

# **Příprava hydrogelů na bázi hyaluronanu a polyvinylalkoholu**

Bc. Barbora FILOVÁ

---

Diplomová práce  
2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav fyziky a mater. inženýrství

akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Barbora Fiřová**

Osobní číslo: **T17303**

Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**

Studijní obor: **Materiálové inženýrství**

Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Příprava hydrogelů na bázi hyaluronanu a polyvinylalkoholu**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte literární rešerši na přípravu a charakterizaci hydrogelů z hyaluronanu a polyvinylalkoholu.
2. Připravte hydrogely z hyaluronanu, PVA a jejich kombinace.
3. Proveďte analýzy připravených materiálů z hlediska jejich porozity a doby tvorby gelu.
4. Proveďte diskuzi výsledků a zpracujte závěry diplomové práce.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

[1] Gřundělová, L., Gregorová, A., Mráček, A., Vícha, R., Smolka, P., Minařík, A.: Viscoelastic and mechanical properties of hyaluronan films and hydrogels modified by carbodiimide. *Carbohydrate Polymers* , 119 142-148 (2015)

[2] Musilová, L., Mráček, A., Kovalčík, A., Smolka, P., Minařík, A., Humpolíček, P., Vícha, R., Ponížil, P.: Hyaluronan hydrogels modified by glycinated Kraft lignin: Morphology, swelling, viscoelastic properties and biocompatibility, *Carbohydrate Polymers*. 181, 394-403, (2018)

Vedoucí diplomové práce: **doc. Mgr. Aleš Mráček, Ph.D.**  
Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání diplomové práce: **1. února 2019**

Termín odevzdání diplomové práce: **17. května 2019**

Ve Zlíně dne 8. února 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*

doc. Mgr. Aleš Mráček, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: .....

Obor: .....

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/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 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/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);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/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.

Ve Zlíně .....

.....

---

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> 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, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> 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, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Tato práce je zaměřena na přípravu hydrogelů na bázi polyvinylalkoholu a hyaluronanu. Cílem bylo připravit hydrogely s vhodnou velikostí a distribucí pórů pro kultivaci buněk. Byl zkoumán vliv jednotlivých složek na dobu tuhnutí a mechanické vlastnosti. Pomocí elektronové mikroskopie a mikrotomografie byla zkoumána pórovitost jednotlivých hydrogelů.

V této práci byly připraveny hydrogely s různou velikostí pórů. Byl připraven hydrogel, jehož strukturu tvoří velké póry s průměrem až 350  $\mu\text{m}$ , střední póry s průměrem okolo 50  $\mu\text{m}$  a velké množství malých pórů s průměrem jednotek mikrometrů.

Klíčová slova: polyvinylalkohol, hyaluronan, hydrogel

## **ABSTRACT**

This work focuses on the preparation of polyvinyl alcohol and hyaluronan hydrogels. The aim of this work was the preparation of hydrogels with specific pore size and distribution for cell culture applications. The influence of individual components was investigated with respect to gel time and mechanical properties. The porosity of the individual hydrogels was examined by the electron microscopy and microtomography.

Porous hydrogels with different pore size were successfully prepared in this work. There was invented a procedure for preparation of hydrogel containing pores with different sizes, including large pores with a diameter up to 350  $\mu\text{m}$ , medium pores with a diameter about 50  $\mu\text{m}$  and small pores with a diameter in unites of micrometers.

Keywords: polyvinyl alcohol, hyaluronan, hydrogel

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především vedoucímu mé bakalářské práce doc. Mgr. Aleši Mráčkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a vedení k samostatnosti. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Lence Musilové, Ph.D. za pomoc během přípravy hydrogelů, Ing. Antonínu Minaříkovi, Ph.D. za pomoc s měřením na tomografu a doc. Ing. Pavlu Mokrejšovi, Ph.D. za pomoc s měřením na Bloom gelometru.

*„Dívejte se vzhůru na hvězdy a nikoli dolů na nohy.  
Pokuste se pochopit, co vidíte a proč existuje vesmír.  
Buďte zvědaví.“*  
Stephen Hawking

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>1 POLYVINYLALKOHOL</b> .....	<b>13</b>
1.1 STRUKTURA .....	13
1.2 PŘÍPRAVA.....	13
1.3 FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI .....	14
1.4 CHEMICKÉ VLASTNOSTI .....	14
1.5 DEGRADACE.....	15
1.5.1 Biodegradace.....	15
1.6 VYUŽITÍ .....	15
1.6.1 Vlákná .....	16
1.6.2 Filmy .....	16
<b>2 HALURONAN</b> .....	<b>17</b>
2.1 STRUKTURA .....	17
2.2 PŘÍPRAVA.....	18
2.3 VLASTNOSTI.....	18
2.4 DEGRADACE.....	19
2.5 VYUŽITÍ .....	19
<b>3 HYDROGELY</b> .....	<b>21</b>
3.1 KLASIFIKACE.....	21
3.1.1 Podle fyzikální struktury .....	21
3.1.2 Podle iontového charakteru.....	21
3.1.3 Podle počtu polymerů .....	21
3.1.4 Podle velikosti.....	22
3.1.5 Podle typu vazeb .....	22
3.2 VLASTNOSTI.....	22
3.3 SYNTÉZA HYDROGELŮ .....	22
3.3.1 Fyzikální síťování .....	23
3.3.2 Chemické síťování .....	23
3.4 SMART HYDROGELY .....	23
3.4.1 pH senzitivní.....	23
3.4.2 Teplotně senzitivní .....	24
3.4.3 Světelně senzitivní .....	24
3.4.4 Elektro senzitivní .....	24
3.4.5 Mechanicky senzitivní .....	24
3.4.6 Enzymově senzitivní .....	25



3.5	PVA+NAHY HYDROGELY .....	25
3.6	HYDROGELY V TĚTO PRÁCI .....	26
3.7	VYUŽITÍ .....	26
3.7.1	Hydrogel jako scaffold pro růst buněk .....	27
<b>4</b>	<b>TECHNIKY MĚŘENÍ A POUŽITÉ PŘÍSTROJE .....</b>	<b>28</b>
4.1	SKENOVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE .....	28
4.2	MIKROTOMOGRFIE .....	28
4.3	BLOOMŮV GELOMETR .....	29
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>30</b>
<b>5</b>	<b>PŘÍPRAVA VZORKŮ .....</b>	<b>31</b>
5.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....	31
5.2	PŘÍPRAVA HYDROGELŮ .....	31
5.2.1	Hydrogely PVA .....	31
5.2.2	Hydrogely PVA+NaHy .....	31
5.3	ZNAČENÍ VZORKŮ .....	32
5.4	PŘIPRAVENÉ HYDROGELY .....	32
<b>6</b>	<b>VLIV JEDNOTLIVÝCH SLOŽEK NA VLASTNOSTI HYDROGELŮ.....</b>	<b>35</b>
6.1	VLIV POLYVINYLALKOHOLU .....	35
6.2	VLIV HYALURONANU .....	36
6.3	VLIV GLYCEROLU .....	36
6.4	VLIV NaCl .....	37
6.5	GRAFICKÉ ZNÁZORNĚNÍ .....	37
<b>7</b>	<b>BLOOMŮV GELOMETR .....</b>	<b>40</b>
7.1	POUŽITÝ PŘÍSTROJ .....	40
7.2	REŽIM MĚŘENÍ.....	40
7.3	VÝSLEDKY .....	40
7.4	DISKUZE.....	41
<b>8</b>	<b>VELIKOST PÓRŮ .....</b>	<b>42</b>
8.1	SKENOVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE .....	42
8.1.1	Použitý přístroj .....	42
8.1.2	Režim měření .....	42
8.1.3	Výsledky .....	42
8.1.3.1	Porovnání molekulové hmotnosti NaHy.....	48
8.1.3.2	Vymyté hydrogely .....	55
8.1.4	Diskuze.....	58
8.2	MIKROTOMOGRFIE .....	58
8.2.1	Použitý přístroj .....	58
8.2.2	Režim měření .....	58
8.2.3	Výsledky .....	59

8.2.4	Diskuze.....	63
<b>ZÁVĚR</b>	.....	<b>65</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b>	.....	<b>67</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b>	.....	<b>70</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b>	.....	<b>71</b>
<b>SEZNAM TABULEK</b>	.....	<b>73</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH</b>	.....	<b>74</b>

## ÚVOD

Polyvinylalkohol je příkladem netoxického syntetického polymeru, který lze enzymatickou cestou degradovat. Díky velké rozmanitosti zpracování v podobě vláken, filmů či hydrogelů nachází uplatnění od textilního průmyslu až po zdravotnictví. Problémem pro biomedicínské využití je špatná adheze buněk na povrch filmu z polyvinylalkoholu, což je kompenzováno roubováním či smísením s jiným biopolymerem.

Hyaluronan je důležitým biopolymerem se širokou škálou využití. Zejména díky své schopnosti vázat a udržovat velké množství vody ve své struktuře je často využíván ve zdravotnictví a kosmetice.

Hydrogely jsou tvořeny polymerní sítí, která do své struktury dokáže pojmout velké množství tekutiny. Tato důležitá vlastnost je využívána v širokém spektru odvětví od zemědělství, přes optiku, až po medicínu. Hydrogely nacházejí uplatnění například při výrobě kontaktních čoček, ale také ve tkáňovém inženýrství nebo při kultivaci buněk.

Tato práce je zaměřena na přípravu hydrogelů na bázi polyvinylalkoholu a hyaluronanu, které budou mít pórovitou strukturou. Cílem této práce je připravit takové hydrogely, které by díky správné velikosti a rozložení pórů mohly být vhodnými kandidáty pro kultivaci buněk.

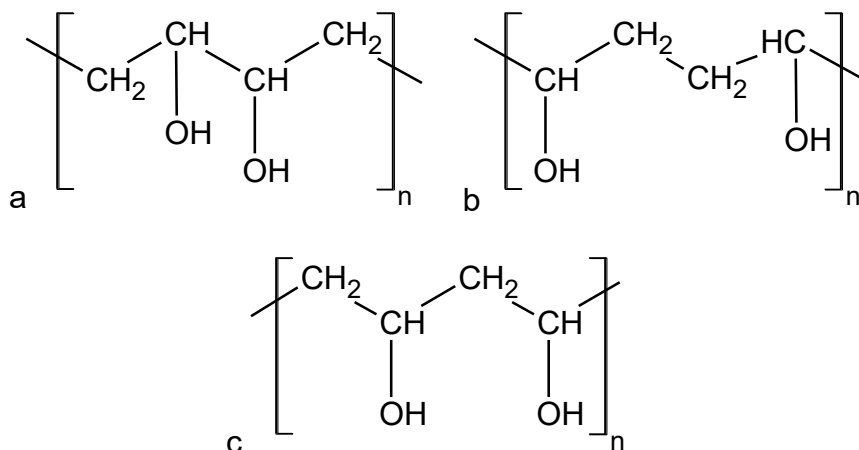
## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 POLYVINYLALKOHOL

Polyvinylalkohol (PVA) je bílý prášek s krystalickou strukturou. Poprvé byl připraven Herrmannem a Haehnelem roku 1924 [1]. V dnešní době se jedná o velice rozšířený polymer, globální velikost trhu s PVA byla v roce 2016 odhadnuta na 714,5 milionu USD. Vzhledem k rozvoji trvale udržitelného obalového průmyslu je PVA vhodným kandidátem díky své rozpustnosti ve vodě a biologické odbouratelnosti. Největšími výrobci PVA jsou Čína, Japonsko a USA. [2][3]

### 1.1 Struktura

Polymer je připravován radikálovou polymerací, připojení jednotlivých merů je možno jako hlava-hlava, pata-pata nebo hlava-pata (viz obrázek 1). V případě polymerace polyvinylalkoholu dominuje konfigurace hlava-pata, tvoří 98-99 % spojení. Spojení hlava-hlava je v polymeru obsaženo pouze z 1-2 %, nicméně má velký vliv na snižování stupně polymerace při zpracování, protože přítomnost –OH skupin na sousedních uhlících není moc stabilní a dochází k roztržení řetězce. Obsah spojení hlava-hlava v řetězci nelze ovlivnit metodou polymerace, rozpouštědlem nebo katalyzátorem. [4]



Obrázek 1: Struktura polyvinylalkoholu; a – hlava-hlava, b – pata-pata, c – hlava-pata

### 1.2 Příprava

Polyvinylalkohol nelze připravit z monomeru vinylalkoholu, neboť u něj dochází k přesmyku na acetaldehyd. PVA je připravován polymerací vinylacetátu na polyvinylacetát a následně dochází k hydrolyzaci vinylacetátových skupin na hydroxylové skupiny. Hydrolyzaci vinylacetátových skupin lze povést třemi způsoby: aminolýzou, acidolýzou

nebo hydrolýzou v zásaditém prostředí. Při průmyslové výrobě je nejčastěji využívána hydrolýza v zásaditém prostředí, při které dochází k esterové výměně vinylacetátových skupin s methanolem za přítomnosti hydroxidu sodného. V připraveném PVA jsou vždy obsaženy nezreagované vinylacetátové skupiny, které modifikují vlastnosti polymeru. [5][6]

### 1.3 Fyzikální vlastnosti

Polyvinylalkohol se nejčastěji připravuje s polymeračním stupněm 500-5000, což odpovídá molekulové hmotnosti 20-200 kDa. Je možné připravit izotaktický, syndiotaktický i ataktický PVA, takticita závisí na výchozích materiálech a způsobu syntézy. Ataktický PVA lze připravit polymerací vinylacetátu a následnou hydrolýzou. PVA připravený radikálovou polymerací vinylformiátu bývá syndiotaktický. Izotaktický PVA lze připravit kationtovou polymerací benzylvinyletheru. [7]

Se zvýšením molekulové hmotnosti a stupně hydrolýzy roste viskozita, odolnost vůči rozpouštědlům, pevnost v tahu, schopnost tvorby filmu a adheze k hydrofilním povrchům. Teplota skelného přechodu a teplota tání závisí především na takticitě. [7]

### 1.4 Chemické vlastnosti

Polyvinylalkohol díky své krystalické struktuře vyniká svou stabilitou a chemickou odolností. PVA je ve vodě rozpustný pouze za zvýšené teploty, minimální teplota rozpustnosti klesá se zvyšujícím se obsahem vinylacetátových skupin. Při obsahu <1 % vinylacetátových skupin je minimální teplota rozpustnosti PVA ve vodě 90 °C, při obsahu >5 % vinylacetátových skupin lze PVA rozpustit ve vodě již při teplotě 65 °C a při obsahu vinylacetátových skupin >12 % lze PVA rozpustit i při laboratorní teplotě. PVA se nerozpouští v olejích ani v organických kyselinách, botná v jednosytných alkoholech a ve vícesytných alkoholech se rozpouští. PVA reaguje s anorganickými kyselinami za vzniku esterů nerozpustných ve vodě. Podobně reaguje s některými oxidy a chloridy. V přítomnosti anorganických kyselin a zásad dochází k vnitřní etherifikaci provázenou ztrátou molekul vody. PVA může vytvořit inter- a intra-molekulární acetátové můstky, díky nimž lze vytvořit zesíťovanou strukturu. [6][7]

## 1.5 Degradace

Při pyrolýze polyvinylalkoholu pod teplotou 300 °C dochází k eliminaci hydroxylových skupin a je uvolňována voda [8]. Studie Tsuchiya a kol. [9] o tepelné degradaci PVA při teplotě 240 °C ukázala, že dochází ke vzniku vody, acetaldehydu, nenasycených aldehydů, ketonů a derivátů benzenu. Podle studie Ballistreri a kol. [10], kde byla pomocí viskozity měřena molekulová hmotnost, dochází při termální degradaci napřed k nárůstu molekulové hmotnosti vlivem zesílení a následně dochází ke snižování molekulové hmotnosti vlivem štěpení řetězce. [11]

### 1.5.1 Biodegradace

Dlouhá desetiletí vědci po celém světě hledali bakteriální kmen, který by byl schopen enzymaticky degradovat polyvinylalkohol. Od roku 1973 bylo izolováno mnoho bakteriálních kmenů například *Pseudomonas* genus, *Alcaligenes*, *Bacillus* a *Sphingomonas* genera, které jsou schopny enzymaticky degradovat PVA. [12][13]

Při biodegradaci je důležitá pravidelnost prostorového uspořádání řetězce. Syndiotaktický, izotaktický a ataktický polyvinylalkohol byl vystaven působení mikroorganismů po dobu 10 dní a následně byla pozorována enzymatická degradace řetězců. Největší úbytek byl zaznamenán u izotaktických řetězců PVA. [13]

Roztok polyvinylalkoholu je schopen absorbovat prášky přírodních minerálů. Při výrobě nanokompozitů na bázi PVA se často využívají přírodní nanoplňiva, například montmorillonit nebo křemelina. Vyšší obsah nanoplňiva může negativně ovlivnit biologickou degradaci nanokompozitu. [12]

## 1.6 Využití

Polyvinylalkohol má vynikající schopnost tvořit film, emulgační a adhezivní vlastnosti, což má za následek široké průmyslové využití. PVA může mít mnoho podob, jako jsou vlákna, filmy, ale také hydrogely, které svým chováním připomínají želatinu. PVA se využívá jako obalový materiál, lepidlo při výrobě papíru či klíždlo v textilním průmyslu. Své využití najde také v lékařských aplikacích, je obsažen například v očních kapkách, v roztoku pro kontaktní čočky nebo je možné z PVA membrány vytvořit umělé cévy či střeva. Lze jej využít například jako vodou rozpustný obal pro tekuté prací prostředky. PVA je také využíván ve stavebnictví jako stavební pojivo či jako zahušťovadlo latexových barev.

Vlákna PVA je možno přidat do cementových kompozitů kvůli snížení vločkování cementových částic. V neposlední řadě je PVA využíván v 3D tisku jako podpůrná struktura, kterou lze snadno rozpustit ve vodě. [2][14]

### 1.6.1 Vlákna

Myšlenku, že by z polyvinylalkoholu bylo možné připravit vlákna, vyslovili již v roce 1931 Hermann a Haehnel [15]. Proces výroby prvních PVA vláken nerozpustných ve vodě byl popsán roku 1939 [16]. Po smíchání roztoku PVA s koncentrovaným roztokem síranu sodného je možné vytahovat vlákna PVA, která jsou semikrystalická. [4]

Vlákna z PVA jsou v dnešní době převážně vyráběny mokrým zvlákňováním z roztoku, ale také speciálním procesem kombinující suché zvlákňování a zvlákňování z taveniny. Lze připravit mnoho druhů PVA vláken, například vlákna s vysokou pevností, s vysokým modulem pružnosti, vlákna odolávající kyselinám, zásadám, ošetrudorná vlákna nebo vlákna odolná vůči slunečnímu záření. Tato variabilita vlastností předurčuje PVA vlákna k širokému spektru využití, například jako textilní vlákna nebo výztuha betonu a cementu ve stavebnictví. PVA vlákna zabraňují pronikání vody do materiálu a zvyšují jeho houževnatost a tuhost. Podobně jako ocelová, uhlíková, skelná či aramidová vlákna mají PVA vlákna vysokou pevnost v tahu a vysoký modul pružnosti, proto se využívají také pro výrobu provazů, lan a sítí. PVA vlákna se vyrábějí s průměrem 0,027-0,7 mm a délkou 6-30 mm v závislosti na dané aplikaci. [17]

### 1.6.2 Filmy

Díky rozpustnosti PVA ve vodě je možné snadno připravovat filmy odléváním z roztoku, nicméně tento postup je velmi nákladný na energii a množství odpařeného rozpouštědla. [14]

PVA filmy nacházejí uplatnění v aplikacích, kde je výhodou jejich rozpustnost ve vodě. Příkladem můžou být kapsle s tekutým pracím prostředkem v obalu z PVA filmu.

Díky netoxicitě a dobrým mechanickým vlastnostem jsou PVA filmy předmětem biomedicínského výzkumu. Hlavním problémem PVA filmů je špatná schopnost adheze buněk, je to dáno jejich vysoce hydrofilní povahou. Zvýšit adhezi buněk lze například přidávkem hedvábných vláken roubovaných chitosanem. [18]

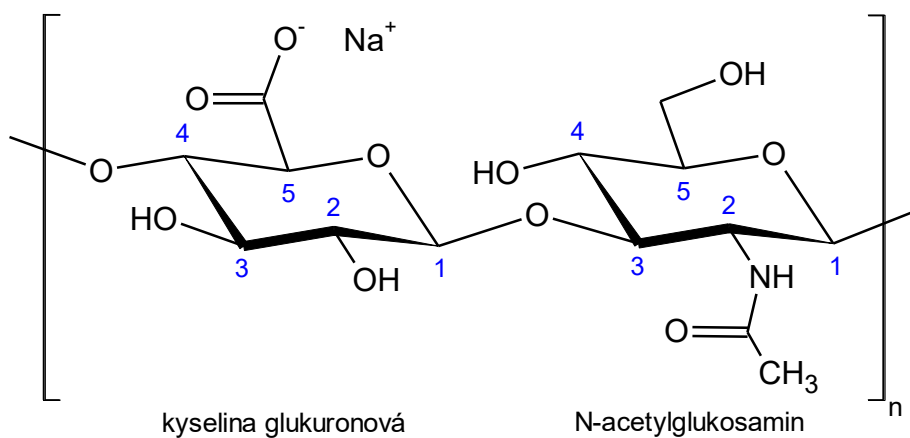


## 2 HALURONAN

V lidském těle se vyskytuje v podobě sodné soli jako hyaluronát sodný (NaHy), v laboratořích se pracuje především s kyselinou hyaluronovou. Hyaluronát sodný i kyselina hyaluronová ve vodném roztoku disociují na polyaniont zvaný hyaluronan. Roku 1934 byla Meyerem a Palmerem poprvé izolována ze sklivce oka a pojmenována jako kyselina hyaluronová [19]. Hyaluronan je důležitou složkou kůže, chrupavek a pojivových tkání, pomáhá buněčné proliferaci a migraci. Hyaluronan má různou délku v různých tkáních, v mezibuněčné hmotě má vyšší molekulovou hmotnost než v místě poranění. [20]

### 2.1 Struktura

Hyaluronan tvoří opakující se jednotky kyseliny D-glukuronové a N-acetyl-d-glukosaminu uspořádané v lineárním nerozvětveném řetězci. Tyto jednotky jsou spojeny prostřednictvím střídavých glykosidických vazeb beta-1,4 a beta-1,3. Obě jednotky jsou prostorově příbuzné, proto zaujímají stejnou prostorovou konfiguraci, struktura disacharidu je tedy velmi stabilní. [21]



Obrázek 2: Struktura hyaluronanu

Vykazuje polydisperzitu s průměrnou molekulovou hmotností v řádech milionů daltonů. Ve zředěných roztocích se každá molekula chová jako velká spirála, se zvyšující se koncentrací dochází ke splétání spirál, které nakonec vytvoří jednu síť. Viskozita má nelineární charakter, se zvyšující se koncentrací viskozita roste exponenciálně, pravděpodobně v důsledku zapletení a vzniku sítě. Viskozita roztoku hyaluronanu je závislá na délce řetězce, koncentraci, pH a iontovém složení roztoku a teplotě. [22]

## 2.2 Příprava

Buněčná syntéza hyaluronanu je jedinečný a vysoce řízený proces. Enzymy hyaluronanové syntázy vytvářejí dlouhé lineární polymerní struktury, ve kterých se pravidelně střídá kyselina glukuronová a N-acetylglukosamin. [21]

Syntetický hyaluronan lze připravit třemi metodami, izolací ze zvířecích tkání, bakteriální fermentací a chemoenzymatickou syntézou. Izolovat hyaluronan lze například z kohoutích hřebenů. Čerstvé kohoutí hřebeny jsou namlety, namočený do acetonu kvůli odstranění tuku, poté je hyaluronan extrahován octanem sodným, vysrážen ethanolem a vytřepáván s chloroformem kvůli odstranění bílkovin. Výtěžek takto připraveného hyaluronanu je přibližně 0,1 % hmotnosti původních kohoutích hřebenů [23]. K bakteriální fermentaci jsou využívány bakterie kmene *Streptococcus*. Bakterie jsou kultivovány v přítomnosti zvýšeného obsahu kyslíku, aby bylo dosaženo lepšího růstu bakterií. Další proces probíhá za anaerobních podmínek, jako zdroj uhlíku je použita glukóza. Poté je nutné usmrtit bakterie kyselinou trichloroctovou a odseparovat hyaluronan [24]. Chemoenzymatická syntéza kombinuje využití syntetických chemických nástrojů a rekombinantních přírodních enzymů. Touto metodou lze kontrolovat molekulovou délku řetězce a řídit distribuci molárních hmotností. [25]

## 2.3 Vlastnosti

Hyaluronan v roztoku zaujímá konfiguraci šroubovice, ve které jsou jednotlivé patra propojena pomocí vodíkových vazeb. Výsledkem je extrémně hydrofilní struktura, která je schopná zachytit velké množství vody (až 1000x více než je hmotnost NaHy [26]). Roztoky hyaluronanu mají i při nízkých koncentracích poměrně vysokou viskozitu. Při vyšších koncentracích mají roztoky gelovitý charakter, který vykazuje pseudoplastické chování. [21]

Značný iontový náboj hyaluronanu způsobený počtem opakujících se jednotek vytváří enormní hydrofilitu, to z něj činí vysoce viskózní mezibuněčnou tekutinu. [27]

Řetězce mají zpravidla molekulovou hmotnost  $10^5$ - $10^7$  Da, což odpovídá přibližně 250-25000 disacharidovým jednotkám. Řetězec s molekulovou hmotností  $10^6$  Da má délku přibližně 2  $\mu\text{m}$ . Při koncentraci 10 g/dm<sup>3</sup> je viskozita 5000x větší než viskozita vody. [20]

## 2.4 Degradace

Nemodifikovaný hyaluronan se v těle rozkládá za 2-5 dní v závislosti na molární hmotnosti. Základní struktura hyaluronanu může být modifikována esterifikací, která způsobuje vyšší hydrofobitu řetězce, nebo zesíťováním, které snižuje schopnost vázat okolní vodu, možnost rozpínání systému a schopnost degradace. [28]

Je mnoho metod, jak lze hyaluronan štěpit, například enzymaticky, tepelně, UV zářením, oxidací či změnou pH.

Hyaluronidáza je třída enzymů, která je schopna katalyzovat degradaci hyaluronanu. Podle charakteru enzymu dochází ke štěpení glykosidické vazby beta-1,4 nebo beta-1,3 mezi acetylglukosaminem a glukuronátem. [29]

Nízké nebo vysoké pH má také degradační účinky, v kyselém roztoku dochází k hydrolyze kyseliny glukuronové. Během této reakce dochází k náhodnému štěpení řetězců, stejným mechanismem probíhá i tepelná degradace hyaluronanu. Při tepelné degradaci roztoku hyaluronanu při teplotách 37, 60 a 90 °C dochází po 12 hodinách expozice k redukci molární hmotnosti o 13,4, 15,5 a 33,5 %. [30]

Hyaluronanu v podobě prášku lze snížit molekulovou hmotnost například ozařováním elektronovým paprskem, působením gama záření, mikrovlnným ozařováním či zvýšením teploty. Studie Choi a kol. [31] ukázala, že dochází nejen k redukci molekulové hmotnosti, ale také ke strukturálním změnám. Při působení mikrovlnného záření dochází ke změně barvy z bílé na hnědou. Hyaluronan po ozařování elektronovým paprskem a zářením gama vykazoval nízkou polydisperzitu. Při tepelné degradaci prášku hyaluronanu při teplotách 60, 90 a 120 °C dochází po 3 hodinách expozice k redukci molární hmotnosti o 38,9, 52,7 a 81,3 %. [30]

## 2.5 Využití

Hyaluronan je jednou ze složek mezibuněčné hmoty, proto se derivát hyaluronanu nebo zesíťovaná forma hyaluronanu hojně využívá ve tkáňovém inženýrství. Mezi největší výhody patří kompatibilita hyaluronanu s buňkami, biokompatibilita, vysoká schopnost absorbovat vodu, vnitřní porozita vhodná pro buněčnou proliferaci a schopnost degradace na netoxické vedlejší produkty. Hlavní nevýhoda použití hyaluronanu jako scaffoldu souvisí

s vysokou hygroskopičností, která vede k vytvoření velmi křehké struktury. Hyaluronan se proto využívá spíše jako nosič buněk než jako pevný skelet. [32]

Hyaluronan podporuje hojení ran a podporuje buněčnou proliferaci, proto je jedním z vhodných biomateriálů pro aplikaci léčiv do organismu. Povrch hyaluronanu lze snadno modifikovat, aby byla podpořena konjugace či zesíťování s jinými funkčními skupinami, které mohou být použity pro dodávání léčiv, hojení ran a další aplikace. Hyaluronan byl zesíťován například divinylsulfonem, dialdehydem nebo glycidyletherem, aby byla zlepšena dostupnost hydrofobních léčiv. Většina těchto aplikací je zkoumána především pro intravenózní podání. [33]

Hyaluronan lze modifikovat dihydrazidem kyseliny adipové (ADH). Takovouto modifikaci lze využít například k regulaci inzulínu v lidském těle. Nízká ionizace hyaluronanu v kyselém pH vede k zabránění uvolňování inzulínu. Nanočástice hyaluronanu naplněné inzulínem jsou schopny regulovat hladinu glykémie a snížit hladinu glukózy v krvi o 24 % během 2 hodin a o 35 % během 6 hodin [34]. Nízkomolekulární hyaluronan (50 kDa) s částečnou ADH modifikací lze snadno metabolizovat a rychle odstranit z organismu [35].

### 3 HYDROGELY

Hydrogely jsou tvořeny trojrozměrnou polymerní sítí, která je schopna do své struktury pojmout velké množství rozpouštědla – vody nebo jiné biologické tekutiny. Hydrogely jsou složeny z polymerních řetězců, síťovacího činidla a rozpouštědla. V současné době dochází k rostoucímu zájmu o hydrogely především díky jejich schopnosti botnat ve vodných roztocích, citlivosti na pH či teplotu. Hydrogely mají významnou úlohu v širokém spektru aplikací, jako jsou systémy dodávání léčiv, tkáňové inženýrství, optika, diagnostika a zobrazování. V medicínských aplikacích jsou nejběžněji používané přírodní polymery (chitosan, alginát, celulóza, hyaluronan a další) a syntetické polymery (deriváty methylakrylátu, polyethylenglykol, vinylacetát a další). [36]

#### 3.1 Klasifikace

Je možné vytvořit několik různých způsobů klasifikace hydrogelů podle jejich vlastností. [36]

##### 3.1.1 Podle fyzikální struktury

Na základě fyzikální struktury polymeru lze rozlišovat amorfni, semikrystalické polymery, polymery se strukturou vodíkových můstků, supermolekuly a hydrokoloidní agregáty. [37]

##### 3.1.2 Podle iontového charakteru

Z hlediska iontových nábojů přítomných v polymerní síti lze hydrogely rozdělit na aniontové, kationtové, neutrální a amfolitické. Aniontové hydrogely obsahují záporné ionty v polymerním řetězci, kationtové hydrogely mají v polymerním řetězci kladné ionty. Neutrální hydrogely ve své struktuře neobsahují žádné ionty a amfolitické hydrogely mají ve své struktuře stejný počet kladných i záporných iontů. [38]

##### 3.1.3 Podle počtu polymerů

Podle počtu polymerů je možné rozlišovat homopolymerní, kopolymerní a multipolymerní hydrogely. Homopolymerní hydrogely jsou připravovány pouze z jednoho hydrofilního monomeru. Kopolymerní hydrogely obsahují dva typy monomerů. Multipolymerní hydrogely jsou připravovány ze tří a více monomerů. [39]

### 3.1.4 Podle velikosti

Z hlediska velikosti a funkce lze hydrogely rozdělit na makrogely, mikrogely a nanogely. Mikrogely a nanogely jsou částicové hydrogely s rozměry řádově v mikrometrech a nanometrech. Makroskopické gely mají velikosti v řádech milimetrů až centimetrů. Velikost částic hydrogelů dramaticky ovlivňuje způsob jejich vpravení do těla. Nanogely a mikrogely lze vpravit do těla injekční stříkačkou či v podobě tablety. Makrogely jsou do těla implantovány chirurgicky nebo jsou v kontaktu s pokožkou v místě poranění. [40]

### 3.1.5 Podle typu vazeb

Hydrogely lze dělit podle typu vazeb na fyzikální a chemické gely. Ve fyzikálních gelech jsou polymerní řetězce spojeny pomocí nekovalentních vazeb, například vodíkovými můstky. V chemických gelech jsou řetězce spojeny kovalentními vazbami. [41]

## 3.2 Vlastnosti

Polymerní síť může být hydrofilní nebo hydrofobní. Hydrofilní složky způsobují nabotnutí hydrogelu, hydrofobní složky řídí rychlost botnutí a mechanické vlastnosti. Hydrogely jsou považovány za superabsorbenty, protože jsou schopné do své struktury absorbovat velké množství vody nebo rozpouštědla, stovky až tisíce násobek své hmotnosti [42]. Množství vody absorbované hydrogelem závisí na rovnováze mezi osmotickým tlakem způsobeným stimuly a vratnou elastickou silou polymerní sítě. Při velké vratné elastické síle hydrogel absorbuje relativně málo vody. Hydrogely mohou reagovat na stimuly v podobě změny pH, teploty, koncentrace soli, světla, přítomnosti jiných molekul, iontové síly či změny magnetického pole v čase, reakce jsou závislé na struktuře hydrogelu a obsahu funkčních skupin. Hydrogely mohou reagovat smrštěním či naopak nabotnutím nebo například změnou barvy [43]. Botnutí hydrogelů probíhá zpravidla při teplotách pod teplotou fázového přechodu, při teplotách nad teplotou fázového přechodu dochází ke smrštění struktury [44]. [36]

## 3.3 Syntéza hydrogelů

Hydrogely lze připravit mnoha různými způsoby, například fyzikálním síťováním, chemickým síťováním, polymeračním roubováním nebo síťováním pomocí UV záření [45]. Řízená polymerace umožňuje přípravu hydrogelů s různým složením, velikostí, tvarem

a morfologií, včetně core-shell částic [46]. Jedním z problémů při syntéze hydrogelů z polymerů je řízená distribuce velikostí částic, je potřeba přesně kontrolovat koncentraci polymeru, teplotu reakce, pH a další parametry, aby bylo dosaženo požadované distribuce velikostí částic [47]. [36]

### 3.3.1 Fyzikální síťování

Příprava fyzikálních gelů má výhodu v tom, že k zesíťování není potřeba síťovací činidlo, odpadá tedy nutnost vymývat přebytečné síťovací činidlo. Hydrogely s fyzikální sítí lze připravit například opakovaným chlazením a zahříváním polymerního roztoku, iontovou interakcí, pomocí vodíkových vazeb nebo agregací za vyšších teplot [48]. Hydrogely s fyzikální sítí mají křehčí strukturu ve srovnání s hydrogely s kovalentními vazbami, nicméně přítomnost vodíkových vazeb či iontových interakcí poskytuje dostatečnou stabilitu systému [49]. [36]

### 3.3.2 Chemické síťování

Mezi hlavní metody chemického síťování patří roubování monomerů a použití síťovacího činidla k propojení dvou řetězců polymeru [50]. Chemické síťování zahrnuje vytváření kovalentních vazeb mezi řetězci polymeru a krátkými řetězci roubovaného polymeru nebo síťovacího činidla. Polymerní řetězce mohou být propojeny se síťovacími činidly reakcí funkčních skupin, například hydroxylových, karboxylových a aminových skupin [51]. Polymerní řetězce mohou být aktivovány chemickými činidly nebo vysokoenergetickým zářením [52]. [36]

## 3.4 Smart hydrogely

V současné době v oblasti hydrogelů dochází k velkému vývoji speciálních hydrogelů tzv. smart hydrogelů. Tyto hydrogely jsou schopny na vnější podnět v podobě změny pH, teploty či proměnného elektrického pole reagovat změnou objemu, čehož je využíváno především v medicínských aplikacích. [36]

### 3.4.1 pH sensitivní

Hydrogely, které jsou schopné reagovat změnou objemu při změně pH okolí, jsou označovány jako pH senzitivní. Tyto hydrogely mají ve své struktuře ionizovatelné kyselé

nebo zásadité skupiny, které při změně pH mohou uvolňovat nebo přijímat proton. Nabotnění nebo smrštění způsobené změnou pH je reverzibilní. [53]

### 3.4.2 Teplotně senzitivní

Teplotně senzitivní hydrogely ve své struktuře obsahují hydrofilní i hydrofobní skupiny. K objemovým změnám dochází při dolní nebo horní kritické teplotě roztoku. Teplotně senzitivní hydrogely byly studovány především jako nosiče léčiv, podáním do organismu se zvýší teplota hydrogelu, prudce poklesne objem hydrogelu, což vede k rychlému uvolnění léčiva. [53]

### 3.4.3 Světelně senzitivní

Hydrogely citlivé na světlo lze rozdělit na dvě skupiny podle typu záření, hydrogely citlivé na UV záření a hydrogely citlivé na viditelné světlo. Hydrogely citlivé na UV záření ve své struktuře obsahují molekulu, kterou lze ionizovat UV zářením, vzniklé ionty způsobí zvýšení osmotického tlaku, což vede k bobtnání hydrogelu. Hydrogely citlivé na viditelné světlo ve své struktuře obsahují chromofor, který je schopen absorbovat a emitovat fotony. To vede ke zvýšení teploty hydrogelu a následné změně objemu. [54]

### 3.4.4 Elektro senzitivní

Změna objemu hydrogelu nastává při změně elektrického pole. Pohyblivé ionty se pohybují v elektrickém poli tak, aby klesal gradient koncentrace iontů mezi hydrogelem a roztokem. Elektro senzitivní hydrogely se mohou v přítomnosti elektrického pole smršťovat nebo bobtnat. V některých případech může docházet k ohybu hydrogelu, na jedné straně dojde ke smrštění a na druhé straně k nabotnění hydrogelu v závislosti na migraci iontů. Příkladem polymerů, které lze použít při přípravě elektro senzibilních hydrogelů, může být kombinace chitosanu a polyanilinu nebo hyaluronanu a polyvinylalkoholu. [55][56]

### 3.4.5 Mechanicky senzitivní

Další skupinou smart hydrogelů jsou hydrogely citlivé na mechanické podněty. K jejich syntéze jsou používány povrchově aktivní látky, při požadované koncentraci jednotlivých látek, vhodné geometrii molekul a vhodné iontové síle jsou vytvořeny hydrogely s různou strukturou, do které můžou nabotnat molekuly vody. Povrchově aktivní látky při vysoké koncentraci vytváří micely, které mají většinou tvar podobný vláknům. Mikrostruktura



hydrogelů citlivých na mechanické podněty je složena z tuhých agregátů ve tvaru nanodrátů. [57]

#### 3.4.6 Enzymově senzitivní

Enzymy jsou důležité biokatalyzátory, které hrají významnou roli v chemických a biologických procesech živých organismů. Enzymem katalyzované reakce vyžadují mírnější podmínky, co se týče pH a teploty, ve srovnání s chemickými reakcemi, proto jsou vhodné zejména pro biomedicínské aplikace. Enzymy mohou katalyzovat hydrolýzu nebo fázové přechody sol-gel a gel-sol v hydrogelu. [58]

### 3.5 PVA+NaHy hydrogely

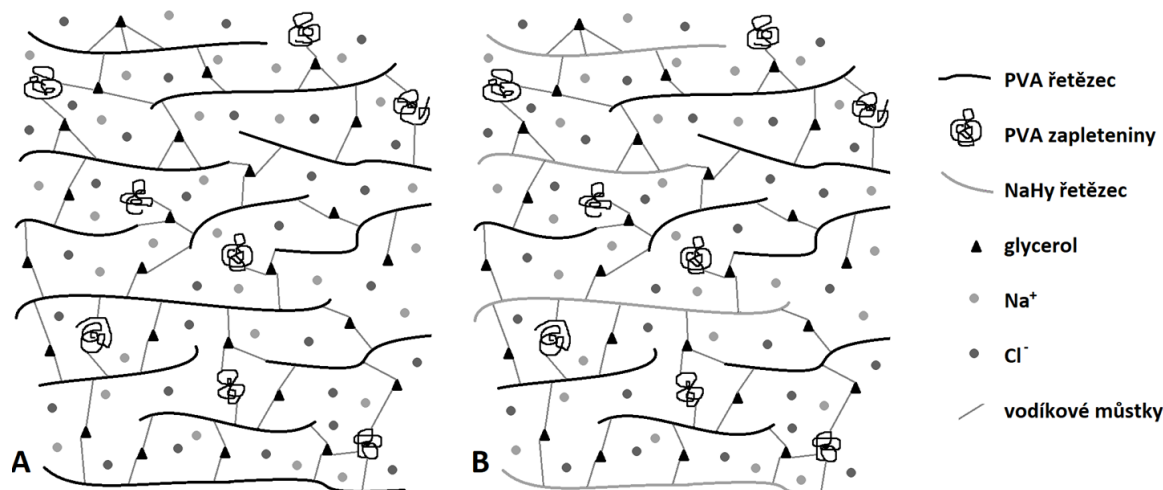
Hydrogely připravené ze směsi polymerů hyaluronanu a polyvinylalkoholu (hydrogely PVA+NaHy) byly zkoumány z hlediska jejich chování v elektrolytech, mechanických vlastností a kultivace buněk.

Hydrogely PVA+NaHy byly připraveny metodou cyklického mrazení a ohřevu v teplotním gradientu. Jedna strana hydrogelu byla na 30 minut v kontaktu s podložkou chlazenou na teplotu kapalného dusíku, docházelo k postupnému zmrazování vzorku, poté byl 6 hodin skladován při laboratorní teplotě, tento cyklus byl opakován 10x. Bylo zjištěno, že část hydrogelu, která byla v kontaktu s podložkou, má výrazně vyšší tuhost v podélném směru a krystalinitu než část hydrogelu na opačné straně. Dále byly do jednotlivých částí hydrogelu vloženy nervové, svalové, kostní buňky a buňky chrupavky a byl pozorován po dobu 4 týdnů vývoj buněčné kultury. Největší rozmnožení kosterních buněk bylo pozorováno u hydrogelu s nejvyšší tuhostí, buňky chrupavky byly nejvíce rozmnoženy v hydrogelu se střední tuhostí a nervové a svalové buňky byly nejvíce rozmnoženy v hydrogelu s nejnižší tuhostí. [59]

V další studii bylo pozorováno chování PVA+NaHy hydrogelů v roztocích elektrolytu, bylo sledováno, zda dochází k botnání a jaká je odezva na přítomnost elektrického pole. Bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací NaCl v elektrolytu docházelo k menšímu botnání hydrogelu. V přítomnosti elektrického pole docházelo k ohýbání hydrogelu, po odstranění elektrického pole se hydrogel vrátil do původní polohy. Při vyšší hodnotě elektrického pole byl úhel ohybu vyšší. [56]

### 3.6 Hydrogely v této práci

Hydrogely v této práci byly připravovány z polyvinylalkoholu, hyaluronanu, glycerolu a NaCl. Jejich příprava byla inspirována prací Peng a kol. [60], kde byly hydrogely připraveny z polyvinylalkoholu, glycerolu a NaCl. Vodný roztok polyvinylalkoholu ve směsi s glycerolem vytvoří systém vodíkových vazeb [61]. Při pokojové teplotě je tvorba hydrogelu zdlouhavá, proto je možné pro urychlení procesu zvolit cestu opakovaného zmrazování a rozmrazování. Druhou možností, jak urychlit proces tvorby hydrogelu, je přidání NaCl, který má vysolovací efekt („salting out“). Při tomto procesu dochází k přesunu části molekul vody od řetězců polymeru k iontům soli. Deficit interakcí polymer-voda je nahrazen interakcemi polymer-polymer či polymer-glycerol. Řetězce polyvinylalkoholu by podle této teorie mohly být mezi sebou propojeny přes molekulu glycerolu pomocí vodíkových můstků. Glycerol má 3 hydroxylové skupiny, mohl by propojit až 3 řetězce, působí tedy jako síťovací činidlo, schéma je znázorněno na obrázku 3A. Hydrogely v této práci jsou připravované také z hyaluronanu, který také obsahuje hydroxylové skupiny. Je předpoklad, že i v tomto hydrogelu dochází k propojení řetězců polymeru mezi sebou přes molekulu glycerolu pomocí vodíkových můstků, schéma je znázorněno na obrázku 3B. [60]



Obrázek 3: Struktura hydrogelu, A – PVA hydrogel, B – PVA+NaHy hydrogel

### 3.7 Využití

Hydrogely nacházejí uplatnění zejména v medicíně, například v léčivech [62], léčebných diagnostikách, tkáňovém inženýrství či při separaci biomolekul a buněk. Hydrogely jsou také materiálem pro výrobu kontaktních čoček nebo obvazů s podporou hojení poranění. Dalším odvětvím, kde hydrogely našly uplatnění, je elektroprůmysl, konkrétně

mikroelektronika, výroba elektrod nebo optoelektronických a fotovoltaických přístrojů [63]. [36][64]

Hydrogely mají velkou schopnost zadržovat vodu, toho se využívá mimo jiné i v zemědělství [65], ale také při výrobě technického sněhu [66]. Hydrogely, které pomáhají zadržovat vodu v zemědělské půdě, jsou připravovány především ze škrobu nebo dalších polysacharidů pomocí roubování hydrofilních skupin [67]. [68]

V posledních letech byly vyvinuty různé typy speciálních hydrogelů, například self-healing hydrogely, hydrogely s tvarovou pamětí nebo hydrogely schopné pohlcovat nebezpečné látky ze vzduchu. Velké pozornosti se dostává především self-healing hydrogelům, autonomní self-healing hydrogely nepotřebují vnější stimul k zahájení procesu hojení, u neautonomních self-healing hydrogelů je nezbytný vnější stimul v podobě světla, magnetického pole nebo tepla, aby byl zahájen proces hojení. [36]

### 3.7.1 Hydrogel jako scaffold pro růst buněk

Hydrogely jsou ve velké míře využívány jako podpůrné struktury, tzv. scaffoldy pro růst buněk. Nejdůležitější vlastností takovýchto struktur je jejich porozita, velikost a distribuce pórů. Póry umožňují migraci a proliferaci buněk, porézní povrch zlepšuje mechanické propojení mezi scaffoldem a okolím. Velikost pórů scaffoldu je nutné optimalizovat v závislosti na typu pěstovaných buněk. Například pro obnovu krevních cév jsou optimální scaffoldy s póry s průměrem 5  $\mu\text{m}$ , pro růst vazivových tkání 5-15  $\mu\text{m}$ , pro regeneraci kůže 20-125  $\mu\text{m}$ , pro regeneraci kostí 100-350  $\mu\text{m}$ . Pro rychlou obnovu vaziva a cévní tkáně a přežití buněk transplantovaných tkání jsou vhodné scaffoldy s průměrem pórů větším než 500  $\mu\text{m}$ . [59][69]

## 4 TECHNIKY MĚŘENÍ A POUŽITÉ PŘÍSTROJE

Hydrogely mohou být charakterizovány z hlediska své chemické struktury, morfologie a fyzikálních vlastností. Chemickou strukturu lze určit pomocí nukleární magnetické rezonance nebo infračervené spektroskopie. Morfologii a vnitřní strukturu hydrogelů lze pozorovat pomocí skenovacího elektronového mikroskopu nebo mikrotomografem. Z fyzikálních vlastností hydrogelů lze měřit jejich nasákavost, stlačitelnost, molekulovou hmotnost, tepelné chování nebo reologické chování. [70]

### 4.1 Skenovací elektronová mikroskopie

Skenovací elektronovou mikroskopií (SEM) je možné zobrazit vnitřní strukturu materiálu. Používá se především pro charakterizaci nehomogenních materiálů, ať už se jedná o plněné materiály nebo o pórovité struktury.

Malá část povrchu vzorku je ozařována proudem urychlených elektronů, které po interakci s povrchem produkují sekundární a zpětně odražené elektrony. Sekundární elektrony nebo zpětně odražené elektrony jsou sbírány detektorem, kde dochází k analýze a následnému vytvoření obrazu povrchu. Proud elektronů je generován v elektronovém děle a je urychlován energií 0,1-50 keV. Pomocí elektromagnetických čoček lze zaostřit proud elektronů na požadované místo na povrchu vzorku. Při použití nejvyššího urychlovacího napětí a nejvyššího rozlišení lze jako jeden bod obvykle zobrazit místo s průměrem menším než 10 nm. Výsledný obrázek je vytvořen snímáním jednotlivých bodů. Pomocí vychylovacích cívek je paprskem pohybováno tak, že dochází k vykreslování obrázku po jednotlivých liniích. V průběhu snímání je vzorek uložen ve vakuové komoře v přítomnosti vysokého vakua, aby nedocházelo k interakci elektronů se vzduchem. [71]

### 4.2 Mikrotomografie

Rentgenová výpočetní tomografie (CT) je poměrně nová digitální zobrazovací metoda, kterou lze nedestruktivně zobrazit vnitřní strukturu materiálu. Dříve byla CT využívána především ve zdravotnictví k neinvazivnímu zobrazení vnitřních orgánů a diagnostice poranění a nemocí. V dnešní době je tomografie přenesena i do průmyslu, kde slouží k zobrazování vnitřní struktury materiálů, například distribuci pórů či defekty a jiné nehomogenity.

Vzorek je umístěn na otočném držáku mezi zdrojem RTG záření a detektorem. V průběhu měření dochází k otáčení vzorku kolem svislé osy o zvolený konstantní úhel, zpravidla méně než jeden stupeň. Rentgenové záření vycházející z rentgenové lampy dopadá na vzorek, kde je část záření rozptýlena a absorbována. Na detektoru je zachycen obraz prošlého záření po každém kroku rotace. Z obrazů jsou následně vytvořeny jednotlivé řezy a 3D model vzorku. [72]

### 4.3 Bloomův gelometr

Pevnost tuhých materiálů v tahu je nejčastěji měřena tahovou zkouškou na univerzálním testovacím stroji. Pevnost v tlaku lze měřit tlakovou zkouškou nebo například pomocí dynamicko-mechanické analýzy. Pevnost gelů a materiálů podobných želatině lze měřit na Bloomově gelometru.

Měření spočívá ve stanovení odporu materiálu s definovanými rozměry vůči železnému válečku s definovaným průměrem při jeho proniknutí do materiálu do požadované hloubky. Výsledkem tohoto měření je síla udaná v gramech, kterou je nutné vyvinout na proniknutí do požadované hloubky. U gelu s Bloom hodnotou 300 bylo potřeba k proniknutí do požadované hloubky vyvinout sílu 300 g, což odpovídá tíze 3 N. [73]

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 PŘÍPRAVA VZORKŮ

### 5.1 Použité chemikálie

K přípravě hydrogelů byl využit polyvinylalkohol s molekulovou hmotností 89-98 kDa, z 99 % hydrolyzovaný od firmy Contipro a.s., hyaluronan s molekulovými hmotnostmi 234, 370, 600 a 1180 kDa od firmy Contipro a.s., glycerol bezvodý s čistotou >99,5 % od firmy PENTA s.r.o. a NaCl BioXtra s čistotou >99,5 % od firmy Sigma Aldrich s.r.o.

### 5.2 Příprava hydrogelů

Hydrogely jsou složeny z polymeru, glycerolu jako síťovací látky a NaCl, který byl přítomen kvůli vytvoření iontového prostředí a urychlení tuhnutí gelu. Byly připravovány dva typy hydrogelů, v prvním případě byl jako polymer použit polyvinylalkohol, ve druhém případě byla použita směs polyvinylalkoholu a hyaluronanu s různými poměry.

#### 5.2.1 Hydrogely PVA

V prvním kroku byl při teplotě 80 °C po dobu 4 hodin rozpouštěn polyvinylalkohol s koncentrací 10 % v deionizované vodě. Ve zkumavce bylo smícháno požadované množství NaCl, glycerolu a temperováno při teplotě 80 °C po dobu 20 minut. Poté bylo přidáno požadované množství 10% polyvinylalkoholu, směs byla temperována při teplotě 80 °C a míchána do zprůhlednění, tj. dokud nedošlo k rozpuštění veškerého NaCl. Poté byla zkumavka vyjmuta z temperační lázně, zchlazena na laboratorní teplotu a docházelo k vytvoření hydrogelu.

#### 5.2.2 Hydrogely PVA+NaHy

Polyvinylalkohol s koncentrací 10 % byl rozpouštěn v deionizované vodě při teplotě 80 °C po dobu 4 hodin. Hyaluronan s koncentrací 1 % byl rozpouštěn v deionizované vodě při teplotě 50 °C po dobu 24 hodin. Dále byla připravena směs polyvinylalkoholu a hyaluronanu o požadovaném poměru za stálého míchání po dobu 4 hodin při teplotě 50 °C. Ve zkumavce bylo smícháno požadované množství NaCl, glycerolu a temperováno při teplotě 50 °C po dobu 20 minut. Poté bylo přidáno požadované množství směsi polyvinylalkoholu s hyaluronanem, směs byla temperována při teplotě 50 °C a míchána do zprůhlednění. Poté

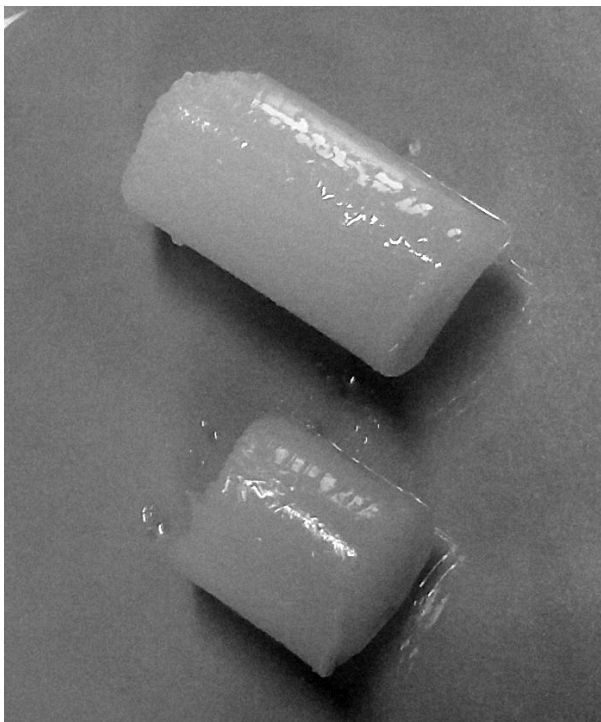
byla zkumavka vyjmuta z temperační lázně, zchlazena na laboratorní teplotu a docházelo k vytvoření hydrogelu.

### 5.3 Značení vzorků

Vzorky hydrogelů jsou značeny kombinací čtyř čísel. Jedná se o poměr hmotnostních dílů jednotlivých složek v pořadí PVA-NaHy-glycerol-NaCl. Vzorek s označením 2-1-1,5-0,5 obsahuje 2 hmotnostní díly 10% polyvinylalkoholu, 1 hmotnostní díl 1% hyaluronanu, 1,5 hmotnostního dílu glycerolu a 0,5 hmotnostního dílu NaCl.

### 5.4 Připravené hydrogely

Připravené hydrogely měly tvar válce s průměrem 8 mm a výškou 10-20 mm.



*Obrázek 4: Připravený hydrogel*

Hydrogely byly připraveny v různých poměrech jednotlivých složek. V tabulce 1 jsou představeny hydrogely, které byly v této práci využity. Jsou zde také uvedena základní rozdělení podle mechanických vlastností a doby tuhnutí hydrogelu. Seznam všech hydrogelů připravených pro tuto práci je přiložen jako příloha P1.



Tabulka 1: Přehled hydrogelů, které se vyskytují v práci

označení vzorku	hm. díly jednotlivých složek				doba tuhnutí	popis
	PVA	NaHy	glycerol	NaCl		
1-0-1-0,5	1	0	1	0,5	2,6 h	měkký
1-0-2-0,5	1	0	2	0,5	3,25 h	měkký
2-0-1-1	2	0	1	1	2,5 h	tuhý
3-0-1-1	3	0	1	1	2 h	tuhý
4-0-1-0,5	4	0	1	0,5	35 h	tuhý
4-0-1-1	4	0	1	1	3,75 h	tuhý
5-0-1-1	5	0	1	1	5,75 h	tuhý
6-0-1-1	6	0	1	1	11,5 h	tuhý
7-0-1-1	7	0	1	1	11 h	tuhý
7,5-0-1-1	7,5	0	1	1	17 h	tuhý
1-1-1-0,3	1	1	1	0,3	9 h	měkký
1-1-1-0,4	1	1	1	0,4	7 h	měkký
1-1-1-0,5	1	1	1	0,5	2,2 h	měkký
1-1-1,5-0,25	1	1	1,5	0,25	17 h	měkký
1-1-1,5-0,5	1	1	1,5	0,5	3,5 h	měkký
2-1-0,5-0,4	2	1	0,5	0,4	11,7 h	měkký
2-1-0,65-0,4	2	1	0,65	0,4	14 h	měkký
2-1-1-0,3	2	1	1	0,3	47 h	měkký
2-1-1-0,4	2	1	1	0,4	14,5 h	měkký
2-1-1,5-0,25	2	1	1,5	0,25		neztuhlý
2-1-1,5-0,3	2	1	1,5	0,3	44 h	měkký
2-1-1,5-0,4	2	1	1,5	0,4	15 h	měkký
2-1-1,5-0,5	2	1	1,5	0,5	12 h	měkký
2-1-1,5-0,6	2	1	1,5	0,6	5 h	sražený
2-1-1,5-0,7	2	1	1,5	0,7	4 h	sražený
2-1-1,5-0,75	2	1	1,5	0,75	2 h	sražený
3-1-1-0,3	3	1	1	0,3		neztuhlý
3-1-1-0,4	3	1	1	0,4		měkký

označení vzorku	hm. díly jednotlivých složek				doba tuhnutí	popis
	PVA	NaHy	glycerol	NaCl		
<b>3-1-1,5-0,5</b>	3	1	1,5	0,5		tuhý
<b>5-1-1,5-1,5</b>	5	1	1,5	1,5		sražený
<b>5-1-2,5-0,75</b>	5	1	2,5	0,75	14 h	tuhý
<b>8-1-2-1</b>	8	1	2	1	48 h	tuhý
<b>8-1-4-1</b>	8	1	4	1	22,6 h	tuhý

Hydrogely jsou podle mechanických vlastností rozděleny do čtyř skupin. Hydrogely, které v průběhu tuhnutí nevytvořily kompaktní tvar nebo zůstaly v podobě gelu, jsou označeny jako „neztuhlý“. Hydrogely, které ztuhly do kompaktního tvaru, jsou označeny jako „měkký“ a „tuhý“. U hydrogelů s označením „sražený“ došlo v průběhu přípravy k vytvoření sraženiny v podobě bílých šupinek.

## 6 VLIV JEDNOTLIVÝCH SLOŽEK NA VLASTNOSTI HYDROGELŮ

V první části práce byl sledován vliv jednotlivých složek na vlastnosti hydrogelů, konkrétně na jejich tuhost a dobu tuhnutí. Byly připraveny soubory hydrogelů, které se lišily pouze v množství jedné složky. Všechny hydrogely byly připraveny z hyaluronanu s molekulovou hmotností 600 kDa.

### 6.1 Vliv polyvinylalkoholu

V tabulkách 2 a 3 je zobrazen vliv množství polyvinylalkoholu na dobu tuhnutí hydrogelu.

*Tabulka 2: Porovnání doby tuhnutí pro hydrogely s různým obsahem polyvinylalkoholu*

označení vzorku	doba tuhnutí
3-0-1-1	2 h
4-0-1-1	3,75 h
5-0-1-1	5,75 h
6-0-1-1	11,5 h
7-0-1-1	11 h
7,5-0-1-1	17 h

*Tabulka 3: Porovnání doby tuhnutí pro hydrogely s různým obsahem polyvinylalkoholu*

označení vzorku	doba tuhnutí
1-1-1-0,3	9 h
2-1-1-0,3	47 h
3-1-1-0,3	neztuhlý

Množství polyvinylalkoholu má výrazný vliv na vlastnosti hydrogelu. V případě hydrogelů PVA výrazně roste jejich tuhost a soudržnost se zvyšujícím se množstvím polyvinylalkoholu. Významný vliv má množství polyvinylalkoholu také na dobu tuhnutí, se zvyšujícím se množstvím polyvinylalkoholu se značně prodlužuje. U hydrogelu 3-1-1-0,3 dokonce k vytvoření kompaktní struktury nedošlo.

## 6.2 Vliv hyaluronanu

Vliv množství hyaluronanu na dobu tuhnutí hydrogelu je zobrazen v tabulkách 4 a 5.

*Tabulka 4: Porovnání doby tuhnutí pro hydrogely s různým obsahem hyaluronanu*

označení vzorku	doba tuhnutí
5-1-2,5-0,75	14 h
5-2,5-2,5-0,75	47 h

*Tabulka 5: Porovnání doby tuhnutí pro hydrogely s různým obsahem hyaluronanu*

označení vzorku	doba tuhnutí
4-0-1-0,5	35 h
4-0,5-1-0,5	48 h

Také množství hyaluronanu má výrazný vliv na dobu tuhnutí hydrogelu. S rostoucím množstvím hyaluronanu se doba tuhnutí prodlužuje. Hydrogely s vyšším obsahem hyaluronanu mají horší mechanické vlastnosti, jsou měkčí a méně kompaktní.

## 6.3 Vliv glycerolu

Tabulky 6 a 7 zachycují vliv množství glycerolu na dobu tuhnutí hydrogelu.

*Tabulka 6: Porovnání doby tuhnutí pro hydrogely s různým obsahem glycerolu*

označení vzorku	doba tuhnutí
1-0-0,5-0,5	2,5 h
1-0-1-0,5	2,6 h
1-0-2-0,5	3,25 h

*Tabulka 7: Porovnání doby tuhnutí pro hydrogely s různým obsahem glycerolu*

označení vzorku	doba tuhnutí
2-1-0,65-0,4	14 h
2-1-1-0,4	14,5 h
2-1-1,5-0,4	15 h

Množství glycerolu obsažené v hydrogelu příliš neovlivňuje dobu jeho tuhnutí. S rostoucím množstvím glycerolu se doba tuhnutí prodlužuje jen velmi málo. Naopak na mechanické vlastnosti má glycerol vliv významný, hydrogely s vyšším množstvím glycerolu jsou velmi křehké a měkké.

## 6.4 Vliv NaCl

V tabulce 8 je zobrazen vliv množství NaCl na dobu tuhnutí hydrogelu.

Tabulka 8: Porovnání doby tuhnutí pro hydrogely s různým obsahem NaCl

označení vzorku	doba tuhnutí	
2-1-1,5-0,25	neztuhlý	
2-1-1,5-0,3	44 h	
2-1-1,5-0,4	15 h	
2-1-1,5-0,5	12 h	
2-1-1,5-0,6	5 h	sražený
2-1-1,5-0,7	4 h	sražený
2-1-1,5-0,75	2 h	sražený

Na dobu tuhnutí má nejvýznamnější vliv obsah NaCl. Jestliže ve směsi není dostatek NaCl, hydrogel nevytvoří kompaktní tvar, ale pouze kašovitou hmotu. Oproti tomu při velkém množství NaCl se vytvoří v průběhu přípravy bílé šupinky sraženiny. V tabulce 8 je zobrazen trend, kdy se při zvyšujícím množství NaCl v hydrogelu doba jeho tuhnutí zkracuje. Množství NaCl má také výrazný vliv na mechanické vlastnosti, hydrogely s vyšším obsahem NaCl jsou tužší.

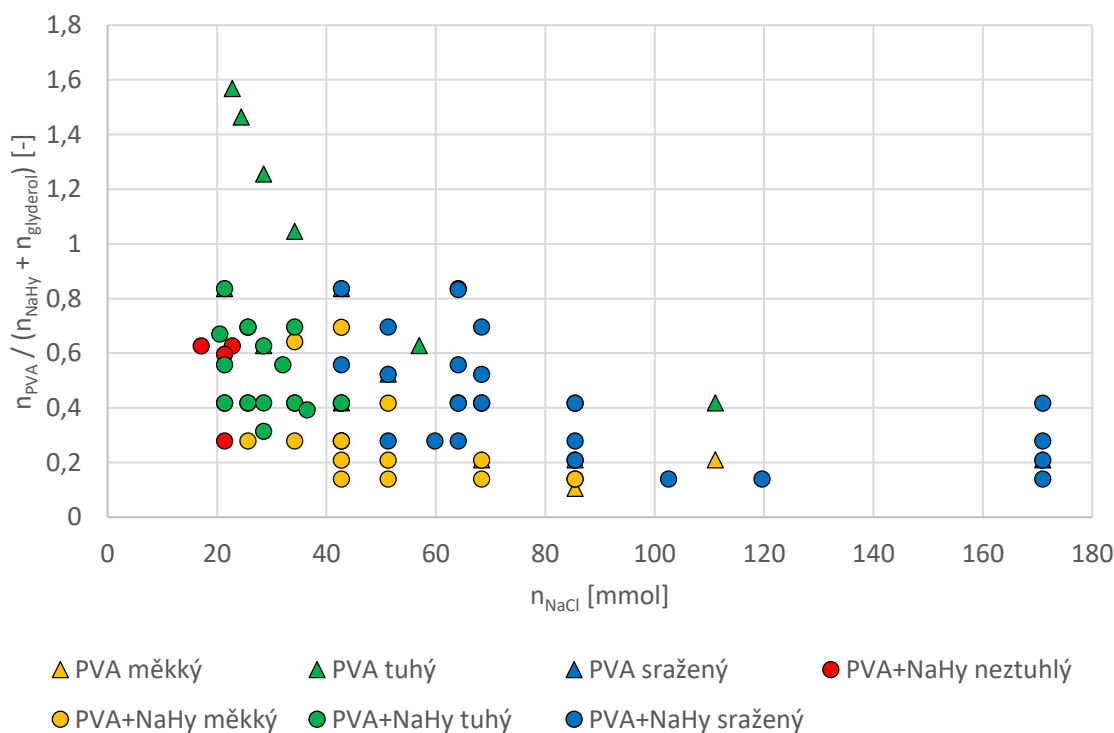
## 6.5 Grafické znázornění

Závěrem této části je grafické porovnání všech připravených hydrogelů v závislosti na jejich složení. Pro vytvoření grafu bylo nutné přepočítat jednotlivé hmotnostní poměry tak, aby množství PVA bylo vždy rovno 10 hmotnostním dílům. Ve druhém kroku byly tyto nové hmotnostní poměry převedeny na látkové množství, které je vyjádřené v milimolech. Přepočet je pro vybraný hydrogel ukázán v tabulce 9.

Tabulka 9: Přepočítání hmotnostních poměrů na látkové množství

	PVA	NaHy	glycerol	NaCl
<b>hmotnostní díly</b>	1	1	0,5	0,25
<b>přepočítání na PVA = 10</b>	10	10	5	2,5
<b>látkové množství (mmol)</b>	22,7	0,3	54,3	42,7

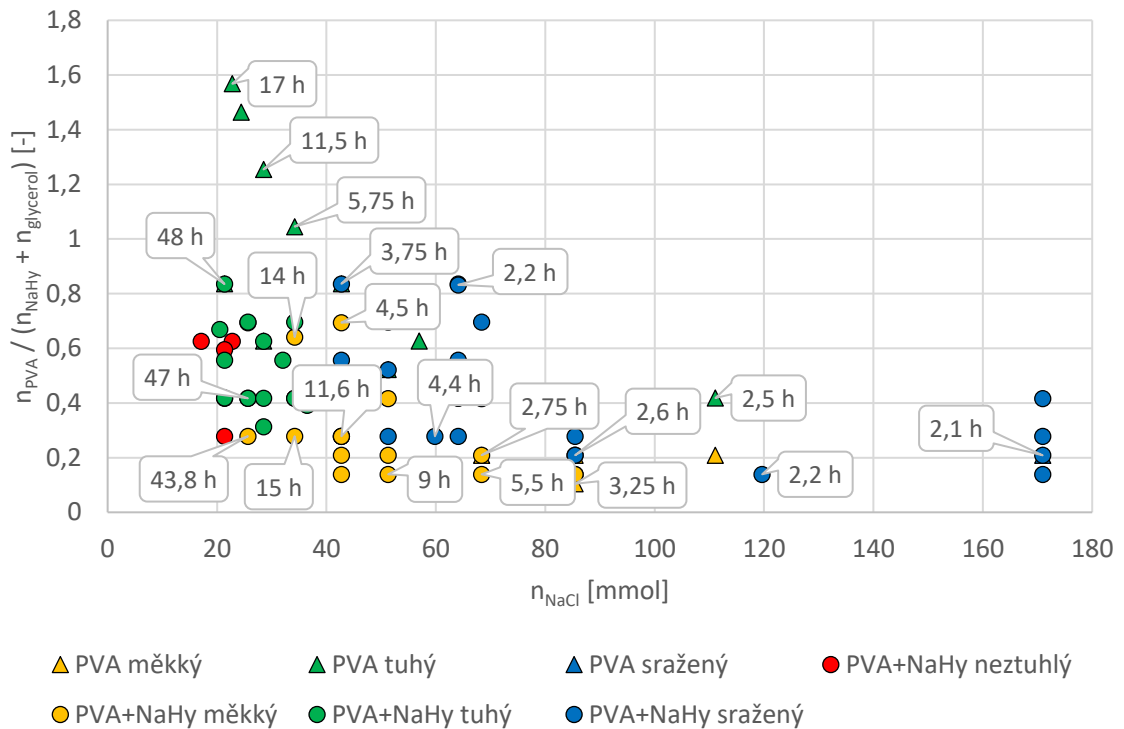
Jak bylo diskutováno výše, vyšší obsah hyaluronanu a glycerolu prodlužuje dobu tuhnutí a zhoršuje mechanické vlastnosti. Naopak vyšší obsah NaCl zlepšuje mechanické vlastnosti a zkracuje dobu tuhnutí. Z toho důvodu byla jako grafické znázornění vybrána závislost podílu látkového množství polyvinylalkoholu a součtu látkových množství hyaluronanu a glycerolu na látkovém množství NaCl.



Graf 1: Grafické znázornění hydrogelů – závislost podílu látkového množství PVA a součtu látkových množství NaHy a glycerolu na látkovém množství NaCl

V grafu 1 lze vidět grafické znázornění vlastností připravených hydrogelů. Dle tvaru symbolu jsou rozlišeny hydrogely PVA a hydrogely PVA+NaHy, barvy představují odlišné mechanické vlastnosti. V dolní části se nacházejí hydrogely s vyšším obsahem hyaluronanu a glycerolu. Hydrogely v pravé části mají vyšší obsah NaCl. Jak lze vidět z použitých symbolů, hydrogely, které nevytvořily kompaktní gel (červená barva), se nacházejí úplně

v levé části grafu, jsou to hydrogely s nejnižším obsahem NaCl. V levé horní části se nacházejí tuhé hydrogely (zelená barva), které obsahují málo hyaluronanu a glycerolu. Naopak hydrogely měkké (žlutá barva) se nacházejí v dolní části grafu a obsahují velké množství hyaluronanu a glycerolu. Hydrogely, u kterých v průběhu přípravy vznikla sraženina (modrá barva), se nacházejí v pravé části grafu a obsahují příliš mnoho NaCl.



Graf 2: Grafické znázornění hydrogelů a jejich doby tuhnutí

V grafu 2 jsou zaneseny doby tuhnutí vybraných hydrogelů. Lze vidět, že u hydrogelů PVA+NaHy se doba tuhnutí příliš nemění v závislosti na množství hyaluronanu a glycerolu, tj. ve svislém směru je doba tuhnutí víceméně konstantní. Zato dramaticky se doba tuhnutí mění v závislosti na množství NaCl.

Ideální hydrogel z hlediska nejkratší doby tuhnutí a zároveň dostatečné soudržnosti by se nacházel v pravé horní části.

## 7 BLOOMŮV GELOMETR

### 7.1 Použitý přístroj

Měření bylo prováděno na Bloomově gelometru Stevens – LFRA texture analyser.

### 7.2 Režim měření

Byly testovány vzorky tvaru válce s průměrem 28 mm a výškou 25 mm. Hydrogel byl stlačován o 4 mm válcovým indentorem o průměru 1 cm. Prvním kondicionačním měřením byly odstraněny nerovnosti na povrchu, následně byly provedeny vždy 3 měření do stejného místa.

### 7.3 Výsledky

V následujících tabulkách jsou zobrazeny výsledky měření tuhosti na Bloomově gelometru pro hydrogely, které se lišily pouze v množství jedné složky. Kondicionační měření není v tabulkách uvedeno.

*Tabulka 10: Bloom hodnoty hydrogelů s různým obsahem polyvinylalkoholu*

označení vzorku	1. měření	2. měření	3. měření	průměr
<b>1-1-1-0,4</b>	211	216	213	213 ± 3
<b>2-1-1-0,4</b>	332	322	300	320 ± 20
<b>3-1-1-0,4</b>	462	426	399	429 ± 30

Závislost Bloom hodnoty na obsahu polyvinylalkoholu je zobrazena v tabulce 10. S rostoucím množstvím polyvinylalkoholu v hydrogelu výrazně roste Bloom hodnota. To znamená, že množství polyvinylalkoholu značně ovlivňuje tuhost hydrogelu a sílu, kterou je nutné vynaložit na stlačení hydrogelu o požadovanou výchylku.

*Tabulka 11: Bloom hodnoty hydrogelů s různým obsahem glycerolu*

označení vzorku	1. měření	2. měření	3. měření	průměr
<b>2-1-0,65-0,4</b>	653	633	615	630 ± 20
<b>2-1-1-0,4</b>	332	322	300	320 ± 20
<b>2-1-1,5-0,4</b>	236	220	206	220 ± 20



Jak lze vidět v tabulce 11, vliv množství glycerolu na Bloom hodnotu je velmi výrazný. S rostoucím obsahem glycerolu Bloom hodnota klesá. Přítomnost většího množství glycerolu snižuje tuhost hydrogelu.

*Tabulka 12: Bloom hodnoty hydrogelů s různým obsahem NaCl*

označení vzorku	1. měření	2. měření	3. měření	průměr
<b>2-1-1,5-0,25</b>	237	224	219	230 ± 10
<b>2-1-1,5-0,3</b>	221	209	200	210 ± 10
<b>2-1-1,5-0,4</b>	236	220	206	220 ± 20
<b>2-1-1,5-0,5</b>	278	263	260	270 ± 10
<b>2-1-1,5-0,6</b>	337	305	276	310 ± 30

Tabulka 12 ukazuje závislost Bloom hodnoty hydrogelů při změně množství NaCl. S rostoucím obsahem NaCl se Bloom hodnota zvyšuje, avšak tento trend není tak výrazný jako v případě polyvinylalkoholu a glycerolu.

## 7.4 Diskuze

Měřením na Bloomově gelometru bylo prokázáno, že množství jednotlivých složek hydrogelu má významný vliv na jeho tuhost, respektive na sílu, kterou je potřeba vykonat na stlačení hydrogelu o danou vzdálenost. Tuhost hydrogelu, v tomto měření ji představuje Bloom hodnota, je výrazně ovlivněna především množstvím polyvinylalkoholu a glycerolu. S rostoucím obsahem polyvinylalkoholu v hydrogelu se Bloom hodnota zvyšuje, dochází k nárůstu tuhosti hydrogelu. S rostoucím množstvím NaCl se Bloom hodnota a tuhost také zvyšuje, avšak podstatně méně než v případě polyvinylalkoholu. Naopak s rostoucím obsahem glycerolu dochází k prudkému poklesu Bloom hodnoty. Síla, kterou je potřeba vykonat ke stlačení hydrogelu o danou vzdálenost, se s rostoucím množstvím glycerolu v hydrogelu snižuje, hydrogel ztrácí svou tuhost.

## 8 VELIKOST PÓRŮ

Cílem této práce bylo vytvořit hydrogely s pórovitou strukturou, které by mohly být vhodné pro růst buněk. Připravené hydrogely byly před lyofilizací zmrazeny, aby byla zachována jejich přirozená struktura. Na snímacím elektronovém mikroskopu byly zkoumány jednotlivé hydrogely v řezu a následně byly vybrány hydrogely s největšími póry. Tyto hydrogely byly poté charakterizovány pomocí mikrotomografie, aby bylo možné porovnat pórovitost v celém objemu hydrogelu.

### 8.1 Skenovací elektronová mikroskopie

#### 8.1.1 Použitý přístroj

Měření bylo prováděno na elektronovém mikroskopu Phenom Pro-X.

#### 8.1.2 Režim měření

Z hydrogelu válcového tvaru o průměru 8 mm byl vyříznut plátek o tloušťce 2 mm, který byl zmražen a lyofilizován. Měření bylo prováděno v režimu zpětně odražených elektronů BSE při urychlovacím napětí 10 keV. Zvětšení bylo pro jednotlivé vzorky individuální.

#### 8.1.3 Výsledky

U hydrogelů s různým množstvím jednotlivých složek byla na SEM zkoumána přítomnost pórů. V tabulce 13 je zobrazen přehled testovaných hydrogelů se základním popisem struktury.

*Tabulka 13: Porovnání velikosti pórů a struktury jednotlivých hydrogelů*

označení vzorku	velikost pórů ( $\mu\text{m}$ )	popis struktury
1-0-1-0,5	0	homogenní hladká struktura
1-0-2-0,5	0	homogenní hladká struktura
7-0-1-1	0	kompaktní zvrásněná struktura
1-1-1-0,5	0	hladká struktura, minimum pórů
1-1-1,5-0,25	15	pórovitá struktura
1-1-1,5-0,5	0	hladká struktura, minimum pórů
2-1-0,5-0,4	0	hladká struktura

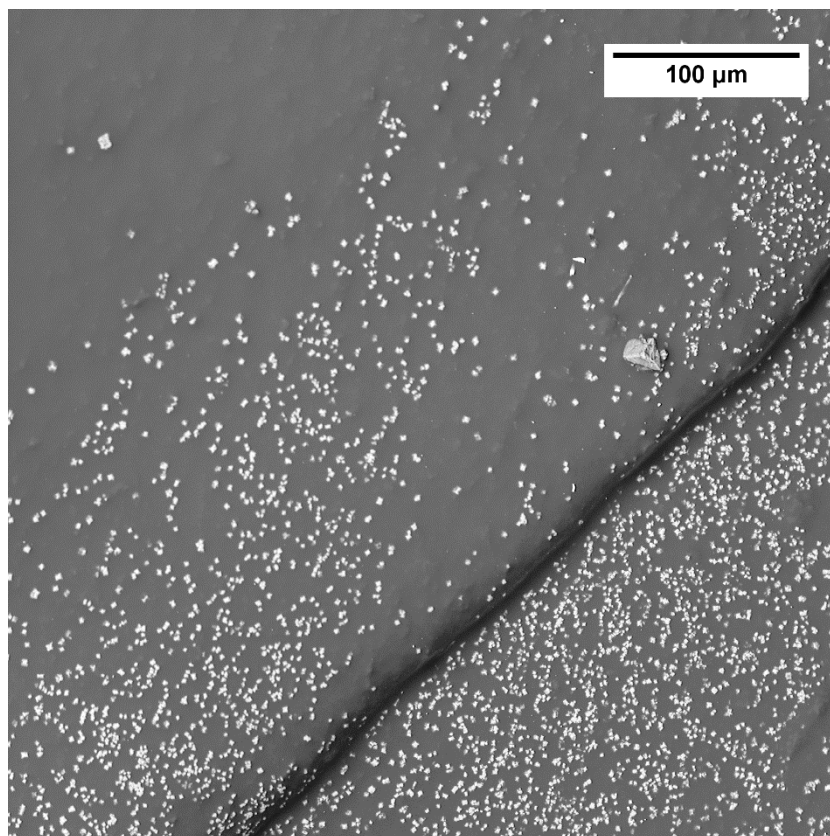
označení vzorku	velikost pórů ( $\mu\text{m}$ )	popis struktury
2-1-1,5-0,5H	50	pórovitá struktura
2-1-1,5-0,5J	20	pórovitá struktura
3-1-1,5-0,5	20	pórovitá struktura
5-1-1,5-0,75	5	zvrásněná pórovitá struktura
5-1-2,5-0,75	0	hladká struktura, minimum pórů
8-1-2-1	5	pórovitá struktura
8-1-4-1	2	pórovitá struktura

Hydrogely, které neobsahují hyaluronan, vykazují poměrně kompaktní strukturu bez viditelných pórů. V případě hydrogelů 1-0-1-0,5 (obrázek 5) a 1-0-2-0,5 je povrch velmi hladký, pouze s přítomností bílých krystalků nerozpuštěné soli. Struktura povrchu hydrogelu 7-0-1-1 (obrázek 6) je velmi zvrásněná, ale také kompaktní a bez přítomnosti viditelných pórů.

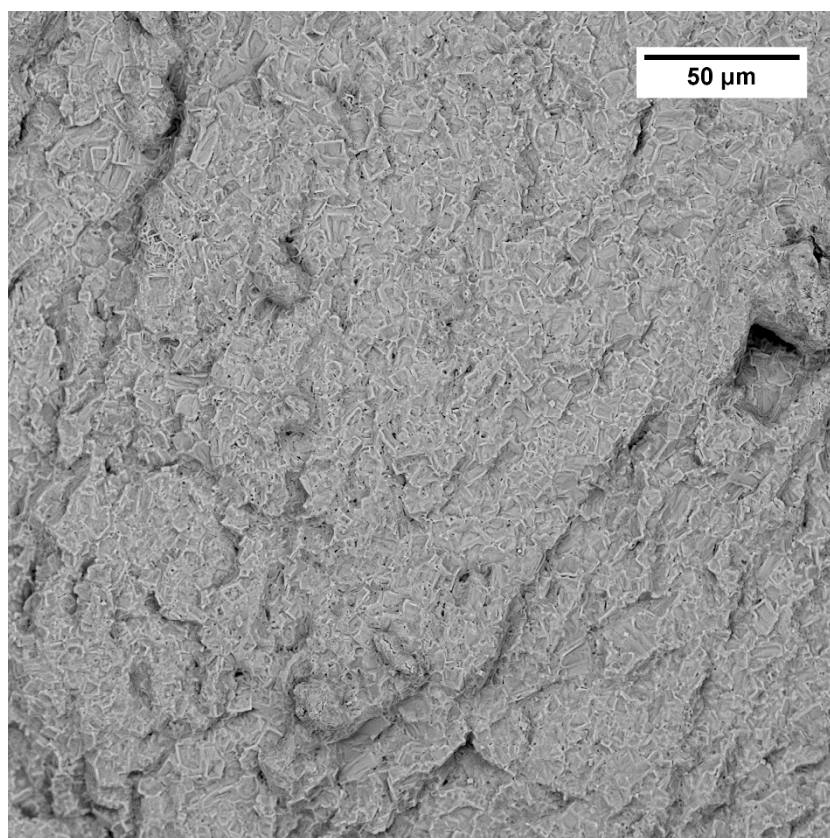
Hydrogely s poměrem polyvinylalkoholu a hyaluronanu 1 : 1 také vykazují převážně strukturu s hladkým povrchem bez viditelných pórů. Pouze hydrogel 1-1-1,5-0,25 (obrázek 7) má na svém povrchu strukturu mělkých pórů s maximálním průměrem 15  $\mu\text{m}$ .

Hydrogely, které mají poměr polyvinylalkoholu a hyaluronanu 2 : 1, mají převážně pórovitou strukturu. Pouze struktura hydrogelu 2-1-0,5-0,4 byla opět hladká a bez viditelných pórů. Povrch hydrogelu 2-1-1,5-0,5 je tvořen velkými póry. Proto byl tento hydrogel připraven ve dvou variantách s rozdílnou hrubostí NaCl. Hydrogel 2-1-1,5-0,5H (obrázek 8) s normální hrubostí soli (H) tvoří pórovitá struktura s průměrem pórů až 50  $\mu\text{m}$ , hydrogel 2-1-1,5-0,5J (obrázek 9) s jemnou solí (J) tvoří také pórovitou strukturu s průměrem pórů okolo 20  $\mu\text{m}$ .

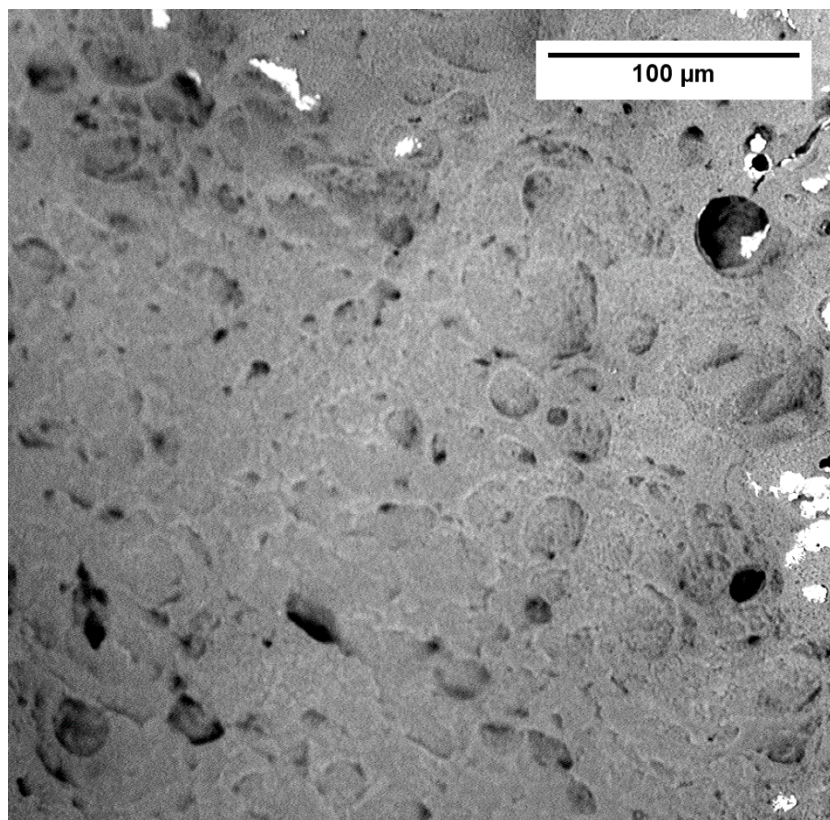
Hydrogely s vyšším obsahem polyvinylalkoholu tvoří taktéž pórovitou strukturu, avšak se zvyšujícím se množstvím polyvinylalkoholu se průměr pórů zmenšuje. V případě hydrogelu 3-1-1,5-0,5 (obrázek 10) je povrch tvořen velkým množstvím pórů s průměrem okolo 20  $\mu\text{m}$ . Hydrogel 5-1-1,5-0,75 (obrázek 11) také tvoří pórovitou strukturu, nicméně velikost pórů je již pouze okolo 5  $\mu\text{m}$ . Povrch hydrogelu 5-1-2,5-0,75 je hladký bez přítomnosti pórů. Hydrogely 8-1-2-1 (obrázek 12) a 8-1-4-1 (obrázek 13) mají poměrně hladkou strukturu s velmi malými póry s průměrem 5 a 2  $\mu\text{m}$ . U hydrogelu s menším obsahem glycerolu je velké množství krystalické NaCl.



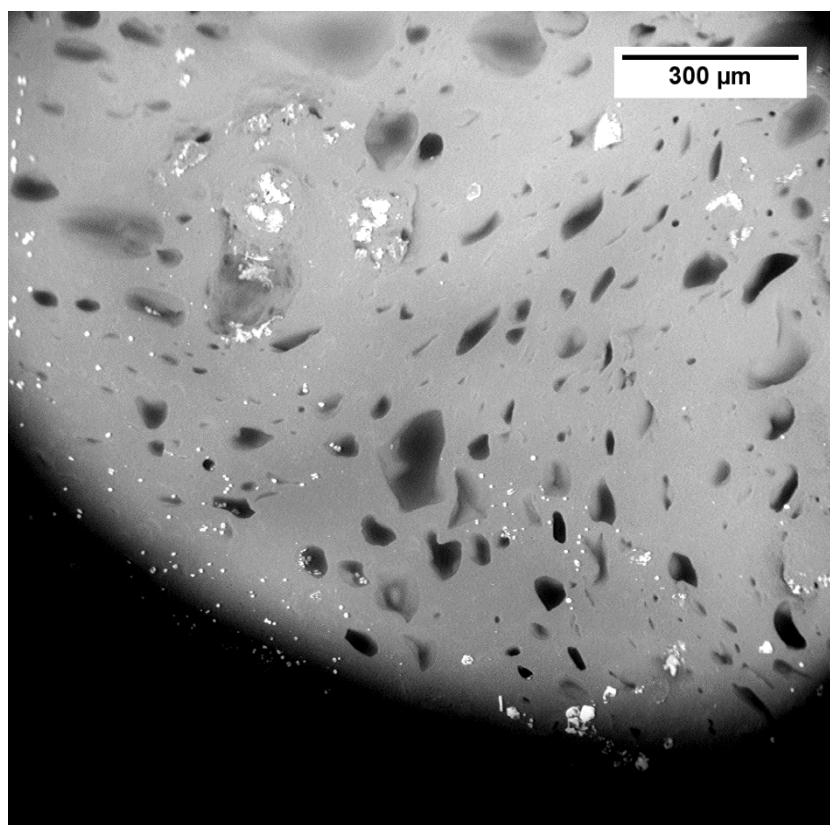
*Obrázek 5: Hydrogel 1-0-1-0,5*



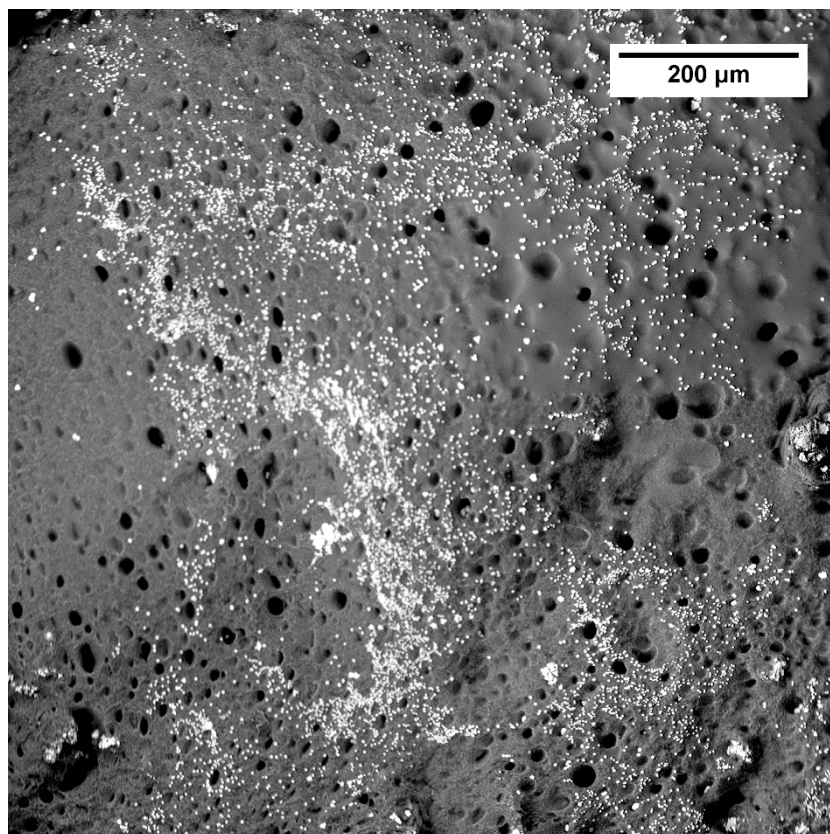
*Obrázek 6: Hydrogel 7-0-1-1*



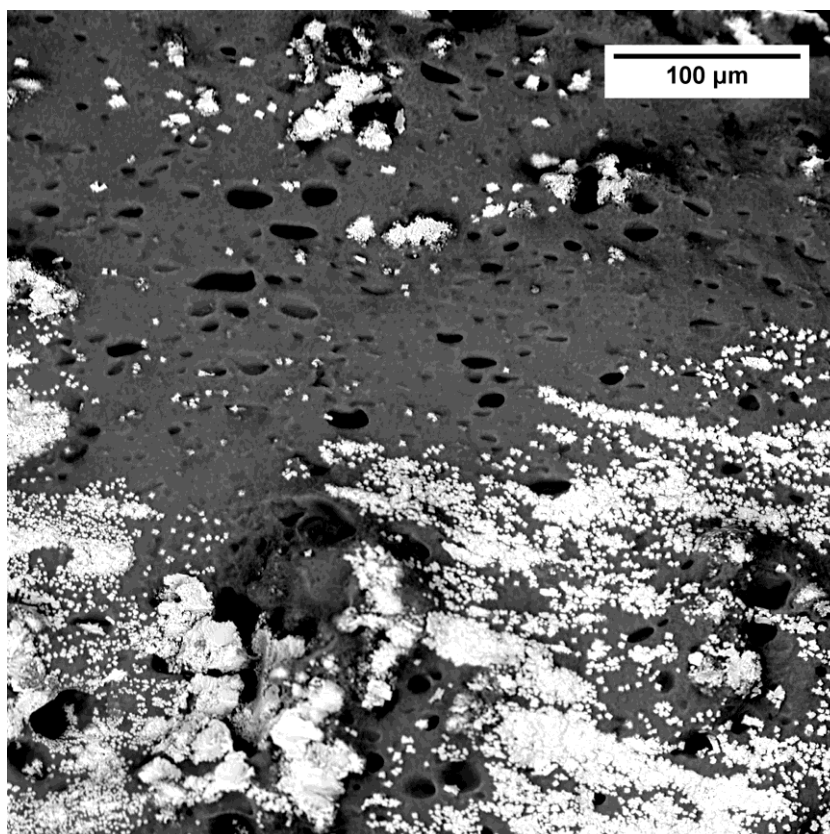
*Obrázek 7: Hydrogel 1-1-1,5-0,25*



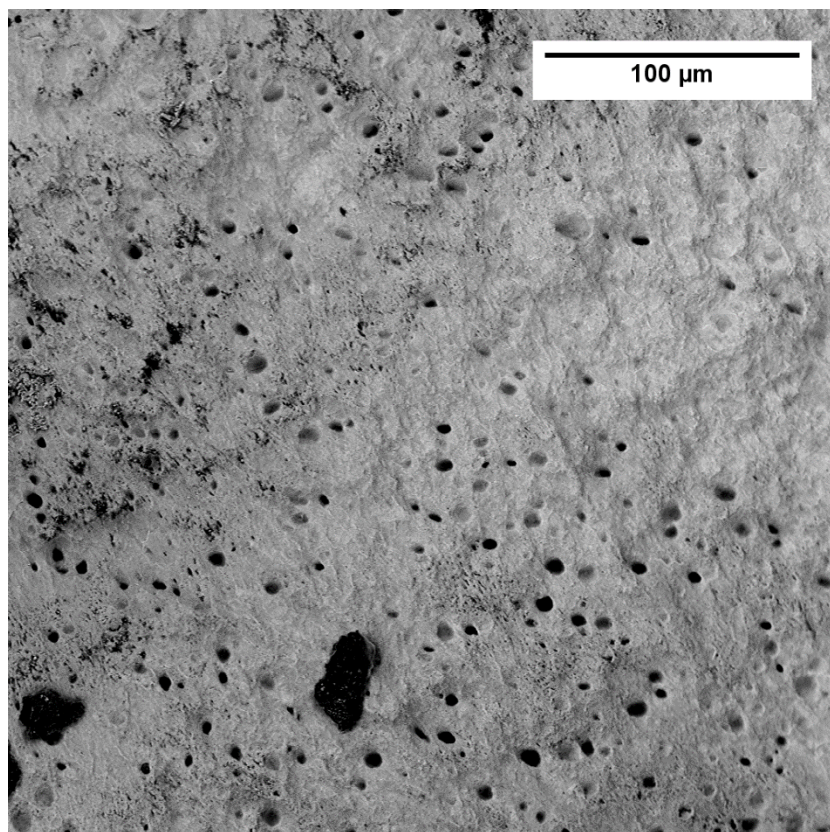
*Obrázek 8: Hydrogel 2-1-1,5-0,5H*



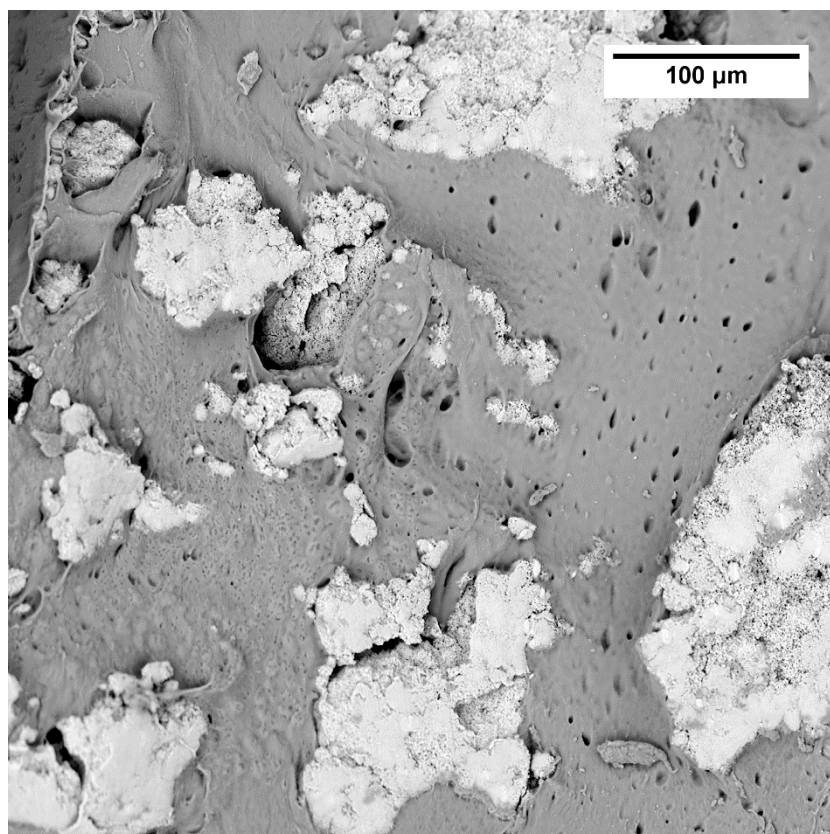
*Obrázek 9: Hydrogel 2-1-1,5-0,5J*



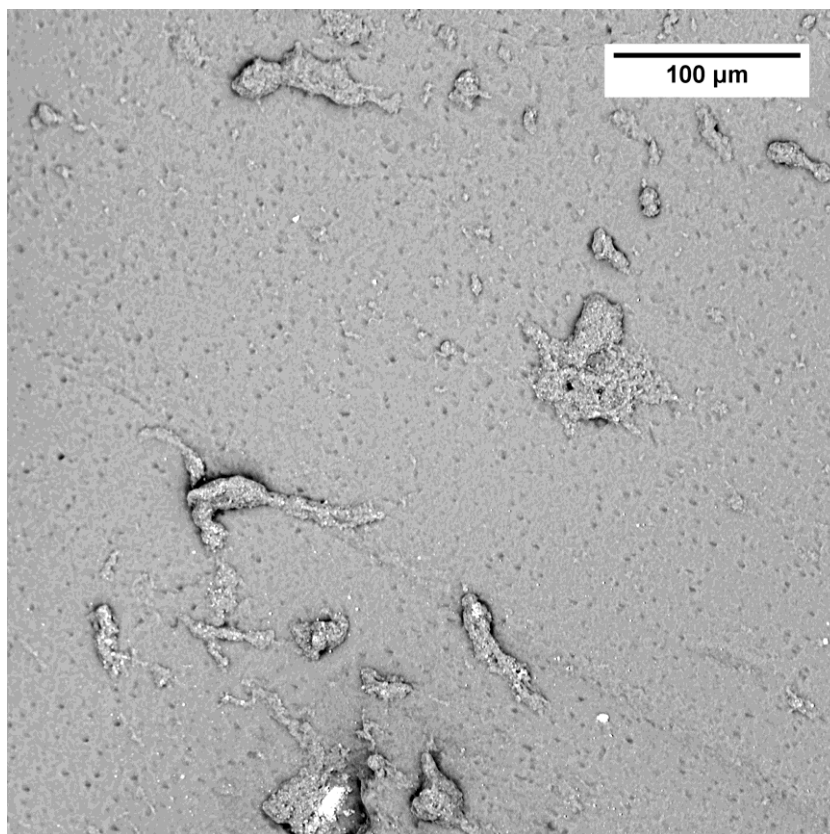
*Obrázek 10: Hydrogel 3-1-1,5-0,5*



*Obrázek 11: Hydrogel 5-1-1,5-0,75*



*Obrázek 12: Hydrogel 8-1-2-1*



Obrázek 13: Hydrogel 8-1-4-1

Pomocí snímků SEM byly charakterizovány hydrogely z hlediska jejich struktury a velikosti pórů. Největší póry jsou ve struktuře hydrogelů 2-1-1,5-0,5 a 3-1-1,5-0,5.

### 8.1.3.1 Porovnání molekulové hmotnosti NaHy

Ve všech předchozích hydrogelech byl použit hyaluronan s molekulovou hmotností 600 kDa. Hydrogely, jejichž struktura je tvořena největšími póry (2-1-1,5-0,5 a 3-1-1,5-0,5), byly následně připraveny z hyaluronanu s různou molekulovou hmotností, konkrétně 234, 370, 600 a 1180 kDa. Pro porovnání byly připraveny také hydrogely 1-1-1,5-0,5. V tabulce 14 je zobrazen přehled struktury a velikosti pórů jednotlivých hydrogelů.

Tabulka 14: Porovnání velikosti pórů a struktury jednotlivých hydrogelů

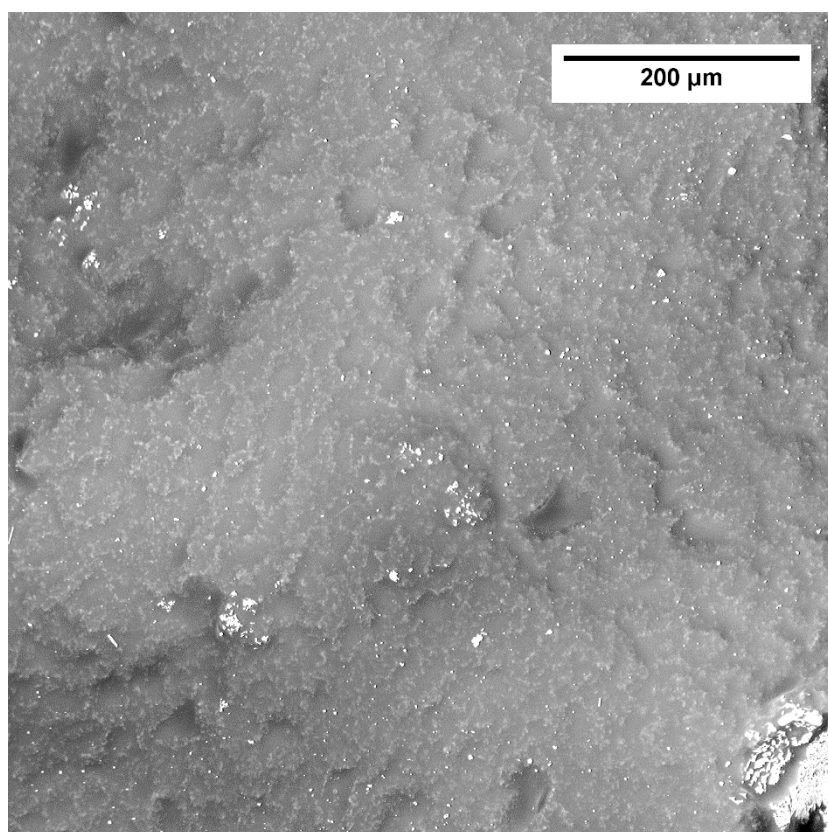
označení vzorku	234 kDa	370 kDa	600 kDa	1180 kDa
<b>1-1-1,5-0,5</b>	zvrásněná struktura bez pórů	zvrásněná struktura bez pórů	zvrásněná struktura bez pórů	
<b>2-1-1,5-0,5</b>	póry 20-30 μm	póry 30-50 μm	póry 30-70 μm	póry 10 μm
<b>3-1-1,5-0,5</b>	póry 10 μm	póry 15 μm	póry 10-20 μm	póry 15 μm



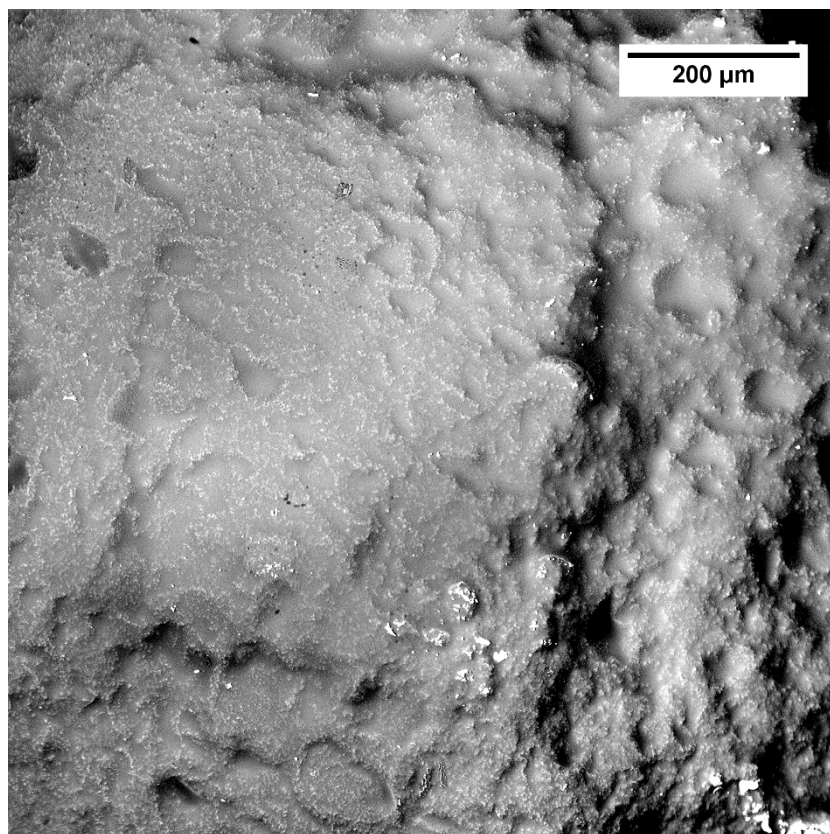
Struktura povrchu hydrogelu 1-1-1,5-0,5 byla nezávisle na molární hmotnosti zvrásněná, kompaktní a bez viditelných pórů. Hydrogel s molekulovou hmotností 1180 kDa nebylo možné připravit kvůli velmi dlouhé době tuhnutí, během které docházelo k separaci jednotlivých složek.

Povrch hydrogelů 2-1-1,5-0,5 je tvořen póry s různým průměrem. Na povrchu hydrogelu s molekulovou hmotností 234 kDa (obrázek 17) jsou poměrně plytké póry s průměrem 20-30  $\mu\text{m}$ . Strukturu hydrogelu s molekulovou hmotností 370 kDa (obrázek 18) tvoří velké množství pórů s průměrem 30-50  $\mu\text{m}$ . Největší póry s průměrem 30-70  $\mu\text{m}$  se nacházejí na povrchu hydrogelu s molekulovou hmotností 600 kDa (obrázek 19). Hydrogel s molekulovou hmotností 1180 kDa (obrázek 20) byl částečně nehomogenní, jeho povrch tvoří vrásčitá struktura s malými póry o průměru 10  $\mu\text{m}$ .

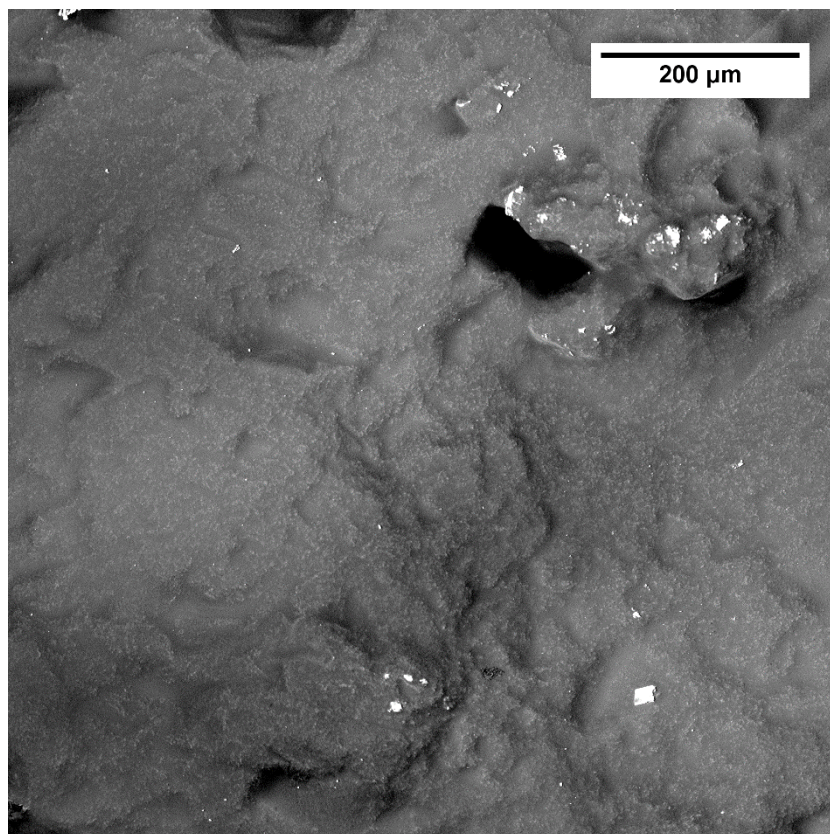
Struktura hydrogelů 3-1-1,5-0,5 je u všech molárních hmotností téměř stejná. Povrch je tvořen hlubokými póry s průměrem přibližně 15  $\mu\text{m}$ .



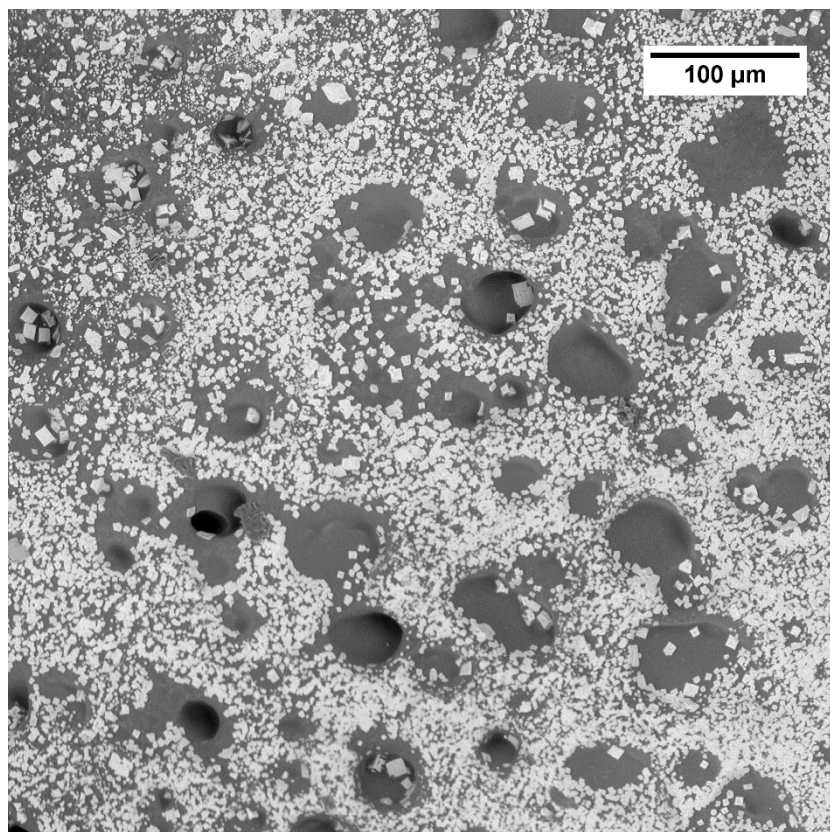
Obrázek 14: Hydrogel 1-1-1,5-0,5 (234 kDa)



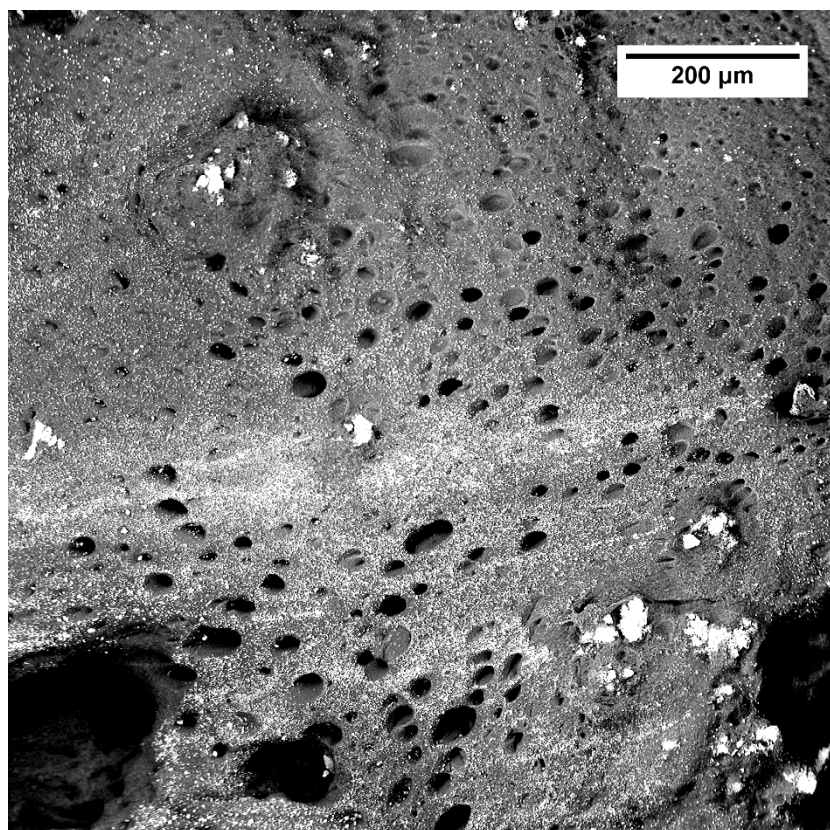
*Obrázek 15: Hydrogel 1-1-1,5-0,5 (370 kDa)*



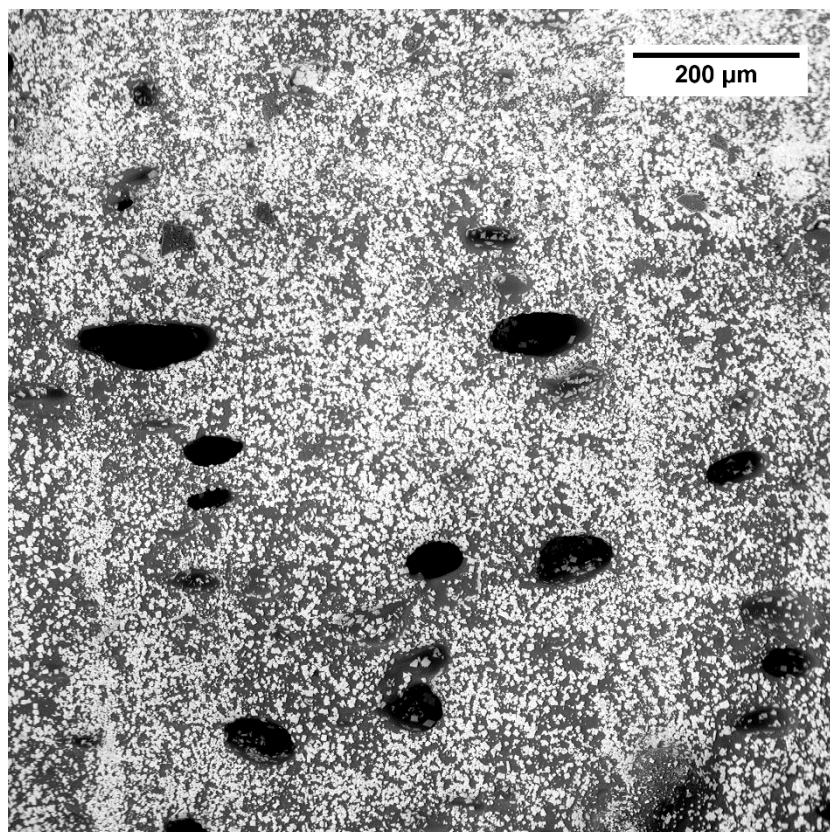
*Obrázek 16: Hydrogel 1-1-1,5-0,5 (600 kDa)*



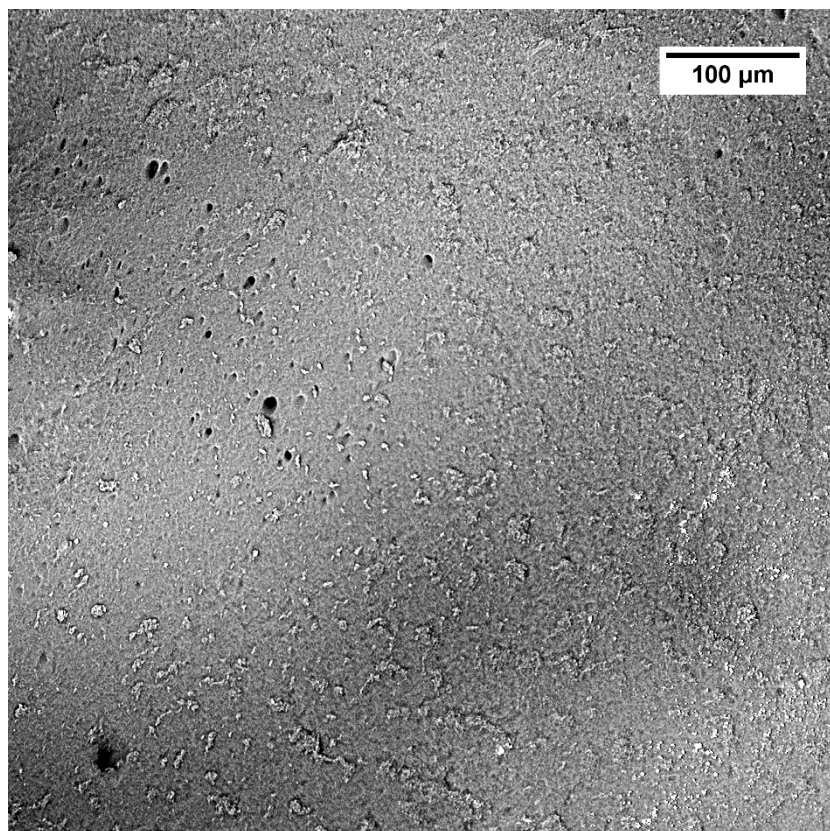
*Obrázek 17: Hydrogel 2-1-1,5-0,5 (234 kDa)*



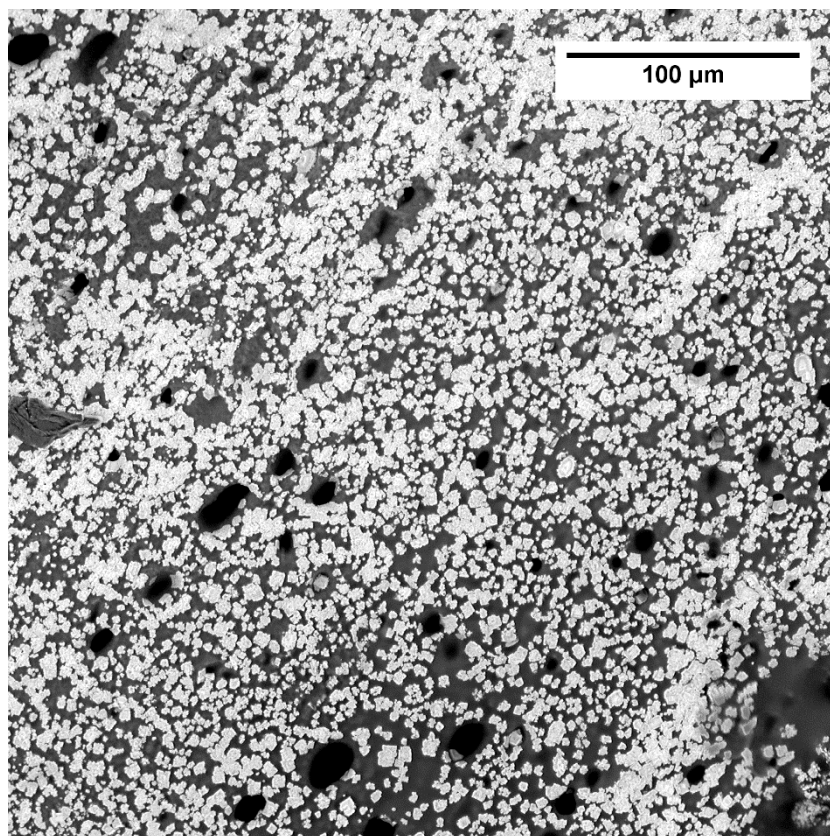
*Obrázek 18: Hydrogel 2-1-1,5-0,5 (370 kDa)*



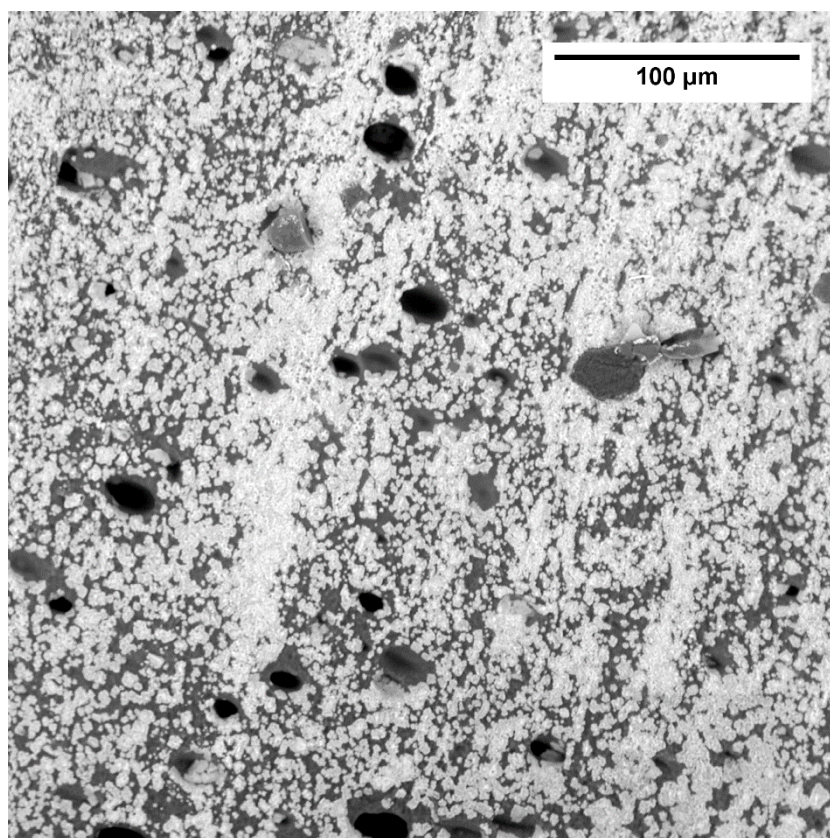
*Obrázek 19: Hydrogel 2-1-1,5-0,5 (600 kDa)*



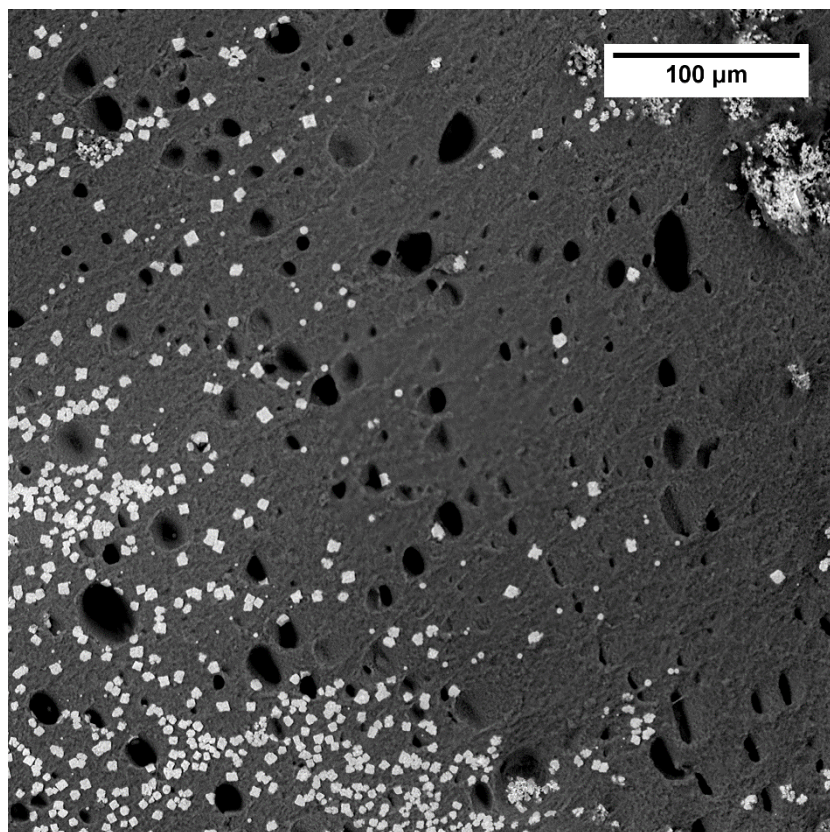
*Obrázek 20: Hydrogel 2-1-1,5-0,5 (1180 kDa)*



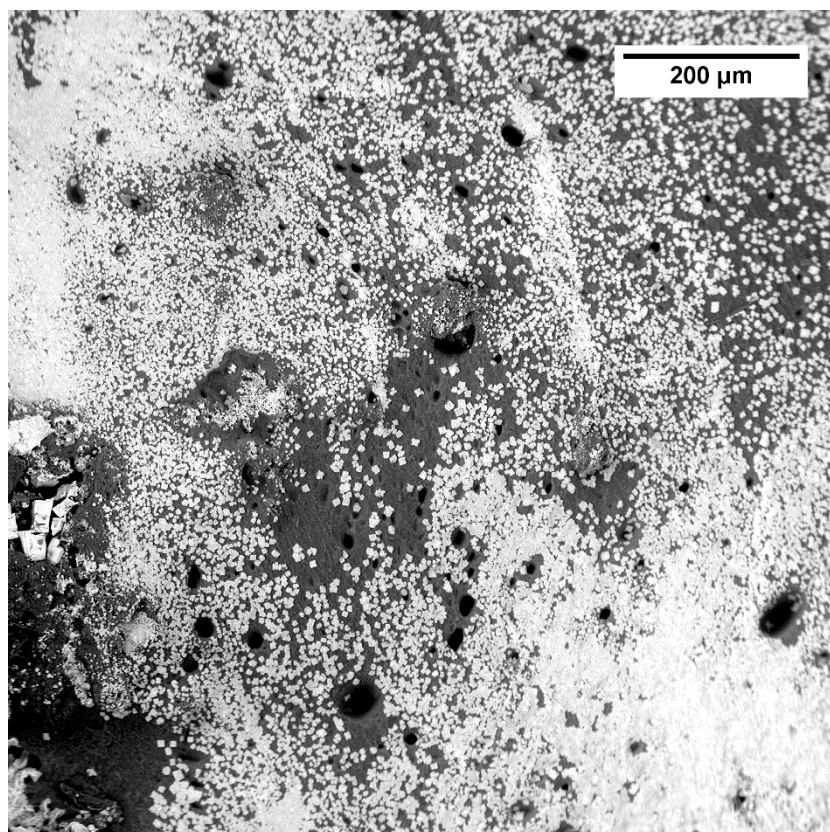
Obrázek 21: Hydrogel 3-1-1,5-0,5 (234 kDa)



Obrázek 22: Hydrogel 3-1-1,5-0,5 (370 kDa)



Obrázek 23: Hydrogel 3-1-1,5-0,5 (600 kDa)

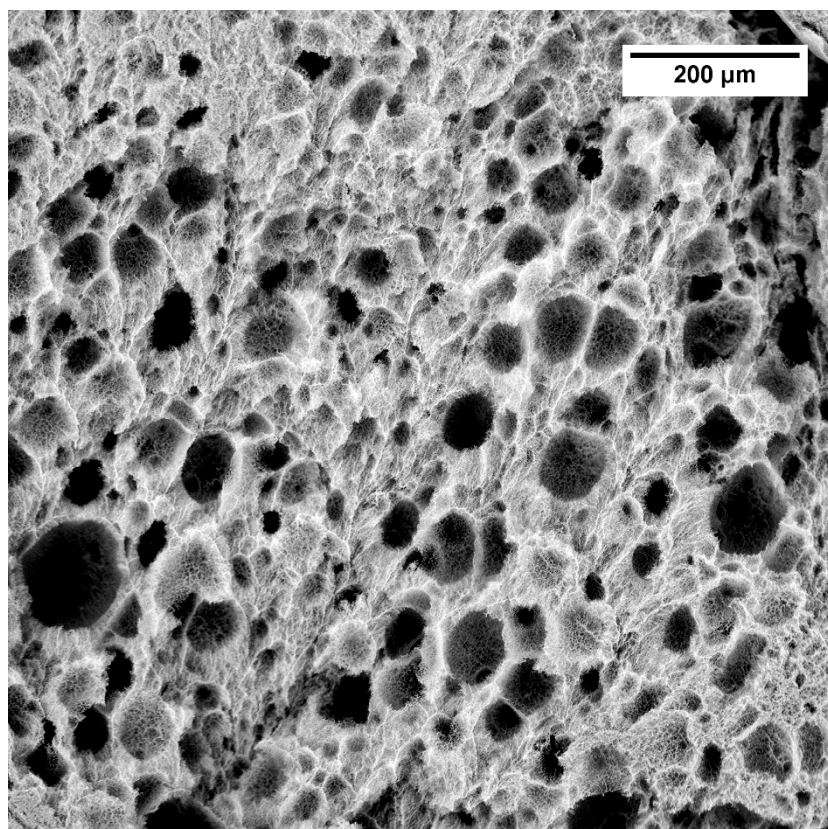


Obrázek 24: Hydrogel 3-1-1,5-0,5 (1180 kDa)

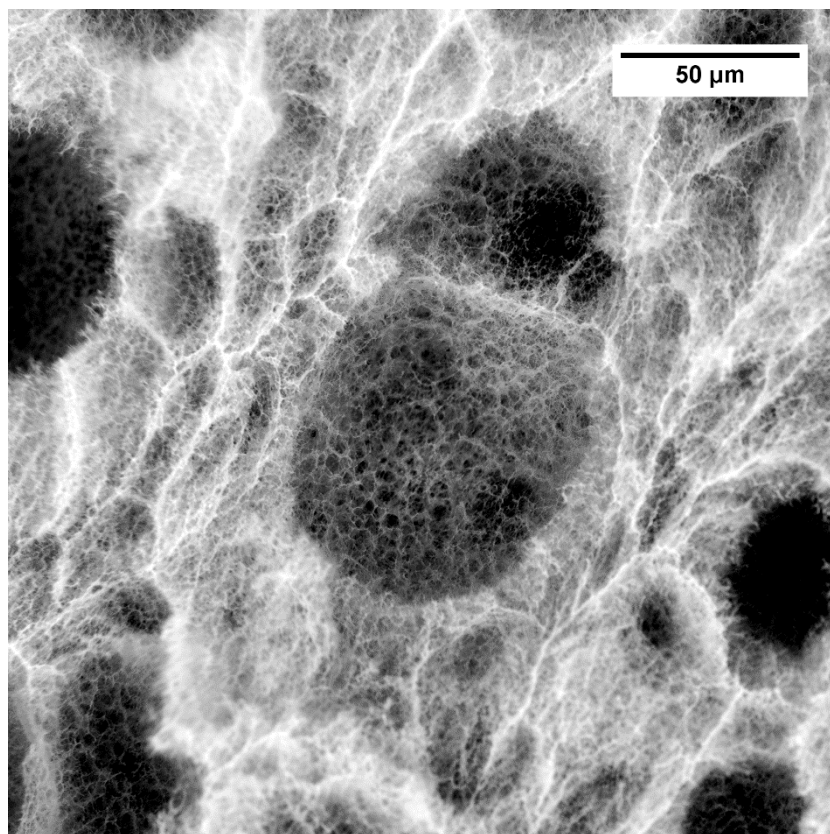
### 8.1.3.2 Vymyté hydrogely

V předchozích měřeních bylo zjištěno, že největší póry ve své struktuře tvoří hydrogely 2-1-1,5-0,5 a 3-1-1,5-0,5, konkrétně s molekulovou hmotností hyaluronanu 370 a 600 kDa. Tyto hydrogely byly po dobu 24 hodin vymývány v deionizované vodě, aby z nich byla odstraněna přebytečná NaCl a nezesíťované přebytky polyvinylalkoholu, hyaluronanu a glycerolu.

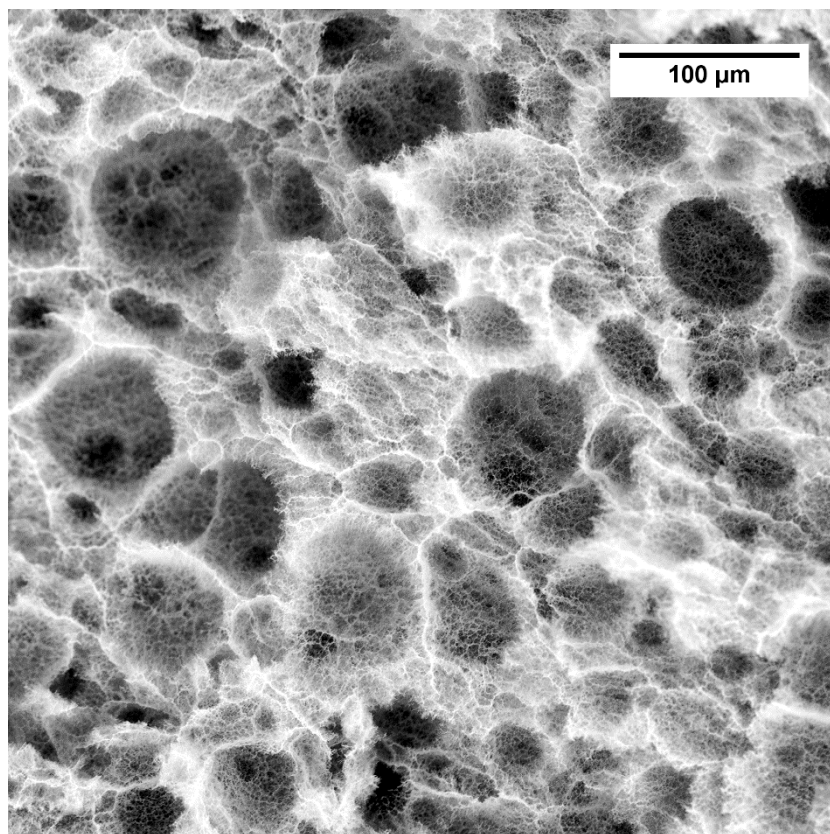
Na následujících snímcích lze vidět vysoce pórovitá struktura. Shluky polymerních řetězců tvoří stěny pórů s průměrem okolo 50  $\mu\text{m}$  a malé póry s průměrem jednotek mikrometrů. Na detailním snímku pórů (obrázek 26) lze vidět fraktálovou strukturu, kde je povrch velkého póru tvořen malými póry. Také prostor mezi velkými póry je tvořen malými póry.



Obrázek 25: Hydrogel 2-1-1,5-0,5 (370 kDa)

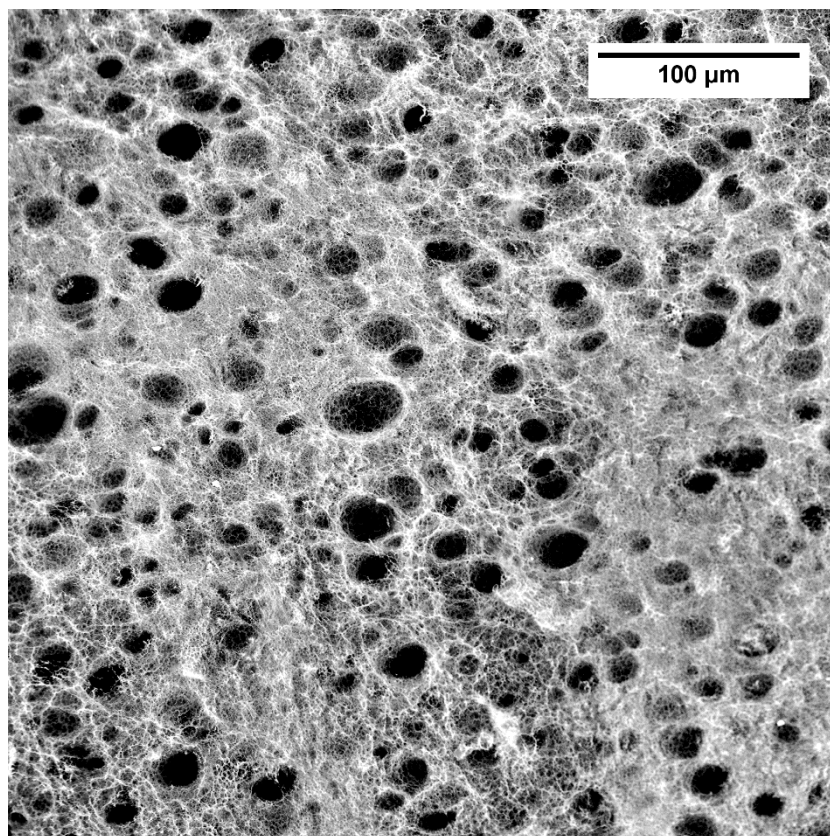


*Obrázek 26: Hydrogel 2-1-1,5-0,5 (370 kDa) – detail póru*

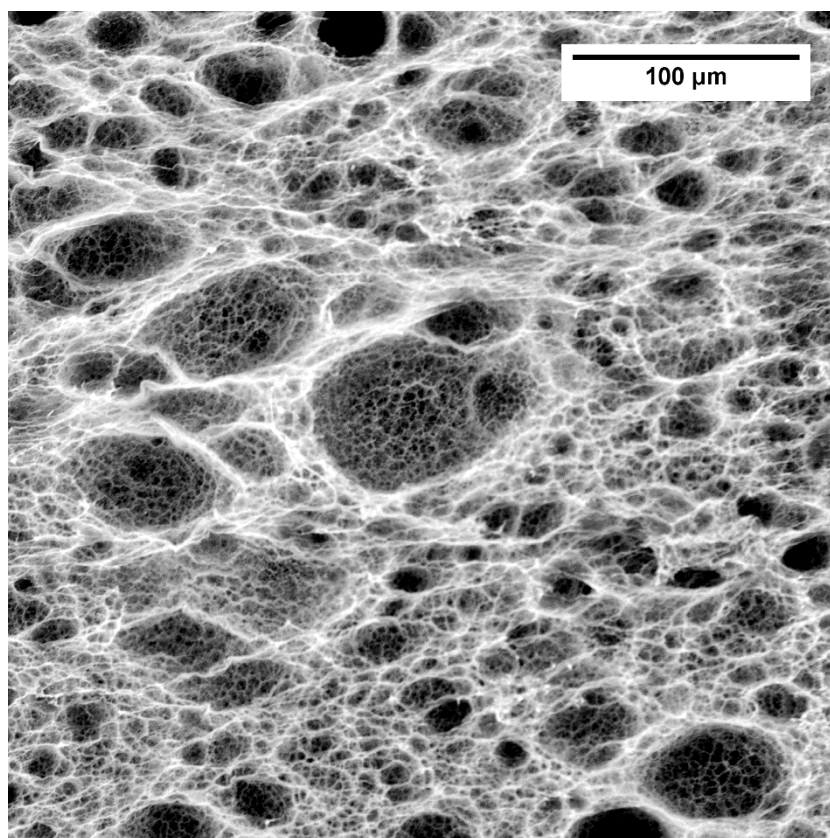


*Obrázek 27: Hydrogel 2-1-1,5-0,5 (600 kDa)*





Obrázek 28: Hydrogel 3-1-1,5-0,5 (370 kDa)



Obrázek 29: Hydrogel 3-1-1,5-0,5 (600 kDa)

### 8.1.4 Diskuze

Pomocí SEM byla zkoumána struktura povrchu řezu a přítomnost pórů u jednotlivých hydrogelů. Hydrogely připravené pouze z polyvinylalkoholu (poměr polyvinylalkoholu a hyaluronanu 1 : 0) nebo s velkým množstvím hyaluronanu (poměr 1 : 1) mají povrch řezu hladký či zvrásněný a zároveň kompaktní a bez přítomnosti viditelných pórů. Povrch hydrogelů, které obsahují malé množství hyaluronanu (poměr 8 : 1 a 5 : 1), tvoří hladká struktura s velmi malými póry. Hydrogely s poměrem polyvinylalkoholu a hyaluronanu 2 : 1 a 3 : 1 obsahují ve své struktuře velké množství velkých pórů. Největší póry s průměrem až 50  $\mu\text{m}$  jsou v hydrogelech 2-1-1,5-0,5 a 3-1-1,5-0,5.

Hydrogely 1-1-1,5-0,5, 2-1-1,5-0,5 a 3-1-1,5-0,5 byly připraveny z hyaluronanu s molekulovými hmotnostmi 234, 370, 600 a 1180 kDa. V případě hydrogelů 1-1-1,5-0,5 a 3-1-1,5-0,5 neměla molekulová hmotnost na strukturu hydrogelů a velikost pórů výrazný vliv. U hydrogelů 2-1-1,5-0,5 byl rozdíl u velikosti pórů patrný. U molekulových hmotností 1180 a 234 kDa byly póry menší, než u molekulových hmotností 370 a 600 kDa.

Po vymytí přebytečného polyvinylalkoholu, hyaluronanu, glycerolu a NaCl, které se nepodílely na síťování, lze vidět vysoce pórovitou strukturu. Shluky polymerních řetězců tvoří velké póry s průměrem okolo 50  $\mu\text{m}$ . Povrch těchto velkých pórů a prostor mezi nimi je tvořen malými póry s průměrem jednotek mikrometrů.

## 8.2 Mikrotomografie

### 8.2.1 Použitý přístroj

Měření bylo prováděno na rentgenovém mikrotomografu SkyScan 1174.

### 8.2.2 Režim měření

Hydrogel válcového tvaru byl zmražen a následně lyofilizován. Lyofilizovaný hydrogel byl skenován mikrotomografem po určitém kroku rotace a následně byl v softwaru N-Recon vytvořen jeho 3D model. Výstupem měření je série řezů hydrogelem v jednotlivých polohách jeho výšky. V tabulce 15 je zobrazeno nastavení rentgenové lampy mikrotomografu a dalších parametrů měření pro jednotlivé vzorky.

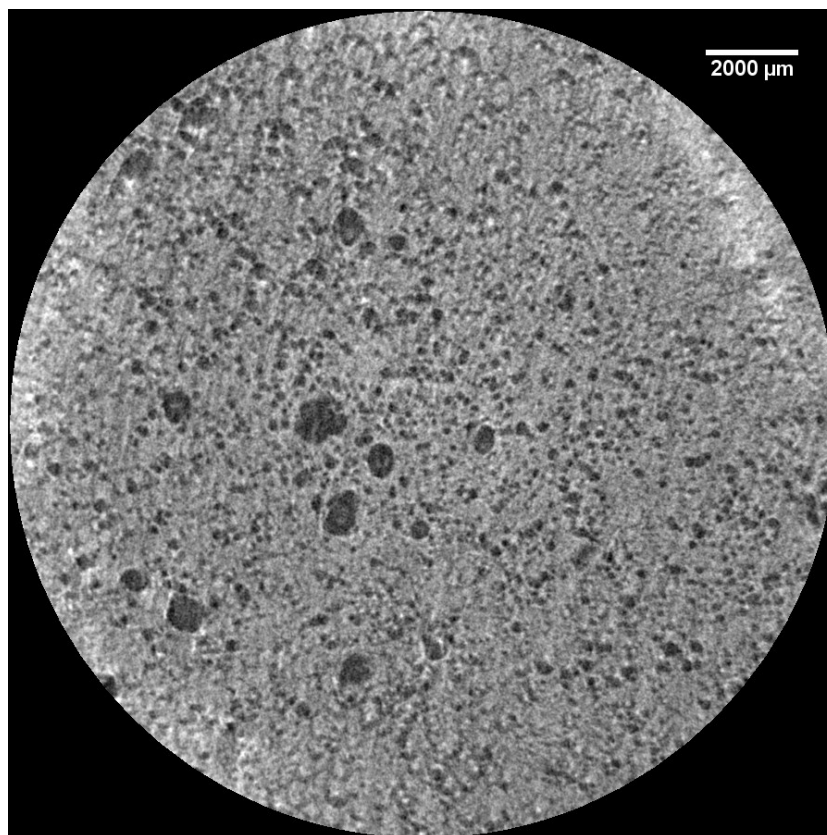
Tabulka 15: Režim měření pro jednotlivé vzorky

vzorek	průměr vzorku	expoziční doba	rentgenová lampa			počet snímků	krok rotace
			napětí	proud	výkon		
2-1-1,5-0,5	25 mm	7000 ms	29 kV	466 $\mu$ A	14 W	10	0,2°
3-1-1,5-0,5	8 mm	7000 ms	32 kV	510 $\mu$ A	16 W	10	0,15°

### 8.2.3 Výsledky

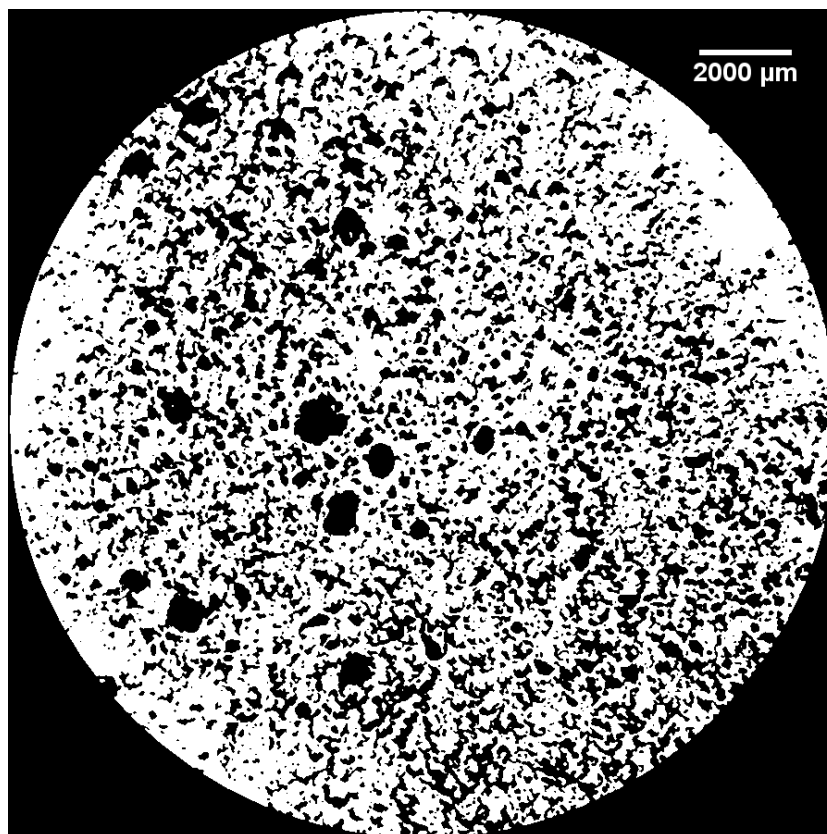
Pro měření na mikrotomografu byly vybrány 2 vzorky, které tvoří největší póry, konkrétně 2-1-1,5-0,5 a 3-1-1,5-0,5, oba připravené z hyaluronanu s molekulovou hmotností 600 kDa.

Výstupem měření na mikrotomografu je série jednotlivých řezů hydrogelem po jednom mikrometru. Z každého vzorku bylo vybráno 5 řezů z různých částí hydrogelu. Z řezu byla vybrána kruhová výseč, která byla následně upravena v programu ImageJ tak, aby póry byly zobrazeny černou barvou a hydrogel bíle. Analýzou byla zjištěna plocha jednotlivých pórů, póry byly aproximovány jako kruhy, proto je dále pracováno s průměrem pórů.

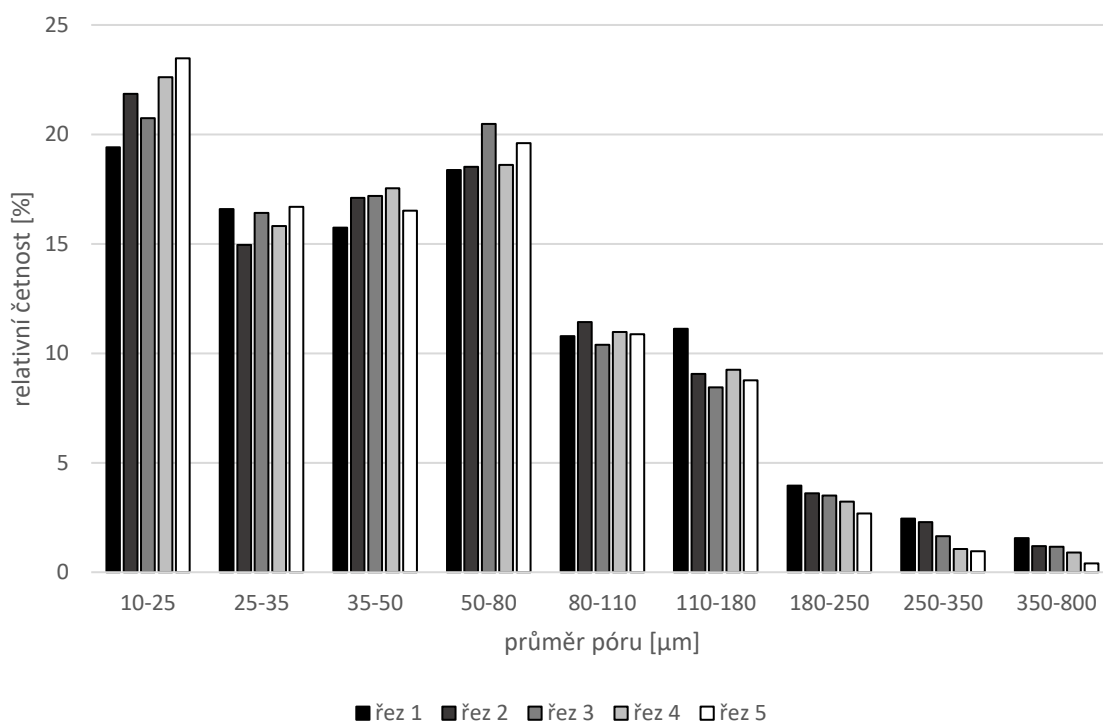


Obrázek 30: Řez hydrogelem 2-1-1,5-0,5

Na řezu hydrogelem 2-1-1,5-0,5 lze vidět několik výrazně větších pórů, které mají průměr okolo 500  $\mu$ m, a velké množství menších pórů.

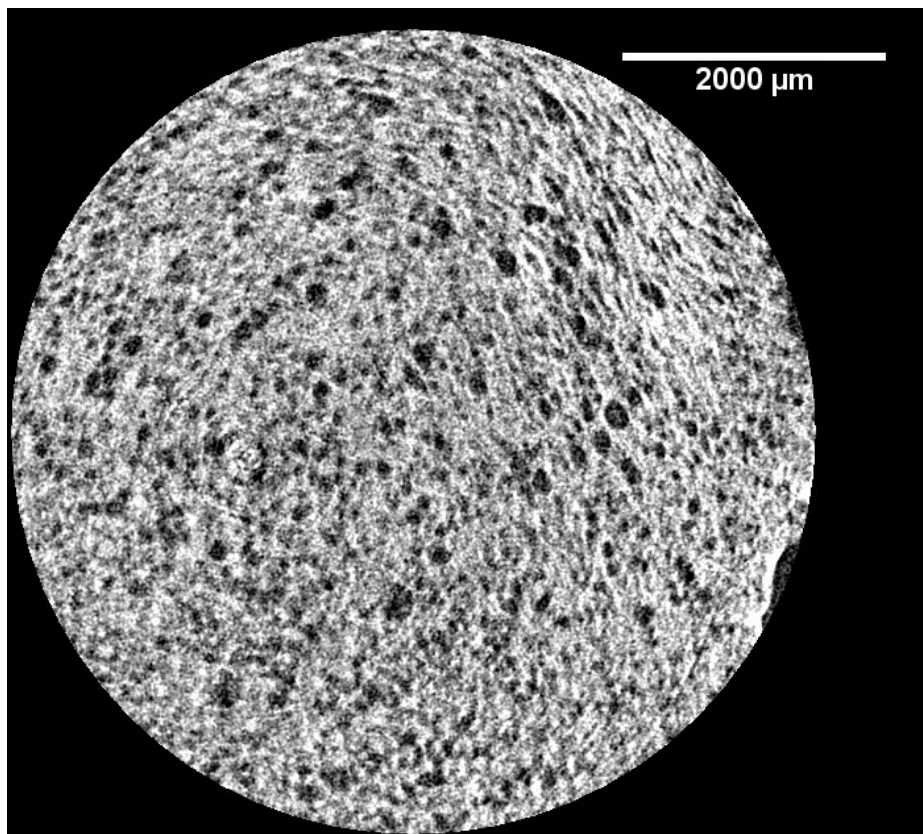


Obrázek 31: Zobrazení pórů hydrogelu 2-1-1,5-0,5



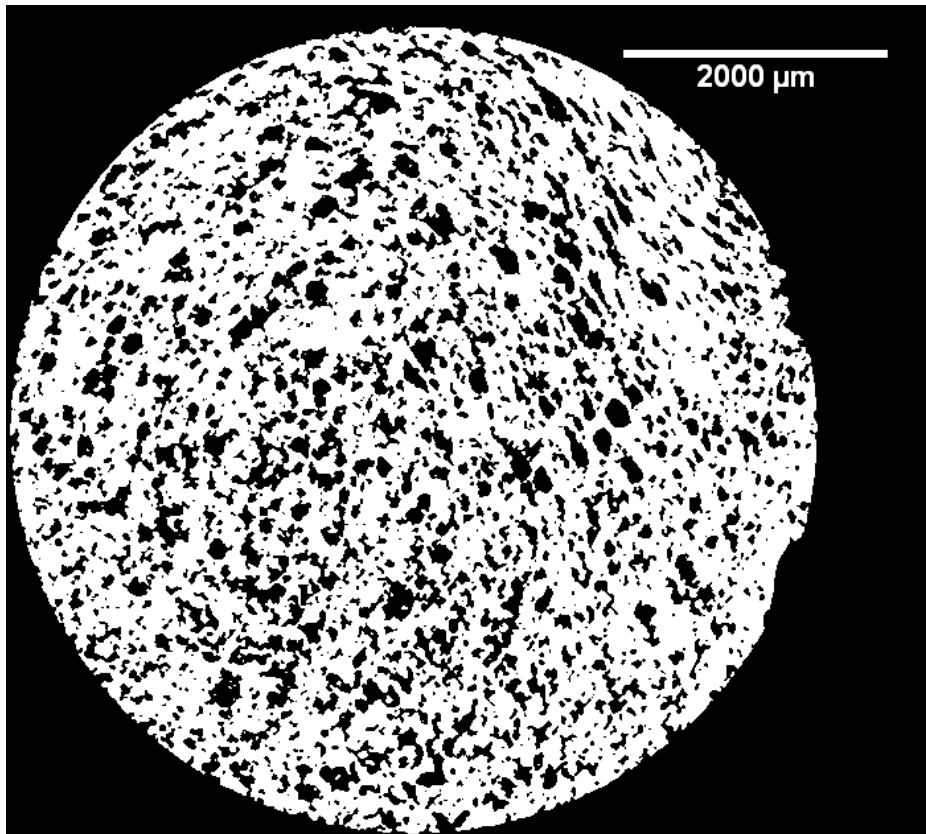
Graf 3: Relativní četnost velikosti pórů hydrogelu 2-1-1,5-0,5

Graf 3 zobrazuje histogram relativní četnosti pórů pro jednotlivé intervaly velikostí pórů pro 5 různých řezů hydrogelu 2-1-1,5-0,5. Relativní četnost byla zvolena z důvodu různého počtu pórů v jednotlivých řezech. Lze vidět, že nejmenší póry s průměrem 10-25  $\mu\text{m}$  dosahují nejvyšší relativní četnosti okolo 20 %. Středně velké póry s průměrem 25-35, 35-50 a 50-80  $\mu\text{m}$  mají relativní četnost 15-20 %. Větší póry s průměrem 80-110 a 110-180  $\mu\text{m}$  se vyskytují v řezech s relativní četností okolo 10 %. Největší póry s průměrem 180-250, 250-350 a 350-800  $\mu\text{m}$  mají relativní četnost méně než 5 %.

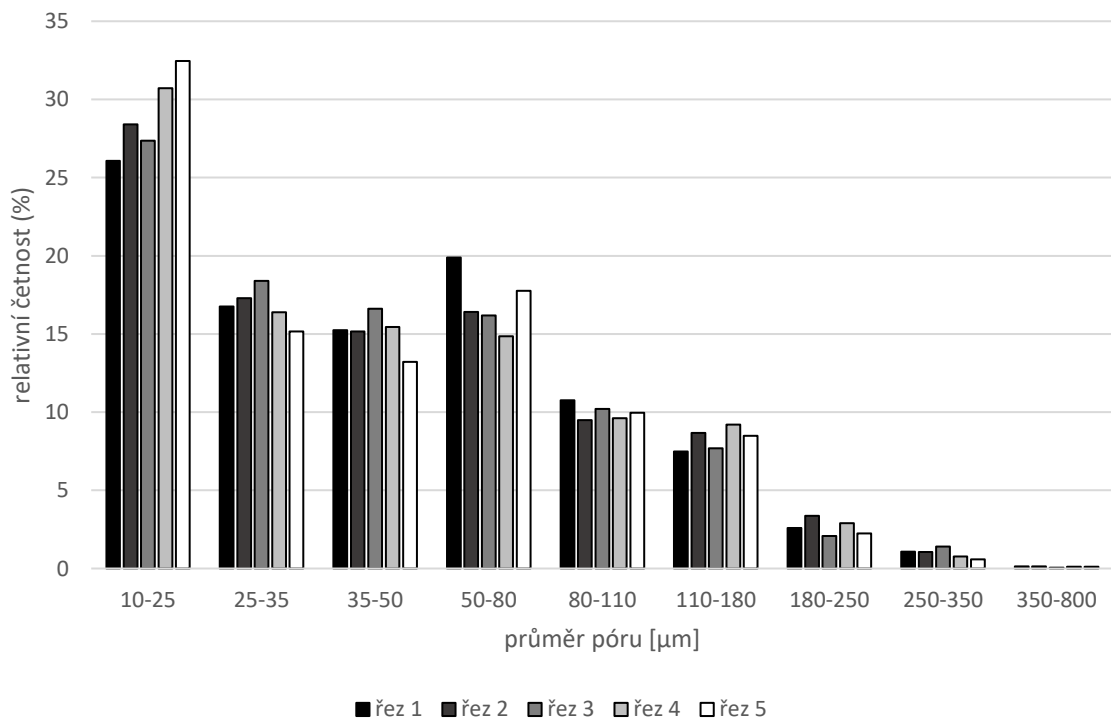


Obrázek 32: Řez hydrogelem 3-1-1,5-0,5

Na řezu hydrogelem 3-1-1,5-0,5 lze vidět poměrně homogenní rozložení větších a menších pórů.

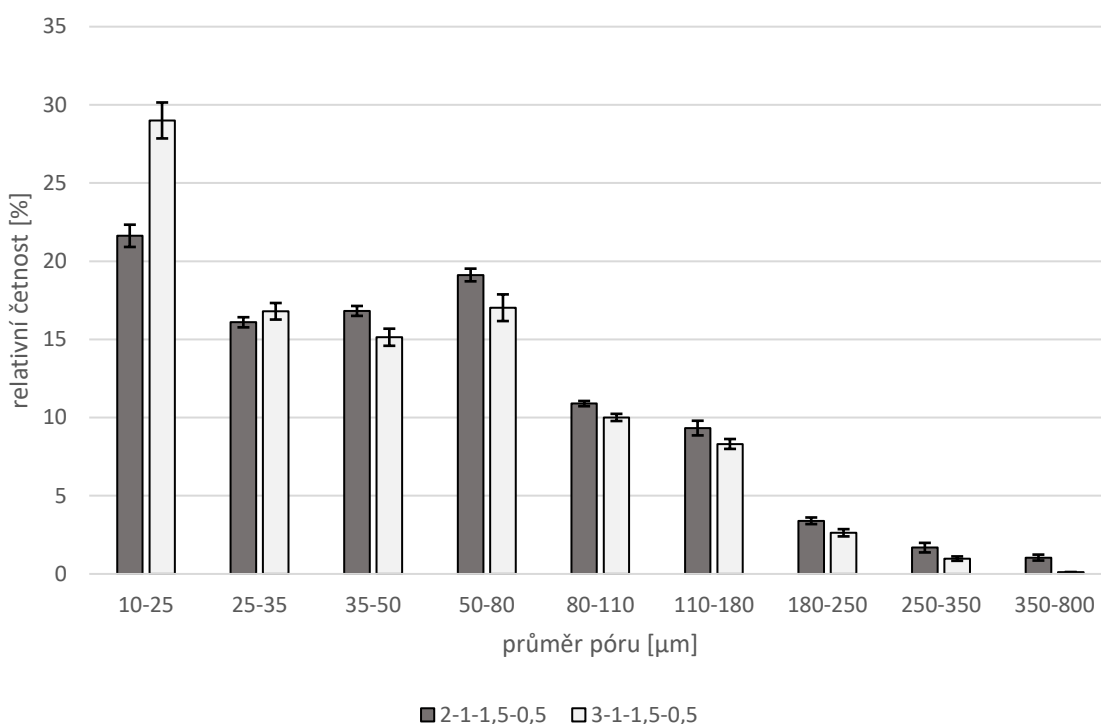


Obrázek 33: Zobrazení pórů hydrogelu 3-1-1,5-0,5



Graf 4: Relativní četnost velikosti pórů hydrogelu 3-1-1,5-0,5

Graf 4 zobrazuje histogram relativní četnosti pórů pro jednotlivé intervaly velikostí pórů, je zde porovnání pro 5 různých řezů hydrogelu 2-1-1,5-0,5. Lze vidět, že nejmenší póry s průměrem 10-25  $\mu\text{m}$  jsou zastoupeny s výraznou převahou, jejich relativní četnost je 25-30 %. Středně velké póry s průměrem 25-35, 35-50 a 50-80  $\mu\text{m}$  dosahují četnosti okolo 15 %. Větší póry s průměrem 80-110 a 110-180  $\mu\text{m}$  mají relativní četnost pod 10 %. Největší póry s průměrem 180-250 a 250-350  $\mu\text{m}$  jsou zastoupeny méně než z 3 %. Póry s průměrem 350-800  $\mu\text{m}$  se v tomto vzorku nevyskytují.



Graf 5: Porovnání relativní četnosti velikosti pórů hydrogelů 2-1-1,5-0,5 a 3-1-1,5-0,5

Při porovnání histogramů velikosti pórů hydrogelů 2-1-1,5-0,5 a 3-1-1,5-0,5 je vidět, že hydrogel 3-1-1,5-0,5 má výrazně více zastoupené malé póry s průměrem 10-25  $\mu\text{m}$ . Zastoupení středních a větších pórů je vždy větší u hydrogelu 2-1-1,5-0,5. Toto rozložení odpovídá i řezům, kde na řezu hydrogelem 2-1-1,5-0,5 jsou vidět velké póry, kdežto na řezu hydrogelem 3-1-1,5-0,5 jsou pouze střední a malé póry.

#### 8.2.4 Diskuze

Na mikrotomografu byly měřeny dva hydrogely, u kterých byly pozorovány největší póry, konkrétně hydrogely 2-1-1,5-0,5 a 3-1-1,5-0,5.

Na řezu hydrogelem 2-1-1,5-0,5 lze vidět několik výrazně větších pórů s průměrem okolo 500  $\mu\text{m}$  a velké množství středních a malých pórů. Takové rozložení pórů ukazuje i histogram, kde dominuje zastoupení malých a středních pórů s průměrem 10-80  $\mu\text{m}$ . Zastoupení větších pórů 80-180  $\mu\text{m}$  a největších pórů s průměrem 180-800  $\mu\text{m}$  je nižší, ale není nezanedbatelné.

Oproti tomu na řezu hydrogelem 3-1-1,5-0,5 lze vidět poměrně homogenní rozložení větších a menších pórů. Na histogramu výrazně dominuje zastoupení nejmenších pórů s průměrem 10-25  $\mu\text{m}$ . Střední póry s průměrem 25-80  $\mu\text{m}$  mají poměrně vysoké zastoupení s porovnání s velkými póry s průměrem 80-350  $\mu\text{m}$ . Největší póry s průměrem 350-800  $\mu\text{m}$  se v tomto hydrogelu vůbec nevyskytují.

Při porovnání histogramu velikosti pórů hydrogelů 2-1-1,5-0,5 a 3-1-1,5-0,5 je vidět, že hydrogel 3-1-1,5-0,5 má výrazně více zastoupené malé póry s průměrem 10-25  $\mu\text{m}$ . Zastoupení středních a větších pórů je vždy větší u hydrogelu 2-1-1,5-0,5, to odpovídá i řezům, kde u hydrogelu 2-1-1,5-0,5 jsou vidět velké póry, kdežto u hydrogelu 3-1-1,5-0,5 je rozložení malých a středních pórů rovnoměrnější.



## ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na přípravu hydrogelů z polyvinylalkoholu, hyaluronanu, glycerolu a NaCl. Úkolem bylo zhodnotit vliv jednotlivých složek na dobu tuhnutí, velikost pórů a připravit hydrogel s vhodnou velikostí a distribucí pórů pro kultivaci buněk.

Bylo zjištěno, že množství jednotlivých složek má výrazný vliv na dobu tuhnutí hydrogelu a jeho mechanické vlastnosti. S větším množstvím polyvinylalkoholu se výrazně prodlužuje doba jeho tuhnutí, zvyšuje se také Bloom hodnota a dochází k nárůstu tuhosti hydrogelu. S rostoucím množstvím hyaluronanu v hydrogelu se doba tuhnutí také prodlužuje, avšak dochází ke zhoršení mechanických vlastností, hydrogely ztrácejí svou tuhost a kompaktnost. Množství glycerolu dobu tuhnutí hydrogelu příliš neovlivňuje, ale s vyšším obsahem glycerolu dochází k významnému změknutí a zkrěhnutí hydrogelu, což dokazuje i prudký pokles Bloom hodnoty. Nejvýraznější vliv na dobu tuhnutí má množství NaCl, s jeho rostoucím obsahem v hydrogelu dochází k výraznému zkrácení doby tuhnutí. S rostoucím množstvím NaCl v hydrogelu se jeho tuhost zvyšuje, což dokazuje nárůst Bloom hodnoty. Při nadměrném množství NaCl se vytvoří bílé šupinky sraženiny, při nedostatku NaCl se vytvoří pouze kašovitá hmota.

Druhá část práce byla zaměřena na zkoumání vnitřní struktury jednotlivých hydrogelů pomocí elektronové mikroskopie a mikrotomografie. Hydrogely připravené pouze z polyvinylalkoholu (poměr PVA : NaHy je 1 : 0) nebo s velkým množstvím hyaluronanu (poměr 1 : 1) mají povrch řezu hladký či zvrásněný a zároveň kompaktní a bez přítomnosti viditelných pórů. Povrch hydrogelů, které obsahují malé množství hyaluronanu (poměr 8 : 1 a 5 : 1), tvoří hladká struktura s velmi malými póry. Hydrogely s poměrem 2 : 1 a 3 : 1 obsahují ve své struktuře velké množství velkých pórů. Největší póry s průměrem až 50  $\mu\text{m}$  jsou ve struktuře hydrogelů 2-1-1,5-0,5 a 3-1-1,5-0,5.

Poslední část byla zaměřena na dva hydrogely, u kterých byly pozorovány největší póry, konkrétně hydrogely 2-1-1,5-0,5 a 3-1-1,5-0,5. Tyto dva hydrogely byly připraveny z hyaluronanu s různými molekulovými hmotnostmi. Bylo zjištěno, že největší póry ve své struktuře tvoří hydrogely s molekulovou hmotností hyaluronanu 370 a 600 kDa. Po vymytí přebytečných chemikálií lze vidět, že hydrogely mají vysoce porézní strukturu. Shluky polymerních řetězců tvoří velké póry s průměrem okolo 50  $\mu\text{m}$ . Povrch těchto velkých pórů a prostor mezi nimi je tvořen malými póry s průměrem jednotek mikrometrů. U těchto dvou hydrogelů byl z řezů vytvořených pomocí mikrotomografu připraven histogram zastoupení

velikosti pórů. Při porovnání histogramů velikosti pórů hydrogelů 2-1-1,5-0,5 a 3-1-1,5-0,5 je vidět, že hydrogel 3-1-1,5-0,5 má výrazně více zastoupené malé póry s průměrem 10-25  $\mu\text{m}$ . Zastoupení středních a větších pórů je vždy větší u hydrogelu 2-1-1,5-0,5 a na rozdíl od hydrogelu 3-1-1,5-0,5 se zde vyskytují i největší póry s průměrem 350-800  $\mu\text{m}$ . To odpovídá i řezům, kde na hydrogelu 2-1-1,5-0,5 jsou vidět velké póry, kdežto u hydrogelu 3-1-1,5-0,5 je poměrně rovnoměrné rozložení středních a malých pórů.

V této práci byly úspěšně připraveny hydrogely z biokompatibilních sloučenin, jejichž pórovitá struktura by mohla být vhodná pro kultivaci buněk.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] W. O. Herrmann *et al.*, *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft*, vol. 60, no. 7, pp. 1–2, 1927.
- [2] C. C. Thong *et al.*, *Constr. Build. Mater.*, vol. 107, pp. 172–180, 2016.
- [3] Grand View Research, Polyvinyl Alcohol (PVA) Market Size, Share & Trends Analysis Report By End Use (Paper, Food Packaging, Construction, Electronics). 2019.
- [4] I. Sakurada *et al.*, Vinyl fibers, in *Handbook of Fiber Chemistry, Second Edition, Revised and Expanded*, Internatio., M. Lewin and E. M. Pearce, Eds. CRC Press, 1998, p. 1114.
- [5] C. A. Finch, Polyvinyl Alcohol: properties and applications. John Wiley & Sons Ltd, 1973.
- [6] V. Ducháček, Polymery - výroba, vlastnosti, zpracování, použití. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2006.
- [7] S. Muppalaneni *et al.*, *J. Dev. Drugs*, vol. 2, no. 3, pp. 1–5, 2013.
- [8] H. Anders *et al.*, *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 18, no. 2, pp. 111–122, 1987.
- [9] Y. Tsuchiya *et al.*, *J. Polym. Sci. Part A-1 Polym. Chem.*, vol. 7, no. 3, pp. 813–826, 1969.
- [10] A. Ballistreri *et al.*, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, vol. 18, no. 6, pp. 1923–1931, Jun. 1980.
- [11] B. J. Holland *et al.*, *Polymer (Guildf.)*, vol. 42, pp. 6775–6783, 2001.
- [12] M. Julinová *et al.*, *J. Environ. Manage.*, vol. 228, no. 4, pp. 213–222, 2018.
- [13] R. Fukae *et al.*, *Polym. J.*, vol. 26, no. 12, pp. 1381–1386, 1994.
- [14] X. Tang *et al.*, *Carbohydr. Polym.*, vol. 85, no. 1, pp. 7–16, 2011.
- [15] W. O. Herrmann *et al.*, “Consortium für elektrochemische Industrie,” 1930.
- [16] I. Sakurada *et al.*, “Patent no. 147,” 1939.
- [17] M. De Araújo, Natural and man-made fibres: Physical and mechanical properties, in *Fibrous and Composite Materials for Civil Engineering Applications*, Figueiro, Ed. Elsevier, 2011, pp. 3–28.
- [18] S. Sheik *et al.*, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 116, no. 7, pp. 45–53, Sep. 2018.
- [19] W. Palmer *et al.*, *Ophthalmology*, pp. 629–634, 1934.
- [20] R. V. Stick *et al.*, Glycoproteins and Proteoglycans, in *Carbohydrates: The Essential Molecules of Life*, 2nd ed., Elsevier, 2009, pp. 369–412.

- [21] J. Necas *et al.*, *Vet. Med. (Praha)*, vol. 53, no. 8, pp. 397–411, 2008.
- [22] A. L. BERTONE, Joint physiology: responses to exercise and training, in *Equine Exercise Physiology*, Elsevier, 2008, pp. 132–142.
- [23] A. W. Ludwig *et al.*, *Endocrinology*, vol. 46, no. 3, pp. 291–298, Mar. 1950.
- [24] M. Heidelberger, *J. Exp. Med.*, vol. 65, no. 5, pp. 647–660, May 1937.
- [25] J.-W. Kuo *et al.*, Hyaluronic Acid, in *Comprehensive Biomaterials*, Elsevier, 2011, pp. 239–259.
- [26] M. K. Cowman *et al.*, *Carbohydr. Res.*, vol. 340, no. 5, pp. 791–809, 2005.
- [27] S. A. Matthes *et al.*, Comparative Biology of the Normal Lung Extracellular Matrix, in *Comparative Biology of the Normal Lung*, Elsevier, 2015, pp. 387–402.
- [28] R. G. Hill, Biomedical polymers, in *Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering*, Elsevier, 2005, pp. 97–106.
- [29] R. Stern *et al.*, *Biotechnol. Adv.*, vol. 25, pp. 537–557, 2007.
- [30] J. Mondek *et al.*, *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 120, pp. 107–113, 2015.
- [31] J. il Choi *et al.*, *Carbohydr. Polym.*, vol. 79, no. 4, pp. 1080–1085, 2010.
- [32] M. P. Chae *et al.*, 3D bioprinting adipose tissue for breast reconstruction, in *3D Bioprinting for Reconstructive Surgery*, Elsevier, 2018, pp. 305–353.
- [33] M. Nurunnabi *et al.*, Polysaccharide based nano/microformulation: an effective and versatile oral drug delivery system, in *Nanostructures for Oral Medicine*, Elsevier, 2017, pp. 409–433.
- [34] L. Han *et al.*, *AAPS PharmSciTech*, vol. 13, no. 3, pp. 836–845, Sep. 2012.
- [35] C.-M. Hsieh *et al.*, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 64, no. 3, pp. 45–52, Mar. 2014.
- [36] M. Mahinroosta *et al.*, *Mater. Today Chem.*, vol. 8, pp. 42–55, 2018.
- [37] X.-Z. Zhang *et al.*, *Biomaterials*, vol. 26, no. 16, pp. 3299–3309, Jun. 2005.
- [38] J. R. Saunders *et al.*, *J. Comput. Theor. Nanosci.*, vol. 5, no. 10, pp. 1942–1960, Oct. 2008.
- [39] N. A. Peppas *et al.*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 50, pp. 27–46, 2000.
- [40] G. Tiwari *et al.*, *Int. J. Pharm. Investig.*, vol. 2, no. 1, pp. 2–11, 2012.
- [41] L. Feng *et al.*, *J. Chem. Phys.*, vol. 133, no. 11, p. 114904, Sep. 2010.
- [42] J. Zhang *et al.*, *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 132, no. 34, p. 42441, Sep. 2015.
- [43] O. Ozay *et al.*, *Sep. Sci. Technol.*, vol. 46, no. 9, pp. 1450–1461, May 2011.
- [44] M. Ochi *et al.*, *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 132, no. 15, p. 41814, Apr. 2015.
- [45] W. E. Hennink *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 54, no. 4, pp. 13–36, 2009.

- [46] W.-H. Chiang *et al.*, *Langmuir*, vol. 42, no. 28, pp. 15056–15064, 2012.
- [47] J. J. Water *et al.*, *Pharm. Res.*, Mar. 2015.
- [48] T. Funami *et al.*, *Food Hydrocoll.*, vol. 21, no. 4, pp. 617–629, Jun. 2007.
- [49] Y. Sasaki *et al.*, *Chem. Rec.*, vol. 10, pp. 366–376, Sep. 2010.
- [50] R. K. O'Reilly *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, vol. 35, no. 11, pp. 1068–1083, 2006.
- [51] C. Chang *et al.*, *Carbohydr. Polym.*, vol. 82, no. 1, pp. 122–127, Aug. 2010.
- [52] L. S. Spinelli *et al.*, *Polym. Eng. Sci.*, vol. 48, no. 10, pp. 1885–1891, Oct. 2008.
- [53] S. J. Kim *et al.*, *Smart Mater. Struct.*, vol. 13, no. 2, p. 317, 2004.
- [54] Y. Qiu *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 53, no. 3, pp. 321–339, 2001.
- [55] S. Sun *et al.*, *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, vol. 39, no. 2, pp. 236–246, Jan. 2001.
- [56] S. J. Kim *et al.*, *Biosens. Bioelectron.*, vol. 19, no. 6, pp. 531–536, Jan. 2004.
- [57] Z. Zhai *et al.*, *Soft Matter*, vol. 12, no. 10, pp. 2715–2720, 2016.
- [58] R. Chandrawati, *Exp. Biol. Med.*, vol. 241, no. 9, pp. 972–979, May 2016.
- [59] S. H. Oh *et al.*, *Acta Biomater.*, vol. 35, pp. 23–31, 2016.
- [60] S. Peng *et al.*, *Eur. Polym. J.*, vol. 106, no. June, pp. 206–213, 2018.
- [61] S. Shi *et al.*, *Polymer (Guildf.)*, vol. 111, pp. 168–176, 2017.
- [62] N. Kashyap *et al.*, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, vol. 22, no. 2, pp. 107–149, 2005.
- [63] H. Ozay *et al.*, *Chem. Eng. J.*, vol. 232, pp. 364–371, 2013.
- [64] E. Caló *et al.*, vol. 65, pp. 252–267, 2015.
- [65] A. Singh *et al.*, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, vol. 4, no. 2, pp. 97–105, 2010.
- [66] A. K. Saxena, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 139, no. 2, pp. 496–497, Feb. 2010.
- [67] J. H. Park *et al.*, *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 80, no. 1, pp. 115–121, Apr. 2001.
- [68] E. M. Ahmed, *J. Adv. Res.*, vol. 6, no. 2, pp. 105–121, 2015.
- [69] N. Annabi *et al.*, *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 16, no. 4, pp. 371–383, Aug. 2010.
- [70] C. E. Schanté *et al.*, *Carbohydr. Polym.*, vol. 85, no. 3, pp. 469–489, 2011.
- [71] J. I. Goldstein *et al.*, *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*, 3rd ed. Boston, MA: Springer US, 2003.
- [72] É. Maire *et al.*, *Comptes Rendus Phys.*, vol. 15, no. 8–9, pp. 674–682, Oct. 2014.
- [73] Gelatin manufacturers institute of America, *Physical / Chemical Testing*, in *Standard testing methods for edible gelatin*, 1st ed., New York, 2013, p. 28.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

PVA	polyvinylalkohol
USD	americké dolary
USA	Spojené státy americké
-OH	hydroxylová skupina
Da	Daltony
3D	trojrozměrný
NaHy	hyaluronát sodný
pH	potenciál vodíku
UV	ultrafialový
ADH	dihydrazid kyseliny adipové
NaCl	chlorid sodný
SEM	skenovací elektronový mikroskop
CT	výpočetní tomografie
RTG	rentgenový
$n_{PVA}$	látkové množství polyvinylalkoholu
$n_{NaHy}$	látkové množství hyaluronanu
$n_{glycerol}$	látkové množství glycerolu
$n_{NaCl}$	látkové množství chloridu sodného
BSE	metoda zpětně odražených elektronů

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1: Struktura polyvinylalkoholu; a – hlava-hlava, b – pata-pata, c – hlava-pata .....	13
Obrázek 2: Struktura hyaluronanu .....	17
Obrázek 3: Struktura hydrogelu, A – PVA hydrogel, B – PVA+NaHy hydrogel .....	26
Obrázek 4: Připravený hydrogel .....	32
Obrázek 5: Hydrogel 1-0-1-0,5 .....	44
Obrázek 6: Hydrogel 7-0-1-1 .....	44
Obrázek 7: Hydrogel 1-1-1,5-0,25 .....	45
Obrázek 8: Hydrogel 2-1-1,5-0,5H .....	45
Obrázek 9: Hydrogel 2-1-1,5-0,5J .....	46
Obrázek 10: Hydrogel 3-1-1,5-0,5 .....	46
Obrázek 11: Hydrogel 5-1-1,5-0,75 .....	47
Obrázek 12: Hydrogel 8-1-2-1 .....	47
Obrázek 13: Hydrogel 8-1-4-1 .....	48
Obrázek 14: Hydrogel 1-1-1,5-0,5 (234 kDa) .....	49
Obrázek 15: Hydrogel 1-1-1,5-0,5 (370 kDa) .....	50
Obrázek 16: Hydrogel 1-1-1,5-0,5 (600 kDa) .....	50
Obrázek 17: Hydrogel 2-1-1,5-0,5 (234 kDa) .....	51
Obrázek 18: Hydrogel 2-1-1,5-0,5 (370 kDa) .....	51
Obrázek 19: Hydrogel 2-1-1,5-0,5 (600 kDa) .....	52
Obrázek 20: Hydrogel 2-1-1,5-0,5 (1180 kDa) .....	52
Obrázek 21: Hydrogel 3-1-1,5-0,5 (234 kDa) .....	53
Obrázek 22: Hydrogel 3-1-1,5-0,5 (370 kDa) .....	53
Obrázek 23: Hydrogel 3-1-1,5-0,5 (600 kDa) .....	54
Obrázek 24: Hydrogel 3-1-1,5-0,5 (1180 kDa) .....	54
Obrázek 25: Hydrogel 2-1-1,5-0,5 (370 kDa) .....	55
Obrázek 26: Hydrogel 2-1-1,5-0,5 (370 kDa) – detail póru .....	56
Obrázek 27: Hydrogel 2-1-1,5-0,5 (600 kDa) .....	56
Obrázek 28: Hydrogel 3-1-1,5-0,5 (370 kDa) .....	57
Obrázek 29: Hydrogel 3-1-1,5-0,5 (600 kDa) .....	57
Obrázek 30: Řez hydrogelem 2-1-1,5-0,5 .....	59
Obrázek 31: Zobrazení pórů hydrogelu 2-1-1,5-0,5 .....	60

---

Obrázek 32: Řez hydrogelem 3-1-1,5-0,5 .....	61
Obrázek 33: Zobrazení pórů hydrogelu 3-1-1,5-0,5 .....	62



**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: Přehled hydrogelů, které se vyskytují v práci.....	33
Tabulka 2: Porovnání doby tuhnutí pro hydrogely s různým obsahem polyvinylalkoholu.....	35
Tabulka 3: Porovnání doby tuhnutí pro hydrogely s různým obsahem polyvinylalkoholu.....	35
Tabulka 4: Porovnání doby tuhnutí pro hydrogely s různým obsahem hyaluronanu.	36
Tabulka 5: Porovnání doby tuhnutí pro hydrogely s různým obsahem hyaluronanu.	36
Tabulka 6: Porovnání doby tuhnutí pro hydrogely s různým obsahem glycerolu.....	36
Tabulka 7: Porovnání doby tuhnutí pro hydrogely s různým obsahem glycerolu.....	36
Tabulka 8: Porovnání doby tuhnutí pro hydrogely s různým obsahem NaCl .....	37
Tabulka 9: Přepočet hmotnostních poměrů na látkové množství .....	38
Tabulka 10: Bloom hodnoty hydrogelů s různým obsahem polyvinylalkoholu.....	40
Tabulka 11: Bloom hodnoty hydrogelů s různým obsahem glycerolu.....	40
Tabulka 12: Bloom hodnoty hydrogelů s různým obsahem NaCl.....	41
Tabulka 13: Porovnání velikosti pórů a struktury jednotlivých hydrogelů .....	42
Tabulka 14: Porovnání velikosti pórů a struktury jednotlivých hydrogelů .....	48
Tabulka 15: Režim měření pro jednotlivé vzorky .....	59

## SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P I: SEZNAM PŘIPRAVENÝCH HYDROGELŮ

## PŘÍLOHA P I: SEZNAM PŘIPRAVENÝCH HYDROGELŮ

označení vzorku	hm. díly jednotlivých složek				doba tuhnutí	popis
	PVA	NaHy	glycerol	NaCl		
1-0-1-0,4	1	0	1	0,4	2,7 h	měkký
1-0-1-0,5	1	0	1	0,5	2,6 h	měkký
1-0-1-0,65	1	0	1	0,65	2,3 h	měkký
1-0-2-0,5	1	0	2	0,5	3,25 h	měkký
2-0-1-0,5	2	0	1	0,5	3,3 h	tuhý
2-0-1-1	2	0	1	1	2,5 h	tuhý
2,5-0-1-0,75	2,5	0	1	0,75	2,5 h	tuhý
3-0-1-0,5	3	0	1	0,5	6,5 h	tuhý
3-0-1-1	3	0	1	1	2 h	tuhý
4-0-1-0,5	4	0	1	0,5	35 h	tuhý
4-0-1-1	4	0	1	1	3,75 h	tuhý
5-0-1-1	5	0	1	1	5,75 h	tuhý
6-0-1-1	6	0	1	1	11,5 h	tuhý
7-0-1-1	7	0	1	1	11 h	tuhý
7,5-0-1-1	7,5	0	1	1	17 h	tuhý
1-1-0,5-0,25	1	1	0,5	0,25	9 h	měkký
1-1-0,5-0,3	1	1	0,5	0,3	8 h	měkký
1-1-0,5-0,4	1	1	0,5	0,4	13 h	měkký
1-1-0,5-0,5	1	1	0,5	0,5		sražený
1-1-0,5-1	1	1	0,5	1		sražený
1-1-0,75-0,25	1	1	0,75	0,25	24 h	měkký
1-1-0,75-0,5	1	1	0,75	0,5		sražený
1-1-0,75-1	1	1	0,75	1		sražený
1-1-1-0,25	1	1	1	0,25	7 h	měkký
1-1-1-0,3	1	1	1	0,3	9 h	měkký
1-1-1-0,4	1	1	1	0,4	7 h	měkký
1-1-1-0,5	1	1	1	0,5	2,2 h	měkký
1-1-1-1	1	1	1	1	2 h	sražený

označení vzorku	hm. díly jednotlivých složek				doba tuhnutí	popis
	PVA	NaHy	glycerol	NaCl		
1-1-1,5-0,25	1	1	1,5	0,25	17 h	měkký
1-1-1,5-0,3	1	1	1,5	0,3	9 h	měkký
1-1-1,5-0,4	1	1	1,5	0,4	5,5 h	měkký
1-1-1,5-0,5	1	1	1,5	0,5	3,5 h	měkký
1-1-1,5-0,6	1	1	1,5	0,6	2,3 h	sražený
1-1-1,5-0,7	1	1	1,5	0,7	2,2 h	sražený
1-1-1,5-1	1	1	1,5	1		sražený
2-1-0,5-0,4	2	1	0,5	0,4	11,7 h	měkký
2-1-0,5-0,75	2	1	0,5	0,75	2 h	sražený
2-1-0,6-0,3	2	1	0,6	0,3	72 h	měkký
2-1-0,6-0,5	2	1	0,6	0,5	4,5 h	tuhý
2-1-0,65-0,4	2	1	0,65	0,4	14 h	měkký
2-1-0,7-0,25	2	1	0,7	0,25		neztuhlý
2-1-1-0,25	2	1	1	0,25		neztuhlý
2-1-1-0,3	2	1	1	0,3	47 h	měkký
2-1-1-0,4	2	1	1	0,4	14,6 h	měkký
2-1-1-0,5	2	1	1	0,5	5,4 h	tuhý
2-1-1-0,75	2	1	1	0,75	2 h	sražený
2-1-1,5-0,25	2	1	1,5	0,25		neztuhlý
2-1-1,5-0,3	2	1	1,5	0,3	44 h	měkký
2-1-1,5-0,4	2	1	1,5	0,4	15 h	měkký
2-1-1,5-0,5	2	1	1,5	0,5	2,6 h	měkký
2-1-1,5-0,6	2	1	1,5	0,6	4,8 h	sražený
2-1-1,5-0,7	2	1	1,5	0,7	4,4 h	sražený
2-1-1,5-0,75	2	1	1,5	0,75	2 h	sražený
3-1-1-0,3	3	1	1	0,3		neztuhlý
3-1-1-0,4	3	1	1	0,4		měkký
3-1-1-0,5	3	1	1	0,5		tuhý
3-1-1,5-0,5	3	1	1,5	0,5		tuhý

označení vzorku	hm. díly jednotlivých složek				doba tuhnutí	popis
	PVA	NaHy	glycerol	NaCl		
<b>3-1-1,6-0,64</b>	3	1	1,6	0,64		tuhý
<b>3-1-2-0,5</b>	3	1	2	0,5		tuhý
<b>5-1-1,5-0,75</b>	5	1	1,5	0,75	45 h	tuhý
<b>5-1-1,5-1</b>	5	1	1,5	1	8,6 h	tuhý
<b>5-1-1,5-1,5</b>	5	1	1,5	1,5		sražený
<b>5-1-1,5-2</b>	5	1	1,5	2		sražený
<b>5-1-1,56-0,6</b>	5	1	1,56	0,6	48 h	tuhý
<b>5-1-2-1,5</b>	5	1	2	1,5		sražený
<b>5-1-2-2</b>	5	1	2	2		sražený
<b>5-1-2,5-0,75</b>	5	1	2,5	0,75	14 h	tuhý
<b>5-1-2,5-1</b>	5	1	2,5	1	8,3 h	tuhý
<b>5-1-2,5-2</b>	5	1	2,5	2		sražený
<b>8-1-2-1</b>	8	1	2	1	48 h	tuhý
<b>8-1-2-2</b>	8	1	2	2		sražený
<b>8-1-2-3</b>	8	1	2	3		sražený
<b>8-1-3-1</b>	8	1	3	1	15,5 h	tuhý
<b>8-1-3-1,5</b>	8	1	3	1,5	12 h	tuhý
<b>8-1-3-2</b>	8	1	3	2		sražený
<b>8-1-3-3</b>	8	1	3	3		sražený
<b>8-1-4-1</b>	8	1	4	1	22,6 h	tuhý
<b>8-1-4-2</b>	8	1	4	2	3,3 h	tuhý
<b>8-1-4-3</b>	8	1	4	3		sražený