



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

POLYVINYLALKOHOLOVÉ HYDROGELY S GRADIENTOVOU STRUKTUROU V HUSTOTĚ SESÍTĚNÍ

POLYVINYL ALCOHOL HYDROGELS WITH GRADIENT STRUCTURE IN CROSSLINKING DENSITY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Romana Ščotková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.

BRNO 2024

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1979/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Romana Ščotková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Procesy a materiály medicínských aplikací
Vedoucí práce: **Ing. Jiří Smilek, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Polyvinylalkoholové hydrogely s gradientovou strukturou v hustotě sesíťení

Zadání diplomové práce:

- Vypracovat literární rešerši zaměřenou na přípravu hydrogelových systémů s různým stupněm síťování a/nebo sumarizaci vhodných metod pro charakterizaci gradientové struktury.
- Na základě literární rešerše vybrat vhodné postupy vedoucí ke tvorbě gradientových hydrogelů a ověřit jejich použitelnost pro přípravu hydrogelů na bázi polyvinylalkoholu.
- Optimalizovat vybrané techniky přípravy PVA hydrogelů s gradientovou strukturou.
- Vhodnými instrumentálními technikami prokázat různou hustotu síťování (gradient) v hydrogelových maticích.
- Jednoduchými experimentálními technikami ověřit, zda gradientovou strukturou hydrogelů lze cíleně ladit jejich transportní vlastnosti.
- Diskutovat naměřené výsledky a vyvozovat logické závěry.

Termín odevzdání diplomové práce: 29.4.2024:

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

Bc. Romana Ščotková
studentka

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Předložená diplomová práce představuje jednu z mnoha možností fyzikální přípravy PVA hydrogelů s gradientem v hustotě sesítnění. Na základě vypracované rešerše, jejíž hlavní náplní byly způsoby přípravy gradientových hydrogelů a charakterizace jejich vlastností, byla vybrána metoda cyklického mrazení a tání, která byla optimalizována se zaměřením na vybrané parametry (molekulová hmotnost polymeru, počet cyklů, délka a teplota cyklů, způsob mrazení) při přípravě. Dalším krokem bylo provedení pilotních experimentů vedoucích k potvrzení a charakterizaci vzniklé gradientové struktury vybranými instrumentálními technikami jako je reometrie, rastrovací elektronová mikroskopie nebo metoda založená na sledování úbytku disperzního prostředí při sušení vzorků. Kromě potvrzení gradientové struktury byl jedním ze studovaných parametrů také vliv přídavku polysacharidu, a vytvoření tak semi-interpenetrovatelné sítě, na výsledné mechanické vlastnosti. Gradientové hydrogely s různou molekulovou hmotností či přídavky polysacharidu coby modelového difuzního činidla byly ve druhé části experimentální práce porovnávány na základě difuzních experimentů za využití methylenové modři. V závěru práce byly všechny získané výsledky diskutovány a byla navržena doplňující měření pro hlubší pochopení dané problematiky.

KLÍČOVÁ SLOVA

gradientové hydrogely, polyvinyl alkohol, reologie, difuzní experimenty, SEM, sušina

ABSTRACT

The presented thesis introduce one of the many possibilities for the physical preparation of PVA hydrogels with a gradient in the crosslinking density. Based on the research conducted, the main focus of which was the preparation methods of gradient hydrogels and the characterization of their properties, a cyclic freezing and thawing method was selected and optimized with a focus on the selected preparation parameters. The next step was to perform pilot experiments leading to the confirmation and characterization of the resulting gradient structure by selected instrumental techniques such as rheology, scanning electron microscopy or a method based on monitoring the loss of dispersion during drying of the samples. In addition to the confirmation of the gradient structure, one of the parameters studied was the effect of the addition of polysaccharide on the resulting mechanical properties. Gradient hydrogels with different molecular weights or biopolymer additions were compared in the second part of the experimental work based on diffusion experiments using methylene blue. At the end of the work, all the results obtained were discussed and additional measurements were proposed for a deeper understanding of the subject.

KEY WORDS

gradient hydrogels, polyvinyl alcohol, rheology, diffusion experiments, SEM, dry matter

ŠČOTKOVÁ, Romana. *Polyvinylalkoholové hydrogely s gradientovou strukturou v hustotě sesítení*. Brno, 2024. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156929>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Jiří Smilek.

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.

.....
Bc. Romana Ščotková

..

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Ing. Jiří Smilkovi, Ph.D. za odborné vedení, věnovaný čas, cenné rady a za neustálý optimismus. Mé poděkování patří také Ing. Natalii Zinkovské za cenné rady, ochotu a pomoc v průběhu řešení experimentální části.

Dále bych chtěla poděkovat své rodině, která mě podporovala v průběhu celého vysokoškolského studia. Speciální poděkování patří také mému příteli, že mi byl během studia oporou a věřil ve mě.

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Gradientové hydrogely.....	9
2.1.1	Příprava.....	9
2.1.2	Charakterizace gradientové struktury.....	11
2.1.3	Aplikace.....	12
2.2	Polyvinylalkohol.....	13
2.2.1	Fyzikální vlastnosti.....	14
2.2.2	Aplikace.....	15
2.3	Vybrané metody pro charakterizaci hydrogelových gradientů.....	15
2.3.1	Reologie.....	15
2.3.2	Rastrovací elektronová mikroskopie.....	18
2.4	Difuze.....	20
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	22
3.1	Metoda freeze/thaw pro přípravu hydrogelových matic.....	22
3.2	Metody ověřování gradientové struktury hydrogelů.....	23
3.3	Studium transportních jevů u hydrogelů.....	24
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	27
4.1	Použité chemikálie.....	27
4.2	Použité přístroje a zařízení.....	27
4.3	Optimalizace přípravy hydrogelů s gradientem hustoty síťování.....	27
4.3.1	Vliv podmínek zmrazování/tání.....	28
4.3.2	Příprava gradientových hydrogelů s přídavkem biopolymeru.....	30
4.4	Vybrané metody pro potvrzení gradientové struktury hydrogelu.....	31
4.4.1	Mechanická charakterizace hydrogelů.....	31
4.4.2	Strukturní analýza rastrovací elektronovou mikroskopií.....	33
4.4.3	Sušicí experimenty.....	33
4.5	Difuzní experimenty.....	33
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	36
5.1	Charakterizace přípravy hydrogelů s gradientem v hustotě sesíťování.....	36

5.2	Metody charakterizace gradientových hydrogelů.....	37
5.2.1	Reologická měření.....	37
5.2.2	Sušící váhy	41
5.2.3	Rastrovací elektronová mikroskopie	44
5.3	Vliv přídavku biopolymeru na výsledné mechanické vlastnosti	48
5.4	Difuzní experimenty	50
5.4.1	Studium absorpce barviva do struktury hydrogelu	50
5.4.2	Studium uvolňování barviva z gradientového hydrogelu.....	57
6	ZÁVĚR	60
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	63
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	71
9	PŘÍLOHY.....	72

1 ÚVOD

Hydrogelové systémy, jako materiály tvořené trojrozměrnou polymerní sítí jako spojité disperzního podílu a vodou jako disperzním prostředím, tvoří dnes důležitou součást nejrůznějších aplikačních odvětví od biomedicíny přes potravinářství až po zemědělství. I přesto, že hydrogely jsou z větší části tvořeny pouze vodou, vykazují chování podobné pevným látkám a dokážou odolávat mechanické deformaci. Jejich výsledné vlastnosti jsou v zásadě závislé na volbě využitého polymeru, počtem a charakterem kovalentních vazeb či slabých vazebných interakcí a obsahem vody. Při snaze připravit sofistikovanější hydrogelové materiály, jejichž vlastnosti lze postupně měnit, vznikly gradientové hydrogely. Gradientové hydrogely mohou být definovány jako hydrogely se změnou alespoň jedné vlastnosti ve struktuře, přičemž tato změna může být plynulá či skoková. Mezi gradientové vlastnosti můžeme zařadit například mechanickou pevnost či hustotu síťování. Vzniklé gradienty mohou představovat nejen změnu prostorovou, ale také změnu časovou či kombinaci obojího. Výhody hydrogelů s gradientovou strukturou oproti konvenčním hydrogelům s homogenní strukturou, která je často limitující, jsou často využívány například v oblasti tkáňového inženýrství. Gradientová struktura může být skvělým prostředkem pro napodobení přirozeného biologického prostředí (např. extracelulární matrix). Právě těmito gely, optimalizací jejich přípravy a její charakterizací se zabývá předložená diplomová práce.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Gradientové hydrogely

Klasické hydrogely, s vodou jako disperzním prostředím a polymerní sítí jako disperzním podílem, mohou být modifikovány a funkcionalizovány tak, aby jejich struktura lépe vyhovovala aplikačním potřebám a mohla tak například simulovat prostředí lidského těla, typicky extracelulární matrix. Jednou z takových modifikací mohou být i tzv. gradientové hydrogely. U takových hydrogelů můžeme v jejich struktuře pozorovat kontinuální prostorovou změnu v alespoň jedné z jejich fyzikálních nebo chemických vlastností. Tyto struktury mohou vykazovat jak změnu prostorovou, tak i změnu časovou, kdy se vybraná vlastnost vyvíjí v čase [1], [2].

Dle povahy gradientu je můžeme rozdělit na gradient fyzikální a chemický. Fyzikální gradient je charakteristický postupnou změnou fyzikálních vlastností jako je tuhost materiálu, pórovitost nebo drsnost povrchu. Fyzikální gradient se přirozeně vyskytuje i v lidském těle. Příkladem je kostní chrupavka, u které můžeme pozorovat změnu vrstvení kolagenových vláken nebo struktura kostí, které mění svou pórovitost od kompaktní až po houbovitou (spongiózní). Chemický gradient hydrogelů se vyznačuje změnou chemického složení, které vede k postupné změně smáčivosti povrchu, koncentrace nebo hustoty ukotvených látek [2].

Gradientové hydrogely sehrály v posledním půlstoletí klíčovou roli v mnoha aspektech materiálového výzkumu, o čemž svědčí exponenciální nárůst publikací na toto téma. Hydrogely s gradientovou strukturou usnadnily systematické studium některých fyzikálně-chemických jevů a upravovat jejich parametry nebo umožnily generovat inteligentní/reaktivní materiály, což vedlo k rychlému technologickému vývoji se zvýšenou účinností [3].

2.1.1 Příprava

Generování gradientové struktury v matici hydrogelu může být dosaženo řadou způsobů – změnou molekulové hmotnosti materiálu tvořícího disperzní podíl, změnou vnějších podmínek (teplota, pH, ...) nebo inkorporací jiných (nano)materiálů do struktury [4]. Při přípravě mohou gradienty v hydrogelech nabývat fyzikální nebo chemický charakter, výjimečně i kombinaci obojího [3]. Změna vlastnosti, která tvoří gradient hydrogelu může být kontinuální i ostře ohraničená. Tento parametr může výrazně ovlivnit například buněčnou aktivitu v hydrogelovém substrátu [5]. Dalšími parametry ovlivňujícími výslednou strukturu jsou bobtnavost hydrogelu a stabilita jeho vazeb. Schopnost absorpce vody, která se pohybuje od zlomku po tisícinásobek hmotnosti, je regulována počtem hydrofilních skupin polymerního řetězce. Bobtnavost následně ovlivňuje difúzní koeficient rozpuštěných látek, mechanické a optické vlastnosti nebo smáčivost povrchu. Stabilita vazby, která definuje fyzikální vlastnosti hydrogelu, závisí nejen na hustotě sesítnění, ale také na vlastnostech polymeru jako je jeho náboj nebo molekulová hmotnost [6].

Kromě rozdělení gradientu hydrogelů na fyzikální a chemické můžeme jejich proces přípravy rozdělit na dvě další skupiny: "*bottom up*" a "*top-down*". Při zvolení prvního přístupu, tedy zdola nahoru, je nejprve generován gradient a až poté je celý roztok síťován. V případě této techniky se hydrogely budují na mateřském substrátu postupným skládáním stavebních bloků gradientu (monomery, oligomery, polymery, ...) přirozeně (např. difuzí) nebo uměle (ponořením vzorku do roztoku, odpařováním z depozice,...). Naopak je tomu u přípravy "*top-down*", u které polymerizace prekurzoru předchází tvorbě gradientu. Metodou shora dolů je základní substrát postupně fyzikálně či chemicky modifikován [3].

Nejjednodušší metody generující hydrogelový gradient využívají molekulární difuzi. V tomto případě se hydrogel obecně připravuje před vznikem gradientu. Ten je vytvářen přidáním roztoku na povrch připraveného hydrogelu a inkubován pro aktivaci difuze. Ačkoliv tato metoda nevyžaduje využití specializovaného vybavení, může být časově velmi náročná, vytvořené gradienty mohou být časoprostorově nestabilní a často vyžadují dodatečnou imobilizaci [2], [7].

Druhá strategie přípravy, která navrhuje alternativu časově náročné metodě difuze, využívá systém programovatelných injekčních pump. Pomocí této metody je možné připravit jak fyzikální, tak chemický gradient řízeným mícháním hydrogelových prekurzorů a jejich následným sesíťováním [7]. Dynamické míchání představuje univerzální techniku také díky možnosti zavedení sekundárního gradientu, například zavedením některých biochemických signálů (růstových faktorů, adhezních molekul, ...) nebo různých typů buněk do jednoho roztoku prekurzoru [9]. Postupný vznik gradientu smícháním dvou různých roztoků systémem injekčních pump je dnes již úspěšně využíván ke studiu chování a diferenciaci buněk v prostředí simulujícím ECM (extracelulární matrix) [10]. Obdobou řízeného míchání kapalných roztoků v makroskopickém měřítku je mikrofluidika. Tato metoda je díky řízenému dávkování malých objemů prekurzorů do kanálek o rozměrech mikrometrů vysoce specifická. Mikroskopické měřítko poté umožňuje i detekci na úrovni jedné buňky a snižuje spotřebu využitých roztoků [8].

Jednou z dalších současných a pokrokových technik je metoda 3D tisku. Prekurzory hydrogelů jsou dávkovány na substrát pomocí pohyblivé tiskové hlavy, která je řízena podle počítačem navrženého modelu [1]. Tato aditivní výrobní metoda umožňuje měnit geometrii, propojení a velikost jednotlivých pórů v rámci jednotlivých vrstev. Úskalím může ale být volba vhodného kapalného prekurzoru, který musí vykazovat dostatečnou rychlost tuhnutí a držet tak tvar vytvořené konstrukce. Technologie 3D tisku je hojně využívána v oblasti tkáňového inženýrství při výrobě implantabilních scaffoldů [7].

Do podmnožiny technik 3D tisku pro přípravu fyzikálního gradientu můžeme zařadit metodu stereolitografie. Ta spočívá v postupné fotopolymeraci jednotlivých vrstev kapalného monomeru pomocí počítačově řízeného laserového paprsku. Pomocí stereolitografie je možné

generovat komplexní prostorovou strukturu [11]. Tvrdost a tloušťku jednotlivých vrstev je možné řídit poměrem monomeru a fotoiniciátoru, rychlostí skenování nebo výkonem laseru. Nutná přítomnost fotoiniciátoru ale může být z důvodu toxicity nevhodná při biomedicínských aplikacích. Především v oblasti tkáňového inženýrství je nutný výběr biokompatibilních monomerů jako je poly(propylenfumarát) (PPF), poly-D,L-laktid (PDLLA) nebo poly(ϵ -kaprolakton) (PCL) [11] [12].

Širokou škálu technik zahrnuje také proces řízeného síťování a gelace v prostoru řízením vnějších podmínek. Tyto „chytré“ hydrogely vykazují změny ve svém bobtnacím chování, síťové struktuře nebo mechanických vlastnostech v reakci na nejrůznější chemické a fyzikální podněty. Nevratné i reverzibilní změny je možné vyvolat pomocí fyzikálních stimulů jako je teplota, světlo nebo elektrické/magnetické pole. Mezi chemické podněty patří například přítomnost iontů a biomolekul, které interagují s polymerní sítí [4].

2.1.2 Charakterizace gradientové struktury

Pro zajištění reprodukovatelné a konzistentní přípravy gradientu v hydrogelové matici bylo třeba vyvinout metody, které potvrdí přítomnost požadované struktury [13]. Metody charakterizace můžeme rozdělit na destruktivní a nedestruktivní. Tahové zkoušky vedou k nenávratnému porušení struktury, zatímco spektroskopické metody jsou analýzy nedestruktivní [15].

Účinná a jednoduchá je metoda vizualizace gradientu pomocí barviv. V rámci vizuální kontroly se využívají jak konvenční (např. potravinářská), tak i fluorescenční barviva (např. FITC-dextran, rhodamin B nebo FITC značené BSA). Barvivo je možné inkorporovat do polymerního solu již před samotným zesíťováním [13].

Příkladem spektroskopické metody může být infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR), která stanovuje přítomnost specifických chemických a funkčních skupin. Chemický gradient hydrogelu lze stanovit sestavením kalibrační křivky absorpčních píků charakteristických pro využitě polymery. Poté lze snadno gradient vizualizovat rozřezáním hydrogelu na jednotlivé pláty a sledovat změnu poměru absorbance [14]. Mezi další používané spektroskopické metody vhodné pro charakterizaci gradientových hydrogelů můžeme zařadit infračervenou spektroskopii v blízké oblasti (NIR) nebo rentgenovou fotoelektronovou spektroskopii (XPS). Nevýhodou charakterizace hydrogelů pomocí infračervené spektrometrie může být vysoký obsah silně absorbující vodné fáze, která může ovlivnit výsledná spektra [15], [16].

Strukturální analýza hydrogelů, tedy studium morfologické struktury, tvaru a velikosti pórů, nám poskytují techniky elektronové mikroskopie, zejména skenovací elektronová mikroskopie nebo konfokální mikroskopie s fluorescenčně obarvenými hydrogely [13]. Porézní strukturu ale nelze pozorovat u hydratovaných hydrogelů, a proto je třeba vzorky před analýzou lyofilizovat (kryo-SEM). Struktura lyofilizovaných vzorků se ale může výrazně lišit od původní struktury

a při nesprávné technice mrazení mohou vznikat nežádoucí artefakty. Výhodou metody SEM může být možnost analýzy propojení, tvaru a distribuce pórů nebo tloušťka stěny [17].

Povrchovou topografií hydrogelu lze zobrazit pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM), která mapuje povrch s vysokým rozlišením a zaznamenává moduly pružnosti a drsnost celého povrchu hydrogelu v jeho nativním hydratovaném stavu [13],[18]. Mikroskopie atomárních sil se ukázala jako vhodná alternativa k transmisní a rastrovací elektronové mikroskopii při studiu biomateriálů v nanoměřítku, ve vodném prostředí nebo při experimentálních podmínkách. Snímacím prvkem mikroskopu je ohebná konzole s ostrou špičkou na konci. Vychýlení této konzole je způsobeno interakcí hrotu se vzorkem, což vyvolá odezvu odraženého laserového paprsku, který je snímán fotodiodovým detektorem. Topografie vzorku je poté získávána z translace změn napětí odvozených interakcemi hrot/vzorek a konečný obraz je počítačově zpracován. Vysoký obsah vody a pružná struktura, které jsou při aplikačním využití velkou výhodou, mohou představovat omezení při AFM zobrazování o vysokém rozlišení. Proto se doporučuje tuto metodu kombinovat i s jinými vizualizačními technikami [19].

Pro charakterizaci modulů pružnosti a viskoelastických vlastností, které mohou sloužit jako nepřímé stanovení přítomného gradientu, lze využít reometrii [13]. Moderní reometry jsou robustní, rychlá a citlivá zařízení, která pro měření vyžadují pouze malý objem vzorku. V závislosti na mezeře měřicí štěrbině a velikosti měřicí geometrie může být objem vzorku menší než 1 ml. Časovými experimenty můžeme sledovat gelaci hydrogelů v reálném čase, oscilační amplitudové testy měří lineární viskoelastickou oblast v závislosti na amplitudě deformace a frekvenční oscilační testy určují lineární plató modul hydrogelu [20]. Nicméně během mechanické analýzy dochází deformaci hydrogelu a k uvolňování vody z polymerní sítě, což může vést k prokluzování vzorku z měřicího senzoru. Pro studium gradientu také není možné provést zkoušku gelu celistvého a obvykle je nutné gel rozřezat na jednotlivé pláty a jejich mechanické vlastnosti navzájem porovnávat [18].

2.1.3 Aplikace

Ze své podstaty jsou gradientové hydrogely funkční struktury a jejich výhodných adaptabilních vlastností je využíváno v řadě odvětví. Biochemické a fyzikální gradienty jsou zodpovědné za řízení mnoha důležitých biologických a fyzikálních procesů jako je pohyblivost, migrace, signalizace a diferenciacie buněk. Mají také schopnost ovlivňovat jevy jako je osmotické bobtnání, smáčivost povrchu nebo adsorpce polymeru na substrát [3].

Gradientní struktury jsou pozorovány v řadě biologických tkání, kde hrají zásadní roli v jejich fyziologickém vývoji a zrání. Buněčné gradienty se nachází v tkáních chrupavčitých, zubních, svalových, epiteliálních i neurálních. Epiteliální tkáň má porézní gradient, zatímco svalová vlákna tvoří strukturální gradienty. Také na rozhraní kosti a chrupavky nebo kosti a tkáně pozorujeme strukturální a molekulární gradienty v podélné ose. Proto není překvapením, že myšlenka implementace přirozeně se vyskytujících gradientu i do klinicky

navržených scaffoldů, se rozšířila také do oblasti tkáňového inženýrství [21]. Hydrogely s mikrostrukturou gradientu byly úspěšně využity jako náhrada chrupavčité tkáně, která svou hustou strukturovanou, ale zároveň pružnou sítí, připomíná pevný gel. Jelikož chrupavka obsahuje molekulární gradient složený z chondrocytů, perichondria a chondroitin sulfátu, homogenní hydrogely zcela nenaplňují potřebné aplikační vlastnosti [21]. Příkladem využití může být studie [22], ve které byl vědci navržen čtyřvrstvý gradientní hydrogelový scaffold tvořený PCL (poly(ϵ -kaprolakton) vlákny s různou porozitou. Připravené gradientní scaffoldy vykazovaly heterogenní diferenciaci chondrogenních buněk a zvyšovaly angiogenezi a vaskularizaci uvnitř tkáně [22].

Současné scaffoldy na bázi hydrogelů mají potenciál k urychlení regenerace tkání. Nedávná studie [23] uvádí úspěšnou přípravu a využití 3D tisknutého gradientu tvořeného želatinou a alginátem, který svým mikroprostředím dokáže napodobit strukturu kůže a její přirozenou tuhost. Hydrogel byl sekundárně zesíťován pomocí Ca^{2+} iontů a byly do něj úspěšně zapouzdřeny kmenové tukové buňky (ADSC). Připravený scaffold vykazoval zlepšenou angiogenezi a zvýšenou hojivost ran ve srovnání s materiálem jednotné tuhosti. Získané výsledky potvrzují návod na širší využití této technologie u jiných chronických ran nebo tkáňových defektů [23].

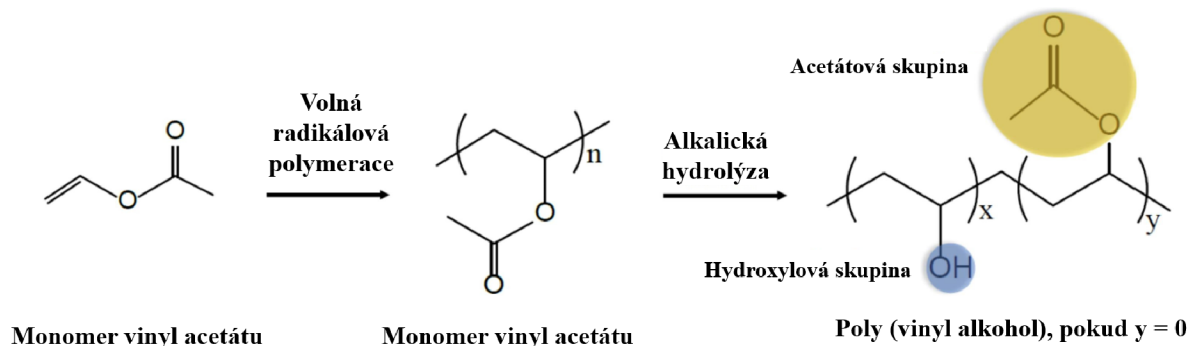
Díky svým variabilním a laditelným vlastnostem nachází hydrogely uplatnění nejenom v odvětví tkáňového inženýrství a medicíny, ale také v oblasti tzv. "měkké robotiky". Gradientní strukturované aktuátory vykazují dle způsobu přípravy (UV záření, působení elektrického/magnetického pole, 4D tisk,...) jsou široce modifikovatelné a nabízí rychlé odezvy na různé podněty [24]. Jednou z realizovaných aplikací je příprava chytrých víceramenných chapadel, které uchopují a uvolňují předměty v reakci na vnější stimuly. V roce 2020 vědci vyrobili čtyřramenný aktuátor, který dokáže ve vodním prostředí o teplotě 50 °C zachytit svými rameny objekt, který následně uvolňuje v nádobě s vodou o teplotě 20 °C [25].

Inspirace přírodou, zejména rostlinami vedla i k vývoji měkkých hydrogelových robotů. Autorům vědecké studie Yang a kol. [26] se podařilo připravit gradientní hydrogelový model, který simuluje zabarvení a pohyb listů a okvětních lístků. Metodou elektroforézy vyvinuly NIPAm (N-isopropylakrylamid) a DMC (dichlormethan) hydrogel, který vykazoval změnu v reakci na teplotní podněty. Hydrogelem tvořené okvětní lístky reagovali na zvýšenou teplotu smrštěním polymerní sítě (zabalením), ale také modrobílou změnou barvy. Tento typ technologie může v budoucnosti nacházet uplatnění v nositelných lékařských zařízeních [26].

2.2 Polyvinylalkohol

Polyvinyl alkohol byl poprvé syntetizován v roce 1924 hydrolyzací polyvinylacetátu v ethanolu v zásaditém prostředí hydroxidu draselného. Dnes se polyvinyl alkohol (PVA) komerčně vyrábí z polyvinylacetátu, který se samotný syntetizuje polymerací vinylacetátu ve vodných roztocích nebo emulzích. Tzv. saponifikace zahrnuje hydrolyzu acetátových skupin výměnou esterů

s methanolem za přítomnosti bezvodého methylátu sodného nebo vodného hydroxidu sodného. [28], [29]. V případě nedokonalé hydrolyzy poly(vinyl acetátu) může být PVA označován za kopolymer, jelikož obsahuje větší množství acetátových funkčních skupin. Množství OH- skupin (% mol) v konečném produktu se nazývá stupeň hydrolyzy (DH) [34].



Obrázek 1 Mechanismus syntézy polyvinyl alkoholu [34]

Polyvinyl alkohol je bělavý semikrystalický syntetický polymer bez chuti a zápachu. Mezi jeho výhodné vlastnosti patří termostabilita, biokompatibilita a netoxičita. Je biologicky odbouratelný za aerobních i anaerobních podmínek. Komerčně vyráběný polyvinyl alkohol je dostupný pro molekulovou hmotnost v rozmezí 20 000–400 000 kDa v závislosti na délce výchozího polymeru, stupně hydrolyzy a zda k hydrolyze dochází za přítomnosti zásady či kyseliny. Polyvinyl alkohol je vysoce hydrofilní, ale odolný vůči většině nepolárních organických rozpouštědel. Je také rozpustný v některých polárních rozpouštědlech, např. dimethylsulfoxid, diethylentriamin nebo formamid [34] [35].

2.2.1 Fyzikální vlastnosti

Pro správné pochopení fyzikálních vlastností polyvinyl alkoholu je nutné studovat fyzikální vlastnosti, které mají na chování polymeru velký vliv a jsou ovlivňovány již při jeho syntéze. Jedním z důležitých parametrů jsou stupeň polymerace a stupeň hydrolyzy, které jsou určovány zbytkovým počtem acetátových skupin a ovlivňují nejen výsledné fyzikální vlastnosti, ale také specifické funkční využití. PVA je dostupný ve dvou formách – částečně nebo plně hydrolyzovaný. Čím vyšší je stupeň hydrolyzy a molekulová hmotnost polymeru, tím obtížnější je proces rozpouštění ve vodných roztocích. Tento jev je připisován intramolekulovým a intermolekulovým H-vazbám a také vysokému stupni krystalinity. Pro rozpouštění vysokomolekulárního či hydrolyzovaného PVA je doporučeno provádět rozpouštění v horké vodě ($> 80\text{ }^\circ\text{C}$) po dobu několika hodin za intenzivního míchání [28] [29].

Rozpustnost, krystalinita, mechanické vlastnosti ale také difuzivita jsou ovlivněny stupněm hydrolyzy. Vědecké studie ukázaly, že roztoky PVA se stupněm hydrolyzy nižším než 90 % netvoří hydrogely za žádných experimentálních podmínek. Tvorbu supramolekulárních struktur ovlivňuje stereoregulace hydroxylových skupin na řetězci polymeru. Obecně platí, že

hydroxylové skupiny ze syndiotaktických (pravidelně střídavých) bloků determinují schopnost vazby se sousedními řetězci na rozdíl od bloků izotaktických (na jedné straně roviny řetězce). Ty jsou naopak zodpovědné za intramolekulární interakce. Z toho plyne, že polyvinyl alkohol s dlouhými syndiotaktickými řetězci spíše vede k tvorbě elastických gelů s vysoce uspořádanou strukturou a vyšší odolností vůči mechanickému namáhání. Dalším důležitým parametrem je molekulová hmotnost polymeru. Vysokomolekulární polyvinyl alkohol se syndiotaktickým uspořádáním jsou využívány pro přípravu vysoce uspořádaných mikrofibrilárních struktur [30], [31].

Síťování polymeru je jedním ze zajímavých nástrojů, díky kterému je možné stávající strukturu modifikovat a měnit povrchové, tepelné nebo mechanické vlastnosti. Zesíťování probíhá v rámci jedné molekuly (intramolekulární) i mezi různými molekulami navzájem (intermolekulární). Stejně jako u jiných polymerů je možné PVA síťovat jak chemicky, tak fyzikálně. Chemické síťování probíhá prostřednictvím síťovacích činidel, které vykazují zvýšenou reaktivitu s přítomnými funkčními skupinami. Kovalentní vazby mezi řetězci polymeru pomáhají tvořit například gluutaraldehyd, formaldehyd nebo kyselina maleinová. Fyzikálního síťování je nejčastěji dosaženo tvorbou vodíkových vazeb mezi hydroxylovými skupinami. Oblíbeným typem fyzikálního síťování PVA je kryogenní zpracování či ionotropní gelace). Kryogelací vznikají tepelně reverzibilní hydrogely, jejichž další vlastnosti jako je turbidita mohou být ovlivněny koncentrací polymeru a vybraným rozpouštědlem [32], [33].

2.2.2 Aplikace

Adheze, vysoká pevnost, flexibilita nebo biokompatibilita činí PVA cenným materiálem v širokém spektru oborů od biomedicíny až po stavebnictví [34]. Polyvinyl alkohol je využíván jako účinnější náhrada ethylenvinyl alkoholu v potravinářském průmyslu, kde je díky biokompatibilním účinkům a nízké propustnosti plynů využíván pro balení potravin. Odolnost vůči nepolárním organickým rozpouštědlům poté chrání potraviny také před sekundární kontaminací tiskařskými barvami. Kromě obalových materiálů se PVA díky želatině podobnému chování přidává do potravin jako jedlé zahušťovadlo. Díky svým výhodným vlastnostem a nízkým výrobním nákladům se stává PVA oblíbenou alternativou jiných komerčně dostupných polymerů také ve stavebnictví jako přísada do nátěrů či lepidel [37]. PVA hydrogely nachází řadu biomedicínských aplikací při výrobě tkáňových štěpů, kontaktních čoček, umělých tkáňových chrupavek, buněčných scaffoldů nebo při léčbě cévní embolie. Využívají také pH a termo stimulaci pro přípravu nosičů léčiv [38].

2.3 Vybrané metody pro charakterizaci hydrogelových gradientů

2.3.1 Reologie

Reologie, doslovně věda o proudění, je oblast fyziky a fyzikální chemie zabývající se tokovými vlastnostmi kapalných látek a deformační chování látek pevných. Výhodným spojením těchto dvou parametrů umožňuje studium mnoha materiálů (včetně hydrogelů), u kterých se působením dostatečně velké smykové síly mění deformační chování na tokové. Smykové

chování všech studovaných materiálů můžeme pomocí reologie rozdělit na ideálně viskózní, ideálně elastické a viskoelastické [39]. U ideálně elastického materiálu dochází k okamžité reakci na působící napětí a deformace není závislá na čase. Naopak u ideálně viskózních materiálů nedochází k okamžité reakci na působící síly, deformace je však nevratná. Viskoelastické materiály reagující deformací vratně či nevratně v závislosti na délce a intenzitě působící síly [40].

Reologická charakterizace je široce využívanou a vhodnou strategií pro zkoumání smykové odezvy hydrogelů. Charakterizace smykové odezvy z hlediska změny toku a potenciálních objemových strukturních změn je krokem vpřed v pochopení deformačního chování hydrogelových materiálů. Výhodou této metody je její rychlost, citlivost a nízká spotřeba vzorku [40].

Pro experimentální stanovení reologických parametrů se využívá měřicí metoda reometrie. Vlastnosti kapalin i pevných látek (mez toku, viskoelastické moduly nebo ztrátový úhel) lze charakterizovat pomocí rotačních či oscilačních testů. Základní reometr se skládá ze statického dolního a pohyblivého horního senzoru. Rotací či oscilací senzoru dochází k namáhání materiálu a zaznamenává se jeho odezva při různých smykových rychlostech. Mezi nejběžnější měřicí geometrie patří uspořádání deska-deska, kužel-deska nebo válec-válec. Výběr měřicí geometrie závisí zejména na viskozitě měřeného vzorku a typu měření [39], [41].

Rotační reometrie

Rotační reometrie je jedním z nejvíce využívaných analýz na poli reometrie. Mechanické rotační testy lze provádět ve dvou provozních režimech. První možností je přednastavení rychlostí otáčení, resp. smykové rychlosti a zaznamenáváme smykové napětí. Toto nastavení simuluje procesy, které jsou závislé na rychlosti proudění, např. nanášení barvy štětcem nebo průtok trubkou. Druhou možností je přednastavení působící síly prostřednictvím krouťícího momentu nebo smykového napětí a výstupem měření je hodnota rychlosti smykové deformace. V tomto případě má měření simulovat děj závislý na působící síle jako je vytlačování past. Výstupem měření na rotačním reometru jsou tzv. tokové nebo viskozitní křivky [41].

Oscilační reometrie

Oscilační reometrie je hlavní metodou studia viskoelastických materiálů od kapalin až po taveniny polymerů. Jak již název vypovídá, viskoelastické chování vykazují materiály na pomezí ideální kapaliny (viskózní) a ideální pevné látky (elastické). Elastické chování si můžeme nejlépe představit na modelu pružiny. Při nulové deformaci zachovává model rovnovážný energetický stav. Působením síly dochází k porušení energetické rovnováhy a vzniku elastické síly, která brání deformaci vnitřní struktury. Pokud je ale takovým napětím působeno na ideální viskózní látku, dochází k okamžité a trvalé deformaci mikrostruktury [42].

Principem oscilačních měření je vystavení vzorku sinusové deformaci a zaznamenání mechanické odezvy vzorku jako funkci času. Malé množství vzorku je nadávkováno mezi

paralelní desky nebo geometrii kužel/deska a předem nastavená amplituda torzních oscilací vytváří ve vzorku smykové napětí. Kvantitativní mírou tuhosti je veličina zvaná komplexní modul (G^*) [Pa], která je pomocí Hookova zákona (rovnice 1) charakterizována jako poměr působícího napětí τ [Pa] k naměřené deformaci vzorku γ [39], [42]:

$$G^* = \frac{\tau}{\gamma}. \quad (1)$$

Pohyb oscilujícího senzoru lze znázornit jako sinusovou křivku s amplitudou deformace na ose y a časem na ose x. Při kontrolovaném deformačním experimentu se poté kontroluje úhlové posunutí a z něj se počítá výsledná deformace. Pro ideálně elastický materiál platí, že smykové napětí je úměrné výsledné deformaci. Maximální deformace tedy nastává při největším smykovém napětí a oba parametry jsou tzv. ve fázi. Ideálně viskózní materiál je maximálně deformován při maximální rychlosti deformace (smykové napětí je úměrné rychlosti deformace). U smykového napětí a deformace tedy dochází k fázovému posunu (δ) o $\pi/2$ a časový signál amplitud je zpožděn. U viskoelastických materiálů pozorujeme chování odpovídající fázovému posunu $0 < \delta < \pi/2$ [41], [42].

Komplexní modul G^* , který bývá charakterizován výrazem

$$G = \sqrt{G' + G''}, \quad (2)$$

se skládá z reálné složky G' [Pa] označované jako paměťový (elastický) modul a složky imaginární (G'') [Pa] označované jako modul ztrátový (viskózní). Paměťový modul představuje uloženou deformační energii, která navrácí materiálu jeho původní tvar, zatímco modul elastický charakterizuje deformační energii rozptýlenou vnitřním třením. Viskoelastické pevné látky jsou charakteristické převahou paměťového modulu, viskoelastické kapaliny jsou naopak charakteristické převahou modulu ztrátového [39], [41].

Hodnot viskoelastických modulů se využívá při popisu deformačního chování vzorků popisují amplitudové a frekvenční testy. Během amplitudového testu je zaznamenávána odezva paměťového a ztrátového modulu při změně amplitudě deformace. Frekvence oscilace je při tomto typu testu konstantní. Pomocí amplitudového testu můžeme stanovit oblast nedestruktivní oscilace – LVO (lineární viskoelastickou oblast). Frekvenční testy slouží k popisu časově závislého vzorku v oblasti nedestruktivní deformace. Výstupem měření je změna viskoelastických modulů v závislosti frekvenci oscilace, zatímco amplituda deformace zůstává konstantní [41].

DMA neboli dynamická mechanická analýza, která spadá do skupiny oscilačních testů, představuje jednu z možných metod charakterizujících mechanické vlastnosti gradientových hydrogelů. Stejně jako u amplitudového testu je sledována odezva materiálu na cyklické působení deformace. Vzorek je nadávkován mezi dvě měřicí geometrie (deska-deska), přičemž horní pohyblivý senzor v tomto případě provádí kompresní pohyb namísto torzního. Výstupem měření je viskoelastický modul (E) [Pa] charakterizující míru tuhosti materiálu [43]:

$$E = \frac{\sigma}{\gamma}, \quad (3)$$

Symbol σ v tomto případě značí aplikované napětí [Pa] a γ kompresní deformaci vzorku (L/L_0). Pokud studovaný materiál vykazuje viskoelastické chování, aplikované napětí můžeme definovat jako funkci času následovně [44]:

$$\sigma(t) = \sigma_0 \sin(\omega t + \delta), \quad (4)$$

kde ω (Hz) značí frekvenci a δ fázový posun. Nejběžnějším využitím DMA je test termické stability, při kterých je frekvence a amplituda oscilace konstantní, zatímco teplota se kontinuálně zvyšuje. Tímto způsobem je možné sledovat například teplotu skelného přechodu polymerů. Stabilita hydrogelů při různých aplikačních podmínkách může být studována pomocí frekvenčním snímání. Při těchto experimentech je nastavená teplota konstantní a frekvence deformace se v průběhu testu zvyšuje/snižuje [43], [44].

Kompresní testy (z ang. *squeeze test*) jsou druhou velkou skupinou spadající pod oscilační reometrii, při kterých je měřena síla potřebná k trvalé deformaci mikrostruktury za konstantní rychlosti stlačování [45]. Vzorek je během experimentu stlačován souosými kruhovými deskami, čímž dochází k jeho radiálnímu vytlačování. Kompresní test je výhodnou technikou pro měření reologických vlastností materiálů, jejichž analýza je v konvenčních reometrech obtížná, např. velmi viskózní materiály. Pro své snadné nastavení se s využitím těchto analýz můžeme setkat také v oblasti strojírenství nebo potravinářství. Pro správné provedení experimentu a získání užitečných výsledků je nutné dbát na některé měřicí podmínky jako je rychlost komprese či velikost geometrie tak, aby nedocházelo k prokluzování vzorku [46].

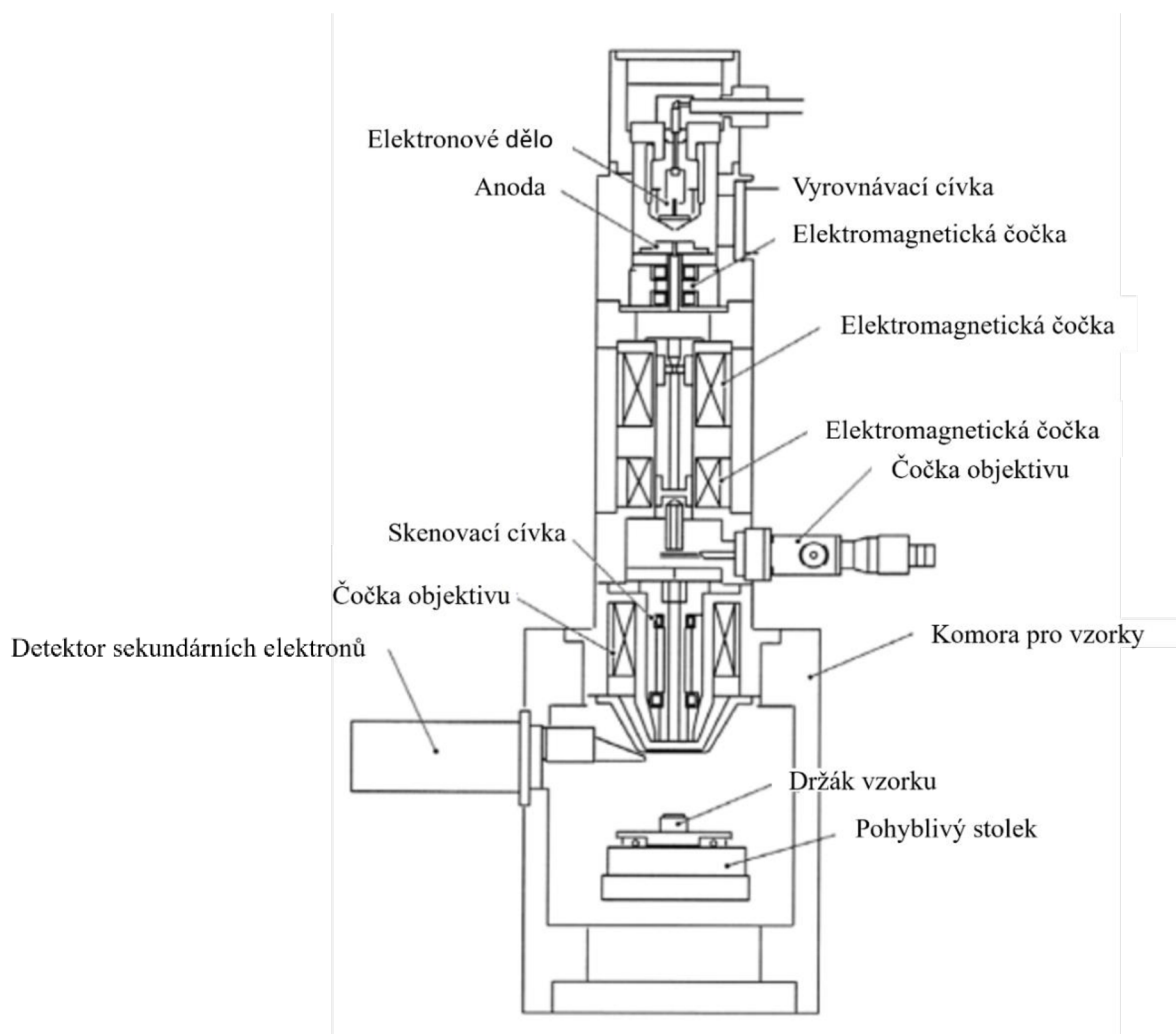
2.3.2 Rastrovací elektronová mikroskopie

Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM) je jednou z nejuniverzálnějších a vysoce citlivých technik umožňujících studium morfologie mikrostruktury, topologie a chemického složení. Pro svou vysokou účinnost se stala elektronová mikroskopie přelomovou jak pro vědecký výzkum, tak i v širokém spektru průmyslových aplikací. Stejně jako u jiných mikroskopů, hlavní funkcí SEM je zvětšit objekty, které jsou lidským okem nepozorovatelné. Výsledný obraz je získáván pohybem elektronového svazku, který dopadá na pozorovaný vzorek. Elektronový mikroskop dokáže zvětšit pozorovaný objekt až $200\,000\times$ a jsme následně schopni pozorovat objekty o velikosti v řádech nanometrů [47].

Tvorba obrazu pomocí SEM závisí na získávání signálu produkovaného interakcí elektronových svazků a vzorku. Tyto interakce mohou být pružné či nepružné. Pružný rozptyl vzniká při vychýlení dopadajícího elektronu atomových jádrem vzorku nebo elektrony vnějšího obalu s podobnými energetickými hladinami. Tento druh interakce se vyznačuje zanedbatelnou ztrátou energie a změnou směru rozptýleného elektronu. Elektrony, které jsou rozptýleny pod úhlem větším než 90° se nazývají zpětně rozptýlené elektrony (Backscattered Electrons – BSE) a poskytují užitečný signál při zobrazování objektu. K nepružnému rozptylu dochází prostřednictvím dalších interakcí dopadajících elektronů s elektrony a atomy pozorovaného

vzorku, přičemž dopadající elektron primárního svazku předává svou energii. Výsledkem je excitace elektronů při ionizaci atomů, která vede ke vzniku sekundárních elektronů. Ty jsou popisovány jako elektrony s hodnotami energie nižšími než 50 eV. Kromě zpětně odražených a sekundárních elektronů se na výsledném obrazu podílí také Augerovy elektrony, charakteristické rentgenové (RTG) záření nebo fotony (katodoluminiscence) [47].

Při dopadu elektronu na povrch pozorovaného vzorku ve většině případů nedochází k okamžitému odrazu. Místo toho elektrony pronikají přes povrchovou vrstvu na určitou vzdálenost, než dojde ke srážce s atomem vzorku. Tento primární elektronový svazek při tom vytváří tzv. oblast primární excitace, která generuje různé signály. Velikost a tvar této oblasti závisí na energii elektronového svazku a atomovém čísle. Hloubka průniku elektronu se zvyšuje s rostoucí energií svazku a klesajícím atomovým číslem vzorku, jelikož je v atomu přítomno méně částic, které by průnik elektronu bránily. Tvar a objem excitační oblasti poté ovlivňuje výsledný obraz – využití vysokého urychlovacího napětí elektronu povede k hlubokému průniku, ale ztrácíme rozlišení a tím detailnější informace o povrchu vzorku [47].



Obrázek 2 Schéma konstrukce rastrovacího elektronového mikroskopu [47]

Základní schéma rastrovacího elektronového mikroskopu, které zobrazuje Obrázek 2, můžeme rozdělit na tubus a tělo, které nese řadu detektorů. Uživatel má přímý kontakt s těmito primárními komponentami mikroskopu a jejich řízení má přímý vliv na kvalitu snímků. Sekundární zařízení rastrovacího elektronového mikroskopu tvoří různá zařízení jako jsou vakuové pumpy, vodní chladiče nebo elektronika, bez kterých rovněž mikroskop nemůže fungovat. Zdrojem elektronového svazku je tzv. elektronové dělo. To se skládá z wolframového vlákna a slouží jako zdroj elektronů, jejichž magnitudu a zrychlení lze měnit. Síla, kterou jsou elektrony prochází kolonou a dopadají na vzorek závisí na použitém urychlovacím napětí, které se pohybuje v rozmezí 2 až 30 kV v závislosti na typu zkoumaného vzorku a požadovaných informacích. Elektronové dělo pracuje ve vakuu, aby nedocházelo k rozptylu emitovaných elektronů. Optický systém mikroskopu se skládá z elektromagnetických čoček (kondenzátoru a objektivu), clon, stigmátoru a skenovacích cívek. Jeho hlavní funkcí je vytvořit elektronovou sondu, která skenuje vzorek ve formě rastru. Detektory připojené k mikroskopu sbírají a převádí signály a převádí je na elektrický impuls, který je počítačovým softwarem převeden na obraz či disperzní rentgenové spektrum (EDS) [47], [48].

Rastrovací elektronový mikroskop je využíván pro charakterizaci mikro a nano struktury široké škály materiálů jako jsou kovy, slitiny, keramika, polymery, ale také filtry, membrány nebo fólie. Možnost vysokého rozlišení, hloubky a ostrosti v kombinaci s časovou nenáročností učinila SEM oblíbenou metodou v mnoha oblastech výzkumu. Mezi limitace této metody ale patří nutnost vzorky analyzovat při vakuu a nemohou být analyzovány v mokřém stavu. Nativní struktura některých biomateriálů je úpravu nenávratně zničena. Studované vzorky také musí být vodivé a je proto nutné je často před pozorováním pokrýt tenkou vrstvou kovu [48].

2.4 Difuze

V soustavách s koncentračním gradientem dochází samovolně k jeho vyrovnání procesem zvaným difuze. Ta je projevem Brownova pohybu a základní hnací silou je rozdíl chemických potenciálů difundujících látek v různých částech soustavy. Směr difuze vždy kopíruje koncentrační gradient a látky tak přechází z prostředí o vyšší koncentraci do prostředí o koncentraci nižší. Tím se systém snaží dosáhnout termodynamické rovnováhy. Rychlost přechodu částic závisí na jejich velikosti – s rostoucím poloměrem částic rychlost difuze klesá. Rychlost difuze ve stacionárním poli definovaná jako látkové množství difundující složky i , které projde jednotkovou plochou kolmou ke směru difuze, popisuje veličina zvaná difúzní tok J_i [49], [50], [51].

Difúzní tok J_i [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$] při jednosměrné stacionární difuzi l. Fickův zákon jako součin koncentračního gradientu $\frac{dc_i}{dx}$ [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{m}^{-1}$] a difúzního koeficientu D_i [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]:

$$J_i = -D_i \cdot \frac{dc_i}{dx} \quad (5)$$

Difúzní koeficient je číselně roven látkovému množství difundující částice, která projde jednotkovou plochou za jednotku času při jednotkovém koncentračním gradientu. Znaménko

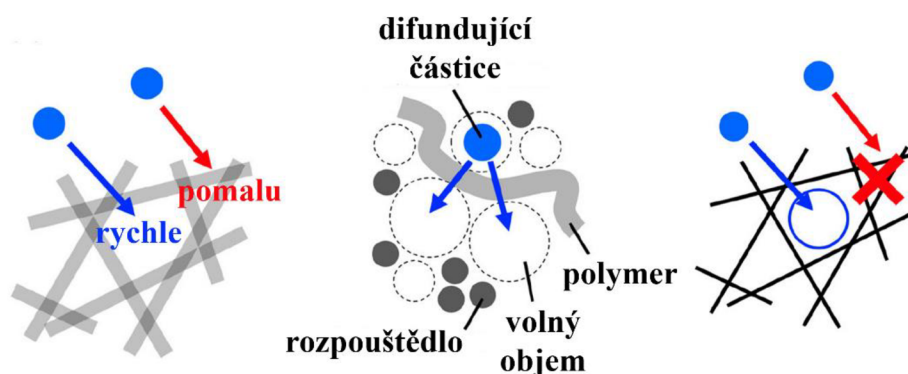
minus v této rovnici znázorňuje difuzi rozpuštěné látky ve směru klesající koncentrace. Symbol parciální derivace značí, že dané veličiny jsou také funkcí teploty, tlaku a popř. času. V případě změny koncentračního gradientu v čase mluvíme o tzv. nestacionární difuzi, kterou popisuje 2. Fickův zákon. Jak koncentrační gradient, tak difuzní tok se mění s polohou a je popisován následovně [50], [51]:

$$\frac{dc_i}{d\tau} = D_i \cdot \frac{d^2c_i}{dx^2} \quad (6)$$

Integrací vztahu dostaneme závislost $c_i = c_i(x, \tau)$ [51].

Difúze rozpuštěných látek v hydrogelech je činí jedinečnými při uplatnění v celé řadě oborů. Využívají se pro zapouzdření buněk, jako biosenzory, systémy pro podávání léčiv nebo jako scaffoldy v oblasti tkáňového inženýrství. Pro pochopení řízení difuzních procesů v hydrogelových maticích byla vyvinuta řada matematických modelů, mezi které patří:

1. Hydrodynamická teorie, která uvažuje tření mezi rozpuštěnou látkou a okolní polymerní sítí hydrogelu.
2. Teorie volného objemu, která předpokládá transport rozpuštěné látky prostřednictvím volných prostorů mezi molekulami.
3. Obstrukční teorie, která modeluje polymerní síť jako zábranu pro difuzi rozpuštěné látky s kapalinou [52].



Obrázek 3 Schéma základních difuzních teorií (zleva hydrodynamická teorie, teorie volného objemu, obstrukční teorie) [53]

Hydrodynamická teorie difuze je tou zdaleka nejvyužívanější a vychází ze Stokes-Einsteinovy rovnice:

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta r_s} \quad (7)$$

kde k_b značí Boltzmannovu konstantu, η dynamickou viskozitu [Pa·s], r_s hydrodynamický poloměr [m] a T termodynamickou teplotu [K]. V té se předpokládá, že difundující molekula má pravidelný kulovitý tvar a její rozměry jsou vyšší v porovnání s molekulami rozpouštědla. Předpokladem pro tuto teorii je také fakt, že molekula se pohybuje konstantní rychlostí [54].

V hydrogelu je difuzivita rozpuštěných látek ovlivněna přítomností polymerních řetězců, které tvoří prostorovou síť. Samotný transport látek poté probíhá především v oblastech volných dutin v polymerní síti, které jsou vyplněny rozpouštědlem. Faktory ovlivňující tento volný objem (průměrná velikost ok, pohyblivost polymerních řetězců, existence nabitých skupin,...) mají vliv také na pohyb rozpuštěných látek. Obecně platí, že difuzivita rozpuštěné látky u fyzikálně síťovaného hydrogelu klesá s rostoucí hustotou sesíťování, s rostoucí velikostí difundujících částic a s klesajícím objemovým podílem vody v gelu [52], [54].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Metoda freeze/thaw pro přípravu hydrogelových matic

Fyzikální hydrogely, tedy takové, u jejichž přípravy není využito žádných síťovacích činidel, jsou slibnými materiály využívanými zejména v oblasti tkáňového inženýrství a medicíny. Jednou z možných příprav fyzikálně síťovaného hydrogelu je metoda cyklického zmrazování a rozmrazování, která je v posledních letech zkoumána zejména za využití polysacharidů. Polysacharidové kryogely jsou výhodné jejich dobře zdokumentovanou biokompatibilitou a netoxicitou. Kryogely vznikají procesem kryogelace, což je specifický typ gelace, při kterém je zásobní roztok ošetřen mrazicím médiem. Polymerní kryogel je makroporézní heterofázový gel, který vznikl prvotním zamrazením po danou dobu a jeho následným rozmrazením. Nezbytnou podmínkou pro úspěšnou gelaci je předpoklad krystalizace roztoku. Mrazením roztoku poté dochází k nucenému uspořádání polymerních řetězců vlivem vzniku krystalků vody, což vede ke vzniku fyzikálních spojů, které zůstávají při rozmrazení neporušeny [55].

Základy metody freeze/thaw za využití polyvinyl alkoholu (PVA) položili **Peppas a kol.** již v roce 1975 [56], kdy sledovali rozptyl světla v závislosti na počtu cyklu zmrazování a rozmrazování. Vodný roztok PVA (15 hm. %) byl mrazen po dobu 45-120 minut a následně dlouhodobě rozmrazován (až 12 hodin). Výsledkem jejich pozorování byl závěr, že s vyšším počtem mrazicích cyklů dochází k nárůstu intenzity rozptylu světla z důvodu vytvoření hustší krystalické mikrostruktury. Zároveň se ukázalo, že intenzita rozptylu se zvyšuje, pokud je roztok šokově zmrazen [56].

Poznatky předchozí studie využili při přípravě fyzikálního kryogelu autoři studie **Kim a kol** [57]. Jejich hlavním cílem bylo využití kryogelace pro přípravu hydrogelu s gradientem tuhosti, který by umožnil sledovat diferenciaci specifických typů buněk. Forma z polypropylenu (PP) o výšce 11,5 cm naplněná 5% roztokem PVA byla mrazena pomocí tekutého dusíku po dobu 5 minut, což zajistilo zamrznutí roztoku v podélném směru. Forma byla následně ponechána po dobu 6 hodin při laboratorní teplotě. Tento postup byl opakován celkem desetkrát, díky čemuž docházelo ke gelaci roztoku a vzniku hydrogelu s definovaným gradientem tuhosti. Úspěšné vytvoření gradientové struktury autoři studie potvrdili pomocí mechanických testů [57].

Modifikaci metody cyklického mrazení se věnovali autoři **Zhu a kol** [58]. V jejich studii zkombinovali přístup mrazení společně s iontovou směrovou difuzí, kterou dosáhli přípravy

gradientového gelu s kontinuální změnou hustoty porézní struktury hydrogelu. Díky synergii zmrazování a vylučování soli vznikl v hydrogelové matici gradient s nízkými moduly pružnosti v horní části gelu, který byl způsoben vznikem krystalků ledu, a vyšším modulem v spodní části hydrogelu, kde docházelo k vylučování soli. Pro přípravu byl využit 15% roztok polyvinyl alkoholu přelitý do formy, která byla z jedné strany překryta semipermeabilní membránou. Strana formy s membránou byla poté ponořena do 25% roztoku NaCl při snížené teplotě (-15 °C) po 8 hodin. Během této doby docházelo k difuzi iontů Na⁺ a Cl⁻, čímž docházelo k agregaci PVA řetězců pomocí H-vazeb a efektu samouspořádání (self-assembly) procesem vysolování. Zároveň vznikala na opačné straně formy porézní struktura při vzniku krystalků ledu. Spojením efektu vysolování a vzniku krystalů je poté dosaženo vytvoření kontinuální gradientové struktury. Fáze rozmraznutí trvala 6 hodin, při které byl gel ponořen do deionizované vody, čímž bylo zajištěno vymytí zbylé soli. Tato metoda představuje účinný návrh přípravy gradientového hydrogelu, který byl poté ve studii úspěšně testován jako hydrogelový senzor reagující na namáhání pomocí tlaku [58].

Pro přípravu hydrogelu pomocí metody cyklického mrazení a rozmrazování je možné využít také přísady jiného polymeru, kterým je možné modifikovat strukturu dle vybrané aplikace. Kombinaci polyvinyl alkoholu a kyseliny hyaluronové zkoumali autoři studie **Heang Oh a kol** [59]. Kyselina hyaluronová je vysokomolekulární polysacharid, který se běžně vyskytuje v extracelulární matrix a hraje důležitou roli v buněčném růstu, migraci a diferenciaci. Připravený hydrogel je proto poté možné využít jako model pro diferenciaci kmenových buněk nebo jejich migrace, jelikož jeho struktura napodobuje strukturu lidské kostní dřeni. Pro přípravu byl použit 5% roztok PVA a 2% roztok kyseliny hyaluronové, které byly nality do válcové formy. Ta byla opakovaně ponořována do tekutého dusíku. Fáze mrazení trvala 30 minut, po které byl vždy vzorek ponechán 6 hodin při laboratorní teplotě. Tento proces byl opakován celkem desetkrát. Finální gel vykazoval gradientovou strukturu a byl určen jako vhodný pro studium diferenciaci širokého spektra buněk a může být proto i v budoucnu využit pro studium vlivu tuhosti substrátu na diferenciaci kmenových buněk [59].

3.2 Metody ověřování gradientové struktury hydrogelů

Gradientové hydrogely představují unikátní možnost, jak efektivně řešit omezené aplikační schopnosti tradičních homogenních hydrogelů. Hydrogely s prostorovou změnou v alespoň jedné ze svých vlastností napomáhají svou strukturou lépe napodobit přirozené prostředí jako je kloubní chrupavka nebo extracelulární matrix [60]. Pro biomedicínské aplikace je proto nezbytné nejen tuto komplexní strukturu řídit, ale také ji pomocí vhodných technik charakterizovat. Právě charakterizační techniky jsou klíčové pro studium vztahu gradientové mikrostruktury a výsledných vlastností gelu [61].

Kombinaci strukturální analýzy a mechanických testů pro charakterizaci anizotropního dvouvrstvého gradientového hydrogelu popisuje odborná studie autorů **Su a kol** [62]. Finální struktura hydrogelu byla dosažena dvoukrokovou přípravou – v prvním kroku byl připraven

PVA hydrogel pomocí metody směrového zmrazování a rozmrazování (DFT). Následovala metoda elektroforézy, pomocí které byly syntetizovány částice hydroxyapatitu (HA) v jedné polovině připravené hydrogelové PVA matrice. Pro potvrzení a charakterizaci vnitřní struktury byly odebrány 3 vzorky – z oblasti směsi PVA a HA, oblasti čistého PVA a jejich rozhraní. Mechanická analýzy vzorků zahrnovala tlakové a tahové testy. Přiložené křivky napětí a deformace znázorňují zvyšování modulu pružnosti od vzorku z oblasti bez částic HA k oblasti s obsahem HA. Zároveň oblast s výskytem hydroxyapatitu vykazuje nejvyšší hodnotu meze pevnosti v tahu jak v kolmém, tak přímém směru ke směru tuhnutí. Potvrzení existence gradientové struktury bylo provedeno také pomocí rastrovací elektronové mikroskopie. Na pořízených snímcích lze v jednom ze vzorků pozorovat výskyt částic HA o velikosti 200-600 nm, které vyplňují póry hydrogelové matrice a hranici jejich výskytu ve vzorku odebraném na rozhraní dvouvrstvého hydrogelu [62].

Potvrzení gradientu hustoty síťování pomocí mechanických testů využili také autoři již zmiňovaného odborného článku **Kim a kol** [57]. Finální PVA hydrogel, vytvořený pomocí metody freeze/thaw, byl rozřezán na 13 stejně velkých částí, přičemž každou byla určena hodnota kompresního modulu. Z naměřených hodnot kompresního modulu vyplývá, že schopnost odolávat mechanické deformaci postupně klesá v podélném směru. Kompresní modul části gelu s nejintenzivnějším kontaktem dosahuje hodnot 24 kPa, zatímco část gelu, která v kontaktu s tekutým dusíkem skoro nebyla má hodnotu kompresního modulu zhruba 1 kPa. Diferenční skenovací kalorimetrie byla v tomto využití jako další metoda nepřímého stanovení gradientové mikrostruktury. Zkoumání tvorby krystalitů mezi řetězci PVA byly hodnoceny sledováním teploty a entalpie tání. Hydrogel byl pro experiment rozřezán na 13 stejných částí a lyofilizován. Kalorimetrický záznam byl sledován od teploty 25 °C do teploty 250 °C s rychlostí ohřevu 10 °C/min. Vyhodnocovány byly parametry teploty a entalpie tání, které odečteny z křivky tání. Krystalinita jednotlivých hydrogelových řezů byla vypočtena podílem dané entalpie tání (ΔH_m) a hodnotou ΔH_m 100% krystalického PVA. Výsledky naznačují zvyšující se hodnoty teploty tání i rostoucí krystalinitu se zvyšující se tuhostí jednotlivých hydrogelových řezů. Zvyšující se krystalinita, tedy schopnost vytvářet pravidelné molekulární útvary, taktéž nepřímo potvrzuje vzniklou strukturu s gradientem hustoty sesíťení. Vznik gradientové struktury si autoři vysvětlují delší dobou kontaktu s tekutým dusíkem a nižší teplotou ve spodní části formy [57].

3.3 Studium transportních jevů u hydrogelů

Úspěch hydrogelů pro jejich aplikační využití v nejrůznějších oblastech zájmu je určován nejen jejich strukturními a mechanickými vlastnostmi, ale také těmi transportními. Hydrogely se díky svým zajímavým vlastnostem stále více využívají pro transportní dodávání léčiv [63], v tkáňovém inženýrství [64] nebo pro enkapsulaci buněk [65]. Studium distribuce a transportu malých molekul může být zásadní například pro chondrocyty zapouzdřené v hydrogelových náhradách chrupavek. Pro zajištění životaschopnosti buněk je potřebná plynulá difuze živin

a následné vyloučení buněk extracelulární matrix při hojení tkáně. Při vývoji kontaktních čoček je nutné zajistit dostatečnou difuzi kyslíku, aby nedocházelo k edému rohovky. Neméně důležitá je studium modelového transportu a uvolňování aktivních látek z hydrogelů pro dosažení správného dávkování. Proto jsou stále zkoumány nové přístupy, jako je NMR (spektroskopie nukleární magnetické rezonance) [66], FCS (fluorescenční korelační spektroskopie) [69] nebo mikrofluidní zařízení [67], [68], k charakterizaci molekulární difuze a distribuce v hydrogelové mikrostruktuře [70], [71].

Velmi oblíbeným a přístrojově nenáročným způsobem studia difuzních charakteristik jsou systémy difuzních cel. Ty se skládají z dvou komor, přijímací a donorové, mezi kterými je umístěna membrána či hydrogel. Tyto difuzní cely mohou být jak statické, tak průtokové. U statických difuzních cel jsou vzorky odebírány v daných časových intervalech a odebraný objem je doplňován čistým médiem. Možností je ale také instalace automatických měřících sond, např. UV-VIS spektrometrická, která detekuje změnu koncentrace solutu v definovaných časových intervalech. Statické difuzní cely je poté možné rozdělit dále na vertikální a horizontální. Naopak u průtokových cel dochází k neustálé obnově čistého přijímacího média pomocí pumpy [72]. Příkladem může být studie autorů **Falk a kol.** [73], kteří využili difuzní cely pro měření difuzního koeficientu paracetamolu přes makroporézní chitosanový hydrogel. Difuzivita hydrogelu byla sledována při různé hmotnostní koncentraci chitosanu (1 až 5 hm. %) a při různé laboratorní teplotě (0-60 °C). Chitosanový hydrogel (10 kDa) byl připraven rozpuštěním zvoleného množství chitosanu v 0,2 M roztoku kyseliny octové. Poté byla směs nalita do teflonové formy (průměr 63,5 mm), vysušena pomocí tekutého ledu (60 minut) a lyofilizována (48 hodin). Xerogel byl poté resuspendován ponořením do vodného roztoku ethanolu. Donorová cela obsahující vodný roztok paracetamolu a přijímací cela s deionizovanou vodou byly odděleny 1,5 mm silnou vrstvou hydrogelu a aparatura byla umístěna do vodní lázně o teplotách 0, 25, 37 a 60 °C. Během experimentu bylo z obou komor periodicky odebíráno 0,5 ml roztoku, které byly analyzovány pomocí HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie). Výsledky této studie je pozorované snížení hodnot difuzního koeficientu při zvyšující se koncentraci polysacharidu a tím i menší pórovitosti. Dalším závěrem studie byla také teplotní závislost. Hodnota difuzního koeficientu paracetamolu roste s rostoucí teplotou a závislost kopíruje Arrheniovu kinetiku s aktivační energií v řádu 25 až 30 kJ/mol. Protože je zjištěná hodnota aktivační energie je vyšší než aktivační energie pro difuzi malých molekul ve vodě (18 až 20 kJ/mol), je zřejmé že i viskozita hydrogelu hraje důležitou roli při molekulární difuzi [73].

Moderní metodou pro analýzu difuzních a vazebných vlastností v biologických a materiálových vědách je tzv. FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) neboli metoda obnovení fluorescence po fotovybělení. FRAP metoda je oblíbená zejména v buněčné biologii, kde pomáhá ve studiu pohybu proteinů a lipidů v plazmatické membráně, cytoplazmě nebo jádře. Technologie je založena na fluorescenční mikroskopii, která umožňuje sledovat

lokální transport molekul v mikrometrovém měřítku. Krátký laserový puls o vysoké intenzitě lokálně působí na vzorek, čímž dochází k vybělení fokusované oblasti. To způsobí vznik lokálního koncentračního gradientu fluoroforů, který vyvolá difuzi neporušených fluoroforů z okolí vyběleného vzorku. Kvantitativní informace je poté získávána z času nárůstu opětovné fluorescence, která je úměrná rychlosti difuze fluorescenčně značených molekul [74]. Metodu FRAP využili pro svůj výzkum autoři článku **Karvinen a kol** [75]. Cílem výzkumu bylo studium mikrostruktury hydrogelů na bázi alginátu, hyaluronanu a polyvinyl alkoholu síťované pomocí hydrazonu. Vedle difuzních parametrů byla pozornost zaměřena také na viskoelastické vlastnosti a strukturní parametry jako je velikost ok polymerní sítě, průměrná molekulová hmotnost polymeru a hustota síťování. Jako difuzní částice byly do hydrogelových vzorků přimíchány částice FITC-dextranu o molekulových hmotnostech 20, 150, 500 a 2000 kDa. Snímky hydrogelů byly pořizovány pomocí laserového skenovacího konfokálního mikroskopu v konstantní hloubce 100 μm ode dna misky. Celkově byla pořizena sekvence 250 snímků. V procesu bělení byl použit argonový laser (488 nm) a jeho intenzita byla nastavena na 100 %, zobrazování probíhalo s použitím laseru s intenzitou pouze 2 %. FITC byl excitován při vlnové délce 488 nm a emise byla detekována v rozsahu 496 nm až 650 nm. Závěrem měření bylo stanovení difuzních koeficientů FITC-dextranů o různých molekulových hmotnostech, přičemž vyplývá, že obnovení fluorescence probíhá rychleji a v plné míře u dextranů s nižší molekulovou hmotností (20 kDa a 150 kDa), zatímco u dextranů o vyšší molekulové hmotnosti (500 kDa a 2000 kDa) dochází pouze k částečnému obnovení po fotovybělení. Tento jev může být vysvětlen zvyšující se velikostí prostorové struktury molekuly s vyšší molekulovou hmotností, případně vazebnými interakcemi fluoroforu a polymerního řetězce. Na hodnotu difuzního koeficientu měla vliv také koncentrace použitého polymeru, kdy se zvyšující se koncentrací polymeru klesala hodnota difuzního koeficientu. Protože byla využita molekula, která nevykazuje žádné vazebné interakce se složkami hydrogelu, zdržení molekulové difuze bylo způsobeno spíše sterickým bráněním [75].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

- Polyvinyl alkohol Sigma-Aldrich s.r.o.; Mw = 111 kDa, CAS: 25213-24-5
- Polyvinylalkohol Sigma-Aldrich s.r.o.; Mw = 57 kDa, CAS: 9002-89-5
- Methylenová modř Penta s.r.o.; CAS: 122965-43-9, $M_r = 319,85$ g/mol
- Rhodamin 6G Sigma Aldrich s.r.o.; č. šarže: BCBX7237
- Chitosan Sigma Aldrich; Mw = 250 kDa; CAS: 9012-76-4
- Kyselina citronová Penta s.r.o.; CAS: 77-92-9
- Chlorid sodný – kuchyňská sůl
- Kapalný dusík
- Deionizovaná voda

4.2 Použité přístroje a zařízení

- Reometr Discovery HR-2, TA Instruments
- Analytické váhy Denver Instruments 224 A
- Magnetická míchačka Thermo Scientific Poly 15
- Laboratorní chladnička s mrazničkou GORENJE RB6288 W
- Sušicí váhy IR 35 DENVER Instruments
- Rastrovací elektronový mikroskop Carl Zeiss AG, EVO LS 10
- Lyofilizátor Biotrade Instruments, VirTis BenchTop K
- UV-VIS spektrometr Hitachi High-Technologies U-3900H

Následující kapitola shrnuje popis postupu experimentální části diplomové práce, která může být rozdělena na 3 kapitoly. Úvodní kapitola popisuje proces optimalizace přípravy polyvinyl alkoholových hydrogelů s gradientem v hustotě sesíťování. Následuje kapitola popisující vybrané instrumentální techniky prokazující gradientové struktury charakterizací strukturních a mechanických vlastností. Závěrečná kapitola experimentální části se věnuje studiu transportních vlastností připravených hydrogelů, které byly demonstrovány pomocí difuzních experimentů.

4.3 Optimalizace přípravy hydrogelů s gradientem hustoty síťování

V experimentální části této diplomové práce byla zaměřena pozornost na přípravu hydrogelů s gradientem hustoty sesíťování na bázi polyvinyl alkoholu pomocí metody mrazení/tání (ang. *freeze/thaw*). Metoda cyklického mrazení a rozmrazování nabízí zajímavý přístup přípravy fyzikálně síťovaných hydrogelů zejména díky možnosti modifikace výsledných vlastností hydrogelu pomocí gelačních podmínek (teplota, délka a počet cyklů mrazení/tání). Pro tuto práci byly vybrány parametry koncentrace a molekulové hmotnosti polymeru, délka cyklů mrazení a tání, počet cyklů a různé způsoby rozmrazování, které budou jednotlivě popsány v následujících kapitolách.

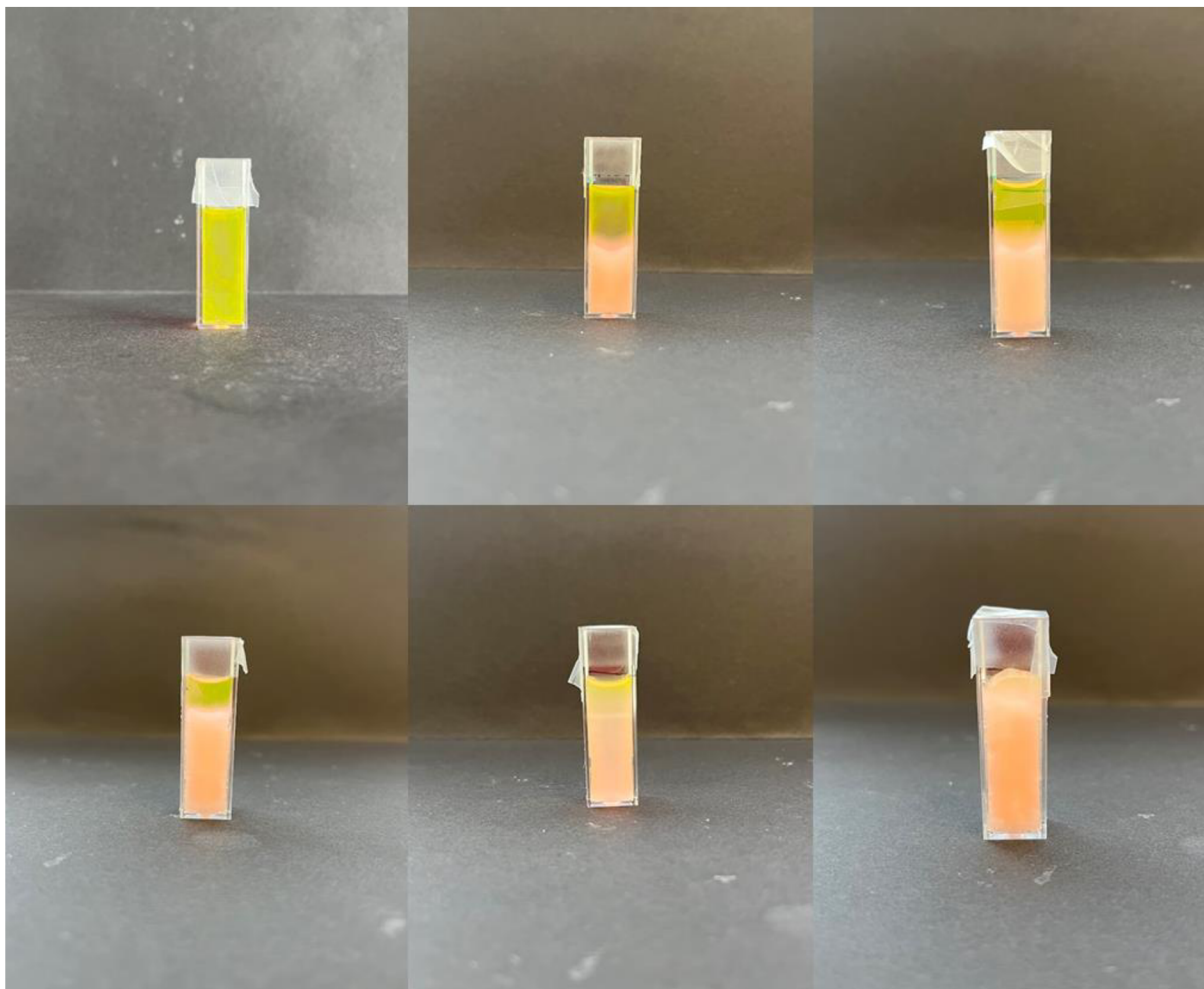
Prvním krokem byla příprava zásobního PVA roztoku, který byl následně síťován. Pro optimalizaci přípravy hydrogelů byly na základě studia literatury [36] vybrány 2 koncentrace polymeru – 5 hm. % a 10 hm. %. Koncentrace 5 hm. % je uváděna jako nejnižší možná koncentrace PVA pro přípravu stabilních hydrogelů pomocí metoda, zatímco koncentrace 10 hm. % je napříč studii nejčastěji využívána. Příprava proto probíhala navážením 5 g či 10 g práškového PVA, které bylo rozpouštěno v menším objemu ultračisté vody a následně doplněno na celkový objem 100 ml. Pro studium vlivu různých molekulových hmotností byl vybrán polyvinyl alkohol o $\overline{M}_w = 30, 57$ a 111 kDa. Se zvyšujícím se stupněm hydrolyzy, koncentrací i molekulovou hmotností je proces rozpouštění PVA náročnější kvůli vysokému počtu H-vazeb a vysokému stupni krystalinity [36]. Pro dosažení úplného rozpouštění proto byly jednotlivé roztoky míchány za zvýšené teploty (90 °C) na magnetické míchače při alespoň 250 ot./min po dobu nejméně 3 hodin. K připraveným roztokům bylo přidáno také barvivo Rhodamin 6G o výsledné koncentraci 0,6 g/dm³ pro lepší vizualizaci procesu gelace a tvorby gradientové struktury.

4.3.1 Vliv podmínek zmrazování/tání

Proces gelace roztoků polymerů byl zajištěn již zmíněnou metodou cyklického mrazení a rozmrazení s využitím tekutého dusíku (-196 °C) jako mrazicího média. Výhodou této metody je možnost řízení výsledné podoby hydrogelů pomocí změny mrazících a rozmrazovacích podmínek. Pro potřeby této diplomové práce byla pozornost zaměřena na počet a délku mrazicího a délku a teplotu rozmrazovacího cyklu. Součástí byla také optimalizace ponořování prekursoru v podobě roztoku polymeru do mrazicího média pro tvorbu stabilní gradientové struktury.

Vzniklý sol byl před mrazením nadávkován do polystyrenové (PS) plastové kyvety (1×1×4,5 cm), která byla zakryta parafilmovou fólií, Tento krok byl zařazen během optimalizace pro minimalizaci kontaktu s mrazicím médiem, který ovlivňoval proces gelace vrchní vrstvy hydrogelu. Optimalizace přípravy byla zahájena opakováním 10 mrazících cyklů, během kterých byla kyveta ponořena do tekutého dusíku po dobu 2 minut a následně byla 30 minut ponechána stát při laboratorní teplotě. Stejně jako koncentrace polymerního prekursoru tvoří počet cyklů mrazení a tání zásadní roli ve finální podobě připravených hydrogelů. Počet cyklů byl tudíž také zvolen na základě vědeckých publikací [36], [57], které naznačují, že provedení 10 cyklů je maximální počet vhodný pro zvýšení mechanické stability hydrogelu. Avšak po studiu viskoelastických vlastností jednotlivých vrstev hydrogelu bylo od tohoto počtu cyklů upuštěno. Při analýze postupu přípravy hydrogelů byl pozorován vznik gelu v celém objemu již po 5 mrazících cyklech. Po opakovaném mrazení již vzniklého gelu nebylo stanovených 30 minut dostatečných pro úplné rozmrazení celého objemu vzorku, a to zejména ve střední části hydrogelu. To vedlo k vyšší míře síťování střední vrstvy, což bylo pro výslednou podobu gradientové struktury vzorku nežádoucí. Z tohoto důvodu byla doba cyklu

tání prodloužena na 60 minut, což zajistilo rozmrznutí vzorku v celém objemu. Zároveň byl snížen počet mrazících cyklů na 5, aby byla dodržena celková doba přípravy hydrogelu.

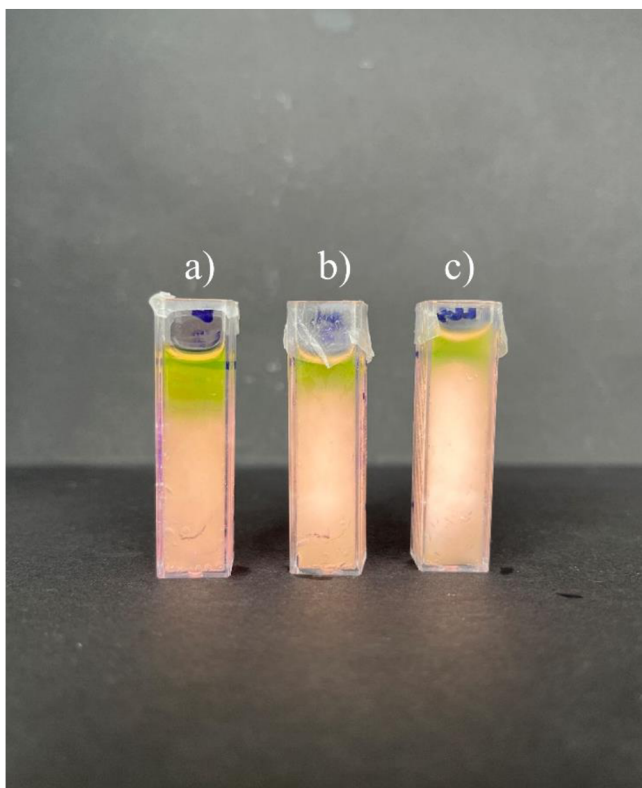


Obrázek 4 Průběh přípravy hydrogelu pomocí metody mrazení/tání (5 cyklů)

Během optimalizace způsobu mrazení byly zkoumány celkem 4 způsoby ponořování kyvety do mrazícího média. Prvním způsobem bylo ponoření kyvety do $\frac{1}{4}$ její výšky, dále ponoření $\frac{1}{2}$ výšky kyvety anebo postupné zanořování kyvety během mrazícího cyklu až do $\frac{3}{4}$ výšky kyvety všechny po dobu 2 minut. Poslední, 4. způsob mrazení, spočíval v zanořování kyvety do $\frac{3}{4}$ její výšky po dobu pouze 1 minuty.

Jak již bylo zmíněno výše, na tvorbu stabilní gradientové struktury má vliv nejen doba cyklu tání, ale také jeho teplota, která ovlivňuje výsledné mechanické vlastnosti hydrogelové mikrostruktury. Součástí optimalizace cyklu tání proto byly vyzkoušeny 3 různé postupy. Prvním postupem bylo ponechání kyvety se zmrazeným solem při laboratorní teplotě. Druhý způsob, který se snažil o pozvolný přechod nízké teploty zahrnoval 20 minut ponoření do ledové tříště se solí ($-2\text{ }^{\circ}\text{C}$), následovalo 20 minut v lednici ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) a posledních 20 minut byla kyveta ponechána při laboratorní teplotě. Po reologickém měření, při kterém byly rozdíly jednotlivých přístupů porovnávány, byl tento způsob byl shledán jako nevhodný, jelikož nedocházelo k úplnému rozmrznutí solu. Jako nejvhodnější byl vybrán přístup, při kterém je

kyveta nejprve umístěna do lednice na 30 minut, poté je 30 minut ponechána při laboratorní teplotě. Tento způsob zajišťuje, že nedochází k šokové změně teploty, která by mohla narušovat stabilitu polymerních řetězců, ale zároveň zajišťuje dostatečně dlouhou dobu pro rozmrznutí vzorku ve stanové délce cyklu.



Obrázek 5 Porovnání míry gelace při různých podmínkách cyklu tání, a) laboratorní teplota, b) lednice + laboratorní teplota, c) ledová lázeň + lednice + laboratorní teplota

Pro porovnání vlivu teploty při mrazícím cyklu byl připraven také hydrogel s homogenní hustotou síťování. Motivací tohoto porovnání bylo potvrzení, že opakovaným kontaktem s mrazícím médiem o velmi nízké teplotě nedochází k degradaci spodní vrstvy hydrogelu a narušení požadované postupné gradientové struktury. Připravený roztok polymeru, používaný také při přípravě gradientových hydrogelů, byl podroben 5 cyklům mrazení a tání. V tomto případě mrazící cyklus trval 30 minut, zatímco cyklus tání trval 60 minut. Následně byly porovnávány mechanické vlastnosti homogenního hydrogelu se s nejhustěji sesíťovanou (spodní) částí hydrogelu gradientového.

4.3.2 Příprava gradientových hydrogelů s přidavkem biopolymeru

Vedle optimalizace podmínek přípravy a vlastností hydrogelu s gradientem v hustotě sesíťování byla během experimentální části na základě literární rešerše [76], **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** věnována pozornost také studiu vlivu přidavku chitosanu do polyvinyl hydrogelové sítě. Původní postup přípravy byl pro semi-interpenetrovanou síť částečně pozměněn. Pro přípravu gelových prekurzorů byly vybrány objemové poměry polymerů 80:20 (PVA/CH) a 60:40 (PVA/CH), díky čemuž bylo možné sledovat také vliv množství přidaného biopolymeru. Polyvinyl alkohol byl připraven dle klasického postupu uvedeného v kapitole 4.3 ve vyšší

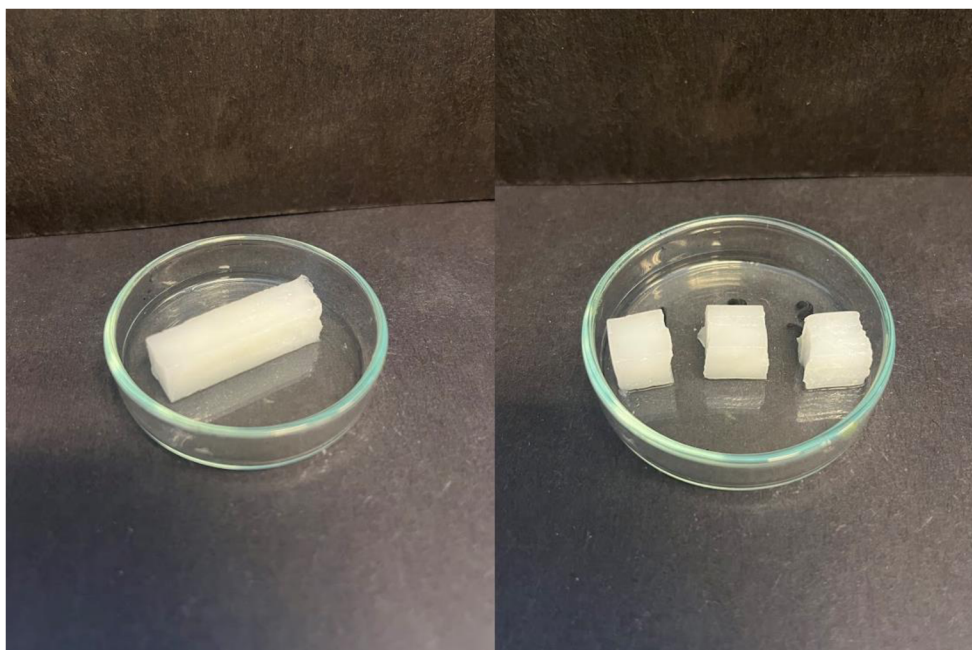
koncentraci (6,25 hm. % a 8,33 hm. %) tak, aby po smíchání polymerů byla jeho výsledná koncentrace stále 5 hm. %. Pro výslednou koncentraci 1 hm. % roztoku chitosanu bylo rozpuštěno 5 g a 2,5 g ve 100 ml vodném roztoku 5 hm. % kyseliny citronové a sol byl následně míchán na magnetické míchačce (nejméně 250 ot./min) po dobu alespoň 24 hodin. Vzniklé roztoky polymerů byly smíchány a ponechány na magnetické míchačce po dobu alespoň 60 minut. Poté byl opakován stejný postup mrazení a tání jako u přípravy PVA hydrogelů (kapitola 4.3.1).

4.4 Vybrané metody pro potvrzení gradientové struktury hydrogelu

Pro prokázání úspěšného připravení gradientového hydrogelu a porovnání vlivu různých parametrů při jejich přípravě byla vybrána řada charakterizačních metod. Mechanické vlastnosti hydrogelů byly studovány pomocí reologických testů, struktura hydrogelové sítě s gradientem hustoty sesítění byla pozorována pomocí rastrovací elektronové mikroskopie a pevný podíl polymerní sítě byl stanoven pomocí sušících experimentů.

4.4.1 Mechanická charakterizace hydrogelů

Pro charakterizaci mechanických vlastností jednotlivých vrstev gradientového hydrogelu bylo využito měření pomocí reometru Discovery HR-2 od společnosti TA Instruments. Pro charakterizaci deformačního chování, které úzce souvisí s hustotou síťování hydrogelů, byly vybrány oscilační amplitudové testy, oscilační amplitudový test a test kompresní. Pro každý z těchto testů byl připravený hydrogel vyjmut z plastové kyvety a pomocí skalpelu rozřezán na 3 stejně velké části (spodní, střední a horní). Ze spodní a vrchní části bylo před tímto rozdělením odřezán cca 1 cm široký pruh hydrogelu, jehož struktura mohla být ovlivněna kontaktem s plastovou kyvetou či mrazicím médiem. Všechna naměřená data byla zpracována v softwarovém progragu Trios společnosti TA Instruments a následně upravena do podoby grafu v MS Excel.



Obrázek 6 Příprava hydrogelu pro reologické měření

Prvním vybraným testem je test amplitudový, který poskytuje informace o mechanických vlastnostech studovaných hydrogelů v rozsahu oblasti lineární viskoelastivity (LVO). Během tohoto měření byl vzorek umístěn mezi geometrii deska-deska se zdrsňeným povrchem dolního senzoru (0,2 mm). Průměr horního pohyblivého senzoru byl 20 mm (20 mm parallel plate, Peltier plate CrossHatched – 115802). Při každém z měření byla nastavena teplota Peltierovy desky na konstantní teplotu 25 °C a vzorky byly za této teploty před měřením relaxovány po dobu 180 s. Pro amplitudové testy, při kterých je frekvence oscilace konstantní (1 Hz), byla nastavena rostoucí amplituda deformace v logaritmickém měřítku s 8 body na dekádu v rozmezí 0,01–1000 %.

Dalším typem experimentu byly oscilační axiální testy, během kterých byla také využita geometrie deska-deska. Zatímco u amplitudových oscilačních testů je měřena odezva na deformaci kroutivým momentem, při axiální dynamické mechanické analýze senzor deformuje vzorek oscilací ve směru osy y a namáhá tak materiál stlačováním. Prvním krokem tohoto experimentu bylo postupné snižování měřící geometrie až do hodnoty pracovní mezery 1000 μm tak, aby před začátkem měření nebyla hodnota axiální síly vyšší než 3 N. Druhým krokem bylo již samotné měření, které probíhalo za konstantní teploty 25 °C, frekvence pohybu horního senzoru 1 Hz a amplitudě oscilace 0,1 – 20 %.

Posledním prováděným reologickým testem byl test kompresní. Během tohoto testu dochází k postupnému stlačování vzorku konstantní rychlostí, přičemž je přístrojem zaznamenávána odezva v podobě změny normálové síly. Po nadávkování vzorku na měřící geometrii deska-deska s hladkým povrchem o průměru 25 mm (25 mm parallel plate, RH chamber, Stainless steel, Disposable – 547229.001) byla horní měřící geometrie snížena tak, aby přilnula

k povrchu hydrogelu bez jeho stlačení. Následně byl spuštěn experiment, při kterém byl vzorek stlačován rychlostí 7 $\mu\text{m/s}$ nebo 4 $\mu\text{m/s}$ až do bodu jeho nevratné deformace.

4.4.2 Strukturní analýza rastrovací elektronovou mikroskopií

Příprava gradientového hydrogelu pro analýzu pomocí SEM byla provedena dle postupu uvedeného v kapitole 4.3. Hotové vzorky byly následně skalpelem rozřezány na 3 stejně velké části. Aby byla vnitřní struktura hydrogelu zachována co možná nejlépe nativnímu stavu, rozřezané části hydrogelu byly převedeny do formy xerogelu šokovým zmrazením po dobu několika minut pomocí tekutého dusíku. Takto připravené xerogely byly následně umístěny do lyofilizátoru, kde byly dodatečně dosušeny. Vzorky poté byly rozlomeny, aby bylo možné sledovat povrch i vnitřní strukturu polymerní sítě a vybrané reprezentativní části xerogelu byly pokryty tenkou vrstvou zlata pomocí naprašovačky. Vzorky byly zobrazovány pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu Carl Zeiss AG, EVO LS 10.

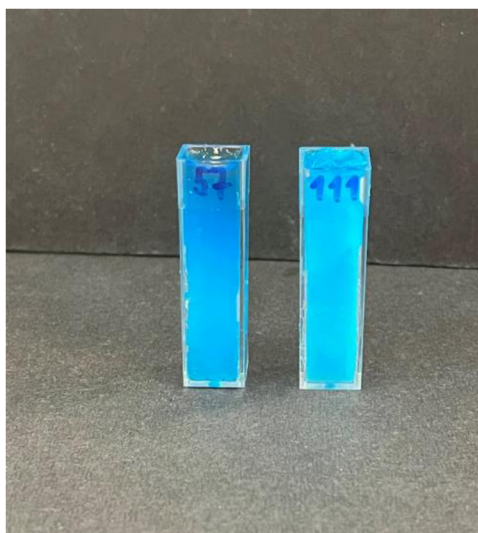
4.4.3 Sušící experimenty

Sušící experimenty za využití sušících vah IR 35 Denver Instruments byly posledním způsobem charakterizace připravených gradientových polyvinyl alkoholových hydrogelů. Stejně jako u předchozích experimentů byly hydrogely pro analýzu připraveny standardním způsobem dle kapitoly 4.3. Poté byly vzorky skalpelem rovněž rozřezány na 3 stejně velké části a jednotlivě podrobeny sušícím testům. Teplota sušení byla nastavena na 110 °C a hmotnost vzorku byla zaznamenávána v intervalech 30 s. Měření bylo pozastaveno po ustálení hmotností jednotlivých vzorků. Získaná data byla zpracována v programu MS Excel v podobě grafu a výpočtu suchého podílu.

4.5 Difuzní experimenty

Studium transportních vlastností PVA gradientových hydrogelů bylo prováděno pomocí difuzních experimentů, během nichž byla sledována absorpce či uvolňování barviva methylenové modři v hydrogelové matici.

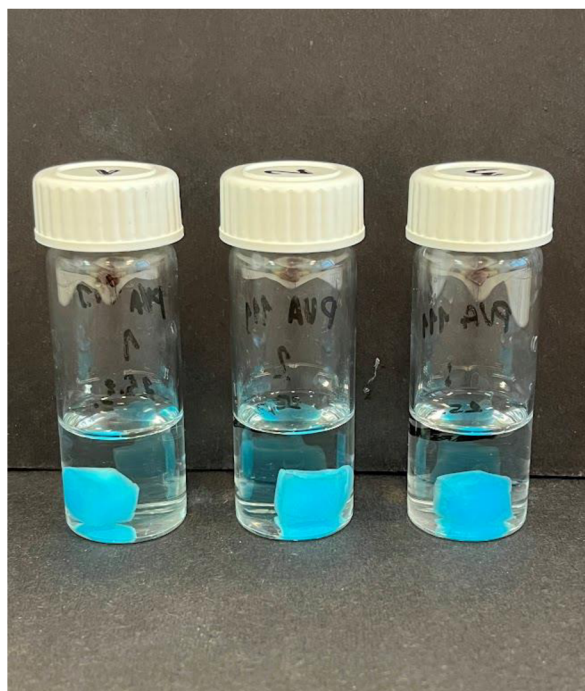
Pro difuzní experimenty byly připraveny 2 sady hydrogelových vzorků. Pro první sadu vzorků, které byly připravovány za účelem studia absorpce barviva z roztoku barviva, byl připraven 5 hm. % roztok PVA stejně, jako je uvedeno v kapitole 4.3 s výjimkou přídavku barviva Rhodaminu 6B. Také cyklické mrazení a tání prekurzorů v kyvetách odpovídalo zmíněnému postupu, kyvety byly v tomto případě ale plněny až po horní okraj. Pro druhou sadu vzorků, u kterých bylo zaznamenáváno uvolňování barviva z hydrogelové sítě, byla pozměněna příprava solu PVA. Změna spočívala v nahrazení čisté deionizované vody roztokem methylenové modři v koncentraci 0,1 g/l. Připravený sol byl stejně jako u přechodného postupu plněn do plastových kyvet až po horní okraj a standardně mražen v 5 cyklech.



Obrázek 7 Hydrogely s obsahem methylenové modři, 57 kDa (vlevo), 111 kDa (vpravo)

Pro studium difuze barviva do struktury hydrogelu byly vybrány hydrogely o 2 molekulových hmotnostech (57 kDa, 111 kDa) a také hydrogely s přidavkem chitosanu (PVA/CH 80/20 obj. %; 60/40 obj. %), jejichž příprava je popsána výše v kapitole 4.3.2. Difúze barviva byla sledována ponořením kyvety s hydrogelem do 20 ml roztoku methylenové modři o koncentraci 0,01 g/l. Prostup barviva do hydrogelu byl sledován ze strany nejvyšší a nejnižší porozity změnou kontaktní strany otočením hydrogelu v kyvetě. Úbytek koncentrace barviva roztoku barviva byl sledován v čase 0; 24; 48; 72 a 96 hodin pomocí UV-VIS spektrometru. Detekce probíhala v rozmezí vlnových délek 400–700 nm s rychlostí skenování 600 nm/min při šířce štěrbinu monochromátoru nastavené na 2 nm. Základní linie (*baseline*) byla stanovena pomocí čisté destilované vody, která byla využita jako referenční vzorek. Získaná data byla zpracována pomocí programu MS Excel.

Druhou část difuzních experimentů tvořily experimenty zaměřeny na uvolňování barviva ze struktury hydrogelu jeho ponořením do ultračisté vody. Pro studium uvolňování barviva ze struktur hydrogelu byly připravené vzorky hydrogelů vytaženy z kyvety a rozřezány na 3 stejně velké části, lišící se mírou sesítnění, o hmotnosti přibližně 1 g. Celkem 6 vzorků rozřezaného hydrogelu bylo ponořeno do 20 ml ultračisté vody a byla pomocí UV-VIS spektrometru byla zaznamenávána změna absorbance roztoku po 30 minutách po dobu 2 hodin. Získaná data byla taktéž zpracována v programu MS Excel.



Obrázek 8 Připravené vzorky pro stanovení transportních vlastností uvolňováním barviva

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato diplomová práce si kladla za cíl optimalizovat přípravu hydrogelů s koncentračním gradientem, a to za využití vybraného polymeru – polyvinyl alkoholu, pomocí metody fyzikálního síťování (cyklické mrazení a tání). Základní charakteristikou takových hydrogelů je změna v alespoň jedné z vlastností napříč hydrogelovou sítí a zároveň absence chemických síťovacích činidel, pro které mohou být gradientové hydrogely největším příslibem, tedy tkáňové inženýrství. Pro přípravu gradientových hydrogelů byla proto v této práci vybrána metoda cyklického mrazení a tání. Během optimalizace přípravy byla pozornost věnována nejen výběru polymeru a jeho molekulové hmotnosti, ale také parametrům spojeným se samotným mrazením/táním, jako je délka obou cyklů či jejich teplota. Tyto parametry významným způsobem ovlivňují finální vlastnosti připravených gradientových hydrogelů.

Pro ověření přítomnosti vytvořené gradientové struktury a charakterizace mechanických vlastností jednotlivých vrstev hydrogelů byly vzorky měřeny pomocí oscilační reometrie, která popisuje jejich viskoelastické chování. Pro doplnění viskoelastických vlastností byla součástí studia hydrogelů data doplněna o studium kinetiky sušení pomocí sušících vah a také snímky z rastrovacího elektronového mikroskopu prokazující gradientovou strukturu. Rovněž bylo součástí diplomové práce také studium transportních vlastností a jejich možného ovlivnění pomocí přítomného koncentračního gradientu. Pro studium transportních vlastností byly využity difuzní experimenty za použití modelového kladně nabitého barviva methylenové modři. Výsledky experimentální části diplomové práce nabízí jeden z možných přístupů k přípravě gradientových hydrogelů a jejich charakterizace a zároveň navrhuje další postupy ve studiu takových materiálů.

5.1 Charakterizace přípravy hydrogelů s gradientem v hustotě sesíťení

Polyvinyl alkohol, jako syntetický semikrystalický polymer, byl na základě literární rešerše vybrán pro přípravu gradientového hydrogelu s hustotou sesíťení pomocí metody cyklického mrazení a tání. Během optimalizace přípravy takového hydrogelu byla pozornost věnována zejména několika faktorům přípravy, které ovlivňují výsledný hydrogel. Mezi tyto faktory patřila délka cyklu mrazení i tání, jejich teplota, počet cyklů a také způsob ponořování květy do mrazicího média během cyklu mrazení.

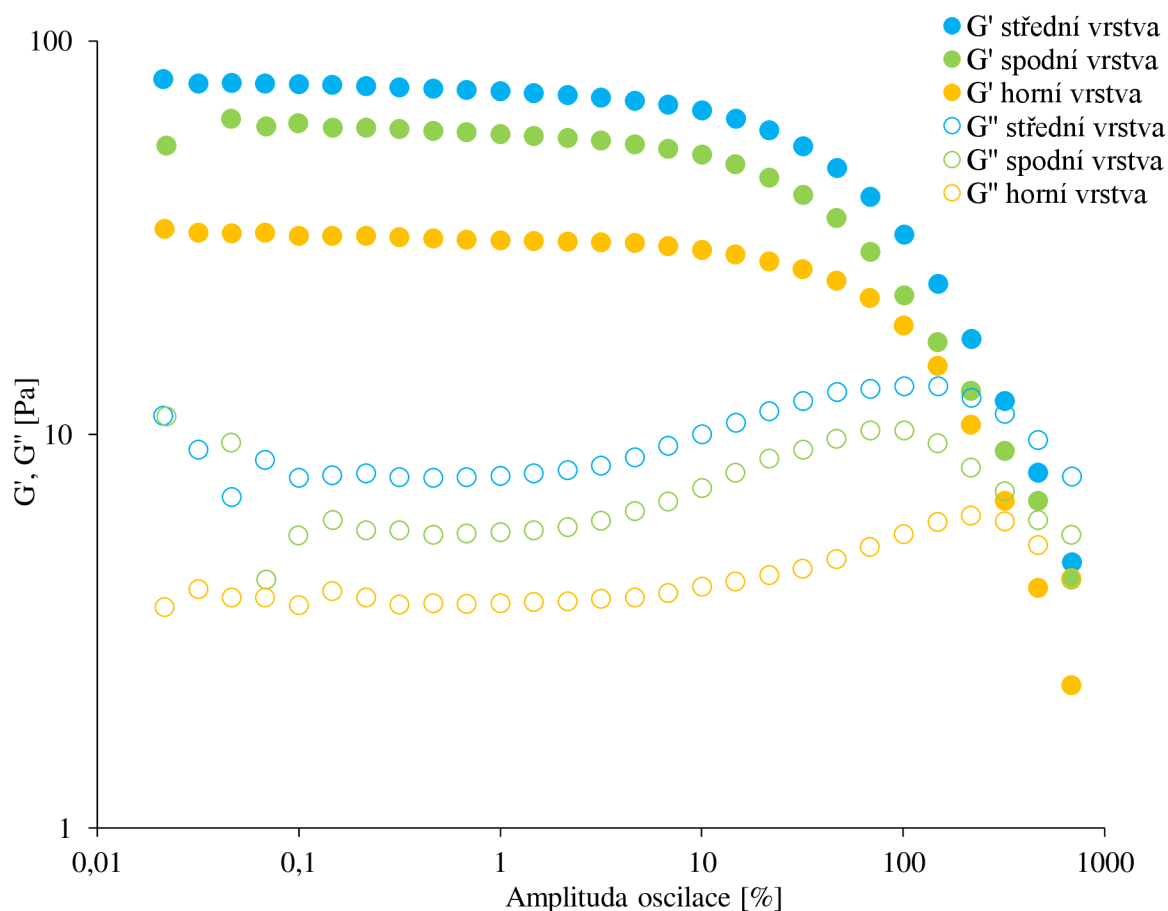
Při výběru hmotnostní koncentrace byla pro následnou přípravu upřednostněna koncentrace 5 hm. %, se kterou se podařilo připravit stabilní hydrogely již při 5 mrazících cyklech. Zároveň nebyly pozorovány rozdíly mezi vytvořenou gradientovou strukturou při využití vyšší molekulové hmotnosti. Z celkově 3 zkoumaných molekulových hmotností PVA (30, 57 a 111 kDa) byly vybrány pouze dvě vyšší hodnoty. Při pokusu o přípravu hydrogelu s nejnižší vybranou molekulovou hmotností PVA prekurzor netvořil žádné nebo pouze nestabilní hydrogelové struktury. Zároveň vybrané molekulové hmotnosti tvoří stále dobrý základ pro studium vlivu tohoto parametru.

Jako nejvhodnější byla zvolena příprava, během které byl sol PVA mrazen pomocí tekutého dusíku v 5 opakujících cyklech, přičemž doba mrazení byla 1 minuta a doba tání 60 minut. Kyveta s prekurzorem hydrogelu byla do mrazícího média ponořena do $\frac{3}{4}$ výšky kyvety a proces tání probíhal střídavě v laboratorní lednici (30 minut) a následně při laboratorní teplotě (30 minut). Vybraná příprava zajistila vznik stabilní hydrogelové gradientové struktury s reprodukovatelnými výsledky. Tato tvrzení byla ověřena pomocí řady vybraných instrumentálních technik, které budou popsány v následujících kapitolách.

5.2 Metody charakterizace gradientových hydrogelů

5.2.1 Reologická měření

Pro prvotní charakterizaci připravených hydrogelů z hlediska jejich viskoelastických vlastností a porovnání mechanické pevnosti jednotlivých částí gradientových hydrogelů byl využit amplitudový oscilační test s řízenou smykovou deformací (*strain sweep*).

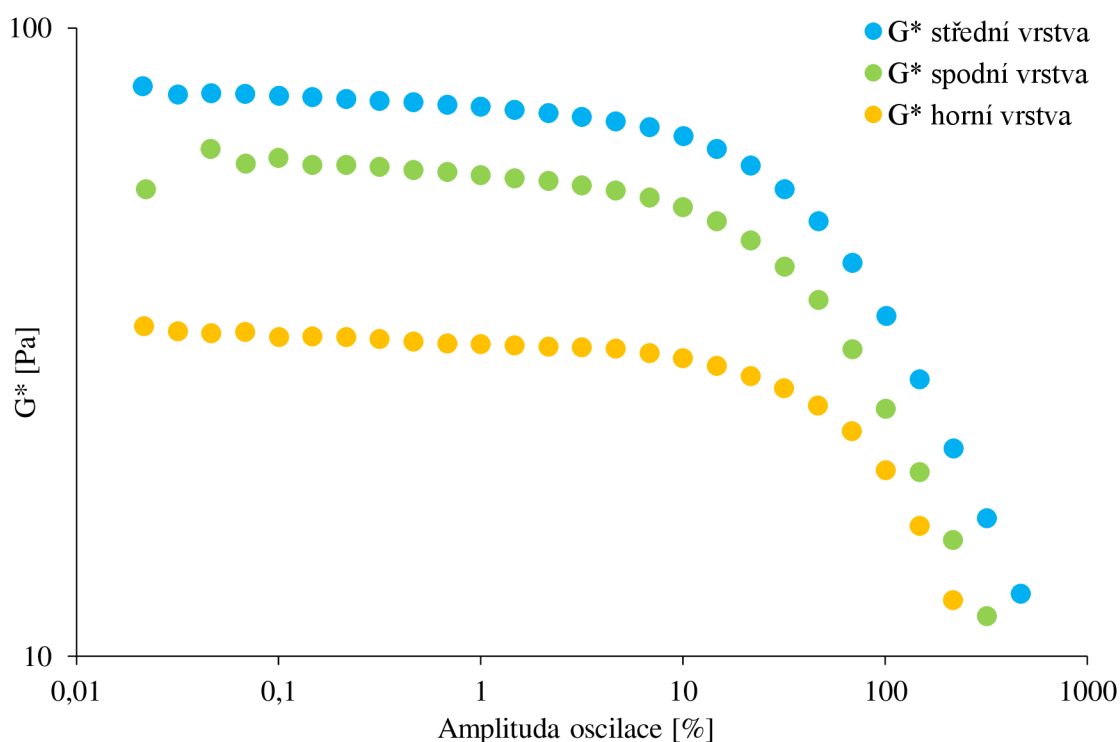


Obrázek 9 Amplitudový oscilační graf PVA gradientového hydrogelu

Výstupem takového měření jsou křivky paměťového (elastického) G' a ztrátového (viskózního) G'' modulu, které svým charakterem vykazují chování typické pro hydrogely. Ty i navzdory vysokému obsahu vody vykazují viskoelastický charakter s převahou elastické složky nad složkou viskózní. Tvar křivek také určuje lineární viskoelastickou oblast (LVO),

kteřá ohraničuje oblast vratné deformace vzorku. Za oblastí LVO pozorujeme překřížení elastického a viskózního modulu, tzv. bod toku (z ang. *flow point*), za kterou dochází k výraznému poklesu elastického a viskózního modulu a struktura hydrogelu je nenávratně poškozena.

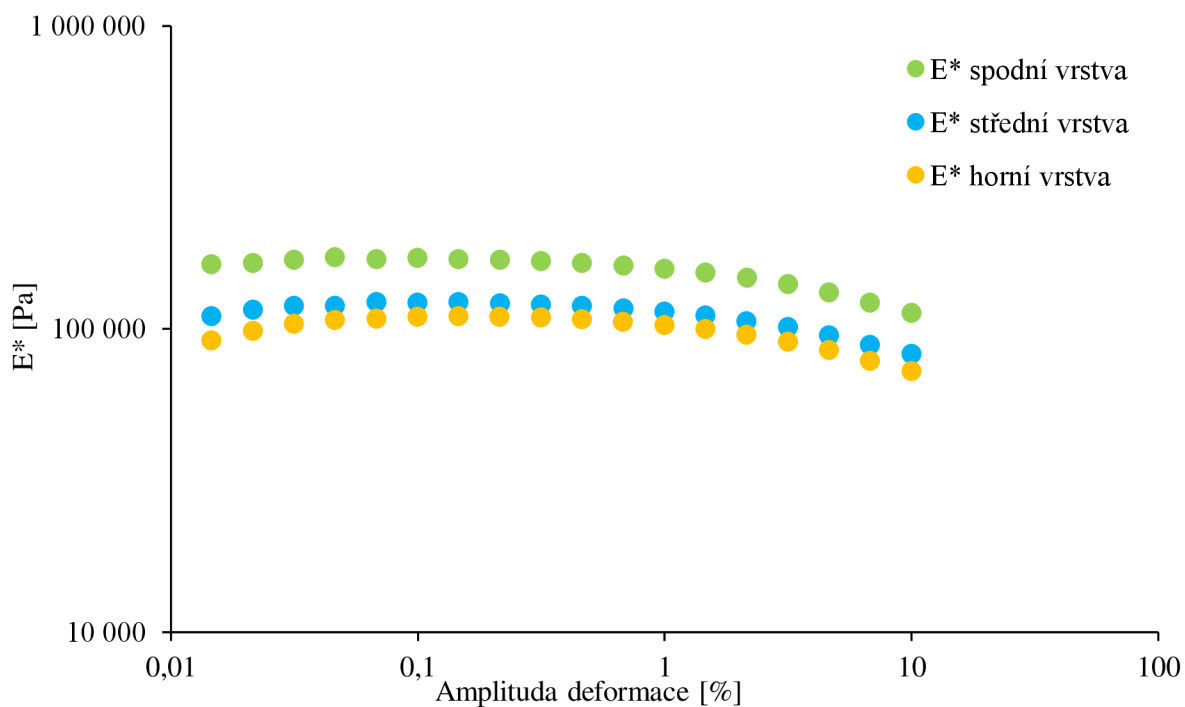
U gradientových hydrogelů může být amplitudového testu využito pro charakterizaci mechanické pevnosti jednotlivých částí gradientového hydrogelu. Základní hypotézou je poté navyšování viskoelastických modulů s vyšší hustotou sesítění. Pro porovnání byly proto pro jednotlivé vrstvy spočítány (rovnice (2)) hodnoty komplexního modulu G^* , který charakterizuje celkovou rigiditu a deformační závislost materiálu. Výsledky komplexního modulu v závislosti na míře deformace pro gradientový hydrogel o molekulové hmotnosti 57 kDa znázorňuje Obrázek 10. Jak je na první pohled patrné, hodnoty komplexního modulu střední vrstvy hydrogelu převyšují hodnoty vrstvy spodní, což je v rozporu s původní hypotézou. I po změnách parametrů při postupu byly tyto výsledky neměnné, a proto byl amplitudový oscilační test shledán jako nevhodný pro charakterizaci tohoto typu hydrogelu.



Obrázek 10 Amplitudový oscilační test PVA gradientového hydrogelu (57 kDa)

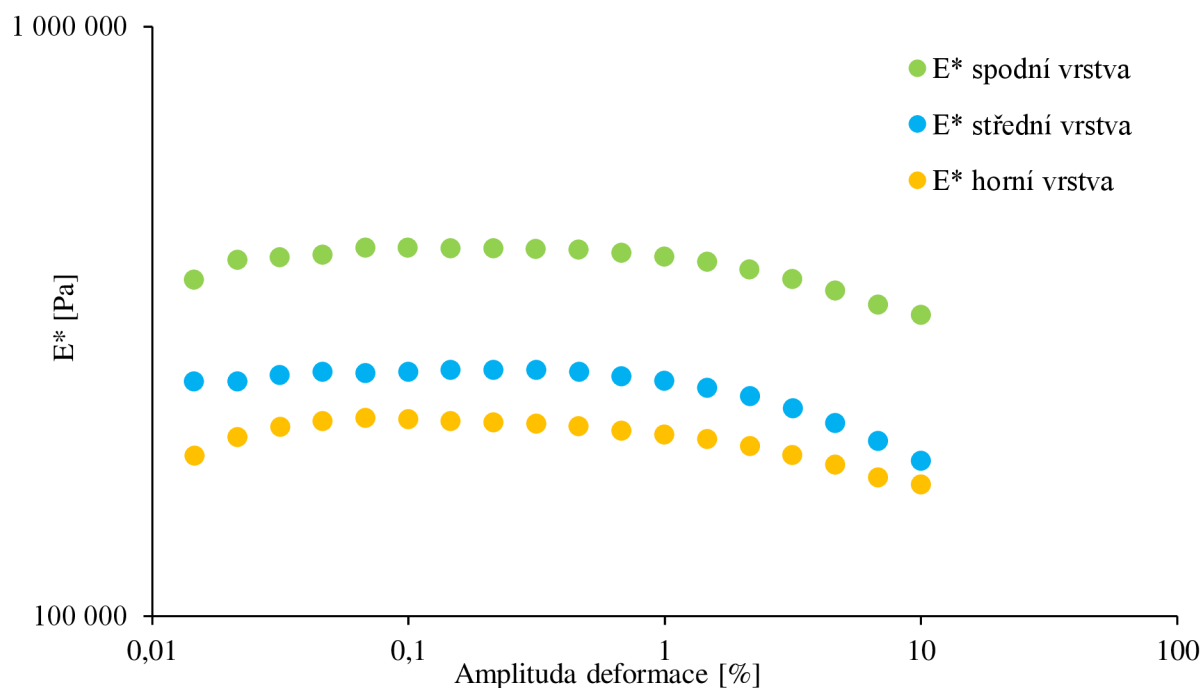
Po literární rešerši řady vědeckých publikací [57], [58], [62], které se charakterizaci mechanických vlastností gradientových hydrogelů věnují, byl vybrán axiální oscilační test (DMA) jako nový způsob charakterizace vrstev hydrogelu. Na rozdíl od amplitudových testů dochází při axiálním pohybu horního měřicího senzoru k cyklickému stlačování vzorku. Pohyb senzoru tak kopíruje směr nárůstu krystalitů (uspořádané vrstevnaté struktury náhodně

rozptýlené v neuspořádané amorfnní polymerní matriční [78]), které v prekurzoru vznikají vlivem cyklického mrazení a tání.



Obrázek 11 Axiální oscilační test PVA gradientového hydrogelu (57 kDa)

Vybraný graf axiálního oscilačního testu (Obrázek 11), měřený pro hydrogel připravený s polymerem o molekulové hmotnosti 57 kDa, již znázorňuje očekávaný pokles viskoelastických modulů. Nejvyšší hodnota komplexního modulu náleží spodní části hydrogelu, jakožto části s nejvyšší hustotou sesítění. S vyšší polohou částí gelu v hydrogelu dochází ke ztrátě mechanické pevnosti a poklesu hodnot viskoelastických modulů. Tento výsledek naznačuje možnost dosažení změny viskoelastických vlastností napříč gradientovým hydrogalem pomocí cíleného kontaktu s mrazícím médiem.

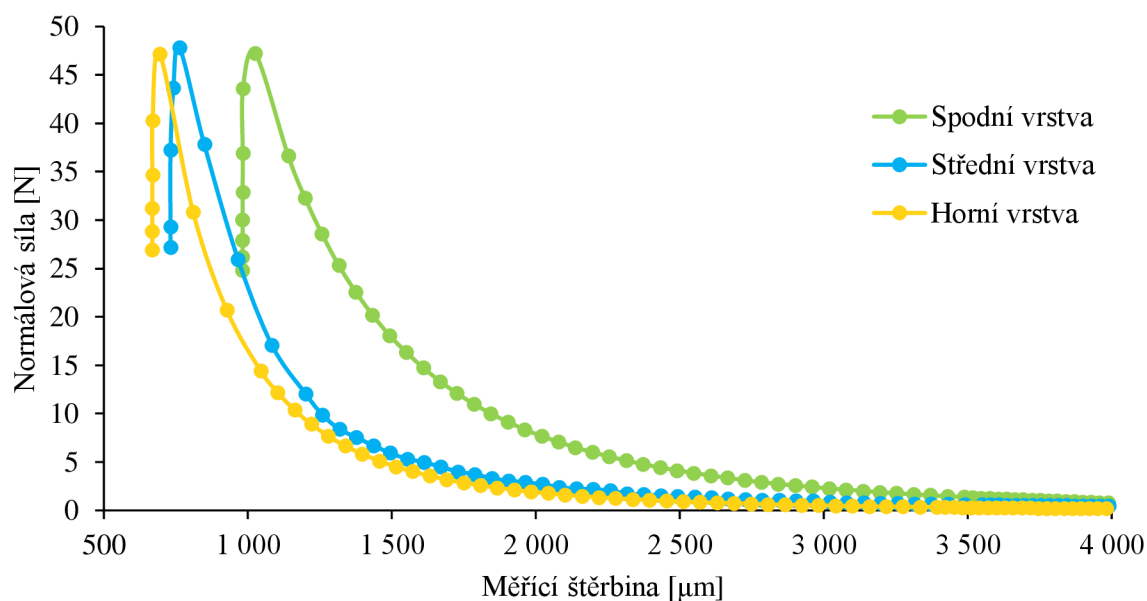


Obrázek 12 Axiální oscilační test PVA gradientového hydrogelu (111 kDa)

Protože byla všechna potvrzující měření prováděna pro 2 molekulové hmotnosti polymeru PVA, Obrázek 12 nabízí výsledek stejného axiálního oscilačního testu pro hydrogel s vyšší molekulovou hmotností (111 kDa). Stejně jako u předchozího vzorku i zde dochází k pozorovatelnému snižování komplexního modulu E^* , což potvrzuje pokles hustoty uzlů v hydrogelové síti.

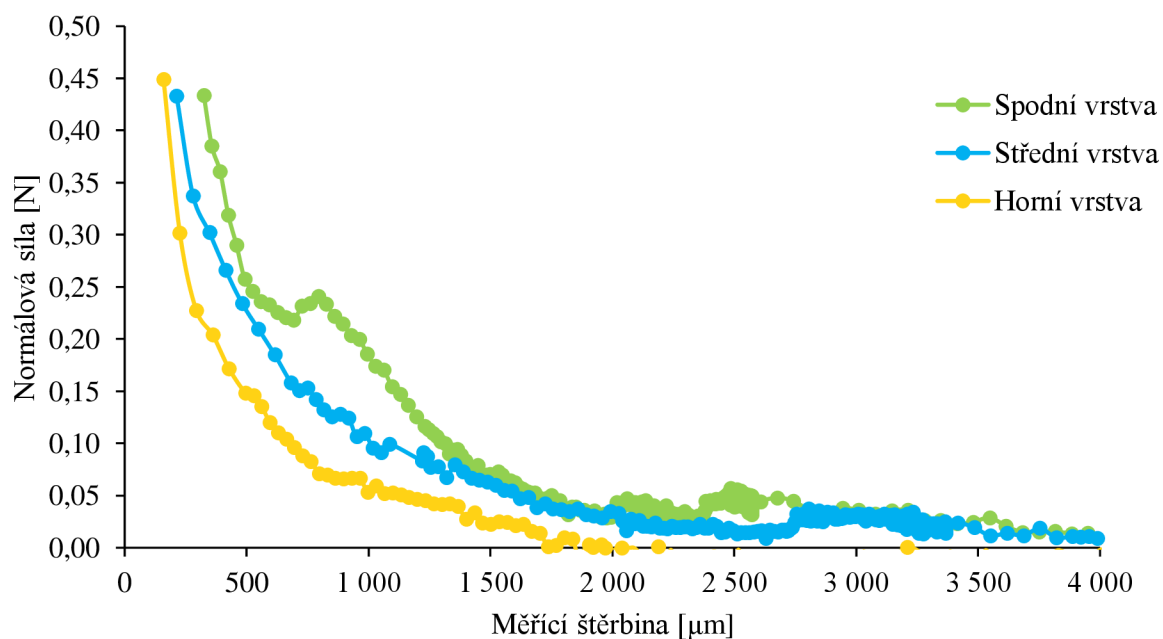
Pokud výsledky těchto měření porovnáme, můžeme pozorovat stejný průběh odezvy na vnější axiální deformaci, hodnoty viskoelastických modulů se však zásadně liší. U hydrogelu s téměř o polovinu nižší molekulovou hmotností došlo k výraznému poklesu pevnosti a hodnota komplexního modulu se snížila o téměř 250 000 Pa. Obecně proto můžeme říci, že mechanické vlastnosti hydrogelů mohou být cíleně modifikovány pomocí molekulové hmotnosti využitého polymeru.

Pro potvrzení výsledků získaných pomocí axiálního oscilačního testu (DMA) byl vybrán také druhý zástupce axiálních testů – test kompresní. Při tomto typu měření je analyzovaný vzorek konstantní rychlostí stlačován horní pohyblivou deskou, přičemž je přístrojem zaznamenávána odezva vzorku změnou normálové síly, která je pro jeho stlačení nutná vykonat. Při srovnání jednotlivých vrstev gradientových hydrogelů je poté jejich měnící se struktura možná sledovat změnou strmosti naměřených křivek. Příkladem může být přiložený Obrázek 13, který znázorňuje odezvu normálové síly s měnící se měřící šterbinou. Zatímco maximální naměřená normálová síla (50 μm) byla u spodní, nejméně pórovité, vrstvy hydrogelu vyvinuta při pracovní šterbině 1000 μm , stejná normálová síla byla u horní vrstvy gelu vyvinuta až při šterbině 700 μm . Tyto data potvrzují hypotézu větší mechanické odolnosti u spodních vrstev hydrogelů s vyšší hustotou síťování.



Obrázek 13 Grafická závislost pracovní štěrby na normálové síle pro vrstvy gradientového hydrogelu (111 kDa)

Stejně jako u předchozí analýzy nabízí Obrázek 14 zajímavé srovnání při využití polymeru s nižší hodnotou molekulové hmotnosti. I přesto, že tvar křivek kopíruje předchozí grafickou závislost, maximální vyvinutá axiální síla je v tomto případě až o 2 řády nižší. To znamená, že měřící geometrie vyvinula o 2 řády nižší normálovou sílu při stejné míře stlačení.



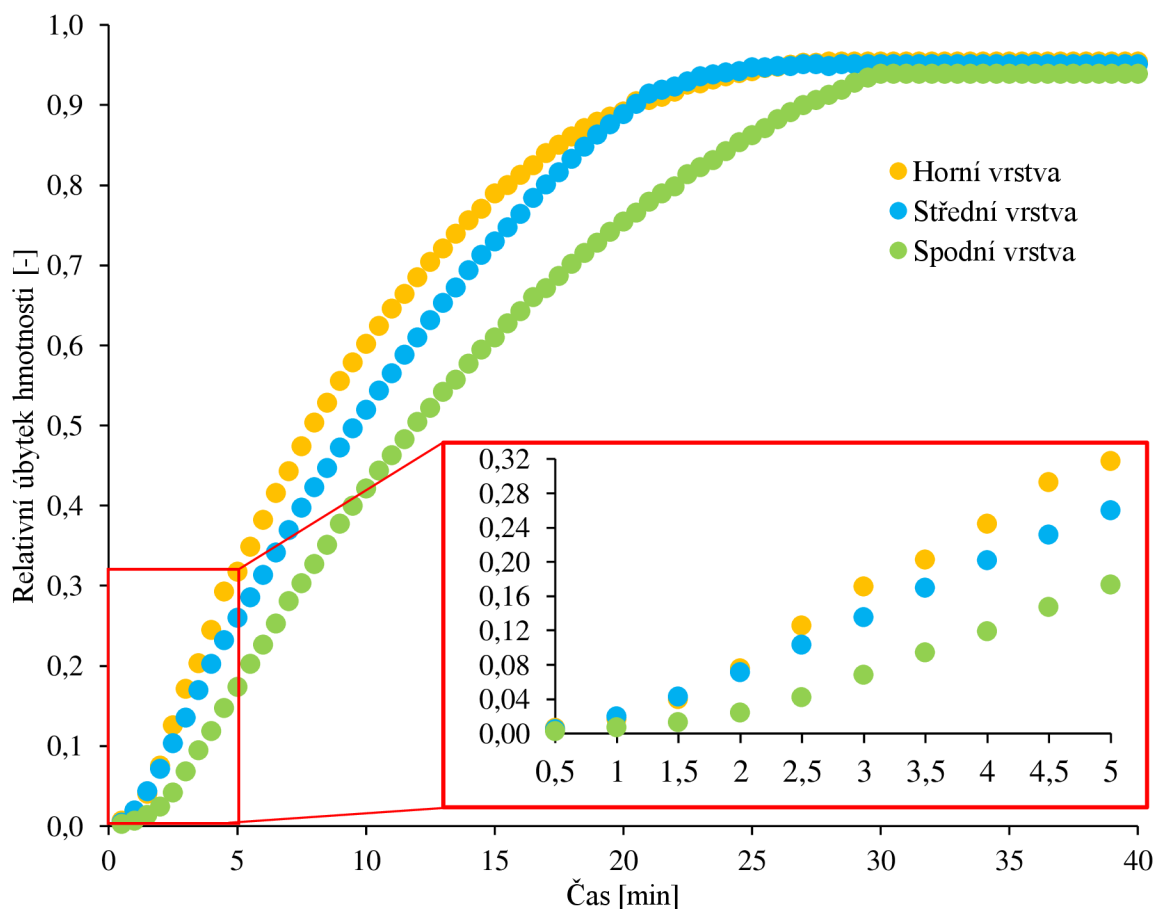
Obrázek 14 Grafická závislost pracovní štěrby na normálové síle pro vrstvy gradientového hydrogelu (57 kDa)

5.2.2 Sušící váhy

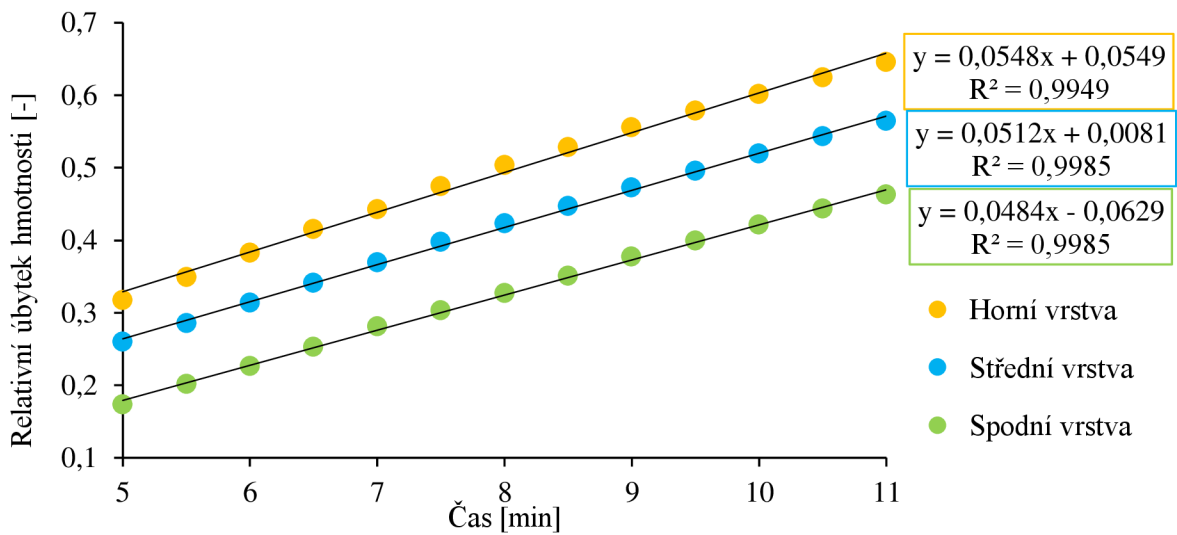
Druhá vybraná technika prokazující přítomnost gradientové struktury byla realizována pomocí sušících vah. Cílem tohoto experimentu bylo srovnání rychlosti úbytku hmotnosti za dané

teploty a určení konečného pevného podílu jednotlivých částí hydrogelu. Motivací byl předpoklad nejen různých hodnot pevných podílů, ale také rozdílných rychlostí odpařování disperzního prostředí.

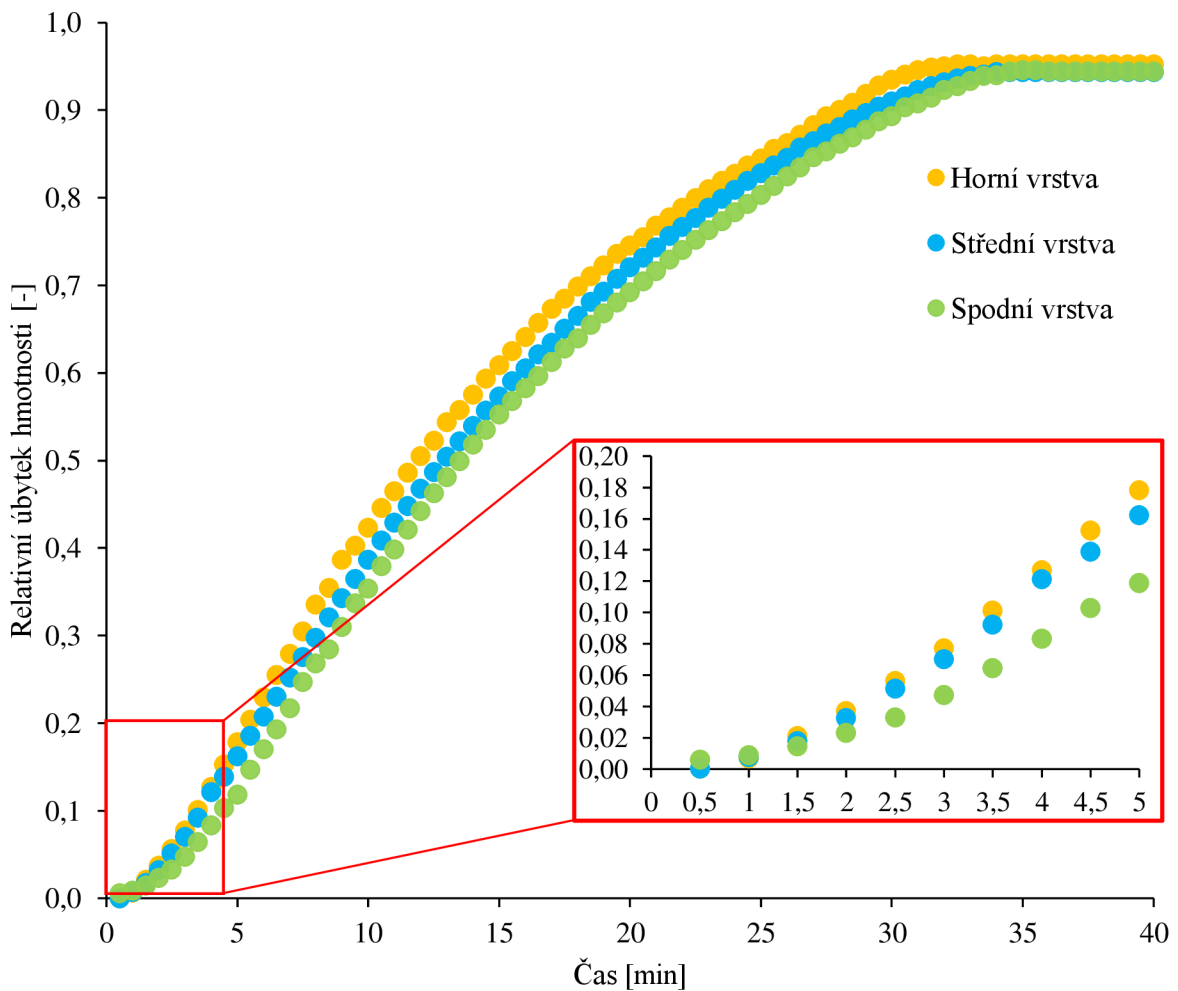
Připravené hydrogely byly sušeny při teplotě 110 °C, dokud nedošlo k ustálení hmotnosti vzorku, tedy nejméně 30 minut. Výsledky sušících experimentů znázorňují tzv. termogravimetrické křivky (Obrázek 15 a Obrázek 17) popisující relativní úbytek hmotnosti jednotlivých vrstev, který odpovídá ztrátě disperzního prostředí v čase. Pro lepší přehlednost jsou termogravimetrické křivky znázorněny na Obrázek 16 a Obrázek 18 ve zúženém časovém intervalu (5-11 minut). Z přiložených grafů vyplývá, že existuje závislost mezi stupněm sesítení a rychlostí odpařování disperzního prostředí. V prvních 5 minutách pozorujeme rychlý pokles hmotnosti všech vzorků, který je způsoben šokovým ohřevem vzorku, což vedlo k uvolnění volně vázaného disperzního prostředí (vody). U horních vrstev, tedy těch s nejmenší hustotou síťování, pak docházelo k rychlejšímu uvolňování disperzního prostředí. Naopak spodní část hydrogelu, která má největší hustotu síťování polymerní sítě, vykazuje úbytek hmotnosti nejpomalejší. Rozdílnou odezvu můžeme pozorovat také při porovnání hydrogelů o 2 studovaných molekulových hmotnostech. Hydrogel tvořený polymerem s nižší molekulovou hmotností uvolňuje vodu z hydrogelové matrice rychleji a dochází také k dřívějšímu ustálení jeho hmotnosti.



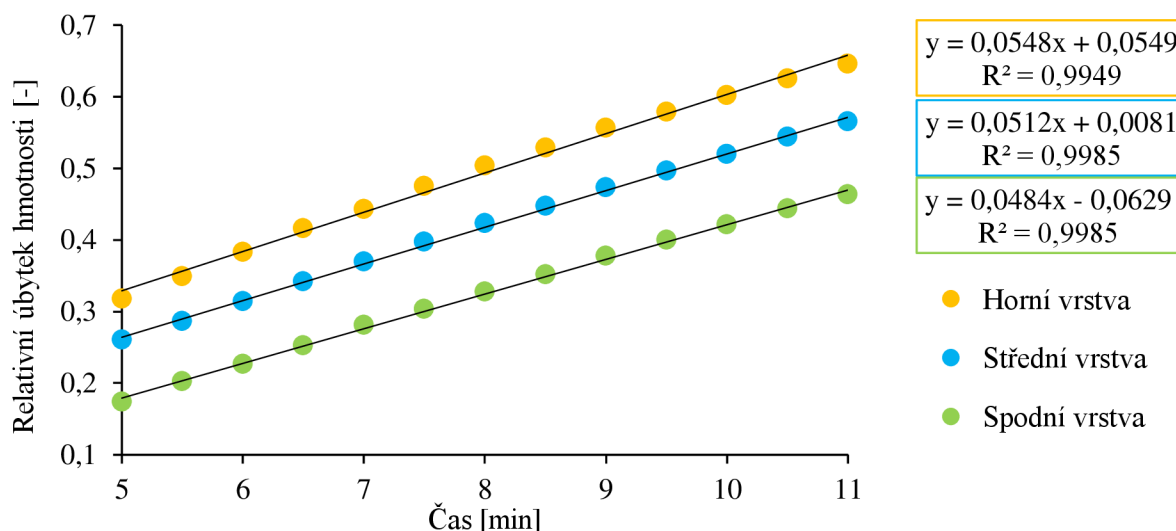
Obrázek 15 Křivky závislosti relativního úbytku hmotnosti na čase (57 kDa)



Obrázek 16 Sušící křivky pro vybraný časový úsek 5–11 minut (57 kDa)



Obrázek 17 Křivky závislosti relativního úbytku hmotnosti na čase (111 kDa)



Obrázek 18 Sušící křivky pro vybraný časový úsek 5–11 minut (111 kDa)

Bez ohledu na zvolenou molekulovou hmotnost lze posouzením směrnice jednotlivých křivek pozorovat pouze malé rozdíly. Ze získaných výsledků lze tedy obecně označit míru zadržení vodného prostředí PVA hydrogelů i se změnou v molekulové hmotnosti za podobné.

Výsledky sušících křivek jsou doplněny o procentuální hodnotu suchého podílu pro každou z rozřezaných částí gelu (Tabulka 1). I přes rozdílné molekulové hmotnosti i hodnoty pevných podílů naznačují zvyšující se hustotu polymerní sítě s nižší polohou vrstvy v hydrogelu. U obou vzorků došlo k částečné odchylce od očekávané hodnoty suchého podílu dle přípravy (5 hm. %). Vzniklé odchylky mohly být způsobeny přítomností pevně vázané vody, pro jejíž odpaření by bylo nutné zvýšit teplotu sušení.

Tabulka 1 Hodnoty procentuálního obsahu pevného podílu ve studovaných hydrogelech

	57 kDa	111 kDa
Spodní vrstva	6,14 %	8,47 %
Střední vrstva	4,94 %	6,56 %
Horní vrstva	4,59 %	6,25 %

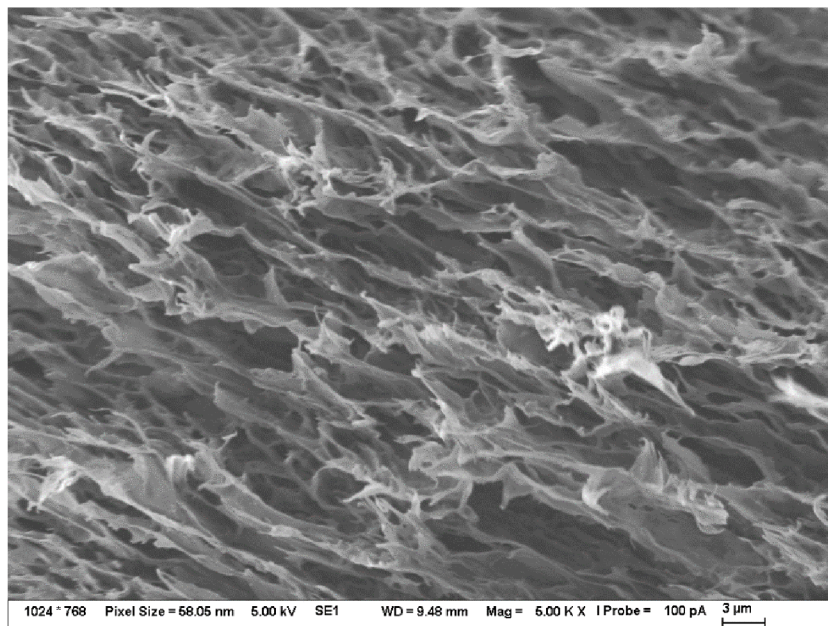
5.2.3 Rastrovací elektronová mikroskopie

Pro studium morfologických vlastností a struktury hydrogelové sítě byla využita metoda rastrovací elektronová mikroskopie. Díky této technice je možné odhalit, na kolik je struktura porovnávaných vzorků odlišná a napomáhá při charakterizaci jednotlivých vrstev gradientové struktury hydrogelu. Pro potřeby této diplomové práce byly vybrány vzorky hydrogelů o molekulové hmotnosti 111 kDa. Připravený gel byl rozřezán na 3 stejně velké části, které byly převedeny do formy xerogelu (postup popsán v kapitole 4.4.2) a dále lyofilizovány. Aby bylo možné pořídit fotografii v dostatečném rozlišení a byla zajištěna nezbytná vodivost

vzorků, lyofilizované vzorky byly také pomocí vakuové naprašovačky pokryty tenkou vrstvou zlata.

Struktury jednotlivých vrstev a rozdíly mezi nimi jsou zachyceny na Obrázek 21. Již na první pohled je viditelná kompaktní porézní struktura s různou velikostí pórů. Rozdíly v morfologii jednotlivých vrstev je možné pozorovat pro všechna využitá přiblížení, nejlépe však odlišnosti struktur znázorňují fotografie s přiblížením 2000x. Hydrogelová síť vykazuje charakter gradientu se snižující se velikostí póru při nižší poloze vrstvy v hydrogelu. Tento fakt naznačuje, že čím intenzivnější kontakt má prekurzor polymeru s mrazícím médiem, tím více jsou k sobě jednotlivé polymerní řetězce natlačovány narůstajícími krystaly pevné fáze rozpouštědla. Pořízené snímky doplňují reologická a sušící měření potvrzující vznik gradientové struktury s hustotou sesítnění.

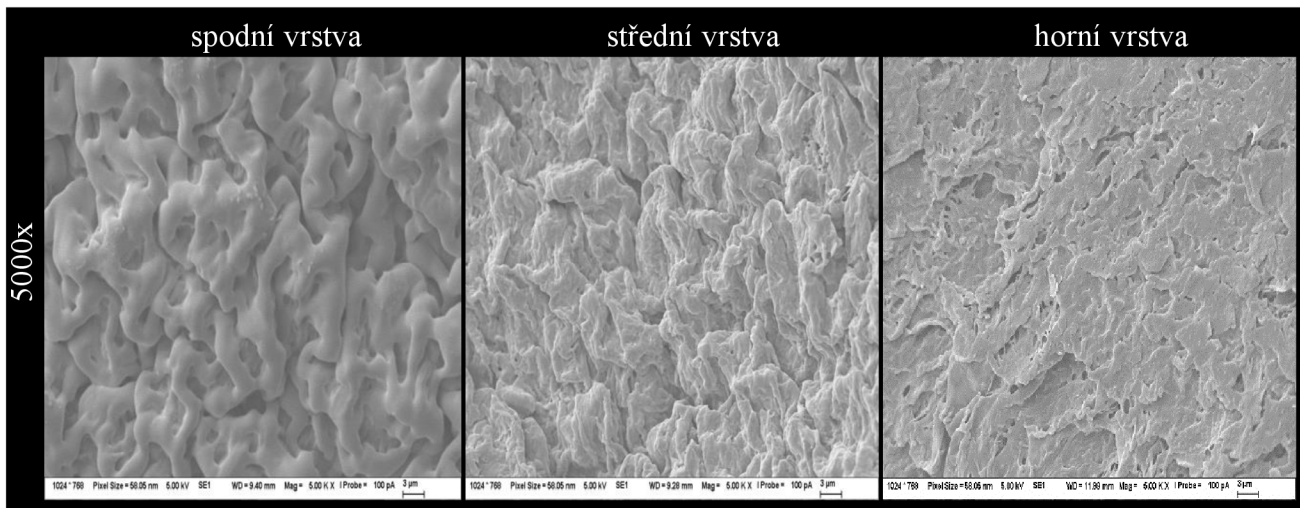
Ačkoliv je metoda SEM často využívána pro charakterizaci hydrogelů, je nutné při vyhodnocování výsledků brát zřetel na její omezení. Na výslednou podobu polymerní sítě a velikosti pórů má totiž značný vliv příprava vzorků, která zahrnuje skokovou změnu teploty vzorků o malém objemu. Během lyofilizace dochází v hydrogelu ke vzniku krystalků ledu, které mohou hydrogelovou síť narušovat a vést ke vzniku kryoartefaktů, viz Obrázek 19. Vzhledem k uvedeným důvodům není metoda vhodná pro měření velikosti jednotlivých pórů, může být však užitečná pro srovnání struktury vzorků s rozdílnými parametry přípravy.



Obrázek 19 Fotografie zhroutené hydrogelové struktury, přiblížení 5000x

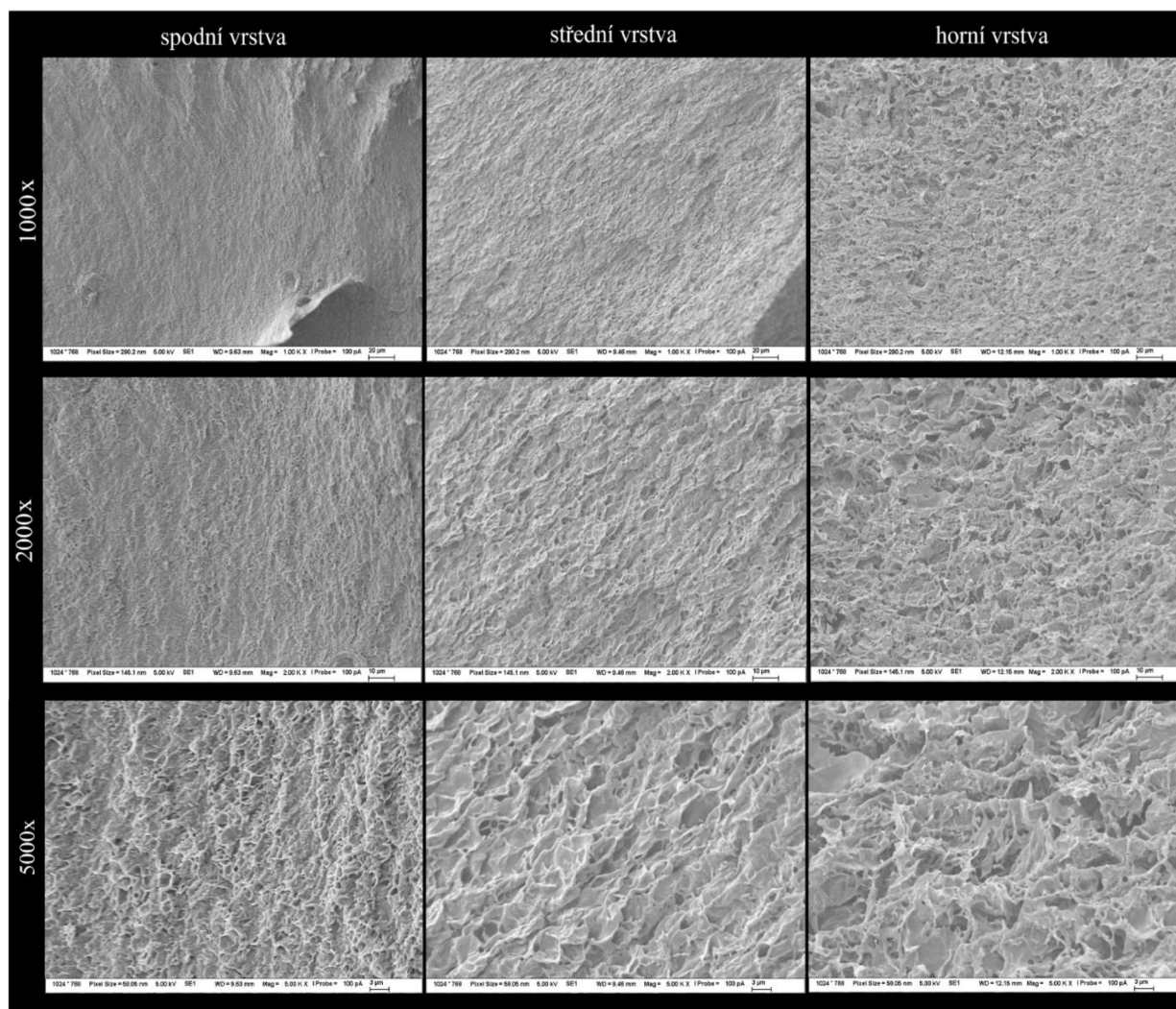
Mimo vnitřní strukturu hydrogelu, jejíž zobrazení bylo hlavní motivací pro pozorování pomocí SEM, byly pořízeny také snímky povrchu vzorků. Porovnání jednotlivých povrchů spodní, střední a horní části, které znázorňuje Obrázek 20, může nabídnout také další zajímavý vhled do rozdílu jednotlivých vrstev. Ačkoliv i v tomto případě budou povrchy vzorků částečně poškozeny, můžeme pozorovat trend snižující se uspořádanosti mikrostruktury. Jak je vidět na

Obrázek 19, nejvíce uspořádanou a ucelenou strukturu má spodní část hydrogelu, která má nejhustější síť gelotvorné složky (polymerní síť). Naopak je tomu u horní části hydrogelu, u které nepozorujeme žádné pravidelné struktury či vlákna typická pro PVA hydrogely. Můžeme se tedy domnívat, že hustě sesítěná oblast s malými póry dokázala nárůst krystalů zbrzdit a mikrostruktura nemusela být znatelně narušena.



Obrázek 20 Snímky povrchu PVA gradientového hydrogelu s přiblížením 5000x z rastrovacího elektronového mikroskopu (111 kDa)

I přesto, že je pomocí metody rastrovací elektronové mikroskopie možné sledovat rozdíly ve strukturních vlastnostech jednotlivých vzorků, pro další měření by bylo vhodné tuto metodu doplnit o jiné analyzační techniky jako např. mikroskopii atomárních sil. Výhodou mikroskopie atomárních sil je nejenom možnost snímat vyšší množství vzorků v jejich nativním stavu při atmosferickém tlaku. Mikroskopie atomárních sil umožňuje kromě studia topografie také analýzu jiných fyzikálních vlastností (např. elastický modul, adhezi, povrchový náboj,...) v reálném čase [79].



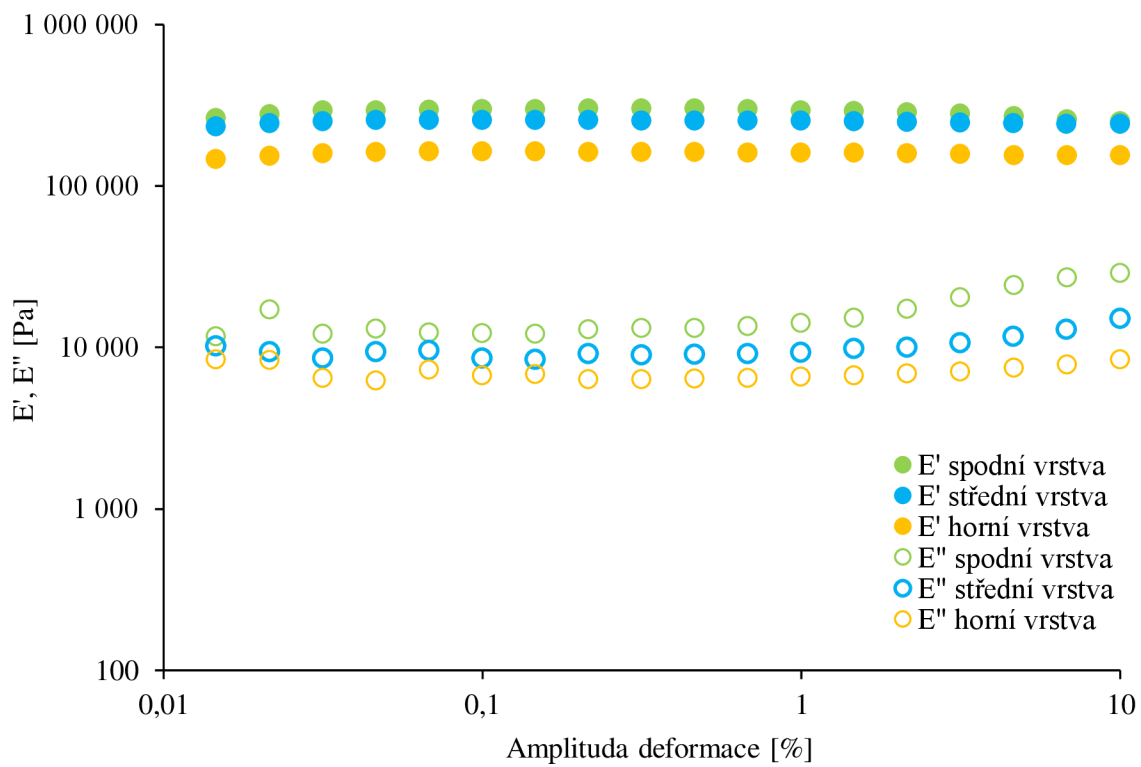
Obrázek 21 Snímky jednotlivých částí gradientového hydrogelu s různým přiblížením z rastrovacího elektronového mikroskopu (111 kDa)

5.3 Vliv přídavku biopolymeru na výsledné mechanické vlastnosti

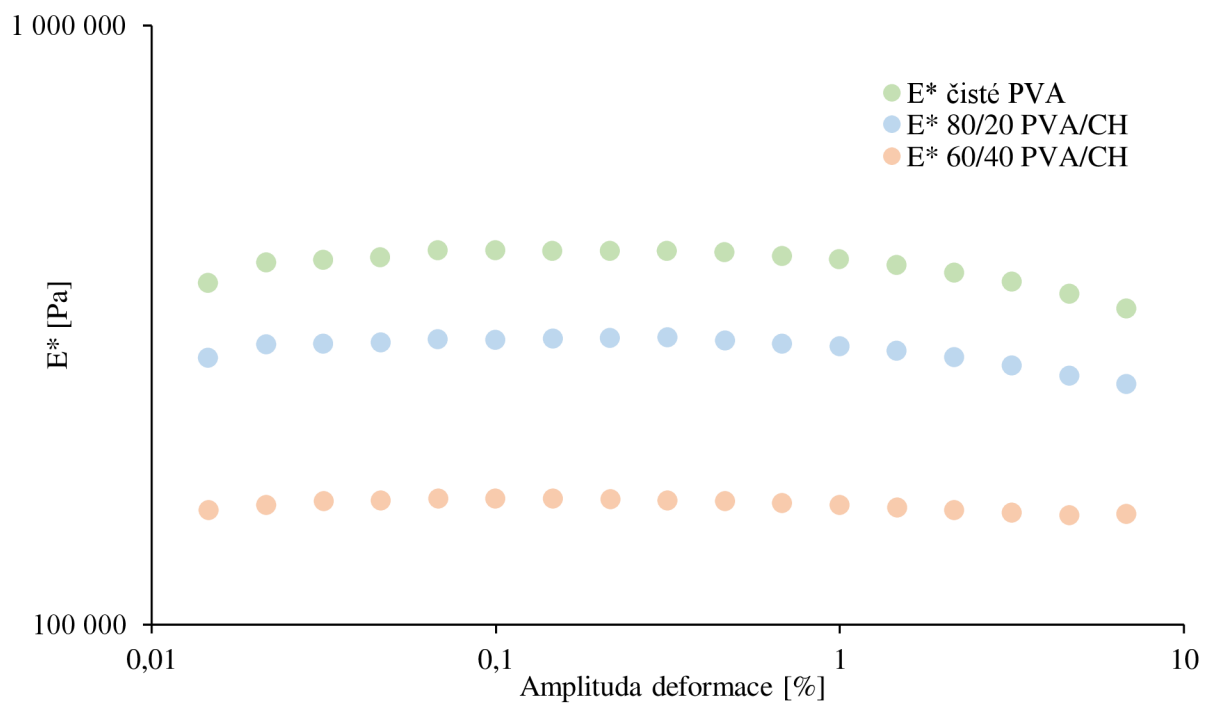
Během optimalizace přípravy gradientových hydrogelů byl jako další proměnný parametr přípravy vybrán také přídavek vhodných aditiv v podobě polysacharidů, který by stejně jako ostatní parametry mohl být využit pro možnou modifikaci mechanických i transportních vlastností. Pro tyto účely byly vybrány gradientové hydrogely s molekulovou hmotností 111 kDa, u kterých mohla být sledována výraznější změna v mechanických a následně i transportních vlastnostech. Při výběru modifikátorů byla pozornost zaměřena zejména na chitosan, jehož výhodné vlastnosti jako biokompatibilita nebo antimikrobiální účinky mohou zlepšit aplikační využití syntetických polymerů jako je polyvinyl alkohol [76], [77].

Příprava hydrogelů s přídavkem polysacharidů probíhala dle postupu popsaného v kapitole 4.3.2. Takto připravené vzorky byly poté rozřezány na 3 stejně velké části, které byly jednotlivě proměřeny pomocí axiálního oscilačního testu (DMA), který byl ověřen pro studium mechanických vlastností PVA gradientových hydrogelů včetně porovnání jednotlivých vrstev. Semi-IPN hydrogely stejně jako nemodifikované gradientové hydrogely vykazují viskoelastický charakter chování (Obrázek 22). Tomu napovídá tvar křivek viskoelastických modulů s převahou elastické složky nad viskózní. Vzhledem k nemožnosti nastavení vyšších hodnot amplitudy deformace pro vybraný test nepozorujeme bod toku (*z ang. flow point*), při němž by došlo k trvalé deformaci hydrogelu. Můžeme však vidět, že při vyšších mírách začíná docházet k poklesu viskoelastických modulů a stejně jako u PVA hydrogelů bez přídavku hydrogelu by při zvyšování smykového napětí k trvalému poškození došlo.

Za předpokladu, že vrstvy mezi jednotlivými hydrogely nabývají podobných rozdílů v hodnotách viskoelastických modulů, můžeme hydrogely s různým přídavkem biopolymeru porovnávat dle komplexních modulů jejich spodních částí. Obrázek 22 srovnává spodní části hydrogelů s obsahem 0, 20 a 40 obj. % chitosanu. Obecně můžeme sledovat pokles komplexního modulu se zvyšujícím se obsahem chitosanu. Tento jev může být vysvětlen snižováním stupně krystalinity PVA s vyšším obsahem chitosanu. Dalším vysvětlením může být tendence chitosanu, jakožto kladně nabitého polysacharidu, vázat se na polymerní řetězec PVA a zabraňovat tak tvorbě slabých vazebných interakcí, které pomáhají zvyšovat pevnost hydrogelu. Nižší schopnost odolávat mechanické deformaci může být způsobena méně uspořádanou a více pórovitou strukturou jednotlivých polymerních řetězců, které se poté vlivem působícího smykového napětí rychleji poškodí. Spojení syntetického a přírodního polymeru s laditelnými mechanickými vlastnostmi nabízí široké spektrum možností např. pro tkáňové inženýrství [76], [77].



Obrázek 22 Vybraný axiální oscilační test PVA/CH 80/20 obj. % gradientového hydrogelu



Obrázek 23 Srovnání komplexních modulů spodních vrstev hydrogelů s různými přídávky chitosanu

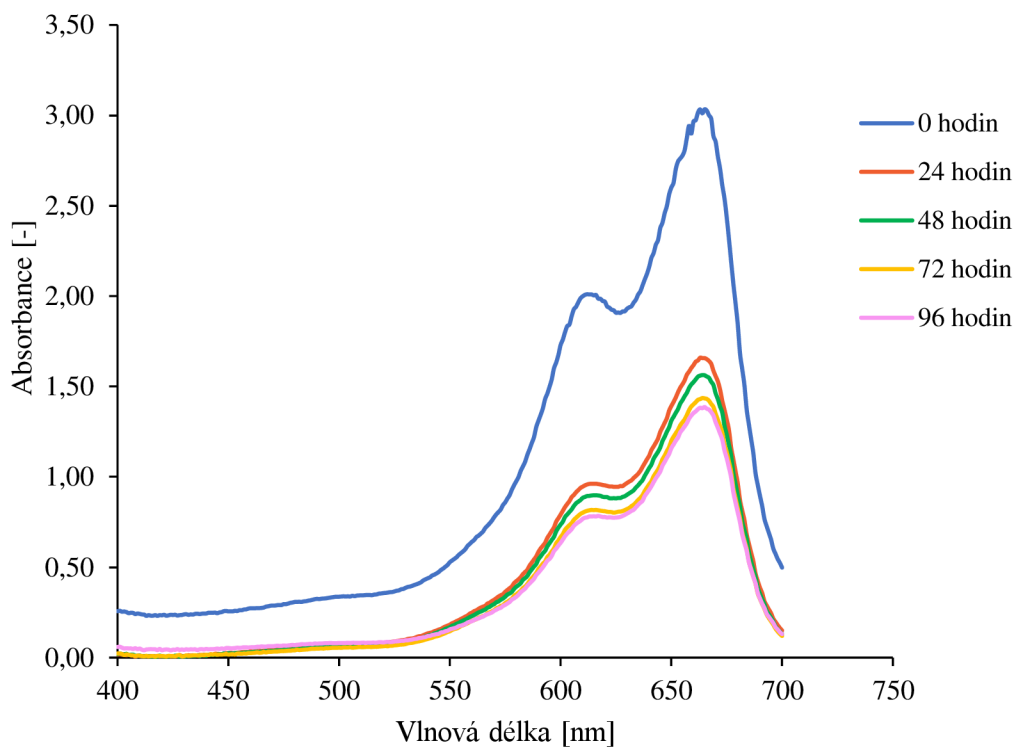
5.4 Difuzní experimenty

Finální částí této diplomové práce bylo studium transportních vlastností gradientových hydrogelů pomocí difuzních experimentů. Primární ambicí bylo zjistit možnost ovlivnění transportních vlastností gradientových hydrogelů, jejichž finální kompozice byla optimalizována na začátku experimentální části. Pro sledování transportu byla vybrána hydrofilní modelová sonda v podobě kladně nabitého organického barviva (methylenová modř). Průběh transportních experimentů byl zkoumán jak vizuálně, tak i za využití UV-VIS spektrometrie. Pro získání ucelené představy o transportních vlastnostech PVA hydrogelů byla sledována jak difúze molekul barviva do hydrogelové matrice, tak jeho uvolňování do prostředí destilované vody. Difuzním experimentům byly podrobeny také hydrogely s inkorporovanou biopolymerní složkou, která by mohla výsledné transportní vlastnosti taktéž ovlivnit.

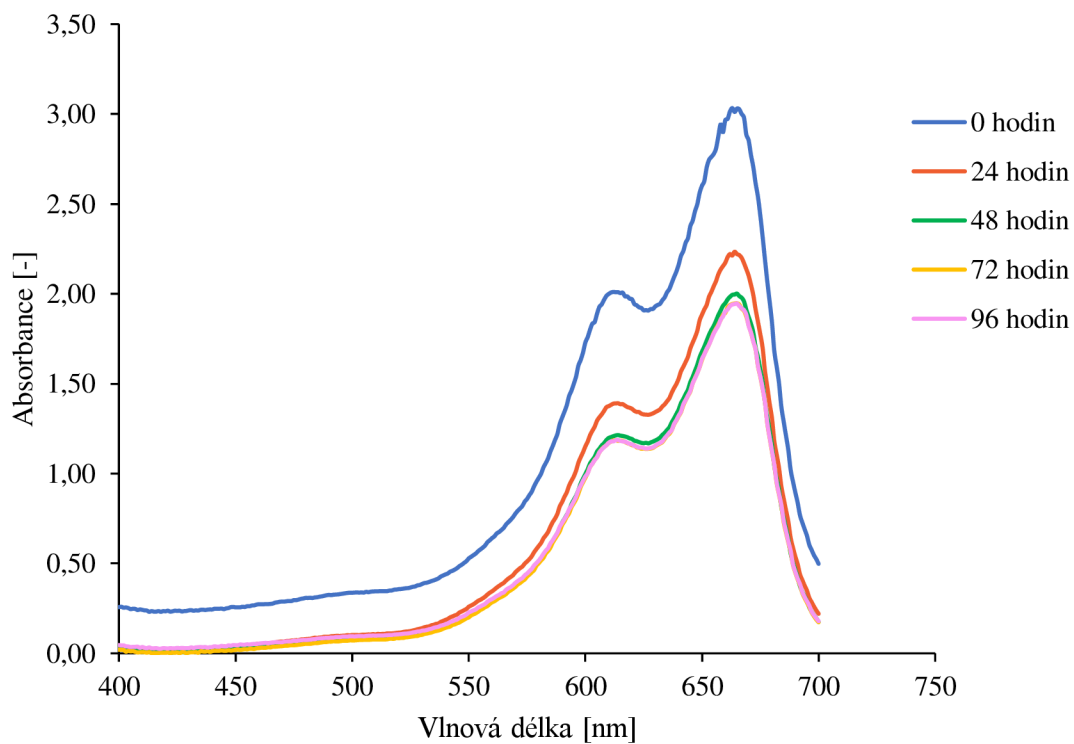
5.4.1 Studium absorpce barviva do struktury hydrogelu

Transportní vlastnosti hydrogelů byly nejprve porovnávány na základě absorpce barviva do struktury hydrogelů. Konkrétní popis postupu přípravy hydrogelů i samostatných experimentů je detailně popsán v kapitole 4.5.

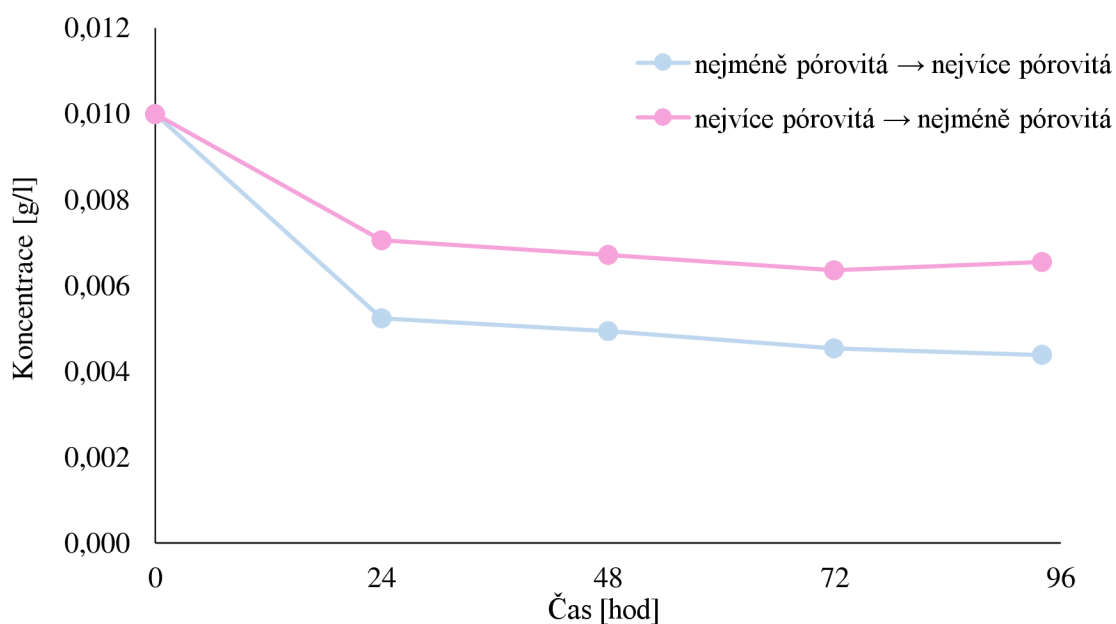
Prvním transportním experimentem bylo studium vlivu hustoty sesíťení na difuzi barviva do struktury hydrogelu. Pro tyto účely byly 2 vzorky připraveného vysokomolekulárního hydrogelu (111 kDa) vyjmuty z původních kyvet a vloženy do kyvet nových tak, aby vrchní kontaktní vrstva byla tvořena nejméně či nejvíce zesíťovanou částí gelu. Úbytek koncentrace roztoku barviva byl vyhodnocován změnou absorpčních spekter získaných grafů zpracovaných v programu MS Excel.



Obrázek 24 Absorpční spektrum PVA hydrogelu (111 kDa) s kontaktní nejméně pórovitou vrstvou

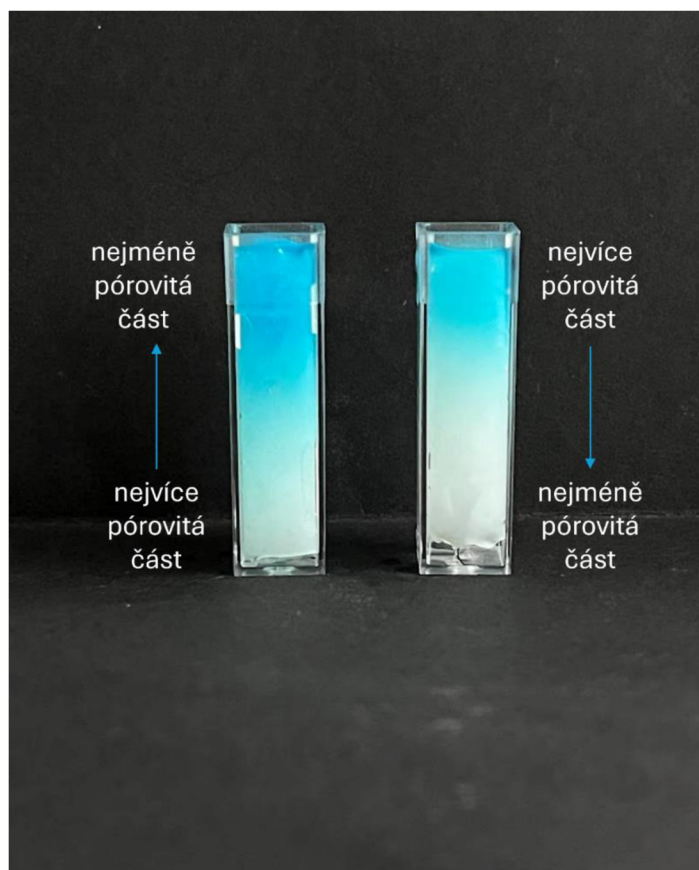


Obrázek 25 Absorpční spektrum PVA hydrogelu (111 kDa) s kontaktní nejvíce pórovitou vrstvou



Obrázek 26 Grafická závislost změny koncentrace v čase u vzorků s rozdílně pórovitou kontaktní vrstvou hydrogelu (111 kDa)

Na Obrázek 26 je znázorněna závislost koncentrace roztoku MM v čase pro vzorky s rozdílnou hustotou hydrogelové sítě jako tou kontaktní. Již na první pohled je u obou vzorků možné pozorovat významný pokles koncentrace po prvních 24 hodinách a po zbylou dobu experimentu již k menšímu poklesu po ustanovení rovnováhy. I přes podobný charakter obou křivek však můžeme pozorovat rozdíly vlivem změny struktury, přes kterou barvivo difunduje. U hydrogelu, jehož kontaktní strana byla nejvíce pórovitá sledujeme menší úbytek koncentrace a dochází k ustanovení rovnováhy již po 24 hodinách. U druhého vzorku, jehož kontaktní strana je naopak pórovitá nejméně, dochází k většímu poklesu koncentrace, což značí vyšší míru difuze barviva do mikrostruktury hydrogelu. To může být vysvětleno většími velikostmi pórů mezi polymerními řetězci, které nebrání prostupu barviva. Výsledky získané měřením absorpčních spekter potvrzují také vizuální hodnocení, při kterých byla pozorována větší míra absorpce u vzorků s kontaktní vrstvou jako tou méně pórovitou.



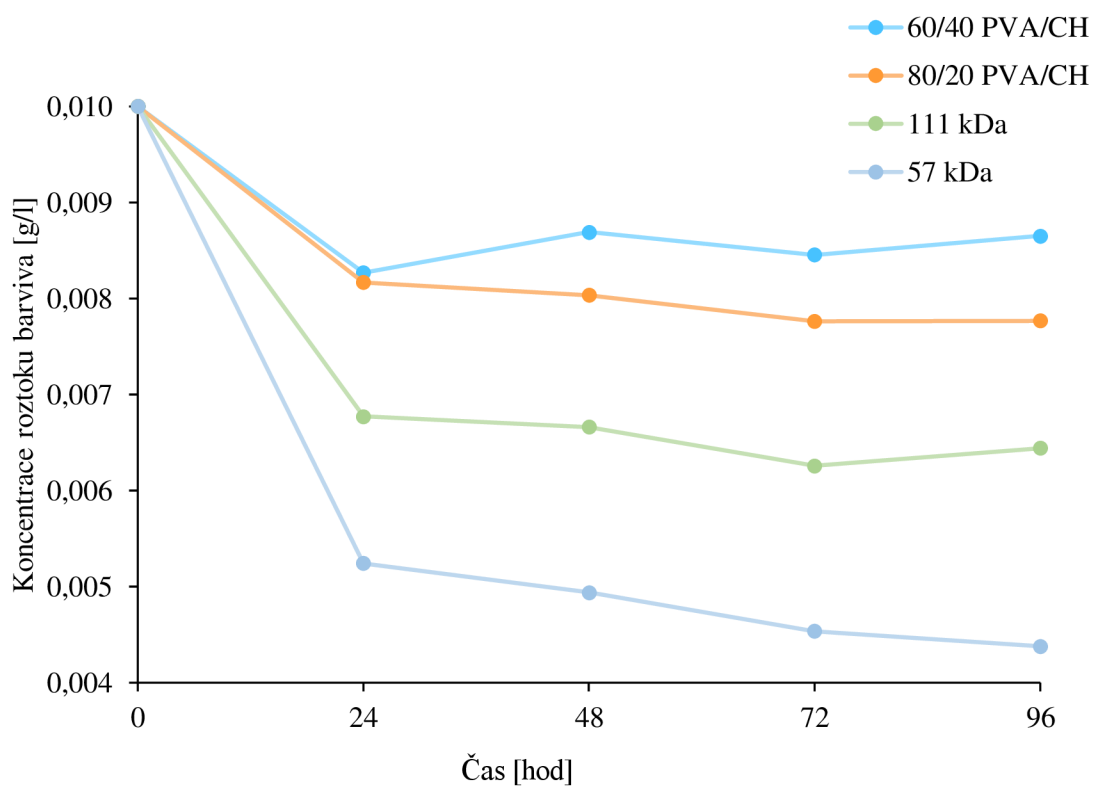
Obrázek 27 Míra absorpce barviva přes různě pórovitou strukturu hydrogelu po 24 hodinách

Stejná měření byla provedena ještě u vzorků o nižší molekulové hmotnosti (57 kDa) a také u vzorků se semi-IPN sítí (PVA/chitosan) v objemových poměrech 80/20 a 60/40 PVA/CH. V tomto případě byla ale již vyhodnocena také míra poklesu koncentrace. Pro kvantitativní vyhodnocení naměřených dat bylo proto nezbytné sestavit kalibrační přímkou MM. Připravená kalibrační křivka byla sestavena proměřením roztoků o vybraných koncentracích na UV-VIS spektrometru. Z absorpčního spektra byla vybrána hodnota 665 nm, která odpovídá absorpčnímu spektru pro methylenovou modř. Ze získané rovnice lineární závislosti (Příloha 5) se poté vycházelo při výpočtech koncentrací pro jednotlivé hydrogely.

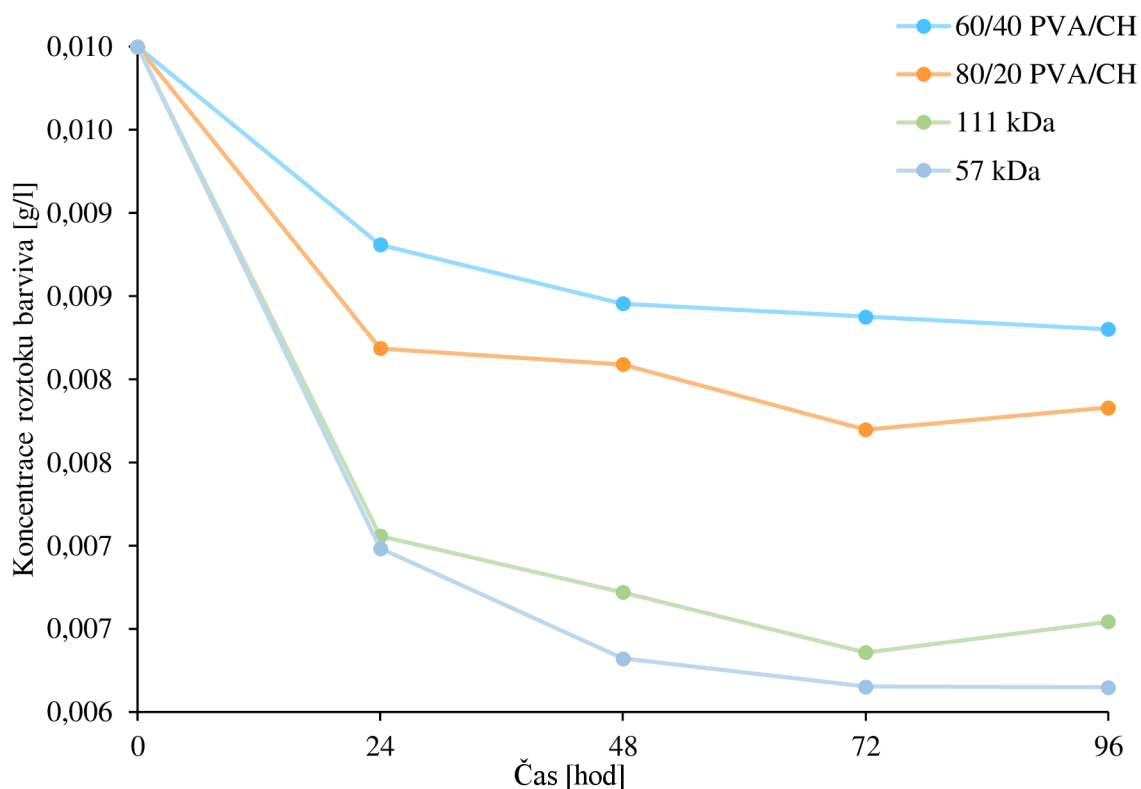
Při hodnocení vlivu molekulové hmotnosti a aditiva v podobě kladně nabitého polysacharidu chitosanu byl postup obdobný. Jednotlivé vzorky gelů byly ponořeny do 20 ml roztoku MM (0,01 g/l) a pokles absorbance byl sledován pro nejméně i nejvíce pórovitou kontaktní stranu v časovém úseku 0–96 hodin. Kromě porovnání poklesu absorbance byly ze získané křivky lineární regrese vypočítány hodnoty koncentrací, které shrnuje Tabulka 2. Pro lepší vizualizaci získaných dat a jejich porovnání byly stejně jako v předešlém případě hodnoty koncentrací vizualizovány grafickou závislostí úbytku koncentrace roztoku barviva v čase (Obrázek 28 a Obrázek 29).

Tabulka 2 Vypočítané hodnoty koncentrací roztoku MM pro vzorky hydrogelů v čase 0-96 hodin (3 → 1 = nejméně pórovitá vrstva jako kontaktní, 1 → 3 = nejvíce pórovitá vrstva jako kontaktní)

Čas [hod]	Koncentrace · 10 ³ [g/l]							
	57 kDa		111 kDa		80/20 PVA/CH		60/40 PVA/CH	
	3 → 1	1 → 3	3 → 1	1 → 3	3 → 1	1 → 3	3 → 1	1 → 3
0	10	10	10	10	10	10	10	10
24	5,2	7	6,8	7,1	8,2	8,2	8,3	8,8
48	4,9	6,3	6,7	6,7	8	8,1	8,7	8,5
72	4,5	6,2	6,3	6,4	7,8	7,7	8,5	8,4
96	4,4	6,1	6,4	6,5	7,8	7,8	8,7	8,3



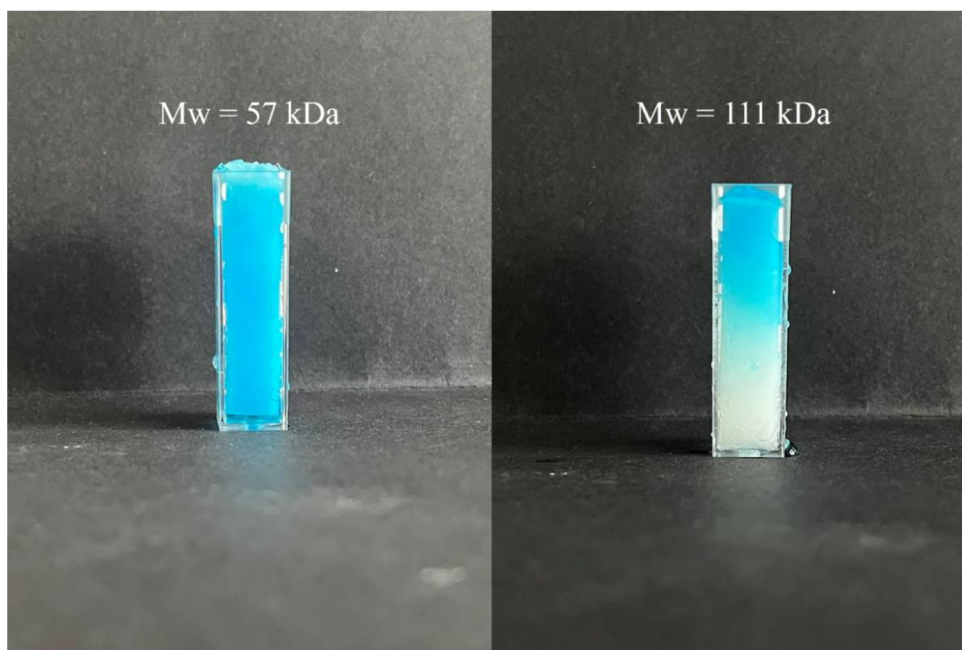
Obrázek 28 Změna koncentrace roztoku barviva v čase pro vzorky při difuzi přes nejméně pórovitou vrstvu hydrogelu



Obrázek 29 Změna koncentrace roztoku barviva v čase pro vzorky při difuzi přes nejvíce pórovitou vrstvu hydrogelu

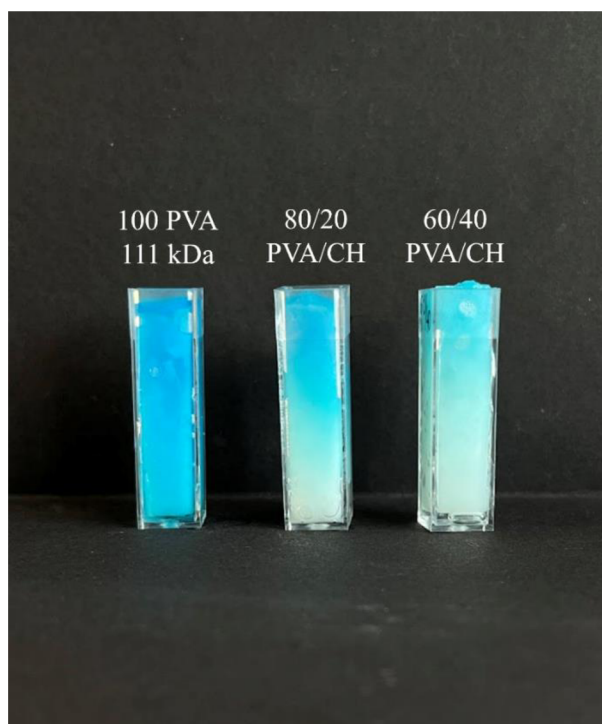
Na základě výběru molekulové hmotnosti, stupně sesítění či přídavku polysacharidu do struktury hydrogelu můžeme sledovat možnosti modifikace transportních vlastností připravených vzorků. Při porovnání změny pórovitosti materiálu pozorujeme u všech zmíněných vzorků, stejně jako u předchozího vzorku, trend poklesu schopnosti absorpce barviva do struktury, pokud obsahuje počáteční vrstva hydrogelu při difuzi nejvíce hustou polymerní síť. Tento výsledek opět potvrzuje, že zvýšený pevný podíl zamezuje rychlému prostupu částic do jeho struktury.

Pokud se podíváme na rozdíly využitých molekulových hmotností, i tady nacházíme prostor pro možnou laditelnost transportních vlastností. Při difuzi přes nejméně i nejvíce pórovitou oblast hydrogelu dochází k rychlejší difuzi barviva do struktur nízkomolekulárního hydrogelu. Důvodem je vyšší obsah disperzního prostředí a méně rigidní a hustá hydrogelová síť, která za stejnou dobu propustí větší množství částic barviva.



Obrázek 30 Rozdílná difúze barviva gradientových hydrogelů o rozdílné molekulové hmotnosti, 48 hodin

Posledním parametrem sledovaným při difuzních experimentech byl vliv přídavku chitosanu. Také v tomto případě sledujeme trend snižující se rychlosti prostupu barviva do hydrogelu s vyšším obsahem polysacharidu. Řetězce polysacharidu jsou v tomto případě rozptýleny mezi vysoce strukturovanou sítí polyvinyl alkoholu, což může být vysvětlením pro pomalejší pohyb částic barviva skrz póry polymerní sítě. Stejně jako u předchozích porovnání i tady u vzorků pozorujeme trend pomalejší absorpce barviva u vzorků s difuzí přes nejhustěji propletenou hydrogelovou síť.



Obrázek 31 Míra absorpce barviva MM do hydrogelu s různým přídavkem biopolymeru, 72 hodin

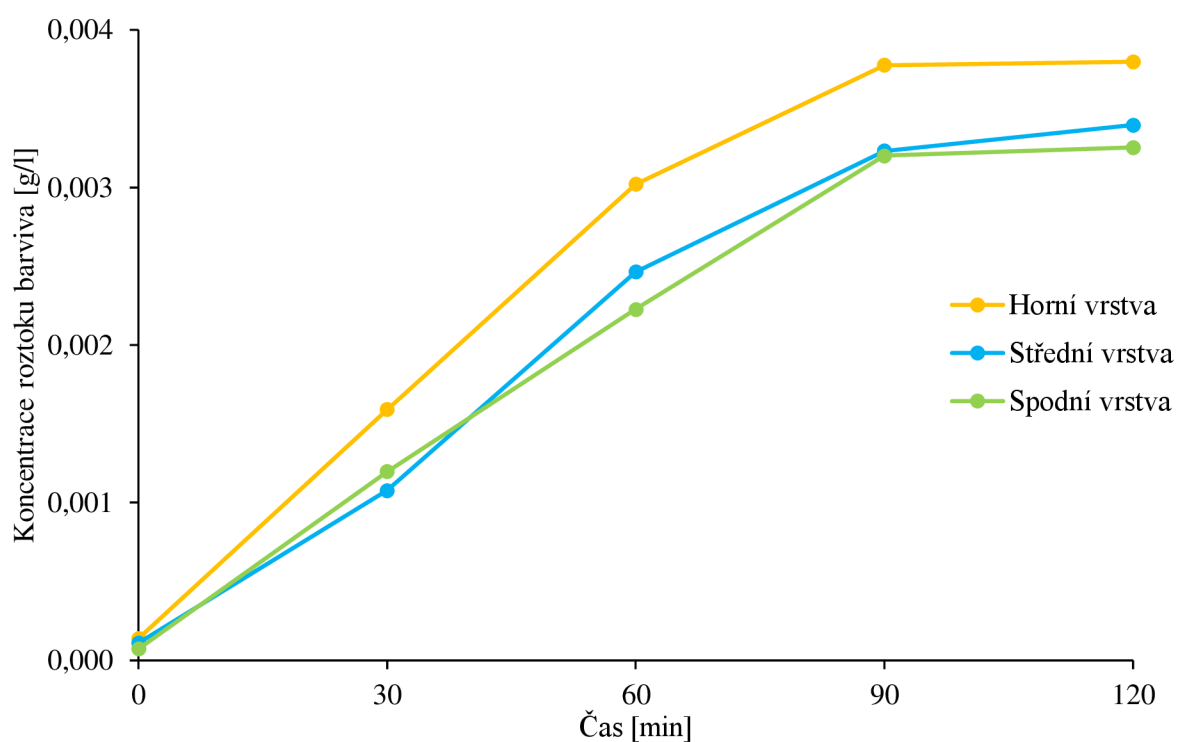
Ze získaných výsledků měření lze usuzovat, že transportní vlastnosti gradientových hydrogelů je možné modifikovat. Cíleně ladit tyto vlastnosti je možné jednak hustotou sesítění kontaktní vrstvy při difuzi, ale také změnou molekulové hmotnosti využitého polymeru, případně přidáním biopolymeru do struktury gradientových hydrogelů. I přesto, že cílem diplomové práce bylo zjištění možné laditelnosti, výsledky měření mohou být vhodným praktickým základem pro další transportní experimenty včetně analýzy kinetiky absorpce barviva do struktury hydrogelu. V takovém případě by bylo vhodné zkoumat kinetiku difuze zejména v prvních 24 hodinách, při kterých dochází k průchodu největšího množství částic barviva.

5.4.2 Studium uvolňování barviva z gradientového hydrogelu

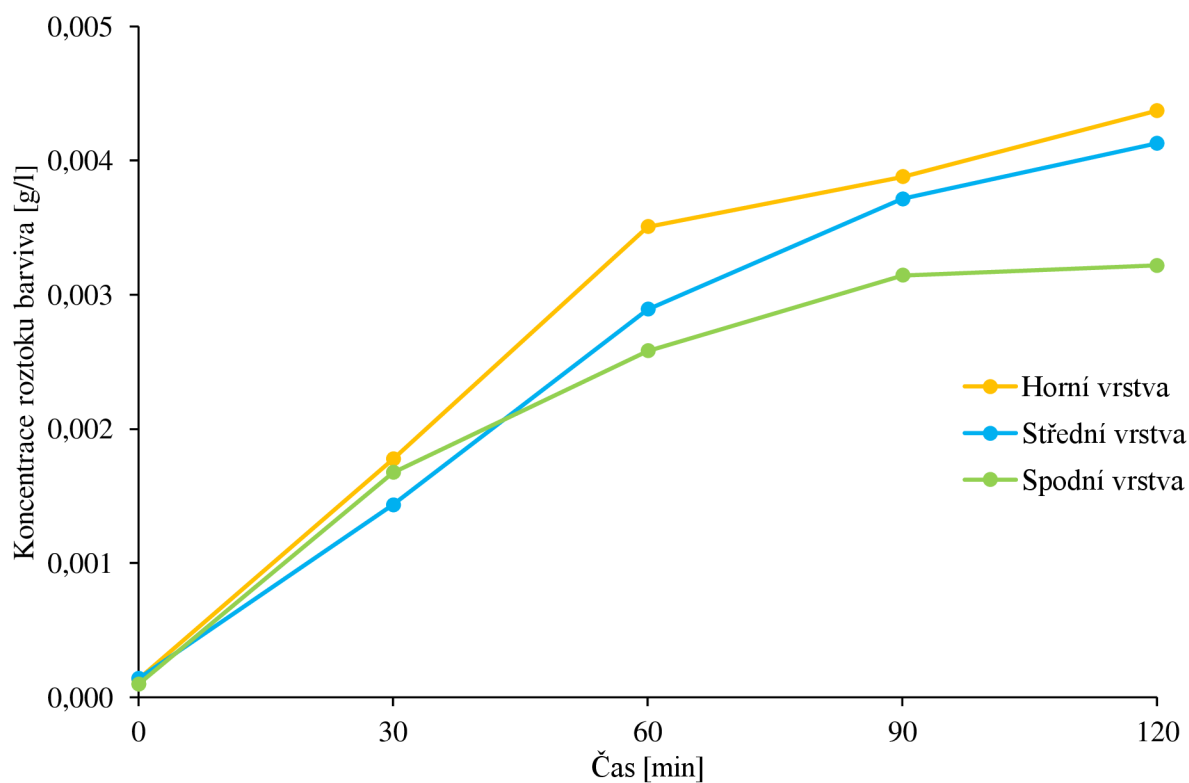
Druhým typem transportních experimentů, které byly v rámci studia transportních vlastností hydrogelových matric studovány je uvolňování barviva ze struktury hydrogelu. Příprava hydrogelů, která je blíže popsána v kapitole 4.5, spočívala v přidání barviva methylenové modři ve formě roztoku nahrazením ultračisté vody při přípravě. Takto připravené soly polymeru byly poté podrobeny standardní přípravě cyklického mrazení a tání. Hotové hydrogely, které byly pro ustanovení rovnováhy vždy ponechány alespoň 24 hodin v klidu za snížené teploty, byly poté rozřezány na 3 stejné velké části. Ty byly vloženy do 20 ml čisté destilované vody, jejíž změna absorbance byla v časových intervalech měřena pomocí UV-VIS spektrometru. Výsledné hodnoty absorbancí byly poté za pomoci sestavené kalibrační přímky přepočítány na změnu koncentrace, které jsou uvedeny v příložené Tabulce 3. Pro lepší názornost byla data také převedena do grafických závislostí (Obrázek 32 a Obrázek 33).

Tabulka 3 Vypočítané hodnoty koncentrací roztoku MM pro difuzi ze vzorků hydrogelů v čase 0–120 minut

		Koncentrace · 10³ [g/l]					
		Čas [min]	0	3	60	90	120
57 kDa	spodní vrstva		0,07	1,20	2,23	3,20	3,25
	střední vrstva		0,11	1,08	2,46	3,23	3,40
	horní vrstva		0,14	1,59	3,02	3,78	3,80
111 kDa	spodní vrstva		0,10	1,67	2,58	3,14	3,22
	střední vrstva		0,14	1,43	2,89	3,72	4,13
	horní vrstva		0,14	1,78	3,51	3,88	4,37



Obrázek 32 Změna koncentrace přijímacího roztoku při uvolňování barviva z hydrogelu (57 kDa)



Obrázek 33 Změna koncentrace přijímacího roztoku při uvolňování barviva z hydrogelu (111 kDa)

Zvyšování koncentrace přijímacího roztoku při studiu uvolňování barviva ze struktury hydrogelu o molekulové hmotnosti 57 kDa je vidět na Obrázek 32. U horní část hydrogelu je po celou dobu experimentu sledováno nejrychlejší nárůst koncentrace uvolněného barviva, zatímco střední a spodní vrstva hydrogelu dosahují srovnatelných výsledků. I přesto je ale možné pozorovat ustanovení rovnováhy v čase 90 minut a postupný pokles uvolněného barviva s rostoucí hustotou sesítění v čase ukončení experimentu.

Stejný trend v chování pozorujeme také u hydrogelu o molekulové hmotnosti 111 kDa. V časovém intervalu 120 minut můžeme sledovat postupný nárůst koncentrace uvolněného barviva do prostředí destilované vody. V prvních 30 minutách experimentu nedošlo k výraznému odlišení uvolnění barviva v rámci 3 rozřezaných vrstev. To se však mění od 60 minuty, kde se uvolněné barvivo liší v závislosti na hustotě sesítění jednotlivých vrstev. Nejstrmější nárůst koncentrace barviva byl naměřen pro horní část hydrogelu, která obsahuje nejméně pórovitou mikrostrukturu. Množství uvolněného barviva se poté snižovalo s vyšším pevným podílem polymeru v hydrogelové síti, přičemž je tento trend pozorovaný po celou dobu experimentu.

Výsledky obou difuzních experimentů naznačují jistou závislost mezi hustotou sesítění a ochotou uvolňovat inkorporované barvivo do struktury hydrogelu. Protože bylo ale během experimentu nakládáno pouze se nízkoobjemovými vzorky, koncentrace uvolněných barviv dosahují pouze velmi malých hodnot. Pro potvrzení této teorie by proto bylo vhodné tento experiment opakovat se vzorky o větším objemu nebo navýšit původní koncentraci barviva v prekurzoru hydrogelu.

6 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce si kladla za cíl optimalizovat přípravu polyvinyl alkoholových gradientových hydrogelů a pomocí vhodných instrumentálních technik tuto strukturu potvrdit. Zároveň byla pomocí jednoduchých experimentů zkoumána možnost cíleně ladit jejich viskoelastické a transportní vlastnosti postupnou změnou v hustotě jejich sesítení.

Prvotní fází byl výběr vhodné metody fyzikálního síťování polyvinyl alkoholu. S ohledem na možné využití v oblasti medicíny a tkáňového inženýrství bylo nutné u připravovaných hydrogelů zachovat nezbytnou biokompatibilitu a biodegradabilitu, která by mohla být přidáním chemického síťovadla či jiného aditiva narušena (studium biokompatibility a biodegradability však nebylo cílem předložené diplomové práce a nabízí tak námět pro navazující VŠKP). Na základě literární rešerše [57], [59] byla za tímto účelem zvolena metoda cyklického mrazení a tání (ang. *freeze-thaw*) za využití tekutého dusíku jako mrazicího média. Během optimalizace byla věnována pozornost různým parametrům přípravy jako je koncentrace a molekulová hmotnost využitého polymeru, počet cyklů mrazení a tání, teplota mrazení a tání nebo způsob mrazení formy se solem polymeru tak, aby došlo k vytvoření požadované gradientové struktury. Testováním všech zmíněných parametrů bylo zjištěno, že ovlivňují nárůst krystalů ledu a tvorbu prostorové hydrogelové sítě a tím i výsledných mechanických či transportních vlastností. Na základě řady reologických testů (amplitudový, axiální oscilační a kompresní test) byl zvolen vhodný postup přípravy, který zahrnoval 5 cyklů mrazení a tání, přičemž délka mrazicího cyklu byla 1 minutu a délka cyklu tání 60 minut. Zároveň bylo během cyklu tání dbáno na to, aby nedošlo k šokovému nárůstu teploty a z celkových 60 minut byl vzorek na 30 minut umístěn do prostředí o teplotě 4 °C. Z celkově 4 různých přístupů mrazení formy s prekurzorem bylo jako nevhodnější zvoleno ponoření kyvety až do $\frac{3}{4}$ její výšky, které zajišťovalo tvorbu gradientové struktury se změnou v hustotě sesítení. I přes poměrně časově náročnou přípravu bylo docíleno přípravy stabilních PVA hydrogelů s přítomným gradientem v hustotě sesítení.

Pro charakterizaci a potvrzení gradientové struktury hydrogelu byly vybrány celkem 3 instrumentální techniky, které zahrnovaly mechanickou analýzu pomocí oscilačního reometru, strukturní analýzu pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu a analýzu obsahu pevného podílu realizovanou pomocí sušících vah. První vybranou metodou bylo zjištění viskoelastických vlastností pomocí oscilačního reometru. Před měřením byl připravený hydrogel vyjmut z formy a rozřezán na 3 stejně velké části – spodní, střední a horní část. Rozřezáním hydrogelu na 3 části byly definovány 3 vzorky, u kterých byla očekávána změna viskoelastických vlastností v závislosti na změně hustoty sesítení. Nejprve byly provedeny amplitudové testy, díky kterým byly získány informace o viskoelastickém chování a lineární viskoelastické oblasti. I přesto, že jsou amplitudové testy pro charakterizaci hydrogelových materiálů běžně využívány, pro potřeby charakterizace PVA gradientových hydrogelů se tato metoda neosvědčila, jelikož její výsledky nekorespondovaly s výsledky ostatních prokazujících

měření. Proto byly vybrány 2 alternativní metody, a to axiální oscilační test a test kompresní. Axiálním oscilačním testem, během kterého byl vzorek periodicky namáhán s danou amplitudou deformace 0,1–20 %, byla zjištěna zvyšující se míra odolnosti vůči mechanické deformaci se snižující se polohou vrstvy v hydrogelu. Tento jev může být vysvětlen zvyšující se hustotou síťování z důvodu intenzivnějšího kontaktu s mrazícím médiem. Hypotéza zvyšující se mechanické odolnosti u vrstev s více porézní strukturou byla potvrzena také pomocí kompresních testů. Při snižování měřící šterbiny byla u částí hydrogelů s nízkou pórovitostí potřeba vykonat nižší normálová síla než u částí hydrogelů s vysokou pórovitostí. Výsledky kompresních testů doplňují výsledky axiálního oscilačního testu a potvrzují úspěšnou přípravu gradientové struktury. Rozdílné chování hydrogelu bylo pozorováno také při změně molekulových hmotností hydrogelových vzorků, kdy hydrogely s nižší molekulovou hmotností (57 kDa) odpovídaly nižším hodnotám komplexních modulů oproti hydrogelům, u jejichž přípravě bylo využito vysokomolekulárního PVA (111 kDa).

Druhá metoda charakterizující jednotlivé vrstvy gradientové struktury využívala řízeného sušení pomocí sušících vah. Cílem tohoto experimentu bylo ověřit, zda dochází vlivem měnící se hustoty sesítní ke zvýšené schopnosti vázat disperzní prostředí v průběhu sušení. Na základě získaných termogravimetrických křivek získaných pro jednotlivé části hydrogelů je patrné, že hustota polymerní sítě ovlivňuje rychlost uvolňování disperzního prostředí. Stejně jako u předchozího měření byla zjištěna také závislost mezi zvolenou molekulovou hmotností polymeru při přípravě a výslednými vlastnostmi. U hydrogelů s nižší molekulovou hmotností dochází k rychlejšímu úbytku celkové hmotnosti vzorku a dosahují nižších hodnot pevných podílů oproti hydrogelům s vyšším hmotnostním zastoupením.

Poslední metodou charakterizace gradientové vrstvy byla analýza morfologických vlastností pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu. Na pořízených snímcích byla sledována typická porézní struktura se změnou ve velikosti pórů u jednotlivých vrstev. Zachycena byla také povrchová struktura jednotlivých xerogelů, která vykazovala nejvyšší míru uspořádání u části s nejvyšší hustotou polymerního sesítní, což značí jeho vysokou odolnost i vůči šokovému zmrazení při úpravě materiálu. I přesto, že výsledky potvrzují predikovaný trend snižování velikosti pórů u nižších vrstev hydrogelu, bylo pro sledování nativní struktury s reálnou velikostí pórů doporučeno doplnění jiné strukturální metody, kterou je například mikroskopie atomárních sil.

Simultánně s optimalizací a charakterizací gradientové struktury hydrogelů byl studován vliv přídavku biopolymeru na jeho výsledné mechanické vlastnosti. Semi-interpenetovatelné hydrogely byly vyvinuty se záměrem zlepšení aplikačního využití, a to úpravou mechanických či transportních vlastností. Pro potřeby této diplomové práce byl zkoumán vliv přídavku 1 hm. % chitosanu (80/20 a 60/40 obj. %) pomocí axiálního oscilačního testu za využití oscilačního reometru. Ze získaných výsledků byl zjištěn trend snižujících se hodnot viskoelastických modulů se zvyšujícím se obsahem biopolymeru. Možnost modifikace

výsledných vlastností takových systémů může vést k přesnějším a výhodnějším aplikacím v oboru medicínských aplikací.

V druhé části této diplomové práce byly zkoumány transportní vlastnosti připravených hydrogelových matric pomocí difuzních experimentů. Pro získání celkové představy o difuzním chování byly provedeny experimenty jak transportu barviva (methylenové modři) do struktury hydrogelu, tak jeho uvolňování po předchozí inkorporaci. Během difuzních experimentů byl zkoumán nejen vliv hustoty sesítní jednotlivých vrstev, ale také molekulové hmotnosti a množství polysacharidu. Ze stanovených úbytků koncentrace roztoků barviva jsme došli k závěru, že u částí hydrogelu s vyšší hustotou sesítní dochází obecně k pomalejší difuzi. Trend snižující se rychlosti difuze byl sledován také při zvýšení molekulové hmotnosti polymeru tvořícího hydrogel. Oba z uvedených jevů je možné vysvětlit zmenšující se velikostí ok hydrogelové sítě, které propouští menší množství barviva. Posledním z analyzovaných parametrů byl vliv přídavku chitosanu. I v tomto případě byla prokázána závislost mezi množstvím přidaného biopolymeru a transportními vlastnostmi. U semi-IPN hydrogelů byla již při vizuálním hodnocení pozorována pomalejší difuze než u hydrogelu tvořeného čistým PVA. Přítomné chitosanové řetězce zaplňují prostor pórů PVA sítě a dochází tak k zabránění rychlejšího prostupu barviva. Při studiu uvolňování inkorporovaného barviva ze struktury hydrogelu byl stejně jako u studia absorpce potvrzen vliv hustoty sesítní jednotlivých vrstev. Uvolňování barviva proběhlo nejrychleji u částí hydrogelu s méně hustou polymerní sítí a u hydrogelu tvořeného polymerem o nižší molekulové hmotnosti. Rozdíly mezi jednotlivými vrstvami však mohly být částečně ovlivněny malým objemem vzorků a nízkou koncentrací roztoku barviva při přípravě. Proto by bylo vhodné se při budoucím studiu transportních vlastností těchto hydrogelů zaměřit na získání většího počtu vzorků nebo provádět tato měření pro vzorky o větším objemu.

Závěrem lze říci, že byla úspěšně optimalizována příprava hydrogelů s gradientem v hustotě sesítní pomocí fyzikální metody *freeze-thaw* za využití tekutého dusíku jako mrazícího média. Zároveň byla využita řada instrumentálních technik, kterými se podařilo charakterizovat mechanické, strukturní i transportní vlastnosti výsledných vzorků a vliv vybraných parametrů při přípravě na výslednou strukturu hydrogelu.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] GADJANSKI, Ivana; DU, Yanan; GUO, Yuqi; HANCOCK, Matthew J.; WANG, Ben et al. Recent advances on gradient hydrogels in biomimetic cartilage tissue engineering.. *F1000Research*. 2017, roč. 6, č. 1, s. 175-185. ISSN 2046-1402. doi.org/10.12688/f1000research.12391.2.
- [2] SANT, Shilpa; HANCOCK, Matthew J.; DONNELLY, Joseph P.; IYER, Dharini a KHADEMHOSEINI, Ali. Biomimetic gradient hydrogels for tissue engineering.. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*. 2010, roč. 88, č. 6, s. 899-909. doi.org/10.1002/cjce.20411.
- [3] GENZER, Jan; BHAT, Rajendra R.; MOKHTARZADEH, Ahad a DE LA GUARDIA, Miguel. Surface-Bound Soft Matter Gradients. *Langmuir*. 2008, roč. 24, č. 6, s. 2294-2317. ISSN 0743-7463. doi.org/10.1021/la7033164.
- [4] LUO, Tianyi; TAN, Bowen; ZHU, Lengjing; WANG, Yating a LIAO, Jinfeng. A Review on the Design of Hydrogels With Different Stiffness and Their Effects on Tissue Repair. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022, roč. 10, č. 6, s. 1799-1812. ISSN 2296-4185. doi.org/10.3389/fbioe.2022.817391.
- [5] SMITH CALLAHAN, Laura; DU, Yanan; GUO, Yuqi; HANCOCK, Matthew J.; WANG, Ben et al. Gradient Material Strategies for Hydrogel Optimization in Tissue Engineering Applications. *High-Throughput*. 2018, roč. 7, č. 1, s. 175-185. ISSN 2571-5135. doi.org/10.3390/ht7010001.
- [6] ABDOLLAHIYAN, Parinaz; OROOJALIAN, Fatemeh; MOKHTARZADEH, Ahad a DE LA GUARDIA, Miguel. Hydrogel-Based 3D Bioprinting for Bone and Cartilage Tissue Engineering. *Biotechnology Journal*. 2020, roč. 15, č. 12, s. 2185-2194. ISSN 1860-6768. doi.org/10.1002/biot.202000095.
- [7] JO, Heejung; YOON, Minhyuk; GAJENDIRAN, Mani; KIM, Kyobum a LIAO, Jinfeng. Recent Strategies in Fabrication of Gradient Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Macromolecular Bioscience*. 2020, roč. 20, č. 3, s. 1799-1812. ISSN 1616-5187. doi.org/10.1002/mabi.201900300.
- [8] WANG, Xiang; LIU, Zhaomiao a PANG, Yan. Concentration gradient generation methods based on microfluidic systems. *RSC Advances*. 2017, roč. 7, č. 48, s. 29966-29984. ISSN 2046-2069. <https://doi.org/10.1039/C7RA04494A>.
- [9] JEON, Oju; ALT, Daniel S.; LINDERMAN, Stephen W.; ALSBERG, Eben; MIKOS, Antonios G. et al. Biochemical and Physical Signal Gradients in Hydrogels to Control Stem Cell Behavior. *Advanced Materials*. 2013, roč. 25, č. 44, s. 6366-6372. ISSN 0935-9648. <https://doi.org/10.1002/adma.201302364>.
- [10] LAVRENTIEVA, Antonina; FLEISCHHAMMER, Tabea; ENDERS, Anton; PIRMAHBOUB, Hamidreza; BAHNEMANN, Janina et al. Fabrication of Stiffness Gradients of GelMA Hydrogels Using a 3D Printed Micromixer. *Macromolecular Bioscience*. 2020, roč. 20, č. 7, s. 1799-1812. ISSN 1616-5187. <https://doi.org/10.1002/mabi.202000107>.

- [11] BRACAGLIA, Laura G.; SMITH, Brandon T.; WATSON, Emma; ARUMUGASAAMY, Navein; MIKOS, Antonios G. et al. 3D printing for the design and fabrication of polymer-based gradient scaffolds. *Acta Biomaterialia*. 2017, roč. 56, s. 3-13. ISSN 17427061. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.03.030>.
- [12] LIU, C.; XIA, Z.; CZERNUSZKA, J.T.; ARUMUGASAAMY, Navein; MIKOS, Antonios G. et al. Design and Development of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering. *Chemical Engineering Research and Design*. 2007, roč. 85, č. 7, s. 1051-1064. ISSN 02638762. <https://doi.org/10.1205/cherd06196>.
- [13] LAVRENTIEVA, Antonina; FLEISCHHAMMER, Tabea; ENDERS, Anton; PIRMAHBOUB, Hamidreza; BAHNEMANN, Janina et al. Gradient Hydrogels. *Tunable Hydrogels*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2021, roč. 20, č. 7, s. 227-251. ISBN 978-3-030-76768-6. ISSN 1616-5187. https://doi.org/10.1007/10_2020_155.
- [14] HE, Jiankang; SCHEIBEL, Thomas; SCHMIDT, Hans-Werner; GIESA, Reiner; BAHNEMANN, Janina et al. Polymer Gradient Materials: Can Nature Teach Us New Tricks?. *Biotechnology and Bioengineering*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2011, roč. 108, č. 10, s. 938-957. ISBN 978-3-030-76768-6. ISSN 0006-3592. <https://doi.org/10.1002/bit.22901>.
- [15] CLAUSSEN, Antonina; SCHEIBEL, Thomas; SCHMIDT, Hans-Werner; GIESA, Reiner; BAHNEMANN, Janina et al. Gradient Hydrogels. *Macromolecular Materials and Engineering*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2012, roč. 297, č. 10, s. 938-957. ISBN 978-3-030-76768-6. ISSN 1438-7492. <https://doi.org/10.1002/mame.201200032>.
- [16] GASDIA-COCHRANE, Marlene. How Water Affects Raman and FTIR Identification of Unknown Substances. n: . <https://www.thermofisher.com/blog/identifying-threats/how-water-affects-raman-and-ftir-identification-of-unknown-substances/>.
- [17] ZINKOVSKA, Natalia; PEKAR, Miloslav; SMILEK, Jiri; HANCOCK, Matthew J.; WANG, Ben et al. Gradient Hydrogels—Overview of Techniques Demonstrating the Existence of a Gradient: Can Nature Teach Us New Tricks?. *Polymers*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2022, roč. 14, č. 5, s. 175-185. ISBN 978-3-030-76768-6. ISSN 2073-4360. <https://doi.org/10.3390/polym14050866>.
- [18] XIA, Tingting; LIU, Wanqian; YANG, Li; IYER, Dharini a KHADEMHOSEINI, Ali. A review of gradient stiffness hydrogels used in tissue engineering and regenerative medicine. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2017, roč. 105, č. 6, s. 1799-1812. ISSN 1549-3296. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36034>.
- [19] ITURRI, Jagoba a TOCA-HERRERA, José. Characterization of Cell Scaffolds by Atomic Force Microscopy. *Polymers*. 2017, roč. 9, č. 8. ISSN 2073-4360. <https://doi.org/10.3390/polym9080383>.
- [20] RUEDINGER, Ferdinand, Antonina LAVRENTIEVA, Cornelia BLUME, et al. Hydrogels for 3D mammalian cell culture: a starting guide for laboratory practice. *Applied*

Microbiology and Biotechnology. Cham: Springer International Publishing, 2015, 99(2), 623-636. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. ISBN 978-3-030-76768-6. ISSN 0175-7598. doi:10.1007/s00253-014-6253-y

[21] PATTNAIK, Ananya; SANKET, A. Swaroop; PRADHAN, Sanghamitra; SAHOO, Rajashree; DAS, Sudiptee et al. Designing of gradient scaffolds and their applications in tissue regeneration. *Biomaterials*. 2023, roč. 296. ISSN 01429612. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2023.122078>.

[22] SUN, Ye; WU, Qiang; ZHANG, Yuxin; DAI, Kerong; WEI, Yongzhong et al. 3D-bioprinted gradient-structured scaffold generates anisotropic cartilage with vascularization by pore-size-dependent activation of HIF1 α /FAK signaling axis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2021, roč. 37. ISSN 15499634. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2021.102426>.

[23] MA, Yuan; WANG, Yilin; CHEN, Danni; SU, Ting; CHANG, Qiang et al. 3D bioprinting of a gradient stiffened gelatin–alginate hydrogel with adipose-derived stem cells for full-thickness skin regeneration. *Journal of Materials Chemistry B*. 2023, roč. 11, č. 13, s. 2989-3000. ISSN 2050-750X. <https://doi.org/10.1039/D2TB02200A>.

[24] LIU, He; LIU, Ruonan; CHEN, Kun; LIU, Yiying; ZHAO, Yue et al. Bioinspired gradient structured soft actuators: From fabrication to application. *Chemical Engineering Journal*. 2023, roč. 461, č. 13, s. 2989-3000. ISSN 13858947. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.141966>.

[25] LIU, Jian; XU, Weizhong; KUANG, Zhongwen; DONG, Pengli; YAO, Youxing et al. Gradient porous PNIPAM-based hydrogel actuators with rapid response and flexibly controllable deformation: From fabrication to application. *Journal of Materials Chemistry C*. 2020, roč. 8, č. 35, s. 12092-12099. ISSN 2050-7526. <https://doi.org/10.1039/D0TC00139B>.

[26] YANG, Yang; TIAN, Fei; WANG, Xionglei; XU, Pingping; AN, Wenli et al. Biomimetic Color-Changing Hierarchical and Gradient Hydrogel Actuators Based on Salt-Induced Microphase Separation: From fabrication to application. *Journal of Materials Chemistry C*. 2019, roč. 11, č. 51, s. 48428-48436. ISSN 1944-8244. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b17904>.

[27] BAKER, Maribel I.; WALSH, Steven P.; SCHWARTZ, Zvi a BOYAN, Barbara D. A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2012, roč. 100B, č. 5, s. 1451-1457. ISSN 1552-4973. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32694>.

[28] SAXENA, S.K. POLYVINYL ALCOHOL (PVA). In: 61st Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) Meeting. FAO, 2003, s. 3. <https://www.fao.org/documents/card/en/c/85e53602-602c-4503-9d61-aeddfa68181e/>.

[29] BAKER, Maribel I.; WALSH, Steven P.; SCHWARTZ, Zvi a BOYAN, Barbara D. A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications: New Vista on

- a Long Serving Biomaterial. In: Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. FAO, 2012, s. 1451-1457. ISSN 1552-4973. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32694>.
- [30] Mowiol Polyvinyl Alcohol. Sulzbach / Hessen: Clariant GmbH, 1999, 105 s, Dostupné z:<https://ia803101.us.archive.org/35/items/polyvinylalcoholmanufacturemanual/Mowiol%20manual.pdf>
- [31] TEODORESCU, Mirela; BERCEA, Maria a MORARIU, Simona. Biomaterials of Poly(vinyl alcohol) and Natural Polymers. . *Polymer Reviews*. 2017, roč. 58, č. 2. ISSN 1558-3724. <https://doi.org/10.1080/15583724.2017.1403928>.
- [32] SAU, Sanjib; PANDIT, Subhankar a KUNDU, Sarathi. Crosslinked poly (vinyl alcohol): Structural, optical and mechanical properties. . *Surfaces and Interfaces*. 2021, roč. 25, č. 2, s. 247-287. ISSN 24680230. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2021.101198>.
- [33] CHOI, Jin Hyun; KO, Sohk-Won; KIM, Byoung Chul; BLACKWELL, John a LYOO, Won Seok. Phase Behavior and Physical Gelation of High Molecular Weight Syndiotactic Poly(vinyl alcohol) Solution: Structural, optical and mechanical properties. . *Macromolecules*. 2001, roč. 34, č. 9, s. 2964-2972. ISSN 0024-9297. <https://doi.org/10.1021/ma001710s>.
- [34] SAPALIDIS, Andreas A.; ENSANDOOST, Reza; SHEBBRIN MOONSHI, Shehzahdi; GAVGANI, Jaber Nasrollah; VASAFI, Emad Izadi et al. Porous Polyvinyl Alcohol Membranes: Preparation Methods and Applications. In: *Symmetry*. FAO, 2020, s. 1451-1457. ISSN 2073-8994. <https://doi.org/10.3390/sym12060960>.
- [35] BEN HALIMA, Nihed; ENSANDOOST, Reza; SHEBBRIN MOONSHI, Shehzahdi; GAVGANI, Jaber Nasrollah; VASAFI, Emad Izadi et al. Poly(vinyl alcohol): review of its promising applications and insights into biodegradation. . In: *RSC Advances*. FAO, 2016, s. 39823-39832. ISSN 2046-2069. <https://doi.org/10.1039/C6RA05742J>.
- [36] ADELNIA, Hossein; ENSANDOOST, Reza; SHEBBRIN MOONSHI, Shehzahdi; GAVGANI, Jaber Nasrollah; VASAFI, Emad Izadi et al. Freeze/thawed polyvinyl alcohol hydrogels: Present, past and future. . In: *European Polymer Journal*. FAO, 2022, s. 1451-1457. ISSN 00143057. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110974>.
- [37] HODGKINSON, Nigel a TAYLOR, Michael. Thermoplastic Poly (Vinyl Alcohol) (PVOH). In: <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=266>.
- [38] BAKER, Maribel I.; WALSH, Steven P.; SCHWARTZ, Zvi a BOYAN, Barbara D. A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. . *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2012, roč. 100B, č. 5, s. 1451-1457. ISSN 1552-4973. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32694>.
- [39] Mezger, Thomas. *The Rheology Handbook: For users of rotational and oscillatory rheometers*, Hannover, Germany: Vincentz Network, 2020. <https://doi.org/10.1515/9783748603702>
- [40] BABY, Deepa K. Rheology of hydrogels. . *Rheology of Polymer Blends and Nanocomposites*. 2020. ISBN 9780128169575. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816957-5.00009-4>.

- [41] MEZGER, Thomas G. Applied rheology: with Joe Flow on rheology road. 5. Graz, Austria: Anton Paar, 2014. ISBN 9783950401608.
- [42] A Basic Introduction to Rheology. Worcestershire, UK, 2016 <https://cdn.technologynetworks.com/TN/Resources/PDF/WP160620BasicIntroRheology.pdf>
- [43] ZHAO, Julia; BARRON, Andrew; BARRON, Andrew a RAJA, Pavan. Dynamic Mechanical Analysis. In: *Physical Methods in Chemistry and Nano Science*. Rice University, 2019, s. 319-326. ISBN 1838008578. <http://cnx.org/content/m50234/1.3/>.
- [44] DE NARDO, L. a FARE', S. Dynamico-mechanical characterization of polymer biomaterials. . *Characterization of Polymeric Biomaterials*. 2017, s. 203-232. ISBN 9780081007372. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100737-2.00009-1>.
- [45] TABILO-MUNIZAGA, Gipsy; BARBOSA-CÁNOVAS, Colin a BURBIDGE, Adam S. Rheology for the food industry: A review. *Journal of Food Engineering*. 2005, roč. 67, č. 1-2, s. 147-156. ISSN 02608774. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.062>.
- [46] ENGMANN, Jan; SERVAIS, Colin a BURBIDGE, Adam S. . *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*. 2005, roč. 132, č. 1-3. ISSN 03770257. <https://doi.org/10.1016/j.jnnfm.2005.08.007>.
- [47] ZHOU, Weilie; APKARIAN, Robert; WANG, Zhong Lin a JOY, David. Fundamentals of Scanning Electron Microscopy (SEM). *Scanning Microscopy for Nanotechnology*. 2006, s. 1-40. ISBN 978-0-387-33325-0. https://doi.org/10.1007/978-0-387-39620-0_1.
- [48] UL-HAMID, Anwar. *A Beginners' Guide to Scanning Electron Microscopy*. . 1. Springer Cham, 2018. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-98482-7>.
- [49] KVÍTEK, Libor a PANÁČEK, Aleš. *Základy koloidní chemie*. . 1. Univerzita Palackého v Olomouci (UPOL), 2007. <https://old.fch.upol.cz/wp-content/uploads/2015/07/Kolonoidni-chemie-text.pdf>
- [50] BARTOVSKÁ, Lidmila a ŠIŠKOVÁ, Marie. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0579-X.
- [51] NOVÁK, Josef. *Fyzikální chemie: bakalářský a magisterský kurz*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-675-3.
- [52] AMSDEN, Brian. Solute Diffusion within Hydrogels. Mechanisms and Models. . *Macromolecules*. 1998, roč. 31, č. 23, s. 8382-8395. ISSN 0024-9297. <https://doi.org/10.1021/ma980765f>.
- [53] FUJIYABU, Takeshi; LI, Xiang; CHUNG, Ung-il a SAKAI, Takamasa. Diffusion Behavior of Water Molecules in Hydrogels with Controlled Network Structure. *Macromolecules*. 2019, roč. 52, č. 5, s. 1923-1929. ISSN 0024-9297. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.8b02488>.
- [54] AXPE, Eneko; CHAN, Doreen; OFFEDDU, Giovanni S.; CHANG, Yin; MERIDA, David et al. A Multiscale Model for Solute Diffusion in Hydrogels. *Macromolecules*. 2019, roč. 52, č. 18, s. 6889-6897. ISSN 0024-9297. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.9b00753>.

- [55] ZHANG, Hongbin; ZHANG, Fei a WU, Juan. Physically crosslinked hydrogels from polysaccharides prepared by freeze–thaw technique. In: *Reactive and Functional Polymers*. 2013, s. 923-928. ISSN 13815148. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2012.12.014>.
- [56] STAUFFER, Shauna R.; PEPPAST, Nikolaos A. a WU, Juan. Poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by freezing-thawing cyclic processing. . In: *Polymer*. 1992, s. 3932-3936. ISSN 00323861. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(92\)90385-A](https://doi.org/10.1016/0032-3861(92)90385-A)
- [57] KIM, Tae Ho; AN, Dan Bi; OH, Se Heang; KANG, Min Kwan; SONG, Hyun Hoon et al. Creating stiffness gradient polyvinyl alcohol hydrogel using a simple gradual freezing–thawing method to investigate stem cell differentiation behaviors. In: *Biomaterials*. 2015, s. 51-60. ISSN 01429612. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.11.017>.
- [58] ZHU, Wenzhuo; WANG, Jian; SUN, Wen; ZHOU, Shuai; HE, Ming et al. Preparation of gradient hydrogel for pressure sensing by combining freezing and directional diffusion processes. In: *Chemical Engineering Journal*. 2023, s. 51-60. ISSN 13858947. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.138335>.
- [59] OH, Se Heang; AN, Dan Bi; KIM, Tae Ho; LEE, Jin Ho; HE, Ming et al. Wide-range stiffness gradient PVA/HA hydrogel to investigate stem cell differentiation behavior. In: *Acta Biomaterialia*. 2016, s. 23-31. ISSN 17427061. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.02.016>.
- [60] LIU, Xin; LIU, Shuai; YANG, Rong; WANG, Penghui; ZHANG, Wenjie et al. Gradient chondroitin sulfate/poly (γ -glutamic acid) hydrogels inducing differentiation of stem cells for cartilage tissue engineering. In: *Carbohydrate Polymers*. 2021, s. 23-31. ISSN 01448617. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118330>.
- [61] MA, Shuanhong; YU, Bo; PEI, Xiaowei; ZHOU, Feng; ZHANG, Wenjie et al. Structural hydrogels. In: *Polymer*. 2016, s. 516-535. ISSN 00323861. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2016.06.053>.
- [62] SU, Cui; SU, Yunlan; LI, Zhiyong; HAQ, Muhammad Abdul; ZHOU, Yong et al. In situ synthesis of bilayered gradient poly(vinyl alcohol)/hydroxyapatite composite hydrogel by directional freezing-thawing and electrophoresis method. In: *Materials Science and Engineering: C*. 2017, s. 76-83. ISSN 09284931. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.136>.
- [63] PFLUMM, Stephan; WIEDEMANN, Yvonne; FAUSER, Dominik; SAFARALIYEV, Javidan; LUNTER, Dominique et al. Autonomous Adaption of Intelligent Humidity-Programmed Hydrogel Patches for Tunable Stiffness and Drug Release. . *Advanced Materials Technologies*. 2023, roč. 8, č. 19. ISSN 2365-709X., doi.org/10.1002/admt.202300937.
- [64] TOSORATTI, Enrico; RÜTSCHKE, Dominic; ASADIKORAYEM, Maryam; PONTA, Simone; FISCH, Philipp et al. Biofabrication of Heterogeneous, Multi-Layered, and Human-Scale Tissue Transplants Using Eluting Mold Casting. *Advanced Functional Materials*. 2024, roč. 34, č. 6. ISSN 1616-301X., doi.org/10.1002/adfm.202305651.
- [65] DAVIDSON, Matthew D.; PRENDERGAST, Margaret E.; BAN, Ehsan; XU, Karen L.; MICKEL, Gabriel et al. Programmable and contractile materials through cell encapsulation

in fibrous hydrogel assemblies. *Science Advances*. 2021, roč. 7, č. 46. ISSN 2375-2548.; doi.org/10.1126/sciadv.abi8157.

[66] FIORATI, Andrea; CONTESSI NEGRINI, Nicola; BASCHENIS, Elena; ALTOMARE, Lina; FARÉ, Silvia et al. Biofabrication of Heterogeneous, Multi-Layered, and Human-Scale Tissue Transplants Using Eluting Mold Casting. *Materials*. 2020, roč. 13, č. 1. ISSN 1996-1944. <https://doi.org/10.3390/ma13010183>.

[67] POLACHEK, William J.; KUTYS, Matthew L.; TEFFT, Juliann B.; CHEN, Christopher S.; MUKHERJEE, Saptarshi et al. Microfabricated blood vessels for modeling the vascular transport barrier: Ibuprofen Drug Diffusion and In Vitro Cytocompatibility. . *Nature Protocols*. 2019, roč. 14, č. 5, s. 1425-1454. ISSN 1754-2189. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0144-8>.

[68] AHN, Song Ih; SEI, Yoshitaka J.; PARK, Hyun-Ji; KIM, Jinhwan; RYU, Yujung et al. Microengineered human blood-brain barrier platform for understanding nanoparticle transport mechanisms: Ibuprofen Drug Diffusion and In Vitro Cytocompatibility. . *Nature Communications*. 2020, roč. 11, č. 1, s. 1425-1454. ISSN 2041-1723. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13896-7>.

[69] NANDY, Atanu; CHAKRABORTY, Subhajit; NANDI, Somen; BHATTACHARYYA, Kankan; MUKHERJEE, Saptarshi et al. Structure, Activity, and Dynamics of Human Serum Albumin in a Crowded Pluronic F127 Hydrogel: Ibuprofen Drug Diffusion and In Vitro Cytocompatibility. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2019, roč. 123, č. 16, s. 3397-3408. ISSN 1520-6106. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b00219>.

[70] WU, Yanbin; JOSEPH, Sony a ALURU, N. R. Effect of Cross-Linking on the Diffusion of Water, Ions, and Small Molecules in Hydrogels. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2009, roč. 113, č. 11, s. 3512-3520. ISSN 1520-6106. <https://doi.org/10.1021/jp808145x>.

[71] WATKINS, Andrew W.; ANSETH, Kristi S. a ALURU, N. R. Investigation of Molecular Transport and Distributions in Poly(ethylene glycol) Hydrogels with Confocal Laser Scanning Microscopy. . *Macromolecules*. 2005, roč. 38, č. 4, s. 1326-1334. ISSN 0024-9297. <https://doi.org/10.1021/ma0475232>.

[72] BARTOSOVA, L. a BAJGAR, J. Transdermal Drug Delivery In Vitro Using Diffusion Cells. *Current Medicinal Chemistry*. 2012, roč. 19, č. 27, s. 4671-4677. ISSN 09298673. <https://doi.org/10.2174/092986712803306358>.

[73] FALK, B. a SHIVKUMAR. . *Materials Letters*. 2004, roč. 58, č. 26. ISSN 0167577X. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2004.05.072>.

[74] LORÉN, Niklas; HAGMAN, Joel; JONASSON, Jenny K.; DESCHOUT, Hendrik; BERNIN, Diana et al. . *Quarterly Reviews of Biophysics*. 2015, roč. 48, č. 3. ISSN 0033-5835. <https://doi.org/10.1017/S0033583515000013>.

[75] KARVINEN, Jennika; IHALAINEN, Teemu O.; CALEJO, Maria Teresa; JÖNKKÄRI, Ilari; KELLOMÄKI, Minna et al. Characterization of the microstructure of hydrazone crosslinked polysaccharide-based hydrogels through rheological and diffusion studies: Effects

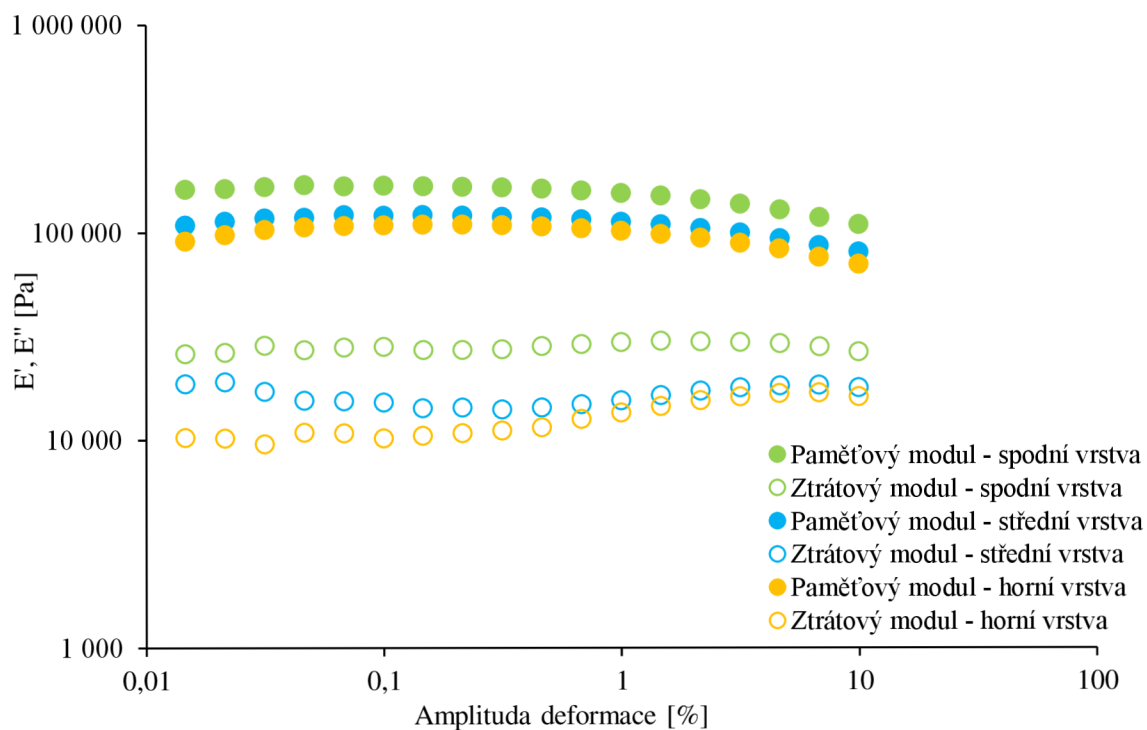
- of scaffold material, time, and culture conditions. *Materials Science and Engineering: C*. 2019, roč. 94, č. 2, s. 1056-1066. ISSN 09284931. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.10.048>.
- [76] CASCONE, M. G. a MALTINTI, S. Effect of chitosan and dextran on the properties of poly(vinyl alcohol) hydrogels. . *JOURNAL OF MATERIAL S SCIENCE: MATERIALS IN MEDICINE*. 1999, 10, s. 431-435.
- [77] ABDEL-MOHSEN, A. M.; ALY, A. S.; HRDINA, R.; MONTASER, A. S. a HEBEISH, A. Eco-Synthesis of PVA/Chitosan Hydrogels for Biomedical Application. . *Journal of Polymers and the Environment*. 2011, roč. 19, č. 4, s. 1005-1012. ISSN 1566-2543. <https://doi.org/10.1007/s10924-011-0334-0>.
- [78] HASSAN, Christie M. a PEPPAS, Nikolaos A. Structure and Applications of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freezing/Thawing Methods. . *Biopolymers · PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites*. Advances in Polymer Science. 2000, s. 37-65. ISBN 978-3-540-67313-2. https://doi.org/10.1007/3-540-46414-X_2.
- [79] JOSHI, Jnanada; HOMBURG, Sarah Vanessa a EHRMANN, Andrea. Atomic Force Microscopy (AFM) on Biopolymers and Hydrogels for Biotechnological Applications— Possibilities and Limits. *Polymers*. Advances in Polymer Science. 2022, roč. 14, č. 6, s. 37-65. ISBN 978-3-540-67313-2. ISSN 2073-4360. <https://doi.org/10.3390/polym14061267>.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

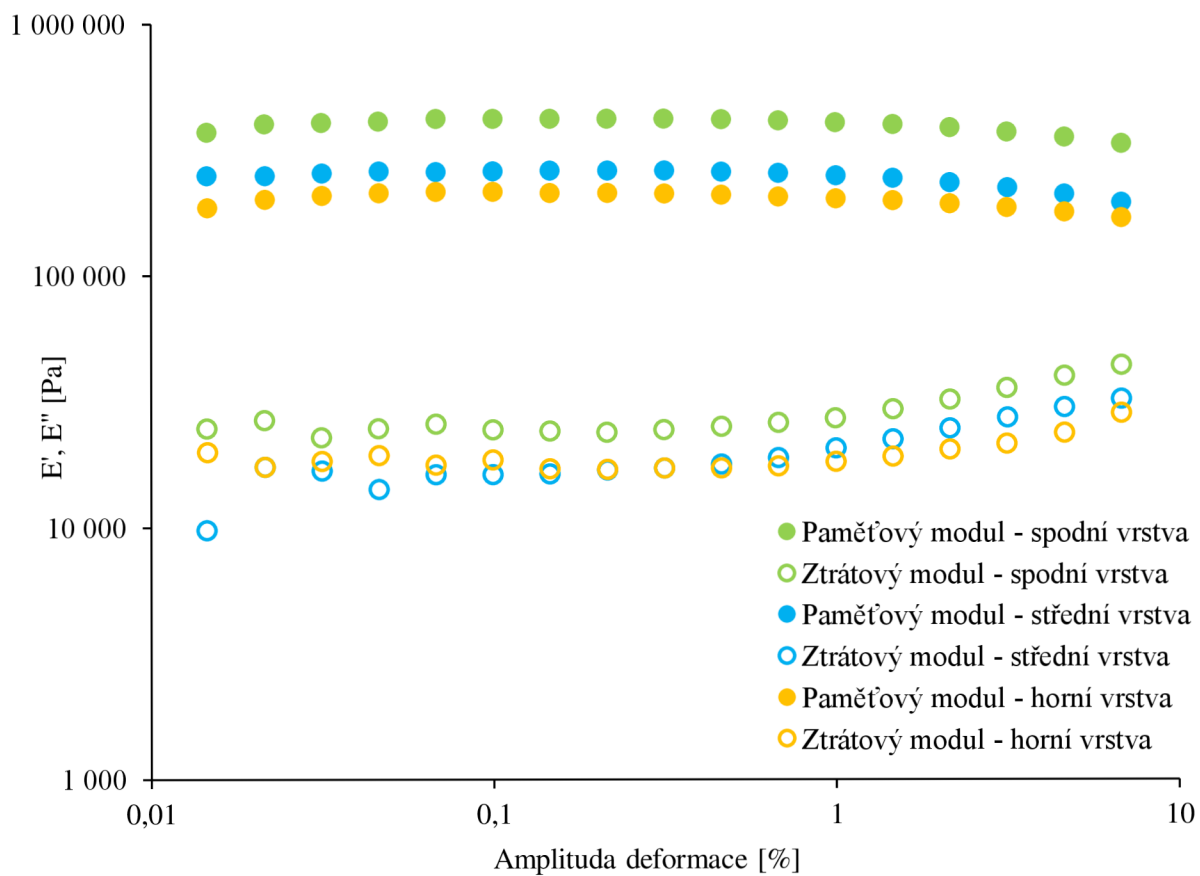
8.1 Seznam použitých zkratek

Zkratka	Význam zkratky
ADSC	kmenové tukové buňky
AFM	mikroskopie atomárních sil
BSE	zpětně odražené elektrony
DFT	směrové zmrazování a rozmrazování
DH	stupeň hydrolýzy
DMA	dynamická mechanická analýza
DMC	dichlormethan
ECM	extracelulární matrix
EDS	disperzní rentgenové spektrum
FCS	fluorescenční korelační mikroskopie
FRAP	metoda obnovení fluorescence po fotovybělení
FTIR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
HA	hydroxyapatit
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
CH	chitosan
LVO	lineární viskoelastická oblast
MM	methylenová modř
NIPAm	N-isopropylakrylamid
NIR	infračervená spektroskopie v blízké oblasti
NMR	spektroskopie nukleární magnetické rezonance
PCL	poly(ϵ -kaprolakton)
PDLLA	poly-D,L-laktid
PP	polypropylen
PPF	poly(propylenfumarát)
PS	polystyren
PVA	polyvinyl alkohol
RTG	rentgenové záření
SEM	rastrovací elektronová mikroskopie
Semi-IPN	semi-interpenetrované polymerní síť
UV-VIS	ultrafialová a viditelná spektroskopie
XPS	rentgenová fotoelektronová spektroskopie

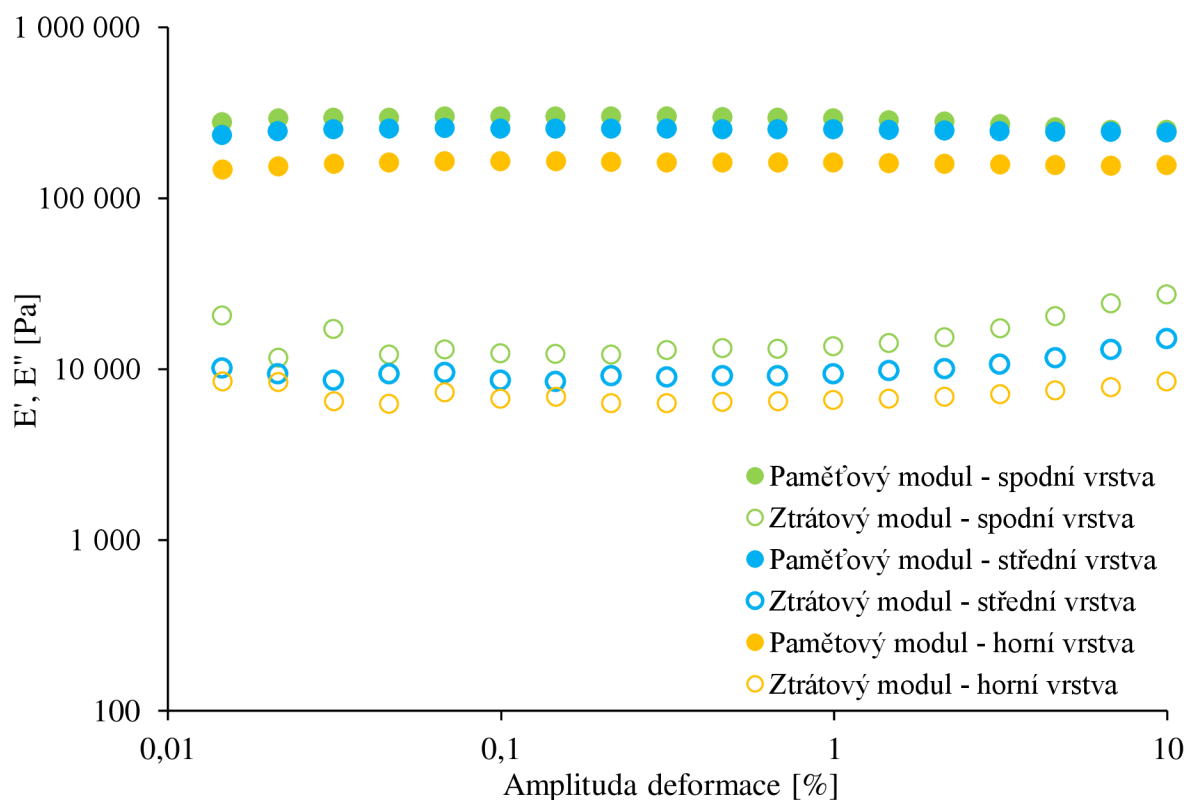
PŘÍLOHY



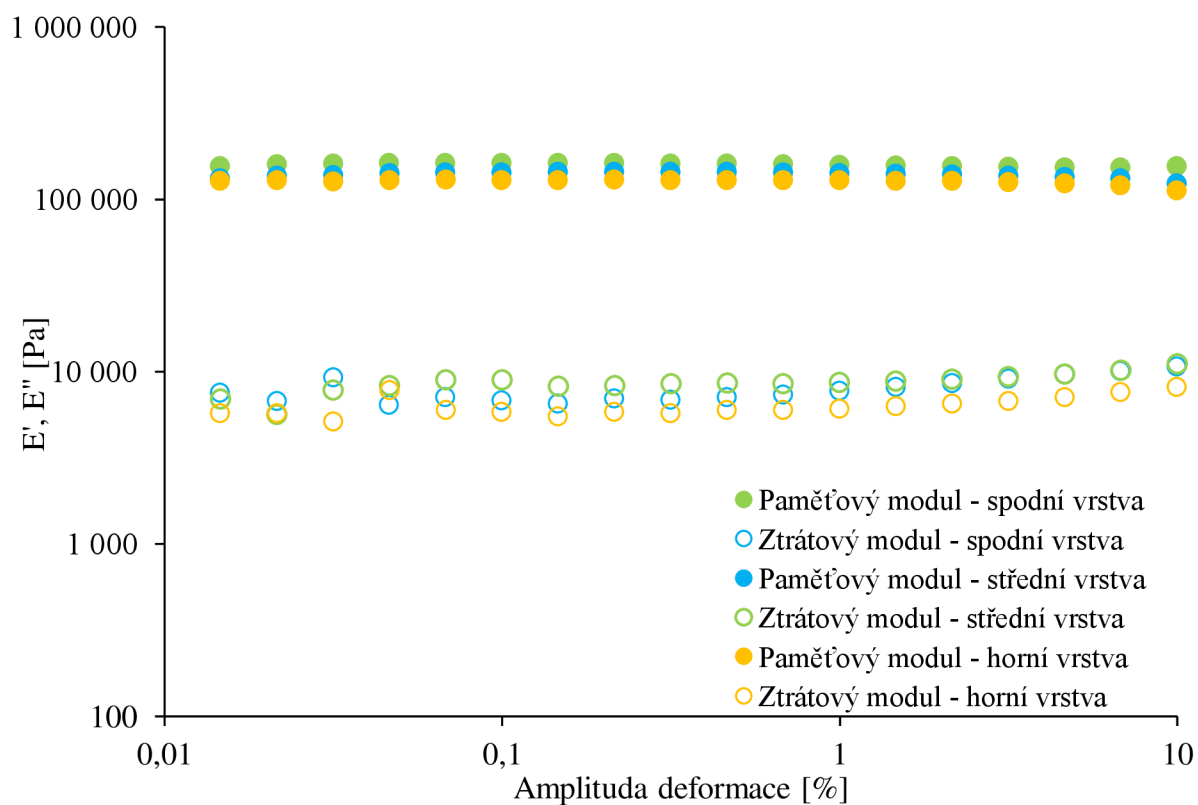
Příloha 1 Axiální oscilační test gradientového PVA hydrogelu (57 kDa)



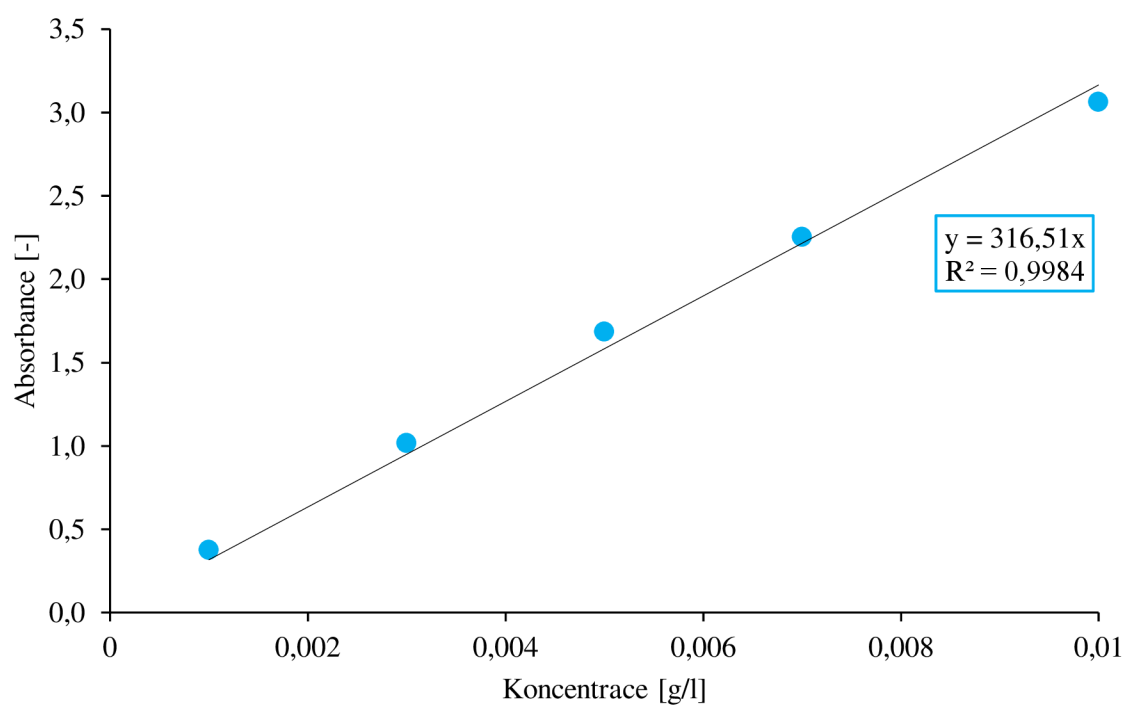
Příloha 2 Axiální oscilační test gradientového PVA hydrogelu (111 kDa)



Příloha 3 Axiální oscilační test pro semi-IPN gradientový hydrogel (PVA/CH 80/20 obj. %)



Příloha 4 Axiální oscilační test pro semi-IPN gradientový hydrogel (PVA/CH 60/40 obj. %)



Příloha 5 Kalibrační přímka pro methylenovou modř