



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

HYDROGELY TYRAMINOVANÉHO
HYALURONANU - ÚPRAVA VLASTNOSTÍ
MODIFICATION OF HYDROGELS BASED ON TYRAMINE-MODIFIED HYALURONAN

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Riyam Mühlhanslová

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1152/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Riyam Mühlhanslová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Hydrogely tyraminovaného hyaluronanu - úprava vlastností

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracovat základní rešerši na téma modifikace hyaluronanu tyraminem, jeho využití v přípravě hydrogelů, dostupnost těchto materiálů na trhu.
2. Ověřit přípravu tohoto hydrogelu z komerčně dostupných výrobků; provést základní charakterizaci připraveného hydrogelu.
3. Modifikovat hydrogel micelami vhodného tenzidu (vybírat ze sortimentu povoleného pro kosmetické účely), prozkoumat jejich uvolňování z hydrogelu do vodného prostředí.
4. Vyhodnotit získané výsledky, posoudit vhodnost modifikace pro přípravu hydrogelu schopného solubilizovat hydrofobní látky.

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

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

Riyam Mühlhanslová
student(ka)

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá studiem vlastností a využití hydrogelů na bázi tyraminovaného hyaluronanu. První část pojednává o obecné charakteristice hydrogelů a kyseliny hyaluronové, jejich vlastností, syntéze a využití. Druhá část je experimentální a je zaměřená na měření základních vlastností hydrogelů na bázi tyraminovaného hyaluronanu. Cílem této práce je modifikovat tyto hydrogely přidavkem tenzidových micel a vytvořit tak v nich domény schopné solubilizovat hydrofobní látky. Vybrané tenzidy byly zkoumány z hlediska jejich rozpustnosti ve vodě a v roztoku PBS, poté byly připraveny hydrogely obsahující micely vybraných tenzidů. Přídavek tenzidu neovlivnil mechanické vlastnosti hydrogelů. Dále bylo zkoumáno uvolňování hydrofobního barviva z modifikovaných hydrogelů do roztoku PBS. Po studovanou dobu pravděpodobně nedocházelo k uvolňování barviva. Jako nejvhodnější se jeví tenzid Tween 40, především z důvodů dobré rozpustnosti ve vodném prostředí.

Abstract

This thesis deals with the study of properties and use of TS-NaHY hydrogels. The first part describes the general characteristics of hydrogels and hyaluronic acid, its properties, synthesis, and utilization. The second part is focused on the experimental measurement of the fundamental properties TS-NaHY hydrogels. The aim of this study is to modify the hydrogels addition of surfactant micelles and create them in a domain capable of solubilizing a hydrophobic substance. The selected surfactants were examined for their solubility in water and in PBS solution, then hydrogels containing micelles of selected surfactants were prepared. The Addition of surfactant did not affect the mechanical properties of hydrogels. Furthermore, the release of the hydrophobic dye from the modified hydrogels into the PBS solution was investigated. Dye release is unlikely to occur at the time of study. The surfactant Tween 40 appears to be most suitable, especially for reasons of good aqueous solubility.

Klíčová slova

Hydrogel, kyselina hyaluronová - vlastnosti, funkce.

Keywords

Hydrogel, hyaluronic acid - properties, functions.

MÜHLHANSLOVÁ, R. *Hydrogely tyraminovaného hyaluronanu - úprava vlastností*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 48 s. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem, který jsem vypracovala samostatně pod vedením prof. Ing. Miloslava Pekaře, CSc. Veškerá literatura a další zdroje ze kterých jsem čerpala jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

.....

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce prof. Ing. MILOSLAVU PEKAŘOVI, CSc. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost, vstřícnost a čas, který mi věnoval. Rovněž patří moje poděkování pro Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D., Ing. Petře Holínkové a paní Leoně Kubíkové. Všem děkuji za odbornou pomoc, cenné připomínky a poskytnuté rady při zpracovávání bakalářské práce.

OBSAH

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | ÚVOD | 7 |
| 2 | TEORETICKÁ ČÁST | 8 |
| 2.1 | Kyselina hyaluronová | 8 |
| 2.1.1 | Charakteristika kyseliny hyaluronové..... | 8 |
| 2.1.2 | Syntéza kyseliny hyaluronové..... | 9 |
| 2.1.3 | Využití kyseliny hyaluronové..... | 9 |
| 2.1.4 | Sít'ování kyseliny hyaluronové..... | 10 |
| 2.2 | Gely | 11 |
| 2.2.1 | Vznik gelů..... | 11 |
| 2.2.2 | Dělení gelů..... | 12 |
| 2.2.3 | Vlastnosti gelů..... | 12 |
| 2.2.4 | Bobtnání gelů..... | 13 |
| 2.3 | Hydrogely na bázi tyraminovaného hyaluronanu | 14 |
| 2.4 | Tyramin | 14 |
| 2.4.1 | Hyaluronan substituovaný tyraminem (TS-HA)..... | 15 |
| 2.5 | Dvoustupňová enzymatická zesít'ovací metoda pro výrobu hydrogelů na bázi tyraminovaného hyaluronanu | 16 |
| 2.5.1 | Modifikace HA..... | 17 |
| 2.6 | Reologie | 19 |
| 2.6.1 | Reologie gelů..... | 20 |
| 2.7 | Tenzidy | 21 |
| 2.7.1 | Dělení tenzidů..... | 23 |
| 2.7.2 | Princip působení tenzidů..... | 24 |
| 3 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 26 |
| 3.1 | Použité chemikálie | 26 |
| 3.2 | Přístroje | 26 |
| 3.3 | Příprava hydrogelů tyraminovaného hyaluronanu | 26 |
| 3.3.1 | Stanovení obsahu vody v hydrogelů..... | 27 |
| 3.3.2 | Analýza bobtnání xerogelů..... | 28 |
| 3.3.3 | Orientační stanovení rozpustnosti tenzidů ve vodě a PBS..... | 28 |
| 3.3.4 | Příprava hydrogelů s obsahem tenzidů..... | 32 |
| 3.3.5 | Spektrofotometrické měření..... | 32 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.3.6 | Uvolňování barviva Sudan z hydrogelů..... | 33 |
| 3.3.7 | Reologické měření hydrogelů | 34 |
| 3.3.8 | Termogravimetrická analýza hydrogelů | 37 |
| 4 | DISKUZE..... | 40 |
| 5 | ZÁVĚR..... | 41 |
| 6 | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 42 |
| 7 | PŘÍLOHY | 41 |
| 8 | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ | 48 |
| 8.1 | Seznam použitých zkratek | 48 |
| 8.2 | Seznam použitých symbolů | 48 |

1 ÚVOD

V současné době se stále rozvíjí vlastnosti hydrogelů, které jsou založené na různé bázi, v našem případě zkoumáme hydrogely na bázi tyraminovaného hyaluronanu. Hydrogely mají široké využití ve zdravotnictví, tkáňovém inženýrství, v kosmetické oblasti atd..

Kyselina hyaluronová, dříve naprosto neznámá látka, byla objevena v roce 1934 Karlem Mayerem a Johnem Palmerem. Svého prvního lékařského využití se dočkala až ke konci padesátých let 20. století. KH je lineární polysacharid, vyskytující se v lidském těle v poměrně vysoké koncentraci. Kyselinu hyaluronovou můžeme najít v lidském těle v kožní tkáni, synoviální tekutině a očním sklivci. Je jednou ze složek pojivových, epiteliálních a nervových tkání. Díky těmto významným vlastnostem a hlavně jelikož se vyskytuje v lidském těle, je hodně významná v estetické medicíně a kosmetice. V estetické medicíně je využívána v plastické chirurgii například pro výplně rýh, vrásek, doplňování drobných asymetrií na nose, po zákrocích a dalších estetických operací. Dále se využívá v kosmetice a je aplikovaná do různých krémů a gelů. KH se při vyšších koncentracích vyznačuje poměrně velkou viskozitou a vytváří gel.

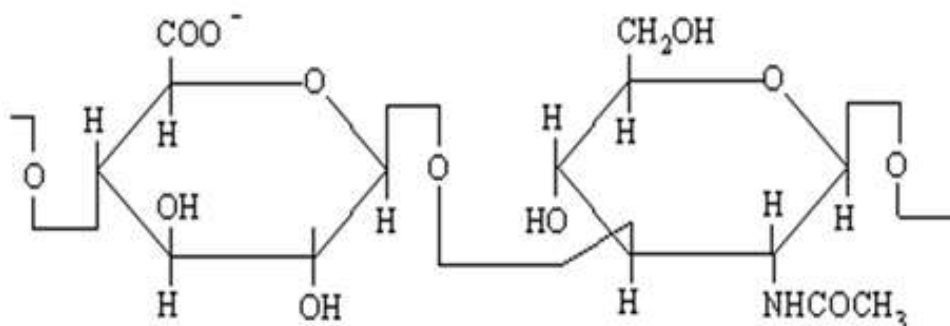
Cílem následující práce je prozkoumání hydrogelů vznikajících z hyaluronanu, který byl modifikován tyraminem. Důvodem, proč jsem si vybrala tuto práci, která se zabývá studiem vlastností hydrogelů tyraminovaného hyaluronanu, je získání nových poznatků z této problematiky v různých oborech a snažit se rozvíjet využití kyseliny hyaluronové jako součást hydrogelů, dále zkoumat a zlepšit vlastnosti hydrogelů na bázi tyraminovaného hyaluronanu. Práce obsahuje krátkou rešerši, která pojednává o využitelnosti a vlastnostech hydrogelů tyraminovaného hyaluronanu.

V této práci se snažíme aplikovat hydrofobní látky do vytvářeného hydrogelu vzniklého na bázi tyraminovaného hyaluronanu a optimalizovat vlastnosti hydrogelů, tak aby hydrogel sloužil jako nosičový systém pro hydrofobní látky.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová, známá také jako hyaluronan nebo hyaluronát, je lineární polysacharid-glykosaminoglykan o velké molekulové hmotnosti, který se skládá ze dvou opakujících se disacharidových jednotek tvořených z N-acetylglukosaminu a kyseliny glukuronové, které jsou propojeny $\beta(1,4)$ a $\beta(1,3)$ glykosidickou vazbou [1]. Hyaluronan je zvláště atraktivní pro tkáňové inženýrství a opravy, má pro toto využití vhodné fyzikálně chemické vlastnosti. Dále je součástí extracelulárních matic většiny savčích tkání, přispívá k biologickým a fyzickým funkcím těchto tkání a má vynikající biokompatibilitu [2].



Obr. 1: Struktura disacharidové jednotky kyseliny hyaluronové.

2.1.1 Charakteristika kyseliny hyaluronové

Kyselina hyaluronová je důležitým komponentem mezibuněčných hmot. Je jednou ze složek pojivových, epiteliálních a nervových tkání. Tělo člověka obsahuje asi 15 g hyaluronové kyseliny. Kyselina hyaluronová se vyskytuje v kůži, synoviální tekutině, nebo v očním sklivci. Vyskytuje se také v pupeční šňůře, v plicích, ledvinách, mozku a ve svalové tkáni. Narozdíl od ostatních glykosaminoglykanů neexistuje žádný důkaz o její vazbě na bílkoviny. Díky specifické vazbě vytvářející se na povrchu buněk a na proteinech extracelulárních hmot se HA aktivně podílí na buněčné signalizaci. Interakce mezi proteinem a ligandem stabilizuje matrix chrupavky a zprostředkovává signalizační kaskády například pro pohyblivost buněk, buněčnou proliferaci a morfogenezi. Mezi nejvýznamnější vlastnosti kyseliny hyaluronové patří její viskoelastičita, přičemž roztoky kyseliny hyaluronové kombinují viskózní vlastnosti kapalin a elastické vlastnosti pevných látek. Mezi další vlastnosti kyseliny hyaluronové patří její vysoká afinita k vodě, a proto má dokonalé hydratační účinky [3].

Mezi nejdůležitější vlastnosti kyseliny hyaluronové patří schopnost vázat vodu, pojme přibližně tisícinásobek své hmotnosti. Také má prostřednictvím negativního náboje proteoglykanu schopnost vyměňovat ionty - jednomocné proti dvojmocným kationtům. Brání prostupu virů a bakterií do buňky přes pericelulární matrix. Dále má schopnost lubrikovat pohyblivé části těla, jako jsou například svaly. Kyselina hyaluronová patří mezi nejvíce hydrofilní molekuly v přírodě, a proto může být označována jako přírodní hydratační látka [4].

2.1.2 Syntéza kyseliny hyaluronové

Kyselina hyaluronová je v organismu syntetizována pomocí fibroblastů a dalších buněk pojivové tkáně. Buněčná syntéza HA je komplikovaně regulovatelný proces. Většina z glykosaminoglykanů je syntetizována prostřednictvím enzymů, které se nazývají hyaluronan-syntázy. Enzym hyaluronan-syntáza vytváří dlouhé, lineární polymery z opakujících se disacharidových jednotek hyaluronanu. Během syntézy je do rostoucího řetězce střídavě připojována kyselina glukuronová a N-acetylglukosamin. Substrátem pro tuto syntézu jsou aktivované sacharidy s navázaným uridindifosfátem (UDP-glukuronová kyselina a UDP-N-acetylglukosamin). Jde o membránové proteiny, které jsou u obratlovců přítomny ve třech formách: HAS1, HAS2 a HAS3. Integrální proteiny prochází přes cytoplazmatickou membránu a jsou tak propojeny s prostorem na obou stranách membrány (cytosol a extracelulární prostor). Narozdíl od periferních membránových proteinů jsou asociovány jen s jednou stranou membrány, tedy buď s vnitřní cytosolovou, nebo s vnější extracelulární [5].

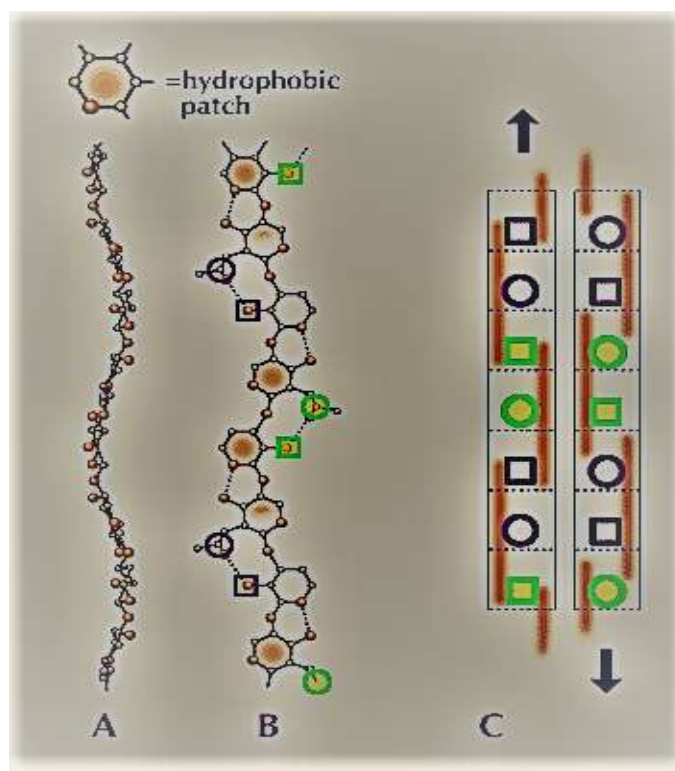
2.1.3 Využití kyseliny hyaluronové

Kyselina hyaluronová má silné hydratační a regenerační účinky. Díky své konzistenci a přívětivosti ke tkáním je používána při redukci vrásek, hydrataci suché pokožky a regeneraci kůže. KH je biokompatibilní a poskytuje rozmanité využití pro medicínské a farmaceutické aplikace. Je využívána k lokální léčbě popálenin, kožních vředů a také jako regenerační podpora po zranění míchy. Kyselina hyaluronová je určena i pro použití v oční chirurgii. Chrání jemné oční tkáně, především endotel rohovky, před poškozením během chirurgického výkonu, využívá se i jako náhrada sklivce při operaci šedého zákalu nebo implantaci čočky. Dále se užívá k dočasnému vyplnění prostoru přední oční komory a k ochraně očních tkání [4].

Nejširší využití má kyselina hyaluronová u pacientů s osteoartrózou - intraartikulární aplikace (tzv. viskosuplementace). Další možná aplikace je periartikulární, například při podvrtnutí kotníku. K významnému používání patří augmentace v plastické chirurgii [4].

2.1.4 Síťování kyseliny hyaluronové

Hyaluronan je schopen agregace sám se sebou. Procesu agregace hyaluronanu napomáhají vazby mezi hydrofobními oblastmi. Sekundární složení má pozoruhodné vlastnosti, vznikají dvojnásobné řetězce. Tyto řetězce jsou totožné, ale také jsou antiparalelní. Agregáty jsou schopné růst na obou koncích. Kvůli tomu, že jsou oba řetězce polyaniony, dochází mezi nimi k vzniku elektrostatické repulze, což způsobuje disociaci agregátů. Tato síla je vyvážovaná jak hydrofobními interakcemi, tak i vodíkovými můstky. Vodíkové můstky vznikají mezi karboxylovými a acetamidovými skupinami [6].



Obr. 2: Na obrázku A a B lze vidět molekule hyaluronanu. Červené oblasti jsou hydrofobní oblasti. Čtverce představují karboxylové a kruhy acetamidové skupiny. Na obrázku C vidíme možnost dvojnásobného antiparalelního řetězce hyaluronanu [6].

2.2 Gely

Gely jsou tuhé nebo polotuhé soustavy, rosolovité povahy. Obvykle vznikají rozpouštěním silně solvatujících látek v kapalině. Gel je složen z vysokomolekulárních látek, mají rozdílné složení látky a rozpouštědla, odborně se nazývají hydrogely. Hydrogel je trojrozměrná makromolekulární síť. Tato síť vzniká z lineárního polymeru. Vnitřní struktura sítě může být propojená buď chemickými vazbami, nebo fyzikálními vazbami. Důsledkem pak může být krystalizace, tvorba komplexů atd. Hydrogely reprezentují velice podstatnou skupinu, respektive skupenství materiálů. Spousta částí lidského těla je tvořena právě hydrogely kupříkladu pojivové tkáně, sklivec nebo rohovka. Tyto komplexní systémy nacházejí plnou řadu aplikací v mnoha odvětvích lidské činnosti, v první řadě v oblasti péče o zdraví a kosmetika [9].

Z fyzikálně-chemického hlediska se jedná o koloidní soustavy, v kterých je disperzním podílem pevná látka a disperzním prostředím voda. V některých případech voda tvoří až 99,9 % celkové hmotnosti hydrogelu, zatímco pevného podílu je zde zastoupené pouze mizivé množství cca 0,1 %. Hydrogel je definován jako dvou nebo více složková soustava, uspořádaná do prostorové sítě, polymerních řetězců a vody, která vyplňuje místo mezi makromolekulami. V závislosti na struktuře může být zadržováno rozmanité množství vody [7].

Hydrogely se přirozeně vyskytují jako polymerní síť kolagenu, želatiny, nebo mohou být uměle syntetizovány. Jsou to velmi slibné biomateriály, které při styku s krví, tělními tekutinami a tkání projevují pozitivní biokompatibilitu [8]. Tradiční podněty, které vyvolávají odezvu hydrogelů, jsou pH, teplota a iontová síla. Hydrogely mají největší použití v biomedicíně. Jsou běžně používány například pro výrobu kontaktních čoček, superabsorbentů, nosičů léčiv a obvazů [10].

2.2.1 Vznik gelů

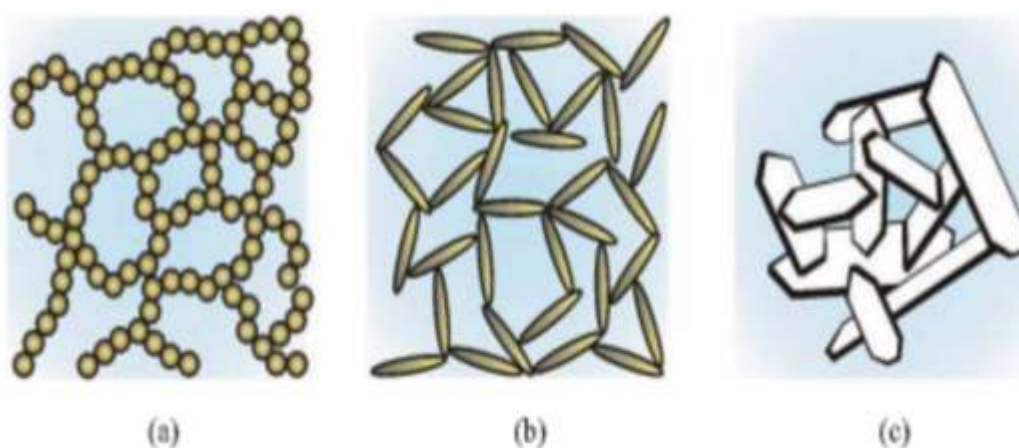
Gely vznikají procesem, který se nazývá gelace. Je to proces, při němž se spojují koloidní částice disperzního podílu v souvislou strukturu. Vytvářením a postupným zpevňováním prostorové sítě – vzniká gel. Tento proces je charakterizován tzv. bodem gelace. Dochází přitom k vytvoření trojrozměrné síťovité struktury, ve které se monomerní jednotky spojují v uzly. Proces gelace může být vyvolán několika způsoby: může být uskutečněn změnou fyzikálního stavu roztoku, chemickou reakcí či bobtnáním. Změna

může být způsobena například teplotou, změnou pH roztoku, či omezenou rozpustností některých látek v různých rozpouštědlech [11].

2.2.2 Dělení gelů

Dle toho zda obsahují nebo neobsahují rozpouštědlo, dělíme gely na:

- Reverzibilní gely – při vysušení dochází ke zmenšení jejich objemu a vzniku kompaktních xerogelů. Reverzibilní gely mohou tedy vznikat gelací roztoků vysokomolekulárních látek nebo bobtnáním xerogelu [12].
- Ireverzibilní gely – při vysušení nedochází k zmenšení jejich objemu. Objem zůstane stejný, jako měl původní lyogel. Ireverzibilní gely vznikají gelací lyofóbních solů [12].



Obr. 3: Ireverzibilní gel (a) s izotermickými částicemi, (b) s jehlicovými částicemi, (c) s detičkovými částicemi [11].

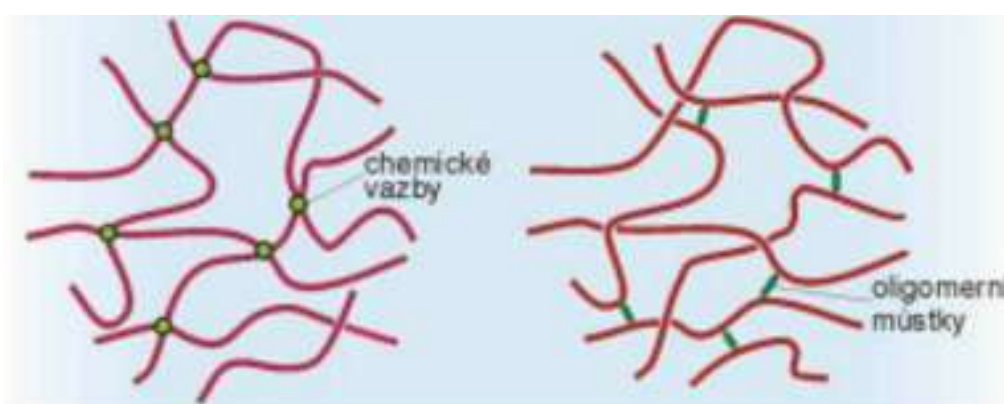
- Lyogely – obsahují kapalně disperzní prostředí [11]. V případě vodného prostředí mluvíme o hydrogelech.
- Xerogely – vznikají vysušením lyogelu. Objem xerogelu je menší přibližně o objem odstraněného rozpouštědla. Xerogel je vratný. Tímto způsobem se makromolekulární gely liší od gelů vzniklých z lyofóbních solů, jejichž vysušení je nevratné [11].

2.2.3 Vlastnosti gelů

I když gely obsahují kapalně disperzní prostředí, vykazují určité mechanické vlastnosti, které jsou charakteristické pro tuhou fázi. Gely jsou schopné se chovat jako elastická tuhá látka, před dosažením určité hodnoty tzv. kritického napětí. Hodnota kritického napětí je přímo úměrná koncentraci vazeb a jejich stabilitě. Tato hodnota je závislá na počtu uzlů, tzn. čím více je vazeb mezi řetězci polymeru, tím je menší možnost změny tvaru

makromolekuly a tím pevnější bude i prostorová síť. Reverzibilní gely s kovalentními vazbami, které naopak obsahují malé množství uzlů, vykazují elastické vlastnosti [12].

Gely, které mají fyzikální spoje, nesou tixotropní vlastnosti. Platí to jak v případě reverzibilních gelů tak i ireverzibilních gelů. V případě, že přitažlivé síly působící v síťovité struktuře jsou malé, dochází ke změně suspenze na sol [12]. Množství spojů narůstá postupně s časem u reverzibilních i u ireverzibilních gelů, jež nejsou v termodynamické rovnováze. Dojde ke zmenšení síťovité struktury. Část kapaliny, která byla přítomna v gelu, vytéká a nastane děj synereze, což je samovolně vytékání kapaliny z gelů, který stárne v důsledku smršťování [12].



Obr. 4: Kovalentně síťované gely [12].

2.2.4 Bobtnání gelů

Bobtnání je proces, při kterém dochází k pohlcování nízkomolekulárního rozpouštědla xerogelem. Tím se zvětšuje objem xerogelů, a vzniká lyogel, ve kterém se vyskytuje pohlcovaná kapalina, ta vytváří disperzní prostředí. Bobtnání se uskutečňuje pouze u reverzibilních gelů. Bobtnání ovlivňuje několik podmínek, jako například přítomnost nízkomolekulárních látek v prostředí. Teplota ovlivňuje rychlost bobtnání, čím je vyšší teplota, tím je bobtnání rychlejší. Bobtnání je specifickým případem rozpouštění, přestože je velmi odlišné od roztavení nízkomolekulárních látek. V první fázi se do xerogelu difunduje jen rozpouštědlo, vysokomolekulární látky do rozpouštědla nedifundují, jelikož jsou spoutané v gelu. Z tohoto důvodu není vidět rozplývání rozhraní mezi oběma fázemi. Je možné pozorovat pouze zvětšování objemu gelu a posun fázového rozhraní. Bobtnání v této fázi se podobá více osmóze než difúzi [12].

Rozlišujujeme dva typy bobtnání gelů. Bobtnání omezené a neomezené:

- Omezené bobtnání je děj, při kterém dochází k pohlcování kapaliny xerogelem. Pohlcování se zastaví v úseku elastického lyogelu a další množství kapaliny už není pohlcováno, i když je v přebytku.
- Neomezené bobtnání je děj, při němž dochází k pohlcování kapaliny xerogelem, které se nezastaví ve fázi lyogelu. Xerogely s fyzikálními spoji bobtnají neomezeně.

2.3 Hydrogely na bázi tyraminovaného hyaluronanu

Chemická modifikace HA je zaměřena na dvě hlavní funkční skupiny - hydroxylové a karboxylové skupiny. Tyto skupiny jsou používány v různých oblastech chemie včetně: esterifikace a reakce zprostředkované karbodiimidem. Tyto techniky jsou používány pro zesílení HA pro tvorbu hydrogelů s dynamickými fyzikálními vlastnostmi. Ovšem zahrnují použití biologicky nekompatibilních chemikálií, způsobujících toxicitu, která vede ke ztrátě životaschopnosti buněk a tkání například v případě zesíťování in vivo [2].

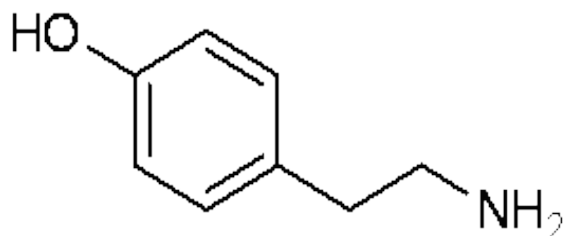
Překonání těchto komplikací je hlavním úkolem při vývoji pokročilých chemických metod pro tvorbu HA hydrogelu. Biokompatibilní HA hydrogel je například fotozesíťovatelný HA hydrogel, který využívá disulfidické reaktivní skupiny k tvorbě syntetických ECM hydrogelů pro aplikace v tkáňovém inženýrství. Extracelulární matrixové (ECM) hydrogely poskytují několik výhod, jedna z nich je schopnost zaplnit nepravidelně tvarovaný prostor a schopnost uchování inherentní biologické aktivity nativní matrice. Nicméně materiálové vlastnosti ECM hydrogelů a účinek těchto vlastností na chování buněk nejsou stále dobře prozkoumány ani úplně pochopeny [2].

2.4 Tyramin

Tyramin (4-hydroxyfenyl ethylamin) je přirozeně se vyskytující sloučenina monoaminu a stopových aminů odvozených z aminokyseliny tyrosinu. Tyramin působí jako katecholamin - uvolňující činidlo. Především není schopný přejít hematoencefalickou bariérou, což má za následek nepsychoaktivní periferní sympatomimetické účinky. Hypertenzní krize může následovat po požití potravin bohatých na tyraminové spojení s inhibitory monoaminoxidázy (MAO) [13].

Tyramin se vyskytuje všeobecně v rostlinách a zvířatech, je metabolizován enzymem monoaminoxidázy. V potravinách se často produkuje dekarboxylací tyrosinu během

fermentace nebo rozkladu. Mezi potraviny, které obsahují značné množství tyraminu, patří potenciálně zkažené nebo nakládané maso. Další potraviny, které obsahují značné množství tyraminu, jsou například čokoláda a alkoholické nápoje. V laboratoři může být tyramin syntetizován různými způsoby, zejména dekarboxylací tyrosinu [14].



Obr. 5: struktura tyraminu.

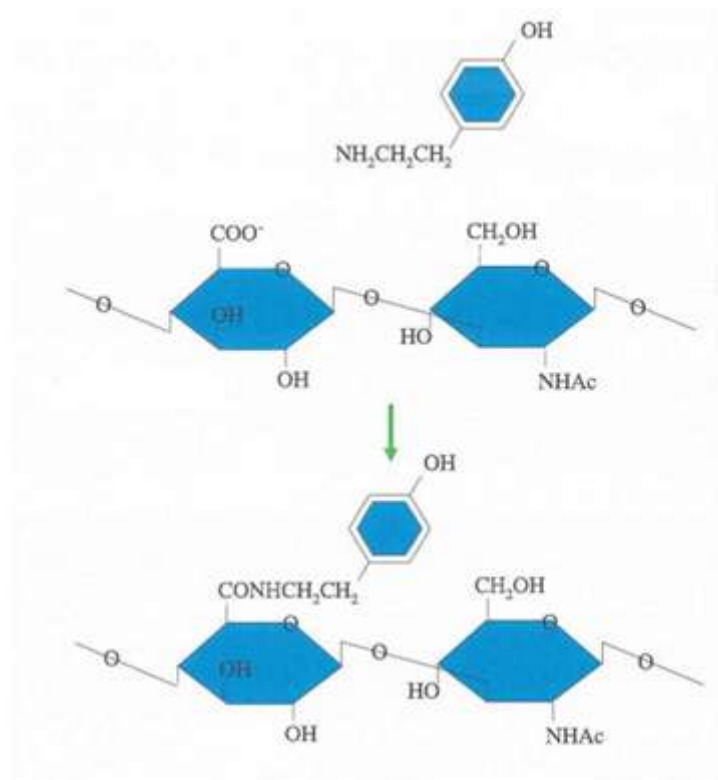
2.4.1 Hyaluronan substituovaný tyraminem (TS-HA)

Hyaluronan substituovaný tyraminem se vyrábí dvoustupňovým procesem. Nejdříve se tyramin naváže na hyaluronan za vzniku hyaluronanu substituovaného tyraminem (TS-NaHy). Vzniklý TS-NaHy slouží jako meziprodukt pro tvorbu hydrogelů tyraminovaného hyaluronanu. Následně se k TS-NaHy přidává peroxidáza a peroxid vodíku za vzniku hydrogelu modifikovaného tyraminovaným hyaluronanem [15].

TS-HA fascie se zesíťováním, vykazují zvýšení počtu makrofágů, velkou buněčnou odezvu a nižší hustotu buněk podobnou fibroblastům. Makrofágy a obrovské buňky fungují tak, že fagocytózou a degradovanými implantovanými biomateriály, vylučují reaktivní meziprodukty kyslíku, kyselin a proteolytických enzymů, jako je matrixová metaloproteináza (MMP). MMP se podílí na degradaci proteinů ECM a následném poklesu mechanických vlastností matrice [16].

I když tato konkrétní příprava TS-HA-ošetřené fascií nebyla účinná při modulaci zánětu nebo zachování mechanických vlastností fascií, tak tyto poznatky budou používány dále, aby se zkoumala léčba TS-HA s úmyslem modulovat zánět, zvýšit fibroblasty pomocí infiltrace, a v důsledku mechanicky podporovat regenerace funkční hostitelské tkáně [16].

Sousední tyraminové adukty mohou být zesíťovány za vzniku tyraminových můstků, což má za následek, že hydrogely HA nejsou náchylné k hydrolýze a mají koncentrační odolnost vůči hyaluronidáze [2].



Obr. 6: Hyaluronan substitovaný tyraminem – TS-HA.

2.5 Dvoustupňová enzymatická zesíťovací metoda pro výrobu hydrogelů na bázi tyraminovaného hyaluronanu

Enzymatické zesíťující metody se objevily jako alternativní cesta k překonání složitosti spojené s chemickými metodami zesíťování. Transglutaminázy jsou používány k tvorbě hydrogelů z látek, jako jsou například polyetylen glykol, kolagen, želatina a polypeptidy. Křenová peroxidáza (HRP) zprostředkovaná zesíťováním tyraminových aduktů je používána také pro tvorbu HA hydrogelu [2].

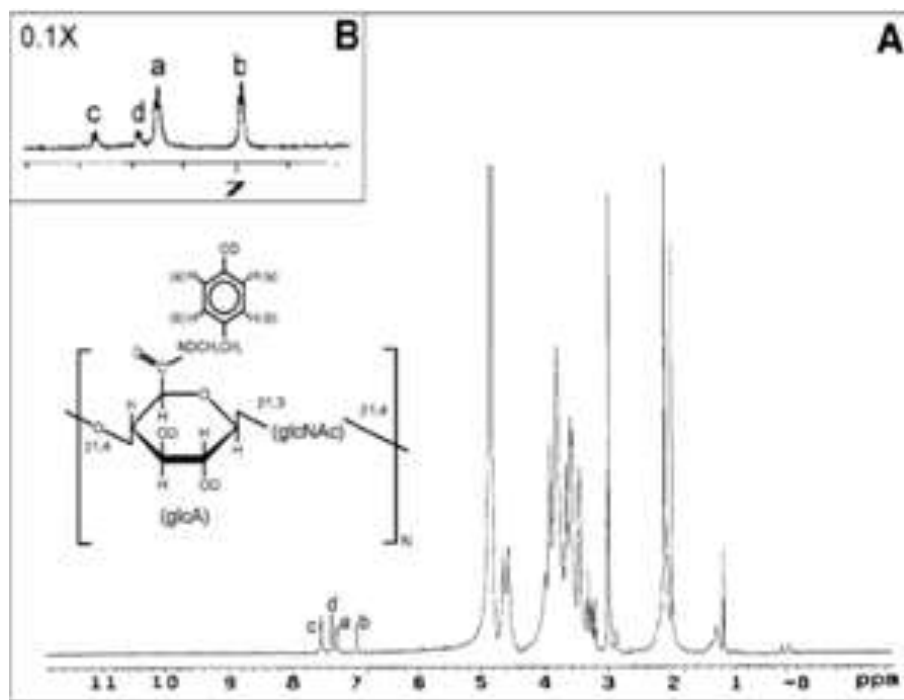
Faktor XIII byl také v poslední době použit k vytvoření peptid-PEG hydrogelu. V posledních letech byly používány biomateriály, vytvořené prostřednictvím zesíťování konjugovaných tyraminových polymerů pomocí křenovou peroxidázou (HRP), ve snaze udržet biologickou kompatibilitu a poskytovat možnost zesíťování *in vivo*. Příklady těchto chemikálií zahrnují: HRP síťovaný alginát, dextran, karboxymethylcelulózu a polyaspartovou kyselinu [2].

2.5.1 Modifikace HA

Tvorba amidové vazby, mezi volnými karboxylovými skupinami na HA molekule a volnými aminovými skupinami na molekulách tyraminu, se provádí pomocí běžné karbodiimidové reakce. Reakce zahrnuje aktivaci karboxylové skupiny s EDC (ethylen dichlorid), pro vytvoření reaktivní O-acyl isomočoviny (meziprodukt). Nukleofilní atak aminoskupiny, tyraminovým elektronem, na elektronově deficítní karbonylový uhlík GlcA (glykolát permeázy) vytváří požadovaný amid a kovalentní vazbou navázaný tyramin na molekulu HA. EDC (ethylen dichlorid), se převede na nereaktivní acylmočovinou formu EDC. N-hydroxysukcinimid je navrhnut jako katalyzátor k usnadnění EDC reakce tvorbou aktivního esteru, čímž se minimalizuje vedlejší reakce, která vytváří kromě tyraminu na TS-HA i další adukty. Tyto adukty se neúčastní následující zesíťovací reakce a jsou tudíž považovány za neproduktivní a nežádoucí [2].

Neproduktivní adukty vznikají v důsledku dvou různých vedlejších reakcí. První je typická pro konvenční karbodiimidové chemikálie. Reaktivní meziprodukt O-acyl isomočoviny (popsán výše) podléhá intramolekulárnímu přesmyku za vzniku N-acylmočovinného aduktu na HA. Dva odlišné adukty jsou možné v důsledku asymetrického charakteru molekuly EDC [2].

N-acylmočovinný adukt zaniká *in vivo* v průběhu času z HA pomocí neenzymatické hydrolýzy, která regeneruje nativní HA karboxylové skupiny a uvolňuje EDC ve své acylmočovinně podobě. To může být příznivé pro aplikace na hojení ran, jelikož bylo prokázáno, že acylmočovinná forma EDC je protizánětlivá a je schopná inhibovat břišní sepse (otrava krve) [2].

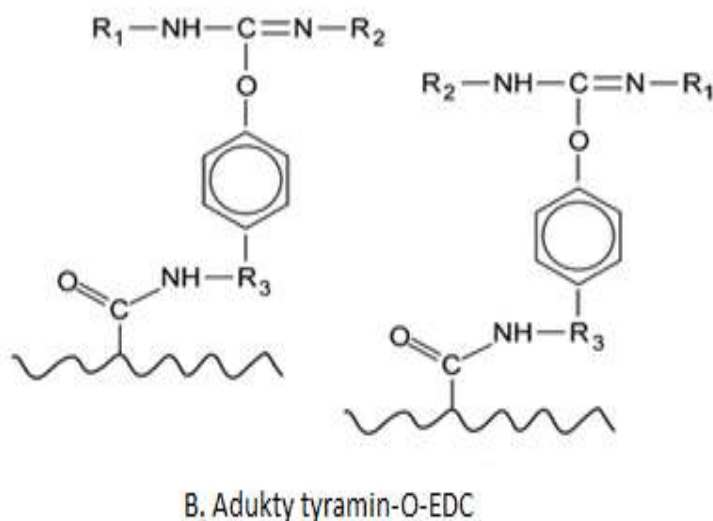
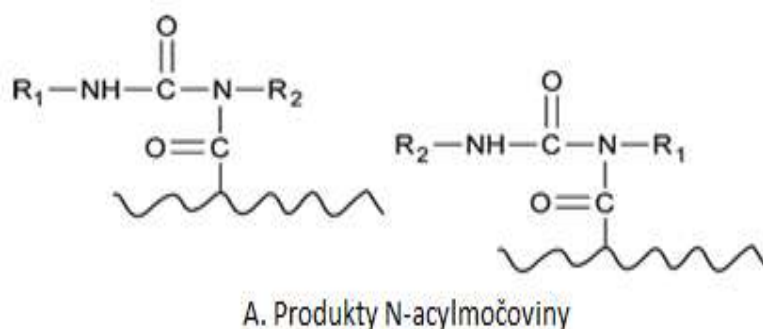


Obr. 7: (A) ^1H NMR (Nukleární magnetická rezonance) spektrum pro tyraminem substituovaný HA (TS-HA) syntetizovaný za použití molárního poměru EDC na tyramin 1. (B) Aromatická oblast ^1H NMR spektra pro TS-HA připravená za použití molárního poměru EDC na tyramin 0,1[2].

Druhá vedlejší reakce je jedinečná díky chemikálii karbodiimidu zahrnující molekuly obsahující hydroxyfenylovou skupinu, jako je například tyramin. Reakce EDC (ethylendichlorid) přímo na hydroxyfenylovou skupinu tyramin (ať již volně v roztoku, nebo již kovalentně vázán na HA prostřednictvím své aminoskupiny) tvoří tyramin-o-EDC adukty na HA [2].

Opět dva odlišné adukty jsou možné v důsledku asymetrického charakteru molekuly EDC. Když se tvoří z volného tyraminu v roztoku, oba tyto chemické druhy si zachovávají svou volnou aminoskupinu, která se může podílet na stejném nukleofilním ataku z reaktivního meziprojektu o-acylisomočoviny, jak je popsáno výše pro tyramin s následným kovalentním připojením ke karboxylovým skupinám na HA [2].

Nicméně, narozdíl od tyraminu, tyramin-O-EDC adukt není schopen podílet se na enzymatické zesíťovací reakci, protože nemá žádné extrahovatelné fenolické, hydroxylové vodíkové atomy (nyní obsazeny EDC) [2].



Obrázek 8: Schéma potenciálních neproduktivních reakčních aduktů na TS-HA: (A) N-acylmočoviny adukty; a (B) tyramin-O-EDC adukty. $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$, $R_2 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH} + (\text{CH}_3)_2\text{Cl}$ - a $R_3 = \text{CH}_2\text{CH}_2$ [2].

Substituce na tyraminový hyaluronan a jiné adukty z neproduktivní vedlejší reakce závisí na molárním poměru tyraminu a karbodiimidu použitým v průběhu substituční reakce (krok 1). Výsledky naznačují, že substituce relativně malého množství tyraminu je žádaná k tvorbě hydrogelů a nechává většinu disacharidů hyaluronanu nezměněných. Dostačující přírodní hyaluronanové struktury se udržují pro umožnění rozpoznání a spojování b-HABP a navázaného komplexu kyseliny hyaluronové, který se běžně nachází v biologické chrupavce [2].

2.6 Reologie

Z řeckého slova RHEOS (tok, proud) je odvozen název oboru reologie. Zakladateli této mezioborové vědy jsou: chemik Eugene Cook Bingham a stavební inženýr Markus Reiner. Reologie je nauka o toku látek. Charakterizuje deformace pevných látek, plynů nebo kapalin působením vnějších sil. Tyto deformace mohou být elastické nebo neelastické.

V případě, že se jedná o elastickou deformaci, a působíme-li na těleso silou menší než je hodnota kritického napětí, po ukončení působení této síly, se těleso vrací do původního stavu. Pokud působíme na těleso větší silou než je hodnota kritického (tečného) napětí, po zastavení vlivu této síly, se těleso nevrací do starého tvaru, ale ztrácí svou elasticitu a teče [17].

Na měření reologických vlastností materiálů se používá přístroj reometr. Díky reometru je vzorek, který se měří buď deformován otáčením rotujícího senzoru, nebo oscilačními pohyby senzoru. Pomocí oscilací senzoru dostáváme informace o míře elasticity vzorku. Zatímco rotací senzoru zjistíme informace o viskozitě a tokových vlastnostech měřeného vzorku [17].

U materiálů, kde považujeme viskozitu za látkovou konstantu, platí pro tečné napětí Newtonův zákon:

$$\tau = \eta \cdot \frac{du}{dx} = \eta \cdot D$$

Zde je τ tečné napětí, η je dynamická viskozita, du je vzájemná rychlost pohybu smykových rovin vzdálených o dx a D je tzv. smyková rychlost. Dynamická viskozita η , je závislá na teplotě a tlaku. Při zvyšující se teplotě u kapalin klesá a u plynů roste. Pokud ji podělíme hustotou, ρ , zjistíme hodnotu kinematické viskozity v $[m^2/s]$ [17].

2.6.1 Reologie gelů

Jak již bylo řečeno výše gely jsou disperze tuhých látek v kapalinách, které se řadí mezi viskoelastické materiály. Gely vykazují vlastnosti tuhých látek až do určité hodnoty kritického napětí, po překročení tohoto napětí, gel přestává aplikovanému napětí odolávat. Pevnost uzlů ve struktuře gelů a koncentrace má velký vliv na hodnotu tečného napětí [18].

Určité typy gelů mají při smykovém usilování tixotropní znaky. Nejdříve gely vykazují vysokou viskozitu, která se vlivem smykového namáhání postupně snižuje. K získání původní struktury je potřeba nechat gel nějakou dobu v klidu, poté dochází ke zvyšování hodnoty zdánlivé viskozity a přibližování k původní hodnotě. Během smykového namáhání dochází nejdříve k narušení nejméně stabilních vazeb. Dojde tak k rozpadu gelu na velké části, které nemají tendenci vracet se do původního stavu. Také se vyskytuje opačný případ, kdy vznik gelu způsoben mechanickým namáháním, v této situaci jde o reopexii [18].

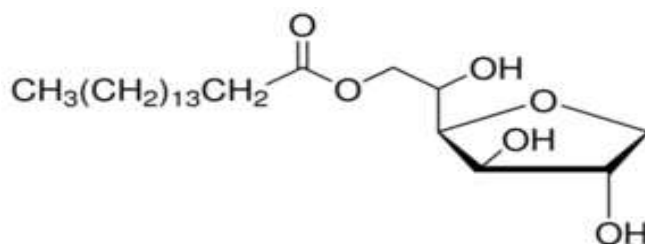
Působíme-li deformačním napětím velmi rychle, elasticita se vyskytuje i u plynů a vody. Reologické vlastnosti materiálů charakterizuje tzv. Debořino číslo.

$$De = \frac{T}{\Delta t}$$

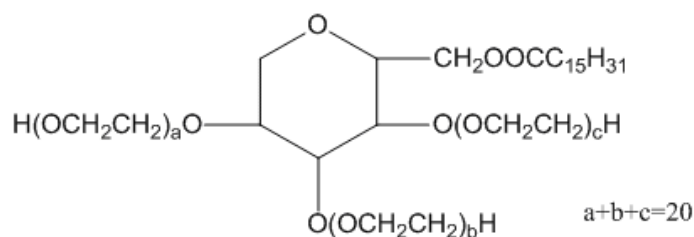
kde T vyjadřuje materiálový čas a Δt délku trvání deformačního procesu. Pro ideálně elastické materiály je T i De rovno nekonečnu. Pro ideálně neelastické kapaliny je $T=0$ a De tedy také 0. Při nízkých hodnotách De se látky chovají jako vazké kapaliny, při vysokých hodnotách jako pružná tělesa [18].

2.7 Tenzidy

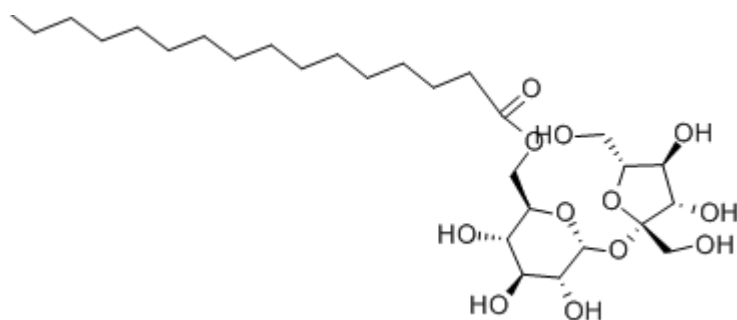
Většina léčiv se nerozpouštějí ve vodě, jednou z možností, jak je dostat do těla, je schovávat je do tenzidů anebo je navázat do hydrogelů. Proto jsme v této práci vybrali tenzidy neiontové na bázi cukru, které jsou povolené pro kosmetické využití. Mezi vybrané tenzidy patří sorbitan monopalmitát, polyoxyetylen sorbitan monopalmitát (Tween 40) a sacharóza palmitát.



Obr. 9: Sorbitan monopalmitát.



Obr. 10: Polyoxyetylen sorbitan monopalmitát (Tween 40).

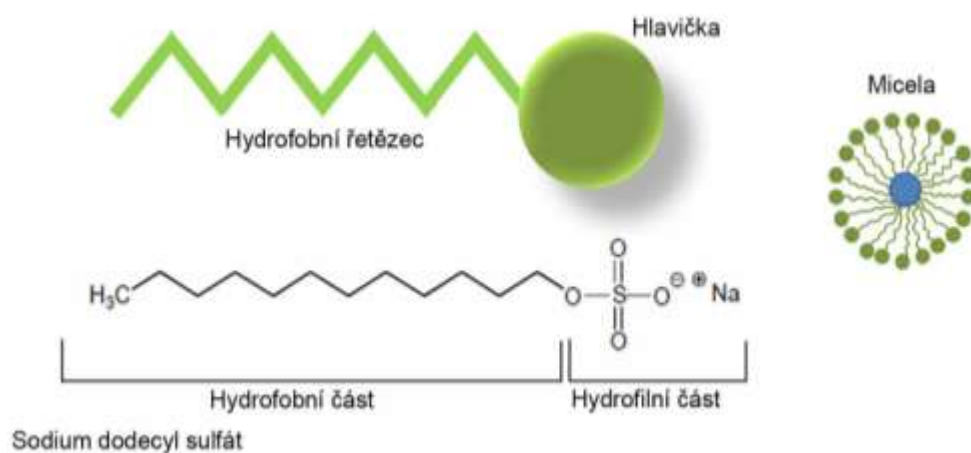


Obr. 11: Sacharóza palmitát.

Tyto tenzidy jsou třídou emulgátorů používaných v některých léčivech a pro přípravu potravin. Často se používají v kosmetice například k rozpuštění esenciálních olejů do přípravků na bázi vody [19];[20];[21].

Tenzidy jsou nedílnou součástí našich životů, jsou základní složkou moderních pracích prostředků. Termínem tenzidy se označují sloučeniny organických látek. Tenzidy jsou také někdy nazývané surfaktanty, nebo-li povrchově aktivní látky (PAL). Společným znakem všech tenzidů je fakt, že v malé koncentraci se hromadí na mezifázovém rozhraní, a tím snižují jeho povrchové napětí. Fázové rozhraní označuje plochu, která rozděluje dvě fáze a to kapalina/kapalina, kapalina/pevná látka nebo kapalina/plyn. Na fázovém rozhraní se shlukují molekuly tenzidů, kde pronikají na povrch rozpouštědla a na rozhraní dvou fází se absorbují a vytvoří monomolekulární vrstvu. Zvýšením koncentrace rozpouštěného tenzidu dochází ke snižování povrchového napětí [22].

Tenzidy se používají hlavně v čistících a pracích prostředcích, dále jako součástí emulzních, smáčecích a změkčovacích prostředků [22].



Obr. 12: Struktura molekuly detergentu (sodium dodecyl sulfát).

Znaky tenzidů jsou dány jejich chemickou stavbou. Molekula se skládá ze dvou částí hydrofobní a hydrofilní. Dlouhý uhlíkatý řetězec, který je hydrofobní (lipofilní). Hydrofilní hlavička je schopná hydratace. Hydrofilní skupina tenzidů se hydratuje ve vodném prostředí molekulami vody, přechází do roztoku a hydrófbní část molekuly je vytěšňována z roztoku kohezní silou [22].

V případě, že se do vody přidá látka, která je nerozpustná, dochází ke vzniku dvou vrstev, které se po promíchání rychle rozvrství. Poté co se tenzid přidá do vody, dochází k asociaci jeho molekul na rozhraní obou kapalin tak, že hydrofobní část se orientuje k látce a hydrofilní k vodě. Takto dochází i ke snížení povrchového napětí a po promíchání vzniká emulze. Podobným stylem se molekuly tenzidu orientují na povrchu pevných látek, které dispergují. Toto dispergování je tak silné, že postihuje i tuhé látky, které se vyskytují na povrchu jiné tuhé látky. Tím je umožněno jejich odstranění vodou (umytí) [22].

2.7.1 Dělení tenzidů

Tenzidy je možné klasifikovat podle různých kritérií - chemické struktury, podle jejich funkce. Důležitou vlastností je dělení tenzidů na základě hydrofilní (polární) skupiny na iontové a neiontové. Dle disociace tenzidů ve vodném prostředí se iontové tenzidy dělí na kationtové, aniontové a amfoterní [22].

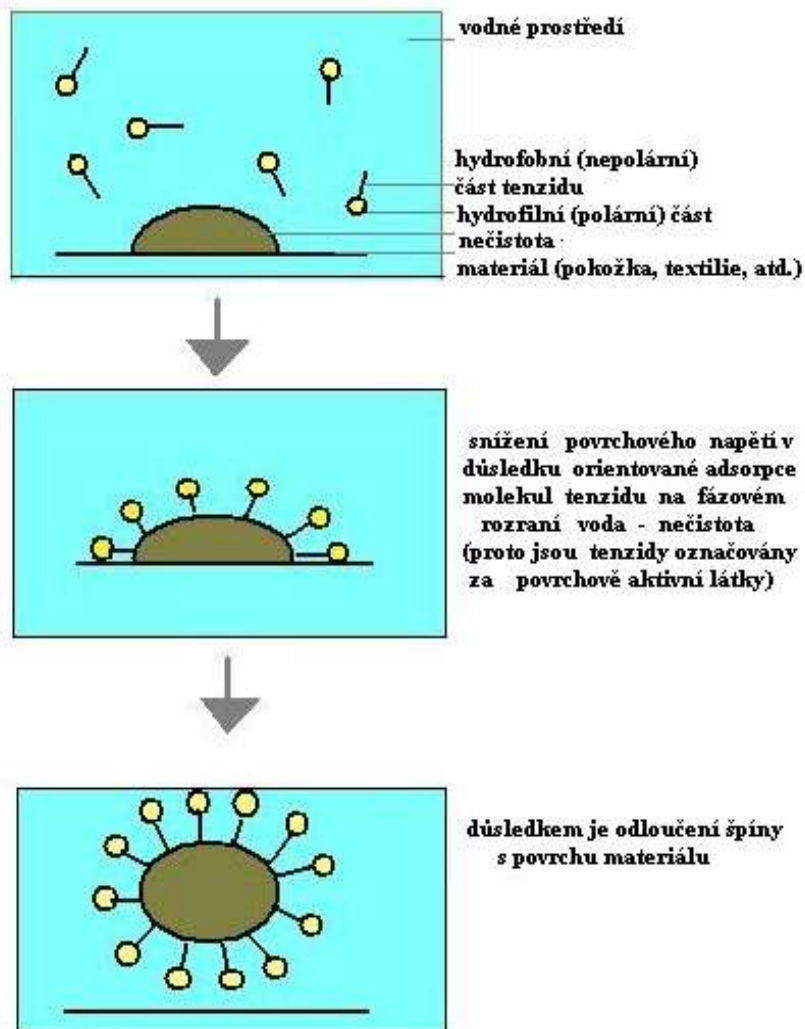
Tenzidy:

- **Iontové** – iontové tenzidy jsou amfifilní sloučeniny schopné disociovat ve vodě.
 - **Kationtové:** označují se též jako invertní mýdla. Ve vodném prostředí mají kladný náboj. Významnou složkou je rozsáhlý organický kation, většinou bývá kvarterní amoniová báze. V případě jejich působení na ně ve vodním prostředí nemají vliv rozpuštěné kationty. Nejvýznamější jsou kvartérní amoniové soli alifatických, alifatickoaromatických aminů a soli pyridinu [23].
 - **Aniontové:** aniontové tenzidy jsou sloučeniny, které obsahují jednu nebo více funkčních skupin. Ve vodném prostředí mají záporný náboj. Disociují za tvorby povrchově aktivních kationtů. Podle chemické struktury je můžeme rozdělit do čtyř nejpoužívanějších skupin aniontových tenzidů [23].

- karboxylové kyseliny
 - deriváty sulfonových kyselin
 - deriváty kyseliny sírové
 - deriváty kyseliny fosforečné
- **Amfoterní:** dle hodnoty pH ve vodném prostředí získají záporný nebo kladný náboj, a nebo jsou elektricky neutrální [23].
- lecitiny - jsou fosfolipidy, získávané nejčastěji ze soji. Mají HLR přibližně 10, proto se můžou používat pro stabilizaci emulzí jak o/v tak v/o.
 - želatina - je amfolitická povrchově aktivní látka, nejvíce se využívá její schopnost tvořit gely a slizy.
 - alkybeatiny - používají se v kosmetice.
- **Neiontové** – neiontové tenzidy jsou neschopné elektrolytické disociace, obvykle se skládají z uhlovodíkového řetězce, který obsahuje polární i neionogenní skupiny. Tyto skupiny (esterové, hydroxylové skupiny) zajišťují rozpustnost sloučenin [23].

2.7.2 Princip působení tenzidů

Základními znaky, které charakterizují tenzidům jejich detergenční způsobilost, jsou jejich amfifilní charakter a tendence produkovat micely. Tenzidy při přijatelné koncentraci vytváří micely s nepolárním jádrem. Nečistoty vůči tomu jsou nepolárního charakteru, budou se tedy lehce uzavírat uvnitř micel, což způsobí jejich odstranění. Na Obrázku číslo 13 jsou zobrazeny dílčí fáze čistícího průběhu [24].



Obr. 13: Princip působení tenzidů [24].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

Hyaluronan sodný substitovaný tyraminem – TS-NaHY, Lifecore.

Křenová peroxidáza, Sigma Aldrich.

Peroxid vodíku, Penta.

Polyoxyethylen sorbitan monopalmitát (Tween 40), Sigma Aldrich.

Sorbitan monopalmitát, Sigma Aldrich.

Sacharóza palmitát, Sigma Aldrich.

Sudan III, Sigma Aldrich.

PBS - (Phosphate Buffered Saline), fosfátový roztok s 0,15 M NaCl, VWR.

3.2 Přístroje

Termogravimetr Q5000, TA Instrument.

Analytické a přesné váhy, Denver instrument.

Třepačka, Heidolph VIBRAMAX 100.

Reometr ARG2, TA Instrument.

UV-VIS spektrofotometr, HITACHI - U-3900H.

3.3 Příprava hydrogelů tyraminovaného hyaluronanu

Chemikálie, které byly používány pro tvorbu hydrogelů tyraminovaného hyaluronanu jsou: 250 mg kyselina hyaluronaová modifikovaná tyraminem ve formě prášku (TS-NaHY), 25 ml (10U/ml) křenová peroxidáza a 5 ml 1% peroxidu vodíku.

Nejprve bylo smícháno 250 mg hyaluronanu sodného, který je modifikovaný tyraminem, s 25 ml 10U křenovou peroxidázou. Následně jsem nechala TS-NaHy asi tři hodiny protřepat na třepačce, aby došlo k efektivnímu rozpuštění TS-NaHy s křenovou peroxidázou. Poté byl roztok TS-NaHy s peroxidázou uložen v chladném prostředí (lednice $t = 2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$), aby lépe ztuhl.

Následující den bylo přidáno k směsi TS-NaHy s peroxidázou 5 ml 1% peroxidu vodíku za vzniku hydrogelů na bázi tyraminovaného hyaluronanu. Křenová peroxidáza je enzym, který katalyzuje oxidaci různých látek za přítomnosti H_2O_2 . Peroxid vodíku funguje jako

zdroj O_2 , který se mění na H_2O . Po přidání peroxidu vodíku a křenové peroxidázy dochází k síťování hydrogelu do trojrozměrných struktur. Tato reakce TS-NaHY s H_2O_2 a křenovou peroxidázou může být prováděna in situ. Po smíšení všech tří složek se po krátké době cca 1-3 minut vytvoří hustý, nerozpustný hydrogel.



Obr. 14: hydrogel tyraminovaného hyaluronanu.

3.3.1 Stanovení obsahu vody v hydrogelu

Při sušení bylo odebráno do třech zvážených Petriho misek přibližně 1 g hydrogelu na bázi tyraminovaného hyaluronanu. Všechny tři misky byly dány přes noc do sušárny, poté zváženy. Sušení probíhalo při $60^\circ C$, aby nedošlo k degradaci hyaluronanu.

Sušení hydrogelu bylo prováděno, za účelem zjištění kolik % vody obsahuje 1 gram hydrogelu, a také abychom se přesvedčili, zda je hydrogel schopný znovu nasát vodu.

Hmotnost Petriho misky:

$$m_1 (\text{Petriho miska}) = 8,5714 \text{ g}$$

$$m_2 (\text{Petriho miska}) = 8,4260 \text{ g}$$

$$m_3 (\text{Petriho miska}) = 8,9374 \text{ g}$$

Hmotnost naváženého hydrogelu:

$$m_1 (\text{gel}) = 0,9033 \text{ g}$$

$$m_2 (\text{gel}) = 1,0818 \text{ g}$$

$$m_3 (\text{gel}) = 1,2413 \text{ g}$$

Hmotnost (gelu + Petr. misky) po vysušení:

$$m_1 (\text{sušina + petr.miska}) = 8,5868 \text{ g}$$

$$m_2 (\text{sušina + petr.miska}) = 8,4435 \text{ g}$$

$$m_3 (\text{sušina + petr.miska}) = 8,9542 \text{ g}$$

Hmotnost vzniklé sušiny:

$$m_1 (\text{sušina}) = 8,5868 - 8,5714 = 0,0154 \text{ g}$$

$$m_2 (\text{sušina}) = 8,4435 - 8,4260 = 0,0175 \text{ g}$$

$$m_3 (\text{sušina}) = 8,9542 - 8,9374 = 0,0168 \text{ g}$$

Výpočet obsahu sušiny (xerogelu) v hydrogelu:

$$0,9033 \dots\dots\dots 100\%$$

$$0,0154 \dots\dots\dots x$$

$$m_1 (\text{xerogel}) = 1,71\%$$

Tabulka 1: Výsledky stanovení obsahu xerogelu

| Hmotnost gelů [g] | Hmotnost xerogelu [g] | Hmotnost xerogelu [%] |
|-------------------|-----------------------|-----------------------|
| 0,9033 | 0,0154 | 1,71 |
| 1,0818 | 0,0175 | 1,62 |
| 1,2413 | 0,0168 | 1,35 |
| Průměr | | 1,56 % |

Pomocí sušení hydrogelu byla zjištěna hmotnost xerogelu a obsah vody v 1 g hydrogelu. Dle výše uvedených hodnot bylo zjištěno, že hmotnost xerogelu odpovídá 1,56% hmotnostních procent a hmotnost vody v hydrogelu 98,44%.

3.3.2 Analýza bobtnání xerogelů

Při provádění nabobtnání xerogelů bylo postupováno tak, že k výše připraveným xerogelům bylo přidáno 5 ml destilované vody. Xerogely byly ponechány ve vodě dva dny. Poté byly nabobtnané xerogely zváženy a byla vypočítána hmotnost vody, kterou byl xerogel schopný nasát.

Ukázka pro výpočet hmotnosti nasáté vody v %:

Připravený gel → sušení 60°C → xerogel (m_1) → +H₂O → bobtnání → znovu gel (m_2).

$$m\% = \frac{m_2 - m_1}{m_2} \cdot 100$$

$$m_1\% = \frac{0,8871 - 0,0154}{0,8871} \cdot 100 = 98,26\%$$

Tabulka 2: Výsledky stanovení obsahu vody po nabobtnání

| Hmotnost sušiny [g] | Hmotnost gelů po nabobtnání [g] | Hmotnost gelů po nabobtnání [%] |
|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 0,0154 | 0,8871 | 98,26 |
| 0,0175 | 0,8275 | 97,89 |
| 0,0168 | 0,3822 | 95,60 |
| Průměr | | 97,3 % |

Prostřednictvím nabobtnaných xerogelů bylo zjištěno, že xerogel je schopen znovu nasát vodu, tzn. systém je tedy vratný. Zjistilo se, jaký obsah vody je xerogel schopen zpětně nasát. Byla vypočítána hmotnost vody po nabobtnání v %, která vyšla 97,3% H₂O.

3.3.3 Orientační stanovení rozpustnosti tenzidů ve vodě a PBS

Kosmetické neiontové tenzidy sorbitan monopalmitát, Tween 40 a palmitát sacharózy byly rozpouštěny ve vodě za studena a za tepla zahříváním na 45°C.

Rozpouštění tenzidů ve vodě za studena probíhalo tak, že do třech zkumavek bylo přidáno zhruba do výše 1cm od každého druhu tenzidů, do zkumavky poté bylo nalito zhruba 4-5 ml deionizované vody. Zkumavky, které obsahovaly roztoky tenzidů s vodou byly ponechány tři dny v laboratoři, aby měl tenzid ve vodě dostatek času na rozpouštění. Během rozpouštění tenzidů ve vodě byly zkumavky několikrát protřepány, aby se urychlil proces rozpouštění. Po třech dnech byly roztoky tenzidů s vodou zfiltrovány a každý filtrát byl dán do předem zvážené hliníkové misky. Filtrát s hliníkovou miskou byl znovu zvážen na analytických váhách. Následně probíhalo sušení filtrátu v sušárně na 105°C abychom zjistili kolik gramů tenzidů bylo rozpouštěno.

Výsledkem rozpouštění tenzidů ve vodě za studena bylo odhaleno, že tenzidy jsou ve vodě rozpustné, ale rozpouštění trvá dlouho a množství rozpustěných tenzidů je minimální. Bylo rozpouštěno 0,0125 g palmitátu sacharózy a 0,0009 g sorbitanu monopalmitátu ve 3-5 ml vody.



Obr. 15: Rozpuštěné tenzidy ve vodě.

Rozpouštění tenzidů ve vodě za tepla zahříváním na 45°C probíhalo stejným výše popsaným postupem. Odlišnost byla pouze v tom, že zkumavky s roztoky tenzidů byly ponechány v sušárně na 45°C jeden den. Následující den byly zkumavky odebrány ze

sušárny a roztok byl zfiltrován, zvážen a dále sušen v sušárně. Úspěšné rozpouštění bylo vidět už tehdy, když byly zkumavky odebrány ze sušárny. Roztoky tenzidů byly čirější než při rozpouštění za studena.

Rozpouštěním tenzidů ve vodě zahříváním na 45°C, jsme dosáhli lepších výsledků. Bylo rozpuštěno 0,0795 g palmitátu sacharózy a 0,001 g sorbitanu monopalmitátu. Vzhledem k tomu, že výrobce prekurzorů hydrogelu dodává roztoky připravené v PBS, zkoumali jsme dále rozpouštění tenzidů v PBS za studena a při zahřívání na 45°C. Během rozpouštění tenzidů za studena bylo přidáno zhruba 0,1-0,5 g z každého druhu tenzidů, následně byl přidán roztok PBS. Zkumavky byly ponechány 1 den při laboratorní teplotě. Další den byly roztoky tenzidů v PBS zfiltrovány a filtráty s hliníkovou miskou byly zváženy a sušeny v sušárně na 105°C. Výsledkem sušení bylo zjištěno, že 0,0063 g palmitátu sacharózy a 0,0024 g sorbitanu monopalmitátu se rozpustilo ve 3-5 ml PBS .

Dalším pokusem při rozpouštění tenzidů v PBS bylo zahřívání za tepla na 45°C, bylo postupováno obdobně, pouze roztok byl ponechán v sušárně 24 hodin a následně byly roztoky zfiltrovány, sušeny a zváženy. Při rozpouštění tenzidů v PBS za tepla bylo dosaženo nejlepších výsledků ze všech pokusů. Bylo získáno 0,0935 g palmitátu sacharózy a 0,1060 g sorbitanu monopalmitátu.

Z výše zjištěné hodnoty rozpustnosti tenzidů v PBS byly vypočítány koncentrace jednotlivých tenzidů. Volba koncentrace tenzidů byla 0,5 g/l podle hodnoty rozpustnosti tenzidů v PBS.

Pro přípravu roztoku PBS s přísávkem tenzidových micel, které budou využívány při přípravě dalších nových hydrogelů, jsem postupovala následně. Bylo zváženo 0,05 g z každého druhu tenzidů, k příslušnému množství tenzidů bylo přidáno 100 ml PBS. Roztok tenzidů s PBS byl protřepán a ponechán v sušárně 24 hodin. Druhý den byly roztoky odebrány ze sušárny. Dalším krokem bylo přidání malého množství práškového barviva Sudanu III ke každému roztoku tenzidů v PBS. Roztok okamžitě po přidání Sudanu zčervenal díky přítomnosti micel. Připravené roztoky byly ponechány v klidu další den, aby rozpouštění Sudanu v připraveném roztoku bylo úplné.



Obr. 16: a) Roztok PBS s tenzidy b) Roztok PBS s tenzidy a Sudanem.

K odstranění nerozpuštěného podílu Sudanu v roztoku PBS s tenzidy byly všechny tři roztoky PBS s tenzidy zfiltrvány. Filtrát PBS s tenzidem sorbitan monopalmitát byl zcela čirý, což ukazuje na velmi slabou solubilizaci Sudanu, a proto roztok PBS s tenzidem sorbitan monopalmitát nebyl dále používán v přípravě hydrogelu. Po filtraci roztoků zbylých tenzidů byly získány červené roztoky solubilizovaného Sudanu. Dle výrazné červené barvy tenzidů tweenu bylo zjištěno, že Sudan se v roztoku tenzidu Tween 40 rozpouští více než v roztoku tenzidu palmitátu sacharózy v PBS, který měl narůžovělou barvu.

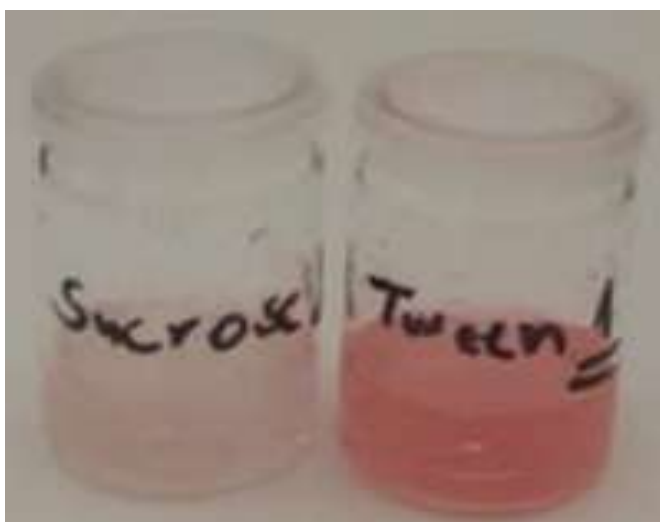


Obr.17: Filtráty roztoků tenzidů v PBS se solubilizovaným Sudanem.

3.3.4 Příprava hydrogelů s obsahem tenzidů

Pro přípravu nových hydrogelů bylo spotřebováno 0,0625 g TS-NaHY, 0,00043 g křenové peroxidázy, 6 ml roztoku PBS z výše připraveného roztoku, který obsahuje jeden druh tenzidu, sacharóza palmitát nebo Tween 40, a 1,25 ml 1% preoxidu vodíku. Nejdříve bylo zváženo 0,00043 g peroxidázy, která byla následně rozpuštěna v 6 ml roztoku PBS s tenzidem sacharóza palmitát. Po smíchání všech složek byl, po krátké době cca 1-5 minut, vytvořen hustý, nerozpustný hydrogel.

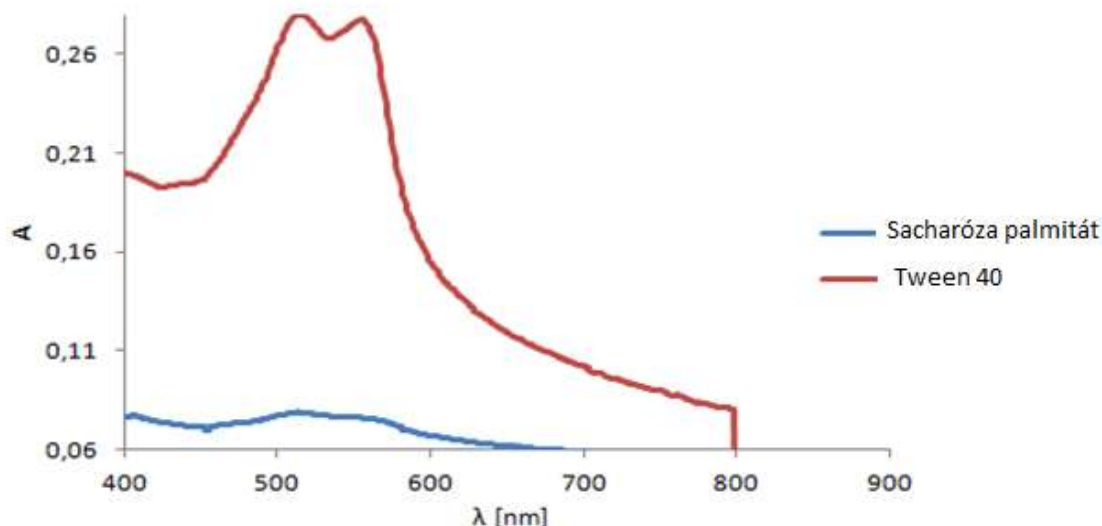
Další hydrogel byl připraven obdobně, pouze se lišilo složení tenzidu. Druhý hydrogel byl připraven s roztokem PBS a tenzidem Tween 40.



Obr. 18: Hydrogely se Sudanem solubilizovaným v micelách tenzidů.

3.3.5 Spektrofotometrické měření

Pomocí přístroje UV-VIS spektrofotometr HITACHI byly změřeny připravené roztoky PBS s tenzidy. Připravené roztoky byly nejdříve zfiltrvány a následně byla změřena jejich absorbance v závislosti na vlnové délce. Měřením bylo zjištěno, kolik barviva Sudanu se rozpustilo v tenzidech Tween 40 a sacharóze palmitátu. Prostřednictvím spektra lze vidět, že za stejných podmínek se rozpustilo více Sudanu v tweenu 40 než v palmitátu sacharózy. Filtrát z roztoku PBS s tenzidem sorbitan monopalmitát nebyl změřen na spektrofotometru, jelikož už u filtrace bylo pouhým okem vidět, že se barvivo Sudan v něm nerozpustilo.



Graf č. 1: Závislost absorpance na vlnové délce.

3.3.6 Uvolňování barviva Sudan z hydrogelů

S nově vytvořenými hydrogely obsahujícími tenzid a barvivo Sudan bylo zkoumáno, jestli dochází k uvolňování hydrofobního barviva Sudanu do roztoku PBS. Bylo postupováno následovně - do dvou zkumavek bylo přidáno zhruba 1 cm připravených hydrogelů s tenzidy sacharóza palmitát a Tween 40 se solubilizovaným Sudanem. Dalším krokem bylo přidání roztoku PBS do zkumavek. Bylo sledováno, jestli se čirý roztok PBS obarví červeným nebo lehce narůžovělým barvivem Sudanem. Prostřednictvím spektrofotometru bylo odhaleno, že k barvení roztoku PBS hydrofobním Sudanem nedocházelo ani po třech hodinách, hydrogely byly ponechány i nadále v roztoku PBS a sledovalo se uvolňování hydrofobního Sudanu z hydrogelů.



Obr. 19: Roztoky PBS s hydrogely.

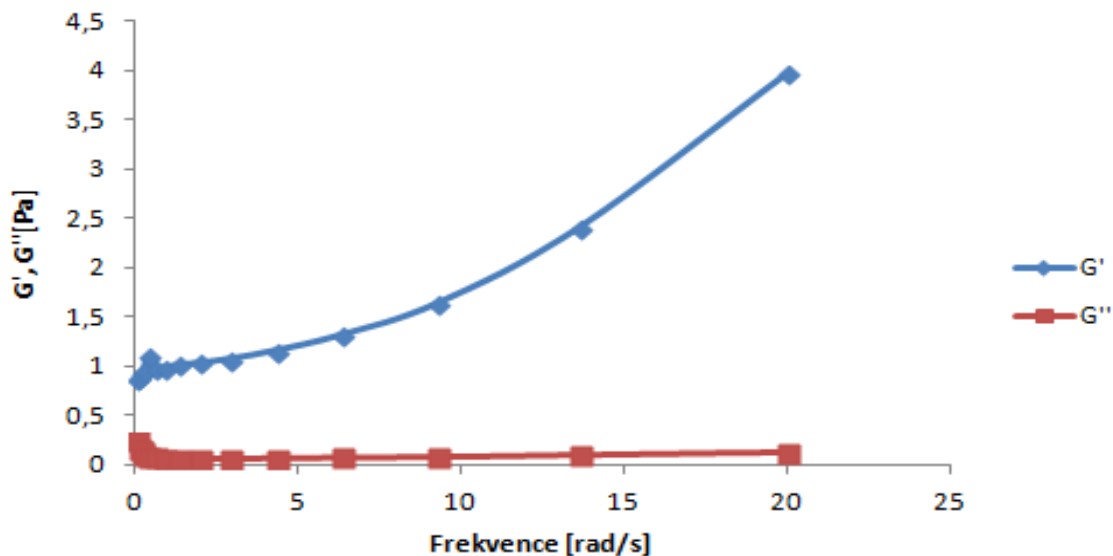
Po dvou dnech sledování uvolňování Sudanu z hydrogelů, pomocí měření na spektrofotometru bylo ověřeno, zda opravdu nedocházelo k uvolňování barviva Sudanu z hydrogelů. Roztoky PBS s hydrogely byly zfiltrvány, ze získaných filtrátů byla následně změřena jejich absorbance v závislosti na vlnové délce pomocí spektrofotometru.

Pomocí experimentu uvolňování barviva Sudan z hydrogelů bylo zjištěno, že k úspěšnému uvolňování hydrofobního barviva Sudan do roztoku PBS ani po 14 dnech nedocházelo, je možné, že k uvolňování je nutná delší doba. Vzhledem k tomu, že intenzita červeného zbarvení hydrogelů se během těchto pokusů snižovala (pozorováno pouhým okem), je toto zjištění překvapivé. Pro objasnění pozorovaných skutečností bude nutný doplňující výzkum nad rámec této práce. Je možné, že při uvolňování micel s barvivem dochází k jejich rozpadu (velmi nízká koncentrace tenzidu) a oddělení nepozorovatelného množství Sudanu ze systému.

3.3.7 Reologické měření hydrogelů

Různé kapaliny tečou různě pomalu nebo rychle. U hydrogelů je typické, že v sobě kombinují jak kapalnou, tak i tuhou látku. Je známo, že většina hydrogelů v sobě kombinuje viskózní a elastickou složku. Pomocí reologických měření odhalíme vlastnosti hydrogelů, jeho viskózní a elastický modul. Viskózní modul hydrogelů popisuje, jak teče, zatímco elastický modul popisuje, jak je pružný. Viskózní modul je označován jako G'' , elastický modul G' . Prostřednictvím reologických měření se tyto dva moduly odhalí. Jestliže je G'' větší než G' převládá tečení, když G' převyšuje G'' převládá elastické pružení.

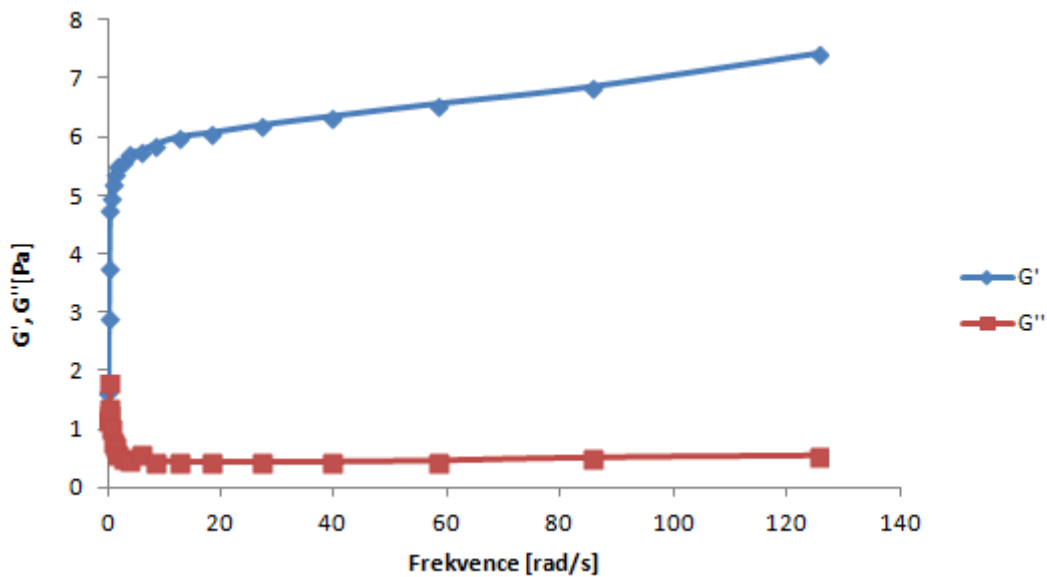
Před každým reologickým měřením gelů je nutné zjistit lineární viskoelastickou oblast, tzv. závislost modulu na deformaci. Měřením na reometru byla zjištěna vhodná hodnota deformace v lineární viskoelastické oblasti hydrogelů bez přídavku tenzidů, která se rovnala 0,2%. Zjištěná hodnota lineární konstantní oblasti se dále využívá při měření viskoelastických křivek, kde je deformace konstantní, ale frekvence je měnitelná. U této konstantní deformace, kterou jsem vybrala, je dále měřeno G'' a G' v závislosti na frekvenci. V příloze na grafu č. 9 lze pozorovat závislost viskozního a elastického modulu na deformaci i lineární viskoelastickou oblast.



Graf č. 2: Závislost viskózního a elastického modulu na frekvenci.

Dle výsledků měření na reometru bylo zjištěno, že u hydrogelů převažuje elastický modul nad viskózním.

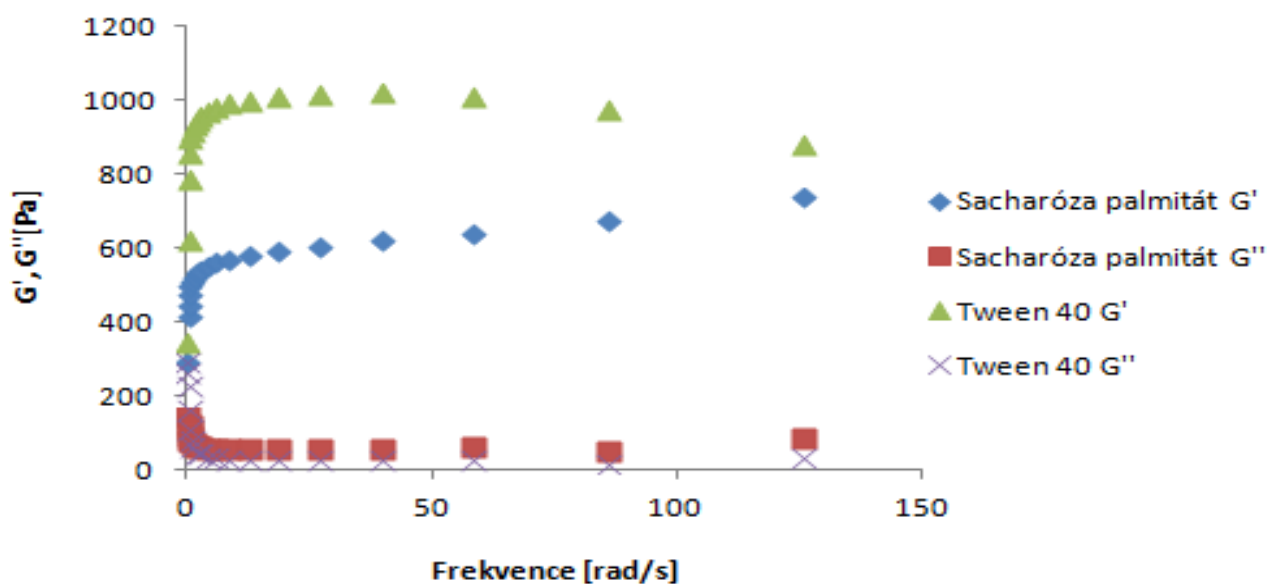
K získání informací o reprodukovatelnosti přípravy hydrogelů a reologických měření byl připraven nový hydrogel a byly měřeny jeho reologické vlastnosti. Nový připravený hydrogel byl připraven následně. Bylo spotřebováno 250 mg TS-NaHY, dále byl připraven 1% peroxid vodíku v PBS z 30% H₂O₂ tak, že bylo smícháno 29 ml PBS s 1 ml 30% H₂O₂. Jako další krok bylo připravit ze 150 U/mg křenové peroxidázy ve formě prášku 25 ml HRP ve formě roztoku. K přípravě 25 ml křenové peroxidázy bylo naváženo 0,0017 g HRP, k naváženému množství křenové peroxidázy bylo přidáno 25 ml PBS. A poté byla připravená HRP ke smíchání s 250 mg TS-NaHY. Poté ke směsi 25 ml HRP a 250 mg TS-NaHY bylo přidáno 5 ml 1% H₂O₂ z připraveného peroxidu vodíku. Pomocí reometru byla zjištěna lineární viskoelastická oblast hydrogelu. Z lineární oblasti byla vybrána hodnota deformace 0,5%, která je vidět v příloze na grafu č. 10. Vybraná hodnota deformace byla dále použita ve frekvenčních testech. Také bylo zjištěno, že u hydrogelu převažuje elastický modul.



Graf č. 3: Závislost viskózního a elastického modulu na frekvenci.

Pro zjištění zda-li se vlastnosti hydrogelů na bázi tyraminovaného hyaluronanu s přidavkem tenzidů Tween 40 a palmitát sacharózy s barvivem Sudanem liší či neliší od hydrogelů bez přidavku tenzidů, byly změřeny pomocí reometru hydrogely s přidavkem tenzidů. V příloze na grafu č. 11 a 12 můžeme pozorovat závislost viskózního a elastického modulu na deformaci.

Získaná hodnota deformace 0,5% byla dale využívána při měření viskoelastických křivek, kde byla deformace konstantní, ale frekvence měnitelná.



Graf č. 4: Závislost viskózního a elastického modulu na frekvenci.

Výsledky měření hydrogelů s přidavkem tenzidů se výrazně nelišily od výsledků získaných pro hydrogely bez přidavku tenzidů. U hydrogelů s přidavkem tenzidů obdobně jako u hydrogelů bez tenzidů převažuje elastický charakter, tedy hydrogely mají více elastický charakter než viskózní. Přídavek tenzidů nemá vliv na reologické vlastnosti hydrogelů.

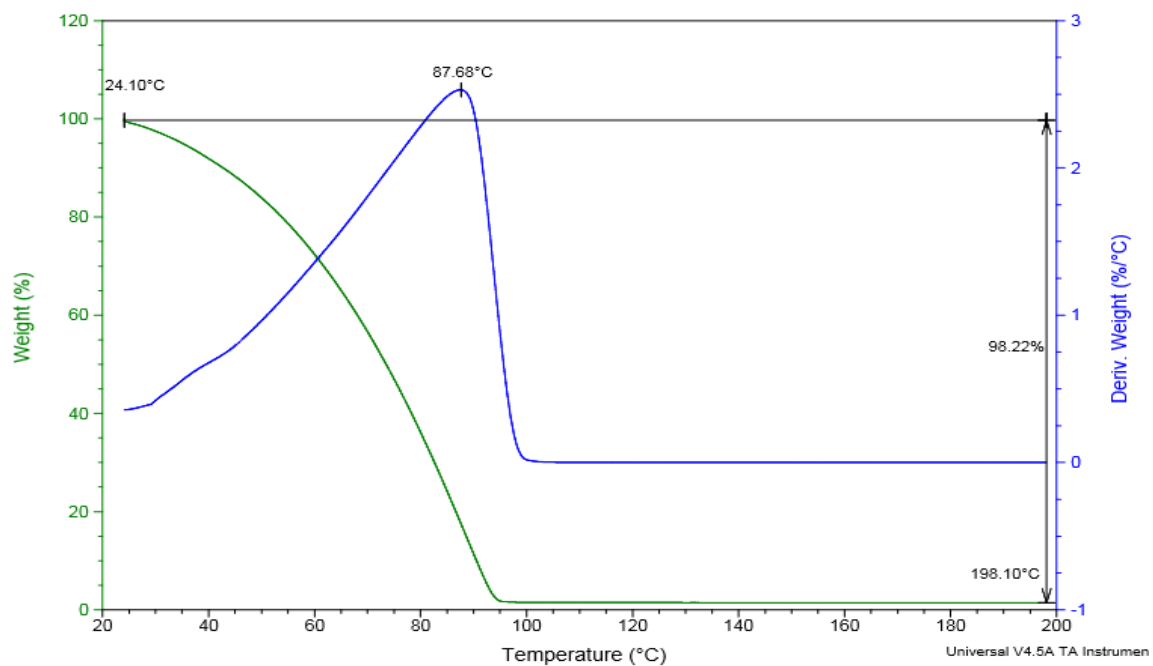
3.3.8 Termogravimetrická analýza hydrogelů

Termogravimetr slouží ke sledování změn hmotnosti vzorku v závislosti na teplotě (nebo čase). Pomocí TGA byla měřená vlhkost hydrogelů, kde dochází k degradaci materiálu během zahřívání. Přístroj zaznamenává hmotnost pánvičky se vzorkem. Měření na TGA probíhalo v dusíkové atmosféře. Vzorek byl vystaven tepelnému namáhání a na citlivých mikrováhách byla sledována změna jeho hmotnosti.

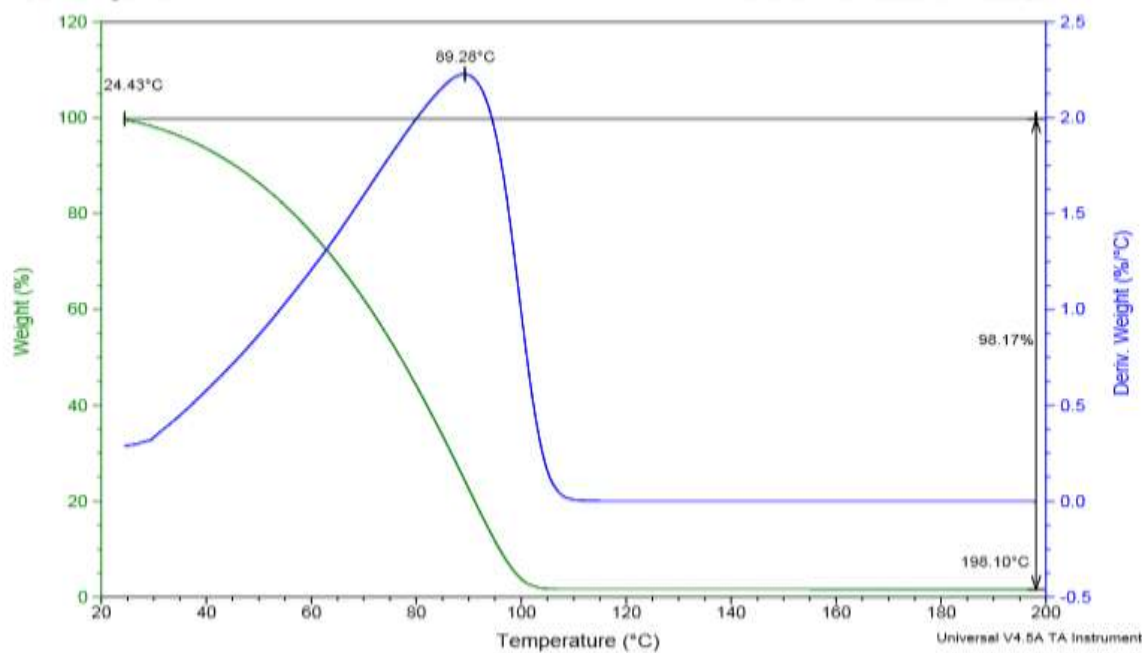
Výsledkem měření na přístroji TGA je termogravimetrická křivka, která uvádí okamžitou hmotnost vzorku v závislosti na teplotě. Měření probíhalo v dusíkové atmosféře, po 5°C do 200°C. Dle grafu č. 11 lze vidět záznam průběhu poklesu hmotnosti vzorku. Jednotlivé poklesy hmotnosti vzorku vypovídají o změnách v hydrogelu v průběhu zahřívání. Zelená křivka popisuje hmotnost vzorku, modrá křivka je matematická derivace hmotnosti vzorku. Výsledkem termogravimetrického měření bylo zjištěno, že vlhkost v hydrogelech byla 98,21%.

Ukázka výpočtu úbytku vody v hydrogelu pomocí TGA měření:

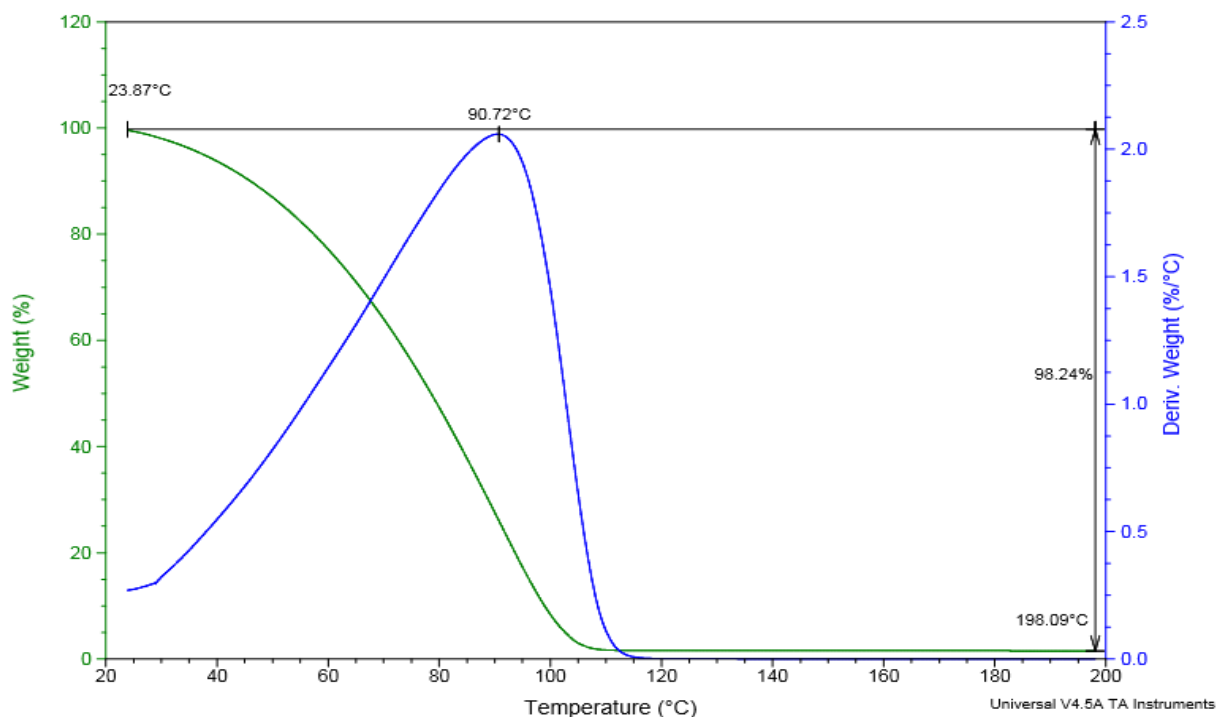
$$\text{úbytek}(H_2O) = \frac{98,22 + 98,17 + 98,24}{3} = 98,21\%$$



Graf č. 5: Termogravimetrická křivka.

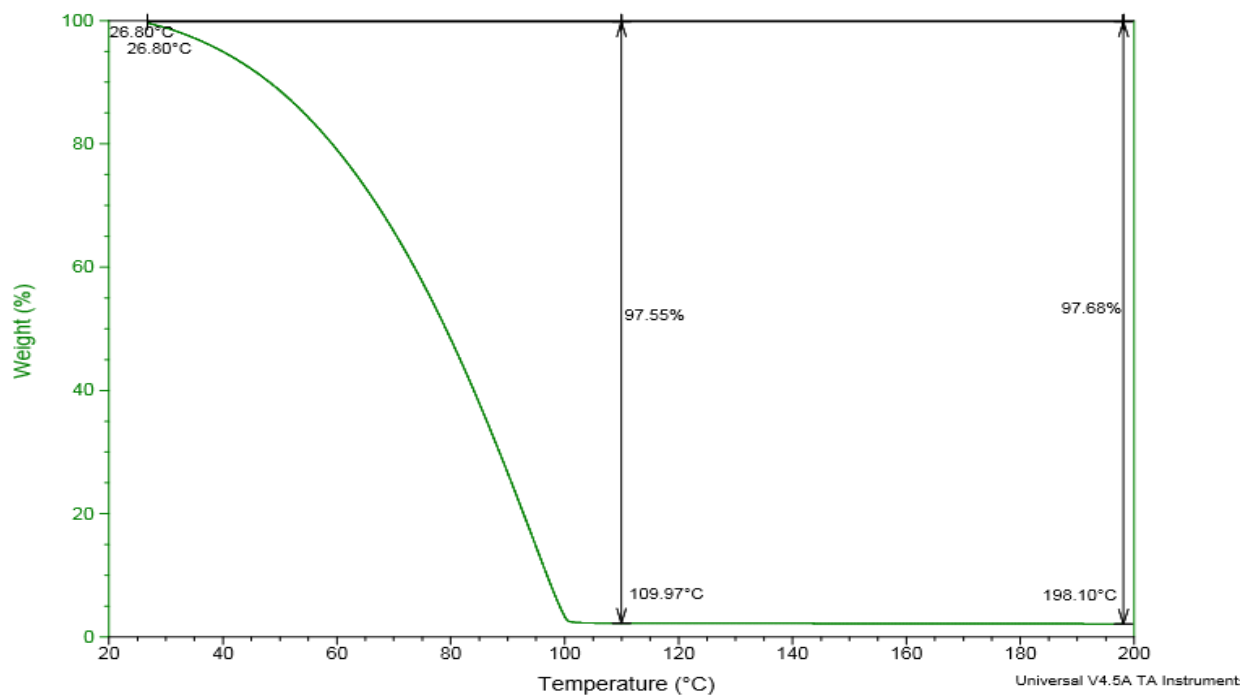


Graf č. 6: Termogravimetrická křivka.



Graf č. 7: Termogravimetrická křivka.

Pro dosažení dokonalých a jistých výsledků byl připraven nový hydrogel bez přídavku tenzidů a bylo měřeno množství vody v hydrogelu pomocí termogravimetru. Z měření na termogravimetru jsme získali podobné výsledky jako u prvního hydrogelu. Obsah vody v hydrogelu byl 97,66%.



Graf č. 8: Termogravimetrická křivka.

Prostřednictvím TGA byla změřena vlhkost nových vytvořených hydrogelů s obsahem tenzidů sacharóza palmitát a Tween 40. V příloze na grafu č. 13, 14, 15 a 16 lze vidět, že hydrogel s obsahem tenzidu sacharóza palmitát obsahoval 97,77% vody a hydrogel s obsahem tenzidu Tween 40 obsahoval 97,75% vody. Bylo zjištěno, že přídavek tenzidů nemá vliv na obsah vody v hydrogelech.

4 DISKUZE

První část této práce se věnuje kyselině hyaluronové - jejím vlastnostem, využití, a modifikace hyaluronanu tyraminem a jeho následného využití v přípravě hydrogelů. Tato práce se zabývá také různými druhy hydrogelů včetně jejich možného využití. Hydrogely reprezentují velmi podstatnou skupinu, respektive skupenství materiálů, nejen proto, že spousta částí lidského těla, jako jsou pojivové tkáně, sklivec nebo rohovka, jsou tvořeny právě hydrogely. Gely se uplatňují v mnoha odvětvích lidské činnosti, zejména pak v oblasti péče o zdraví a kosmetiky.

V druhé části práce byly vybrány tenzidy neiontové pro kosmetické účely jako například sacharóza palmitát, sorbitan monopalmitát a Tween 40. Dále byl použit hyaluronan modifikovaný tyraminem od známé firmy Lifecore a další potřebné chemikálie k tvorbě hydrogelů, které jsou výše popsány v kapitole 3.3. Byly vytvořené hydrogely bez přídavku a s přídavkem tenzidů. Také byla prozkoumána modifikace hydrogelů micelami vhodného tenzidu a jejich uvolňování z hydrogelu do roztoku PBS. V první řadě byly zkoumány různé vlastnosti hydrogelu na bázi tyraminovaného hyaluronanu bez přídavku tenzidů, byly měřeny reologické vlastnosti hydrogelů, zda převažuje elastický nebo viskózní modul. Pomocí termogravimetrie bylo také zkoumáno, kolik zhruba obsahují tyto hydrogely množství vody. U hydrogelů s obsahem tenzidů byly měřené stejné experimenty, popsány výše.

Ze všech tenzidů dosáhl tenzid Tween 40 nejlepších výsledků rozpustnosti jak lze usoudit z grafu č.1. Tenzid sacharóza palmitát byl také rozpustný v PBS, ale méně než předchozí zmíněný.

Tenzid sorbitan monopalmitát se ze všech vybraných tenzidů rozpouští nejhůř. Pomocí filtrace roztoku PBS s barvivem Sudanem a tenzidem sorbitan monopalmitát bylo zjištěno, že sorbitan monopalmitát není rozpustný, a proto dále nebyl používán při přípravě hydrogelů s obsahem tenzidu. Rovněž bylo zkoumáno uvolňování barviva Sudan z hydrogelů s obsahem tenzidů do roztoku PBS.

5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zkoumat, zlepšit a modifikovat tyto hydrogely na bázi tyraminovaného hyaluronanu přidavkem tenzidových micel a vytvořit tak v nich domény schopné solubilizovat hydrofobní látky.

Výsledkem této studie bylo odhaleno, že nejlepší ze třech vybraných tenzidů, pro modifikaci hydrogelů pomocí jejich micel, je tenzid Tween 40. Tento tenzid, jiným názvem Polyoxyethylen sorbitan monpalmitate, je ze všech tenzidů nejvíce rozpustný. Tenzid sacharóza palmitát je rozpustný, ale méně než Tween 40. Sorbitan monopalmitát je nerozpustný, nebylo ho vhodné aplikovat do hydrogelů, protože by nesplnil požadované cíle. V porovnání všech tenzidů je polyoxyethylen sorbitan monopalmitát (Tween 40) rozhodně nejvhodnějším tenzidem pro modifikace hydrogelů.

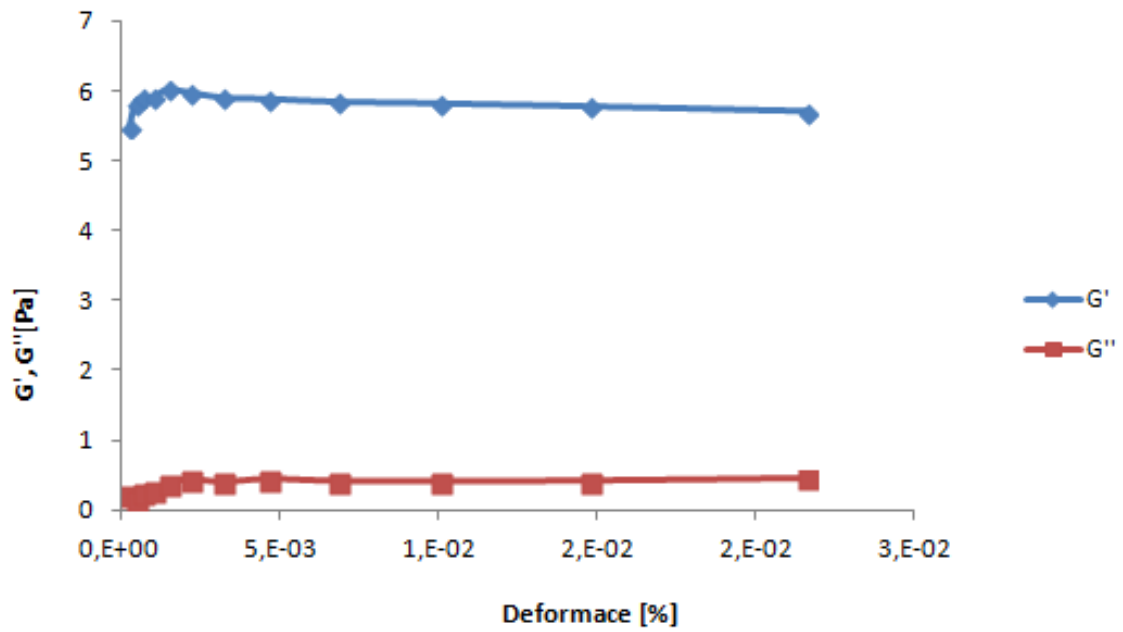
Bylo prozkoumáno uvolňování barviva Sudan z hydrogelu obsahující tenzid Tween 40 a z hydrogelu obsahující tenzid sacharóza palmitát do roztoku PBS. Tenzid sorbitan monopalmitát, kvůli jeho nevhodným vlastnostem, nebyl modifikován do hydrogelu na bázi tyraminovaného hyaluronanu. Na konci této studie nedošlo k uvolňování hydrofobní látky, v našem případě barviva Sudan, do roztoku PBS z hydrogelů na bázi tyraminovaného hyaluronanu s přidavkem tenzidových micel. Vzhledem k tomu, že intenzita červeného zabarvení hydrogelů se během těchto pokusů snižovala (pozorováno pouhým okem), je toto zjištění překvapivé. Pro objasnění pozorovaných skutečností bude nutný doplňující výzkum nad rámec této práce. Je možné, že při uvolňování micel s barvivem dochází k jejich rozpadu (velmi nízká koncentrace tenzidu) a oddělení nepozorovatelného množství Sudanu ze systému.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

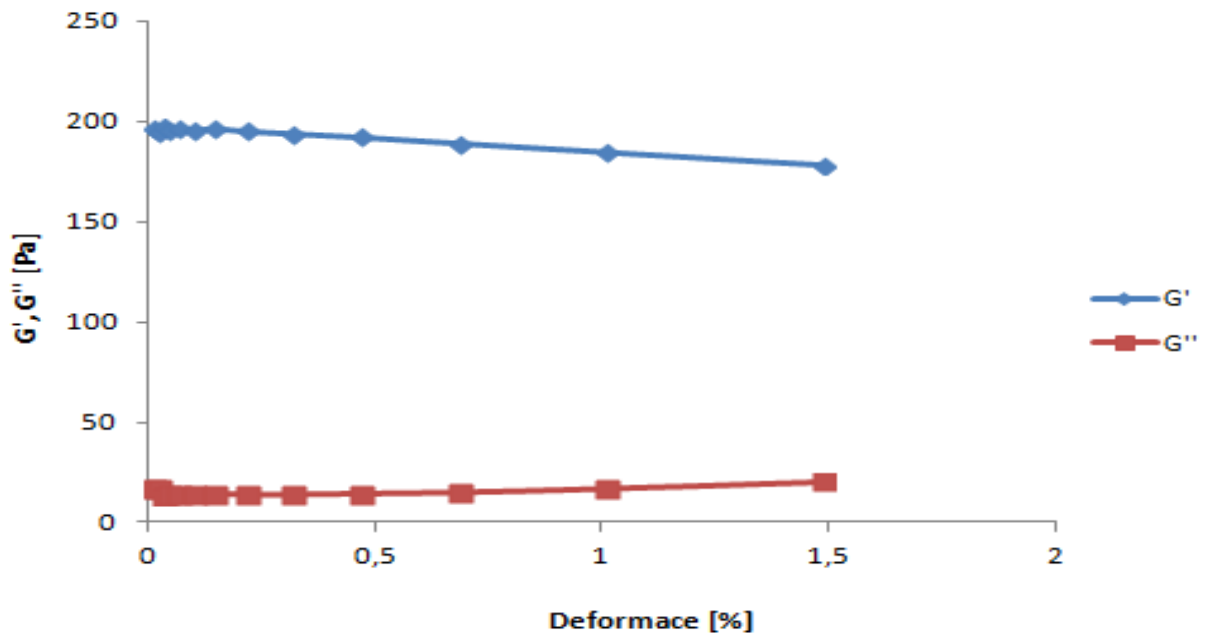
- [1] Kuo, J. W., Swann, D. A., and Prestwich, G. D. (1991) CHEMICAL MODIFICATION OF HYALURONIC-ACID BY CARBODIIMIDES, *Bioconjugate Chemistry* 2, 232-241.
- [2] Darr, A., and Calabro, A. (2009) Synthesis and characterization of tyramine-based hyaluronan hydrogels, *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 20, 33-44.
- [3] Prestwich, G. D., and Vercruyse, K. P. (1998) Profiles Therapeutic applications of hyaluronic acid and hyaluronan derivatives, *Pharmaceutical Science & Technology Today* 1, 42-43.
- [4] NECAS, J, L BARTOSIKOVA, P BRAUNER a J KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. Review Article [online]. [cit. 2016-10-16].
- [5] Stern, R. (2004) Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway, *European Journal of Cell Biology* 83, 317-325.
- [6] Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solution. Some Biological Consequences. [Http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html](http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html) [onlin].1998 [cit. 2017-03-26].Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>
- [7] Lee, F., Chung, J. E., and Kurosawa, M. (2009) An injectable hyaluronic acid-tyramine hydrogel system for protein delivery, *Journal of Controlled Release* 134, 186-193.
- [8] Peppas, N. A., Slaughter, B. V., and Kanzelberger, M. A. (2012) 9.20 - Hydrogels A2 - Matyjaszewski, Krzysztof, In *Polymer Science: A Comprehensive Reference* (Möller, M., Ed.), pp 385-395, Elsevier, Amsterdam.
- [9] Rosiak, J. M., and Yoshii, F. (1999) Hydrogels and their medical applications, *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms* 151, 56-64.
- [10] ROSIAK, Janusz M. *Radiation Formation of Hydrogels for Biomedical Applications: Institute of Applied Radiation Chemistry, Technical University of Lodz Wroblewskiego 15, 93-590 Lodz, Poland* [online]. 1999 [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: http://mitr.p.lodz.pl/biomat/old_site/raport/book_index.html
- [11] Pouchlý Julius: Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav [online]. Version 1.0. Praha : VŠCHT Praha,2008 [cit. 2017-03-26]. Available from www: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-978-80-7080-674-6/pages-img/. ISBN 978-8-7080-674-6
- [12] Bartovská Ludmila, Šišková Marie : Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav [online]. Version 1.0. Praha : VŠCHT Praha, 2005 [cit.2017-03-26]. Available from www: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-579-X/pages-img/. ISBN 80-7080-579-X

- [13] Tyramine. *PubChem* [online]. [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5610#section=Top>
- [14] Tyramine. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Tyramine>
- [15] Corgel®BioHydrogel (TS-NaHy). *Lifecore Biomedical* [online]. [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: <http://www.lifecore.com/research-products/hydrogels>
- [16] Chin, L., Calabro, A., Walker, E., and Derwin, K. A. *Mechanical properties of tyramine substituted-hyaluronan enriched fascia extracellular matrix: Journal of Biomedical Materials Research* [online]. 2012 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1002/jbm.a.34025. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.a.34025/ful>
- [17] MACOSKO, Christopher W. *Rheology principles, measurements, and applications*. New York ; Weinheim [u.a.], 1994. ISBN 1560815795 9781560815792 0471185752 9780471185758
- [18] Guide to rheology. [online]. [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: <https://ciks.cbt.nist.gov/~garbocz/SP946/node14.htm>
- [19] Tween40 (Polyoxyetylén Sorbitan Monopalmitát) [online]. [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: <http://sk.irochementerprise.com/surfactant/emulsifier-surfactant/tween40-polyoxyethylene-sorbitan.html>
- [20] SORBITAN MONOPALMITATE [online]. [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14927#section=Top> (sorbitan monopalmitát)
- [21] Sucrose palmitate (VAN). *ChemSpider* [online]. [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: [http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.20003730.html%20\(sucrose\)](http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.20003730.html%20(sucrose))
- [22] ŠMIDRKAL, JAN. TENZIDY A DETERGENTY DNES. In: *Chem. Listy* [online]. [cit. 2017-03-26]. ISSN 0009-2770. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/1999_07_421-427.pdf
- [23] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav* [online]. VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE. [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: <http://147.33.74.135/knihy/uid isbn-80-7080-579-X/pages-img/>
- [24] DETERGENTY [online]. [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: <http://jane111.chytrak.cz/Ch9/34.detergenty.pdf>

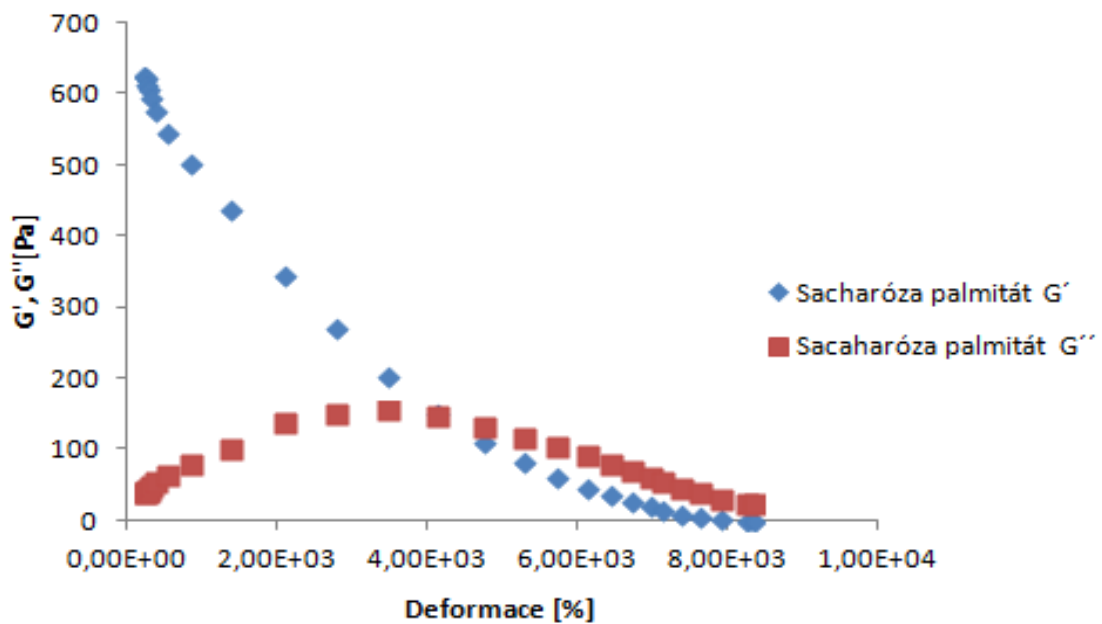
7. Přílohy



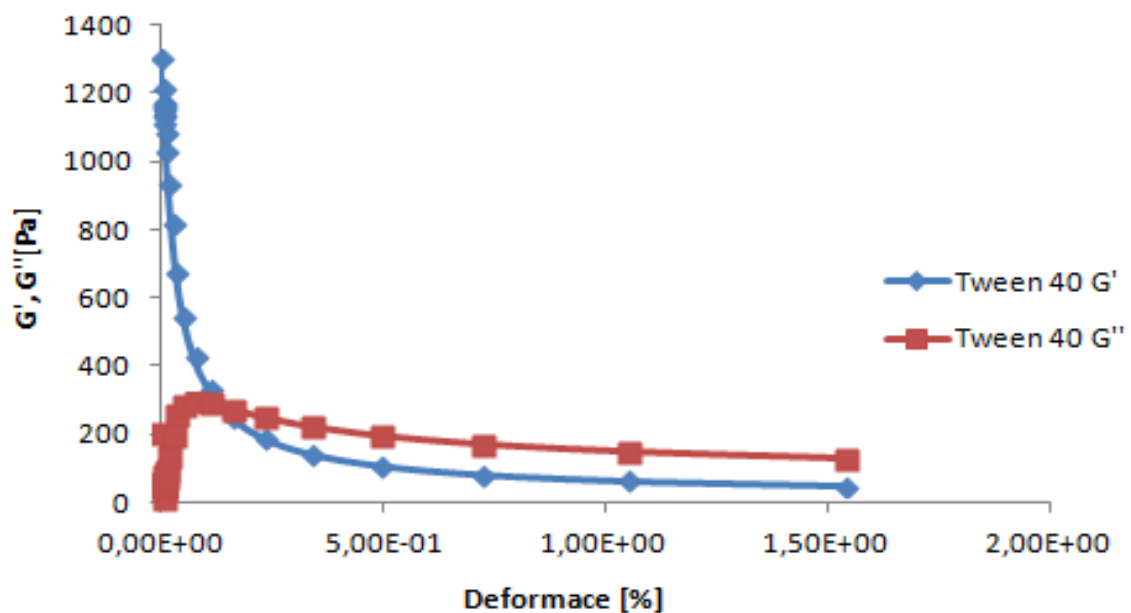
Graf č. 9: Závislost viskózního a aelastického modulu na deformaci.



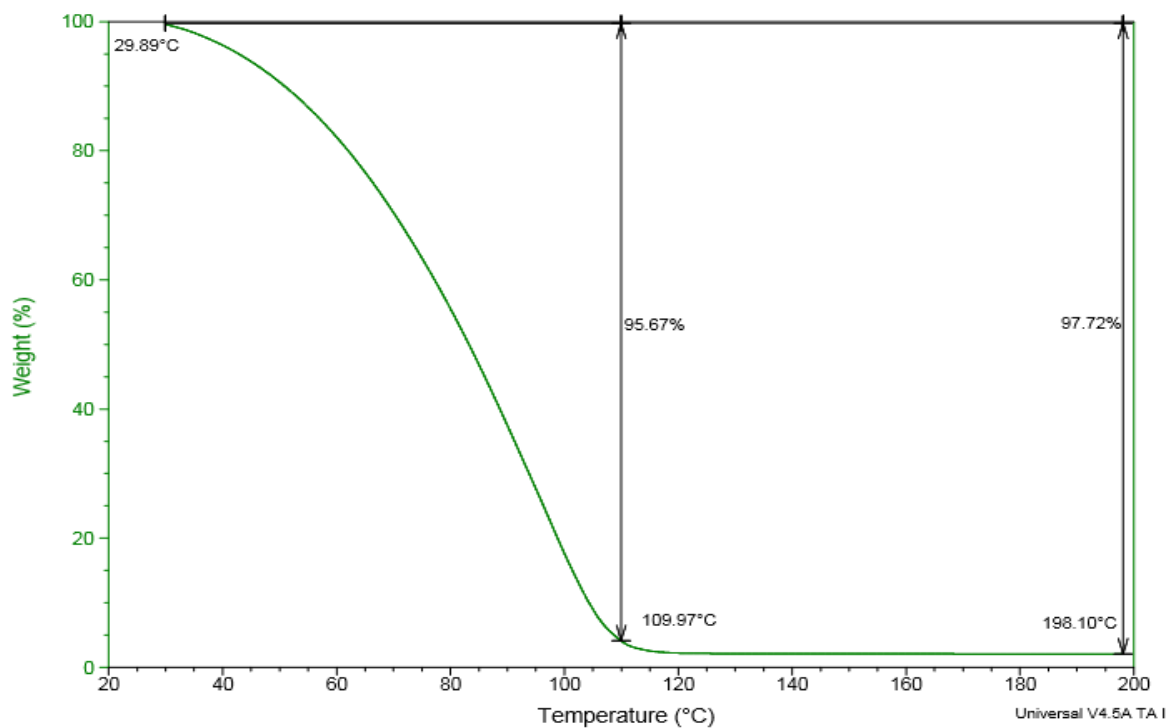
Graf č. 10: Závislost viskózního a aelastického modulu na deformaci.



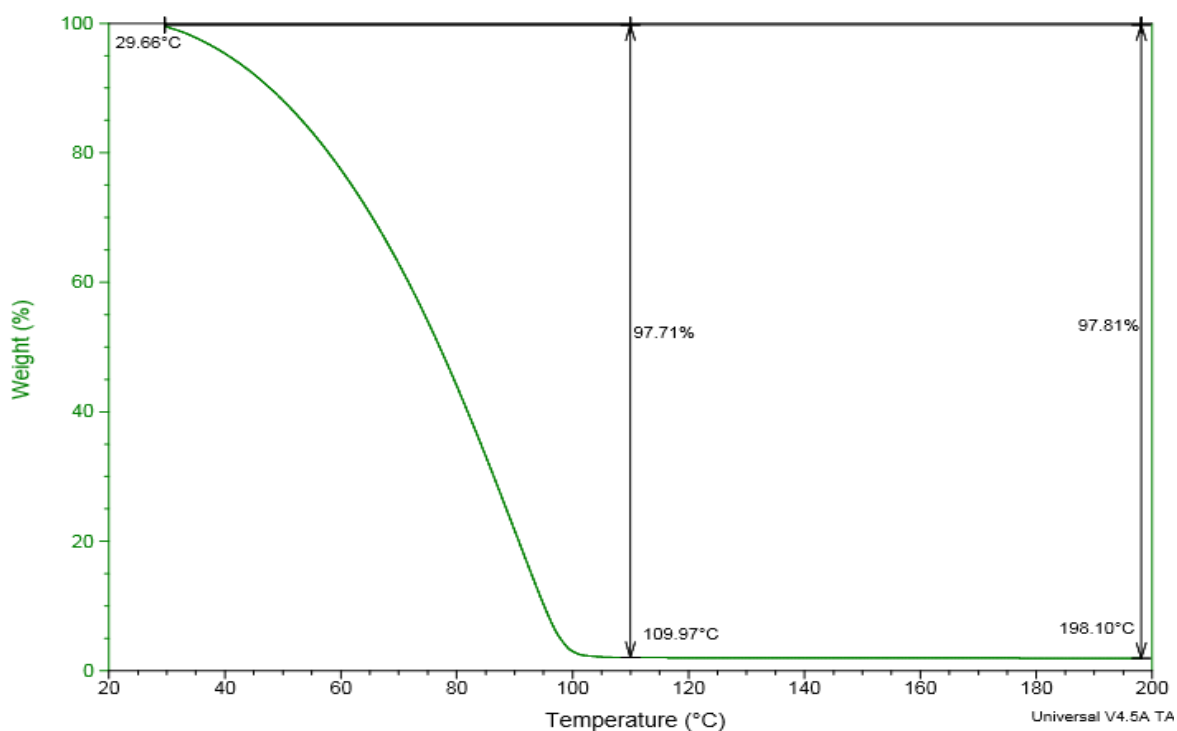
Graf č. 11: Závislost viskózního a aelastického modulu na deformaci.



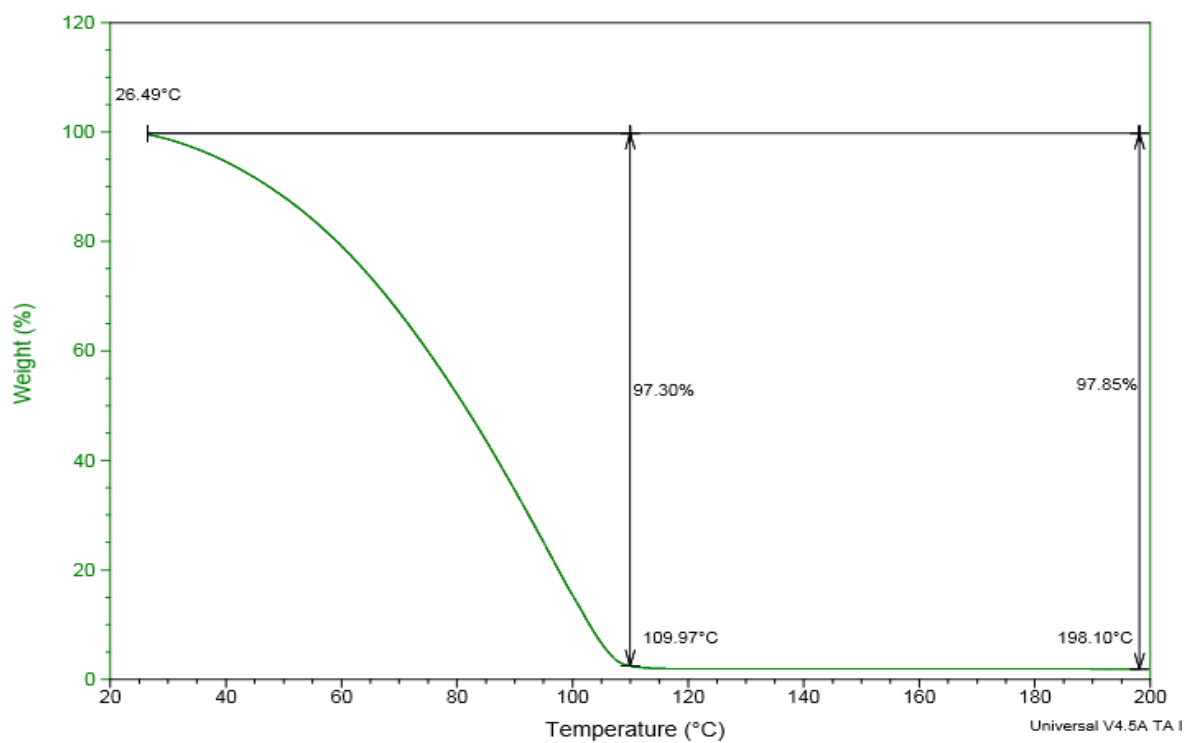
Graf č. 12: Závislost viskózního a aelastického modulu na deformaci.



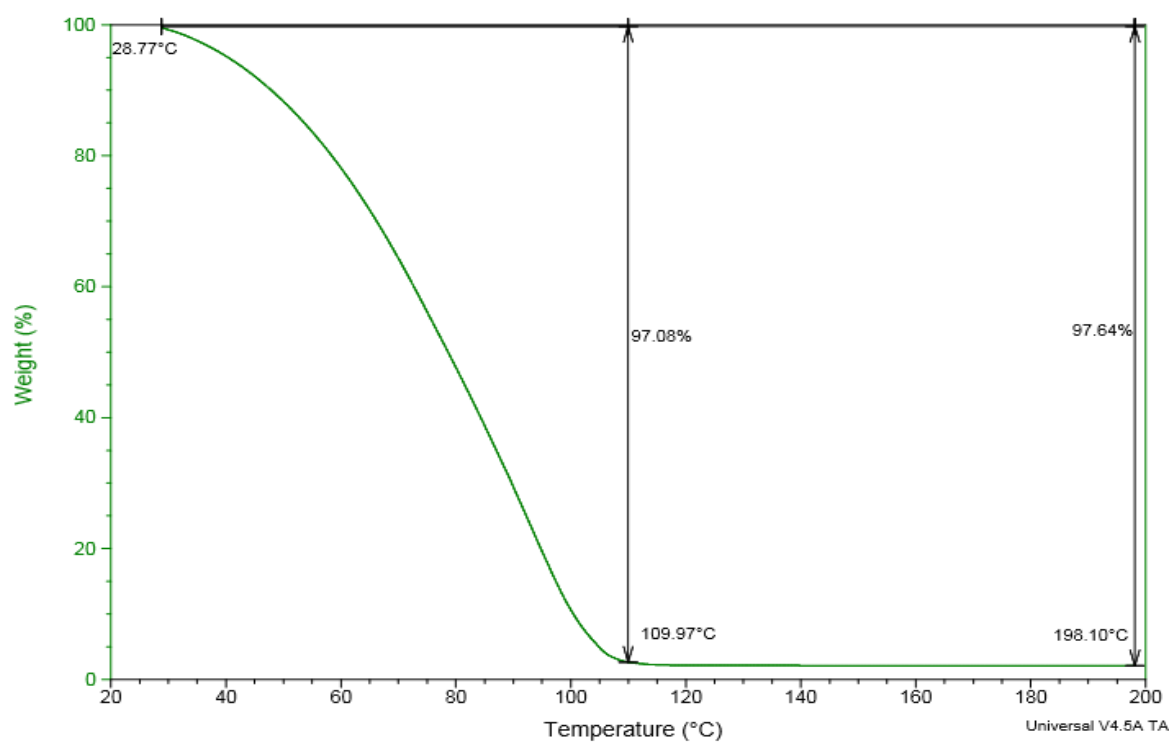
Graf č. 13: Termogravimetrická křivka - Sacharóza palmitát.



Graf č. 14: Termogravimetrická křivka – Sacharóza palmitát.



Graf č. 15: Termogravimetrická křivka - Tween 40.



Graf č. 16: Termogravimetrická křivka - Tween 40.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Seznam použitých zkratek

| | |
|---------|-------------------------------------|
| KH | kyselina hyaluronová |
| ECM | extracelulární matrix |
| HRP | křenová peroxidáza |
| TGA | termogravimetr |
| TS-NaHY | hyaluronan substitovaného tyraminem |
| PBS | fosfátový roztok s 0,15 M NaCl |
| HA | hyaluronan |
| EDC | ethylendichlorid |
| IMAO | inhibitory monoaminoxidázy |
| GlcA | glykolát permeázy |
| PAL | povrchově aktivní látka |

8.2 Seznam použitých symbolů

| | |
|------------|-----------------------------------|
| G' | elastický modul |
| G'' | viskózní modul |
| Δt | délka trvání deformačního procesu |
| De | debořino číslo |
| du | smyková rychlost |
| ρ | hustota |
| η | dynamická viskozita |
| τ | tečné napětí |