



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

**INKORPORACE POLYELEKTROLYTOVÝCH
AKTIVNÍCH SLOŽEK DO HYDROGELOVÝCH
MATRIC – VLIV NA MECHANICKÉ A
TRANSPORTNÍ VLASTNOSTI**

INSERTION OF POLYELECTROLYTE ADDITIVES IN THE HYDROGEL MATRICES -
INFLUENCE ON THE MECHANICAL AND TRANSPORT PROPERTIES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Alica Dušenková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1267/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Alica Dušenková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název diplomové práce:

Inkorporace polyelektrolytových aktivních složek do hydrogelových matic – vliv na mechanické a transportní vlastnosti

Zadání diplomové práce:

1. Vypracovat literární rešerši na téma hydrogelových materiálů na bázi interpenetrovaných a semi-interpenetrovaných polymerních sítí.
2. Navrhnout kompozici modelových hydrogelů s inertní gelotvornou maticí a interpenetrovanou složkou na bázi syntetických nebo přírodních polyelektrolytů.
3. Připravit vzorkovou řadu gelů.
4. Na základě realizovaných materiálových analýz připravených vzorků diskutovat vliv polyelektrolytové složky především na mechanické a transportní vlastnosti výsledných gelů.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019

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

Bc. Alica Dušenková
student(ka)

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloš Pekař, C.Sc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Hlavným cieľom tejto diplomovej práce je skúmanie vplyvu inkorporovaných polyelektrolytových zložiek v modelovom hydrogéli na výsledné mechanické a transportné vlastnosti. Ako modelový materiál bol zvolený polyvinylalkoholový hydrogél, ktorý je možné sieťovať fyzikálne alebo chemicky. Skúmaný bol vplyv alginátu sodného, polystyren sulfonátu sodného a polyglutamátu sodného. Mechanické vlastnosti boli skúmané prostredníctvom reológie, tj. meraním viskoelastických vlastností. Transportné vlastnosti boli analyzované metódou difúzneho páru a metódou fluorescenčnej korelačnej spektroskopie.

ABSTRACT

The main aim of the diploma thesis is to investigate the influence of incorporated polyelectrolyte additives on the mechanical and transport properties of hydrogel. Hydrogels, based on polyvinylalcohol, were selected for these experiments. Gelation of polyvinylalcohol can be induced physically or chemically. The aim was to investigate the influence of sodium alginate, sodium polystyrene sulfonate and sodium polyglutamate. Mechanical properties were studied by rheology, through viscoelastic properties. Transport properties were analyzed by using two methods: diffusion pair and fluorescence correlation spectroscopy.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Hydrogély, polyvinylalkohol, polyelektrolyty, mechanické a transportné vlastnosti

KEYWORDS

Hydrogels, polyvinylalcohol, polyelectrolytes, mechanical and transport properties

DUŠENKOVÁ, Alica. *Inkorporace polyelektrolytových aktivních složek do hydrogelových matric – vliv na mechanické a transportní vlastnosti*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113442>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petr Sedláček.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že som všetky použité zdroje správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a ku komerčným účelom môže byť využitá len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

Podpis študenta

Pod'akovanie:

Rada by som touto cestou poďakovala vedúcemu diplomovej práce Ing. Petru Sedláčkovi Ph.D. za odborné vedenie, cenné rady a čas, ktorý mi počas celého štúdia venoval. Veľká vďaka patrí predovšetkým Ing. Monice Trudičové za jej vynaložený čas, ochotu, motiváciu a pomoc pri riešení experimentálnych problémov. Taktiež by som chcela poďakovať Ing. Katce Bílkové za pomoc v experimentálnej časti práce. Pod'akovanie patrí aj mojej rodine a blízkym za neustálu podporu počas celého môjho štúdia.

OBSAH

1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČASŤ	8
2.1 Hydrogély	8
2.1.1. Proces vzniku a bobtnania hydrogéllov	9
2.1.2. Interpenetrované a semi-interpenetrované polymérne siete.....	10
2.1.3. Inteligentné hydrogély	11
2.1.4. Použité materiály.....	12
2.1.4.1 Polyvinylalkohol.....	12
2.1.4.2 Alginát sodný.....	14
2.1.4.3 Polystyrén sulfonát sodný	15
2.1.4.4 Polyglutamát sodný	16
2.2 Mechanické vlastnosti hydrogéllov	16
2.2.1. Reológia	16
2.2.2. Viskoelasticita.....	18
2.2.3. Viskoelastické testy.....	19
2.3 Transportné vlastnosti hydrogéllov	20
2.3.1. Základný popis difúzie.....	20
2.3.2. Difúzia v hydrogéllových systémoch.....	21
2.3.3. Metódy stanovenia transportných vlastností.....	22
2.3.3.1 Fluorescenčná korelačná spektroskopia	22
2.3.3.2 Metóda difúzneho páru	23
3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	24
3.1 Polyvinylalkoholový hydrogél.....	24
3.2 (Semi)interpenetrované polymérne siete	26
4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	32
4.1 Použité chemikálie.....	32
4.2 Použité prístroje	32
4.3 Pracovný postup.....	32
4.3.1. Príprava zásobného roztoku polyvinylalkoholu.....	32
4.3.2. Príprava zásobného roztoku boraxu a polyelektrolytov.....	32
4.3.3. Príprava hydrogéllov	32

4.3.4. Reologické meranie.....	32
4.3.5. Stanovenie transportných vlastností gélov na makroskopickú úroveň	33
4.3.6. Stanovenie transportných vlastností gélov na molekulárnej úrovni	35
5 VÝSLEDKY A DISKUSIA	36
5.1 Optimalizácia postupu prípravy polyvinylalkoholových hydrogélů	36
5.2 Optimalizácia postupu stanovenia mechanických vlastností.....	39
5.2.1. Amplitúdový test.....	39
5.2.2. Frekvenčný test	42
5.3 Optimalizácia postupu stanovenia transportných vlastností.....	46
5.3.1. Optimalizácia metódy difúzneho páru	46
5.3.2. Diskusia výsledkov získaných metódou difúzneho páru	49
5.3.3. Diskusia výsledkov získaných metódou fluorescenčnej korelačnej spektroskopie	54
6 ZÁVER.....	57
7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	60
8 PRÍLOHA	68

1 ÚVOD

V súčasnej dobe nachádzajú hydrogély v biomedicínskych aplikáciách stále širšie uplatnenie. Klasické hydrogély, tie, ktoré sú tvorené len jednou polymérou sieťou sú, kvôli nedostatočným vlastnostiam, nahradzované (semi)interpenetrovanými polymérnymi sieťami, ktoré majú vo svojej štruktúre inkorporované aj ďalšie polyméry, prípadne ďalšie polymérne siete, čím sa dá ovplyvniť mnoho dôležitých vlastností.

Pre vývoj hydrogélových systémov a pre optimalizáciu ich praktického použitia je kľúčové pochopenie mechanických či transportných alebo iných aplikačne relevantných vlastností. Z tohto dôvodu je táto diplomová práca zameraná na sledovanie vplyvu inkorporovaných polyelektrolytových zložiek na výsledné mechanické a transportné vlastnosti modelového hydrogélu. Ako modelový materiál bol kvôli jeho širokému uplatneniu v biomedicínskych aplikáciách zvolený polyvinylalkoholový hydrogél, ktorý je možné sieťovať buď fyzikálne alebo chemicky.

K štúdiu mechanických vlastností bola zvolená metóda reológie, ktorá skúma deformáciu a tok materiálov pod vplyvom mechanických vonkajších síl. Reológia sa zároveň zaoberá aj stanovovaním viskoelastických vlastností. Transportné vlastnosti boli skúmané z makroskopického hľadiska, prostredníctvom metódy difúzneho páru, kedy transportný proces prebiehal zo zdrojového prostredia obsahujúceho PVA hydrogél s nenulovou koncentráciou rhodaminu 6G do prijímacieho prostredia obsahujúceho PVA hydrogél bez/s prídavkom polyelektrolytu s nulovou koncentráciou rhodaminu 6G. Metódou fluorescenčnej korelačnej spektroskopie boli procesy difúzie, z mikroskopického hľadiska, stanovované prostredníctvom sledovania tepelného pohybu inkorporovaných fluorescenčných častíc, v tomto prípade častíc rhodaminu 6G.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Hydrogély

Gély sú disperzie tuhých látok v kvapaline. Ide o zvláštny prípad disperzií, keďže disperzné častice tuhej látky nie sú izolované, ale sú vo vzájomnom kontakte a vytvárajú trojrozmernú sieťovú štruktúru prestupujúcu celým disperzným prostredím. Spojité je teda nie len disperzné prostredie, ale aj disperzný podiel. Hydrogély sú trojrozmerné polymérne siete, kde disperzným prostredím je voda [1].

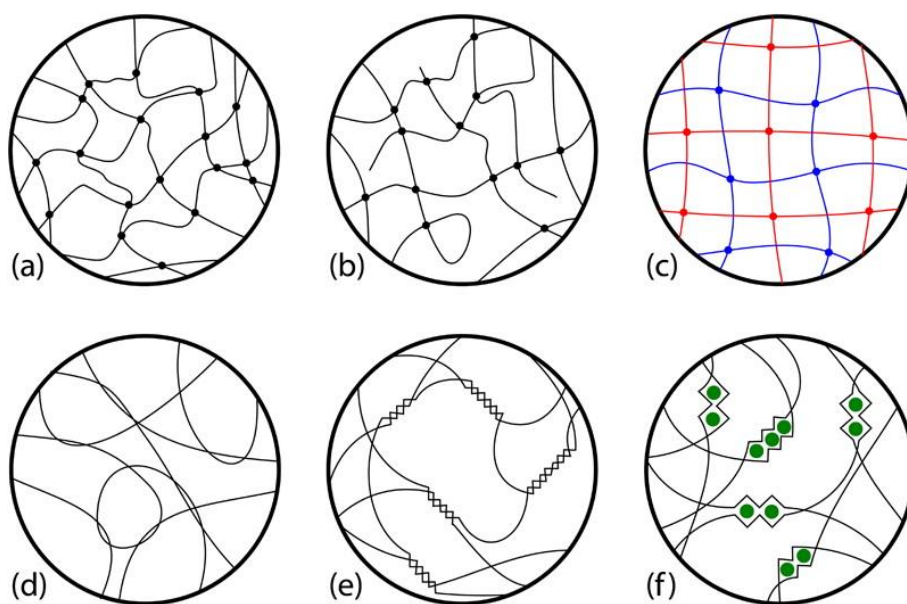
Pojem „hydrogél“ sa prvýkrát objavil v publikáciách okolo roku 1900, kedy išlo o koloidné gély anorganických solí. Neskôr v roku 1960 Wichterle a Lim prvýkrát vyvinuli trojrozmerný hydrofilný polymérny materiál, presnejšie polyhydroxyethylmethakrylátový (pHEMA) hydrogél zosieťovaný ethylendimethakrylátom, ktorý bol využívaný k výrobe kontaktných šošoviek [2]. Odvtedy sa výrazne začal rozvíjať výskum hydrogéllov. *Prvá generácia hydrogéllov* bola prevažne pripravovaná polymerizáciou vo vode rozpustných monomérov v prítomnosti sieťovacích činidiel [3; 4]. V sedemdesiatych rokoch Dušek a Patterson [5] teoreticky predpokladali, že zmeny vonkajších podmienok môžu vyvolať náhle zmeny v bobtnavosti (absorpcii vody) hydrogéllov, čo bolo o desať rokov neskôr aj experimentálne potvrdené. Vyvinula sa teda *druhá generácia hydrogéllov*, tzv. inteligentných hydrogéllov, reagujúcich na špecifický stimul, napr. na zmeny pH, teploty alebo koncentrácie špecifickej molekuly. Náhlou zmenou vonkajších podmienok je totiž možné doceliť polymerizáciu materiálu, uvoľnenie aktívnej látky zo štruktúry hydrogéllov, prípadne *in situ* tvorbu hydrogéllov [4; 6]. V deväťdesiatych rokoch boli rozpoznané aj ďalšie fyzikálne interakcie využiteľné pri syntéze *tretej generácie hydrogéllov*. Ide o stereokomplexáciu, tvorbu koordinačnej väzby alebo o peptidové interakcie [4].

Hydrogély rozlišujeme podľa viacerých kritérií. Z hľadiska pôvodu rozlišujeme hydrogély *syntetické* a *prírodné* (biopolymérne). Biopolymérne hydrogély sú tvorené proteínmi alebo polysacharidmi extrahovanými z rastlín, živočíchov alebo z morských rias. Štruktúrne sú podobné extracelulárnej matrix (ECM). Nevýhodou prírodných polymérov je obtiažna reprodukovateľnosť finálnych vlastností (mikroštruktúra, mechanické vlastnosti), keďže v mnohých prípadoch sa ich chemické zloženie a štruktúra môže značne líšiť. Syntetické polyméry sú, v porovnaní s prírodnými, ľahšie reprodukovateľné a ich finálna štruktúra závisí na podmienkach polymerizácie. Všeobecne, syntetické polyméry poskytujú väčšiu flexibilitu pri modifikovaní chemického zloženia a finálnych vlastností vytvoreného hydrogéllov [3].

Podľa povahy síl, ktoré stabilizujú sieťovú štruktúru, sa gély rozdeľujú na *fyzikálne sieťované* gély a gély *sieťované chemicky*. Gély majú v dôsledku tohto usporiadania mechanické vlastnosti charakteristické pre tuhý stav. Základom chemicky sieťovaných gélov sú kovalentné väzby medzi reťazcami polymérov vznikajúce aktiváciou reaktívnych miest v reťazci polyméru. K tomu dochádza v dôsledku zavedenia sieťovacieho činidla (napr. vhodná chemická látka, kation kovu alebo žiarenie) alebo v dôsledku zmeny pH, prípadne teploty roztoku polyméru. Štruktúra gélov s chemickými väzbami je pevná, čím väčší je počet kovalentných väzieb medzi reťazcami polyméru, tým rigidnejšia je vzniknutá priestorová

sieť [3; 7; 8]. Príkladom je napr. už spomínaný pHEMA hydrogél vytvorený v prítomnosti ethylendimethakrylátu, sieťovacieho činidla.

Pri fyzikálnom sieťovaní dochádza k asociácii medzi jednotlivým reťazcami v dôsledku fyzikálnych interakcií (hydrofóbne, elektrostatické interakcie alebo tvorba vodíkových väzieb) do útvarov, ktoré plnia funkciu uzlov. Gély s pevnými uzlovými oblasťami majú štruktúru podobnú ako gély s chemickými väzbami, zatiaľ čo gély so slabými spojmi v sieti nie sú pevné, ich mechanická odolnosť je nízka, pôsobením väčšieho napätia sa rozpadajú. Výhodou fyzikálneho sieťovania je neprítomnosť sieťovacích činidiel, ktoré v mnohých prípadoch môžu pôsobiť toxicky [3; 7; 8]. Príkladom fyzikálneho sieťovania prostredníctvom vodíkových väzieb je tvorba agarózového hydrogélu. Postupným ochladzovaním vodného roztoku agarózy časť reťazcov prechádza do podoby dvojjávitnic, ktoré sú následne stabilizované vodíkovými mostíkmi [9]. Vodíkové väzby vyvolávajú aj vznik kryštalickej fázy PVA, mechanizmus bude bližšie popísaný v podkapitole 2.1.4.1. Na základe iónových interakcií je vytváraný napr. alginátový hydrogél, kedy interakciou s dvojjávitnými vápenatými kationmi dochádza k sieťovaniu. Iónové interakcie môžu vznikáť aj medzi reťazcami opačne nabitých polymérov [7]. Na Obr. 1 sú schematicky znázornené rôzne druhy chemicky (*a až c*) a fyzikálne (*d až f*) sieťovaných gélov.



Obr. 1: Schematické znázornenie mikroštruktúr v polymérnej sieti v závislosti na type zosieťovania: (a) ideálna sieťová štruktúra, (b) štruktúra so slučkami a s voľne visiacimi koncami, (c) interpenetrovaná polymérna sieť, (d) zapletenina, (e) dvojjávitnicové segmenty, (f) iónové interakcie [10]

2.1.1. Proces vzniku a bobtnania hydrogélou

Gélová štruktúra, čiže trojdimenzionálna polymérna sieť, vzniká buď zosieťovaním (fyzikálnym alebo chemickým) alebo bobtnaním existujúceho xerogélu. Proces vzniku gélu je označovaný ako gelácia a bod, kedy sa v systéme objaví nekonečná trojrozmerná sieť, je označovaný ako bod gelácie (prechod zo sólu na gél). V priebehu gelácie sa postupne znižuje rozpustnosť polyméru (sólu) a po dosiahnutí bodu gelácie sa v systéme objavuje prvá gélová štruktúra, ktorá je už nerozpustná a v prítomnosti rozpúšťadla bobtná. Bod gelácie, spolu

s mechanickými vlastnosťami, sa stanovuje najčastejšie reologicky, tj. meraním viskoelastických vlastností [10; 11].

Bobtnanie je komplexný proces, pri ktorom dochádza k pohlčovaniu rozpúšťadla gélom. Hydrogély s hydrofilnými funkčnými skupinami bobtnajú vo vode v dôsledku interakcií medzi polymérom a vodou. Čím viac je teda hydrofilných funkčných skupín v polymérnej sieti, tým je výraznejšia aj bobtnavosť a s tým spojená expanzia polymérnej siete. K ďalšiemu pohlčovaniu rozpúšťadla dochádza v dôsledku osmotickej hnacej sily reťazcov polymérnej siete smerom k nekonečnému zriadeniu. Proti tomu pôsobia elastické sily polymérnej siete. Keďže v dôsledku bobtnania dochádza k zväčšovaniu objemu a aj k elastickej deformácii polymérnej siete, v sieti začne pôsobiť retrakčná sila. Retrakčná sila polymérnej siete následne pôsobí proti osmoticky hnacej sile a v určitom bode sa ustanoví rovnováha medzi týmito konkurenčnými silami. Čím je teda väčšia hustota sieťovania, tým je vyvíjaná aj vyššia retrakčná sila, a stupeň nabobtnania je menší. Bobtnanie je obmedzené v prípade kovalentne sieťovaných hydrogélom, polymérna sieť nemôže prejsť bez porušenia kovalentných väzieb do roztoku. Neobmedzene môžu bobtnať fyzikálne sieťované hydrogély, bobtnanie sa nezastavuje v štádiu lyogélu (prípade obmedzeného bobtnania), naopak dochádza k zániku uzlov a polymérna sieť prechádza do roztoku. Typ bobtnania závisí na rovnováhe medzi hydrogélom a okolitým rozpúšťadlom, na štruktúre hydrogélom a na fyzikálnych podmienkach [8; 11; 12].

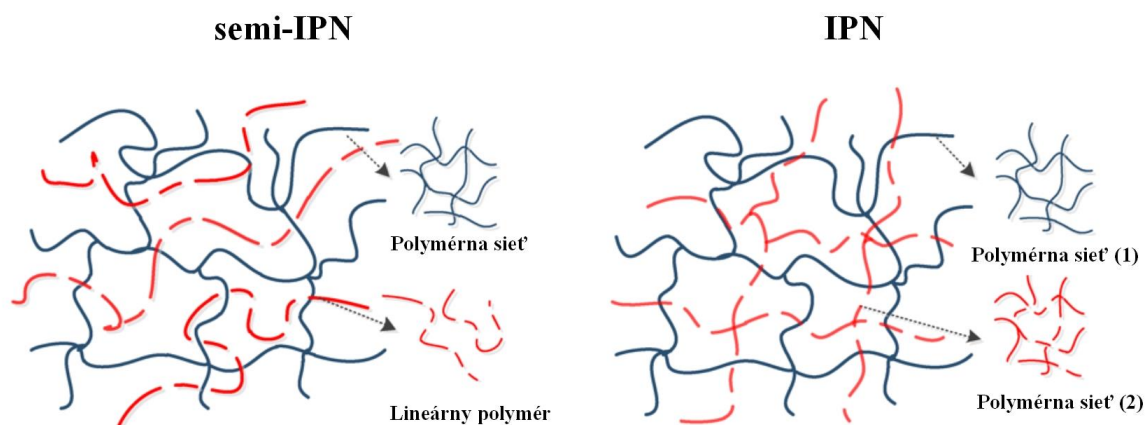
2.1.2. Interpenetrované a semi-interpenetrované polymérne siete

V posledných rokoch bola predstavená nová skupina polymérov, tzv. interpenetrované polymérne siete (IPN), s cieľom vylepšenia mechanických vlastností monokomponentných polymérnych sietí. IPN boli prvýkrát popísané v roku 1914, kedy Aylsworth navrhol prvú syntetickú IPN, avšak až v šesťdesiatych rokoch začali vedci prejavovať záujem o tieto zložité štruktúry, pričom Millar bol prvý, kto začal skúmať vlastnosti týchto materiálov a zaviedol termín „Interpenetrating Polymer Network“ [13].

Definícia IUPAC pre IPN je nasledujúca: „*Polymér obsahujúci dve alebo viac sietí, ktoré sú aspoň čiastočne prepletené na molekulárnej úrovni, ale nie sú vzájomne kovalentne viazané a nemôžu byť oddelené, pokiaľ nebudú chemické väzby prerušené. Zmes dvoch alebo viac dopredu vytvorených polymérnych sietí nie je IPN*“ [14]. Posledná veta sa pridáva ako poznámka s cieľom zdôraznenia rozdielu medzi IPN a zmesou polymérov. IPN (Obr. 2) sú teda zmesi dvoch alebo viacerých polymérnych sietí, pričom aspoň jedna je syntetizovaná v bezprostrednej prítomnosti druhej. Každá individuálna polymérna sieť si zachováva svoje vlastnosti, čiže v prípade IPN je prítomný synergický efekt materiálových vlastností polymérnych systémov. Od klasických zmesí polymérov je IPN možné rozlíšiť aj tým, že vo vodných roztokoch nedochádza k ich rozpúšťaniu, ale k bobtnaniu [13].

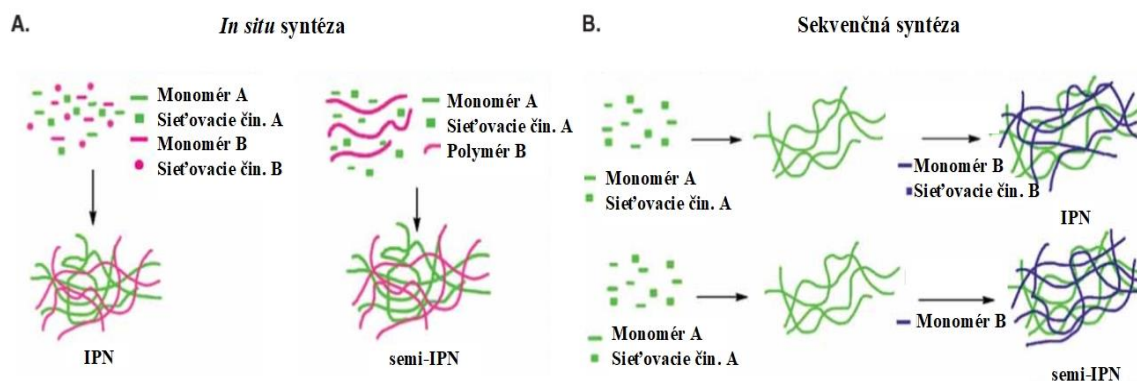
Ak je iba jedna polymérna zložka zosieťovaná, výsledná sieť je definovaná ako semi-IPN (Obr. 2), pričom definícia IUPAC je nasledujúca: „*Polymér obsahujúci jednu alebo viac sietí a jeden alebo viac lineárnych, prípadne rozvetvených polymérov vyznačujúcich sa prenikaním na molekulárnej úrovni aspoň jednej zo sietí aspoň niektorými z lineárnych alebo rozvetvených makromolekúl*“. Aj v tomto prípade je pridaná poznámka k zdôrazneniu rozdielu medzi semi-

IPN a IPN: „Semi-IPN sa odlišujú od IPN, pretože lineárne alebo rozvetvené polyméry tvoriace sieť môžu byť principiálne oddelené od siete polymérov bez porušenia chemickej väzby“ [14].



Obr. 2: Schematické znázornenie rozdielu medzi semi-IPN (naľavo) a IPN (napravo) [15]

Najčastejšie používaným postupom pre vytvorenie IPN je príprava *in situ*, ktorá zahŕňa miešanie reaktantov v roztoku pred spustením polymerizačnej reakcie alebo sieťovania. Syntéza dvoch sietí môže, ale nemusí byť iniciovaná v rovnaký čas a teda dve siete môžu byť vytvorené buď súčasne alebo postupne, ako je znázornené aj na Obr. 3. V postupnej, čiže sekvenčnej syntéze IPN, je prvá polymérna sieť syntetizovaná a nabobtnaná prekursorami potrebnými na syntézu druhej polymérnej siete, vzniká tak semi-IPN a následným sieťovaním v štruktúre prvej polymérnej siete vzniká IPN [16].



Obr. 3: Schematické znázornenie rozdielu medzi *in situ* prípravou (naľavo) a sekvenčnou syntézou (napravo) [16]

2.1.3. Inteligentné hydrogély

Jedným z najvýznamnejších úspechov v rámci kontrolovaného uvoľňovania liečiv je vývoj tzv. inteligentných alebo „smart“ hydrogelov reagujúcich na malé zmeny určitých parametrov okolitého prostredia, a to buď fyzikálneho (svetlo, tlak, teplota, elektrické/magnetické pole) alebo chemického (pH, iónová sila) charakteru [12]. Dôležité je zaistiť uvoľňovanie enkapsulovaného liečiva v reakcii na určité špecifické spúšťače vo vhodnom čase a v mieste účinku. Z biomedicínskeho hľadiska môže ísť o interný spúšťač (výsledok fyziologických

zmien v mieste účinku) alebo o spúšťač externý (umelo indukovaný). Z tohto pohľadu sú najdôležitejšie tie hydrogélové systémy, ktoré reagujú na zmenu teploty a/alebo pH okolitého prostredia (organizmu), keďže v ľudskom tele je na rôznych miestach rôzna hodnota pH [16].

Termosenzitívne polyméry podliehajú prechodu z hydrofilného materiálu na materiál hydrofóbny, čiže prechodu zo sólu na gél, a opačne, malou zmenou teploty v okolí tzv. kritickej rozpúšťacej teploty (*critical solution temperature*, CST). Rozlišujeme dva typy termosenzitívnych polymérov. Polyméry, vykazujúce dolnú kritickú rozpúšťaciu teplotu (*lower critical solution temperature*, LCST), sú pod hodnotu LCST hydrofilné a nad hodnotu LCST sa polyméry stávajú značne hydrofóbnymi a dochádza tak k prechodu zo sólu na gél. Opačným prípadom sú polyméry vykazujúce hornú kritickú rozpúšťaciu teplotu (*upper critical solution temperature*, UCST), a teda k prechodu zo sólu na gél dochádza znížením teploty pod hodnotu UCST. Polyméry s LCST sú v značnej miere študované pre biomedicínske a farmaceutické aplikácie, pričom pozornosť je zameraná predovšetkým na polyméry s LCST hodnotou blízkou hodnote fyziologickej teploty. Príkladom je syntetický polymér poly(N-isopropylakrylamid) (pNIPAAm) s LCST hodnotou 32–37 °C [12; 13; 17; 18].

Gély zosieťované polyelektrolytmi vykazujú pri malej zmene pH náhle zmeny vo vnútornej štruktúre polymérnej siete vplyvom elektrostatického odpudzovania vyvolaného ionizáciou kyslých/zásaditých funkčných skupín na polymérnom reťazci. V dôsledku toho dochádza k výraznému nabobtnaniu gélu, čo sa dá využiť k pohlteniu aktívnej látky. V cieľovom mieste účinku ďalšia zmena pH môže minimalizovať odpudivú silu, čo vyvolá uvoľnenie aktívnej látky do okolitého prostredia [12; 19].

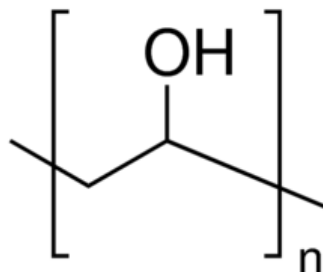
Hydrogély s jednou polymérnou sieťou majú slabé mechanické vlastnosti. Z tohto dôvodu boli vyvinuté (semi)interpenetrované polymérne siete vyznačujúce sa fyzikálno-chemickými vlastnosťami, ktoré sa výrazne líšia od vlastností hydrogélom s jednou polymérnou sieťou [13; 16]. Ako už bolo spomenuté, semi-IPN hydrogél je tvorený minimálne jedným polymérom a jednou polymérnou sieťou. Výhodou inkorporovaného polyméru je to, že poskytuje nielen rýchlejšiu odpoveď na zmeny pH/teploty, ale taktiež ovplyvňuje aj štruktúrnu morfológiu (veľkosť pórov) výsledných semi-IPN bez toho, aby výrazne menil mechanické vlastnosti semi-IPN hydrogélom. Opakom je IPN hydrogél obsahujúci iba polymérne siete ovplyvňujúce už aj mechanické vlastnosti, čoho výsledkom je relatívne husto zosieťovaná rigidná hydrogélomá matrica schopná efektívnejšej imobilizácie aktívnej látky v porovnaní s klasickými hydrogélomami. Vo všeobecnosti, systém umožňujúci interpenetráciu hydrofilného polyméru do hydrofóbnej polymérnej siete, a teda vznik IPN, výrazne zvyšuje schopnosť imobilizácie aktívnej látky čo otvára nové možnosti pri vyvíjaní systémom s kontrolovaním uvoľňovaním [12].

2.1.4. Použité materiály

2.1.4.1 Polyvinylalkohol

Polyvinylalkohol (PVA), prvýkrát popísaný v roku 1924, je lineárny syntetický polymér produkovaný voľnou radikálovou polymerizáciou vinylacetátu a následnou hydrolyzou acetátových skupín na skupiny alkoholové (Obr. 4). Stupeň hydrolyzy, väčšinou 85 až 100 %, definuje rôzne vlastnosti PVA, ako napr. kryštalinitu a rozpustnosť vo vodných roztokoch,

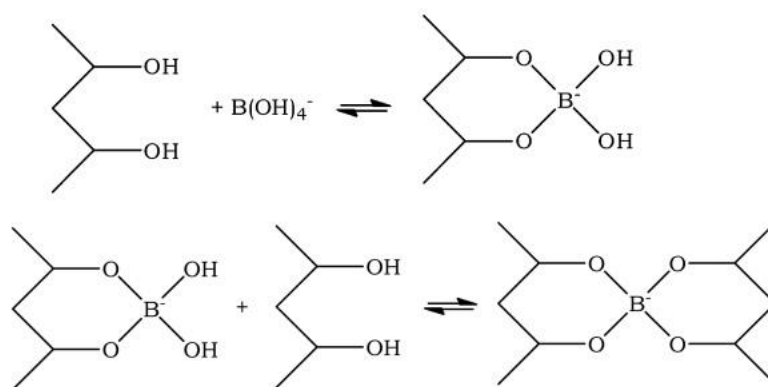
čo sú dôležité parametre pri určovaní vlastností hydrogéllov [4]. Vďaka priaznivým vlastnostiam (biokompatibilita, filmotvorná vlastnosť, chemická a mechanická rezistentnosť) je PVA polymér skúmaný pre jeho využitie v biomedicínskych alebo vo farmaceutických aplikáciách [20].



Obr. 4: Znáozornenie chemickej štruktúry polyvinylalkoholu [4]

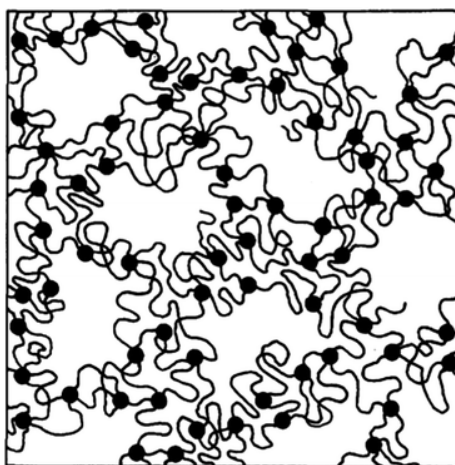
PVA hydrogély môžu byť zosieťované buď chemicky alebo fyzikálne. Chemicky je možné PVA hydrogély zosieťovať použitím dvojmocných, prípadne viacmocných sieťovacích činidiel s funkčnými skupinami reagujúcimi s hydroxylovými skupinami PVA, ako napr. aldehydy, anhydridy alebo isokyanáty. Najväčším rizikom pri tejto metóde je možná prítomnosť reziduí sieťovacích činidiel a ich následná toxicita, čo môže mať nepriaznivý vplyv pri aplikovaní hydrogéllov v biomedicíne [4].

PVA polymér vytvára komplexy aj s dekahydrátom tetraboritanu sodného (borax), čo pri dostatočnej koncentrácii vedie k tvorbe hydrogélového systému. Dvojstupňový mechanizmus sieťovania tetraboritanového iónu s PVA (Obr. 5) je založený na di-diol komplexácii medzi dvoma diolovými jednotkami a jedným tetraboritanovým iónom. V prvom stupni interaguje tetraboritanový ión s polymérnym reťazcom PVA, vzniká mono-diol komplex s charakterom polyelektrolytovej štruktúry. Očakávané je teda elektrostatické odpudzovanie monodiolových jednotiek, čoho výsledkom je expanzia individuálnych polymérnych reťazcov. Týmto vzniká výhodná konformácia na tvorbu di-diol komplexu, a to intramolekulárne aj intermolekulárne, čoho výsledkom je hydrogélový systém. Platí, že koncentrácia tetraboritanových aniónov má väčší efekt na tvorbu hydrogélu ako koncentrácia PVA. Sodné katióny tetraboritanu totiž elektrostaticky tienia celkový negatívny náboj na polyelektrolytovom reťazci. Vzniká tak PVA hydrogél s vyššou hustotou zosieťovania. Hydrogélový systém je teda výsledkom rovnováhy vylúčeného objemu polymérov, elektrostatického odpudzovania nabitých úsekov na polymérnom reťazci a tieniaceho efektu sodných katiónov [21; 22].



Obr. 5: Mechanizmus sieťovania tetraboritanového iónu s PVA [23]

Proces sieťovania PVA prostredníctvom fyzikálnych interakcií, ktorý prvýkrát publikoval v roku 1975 Peppas [24], spočíva v niekoľkých opakovacích cykloch zmrazovania a rozmrazovania (metóda *freeze-thaw*). V priebehu zmrazovania vodného roztoku PVA dochádza k fázovej premene vody na ľad, a teda k fázovej separácii, čo vyvolá vytlačenie PVA polyméru a tým pádom tvorbu oblastí s vyššou koncentráciou PVA. Následkom toho sú PVA reťazce v blízkom kontakte, dochádza ku kryštalizácii a k tvorbe vodíkových väzieb medzi jednotlivými reťazcami PVA. Tieto interakcie zostávajú neporušené aj pri rozmrazovaní a výsledkom je hydrogélová polymérna sieť (Obr. 6). Vlastnosti takto vytvoreného PVA hydrogélu závisia nielen na molekulovej hmotnosti a koncentrácii PVA polyméru, ale aj na teplote, dĺžke zmrazovania/rozmrazovania a na počte opakovacích cyklov [25].



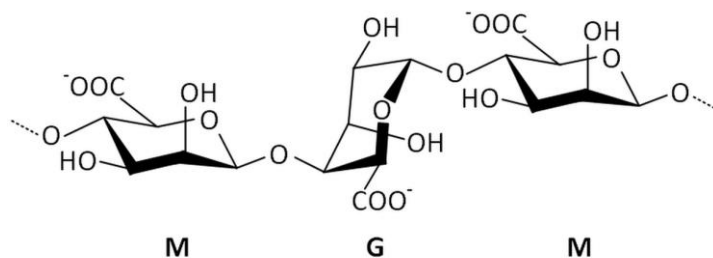
Obr. 6: Schematické znázornenie mikroštruktúry fyzikálne sieťovaných PVA gélov [25]

Vodné roztoky PVA polyméru prechádzajú v hydrogélovú polymérnu sieť aj pri dostatočne dlhom skladovaní pri laboratórnej teplote a to starnutím v podobe postupnej kryštalizácie. Mechanické vlastnosti hydrogélu sú ale nedostatočné pre ich následné aplikovanie [25; 26].

2.1.4.2 Alginát sodný

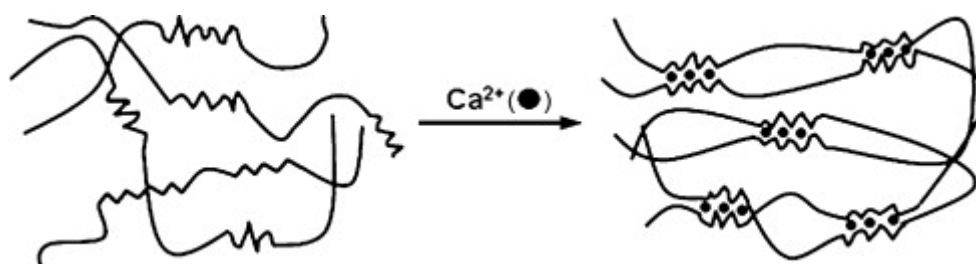
Alginát je aniónový polysacharid, soľ kyseliny algínovej, získavaný extrakciou z hnedých morských rias, prípadne môže byť produkovaný pôdnou baktériou *Azotobacter vinelandii*. Štruktúrne ide o lineárny kopolymér tvorený monomérmi β -D-manuronovej (M) a α -L-guluronovej kyseliny (G) viazanými (1,4) glykozidovou väzbou. Tieto monoméry sú

usporiadané buď ako homopolymérne bloky (GG, MM) alebo ako striedajúce sa bloky M a G, pričom pomer monomérov M/G závisí na prírodnom zdroji alginátu (Obr. 7) [27].



Obr. 7: Naznačenie chemickej štruktúry alginátu [28]

Alginát môže tvoriť fyzikálne sieťovaný hydrogél, a to prostredníctvom iónových interakcií, v prítomnosti divalentných (hlavne vápenatých) katiónov. Nutné je podotknúť, že na intermolekulárnom zosieťovaní s vápenatými katiónmi sa podieľajú iba G bloky lineárneho kopolyméru. Obr. 8 schematicky znázorňuje zosieťovanie alginátu. Výsledné vlastnosti alginátového hydrogélu teda závisia na pomere M/G a na dĺžke G blokov kopolyméru [27; 28].



Obr. 8: Schematické znázornenie prípravy alginátového hydrogélu prostredníctvom iónových interakcií [28]

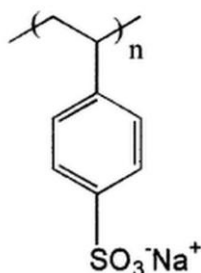
Alginát sa vyznačuje biokompatibilitou, nízkou toxicitou a štruktúrnou podobnosťou s extracelulárnou matrix (ECM) živých tkanív, čo umožňuje využitie alginátu v mnohých biomedicínskych oblastiach (kontrolované hojenie rán, enkapsulácia a následné uvoľnenie bioaktívnych látok). Alginátové kryty rán minimalizujú bakteriálnu infekciu, udržuujú hydrofilné prostredie okolo rany, a urýchľujú jej hojenie. Úpravou stupňa zosieťovania alginátu je možné docieľiť kontrolované uvoľňovanie aktívnych látok [28].

Vďaka svojim vlastnostiam je alginát častokrát súčasťou (semi)interpenetrovaných polymérnych sietí, a to hlavne v kombinácii so syntetickými alebo prírodnými polymérmi reagujúcimi na zmenu pH alebo teploty (pNIPAAm) [13]. Príkladom je aj inkorporácia alginátu do fyzikálne zosieťovanej PVA hydrogélovej membrány v rámci využitia takéhoto materiálu pri kontrolovanom hojení rán, keďže alginát je v porovnaní s PVA hydrofilnejší a vyznačuje sa biodegradabilitou [20].

2.1.4.3 Polystyrén sulfonát sodný

Polystyrén sulfonát sodný (PSS) je hydrofilný polymér, presnejšie soľ, ktorej základom je, z chemického hľadiska, styrenový skelet s naviazanými funkčnými sulfonátovými skupinami (Obr. 9). Ide o iónomenič, ktorý uvoľňuje sodné ióny a absorbuje iné katióny, hlavne

draslík. Tento polymér našiel vysoké uplatnenie v medicíne, využíva sa k znižovaniu koncentrácie draslíka v krvi pri hyperkalémii [29; 30].



Obr. 9: Znáznornenie chemickej štruktúry polystyrén sulfonátu sodného [29]

2.1.4.4 Polyglutamát sodný

Polyglutamátová kyselina (PGA) je vo vode rozpustný, aniónový polymér. Vo forme kyseliny (H^+) sa síce vo vode nerozpúšťa, zatiaľ čo vo forme soli (K^+ , Na^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) je PGA už kompletne vo vode rozpustný. Ide o biodegradabilný, netoxický materiál, ktorého hygroskopické a zvlhčujúce účinky sú porovnateľné s účinkami kyseliny hyaluronovej. PGA má taktiež značné adsorpčné vlastnosti, takže je využiteľný aj ako adsorbant [31].

2.2 Mechanické vlastnosti hydrogélů

Jedným z kľúčových faktorov pri analyzovaní hydrogélůvých systémův je stanovenie ich mechanických vlastností. Tie sú ovplyvnené typom (fyzikálne, chemické) a hustotou zosieťovania (koncentrácia polyméru, prípadne sieťovacích činidiel). Mechanické vlastnosti hydrogélův úzko súvisia aj s procesmi bobtnania (popísaný v podkapitole 2.1.1) a difúzie (bližšie bude popísaná v podkapitole 2.3.2). Najčastejšou metódou stanovenia mechanických vlastností hydrogélův je reológia [10].

2.2.1. Reológia

Predmetom reológie je štúdium deformácie a toku materiálov pod vplyvom mechanických vonkajších síl. Podľa mechanických vlastností materiálov rozlišujeme ideálnu (*newtonskú*) kvapalinu a ideálne pevné (*hookovské*) teleso.

Ideálne elastické teleso je charakterizované Hookovým zákonom elasticity,

$$\sigma = G \cdot \gamma \quad (1)$$

kde σ je šmykové napätie, G je šmykový modul a γ je šmyková deformácia. Šmykový modul vyjadruje tuhosť materiálu, nezávisí na šmykovom napätí ani na dobe trvania deformácie.

Viskozita ideálnych kvapalín je definovaná Newtonovým zákonom,

$$\sigma = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (2)$$

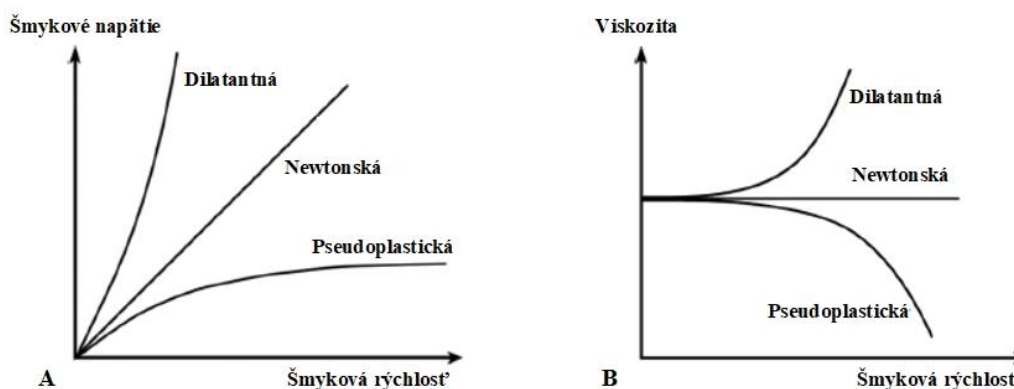
kde $\dot{\gamma}$ je šmyková rýchlosť a η je dynamická viskozita. Dynamická viskozita newtonských kvapalín je látková konštanta, jej hodnota závisí na teplote a tlaku, ale nezávisí na šmykovej rýchlosti ani na šmykovom napätí.

Väčšina kvapalín avšak preukazuje odlišné správanie, ich viskozita už nie je látkovou konštantou, ale mení sa v závislosti na čase, šmykovej rýchlosti a šmykovom napätí. Ide o *nenewtonské* kvapaliny, pre ktoré platí Newtonov zákon:

$$\sigma = \eta_{ZD} \cdot \dot{\gamma} \quad (3)$$

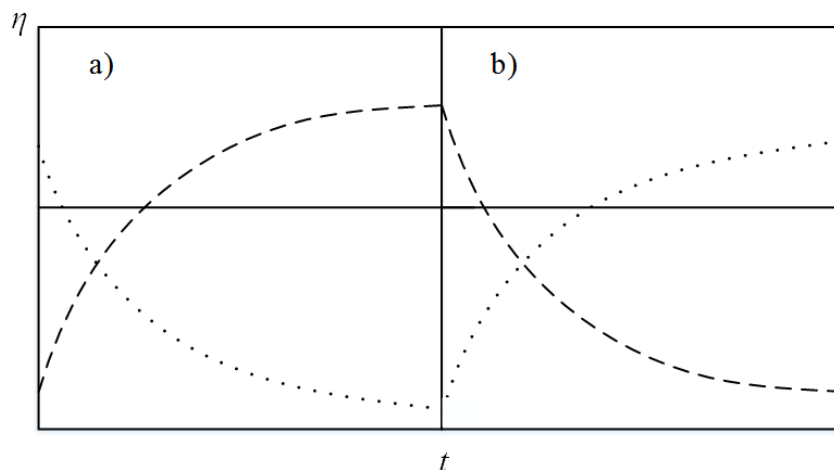
kde namiesto dynamickej viskozity je viskozita zdanlivá η_{ZD} [32].

Podľa toho či zdanlivá viskozita, príp. šmykové napätie klesá alebo rastie v závislosti na šmykovej rýchlosti, rozlišujeme *binghamské*, *pseudoplastické* a *dilatantné* kvapaliny. Pre *binghamské* kvapaliny je typické to, že k toku dochádza až pri dosiahnutí určitej šmykovej rýchlosti. Ak zdanlivá viskozita s rastúcou šmykovou rýchlosťou klesá, ide o *pseudoplastické* kvapaliny (Obr. 10). Opačným prípadom sú kvapaliny *dilatantné*, kedy zdanlivá viskozita rastie s rastúcou šmykovou rýchlosťou. Tento efekt je pozorovaný aj v prípade PVA hydrogélu zosieťovaného v prítomnosti boraxu [23].



Obr. 10: Tokové krivky pre newtonskú, dilatantnú a pseudoplastickú kvapalinu: (A) závislosť šmykového napätia na šmykovej rýchlosti, (B) závislosť viskozity na šmykovej rýchlosti [32]

Z hľadiska zmeny zdanlivej viskozity s dobou pôsobenia šmykového napätia rozlišujeme *tixotropné* a *reopexné* kvapaliny (Obr. 11). *Tixotropnými* vlastnosťami sa vyznačujú pseudoplastické systémy, ako aj fyzikálne pútané gély, ich zdanlivá viskozita s časom postupne klesá a po odstránení pôsobiaceho napätia sa opäť blíži k pôvodnej hodnote. Typická je však hysterezia, kedy priebeh tokovej krivky nameranej pri pravidelnom zvyšovaní napätia nie je totožný s priebehom nameraným pri jeho znižovaní. Opačne sa správajú *reopexné* kvapaliny, v tomto prípade ich zdanlivá viskozita s časom postupne rastie a po odstránení pôsobiaceho napätia zdanlivá viskozita opäť klesá k pôvodnej hodnote [23; 33].



Obr. 11: Časová závislosť zdanlivej viskozity pre newtonskú kvapalinu (plná čiara), tixotropnú kvapalinu (bodkovaná) a reopektickú kvapalinu (čiarkovaná) a) pri pôsobení napätia na kvapalinu, b) pri odstránení zdroja napätia [34]

Väčšina polymérnych materiálov vykazuje radu mechanických vlastností charakteristických pre tuhé látky (odpor proti deformácii), ale aj pre kvapaliny (tok pri deformácii). Takéto materiály označujeme ako *viskoelastické*, typickým príkladom sú gély. Aj keď je ich disperzné prostredie kvapalné, gély v dôsledku svojho usporiadania vykazujú mechanické vlastnosti charakteristické pre tuhý stav. Úlohou reológie je stanovenie vzťahu medzi deformáciou, napätím a časom, ale taktiež aj stanovenie vzťahu medzi štruktúrou daných materiálov a ich viskoelastickými vlastnosťami.

2.2.2. Viskoelasticita

Polymérne materiály, v tomto prípade gély, majú viskoelastický charakter, a teda ich vlastnosti, ako už bolo spomenuté, závisia na mnohých faktoroch (teplota, doba pôsobenia deformácie). Viskoelastické materiály sa do určitej miery správajú ako elastické a kvapalné látky zároveň, a to, či sa prejaví ich viskóznny alebo elastický charakter, závisí na dobe a miere pôsobenia deformácie.

Mechanickým namáhaním elastického materiálu dochádza k jeho deformácii, ktorá je priamoúmerná aplikovanému napätiu a konštantná, ak je konštantné aj aplikované napätie – deformácia odpovedá Hookovmu zákonu. Po ukončení pôsobiaceho napätia sa uchovaná elastická energia uvoľní, deformácia sa okamžite odstráni a materiál sa vráti do svojho pôvodného nedeformovaného tvaru. Opačným prípadom sú newtonské kvapaliny, tie sa deformujú rýchlosťou, ktorá je priamoúmerná aplikovanému napätiu. Deformácia je ale trvalá, energia je disipovaná na teplo. Ak je mechanicky namáhaný viskoelastický materiál, časť pôsobiacej energie sa premení na energiu elastickú a časť je disipovaná, čiže po odstránení napätia sa časť deformácie odstráni okamžite a zbytok deformácie sa buď odstráni pomalou relaxáciou alebo nezmizne vôbec [35].

Gél sa až do určitej hodnoty napätia (tzv. kritické napätie), správa ako tuhé elastické teleso a napätiu odoláva. Účinok vonkajšej sily je prenášaný na celú gélovú sieť, dochádza k zmene polôh kovalentných väzieb, prípadne uzlov. Vyššie napätie už vyvolá nevratnú zmenu štruktúry

gél. Hodnota napätia závisí na type polyméru, na koncentrácii a pevnosti uzlov, príp. kovalentných väzieb. Kovalentne sieťované gély s malým počtom väzieb sú značne elastické a naopak, čím väčší je počet kovalentných väzieb, tým rigidnejšia je priestorová sieť. Ak sú v štruktúre fyzikálne pútaných gélov uzly o rôznej pevnosti, mechanickým namáhaním sa porušujú iba najmenej pevné väzby, tieto gély vykazujú tixotropné vlastnosti [8].

Viskoelastické vlastnosti sú matematicky vyjadrované prostredníctvom elastického G' a viskózneho modulu G'' . Elastický modul je mierou energie uloženej pri deformácii, zatiaľ čo viskózný modul predstavuje množstvo deformačnej energie, ktorá je spotrebovaná pri zmene štruktúry materiálu. S elastickým a viskóznym modulom úzko súvisí aj tangens stratového uhlu δ , ktorý je rovný podielu viskózneho a elastického modulu:

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (4)$$

Táto veličina sa využíva na stanovenie toho, či v materiáli prevláda viskózna alebo elastická zložka. Platí, že ak je $\delta = 45^\circ$, tak neprevažuje v materiáli ani viskózne, ani elastické správanie. Ak je $\delta < 45^\circ$, v materiáli prevláda elastická zložka, a naopak, ak je $\delta > 45^\circ$, tak v materiáli prevláda zložka viskózna. Dôležitý je aj komplexný modul $|G^*|$ podávajúcí informácie o celkovej rigidite materiálu [36]:

$$|G^*| = \sqrt{G'^2 + G''^2} \quad (5)$$

2.2.3. Viskoelastické testy

K sledovaniu viskoelastických vlastností materiálov sa využívajú viskoelastické testy, prostredníctvom ktorých vieme stanoviť viaceré charakteristické vlastnosti gélov, ako napr. hustotu a typ zosieťovania, bod gelácie či degradácie gélu, starnutie gélu, prípadne prítomnosť štruktúrnych nehomogenít.

Pri charakterizovaní gélov je v prvom kroku nutné stanoviť lineárnu viskoelastickú oblasť (LVO), v rámci ktorej nedochádza k porušeniu štruktúry gélu. Tá sa určuje prostredníctvom amplitúdového testu (*strain sweep*), čo je závislosť viskoelastických modulov (elastický modul G' , viskózný modul G'') na zvyšujúcej sa amplitúde deformácie pri konštantnej frekvencii oscilácie senzoru reometra. Amplitúdový test slúži taktiež aj k určeniu toho, či v materiáli prevláda zložka viskózna alebo elastická. V prípade gélov má prevládať zložka elastická. Viskoelastické moduly sú v oblasti LVO konštantné, nezávislé na aplikovanej deformácii. Hodnota amplitúdy deformácie, pri ktorej končí LVO, sa nazýva limitná amplitúda deformácie γ_c [32].

Po určení vhodnej hodnoty amplitúdy deformácie z oblasti LVO je možné pristúpiť k frekvenčnému testu (*frequency sweep*), čo je závislosť viskoelastických modulov na frekvencii oscilácie senzoru pri konštantnej hodnote amplitúdy deformácie. Pre gély všeobecne platí, že pri nízkej frekvencii oscilácie (charakterizuje dlhodobé deformačné odozvy gélu) sa prejavuje viskózný charakter ($G'' > G'$), keďže pri dlhšom pozorovaní dochádza k reorganizácii mikroštruktúry gélu. Naopak, pri vyššej frekvencii oscilácie (charakterizuje krátkodobú deformačnú odozvu) prevažuje elastický charakter ($G'' < G'$). Frekvenčný test

služi k určeniu hodnoty frekvencie oscilácie, pri ktorej je pozorovaný ideálne viskoelastický charakter gélu, čiže bod, kedy dochádza k pretnutiu elastického a viskózneho modulu [32; 37].

Bod gelácie sa stanovuje prostredníctvom časového testu (*time sweep*), čo je závislosť viskoelastických modulov na čase pri konštantnej hodnote amplitúdy deformácie (určenej z oblasti LVO) a konštantnej hodnote frekvencie oscilácie (určenej frekvenčným testom). V priebehu gelácie skúmaný gél stráca vlastnosti odpovedajúce viskózne kvapaline, postupne sa zvyšuje hodnota elastického modulu, ktorá prevýši hodnotu viskózneho modulu. V bode gelácie majú elastický a viskózny modul rovnakú hodnotu ($G'' = G'$) [37].

2.3 Transportné vlastnosti hydrogélů

Okrem stanovenia mechanických vlastností hydrogélů je mimoriadne dôležité aj pochopenie difúzných procesov prebiehajúcich v hydrogéli, keďže tie sú taktiež ovplyvnené štruktúrou a morfológiou polymérnej siete. Naopak, štruktúrna charakterizácia hydrogélů umožňuje predpovedať rýchlosť difúzie modelovej látky, a tým je možné zoptimalizovať prípravu hydrogélů tak, aby daný hydrogél spĺňoval kinetické požiadavky na uvoľňovanie aktívnej látky. Z hľadiska difúzných procesov sa hydrogély využívajú napr. na štúdium difúzie modelových látok alebo ako nosičové systémy vo farmácii [38].

2.3.1. Základný popis difúzie

Kinetické vlastnosti disperzných systémov, nielen gélov, sú dané tepelným, tzv. *Brownovým pohybom molekúl*. Podstatou Brownovho pohybu na mikroskopickú úroveň je náhodný neusporiadaný pohyb molekúl bez preferovanej trajektórie, avšak z makroskopického hľadiska je tento pohyb pozorovaný len z oblasti vyššej koncentrácie molekúl do oblasti nižšej koncentrácie. Takýto prestup látky označujeme pojmom *difúzia*.

Hnacou silou difúzie je rozdiel koncentrácie transportovanej látky v dvoch miestach, medzi ktorými sa transport uskutočňuje. Rýchlosť difúzie je vyjadrovaná prostredníctvom difúzneho toku J_i definovaného v stacionárnom prostredí ako látkové množstvo difundujúcej zložky i , ktorá za jednotku času prejde jednotkovou plochou kolmou k smeru difúzie. Difúzny tok je pri jednorozmernej stacionárnej difúzii (v smere osi x) úmerný koncentračnému gradientu

$$J_i = -D_i \cdot \frac{\partial c_i}{\partial x} \quad (6)$$

kde c_i je molárna koncentrácia difundujúcej zložky a x je vzdialenosť. Rovnica (6) sa nazýva **I. Fickov zákon**. Koeficient D je označovaný ako *difúzny koeficient* a má rozmer $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Difúzny koeficient udáva mieru mobility difundujúcej zložky a číselne je rovný látkovému množstvu difundujúcej zložky i , ktorá prejde jednotkovou plochou za jednotku času pri jednotkovom koncentračnom gradiente. Závisí na vlastnostiach prostredia a difundujúcich častíc (teplota, veľkosť častíc, viskozita prostredia) [8; 39].

II. Fickov zákon (7) vyjadruje časovú zmenu koncentrácie difundujúcej zložky pri nestacionárnej difúzii. Koncentrácia difundujúcej zložky teda nezávisí len na priestorovej súradnici, ale aj na čase [39].

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = D_i \cdot \frac{\partial^2 c_i}{\partial x^2} \quad (7)$$

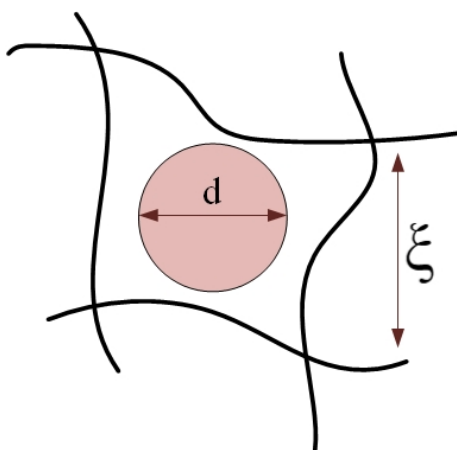
2.3.2. Difúzia v hydrogélových systémoch

Transport látky v hydrogélach je výrazne ovplyvnený viacerými faktormi. Difúzny koeficient rozpustenej látky ovplyvňuje napr. štruktúra a veľkosť pórov, obsah vody alebo aj štruktúra a veľkosť molekúl difundujúcej látky. V poréznom systéme difunduje látka skrz póry naplnené disperzným prostredím, a to po kľukatej trajektórii, čoho výsledkom je nižšia rýchlosť pohybu molekúl než v prípade čistého disperzného prostredia. Proces difúzie je v prípade hydrogélou vyjadrovaný prostredníctvom *efektívneho difúzneho koeficientu*, ktorý zohľadňuje pórovitosť gélovej siete a je definovaný ako

$$D_{eff} = D^0 \cdot \frac{K_p \cdot \varepsilon}{\tau} \quad (8)$$

kde D^0 je difúzny koeficient v čistom rozpúšťadle, ε je porozita, τ je tortuozita vyjadrujúca vplyv predĺženia dráhy molekuly v géli a K_p je partičný koeficient vyjadrujúci koncentračný skok (pomer koncentrácie difundujúcej látky zo strany gélu a okolitého prostredia) na fázovom rozhraní.

Pokiaľ sú póry výrazne väčšie ako molekuly difundujúcej látky, tak je proces difúzie spomaľovaný iba v dôsledku prítomnosti polymérnej siete. Ak sa ale veľkosť molekúl difundujúcej látky blíži veľkosti pórov, vtedy sa zvyšuje aj vplyv interakcie difundujúcej látky s pevnou fázou gélu a spomaľuje sa tak transport difundujúcej látky. Transport difundujúcej látky môže byť ovplyvnený aj prítomnosťou veľkého množstva reaktívnych skupín na reťazci sieťovaného polyméru, ktoré môžu určitým spôsobom interagovať s difundujúcou látkou [11].



Obr. 12: Schematické porovnanie veľkosti pórov (ζ) a veľkosti difundujúcej molekuly (d) [12]

2.3.3. Metódy stanovenia transportných vlastností

2.3.3.1 Fluorescenčná korelačná spektroskopia

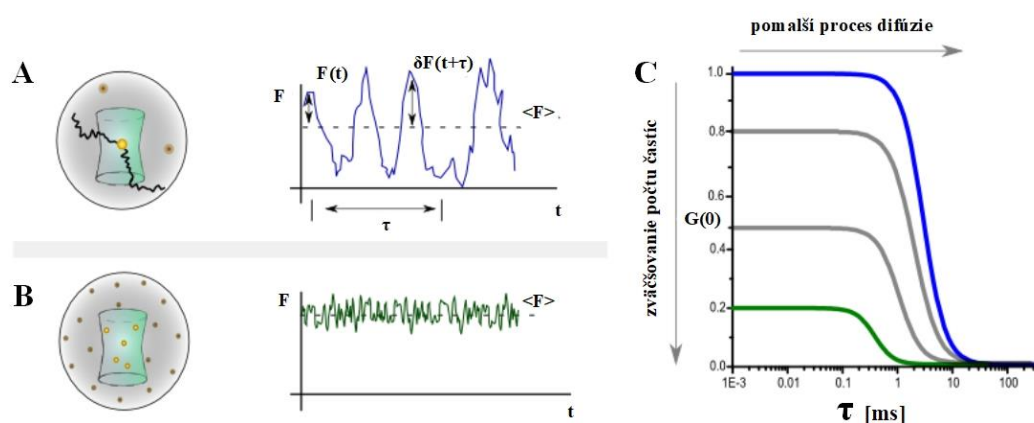
Transportné vlastnosti hydrogélou je možné stanoviť prostredníctvom *fluorescenčnej korelačnej spektroskopie* (*fluorescence correlation spectroscopy*, FCS). Metóda bola predstavená v roku 1972 vedcami Webb, Magde a Elson [40], no jej aplikovateľnosť sa zvýšila až po objavení konfokálnej optiky. Táto spektroskopická metóda je založená na analýze časových fluktuácií intenzity fluorescence detekovanej z fluorescenčných častíc, ktoré sú inkorporované v hydrogélovej sieti. Základné vlastnosti, ako priemerný počet alebo priemerná hodnota difúzneho koeficientu fluorescenčných častíc v konfokálnom objeme, sa určujú prostredníctvom autokorelačnej funkcie $G(\tau)$

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (9)$$

kde $I(t)$ je intenzita fluorescenčného signálu v aktuálnom čase t a $I(t + \tau)$ vyjadruje intenzitu po určitom časovom posune τ . Metóda je založená na skúmaní fluorescenčných častíc pravidelne difundujúcich cez konfokálny objem, pričom priemerný počet fluoroforov N je určený autokorelačnou funkciou $G(0)$ v čase $\tau = 0$

$$N = \frac{1}{G(0)} \quad (10)$$

Obr. 13 znázorňuje, ako sa mení tvar autokorelačnej funkcie v závislosti na počte fluorescenčných častíc difundujúcich cez konfokálny objem. Je vidieť, že čím je väčší počet fluorescenčných častíc v objeme, tým výraznejšie klesá autokorelačná funkcia a zároveň, čím pomalšie difundujú fluorescenčné častice cez konfokálny objem, tým výraznejší je posun funkcie k dlhšiemu časovému rozsahu.



Obr. 13: Základný princíp FCS. (A) Pomaly difundujúce fluorescenčné častice o veľmi nízkej koncentrácii vyvolávajú výraznú zmenu časových fluktuácií intenzity fluorescence, (B) Rýchlo difundujúce fluorescenčné častice o vysokej koncentrácii, naopak, produkujú nevýrazné časové fluktuácie intenzity fluorescence. (C) Autokorelačné krivky z (A) a (B). V prípade (B) bude mať korelačná krivka kratší difúzny čas a nižšiu $G(0)$ v porovnaní s (A) [41]

Z inflexného bodu autokorelačnej funkcie sa určuje difúzny čas τ_D , prostredníctvom ktorého sa stanovuje aj difúzny koeficient

$$D = \frac{w_{xy}^2}{4\tau_D} \quad (11)$$

Keďže difúzny čas závisí na rozmere w_{xy} , šírke sledovaného konfokálneho objemu, nutné je najprv určiť rozmery konfokálneho objemu. Na to sa využívajú roztoky fluorescenčných častíc so známymi difúznymi koeficientmi [41; 42; 43].

2.3.3.2 Metóda difúzneho páru

Táto metóda je založená na experimente medzi dvoma difúznymi prostrediami obsahujúcimi rôznu koncentráciu difundujúcej látky. Na začiatku experimentu sú obe prostredia spojené, dochádza tak ku transportu sledovanej látky zo zdrojovej časti do časti prijímacej, ktorá má na začiatku experimentu nulovú koncentráciu sledovanej látky. Po zvolenom čase sú časti rozpojené a v prijímacej časti je zmeraná koncentrácia sledovanej látky v rôznych polohách. Následne je z tvaru koncentračného profilu analyticky zistená hodnota difúzneho koeficientu prostredníctvom tohto vzťahu:

$$c = c_0 \cdot \operatorname{erfc} \left(\frac{x}{\sqrt{4Dt}} \right) \quad (12)$$

$$n_1 = \sqrt{\frac{4Dt_0}{\pi}} \cdot c_0 \quad (13)$$

kde c_0 je koncentrácia na rozhraní, a n_1 je celkové množstvo transportované skrz rozhranie za čas t_0 [44].

3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

Hydrogély majú v medicíne vysoký aplikačný potenciál. Svojimi vlastnosťami sú podobné extracelulárnej matrix, podporujú migráciu buniek, ich adhéziu a rast. Nie sú toxické a využívajú sa ako nosiče aktívnych látok. Nevýhodou klasických hydrogélů (tvorených jednou polymérou sieťou) je nízka mechanická stabilita, heterogenita, pomalá bobtnavosť, prípadne nedostatočná odpoveď na zmeny v lokálnom prostredí, čo výrazne limituje ich aplikačný potenciál. Z tohto dôvodu je v súčasnosti mnoho vedeckých štúdií zameraných na vývoj multikomponentných polymérnych sietí, medzi nimi konkrétne napr. semi-interpenetrované (semi-IPN) a interpenetrované (IPN) polymérne siete. Interpenetrované polymérne systémy vykazujú fyzikálno-chemické vlastnosti, ktoré sa značne líšia od vlastností ich individuálnych polymérov.

Jednou z konkrétnych oblastí medicíny, v ktorej sú v poslednej dobe široko skúmané gélové materiály, sú aplikácie zamerané na kontrolované hojenie rán. Kontrolované hojenie rán je založené na absorbovaní exsudátov z povrchu rany, a to hlavne v prípade vylučovania exsudátov v nadmernom množstve. Alebo, naopak, v prípade suchých rán je nutné rany hydratovať a udržiavať tak vlhké, hydrofilné prostredie okolo rany. V ideálnom prípade by mali mať dané kryty rán taktiež vhodné viskoelastické vlastnosti, aby dokonale pokryli ranu, a vhodné kohezívne vlastnosti, aby ich bolo možné bez porušenia štruktúry odstrániť z povrchu rany. Vo väčšine vedeckých štúdií je, v súvislosti s touto aplikáciou, najviac spomínaný syntetický polymér polyvinylalkohol (PVA), ktorý, s cieľom zlepšenia fyzikálno-chemických vlastností, zvykne byť sieťovaný v prítomnosti iných syntetických alebo prírodných polymérov, prevažne polysacharidov, za tvorby (semi)IPN hydrogélů [20; 22; 45].

3.1 Polyvinylalkoholový hydrogél

Charakterizáciou fyzikálnych a reologických vlastností PVA hydrogélů sieťovaného v prítomnosti dekahydrátu tetrahydroxyboritanu sodného (borax) sa zaoberali autori štúdie [22]. Skúmali vplyv koncentrácie PVA/boraxu a rôzneho stupňa hydrolýzy PVA na jednotlivé vlastnosti hydrogélů. Vyššia koncentrácia PVA vyvolala nárast v hodnotách tvrdosti a kompresibility hydrogélů, pravdepodobne z dôvodu väčšej hustoty zosieťovania pri konštantnej koncentrácii boraxu a z dôvodu väčšieho počtu interakcií polymér-polymér. Rovnaký efekt bol pozorovaný aj po zvýšení koncentrácie boraxu, zväčšil sa počet väzieb medzi PVA a boraxom pri konštantnej koncentrácii PVA. V prípade vyššej koncentrácie PVA, prípadne boraxu, bol pozorovaný nárast nielen elastického, ale aj viskózneho modulu. Vyššia koncentrácia PVA zväčšuje pravdepodobnosť interakcie polymér-polymér a pravdepodobnosť ustanovenia rovnováhy di-diolových väzieb medzi PVA a boraxom. Vyššia koncentrácia boraxu zväčšuje počet di-diolových väzieb a ďalšie zvýšenie koncentrácie má za následok zväčšenie hustoty zosieťovania z dôvodu zoslabenia elektrostatického odpudzovania mono-diol väzieb prostredníctvom sodných katiónov. Pri nízkych frekvenciách deformácie prevládal viskózný modul, zatiaľ čo pri vysokých frekvenciách prevládal už modul elastický. Skúmaný bol taktiež aj charakteristický modul G odpovedajúci priesečníku frekvenčných charakteristík modulov, čiže bod, kedy sa viskózný modul rovná elastickému modulu. Takmer vo všetkých prípadoch bol zvýšením koncentrácie PVA/boraxu pozorovaný pokles charakteristického modulu, keďže začínal prevládať elastický charakter väzieb už pri nižších frekvenciách.

Výnimku tvorili hydrogély s nízkou koncentráciou boraxu (1 hm.%), keďže pri vyššej koncentrácii PVA vzniká väčší počet mono-diol väzieb a menší počet di-diol väzieb, výsledkom je expanzia objemu polymérnych väzieb v dôsledku elektrostatického odpudzovania, a teda aj nižší nárast elastického modulu. V rámci možnosti aplikácie PVA hydrogél, ako potenciálny topický nosič aktívnych látok, bola skúmaná aj bioadhezivita a difúzivita. S vyššou koncentráciou boraxu bol sledovaný aj pokles v bioadhezivite, a to z dôvodov, ktoré boli už vyššie spomenuté (zvýšená hustota zosieťovania a znížená flexibilita polymérnej siete). V štruktúre nie je dostatočný počet voľných hydroxylových skupín, ktoré by elektrostaticky interagovali s tkanivovým substrátom, čo je priaznivé. Problém však je, že bioadhezivita bola v porovnaní s komerčnými produktmi ešte stále vysoká. Čo sa týka difúzivity, vyššia koncentrácia PVA/boraxu a vyššia hodnota stupňa hydrolýzy vyvolala taktiež aj pokles difúzivity. Autori štúdie upozornili na potrebu nájdania vhodnej rovnováhy medzi viskoelasticitou, difúzivitou a adhezivitou.

Mechanizmom fyzikálneho zosieťovania PVA hydrogél, sa zaoberali autori štúdie [25]. Metóda pozostáva z niekoľkých opakovacích cyklov zmrazovania a rozmrazovania vodného roztoku PVA polyméru, ktorej výsledkom je hydrogél, ktorá je polymérna sieť. Viaceré štúdie poukázali na prítomnosť dvoch unikátnych mechanizmov zodpovedných za výsledné mechanické vlastnosti PVA hydrogél [46; 47]. Kryštalizácia, ku ktorej dochádza počas zmrazovania, sa pokladá za primárny mechanizmus, no dôležitá je aj fázová separácia vyvolaná fázovou premenou vody na ľad v priebehu zmrazovania. Autori štúdie sa zaoberali účinkom fázovej separácie na výsledné vlastnosti rôzne koncentrovaného PVA hydrogél (10, 20, 30 a 40 hm.%) pripraveného desiatimi cyklami pravidelného zmrazovania a rozmrazovania. Tieto hydrogély boli porovnávané s PVA hydrogélmi vytvorenými postupným starnutím, čiže postupnou kryštalizáciou, vodného roztoku PVA. Je nutné podotknúť, že pri postupnom starnutí vodného roztoku PVA dochádza síce ku kryštalizácii, ale nie k fázovej separácii. Vlastnosti boli sledované z pohľadu stanovenia pevnosti v kompresii, relatívnej kryštalinity a mikroštruktúry. Čo sa týka PVA hydrogél, vytvorených metódou zmrazovania-rozmrazovania, pozorovaný bol lineárny nárast pevnosti v kompresii v rámci prvých šiestich cyklov zmrazovania-rozmrazovania. Po šiestich cykloch sa táto hodnota už nezvýšila, dosiahla plató. Lineárny nárast relatívnej kryštalinity bol pozorovaný iba v priebehu prvých troch cyklov, čo nasvedčuje prítomnosti iného mechanizmu zodpovedného za nárast pevnosti v kompresii. Sledovaním mikroštruktúry bola potvrdená nielen vyššia priemerná veľkosť pórov, ale aj prítomnosť oblastí s čoraz vyššou koncentráciou PVA v súvislosti so zvyšovaním koncentrácie polyméru a so zvyšovaním počtu cyklov zmrazovania-rozmrazovania. Autori štúdie to vysvetlili tým, že počas zmrazovania sú následkom fázovej premeny vody na ľad vytlačované PVA reťazce v dôsledku čoho sa vytvára oblasť s vyššou koncentráciou PVA. Tento proces sa pravidelne s každým cyklom opakuje, tým pádom je postupne znižovaná vzdialenosť medzi jednotlivými reťazcami PVA, čo napomáha kryštalizácii a tvorbe vodíkových väzieb. Postupným starnutím vodného roztoku PVA došlo ku tvorbe hydrogél, iba v prípade vodných roztokov PVA o vyššej koncentrácii (30 a 35 hm.%) pravdepodobne z dôvodu menšej vzdialenosti medzi jednotlivými PVA reťazcami čo uľahčilo kryštalizáciu. Sledované boli ale nižšie hodnoty pevnosti v kompresii a relatívnej kryštalinity. Signifikantné zmeny v mikroštruktúre takýchto hydrogél, neboli dokázané,

keďže v tomto prípade nedochádza ku fázovej separácii. Autori štúdie potvrdili prítomnosť dvoch odlišných mechanizmov, ktoré majú vplyv na výsledné vlastnosti hydrogélů vytvorených metódou zmrazovania-rozmrazovania. Dôležitým poznatkom je tvorba kryštálov už v priebehu prvého cyklu, zatiaľ čo fázová separácia PVA prevláda až v neskorších cykloch.

Autori štúdií [23; 48] skúmali reologické vlastnosti PVA, ktorý bol buď vo forme vodného roztoku alebo vo forme hydrogélů zosieťovaného v prítomnosti boraxu. Čo sa týka vodného roztoku PVA o hmotnostnej koncentrácii 10 až 25 %, sledovaná bola závislosť komplexnej viskozity a viskoelastických modulov na frekvencii oscilácie. Pozorovaný bol pokles komplexnej viskozity v závislosti na frekvencii oscilácie. V súvislosti s vyššou hodnotou koncentrácie skúmaných vodných roztokov bola pozorovaná aj vyššia hodnota či už komplexnej viskozity alebo elastického a viskózneho modulu. Na základe závislosti šmykového napätia na šmykovej rýchlosti určili, že sa vodné roztoky PVA vyznačujú vlastnosťami typickými pre pseudoplastické kvapaliny. Prevedené boli aj tzv. *creep* a *recovery testy* založené na sledovaní charakteristických zmien v čase pri pôsobení konštantného napätia a po odstránení príslušného zdroja napätia pôsobiaceho na vodné roztoky PVA. Medzi viskózne kvapaliny patrí 10% vodný roztok PVA, zatiaľ čo koncentrovanejšie vodné roztoky PVA už vykazovali viskoelastický charakter. PVA hydrogély zosieťované v prítomnosti boraxu boli skúmané prostredníctvom rotačného viskozimetru. Sledovaná bola závislosť viskozity a šmykového napätia na šmykovej rýchlosti. V oboch prípadoch bol pozorovaný nárast, PVA hydrogély teda vykazujú správanie typické pre dilatantné kvapaliny. Potvrdená bola aj reopexná vlastnosť hydrogélů, hodnota viskozity sa v závislosti na dobe pôsobenia šmykového napätia zvyšovala.

Autori štúdie [49] skúmali proces difúzie fluorescenčných častíc, presnejšie častíc karboxytetramethylrhodaminu (TAMRA). Tie boli inkorporované buď v štruktúre vodného roztoku PVA alebo v štruktúre chemicky zosieťovaného PVA o hmotnostnej koncentrácii 1 až 8,6 %, pričom bol menený aj pomer pridávaného sieťovacieho činidla (glutaraldehyd) a s tým súvisiaca hustota zosieťovania. Na základe výsledkov autori usúdili, že pri rovnakej koncentrácii PVA je proces difúzie fluorescenčných častíc v prípade PVA hydrogélů spomalený viac ako v prípade vodného roztoku PVA. Zároveň, fluorescenčné častice difundujú v PVA hydrogélůch tým pomalšie, čím je vyššia hustota sieťovania sledovaného hydrogélů.

3.2 (Semi)interpenetrované polymérne siete

V mnohých prípadoch je štruktúra (semi)IPN hydrogélů výsledkom kombinácie syntetických polymérov a polysacharidov. Polysacharidy sú ľahko dostupné, náklady na ich výrobu nie sú vysoké a funkčné skupiny na bočných reťazcoch je možné chemicky modifikovať, čo umožňuje syntézu nových polymérnych systémů s vylepšenými vlastnosťami. Takéto systémy sú následne ďalej využívané v mnohých biomedicínskych aplikáciách [13].

Typickým zástupcom polysacharidov je alginát, aniónový polysacharid, tvoriaci hydrogél iónovou interakciou s dvojitými (nielen vápenatými) iónmi. Alginát je vďaka svojim výhodným vlastnostiam (biokompatibilita, nízka toxicita apod.) jedným z najviac študovaných gélotvorných systémů. V prípade (semi)IPN polymérnych sietí je alginát mnohokrát kombinovaný so syntetickými alebo prírodnými polymérmi reagujúcimi na zmeny okolitého

prostredia, či už ide o teplotu alebo o pH [13]. Termosenzitívne polyméry, ako už bolo spomenuté, podliehajú prechodu zo sólu na gél, a opačne, malou zmenou teploty okolitého prostredia. Polyméry vykazujú buď dolnú kritickú rozpúšťaciu teplotu (LCST) a teda k tvorbe gélu dochádza nad touto hodnotou, alebo vykazujú hornú kritickú rozpúšťaciu teplotu (UCST) a gél sa tvorí pod touto hodnotou. V značnej miere sú študované polyméry s LCST hodnotou blízkou hodnote fyziologickej teploty. Najviac skúmaný je syntetický polymér poly(N-isopropylakrylamid) (pNIPAAm) s LCST hodnotou 32–37 °C [13; 50].

Predmetom štúdie [20] boli hydrogélové membrány tvorené kombináciou polyvinylalkoholu a alginátu sodného, pričom súčasťou štruktúry bol aj ampilicín, modelová aktívna látka, s antibiotickými účinkami. Hydrogélové membrány boli zosieťované metódou opakovaného zmrazovania a rozmrazovania. Skúmaný bol 10% PVA hydrogél, do ktorého štruktúry bol pridávaný 1,5% alginát sodný v určitom percentuálnom zastúpení (0, 25, 33, 50, 65 a 75 %). Autori skúmali vplyv pridávaného alginátu sodného na niektoré fyzikálno-chemické vlastnosti výsledných hydrogélových membrán (obsah pevného podielu, bobtnavosť, morfológia a mechanická stabilita). V závere štúdie sa zaoberali aj charakterizáciou esenciálnych vlastností pri hojení rán. Zistili, že pridávané množstvo alginátu sodného znižovalo obsah pevného podielu, elasticitu a rozťažnosť hydrogélových membrán a zvyšovalo množstvo absorbovanej vody, ale iba do určitého limitu. Štruktúrne ide len o semi-IPN hydrogély, alginát sodný netvorí polymérnu sieť a má teda tendenciu rozpúšťať sa v kvapalnom médiu, čo pri 75% obsahu alginátu sodného v štruktúre PVA gélu vyvolalo deštrukciu hydrogélovej membrány. Prostredníctvom SEM metódy bol potvrdený vplyv alginátu sodného na morfológiu hydrogélových membrán. Klasický PVA hydrogél má štruktúru hladkú, uniformnú a bez pórov, zatiaľ čo s prídavkom alginátu sodného bola pozorovaná distribúcia pórov s rôznou priemernou veľkosťou. Uvoľňovanie modelovej látky z hydrogélovej membrány bolo v prítomnosti alginátu sodného spomaľované, a to pravdepodobne v dôsledku tvorby väzby medzi záporne nabitými skupinami alginátu (COO^-) a kladne nabitými skupinami ampilicínu sodného (Na^+ , NH_3^+ , H^+). Výsledky štúdie preukázali, že PVA-alginátové hydrogélové membrány môžu byť aplikované ako potenciálne kryty rán. Prídavok alginátu sodného mal pozitívny vplyv na bioaktívne vlastnosti, napr. na adsorpciu proteínu BSA (bovine serum albumin), hydrolytickú degradáciu, hemolýzu, zvýšila sa taktiež antibakteriálna aktivita a hemokompatibilita hydrogélových membrán.

V rámci potenciálnych krytov rán bol autormi štúdie [51] skúmaný aj 6% PVA hydrogél sieťovaný boraxom, v ktorého štruktúre bola inkorporovaná vysoká koncentrácia medu Manuka (až do výšky 80 % suchej hmoty). Fyzikálna metóda zosieťovania PVA vyžadujúca opakované cykly zmrazovania a rozmrazovania nemohla byť v tomto prípade použitá, keďže vyššia teplota by denaturovala enzýmy v mede zodpovedné za antibakteriálne účinky. Vysoká koncentrácia medu môže negatívne ovplyvniť biomedicínske, fyzikálno-chemické a mechanické vlastnosti hydrogélmu a z tohto dôvodu bolo cieľom autorov štúdie vylepšenie spomenutých vlastností. Sledovaním zmien v miere bobtnavosti hydrogélového filmu určili vhodnú koncentráciu boraxu (1%), pri ktorej nedošlo ku degradácii polymérnej siete ani po dvadsiatich štyroch hodinách. Pozorovali však odlišnú kinetiku bobtnania. Prvých desať hodín bol sledovaný strmý nárast v bobtnavosti, čo súviselo s penetráciou modelového média (pseudoextracelulárnej tekutiny) do hybridnej polymérnej siete. Po desiatich hodinách

dochádzalo k výraznému poklesu bobtnavosti súvisiaceho s postupným uvoľňovaním medu z polymérnej siete do modelového média. Následne bola udržiavaná konštantná bobtnavosť len samotnou štruktúrou PVA-borax. Penetrácia modelového média do hybridnej polymérnej siete pravdepodobne zoslabuje vodíkové väzby medzi medom a inými komponentami polymérnej siete, a med bol teda uvoľňovaný do okolia, a to až po dobu pätnástich hodín. Kinetika bobtnania rovnako ovplyvnila aj bioadhezivitu a hodnotu pevnosti v ťahu, ktorá postupne klesala. Bobtnaním modelového média sa zvýšila flexibilita hybridnej štruktúry PVA/med, čím sa zvýšila aj rozťažnosť. Med Manuka je bohatý na monosacharidy, prevažne na fruktózu a glukózu, a tie je možné rozpustiť v exsudáte rany za vzniku tenkej vrstvy hydrofilného gélu, ktorá by mohla urýchliť proces hojenia rany znížením rizika kontaminácie. Potvrdená bola nielen antibakteriálna aktivita medu Manuka voči bakteriálnemu kmeňu *S. aureus*, ale potvrdila sa aj zvýšená viabilita a proliferácia buniek. Autorom štúdie sa podarilo vyvinúť hybridný hydrogélový film (s postupným uvoľňovaním medu), ktorého adhézia je dostatočne nízka na to, aby ochraňovala epitelizáciu buniek a podporovala ich proliferáciu. Výsledkom je hybridný hydrogél PVA/Manuka s optimalizovanými vlastnosťami aplikovateľnými pri krytoch rán.

Jednoduchou metódou vyvinuli autori štúdie [52] mechanicky stabilný a vodivý hydrogél tvorený PVA a alginátom sodným. Hydrogély boli pripravené fyzikálnou metódou zmrazovania-rozmrazovania a následne vložené do nasýteného vodného roztoku chloridu sodného za účelom zvýšenia ich vodivosti a mechanickej stability. Skúmaná bola zmena mechanických a bobtnacích vlastností v závislosti na tom, ako dlho boli hydrogély ponorené v roztoku. Koncentračný rozdiel medzi hydrogélom a vodným roztokom chloridu sodného vyvolal postupné zmršťovanie hydrogélom súvisiace s osmotickým tokom vody z hydrogélovej siete. SEM analýza potvrdila zvýšenie hustoty zosieťovania vplyvom vysolovacieho efektu. Z dôvodu zvýšenej hustoty zosieťovania došlo k poklesu v miere bobtnania, ale zlepšili sa mechanické vlastnosti, zvýšila sa pevnosť v ťahu a rozťažnosť. Je nutné podotknúť, že pre získanie požadovaných vlastností je potrebné určiť optimálnu dĺžku vloženia hydrogélom do vodného roztoku NaCl, pretože vysoký obsah sodných a chloridových iónov mal opačný efekt na mechanické vlastnosti hydrogélom. Potvrdená bola aj zvýšená konduktivita (merná elektrická vodivosť) hydrogélom, čo naznačuje, že pri ponorení do vodného roztoku prešli sodné a chloridové ióny cez membránu hydrogélovej siete. Ďalšia vlastnosť, ktorú hydrogély nadobudli po ponorení do vodného roztoku chloridu sodného bola antiseptická vlastnosť, ani po dlhšom čase nedošlo k vzniku bakteriálneho povlaku na povrchu hydrogélom. Autori predstavili jednoduchý spôsob prípravy pevného hydrogélom, s vysokým aplikačným potenciálom napr. v oblastiach vývoja bioelektród alebo v tkanivovom inžinierstve.

Ako už bolo spomenuté, alginát je v značnej miere skúmaný aj v kombinácii so syntetickým polymérom poly(N-isopropylakrylamid) (pNIPAAm). Autori štúdií [17; 18; 53] skúmali vplyv teploty na mechanické vlastnosti a permeabilitu membrán IPN polymérnych sietí zložených z chemicky zosieťovaného polyméru pNIPAAm a z alginátu zosieťovaného v prítomnosti vápenatých iónom. Miera bobtnavosti bola skúmaná v rozmedzí teplôt 25–40 °C v závislosti na rôznych koncentráciach pridávaných polymérom. V porovnaní s klasickým alginátovým hydrogélom, sledovaný bol pokles bobtnavosti po pridaní polyméru pNIPAAm, a to hlavne po zvýšení teploty na hodnotu 32 až 33 °C, čiže na hodnotu LCST. Čím bola koncentrácia

pNIPAAm vyššia, tým bol tento efekt výraznejší. Zmeny v bobtnavosti súvisia so zmenou v priemernej veľkosti pórov počas zvyšovania teploty, čo bolo skúmané prostredníctvom skenovacieho elektrónového mikroskopu (SEM). Pod hodnotou LCST sú IPN hydrogély vysoko porézne, zatiaľ čo nad hodnotou LCST dochádza k výraznému poklesu v priemernej veľkosti pórov. Tento jav nie je pozorovaný pri klasických hydrogélach. Autori štúdií to vysvetlili tým, že zvyšovanie teploty indukuje zmršťovanie väzieb polyméru pNIPAAm, čo má za následok aj zmrštenie polymérnej siete alginátu. Výsledkom je mechanicky stabilný a menej deformovateľný IPN hydrogél, avšak s nižšou permeabilitou. Teplotou je teda možné upravovať výsledné vlastnosti IPN hydrogélom.

pH-senzitívne hydrogély tvorené polyelektrolytmi podliehajú prechodu zo sólu na gél, a opačne, zmenou pH okolitého prostredia. Takéto hydrogély sú aplikovateľné napr. ako nosiče aktívnych látok, keďže zmenou pH v mieste určenia je možné docieľiť kontrolované uvoľňovanie aktívnej látky. Autori štúdie [54] sa zaoberali charakterizáciou pH-senzitívnych a termo-senzitívnych semi-IPN hydrogélom, ktorých štruktúra bola opäť založená na kombinácii pNIPAAm a alginátu sodného. Chemicky zosieťovaný pNIPAAm poskytuje výsledným materiálom termosenzitivitu, zatiaľ čo alginát sodný je pôvodcom ich citlivosti na zmenu pH. Skúmali vplyv teploty a pH na štruktúru hydrogélom v závislosti na koncentrácii pridávaného alginátu sodného. Štruktúra bola sledovaná prostredníctvom metódy SEM. Klasický pNIPAAm hydrogél má relatívne hustú štruktúru bez pórov, zatiaľ čo v prípade semi-IPN hydrogélom je viditeľná porézna štruktúra. S vyššou koncentráciou alginátu sodného sa zvyšuje aj priemerná veľkosť pórov. Bobtnavosť bola študovaná v závislosti na teplote a následne na pH. Za bazických podmienok, v dôsledku elektrostatického odpudzovania, bola miera bobtnania semi-IPN hydrogélom vyššia v porovnaní s klasickým pNIPAAm hydrogélom a to tým výraznejšie, čím bola vyššia koncentrácia alginátu. V opačnom prípade, za kyslých podmienok, bola miera bobtnania semi-IPN hydrogélom nižšia. Čo sa týka zmeny pH, výrazná bobtnavosť bola pozorovaná pri pH 7,4 a v okolí hodnoty pK_a alginátu. Nad hodnotou LCST klesá citlivosť na zmenu pH, keďže dochádza k zmršteniu semi-IPN hydrogélom. Priemerná veľkosť pórov je ovplyvnená aj hodnotou pH, pričom vplyv je identický ako v prípade vplyvu hodnoty pH na bobtnavosť, v spomenutých hodnotách dochádza k zvyšovaniu priemernej veľkosti pórov.

Zatiaľ čo pri klasických hydrogélach je dôležitá tvorba homogénnej štruktúry, niektorí autori pristúpili k vývoju hydrogélom, pri ktorých je heterogenita štruktúry naopak žiaduca. Táto nová skupina hydrogélom je známa ako „*double network (DN) hydrogels*“, patrí medzi IPN polymérne siete a pozornosť si získala vďaka vysokému obsahu vody (90%) a excelentným mechanickým vlastnostiam (elastický modul 0,1–1 MPa; pevnosť v ťahu 1–10 MPa, roztlačnosť 1000–2000 %; pevnosť v kompresii 20–60 MPa, limitná deformácia v kompresii 90–95 %; povrchová energia defektu 100–1000 J·m⁻²) DN gélov, ktoré sú porovnateľné alebo vyššie ako mechanické vlastnosti mäkkých spojivových tkanív. Esenciálnym znakom DN gélov je to, že pozostávajú z dvoch druhov polymérov s asymetrickou štruktúrou, čím sa líšia od klasických IPN. Základne pravidlá prípravy DN chemicky zosieťovaných hydrogélom boli zosumarizované skupinou vedcov v roku 2010: (1) prvú polymérnu sieť tvorí rigidný a krehký polyelektrolyt, zatiaľ čo druhá polymérna sieť je tvorená mäkkým a tvarovateľným neutrálnym polymérom; (2) molárna koncentrácia druhej polymérnej siete je 20–30krát vyššia

oproti prvej polymérnej sieti; (3) prvá polymérna sieť je husto zosieťovaná, zatiaľ čo druhá polymérna sieť je riedko zosieťovaná, čiže je požadovaná vysoká molekulárna hmotnosť druhého polyméru. Ako prvý bol vyvinutý, a to dvojestupňovou polymerizáciou, hydrogél tvorený polyelektrolytom PAMPS (2-akrylamido-2-methyl-1-propansulfánová kyselina) a neutrálnym polymérom PAAm (polyakrylamid) [55; 56].

Prvý krok prípravy DN hydrogélom spočíva v kovalentnom zosieťovaní silného polyelektrolytu, čím sa vytvorí prvá polymérna sieť. Následne je tento gél nabobtnaný roztokom prekursoru obsahujúcim monoméry druhej polymérnej siete, iniciátory a sieťovacie činidlá. V dôsledku silnej bobtnacej povahy polyelektrolytov, reaktanty druhej polymérnej siete budú pomaly difundovať do už vytvoreného gélu, čím dôjde k veľkej objemovej expanzii a k polymerizácii druhej polymérnej siete v štruktúre prvého gélu. Z toho vyplýva, že pre druhý polymerizačný proces je extrémne dôležitá bobtnacia povaha polyelektrolytov. Možná je síce aj príprava DN gélov z neutrálného polyméru a nie z polyelektrolytu. V tomto prípade je v prvom kroku syntetizovaná prvá, neutrálna, polymérna sieť, do ktorej je následne inkorporovaný silný lineárny polyelektrolyt a vzniká tak semi-IPN gél. V priebehu tohto procesu je celkový osmotický tlak semi-IPN gélu zvýšený, vďaka čomu sú väzby neutrálnej polymérnej siete natiahnuté natoľko, že bobtnacia povaha semi-IPN gélu je rovnaká ako v prípade polyelektrolytového gélu. Spomenuté metódy prípravy DN gélov sú však časovo náročné, vyžadujú niekoľkostupňovú syntézu a výsledkom je chemicky zosieťovaný DN gél, takže tu existuje riziko ireverzibilnej deformácie [55]. Z tohto dôvodu rovnakí autori syntetizovali nový typ DN gélov, presnejšie ide o hybridné DN hydrogély, pričom prvá polymérna sieť je tvorená fyzikálne zosieťovaným gélom a druhá polymérna sieť je zosieťovaná chemicky. Príkladom je hybridný DN gél tvorený agarom a polyakrylamidom (PAAm). Termoreverzibilná vlastnosť agaru umožňuje syntézu agar-PAAm DN gélu len v jednej reakčnej nádobe („*one pot method*“). V prvom kroku je zvýšením teploty a následným ochladením vytvorený agarový hydrogél (prvá polymérna sieť) s inkorporovanými prekursorami druhej polymérnej siete. Fotopolymerizáciou následne dochádza k syntéze aj chemicky zosieťovaného polyakrylamidu už v štruktúre agarového hydrogélu (druhá polymérna sieť). Mechanické vlastnosti tohto hybridného gélu sú porovnateľné s vlastnosťami DN gélu pripraveného vyššie spomenutou metódou. Táto metóda prípravy nezahŕňa bobtnanie a proces difúzie, čiže nie je časovo náročná, čo je výhodou. Prvá polymérna sieť môže byť okrem termoreverzibilných gélov tvorená aj gélmi zosieťovanými iónovými interakciami (napr. alginát sieťovaný v prítomnosti vápenatých kationov) [57].

Autori štúdie [58] navrhli nový spôsob tvorby tuhých a zároveň aj tzv. *self-healing* (samoobnovovacích) DN gélov, pričom štruktúra je tvorená iba polymérmi zosieťovanými prostredníctvom vodíkových väzieb, presnejšie agarom (prvá polymérna sieť) a polyvinylalkoholom (druhá polymérna sieť). Rozpustením agaru a PVA v horúcej destilovanej vode a ochladením vznikne agarový hydrogél s inkorporovaným PVA. Po niekoľkých cykloch zmrazovania-rozmrazovania dochádza aj k zosieťovaniu PVA. Obidve polymérne siete sú síce sieťované vodíkovými väzbami, ale rozdiel spočíva v tom že agar tvorí helikálnu štruktúru, zatiaľ čo štruktúra PVA je tvorená kryštálmi. Skúmaná bola štruktúra a mechanické vlastnosti týchto DN gélov v závislosti na koncentrácii agaru a výsledky boli porovnávané s klasickým PVA hydrogélom. SEM metódou bola pozorovaná nepravidelnosť

štruktúry zvyšovaním koncentrácie agaru. Určovaná bola hodnota Youngovho modulu, pevnosti v ťahu a rozťažnosti DN gélov prostredníctvom deformačnej krivky. Prítomnosť agaru má priaznivý vplyv na pevnosť v ťahu a elastický modul, ale znižuje hodnotu rozťažnosti, pretože pri vyššej koncentrácii agaru vzniká hustejšia polymérna sieť. Autori pokladajú za dôležité to, že v prípade agar/PVA gélu medzi sebou pozitívne korelujú hodnoty tuhosti a húževnatosti, čo neplatí pre už vyššie spomenuté chemicky zosieťované DN gély. Vysvetlili to tým, že v priebehu deformácie chemicky zosieťovaného DN gélu dochádza k permanentnému vzniku klastrov v prvej polymérnej sieti, čiže druhá polymérna sieť zostáva nedotknutá, zatiaľ čo pri agar/PVA DN gélu sa disipácii energie zúčastnia obe polymérne siete a vzniká tak DN gél s väčšou húževnatosťou. Ďalšou významnou vlastnosťou agar/PVA DN gélu je jeho samoobnova po deformácii, čo bolo kontrolované deformačnými krivkami. Už po 10 minútach bol pozorovaný nárast hodnoty pevnosti v ťahu na 67 % z hodnoty pôvodného DN gélu, čo je pri väčšine hydrogélach pozorované až po niekoľkých hodinách. Autorom sa teda podarilo vyvinúť hydrogél, ktorý má nielen pozoruhodné mechanické vlastnosti, ale aj schopnosť samoobnovy, čo je veľmi dôležité v biomedicínskej oblasti.

Mimo mechanických vlastností DN gélov, ďalšou kľúčovou vlastnosťou pre mnohé aplikačné oblasti je ich formovateľnosť. Napr. pre funkčnosť umelých tkanív nie je dôležitá len vysoká mechanická vlastnosť materiálov, ale aj formovateľnosť do požadovaného tvaru. Tvar DN gélov je determinovaný prvou polymérnou sieťou, tzv. „kostrou“, ktorá sa po nabobtnaní druhej polymérnej siete určitým spôsobom deformuje do iného tvaru. Prvú polymérnu sieť je možné síce syntetizovať do formy s dopredu definovaným tvarom, avšak kvôli horším mechanickým vlastnostiam by nebolo možné s gélom ďalej manipulovať bez deformácie. Autori štúdie [59] preto navrhli možnosť syntézy prvej polymérnej siete v štruktúre iného hydrogélu, ktorý by už bol dostatočne silný na to, aby ho bolo možné ľahko tvarovať. Ako tzv. „vnútornú formu“ zvolili fyzikálne zosieťovaný PVA hydrogél, ktorý je dostatočne flexibilný a pevný. Najprv bol syntetizovaný PVA gél s definovaným tvarom a v jeho štruktúre bola polymerizovaná prvá (PAMPS) a následne aj druhá (PAAm) polymérna sieť. Vznikol tak PVA-DN gél, ktorý mohol byť formovateľný do akéhokoľvek tvaru a aj napriek tomu vykazoval extrémne vysoké mechanické vlastnosti. Autori zdôraznili niekoľko dôležitých bodov. Formovateľnosť je dôsledkom flexibility PVA gélu, zatiaľ čo extrémne veľká sila PVA-DN gélu súvisí s rigiditou prvej polymérnej siete. To je dôvod prečo PVA-DN gél majú aj významné mechanické vlastnosti a aj formovateľnosť oproti klasickým DN gélom. Ako príklad uviedli PAMPS/PAAm DN gél, ktorý je síce silný, ale nie je formovateľný kvôli rigidite a krehkosti prvej polymérnej siete. Naopak, PVA/PAAm DN gély sú síce formovateľné, ale prvá polymérna sieť nemá dostatočné mechanické vlastnosti.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité chemikálie

- Polyvinylalkohol (PVA), Sigma Aldrich
- Dekahydrát tetraboritanu sodného (borax), Sigma Aldrich
- Alginát sodný (Alg), Sigma Aldrich
- Polystyrensulfonyl sodný (PSS), Sigma Aldrich
- Polyglutamát sodný (PGA), Carbosynth Ltd.
- Rhodamin 6G (R6G), Sigma Aldrich
- Deionizovaná voda (ELGA)

4.2 Použité prístroje

- Analytické váhy (Denver Instrument)
- Reometer (ARG2 – TA Instruments)
- Fluorescenčný korelačný spektroskop (MicroTime 200, PicoQuant)
- UV/VIS Spektrometer (Cary 50, Probe)

4.3 Pracovný postup

4.3.1. Príprava zásobného roztoku polyvinylalkoholu

Pripravený bol 4% zásobný roztok PVA. Na to, aby došlo k úplnému rozpusteniu navážky v požadovanom objeme deionizovanej vody, bolo potrebné najprv roztok neustále miešať 30 minút pri laboratórnej teplote a následne 2 hodiny udržiavať roztok za stáleho miešania pri teplote v rozmedzí 90 až 100 °C.

4.3.2. Príprava zásobného roztoku boraxu a polyelektrolytov

Pripravený bol 4% zásobný roztok boraxu úplným rozpustením navážky v danom množstve deionizovanej vody za stáleho miešania pri mierne zvýšenej teplote (30 až 35°C). Zásobné roztoky polyelektrolytov (Alg, PSS a PGA) boli pripravené taktiež úplným rozpustením navážky v danom množstve deionizovanej vody za stáleho miešania pri laboratórnej teplote.

4.3.3. Príprava hydrogélů

Všetky hydrogély v tejto diplomovej práci boli pripravené buď v pomere 10 : 1 (PVA : borax) bez prídavku polyelektrolytu alebo s prídavkom polyelektrolytu v pomere 10 : 1 : 1 (PVA : borax : polyelektrolyt) s použitím zásobného roztoku o takej koncentrácii polyelektrolytu, aby sa jeho koncentrácia vo finálnom hydrogéli pohybovala v koncentračnej rade 0,002; 0,005; 0,01; prípadne aj 0,1 hm. %. V závislosti na metóde analýzy PVA hydrogélů bol do štruktúry pridávaný aj vodný roztok R6G o určitej koncentrácii. K tvorbe PVA hydrogélů dochádza v prítomnosti boraxu ako sieťovacieho činidla v priebehu pár sekúnd, takže roztok boraxu musel byť pridaný až po zmiešaní všetkých vstupných látok. Po zosieťovaní boli hydrogély uložené aspoň na 24 hodín v chladničke alebo v exsikátore.

4.3.4. Reologické meranie

K štúdiu mechanických vlastností boli hydrogély pripravované podľa podkapitoly 4.3.3. Pripravovaná bola celá koncentračná rada polyelektrolytov v PVA géli bez prídavku vodného

roztoku R6G. Hydrogély boli merané na reometri typu ARG2 od firmy TA Instruments. Po nadávkovaní vzorky na stacionárnu dosku bolo potrebné zísť senzorom dole na vzorku. Na samotné meranie bola využitá geometria typu doska–doska s priemerom hornej dosky 40 mm, vzdialenosť medzi senzorom a doskou bola 500 μm . Taktiež bolo potrebné vyčistiť okolie senzoru, aby sa vzorka nelepila na geometriu a neovplyvňovala tak meranie. Následne bola vzorka pokvapkaná silikónovým olejom, aby behom merania nedošlo k vysušovaniu vzorky.

Prevedené boli amplitúdové a frekvenčné testy. Pred každým meraním musel byť spustený aj *conditioning step* slúžiaci pre relaxáciu vzorky. Ako prvý test musel byť meraný *amplitúdový test* k definovaniu rozsahu lineárnej viskoelastickej oblasti (LVO), oblasti, v ktorej sú viskoelastické moduly nezávislé na amplitúde deformácie. Amplitúdový test je potrebný pre nastavenie meracích podmienok vo frekvenčnom teste. Z tohto testu bol získavaný aj komplexný modul, ktorý podáva informácie o celkovej rigidite hydrogélu. Následne bol meraný *frekvenčný test*, z ktorého boli získavané hodnoty komplexného modulu a stratového uhlu vo viacerých bodoch. Všetky získané hodnoty boli vyhodnotené v programe MS Excel. Podrobný popis parametrov je uvedený v Tab. 1.

Tab. 1: Parametre pre amplitúdový a frekvenčný test

	Amplitúdový test	Frekvenčný test
Teplota	25 °C	25 °C
Frekvencia oscilácie	1 Hz	0,01–100 Hz
Amplitúda deformácie	0,01–1000 %	1 %
Body na dekádu	6	6

4.3.5. Stanovenie transportných vlastností gélov na makroskopickej úrovni

Metóda difúzneho páru spočíva v spojení dvoch difúzných prostredí obsahujúcich PVA hydrogél, pričom prvé prostredie (zdrojový gél) obsahuje konštantnú nenulovú koncentráciu difundujúcej látky (R6G) a druhé (prijímací gél) obsahuje nulovú koncentráciu difundujúcej látky a aj prípadne prídavok polyelektrolytu. Po spojení dochádza k transportu sledovanej látky v smere poklesu koncentračného gradientu. V určitých časových intervaloch (24, 48, 72 a 168 hodín) sú difúzne prostredia (kyvety) opäť rozpojené a sledovaná je zmena koncentrácie difundujúcej látky (R6G) v prostredí, kde bola pôvodne nulová koncentrácia R6G.

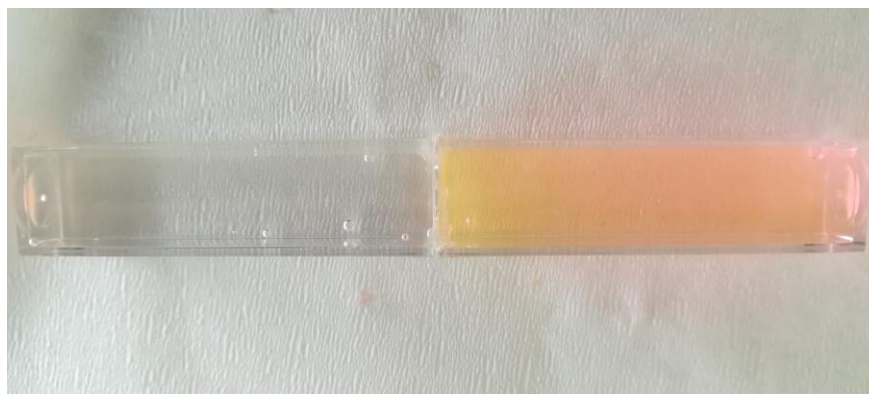
PVA hydrogély boli na túto metódu pripravované opäť podľa postupu uvedenom v podkapitole 4.3.3. V prípade prijímacích gélov s prídavkom Alg a PGA, pripravovaná bola iba koncentračná rada do 0,01 hm. %, keďže hydrogély s vyššou koncentráciou inkorporovaného polyelektrolytu už neboli transparentné a teda by ich nebolo možné touto metódou vyhodnotiť. V rámci prídavku PSS bola pripravovaná aj koncentrácia 0,1 hm. %. Zdrojové boli PVA gély (bez prídavku polyelektrolytu) s prídavkom vodného roztoku R6G s použitím zásobného roztoku R6G o takej koncentrácii, aby koncentrácia R6G vo finálnom hydrogéli bola 0,006 g/l.

Keďže ide o gély vytvárajúce polymérnu sieť po pridaní sieťovacieho činidla, gély museli byť pripravované najprv v kadičke, pretože v kyvete by ich nebolo možné pripraviť do celého objemu. Následne boli gély prevedené do kyvety (Obr. 14) a bolo ich potrebné uchovať dlhšiu dobu (týždeň až 2 týždne) v chladničke, kým nedošlo k odstráneniu vzduchových bublín.



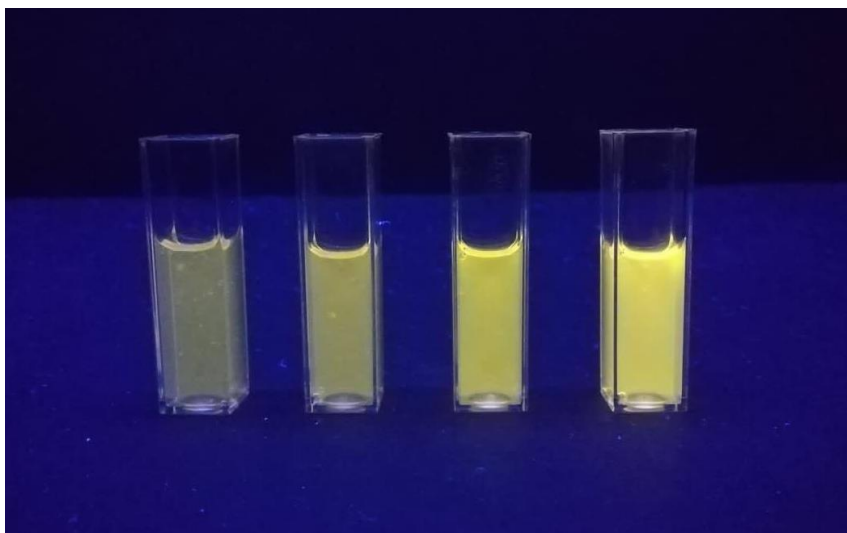
Obr. 14: PVA gél po prevedení do kyvety – prítomnosť vzduchových bublín

Po minimalizovaní množstva vzduchových bublín boli difúzne prostredia (kyvety) spojené (Obr. 15), zakryté parafilmom a uložené vo vertikálnej polohe v exsikátore s vodou pri laboratórnej teplote. Gély boli pripravované na 2 opakovania.



Obr. 15: Difúzny pár použitý ako experimentálna difúzna aparátúra

Na získanie koncentračných profilov bola samozrejmosťou aj príprava gélov na kalibráciu. Tá spočívala v tom, že všetky gély, čiže PVA gély bez prídavku a s prídavkom polyelektrolytu, museli byť pripravené aj s prídavkom troch, prípadne štyroch rôzne koncentrovaných zásobných roztokov R6G, tak, aby koncentračná rada R6G v PVA géli bola 0,002; 0,004; 0,006 a prípadne aj 0,008 g/l. Príklad gélov na kalibráciu je znázornený na Obr. 16, kde vidíme kalibráciu pre prídavok PSS. Znázornená je navyššia koncentrácia pridávaného R6G pre rôzne testované prídavky PSS (vo vyššie uvedenej koncentračnej rade).



Obr. 16: Kalibračné PVA gély s prídavkom PSS: znázornená je najvyššia koncentrácia pridávaného R6G; smerom doprava sa zvyšuje koncentrácia pridávaného PSS

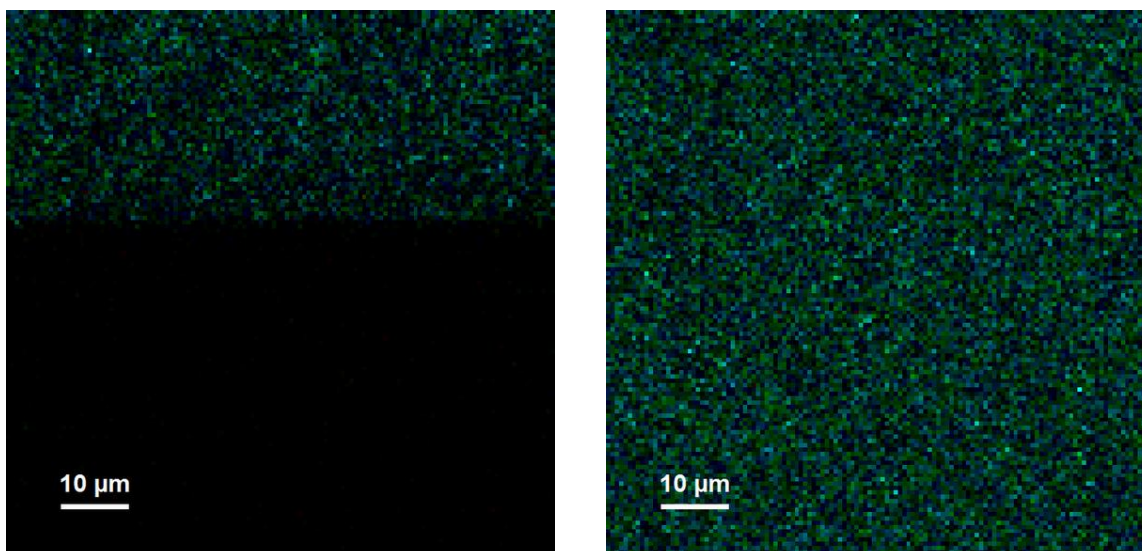
4.3.6. Stanovenie transportných vlastností gélov na molekulárnej úrovni

FCS analýza prebiehala na prístroji MicroTime 200 (firma PicoQuant) s inverzným konfokálnym mikroskopom Olympus IX71. Využívaný bol objektív s vodnou imerziou, pinhole o veľkosti 50 μm a laser (excitačný zdroj) s vertikálnou polarizáciou o vlnovej dĺžke 510 nm. Dichroické zrkadlo bolo nastavené na hodnotu 514/640 nm a emisný filter bol nastavený na 550/49 nm.

Pred každým meraním bolo potrebné zistiť veľkosť konfokálneho objemu, pretože tá sa zakaždým mení. Na kalibráciu bol využívaný vodný roztok R6G. Zistila sa veľkosť efektívneho objemu a excentricita κ (odchýlenie objemu od tvaru gule). Z toho sa systémom FCS určili ďalšie rozmery konfokálneho objemu, ktoré sú potrebné pri stanovení difúzneho koeficientu.

Gély na FCS analýzu boli pripravované taktiež podľa postupu uvedeného v podkapitole 4.3.3. Pripravovaná bola celá koncentračná rada aj s prídavkom vodného roztoku R6G tak, aby koncentrácia R6G v hydrogéle bola $1 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Pri samotnom meraní musela byť každá vzorka zameraná v ose z , vykonaný bol xz alebo yz sken, aby bola určená poloha rozhrania gél/sklíčko (Obr. 17). Meranie prebiehalo približne 5 μm nad hranicou sklíčka (hodnota osy z). V takto určenej hodnote z bol prevedený rez v rovine xy (Obr. 17). V tejto rovine boli zvolené 3 miesta, v ktorých prebiehala FCS analýza. Body nemohli byť úplne v krajnej oblasti alebo uprostred zagregovaných častíc R6G s vyššou intenzitou fluorescence. Pri meraní sa využívali dva detektory, výstupom FCS analýzy bola kroskorelačná krivka, ktorá bola analyzovaná v móde FCS Analyses. Získané hodnoty difúznych koeficientov boli spriemerované.

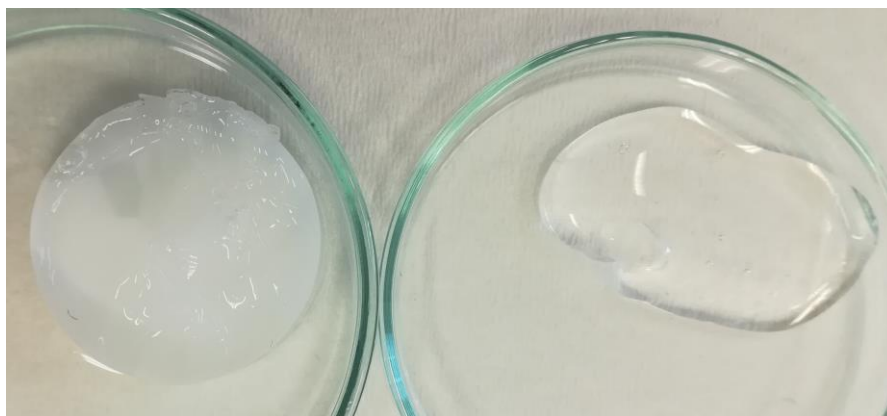


Obr. 17: Rez rovinou xz (vľavo) a rez rovinou xy (vpravo)

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 Optimalizácia postupu prípravy polyvinylalkoholových hydrogélů

Cieľom tejto diplomovej práce bolo sledovanie vplyvu interpenetrovaných polyelektrolytových zložiek na mechanické a transportné vlastnosti modelových hydrogélů. Ako modelový materiál bol zvolený PVA, syntetický polymér, ktorého hydrogélová sieť môže vznikáť aj vplyvom fyzikálnych interakcií, indukovaných napr. metódou gelácie *freeze-thaw*, ktorá spočíva v niekoľkých opakovacích cykloch zmrazovania a rozmrazovania vodného roztoku PVA, čo bolo bližšie popísané aj v podkapitole 2.1.4.1. Na začiatok sa pristúpilo k tvorbe PVA hydrogélů touto metódou, aby sa zamedzilo používaniu akýchkoľvek sieťovacích činidiel. Príprava 4% PVA hydrogélů spočívala v ôsmich cykloch zmrazovania a rozmrazovania 4% vodného roztoku PVA v pravidelných časových intervaloch: 4% vodný roztok PVA bol podrobený zmrazovaniu po dobu jednej hodiny a rozmrazovaniu po dobu tridsiatich minút, pričom prvé zmrazovanie prebiehalo 12 hodín. Ukázalo sa, že pre potreby tejto diplomovej práce nie je *freeze-thaw* metóda prípravy PVA hydrogélů vhodná, pretože výsledný hydrogél vykazuje intenzívny zákal (Obr. 18), a teda stanovenie transportných vlastností hydrogélů spektroskopickými metódami by bolo analyticky komplikované.



Obr. 18: PVA gél pripravený metódou freeze-thaw (naľavo) a metódou chemického zosieťovania v prítomnosti boraxu (napravo)

Z tohto dôvodu sa pristúpilo k príprave chemicky zosieťovaného PVA hydrogélú za použitia dekahydrátu tetraboritanu sodného (borax) ako sieťovacieho činidla, mechanizmus tvorby hydrogélú je taktiež popísaný podkapitole 2.1.4.1. Výsledný hydrogél je síce transparentný (Obr. 18), avšak pri samotnej príprave hydrogélú bolo potrebné vyriešiť niekoľko experimentálnych komplikácií. Pre zhomogenizovanie je nevyhnutné miešať zmes polymér/sieťovacie činidlo, a keďže v priebehu miešania už dochádza k sieťovaniu, výsledkom je gél obsahujúci vzduchové bubliny. Zároveň dochádza aj k prichytávaniu gélu na sklenenú tyčinku (viz Obr. 19). Výsledný gél je následne nutné uchovať dlhšiu dobu v exsikátore alebo v chladničke, kým nedôjde k odstráneniu alebo k úplnému minimalizovaniu týchto bublín. Vizualným hodnotením obsahu vzduchových bublín bolo stanovené, že nevyhnutná doba uloženia je, v závislosti na metóde analýzy gélov, aspoň dva dni (príprava v kadičke) až dva týždne (príprava v kyvete). Po úspešnej optimalizácii prípravy PVA hydrogélú sa pristúpilo aj k inkorporovaniu týchto zvolených záporne nabitých polyelektrolytov: Alg, PSS a PGA. PSS má vysokú nábojovú hustotu a je syntetického pôvodu, zatiaľ čo Alg je prírodný polymér široko využívaný v mnohých aplikačných oblastiach (viz kapitola 3). PGA je pomerne „nový“ biopolymér, ktorý by mohol predstavovať zaujímavú aplikačnú alternatívu pre Alg.



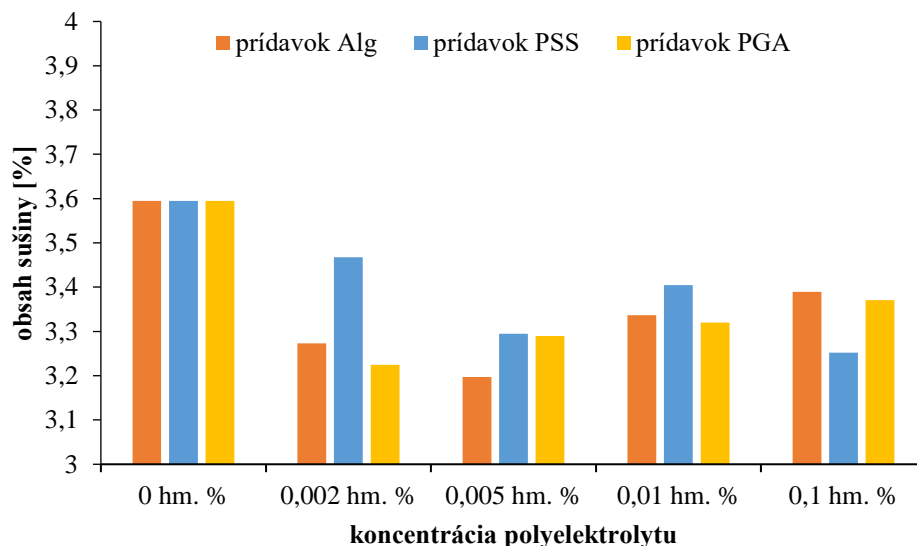
Obr. 19: Prichytávanie PVA gélu na sklenenú tyčinku počas prípravy

Pred samotným začiatkom všetkých experimentov bol stanovený aj obsah pevného podielu (obsah sušiny) v PVA hydrogélach bez alebo s prídavkom polyelektrolytu. Vzorky pripravených gélov boli sušené pri 40 °C po dobu dvoch dní. Následne bol vypočítaný obsah sušiny v géloch podľa vzťahu

$$s = \frac{m_s}{m_g} \cdot 100\% \quad (14)$$

kde m_s je hmotnosť po vysušení gélu a m_g je hmotnosť gélu pred vysušením.

Výsledky sú znázornené v stĺpcovom grafe na Obr. 20. Na základe výsledkov, pridávané polyelektrolyty nemajú signifikantný vplyv na obsah pevného podielu, mierny pokles v hodnotách mohol byť ovplyvnený aj nehomogenitou vzorky. Keďže PVA hydrogél bez prídavku polyelektrolytu má ako jediný najvyšší obsah pevného podielu, je možné, že prídavok polyelektrolytu znižuje hustotu zosieťovania, čoho výsledkom je menšie množstvo sušiny zapríčinené väčším množstvom absorbovanej vody po pridaní polyelektrolytu do štruktúry PVA gélu. PVA hydrogél bez prídavku polyelektrolytu má na základe uvedených výsledkov najväčšiu hustotu zosieťovania.



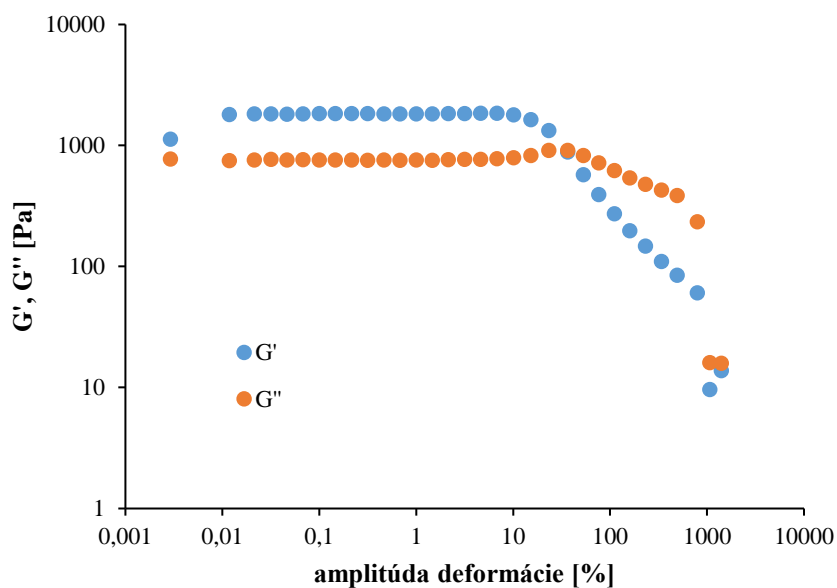
Obr. 20: Porovnanie obsahu sušiny v závislosti na koncentrácii a type prídavaného polyelektrolytu do štruktúry PVA hydrogél

5.2 Optimalizácia postupu stanovenia mechanických vlastností

Mechanické vlastnosti PVA hydrogélů bez alebo s prídavkom polyelektrolytu boli stanovované prostredníctvom oscilačných meraní pozostávajúcich z amplitúdového a frekvenčného testu.

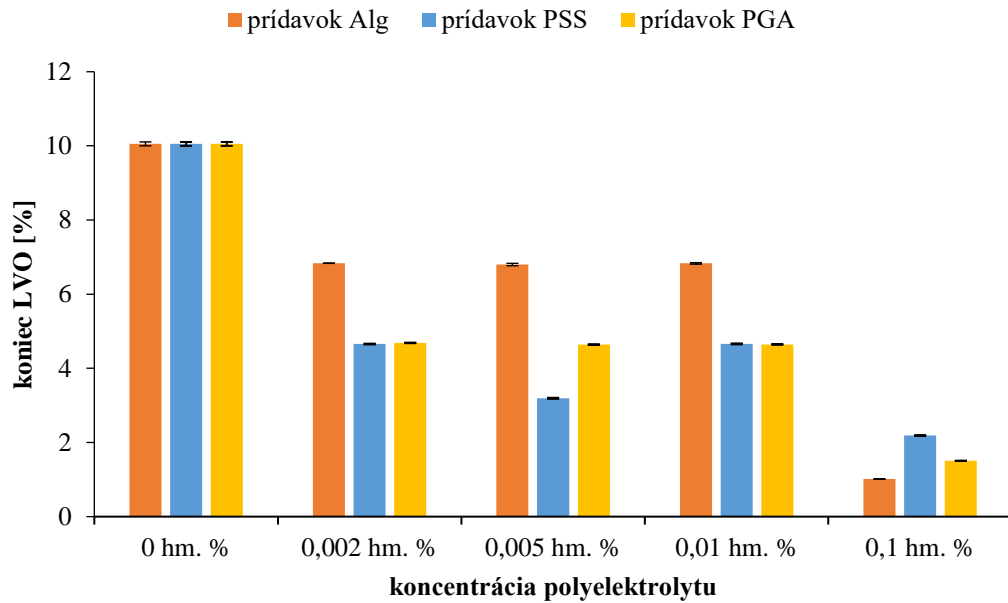
5.2.1. Amplitúdový test

Ako prvý musel byť prevedený amplitúdový test (*strain sweep*), čo je závislosť viskoelastických modulov na zvyšujúcej sa amplitúde deformácie pri konštantnej frekvencii oscilácie senzoru. Tento test slúži k stanoveniu rozmedzia lineárnej viskoelastickej oblasti (LVO) a k určeniu toho, ktorý z dvoch viskoelastických modulov prevláda v LVO. Amplitúdový test je potrebný hlavne aj pre správne nastavenie meracích podmienok pri frekvenčnom teste. Ako modelový prípad bol zvolený amplitúdový test PVA hydrogélů bez prídavku polyelektrolytu (Obr. 21). Z grafu je vidieť, že LVO oblasť sa objavuje vo väčšom rozsahu amplitúdy deformácie a zároveň platí, že v celej tejto oblasti prevláda elastický modul (G'). Takýto priebeh amplitúdového testu bol typický pre všetky namerané vzorky, čo znamená, že vo všetkých prípadoch ide o zosieťované gélové siete. Pre všetky namerané vzorky bola hodnota amplitúdy deformácie, teda hodnota potrebná pri frekvenčnom teste, zvolená na 1%.



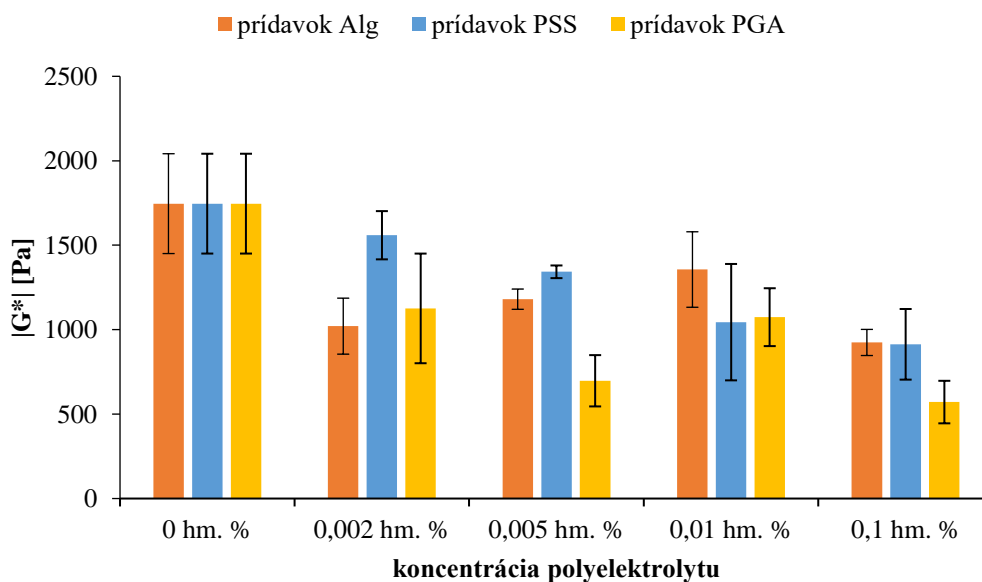
Obr. 21: Závislosť viskoelastických modulov na amplitúde deformácie pre PVA hydrogél bez prídavku polyelektrolytu

Z amplitúdového testu bola pre všetky namerané vzorky určená aj limitná amplitúda deformácie γ_c , čiže hodnota, pri ktorej končí LVO. Pre ľahšiu orientáciu bol zostavený stĺpcový graf znázorňujúci limitnú amplitúdu deformácie pre PVA gély bez alebo s prídavkom polyelektrolytu (Obr. 22). Čím je táto hodnota vyššia, tým by mali byť väzby v géli rigidnejšie a odolnejšie voči deformácii. Na základe grafu je vidieť, že najpevnější je PVA gél bez prídavku polyelektrolytu, zatiaľ čo najmenej pevné sú PVA gély s najvyššou koncentráciou inkorporovaného polyelektrolytu. V závislosti na type polyelektrolytu, s výnimkou alginátu, je pozorovaný takmer totožný koniec LVO.



Obr. 22: Porovnanie limitnej amplitúdy deformácie v závislosti na koncentrácii a type prídavaného polyelektrolytu do štruktúry PVA hydrogélu

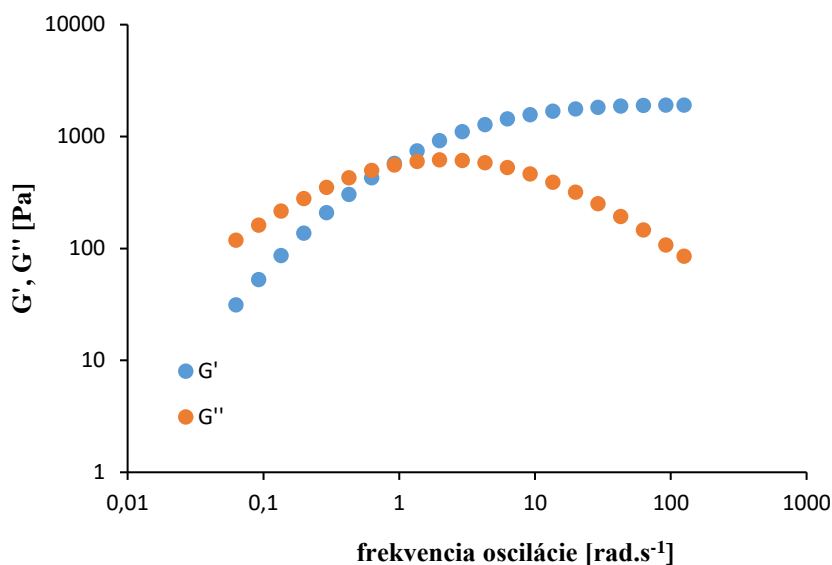
Stanovovaná bola taktiež aj hodnota komplexného modulu $|G^*|$ v LVO oblasti, keďže tá určuje celkovú rigiditu gélu v oblasti, kde nie je jeho sieť deformovaná nevratne (Obr. 23). Namerané hodnoty potvrdzujú fakt, že väzby v PVA géli bez prídavku polyelektrolytu sú najodolnejšie voči deformácii. Pozorovaný je len mierny pokles hodnôt komplexného modulu v závislosti na koncentrácii prídavaného polyelektrolytu.



Obr. 23: Porovnanie komplexného modulu v závislosti na koncentrácii a type prídavaného polyelektrolytu do štruktúry PVA hydrogélu

5.2.2. Frekvenčný test

Frekvenčný test (*frequency sweep*) je závislosť viskoelastických modulov na frekvencii oscilácie senzoru pri konštantnej hodnote amplitúdy deformácie, čiže hodnote, ktorá bola zvolená na základe amplitúdového testu (1%). Opäť ako modelový prípad bol zvolený frekvenčný test PVA hydrogél bez prídavku polyelektrolytu (Obr. 24). Na grafe je možné pozorovať typické gélové správanie. Pri nízkej frekvencii oscilácie sa prejavuje viskózný charakter ($G'' > G'$), so zvyšujúcou sa frekvenciou oscilácie nastáva bod pretnutia kriviek, (tzv. *cross-over*, $G'' = G'$), a následne, pri vyššej frekvencii oscilácie už prevažuje elastický charakter ($G'' < G'$). Takýto priebeh bol opäť pozorovaný pri všetkých nameraných vzorkách.

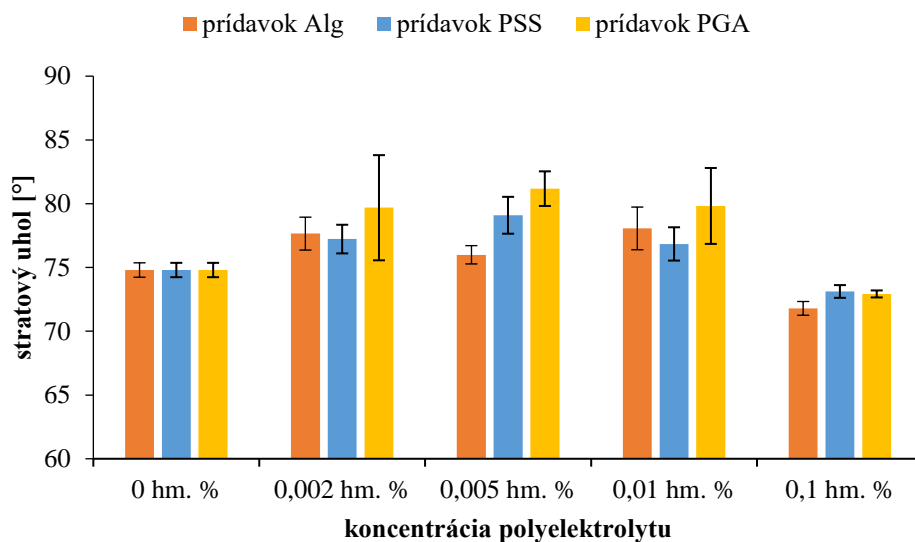


Obr. 24: Závislosť viskoelastických modulov na frekvencii oscilácie pre PVA hydrogél bez prídavku polyelektrolytu

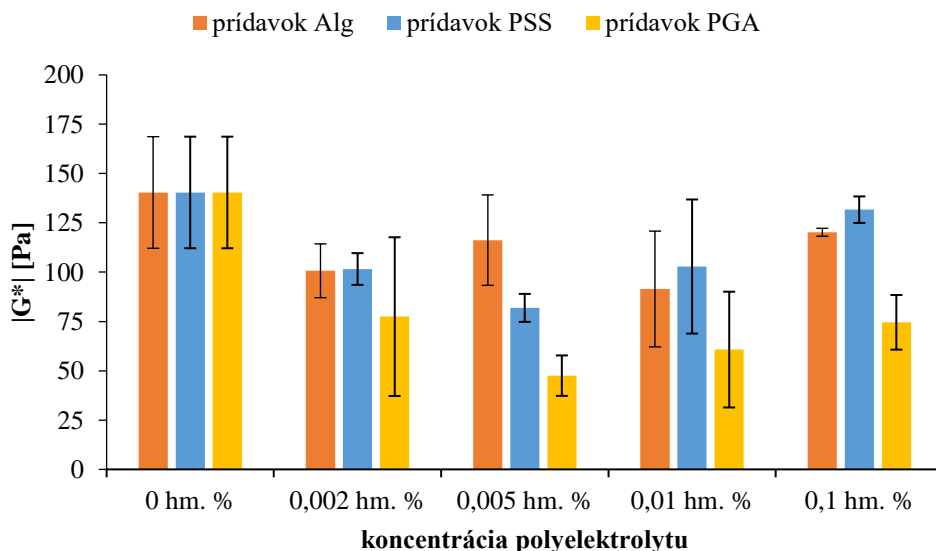
Z frekvenčného testu bol stanovovaný stratový uhol δ a veľkosť komplexného modulu $|G^*|$, a to v troch bodoch: pri najnižšej a najvyššej frekvencii oscilácie a taktiež v crossover bode, kde bola stanovovaná iba hodnota komplexného modulu $|G^*|$, keďže v crossover bode je hodnota stratového uhlu δ definične rovná 45° .

Ako prvé sú opäť prostredníctvom stĺpcových grafov znázornené hodnoty stratového uhlu (Obr. 25) a komplexného modulu (Obr. 26) pri najnižšej frekvencii oscilácie (konkrétne $0,063 \text{ rad.s}^{-1}$), ktorá reprezentuje predovšetkým správanie gélov pri dlhodobom pomalom zaťažení (*long-term behavior*). Ako už bolo spomenuté, pri nízkej frekvencii oscilácie sa pri všetkých nameraných vzorkách prejavoval viskózný charakter, čo potvrdzujú aj hodnoty stratového uhlu, keďže tie sú väčšie ako 45° . Zároveň, najnižšie hodnoty boli pozorované v prípade PVA gélu bez prídavku polyelektrolytu a prekvapivo taktiež v prípade PVA gélu s najvyššou koncentráciou polyelektrolytu. Tieto gély majú teda menej výrazný viskózný charakter oproti ostatným vzorkám, u ktorých zrejme dochádza k absorpcii väčšieho množstva disperzného prostredia. Tento fakt podporujú aj hodnoty komplexného modulu (Obr. 26), spomenuté gély majú najvyššie hodnoty komplexných modulov a sú teda rigidnejšie, s výnimkou prídavku PGA, pri ktorom je pozorovaný výraznejší pokles hodnoty komplexného

modulu. Na základe toho sa zdá, že už malý prídavok polyelektrolytu skutočne znižuje hustotu zosieťovania, čoho výsledkom je gél s výraznejším viskóznym charakterom (súhlasí to aj s výsledkami stanovenia obsahu pevného podielu v géloch). Pri najvyššom prídavku polyelektrolytu už zrejme môže dochádzať ku vzniku druhej fyzikálnej siete a reťazce interpenetrovaného polyelektrolytu si tak na seba preberajú časť elastickej odozvy,



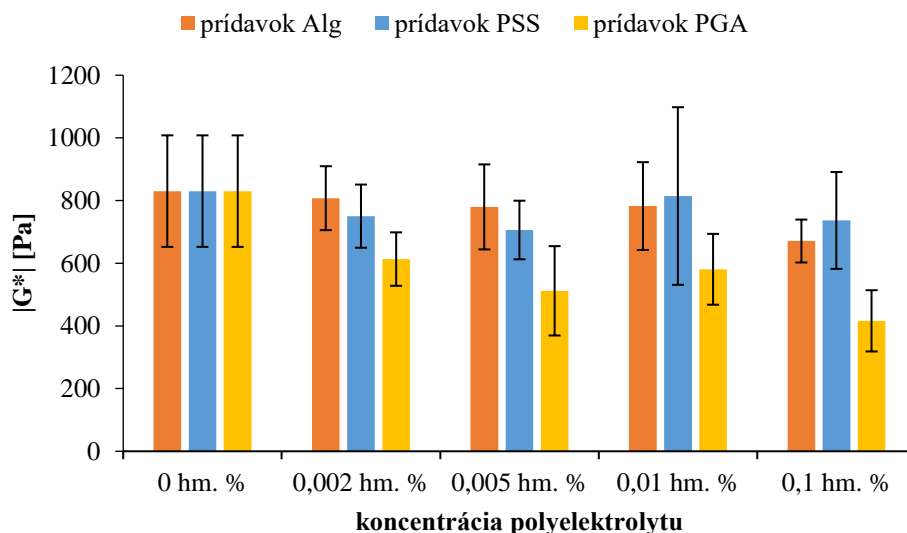
Obr. 25: Porovnanie stratového uhlu pri najnižšej frekvencii oscilácie v závislosti na koncentrácii a type pridávaného polyelektrolytu do štruktúry PVA hydrogélu



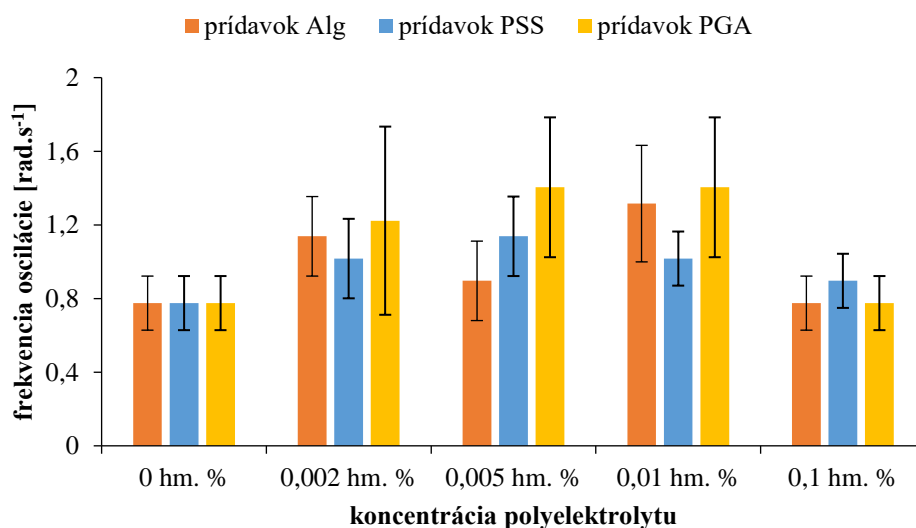
Obr. 26: Porovnanie komplexného modulu pri najnižšej frekvencii oscilácie v závislosti na koncentrácii a type pridávaného polyelektrolytu do štruktúry PVA hydrogélu

Druhým, a zároveň najdôležitejším bodom, je crossover bod, čiže bod prenutia elastickeho a viskózneho modulu, moment, kedy sa gél javí ideálne viskoelasticky. K prenutiu viskoelastických modulov došlo pri všetkých nameraných vzorkách. Hodnoty komplexných modulov v bode prenutia sú znázornené na Obr. 27. Inkorporované polyelektrolyty nemajú

výrazný vplyv na výsledný komplexný modul v bode pretnutia, hodnoty sa takmer nelíšia, výnimkou je opäť iba prídavok PGA, kde je pozorovaný výraznejší pokles hodnoty v porovnaní s ostatnými vzorkami. Dôležitá je hlavne frekvencia oscilácie, pri ktorej dochádza k pretnutiu elastického a viskózneho modulu, tá je znázornená na Obr. 28. Najnižšia hodnota je pozorovaná v prípade PVA gélu bez prídavku polyelektrolytu a v prípade PVA gélu s najvyššou koncentráciou pridávaného polyelektrolytu, čo znamená, že elastický modul začne pri týchto vzorkách prevládať skôr. Tento výsledok bol zrejmy už z hodnôt stratového uhlu pri najnižšej frekvencii oscilácie.

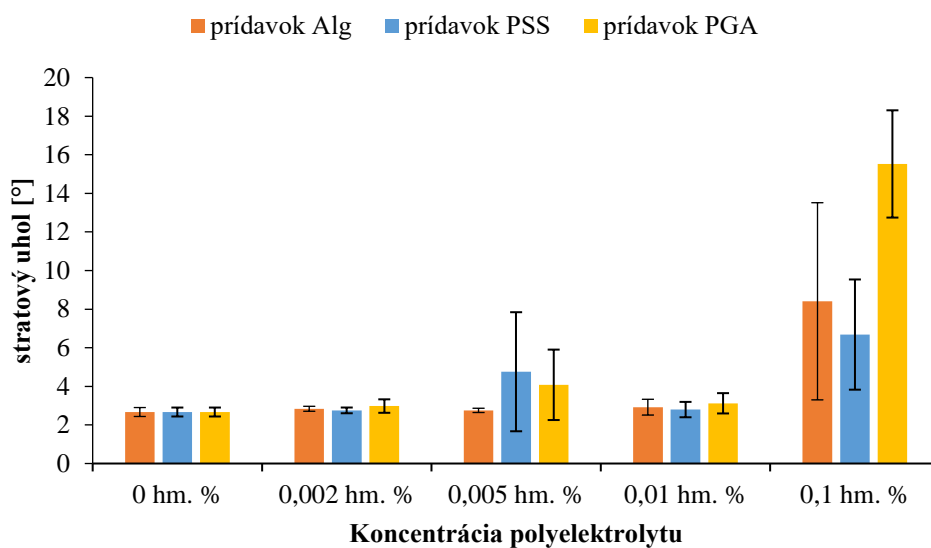


Obr. 27: Porovnanie komplexného modulu v crossover bode v závislosti na koncentrácii a type pridávaného polyelektrolytu do štruktúry PVA hydrogél

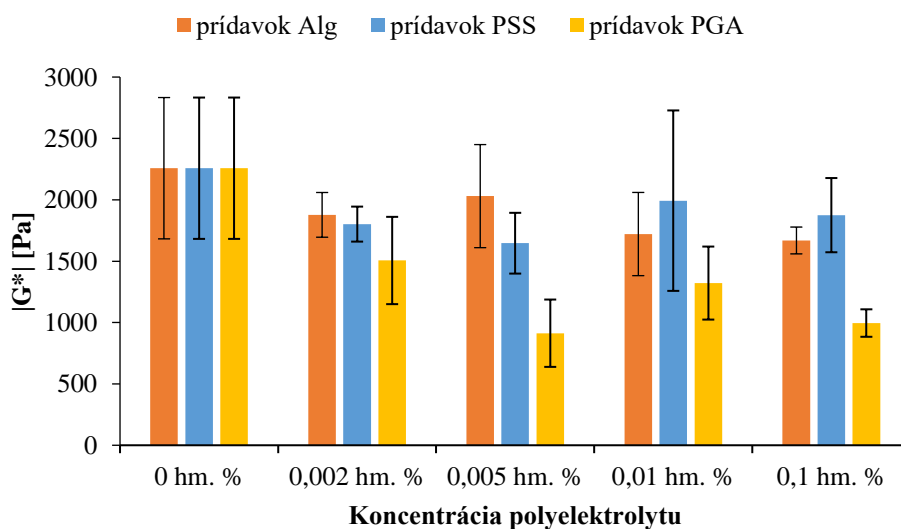


Obr. 28: Porovnanie frekvencie oscilácie v crossover bode v závislosti na koncentrácii a type pridávaného polyelektrolytu do štruktúry PVA hydrogél

Ako posledné boli stanovované hodnoty stratového uhlu (Obr. 29) a komplexného modulu (Obr. 30) pri najvyššej frekvencii oscilácie (konkrétne $125,7 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$). Výsledky merania pri tejto frekvencii reprezentujú predovšetkým krátkodobú odozvu materiálu na rýchlu deformáciu (*short-term behavior*). Opäť platí, že pri vyššej frekvencii oscilácie už prevláda elastický charakter, čo potvrdzujú aj hodnoty stratového uhlu, ktoré sú vo všetkých prípadoch menšie ako 45° . Výrazný elastický charakter je pozorovaný pri všetkých nameraných vzorkách okrem prípadu s najvyššou koncentráciou pridávaného polyelektrolytu. Ani v tomto prípade sa neprejavil výrazný vplyv inkorporovaných polyelektrolytov na rigiditu, výsledné hodnoty komplexného modulu pri najvyššej frekvencii oscilácie sa takmer nelíšia a opäť je pozorovaný výraznejší pokles iba v prípade PGA.



Obr. 29: Porovnanie stratového uhlu pri najvyššej frekvencii oscilácie v závislosti na koncentrácii a type pridávaného polyelektrolytu do štruktúry PVA hydrogélu



Obr. 30: Porovnanie komplexného modulu pri najvyššej frekvencii oscilácie v závislosti na koncentrácii a type pridávaného polyelektrolytu do štruktúry PVA hydrogélu

Všetky uvedené výsledky naznačujú, že inkorporované polyelektrolyty nemajú výrazný vplyv na výsledné mechanické PVA hydrogél. Prídanie polyelektrolytu ovplyvnilo hlavne hodnotu δ pri najnižšej frekvencii oscilácie a hodnotu frekvencie oscilácie v bode pretnutia viskoelastických modulov. Hydrogély s prídavkom polyelektrolytu majú viskóznejší charakter a zároveň sú menej rigidné v porovnaní s PVA hydrogélom bez prídavku polyelektrolytu. Viskóznejší charakter bol očakávaný už na základe stanovovaného obsahu sušiny (viz podkapitola 5.1) v hydrogélach. Malý prídavok polyelektrolytu zrejme znižuje hustotu zosieťovania, čoho výsledkom je väčšie množstvo absorbovanej vody. Potvrďuje to aj frekvencia oscilácie v bode pretnutia viskoelastických modulov, ktorá sa po pridaní polyelektrolytu zvýšila, čo znamená, že elastický modul začal prevládať neskôr. Väčšia zmena je pozorovaná iba v prípade najvyššej koncentrácie inkorporovaného polyelektrolytu. Táto koncentrácia bola použitá hlavne pri testovaní mechanických vlastností, keďže tá predstavovala akýsi extrém, aby sa určilo, ako najviac je možné ovplyvniť mechanické vlastnosti bez toho, aby bola výrazne ovplyvnená aj základná gélotvorná sieť.

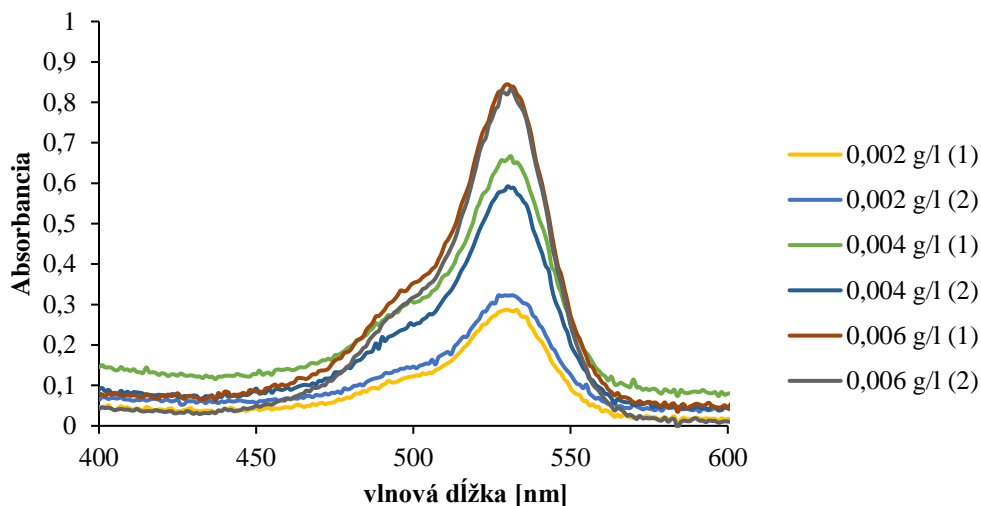
5.3 Optimalizácia postupu stanovenia transportných vlastností

Transportné vlastnosti PVA hydrogél boli pozorované najprv z makroskopického pohľadu a následne z mikroskopického pohľadu, prostredníctvom fluorescenčnej korelačnej spektroskopie. K stanoveniu transportných vlastností na makroskopickej úrovni bola zvolená metóda difúzneho páru, ktorú bolo potrebné zoptimalizovať.

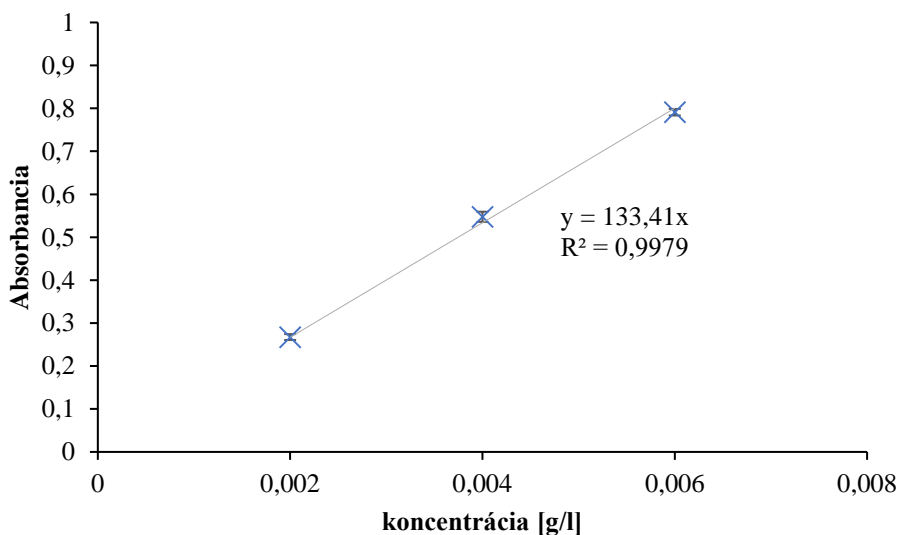
5.3.1. Optimalizácia metódy difúzneho páru

Presný postup prípravy hydrogél a zostavenia aparatury pre tento experiment je popísaný v podkapitole 4.3.3. Táto metóda je založená na sledovaní procesu difúzie R6G zo zdrojového gélu obsahujúceho konštantnú koncentráciu R6G do gélu prijímacieho, ktorý na začiatku experimentu obsahuje nulovú koncentráciu R6G a buď ide o PVA gél bez prídavku alebo s prídavkom polyelektrolytu. Samotný proces difúzie prebieha po spojení dvoch difúzných prostredí (kyvet) a tie sú v určitých časových intervaloch (24, 48, 72 a 168 hodín) rozpojené a sledovaná je zmena koncentrácie difundujúcej látky (R6G) v prijímacom géli.

Vlastné vyhodnocovanie spočívalo v niekoľkých krokoch. Ako modelový prípad bol opäť zvolený PVA hydrogél bez prídavku polyelektrolytu. Na začiatok bolo, pre určenie presnej zmeny koncentrácie difundujúcej látky, potrebné zostrojiť kalibračnú krivku. Prvý krok spočíval v nameraní absorpčných spektier PVA hydrogél obsahujúceho prídavok rôzne koncentrovaného vodného roztoku R6G. Výsledkom je Obr. 31, z ktorého bola po úprave absorpčných spektier zostrojená kalibračná krivka (Obr. 32).

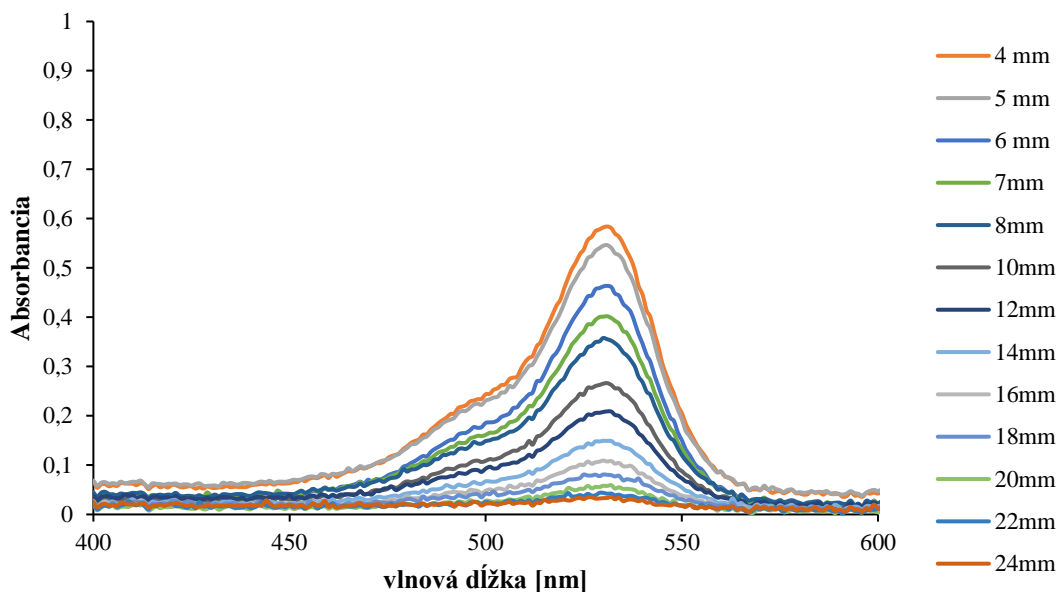


Obr. 31: Absorpčné spektrum – kalibrácia pre PVA hydrogél bez prídavku polyelektrolytu



Obr. 32: Kalibračná krivka pre PVA hydrogél bez prídavku polyelektrolytu; hodnoty absorbancií získané z absorpčného maxima (v okolí hodnoty vlnovej dĺžky 530 nm)

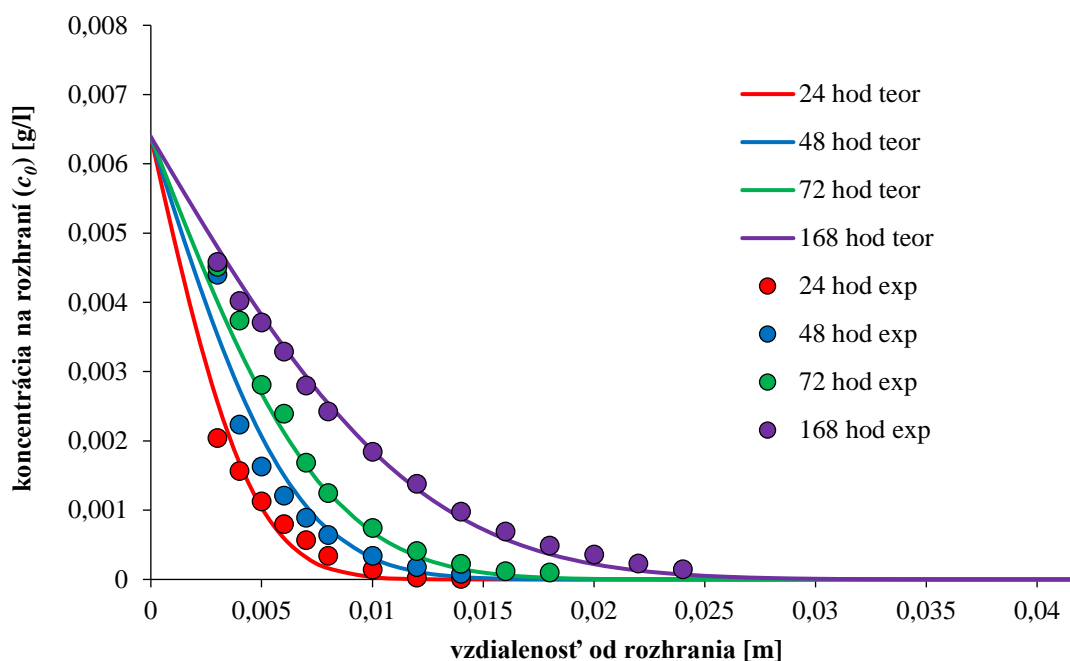
Následne boli merané absorpčné spektrá pozdĺž kyvety v určitých vzdialenostiach od rozhrania kyvety v uvedených časových intervaloch. Ako príklad je uvedené absorpčné spektrum pre PVA hydrogél po 168 hodinách (Obr. 33). Všetky merané hydrogély mali podobný priebeh absorpčných spektier, smerom od rozhrania kyvety dochádzalo k postupnému poklesu v maxime absorpčných spektier, a zároveň, všetky absorpčné spektrá museli byť upravené, pretože dochádzalo okrem absorpcie svetla molekulami R6G taktiež aj k jeho rozptylu na polymérnej sieti gélu.



Obr. 33: Absorpčné spektrum PVA hydrogélú po 168 hodinách

Všetky absorpčné spektrá, aj tie, ktoré boli namerané pre zostrojenie kalibračnej krivky, boli upravované týmto spôsobom: pre potreby potlačenia rozptylového vplyvu boli od absorpčného maxima (v okolí hodnoty 530 nm) odčítané spriemerované hodnoty absorbancie namerané v rozmedzí hodnôt 430–440 nm a 630–640 nm, kde je predpokladaná (na základe meraní absorpčného spektra vodného roztoku R6G) nulová absorbcia žiarenia molekulami R6G. Po tejto úprave už bolo možné pristúpiť k stanoveniu koncentračných profilov a difúzneho koeficientu R6G v sledovanom hydrogéli. Z absorpčných spektier boli získané experimentálne hodnoty koncentračných profilov, ktoré boli prostredníctvom doplnku Riešiteľ v programe MS Excel preložené teoretickým modelom (difúznou rovnicou) definovaným v podkapitole 2.3.3.2 (k regresii experimentálnych dát bola použitá metóda najmenších štvorcov), na základe ktorého bola stanovená koncentrácia (na rozhraní) a difúzny koeficient R6G v štruktúre PVA hydrogélú.

Pri regresii experimentálnych dát stanovených pre jeden rovnaký prijímací gél v rôznej dobe trvania difúzneho experimentu bolo (v súlade s použitým difúznym modelom) predpokladané, že difúzny koeficient R6G (D) a ani koncentrácia R6G na rozhraní (c_0) sa s časom nemení. Iterácia tak viedla k nájdeniu takých spoločných hodnôt D a c_0 , pre ktoré je suma štvorcov odchýlok medzi teoretickými a experimentálnymi difúznymi profilami pre daný prijímací gél najmenšia pre všetky doby trvania experimentu. Výsledkom je koncentračný profil uvedený na Obr. 34, z ktorého bola stanovená finálna hodnota koncentrácie R6G na rozhraní a finálna hodnota difúzneho koeficientu R6G v sledovanom hydrogéli.



Obr. 34: Preloženie experimentálnych dát teoretickým modelom pre PVA hydrogél bez prídavku polyelektrolytu

Takýmto spôsobom boli spracovávané všetky analyzované PVA hydrogély či už bez prídavku alebo s prídavkom polyelektrolytu. Najprv museli byť pre všetky skúmané hydrogély zostrojené kalibračné krivky (viz príloha), a až potom bolo možné rovnakým spôsobom pristúpiť k analýze koncentračných profilov pomocou doplnku Riešiteľ.

5.3.2. Diskusia výsledkov získaných metódou difúzneho páru

Táto podkapitola je venovaná diskusii výsledkov získaných po úspešnej optimalizácii metódy difúzneho páru.

Čo sa týka inkorporácie Alg do štruktúry PVA hydrogélu, metódou difúzneho páru nebola už sledovaná 0,1 % hmotnostná koncentrácia, pretože výsledný hydrogél nie je natoľko transparentný, aby ho bolo možné analyzovať metódou UV/VIS. Táto koncentrácia nebola pre stanovenie transportných vlastností ani potrebná, keďže cieľom bolo modulovanie transportných vlastností s pokiaľ možno čo najmenším zásahom do mechanických vlastností výsledného gélu. V Tab. 2 sú zhrnuté výsledné hodnoty difúznych koeficientov a aj hodnoty koncentrácie R6G na rozhraní v závislosti na koncentrácii pridávaného Alg. Na základe difúznych koeficientov je zrejmé, že prídanie alginátu nevyvolalo spomalenie procesu difúzie R6G v PVA hydrogéli, naopak, po pridaní alginátu do štruktúry PVA sa proces difúzie urýchlil. Na rozhraní nedochádzalo ani k zakoncentrovávaniu R6G, výsledná hodnota koncentrácie R6G na rozhraní je menšia v porovnaní s PVA hydrogélom bez prídavku polyelektrolytu. V závislosti na koncentrácii pridávaného Alg, výsledná hodnota koncentrácie R6G na rozhraní sa signifikantne nemení. Tieto výsledky podporuje aj samotná vizuálna charakterizácia gélov po ukončení experimentu (Obr. 35).

Tab. 2: Porovnanie koncentrácie (na rozhraní) a difúzneho koeficientu R6G v závislosti na koncentrácii pridávaného Alg do štruktúry PVA hydrogélu

Koncentrácia Alg	c_0 [g/l]	D [m ² /s]
0 hm. %	$(6,76 \pm 0,52) \cdot 10^{-3}$	$0,71 \pm 0,05$
0,002 hm. %	$(4,59 \pm 0,21) \cdot 10^{-3}$	$0,84 \pm 0,04$
0,005 hm. %	$(4,70 \pm 0,09) \cdot 10^{-3}$	$0,91 \pm 0,03$
0,01 hm. %	$(5,42 \pm 0,12) \cdot 10^{-3}$	$0,84 \pm 0,03$

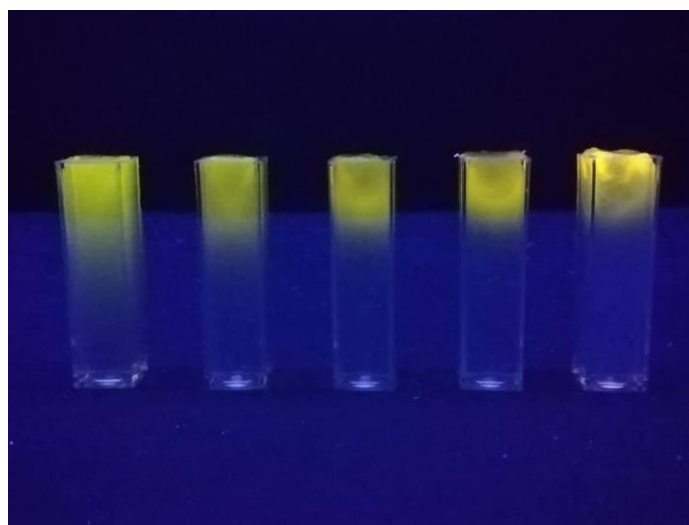


Obr. 35: Vizuálna charakterizácia PVA hydrogélův po ukončení experimentu; naľavo je PVA hydrogél bez prídavku polyelektrolytu; smerom doprava sa zvyšuje koncentrácia pridávaného Alg

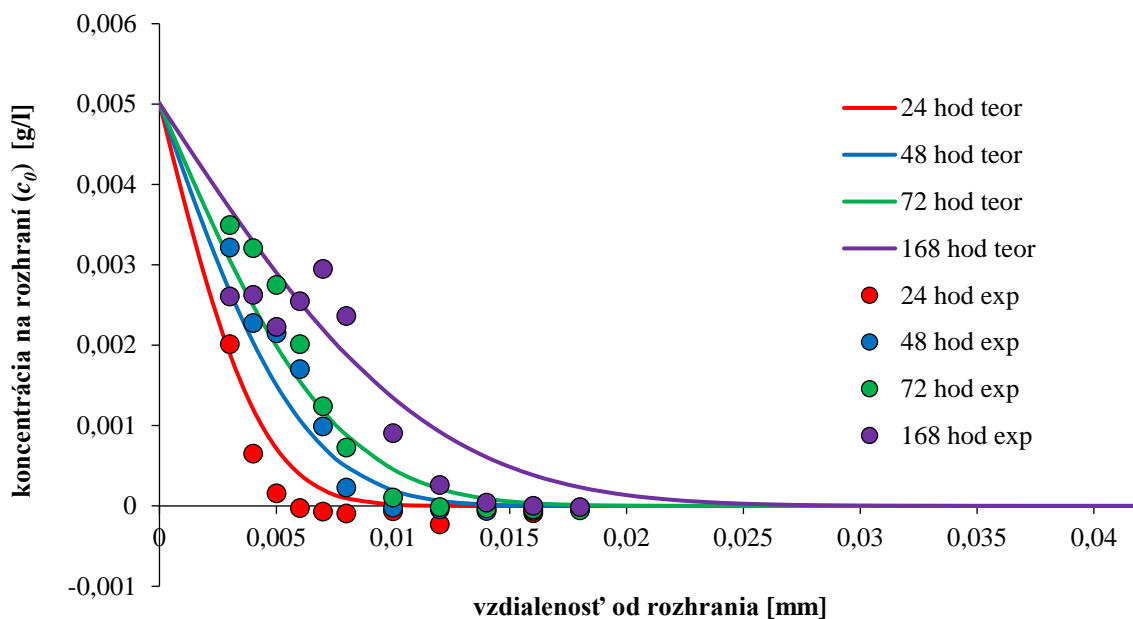
Úplne iný je vplyv inkorporovaného PSS na transportné vlastnosti PVA hydrogélu, výsledné hodnoty sú znázornené v Tab. 3. V závislosti na koncentrácii pridávaného PSS je pozorovaný nárast koncentrácie R6G na rozhraní v porovnaní s PVA hydrogélom bez prídavku polyelektrolytu. Na rozhraní totiž dochádza k zakoncentrovávaniu R6G vplyvom PSS, čoho dôkazom je Obr. 36, kde je viditeľné postupné zakoncentrovávanie R6G v závislosti na koncentrácii pridávaného PSS. Zároveň dochádza aj k výraznému spomaleniu difúzie v géloch s prídavkom PSS, čo je prezentované poklesom difúzneho koeficientu v závislosti na koncentrácii PSS. Je nutné si povšimnúť, že získané hodnoty koncentrácie a difúzneho koeficientu pri najvyššej koncentrácii PSS (0,1 hm.%) nesúhlasia s vizuálnou charakterizáciou (Obr. 36), na základe ktorej je jasné, že najvýraznejšie zakoncentrovávanie R6G je pozorované pri koncentrácii 0,1 hm. %, a teda v tomto prípade by mala byť pozorovaná aj najvyššia hodnota koncentrácie na rozhraní a najnižšia hodnota difúzneho koeficientu R6G. Dôvodom je práve to zakoncentrovávanie, čo spôsobilo, že experimentálne hodnoty koncentračných profilov nebolo možné úplne preložiť zvoleným teoretickým modelom (Obr. 37). Zaujímavosťou je aj Obr. 38, na ktorom je možné pozorovať tvorbu zhlukov v zdrojovom géli, ktorý bol spojený s PVA gélom obsahujúcim najvyššiu koncentráciu PSS (0,1 hm.%). PSS teda výrazne interaguje s R6G a ovplyvňuje transportné vlastnosti PVA hydrogélu.

Tab. 3: Porovnanie koncentrácie (na rozhraní) a difúzneho koeficientu R6G v závislosti na koncentrácii pridávaného PSS do štruktúry PVA hydrogélu

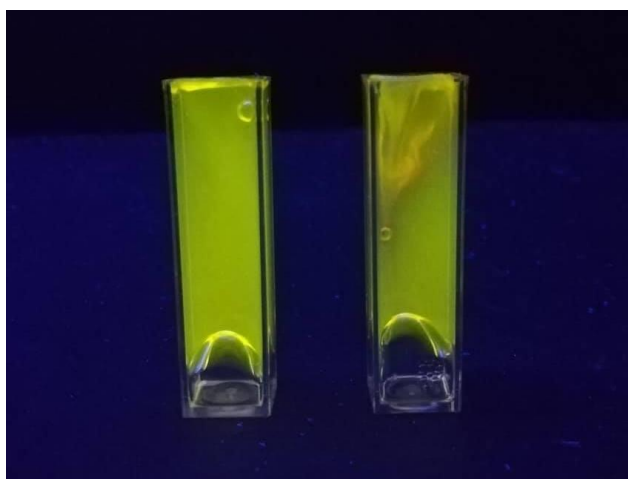
Koncentrácia PSS	c_0 [g/l]	D [m ² /s]
0 hm. %	$(6,76 \pm 0,52) \cdot 10^{-3}$	$0,708 \pm 0,046$
0,002 hm. %	$(7,56 \pm 0,08) \cdot 10^{-3}$	$0,578 \pm 0,024$
0,005 hm. %	$(8,20 \pm 1,67) \cdot 10^{-3}$	$0,492 \pm 0,004$
0,01 hm. %	$(8,90 \pm 3,44) \cdot 10^{-3}$	$0,485 \pm 0,129$
0,1 hm. %	$(5,89 \pm 1,25) \cdot 10^{-3}$	$0,623 \pm 0,075$



Obr. 36: Vizuálna charakterizácia PVA hydrogélv po ukončení experimentu; naľavo je PVA hydrogél bez prídavku polyelektrolytu; smerom doprava sa zvyšuje koncentrácia pridávaného PSS



Obr. 37: Preloženie experimentálnych dát teoretickým modelom pre PVA hydrogél s prídavkom PSS o koncentrácii 0,1 hm. %

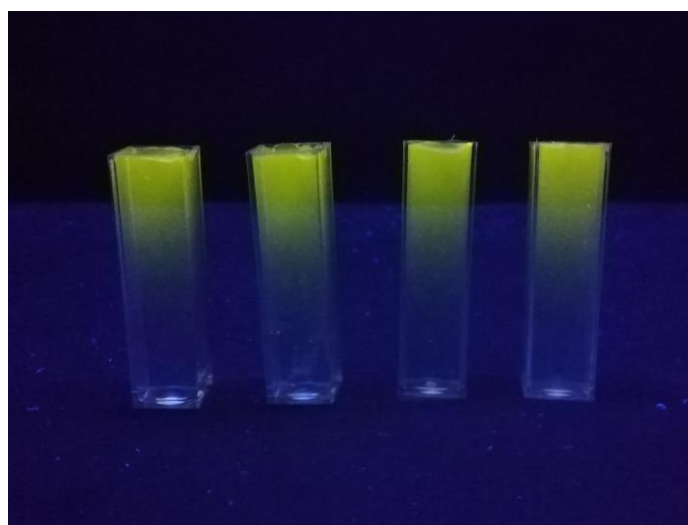


Obr. 38: Vizuálna charakterizácia zdrojových PVA gélov; napravo je zdrojový gél, ktorý bol spojený s PVA gélom obsahujúcim najvyššiu koncentráciu prídavaného PSS (0,1 hm.%)

Ako posledný bol do štruktúry PVA hydrogélu prídavaný aj PGA. Touto metódou nebola sledovaná 0,1 % hmotnostná koncentrácia, tak ako aj u Alg, a to z rovnakých dôvodov. Na základe hodnôt v Tab. 4, ale aj na základe vizuálnej charakterizácie (Obr. 39) je možné konštatovať, že prídavok PGA urýchľuje proces difúzie a nevyvoláva zakonzentrovávanie R6G na rozhraní, tak isto, ako to bolo aj v prípade Alg. Platí ale, že v tomto prípade nezávisí proces difúzie na presnej koncentrácii prídavaného PGA, keďže difúzne koeficienty sa významne nelíšia.

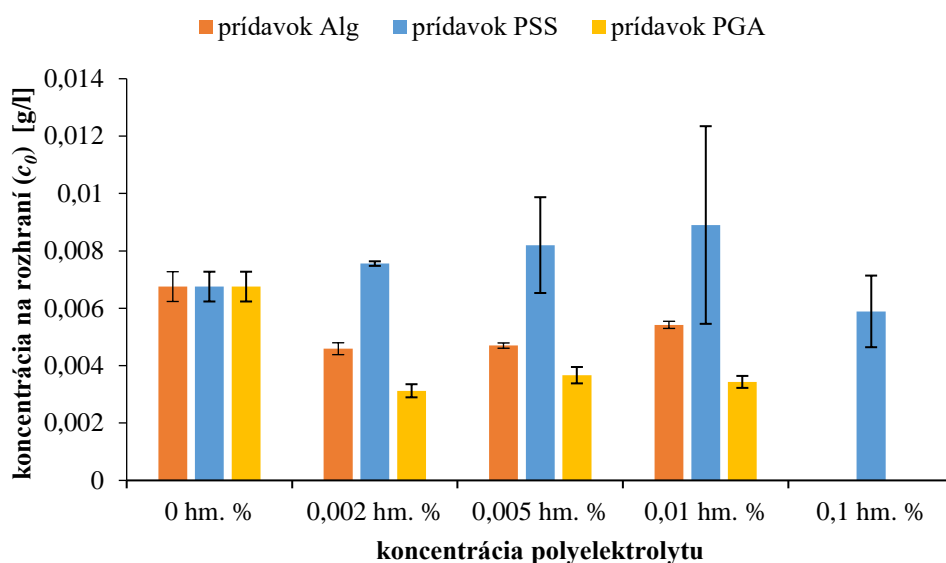
Tab. 4: Porovnanie koncentrácie (na rozhraní) a difúzneho koeficientu R6G v závislosti na koncentrácii pridávaného PGA do štruktúry PVA hydrogélu

Koncentrácia PGA	c_0 [g/l]	D [m ² /s]
0 hm. %	$(6,76 \pm 0,52) \cdot 10^{-3}$	$0,71 \pm 0,05$
0,002 hm. %	$(3,13 \pm 0,23) \cdot 10^{-3}$	$1,11 \pm 0,06$
0,005 hm. %	$(3,67 \pm 0,29) \cdot 10^{-3}$	$0,94 \pm 0,12$
0,01 hm. %	$(3,43 \pm 0,21) \cdot 10^{-3}$	$1,00 \pm 0,09$

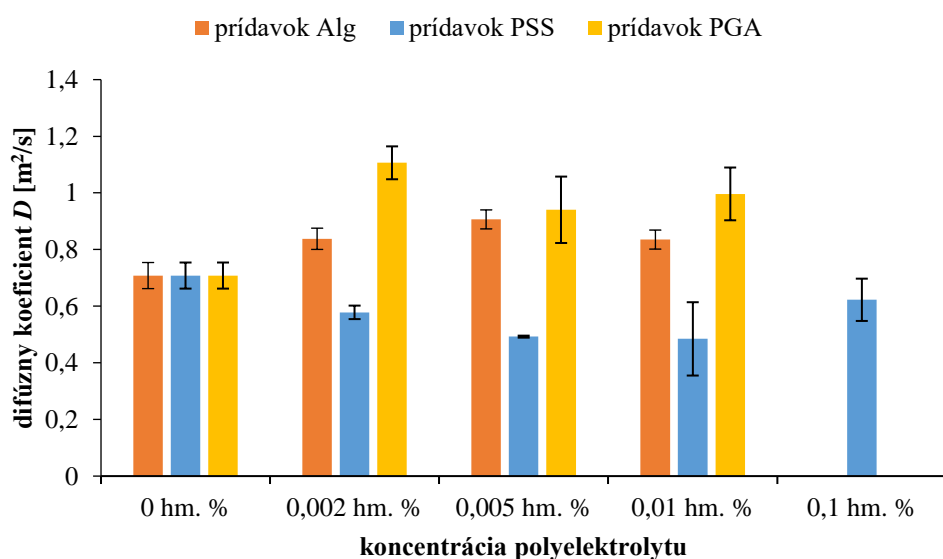


Obr. 39: Vizuálna charakterizácia PVA hydrogélv po ukončení experimentu; naľavo je PVA hydrogél bez prídavku polyelektrolytu; smerom doprava sa zvyšuje koncentrácia pridávaného PGA

Pre ľahšiu orientáciu boli zostrojené aj stĺpcové grafy porovnávajúce koncentráciu R6G na rozhraní (Obr. 40) a difúzny koeficient R6G (Obr. 41) v závislosti na koncentrácii a type pridávaného polyelektrolytu. Metódou difúzneho páru bolo zistené, že pridávané polyelektrolyty majú vplyv na výsledné transportné vlastnosti. R6G má vo svojej štruktúre jeden kladný náboj, zatiaľ čo polyelektrolyty sú záporne nabité. Na základe toho by mali iónové interakcie medzi polyelektrolytom a R6G ovplyvňovať samotný transport molekuly R6G. PSS ako jediný špecificky interaguje s R6G, čoho výsledkom je pomalší proces difúzie a vyššia koncentrácia R6G na rozhraní z dôvodu zakoncentrovávania. Oproti tomu, prídavok PGA a Alg urýchľuje proces difúzie, čo nebolo očakávané. Interakcia medzi PSS a R6G môže súvisieť aj s ich podobnou chemickou štruktúrou. PSS, ako jediný z týchto polyelektrolytov, obsahuje vo svojej štruktúre aromatické jadro, na ktorom je naviazaná skupina nesúca záporný náboj, zatiaľ čo R6G nesie v blízkosti aromatického jadra kladný náboj. Interakcie medzi týmito aromatickými jadrami sú zrejme dôvodom zakoncentrovania a spomalenia procesu difúzie R6G. Je možné, že záporné náboje na reťazci Alg a PGA si určitým mechanizmom medzi sebou postupne predávajú kladne nabitú molekulu R6G, čoho následkom je, naopak, zrýchlenie procesu difúzie R6G.



Obr. 40: Porovnanie koncentrácie R6G na rozhraní v závislosti na koncentrácii a type pridávaného polyelektrolytu do štruktúry PVA hydrogélu



Obr. 41: Porovnanie difúzneho koeficientu R6G v závislosti na koncentrácii a type pridávaného polyelektrolytu do štruktúry PVA hydrogélu

5.3.3. Diskusia výsledkov získaných metódou fluorescenčnej korelačnej spektroskopie

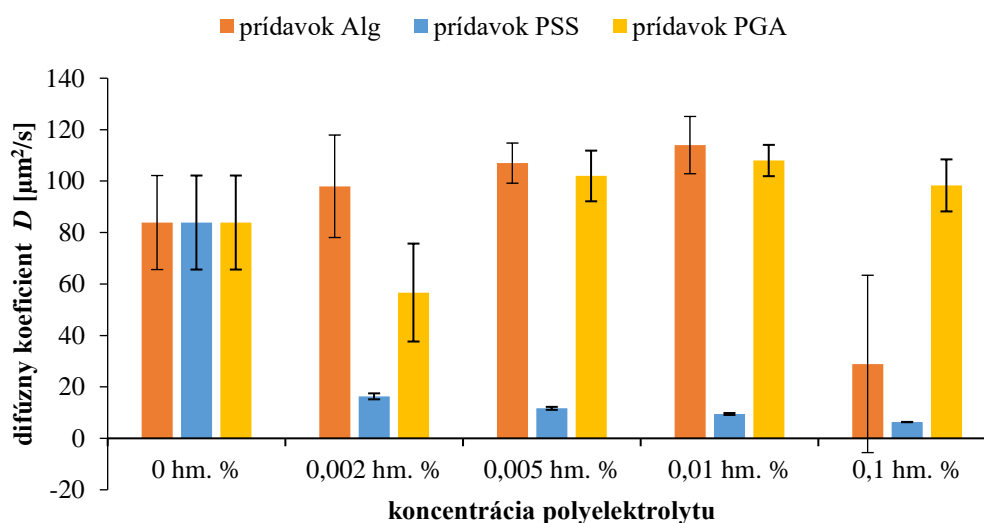
Presný postup prípravy hydrogelov a nastavenia FCS je popísaný v podkapitole 4.3.3. Postup stanovenia difúzných koeficientov metódou FCS nebolo nutné optimalizovať, keďže tomu som sa venovala už vo svojej bakalárskej práci [60]. Získané difúzne koeficienty R6G sú zhrnuté v Tab. 5, a pre ľahšiu orientáciu bol aj v tomto prípade zostrojený stĺpcový graf (Obr. 42) znázorňujúci difúzne koeficienty.

V tomto prípade je možné sledovať istý trend v zmene difúzných koeficientov v porovnaní s výsledkami získanými metódou difúzneho páru. Taktiež pri štúdiu difúzie R6G

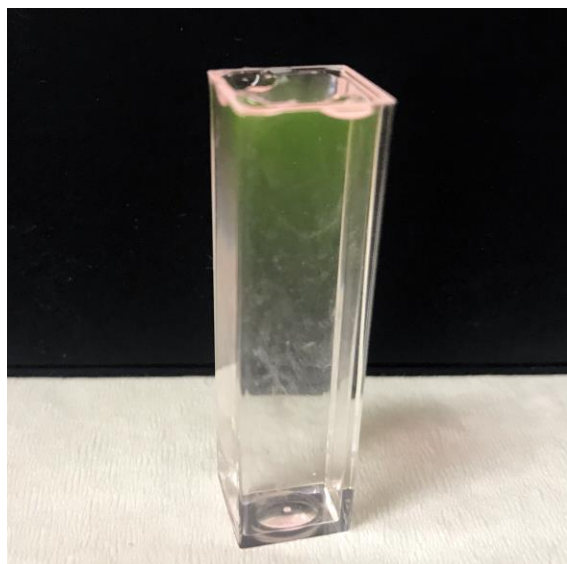
na molekulárnej úrovni sa potvrdilo, že proces difúzie je prídavkom PGA a Alg skôr urýchľovaný, zatiaľ čo prídavok PSS proces difúzie spomaľuje. Výraznejšia zmena je pozorovaná iba v prípade koncentrácie 0,002 hm. % PGA v PVA hydrogéli. Už pri analyzovaní tejto koncentrácie metódou difúzneho páru bola na základe vizuálnej charakterizácie zistená prítomnosť viditeľných zhlukov, ktoré sú znázornené aj na Obr. 43. Tieto zhluky boli príčinou výrazného rozptylu hodnôt absorpčného spektra (Obr. 44), čoho následkom bolo aj nepresné preloženie experimentálnych hodnôt koncentračných profilov. Je teda možné, že metódou FCS bola sledovaná difúzivita častíc práve v prítomnom zhluku, čo mohlo vyvolať pokles v hodnote difúzneho koeficientu.

Tab. 5: Porovnanie difúzneho koeficientu R6G v závislosti na koncentrácii pridávaného polyelektrolytu do štruktúry PVA hydrogélů

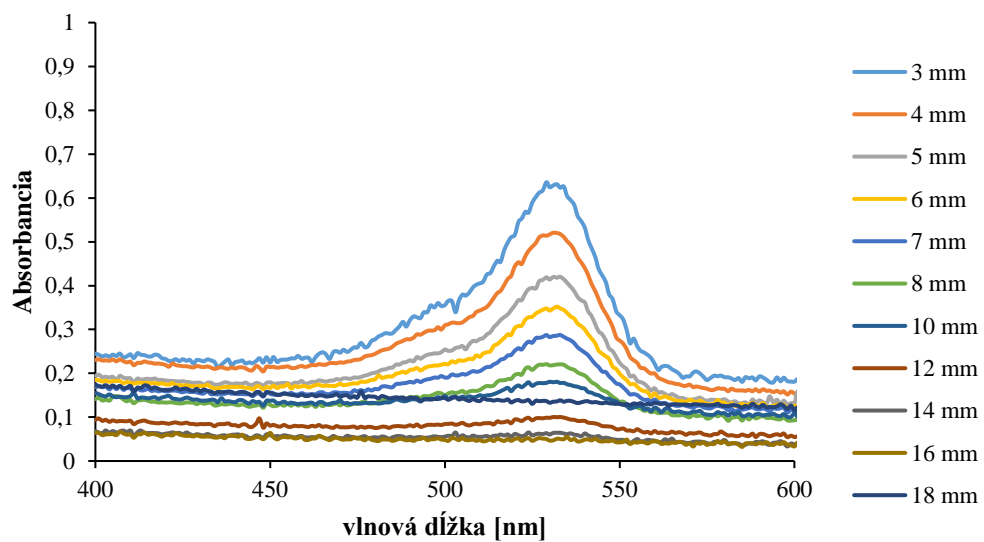
	D [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]				
	0 hm. %	0,002 hm. %	0,005 hm. %	0,01 hm. %	0,1 hm. %
Alg	83,9±18,3	98,0±19,9	107,0±7,8	114,0±11,1	28,9±34,5
PSS		16,3±1,2	11,7±0,6	9,5±0,4	6,3±0,1
PGA		56,7±19,1	102,0±9,8	108,0±6,1	98,3±10,1



Obr. 42: Porovnanie difúzneho koeficientu R6G v závislosti na koncentrácii a type pridávaného polyelektrolytu do štruktúry PVA hydrogélů



Obr. 43: Vizuálna charakterizácia PVA hydrogélu s prídavkom PGA o koncentrácii 0,002 hm. %



Obr. 44: Absorpčné spektrum po 48 hodinách pre PVA hydrogél s prídavkom PGA o koncentrácii 0,002 hm. %

6 ZÁVER

Cieľom tejto diplomovej práce bola inkorporácia polyelektrolytových zložiek do hydrogélovej matrice za účelom skúmania ich vplyvu na výsledné mechanické a transportné vlastnosti zvoleného hydrogélu.

Ako modelový gélotvorný materiál bol zvolený polyvinylalkohol (PVA), syntetický polymér, ktorý je možné sieťovať fyzikálne alebo chemicky. Na začiatok bola zvolená syntéza PVA hydrogélu prostredníctvom fyzikálnych interakcií, tzv. metódou *freeze-thaw*, ktorá spočíva v pravidelných cykloch zmrazovania a rozmrazovania vodného roztoku PVA. Táto metóda sa ukázala ako nevhodná pre skúmanie transportných vlastností, výsledné gély by nebolo možné vyhodnotiť spektroskopickými metódami, keďže neboli dostatočne transparentné. V dôsledku toho sa pristúpilo k príprave chemicky zosieťovaného PVA, a to za prítomnosti dekahydrátu tetraboritanu sodného (boraxu). Výsledný PVA hydrogél už bol transparentný a po vyriešení niekoľkých komplikácií pri samotnej príprave hydrogélu (prichytávanie gélu na sklenenú tyčinku, prítomnosť vzduchových bublín) bolo možné pristúpiť aj k inkorporácii záporne nabitých polyelektrolytových zložiek a k následnému skúmaniu ich vplyvu na mechanické a transportné vlastnosti PVA hydrogélu. Skúmaný bol vplyv alginátu sodného (Alg), polystyren sulfonátu sodného (PSS) a polyglutamátu sodného (PGA).

Pred začiatkom skúmania mechanických a transportných vlastností bol stanovovaný aj obsah pevného podielu (sušiny) v PVA hydrogélach v závislosti na koncentrácii a type pridávaného polyelektrolytu. Najväčší podiel sušiny, na základe výsledkov, obsahuje PVA hydrogél bez prídavku polyelektrolytu. Prídavok polyelektrolytu zrejme znižuje hustotu zosieťovania, čoho výsledkom je väčšie množstvo absorbovanej vody.

Mechanické vlastnosti boli z hľadiska viskoelastických vlastností skúmané prostredníctvom reológie. Prevedené boli amplitúdové (*strain sweep*) a frekvenčné (*frequency sweep*) testy. Amplitúdovým testom bola stanovená hranica lineárnej viskoelastickej oblasti (LVO), v ktorej sú hodnoty viskoelastických modulov konštantné. Pri všetkých nameraných géloch prevládala v LVO elastický charakter, čo dokazuje že ide zosieťované gélové siete. Z amplitúdového testu bola stanovovaná aj limitná amplitúda deformácie a komplexný modul. Výsledné hodnoty naznačujú, že PVA gél bez prídavku polyelektrolytu má najodolnejšie väzby voči deformácii. Amplitúdovým testom bola určená aj vhodná amplitúda deformácie (1 %), pri ktorej boli prevedené frekvenčné testy.

Frekvenčným testom bolo pri všetkých nameraných vzorkách dokázané gélové správanie charakteristické tým, že pri nízkej frekvencii oscilácie sa prejavuje viskózný charakter (vyšší viskózný modul), so zvyšujúcou sa frekvenciou oscilácie nastáva bod prenutia viskoelastických modulov, a následne, pri vyššej frekvencii oscilácie už prevažuje elastický charakter (vyšší elastický modul). Z frekvenčného testu boli stanovované hodnoty stratového uhlu a komplexného modulu pri najnižšej a najvyššej frekvencii oscilácie a taktiež v bode prenutia viskoelastických modulov, kde bola stanovovaná iba hodnota komplexného modulu, keďže v crossover bode je hodnota stratového uhlu δ definične rovná 45° . Na základe výsledkov nemajú inkorporované polyelektrolyty výrazný vplyv na mechanické vlastnosti PVA hydrogélu, keďže neboli pozorované výrazné zmeny v hodnotách komplexného modulu

po pridaní polyelektrolytu. Pozorovaná bola napr. vyššia hodnota stratového uhlu pri nízkej frekvencii oscilácie, a teda viskóznejší charakter po pridaní polyelektrolytu, čo svedčí o väčšom množstve absorbovanej vody. To potvrdzuje aj frekvencia oscilácie v bode prenutia viskoelastických modulov, ktorá sa po pridaní polyelektrolytu zvýšila, čo znamená, že elastický modul začal prevládať neskôr. Očakávaná, väčšia zmena, bola pozorovaná iba v prípade najvyššej koncentrácie inkorporovaného polyelektrolytu, keďže táto koncentrácia predstavovala akýsi extrém, aby sa určilo, ako najviac je prídavkom polyelektrolytu možné ovplyvniť mechanické vlastnosti bez toho, aby bola výrazne ovplyvnená aj základná gelotvorná sieť.

Čo sa týka transportných vlastností, tie boli pozorované najprv metódou difúzneho páru, ktorú bolo nutné optimalizovať. Sledovaný bol proces difúzie R6G zo zdrojového PVA gélu do prijímacieho PVA gélu bez alebo s prídavkom polyelektrolytu. Metóda spočívala v meraní absorpčných spektier pozdĺž kyvety v určitých časových intervaloch (24,48, 72 a 168 hodín), pričom smerom od rozhrania kyvety dochádzalo k postupnému poklesu v maxime absorpčných spektier. Absorpčné spektrá museli byť aj upravované, keďže dochádzalo k rozptylu svetla na gélovej sieti. Po zostrojení kalibračných kriviek boli z absorpčných spektier získané experimentálne hodnoty koncentračných profilov, ktoré boli preložené teoretickým modelom (prostredníctvom doplnku Riešiteľ v programe MS Excel), na základe ktorého bola stanovená koncentrácia (na rozhraní) a difúzny koeficient R6G v štruktúre hydrogél.

Potvrdený bol vplyv inkorporovaných polyelektrolytov na výsledné transportné vlastnosti PVA hydrogél. V prípade inkorporácie Alg a PGA bolo pozorované urýchlenie procesu difúzie R6G, zatiaľ čo inkorporácia PSS mala za následok jeho spomalenie. PSS zrejme ako jediný špecificky interaguje s R6G, čo bolo potvrdené aj vizuálnou charakterizáciou, keďže bolo pozorované jasne viditeľné zakoncentrovanie R6G na rozhraní. Tieto výsledky boli potvrdené aj metódou fluorescenčnej korelačnej spektroskopie (FCS), ktorá je založená na sledovaní procesu difúzie prostredníctvom analýzy časových fluktuácií intenzity fluorescencie detekovanej z fluorescenčných častíc, teda z častíc R6G. Aj touto metódou bolo pozorované urýchlenie procesu difúzie po inkorporovaní Alg a PGA a spomalenie procesu difúzie vplyvom inkorporovaného PSS. Zmena bola pozorovaná iba v prípade prídavku PGA o hmotnostnej koncentrácii 0,002 %, podľa výslednej hodnoty difúzneho koeficientu získanej metódou FCS, by mal tento prídavok spomaliť, a nie zrýchliť proces difúzie R6G v PVA hydrogéli. Táto hodnota je ale nepresná, metódou FCS bola zrejme sledovaná difúzivita častíc v prítomnom zhluku. Zhluky boli pozorované už pri metóde difúzneho páru, pretože tie vyvolali aj výrazný rozptyl hodnôt absorpčných spektier.

Na navrhnutých materiáloch bola potvrdená využiteľnosť semi-interpenetrovaných polymérnych sietí pre prípravu materiálov s modulovateľnými vlastnosťami. Z výsledkov prevedených analýz vyplýva, že inkorporované polyelektrolyty síce nemajú výrazný vplyv na mechanické vlastnosti výsledného PVA hydrogél, no na základe výsledkov je preukázateľný ich vplyv na transportné vlastnosti. Je možné konštatovať, že PSS ako jediný špecificky interaguje s R6G, čo zrejme súvisí s ich podobnou chemickou štruktúrou. PSS vo svojej štruktúre obsahuje aromatické jadro, na ktorom je naviazaná skupina nesúca záporný

náboj. Zakoncentrovanie R6G a spomalenie procesu difúzie je zrejme vyvolané špecifickými interakciami medzi aromatickými jadrami R6G a PSS.

Pre úplné pochopenie PVA ako gélového materiálu by bolo v budúcnosti vhodné zamerať sa aj na štruktúrnú charakterizáciu či už PVA hydrogélú zosieťovaného chemicky (v prítomnosti boraxu ako sieťovacieho činidla) alebo fyzikálne (metódou *freeze-thaw*), keďže štruktúra polymérnej siete úzko súvisí so stanovovanými mechanickými a transportnými vlastnosťami. Týmto by sa získal komplexný pohľad na aplikačne relevantné vlastnosti. Štruktúrnou charakterizáciou by bolo následne možné predpovedať rýchlosť difúzie modelovej látky a tým by bolo možné zoptimalizovať prípravu hydrogélú tak, aby daný hydrogél splňoval kinetické požiadavky na uvoľňovanie aktívnej látky. Vďaka možnosti ovplyvnenia transportných vlastností inkorporáciou určitého typu polyelektrolytu sú PVA hydrogély perspektívnym typom materiálu využiteľného pri vývoji systémov pre riadenú distribúciu liečiv.

7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav. Vyd. 3., přeprac. a rozš. Praha: VŠCHT, 1999. ISBN 8070803371.
- [2] WICHTERLE, O. a D. LÍM. Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature* [online]. 1960, 185(4706), 117-118 [cit. 2019-02-07]. DOI: 10.1038/185117a0. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/185117a0>
- [3] YAHIA, LHocine. History and Applications of Hydrogels. *Journal of Biomedical Sciences* [online]. 2015, 04(02) [cit. 2019-01-31]. DOI: 10.4172/2254-609X.100013. ISSN 2254609X. Dostupné z: <http://www.jbiomeds.com/biomedical-sciences/history-and-applications-of-hydrogels.php?aid=7218>
- [4] BUWALDA, Sytze, Kristel BOERE, Pieter DIJKSTRA, Jan FEIJEN, Tina VERMONDEN a Wim HENNINK. Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials. *Journal of Controlled Release* [online]. 2014, 190, 254-273 [cit. 2018-11-29]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.03.052. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365914002181>
- [5] DUŠEK, K. a D. PATTERSON. Transition in swollen polymer networks induced by intramolecular condensation. *Journal of Polymer Science Part A-2: Polymer Physics* [online]. *b.r.*, 6(7), 1209-1216 [cit. 2019-01-31]. DOI: 10.1002/pol.1968.160060701. ISSN 04492978. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pol.1968.160060701>
- [6] KOPEČEK, Jindřich. Hydrogel biomaterials: A smart future?. *Biomaterials* [online]. 2007, 28(34), 5185-5192 [cit. 2019-01-31]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.044. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961207005819>
- [7] PARHI, Rabinarayan. Cross-Linked Hydrogel for Pharmaceutical Applications: A Review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* [online]. 2017, 7(4), 515-530 [cit. 2019-02-06]. DOI: 10.15171/apb.2017.064. ISSN 2228-5881. Dostupné z: http://apb.tbzmed.ac.ir/Abstract/APB_19295_20170413093617
- [8] NOVÁK, Josef. Fyzikální chemie II. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 807080436X.
- [9] NORDQVIST, David a Thomas VILGIS. Rheological Study of the Gelation Process of Agarose-Based Solutions. *Food Biophysics* [online]. 2011, 6(4), 450-460 [cit. 2019-02-06]. DOI: 10.1007/s11483-011-9225-0. ISSN 1557-1858. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11483-011-9225-0>
- [10] OYEN, M. Mechanical characterisation of hydrogel materials. *International Materials Reviews* [online]. 2013, 59(1), 44-59 [cit. 2019-02-09]. DOI: 10.1179/1743280413Y.0000000022. ISSN 0950-6608. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/1743280413Y.0000000022>

- [11] REDAELLI, F., M. SORBONA a F. ROSSI. Synthesis and processing of hydrogels for medical applications. *Bioresorbable Polymers for Biomedical Applications* [online]. Elsevier, 2017, s. 205-228 [cit. 2019-02-12]. DOI: 10.1016/B978-0-08-100262-9.00010-0. ISBN 9780081002629. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081002629000100>
- [12] ULLAH, Faheem, Muhammad OTHMAN, Fatima JAVED, Zulkifli AHMAD a Hazizan AKIL. Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2015, 57, 414-433 [cit. 2018-11-29]. DOI: 10.1016/j.msec.2015.07.053. ISSN 09284931. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493115302393>
- [13] MATRICARDI, Pietro, Chiara DI MEO, Tommasina COVIELLO, Wim HENNINK a Franco ALHAIQUE. Interpenetrating Polymer Networks polysaccharide hydrogels for drug delivery and tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2013, 65(9), 1172-1187 [cit. 2018-10-15]. DOI: 10.1016/j.addr.2013.04.002. ISSN 0169409X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X13000628>
- [14] MILLAR, J. 263. Interpenetrating polymer networks. Styrene-divinylbenzene copolymers with two and three interpenetrating networks, and their sulphonates. *J. Chem. Soc* [online]. 1960, 0(0), 1311-1317 [cit. 2018-11-28]. DOI: 10.1039/JR9600001311. ISSN 0368-1769. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=JR9600001311>
- [15] YE, Yun-Sheng, John RICK a Bing-Joe HWANG. Water Soluble Polymers as Proton Exchange Membranes for Fuel Cells. *Polymers* [online]. 2012, 4(2), 913-963 [cit. 2019-02-09]. DOI: 10.3390/polym4020913. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2073-4360/4/2/913>
- [16] AMINABHAVI, Tejraj, Mallikarjuna NADAGOUDA, Uttam MORE, Shrinivas JOSHI, Venkatrao KULKARNI, Malleshappa NOOLVI a Padmakar KULKARNI. Controlled release of therapeutics using interpenetrating polymeric networks. *Expert Opinion on Drug Delivery* [online]. 2014, 12(4), 669-688 [cit. 2018-11-28]. DOI: 10.1517/17425247.2014.974871. ISSN 1742-5247. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425247.2014.974871>
- [17] GUILHERME, Marcos, Márcia DE MOURA, Eduardo RADOVANOVIC, Georges GEUSKENS, Adley RUBIRA a Edvani MUNIZ. Novel thermo-responsive membranes composed of interpenetrated polymer networks of alginate-Ca²⁺ and *poly(N-isopropylacrylamide)*. *Polymer* [online]. 2005, 46(8), 2668-2674 [cit. 2018-10-17]. DOI: 10.1016/j.polymer.2005.01.082. ISSN 00323861. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386105001333>

- [18] DE MOURA, Márcia, Fauze AOUADA, Marcos GUILHERME, Eduardo RADOVANOVIC, Adley RUBIRA a Edvani MUNIZ. Thermo-sensitive IPN hydrogels composed of PNIPAAm gels supported on alginate-Ca²⁺ with *LCST tailored close* to human body temperature. *Polymer Testing* [online]. 2006, 25(7), 961-969 [cit. 2018-10-17]. DOI: 10.1016/j.polymeresting.2006.06.002. ISSN 01429418. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142941806001103>
- [19] BAJPAI, A.K., Sandeep SHUKLA, Smitha BHANU a Sanjana KANKANE. Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progress in Polymer Science* [online]. 2008, 33(11), 1088-1118 [cit. 2019-02-07]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2008.07.005. ISSN 00796700. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670008000609>
- [20] KAMOUN, Elbadawy, El-Refaie KENAWY, Tamer TAMER, Mahmoud ELMELIGY a Mohamed MOHY ELDIN. Poly (vinyl alcohol)-alginate physically crosslinked hydrogel membranes for wound dressing applications: *Characterization and bio-evaluation*. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2015, 8(1), 38-47 [cit. 2018-10-30]. DOI: 10.1016/j.arabjc.2013.12.003. ISSN 18785352. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878535213004310>
- [21] LIN, Hsiu-Li, Yuan-Feng LIU, T. YU, Wen-Horng LIU a Syang-Peng RWEI. Light scattering and viscoelasticity study of poly(vinyl alcohol)-borax aqueous solutions and gels. *Polymer* [online]. 2005, 46(15), 5541-5549 [cit. 2018-11-29]. DOI: 10.1016/j.polymer.2005.04.074. ISSN 00323861. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386105005392>
- [22] MURPHY, Diarmaid, Mayur SANKALIA, Ryan LOUGHLIN, Ryan DONNELLY, Mark JENKINS a Paul MCCARRON. Physical characterisation and component release of poly(vinyl alcohol)-tetrahydroxyborate hydrogels *and their applicability as* potential topical drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2012, 423(2), 326-334 [cit. 2018-10-30]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.11.018. ISSN 03785173. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517311010568>
- [23] HURST, Glenn, Malika BELLA a Christoph SALZMANN. The Rheological Properties of Poly(vinyl alcohol) Gels from Rotational Viscometry. *Journal of Chemical Education* [online]. 2015, 92(5), 940-945 [cit. 2019-02-20]. DOI: 10.1021/ed500415r. ISSN 0021-9584. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/ed500415r>
- [24] PEPPAS, Nikolaos. *Die Makromolekulare Chemie* [online]. b.r., 176(11), 3433-3440 [cit. 2019-01-28]. DOI: 10.1002/macp.1975.021761125. ISSN 0025116X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/macp.1975.021761125>

- [25] HOLLOWAY, Julianne, Anthony LOWMAN a Giuseppe PALMESE. The role of crystallization and phase separation in the formation of physically cross-linked PVA hydrogels. *Soft Matter* [online]. 2013, 9(3), 826-833 [cit. 2019-01-28]. DOI: 10.1039/C2SM26763B. ISSN 1744-683X. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C2SM26763B>
- [26] KAMOUN, Elbadawy, Xin CHEN, Mohamed MOHY ELDIN a El-Refaie KENAWY. Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications: A review of remarkably blended polymers. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2015, 8(1), 1-14 [cit. 2019-01-28]. DOI: 10.1016/j.arabjc.2014.07.005. ISSN 18785352. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878535214001403>
- [27] RINAUDO, Marguerite. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International* [online]. 2008, 57(3), 397-430 [cit. 2019-02-06]. DOI: 10.1002/pi.2378. ISSN 09598103. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pi.2378>
- [28] LEE, Kuen a David MOONEY. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science* [online]. 2012, 37(1), 106-126 [cit. 2019-02-06]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003. ISSN 00796700. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670011000918>
- [29] PEYRATOUT, Claire, Edwin DONATH a Lars DAEHNE. Electrostatic interactions of cationic dyes with negatively charged polyelectrolytes in aqueous solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* [online]. 2001, 142(1), 51-57 [cit. 2019-04-01]. DOI: 10.1016/S1010-6030(01)00490-7. ISSN 10106030. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1010603001004907>
- [30] 4-Ethenylbenzenesulfonic acid. National Center for Biotechnology Information: PubChem Database [online]. b.r. [cit. 2019-04-01]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/75905>
- [31] IN, Najar a Das S. Poly-Glutamic Acid (PGA) - Structure, Synthesis, Genomic Organization and Its Application: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* [online]. 2015, 6(6) [cit. 2019-05-01]. ISSN 0975-8232.
- [32] WILLENBACHER, Norbert a Kristina GEORGIEVA. Rheology of Disperse Systems. BRÖCKEL, Ulrich, ed., Willi MEIER, ed. a Gerhard WAGNER, ed., Ulrich BRÖCKEL, Willi MEIER, Gerhard WAGNER. *Product Design and Engineering* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013, s. 7-49 [cit. 2019-02-20]. DOI: 10.1002/9783527654741.ch1. ISBN 9783527654741. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527654741.ch1>

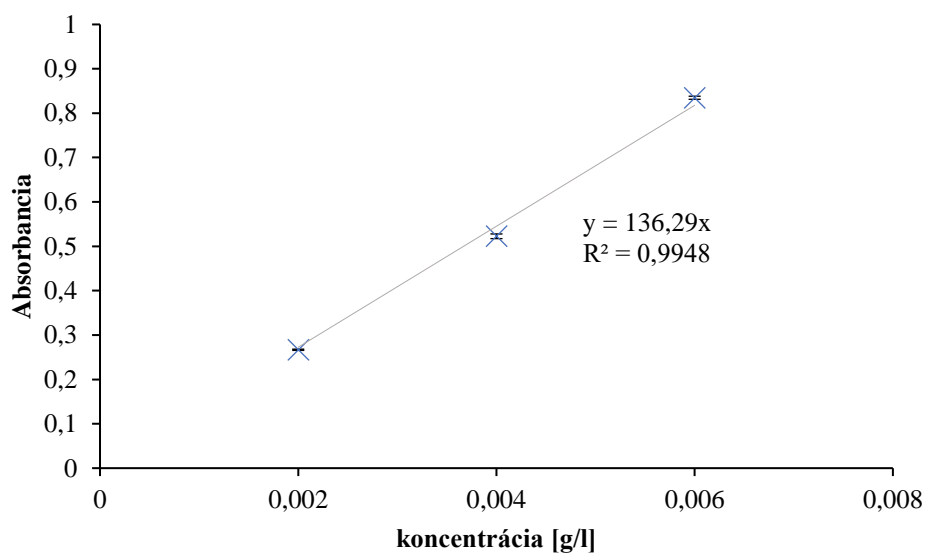
- [33] LEE, Chi, Venkat MOTURI a Yugyung LEE. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. *Journal of Controlled Release* [online]. 2009, 136(2), 88-98 [cit. 2019-02-20]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.02.013. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365909001254>
- [34] 3. Kapitola: Reologie. ÚSTAV FYZIKY A MATERIÁLOVÉHO INŽENÝRSTVÍ: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně [online]. b.r. [cit. 2019-05-01].
- [35] SHAW, Duncan. *Introduction to colloid and surface chemistry*. 4th ed. Boston: Butterworth-Heinemann, 1992. ISBN 07-506-1182-0.
- [36] MURATA, Hiroshi. *Rheology - Theory and Application to Biomaterials*. DE SOUZA GOMES, Ailton, ed., Ailton DE SOUZA GOMES. *Polymerization* [online]. InTech, 2012 [cit. 2019-04-08]. DOI: 10.5772/48393. ISBN 978-953-51-0745-3. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/polymerization/rheology-theory-and-application-to-biomaterials>
- [37] ZUIDEMA, Jonathan, Christopher RIVET, Ryan GILBERT a Faith MORRISON. A protocol for rheological characterization of hydrogels *for tissue engineering strategies*. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* [online]. 2014, 102(5), 1063-1073 [cit. 2019-03-01]. DOI: 10.1002/jbm.b.33088. ISSN 15524973. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.b.33088>
- [38] GOLMOHAMADI, Mahmood, Thomas DAVIS a Kevin WILKINSON. Diffusion and Partitioning of Cations in an Agarose Hydrogel. *The Journal of Physical Chemistry A* [online]. 2012, 116(25), 6505-6510 [cit. 2019-03-16]. DOI: 10.1021/jp212343g. ISSN 1089-5639. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp212343g>
- [39] ATKINS, P. *Fyzikálna chémia*. 6. vyd. Bratislava: Slovenská technická univerzita, 1999. ISBN 80-227-1238-8.
- [40] MAGDE, Douglas, Elliot ELSON a W. WEBB. Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System—Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Physical Review Letters* [online]. 1972, 29(11), 705-708 [cit. 2019-03-16]. DOI: 10.1103/PhysRevLett.29.705. ISSN 0031-9007. Dostupné z: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.29.705>
- [41] *Introduction to Fluorescence Correlation Spectroscopy*. Time-Resolved Fluorescence Wiki [online]. b.r. [cit. 2019-04-21]. Dostupné z: https://www.tcspc.com/doku.php/general:fluorescence_correlation_spectroscopy-_a_short_introduction
- [42] WÖLL, Dominik. Fluorescence correlation spectroscopy in polymer science. *RSC Adv* [online]. 2014, 4(5), 2447-2465 [cit. 2019-04-21]. DOI: 10.1039/C3RA44909B. ISSN 2046-2069. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3RA44909B>

- [43] JOSEPH R. LAKOWICZ., . Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York: Springer, 2006. ISBN 978-038-7463-124.
- [44] CUSSLER, E. Diffusion: mass transfer in fluid systems. 3rd ed. New York: Cambridge University Press, 2009. ISBN 9780521871211.
- [45] KAMOUN, Elbadawy, El-Refaie KENAWY a Xin CHEN. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *Journal of Advanced Research [online]. 2017, 8(3), 217-233 [cit. 2018-10-30]. DOI: 10.1016/j.jare.2017.01.005. ISSN 20901232. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2090123217300243>*
- [46] LOZINSKY, V., L. DAMSHKALN, I. KUROCHKIN a I. KUROCHKIN. Study of cryostructuring of polymer systems: 28. Physicochemical properties and morphology of poly(vinyl alcohol) cryogels formed by multiple freezing-thawing. *Colloid Journal [online]. 2008, 70(2), 189-198 [cit. 2019-01-29]. DOI: 10.1134/S1061933X08020117. ISSN 1061-933X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1134/S1061933X08020117>*
- [47] RICCIARDI, Rosa, Gaetano MANGIPIA, Fabrizio LO CELSO, Luigi PADUANO, Roberto TRIOLO, Finizia AURIEMMA, Claudio DE ROSA a Françoise LAUPRÊTRE. Structural Organization of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Obtained by Freezing and Thawing Techniques: A SANS Study. *Chemistry of Materials [online]. 2005, 17(5), 1183-1189 [cit. 2019-01-29]. DOI: 10.1021/cm048632y. ISSN 0897-4756. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cm048632y>*
- [48] GAO, Han-Wen, Rong-Jie YANG, Ji-Yu HE a Lei YANG. Rheological behaviors of PVA/H₂O solutions of high-polymer concentration. *Journal of Applied Polymer Science [online]. 2009, 116(3), 1459-1466 [cit. 2019-03-01]. DOI: 10.1002/app.31677. ISSN 00218995. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.31677>*
- [49] MICHELMAN-RIBEIRO, Ariel, Hacène BOUKARI, Ralph NOSSAL a Ferenc HORKAY. Fluorescence Correlation Spectroscopy Study of Probe Diffusion in Poly(vinyl alcohol) Solutions and Gels. *Macromolecular Symposia [online]. 2005, 227(1), 221-230 [cit. 2019-03-05]. DOI: 10.1002/masy.200550922. ISSN 1022-1360. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/masy.200550922>*
- [50] KLOUDA, Leda a Antonios MIKOS. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics [online]. 2008, 68(1), 34-45 [cit. 2018-10-15]. DOI: 10.1016/j.ejpb.2007.02.025. ISSN 09396411. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641107002470>*
- [51] TAVAKOLI, Javad a Youhong TANG. Honey/PVA hybrid wound dressings with controlled release of antibiotics: Structural, physico-mechanical and in-vitro biomedical studies. *Materials Science and Engineering: C [online]. 2017, 77, 318-325 [cit. 2018-11-03]. DOI: 10.1016/j.msec.2017.03.272. ISSN 09284931. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493116320938>*

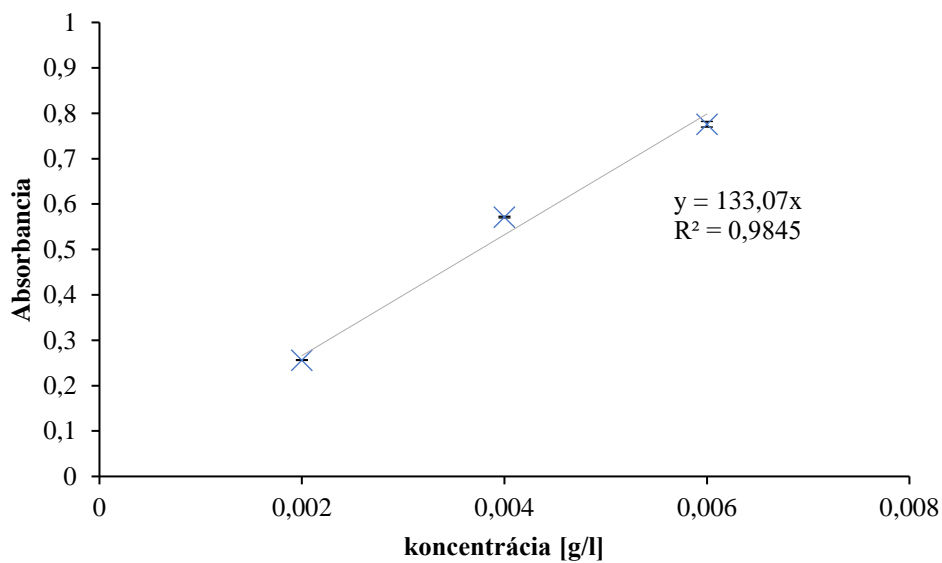
- [52] JIANG, Xiancai, Nanping XIANG, Hongxiang ZHANG, Yujun SUN, Zhen LIN a Linxi HOU. Preparation and characterization of poly(vinyl alcohol)/sodium alginate hydrogel with *high toughness and electric* conductivity. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2018, 186, 377-383 [cit. 2018-11-05]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.01.061. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861718300791>
- [53] DE MOURA, Márcia, Marcos GUILHERME, Gilsinei CAMPESE, Eduardo RADOVANOVIC, Adley RUBIRA a Edvani MUNIZ. Porous alginate-Ca²⁺ hydrogels interpenetrated with PNIPAAm networks: Interrelationship between compressive *stress and pore morphology*. *European Polymer Journal* [online]. 2005, 41(12), 2845-2852 [cit. 2018-10-17]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2005.06.007. ISSN 00143057. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305705002569>
- [54] ZHANG, Gao, Liu ZHA, Mei ZHOU, Jing MA a Bo LIANG. Preparation and characterization of pH- and temperature-responsive semi-interpenetrating polymer network hydrogels based on linear *sodium alginate and crosslinked* poly(N-isopropylacrylamide). *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2005, 97(5), 1931-1940 [cit. 2018-10-27]. DOI: 10.1002/app.21957. ISSN 0021-8995. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.21957>
- [55] CHEN, Qiang, Hong CHEN, Lin ZHU a Jie ZHENG. Fundamentals of double network hydrogels. *Journal of Materials Chemistry B* [online]. 2015, 3(18), 3654-3676 [cit. 2018-11-06]. DOI: 10.1039/C5TB00123D. ISSN 2050-750X. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5TB00123D>
- [56] GONG, Jian. Why are double network hydrogels so tough?. *Soft Matter* [online]. 2010, 6(12) [cit. 2018-11-06]. DOI: 10.1039/b924290b. ISSN 1744-683X. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b924290b>
- [57] CHEN, Qiang, Lin ZHU, Chao ZHAO, Qiuming WANG a Jie ZHENG. A Robust, One-Pot Synthesis of Highly Mechanical and Recoverable Double Network Hydrogels Using Thermoreversible *Sol-Gel Polysaccharide*. *Advanced Materials* [online]. 2013, 25(30), 4171-4176 [cit. 2018-11-06]. DOI: 10.1002/adma.201300817. ISSN 09359648. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/adma.201300817>
- [58] SABZI, Mohammad, Navid SAMADI, Farhang ABBASI, Gholam MAHDAVINIA a Masoud BABA AHMADI. Bioinspired fully physically cross-linked double network hydrogels with a robust, tough and self-healing structure. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2017, 74, 374-381 [cit. 2018-11-13]. DOI: 10.1016/j.msec.2016.12.026. ISSN 09284931. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493116325437>

- [59] NAKAJIMA, Tasuku, Naoyuki TAKEDOMI, Takayuki KUROKAWA, Hidemitsu FURUKAWA a Jian GONG. A facile method for synthesizing free-shaped and tough double network hydrogels using physically crosslinked *poly(vinyl alcohol)* as an internal mold. *Polymer Chemistry* [online]. 2010, 1(5) [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1039/c0py00031k. ISSN 1759-9954. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c0py00031k>
- [60] DUŠENKOVÁ, Alica. Optimalizace mikrereologických technik pro charakterizaci biopolymerních gelů [online]. b.r. [cit. 2019-04-21]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/100013>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petr Sedláček.

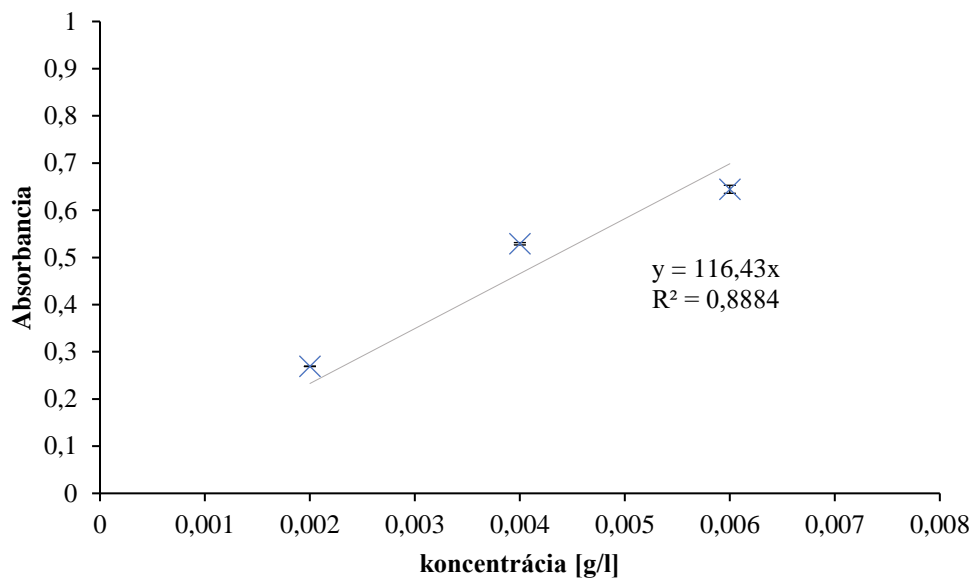
8 PRÍLOHA



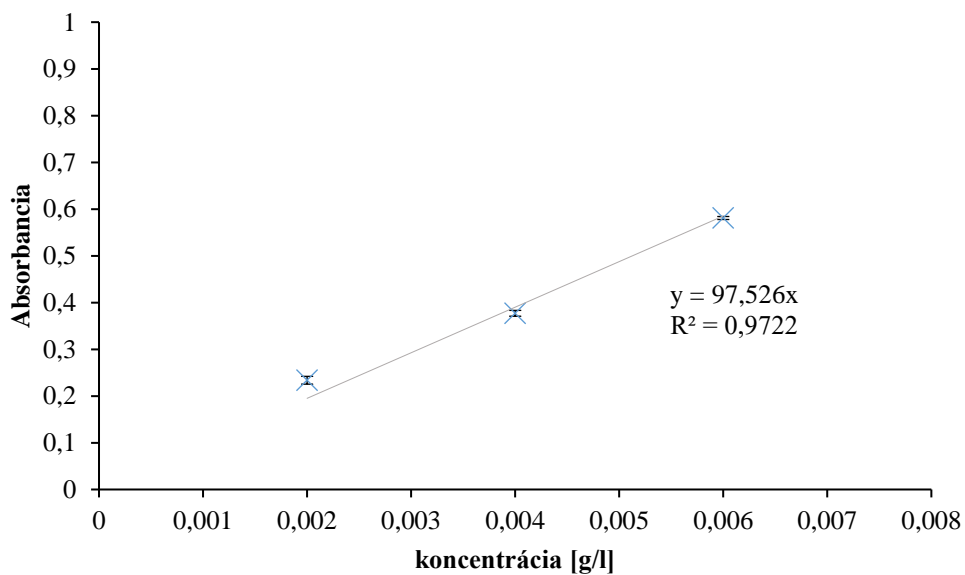
Obr. 45: Kalibračná krivka pre PVA hydrogél s prídavkom Alg o koncentrácii 0,002 hm. %



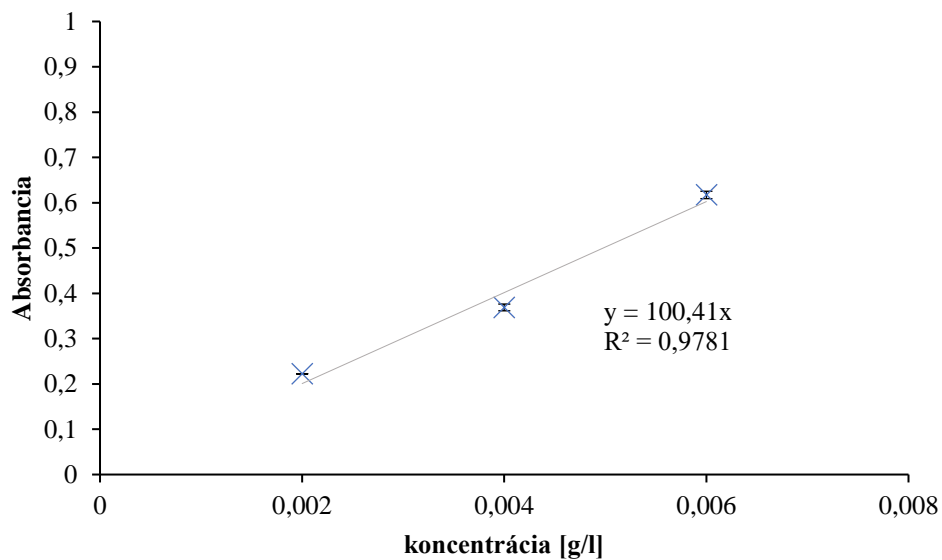
Obr. 46: Kalibračná krivka pre PVA hydrogél s prídavkom Alg o koncentrácii 0,005 hm. %



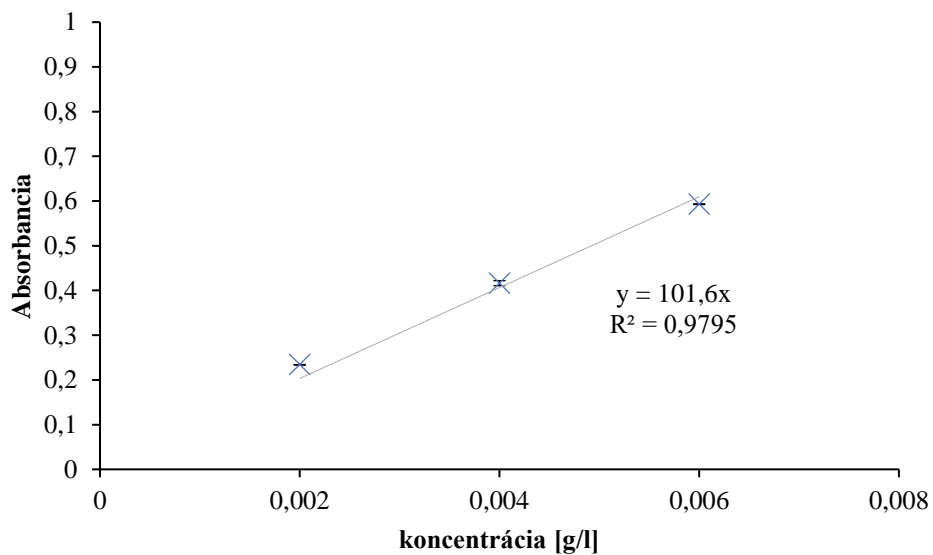
Obr. 47: Kalibračná krivka pre PVA hydrogél s prídavkom Alg o koncentrácii 0,01 hm. %



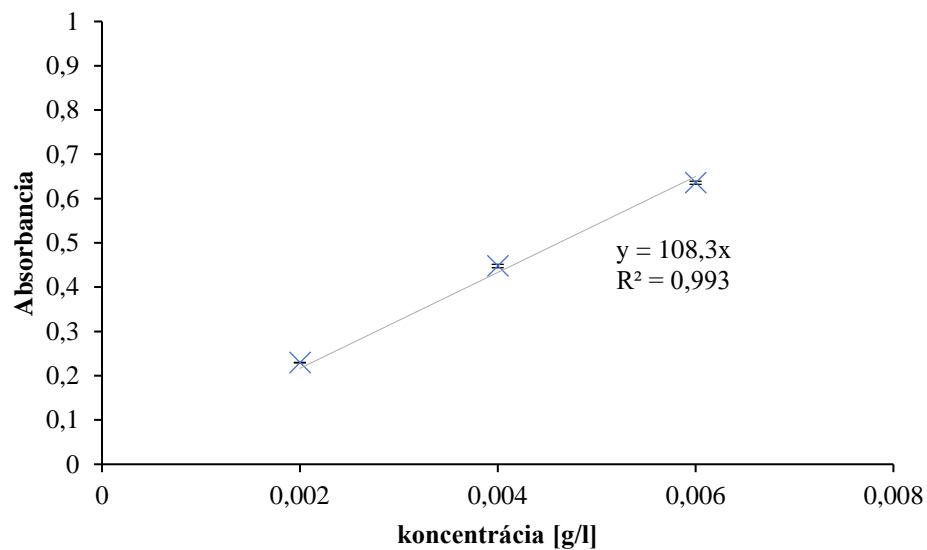
Obr. 48: Kalibračná krivka pre PVA hydrogél s prídavkom PSS o koncentrácii 0,002 hm. %



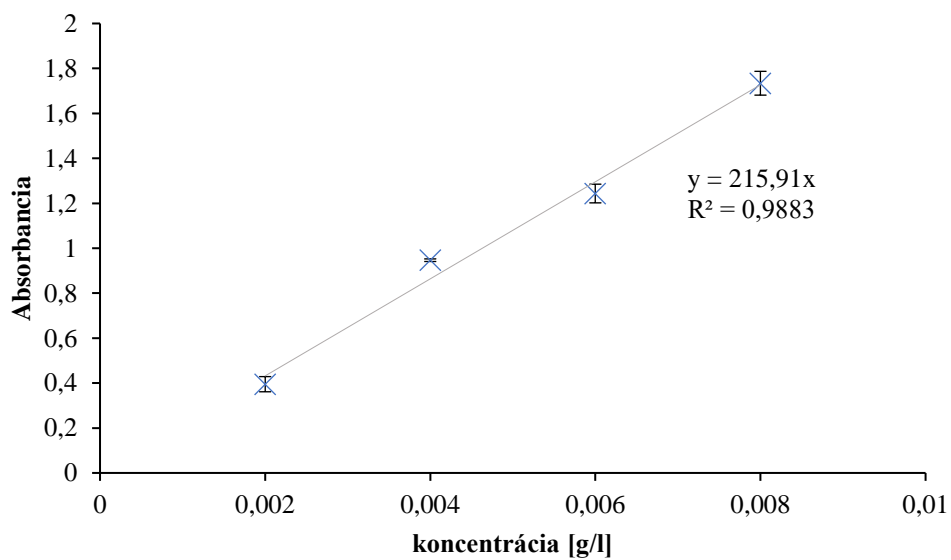
Obr. 49: Kalibračná krivka pre PVA hydrogél s prídavkom PSS o koncentrácii 0,005 hm. %



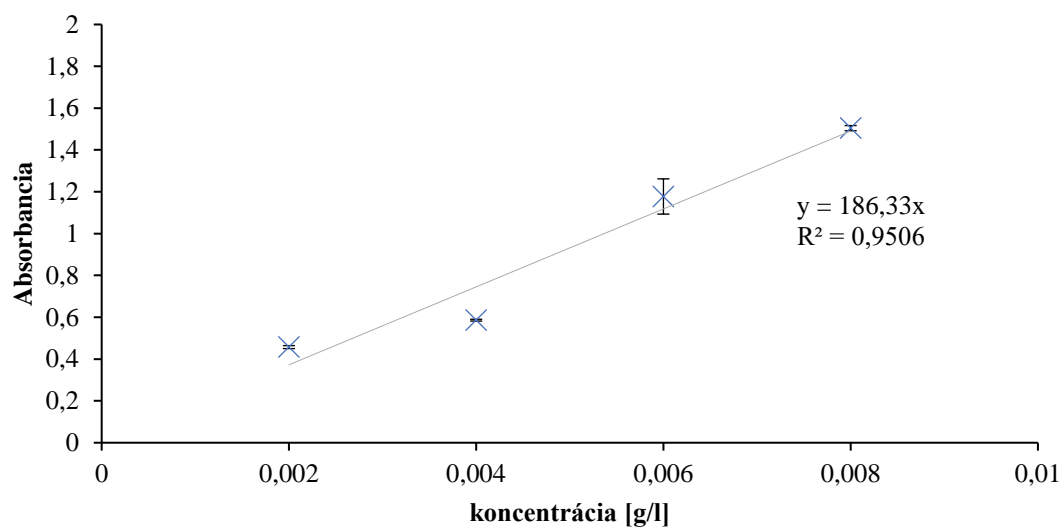
Obr. 50: Kalibračná krivka pre PVA hydrogél s prídavkom PSS o koncentrácii 0,01 hm. %



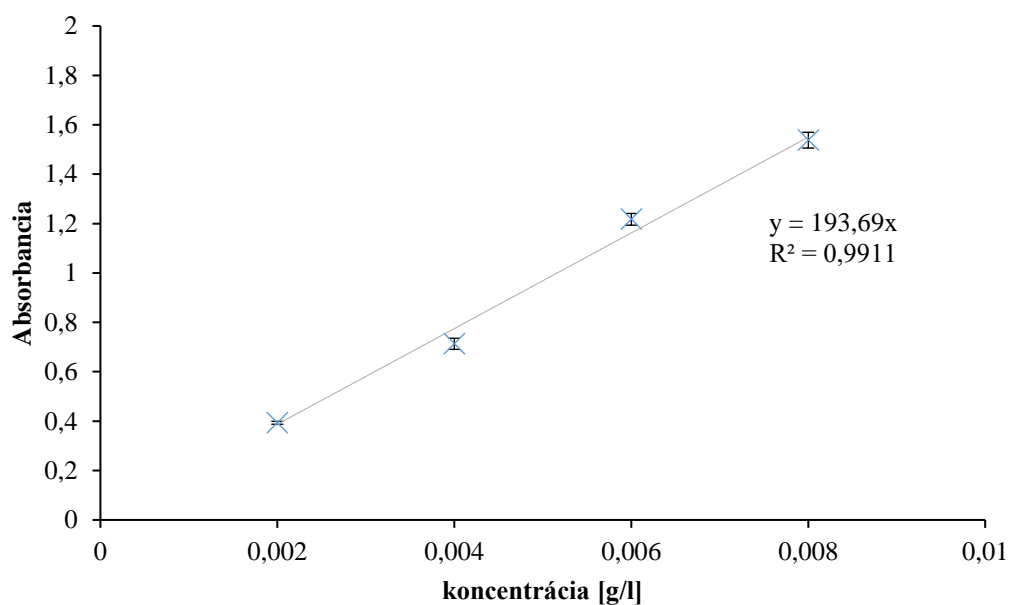
Obr. 51: Kalibračná krivka pre PVA hydrogél s prídavkom PSS o koncentrácii 0,1 hm. %



Obr. 52: Kalibračná krivka pre PVA hydrogél s prídavkom PGA o koncentrácii 0,002 hm. %



Obr. 53: Kalibračná krivka pre PVA hydrogél s prídavkom PGA o koncentrácii 0,005 hm. %



Obr. 54: Kalibračná krivka pre PVA hydrogél s prídavkom PGA o koncentrácii 0,01 hm. %