



Tepelná stabilizace funkcionalizovaných nanovláknenných materiálů založených na polyvinylalkoholu

Bakalářská práce

Studijní program:

B0719A130001 Nanotechnologie

Autor práce:

Matěj Holeček

Vedoucí práce:

Ing. Věra Jenčová, Ph.D.

Katedra chemie

Konzultant práce:

Ing. Maxim Lisnenko

Katedra chemie





Zadání bakalářské práce

Tepelná stabilizace funkcionalizovaných nanovláknenných materiálů založených na polyvinylalkoholu

Jméno a příjmení: **Matěj Holeček**
Osobní číslo: M19000116
Studijní program: B0719A130001 Nanotechnologie
Zadávající katedra: Katedra chemie
Akademický rok: **2021/2022**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracování rešerše na dané téma
2. Příprava materiálů určených pro tepelnou stabilizaci, charakteristika vstupních materiálů.
3. Tepelná stabilizace připravených vzorků při různých teplotách a časech
4. Analýza vlivu tepelné stabilizace na vlastnosti studovaných materiálů (morfologie, rozpustnost PVA, případně uvolňování inkorporované látky)
5. Vyhodnocení výsledků

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování práce:
Jazyk práce:

dle potřeby dokumentace
30-40 stran
tištěná/elektronická
Čeština



Seznam odborné literatury:

1. KOPRIVOVA, B., M. LISNENKO, K. SOLARSKA-SCIUK, R. PROCHAZKOVA, V. NOVOTNY, J. MULLEROVA, P. MIKES a V. JENCOVA. Large-scale electrospinning of poly (vinylalcohol) nanofibers incorporated with platelet-derived growth factors. *Express Polymer Letters* [online]. 2020, **14**(10), 987-1000 [cit. 2021-8-10]. ISSN 1788618X. Dostupné z: doi:10.3144/expresspolymlett.2020.80
2. MIRAFTAB, Mohsen, Abu Naser SAIFULLAH a Ahmet ÇAY. Physical stabilisation of electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibres: comparative study on methanol and heat-based crosslinking. *Journal of Materials Science*. 2015, **50**(4), 1943-1957. ISSN 0022-2461. Dostupné z: doi:10.1007/s10853-014-8759-1
3. RYNKOWSKA, FATYEYEVA, MARAIS, KUJAWA a KUJAWSKI. Chemically and Thermally Crosslinked PVA-Based Membranes: Effect on Swelling and Transport Behavior. *Polymers*. 2019, **11**(11). ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym11111799
4. WONG, Kenneth Kar Ho, Martin ZINKE-ALLMANG a Wankei WAN. Effect of annealing on aqueous stability and elastic modulus of electrospun poly(vinyl alcohol) fibers. *Journal of Materials Science*. 2010, **45**(9), 2456-2465. ISSN 0022-2461. Dostupné z: doi:10.1007/s10853-010-4217-x

Vedoucí práce:

Ing. Věra Jenčová, Ph.D.
Katedra chemie

Konzultant práce:

Ing. Maxim Lisnenko
Katedra chemie

Datum zadání práce:

11. října 2021

Předpokládaný termín odevzdání:

16. května 2022

prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D.
děkan

L.S.

prof. Ing. Josef Šedlbauer, Ph.D.
vedoucí katedry

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně jako původní dílo s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Jsem si vědom toho, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu Technické univerzity v Liberci.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti Technickou univerzitu v Liberci; v tomto případě má Technická univerzita v Liberci právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Současně čestně prohlašuji, že text elektronické podoby práce vložený do IS/STAG se shoduje s textem tištěné podoby práce.

Beru na vědomí, že má bakalářská práce bude zveřejněna Technickou univerzitou v Liberci v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů.

Jsem si vědom následků, které podle zákona o vysokých školách mohou vyplývat z porušení tohoto prohlášení.

15. května 2022

Matěj Holeček

Tepelná stabilizace funkcionalizovaných nanovláknenných materiálů založených na polyvinylalkoholu

Abstrakt

V posledních letech je značná pozornost věnována vývoji nových typů funkčních krytů kožních ran založených na polymerních nanovláknenných materiálech. Tyto materiály mohou být dále funkcionalizovány aktivními látkami, např. látkami s antibakteriálními účinky. Problémem spojeným s aplikací těchto materiálů může být rychlé počáteční uvolňování většiny inkorporovaných aktivních látek při vložení materiálu do vodného prostředí. Tato překážka může být řešena stabilizací materiálů dodatečným síťováním polymeru. Předkládaná bakalářská práce se zabývá tepelnou stabilizací (HT) funkcionalizovaných nanovláknenných materiálů založených na vodorozpustném polymeru polyvinylalkoholu (PVA). K funkcionalizaci nanovláken bylo použito experimentální antibiotikum lipofosfonoxin DR6180 (LPPO). K přípravě nanovláknenných materiálů pomocí elektrického zvláknění byl zvolen PVA s vysokým stupněm hydrolyzy (98–98,8 %) a vysokou molekulovou hmotností (125 000 g/mol). Připraven byl jak nanovláknenný materiál bez obsahu LPPO, tak nanovláknenný materiál s obsahem LPPO. Připravené materiály byly podrobeny HT při vybraných teplotách (90–180 °C) po zvolenou dobu (1–16 h). Střední průměry vláken připravených materiálů, které byly 470 ± 120 nm pro nanovláknena bez LPPO a 290 ± 70 nm pro nanovláknena s LPPO, se vlivem HT výrazně neměnily. Analýza FTIR prokázala, že působením HT docházelo u PVA k chemickým a strukturním změnám, které vedly k rozdílné rozpustnosti stabilizovaných materiálů. Výrazné snížení rozpustnosti však nastávalo až po HT při 150 °C. Materiály stabilizované při 180 °C se stávaly zcela nerozpustnými. Ačkoliv působením HT nedocházelo ke zpomalování uvolňování LPPO, snižovalo se celkové množství uvolněného LPPO. Ze získaných dat lze konstatovat, že HT ovlivňuje stabilitu nanovláknenných materiálů z PVA ve vodném prostředí a má vliv také na uvolňování aktivní látky z těchto nanovláknenných materiálů.

Klíčová slova: tkáňové inženýrství, polyvinylalkohol, nanovláknenné materiály, tepelná stabilizace, lipofosfonoxiny

Heat treatment of functionalized nanofibrous materials based on polyvinyl alcohol

Abstract

In recent years, considerable attention has been paid to the development of new types of functional skin wound dressings based on polymeric nanofibrous materials. These materials can be further functionalized with active agents, e.g. antibacterial agents. A problem associated with the application of these materials can be initial burst release of most of the incorporated active agents when the material is placed in an aqueous environment. This obstacle can be addressed by stabilizing the materials by additional crosslinking of the polymer. The presented bachelor thesis deals with heat treatment (HT) of functionalized nanofibrous materials based on water-soluble polymer polyvinyl alcohol (PVA). The experimental antibiotic lipophosphonoxine DR6180 (LPPO) was used to functionalize the nanofibers. PVA with a high degree of hydrolysis (98–98.8 %) and high molecular weight (125 000 g/mol) was chosen for preparation of nanofibrous materials by electrospinning. Both nanofibrous material without LPPO content and nanofibrous material with LPPO content were prepared. The prepared materials were subjected to HT at selected temperatures (90–180 °C) for selected time (1–16 h). The mean fiber diameters of the prepared materials, which were 470 ± 120 nm for nanofibers without LPPO and 290 ± 70 nm for nanofibers with LPPO, did not change significantly due to HT. FTIR analysis showed that the chemical and structural changes in PVA caused by HT resulted in different solubility of the stabilized materials. However, a significant reduction in solubility did not occur until after HT at 150 °C. Materials stabilised at 180 °C became completely insoluble. Although HT did not slow down the release of LPPO, the total amount of released LPPO decreased. From the data obtained, it can be concluded that HT affects the stability of PVA nanofibrous materials in aqueous environment and also influences the release of active substance from these nanofibrous materials.

Keywords: tissue engineering, polyvinyl alcohol, nanofibrous materials, heat treatment, lipophosphonoxins

Poděkování

Rád bych zde poděkoval především své vedoucí, Ing. Věře Jenčové, Ph.D., za odborné konzultace, četné cenné rady a připomínky ke zpracování mé bakalářské práce a také za čas, který mi věnovala po celou dobu psaní této práce. Velký dík patří také mému konzultantovi, Ing. Maximu Lisnenkovi, za jeho vstřícný přístup a odbornou pomoc s experimenty prováděnými v rámci této práce. Rovněž bych rád poděkoval Ing. Janě Müllerové, Ph.D., za analýzu pomocí infračervené spektroskopie, Ing. Luboši Běhálkovi, Ph.D., za analýzu pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie, Mgr. Vítu Novotnému za analýzu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a také doc. RNDr. Michalu Řezankovi, Ph.D., za odborné konzultace a návrhy k dané problematice. Poděkování patří také finanční podpoře projektu MŠMT NanoEnviCz číslo LM2018124, díky které mohly být provedeny zmíněné analýzy pomocí infračervené spektroskopie a vysokoúčinné kapalinové chromatografie. V neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině a přátelům za obrovskou podporu v nelehkých chvílích nejen během psaní této bakalářské práce, ale po celou dobu mého studia.

Obsah

Seznam zkratk	10
Seznam obrázků	14
Seznam tabulek	15
Úvod	16
Teoretická část	16
1 Nanovláknenné materiály pro tkáňové inženýrství	17
1.1 Extracelulární hmota	17
1.2 Nároky na materiály pro tkáňové inženýrství	20
1.3 Materiály pro tkáňové inženýrství	22
1.3.1 Polymerní nanovláknenné materiály	23
1.4 Polymery pro přípravu nanovláknenných materiálů	23
1.4.1 Přírodní polymery	23
1.4.2 Syntetické polymery	25
1.4.3 Polymery rozpustné ve vodě	26
1.5 Metody přípravy nanovláken	28
1.5.1 Stejnoseměrné elektrické zvlákňování	29
2 Funkcionalizace nanovláknenných materiálů	31
2.1 Antimikrobiální látky užívané k funkcionalizaci nanovláknenných materiálů	33
2.1.1 Lipofosfonoxiny	35
2.2 Mechanismy uvolňování inkorporovaných látek	35
3 Metody stabilizace scaffoldů	37
3.1 Chemické metody	37
3.2 Fyzikální metody	38
3.2.1 Tepelná stabilizace působením vysokých teplot	39
Experimentální část	40
4 Materiál a metody	41
4.1 Použité chemikálie a roztoky	41
4.2 Použité přístroje a programy	42
4.3 Použité metody a postupy	43

4.3.1	Příprava nanovlákných materiálů	43
4.3.2	Tepelná stabilizace nanovlákných materiálů	45
4.3.3	Analýza morfologie materiálů pomocí elektronové mikroskopie	45
4.3.4	Analýza rozpustnosti PVA a uvolňování aktivní látky pomocí spektrofotometrie	46
4.3.5	Analýza chemických a strukturních změn materiálů pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací	50
4.3.6	Analýza krystalinity materiálů pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie	50
5	Výsledky a diskuze	51
5.1	Optimalizace tepelné stabilizace nanovlákného materiálu z PVA . .	52
5.1.1	Příprava a charakteristika nanovlákného materiálu z PVA .	52
5.1.2	Tepelná stabilizace nanovlákného materiálu z PVA	53
5.1.3	Analýza nanovlákných materiálů z PVA po tepelné stabilizaci	54
5.2	Tepelná stabilizace nanovlákného materiálu z PVA s obsahem ak- tivní látky	64
5.2.1	Příprava a charakteristika nanovlákného materiálu z PVA s obsahem aktivní látky	64
5.2.2	Tepelná stabilizace nanovlákného materiálu z PVA s obsa- hem aktivní látky	65
5.2.3	Analýza nanovlákných materiálů z PVA s obsahem aktivní látky po tepelné stabilizaci	66
	Závěr	76
	Použitá literatura	87
	Přílohy	88

Seznam zkratek

AV ČR	Akademie věd České republiky
CXI	Ústav pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace
dH₂O	Destilovaná voda
DSC	Diferenciální skenovací kalorimetrie
ECM	Extracelulární hmota („extracellular matrix“)
FP	Fakulta pedagogická
FS	Fakulta strojní
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GAG	Glykosaminoglykany
hm%	Hmotnostní procenta
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HT	Tepelná stabilizace působením vysokých teplot („heat treatment“)
LPPO	Lipofosfonoxin
NC	Negativní kontrola („negative control“)
PBS	Fosfátový pufr
PCL	Polykaprolakton
PEG	Polyethylenglykol
PGA	Polyglykolová kyselina
PLA	Polymléčná kyselina
PVA	Polyvinylalkohol
PVAc	Polyvinylacetát
RT	Pokožová teplota („room temperature“)
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
SD	Směrodatná odchylka
TI	Tkáňové inženýrství
TUL	Technická univerzita v Liberci

Seznam obrázků

1.1	Schéma stavby ECM; převzato a upraveno podle [12]	18
1.2	Struktura proteoglykanového agregátu; převzato z [14]	19
1.3	Schéma vratné deformace elastinových vláken; převzato z [11]	20
1.4	Alkalická alkoholýza polyvinylacetátu (PVAc) za vzniku částečně hydrolyzovaného polyvinylalkoholu (PVA) a methyl-acetátu (MeO-Ac)	27
1.5	Strukturní vzorce (A) částečně hydrolyzovaného PVA a (B) plně hydrolyzovaného PVA	27
1.6	Schéma aparatury pro jehlové zvlákňování; inspirováno dle [11]	30
2.1	Funkcionalizace a uvolňování aktivních látek z nanovláken připravených (A) povrchovou modifikací, (B) zvlákňováním ze směsi, (C) koaxiálním zvlákňováním a (D) emulzním zvlákňováním; převzato a upraveno podle [47]	32
2.2	Strukturní vzorce zástupců první (LPPO I) a druhé (LPPO II) generace lipofosfonoxinů; převzato a upraveno podle [55]	35
3.1	Vodíkové můstky vznikající mezi řetězci PVA	40
4.1	Kalibrační křivka PVA pro 10násobné ředění (závislost absorbance při 630 nm na koncentraci PVA v mg/ml)	47
4.2	Kalibrační křivka PVA pro 20násobné ředění (závislost absorbance při 630 nm na koncentraci PVA v mg/ml)	48
4.3	Kalibrační křivka LPPO (závislost absorbance při 260 nm na koncentraci LPPO v $\mu\text{g/l}$)	49
4.4	Kalibrační křivka PVA pro UV oblast (závislost absorbance při 260 nm na koncentraci PVA v mg/ml)	49
5.1	Snímek vstupního materiálu ze skenovací elektronové mikroskopie (měřítko 10 μm) s příslušným histogramem distribuce průměrů vláken	53
5.2	Změny zbarvení PVA nanovláken při různých podmínkách HT	54
5.3	Grafy zobrazující kumulativní uvolňování PVA (vyjádřeno v % celkové hmotnosti vzorku) z PVA nanovláken v závislosti na čase uvolňování – porovnání vlivu doby HT na stabilitu PVA nanovláken pro danou teplotu stabilizace: A) 90 °C, B) 120 °C, C) 150 °C a D) 180 °C; NC označuje materiál bez HT	56

5.4	Grafy zobrazující kumulativní uvolňování PVA (vyjádřeno v % celkové hmotnosti vzorku) z PVA nanovláken v závislosti na čase uvolňování – porovnání vlivu teploty HT na stabilitu PVA nanovláken pro danou dobu stabilizace: A) 1 h HT, B) 4 h HT, C) 8 h HT a D) 16 h HT; NC označuje materiál bez HT	57
5.5	Analýza FTIR: infračervená spektra PVA nanovláken podrobených HT po dobu 8 h při teplotách 90, 120, 150 a 180 °C; PVA NC označuje materiál bez HT	58
5.6	Schéma odstraňování zbytkových molekul vody vlivem HT a vzniku vodíkových můstků mezi řetězci PVA	58
5.7	Schéma odštěpování hydroxylových skupin z řetězců PVA vlivem HT za vzniku konjugovaného systému dvojných vazeb	59
5.8	Schéma vzniku etherových můstků mezi řetězci PVA vlivem HT	60
5.9	Schéma oxidace hydroxylových skupin PVA vlivem HT a vznik cyklických ketalových (a acetalových) struktur mezi řetězci PVA	60
5.10	Analýza FTIR: detail oblasti infračervených spekter PVA nanovláken podrobených HT po dobu 8 h při teplotách 90, 120, 150 a 180 °C; PVA NC označuje materiál bez HT	61
5.11	Analýza FTIR: infračervená spektra PVA nanovláken podrobených HT při 90 °C po dobu 1, 4, 8 a 16 h; PVA NC označuje materiál bez HT	61
5.12	Analýza FTIR: infračervená spektra PVA nanovláken podrobených HT při 120 °C po dobu 1, 4, 8 a 16 h; PVA NC označuje materiál bez HT	62
5.13	Analýza FTIR: infračervená spektra PVA nanovláken podrobených HT při 150 °C po dobu 1, 4, 8 a 16 h; PVA NC označuje materiál bez HT	62
5.14	Analýza FTIR: infračervená spektra PVA nanovláken podrobených HT při 180 °C po dobu 1, 4, 8 a 16 h; PVA NC označuje materiál bez HT	62
5.15	Graf reprezentující změny krystalinity nanovláčenných materiálů z PVA vlivem HT – závislost krystalinity materiálu na době stabilizace pro teploty stabilizace 90, 120, 150 a 180 °C; NC označuje materiál bez HT	63
5.16	Analýza FTIR: infračervená spektra nestabilizovaných PVA nanovláken (PVA NC), nestabilizovaných PVA+LPPO nanovláken (PVA+LPPO NC) a použitého LPPO DR6180 (LPPO)	64
5.17	Snímek připraveného nanovláčenného materiálu z PVA s obsahem LPPO ze skenovací elektronové mikroskopie (měřítko 10 μm) s příslušným histogramem distribuce průměrů vláken	65
5.18	Grafy zobrazující kumulativní uvolňování PVA (vyjádřeno v % celkové hmotnosti vzorku) z PVA+LPPO nanovláken v závislosti na čase uvolňování – porovnání vlivu doby HT na stabilitu PVA nanovláken pro danou teplotu stabilizace: A) 90 °C, B) 120 °C a C) 150 °C; NC označuje materiál bez HT	68

5.19	Grafy zobrazující kumulativní uvolňování PVA (vyjádřeno v % celkové hmotnosti vzorku) z PVA+LPPO nanovláken v závislosti na čase uvolňování – porovnání vlivu teploty HT na stabilitu PVA nanovláken pro danou dobu stabilizace: A) 1 h HT, B) 4 h HT a C) 8 h HT; NC označuje materiál bez HT	69
5.20	Analýza FTIR: infračervená spektra PVA+LPPO nanovláken podrobených HT po dobu 4 h při teplotách 90, 120 a 150 °C; PVA+LPPO NC označuje materiál bez HT	70
5.21	Analýza FTIR: detail oblasti infračervených spekter PVA+LPPO nanovláken podrobených HT po dobu 4 h při teplotách 90, 120 a 150 °C; PVA+LPPO NC označuje materiál bez HT	70
5.22	Analýza FTIR: infračervená spektra PVA+LPPO nanovláken podrobených HT při 90 °C po dobu 1, 4 a 8 h; PVA+LPPO NC označuje materiál bez HT	71
5.23	Analýza FTIR: infračervená spektra PVA+LPPO nanovláken podrobených HT při 120 °C po dobu 1, 4 a 8 h; PVA+LPPO NC označuje materiál bez HT	71
5.24	Analýza FTIR: infračervená spektra PVA+LPPO nanovláken podrobených HT při 150 °C po dobu 1, 4 a 8 h; PVA+LPPO NC označuje materiál bez HT	71
5.25	Grafy zobrazující kumulativní uvolňování LPPO (vyjádřeno v % teoretické maximální hmotnosti) z PVA+LPPO nanovláken v závislosti na čase uvolňování – porovnání vlivu doby HT na uvolňování LPPO pro danou teplotu stabilizace: A) 90 °C, B) 120 °C a C) 150 °C; NC označuje materiál bez HT	72
5.26	Grafy zobrazující kumulativní uvolňování LPPO (vyjádřeno v % teoretické maximální hmotnosti) z PVA+LPPO nanovláken v závislosti na čase uvolňování – porovnání vlivu teploty HT na uvolňování LPPO pro danou dobu stabilizace: A) 1 h, B) 4 h a C) 8 h; NC označuje materiál bez HT	73
5.27	Graf zobrazující HPLC analýzu kumulativního uvolňování LPPO (vyjádřeno v % teoretické maximální hmotnosti) z vybraných vzorků stabilizovaných PVA+LPPO nanovláken v závislosti na čase uvolňování; NC označuje materiál bez HT	74
5.28	Graf reprezentující změny krystalinity nanovláčkových materiálů z PVA s obsahem LPPO vlivem HT – závislost krystalinity materiálu na době stabilizace pro teploty stabilizace 90, 120 a 150 °C; NC označuje materiál bez HT	75
5.29	Absorpční spektrum PVA	88
5.30	Absorpční spektrum LPPO	88
5.31	Analýza FTIR: infračervená PVA nanovláken z PVA podrobených HT po dobu 1 h při teplotách 90, 120, 150 a 180 °C; PVA NC označuje materiál bez HT	96

5.32	Analýza FTIR: infračervená spektra PVA nanovláken podrobených HT po dobu 4 h při teplotách 90, 120, 150 a 180 °C; PVA NC označuje materiál bez HT	96
5.33	Analýza FTIR: infračervená spektra PVA nanovláken podrobených HT po dobu 16 h při teplotách 90, 120, 150 a 180 °C; PVA NC označuje materiál bez HT	96
5.34	Analýza FTIR: infračervená spektra PVA+LPPO nanovláken podrobených HT po dobu 1 h při teplotách 90, 120 a 150 °C; PVA+LPPO NC označuje materiál bez HT	97
5.35	Analýza FTIR: infračervená spektra PVA+LPPO nanovláken podrobených HT po dobu 8 h při teplotách 90, 120 a 150 °C; PVA+LPPO NC označuje materiál bez HT	97

Seznam tabulek

1.1	Přírodní polymery používané pro přípravu nanovláknenných materiálů	24
1.2	Syntetické polymery používané pro přípravu nanovláknenných materiálů.	25
4.1	Seznam použitých chemikálií	41
4.2	Seznam použitých roztoků	42
4.3	Seznam použitých přístrojů a programů	42
4.4	Parametry pro přípravu nanovláknenného materiálu z PVA	44
4.5	Parametry pro přípravu nanovláknenného materiálu z PVA s obsahem LPPO	45
5.1	Střední průměry vláken stabilizovaných nanovláknenných materiálů z PVA	55
5.2	Snímky nanovláknenných materiálů z PVA ze skenovací elektronové mikroskopie (měřítko 10 μm) reprezentující oba extrémní stabilizace s příslušnými histogramy distribuce průměrů vláken	55
5.3	Střední průměry vláken stabilizovaných nanovláknenných materiálů z PVA s obsahem LPPO	66
5.4	Snímky nanovláknenných materiálů z PVA s obsahem LPPO ze skenovací elektronové mikroskopie (měřítko 10 μm) reprezentující oba extrémní stabilizace s příslušnými histogramy distribuce průměrů vláken	67
5.5	Snímky stabilizovaných nanovláknenných materiálů z PVA ze skenovací elektronové mikroskopie (měřítko 10 μm) a příslušné histogramy distribuce průměrů vláken	89
5.6	Snímky stabilizovaných nanovláknenných materiálů z PVA s obsahem LPPO ze skenovací elektronové mikroskopie (měřítko 10 μm) a příslušné histogramy distribuce průměrů vláken	93

Úvod

Nanomateriály zažívají v posledních desetiletích obrovský rozmach a stále častěji se objevují jako součást řady technologických a průmyslových aplikací. Velké téma představují také v rámci rapidně se rozvíjejícího oboru tkáňového inženýrství, jehož cílem je vývoj nových materiálů pro regeneraci poškozených tkání a orgánů. Jednou z intenzivně studovaných oblastí je kožní tkáňové inženýrství, zabývající se léčbou chronických kožních poranění. Chronické a špatně se hojící rány představují vážný a nákladný problém ve zdravotnictví. Značná pozornost je proto věnována vývoji nových typů kožních náhrad a krytů kožních ran, které by se aktivně podílely na procesu hojení a zároveň by snižovaly riziko vzniku infekce v ráně. Polymerní nanovláknenné materiály mají řadu charakteristik, které je činí vhodnými kandidáty pro přípravu funkčních krytů kožních ran. Příkladem těchto charakteristik může být strukturní podobnost s nativní extracelulární hmotou, vysoká porozita umožňující výměnu plynů mezi ránou a okolním prostředím nebo možnost inkorporace aktivních látek s antibakteriálními účinky do struktury nanovláken. Častým problémem spojeným s aplikací nanovláknenných materiálů s inkorporovanými aktivními látkami je, že při styku těchto materiálů s vodným prostředím dochází k rychlému uvolnění většinového množství přítomné aktivní látky – nastává tzv. „burst release“ efekt. Teto problém je obvykle řešen zvýšením stability nanovláknenných materiálů, což se provádí dodatečným síťováním polymeru některou z dostupných metod.

V rámci této bakalářské práce je studován vliv tepelné stabilizace působením vysokých teplot (HT, „heat treatment“) na rozpustnost nanovláknenných materiálů z polyvinylalkoholu (PVA) a také vliv HT na uvolňování inkorporovaného experimentálního antibiotika lipofosfonoxinu DR6180 (LPPO) z nanovláken ve vodném prostředí. Sledován a porovnáván je vliv změny teploty a doby HT. V teoretické části práce je nastíněn vztah nanovláknenných materiálů k tkáňovému inženýrství a zmíněny jsou také metody jejich přípravy s důrazem kladeným na přípravu nanovláken pomocí stejnosměrného elektrického zvláknění. Dále jsou stručně popsány možnosti funkcionalizace nanovláknenných materiálů a uvedeny jsou příklady látek s antimikrobiálními účinky, které se k funkcionalizaci nanovláken používají. V neposlední řadě teoretická část obsahuje také kapitola zabývající se dostupnými metodami stabilizace nanovláknenných materiálů. Experimentální část popisuje přípravu nanovláknenných materiálů, jejich tepelnou stabilizaci, následně provedené analýzy morfologie materiálů, rozpustnosti PVA, uvolňování LPPO, chemických a strukturních změn a změn krystalinity materiálů a vyhodnocení výsledků získaných ze zmíněných analýz.

1 Nanovláknenné materiály pro tkáňové inženýrství

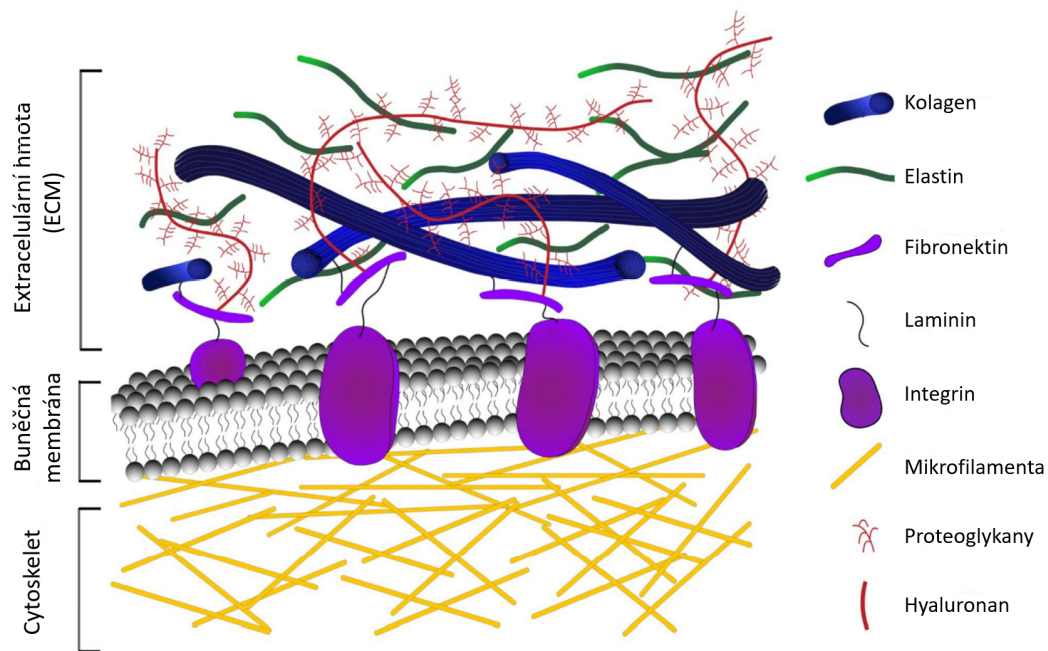
Ztráta nebo selhání daného orgánu či určitého typu tkáně je jedním z velmi častých a nákladných problémů v humánní medicíně [1]. V současné době je tato situace řešena využíváním tkání a orgánů od dárců, avšak vzhledem k jejich nedostatečnému počtu, rostoucímu počtu lidí čekajících na transplantaci a celkově stárnoucí populaci není tento přístup udržitelný. Jako slibná možnost k řešení této kritické situace se jeví tkáňové inženýrství (TI) [2]. TI je multidisciplinární obor, který v sobě kombinuje znalosti a technologie z oblastí, jako jsou biologie, chemie, medicína, farmacie, materiálové inženýrství a mnoho dalších. Proces tkáňového inženýrství je zpravidla vícekrokový, s cílem vyvinout materiály sloužící k regeneraci, náhradě či vylepšení funkce poškozených tkání a orgánů [2, 3]. Právě studium a vývoj nových materiálů pro výrobu tkáňových nosičů (tzv. scaffoldů), které slouží k imitaci přirozeného prostředí buněk, jejich osazení buňkami *in vitro* a následná implantace do těla pacienta může vést k úspěšné regeneraci poškozených tkání, případně orgánů [3].

Jednou z intenzivně studovaných oblastí je kožní TI. Aplikace kožních náhrad slouží k podpoře hojení akutních a chronických ran s cílem regenerovat původní stavbu a funkci kůže [4, 5]. Ačkoliv se příprava kožních náhrad a jejich aplikace u pacientů stala realitou, řada vědců z různých oborů stále řeší problémy spojené s přípravou komplexních kožních náhrad, které lze snadno transplantovat ve velkém množství a pokud možno v jediném chirurgickém zákroku [6]. Nanovláknenné materiály, jakožto populární materiály v mnoha oblastech tkáňového inženýrství, jsou připravovány z celé řady syntetických i přírodních polymerů. Díky svým unikátním vlastnostem mohou nanovláknena sloužit nejen jako nosiče kožních buněk, ale rovněž dokáží bránit pronikání mikrobů do ran a udržovat vhodnou vlhkost v poškozené kůži [7]. Pro správné pochopení požadavků na materiály pro TI je nutné si nejprve představit stavbu a složení mezibuněčné hmoty.

1.1 Extracelulární hmota

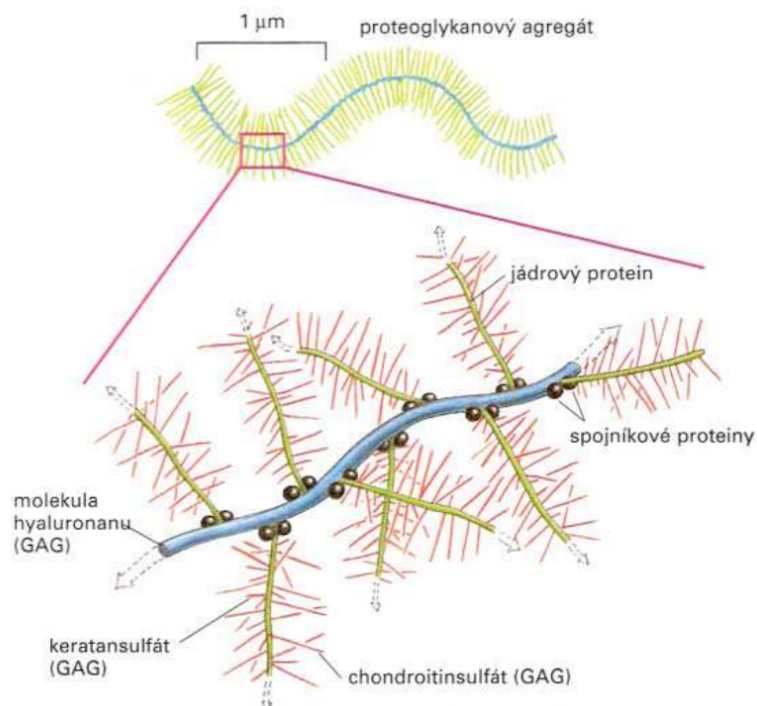
Mezibuněčná hmota neboli extracelulární hmota (ECM, „extracellular matrix“) je nebuněčná součást všech tkání a orgánů [8]. Dříve byla považována za materiál vyplňující mezibuněčné prostory, s úkolem poskytovat mechanickou pevnost a opo-

ru. Dnes je již známo, že ECM je dynamickou strukturou, která se podílí také na řízení buněčných dějů prostřednictvím generování signálů a interakcí s buňkami. Přítomné bioaktivní makromolekuly se účastní procesů, jako je například buněčná adheze, proliferace, diferenciace či mezibuněčná komunikace [9, 10]. Pro úspěšnou konstrukci tkáňových nosičů je tedy nezbytné studovat strukturu ECM. Ačkoliv se její specifické složení může u různých typů tkání do jisté míry lišit, obecně lze ECM označit za komplexní nanovláknennou síť, složenou zejména ze tří kategorií makromolekul: fibrilárních proteinů, adhezivních glykoproteinů a glykosaminoglykanů [3, 11].



Obrázek 1.1: Schéma stavby ECM; převzato a upraveno podle [12]

- **Glykosaminoglykany (GAG)** jsou lineární polysacharidy s vysokou molekulovou hmotností, v nichž se pravidelně opakuje disacharidová jednotka složená z uronové kyseliny (glukuronová či induronová kyselina) a hexosaminu (glukosamin či galaktosamin). Jednotky GAG jsou zpravidla sulfatované. Sulfatace ve spojení s přítomnými karboxylovými skupinami vytváří záporné náboje, což způsobuje hydrofilitu GAG. Značná hydrofilita umožňuje vznik struktur podobných hydrogelům, které mají významný vliv na vlastnosti ECM. Kyselina hyaluronová (hyaluronan) je příkladem nesulfatovaného GAG, který se jako jediný neváže kovalentně s proteiny. Sulfatované GAG, mezi něž patří např. chondroitinsulfát, dermatansulfát nebo keratansulfát, se kovalentně váží na proteinová jádra, čímž vytváří tzv. proteoglykany. Proteoglykany mohou vytvářet obrovské agregáty. Struktura takového agregátu je znázorněna na obrázku 1.2. GAG jsou ve tkáních obvykle vázány na další složky ECM, povrchy buněk, membránové receptory či růstové faktory a podílí se na mezibuněčných interakcích. [11, 13]

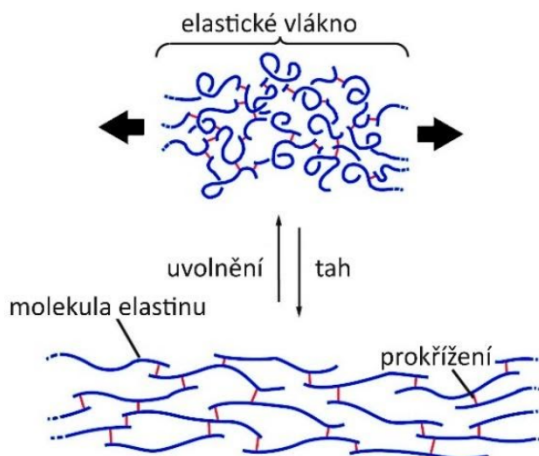


Obrázek 1.2: Struktura proteoglykanového agregátu; převzato z [14]

- **Glykoproteiny** jsou složeny z části proteinové a části sacharidové, převažuje však složka proteinová. Sacharidovou složku tvoří řetězce oligosacharidů a polysacharidů, které jsou často větvené. Glykoproteiny obsahují vazebná místa pro řadu struktur z buněčných povrchů i ECM. Zprostředkovávají tak interakce sousedních buněk a adhezi buněk k okolnímu substrátu. Mezi glykoproteiny patří např. fibronectin nebo laminin. [13]
- **Fibrilární proteiny** zahrnují kolagenní, elastická a retikulární vlákna [13]. Kolagenní vlákna představují celou skupinu proteinů, u člověka jich rozeznáváme asi 40 typů [11]. Základem kolagenů jsou molekuly tropokolagenu tvořené trojicí polypeptidových řetězců, které jsou složeny v charakteristickou trojšroubovici. V extracelulárním prostoru se molekuly tropokolagenu uspořádávají, zpravidla do kolagenních fibril [11, 15]. Dlouhé nevětvené kolagenní fibrily dávají tkáním pevnost a odolnost v tahu. Nejrozšířenějším typem kolagenu je kolagen typu I. Fibrily kolagenu typu I spontánně agregují a vytváří vlákna, která se dále spojují ve svazky vláken pozorovatelné optickým mikroskopem [11, 13]. Elastická vlákna, jejichž základní složkou je protein elastin, se mohou skládat v prostorové sítě a jsou příčinou pružnosti a ohebnosti ECM. Řetězce elastinu obsahují dva typy pravidelně se střídajících segmentů: hydrofobní segment zodpovědný za roztažnost a segment zprostředkávající kovalentní síťování mezi jednotlivými molekulami elastinu. Určité části řetězce jsou díky kovalentnímu síťování při natahování drženy na svých pozicích, což umožňuje jejich vratnou deformaci. Elastická vlákna jsou méně odolná v tahu než vlákna kolagenní,

za to však mohou být vratně roztažena až na dvojnásobek své původní délky (schématicky znázorněno na obrázku 1.3). [11, 13]

Retikulární vlákna, složená z kolagenu typu III, tvoří jemné sítě, které slouží jako opora pro některé speciální typy tkání. Objevují se rovněž během vývoje, u zánětlivých pochodů a při hojení ran, kde slouží jako předchůdci zralejších vláken z kolagenu typu I. [13]



Obrázek 1.3: Schéma vratné deformace elastinových vláken; převzato z [11]

Každá složka ECM má svou zásadní roli a společně tyto složky zprostředkovávají důležité funkce ECM. Glykosaminoglykany, jimi tvořené proteoglykany a glykoproteiny tvoří spolu s vodou a ionty tzv. amorfní složku ECM. Amorfní složka je viskózní a transparentní hmota vyplňující prostor mezi jednotlivými buňkami a vlákny, která se zásadním způsobem podílí na stupni hydratace. Hydratace ovlivňuje mechanické vlastnosti a konzistenci tkání (pohyblivost jednotlivých vrstev, viskozitu), účinnost difúze látek a šíření buněk či mikroorganismů mezibuněčným prostorem. Důležitou rolí je také zprostředkování vazeb mezi buňkami a komponentami ECM pomocí glykoproteinů. Vlákniatá složka, tvořená fibrilárními proteiny, dává tkáním a orgánům pevnost v tahu (kolagen), pružnost (elastin) či vytváří opornou síť (retikulární vlákna). [13]

1.2 Nároky na materiály pro tkáňové inženýrství

Jak již bylo zmíněno výše, jedním z cílů tkáňového inženýrství je studium a vývoj materiálů pro přípravu scaffoldů. Ty mají za úkol imitací přirozeného prostředí poskytovat strukturální podporu pro uchycení buněk, jejich proliferaci a diferenciaci. Materiály, respektive z nich vyrobené scaffoldy by tak měly alespoň částečně napodobovat strukturu a funkci nativní ECM [3, 16]. Na druhou stranu by nově vznikající tkáň měla být často schopná materiál postupně odbourávat a nahrazovat ho přirozenou ECM [17]. V některých případech, typicky u kožních aplikací, má scaffold rovněž fungovat jako vnější bariéra, která chrání ránu před vstupem infekce, snižuje ztráty vody a krve z organismu a reguluje bolestivost rány [18].

- **Biokompatibilita** je základním kritériem při výběru materiálu. Použité materiály nesmějí být toxické. Biokompatibilní scaffold by měl podporovat buněčnou adhezi, proliferaci a normální funkce buněk. Po zavedení do organismu musí být materiál schopný se integrovat do cílové tkáně s minimální imunitní odpovědí, aby se předešlo vzniku závažné zánětlivé reakce, která by mohla vést až k odmítnutí implantátu organismem. [17, 19]
- **Biodegradabilita** je také častým požadavkem na materiály pro tkáňové inženýrství. Ve většině případů nejsou scaffoldy myšleny jako trvalé implantáty. Materiál by měl postupně degradovat a současně být nahrazován ECM produkovanou přítomnými buňkami. Aby byl materiál označen za biodegradabilní, musejí být vznikající produkty degradace netoxické a schopné opustit organismus bez negativního účinku na ostatní orgány a okolní tkáň. Požadavky na rychlost degradace materiálu jsou odlišné pro různé typy tkáně a měly by co nejvíce odpovídat rychlosti novotvorby tkáně. [19]
- **Mechanické vlastnosti** materiálů, jako je např. ohebnost či tvrdost, by v ideálním případě měly být co nejpodobnější dané tkáni, resp. cílovému anatomickému místu. Materiál má za úkol poskytovat mechanickou oporu po dobu potřebnou k dokončení procesu remodelace, při kterém je scaffold nahrazen ECM příslušné tkáně. Kromě vlivu na správnou produkci a funkci nově vznikající tkáně je dostatečná pevnost nezbytná k proveditelnosti samotného chirurgického zákroku – implantaci. [17, 19]
Nároky na mechanické vlastnosti se pro různé tkáně mohou značně lišit. V případě kožního TI jsou vlastnosti jako elasticita, patřičná mechanická odolnost a vhodná přilnavost scaffoldu nezbytné pro správnou regeneraci poškozené kůže. [18]
- **Fyzikální a chemické vlastnosti** do jisté míry zahrnují i výše zmíněné požadavky. Pro specifické aplikace v TI jsou velmi důležité fyzikálně-chemické vlastnosti povrchů použitých materiálů. Ty mají značný vliv na možnosti povrchových modifikací vázáním biologicky aktivních látek. Přítomnost vhodných funkčních skupin umožňuje přímé vázání aktivních látek tvorbou kovalentních vazeb. Vázání na povrch materiálu může probíhat také nespecifickou absorpcí. Fyzikální a chemické vlastnosti ovlivňují i možnosti následného síťování za účelem stabilizace materiálu. Případné chemické modifikace pak mají značný vliv na výsledné interakce mezi buňkou a materiálem. [20, 21]
Fyzikální a chemické vlastnosti použitých materiálů mají nemalý vliv na diferenciaci kmenových buněk a pouhá změna složení scaffoldu může vést k diferenciaci kmenových buněk do jiných buněčných typů. [22]
- **Struktura** scaffoldu, do značné míry určena zvoleným materiálem, je rovněž důležitým parametrem. Klíčovou roli hraje porozita. Velké množství vzájemně propojených pórů zajišťuje difúzi živin do scaffoldu a ECM nově vznikající tkáně a naopak umožňuje odvod degradačních a odpadních produktů pryč. Porozita rovněž umožňuje vaskularizaci v nově vznikající tkáni. Kromě porozity (hustota pórů) má zásadní vliv i velikost a vzájemné propojení těchto

pórů. Dostatečná velikost pórů dovoluje buňkám migrovat do struktury scaffoldu. [19]

Rovnováha mezi dobrými mechanickými vlastnostmi a vhodnou strukturou scaffoldu je značnou výzvou. Na jedné straně musí být použitý materiál dostatečně odolný, aby mohl poskytovat oporu nově vznikající tkáni a umožňovat dobrou manipulovatelnost při chirurgickém zákroku, na druhé straně je nutná dostatečná porozita pro zajištění správné funkčnosti nově vznikající tkáně. [17]

Výše uvedené požadavky jsou brány v potaz při výběru materiálu na přípravu scaffoldu pro daný typ tkáně. Typy materiálů používané v tkáňovém inženýrství a některé jejich konkrétní příklady jsou diskutovány v následujících kapitolách.

1.3 Materiály pro tkáňové inženýrství

Materiál vyvíjený k interakcím s biologickými systémy za účelem léčby, zlepšení funkce či náhrady tkáně nebo orgánu je označován jako biomateriál. Biomateriály do jisté míry splňují výše zmíněné požadavky a jsou používány například pro přípravu scaffoldů v TI. Mezi tři základní skupiny biomateriálů používaných pro přípravu scaffoldů patří kovy, keramické materiály a polymery. [19]

1. **Kovy** používané v TI jsou například titan, zlato, stříbro, hořčík či jejich slitiny s dalšími kovy. Jejich unikátní vlastnosti umožňují přípravu nejrůznějších forem a tvarů scaffoldů. V případě slitin lze snadno řídit finální složení materiálu. Chemické vlastnosti kovů umožňují jejich povrchovou modifikaci pomocí biologicky aktivních látek nebo polymerů. Používané jsou hlavně v ortopedických aplikacích, především pro své výborné mechanické vlastnosti, jako je tuhost a odolnost proti opotřebení. Pro určité specifické aplikace je výhodná chemická stálost kovů a jejich minimální interakce s živou tkání. [23]
2. **Keramické materiály**, typicky hydroxyapatit či fosforečnan vápenatý, se vyznačují vysokou tvrdostí a nízkou elasticitou. Na druhou stranu jsou však velmi křehké. Díky své strukturní a chemické podobnosti s neústrojnou složkou kostí vykazují vysokou biokompatibilitu a osteokonduktivitu. Proto jsou používány pro přípravu scaffoldů určených právě k regeneraci kostní tkáně. [19]
3. **Polymery** jsou v TI populární pro obrovskou rozmanitost jejich vlastností, ať už jde o vlastnosti mechanické, degradační, či možnost volby polymerů s hydrofilními nebo hydrofobními vlastnostmi. Tato rozmanitost je zaručena širokým výběrem dostupných polymerů, které mohou být jak přírodního, tak syntetického původu. Jejich vlastnosti mohou být dále modifikovány, například síťováním pomocí různých metod (viz kapitola 3). V případě TI se síťování provádí především za účelem snížení rozpustnosti výsledných materiálů. Rovněž je možná příprava kopolymerů, u kterých do jisté míry dochází ke

kombinaci vlastností použitých homopolymerů. Výsledné materiály se vyznačují vysokou porozitou a velkým poměrem povrchu k objemu, což jsou další výhody pro aplikace polymerů v mnoha odvětvích TI. [24]

Polymerní materiály se v TI využívají zpravidla ve formě hydrogelů nebo nanovláken (viz kapitola 1.3.1). Hydrogely jsou tvořeny síťovanými hydrofilními polymery, které jsou schopné pojmout značné množství vody, aniž by došlo k jejich rozpuštění. Hydrogely je možné snadno osadit buňkami a inkorporovat do jejich struktury bioaktivní látky. Díky svým vlastnostem mohou být využity k vyplnění nepravidelně tvarovaných kožních defektů, kam mohou být vpraveny injekčně či s použitím minimálně invazivních postupů. [25]

1.3.1 Polymerní nanovláknenné materiály

V porovnání s ostatními materiály používanými k přípravě scaffoldů nanovláknenné materiály nejlépe napodobují vláknennou strukturu nativní ECM. Díky tomu mají značný potenciál umožnit dobrou adhezi, proliferaci a diferenciaci buněk. Díky jejich velkému poměru povrchu k objemu je možné modifikovat nanovláknenný materiál množstvím aktivních látek, které se mohou navázat na povrch či inkorporovat dovnitř struktury nanovláken. Změnou složení materiálů a modifikací výrobních parametrů je možné do značné míry přizpůsobovat jejich vlastnosti dané aplikaci. Také průměr nanovláken má vliv na vlastnosti výsledného materiálu, například mechanické. To je velmi užitečné pro možnosti ovlivňování chování buněk výběrem vhodných mechanických vlastností scaffoldu. [26, 27]

Nanovláknenné materiály jsou vhodným kandidátem pro přípravu krytů kožních ran. Jejich struktura napodobuje strukturu nativní ECM kůže, čímž stimulují procesy buněčné regenerace, a mají tak pozitivní vliv na samotný proces hojení. Navíc jsou propustné pro plyny a umožňují odvod exsudátů z rány. Nanovláknena z hydrofilních polymerů udržují vlhké prostředí v ráně, čímž dále zlepšují hojení a snižují intenzitu jizvení. Přírodní i syntetické polymery používané pro přípravu nanovláknenných scaffoldů a různé metody jejich přípravy jsou probírány v následujících kapitolách. [28]

1.4 Polymery pro přípravu nanovláknenných materiálů

1.4.1 Přírodní polymery

Zdrojem přírodních polymerů mohou být mikroorganismy, rostliny nebo živočichové. Mezi hlavní výhody patří jejich vysoká biokompatibilita a schopnost interakce s biologickými systémy. Přírodní polymery i jejich degradační produkty bývají netoxické. Produkty degradace jsou navíc často využitelné v buněčném metabolismu. Zpravidla nevyvolávají silné zánětlivé reakce, avšak vlivem procesu jejich přípravy mohou obsahovat určité nečistoty, které zánětlivé reakce naopak vy-

volávají. Navíc může docházet k přenosu nemocí z jiných biologických druhů. [29, 30]

Mezi další nevýhody patří horší mechanické vlastnosti, vysoké rychlosti degradace a slabé možnosti řízení těchto degradačních rychlostí. Hlavním problémem spojeným s použitím přírodních polymerů je, že vzhledem ke způsobu jejich získávání nemusí mít daný druh polymeru různého původu a šarže stejnorodé vlastnosti. To má za následek omezenou reprodukovatelnost vlastností z nich připravených materiálů. Příklady přírodních polymerů používaných pro přípravu nanovláken jsou uvedeny v tabulce 1.1. [31]

Tabulka 1.1: Přírodní polymery používané pro přípravu nanovláknenných materiálů

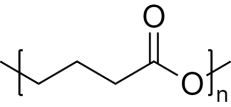
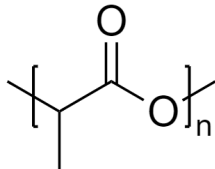
Polymer	Charakteristika
Chitosan	Polysacharid chitosan je díky svým vlastnostem, jako je biodegradabilita a biokompatibilita, oblíbeným polymerem pro aplikace v medicíně. Je jedním z mála přírodních polymerů, který se přirozeně nenachází v lidském organismu, a přesto je používán pro medicínské aplikace. Mezi další výhodné vlastnosti pro aplikace v TI patří schopnost podporovat hojení ran. Pro své špatné mechanické vlastnosti a vysokou hydrofilitu bývá často síťován, například pomocí dalších polymerů. [30]
Hyaluronová kyselina	Hyaluronová kyselina je všudypřítomnou složkou ECM, a nachází se tak v mnoha tkáních. Díky tomu je vysoce biokompatibilní. Navíc podporuje pohyblivost a proliferaci buněk a také se podílí na stimulaci lokální zánětlivé reakce, což jsou důležité atributy pro regeneraci tkání. Díky přítomnosti vhodných funkčních skupin jsou možné chemické modifikace hyaluronové kyseliny. [30]
Kolagen	V případě kolagenu používaného pro přípravu scaffoldů v TI jde zpravidla o kolagen typu I. Kolagen má vhodné chemické vlastnosti, které pomáhají buňkám přilnout na připravený materiál. Přilnuté buňky degradují materiál z kolagenu a zároveň syntetizují a secernují svou vlastní ECM. To je výhodné v procesech rekonstrukce a obnovy mnoha typů tkání či orgánů. Pro zvýšení biologické aktivity a zlepšení mechanických vlastností se při přípravě scaffoldů může kolagen kombinovat s dalšími polymery. [30, 31]

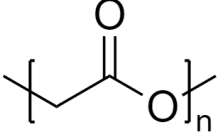
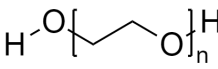
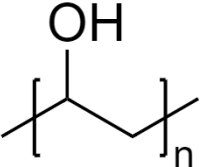
Želatina	Želatina je produktem denaturace nebo částečné alkalické či kyselé hydrolýzy kolagenu typu I. Výsledné vlastnosti želatiny závisí na způsobu přípravy a zdroji výchozího kolagenu. Použití želatiny je omezené v důsledku její značné rychlosti biodegradace, která je mimo jiné způsobená vysokou rozpustností za fyziologických podmínek. To má spojitost i se zhoršenými mechanickými vlastnostmi želatiny oproti kolagenu. Vysoké rychlosti degradace mohou působit problémy při regeneraci tkáně, jelikož rychlosti degradace materiálu a rychlosti novotvorby tkáně nemusejí odpovídat. Díky přítomnosti funkčních skupin ve struktuře želatiny je možná její chemická stabilizace, která může vést ke snížení degradačních rychlostí. [31]
----------	---

1.4.2 Syntetické polymery

Syntetické polymery mají oproti přírodním řadu výhod, mezi které patří například snadná syntéza i v rozsáhlém měřítku, lepší a snadněji modifikovatelné mechanické vlastnosti či možnosti řízení degradačních rychlostí. Způsob výroby syntetických polymerů umožňuje zachování jejich vlastností i v rámci různých šarží. Vlastnosti materiálů připravených ze syntetických polymerů jsou tak mnohem lépe reprodukovatelné [30, 32]. Na rozdíl od přírodních polymerů však nemají ve svých strukturách místa vhodná pro specifickou adhezi buněk, a vyžadují tak více chemických modifikací, které zlepší jejich biologické vlastnosti [31]. Příklady syntetických polymerů jsou v tabulce 1.2.

Tabulka 1.2: Syntetické polymery používané pro přípravu nanovláčkových materiálů.

Polymer	Charakteristika
Polykaprolakton 	Polykaprolakton (PCL) je biokompatibilní, biodegradabilní a biologicky vstřebatelný hydrofobní polyester, který se poměrně hojně využívá v TI. Za fyziologických podmínek k degradaci dochází hydrolýzou esterových vazeb a časy biodegradace jsou relativně dlouhé, v řádu jednotek let. Zvýšení biologické aktivity PCL se provádí povrchovou funkcionalizací, kopolymerizací či tvorbou směsí s dalšími polymery. [31, 33]
Kyselina polymléčná 	Polymléčná kyselina (PLA) je polyester s obdobnými charakteristikami jako PCL. Je široce používaná v lékařství např. ve formě vstřebatelných implantátů (šrouby, čepy). Použití nachází také v TI. PLA má kratší časy degradace oproti PCL, avšak tyto časy jsou stále poměrně dlouhé v porovnání s ostatními materiály používanými v TI. [29, 33]

<p>Kyselina polyglykolová</p> 	<p>Polyglykolová kyselina (PGA) je dalším příkladem polyestru. Produkty degradace PGA, stejně jako produkty degradace PLA, jsou odbourávány přirozenými metabolickými cestami, jelikož kyselina glykolová i kyselina mléčná jsou běžné metabolity. Vysoké hladiny kyseliny glykolové však stimuluje nadměrnou zánětlivou reakci. [30, 31]</p> <p>Vzhledem k pravidelné struktuře řetězců mívá PGA vysoký stupeň krystalinity. Díky chybějící methylové skupině je PGA hydrofilnějším polymerem v porovnání s PLA, což má za následek i kratší degradační časy v řádu jednotek týdnů. [34]</p>
<p>Polyethylenglykol</p> 	<p>Polyethylenglykol (PEG) je inertní, biokompatibilní, hydrofilní, ve vodě rozpustný polyether s nízkou adhezivitou pro buňky a nízkou schopností vázat proteiny. PEG má rovněž minimální schopnost vyvolávat imunitní reakce. [31]</p> <p>V tkáňovém inženýrství se obvykle využívá ve formě hydrogelů, což vyžaduje jeho síťování. Příprava nanovláčkových materiálů je však také možná. Vlastnosti PEG scaffoldu závisí mimo jiné na molekulové hmotnosti či stupni síťování polymeru. [30]</p>
<p>Polyvinylalkohol</p> 	<p>Polyvinylalkohol (PVA) je biokompatibilní, netoxický, nekarcinogenní polymer s dobrou schopností přilnout na biologický povrch. Stejně jako v případě PEG se jedná o vodorozpustný polymer. Vzhledem k tématu práce je o PVA blíže pojednáváno v následující kapitole. [33]</p>

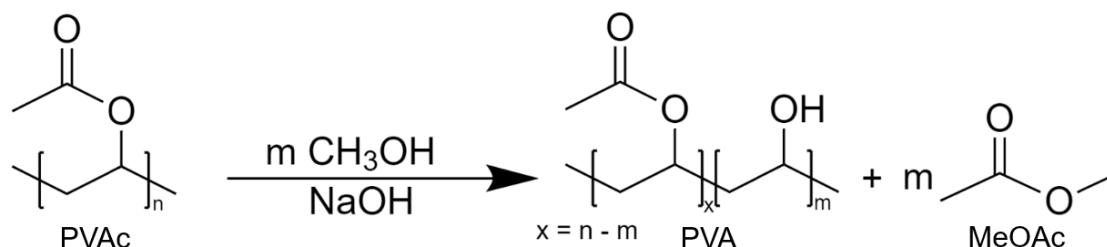
1.4.3 Polymery rozpustné ve vodě

Vodorozpustné polymery mohou být původu přírodního (hyaluronová kyselina, želatina) i syntetického (PEG, PVA). Zpravidla jsou využívány ve formě hydrogelů, ale vhodné jsou i pro přípravu nanovláčkových materiálů. Díky rozpustnosti ve vodě může zvláknování probíhat z vodného roztoku polymeru. To je zvláště výhodné v případě funkcionalizace nanovláčkového materiálu pomocí biologicky aktivních látek, které v nevodných prostředích ztrácejí svou aktivitu. Hydrofilita připravených materiálů však způsobuje, že při kontaktu s vodným prostředím dochází k jejich rychlému rozpouštění, a tedy rychlému uvolnění inkorporovaných látek. Proto se tyto materiály zpravidla podrobují stabilizacím (viz kapitola 3), jejichž výsledkem je snížení rozpustnosti. [11]

Polyvinylalkohol

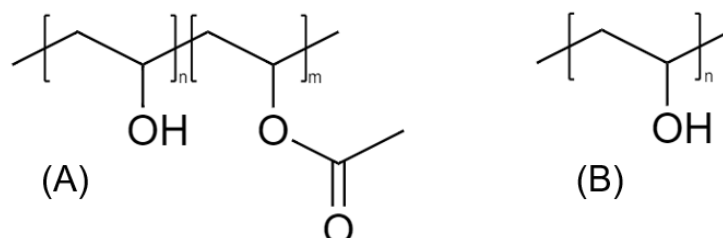
Polyvinylalkohol je průsvitný, bílý nebo krémově zbarvený granulární prášek bez chuti a zápachu. Poprvé byl připravený Hermannem a Haehnelem v roce 1924. Je

rozpustný ve vodě a slabě rozpustný v ethanolu. V nepolárních rozpouštědlech rozpustný není. Komerčně se PVA vyrábí alkoholýzou polyvinylacetátu (PVAc) v přítomnosti alkoholu (např. methanolu) a alkalického katalyzátoru (např. hydroxidu sodného). Během této reakce dochází k nahrazování acetátových skupin za hydroxylové (viz obrázek 1.4). [35]



Obrázek 1.4: Alkalická alkoholýza polyvinylacetátu (PVAc) za vzniku částečně hydrolyzovaného polyvinylalkoholu (PVA) a methyl-acetátu (MeOAc)

Během alkoholýzy (resp. hydrolyzy) může dojít k nahrazení všech acetátových skupin, pak se hovoří o plně hydrolyzovaném PVA. V případě, že jsou po hydrolyze ve struktuře přítomny reziduální acetátové skupiny, jde o tzv. částečně hydrolyzovaný PVA (viz obrázek 1.5). Stupeň hydrolyzy pak vyjadřuje procentuální poměr hydrolyzovaných skupin vůči acetátovým skupinám přítomným v původním PVAc. Teplota skelného přechodu PVA je $T_g = 85 \text{ }^\circ\text{C}$ a teplota tání je $T_m = 230 \text{ }^\circ\text{C}$. Molekulová hmotnost komerčně dostupných produktů bývá v rozmezí od 30 000 do 200 000 g/mol. [35]



Obrázek 1.5: Strukturální vzorce (A) částečně hydrolyzovaného PVA a (B) plně hydrolyzovaného PVA

Mechanické vlastnosti PVA závisí na stupni hydrolyzy a molekulové hmotnosti. Tyto charakteristiky rovněž ovlivňují krystalinitu polymeru. Obsah krystalické fáze roste s rostoucím stupněm hydrolyzy. Hydroxylové skupiny jsou menší než skupiny acetátové, a tedy se snadněji skládají do kompaktní krystalické struktury. Rovněž jsou zdrojem ne vazebných interakcí – vodíkových můstků, které udržují krystalickou fázi polymeru. Naopak s rostoucí molekulovou hmotností stupeň krystalinity vlivem snížené mobility řetězců klesá. [36]

Krystalinita, a tím tedy i stupeň hydrolyzy, mají vliv na rozpustnost PVA. Polymery s nižším stupněm hydrolyzy vykazují vyšší rozpustnost při nízkých teplotách, jelikož zbytkové acetátové skupiny zeslabují vodíkové můstky od hydroxylových skupin. S rostoucím obsahem krystalické fáze se materiál stává méně rozpustným, protože molekuly rozpouštědla hůře penetrují do těsně uspořádané krystalické struktury. Polymer se totiž zcela nerozpustí, dokud nedojde k rozrušení krystalové struktury, tedy dokud se nerozpustí krystalická fáze. Rozpouštění zahrnuje výměnu interakcí polymer-polymer za interakce polymer-rozpouštědlo. S rostoucí molekulovou hmotností rozpustnost PVA klesá z důvodu vzniku zapletenin mezi řetězci polymeru. [35, 37]

PVA je netoxický a nekarcinogenní. Proto se hojně využívá v potravinářském a farmaceutickém průmyslu, kde slouží jako pojivo či obalový materiál. Navíc dokáže bránit vstupu vlhkosti do jídla či léků a zároveň dokáže maskovat jejich chuť i zápach. Díky své biokompatibilitě se rovněž používá pro pokročilé biomedicínské aplikace, jako jsou nosiče pro cílenou dopravu léčiv či příprava scaffoldů v TI [35]. Pro tyto účely se často využívá ve formě hydrogelů, což vyžaduje síťování PVA chemickými či fyzikálními metodami [37]. PVA se v TI využívá rovněž ve formě nanovláken, připravených zpravidla pomocí elektrického zvlákňování (viz kapitola 1.5.1). Nespornou výhodou PVA je možnost přípravy nanovláken z vodného roztoku. Nanovláčenné scaffoldy založené na PVA prokázaly značný potenciál pro aplikace v mnoha odvětvích TI, například kostí, kůže, chrupavek a mnoho dalších [38]. Vzhledem k rozpustnosti PVA ve vodě je nutné připravená nanovláčna stabilizovat některou z dostupných metod uvedených v kapitole 3.

1.5 Metody přípravy nanovláken

Existuje řada způsobů přípravy nanovláken. Mezi tři časté metody patří samoorganizace (self-assembly), fázová separace (phase separation) a elektrické zvlákňování (electrospinning). Každá z metod má své možnosti, výhody a nevýhody. [39]

- **Samoorganizace makromolekul** je samovolná asociace makromolekul do stabilních nadmolekulárních struktur, zprostředkovaná nevazebnými interakcemi, jako jsou vodíkové můstky, van der Waalsovy, elektrostatické či hydrofobní interakce. V přírodě jsou takto vzniklé molekuly s velmi dobře definovanou strukturou všudypřítomné. Metoda umožňuje přípravu vláken s menšími průměry, než je tomu v případě elektrického zvlákňování. Na druhou stranu mají takto připravené scaffoldy nízkou pórovitost a poměrně špatné mechanické vlastnosti. Metoda samoorganizace je komplikovaný proces s nízkou produktivitou a relativně vysokou cenou. [32, 40]
- **Fázová separace** je víceřadový proces přípravy nanovláken. Daný polymer je rozpuštěn ve vhodném rozpouštědle. Za určitých podmínek se vzniklý roztok polymeru stává termodynamicky nestabilním a rozdělí se na dvě fáze – fázi s vysokým obsahem polymeru a fázi s nízkým obsahem polymeru. Po extrakci

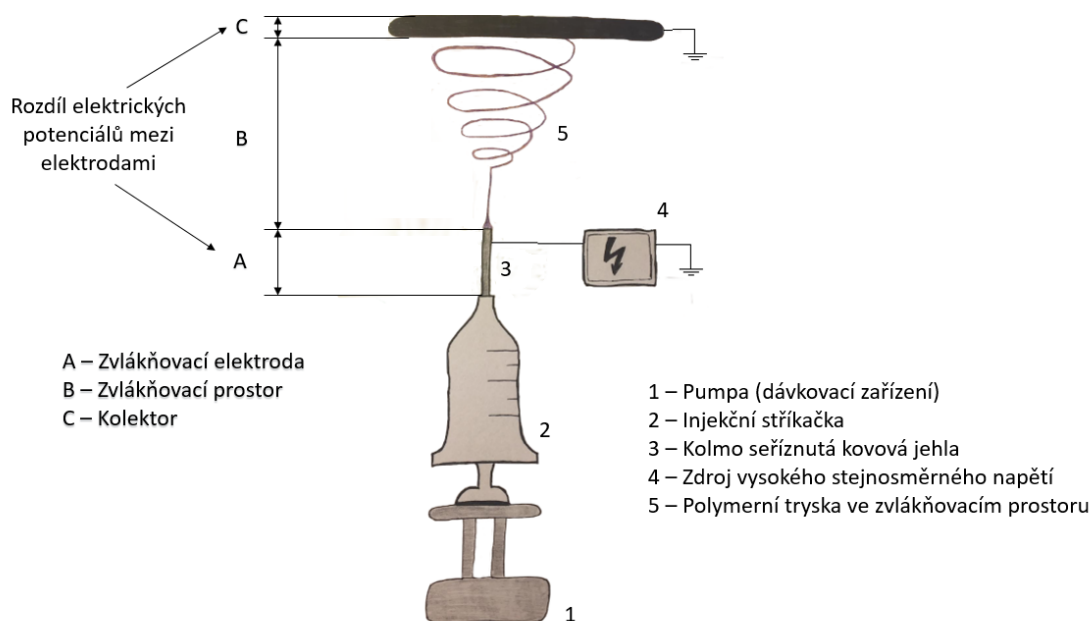
rozpuštědla a odstranění fáze s nízkým obsahem polymeru fáze bohatá na polymer ztuhne. Výsledná struktura závisí na zvoleném systému polymer-rozpuštědlo a podmínkách fázové separace. [39]

Oproti ostatním metodám má materiál připravený pomocí fázové separace mnohem vyšší poměr povrchu k objemu s porozitou přes 98 % a průměrem vláken od 50 do 500 nm [40]. Výhody této metody jsou jednoduchost a nízká cena. Mezi nevýhody patří dlouhé procesní časy, produkce omezená pouze na laboratorní měřítko a limitovaný výběr vhodných polymerů [32].

- **Elektrické zvlákňování** je metoda, která k přípravě nanovláken využívá silného elektrického pole, které vzniká v důsledku vysokého elektrického napětí aplikovaného při zvlákňování. Působením elektrického pole na roztok či taveninu polymeru dochází k indukci náboje na povrchu kapaliny. Elektrické síly vzniklé odpuzováním indukovaných nábojů působí proti soudržným kapilárním silám povrchového napětí. Ve chvíli, kdy intenzita elektrického pole dosáhne kritické hodnoty, při které odpuzivé elektrické síly překonají síly povrchového napětí, dochází k vymrštění polymerní trysky z povrchu kapaliny. Pohybem trysky ve vzduchu dochází k odpaření rozpuštědla či ztuhnutí taveniny a vznikají tak nabitá polymerní vlákna. Díky tomu je možné ovlivňovat trajektorii vzniklých vláken elektrickým polem a ukládat je na kolektor ve formě netkané textilie. Průměr takto připravených vláken je v rozmezí 40–2 000 nm. [41, 42] Mezi hlavní výhody elektrického zvlákňování patří poměrně jednoduchá proveditelnost, široká škála použitelných materiálů, možnost inkorporace biologicky aktivních látek a v neposlední řadě také cenově výhodná vysoká produkční schopnost [43]. Elektrické zvlákňování je možné provádět jak s použitím stejnosměrného elektrického napětí (stejnosměrné elektrické zvlákňování), tak s použitím střídavého elektrického napětí (střídavé elektrické zvlákňování) [11]. Vzhledem k experimentální části této práce je blíže popsáno stejnosměrné zvlákňování.

1.5.1 Stejnosměrné elektrické zvlákňování

Elektrické zvlákňování stejnosměrným elektrickým napětím je v současné době nejrozšířenějším způsobem výroby polymerních nanovláken. Vyžaduje přítomnost dvou aktivních elektrod, mezi kterými je nastaven potenciálový spád. První z nich je zvlákňovací elektroda, na kterou je přiváděna zvlákňovaná kapalina. Druhá funguje jako protielektroda zachytávající vzniklá nanovlákna a nazývá se kolektor. Obě elektrody vymezují zvlákňovací prostor, kam vstupují trysky kapaliny ze zvlákňovací elektrody. V případě tzv. jehlového zvlákňování je zvlákňovací elektrodou trubice malého vnitřního průměru (kapilára), kterou je vedena zvlákňovaná kapalina ke zvlákňovacímu prostoru. Jednoduchým příkladem takové zvlákňovací elektrody je injekční kovová jehla seříznutá kolmo k její ose. Schéma jednoduché aparatury pro jehlové zvlákňování je na obrázku 1.6. [11]



Obrázek 1.6: Schéma aparatury pro jehlové zvlákňování; inspirováno dle [11]

Nevýhodou jehlového zvlákňování je, že každá kapilára generuje pouze jednu polymerní trysku, což má za následek omezenou efektivitu této metody. Jedním z přístupů ke zvýšení produkce nanovláken při elektrickém zvlákňování je zvýšení počtu jehel (kapilár). Tento přístup však vyžaduje velké pracovní prostory a pečlivé rozmístění jednotlivých jehel, aby nedocházelo k nerovnoměrnému ukládání vláken na kolektoru vlivem odpuzivých sil mezi stejně nabitými sousedními jehlami a polymerními tryskami. Bezjehlové zvlákňování představuje výrazně produktivnější alternativu k vícejehlovým uspořádáním. Řadu polymerních trysek je totiž možné generovat i z otevřeného povrchu kapaliny [44]. Toho využívá i technologie NanospiderTM vyvinutá společností Elmarco, kde je polymerní roztok nanášen na tenkou kovovou strunu, odkud je generováno mnoho trysek najednou. [45]

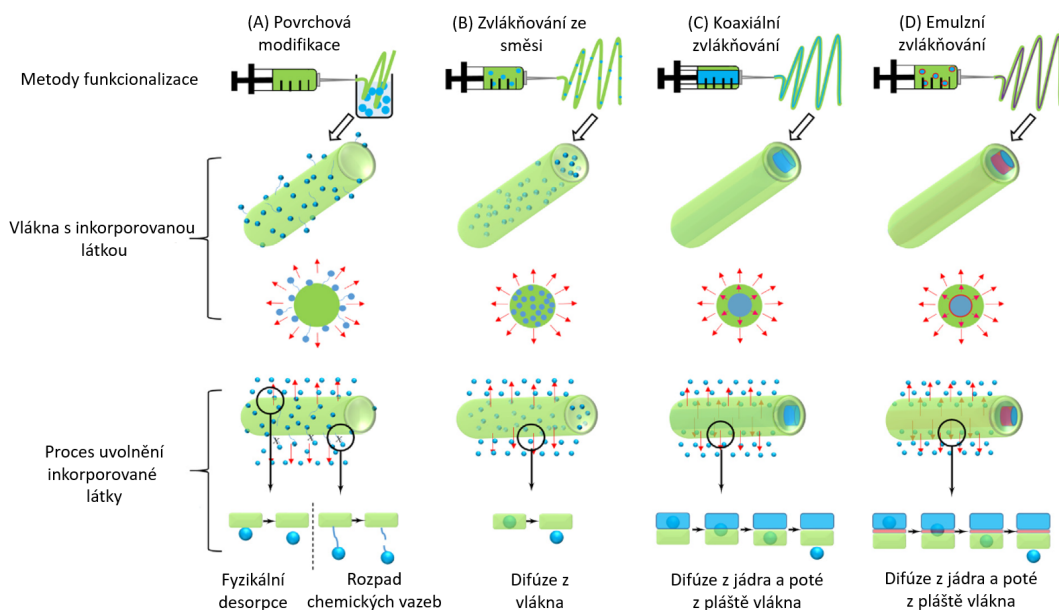
Výsledná struktura materiálu je ovlivněná celou řadou parametrů, které se dělí zpravidla do dvou kategorií. První kategorií jsou procesní parametry, kam typicky patří velikost přiloženého napětí, vzdálenost mezi zvlákňovací elektrodou a kolektorem, typ kolektoru, případně vlastnosti podkladového materiálu, na který jsou vznikající vlákna zachytávána. Mezi procesní parametry se často řadí i parametry okolního prostředí, tedy teplota a relativní vlhkost v průběhu zvlákňování. Druhá kategorie shrnuje parametry materiálové, tedy parametry zvlákňované kapaliny. Důležitým materiálovým parametrem je viskozita, která je v blízkém vztahu s koncentrací polymerního roztoku a molekulovou hmotností zvoleného polymeru v roztoku nebo tavenině. Dále se do této kategorie řadí povrchové napětí a elektrická vodivost zvlákňované kapaliny. V případě zvlákňování z roztoku hraje roli i těkavost použitého rozpouštědla. [11, 43]

2 Funkcionalizace nanovláknenných materiálů

Funkcionalizace nanovláknenných materiálů pro aplikace v TI má za cíl zvýšení účasti materiálu na procesu regenerace tkání. Aktivními látkami používanými pro funkcionalizaci mohou být léčiva či látky podporující hojení a regeneraci tkání. Mohou to být antibiotika, antiseptika, protizánětlivé látky, protinádorová léčiva, ale i organismu vlastní biomolekuly, jako jsou peptidy, proteiny či nukleové kyseliny. V případě kožního TI je značnou výhodou přímý kontakt mezi funkcionalizovaným materiálem a tkání, čímž se omezuje možnost vzniku vedlejších systémových účinků léčiv. Účinné látky mohou být jednak poutány na povrch materiálu, nebo inkorporovány do struktury nanovláken. [28]

Funkcionalizace povrchu materiálu může probíhat buď fyzikální adsorpcí, nebo chemickým vázáním na povrch nanovláken. Metody fyzikální adsorpce jsou šetrnější vůči aktivním látkám v porovnání s metodami inkorporace látek do struktury nanovláken, které jsou zpravidla prováděny speciálními postupy elektrického zvlákňování. V průběhu elektrického zvlákňování jsou totiž aplikovány poměrně náročné podmínky, které mohou snižovat aktivitu inkorporovaných látek. [46]

- **Fyzikální adsorpce** je zprostředkována nevazebnými interakcemi. Díky vysokému poměru povrchu k objemu nanovláken může být na jejich povrch sorbováno značné množství aktivní látky. Při využití této metody funkcionalizace dochází k rychlému uvolňování látek z povrchu materiálu, což umožňuje snadnou kontrolu nad krátkodobým dávkováním specifických léčiv při speciálních aplikacích, jako je prevence bakteriální infekce vyskytující se v rámci několika hodin po operaci. Kromě prosté fyzikální adsorpce látky na povrch materiálu existují i speciální metody adsorpce, které umožňují vznik unikátních profilů uvolňování aktivních látek. [46]
- **Chemické vázání** aktivních látek vyžaduje přítomnost reaktivních funkčních skupin na povrchu nanovláknenného materiálu, aby mohlo dojít ke vzniku kovalentní vazby mezi funkcionalizovaným materiálem a aktivní látkou. Vhodné chemické skupiny mohou být na povrch materiálu zavedeny například plazmovými modifikacemi povrchu nebo částečnou hydrolýzou materiálu. V TI je chemické vázání preferováno před fyzikální adsorpcí, jelikož kovalentně vázané molekuly nemohou z povrchu nanovláken snadno unikat, jako je tomu v případě prosté adsorpce. Na druhou stranu však může vlivem kovalentní modifikace docházet k částečné inaktivaci účinných látek. Kovalentní vázání



Obrázek 2.1: Funkcionalizace a uvolňování aktivních látek z nanovláken připravených (A) povrchovou modifikací, (B) zvlákňováním ze směsi, (C) koaxiálním zvlákňováním a (D) emulzním zvlákňováním; převzato a upraveno podle [47]

nemusí probíhat přímo mezi povrchem materiálu a aktivní látkou, ale může být zprostředkováno další molekulou (tzv. „linker“) s vhodnými funkčními skupinami. [46]

Inkorporace aktivních látek do struktury nanovláken zpravidla probíhá speciálními metodami elektrického zvlákňování, kam patří zvlákňování ze směsi, koaxiální zvlákňování a emulzní zvlákňování. Tyto postupy jsou vyvinuty za účelem lepšího řízení uvolňování aktivních látek v porovnání s povrchovými úpravami, čehož je využíváno u aplikací, které vyžadují působení těchto látek po určitou dobu. [47]

- **Elektrické zvlákňování ze směsi** využívá přímého rozpuštění aktivní látky v roztoku polymeru před samotným procesem elektrického zvlákňování. Během elektrického zvlákňování je aktivní látka enkapsulována do struktury nanovláken. Pro dobrou účinnost enkapsulace, homogenní distribuci a vhodnou kinetiku uvolňování látky je nezbytné, aby polymer a účinná látka vykazovaly podobnou rozpustnost v jejich společném rozpouštědle. Špatná rozpustnost aktivních látek v použitém rozpouštědle může mít za následek jejich nerovnoměrnou distribuci ve vzniklém materiálu. Navíc může docházet k migraci těchto látek směrem k povrchu vláken, což může v konečném důsledku způsobit nežádoucí rychlé počáteční uvolňování (tzv. „burst release“). [47]
- **Koaxiální elektrické zvlákňování** je metoda vyžadující speciální experimentální uspořádání, konkrétně přítomnost tzv. koaxiálních kapilár, které umožňují současný přívod dvojice roztoků (vnitřního a vnějšího) ke hrotu kapiláry a jejich společné zvlákňování. Vnitřní roztok obsahující aktivní látky

je v procesu koaxiálního zvlákňování obalen polymerem, který byl rozpuštěn ve vnějším roztoku. Výsledkem je příprava dvouvrstvých nanovláken se strukturou jádro-plášť. Takové uspořádání způsobuje, že polymerní plášť chrání inkorporované látky před vnějšími vlivy a zachovává tak jejich aktivitu. Uspořádání jádro-plášť je efektivní metodou jak řešit problém s rychlým počátečním uvolňováním. Aktivní látky tak mohou být uvolňovány po delší dobu ve srovnání se zvlákňováním ze směsi. Změnou tloušťky a složení pláště je možné ovlivňovat doby difúze aktivních látek z materiálu. [47, 48]

- **Emulzní elektrické zvlákňování** rovněž umožňuje přípravu nanovláken se strukturou jádro-plášť. Na rozdíl od koaxiálního elektrického zvlákňování však nevyžaduje speciální uspořádání zvlákňovací aparatury. Při této metodě většinou dochází k rozpuštění hydrofilních aktivních látek ve vodě a tento vodný roztok je přidán k roztoku polymeru v nepolárním organickém rozpouštědle, čímž dojde k vytvoření emulze. Během zvlákňování z této emulze dochází k zapouzdření roztoku aktivních látek do struktury vznikajících nanovláken. Vnější polymerní vrstva opět slouží jako bariéra pro difúzi inkorporovaných látek, a dochází tak k delším časům uvolňování v porovnání se zvlákňováním ze směsi. Další nespornou výhodou emulzního elektrického zvlákňování je, že metoda nevyžaduje společné rozpouštědlo pro aktivní látku i polymer, jako tomu je v případě zvlákňování ze směsi. Tím pádem nedochází ke kontaktu aktivních látek a organických rozpouštědel, což by jinak mohlo mít za následek ztrátu jejich funkce. Je tedy možné společně zvláknit polymery a aktivní látky s dramaticky odlišnými rozpustnostmi v polárních, resp. nepolárních rozpouštědlech. [47, 49]

2.1 Antimikrobiální látky užívané k funkcionalizaci nanovlákných materiálů

Pro své unikátní vlastnosti popsané v kapitole 1.3.1 jsou nanovláknenné materiály vhodnými materiály k přípravě krytů kožních ran. Jejich vlastnosti mohou být dále vylepšeny funkcionalizací pomocí biologicky aktivních látek, které příznivě ovlivňují hojení ran. Jednou skupinou těchto aktivních látek jsou látky s antimikrobiálními účinky zamezující vzniku infekce v ráně, která by jinak zhoršovala proces hojení. Níže jsou uvedeny příklady látek s antimikrobiálními účinky využívané k funkcionalizaci nanovláken. [50]

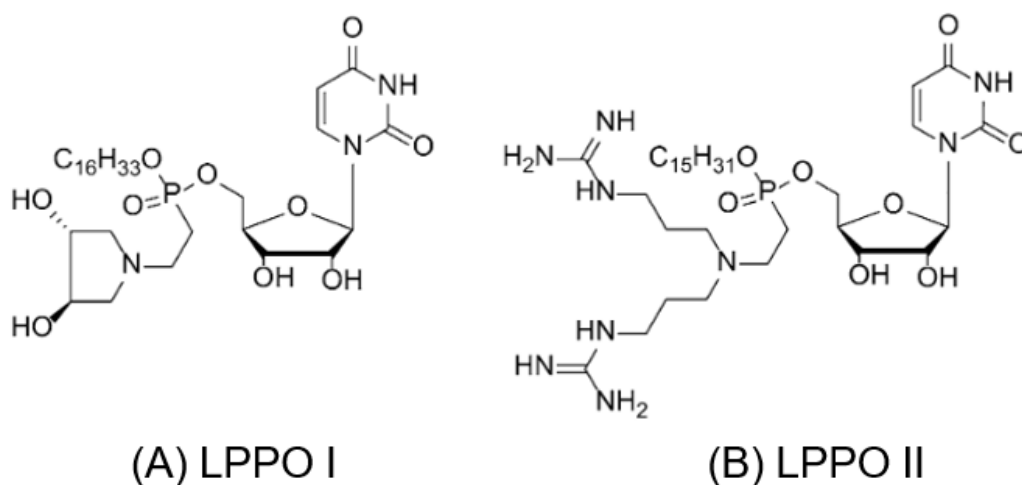
- **Antibiotika** se v klinice podávají nejčastěji orální cestou. Tento přístup s sebou nese určité nevýhody, jako je rychlá eliminace z krevního oběhu, degradace či tenká hranice mezi léčebnou a toxickou dávkou těchto látek. Proto jsou studovány možnosti topických aplikací antibiotik jejich inkorporací do krytů ran. Antibiotika, jako například gentamycin či tetracyklin, byla použita pro funkcionalizaci elektrostaticky zvlákněných nanovláknenných membrán za účelem vytvoření aseptického prostředí v ráně a také za účelem podpory regenerace poškozené tkáně. [51]

Ačkoliv jsou antibiotika stále velmi rozšířenou metodou léčby bakteriálních infekcí, jejich široké užívání vedlo ke vzniku multirezistentních bakteriálních kmenů. Přestože existuje více typů antibiotik s různými mechanismy účinku, bakterie jsou schopné si vyvinout rezistence vůči všem mechanismům účinku hlavních skupin antibiotik. Proto jsou intenzivně studovány další látky s antimikrobiálními účinky, které by mohly sloužit jako alternativa k antibiotikům. [52]

- **Nanočástice kovů** představují zajímavou alternativu k antibiotikům. Ačkoliv se v této souvislosti nejvíce probírají nanočástice stříbra, další kovy, jako je zlato, měď, zinek a jim příslušné oxidy, jsou rovněž studovány. Mechanismů antimikrobiálního účinku kovových nanočástic existuje více a při jejich aplikaci pravděpodobně dochází k simultánnímu působení více těchto mechanismů. Vzhledem k různorodosti mechanismů účinku se zdá být vznik rezistence vůči působení nanočástic velmi nepravděpodobný. Navzdory těmto slibným vlastnostem existují určité problémy spojené s využitím kovových nanočástic, které brání jejich širokému klinickému použití. Mechanismy antibakteriálního účinku nejsou ještě zcela popsány. Rovněž údaje týkající se toxicity kovových nanočástic a jejich dlouhodobé interakce s lidským organismem nejsou dostatečné. Je tedy nutná důkladná analýza, která by posloužila k vyhodnocení biologické bezpečnosti kovových nanočástic. [51, 53]
- **Přírodní extrakty** jsou dobrými kandidáty pro překonání omezení spojených s používáním antibiotik a nanočástic kovů. Široká škála takových přírodních produktů byla použita pro funkcionalizaci nanovláknenných materiálů. Jako potenciální zdroje nových antimikrobiálních sloučenin se objevily esenciální oleje například ze skořice, voňatky citronové či máty peprné. Antimikrobiální účinky, které vykazují esenciální oleje, se připisují především přítomnosti aktivních složek, jako jsou terpeny, terpenoidy a další aromatické a alifatické sloučeniny. [51]
- **Antimikrobiální peptidy** jsou nízkomolekulární látky složené z 5–100 aminokyselin. Díky přebytku lysinu, argininu a histidinu bývají kladně nabitě. Většina antimikrobiálních peptidů je amfifilní, což jim umožňuje efektivně interagovat s biologickými membránami. Antimikrobiální peptidy tvoří nedílnou součást vrozeného imunitního systému, který funguje jako obranný mechanismus u většiny organismů včetně rostlin, hmyzu, bakterií, obratlovců a člověka. Přestože jsou známy již mnoho let, jejich role v imunitní odpovědi savců byla zpočátku opomíjena nebo nedoceněna. Tyto přírodní a syntetické peptidy poskytují nespecifickou obranu proti širokému spektru patogenů jako jsou bakterie, plísňe a některé viry. Typicky jsou jejich zdrojem rostliny či savci, ale možná je i jejich umělá chemická syntéza (viz následující kapitola). [54]

2.1.1 Lipofosfonoxiny

Syntetická antimikrobiální peptidomimetika, tedy syntetické napodobeniny antimikrobiálních peptidů, představují zajímavou skupinu látek, které lze využít jako alternativu k antibiotikům. Jedním z typů nebílkovinných syntetických antimikrobiálních peptidomimetik jsou lipofosfonoxiny (LPPO). LPPO vykazují významnou antibakteriální aktivitu vůči širokému spektru bakterií, včetně multirezistentních kmenů, zatímco na eukaryotické buňky nemají v baktericidních koncentracích žádné cytotoxické účinky. LPPO působí prostřednictvím permeabilizace cytoplazmatické membrány, což nakonec vede ke ztrátě její funkce a buněčné smrti. První generace (LPPO I) vykazovala antimikrobiální účinky pouze proti grampozitivním bakteriím. Druhá generace (LPPO II) však vykazuje antimikrobiální aktivitu vůči širokému spektru grampozitivních i gramnegativních bakterií. Vzorce zástupců obou generací LPPO jsou na obrázku 2.2. [55]



Obrázek 2.2: Strukturální vzorce zástupců první (LPPO I) a druhé (LPPO II) generace lipofosfonoxinů; převzato a upraveno podle [55]

Ve studii Do Pham et al. [56] byla druhá generace LPPO využita pro přípravu aktivních nanovlákných kožních krytů založených na PCL. Uvolňovaný LPPO vykazoval antibakteriální účinky, aniž by docházelo k narušení proliferace a diferenciace fibroblastů a keratinocytů. Materiál tedy vykazuje značný potenciál pro klinické aplikace v léčbě kožních poranění. Analogicky k této studii je vyvíjen obdobný nanovlákný materiál, který je založený na PVA. Tato bakalářská práce je součástí výzkumu zabývajícího se vývojem tohoto materiálu.

2.2 Mechanismy uvolňování inkorporovaných látek

Mechanismus uvolňování aktivních látek z nanovláken může být popsán především desorpce z povrchu, difuzí skrze nanovláknina a degradací nanovláken. Všechny

tři mechanismy uvolňování mohou působit současně a významně tak ovlivňovat kinetiku uvolňování léčiva po celou dobu uvolňování. Výsledný profil uvolňování je nakonec určen jistou rovnováhou mezi jednotlivými mechanismy a je korelován s odpovídajícími technikami funkcionalizace nanovláken a výběrem polymeru. [47]

- **Desorpce** je počátečním mechanismem uvolňování aktivních látek při vložení funkcionalizovaného materiálu do vodného prostředí. Mechanismus není omezen pouze na látky přilnuté k vnějšímu povrchu nanovláken, ale zahrnuje také uvolňování z vnitřního povrchu nanopórů uvnitř vláken. Desorpce vede k relativně rychlému uvolnění („burst release“) navázaných látek, tudíž tento mechanismus není považován jako vhodný pro řízené uvolňování aktivních látek z materiálu. [47]
- **Difúze** aktivních látek skrze kanálky a póry nanovláken je mechanismus závislý na koncentračním gradientu mezi prostředím uvnitř nanovláken a vnějším prostředím, míře difuzivity aktivních látek v rámci polymerní matrice a na cestě difúze. Při použití zvlákňování ze směsi je rychlost difúze závislá především na koncentračním gradientu mezi polymerní matricí a vnějším prostředím, což opět vede k rychlému počátečnímu uvolňování. Tento jev lze zmírnit vytvořením bariérové vrstvy mezi aktivními látkami a vnější vodnou fází, použitím speciálních postupů, jako je koaxiální či emulzní elektrické zvlákňování. Při takovém uspořádání je možné dosáhnout téměř konstantního koncentračního gradientu, pokud je rychlost přenosu přes bariéru dostatečně nízká ve srovnání s množstvím aktivních látek a rychlostí jejich uvolňování mimo bariéru. Je tak možné dosáhnout téměř konstantních rychlostí uvolňování. Ke zvýšení doby uvolňování dochází i prodloužením difúzních cest. [47, 57]
- **Degradace** nanovláken významně ovlivňuje rychlosti uvolňování aktivních látek, a to bez ohledu na zvoleném způsobu přípravy těchto nanovláken. U většiny nerozložitelných polymerů je rychlost uvolňování spjata pouze difúzní vzdáleností přes polymer nebo přes póry způsobené sorpcí vody. Při použití biodegradabilních polymerů však mohou být aktivní látky uvolňovány do okolního prostředí prostřednictvím prostorů vytvořených degradačními vlákny. To je výraznější u rychle degradujících polymerů. [47]

Rychlost uvolňování aktivních látek není závislá pouze na výběru polymeru a způsobu přípravy funkcionalizovaného nanovláčenného materiálu. Značný vliv mohou mít rovněž charakteristiky použitých aktivních látek, jako je například jejich molekulová hmotnost nebo typ a síla interakcí vznikajících mezi polymerem a aktivními látkami. [58]

3 Metody stabilizace scaffoldů

Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.4.3, zásadní výhoda použití ve vodě rozpustných polymerů k přípravě funkcionalizovaných nanovlákných scaffoldů pro TI tkví v možnosti přípravy nanovláken z vodných roztoků, ve kterých použité aktivní látky neztrácejí své biologické funkce. Na druhou stranu, scaffoldy připravené z vodorozpustných polymerů vykazují nízkou stabilitu ve vodných prostředích, a je proto nutné takové scaffoldy stabilizovat pomocí některé z dostupných metod. Stabilizace zpravidla vyvolává síťování polymeru, které snižuje rychlost rozpouštění výsledného materiálu. Dodatečné síťování však může mít negativní vliv na aktivitu inkorporovaných látek či způsobovat cytotoxicitu samotného materiálu. Kromě rozpustnosti je možné síťováním ovlivňovat další vlastnosti scaffoldů, jako jsou například rychlosti degradace nebo mechanické vlastnosti. Zpravidla se metody stabilizace dělí do dvou základních skupin, a sice na chemické metody a fyzikální metody. [59, 60]

3.1 Chemické metody

Chemické metody stabilizace využívají chemických látek, tzv. síťovacích činidel. Síťovací činidla typicky reagují přímo s vhodnými funkčními skupinami ve struktuře polymeru, čímž vznikají kovalentní vazby mezi síťovacím činidlem a polymerem. Dochází tak k propojení jednotlivých řetězců polymeru. Aby k propojení řetězců mohlo dojít, polymer i síťovací činidlo musejí obsahovat vhodné reaktivní skupiny. Síťovací činidla se tímto procesem integrují do struktury výsledného materiálu. Jako síťovací činidla se zpravidla využívají bifunkční aldehydy, isokyanáty nebo některé epoxidy. Velmi hojně využívaným síťovacím činidlem je glutaraldehyd. [60]

Síťovací činidla se však nemusí vždy zabudovávat do struktury stabilizovaného materiálu. Mohou také fungovat jako katalyzátor chemické reakce, při které dochází k přímému propojení řetězců vznikem kovalentních vazeb mezi vhodnými funkčními skupinami ve struktuře polymeru [60]. Příkladem takové stabilizace je kysele katalyzovaný vznik etherových můstků mezi řetězci PVA, s cílem snížit rozpustnost polymeru ve vodě [61].

Další metodou je tzv. fotochemické síťování. V tomto procesu je kovalentní síťování iniciováno působením elektromagnetického záření z viditelné části spektra, případně pomocí ultrafialového záření. Metoda vyžaduje použití speciálních fotosenzitivních síťovacích činidel. [62]

Chemické metody stabilizace nemusejí nutně vést ke vzniku nových kovalentních vazeb, ale mohou materiál stabilizovat prostřednictvím ne vazebných interakcí. Příkladem takového síťování je stabilizace PVA nanovláken pomocí methanolu, který zvyšuje soudržnost řetězců PVA tvorbou vodíkových můstků a dalších mezimolekulárních sil. [63]

V případě chemického síťování scaffoldů pro TI nastává problém v tom, že použitá síťovací činidla bývají často toxická. Představují tedy zdravotní riziko a mohou snižovat biokompatibilitu výsledného scaffoldu. [60]

3.2 Fyzikální metody

Fyzikální metody stabilizace mohou k vyvolání síťování polymeru využívat elektromagnetické záření, svazku elektronů s vysokou energií či působení plazmy. Mezi fyzikální metody se řadí také metody tepelné stabilizace, při kterých je síťování vyvoláno nízkými nebo naopak vysokými teplotami. Hlavní výhodou fyzikálních metod síťování polymerů je, že nevyžadují přidávání potenciálně toxických látek do výsledného materiálu. To je obzvláště důležité při přípravě scaffoldů pro TI, kdy při použití fyzikálních metod stabilizace zpravidla nedochází ke vzniku zdravotního rizika. Na druhou stranu však fyzikální metody obecně vedou k nižšímu stupni síťování, než je tomu v případě metod chemických. [60]

V případě elektromagnetického záření je používáno vysokoenergetické záření gama [60]. Výhodou této metody je, že současně se síťováním může docházet také ke sterilizaci výsledného materiálu. Naopak aplikací gama záření dochází k velké energetické zátěži materiálu, což může způsobit tepelné poškození polymeru a případných inkorporovaných aktivních látek. Kromě elektromagnetického záření je možné síťování vyvolat také působením urychleného svazku elektronů s vysokou energií nebo působením plazmy. [60, 64]

Síťování polymerů může být vyvoláno také působením nízkých, nebo naopak vysokých teplot. Metoda „freeze-thaw“ využívá opakovaného zmrazení materiálu ochlazením pod teplotu 0 °C a následného rozmrazení při teplotách nad 0 °C. Vedle vlastností použitého polymeru závisí míra síťování na faktorech, jako je délka zmrazovací, resp. rozmrazovací fáze, použité teploty pro obě fáze cyklu nebo počet jednotlivých cyklů zmrazení a rozmrazení [65]. Dehydrotermální stabilizace naopak využívá dlouhodobého působení (typicky v řádu dní) zvýšené teploty (nad 100 °C) za velmi nízkých tlaků (pod 100 mTorr), čímž je usnadněno odpařování zbytkového rozpouštědla ze struktury polymeru a je podporován vznik ne vazebných interakcí mezi řetězci polymeru [60].

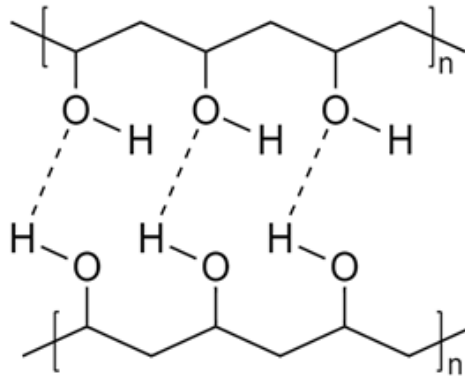
3.2.1 Tepelná stabilizace působením vysokých teplot

Tepelná stabilizace působením vysokých teplot (HT, „heat treatment“) je jednou z fyzikálních metod stabilizace polymerů. V porovnání s dehydrotermální stabilizací je HT zpravidla prováděna při vyšších tlacích a po kratší dobu (typicky v řádu jednotek hodin) [63, 66]. Zahřívání materiálů založených na PVA nad teplotou skelného přechodu PVA (85 °C) vede k jejich stabilizaci. To je spojené se zvýšením obsahu krystalické fáze v materiálu a dalšími případnými změnami ve struktuře PVA, ke kterým dochází v důsledku působení vysokých teplot při HT [66, 67].

Wong, Zinke-Allmang a Wan [66] stabilizovali nanovlákná z PVA za sníženého tlaku (10 Torr) při teplotách 85, 110, 135 a 160 °C po dobu 4 h. Analýza obsahu krystalické fáze prokázala, že se krystalinita PVA zvyšovala s rostoucí teplotou stabilizace z 57 % pro nestabilizovaný vzorek až na 81 % pro vzorek stabilizovaný při 160 °C. Vzrostla také velikost krystalitů z 3,5 nm u nestabilizovaného vzorku až na 6,9 nm pro vzorek stabilizovaný při 160 °C. S vyšší teplotou stabilizace rostla také stabilita vláken ve vodě při pokojové teplotě. Zatímco u materiálů stabilizovaných při 85 a 110 °C došlo k částečnému rozpuštění už po 1 dni, materiály stabilizované při 135 a 160 °C vykazaly stabilitu ve vodě při pokojové teplotě až po dobu 30 dní. O nižší stabilitě vzorků stabilizovaných při teplotách 85 a 110 °C svědčí také fakt, že po 1 dni ve vodě došlo k značnému poklesu průměrů vláken a také snížení hmotnosti o 67 % u vzorku stabilizovaného při 85 °C a o 50 % u vzorku stabilizovaného při 110 °C. U vzorků stabilizovaných při 135 a 160 °C nebyl pokles průměrů vláken ani pokles hmotnosti pozorován. Tepelná stabilizace při 135 °C po dobu 4 h rovněž zvýšila modul pružnosti materiálu o 80 % v porovnání s nestabilizovaným materiálem.

Miraftab, Saifullah a Cay [63] stabilizovali nanovlákná z PVA při teplotách 150 a 180 °C po dobu 30 min a 1, 4 a 8 h. Výsledky provedených analýz prokázaly zvýšení stability materiálů ve vodě po HT. Větší nárůst stability byl pozorován jak s vyššími teplotami, tak s delšími časy stabilizace. Zvýšenou stabilitu materiály vykazaly ve vodě pokojové teploty i ve vroucí vodě. Prodloužení doby stabilizace bylo také spojené s nárůstem krystalinity PVA, a to z 46 % pro vzorek stabilizovaný po dobu 30 min až na 54 % pro vzorek stabilizovaný po dobu 8 h, v obou případech při teplotě 180 °C

S rostoucí teplotou se zvyšuje mobilita řetězců polymeru, což usnadňuje tvorbu krystalické fáze polymeru. Krystalické oblasti slouží jako zdroj silného fyzikálního síťování, které udržuje strukturu materiálu ve vodném prostředí. Krystalická fáze je udržována vodíkovými můstky vznikajícími mezi hydroxylovými skupinami řetězců PVA (viz obrázek 3.1). Stabilita materiálu z PVA ve vodném prostředí tak může být modifikována vhodným výběrem teploty a doby HT. [63]



Obrázek 3.1: Vodíkové můstky vznikající mezi řetězci PVA

Song et al. [68], kteří zahřívají fólie z PVA při teplotách 50, 80, 100, 120 a 130 °C po dobu 2 h, ve své studii uvádějí, že s rostoucí teplotou HT narůstá síla mezimolekulových interakcí mezi řetězci PVA zprostředkovaných vodíkovými můstky. Příprava materiálů z PVA zpravidla probíhá z vodného roztoku polymeru. Ačkoliv se v procesu přípravy výsledného materiálu většinová část rozpouštědla odpaří, zůstávají ve struktuře materiálu určité zbytkové molekuly vody. Tyto molekuly vody interagují se segmenty PVA prostřednictvím vodíkových můstků. Vlivem HT se redukuje počet segmentů PVA s vysokým stupněm hydratace, což umožňuje vznik interakcí přímo mezi řetězci polymeru. Odpaření zbytkových molekul vody vede také ke snížení volného objemu. Zmíněné procesy způsobují, že při následném vložení stabilizovaných folií z PVA do vodného prostředí dochází k nižší absorpci rozpouštědla a snižuje se jejich rozpustnost.

Kromě růstu krystalinity dochází při tepelné stabilizaci také k dehydratační reakci. Při této reakci dochází k eliminaci hydroxylových skupin z řetězců PVA za odštěpování molekul vody a vzniká konjugovaný systém dvojných vazeb. Tento proces je doprovázen změnou zbarvení materiálu z bílé přes žlutou do tmavě oranžové až hnědé [69]. Vznik konjugovaných dvojných vazeb rovněž vede ke snížení rozpustnosti výsledného materiálu. Proces eliminace vody z PVA je s rostoucími teplotami stabilizace více znatelný [61].

4 Materiál a metody

4.1 Použité chemikálie a roztoky

Tabulka 4.1: Seznam použitých chemikálií

Chemikálie	Firma
Zvlákňovací roztoky	
PVA Mowiol: 125 000 g/mol, stupeň hydrolyzy 98–98,8 %	Merck, Německo
Lipofosfonoxin DR6180 (LPPO)	Ústav organické chemie a biochemie AV ČR
Destilovaná voda pro HPLC (dH ₂ O)	VWR International
Ethanol 96 % (C ₂ H ₅ OH)	Penta, Česká republika
Fosfátový pufr (PBS) s 0,02% azidem sodným	
Chlorid sodný (NaCl)	Analytika Praha, s.r.o., Česká republika
Chlorid draselný (KCl)	Analytika Praha, s.r.o., Česká republika
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O)	Analytika Praha, s.r.o., Česká republika
Dihydrogenfosforečnan draselný (KH ₂ PO ₄)	Analytika Praha, s.r.o., Česká republika
Azid sodný (NaN ₃)	Merck, Německo
Kyselina chlorovodíková (HCl)	Penta, Česká republika
pH standardy 4.01; 7.00; 10.01	Hamilton Bonaduz AG, Švýcarsko
Barvení pro spektrofotometrii	
Kyselina trihydrogenboritá (H ₃ BO ₃)	Merck, Německo
Jód (I ₂)	Lachema, Česká republika
Jodid draselný (KI)	Lachema, Česká republika

Tabulka 4.2: Seznam použitých roztoků

Roztok	Složení	
Pufř PBS + 0,02% azid sodný (2000 ml)	dH ₂ O	1800 ml
	NaCl	16 g
	KCl	0,4 g
	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	7,26 g
	KH ₂ PO ₄	0,48 g
	NaN ₃	0,4 g
	Upravit pH roztoku pomocí HCl na hodnotu 7,4. Poté doplnit objem vodou do 2000 ml a přefiltrovat jej přes filtrační papír.	
Zvlákňovací roztok 10% PVA (100 g)	PVA	10 g
	dH ₂ O	81 g
	C ₂ H ₅ OH	9 g
Zvlákňovací roztok 10% PVA + 5% LPPO (50 g)	PVA	5 g
	dH ₂ O	31,25 g
	C ₂ H ₅ OH	4 g
	5% LPPO	5 g
5% LPPO (5 g)	LPPO	0,25 g
	dH ₂ O	4,75 g
Roztok H ₃ BO ₃ 40 g/l (1000 ml)	dH ₂ O	1000 ml
	H ₃ BO ₃	40 g
Roztok I ₂ + KI (1000 ml)	dH ₂ O	1000 ml
	I ₂	12,7 g
	KI	25 g
Barvení PVA pro spektrofotometrii při 10x ředění (jedna jamka mikrotitrační destičky)	dH ₂ O	45 μl
	H ₃ BO ₃ (40 g/l)	187,5 μl
	I ₂ + KI	37,5 μl
	Vzorek PVA	5 μl
Barvení PVA pro spektrofotometrii při 20x ředění (jedna jamka mikrotitrační destičky)	dH ₂ O	47,5 μl
	H ₃ BO ₃ (40 g/l)	187,5 μl
	I ₂ + KI	37,5 μl
	Vzorek PVA	2,5 μl

4.2 Použité přístroje a programy

Tabulka 4.3: Seznam použitých přístrojů a programů

Přístroje a programy		Výrobce
Nanospider TM	NS 1WS500U	Elmarco
Skenovací elektronový mikroskop	Vega 3	TESCAN

Laboratorní váhy	PA224C	OHAUS Corporation
Laboratorní inkubátor	Q-cell 140/40 Basic	POL-LAB
pH metr	FiveEasy Plus	Mettler-Toledo
Přístroj pro nanášení tenké vrstvy zlata	Quorum Q150R S Plus	Quorum Technologies
Lednice	LCv 4010	Liebherr
Spektrofotometr	Spark	Tecan
DSC přístroj	DSC 1/700	Mettler Toledo
Chromatograf	Dionex UltiMate 3000 HPLC	Thermo Scientific
Chromatografická kolona	Supertex 200 In- crease	GE Healthcare
Infračervený spektroskop s Fourierovou transformací	Nicolet iZ10	Thermo Fisher Scientific
Laboratorní sušárna	TCF 120 Plus	Chromservis
Software pro analýzu obrazů	ImageJ	Fiji Contributors
Software pro tvorbu grafů, tabulek	Microsoft Office Standart 2016	Microsoft Corporation
	GraphPad Prism 8.0.1	GraphPad Software
Software pro tvorbu chemických vzorců a rovnic	ChemDraw JS	PerkinElmer

4.3 Použité metody a postupy

Následující podkapitoly obsahují podrobný popis metod a postupů použitých pro přípravu, tepelnou stabilizaci a následnou analýzu funkcionalizovaných nanovláknenných materiálů založených na polyvinylalkoholu. Pokud se v následujícím textu vyskytuje procentuální vyjádření obsahu určité látky v roztoku, vždy se jedná o procenta hmotnostní (hm%).

4.3.1 Příprava nanovláknenných materiálů

Příprava materiálů zahrnovala přípravu polymerních roztoků pro zvlákňování a samotný proces elektrostatického zvlákňování.

Příprava roztoků pro zvlákňování

Ke zvlákňování byly připraveny dva polymerní roztoky. Jeden sloužil pro přípravu nanovláknenného materiálu z polyvinylakoholu (PVA), druhý pro přípravu nanovláknenného materiálu z PVA s obsahem lipofosfonoxinu DR6180 (LPPO).

Použití 10% roztoku PVA v rozpouštědlovém systému voda : ethanol pro přípravu nanovláknenného materiálu bylo zvoleno na základě studie Kopřivové et al. [59] s tím rozdílem, že rozpouštědlový systém voda : ethanol byl upraven na hmotnostní poměr 9 : 1. Příprava 100 g takového roztoku probíhala následovně: k 10 g PVA bylo přidáno 81 g dH₂O (odpovídá 81 ml) a 9 g ethanolu (odpovídá 11,41 ml). Vzniklý roztok byl zahříván při 90 °C až do úplného rozpuštění polymeru (cca. 4 až 6 hodin). Po rozpuštění polymeru byl roztok skladován při pokojové teplotě (RT, „room tempereture“) až do použití.

Pro přípravu nanovláknenného materiálu z PVA s 5% obsahem LPPO v sušině bylo připraveno 50 g 10% roztoku PVA s obsahem LPPO ve stejném rozpouštědlovém systému voda : ethanol (9 : 1). Nejprve byl připraven primární roztok rozpuštěním 5 g PVA v 31,25 g dH₂O (odpovídá 31,25 ml) a 4 g ethanolu (odpovídá 5,07 ml) při 90 °C. Po zchlazení na pokojovou teplotu bylo k primárnímu roztoku přidáno 5 g 5% roztoku LPPO, který vznikl rozpuštěním 0,25 g LPPO v 4,75 g dH₂O (odpovídá 4,75 ml). Takto byl připraven finální roztok pro zvlákňování, který byl opět do použití skladován při RT.

Stejnoseměrné elektrické zvlákňování

Zvlákňování bylo prováděno Ing. Maximem Lisnenkem z Katedry chemie FP TUL. Nanovláknenné materiály byly připraveny stejnosměrným elektrickým zvlákňováním na přístroji NanospiderTM. Výsledná nanovláknenná vrstva byla připravena tak, že zvlákňování na daný podkladový materiál (tzv. spunbond) bylo provedeno celkem dvakrát. Tedy po skončení jednoho cyklu zvlákňování byl spunbond navinut zpět a nechán projet zvlákňovací aparaturou ještě jednou. Použité procesní parametry a podmínky, za kterých zvlákňování probíhalo, jsou shrnuty v tabulce 4.4 pro nanovláknna bez obsahu LPPO a v tabulce 4.5 pro nanovláknna s obsahem LPPO.

Tabulka 4.4: Parametry pro přípravu nanovláknenného materiálu z PVA

Parametr	Hodnota	
Elektrické napětí elektrod [kV]	Zvlákňovací (struna)	35–40
	Sběrná (kolektor)	-10
Vzdálenost elektrod [mm]	175–180	
Průvlak [mm]	0,7	
Odtah textlie [mm/min]	7–13	
Odtah struny	30	
Rychlost cartridge (dávkování) [mm/sec]	290–335	
Teplota [°C]	20,8–22	
Vlhkost [%]	20–22,4	

Tabulka 4.5: Parametry pro přípravu nanovláknenného materiálu z PVA s obsahem LPPO

Parametr	Hodnota	
Elektrické napětí elektrod [kV]	Zvláknovací (struna)	48
	Sběrná (kolektor)	-10
Vzdálenost elektrod [mm]	161	
Průvlak [mm]	0,7	
Odtah textilie [mm/min]	10	
Odtah struny	14	
Rychlost cartridge (dávkování) [mm/sec]	350	
Teplota [°C]	21	
Vlhkost [%]	22	

4.3.2 Tepelná stabilizace nanovláknenných materiálů

Ze zvláknenných materiálů byly připraveny vzorky určené pro tepelnou stabilizaci působením vysokých teplot (HT). Nanovláknenná vrstva byla nejprve oddělena od vrstvy podkladové a z nanovláknenné vrstvy byl vždy odstrižen vzorek tak, aby vážil přesně asi 10 mg. Pro každou teplotu a každý čas stabilizace bylo nutné připravit celkem 5 vzorků pro jednotlivé analýzy – 1 společný pro analýzu morfologie a pro infračervenou spektroskopii s Fourierovou transformací (FTIR), 1 pro diferenciální skenovací kalorimetrii (DSC) a 3 pro analýzu rozpustnosti materiálu a uvolňování aktivní látky pomocí spektrofotometrie. Připravené vzorky byly přeneseny do skleněných Petriho misek. Petriho misky se vzorky byly následně vloženy do laboratorní sušárny vytemperované na příslušnou teplotu HT. Pro HT byly zvoleny teploty 90, 120, 150 a 180 °C a časy 1, 4, 8 a 16 hodin. Po stabilizaci byly vzorky do příslušné analýzy uchovávány při RT.

4.3.3 Analýza morfologie materiálů pomocí elektronové mikroskopie

Vliv tepelné stabilizace na morfologii materiálů byl analyzován pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Jednotlivé materiály byly prozkoumány při různých zvětšeních (500×, 1000×, 3000×, 5000× a 10000×). Urychlovací napětí bylo nastaveno na hodnotu 15 kV. Vzorky pro elektronovou mikroskopii byly připraveny tak, že na kovový terčík pokrytý oboustrannou lepicí páskou byly nalepeny malé ústřížky příslušných materiálů. Pro každý materiál byly nalepeny celkem dva ústřížky reprezentující obě strany materiálu. Vzorky pro standardní SEM musejí být vodivé. Proto byla na terčíky s připravenými vzorky nanášena po dobu 2 minut tenká vodivá vrstva zlata pomocí přístroje Quorum Q150R S Plus. Pro každý materiál bylo pořízeno alespoň pět snímků při zvětšení 5000×, které reprezentovaly obě strany materiálu. Pomocí programu Image J byl změřen průměr 100 vláken pro každý stabilizovaný materiál a průměr 300 vláken pro oba nestabilizované materiály. Měření probíhalo

tak, že podél zvolené uhlopříčky byl změřen průměr prvních 20 (resp. prvních 60) vláken v každém snímku při zvětšení 5000×. Získaná data byla zpracována do histogramů s použitím programu GraphPad Prism 8.0.1 a morfologie daného materiálu je reprezentována jako střední průměr vláken ± směrodatná odchylka (SD).

4.3.4 Analýza rozpustnosti PVA a uvolňování aktivní látky pomocí spektrofotometrie

Vliv tepelné stabilizace na rozpustnost nanovláken z PVA a na rychlost uvolňování LPPO z materiálu byl analyzován pomocí spektrofotometrie. Nejprve byly připraveny vzorky, které následně sloužily k samotné analýze.

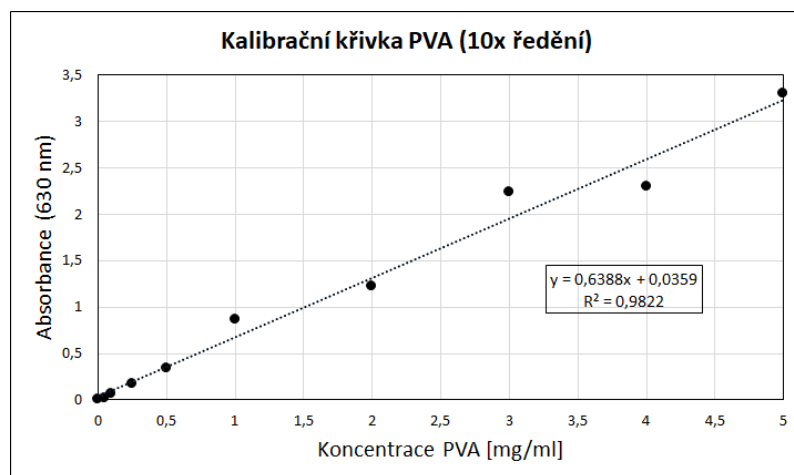
Příprava vzorků

Pro každou teplotu a každý čas stabilizace byly připraveny celkem 3 vzorky stabilizovaných materiálů, každý o váze $10 \pm 0,2$ mg (váženo před tepelnou stabilizací). Obdobně byly připraveny 3 vzorky obou nestabilizovaných materiálů, které sloužily jako příslušná negativní kontrola. Každý vzorek byl vložen do vlastní mikrozkušavky o objemu 2 ml a ke každému vzorku byl přidán 1 ml PBS s 0,02% azidem sodným. Takto připravené vzorky byly inkubovány při 37 °C. Odběr alikvotních vzorků pro analýzu koncentrace rozpuštěného PVA byl prováděn po 1, 2, 4, 6, 8, 24, 72 a 168 h. Odběry probíhaly tak, že ve stanovený čas bylo z každé mikrozkušavky odebráno vždy 200 μ l roztoku a přeneseno do další mikrozkušavky o objemu 0,5 ml. Odebraný objem roztoku byl pokaždé nahrazen stejným objemem (200 μ l) PBS s 0,02% azidem sodným. Odebrané alikvotní vzorky byly ihned po odběru zamrazeny při teplotě -20 °C a takto byly skladovány až do příslušné analýzy.

Analýza rozpustnosti PVA

Stanovení koncentrace PVA v odebraných alikvotních vzorcích pomocí spektrofotometrie bylo prováděno podle metody Procházkové et al. [70], která je založená na práci Pritcharda a Akintoly [71]. Principem této metody je vznik barevného komplexu PVA s jodem v prostředí kyseliny borité. Podle Pritcharda a Akintoly [71] kyselina boritá reaguje s hydroxylovými skupinami PVA za vzniku cyklických esterů, které snižují flexibilitu řetězce polymeru a umožňují tak vznik barevných komplexů se strukturou podobnou komplexu amylozy s jodem. Po vzniku modrozeleného komplexu je měřena absorbance světla o vlnové délce 630 nm.

Vzhledem k tomu, že analyzované vzorky měly vysokou koncentraci PVA, bylo nutné zavést desetinásobné ředění, které bylo zvoleno na základě diplomové práce Ing. Maxima Lisnenka [72]. Nejprve bylo nutné zjistit závislost absorbance viditelného záření o vlnové délce 630 nm na koncentraci PVA v roztoku, tedy sestavit kalibrační křivku s ředěním 10× (viz obrázek 4.1). Za tímto účelem byla připravena kalibrační řada PVA s roztoky o koncentracích 0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4 a 5 mg/ml. Roztok s koncentrací 0 mg/ml, tzv. slepý vzorek, je pouze

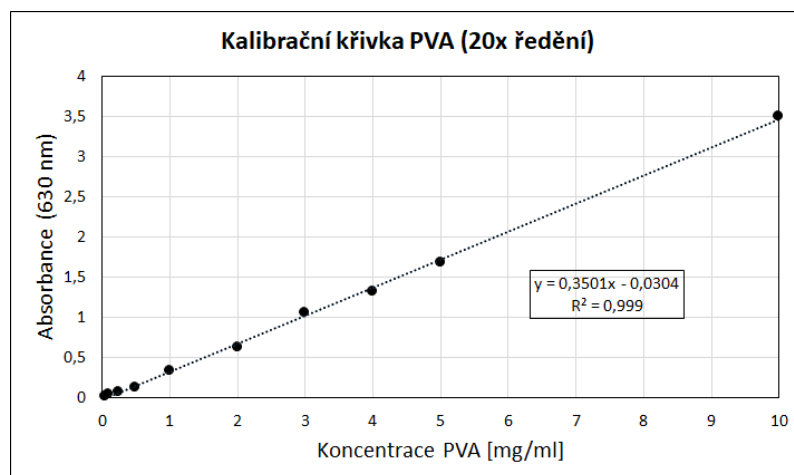


Obrázek 4.1: Kalibrační křivka PVA pro 10násobné ředění (závislost absorbance při 630 nm na koncentraci PVA v mg/ml)

destilovaná voda. Každý roztok kalibrační řady byl měřen v tripletu. Za účelem vytvoření barevného komplexu bylo do jamek mikrotitrační destičky (96 jamek) napipetováno vždy 37,5 μl roztoku $\text{I}_2 + \text{KI}$ a 187,5 μl roztoku H_3BO_3 (40 g/l). Dále bylo přidáno vždy 45 μl destilované vody a 5 μl měřeného vzorku, čímž se docílilo 10násobného ředění vzorku. Po důkladném promíchání (propipetování) byla měřena absorbance při 630 nm.

Některé vzorky byly i při 10násobném ředění příliš koncentrované (došlo k příliš intenzivnímu zabarvení vniklého komplexu) a hodnoty absorbance byly nad detekčním limitem přístroje. Pro tyto vzorky bylo nutné použít 20násobné ředění. V takovém případě byla sestrojena kalibrační křivka s ředěním 20 \times (viz obrázek 4.2), ve které byly použity kalibrační roztoky o koncentracích 0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 a 10 mg/ml. Stejně jako v předchozím případě byl každý roztok kalibrační řady měřen v tripletu. Pro přípravu barevného komplexu bylo do jamek mikrotitrační destičky napipetováno 37,5 μl roztoku $\text{I}_2 + \text{KI}$ a 187,5 μl roztoku H_3BO_3 (40 g/l), ke kterým bylo přidáno vždy 47,5 μl dH_2O a 2,5 μl měřeného vzorku, čímž bylo zajištěno ředění 20 \times . Po důkladném promíchání (propipetování) byla měřena absorbance při 630 nm.

Pro každý roztok kalibrační řady byly naměřeny tři hodnoty absorbance, ze kterých byl vypočten jejich průměr. Od každé průměrné hodnoty byl následně odečten průměr absorbance slepého vzorku. Takto vypočtené hodnoty absorbance byly použity k sestrojení kalibrační křivky. Při analýze samotných materiálů byl od každé naměřené absorbance příslušného vzorku opět odečten průměr absorbance slepého vzorku. Z takto upravených hodnot absorbance byla s použitím regresní rovnice příslušné kalibrační křivky vypočtena koncentrace PVA v analyzovaném alikvótním vzorku. Z koncentrace byla dále vypočtena kumulativní hmotnost rozpuštěného PVA vztážená na celý objem (1 ml) pufru s příslušným materiálem. Jelikož pro každý materiál byly připraveny celkem tři vzorky, byla z hmotností pro vzorky



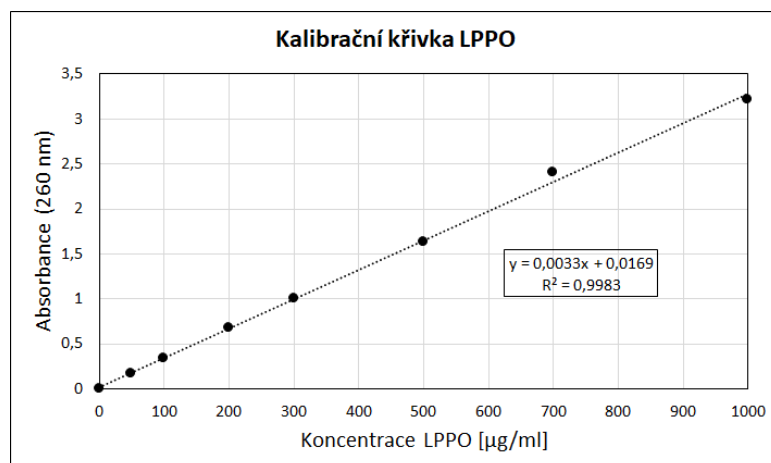
Obrázek 4.2: Kalibrační křivka PVA pro 20násobné ředění (závislost absorbance při 630 nm na koncentraci PVA v mg/ml)

s odpovídajícími podmínkami stabilizace vypočtena průměrná hodnota hmotnosti uvolněného PVA v čase odběru a určena směrodatná odchylka. V programu GraphPad Prism 8.0.1 byly sestrojeny grafy znázorňující hmotnost rozpuštěného PVA v závislosti na době uvolňování.

Analýza uvolňování LPPO

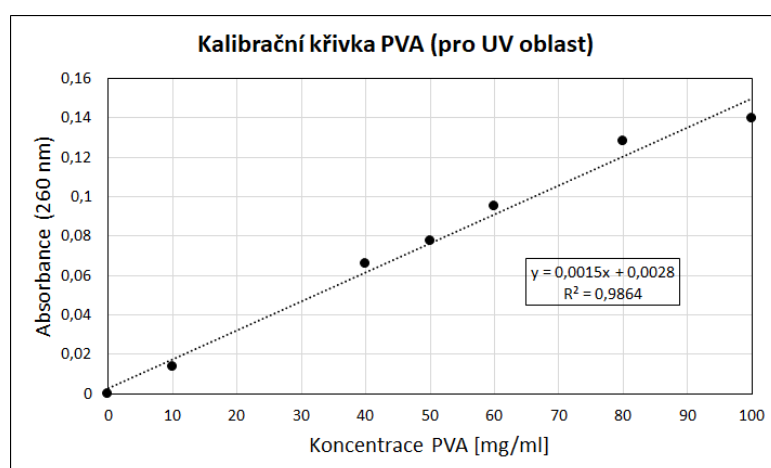
Molekuly lipofosfonoxinu DR6180 použitého v této práci absorbují ultrafialové záření o vlnové délce 260 nm (viz přílohy, obrázek 5.30). Díky tomu je možné stanovit koncentraci LPPO v roztoku pomocí spektrofotometrie. Nejprve byla sestrojena kalibrační křivka (viz obrázek 4.3), pro kterou byly připraveny kalibrační roztoky o koncentracích 0, 50, 100, 200, 300, 500, 700 a 1000 $\mu\text{g/ml}$. Roztok s koncentrací 0 $\mu\text{g/ml}$ je pouze destilovaná voda. Každý roztok kalibrační řady byl měřen v tripletu. Pro měření bylo do mikrotitrační destičky (96 jamek) transparentní pro ultrafialové záření napipetováno vždy 100 μl příslušného měřeného vzorku a následně byla změřena absorbance při 260 nm.

Kalibrační křivka byla sestrojena stejným způsobem jako v případě kalibrační křivky pro analýzu rozpouštění PVA. Vzhledem k tomu, že pro analýzu uvolňování LPPO byly použity stejné vzorky jako pro analýzu rozpustnosti PVA, obsahovaly měřené vzorky kromě LPPO také PVA. Jelikož má polyvinylalkohol slabý absorpční pás v oblasti 260 nm (viz přílohy, obrázek 5.29), bylo nutné od naměřené absorbance pro jednotlivé vzorky odečíst kromě absorbance vody také absorbanci příslušející přítomnému PVA. Za tímto účelem byla sestrojena kalibrační křivka popisující závislost absorbance ultrafialového záření o vlnové délce 260 nm na koncentraci PVA (viz obrázek 4.4). Vzhledem k tomu, že PVA v této oblasti absorbuje pouze slabě, byly použity kalibrační roztoky s vyššími koncentracemi, než tomu bylo v případě kalibrační řady pro absorpci při 630 nm. Použity byly kalibrační roztoky o koncentracích 10, 20, 40, 50, 60, 80 a 100 mg/ml. Každý roztok byl měřen v tripletu a kalib-



Obrázek 4.3: Kalibrační křivka LPPO (závislost absorpance při 260 nm na koncentraci LPPO v $\mu\text{g/l}$)

rační křivka byla sestrojena stejně jako v předchozích případech. Absorbance vody při 260 nm byla již známa ze stanovení kalibrační křivky pro LPPO. Koncentrace PVA v každém měřeném vzorku byla známa z provedené analýzy rozpustnosti PVA. Od celkové naměřené absorpance příslušného vzorku byla vždy odečtena absorbance vody a absorpance přítomného PVA. Z takto upravených hodnot absorpance byla pomocí regresní rovnice příslušné kalibrační křivky vypočtena nejprve koncentrace LPPO v analyzovaném vzorku a následně také kumulativní hmotnost uvolněného LPPO vztažená na celý objem (1 ml) pufru s příslušným materiálem. Z hmotností pro vzorky s odpovídajícími podmínkami stabilizace byla vypočtena průměrná hodnota hmotnosti uvolněného LPPO v čase odběru a určena směrodatná odchylka. V programu GraphPad Prism 8.0.1 byly sestrojeny grafy znázorňující hmotnost uvolněného LPPO v závislosti na době uvolňování.



Obrázek 4.4: Kalibrační křivka PVA pro UV oblast (závislost absorpance při 260 nm na koncentraci PVA v mg/ml)

4.3.5 Analýza chemických a strukturních změn materiálů pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací

Principem infračervené spektroskopie je absorpce infračerveného záření při průchodu analyzovaným vzorkem. Při absorpci infračerveného záření dochází ke změnám rotačních a vibračních stavů molekul, které jsou spojeny se změnou dipólového momentu molekul. Rozšířením této metody je infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR). V této metodě je měřen interferogram modulovaného svazku záření po průchodu vzorkem. Klasické infračervené spektrum, udávající závislost absorbované nebo transmittované (prošlé) energie na vlnové délce (resp. vlnočtu) dopadajícího záření, se získá metodou Fourierovy transformace. Infračervené spektrum je jedinečné pro danou látku. Navíc určité funkční skupiny absorbují v různých molekulách v podobné oblasti, což umožňuje ve spektru látky rozeznat i tyto funkční skupiny.

Analýza byla prováděna Ing. Janou Müllerovou, Ph.D., na Oddělení nanochemie CXI TUL. Postupně byly analyzovány všechny vzorky umístěním na diamantový krystal ATR (attenuated total reflection) a proměřením spektra v rozsahu vlnočtů $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ při RT. Získaná spektra byla sestavena tak, aby bylo možné na daném obrázku sledovat vliv různých časů stabilizace na materiál při vybrané teplotě a na jiném obrázku sledovat naopak vliv různých teplot stabilizace na materiál při vybrané době stabilizace. Do každé skupiny spekter bylo zahrnuto také spektrum nestabilizovaného materiálu sloužící jako negativní kontrola.

4.3.6 Analýza krystalinity materiálů pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie

Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) je velmi rozšířenou metodou sloužící k analýze tepelných vlastností materiálů. Princip metody spočívá v současném ohřívání (případně ochlazování) referenčního a testovaného vzorku konstantní rychlostí a měření rozdílů mezi množstvím tepla dodaném testovanému a referenčnímu vzorku, které je potřebné k udržení izotermních podmínek mezi oběma vzorky. Ze získaného průběhu DSC křivky polymeru je možné určit teplotu skelného přechodu (T_g), exotermický moment krystalizace (T_c) a endotermické tání materiálu (T_m). Metoda rovněž umožňuje stanovit krystalinitu analyzovaného materiálu z plochy pod píkem v oblasti teploty T_c .

Analýza byla prováděna Ing. Lubošem Běhálkem, Ph.D., z Katedry strojírenské technologie FS TUL. Měření spočívalo v navážení malého množství (3,2–4,2 mg) příslušného materiálu a jeho rozprostření na dně hliníkového kelímku o objemu $25\ \mu\text{l}$. Kelímky byly následně hermeticky uzavřeny víčkem a vzorky zalisovány před samotným měřením. Měření probíhalo v inertní atmosféře dusíku s rychlostí průtoku plynu 50 ml/min pro teploty od $-20\text{ }^\circ\text{C}$ do $260\text{ }^\circ\text{C}$ s rychlostí ohřevu $10\text{ }^\circ\text{C/min}$.

5 Výsledky a diskuze

Předkládaná bakalářská práce se zabývá tepelnou stabilizací funkcionalizovaných nanovláknenných materiálů založených na polyvinylalkoholu (PVA). Nanovláknenné materiály založené na PVA mají značný potenciál pro přípravu scaffoldů a krytů kožních ran v tkáňovém inženýrství (TI). Nespornou výhodou PVA je jeho rozpustnost ve vodě. To umožňuje přípravu nanovláken z vodného roztoku polymeru. Vodný roztok může rovněž obsahovat biologicky aktivní látky, které se v procesu zvláknění inkorporují do struktury vznikajících nanovláken a které by v nevodných prostředích ztrácely své funkce. Problémem spojeným s vodorozpustností PVA je, že výsledný nanovláknenný materiál je značně nestabilní ve vodném prostředí. Dochází k rychlému rozpouštění materiálu, což je spojené s téměř okamžitým uvolněním inkorporovaných látek. Nanovláknenné materiály na bázi PVA určené pro aplikace v TI je proto zpravidla nutno podrobit některé z dostupných metod stabilizace. Tepelná stabilizace působením vysokých teplot (HT, z anglického „heat treatment“) je jednou z fyzikálních metod stabilizace. Výhodou HT je, že na rozdíl od chemických metod stabilizace nevyžaduje použití síťovacích činidel, které mohou být potenciálně toxické a představovat tak zdravotní riziko při aplikaci výsledného materiálu pro medicínské účely. K funkcionalizaci nanovláknenného materiálu bylo použito experimentální antibiotikum lipofosfonoxin DR6180 (LPPO) poskytnuté Ústavem organické chemie a biochemie AV ČR. Výhodou této látky je její tepelná stabilita, což z ní dělá vhodného kandidáta pro funkcionalizaci nanovláknenných materiálů, které jsou následně podrobeny HT. Bakalářská práce je součástí výzkumu zabývajícího se vývojem aktivních nanovláknenných krytů kožních ran obsahujících látky podporující hojení, případně látky s antimikrobiálními účinky [56, 59, 73]. Práce rovněž navazuje na diplomové práce Ing. Maxima Lisnenka [72] a Ing. Barbory Kopřivové [74]. Pro přípravu nanovláknenných materiálů byl, na základě studie provedené Kopřivovou et al. [59], zvolen PVA s vysokým stupněm hydrolýzy (98–98.8 %). S rostoucím stupněm hydrolýzy klesá rozpustnost PVA ve vodě v důsledku vzniku mnoha interakcí mezi řetězci polymeru zprostředkované vodíkovými můstky mezi hydroxylovými skupinami a také Van der Waalsovými silami vznikajícími mezi uhlovodíkovými páteřemi PVA. Právě díky existenci velkého množství nekovalentních interakcí je tento polymer vhodným kandidátem pro přípravu nanovláknenných materiálů, které jsou následně podrobeny fyzikální stabilizaci, například pomocí vysokých teplot. Značné množství interakcí mezi řetězci a pravidelná struktura řetězců PVA s vysokým stupněm hydrolýzy také souvisí s vysokým obsahem krystalické fáze ve výsledném materiálu.

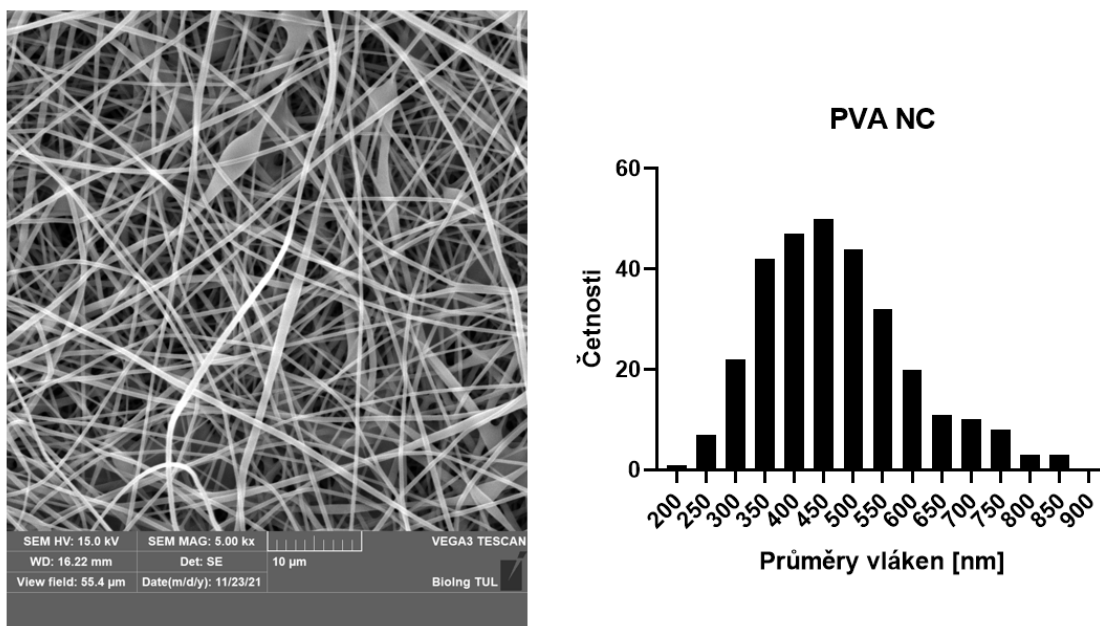
Připravené a stabilizované materiály byly podrobeny řadě analýz. Morfologie materiálů byla sledována pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM), změny v rozpustnosti PVA byly analyzovány pomocí spektrofotometrie, uvolňování LPPO bylo zjišťováno pomocí spektrofotometrie a vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), změny v krystalinitě polymeru vlivem HT byly měřeny s použitím diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) a chemické a strukturní změny PVA byly analyzovány ze spekter získaných pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR). Výsledky jednotlivých analýz jsou uvedeny zvlášť pro nanovláknenné materiály z PVA (viz kapitola 5.1) a zvlášť pro nanovláknenné materiály z PVA s obsahem LPPO (viz kapitola 5.2).

5.1 Optimalizace tepelné stabilizace nanovláknenného materiálu z PVA

Tato kapitola obsahuje charakteristiku připraveného nanovláknenného materiálu z PVA, jeho tepelnou stabilizaci při vybraných teplotách (90, 120, 150 a 180 °C) a časech (1, 4, 8 a 16 h) a výsledky provedených analýz dokumentující vliv HT na vlastnosti a stabilitu výsledných materiálů. Nanovláknenný materiál z PVA bude dále nazýván také jako PVA nanovláknena. Jednotlivé stabilizované materiály budou nadále označovány jako PVA X Y (X = teplota stabilizace, Y = čas stabilizace), tedy například PVA 150 °C 8 h označuje materiál stabilizovaný při 150 °C po dobu 8 hodin. Jako PVA NC bude označována negativní kontrola, tedy materiál bez HT.

5.1.1 Příprava a charakteristika nanovláknenného materiálu z PVA

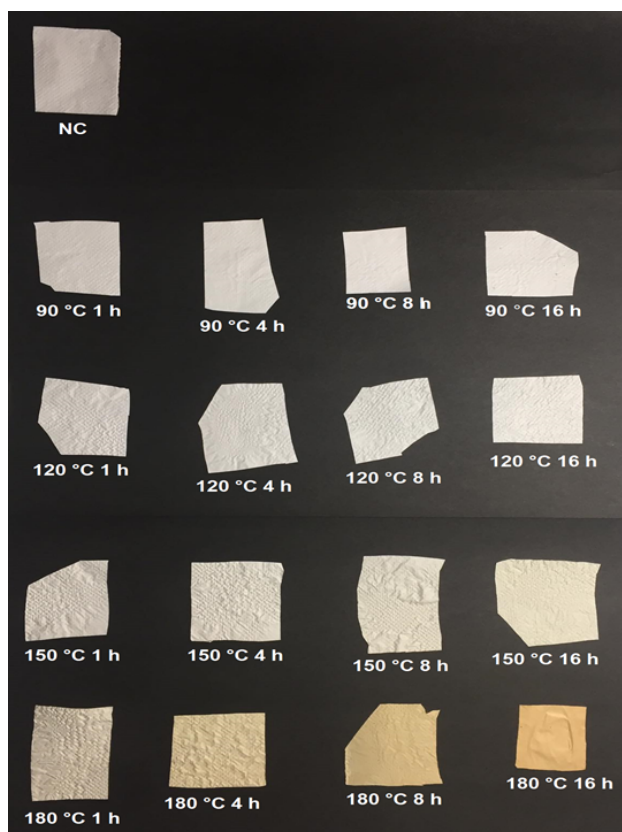
Příprava roztoku pro zvláknění a průběh bezjehlového stejnosměrného elektrického zvláknění s použitím technologie NanospiderTM jsou popsány v kapitole 4.3.1. Za účelem přípravy kompaktní nanovláknenné vrstvy s dostatečnou plošnou hmotností proběhlo zvláknění na daný podkladový materiál celkem dvakrát (na první zvlákněnou vrstvu byla nanášena vrstva druhá). Zvlákněním byl připraven materiál o plošné hmotnosti $5,93 \pm 0,65 \text{ g/m}^2$ a se středním průměrem vláken $470 \pm 120 \text{ nm}$. Snímek vstupního materiálu spolu s histogramem distribuce průměrů vláken je na obrázku 5.1. Materiál na nanovlákněch obsahoval malé množství defektů tvaru kapky (viz obrázek 5.1), případně defekty, u kterých došlo k fúzi okolních vláken. Defekt tvaru kapky je pravděpodobně způsoben nedostatečným odpařením rozpouštědla v průběhu zvláknění. Majoritní zastoupení v použitém rozpouštědlovém systému měla totiž voda, která není příliš těkavá a v porovnání s organickými rozpouštědly se poměrně obtížně vypařuje. Defekt fúze vláken je pravděpodobně způsoben lokálně zvýšenou intenzitou elektrického pole během zvláknění, která může vést k vyrazení kapky rozpouštědla (vody). Takto vyražená kapka se nestihne odpařit a dopadá již zvlákněný materiál, čímž způsobí jeho částečné rozpuštění. Vstupní materiál sloužil pro přípravu vzorků určených pro HT.



Obrázek 5.1: Snímek vstupního materiálu ze skenovací elektronové mikroskopie (měřítko 10 μm) s příslušným histogramem distribuce průměrů vláken

5.1.2 Tepelná stabilizace nanovláknenného materiálu z PVA

Parametry HT pro tuto bakalářskou práci byly vybrány na základě studie od Wonga, Zinke-Allmanga a Wana [66] a také studie Miraftaba, Saifullaha a Caya [63], které se zabývají stabilizací PVA nanovláken pomocí vysokých teplot (viz kapitola 3.2.1). Na základě těchto dvou studií byly vybrány teploty stabilizace 90, 120, 150 a 180 $^{\circ}\text{C}$ a časy stabilizace 1, 4, 8 a 16 h (zmněné studie dobu stabilizace 16 h nezkuoumají, ta byla přidána pro tuto práci jako extrém). Postup HT je popsán v kapitole 4.3.2. HT způsobila změnu zbarvení materiálu z bílé, přes žlutou až do hnědé (viz obrázek 5.2). Změna odstínu byla znatelnější s rostoucími teplotami a časy stabilizace a nejvýraznější byla v případě teploty 180 $^{\circ}\text{C}$. Podle literatury [61, 69] dochází vlivem vysokých teplot k eliminaci hydroxylových skupin z řetězců PVA za odštěpování vody, čímž vzniká konjugovaný systém dvojných vazeb (dále diskutováno v kapitole 5.1.3, část „Analýza chemických a strukturních změn materiálů“), který způsobuje změny zbarvení materiálů. HT měla také vliv na mechanickou odolnost nanovláken. Vzorky stabilizované při 180 $^{\circ}\text{C}$ se staly velmi křehkými a při doteku se poměrně snadno lámaly.



Obrázek 5.2: Změny zbarvení PVA nanovláken při různých podmínkách HT

5.1.3 Analýza nanovláknenných materiálů z PVA po tepelné stabilizaci

Materiály po HT byly dále analyzovány za účelem vyhodnocení vlivu stabilizace na morfologii, vlastnosti a stabilitu PVA nanovláken. Změny morfologie materiálů byly analyzovány pomocí SEM, změny v rozpustnosti PVA pomocí spektrofotometrie, strukturální a chemické změny PVA pomocí FTIR a změny v obsahu krystalické fáze polymeru pomocí DSC.

Analýza morfologie materiálů

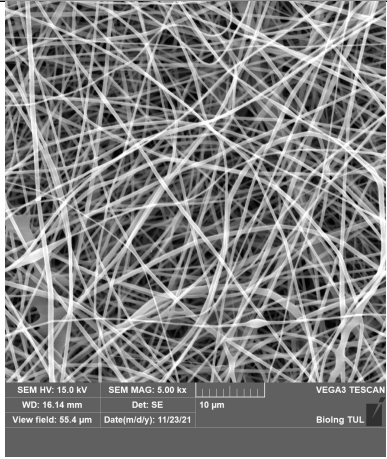
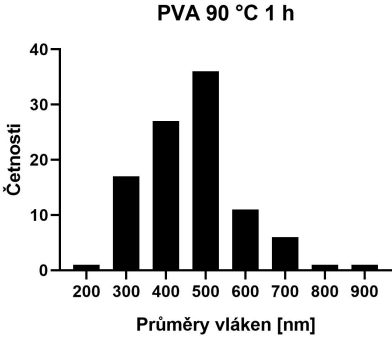
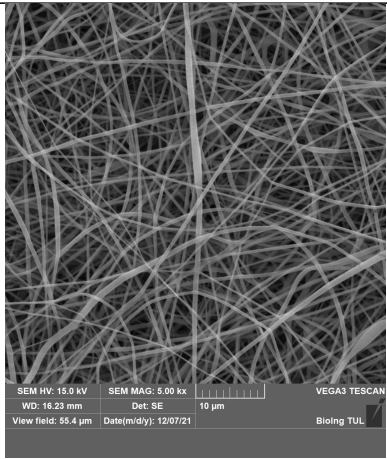
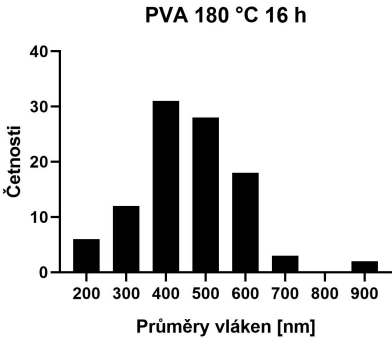
Analýza morfologie, jejíž postup je popsán v kapitole 4.3.3, neprokázala výraznou změnu průměrů vláken při jakýchkoliv podmínkách HT. Téměř všechny materiály měly střední průměr vláken v intervalu od 450 nm do 470 nm, viz tabulka 5.1. Výjimkou je materiál PVA 120 °C 1 h, u kterého vyšla střední hodnota průměrů 420 nm a materiál PVA 150 °C 16 h, u kterého vyšla střední hodnota průměrů 490 nm. Tyto výraznější odchylky pravděpodobně souvisí s nestejným rozdělením vláken různých průměrů ve vzorcích spíše než s vlivem HT na morfologii materiálů. V tabulce 5.2 jsou uvedeny vybrané snímky vzorků reprezentujících oba extrémy stabilizace a jim příslušné histogramy distribuce průměrů vláken. Vzhledem k tomu, že se s rozdílnými podmínkami HT výrazně neměnila morfologie materiálů, jsou vy-

brané snímky ostatních stabilizovaných vzorků s příslušnými histogramy distribuce průměrů vláken uvedeny jako přílohy (viz tabulka 5.5).

Tabulka 5.1: Střední průměry vláken stabilizovaných nanovláknenných materiálů z PVA

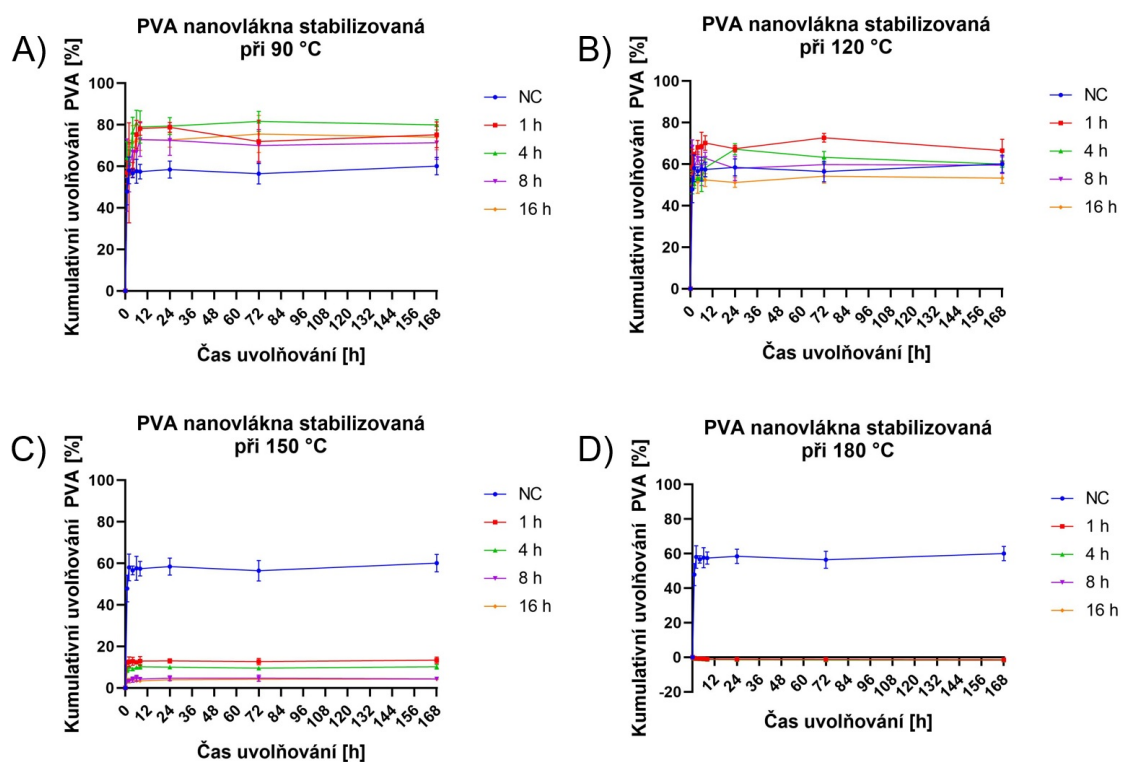
Materiál	Průměr [nm]	Materiál	Průměr [nm]
PVA 90 °C 1 h	470 ± 120	PVA 150 °C 1 h	460 ± 140
PVA 90 °C 4h	460 ± 130	PVA 150 °C 4 h	450 ± 130
PVA 90 °C 8 h	460 ± 130	PVA 150 °C 8 h	450 ± 120
PVA 90 °C 16 h	470 ± 130	PVA 150 °C 16 h	490 ± 130
PVA 120 °C 1 h	420 ± 120	PVA 180 °C 1 h	460 ± 140
PVA 120 °C 4 h	470 ± 130	PVA 180 °C 4 h	450 ± 110
PVA 120 °C 8 h	450 ± 130	PVA 180 °C 8 h	450 ± 130
PVA 120 °C 16 h	470 ± 120	PVA 180 °C 16 h	460 ± 130

Tabulka 5.2: Snímky nanovláknenných materiálů z PVA ze skenovací elektronové mikroskopie (měřítko 10 μm) reprezentující oba extrémní stabilizace s příslušnými histogramy distribuce průměrů vláken

HT	SEM snímek vzorku	Histogram průměrů vláken
PVA 90 °C 1 h		
PVA 180 °C 16 h		

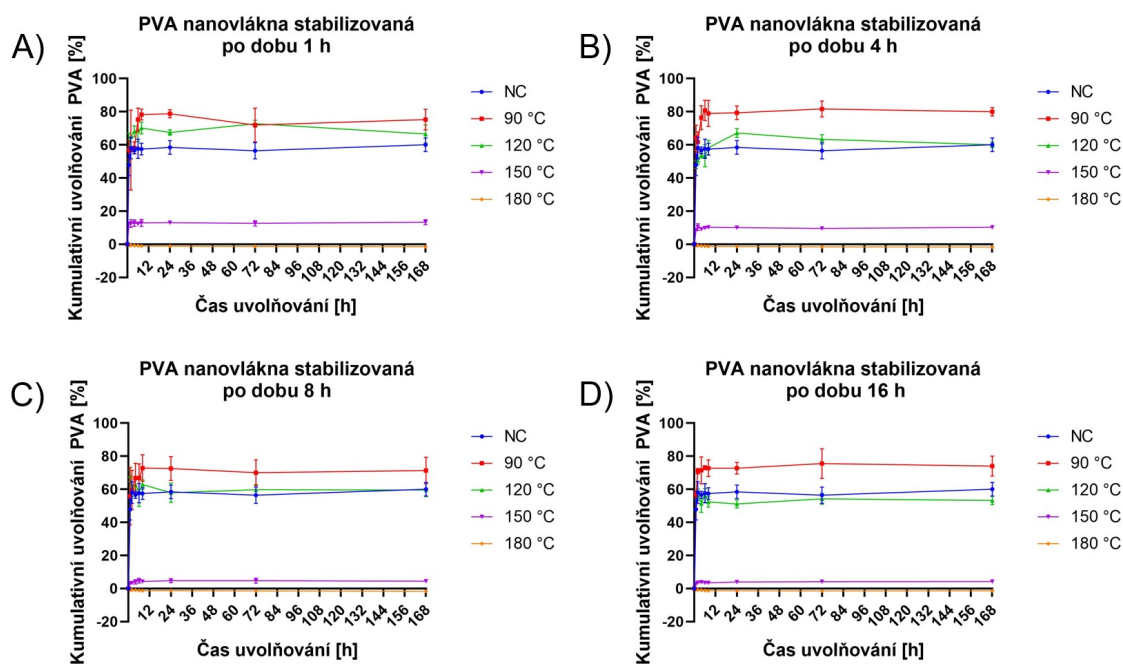
Analýza rozpustnosti materiálů

Příprava vzorků a proces analýzy pomocí spektrofotometrie jsou popsány v kapitole 4.3.4. Grafy na obrázku 5.3 porovnávají změny rozpustnosti PVA nanovláken v PBS + 0,02 % azid sodný (dále pouze PBS) při 37 °C, způsobené různými dobami stabilizace při určité teplotě HT. Z grafů je patrné, že stabilizací při teplotách 90 a 120 °C nedocházelo k výraznému snížení rozpustnosti PVA nanovláken. Z výsledků dále plyne, že materiály po HT při 90 °C pro všechny časy a po HT při 120 °C po dobu 1 h se rozpouštěly více než nestabilizovaný materiál. Zatímco u nestabilizovaného materiálu se po 7 dnech rozpustilo 60 % z celkové hmotnosti vzorku (obrázek 5.3 A, B, C, D), u materiálů po HT při 90 °C to bylo 70 až 80 % (obrázek 5.3 A) a po HT při 120 °C 53 až 67 % (obrázek 5.3 B), vždy v závislosti na době stabilizace. Z makroskopického pozorování bylo patrné, že materiály stabilizované při 90 a 120 °C vytvářely po vložení do PBS transparentní hydrogely, které byly ve zkumavce přítomné po celou dobu experimentu (7 dní). Při odběru alikvótů vzorků pomocí pipety tak mohlo dojít spolu s roztokem také k nabrání malého množství vzniklého hydrogelu. Přítomný hydrogel by způsobil zvýšení koncentrace PVA v odebraném alikvótu oproti koncentraci skutečně rozpuštěného PVA v PBS s nasazeným vzorkem, čímž by následně došlo ke zkreslení výsledků analýzy.



Obrázek 5.3: Grafy zobrazující kumulativní uvolňování PVA (vyjádřeno v % celkové hmotnosti vzorku) z PVA nanovláken v závislosti na čase uvolňování – porovnání vlivu doby HT na stabilitu PVA nanovláken pro danou teplotu stabilizace: A) 90 °C, B) 120 °C, C) 150 °C a D) 180 °C; NC označuje materiál bez HT

K výrazné změně rozpustnosti PVA nanovláken docházelo až po HT při 150 °C, kdy se po 7 dnech rozpustilo 4 až 13 % z celkové hmotnosti vzorku, a to v závislosti na době stabilizace (obrázek 5.3 C). Dále je z grafů na obrázku 5.3 patrné, že u teplot 120 a 150 °C klesala rozpustnost PVA nanovláken úměrně s rostoucí dobou HT. Pro teplotu 90 °C nebyla zjištěna souvislost mezi stabilitou materiálu a rostoucí dobou stabilizace. Při HT na 180 °C se materiál stával zcela nerozpustným, a to pro kterýkoliv čas stabilizace (obrázek 5.3 D). Procesy probíhající v materiálech vlivem HT, které by mohly mít za následek snížení jejich rozpustnosti, jsou diskutovány v další části „Analýza chemických a strukturních změn materiálů“.



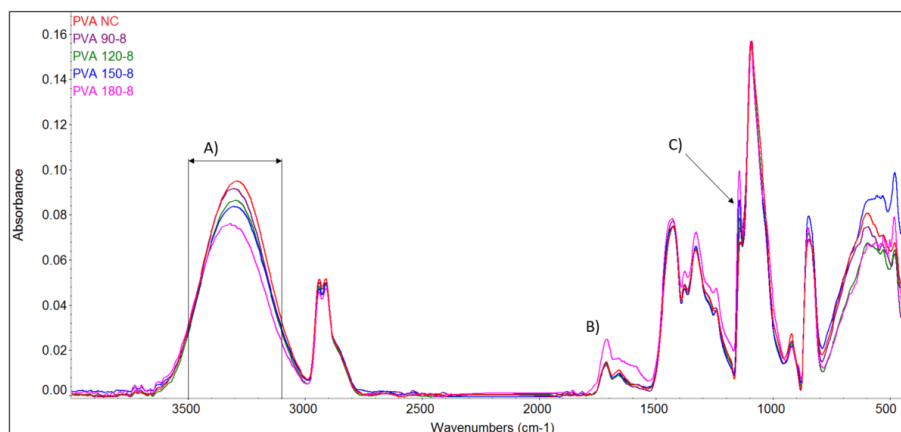
Obrázek 5.4: Grafy zobrazující kumulativní uvolňování PVA (vyjádřeno v % celkové hmotnosti vzorku) z PVA nanovláken v závislosti na čase uvolňování – porovnání vlivu teploty HT na stabilitu PVA nanovláken pro danou dobu stabilizace: A) 1 h HT, B) 4 h HT, C) 8 h HT a D) 16 h HT; NC označuje materiál bez HT

Grafy na obrázku 5.4 porovnávají změny rozpustnosti PVA nanovláken způsobené zvýšením teploty HT při konstantní době stabilizace. K nárůstu hmotnosti rozpuštěného PVA docházelo pouze při několika prvních odběrech. Po určité době uvolňování (6 až 8 h) se hmotnost rozpuštěného PVA ustálila a dále již nerostla.

Analýza chemických a strukturních změn materiálů

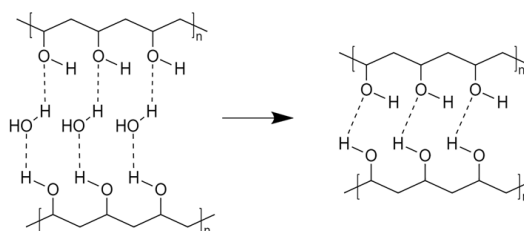
Analýza pomocí FTIR, jejíž proces je popsán v kapitole 4.3.5, sloužila k určení chemických a strukturních změn, které vlivem HT v materiálech probíhají a které by mohly způsobovat změny v jejich rozpustnosti. Vzhledem k značnému množství naměřených spekter byla pro demonstraci pozorovaných změn vyvolaných různými teplotami stabilizace vybrána spektra materiálů podrobených HT po dobu 8 h

(viz obrázek 5.5). Spektra ostatních materiálů s odpovídajícími časy HT jsou uvedena jako přílohy (viz obrázky 5.31, 5.32 a 5.33). Při porovnání získaných spekter s informacemi dostupnými v literatuře je možné navrhnout několik procesů potenciálně souvisejících s rozdílnou rozpustností stabilizovaných materiálů.



Obrázek 5.5: Analýza FTIR: infračervená spektra PVA nanovláken podrobených HT po dobu 8 h při teplotách 90, 120, 150 a 180 °C; PVA NC označuje materiál bez HT

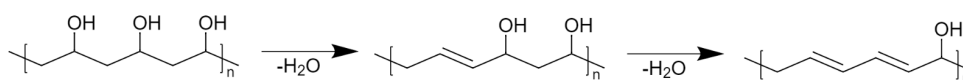
1. Absorpční pás o vlnočtech $3\ 100\ \text{cm}^{-1}$ až $3\ 500\ \text{cm}^{-1}$ (na obrázku 5.5 označený jako **A**) pochází podle Mirafataba, Saifullaha a Caya [63] od $-\text{OH}$ „stretching“ vibrací vodíkových můstků a úzce souvisí s obsahem vody v materiálu. Čím je absorpční pás intenzivnější, tím je obsah vody v materiálu vyšší. Příprava PVA nanovláken probíhala z vodného roztoku. Ačkoliv se v procesu zvlákňování velká část rozpouštěla odpaří, určité množství vody zůstává ve struktuře vznikajících nanovláken vázáno prostřednictvím vodíkových můstků mezi molekulami vody a hydroxylovými skupinami polymeru. Zbytkové molekuly vody brání těsnému uspořádání řetězců a znemožňují vznik vodíkových můstků přímo mezi segmenty polymeru. Jak je patrné ze spekter na obrázku 5.5, s rostoucí teplotou stabilizace klesala absorbance v tomto absorpčním pásu. Tento pokles vykazoval velmi pravidelný trend. Působením vysokých teplot při HT tedy pravděpodobně dochází k odpařování těchto zbytkových molekul rozpouštědla. Song et al. [68] navrhují, že odstraněním zbytkové vody z ma-



Obrázek 5.6: Schéma odstraňování zbytkových molekul vody vlivem HT a vzniku vodíkových můstků mezi řetězci PVA

teriiálu dochází ke snížení hydratace segmentů PVA a snížení volného objemu, což umožňuje vznik silných interakcí (vodíkových můstků) mezi řetězci PVA, jak je schématicky znázorněno na obrázku 5.6. Snížení volného objemu a vznik silných interakcí v materiálu by mohly bránit následnému vstupu rozpouštědla do materiálu a snižovat tak jeho rozpustnost.

2. Absorpční pás **B)** na obrázku 5.5 pochází podle Omkarama, Chakradhara a Rao [75] od C=O „stretching mode“ s absorpčním pásem v oblasti vlnočtů 1700 cm^{-1} a od C=C „stretching mode“ s absorpčním pásem v oblasti vlnočtů 1650 cm^{-1} . Vlivem tepelné stabilizace pravděpodobně dochází k eliminační reakci, při které jsou z řetězců PVA odštěpovány hydroxylové skupiny a dochází ke vzniku konjugovaných dvojných vazeb (schématicky znázorněné na obrázku 5.7). O tomto procesu svědčí také změna odstínů materiálů po HT (viz obrázek 5.2), která je podle Smirnova, Platonova a Popova [69] způsobena právě vznikem konjugovaných dvojných vazeb. Vzhledem k tomu, že HT



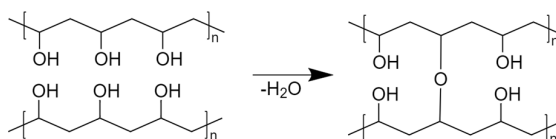
Obrázek 5.7: Schéma odštěpování hydroxylových skupin z řetězců PVA vlivem HT za vzniku konjugovaného systému dvojných vazeb

probíhala v laboratorní sušárně za atmosférického tlaku, mohlo vlivem vysoké teploty za přítomnosti kyslíku docházet k oxidaci hydroxylových skupin na skupiny karbonylové. Immelman et al. [76] uvádějí, že za vysokých teplot v přítomnosti kyslíku může docházet k oxidaci nenasycených struktur PVA vzniklých eliminací hydroxylových skupin, čímž jsou do struktury polymeru zavedeny karbonylové skupiny. Vzniklé karbonylové skupiny dále podporují eliminaci hydroxylových skupin ze sousedních segmentů PVA. Tím dochází ke vzniku karbonylových skupin konjugovaných s nenasycenými úseky polymerního řetězce. Ačkoliv podle Immelmana et al. [76] k tomuto dochází při teplotách okolo $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, v určité míře by tento proces pravděpodobně mohl probíhat i při teplotách nižších. Vznik dvojných vazeb a karbonylových skupin ve struktuře PVA působením vysokých teplot je popsán rovněž ve studii Matsubary a Imoty [77]. Vzniklé karbonylové skupiny by se mohly účastnit dalších reakcí, viz dále. Ze získaných spekter je patrné, že k detekovatelné změně obou absorpčních pásů docházelo až po stabilizaci při $180\text{ }^{\circ}\text{C}$. To je v souladu s pozorováním, kdy k opravdu výrazné změně odstínu docházelo až u materiálů stabilizovaných při teplotě $180\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3. Absorpční pík s vlnočtem 1400 cm^{-1} je na obrázku 5.5 označený jako **C)**. Detail z této oblasti spektra je uveden na obrázku 5.10. Tento pík vykazoval velmi pravidelný trend zvyšování absorbance s rostoucí teplotou i dobou HT. Řada literatury (např. [66, 79, 78]) spojuje tento pík s symetrickými C–C „stretching“ vibracemi a přisuzuje mu vysokou citlivost na obsah krystalické

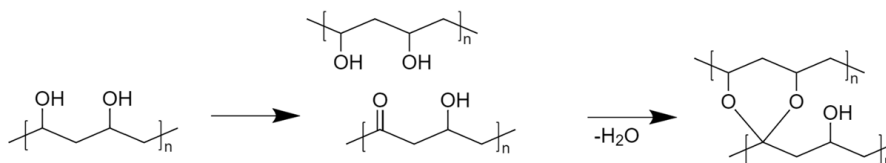
fáze v PVA, kdy polymer s vyšší krystalinitou má vyšší absorpenci infračerveného záření v oblasti vlnočtů $1\ 140\ \text{cm}^{-1}$. Tento předpoklad byl ověřován pomocí DSC, viz následující část „Analýza krystalinity materiálů“. Krystalická fáze v PVA je zdrojem silného fyzikálního síťování, tudíž materiály s vyšší krystalinitou vykazují vyšší stabilitu ve vodných prostředích a jsou tedy méně rozpustné.

Některé zdroje (např. [61, 80]) asociují pík v této oblasti rovněž s C–O–C „stretching“ vibracemi. Vznik takové vazby ve struktuře PVA vlivem HT by mohl nastávat dvěma mechanismy. Literatura [61, 76] uvádí, že za kyselých katalýz dochází vlivem HT, mimo eliminaci hydroxylových skupin, také k tvorbě etherových můstků mezi řetězci (schématicky znázorněno na obrázku 5.8). Zároveň však oba zdroje uvádějí, že s rostoucí teplotou stabilizace je upřed-



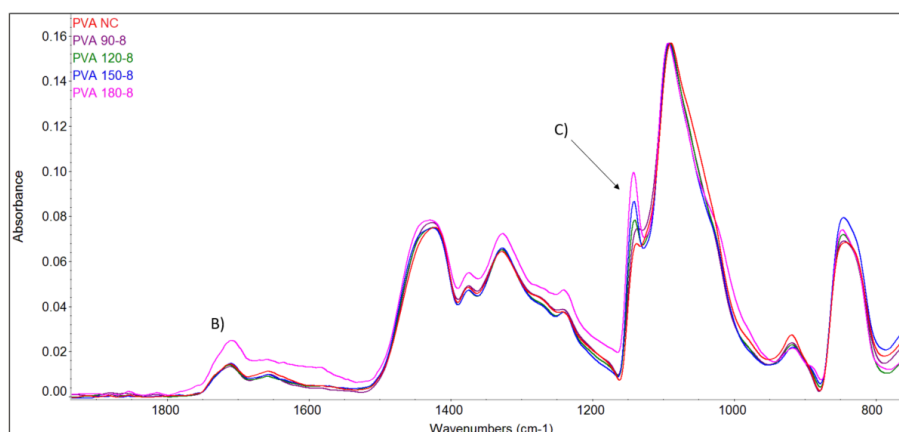
Obrázek 5.8: Schéma vzniku etherových můstků mezi řetězci PVA vlivem HT

nostňována eliminace hydroxylových skupin ze struktury PVA nad tvorbou etherových můstků nukleofilní substitucí. To však neodpovídá trendu získaných infračervených spekter, kdy absorpance v oblasti $1\ 140\ \text{cm}^{-1}$ rostla s vyššími teplotami stabilizace. V případě experimentu prováděného v rámci této práce však nebyl použit kyselý katalyzátor. Ke vzniku etherových můstků by tak možná mohlo docházet i bez přítomnosti kyselého katalyzátoru a pro širší interval teplot. Pritchard a Akintola [71] ve své studii uvádějí, že pokud jsou ve struktuře PVA přítomny karbonylové skupiny, může docházet ke vzniku cyklických ketalových a acetalových struktur, jak je schématicky znázorněno na obrázku 5.9. Pokud by tedy vlivem HT docházelo ke vzniku karbonylových skupin, jak bylo navrženo výše, mohlo by docházet také ke vzniku zmíněných cyklických struktur. Oba popsané mechanismy vzniku vazby C–O–C by mě-



Obrázek 5.9: Schéma oxidace hydroxylových skupin PVA vlivem HT a vznik cyklických ketalových (a acetalových) struktur mezi řetězci PVA

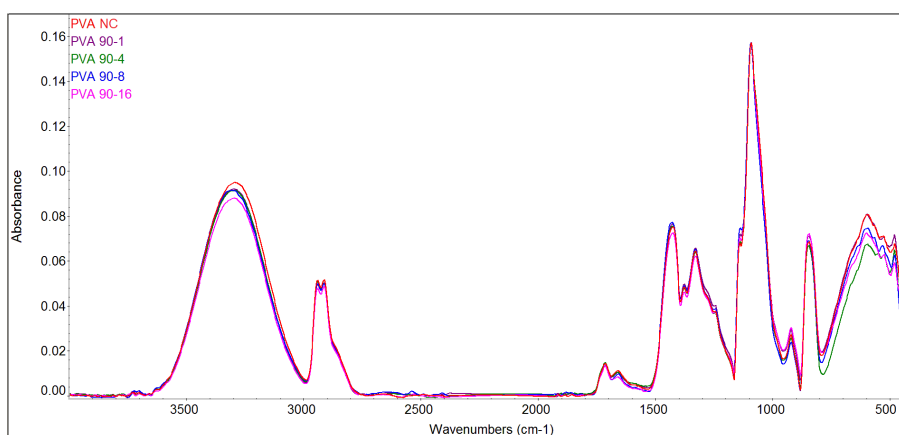
ly za následek kovalentní síťování polymeru. Kovalentní síťování by vedlo ke snížení rozpustnosti materiálu a při dostatečné hustotě síťování by se materiál mohl stát i nerozpustným, což bylo pozorováno u vzorků stabilizovaných při teplotě $180\ ^\circ\text{C}$.



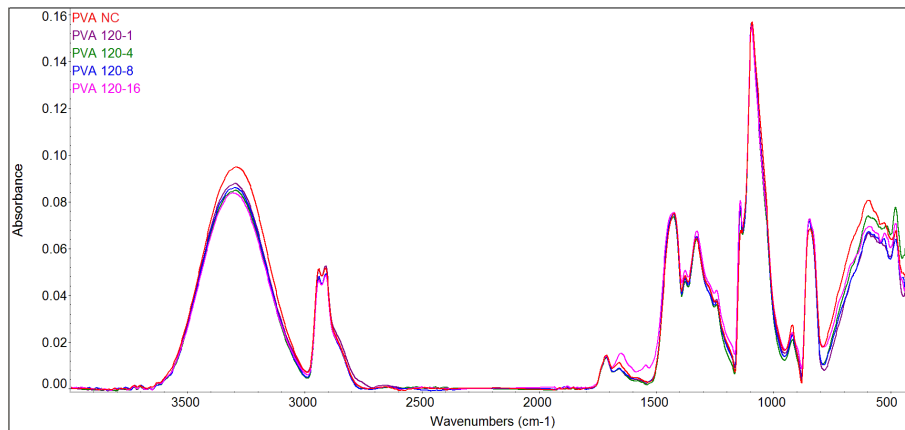
Obrázek 5.10: Analýza FTIR: detail oblasti infračervených spekter PVA nanovláken podrobených HT po dobu 8 h při teplotách 90, 120, 150 a 180 °C; PVA NC označuje materiál bez HT

Z infračervených spekter na obrázcích 5.5 a 5.10 je patrné, že k výše popsaným změnám ve struktuře PVA, které pravděpodobně souvisí s poklesem rozpustnosti stabilizovaných materiálů, docházelo i po HT při 90 a 120 °C. Z výsledků analýzy rozpustnosti PVA však vyšlo, že se materiály stabilizované při teplotách 90 a 120 °C rozpouštěly srovnatelně nebo i více, než materiál bez HT (viz obrázek 5.3 A, B). Tato nesrovnalost by mohla být způsobena zkreslenými výsledky analýzy na koncentraci PVA pomocí spektrofotometrie. Původ případného zkreslení je diskutován výše v části „Analýza rozpustnosti materiálů“.

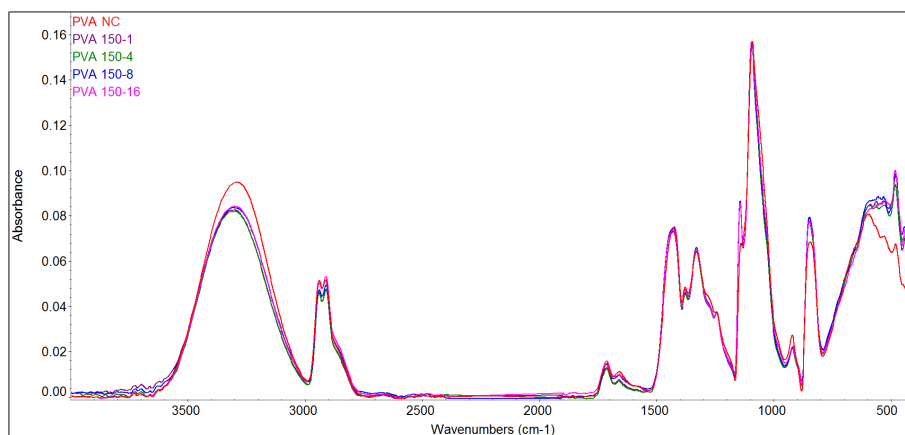
Na obrázcích 5.11, 5.12, 5.13 a 5.14 jsou vždy uvedena spektra materiálů s odpovídající teplotou HT, ve kterých je možné pozorovat změny spekter vyvolané vlivem různých časů stabilizace. Ze zmíněných obrázků je patrné, že prodloužení doby stabilizace zpravidla vedlo k menším změnám než v případě zvýšení teploty HT.



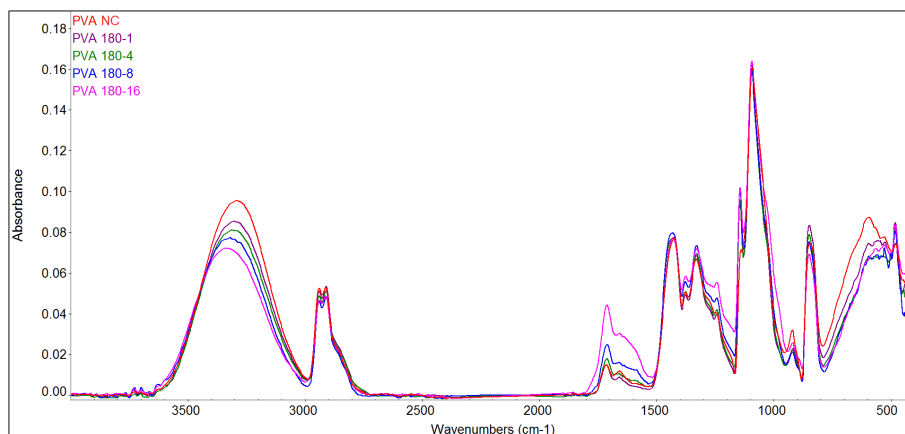
Obrázek 5.11: Analýza FTIR: infračervená spektra PVA nanovláken podrobených HT při 90 °C po dobu 1, 4, 8 a 16 h; PVA NC označuje materiál bez HT



Obrázek 5.12: Analýza FTIR: infračervená spektra PVA nanovláken podrobených HT při 120 °C po dobu 1, 4, 8 a 16 h; PVA NC označuje materiál bez HT



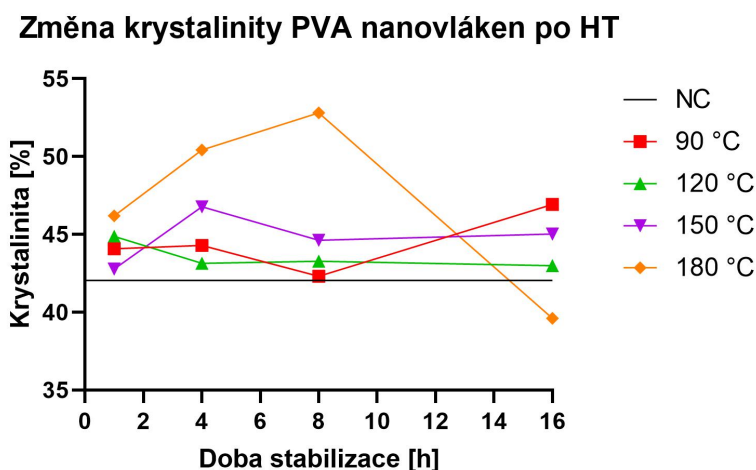
Obrázek 5.13: Analýza FTIR: infračervená spektra PVA nanovláken podrobených HT při 150 °C po dobu 1, 4, 8 a 16 h; PVA NC označuje materiál bez HT



Obrázek 5.14: Analýza FTIR: infračervená spektra PVA nanovláken podrobených HT při 180 °C po dobu 1, 4, 8 a 16 h; PVA NC označuje materiál bez HT

Analýza krystalinity materiálů

Krystalinita materiálů podrobených HT byla zjišťována pomocí DSC. Proces této analýzy je popsán v kapitole 4.3.6. Z grafu na obrázku 5.15 je patrné, že pro HT při teplotách 90, 120 a 150 °C nevznikal žádný výrazný trend závislosti krystalinity materiálu na podmínkách stabilizace. Ačkoliv u teploty 180 °C podle výsledků vznikl trend zvyšování obsahu krystalické fáze s rostoucí dobou stabilizace, pro nejdelší čas stabilizace (16 h) byl naopak zaznamenán prudký pokles krystalinity materiálu. Hodnota krystalinity v tomto vzorku klesla dokonce pod hodnotu krystalinity nestabilizovaného materiálu. Absorbance infračerveného záření o vlnočtu $1\ 140\ \text{cm}^{-1}$ však vykazovala velmi pravidelný trend v získaných infračervených spektrech stabilizovaných materiálů, kdy se zvyšovala jak s rostoucím časem, tak s rostoucí teplotou HT (viz obrázek 5.10). Tento pík tak pravděpodobně není citlivý pouze na obsah krystalické fáze v materiálu, ale může souviset s dalšími změnami v materiálu vyvolanými vlivem HT (vznik vazby C–O–C, diskutováno výše v části „Analýza chemických a strukturních změn materiálů“). Je však nutné podotknout, že analýza krystalinity probíhala vždy pouze z jednoho vzorku pro každé podmínky HT. Dle vyjádření Ing. Luboše Běhálka, Ph.D., který měření pomocí DSC prováděl, může být krystalická fáze v materiálu nehomogenně rozprostřena a výsledná hodnota krystalinity pro daný materiál se tak může značně měnit v závislosti na tom, ze které části materiálu byl odebrán vzorek určený k DSC analýze. Pro zpřesnění výsledků a získání lepší představy o krystalinitě materiálů by tak bylo nutné proměřit více vzorků pro každé podmínky HT a získané výsledky zprůměrovat. Vliv na přesnost výsledků může mít také fakt, že vzorky po HT byly skladovány v laboratoři při proměnlivých podmínkách. Pro získání spolehlivějších výsledků by bylo vhodné skladovat materiály v prostředí s řízenými podmínkami, především s řízenou vlhkostí, tedy např. v exikátoru.



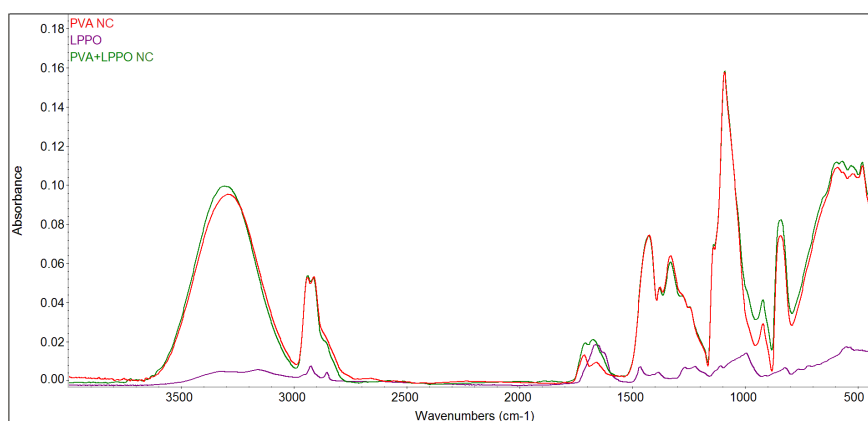
Obrázek 5.15: Graf reprezentující změny krystalinity nanovláknenných materiálů z PVA vlivem HT – závislost krystalinity materiálu na době stabilizace pro teploty stabilizace 90, 120, 150 a 180 °C; NC označuje materiál bez HT

5.2 Tepelná stabilizace nanovláknenného materiálu z PVA s obsahem aktivní látky

V této kapitole je uvedena charakteristika připraveného nanovláknenného materiálu z PVA s obsahem LPPO, tepelná stabilizace tohoto materiálu při vybraných teplotách (90, 120 a 150 °C) a časech (1, 4 a 8 h) a výsledky provedených analýz popisujících vliv HT na vlastnosti a stabilitu výsledných materiálů. Nanovláknenný materiál z PVA s obsahem LPPO bude dále označován také jako PVA+LPPO nanovláknena. Jednotlivé stabilizované materiály budou nadále označovány jako PVA+LPPO X Y (X = teplota stabilizace, Y = čas stabilizace), tedy PVA+LPPO 120 °C 4 h označuje materiál stabilizovaný při 120 °C po dobu 4 hodin. Jako PVA+LPPO NC bude označována negativní kontrola, tedy materiál bez HT.

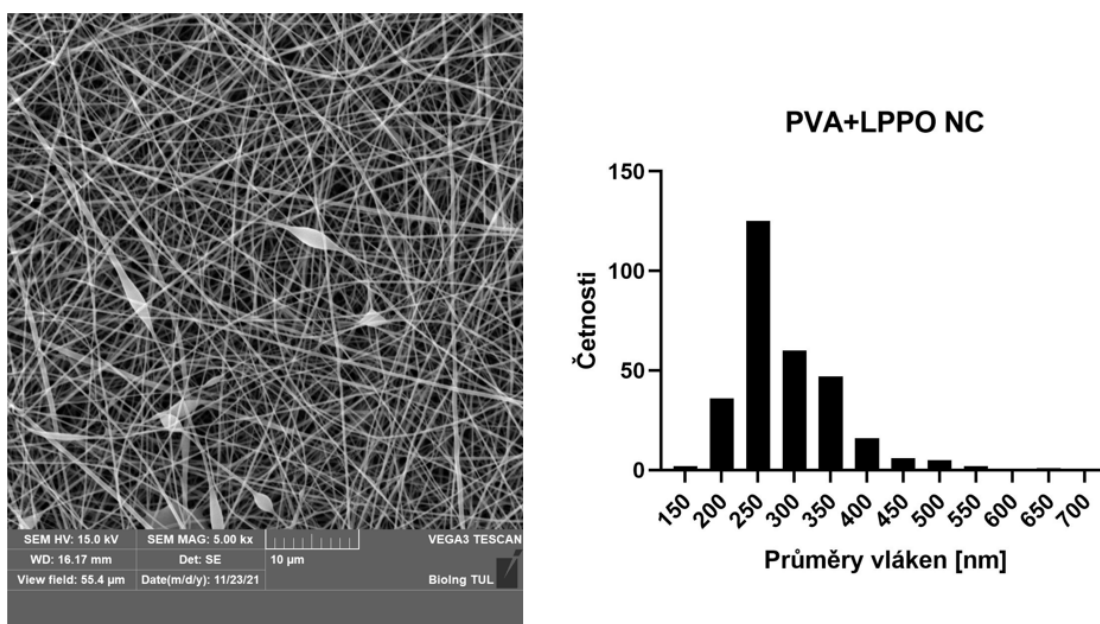
5.2.1 Příprava a charakteristika nanovláknenného materiálu z PVA s obsahem aktivní látky

Informace o zvoleném roztoku pro zvlákňování, jeho přípravě a samotném procesu bezjehlového stejnosměrného elektrického zvlákňování s použitím technologie NanospiderTM jsou uvedeny v kapitole 4.3.1. Pro přípravu kompaktní nanovláknenné vrstvy s dostatečnou plošnou hmotností bylo zvlákňování na daný podkladový materiál provedeno celkem dvakrát (na první zvlákňovanou vrstvu byla nanosená vrstva druhá). Připravený materiál měl plošnou hmotnost $9,11 \pm 0,29$ g/m². Střední průměr vláken byl 290 ± 70 nm. Teoretický obsah LPPO v sušině materiálu byl 5 hm%. Přítomnost LPPO v nanovláknenném materiálu prokázala analýza pomocí FTIR. Na obrázku 5.16 jsou infračervená spektra obou vstupních materiálů (PVA a PVA+LPPO nanovláken) bez stabilizace a infračervené spektrum použitého LPPO DR6180. Patrný rozdíl ve spektrech v oblasti vlnočtů $1\ 600\text{ cm}^{-1}$ až $1\ 750\text{ cm}^{-1}$ je způsoben přítomností inkorporované látky u PVA+LPPO nanovláken.



Obrázek 5.16: Analýza FTIR: infračervená spektra nestabilizovaných PVA nanovláken (PVA NC), nestabilizovaných PVA+LPPO nanovláken (PVA+LPPO NC) a použitého LPPO DR6180 (LPPO)

Snímek připraveného materiálu ze skenovací elektronové mikroskopie spolu s histogramem distribuce průměrů vláken je na obrázku 5.17. Při porovnání zmíněného obrázku s obrázkem 5.1 je patrné, že nanovláknenný materiál s obsahem LPPO měl výrazně menší průměry vláken než PVA nanovláknena bez obsahu LPPO. Ve struktuře nanovláken bylo přítomno malé množství defektů kapkovitého tvaru (viz obrázek 5.17). Rovněž byly pozorovány defekty způsobené fúzí okolních vláken. Původ obou typů defektů je popsán v kapitole 5.1.1. Ze vstupního materiálu byly připraveny vzorky pro HT.



Obrázek 5.17: Snímek připraveného nanovláknenného materiálu z PVA s obsahem LPPO ze skenovací elektronové mikroskopie (měřítko 10 µm) s příslušným histogramem distribuce průměrů vláken

5.2.2 Tepelná stabilizace nanovláknenného materiálu z PVA s obsahem aktivní látky

Na základě výsledků optimalizace HT provedené s nanovláknennými materiály z PVA byly pro stabilizaci PVA+LPPO nanovláken vybrány teploty 90, 120 a 150 °C a časy 1, 4 a 8 h. Teplota stabilizace 180 °C použita nebyla, jelikož záměrem nebylo připravit materiál zcela nerozpustný ve vodném prostředí. Materiál bylo potřeba stabilizovat pouze do té míry, aby došlo ke snížení rozpustnosti nanovláken z PVA, což by potenciálně mohlo vést ke zpomalení uvolňování inkorporované látky (LPPO) z materiálu. Dále byla odstraněna stabilizace po dobu 16 h, protože nebyl prokázán velký rozdíl mezi rozpustností materiálů stabilizovaných po dobu 8 h a po dobu 16 h. Zároveň je eliminována stabilizace, při které dochází k velké zátěži inkorporované látky dlouhodobým působením vysoké teploty. HT byla provedena dle postupu popsaného v kapitole 3.2.1. Vysoké teploty stabilizace způsobovaly obdobné změny

odstínů stabilizovaných materiálů z bílé na žlutou až oranžovou jako u PVA nanovláken s odpovídajícími parametry stabilizace (viz obrázek 5.2). Ke změně odstínu dochází pravděpodobně v důsledku vzniku konjugovaných dvojných vazeb v řetězcích PVA, jak je popsáno v kapitole 5.1.2.

5.2.3 Analýza nanovláknenných materiálů z PVA s obsahem aktivní látky po tepelné stabilizaci

Pro vyhodnocení vlivu tepelné stabilizace na PVA+LPPO nanovláknena posloužily výsledky z analýz prováděných analogicky jako u PVA nanovláken bez LPPO (viz kapitola 5.2.3). Změny morfologie byly analyzovány pomocí skenovací elektronové mikroskopie, změny v rozpustnosti PVA pomocí spektrofotometrie, strukturní a chemické změny pomocí FTIR a změny v obsahu krystalické fáze pomocí DSC. Navíc byly přidány analýzy uvolňování LPPO z nanovláken ve vodném prostředí pomocí spektrofotometrie a pomocí kapalinové chromatografie.

Analýza morfologie materiálů

Analýza morfologie stabilizovaných materiálů probíhala postupem popsaným v kapitole 4.3.3. Ze získaných výsledků plyne, že vlivem HT nedocházelo k výrazným změnám středních průměrů vláken. Všechny vzorky měly střední průměr vláken v intervalu od 280 nm do 310 nm, viz tabulka 5.3. V tabulce 5.4 jsou pak vybrané snímky stabilizovaných vzorků ze skenovací elektronové mikroskopie reprezentující oba extrémy stabilizace. Rovněž jsou v tabulce uvedeny histogramy distribuce průměrů vláken příslušných vzorků. Snímky vzorků stabilizovaných při ostatních podmínkách HT jsou spolu s příslušnými histogramy distribuce průměrů vláken uvedeny jako přílohy (viz tabulka 5.6).

Tabulka 5.3: Střední průměry vláken stabilizovaných nanovláknenných materiálů z PVA s obsahem LPPO

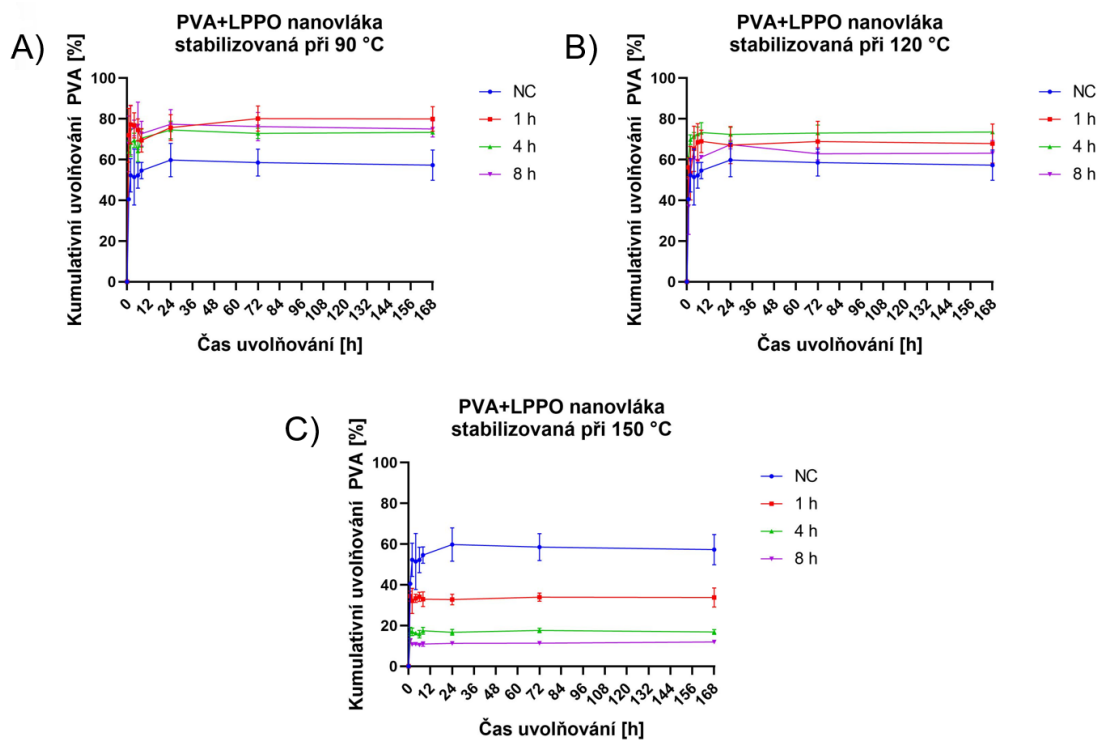
Materiál	Průměr [nm]
PVA+LPPO 90 °C 1 h	280 ± 70
PVA+LPPO 90 °C 4h	280 ± 80
PVA+LPPO 90 °C 8 h	310 ± 90
PVA+LPPO 120 °C 1 h	290 ± 70
PVA+LPPO 120 °C 4 h	300 ± 60
PVA+LPPO 120 °C 8 h	300 ± 70
PVA+LPPO 150 °C 1 h	300 ± 70
PVA+LPPO 150 °C 4 h	300 ± 70
PVA+LPPO 150 °C 8 h	280 ± 70

Tabulka 5.4: Snímky nanovláčkových materiálů z PVA s obsahem LPPO ze skenovací elektronové mikroskopie (měřítko 10 μm) reprezentující oba extrémní stabilizace s příslušnými histogramy distribuce průměrů vláken

HT	SEM snímek vzorku	Histogram průměrů vláken																										
PVA+LPPO 90 °C 1 h		<p>PVA+LPPO 90 °C 1 h</p> <table border="1"> <caption>Data for PVA+LPPO 90 °C 1 h histogram</caption> <thead> <tr> <th>Průměr vláken [nm]</th> <th>Četnosti</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>150</td><td>0</td></tr> <tr><td>200</td><td>18</td></tr> <tr><td>250</td><td>38</td></tr> <tr><td>300</td><td>28</td></tr> <tr><td>350</td><td>10</td></tr> <tr><td>400</td><td>3</td></tr> <tr><td>450</td><td>2</td></tr> <tr><td>500</td><td>1</td></tr> <tr><td>550</td><td>3</td></tr> <tr><td>600</td><td>0</td></tr> <tr><td>650</td><td>0</td></tr> <tr><td>700</td><td>0</td></tr> </tbody> </table>	Průměr vláken [nm]	Četnosti	150	0	200	18	250	38	300	28	350	10	400	3	450	2	500	1	550	3	600	0	650	0	700	0
Průměr vláken [nm]	Četnosti																											
150	0																											
200	18																											
250	38																											
300	28																											
350	10																											
400	3																											
450	2																											
500	1																											
550	3																											
600	0																											
650	0																											
700	0																											
PVA+LPPO 150 °C 8 h		<p>PVA+LPPO 150 °C 8 h</p> <table border="1"> <caption>Data for PVA+LPPO 150 °C 8 h histogram</caption> <thead> <tr> <th>Průměr vláken [nm]</th> <th>Četnosti</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>150</td><td>0</td></tr> <tr><td>200</td><td>16</td></tr> <tr><td>250</td><td>40</td></tr> <tr><td>300</td><td>23</td></tr> <tr><td>350</td><td>12</td></tr> <tr><td>400</td><td>5</td></tr> <tr><td>450</td><td>2</td></tr> <tr><td>500</td><td>1</td></tr> <tr><td>550</td><td>0</td></tr> <tr><td>600</td><td>0</td></tr> <tr><td>650</td><td>1</td></tr> <tr><td>700</td><td>0</td></tr> </tbody> </table>	Průměr vláken [nm]	Četnosti	150	0	200	16	250	40	300	23	350	12	400	5	450	2	500	1	550	0	600	0	650	1	700	0
Průměr vláken [nm]	Četnosti																											
150	0																											
200	16																											
250	40																											
300	23																											
350	12																											
400	5																											
450	2																											
500	1																											
550	0																											
600	0																											
650	1																											
700	0																											

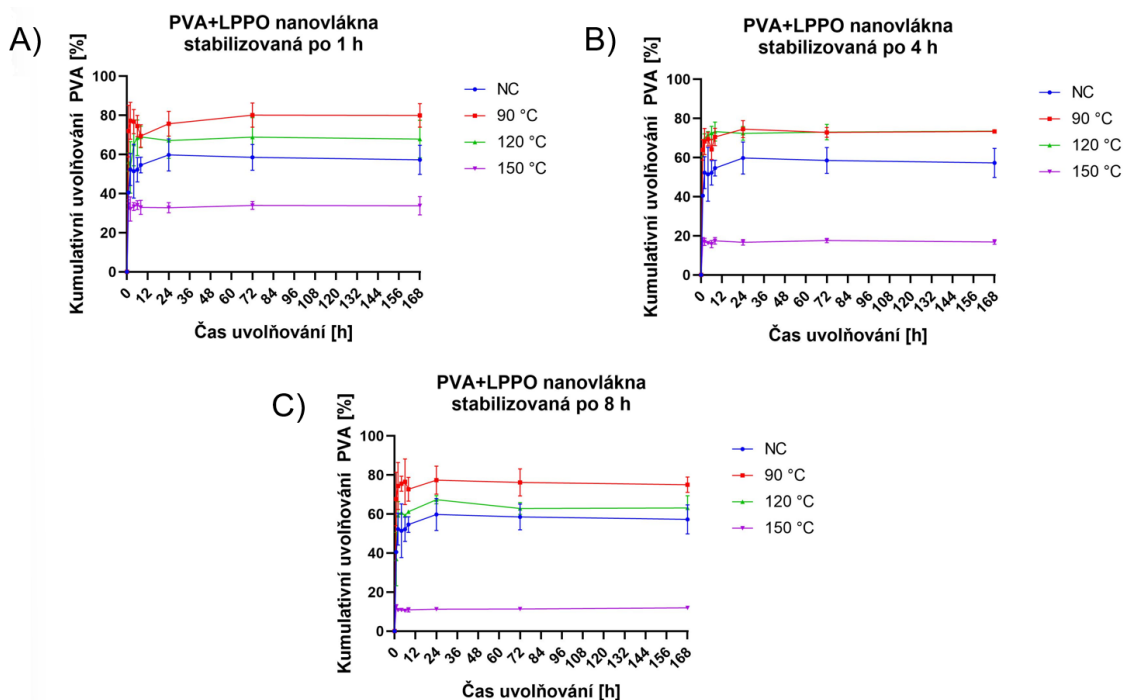
Analýza rozpustnosti materiálů

Proces přípravy a analýzy vzorků sloužících k určení vlivu HT na rozpustnost PVA pomocí spektrofotometrie je popsán v kapitole 4.3.4. Grafy na obrázku 5.18 znázorňují vliv prodloužení doby HT při dané teplotě stabilizace na rozpustnost PVA+LPPO nanovláček v PBS při 37 °C. Podle výsledků analýzy se materiály stabilizované při teplotách 90 a 120 °C rozpouštěly více než nestabilizovaný materiál, což koresponduje s výsledky analýzy rozpustnosti PVA nanovláček (viz kapitola 5.1.3, část „Analýza změn rozpustnosti materiálů“). U nestabilizovaného materiálu se po 7 dnech rozpustilo cca 60 % z celkové hmotnosti vzorku (obrázek 5.18 A, B, C), zatímco u vzorků po HT na 90 °C se uvolnilo 75 až 80 % (obrázek 5.18 A) a u vzorků po HT na 120 °C 63 až 73 % (obrázek 5.18 B), vždy v závislosti na době stabilizace. Dále je ze zmíněných grafů patrné, že u těchto materiálů nedocházelo s rostoucí dobou HT k navyšování jejich stability.



Obrázek 5.18: Grafy zobrazující kumulativní uvolňování PVA (vyjádřeno v % celkové hmotnosti vzorku) z PVA+LPPO nanovláček v závislosti na čase uvolňování – porovnání vlivu doby HT na stabilitu PVA nanovláček pro danou teplotu stabilizace: A) 90 °C, B) 120 °C a C) 150 °C; NC označuje materiál bez HT

Výrazné snížení rozpustnosti bylo zaznamenáno až po HT při 150 °C, a to pro všechny časy stabilizace, což je dobře patrné z grafů na obrázku 5.19. Rozpustnost navíc klesala úměrně s delší dobou stabilizace (viz obrázek 5.18 C). Pokles rozpustnosti PVA+LPPO nanovláček po stabilizaci při 150 °C byl však méně výrazný než v případě PVA nanovláček s odpovídajícími parametry HT. Zatímco u vzorku PVA 150 °C 1 h se po 7 dnech v PBS uvolnilo necelých 14 % z celkové hmotnosti vzorku (obrázek 5.3 C), u vzorku PVA+LPPO 150 °C 1 h se rozpustilo přes 30 % (obrázek 5.18 C), tedy více než 2× tolik. I u ostatních časů HT při teplotě 150 °C se PVA+LPPO nanovláčka rozpouštěla více než nanovláčka bez LPPO s odpovídajícím časem stabilizace (PVA 150 °C 4 h – 10 %, PVA 150 °C 8 h – 4 %, PVA+LPPO 150 °C 4 h – 16 %, PVA+LPPO 150 °C 8 h – 11 %). Tento efekt by mohl být způsoben přítomností molekul LPPO ve struktuře nanovláček, které zabraňují vzniku vodíkových můstků mezi řetězci PVA a narušují možnost tvorby krystalické fáze v materiálech. Pokles dostupných mezimolekulových interakcí mezi řetězci PVA tak může vést ke snížení vlivu HT na stabilitu materiálu.

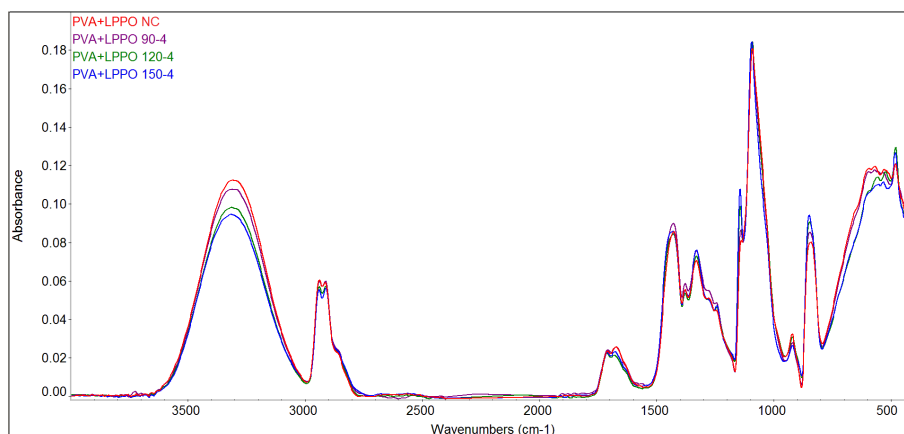


Obrázek 5.19: Grafy zobrazující kumulativní uvolňování PVA (vyjádřeno v % celkové hmotnosti vzorku) z PVA+LPPO nanovláken v závislosti na čase uvolňování – porovnání vlivu teploty HT na stabilitu PVA nanovláken pro danou dobu stabilizace: A) 1 h HT, B) 4 h HT a C) 8 h HT; NC označuje materiál bez HT

Grafy na obrázku 5.19 porovnávají změny rozpustnosti PVA+LPPO nanovláken způsobené zvýšením teploty HT při konstantní době stabilizace. Nárůst hmotnosti kumulativně uvolněného PVA nastával pouze při prvních odběrech. Po určité době uvolňování (6 až 8 h) se hmotnost rozpuštěného PVA ustálila na určité hodnotě a dále již nerostla.

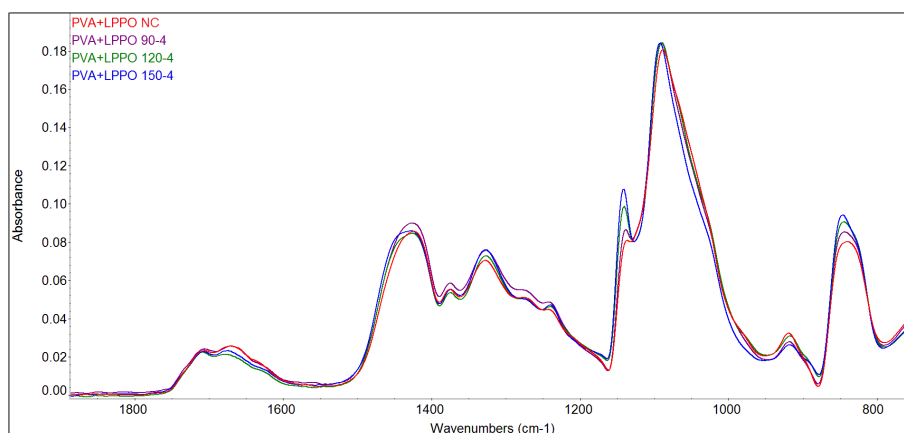
Analýza chemických a strukturních změn materiálů

Chemické a strukturní změny PVA+LPPO nanovláken vyvolané působením vysokých teplot při HT byly analyzovány pomocí FTIR. Průběh analýzy je popsán v kapitole 4.3.5. Pro porovnání vlivu rostoucí teploty HT na chemické a strukturní změny byla vybrána infračervená spektra materiálů stabilizovaných po dobu 4 h, viz obrázky 5.20 a 5.21. Zbylá spektra materiálů s odpovídajícími časy HT jsou uvedena jako přílohy (viz obrázky 5.34 a 5.35). Z výsledků analýzy pomocí FTIR je patrné, že se ve spektrech objevují velmi pravidelné trendy. S rostoucí teplotou i zvyšujícím se časem HT docházelo jednak ke snížení absorpce v absorpčním pásu v oblasti vlnočtů $3\ 100\ \text{cm}^{-1}$ až $3\ 500\ \text{cm}^{-1}$ (obrázek 5.20), a dále také ke zvýšení absorpce infračerveného záření o vlnočtu okolo $1\ 140\ \text{cm}^{-1}$ (obrázky 5.20 a 5.21). Vlivem HT tedy u PVA+LPPO nanovláken nastávaly velmi podobné změny, související pravděpodobně se stabilitou nanovláken ve vodném prostředí, jako tomu bylo u PVA nanovláken bez LPPO (viz kapitola 5.1.3, část „Analýza chemických a struk-



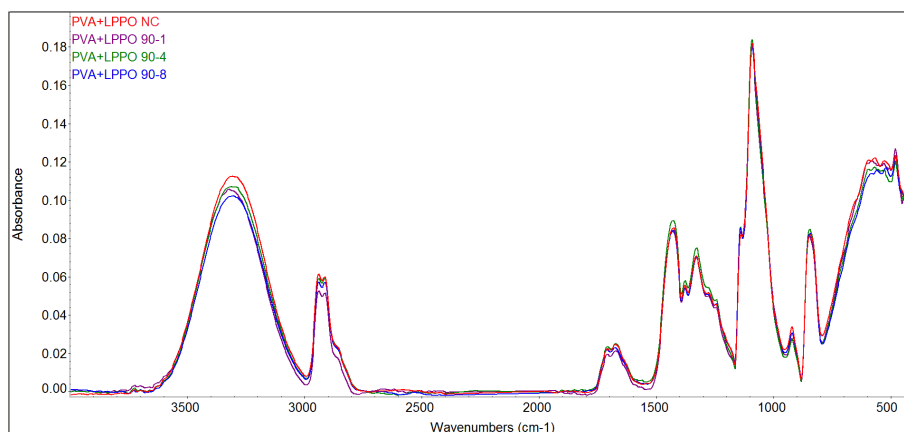
Obrázek 5.20: Analýza FTIR: infračervená spektra PVA+LPPO nanovláken podrobených HT po dobu 4 h při teplotách 90, 120 a 150 °C; PVA+LPPO NC označuje materiál bez HT

turních změn materiálů“). V absorpčním pásu vlnočtů $1\ 600\ \text{cm}^{-1}$ až $1\ 750\ \text{cm}^{-1}$ nebyly u stabilizovaných materiálů pozorovány žádné výrazné změny. Avšak u PVA nanovláken nastávaly výrazné změny v této oblasti až po HT při 180 °C (obrázek 5.14), která pro stabilizaci PVA+LPPO nanovláken nebyla použita.

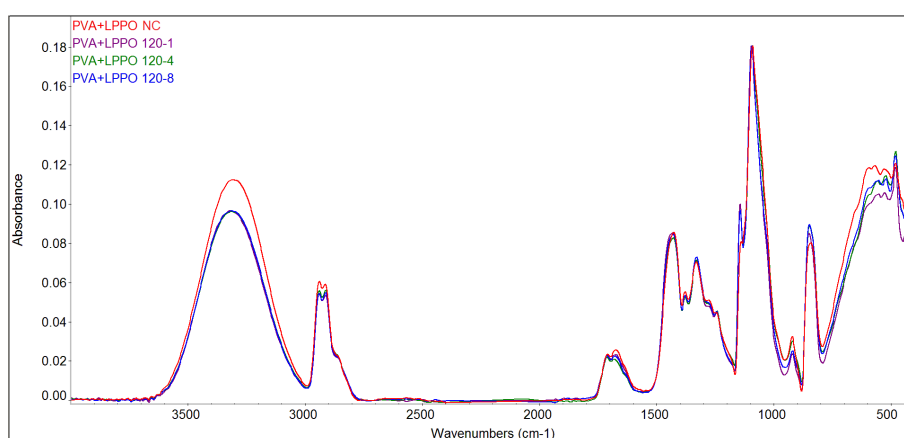


Obrázek 5.21: Analýza FTIR: detail oblasti infračervených spekter PVA+LPPO nanovláken podrobených HT po dobu 4 h při teplotách 90, 120 a 150 °C; PVA+LPPO NC označuje materiál bez HT

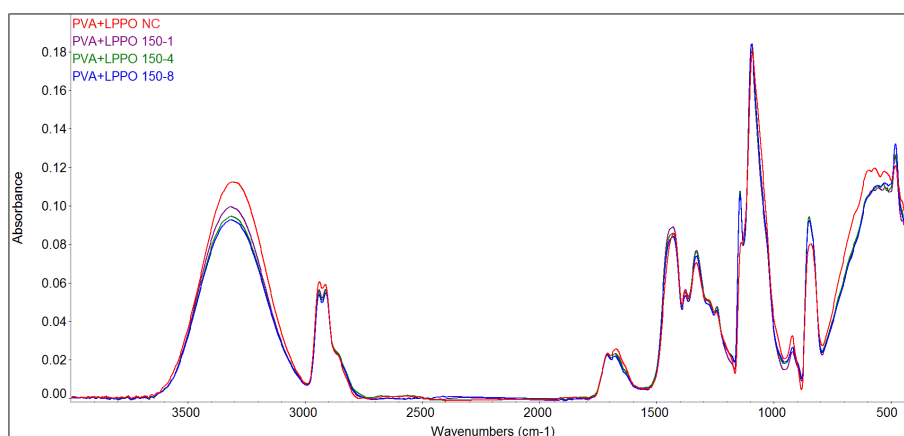
Prodloužení doby stabilizace zpravidla způsobovalo menší chemické a strukturální změny v materiálech, než tomu bylo v případě zvýšení teploty HT, což je dobře patrné z infračervených spekter vzorků s odpovídající teplotou stabilizace uvedené na obrázcích 5.22, 5.23 a 5.24. To koresponduje s výsledky získanými v rámci analýzy prováděné s PVA nanovláknky bez LPPO (viz kapitola 5.1.3, část „Analýza chemických a strukturálních změn materiálů“).



Obrázek 5.22: Analýza FTIR: infračervená spektra PVA+LPPO nanovláken podrobených HT při 90 °C po dobu 1, 4 a 8 h; PVA+LPPO NC označuje materiál bez HT



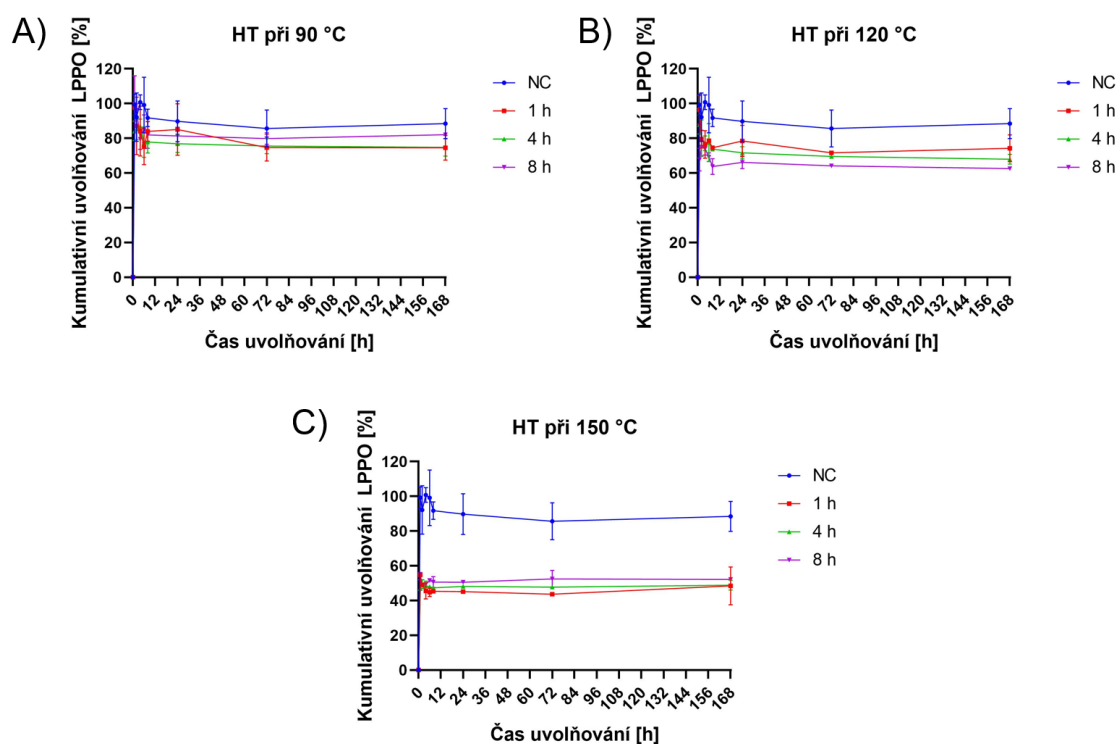
Obrázek 5.23: Analýza FTIR: infračervená spektra PVA+LPPO nanovláken podrobených HT při 120 °C po dobu 1, 4 a 8 h; PVA+LPPO NC označuje materiál bez HT



Obrázek 5.24: Analýza FTIR: infračervená spektra PVA+LPPO nanovláken podrobených HT při 150 °C po dobu 1, 4 a 8 h; PVA+LPPO NC označuje materiál bez HT

Analýza uvolňování aktivní látky z materiálů

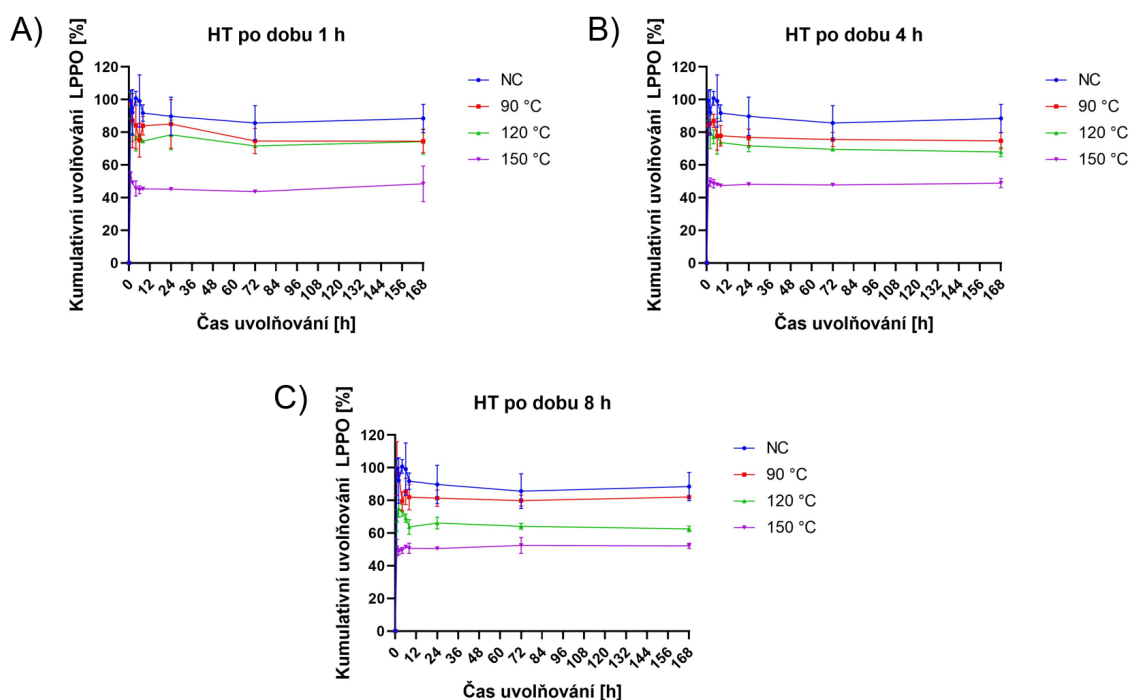
Vliv HT na rychlost uvolňování LPPO byl analyzován pomocí spektrofotometrie. Příprava vzorků a proces analýzy jsou popsány v kapitole 4.3.4. Grafy na obrázku 5.25 porovnávají vliv doby HT na uvolňování LPPO při dané teplotě stabilizace. Kumulativně uvolněný LPPO je vyjádřen v procentech maximální teoretické hmotnosti inkorporované látky, což v případě 10 mg vzorku nanovláčenného materiálu s 5% obsahem LPPO v sušině představuje 0,5 mg. Z výsledků analýzy lze konstatovat, že se s rostoucí teplotou stabilizace snižovalo množství uvolněného LPPO z nanovláčenných materiálů nasazených v PBS a inkubovaných při 37 °C. Zatímco se v případě nestabilizovaného materiálu uvolnilo téměř 100 % LPPO



Obrázek 5.25: Grafy zobrazující kumulativní uvolňování LPPO (vyjádřeno v % teoretické maximální hmotnosti) z PVA+LPPO nanovláček v závislosti na čase uvolňování – porovnání vlivu doby HT na uvolňování LPPO pro danou teplotu stabilizace: A) 90 °C, B) 120 °C a C) 150 °C; NC označuje materiál bez HT

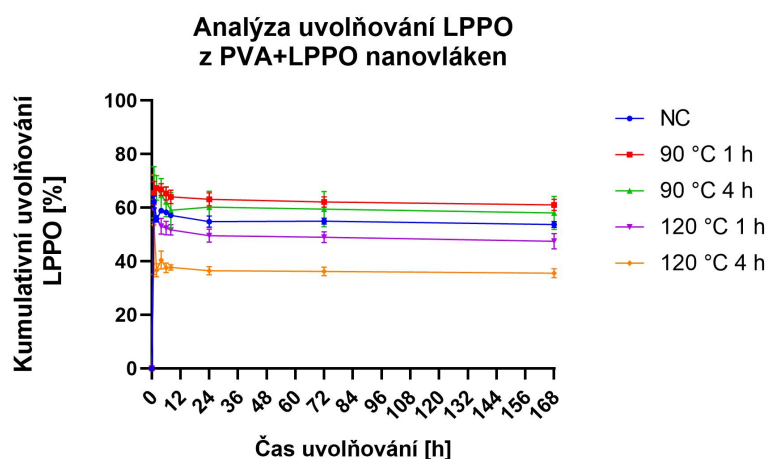
přítomného v nanovláčkách (obrázek 5.25 A, B, C), u vzorků po HT při 90 °C se uvolnilo až 80 % (obrázek 5.25 A), po HT při 120 °C až 70 % (obrázek 5.25 B) a po HT při 150 °C se uvolnilo již pouze 50 % LPPO (obrázek 5.25 C) obsaženého ve stabilizovaných materiálech. Z těchto výsledků lze usoudit, že i HT při teplotách 90 a 120 °C vedla k určité stabilizaci materiálů ve vodním prostředí. Dále je z grafů na obrázku 5.25 patrné, že s výjimkou HT při 120 °C nebylo pozorováno snížení množství uvolněného LPPO úměrně s delšími časy stabilizace.

Z průběhů grafů na obrázcích 5.26 a 5.25 lze usuzovat, že se celkové množství uvolněného LPPO uvolnilo téměř ihned po nasazení materiálu do zkumavky s PBS a v průběhu následujících 7 dní již koncentrace uvolněného LPPO v podstatě nerostla. U všech materiálů přetrvával efekt „burst-release“. Výsledky analýzy tedy ukazují, že spíše než ke zpomalení uvolňování docházelo vlivem HT ke snížení celkového množství uvolněné aktivní látky z nanovláčenného materiálu nasazeného ve vodném prostředí. Dále jsou v grafech na obrázcích 5.26 a 5.25 u většiny vzorků pozorovatelné zvýšené hodnoty uvolněného LPPO pro nízké časy uvolňování (do 6 h) a následný prudký pokles těchto hodnot. Vzhledem k tomu, že je v grafech vyneseno kumulativní uvolňování, hodnoty uvolněného LPPO teoreticky nemohou takto klesat. Tato nesrovnalost by mohla být způsobena např. degradací LPPO po stabilizaci ve vodném prostředí v průběhu uvolňování, vzájemnými interakcemi mezi molekulami LPPO nebo interakcemi těchto molekul s řetězci PVA. Předpoklad degradace by bylo možné ověřit změřením příslušného absorpčního spektra LPPO pomocí spektrofotometrie, změřením jeho infračerveného spektra pomocí FTIR, případně analýzou jeho struktury s použitím nukleární magnetické rezonance. Je třeba také zmínit možné zkreslení výsledků způsobené problémy při odběru alikvotních vzorků určených k analýze rozpustnosti PVA a uvolňování LPPO, jak je diskutováno v kapitole 5.1.3, část „Analýza rozpustnosti materiálů“.



Obrázek 5.26: Grafy zobrazující kumulativní uvolňování LPPO (vyjádřeno v % teoretické maximální hmotnosti) z PVA+LPPO nanovláček v závislosti na čase uvolňování – porovnání vlivu teploty HT na uvolňování LPPO pro danou dobu stabilizace: A) 1 h, B) 4 h a C) 8 h; NC označuje materiál bez HT

U vzorků PVA+LPPO nanovláken s vybranými teplotami (90 a 120 °C) a časy (1 a 4 h) HT bylo množství uvolněného LPPO v odebraných alikvótech analyzováno také pomocí HPLC. Tato analýza byla prováděna Mgr. Vítem Novotným z Oddělení enviromentální chemie CXI TUL. Metodika přípravy vzorků a proces samotné analýzy jsou popsány ve studii DoPham et al. [56]. Výsledky analýzy, shrnuté v grafu na obrázku 5.27, vykazují obdobný trend zvýšených hodnot uvolněného LPPO pro nízké časy uvolňování, jako byly pozorovány u výsledků získaných pomocí spektrofotometrie.



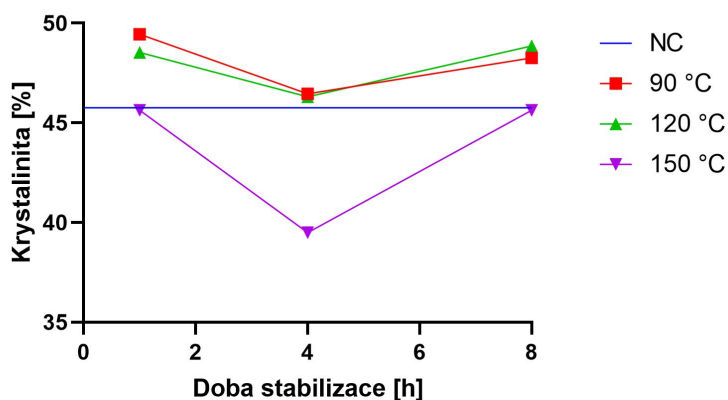
Obrázek 5.27: Graf zobrazující HPLC analýzu kumulativního uvolňování LPPO (vyjádřeno v % teoretické maximální hmotnosti) z vybraných vzorků stabilizovaných PVA+LPPO nanovláken v závislosti na čase uvolňování; NC označuje materiál bez HT

Analýza krystalinity materiálů

Postup DSC analýzy, která sloužila k určení krystalinity materiálů, je popsán v kapitole 4.3.6. Získané výsledky analýzy jsou shrnuty v grafu na obrázku 5.28. U analyzovaných vzorků nebyl pozorován pravidelný trend růstu krystalinity s delšími dobami stabilizace. Ve zmíněném grafu je možné pozorovat zvláštní trend poklesu krystalinity u vzorků stabilizovaných po dobu 4 h. Obdobný trend nebyl u PVA nanovláken bez LPPO zaznamenán (viz obrázek 5.15). Rovněž nebyl pozorován pravidelný trend růstu obsahu krystalické fáze ve vzorcích s vyššími teplotami stabilizace. Ačkoliv po stabilizaci při teplotách 90 a 120 °C došlo k určitému vzrůstu krystalinity, materiály stabilizované při teplotě 150 °C měly podle výsledků analýzy stejnou, nebo dokonce nižší krystalinitu než nestabilizovaný materiál. Naproti tomu absorbance infračerveného záření v oblasti vlnočtů okolo 1 140 cm^{-1} narůstala úměrně s rostoucími časy i dobami stabilizace (viz obrázek 5.21). Ze získaných výsledků by bylo možné předpokládat, že zmíněný absorpční pík v infračerveném spektru stabilizovaných materiálů nemusí být citlivý pouze na obsah krystalické fáze v materiálu, ale může souviset také s dalšími změnami vyvolanými HT, které jsou

uvedeny v kapitole 5.1.3, část „Analýza chemických a strukturních změn materiálů“. Výsledky analýzy krystalinity lze však posuzovat spíše jako orientační, jelikož měření krystalinity každého materiálu probíhalo pouze z jednoho vzorku a vzorky po HT byly skladovány při podmínkách v laboratoři. Zpřesnění výsledků by vyžadovalo přípravu a analýzu více vzorků pro každý z parametrů HT a také skladování stabilizovaných materiálů v prostředí s řízenými podmínkami (např. exsikátor).

Změna krystalinity PVA+LPPO nanovláken po HT



Obrázek 5.28: Graf reprezentující změny krystalinity nanovláčkových materiálů z PVA s obsahem LPPO vlivem HT – závislost krystalinity materiálu na době stabilizace pro teploty stabilizace 90, 120 a 150 °C; NC označuje materiál bez HT

Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo prozkoumat vliv tepelné stabilizace působením vysokých teplot (HT) na stabilitu nanovláknenných materiálů založených na PVA ve vodném prostředí a také na uvolňování inkorporované látky z těchto materiálů. V rámci této práce byly připraveny jak nanovláknenné materiály z PVA bez obsahu LPPO (PVA nanovláknena), tak s obsahem LPPO (PVA+LPPO nanovláknena). Pro přípravu nanovláken byl zvolen PVA s vysokou molekulovou hmotností (125 000 g/mol) a vysokým stupněm hydrolyzy (98–98,8 %). Samotná výroba materiálů probíhala pomocí stejnosměrného elektrického zvláknění s použitím technologie NanospiderTM. Připravené materiály byly následně podrobeny tepelné stabilizaci působením vysokých teplot (90, 120, 150 a 180 °C) po zvolené časy (1, 4, 8 a 16 h). Stabilizované materiály byly analyzovány řadou metod za účelem vyhodnocení účinku HT na vlastnosti materiálů.

Připravená PVA nanovláknena měla střední průměr vláken 470 ± 120 nm a plošnou hmotnost $5,93 \pm 0,65$ g/m². Připravená PVA+LPPO nanovláknena měla výrazně nižší střední průměr vláken 290 ± 70 nm v porovnání s nanovláknem bez LPPO. Plošná hmotnost připravených PVA+LPPO nanovláken byla $9,11 \pm 0,29$ g/m².

Připravené materiály byly stabilizovány při vybraných teplotách a časech. Analýza morfologie materiálů po stabilizaci ukázala, že vlivem HT nedocházelo k výrazné změně průměrů vláken ani pro jeden z typů materiálů. Analýza rozpustnosti PVA neprokázala, že by HT při teplotách 90 a 120 °C snižovala rozpustnost PVA nebo PVA+LPPO nanovláken. Většina vzorků se po stabilizaci při těchto teplotách dokonce rozpouštěla více, než materiály bez stabilizace. Zatímco u nestabilizovaných materiálů se v průběhu 7 dní rozpustilo 60 % z celkové hmotnosti vzorku, u materiálů po HT při 90 °C to bylo až 80 % a u materiálů po HT při 120 °C až 73 %. K výraznému snížení rozpustnosti nanovláken docházelo až po HT při 150 °C, kdy se v závislosti na době stabilizace rozpustilo 4 až 13 % z celkové hmotnosti vzorku v případě PVA nanovláken a 11 až 30 % v případě PVA+LPPO nanovláken. Pro teplotu 150 °C klesala rozpustnost materiálů úměrně s rostoucí dobou stabilizace. U teplot 90 a 120 °C tento trend nebyl vždy zachován. PVA nanovláknena se po HT při 180 °C stala nerozpustnými, a to pro jakoukoliv délku stabilizace. Pro stabilizaci PVA+LPPO nanovláken tato teplota použita nebyla. Snížení rozpustnosti materiálů nastávalo vlivem strukturních a chemických změn, ke kterým docházelo působením vysokých teplot při HT. Na základě porovnání získaných infračervených spekter s dostupnou literaturou lze předpokládat několik mechanismů uplatňujících

se při změnách v rozpustnosti stabilizovaných materiálů:

- Vlivem HT nejspíše dochází k odpařování zbytkového rozpouštědla (vody), které v materiálech zůstávalo po procesu zvlákňování. Odstranění zbytkových molekul vody umožňuje těsnější uspořádání řetězců PVA a vznik vodíkových můstků přímo mezi segmenty polymeru doprovázené zvýšením krystalinity materiálů, čímž došlo ke stabilizaci materiálů.
- Aplikace vysokých teplot pravděpodobně způsobuje odštěpování hydroxylových skupin z řetězců PVA, což vede ke vzniku konjugovaných dvojných vazeb. Tento proces je také doprovázen změnou zbarvení materiálu z bílé přes žlutou do oranžové až hnědé.
- Působení vysokých teplot na materiál může dále způsobit jeho kovalentní síťování, konkrétně vznik vazby C–O–C. Tato vazba by mohla vznikat buď tvorbou etherových můstků mezi řetězci PVA, nebo za předpokladu, že vlivem HT docházelo k oxidaci některých hydroxylových skupin na karbonylové, také tvorbou ketalových, případně acetalových cyklických struktur.

Absorpční pásy odpovídající výše popsaným změnám vykazovaly velmi pravidelné trendy v závislosti na rostoucí době i teplotě HT.

Analýza uvolňování LPPO neprokázala, že by vlivem HT docházelo ke zpomalení uvolňování LPPO z materiálů. Veškeré uvolněné LPPO se uvolnilo téměř ihned po vložení materiálu do vodného prostředí. Podle výsledků však docházelo ke snížení celkového množství uvolněného LPPO. Zatímco v případě nestabilizovaného materiálu se uvolnilo téměř 100 % LPPO přítomného v nanovláčkách, u vzorků po HT při 90 °C se uvolnilo až 80 %, po HT při 120 °C se uvolnilo až 70 % a u vzorků po HT na 150 °C se uvolnilo již pouze 50 % LPPO. Prodloužení doby stabilizace nemělo výrazný vliv na množství uvolněného LPPO ani pro jednu z teplot HT. Je však třeba ověřit, zda získané výsledky prokazující snížení celkového množství uvolněného LPPO, nemohou být způsobeny také jeho současnou degradací ve vodném prostředí, vzájemnými interakcemi mezi molekulami LPPO nebo interakcemi těchto molekul s řetězci PVA.

Z výsledků získaných v rámci této práce lze konstatovat, že vlivem HT dochází ke stabilizaci nanovláčkových materiálů z PVA ve vodném prostředí, tedy ke snížení jejich rozpustnosti. Předpoklad, že se s rostoucí teplotou stabilizace snižuje celkové množství uvolněného LPPO z materiálu, je třeba dále ověřit. V návaznosti na experimenty prováděné v rámci této práce by bylo přínosné blíže prozkoumat interval teplot HT 120 až 150 °C, kde docházelo k největším změnám v rozpustnosti nanovláčkových materiálů z PVA. Za účelem zpřesnění výsledků analýzy rozpustnosti pomocí spektrofotometrie by bylo vhodné pro následující experimenty vylepšit metodu odběru vzorků. Přesnější analýza krystalinity materiálů by vyžadovala provést měření s větším počtem vzorků a vzorky po HT skladovat v prostředí s regulovanými vlastnostmi. Další informace o struktuře stabilizovaných materiálů by mohla

přinést analýza pomocí nukleární magnetické rezonance a rentgenová difrakční analýza. Dále by bylo vhodné blíže prozkoumat proces uvolňování LPPO ze struktury nanovláken z PVA a také jeho dlouhodobou stabilitu a chování ve vodném prostředí ve smyslu vzájemných interakcí mezi jeho molekulami a interakcemi s přítomným polymerem.

Použitá literatura

- [1] LANGER, Robert a Joseph P. VACANTI. Tissue Engineering. *Science*. 1993, roč. 260, č. 5110, s. 920–926. ISSN 0036-8075. Dostupné z DOI: [10.1126/science.8493529](https://doi.org/10.1126/science.8493529).
- [2] LANZA, Robert, Robert LANGER, Joseph P. VACANTI a Anthony ATALA. *Principles of Tissue Engineering*. 5th ed. Waltham: Elsevier, 2020. ISBN 978-0-12-818422-6.
- [3] WOLFOVÁ, Lucie, Lucy VOJTOVÁ, Lucie JUREČKOVÁ a Lenka KOVÁŘOVÁ. *Úvod do tkáňového inženýrství*. Česká republika: MediaBros s.r.o., 2015. ISBN 978-80-260-9720-4.
- [4] MANSBRIDGE, Jonathan. Skin tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2012, roč. 19, č. 8, s. 955–968. ISSN 0920-5063. Dostupné z DOI: [10.1163/156856208784909417](https://doi.org/10.1163/156856208784909417).
- [5] BANNASCH, H, M FÖHN, T UNTERBERG, A.D BACH, B WEYAND a G.B STARK. Skin tissue engineering. *Clinics in Plastic Surgery*. 2003, roč. 30, č. 4, s. 573–579. ISSN 00941298. Dostupné z DOI: [10.1016/S0094-1298\(03\)00075-0](https://doi.org/10.1016/S0094-1298(03)00075-0).
- [6] BÖTTCHER-HABERZETH, Sophie, Thomas BIEDERMANN a Ernst REICHMANN. Tissue engineering of skin. *Burns*. 2010, roč. 36, č. 4, s. 450–460. ISSN 03054179. Dostupné z DOI: [10.1016/j.burns.2009.08.016](https://doi.org/10.1016/j.burns.2009.08.016).
- [7] BACAKOVA, Lucie, Marketa ZIKMUNDOVA, Julia PAJOROVA, Antonin BROZ, Elena FILOVA, Andreu BLANQUER, Roman MATEJKA, Jana STEPANOVSKA, Petr MIKES, Vera JENCOVA, Eva Kuzelova KOSTAKOVA a Alla SINICA. Nanofibrous scaffolds for skin tissue engineering and wound healing based on synthetic polymers. *Applications of Nanobiotechnology*. 2020. ISBN 978-1-78985-977-5. Dostupné z DOI: [10.5772/intechopen.88744](https://doi.org/10.5772/intechopen.88744).
- [8] FRANTZ, Christian, Kathleen M. STEWART a Valerie M. WEAVER. The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*. 2010, roč. 123, č. 24, s. 4195–4200. ISSN 1477-9137. Dostupné z DOI: [10.1242/jcs.023820](https://doi.org/10.1242/jcs.023820).
- [9] JÄRVELÄINEN, Hannu, Annele SAINIO, Markku KOULU, Thomas N. WIGHT a Risto PENTTINEN. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews*. 2009, roč. 61, č. 2, s. 198–223. ISSN 0031-6997. Dostupné z DOI: [10.1124/pr.109.001289](https://doi.org/10.1124/pr.109.001289).

- [10] DALEY, William P., Sarah B. PETERS a Melinda LARSEN. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *Journal of Cell Science*. 2008, roč. 121, č. 3, s. 255–264. ISSN 1477-9137. Dostupné z DOI: [10.1242/jcs.006064](https://doi.org/10.1242/jcs.006064).
- [11] JENČOVÁ, Věra, Eva Kuželová KOŠŤÁKOVÁ, Petr MIKEŠ, Věra HEDVIČÁKOVÁ a David LUKÁŠ. *Nanovlákná: teorie, technologie a použití*. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2021. ISBN 978-80-7494-539-7.
- [12] POOLE, Joshua J. A. a Leila B. MOSTAÇO-GUIDOLIN. Optical Microscopy and the Extracellular Matrix Structure: A Review. *Cells*. 2021, roč. 10, č. 7. ISSN 2073-4409. Dostupné z DOI: [10.3390/cells10071760](https://doi.org/10.3390/cells10071760).
- [13] BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. *Memoria histologie*. 2. vydání. Praha: Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-249-7.
- [14] ALBERTS, Bruce, Dennis BRAY, Alexander JOHNSON, Julian LEWIS, Martin RAFF, Keith ROBERTS a Peter WALTER. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero, 1998. ISBN 80-902-9060-4.
- [15] BOOT-HANDFORD, Raymond P. a Danny S. TUCKWELL. Fibrillar collagen: The key to vertebrate evolution? A tale of molecular incest. *BioEssays*. 2003, roč. 25, č. 2, s. 142–151. ISSN 02659247. Dostupné z DOI: [10.1002/bies.10230](https://doi.org/10.1002/bies.10230).
- [16] CHAN, B. P. a K. W. LEONG. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*. 2008, roč. 17, č. S4, s. 467–479. ISSN 0940-6719. Dostupné z DOI: [10.1007/s00586-008-0745-3](https://doi.org/10.1007/s00586-008-0745-3).
- [17] DOLCIMASCOLO, Anna, Giovanna CALABRESE, Sabrina CONOCI a Rosalba PARENTI. Innovative biomaterials for tissue engineering. In: *Biomaterial-supported Tissue Reconstruction or Regeneration*. IntechOpen, 2019. ISBN 978-1-83880-377-3. Dostupné z DOI: [10.5772/intechopen.83839](https://doi.org/10.5772/intechopen.83839).
- [18] ZHONG, S. P., Y. Z. ZHANG a C. T. LIM. Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2010, roč. 2, č. 5, s. 510–525. ISSN 1939-5116. Dostupné z DOI: [10.1002/wnan.100](https://doi.org/10.1002/wnan.100).
- [19] O'BRIEN, Fergal J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*. 2011, roč. 14, č. 3, s. 88–95. ISSN 13697021. Dostupné z DOI: [10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X).
- [20] SHAKESHEFF, Kevin M., Scott M. CANNIZZARO a Robert LANGER. Creating biomimetic micro-environments with synthetic polymer-peptide hybrid molecules. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2012, roč. 9, č. 5, s. 507–518. ISSN 0920-5063. Dostupné z DOI: [10.1163/156856298X00596](https://doi.org/10.1163/156856298X00596).

- [21] SEBRA, Robert P., Sirish K. REDDY, Kristyn S. MASTERS, Christopher N. BOWMAN a Kristi S. ANSETH. Controlled polymerization chemistry to graft architectures that influence cell-material interactions. *Acta Biomaterialia*. 2007, roč. 3, č. 2, s. 151–161. ISSN 17427061. Dostupné z DOI: [10.1016/j.actbio.2006.07.010](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2006.07.010).
- [22] GHASEMI-MOBARAKEH, Laleh. Structural properties of scaffolds: Crucial parameters towards stem cells differentiation. *World Journal of Stem Cells*. 2015, roč. 7, č. 4, s. 728–744. ISSN 1948-0210. Dostupné z DOI: [10.4252/wjsc.v7.i4.728](https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i4.728).
- [23] OKAMOTO, Masami. The role of scaffolds in tissue engineering. *Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume One*. 2019, s. 23–49. ISBN 9780081025635. Dostupné z DOI: [10.1016/B978-0-08-102563-5.00002-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102563-5.00002-2).
- [24] PINA, Sandra, Viviana P. RIBEIRO, Catarina F. MARQUES, F. Raquel MAIA, Tiago H. SILVA, Rui L. REIS a J. Miguel OLIVEIRA. Scaffolding Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *Materials*. 2019, roč. 12, č. 11. ISSN 1996-1944. Dostupné z DOI: [10.3390/ma12111824](https://doi.org/10.3390/ma12111824).
- [25] MA, Peter X. Scaffolds for tissue fabrication. *Materials Today*. 2004, roč. 7, č. 5, s. 30–40. ISSN 13697021. Dostupné z DOI: [10.1016/S1369-7021\(04\)00233-0](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(04)00233-0).
- [26] GUPTA, Kailash Chandra, Adnan HAIDER, Yu-ri CHOI a Inn-kyu KANG. Nanofibrous scaffolds in biomedical applications. *Biomaterials Research*. 2014, roč. 18, č. 1. ISSN 2055-7124. Dostupné z DOI: [10.1186/2055-7124-18-5](https://doi.org/10.1186/2055-7124-18-5).
- [27] DAHLIN, Rebecca L., F. Kurtis KASPER a Antonios G. MIKOS. Polymeric Nanofibers in Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2011, roč. 17, č. 5, s. 349–364. ISSN 1937-3368. Dostupné z DOI: [10.1089/ten.teb.2011.0238](https://doi.org/10.1089/ten.teb.2011.0238).
- [28] ROŠIĆ, Romana, Petra KOCBEK, Jan PELIPENKO, Julijana KRISTL a Saša BAUMGARTNER. Nanofibers and their biomedical use. *Acta Pharmaceutica*. 2013, roč. 63, č. 3, s. 295–304. ISSN 1846-9558. Dostupné z DOI: [10.2478/acph-2013-0024](https://doi.org/10.2478/acph-2013-0024).
- [29] ASGHARI, Fatemeh, Mohammad SAMIEI, Khosro ADIBKIA, Abolfazl AKBARZADEH a Soodabeh DAVARAN. Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2017, roč. 45, č. 2, s. 185–192. ISSN 2169-1401. Dostupné z DOI: [10.3109/21691401.2016.1146731](https://doi.org/10.3109/21691401.2016.1146731).
- [30] OZDIL, Deniz a Halil Murat AYDIN. Polymers for medical and tissue engineering applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2014, roč. 89, č. 12, s. 1793–1810. ISSN 02682575. Dostupné z DOI: [10.1002/jctb.4505](https://doi.org/10.1002/jctb.4505).
- [31] REDDY, M. Sai Bhargava, Deepalekshmi PONNAMMA, Rajan CHOUDHARY a Kishor Kumar SADASIVUNI. A Comparative Review of Natural and Synthetic Biopolymer Composite Scaffolds. *Polymers*. 2021, roč. 13, č. 7. ISSN 2073-4360. Dostupné z DOI: [10.3390/polym13071105](https://doi.org/10.3390/polym13071105).

- [32] NEMATI, Sorour, Se-jeong KIM, Young Min SHIN a Heungsoo SHIN. Current progress in application of polymeric nanofibers to tissue engineering. *Nano Convergence*. 2019, roč. 6, č. 1. ISSN 2196-5404. Dostupné z DOI: [10.1186/s40580-019-0209-y](https://doi.org/10.1186/s40580-019-0209-y).
- [33] JANOUSHKOVÁ, O. Synthetic Polymer Scaffolds for Soft Tissue Engineering. *Physiological Research*. 2018, roč. 67, č. 2, s. 335–348. ISSN 1802-9973. Dostupné z DOI: [10.33549/physiolres.933983](https://doi.org/10.33549/physiolres.933983).
- [34] GUO, BaoLin a Peter X. MA. Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review. *Science China Chemistry*. 2014, roč. 57, č. 4, s. 490–500. ISSN 1674-7291. Dostupné z DOI: [10.1007/s11426-014-5086-y](https://doi.org/10.1007/s11426-014-5086-y).
- [35] NAGARKAR, Rigved a Jatin PATEL. Polyvinyl Alcohol: A Comprehensive Study. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences*. 2019, roč. 3, č. 4, s. 34–44. ISSN 2581-5423.
- [36] HDIDAR, M., S. CHOUIKHI, A. FATTOUM a M. AROUS. Effect of hydrolysis degree and mass molecular weight on the structure and properties of PVA films. *Ionics*. 2017, roč. 23, č. 11, s. 3125–3135. ISSN 0947-7047. Dostupné z DOI: [10.1007/s11581-017-2103-0](https://doi.org/10.1007/s11581-017-2103-0).
- [37] KUMAR, Anuj a Sung Soo HAN. PVA-based hydrogels for tissue engineering: A review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2016, roč. 66, č. 4, s. 159–182. ISSN 0091-4037. Dostupné z DOI: [10.1080/00914037.2016.1190930](https://doi.org/10.1080/00914037.2016.1190930).
- [38] TEIXEIRA, Marta A., M. Teresa P. AMORIM a Helena P. FELGUEIRAS. Poly(Vinyl Alcohol)-Based Nanofibrous Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Polymers*. 2020, roč. 12, č. 1. ISSN 2073-4360. Dostupné z DOI: [10.3390/polym12010007](https://doi.org/10.3390/polym12010007).
- [39] HOLZWARTH, Jeremy M. a Peter X. MA. 3D nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry*. 2011, roč. 21, č. 28. ISSN 0959-9428. Dostupné z DOI: [10.1039/c1jm10522a](https://doi.org/10.1039/c1jm10522a).
- [40] SMITH, I. O., X. H. LIU, L. A. SMITH a P. X. MA. Nanostructured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2009, roč. 1, č. 2, s. 226–236. ISSN 1939-5116. Dostupné z DOI: [10.1002/wnan.26](https://doi.org/10.1002/wnan.26).
- [41] DOSHI, Jayesh a Darrell H. RENEKER. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Journal of Electrostatics*. 1995, roč. 35, č. 2-3, s. 151–160. ISSN 03043886. Dostupné z DOI: [10.1016/0304-3886\(95\)00041-8](https://doi.org/10.1016/0304-3886(95)00041-8).
- [42] RENEKER, Darrell H a Iksoo CHUN. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology*. 1996, roč. 7, č. 3, s. 216–223. ISSN 0957-4484. Dostupné z DOI: [10.1088/0957-4484/7/3/009](https://doi.org/10.1088/0957-4484/7/3/009).
- [43] LI, Yawen a Therese BOU-AKL. Electrospinning in Tissue Engineering. In: *Electrospinning - Material, Techniques, and Biomedical Applications*. InTech, 2016, s. 117–139. ISBN 978-953-51-2821-2. Dostupné z DOI: [10.5772/65836](https://doi.org/10.5772/65836).

- [44] JIRSÁK, O., F. SANETRNÍK, D. LUKÁŠ, V. KOTEK, L. MARTINOVÁ a J. CHALOUPEK. *A Method of nanofibers production from polymer solution using electrostatic spinning and a device for carrying out the method*. Patent CZ 294274 (B6), WO 2005024101. 2005. Dostupné také z: <https://patents.google.com/patent/CZ294274B6/en>.
- [45] WANG, Xin, Haitao NIU, Tong LIN a Xungai WANG. Needleless electrospinning of nanofibers with a conical wire coil. *Polymer Engineering & Science*. 2009, roč. 49, č. 8, s. 1582–1586. ISSN 00323888. Dostupné z DOI: [10.1002/pen.21377](https://doi.org/10.1002/pen.21377).
- [46] YOO, Hyuk Sang, Taek Gyoung KIM a Tae Gwan PARK. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009, roč. 61, č. 12, s. 1033–1042. ISSN 0169409X. Dostupné z DOI: [10.1016/j.addr.2009.07.007](https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.007).
- [47] ZHANG, Qiang, Yingchun LI, Zhi Yuan (William) LIN, Kenneth K.Y. WONG, Min LIN, Lara YILDIRIMER a Xin ZHAO. Electrospun polymeric micro/nanofibrous scaffolds for long-term drug release and their biomedical applications. *Drug Discovery Today*. 2017, roč. 22, č. 9, s. 1351–1366. ISSN 13596446. Dostupné z DOI: [10.1016/j.drudis.2017.05.007](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.05.007).
- [48] QIN, X. Coaxial electrospinning of nanofibers. *Electrospun Nanofibers*. 2017, s. 41–71. ISBN 9780081009079. Dostupné z DOI: [10.1016/B978-0-08-100907-9.00003-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100907-9.00003-9).
- [49] HU, Jun, Junchao WEI, Wanyun LIU a Yiwang CHEN. Preparation and characterization of electrospun PLGA/gelatin nanofibers as a drug delivery system by emulsion electrospinning. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2012, roč. 24, č. 8, s. 972–985. ISSN 0920-5063. Dostupné z DOI: [10.1080/09205063.2012.728193](https://doi.org/10.1080/09205063.2012.728193).
- [50] ZAHEDI, Payam, Iraj REZAEIAN, Seyed-Omid RANAIEI-SIADAT, Seyed-Hassan JAFARI a Pitt SUPAPHOL. A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. *Polymers for Advanced Technologies*. 2010, roč. 21, č. 2, s. 77–95. ISSN 10427147. Dostupné z DOI: [10.1002/pat.1625](https://doi.org/10.1002/pat.1625).
- [51] MIGUEL, Sónia P., Rosa S. SEQUEIRA, André F. MOREIRA, Cátia S.D. CABRAL, António G. MENDONÇA, Paula FERREIRA a Ilídio J. CORREIA. An overview of electrospun membranes loaded with bioactive molecules for improving the wound healing process. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2019, roč. 139, s. 1–22. ISSN 09396411. Dostupné z DOI: [10.1016/j.ejpb.2019.03.010](https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.03.010).
- [52] WANG, Linlin, Chen HU a Longquan SHAO. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*. 2017, roč. 12, s. 1227–1249. ISSN 1178-2013. Dostupné z DOI: [10.2147/IJN.S121956](https://doi.org/10.2147/IJN.S121956).

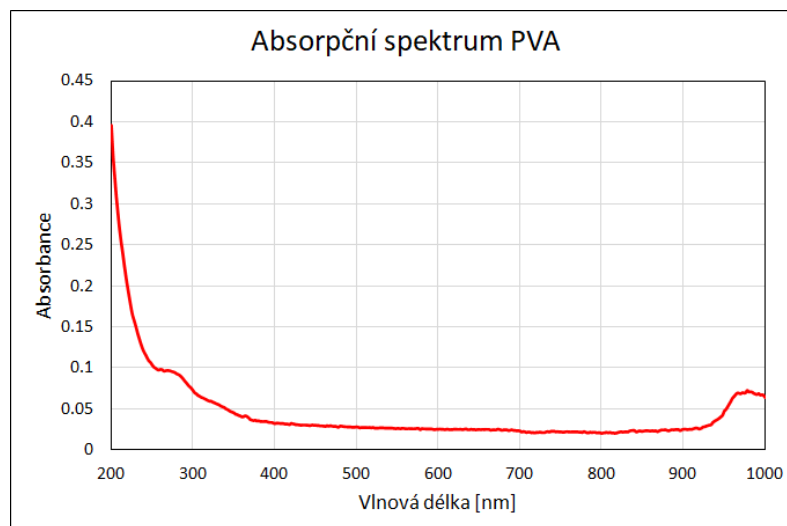
- [53] GODOY-GALLARDO, Maria, Ulrich ECKHARD, Luis M. DELGADO, Yolanda J.D. de ROO PUENTE, Mireia HOYOS-NOGUÉS, F. Javier GIL a Roman A. PEREZ. Antibacterial approaches in tissue engineering using metal ions and nanoparticles: From mechanisms to applications. *Bioactive Materials*. 2021, roč. 6, č. 12, s. 4470–4490. ISSN 2452199X. Dostupné z DOI: [10.1016/j.bioactmat.2021.04.033](https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.04.033).
- [54] FELGUEIRAS, Helena P. a M. Teresa P. AMORIM. Functionalization of electrospun polymeric wound dressings with antimicrobial peptides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017, roč. 156, s. 133–148. ISSN 09277765. Dostupné z DOI: [10.1016/j.colsurfb.2017.05.001](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.001).
- [55] LÁTROVÁ, Klára, Noemi HAVLOVÁ, Renata VEČEŘOVÁ, Dominik PINKAS, Kateřina BOGDANOVÁ, Milan KOLÁŘ, Radovan FIŠER, Ivo KONOPÁSEK, Duy Dinh Do PHAM, Dominik REJMAN a Gabriela MIKUŠOVÁ. Outer membrane and phospholipid composition of the target membrane affect the antimicrobial potential of first-and second-generation lipophosphonoxins. *Scientific Reports*. 2021, roč. 11, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z DOI: [10.1038/s41598-021-89883-0](https://doi.org/10.1038/s41598-021-89883-0).
- [56] PHAM, Duy Dinh Do, Věra JENČOVÁ, Miriam KAŇUCHOVÁ, Jan BAYRAM, Ivana GROSSOVÁ, Hubert ŠUCA, Lukáš URBAN, Kristýna HAVLÍČKOVÁ, Vít NOVOTNÝ, Petr MIKEŠ, Viktor MOJR, Nikifor ASATIANI, Eva Kuželová KOŠTÁKOVÁ, Martina MAIXNEROVÁ, Alena VLKOVÁ, Dragana VÍTOVSKÁ, Hana ŠANDEROVÁ, Alexandr NEMEC, Libor KRÁSNÝ, Robert ZAJÍČEK, David LUKÁŠ, Dominik REJMAN a Peter GÁL. Novel lipophosphonoxin-loaded polycaprolactone electrospun nanofiber dressing reduces *Staphylococcus aureus* induced wound infection in mice. *Scientific Reports*. 2021, roč. 11, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z DOI: [10.1038/s41598-021-96980-7](https://doi.org/10.1038/s41598-021-96980-7).
- [57] SZENTIVANYI, Andreas, Tanmay CHAKRADEO, Holger ZERNETSCH a Birgit GLASMACHER. Electrospun cellular microenvironments: Understanding controlled release and scaffold structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011, roč. 63, č. 4-5, s. 209–220. ISSN 0169409X. Dostupné z DOI: [10.1016/j.addr.2010.12.002](https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.12.002).
- [58] DING, Yaping, Wei LI, Feng ZHANG, Zehua LIU, Nazanin Zanzanizadeh EZAZI, Dongfei LIU a Hélder A. SANTOS. Electrospun Fibrous Architectures for Drug Delivery, Tissue Engineering and Cancer Therapy. *Advanced Functional Materials*. 2019, roč. 29, č. 2. ISSN 1616301X. Dostupné z DOI: [10.1002/adfm.201802852](https://doi.org/10.1002/adfm.201802852).
- [59] KOPRIVOVA, B., M. LISNENKO, K. SOLARSKA-SCIUK, R. PROCHAZKOVA, V. NOVOTNY, J. MULLEROVA, P. MIKES a V. JENCOVA. Large-scale electrospinning of poly (vinylalcohol) nanofibers incorporated with platelet-derived growth factors. *Express Polymer Letters*. 2020, roč. 14, č. 10, s. 987–1000. ISSN 1788618X. Dostupné z DOI: [10.3144/expresspolymlett.2020.80](https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2020.80).

- [60] CAMPIGLIO, Chiara Emma, Nicola Contessi NEGRINI, Silvia FARE` a Lorenza DRAGHI. Cross-Linking Strategies for Electrospun Gelatin Scaffolds. *Materials*. 2019, roč. 12, č. 15. ISSN 1996-1944. Dostupné z DOI: [10.3390/ma12152476](https://doi.org/10.3390/ma12152476).
- [61] MICHELE, Andre, Patrick PASCHKOWSKI, Christopher HÄNEL, Günter E. M. TOVAR, Thomas SCHIESTEL a Alexander SOUTHAN. Acid catalyzed cross-linking of polyvinyl alcohol for humidifier membranes. *Journal of Applied Polymer Science*. 2022, roč. 139, č. 6. ISSN 0021-8995. Dostupné z DOI: [10.1002/app.51606](https://doi.org/10.1002/app.51606).
- [62] CHAN, B. P. a K.-F. SO. Photochemical crosslinking improves the physicochemical properties of collagen scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2005, roč. 75A, č. 3, s. 689–701. ISSN 1549-3296. Dostupné z DOI: [10.1002/jbm.a.30469](https://doi.org/10.1002/jbm.a.30469).
- [63] MIRAFTAB, Mohsen, Abu Naser SAIFULLAH a Ahmet ÇAY. Physical stabilisation of electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibres: comparative study on methanol and heat-based crosslinking. *Journal of Materials Science*. 2015, roč. 50, č. 4, s. 1943–1957. ISSN 0022-2461. Dostupné z DOI: [10.1007/s10853-014-8759-1](https://doi.org/10.1007/s10853-014-8759-1).
- [64] EHRMANN, Andrea. Non-Toxic Crosslinking of Electrospun Gelatin Nanofibers for Tissue Engineering and Biomedicine—A Review. *Polymers*. 2021, roč. 13, č. 12. ISSN 2073-4360. Dostupné z DOI: [10.3390/polym13121973](https://doi.org/10.3390/polym13121973).
- [65] HASSAN, Christie M. a Nikolaos A. PEPPAS. Structure and Applications of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freezing/Thawing Methods. In: *Biopolymers · PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2000, s. 37–65. ISBN 978-3-540-67313-2. Dostupné z DOI: [10.1007/3-540-46414-X_2](https://doi.org/10.1007/3-540-46414-X_2).
- [66] WONG, Kenneth Kar Ho, Martin ZINKE-ALLMANG a Wankei WAN. Effect of annealing on aqueous stability and elastic modulus of electrospun poly(vinyl alcohol) fibers. *Journal of Materials Science*. 2010, roč. 45, č. 9, s. 2456–2465. ISSN 0022-2461. Dostupné z DOI: [10.1007/s10853-010-4217-x](https://doi.org/10.1007/s10853-010-4217-x).
- [67] HASIMI, A., A. STAVROPOULOU, K.G. PAPADOKOSTAKI a M. SANPOULOU. Transport of water in polyvinyl alcohol films: Effect of thermal treatment and chemical crosslinking. *European Polymer Journal*. 2008, roč. 44, č. 12, s. 4098–4107. ISSN 00143057. Dostupné z DOI: [10.1016/j.eurpolymj.2008.09.011](https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2008.09.011).
- [68] SONG, Yingxu, Sumei ZHANG, Jian KANG, Jinyao CHEN a Ya CAO. Water absorption dependence of the formation of poly(vinyl alcohol)-iodine complexes for poly(vinyl alcohol) films. *RSC Advances*. 2021, roč. 11, č. 46, s. 28785–28796. ISSN 2046-2069. Dostupné z DOI: [10.1039/D1RA04867H](https://doi.org/10.1039/D1RA04867H).

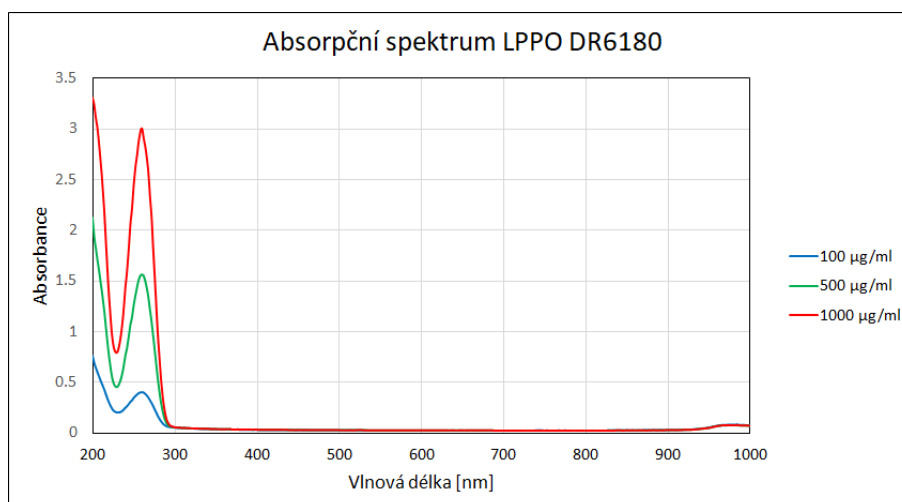
- [69] SMIRNOV, L. V., N. V. PLATONOVA a K. R. POPOV. Color change of poly(vinyl alcohol) during heat treatment (dehydration and formation of polyene fractions). *Journal of Applied Spectroscopy*. 1967, roč. 7, č. 1, s. 71–74. ISSN 0021-9037. Dostupné z DOI: [10.1007/BF00714709](https://doi.org/10.1007/BF00714709).
- [70] PROCHÁZKOVÁ, Lenka, Yadira RODRÍGUEZ-MUÑOZ, Jindřich PROCHÁZKA a Jiří WANNER. Simple spectrophotometric method for determination of polyvinylalcohol in different types of wastewater. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 2013, roč. 94, č. 4, s. 399–410. ISSN 0306-7319. Dostupné z DOI: [10.1080/03067319.2013.853761](https://doi.org/10.1080/03067319.2013.853761).
- [71] PRITCHARD, J. Complexation of polyvinyl alcohol with iodine Analytical precision and mechanism. *Talanta*. 1971, roč. 19, č. 7, s. 877–888. ISSN 00399140. Dostupné z DOI: [10.1016/0039-9140\(72\)80256-X](https://doi.org/10.1016/0039-9140(72)80256-X).
- [72] LISNENKO, Maxim. *Příprava a charakteristika nanovláčkových scaffoldů založených na PVA a jejich funkcionalizace růstovými faktory*. Liberec, 2020. Diplomová práce. Technická univerzita v Liberci.
- [73] BLANQUER, Andreu, Jana MUSILKOVA, Elena FILOVA, Johanka TABORSKA, Eduard BRYNDA, Tomas RIEDEL, Andrea KLAPSTOVA, Vera JENCOVA, Jana MULLEROVA, Eva Kuzelova KOSTAKOVA, Renata PROCHAZKOVA a Lucie BACAKOVA. The Effect of a Polyester Nanofibrous Membrane with a Fibrin-Platelet Lysate Coating on Keratinocytes and Endothelial Cells in a Co-Culture System. *Nanomaterials*. 2021, roč. 11, č. 2. ISSN 2079-4991. Dostupné z DOI: [10.3390/nano11020457](https://doi.org/10.3390/nano11020457).
- [74] KOPŘIVOVÁ, Barbora. *Funkcionalizace tkáňového nosiče založeného na PVA pomocí růstových faktorů*. Liberec, 2018. Diplomová práce. Technická univerzita v Liberci.
- [75] OMKARAM, I., R.P. Sreekanth CHAKRADHAR a J. Lakshmana RAO. EPR, optical, infrared and Raman studies of VO₂ ions in polyvinylalcohol films. *Physica B: Condensed Matter*. 2007, roč. 388, č. 1-2, s. 318–325. ISSN 09214526. Dostupné z DOI: [10.1016/j.physb.2006.06.134](https://doi.org/10.1016/j.physb.2006.06.134).
- [76] IMMELMAN, E., R. D. SANDERSON, E. P. JACOBS a A. J. Van REENEN. Poly(vinyl alcohol) gel sublayers for reverse osmosis membranes. I. Insolubilization by acid-catalyzed dehydration. *Journal of Applied Polymer Science*. 1993, roč. 50, č. 6, s. 1013–1034. ISSN 00218995. Dostupné z DOI: [10.1002/app.1993.070500611](https://doi.org/10.1002/app.1993.070500611).
- [77] MATSUBARA, Tsutomu a Tatsuya IMOTO. Thermal degradation of polyacetaldehyde having polyvinylalcohol-type structure. *Die Makromolekulare Chemie*. 1968, roč. 117, č. 1, s. 215–223. ISSN 0025116X. Dostupné z DOI: [10.1002/macp.1968.021170120](https://doi.org/10.1002/macp.1968.021170120).
- [78] TRETINNIKOV, O. N. a S. A. ZAGORSKAYA. Determination of the degree of crystallinity of poly(vinyl alcohol) by FTIR spectroscopy. *Journal of Applied Spectroscopy*. 2012, roč. 79, č. 4, s. 521–526. ISSN 0021-9037. Dostupné z DOI: [10.1007/s10812-012-9634-y](https://doi.org/10.1007/s10812-012-9634-y).

- [79] PEPPAS, Nikolaos A. Infrared spectroscopy of semicrystalline poly(vinyl alcohol) networks. *Die Makromolekulare Chemie*. 1977, roč. 178, č. 2, s. 595–601. ISSN 0025116X. Dostupné z DOI: [10.1002/macp.1977.021780228](https://doi.org/10.1002/macp.1977.021780228).
- [80] BHAT, N.V., M.M. NATE, M.B. KURUP, V.A. BAMBOLE a S. SABHARWAL. Effect of γ -radiation on the structure and morphology of polyvinyl alcohol films. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. 2005, roč. 237, č. 3-4, s. 585–592. ISSN 0168583X. Dostupné z DOI: [10.1016/j.nimb.2005.04.058](https://doi.org/10.1016/j.nimb.2005.04.058).

Přílohy



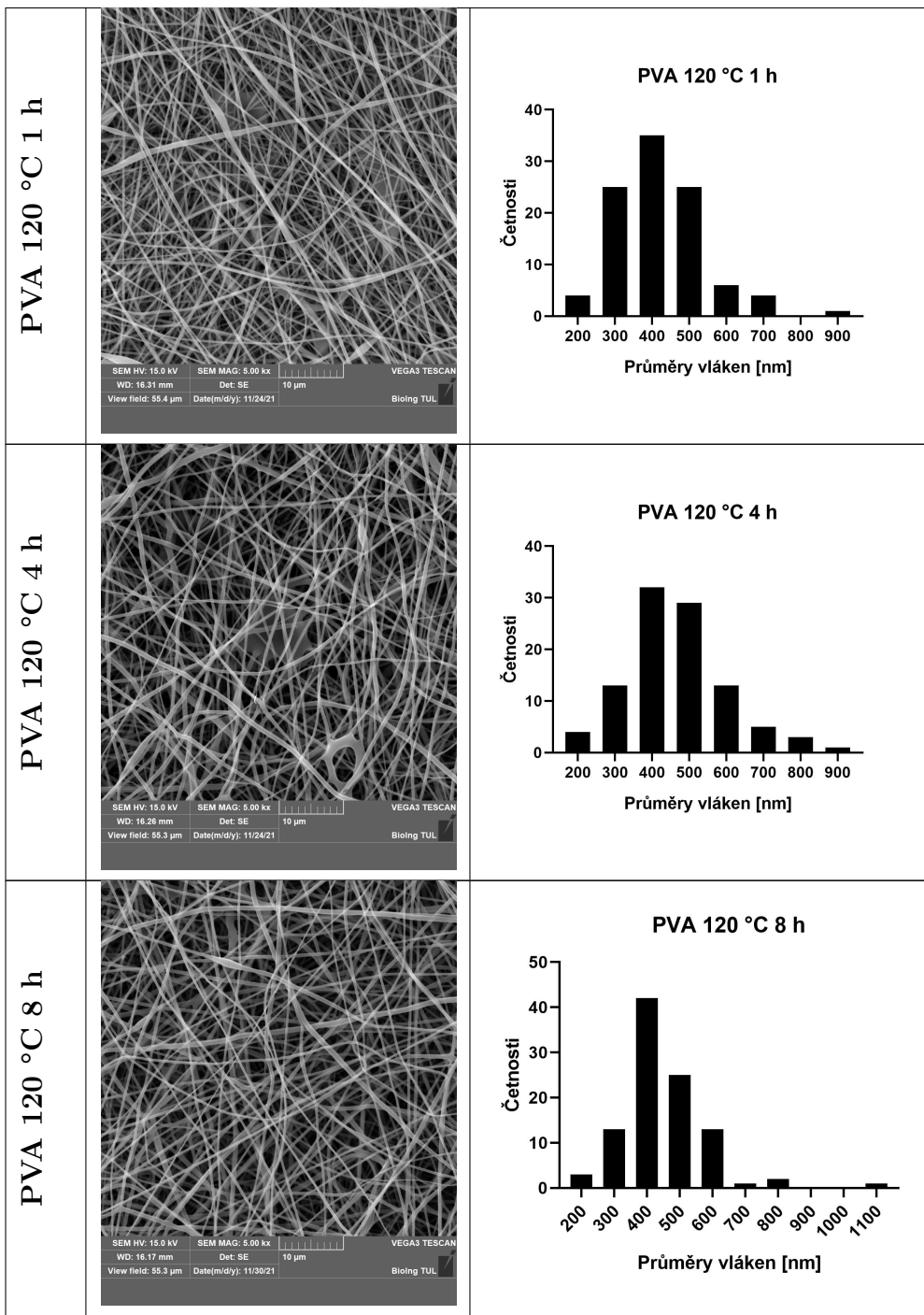
Obrázek 5.29: Absorpční spektrum PVA

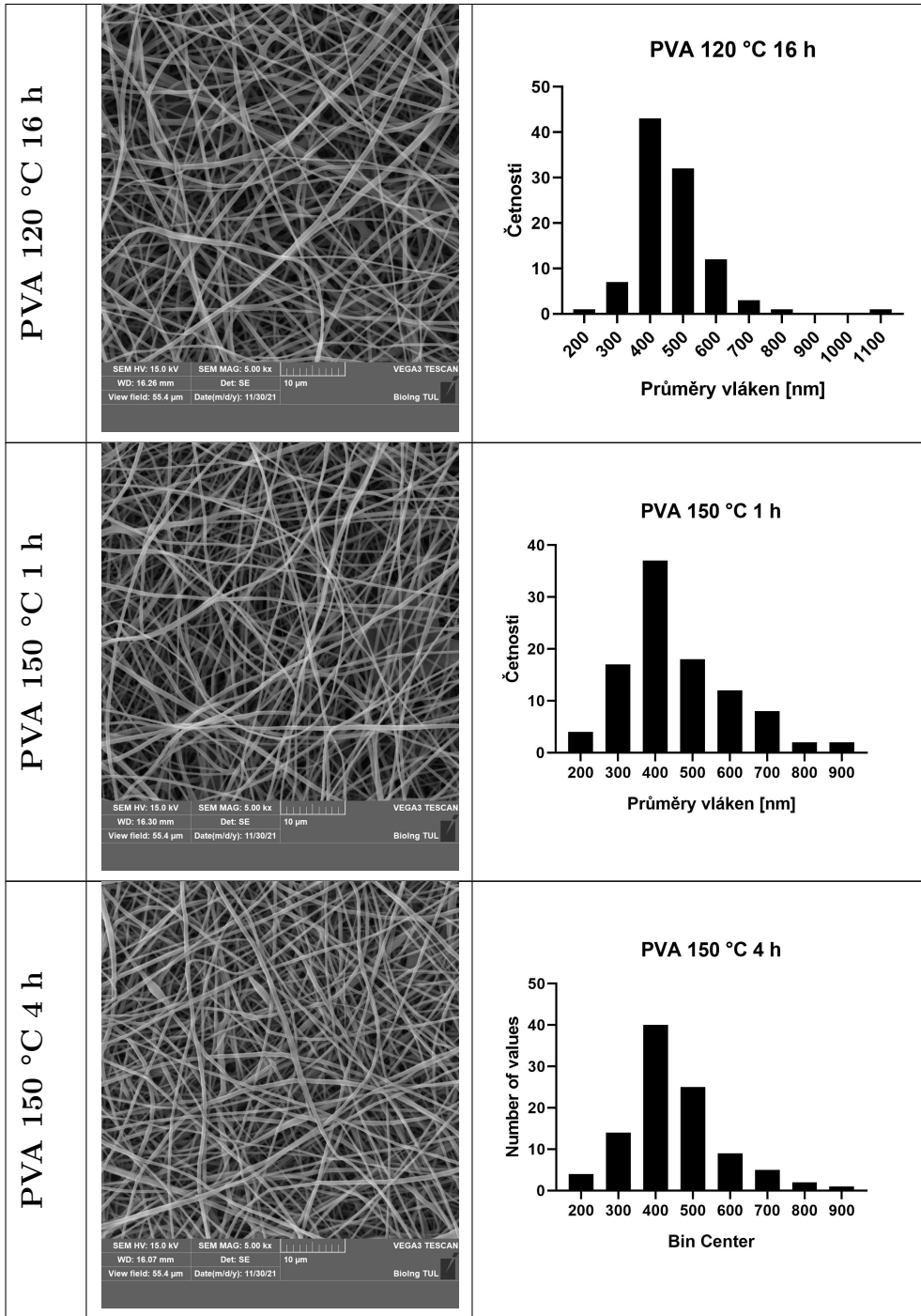


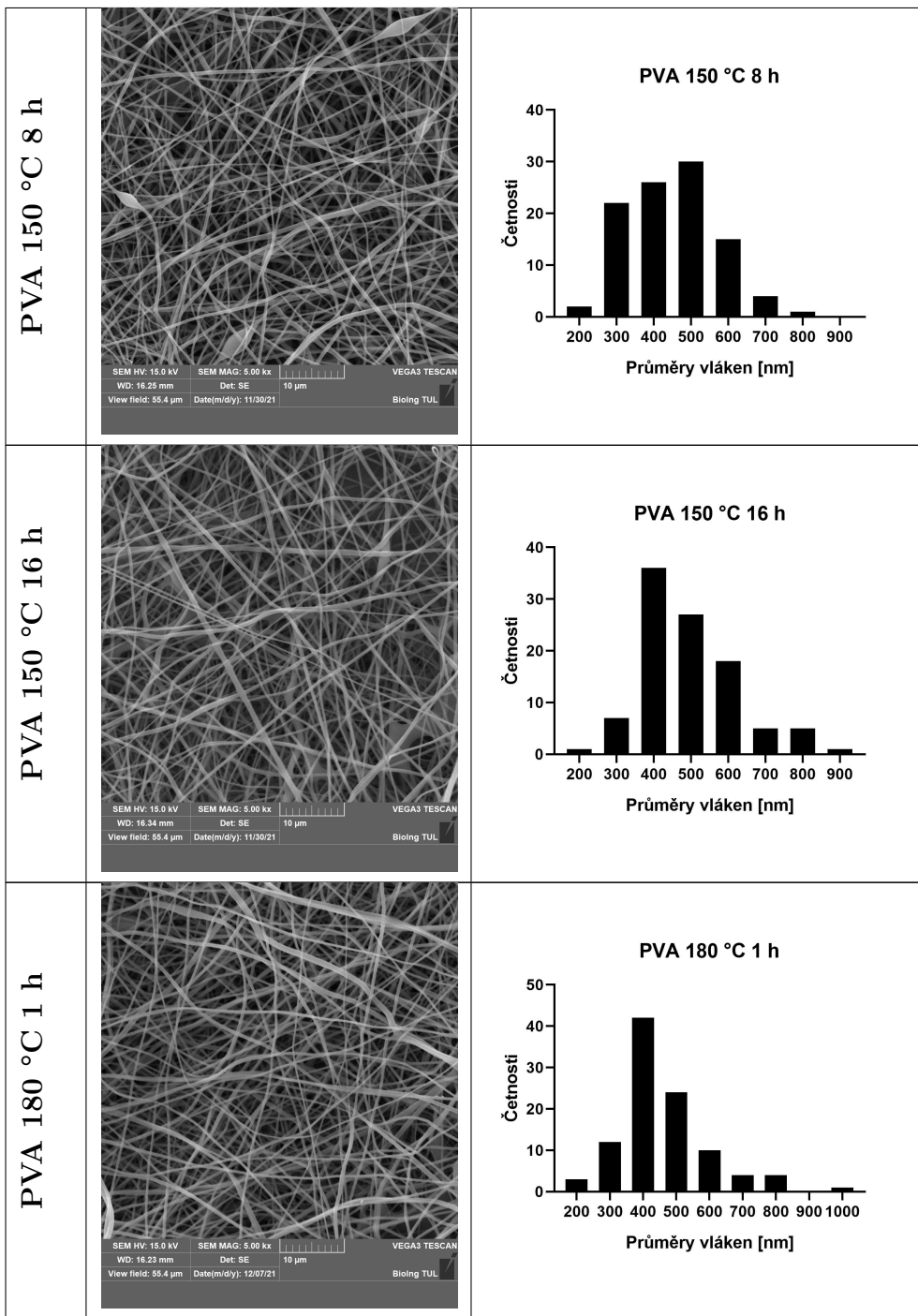
Obrázek 5.30: Absorpční spektrum LPPO

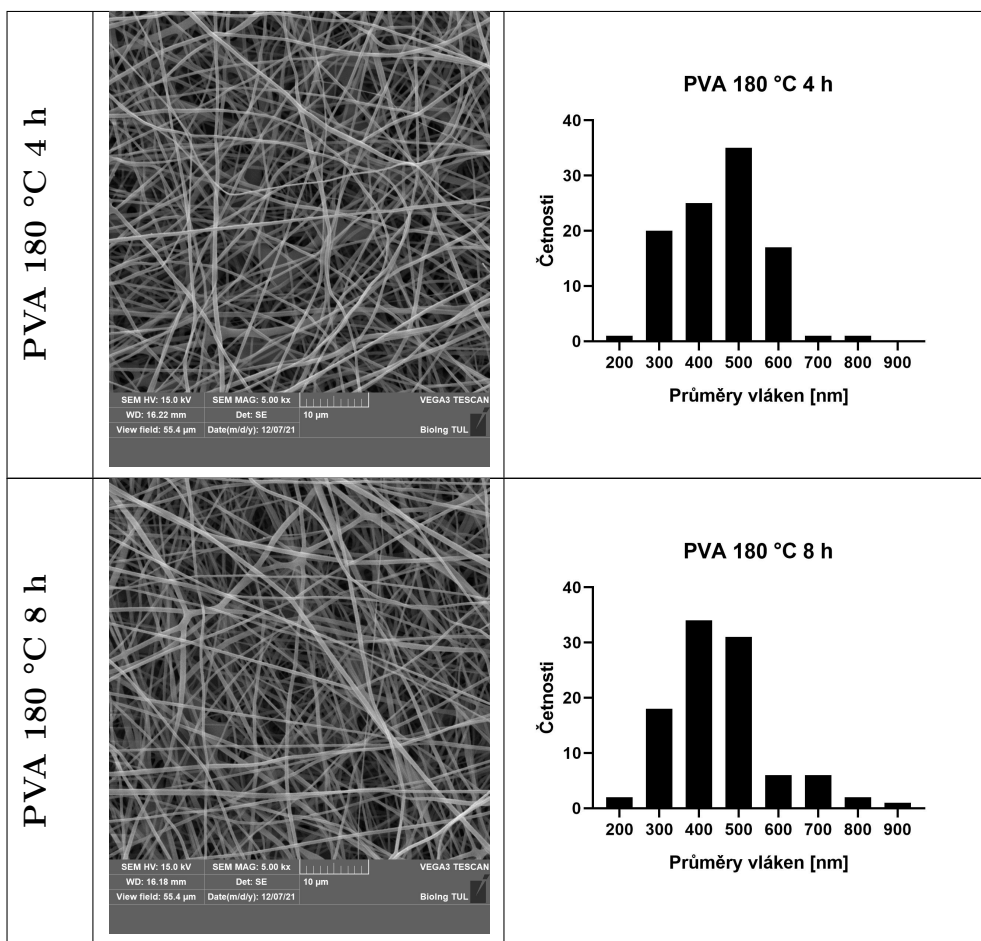
Tabulka 5.5: Snímky stabilizovaných nanovláknenných materiálů z PVA ze skenovací elektronové mikroskopie (měřítko 10 μm) a příslušné histogramy distribuce průměrů vláken

HT	SEM snímek vzorku	Histogram průměrů vláken																																		
PVA 90 °C 4 h		<p>PVA 90 °C 4 h</p> <table border="1"> <caption>Data for PVA 90 °C 4 h histogram</caption> <thead> <tr> <th>Průměr vláken [nm]</th> <th>Četnosti</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>200-250</td><td>2</td></tr> <tr><td>250-300</td><td>15</td></tr> <tr><td>300-350</td><td>38</td></tr> <tr><td>350-400</td><td>22</td></tr> <tr><td>400-450</td><td>15</td></tr> <tr><td>450-500</td><td>5</td></tr> <tr><td>500-550</td><td>2</td></tr> <tr><td>550-600</td><td>1</td></tr> <tr><td>600-650</td><td>1</td></tr> </tbody> </table>	Průměr vláken [nm]	Četnosti	200-250	2	250-300	15	300-350	38	350-400	22	400-450	15	450-500	5	500-550	2	550-600	1	600-650	1														
Průměr vláken [nm]	Četnosti																																			
200-250	2																																			
250-300	15																																			
300-350	38																																			
350-400	22																																			
400-450	15																																			
450-500	5																																			
500-550	2																																			
550-600	1																																			
600-650	1																																			
PVA 90 °C 8 h		<p>PVA 90 °C 8 h</p> <table border="1"> <caption>Data for PVA 90 °C 8 h histogram</caption> <thead> <tr> <th>Průměr vláken [nm]</th> <th>Četnosti</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>200-250</td><td>2</td></tr> <tr><td>250-300</td><td>15</td></tr> <tr><td>300-350</td><td>36</td></tr> <tr><td>350-400</td><td>27</td></tr> <tr><td>400-450</td><td>9</td></tr> <tr><td>450-500</td><td>9</td></tr> <tr><td>500-550</td><td>1</td></tr> <tr><td>550-600</td><td>1</td></tr> <tr><td>600-650</td><td>1</td></tr> <tr><td>650-700</td><td>1</td></tr> <tr><td>700-750</td><td>1</td></tr> <tr><td>750-800</td><td>1</td></tr> <tr><td>800-850</td><td>1</td></tr> <tr><td>850-900</td><td>1</td></tr> <tr><td>900-950</td><td>1</td></tr> <tr><td>950-1000</td><td>1</td></tr> </tbody> </table>	Průměr vláken [nm]	Četnosti	200-250	2	250-300	15	300-350	36	350-400	27	400-450	9	450-500	9	500-550	1	550-600	1	600-650	1	650-700	1	700-750	1	750-800	1	800-850	1	850-900	1	900-950	1	950-1000	1
Průměr vláken [nm]	Četnosti																																			
200-250	2																																			
250-300	15																																			
300-350	36																																			
350-400	27																																			
400-450	9																																			
450-500	9																																			
500-550	1																																			
550-600	1																																			
600-650	1																																			
650-700	1																																			
700-750	1																																			
750-800	1																																			
800-850	1																																			
850-900	1																																			
900-950	1																																			
950-1000	1																																			
PVA 90 °C 16 h		<p>PVA 90 °C 16 h</p> <table border="1"> <caption>Data for PVA 90 °C 16 h histogram</caption> <thead> <tr> <th>Průměr vláken [nm]</th> <th>Četnosti</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>200-250</td><td>3</td></tr> <tr><td>250-300</td><td>14</td></tr> <tr><td>300-350</td><td>31</td></tr> <tr><td>350-400</td><td>27</td></tr> <tr><td>400-450</td><td>18</td></tr> <tr><td>450-500</td><td>6</td></tr> <tr><td>500-550</td><td>2</td></tr> <tr><td>550-600</td><td>1</td></tr> <tr><td>600-650</td><td>1</td></tr> <tr><td>650-700</td><td>1</td></tr> <tr><td>700-750</td><td>1</td></tr> <tr><td>750-800</td><td>1</td></tr> <tr><td>800-850</td><td>1</td></tr> <tr><td>850-900</td><td>1</td></tr> </tbody> </table>	Průměr vláken [nm]	Četnosti	200-250	3	250-300	14	300-350	31	350-400	27	400-450	18	450-500	6	500-550	2	550-600	1	600-650	1	650-700	1	700-750	1	750-800	1	800-850	1	850-900	1				
Průměr vláken [nm]	Četnosti																																			
200-250	3																																			
250-300	14																																			
300-350	31																																			
350-400	27																																			
400-450	18																																			
450-500	6																																			
500-550	2																																			
550-600	1																																			
600-650	1																																			
650-700	1																																			
700-750	1																																			
750-800	1																																			
800-850	1																																			
850-900	1																																			

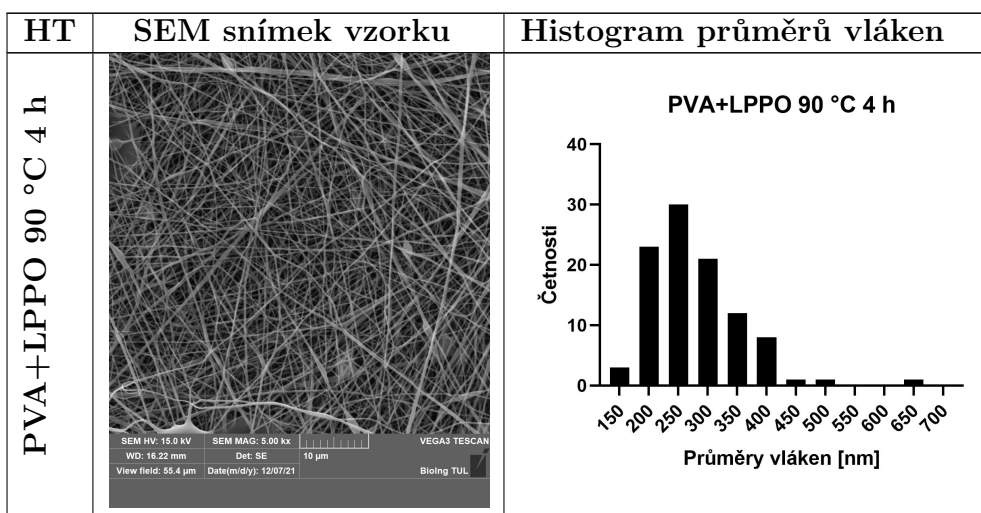


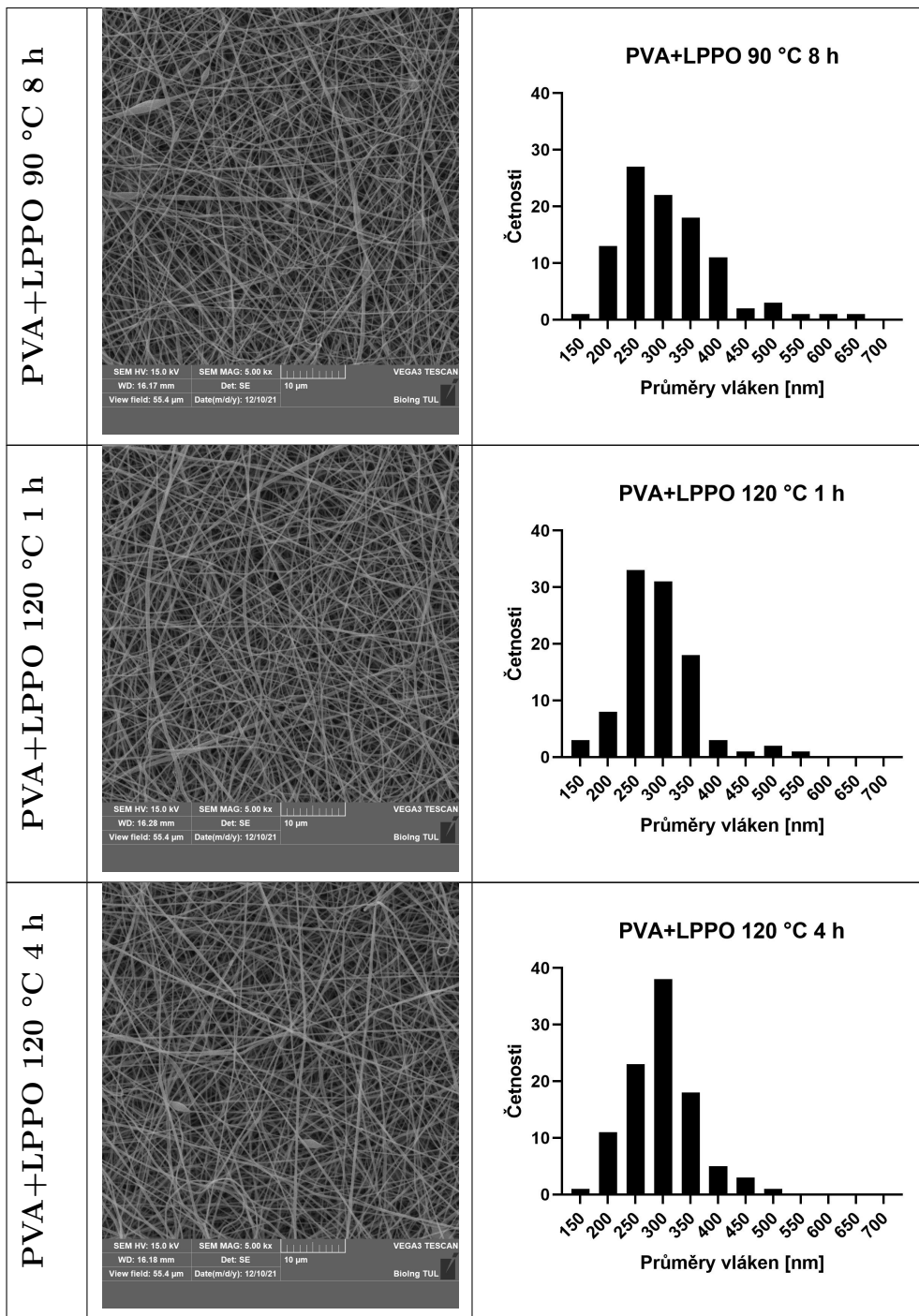


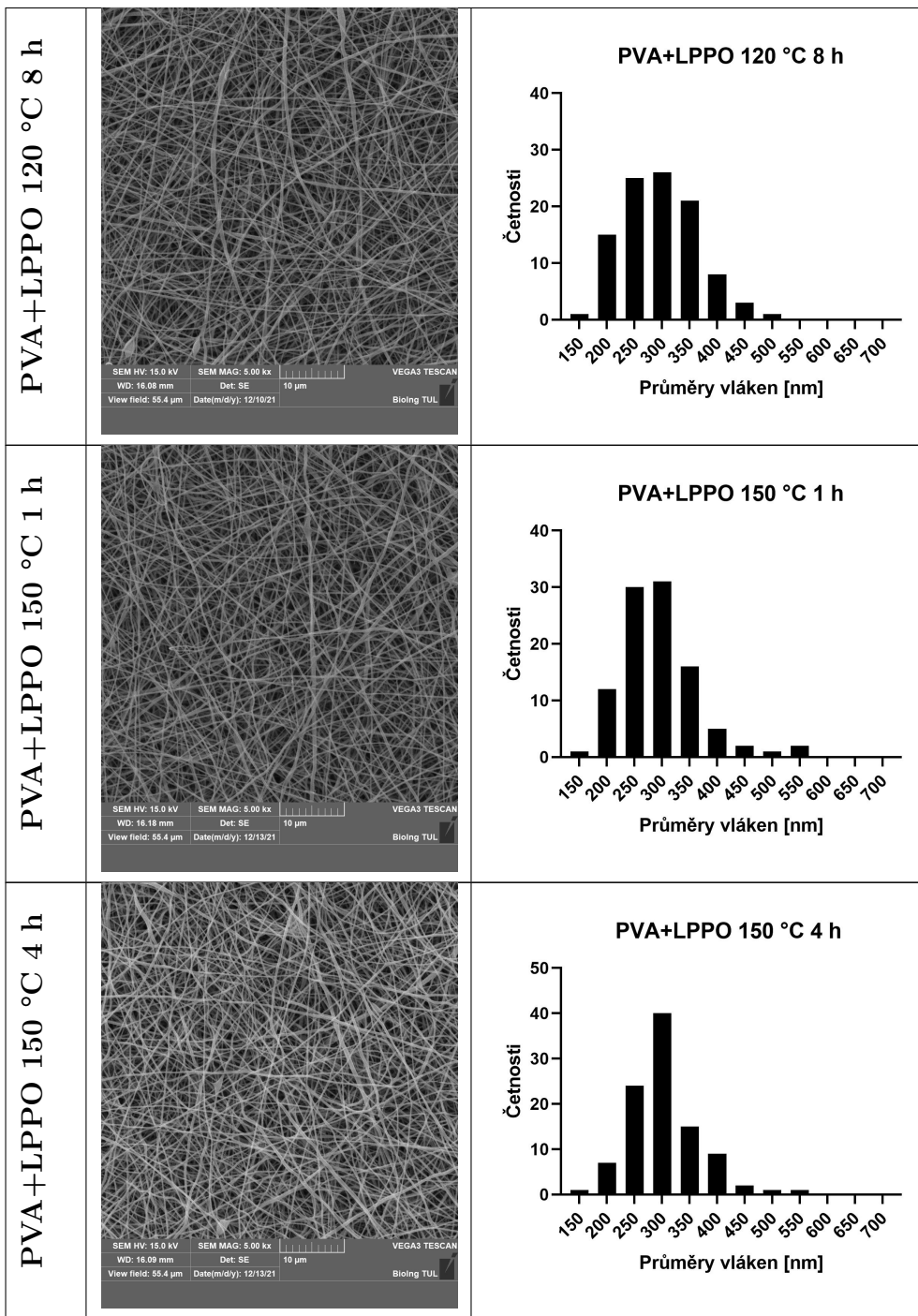


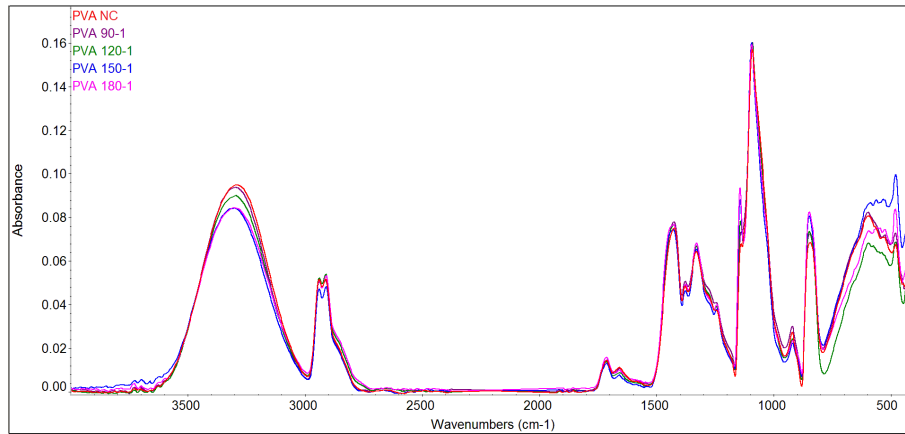


Tabulka 5.6: Snímky stabilizovaných nanovláčkových materiálů z PVA s obsahem LPPO ze skenovací elektronové mikroskopie (měřítko 10 μm) a příslušné histogramy distribuce průměrů vláken

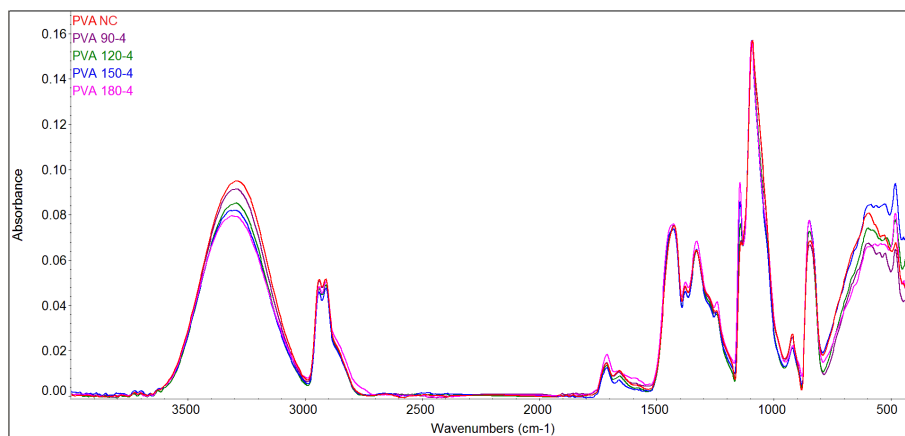




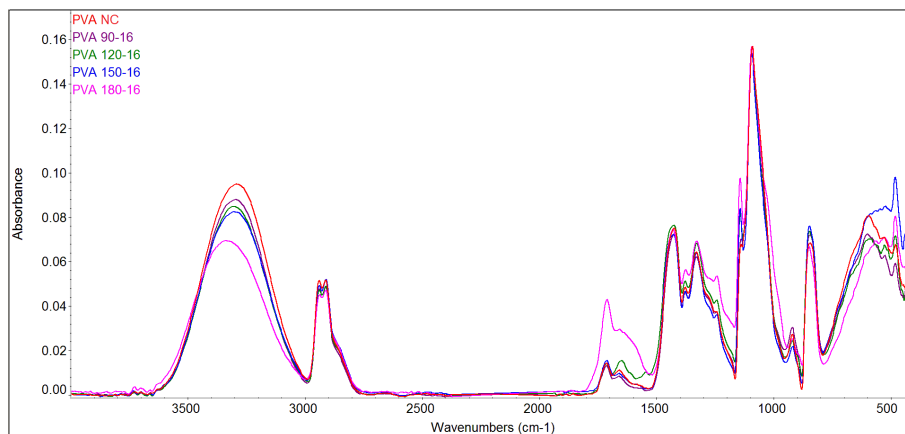




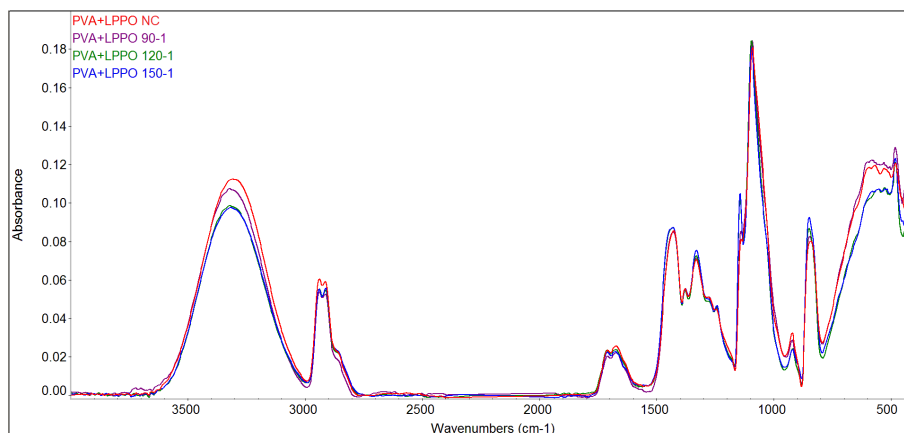
Obrázek 5.31: Analýza FTIR: infračervená PVA nanovláken z PVA podrobených HT po dobu 1 h při teplotách 90, 120, 150 a 180 °C; PVA NC označuje materiál bez HT



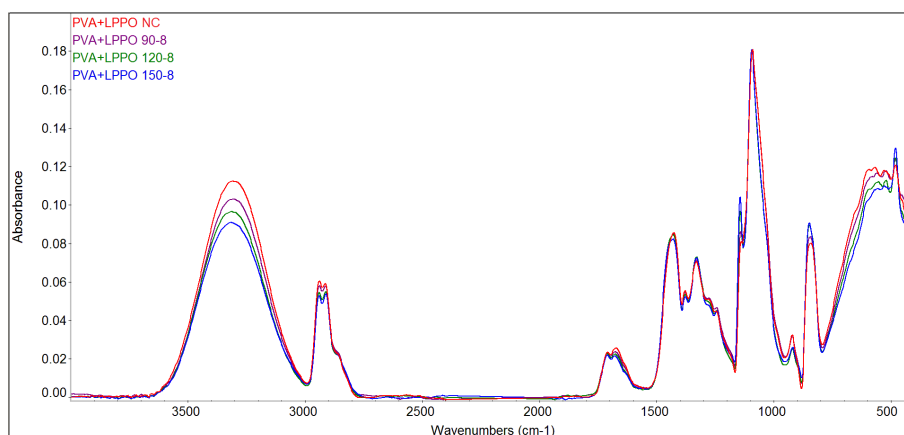
Obrázek 5.32: Analýza FTIR: infračervená spektra PVA nanovláken podrobených HT po dobu 4 h při teplotách 90, 120, 150 a 180 °C; PVA NC označuje materiál bez HT



Obrázek 5.33: Analýza FTIR: infračervená spektra PVA nanovláken podrobených HT po dobu 16 h při teplotách 90, 120, 150 a 180 °C; PVA NC označuje materiál bez HT



Obrázek 5.34: Analýza FTIR: infračervená spektra PVA+LPPO nanovláken podrobených HT po dobu 1 h při teplotách 90, 120 a 150 °C; PVA+LPPO NC označuje materiál bez HT



Obrázek 5.35: Analýza FTIR: infračervená spektra PVA+LPPO nanovláken podrobených HT po dobu 8 h při teplotách 90, 120 a 150 °C; PVA+LPPO NC označuje materiál bez HT