Příprava hydrogelů na bázi chitosanu pro přenos léčiv

Barbora Polášková

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 Polášková**
Osobní číslo:	**T19636**
Studijní program:	**B0711A130009 Materiály a technologie**
Specializace:	**Biomateriály a kosmetika**
Forma studia:	**Prezenční**
Téma práce:	**Příprava hydrogelů na bázi chitosanu pro přenos léčiv**

Zásady pro vypracování

Hydrogely na bázi polysacharidů jsou vyhledávanými biomateriály zejména pro jejich vysokou biokompatibilitu, biodegradabilitu a širokou škálu možných fyzikálních vlastností. Náplní práce bude zpracování literární rešerše na téma hydrogely na bázi modifikovaných polysacharidů se zaměřením na chitosan, a také následná příprava hydrogelů na bázi polysacharidů, které mohou sloužit jako biomateriály pro přenos léčiv. Vhodný polysacharid (chitosan) bude zesíťován pomocí netoxických síťovadlel na bázi dialdehydů jiných polysacharidů (celulóza, hyaluronan). Vzniklé hydrogely budou charakterizovány za pomoci dostupných fyzikálně-chemických metod a jejich vlastnosti porovnány. Budou také stanoveny mechanické a viskoelastické charakteristiky a bude sledováno bobtnání a stabilita hydrogelů v různých médiích. Množství a typ síťovadla bude optimalizováno tak, aby docházelo k rychlé gelaci in situ, a zároveň aby bylo umožněno injekční podání. Vhodní kandidáti budou následně nasyceni roztokem vybraného léčiva či jiné biologicky aktivní látky a bude studována kinetika jeho uvolňování.

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

Seznam doporučené literatury:

[1] Kim, U.-J.; Lee, Y. R.; Kang, T. H.; Choi, J. W.; Kimura, S.; Wada, M. Protein Adsorption of Dialdehyde Cellulose-Crosslinked Chitosan with High Amino Group Contents. *Carbohydrate Polymers* **2017**, 163, 34-42.
[2] Münster, L.; Vícha, J.; Klofáč, J.; Masař, M.; Kucharczyk, P.; Kuřitka, I. Stability and Aging of Solubilized Dialdehyde Cellulose. *Cellulose* **2017**, 24 (7), 2753-2766.
[3] Fu, J.; Yang, F.; Guo, Z. The Chitosan Hydrogels: From Structure to Function. *New J. Chem*. **2018**, 42 (21), 17162-17180.
[4] Hamedi, H.; Moradi, S.; Hudson, S. M.; Tonelli, A. E. Chitosan Based Hydrogels and Their Applications for Drug Delivery in Wound Dressings: A Review. *Carbohydrate Polymers* **2018**, 199, 445-460.

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: 20.5.2022

Jméno a příjmení studenta: Barbora Polášková

…….
podpis studenta

ABSTRAKT

Předmětem této bakalářská práce bylo připravit a charakterizovat injektovatelné hydrogely na bázi chitosanu (SCN) zesíťovaného pomocí 2,3-dialdehydcelulózy (DAC). Různorodost hydrogelů byla způsobena různou hustotou sítě, čehož bylo dosaženo různou koncentrací matrice i různým množstvím síťovadla. U připravených hydrogelů byly následně zkoumány parametry sítě, viskoelastické vlastnosti, struktura a schopnost absorbovat biologicky aktivní látku, kinetika jejího uvolňování a na závěr cytotoxicita. Přípravou SCN/DAC hydrogelů o různé koncentraci matrice i různého množství síťovadla lze připravit hydrogel s nejvhodnějšími mechanickými vlastnostmi, nízkou toxicitu a schopnost navázání a uvolnění biologicky aktivní látky. Takto připravené hydrogely mohou být využity pro možné biomedicínské aplikace.

Klíčová slova: Chitosan, dialdehyd celulózy, hydrogel, přenos léčiv, biomateriál, viskoelastické vlastnosti, nízká toxicita

ABSTRACT

The aim of this bachelor thesis was to prepare and characterize injectable chitosan-based hydrogels (SCN) crosslinked with 2,3-dialdehyde cellulose (DAC). The diversity of the hydrogels was caused by different network densities, which were achieved by varying the matrix concentration as well as the amount of crosslinker. The prepared hydrogels were subsequently studied with regard to network parameters, viscoelastic properties and structure properties, the capability to absorb the biologically active agent, its release kinetics and finally cytotoxicity. By preparing SCN/DAC hydrogels of different matrix concentration and different amounts of crosslinker, a hydrogel with the most suitable mechanical properties, low toxicity and ability to bind and release the biologically active agent can be developed. These hydrogels can be used for possible biomedical applications.

Keywords: chitosan, dialdehyde cellulose, hydrogel, drug delivery, biomaterial, viscoelastic properties, low toxicity

Nyní bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Janu Víchovi, Ph.D., dále také Ing. Lukáši Münsterovi, Ph.D. a Ing. Monice Muchové za vedení, rady a vynaložený čas strávený při pomoci zhotovení mé bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat Ing. Milanu Masaři, Ph.D., Ing. Simoně Káčerové a Ing. Elišce Daďové za jejich ochotu a pomoc při provádění experimentů. Na závěr bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za jejich podporu nejen při práci na mé bakalářské práci, ale i po celý čas studia.

„Svět bez vědy je svět bez budoucnosti.“

- *prof. Ing. Danuše Nerudová, Ph.D.*

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

OBSAH

ÚVOD **9**
I TEORETICKÁ ČÁST **10**
1 BIOMATERIÁLY **11**
1.1 CHARAKTERISTIKA A KLASIFIKACE BIOMATERIÁLŮ 13
2 HYDROGELY **15**
2.3 PŘÍPRAVA HYDROGELŮ NA BÁZI CHITOSANU 21
2.4 INJEKTOVATELNÉ HYDROGELY 22
2.5 VYUŽITÍ HYDROGELŮ NA BÁZI CHITOSANU 23
3 METODY STUDIA HYDROGELŮ **25**
3.1 MORFOLOGIE 25
3.1.1 Porozita – SEM analýza 25
3.2 PARAMETRY HYDROGELNÍ SÍTĚ 26
3.2.1 Bobtnání 26
3.2.2 Obsah vody v rovnovážném stavu 26
3.2.3 Gelová frakce 27
3.3 VISKOELASTICKÉ VLASTNOSTI 27
3.4 UVOLŇOVÁNÍ LÁTEK – UV-VIS 28
3.5 BIOKOMPATIBILITA HYDROGELŮ 29
3.5.1 MTT 29
II PRAKTICKÁ ČÁST **31**
4 CÍL PRÁCE **32**
5 METODY PŘÍPRAVY A CHARAKTERIZACE CHITOSANOVÝCH HYDROGELŮ ZESÍŤOVANÝCH POMOCÍ DAC **33**
5.1 POUŽITÉ MATERIÁLY 33
5.1.1 Chemikálie 33
5.2 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ 33
5.2.1 Spektroskopická analýza 33
5.2.2 Analýza dynamického rozptylu světla chitosanových hydrogelů 34
5.2.3 Morfologie 34
5.2.4 Parametry sítě 35
5.2.5 Viskoelastické vlastnosti 35
5.2.6 Cytotoxicita 36
5.2.7 Nasycení hydrogelů biologicky aktivní látkou a její uvolňování 36
5.3 PŘÍPRAVA CHITOSANOVÝCH HYDROGELŮ 38
5.3.1 Příprava SCN 38
5.3.2 Příprava DAC 39
5.3.3 Příprava SCN/DAC hydrogelů 42

6 VÝSLEDKY A DISKUZE 44
6.1 CHARAKTERIZACE SCN/DAC HYDROGELŮ 44
6.2 NASYCENÍ HYDROGELŮ BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKOU A JEJÍ UVOLŇOVÁNÍ 52
6.3 TEST INJEKTOVATELNOSTI HYDROGELŮ 53
ZÁVĚR 54
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 56
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK 61
SEZNAM OBRÁZKŮ 62
SEZNAM TABULEK 63

ÚVOD

Historie biomateriálů sahá až do období 200 let př. n. l., kdy byly Egypťany zhotoveny první kovové dentální implantáty. K velkému rozvoji došlo po 2. světové válce, kdy byly vyvinuty syntetické (polymerní) materiály, jako je polymethylmetakrylát (PMMA) či nylon. V tomto poválečném období došlo také například k první aplikaci kovové umělé kyčle, nebo k vývoji dialyzačního zařízení zhotoveného z derivátů celulózy a cévních implantátů vyrobených z hedvábí.

Rychlý vývoj zapříčinil zavedení regulací a kontroly materiálů pro biomedicínské aplikace. Biomateriály jako vědní obor jsou staré přibližně padesát let. Studium biomateriálů se také označuje jako věda o biomateriálech nebo biomateriálové inženýrství. Věda o biomateriálech zahrnuje prvky medicíny, biologie, chemie, tkáňového inženýrství a materiálové vědy. Jejich vývoj lze rozdělit do čtyř generací. V první generaci byly vynalezeny inertní (neaktivní) biomateriály, které sloužily pouze jako pevná podpora stavby těla bez kontaktu s okolím. Biologicky aktivní materiály spadají do druhé generace. Následně byly vyvinuty technologie pro cílená léčiva a neinvazivní implantace či nanokompozity. Do poslední čtvrté generace se řadí implantáty zajišťující opravu poškozené tkáně, kde se využívá poznatků z oboru tkáňového inženýrství.

Biomateriály či zdravotnické prostředky, jež se skládají z biomateriálů, se dnes běžně používají jako protézy v kardiovaskulární, ortopedické, zubní, oční a rekonstrukční chirurgii nebo jako stehy a materiály pro přenos léčiv.

Samotný výzkum a vývoj v oblasti biomateriálů byl stimulován a řídí se pokroky v buněčné a molekulární biologii, patologii, klinické medicíně a stomatologii, chemii, materiálové vědě a inženýrství.

Výjimečná pozornost se věnuje hydrogelům, a to hlavně díky jejich netoxickým a biokompatibilním vlastnostem a podobnosti s živou tkání.

Tato bakalářská práce je zaměřena na přípravu biomateriálu v podobě hydrogelu na bázi chitosanu s funkcí přenosu léčiv. V samotné práci je průřezem pojednáno o tématech biomateriálů, hydrogelů a použitých metodikách. V neposlední řadě je čtenáři představena praktická část zaměřená na metody přípravy a charakterizace chitosanových hydrogelů zesíťovaných pomocí 2,3-dialdehydcelulózy (DAC). Závěr práce je věnován diskuzi a výsledkům.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOMATERIÁLY

Věda o materiálech hraje nedílnou součást v lidském poznání a výzkumu. Tento vědní obor se neustále rozvíjí. Jednou z nových podoblastí této vědy jsou biomateriály. Za biomateriály se považují látky, které byly vyhotoveny tak, aby mohly interagovat s biologickými systémy po danou dobu za medicínským účelem, jako je doplnění, opravy nebo náhrady funkce tkáně či materiálu biologického systému. V ideálním případě by měly způsobovat pozitivní odezvu živého systému, přičemž jejich charakteristickou vlastností je biokompatibilita.

Biokompatibilita je důležitá vlastnost materiálu, která se projevuje jako snášenlivost biomateriálu biologickým systémem při specifickém využití, přičemž nesmí dojít k nežádoucí reakci buněk nebo tkáně. Za biologický systém se považují jednotlivé buňky případně živá tkáň. I přes využití poznatků ohledně živých soustav a dalších faktorů určujících odezvu organismu, jako je typ materiálu, tvar implantátu, degradační charakteristiky, povrchové, objemové a mechanické vlastnosti, není vždy zajištěna odezva pozitivní. Organismus může reagovat odmítavě, a tedy dochází k tzv. negativní odezvě, u které je zásadní odpověď proteinů a buněk na implantovaný materiál. Reakce se může projevovat záněty, zarudnutím, bobtnáním, zvýšenou teplotou, bolestí, krevními sraženinami uvnitř krevního řečiště, vápenatěním, či při nejhorším rakovinným bujením. Tyto projevy vedou dále k aktivaci imunitního systému. Reakci na testovaný materiál lze sledovat *in vitro*, při kterém pozorování probíhá např. na tkáňovém plastiku (např. Petriho miska), nebo *in vivo*, kde je reakce pozorována v živém organismu – např. v myši. Při snaze o zkoumání biologické odezvy je zapotřebí brát v úvahu hned několik základních faktorů, mezi které patří například umístění materiálu, doba jeho přítomnosti a působící vnější síly vyvolávající jeho vnitřní napětí. Okolím biomateriálu mohou být měkké nebo pojivové tkáně. Materiál může být také bezprostředně vystaven přímému kontaktu s tělními tekutinami, slinami nebo krevním řečištěm, kterým by se mohly roznést v krátkém časovém intervalu případné škodliviny obsažené v materiálu. Proto obecně platí, že biokompatibilitu materiálů, které komunikují přes epitel nebo leží zcela pod ním, je zapotřebí hodnotit přísněji. Doba přítomnosti materiálu v těle se pozoruje z důvodu možných opožděných nežádoucích projevů organismu, jelikož dlouhá doba kontaktu poskytuje dostatek prostoru pro možné škodlivé působení. Dalším zmiňovaným faktorem, který je nutno sledovat, je pevnost, jelikož materiál musí vykazovat určitou odolnost, aby nedošlo k jeho poškození z krátkodobého či dlouhodobého hlediska. [1, 2] Tato klíčová vlastnost biomateriálů a jejich

výběr pro danou aplikaci ovšem závisí na mechanismu degradace a povrchových a objemových vlastnostech.

Biologické prostředí tvořené zdánlivě mírným vodním roztokem soli o teplotě 37 °C je ve skutečnosti překvapivě agresivní a může vést k rychlému nebo postupnému rozkladu mnoha materiálů. [3] **Biodegradace** je chemický rozklad materiálů zapříčiněný působením živých organismů, který vede ke změnám fyzikálních a chemických vlastností materiálu. Konečným měřítkem přijatelnosti materiálu jakožto zdravotnického prostředku je proto jeho vyhovující funkční způsobilost po dobu předpokládané životnosti prostředku. Zárodky biodegradace mohou být zasety již před implantací materiálu pomocí jeho nevhodného složení nebo zpracování. [4]

Využití biomateriálů nebo implantátů na bázi biomateriálů není pro lékařské účely novinkou, nicméně většina z nich selhala kvůli nepříznivé interakci s biologickým povrchem a následně vedla k infekci nebo přidruženému vedlejšímu účinku biomateriálů. Z těchto důvodů jsou správné parametry **povrchových vlastností** jednou z klíčových zásad pro bezpečný kontakt biomateriálu s živým systémem. Na povrchu biomateriálu ulpívá množství různorodých proteinů, které mohou na biomateriálu denaturovat. Chemická struktura povrchu biomateriálů má také zásadní význam pro interferenci s buňkami i reakce hostitele, a tím určuje, zda trvale implantovaný materiál bude tolerován nebo odmítnut. K usnadnění příznivé reakce těla po implantaci materiálu se využívají jeho modifikace. Využívané biomateriály mají obecně větší afinitu k široké škále proteinů, přičemž jejich interakce a proces absorpce mění konformaci vyvinutého biomateriálu. [5, 6]

Při popisu materiálů se také klade důraz na tzv. **objemové vlastnosti**. Objemové atributy musí splňovat fyzikální neboli mechanické požadavky, jako například přenášení mechanického zatížení, index lomu či tepelné vlastnosti. Liší se u mnoha materiálů, jako jsou kovy, polymery a keramika z důvodu různých meziatomových nebo mezimolekulárních sil, které drží atomy a molekuly pohromadě. Mechanické vlastnosti se vztahují k charakteristickým hodnotám, také označovaným jako kvantitativní míry, při kterých dochází k určitým strukturním přechodům v materiálu. K mechanickým veličinám se řadí mechanické napětí a deformace, které se u materiálu běžně uvádějí, ale nejsou skutečnými vlastnostmi materiálu. Za vlastnosti materiálu se mohou považovat pouze napětí, která způsobují určité strukturní změny, jako je například poddajnost nebo porušení. Tuto situaci lze přirovnat ke skutečnosti, že teplota vody je považována za fyzikální veličinu, ale dané

teploty, při nichž dochází k fázovým přechodům vody, považujeme za její vlastnosti, jako je bod tuhnutí nebo bod varu. [6]

V biologických systémech zastává významnou funkci voda, jelikož se jedná o hlavní složku ve složení živého organismu. U lidí se jedná až o 70% hmotnosti člověka. Voda je dynamická molekula a jedinečná látka, která je důležitým prostředníkem v podstatě všech biologických interakcí. Například když se protein nebo buňka přiblíží k biomateriálu, interaguje nejprve s povrchovou vodou. [7, 8]

Biomateriály lze získávat buď úpravou přírodních materiálů, nebo laboratorní syntézou pomocí různých chemických přístupů s využitím kovových složek, polymerů, keramiky nebo kompozitních materiálů. K prudkému rozvoji tohoto oboru přispěl fakt, že se jedná o odvětví odpoutávající se od syntetických materiálů a hledající inspiraci v živých soustavách pro jejich snazší a přirozenější integraci mezi biologické formy. K často používaným biomateriálům patří implantáty, které se využívají s cílem částečného upravení či úplného nahrazení orgánů nebo tkání bez jejich poškození. Každodenně se používají v zubním lékařství, chirurgii a při podávání léčiv. Do těla lze například umístit konstrukci impregnovanou farmaceutickými produkty, která umožňuje dlouhodobé uvolňování léčiva. Cílem výzkumu a vývoje biomateriálů je navržení nejvhodnějšího typu a složení pro danou aplikaci, biokompatibilitu a zajištění požadovaných mechanických vlastností, které by zajistily dostatečnou mechanickou integritu zvoleného implantátu. [9]

1.1 CHARAKTERISTIKA A KLASIFIKACE BIOMATERIÁLŮ

Biomateriály můžeme klasifikovat podle několika kritérií: [9]

a) podle působení na biologické systémy:

   1) bioinertní – biomateriál s relativně pasivní funkcí v živém systému, což znamená, že neovlivňuje systém v průběhu doby interakce (např. srdeční chlopně, srdeční stenty)

   2) bioaktivní – biomateriál více interaguje s biologickým systémem, jelikož vyvolává specifickou biologickou aktivitu (např. kyčelní implantáty)

   3) bioresorbovatelné – biomateriály, jenž jsou odstraňovány v důsledku rozpouštění v biologickém prostředí či buněčné aktivity (např. vstřebatelné scaffoldy)

b) podle materiálu:

1) kovové – jsou biomateriály o vysoké pevnosti, dobré tvarovatelnosti a s výbornými únavovými a lomovými vlastnostmi. Díky těmto vlastnostem dominují jak v dočasných (např. šrouby, čepy nebo kostní destičky), tak i v trvalých pomůckách nejen v ortodoncii a ortopedii, ale stejně tak i v kardiovaskulárních aplikacích (např. biodegradabilní stenty vyrobené z hořčíku nebo železa). Jednou z výhod kovových materiálů je možnost výroby různých slitin kovů, které rozšiřují jejich funkcionalizaci. [10]
2) keramické – mohou být syntetického, nebo přírodního původu. Jedná se o biomateriály využívané jako alternativa kovových implantátů. Jeho nejdůležitější rysy jsou dobré fyzikálně-chemické vlastnosti a shodné s některými částmi lidského těla, jako jsou například zuby. Vynikají také svou biokompatibilitou, vysokou teplotou tání, nekorodují, mají nižší plasticitu než biomateriály na bázi kovových látek a špatně se rozkládají, což může být výhodou i nevýhodou v závislosti na požadavku. [11]
3) polymerní [12]
    - přírodní – biomateriály skládající se z přírodních polymerů, mezi které se řadí například alginát, kolagen, fibrin, chitosan či kyselina hyaluronová. Výhodou těchto přírodních polymerů je jejich přirozená biokompatibilita, ohled na životní prostředí a dostatek zdrojů. Nevýhodou je naopak jejich nízká stabilita, špatné mechanické vlastnosti a rychlá degradace vyrobeného biomateriálu. [13]
    - syntetické – využívají se například v tkáňovém inženýrství, jelikož jejich vlastnosti mohou být lépe kontrolovatelné a jsou také lépe reprodukovatelné. Mezi biomateriály tvořené syntetickými polymery řadíme 3D scaffoldy, hydrogely nebo mikrovlákenné disky sloužící jako nosiče pro tkáňové inženýrství chrupavek. Díky vlastnostem syntetických polymerů lze opakovaně vyrábět např. hydrogely z matrice o dané molekulové hmotnosti, blokové struktuře, rozložitelnými vazbami a o určitých způsobech síťování. Tyto vlastnosti poté určují proces tvorby hydrogelu, dynamiku tvorby hydrogelu, hustotu síťování či mechanické a degradační vlastnosti materiálu. Příklady těchto polymerů jsou poly (ethylenglykol) (PEG), poly (vinylalkohol) (PVA) a částečně hydrolyzovaný poly (akrylamid) (PHPA). [14, 15]

2 HYDROGELY

Hydrogely jsou trojrozměrné zesíťované struktury tvořené zejména hydrofilními makromolekulami, jež jsou schopny absorbovat velké množství vody, vodného roztoku či fyziologické tekutiny bez rozpuštění. [16] V závislosti na vlastnostech použitého polymeru a na povaze a hustotě síťových spojů mohou rozdílné struktury v rovnovážném stavu obsahovat různé množství vody. V nabobtnalém stavu je hmotnostní podíl vody v hydrogelu obvykle mnohem vyšší než hmotnostní podíl polymeru. [17] Mezi další jejich vlastnosti patří schopnost inkorporovat různé bioaktivní látky nebo jiné biomolekulární struktury, jako jsou nukleové kyseliny, mastné kyseliny, glykany a růstové faktory, a hodí se proto pro přenos různých látek. [13] Výhodami hydrogelů jsou jejich fyzikálně-chemické vlastnosti podobné s živými tkáněmi.

Definici hydrogelů odpovídá mnoho materiálů, jak přírodních, tak syntetických. Během posledních dvou desetiletí byly přírodní hydrogely postupně nahrazeny syntetickými hydrogely, které mají dlouhou životnost, schopnost větší absorpce vody a vysokou pevnost gelu. [17]

Obr. 1: Hydrogel [18]

2.1 Charakteristika a klasifikace hydrogelů

Vzhledem k využívání v medicínských aplikacích pro vnitřní i vnější užívání, jsou hydrogely podrobeny přísným požadavkům na jejich vlastnosti. K důležitým požadavkům patří biodegradabilita, která je nutná pro obě aplikace jak z důvodu úmyslného umístění v těle, tak ochrany životního prostředí. Mezi další důležité charakteristiky patří biokompatibilita, která je nutná vzhledem ke kontaktu s živým organismem či jeho okolím. Samozřejmě by neměla být opomenuta i mechanická stabilita, díky níž mají hydrogely dostatečnou odolnost odpovídající cíli jejich aplikace. Jednou z charakteristických vlastností je také bobtnání, díky němuž je hydrogel schopen adsorbovat různé tekutiny. Unikátní vlastností hydrogelů je

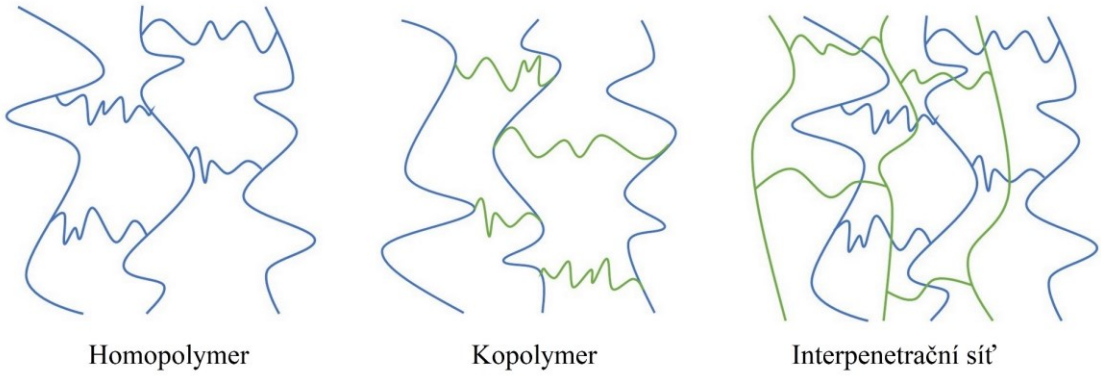
jejich schopnost vázat vodu, aniž by došlo k rozpadu jejich trojrozměrné struktury díky jejímu síťování. [15, 16]

Struktura a vlastnosti hydrogelů jsou vázány na způsob interakce mezi matricí a síťovadlem, které mohou být propojeny fyzikálně nebo kovalentně do trojrozměrně zesíťovaného uspořádání. Velmi důležité jsou také zapletení řetězců či slabé molekulární interakce, které se vzájemně doplňují. [16]

V závislosti na způsobu jejich přípravy, iontovém náboji nebo strukturních vlastnostech lze hydrogely rozdělit do několika kategorií: [1, 17]

a) podle způsobu přípravy:
    1) homopolymerní
    2) kopolymerní
    3) multipolymerní
    4) interpenetrující polymerní sítě (IPN)
b) podle typu vazeb:
    1) reverzibilní (fyzikální)
    2) trvalé (chemické)
c) podle fyzikálně-chemických strukturních vlastností:
    1) amorfní
    2) semikrystalické
    3) komplexní
d) podle odpovědi na stimul:
    1) fyzikální – UV záření, infračervené záření, mikrovlnné záření, teplota
    2) chemická – pH prostředí,
    3) biologická – imunitní
e) podle stability:
    1) stabilní
    2) rozložitelné: hydrolyticky/enzymaticky

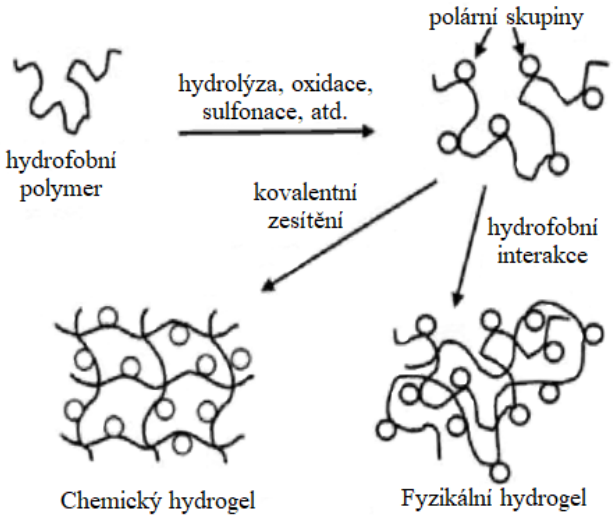
Jako homopolymerní gely se označují hydrogely, které mají matrici tvořenou pouze jedním typem opakujících se monomerních jednotek. Kdežto kopolymerní hydrogely jsou syntetizovány pomocí různých druhů monomerů v blokovém, opakujícím se či náhodném uspořádání. Tyto polymerní sítě mohou tvořit takzvané interpenetrující polymerní sítě (IPN). IPN jsou zesíťovány jednotlivě a při jejich propletení mezi nimi dochází k fyzikálním interakcím, kupříkladu prostřednictvím vodíkových můstků. [16]



Obr. 2: Typy hydrogelových struktur podle způsobu přípravy

Hustota zesítění ovlivňuje významné strukturní parametry a porozitu hydrogelů. [16]

Hydrogely mohou být chemicky stabilní nebo degradující, neboli nestabilní. Nazývají se také reverzibilní (fyzikální) a ireverzibilní (chemické). Pokud sítě drží pohromadě pomocí molekulárního pletence nebo sekundárních sil, včetně iontových, vodíkových nebo hydrofobních sil, jedná se o hydrogely fyzikální. Tento typ hydrogelů není homogenní, jelikož mohou tvořit shluky či nehomogenity. Volné konce nebo smyčky řetězců reverzibilních hydrogelů také představují přechodné defekty sítě. Chemické hydrogely jsou naopak kovalentně zesíťované sítě. V chemických gelech představují volné konce řetězců "defekty" gelové sítě, které nepřispívají k její pružnosti. Dalšími defekty sítě jsou řetězové smyčky a propletence, které rovněž nepřispívají k trvalé elasticitě sítě. [19]



Obr. 3: Typy hydrogelových struktur podle typu vazeb [20]

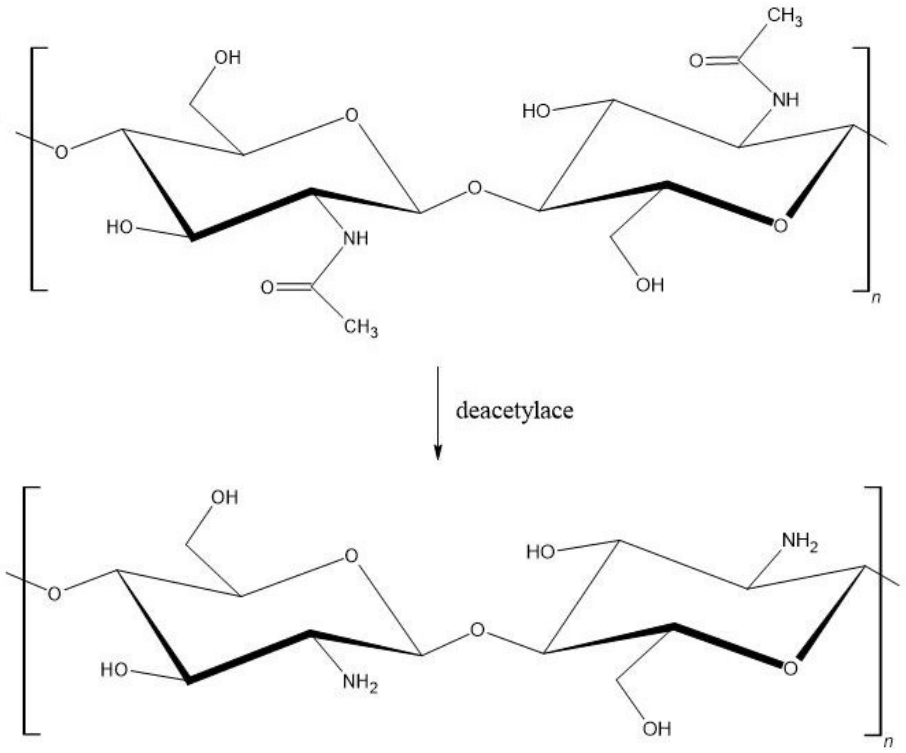
Amorfní hydrogely obsahují kovalentní vazby, které se mohou nacházet i u semikrystalických hydrogelů, vyznačujících se samovolnými oblastmi uspořádaných makromolekulárních řetězců, tzv. krystalitů. Ovšem u hydrogelů amorfních jsou makromolekulární řetězce uspořádány náhodně. [21]

2.2 HYDROGELY NA BÁZI CHITOSANU

Díky své vysoké biokompatibilitě se v dnešní době čím dál častěji zkoumají materiály z přírodních látek. Výjimkou nejsou ani hydrogely, které se využívají v medicínských aplikacích. Jeden z mnoha přírodních polymerů používající k přípravě hydrogelů je chitosan, který je nejčastěji využíván kvůli jeho převážně příznivým vlastnostem při interakci s živým systémem. [22]

2.2.1 Chitosan

Chitosan je biopolymer, β-(1,4)-N-acetyl-D-glukosamin, který se získává z chitinu, základní složky schránek krabů, krevet, mušlí, krovek hmyzu či hub, zejména zygomycet. [13, 15] Je jedním z nejpoužívanějších polymerů pro výrobu hydrogelů zejména díky své nízké toxicitě, velice dobré biokompatibilitě a antimikrobiálním vlastnostem. Navzdory svému xenobiogennímu původu také prokázal příznivé interakce *in vivo*, a proto se jedná o látku, která bývá využívána například jako hydrogelové scaffoldy pro tkáňové inženýrství. [14, 15] V současné době se chitosanové hydrogely používají při separaci a kultivaci buněk, tkáňovém inženýrství či řízeném uvolňování léčiv. [22] Ačkoliv je chitosan přítomen v podhoubí některých druhů hub, nejčastěji se přesto získává částečnou alkalickou deacetylací chitinu (Obr. 4). [23]



Obr. 4: Příprava chitosanu deacetylací chitinu

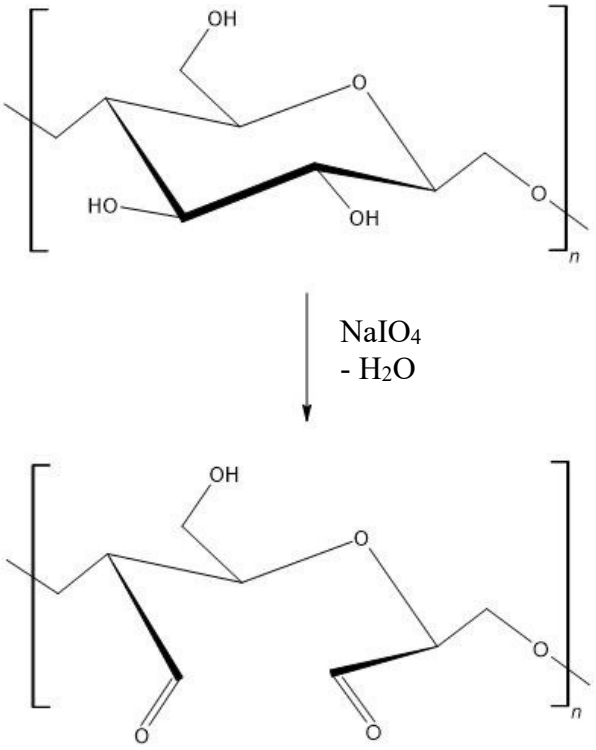
Chitin a chitosan mají i další jedinečné vlastností, jako je biologická rozložitelnost, vyznačují se také hemostatickými vlastnostmi, buněčnou afinitou a podporují regeneraci. Chitosan je rozpustný ve vodných roztocích s pH < 5, ale nerozpustný ve vodných roztocích s pH > 7, což je zapříčiněno obsaženými amino skupinami, které jsou naprotonované, tedy kladně nabité, pouze v kyselých roztocích. [24]

Chitosan lze charakterizovat podle různých parametrů, jedním z nejdůležitějších je charakterizace podle stupně deacetylace. Stupeň deacetylace je definován jako poměr počtu D-glukosaminových jednotek k součtu počtu N-acetylglukosaminových jednotek a D-glukosaminových jednotek a uvádí se v procentech. Ovlivňuje jak fyzikální, tak chemické nebo biologické vlastnosti chitosanu, pod které se řadí elektrostatické, acidobazické vlastnosti, biologická rozložitelnost, samoagregace, sorpční vlastnosti a schopnost chelatovat ionty kovů, tedy odstraňovat toxické kovové ionty z organismu či odpadních vod. [23, 25] Čistá kationtovost a přítomnost více reaktivních funkčních skupin v molekule činí z chitosanu vyhledávanou biomolekulu. To také nabízí prostor přípravě u širokého spektra derivátů pro specifické použití v rozmanitých oblastech. Potenciál využití chitosanu je tedy mnohostranný, například v potravinářství a výživě, biotechnologii, materiálové vědě, léčivech a farmaceutických přípravcích, zemědělství a ochraně životního prostředí a v poslední době také v genové terapii. [26]

2.2.2 Dialdehyd celulózy

Blížící doba nedostatku fosilních zdrojů vede k hledání alternativních materiálů na biologickém základu vhodných k nahrazení různých organických síťovadel pro tvorbu hydrogelů. Jednou z možností je využití nejrozšířenějšího biopolymeru, celulózy. Celulóza je široce zastoupena v přírodě, například v rostlinných vláknech, bakteriích, řasách a mořských živočiších. Její matrice se skládá z D-glukózových jednotek spojených pomocí β-1,4-glykosidických vazeb. [22, 27] Celulóza má vysoce uspořádanou síť intramolekulárních a intermolekulárních vodíkových vazeb. Kvůli této husté síti vodíkových vazeb je omezena dostupnost volných hydroxylových skupin, což má za následek také špatnou rozpustnost nativní celulózy. Síť vodíkových vazeb navíc způsobuje, že celulóza nabývá vysoce krystalické struktury, což dále snižuje její rozpustnost a reaktivitu. [28] V jejím řetězci se nachází velké množství hydroxylových skupin, které mohou vstupovat do reakcí typickým alkoholům, a tudíž je lze považovat za aktivní funkční skupiny celulózy.

Modifikovaná celulóza má dobré vlastnosti zadržování vody a může být použita k přípravě superabsorpčních hydrogelů. Chemická modifikace celulózy zároveň zlepšuje zpracovatelskou kapacitu celulózy a produkuje deriváty celulózy pro specifické průmyslové aplikace. [29]

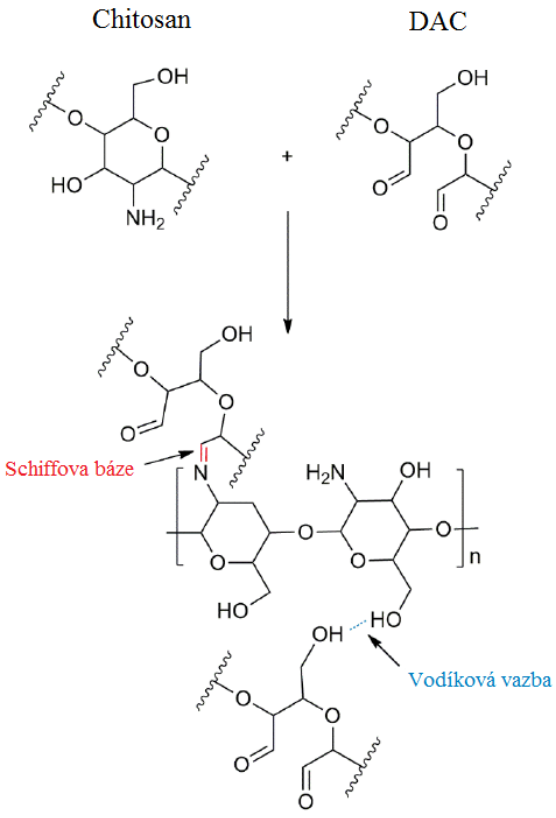


Obr. 5: Příprava dialdehyd celulózy

Jednou z úprav celulózy, na které se v poslední době zaměřuje výzkum, je regioselektivní oxidace celulózy pomocí $NaIO_4$, tzv. periodátu, za vzniku dialdehydu celulózy (DAC) (Obr. 4). Jedním z klíčových problémů při periodátové oxidační reakci je zmíněná nízká rozpustnost a tím pádem omezená reaktivita celulózy. Pro průběh této reakce jsou tedy zapotřebí účinné metody uvolnění pevné sítě vodíkových vazeb celulózy a snížení vysoké krystalinity. Ke zvýšení reaktivity celulózových vláken při periodátové oxidační reakci lze použít jak chemickou, tak mechanickou aktivaci. Bylo zjištěno, že použití solí kovů a vysoké teploty (vyšší než 55 °C) během oxidační reakce vede ke zvýšení obsahu aldehydů. To umožňuje použití relativně nízkého množství oxidantu, což vede k ekologicky šetrnější výrobě DAC. Jak DAC, tak její deriváty mají velký potenciál ve špičkových aplikacích, jako jsou lékařské materiály a biologicky rozložitelné kompozity. Aldehydové skupiny DAC mají vysokou reaktivitu, a lze je využít pro různé další modifikace, jako je například reakce s aminem za vzniku Schiffovy báze, kationizace a další oxidace na 2,3-dikarboxycelulózou (DCC). [27, 28, 30]

2.3 Příprava hydrogelů na bázi chitosanu

Polymery obsahující aminy jako je chitosan, lze zesíťovat pomocí aldehydového činidla za mírných podmínek, kdy se tvoří tzv. Schiffovy báze (Obr. 6). K tvorbě Schiffovy báze dochází mezi aminoskupinou a aldehydovou skupinou za vzniku iminové vazby za fyziologických podmínek. [31]



Obr. 6: Schéma reakce chitosanu s DAC [32]

Při této interakci dochází k vytvoření dynamické rovnováhy mezi vazbami aldehydovými a aminovými reaktanty a produktem (Schiffovou bazí).

$$-NH_2 + -CH=O \rightleftarrows -N=CH-$$

Tyto vazby lze proto považovat za pseudokovalentní vazby, jelikož v hydrogelových sítích dochází k rozpojování a opětovnému spojování iminových vazeb. Někdy také bývají označovány termínem dynamické kovalentní vazby. Tato skutečnost má za následek samoregenerační schopnost hydrogelu. Další výhodou těchto gelů je, že mohou být injektovatelné. [31]

2.4 Injektovatelné hydrogely

Tradiční hydrogely nejsou příliš citlivé na změny prostředí, jako jsou změny teploty nebo pH. Při působení vnějších sil se struktura hydrogelu nenávratně naruší a tradiční hydrogel se již nemůže sám opravit. Nejen, že to zkracuje jeho životnost a zvyšuje spotřebu surovin, ale také může způsobit např. sekundární infekci rány během procesu výměny hydrogelního obvazu, což může být v těžkých případech dokonce život ohrožující. Proto je aplikace tradičních hydrogelů omezená. [33]

Na druhé straně existují hydrogely, které mají samoregenerační vlastnosti, což rozšiřuje možnosti jejich aplikací, včetně injekčního podání. Samoregenerační hydrogel má schopnost hojení, a tím tak prodlužuje svou životnost. Proto jsou samoléčebné hydrogely velmi zajímavé v tkáňovém inženýrství, ve formě obvazů na rány nebo nosičů léků. [33]

Samoregenerační hydrogely s injekčním podáním mohou být například rychle a snadno vstřikovány do velkých nepravidelných ran bez poničení jejich struktury, čímž se navíc vytvoří ideálně tvarovaný hydrogelový obvaz, který zcela vyplní oblast rány. Dalšími výhodami jsou jejich dobré dynamické a mechanické vlastnosti a odolnost vůči hydrolýze. Proto se staly jedním z nejatraktivnějších materiálů pro vývoj pokročilých bioaktivních obvazů a potenciálních kandidátů pro tkáňové inženýrství. [34, 35]

2.5 Využití hydrogelů na bázi chitosanu

Hydrogely na bázi chitosanu v poslední době přitahují velkou pozornost, a to díky jejich vynikající biokompatibilitě a biologické odbouratelnosti. [35]

2.5.1 Obvazové materiály

Jednou ze zmiňovaných možností využití chitosanových hydrogelů je výroba obvazů k urychlení hojení ran. Kůže je největší orgán lidského organismu. Jeho úlohou je bariérová kožní ochrana před vnějším poškozením a zabránění ztrátám tělesných tekutin, elektrolytů a živin. Poranění kůže způsobené úrazy, chirurgickými zákroky a popálením patří k nejzávažnějším problémům klinické léčby ran. Hojení ran je velice komplexní a dynamický proces, jež zahrnuje kroky homeostáze, proliferace a remodelace. V současné době nastal rozmach různých materiálů vhodných k výrobě obvazů pro urychlení hojení ran. Hlavní strategií této problematiky se staly multifunkční obvazy. Mezi tyto formy materiálů se řadí nanovlákna, pěnové membrány či právě hydrogely. Hydrogelové obvazy sloužící jsou ideální pro hojení ran, jelikož zajišťují vlhké prostředí, napodobují extracelulární matrix, umožňují výměnu plynných složek a zároveň brání prostoupení bakteriálních či plísňových organismů. Hydrogelové obvazy na bázi chitosanu jsou výjimečné díky své dobré biologické přilnavosti a antibakteriálním a hemostatickým vlastnostem. Pro využití ve zdravotnictví je zapotřebí využitít chemické modifikace chitosanu kvůli rozšíření rozsahu jeho použití. [32]

2.5.2 Podávání léčiv

Většina komerčně používaných systémů pro podávání léčiv bývá nerozložitelná, hromadí se v játrech či slezině, což zapříčiňuje možnost projevu nežádoucích vedlejších účinků. Poslední dobou proto přitahují velkou pozornost vědců nosiče nebo doručovací systémy vyrobené z biodegradabilních tělem vstřebatelných látek, které by mohly velmi přispět k řešení problému se zatěžováním orgánů při užívání léčiv. Chitosan a jeho deriváty mají velký potenciál pro léčbu rakoviny díky doručování různých chemoterapeutik buď pasivním, nebo aktivním cíleným uvolňováním léčebných látek. Příkladem látek, které splňují požadavky biokompatibility, biodegradability, adhezivních vlastnosti a dostupnosti různých aktivních funkčních skupin pro povrchovou funkcionalizaci, jsou chitosanové polymery ve formě samoregeneračních hydrogelů. [36]

Jako nosič léčiv má hydrogel vysokou účinnou kapacitu pro přenos léků s možností pomalého uvolňování, a tedy trvalého dodávání léčiv v místě nádoru s mnohem menšími vedlejšími účinky. [33]

Trojrozměrná porézní struktura hydrogelů vytváří difuzní bariéru pro molekuly léčiv, což vede k pomalému uvolňování molekul léčiv z hydrogelové matrice. Mechanismus uvolňování léčiv řízený bobtnáním je nejvhodnější pro hydrogely na bázi chitinu a jeho derivátů vzhledem k jejich vysoké schopnosti bobtnat ve vodném prostředí. Řízení bobtnání hydrogelů se proto stalo jednou z nejčastějších strategií uvolňování léčiv uvězněných v hydrogelové matrici. Bobtnání hydrogelů lze ovlivnit složením hydrogelů. Důležitými parametry ovlivňující bobtnání hydrogelů jsou také: [37]

- pH – z důvodu kolísání pH v živém systému (např. výrazné kolísání pH v gastrointerstinálním traktu při perorálním podávání nosičů s léčivy)
- teplota – citlivost hydrogelových polymerních sítí je přičítána přítomnosti hydrofobních skupin
- magnetické pole – využíváno k cílenému, kontrolovanému či zpožděnému uvolňování za přítomnosti magnetických nanočástic
- elektrické pole – reakce hydrogelů na elektrické podněty (např. polyelektrolyty s kationty nebo anionty zabudované ve struktuře), přičemž uvolňování léčiv je řízeno například elektrodifúzí

3 METODY STUDIA HYDROGELŮ

Fyzikální, chemické a mechanické vlastnosti materiálů souvisejí s vlastnostmi jejich matrice a použitého síťovadla. [38]

Hydrogely, jakožto polymerní sítě, mohou být zkoumány pomocí celé řady metod. Hlavními metodami jsou techniky mikroskopické a spektroskopické. Charakterizace hydrogelů se zaměřuje nejen na jejich morfologii, parametry sítě, viskoelastické a mechanické vlastnosti ale i biokompatibilitu, resp. cytotoxicitu, aby se mohl zkoumaný materiál považovat za biomateriál.

Ve všech případech mikrostrukturní charakterizace dochází k interakci pečlivě připraveného vzorku s nějakou formou sondy a k analýze se shromažďuje rozptýlený nebo vybuzený signál ze vzorku. Nejčastěji používanými sondami pro charakterizaci materiálů jsou viditelné světlo, rentgenové záření a energetické elektrony. Všechny sondy mohou se vzorkem interagovat prostřednictvím elastických nebo nepružných procesů. [38]

3.1 MORFOLOGIE

Studium morfologie hydrogelů udává informace o jejich struktuře, a také povrchových vlastnostech, jako jsou přítomnost, velikost a tvar pórů.

3.1.1 Porozita – SEM analýza

Porozita je jedním z hlavních aspektů vývoje hydrogelů pro přenos léčiv, jelikož přítomnost pórů v jejich hlavním řetězci slouží k transportu poměrně velkého množství biologicky aktivních látek a zároveň určuje rychlost jejich uvolňování. [39]

Měření velikosti pórů lze provádět několika způsoby. Všeobecně patří mezi nejpoužívanější způsoby pozorování biomateriálů skenovací elektronová mikroskopie SEM (Scanning Electron Microscopy) [27], transmisní elektronová mikroskopie (TEM), rastrovací tunelová mikroskopie (STM) a mikroskopie atomárních sil (AFM). Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) je elektronová mikroskopická technika vhodná k pozorování hydrogelů. Zobrazuje povrch vzorku skenováním fokusovaného svazku energetických elektronů. SEM je jedním z nejběžnějších nástrojů pro studium morfologie povrchu a identifikaci malých oblastí, které nelze rozlišit optickou mikroskopií. Primární elektrony emitované z elektronového děla interagují s atomy na povrchu vzorku a emitují různé signály. Běžnými typy emitorů elektronů jsou katody s wolframovým vláknem a katody s hexaboridem

lanthanu a zdroje emise polí, jako je typ studené katody využívající wolframový monokrystalický emitor nebo tepelně asistovaný Schottkyho emitor typu oxidu zirkoničitého. Elektrony jsou obvykle urychlovány na energii 0,2 - 40 keV a prostorově fokusovány jednou nebo dvěma kondenzátorovými čočkami do bodu o průměru asi 0,4 – 5 nm. Svazek elektronů pak prochází skenovacími cívkami nebo deflektorovými deskami v elektronovém sloupci, aby se dosáhlo vychýlení ve směru x a y pro skenování. Skenovaná oblast je obvykle čtverec nebo obdélník. Při dopadu primárních elektronů na vzorek ztrácejí elektrony energii opakovaným náhodným rozptylem a absorpcí v objemu vzorku známém jako interakční objem, který připomíná kapku slzy nebo balónek s hloubkou 1-5 um v závislosti na energii elektronů. Různé signály pocházejí z různých hloubek interakčního objemu a sekundární elektrony jsou emitovány z horních 5-10 nm povrchu vzorku a obsahují topografické informace. Kromě toho dochází k odrazu vysokoenergetických elektronů pružným rozptylem a emisi elektromagnetického záření. Emitované signály jsou detekovány specializovanými detektory a signály jsou zesíleny a zobrazeny na katodové trubici. Aby se zabránilo vniknutí sekundárních elektronů do detektoru, je na Faradayovu klec, která je připevněna k detektoru a umístěna pod úhlem ke sloupci primárního svazku, indukován mírně záporný náboj. Zobrazení na CRT je synchronizováno s rastrováním elektronového svazku a výsledný obraz představuje mapu intenzity signálů emitovaných ve snímané oblasti. [38, 40]

3.2 PARAMETRY HYDROGELNÍ SÍTĚ

3.2.1 Bobtnání

Rovnovážné bobtnání hydrogelu lze získat z rovnice (1), kde M_E je hmotnost nabobtnalého hydrogelu a M_0 je hmotnost vypraného a vysušeného hydrogelu.[41]

$$\text{Procentuální zbobtnání [\%]} = \frac{M_E - M_0}{M_0} \times 100 \tag{1}$$

3.2.2 Obsah vody v rovnovážném stavu

Obsah vody v rovnovážném stavu hydrogelu (EWC) popisuje maximální množství vody, který může hydrogel nasytit a lze jej získat podle rovnice (2), kde M_s je hmotnost zbobtnalého vzorku a M_0 je hmotnost vypraného a vysušeného hydrogelu. [41]

$$\text{EWC [\%]} = \frac{M_s - M_0}{M_s} \times 100 \tag{2}$$

3.2.3 Gelová frakce

Gelová frakce je poměr hmotnosti vypraného a nevypraného vzorku. Lze ji vypočítat pomocí rovnice (3), kde M_0 je hmotnost vypraného a vysušeného hydrogelu po extrakci rozpustné frakce v hydrogelu a M_{int} je hmotnost nevypraného a suchého vzorku hydrogelu. [41]

$$\text{Gelová frakce [\%]} = \frac{M_0}{M_{int}} \times 100 \tag{3}$$

3.3 VISKOELASTICKÉ VLASTNOSTI

Hydrogely, jakožto síťované polymerní sítě, vykazují určité mechanické vlastnosti charakteristické pro polymerní taveniny. Existují dva základní limitní typy chování – elasticita a plasticita (viskozita). Elastické chování se vykazuje svou vratnou deformací po ukončení působení vnější síly na taveninu, kdežto viskózní chování tekutin vychází z její nevratné deformace. Ovšem řada materiálů podléhá chování mezi oběma limitami, a tudíž jejich odezva na vnější sílu záleží na době působení této aplikované síly, tzv. viskoelastické chování. [42]

K pochopení chování injekčně aplikovatelných hydrogelů je zapotřebí studia smykové odezvy hydrogelů z hlediska toku a potenciálních změn objemových strukturních vlastností. [43] Reologická měření reprezentují chování polymerního materiálu a vztah mezi napětím, deformací a časem při jeho zpracování. Kvantifikuje reakci taveniny na deformaci. [44]

Viskoelastické chování hydrogelu jsou popsány následnými rovnicemi: [45]

$$\sigma = \sigma_0 \cdot \cos(\omega \cdot t + \delta) \tag{4}$$

$$\varepsilon = \varepsilon_0 \cdot \cos(\omega \cdot t) \tag{5}$$

Kde σ je označení napětí, σ_0 je absolutní výchylka napětí, ε (t) je poměrná deformace v čase t, ε_0 je poměrná deformace, ω značí kruhovou frekvenci a δ fázový posun. [45]

Při harmonickém namáhání materiálu se část integrované mechanické energie spotřebuje na vyrovnání deformace při přerušení působení síly na materiál a její zbytek se přemění na energii jiné formy. Mezi napětím a poměrnou deformaci se nachází fázový posun o intervalu $\delta = (0; \pi/2)$. [45]

Jelikož rovnice (4) popisuje časovou závislost napětí při harmonickém namáhání, lze tuto základní rovnici upravit pro reálné reometrické měření na: [44]

$$\sigma = G' \cdot \varepsilon_0 \cdot \cos(\omega \cdot t) + G'' \cdot \cos\left(\omega \cdot t + \frac{\pi}{2}\right) \tag{6}$$

Kde G‘ značí reálnou složku elastického modulu pružnosti v tahu a G“ je složkou imaginární daného modulu, také zvaný jako ztrátový modul. Tyto dvě složky jsou funkcí frekvence kmitání při harmonickém namáhání v tahu. Elastický modul (komplexní modul) reprezentuje pevnostní vlastnosti materiálu, kdežto modul ztrátový jeho vlastnosti tlumící. Jednotlivé moduly mohou být vyjádřeny následujícími rovnicemi: [44]

$$G' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \cdot \cos\delta \tag{7}$$

$$G'' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \cdot \sin\delta \tag{8}$$

Komplexní modul pružnosti G^* se skládá z elastické a ztrátové složky a lze jej vyjádřit rovnicí: [44]

$$G^* = G' + i \cdot G'' \tag{9}$$

Poměr daných složek udává rozsah projevu viskóznějšího či elastického chování materiálu. Mohou nastat následující situace: [44]

- Pokud G‘ > G“; pak se materiál chová elasticky a je tedy vysoce strukturovaný
- Pokud G‘ < G“; pak se materiál chová více viskózně

3.4 UVOLŇOVÁNÍ LÁTEK – UV-vis

UV-vis spektroskopie zahrnuje absorpční a reflektanční spektroskopii v UV a viditelné oblasti spektra. π-elektrony nebo nevazebné elektrony (n-elektrony) v molekulách mohou absorbovat energii ultrafialového nebo viditelného světla a být excitovány do vyšších antivazebných vrstev molekulových orbitalů, dochází tedy k elektronickým přechodům. Obecně se UV-vis spektroskopie používá ke kvantitativnímu stanovení koncentrace prvků v roztoku podle Beerova-Lambertova zákona, kterým je popsána závislost absorbance na koncentraci a tloušťce kyvety: [38, 46]

$$A = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot L, \tag{10}$$

kde A je naměřená absorbance, I_0 je intenzita dopadajícího světla při dané vlnové délce, I je prošlá intenzita, L je délka kyvety, c je koncentrace absorbující látky a ε je konstanta známá jako molární absorbance nebo extinkční koeficient specifický pro každou látku a vlnovou

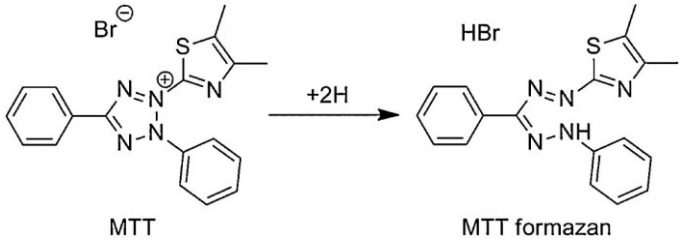
délku. Obvykle se při kvantitativní analýze používá ε při vlnové délce maxima absorpce (A_{max}), protože chyby vyplývající z nejistoty přístrojové vlnové délky jsou minimalizovány na vrcholu absorpční křivky. Podle tohoto vztahu lze vypočítat koncentraci analytu, když je známo ε, L je pevně stanoveno a I_0 a I jsou změřeny. Je-li k dispozici kalibrační křivka analytu, lze koncentraci analytu určit přesněji. Nicméně tato aplikace UV-vis spektroskopie na biomateriály není rozšířená, protože většina biomateriálů není v roztoku, molární extinkční koeficienty některých biomateriálů v roztoku nejsou známy a kalibrační křivky se obtížně získávají. Místo toho se roztok obsahující biomateriály charakterizuje pomocí UV-vis spektroskopie, aby se získala absorpční spektra, nikoliv koncentrace. [38, 46]

3.5 BIOKOMPATIBILITA HYDROGELŮ

V případě materiálů, které se vyvíjí za předpokladu interakce s živým systémem, je zapotřebí vyloučit případné toxické materiály. K tomu se používají testy cytotoxicity, které jsou založeny na sledování a ověření biokompatibility pomocí testů buněčné životaschopnosti. Životaschopnost buněk je kvantifikována po jejich vystavení různým materiálům po určitou dobu. Tato schopnost může být analyzována několika metodami, které jsou založeny na parametrech, jako je integrita buněčných membrán, metabolická aktivita nebo redoxní potenciál buněčné populace. [47]

3.5.1 MTT

Jednou z těchto metod je test založený na sledování zachování metabolické aktivity analyzovaných buněk, tzv. MTT. Tento test společně s detekcí ATP (ATP test) poskytují rychlý přehled o potenciálním cytotoxickém účinku jakékoli sloučeniny. MTT je založen na enzymatické redukci žluté tetrazoliové soli MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5--difenyltetrazolium bromidu za vzniku fialového MTT (formazanu). Tuto redukci katalyzuje mitochondriální dehydrogenáza. Množství vytvořeného formazanu je úměrné počtu živých buněk a stanovuje se zaznamenáním změn absorbance. Jde tedy o kolorimetrickou reakci, kterou lze analyzovat spektrofotometricky. [47]



Obr. 7: Enzymatická redukce MTT za vzniku formazanu [47]

Formazan je ve vodě nerozpustná sůl, a proto se musí před měřením absorbance rozpustit pomocí rozpouštědel, jako jsou DMSO, isopropanol nebo SDS. Pro rozpuštění formazanu v tomto protokolu bylo využito DMSO. [47]

MTT testování hydrogelů jsou prováděna dle směrnice ČSN EN ISO 1099, která zahrnuje zkoušku extraktu a přímého a nepřímého kontaktu. Zavádí se zde pojem inhibiční koncentrace IC_{50}, která vyjadřuje koncentraci látky, při níž dochází k 50 % zamezení růstu či úhynu organismům. Interpretace výsledků inhibiční koncentrace je prováděna podle ČSN EN ISO 10993. [48]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo připravit hydrogely na bázi chitosanu pomocí dialdehydu celulózy jakožto síťovadla a optimalizovat jejich vlastnosti pro medicínské aplikace přenosu léčiv na základě rozdílné koncentrace chitosanu a různých koncentrací síťovacího činidla. Hydrogely byly charakterizovány pomocí fyzikálně-chemických metod zejména stanovením parametrů sítě, stupně bobtnání a viskoelastických vlastností. Mimo toho byly hydrogely také nasyceny biologicky aktivní látkou – kofeinem a byla studována kinetika jejich uvolňování. Na závěr nesměly chybět také testy cytotoxicity.

5 METODY PŘÍPRAVY A CHARAKTERIZACE CHITOSANOVÝCH HYDROGELŮ ZESÍŤOVANÝCH POMOCÍ DAC

5.1 POUŽITÉ MATERIÁLY

Pro testy cytotoxicity byly použity buňky myších fibroblastů NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658^{TM}, USA) a jako médium pro kultivaci buněk bylo použito Dulbecco's Modified Eagle's Medium (PAA Laboratories GmbH, Rakousko). Do média bylo přidáno 100 Uml^{-1} Penicillin/Streptomycin (Biosera, France). K promývání buněk byl použit fyziologický roztok (PBS, Invitrogen, USA). Kultivace buněk probíhala na plastiku Techno (TPP, Švýcarsko) a ke stanovení jejich životaschopnosti byl použit Tetrazolium kit (test proliferace buněk pomocí MTT, Duchefa Biochemie, Nizozemsko).

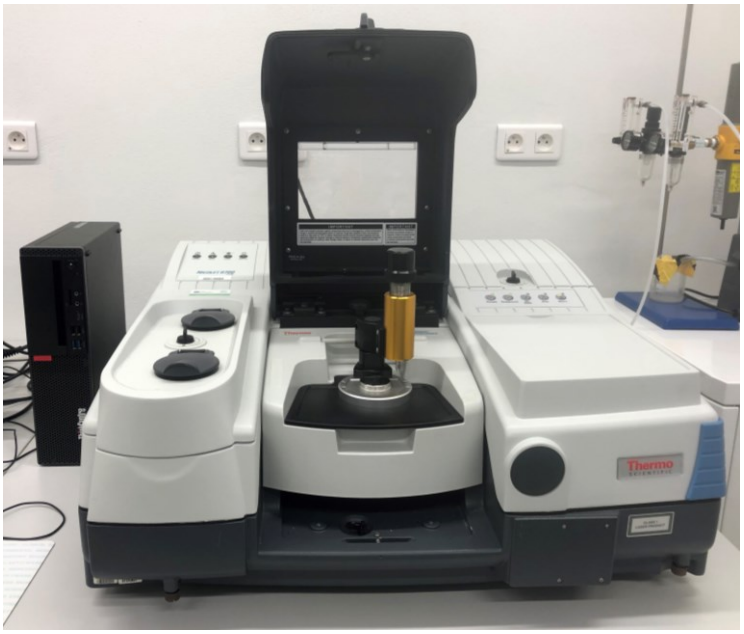
5.1.1 Chemikálie

Nízkomolekulární chitosan se stupněm deacetylace 75 % (448869, M_w= 50 – 190 kDa, Sigma Aldrch Co.), sigma-celulóza (Sigma Aldrich Co.), jodistan sodný ($NaIO_4$) (Penta, Česká republika), ethylenglykol, hydroxid sodný (NaOH), kyselina chlorovodíková (HCl) (Penta, Česká republika). Připravené vzorky hydrogelů o různých poměrech koncentrací nasyceny kofeinem (Sigma Aldrich Co.).

5.2 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

5.2.1 Spektroskopická analýza

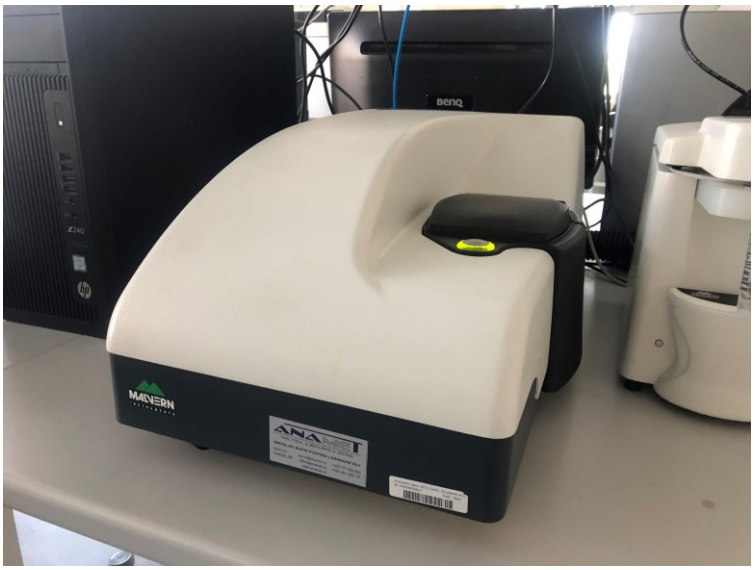
Vzorky připravených lyofilizovaných prášků SCN (50% deacetylovaný chitosan) a DAC (dialdehyd celulózy) a také jejich výchozích látek byly analyzovány infračervenou spektroskopí s Fourierovou transformací (FT-IR) pomocí spektrometru Nicolet 6700 (Thermo Fisher Scientific, USA) (Obr. 8) vybaveného diamantovým krystalem v režimu ATR v rozsahu vlnových délek 4000-400 nm (počet snímků: 64, s potlačením atmosférických plynů).



Obr. 8: FT-IR spektrometr Nicolet 6700

5.2.2 Analýza dynamického rozptylu světla chitosanových hydrogelů

Analýza koloidů SCN/DAC pomocí dynamického rozptylu světla (DLS) byla provedena na přístroji Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, USA) (viz. Obr. 9).



Obr. 9: Zetasizer Nano ZS

5.2.3 Morfologie

Lyofilizované chitosanové hydrogely byly analyzovány rastrovací elektronovou mikroskopií (SEM) pomocí mikroskopu Nova NanoSEM 450 (FEI, Česká republika) za 5 kV urychlovacího napětí. Před analýzou byly poprášeny nanočásticemi zlata-palladia kvůli potlačení účinku akumulace náboje.

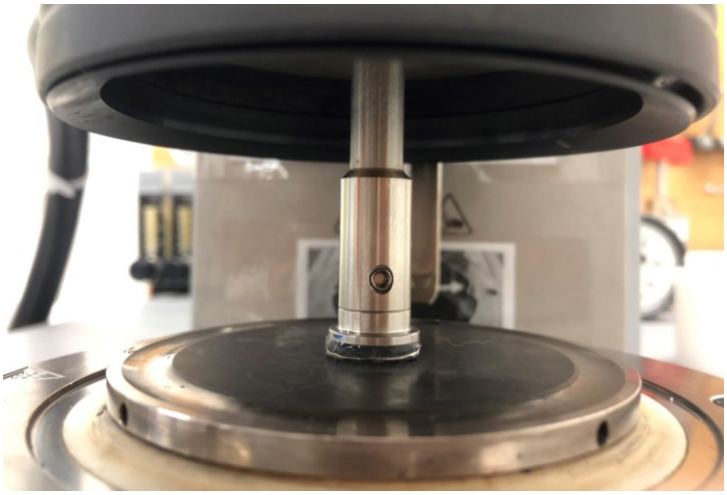
5.2.4 Parametry sítě

Za pomoci skalpelu byly ze ztuhlých nevypraných hydrogelů vyřezána 3 válcovitá tělíska o délce 15 mm. Tato tělíska byla zvážena a následně důkladně vyprána v destilované vodě při 37 °C po dobu 2 dnů. Zbobtnaná tělíska byla zvážena a poté lyofilizována. Parametry sítě byly stanoveny podle rovnovážné teorie bobtnání, jež je popsána v kapitole 3.2.

5.2.5 Viskoelastické vlastnosti

Tělíska byla měřena pomocí rotačního reometru Anton Paar MCR 502 (Anton Paar, Rakousko) (Obr. 10), který zahrnoval také hřídel s 15 mm zdrsněným hliníkovým plátem D-CP/PP-7 a spodní podkladní deska byla vybavena brusným papírem kvůli zamezení prokluzování tělísek při měření (viz. Obr. 11). Měření bylo provedeno při teplotě 37 °C. K dalším parametrům měření patří rozmezí úhlové rychlosti, které bylo nastaveno od 1 až 10 Hz při 1 % konstantní deformaci. Měření pro každý vzorek bylo opakováno třikrát.

Obr. 10: Rotační reometr Anton Paar MCR 502



Obr. 11: Vzorek hydrogelu při měření viskoelastických vlastností pomocí reometru

5.2.6 Cytotoxicita

Pro stanovení cytotoxicity hydrogelů byla zvolena buněčná linie myších fibroblastů NIH/3T3 (ECACC 93061524, England). Příprava extraktů ze vzorků zbobtnalých hydrogelů DAC5_SCN7,5, DAC10_SCN7,5, DAC20_SCN7,5 a DAC50_SCN7,5 (značení vzorků viz. kapitola 5.3.3, Tab. 5) proběhla podle ISO normy 10993-12. Na přípravu extraktů vylo využito 0,1 g zbobtnalého hydrogelu na 1 ml kultivačního média. Hydrogel byl extrahován v kultivačním médiu při 37 °C po dobu 24 h za stálého míchání. Poté byly získané extrakty zředěny čerstvým kultivačním médiem také na 75 a 50 % původní koncentrace. Samotné testování cytotoxicity bylo provedeno podle postupu v ČSN EN ISO normě 10993-5. Buňky ještě před započetím experimentu kultivovány po dobu 24 h a následně rozpipetovány do 96-jamkových destiček, přičemž každá jamka obsahovala 100 µl buněčné suspenze o koncentraci $1x10^5$ buněk/1 ml). Na takto připravené buňky byly naneseny hydrogelní extrakty a destičky byly inkubovány po dalších 24 h. Životaschopnost buněk byla následně kvantifikována pomocí MTT analýzy.

5.2.7 Nasycení hydrogelů biologicky aktivní látkou a její uvolňování

Vybrané zbobtnalé SCN/DAC hydrogely (DAC5_SCN7,5 a DAC50_SCN7,5) byly nasyceny roztokem kofeinu, jako modelovou biologicky aktivní látkou. Jako první byl připraven zásobní roztok kofeinu o koncentraci 20 mg/ml. Následně byly roztoky matrice o koncentraci 7,5 mg/ml a o objemu 2,5 ml smíchány s daným množstvím zásobního roztoku kofeinu odpovídající celkem 5 mg kofeinu. Dále byly připraveny i roztoky příslušného množství síťovadla (5, 50 mol. %). Takto připravené roztoky byly umístěny do injekčních stříkaček a třepány při 37 °C po dobu 24 h pro nejvyšší možné nasycení hydrogelu. Poté

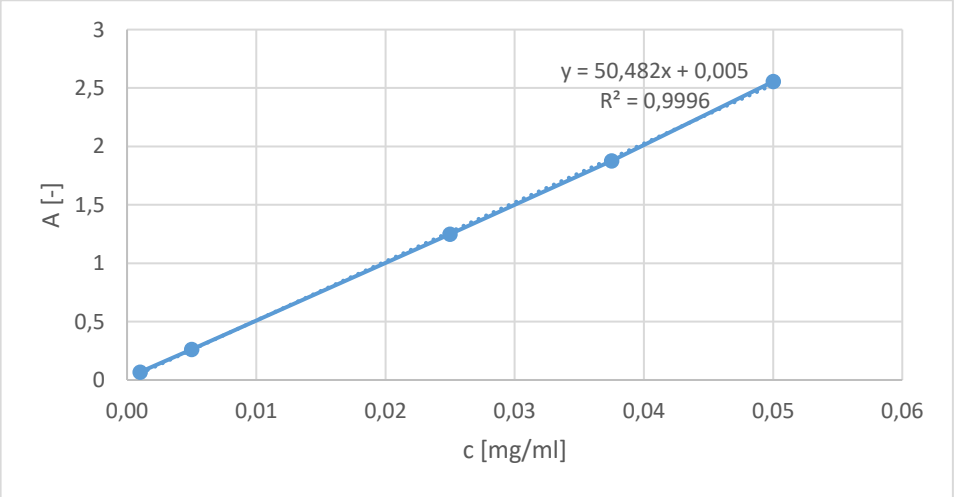
byly hydrogely připraveny standardním postupem, viz. kap. 5.3.3. Takto perfektně promíchané vzorky s kofeinem byly připraveny ke studiu kinetiky uvolňování biologicky aktivní látky.

5 ml každého hydrogelu obsahujícího 5 mg kofeinu byly převedeny do dialyzační membrány o MWCO (molecular weight cut-off) 3500 Da, následně uloženy do uzavíratelných nádob s 100 ml ultračisté vody (UPW, ultrapure water) a byly třepány při 37 °C za nepřístupu světla. Při daných časových intervalech (po 1/12 h, 1/4 h, 1/2 h, 3/4 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h a 48 h) se odebíralo 5 ml roztoku a po každém odběru bylo vždy ihned přidáno 5 ml UPW pro zachování konstantního objemu. Jednotlivé vzorky byly poté analyzovány pomocí UV-VIS spektrometru Perkin Elmer Lambda 1050 (Perkin Elmer 219 Inc., USA). Škála rozpětí vlnových délek zahrnovala vlnové délky od 200-325 nm. Uvolňování modelové biologicky aktivní látky (kofeinu) bylo studováno sledováním intenzity absorpčního pásu kofeinu při 273 nm.

Pro vyhodnocení množství uvolněného kofeinu z připravených hydrogelových matric byla pomocí roztoků kofeinů o různých koncentracích (Tab. 1) sestavena kalibrační křivka (Obr. 12).

Tab. 1: Kalibrační křivka kofeinu – naměřené hodnoty

c [mg/ml]	A 273 nm
0,0500	2,5545
0,0375	1,8763
0,0250	1,2479
0,0050	0,2609
0,0010	0,0677

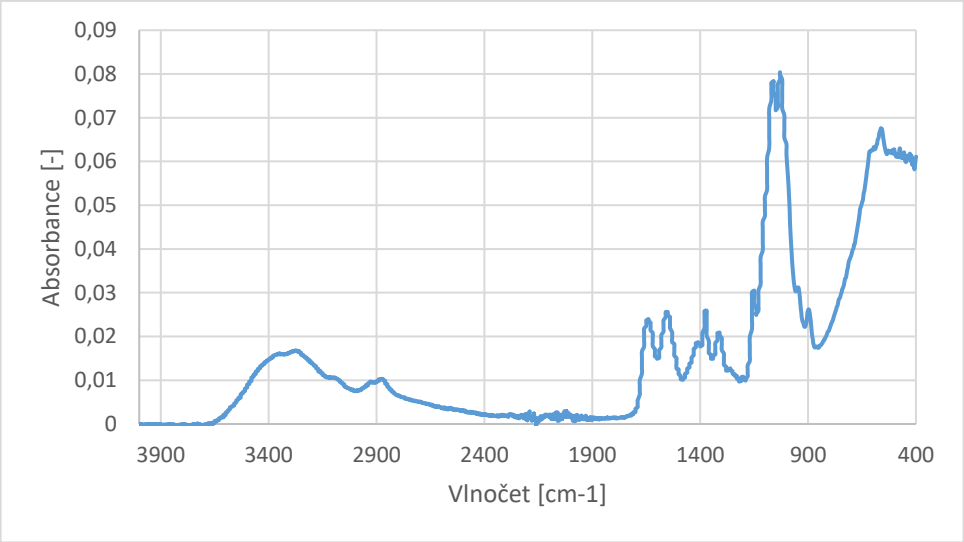


Obr. 12: Kalibrační křivka kofeinu

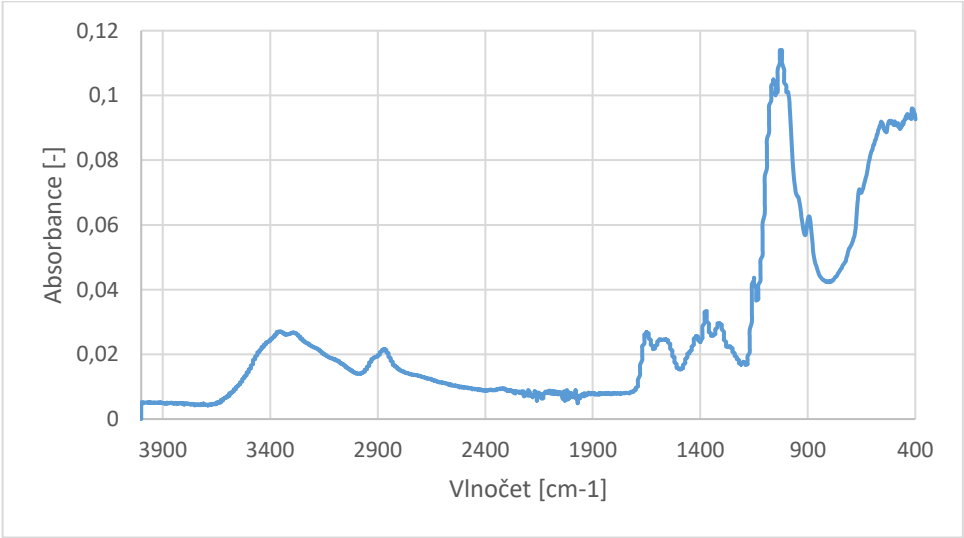
5.3 PŘÍPRAVA CHITOSANOVÝCH HYDROGELŮ

5.3.1 Příprava SCN

K přípravě hydrogelů byl zvolen 50 % deacetylovaný chitosan díky jeho vyššímu obsahu amidových skupin a tím pádem dobré rozpustnosti nejen v kyselém prostředí, ale i ve vodném roztoku. Chitosanový roztok byl připraven rozpuštěním 2,2 g nízkomolekulárního chitosanu v 70 ml 10 % roztoku kyseliny octové za stálého míchání při 600 RPM za laboratorní teploty po dobu 2 h a následně za stálého míchání při 300 RPM za laboratorní teploty po dobu 2 h. V následujícím kroku bylo přidáno 50 ml ethanolu s obsahem 0,519 ml anhydridu kyseliny octové. Tato směs byla míchána při 200 RPM po dobu 18 h za nepřístupu světla. Po uplynutí této doby byl postupně přidáván 5 M roztok NaOH pro docílení pH 8,5. Ihned poté byl vzorek rozdělen na dvě poloviny a dialyzován ve vodném prostředí po dobu 72 h. Během dialýzy byl vzorek také ručně protřepáván. Poté bylo opět upraveno pH roztoku na hodnotu 6,5 pomocí postupného přidávání 1 M roztoku HCl. Tento mírně kyselý roztok byl dialyzován ve vodném prostředí po dobu 72 h. Dialyzovaný roztok byl převeden do 800 ml kádinky a po zkontrolování pH byl odpařován při 50 °C z cca 600 ml na 200 ml. Po další kontrole pH roztoku, které mělo odpovídat hodnotě 6,5, byl roztok centrifugován (10 000RPM, 10 min), filtrován přes filtrační papír a lyofilizován. Pro odstranění kyseliny octové z produktu byl znovu rozpuštěn v koncentraci 100 mg na 100 ml destilované vody a dialyzován v prostředí roztoku NaCl při koncentraci 1 mg na 1 ml o celkovém objemu 5 l po dobu 1 týdne a proti vodě po dobu posledních 24 h. Na závěr byl vzorek přefiltrován, lyofilizován, charakterizován a porovnán s původním chitosanem (deacetylovaným ze 75 %) pomocí IR spektroskopie (Obr. 13 a Obr. 14). Ve spektrech je patrný pokles přítomnosti intenzivních pásů amidových skupin při vlnočtu 1640 (vibrace Amide I) a 1540 cm^{-1} (Amide II), což odpovídá snížení stupně deacetylace, tedy menšímu počtu amidických skupin. [49]



Obr. 13: IR spektrum 50 % deacetylovaného chitosanu (SCN)



Obr. 14: IR spektrum námi připraveného 75 % deacetylovaného chitosanu

5.3.2 Příprava DAC

2,3-dialdehyd celulózy (DAC) by připraven procesem periodátové regioselektivní oxidace sigma-celulózy (Sigmacell) pomocí $NaIO_4$. Zvolený molární poměr reaktaktů byl 1:1,25 (DAC : periodát). Nejprve byly 2 g sigma-celulózy dispergovány společně s 3,3 g $NaIO_4$ ve 100 ml destilované vody. Následně byla směs míchána na 500 RPM ve vodní lázni při laboratorní teplotě po dobu 72 h za nepřístupu světla. Po uplynutí této doby byla oxidace zastavena přídavkem 2 ml ethylenglykolu a následného míchání při 500 RPM po dobu 10 min. Poté byla směs důkladně pročištěna opakovanou centrifugací vždy po dobu 15 min a mechanickou redispergací homogenizátorem. Suspenze DAC ve 200 ml destilované vody byla solubilizována při teplotě 80 °C po dobu 2 h. Solubilizační systém s tříhrdlou baňkou

ponořenou do ethylenglykolové lázně byl vybaven zpětným chladičem a teploměrem, kterým byla regulována teplota reakční směsi. Solubilizovaný vzorek DAC byl následně zchlazen, poté dialyzován (48 h) ve vodném prostředí, přefiltrován a jeho výtěžek byl lyofilizován. Výtěžek DAC vzorku činil 1,0582 g.

Stupeň oxidace DAC byl určen pomocí potenciometrické titrace kyseliny chlorovodíkové (HCl) hydroxidem sodným (NaOH). Příprava vzorku probíhala rozpuštěním 0,1 g DAC ve 30 ml destilované vody a následné úpravou roztoku na pH 4. Zásobní roztok hydroxylaminu byl připraven rozpuštěním 5,375 g hydroxylaminu ve 250 ml destilované vody s následnou úpravou daného zásobního roztoku na pH 4. Následně bylo ke každému vzorku přidáno 20 ml zásobního roztoku. Takto připravené roztoky byly před podrobení potenciometrické titraci změřeny pomocí pH metru a jejich hodnoty byly zaznamenány do tabulky (Tab. 3). Roztoky byly dále titrovány pomocí 0,1 M NaOH do stavu dosažení hodnoty pH 4, následně byla odečtena a zaznamenána spotřeba NaOH. Tento postup se opakoval třikrát.

Pro korekci titrace bylo zapotřebí stanovení spotřeby NaOH pro slepý vzorek pomocí acidobazické titrace. Měření slepého pokusu proběhlo třikrát. K provedení standardizace byl použit 0,1 M NaOH. Nejdříve byly přidány k 10 ml 0,05 M dihydrátu kyseliny šťavelové 2-3 kapky indikátoru methyloranž (pH přechodu 3,1 - 4,4). Poté byl přidáván standard 0,1 M NaOH do momentu změny zbarvení z červené na žlutou barvu roztoku. Následoval přídavek 10 ml 2 M chloridu vápenatého, čímž opět dojde ke změně zbarvení. Titrace standardem pokračovala do stavu barevného přechodu. Poté byla odečtena spotřeba NaOH (viz. Tab. 2).

Tab. 2: Spotřeba NaOH pro slepý vzorek pomocí acidobazické titrace

Číslo měření	**Spotřeba NaOH V_0 [ml]**
1	10,2
2	10,2
3	10,2
Průměr V_0	10,2

Tab. 3: Navážka DAC, výsledky stanovení pH roztoků a objem spotřeby NaOH

Číslo vzorku	**Navážka DAC [g]**	**pH před titrací [-]**	**pH před titrací [-]**	**Spotřeba NaOH V_{NaOH} [ml]**
DAC_1	0,1001	1,79	4,00	9,4
DAC_2	0,1000	1,78	4,00	9,6
DAC_3	0,1005	1,79	4,00	9,6

K určení hodnoty stupně oxidace DAC byly použity následující výpočty, díky nimž byl stanoven na 74,8 % (viz. Tab. 4).

1) Výpočet titru pomocí hmotnosti dihydrátu kyseliny šťavelové v roztoku (m_i), objemu NaOH stanovenému pro slepý vzorek standardizace (V_0) a titračního faktoru kyseliny šťavelové (f_i):

$$t = \frac{m_i}{V_0 \cdot f_i} \tag{11}$$

2) Výpočet korekce na titraci pomocí objemu spotřeby NaOH po konci potenciometrické titrace vzorků DAC (V_{NaOH}) a titru (t):

$$V_t = V_{NaOH} \cdot t \tag{12}$$

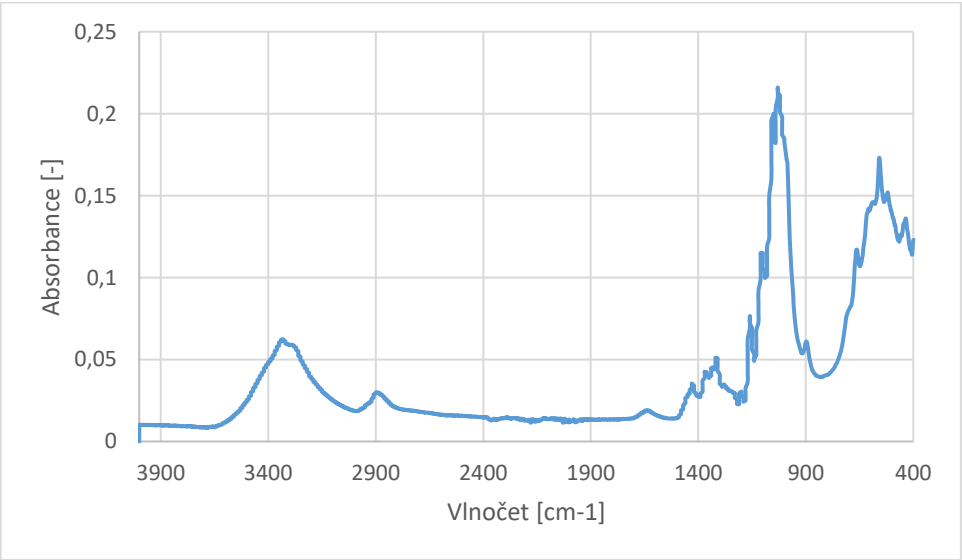
3) Výpočet hmotnosti HCl pomocí faktoru titrace HCl (F) a korekce na titraci (V_t):

$$m = F \cdot V_t \tag{13}$$

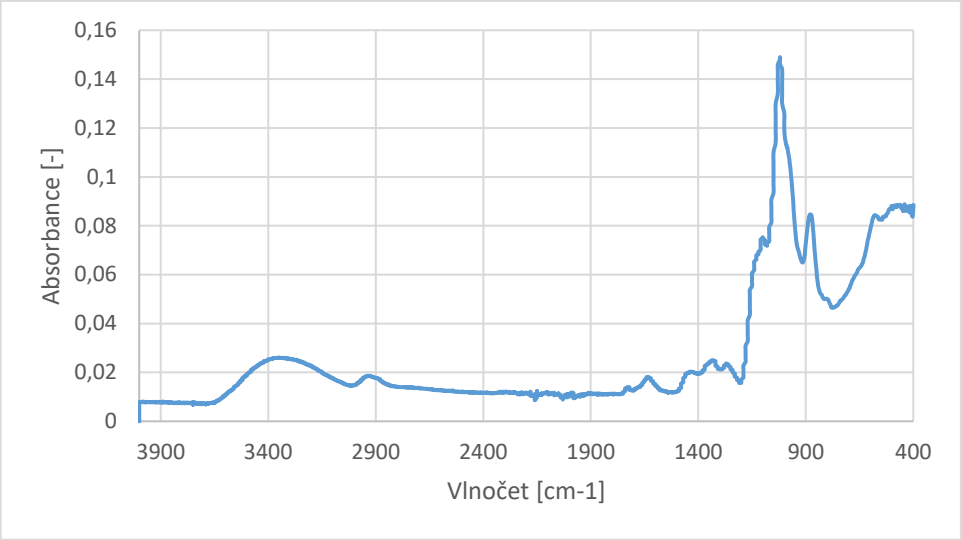
Tab. 4: Výsledky výpočtů a hodnoty potřebné ke stanovení stupně oxidace DAC

Vzorek	**Titr**	**V_{NaOH} [ml]**	**m DAC [g]**	**V_t [ml]**	**m HCl [mg]**	**n HCl [mmol]**	**n -CHO v 1g [mmol/g]**	**n 100% -CHO [mmol/g]**	**Konverze [%]**
DAC	0,9804	9,5	0,1	9,3	34,1	0,9	9,3	12,5	74,8

Vzorek byl charakterizován pomocí IR spektroskopie a porovnán s původní celulózou (Obr. 15 a Obr. 16). Dva charakteristické peaky v oblasti pásů 1730 cm^{-1} a 877 cm^{-1}., potvrzují vznik aldehydických skupin.



Obr. 15: IR spektrum sigma-celulózy



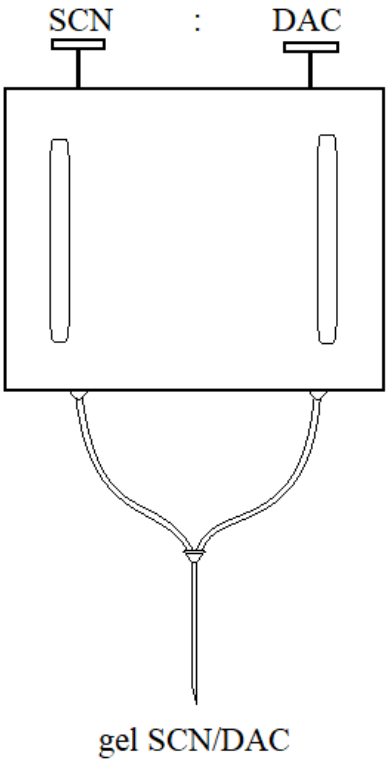
Obr. 16: IR spektrum námi připravené dialdehyd celulózy

5.3.3 Příprava SCN/DAC hydrogelů

SCN a DAC byly naváženy v molárních poměrech uvedených v Tab. 5 do 25 ml injekční stříkačky. Následně byl k látkám přidáno 2,5 ml destilované vody. Takto připravené roztoky polymerů byly míchány při 37 °C na 300 RPM po dobu 72 h. Tvorba gelu vyžadovala použití směšovacího nástavce, do kterého byly vsunuty injekční stříkačky s roztoky SCN a DAC (viz. Obr. 17). Injekční jehly obou stříkaček se sbíhaly do směšovací komůrky, která byla ukončena další injekční jehlou o větším průměru, kterou byl vytlačen už smíchaný gel. Takto zhotovený gel byl následně využit pro inverse tube test a stanovení času gelace. Již ztuhlé gely byly využity k měření parametrů jejich sítí, viskoelastických vlastností a testu cytotoxicity.

Tab. 5: Připravené vzorky SCN/DAC

Značení vzorků	**Koncentrace roztoku SCN**	**Molární zlomek**	**Finální koncentrace**	**Navážka**	
	c_r [mg.ml^{-1}]	x_{DAC} [mol %]	c_{SCN} [mg.ml^{-1}]	**SCN [mg]**	**DAC [mg]**
DAC5_SCN1	2	5	1	5,0	0,2313
DAC5_SCN2,5	5	5	2,5	12,5	0,5783
DAC5_SCN5	10	5	5	25,0	1,1565
DAC5_SCN7,5	15	5	7,5	37,5	1,7348
DAC10_SCN1	2	10	1	5,0	0,4883
DAC10_SCN7,5	15	10	7,5	37,5	3,6623
DAC20_SCN1	2	20	1	5,0	1,0987
DAC20_SCN7,5	15	20	7,5	37,5	8,2403
DAC50_SCN7,5	15	50	7,5	37,5	32,9611



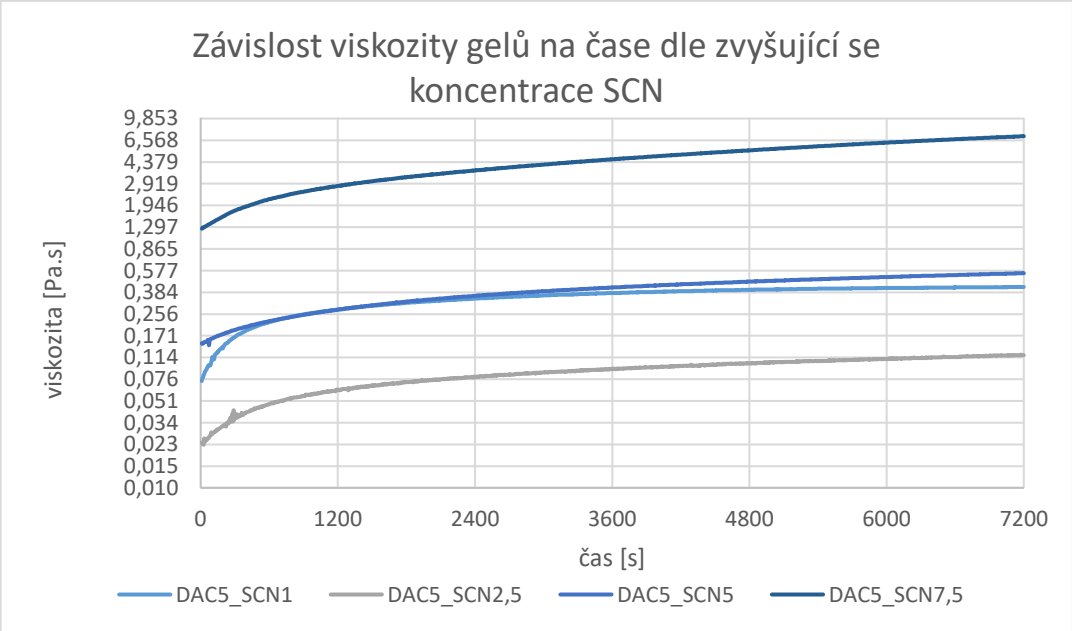
Obr. 17: Grafické znázornění směšovacího podstavce

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 CHARAKTERIZACE SCN/DAC HYDROGELŮ

6.1.1 Gelace v závislosti na koncentraci SCN

Rychlost gelace v závislosti na koncentraci SCN byla stanovována pro vzorky zbobtnalých hydrogelů pomocí reometru s geometrií válec-válec. Stanovení probíhalo u vzorků DAC5_SCN1, DAC5_SCN2,5, DAC5_SCN5 a DAC5_SCN7,5, a tedy při konstantním množství síťovadla DAC (5 mol. %) pomocí rotačního reometru. Měřena byla dynamická viskozita jednotlivých hydrogelů při konstantní frekvenci 1 Hz s amplitudou deformace 1 % po dobu 2 h v geometrii válec-válec. Rozsah dynamických viskozit v závislosti na koncentraci se pohyboval od 0,23 – 6,5 Pa.s. Nejvyšší nárůst dynamické viskozity byl zaznamenán do 10 min od počátku měření. Při větší koncentraci SCN byly hodnoty dynamické viskozity znatelně vyšší. Hodnota dynamické viskozity téměř všech vzorků se stále zvyšovala i na konci měření (Obr. 18), což naznačuje, že gelace stále ještě nebyla ukončena. Pro další studium vzorků hydrogelů byly zvoleny vzorky o nejvyšší koncentraci SCN (7,5 mg.ml^{-1}), jelikož pouze u nich došlo v daném časovém úseku ke gelaci, zatímco u ostatních došlo pouze ke zvýšení dynamické viskozity.

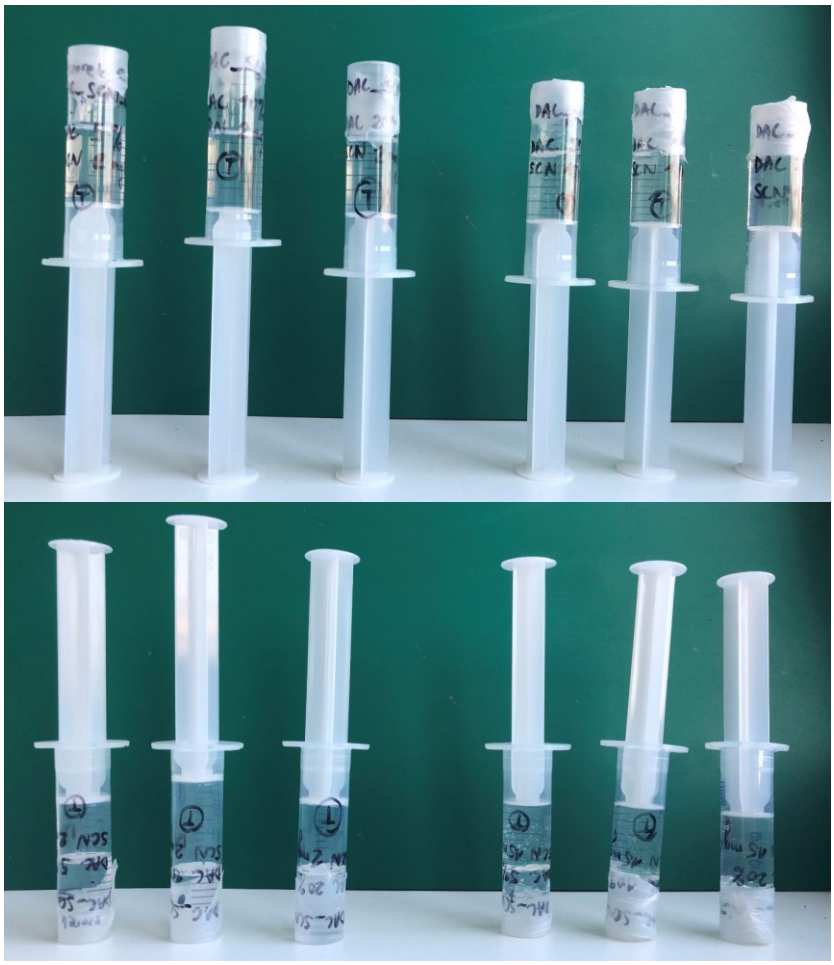


Obr. 18: Závislost dynamické viskozity gelů na čase dle zvyšující se koncentrace SCN

U vzorků s nejnižší koncentrací SCN byl dále zkoumán ještě vliv množství síťovadla pomocí tzv. inverse-tube testu a vybrané nezgelované vzorky byly charakterizovány pomocí DLS analýzy.

6.1.2 Inverse tube test

Inverse tube test (ITT) je využíván pro kvalitativní určení času gelace. Hydrogely byly vytlačeny přes směšovací nástavec do injekčních stříkaček, které byly v pravidelných intervalech otáčeny. Za gelační čas je považována doba, po níž už obsah stříkačky nestekl. Pro inverse tube test byly vybrány vzorky zbobtnalých hydrogelů s nejnižší a nejvyšší koncentrací SCN (1 a 7,5 $mg.ml^{-1}$) o různých molárních poměrech síťovacího činidla DAC. V tomto testu uspěla pouze polovina vzorků, a to těch s vyšší koncentrací SCN (Obr. 19). Konkrétně se jednalo o vzorky DAC5_SCN7,5, DAC10_SCN7,5, DAC20_SCN7,5 a DAC50_SCN7,5 jejichž gelační časy jsou uvedeny viz. Tab. 6.



Obr. 19: Inverse tube test

Tab. 6: Stanovená doba gelace jednotlivých vzorků hydrogelů

Vzorek	Doba gelace [min]
DAC5_SCN7,5	20,0
DAC10_SCN7,5	15,0
DAC20_SCN7,5	4,0
DAC50_SCN7,5	0,5

Hydrogely o nejnižší koncentraci SCN nezgelovaly ani v případě zvýšení obsahu síťovadla až na 50 %, a tudíž neprošli ITT testem, proto byly následně charakterizovány pomocí DLS analýzy. U hydrogelů s nejvyšší koncentrací SCN (7,5 mg.ml-1) došlo ke gelaci v rozmezí 0,5 – 20 min, v závislosti na obsahu síťovadla.

6.1.3 DLS analýza

Nezgelované vzorky hydrogelů o koncentraci 1 mg.ml SCN o různých molárních poměrech síťovadla byly podrobeny DLS analýze. Nejmenší částice o velikosti 350 ± 150 byly pozorovány u vzorku DAC5_SCN1. Ostatní částice měly velikost nad 4500 nm, což sahalo za hranici měření přístroje (Tab. 7).

Bylo tedy zjištěno, že tyto vzorky hydrogelů lze považovat za mikrogely. Mikrogel se definuje jako systém disperzních koloidních částic o velikosti v řádech nm až μm, což odpovídá naměřeným datům. [50]

Tab. 7: Vypočítané průměry velikosti dispergovaných částic vzorků hydrogelů

Vzorek	c_{SCN} [mg. ml^{-1}]	n_{DAC} [mol. %]	Velikost částic [nm]
DAC5_SCN1	2	5	350 ± 150
DAC10_SCN1	2	10	> 4500
DAC20_SCN1	2	20	> 4500

6.1.4 Parametry sítě

Parametry sítě různých vzorků SCN/DAC hydrogelů byly vypočítány podle rovnic v kapitole 3.2. Sledované vzorky zahrnovaly už pouze vzorky s nejvyšší koncentrací SCN a různým množstvím síťovadla: DAC5_SCN7,5, DAC10_SCN7,5, DAC20_SCN7,5 a DAC50_SCN7,5. Jejich výsledky jsou uvedeny v Tab. 8. Výsledky ukázaly, že zbobtnání matric hydrogelu je závislé na množství síťovadla. Čím nižší obsah síťovadla, tím více je hydrogel schopen navázat na sebe vodu, a tedy zbobtnat. Vypočítané hodnoty EWC (equilibrium water content) měly naopak klesající charakter se zvyšováním množství síťovadla, a tedy menším obsahem vody v rovnovážném zbobtnalém stavu hydrogelu. Gelová frakce se naopak zvětšovala se vzrůstajícím množstvím síťovadla.

Těmto faktům neodpovídal vzorek DAC5_SCN7,5, u kterého došlo pravděpodobně k částečnému rozpuštění a rozpadu sítě, což ovlivnilo stanovené síťových parametrů. Nejvyšší hodnoty zbobtnání i EWC tak vykazuje vzorek SCN7,5_DAC10.

Tab. 8: Vypočítané hodnoty stanovení parametrů sítě

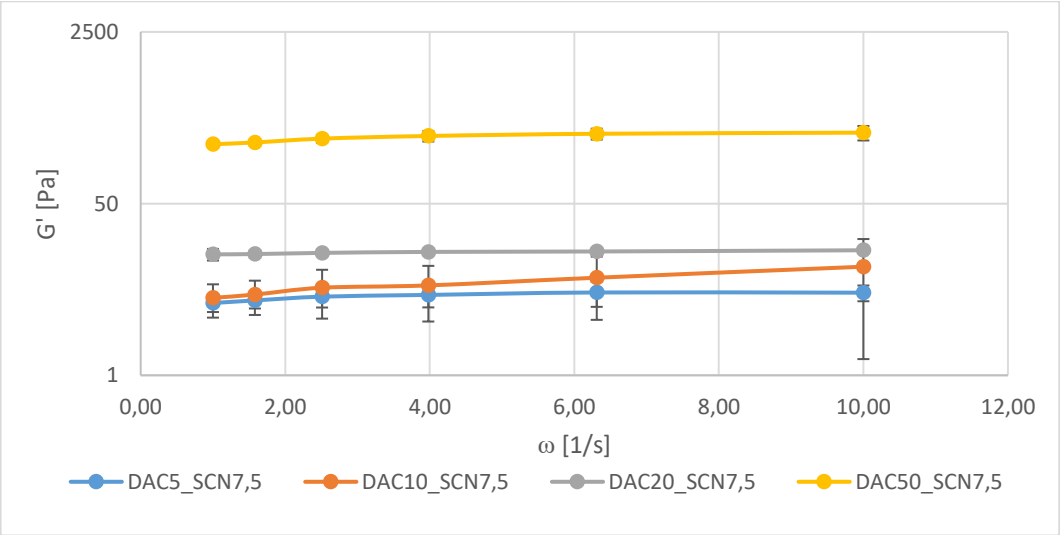
Vzorek	Zbobtnání [%]	EWC [%]	Gelová frakce [%]
DAC5_SCN7,5	43200 ± 10500	99,8 ± 0,05	0,6 ± 0,2
DAC10_SCN7,5	48500 ± 3400	99,9 ± 0,0	0,8 ± 0,0
DAC20_SCN7,5	36600 ± 1110	99,7 ± 0,0	0,6 ± 0,1
DAC50_SCN7,5	1600 ± 300	93,8 ± 1,1	8,5 ± 0,5

6.1.5 Viskoelastické vlastnosti

Charakteristika viskoelastických vlastností hydrogelů v rovnovážně zbobtnalém stavu zahrnovala studium vzorků, které úspěšně prošli ITT testem, a tedy došlo ke gelaci. Konkrétně se jednalo o vzorky DAC5_SCN7,5, DAC10_SCN7,5, DAC20_SCN7,5 a DAC50_SCN7,5. Viskoelastické vlastnosti nevypraných vzorků byly měřeny pomocí reometru s frekvencí 1 Hz až 10 Hz při konstantní deformaci 1 %. Na Obr. 20, Obr. 21 a Obr. 22 jsou znázorněny moduly elastické, ztrátové a komplexní v závislosti na frekvenci a jejich naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tab. 9, Tab. 10 a Tab.11.

Tab. 9: Naměřené hodnoty elastického modulu

	DAC5_SCN7,5		DAC10_SCN7,5		DAC20_SCN7,5		DAC50_SCN7,5	
frekvence ω [1/s]	G‘ [Pa]	chyba [Pa]	G‘ [Pa]	chyba [Pa]	G‘ [Pa]	chyba [Pa]	G‘ [Pa]	chyba [Pa]
1,00	5	1	6	3	16	2	193	11
1,58	6	1	6	3	16	2	201	15
2,51	6	2	7	4	16,3	0,9	220	21
3,98	6	2	8	5	16,6	0,7	233	28
6,31	7	2	9	6	17	1	245	31
10,00	7	2	12	11	17	2	252	41

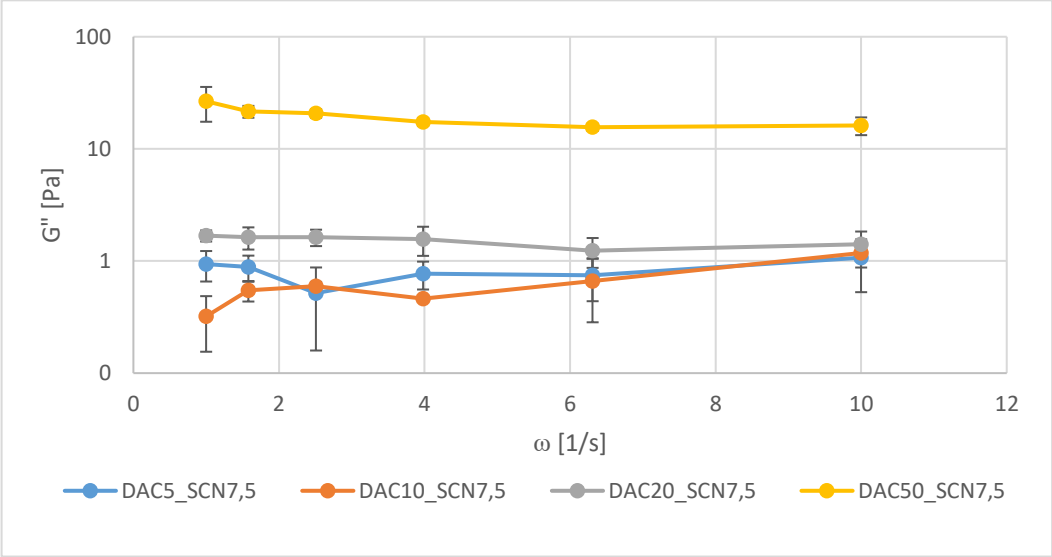


Obr. 20: Závislost elastického modulu na úhlové frekvenci

Z Obr. 20 je patrné, že elastický modul vykazoval největší hodnoty u vzorku DAC50_SCN7,5, který obsahoval nejvíce síťovacího činidla, a tudíž měl nejhustší zesíťování. Mezní hodnoty elastického modulu SCN/DAC hydrogelů se pohybovaly od (252 ± 41) Pa u vzorku DAC50_SCN7,5 po (5 ± 1) Pa u vzorku DAC5_SCN7,5. Parametry vzorků připravených pomocí 5 a 10 % jsou shodné v rámci chyby měření.

Tab. 10: Naměřené hodnoty ztrátového modulu

	DAC5_SCN7,5		**DAC10_SCN7,5**		**DAC20_SCN7,5**		**DAC50_SCN7,5**	
frekvence ω [1/s]	**G“ [Pa]**	**chyba [Pa]**	**G“ [Pa]**	**chyba [Pa]**	**G“ [Pa]**	**chyba [Pa]**	**G“ [Pa]**	**chyba [Pa]**
1,00	0,9	0,3	0,3	0,2	1,7	0,2	27	10
1,58	0,9	0,3	0,5	0,2	1,6	0,4	22	3
2,51	0,5	0,4	0,59	0,06	1,6	0,3	21	2
3,98	0,8	0,3	0,46	0,03	1,6	0,5	17	2
6,31	0,7	0,3	0,7	0,4	1,2	0,4	16	2
10,00	1,1	0,2	1,2	0,7	1,4	0,2	16	3

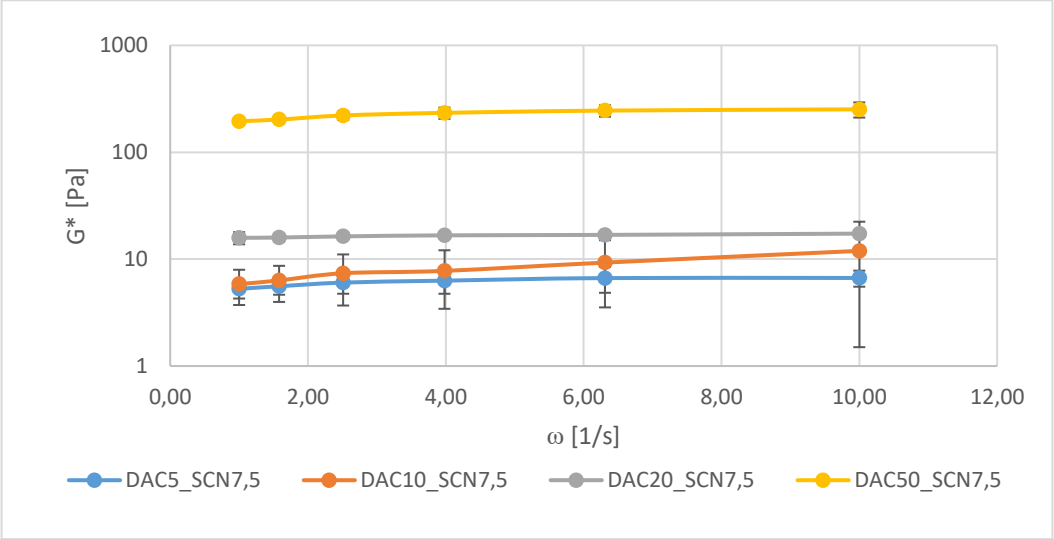


Obr. 21: Závislost ztrátového modulu na úhlové frekvenci

Závislost ztrátového modulu hydrogelů na frekvenci má podobný charakter jako tomu je u modulu dynamického. Nejvyšší hodnoty náleží vzorkům s nejvyšším obsahem síťovadla. Mezní hodnoty ztrátového modulu se pohybují od (27 ± 10) Pa u vzorku DAC50_SCN7,5 po (0,3 ± 0,2) Pa u vzorku DAC10_SCN7,5. Ve všech případech ale byla hodnota ztrátového modulu výrazně menší než u modulu elastického, což značí, že se jedná o strukturované hydrogely s převahou elastického chování nad viskózním.

Tab. 11: Naměřené hodnoty komplexního modulu

	DAC5_SCN7,5		DAC10_SCN7,5		DAC20_SCN7,5		DAC50_SCN7,5	
frekvence ω [1/s]	**G* [Pa]**	**chyba [Pa]**	**G* [Pa]**	**chyba [Pa]**	**G* [Pa]**	**chyba [Pa]**	**G* [Pa]**	**chyba [Pa]**
1,00	5	1	6	3	16	2	195	9
1,58	6	1	6	3	16	2	202	15
2,51	6	2	7	4	16,3	0,9	221	20
3,98	6	2	7	5	16,7	0,7	234	29
6,31	7	2	9	6	17	1	245	30
10,00	7	2	12	11	17	1	252	41

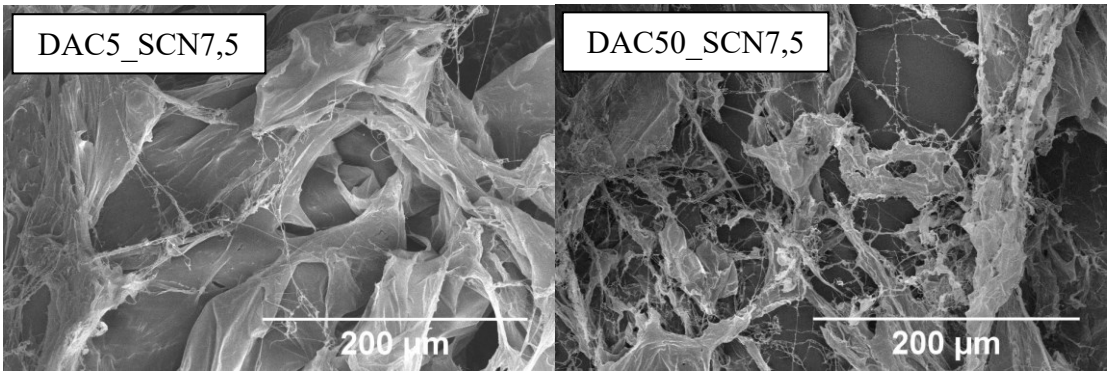


Obr. 22: Závislost komplexního modulu na úhlové frekvenci

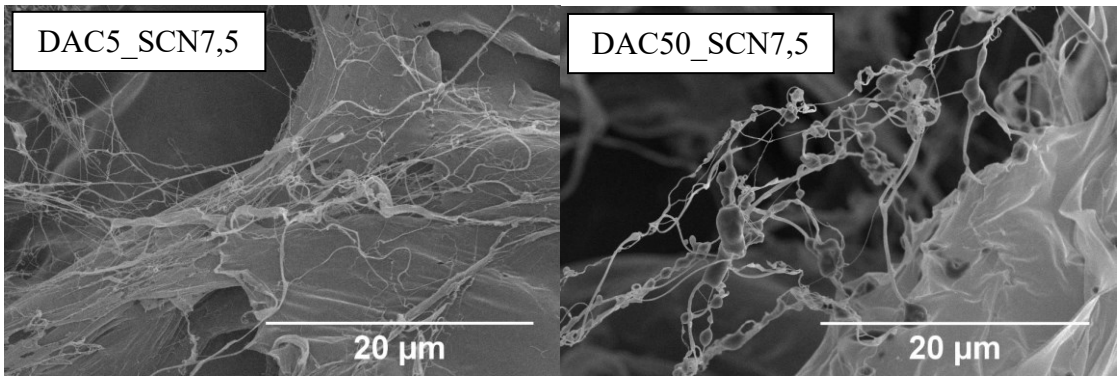
Výsledná naměřená závislost komplexního modulu odpovídala předpokladu dle rovnice v kapitole 3.2 a kopíruje trendy pozorované u elastického modulu. Opět nejvyšší hodnoty zaujímaly komplexní moduly vzorku hydrogelu s nejvyšším obsahem síťovacího činidla DAC (DAC50_SCN7,5).

6.1.6 SEM analýza

Kryogely připravené lyofilizací ze zbobtnalých vzorků hydrogelů DAC5_SCN7,5 a DAC50_SCN7,5 byly analyzovány pomocí rastrovací elektronové mikroskopie (SEM) při zvětšení 10 000 x a 30 000 x. Pozorován byl vliv množství síťovadla pro tvorbu sítí hydrogelu. Z Obr. 23 a 24 je zřejmé, že docházelo k tvorbě zesítěných rovin v podobě navrstvených plástů. Celá struktura obou vzorků hydrogelů včetně plástů je velmi neuspořádaná až chaotická s lokálními většími shluky sítí. S ohledem na chaotickou strukturu nelze usoudit, jestli mělo množství síťovadla vliv na porozitu sítě hydrogelů. Pozorované póry mají rozměry až několik μm.



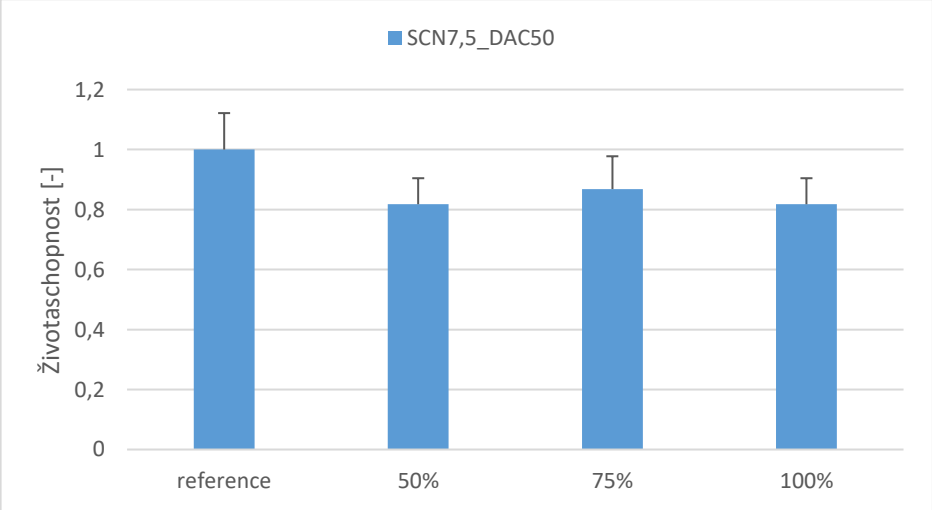
Obr. 23: Mikrofotografie dvou vzorků hydrogelů SCN/DAC pořízené SEM (zvětšení 1 000x)



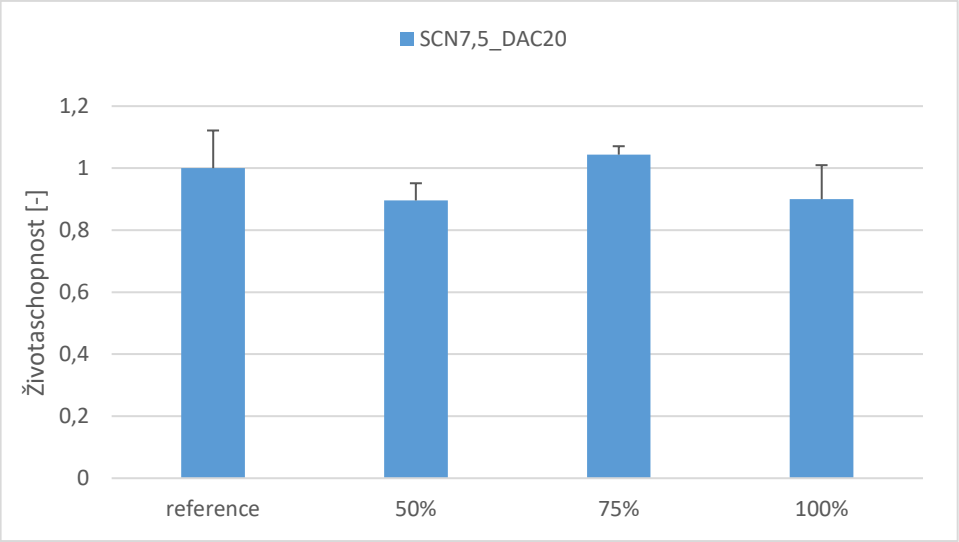
Obr. 24: Mikrofotografie dvou vzorků hydrogelů SCN/DAC pořízené SEM (zvětšení 10 000x)

6.1.7 Testy cytotoxicity

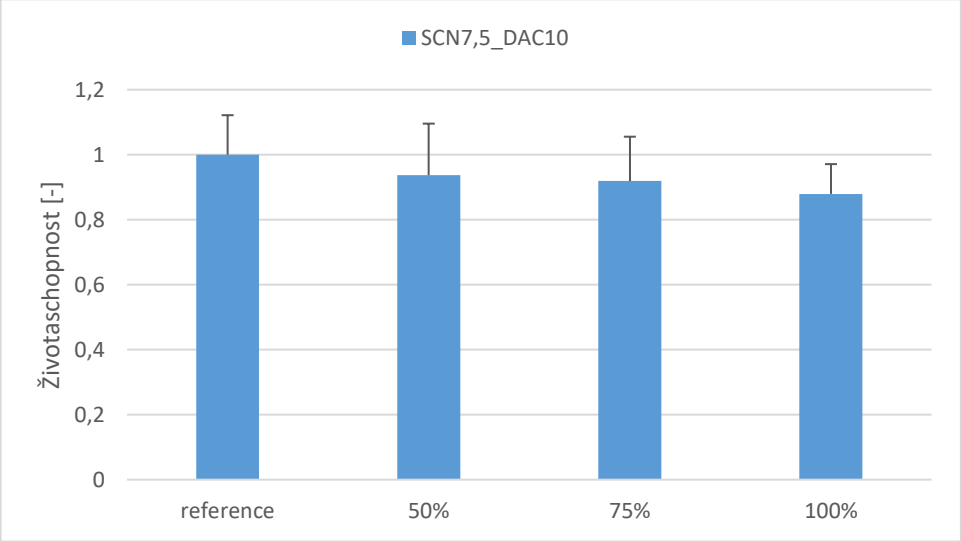
Test cytotoxicity proběhl na extraktech hydrogelu v kultivačním médiu podle normy ČSN EN ISO 10993 (Obr. 26). Za buněčnou linii byly zvoleny myší embryonální fibroblasty (NIH/3T3).



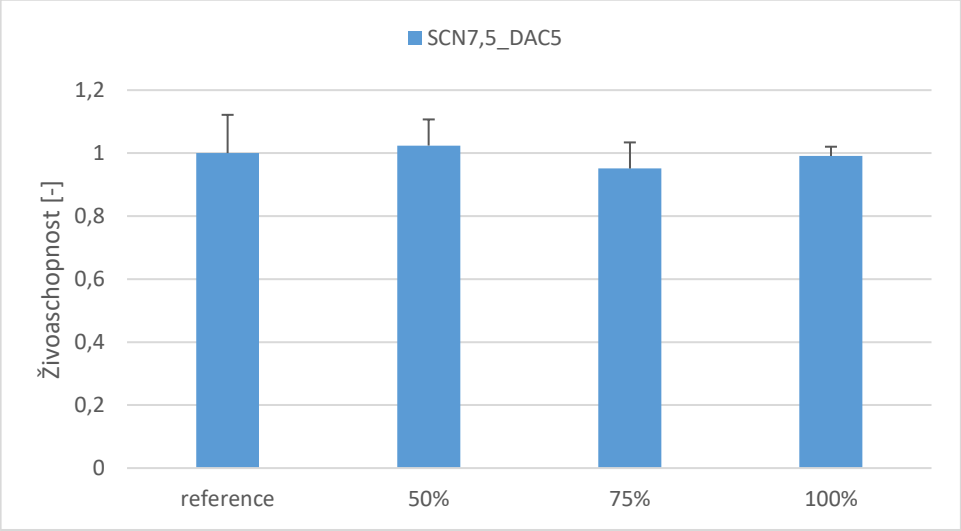
Obr. 25: Znázornění životaschopnosti buněk pro extrakty SCN7,5_DAC50



Obr. 26: Znázornění životaschopnosti buněk pro extrakty SCN7,5_DAC20



Obr. 27: Znázornění životaschopnosti buněk pro extrakty SCN7,5_DAC10



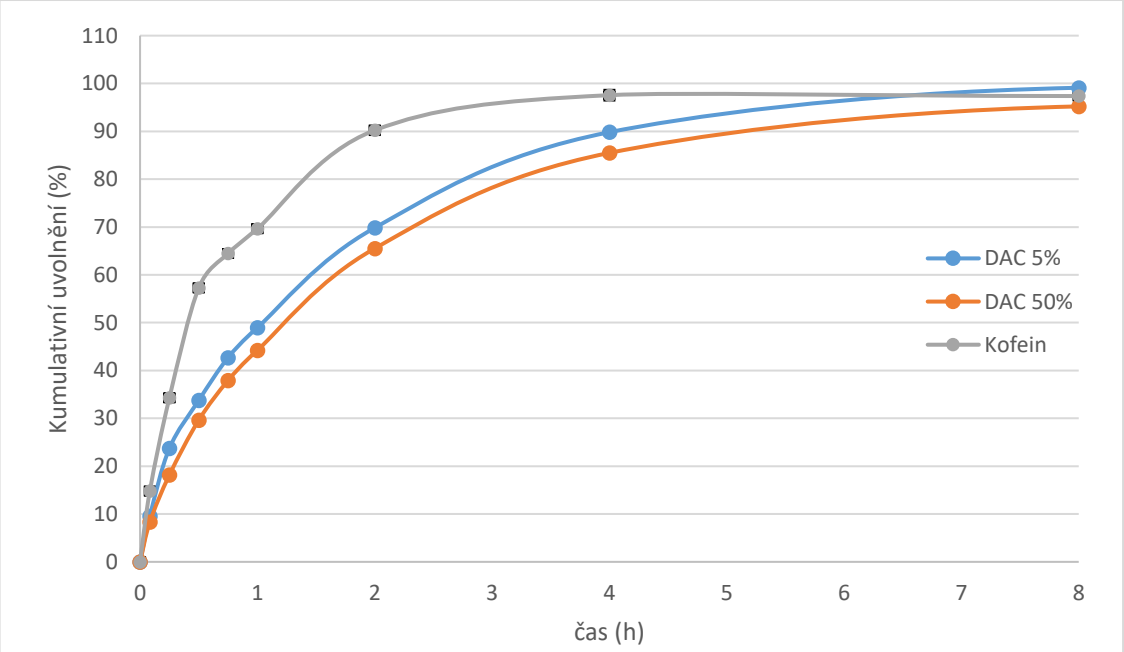
Obr. 28: Znázornění životaschopnosti buněk pro extrakty SCN7,5_DAC5

Z Obr. 25, 26, 27 a 28 je patrné, že nedošlo k významnějšímu poklesu životaschopnosti ani u jednoho extraktu hydrogelu při různých koncentracích síťovadla. Všechny vzorky hydrogelů lze tedy považovat za netoxické podle ISO 10933-5. Závěrem je možno deklarovat, že z pohledu cytotoxicity extraktů jsou všechny vzorky vhodné pro medicínské aplikace, jako jsou například hydrogelové náplasti či přenosná matrice pro parenterální aplikaci.

6.2 NASYCENÍ HYDROGELŮ BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKOU A JEJÍ UVOLŇOVÁNÍ

Pro zkoumání kinetiky uvolňování biologicky aktivních látek z hydrogelu byl vybrán kofein jako modelová látka s ohledem na jeho výbornou rozpustnost ve vodě a pro jeho vysokou absorbanci v UV/VIS při nízkých koncentracích.

Jeho uvolňování bylo zkoumáno u vybraných vzorků zbobtnalých hydrogelů DAC5_SCN7,5 a DAC50_SCN7,5, které se liší množstvím síťovadla a porovnáno s roztokem obsahujícím stejné množství kofeinu. Tudíž rychlost uvolňování kofeinu z hydrogelu by měla být ovlivněna hustotou jeho zesítění ale také velikosti molekuly biologicky aktivní látky. Průběh uvolňování kofeinu z hydrogelů znázorňuje graf časové závislosti kumulativního uvolnění (Obr. 29).



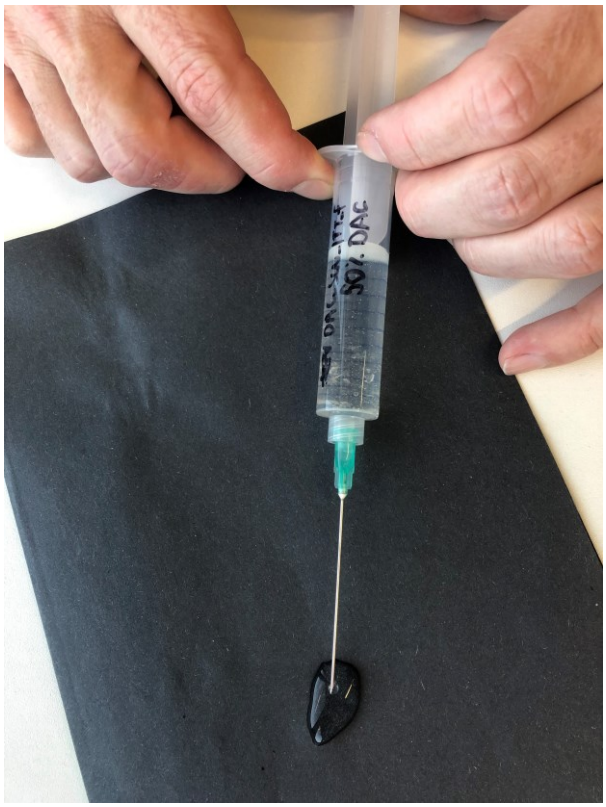
Obr. 29: Kinetika uvolňování kofeinu dvou různě zesítěných vzorků hydrogelů

Je zřejmé, že se průběh uvolňování daných vzorků sice liší při porovnání vzorků se samotným kofeinem, které bylo výrazně rychlejší, ale mezi oběma vzorky se už příliš neliší. Nejrychlejší uvolnění biologicky aktivní látky nastalo již v první hodině, kdy došlo k uvolnění 44 – 50 % nasycené látky. Ačkoliv byl průběh uvolňování pozorován v průběhu 48 h, už během 8 h se uvolnil téměř veškerý obsah kofeinu, a to konkrétně 95 – 99 %. Vliv množství síťovadla je znatelný, i když jen velmi málo. Pomalejší uvolňování probíhalo u hydrogelu s vyšším obsahem síťovacího činidla, a tedy vyšší míry zesítění.

Na závěr lze podotknout, že takto vysoká rychlost uvolňování léčiv může být skvěle využita v medicínském odvětví hojení ran pro biomateriálové produkty jako jsou hydrogelové náplasti, u kterých se předpokládá doba aplikace v jednotkách hodin.

6.3 TEST INJEKTOVATELNOSTI HYDROGELŮ

Test injektovatelnosti proběhl pouze u vzorku SCN7,5_DAC50, tedy s nejvyšším množstvím síťovadla. Schopnost injektovatelnosti byla testována vytlačením daného hydrogelu z injekční stříkačky přes jehlu G18. Z Obr. 30 lze pozorovat, že i nejvíce zesíťovaný hydrogel je bez problémů injektovatelný, což značně rozšiřuje možnosti jeho aplikace v medicíně.



Obr. 30: Test injektovatelnosti hydrogelu SCN7,5_DAC50

ZÁVĚR

V této bakalářské práci byla připravena řada vzorků injektovatelných SCN/DAC hydrogelů s rozličnými vlastnostmi, čehož bylo docíleno pomocí kombinací různých koncentrací SCN matrice s různými molárními poměry síťovadla DAC. Tato skutečnost umožňovala získat relativně široký rozsah parametrů sítě hydrogelů, a jejich viskoelastických vlastností. Na závěr byla také stanovena kinetika uvolňování biologicky aktivní látky z matrice a biokompatibilita hydrogelů. Díky těmto testům charakterizace hydrogelů bylo možné určit vzorky s nejvhodnějšími vlastnostmi pro medicínské aplikace.

Pomocí inverse tube testu bylo zjištěno, že hydrogely s nejnižší koncentrací matrice nezgelovaly, a proto byly vyloučeny z dalšího studia. Charakterizovány byly pouze pomocí DLS, kde se prokázala přítomnost koloidních disperzních částic o velikosti odpovídající mikrogelu.

Vliv množství síťovadla k obsahu matrice byl jasně pozorovatelný u parametrů hydrogelů. Nejvýraznější schopnost zbobtnání a hodnotu EWC vykazoval vzorek DAC10_SCN7,5. Ačkoliv hodnota gelové frakce měla mít zpravidla klesající charakter se zvyšujícím se množství síťovadla DAC, vzorek DAC5_SCN7,5 tuto hypotézu narušoval. To je zřejmě dáno faktem, že nejméně zesíťovaný hydrogel DAC5_SCN7,5 se částečně rozpouštěl, a to zkreslilo určení parametrů sítě.

Vliv podílu DAC se projevil také u viskoelastických vlastností vzorků hydrogelů v rovnovážně zbobtnalém stavu, kdy vyšší hodnoty elastického, ztrátového i komplexního modulu vykazovaly vzorky hydrogelů o nejvyšším množství DAC. V komplexním modulu převažovala hodnota elastického modulu nad ztrátovým. Tento fakt dokazuje převahu pevného chování hydrogelů nad chováním viskózním, a tedy závisí převážně na podílu síťovadla. Největší elasticita se projevila u vzorku DAC50_SCN7,5.

Při porovnání mikrofotografií vzorků s nejmenším a nejvyšším obsahem DAC, které byly pořízeny SEM analýzy vykazoval vzorek DAC5_SCN7,5 zřetelnou tvorbu velkých vrstevnatých plástů. U vzorku DAC50_SCN7,5 byly tyto plásty menší. U obou vzorků se vyskytovala také samostatné shluky vláken. Vzhledem k jejich chaotické struktuře nelze prokázat jakýkoliv účinek různého množství síťovadla DAC na porozitu hydrogelu.

Testy cytotoxicity proběhly úspěšně pro všechny vzorky hydrogelových extraktů a podle normy ISO EN 10993 se dají považovat za necytoxické, a tudíž jsou zřejmě vhodné pro medicínské aplikace.

Kinetika uvolňování biologicky aktivní látky (kofein) ze vzorků hydrogelů byla sledována v průběhu 48 h. Rychlost uvolňování byla nejintenzivnější v první hodině, kdy se jednalo až o 44 – 50 % uvolnění nasycené látky a po 8 h došlo k až 95 – 99 % uvolnění kofeinu. Ovšem ke kompletnímu uvolnění došlo až po 24 h. Hodnoty kumulativního uvolňování pro oba měřené vzorky probíhaly velmi podobně, což svědčí o nižší důležitosti vlivu podílu síťovadla.

Bylo zjištěno, že nejvhodnějšími necytotoxickými injektovatelnými hydrogely byly vzorky s vyšším obsahem SCN. Za nejideálnější hydrogel pro postupné uvolňování látek by se tedy dal považovat vzorek SCN7,5_DAC50.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] RATNER, B. D. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine* [online]. Place of publication not identified: Academic Press, 2013 [vid. 2021-11-28]. ISBN 978-0-08-087780-8. Dostupné z: http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpBSAIMM06/biomaterials-science-an

[2] PERROTTI, V., A. PIATTELLI, A. QUARANTA, G. GÓMEZ-MORENO a G. IEZZI. Biocompatibility of dental biomaterials. In: *Biocompatibility of Dental Biomaterials* [online]. B.m.: Elsevier, 2017 [vid. 2022-02-27], s. 1–7. ISBN 978-0-08-100884-3. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100884-3.00001-1

[3] RATNER, Buddy D. a William R. WAGNER. Introduction. In: *Biomaterials Science* [online]. B.m.: Elsevier, 2020 [vid. 2022-02-27], s. 917–918. ISBN 978-0-12-816137-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816137-1.00061-1

[4] COURY, Arthur J. Chemical and Biochemical Degradation of Polymers Intended to Be Biostable. In: *Biomaterials Science* [online]. B.m.: Elsevier, 2020 [vid. 2022-02-27], s. 919–940. ISBN 978-0-12-816137-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816137-1.00062-3

[5] RAVAL, Nidhi, Dnyaneshwar KALYANE, Rahul MAHESHWARI a Rakesh K. TEKADE. Surface Modifications of Biomaterials and Their Implication on Biocompatibility. In: *Biomaterials and Bionanotechnology* [online]. B.m.: Elsevier, 2019 [vid. 2022-02-27], s. 639–674. ISBN 978-0-12-814427-5. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814427-5.00017-2

[6] ZHANG, Guigen a Christopher VINEY. Bulk Properties of Materials. In: *Biomaterials Science* [online]. B.m.: Elsevier, 2020 [vid. 2022-02-27], s. 41–51. ISBN 978-0-12-816137-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816137-1.00005-2

[7] RATNER, Buddy D. a Robert A. LATOUR. Role of Water in Biomaterials. In: *Biomaterials Science* [online]. B.m.: Elsevier, 2020 [vid. 2022-02-27], s. 77–82. ISBN 978-0-12-816137-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816137-1.00007-6

[8] YASUI, M. Water Biology in Human Body. In: *Comprehensive Biomedical Physics* [online]. B.m.: Elsevier, 2014 [vid. 2022-03-30], s. 83–89. ISBN 978-0-444-53633-4. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-53632-7.01007-8

[9] STARÝ, Vladimír, František DENK, ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE, a STROJNÍ FAKULTA. *Biomateriály a biotolerance*. 2020. ISBN 978-80-01-06741-3.

[10] SANTOS-COQUILLAT, Ana, Enrique MARTÍNEZ-CAMPOS, Hugo MORA SÁNCHEZ, Lara MORENO, Raúl ARRABAL, Marta MOHEDANO, Alberto GALLARDO, Juan RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ a Endzhe MATYKINA. Hybrid functionalized coatings on Metallic Biomaterials for Tissue Engineering. *Surface and Coatings Technology* [online]. 2021, **422**, 127508. ISSN 02578972. Dostupné z: doi:10.1016/j.surfcoat.2021.127508

[11] PUNJ, Shivani, Jashandeep SINGH a K. SINGH. Ceramic biomaterials: Properties, state of the art and future prospectives. *Ceramics International* [online]. 2021, **47**(20), 28059–28074. ISSN 02728842. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceramint.2021.06.238

[12] SONI, Shreya S. a Christopher B. RODELL. Polymeric materials for immune engineering: Molecular interaction to biomaterial design. *Acta Biomaterialia* [online]. 2021, **133**, 139–152. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2021.01.016

[13] TSOU, Yung-Hao, Joe KHONEISSER, Ping-Chun HUANG a Xiaoyang XU. Hydrogel as a bioactive material to regulate stem cell fate. *Bioactive Materials* [online]. 2016, **1**(1), 39–55. ISSN 2452199X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioactmat.2016.05.001

[14] BARBUCCI, Rolando, ed. *Hydrogels: biological properties and applications*. Milan ; New York: Springer, 2009. ISBN 978-88-470-1103-8.

[15] HAMEDI, Hamid, Sara MORADI, Samuel M. HUDSON a Alan E. TONELLI. Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2018, **199**, 445–460. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2018.06.114

[16] PEPPAS, N.A., B.V. SLAUGHTER a M.A. KANZELBERGER. Hydrogels. In: *Polymer Science: A Comprehensive Reference* [online]. B.m.: Elsevier, 2012 [vid. 2021-11-19], s. 385–395. ISBN 978-0-08-087862-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-53349-4.00226-0

[17] AHMED, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research* [online]. 2015, **6**(2), 105–121. ISSN 20901232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jare.2013.07.006

[18] ČIHÁK, Lukáš. Nový švýcarský hydrogel [online]. nedatováno. Dostupné z: https://cdr.cz/clanek/novy-svycarsky-hydrogel-uzdravi-kolena-i-chrupavky-bez-operaci

[19] YAHIA, LHocine. History and Applications of Hydrogels. *Journal of Biomedical Sciencies* [online]. 2015, **04**(02) [vid. 2022-02-27]. ISSN 2254609X. Dostupné z: doi:10.4172/2254-609X.100013

[20] AYATULLAH HOSNE ASIF, A. K. M., Mahbubur RAHMAN, Priti SARKER, Md. Zayedul HASAN a Debasree PAUL. Hydrogel Fibre: Future Material of Interest for Biomedical Applications. *Journal of Textile Science and Technology* [online]. 2019, **05**(04), 92–107. ISSN 2379-1543, 2379-1551. Dostupné z: doi:10.4236/jtst.2019.54009

[21] PEPPAS, Nicholas A. a Allan S. HOFFMAN. Hydrogels. In: *Biomaterials Science* [online]. B.m.: Elsevier, 2020 [vid. 2022-02-27], s. 153–166. ISBN 978-0-12-816137-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816137-1.00014-3

[22] AMBAYE, Teklit Gebregiorgis, Mentore VACCARI, Shiv PRASAD, Eric D. VAN HULLEBUSCH a Sami RTIMI. Preparation and applications of chitosan and cellulose composite materials. *Journal of Environmental Management* [online]. 2022, **301**, 113850. ISSN 03014797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jenvman.2021.113850

[23] WEISSPFLOG, Janek, David VEHLOW, Martin MÜLLER, Benjamin KOHN, Ulrich SCHELER, Susanne BOYE a Simona SCHWARZ. Characterization of chitosan with different degree of deacetylation and equal viscosity in dissolved and solid state – Insights by various complimentary methods. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2021, **171**, 242–261. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.01.010

[24] AVCU, Egemen, Fatih E. BAŞTAN, Hasan Z. ABDULLAH, Muhammad Atiq Ur REHMAN, Yasemin Yıldıran AVCU a Aldo R. BOCCACCINI. Electrophoretic deposition of chitosan-based composite coatings for biomedical applications: A review. *Progress in Materials Science* [online]. 2019, **103**, 69–108. ISSN 00796425. Dostupné z: doi:10.1016/j.pmatsci.2019.01.001

[25] VERA, Mayra, Christian CRUZAT a María Eulalia VANEGAS. Low-Cost Crop Waste Biosorbent Technology for Removing Toxics and Pollutants from Wastewater. In: Pablo A. CHONG, David J. NEWMAN a Douglas A. STEINMACHER, ed. *Agricultural, Forestry and Bioindustry Biotechnology and Biodiscovery* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2020 [vid. 2022-02-20], s. 177–216. ISBN 978-3-030-51357-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-51358-0_11

[26] SAHOO, Debasish, Sarmila SAHOO, Priyanka MOHANTY, S. SASMAL a P. L. NAYAK. Chitosan: a New Versatile Bio-polymer for Various Applications. *Designed Monomers and Polymers* [online]. 2009, **12**(5), 377–404. ISSN 1568-5551. Dostupné z: doi:10.1163/138577209X12486896623418

[27] SIMON, Jonas, Otgontuul TSETSGEE, Nohman Arshad IQBAL, Janak SAPKOTA, Matti RISTOLAINEN, Thomas ROSENAU a Antje POTTHAST. A fast method to measure the degree of oxidation of dialdehyde celluloses using multivariate calibration and infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2021, 118887. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2021.118887

[28] SIRVIÖ, Juho, Henrikki LIIMATAINEN, Jouko NIINIMÄKI a Osmo HORMI. Dialdehyde cellulose microfibers generated from wood pulp by milling-induced periodate oxidation. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2011, **86**(1), 260–265. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2011.04.054

[29] KAMEL, S., N. ALI, K. JAHANGIR, S. M. SHAH a A. A. EL-GENDY. Pharmaceutical significance of cellulose: A review. *Express Polymer Letters* [online]. 2008, **2**(11), 758–778. ISSN 1788618X. Dostupné z: doi:10.3144/expresspolymlett.2008.90

[30] MÜNSTER, Lukáš, Jan VÍCHA, Jiří KLOFÁČ, Milan MASAŘ, Pavel KUCHARCZYK a Ivo KUŘITKA. Stability and aging of solubilized dialdehyde cellulose. *Cellulose* [online]. 2017, **24**(7), 2753–2766. ISSN 0969-0239, 1572-882X. Dostupné z: doi:10.1007/s10570-017-1314-x

[31] HENNINK, W.E. a C.F. VAN NOSTRUM. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2012, **64**, 223–236. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2012.09.009

[32] GAO, Cong, Shuo WANG, Baojie LIU, Shuangquan YAO, Yi DAI, Long ZHOU, Chengrong QIN a Pedram FATEHI. Sustainable Chitosan-Dialdehyde Cellulose Nanocrystal Film. *Materials* [online]. 2021, **14**(19), 5851. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma14195851

[33] YANG, Yongyan, Lifeng XU, Jingfei WANG, Qingye MENG, Shuangling ZHONG, Yan GAO a Xuejun CUI. Recent advances in polysaccharide-based self-healing hydrogels for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2022, **283**, 119161. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2022.119161

[34] JIANG, Xueyu, Xuefeng YANG, Boguang YANG, Lina ZHANG a Ang LU. Highly self-healable and injectable cellulose hydrogels via rapid hydrazone linkage for drug delivery and 3D cell culture. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2021, **273**, 118547. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2021.118547

[35] DENG, Pengpeng, Lichao YAO, Juanjuan CHEN, Zhigang TANG a Jinping ZHOU. Chitosan-based hydrogels with injectable, self-healing and antibacterial properties for wound healing. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2021, 118718. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2021.118718

[36] PADHI, Santwana, Anindita BEHERA, Md Saquib HASNAIN a Amit Kumar NAYAK. Chitosan-based drug delivery systems in cancer therapeutics. In: *Chitosan in Drug Delivery* [online]. B.m.: Elsevier, 2022 [vid. 2022-02-20], s. 159–193. ISBN 978-0-12-819336-5. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-819336-5.00011-X

[37] LIAO, Jing, Bo HOU a Huihua HUANG. Preparation, properties and drug controlled release of chitin-based hydrogels: An updated review. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2022, **283**, 119177. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2022.119177

[38] BANDHYOPADHYA, Amit a Susmita BOSE, ed. *Characterization of biomaterials*. Amsterdam: Elsevier, 2013. ISBN 978-0-12-415800-9.

[39] AZMAN, Nur Hawa Nabilah a Yusran SULAIMAN. Hierarchical Porous Materials for Supercapacitors. In: *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences* [online]. B.m.: Elsevier, 2020 [vid. 2021-12-13], s. B9780128197233000000. ISBN 978-0-12-409548-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-819723-3.00022-6

[40] ARGENTA, Débora F., Talitha C. DOS SANTOS, Angela M. CAMPOS a Thiago CAON. Hydrogel Nanocomposite Systems. In: *Nanocarriers for Drug Delivery* [online]. B.m.: Elsevier, 2019 [vid. 2022-02-25], s. 81–131. ISBN 978-0-12-814033-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814033-8.00003-5

[41] MUCHOVÁ, Monika, Lukáš MÜNSTER, Zdenka CAPÁKOVÁ, Veronika MIKULCOVÁ, Ivo KUŘITKA a Jan VÍCHA. Design of dialdehyde cellulose crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels for transdermal drug delivery and wound dressings. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2020, **116**, 111242. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2020.111242

[42] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchu a koloidních soustav*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 978-80-7080-579-4.

[43] BABY, Deepa K. Rheology of hydrogels. In: *Rheology of Polymer Blends and Nanocomposites* [online]. B.m.: Elsevier, 2020 [vid. 2022-02-26], s. 193–204. ISBN 978-0-12-816957-5. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816957-5.00009-4

[44] *Fyzika polymerů. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně: Fakulta technologická. Ústav fyziky a materiálového inženýrství* [online]. 2009. Dostupné z: http://ufmi.ft.utb.cz/index.php?page=fyzika_pol

[45] MUCHOVÁ, Bc. Monika. *Příprava hydrogelů na bázi polyvinylalkoholu pro kosmetické aplikace* [online]. Dostupné z: https://digilib.k.utb.cz/handle/10563/45620

[46] MARÁKOVÁ, NELA. Příprava, charakterizace a biokompatibilita koloidního polyanilinu [online]. 2022, **2015**. Dostupné z: https://theses.cz/id/lcpfkf/

[47] GRELA, Ewa, Joanna KOZŁOWSKA a Agnieszka GRABOWIECKA. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. *Acta Histochemica* [online]. 2018, **120**(4), 303–311. ISSN 00651281. Dostupné z: doi:10.1016/j.acthis.2018.03.007

[48] PELLEVOISIN, Christian, Christelle VIDEAU, Damien BRIOTET, Corinne GRÉGOIRE, Carine TORNIER, Alain ALONSO, Anne Sophie RIGAUDEAU, Charbel BOUEZ a Nathalie SEYLER. SkinEthic^{TM} RHE for in vitro evaluation of skin irritation of medical device extracts. *Toxicology in Vitro* [online]. 2018, **50**, 418–425. ISSN 08872333. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2018.01.008

[49] DIMZON, Ian Ken D. a Thomas P. KNEPPER. Degree of deacetylation of chitosan by infrared spectroscopy and partial least squares. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2015, **72**, 939–945. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.09.050

[50] THORNE, Joanna B., George J. VINE a Martin J. SNOWDEN. Microgel applications and commercial considerations. *Colloid and Polymer Science* [online]. 2011, **289**(5–6), 625–646. ISSN 0303-402X, 1435-1536. Dostupné z: doi:10.1007/s00396-010-2369-5

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

př. n. l	Před naším letopočtem
PMMA	Polymethylmetakrylát
3D	Trojrozměrný model
PEG	Poly(ethyleneglykol)
PVA	Poly(vinylalkohol)
PHPA	Poly(akrylamid)
IPN	Interpenetrující polymerní síť
UV	Ultraviolet
SCN	Deacetylovaný chitosan
DAC	Dialdehyd celulózy
DCC	2,3-dikarboxylová kyselina celulosy
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
STM	Rastrovací tunelová mikroskopie
AFM	Mikroskopie atomárních sil
CRT	Katodová trubice (cathode ray tube)
EWC	Obsah vody v rovnovážném stavu zbobtnání
UV-VIS	Ultrafialové a viditelné záření
MTT	Thiazolová sůl (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid)
ITT	Inverse tube test
UPW	Ultračistá voda
MWCO	Mezní molekulová hmotnost propustnosti (Molecular weight cut-off)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Hydrogel [18] 15
Obr. 2: Typy hydrogelových struktur podle způsobu přípravy 17
Obr. 3: Typy hydrogelových struktur podle typu vazeb [20] 18
Obr. 4: Příprava chitosanu deacetylací chitinu 19
Obr. 5: Příprava dialdehyd celulózy 20
Obr. 6: Schéma reakce chitosanu s DAC [32] 22
Obr. 7: Enzymatická redukce MTT za vzniku formazanu [47] 29
Obr. 8: FT-IR spektrometr Nicolet 6700 34
Obr. 9: Zetasizer Nano ZS 34
Obr. 10: Rotační reometr Anton Paar MCR 502 35
Obr. 11: Vzorek hydrogelu při měření viskoelastických vlastností pomocí reometru 36
Obr. 12: Kalibrační křivka kofeinu 37
Obr. 13: IR spektrum 50 % deacetylovaného chitosanu (SCN) 39
Obr. 14: IR spektrum námi připraveného 75 % deacetylovaného chitosanu 39
Obr. 15: IR spektrum sigma-celulózy 41
Obr. 16: IR spektrum námi připravené dialdehyd celulózy 42
Obr. 17: Grafické znázornění směšovacího podstavce 43
Obr. 18: Závislost dynamické viskozity gelů na čase dle zvyšující se koncentrace SCN 44
Obr. 19: Inverse tube test 45
Obr. 20: Závislost elastického modulu na úhlové frekvenci 47
Obr. 21: Závislost ztrátového modulu na úhlové frekvenci 48
Obr. 22: Závislost komplexního modulu na úhlové frekvenci 49
Obr. 23: Mikrofotografie dvou vzorků hydrogelů SCN/DAC pořízené SEM (zvětšení 1 000x) 50
Obr. 24: Mikrofotografie dvou vzorků hydrogelů SCN/DAC pořízené SEM (zvětšení 10 000x) 50
Obr. 25: Znázornění životaschopnosti buněk pro extrakty SCN7,5_DAC50 50
Obr. 26: Znázornění životaschopnosti buněk pro extrakty SCN7,5_DAC20 51
Obr. 27: Znázornění životaschopnosti buněk pro extrakty SCN7,5_DAC10 51
Obr. 28: Znázornění životaschopnosti buněk pro extrakty SCN7,5_DAC5 51
Obr. 29: Kinetika uvolňování kofeinu dvou různě zesítěných vzorků hydrogelů 52
Obr. 30: Test injektovatelnosti hydrogelu SCN7,5_DAC50 53

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Kalibrační křivka kofeinu – naměřené hodnoty 37
Tab. 2: Spotřeba NaOH pro slepý vzorek pomocí acidobazické titrace 40
Tab. 3: Navážka DAC, výsledky stanovení pH roztoků a objem spotřeby NaOH 40
Tab. 4: Výsledky výpočtů a hodnoty potřebné ke stanovení stupně oxidace DAC 41
Tab. 5: Připravené vzorky SCN/DAC 42
Tab. 6: Stanovená doba gelace jednotlivých vzorků hydrogelů 45
Tab. 7: Vypočítané průměry velikosti dispergovaných částic vzorků hydrogelů 46
Tab. 8: Vypočítané hodnoty stanovení parametrů sítě 47
Tab. 9: Naměřené hodnoty elastického modulu 47
Tab. 10: Naměřené hodnoty ztrátového modulu 48
Tab. 11: Naměřené hodnoty komplexního modulu 49