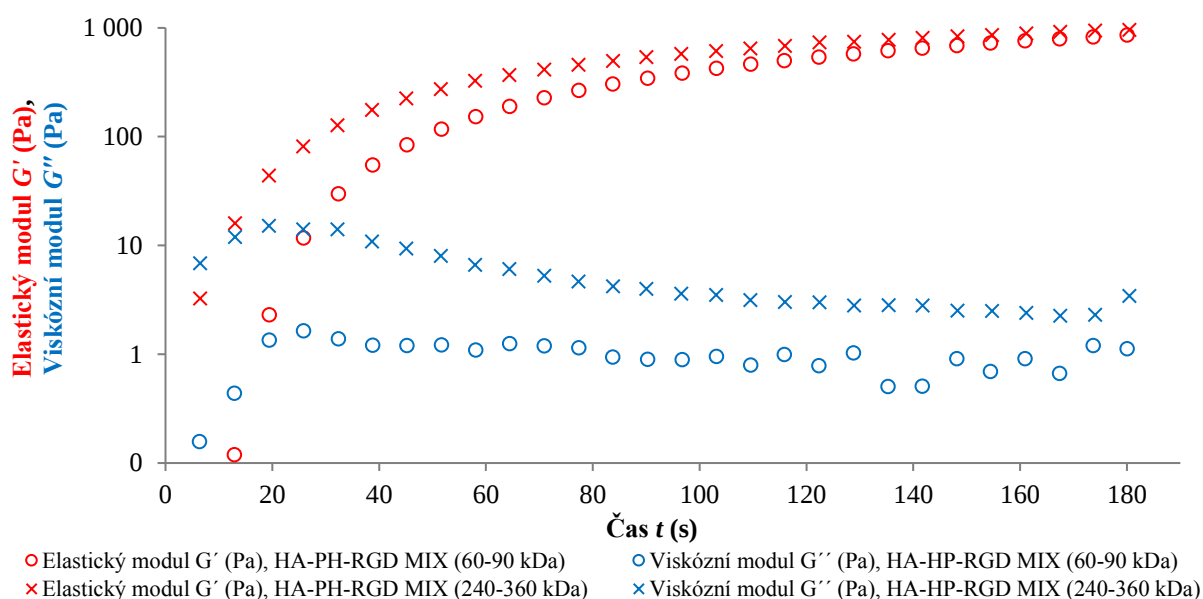
V případě tohoto systému je výtlačná síla dána především parametry derivátu HA (HA-TA, HA-PH-RGD). Byly testovány deriváty lišící se v molekulové hmotnosti při zachování stejné koncentrace roztoku derivátu 20 mg/ml v PBS (pH 7,14). Roztoky derivátů spec. A a B (60–90 kDa, 240–360 kDa) lze bez větších obtíží vytlačit přes tenkou jehlu. V následujících grafech (Obr. 88) jsou uvedeny hodnoty maximálního a průměrného tlaku při extruzi roztoku přes jehlu 25 G a porovnání maximálního tlaku při výtlaku přes oba typy jehel.



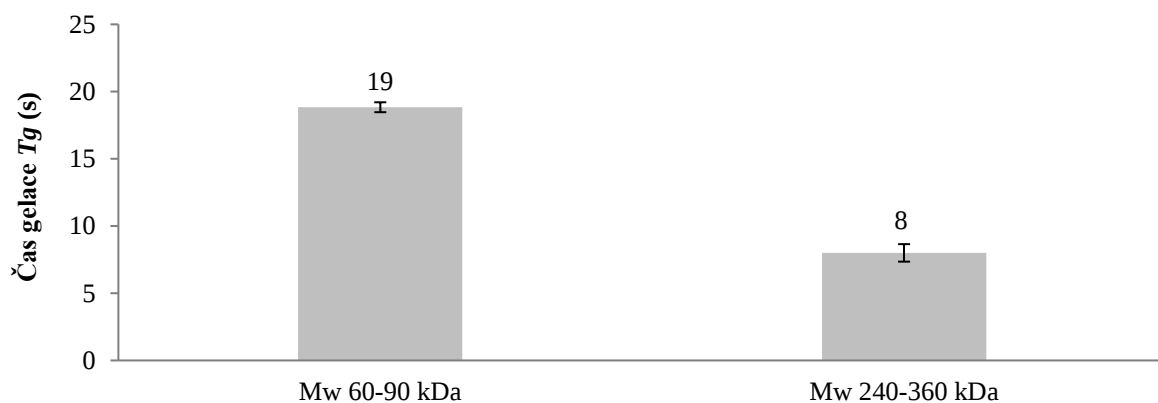
Obr. 88 Výtlačná síla – maximální a průměrný tlak vytlačovaných roztoků HA-PH-RGD^{MIX} (spec A a B) přes jehlu o velikost 25 G (vlevo) a srovnání hodnoty maximálního tlaku pro jehlu při 25 a 27 G (vpravo).

7.2.5.3 Čas gelace

Byl testován materiál na bázi HA-PH-RGD^{MIX} (1:1) v koncentraci 20 mg/ml v roztoku PBS (pH 7,4) se síťovacími činidly 1 (koncentrace H₂O₂ 0,003 %, aktivita HRP 0,24 U/ml) s nízkou (60–90 kDa) a střední M_w (240–360 kDa). V Obr. 89 je vidět průběh kinetiky gelace těchto dvou materiálů a čas gelace je zaznamenán v následujícím Obr. 90.

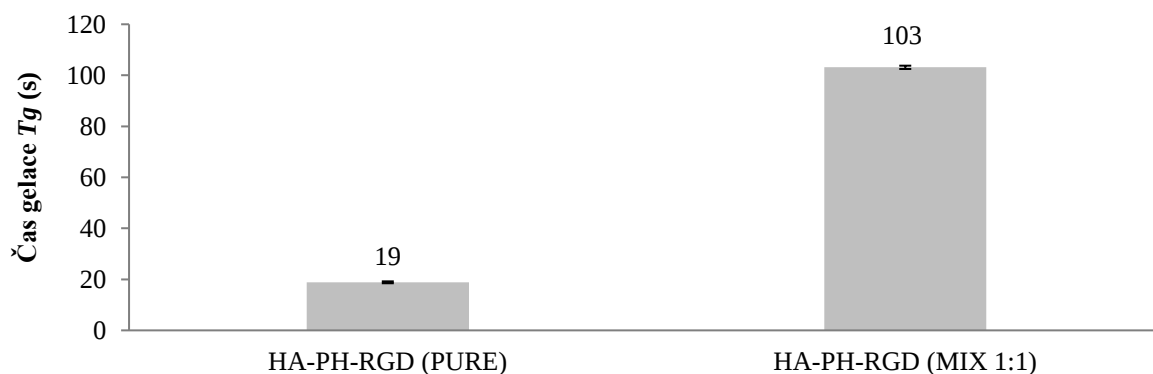


Obr. 89 Závislost elastického a viskózního modulu na čase u materiálů na bázi derivátu HA-PH-RGD^{MIX} spec. A o koncentraci 20 mg/ml s různou M_w. Aktivita HRP je 0,24 U/ml a koncentrace H₂O₂ 0,003 %.



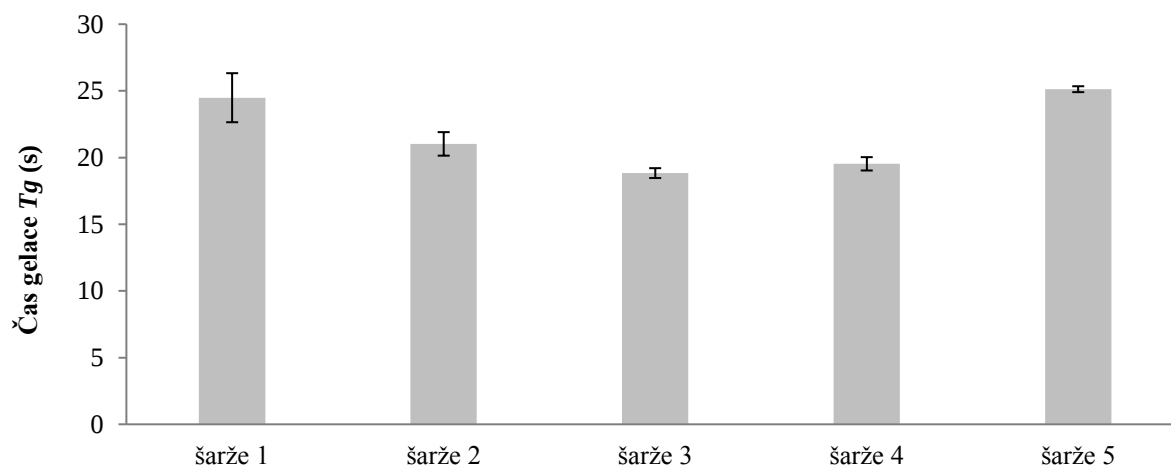
Obr. 90 Čas gelace Tg materiálů na bázi derivátu HA-PH-RGD^{MIX} spec. A o koncentraci 20 mg/ml s různou molekulovou hmotností. Aktivita HRP 0,24 U/ml, koncentrace H₂O₂ 0,003 %.

U derivátu spec. A s nízkou M_w (60–90 kDa) byla porovnána rychlost gelace HA-PH-RGD^{PURE} a směsi HA-PH-RGD^{MIX} (20 mg/ml, PBS 7,4) se síťovacími činidly 1 (koncentrace H₂O₂ 0,003 %, aktivita HRP 0,24 U/ml), jak je vidět v Obr. 91.



Obr. 91 Čas gelace Tg materiálů na bázi derivátů HA-PH-RGD^{PURE} a HA-PH-RGD^{MIX} spec. A (20 mg/ml, PBS 7,4) se síťovacími činidly 1 (koncentrace H₂O₂ 0,003 %, aktivita HRP 0,24 U/ml).

U směsi derivátů HA-PH-RGD^{MIX} spec. A (M_w 60–90 kDa) bylo proměřeno množství připravených vzorků lišících se šarží vstupního derivátu HA-PH-RGD^{MIX} spec. A, šarží HRP a H₂O₂. Tyto aspekty z aplikačního hlediska minoritně ovlivňují rychlost gelace, jak je vidět v Obr. 92.



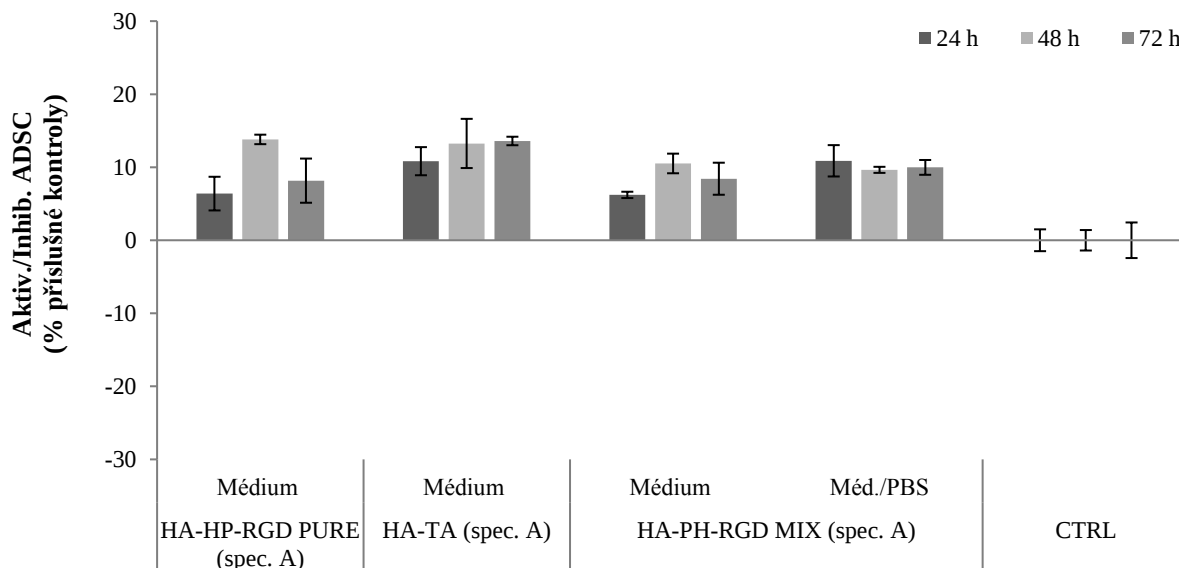
Obr. 92 Čas gelace vzorků lišících se šarží derivátu HA-PH-RGD^{MIX} spec. A či šarží HRP a H₂O₂.

7.2.5.4 Viskoelastické vlastnosti

Viskoelastické vlastnosti hydrogelů na bázi HA-PH-RGD^{MIX} jsou součástí kapitoly 7.5.

7.2.5.5 Cytotoxicita

Cytotoxicita samotných síťovacích činidel byla testována v rámci kapitoly 7.2.1.4.2. Níže v Obr. 93 je znázorněn vliv vzorků připravených derivátů HA-PH-RGD^{PURE}, HA-TA a HA-PH-RGD^{MIX} na buněčnou viabilitu ADSC.



Obr. 93 Aktivace a inhibice ADSC vyjádřena v procentech vůči příslušné kontrole CTRL u hydroxyfenyl derivátů HA specifikace A s nízkou M_w (HA-TA a HA-PH-RGD^{PURE} a jejich směs HA-PH-RGD^{MIX}).

7.2.5.6 Botnání hydrogelů – in vitro stabilita HA-PH-RGD hydrogelů

Hydrogely na bázi HA-PH-RGD^{MIX} byly připraveny v roztoku PBS pH 7,4 o koncentraci 20 mg/ml. Dle postupu uvedeném v kapitole 6.2.3 byly připraveny gely o průměru 11,1 mm a hmotnosti 300–500 mg. Hydrogely byly po zvážení vloženy do vialek a zality 3 ml roztoku PBS a uchovávány v inkubátoru po dobu 8 týdnů. Koeficient nabotnění byl spočten jako podíl hmotnosti gelu po a před botnání (Tab. 19) a byl sledován spolu s Youngovým modulem po dobu 8 týdnů.

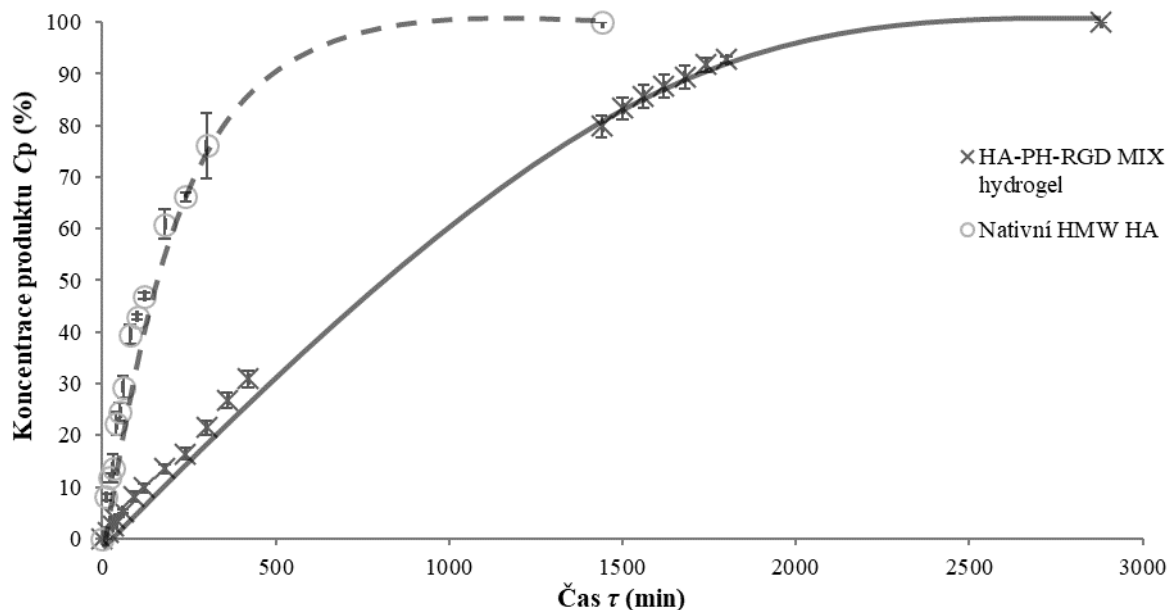
Tab. 19 Botnání hydrogelů HA-PH-RGD^{MIX} v PBS (pH 7,4) po dobu 8 týdnů

	Koncentrace H ₂ O ₂ (%)	HRP (U/ml)	Čas t	Koeficient nabotnění Q ± SD (%)	Youngův modul ± SD (kPa)
HA-PH- RGD ^{MIX}	0,003	0,24	0 dní	100,0	9,7 ± 1,2
			1 dní	143,3 ± 2,0	8,4 ± 1,1
			7 dní	145,4 ± 2,4	8,1 ± 1,1
			14 dní	152,0 ± 0,6	6,8 ± 0,2
			21 dní	161,8 ± 12,8	5,6 ± 0,7
			28 dní	169,1 ± 4,0	6,7 ± 0,9
			6 týdnů	183,1 ± 5,5	6,1 ± 1,9
			8 týdnů	178,9 ± 0,5	6,4 ± 1,2

7.2.5.7 Degradace

Postup degradace a stanovení je popsán v kapitole 6.2.7.1. Hydrogely na bázi HA-PH-RGD^{MIX} a roztoky vysokomolekulární HA byly degradovány pomocí enzymu BTH za stejných podmínek (pH, teplota). Počáteční koncentrace (mg/ml) a aktivita hyaluronidázy BTH (U/mg) byla v obou případech stejná a

kinetika degradace je proto porovnatelná. Kumulativní tvorba produktu (degradace substrátu) je ukázána v Obr. 94.



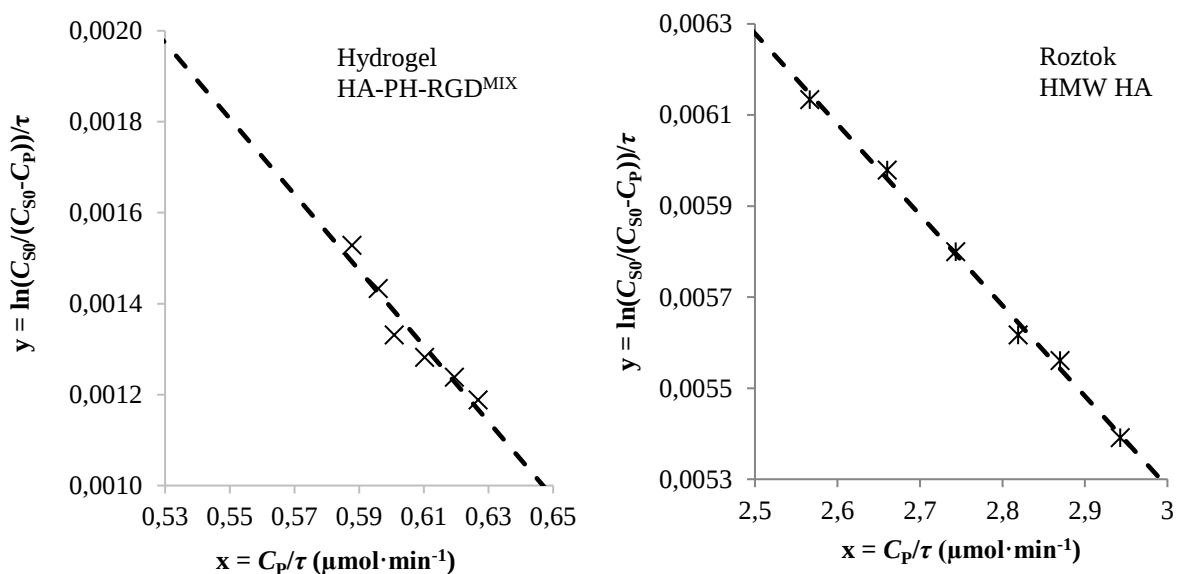
Obr. 94 Kumulativní tvorba produktu.

Kinetické parametry byly určeny z integrované rovnice Michaelis-Mentenové ve tvaru:

$$\ln \frac{c_{S0}}{c_{S0} - c_P} \cdot \frac{1}{\tau} = \frac{v_{max}}{K_M} - \frac{1}{K_M} \cdot \frac{c_P}{\tau}$$

kde c_{S0} je koncentrace substrátu na počátku, c_P koncentrace produktu, v_{max} představuje maximální rychlost, K_M je Michaelisova konstanta a τ vyjadřuje čas.

Závislost $\ln \frac{c_{S0}}{c_{S0} - c_P} \cdot \frac{1}{\tau}$ na $\frac{c_P}{\tau}$ byla vynesena do grafů (Obr. 95). Úsek na svislé ose je roven v_{max}/K_M . Pro HA-PH-RGD^{MIX} je $K_M = 196,18 \pm 15,76 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $v_{max} = 0,86 \pm 0,02 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ a pro roztok vysokomolekulární (HMW) HA: $K_M = 500 \pm 170 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $v_{max} = 5,6 \pm 1,9 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.



Obr. 95 Integrovaná forma rovnice Michaelis-Mentenové pro hydrogel na bázi HA-PH-RGD^{MIX} a roztok HMW HA.

7.3 Buněčná interakce s hydrogely

Pro buněčnou adhezi je nutné zakomponovat do struktury hydrogelů na bázi HA adhezivní molekuly. Jako adhezivní molekula byl zvolen fibrinogen, který lze snadno zakomponovat do struktury hydrogelu na bázi HA-TA i HA-Ox derivátu v koncentraci 1 mg/ml, a která je dostačující pro podporu buněčné adheze. Fibrinogen je známý koagulační faktor, který není ve struktuře hydrogelu pevně vázán a je zde možné riziko koagulace při jeho přímé aplikaci do srdeční tkáně. Proto byl také připraven a testován hydroxyfenyl derivát HA nesoucí pevně vázanou RGD sekvenci (HA-PH-RGD^{PURE}) či v kombinaci s tyraminovaným derivátem HA-TA tvořící směs HA-PH-RGD^{MIX} [88].

7.3.1 Buněčná adheze k povrchu materiálu

7.3.1.1.1 HA-TA

Bez přítomnosti adhezivní molekuly nedochází k adhezi na povrch hydrogelu na bázi hydroxyfenyl (tyraminovaného) derivátu HA (HA-TA). Buněčná adheze na povrch hydroxyfenyl derivátu HA s RGD sekvencí a přidavku fibrinogenu je uvedena v publikaci autorky Záviškové, která byla testována za účelem regenerace poranění míchy [165].

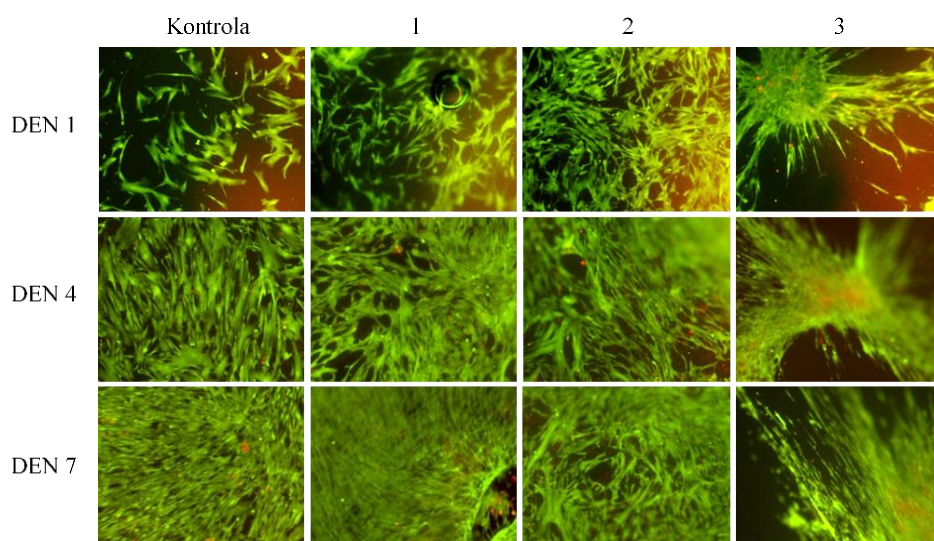
7.3.1.1.2 HA-Ox/POA

Pro detekci buněčné adheze k povrchu hydrogelu na bázi HA-Ox/POA byly použity kmenové buňky SC. Pro podporu buněčné adheze byl zakomponován do hydrogelu fibrinogen v koncentraci 1 mg/ml. Do 24-jamkového kultivačního panelu bylo aplikováno 400 μ l testovaného materiálu na jamku a po zgelování byly do každé jamky přidány buňky v koncentraci $1,3 \cdot 10^4$. Jako kontrola je využita jamka bez obsahu materiálu. Specifikace testovaných materiálů je uvedena v tabulce (Tab. 20).

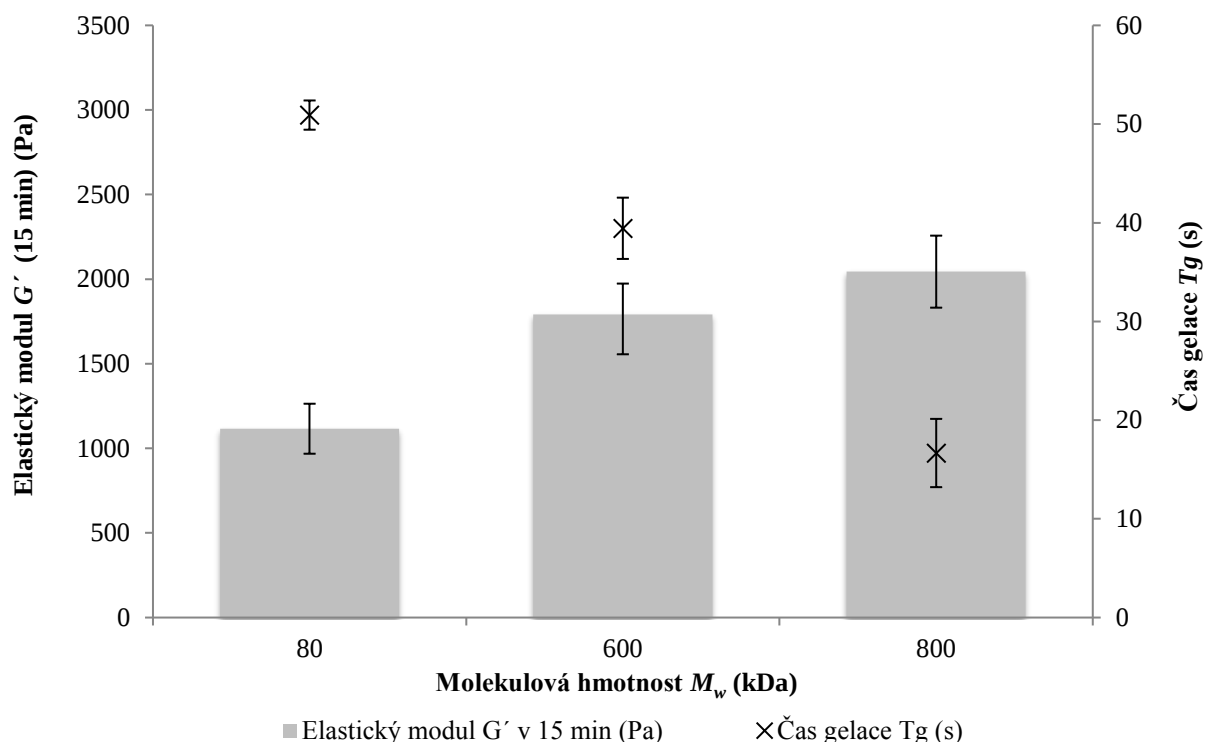
U všech testovaných hydrogelů na bázi HA-Ox/POA dochází k adhezi buněk na jejich povrch (Obr. 96). Hydrogely se liší rychlostí gelace a tuhostí finální hydrogelové matrice, jak je vidět v Obr. 97, což ovlivňuje i samotnou buněčnou adhezi (Obr. 96).

Tab. 20 Specifikace testovaných materiálů

	M_w (kDa)	DS (%)	Poměr vazných míst NH ₂ :CHO	Konc. HA-Ox (mg/ml)	Konc. POA (mg/ml)	Rozpouštědlo
HA-Ox + 1 mg/ml fibrinogenu	80	9	1:2	40	0,4	0,9% roztok NaCl
	600	6	1:1	20	0,28	
	800	9	1:2	20	0,2	



Obr. 96 Buněčná adheze SC na povrchu hydrogelu na bázi HA-Ox/POA.



Obr. 97 Kinetika gelace (čas gelace a elastický modul odečtený po 15 min gelace) materiálů využitých při adhezi buněk k povrchu hydrogelu.

7.3.2 Inkorporace buněk do hydrogelu

Pro dosažení požadovaného efektu regenerace tkáně po infarktu myokardu je nutné do hydrogelu zakomponovat co nejvíce buněk při zachování jejich viability, možnosti proliferace a současně zachování vhodných vlastností materiálu.

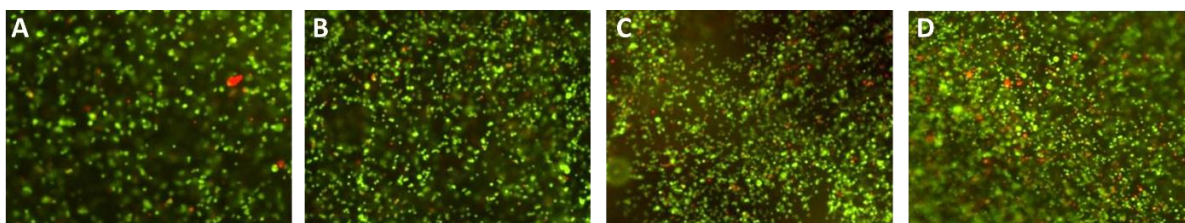
7.3.2.1 HA-Ox

Buňky linie HCT-116 v koncentraci 10 a 30 milionů na 1 ml hydrogelu byly inkorporovány do hydrogelu na bázi HA-Ox (M_w 250–350 kDa, DS 8–10 %) o koncentraci 20 mg/ml v 0,9% roztoku NaCl, POA o koncentraci 0,4 mg/ml s poměrem $NH_2:CHO$ 1:1. U hydrogelů na bázi oxidované formy HA se zvýšeným množstvím buněk dochází ke znatelnému ovlivnění hydrogelace za vzniku velmi málo a nehomogenně zesíťovaných hydrogelů (10 mil. HCT-116/ml) či hydrogely nevznikají vůbec (30 mil. HCT-116/ml). Navíc signifikantní prodloužení gelace (30 minut a více), během níž buňky nejsou v kontaktu s kultivačním médiem, není v souladu s životaschopností buněk i s danou aplikací.

7.3.2.2 Hydroxyfenyl derivát HA (HA-TA, HA-PH-RGD)

7.3.2.2.1 Tyraminovaný derivát HA (HA-TA)

Kvůli vysokému počtu buněk potřebného na dané experimenty byly zvoleny HCT-116, buněčná linie vyznačující se vysokou proliferační schopností, u které lze, na rozdíl od kmenových buněk, kultivaci *in vitro* před inkorporací buněk do scaffoldu, získat velký počet buněk. Buňky v koncentraci 1–100 milionů na 1 ml hydrogelu byly inkorporovány do jeho struktury na bázi tyraminovaného derivátu HA (HA-TA) v PBS (pH 7,4) (Obr. 98). Aktivita HRP a koncentrace peroxidu vodíku byla navýšena na hodnotu 0,5 U/ml a 0,005 %.



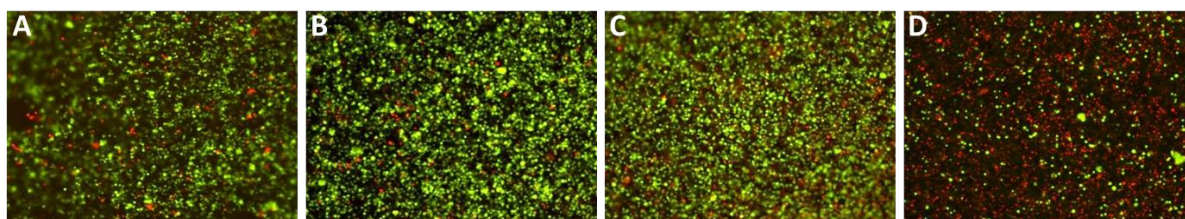
Obr. 98 Inkorporace vysokého množství buněk do hydrogelů na bázi HA-TA. A – 10 mil. b./ml, B – 30 mil. b./ml, C – 50 mil. b./ml a D – 100 mil. b./ml. Kultivace den 3.

U připravených hydrogelů byl testován vliv počtu inkorporovaných buněk na mechanické vlastnosti. Při zvolené koncentraci buněk 50 a 100 mil. b./ml dochází ke znatelnému vlivu na gelaci, hydrogely ztrácí integritu a tvarovou stálost, a proto nebylo možné stanovit mechanické vlastnosti v kompresi.

Tab. 21 Vliv počtu buněk inkorporovaných do hydrogelu na jeho mechanické vlastnosti

Koncentrace buněk (mil./ml)	Čas <i>t</i> kultivace (dny)	Youngův modul (kPa)	Napětí v mezi pevnosti (kPa)	Houževnatost (J/m ³)
1	0	18,2	83,6	6591
	3	15,6	162	10817
10	0	13,4	241	14379
	3	12,2	145	8615
20	0	9,43	165	12585
	3	9,12	58,6	3554
30	0	8,93	98,0	8185
	3	6,31	22,2	2143
50	0	Hydrogely ztrácí integritu a tvarovou stálost. Stanovení mechanických vlastností neprovedeno. Hydrogely lze připravit pouze při navýšení síťovacích činidel (aktivita HRP 1 U/ml a koncentrace peroxidu vodíku 0,01 %)		
	3			
70	0	Hydrogely ztrácí integritu a tvarovou stálost. Stanovení mechanických vlastností neprovedeno.		
	3			
100	0	Hydrogely ztrácí integritu a tvarovou stálost. Stanovení mechanických vlastností neprovedeno.		
	3			

U daného typu derivátu HA-TA a buněk HCT-116 byl také testován vliv vysokého množství inkorporovaných buněk a délky kultivace na viabilitu a proliferaci buněk. Buňky o koncentraci 70 mil. b./ml byly inkorporovány do hydrogelu se zvýšeným obsahem činidel (HRP 1 U/ml a koncentrace peroxidu vodíku 0,01 %) kvůli snížení efektu buněčné suspenze na gelaci a tuhost hydrogelové sítě. Buňky po 7 dnech dosahují maximální možné hustoty (konfluence) a proliferace je omezena (Obr. 99). Kultivace byla ukončena po 9 dnech, kdy došlo ke znatelnému poklesu viability buněk kvůli nedostatku výměny živin a metabolitů ve scaffoldu.



Obr. 99 Inkorporace vysokého množství buněk (70 mil. b./ml) do hydrogelů na bázi HA-TA. Vliv délky kultivace na buněčnou viabilitu. A – den 0, B – den 2, C – den 7, D – den 9.

7.3.2.2.2 HA-PH-RGD, Kardiopoietické buňky (ADSC)

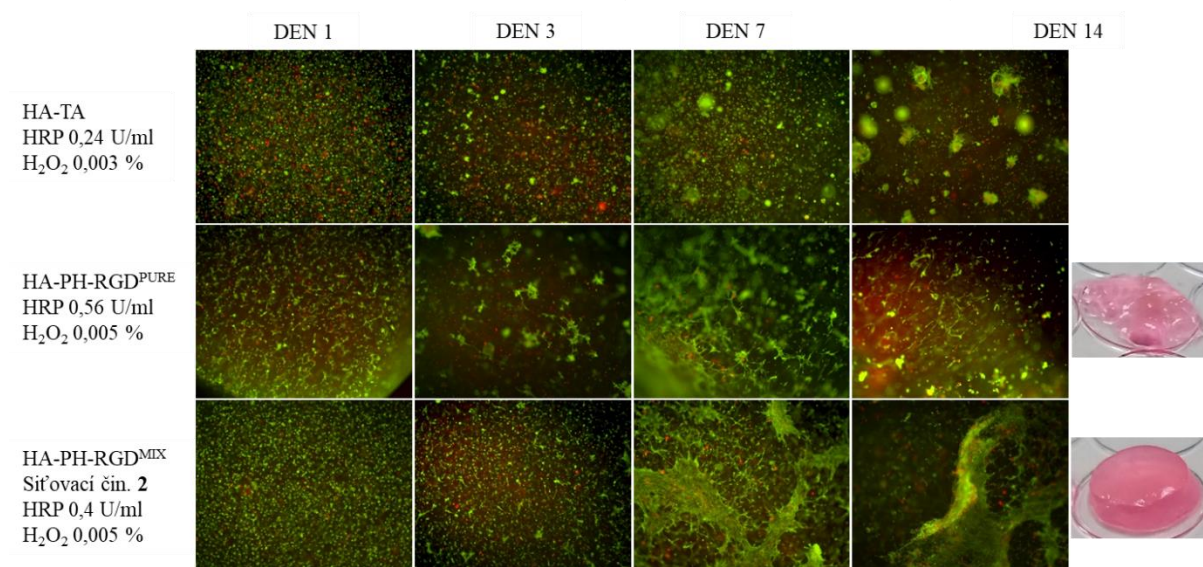
Pro danou aplikaci byly použity kardiopoietické buňky ADSC. Na základě výsledků z předchozí kapitoly není žádoucí inkorporace více než 30 mil. buněk HCT-116 na 1 ml hydrogelu a při 30 mil. b./ml dochází k poklesu mechanických vlastností hydrogelu během následné kultivace. Zvolené finální

množství buněk (ADSC) inkorporovaných do hydrogelu bylo 20 mil na 1 ml hydrogelu. Ke zvýšení buněčné adheze byl použit derivát s navázanou peptidovou sekvencí HA-PH-RGD.

7.3.2.2.2.1 Vliv množství RGD na buněčnou adhezi a charakter gelu

Byla porovnána adheze buněk inkorporovaných v hydrogelu na bázi hydroxyfenyl (tyraminovaného) derivátu HA (HA-TA), hydroxyfenyl derivátu HA s RGD sekvencí HA-PH-RGD^{PURE} a kombinace těchto dvou materiálů HA-PH-RGD^{MIX} v hmotnostním poměru 1:1 (Obr. 100). Koncentrace derivátu v gelu byla 20 mg/ml, spec. A (Mw 60–90 kDa), v PBS pH 7,4. Dle předpokladu u hydrogelu na bázi HA-TA derivátu bez RGD sekvence nedochází k adhezi buněk na povrch hydrogelu, kdežto s přidavkem RGD sekvence se projevuje buněčná adheze u obou materiálů. U hydrogelů s různým obsahem RGD bylo vhodnou volbou koncentrace činidel dosaženo srovnatelné tuhosti před začátkem experimentu (Youngův modul je roven 6–10 kPa), přesto po 14 dnech kultivace hydrogel na bázi HA-PH-RGD^{PURE} botná a degraduje signifikantně více.

HA-TA	Koncentrace H ₂ O ₂ 0,003 %	Aktivita HRP 0,24 U/ml
HA-PH-RGD ^{PURE}	Koncentrace H ₂ O ₂ 0,005 %	Aktivita HRP 0,56 U/ml
HA-PH-RGD ^{MIX}	Koncentrace H ₂ O ₂ 0,005 %	Aktivita HRP 0,4 U/ml

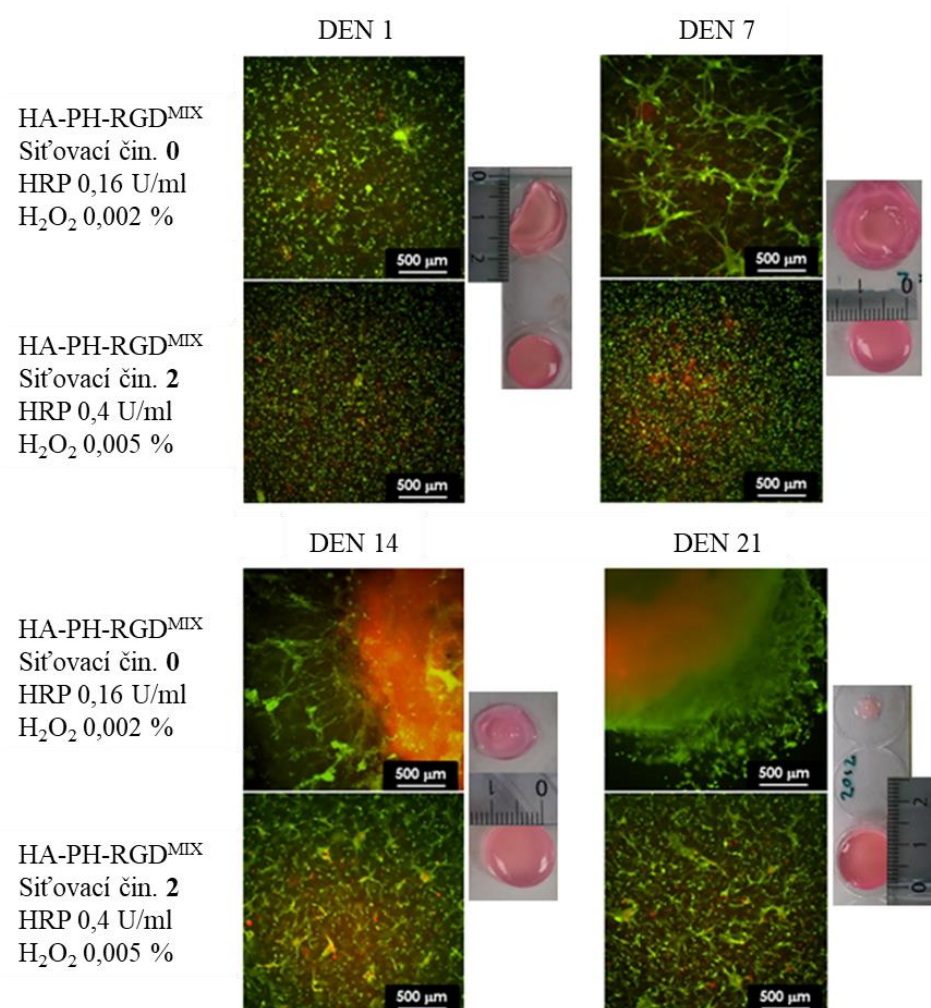


Obr. 100 Inkorporace a kultivace ADSC buněk v hydrogelech. Adheze buněk v hydrogelu na bázi hydroxyfenyl (tyraminovaného) derivátu HA (HA-TA), hydroxyfenyl derivátu HA s RGD sekvencí HA-PH-RGD^{PURE} a kombinace těchto dvou materiálů HA-PH-RGD^{MIX} v hmotnostním poměru 1:1. Vzhled hydrogelů po 14 dnech kultivace.

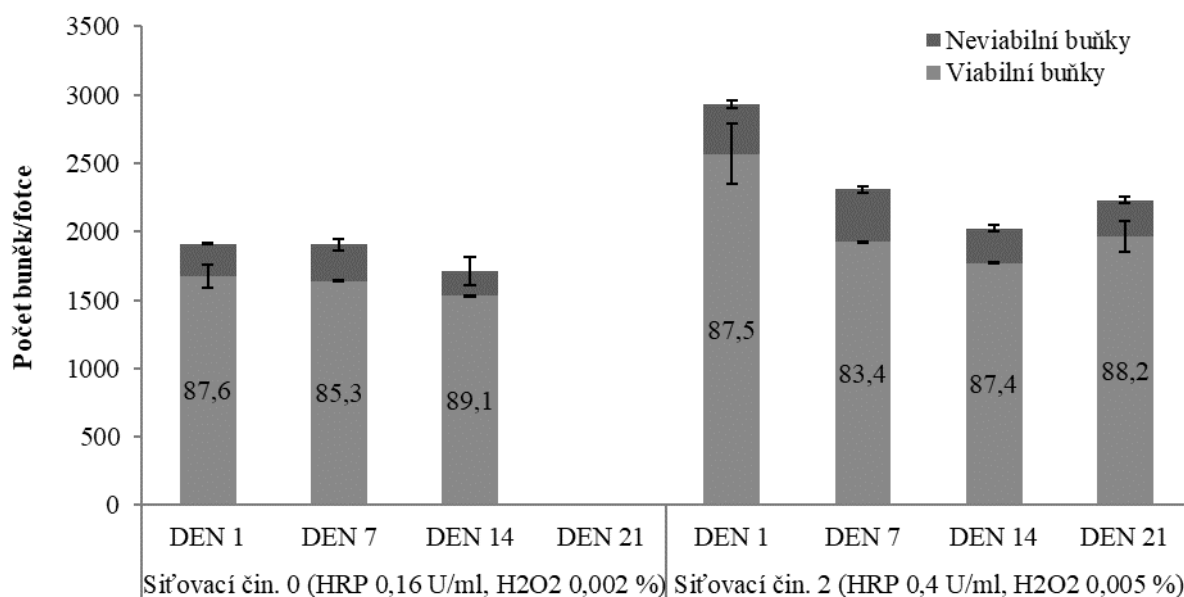
7.3.2.2.2.2 Vliv stupně zesítnění hydrogelu na buněčnou adhezi

Dále byly testovány gely na bázi HA-PH-RGD^{MIX} s různou tuhostí, která byla řízena přidavkem síťovacích činidel (HRP, H₂O₂).

Buňky ADSC adherují již po 7 dnech v hydrogelu v případě méně tuhého gelu (HRP 0,16 U/ml, H₂O₂ 0,66 mM) (Obr. 101 síťovací činidla 0), na druhou stranu gely rychle degradují a po 14 dnech je gel z 90 % zdegradován. Gely také vykazují vysoký stupeň nabotnění, což není aplikačně vhodné, jelikož by mohlo dojít k výraznému tlaku na okolní tkáň. Na druhou stranu tužší hydrogely (HA-PH-RGD^{MIX}, síťovací činidla 2 Obr. 101) si zachovávají tvar, botnají méně a degradují postupně. Adheze se projevuje až po 14 dnech kultivace. Analýzou obrazu z fotek *Live/Dead* byly získány data uvedené v Obr. 102.



Obr. 101 Vliv tuhosti gelů na buněčnou adhezi a růst ADSC. Materiály s nižším přidavkem sířovacích řinidel (HRP 0,16 U/ml, H₂O₂ 0,002 %) s nižší tuhostí (Sířovací řinidla 0) a vyšším přidavkem sířovacích řinidel (HRP 0,4 U/ml, H₂O₂ 0,005 %) s vyšší tuhostí (Sířovací řinidla 2).



Obr. 102 Viabilita buněk inkorporovaných do hydrogelu na bázi HA-PH-RGD^{MIX} zesířené pomocí HRP a H₂O₂ o různé koncentraci.

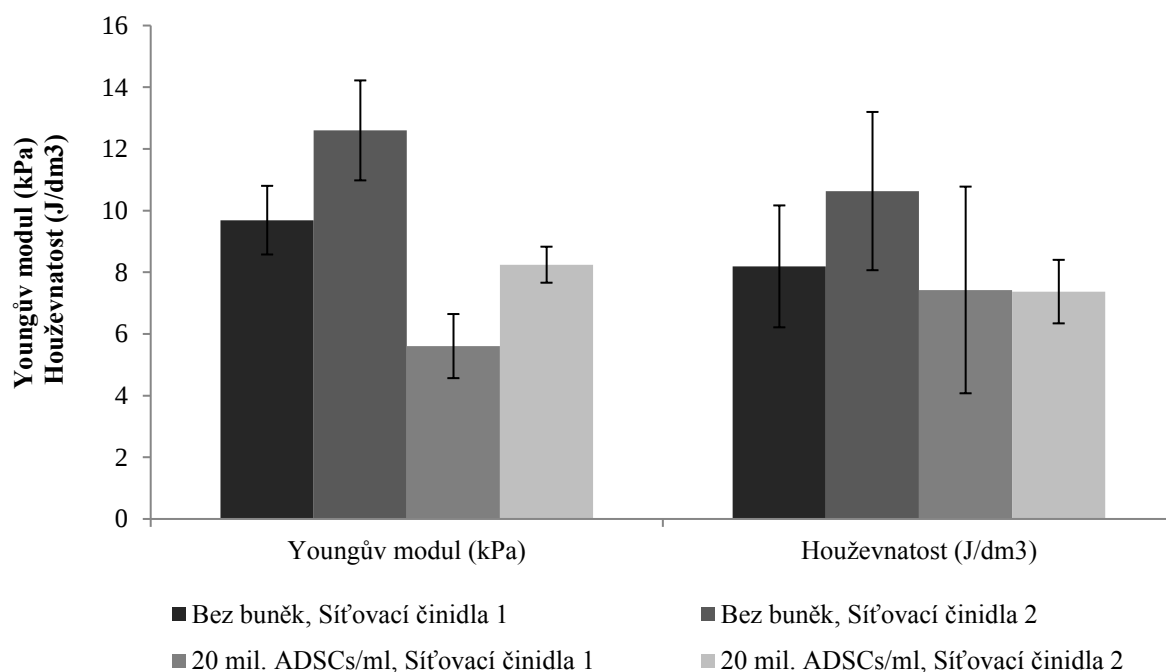
7.3.2.3 Vliv inkorporovaných buněk na charakter hydrogelu na bázi HA-PH-RGD^{MIX}

Hydrogely byly připraveny dle postupu v kapitole 6.2.3. Zvolený finální materiál HA-PH-RGD^{MIX} byl rozpuštěn v roztoku PBS pH 7,4 v koncentraci 20 mg/ml. V případě buněčných hydrogelů byla při gelaci přidána buněčná suspenze s finální koncentrací 20 mil. ADSC/ml.

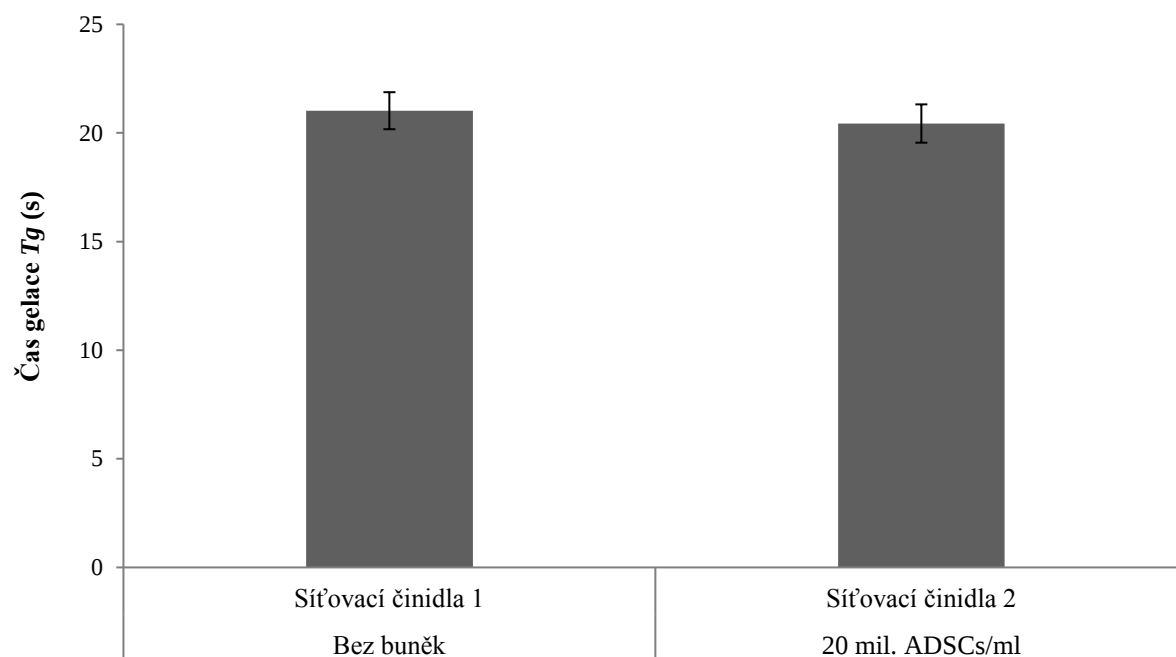
Hydrogel

Bez buněk	Síťovací činidla 1	Konc. H ₂ O ₂ 0,003 %	Aktivita HRP 0,24 U/ml
Bez buněk	Síťovací činidla 2	Konc. H ₂ O ₂ 0,005 %	Aktivita HRP 0,4 U/ml
20 mil. ADSC/ml	Síťovací činidla 1	Konc. H ₂ O ₂ 0,003 %	Aktivita HRP 0,24 U/ml
20 mil. ADSC/ml	Síťovací činidla 2	Konc. H ₂ O ₂ 0,005 %	Aktivita HRP 0,4 U/ml

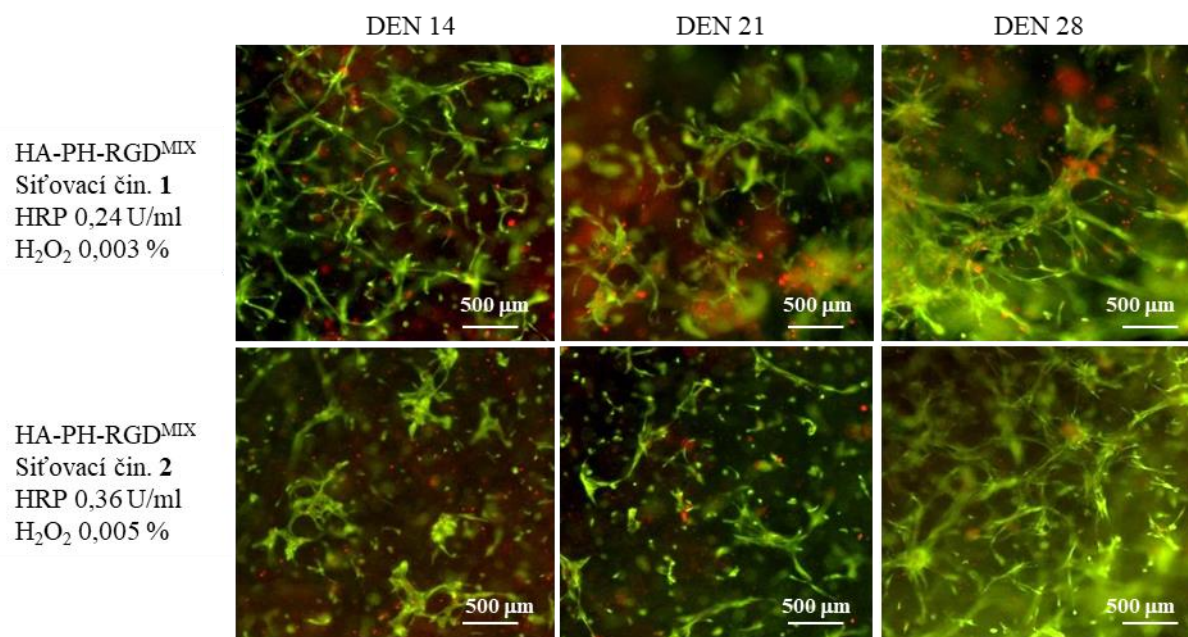
U materiálu bez buněk se síťovacími činidly 1 bylo docíleno optimálních vlastností hydrogelu z pohledu rychlosti gelace, mechanických a viskoelastických vlastností či botnání (HA-PH-RGD^{MIX} síťovací činidla 1, kapitola 7.2.5). Pokud jsou ale do hydrogelu inkorporovány buňky, dochází ke znatelnému botnání a degradaci během kultivace (Obr. 105). Tento negativní jev je pravděpodobně způsoben dekompozicí peroxidu vodíku vedoucí k prodloužení gelačního času a poklesu tuhosti hydrogelové sítě, resp. Youngova modulu po inkorporaci buněk (Obr. 103 hydrogel obsahující síťovací činidla 1 – bez buněk vs. inkorporace 20 mil. ADSC/ml). Navýšením koncentrace činidel lze tyto nevyhovující vlastnosti eliminovat a dosáhnout srovnatelných vlastností gelu s obsahem ADSC jako v případě hydrogelu bez buněk (Obr. 103 – hydrogel obsahující síťovací činidla 2 s inkorporovanými 20 mil. ADSC/ml). Také rychlost gelace je u hydrogelu bez buněk s nižším obsahem síťovacích činidel (1) a buněčného hydrogelu s vyšším obsahem síťovacích činidel (2) srovnatelná (Obr. 104).



Obr. 103 Youngův modul a houževnatost hydrogelů bez buněk a s obsahem 20 mil. ADSC na 1 ml s různým stupněm zesíťení určeným síťovacími činidly: 1 (koncentrace H₂O₂ 0,003 %, aktivita HRP 0,24 U/ml) a 2 (koncentrace H₂O₂ 0,005 %, aktivita HRP 0,4 U/ml).



Obr. 104 Čas gelace hydrogelu bez buněk s obsahem síťovacích činidel 1 a hydrogelu s inkorporovanými buňkami (20 mil. ADSC/ml) s obsahem síťovacích činidel 2.

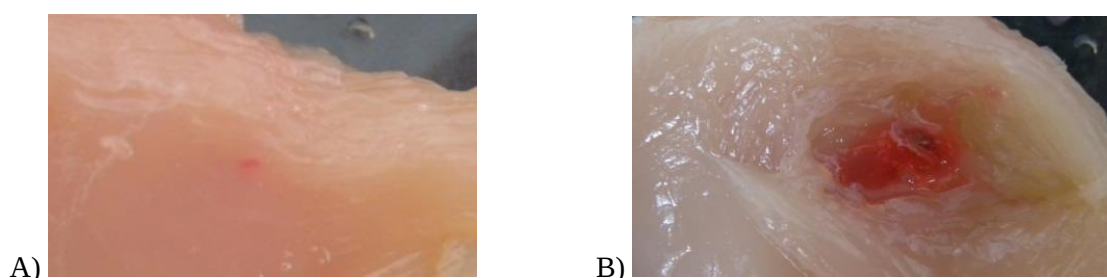


Obr. 105 Vliv tuhosti gelů na adhezi a růst ADSC. Materiály s nižším přidavkem síťovacích činidel (HRP 0,24 U/ml, H₂O₂ 0,003 %) s nižší tuhostí (Síťovací čin. 1) a vyšším přidavkem síťovacích činidel (HRP 0,4 U/ml, H₂O₂ 0,005 %) s vyšší tuhostí (Síťovací čin. 2).

7.4 Detekce hydrogelů

7.4.1 Sirius Red, methylenová modř

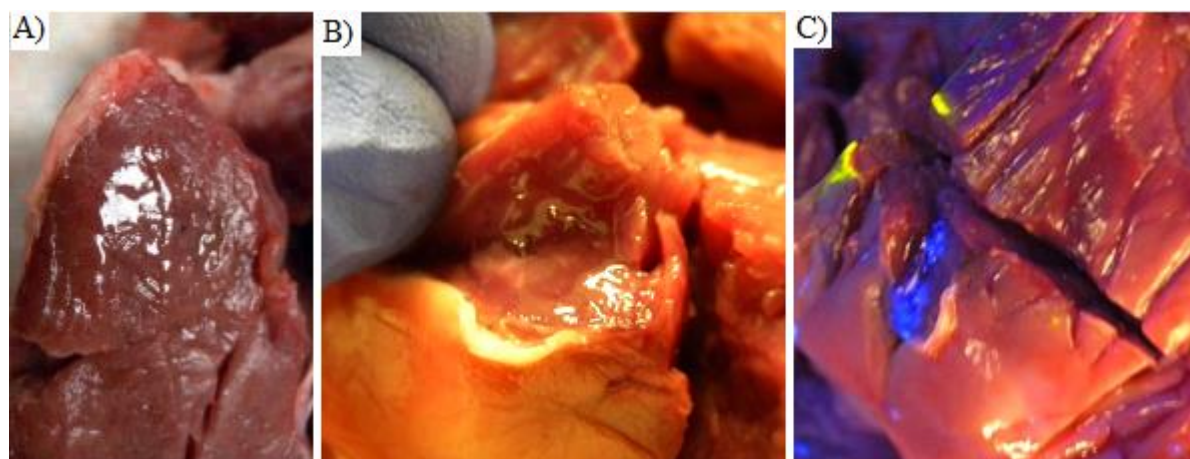
K detekci hydrogelu v tkáni lze využít různé typy barevných sloučenin. Podmínkou výběru je především kompatibilita s vybraným síťovacím systémem. Byly vybrány 2 běžně dostupná barviva Sirius Red a methylenová modř, které nemají signifikantní vliv na rychlost gelace a charakter vzniklého gelu na bázi enzymatického systému. Prekurzorový roztok obsahující Sirius Red byl aplikován do kuřecí svalové tkáně a následně proveden řez skalpelem (Obr. 106). Hydrogel je velmi dobře detekovatelný v dané tkáni, ale není vhodný pro tkáň srdeční vzhledem k barevné podobnosti s tkání. Dané barvivo bylo použito pro vizualizaci homogenity připravených hydrogelů (Obr. 109, Obr. 115). Methylenová modř byla využita pro detekci materiálu (gelu) ve SPREADS kapse (Obr. 114) v rámci preklinických studií.



Obr. 106 Místo po vpichu jehly v kuřecí tkáni (A). Zesítný hydrogel s obsahem barviva Sirius Red po rozříznutí tkáně skalpelem (B).

7.4.2 Dityramin

Vznikající dityramin během síťovací reakce (enzymatický systém) je možné detekovat pod UV lampou, jelikož se jedná o fluorofor. Na Obr. 107 je znázorněn vzniklý gel připravený *in situ*. Jako materiál byl zvolen HA-TA derivát (spec. A) o koncentraci roztoku 20 mg/ml s konečnou aktivitou HRP 0,24 U/ml a koncentrací H_2O_2 0,003 %. Jako testovací objekt byla zvolena prasečí srdeční tkáň. Na Obr. 107 A je vidět místo po vpichu jehly. Na Obr. 107 B je po rozříznutí tkáně skalpelem viditelný zesítný hydrogel. Poslední fotka Obr. 107 C znázorňuje hydrogel pod UV lampou. Nevýhodou je možnost detekce pouze hydrogelů s vyšším stupněm zesítnění. Málo zesítněné hydrogely či prekurzorové roztoky nelze detekovat.



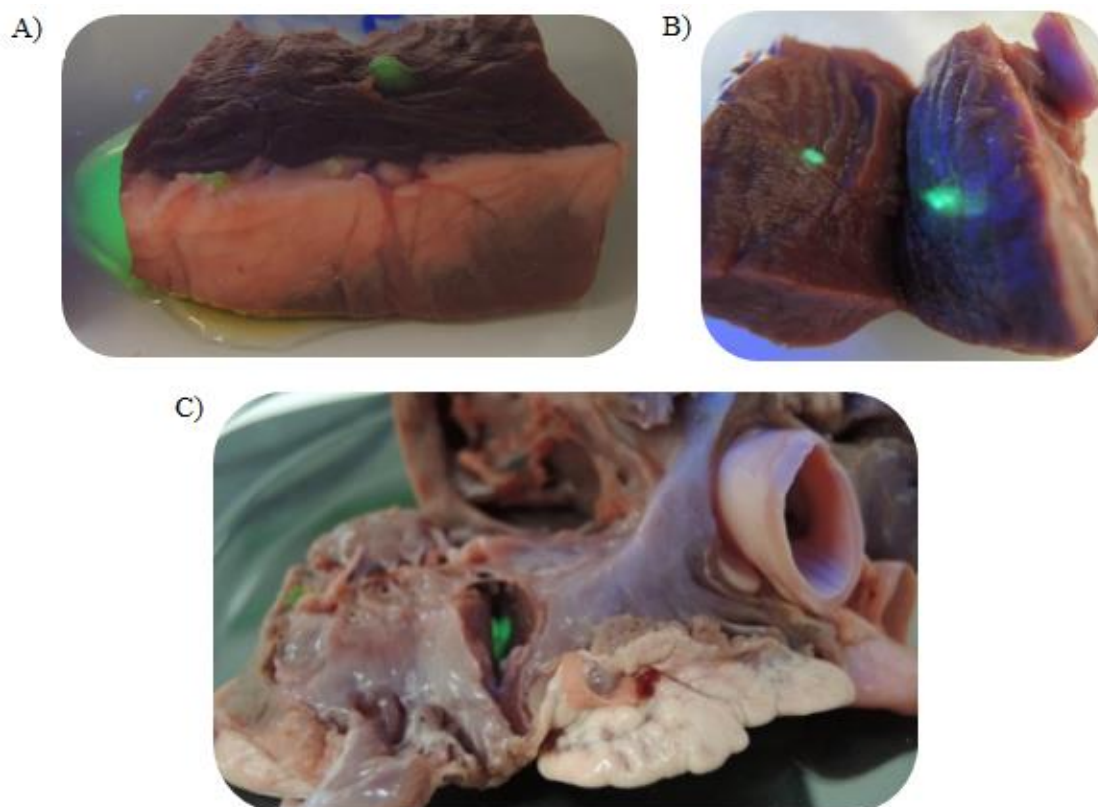
Obr. 107 Místo po vpichu jehly v srdeční tkáni (A). Zesítný hydrogel připravený *in situ* (B). Detekce hydrogelu pod UV lampou (C).

7.4.3 Fluorescenční derivát

Prekurzorové roztoky či hydrogely na bázi HA-PH-FITC je možné detekovat v tkáni, jelikož použitá fluorescenční značka FITC emituje záření při vlnové délce 519 nm působením viditelného světla (absorpční maximum při 495 nm), ale i při nižší vlnové délce (UV).

Enzymaticky zesítněné hydrogely byly připraveny pomocí HRP a H_2O_2 obdobně dle reakce uvedené v kapitole 6.2.2.2. Fluorescenčně značený derivát na bázi HA (HA-PH-FITC) byl syntetizován dle postupu uvedeném v kapitole 6.1.1.2.3. Intenzita fluorescence derivátu HA-PH-FITC je velmi vysoká, a proto byla v dané práci použita směs tyraminovaného derivátu HA-TA (95 % w/w, spec. A) a HA-PH-FITC (5 % w/w, spec. B), tedy HA-PH-FITC^{MIX}.

Vzorky na bázi HA-PH-FITC^{MIX} byly aplikovány pomocí jehly o velikosti 25 a 27 G do kadáveru (prasečí srdeční tkáň). Výhodou je možnost vizualizace i prekurzorových roztoků před gelací, a to uvnitř i vně tkáně. V případě hydrogelů s velmi pomalou gelací (> 60 s, Obr. 108 A) dochází k vytékání materiálu z místa aplikace. V případě gelů s rychlejší gelací (Obr. 108 B a C) byly vzorky po 60 s rozříznuty skalpelem a pomocí UV lampy vizualizovány hydrogely. V případě hydrogelu s velmi rychlou gelací (< 10 s, Obr. 108 B) zůstává materiál v místě v pichu, ale nedochází vůbec k jeho rozprostření. Na druhou stranu při využití derivátu s nízkou M_w s časem gelace 15–30 s, materiál nevytéká z tkáně, ale částečně difunduje tkání (Obr. 108 C).



Obr. 108 Detekce hydrogelu v tkáni. Hydrogel s pomalou gelací (> 60 s) (A), hydrogel s velmi rychlou gelací (< 10 s) (B), hydrogel s gelací (15–30 s) (C).

7.5 Kompatibilita vybraného materiálu s aplikačními zařízeními

Na základě dosažených výsledků (7.2.5, 7.3.2.3), byl pro testování použit derivát na bázi HA-PH-RGD^{MIX}, který lze zesílit enzymatickou reakcí pomocí enzymu HRP při přidavku peroxidu vodíku, a jenž podporuje viabilitu a adhezi buněk ADSC ve finální zvolené koncentraci 20 mil./ml hydrogelu (7.3.2.2.2).

Pro snadnou aplikovatelnost materiálu pomocí aplikačních zařízení byl zvolen derivát s nízkou molekulovou hmotností 60–90 kDa vykazující v koncentraci 20 mg/ml nízkou viskozitu prekurzorových roztoků (7.2.5.1). Dalším důležitým parametrem je gelační čas, který nesmí být příliš rychlý, aby nedošlo k ztuhnutí v aplikační části SPREADS zařízení či v jehle katetru, ale také příliš dlouhý, aby nedocházelo k vytékání materiálu z místa aplikace při použití katetru jako aplikačního zařízení. Aktivita HRP a koncentrace H₂O₂ byla proto zvolena u scaffoldu bez buněk 0,24 U/ml a 0,003 %. Při inkorporaci buněk ADSC v hustotě 20 mil. b./ml byl navýšen obsah síťovacích činidel (HRP 0,4 U/ml a H₂O₂ 0,005 %) pro zachování vhodné rychlosti gelace a charakteru gelu (7.3.2.3). Výsledky popisu charakteru finálního materiálu a jeho kompatibility s aplikačními zařízeními jsou uvedeny v daných publikacích [166, 167].

7.5.1 Aplikace materiálu pomocí katetru

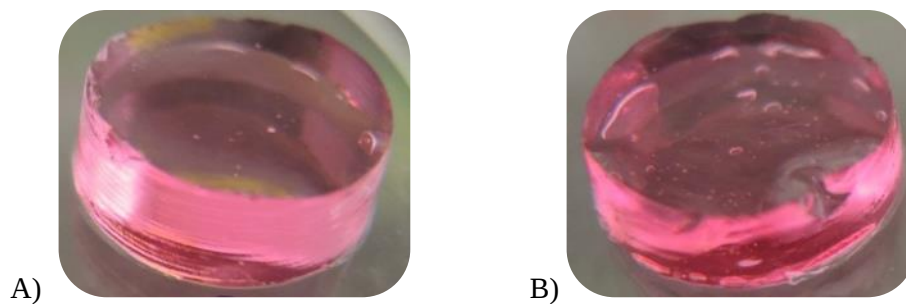
Pro možnou aplikaci daného materiálu do srdeční tkáně byl v rámci EU projektu AMCARE (FP7-NMP-2013-SME-7) partnery navržen speciální katetr AMCath s uzpůsobeným dávkováním vzorku popsany v uvedené publikaci [166]. Katetr délky 1,2 m je složen ze dvou přírodních hadiček s vnitřním průměrem 0,5 mm zakončených nástavcem mající *luer lock* pro možné napojení stříkaček, které obsahují prekurzorové roztoky HA-PH-RGD^{MIX} se síťovacími činidly a ADSC buňkami. Přírodní dvoucestná hadička vede do reservoáru o objemu 5 ml v koncové části katetru, kde dochází ke smísení dvou prekurzorových roztoků. Katetr je zakončen konickou jehlou s velmi malým vnitřním průměrem ($0,24 \pm 0,01$ mm). Katetr, vyjma úchytné části, je přes abdominální aortu zaveden do srdce, kde jsou aplikovány malé dávky materiálu (200 μ l) do srdeční stěny. Struktura nově navrženého katetru AMCath je ukázána v příloze 12.2.

7.5.1.1 Charakterizace hydrogelů připravených pomocí katetru

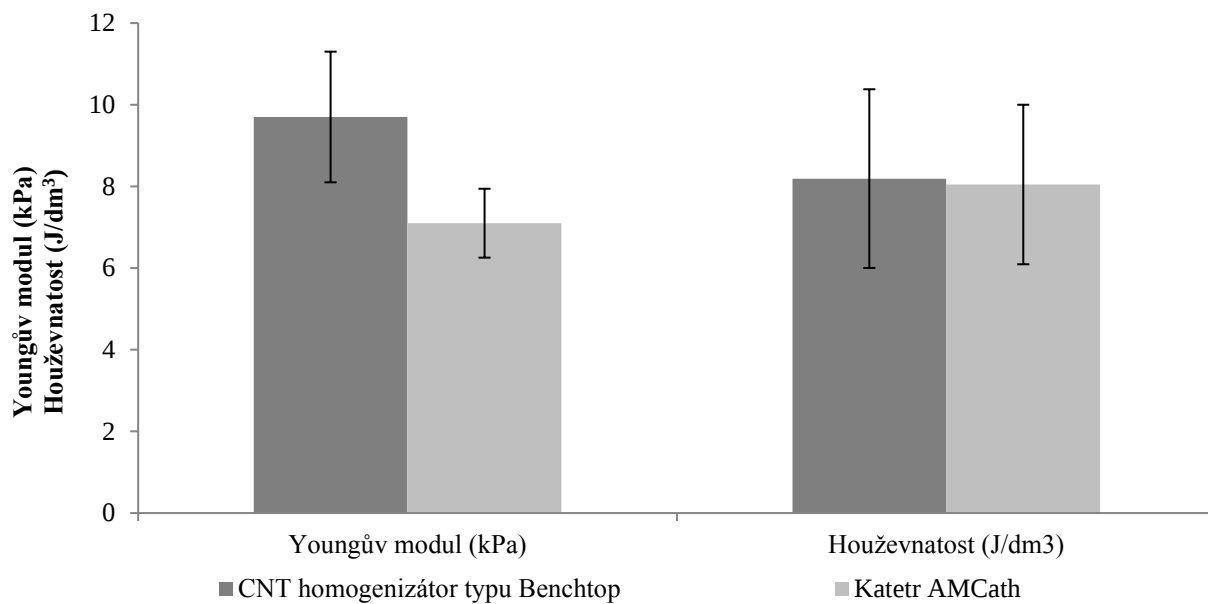
Byly porovnány vlastnosti hydrogelů připravených pomocí Contipro směšovače (6.2.3) a katetru AMCath. Koncentrace finálního materiálu HA-PH-RGD^{MIX} (1:1) byla 20 mg/ml v PBS (pH 7,4), koncentrace H₂O₂ 0,003 % a aktivita HRP 0,24 U/ml. Byly stanoveny viskoelastické a mechanické vlastnosti hydrogelů a stupeň nabotnění.

Homogenita připravených hydrogelů byla testována vizuálně pomocí barviva Sirius Red, která byla zamíchána do prekurzorového roztoku před jeho přípravou. Vizuálně nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi hydrogely připravenými pomocí homogenizátoru a katetru (Obr. 109).

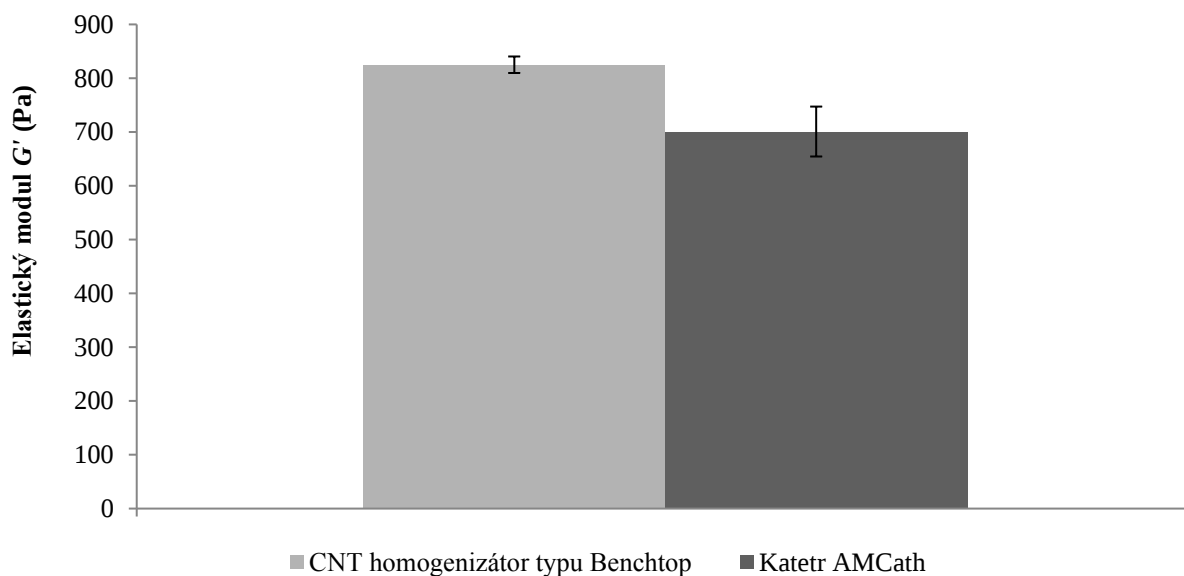
Na druhou stranu tuhost hydrogelů připravených pomocí standardního směšovače byla vyšší v porovnání s hydrogely připravenými pomocí katetru (Obr. 110, Obr. 111). Tuhost sítě byla určena stanovením elastického G' (viskózního modulu G'' , ztrátového úhlu δ) a Youngova modulu Y – pro hydrogel připravený směšovačem jsou hodnoty následové: $G' = 825$ Pa, $G'' = 3,2$ Pa, $\delta = 0,22^\circ$, $Y = 9,7$ kPa a pomocí katetru $G' = 701$ Pa, $G'' = 4,3$ Pa, $\delta = 0,36^\circ$, $Y = 7,7$ kPa se statistickým rozdílem pro G' $p = 0,0002$ a pro Y $p = 0,0077$. Stupeň nabotnění (Obr. 112) byl také vyšší u hydrogelů připravených pomocí katetru (52,5 % vs. 43,3 %, $p = 0,0077$), což koreluje s výsledky dosaženými při testování viskoelastických a mechanických vlastností. Rozdíl nebyl zaznamenán u houževnatosti stanovené podílem energie, potřebné k narušení hydrogelu, a objemu hydrogelu (0,35–0,45 ml).



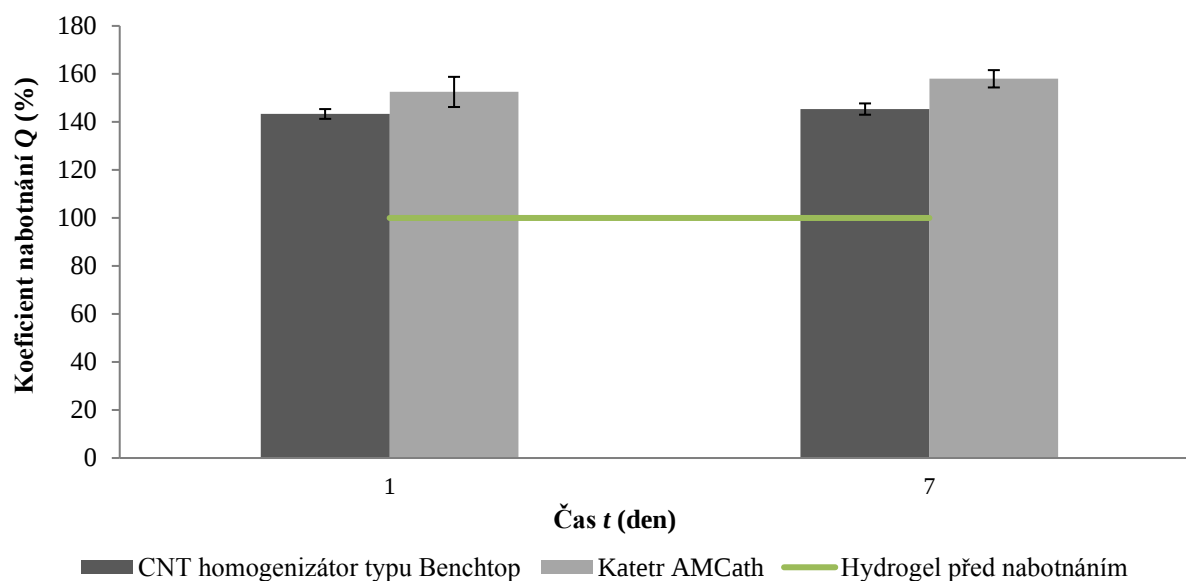
Obr. 109 Homogenita hydrogelů připravených pomocí Contipro homogenizátoru typu Benchtop (A) a katetru AMCath (B) vizuálně znázorněna pomocí přídatku barviva Sirius Red.



Obr. 110 Youngův modul a houževnatost hydrogelů připravených pomocí Contipro (CNT) homogenizátoru typu Benchtop a katetru AMCath.



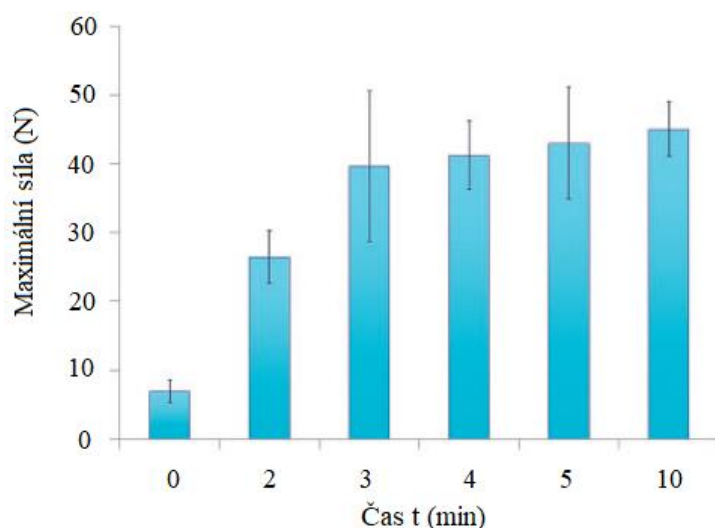
Obr. 111 Elastický modul hydrogelů připravených pomocí Contipro (CNT) homogenizátoru typu Benchtop a katetru AMCath.



Obr. 112 *Stupeň nabotnění Q hydrogelů připravených pomocí Contipro (CNT) homogenizátoru typu Benchtop a katetru AMCath.*

Již v rámci kapitoly 7.2.5.2 byla testována výtlačná síla u dvou typů derivátů HA-PH-RGD^{MIX} s různou M_w a dvou typů jehel (25 G a 27 G) se srovnatelným vnitřním průměrem, jako je u jehly zakončující katetr. Výtlačná i maximální síla byla nižší u hydrogelu na bázi derivátu s nízkou M_w (60–90 kDa) spec. A, která je i finální specifikací.

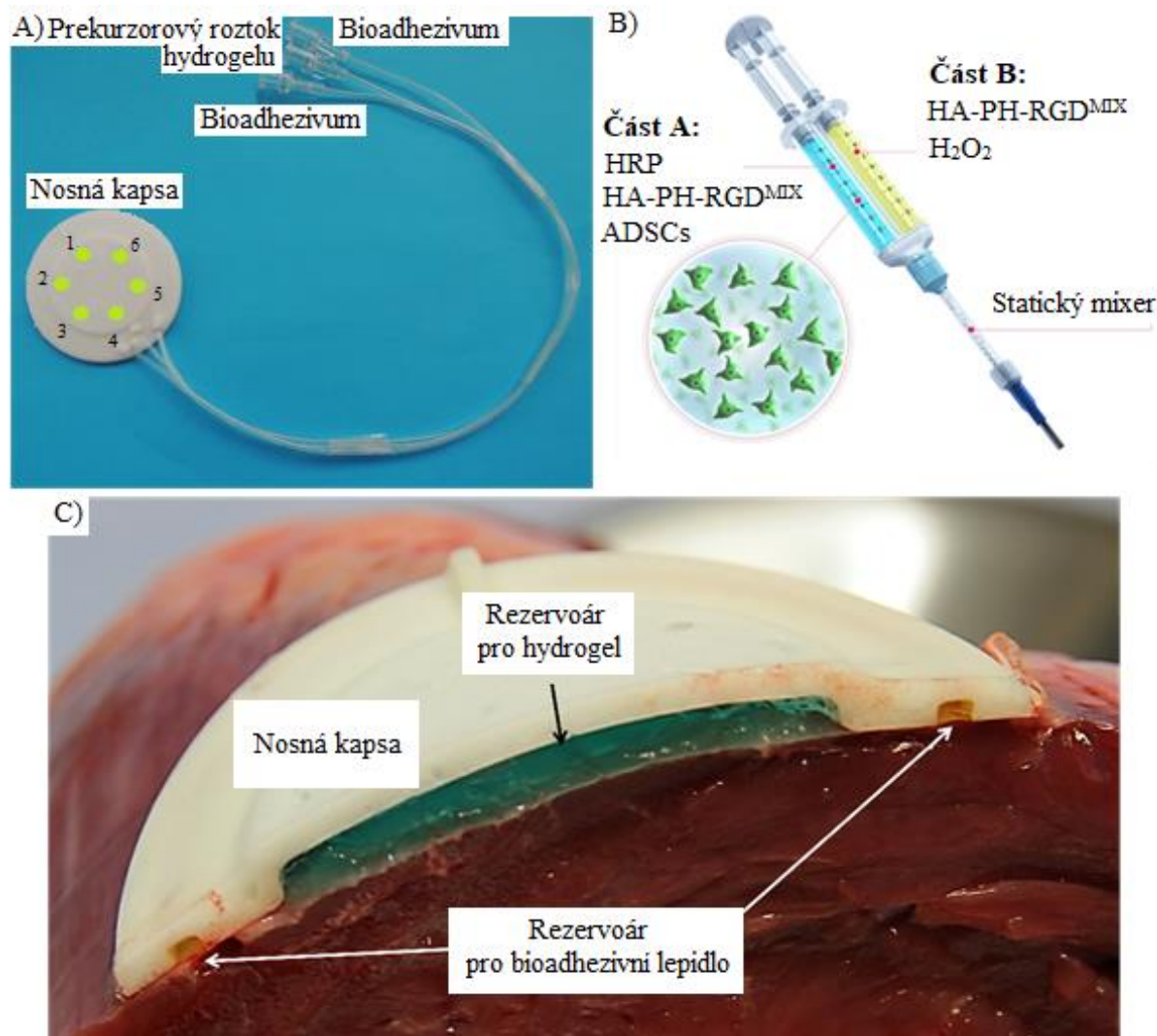
Pro snadnou aplikovatelnost *in vivo* je důležité stanovení maximální síly potřebné pro extruzi materiálu při stlačení stříkaček spojených s katetrem. Obecně je maximální vhodná síla pro stlačení mužem 70 N a ženou 50 N. Byla stanovena maximální síla pro extruzi finálního materiálu pomocí AMCath katetru v průběhu gelačního procesu. Během gelace dochází k nárůstu maximální síly, ale ta nepřesahuje hodnotu 50 N (Obr. 113) [166].



Obr. 113 *Závislost maximální síly na čase při extruzi finálního materiálu pomocí katetru během gelačního procesu [166].*

7.5.2 Aplikace materiálu pomocí SPREADS zařízení

SPREADS je speciální aplikační zařízení, které bylo vyvinuto společností AdjuCor GmbH (<https://www.adjuco.com/>). Je složeno z nosné kapsy (*substance carrier*) a 3 přívodních hadiček (*supply line*) – jedna pro aplikaci hydrogelového prekurzorového roztoku do rezervoáru ve středu kapsy a dvou hadiček pro dopravení bioadheziva do rezervoáru nacházející se po obvodu kapsy. Spodní část nosné kapsy je tvořena biodegradabilní polopropustnou membránou (Obr. 114) [167, 169].

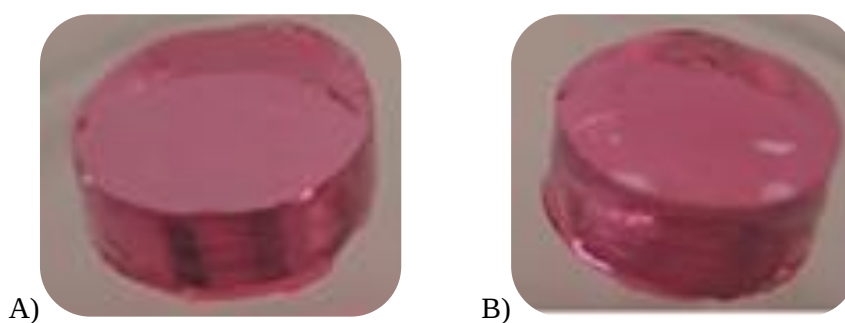


Obr. 114 Zařízení SPREADS je složeno z nosné kapsy a aplikačních hadiček (A) a směšovače pro přípravu homogenního roztoku (B). Ukázka řezu nosné kapsy aplikované na prasečím kadáveru obsahující hydrogel obarvený methylenovou modří (C) [167].

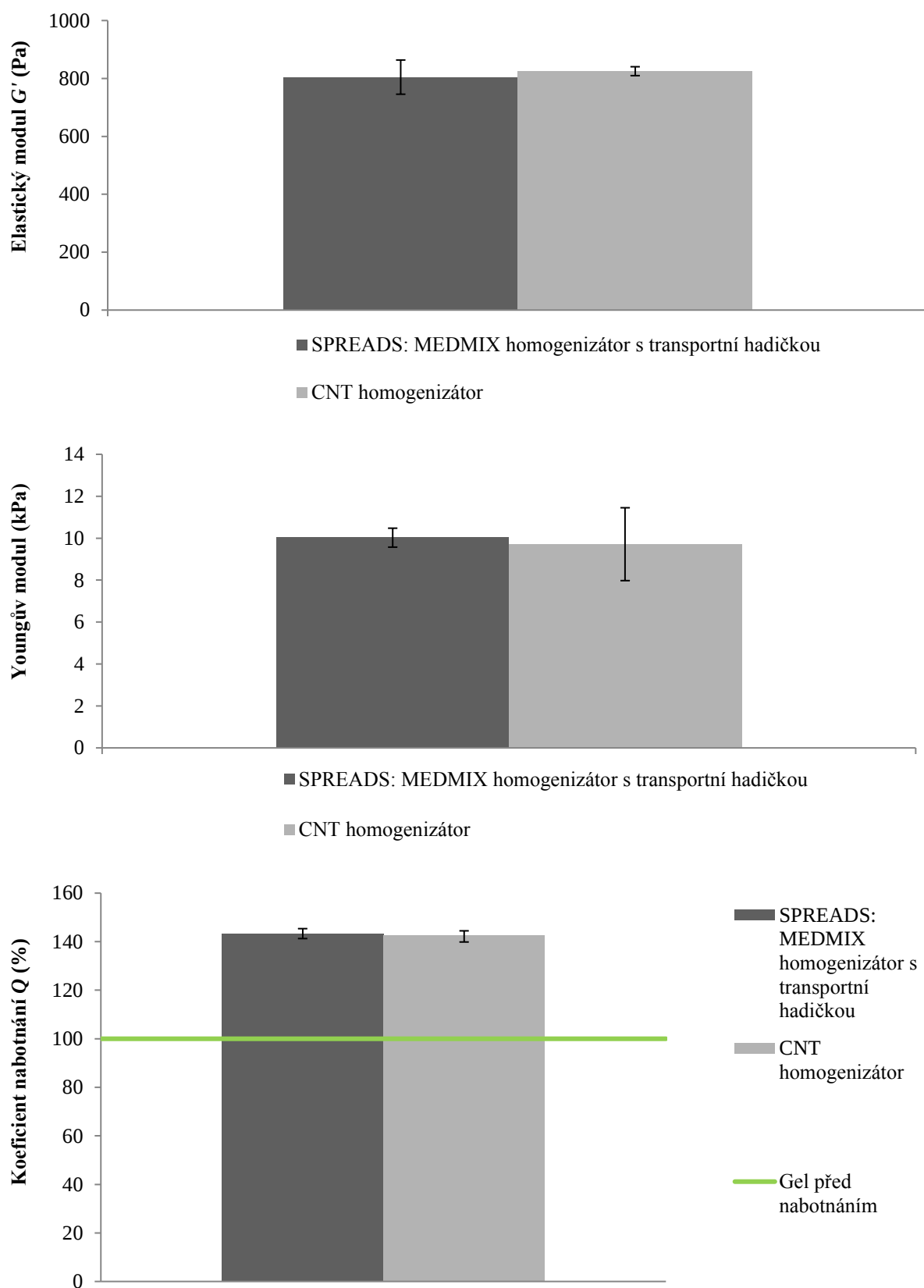
7.5.2.1 Charakterizace hydrogelů připravených pomocí aplikační části zařízení SPREADS

Pro smísení prekurzorových roztoků byl použit směšovač zakoupený od společnosti MEDMIX (<https://www.medmix.ch/>). Byly porovnány vlastnosti hydrogelů připravené tímto směšovačem s transportní hadičkou vedoucí do nosné kapsy SPREADS zařízení (Obr. 114) a Contipro (CNT) homogenizátorem typu Benchtop (6.2.3), který byl použit při předchozím testování hydrogelových vlastností.

Finální prekurzorový roztok byl zvolen na bázi HA-PH-RGD^{MIX} s nízkou molekulovou hmotností (60-90 kDa) a koncentrací roztoku (20 mg/ml) zachovávající si velmi nízkou viskozitu kvůli snadné aplikovatelnosti. Koncentrace síťovacích činidel byla volena, aby nedošlo k zatuhnutí směsi v přívodné hadičce a došlo k dostatečnému rozprostření materiálu v nosné kapse (H_2O_2 0,003 %, HRP 0,24 U/ml) zaručující homogenní distribuci buněk. Homogenita připravených hydrogelů byla testována vizuálně pomocí barviva Sirius Red, která byla zamíchána do prekurzorového roztoku před jeho přípravou. Vizuálně nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi připravenými hydrogely pomocí Contipro a MEDMIX homogenizátory (Obr. 115), což bylo potvrzeno srovnatelnými hodnotami elastického a Youngova modulu a koeficientu nabobtnání (Obr. 116). Pro hydrogel připravený Contipro směšovačem byly stanoveny hodnoty: $G' = 825$ Pa, $G'' = 3,2$ Pa, $\delta = 0,20^\circ$, $Y = 9,7$ kPa a pomocí MEDMIX směšovače s přívodnou hadičkou: $G' = 805$ Pa, $G'' = 2,8$ Pa, $\delta = 0,22^\circ$, $Y = 7,7$ kPa se statistickým rozdílem pro $G' p = 0,0002$ a pro $Y p = 0,0077$.



Obr. 115 Homogenita hydrogelů připravených pomocí Contipro (CNT) homogenizátoru typu Benchtop (A) a MEDMIX homogenizátoru s transportní hadičkou (B) vizuálně znázorněna pomocí přidavku barviva Sirius Red.



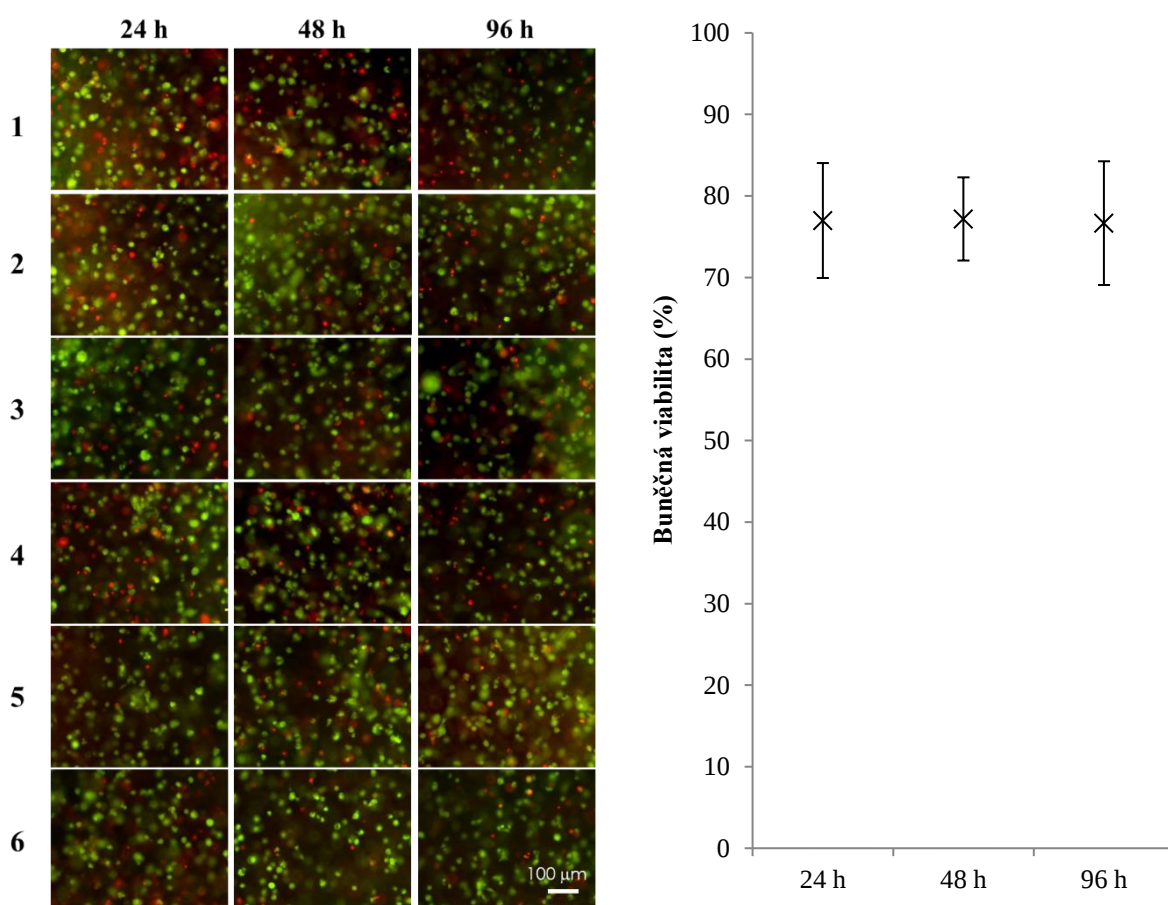
Obr. 116 Hydrogely připravené pomocí Contipro (CNT) homogenizátoru typu Benchtop a MEDMIX homogenizátoru s transportní hadičkou. Elastický (A), Youngův modul (B) a koeficient nabotnění (C) hydrogelů na bázi HA-PH-RGD^{MIX} (20 mg/ml, PBS pH 7,4, H₂O₂ 0,003 %, HRP 0,24 U/ml).

7.5.2.2 Homogenní distribuce buněk v SPREADS zařízení

Byla zjišťována homogenní distribuce a viabilita buněk v hydrogelu injektovaném do nosné kapsy aplikačního zařízení SPREADS. Buňky ADSC byly enkapsulovány do HA-PH-RGD^{MIX} hydrogelu v koncentraci 20 mil. b./ml. Obsah síťovacích činidel byl kvůli přítomnosti buněk navýšen na koncentraci H₂O₂ 0,005 % a aktivitu HRP 0,4 U/ml.

Stříkačky s hydrogelovými prekurzorovými roztoky byly připevněny pomocí *luer lock* zakončení k SPREADS zařízení a plynule stlačovány, čímž vznikl pomocí směšovače hydrogelový prekurzorový roztok. Díky vytvořenému aplikačnímu oknu danému rychlostí gelace (nad 15 sekund), dochází k jeho zatuhnutí po průchodu přívodní hadičkou a rozprostření v nosné kapse (Obr. 114).

Po 15 minutách od přípravy hydrogelu byly vzorky vyřezány z nosné kapsy v 6 různých místech dle Obr. 114-A pomocí nástavce na biopsii (5 mm *biopsy punch*). Každý vzorek (výřez hydrogelu) byl vložen odděleně do 6-jamkového kultivačního panelu a vzorky byly kultivovány při 37 °C s 5 % CO₂. Distribuce a viabilita buněk ve vzorcích byla detekována po 24, 48 a 96 hodinách (Obr. 117).



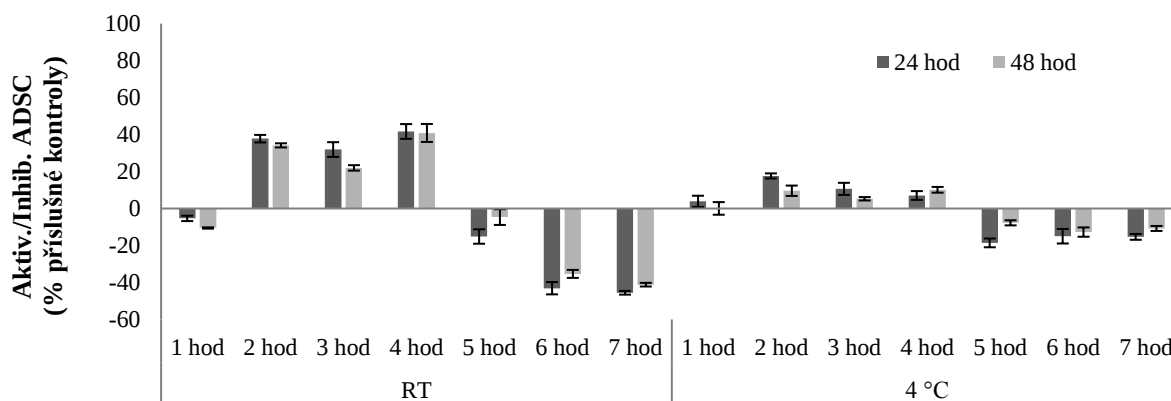
Obr. 117 Distribuce buněk v hydrogelu odebraného z různých částí nosné kapsy SPREADS zařízení (1-6). Barvení Live/Dead – živé buňky (zelené) a mrtvé buněčné jádro (červené). Viabilita buněk vyjádřena v procentech v grafu, detekována po 24, 48 a 96 hodinách ($n = 6$).

7.6 Preklinická studie

V rámci preklinické studie byl vyvinut model pro simulaci infarktu myokardu společností Explora Biotech (projekt AM CARE, <https://www.explora-biotech.com/>). Testování aplikačních zařízení *in vivo* (AMCath/SPREADS zařízení) na modelu prasete s finálním materiálem bylo úspěšné. Dále proběhlo testování terapeutického efektu na modelu velkého zvířete. Preklinické studie jsou popsány v uvedených publikacích [166, 167].

7.6.1 Viabilita buněk v prekurzorovém roztoku HA-PH-RGD^{MIX}

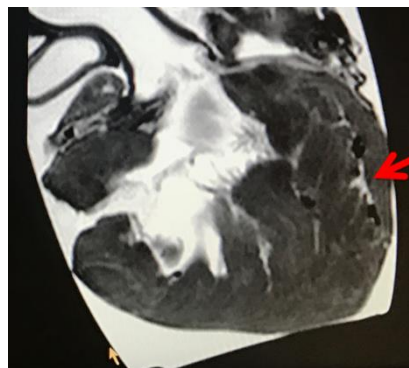
Operace myokardu, ať už za použití katetru či SPREADS zařízení, je několikahodinový proces, během kterého může dojít k tomu, že předem připravená suspenze buněk zůstane před vlastní aplikací ve směsi s roztokem A (HA-PH-RGD^{MIX} v PBS pH 7,4 obsahující mimo jiné HRP). Proto je nutné stanovit dobu, po jakou může být takováto směs uchována, aniž by byla narušena viabilita buněk. 40 miliónů ADSC buněk bylo obsaženo v 1 ml prekurzorového roztoku A. Směs byla uchovávána po dobu až 7 hodin při laboratorní teplotě (RT) a při snížené teplotě v lednici a v hodinových intervalech byly ze směsi odebrány vzorky. Tyto vzorky byly po zředění kultivačním médiem nasazeny na kultivační panel. Viabilita buněk byla stanovena po 24 a 48 h. Viabilita ADSC není ovlivněna po dobu 4 hodin při inkubaci v roztoku HA-PH-RGD^{MIX} + HRP, ať už při RT či při snížené teplotě (2–10 °C). Poté signifikantně klesá viabilita buněk ($p < 0.05$), ale v případě uchování v lednici nedochází k poklesu o 30 % vůči kontrole po dobu 7 hodin (Obr. 118).



Obr. 118 Viabilita buněk ADSC po inkubaci 1–7 hod v prekurzorovém roztoku HA-PH-RGD^{MIX} + HRP vyjádřena v % růstu kontrolních buněk.

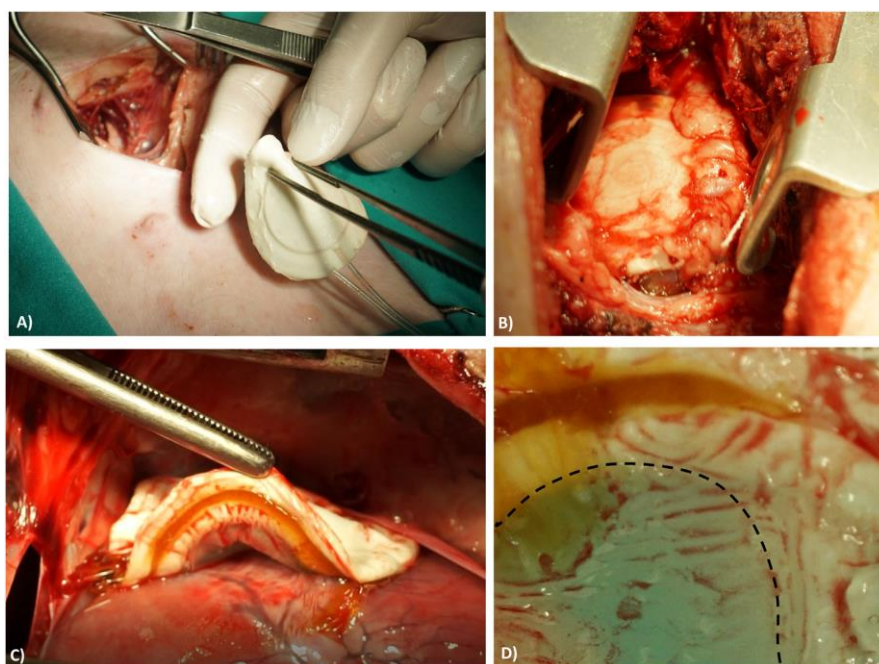
7.6.2 Aplikovatelnost materiálu *in vivo*

Proveditelnost aplikace pomocí katetru byla testována na modelu velkého zvířete – prasete (90 kg, Landrace, samice), (Ethics approval No.904/2015-PR). Katetr byl zaveden přes abdominální aortu, aortální arch a následně do levé srdeční komory (LV). Stříkačky obsahující prekurzorové roztoky byly připevněny k homogenizátoru a postupným stlačováním obou stříkaček byl roztok aplikován do daného místa v rámci několikanásobné dávky malého objemu (200 ul/12 s). Po 30 sekundách byla konická jehla přesunuta do dalšího místa aplikace. Celkem byly provedeny 3 vpichy. Po 20 minutách od posledního aplikovaného vzorku byly subjekty usmrceny. Přítomnost hydrogelu uvnitř stěny LV byla potvrzena vizuálně a MRI analýzou (Obr. 119) [166].



Obr. 119 MRI analýza injektovaného hydrogelu v srdeční tkáni pomocí AMCath [166].

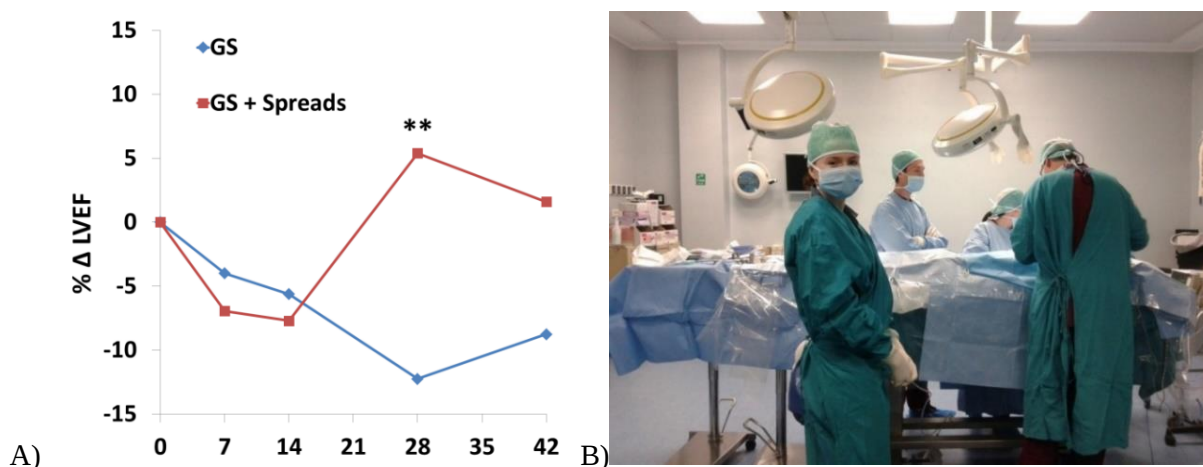
Implantace SPREADS zařízení i s aplikací materiálu a gelací proběhla úspěšně. SPREADS zařízení bylo implantováno na srdeční stěnu pomocí adhesiva aplikovaného do okrajových částí aplikačního zařízení. Uchycení proběhlo úspěšně. Nadávkování prekursorového roztoku a gelace materiálu v nosné kapse byla bezproblémová a viditelná, jelikož hydrogel byl obarven methylenovou modří (Obr. 120) [167].



Obr. 120 Implantace minimálně invazivního SPREADS zařízení s inkorporovaným hydrogelem a ADSC buňkami (A). Umístění nosné kapsy (B), kontrola uchycení po 1 hodině po implantaci (C) a kontrola přítomnosti a umístění hydrogelu v nosné kapse (n = 4 zvířata) [167].

7.6.3 Terapeutický efekt

Testování proběhlo na 36 miniprasatech (~40 kg, Landrace, samice) rozčleněných do 6 skupin. *In vivo* studie byla započata stimulací infarktu myokardu zavedením katetru s implantovaným balónkem. Po 14 dnech byla provedena implantace SPREADS zařízení a aplikace materiálu pomocí katetru. U žádného testovaného subjektu nedošlo k nežádoucí reakci. Následně po 7 dnech od provedení zákroku (21. den) bylo zjištěno signifikantní zlepšení LVEF (%) u subjektů, kterým byl aplikován SPREADS s hydrogelem bez a s ADSC buňkami oproti kontrole (*gold standard*) (Obr. 121) [167, 169].



Obr. 121 Porovnání LVEF (%) u materiálu SPREADS bez a s buňkami oproti kontrole (A) [167, 169]. Ukázka aplikace SPREADS zařízení s obsahem hydrogelu a ADSC buněk (B).

8 DISKUZE

Kardiovaskulární nemoci, mezi něž patří i infarkt myokardu, jsou světově příčinou vysoké morbidity a mortality. Přestože náklady na léčbu jsou velmi vysoké, neexistuje v současnosti léčba zahrnující i regeneraci srdeční tkáně a vzniklá jizva po infarktu myokardu zůstává.

Ischemie je obvykle způsobena náhlým zúžením či uzavřením koronární tepny, následně vedoucí k ireverzibilnímu poškození kardiomyocytů. Dosavadní léčba je zaměřena především na obnovení průtoku krve, kdy je indikována p-PCI (primární perkutánní koronární intervence) léčba implantací stentu obvykle po predilataci balonkovým katetrem a celkové zachování srdeční funkce pomocí medikamentů [112, 113].

Za účelem regenerace vzniklé jizvy po infarktu myokardu se regenerativní medicína ubírá směrem k využití kmenových buněk [115, 124]. Jako slibné se ukazují i výsledky v rámci preklinických studií. Na druhou stranu retence buněk v místě aplikace je nízká a také buňky nezůstávají viabilní obvykle déle než 24 hodin. Jednou z možností prodloužení setrvání buněk v místě aplikace a zlepšení jejich viability je využití hydrogelové matrice sloužící jako matrix pro inkorporaci buněk [134]. Tato forma se vyznačuje značnou hydrofilitou a strukturní podobností s extracelulární matrix. Volba hydrogelové sítě pro danou aplikaci ve srovnání s ostatními scaffoldy (nano/mikrovláknenné matrice či např. PP houbičky) tkví také v možnosti aplikace materiálu např. pomocí katetru.

Existuje nepřeberné množství materiálů ať už syntetického nebo přírodního původu pro přípravu daného matrixu. Kyselina hyaluronová je lineární polysacharid nacházející se v pojivové, epiteliální či nervové tkáni obratlovců. Díky její přirozené biokompatibilitě, biodegradabilitě je využívána v mnoha medicínských aplikacích. Degradace nativní HA a materiálu z ní připravených (roztoky, fyzikální gely) je v lidském těle velmi rychlá díky přítomným hyaluronidázám, popř. působením ROS. Na druhou stranu vhodnou modifikací struktury můžeme získat materiály s výrazně výhodnějšími vlastnosti pro daný účel [47, 48, 49]. Jedním ze způsobů je příprava hydrogelů odvozených od kovalentně zesíťovaných derivátů HA. Takové materiály vykazují výrazně delší biologický poločas a vyšší odolnost proti mechanickému namáhání, takže *in vivo* mohou plnit funkci podpůrné struktury pro růst buněk po delší dobu. Zejména výhodné jsou hydrogely vznikající zesíťováním původně lineárních molekul modifikované HA v přítomnosti buněk či přímo ve tkáni příjemce (*in situ*). Takové hydrogely jsou ideální jednak pro enkapsulaci buněk a dále roztoky, ze kterých gely v místě aplikace vznikají, mohou vykazovat lepší reologické vlastnosti (zejména nižší viskozitu) než předem zesíťované hydrogely, což usnadňuje jejich injekční podání, či využití dalších aplikačních nástrojů (např. katetrů).

V současnosti jsou hojně používány katetry i v rámci regenerace tkáně po infarktu myokardu. V této práci byl využit speciálně navržený katetr s rezervoárem popsáný v kapitole 7.5.1 a uvedené publikaci [166]. Druhé použité aplikační zařízení v daném práci byl SPREADS složený z aplikační části, která je spojena s nosnou kapsou, jež je vyplněna hydrogelem obsahující buňky a na okrajích bioadhezivem pro uchycení zařízení na srdeční stěně (7.5.2) [167].

Tuhé hydrogely nelze aplikovat katetrem a jehlou s malým průměrem a pouze hydrogely s velmi nízkým stupněm zesíťování, s elastickým modulem v desítkách Pa, jsou aplikačně vhodné. Degradace hydrogelů s nízkým stupněm zesíťování je obecně mnohem rychlejší v porovnání s hydrogely s vyšším stupněm zesíťování. Navíc u tohoto typu nemusí docházet k rozprostření materiálu v tkáni a případná vytvořená sraženina („hrudka“) gelu nese riziko opouzdření v srdečním svaly či případně může mechanicky uzavřít tepnu a způsobit zástavu krevního zásobování srdce vedoucí opět k infarktu myokardu.

Druhou možností a předmětem této práce je *in situ* aplikace, kterou lze realizovat mimo jiné hydrogely na bázi oxidované formy kyseliny hyaluronové (HA-Ox, 7.1) a hydroxyfenyl derivátů kyseliny hyaluronové (HA-TA, HA-PH-RGD, HA-TA-RGD 7.2). Možnost *in situ* aplikovatelnosti je velmi důležitá, pokud chceme využít katetru či nově vyvinutého zařízení SPREADS jako aplikačního zařízení.

Je nutné zachovat nízkou viskozitu, jelikož průměr jehly zakončující katetr je velmi malý, optimálně 27 G. *In situ* gelace umožňuje docílit nízké viskozity materiálu při jeho průchodu katetrem danou pouze viskozitou prekurzorových roztoků. K prudkému nárůstu viskozity dochází v místě aplikace či částečně v přizpůsobeném rezervoáru umístěném na konci katetru. Dále je velmi důležitá rychlost gelace, která musí být dostatečně rychlá, aby došlo ke zgelování pouze v místě aplikace. Na druhou stranu příliš rychlá gelace nemusí přinést dobrou integraci materiálu do tkáně, jelikož se materiál vhodně nerozprostře a může docházet ke gelaci v aplikátoru.

V první části diskuze jsou popsány různé hydrogelové matrice lišící se materiálem, z nichž jsou připraveny. V dané práci je využita oxidovaná forma kyseliny hyaluronové neboli formyl hyaluronát (HA-Ox) a hydroxyfenyl (tyraminovaný) derivát HA-TA samotný či navázanou RGD sekvencí (HA-PH-RGD). Dále je diskutována adheze a inkorporace buněk a také možnosti detekce gelů a prekurzorových roztoků v tkáni. V neposlední řadě byla testována kompatibilita vybraného finálního materiálu s aplikačním zařízením – katetrem AMCath a SPREADS. Diskuze je zakončena krátkým shrnutím preklinické studie.

8.1 Hydrogely na bázi oxidované formy HA

K zesítnění oxidované formy HA (HA-Ox derivátu) může dojít za interakce s alkoxyaminy či hydrazidy [105, 106, 168]. V dané práci byl jako představitel vybrán dvouvazný alkoxyamin POA se 3mi uhlíky (O,O'-1,3-propandiylbishydroxylamin dihydrochlorid) umožňující zesítnění *in situ*. Charakter gelu lze regulovat mnoha faktory, jako je pH, teplota, iontová síla, parametry derivátu (molekulovou hmotností, stupněm substituce), koncentrace prekurzorového roztoku HA-Ox a v neposlední řadě koncentrací síťovacího činidla POA (7.1). Danou reakcí lze připravit hydrogely od nízkého po vyšší stupeň zesítnění (Obr. 43).

Daný alkoxyamin POA je hydrochlorid. Vzhledem k obsahu kyseliny chlorovodíkové v samotné surovině POA, dosahuje připravený roztok POA v solventech bez pufrací kapacity (např. DEMI, 0,9% roztok NaCl) nízkých hodnot pH. Dokonce pufrací kapacita např. fosfátového pufru PBS (pH 7,4) není dostatečná pro dosažení neutrálního pH roztoku. Titrace roztoku POA a stanovení přídatku hydroxidu sodného pro 3 různé šarže POA je uvedeno v kapitole 7.1.2, kde je určen bod ekvivalence pomocí křivky druhé derivace titrační křivky (Obr. 44), čímž byl standardizován postup přípravy roztoku POA titrací roztokem hydroxidu sodného.

Pro případné klinické využití produktu je důležitá mimo jiné stabilita prekurzorových roztoků. Stabilita roztoku POA byla ověřována v průběhu 1 roku testováním rychlosti gelace v kombinaci s HA-Ox derivátem. Roztok POA byl uchováván v lednici při kontrolované teplotě 2–10 °C (7.1.3). Po 1 roce nedochází ke zpomalení reakce a čas gelace zůstává v rámci směrodatné odchylky stejný v obou uvedených rozpouštědlech (Obr. 45). Také bez možné opakovatelnosti přípravy vzorků není možná využitelnost daného systému. Proto byly připraveny 6krát za sebou vzorky HA-Ox/POA a stanovena kinetika gelace (Obr. 48). Prokázala se vyhovující reprodukovatelnost výsledků (7.1.5).

Pro možnost injekčního podání či využití katetru při aplikaci materiálů je důležitým parametrem viskozita výchozího roztoku HA-Ox. S rostoucí smykovou rychlostí dochází k poklesu zdánlivé viskozity (Obr. 46). Tento fakt vychází z podstaty těchto polymerních roztoků, které patří mezi newtonské kapaliny a jejich viskozita roztoku závisí na smykové rychlosti. U velmi nízkých koncentrací polymeru a jeho velmi nízké molekulové hmotnosti je i viskozita velmi nízká a její hodnota se s rostoucí smykovou rychlostí v měřeném rozsahu téměř nemění (Obr. 46). Pro snadnou aplikaci materiálu pomocí katetru či jiného aplikačního zařízení je nutné zachovat nižší viskozitu roztoku HA-Ox. Tu lze ovlivnit především koncentrací výchozího roztoku a molekulovou hmotností HA-Ox derivátu. V kapitole 7.1.4 je ukázán vliv molekulové hmotnosti, kde dle předpokladu s rostoucí M_w narůstá i hodnota viskozity při dané smykové rychlosti (Obr. 47). Z tohoto pohledu není výhodné pro

roztoky o koncentraci 20 mg/ml využití derivátů specifikace C a D, tedy s molekulovou hmotností nad 400 kDa.

Stanovení času gelace je podstatným aspektem této aplikace. Lze jej stanovit ze závislosti elastického a viskózního modulu na čase. Během síťovací reakce roste viskozita vzorku a hodnota elastického modulu. V čase známém jako *cross-over point* dochází k vyrovnání hodnot obou modulů a dále už převyšuje modul elastický. Ke konci reakce elastický modul dosahuje rovnovážných hodnot. Při pomalé gelaci dochází k tomuto bodu „dozrání“ hydrogelu po dlouhé době v rámci hodin a nelze jej z praktických důvodů stanovit měřením kinetiky gelace. Zrání hydrogelu na bázi HA-Ox bylo stanoveno v kapitole 7.1.9. Elastický modul G' byl určen u již připravených hydrogelů a to v časových bodech od počátku přípravy hydrogelu (3, 6, 24 a 48 hodin). V grafech (Obr. 52, Obr. 53) je vidět signifikantní vliv pH na rychlost dozrávání hydrogelu. Při pH 5 a 6 se již elastický modul po 3 hodinách nemění u obou specifikací derivátu A a B (M_w 60–90 kDa resp. 240–360 kDa) a všech zvolených koncentrací síťovacího činidla POA (0,4; 0,2; 0,1; 0,05 mg/ml). Naproti tomu je vidět velmi pomalé dozrávání hydrogelů při pH 7, kdy i v případě poměru vazných skupin $NH_2:CHO$ 1:1 dosahuje elastický modul rovnovážných hodnot až po 24 hodinách od počátku přípravy hydrogelu (Obr. 52, Obr. 53).

Vliv pH na dozrávání gelů koreluje s výsledky dosaženými při stanovení kinetiky gelace (7.1.6.). S rostoucím pH dochází k prodloužení času gelace a snížení elastického modulu G' , který byl odečten ve 3 minutách od počátku gelace (Obr. 49). Daná reakce není výhodná za vyššího pH, kdy se gelace prodlužuje či k ní nedochází vůbec. Avšak roztok s příliš nízkým pH (5) nelze použít kvůli samotné biokompatibilitě s tkání a také kvůli viabilitě inkorporovaných buněk. Volba pH 6 je kompromisem mezi pH blízké fyziologickému a optimální rychlostí gelace.

Obdobně byl zjištěn znatelný vliv iontové síly na rychlost gelace (7.1.7.). S rostoucí iontovou silou dochází k urychlení gelace (Obr. 50). Na druhou stranu nelze ani v tomto případě využít příliš vysokou či nízkou iontovou sílu kvůli viabilitě buněk. Ideální je využití fyziologického roztoku 0,15 M NaCl (0,9% roztok NaCl) či fosfátového pufru PBS, obecněji roztok isotonický, tj. se srovnatelnou osmolaritou (308 mOsmol/l) s krevní plazmou.

Variabilita pH a iontové síly je omezena *in vivo* aplikací, což platí i pro zvolenou teplotu, která je určena teplotou lidského těla v případě využití katetru a teplotou RT v případě využití zařízení SPREADS, kdy hydrogel může být aplikován do vnitřního prostoru kapsy před či po implantaci zařízení na srdeční tkáň. V kapitole 7.1.8 je ukázán vliv teploty na rychlost gelace. S rostoucí teplotou (25–37 °C) dochází ke zpomalení gelace a poklesu elastického modulu odečteného ve 3 minutách od počátku gelace (Obr. 51). U enzymatické reakce HA-TA derivátu s HRP v přítomnosti H_2O_2 dochází k opačnému jevu, tedy k urychlení gelace s teplotou, spojeného s posunem reakční rovnováhy směrem k produktu. Opačný vliv teploty u reakce HA-Ox/POA pravděpodobně souvisí s poklesem viskozity prekurzorového roztoku HA-Ox a vlivem teploty na elastický a viskózní modul, jejichž nárůst je teplotou zpomalen.

Nejrychlejší gelace dosahuje systém při koncentraci POA, kdy počet amino skupin daného síťovadla se rovnají počtu hydroxyskupin makromolekuly HA-Ox. Zároveň při této koncentraci vzniklé hydrogely dosahují nejvyšších hodnot elastického modulu (Obr. 53, Obr. 54). Se snižující se koncentrací POA (od koncentrace POA odpovídající poměru skupin $NH_2:CHO$ 1:1) dochází ke snížení stupně zesítnění, což lze vidět na hodnotě elastického modulu, který postupně klesá (Obr. 54), naproti tomu roste stupeň nabotnění (Obr. 58). Při navýšení koncentrace POA nad koncentraci odpovídající 1:1 dochází ke skokovému poklesu tuhosti sítě – Youngova modulu (Obr. 55). Pravděpodobně u některých molekul POA dochází k navázání pouze jedním vazným místem a druhá amino skupina zůstává nenavázána, tím nedochází k vytvoření sítě vůbec anebo jen s některými molekulami POA.

Dále byl sledován vliv molekulové hmotnosti HA-Ox a koncentrace prekurzorového roztoku na charakter gelu. Dle předpokladu s rostoucí hodnotou těchto faktorů roste i stupeň zesítnění, který byl prokázán na základě vyšších hodnot elastického modulu při vyšší koncentraci roztoku (Obr. 56) či

molekulové hmotnosti (Obr. 57). U derivátů s vyšší molekulovou hmotností a při dostatečné koncentraci (koncentrace překryvu) dochází ke ztuhlání řetězců mezi sebou. Tyto vzniklé zapleteniny jsou fyzikálního původu, tedy slabší a vratné ve srovnání s kovalentní vazbou. Na druhou stranu, pokud jsou řetězce navíc spojeny kovalentně mezi sebou, tak mohou zapleteniny přinášet do systému znatelný efekt a tím zvyšovat tuhost sítě. Při vyšší koncentraci polymeru získáme více vazných míst pro samotné zesílení řetězců, stupeň zesílení narůstá, čímž roste elastický modul (Obr. 56). Na druhou stranu, i když roste stupeň zesílení, nedochází k poklesu botnacího koeficientu, ale naopak hydrogely signifikantně více botnají (Obr. 60). Tento fakt je dán samotným vyšším podílem sušiny a hydrofilní povahou řetězců derivátů na bázi kyseliny hyaluronové.

U gelů je mimo jiné důležitým parametrem stabilita v tělních tekutinách. Parametr botnání slouží k charakterizaci míry nabotnutí daného gelu v porovnání s gelem nenabotnaným. Lze jej dle zjednodušeného vzorce stanovit z podílu hmotnosti nabotnaného gelu a jeho nenabotnané formy. Jako botnací médium byl využit fyziologický roztok 0,9 % NaCl a pro lepší simulaci tělní tekutiny prasečí plazma obsahující mimo jiné také bílkovinné složky. V prvním případě byl stanoven vliv poměru vazných míst (koncentrace síťovadla POA) na botnací koeficient. Dle předpokladu gely botnají nejméně při poměru vazných míst $\text{NH}_2\text{:CHO}$ 1:1 (Obr. 58), kdy gely dosahují nejvyššího elastického modulu. Na druhou stranu elastický modul není vždy rozhodujícím faktorem. S rostoucím obsahem sušiny HA-Ox sice dochází k nárůstu elastického modulu (Obr. 56), ale vzorky více botnají (Obr. 60). Botnání hydrogelů v krevní prasečí plazmě je vlivem iontové síly a obsahu bílkovinných složek nižší (Obr. 59) a také charakter gelu (tuhost sítě) se příliš nemění – nízký pokles Youngova modulu během procesu botnání (Obr. 59).

Materiál není cytotoxický, pokud buněčná viabilita neklesne o 30 % vůči kontrole dle ISO 10993-5. Na základě výsledků je mírně cytotoxický (-32 %) samotný roztok POA o koncentraci 0,4 mg/ml, nižší koncentrace roztoků POA cytotoxicitu nevykazují (Obr. 61). Na druhou stranu roztoky derivátů HA vykazují „protektivní“ charakter (proliferace buněk u roztoků derivátů HA oproti kontrole), a také alkoxyamin POA je v hydrogelu zabudován a pevně vázán (Obr. 62) a v organismu nedochází k jeho okamžitému uvolnění, ale postupně při procesu degradace.

Dle ISO 10993-5 je důležitým parametrem cytotoxicita výluhů (extraktů hydrogelů) a degradačních produktů. Výluhy z hydrogelů připravených a stanovených dle postupu ISO 10993-5 nejsou cytotoxické (Obr. 62). Ve výluzech byl stanoven obsah POA pomocí HPLC analýzy, který nepřesahuje hodnotu 5 % teoretické hodnoty koncentrace POA, která by byla přítomna v roztoku, kdyby nebylo dané síťovadlo pevně vázáno ve struktuře hydrogelové sítě (Obr. 62). Stejně tak příslušné produkty degradace nebyly cytotoxické do koncentrace 0,4 mg/ml (Obr. 63, Obr. 64), ale v případě 0,4 mg/ml vykazují buňky sníženou proliferační schopnost po 48 a 72 hodinách od ovlivnění (Obr. 64).

8.2 Hydrogely na bázi hydroxyfenyl derivátů HA

Reakcí hydroxyfenyl derivátu HA s peroxidem vodíku H_2O_2 a enzymem HRP lze připravit gely s rychlostí gelace pohybující se od několika minut až po velmi rychlou gelaci v řádu sekund. Kinetiku gelace lze ovlivnit parametry derivátu, především molekulovou hmotností M_w či stupněm substituce DS, dále koncentrací HA-TA roztoků a v neposlední řadě množstvím síťovacích činidel (koncentrací peroxidu vodíku H_2O_2 či aktivitou enzymu HRP) (7.2).

Důležitým parametrem je dlouhodobá stabilita síťovacích činidel. Roztoky peroxidu vodíku (Obr. 65) a HRP (Obr. 66) jsou při teplotě 2–10 °C v uvedených koncentracích, resp. aktivitě stabilní minimálně po dobu 1 roku.

Jednotlivé složky (HRP, H_2O_2 či HA-TA deriváty) v použitých koncentracích nevykazují v roztocích např. 0,9 % NaCl či PBS znatelnou změnu pH oproti samotným roztokům bez těchto látek, a proto nebyl vliv pH měřen. Iontová síla roztoku je určena typem použitého rozpouštědla.

Dále byla u jednotlivých komponent testována cytotoxicita. Dle předpokladu dochází k proliferaci buněk v přítomnosti HA-TA derivátů (Obr. 93). Roztoky enzymu křenové peroxidázy HRP nejsou cytotoxické, kdežto samotný roztok H_2O_2 je cytotoxický v koncentraci 0,003 % a vyšší (Obr. 68). Na druhou stranu je roztok peroxidu vodíku během síťovací reakce spotřebováván a buňky jsou jím exponovány po velmi krátkou dobu v rámci sekund či desítek sekund.

Stejně jako v případě roztoků HA-Ox dochází i u HA-TA derivátu s rostoucí smykovou rychlostí k poklesu zdánlivé viskozity (*shear-thinning*). Dle předpokladu M_w derivátu signifikantně ovlivňuje viskozitu roztoku, přičemž s její rostoucí hodnotou dochází k nárůstu viskozity (Obr. 67).

Vliv teploty na rychlost gelace je popsána v kapitole 7.2.2.1. S rostoucí teplotou dochází k urychlení gelace a nárůstu elastického modulu (Obr. 69). Nicméně ani v případě teploty nelze volit náhodnou hodnotu. Ke gelaci dochází *in vivo* v lidském těle, teplota se tedy blíží 37 °C. Z tohoto důvodu byla kinetika gelace s vlivem různých faktorů měřena dále jen při této teplotě.

V kapitole 7.2.2.2 a 7.2.2.3 je ukázán průběh kinetiky gelace (Obr. 70, Obr. 74). Zpočátku síťovací reakce je hodnota elastického modulu nižší v porovnání s modulem viskózním (G''). Obvykle jsou hodnoty obou modulů nízké, jejich hodnota na počátku reakce ale závisí na typu polymeru a jeho rozpouštědla, molekulové hmotnosti polymeru a koncentraci prekurzorového roztoku. Jak je vidět z Obr. 74, u derivátu s velmi nízkou M_w (60–90 kDa, spec. A) se moduly na počátku reakce blíží nule, kdežto u derivátu s vyšší M_w (240–360 kDa, spec. B) je již patrný příspěvek elasticity sítě. Přítomnost elastického podílu před bodem gelace lze vysvětlit na základě napínání řetězců polymerů za působení deformace a potenciálních fyzikálních zapletenin mezi jednotlivými řetězci polymerů projevující se především při ještě vyšších koncentracích roztoku a M_w . Během síťovací reakce roste viskozita vzorku a hodnota elastického modulu. Delší polymery mají delší relaxační časy a více se zaplétají. V čase známém jako *cross-over point* dochází k vyrovnání hodnot obou modulů a dále už převyšuje modul elastický. Ke konci reakce elastický modul dosahuje rovnovážných hodnot. Tuhší gely budou mít vyšší elastický modul a nižší ztrátový úhel. U velmi tuhých gelů může být příspěvek viskózního modulu téměř zanedbatelný.

Dle předpokladu dochází k urychlení gelace a nárůstu tuhosti s rostoucím stupněm substituce (Obr. 71, Obr. 72, Obr. 73) a M_w derivátu (Obr. 75, Obr. 76). Tuhost hydrogelu lze popsat pomocí elastického a Youngova modulu, kdežto pevnost odpovídá houževnatosti. Materiál s vysokou pevností je schopen zůstat při namáhání vcelku bez narušení. Je zřejmé, že rychlost gelace a tuhost gelů na bázi HA-TA derivátů s vyšším stupněm substituce bude vyšší. Je to dáno možností vytvoření vyššího počtu vazeb mezi makromolekulami v případě vyšší hodnoty DS (Obr. 71, Obr. 72, Obr. 73). Také s rostoucí M_w derivátu dochází k urychlení gelace (Obr. 75). Roztokům s vyšší M_w připadají vyšší hodnoty viskozity – polymerní řetězec je hydrofilní a zaujímá v roztoku velkou doménu a také dochází k zaplétání řetězců polymeru mezi sebou, k čemuž u velmi nízké M_w nedochází anebo se řetězce v krátkém okamžiku rozpletou. Pokud se mezi těmito částečně zapletenými řetězci (vyšší M_w) následně vytvoří spoj, dojde k rychlejšímu nárůstu viskozity a gelaci než v případě kratších řetězců.

Pevnost hydrogelu roste se zvyšující se molekulovou hmotností (Obr. 76). Na druhou stranu ne vždy dochází v závislosti na M_w ke zvýšení tuhosti tedy elastického (Obr. 75) nebo Youngova (Obr. 76) modulu hydrogelu. V Obr. 75-A jsou použity k přípravě hydrogelů deriváty s nízkým stupněm substituce 1,5 % a s nárůstem M_w derivátu roste i elastický modul. Na druhou stranu v Obr. 75-C (DS derivátu 3 %) nebyl naměřen rozdíl v elastickém modulu při vyšší M_w (280–320 kDa vs. 700–750 kDa) dosahující vysoké hodnoty elastického modulu větší než 3000 Pa.

Obecně s rostoucí koncentrací H_2O_2 roste tuhost sítě (Obr. 78, Obr. 79), naproti tomu aktivita HRP je spojována s rychlostí gelace (Obr. 77). Vliv koncentrace peroxidu vodíku a aktivity enzymu HRP ale není tak jednoznačný, jelikož tyto dva parametry na sobě závisí. Pokud zvolíme příliš nízkou koncentraci

H₂O₂, vliv nárůstu aktivity HRP na rychlost gelace nemusí být již signifikantní. Stejně tak při příliš nízké aktivitě HRP, nemusí být vliv nárůstu koncentrace H₂O₂ na elastický modul signifikantní.

S rostoucí aktivitou HRP dochází k urychlení gelace a při aktivitě HRP vyšší než 0,32 U/ml nebyl bod gelace již zachycen (velmi rychlá gelace pod 6,5 s detekce přístroje) (Obr. 77). Také se projevuje vliv aktivity HRP na elastický modul odečtený ve 3 minutách od počátku měření kinetiky gelace (Obr. 78). Neustálé zvyšování aktivity HRP při zachování koncentrace H₂O₂ by nevedlo ke stálému urychlování reakce. Při znatelném nadbytku enzymu (0,32 a 0,4 U/ml) vzhledem k množství peroxidu vodíku bude reakce probíhat stejně rychle a elastický modul (3 min) bude porovnatelný. Pokud je aktivita HRP dostatečně vysoká (0,32 a 0,4 U/ml), další navýšení koncentrace H₂O₂ již nemá signifikantní efekt na tuhost sítě (Obr. 78). Elastický modul může dosahovat již ve 3 minutách nejvyšších hodnot (plata), ale v mnoha případech dochází dále k jeho růstu a zvýšení tuhosti gelu. Proto jsou připravovány hydrogely do teflonových forem a po 1 hodině „zrání“ jsou stanoveny mechanické vlastnosti v kompresi. Hodnoty Youngova modulu v závislosti na aktivitě HRP a koncentraci H₂O₂ jsou uvedeny v Obr. 79. Jak je vidět z daného grafu, v závislosti na aktivitě HRP nedochází ke změně Youngova modulu v měřeném rozmezí.

Vliv koncentrace peroxidu vodíku na rychlost gelace je velmi malý či žádný za daných koncentrací a podmínek reakce (Obr. 77). Na druhou stranu se projevuje vliv na elastický modul po 3 minutách – s rostoucí koncentrací peroxidu vodíku dochází k jeho nárůstu (Obr. 78). U dozrálých hydrogelů je patrný signifikantní rozdíl v Youngovu modulu mezi nejnižší použitou koncentrací H₂O₂ (0,33 mM, 0,001 %) a koncentracemi vyššími (Obr. 79).

Zobrazení struktury lyofilizátu vzniklého z hydrogelu pomocí skenovací elektronové mikroskopie může přinést nové poznatky o struktuře pouze bezvodého (zlyofilizovaného) hydrogelu. Na druhou stranu mnohdy tato metoda zkresluje představu o velikosti prostoru mezi jednotlivými řetězci sítě v hydrogelu (*mesh size* neboli velikost ok sítě hydrogelu), tedy řetězců polymeru v hydratovaném stavu. Velikost ok sítě hydrogelu (*mesh size*) popisuje strukturu polymerní sítě na molekulární úrovni, kdežto porosita charakterizuje mikroskopické uspořádání hydrogelu nebo případně z něj připravených xerogelů. Velikost ok sítě (*mesh size*) byla počítána z hodnoty stanoveného elastického modulu u hydrogelů na bázi derivátů HA dle vzorce uvedeném v rovnici 1 popsaného v literatuře [19].

Velikost pórů viditelná pomocí skenovací elektronové mikroskopie je znatelně ovlivněna přípravou vzorků (teplotou při lyofilizaci, dobou zamrazení). Velikost pórů se pohybuje řádově ve stovkách mikrometrů (Obr. 81). Naproti tomu v hydratovaném stavu je velikost prostorů mezi řetězci polymerů velmi malá – desítky až stovky nanometrů. Hydrogely na bázi HA popsané v této práci vykazují elastický modul od 100–4000 Pa dle volby derivátu a jeho M_w , DS , koncentrace a dalších parametrů. Velikost ok hydrogelové sítě (*mesh size*) připravovaných hydrogelů dle výpočtu je v hydratovaném stavu v průměru pouze 10–50 nm (pravděpodobně až 200 nm u některých pórů). Z těchto důvodů nebyla dále skenovací elektronová mikroskopie (SEM) použita u ostatních vzorků. Řešením by bylo využití kryo-SEM analýzy, metody umožňující stanovení hydrogelu v hydratovaném stavu, ale který je kryogenně fixovaný a zobrazený pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu v kryogenní komoře.

8.2.1 Generátory peroxidu vodíku

Peroxid vodíku může být do reakce přidán přímo v podobě roztoku anebo jej lze generovat například další enzymatickou reakcí. Možností je enzymaticky katalyzovaná reakce přeměny glukózy Glu (resp. galaktózy Ga) enzymem glukózo-oxidázou GluO (resp. galaktózo-oxidázou GaO) popsané v kapitole 7.2.3.

Generátory peroxidu vodíku byly vyvíjeny za účelem zjednodušení finálního KITu, tedy přípravy pouze jednoho aplikačního roztoku, který by obsahoval směs HA-TA derivátu, enzym HRP a GluO (resp. GaO). U systému Glu-GluO (7.2.3.1) byl předpoklad *in vivo* gelace po aplikaci finálního roztoku

z důvodu přítomnosti glukózy v krvi. Substrát pro danou reakci je komponentou lidské krve v koncentraci 9 g/l (5 mmol/l – glykémie). Dle *in vitro* experimentu při přidavku roztoku obsahující HA-TA derivát, HRP a GluO do roztoku glukózy o koncentraci 9 g/l dochází ke gelaci (Obr. 82). Galaktóza 7.2.3.2 je také přítomna v lidském organismu, ale pouze v malém množství nedostatečném pro gelaci. Tento substrát lze přidat přímo do prekursorového roztoku anebo zvýšit lokálně koncentraci galaktózy v místě aplikace. Předpokladem je využití daného systému pro oddálení gelace při zachování vhodných mechanických a viskoelastických vlastností a nízkého stupně nabotnění.

Systémy Glu-GluO a Ga-GaO jsou principiálně velmi podobné. Pro přesnou a opakovatelnou přípravu hydrogelů je vhodné stanovení aktivity enzymů. Stanovení aktivity HRP je možné charakterizovat stejnou metodou popsanou v kapitole 6.2.9.1 a aktivita enzymu glukózo-oxidázy lze určit reakcí s anisidinem 6.2.9.2.

Obdobně jako v případě systému HA-TA/HRP/H₂O₂ popsaného v kapitole 7.2.2 je rychlost gelace a charakter gelu ovlivněna parametry derivátu, jako jsou molekulová hmotnost či stupeň substituce, přičemž trend závislostí je obdobný a dochází i v tomto případě k nárůstu tuhosti s rostoucí molekulovou hmotností či stupněm substituce derivátu (Obr. 85). Rychlost gelace i mechanické vlastnosti gelů lze regulovat aktivitou enzymů HRP, GluO či GaO a také koncentrací substrátů glukózy či galaktózy.

Dle předpokladu dochází s rostoucí koncentrací enzymu GluO k urychlení gelace. Při aktivitě 75 U/ml již je gelace rychlejší než 6,5 s – detekovatelná hranice reometru AR-G2 při daném nastavení. Při zachování stejných podmínek reakce a pouze zvýšení aktivity HRP je gelace srovnatelná a ve všech případech rychlejší než 6,5 s. Vliv koncentrace glukózy na rychlost gelace byl detekován u vzorků s koncentrací glukózy 0,18 g/l a 0,9 g/l. S rostoucí koncentrací glukózy či aktivitou HRP dochází k urychlení gelace (Obr. 83).

Srovnatelně s Glu-GluO systémem, dochází s rostoucí koncentrací enzymů GaO či HRP a substrátu galaktózy Ga k urychlení gelace (Obr. 84). Cílem bylo připravit hydrogely s prodlouženou rychlostí gelace při zachování vhodných mechanických vlastností gelu. Prodloužení gelace bylo docíleno snížením aktivity GaO u derivátu s vyšším stupněm substituce pro docílení vyšší tuhosti hydrogelové sítě. Gelace byla prodloužena na 115 s, ale v tomto extrémním případě vykazuje hydrogel nízkou tuhost (5 kPa). Zkrácení gelace na 80 s navýšením aktivity GaO vedlo ke zvýšení Youngova modulu na hodnotu 8 kPa a při čase gelace 25 s byly hydrogely tužší s Youngovým modulem 18 kPa (Tab. 18).

8.2.2 Porovnání HA-TA systému s přímým přidavkem peroxidu vodíku a jeho generací

V kapitole 7.2.4 je porovnán systém s přímým přidavkem peroxidu vodíku a jeho generací pomocí enzymatických reakcí. Systém Glu-GluO resp. Ga-GaO je možné optimalizovat, aby bylo dosaženo srovnatelných vlastností hydrogelů připravených s přímým přidavkem H₂O₂. Za jistých podmínek – vysoké koncentrace enzymů a substrátu dochází k velmi rychlé generaci peroxidu vodíku a systémy Glu-GluO a Ga-GaO se budou chovat obdobně jako systém s jednou enzymatickou reakcí s přímým přidavkem peroxidu vodíku neboli rychlost gelace i charakter gelu bude řízen pouze reakcí H₂O₂ a HRP. Tento jev je ukázán v Obr. 85 na Youngovu modulu hydrogelů připravených těmito dvěma systémy.

U systému s přímým přidavkem H₂O₂ a jeho generací byla testována také cytotoxicita (Obr. 86). Materiály s přímým přidavkem H₂O₂ a Ga-GaO systému nevykazují cytotoxický charakter, testované buňky jsou viabilní a nedochází k poklesu proliferace ani při kultivaci po dobu 14 dní. U systému Glu-GluO dochází k signifikantnímu poklesu viability buněk při využití média obsahující glukózu, jelikož dochází ke spotřebě hlavní živiny buněk (glukózy) a k nadměrné produkci H₂O₂. Pokud je glukóza nahrazena jinou živinou pro buňky (např. pyruvát), systém není cytotoxický (Obr. 86). Tento systém ale není vhodný pro inkorporaci buněk, jelikož dochází ke spotřebě glukózy, která je důležitou živinou buněk, navíc během reakce vzniká peroxid vodíku vykazující cytotoxicitu. Na základě těchto výsledků byl systém na bázi Glu-GluO zavrhnut pro využití v dané aplikaci. Materiály na bázi Ga-GaO

jsou vhodné pro přípravu buněčných scaffoldů. Na druhou stranu se nepodařilo tento materiál zesílit *in situ* pouhým lokálním navýšením koncentrace galaktózy v tkáni a následovným přidavkem ostatních komponent. V případě prodloužení gelace byla optimalizace úspěšná, ale systém nevykazuje výhody oproti standardnímu systému s přímým přidavkem H_2O_2 , převyšující nevýhodu vytvoření složitějšího systému dvou enzymatických reakcí.

8.3 Hydrogely na bázi hydroxyfenyl derivátu HA nesoucí RGD sekvenci

Pro zvýšení buněčné adheze je žádoucí přidavek adhezivní molekuly. Jednou z možností je využití RGD sekvence, která lze navázat na derivát kyseliny hyaluronové. Výsledný derivát obsahuje RGD sekvenci i hydroxyfenylovou skupinu (HA-PH-RGD^{PURE}) možnou zesílit pomocí peroxidu vodíku a HRP stejně jako u systému na bázi HA-TA derivátu. Reakce je pomalejší ve srovnání s tyraminovaným derivátem HA-TA, a proto je žádoucí kombinace těchto dvou derivátů (HA-PH-RGD^{PURE} a HA-TA) v hmotnostním poměru 1:1 (HA-PH-RGD^{MIX}) pro dosažení vhodné rychlosti gelace a viskoelastických či mechanických vlastností.

HA-PH-RGD^{PURE} spec A dosahuje velmi pomalých časů gelace ≈ 100 s (Obr. 91) a materiál by vytékal po aplikaci z místa defektu. Z tohoto důvodu byl kombinován s HA-TA derivátem v hmotnostním poměru 1:1 za vzniku směsi HA-PH-RGD^{MIX}. Mísení bylo provedeno rozpuštěním směsi a opětovnou lyofilizací materiálu. Čas gelace se tímto způsobem zkrátil na 18–26 s v závislosti na šarži derivátu, HRP a H_2O_2 . (Obr. 92).

Roztoky HA-PH-RGD^{MIX} v PBS pH 7,4 o koncentraci 20 mg/ml byly zvoleny pro porovnání viskozity roztoků lišících se molekulovou hmotností výchozího derivátu. Obdobně jako u ostatních testovaných derivátů HA, dochází i u roztoku HA-PH-RGD^{MIX} k poklesu zdánlivé viskozity se smykovou rychlostí (Obr. 87). Jedná se o projev newtonského chování, kdy dochází k zřednutí při toku (*shear-thinning*). Pokles je o to více signifikantní, čím je vyšší molekulová hmotnost. Pokud je molekulová hmotnost velmi nízká (M_w 60–90 kDa, 20 mg/ml derivátu), roztoky se chovají téměř jako newtonské. Hodnoty viskozit jednotlivých roztoků byly odečteny při smykové rychlosti $1,9 \text{ s}^{-1}$ z viskozitní křivky (závislosti viskozity na smykové rychlosti). Jak je vidět z Obr. 87, s rostoucí M_w dochází dle předpokladu k nárůstu viskozity.

S viskozitou také souvisí výtlačná síla. Ta byla stanovena dle postupu v kapitole 6.2.5.2. Byl stanoven maximální a průměrný tlak. Pro aplikaci materiálu byly použity 2 typy velmi tenkých jehel 25 G a 27 G s délkou 40 mm a vnitřním průměrem 0,26 mm (25 G) a 0,21 mm (27 G). Jehly byly zvoleny na základě parametrů aplikačního zařízení AMCath. Vnitřní průměr 1,2 m dlouhého dvoucestného katetru (0,5 mm) i jehly zakončující katetr ($0,24 \pm 0,01$ mm) jsou velmi malé. Byly testovány deriváty lišící se v molekulové hmotnosti při zachování stejné koncentrace roztoku derivátu 20 mg/ml v PBS (pH 7,14). Maximální i průměrný tlak je vyšší u roztoků derivátu s vyšší M_w (240–360 kDa) v porovnání s nízkomolekulárním (60–90 kDa) derivátem. Dle předpokladu je také hodnota maximálního tlaku vyšší u jehly (27 G) s menším vnitřním průměrem (Obr. 88). Na základě výsledků viskozity a výtlačné síly roztoků HA-PH-RGD^{MIX} je výhodné využití derivátu s nejnižší M_w spec. A (60–90 kDa). Jelikož bude materiál aplikován katetrem o délce 1,2 m do srdeční tkáně, je nízká hodnota viskozity a elastického modulu na počátku reakce velmi důležitá. Jak je vidět z Obr. 89, roztok HA-PH-RGD^{MIX} spec. B (240–360 kDa) dosahuje na počátku gelace vyššího elastického a viskózního modulu ve srovnání se spec. A. Rychlost gelace spec. B je také příliš rychlá (8 s) ve srovnání se spec. A (19 s) (Obr. 90) a mohlo by dojít ke gelaci i v aplikační části SPREADS zařízení (přívodné hadičce) či nehomogennímu rozptýření materiálu uvnitř nosné kapsy (Obr. 114).

V neposlední řadě byla testována opakovatelnost přípravy vzorků – byla porovnána kinetika gelace jednotlivých připravených vzorků různých šarží derivátu HA-PH-RGD^{MIX}, HRP či H_2O_2 . Jak je vidět z Obr. 92, rychlost gelace je minoritně ovlivněna těmito parametry a příprava je opakovatelná.

Cytotoxicita samotných síťovacích činidel byla testována v rámci kapitoly 7.2.1.4.2. Roztoky HRP nejsou cytotoxické, kdežto samotný roztok H_2O_2 je cytotoxický v koncentraci 0,003 % a vyšší (Obr. 68). Na druhou stranu je roztok peroxidu vodíku během síťovací reakce spotřebováván a buňky jsou jím exponovány po velmi krátkou dobu v rámci sekund či desítek sekund. Při zvolené finální koncentraci H_2O_2 (0,005 %) a HRP (0,4 U/ml) s obsahem oligo-HA není vzorek cytotoxický (Obr. 68). Navíc u derivátů HA-TA, HA-PH-RGD^{PURE} a HA-PH-RGD^{MIX} buňky vykazují vyšší proliferální schopnost v porovnání s kontrolou (kultivačním médiem) (Obr. 93).

V neposlední řadě byla porovnána degradace hydrogelu a vysokomolekulární (HMW) nativní HA pomocí enzymu BTH dle postupu popsaného v kapitole 6.2.7. Z Obr. 94 závislosti kumulace produktu c_s na čase je patrné, že hydrogely na bázi HA-PH-RGD jsou odolnější vůči enzymatickému štěpení ve srovnání s vysokomolekulární HA. Kinetické parametry byly určeny výpočtem z integrované rovnice Michaelis-Mentenové (Obr. 95). Pro HA-PH-RGD^{MIX} je $K_M = 196,18 \pm 15,76 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $v_{\max} = 0,86 \pm 0,02 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ a pro HMW HA roztok: $K_M = 500 \pm 170 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $v_{\max} = 5,6 \pm 1,9 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$.

8.4 Buněčná interakce s hydrogely

Buněčná adheze k povrchu hydrogelů na bázi kyseliny hyaluronové je termodynamicky nevýhodná. Je to dáno značnou hydrofilitou polymeru a jeho záporným nábojem [82]. Dále pak samotná struktura a povaha polysacharidů hraje důležitou roli v interakci s buňkami, tzv. *crosstalk* je příhodný pro bílkoviny/peptidy obsahující mnoho amino skupin. Neadhezivní charakter hydrogelů na bázi HA-TA nebo HA-Ox derivátu byl experimentálně potvrzen (Obr. 100). Adheze buněk je důležitá kvůli proliferaci a diferenciaci buněk. Pro buněčnou adhezi je tedy nutné zakomponovat do struktury hydrogelu adhezivní molekuly, jako je kolagen, fibronectin, laminin, vitronectin, fibrin či fibrinogen [81, 83, 84] či různé peptidové sekvence [82, 85, 86, 87, 88, 89, 90].

Jako zástupce proadhezivního potenciálu byl vybrán fibrinogen, u kterého je literárně potvrzen adhezivní účinek [83, 84] a také kvůli dobré dostupnosti zdroje, rozpustnosti ve vodných roztocích, a tedy možnosti snadné mísitelnosti s roztoky derivátů na bázi HA a následné filtrovatelnosti směsí, čímž vznikají sterilní roztoky, což je nezbytné pro buněčné experimenty a obecně pro využití systému v medicínských aplikacích.

Při koncentraci fibrinogenu 1 mg/ml hydrogelu byl zjištěn znatelný adhezivní charakter buněk na povrch hydrogelů na bázi HA-Ox derivátu. U všech testovaných hydrogelů na bázi HA-Ox dochází k adhezi na jeho povrch (Obr. 96). Pouze u třetího typu hydrogelu je adheze nehomogenní, pravděpodobně dáno samotnou nehomogenitou hydrogelu – makroskopicky nesouměrný povrch hydrogelu. Nehomogenita je pravděpodobně zapříčiněna příliš vysokou viskozitou roztoku HA-Ox (danou M_w derivátu) a tedy i nedostatečným promísením roztoku derivátu s buněčnou suspenzí před vlastní gelací. V tomto případě je gelace velmi rychlá, což také znesnadňuje promísení složek (Obr. 97). V případě dvou zbylých typů je povrch vizuálně hladký a adheze rovnoměrná. Buňky adherují na materiál 2 více v porovnání s materiálem 1 (Obr. 96), což může být způsobeno vyšší tuhostí hydrogelové sítě materiálu 2 (Obr. 97).

Pro dosažení požadovaného efektu regenerace tkáně po infarktu myokardu je nutné do hydrogelu zakomponovat vysoké množství buněk. Buňky v koncentraci 10–100 milionů na 1 ml byly inkorporovány do hydrogelu na bázi HA-TA a HA-Ox. Kvůli vysokému počtu buněk potřebného na daný experiment byly zvoleny HCT-116, buněčná linie vyznačující se vysokou proliferální schopností, u které lze *in vitro* před inkorporací buněk do scaffoldu získat jejich velký počet. U připravených hydrogelů byly testovány také mechanické vlastnosti.

U hydrogelů na bázi oxidované formy HA s vyšším množstvím buněk (10 mil/ml) dochází ke znatelnému ovlivnění gelace za vzniku velmi měkkých hydrogelů či hydrogely nevznikají vůbec. Jev je způsoben pravděpodobně přítomností velkého množství amino sloučenin v médiu, které interagují

s hydroxylovou skupinou na polymeru a také interakcí se samotnými buňkami. Na základě těchto výsledků není HA-Ox/POA systém vhodný pro cílenou aplikaci s inkorporací vysokého množství buněk do hydrogelu. Přesto vykazuje daný systém rychlou gelaci umožňující *in situ* aplikaci, regulovatelnost vlastností vzniklého hydrogelu (mechanické a viskoelastické vlastnosti, botnání) dobrou cytokompatibilitu a možnost inkorporace nižšího množství buněk vykazující adherentní charakter při přidavku fibrinogenu jako adhezivní molekuly (Obr. 96).

Naproti tomu inkorporace vysokého počtu buněk do hydrogelu (až 100 mil/ml) je možné v případě využití tyraminovaného derivátu HA-TA (Obr. 98). Při vyšších koncentracích buněk ale dochází také ke znatelnému zpomalení gelace a snížení tuhosti hydrogelů (Tab. 21) především dekompozicí peroxidu vodíku. U koncentrace buněk HCT-116 50 a 100 mil/ml ztrácí hydrogel integritu (tvarovou stálost), a proto nebylo možné stanovit mechanické vlastnosti v kompresi. Hydrogely s obsahem 50 a 70 mil. HCT-116 na 1 ml hydrogelu lze připravit pouze signifikantním navýšením síťovacích činidel (0,01 % H_2O_2 a aktivitě HRP 0,8 U/ml). U hydrogelů s obsahem 70 mil. buněk HCT-116 na 1 ml byl také testován vliv vysokého množství inkorporovaných buněk a délky kultivace na viabilitu a proliferaci buněk (Obr. 99). Buňky po 7 dnech dosahují maximálního počtu a proliferace je omezena. Kultivace byla ukončena po 9 dnech, kdy došlo ke znatelnému poklesu viability buněk kvůli nedostatku výměny živin a metabolitů ve scaffoldu. Jak je vidět, příliš vysoká buněčná koncentrace není výhodná.

Fibrinogen je známý koagulační faktor, který není ve struktuře hydrogelu na bázi HA pevně vázán a je zde možné riziko koagulace při jeho přímé aplikaci do srdeční tkáně. Proto byl také připraven a testován hydroxyfenyl derivát HA nesoucí pevně vázanou RGD sekvenci (HA-PH-RGD^{PURE}) či v kombinaci s HA-TA derivátem (HA-PH-RGD^{MIX}) podléhající enzymatické reakci (HRP) v přítomnosti H_2O_2 [88]. Tento oligopeptid je známý pro svůj adhezivní charakter stimulací integrinů [88, 166, 167].

Pro danou aplikaci byly použity kardiopoietické buňky ADSC získané z tukové tkáně dárců. Buňky byly poskytnuty společností Celyad, jedním z partnerů EU projektu AM CARE.

Na základě výsledků není žádoucí inkorporace více než 30 mil. buněk HCT-116 na 1 ml hydrogelu a při 30 mil/ml dochází k poklesu mechanických vlastností během kultivace. Zvolené finální množství buněk ADSC inkorporovaných do hydrogelu bylo proto zvoleno 20 mil na 1 ml hydrogelu v kombinaci s derivátem s navázanou peptidovou sekvencí HA-PH-RGD.

Byl stanovován vliv množství RGD na buněčnou adhezi. Jako negativní kontrola byl zvolen samotný hydroxyfenyl (tyraminovaný) derivát HA (HA-TA) bez adhezivní molekuly. Byla porovnána buněčná adheze na povrchu hydrogelu na bázi hydroxyfenyl derivátů HA s RGD sekvencí HA-PH-RGD^{PURE} či v kombinaci HA-TA a HA-PH-RGD^{PURE} derivátu v hmotnostním poměru 1:1 za vzniku směsi HA-PH-RGD^{MIX}. Koncentrace derivátu v gelu byla 20 mg/ml, spec. A (M_w 60-90 kDa) v PBS pH 7,4. Pro dosažení srovnatelné tuhosti hydrogelů byla zvolena různá koncentrace síťovacích činidel. Dle předpokladu se adheze neprojevila u hydrogelu na bázi HA-TA derivátu bez RGD sekvence, kdežto v případě HA-PH-RGD^{PURE} i směsi HA-PH-RGD^{MIX} buňky adherují (Obr. 100). V průběhu kultivace je znatelně vidět rozdíl v degradaci a botnání těchto dvou materiálů. Hydrogely na bázi samotného hydroxyfenyl derivátu HA nesoucí RGD sekvenci HA-PH-RGD^{PURE} botnají a degradují signifikantně více v porovnání s hydrogely tvořené směsí HA-PH-RGD^{MIX}. Z tohoto důvodu byl dále již testován pouze tento materiál HA-PH-RGD^{MIX}.

V neposlední řadě byl stanovován vliv stupně zesíťení na buněčnou adhezi. Byly testovány gely na bázi HA-PH-RGD^{MIX} s různou tuhostí, která byla řízena přidavkem síťovacích činidel (HRP, H_2O_2). Buňky (ADSC) adherují již po 7 dnech na povrch hydrogelu v případě méně tuhého gelu (HRP 0,16 U/ml, H_2O_2 0,002 %, Obr. 101 – síťovací činidlo 0). Na druhou stranu rychle degradují a po 14 dnech je gel z 90 % zdegradován. Gely také vykazují vysoký stupeň nabotnání, což není aplikačně vhodné, jelikož by mohlo dojít k výraznému tlaku na okolní tkáň. Na druhou stranu tužší hydrogely (HA-PH-RGD^{MIX}, síťovací činidlo 2, HRP 0,4 U/ml, H_2O_2 0,005 %) si zachovávají tvar, botnají méně a degradují postupně

(Obr. 101 – síťovací činidla 2). Viabilita buněk neklesá o 30 % vůči kontrole u obou testovaných materiálů (Obr. 102).

U finálního materiálu HA-PH-RGD^{MIX} bez buněk se síťovacími činidly 1 (HRP 0,24 U/ml, H₂O₂ 1 mM) bylo docíleno optimálních vlastností hydrogelu z pohledu rychlosti gelace, mechanických a viskoelastických vlastností (HA-PH-RGD^{MIX} síťovací činidla 1, kapitola diskuze 8.3). Bylo zjištěno, že inkorporace 20 miliónů ADSC na 1 ml HA-PH-RGD^{MIX} hydrogelu se síťovacími činidly 1 ovlivňuje signifikantně rychlost gelace a charakter gelu. Tuhost hydrogelové sítě klesá, což je patrné na hodnotě Youngova modulu (Obr. 103). Také dochází ke ztuhlání a degradaci během kultivace, což je nežádoucím jevem. Navýšením koncentrace činidel (síťovací činidla 2, HRP 0,4 U/ml, H₂O₂ 0,005 %) lze tyto nevyhovující vlastnosti eliminovat a dosáhnout srovnatelných vlastností gelu. Youngův modul a houževnatost (Obr. 103) a rychlost gelace (Obr. 104) je pak srovnatelná s hydrogelem bez buněk se síťovacími činidly 1. V tomto případě hydrogely během kultivace signifikantně méně botnají, degradace je zpomalena. Adheze ADSC je patrná u obou hydrogelů lišících se tuhostí a charakterem (Obr. 105).

Na základě výše uvedených výsledků byl zvolen jako finální materiál pro následné testování pomocí aplikačních zařízení a *in vivo* experimenty derivát HA-PH-RGD^{MIX} (1:1) specifikace A s nízkou M_w (60–90 kDa) v roztoku PBS pH 7,4 o koncentraci 20 mg/ml s obsahem síťovacích činidel 1 (HRP 0,24 U/ml, H₂O₂ 0,003 %, 1 mM) v případě hydrogelu bez buněk a síťovacích činidel 2 (HRP 0,4 U/ml, H₂O₂ 0,005 %, 1,67 mM) s inkorporovanými buňkami ADSC o koncentraci 20 miliónů na 1 ml hydrogelu.

8.5 Aplikace materiálu pomocí katetru

V rámci Evropského projektu AM CARE byl vyvinut speciálně upravený katetr pro aplikaci materiálu do srdeční tkáně [166]. Tento katetr (7.5.1) je složen z úchytné části pro zapojení stříkaček s prekurzorovými roztoky, následuje přívodná dvoucestná hadička s reservuárem v koncové části katetru. Katetr je zakončen konickou jehlou s velmi malým vnitřním průměrem ($0,24 \pm 0,01$ mm). Katetr, vyjma úchytné části, je zaveden a materiál následně aplikován do srdeční stěny v malých dávkách (po 200 μ l). Gelace musí být dostatečně rychlá, aby bylo zamezeno úniku materiálu z místa aplikace způsobující možnou embolizaci. Na druhou stranu nesmí být příliš rychlá, aby nedošlo k ztuhnutí materiálu v katetru či jehle. Také viskozita prekurzorových roztoků musí být uzpůsobena malému profilu jehly a délce katetru s malým vnitřním poloměrem. Hydrogely na bázi finálního materiálu HA-PH-RGD^{MIX} (1:1) spec. A s nízkou M_w (60–90 kDa) v roztoku PBS pH 7,4 s obsahem síťovacích činidel 1 bez buněk (HRP 0,24 U/ml, H₂O₂ 1 mM, 0,003 %) splňují tyto podmínky a mají potřebné kompetence pro zamýšlenou aplikaci.

Prekurzorový roztok HA-PH-RGD^{MIX} spec. A vykazuje velmi nízkou viskozitu a výtlačnou sílu přes jehly s velmi malým průměrem. To koresponduje s výsledky dosaženými při testování maximální síly na čase při extruzi finálního materiálu pomocí katetru během gelačního procesu (Obr. 113) [166]. V průběhu 3 minut dochází k nárůstu maximální síly zapříčiněné gelačním procesem na hodnotu přibližně 50 N a dále se již tato hodnota nemění a je možné materiál aplikovat. To je v korespondenci s vhodnými hodnotami maximální síly pro stlačení mužem 70 N a ženou 50 N. Tento fakt je dán vlastní konstrukcí katetru obsahující reservuár v konečné části, kde dochází k mísení prekurzorových roztoků, a také charakterem samotného materiálu po gelaci – hydrogely nevykazují příliš vysokou tuhost.

Byl porovnán charakter hydrogelu připraveného pomocí Contipro homogenizátoru a pomocí katetru. Homogenita připravených hydrogelů byla testována vizuálně pomocí barviva Sirius Red, která byla zamíchána do prekurzorového roztoku před jeho přípravou. Nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi hydrogely připravenými pomocí homogenizátoru a katetru (Obr. 109).

Na druhou stranu hydrogely připravené katetrem vykazují mírně nižší Youngův a elastický modul (Contipro homogenizátor: $G' = 825$ Pa, $G'' = 3,2$ Pa, $\delta = 0,22^\circ$, $Y = 9,7$ kPa a katetr: $G' = 701$ Pa,

$G'' = 4,3 \text{ Pa}$, $\delta = 0,36^\circ$, $Y = 7,7 \text{ kPa}$, Obr. 110, Obr. 111). Stupeň nabotnění byl také mírně vyšší u hydrogelů připravených pomocí katetru (152,5 % resp. 52,5 % vs. 143,3 % resp. 43,3 %, Obr. 112), což koreluje s výsledky dosaženými při testování viskoelastických a mechanických vlastností. Pravděpodobně je rozdíl dán mírnou nehomogenitou způsobenou nedostatečným zesíťčením, která ale není vizuálně patrná. Na druhou stranu hydrogel je kompaktní, drží tvar a lze do něj inkorporovat buňky bez ztráty integrity vzorků. Rozdíl nebyl zaznamenán u houževnatosti stanovené podílem energie potřebné k narušení hydrogelu a objemu hydrogelu (0,35–0,45 ml). V neposlední řadě viabilita a metabolická aktivita ADSC nebyla ovlivněna injekcí pomocí katetru a je srovnatelná s výsledky dosaženými pomocí směšovače typu Benchtop. Výsledky jsou součástí uvedené publikace [166].

8.6 Aplikace materiálu pomocí SPREADS zařízení

Společností AdjuCor GmbH (<https://www.adjucor.com/>), partnerem EU projektu AMCARE, bylo vyvinuto speciální aplikační zařízení SPREADS (Obr. 114). Je složeno z nosné kapsy (*substance carrier*) a 3 přívodních hadiček (*supply line*) – jedna pro aplikaci hydrogelového prekurzorového roztoku do rezervoáru ve středu kapsy a dvou hadiček pro dopravení bioadheziva do oblasti nacházející se po obvodu kapsy. Spodní část nosné kapsy je tvořena biodegradabilní polopropustnou membránou.

Finální prekurzorový roztok byl zvolen na bázi HA-PH-RGD^{MIX} s nízkou M_w (60–90 kDa) a koncentrací roztoku (20 mg/ml) zachovávající velmi nízkou viskozitu kvůli snadné aplikovatelnosti. Koncentrace síťovacích činidel byla volena, aby nedošlo k zatuhnutí směsi v přívodné hadičce a došlo k dostatečnému rozprostření materiálu v nosné kapse zaručující homogenní distribuci buněk. U hydrogelu bez buněk byl obsah síťovacích činidel 1 H_2O_2 0,003 % a aktivita HRP 0,24 U/ml a při inkorporaci 20 mil ADSC/ml byl obsah síťovacích činidel navýšen na koncentrace H_2O_2 0,005 % a aktivitu HRP 0,4 U/ml.

Stříkačky s hydrogelovými prekurzorovými roztoky byly připevněny pomocí *luer lock* zakončení k SPREADS zařízení a plynule stlačovány, čímž vznikl pomocí směšovače hydrogelový prekurzorový roztok. Díky vytvořenému aplikačnímu oknu danému rychlostí gelace (> 15 sekund), dochází k jeho zatuhnutí po průchodu přívodní hadičkou a rozprostření v nosné kapse (Obr. 114-C).

Pro smísení prekurzorových roztoků byl použit směšovač zakoupený od společnosti MEDMIX. Byly porovnány vlastnosti hydrogelů připravené tímto homogenizátorem s transportní hadičkou vedoucí do nosné kapsy SPREADS zařízení a Contipro (CNT) homogenizátorem typu Benchtop, který byl použit při předchozím testování hydrogelových vlastností. Homogenita připravených hydrogelů byla testována vizuálně pomocí barviva Sirius Red, která byla zamíchána do prekurzorového roztoku před jeho přípravou. Nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi hydrogely připravenými pomocí Contipro homogenizátoru a MEDMIX směšovače s přívodnou SPREADS hadičkou (Obr. 115). Porovnatelný vzhled hydrogelů koreluje s výsledky dosaženými testováním viskoelastických a mechanických vlastností hydrogelů a z procesu botnění. Elastický a Youngův modul i koeficient nabotnění hydrogelové matrice je srovnatelný při přípravě matrice pomocí Contipro homogenizátoru ($G' = 825 \text{ Pa}$, $G'' = 3,2 \text{ Pa}$, $\delta = 0,20^\circ$, $Y = 9,7 \text{ kPa}$, $Q = 142,7 \%$ resp. 42,7 %) a MEDMIX směšovače s přívodnou SPREADS hadičkou ($G' = 805 \text{ Pa}$, $G'' = 2,8 \text{ Pa}$, $\delta = 0,22^\circ$, $Y = 7,7 \text{ kPa}$, $Q = 143,3 \%$ resp. 43,3 %) (Obr. 116).

Také byla zjišťována homogenní distribuce a viabilita buněk (ADSC 20 mil/ml) v HA-PH-RGD^{MIX} hydrogelu, který byl injektován do nosné kapsy aplikačního zařízení SPREADS. Obsah síťovacích činidel byl kvůli přítomnosti buněk navýšen na koncentraci H_2O_2 0,005 % a aktivitu HRP 0,24 U/ml. Mezi testovanými vzorky nebyl pozorován žádný významný rozdíl v distribuci buněk a životaschopnosti. Průměrná životaschopnost buněk v hydrogelu byla 77 % (Obr. 117).

8.7 Detekce hydrogelů

Existuje několik možností detekce hydrogelů v tkáni. Jedna z možností vyplývá přímo z podstaty tvorby dityraminové vazby u hydroxyfenyl derivátu HA. Vytvořená vazba za UVB záření emituje viditelné světlo (Obr. 107). Na druhou stranu je tento jev patrný pouze u gelů s vyšším stupněm zesítnění a nelze detekovat pohyb prekursorového roztoku či materiálu v tkáni, u kterého nedošlo k vytvoření vazeb, tedy ke gelaci. Další možností je využití rozličných barviv. Volba závisí na mnoha faktorech, především tedy na interferenci se síťovacím systémem. Zde je důležité si uvědomit, že zvolená barva barviva nesmí být podobná barvě tkáně, krve a dalších transfúzních přípravků, jako má kupříkladu barvivo Sirius Red (Obr. 106). Pro detekci materiálu a jeho homogenity v nosné kapse SPREADS zařízení byla použita methylenová modř (Obr. 114, Obr. 120). Další možností je využití fluorescenčně značeného tyraminovaného derivátu HA. Výhodou je možná detekce prekursorových roztoků i vzniklého hydrogelu (Obr. 108), což bylo využito v preklinické studii při testování aplikovatelnosti materiálu pomocí katetru.

8.8 Preklinická studie

Finální materiál na bázi **HA-PH-RGD^{MIX}** byl aplikován pomocí katetru AMCath a SPREADS zařízení v rámci preklinické studie na modelu prasete či miniprasete. Preklinické studie jsou popsány v uvedených publikacích [166, 167, 169].

Operace myokardu, ať už za použití katetru či SPREADS zařízení, je časově náročná a během operačního procesu může zůstat suspenze buněk smísená s roztokem A – HA-PH-RGD^{MIX} v PBS pH 7,4 obsahující HRP. Viabilita ADSC není ovlivněna po dobu 4 hodin při inkubaci v roztoku HA-PH-RGD^{MIX} + HRP, ať už při RT či při snížené teplotě (2–10 °C). Poté signifikantně klesá viabilita buněk ($p < 0.05$), ale v případě uchování v lednici nedochází k poklesu buněčné viability o 30 % po dobu 7 hodin (Obr. 118).

V rámci preklinické studie byl vyvinut model pro simulaci infarktu myokardu společností Explora Biotech (partner EU projektu AM CARE). Testování aplikačních zařízení *in vivo* (AMCath/SPREADS zařízení) v kombinaci s finálním materiálem bylo úspěšné. Materiál pomocí katetru byl aplikován do srdeční stěny LV. Přítomnost hydrogelu uvnitř stěny LV byla potvrzena vizuálně a MRI analýzou (Obr. 119). SPREADS zařízení bylo úspěšně implantováno na srdeční stěnu pomocí adhesiva aplikovaného do okrajových částí aplikačního zařízení. Nadávkování prekursorového roztoku a gelace materiálu v nosné kapse byla bezproblémová a viditelná, jelikož hydrogel byl obarven methylenovou modří (Obr. 120). Dále proběhlo testování terapeutického efektu na modelu velkého zvířete – miniprasete. Testování proběhlo na miniprasatech. *In vivo* studie byla započata stimulací infarktu myokardu zavedením katetru s implantovaným balónkem. Po 14 dnech byla provedena implantace SPREADS zařízení a aplikace materiálu pomocí katetru. U žádného testovaného subjektu nedošlo k nežádoucí reakci. Následně po 7 dnech od provedení zákroku bylo zjištěno signifikantní zlepšení LVEF (%) u subjektů, kterým bylo aplikováno SPREADS zařízení obsahující hydrogel bez a s ADSC buňkami oproti kontrole (*gold standard*) (Obr. 121) [166, 167, 169].

9 ZÁVĚR

Omezená regenerační kapacita srdce po infarktu myokardu má za následek remodelační procesy, které mohou vést až k srdečnímu selhání. Bylo vyvinuto několik strategií zahrnujících mechanickou oporu srdeční tkáně či regenerativní přístupy za využití např. kmenových buněk. Prozatímní účinnost léčby je ale stále nedostatečná, mimo jiné díky nízké životaschopnosti buněk a jejich nedostatečné retenci v místě aplikace.

Nosným prvkem, který by podpořil životaschopnost buněk a jejich retenci v místě aplikace, může být hydrogel. Jeho značná hydrofilita, podobnost s extracelulární matrix a možnost gelace *in situ* jej předurčují jako vhodného kandidáta pro využití v této aplikaci. Kyselina hyaluronová je tělu vlastní látka s přirozenou biokompatibilitou a biodegradabilitou. Díky přítomnosti hyaluronidáz či reaktivních forem kyslíku v lidském těle dochází k rychlé degradaci, kterou lze výrazně zpomalit její modifikací za vzniku derivátů HA vedoucích za vhodných podmínek k tvorbě hydrogelů. Díky těmto vlastnostem jsou hydrogely na bázi HA považovány za vhodné materiály pro vývoj prostředků umožňujících aplikaci a růst buněk sloužících pro buněčnou terapii po infarktu myokardu.

Pro dosažení požadovaného efektu regenerace tkáně po infarktu myokardu je nutné do hydrogelu zakomponovat co nejvíce buněk při zachování jejich viability, možnosti proliferace a současně zachování vhodných vlastností materiálu. Pro danou aplikaci byly použity kardiopoietické buňky ADSC. Zvolené finální množství buněk (ADSC) inkorporovaných do hydrogelu bylo 20 mil na 1 ml hydrogelu.

V dané práci byly využity oxidovaná forma HA (HA-Ox), kterou lze zesíť pomocí alkoxyaminu POA, a také tyraminovaný (hydroxyfenyl) derivát HA (HA-TA) podstupující reakci katalyzovanou enzymem HRP za přítomnosti H_2O_2 . Síťovací reakce HA-Ox/POA lze řídit prostřednictvím reakčních podmínek, ale přítomnost biologického materiálu (buněk) v gelační směsi má signifikantní vliv na rychlost gelace a tuhost gelů. Při inkorporaci požadovaného množství buněk pro vyvíjenou aplikaci (20 mil. ADSC na 1 ml gelu) ztrácí gely tvarovou stálost či ke gelaci nedochází. Na základě dosažených výsledků by mohl být tento materiál využitelný v regenerativní medicíně jako matrice pro buňky v nižší koncentraci či uvolňování růstových faktorů, ale není vhodný pro danou aplikaci zahrnující inkorporaci vysokého množství buněk. Naproti tomu enzymatickou reakcí tyraminovaného derivátu HA v přítomnosti peroxidu vodíku vznikají hydrogely s vhodnými viskoelastickými vlastnostmi i v přítomnosti požadovaného množství buněčného materiálu.

Buněčná adheze k povrchu hydrogelů na bázi kyseliny hyaluronové je ale termodynamicky nevýhodná. Pro podporu buněčné viability a adheze byly vyvinuty hydrogely, které obsahují peptidové sekvence interagující s buněčnými receptory ze skupiny integrinů. Z tohoto důvodu byly připraveny hydrogely na bázi HA-TA obsahující příměs fibrinogenu – proteinu, který ve své struktuře nese řadu adhesivních oligopeptidových sekvencí interagujících s integriny (např. RGD). Fibrinogen signifikantně podporuje buněčnou adhezi, ale jelikož je koagulantem a není pevně vázán na strukturu derivátu, je zde riziko embolizace. Druhou možností zavedení adhesivních oligopeptidů do hydrogelu je využití derivátu HA, jenž obsahuje kovalentně vázanou syntetickou sekvenci aminokyselin. K tomuto účelu byl využit derivát (HA-PH-RGD^{PURE}) s adhesivním oligopeptidem acylovaným 3-(4-hydroxyfenyl)propionovou kyselinou, která díky přítomnosti hydroxyfenylového jádra umožňuje zesíťování tohoto derivátu HA pomocí HRP katalyzované reakce. Výhodou je pevná vazba RGD sekvence na strukturu derivátu, čímž je zamezeno riziku embolizace. Na druhou stranu objemnost skupiny RGD snižuje efektivitu zesíťování, tedy zpomaluje gelaci a snižuje tuhost hydrogelové sítě. Proto byl derivát s RGD (HA-PH-RGD^{PURE}) kombinován s tyraminovaným derivátem HA-TA (1:1). Čas gelace se tímto způsobem zkrátil ze ≈ 100 s na 18–26 s v závislosti na šarži derivátu, šarži HRP či peroxidu vodíku.

V této práci byl jako aplikační zařízení využit speciálně navržený katetr s rezervoárem a SPREADS zařízení složené z aplikační části sloužící k dopravení materiálu do nosné kapsy, která je tak vyplněna hydrogelem obsahující buňky a na okrajích bioadhezivem pro uchycení *patche* na srdeční stěně.

Pro možnou aplikaci připraveného materiálu pomocí daných zařízení je nutné zachování nízké viskozity a výtlačné síly prekurzorového roztoku, čehož bylo docíleno volbou nízké molekulové hmotnosti výchozího derivátu (60–90 kDa) při koncentraci 20 mg/ml. Obsah síťovacích činidel 1 (HRP 0,24 U/ml, H₂O₂ 0,003 %, 1 mM,) byl zvolen na základě rychlosti gelace, charakteru hydrogelové sítě, botnění a kompatibility s dvěma zvolenými aplikačními zařízeními (katetr, SPREADS). Inkorporace vysokého množství buněk (20 mil. ADSC na 1 ml) má sice vliv na charakter gelu, ale ten lze redukovat mírným navýšením obsahu činidel – síťovací činidla 2 HRP 0,4 U/ml, H₂O₂ 0,005 %, 1,67 mM.

U finálního materiálu s obsahem 20 mil ADSC/ml byla prokázána aplikovatelnost pomocí katetru *in vitro* bez signifikantního vlivu na buněčnou viabilitu. Výhodou katetru je jeho minimálně invazivní aplikace do srdeční stěny. Vzniklý hydrogel byl při preklinické studii detekován v místě aplikace bez negativního vlivu na okolní tkáň či testovaný subjekt (miniprase).

Materiál byl rovněž *in vitro* aplikován do nosné kapsy zařízení SPREADS, kde došlo k jeho rozprostření a vzniku hydrogelu s inkorporovanými viabilními buňkami s homogenní distribucí. Předpokladem je mechanická opora poškozené srdeční stěny po infarktu myokardu pomocí tohoto elastického a biologicky rozložitelného *patche* v kombinaci s regenerací srdeční tkáně kmenovými buňkami, jež prochází přes polopropustnou membránu při SPREADS degradaci. *In vivo* aplikace hydrogelu do nosné kapsy, její implantace a uchycení pomocí bioadheziva bylo úspěšné. Došlo k významnému zvýšení LVEF (%) po 7 dnech od implantace v porovnání se standardem GS (*gold standard*), u kterého nebylo použito aplikační zařízení ani vyvinutý materiál či buňky.

Cílem disertační práce byl vývoj hydrogelu na bázi HA sloužící jako scaffold pro enkapsulaci buněk pro možnou aplikaci v tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně. Hydrogely na bázi hydroxyfenyl derivátu HA a oxidované formy HA naplňují daný záměr. Za účelem zvýšení regenerační schopnosti tkáně po infarktu myokardu musí scaffold umožnit zabudování vysokého množství buněk. Tuto podmínku splňují hydrogely na bázi hydroxyfenyl derivátu HA. Pro podporu viability a adheze buněk ve scaffoldu byl zvolen hydroxyfenyl derivát HA nesoucí pevně vázanou RGD sekvenci. V rámci disertační práce byl vyvinut hydrogel, do jehož struktury lze inkorporovat kmenové buňky izolované z tukové tkáně dárců. Obsah síťovacích činidel byl optimalizován pro možnou enkapsulaci vysokého množství buněk. Finálně vybraný materiál byl úspěšně aplikován pomocí speciálně vyvinutých aplikačních zařízení (katetru a SPREADS) *in vitro* i *in vivo*.

10 LITERATURA

1. Pouchlý, J.: Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav. Vyd. 2, Praha: VŠCHT, 2001. Makromolekulární gely, s. 147–164, ISBN 80-7080-422-X.
2. Osada Y., Kajiwara, K. Gels handbook [online]. San Diego: Academic Press, 2001 [cit. 2016-08-08]. ISBN 01-239-4964-5.
3. Bartovská, L.; Šišková, M.: Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav, Praha VŠCHT, 2002. ISBN 80-7080-475-0
4. Picout, D. R., Ross-Murphy, S. B.: Rheology of Biopolymer Solutions and Gels. *The Scientific World Journal* [online]. 2003, 3, 105–121 [cit. 2016-04-16]. ISSN 1537-744x. DOI: 10.1100/tsw.2003.15.
5. Barbucci, R. *Hydrogels biological properties and applications*. Online-Ausg. Milan: Springer, 2009. ISBN 88-470-1104-3
6. Burdick, J. A., Prestwich, G. D. Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications. *Advanced Materials* [online]. 2011, 23(12), H41–H56 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1002/adma.201003963. ISBN 10.1002/adma.201003963. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/adma.201003963>
7. Singh, A., Sharma, P. K., Garg, V. K., Garg, G. Hydrogels: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* [online]. 2010, 4(2), 97–105 [cit. 2016-08-08]. ISSN 0976 – 044X. Dostupné z: <http://www.globalresearchonline.net>
8. Burdick, J. A., Mauck, R. L. *Biomaterials for tissue engineering applications: a review of the past and future trends* [online]. Wien: Springer, c2011 [cit. 2016-08-08]. ISBN 978-3-7091-0384-5.
9. Spiller, K. L., Maher, S. A., Lowman, A. M. Hydrogels for the Repair of Articular Cartilage Defects. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* [online]. 2010, 4(2), 97–105 [cit. 2016-08-08]. DOI: 10.1089/ten.teb.2011.0077. ISBN 10.1089/ten.teb.2011.0077. ISSN 0976 – 044X. Dostupné z: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ten.teb.2011.0077>
10. Ji, C.; Khademhosseini, A.; Dehghani, F.: Enhancing cell penetration and proliferation in chitosan hydrogels for tissue engineering applications, *Biomaterials* [online]. 2011, 32(36), 9719–9729 [cit. 2019-12-29]. ISSN 0142-9612. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.09.003>.
11. Song, X.; Zhu, C.; Fan, D.; Mi, Y.; Li, X.; Fu, R.Z.; Duan, Z.; Wang, Y.; Feng, R.R. A Novel Human-Like Collagen Hydrogel Scaffold with Porous Structure and Sponge-Like Properties. *Polymers* [online]. 2017, 9(12), 638 [cit. 2019-12-29]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6418622/>
12. Pescosolido, L.; Feruglio, L. et al. Mesh size distribution determination of interpenetrating polymer network hydrogels *Soft Matter* [online]. 2012, 8, 7708–7715 [cit. 2019-12-29]. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/sm/c2sm25677k#!divAbstract>
13. Hahn, M. S.; Liao, H. et al. *Acta Biomater* [online]. 2008, 4(5): 1161–1171 [cit. 2019-12-29]. DOI: 10.1016/j.actbio.2008.04.013 Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2629651/>
14. Caliri, S.; Burdick, J. A. A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nat Methods* [online]. 2016, 13, 405–414 [cit. 2019-12-29]. DOI: 10.1038/nmeth.3839 Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5800304/>
15. Anseth K. S.; Bowman, C. N.; Brannon-Peppas, L. Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. *Biomaterials* [online]. 1996, 17(17), 1647–1657 [cit. 2019-12-29]. ISSN 0142-9612, [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)87644-7](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)87644-7). Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0142961296876447>

16. Kuijpers, A. *et al.*, Characterization of the network structure of carbodiimide cross-linked gelatin gels., *Macromolecules* [online]. 1999, **32**(10), 3325–3333 [cit. 2019-12-29]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/1854/LU-120949>
17. Drury, J. L.; Dennis, R. G.; Mooney, D. J. The tensile properties of alginate hydrogels. *Biomaterials* [online]. 2004, **25**(16), 3187–3199 [cit. 2019-12-29]. ISSN 0142-9612, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.002>. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961203008743>
18. Li, J. Y.; Hu, Y.H.; Vlassak, J. J.; Suo, Z. G. Experimental determination of equations of state for ideal elastomeric gels. *Soft Matter* [online]., 2012, **8**, 8121–8128 [cit. 2019-12-29]. DOI: 10.1039/C2SM25437A Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/SM/c2sm25437a#!divAbstract>
19. Li, J.; Mooney, D. J. Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nat Rev Mater.* [online]. 2016, **1**(12): 16071. DOI: 10.1038/natrevmats.2016.71 Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5898614/>
20. Hennink, W. E., Nostrum C. F. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Review* [online]. 2002, **54**(1), 13–36 [cit. 2017-09-25]. DOI: 10.1016/S0169-409X(01)00240-X. ISBN 10.1016/S0169-409X(01)00240-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X0100240X>
21. Hoffman, A. S. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2002, **54**(1), 3–12 [cit. 2017-09-28]. DOI: 10.1016/S0169-409X(01)00239-3. ISSN 0169409x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X01002393>
22. Gulrez, S. K. H., Al-Assaf, S., Glyn O. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications* [online]. InTech, 2011 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.5772/24553. ISBN 10.5772/24553. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/progress-in-molecular-and-environmental-bioengineering-from-analysis-and-modeling-to-technology-applications/hydrogels-methods-of-preparation-characterisation-and-applications>
23. Bouklas, N., Huang, R. Swelling kinetics of polymer gels: comparison of linear and nonlinear theories. *Soft Matter* [online]. 2012, **8**(31) [cit. 2016-08-08]. DOI: 10.1039/C2SM25467K. ISBN 10.1039/c2sm25467k. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2sm25467k>
24. Roylance, D. Stress-strain curves. [online]. 2001 [cit. 2016-08-08]. Dostupné z: <http://www.saylor.org/site/wp-content/uploads/2012/09/ME1022.2.4.pdf>
25. Nair, L. S. *Injectable hydrogels for regenerative engineering*. Hackensack, NJ: Imperial College Press, 2016. ISBN 978-178-3267-460
26. Shu, X. Z., Liu, Y., Palumbo, F. S., Luo, Y., Prestwich, G. D. In situ crosslinkable hyaluronan hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* [online]. 2004, **25**(7–8), 1339–48 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.08.014. ISBN 10.1016/j.biomaterials.2003.08.014. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961203006707>
27. Hyiodine [online]. [cit. 2016-08-08]. Dostupné z: <http://www.hyiodine.cz/>
28. Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., Kolar, J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Journal of Structural Biology* [online]. 2008, **53**, 397–411, [cit. 2016-08-08]. Dostupné z: <http://www.journals.uzpi.cz/uniqueFiles/02029.pdf>
29. Varki, A., Cummings, R. D., Esko J. D. et al., editors: *Essentials of Glycobiology*, 2nd edition, Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. Hyaluronan [online]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>
30. Hamidi, M., Azadi, A., Rafiei, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2008, **60**(15), 1638–1649 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1016/j.addr.2008.08.002. ISBN 10.1016/j.addr.2008.08.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X08002275>

31. Hyalobarrier gel/ Hyalobarrier gel ENDO [online]. [cit. 2016-08-08]. Dostupné z: <http://www.srusty.cz/cz/hyalobarrier-gel/>
32. Gengigel Rinse [online]. [cit. 2016-08-08]. Dostupné z: http://www.tepe.com/fileadmin/uploads/pdf-filer/UK/Gengigel_Leaflet.pdf
33. Hascall, V. C., Laurent, C. T.: Hyaluronan: Structure and Physical Properties. *Glycoforum* [online]. 1997, [cit. 2016-08-08]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/>
34. Thalberg, K., Lindman, B.: Interaction between hyaluronan and cationic surfactants. *J. Phys. Chem.* [online]. 1989, **93**(4), 1478–1483 [cit. 2019-12-29]. ISSN 0022-3654 DOI: 10.1021/j100341a058 Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/j100341a058>
35. Structure of hyaluronan [online]. [cit. 2019-12-29]. Dostupné z: <https://vismed.trbchemedica.co.uk/business-professionals/role-and-purpose-of-hyaluronan/structure-of-hyaluronan>
36. Xu, X. et al Hyaluronic acid-based hydrogels: from a natural polysaccharide to complex networks. *Soft Matter* [online]. 2012, **8**(12), 3280–3294 [cit. 2016-08-08]. ISSN 1744-683x. DOI: 10.1039/C2SM06463D. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2sm06463d>
37. Faure, A. M., Werder, J., Nyström, L. Reactive oxygen species responsible for beta-glucan degradation, *Food Chemistry*, 2013, **141**(1), 589–596, ISSN 0308-8146, DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.02.096. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613002598>
38. Weigel, P. H.: Bacterial hyaluronan synthases. *Glycoforum* [online]. 1998, [cit. 2016-08-08]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/>
39. Garg, H. G., Hales, C. A. *Chemistry and biology of hyaluronan* [online]. Boston: Elsevier, 2004 [cit. 2016-08-09]
40. Spiller, K. L., Maher, S. A., Lowman, A. M. Hydrogels for the Repair of Articular Cartilage Defects. *Tissue Engineering Part B: Reviews* [online]. 2011, **17**(4), 281–299 [cit. 2017-09-28]. DOI: 10.1089/ten.teb.2011.0077. ISSN 1937-3368. Dostupné z: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ten.teb.2011.0077>
41. Sivashanmugam, A., Kumar, R. A., Priya, M. V., Nair, S. V., Jayakumar R. An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering. *European Polymer Journal* [online]. 2015, **72**, 543–565 [cit. 2017-09-28]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2015.05.014. ISSN 00143057. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305715002785>
42. Li, J., Mooney, D. J. Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nature Reviews Materials* [online]. 2016, **1**(12) [cit. 2017-09-28]. DOI: 10.1038/natrevmats.2016.71. ISSN 2058-8437. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/natrevmats201671>
43. ISO 10993-1: Biological Evaluation of Medical Devices Part 1, Attachment A, 2013
44. Zaviskova, K. et al. Injectable hydroxyphenyl derivative of hyaluronic acid hydrogel modified with RGD as scaffold for spinal cord injury repair. *J Biomed Mater Res A*. [online]. 2018, **106**(4), 1129–1140. DOI: 10.1002/jbm.a.36311 Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29266693>
45. Johnson, T. D., Christman, K. L. Injectable hydrogel therapies and their delivery strategies for treating myocardial infarction. *Expert Opinion on Drug Delivery* [online]. 2012, **10**(1), 59–72 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1517/17425247.2013.739156. ISBN 10.1517/17425247.2013.739156. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425247.2013.739156>
46. Prestwich, G. D.: Biomaterials from Chemically-Modified Hyaluronan. *Glycoforum* [online]. 2001, [cit. 2016–16–4]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/>
47. Liu, M., Zeng, X., Mao, Ch. et al. Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. *Bone Research* [online]. 2017, **5** [cit. 2017-09-28]. DOI: 10.1038/boneres.2017.14. ISBN 10.1038/boneres.2017.14. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/boneres201714>

48. Fallacara, A., Baldini, E., Manfredini, S., Vertuani S. Hyaluronic Acid in the Third Millennium. *Polymers (Basel)* [online]. 2018, **10**(7) [cit. 2019-12-29]. DOI: 10.3390/polym10070701. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30960626>
49. Buffa, R., Pravda, M., Sedláček, P., Chytil, M., Hydrogely, 2015, ISBN 978-80-260-7866-1
50. Khunmanee, S., Jeong, Y., Park, H. Crosslinking method of hyaluronic-based hydrogel for biomedical applications. *J Tissue Eng.* [online]. 2017 [cit. 2019-12-29]. DOI: 10.1177/2041731417726464. Dostupné z: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2041731417726464>
51. Highley, C. B., et al. Recent advances in hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2016, **40**, 35–40 [cit. 2019-12-29]. ISSN 0958-1669, DOI: 10.1016/j.copbio.2016.02.008. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166916300313>
52. Vorvolakos, K. et al. Ionically cross-linked hyaluronic acid: wetting, lubrication, and viscoelasticity of a modified adhesion barrier gel. *Med Devices* [online]. 2011, **4**, 1–10 [cit. 2019-12-29]. DOI: 10.2147/MDER.S13962 Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3417868/#__ffn_sectitle
53. Wang M-D et al. Novel crosslinked alginate/hyaluronic acid hydrogels for nerve tissue engineering. *Frontiers of Materials Science* [online]. 2013, **7**(3), 269–284 [cit. 2019-12-29]. ISSN 2095-0268, DOI: 10.1007/s11706-013-0211-y Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11706-013-0211-y>
54. Mayol, L. et al Effect of hyaluronic acid on the thermogelation and biocompatibility of its blends with methyl cellulose. *Carbohydr. Polym.* [online]. 2014, **4**, 480–5 [cit. 2019-12-29]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.06.020 Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25129771>
55. Tan, H. et al. Thermosensitive injectable hyaluronic acid hydrogel for adipose tissue engineering. *Biomaterials* [online]. 2009, **30**(36), 6844–6853 [cit. 2019-12-29]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.08.058. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19783043>
56. Rodell, C. B. et al Rational design of network properties in guest-host assembled and shear-thinning hyaluronic acid hydrogels. *Biomacromolecules* [online]. 2013, **14**(11), 4125–4134. DOI:10.1021/bm401280z Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm401280z>
57. La Gatta, A. et al. Hyaluronan dermal fillers via crosslinking with 1,4-butanediol diglycidyl ether: Exploitation of heterogeneous reaction conditions. *Journal of biomedical materials research. Part B Applied biomaterials* [online]. 2015, **104**(1), 9–18 [cit. 2019-12-29]. DOI: 10.1002/jbm.b.33329. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25611588>
58. Khunmanee, S., Jeong, Y., Park, H. Crosslinking method of hyaluronic-based hydrogel for biomedical applications. *J Tissue Eng.* [online]. 2017, **8** [cit. 2019-12-29]. DOI: 10.1177/2041731417726464 Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5590699/>
59. Borzacchiello, A., Rosso, L., Malle, B. M., Schwach-Abdellaoui, K., Ambrosio, L. Hyaluronic Acid Based Hydrogels for Regenerative Medicine Applications. *BioMed Research International* [online]. 2015, 1–12 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1155/2015/871218. ISSN 2314-6133. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/871218/>
60. Darr, A., Calabro, A. Synthesis and characterization of tyramine-based hyaluronan hydrogels. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2009, **20**(1), 33–44 [cit. 2017-09-28]. DOI: 10.1007/s10856-008-3540-0. ISSN 0957-4530. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-008-3540-0>
61. Kobayashi, S., Uyama, H., Kimura, S. Enzymatic polymerization. *Chem Rev* [online]. 2001, **101**(12), 3793–818 [cit. 2017-09-28]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/cr9901211>

62. Kobayashi, S., Morii, H., Itoh, R., Kimura, S., Ohmae, M. Enzymatic polymerization to artificial hyaluronan: a novel method to synthesize a glycosaminoglycan using a transition state analogue monomer. *J Am Chem Soc* [online]. 2001, **123**(47), 11825–6 [cit. 2017-09-28]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ja017104+>
63. Kurisawa, M., Chung, J. E., Yang, Y. Y., Gao, S. J., Uyama H. Injectable biodegradable hydrogels composed of hyaluronic acid-tyramine conjugates for drug delivery and tissue engineering. *Chemical Communications* [online]. 2005, (34), 4312–4314 [cit. 2017-09-28]. DOI: 10.1039/b506989k. ISSN 1359-7345. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b506989k>
64. Gross, A. J., Sizer, I. W. The Oxidation of Tyramine, Tyrosine, and Related Compounds by Peroxidase *J. Biol. Chem.* 1959, **234**(6), 1611-1614.
65. Teixeira, L. S., Feijen J., van Blitterswijk C. A. et al. Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: emerging strategies for tissue engineering. *Biomaterials* [online]. 2012, **33**(5), 1281-1290 [cit. 2017-09-28]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.067. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014296121101283X>
66. Lee, F., Chung, J. E., Kurisawa, M. An injectable hyaluronic acid–tyramine hydrogel system for protein delivery. *J Control Release* 2009, **134**(3), 186–193.
67. Wang, L.-S., Boulaire, J., Chan, P. P. Y., Chung, J. E., Kurisawa, M. The role of stiffness of gelatin-hydroxyphenylpropionic acid hydrogels formed by enzyme-mediated crosslinking on the differentiation of human mesenchymal stem cell. *Biomaterials* 2010, **31**(33), 8608–8616.
68. Lim, T. C., Toh, W. S., Wang, L.-S., Kurisawa, M., Spector, M. The effect of injectable gelatin-hydroxyphenylpropionic acid hydrogel matrices on the proliferation, migration, differentiation and oxidative stress resistance of adult neural stem cells. *Biomaterials* 2012, **33**(12), 3446-3455.
69. Toh, W. S., Lim, T. C., Kurisawa, M., Spector, M. Modulation of mesenchymal stem cell chondrogenesis in a tunable hyaluronic acid hydrogel microenvironment. *Biomaterials* 2012, **33**(15), 3835–3845
70. Wang, L.-S., Du, C., Chung, J. E., Kurisawa, M. Enzymatically cross-linked gelatin-phenol hydrogels with a broader stiffness range for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Acta Biomaterialia* 2012, **8**(5), 1826–1837
71. Wang, L.-S., Du, C., Toh, W. S., Wan, A. C., Gao, S. J., Kurisawa, M. Modulation of chondrocyte functions and stiffness-dependent cartilage repair using an injectable enzymatically crosslinked hydrogel with tunable mechanical properties. *Biomaterials* 2014, **35**(7), 2207–2217
72. Tavakol, M., Vashghani-Farahani, E., Soleimani, M., Mohammadifar, M. A., Hashemi-Najafabadi, S., Hafizi, M. Synthesis and characterization of an enzyme mediated *in situ* forming hydrogel based on gum tragacanth for biomedical applications. *Iranian Journal of Biotechnology* 2014, **12**, 42–49
73. Hu, M., Kurisawa, M., Deng, R., Teo, C.-M., Schumacher, A., Thong, Y.-X., Wang, L., Schumacher, K. M., and Ying, J. Y. Cell immobilization in gelatin-hydroxyphenylpropionic acid hydrogel fibers. *Biomaterials* 2009, **30**(21), 3523–3531
74. Chin, L., Calabro, A., Walker, E., Derwin, K. A. Mechanical properties of tyramine substituted-hyaluronan enriched fascia extracellular matrix. *J Biomed Mater Res Part A* 2012, **100**(3), 786-793
75. Loebel, C., Stauber, T., D'Este, M., Alini, M., Zenobi-Wong, M., Eglin, D. Fabrication of cell-compatible hyaluronan hydrogels with a wide range of biophysical properties through high tyramine functionalization. *J. Mater. Chem. B* [online]. 2017, **5**(12), 2355–2363 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1039/C6TB03161G. ISBN 10.1039/C6TB03161G. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6TB03161G>

76. Abu-Hakmeh, A., Kung, A., Mintz, B. R., Kamal, S., Cooper, J. A., Lu, X. L., Wan, L. Q. Sequential gelation of tyramine-substituted hyaluronic acid hydrogels enhances mechanical integrity and cell viability. *Medical* [online]. 2016, **54**(12), 1893–1902 [cit. 2017-09-28]. DOI: 10.1007/s11517-016-1474-0. ISSN 0140-0118.
Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11517-016-1474-0>
77. Wolfova, L., Pravda, M. et al. *Derivates based on hyaluronic acid, capable of forming hydrogels, method of preparation thereof, hydrogels based on said derivatives, method of preparation thereof and use* (2013) WO2013127374 A1
78. Kučera, L., Weinfurterová, R., Dvořáková, J., Kučera, J., Pravda, M., Foglarová, M. et al Chondrocyte Cultivation in Hyaluronan-Tyramine Cross-Linked Hydrogel, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 2015, **64**(13), 661–674
DOI: 10.1080/00914037.2014.996715
79. Dvořáková, J., Kučera, L., Kučera, J., Švík, K., Foglarová, M., Muthný, T. et al. Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in a Hydrogel System Based on an Enzymatically Crosslinked Tyramine Derivative of Hyaluronan. *J Biomed Mater Res* 2014, **102**, 3523–3530.
DOI: 10.1002/jbm.a.35033
80. Sakai, S., Komatani, K., Taya, M. Glucose-triggered co-enzymatic hydrogelation of aqueous polymer solutions. *RSC Adv* [online]. 2012, **2**(4), 1502–1507 [cit. 2017-09-28]. DOI: 10.1039/C1RA01060C. ISSN 2046-2069. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C1RA01060C>
81. Nuttelman, C. R., Mortisen, D. J., Henry, S. M., Anseth, K. S. Attachment of fibronectin to poly(vinyl alcohol) hydrogels promotes NIH3T3 cell adhesion, proliferation, and migration. *J Biomed Mater Res*. 2001, **57**(2), 217–223
82. Shu, X. Z., Ghosh, K., Liu, Y., Palumbo, F. S. Luo, Y., Clark, R. A., Prestwich G. D. Attachment and spreading of fibroblasts on an RGD peptide–modified injectable hyaluronan hydrogel. *Journal of Biomedical Materials Research* [online]. 2004, **68A**(2), 365–375 [cit. 2017-09-28]. DOI: 10.1002/jbm.a.20002. ISSN 0021-9304. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.20002>
83. Flanagan, L. A., Rebaza, L. M., Derzic, S., Schwartz, P. H., Monuki E. S. Regulation of human neural precursor cells by laminin and integrins. *Journal of Neuroscience Research* [online]. 2006, **83**(5), 845–856 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1002/jnr.20778. ISSN 0360-4012. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jnr.20778>
84. Meiners, S., Mercado, M. L. T. (2003) Functional peptide sequences derived from extracellular matrix glycoproteins and their receptors. *Molecular Neurobiology* [online]. 2003, **27**(2), 177–196 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1385/MN:27:2:177. ISSN 0893-7648. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1385/MN:27:2:177>
85. Schense, J. C., Bloch, J., Aebischer, P., Hubbel, J. A. Enzymatic incorporation of bioactive peptides into fibrin matrices enhances neurite extension. *Nat. Biotech.* 2000, **18**(4), 415–419
86. Kurimoto, R., Kanie, K., Idota, N., et al. Combinational Effect of Cell Adhesion Biomolecules and Their Immobilized Polymer Property to Enhance Cell-Selective Adhesion. *International Journal of Polymer Science* [online]. 2016, 1–9 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1155/2016/2090985. ISSN 1687-9422. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ijps/2016/2090985/>
87. Huerta-Angeles, G., et al. Reductive alkylation of hyaluronic acid for the synthesis of biocompatible hydrogels by click chemistry. *Carbohydr. Polym.*, 2012, **90**(4), 1704–1711
88. Pravda, M., et al. RGD modified conjugate of hyaluronic acid and 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2014, **8**, 359–359
89. Wang, X., Yan, C., Ye, K., He, Y., Li, Z., Ding, J. Effect of RGD nanospacing on differentiation of stem cells. *Biomaterials* [online]. 2013, **34**(12), 2865–2874 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.01.021. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961213000379>

90. Soler-Botija, C., Bagó, J. R., Llucà-Valldeperas, A. et al. Engineered 3D bioimplants using elastomeric scaffold, self-assembling peptide hydrogel, and adipose tissue-derived progenitor cells for cardiac regeneration. *American Journal of Translational Research*. 2014, **6**(3), 291-301
91. Ranga, A., Lutolf, M. P., Hilborn, J., Ossipov, D. O. Hyaluronic Acid Hydrogels Formed in Situ by Transglutaminase-Catalyzed Reaction. *Biomacromolecules*, 2016, **17**(5), 1553–1560, DOI: 10.1021/acs.biomac.5b01587
92. Teixeira, L. S. M., Feijen, J., van Blitterswijk, C. A., Dijkstra, P. J., Karperien, M., Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: Emerging strategies for tissue engineering. *Biomaterials* [online]. 2012, **33**(5), 1281–1290. [cit. 2019-12-29]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.067>
93. Yu, F., Cao, X., Li, Y., Zeng, L., Yuan, B., Chen, X. An injectable hyaluronic acid/PEG hydrogel for cartilage tissue engineering formed by integrating enzymatic crosslinking and Diels–Alder “click chemistry”. *Polym. Chem* [online]. 2014, **5**(3), 1082–1090 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1039/C3PY00869J. ISSN 1759-9954. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3PY00869J>
94. Baiet Leach, J., Bivens, K. A., Patrick, C. W. Jr, Schmidt, C. E. Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: Natural, biodegradable tissue engineering scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 2003, **82**(5), 578–589 [cit. 2017-09-28]. DOI: 10.1002/bit.10605. ISSN 0006-3592. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.10605>
95. Ondeck, M. G., Engler, A. J. Mechanical Characterization of a Dynamic and Tunable Methacrylated Hyaluronic Acid Hydrogel. *J Biomech Eng* 2016, **138**(2), DOI: 10.1115/1.4032429
96. Bobula, T., Buffà R., Hermannová M., Kohutová L., et al. A novel photopolymerizable derivative of hyaluronan for designed hydrogel formation. *Carbohydr Polym.* [online]. 2017, **161**, 277–285 [cit. 2017-09-12]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.01.009. ISBN 10.1016/j.carbpol.2017.01.009. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861717300097>
97. Donnelly, P. E., Chen, T., Finch, A. et al. Photocrosslinked Tyramine-Substituted Hyaluronate Hydrogels with Tunable Mechanical Properties Improve Immediate Tissue-Hydrogel Interfacial Strength in Articular Cartilage. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2017, **28**(6), 582–600. DOI: 10.1080/09205063.2017.1289035.
98. Loebel, C., Szczesny, S. E., Cosgrove B. D. et al. Cross-Linking Chemistry of Tyramine-Modified Hyaluronan Hydrogels Alters Mesenchymal Stem Cell Early Attachment and Behavior. *Biomacromolecules* [online]. 2017, **18**(3), 855–864 [cit. 2019-12-27]. DOI: 10.1021/acs.biomac.6b01740. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28134036>
99. Takahashi, A., Suzuki, Y., Suhara, T., et al. In Situ Cross-Linkable Hydrogel of Hyaluronan Produced via Copper-Free Click Chemistry. *Biomacromolecules* [online]. 2013, **14**(10), 3581-3588 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1021/bm4009606. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm4009606>
100. Nimmo, C. M., Owen, S. C., Shoichet, M. S. Diels–Alder Click Cross-Linked Hyaluronic Acid Hydrogels for Tissue Engineering. *Biomacromolecules* [online]. 2011, **12**(3), 824–830 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1021/bm101446k. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm101446k>
101. Kharkar, P. M., Rehmann, M. S., Skeens, K. M., Maverakis, E., Kloxin, A. M. Thiol-ene click hydrogels for therapeutic delivery. *ACS biomaterials science & engineering* [online]. 2016, **2**(2), 165–179 [cit. 2019-09-29]. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.5b00420. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.5b00420>

102. Lee, H. J., Fernandes-Cunha, G. M., Myung, D. In situ-forming hyaluronic acid hydrogel through visible light-induced thiol-ene reaction. *Reactive and Functional Polymers* [online]. 2018, **131**, 29-35, ISSN 1381-5148, [cit. 2019-12-29]. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2018.06.010. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381514818303341>
103. Wu, Z. M., Zhang, X. G., C. Zheng, C., Li, C. X., Zhang, S. M., Dong, R. N., Yu, D. M. Disulfide-crosslinked chitosan hydrogel for cell viability and controlled protein release. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2009, **37**(3-4), 198-206 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1016/j.ejps.2009.01.010. ISSN 09280987. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098709000335>
104. Bansil, R., Stanley, E., Lamont, J. T. Mucin Biophysics. *Annual Review of Physiology* [online]. 1995, **57**(1), 635-657 [cit. 2017-09-29]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.57.030195.003223>
105. Šedová, P., Buffa, R., Kettou S., et al. Preparation of hyaluronan polyaldehyde—a precursor of biopolymer conjugates. *Carbohydrate Research* [online]. 2013, **371**, 8-15 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1016/j.carres.2013.01.025. ISSN 00086215. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621513000487>
106. Buffa, R., Šedová, P., et al. α,β -Unsaturated aldehyde of hyaluronan—Synthesis, analysis and applications. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2015, **134**, 293-299 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.07.084. ISSN 01448617. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861715007134>
107. Tan, H., Li, H., Rubin, J. P., Marra, K. G. Controlled gelation and degradation rates of injectable hyaluronic acid-based hydrogels through a double crosslinking strategy. *J Tissue Eng Regen Med.* [online]. 2011, **5**(10), 790-797 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1002/term.378. ISBN 10.1002/term.378. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/term.378>
108. Tan, H., Rubin, J. P., Marra, K. G. Injectable in situ forming biodegradable chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for adipose tissue regeneration. *Organogenesis* [online]. 2010, **6**(3), 173-180 [cit. 2017-09-29].
109. Mozaffarian, D., et al., Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update. *A Report From the American Heart Association*, 2015.
110. Roger, V. L., Go, A. S., Lloyd-Jones, D. M., et al. Heart disease and stroke statistics—2012 Update: A report from the American Heart Association. *Circulation* 2012.
111. Wong, N. D. Epidemiological studies of CHD and the evolution of preventive cardiology. *Nat Rev Cardiol* [online]. 2014, **11**(5), 276-289 [cit. 2017-12-29]. DOI: 10.1038/nrcardio.2014.26. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24663092>
112. Christman, K. L., Lee, R. J. Biomaterials for the treatment of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* [online]. 2006, **48**, 907-13 [cit. 2017-12-29]. DOI: 10.1016/j.jacc.2006.06.005 Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16949479>
113. Blom, A. S., Acker, M. A. The Surgical Treatment of End-Stage Heart Failure. *Current Problems in Cardiology* [online]. 2007, **32**(10), 553-599 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1016/j.cpcardiol.2007.08.001. ISSN 01462806. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0146280607000965>
114. O'Neill, H. S., Gallagher, L. B., O'Sullivan, J. et al. Biomaterial-Enhanced Cell and Drug Delivery: Lessons Learned in the Cardiac Field and Future Perspectives. *Advanced Materials* [online]. 2016, **28**(27), 5648-5661 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1002/adma.201505349. ISSN 09359648. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/adma.201505349>
115. Schulman, I. H., Hare, J. M. Key developments in stem cell therapy in cardiology. *Regenerative Medicine* [online]. 2012, **7**(6s), 17-24 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.2217/rme.12.80. ISSN 1746-0751. Dostupné z: <http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/rme.12.80>

116. Roche, E. T., et al., Comparison of biomaterial delivery vehicles for improving acute retention of stem cells in the infarcted heart. *Biomaterials*, 2014, **35**(25), 6850–6858.
117. Stamm, C., Nasser, B., Choi, Y. H., Hetzer, R. Cell Therapy for Heart Disease: Great Expectations, As Yet Unmet. *Heart, Lung and Circulation* [online]. 2009, **18**(4), 245–256 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1016/j.hlc.2008.10.014. ISSN 14439506. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1443950608009256>
118. Sherman, W., Martens, T. P., Viles-Gonzalez, J. F., Siminiak, T. Catheter-based delivery of cells to the heart. *Nature Clinic. Pract. Cardiovas. Med.*, 3(Suppl. 1), 2006, 57-64
119. Rane, A. A., Christman, K. L. Biomaterials for the treatment of myocardial infarction: a 5-year update. *J Am Coll Cardiol* 2011, **58**, 2615–29
120. Li, Z.; Guan, J. Hydrogels for Cardiac Tissue Engineering. *Polymers* [online]. 2011, **3**(4), 740-761 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.3390/polym3020740. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2073-4360/3/2/740/>
121. Tous, E., Ifkovits, J. L., Koomalsingh, K. J., et al. Influence of Injectable Hyaluronic Acid Hydrogel Degradation Behavior on Infarction-Induced Ventricular Remodeling. *Biomacromolecules* [online]. 2011, **12**(11), 4127–4135 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1021/bm201198x. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm201198x>
122. Takahashi, K., Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* [online]. 2006, **126**(4), 663–676 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024. ISSN 00928674. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867406009767>
123. Takahashi, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* [online]. 2007, **131**(5), 861–72 [cit. 2019-12-29]. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.019 Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18035408>
124. Klabusay, M., Skopalík, J., Meluzín, J. Kmenové buňky v kardiologii: minulost, současnost a budoucnost celulární terapie poškozeného myokardu. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2009, **11**(10), 452–457 [cit. 2017-09-29]. Dostupné z: https://www.internimedicina.cz/artkey/int-200910-0005_Kmenove_bunky_v_kardiologii_minulost_soucasnost_a_budoucnost_celularni_terapie_poskozeneho_myokar.php
125. Gomez-Mauricio, R. G., Acarregui, A., Sanchez-Margallo, F. M., et al. A preliminary approach to the repair of myocardial infarction using adipose tissue-derived stem cells encapsulated in magnetic resonance-labelled alginate microspheres in a porcine model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2013, **84**(1), 29–39 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1016/j.ejpb.2012.11.028. ISSN 09396411. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641112004158>
126. Nelson, T. J., Martinez-Fernandez, A.; Yamada, S., Perez-Terzic, C., Ikeda, Y., Terzic, A. Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. *Circulation* 2009, **120**, 408-416.
127. Kaiser, N. J., Coulombe, K. L. Physiologically inspired cardiac scaffolds for tailored in vivo function and heart regeneration. *Biomedical Materials* [online]. 2015, **10**(3) [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1088/1748-6041/10/3/034003. ISSN 1748-605x. Dostupné z: <http://stacks.iop.org/1748-605X/10/i=3/a=034003?key=crossref.0271a9dd07a702feab32fbfe3bce9554>
128. Dobner, S., Bezuidenhout, D., Govender, P., Zilla, P., Davies, N. A Synthetic Non-degradable Polyethylene Glycol Hydrogel Retards Adverse Post-infarct Left Ventricular Remodeling. *Journal of Cardiac Failure* [online]. 2009, **15**(7), 629–636 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1016/j.cardfail.2009.03.003. ISSN 10719164. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1071916409000967>

129. Ifkovits, J. L., Tous, E., et al. Injectable hydrogel properties influence infarct expansion and extent of postinfarction left ventricular remodeling in an ovine model. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2010, **107**(25), 11507–11512 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1073/pnas.1004097107. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1004097107>
130. Rodell, C. B., Lee, M. E., Wang, H., et al., Injectable Shear-Thinning Hydrogels for Minimally Invasive Delivery to Infarcted Myocardium to Limit Left Ventricular Remodeling. *Circulation: Cardiovascular Interventions*, 2016, **9**(10).
131. Plotkin, M., Vaibavi, S.R., Rufaihah, A. J., Nithya, V., Wang, J., Shachaf, Y., Kofidis, T., Seliktar, D. The effect of matrix stiffness of injectable hydrogels on the preservation of cardiac function after a heart attack. *Biomaterials* [online]. 2014, **35**(5), 1429–1438 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.10.058. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961213013021>
132. Mann, D. L., et al., One-year follow-up results from AUGMENT-HF: a multicentre randomized controlled clinical trial of the efficacy of left ventricular augmentation with Algisyl in the treatment of heart failure. *Eur J Heart Fail* 2016, **18**(3), 314–25
133. Lee, L.C., et al. Algisyl-LVR™ with coronary artery bypass grafting reduces left ventricular wall stress and improves function in the failing human heart. *International Journal of Cardiology* 2013, **168**(3), 2022–2028
134. Yu, J., Gu, Y., Du, K. T., Mihardja, S., Sievers, R. E., Lee, R. J. The effect of injected RGD modified alginate on angiogenesis and left ventricular function in a chronic rat infarct model. *Biomaterials* [online]. 2009, **30**(5), 751–756 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.09.059. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961208007448>
135. Karoubi, G., Ormiston, M. L., Stewart, D. J., Courtman, D. W. Single-cell hydrogel encapsulation for enhanced survival of human marrow stromal cells. *Biomaterials* [online]. 2009, **30**(29), 5445–5455 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.06.035. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961209006516>
136. Reboucas, J. de S., Santos-Magalhaes, N. S., Formiga, F. R. Cardiac Regeneration using Growth Factors: Advances and Challenges. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* [online]. 2016, **107**(3), 271–275 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.5935/abc.20160097. ISSN 0066-782x. Dostupné z: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/abc.20160097>
137. Leor, J., Tuvia, S., Guetta, V., et al. Intracoronary injection of in situ forming alginate hydrogel reverses left ventricular remodeling after myocardial infarction in swine. *J Am Coll Cardiol* 2009, **54**, 1014–23
138. Chachques, J. C., Azarine, A., Mousseaux, E., et al. MRI evaluation of local myocardial treatments: epicardial versus endocardial (Cell-Fix catheter) injections. *J Interv Cardiol* 2007, **20**, 188–96
139. Furst, W., Bnerjee, A. Release of glutaraldehyde from an albumin-glutaraldehyde tissue adhesive causes significant in vitro and in vivo toxicity. *The annals of Thoracic Surgery* 2005, **79**(5), 1522–1528
140. Wallace, D. G., Cruise. G. M., Rhee, W. M., Schroeder, J. A., Prior, J. J., Ju, J., et al. A tissue sealant based on reactive multifunctional polyethylene glycol. *Journal of Biomedical Materials Research* 2001, **58**(5), 545–556
141. Wlfofá L., Vojtová L., Jurečková L., Kohutová L. Úvod do tkáňového inženýrství ESF OPVK Škola molekulárních biotechnologií – Lékařské nanobiotechnologie
142. Curley, C. J., Dolan, E. B., Cavanagh, B., O'Sullivan, J., Duffy, G. P., Bruce, P. M. An in vitro investigation to assess procedure parameters for injecting therapeutic hydrogels into the myocardium. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2016. DOI: 10.1002/jbm.b.33802. ISSN 15524973

143. Yacoub, M. H., Terrovitis, J. CADUCEUS, SCIPIO, ALCADIA: Cell therapy trials using cardiac-derived cells for patients with post myocardial infarction LV dysfunction, still evolving. *Global Cardiology Science and Practice* [online]. 2013, **2013**(1), 5–8 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.5339/gcsp.2013.3. ISSN 2305-7823. Dostupné z: <http://www.qscience.com/doi/abs/10.5339/gcsp.2013.3>
144. Bartunek, J., Behfar, A., Dolatabadi, D. et al., Cardiopoietic Stem Cell Therapy in Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology* [online]. 2013, **61**(23), 2329–2338 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.02.071. ISSN 07351097. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735109713013971>
145. Bartunek, J., Terzic, A., Davison, B. A., et al. Cardiopoietic cell therapy for advanced ischemic heart failure: results at 39 weeks of the prospective, randomized, double blind, sham-controlled CHART-1 clinical trial. *European Heart Journal* [online]. 2017, **38**(9), 648–660 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1093/eurheartj/ehw543. ISSN 0195-668x. Dostupné z: <https://academic.oup.com/eurheartj/article-lookup/doi/10.1093/eurheartj/ehw543>
146. Afzal, M. R., et al., Adult Bone Marrow Cell Therapy for Ischemic Heart Disease Novelty and Significance. *Circulation Research* [online]. 2015, **117**(6), 558–575 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.304792. ISSN 0009-7330. Dostupné z: <http://circres.ahajournals.org/lookup/doi/10.1161/CIRCRESAHA.114.304792>
147. Purcell, B. P. et al. Injectable and bioresponsive hydrogels for on-demand matrix metalloproteinase inhibition. *Nat. Mater.* 2014, **13**, 653–661
148. Christman, K. L., et al., Injectable fibrin scaffold improves cell transplant survival, reduces infarct expansion, and induces neovasculature formation in ischemic myocardium. *J Am Coll Cardiol*, 2004, **44**(3), 654–60
149. Gaetani, R., Feyen, D. A. M., Verhage, V., et al. Epicardial application of cardiac progenitor cells in a 3D-printed gelatin/hyaluronic acid patch preserves cardiac function after myocardial infarction. *Biomaterials* [online]. 2015, **61**, 339–348 [cit. 2017-09-29]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.05.005. ISSN 01429612. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961215004287>
150. Gaffey, A. C., et al. Injectable shear-thinning hydrogels used to deliver endothelial progenitor cells, enhance cell engraftment, and improve ischemic myocardium. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2015, **150**(5), 1268–1277
151. Buffa, R. et al (2012). A method of preparation of an oxidized derivative of hyaluronic acid and a method of modification thereof. EP2510016B1
152. Buffa, R. et al (2012). Oxidized derivative of hyaluronic acid, a method of preparation thereof and a method of modification thereof EP2510017B1
153. Hermanson, G. T. *Bioconjugate techniques: Chapter 10 - Fluorescent Probes* [online]. Third edition. Waltham, MA: Elsevier/AP, 2013, 395–463 [cit. 2020-01-21]. ISBN 978-012-3822-390. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123822390000108>
154. Messerschmidt, A. Copper Metalloenzymes. *Comprehensive Natural Products II* [online]. Elsevier, 2010, **8**, 489–545 [cit. 2020-01-21]. DOI: 10.1016/B978-008045382-8.00180-5. ISBN 9780080453828. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080453828001805>
155. Doraiswamy, D. The Origin of Rheology: A Short Historical Excursion. *Rheology Bulletin* [online]. 2002, **71** [cit. 2017-09-29]. Dostupné z: http://www0.rheology.org/sor/publications/Rheology_B/Jan02/Origin_of_Rheology.pdf
156. Wein, O. Úvod do reologie. FCH VUT v Brně, Brno 1996.
157. Holubová, R. *Základy reologie a reometrie kapalin* [online]. Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. [cit. 2017–09–16]. ISBN 978-80-244-4178-8. Dostupné z: <https://docplayer.cz/11920619-Zaklady-reologie-a-reometrie-kapalin.html>

158. Grillet, A. M., Wyatt, N. B., Gloe, L. M.: Polymer Gel Rheology and Adhesion, Rheology, Dr. Juan De Vicente (Ed.), ISBN: 978-953-51-0187-1, InTech, 2012. [online]. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/rheology/rheology-andadhesion-of-polymer-gels>
159. Oscillatory rheology: Measuring the Viscoelastic Behaviour of Soft Materials. G.I.T. Laboratory Journal [online]. 2007. roč. 3–4, 68–70 [cit. 2016-04-16]. Dostupné z: http://www.mate.tue.nl/~wyss/files/Wyss_GIT_Lab_J_2007.pdf
160. Deshpande, A. P. *Techniques in oscillatory shear rheology* [online]. 1–23 [cit. 2016-04-16]. Dostupné z: <http://physics.iitm.ac.in/~compflu/Lect-notes/abhijit.pdf>
161. Steffe, J. F. *Rheological methods in food process engineering* [online]. 2nd ed. East Lansing, MI: Freeman Press, c1996, s. 319–321 [cit. 2016-04-18]. ISBN 0963203614. Dostupné z: <https://books.google.cz/>
162. Hyun, K., Wilhelm, M., Klein, C. O., et al. A review of nonlinear oscillatory shear tests: Analysis and application of large amplitude oscillatory shear (LAOS). *Progress in Polymer Science* [online]. 2011, **36**(12), 1697–1753 [cit. 2016-04-18]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2011.02.002. ISSN 00796700. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670011000281>
163. Shannon, L. M., Kay, E., Lew, J. Y. Peroxidase isozymes from horseradish roots. I. Isolation and physical properties. *J Biol Chem* 1966, **241**(9), 2166–72
164. ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity 2009
165. Zaviskova, K., Tukmachev, D., Dubisova, J. et al. Injectable hydroxyphenyl derivative of hyaluronic acid hydrogel modified with RGD as scaffold for spinal cord injury repair. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2018, **106**(4), 1129–1140 [cit. 2020-04-24]. DOI: 10.1002/jbm.a.36311. ISSN 15493296. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.36311>
166. Dolan, E. B., Kovarova, L. et al. Advanced Material Catheter (AMCath), a minimally invasive endocardial catheter for the delivery of fast-gelling covalently cross-linked hyaluronic acid hydrogels. *Journal of Biomaterials Applications* [online] 2018, **33**(5), 681–692 [cit. 2020-01-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30354912>
167. Dolan, E. B., Hofmann, B., de Vaal, H., Bellavia, G., Straino, S., Kovarova, L. et al. A bioresorbable biomaterial carrier and passive stabilization device to improve heart function post-myocardial infarction. *Materials Science and Engineering: C* [online] 2019, [cit. 2020-01-26]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493118327838>
168. Šedová, P., Buffa, R., Šilhár, P., Kovářová, L. et al. The effect of hydrazide linkers on hyaluronan hydrazone hydrogels. *Carbohydrate Polymers* [online] 2019, **261**, 63–71 [cit. 2020-01-26]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861719303959>
169. Dolan, E. B., Hofmann, B., de Vaal, H., Bellavia, G., Straino, S., Kovarova, L. et al. A bioresorbable biomaterial carrier and passive stabilization device to improve heart function post-myocardial infarction. In: 8th World Congress of Biomechanics, 8.–12. 6. 2018, Dublin, Irsko.

11 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

HA-Ox	Derivát na bázi HA – oxidovaná forma HA/aldehyd HA
HA-TA	Derivát na bázi HA – tyraminovaný/hydroxyfenyl derivát HA
HA	Kyselina hyaluronová/hyaluronan
POA	O,O'-1,3-propandiyl-bishydroxylamin dihydrochlorid
RGD	Peptidová sekvence Arg-Gly-Asp (argynin-glycin-kyselina asparagová)
AMCARE	<i>Advanced Materials for Cardiac Regeneration</i> (EU projekt)
M_w	Molekulová hmotnost
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
Da	Dalton (jednotka M_w polymerů, $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
EDC	1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)-propyl]-karbodiimid
HRP	Křenová peroxidáza (<i>Horseradish peroxidase</i>)
hMDS	Lidské mesenchymální buňky (<i>Human mesenchymal stem cells</i>)
GluO	Glukózo-oxidáza
GaO	Galaktózo-oxidáza
IKVAV	Peptidová sekvence Ile-Lys-Val-Ala-Val (izoleucin-lysin-valin-alanin-valin)
YIGSR	Peptidová sekvence Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (tyramin-izoleucin-glycin-serotonin-arginin)
RGDS	Peptidová sekvence Arg-Gly-Asp-Ser (argynin-glycin-kyselina asparagová-serotonin)
GMHA	Metakrylový derivát HA (<i>Glycid methacrylate hyaluronic acid</i>)
ESC	Embryonální kmenové buňky (<i>Embryonic stem cells</i>)
ASC	Dospělé kmenové buňky (<i>Adult stem cells</i>)
CSC	Srdeční kmenové buňky (<i>Cardiac stem cells</i>)
HSC	Hematopoietické kmenové buňky (<i>Hematopoietic stem cells</i>)
EPC	Endoteliální progenitorové buňky (<i>Endothelial progenitor cell</i>)
MSC	Mesenchymální kmenové buňky (<i>Mesenchymal stem cells</i>)
	hMSC Lidské MSC (<i>Human mesenchymal stem cells</i>)
BMC	Buňky kostní dřeně (<i>Bone marrow cells</i>)
	BMSC <i>Bone marrow stem cells</i>
	BMMSC <i>Bone marrow-derived mesenchymal stem cells</i>
	BMMNC <i>Bone marrow mononuclear cells</i>
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor (<i>Vascular endothelial growth factors</i>)
FGF	Fibroblastový růstový faktor (<i>Fibroblast growth factor</i>)
ADSC	Kmenové buňky získané z tukové tkáně (<i>Adipose-derived stem cells</i>)
PBSC	Kmenové buňky periferní krve (<i>Peripheral blood stem cells</i>)
UBC	Kmenové buňky pupečnickové krve (<i>Umbilical cord blood cells</i>)
IPSC	Indukované pluripotentní kmenové buňky (<i>Induced pluripotent stem cells</i>)

FDA	Federální agentura pro kontrolu potravin a léčiv <i>Food and Drug Administration</i>
LVEF	Ejekční frakce levé komory (<i>Left ventricular ejection fraction</i>)
IGF-1	Inzulínu podobný růstový faktor 1 (<i>Insulin-like growth factor 1</i>)
HGF	Růstový faktor hepatocytů (<i>Hepatocyte growth factors</i>)
PDGF	Destičkový růstový faktor (<i>Platelet-derived growth factor</i>)
G-CSF	Granulocytární kolonie stimulující faktor (<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>)
BSA	Bovinní sérový albumin
GGRMSMPV	Peptidová sekvence (Gly-Gly-Arg-Met-Ser-Met-Pro-Val) (glycin-glycin-argynin-methionin-serotonin-methionin-prolin-valin)
DS	Stupeň substituce
NMR	Nukleární magnetická rezonance
SEC-MALLS	<i>Size exclusion chromatography, Multi-Angle Laser Light Scattering.</i> Vylučovací chromatografie s detekcí pomocí rozptylu světla.
UV-VIS	Ultrafialová-viditelná spektroskopie
HA-PH-RGD	Hydroxyfenyl derivát HA s navázanou RGD sekvencí
HA-PH-FITC	Hydroxyfenyl derivát HA s navázanou FITC skupinou
FITC	Fluorescein isothiokyanát
ATP	Adenosintrifosfát
DEMI	Demineralizovaná voda
Glu	Glukóza (D-+)-Glucose)
Ga	Galaktóza (D-+)-Galactose)
η	Viskozita
t	Čas
SAOS	<i>Small Amplitude Oscillatory Shear</i>
δ	Fázový posun/ztrátový úhel
G^*	Komplexní modul pružnosti ve smyku
G'	Elastický (paměťový) modul
G''	Viskózní (ztrátový) modul
LVR	Lineární viskoelastická oblast (<i>Linear viscoelastic region</i>)
RT	Pokožová/laboratorní teplota
T_g	Čas gelace
Q	Botnací koeficient/ koeficient nabotnění/ stupeň nabotnění
BTH	Bovinní testikulární hyaluronidáza
BSA	Bovinní sérový albumin
SC	Mezenchymální kmenové buňky z kostní dřeně
HCT-116	Linie karcinomu tlustého střeva

3T3	Swiss albino – linie, myší embryonální fibroblasty
n	Počet subjektů/opakování
NH ₂ :CHO	Poměr vazných skupin: amino skupin alkoxyaminu POA (NH ₂) a aldehydických skupin derivátu HA-Ox (CHO)
SD	Směrodatná odchylka
HMW HA	Vysokomolekulární (high molecular weight) kyselina hyaluronová
Y	Youngův modul
p	Statistický rozdíl
LV	Levá srdeční komora

12 PŘÍLOHY

12.1 Příloha 1: Kultivace buněk

Složení kultivačních médií dle typu buněk

kmenové b. (SC)	výsledná konc. v médiu
• a-MEM, low Glucose • Fetální Bovinní Sérum (FBS) • L-Glutamine • Pen/Strep	10 % 2 mM 1 % (Pen. 100 000 U/L; Strep. 100 mg/L)
kmenové b. (ADSC)	výsledná konc. v médiu
• advanced-MEM • GlutaMAX • heparin • Pen/Strep • PLTMax	2 mM 2 U/ml 1 % 2,5 %
linie 3T3	výsledná konc. v médiu
• DMEM, low Glucose • FBS • L-Glutamine • D-Glucose • Pen/Strep	10 % 2 mM 4 g/L 1 %
linie HCT	výsledná konc. v médiu
• McCoy's 5A • FBS • L-Glutamine • Pen/Strep	10 % 2 mM 1 %

Složení pufru PBS

- NaCl 8,0 g
- KCl 0,2 g
- Na₂HPO₄·12H₂O 2,85 g
- KH₂PO₄ 0,2 g
- DEMI voda 1 L

Specifikace použitých chemikálií

Chemikálie potřebné k přípravě kultivačních médií

- a-MEM, low Glucose (Lonza, BE02-002F)
- advanced-MEM (Thermo Fisher Scientific, 12492-021)
- DMEM, low Glucose (Diagnovum, D005)
- McCoy's 5A (Merck, M8403)
- FBS (Diagnovum, D101)
- L-Glutamine (Merck, G8540)
- D-Glucosa (Lach-Ner, 30268)
- Penicillin-Streptomycin (Merck, P4333)
- GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 35050038)
- PLTMax (Mill Creek, research grade)
- Heparin (Merck, H3393)

Chemikálie potřebné k přípravě PBS

- NaCl (Fluka, 71381)
- KCl (Lach-Ner, 30383)
- Na₂HPO₄·12H₂O (Lach-Ner, 30307)
- KH₂PO₄ (Lach-Ner, 30145)

Ostatní chemikálie potřebné ke kultivaci buněk

- Trypsin/EDTA 10x (Merck, T4174)
- DMSO (Merck, D2650)

Chemikálie potřebné k vyhodnocení růstu/viability buněk

- CellTiter-Glo reagent (Promega, G7571)
- Calcein-AM (AnaSpec, AS-89201)
- Propidium Iodide (Thermo Fisher Scientific, P1304MP)

Postup kultivace buněk

Veškerá práce probíhá za sterilních podmínek.

Kultivace buněk

Všechny typy buněk byly kultivovány v příslušném médiu za standardních kultivačních podmínek (37 °C/5% CO₂) na kultivačních lahvích (TPP). Výměna média byla prováděna každé 2–3 dny. Po dosažení 80% konfluency nárůstu na lahvích byla provedena pasáž buněk pomocí Trypsinu. Zpasážívané buňky byly použity pro pokusy nebo naředěny čerstvým médiem a nasazeny na novou kultivační lahev. V případě potřeby dlouhodobého uchování buněk byly zpásážívané buňky resuspendovány v zamrazovacím médiu (95 % kultivační médium + 5 % DMSO), zamrazeny s postupně klesající teplotou a uchovávány při -196 °C.

Testy cytotoxicity

Buňky byly nasazeny na 96-jamkové nebo 24-jamkové kultivační panely (TPP) a kultivovány za standardních kultivačních podmínek do druhého dne. Následující den bylo odsáto médium a do jamek byly přidány testované extrakty nebo vzorky rozpuštěné v čerstvém médiu. Stanovení buněčné viability proběhlo v uvedených časových intervalech (obvykle 24–72 h).

Testy 2D adheze buněk

Testovanými materiály byly coatovány jamky na 24-jamkových kultivačních panelech. Buňky byly nasazeny na povrch materiálu, zality kultivačním médiem (1 ml/jamku) a kultivovány za standardních kultivačních podmínek.

Inkorporace buněk do hydrogelu

Zpasážívané buňky byly suspendovány v PBS a smíseny s prekurzorovým roztokem materiálu. Následně byly dle standardního postupu připraveny hydrogely do teflonových formiček. Po uzrání byly hydrogely přemístěny do 24-jamkového kultivačního panelu, zality kultivačním médiem (1 ml/jamku) a kultivovány za standardních podmínek. Výměna média byla prováděna každé 2–3 dny.

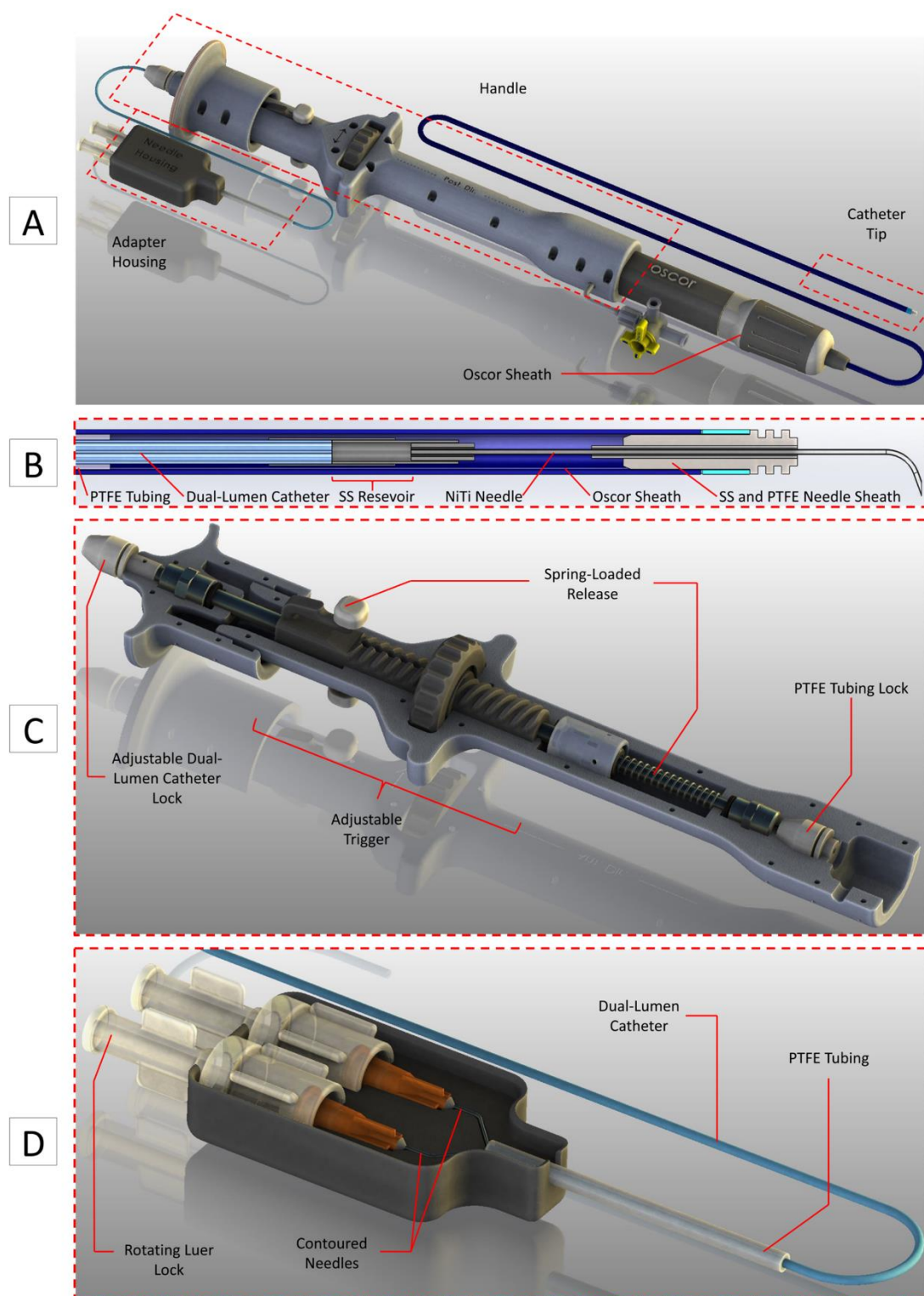
V případě inkorporace vysokého počtu buněk (≥ 10 mil. b./ml) byl gel kultivován v 6-jamkovém panelu s 6 ml média/jamku.

Stanovení buněčné viability

Barvení Live/Dead: kultivační médium bylo nahrazeno médiem bez FBS s 1 µg/ml Calcein-AM a 2 µg/ml Propidium Iodide. Vzorek byl inkubován ve tmě 20 min. Fotografie byly pořízeny na fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse Ti pomocí softwaru NIS Elements. Analýza obrazu byla provedena v softwarech NIS Elements a Icy 1.9.10.0.

Stanovení viability pomocí Cell-Titer Glo assay: vzorky byly promyty od média pomocí pufru PBS a následně byl přidán nový roztok PBS s Cell-Titer Glo v poměru 5:1 (např. 200 µl PBS + 40 µl Cell-Titer Glo). Vzorek byl inkubován na horizontální třepačce ve tmě 30 min a následně ustálen 10 min. Luminiscenční signál byl odečten na přístroji TECAN Infinite 200.

12.2 Příloha 2: Katetr (AMCath)



Obr. 122 Složení katetru AMCath. Vnitřní komponenty (A) řez konečné části katetru obsahující rezervoár zakončený konickou jehlou (B), tělo katetru – řez drždlem (C) a adapter pro zapojení stříkaček obsahující prekurzorový roztok a ukázka dvoucestného provedení katetru (D) [166].

12.3 Příloha 3: Životopis

Ing. Lenka Kovářová (rozená Kohutová)

KONTAKTNÍ A OSOBNÍ INFORMACE

Rodné příjmení: Kohutová
Národnost: česká
Adresa: Na Podlesí 1130, Frýdek-Místek 739 11, Česká republika
Telefon: + 420 774 489 840
E-mail: KovarovaLenka5@seznam.cz
Lenka.Kovarova@contipro.com
Datum narození: 5. 7. 1989

VZDĚLÁNÍ

2014–současnost **Doktorský studijní program, obor fyzikální chemie**
Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Česká republika
Disertační práce: *Vývoj materiálu na bázi hydrogelů kyseliny hyaluronové pro regeneraci myokardu*

2011–2013 **Magisterský studijní program, obor Spotřební chemie**
Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Česká republika
Diplomová práce: *Studium fyzikálních gelů s hydrofobními doménami*

2008–2011 **Bakalářský studijní program, obor Spotřební chemie**
Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Česká republika
Bakalářská práce: *Příprava a aplikace fyzikálních hyaluronových gelů*

2004–2008 **Všeobecné gymnázium**
Frýdlant nad Ostravicí, nám. T. G. Masaryka, Česká republika
Zakončeno maturitní zkouškou: Český jazyk, Anglický jazyk, Fyzika, Chemie

PRACOVNÍ ZKUŠENOSTI

1. 9. 2016–současnost Contipro a.s.
Výzkumný pracovník R&D
Příprava a charakterizace hydrogelů na bázi HA. Reologické a mechanické hodnocení různých typů materiálů.

1. 6. 2015–1. 9. 2016 Contipro Pharma
Výzkumný pracovník R&D (1. 9. 2015–1. 9. 2016)
Odborný asistent R&D (1. 6.–31. 8. 2015)
Příprava a charakterizace hydrogelů na bázi HA. Reologické a mechanické hodnocení různých typů materiálů.

2. 9. 2013–31. 5. 2015 Contipro Biotech s.r.o.

Asistent R&D

Příprava a charakterizace hydrogelů na bázi HA. Reologické a mechanické hodnocení různých typů materiálů.

ŠKOLENÍ/ CERTIFIKACE

06. 01. 2020	Nakládání s chemickými látkami a přípravky (BOZP)
06. 01. 2020	Periodické školení (BOZP)
9. 12. 2020	Tlakové nádoby stabilní (BOZP)
15.–16. 10. 2019	3. ročník dvoudenního semináře Československé reologické akademie
13. 5. 2019	Řízení aplikovaného výzkumu a experimentálního vývoje, zabezpečování kvality při návrhu a vývoji zdravotnických prostředků (R&D)
24. 9. 2018	Vynálezy a užité vzory
30. 04. 2014	ESPACENET (R&D)
2013	Interní auditor ISO 9001:2008, KONFIRM, Brno
2013	Interní auditor HACCP, KONFIRM, Brno
2013	Senzorická analýza
2012	FCE zkouška

ZNALOST CIZÍCH JAZYKŮ

Český jazyk	mateřský jazyk
Anglický jazyk	B2 (certifikát FCE zkouška)
Německý jazyk	mírně pokročilý

DALŠÍ INFORMACE

Řidičský průkaz sk. B

Počítačové znalosti: MS Office, Origin Lab, QC Expert, ChemSketch

VLASTNOSTI A ZÁJMY

Flexibilita, komunikativnost, pečlivost, odolnost vůči stresu, veřejné dění, cestování

12.4 Příloha 4: Publikační činnost

Ing. Lenka Kovářová (rozená Kohutová)

Tučným písmem jsou vyznačeny publikace, ve kterých jsou uvedeny výsledky této disertační práce.

POSTERY

BOBULA, T.; KUTOVÁ, A.; BUFFA, R.; BASARABOVÁ, I.; KOVÁŘOVÁ, L.; VELEBNÝ, V. Dual crosslinking of methacrylated hyaluronic acid [poster]. In: Biofabrication, 20.–22. 10. 2019, Columbus, USA.

KAREL, S.; KOVÁŘOVÁ, L.; VELEBNÝ, V. Peptide Cross-Linked Hyaluronan Hydrogels [poster]. In: 26th American and 11th International Peptide Symposium (APS), 22.–27. 6. 2019, Monterey, USA

KOVAROVA, L.; TOROPITSYN, E.; SCIGALKOVA, I.; PRAVDA, M.; BOBULA, T.; VELEBNY, V. *In situ* gelation by UV curing in nasal cavity for multiple sclerosis treatment [poster]. In: Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS), 27.–31. 5. 2019, Rhodos, Řecko.

PRAVDA, M.; KOVAROVA, L.; SCIGALKOVA, I.; VELEBNY, V. *In situ* gellable hyaluronan based hydrogels with antimicrobial activity [poster]. In: Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS), 27.–31. 5. 2019, Rhodos, Řecko.

BOBULA, T.; BOHÁČOVÁ, P.; KOVÁŘOVÁ, L.; VÁGNEROVÁ, V.; HROBAŘ, V.; KAREL, S.; PRAVDA, M.; VELEBNY, V. Visible light crosslinking of RGD modified hyaluronan [poster]. In: Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS), 27.–31. 5. 2019, Rhodos, Řecko.

KOVAROVA, L.; SCIGALKOVA, I.; WILDHIRT, S.; PRAVDA, M.; DARO, D.; DUFFY G.; VELEBNY, V. Hydrogels based on hyaluronan derivatives combined with implantable device for heart regeneration after myocardial infarction [poster]. In: Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) World Congress, 4.–7. 9. 2018, Kyoto, Japonsko.

KOVAROVA, L.; SCIGALKOVA, I.; PRAVDA, M.; SULAKOVA, R.; DARO, D.; DUFFY G.; VELEBNY, V. Hydrogels based on hyaluronan-tyramine conjugates for use in myocardial infarction regeneration [poster]. In: 28th Annual Conference of the European Society for Biomaterials (ESB), 4.–8. 9. 2017, Atény, Řecko.

KOHUTOVÁ, L.; ŠČIGALKOVÁ, I.; BUFFA, R.; WOLFOVÁ, L.; VELEBNÝ, V. New designed hydrogels based on aldehyde-derivative of hyaluronic acid for application in tissue engineering and regenerative medicine [poster]. In: European Chapter Meeting of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS), 28. 6.–1. 7. 2016, Uppsala, Švédsko.

KOHUTOVÁ, L.; ŠČIGALKOVÁ, I.; WOLFOVÁ, L.; BYSTROŇOVÁ, J.; PRAVDA, M. et al. The capacity of new designed hydrogels based on hyaluronan-tyramine derivative for cell incorporation [poster]. In: World Conference on Regenerative Medicine (WCRM), 21.–23. 10. 2015, Lipsko, Německo.

KOHUTOVÁ, L.; WOLFOVÁ, L.; PRAVDA, M.; ŠČIGALKOVÁ, I.; BYSTROŇOVÁ, J.; VELEBNÝ, V. Different crosslinking systems enable of hydrogels preparation based on hyaluronan-tyramine conjugates [poster]. In: 27th Annual Conference of the European Society for Biomaterials (ESB), 30. 8.–3. 9. 2015, Krakow, Polsko.

KOHUTOVÁ, L.; PRAVDA, M.; WOLFOVÁ, L.; ŠČIGALKOVÁ, I.; BYSTROŇOVÁ, J.; VELEBNÝ, V. Glucose sensitive gelation of hydrogel based on hyaluronan-tyramine conjugate. [poster]. In: 26th European Conference on Biomaterials, 31.8.-3.9. 2014, Liverpool, Anglie.

PŘEDNÁŠKY

ŠEDOVI, P.; KOVÁŘOVÁ L.; BUFFA, R.; BEDNÁŘÍK, J. Vliv struktury oxyaminového linkeru na zesílení hyaluronanu. In: 71. sjezd chemiků. 9.–13. 9. 2019, Horný Smokovec, Slovensko.

DOLAN, E. B.; HOFMANN, B.; DE VAAL, H.; BELLAVIA, G.; STRAINO, S.; KOVAROVA, L.; MONAHAN, D.; KELLY, H.; WILDHIRT, S.; DUFFY, G. P. A bioresorbable carrier and passive stabilization device to improve heart function postmyocardial infarction. In: Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS), 27.–31. 5. 2019, Rhodos, Řecko.

ŠČIGALKOVÁ, I.; KOVÁŘOVÁ, L.; PRAVDA, M.; BYSTROŇOVÁ, J.; VELEBNÝ, V.; RIABOV, V.; KZHYSHKOWSKA, J.; VRANA, N. E. Interakce imunitních buněk s hydrogely na bázi hyaluronanu a želatiny In: Bioimplantologie, 11.–12. 4. 2019, Brno, ČR.

ŠEDOVI, P.; ŠILHÁR, P.; BUFFA, R.; KOVÁŘOVÁ, L.; VÁGNEROVÁ, H.; BEDNÁŘÍK, J. Zesílení hyaluronanu – vliv hydrazidových linkerů na vlastnosti hydrogelu. In: Sjezd chemiků, 9.–12. 9. 2018, Zlín, ČR.

KOHUTOVÁ, L.; PRAVDA, M.; PEKAŘ, M.; DUFFY G.; VELEBNY, V. Development of materials based on hyaluronic acid's hydrogels for myocardial regeneration. In: Studentská konference Chemie je život, FCH, 23.03.2017, FCH VUT, Brno, ČR.

BOBULA, T.; BUFFA, R.; HERMANNOVÁ, M.; KOHUTOVÁ, L.; PROCHÁZKOVÁ, P.; VÁGNEROVÁ, H.; ČEPA, M.; ŽIDEK, O.; VELEBNÝ, V. The photocrosslinking of hyaluronan derivatives for designed hydrogel formation. In: Biofabrication, 29.–31. 10. 2016, Winston-Salem, USA.

BUFFA, R.; PRAVDA, M.; KOHUTOVÁ, L.; BASARABOVÁ, I.; KULHÁNEK, J.; BROULÍKOVÁ, M.; HROBAŘ, V.; VELEBNÝ, V. Conjugates of hyaluronic acid with tyramine – synthesis and application. In: Eurochemistry, 16.–18. 6. 2016, Řím, Itálie.

ČLÁNKY V IMPAKTOVANÝCH ČASOPISECH

GALLAGHER, L. B.; DOLAN, E. B.; O'SULLIVAN, J.; LEVEY, R.; CAVANAGH, B. L.; KOVAROVA, L.; PRAVDA, M.; VELEBNY, V.; FARRELL, T.; O'BRIEN, F. J.; DUFFY, G. P. Pre-culture of Mesenchymal Stem Cells within RGD-modified Hyaluronic Acid Hydrogel Improves their Resilience to Ischaemic Conditions. *Acta Biomaterialia* [online]. 2020, 107, 78–90 [cit. 2020-04-26]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.02.043> ISSN 17427061. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706120301318>

O'DWYER, J.; MURPHY, R.; DOLAN, E. B.; KOVAROVA L. et al. Development of a nanomedicine-loaded hydrogel for sustained delivery of an angiogenic growth factor to the ischaemic myocardium. *Drug Delivery and Translational Research* [online]. 2019, 1–15 [cit. 2020-01-26]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13346-019-00684-5>

SCIGALKOVA, I.; BYSTRONOVA, J.; KOVAROVA, L. et al The effect of healing phenotype-inducing cytokine formulations within soft hydrogels on encapsulated monocytes and incoming immune cells. *RSC Advances* [online]. 2019, 9(37), 21396–21404 [cit. 2020-03-04]. DOI: 10.1039/C9RA02878A. ISSN 2046-2069. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C9RA02878A>

DOLAN, E. B.; HOFMANN, B.; DE VAAL, H.; BELLAVIA, G.; STRAINO, S.; KOVAROVA, L. et al. A bioresorbable biomaterial carrier and passive stabilization device to improve heart function post-myocardial infarction. *Materials Science and Engineering: C* [online] 2019, [cit. 2020-01-26].

Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493118327838>

ŠEDOVIČ, P.; BUFFA, R.; ŠILHÁR, P.; KOVÁŘOVÁ, L. et al. The effect of hydrazide linkers on hyaluronan hydrazone hydrogels. *Carbohydrate Polymers* [online] 2019, 261, 63–71 [cit. 2020-01-26].

Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861719303959>

DOLAN, E. B.; KOVAROVA, L. et al. Advanced Material Catheter (AMCath), a minimally invasive endocardial catheter for the delivery of fast-gelling covalently cross-linked hyaluronic acid hydrogels. *Journal of Biomaterials Applications* [online] 2018, 33(5), 681–692 [cit. 2020-01-26].

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30354912>

BOBULA, T.; BUFFA, R.; HERMANNOVÁ, M.; KOHUTOVÁ, L. et al. A novel photopolymerizable derivative of hyaluronan for designed hydrogel formation. *Carbohydr Polym.* [online]. 2017, **161, 277–285 [cit. 2017-09-12]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.01.009. ISBN 10.1016/j.carbpol.2017.01.009.**

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861717300097>

KNIHY/SKRIPTA

WOLFOVÁ, L.; VOJTOVÁ, L.; JUREČKOVÁ, L.; KOHUTOVÁ, L. Úvod do tkáňového inženýrství ESF OPVK Škola molekulárních biotechnologií – Lékařské nanobiotechnologie, reg.č.: CZ.1.07/2.2.00/28.0144.

PATENTY/UŽITNÉ VZORY

PRAVDA, M.; KOVÁŘOVÁ, L.; ŠČIGALKOVÁ, I.; BYSTROŇOVÁ, J.; TOROPITSYN, E.; VELEBNÝ, V. *Prostředek pro použití v přípravě hydrogelu na bázi hydroxyfenylového derivátu hyaluronanu*. CZ 33901 U1. 7. 4. 2020

TOROPITSYN, E.; PRAVDA, M.; KOVÁŘOVÁ, L.; BYSTROŇOVÁ, J.; VELEBNÝ, V. *Hydrogel na bázi zesíťovaného hydroxyfenylového derivátu kyseliny hyaluronové*. CZ 33324 U1. 25. 10. 2019

BOBULA, T.; BUFFA, R.; VÁGNEROVÁ, H.; ŠULÁKOVÁ, R.; WOLFOVÁ, L.; KOHUTOVÁ, L.; MORAVCOVÁ, V.; ŽIDEK, O.; PROCHÁZKOVÁ, P.; VELEBNÝ, V. *Deriváty sulfatovaných polysacharidů, způsob jejich přípravy, způsob jejich modifikace a použití*. CZ 306662 B6. 26. 4. 2017

12.5 Příloha 5: Přehled aktivit

STÁŽE/KONFERENCE/MEETING

30.–31. 7. 2019	Konference NOVEL TRENDS IN RHEOLOGY VIII Zlín (ČR)
26.–29. 6. 2019	Meeting EU projekt N2B-patch Poros (Řecko)
27.–31. 5. 2019	Konference TERMIS poster prezentace Rhodos (Řecko)
27.–30. 1. 2019	Meeting EU projekt N2B-patch Ueberherrn (Německo)
4.–5. 11. 2018	Meeting EU projekt N2B-patch Stuttgart (Německo)
4.–7. 9. 2018	Konference TERMIS poster prezentace Kyoto (Japonsko)
15.–17. 1. 2018	Meeting EU projekt N2B-patch Paříž (Francie)
4.–6. 10. 2017	Meeting EU projekt AMCARE Stuttgart (Německo)
4.–8. 9. 2017	Konference ESB poster prezentace Athény (Řecko)
18.–21. 7. 2017	Meeting EU projekt N2B-patch Florencie (Itálie)
25.–29. 4. 2017	Meeting EU projekt AMCARE Stockholm (Švédsko)
23. 4. 2017	Konference Chemie je život poster prezentace Brno (ČR)
29.–31. 1. 2017	Meeting EU projekt N2B-patch Stuttgart (Německo)

30. 11.–3. 12. 2016	Meeting EU projekt AMCARE Galway (Irsko)
26.–28. 10. 2016	Konference REinEU diseminace EU projektu AMCARE Bratislava (Slovensko)
25.–28. 9. 2016	Preklinická studie – EU projekt AMCARE Účast na preklinické studii – příprava vzorků Řím (Itálie)
27. 6.–1. 7. 2016	Konference TERMIS poster prezentace Uppsala (Švédsko)
11.–14. 5. 2016	Meeting EU projekt AMCARE Benátky (Itálie)
21.–23. 10. 2015	Konference WCRM Poster prezentace Lipsko (Německo)
12.–14. 10. 2015	Meeting EU projekt AMCARE Dublin (Irsko)
29. 8.–4. 9. 2015	Konference ESB poster prezentace Krakov (Polsko)
14.–15. 4. 2015	EU projekt AMCARE Praha (ČR)
8.–9. 9. 2014	Workshop CEITEC Brno (ČR)
30. 8.–4. 9. 2014	Konference ESB poster prezentace Liverpool (Velká Británie)
14. 8.–23. 12. 2011	Univerzita NTNU Studium (ERASMUS)