

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Studium procesu botnání polymerních filmů z nerozpustných derivátů
hyaluronanu

Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Pavína Konopáčová**
Osobní číslo: **C18064**
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**
Téma práce: **Studium procesu bobtnání polymerních filmů z nerozpustných derivátů hyaluronanu**
Zadávací katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Zásady pro vypracování

1. Provedte literární rešerši na téma měření bobtnavosti polysacharidových materiálů, s důrazem na formu filmu a použití hyaluronanu (HA).
2. Provedte měření kinetiky bobtnání lauroyl HA filmů v klasickém uspořádání experimentu s nadbytkem rozpouštědla.
3. Provedte měření kontaktní bobtnavosti lauroyl HA filmů, kdy bude film přiložen na povrch s definovanou vlhkostí (hydrogel). Pokuste se v návrhu experimentu co nejvíce přiblížit klinické situaci, kdy je film přiložen na tkáň.
4. Diskutujte získané výsledky s důrazem na vliv stupně substituce hyaluronanu.
5. Na základě literatury a vlastních výsledků navrhnete optimální postup pro testování bobtnavosti polymerních filmů z derivátů hyaluronanu.
6. Výsledky zpracujte formou závěrečné zprávy.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:
Veškerá dostupná odborná literatura.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Alena Komersová, Ph.D.**
Katedra fyzikální chemie
Školitel bakalářské práce: **Ing. Josef Chmelař, Ph.D.**
Contipro a.s.
Datum zadání bakalářské práce: **26. února 2021**
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Pavλίna Konopáčová

Poděkování:

Mé poděkování patří firmě Contipro a.s. za možnost pracovat na své bakalářské práci v moderní laboratoři pod vedením odborníků. Děkuji zejména Ing. Josefu Chmelaři, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval. Dále bych chtěla poděkovat doc. Ing. Aleně Komersové, Ph.D. za věcné připomínky a vstřícnost.

ANOTACE

Polymerní filmy založené na polysacharidu hyaluronanu (HA) jsou zajímavými materiály s potenciálem pro využití v medicíně. Pro přípravu filmů jsou využívány zejména ve vodě nerozpustné deriváty HA, kdy je možné volbou stupně modifikace vhodně nastavit biodegradabilitu filmu. Cílem této práce je experimentální studium procesu bobtnání filmů z lauroyl derivátů HA. Bobtnání je velmi významné z pohledu klinických aplikací, neboť filmy budou ve styku s tkáněmi vždy nabírat vlhkost. V práci je využito jak standardní měření v nadbytku tekutiny (pufru), tak inovativní měření „kontaktní“ bobtnavosti, součástí práce je též optimalizace samotného experimentu. Závěrem jsou získaná data kriticky diskutována a je navržen optimální postup pro měření bobtnavosti filmů z derivátů HA.

KLÍČOVÁ SLOVA

kyselina hyaluronová, hyaluronan, bobtnavost, hydrogel, pufr

TITLE

Study of swelling of polymeric films from water insoluble derivatives of hyaluronan

ANNOTATION

Polymer films based on the polysaccharide hyaluronan (HA) are interesting materials with potential for use in medicine. Mainly water-insoluble HA derivatives are used for the preparation of films. The biodegradability of the film can be set by a suitable choice of the degree of modification of the HA derivative. This work aims to experimentally study the process of swelling of films prepared from lauroyl derivatives of HA. Swelling is very important from the point of view of clinical applications because the films will always absorb moisture when in contact with tissues. This work will utilize both standard measurements in excess fluid (buffer), as well as innovative measurements of "contact" swelling, where the optimization of the experiment itself will also be included. Finally, the obtained data will be critically discussed and an optimal procedure for measuring the swelling of films from HA derivatives will be proposed.

KEYWORDS

hyaluronic acid, hyaluronan, swelling, hydrogel, buffer

Obsah

ÚVOD.....	11
1 TEORETICKÁ ČÁST	12
1.1 Hyaluronan a jeho deriváty	12
1.2 Polymerní filmy z hyaluronanu a jeho derivátů.....	17
1.2.1 Charakteristika tenkých filmů z lauroyl hyaluronanu.....	19
1.3 Botnavost polymerních filmů.....	19
1.4 Hydrogely jako modely tkání.....	21
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
2.1 Vzorky.....	23
2.2 Příprava filmů.....	24
2.2.1 Příprava tenkých filmů z lauroyl hyaluronanu	24
2.3 Příprava gelu a vývoj metody	24
2.3.1 Optimalizace složení gelu.....	24
2.3.2 Optimalizovaný postup přípravy gelu.....	25
2.4 Měření botnavosti.....	25
2.4.1 Příprava 0,1 M fosfátového pufru.....	25
2.4.2 Příprava ostatních pufrů.....	26
2.4.3 Měření botnavosti v nadbytku pufru.....	26
2.4.4 Kontaktní bobtnavost.....	27
3 VÝSLEDKY A DISKUSE	28
3.1 Dynamika botnání v nadbytku pufru.....	28
3.2 Vliv pH na botnavost v nadbytku pufru	31
3.3 Kontaktní botnavost	33
4 ZÁVĚR	36
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	37

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Chemická struktura kyseliny hyaluronové [4].....	12
Obrázek 2: Konjugované a zesíťované polymery, L-ligand [4].....	15
Obrázek 3: Transparentní obvaz na rány, Hyalosafe [20].....	18
Obrázek 4: Strukturální vzorec hyaluronanu esterifikovaného na primárním hydroxyly glukosaminu [16]	23

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Použité vzorky lauroyl HA	23
Tabulka 2: Dynamika bobtnavosti lauroyl HA filmů s různým DS. Zaškrtnutá místa v tabulce značí časy, po kterých byl vzorek již neměřitelný. Prázdná místa v tabulce znamenají, že vzorek v tomto čase měřený nebyl.	29

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Dynamika bobtnavosti filmů o různém DS (viz. čísla v legendě) v nadbytku pufru	30
Graf 2: Bobtnavost lauroyl HA filmů v nadbytku pufru po 1 h a 24 h.....	31
Graf 3: Dynamika bobtnavosti lauroyl HA filmů v nadbytku pufru o různém pH	32
Graf 4: Bobtnavost v nadbytku pufru po 1 a 24 h pro různá pH	33
Graf 5: Dynamika kontaktní bobtnavosti lauroyl HA filmů o různém DS (viz. číselné hodnoty v legendě).....	34
Graf 6: Kontaktní bobtnavost lauroyl HA filmů po 1 h, 6 h, 24 h.....	35

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

KH	kyselina hyaluronová
HA	hyaluronan
CD44	transmembránový glykoprotein (Cluster of Differentiation 44)
PBS	fosfátový pufr
hm	hmotnostní
SR	stupeň bobtnavosti (swelling ratio)
DS	stupeň substituce (degree of substitution)
pH	vodíkový exponent (potential of hydrogen)
pKa	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
PVA	polyvinylalkohol
DMSO	dimethylsulfoxid
HA-ADH	derivát adipového dihydrazinu
PEG-diald	poly(ethylenglykol)propiondialdehyd
BDDE	butandiol diglycidylether

ÚVOD

Polymerní tenké filmy jsou v současnosti velmi studovanou oblastí. Mají široké možnosti aplikace například v nanotechnologickém, mikroelektronickém, biotechnologickém a medicíně. Práce je zaměřena na polymerní filmy z hyaluronanu (HA) a jeho derivátů. Tyto filmy mají velký potenciál jako materiál využívaný v medicíně. Využívají se například jako nosiče léčiv, kryty ran a materiály pro prevenci vzniku pooperačních adhezí. Práce je zaměřena konkrétně na experimentální studium procesu botnání tenkých filmů z lauroyl derivátu HA, které jsou ve vodě nerozpustné. Volbou stupně modifikace lze nastavit vhodnou biodegradabilitu filmu. Botnavost HA filmů je velmi důležitá z pohledu klinických aplikací, neboť filmy vždy nabírají v kontaktu s tkáněmi vlhkost. Tato práce má teoretickou i praktickou část. Informace pro teoretickou část práce byly získány zejména z odborných časopisů, studií, monografií, které byly vyhledány v internetových databázích. Dalším zdrojem byly informace poskytnuté firmou Contipro a.s., kde byla také provedena celá praktická část této práce.

V teoretické části jsou shromážděny informace týkající se HA. Popsána je jeho struktura, výroba, základní vlastnosti, modifikace a použití. Dále se práce zaměřuje na tenké filmy připravené z HA a jeho derivátů. Popsány jsou možné způsoby přípravy těchto filmů a jejich využití v medicíně. V další části jsou probrány různé možnosti měření botnavosti tenkých polymerních filmů. Konec teoretické části je věnován hydrogelům. Hledány byly různé typy hydrogelů používané jako modely měkkých tkání člověka. Díky získaným informacím byl připraven hydrogel, napodobující některé vlastnosti měkké tkáně, potřebný pro praktickou část práce.

Praktická část práce se zaměřuje na studium procesu botnání tenkých HA filmů. Použita byla standardní metoda měření v nadbytku pufru a také nová inovativní metoda botnání filmu na povrchu gelu neboli metoda kontaktní botnavosti. Stručně je zde popsána příprava tenkých filmů z HA a jejich charakterizace. Dále se práce věnuje přípravě a optimalizaci složení hydrogelu pro kontaktní měření. Následně je optimalizována i celá metoda měření kontaktní botnavosti. Popsán je i použitý postup měření botnavosti v nadbytku pufru a pro tuto metodu je také objasněn způsob přípravy používaných pufků.

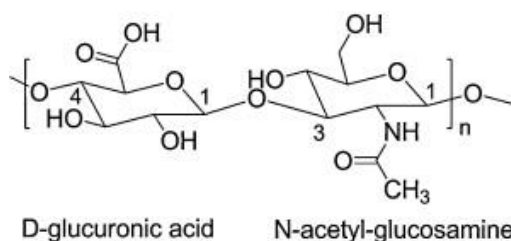
Cílem této práce je najít optimální způsob měření botnavosti tenkých filmů z HA derivátů, využívaných pro lékařské aplikace.

1 TEORETICKÁ ČÁST

Teoretická část této práce se zabývá základní charakteristikou hyaluronanu (HA) s podrobnějším náhledem na jeho využití jako tenkého polymerního filmu. Dále je práce zaměřena na různé způsoby měření botnavosti tenkých polymerních filmů. Na konci teoretické části je kapitola věnovaná přípravám různých typů hydrogelů. Tato kapitola je důležitým zdrojem informací pro výběr vhodného hydrogelu použitého v praktické části této práce.

1.1 Hyaluronan a jeho deriváty

Kyselina hyaluronová (KH) je lineární nevětvený polysacharid, konkrétně heteropolysacharid patřící do skupiny glykosaminoglykanů. Skládá se z opakujících se jednotek β -1,3-*N*-acetylglukosaminu a kyseliny β -1,4-*D*-glukuronové, navzájem spojených glykosidickou vazbou [1]. KH je značně kyselá s hodnotou pKa okolo 3 [2], proto se při pH krevní plasmy vyskytuje ve formě aniontu, nejčastěji jako sodná nebo jiná sůl. Upřednostňuje se tedy označení hyaluronan (HA) [3].



Obrázek 1: Chemická struktura kyseliny hyaluronové (převzato z [4])

HA je v těle syntetizován v cytoplazmatické membráně pomocí enzymu hyaluronansyntázy a poskytuje dlouhé lineární polymery. V savčím organismu nalezneme tři různé izoenzymy hyaluronanesterázy, přičemž každý má dvě různé vazebné domény pro uridindofosfátové sacharidy. Tyto izoenzymy jsou si strukturně velmi podobné, avšak liší se schopností syntetizovat HA o různé molekulové hmotnosti. Tvorba polymeru HA probíhá na vnitřní straně cytoplazmatické membrány, kde hyaluronansyntáza střídavě přidává monomer uridindifosfát-glukuronové kyseliny a uridindifosfát-*N*-acetylglukosaminu na redukující konec rostoucího řetězce. S postupným zvětšováním řetězce se neredukující konec sacharidového řetězce dostává přes póry v cytoplazmatické membráně do mimobuněčného systému [5]. Naopak pro člověka důležitou biodegradaci obstarává enzym hyaluronidáza. Ten se vyskytuje v těle ve více izomerních formách, které si mohou navzájem konkurovat. Štěpení HA řetězce těmito enzymy

začíná již na cytoplazmatické membráně. Následná degradace začíná navázáním HA na transmembránový protein, receptor CD44 (Cluster of Differentiation 44) [6]. Pomocí jednoho z izomerů hyaluronidázy se HA štěpí na středně velké fragmenty. Ty dále vstupují do endozomů a lysozomů, kde jsou dále rozkládány lysozomální hyaluronidázou na menší fragmenty [7].

HA se primárně vyskytuje v mezibuněčné a pericelulární hmotě, nachází se tedy v pojivových, epiteliálních i nervových tkáních. Zjištěno bylo i velké množství HA v synoviální tekutině, kůži a v očním sklivci, ze kterého se mimo jiné v minulosti získávala. Dalšími biologickými materiály, ze kterých byl HA izolován byly kohoutí hřebínky, žraločí kůže nebo pupeční šňůry. Tyto způsoby získávání byly však značně náročné, neetické a již se příliš nevyužívají. V současnosti se využívá biotechnologické přípravy s využitím bakterií rodu *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus equi* nebo *Streptococcus pneumoniae*. HA se získává z buněčných stěn bakterií, které jsou v procesu zbaveny všech patogenů. Biotechnologická příprava s využitím výše uvedených bakterií vykazuje velké výtěžky, produkt o vysoké čistotě a HA o molekulové hmotnosti přibližně $(1,8-2) \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ [1, 8].

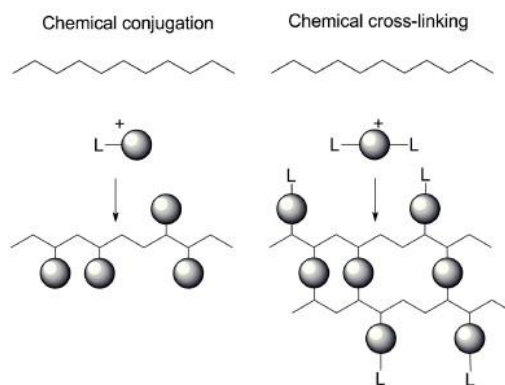
Vlastnosti HA se liší v závislosti na jeho molekulové hmotnosti, která může dosahovat až $10 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$, přičemž nejčastěji se v organismu vyskytuje molekulová hmotnost mezi $(2-5) \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$. HA s velkou molekulovou hmotností má anti-angiogenní a protizánětlivé účinky. Slouží hlavně jako strukturální jednotka, plní tedy výplňovou funkci a udržuje tvar tkání. Plní také úlohu lubrikantu a humektantu. V extracelulárním prostoru plní hlavně funkci organizační, vytváří v něm nadmolekulární útvary a má vliv na organizaci dalších složek, jako kolagenu a dalších glykoproteinů. Působí také jako signální molekula interakcí s povrchovými receptory buněk a jako molekula regulující buněčnou proliferaci, migraci a diferenciaci. Je nezbytný pro správný embryonální vývoj. HA s nízkou molekulovou hmotností, často se uvádí pod $0,5 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$, se vyznačuje opačnou biologickou aktivitou, má tedy prozánětlivé účinky, působí jako stimulant imunity a angiogeneze. Byla prokázána nepřímá úměrnost mezi molekulovou hmotností a mírou biologické aktivity [9].

Molekuly HA patří díky velkému počtu hydroxylových skupin v řetězci k jedněm z nejvíce hygroskopických přírodních látek, dokážou nabobtnat v objemu až 1000krát, díky tomu má HA i skvělé hydratační vlastnosti a dobře se rozpouští ve vodě. Důležitou biologickou funkcí je udržování viskoelastické pojivové tkáně, jako je kloubní či oční sklovitá tekutina [3]. Mimo

jiné mohou molekuly HA také působit jako síto omezující pohyb patogenů nebo bránit ukládání kolagenu a tím usnadňovat hojení [10].

HA je biodegradabilní, netoxická a biokompatibilní látka široce využívaná v medicíně. Mezi nejdůležitější oblasti využití HA patří oftalmologie, používá se například jako součást nitrooční injekce aplikované během operace oka k udržení tvaru přední komory nebo jako přísada do očních kapek a roztoků. Přípravek Healon® (Abbott Medical Optics, Abbott Park, Illinois) je 1 % hyaluronát sodný, který byl vyvinut, aby nahradil oční sklivec a také chránil rohovku před mechanickým poškozením. Využívá se například při operaci šedého zákalu. Tento přípravek je možné využít i při léčbě suchého oka, jako umělé slzy [11]. Díky svým antiadhezivním vlastnostem jsou deriváty HA účinné také při zvyšování krevní kompatibility kardiovaskulárních implantátů, jako jsou štěpy a stenty [3]. Značné využití nachází přípravky s obsahem HA také v oblasti ortopedie. Při léčbě lokální osteoartrity se využívá při viskosuplementaci. Tato metoda využívá injekčního podání HA do kloubu, kde působí lubrikačně, podporuje tvorbu endogenního HA a tlumí mechanické nárazy [8]. Existuje také řada již komerčně dostupných přípravků s obsahem HA pro léčbu ran. Například přípravkem pro léčbu hlubokých a chronických ran i diabetických defektů je Hyiodine (Contipro a.s., Česká republika). Tento přípravek je založen na kombinaci HA a jódu. HA podporuje hojení ran a jód v přípravku slouží jako dezinfekční prostředek [12]. Díky své schopnosti vázat na sebe vodu je HA také součástí řady kosmetických přípravků (vyplnění obličejových vrásek, reparační jizev).

V řadě aplikací je od zdravotnického prostředku vyžadována určitá mechanická odolnost či zachování struktury ve vlhkém prostředí. Pro tyto aplikace není nativní HA vhodný vzhledem k jeho vysoké rozpustnosti. Pro odstranění tohoto problému se využívají různé chemické modifikace HA. Rozpustnost, rychlost degradace a další fyzikální vlastnosti dokážeme ovlivnit výběrem substituentu, stupněm substituce, umístěním ligandu na řetězci a typem chemické vazby, která ligand připojuje na HA. Pro chemické modifikace se využívají především molekuly s nižší a střední molekulovou hmotností, které mají nižší viskozitu a lze u nich lépe regulovat rovnoměrnost modifikace v délce řetězce. Chemické modifikace HA probíhají primárně na hydroxylové a karboxylové skupině, sekundárně na acetamidové skupině. Nejlépe biologicky odbouratelná je vazba esterová, zejména ta, kde je esterifikována primární hydroxylová skupina. Esterifikací karboxylové skupiny vznikají pomaleji odbouratelné estery. Stabilnější vazbou je vazba karbamátová a téměř biologicky neodbouratelná je vazba éterová [9]. Modifikace probíhají dvěma způsoby, konjugací a síťováním.



Obrázek 2: Konjugované a zesíťované polymery, L-ligand [4]

Chemická konjugace spočívá v navázání látky přes funkční skupinu pouze k jednomu řetězci HA. Konjugace může probíhat různými reakcemi například sulfonací, karboimidu zprostředkovanou modifikací a esterifikací. Sulfonací vznikají např. deriváty vhodné pro kardiovaskulární aplikace, strukturně i chemicky velmi podobné heparinu [10]. Amidací karboxylové skupiny karboimidu vznikají deriváty biologicky prakticky neodbouratelné a v organismu velmi stabilní. Dalším příkladem chemické konjugace s cílem zmírnit vysokou rozpustnost HA je navázání hydrofobních acylových řetězců na hydroxylovou skupinu. Tyto řetězce se na molekulu zavedou esterifikací vyššími mastnými kyselinami, za vzniku například lauroyl nebo palmitoyl derivátu [13, 14]. Esterifikace je provedena reakcí HA s acylhalogenidy nebo anhydridy mastných kyselin [9]. Snížená rozpustnost či nerozpustnost vzniklého derivátu HA je dána vzájemnými ne vazebnými interakcemi nepolárních (hydrofobních) acylových řetězců (tomuto efektu se říká fyzikální nebo také nekovalentní síťování) [15]. Se zvyšujícím se stupněm substituce (DS) dochází k silnějším hydrofobním interakcím, a tedy i ke snížení rozpustnosti derivátu, případně omezení bobtnání nerozpustných materiálů [13]. Na řetězec lze také navázat biologicky aktivní látky, toho využíváme například při cílené dopravě léčiv [9].

Kovalentním síťováním lineárního řetězce HA vznikají trojrozměrné struktury, hydrogely. Hydrogely se využívají například ve tkáňovém inženýrství jako scaffoldy, nosiče léčiv nebo kryty ran. Existují dva druhy kovalentního síťování. Síťování, při kterém síťovací činidlo reaguje s funkčními skupinami na řetězci HA, je přímé síťování. Druhou variantou je síťování derivátů HA. Síťování se provádí přímými chemickými metodami, enzymaticky nebo fotochemicky. Příkladem chemické metody je síťování za použití butandiol diglycidyletheru (BDDE) [4], karboimidu nebo glutaraldehydu [16]. Fotochemicky jsou síťovány například metakrylátové deriváty HA získané reakcí HA s anhydridem metakrylátu [17]. Síťovány byly radikálovou polymerací, po vystavení ultrafialovému záření za přítomnosti fotoiniciátoru.

Enzymatické síťování lze indukovat pomocí enzymu avidin-peroxodiáza, takto se síťuje například tyraminem modifikovaný HA [4]. Ze získaných derivátů HA lze připravit hydrogely, micely, tenké filmy, nanovlákná, staplová vlákna, mikrovlákná a další [9, 4].

Deriváty HA se uplatňují zejména ve zdravotnictví. Jedno z využití je v oblasti prevence vzniku pooperačních adhezí (srůstů). Pooperační adheze jsou velmi častou komplikací zvláště po chirurgických zákrocích v břišní, nitroděložní, perikardiální a šlachové oblasti. Tato komplikace může vést až k neplodnosti, neprůchodnost střev, nebo ke zvýšenému riziku úmrtí po srdeční operaci. Adheze jsou iniciovány narušením epitelální nebo mezoteliální vrstvy tkáně a tvoří se mezi 3. a 5. dnem po chirurgickém zákroku. Mezi hlavní příčiny vzniku adhezí patří nedostatečná fibrinolýza, tj. nedostatečné rozpouštění fibrinových vláken vzniklých v reakci na poranění (operační zákrok). Pokud se fibrinová vlákna včas nerozpustí, začnou se tvořit „mosty“ mezi sousedními tkáněmi a vzniká adheze. Tvorbu adhezí ovlivňují různé biologické procesy probíhající během hojení, například koagulace, zánět, či fibrinolýza. Pro boj s adhezemi jsou vyvíjena různá adheziva, což jsou zdravotnické prostředky preventivně aplikované po operačním zákroku s cílem minimalizovat riziko vzniku adheze. Příkladem produktu obsahujícího derivát HA je Hyalobarrier (Anika Therapeutics Inc. Abano Terme, Itálie). Tento sterilní, transparentní a viskózní gel je složen z vysoce čištěné a zesítěné HA. Gel přilne k povrchu tkáně a k břišní stěně a tím vytvoří antiadhezivní bariéru, které chrání před vznikem pooperačních adhezí [18].

Pokud se podíváme na aplikace mimo prevenci adhezí, velice slibně se také jeví využití zesítěného HA jako biomateriálu pro srdeční tkáňové inženýrství [19]. Sulfatovaný derivát hyaluronanu pak může působit jako napodobenina heparinu, neboť deriváty s vyšším stupněm sulfonace jsou spojeny se schopností předcházet koagulaci krve [3]. Deriváty HA se také využívají jako kryty při hojení ran, jsou protizánětlivé a udržují ránu vlhkou. Pro výrobu krytů na hojení ran byla vyvinuta technologie HYAFF, která je založena na esterifikaci volné karboxylové skupiny benzylalkoholem. Touto modifikací snížíme hydrofilitu karboxylových skupin a tím zvýšíme celkovou hydrofobicitu polysacharidu [20]. Příkladem takového krytu, využívající technologii HYAFF, je oboustranná, sterilní a flexibilní dermální náhrada Hyalomatrix (Anika Therapeutics Inc. Abano Terme, Itálie), která se používá při léčbě hlubokých popálenin, post-traumatických, pooperačních nebo chronických ran [20]. Hyalomatrix zajišťuje okamžité uzavření rány a podporuje regeneraci dermis. Skládá se ze dvou vrstev, semipermeabilní silikonové membrány a netkané textilie z HYAFF, která je ve styku

s ránou a napomáhá obnovení dermální tkáně. Silikonová vrstva chrání ránu před znečištěním a zabraňuje ztrátě tekutin [20].

1.2 Polymerní filmy z hyaluronanu a jeho derivátů

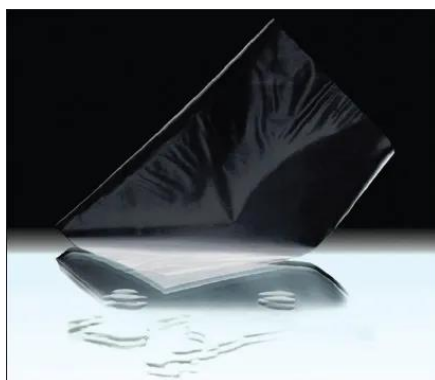
Polymerní filmy můžeme dělit dle různých hledisek. Podle použitého materiálu je dělíme na filmy z biopolymerů nebo syntetických polymerů. Další důležité rozlišení je dle jejich biodegradability. Pokud se zaměříme na biodegradabilní filmy z biopolymerů, ty se mohou dále dělit dle jejich chemické struktury. Mohou obsahovat proteiny, polysacharidy (HA, deriváty celulózy, chitosan, ...) nebo další přírodních látky [21, 22].

Mezi běžné metody výroby polymerních filmů patří odlévání [13], sušení hydrogelů [23], spin-coating [24], dip-coating [25], layer-by-layer [26], sprejování [27] a roztírání [28]. Nejjednodušší metodou je metoda odlévání, při níž je roztok vylit do formy požadované velikosti a vysušen zahříváním formy. Tato metoda se využívá zejména při přípravě tlustších filmů (desítky μm) [22]. Také odpařením rozpouštědla z vrstvy hydrogelu vzniká spíše tlustší polymerní film. Při metodě spin-coating vznikají velmi tenké filmy. Metoda spočívá v nanesení roztoku na střed rotujícího substrátu, roztok se rotací rozprostře a při stálé rotaci je postupně vysušen. Dip-coating je metoda, při níž je substrát ponořen do nádoby s polymerem. Substrátem v roztoku je potřeba konstantně pohybovat. Následně se nechá ponořen bez pohybu, a nakonec se konstantní rychlostí z polymeru vytáhne. Film je na substrátu fixován vysušením. Layer-by-layer metoda využívá elektrostatický tah materiálu na opačně nabitý povrch. Film se vytváří opakovaným nanášením protikladně nabitých vrstev (často technikou dip-coating). Touto metodou vznikají spíše tenké filmy, běžnou aplikací je povrstvování implantátů, které zlepšuje jejich biokompatibilitu a potlačuje infekce [29]. Pro vytvoření samostatného filmu touto metodou je zapotřebí nanést mnoho vrstev. Metoda layer-by-layer je tedy pro vytvoření samostatného filmu značně nevhodná, hlavně kvůli její časové náročnosti [26].

Jednou z možností využití HA a jeho derivátů je právě příprava tenkých polymerních filmů. Nejpoužívanější metody pro přípravu tenkých filmů na bázi HA jsou odlévání, sušení hydrogelů a layer-by-layer [13]. Tenké filmy z HA jsou pevné, pružné a umožňují snadnou manipulaci. V medicíně mají filmy řadu využití například jako biologicky rozložitelné implantáty. Slibně se jeví také jejich využití jako nosiče léčiv [30], zejména takových, která jsou citlivá na podmínky zpracování či nestabilní ve vodném prostředí a nelze je tedy aplikovat ve formě tablet nebo kapalných přípravků. Filmy mohou být vhodné zejména pro orální, bukalní, sublingvální,

okulární a transdermální použití [22]. Použitím tenkých filmů lze zvýšit účinnost některých léčiv a eliminovat jejich vedlejší účinky [22]. Dobré výsledky vykazoval film, při jehož přípravě je nejprve HA převeden na derivát adipového dihydrazinu (HA-ADH), poté síťován za pomoci makromolekulárního síťovadla poly(ethylenglykol)propiondialdehydu (PEG-diald) a nakonec je tento roztok odlit do formy, kde je odpařeno rozpouštědlo. Během přípravy filmů do nich může být vpravena léčivá látka, například kortison, pilokarpin, prednisolon. Léčivo se nejprve rozpustí ve vodě nebo ethanolu a poté smíchá s roztokem HA-ADH. Směs je síťována roztokem PEG-diald, následně míchána 24 h a pomalu sušena při 37 °C. Výsledný zesítný film po namočení během pár sekund bobtná na pružný hydrogel. Tento film by mohl mít široké využití ve zdravotnictví, jeho aplikace je určena podle druhu léčiva, který obsahuje [31].

Filmy z HA se používají při léčbě ran, například popálenin. Účinným krytem ran je například produkt s názvem Hyalosafe (Anika Therapeutics Inc. Abano Terme, Itálie). Hyalosafe je transparentní film z HA derivátu HYAFF. Hyalosafe je určený k léčbě popálenin prvního a povrchových popálenin druhého stupně. Je protizánětlivý a udržuje v ráně vlhkost, díky postupnému uvolňování HA během degradace napomáhá obnově epitelu. Velmi dobré výsledky vykazuje při použití u obličejových popálenin, kdy zmírňuje zjizvení a chrání spálenou oblast před infekcemi [20].



Obrázek 3: Transparentní obvaz na rány, Hyalosafe [20]

Tenké filmy s obsahem HA se také využívají k prevenci pooperačních adhezí. Příkladem komerčně dostupného produktu je polymerní membrána Seprafilm™ (Genzyme Corporation, Cambridge, MA). Tato membrána se skládá z HA a karboxymethylcelulózy s modifikací karbodiimidem (EDC). Seprafilm™ se aplikuje na tkáň, která má být chráněna, a do 24 až 48 hodin od umístění se hydratuje za vzniku gelového povlaku. Tento povlak působí jako fyzická bariéra k oddělení tkání v kritické fázi hojení a do 7 dnů je tělem resorbován. Rychlá degradace Seprafilmu™ snižuje riziko reakce těla na cizí těleso [32].

1.2.1 Charakteristika tenkých filmů z lauroyl hyaluronanu

Tenké filmy z lauroyl hyaluronanu jsou poloprůhledné s nepravidelnými vzory, neporézní a mají hladký povrch. Tloušťka filmů závisí na dávkování polymeru a může se pohybovat v rozmezí přibližně 5-100 μm . Botnavost je závislá na DS, neboť DS udává počet hydrofobních řetězců navázaných na HA. S rostoucím DS filmy nasakují menší množství vody, jsou po hydrataci pevnější, a pomaleji se rozkládají. Filmy s velice nízkým DS mají již po krátké době ve vodném prostředí podobu gelu a nelze s nimi manipulovat. Naopak v suchém stavu filmy neprokázaly významnou závislost mechanických vlastností na DS [14, 13].

Biodegradabilita je pro použití v medicíně velice důležitá vlastnost. Rychlost enzymatického rozkladu lauroyl HA filmů je závislá na DS (s rostoucím DS klesá), díky tomu můžeme řídit rychlost rozkladu HA filmů v těle [13]. Filmy nejsou cytotoxické. Cytotoxicitu lze testovat přímým kontaktem filmu s buněčnou vrstvou, kdy se sleduje šířka oblastí poškození buněk v blízkosti filmu a změny morfologie buněk. Ukázalo se, že buňky nevykazují žádnou kontaktní inhibici buněčného růstu [14]. Dalším způsobem hodnocení cytotoxicity je pomocí extraktů z filmů, kdy je testována životaschopnost buněk v extraktu. Testováním *in-vitro* i *in-vivo* na modelovém organismu myši se filmy prokázaly jako vhodný materiál pro lékařské aplikace [13].

1.3 Botnavost polymerních filmů

Botnavost patří mezi nejčastěji měřené vlastnosti polymerních filmů. Botnavost filmu závisí na jeho složení a postupu přípravy, ale také na samotném způsobu měření botnavosti.

Botnavost filmů na bázi alginátu, agaru nebo chitosanu byla měřena například u filmů s přídavkem propolis. Propolis má antibakteriální účinky a je často využíván při léčbě infekcí v dutině ústní. Produkty s propolisem však často podléhají rychlé eliminaci působením slin. Cílem této studie bylo najít vhodné přírodní polymery pro výrobu tenkých filmů postupně uvolňující propolis v ústní dutině. Jednou testovanou vlastností byla i botnavost, přesněji doba, za kterou vzorek dosáhne maximální hydratace. Tyto filmy byly připraveny odpařením rozpouštědla a botnavost byla hodnocena měřením nárůstu hmotnosti po kontaktu filmu s fosfátovým pufrem. Filmy byly nejprve nastříhány na čtverce o rozměru 1,5 cm na 1,5 cm a poté umístěny na předem zváženou plastovou síť. Tato síť s filmem byla umístěna do Petriho

misky s 10 ml fosfátového pufru. Každý film byl po 30sekundových intervalech vyjmut z Petriho misky, poté osušen filtračním papírem od přebytečné vody a zvážen. Takto byly filmy proměřovány, dokud nebyla jejich hmotnost konstantní, tedy nenastala rovnováha. Botnavost byla spočítána z hodnot počáteční hmotnosti suchého filmu a hmotnosti filmu v pufru po určitém časovém intervalu. Filmy byly porovnány po 4 min. v pufru, kdy už byly všechny druhy filmů v rovnováze. Filmy nabotnaly v pořadí od nejvíce po nejméně alginát-chitosan, alginát, agar. Filmy z alginát-chitosonu i čistého alginátu vykazovaly uspokojivou botnavost, maximální hydratace dosáhly po 210 s. I ostatní vlastnosti byly příznivé pro jejich použití v dutině ústní jako nosiče propolisu. Film z agaru botnal velmi omezeně a své maximální hydratace dosáhl již po 30 s. Jeho velká hydrofobicita znemožňuje jeho použití v ústní dutině [33].

Dalším příkladem je měření botnavosti polyakrylamidových filmů připravených metodou spin-coating na křemíkových substrátech. Film je při měření vystaven vodní páře a jeho hmotnost a tloušťka jsou sledovány pomocí gravimetrických metod a rentgenové reflexe. Pro gravimetrické měření byla použita mikrováha a zdroj vody byl umístěn uvnitř vážicí komory. Sledována byla závislost hmotnosti filmu absorbujícího vlhkost na čase. Měřením metodou optické rentgenové reflexe byla zjištěna tloušťka a hustota elektronů botnajícího filmu vystaveného vodním parám. Výsledky těchto dvou metod byly porovnány a zjištěno bylo, že nárůst hmotnosti je rychlejší než expanze tloušťky filmu [34].

Závislost botnavosti fosforylcholinových filmů různé tloušťky na čase byla sledována za pomoci spektroskopické elipsometrie. Cílem tohoto sledování bylo zjistit vliv zesíťování silylethery, žihání a poměru hydrofilních a hydrofobních skupin na botnání filmů. Bylo zjištěno, že botnání těchto filmů je dvoustupňové. Nejprve dochází k rychlé expanzi filmu při ponoření do vody. Dále se nárůst botnavosti filmu zpomaluje, a to uvolňováním polymerních fragmentů. Bylo pozorováno, že u filmů obsahujících 5 mol % síťovacích činidel, se po zvýšení teploty žihání snížila rychlost botnavosti. Dále zvýšením hydrofilních skupin u filmů bez síťovadla se rychlost botnavosti zvýšila. U směsných polymerních filmů složených z fosforylcholinu a fosforylcholinu obsahujícím 5 mol % síťovadla, velikost botnavosti určuje poměr těchto dvou složek. Film, ve kterém převažuje fosforylcholin se síťovadlem botnal více než směsný film vyrobený převážně s fosforylcholinu bez síťovadla [35].

Botnání velmi tenkých nebo naopak silných polymerních filmů z polymethylmetakrylátu (PMMA) ve „špatných“ rozpouštědlech (rozpouštědlech, které tvoří s polymerem homogenní

směs jen v úzkém intervalu koncentrací) se dá měřit metodou spektrofotometrickou. U této metody se rozpouštědlo obarví jodem a absorpce rozpouštědla do filmu z PMMA se měří sledováním absorpce viditelného světla nabítným filmem pomocí spektrofotometru. Spektrum bylo zaznamenáváno v rozmezí 350-500 nm. Jako špatná rozpouštěla byly použity různé alkoholy a voda, které neabsorbují při měřených vlnových délkách. Naopak jod v roztoku při vybraném rozmezí vykazuje širokou absorpci. Intenzita absorpce jodu PMMA filmem byla použita jako hodnota celkové absorpce rozpouštědla filmem. Bobtnavost PMMA filmů se lišila v závislosti na molekulové hmotnosti, zvoleném rozpouštědle a zda byly filmy vystaveny rozpouštědlu z jedné nebo obou stran. Tato metoda se ukázala jako vhodná pro měření bobtnavosti velmi tenkých polymerních filmů špatnými rozpouštědly, u nichž je měření tradičními technikami obtížné [36].

1.4 Hydrogely jako modely tkání

Pro *in-vitro* testování vlastností materiálů či zkoušení operačních postupů lze využít umělé modely tkání, které se snaží kopírovat specifické vlastnosti skutečných měkkých tkání. Jako potencionální model pro zkoumání mechaniky zavádění jehly do měkké tkáně byl navržen gel z glukomananu a vody. Při 1,5 % koncentraci vykazuje gel mechanickou odezvu odpovídající publikovaným datům o lidské kožní tkáni [37].

Podobný gel lze také vytvořit smícháním karagenu s vodou. Tento gel o 3 % koncentraci byl použit například pro výzkum zabývající se silami, kterými na sebe působí jehla a tkáň při biopsii. Cílem bylo zjistit, jak síla, kterou působí tkáň na jehlu, mění trajektorii jehly [37].

Slibným modelem měkké tkáně je PVA (polyvinylalkohol) hydrogel. Při přípravě tohoto gelu byl použit DMSO (dimethylsulfoxid) jako rozpouštědlo zvyšující průhlednost materiálu. Transparentní PVA hydrogel byl zkoumán jako model pro napodobení měkké tkáně při miniinvazivním chirurgickém zákroku jehlou, který může sloužit například k předoperačnímu plánování zákroku [38].

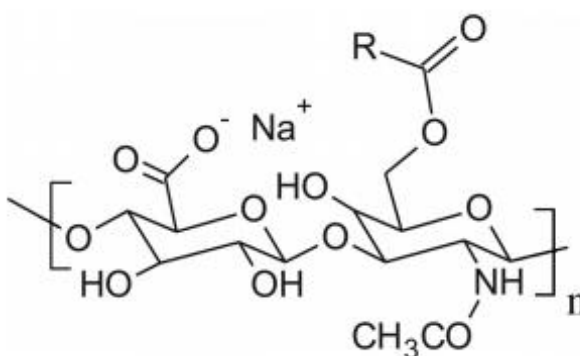
Agarový gel připravený v koncentraci 2,3 % se ukázal jako materiál s mechanickými vlastnostmi dostatečnými pro přípravu trojrozměrných tvarů, které mohou modelovat různé orgány a biologické tkáně. Tento gel také absorbuje a rozptyluje ionizující záření podobně jako měkké tkáně. Ukázal se tedy jako vhodný materiál při charakterizaci radiometrických a optických vlastností zobrazovacích činidel radioterapie [39].

Gel z vepřové želatiny byl připraven za účelem validace diagnostických technik, zejména ultrazvuku a magnetické rezonance. Byly připraveny gely vykazující tři různé pevnosti. Při výrobě těchto gelů byla část vody, která je potřebná na výrobu želatiny, nahrazena kondenzovaným mlékem. Díky tomu bylo dosaženo akustických vlastností v rozmezí měkkých tkání. Výsledné hodnoty mechanických a tepelných vlastností všech tří typů gelů také spadaly do rozsahů měkkých tkání uváděných v literatuře. Tyto gely se tedy ukázaly jako vyhovující pro validaci těchto diagnostických technik [40].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Vzorky

Pro měření byly použity vzorky lauroyl derivátů HA uvedené v *Tabulce 1*. Veškeré vzorky byly poskytnuty firmou Contipro a.s. Lauroyl HA byl připraven esterifikací na hydroxylovou skupinu symetrickým anhydridem kyseliny laurové. Stupeň substituce HA (DS) lauroylem je stanoven pomocí alkalické hydrolyzy vzorku, extrakce hydrolyzovaných mastných kyselin a jejich kvantifikace pomocí plynové chromatografie. DS je vyjádřen jako průměrný počet lauroylových řetězců na 100 monomerních jednotek HA [41].



Obrázek 4: Strukturní vzorec hyaluronanu esterifikovaného na primárním hydroxyly glukosaminu [16]

Derivát	DS/%
LAU 1	11,8
LAU 2	22,0
LAU 3	22,0
LAU 4	24,5
LAU 5	25,3
LAU 6	25,5
LAU 7	30,5
LAU 8	31,3
LAU 9	31,3
LAU 10	34,3
LAU 11	39,3
LAU 12	40,1
LAU 13	41,3
LAU 14	43,9

Tabulka 1: Použité vzorky lauroyl HA

2.2 Příprava filmů

2.2.1 Příprava tenkých filmů z lauroyl hyaluronanu

Filmy z lauroyl hyaluronanu byly připraveny metodou odlévání roztoku. Nejdříve musí být připravený polymer převeden do tekuté formy s nízkou viskozitou. Byl tedy rozpuštěn ve vodném roztoku 2-propanolu (50 hm. %), výsledná koncentrace činila 10 mg/ml. Pro zajištění úplného rozpuštění byl roztok míchán při 25 °C po dobu 18 hodin. Získaný roztok byl přelit do speciální sušící cely na hydrofobní sklo. Tato sušící cela byla pomocí topné desky zahřáta na 50 °C. Odpařování probíhalo 5 hodin a 45 minut. Poté byla sušící cela otevřena a film byl ze substrátu odstraněn [13]. Případnou sterilizaci lze provést ethylenoxidem.

2.3 Příprava gelu a vývoj metody

K měření kontaktní botnavosti byl použit gel, sloužící jako model měkké tkáně. Pro účely měření byly hledány směsi stálé při teplotě 37 °C, udržující vlhkost na povrchu a vykazující vhodnou pevnost. Z informací získaných ze studií pojednávajících o hydrogelech jako modelech tkání (literatura, interní materiály Contipro a.s.) byl připraven gel splňující námi kladené požadavky. Tento gel je směs agaru, kolagenasy a želatiny.

2.3.1 Optimalizace složení gelu

Při hledání ideálního složení gelu bylo nejprve zjišťováno vhodné množství agaru, přičemž množství želatiny, kolagenasy a rozpouštědla bylo stálé. V prvním testování bylo použito 0,6 g agaru na 6 g želatiny, 17,8 mg kolagenasy a 100 ml demineralizované vody. Tento gel ztuhl velice málo a pro naše účely byl příliš měkký. V dalším pokusu jsme zvýšili množství agaru na 1 g. I tento gel byl stále velice měkký. Při množství 1,5 g agaru byl gel tužší, pro naše měření však stále málo. V dalším pokusu jsme navázili 2 g agaru a toto množství se ukázalo jako ideální s ohledem na tuhost gelu. Při měření botnavosti však bylo zjištěno, že film na gelu z demineralizované vody botná velkou rychlostí. Tento jev byl nejspíše způsoben absencí iontů v demineralizované vodě, proto jsme se rozhodli zaměřit ji za fyziologický roztok. Tento roztok byl připraven z 0,9 g NaCl a 100 ml demineralizované vody. Výsledný gel byl však při zachování navážky 2 g agaru řidší než původní gel z demineralizované vody a botnání filmu bylo stále rychlé. Jako ideální se ukázalo připravit gel z 0,1 M fosfátového pufru (PBS). Takto připravený gel vykazuje vhodnou pevnost a botnavost filmu na gelu je mírná a postupná.

Po nalezení ideálního složení gelu byl proveden test vlivu koncentrace agaru na botnavost filmu, kdy ani zvýšení dávky agaru až na 3 g nevedlo ke změnám hodnot botnavosti filmu. Dále

byly provedeny zkoušky pro zjištění opakovatelnosti měření na stejném vzorku. Vzorek filmu byl přiložen na gel a po 1 h změřen a posunut na nové místo a po 3 h znovu změřen. Druhý vzorek stejného filmu byl po 1 h na gelu také změřen, umístěn na stejné místo a po 3 h opět přeměřen. Oba vzorky vykazovaly podobné hodnoty botnavosti. Tím se ukázalo, že umístění filmu na konkrétní místo na povrchu gelu nemá na měření botnavosti velký vliv. Bylo také testováno stárnutí gelu, kdy měření na den starém gelu vykazovalo podobné výsledky jako na čerstvě připraveném. Degradace gelu byla zaznamenána až na týden starém gelu. Film na týden starém gelu nabotnal za stejný čas o poznání méně. Testování bylo prováděno vždy ve 3 opakováních a použit byl film z derivátu LAU 7 s DS 30,5 %. Pro další měření byl použit vždy maximálně den starý gel, aby bylo zamezeno chybným výsledkům.

2.3.2 Optimalizovaný postup přípravy gelu

Na přípravu gelu byl použit agar, kolagenasa, želatina a 0,1 M PBS o pH 7,4. Do kádinky o objemu 150 ml byly naváženy 2 g agaru, který byl rozpuštěn v 50 ml PBS. Tato směs byla ve vodní lázni ohřata na 100 °C a míchána po 10 minut. Do kádinky druhé, také o objemu 150 ml, bylo naváženo 6 g želatiny a rozpuštěno v 50 ml PBS. Za stálého míchání byla směs po 10 minut ohřívána na 80 °C. Obě směsi byly za stálého míchání smíchány v 250 ml kádince. Získaný roztok byl na vodní lázni zahříván na 100 °C po dobu 15 minut. Po vychladnutí na teplotu maximálně 40 °C bylo přidáno 17,8 mg kolagenasy. Poté byl gel rozlit do 3-4 Petriho misek tak, aby výsledná vrstva gelu byla přibližně 0,5 cm vysoká. Gely byly skladovány při teplotě 37 °C.

2.4 Měření botnavosti

Měření botnavosti filmů je rychlý a snadný test materiálu. Podle výsledné bobtnavosti lze odhadnout pevnost filmu a také dobu jeho rozpadu [13].

2.4.1 Příprava 0,1 M fosfátového pufru

Jako standardní médium pro měření botnavosti byl použit fosfátový pufr dle interního postupu Contipro a.s. Ten byl připraven smícháním dvou roztoků. První roztok byl připraven rozpuštěním 3,5 g hydrogenufosforečnanu sodného ve 100 ml demineralizované vody, pro usnadnění rozpuštění lze roztok mírně zahřát. Druhý roztok byl připraven rozpuštěním 2,7 g dihydrogenufosforečnanu sodného ve 100 ml demineralizované vody. Výsledný 0,1 M roztok o

pH 7,4 byl získán smícháním těchto dvou roztoků, v poměru 40,5 ml prvního roztoku a 9,5 ml druhého roztoku, s následným doplněním na objem 100 ml demineralizovanou vodou.

2.4.2 Příprava ostatních pufřů

Pro měření závislosti botnavosti na pH byly připraveny pufřy s odlišným pH, ale stejnou hodnotou iontové síly. Navážka byla spočtena podle následujícího vztahu pro iontovou sílu (I). Tento vztah je definován jako polovina sumy všech koncentrací (c) násobených druhou mocninou mocenství daných iontů (z).

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 \text{ [mol} \cdot \text{l}^{-1}\text{]}$$

Požadovaná iontová síla činila 0,25 mol l⁻¹ a pH pufřů bylo voleno v intervalu 2,1-13,03. Bylo třeba zvolit vždy takový poměr látek, ab pufř vykazoval požadované pH. Spočtené množství látek potřebné na přípravu pufřu bylo naváženo na analytických vahách a rozpuštěno v malém množství demineralizované vody. Poté byly tyto roztoky smíchány a doplněny na požadovaný objem 100 ml demineralizovanou vodou. Výsledný pufř byl důkladně promíchán skleněnou tyčinkou, pro zajištění homogenizace roztoku. Výsledné pH roztoku bylo měřeno pH metrem. Pro nízké pH byl zvolen pufř složený z tris(hydroxymethyl)aminomethanu a 35% kyseliny chlorovodíkové (HCl) v poměru 90:10, čímž bylo dosaženo hodnoty pH 2,1. Pro střední pH byl připraven octanový pufř v poměru 70 dílů soli ku 30 dílům kyseliny. Tímto poměrem vznikl pufř o pH 4,75. Jako neutrální pufř byl použit fosfátový pufř (viz. kapitola 2.4.1) o pH 7,4. Pro vyšší pH byl připraven taktéž fosfátový pufř, avšak v poměru hydrogenfosforečnan sodný : dihydrogenfosforečnan sodný = 99 : 1. Výsledné pH tohoto pufřu činilo 8,1. Posledním bazickým pufřem byl pufř z NaOH a KH₂PO₄, který byl nejprve připraven v poměru 55 : 45 s konečným pH 10,6 a následně v poměru 99 : 1 s hodnotou pH 13,03.

2.4.3 Měření botnavosti v nadbytku pufřu

Botnavost filmů byla měřena při 37 °C. Vážení probíhalo na analytických vahách. Měřeny byly filmy s různým DS a pro každé měření bylo připraveno tři až pět vzorků filmu velikosti 2x2 cm. Větší počet vzorků od každého z filmů byl použit pro minimalizaci možné chyby, tj. k zajištění opakovatelnosti měření, a k vykreslení co nejpřesnější křivky závislosti botnavosti na čase (použity byly průměrné hodnoty).

Vzorky filmů byly nejprve zváženy v suchém stavu a poté umístěny do 0,1M PBS. Po určitém časovém úseku, který je zvolen v závislosti na účelu měření, byly nabotnalé filmy vyjmuty z PBS, změřeny (rozměr), jemně vysušeny filtračním papírem a zváženy. Následně byl pomocí hodnot počáteční hmotnost m_0 (suchý film) a konečná hmotnost m_{eq} spočítán stupeň botnavosti (SR) [13].

$$SR(\%) = \frac{m_{eq} - m_0}{m_0} \times 100$$

2.4.4 Kontaktní botnavost

Kontaktní botnavost filmů s různými DS byla měřena při 37 °C, vždy ve více opakováních pro minimalizaci chyby (např. poškození vzorku při manipulaci) a zajištění dobré opakovatelnosti měření. Pro každý film tak byly připraveny tři vzorky velikosti 2x2 cm, které byly prvně zváženy na analytických vahách a poté položeny za pomoci pinzety na povrch dříve připraveného gelu (viz. kapitola 2.3.2). Vzorky byly měřeny v různých časových intervalech, po uplynutí každého intervalu byl vzorek opatrně sejmuto pinzetou z povrchu gelu, položen na filtrační papír, změřen (rozměr), zlehka osušen filtračním papírem od přebytečné vlhkosti a zvážen na analytických vahách. Stupeň botnavosti byl spočítán dle stejného vztahu jako u měření botnavosti v nadbytku pufry. Výsledná křivka závislosti botnavosti na čase byla sestavena z aritmetického průměru hodnot naměřených pro všechny tři vzorky.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Dynamika botnání v nadbytku pufru

Měření botnání v nadbytku pufru je častým testem materiálu, pokud chceme zjistit závislost botnavosti na různých parametrech, např. na čase či míře substituce. Jako vhodný pufr byl vybrán 1 M PBS, který vykazuje téměř neutrální pH 7,4. Běžně jsou filmy z derivátů HA měřeny po delším časovém období (24 h, 48 h a týdnu), po které jsou umístěny v nadbytku pufru.

Jedním z cílů této práce bylo zjistit, zda existuje vhodný časový interval, který by umožnil měření málo substituovaných filmů, které jsou po 24 h již zcela neměřitelné kvůli ztrátě mechanických vlastností (rozpadají se, gelují). Vybraný interval by měl vypovídat o chování filmu stejně jako běžně měřený 24 h interval, proto byla měřena dynamika botnání od krátkých časů až do 24 h. Jak vidíme v tabulce níže (*Tabulka 2*), nejkratší čas, který byl pro měření vybrán byl 0,25 h.

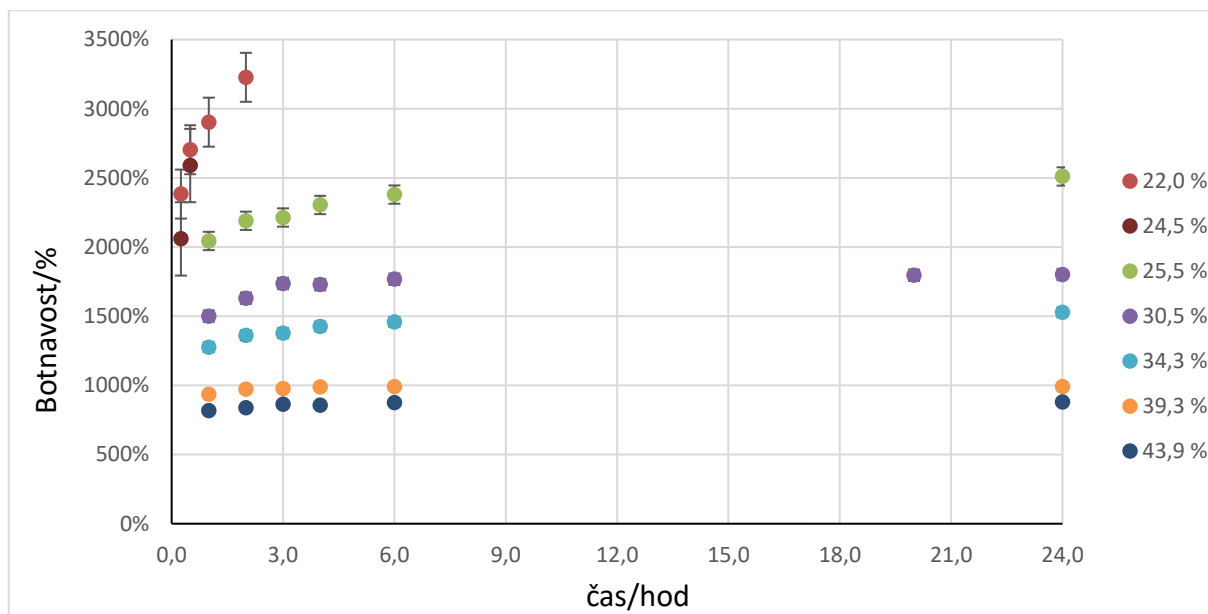
Vzorek s DS 11,8 % byl již po tomto krátkém čase neměřitelný. Jelikož s kratším časem se zvyšuje možná chyba při měření a také kvůli rychlému botnání filmu na začátku již nebylo vhodné dále zkracovat čas měření. Vzorek s druhým nejnižším stupněm substituce, LAU 2 o DS 22 %, se již po 0,25 h začal nepatrně trhat a ztrácel svoji pevnost, ale ještě po 2 h byly jeho mechanické vlastnosti dostatečné pro jeho zvažení. Po delším namočení v PBS již tento vzorek měřitelný nebyl. Teprve vzorek o DS 25,3 % (LAU5) bylo možné proměřit v celé časové škále, přičemž po 4 h v PBS se na filmu začaly objevovat malé trhlinky a po 24 h už byl film málo pevný a začal se trhat. Ostatní vzorky s vyšším DS byly dostatečně pevné v celém časovém rozmezí.

Derivát	DS / %	0,25	0,5	1	2	3	4	6	20	24 / hod
LAU 1	11,8	x	x	x	x	x	x	x		x
LAU 2	22,0	2383 %	2703 %	2903 %	3227 %	x	x	x		x
LAU 3	22,0			2808 %						
LAU 4	24,5			2059 %	2589 %	x	x	x		x
LAU 5	25,3			2109 %				2762 %		3195 %
LAU 6	25,5			2044 %	2190 %	2214 %	2304 %	2379 %		2510 %
LAU 7	30,5			1501 %	1630 %	1737 %	1728 %	1768 %	1796 %	1802 %
LAU 8	31,3			1209 %				1485 %		1488 %
LAU 9	31,3			1284 %				1462 %		1462 %
LAU 10	34,3			1276 %	1361 %	1378 %	1426 %	1458 %		1527 %
LAU 11	39,3			935 %	971 %	978 %	989 %	990 %		991 %
LAU 12	40,1			800 %				880 %		882 %
LAU 13	41,3			846 %				895 %		900 %
LAU 14	43,9			817 %	838 %	863 %	856 %	874 %		880 %

Tabulka 2: Dynamika botnavosti lauroyl HA filmů s různým DS. Zaškrtnutá místa v tabulce značí časy, po kterých byl vzorek již neměřitelný. Prázdná místa v tabulce znamenají, že vzorek v tomto čase měřený nebyl.

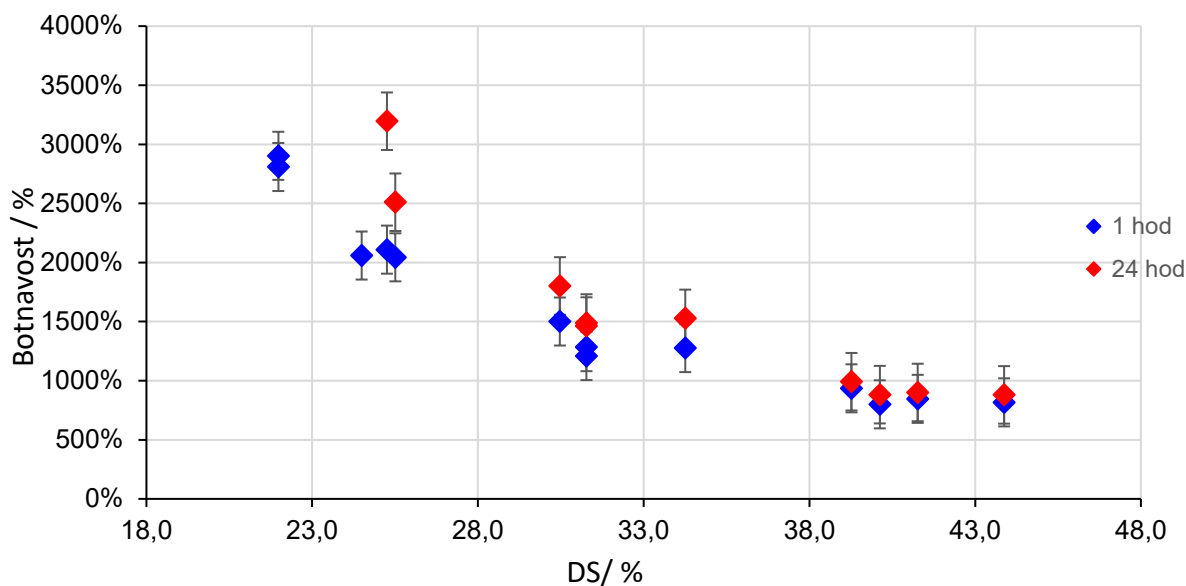
Proměřena tedy byla celá škála vzorků až do DS 43,9 %. V níže zobrazené grafické závislosti botnavosti na čase (*Graf 1*) vidíme, že nízko substituované vzorky (22 a 24,5 %) botnají již po krátkém čase velice silně a jejich ustálení nelze zachytit z důvodu ztráty mechanické integrity pro časy delší než 2 h. Vzorky, které jsou více substituované, vykazují pomalejší nárůst botnavosti v čase. U hodně substituovaných filmů (39,3 a 43,9 %) je také pozorován rychlý počáteční nárůst, poté je však botnavost v čase téměř konstantní. Pro vzorek o středním DS 30,5 % jsme proměřili i botnavost po 20 h, přičemž výsledná hodnota je blízká hodnotě botnavosti po 24 h (jde již tedy o ustálený stav).

Lze tedy učinit závěr, že s rostoucím DS lauroyl HA klesají hodnoty botnavosti filmů a také nárůst botnavosti v čase je mírnější. Díky proměření celé škály vzorků se jako ideální čas pro měření vysoce i nízko substituovaných (nejnižší hodnota 22 %) filmů ukázal čas 1 h.



Graf 1: Dynamika botnavosti filmů o různém DS (viz. čísla v legendě) v nadbytku pufru

Pokud porovnáme hodnoty botnavosti všech vzorků po 1 h, vidíme, že již tento krátký čas vypovídá o chování filmů z nízko i vysoce substituovaných derivátů HA v nadbytku pufru. Následující graf (*Graf 2*) ukazuje závislost botnavosti na DS použitého derivátu pro dva různé časy měření: 1 a 24 h. Porovnáme-li všechny hodnoty po 1 a 24 h, vidíme, že již po 1 h lze pozorovat charakteristické chování vzorku v nadbytku pufru. Trend botnavosti po 1 h je podobný jako po 24 h, tedy botnavost s rostoucím DS postupně klesá. Zjištěno také bylo, že s rostoucím DS se hodnoty botnavosti po 1 a 24 h přibližují, rovnováha tedy nastává rychleji. Filmy s DS nad 38 % vykazují botnavost po 1 h téměř totožnou s botnavostí po 24 h. Po 1 h lze také proměřit více vzorků (deriváty s nižšími DS), které jsou jinak po 24 h v nadbytku pufru neměřitelné. Díky tomu jsme dospěli k závěru, že vhodnou krátkou dobou pro proměření celé škály vzorků je 1 h.



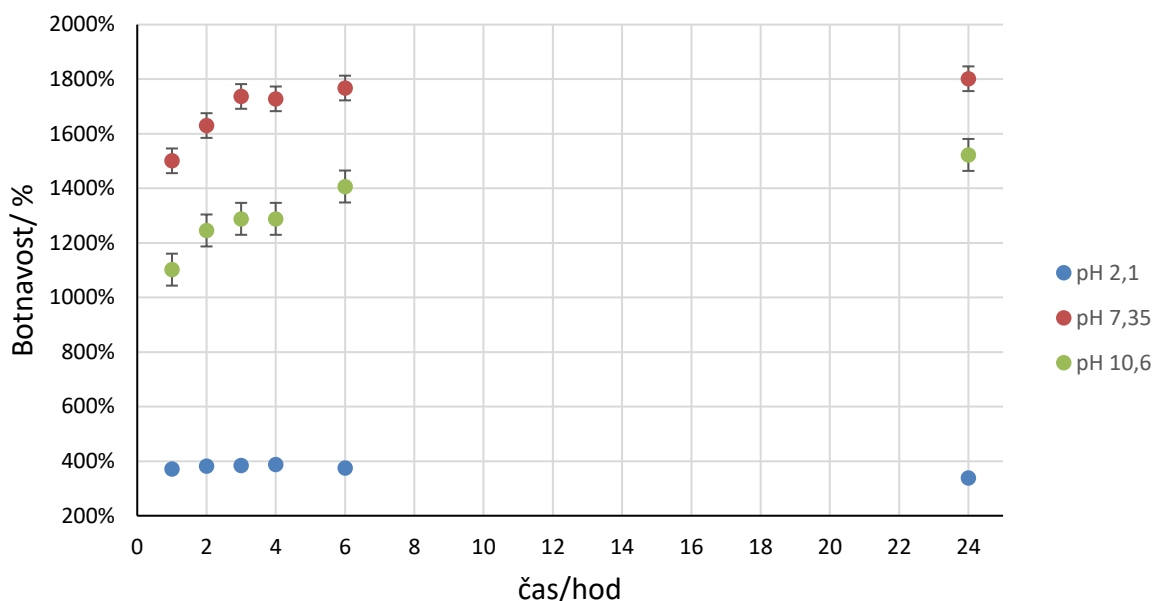
Graf 2: Botnavost lauroyl HA filmů v nadbytku pufru po 1 h a 24 h

3.2 Vliv pH na botnavost v nadbytku pufru

Pro použití tenkých filmů v medicíně je důležité jejich chování v prostředích o různých pH, neboť různé části těla mají různé hodnoty pH. Například žaludek vykazuje velmi kyselé pH 1 až 3,5, lidská kůže vykazuje pH o hodnotě 4 až 6,5 [42], intracelulární pH v mozku se udržuje na přibližně 7,2 [43], chronické rány mají pH v rozmezí 7,15 až 8,9 [44] a peritoneální dutina má pH 7,5 až 8 [45].

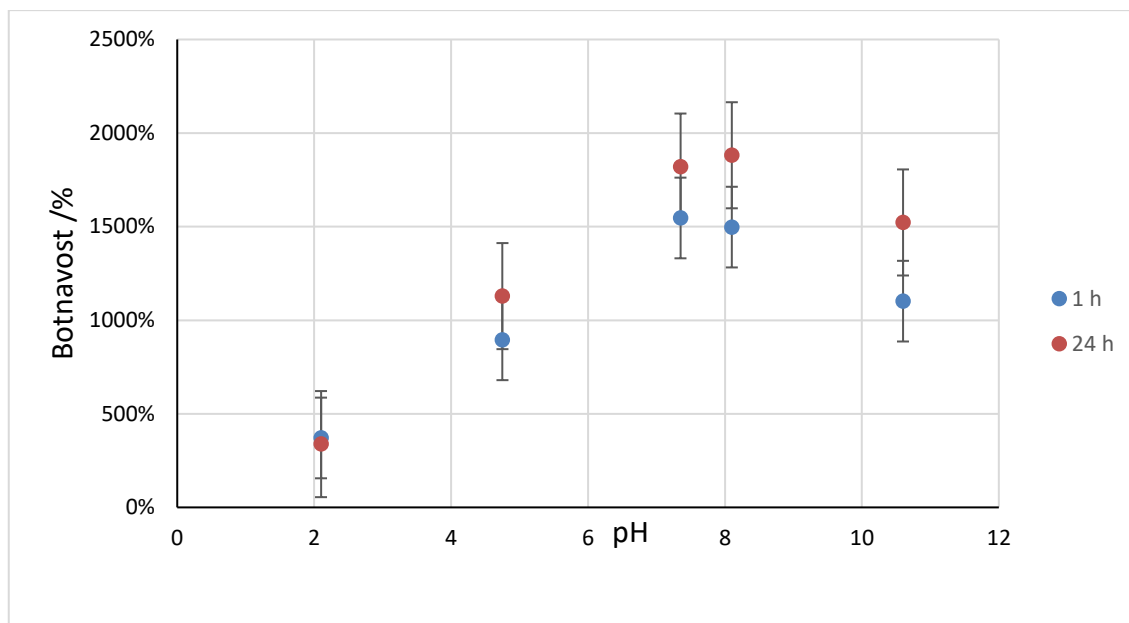
Pro zjištění závislosti botnavosti lauroyl HA filmů na pH byl vybrán vzorek se středním DS (30,5 %) a připraveny byly pufrы s pH přibližně od 2 do 13 (viz. kapitola 2.4.2). Pufrы byly připraveny s podobnou iontovou silou, aby se zabránilo vlivu této veličiny na botnavost filmů (vychází z interních dat firmy Contipro a.s.). V pufru o nejvyšším pH 13,03 byl film vlivem alkalické hydrolyzy již po 1 h zcela rozpuštěný a nebylo tedy možné botnavost změřit [46]. Pro proměření dynamiky botnání v nadbytku pufru byly tedy vybrány pufrы o nízkém, středním, a „přiměřeně vysokém“ pH, které ještě umožní měření filmu. Vybraný film byl proměřen po 1, 2, 3, 4, 6 a 24 h, vždy ve třech opakováních. V grafu níže (Graf 3) vidíme, že film v pufru o nízkém pH (2,1) vykazoval nízkou, ale ustálenou botnavost v celém časovém rozmezí. Hodnoty botnavosti filmu v pufru střední hodnoty pH (7,35) a pufru s vyšším pH (10,6) jsou vyšší než hodnoty pro botnavost v pufru o nízkém pH a vykazují navzájem podobný trend, kdy hodnota botnavosti nejprve rychle vzroste během první hodiny, poté vykazuje postupný nárůst

a po 6 h se hodnoty botnavosti ustalují. Nejvyšší hodnoty botnavosti v tomto grafu vykazoval film v pufru o přibližně neutrálním pH (7,35).



Graf 3: Dynamika botnavosti lauroyl HA filmů v nadbytku pufru o různém pH

Pro širší spektrum pufrů o pH od 2,1 do 10,6 byla proměřena botnavost po 1 a 24 h. Z grafu níže (Graf 4) můžeme vyčíst, že téměř totožné hodnoty pro 1 a 24 h vykazuje vzorek ve velmi kyselém pufru (pH 2,1), přičemž obě tyto hodnoty jsou v porovnání s ostatními velmi nízké. Pro zbylé pH platí, že hodnoty botnavosti po 24 h jsou vyšší než po 1 h. Nejvyšší hodnoty botnavosti vykazují vzorky v pufrách o pH blízkém neutrálnímu. Vzorky ve všech pufrách, kromě alkalického pufru s pH 10,6, jsou po 1 i 24 h stále pevné a udržují svůj tvar. V alkalickém pH 10,6 začínaly být vzorky po 24 h méně pevné a natrhávaly se. Je tedy zřejmé, že při měření botnavosti s cílem vzájemného porovnání různých vzorků je důležité proměřit všechny vzorky v pufru se stejnou hodnotou pH, neboť pH pufru má na botnavost vzorku velký vliv.

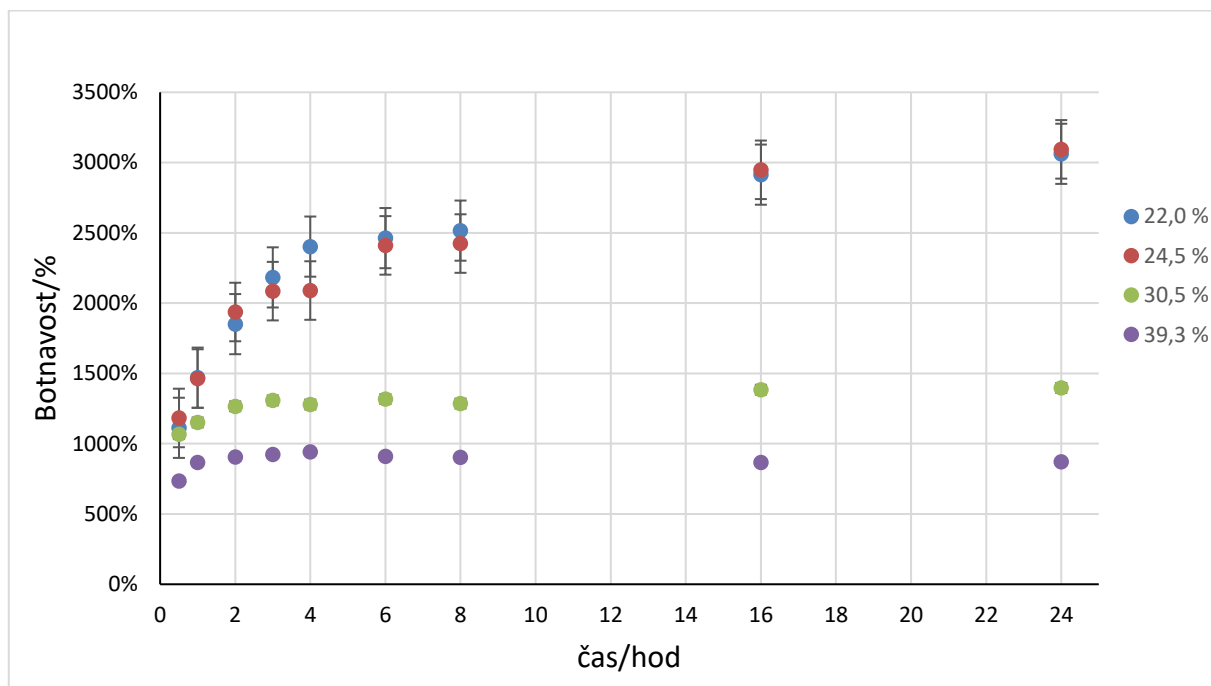


Graf 4: Botnavost v nadbytku puftru po 1 a 24 h pro různá pH

3.3 Kontaktní botnavost

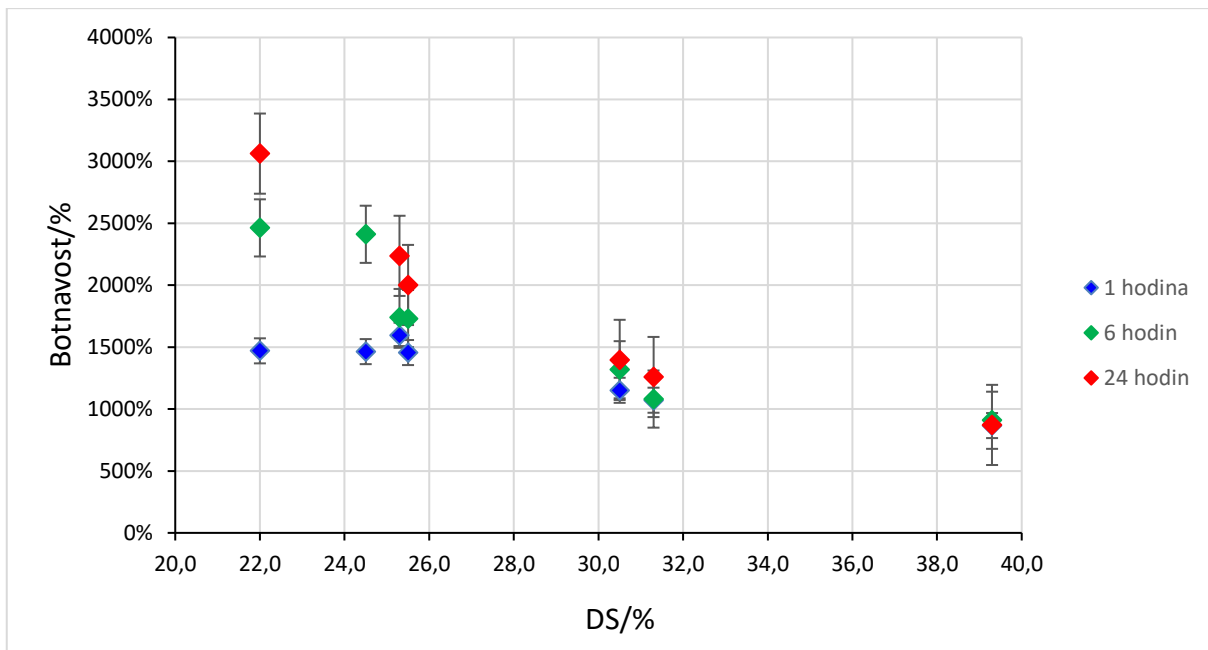
Měření kontaktní botnavosti bylo zavedeno jako nový způsob testování vlastností tenkých HA filmů. Tento způsob měření botnavosti by měl více odpovídat chování těchto filmů při kontaktu s tkáněmi, jelikož film vsakuje vlhkost z povrchu gelu stejně jako z povrchu tkáně. Díky tomuto způsobu měření získáme jistou představu, jak se tenké lauroyl HA filmy chovají na povrchu s definovanou vlhkostí a zda filmy vykazují odlišné nebo srovnatelné výsledky v porovnání s měření botnavosti v nadbytku puftru.

Pro zástupce filmu s nižším (22 a 24,5 %), středním (30,5 %) i vyšším (39,3 %) DS byla proměřená dynamika botnání od 0,5 h po 24 h. Na grafu (*Graf 5*) vidíme, že botnavost klesá se vzrůstajícím DS stejně jako v případě měření botnavosti v nadbytku puftru. Čím vyšší je stupeň substituce použitého derivátu, tím dříve se ustálí rovnováha. Vzorky se středním a vyšším DS (30,5 a 39,3 %) nejprve výrazněji nabobtnají během první 0,5 h, poté botnavost ještě mírně roste ale již po 2 h je téměř ustálená. Filmy s nižším DS (22 a 24,5 %) bobtnají dynamičtěji. Jejich botnavost nejprve rychle narůstá a po 6 h již vzrůstá pomaleji. Porovnáme-li však tyto hodnoty s hodnotami botnavosti v nadbytku puftru, je celkově nárůst botnavosti mírnější, a proto lze proměřit vzorky o nízkém DS i po delším časovém intervalu. Tyto vzorky sice byly méně pevné, ale začínaly se trhat až po 16 h, zatímco při měření v nadbytku puftru nebyly měřitelné již po 3 h. Ostatní vzorky si svou pevnost držely i při měření po 24 h.



Graf 5: Dynamika kontaktní botnavosti lauroyl HA filmů o různém DS (viz. číselné hodnoty v legendě).

Sledujeme-li kontaktní botnavost pro různé DS po 1 a 24 h vidíme, že botnavost s rostoucím DS klesá. Všechny hodnoty botnavosti po 1 h jsou mírné, poté botnavost filmů s nižším DS (22-26 %) narůstá rychleji, se středním DS okolo (30-32 %) vzroste botnavost méně a pro vysoko substituované filmy (39,3 %) vzrůstá botnavost už jen nepatrně. Některé vzorky byly proměřeny i po 6 h, tyto hodnoty nám potvrdily vzrůstající botnavost nebo již ustálenou rovnováhu ve srovnání s botnavostí po 1 h (dle DS). Porovnáme-li hodnoty botnavosti po 1, 6 a 24 h je jasné, že s rostoucím DS se rychleji ustaluje rovnováha botnavosti filmu, a tím jsou si také hodnoty pro botnavost po 1, 6 a 24 h bližší. Jako vhodný krátký interval měření se ukázala 1 h, po které již vidíme, že s rostoucím DS nám bobtnavost klesá. Rychlost botnání na povrchu gelu je celkově nižší než v nadbytku pufru, proto lze i nízko substituované (22, 24,5 %) filmy změřit po 6 h. Hodnoty botnavosti po 24 h pro vzorek s DS 22 % byly velmi obtížně měřitelné a pro vzorek s DS 24,5 % se tuto hodnotu nepodařilo vůbec změřit.



Graf 6: Kontaktní botnavost lauroyl HA filmů po 1 h, 6 h, 24 h

4 ZÁVĚR

V rámci své bakalářské práce jsem se zabývala botnavostí tenkých lauroyl HA filmů, které jsou vyvíjeny pro využití v medicíně. Cílem práce bylo najít optimální způsob měření botnavosti využitelný pro co největší škálu vzorků. Tento způsob měření by měl sloužit k rychlému měření botnavosti tenkých filmů připravených z derivátů HA s různými DS. Jako vhodný krátký čas pro měření botnavosti vzorků se ukázala 1 h. Po 1 h lze ještě změřit vzorky s nízkým DS a zároveň při porovnání botnavosti vzorků po 1 a 24 h vidíme, že celkový trend závislosti na DS se kvalitativně neliší. Tento čas byl vybrán jako vhodný pro měření botnavosti v nadbytku pufru i na povrchu gelu.

Zaměříme-li se na metodu měření botnavosti vzorků tenkých HA filmů, studovala jsem dva způsoby. Prvním způsobem bylo měření botnavosti v nadbytku pufru a druhým kontaktní měření na povrchu gelu. Botnavost v nadbytku pufru pro vzorky s nižším DS (22, 24,5 %) po 1 h rychle roste a poté se vzorky brzy rozpadají, oproti tomu na povrchu gelu je botnavost pro tyto vzorky po 1 h nižší a stále pomalu narůstá po celých 24 h. Díky tomu jsme při měření kontaktní botnavosti schopni měřit vzorky s nižším DS i po 24 h. Celkové trendy jsou však u obou metod stejné: snižující se botnavost a přibližování hodnot botnavosti po 1 a 24 h se zvyšujícím se DS filmů. Pro zvolenou dobu měření 1 h jsou vhodné obě metody, neboť v obou případech lze změřit i vzorky s nízkým DS (22, 24,5 %).

Výhodou měření v nadbytku pufru je menší časová náročnost pro přípravu pufru v porovnání s přípravou gelu pro kontaktní měření. Dále také menší spotřeba chemických látek, a tedy menší finanční náročnost. Vzorek filmu je také snadněji zbaven přebytečné vlhkosti za pomoci filtračního papíru než u kontaktní botnavosti. U měření na povrchu gelu hrozí, že neopatrnou manipulací s pinzetou můžeme část gelu seškrábnout spolu se vzorkem filmu a zkreslit tak výsledky. Porovnáním metod, jejich výhod a nevýhod, jsem dospěla k závěru, že vhodnějším způsobem měření botnavosti je měření v nadbytku pufru.

Jelikož jsou HA filmy vyvíjeny pro aplikace v medicíně a jejich použití je zvažováno ve více částech těla, bylo žádoucí zjistit závislost botnavosti na pH. Tato měření ukázala, že pH má na botnavost značný vliv, přičemž maximum botnavosti film vykazuje při přibližně neutrálním pH. Ze získaných výsledků také vyplývá, že při vzájemném porovnávání vzorků je nutné použít pro všechny vzorky pufr o stejném pH.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] FRASER, J, E, Robert., LAURENT, C, Torvard., LAURENT, B, Ulla. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*, **1997**. 242, 27-33.
- [2] BROWN, Marc., JONES, Stuart. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, **2005**. 19(3), 308-318.
- [3] NECAS, Jiří., BARTOSIKOVA, Lenka., BRAUNER, Pavel., KOLAR, Josef. Hyaluronic acid (hyaluronan). *Veterinarni Medicina*, **2008**. 53, 397–411
- [4] SCHANTÉ, E, Carole., ZUBER, Guy., HERLIN, Corinne., VANDAMME, F, Thierry. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, **2011**. 85, 469-489.
- [5] DICKER, T, Kevin., GURSKI, A, Lisa., PRADHAN-BHATT, Swati., WITT, L, Robert., FARACH-CARSON, C, Mary., JIA, Xinqiao. Hyaluronan, A simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomaterialia*, **2014**. 10(4), 1558-1570.
- [6] STERN, Robert. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *European Journal of Cell Biology*, **2004**. 83, 317-325.
- [7] STERN, Robert. Hyaluronidases in cancer biology. *Seminars in Cancer Biology*, **2008**. 18, 275-280.
- [8] KOGAN, Grigorij., ŠOLTÉS, Ladislav., STERN, Robert., GEMEINER, Peter. Hyaluronic acid: A natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters* **2007**. 29(1), 17-25.
- [9] VELEBNÝ, Vladimír. 2012. *Hyaluronan - biopolymer pro tkáňové inženýrství*, Brno, VUTIUM.
- [10] LEACH, Baier, Jennie., SCHMIDT, E, Christine., Hyaluronan. In: Wnek, E, Gary., Bowlin, L, Gary., *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical engineering*[online]. 1, Boca Raton: CRC Press, 2008, 1421-1431. [cit. 15.12.2020]. Dostupné z:<https://books.google.cz>
- [11] RAH, Marjorie J. A review of hyaluronan and its ophthalmic applications. *Optometry - Journal of the American Optometric Association*, **2011**. 82(1), 38-43.

- [12] SOBOTKA, Lubos., VELEBNÝ, Vladimír., SMAHELOVÁ, A., KUSALOVÁ, M. Sodium hyaluronate and an iodine complex - Hyiodine® - New method of diabetic defects treatment. *Vnitřní lékařství*, **2006**. 52, 417-22.
- [13] CHMELARĚ, Josef., MRÁZEK, Jiří., HERMANNOVÁ, Martina., KUBALA, Lukáš., AMBROŽOVÁ, Gabriela., KOCURKOVÁ, Anna., DRMOTA, Tomáš., NEŠPOROVÁ, Kristina., GRUSOVÁ, Ludmila., VELEBNÝ, Vladimír. Biodegradable free-standing films from lauroyl derivatives of hyaluronan. *Carbohydrate Polymers* [Online]Elsevier 2019. **224**, 115162. [cit. 25.12.2020]. 0144-8617, Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115162>
- [14] FOGLEAROVÁ, Marcela., CHMELARĚ, Josef., HUERTA-ANGELES, Gloria., VÁGNEROVÁ, Hana., KULHÁNEK, Jaromír., BARTOŇ TOMÁNKOVÁ, Kateřina., MINAŘÍK, Antonín., VELEBNÝ, Vladimír. Water-insoluble thin films from palmitoyl hyaluronan with tunable properties. *Carbohydrate Polymers*, **2016**. 144,, 68-75.
- [15] CHMELARĚ, Josef., BĚLSKÝ, Petr., MRÁZEK, Jiří., ŠVADLÁK, Daniel., HERMANNOVÁ, Martina., ŠLOUF, Miroslav., KRAKOVSKÝ, Ivan., ŠMEJKALOVÁ, Daniela., VELEBNÝ, Vladimír. Nanostructure of hyaluronan acyl-derivatives in the solid state. *Carbohydrate Polymers*, **2018**. 195, 468-475.
- [16] COLLINS, N, Maurice., BIRKINSHAW, Colin. Comparison of the effectiveness of four different crosslinking agents with hyaluronic acid hydrogel films for tissue-culture applications. *Journal of Applied Polymer Science*, **2007**. 104(5), 3183-3191.
- [17] BOBULA, Tomáš., BUFFA, Radovan., HERMANNOVÁ, Martina., KOHUTOVÁ, Lenka., PROCHÁZKOVÁ, Pavlína., VÁGNEROVÁ, Hana., ČEPA, Martin., WOLFOVÁ, Lucie., ŽIDEK, Ondřej., VELEBNÝ, Vladimír. . A novel photopolymerizable derivative of hyaluronan for designed hydrogel formation. *Carbohydrate Polymers* **2017**. 161, 277-285.
- [18] CAPELLA-MONSONÍS, Héctor., KEARNS, Stephen., KELLY, Jack., ZEUGOLIS, I, Dimitrios. Battling adhesions: from understanding to prevention. *BMC Biomedical Engineering*, **2019**. 1(5).
- [19] SOGORKOVA, Jana., ZAPOTOCKY, Vojtech., CEPA, Martin., STEPANKOVA, Veronika., VAGNEROVA, Hana., BATOVA, Jana., POSPISILOVA, Martina., BETAK, Jiri., NESPOROVA, Kristina., HERMANNOVA, Martina., DARO, Dorothee., DUFFY, Garry., VELEBNY, Vladimir. Optimization of cell growth on palmitoyl-hyaluronan knitted scaffolds developed for tissue engineering applications *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **2018**. 106(6), 1488-1499.

- [20] LONGINOTTI, Cristina. The use of hyaluronic acid based dressings to treat burns: A review. *Burns & Trauma*, **2014**. 2(4), 162-168.
- [21] BENBETTAIEB, Nasreddine., GAY, Jean-Pierre., KARBOWIAK, Thomas., DEBEAUFORT, Frédéric. Tuning the Functional Properties of Polysaccharide–Protein Bio-Based Edible Films by Chemical, Enzymatic, and Physical Cross-Linking. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [Online] Institute of Food Technologists, 2016. 15(4), 739-752. [cit. 15.01.2021]. ISSN 1541-4337, Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12210>
- [22] KARKI, Sandeep., KIM, Hyeongmin., NA, Seon-Jeong., SHIN, Dohyun., JO, Kanghee., LEE, Jaehwi. Thin films as an emerging platform for drug delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2016**. 11(5), 559-574.
- [23] KHACHATRYAN, Gohar., KHACHATRYAN, Karen., GRZYB, Jacek., FIEDOROWICZA, Maciej. Formation and properties of hyaluronan/nano Ag and hyaluronan-lecithin/nano Ag films. . *Carbohydrate Polymers*, **2016**. 156, 452-457.
- [24] CHUNG, Wan-Young., SAKAI, Go., SHIMANOE, Kengo., MIURA, Norio., LEE, Duk-Dong., YAMAZOE, Noboru. Preparation of indium oxide thin film by spin-coating method and its gas-sensing properties. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **1998**. 46(2), 139-145.
- [25] NEGISHI, Nobuaki., TAKEUCHI, Koji., IBUSUKI, Takashi. Preparation of the TiO₂ Thin Film Photocatalyst by the Dip-Coating Process. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **1998**. 13, 691-694.
- [26] RODRIGUES, R, José., ALVES, M, Natália., MANO, F, Joao. Biomimetic polysaccharide/bioactive glass nanoparticles multilayer membranes for guided tissue regeneration. *RSC Advances*, **2016**. 6, 75988-75999.
- [27] AHIRE, J, Jayesh., DICKS, T, M, Leon. . Antimicrobial hyaluronic acid-cefoxitin sodium thin films produced by electrospraying. . *Current Microbiology* **2016**. 73(2), 236-241.
- [28] AGOSTINI, Elisa., WINTER, Gerhard., ENGERT, Julia. Scale-up of water-based spider silk film casting using a film applicator. *International Journal of Pharmaceutics*, **2017**. 532(1), 13-20.
- [29] CARVALHO, Ana., VALE, Ana., SOUSA, Maria., BARBOSA, Ana., TORRADO, Egidio., MANO, João F., ALVES, Natália. Antibacterial bioadhesive layer-by-layer coatings for orthopedic applications. *Journal of Materials Chemistry B*, **2016**. 4, 5385.

- [30] PARK, Sohyeon., HAN, Uiyoung., CHOI, Daheui., HONG, Jinkee. Layer-by-layer assembled polymeric thin films as prospective drug delivery carriers: design and applications. *Biomaterials Research*, **2018**. 22.
- [31] LUO, Yi., KIRKER, R, Kelly., PRESTWICH, D, Glenn. Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, **2000**. 69(1), 169-184.
- [32] DIAMOND, Michael P., BURNS, Ellen L., ACCOMANDO, Beverly., MIAN, Sadiqa., HOLMDAHL, Lena. Seprafilm® adhesion barrier: (1) a review of preclinical, animal, and human investigational studies. *Gynecological Surgery*, **2012**. 9(3), 237-245.
- [33] PALA, Caterina., COSSU, Massimo., PIU, Luisella., JULIANO, Claudia. Polymeric films containing propolis: preparation and characterisation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **2007**. 17(3), 177-181.
- [34] SINGH, Amarjeet., MUKHERJEE, M. Swelling Dynamics of Ultrathin Polymer Films. *Macromolecules*, **2003**. 36(23), 8728-8731.
- [35] Tang, Y., Lu, J. R., Lewis, A. L., Vick, T. A., Stratford, P. W. Structural Effects on Swelling of Thin Phosphorylcholine Polymer Films. *Macromolecules*, **2002**. 35(10), 3955-3964.
- [36] STEVENS, F. Spectrophotometric measurement of swelling of polymer films by very poor solvents. *Journal of Applied Polymer Science*, **2005**. 97(3), 1082-1089.
- [37] FALCONER, S, E., TAYLOR, Z, A., TOMLINSON, R, A. Developing a soft tissue surrogate for use in photoelastic testing. *Materials Today: Proceedings*, **2019**. 7, 537-544.
- [38] JIANG, Shan., LIU, Sha., FENG, Wenhao. PVA hydrogel properties for biomedical application. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, **2011**. 4(7), 1228-1233.
- [39] ARANDA-LARA, Liliana., TORRES-GARCÍA, Eugenio., ORROS, Rigoberto. Biological Tissue Modeling with Agar Gel Phantom for Radiation Dosimetry of ^{99m}Tc. *Open Journal of Radiology*, **2014**. 04, 44-52.
- [40] FARRER, I, Alexis., ODÉEN, Henrik., BEVER, Joshua., COATS, Brittany., PARKER, L, Dennis., PAYNE, Allison., CHRISTENSEN, A, Douglas. Characterization and evaluation of tissue-mimicking gelatin phantoms for use with MRgFUS. *Journal of Therapeutic Ultrasound*, **2015**. 3(9).
- [41] CHMELAŘ, Josef., KOTZIANOVÁ, Adéla., HERMANNOVÁ, Martina., ŠULÁKOVÁ, Romana., ŠMEJKALOVÁ, Daniela., KULHÁNEK, Jaromír.,

- VELEBNÝ, Vladimír. . Evaluating the degree of substitution of water-insoluble acyl derivatives of hyaluronan using Raman spectroscopy: Method development and comparison with gas chromatography *Analytical Methods*, **2017**. 9, 232–239.
- [42] SCHWALFENBERG, K, Gerry. The alkaline diet: is there evidence that an alkaline pH diet benefits health? *Journal of environmental and public health*, **2012**. 2012, 727630-727630.
- [43] CASEY, R, Joseph., GRINSTEIN, Sergio., ORLOWSKI, John. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2010**. 11(50-61).
- [44] WALLACE, Laura., GWYNNE, Lauren., JENKINS, Tobias. Challenges and opportunities of pH in chronic wounds. *Therapeutic Delivery*, **2019**. 10(11), 719-735.
- [45] ZEREGA, G, S., RODGERS, K, E., Peritoneal Fluid. In: *The Peritoneum*[online]. Springer, 1992, [cit. 24.02.2021]. ISBN 978-1-4613-9235-4: ISBN 978-1-4613-9235-4: Dostupné z:<https://link.springer.com/>
- [46] STERN, Robert., KOGAN, Grigorij., JEDRZEJAS, J, Mark ., ŠOLTÉS, Ladislav. The many ways to cleave hyaluronan. *Biotechnology Advances*, **2007**. 25(6), 537-557.