



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VLIV RŮZNÉHO TYPU A HUSTOTY SÍŤOVÁNÍ POLYETHYLENGLYKOLOVÝCH HYDROGELŮ NA TRANSPORTNÍ A SORPČNÍ VLASTNOSTI

EFFECT OF DIFFERENT TYPE AND CROSSLINKING DENSITY OF POLYETHYLENE GLYCOL HYDROGELS
ON TRANSPORT AND SORPTION PROPERTIES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Kristýna Janáková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jitka Krouská, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1885/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Kristýna Janáková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie bioaktivních látek
Vedoucí práce: **Ing. Jitka Krouská, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Vliv různého typu a hustoty síťování polyethylenglykolových hydrogelů na transportní a sorpční vlastnosti

Zadání diplomové práce:

1. Vypracovat literární rešerši zaměřenou na různý typ řízené gelace PEG hydrogelů.
2. Optimalizovat metodiku přípravy PEG hydrogelů na základě literární rešerše.
3. Charakterizovat PEG hydrogely vhodnými fyzikálně–chemickými metodami.
4. Prostudovat transportní a sorpční charakteristiky PEG hydrogelů v závislosti na typu a hustotě síťování.
5. Diskutovat naměřené výsledky a vyvozovat logické závěry.

Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Kristýna Janáková
studentka

Ing. Jitka Krouská, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Hlavním cílem této diplomové práce bylo prostudovat transportní a sorpční vlastnosti polyethylenglykolových (PEG) hydrogelů s různým typem a hustotou síťování. Před charakterizací těchto vlastností bylo nutné provést optimalizaci přípravy vybraných hydrogelů včetně studia mechanických vlastností, a to pomocí reologického měření. Značnou část práce tedy tvoří optimalizace PEGDA-thiol hydrogelů vytvořených z 4 ramenného polyethylenglykol-thiolu (PEG-4SH) a polyethylenglykol diakrylátu (PEGDA) postupnou polymerací. Pro porovnání transportních a sorpčních vlastností u jiného typu síťování byly připraveny PEGDA hydrogely pomocí radikálové polymerace. U transportních experimentů byla sledována sorpce a desorpce barviva Rhodaminu 6G pomocí volné difúze. K charakterizaci průběhu těchto experimentů byla využita molekulová absorpční spektrometrie (UV/VIS). Taktéž byla porovnána struktura těchto gelů pomocí rastrovací elektronové mikroskopie.

KLÍČOVÁ SLOVA

hydrogel, polyethylenglykol, reologie, difúze

ABSTRACT

The main goal of this work was to study the transport and sorption properties of polyethylene glycol (PEG) hydrogels with different types and densities of cross-linking. Before characterizing these properties it was necessary to optimize the preparation of selected hydrogels including the study of mechanical properties using rheological measurements. A significant part of the work, therefore, consists of the optimization of PEGDA-thiol hydrogels created from 4-arm polyethylene glycol-thiol (PEG-4SH) and polyethylene glycol diacrylate PEGDA by step-growth polymerization. To compare the transport and sorption properties of another type of crosslinking, PEGDA hydrogels were prepared using radical polymerization. In the transport experiments, the sorption and desorption of the Rhodamine 6G dye were monitored using free diffusion. Molecular absorption spectrometry (UV/VIS) was used to characterize the course of these experiments. The structure of these gels was compared using scanning electron microscopy.

KEYWORDS

hydrogel, polyethylene glycol, rheology, diffusion

CITACE

JANÁKOVÁ, Kristýna. *Vliv různého typu a hustoty síťování polyethylenglykolových hydrogelů na transportní a sorpční vlastnosti*. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/148103>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Jitka Krouská.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

Kristýna Janáková

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Jitce Krouské Ph.D., dále Ing. Monice Trudičové a také Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D. za jejich čas, cenné rady a podporu.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Hydrogely	9
2.1.1	Proces vzniku hydrogelů	10
2.1.2	Botnání	11
2.1.3	Klasifikace hydrogelů	12
2.1.4	Biomedicínské aplikace hydrogelů	12
2.2	Transportní vlastnosti	13
2.2.1	Modely difúze	14
2.2.2	Difúze v hydrogelech	15
2.3	Reologie	15
2.3.1	Mechanické vlastnosti hydrogelů	17
2.3.2	Reometrie	18
2.4	Syntetické polymery k přípravě hydrogelů	20
2.4.1	Polyethylenglykol	20
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	22
3.1	Způsoby přípravy PEG hydrogelů	22
3.1.1	Thiol-Michaelova adiční polymerace	23
3.2	Aplikace PEG hydrogelů	24
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
4.1	Použité chemikálie	27
4.2	Použité přístroje	27
4.3	Příprava pufovaného fyziologického roztoku	28
4.4	Příprava vzorku PEGDA-thiol hydrogelu	28
4.5	Příprava vzorku PEGDA hydrogelu	29
4.6	Reologické měření	29

4.7	FTIR spektroskopie	30
4.8	Sušení a botnání	30
4.9	Rastrovací elektronová mikroskopie	31
4.10	Transportní a sorpční experimenty	31
4.10.1	PEGDA-thiol hydrogely	31
4.10.2	PEGDA hydrogely	33
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	34
5.1	Optimalizace PEGDA-thiol hydrogelů	34
5.1.1	Studium doby gelace	34
5.1.2	Studium vlivu doby míchání PEG-4SH na mechanické vlastnosti	35
5.1.3	Reologické měření	38
5.1.4	FTIR	40
5.1.5	Sušení a botnání	42
5.1.6	SEM	44
5.2	Transportní a sorpční experimenty	46
5.2.1	Studium sorpce	46
5.2.2	Studium desorpce	47
5.3	PEGDA hydrogely	49
5.3.1	Studium sorpce	50
5.3.2	Studium desorpce	51
6	ZÁVĚR	52
7	CITOVANÁ LITERATURA	54
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	62
8.1	Seznam zkratk	62
8.2	Seznam symbolů	63

1 ÚVOD

Hydrogely skládající se ze vzájemně zesíťovaných hydrofilních polymerů jsou díky přítomnosti hydrofilních funkčních skupin na polymerní kostře schopné absorbovat velké množství vody. Biokompatibilita a porézní struktura hydrogelů je činí vhodnými kandidáty pro aplikace podávání léčiv, díky těmto vlastnostem mohou taktéž nalézt uplatnění například v tkáňovém inženýrství. Primárním mechanismem uvolňování mnoha léčiv z hydrogelů je difúze, která probíhá prostorem dostupným mezi makromolekulárními řetězci, přičemž ve většině zmíněných aplikacích působí hydrogel jako prostředek zpomalující difúzi molekuly. Přírodní polymery tvořící hydrogel mohou postrádat požadované mechanické vlastnosti pro biomedicínské aplikace, proto jsou v posledních letech nahrazovány syntetickými. Výhodou syntetických polymerů je dobře definovaná struktura, kterou lze modifikovat tak, aby poskytovaly příznivou degradovatelnost a funkčnost. Mezi syntetické polymery patří polyethylenglykol (PEG), který je charakteristický tím, že je netoxický, snadno se připojuje k jiným molekulám a povrchům a má vysokou hydratační kapacitu. Kromě aplikací pro dodávání léčiv a tkáňového inženýrství je hojně využíván jako součást parenterálních tekutých přípravků, ultrazvukových gelů nebo v kosmetickém průmyslu.

V literární rešerši jsou kromě samotné charakterizace hydrogelů a PEG také popsány metody pro charakterizaci mechanických a transportních vlastností hydrogelů. Tyto metody jsou následně využity u PEG hydrogelů v experimentální části.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Hydrogely

Gely jsou obecně systémy tvořené trojrozměrnou sítí, která vytváří souvislou strukturu a prostupuje celým disperzním prostředím. Spojité je tedy nejen disperzní prostředí, ale i disperzní podíl. V důsledku tohoto uspořádání vykazují gely mechanické vlastnosti charakteristické pro tuhý stav i přes to, že disperzní prostředí je kapalné [1]. Dle toho, zda gely obsahují nebo neobsahují rozpouštědlo, se dělí na lyogely (dle povahy rozpouštědla lze využít název hydrogel nebo organogel) a xerogely. Vysušením lyogelu vzniká kompaktní xerogel, jehož objem je menší přibližně o objem odstraněného rozpouštědla [2]. Na základě chování gelů ve vysušeném stavu jsou gely dále rozděleny na reverzibilní a ireverzibilní. Reverzibilní gely při vysušení vytvoří xerogely, které jsou schopny opět přejít do původního stavu přijímáním disperzního prostředí tzv. botnáním. Gely ireverzibilní mají ve vysušeném stavu přibližně stejný objem jako původní lyogely. Při styku s disperzním prostředím jsou sice schopné sorbovat určité množství kapaliny, nicméně lyogel tím nevzniká [1]. Pokud voda v gelu tvoří alespoň 10 % celkové hmotnosti či objemu, jedná se poté o tzv. hydrogel [3].

Hydrogely jsou tedy definovány jako trojrozměrné sítě, které jsou složené ze vzájemně zesíťovaných hydrofilních polymerů. Jsou charakteristické tím, že mají schopnost absorbovat velké množství vody [4]. Tato schopnost je dána přítomností hydrofilních funkčních skupin navázaných na polymerní kostře. Naopak odolnost hydrogelů vůči rozpouštění je dána zesíťováním jednotlivých polymerních řetězců [5].

První použití hydrogelu pro biomedicínské aplikace sahá až do roku 1960, kdy Wichterle a Lim vyvinuli síťovaný poly(hydroxyethylmethakrylát) PHEMA, který byl využit pro výrobu kontaktních čoček [6]. Následně zájem o hydrogely rapidně vzrostl, a to díky jejich jedinečným vlastnostem jako je biokompatibilita s biologickými buňkami a tkáněmi, biologická odbouratelnost, dále jejich schopnost chránit léčivo před okolním médiem a také schopnost řízeně uvolňovat léčiva [4]. V posledních letech byly také nahrazovány přírodní hydrogely syntetickými, které mají dlouhou životnost, vysokou schopnost absorpce vody a vysokou pevnost gelu. Syntetické polymery mají obvykle dobře definovanou strukturu, kterou lze modifikovat tak, aby poskytovaly příznivou degradovatelnost a funkčnost [5]. Dnes jsou tedy hydrogely velmi intenzivně zkoumány v oboru tkáňového inženýrství a řízeného transportu a uvolňování léčiv, a také v oboru implantologie jako materiály

potenciálně vhodné pro vývoj implantátů umožňujících dlouhodobý přímý kontakt s organismem. Kromě medicínských aplikací nacházejí hydrogely své uplatnění i v chemicko-technologických oblastech, např. jako stacionární fáze v gelové chromatografii [7].

2.1.1 Proces vzniku hydrogelů

Dle definice jsou hydrogely polymerní sítě mající hydrofilní vlastnosti. Zatímco hydrogely jsou obecně připravovány na základě hydrofilních monomerů, hydrofobní monomery se někdy využívají k regulaci vlastností pro specifické aplikace [5].

Sít'ování neboli také gelace je stabilizační jev, při kterém dochází ke spojování makromolekulárních řetězců dohromady a zároveň vede k tvorbě postupně větších rozvětvených polymerů [6,8]. Směs těchto stále rozpustných rozvětvených polymerů se nazývá sol. Pokračování procesu spojování vede ke zvětšení rozvětveného polymeru a vzniká tzv. nekonečná polymerní síť, která se nazývá gel [8]. Tento okamžik značí bod gelace, kdy rozměry vzniklé sítě jsou totožné s rozměry makroskopické gelové fáze. V bodě gelace je váhový podíl nepatrný, nicméně v dalším průběhu dochází k značnému nárůstu [9]. Sít'ování mezi polymerními řetězci může zahrnovat buď fyzikální nebo chemické interakce [4].

Fyzikální sít'ování obvykle vede k přechodnému spojení, které může vzniknout buď zapletením řetězců nebo pomocí slabých interakcí, jako je vodíková vazba, hydrofobní interakce nebo iontová vazba [4]. Jedním ze způsobů vzniku těchto hydrogelů je např. zahřívání/chlazení roztoku polymeru. Zájem o tyto fyzikální gely vzrostl hlavně díky snadnosti jejich výroby a výhodě nepoužívání sít'ovacích činidel. Slabé fyzikální gely mají reverzibilní vazby. Tato sdružení mají omezenou životnost, neustále se rozbíjejí a reformují [8].

Chemické sít'ování naopak zahrnuje kovalentní vazby, vede tudíž k trvalému spojení a mezi tři hlavní procesy chemické gelace patří kondenzace, vulkanizace a adiční polymerace [4,8]. Zesít'ování přírodních a syntetických polymerů lze dosáhnout reakcí jejich funkčních skupin (jako je $-OH$, $-COOH$ a $-NH_2$) se sít'ovacími činidly, např. s glutaraldehydem.

Kromě fyzikálního a chemického sít'ování existuje i radiační sít'ování. Je to široce používaná technika, jelikož nevyužívá chemické přísady, a tím zachovává biokompatibilitu biopolymeru. Spočívá na produkci volných radikálů v polymeru po vystavení zdroji vysoké energie, jako je gama záření, rentgenový nebo elektronový paprsek [8].

Hydrogely jsou schopny také procházet významným objemovým fázovým přechodem nebo fázovým přechodem gel-sol v reakci na určité fyzikální a chemické podněty. Mezi fyzikální stimuly patří teplota, elektrické a magnetické pole, složení rozpouštědla, intenzita světla a tlak. Naopak mezi chemické nebo biochemické stimuly patří pH, ionty a specifické chemické složení. Ve většině případů jsou však takové konformační přechody reverzibilní, proto jsou hydrogely schopné se vrátit zpět do svého původního stavu po reakci, jakmile je spouštěč odstraněn. Odezva hydrogelů na vnější podněty je určena především povahou monomeru, hustotou náboje a stupněm zesíťování. Velikost odezvy je také přímo úměrná aplikovanému vnějšímu podnětu [3]. Schopnost hydrogelů reagovat na určité podněty je využívána v biomedicínských aplikacích, jako je řízené uvolňování léčiv a tkáňové inženýrství. Také je možné je využít např. ke konstrukci katalytických spínačů či povrchů pro řízený růst buněk [10].

2.1.2 Botnání

Jak již bylo zmíněno, hydrogely jsou schopny zadržovat vodu, což patří mezi nejdůležitější charakteristické vlastnosti hydrogelu. Polární hydrofilní skupiny jsou první, které jsou hydratovány v kontaktu s vodou, což vede k tvorbě primárně vázané vody. Tím dochází k tomu, že síť botná a vystavuje tak hydrofobní skupiny, které jsou také schopné interakce s molekulami vody. To vede k tvorbě hydrofobně vázané vody neboli také sekundárně vázané vodě. Primární a sekundární vázaná voda se často kombinuje a nazývá se jako celkově vázaná voda. Další vodu síť absorbuje díky osmotické hnací síle polymerních řetězců směrem k nekonečnému zředění. Nicméně proti tomuto dodatečnému nabotnání brání kovalentní nebo fyzikální síťování. Dodatečná absorbovaná voda se nazývá jako volná voda a předpokládá se, že vyplňuje prostor mezi síťovými řetězci a/nebo střed větších pórů. Pokud je následně ve vytvořeném hydrogelu síťový řetězec nebo vazba degradovatelná, nastává dezintegrace a/nebo rozpuštění. To je využíváno v tkáňovém inženýrství, kdy biologicky odbouratelné hydrogely, které obsahují tyto tzv. labilní vazby, se mohou rozrušit za fyziologických podmínek buď enzymaticky nebo chemicky, ve většině případů hydrolýzou [8].

Jedním z nejdůležitějších faktorů, které ovlivňují botnání hydrogelů je poměr síťování. Je definován jako poměr molů síťovacího činidla k molům opakujících se jednotek polymeru. Čím vyšší je poměr síťování, tím více síťovacího činidla je začleněno do hydrogelové struktury. Vysoce zesíťované hydrogely mají těsnější strukturu a budou méně botnat

ve srovnání se stejnými hydrogely s nižšími poměry síťování. Síťování brání pohyblivosti polymerního řetězce, a tím snižuje botnací poměr [11].

2.1.3 Klasifikace hydrogelů

Hydrogely můžeme klasifikovat z různých hledisek. Dle původu polymeru tvořící síť lze hydrogely rozdělit na přírodní a syntetické. Mezi přírodní polymery patří proteiny, jako je kolagen a želatina, a polysacharidy, jako je škrob, alginát a agaróza. Dále dle polymerního složení se hydrogely dělí na homopolymerní a kopolymerní. Jako homopolymerní hydrogel je označována polymerní síť, která je odvozená od jednoho druhu monomeru. Naopak kopolymerní hydrogely se skládají ze dvou nebo více různých druhů monomerů s alespoň jednou hydrofilní složkou. Na základě rozdílné fyzikální struktury a chemického složení lze následně hydrogely rozdělit na amorfnní, semikrystalické a krystalické. Podle přítomnosti či nepřítomnosti elektrického náboje na zesíťovaných řetězcích lze hydrogely rozdělit do čtyř skupin na neutrální, iontové (aniontové nebo kationtové), amfoterní (obsahující kyselé i bazické skupiny) a zwitteriontové (obsahující aniontové i kationtové skupiny v každé strukturně opakující se jednotce) [5].

2.1.4 Biomedicínské aplikace hydrogelů

Díky biokompatibilitě hydrogelů a možnosti řízení transportu látek v nich jsou hydrogely vhodné pro aplikace podávání léků. Porézní struktury hydrogelů umožňují vysokou propustnost pro různé druhy léčiv, a tím tak mohou být léčiva vnesena do hydrogelu a za správných podmínek uvolněna. Hydrogelové struktury s vysokou porozitou lze získat úpravou dvou faktorů a to, stupněm zesíťování v matici a afinitou hydrogelu k vodnému prostředí, ve kterém dochází k botnání. Hydrogely jsou schopny uvolňovat léčiva po dlouhou dobu při požadované kinetice uvolňování a dodávat tak vysokou koncentraci aktivní farmaceutické látky na konkrétní místo. Uvolňování léčiva může být aktivováno na vyžádání místními změnami pH, teploty, přítomností specifických enzymů či vzdálenými fyzikálními podněty [3]. Za účelem navržení konkrétního mechanismu uvolňování jsou experimentální data porovnána s teoretickým modelem. Naprostá většina teoretických modelů je založena na difúzních rovnicích popsanych v následující kapitole 2.2. Systém dodávání léčiv na bázi hydrogelu lze využít pro orální, rektální, oční, epidermální a subkutánní aplikaci [11].

Další aplikací hydrogelů je tkáňové inženýrství, které je definováno jako kombinace materiálů, inženýrství a buněk, a které slouží ke zlepšení či nahrazení biologických orgánů.

To vyžaduje výběr vhodného typu buněk a jejich následnou kultivaci ve vhodném scaffoldu za vhodných podmínek. Hydrogely jsou atraktivním nosným materiálem, protože jejich struktury jsou podobné extracelulární matriční mnoha tkání. K vytvoření hydrogelů pro tkáňové inženýrství lze použít syntetické i přírodní materiály. U syntetických hydrogelů je snadné řídit jejich chemii a strukturu, a tak měnit jejich vlastnosti. Příklady polymerních syntetických materiálů, které lze použít k tvorbě hydrogelů pro tkáňové inženýrství, jsou poly(ethylenoxid) PEO, poly(vinylalkohol) PVA a poly(propylen fumarát) PPF. Naopak výhodou přírodních materiálů tvořících hydrogely je fakt, že jsou buď přírodními složkami extracelulární matrice nebo mají vlastnosti podobné těmto matricím. Příkladem jsou alginát a chitosan. Hydrogely se v aplikacích tkáňového inženýrství používají pro tři účely. Mohou být použity jako činidla pro vyplnění prázdných prostor, jako nosiče pro dodávání bioaktivních molekul a jako 3D struktury, které fungují jako podpora buněk a napomáhají tvorbě ideální tkáně [3].

2.2 Transportní vlastnosti

Řízení transportu rozpuštěných látek v hydrogelech definuje použití těchto materiálů v biomedicínských aplikacích. V případě, že jsou buňky zapouzdřené v hydrogelech, pak se tyto buňky musí spoléhat na transport přes polymerní síť, tak aby byl zajištěn nepřetržitý přístup k živinám. Naproti tomu, když jsou hydrogely využívány pro dodávání léčiv, pak omezená mobilita makromolekul může být žádoucí (např. zpomalení či řízení uvolňování léčiva). Pochopení parametrů ovlivňující transport je proto klíčové pro návrh hydrogelů pro specifické účely [12].

Primárním mechanismem uvolňování mnoha léčiv z hydrogelů je difúze, která probíhá prostorem dostupným mezi makromolekulárními řetězci [11]. Základním principem difúze je Brownův pohyb. Jedná se o jev, při kterém dochází k nárazu molekul disperzního prostředí vlivem tepelného pohybu do koloidních částic. Tyhle nárazy jsou důsledkem pohybu částic, který je tím intenzivnější, čím menší jsou částice a čím vyšší je teplota [13].

Hnací silou difúze je rozdíl chemických potenciálů difundující látky, tedy rozdíl koncentrací – koncentrační gradient, v různých částech soustavy. Směr difúze je z makroskopického hlediska vždy z prostředí o vyšší koncentraci do prostředí s nižší koncentrací se snahou vyrovnat koncentraci v celém systému [13].

Difúzní tok (J_i) udává látkové množství (n_i) difundující složky i , které projde za jednotku času (t) jednotkovou plochou (A) kolmou ke směru difúze [14]:

$$J_i = \frac{dn_i}{Ad_t} \quad (1)$$

Pohyb molekul závislý na koncentračním gradientu ($\partial c_i / \partial y$) v daném místě a daném čase popisuje 1. Fickův zákon:

$$J_i = -D_i \frac{\partial c_i}{\partial y} \quad (2)$$

Symbol parciální derivace značí, že veličiny jsou také funkcí teploty a tlaku, popř. času. V případě, že koncentrační gradient je konstantní, pak se jedná o stacionární difúzi. Koeficient úměrnosti nebo také difúzní koeficient je značen D_i a je tedy roven látkovému množství difundující látky, které projde jednotkovou plochou za jednotku času při jednotkovém koncentračním gradientu. Závisí na teplotě, tlaku a velikosti částic. Jednotkou difúzního koeficientu je m^2s^{-1} [14]. Einsteinova rovnice (3) popisuje vztah mezi difúzním koeficientem, koeficientem tření (B) a absolutní teplotou (T):

$$D_i = \frac{kT}{B}, \quad (3)$$

kde k je Boltzmanova konstanta. V případě, že se bude jednat o symetrickou částici o poloměru (r), pak platí pro koeficient tření (B) Stokesova rovnice (4), kde η je viskozita prostředí [13,14]:

$$B = 6\pi\eta r \quad (4)$$

Pokud se ale koncentrační gradient s časem mění, poté se jedná o nestacionární difúzi. Rychlost změny koncentrace v určitém místě systému pro tento případ popisuje 2. Fickův zákon [14]:

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = D_i \frac{\partial^2 c_i}{\partial y^2} \quad (5)$$

2.2.1 Modely difúze

Analytické řešení Fickových rovnic není často jednoduché. Pro různé typy modelů a okrajových podmínek je řešení těchto rovnic uvedeno v publikaci J. Crank [15]. Mezi dva nejjednodušší příklady (modely) difúze patří difúze skrze tenký film a volná difúze. Tyto modely slouží pouze jako okrajové případy pro stejné uspořádání difúzních procesů.

Pro velmi dlouhé časy platí model skrze tenký film, naopak pro krátké časy slouží model volné difúze.

V případě difúze skrze tenký film probíhá difúze mezi dvěma různě zředěnými roztoky jedné rozpuštěné látky. Rozpuštěná látka difunduje z vyšší koncentrace, umístěné na jedné straně filmu, do méně koncentrovaného roztoku, umístěného na druhé straně. Jedná o proces v ustáleném stavu, tudíž akumulace látky je nulová a tok látky je konstantní.

Dalším modelem je volná difúze, kde se předpokládá velmi dlouhé médium začínající rozhraním. Na začátku má toto médium konstantní koncentraci dané látky. Náhlým zvýšením koncentrace na rozhraní dojde ke vzniku koncentračního gradientu a látka začne difundovat hlouběji do média. Dochází tedy ke vzniku časově proměnného koncentračního profilu, který se vyvíjí, když rozpuštěná látka difunduje do média [16].

2.2.2 Difúze v hydrogelech

Difúze rozpuštěných látek v makroporézních hydrogelech s tuhým řetězcem se uplatňuje v široké škále biotechnologických oblastí od zapouzdření buněk, přes chromatografickou separaci až po řízené dodávání léčiv. Ve většině těchto aplikací působí hydrogel jako prostředek zpomalující difúzi molekuly. Hydrogely jsou typicky modelovány tak, že mají síťovou strukturu tvořenou řetězcí a volný prostor mezi nimi vyplňuje vodní doména. Transport rozpuštěné látky probíhá primárně v oblastech naplněných vodou v prostoru vymezeném polymerními řetězcí. Obecně platí, že difuzivita rozpuštěné látky přes hydrogel se snižuje se zvyšující se hustotou síťování, s rostoucí velikostí rozpuštěné látky a s klesajícím objemovým podílem vody v gelu. Difuzivita je také ovlivněna tloušťkou a tuhostí polymerních řetězců, přičemž difúze rozpuštěné látky je větší v gelech s tlustšími polymerními řetězcí [17].

2.3 Reologie

Reologie se zabývá tokem a deformací hmoty vlivem vnějších mechanických sil. Existují dva možné mezní typy chování, a to elastické a viskózní. Pokud účinkem vnější síly nastane deformace, která vratně vymizí po jejím odstranění, pak se jedná o elastické chování. Je vykazováno tuhými látkami a energie vynaložená na deformaci se ukládá, a po relaxaci tuhé látky se uvolní. O viskózním chování pak mluvíme, jestliže působením síly hmota teče a tok se zastaví ale neobráťí, je-li síla odstraněna. Toto chování je charakteristické pro jednoduché

tekutiny a vynaložená energie je disipována jako teplo. Mezi těmito dvěma typy chování se nachází viskoelastické chování, které vykazují systémy, jejichž odezva na aplikovanou sílu závisí na době, po kterou tato síla působí [1].

Metoda reologie spočívá v konstrukci modelů, které jsou užitečné při kvalitativním i kvantitativní popisu experimentálních výsledků mechanického chování různých materiálů. Mezi modely patří kapaliny a pevné látky, jejichž matematické vyjádření pochází od Isaaca Newtona a Roberta Hooke [18]. Vyjádřením tak objasnili tokové vlastnosti tzv. ideálně viskózních a ideálně elastických materiálů [19].

Isaac Newton poprvé zavedl pojem viskozita jako konstantu úměrnosti mezi silou vztaženou na jednotku plochy (smykové napětí σ) k vytvoření ustáleného smykového proudění a výsledným gradientem rychlosti ve směru kolmém ke směru proudění (smyková rychlost $\dot{\gamma}$) [19].

$$\sigma = \eta \dot{\gamma}, \quad (6)$$

kde η je dynamická viskozita kapaliny [19]. Dynamická viskozita kapalin je obecně závislá na teplotě (s rostoucí teplotou klesá) a na tlaku. Tekutiny, které se řídí Newtonovým zákonem, se označují jako newtonské a jsou to zpravidla nízkomolekulární látky [20]. Newtonovská kapalina je charakteristická tím, že její viskozita je nezávislá na smykové rychlosti. Typickým příkladem newtonské kapaliny je olej, glycerin nebo voda. Materiály, jako jsou disperze, emulze či roztoky polymerů, často vykazují tokové vlastnosti výrazně odlišné od newtonského chování. To znamená, že buď viskozita klesá nebo roste se zvyšující se smykovou rychlostí, což se označuje jako smykové ztenčování a smykové zahušťování [19]. Takové kapaliny se označují jako nenewtonské a platí pro ně analogický Newtonův zákon, s výjimkou, že η je tzv. zdánlivá viskozita. Nenewtonské kapaliny můžeme rozdělit dle závislosti na čase. Pokud jsou tyto kapaliny časově závislé, pak je dělíme na tixotropní a reopektické, jejichž význam je vysvětlen v kapitole 2.3.1 věnované mechanickým vlastnostem hydrogelů. Naopak pokud jsou kapaliny na čase nezávislé, dělíme je na pseudoplastické, dilatantní a binghamské. U pseudoplastických se zdánlivá viskozita zmenšuje s rostoucím gradientem rychlosti. Dilatantní jsou charakteristické tím, že s rostoucím gradientem rychlosti roste i jejich zdánlivá viskozita. U binghamských kapalin dochází k toku až po překročení určitého prahového smykového napětí, tzv. meze toku [20].

V případě ideálních elastických materiálů platí Hookův zákon pružnosti:

$$\sigma = G\gamma, \quad (7)$$

kde γ je smyková deformace a G je smykový modul, který charakterizuje tuhost materiálu. Smykový modul ideálního elastického tělesa je nezávislý na smykovém napětí a době trvání smykového zatížení.

Smykový modul lze také zapsat v komplexní podobě:

$$G^* = G' + iG'', \quad (8)$$

kde G' je paměťový modul a G'' je ztrátový modul. G' je mírou energie uložené v materiálu během deformace a představuje elastické chování materiálu, kdežto G'' je mírou energie rozptýlené nebo ztracené jako teplo během smyku a představuje viskózní chování materiálu [19].

2.3.1 Mechanické vlastnosti hydrogelů

Gely jsou typickým příkladem viskoelastických materiálů, nicméně vykazují řadu mechanických vlastností, které jsou charakteristické pro tuhý stav. Až do určité hodnoty tečného napětí se gel chová jako tuhé elastické těleso a napětí odolává. Tato hodnota je závislá na koncentraci a pevnosti uzlů ve struktuře gelu. Čím více je vazeb mezi řetězci polymeru, tím tužší je vzniklá prostorová síť a tím je i menší možnost změny tvaru makromolekuly. Gely, které obsahují kovalentní spoje s malým počtem vazeb, jsou obvykle elastické. Fyzikální gely (reverzibilní i ireverzibilní) se při smykovém namáhání, např. při míchání, třepání, často vyznačují tixotropními vlastnostmi. To znamená, že tyto gely jsou zpočátku vysoce viskózní, ale s časem se viskozita snižuje. Pokud se systém ponechá v klidu, pak se původní struktura bude obnovovat a viskozita se bude blížit původní hodnotě. Tixotropie se využívá u nátěrových hmot a naftařských kapalin. Opakem tixotropie je reopexie, která podporuje tvorbu gelu [9].

Slabé fyzikální gely jsou charakteristické tím, že jsou plastické. Jsou elastické pouze při nízkých mechanických napětích. Při vyšším napětí, nazývané jako statická mez kluzu, podléhají deformaci, která může být buď trvalá nebo jen částečně reverzibilní [9].

V případě čerstvých gelů, ať už reverzibilních i ireverzibilních, dochází k řadě samovolných jevů, jelikož tyto systémy nejsou v termodynamické rovnováze. Při procesu stárnutí gelu dochází k růstu počtu styčných bodů a gel se smršťuje. Z gelu je vytlačována část původně

přítomné kapaliny. Tento jev se nazývá synereze a je podporován zvýšením teploty a také přidavkem elektrolytu [9].

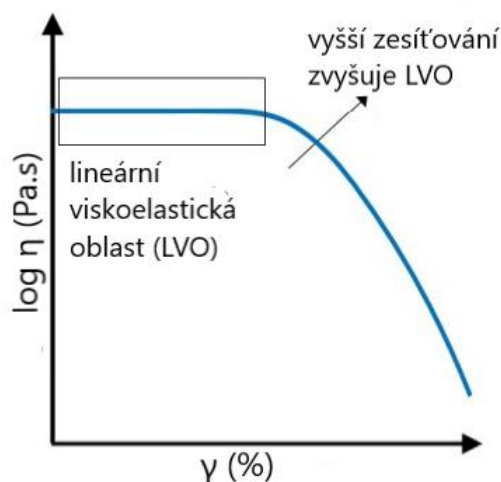
2.3.2 Reometrie

Díky pozorování mechanického chování materiálů můžeme usuzovat jejich reologické vlastnosti a jejich znalost pak můžeme využít k předpovědi chování za jiných podmínek. Jedním ze způsobů, jak můžeme sledovat reologické vlastnosti, je reometrie. V reometrii jsou reálné materiály podrobovány toku, resp. deformaci za kinematicky jednoduchých podmínek s cílem získat kvantitativní informace o reologických vlastnostech [21]. Reometrické měření tedy charakterizuje, nakolik je gel tekutý nebo naopak tuhý [9].

Viskoelastické vlastnosti lze charakterizovat pomocí oscilačních měření provádějící rozmítání (anglicky sweep) amplitudy a frekvence [19]. Vzorek se vkládá mezi dvě desky, přičemž horní deska se pohybuje a spodní deska zůstává nehybná. Obě desky jsou vybaveny senzory. První senzor detekuje dráhu vychýlení horní pohyblivé desky. Signál je pak reologicky vyhodnocen jako deformace. Druhý senzor naopak detekuje sílu, která působí na spodní nehybnou desku. V tomto případě je pak signál reologicky vyhodnocen jako smykové napětí. Parametry pro oscilační testy jsou obvykle přednastaveny ve formě sinusové křivky [22].

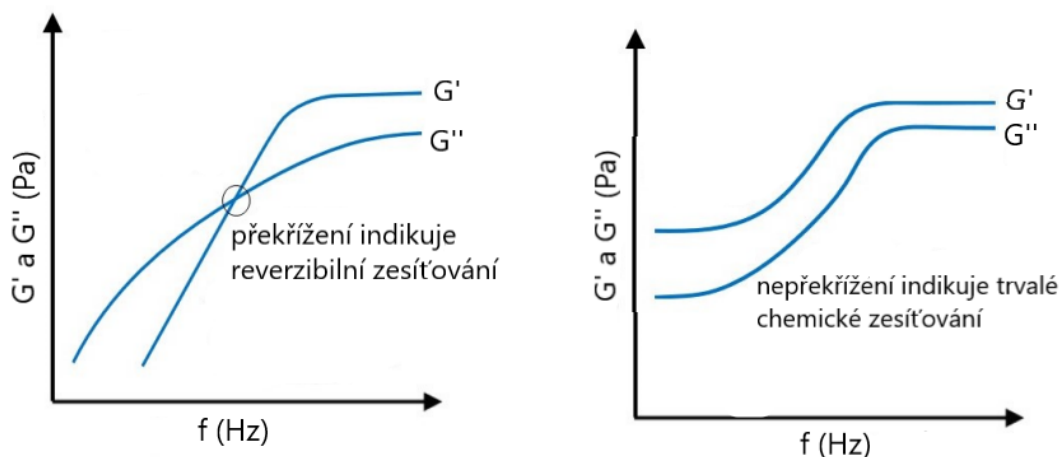
Pro viskoelastické chování vykazují sinusové křivky přednastaveného parametru (např. deformace) a výsledku měření (např. smykové napětí) časové zpoždění signálu odezvy. Toto zpoždění se nazývá fázový posun δ . Pro ideálně elastické chování je $\delta = 0^\circ$, zatímco pro ideálně viskózní chování je $\delta = 90^\circ$. Mezi těmito dvěma extrémy probíhají všechny druhy viskoelastického chování [22].

Strain sweep test (amplitudový test) je jedna z reologických testovacích metod využívaných k charakterizaci hydrogelů pomocí rostoucí oscilační deformace při konstantní frekvenci. Hlavním účelem deformačního testování je stanovení lineární viskoelastické oblasti (LVO) hydrogelů. Tato oblast hydrogelů nastává při nízkém smykovém napětí, během kterého jsou moduly nezávislé na rostoucím napětí [23]. Udává tedy rozsah, ve kterém lze provést tento typ testu bez toho, aniž by došlo ke zničení struktury vzorku. Výsledky měření amplitudového testu jsou prezentovány jako diagram se závislostí paměťového G' a ztrátového G'' modulu na smykovém napětí (deformaci). Paměťový modul může být také nazýván jako elastický a ztrátový jako viskózní [22].



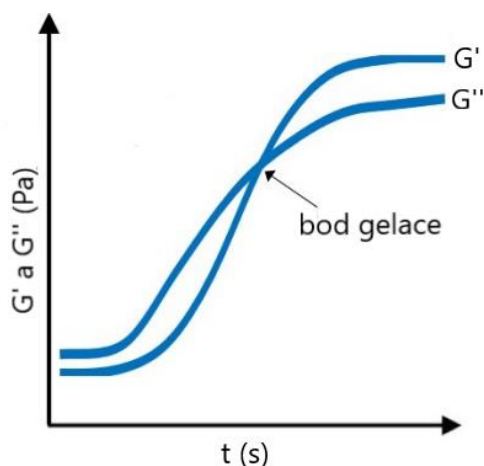
Obrázek 1: Amplitudový test znázorňující LVO u hydrogelů (upraveno z [23])

Ve frequency sweep (frekvenčním testu) se frekvence mění za konstantní amplitudy deformace v LVO [23]. Limit LVO musí být tedy nejprve určen pomocí amplitudového testu. Vysoké frekvence se používají k simulaci rychlého pohybu v krátkých časových intervalech, zatímco nízké frekvence simulují pomalý pohyb na dlouhých časových úsecích nebo v klidu. Frekvence může být uvedena buď jako frekvence f v Hz anebo jako úhlová frekvence ω v rad/s. Výsledky frekvenčního testu jsou prezentovány pomocí diagramu obsahující závislost paměťového G' a ztrátového modulu G'' na (úhlové) frekvenci [22].



Obrázek 2: Frekvenční test znázorňující reverzibilní a trvalé chování sítě hydrogelů (upraveno z [23])

Time sweep test (časový test) je technika, která se využívá pro stanovení strukturálních změn určitého materiálu za určité časové období. Mezi strukturální změny patří např. odpařování rozpouštědla, vytvrzování, gelace, degradace polymeru, anebo regenerace. Tyto změny přímo ovlivňují reologické vlastnosti sloučeniny. V tomto testu se určuje bod gelace, při kterém dochází při překřížení modulu G' a G'' [23].



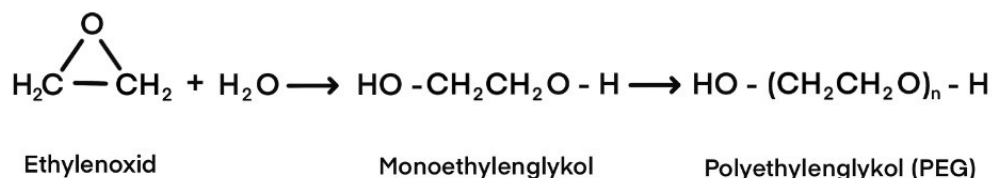
Obrázek 3: Proces tvorby síťové struktury v hydrogelu v závislosti na čase (upraveno z [23])

2.4 Syntetické polymery k přípravě hydrogelů

Hydrogely obsahují přírodní nebo syntetické polymery. Přírodní polymery vynikají tím, že jsou biokompatibilní, biologicky odbouratelné a obsahují také biologicky rozpoznatelné části, nicméně pro biomedicínské aplikace mohou postrádat požadované mechanické vlastnosti, které jsou nutné v místě aplikace. Při zavedení do lidského těla mohou přírodní polymery také vyvolat imunitní/zánětlivé reakce. Proto jsou navrhovány syntetické polymery pro přípravu hydrogelu tak, aby poskytovaly požadované mechanické vlastnosti a další příznivé vlastnosti, i když nemají žádnou vlastní biologickou aktivitu [24].

2.4.1 Polyethylenglykol

Polyethylenglykol (PEG) je polyether složený z opakovaných ethylenglykolových jednotek $[-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n]$. PEG lze syntetizovat polymerací ethylenoxidu a jakýchkoli hydroxylových iniciátorů [25]. Obrázek 4 znázorňuje polymeraci ethylenoxidu za přítomnosti H_2O jako iniciátoru, kdy vzniká monoethylenglykol a poté polyethylenglykol:



Obrázek 4: Polymerace ethylenoxidu [26]

Komerčně jsou PEG dostupné s různým stupněm polymerace a aktivovanými funkčními skupinami. Mezi tyto deriváty PEG patří např. PEG-amin, PEG-thiol, PEG-alkyn nebo PEG-aldehyd [25].

PEG si vysloužil svou oblíbenost díky vysoké flexibilitě struktury, biokompatibilitě, amfifilitě, vysoké hydratační kapacitě a také tím, že je to látka bez jakýchkoli sterických překážek. Vysoká polarita PEG zvyšuje rozpustnost ve vodě, což je vynikající vlastnost mezi podobnými strukturními polymery. Vysoká rozpustnost PEG je také pozorována ve většině organických i anorganických rozpouštědlech [24]. Další výhodou je, že tento polymer je netoxický, v případě interakce s buněčnými membránami nepoškozuje buňky ani aktivní proteiny a snadno se připojuje k jiným molekulám a povrchům [27].

Termín PEG se nejčastěji používá v kombinaci s číselnou hodnotou. V kosmetickém průmyslu se toto číslo týká průměrného počtu ethylenoxidových jednotek (n) v každé molekule (tj. PEG 75, kde počet jednotek = 75). Ve farmaceutickém průmyslu číslo označuje zaokrouhlenou průměrnou molekulovou hmotnost MW (g/mol) daného PEG produktu (tj. PEG 3350 (g/mol) = $75 \times 44 = 3350$). Stejná sloučenina tedy může být pojmenována PEG 3350 nebo PEG 75 v závislosti na typu produktu, ve kterém figuruje. Komerčně dostupné MW se pohybují od 200 do 35 000 g/mol. PEG s nízkou MW (<400 g/mol) jsou čiré, viskózní kapaliny, zatímco PEG s vysokou MW (>1000 g/mol) jsou neprůhledné pevné látky nebo prášky [26].

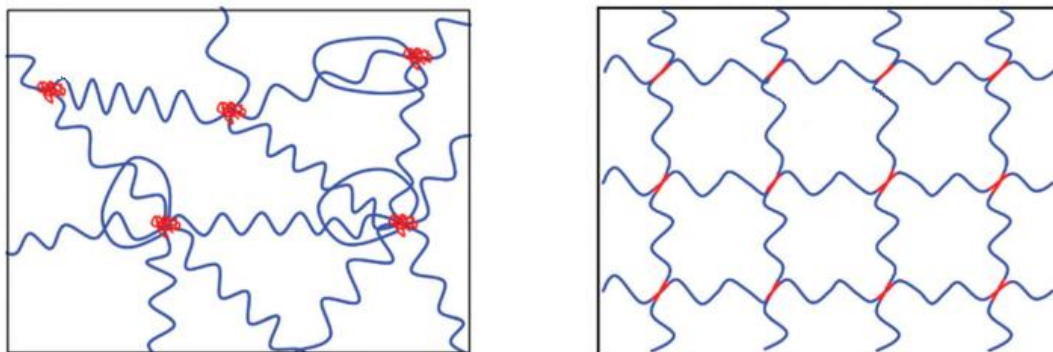
Rozsah fyzikálně-chemických vlastností PEG a výrazná toxikologická bezpečnost je činí vhodnými kandidáty pro různé aplikace. Jsou součástí parenterálních tekutých přípravků, lubrikantů, ultrazvukových gelů a čípků. Díky schopnosti vázat vodu se nacházejí i v lékařských materiálech, jako jsou obvazy na rány a hydrogely. Také jsou využívány při dodávání léčiv. Proces, kdy PEG jsou kovalentně připojeny k systémovým lékům, aby se zvýšila molekulová hmotnost a prodloužila doba oběhu, se nazývá PEGylace. PEGylované léky jsou běžně využívány u léčby rakoviny, dny a při imunoterapii. V kosmetickém průmyslu je PEG široce rozšířen v mastech, šamponech, barvách na vlasy a prostředcích pro ústní hygienu [26].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

První částí této práce bylo zpracování rešerše různých vědeckých publikací zabývajících se přípravou PEG hydrogelů pro biomedicínské aplikace, které by vedlo ke konkrétnímu postupu přípravy PEG hydrogelů a stanovení jejich transportních a sorpčních vlastností. Tato kapitola se tedy zabývá různými druhy přípravy PEG hydrogelů a jejich konkrétními aplikacemi, jako dodávání léčiv a tkáňové inženýrství.

3.1 Způsoby přípravy PEG hydrogelů

K přípravě chemicky stabilních PEG hydrogelů se používají dva nejběžnější mechanismy síťování hydrogelů, a to polymerace s růstem řetězce a polymerace s postupným růstem [28]. Polymerizace s růstem řetězcem je iniciována reaktivními centry, jako jsou radikály, generované tepelnou energií, redoxními reakcemi nebo fotoštěpením molekul iniciátoru. Tyto volné radikály se šíří prostřednictvím více dvojných vazeb uhlík-uhlík na monomerech, a tím dochází k řetězové polymeraci [29]. Hydrogely polymerované s postupným růstem vznikají reakcí alespoň dvou multifunkčních monomerů se vzájemně reaktivními skupinami a každý monomer s definovanou funkčností slouží jako zesíťovací bod [28].



Obrázek 5: Polymerace s růstem řetězce (vlevo) a polymerace s postupným růstem (vpravo).

Červenou barvou vyznačena funkčnost zesíťování definována jako počet ramen na bod zesíťování

(upraveno z [28])

Literatury popisující přípravu PEG hydrogelů je velké množství, nicméně pro tuto práci bylo cílem otestovat přípravu využívající postupnou polymeraci, která by měla mít oproti polymeraci s růstem řetězce několik výhod. Jako hlavní nevýhoda polymerace s růstem řetězce se dá považovat fakt, že může vést k menší konverzi funkčních skupin a zbývající nezreagované monomery nebo funkční skupiny mohou během potenciálního použití v lidském těle způsobit lokální zánětlivou reakci. Často uváděná metoda postupné polymerace

je pomocí Michaelovy adiční polymerace. Jedná se o reakci mezi nukleofilem (Michaelův donor) a aktivovaným olefinem a alkynem (Michaelův akceptor), při které se nukleofil aduje přes násobnou vazbu uhlík-uhlík [30].

3.1.1 Thiol-Michaelova adiční polymerace

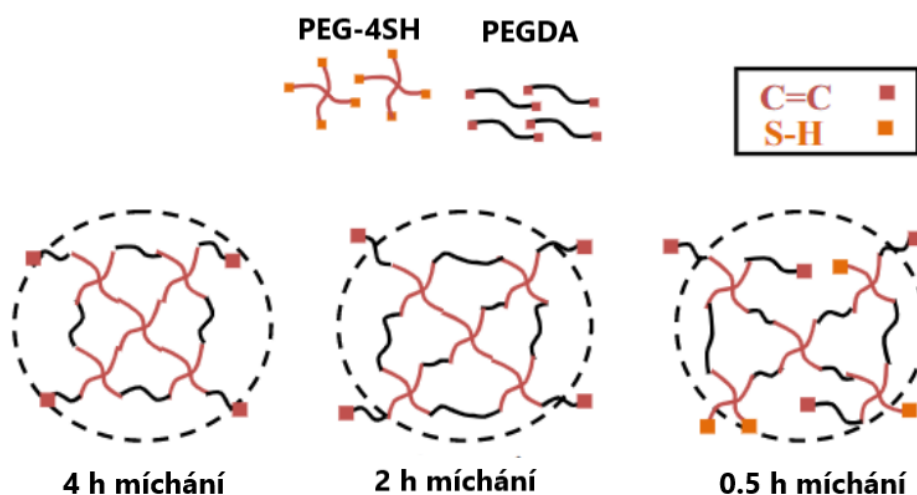
Michaelovu adici ve své studii využívali Ortal Yom-Tov a kol. [31], která byla inspirací pro tuto práci. Tento typ polymerace využívali pro přípravu tzv. PEG-thiol hydrogelů složených z PEG diakrylátu (PEGDA) a 4 ramenného PEG-thiolu (PEG-4SH). Jedná se tedy o postupnou polymeraci, kdy dochází k reakci mezi nenasycenými akrylátovými skupinami a nukleofilními thioly [32]. Nicméně protonová forma thiolové skupiny (-SH) není nijak zvlášť reaktivní, ale deprotonová forma (-S) thiolátový aniont, je nukleofilní, jelikož je bohatý na dostupné elektrony, a je tedy schopen podléhat thiol-Michaelově adici [33,34]. V této studii, kdy se využívá pufovaný fyziologický roztok, jsou thiolátové anionty generovány dynamickou rovnováhou mezi thiolovou funkční skupinou a fosfátem. Ionizace thiolátových aniontů je vysoce závislá na hodnotě pH, tedy při vyšším pH lze dosáhnout vyšší konverze thiolu. Hodnota pH by také měla mít významný vliv na celkovou rychlost polymerační adice thiol-Michael [35].

V každém reakčním místě thiolu a akrylátu se vytváří thioether-esterová vazba. Esterová vazba přítomná na nezreagovaném PEG-akrylátu je jen mírně hydrolyticky degradovatelná, ale blízkost thioetherové skupiny k PEG akrylátovému esteru značně zvyšuje hydrolytickou labilitu tohoto esteru o několik řádů. To vede ke štěpení modifikovaného esteru a celkový rozpad celé zesíťované sítě v časových měřících relevantních pro mnoho aplikací pro dodávání léčiv a regeneraci tkání [32]. Obecně výhodou této reakce je, že se zde vyhýbá použití cytotoxických volných radikálů a UV záření [31]. Reakce probíhá tedy za mírných reakčních podmínek a běžně se provádí při fyziologické teplotě a stavu blízkému fyziologickému pH [30,36].

V již zmíněné studii [31] pracovali se zásobními roztoky (PEG-4SH + fosfátový pufr), které byly míchány po různé časové intervaly před jejich smícháním s roztoky (PEGDA + fosfátový pufr). Tím se dosáhlo různých stupňů tvorby disulfidových vazeb a také je tento postup nutný, protože rozpuštění obou polymerů ve stejné nádobě aktivuje polymerační proces před jejich úplným rozpuštěním. Byl zkoumán vliv různých dob míchání a různých dob polymerace na výslednou strukturu a vlastnosti hydrogelů (znázorněn na *Obrázku 6*). Pro porovnání vlastností byly radikálovou polymerací připraveny PEG-AC

(PEG-akrylátové) hydrogely. Byly provedeny experimenty botnání, reologického měření a měření Youngova modulu, který je definovaný jako poměr aplikovaného napětí a vzniklé deformace.

Bylo zjištěno, že u PEG-thiol hydrogelů se doba gelace významně snižuje při vyšších dobách míchání PEG-4SH. Vysokých hodnot modulu bylo dosaženo při delších dobách gelace. Dále bylo zjištěno, že hydrogely PEG-4SH vykazují schopnost botnání 260 % po 24 hodinách. Po delší době všechny hydrogely ztratily svou integritu v důsledku degradace. Také pro tyto hydrogely byla vypočtena vyšší pórovitost a nižší hustota zesílení ve srovnání s hydrogely PEG-4AC. Signifikantně vyšší hodnoty hustoty zesílení byly pozorovány při delších dobách gelace a také při prodloužené době míchání.



Obrázek 6: Vliv doby míchání PEG-4SH na zesíťování [31]

U PEG-4AC byla zjištěna velmi rychlá rychlost gelace a rovnovážné botnání přibližně 40 % po 24 hodinách. Youngův modul byl dvakrát vyšší než u PEG-thiol hydrogelů. Manipulací s postupem přípravy PEG hydrogelů lze tak doladit určité žádoucí vlastnosti materiálu, které jsou vyžadovány pro specifické biomedicínské aplikace.

3.2 Aplikace PEG hydrogelů

V případě, že chceme do hydrogelů inkorporovat léčivo, nabízejí se dva způsoby přípravy. Buď se léčivo smíchá s polymerem, který má být použit pro hydrogel, a nechají se společně polymerovat. Druhým způsobem je, že se vytvořený hydrogel nechá botnat v roztoku léčiva až do dosažení rovnováhy. Po vnesení léčiva je hydrogel vysušen [37].

Michaelovu adici k enkapsulaci a prodlouženému uvolňování proteinových léčiv využívali Petra van de Wetering a kol. [38]. PEG hydrogely byly složeny z multiakrylátů a dithiothreitolu (DTT). Léčivem byl lidský růstový hormon (hGH), který byl precipitován buď Zn^{2+} nebo lineárním PEG, aby byl chráněn před reakcí s gelovými prekurzory během gelace. Díky precipitaci hormonu ionty Zn^{2+} docházelo k pomalému rozpouštění, zatímco lineární PEG poskytl rychle se rozpouštějící precipitáty. Výhodou u Michaelovy adice je, že můžeme změnou molekulové hmotnosti výchozích složek tvořících hydrogel vyladit uvolňování proteinu v rozsahu nárazového uvolňování až po dlouhodobé uvolňování v řádu měsíců.

Rychlost uvolňování proteinu lze také snížit zvýšením hustoty zesíťování hydrogelu, nicméně to vede ke snížení množství proteinu a hydrofilnosti matrice [39]. Proto byly vyvinuty afinitní hydrogely, kde se ligandy ukotvené v hydrogelu reverzibilně vážou na fyzikálně nabitě proteiny a udržují tak jejich uvolňování. Hydrogelům s peptidy vážícími se na proteiny se věnovali Jing Wang a kol. [40]. Cílem byl vyvinout injekční systém, který by sloužil jako nosič neurotrofinu-3, což je růstový faktor, který umožňuje regeneraci poškozené synapse, která by v případě ztráty mohla způsobit ztrátu sluchu. I zde pro přípravu PEG hydrogelů využívali Michaelovou adici a to thiol-vinylsulfonu (PEG-4SH a PEG-4VS). V další studii pro řízené uvolňování naopak hydrofobních léčiv s nízkou molekulovou hmotností využívali J. Li a kol. [41,42] cyklodextrin ukotvený v PEG hydrogelu.

Nejběžnějším způsobem přípravy PEG je však fotopolymerace, která využívá světlo k přeměně kapalných roztoků makromerů PEG na pevné hydrogely [43]. Jedná se tzv. o radikálovou polymeraci, kdy viditelné nebo UV světlo reaguje s fotoiniciátory za vzniku volných radikálů, které jsou schopny iniciovat polymeraci za vzniku zesíťovaných hydrogelů [44]. Tento druh polymerace využívali Quick a Anseth [44,45] s cílem enkapsulovat nukleové kyseliny. Odhalili, že při tomto síťování může přítomnost volných radikálů poškodit zapouzdřené biomolekuly, ale také zjistili, že přidáním činidel či antioxidantů dochází ke snížení poškození DNA radikály. Volné radikály také mohou snižovat účinnost uvolňování biomolekul. Na tom pracovali Chien-Chi Lin a kol. [47], kteří přidávali do roztoku PEG kyselinu iminodioctovou, čímž došlo ke zvýšení celkového uvolňování proteinu z fotopolymerizované sítě.

Podstata využití PEG hydrogelů pro regenerativní medicínu vychází z toho, že vysoký obsah vody v hydrogelu se podobá měkké tkáni, a tak vytváří vhodné prostředí pro mnoho zapouzdřených biomolekul a buněk [11, 48]. Kristen L. Moffat a Kacey G. Marra [49]

studovaly PEG-diamin hydrogely zesíťované pomocí genipinu pro aplikace v tkáňovém inženýrství. Zajímavostí je, že genipin je 10 000krát méně toxický než glutaraldehyd jakožto nejrozšířenější síťovací činidlo pro biomateriály. Studium adheze buněk hladkého svalstva ukázalo, že po 24 hodinách inkubace není žádný významný rozdíl v počtu buněk ulpívajících na povrchu hydrogelu PEG-genipin oproti pozitivní kontrole. Pro podpoření adheze a funkce buněk lze zavádět funkční skupiny do PEG hydrogelů. Např. Jason A. Burdick a kol. [50] využívali k modifikaci PEG hydrogelu peptid RGD (Arg-Gly-Asp), který podpořil přežití enkapsulovaných osteoblastů.

Použitelnost PEG hydrogelů v regenerativní medicíně může být dále rozšířena začleněním degradovatelných segmentů do PEG hydrogelových sítí [51]. A. T. Metters a kol. [52,53] začleňovali do PEG hydrogelových sítí hydrolyticky degradovatelné skupiny poly(kyseliny) mléčné PLA a vytvářeli tak různé druhy kopolymerů. Naopak Hubbell a kol. [54] vytvářeli PEG hydrogely Michaelovou adicí s MMP (matricovými metaloproteinázami) a zjistili, že MMP reagují na buňky a umožňují tak usnadněnou degradaci hydrogelu. Na vývoji PEG systému s enzymaticky labilními kaprolaktonovými jednotkami a enkapsulovanými chondrocyty spolupracovali Anseth a kol. [55,56], kdy dodáním lipázy umožnili exogenně kontrolovat degradaci materiálu.

Kromě zmíněných aplikací se PEG hydrogely ukázaly jako užitečné při studiu diferenciaci kmenových buněk v 3-D prostředí, kdy zapouzdřené lidské kmenové buňky mohou být indukovány k diferenciaci pomocí navázaných chemických funkčních skupin malých molekul [57]. Elisseff a kol. [58,59] zkoumali vliv hydrogelového scaffoldu složeného z PEG a chondroitinsulfátu na chondrogenesi mezenchymálních kmenových buněk.

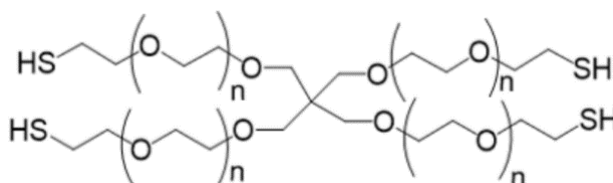
Velký potenciál PEG hydrogelů je také v oblasti hojení ran. Siju Liu a kol. [60] připravovali injikovatelný a degradovatelný hydrogel prostřednictvím adice Michaelova typu. Testy ukázaly, že PEG hydrogel měl vynikající biokompatibilitu, nízkou cytotoxicitu a také že je schopen inhibovat růst bakterií.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

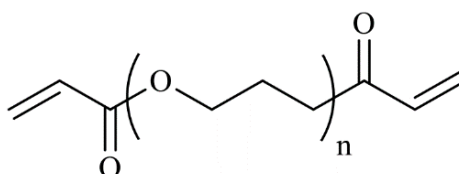
4.1 Použité chemikálie

Tabulka 1: Použité PEG

	Molekulová hmotnost [kDa]	Výrobce	Lot
PEG-4SH (Obrázek 7)	10	Laysan Bio, Inc.	165-174
PEGDA (Obrázek 8)	10	Laysan Bio, Inc.	163-94



Obrázek 7: Chemická struktura PEG-4SH [61]



Obrázek 8: Chemická struktura PEGDA [62]

Tabulka 2: Použité chemikálie

	Molekulová hmotnost [g/mol]	Výrobce	CAS
NaCl	58,44	Lach-Ner, s.r.o.	7647-14-5
KCl	74,56	PENTA s.r.o.	7447-40-7
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	177,99	PENTA s.r.o.	10028-24-7
KH ₂ PO ₄	136,09	PENTA s.r.o.	7778-77-0
Rhodamin 6G	479,01	Sigma-Aldrich s.r.o.	989-38-8
EGDMA	198,22	Sigma-Aldrich s.r.o.	97-90-5
NaOH	40,00	PENTA s.r.o.	1310-73-2
Irgacure 2959	224,25	Sigma-Aldrich s.r.o.	106797-53-9

*EGDMA = Ethylenglykol dimethakrylát

*Irgacure 2959 = 2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenon

4.2 Použité přístroje

Reometr TA Instruments HR-2

UV-VIS spektrofotometr Hitachi U-3900H

Rastrovací elektronový mikroskop ZEISS EVO LS 10

FT-IR Nicolet iS50 ThermoFisher Scientific

Analytické váhy Denver Instrument TB-224A

pH metr Mettler Toledo S40 SM

Magnetická míchačka Thermo Scientific

Sušárna Memmert

4.3 Příprava pufovaného fyziologického roztoku

Tabulka 3: Složení pufovaného fyziologického roztoku

	Množství [g]	Koncentrace [M]
NaCl	8	0,14
KCl	0,2	0,003
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	1,8	0,01
KH ₂ PO ₄	0,24	0,002

Pro přípravu pufovaného fyziologického roztoku o pH = 7,4 byly naváženy a smíchány výše uvedené chemikálie. Do objemu 1 litru byla dolita deionizovaná voda a směs byla následně promíchána a uchována. Celková iontová síla tohoto fyziologického roztoku byla stanovena na 0,175 mol/l.

4.4 Příprava vzorku PEGDA-thiol hydrogelu

Příprava PEGDA-thiol hydrogelů postupnou polymerací je inspirována prací Ortal Yom-Tov a kol. [31] zmíněnou na str. 23.

PEGDA-thiol hydrogel se tedy skládá ze dvou složek, a to PEG-4SH a PEGDA, které byly po celou dobu uchovávány v mrazáku. Pro přípravu bylo nejdříve naváženo 0,1 g PEG-4SH a 0,05 g PEGDA. K těmto odděleným navážkám bylo přidáno 0,5 ml pufovaného fyziologického roztoku. Následně byly tyto dva roztoky míchány (otáčky 300 rpm) po různých časových intervalech (1; 2; 3 a 5 hod). Po uplynulém čase se roztoky smíchaly, protřepaly a vylily se na malou Petriho misku. Vzorky hydrogelů byly uchovávány pod parafilmem v exsikátoru s vodou.

4.5 Příprava vzorku PEGDA hydrogelu

Příprava PEGDA hydrogelů pomocí fotoiniciace byla převzata z probíhajících experimentů v rámci bakalářské práce kolegyně Michaely Kadlecové.

Zpočátku bylo naváženo 0,1 g PEGDA, který byl následně rozpuštěn v 1665 μl deionizované vody a následně bylo přidáno 4 μl síťovacího činidla EGDMA. Těsně před vložením pod UV lampu se přidalo k roztoku 0,01 g fotoiniciátoru Irgacure, který se nechal pořádně rozmíchat. Roztok byl následně vylit na Petriho misku/do trubičky a vložil se na 25 minut pod UV lampu s intenzitou $2,4 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$.

4.6 Reologické měření

Vzhledem k tomu, že na Fakultě chemické VUT v Brně ještě hydrogely na této bázi (kombinace PEGDA a PEGDA-thiol) nebyly studovány, bylo potřeba jako první optimalizovat přípravu PEGDA-thiol hydrogelů.

Pro studium viskoelastických (mechanických) vlastností byl zvolen Reometr TA Instrument HR-2. Na základě množství a charakteru vzorku byla vybrána ocelová geometrie deska-deska s průměrem horní desky 25 mm. Před samotným měřením bylo třeba geometrii zkalibrovat. Pro měřicí stav byla nastavena vzdálenost (tzv. gap) mezi oběma deskami 500 μm . Pro tuto práci byly zvoleny tři typy testů: časový (time sweep) pro studium gelace, amplitudový a frekvenční.

Time sweep test pro studium gelace byl prováděn při 25 °C. Díky tomuto testu je možné sledovat průběh gelace v čase. Okamžik vzniku gelu značí bod gelace, k němuž dochází při překřížení elastického G' a viskózního G'' modulu, přičemž poté je $G' > G''$. Zvolenými parametry pro tento typ testu byly: amplituda deformace 0,1 %, frekvence 1 Hz a doba relaxace vzorku před samotným měřením 120 s.

Amplitudový test probíhal za konstantní frekvence oscilací a nastavené parametry pro tento typ testu byly následující: teplota 25 °C, frekvence 1 Hz, amplituda deformace 0,01 – 1000 % a počet bodů na dekádu 8. Doba relaxace vzorku před samotným měřením byla opět 120 s. V tomto testu se stanovovala lineární viskoelastická oblast (LVO), což je oblast, ve které nedochází ke zničení struktury vzorku a určuje tedy sílu vazeb. Hodnota amplitudy deformace z LVO poté sloužila jako parametr pro následující frekvenční test.

Frekvenční test probíhal za vybrané konstantní hodnoty amplitudy deformace. Měření probíhalo při teplotě 25 °C a zvolený rozsah frekvence byl 0,1 – 100 Hz. Počet bodů na dekádu byl opět 8 a doba relaxace 120 s.

Problémem u frekvenčních a amplitudových testů byla velmi dlouhá doba stlačení některých vzorků gelu (až 3 hodiny) pomocí horního senzoru na požadovaný gap (tedy vzdálenost spodní a horní desky v měřící poloze) a to vlivem vysoké pevnosti gelu.

4.7 FTIR spektroskopie

Pro analýzu vybraných vzorků hydrogelů byla využita technika FTIR (Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací), kdy nejdříve bylo nutné připravené hydrogely před samotnou analýzou vysušit.

Metoda FTIR využívá infračerveného záření k určení chemických funkčních skupin přítomných ve vzorku. Principem je absorpce infračerveného záření při průchodu vzorkem, při níž dochází ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekuly v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly. Výstupem je infračervené spektrum funkční závislosti energie, vyjádřené v procentech transmitance nebo jednotkách absorbance, na vlnové délce dopadajícího záření [63]. Vzorky byly analyzované v rozmezí vlnočtu 1800–1500 cm^{-1} .

Mezi analyzované vzorky patřil hydrogel obsahující pouze PEG-4SH, dále hydrogel PEG-4SH + PEGDA (obě chemikálie míchané v pufru), hydrogel PEG-4SH (míchaný v roztoku NaOH – pH 10.6) + PEGDA (míchaný v deionizované vodě) a poté i čisté chemikálie.

4.8 Sušení a botnání

Sušení a botnání bylo provedeno za účelem zjištění, zda je gel po vysušení (kdy je zbaven vodného prostředí) schopen opět přijmout/absorbovat vodu a jaké množství sušiny reálně obsahuje. Pro tento experiment byl připraven PEGDA-thiol hydrogel s dobou míchání 2 hodiny. Tento připravený hydrogel byl následně uschován pod parafilmem v exsikátoru s vodou. Po 24 hodinách byl vzorek vytažen, následně sušen v sušárně při teplotě 105 °C a po určitých časových intervalech byl vážen, a to až do konstantní hmotnosti, kdy byl ze sušárny vytažen. Poté následovalo vložení vysušeného vzorku do 60 ml deionizované

vody. Opět byly po určitých časových intervalech zaznamenávány hmotnosti vzorku, nicméně vždy jej bylo třeba před zvážením osušit.

Kromě tohoto experimentu se také provedl experiment botnání hydrogelu v nativním stavu. Opět byl připraven vzorek s 2hodinovým mícháním, ten byl vložen do exsikátoru s vodou na 24 hodin. Po této době se vzorek zvážil a vložil do 60 ml deionizované vody. Po určitých časových intervalech byly zaznamenávány hmotnosti vzorku, kdy před zvážením bylo nutné vzorek opět osušit.

4.9 Rastrovací elektronová mikroskopie

Pro zobrazení struktury vysušených vzorků PEGDA-thiol a PEGDA hydrogelů byla využita rastrovací elektronová mikroskopie (SEM). Příprava hydrogelů pro tuto analýzu spočívala v několika krocích, nejdříve byl hydrogel po 24 hodinách v exsikátoru s vodou vytažen, následně byl šokově zmražen tekutým dusíkem, aby se omezily vznikající artefakty struktury gelu. Poté byl vzorek lyofilizován, díky čemuž došlo k sublimaci vody. Vzhledem k tomu, že vzorky nebyly vodivé, bylo potřeba je před pozorováním pomocí SEM pokovit (zlatem pomocí vakuové naprašovačky).

4.10 Transportní a sorpční experimenty

4.10.1 PEGDA-thiol hydrogely

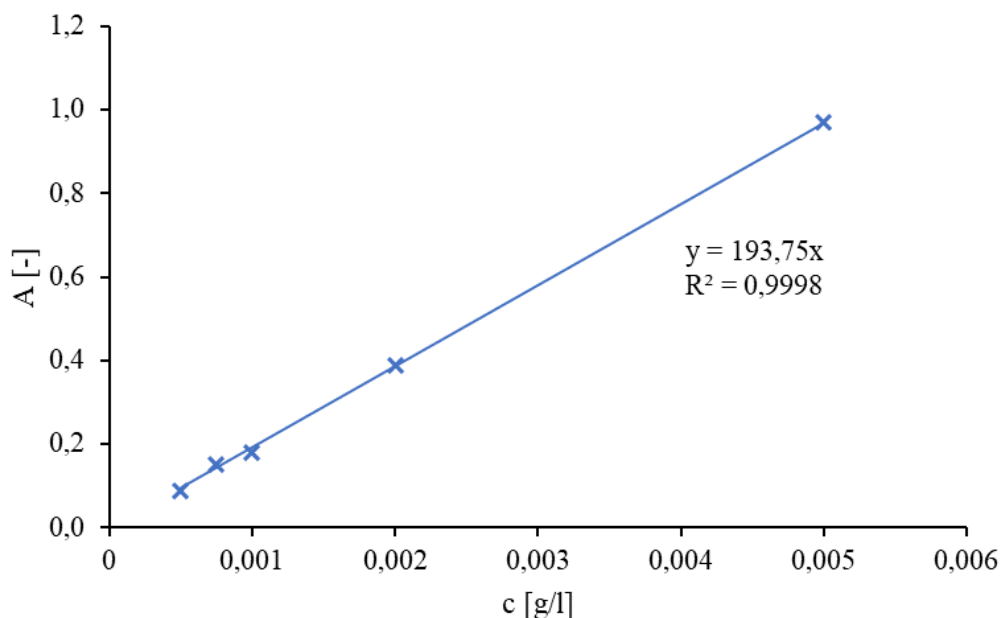
Pro transportní a sorpční experimenty byly připraveny dva druhy roztoků barviva Rhodaminu 6G:

- Roztok Rhodaminu 6G o koncentraci 0,005 g/l (rozpuštěn v destilované vodě)
- Roztok Rhodaminu 6G o koncentraci 0,05 g/l, ve kterém byly rozpuštěny soli pro pufrovaný fyziologický roztok o stejných navázkách

Pro tyto experimenty byly vzorky připravovány do trubiček o velikosti 1 cm × 1 cm, což ovlivnilo gelaci a vzorky se tedy nechávaly po přípravě v exsikátoru po dobu 72 hodin, aby byl zajištěn vznik hydrogelu v celém objemu.

První experiment spočíval ve studiu sorpce barviva hydrogelem. Po 3 dnech v exsikátoru byl vzorek vyloupen z trubičky a následně byl vložen do připraveného roztoku Rhodaminu 6G (koncentrace 0,005 g/l) o objemu 20 ml. Cílem bylo zjistit změnu koncentrace roztoku barviva po jeho předpokládané difúzi do struktury hydrogelu. Měření probíhalo

na spektrofotometru Hitachi, kde se získaly pouze hodnoty absorbance v různých časových intervalech v závislosti na vlnové délce. Hodnota absorbance byla odečtena při vlnové délce 526 nm (absorpční maximum Rhodaminu 6G). Pro výpočet koncentrace z absorbance sloužila kalibrační přímka (Obrázek 9), která byla získána z různě naředěných roztoků Rhodaminu 6G.



Obrázek 9: Kalibrační přímka Rhodaminu 6G

Druhým typem experimentu pak bylo sledování desorpce/uvolňování barviva ze vzorku do vodného prostředí. Tentokrát bylo barvivo inkorporováno již při přípravě hydrogelu. Ta probíhala prakticky stejně, jako v kapitole 4.4, jen se k PEG-4SH a PEGDA nepřidával pufrovaný fyziologický roztok, ale již zmíněný připravený roztok Rhodaminu 6G o koncentraci 0,05 g/l s obsahem solí. Vzorek byl opět připraven do trubiček, po 3 dnech byl vyloupenut (Obrázek 10) a následně byl vložen do destilované vody o objemu 20 ml. Po určitých časových intervalech se proměřoval roztok vody na spektrofotometru, kdy kalibrační rovnice pro výpočet koncentrace byla stejná, jako pro předchozí experiment.



Obrázek 10: Vzorek PEGDA-thiol hydrogelu s inkorporovaným barvivem Rhodaminu 6G

4.10.2 PEGDA hydrogely

Pro transportní a sorpční experimenty byly připraveny dva druhy roztoků barviva Rhodaminu 6G:

- Roztok Rhodaminu 6G o $c = 0,005$ g/l (rozpuštěn v destilované vodě)
- Roztok Rhodaminu 6G o $c = 0,05$ g/l (rozpuštěn v destilované vodě)

Pro studium sorpce barviva byl postup pro přípravu PEGDA hydrogelů totožný jako v kapitole 4.5. U těchto hydrogelů nebylo třeba čekat než zgeluje, tudíž jej bylo možné využít ihned po přípravě. Připravený hydrogel byl ponořen do 20 ml roztoku Rhodaminu 6G o koncentraci 0,005 g/l a opět byla sledována změna koncentrace Rhodaminu 6G stejně jako bylo popsáno u sorpcí PEGDA-thiol hydrogelů.

U desorpcí barviva z PEGDA hydrogelu bylo barvivo taktéž inkorporováno při přípravě hydrogelu. Postup přípravy byl totožný jako v kapitole 4.5, nicméně místo 1665 μ l deionizované vody byl přidán roztok Rhodaminu 6G o koncentraci 0,05 g/l. Po přípravě se vzorek hydrogelu vložil do 20 ml destilované vody a opět byla sledována změna koncentrace vody, do které se uvolňovalo barvivo obdobně jako u desorpcí PEGDA-thiol hydrogelů.

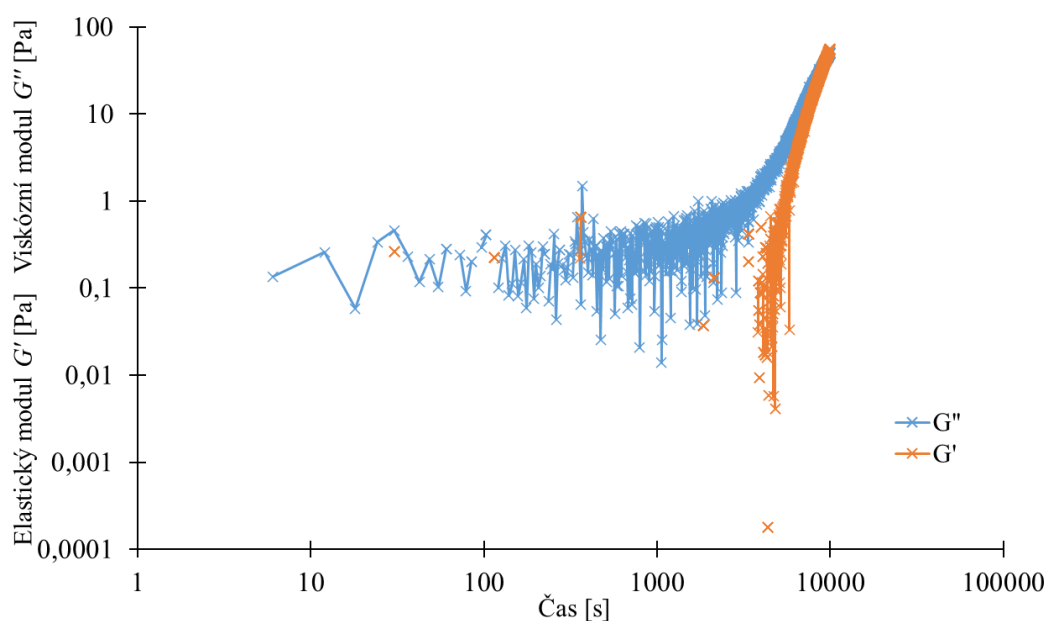
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Optimalizace PEGDA-thiol hydrogelů

PEGDA-thiol hydrogely tvoří značnou část této experimentální práce. Prvotním krokem byla samotná optimalizace a poté až studium transportních a sorpčních vlastností. Pro porovnání těchto vlastností u jiného typu síťování polyethylenglykolových hydrogelů sloužily PEGDA hydrogely připravené fotoiniciací.

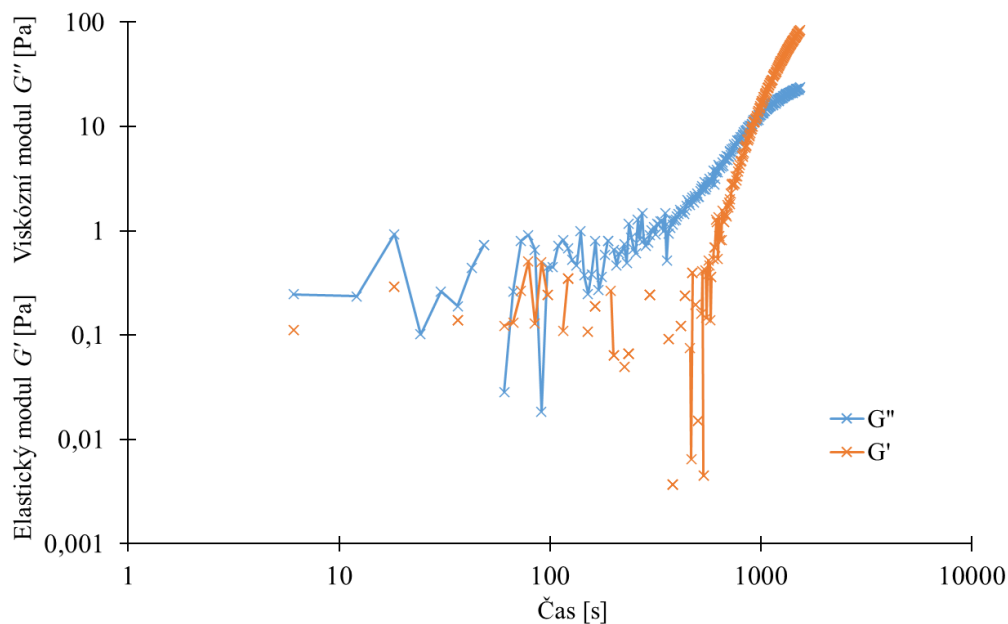
5.1.1 Studium doby gelace

Pro prvotní ověření, zda vůbec vybrané chemikálie (PEG-4SH a PEGDA) opravdu společně tvoří vybraným typem síťování gel, bylo využito reologické měření, konkrétně time sweep test. Byly vybrány dvě doby míchání roztoků, a to 2 a 3 hodiny, kdy po smíchání byly výsledné roztoky ihned měřeny.



Obrázek 11: Závislost viskoelastických modulů na čase pro PEGDA-thiol s 2 hod. mícháním

Z grafu (Obrázek 11) je možné vidět, že na začátku měření byl vzorek v kapalném stavu, protože převažuje viskózní modul, tudíž $G'' > G'$. Následně dochází k procesu tvorby síťové struktury a vzorek se pomalu zpevňuje. Překřížením křivek G' a G'' dochází ke vzniku gelu, což je definováno jako tzv. bod gelace. Poté elastický modul G' stále roste, gel se stává pevnějším a stále geluje. U tohoto vzorku s 2hodinovým mícháním došlo ke vzniku bodu gelace za necelých 10 000 s = 3 hod.



Obrázek 12: Závislost viskoelastických modulů na čase pro PEGDA-thiol s 3 hod. mícháním

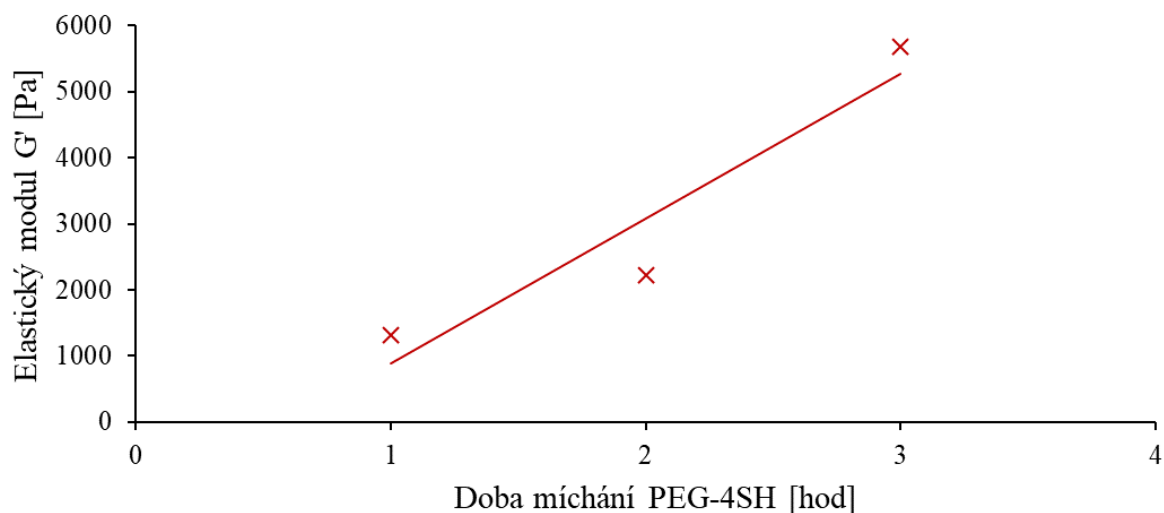
Naopak u vzorku s 3hodinovým mícháním (Obrázek 12) došlo ke vzniku bodu gelace rychleji, a to za necelých 1000 s = 17 min.

Ke vzniku gelu tedy došlo v obou případech (pro 2 i 3hodinové míchání), ovšem doba, za kterou k tomu došlo, se výrazně lišila. Byť se oba polymery míchají stejně dlouhou dobu, tak dle studie [31] doba míchání ovlivňuje hlavně PEG-4SH a to tak, že za určitý čas se vytvoří určitý stupeň disulfidových vazeb vlivem oxidace (tedy přítomností kyslíku) [64]. Různá doba míchání PEGDA nemá žádný vliv. Po smíchání se ve výsledném hydrogelu nevyskytují pouze disulfidové vazby, ale také vazby mezi thiolem a akrylátem. Dobou míchání roztoku PEG-4SH je tedy možno ovlivnit dobu gelace, což bylo potvrzeno i v rámci této práce.

5.1.2 Studium vlivu doby míchání PEG-4SH na mechanické vlastnosti

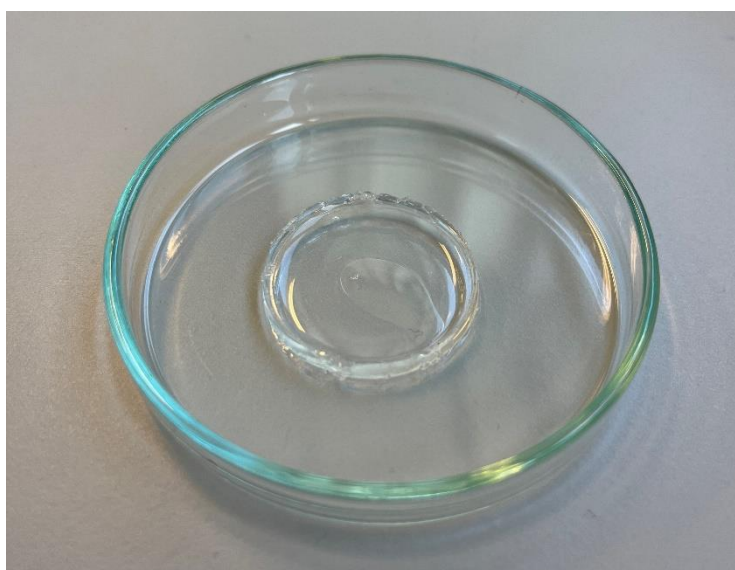
Bylo tedy zjištěno, že doba míchání PEG-4SH má vliv na dobu gelace (s delší dobou míchání gelace probíhá rychleji). Dále se ověřoval vliv doby míchání PEG-4SH na mechanické vlastnosti výsledného hydrogelu. Byly vybrány následující doby míchání, a to 1; 2; 3 a 5 hodin. Roztoky PEG-4SH a PEGDA byly po těchto časových intervalech smíchány a ponechány 3 hodiny v Petriho misce zabalené parafilmem. Po 3 hodinách se u vzorků změřily viskoelastické vlastnosti, a to pomocí reometru, konkrétně amplitudový a frekvenční test.

Na *Obrázku 13* lze vidět, že již po 3 hodinách po smíchání jsou viditelné rozdíly v hodnotách elastického modulu v závislosti na době míchání PEG-4SH. Pro tento graf byl vybrán vždy stejný bod elastického modulu pro každou dobu míchání z amplitudového testu (amplituda deformace 1 %). Kromě uvedených dob míchání v grafu byla vyzkoušena i doba míchání PEG-4SH 5 hodin, nicméně za tuto dobu roztok na míchačce zgeloval, tudíž jej nebylo možné smíchat s roztokem PEGDA.



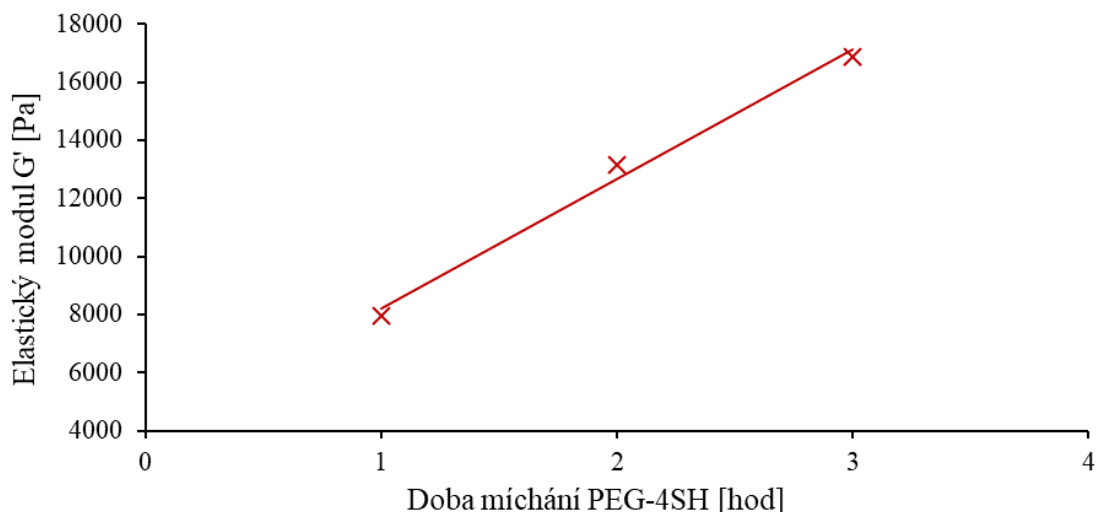
Obrázek 13: Závislost elastického modulu na době míchání PEG-4SH (za 3 hod.)

Dále bylo provedeno měření po 24 hodinách. Pro představu, jak takové hydrogely vůbec vypadají se na *Obrázku 14* nachází PEGDA-thiol hydrogel po 24 hod. v exsikátoru. Hydrogel je transparentní, drží tvar a dobře se s ním manipuluje.



Obrázek 14: PEGDA-thiol hydrogel po 24 hod.

Obrázek 15 představuje graf pro stejné vzorky měřené po 24 hodinách. Je zde vidět, že s delší dobou míchání PEG-4SH taktéž vznikají hydrogely s vyšším elastickým modulem. Opět to lze vysvětlit tím, že za delší dobu míchání thiolu se vytváří vyšší stupeň (počet) disulfidových vazeb, které přispívají k pevnosti [31]. Po 24 hodinách je vidět velký rozdíl v hodnotách elastického modulu oproti hodnotám na Obrázku 13, což znamená, že během těchto 24 hodin hydrogel stále geloval.



Obrázek 15: Závislost elastického modulu na době míchání PEG-4SH (za 24 hod.)

Určení konce LVO (po 24 hod.) pro jednotlivé doby míchání z hlediska amplitudy deformace je zobrazeno Tabulce 4.

Tabulka 4: Určení konce LVO z hlediska amplitudy deformace

doba míchání PEG-4SH [hod]	amplituda deformace [%]
1	117,62
2	88,23
3	27,87

Z tabulky lze vyčíst, že s nejkratší dobou míchání PEG-4SH je konec LVO až při amplitudě deformace 117,62 %. Naopak s nejdelší dobou míchání PEG-4SH je konec LVO už při amplitudě deformace 27,87 %. To je způsobeno tím, že za delší dobu míchání vzniká větší množství uzlů, čímž vzniká větší pravděpodobnost defektů, které mohou podlehnout deformaci.

Bylo tedy prokázáno, že doba míchání PEG-4SH má vliv nejenom na dobu gelace, ale taktéž na výsledné mechanické vlastnosti hydrogelů. Na základě těchto výsledků byla vybrána doba míchání 2 hod. jako vhodná pro další experimenty.

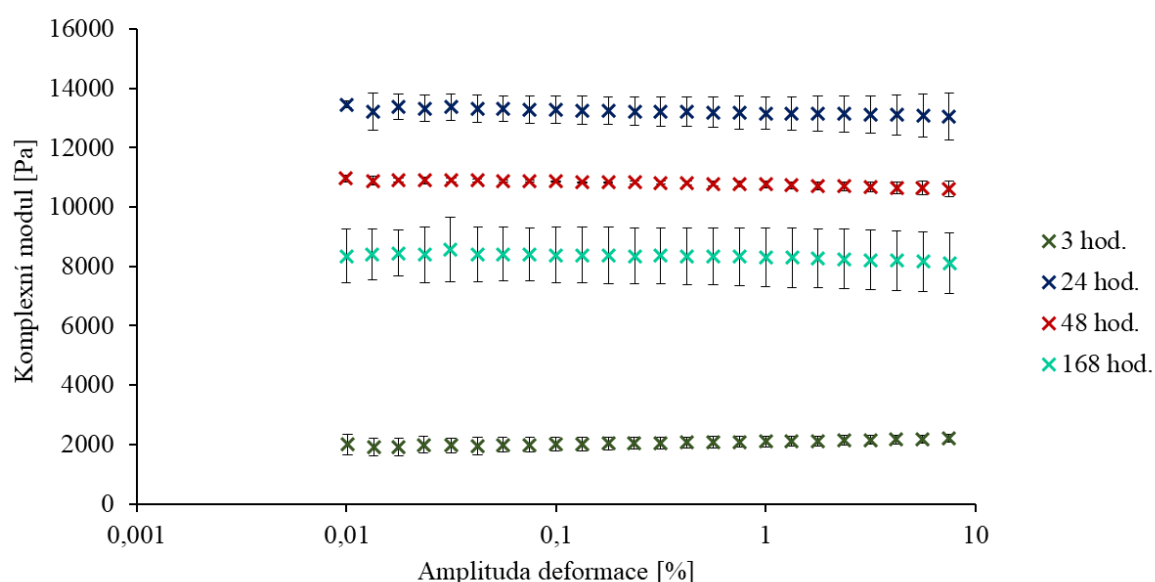
5.1.3 Reologické měření

PEGDA-thiol hydrogel s vybranou dobou míchání PEG-4SH 2 hodiny byl následně podroben bližšímu reologickému měření. Kromě získání informací o tom, jak se vzorek hydrogelu chová v průběhu několika dní, bylo také důležité zjistit, za jak dlouhou dobu gel již nezvyšuje hodnoty elastického modulu. V takovém případě by nezvyšující se modul dával informaci o tom, že hydrogel je již plně zesíťován.

Obrázek 16 znázorňuje graf pro vzorek hydrogelu, který byl proměřován pomocí amplitudového testu po určitém časovém rozmezí. Jedná se o graf závislosti komplexního modulu G^* na amplitudě deformace. Komplexní modul je dán vztahem:

$$G^* = \sqrt{G'{}^2 + G''{}^2} \quad (9)$$

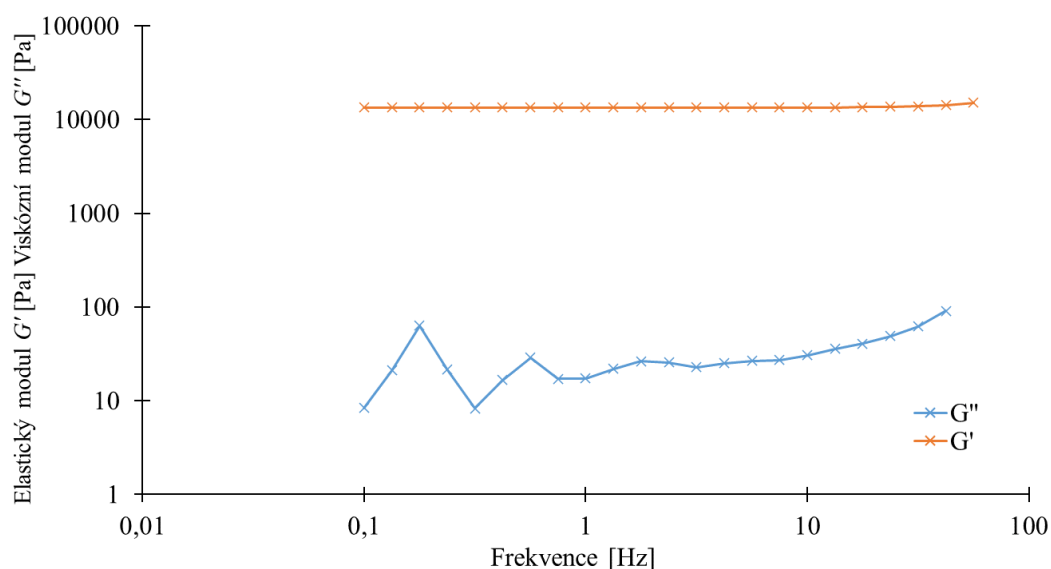
Vzhledem k omezenému množství chemikálií následoval po amplitudovém testu frekvenční na stejném vzorku, bylo tedy nutné ukončit amplitudový test před deformací vzorku, což mělo za následek ukončení testu jednotlivých vzorků v jiných časech. Pro zpracování grafu byla tedy vybrána oblast rozmezí amplitudy deformace nacházející se u všech měření. Pro každé nové měření amplitudového testu se využíval vždy nový vzorek hydrogelu, aby nedocházelo k ovlivňování výsledků deformací vzorku způsobenou předchozím měřením (např. úprava vzorku, ztláčování). Všechny vzorky byly uchovávány pod parafilmem v exsikátoru s vodou, aby nedocházelo k vysoušení.



Obrázek 16: Závislost komplexního modulu na amplitudě deformace

Graf (Obrázek 16) tedy ukazuje, že po 3 hodinách po smíchání roztoků PEG-4SH a PEGDA jsou hodnoty modulu poměrně nízké oproti hodnotám po 24 hodinách. V této době hydrogel stále geluje a zpevňuje se. Po 48 hodinách už je viditelný pokles modulu. Z čehož lze usoudit, že hydrogel je po 24 hodinách plně zgelovaný a pokles může být způsoben tím, že je vzorek uchován v exsikátoru s vodou, může tedy částečně absorbovat vodu a tím tak snižovat mechanické vlastnosti. Po 7 dnech (=168 hodin) lze také pozorovat snížené hodnoty modulu.

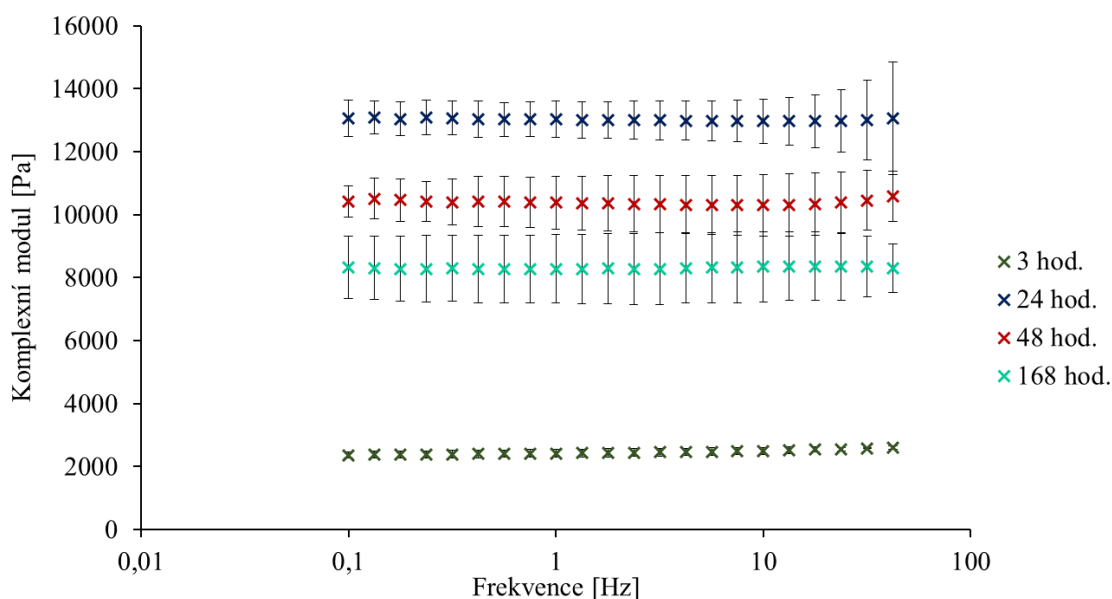
Po amplitudovém testu byl proveden frekvenční test při konstantní amplitudě deformace zvolené z amplitudového testu.



Obrázek 17: Frekvenční test pro PEGDA-thiol (po 24 hod.)

Pro představu je zde uveden příklad frekvenčního testu pro PEGDA-thiol hydrogel po 24 hod. (Obrázek 17). Při frekvenčním testu docházelo ke zvýšení hodnot viskózního modulu se zvyšující se frekvencí. To je způsobeno tím, že vzorek nemá prostor na relaxaci a tím se zpevňuje. Elastický modul je s rostoucí frekvencí konstantní, jen při nejvyšší frekvenci se nepatrně zvyšuje.

Obrázek 18 představuje pro přehlednost graf závislosti komplexního modulu na frekvenci po určitých časových intervalech. Opět zde můžeme vidět podobný trend hodnot jako u amplitudového testu.



Obrázek 18: Závislost komplexního modulu na frekvenci

Když z reologického hlediska porovnáme tyto hydrogely s fyzikálně zesíťovanými agarózovými hydrogely, tak zjistíme, že PEGDA-thiol hydrogely disponují mnohem větší mechanickou pevností [65]. Nicméně podobný rozdíl je také, když porovnáme hodnoty modulu s vybranými chemicky zesíťovanými PEG thiol-vinylsulfon hydrogely připravenými stejným způsobem jako PEGDA-thiol hydrogely s výjimkou, že se roztoky nemíchaly po různé časové intervaly [40]. Delší doba míchání PEG-4SH pro PEGDA-thiol hydrogely má tedy zásadní vliv na vysoké hodnoty komplexního modulu.

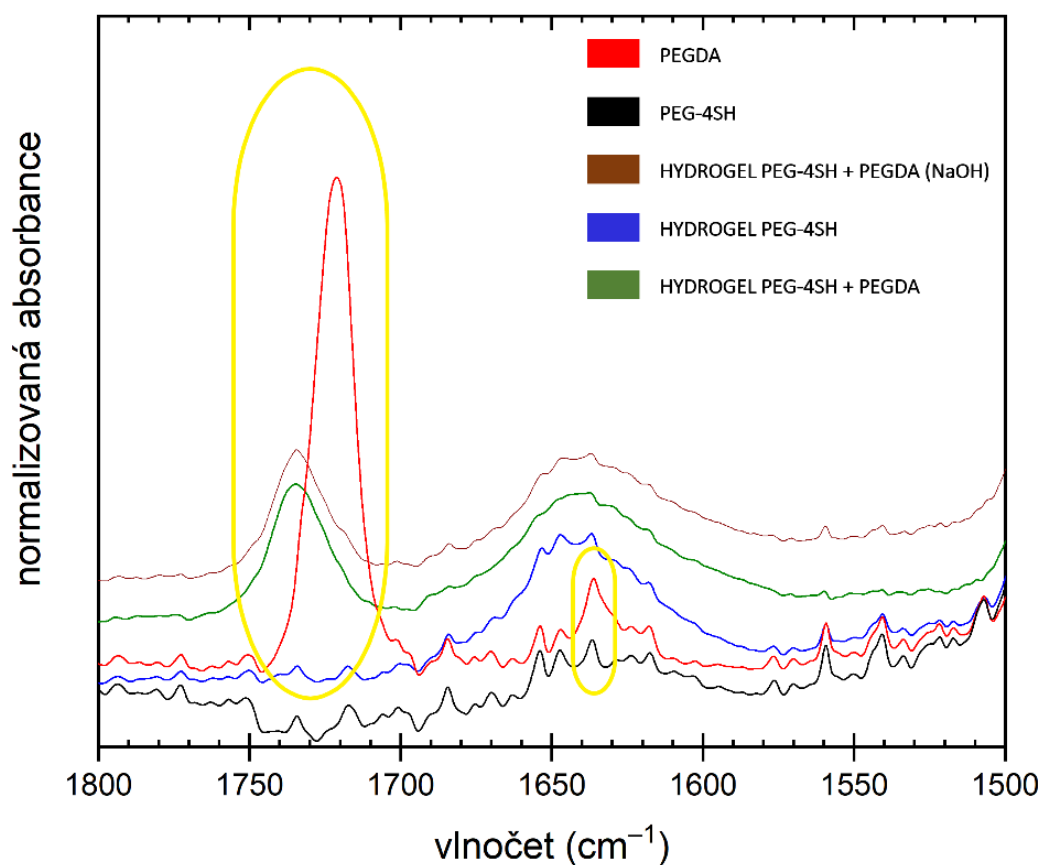
5.1.4 FTIR

Pomocí FTIR byly analyzovány následující vzorky:

- hydrogel obsahující pouze PEG-4SH, který se síťuje vlivem oxidace, a tedy tvorbou disulfidových vazeb
- hydrogel obsahující PEG-4SH a PEGDA, kdy jednotlivé PEG byly míchány v pufru
- hydrogel obsahující PEG-4SH (míchan v NaOH – pH 10.6) a PEGDA (míchan v deionizované vodě)
- čisté chemikálie: PEG-4SH, PEGDA

Hlavním cílem této analýzy bylo potvrdit fakt, že se PEGDA podílí na síťování. Hydrogel obsahující NaOH byl vybrán z důvodu zjištění, jaký vliv má vyšší hodnota pH na jeho síťování. Obrázek 19 představuje výstup z FTIR analýzy. Důkazem zapojení PEGDA do síťování potvrzují dva žlutě označené píky na červené křivce, které je nutno porovnat

s dalšími křivkami. Červená křivka znázorňuje samotný PEGDA, kdy při vlnočtu 1724 cm^{-1} lze vidět velký pík znázorňující karbonylovou skupinu. V případě, že tento pík porovnáme se zelenou a hnědou křivkou, zjistíme, že se pík posouvá, což znamená, že se mění okolí vazby. Při vlnočtu 1633 cm^{-1} je na červené křivce označený druhý žlutý pík představující dvojnou vazbu C=C. Při porovnání opět se zelenou a hnědou křivkou, je vidět pokles tohoto píku, tudíž dochází k úbytku dvojných vazeb. Závěrem lze říct, že PEGDA se podílí na síťování a že vyšší hodnota pH nemá prakticky žádný vliv na síťování.

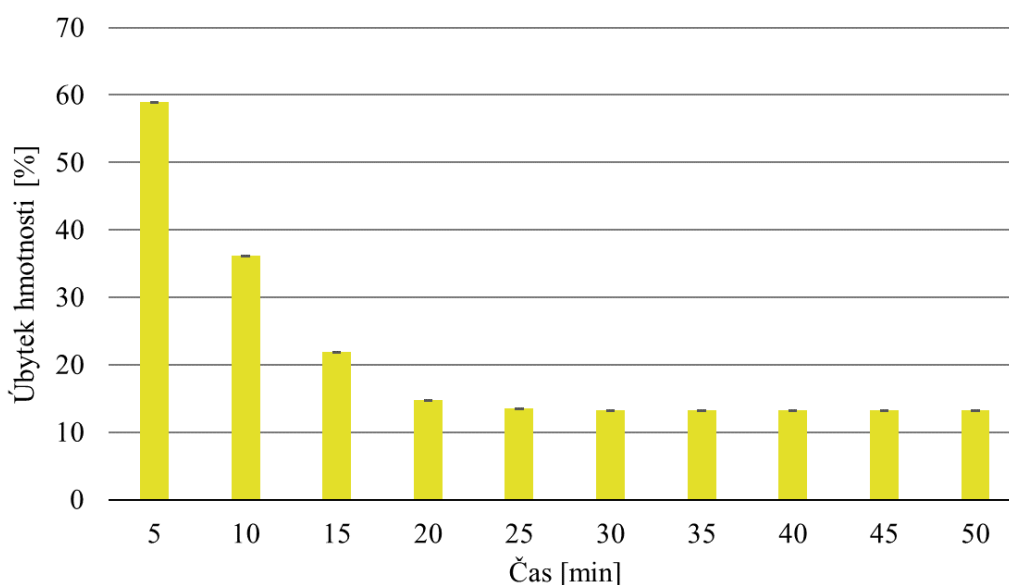


Obrázek 19: Spektrum z FTIR

5.1.5 Sušení a botnání

Pro studium botnání hydrogelu byly provedeny dva experimenty. Prvním experimentem bylo sušení hydrogelu do konstantní hmotnosti a jeho následné botnání. Druhým experimentem bylo botnání hydrogelu v nativním stavu. Důležité je zde zmínit, že se vždy pracovalo se vzorky hydrogelu až po 24 hodinách po přípravě na základě dříve uvedených výsledků z reologických měření.

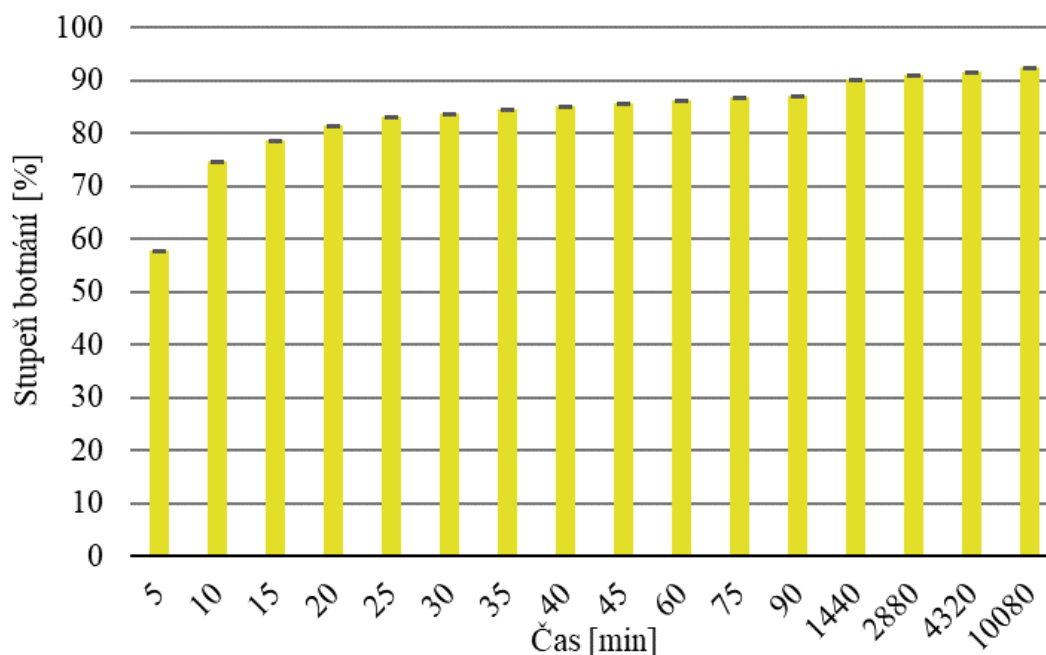
U prvního experimentu bylo zjištěno, že již za 30 minut sušení při 105 °C byla hmotnost gelu konstantní, z čehož lze usoudit, že za tuto dobu je vzorek gelu vysušený a můžeme jej považovat za xerogel (Obrázek 20). Při sušení došlo k celkové ztrátě vody 87 %, což znamená, že gel obsahuje 13 % sušiny.



Obrázek 20: Graf závislosti úbytku hmotnosti hydrogelu na době sušení

Vysušený xerogel byl následně vložen do deionizované vody. Ze začátku byl sledován přírůstek váhy v častých časových intervalech a poté vždy po 24 hodinách.

Obrázek 21 zaznamenává průběh botnání xerogelu, kdy bylo zjištěno, že vzorek je schopen dostat se na svoji původní hmotnost před sušením již za 1 hodinu ve vodě. K největšímu nárůstu vody v gelu došlo v prvních 20 minutách ve vodě. Po 3 dnech ve vodě byla zaznamenána snížená pevnost a od 8. dne se vzorky postupně začaly trhat/rozpadat. Tento rozpad hydrogelu je umožněn štěpením modifikovaného esteru (blízkost thioetherové skupiny k PEG akrylátovému esteru značně zvyšuje hydrolytickou labilitu tohoto esteru) [32]. Celkový obsah vody v gelu za 7 dní byl 92,4 %.

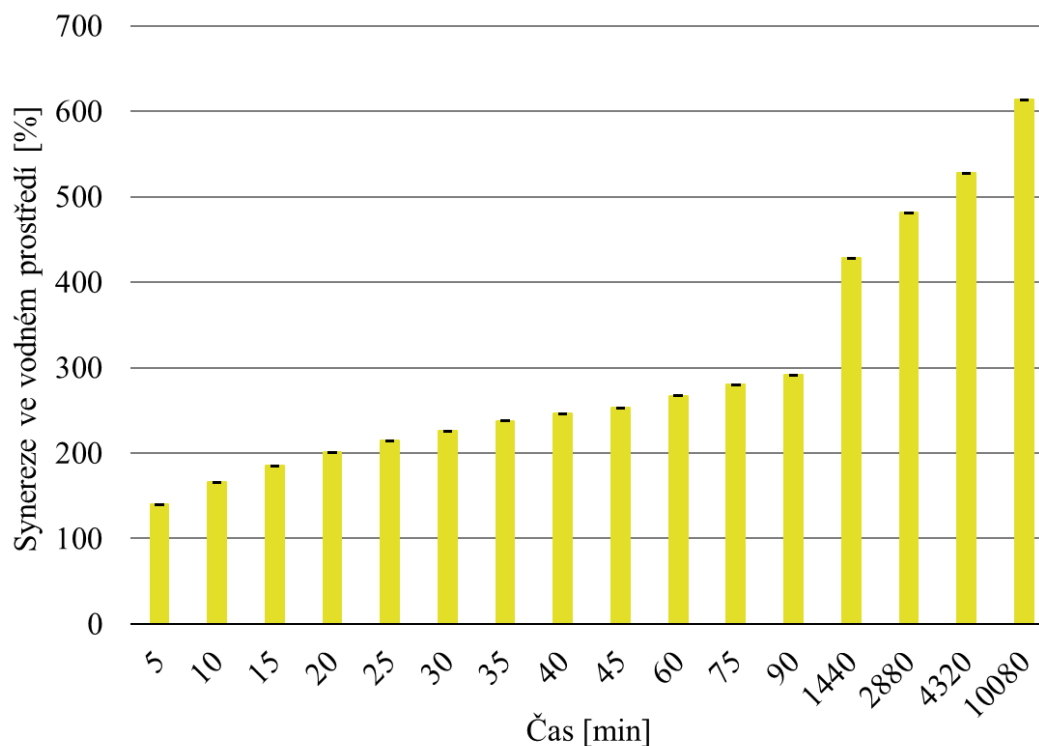


Obrázek 21: Změna obsahu vody v gelu při botnání v závislosti na čase (1.,2.,3.,4. a 7. den)

Stupeň botnání byl vypočítán následujícím způsobem:

$$\text{stupeň botnání} = \left(\frac{(m \text{ nabotnalého hydrogelu} - m \text{ xerogelu})}{m \text{ nabotnalého hydrogelu}} \right) \cdot 100 \quad (10)$$

Druhý experiment zahrnující botnání hydrogelu je zaznamenán na Obrázku 22.



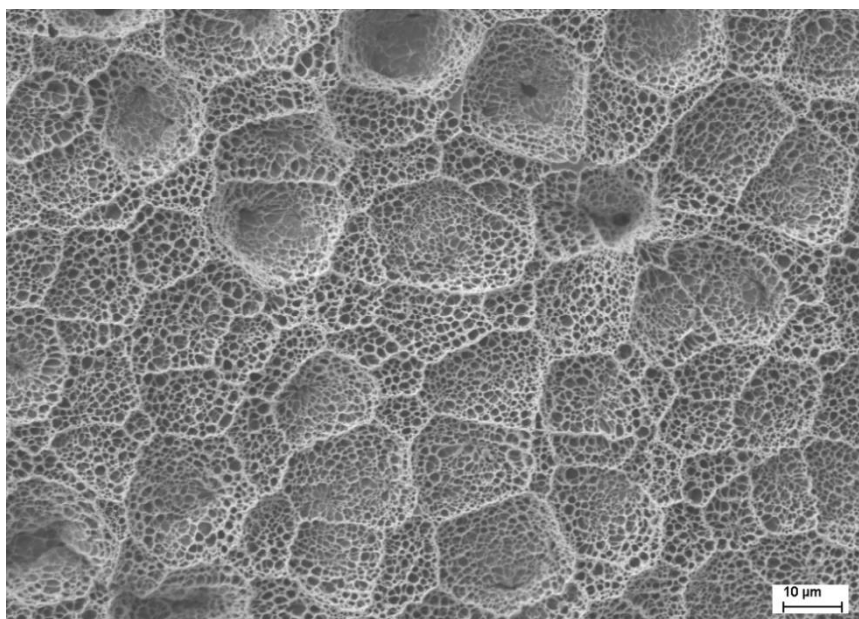
Obrázek 22: Synerize hydrogelu ve vodném prostředí v závislosti na čase (1.,2.,3.,4. a 7. den)

Graf zobrazuje průběh synerexe hydrogelu ve vodném prostředí za určité časové intervaly. Je zde tedy vyobrazeno procento nabotnutí samotného hydrogelu při stárnutí ve vodném prostředí. Již po 2 dnech (= 2880 min) ve vodě hydrogely vykazovaly sníženou pevnost a čím více zvětšovaly svůj průměr, tím se muselo se vzorky pracovat opatrněji, aby nedošlo k roztržení. Poslední sedmý den bylo velmi obtížné vzorek hydrogelu vyjmout z vody, jelikož nabotnal do velkého průměru a jeho mechanická pevnost byla velmi nízká.

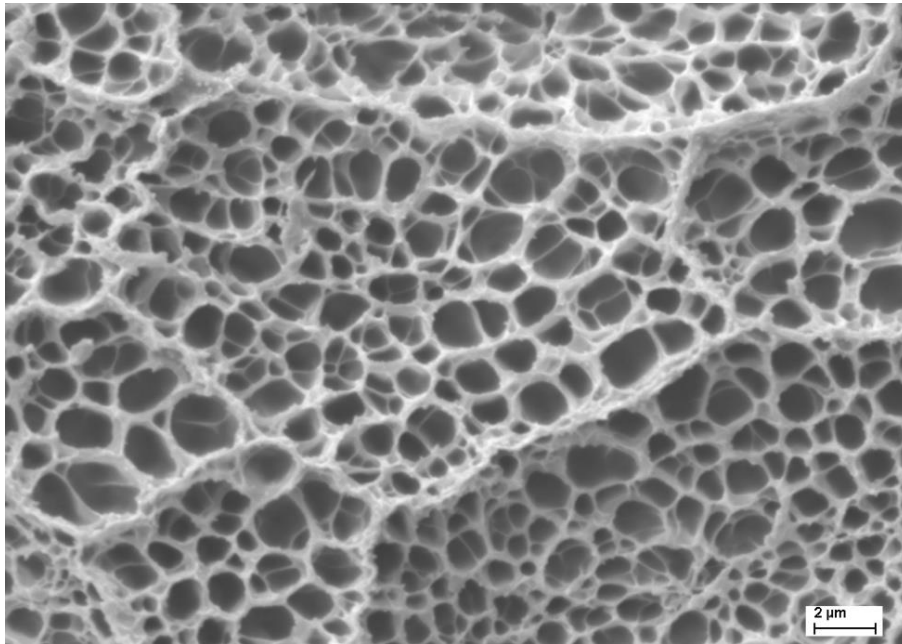
Je důležité zmínit, že při opakování experimentů (v rozmezí půl roku), hydrogely vykazovaly zvýšené botnání. Již po jednom dni se chovaly obdobně jako po sedmi dnech v předešlém pokuse. To znamená, že za den nabraly tolik vody, jako hydrogely uváděné v této studii za 7 dní. Při přípravě a samotném procesu botnání byly zachovány stejné podmínky, vzhledem k tomu se tedy jako možným důvodem v rozdílných vlastnostech nabízí čistota chemikálií, která ovlivnila i výsledné vazby v hydrogelu a tím pádem i rychlost rozpadu. Čistota mohla být ovlivněna různými faktory, například vlhkostí, která se do ní dostala po otevření či jiná kvalita nebo chyba skladování při převozu (jednalo se o jinou šarži chemikálií dodanou později, poprvé chemikálie došla v 5x1g lahvičkách, podruhé zase v 5 g balení).

5.1.6 SEM

Pro zobrazení struktury PEGDA-thiol hydrogelu byl vybrán hydrogel s dobou míchání PEG-4SH 2 hod. Pro pozorování struktury lyofilizovaných hydrogelů byl využit mód sekundárních elektronů s urychlovacím napětím 5 kV (toto napětí bylo zvoleno k omezení nabíjení vzorků). Sekundární elektrony dávají informaci o povrchu vzorku.



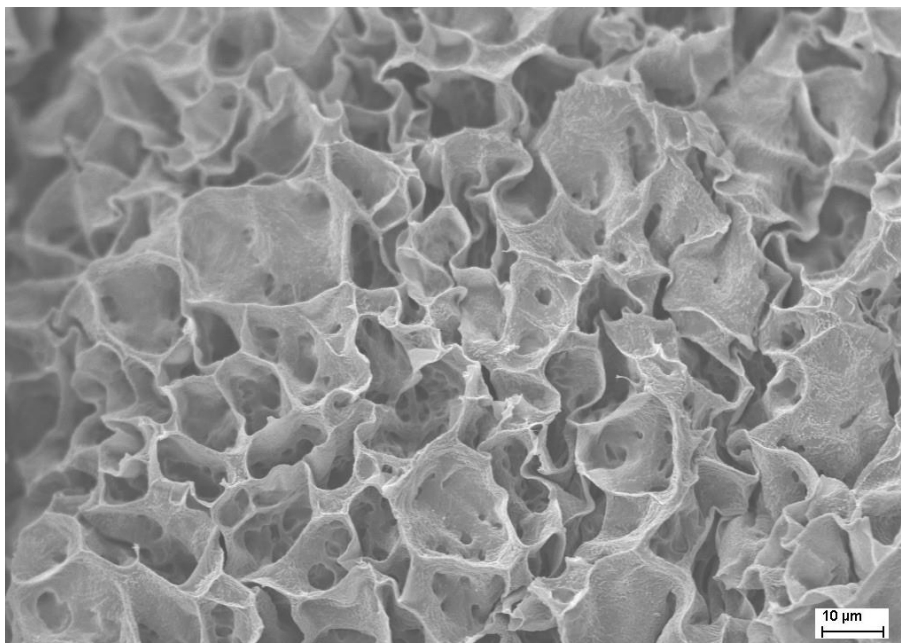
Obrázek 23: Fotografie pořízená SEM pro vzorek hydrogelu (2 hod.) – originální zvětšení 2000x



Obrázek 24: Fotografie pořízená SEM pro vzorek hydrogelu (2 hod.) – originální zvětšení 10000x

Z Obrázku 23 a Obrázku 24 lze usuzovat, že struktura je pórovitá s velikostí pórů v desítkách mikrometrů.

Také byly pomocí SEM zobrazeny struktury PEGDA hydrogelu. (PEGDA 10 kDa, Sigma-Aldrich s.r.o.).



Obrázek 25: Fotografie pořízená SEM pro vzorek PEGDA hydrogelu – originální zvětšení 2000x

Při porovnání Obrázku 23 a Obrázku 25 je vidět značný rozdíl mezi strukturou. Oproti PEGDA-thiol hydrogelům je u PEGDA struktura zdeformovaná, z čehož lze usuzovat, že jsou

tyto gely náchylnější k deformaci a jejich síť pravděpodobně nebude tak hustá. Samozřejmě se musí brát v potaz, že vzorky prošly procesem mražení, a to tedy může způsobit změny ve struktuře, ale i přes to je zde pozorovatelný rozdíl ve struktuře jednotlivých gelů. Z toho lze tedy vydedukovat, že zesíťování u těchto hydrogelů je jiné a že PEGDA-thiol hydrogely mají hustší síť lépe odolávající změnám struktury vlivem růstu krystalů ledu při mražení.

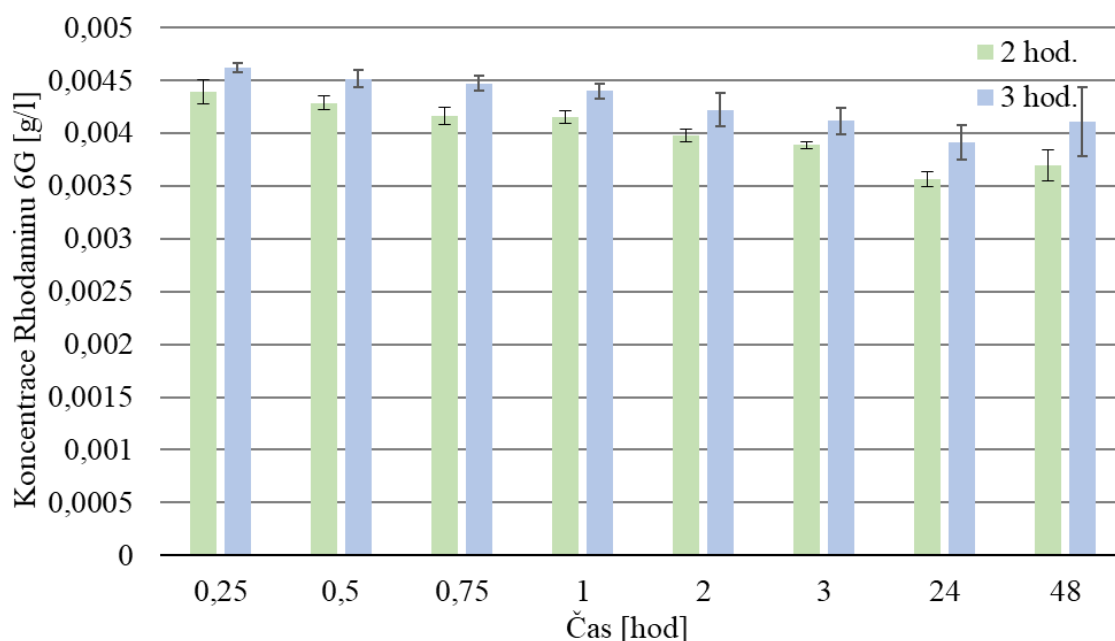
5.2 Transportní a sorpční experimenty

5.2.1 Studium sorpce

Jak již bylo zmíněno v teorii, mezi aplikace PEG hydrogelů patří i systémy dodávání léčiv, kde hlavním cílem je zpomalit či řízeně uvolňovat léčiva. Jako vhodná sonda pro sledování těchto vlastností byl zvolen Rhodamin 6G, který je snadno detekovatelný pomocí UV-VIS.

Pro studium sorpce byly připraveny PEGDA-thiol hydrogely (doba míchání PEG-4SH 2 a 3 hod.) do trubiček o definovaném tvaru a byly uchovány před začátkem těchto experimentů v exsikátoru s vodou 3 dny. Po 3 dnech a po vyloupení z trubiček byly vzorky přeneseny do roztoku Rhodaminu 6G o $c = 0,005$ g/l a po určitých časových intervalech byl roztok měřen na spektrofotometru. Roztok byl po celou dobu míchán na magnetické míchačce (otáčky 130 rpm) tak, aby nedocházelo k poškození vzorku míchadlem.

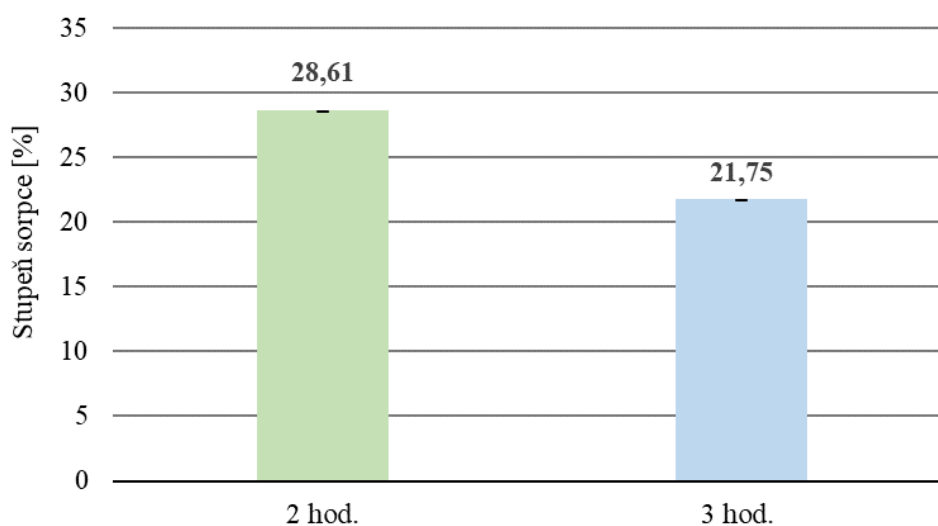
Oba vzorky vykazovaly sorpční schopnost Rhodaminu 6G po dobu 24 hod., jak lze vidět na *Obrázku 26*.



Obrázek 26: Graf závislosti koncentrace Rhodaminu 6G na čase pro vzorky s dobou míchání 2 a 3 hod.

Za 24 hod. měly vzorky schopnost nabotnat až na 4–5násobek jejich původní hmotnosti. Je zde tedy rozdíl v chování hydrogelu při botnání oproti studii v kapitole 5.1.5. Nicméně za 48 hod. se vzorky částečně začaly rozpouštět, a tudíž se koncentrace Rhodaminu 6G zvýšila. Z grafu je patrné, že existuje rozdíl sorpční kapacity pro rozdílné doby míchání PEG-4SH. Na ose y je vynesena koncentrace roztoku Rhodaminu 6G, která se v průběhu sorpce hydrogelem snižuje.

Vzorky s 2 hod. mícháním byly schopny za 24 hod. nasorbovat větší množství barviva, konkrétně 28,61 %, jak je uvedeno v následujícím grafu (Obrázek 27). Oproti tomu vzorek s 3 hod. mícháním byl schopen nasorbovat pouze 21,75% barviva. Díky tomu, že při 3 hod. míchání vznikají hydrogely s vyšší mechanickou pevností, předpokládalo se, že jsou tyto hydrogely i více zesíťované. To se tedy potvrdilo tím, že je právě schopen méně sorbovat díky většímu (hustšímu) zesíťování [39].



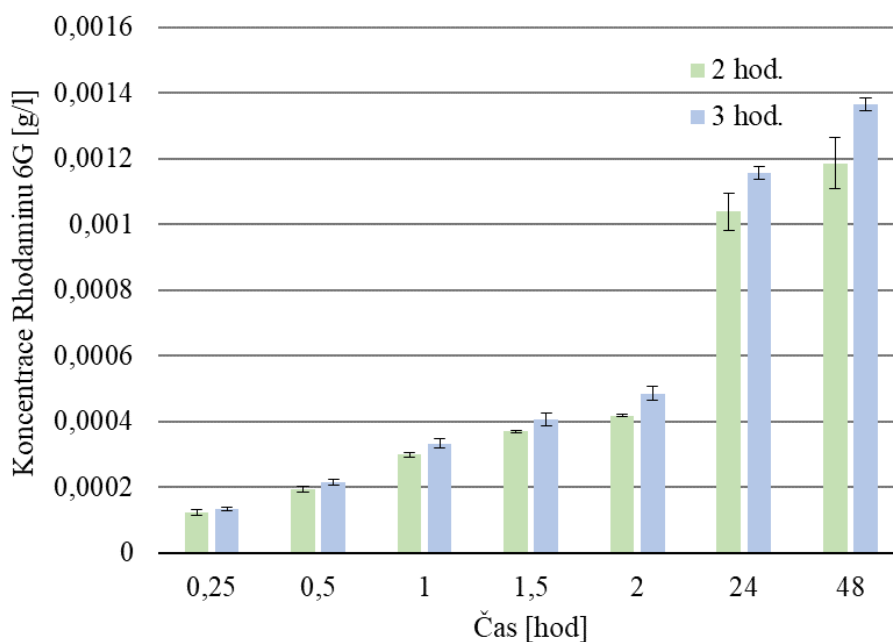
Obrázek 27: Graf závislosti stupně sorpce na rozdílné době míchání PEG-4SH

5.2.2 Studium desorpce

Vzhledem k tomu, že hydrogely začaly podléhat v experimentu sorpcí rozpouštění, nebylo možné z hydrogelu nasorbovaného barvivem studovat ihned desorpce barviva. Proto bylo nutné zainkorporovat barvivo o $c = 0,05$ g/l obsahující soli pro pufr již při přípravě hydrogelu, tak aby se zachovaly podmínky, jako při klasické přípravě hydrogelu. Koncentrace barviva 0,005 g/l, která se používala v předchozím experimentu, nebyla použitelná při desorpčních experimentech, jelikož tato nízká koncentrace nebyla detekovatelná. Jako při sorpcích byly zde připraveny PEGDA-thiol hydrogely s dobou míchání PEG-4SH 2 a 3 hod. a opět se

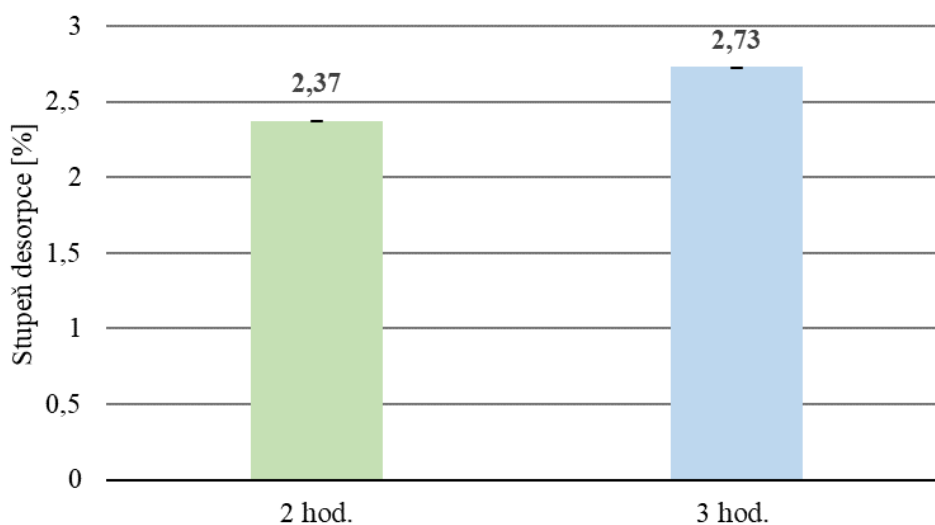
ponechaly v trubičkách umístěných v exsíkátoru s vodou po dobu 3 dnů. Hydrogely se poté umístily do destilované vody a sledovalo se, kolik množství barviva se uvolní do vody.

Obrázek 28 popisuje průběh desorpce barviva z hydrogelů. Stejně tak jak bylo popsáno při sorpcích, tak i zde vzorky podlely po 48 hod. postupnému rozpouštění. Na ose y je vynesena koncentrace Rhodaminu 6G, která představuje množství barviva, které se uvolnilo z gelu do vody. Je zde vidět rozdíl mezi hydrogely s odlišnou dobou míchání PEG-4SH.



Obrázek 28: Graf závislosti koncentrace Rhodaminu 6G na čase pro vzorky s 2 a 3 hod. mícháním

Vzorky s 2 hod. mícháním uvolnily menší množství barviva, konkrétně 2,37 %, jak znázorňuje *Obrázek 29*. Vzorky s 3 hod. mícháním desorbovaly nepatrně větší množství barviva, přesněji 2,73 %.

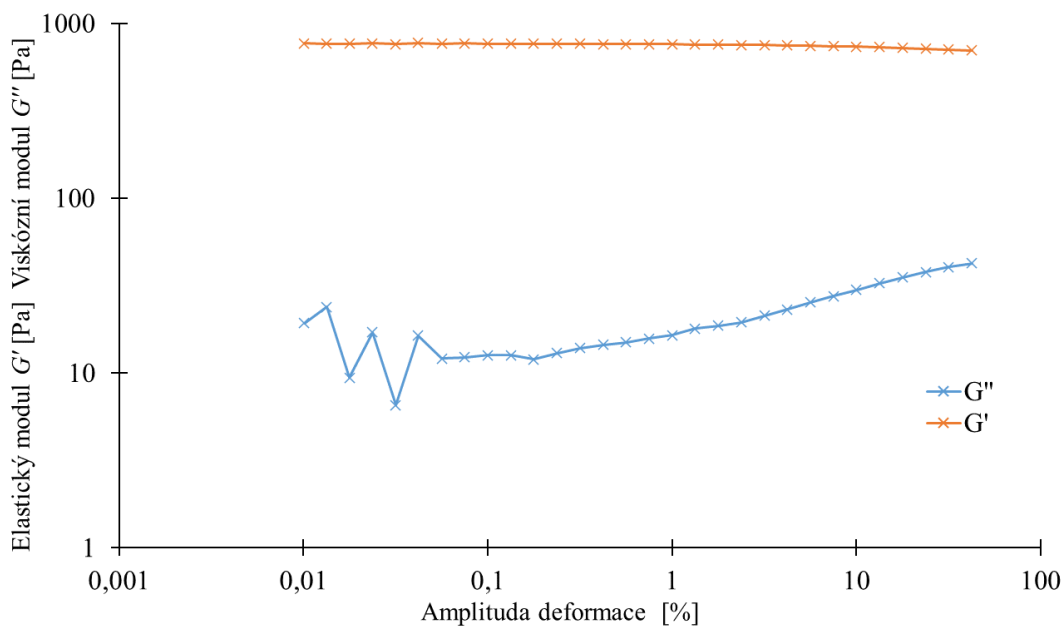


Obrázek 29: Graf závislosti stupně desorpce na rozdílné době míchání PEG-4SH

Z výsledků sorpcí a desorpcí je možné říct, že dobou míchání PEG-4SH lze ovlivnit množství barviva, co se nasorbuje či se uvolní.

5.3 PEGDA hydrogely

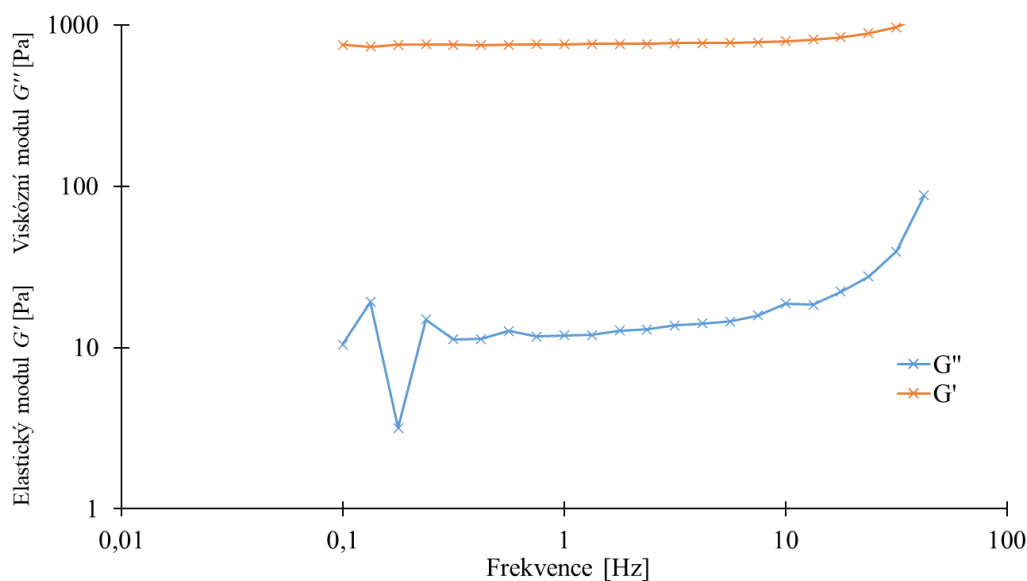
Pro porovnání sorpčních a desorpčních vlastností PEGDA-thiol hydrogelů byly vybrány PEGDA hydrogely vytvořené fotoiniciací. U PEGDA hydrogelů nebylo třeba vzorky uchovávat v exsikátoru po dobu několika dnů, protože byly zgelované hned po přípravě. Jelikož o optimalizaci přípravy těchto gelů se starala kolegyně Michaela Kadlecová, bylo zde nutné provést alespoň reologické měření z hlediska porovnání mechanických vlastností s PEGDA-thiol hydrogely. Byl proveden amplitudový (Obrázek 30) a frekvenční test (Obrázek 31).



Obrázek 30: Amplitudový test pro PEGDA hydrogel

Amplitudový test byl pozastaven, tak aby nedošlo ke zničení vzorku a také aby se určila hodnota amplitudy deformace z LVO pro frekvenční test. Jak lze vidět u amplitudového testu, hodnoty elastického modulu se zde pohybují těsně pod 1000 Pa. Oproti PEGDA-thiol hydrogelu s 2 hod. mícháním je to poměrně velký rozdíl, jelikož tam se hodnoty elastického modulu pohybovaly po 1 dnu od přípravy okolo 12 000 Pa.

U frekvenčního testu na Obrázku 31 lze vidět, že se zvyšující se frekvencí se také zvyšuje hodnota viskózního modulu, což je dáno tím, že vzorek nemá prostor na relaxaci a tím se zpevňuje.

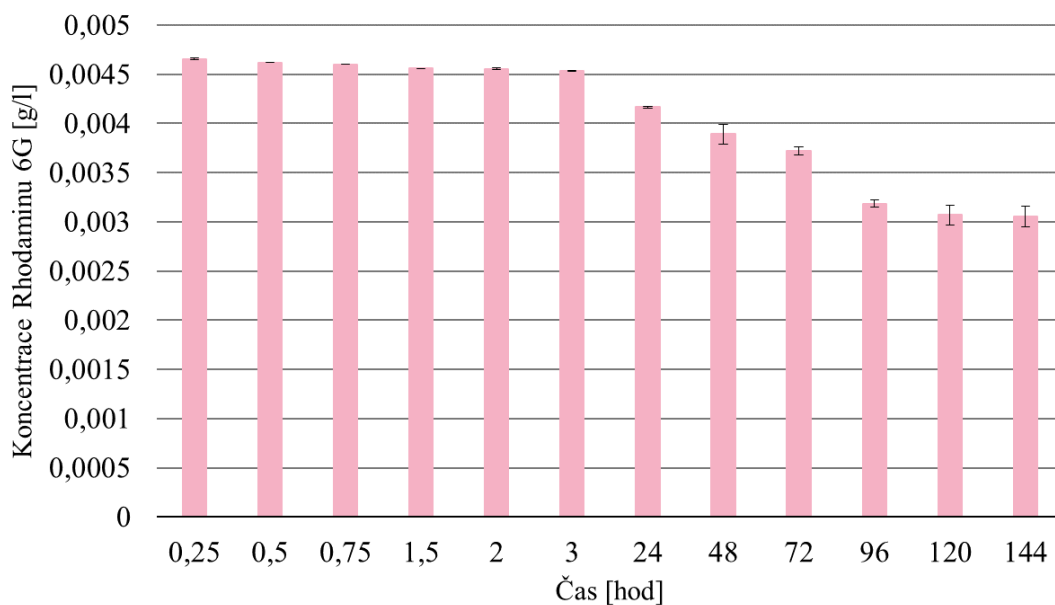


Obrázek 31: Frekvenční test pro PEGDA hydrogel

5.3.1 Studium sorpce

Co se týká samotného studia sorpčních vlastností PEGDA hydrogelů, byly připravené gely vloženy do barviva o stejné koncentrace (0,005 g/l) a byl sledován průběh stejně jako u PEGDA-thiol hydrogelů.

Obrázek 32 popisuje průběh sorpce barviva do hydrogelu. Na ose y je zobrazena koncentrace roztoku Rhodaminu 6G, která se v průběhu sorpce hydrogelem snižuje.

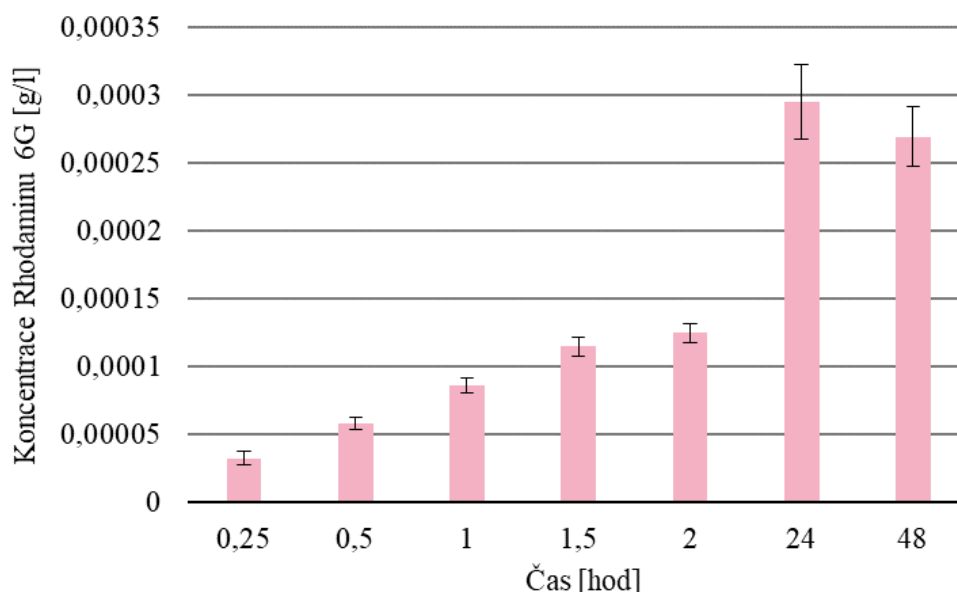


Obrázek 32: Graf závislosti koncentrace Rhodaminu 6G na čase

Z grafu si lze povšimnout, že hydrogel byl schopen sorbovat barvivo po dobu 5 dní, poté se již koncentrace nesnižuje. Oproti PEGDA-thiol hydrogelům je zde vidět rozdíl v tom, že tyto hydrogely sorbovaly barvivo pomaleji, nicméně nasorbovaly větší množství barviva a to konkrétně 39,2 %. Nutno zdůraznit, že tyto hydrogely nevykazovaly známky jakéhokoli rozpouštění a po dobu těchto 5 dní nabotnaly jen o 2/3 své původní hmotnosti. Z naměřených výsledků lze usoudit, že tyto PEGDA hydrogely oproti PEGDA-thiol hydrogelům disponují větší sorpční kapacitou.

5.3.2 Studium desorpce

Pro studium desorpce barviva z PEGDA hydrogelu bylo barvivo o $c = 0,05 \text{ g/l}$ zainkorporováno při přípravě. Hydrogely se poté umístily do destilované vody a sledovalo se, kolik množství barviva se uvolní do vody.



Obrázek 33: Závislost koncentrace Rhodaminu 6G na čase

Obrázek 33 znázorňuje proces desorpce barviva z PEGDA hydrogelu. Na ose y je zobrazena koncentrace Rhodaminu 6G, která představuje množství barviva uvolněného z hydrogelu do vody. Za 24 hodin desorpce dosáhla svého maxima. Poté po 48 hodinách se koncentrace opět snižuje. To je způsobeno jednak tím, že dochází k ustanovení rovnováhy a také, že hydrogel stále botná a tím tak může nabotnat vodu i s barvivem. Za 24 hodin, kdy pozorujeme maximální koncentraci desorbovaného barviva, se uvolnilo 0,59 % barviva z hydrogelu.

6 ZÁVĚR

Tato diplomová práce je zaměřena na studium transportních a sorpčních vlastností různých polyethylenglykolových hydrogelů, které se liší typem a hustotou síťování. Před samotnou charakterizací těchto vlastností bylo nutné provést optimalizaci přípravy vybraného typu hydrogelu. Tímto typem PEG hydrogelu byl PEGDA-thiol tvořený z PEG-4SH a PEGDA a zesíťovaný pomocí postupné polymerace. Před samotným smícháním těchto chemikálií byly roztoky těchto PEG míchány po různé časové intervaly, přičemž nejdůležitější je doba míchání PEG-4SH. Bylo zjištěno, že s delší dobou míchání roztoku PEG-4SH dochází k rychlejší gelaci a že hydrogely s vyšší dobou míchání vykazují vyšší mechanické vlastnosti. Kromě vazeb mezi thiolem a akrylátem, vznikají i disulfidové vazby mezi thioley vlivem oxidace, jejichž stupeň tvorby je dán dobou míchání. Pro další optimalizaci byly vybrány hydrogely s 2 hod. míchání PEG-4SH. Pomocí reologického měření bylo zjištěno, že hydrogel je po 24 hodinách od smíchání plně zesíťován. Při sušení (105 °C) byly hydrogely schopny se vysušit do konstantní hmotnosti již za 30 min. Při sušení došlo k celkové ztrátě vody 87 %, což tedy znamená, že gel obsahuje 13 % sušiny. Xerogely poté při botnání absorbovaly vodu a již za 1 hodinu byly schopny se dostat se na svoji původní hmotnost před sušením.

Důležitým parametrem pro potenciální aplikaci hydrogelů jako nosiče léčiv je možnost regulace rychlosti uvolňování léčiv. Jako vhodná sonda pro sledování těchto procesů byl zvolen Rhodamin 6G, který je snadno detekovatelný pomocí UV-VIS. Při transportních experimentech byla sledována schopnost hydrogelu sorbovat a desorbovat barvivo pomocí volné difúze. Pro tyto experimenty byly připraveny vzorky hydrogelu s 2 a 3 hod. mícháním PEG-4SH. Při sorpcích i desorpcích hydrogely začaly podléhat po 48 hod. postupnému rozpouštění. Vzorky s 2 hod. mícháním byly schopny nasorbovat větší množství barviva než vzorky s 3 hod. mícháním, což naznačuje, že hydrogely s 2 hod. mícháním jsou méně zesíťované. U desorpcí vzorky s 2 hod. mícháním uvolnily nepatrně menší množství barviva než vzorky s 3 hod. mícháním.

Pro porovnání těchto transportních experimentů s jiným typem síťování byly připraveny PEGDA hydrogely pomocí radikálové polymerizace. Z reologického hlediska tyto gely nevykazují tak velkou mechanickou pevnost jak PEGDA-thiol hydrogely. Během transportních experimentů hydrogely nevykazovaly známky jakéhokoliv rozpouštění. Při sorpcích tyto hydrogely sorbovaly barvivo pomaleji, ale nasorbovaly větší množství barviva než PEGDA-thiol hydrogely, z čehož lze usuzovat, že disponují větší sorpční

kapacitou. Při desorpcích bylo dosaženo maxima po 24 hodinách, poté se koncentrace začala snižovat, a to vlivem ustanovení rovnováhy a také, že hydrogel stále bobtná a tím tak může nabotnat vodu i s barvivem.

Závěrem lze tedy říct, že různý typ a hustota síťování má vliv na rozdílné transportní a sorpční vlastnosti výsledného hydrogelu tvořeného PEG. Jak již bylo zmíněno, jedná se o počáteční výzkum, návrhem pro další studii je například rozšíření instrumentální techniky o nukleární magnetickou rezonanci pro bližší specifikaci či provedení stejné studie za jiných reakčních podmínek.

7 CITOVANÁ LITERATURA

- [1] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-7080-579-X.
- [2] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [3] Morteza BAHRAM, Naimeh MOHSENI a Mehdi MOGHTADER, 2016. An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications. Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels. InTech, 2016-08-24. ISBN 978-953-51-2509-9. Dostupné z: doi:10.5772/64301
- [4] Ali, Zahraa & Alkotaji, Myasar. (2021). SMART HYDROGEL POLYMERS FOR DRUG DELIVERY. *Military Medical Science Letters*. 10.31482/mmsl.2021.032.
- [5] AHMED, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. *Journal of advanced research* [online]. AMSTERDAM: Elsevier B.V, 2015, 6(2), 105-121 [cit. 2023-02-01]. ISSN 2090-1232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jare.2013.07.006
- [6] Jaya Maitra, Vivek Kumar Shukla, Cross-linking in Hydrogels - A Review, *American Journal of Polymer Science*, Vol. 4 No. 2, 2014, pp. 25-31. doi: 10.5923/j.ajps.20140402.01.
- [7] Kaňka, J., Chylíková Krumbholcová, E., Chmelíková, D., Pánek, J., Podhorská, B., Krejčíková, S., Vampola, T., Banafshehvaragh, N.R., Vetrík, M., Kaberova, Z. a Dušková Smrčková, M. 2019. Makroporézní hydrogely pro buněčné kultivace a jejich prostorové zobrazení [Macroporous Hydrogels for Cell Cultivations and Their 3-D Visualization]. *Chemické listy*. 113, 12 (pro. 2019), 726-731.
- [8] GULREZ, Syed K. H. *Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications*. In: . IntechOpen, 2011. ISBN 9533072687. Dostupné z: doi:10.5772/24553
- [9] SEDLÁČEK, P. Reologie gelů – stručný přehled. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2007. 34 s.
- [10] WILLNER, Itamar. Stimuli-Controlled Hydrogels and Their Applications. *Accounts of chemical research* [online]. WASHINGTON: American Chemical Society, 2017, 50(4), 657-658 [cit. 2023-02-02]. ISSN 0001-4842. Dostupné z: doi:10.1021/acs.accounts.7b00142

- [11] PEPPAS, N.A., P. BURES, W. LEOBANDUNG a H. ICHIKAWA. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. AMSTERDAM: Elsevier B.V, 2000, **50**(1), 27-46 [cit. 2023-02-05]. ISSN 0939-6411. Dostupné z: doi:10.1016/S0939-6411(00)00090-4
- [12] OFFEDDU, G. S., E. AXPE, B. A. C. HARLEY a M. L. OYEN. Relationship between permeability and diffusivity in polyethylene glycol hydrogels. *AIP advances* [online]. MELVILLE: Amer Inst Physics, 2018, **8**(10), 105006-105006 [cit. 2023-02-07]. ISSN 2158-3226. Dostupné z: doi:10.1063/1.5036999
- [13] KVÍTEK, Libor a Aleš PANÁČEK. *Základy koloidní chemie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci (UPOL), 2007. ISBN 978-80-2441-669-4.
- [14] Novák Josef a kol. : *Fyzikální chemie - bakalářský a magisterský kurz*. 1st ed. Praha : VŠCHT Praha, 2008. P. 305. ISBN 978-80-7080-675-3
- [15] CRANK, J. *The Mathematics of diffusion*. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press, 1975. ISBN 01-985-3344-6.
- [16] Cussler, E.L. *Diffusion: Mass Transfer in Fluid Systems*, Cambridge University Press, Cambridge, 1984, pp. 132–143
- [17] AMSDEN, Brian. Solute diffusion in hydrogels. *Polymer Gels and Networks*. 1998, 6(1), 13-43. DOI: 10.1016/S0966-7822(97)00012-9. ISSN 09667822.
- [18] YA. MALKIN, Alexander a Avraam I ISAYEV. *Rheology*. San Diego: ChemTec Publishing, 2022. ISBN 1927885930.
- [19] Willenbacher, N., & Georgieva, K. (2013). *Rheology of Disperse Systems. Product Design and Engineering*, 7–49. doi:10.1002/9783527654741.ch1
- [20] Renata HOLUBOVÁ, 2014. *Základy reologie a reometrie kapalin*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN 978-80-244-4178-8.
- [21] WEIN, Ondřej. *Úvod do reologie*. Brno: Malé Centrum, 1996. ISBN 80-238-0928-8.
- [22] MEZGER, Thomas. *Applied rheology: with Joe Flow on rheology road*. 5th edition. Graz: Anton Paar, 2015, 192 stran : barevné ilustrace. ISBN 978-3-9504016-0-8.

- [23] STOJKOV, Gorjan, Zafarjon NIYAZOV, Francesco PICCHIONI a Ranjita BOSE. Relationship between Structure and Rheology of Hydrogels for Various Applications. *Gels* [online]. Switzerland: MDPI, 2021, **7**(4), 255 [cit. 2023-02-17]. ISSN 2310-2861. Dostupné z: doi:10.3390/gels7040255
- [24] MADDUMA-BANDARAGE, Ujith S. K. a Sundararajan V. MADIHALLY. Synthetic hydrogels: Synthesis, novel trends, and applications. *Journal of applied polymer science* [online]. Hoboken, USA: John Wiley & Sons, 2021, **138**(19), 50376-n/a [cit. 2023-02-18]. ISSN 0021-8995. Dostupné z: doi:10.1002/app.50376
- [25] D'souza AA, Shegokar R. Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. *Expert Opin Drug Deliv.* 2016 Sep;13(9):1257-75. doi: 10.1080/17425247.2016.1182485. Epub 2016 May 17. PMID: 27116988.
- [26] Wenande E, Garvey LH. Immediate-type hypersensitivity to polyethylene glycols: a review. *Clin Exp Allergy.* 2016 Jul;46(7):907-22. doi: 10.1111/cea.12760. PMID: 27196817.
- [27] HARRIS, J. Milton, ed. Poly(Ethylene Glycol) Chemistry [online]. Boston, MA: Springer US, 1992 [cit. 2023-02-06]. ISBN 978-1-4899-0705-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4899-0703-5
- [28] LEE, Soah, Xinming TONG a Fan YANG. Effects of the poly(ethylene glycol) hydrogel crosslinking mechanism on protein release. *Biomaterials science* [online]. England, 2016, **4**(3), 405-411 [cit. 2023-02-18]. ISSN 2047-4830. Dostupné z: doi:10.1039/c5bm00256g
- [29] RYDHOLM, Amber E., Christopher N. BOWMAN a Kristi S. ANSETH. Degradable thiol-acrylate photopolymers: polymerization and degradation behavior of an in situ forming biomaterial. *Biomaterials* [online]. OXFORD: Elsevier, 2005, **26**(22), 4495-4506 [cit. 2023-03-22]. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2004.11.046
- [30] MATHER, Brian D., Kalpana VISWANATHAN, Kevin M. MILLER a Timothy E. LONG. Michael addition reactions in macromolecular design for emerging technologies. *Progress in polymer science* [online]. OXFORD: Elsevier, 2006, **31**(5), 487-531 [cit. 2023-02-19]. ISSN 0079-6700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2006.03.00

- [31] YOM-TOV, Ortal, Dror SELIKTAR a Havazelet BIANCO-PELED. PEG-Thiol based hydrogels with controllable properties. *European polymer journal* [online]. OXFORD: Elsevier, 2016, **74**, 1-12 [cit. 2023-02-19]. ISSN 0014-3057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2015.11.002
- [32] METTERS, Andrew a Jeffrey HUBBELL. Network Formation and Degradation Behavior of Hydrogels Formed by Michael-Type Addition Reactions. *Biomacromolecules* [online]. WASHINGTON: American Chemical Society, 2005, **6**(1), 290-301 [cit. 2023-02-22]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm049607o
- [33] SUN, Yanping, Hui LIU, Lin CHENG, Shimeng ZHU, Cuifang CAI, Tianzhi YANG, Li YANG a Pingtian DING. Thiol Michael addition reaction: a facile tool for introducing peptides into polymer-based gene delivery systems. *Polymer international* [online]. 2018, **67**(1), 25-31 [cit. 2023-03-06]. ISSN 0959-8103. Dostupné z: doi:10.1002/pi.5490
- [34] Wall SB, Oh JY, Diers AR, Landar A. Oxidative modification of proteins: an emerging mechanism of cell signaling. *Front Physiol.* 2012 Sep 14;3:369. doi: 10.3389/fphys.2012.00369. PMID: 23049513; PMCID: PMC3442266.
- [35] Zhu H, Yang X, Genin GM, Lu TJ, Xu F, Lin M. The relationship between thiol-acrylate photopolymerization kinetics and hydrogel mechanics: An improved model incorporating photobleaching and thiol-Michael addition. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2018 Dec;88:160-169. doi: 10.1016/j.jmbbm.2018.08.013. Epub 2018 Aug 24. PMID: 30173068; PMCID: PMC6392438.
- [36] HOU, Dan-dan, Xue GENG, Lin YE, Ai-ying ZHANG a Zeng-guo FENG. Novel supramolecular hydrogels made via Michael-type addition reaction of dithiothreitol with self-assembly of α -cyclodextrins and acryloyl-terminated 3-arm PEG. *Signal, image and video processing* [online]. 2010, **4**(1), 70-77 [cit. 2023-03-07]. ISSN 1863-1703. Dostupné z: doi:10.1007/s11706-010-0010-7
- [37] MISHRA B, UPADHYAY M, REDDY ADENA SK, VASANT BG and MUTHU MS. Hydrogels: An Introduction to a Controlled Drug Delivery Device, Synthesis and Application in Drug Delivery and Tissue Engineering. *Austin J Biomed Eng.* 2017; 4(1): 1037
- [38] VAN DE WETERING, Petra, Andrew T. METTERS, Ronald G. SCHOENMAKERS a Jeffrey A. HUBBELL. Poly(ethylene glycol) hydrogels formed by conjugate addition with

controllable swelling, degradation, and release of pharmaceutically active proteins. *Journal of controlled release* [online]. AMSTERDAM: Elsevier B.V, 2005, **102**(3), 619-627 [cit. 2023-03-08]. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2004.10.029

[39] C. C. Lin, and A. T. Metters. Metal-chelating affinity hydrogels for sustained protein release. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 83A:954–964 (2007). doi:10.1002/jbm.a.31282

[40] Wang J, Youngblood R, Cassinotti L, Skoumal M, Corfas G, Shea L. An injectable PEG hydrogel controlling neurotrophin-3 release by affinity peptides. *J Control Release*. 2021 Feb 10;330:575-586. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.12.045. Epub 2020 Dec 27. PMID: 33378693; PMCID: PMC8783643.

[41] J. Li, X. Li, X. P. Ni, X. Wang, H. Z. Li, and K. W. Leong. Self-assembled supramolecular hydrogels formed by biodegradable PEO-PHB-PEO triblock copolymers and alpha-cyclodextrin for controlled drug delivery. *Biomaterials*. 27:4132–4140 (2006). doi:10.1016/j.biomaterials.2006.03.025.

[42] J. Li, X. P. Ni, and K. W. Leong. Injectable drug-delivery systems based on supramolecular hydrogels formed by poly (ethylene oxide) and alpha-cyclodextrin. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 65A:196–202 (2003). doi:10.1002/jbm.a.10444.

[43] ZHU, Junmin. Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* [online]. OXFORD: Elsevier, 2010, **31**(17), 4639-4656 [cit. 2023-03-27]. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2010.02.044

[44] NGUYEN, Kytai Truong a Jennifer L. WEST. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials* [online]. OXFORD: Elsevier, 2002, **23**(22), 4307-4314 [cit. 2023-03-29]. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(02)00175-8

[45] D. J. Quick, and K. S. Anseth. Gene delivery in tissue engineering: a photopolymer platform to coencapsulate cells and plasmid DNA. *Pharm. Res.* 20:1730–1737 (2003). doi:10.1023/B:PHAM.0000003368.66471.6a.

[46] D. J. Quick, and K. S. Anseth. DNA delivery from photocrosslinked PEG hydrogels: encapsulation efficiency, release profiles, and DNA quality. *J. Control. Release*. 96:341–351 (2004). doi:10.1016/j.jconrel.2004.01.021.

[47] C. C. Lin, and A. T. Metters. Enhanced protein delivery from photopolymerized hydrogels using a pseudospecific metal PEG Hydrogels for the Controlled Release of

Biomolecules 641 chelating ligand. *Pharm. Res.* 23:614–622 (2006). doi:10.1007/s11095-005-9395-x

[48] PÉREZ-LUNA, Víctor H. a Orfil GONZÁLEZ-REYNOSO. Encapsulation of biological agents in hydrogels for therapeutic applications. *Gels* [online]. BASEL: Mdpi, 2018, 4(3), 61 [cit. 2023-03-22]. ISSN 2310-2861. Dostupné z: doi:10.3390/gels4030061

[49] MOFFAT, Kristen L. a Kacey G. MARRA. Biodegradable poly(ethylene glycol) hydrogels crosslinked with genipin for tissue engineering applications. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* [online]. Hoboken: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2004, 71B(1), 181-187. ISSN 1552-4973. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.b.30070

[50] BURDICK, Jason A. a Kristi S. ANSETH. Photoencapsulation of osteoblasts in injectable RGD-modified PEG hydrogels for bone tissue engineering. *Biomaterials* [online]. OXFORD: Elsevier, 2002, 23(22), 4315-4323 [cit. 2023-03-28]. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(02)00176-X

[51] G. D. Nicodemus, and S. J. Bryant. Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Tissue Eng. Part B-Reviews.* 14:149–165 (2008).

[52] A. T. Metters, K. S. Anseth, and C. N. Bowman. Fundamental studies of a novel, biodegradable PEG-b-PLA hydrogel. *Polymer.* 41:3993–4004 (2000). doi:10.1016/S0032-3861(99)00629-1.

[53] M. N. Mason, A. T. Metters, C. N. Bowman, and K. S. Anseth. Predicting controlled-release behavior of degradable PLA-b-PEG-b-PLA hydrogels. *Macromolecules.* 34:4630–4635 (2001). doi:10.1021/ma010025y

[54] M. P. Lutolf, J. L. Lauer-Fields, H. G. Schmoekel, A. T. Metters, F. E. Weber, G. B. Fields, and J. A. Hubbell. Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell-invasion characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:5413–5418 (2003). doi:10.1073/pnas.0737381100.

[55] M. A. Rice, J. Sanchez-Adams, and K. S. Anseth. Exogenously triggered, enzymatic degradation of photopolymerized hydrogels with polycaprolactone subunits: experimental

observation and modeling of mass loss behavior. *Biomacromolecules*. 7:1968–1975 (2006). doi:10.1021/bm060086+.

[56] M. A. Rice, and K. S. Anseth. Controlling cartilaginous matrix evolution in hydrogels with degradation triggered by exogenous addition of an enzyme. *Tissue Eng*. 13:683–691 (2007). doi:10.1089/ten.2006.0142.

[57] D. S. W. Benoit, M. P. Schwartz, A. R. Durney, and K. S. Anseth. Small functional groups for controlled differentiation of hydrogel-encapsulated human mesenchymal stem cells. *Nature Materials*. 7:816–823 (2008). doi:10.1038/nmat2269

[58] S. Varghese, N. S. Hwang, A. C. Canver, P. Theprungsirikul, D. W. Lin, and J. Elisseeff. Chondroitin sulfate based niches for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Matrix Biology*. 27:12–21 (2008). doi:10.1016/j.matbio.2007.07.002.

[59] B. Sharma, C. G. Williams, M. Khan, P. Manson, and J. H. Elisseeff. In vivo chondrogenesis of mesenchymal stem cells in a photopolymerized hydrogel. *Plast. Reconstr. Surg*. 119:112–120 (2007). doi:10.1097/01.prs.0000236896.22479.52.

[60] Liu S, Jiang T, Guo R, Li C, Lu C, Yang G, Nie J, Wang F, Yang X, Chen Z. Injectable and Degradable PEG Hydrogel with Antibacterial Performance for Promoting Wound Healing. *ACS Appl Bio Mater*. 2021 Mar 15;4(3):2769-2780. doi: 10.1021/acsabm.1c00004. Epub 2021 Mar 2. Erratum in: *ACS Appl Bio Mater*. 2022 Mar 21;5(3):1361-1362. PMID: 35014316.

[61] SARWAT, Mariah, Denver C SURRAO, Nick HUETTNER, James A ST JOHN, Tim R DARGAVILLE a Aurelien FORGET. Going beyond RGD: screening of a cell-adhesion peptide library in 3D cell culture. *Biomedical materials (Bristol)* [online]. IOP Publishing, 2020, **15**(5), 055033-055033 [cit. 2023-03-28]. ISSN 1748-6041. Dostupné z: doi:10.1088/1748-605X/ab9d6e

[62] Klosinski, Karol & Girek, Malgorzata & Wach, Radoslaw & Czechowska-Biskup, Renata & Arkuszewski, Piotr & Szymański, Paweł & Pasięka, Zbigniew. (2017). Synthesis and potential cytotoxicity evaluation of carboxymethyl chitosan hydrogels. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*. XXII. 82. 10.15259/PCACD.22.08.

[63] Michaljaničová, I., Slepíčka, P., Kolská, Z., & Švorčík, V. (2018). Modifikace a charakterizace povrchu polymerů po expozici v plazmatu. *Chemické Listy*, 112(1), 10–19. Získáno z <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2961>

[64] BERMEJO, Daniel, Alice AZÉMAR, Oommen PODIYAN, Jöns HILBORN a Oommen P. VARGHESE. Modulating Thiol pKa Promotes Disulfide Formation at Physiological pH: An Elegant Strategy To Design Disulfide Cross-Linked Hyaluronic Acid Hydrogels. *Biomacromolecules* [online]. 2019, (20), 1412 [cit. 2023-04-09]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biomac.8b01830

[65] ZUIDEMA, Jonathan M., Christopher J. RIVET, Ryan J. GILBERT a Faith A. MORRISON. A protocol for rheological characterization of hydrogels for tissue engineering strategies. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* [online]. 2014, **102**(5), 1063-1073. ISSN 1552-4973. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.b.33088

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Seznam zkratek

PEG	polyethylenglykol
PEGDA	polyethylenglykol diakrylát
PEG-4SH	4 ramenný polyethylenglykol-thiol
PHEMA	poly(hydroxyethylmethakrylát)
PEO	poly(ethylenoxid)
PVA	poly(vinylalkohol)
PPF	poly(propylen fumarát)
LVO	lineární viskoelastická oblast
MW	molekulová hmotnost
DTT	dithiothreitol
hGH	lidský růstový hormon
PEG-4VS	polyethylenglykol-vinylsulfon
DNA	deoxyribonukleová kyselina
RGD	glycin-arginin-asparagová kyselina
MMP	matricové metaloproteinázy
EGDMA	ethylenglykol dimethakrylát
SEM	skenovací elektronová mikroskopie

8.2 Seznam symbolů

J	difuzní tok
n	látkové množství složky i
A	plocha
t	čas
D	difúzní koeficient složky i
c	koncentrace
∂	parciální derivace
B	koeficient tření
T	absolutní teplota
k	Boltzmanova konstanta
r	poloměr
η	viskozita
σ	smykové napětí
$\dot{\gamma}$	smyková rychlost
G	smykový modul
G'	paměťový modul
G''	ztrátový modul
δ	fázový posun
f	frekvence
ω	úhlová frekvence
Pa	Pascal
kDa	kilodalton
M	molární koncentrace
μ	mikro
Hz	hertz