

Příprava termo-responzivních systémů pro biomedicínské aplikace

Barbora Hermanová

Bakalářská práce
2022



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Barbora Hermanová**
Osobní číslo: **T19625**
Studijní program: **B0711A130009 Materiály a technologie**
Specializace: **Biomateriály a kosmetika**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Příprava termo-responzivních systémů pro biomedicínské aplikace**

Zásady pro vypracování

Práce se bude zabývat modifikací biopolymerů jako je např. celulóza nebo k. hyaluronová pomocí termo-responzivního polymeru (N-isopropylakrylamidu) za účelem přípravy tzv. stimuli-responzivních materiálů (hydrogelů, mikro/nanogelů) pro medicínské aplikace. Cílem je prozkoumat možnosti tvorby tzv. stimuli-responzivních biokompatibilních materiálů, které budou dobře rozpustné ve vodě za laboratorní teploty, ale u kterých dojde k sol-gel přechodu (gelaci) při tělesné teplotě. Takovéto materiály umožňují snadné injekční podání a přitom mohou sloužit např. jako zásobníky léčiv s dlouhodobým uvolňováním.

V průběhu práce student zpracuje literární rešerši na téma aplikace termo-responzivních polymerů v medicíně, seznámí se s chemií polysacharidů, bio-konjugacími reakcemi a bude se věnovat optimalizaci syntézy těchto materiálů s ohledem na molekulovou hmotnost polysacharidu, stupeň substituce polymeru a jejich výsledné formulace (hydrogel, mikro/nanogel), které následně charakterizuje za pomoci vhodných chemicko-fyzikálních metod.

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

- [1] D’Este, M.; Eglin, D.; Alini, M. A Systematic Analysis of DMTMM vs EDC/NHS for Ligation of Amines to Hyaluronan in Water. *Carbohydrate Polymers* **2014**, 108, 239-246. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.070>.
- [2] Maudens, P.; Meyer, S.; Seemayer, C. A.; Jordan, O.; Allémann, E. Self-Assembled Thermoresponsive Nanostructures of Hyaluronic Acid Conjugates for Osteoarthritis Therapy. *Nanoscale* **2018**, 10 (4), 1845-1854. <https://doi.org/10.1039/C7NR07614B>.
- [3] Lanzalaco, S.; Armelin, E. Poly(N-Isopropylacrylamide) and Copolymers: A Review on Recent Progresses in Biomedical Applications. *Gels* **2017**, 3 (4). <https://doi.org/10.3390/gels3040036>.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Jan Vícha, Ph.D.**
Centrum polymerních systémů

Datum zadání bakalářské práce: **25. února 2022**
Termín odevzdání bakalářské práce: **20. května 2022**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Cílem této bakalářské práce je příprava a charakterizace termo-responzivního systému pro biomedicínské aplikace. Konkrétně se jedná o modifikaci kyseliny hyaluronové pomocí poly(isopropylakrylamidu), čímž vznikne termo-responzivní polymer, který je za laboratorní teploty rozpustný, ale po zahřátí nad dolní kritickou rozpouštěcí teplotu se vytvoří hydrogel, který by měl následně nalézt svou aplikaci např. ve farmakologii jako nosič léčiv. Charakteristiky termoresponzivního hydrogelu, které budou zkoumány v této práci jsou např. stanovení dolní kritické rozpouštěcí teploty (LCST), reologické vlastnosti, biokompatibilita a cytotoxicita.

Klíčová slova: kyselina hyaluronová, poly(isopropylakrylamid), termoresponzivní hydrogel, LCST, reologie, biokompatibilita, cytotoxicita

ABSTRACT

The aim of the dissertation is the preparation and characterization of a thermo-responsive system for biomedical applications. In particular, hyaluronic acid is modified with poly(isopropyl acrylamide) for the preparation of thermo-responsive hydrogel which is soluble at laboratory temperature but forms hydrogel when heated above low critical solubility temperature, which can find its purpose in pharmacology as a drug carrier. Characteristics of prepared thermo-responsive hydrogel discussed are the determination of low critical solubilization temperature (LCST), rheological properties, biocompatibility, and cytotoxicity.

Keywords: hyaluronic acid, poly(isopropylacrylamide), thermo-responsive hydrogel, LCST, rheology, biocompatibility, cytotoxicity

Poděkování

Chtěla bych zejména poděkovat Mgr. Janu Víchovi, Ph.D. za konzultace, odborné rady a celkové vedení mé bakalářské práce. Dále pak Ing. Monice Muchové, Ing. Alžbětě Vávrové a Ing. Simoně Káčerové za laboratorní asistenci a pomoc s experimentem.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	8
I TEORETICKÁ ČÁST	9
1 BIOMATERIÁLY.....	10
1.1 KYSELINA HYALURONOVÁ A JEJÍ MODIFIKACE.....	11
2 STIMULI-RESPONZIVNÍ MATERIÁLY	14
2.1 TERMORESPONZIVNÍ HYDROGELY	14
2.1.1 pNIPAM.....	16
3 HA+ PNIPAM	19
4 METODY ANALÝZY HYDROGELŮ	20
4.1 REOLOGIE	20
4.1.1 Rotační reometr	21
4.2 FT-IR.....	22
4.3 DLS.....	23
4.4 BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ – CYTOTOXICITA.....	24
5 CÍL PRÁCE.....	25
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	26
6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	27
6.1 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE.....	27
6.2 PŘÍPRAVA HA-PNIPAM.....	28
7 VÝSLEDKY A DISKUZE	29
7.1 CHARAKTERIZACE HA-PNIPAM.....	29
7.1.1 FT-IR	29
7.1.2 Stanovení velikosti částic.....	30
7.1.3 Stanovení kritické gelační koncentrace	31
7.2 STANOVENÍ LCST.....	33
7.3 CYTOTOXICITA.....	37
ZÁVĚR	38
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	39
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	42
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	43
SEZNAM GRAFŮ.....	44
SEZNAM ROVNIC.....	45

ÚVOD

Lidské tělo je dynamický systém, který má schopnost splňovat různé funkce, které jako celek udržují jeho zdravou kondici. Tyto funkce mají však omezenou životnost, kterou už v současné době lze prodloužit, a to sice pomocí biomateriálů.

Oblast biomateriálů je velmi obsáhlá, avšak v této práci se budu zajímat konkrétně o termoresponzivní hydrogely, které jsou v posledních letech zkoumány, a to zejména v oblasti onkologické, jakožto potenciální nosiče léčiv pro řízené jejich řízené uvolňování. Termoresponzivní hydrogely mohou být založené například na kyselině hyaluronové modifikované poly(N-isopropylakrylamidem) zkráceně p-NIPAMem. Kyselina hyaluronová je přírodním polymerem, známým pro tělo, je biodegradabilní a biokompatibilní. Její modifikací pomocí p-NIPAMu můžeme docílit termoresponzivity, tedy tepelného přechodu při určité teplotě. Přípravě a charakterizaci takového systému se věnuji ve své bakalářské práci.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOMATERIÁLY

Výzkumem biomateriálů se zabývají různé vědní obory od materiálového inženýrství, přes buněčnou biologii až po medicínu. Jedna z definic biomateriálů ho popisuje jako jakoukoliv substanci či kombinaci substancí, syntetickou či přírodní, která může být použita po určitou dobu jakožto součást systému, do kterého je zavedena anebo pro celkovou náhradu celého biologického systému, a tímto může rozšířit či nahradit jakoukoliv tkáň, orgán nebo jinou funkci v organismu. Další definicí takového biomateriálu by mohlo být, že to je neživý materiál používaný v medicíně a sloužící k interakci s živým systémem. Aby však takto definované materiály mohly být užity v praxi, musejí splňovat mnoho podmínek, mimo jiné biokompatibilitu s organismem, aby nezpůsobovaly imunitní reakci a aby byly nezánětlivé. Jako další je tedy nutno definovat biokompabilitu, což je tedy schopnost vykonávat či vyvolávat náležitou reakci hostitele. [1], [2], [3]

Na základě chemického složení mohou být biomateriály děleny:

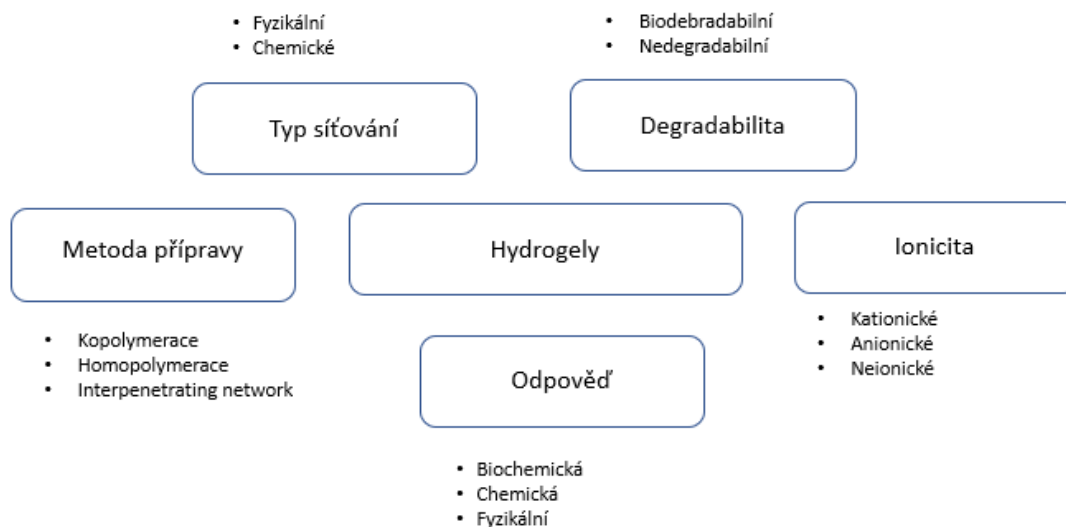
- a. **Keramické:** typické jsou pro ně iontové nebo kovalentní interakce, vysoký bod tání, chemická stabilita, nízká teplotní i elektrická vodivost (u elektrické mohou být výjimky), mají nízkou deformaci a jsou velmi husté. Aplikace najdeme např. v zubním lékařství.
- b. **Kovové:** váží se k sobě kovovou vazbou, bod tání je středně vysoký, mají dobrou chemickou stabilitu, jsou dobrými elektrickými i tepelnými vodiči a taktéž mají vysokou mechanickou odolnost. Uplatňují se v oblasti tkáňového inženýrství, konkrétněji jako např. jako ortopedické nebo dentální náhrady.
- c. **Polymerní:** váží se kovalentními vazbami a van der Waalovými silami, mívají nízký bod tání, nejsou příliš chemicky stabilní, nejsou obvykle dobrými elektrickými ani tepelnými vodiči, bývají degradabilní, mají podobnou hustotu jako jemné tkáně, jsou velmi plastické a mají vysokou deformaci. Využití mají v oblasti biomedicínské jako implantáty jemných tkání, k dopravování léčiv a tkáňovému inženýrství.

Jedněmi z velmi významných polymerních biomateriálů jsou hydrogely. [2], [4]

Hydrogely jsou 3D zesíťované struktury, tvořené hydrofilními polymery, které jsou na sebe schopny vázat velké množství vody a mají také schopnost bobtnání, kterou mohou díky své struktuře ovlivnit, a dokonce se mohou i smršťovat. Například inkorporací hydrofilní jednotky v matici hydrogelů se zvyšuje objem bobtnání, naopak s přidávkem hydrofóbní

jednotky dochází k opačnému jevu. Strukturu hydrogelu ovlivňují aspekty jako struktura či obecné vlastnosti jejich monomerů anebo změna koncentrace jejich síťovadla. [5], [6], [7]

Následující schéma (Obr. 1) popisuje základní dělení hydrogelů podle různých hledisek.



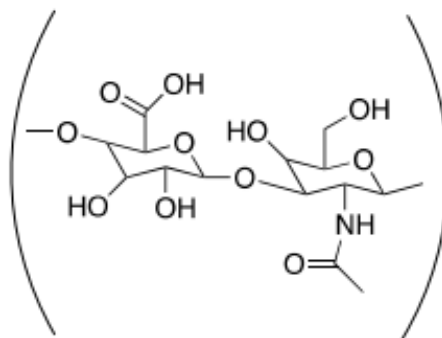
Obrázek 1.: Rozdělení typů hydrogelů podle různých hledisek

Dále se hydrogely mohou dělit také dle původu:

- Syntetické: např. polyetylen glykol-akrylát, polyakrylamid, polyvinylalkohol
- Přírodní: např. kolagen, fibrin, kyselina hyaluronová, chitosan apod. [8]

1.1 Kyselina hyaluronová a její modifikace

Kyselina hyaluronová (Obr. 2) je vysokomolekulární polysacharid patřící do skupiny glykosaminoglykanů. Je složena z opakujících se disacharidových jednotek N-acetylglukosaminů a glukuronové kyseliny. Jelikož se v organismu vyskytuje jako polyaniont, často je označována v tomto kontextu jako hyaluronan. [9], [10]



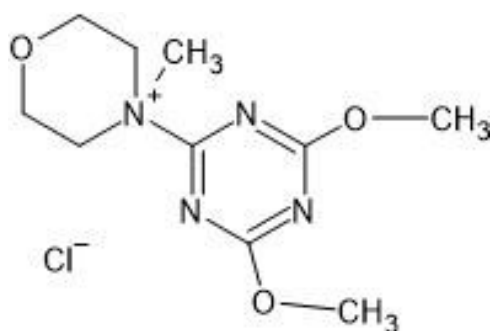
Obrázek 2.: Kyselina hyaluronová

Hyaluronan je jeden z nejdůležitějších a z nejvíce studovaných biologických polymerů v medicíně. Je to všudypřítomný komponent těla všech obratlovců a je nezbytný pro tvorbu vhodného prostředí pro buňky jakožto součástí extracelulární matrix. Podílí se také na jejich proliferaci, transportu a diferenciaci. Přispívá k homeostáze a poskytuje odolnost a mechanické vlastnosti v mezibuněčném prostoru. Další biologické funkce HA slouží k udržení elastické viskozity tekuté části pojivové tkáně např. v očním sklivci či v synoviální tkáni kloubů, kontrola hydratace tkání a přenos vody, ale také k buněčné migraci, mitóze apod. [10], [11]

Právě díky těmto vlastnostem jsou biomateriály na bázi kyseliny hyaluronové jedny z nejvíce poptávaných v biomedicínských aplikacích jako např. viskosuplementace. Jednou z nejčastějších kloubních chorob dnešní stárnoucí populace je osteoartróza, což je nemoc, která je způsobená degradací chrupavky, což ovlivňuje celý kloub. Je to pomalý, progresivní a vysilující proces s vysokou prevalencí u dospělé populace. Viskosuplementace funguje tak, že je pacientovi injekčně podaná HA do kloubu, za účelem obnovení reologických vlastností synoviální (kloubní) tekutiny, a tedy dodání mechanického, analgetického, nezánnětlivého a chondro-ochranného efektu. [12]

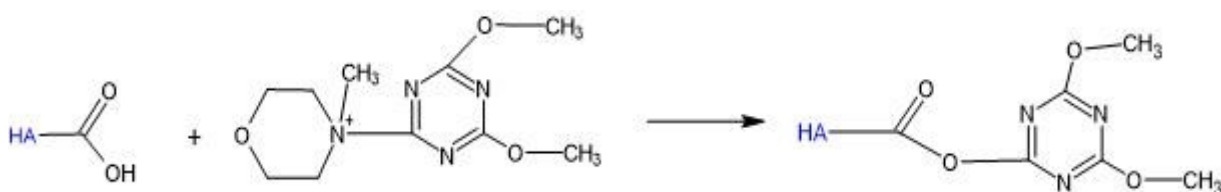
Pokud je HA podrobena modifikaci, jako např. zesíťování, může nalézt ještě širší využití například v tkáňovém inženýrství jako biologické scaffoldy. Scaffold je definován jako dočasná oporná struktura pro podporu růstu buněk a tkání. Taktéž se mu přezdívá syntetická extracelulární matrix a hraje kritickou roli u buněčné proliferace, migrace a diferenciaci v 3D prostoru, což vede ke tvorbě specifických tkání s různými funkcemi. HA scaffoldy mohou vázat proteiny a buňky skrz povrchové receptory buněk. [11],[13]

Pro syntézu hydrogelů na bázi kyseliny hyaluronové je nejvhodnější modifikace její karboxylové skupiny. Jednou z těchto modifikací může být např. tzv. roubování (grafting) aminů na karboxylovou skupinu. K tomu však musí být prvně karboxylová skupina aktivována pomocí nějakého organického činidla, např. pomocí (4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methyl-morfolinia) DMTMM, Obr. 3. DMTMM je rozpustné ve vodě a je stabilní ve vodním prostředí delší dobu než jiná srovnatelná činidla, např. N-ethylkarbodiimid, což je jeho jedinečná vlastnost. [11], [14]



Obrázek 3.: Struktura DMTMM

Aktivace karboxylové skupiny HA pomocí DMTMM probíhá substitucí $-OH$ skupiny karboxylátu s vytvořením meziprojektu, tzv. s-triazin esteru kyseliny hyaluronové. Tento meziprojekt je velmi reaktivní, hlavně vůči aminovým skupinám, Obr.4. Při reakci také není potřeba užívat žádný pufr, a to zejména díky vlastnosti HA pufovat samu sebe na základě obsahu karboxylických skupin v její struktuře, což umožňuje jak zachytávání protonů, tak i jejich současné uvolňování.



Obrázek 4.: Obecné schéma reakce HA a DMTMM

Jakmile je karboxylová skupina aktivována, je možno na ní roubovat jinou sloučeninu a tím modifikovat fyzikálně-chemické vlastnosti HA, což může vést k přípravě stimuli-responzivních systémů. [11]

2 STIMULI-RESPONZIVNÍ MATERIÁLY

Stimuli-responzivní biomateriály můžeme definovat jako materiály, které jsou schopny reagovat na určitý signál či stimul, kterému jsou vystaveny. Kromě základních vlastností biomateriálů jako je biokompatibilita, biologická funkčnost, biodegradabilita a aby obecně nepůsobily toxicky na organismus, stimuli-responzivní biomateriály vykazují tedy i speciální vlastnosti v závislosti na stimulu, který je na ně aplikován. [15], [16]

Rozdělení stimulů v závislosti, odkud přicházejí:

a. Vnější stimuly

Mezi tyto stimuly patří např.: teplota, světlo, magnetické nebo elektrické pole, ultrazvuk. Tyto stimuly mohou působit na systém v časových intervalech nebo jen jednorázově a dočasně.

b. Vnitřní stimuly

Mezi tyto řadíme pH, redoxní reakce, přítomnost enzymů či jiné stimuly ovlivněné zejména fyziologickým stavem, které není možno ovlivnit externím působením.

Rozdělení stimulů dle jejich původu:

a. Fyzikální: např. expozice záření, změna teploty či vystavení elektrickému poli

b. Chemické: např. změna pH, redox prostředí

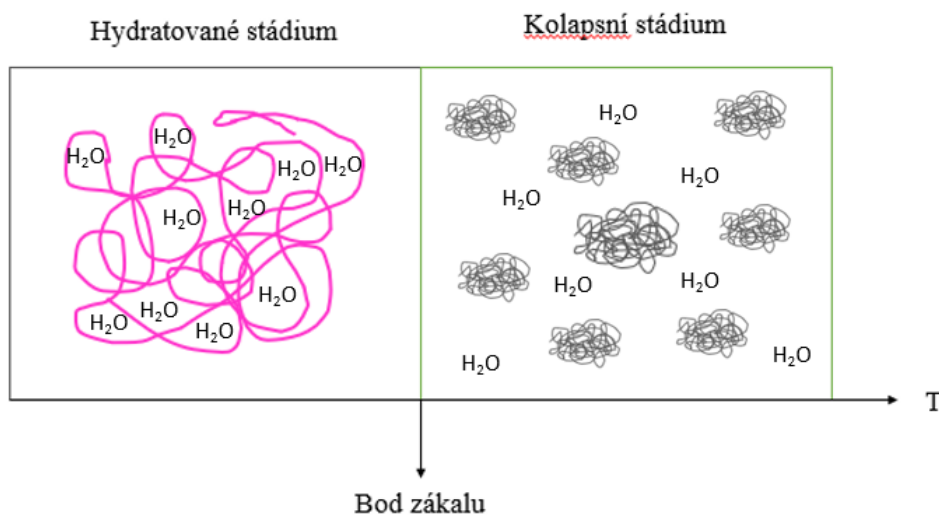
c. Biologické: např. působení enzymů

Stimuli-responzivní hydrogely mohou modifikovat nejen jejich „smršťovací“ chování, ale také jejich mechanické vlastnosti, sol-gel přechod, permeabilitu a síťovou strukturu na základě stimulů na ně aplikovaných. Takovýchto vlastností můžeme docílit například synergickým kombinováním dvou makromolekul s jinými funkcemi. Jak jsem již zmiňovala v rozdělení, jedním ze stimulů může být například právě teplota. [2], [13], [17]

2.1 Termoresponzivní hydrogely

Termoresponzivní hydrogely jsou hydrogely, které vykazují odpověď na tepelný podmět tzv. přechodem sol-gel při specifické teplotě označované zkratkou LCST z anglického lower critical solubilization temperature, tedy dolní kritická rozpouštěcí teplota. LCST je nejnižší teplota, při které je polymer ještě rozpouštěn v roztoku. Jakmile se teplota začne zvyšovat a přesáhne LCST, tak dochází k reverzibilní změně objemu termoresponzivního polymeru a

smrsklá struktura vytlačí vodu do okolí a přejde do dehydratovaného stavu (Obr.5). Znamená to tedy, že nad LCST se značně zvýší jeho hydrofobita a začne být nerozpustný, což vede ke vzniku gelovité struktury, Obr.5. [18], [19]



Obrázek 5.: Sol-gel přechod termoresponzivního polymeru při bodu zákalu

LCST je také závislá na kritické gel koncentraci (CGC), což je minimální koncentrace, při které jsou molekuly termoresponzivního hydrogelu schopné sol-gel přechodu. Snížení rozpustnosti polymerů při změně teploty je tedy důsledkem změny celkové hydrofilicity polymerních řetězců. Pokud je polymer rozpuštěn ve vodě, mohou nastat celkově tři interakce: polymer-polymer, polymer-voda, voda-voda. Zvýšení teploty u termoresponzivních polymerů vede ke zvýšení celkové Gibbsovy energie G , což je nevýhodné pro interakci polymer-voda, a naopak upřednostňuje interakce voda-voda a polymer-polymer. Zvýšení celkové Gibbsovy energie je přisuzováno celkové změně entropie S a taktéž zvýšení entalpie H podmíněné interakcemi voda-voda (Rovnice 1). Dochází zde k tzv. hydrofóbnímu efektu. [20]

$$\delta G = \delta H - t \cdot \delta S$$

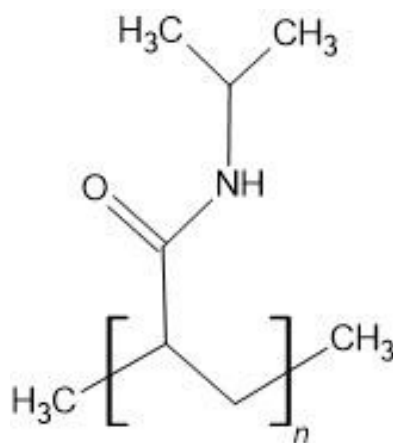
Rovnice 1.: II. termodynamický zákon

Termoresponzivní polymery mají budoucnost jako nosiče léčiv pro možnost řízeného uvolňování látek, tkáňové inženýrství a její diagnostiku apod. Mají mimo jiné schopnost adheze, které se také může potencionálně využít v těchto aplikacích. Jedním z nejvíce

zkoumaných termoresponzivních polymerů je pNIPAM neboli poly(N-isopropylakrylamid). [7], [20]

2.1.1 pNIPAM

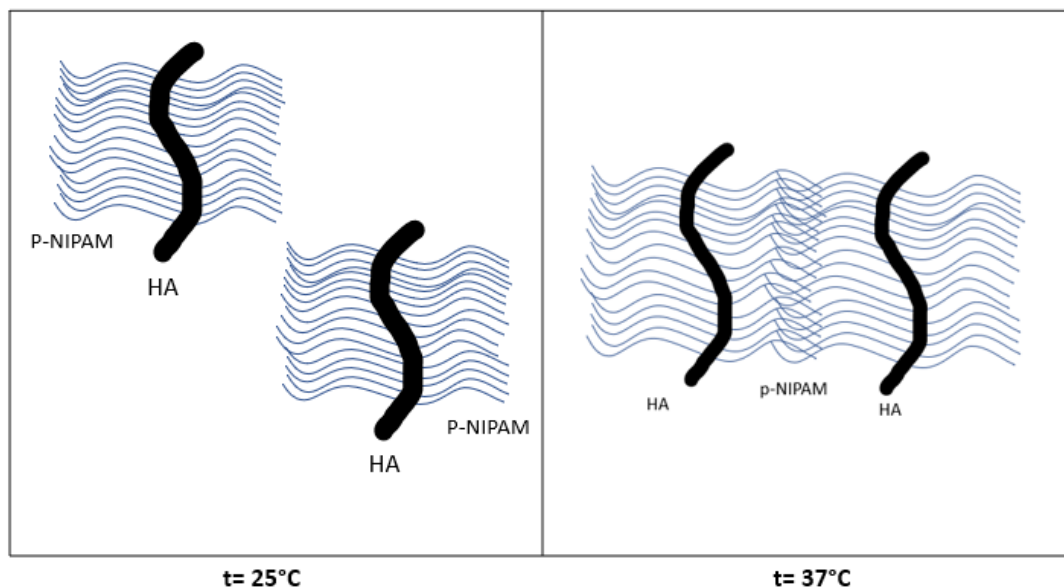
p-NIPAM (Obr. 6) je syntetický termoresponzivní polymer, který zůstává v rozpuštěn ve vodě pod LCST (32 °C). Jakmile je vystaven LCST, dojde k sol-gel přechodu, je-li splněna podmínka CGC, tedy kritické gelační koncentrace, což je minimální koncentrace, při které se začínají formovat gely. LCST je závislá hlavně na vodíkových interakcích mezi molekulami vody a funkčním monomerem p-NIPAMu, konkrétněji N-H a C=O skupinami. Proto obvykle při graftingu pNIPAMu na více hydrofilní řetězce dojde ke zvýšení celkové hydrofility polymeru a také zvýšení celkové energie interakcí polymer-voda, což vede ke zvýšení LCST teploty. Taktéž platí, že inkorporace pNIPAMu na více hydrofóbní řetězce vede ke snížení LCST. PNIPAM mimo jiné vykazuje vysoký stupeň synerezy během gelace, tedy samovolného vytékání kapaliny z gelu, k čemuž obvykle dochází v důsledku smršťování při stárnutí gelu. Dále je pak velmi dobře biokompatibilní se zvířecími buňkami a je vhodný k napodobování mikroskopických struktur některých měkkých tkání, avšak sám o sobě nevykazuje vysokou buněčnou adhezivitu a není biodegradabilní. Nepříznivé jsou také reologické vlastnosti čistých pNIPAM-ových hydrogelů, které nejsou úplně žádoucí na přípravu membrán, nahrazení kostních tkání nebo výrobu scaffoldů. [7], [20], [21]



Obrázek 6.: pNIPAM

Zlepšení jeho vlastností je možno docílit různými způsoby jako například tvorbou interpenetrujících polymerních sítí, výrobou nanokompozitních p-NIPAM hydrogelů nebo kopolymerací. Vlastnosti takovýchto látek se odvíjí od několika faktorů a to sice: původ, struktura a vlastnosti polymeru a látky, na níž je roubováno a vzájemný poměr mezi těmito molekulami. Pokud bychom se měli zaměřit třeba konkrétně na roubování na některý

z přírodních polymerů jako kyselina hyaluronová, chitosan, gelatin, kolagen apod., které jsou biodegradabilní a také vylepšují biokompatibilitu a fyzikální vlastnosti gelu, zde se usiluje např. o vyšší a reverzibilní buněčnou adhezi v závislosti na LCST. Obr.7. [7], [15], [16], [21]



Obrázek 7.: Roubovaný p-NIPAM na HA

Hydrogely zesíťované pomocí pNIPAMu mají obecně jemnou strukturu a poměrně vysokou schopnost bobtnání, což vyhovuje buněčnému životu, protože buňky potřebují specifické viskoelastické chování, aby bylo zabráněno jejich poškození, a zároveň aby byly v přítomnosti velkého množství vody. Dále se tyto hydrogely mohou také aplikovat pro enkapsulaci či podávání léčiv. [6], [16], [18]

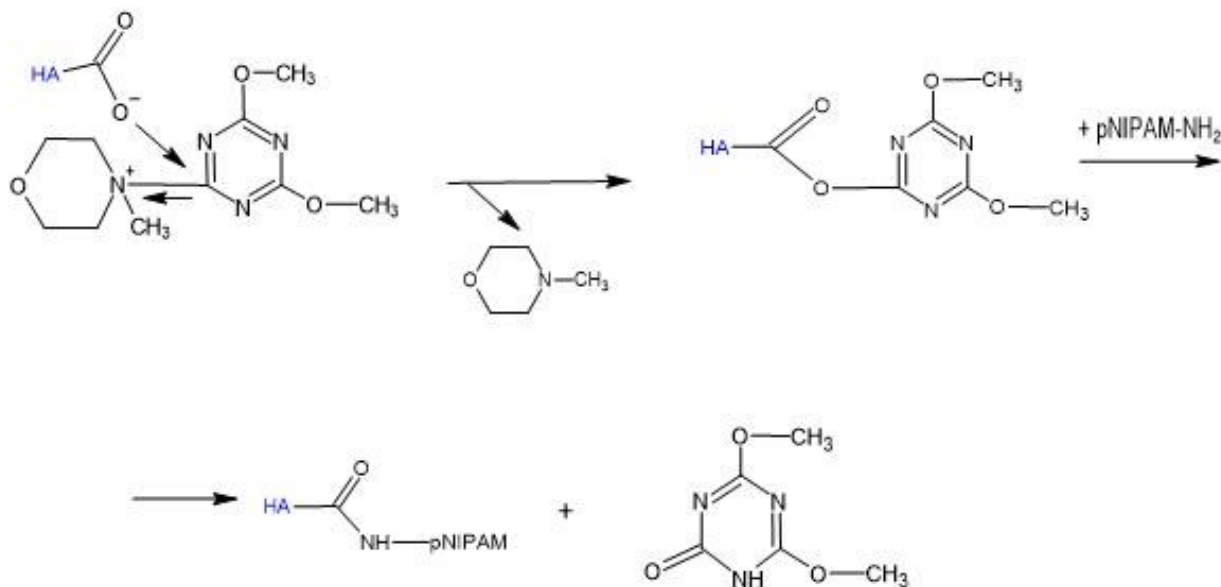
Jak již bylo zmíněno, p-NIPAM je velmi studovaným materiálem. Například G.Conzati, F. Ayadi a kol. naroubovali p-NIPAM na alginát a chitosan. Díky tomu, že dochází k přechodu struktur při LCST, je předpokládáno, že tento přechod ovlivní povrchové interakce. Alginát a chitosan jsou přírodními biopolymery, které jsou vhodné pro aplikaci při hojení ran. Pro modifikaci jejich interakce s povrchem byl použit p-NIPAM, kdy studie prokázala, že po modifikaci se změnil kontaktní úhel a p-NIPAM zvýšil jejich hydrofobitu. [22]

Naopak Ohya a kol. zkoumali, zda p-NIPAM roubovaný na želatinu s LCST při 34 °C, je schopen tvořit in situ 3D extracelulární matrix nebo buněčné scaffolds. Směs fibroblastů s fluorescenčním činidlem a pNIPAM-želatina v médiu byly injekčně podány do podkožní tkáně krysy, kde okamžitě začaly tvořit gel. Fibroblasty měly ihned po injekci sférický tvar

a byly homogenně distribuované v gelu. Po dvou týdnech se fibroblasty rozšířily a proliferovaly. Gel tedy nevykazoval žádnou cytotoxicitu. [17]

3 HA+ PNIPAM

Kyselina hyaluronová je díky svým biologickým vlastnostem velmi užívaným polymerem, avšak nevykazuje termoresponzivitu. Té je možno docílit právě díky graftingu pNIPAMu terminovaného –NH₂ skupinou. [7]



Obrázek 8.: Nukleofilní substituce DMTMM a HA a následná reakce s pNIPAMem

Jak jsem již zmiňovala v kapitole 1.1., aby mohla HA reagovat s pNIPAMem je nutno prvně aktivovat její karboxylovou skupinu, například pomocí DMTMM. Na karboxylové skupině je parciální kladný náboj na uhlíku C, parciální negativní na =O a záporný na –O skupinách. Ten přitahuje kladně nabitý dusík N na struktuře DMTMM. V mírně kyselém prostředí se DMTMM rozpadne za současného navázání na HA, uvolní se N-methylmorfolinium a vzniká ester s-triazinu a kyseliny hyaluronové. Tento ester je ovšem pouze omezeně stabilní, a pokud se v reakční směsi nachází látka obsahující amino skupinu, například právě pNIPAM, který je terminálně modifikován –NH₂ skupinou, dochází k substituci na karboxylovém uhlíku za vzniku amidické vazby (Obr. 8).

4 METODY ANALÝZY HYDROGELŮ

4.1 Reologie

Reologie je věda zabývající se tokem a deformací materiálů. Viskozita v tomto oboru hraje důležitou roli, jelikož určuje míru vnitřního odporu materiálu vůči vnějšímu zatížení. Co se týče hydrogelových struktur, obecně můžeme říct, že dokážou velmi dobře udržovat svůj tvar v důsledku síťování, které je tvořeno jednotlivými řetězci molekul (polymerní gely) nebo větším shromažďováním molekul (koloidní útvary). Aplikace hydrogelů velmi úzce souvisí s jejich reologickými vlastnostmi, a to hlavně s jejich komplexní viskozitou, elastickým modulem a ztrátovým modulem. Tyto parametry jsou ovlivněny strukturou polymerní sítě a také jejím okolím. [23], [24], [25]

Komplexní viskozita η^* je mírou celkového odporu toku, tedy funkcí úhlové rychlosti (ω) oscilačním poli (rovnice 2)

$$\eta^* = G^* / \omega$$

Rovnice 2.: Vztah mezi komplexní viskozitou, komplexním modulem a úhlovou rychlostí
Kde G^* je komplexní modul pružnosti. Dále lze komplexní viskozitu vyjádřit jako vztah mezi dynamickou viskozitou η' a ztrátovou viskozitou η'' , které reprezentují reálnou a nereálnou část komplexní viskozity η^* (rovnice 3) [26]

$$\eta^* = \eta' + i\eta''$$

Rovnice 3.: vztah mezi komplexní, dynamickou a ztrátovou viskozitou

Komplexní modul G^* lze také definovat jako vztah mezi smykovým napětím τ a smykovou deformací γ a popisuje celé viskoelastické chování vzorku (rovnice 4). Je podobně jako η^* složen z viskózní a elastické složky (rovnice 5), reprezentované elastickým modulem G' a ztrátovým modulem G'' .

$$G^* = \frac{\tau_A}{\gamma_A}$$

Rovnice 4.: Komplexní modul

G^* lze podobně jako η^* vyjádřit pomocí viskózní a elastické složky (rovnice 5), reprezentovaných elastickým modulem G' a ztrátovým modulem G'' .

$$G^* = G' + iG''$$

Rovnice 5.: Komplexní modul, elastický modul a ztrátový modul

Viskózní chování je způsobeno vnitřním třením mezi složkami v materiálu. Souvisí tedy i s vývojem třecího tepla ve vzorku a následnou přeměnou deformační energie na tepelnou. Tato energie je absorbována vzorkem a není již k dispozici, aby ovlivnila další chování materiálu vzorku. Naproti tomu pružná část energie je uložena v deformovaném materiálu v důsledku prodloužení nebo natažení vnitřních vazeb bez jejich nadměrného namáhání nebo ničení. Po uvolnění se nevyužitá uložená energie uvolní do přetvoření struktury do původního tvaru. Elastický modul G' tedy představuje elastickou část ve viskoelastickém chování látky a je popsán jako reálná složka komplexního modulu. Ztrátový modul G'' potom charakterizuje viskózní část viskoelastického chování a uloženou deformační energii. Viskoelastické pevné fáze nebo látky mají vyšší elastický modul, tedy elastickou část, což je způsobeno fyzikálně-chemickými interakcemi uvnitř látky. Naproti tomu viskoelastické kapalně fáze mají vyšší ztrátový modul, tedy viskózní složku, jelikož se tam nenacházejí tyto interakce. Tuto závislost vyjadřujeme pomocí tlumícího faktoru $\tan(\theta)$. Látky s viskoelastickým chováním mají tlumící faktor $\tan(\theta)$ roven 1. Pokud je $\tan(\theta)$ menší než 1, látka se chová elasticky, naopak viskózně se bude chovat v případě, že by byl $\tan(\theta)$ větší než 1 (rovnice 6). [26], [27]

$$\tan(\theta) = \frac{G''}{G'}$$

Rovnice 6.: Vztah mezi tlumícím faktorem, ztrátovým modulem a elastickým modulem

4.1.1 Rotační reometr

Jedním z přístrojů, který může být užit při měření reologických vlastností materiálů je rotační reometr, který může měřit v ustáleném smykovém či oscilačním poli. V ustáleném smykovém poli je možno měřit smykové napětí, rychlost smykové deformace nebo prahové napětí. V oscilačním pak viskoelastické moduly či komplexní viskozitu. U rotačního reometru můžeme užit tři konfigurace pro souosé geometrie pracovní části reometru. Geometrie má reometr dvě, a to pohyblivou a statickou. Co se týče zmíněných konfigurací, ty mohou být: válec-válec, deska-deska, kužel-deska. Volba konfigurace se odvíjí od materiálu, který je podroben zkoušce a druhu měření. [23]

4.2 FT-IR

Infračervená spektroskopie se zabývá interakcí mezi hmotou a infračerveným zářením. Infračervené záření je elektromagnetické záření o vlnové délce 0,78-1000 μm , což odpovídá vlnočtu 12800-10 cm^{-1} . Jedná se o strukturní analýzu, která se používá k identifikaci nových vzorků nebo prokázání složení těch známých. Infračervené spektrum má delší vlnovou délku než viditelné světlo, tedy nese s sebou menší energii. Při tomto měření prochází infračervené světlo vzorkem a na základě množství energie, kterou nese, může způsobit vibrace chemických vazeb ve vzorku, přičemž je pohlceno, jinými slovy dochází k absorpci, zároveň je však nedestruktivní metodou a vzorek tedy zůstává neporušen. Při absorpci dochází ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekuly, a to v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly. Záření, které nebylo pohlceno, prochází vzorkem a je zachycováno detektorem. Konkrétně tedy u infračervené spektrofotometrie s Fourierovou transformací, světlo vychází ze zdroje a dopadá na odražeč paprsků. Ten současně odráží světlo na dvě zrcadla, jedno, co se pohybuje a druhé, které je v klidu. Paprsky se odráží od zrcadel a protínají se navzájem a vytvářejí interferenci, která prochází přes vzorek, který část absorbuje a část se odrazí a detektor jej zaznamená. [28]

Výsledkem měření je závislost transmitance nebo absorbance na vlnočtu. Absorbance je definovaná jako záporný dekadický logaritmus transmitance (rovnice 6). Transmitance T je definovaná jako poměr intenzity prošlého záření I_p ku celkové intenzitě záření I_c (rovnice 7). Absorbance se dá rovněž stanovit dle Lambert-Beerova zákona, který vyjadřuje závislost molárního absorpčního koeficientu ε , délku dráhy l a koncentrace roztoku c (rovnice 8). [29]

$$A = -\log(T)$$

Rovnice 6.: Absorbance

$$T = \frac{I_p}{I_c}$$

Rovnice 7.: Transmitance

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

Rovnice 7.: Lambert – Beerův zákon

4.3 DLS

Metoda DLS, dynamic light scattering neboli metoda měření rozptylu záření v koloidních roztocích byla použita pro stanovení velikosti částic v roztoku. Při rozptylu záření dochází k tzv. elastickému odrazu fotonu od částice. Nedochozí zde tedy k absorpci. Přijaté kvantum světelné energie je posléze vyzářeno bez změny vlnové délky. Dynamický rozptyl světla je založen na Brownovu pohybu částic v disperzním prostředí. V disperzním prostředí jsou částice rozptýleny a náhodně se pohybují a naráží do sebe. Tyto nárazy způsobují přenesení energie, což způsobuje neustálý pohyb částic. Přenesená energie je víceméně konstantní a má tedy větší efekt na částice, které jsou menších rozměrů. Tedy menší částice se pohybují rychleji než ty větší. Vztah mezi rychlostí částic a jejich velikostí popisuje Stokesova – Einsteinova rovnice. Rychlost částic je vyjádřena difúzním koeficientem D (rovnice 8). Základem pro tuto rovnici je, aby pohyb částic byl ovlivněn pouze Brownovým pohybem. Pokud by částice sedimentovaly, nedocházelo by k náhodnému pohybu a výsledky měření by nebyly správné. [30]

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H}$$

Rovnice 8.: Stokes-Einsteinova rovnice

Měření probíhá způsobem, kdy koloidním vzorkem, který je umístěn v kyvetě, prochází světlo, které je následně rozptýleno do různých směrů. Světlo je pak detekováno na detektoru pod určitým úhlem po určitou dobu a tento signál je následně použit k určení difúzního koeficientu. Intenzita rozptýleného světla není konstantní, ale mění se v čase. Menší částice, které se pohybují rychleji, vykazují rychlejší fluktuace než větší částice. Naopak větší částice zase vykazují vyšší amplitudy mezi maximy a minimy intenzity rozptylu. K zjištění jejich velikosti se používá korelační funkce. Korelační funkce popisuje, jak dlouho se částice vyskytuje na jednom místě v roztoku. Zpočátku je korelační funkce lineární a skoro konstantní, což znamená, že se částice vyskytuje na stejném místě jako předtím. S časem se lineárnost mění v exponenciální křivku, což indikuje pohyb částice. Pokud se již nevyskytuje žádná podobnost s počátkem, pak se korelační funkce objevuje znovu jako lineární. Informace o pohybu závislém na velikosti částic je tedy zahrnuta do rozpadu korelační funkce. Rozpad korelační funkce představuje nepřímou míru času, který částice potřebují ke změně své relativní polohy. Malé částice se rychle pohybují, takže je rozpad rychlejší než u větších částic. Korelační funkce je tedy v podstatě matematický popis fluktuace rozptýleného světla a používá se k určení difúzního koeficientu. Intenzita rozptýleného

světla za čas t je porovnávána s intenzitou stejné stopy posunuté o dobu zpoždění c . Měření velikostí částic v roztoku tedy neprobíhá přímou metodou, ale je založen na jejich pohybu. Hydrodynamický průměr definuje velikost hladkých sférických částic, které difundují za stejný čas v roztoku. Polydisperzní index je dán popisem distribucí velikostí částic. Pokud má tento index hodnotu pod 10 %, považuje se systém za monodisperzní, tedy že skoro všechny částice jsou podobně velké. [29], [30], [31]

4.4 Biologické testování – cytotoxicita

Jedním ze základních biologických testů je test cytotoxicity, kdy „cyto“ znamená buňka a „toxic“ jed. Cytotoxické testování proměřuje schopnost cytotoxické složky poškodit buňku nebo ji usmrtit. Cytotoxicita tedy udává stupeň, do kterého ovlivňuje určitá látka buněčnou životaschopnost. Látka či proces, který může poškodit buňku či ji zabít je zvaná cytotoxickou. Buňka vystavená cytotoxickému prostředí může podstoupit procesy jako nekróza (neřízená buněčná smrt), apoptóza (řízenou buněčnou smrt), autofagocytóza nebo přestane růst a dělit se, což může snížit celkovou buněčnou proliferaci. [32]

MTT testování je velmi často užíváno k měření buněčné metabolické aktivity jako indikátor buněčné životaschopnosti, proliferace a cytotoxicity. Je to metoda založená na redukci žluté tetrazoliové soli (3-(4,5dimetyltiazol-2-yl)-2,5- difenyltetrazolium bromid) na fialové formazanové krystalky. Tohoto procesu je buňka schopná NADH – dependentní oxidoreduktáze, která redukuje MTT na formazán. Tento proces probíhá na mitochondriálních membránách buněk. Nerozpustné formazanové krystalky jsou rozpuštěny solubilizačním činidlem a výsledek je změna barvy, která je měřitelná pomocí spektroskopie. Čím je roztok tmavší a více fialový, tím je vyšší je počet žijících metabolicky aktivních buněk. [33], [34]

5 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce byla příprava a charakterizace kyseliny hyaluronové, která byla modifikována pomocí p-NIPAMu za účelem termoresponzivity výsledného produktu a tím změny jeho fyzikálně – chemických vlastností.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1 Materiály a přístroje

Pro experiment byla použita kyselina hyaluronová o $M_w = 1250-1500$ kg/mol, označována v textu jako „nízkomolekulová“, a o $M_w = 2000-2200$ kg/mol, označovaná jako „vysokomolekulová“ (Contipro). Dále pak byl použit p-NIPAM 4-(4,6dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl) -4-methylmorfolinium chlorid (DMTMM $\geq 96,0$ %) ($M_w = 276,72$ kg/mol) (Sigma Aldrich, Co.). Pro upravení pH byla použita kyselina chlorovodíková (HCl, 0,01M, Penta, Česká republika) a hydroxid sodný (NaOH, 0,01M; Lachner, Česká republika). Na dialýzu byly použity dialyzační membrány schopné zachytit látky o molární hmotnosti nad 14 kg/mol (MWCO z angl. „Molecular Weight Cut Off“) (Sigma Aldrich, Co.) Vzorky byly filtrovány přes 0,22 μm filtry. Pro experiment bylo využito UPW (z angl. ultra pure water).

Lyofilizace byla provedena v lyofilizátoru CoolSafe 110-4 PRO. Velikost částic a jejich distribuce a následně i zeta potenciál byly zjištěny pomocí analyzátoru částic ZETA NANO ZS ZEN3601 pomocí metody DLS (z angl. Dynamic Light Scattering) s využitím Smochulowského modelu. Měření vzorky byly o koncentraci 0,1 mg/ml a měření proběhlo při 25 °C a 37 °C v kapilární kyvetě DTS1070. Pro charakterizaci vzorku po modifikaci byla použita infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací, která byla naměřena pomocí spektrofotometru NICOLET 6700 (Thermo Fisher Scientific, USA). Měření se provádělo metodou ATR (Attenuated total reflectance – zeslabená úplná reflektance) a to v rozmezí vlnočtu 4000-400 cm^{-1} . Pro určení LCST u vzorků byl použit rotační reometr Anton-Paar MCR 502, u kterého byla využita geometrie kužel-deska a deska-deska. Vzorky byly deformovány frekvencí $f = 0,1$ Hz a 1 % deformací v tepelném rozmezí $t = 25$ °C-40°C. Nakonec byly vzorky podrobeny biologickému testování na cytotoxicitu. Jako buněčná linie sloužily fibroblasty z myších embryí linie NIH/3T3 (ECACC 93061524, Anglie). Kultivační médium bylo Dulbeccem modifikované Eaglovo médium (BioSera, Francie), které obsahovalo 10 % telecího séra (BioSera, Francie) a 100 U ml^{-1} Penicilinu/Streptomycinu (BioSera, Francie). Buňky byly kultivovány při 37 °C v 5 % CO_2 ve zvlhčeném vzduchu. Testování cytotoxicity bylo provedeno podle ISO protokolu (ISO 10993-5). K determinaci buněčné životaschopnosti bylo použité Tetrazolium (MTT cell proliferation assay kit, Duchefa Biochemie, Netherlands). Absorbance byla měřena při 570 nm a referenční vlnová délka byla upravena na 690 nm. Výsledky jsou prezentovány jako podíl buněčné životaschopnosti v procentech v porovnání s buňkami kultivovanými v médiu bez

přítomnosti testovaných vzorků. Morfologie buněk byla studována z kultivačních plátů na inverzním fázově kontrastním mikroskopu Olympus (IX 91).

6.2 Příprava HA-pNIPAM

Nejprve byly naváženy po 0,750 g obě HA a předem rozpuštěny v UPW po dobu 24 h. Vzniklé gelovité roztoky byly rozředěny do celkových objemů 76,25 ml a jejich koncentrace byla $c_w = 9,83$ mg/ml. Tyto roztoky byly použity pro přípravu vzorků HANN a HANV, kde HA je kyselina hyaluronová, N označuje modifikaci pNIPAMem. V a N na konci zkratk pak označuje vysoko/nízkomolekulární HA. Ještě byl připraven kontrolní set vzorků HAN a HAV, které nebyly modifikovány pomocí pNIPAMu, ale procházely všemi operacemi a jsou tak brány jako referenční (N – nízkomolekulární, V – vysokomolekulární). Pro ty byly počáteční navážky $m = 0,1$ g.

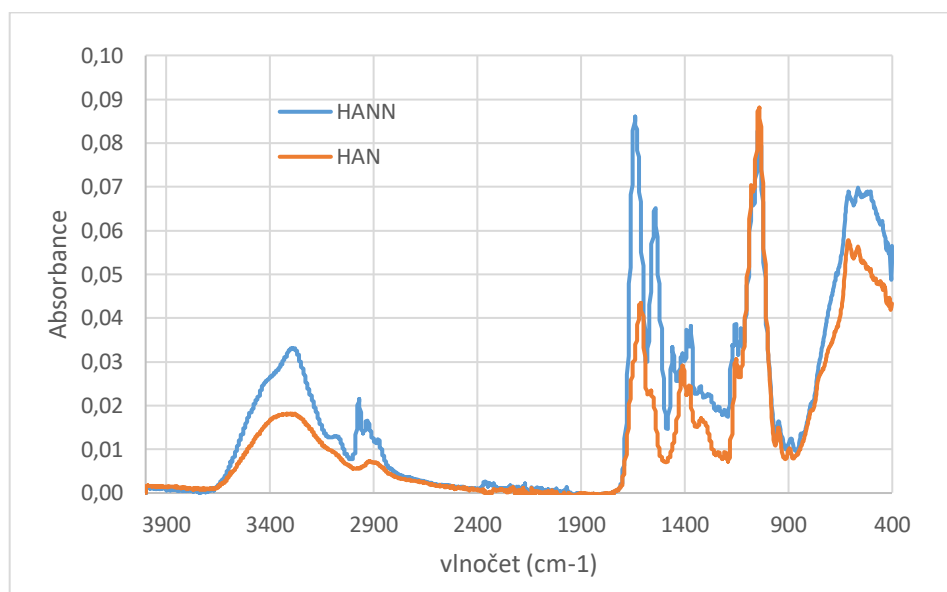
U vzorků pro modifikace bylo nastaveno pH na $6,50 \pm 0,02$. Následně bylo ke každému přidáno 0,750 g DMTMM – hmotnostní poměr HA: pNIPAM byl tedy 1: 1. Roztok se míchal po dobu 7 dní za laboratorní teploty. Následovala dialýza v demineralizované vodě v dialyzační membráně po dobu 5 dní. Zdialyzované vzorky byly přefiltrovány a zmrazeny v etanolové lázni a lyofilizovány. Výtěžky byly: HANN= 1522,0 mg; HANV= 1539,9 mg; HAN= 134,8 mg a HAV= 130,4 mg. Lyofilizované vzorky byly rozpuštěny v UPW o koncentracích pro HANN a HANV: 5 mg/ml; 30 mg/ml; 50 mg/ml a 75 mg/ml. HAV a HAN byly rozpuštěny v koncentracích $c_w = 7,5$ mg/ml.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Charakterizace HA-pNIPAM

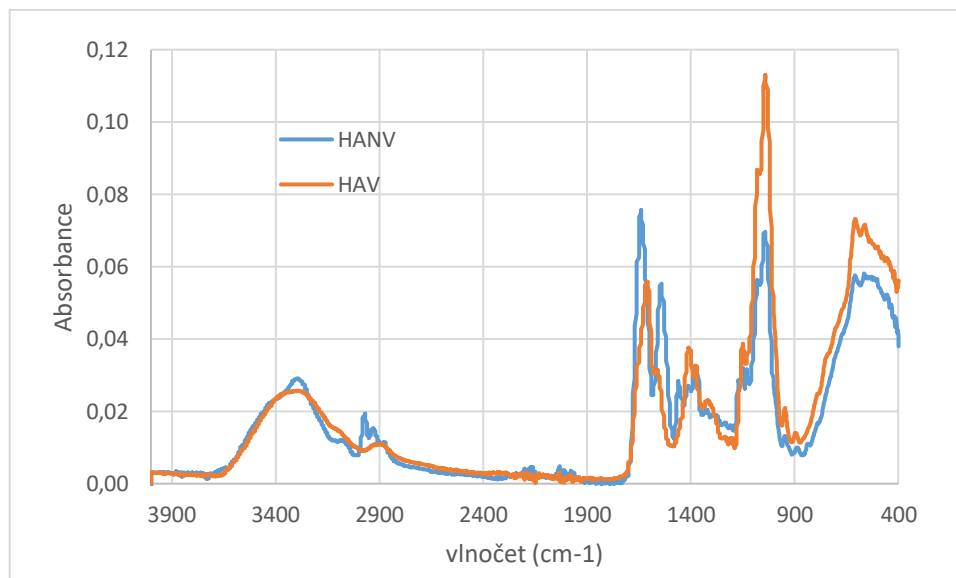
7.1.1 FT-IR

Charakterizace připravených látek byla provedena pomocí FT-IR, tedy infračervené spektroskopie s Fourierovou konformací při použití ATR (Attenuated total reflectance).



Graf 1.: spektrum FT-IR pro vzorky HAN a HANN

Na Grafu č. 1 lze pozorovat nárůst některých píků u vzorku HANN oproti HAN v důsledku reakce s DMTMM a graftingu p-NIPAMu na HA. Lze zde pozorovat nárůst intenzity pásu odpovídající přítomnosti amidových skupin. U hodnoty $\nu = 3330 \text{ cm}^{-1}$, můžeme vidět zvýšení intenzity pásů vzorku HANN v porovnání s HAN, odpovídající tzv. Amid A vibračnímu módu. Další výrazný nárůst lze pozorovat pro pás při $\nu = 1640 \text{ cm}^{-1}$, kde absorbance pro vzorek HAN byla $A=0,043$ a pro HANN $A=0,086$. Jedná se charakteristickou vibraci amidické skupiny, známou jako Amid I. Pro vibrace typu Amid II při hodnotě $\nu = 1500 \text{ cm}^{-1}$ lze taktéž pozorovat značný nárůst, kdy absorbance pro vzorek HAN se rovnala $A = 0,023$, kdežto pro HANN byla $A=0,065$.

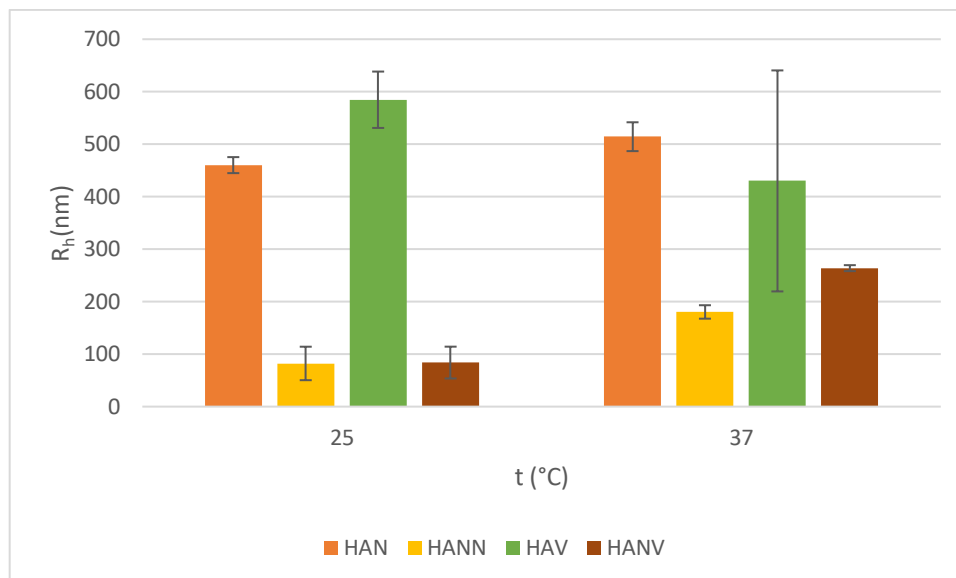


Graf 2.: HAV a HANV

Na grafu č. 2 lze taktéž pozorovat nárůst píků při určitých vibracích amidových skupin jako tomu bylo u vzorku HANN. Taktéž lze tedy vyvodit, že v přítomnosti DMTMM došlo k tvorbě amidické vazby mezi p-NIPAMem na HA. U hodnoty $\nu=3310 \text{ cm}^{-1}$, můžeme pozorovat jen slabé zvýšení intenzity pásů HANV oproti HAN, zdaleka ne takové jako tomu bylo u vzorku HANN. Signál odpovídá opět vibračnímu módu Amid A. Výraznější nárůst lze pozorovat u $\nu=1650 \text{ cm}^{-1}$, kde byla absorbance pro vzorek HAV $A=0,054$ a pro HANV $A=0,075$. Jde o charakteristickou vibraci amidické skupiny Amid I. Další vibraci amidové skupiny, kterou je na grafu možno pozorovat je Amid II, a to při hodnotě $\nu=1540 \text{ cm}^{-1}$ s absorbancí $A=0,030$ pro vzorek HAV, kdežto pro HANV $A=0,053$.

7.1.2 Stanovení velikosti částic

Stanovení velikosti částic bylo provedeno pomocí metody DLS. Touto metodou byla stanovena změna velikosti částic při 25 °C a nad odhadovanou LCST, tedy při 37 °C . Vzorky, které byly o koncentracích $c=0,01 \text{ mg/ml}$. Na grafu č.3 jsou znázorněny hydrodynamické poloměry vzorků HANN a HANV v porovnání s nemodifikovanými vzorky HAN a HAV, a to při obou teplotách.

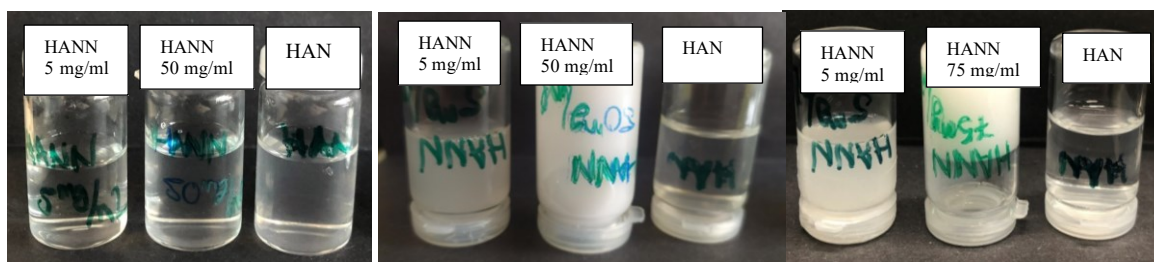


Graf 3.: velikost částic metodou DLS pro HAN, HANN, HAV, HANV

Při teplotě 25 °C, lze pozorovat znatelný rozdíl ve velikosti částic mezi vzorky s pNIPAMem HANN a HANV s nemodifikovanými HAN a HANV. Pro HANN bylo $R_h = 82 \pm 32$ nm a pro HAN $R_h = 460 \pm 15$ nm. Pro vzorek HANV v porovnání s HAN byl rozdíl podobný, kdy pro HANV $R_h = 84 \pm 30$ nm a pro HAV $R_h = 585 \pm 54$ nm. Co se týče měření nad předpokládanou LCST, dochází u HANN ke změně velikosti částic na $R_h = 180 \pm 13$ nm, což značí o nárůst velikostí částic. Taktéž tomu je pro HANV, kdy při 37 °C je $R_h = 263 \pm 6$ nm. U neamidovaného vzorku HAN došlo také ke zvětšení částic, kde $R_h = 514 \pm 27$ nm. Naopak u HAV nelze s ohledem na vysokou odchylku měření jednoznačně určit k jaké změně došlo. Závěrem lze říct, že HA modifikovaná pNIPAMem vytváří výrazně menší částice než HA nemodifikovaná.

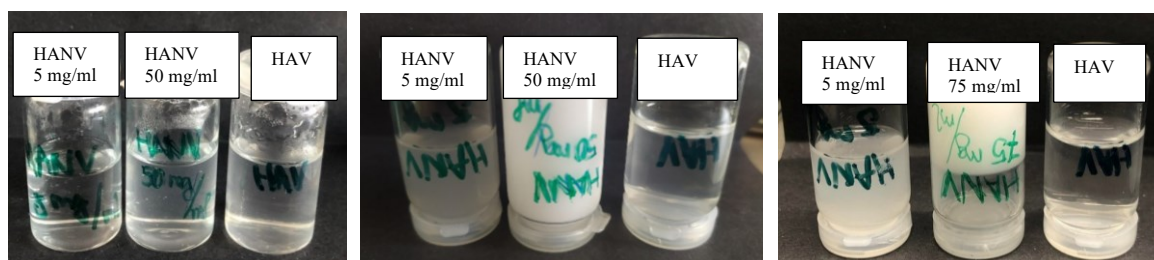
7.1.3 Stanovení kritické gelační koncentrace

Po přípravě roztoků jsem provedla stanovení kritické gelační koncentrace pomocí tzv. inverse tube testu (ITT). Připravené vzorky HANN a HANV o koncentracích 5 mg/ml; 50 mg/ml a 75 mg/ml a HAN a HANV o koncentracích 10 mg/ml byly temperovány na 37 °C po dobu 2 hodin a následně byl proveden inverse tube test jejich otočením po dobu 60 sekund. V případě gelace zůstal tuhý gel na dně vialky a nestekl.



Obrázek 9.: Stanovení kritické gelační koncentrace HANN v porovnání s HAN. Vzorek HANN o $c=5$ mg/ml; 50 mg/ml a HAN při teplotě při 25 °C (vlevo), HANN o $c=5$ mg/ml; 50 mg/ml a HAN při teplotě při 37 °C (uprostřed) a HANN o $c=5$ mg/ml; 75 mg/ml a HAN při teplotě při 37 °C (vpravo)

Na obrázku č.9 jsou fotografie zachycující průběh ITT pro HANN. Po zahřátí nebyly při nejnižší koncentraci, tedy 5 mg/ml, viditelné žádné známky gelace. Bílé zakalení ukazuje pouze na tvorbu koloidní suspenze nad LCST. Naopak při 50 mg/ml již část materiálu zgelovala, avšak nedošlo k tvorbě hydrogelu a gel stále stékal. U vzorku HANN o koncentraci 75 mg/ml však došlo ke gelaci a zesíťovaný hydrogel již držel u dna vialky.

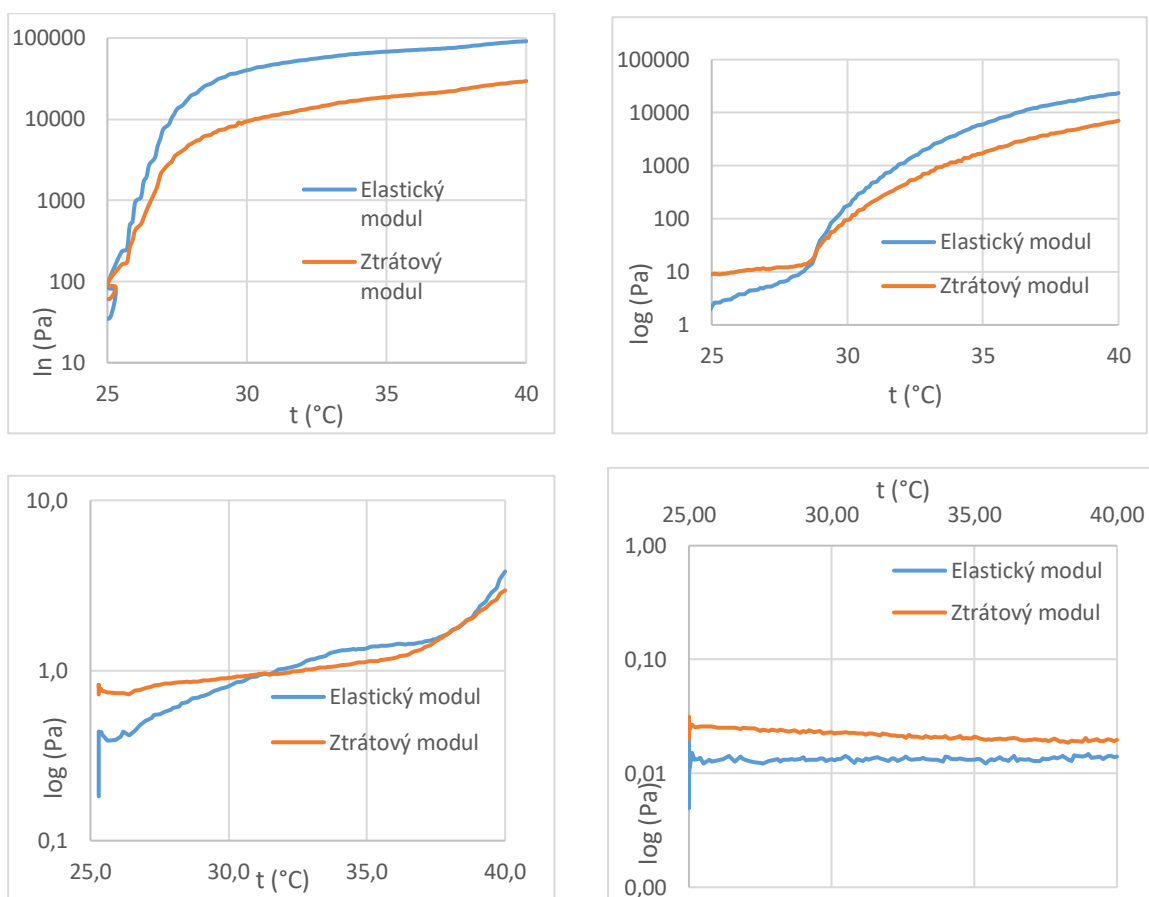


Obrázek 10.: Stanovení kritické gelační koncentrace HANV v porovnání s HAV. Vzorek HANV o $c=5$ mg/ml; 50 mg/ml a HAV při teplotě při 25 °C (vlevo), HANV o $c=5$ mg/ml; 50 mg/ml a HANV při teplotě při 37 °C (uprostřed) a HANV o $c=5$ mg/ml; 75 mg/ml a HAV při teplotě při 37 °C (vpravo)

Na obrázku č.10 je vidět průběh ITT pro vzorky HANV v porovnání s HAV. Zde lze rozpoznat prakticky stejná situace jako u HANN. U 5 ml/ml opět docházelo pouze k bílému zákalu jako tomu bylo u HANN. U 50 mg/ml došlo k částečnému síťování, nedá se však považovat za hydrogel, ale za viskózní kapalinu. U 75 mg/ml došlo stejně jako tomu bylo u vzorku HANN k tvorbě hydrogelů a gel se držel u dna a nestékal.

7.2 Stanovení LCST

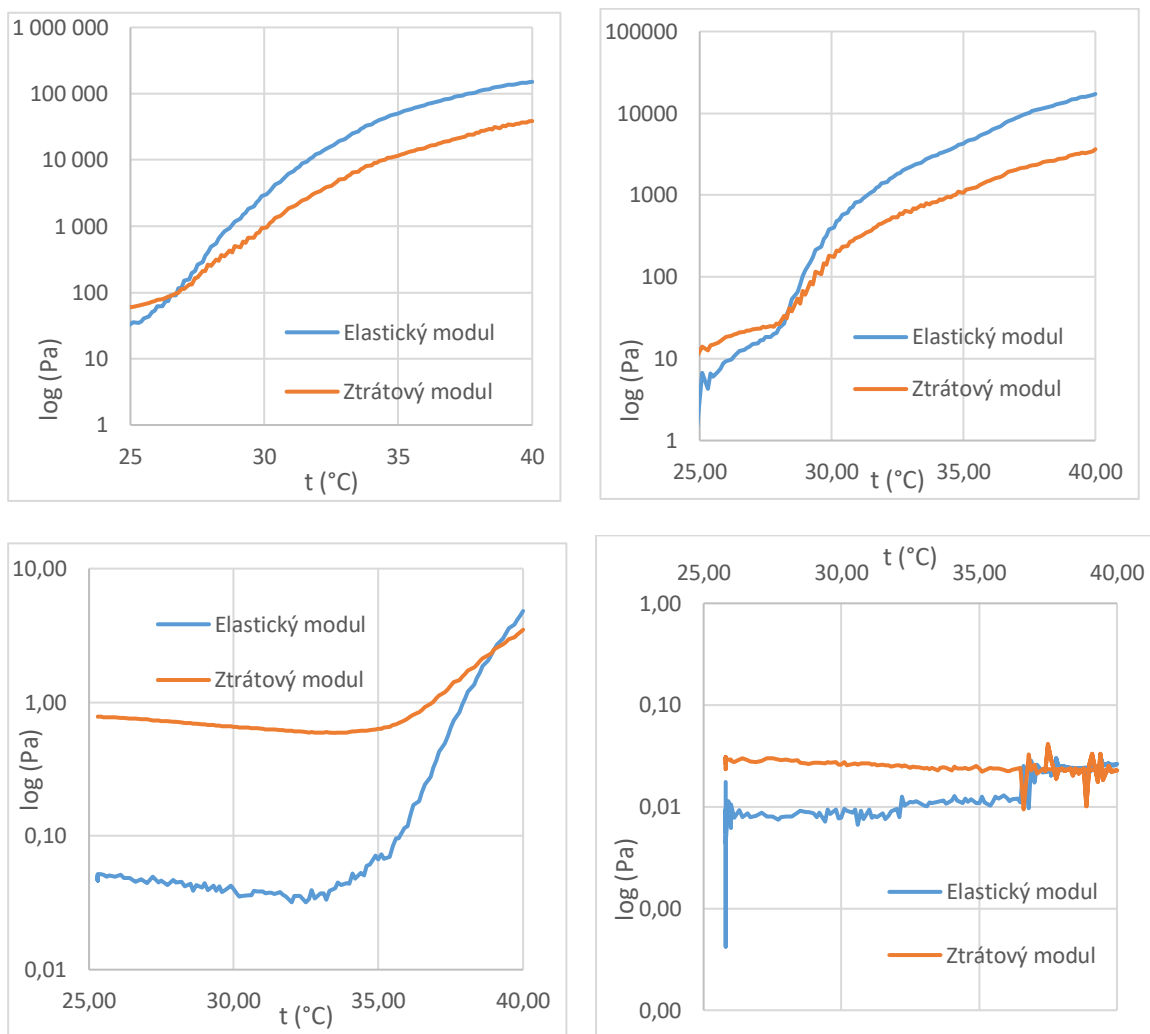
LCST byla stanovena pomocí Rheometru Antoon-Paar MCR 502, kdy byly sledovány změny komplexní viskozity a elastického a ztrátového modulu v závislosti na teplotě pro vzorky HANN a HANV o koncentracích 75 mg/ml; 50 mg/ml; 30 mg/ml a blank vzorky HAN a HAV.



Graf 4.: Závislost elastického a ztrátového modulu na teplotě pro vzorky HANN o $c=75$ mg/ml (vlevo nahoře); 50 mg/ml (vpravo nahoře); 30 mg/ml (vlevo dole) a pro vzorek HAN o $c=10$ mg/ml (vpravo dole).

Na grafu č.4 jsou zobrazeny závislosti elastického a ztrátového modulu jednotlivých koncentrací vzorku HANN a referenčního HAN vzorku. U koncentrace 75 mg/ml je vidět, že nárůst elastického modulu nad ztrátovým, který charakterizuje gelaci, probíhá již na začátku měření okolo teploty 25-26°C. Oproti tomu při koncentraci 50 mg/ml lze tento nárůst elastického modulu nad ztrátovým pozorovat o něco později a to okolo 28°C. To je poměrně značný rozdíl. Pokud je detailněji rozebrán tento nárůst, lze pozorovat, že přibližně do hodnoty 27-28 °C se ztrátový modul skoro nemění, a naopak roste hlavně elastická část, která následně přeroste ztrátovou. S teplotou zvyšující se nad řečený přechod se začnou značně zvedat oba moduly. U koncentrace 30 mg/ml je již průběh jiný. Do zhruba poloviny

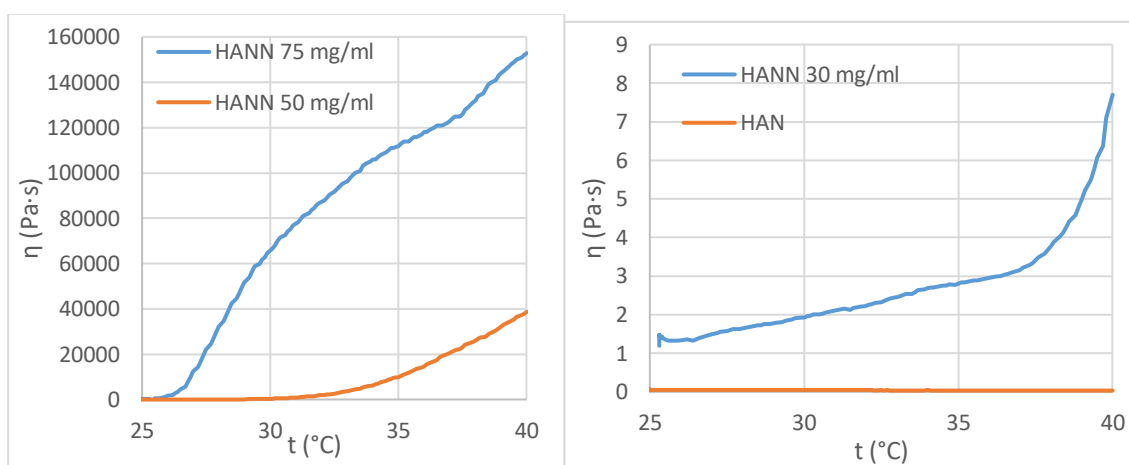
měření nedochází k tomu, že by elastický modul převýšil ztrátový, avšak při teplotě přibližně 38 °C to vypadá, že se křivky opět překrývají. Lze tedy předpokládat, že se jednalo o viskózní kapalinu, a gel se nevytvořil. Co se týče referenčního vzorku HAN, zde se elastický ani ztrátový modul během měření příliš neměnily.



Graf 5.: Závislost elastického a ztrátového modulu na teplotě pro vzorky HANV o $c=75$ mg/ml (vlevo nahoře); 50 mg/ml (vpravo nahoře); 30 mg/ml (vlevo dole) a pro vzorek HAV o $c=10$ mg/ml (vpravo dole).

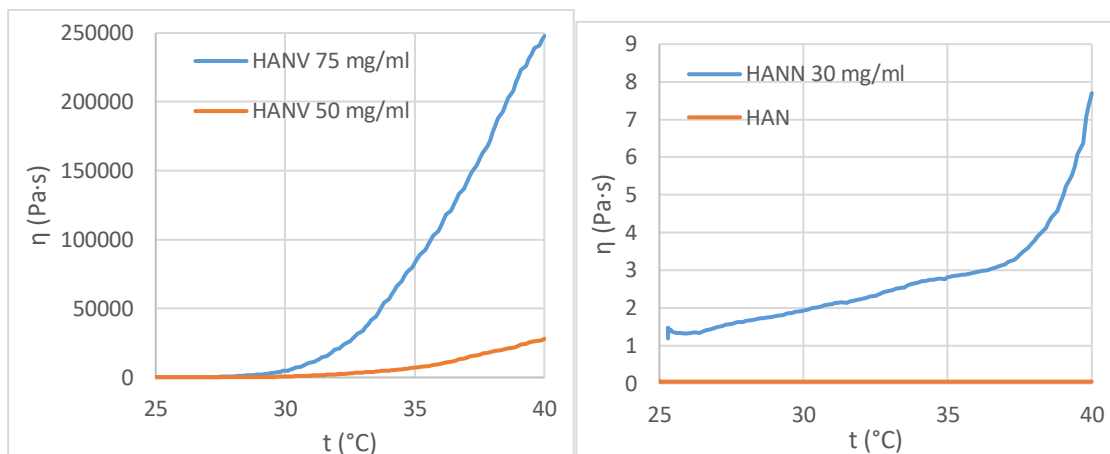
Podobně jako tomu bylo u vzorků HANN, na grafu č.5 jsou zobrazeny elastické a ztrátové moduly jednotlivých koncentrací vzorku HANV a referenčního HAV vzorku. U koncentrace 75 mg/ml je vidno, že nárůst elastického modulu nad ztrátovým podobně jako u HANN probíhal hned na začátku měření, tedy kolem 26°C. Avšak lze zde pozorovat jisté rozdíly v porovnání se vzorkem HANN, zejména u vzorku HANN $c=75$ mg/ml byla křivka závislosti mnohem strmější než u vzorku HANV. Z toho lze usuzovat, že gelace byla rychlejší. U HANV o $c=50$ mg/ml, lze pozorovat podobný průběh jako u vzorku HANN o

stejné koncentraci. Opět s poklesem koncentrace došlo ke zvýšení teploty přechodu elastického modulu vůči ztrátovému, konkrétně v tomto grafu okolo 27-28 °C. Dále pak v porovnání se vzorkem HANN to vypadá, že nad tuto teplotu rostl více elastický modul u vzorku HANN. Co se týče vzorku HANV o $c = 30 \text{ mg/ml}$ zde došlo k rapidnímu nárstu elastického modulu okolo 35 °C, zatímco ztrátový modul se příliš neměnil a rostl mnohem pomaleji než elastický modul. Elastický modul převýšil ztrátový okolo 38-39 °C. S ohledem na nízké hodnoty obou modulů se ovšem jedná velmi řídké síťovaný hydrogel. Srovnávací vzorek HAV, nejevil známky gelace a průběh grafu byl opět jako u HAN zcela jiný než u modifikovaných vzorků.



Graf 6.: Závislost komplexní viskozity pro HANN $c = 75 \text{ mg/ml}$; 50 mg/ml (vlevo) a HANN $c = 30 \text{ mg/ml}$; HAN (vpravo)

Na grafu č.6 je vyobrazena závislost komplexní viskozity na teplotě u jednotlivých vzorků HANN o koncentraci $c = 75 \text{ mg/ml}$; 50 mg/ml ; 30 mg/ml a vzorku HAN v závislosti na teplotě. Lze zde vidět značný nárůst u jednotlivých viskozit se vzrůstající teplotou, u vzorku HANN o 75 mg/ml již nad teplotou 25 °C . LCST byla stanovena proložení lineárních částí křivek pomocí lineární regrese, a z průsečíku těchto křivek byla dopočítaná LCST pro jednotlivé koncentrace. LCST u HANN o 75 mg/ml byla stanovena na $t = 26,4 \text{ °C}$. U koncentrace 50 mg/ml se růstová křivka odlišuje. Mezi 25 a 30 °C prakticky neroste a okolo 32 °C lze pozorovat exponenciální růst. LCST určena na $t = 32,1 \text{ °C}$. U koncentrace HANN o 30 mg/ml je nárůst viskozity mezi 25 °C a 38 °C vcelku nízký a poté viskozita opět začíná strmě narůstat. LCST zde již nešla stanovit, jelikož se u této koncentrace již nejednalo o gelovitou strukturu, ale spíše o viskózní kapalinu. V referenčního vzorku HAN nebyl pozorován žádný růst.

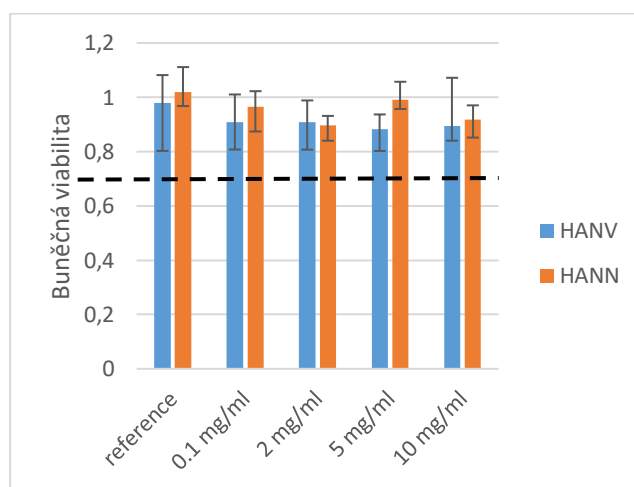


Graf 7.: Komplexní viskozita pro HANV $c=75$ mg/ml; 50 mg/ml (vlevo) a HANV $c=30$ mg/ml; HAV (vpravo)

Na grafu č.7 byla pozorována komplexní viskozita pro HANV o koncentracích $c=75$ mg/ml; 50 mg/ml; 30 mg/ml a referenčním HAV. Byl zde sledován obnovný průběh jako u vzorku HANN. U vzorku 75 mg/ml je však na rozdíl od vzorku HANN pozorován nárůst komplexní viskozity až okolo 27°C. Křivka celkově vypadá spíše exponenciálně a LCST zde byla stanovena na 27,2 °C. U koncentrace 50 mg/ml lze pozorovat podstatné snížení viskozity oproti 75 mg/ml vzorku. I v porovnání s grafem č.6 lze vidět, že viskozita ubyla mnohem vyšší u vzorku HANV než u HANN. Nárůst viskozity lze zde pozorovat okolo 32 °C, konkrétně její LCST byl stanovena $t=30,4$ °C. U 30 mg/ml se opět jednalo o spíše viskóznější kapalinu jako tomu bylo u HANN, gel se nevytvořil, a tedy nebyla vyhodnocena ani hodnota LCST. Takovýto případ nastal i pro referenční vzorek HAV, kde opět nebyl pozorován žádný nárůst viskozity v závislosti na teplotě.

7.3 Cytotoxicita

Vzorky byly rozpuštěny v médiu o koncentraci 10 mg/ml a následně zředěny s médiem na koncentrace 5 mg/ml, 2 mg/ml a 0,1 mg/ml. Buňky byly nasazeny a preinkubovány v 96místném plátu o koncentracích $1 \cdot 10^5$ buněk/ml. Za 24 hodin bylo kultivační médium vyměněno za roztoky se vzorky o koncentracích 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2 mg/ml a 0,1 mg/ml. S těmito roztoky byly buňky kultivovány po dobu 24 h. Po uplynutí této doby byly buňky studovány pomocí mikroskopu a provedl se test MTT.



Graf 8.: Cytotoxicity vzorku HANN a HANV při různých koncentracích (10 mg/ml, 5 mg/ml, 2 mg/ml a 0,1 mg/ml) a reference.

Čárkovaná linie označuje limitní buněčnou životaschopnost podle EN ISO 10993-5; životaschopnost $<0,7$ koresponduje s cytotoxicitou. Jak můžeme vidět na grafech ani jeden ze vzorků nevykazuje cytotoxicitu při ani jedné z koncentrací. Životaschopnost buněk byla vyšší než 70 %.

ZÁVĚR

Tato práce se zabývala přípravou biokompatibilního materiálu, který by byl za laboratorní teploty rozpustný a při zahřátí na 37 °C, by u něj docházelo ke gelaci. Za tímto účelem byla modifikovaná kyselina hyaluronová pomocí p-NIPAMu v přítomnosti DMTMM, a to z toho důvodu, že DMTMM je schopno aktivovat karboxylovou skupinu u kyseliny hyaluronové a následně může být p-NIPAM efektivněji naroubován. Navázání p-NIPAMu bylo u jednotlivých vzorků potvrzeno pomocí infračervené spektroskopie, kdy šel vidět specifický nárůst intenzity píků vibrací amidových skupin.

DLS měření při teplotě 25 °C a při teplotě 37 °C odhalilo, že velikost částic HA s navázaným pNIPAM byla výrazně menší než u nemodifikované HA. Při zvýšení teploty docházelo u obou vzorků k nárůstu velikosti.

Kritická gelační koncentrace byla stanovena pro HANN i HANV na $c = 75$ mg/ml pomocí inverse tube testu. Pomocí reologie byla také sledována gelační křivka a závislost elastického modulu, ztrátového modulu a komplexní viskozity na teplotě. Testované vzorky HANN a HANV byly o koncentracích $c = 30$ mg/ml; 50 mg/ml a 75 mg/ml. Pomocí komplexní viskozity byly rovněž stanoveny teploty LCST vzorků HANN a HANV o koncentracích $c = 75$ mg/ml a $c = 50$ mg/ml. U koncentrace $c = 30$ mg/ml bylo vyhodnoceno, že se již nejedná o hydrogel a nebyla tedy stanovena. LCST pro oba vzorky však nebyly navýšeny oproti čistému p-NIPAMu, ale naopak sníženy. Jak již bylo řečeno v teoretické části, p-NIPAM má poměrně hydrofobní strukturu. Přídavkem hydrofilní kyseliny hyaluronové tedy mělo dojít k teoretickému zvýšení LCST. Došlo však k opaku, a to zřejmě kvůli tomu, že hydrofilita HA je do značné míry spojena s přítomností jejích $-COOH$ skupin. Ty však byly využity k roubování více hydrofobního pNIPAMu, což vedlo ke snížení LCST.

Jako poslední byla testována cytotoxicita pomocí MTT, kdy byly vzorky smíchány s živným médiem o koncentracích $c = 10$ mg/ml; 5 mg/ml; 2 mg/ml; 0,1 mg/ml. Vzorky nevykazovaly žádný náznak cytotoxicity a testy byly prováděly dle EN ISO 10993-5.

Závěrem lze říct, že se podařilo připravit termoresponzivní hydrogely na bázi modifikované k. hyaluronové, které jsou zároveň vhodné pro biomedicínské aplikace.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] CHEN, Qizhi. *Biomaterials: a basic introduction*. B.m.: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2015. ISBN 978-1-4822-2769-7.
- [2] HOLLINGER, Jeffrey O., ed. *An introduction to biomaterials*. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis, 2012. Biomedical engineering series. ISBN 978-1-4398-1256-3.
- [3] KOPEČEK, Jindřich. Hydrogel biomaterials: A smart future? *Biomaterials* [online]. 2007, **28**(34), 5185–5192 [vid. 2021-10-18]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.044
- [4] RAMAKRISHNA, Seeram. *An Introduction To Biomaterials Science And Engineering, An*. B.m.: World Scientific Publishing Co Pte Ltd, nedatováno. ISBN 9811228175.
- [5] YAHIA, LHocine, Naziha CHIRANI, Lukas GRITSCH, Federico Leonardo MOTTA, SOUMIACHIRANI a Silvia FARE. History and Applications of Hydrogels. *Journal of Biomedical Sciences* [online]. 2015, **4**(2) [vid. 2021-12-05]. ISSN ISSN No. 2254- 609X. Dostupné z: doi:10.4172/2254-609X.100013
- [6] LANZALACO, Sonia a Elaine ARMELIN. Poly(N-isopropylacrylamide) and Copolymers: A Review on Recent Progresses in Biomedical Applications. *Gels* [online]. 2017, **3**(4), 36 [vid. 2022-05-10]. ISSN 2310-2861. Dostupné z: doi:10.3390/gels3040036
- [7] GHASEMI-MOBARAKEH, Laleh, Davood KOLAHREEZ, Seeram RAMAKRISHNA a David WILLIAMS. Key terminology in biomaterials and biocompatibility. *Current Opinion in Biomedical Engineering* [online]. 2019, **10**, 45–50 [vid. 2021-10-19]. ISSN 24684511. Dostupné z: doi: 10.1016/j.cobme.2019.02.004
- [8] LATEČKA, Filip. *Development of the method for the control of the molecular weight of oxidized polysaccharides* [online]. 19. květen 2021. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10563/47323>
- [9] NECAS, J., L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER a J. KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinární Medicína* [online]. 2008, **53**(No. 8), 397–411 [vid. 2021-11-15]. ISSN 03758427, 18059392. Dostupné z: doi:10.17221/1930-VETMED
- [10] D'ESTE, Matteo, David EGLIN a Mauro ALINI. A systematic analysis of DMTMM vs EDC/NHS for ligation of amines to Hyaluronan in water. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2014, **108**, 239–246 [vid. 2021-12-15]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi: 10.1016/j.carbpol.2014.02.070
- [11] DE REZENDE, Márcia Uchôa a Gustavo Constantino DE CAMPOS. VISCOSUPPLEMENTATION. *Revista Brasileira de Ortopedia* [online]. 2015, **47**(2), 160–164 [vid. 2021-12-13]. ISSN 2255-4971. Dostupné z: doi:10.1016/S2255-4971(15)30080-X

- [12] COLLINS, Maurice N. a Colin BIRKINSHAW. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2013, **92**(2), 1262–1279 [vid. 2022-04-03]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi: 10.1016/j.carbpol.2012.10.028
- [13] KUNISHIMA, Munetaka, Chiho KAWACHI, Jun MONTA, Keiji TERAŌ, Fumiaki IWASAKI a Shohei TANI. 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl) -4-methylmorpholinium chloride: an efficient condensing agent leading to the formation of amides and esters. *Tetrahedron* [online]. 1999, **55**(46), 13159–13170 [vid. 2021-12-15]. ISSN 00404020. Dostupné z: doi:10.1016/S0040-4020(99)00809-1
- [14] AMUKARIMI, Shukufe, Seeram RAMAKRISHNA a Masoud MOZAFARI. Smart biomaterials—A proposed definition and overview of the field. *Current Opinion in Biomedical Engineering* [online]. 2021, **19**, 100311 [vid. 2021-12-09]. ISSN 24684511. Dostupné z: doi: 10.1016/j.cobme.2021.100311
- [15] HAQ, Muhammad Abdul, Yunlan SU a Dujin WANG. Mechanical properties of PNIPAM based hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2017, **70**, 842–855 [vid. 2021-11-22]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi: 10.1016/j.msec.2016.09.081
- [16] OHYA, Shoji, Yasuhide NAKAYAMA a Takehisa MATSUDA. In vivo evaluation of poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)-grafted gelatin as an in situ-formable scaffold. *Journal of Artificial Organs: The Official Journal of the Japanese Society for Artificial Organs* [online]. 2004, **7**(4), 181–186. ISSN 1434-7229. Dostupné z: doi:10.1007/s10047-004-0265-9
- [17] CHEN, Jyh-Ping, Yann-Lii LEU, Chia-Lang FANG, Chao-Huang CHEN a Jia-You FANG. Thermosensitive Hydrogels Composed of Hyaluronic Acid and Gelatin as Carriers for the Intravesical Administration of Cisplatin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2011, **100**(2), 655–666 [vid. 2021-12-15]. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.22309
- [18] TANAKA, Fumihiko. *Polymer physics: applications to molecular association and thermoreversible gelation*. B.m.: Cambridge University Press, 2011. ISBN 978-0-521-86429-9.
- [19] KLOUDA, Leda a Antonios G. MIKOS. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2008, **68**(1), 34–45 [vid. 2022-03-27]. ISSN 09396411. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ejpb.2007.02.025
- [20] *Injectable PNIPAM/Hyaluronic acid hydrogels containing multipurpose modified particles for cartilage tissue engineering: Synthesis, characterization, drug release and cell culture study – ScienceDirect* [online]. [vid. 2021-12-09]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813019314461>
- [21] CONZATTI, G., F. AYADI, S. CAVALIE, N. CARRÈRE a A. TOURRETTE. Thermosensitive PNIPAM grafted alginate/chitosan PEC. *Applied Surface Science* [online]. 2019, **467–468**, 940–948 [vid. 2021-11-15]. ISSN 01694332. Dostupné z: doi: 10.1016/j.apsusc.2018.10.269

- [22] *KZM_03.pdf* [online]. [vid. 2021-12-04]. Dostupné z: http://ufmi.ft.utb.cz/texty/kzm/KZM_03.pdf
- [23] *Rheology – an overview | ScienceDirect Topics* [online]. [vid. 2021-12-04]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/materials-science/rheology>
- [24] ABRAHAM, J., T. SHARIKA, R.K. MISHRA a S. THOMAS. Rheological characteristics of nanomaterials and nanocomposites. In: *Micro and Nano Fibrillar Composites (MFCs and NFCs) from Polymer Blends* [online]. B.m.: Elsevier, 2017 [vid. 2021-12-04], s. 327–350. ISBN 978-0-08-101991-7. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-101991-7.00014-5
- [25] Basics of rheology:: Anton Paar Wiki. *Anton Paar* [online]. [vid. 2021-12-13]. Dostupné z: <https://wiki.anton-paar.com/cz-cs/zaklady-reologie/>
- [26] HEGROVÁ, Michaela. Reologické vlastnosti stavebních pojiv v čerstvém stavu [online]. nedatováno [vid. 2022-05-10]. Dostupné z: <http://dspace.vutbr.cz/handle/11012/62747>
- [27] *Guide to FT-IR Spectroscopy | Bruker* [online]. [vid. 2021-12-05]. Dostupné z: <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/infrared-and-raman/ft-ir-routine-spectrometer/what-is-ft-ir-spectroscopy.html>
- [28] KVÍTEK, Libor. *Základy koloidní chemie*. 1. vyd. B.m.: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. Skripta. ISBN 978-80-244-1669-4.
- [29] ŠEVČÍKOVÁ, P., V. KAŠPÁRKOVÁ, J. KREJČÍ a P. VLTAVSKÁ. Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chemické listy* [online]. 2014, **108**(5), 479–482 [vid. 2021-12-04]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/506>
- [30] The principles of dynamic light scattering: Anton Paar Wiki. *Anton Paar* [online]. [vid. 2022-03-27]. Dostupné z: <https://wiki.anton-paar.com/cz-cs/principy-dynamickeho-rozptylu-svetla/>
- [31] *Cytotoxicity Assays – CZ* [online]. [vid. 2022-04-03]. Dostupné z: [//www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/cell-analysis/cell-viability-and-regulation/cytotoxicity.html](http://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/cell-analysis/cell-viability-and-regulation/cytotoxicity.html)
- [32] GERLIER, Denis a Nicole THOMASSET. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of Immunological Methods* [online]. 1986, **94**(1–2), 57–63 [vid. 2022-04-03]. ISSN 00221759. Dostupné z: doi:10.1016/0022-1759(86)90215-2
- [34] MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* [online]. 1983, **65**(1–2), 55–63 [vid. 2022-04-03]. ISSN 00221759. Dostupné z: doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HANN	„Nízkomolekulární“ kyselina hyaluronová modifikovaná p-NIPAMem
HAN	„Nízkomolekulární“ kyselina hyaluronová bez modifikací
HANV	„Vysokomolekulární“ kyselina hyaluronová modifikovaná p-NIPAMem
HAV	„Vysokomolekulární“ kyselina hyaluronová bez modifikací
p-NIPAM	Poly (N-isopropylakrylamid) terminovaný – NH ₂ skupinou
HA	Kyselina hyaluronová
DMTMM	4-(4,6- dimethoxy-1,3,5- triazin- 2- yl) -4- methyl – morfolinium
LCST	Dolní kritická rozpouštěcí teplota
CGC	Kritická gelační koncentrace
FT-IR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou konformací
MWCO	Molecular weight cut off
DLS	Dynamický rozptyl světla
MTT	Kolorimetrický test pro hodnocení buněčné metabolické aktivity
NH ₂	Aminová skupina
HCl	Kyselina chlorovodíková
NaOH	Hydroxid sodný
ATR	Attenuated Total Reflectance
NIH/3T3	Linie fibroblastů z myších embryí
UPW	Ultra pure water
A	Absorbance
R _h	Hydrodynamický průměr
ITT	Inverse Tube Test

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1.: Rozdělení typů hydrogelů podle různých hledisek	11
Obrázek 2.: Kyselina hyaluronová.....	12
Obrázek 3.: Struktura DMTMM	13
Obrázek 4.: Obecné schéma reakce HA a DMTMM	13
Obrázek 5.: Sol-gel přechod termoresponzivního polymeru při bodu zákalu	15
Obrázek 6.: pNIPAM	16
Obrázek 7.: Roubovaný p-NIPAM na HA	17
Obrázek 8.: Nukleofilní substituce DMTMM a HA a následná reakce s pNIPAMem.....	19
Obrázek 9.: Stanovení kritické gelační koncentrace HANN v porovnání s HAN. Vzorek HANN o $c=5$ mg/ml; 50 mg/ml a HAN při teplotě při 25 °C (vlevo), HANN o $c=5$ mg/ml; 50 mg/ml a HAN při teplotě při 37 °C (uprostřed) a HANN o $c=5$ mg/ml; 75 mg/ml a HAN při teplotě při 37 °C (vpravo).....	32
Obrázek 10.: Stanovení kritické gelační koncentrace HANV v porovnání s HAV. Vzorek HANV o $c=5$ mg/ml; 50 mg/ml a HAV při teplotě při 25 °C (vlevo), HANV o $c=5$ mg/ml; 50 mg/ml a HANV při teplotě při 37 °C (uprostřed) a HANV o $c=5$ mg/ml; 75 mg/ml a HAV při teplotě při 37 °C (vpravo).....	32

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1.: spektrum FT-IR pro vzorky HAN a HANN	29
Graf 2.: HAV a HANV	30
Graf 3.: velikost částic metodou DLS pro HAN, HANN, HAV, HANV.....	31
Graf 4.: Závislost elastického a ztrátového modulu na teplotě pro vzorky HANN o $c=75$ mg/ml (vlevo nahoře); 50 mg/ml (vpravo nahoře); 30 mg/ml (vlevo dole) a pro vzorek HAN o $c=10$ mg/ml (vpravo dole).	33
Graf 5.: Závislost elastického a ztrátového modulu na teplotě pro vzorky HANV o $c=75$ mg/ml (vlevo nahoře); 50 mg/ml (vpravo nahoře); 30 mg/ml (vlevo dole) a pro vzorek HAV o $c=10$ mg/ml (vpravo dole).	34
Graf 6.: Závislost komplexní viskozity pro HANN $c= 75$ mg/ml; 50 mg/ml (vlevo) a HANN $c=30$ mg/ml; HAN (vpravo)	35
Graf 7.: Komplexní viskozita pro HANV $c= 75$ mg/ml; 50 mg/ml (vlevo) a HANV $c=30$ mg/ml; HAV (vpravo).....	36
Graf 8.: Cytotoxicity vzorku HANN a HANV při různých koncentracích (10 mg/ml, 5 mg/ml, 2 mg/ml a 0,1 mg/ml) a reference.	37

SEZNAM ROVNIC

Rovnice 1.: II. termodynamický zákon	15
Rovnice 2.: Vztah mezi komplexní viskozitou, komplexním modulem a úhlovou rychlostí	20
Rovnice 3.: vztah mezi komplexní, dynamickou a ztrátovou viskozitou.....	20
Rovnice 4.: Komplexní modul.....	20
Rovnice 5.: Vztah mezi ztrátovým faktorem, modulem a elastickým modulem.....	21
Rovnice 6.: Lambert – Beerův zákon.....	22
Rovnice 7.: Stokes-Einsteinova rovnice.....	23

