



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta mechatroniky, informatiky
a mezioborových studií ■

Příprava nanovláken na bázi kyseliny hyaluronové metodou elektrostatického zvlákňování

Bakalářská práce

Studijní program: B3942 – Nanotechnologie
Studijní obor: 3942R002 – Nanomateriály

Autor práce: **Markéta Klíčová**
Vedoucí práce: Ing. Miroslava Rysová





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC
Faculty of Mechatronics, Informatics
and Interdisciplinary Studies ■

Preparation of hyaluronic acid-based nanofibers via electrospinning

Bachelor thesis

Study programme: B3942 – Nanotechnology
Study branch: 3942R002 – Nanomaterials

Author: **Markéta Klíčová**
Supervisor: Ing. Miroslava Rysová



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Markéta Klíčová**
Osobní číslo: **M13000156**
Studijní program: **B3942 Nanotechnologie**
Studijní obor: **Nanomateriály**
Název tématu: **Příprava nanovláken na bázi kyseliny hyaluronové metodou elektrostatického zvlákňování**
Zadávající katedra: **Ústav nových technologií a aplikované informatiky**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Prostudujte literaturu a vypracujte rešerši týkající se možností zpracování kyseliny hyaluronové metodou elektrostatického zvlákňování.
2. Prostudujte teorii a aplikaci polymerních roztoků a jejich směsí v elektrostatickém zvlákňování.
3. Nalezněte optimální podmínky elektrostatického zvlákňování kyseliny hyaluronové ve směsi s alespoň jedním vybraným polymerem.
4. Vyšetřete vliv rozpouštědel a molekulové hmotnosti polymeru na průběh zvlákňování.
5. Výsledky shrňte a diskutujte.

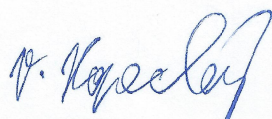
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **cca 40 stran**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**
Seznam odborné literatury:

- [1] Bhardwaj, N. and Kundu, S. C., 2010. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* 28 (2010), pp. 325-347.
- [2] Kogan, G. et al., 2007. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters* 29 (2007), pp. 17-25.
- [3] Yang, X., 2014. Multi-functional Hyaluronan Based Biomaterials for Biomedical Applications. *Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology*. ISBN 978-91-554-8974-8.
- [4] Liang, D. et al., 2007. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (2007), pp. 1392-1412.
- [5] Brenner, E. K. et al., 2012. Electrospinning of hyaluronic acid nanofibres from aqueous ammonium solutions. *Carbohydrate Polymers* 87 (2012), pp. 926-929.
- [6] Liu, Y. et al., 2011. Effect of solution properties and electric field on the electrospinning of hyaluronic acid. *Carbohydrate Polymers* 83 (2011), pp. 1011-1015

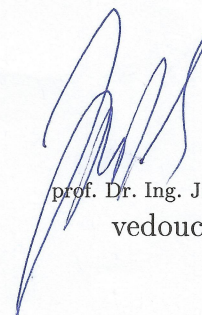
Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Miroslava Rysová**

Datum zadání bakalářské práce: **20. října 2015**

Termín odevzdání bakalářské práce: **16. května 2016**



prof. Ing. Václav Kopecký, CSc.
děkan



prof. Dr. Ing. Jiří Maryška, CSc.
vedoucí ústavu

V Liberci dne 20. října 2015

Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

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

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

Bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum: 16.5.2016

Podpis: 

Poděkování

Ráda bych poděkovala především Ing. Miroslavě Rysové za trpělivost, odborné konzultace a pomoc při zpracování výsledků.

Doc. Ing. Lence Martinové, CSc., za rady a věcné připomínky.

Rodině za důvěru a velkou podporu.

Spolužákům za jejich pomocnou ruku a pozitivní přístup po celou dobu studia.

Abstrakt

Tato práce se zabývá nalezením optimálních podmínek pro zvláknění kyseliny hyaluronové (HA) metodou elektrostatického zvláknování z volné hladiny. Kyselina hyaluronová je přírodní polysacharid s širokým využitím v oblasti tkáňového inženýrství. Vytvoření nanovláknenné vrstvy metodou elektrostatického zvláknování je, jako u většiny biopolymerů, obtížné. Problémem je jejich přílišná viskozita ve vodných roztocích a polyelektrolytická povaha. Tato práce shrnuje výběr dosavadních pokusů o vytvoření nanovláken na bázi kyseliny hyaluronové. Na teoretickou část navazuje část praktická, která ukazuje postup a dosažené výsledky vlastního snažení o vytvoření nanovláken, především ve směsi s nosným polymerem, kterým byl zvolen polyethylenoxid (PEO). Podařilo se takto zvláknit vysokomolekulární i nízkomolekulární kyselinu hyaluronovou v různých poměrech HA:PEO.

Abstract

This bachelor thesis deals with finding the optimal condition to prepare hyaluronic acid-based nanofibers via free surface electrospinning. Hyaluronic acid (HA) is polysaccharide with numerous uses in the field of tissue engineering. Electrospinning of nanofibrous mats is still a real issue because of its high viscosity in aqueous solvent and polyelectrolytic nature. In the first part of this thesis, the results from previous papers aiming for preparation of HA nanofibers are concluded. The theoretical part is followed by experimental results regarding preparation of nanofibers in a solution containing hyaluronic acid and polyethylenoxide (PEO). In this study high molecular weight HA as well as low molecular weight HA nanofibers were obtained by using various ratios of HA:PEO.

Klíčová slova

elektrostatické zvláknování, biopolymer, kyselina hyaluronová, polyethylenoxid, nanovláknena

Key words

electrospinning, biopolymer, hyaluronic acid, polyethylenoxide, nanofibers

Obsah

1	Nanovlákná	13
1.1	Vlastnosti nanovláken.....	13
1.1.1	Biokompatibilita.....	13
1.1.2	Biodegradabilita	14
1.2	Možné formy nanovláken	14
1.2.1	Lineární nanovlákná	14
1.2.2	Nanovlákná v plošných strukturách.....	14
1.2.3	Nanovlákná v objemových strukturách	15
1.2.4	Nanovlákná v dalších formách.....	15
1.3	Metody přípravy nanovláken.....	15
1.3.1	Dloužení.....	16
1.3.2	Syntéza přes šablony.....	16
1.3.3	Samosestavování (samoorganizace)	16
1.3.4	Foukání taveniny.....	16
1.3.5	Fázová separace.....	16
2	Elektrostatické zvlákňování	17
2.1	Úvod.....	17
2.2	Zařízení pro elektrostatické zvlákňování a princip metody.....	18
2.3	Morfologie výsledného produktu – nanovláken.....	18
2.4	Modifikace zařízení elektrostatického zvlákňování.....	21
2.4.1	Electroblowing.....	21
2.4.2	Nanospider™.....	22
3	Elektrostaticky zvlákňované polymery.....	22
3.1	Obecný úvod do biopolymerů.....	22
3.2	Kyselina hyaluronová.....	23

3.2.1	Úvod	23
3.2.2	Chemická struktura.....	23
3.2.3	Syntéza	24
3.2.4	Degradace	24
3.2.5	Štěpení HA	24
3.2.6	Využití HA	25
3.2.7	Elektrostatické zvlákňování kyseliny hyaluronové.....	25
3.3	Polyethylenoxid.....	28
3.3.1	Úvod	28
3.3.2	Vlastnosti a chemická struktura.....	28
3.3.3	Využití.....	29
4	Vybrané metody analýzy vytvořených nanovláken	29
4.1	Elektronový rastrovací mikroskop	29
4.2	FTIR.....	29
5	Cíle praktické části	31
6	Materiály a metody	31
6.1	Materiály	31
6.2	Metody	31
6.2.1	Elektrostatické zvlákňování.....	31
6.2.2	Štěpení HA	32
6.2.3	Charakterizace nanovláken.....	34
7	Zvlákňování roztoků vysokomolekulární HA	35
7.1	Příprava zvlákňovacích roztoků	35
7.2	Vystavení roztoků elektrostatickému poli.....	35
7.3	Výsledky	36
7.4	Diskuse výsledků	37
8	Zvlákňování roztoků vysokomolekulární HA ve směsi s nosným polymerem	37

8.1	Příprava zvlákňovacích roztoků	37
8.2	Vystavení roztoků elektrostatickému poli.....	38
8.3	Analýza nanovláken a výsledky	39
8.3.1	Morfologie vláken	39
8.3.2	Analýza chemického složení (FTIR)	40
8.4	Diskuse výsledků	41
9	Zvlákňování roztoků nízkomolekulární HA ve směsi s nosným polymerem... 42	
9.1	Štěpení HA	42
9.1.1	Příprava roztoku	42
9.1.2	Postup.....	42
9.1.3	Výsledky štěpení HA a diskuse	43
9.2	Zvlákňování roztoků nízkomolekulární HA	46
9.2.1	Příprava roztoků	46
9.2.2	Vystavení roztoků elektrostatickému poli	46
9.2.3	Morfologie vláken	47
9.2.4	Analýza chemického složení (FTIR)	48
9.2.5	Diskuse výsledků.....	49
10	Závěr	50
	Literární zdroje	51
	Přílohy	59

Seznam obrázků

<i>Obrázek 1 - Schéma zařízení pro elektrostatické zvlákňování.....</i>	<i>18</i>
<i>Obrázek 2 - Strukturní jednotka kyseliny hyaluronové.....</i>	<i>24</i>
<i>Obrázek 3 - Chemická struktura PEO.....</i>	<i>29</i>
<i>Obrázek 4 - Fotografie používaného zařízení pro elektrostatické zvlákňování.....</i>	<i>32</i>
<i>Obrázek 5 - Kinetika hydrolýzy pro acidickou koncentraci.....</i>	<i>33</i>
<i>Obrázek 6 - Kinetika hydrolýzy pro hodnoty pH.....</i>	<i>33</i>
<i>Obrázek 7 - Aparatura ke štěpení HA.....</i>	<i>34</i>
<i>Obrázek 8 - SEM snímky nanovláken.....</i>	<i>40</i>
<i>Obrázek 9 - Vliv podílu PEO na průměr vláken.....</i>	<i>40</i>
<i>Obrázek 10 - FTIR spektrum roztoků HA/PEO.....</i>	<i>41</i>
<i>Obrázek 11 - Chromatogramy hyaluronových kyselin.....</i>	<i>44</i>
<i>Obrázek 12 - Chromatogramy hyaluronových kyselin.....</i>	<i>44</i>
<i>Obrázek 13 - Závislost dosažené molekulové hmotnosti na čase t [h].....</i>	<i>45</i>
<i>Obrázek 14 - Srovnání spekter původní HA a HA po hydrolýze 10,5 h.....</i>	<i>45</i>
<i>Obrázek 15 - SEM snímky nanovláken.....</i>	<i>48</i>
<i>Obrázek 16 - Vliv podílu PEO na průměr vláken.....</i>	<i>48</i>
<i>Obrázek 17 - FTIR spektrum LMW HA/PEO.....</i>	<i>49</i>

Seznam tabulek

<i>Tabulka 1 - Parametry ovlivňující výsledek elektrostatického zvlákňování.....</i>	<i>19</i>
<i>Tabulka 2 - Výsledky vystavení roztoků čisté HA elektrostatickému poli.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabulka 3 - Složení a značení roztoků vysokomolekulární HA.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabulka 4 - Výsledky vystavení roztoků HA/PEO elektrostatickému poli.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabulka 5 - Průměr vláken HMW HA/PEO.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabulka 6 - Složení a značení roztoků vysokomolekulární HA.....</i>	<i>46</i>
<i>Tabulka 7 - Výsledky vystavení roztoků HA/PEO elektrostatickému poli.....</i>	<i>47</i>
<i>Tabulka 8 - Průměr vláken LMW HA/PEO.....</i>	<i>47</i>

Seznam zkratek

DIW	Deionizovaná voda
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EtOH	Ethanol
FTIR	Fourierova spektroskopie
Ge	Germanium
H ₂ O	Voda
HA	Kyselina hyaluronová
HA-DTPH	3,3'-dithiobispropandihydrazid-modifikovaná kyselina hyaluronová
HMW	Vysokomolekulární
HPLC - ELSD	Kapalinová chromatografie s odpařovacím detektorem rozptylu světla
CH ₃ COOH	Kyselina octová
IPA	Izopropylalkohol
LMW	Nízkomolekulární
NaCl	Chlorid sodný
NaOH	Hydroxid sodný
NH ₄ OH	Hydroxid amonný
PEG	Polyethylenglykol
PEO	Polyethylenoxid
REM (SEM)	Elektronová rastrovací mikroskopie
v/v	Objemový poměr
w/v	Poměr hmotnosti na objem
w/w	Hmotnostní poměr

Úvod

Metoda zvaná electrospinning, česky elektrostatické zvlákňování, je poměrně všestranná a efektivní metoda k získání kontinuálních vláken s průměry v nanometrech. (Greiner a Wendorff 2007; Bhardwaj a Kundu 2010) Nanovlákna mají řadu unikátních vlastností, např. velký měrný povrch, vysokou pórovitost a malou velikost jednotlivých pórů. (Liu et al. 2011) Tyto vlastnosti dávají nanovláknům potenciál pro široké využití v řadě oblastí. V posledních letech se nanovláknenné materiály staly předmětem zájmu v oblasti biomedicíny. Výzkum v této oblasti je velmi intenzivní. Pro tyto účely je nezbytné používat biokompatibilní a biodegradabilní materiály, pro metodu elektrostatického zvlákňování tedy biopolymery. Jedním z biopolymerů, který lze zvláknit touto metodou je kyselina hyaluronová (HA). Biokompatibilita této kyseliny umožňuje využití HA v tkáňovém inženýrství, pro léčení ran, dopravu léčiv či k výrobě umělých cév. (Liu et al. 2011; Brenner et al. 2012)

Tvorba nanovláknenných struktur je ovšem velmi obtížná. Se snahou zachování biokompatibility přichází omezení ve výběru rozpouštědel a HA pouze ve vodných roztocích vykazuje vysokou viskozitu, což výrazně znesnadňuje elektrostatické zvlákňování. Zároveň jsou komplikací elektrické vlastnosti biopolymerů. (Brenner et al. 2012) V této práci se k usnadnění procesu zvlákňování užívá biokompatibilní nosný polymer a medicínsky přijatelné příměsi.

Použitelnost vyrobených nanovrstev HA v biomedicíně, ověřili např. Kim a kolektiv (2008), kteří zkoumali nanovláknenné vrstvy HA/kolagenu a výsledky ukazují, že tyto vrstvy mohou být použitelné jako nosiče pro tkáňové inženýrství. (Kim et al. 2008)

TEORETICKÁ ČÁST

1 Nanovlákná

Nanovlákná jsou, dle Mezinárodní organizace pro normalizaci (ISO), vlákna s průměrem pod 100 nm. Ovšem v průmyslových odvětvích se za nanovlákná považují vlákna s širším vymezením průměru. (Sekaninová 2014) Elmarco uvádí, že nanovlákná jsou vlákna o průměru menším než 500 nm ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). (Elmarco 2016) Další zdroje často uvádí i rozmezí 50 – 1000 nm. (Peňázová 2009; Košťáková 2016) Nanovlákná patří do tzv. nanostruktur. Tvorbu nanovláken neumožňují veškeré materiály, vláknotvornými materiály jsou především polymerní roztoky či taveniny. (Sodomka 2009; Peňázová 2009)

1.1 Vlastnosti nanovláken

Nanovlákná mají unikátní vlastnosti. Právě jejich vlastnosti vedou k častému využití, ať už v oblasti filtrací díky vysoce porézní struktuře s velkým povrchem a možnosti inkorporace dalších materiálů do struktury (Barhate a Ramakrishna 2007), v tkáňovém inženýrství, nanoelektronice, pro výrobu ochranného oblečení, ve vesmírném výzkumu, i ke zlepšování vlastností dnešních materiálů. (Reneker et al. 2000)

Mezi vlastnosti nanovláken patří (Košťáková 2016; Elmarco 2016):

- velký měrný povrch,
- malá velikost pórů,
- vysoká pórovitost,
- možnost kombinace s dalšími nanomateriály,
- tuhost, houževnatost (v závislosti na chemické povaze).

V případě aplikace nanovláken v medicíně je nutné věnovat pozornost také vlastnostem jako jsou biokompatibilita (kapitola 1.1.1.) a biodegradabilita (kapitola 1.1.2) vláken.

1.1.1 Biokompatibilita

Při aplikaci cizího materiálu do živého systému dochází k interakci. Pro použití cizího materiálu v medicínských aplikacích je žádoucí, aby nedocházelo k nepříznivé reakci. Biokompatibilní materiály jsou takové materiály, které po

vložení do biologického prostředí nejlépe vůbec nereagují, případně reagují zanedbatelně. Zároveň ale není možné zapomínat, že materiál musí být dostatečně odolný proti procesům, probíhajícím v lidském těle, které by mohly materiál rozložit. Materiál si tedy musí být schopný zachovat své vlastnosti, ale zároveň být nedráždivý pro lidské tělo. (Mazánek et al. 2014; Houdek et al. 2007)

Polymerní materiály se se svými výhodnými biologickými i mechanickými vlastnostmi ukázaly jako nejlepší řešení pro výrobu nosiče materiálu v tkáňovém inženýrství. Jak bylo uvedeno, pro použití vyrobených nanovláken pro medicínské aplikace je nutné, aby použitý polymer měl co největší biokompatibilitu. Proto by bylo ideální používat přírodní polymery, jako například kyselinu hyaluronovou, chitosan či kolagen, které poskytují přirozenější povrch pro lepší připojení buňky v oblasti tkáňového inženýrství, nicméně tyto polymery bývá obtížné zpracovat, více se pro tkáňové inženýrství používají polymery syntetické, které jsou biodegradabilní. (Llorens et al. 2013)

1.1.2 Biodegradabilita

Biodegradabilita je rovněž důležitou charakteristikou biomateriálů. Je to schopnost materiálu rozložit se v organickém prostředí. Biologicky odbouratelné polymery jsou rovněž základ tkáňového inženýrství, slouží především k účelu, kdy buňky nanese na tkáňový nosič (scaffold) a implantujeme natrvalo. Plně přirozená obměna tkáně bez přebytečných materiálů, které zůstávají v těle, je žádoucí výsledek. (Sykáčková 2014)

1.2 Možné formy nanovláken

1.2.1 Lineární nanovlákn

Za lineární nanovlákn jsou považovány nitě a příze. Nejde právě pouze o nános nanovláken na povrch běžné nitě, naopak jedná se o nitě a příze, které v celém objemu tvoří nanovlákn. U takových vláken je poměrně velká technologická obtíž s přípravou, nicméně by mohla být vyvážena jejich dobrými mechanickými vlastnostmi. (Kloučková 2014; Petráš et al. 2009)

1.2.2 Nanovlákn v plošných strukturách

Nanovlákn v plošných strukturách, jednoduše plošná nanovlákn, jsou nanovlákn ve vrstvách. Jsou to standartní textilní útvary. Můžeme je rozdělit na dva typy, tkané

a netkané, které se liší z hlediska struktury a možnosti přípravy. Pokud jsou vlákna v tvořené rovině náhodně rozházena, jsou to vlákna netkané. Proti tomu u vláken tkaných převládá jeden ze směrů, neboli vlákna jsou organizována. Druhým rozdílem je právě připravenost, která je u vláken tkaných velmi obtížná, nejsou zmiňovány žádné metody přípravy, které by přesně vedly k předem stanoveným strukturám. Naopak netkané textilie tvořené nanovláknem patří mezi nejrozšířenější nanovláknenné materiály s širokým použitím – filtrační membrány či medicínské aplikace (krytí ran zajišťující lepší hojení). (Petraš et al. 2009)

1.2.3 Nanovláknem v objemových strukturách

Co se týká nanovláken v objemových strukturách jde o podobnou strukturu jako v předchozí podkapitole, rozdílem je, že zde se jedná o 3D struktury, tedy vlákna vstupují i do třetího rozměru. Stejně jako se u nanovláken v plošných strukturách nacházelo rozdělení na tkané a netkané nanovláknenné textilie, i ve trojrozměrné struktuře se nachází celky, které mají uspořádaná i neuspořádaná vlákna (ty jsou častější a vypadají jako vaty různé hustoty). Uplatnění pak nachází např. v tkáčovém inženýrství. (Petraš et al. 2009; Kloučková 2014)

1.2.4 Nanovláknem v dalších formách

Existují i další málo časté formy nanovláken, které by mohly být užitečné v budoucnosti. Jsou jimi například nanovláknem, která jsou nanosená na povrchu tak, že tvoří kolmou vrstvu k podkladu či nanovláknem, která jsou součástí majoritního objemu, který je tvořen jiným materiálem (např. keramikou či plastem). (Petraš et al. 2009)

1.3 Metody přípravy nanovláken

V kapitole 2 bude rozebráno elektrostatické zvláknění, což je jediná metoda, kterou vyrobíme kontinuální polymerní nanovláknem. Zároveň při této metodě můžeme dobře kontrolovat a ovlivňovat parametry vláken jako např. jejich průměr, hustotu a jiné. (Širc et al. 2012) Ne všechny polymery jsou ovšem kompatibilní s vysokým elektrickým polem, nutným pro elektrostatické zvláknění. (Vajtai 2013) Existují i další možnosti výroby vláken, v následujících podkapitolách uvedu příklady některých z nich.

1.3.1 Dloužení

Dloužení neboli tzv. drawing je založen na principu odtahování kapky roztoku kapilárou. Kapilára se odtahuje nastavenou rychlostí, čímž vzniká nanovlákn. Tím se liší od metody elektrostatického zvláknování, jelikož při dloužení dokážeme získat individuální vlákno. (Bajáková et al. 2011) Tato metoda nemá a nejspíš nebude mít výrazné použití ani v budoucnosti, jelikož neumíme pomocí této metody opakovatelně vyrábět vlákna o stejných parametrech. (Petráš et al. 2009)

1.3.2 Syntéza přes šablony

Při tomto procesu je používána šablona, která je vlastně nanoporézní membránou. Výhodou této metody je získání vláken s předem určenými parametry – ty jsou přímo určeny velikostí pórů šablony. (Martin 1996)

1.3.3 Samosestavování (samoorganizace)

Pro tuto metodu je vyžadováno použití polymerů, které prodělají samosestavování přirozeně nebo polymerů, které se shromáždí do fibril či vláken díky své hydrofilním a lipofilním vlastnostem. (Vajtai 2013) Jak uvádí Ramakrishna (2005) hlavním mechanismem jsou intramolekulární síly, jako např. elektrostatická interakce, vodíkové vazby. Tyto síly spojují menší jednotky, které budují vlákna. (Ramakrishna 2005)

1.3.4 Foukání taveniny

Tato metoda je zvaná meltblown. Pro tuto technologii je zapotřebí používat pouze speciální polymery (pouze termoplasty, např. high MFI¹ polypropylen). Metoda totiž funguje tak, že tavenina polymeru se protlačí tryskou s otvory, následně je zachycena horkým stlačeným vzduchem. Vzduch proudí vysokou rychlostí, dále unáší polymer a dochází k jeho významnému prodloužení. Kombinací vhodných konstrukčních parametrů zařízení, včetně vysoké rychlosti vzduchu a patřičných vlastností polymeru, lze získat výjimečně až nanovlákn. (Petráš et al. 2009)

1.3.5 Fázová separace

Fázová separace je další z možností metod přípravy nanovláken. V této metodě je cílem získat porézní nanovlákn. (Khajavi a Abbasipour 2012) Nejprve je potřeba získat výchozí roztok, kterým je polymer v rozpouštědle. Tento roztok se následně

¹ melt flow index neboli index určující míru tečení taveniny (čím vyšší index, tím snáze teče)

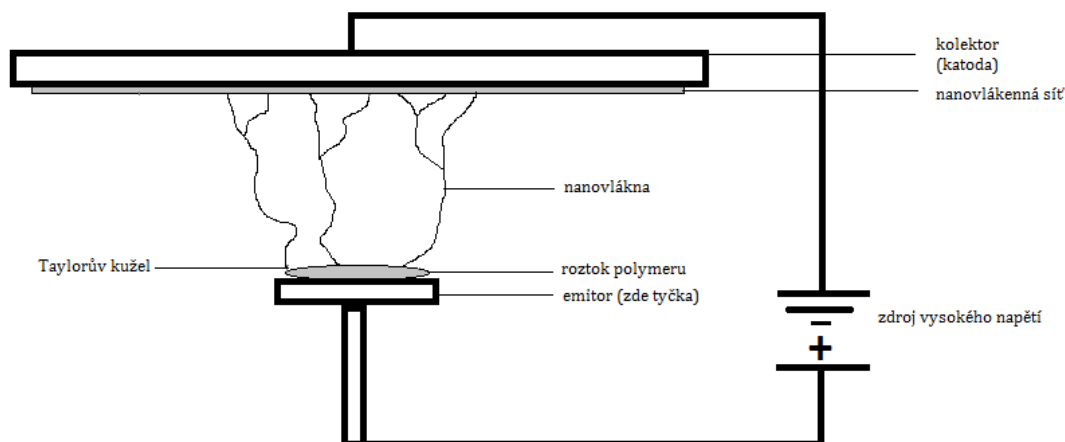
ochladí, až dojde k přechodu na gel. Následně je zapotřebí náhrada původního rozpouštědla za nové, jiné rozpouštědlo s odlišnými vlastnostmi. Tímto krokem dojde k vytvoření vlákně s pory s průměrem odpovídajícím nanorozměru. Rozpouštědlo je po ztuhnutí, které vzniklo ochlazením na teplotu tuhnutí rozpouštědla, odstraněno. (Ramakrishna 2005; Kloučková 2014; Petráš et al. 2009)

2 Elektrostatické zvlákňování

2.1 Úvod

Electrospinning neboli elektrostatické zvlákňování je v dnešní době nejběžnější způsob získání nanovláken. Při této metodě jsou výsledná vlákna tvořena z viskoelastického polymerního roztoku/taveniny. Technika elektrostatického zvlákňování používá vysoké elektrické napětí, principem metody je vytvoření elektrostatického pole vysokým zdrojem napětí. Stejnosemné elektrostatické pole se vytváří mezi emitorem, na kterém je umístěn roztok či tavenina, a kovovým kolektorem. Elektrostatickým polem se pak generuje proud polymerního roztoku/taveniny, který je elektricky nabitý. Při umístění roztoku/taveniny na emitor, kterým může být jehla nebo volný povrch, vznikne polokulovitá kapka roztoku/taveniny držící povrchovým napětím. Při vygenerování elektrického pole s dostatečnou silou dojde ke změně tvaru kapky, protože náboj elektrostatického pole s povrchovým napětím se odpuzují. Když stejnosměrné napětí dosáhne tak vysokých hodnot, že překonají soudržnost roztoku/taveniny, způsobenou povrchovými silami, z Taylorových kuželů se začnou tvořit tenké prameny polymerního roztoku/taveniny. Dochází k prodloužení a zúžení vlákna po celou dobu, než je zachyceno na kolektor, na kterém tak vzniká nanovlákněná síť. Při prodloužení a zúžení rovněž dochází k odpařování rozpouštědla. (Norman a Desai 2006; Subbiah et al. 2005; Vasita a Katti 2006)

2.2 Zařízení pro elektrostatische zvlákňování a princip metody



Obrázek 1 - Schéma zařízení pro elektrostatische zvlákňování (emitorem je tyčka)

Zařízení pro výrobu nanovláken je konstruováno ze tří základních komponentů, kterými jsou zdroj vysokého napětí, emitor a kolektor. Kolektor a emitor jsou elektrody, umístěny tak, že emitor s polymerním roztokem/taveninou je přímo spojen se zdrojem, který generuje vysoké napětí a v dané vzdálenosti je protielektroda, tzv. kolektor, který je uzemněn. Na kovový kolektor se zachycují vytvořená nanovlákná. (Bhardwaj a Kundu 2010; Subbiah et al. 2005) Dle používaného emitoru rozdělujeme elektrostatische zvlákňování na dva druhy a to sice na zvlákňování z jehly a zvlákňování z volného povrchu. Na Obr. 1 je znázorněn případ, kdy emitor tvoří tyčka, toto schéma bylo používáno po celou praktickou část této práce.

2.3 Morfologie výsledného produktu – nanovláken

Další nedílnou součástí při procesu elektrostatischeho zvlákňování je nalezení optimálních podmínek, kde spousta parametrů (ať už parametry, které volíme při nastavení zařízení, okolní prostředí i vlastnosti samotného roztoku/taveniny polymeru) hraje důležitou roli ve vlastnostech výsledných nanovláken. Navíc pro výrobu vláken je žádoucí, aby byl proces reprodukovatelný. Je nutné znát veškeré podmínky při zvlákňování, respektive hodnoty parametrů, které jsou nejvýhodnější pro dosažení výsledku o požadovaných vlastnostech.

Zdroje se neshodují na tom, který parametr nejvíce ovlivňuje průběh zvlákňování. Přehled zásadních parametrů je uveden v tabulce 1. (Li a Wang 2013)

Tabulka 1 - Parametry ovlivňující výsledek elektrostatického zvlákňování

Nastavení zařízení pro elektrospinning	Vlastnosti zvlákňovaného polymeru	Parametry okolního prostředí
<ul style="list-style-type: none"> • Napětí • Použité elektrody • Vzdálenost emitor - kolektor 	<ul style="list-style-type: none"> • Viskozita • Koncentrace polymeru • Molekulová hmotnost polymeru • Povrchové napětí • Rozpouštědlo • Vodivost • Mísení s dalším polymerem 	<ul style="list-style-type: none"> • Vlhkost vzduchu • Teplota • Rychlost proudění vzduchu

Napětí

Napětí je extrémně důležité již pro zahájení samotného procesu zvlákňování. Aby vůbec došlo k tvorbě vláken musí být napětí dostatečně vysoké. Pokud zvýšíme napětí, zvýšíme i sílu elektrického pole mezi elektrodami. (Li a Wang 2013) Vliv napětí na morfologii vláken je zkoumán ve více zdrojích, například jak uvádí Zhang a kolektiv (2005), ve své studii zvlákňování polyvinylakoholu při zvýšeném napětí dojde k nárůstu hodnot průměrů vláken. (Zhang et al. 2005)

Elektrody

Jak už bylo zmíněno v kapitole 2.2 emitorem může být jehla či volný povrch. Ovšem i tvar kolektoru hraje roli v morfologii výsledných vláken. Bývá používána kovová deska, na kterou se chytají vlákna s náhodnou orientací. Existují ale i speciálně upravené kolektory, jako například rotující bubnový kolektor, vesměs sloužící k zachycení uspořádaných vláken, která jsou navíc zarovnaná. Jako kolektor se také často používá hliníková folie, na kterou se přímo chytají nanovlákná, nicméně je obtížné přenést nanovlákná na další substráty, pro tyto účely lze použít i jiné rozmanité formy kolektoru, například mřížku či tekutou lázeň. (Li a Wang 2013)

Vzdálenost emitor – kolektor

Na této vzdálenosti dochází k odpařování rozpouštědla. Pokud je nastavená vzdálenost nedostatečná, vlákna nestihnou před dosažením kolektoru ztuhnout, navíc při použití vodných roztoků polymeru nedojde k úplnému odpaření rozpouštědla a vznikají mokrá vlákna. Pokud je naopak ale vzdálenost větší, než by bylo potřeba, jsou získány spíše kapky. (Li a Wang 2013)

Viskozita roztoku

Viskozita roztoku je dalším důležitým faktorem ve výsledné morfologii vláken. Nízká viskozita způsobí proces zvaný electrospraying. Electrospraying je tvorba kapiček namísto vláken. K takovému jevu dojde, protože povrchové napětí roztoku při nízké viskozitě je dominantní, takže způsobí rozpad celistvého útvaru a vzniknou právě kapky. Vysoká viskozita zase způsobí obtížné vybuzení proudu polymeru, respektive znemožní tvorbu Taylorových kuželů. Je nutné najít optimální viskozitu, přičemž nelze opomenout, že viskozita, koncentrace polymeru, jeho molekulová hmotnost a další vlastnosti roztoku (aditiva, rozpouštědlo,...) spolu souvisí. (Li a Wang 2013)

Povrchové napětí roztoku

Jak již bylo řečeno, pro zvláknění polymerního roztoku je nutné překonat povrchové napětí pomocí dostatečného napětí. Povrchovým napětím můžeme lehce ovlivnit výsledný produkt při zvláknění. Při konstantní koncentraci a úpravě pouze povrchového napětí roztoku může dojít ke změně tvorby kapiček na tvorbu kontinuálních vláken. (Li a Wang 2013)

Vodivost

Pokud je v zájmu vyrobit vlákna, která budou jednotné, tzv. uniformní, bez poškození, je důležitým faktorem vodivost, jelikož se zvyšující se vodivostí roztoku, tedy se zvyšující se hustotou náboje, dochází právě k výrobě uniformních vláken a zároveň většinou i ke snížení průměru vláken. Na vznik případných kulovitých útvarů nemá rovněž vliv jen viskozita roztoku, ale také vodivost, proto se často používají povrchově aktivní látky, které vedou i ke zmenšení průměru vláken. (Košťáková 2016)

Mísení s dalším polymerem

Tvořením polymerních směsí, tedy směsí vzniklých ze dvou a více polymerů, je možné ovlivnit úspěšnost elektrostatického zvlákňování. Pokud uvažujeme zvláknění polymeru, ze kterého je obtížné vytvoření vláken, je možným řešením smíchání s roztokem nosného polymeru, který pozitivně reaguje na vystavení elektrostatickému poli. Zároveň lze mísením polymerů dosáhnout výhodnějších vlastností výsledného materiálu. Lze kombinovat přírodní a syntetické polymery a tím dosáhnout kombinace bioaktivity a mechanických vlastností. (Rysová 2012) Příprava polymerních směsí může být provedena mechanickým mícháním roztoků či mísením v tavenině, případně rozpuštěním v ko-rozpuštědle, což je rozpouštědlo přidané v malých množstvích ke zvýšení účinnosti hlavního rozpouštědla, dále pak směšováním latexů atd. (Navrátilová 2007) Pro tuto práci bylo při mísení polymerů použito mechanické míchání. Extrémně důležitá je dobrá mísitelnost polymerů.

Parametry okolního prostředí

Na podmínkách okolí rovněž záleží morfologie a průměr tvořených vláken. Nejde jen o výsledný produkt, ale také o to, že při zvlákňování dochází k odpařování rozpouštědla, proto v závislosti na vlastnostech rozpouštědla je vhodné zvážit i zvlákňování za odsávání vzduchu či přímo ve vakuu (to zejména při zvlákňování tavenin). Teplota okolního prostředí může být důležitá ale i pro samotnou tvorbu vláken, úspěšný proces zvláknění některých polymerů přímo vyžaduje vysokou teplotu. Zvýšení teploty také vede k zúžení vláken. Vlhkost vzduchu také hraje roli při procesu. Nízká vlhkost vzduchu podporuje odpařování rozpouštědla. Vysoká vlhkost má na morfologii vláken negativní vliv. (Li a Wang 2013)

2.4 Modifikace zařízení elektrostatického zvlákňování

2.4.1 Electroblowing

Proces electrospinningu může být obohacen o další modifikace, které mohou napomoci k efektivnější přípravě nanovláken. Jedním ze způsobů je příprava metodou electroblowing, která kombinuje samotný proces elektrostatického zvlákňování s procesem proudění vzduchu kolem trysky, která je součástí aparatury. Dochází tím ke kombinování elektrického pole s proudem vzduchu. Existují nejméně čtyři výhody přípravy nanovláken touto cestou. Jednak kombinací

sil elektrického pole a proudu vzduchu dojde k překonání vysoké viskozity roztoku, také použití vhodné teploty vzduchu, respektive použití zvýšené teploty vzduchu, vede k snížení viskozity roztoku. Nižší viskozita usnadní tvorbu Taylorových kuželů. Proudící vzduch také zrychlí vypařování rozpouštědla. Zároveň kontrolou teploty, směru a tempa proudění vzduchu můžeme snadno ovlivňovat vlastnosti nanovláken. (Fanun 2010)

2.4.2 Nanospider™

Další modifikací electrospinningu je tzv. technologie Nanospider™. Technologie je výjimečná především tím, že při zvlákňování touto cestou není potřeba použít trysky ani kapiláry. Tyto komponenty jsou nahrazeny rotační elektrodou, kterým je válec. Rotační elektroda je zčásti vložena do roztoku zvlákňovaného polymeru a otáčením způsobuje vznik tenké vrstvy polymeru v elektrostatickém poli, ze které je možné zvlákňovat. (Jirsák et al. 2009) Metoda má velkou výhodu, mimo jednoduchých elektrod, ve vysoké kvalitě vyrobených nanovláken, produkci nanovláken v průmyslovém měřítku, rozmanitosti použitelných polymerů i ekonomicky nenáročném provozu. (Linhartová 2008)

3 Elektrostaticky zvlákňované polymery

Mezi nejčastěji zvlákňované polymery z roztoku patří polyamid 6, polyvinylalkohol, polyuretan, polykaprolakton, polyvinylpyrrolidon atd., z taveniny poté polyethylen, polypropylen a další. (Košťáková 2016) Z biopolymerů např. kolagen, kyselina hyaluronová, chitosan. (Rysová 2012) Vzhledem k zaměření této práce se následující podkapitoly budou věnovat biopolymerům s důrazem na kyselinu hyaluronovou.

3.1 Obecný úvod do biopolymerů

Biopolymery jsou polymery, tedy vysokomolekulární látky, mající přírodní původ. (Vodrážka 1969) Zhruba by biopolymery mohly být klasifikovány do tří skupin, a to sice nukleové kyseliny, proteiny a polysacharidy. Struktura biopolymerů je dána povahou monomerních jednotek, ze kterých se biopolymer skládá, v kombinaci s dalšími faktory jako teplota, rozpouštědlo (kterým bývá voda), a přítomnost solí či jiných molekulárních složek. Jedním z rysů biopolymerů je fakt, že se jedná většinou o heteropolymery, což znamená, že obsahují více druhů monomerních jednotek.

Pořadí monomerů se nazývá primární struktura a udává biologický význam biomakromolekuly. (Maarel 2008)

Biopolymery najdou využití ve spoustě odvětví pro svou šetrnost k životnímu prostředí, obnovitelnost, navíc jsou z podstaty antibakteriální, biokompatibilní, biodegradabilní.

Jak již bylo řečeno, do biopolymerů řadíme i polysacharidy. Polysacharidy jsou makromolekulární látky složené z monosacharidů, které jsou vzájemně spojeny glykosidickou vazbou. Monomery jsou v tomto případě cyklické struktury a to nejčastěji cykly obsahující pět nebo šest uhlíkových atomů (pentózy nebo hexózy). (Maarel 2008) Do skupiny polysacharidů patří například celulóza, chitosan, kyselina hyaluronová, dextran. (Schiffman a Schauer 2008) Co se ale tvorby nanovláken týká je jejich použití omezeno.

3.2 Kyselina hyaluronová

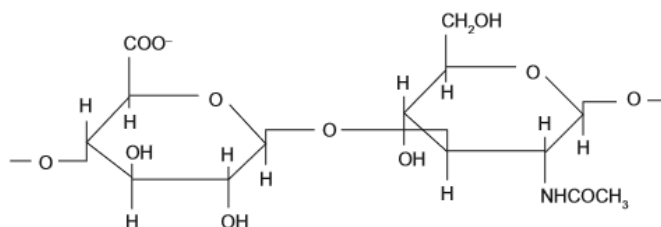
3.2.1 Úvod

Kyselina hyaluronová (HA) je přírodní polysacharid s vysokou molekulovou hmotností. HA se vyskytuje přirozeně ve všech živých organizmech, jednak jako hlavní komponent extracelulární matrix (mezibuněčné hmoty) a jednak v tvz. volné formě v kůži, kloubech, očním sklivci atd. Kyselina hyaluronová je biokompatibilní a biodegradabilní, a tudíž nachází hojné využití v medicínských aplikacích, například k bezjizevnatému hojení či při přenosu léčiv. Prvně byla objevena při izolaci substance, obsahující kyselinu močovou a aminocukr. Tato předtím neznámá substance byla izolována ze sklivce zvířecího oka, proto byla následně pojmenována spojením dvou slov, řeckého „hyalos“ - sklivec a anglického „uronic acid“ – močová kyselina. Používání termínu hyaluronan vychází z faktu, že ve fyziologickém pH, jinak řečeno *in vivo*, se HA vyskytuje jako sůl, hyaluronát sodný. (Nečas et al. 2008)

3.2.2 Chemická struktura

Jak bylo řečeno v kapitole 3.2.1., kyselina hyaluronová je polysacharid, skládající se z kyseliny močové a aminocukru, kterými jsou kyselina D-glukuronová a N-acetylglukosamin. Tyto monosacharidy jsou spojeny v disacharidickou jednotku pomocí β -1,3 glykosidické vazby. Kyselina hyaluronová je polymer, tvořený opakující se základní disacharidickou jednotkou, základní jednotky jsou spojeny β -

1,4 glykosidickými vazbami. Znázorněno na Obr. 2. Počet těchto opakujících se jednotek může překročit hodnotu až 10 000 jednotek v molekule hyaluronanu. Molekulová hmotnost bývá průměrně okolo 1000-8000 kDa². (Necas J. et al. 2008; Cowman et al. 2015; Kogan et al. 2007)



Obrázek 2 - Strukturální jednotka kyseliny hyaluronové (Bojiang et al. 2010)

3.2.3 Syntéza

Kyselina hyaluronová není jako většina ostatních glykosaminoglykanů syntetizována v Golgiho aparátu, nýbrž mnoha buňkami organismu obratovců. Především se jedná o buňky, které jsou zapojeny do produkce extracelulární matrix. (Necas et al. 2008; Velebný 2012) Růst polymerního řetězce probíhá za působení enzymů tzv. hyaluronan syntázy. (Honegrová 2010)

3.2.4 Degradace

Degradaci v organismu zajišťuje enzym hyaluronidáza, která rozštěpí hyaluronan na fragmenty, které jsou zaneseny krevním řečištěm do jater, kde dojde ke zpracování a následně jsou metabolizovány standartně. (Velebný 2012; Honegrová 2010)

3.2.5 Štěpení HA

Jak již bylo řečeno v kapitole 3.2.1. a 3.2.2. kyselina hyaluronová je polymer s vysokou molekulovou hmotností. HA velmi snadno degraduje ve tkáních, je dobře rozpustná ve vodném prostředí, a její vodné roztoky jsou vzhledem k velké molekulové hmotnosti velmi viskózní. (Velebný 2012) Tato práce se zabývá výrobou vláken metodou elektrostatického zvlákňování, a právě při této metodě se ukazují velká viskozita roztoků jako nežádoucí faktor, který ztěžuje tvorbu Taylorových kuželů, viz. kapitola 2.3.

² (unifikovaná) atomová hmotnostní jednotka

Jak uvádí Fakhari a Berklund (2013), metod rozkladu HA na fragmenty je hned několik. Obecně řečeno metody degradace mohou být prováděny enzymatickými nebo neenzymatickými reakcemi. Enzymaticky poté enzymem zvaným hyaluronidáza, která rozloží HA na malé fragmenty, nebo enzymy, které degradují fragmenty odstraněním neredukujících sacharidů. Do neenzymatických rozkladů patří kyselá a zásaditě katalyzovaná hydrolýza. (Fakhari a Berklund 2013)

Hydrolytickou degradací HA se zabývají Tømmeraas a Melander (2008). Kyselá katalyzovaná hydrolýza je degradační proces pro kyselinu hyaluronovou, možný provést v různých kyselých hodnotách pH. Při tomto procesu dochází k rozštěpení β 1-3 a β 1-4 vazeb a vzniku polysacharidů a oligosacharidů. (Tømmeraas a Melander 2008; Velebný 2012)

Ve studii, kterou uvádí Tømmeraas a Melander (2008), se tvrdí, že efekt hydrolýzy závisí přímo na koncentraci kyseliny a teplotě. Změny v molekulové hmotnosti HA jsou závislé i na čase průběhu hydrolýzy. Bylo zjištěno, že hydrolýza je kinetická reakce prvního řádu, tedy platí rovnice:

$$k_h = \frac{A \cdot e^{-E_a}}{R \cdot T} \quad [h^{-1}], \quad (1)$$

kde k_h představuje rychlostní konstantu reakce, A je předexponenciální faktor, E_a aktivační energie, R pak molární plynová konstanta a T je termodynamická teplota. Jsou také uvedeny rychlostní konstanty pro různé hodnoty pH, měřené při 25°C, hodnoty byly použity pro praktickou část této bakalářské práce.

3.2.6 Využití HA

Kyselina hyaluronová má široké využití v medicíně. Jelikož se nachází ve velkých koncentracích v kůži, slouží jako podpora regenerace kůže a léčení jizev. Dále jako diagnostické markery pro řadu vážných onemocnění. Vyskytuje se rovněž v očních sklivci a používá se k aplikacím v oftalmologii. Zároveň slouží k cílené dopravě léčiv a k rekonstrukci měkkých tkání. (Kogan et al. 2007; Yang 2014; Necas et al. 2008)

3.2.7 Elektrostatické zvlákňování kyseliny hyaluronové

Tato kapitole je věnována čistě rešerši týkající se shrnutí výběru dosavadních pokusů o tvorbu nanovláken na bázi kyseliny hyaluronové.

Pravděpodobně první publikací zmiňující se o zpracování kyseliny hyaluronové metodou elektrostatičkého zvlákňování je *Electrospinning and Electroblowing of Hyaluronic Acid* (Um et al. 2004). Autoři tohoto článku ověřili, jak velký vliv má koncentrace zvlákňovaného polymeru, a to sice, že pokud je koncentrace příliš nízká, dochází spíše k electro sprayingu, zatímco při příliš vysoké koncentraci nedojde k tvorbě Taylorových kuželů a tudíž ani ke tvorbě vláken. Byl použit roztok vysokomolekulární (HMW) HA o molekulové hmotnosti $3,5 \cdot 10^6$ g/mol, připraveny silně kyselé roztoky za přidání HCl a zjištěno, že k pozitivní reakci na vystavení elektrostatičkému poli, tedy ke tvorbě vláken došlo od koncentrace vyšší než 1,3 % (w/v). Nad hodnotu 1,5 % (w/v) už nedochází k tvorbě vláken.

Autoři dále upozorňují na vysokou viskozitu roztoků a na fakt, že je třeba snížit viskozitu, ale zachovat co nejvyšší koncentraci, u málo koncentrovaných roztoků je totiž potřeba odpaření velkého množství rozpouštědla než vlákna dopadnou na kolektor, což je často nemožné a vznikají tak mokrá vlákna. Autoři uvádí, že jedním ze způsobů, jak snížit viskozitu a zároveň zachovat koncentraci HA, je smísení s nízkomolekulárními frakcemi HA. Jako nízkomolekulární (LMW) HA použili HA o molekulové hmotnosti 45 000 g/mol. Po porovnání roztoku HA 1,5 % (w/v) a roztoku 2% (w/v) LMW HA/1,3% (w/v) HMW HA bylo vidět, že morfologie vláken vypadá lépe při smísení s LMW HA.

Dále byl zkoumán vliv ethanolu, od kterého se přepokládalo, že usnadní odpařování rozpouštědla a sníží povrchové napětí, čímž usnadní zvlákňování. Bylo pozorováno nepatrné zlepšení, nicméně ethanol byl vyhodnocen jako nedostatečné zlepšení i proto, že jeho použití s HA je limitováno rozpustností HA v ethanolu.

Jelikož dosavadní pokusy stále neumožňovaly dostatečné výsledky, bylo přistoupeno k použití modifikace zařízení electrospinning a to sice ke zvlákňování za použití proudícího vzduchu při vysokých teplotách, tzv. electroblowing. Nejúspěšnější bylo zvlákňování za teploty 57 °C. Při vyšších teplotách ale došlo ke zvýšení průměru vláken, autoři toto vysvětlují vlivem rychlejšího vysušování a tím pádem větší změně koncentrace polymeru, zvýšení viskozity a konečně většímu průměru vláken.

Autoři dokázali připravit nanovláknna kyseliny hyaluronové s průměry o desítkách nanometrů pouze použitím kombinace procesu electrospinning a electroblowing, jelikož tím dokázali snížit viskozitu polymeru a urychlit odpařování rozpouštědla, zároveň použití této kombinace lze regulováním teploty, ovlivňovat průměr vláken. (Um et al. 2004)

V dalších výzkumech je rovněž oblastí zájmu omezení vysoké viskozity a zároveň úspěšné zvláknění HA, kromě úpravou zařízení pro electrospinning lze pro tyto účely HA mísit s dalšími polymery jako např. kolagen, želatina, polyethylenoxid, polyvinylalkohol. (Li et al. 2006; Fischer et al. 2012; Ji et al. 2006; Young 2006) Kolagen byl zvolen pro svou dobře známou chemickou strukturu a biokompatibilitu, jelikož takto připravené nanovláknenné vrstvy mají využití v tkáňovém inženýrství, autoři vyráběli vrstvu konkrétně pro podporu růstu kostí u pacientů s osteoporózou. V experimentu zvolili roztok 7,5 % (w/v) HA/kolagen v poměru 95:5 (w/w) rozpuštěný ve 4:1 (v/v) NaOH/DMF, se kterým se podařila vytvořit konzistentní nanovláknenná vrstva. Autoři poukazují na vliv okolního prostředí, hlavně na vlhkost vzduchu a tudíž na obtížné odpařování rozpouštědla během některým experimentů. (Fischer et al. 2012) Polyethylenoxid byl rovněž využit pro svou snadnou zvláknitelnost. Ji a kolektiv (2006) použili PEO, $M_w=900\ 000$ g/mol, a smíchali s thiolovaným derivátem HA (který byl použit pro svou nízkou molekulovou hmotnost), neboli HA - DTPH (3,3'-dithiobispropandihydrazid-modifikovaná kyselina hyaluronová), a byl tak vytvořen zesíťovaný povrch nanovláken. V práci byl použit hmotnostní poměr PEO:HA-DTPH 1:1. Práce se nadále zabývá rovněž stabilizací vytvořené vrstvy ve vodě. (Ji et al. 2006) Zvláknění s nosným polymerem se zabývá i Young (2006), kde ověřuje nejdříve možnost tvorby vláken vysokomolekulární 2% (w/w) HA za přídavku 1M NaCl a 0,5M NaCl, ovšem neúspěšně. Úspěšné bylo až zvláknění po přidání nosného polymeru PEO ($M_w=900\ 000$ g/mol), zvlákněny byly roztoky 1% (w/w) HA/PEO v objemových poměrem 60:40 a 70:30. (Young 2006)

Vhodná volba rozpouštědel HA vede rovněž k úspěchu. Lze zvláknit čistou HA v rozpuštěnou v DMF:H₂O, ovšem průměr takto vytvořených vláken přesahuje 100 nm. (Kim et al. 2008) Další možnou úspěšnou kombinací je systém 25:50:25 H₂O:kyselina mravenčí:DMF. Ovšem pH tohoto systému se poté pohybuje v nízkých

hodnotách, takže nastává degradace HA. (Liu et al. 2011) Brenner a kolektiv (2011) na výzkum volně navázali a používali kombinaci 25% NH₄OH:DMF. Tento roztok má pH=11. Takto bylo právě zvoleno kvůli snaze eliminovat jakoukoli degradaci HA pro vytvoření nanovlákněné vrstvy použitelné v biomedicíně. Podařilo se takto připravit nanovláknina s průměrem, odpovídajícím desítkám nm. (Brenner et al. 2012) Li a kolektiv (2005) poukazují opět na potřebu zvýšit rychlost odpařování rozpouštědla a použili ethanolovou lázeň, respektive hliníkovou fólii ponořenou do ethanolu. Ovšem ani korigováním vzdálenosti emitör - kolektor či zvyšováním napětí nedošlo k zvláknění bez tvorby kapek. Dále autoři zkoumali zvláknění s přidáním želatiny, která zvýší bílkovinný charakter výsledné vrstvy (Linhartová 2008), a které bylo úspěšné. Zkoumali i zvláknění HA ve směsi DMF/H₂O, kde se jim podařilo zvláknit bez modifikací zařízení elektrostatického zvláknování. Souhrnně tedy zhodnotili, že přidání DMF/H₂O stejně jako přidání želatiny k roztoku HA rapidně usnadní zvláknování. (Li et al. 2006)

V průběhu literární rešerše nebyla nalezena publikace zabývající se zvláknováním kyseliny hyaluronové z volné hladiny (tedy metodou bezjehlového elektrostatického zvláknování).

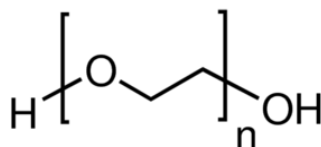
3.3 Polyethylenoxid

3.3.1 Úvod

Polyethylenoxid (PEO) je syntetický polymer využívaný v medicínských aplikacích pro svou netoxičnost, nekarcinogenitu, souhrnně řečeno biokompatibilitu (Ruys 2013), stejně tak pro dobře známé chemické vlastnosti a především pro svou snadnou zvláknitelnost. (Chen et al. 2016)

3.3.2 Vlastnosti a chemická struktura

Polyethylenoxid je syntetický polymer, v literatuře znám i pod názvem polyethylenglykol (PEG), vyskytuje se totiž v různých molekulových hmotnostech, pro nízkomolekulární polymer se používá název PEG. Rozdíl je i ve skupenstvích, a to sice nízkomolekulární polymery se vyskytují jako viskózní kapaliny i tuhé vosky, zatímco vysokomolekulární PEO je pevná látka. PEO je rozpustný ve vodě i v různých organických rozpouštědlech. Má vysoký bod tání. (Bailey 2012; Sigma-Aldrich 2016) PEO vzniká polymerizací cyklického etheru, ethylenoxidu. (Bailey 2012)



Obrázek 3 - Chemická struktura PEO (Sigma-Aldrich 2016)

3.3.3 Využití

Kromě použití jako nosný polymer se různé formy využívají jako iniciátory polymerizačního procesu. Také k dodávání léčiv, jako scaffold v tkáňovém inženýrství a k technickým aplikacím. (Nanopharma 2016)

4 Vybrané metody analýzy vytvořených nanovláken

Metod pro analýzu nanovláknenných vrstev je řada, v této kapitole je věnována pozornost metodám, které byly v práci použity.

4.1 Elektronový rastrovací mikroskop

Elektronový rastrovací mikroskop (REM či SEM z anglického Scanning electron microscope) je mikroskop používající pohyblivý svazek elektronů, který zaměřuje na místa vzorku a postupně (po řádcích, odtud i název „řádkovací“) snímá vzorek. Zdrojem elektronů bývá žhavené wolframové vlákno a elektrony se urychlují pomocí urychlovacího napětí. Místo skleněných čoček se používají čočky elektromagnetické. Tím, že svazek dopadá na vzorek, dochází k určitému průniku svazku do vzorku, elektrony jsou rozptylovány a absorbovány, čímž vzniká řada signálů. Jedním ze signálů, vznikajících při této interakci s pevnou látkou, jsou sekundární elektrony (SE), které jsou následně detekovány a za použití scintilátoru a fotonásobiče převedeny na elektrický signál a následně na barvu ve stupních šedi. (Michlíček 2013; Vodičková 2016)

4.2 FTIR

Zkrácený název této metody vychází z anglického Fourier transform infrared spectroscopy, což napovídá, že jde o druh provedení infračervené spektroskopie. Zvolit tuto metodu je výhodné, pokud chceme zjistit kvalitativní složení materiálu ve zkoumaném vzorku. Při průchodu infračerveného laseru vzorkem dochází k absorpci infračerveného záření. Absorpcí se změní vibračně rotační energetické stavy molekuly a výsledkem je spektrum, které je charakteristické pro jednotlivé

látky. (Vodičková 2016b) Vyhodnocení tohoto spektra probíhá porovnáním s již uloženými spektry látek v tzv. digitální knihovně, případně pokud se dokazuje složení směsi o známých složkách, je výhodné nejdříve získat spektrum jednotlivých složek a následně porovnat, jako bylo provedeno v této práci.

PRAKTICKÁ ČÁST

5 Cíle praktické části

Cílem praktické části bylo nalezení optimálních podmínek pro zvláknění roztoků kyseliny hyaluronové ve směsi s nosným polymerem za použití medicínsky přijatelných rozpouštědel pro zachování biokompatibility a pro potenciální využití v tkáňovém inženýrství. Nanovláknina byla vytvořena metodou elektrostatického zvláknování z volné hladiny.

Praktická část je rozdělena do tří hlavních kapitol a jedné podkapitoly:

- Zvláknování roztoků vysokomolekulární HA,
- Zvláknování roztoků vysokomolekulární HA ve směsi s nosným polymerem,
- Zvláknování roztoků nízkomolekulární HA ve směsi s nosným polymerem,
 - Štěpení HA.

Výsledky jsou uvedeny u každé kapitoly a shrnuty v diskusi.

6 Materiály a metody

6.1 Materiály

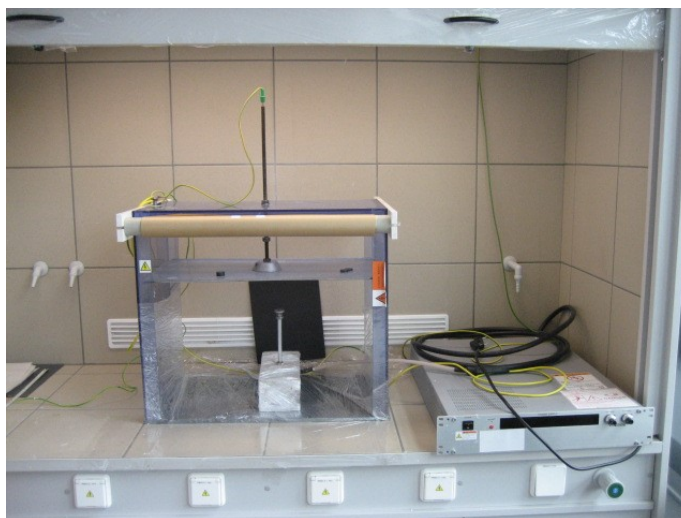
Byla zvolena kombinace přírodního a syntetického polymeru. Jako přírodní polymer byla zvolena prášková kyselina hyaluronová bakteriálního původu v kosmetické kvalitě. $M_w = 1,3 \text{ MDa}$, $\rho = 0,143 \text{ g/cm}^3$, obsah proteinu pod 0,1%. Jako syntetický polymer byl použit polyethylenoxid, $M_w = 400\,000 \text{ g/mol}$, od firmy Sigma-Aldrich. Jako rozpouštědla a příměsi byly použity deionizovaná voda (DIW, $0,08 \mu\text{S/cm}$), ethanol, p.a. (Penta), DMSO (Penta), vodný roztok NH_3 (24-28% ; Penta), pro snížení povrchového napětí roztoku TRITON X – 100 (Sigma Aldrich).

6.2 Metody

6.2.1 Elektrostatické zvláknování

Samotný proces zvláknování byl popsán v kapitole 2, včetně popisu tyčkové aparatury (viz Obr. 1), která byla použita během praktické části. Bylo tedy zvláknováno z volné hladiny, použitý kolektor byl kovový, vzdálenost elektrod fixně nastavená na 0,1 m. Průměr emitoru (tyčkové elektrody) byl 0,01 m. Tato aparatura byla vybrána pro své výhody snadné údržby, nastavitelnosti vzdálenosti mezi

emitorem a kolektorem a také pro ověření, zda je možné zvláknění z volné hladiny, a tudíž, zda budou mít testované směsi potenciál pro zpracování na poloprovozním zařízení Nanospider™, což by znamenalo možnost výroby nanovrstvy v průmyslovém měřítku. Nanospider™ nebyl použit primárně kvůli požadavkům na minimální objem zvláknovacích roztoků.

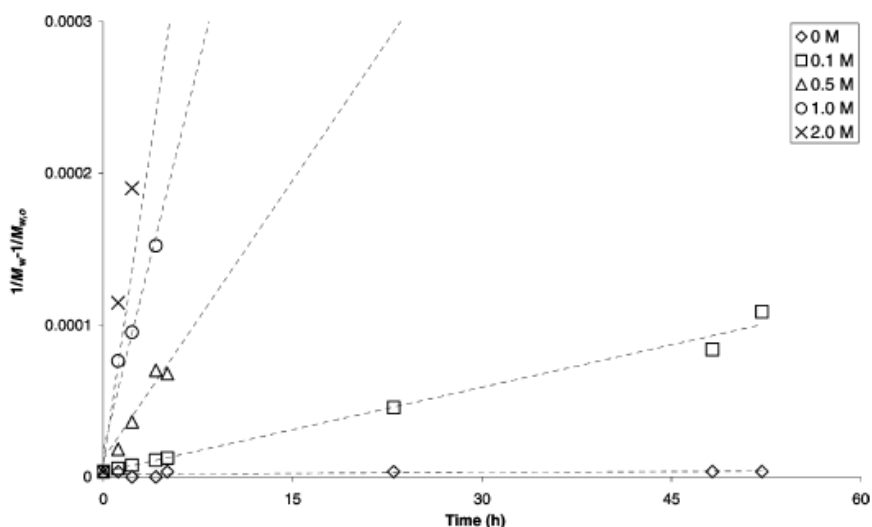


Obrázek 4 - Fotografie používaného zařízení pro elektrostatické zvláknování

6.2.2 Štěpení HA

Ke štěpení HA bylo přistoupeno na základě článku, který uvádí Um a kolektiv (2004), kde se předpokládalo usnadnění procesu zvláknování po rozštěpení HA na nízkomolekulární fragmenty. (Um et al. 2004) Při samotném procesu bylo vycházeno ze studie Kinetics of Hyaluronan Hydrolysis in Acidic Solution at Various pH Values (Tømmerraas a Melander 2008). O teoretickém aspektu této studie se zmiňuje kapitola 3.2.5.

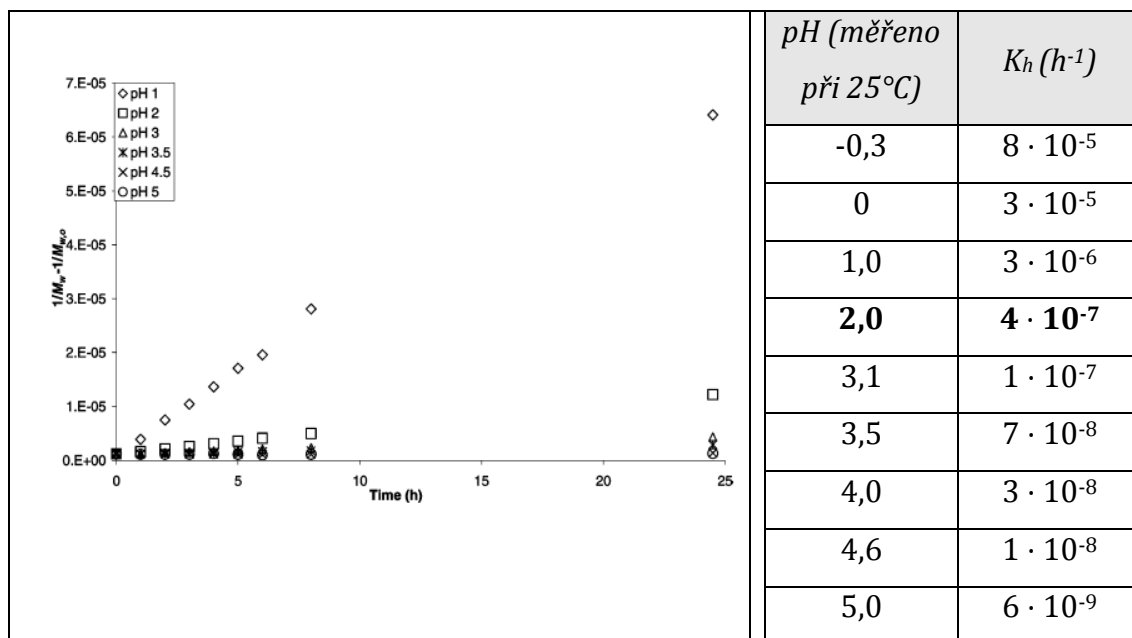
Graf popisující kinetiku hydrolýzy HA a vlivu parametrů procesu na molekulovou hmotnost vznikajících produktů je uveden na Obr. 5. Konkrétně ukazuje závislost změny inverzní průměrné hodnoty molekulové hmotnosti na čase pro acidické molární koncentrace. Graf vychází ze štěpení při 60°C. $M_{w,0}$ je molekulová hmotnost HA na začátku hydrolýzy.



Obrázek 5 - Závislost $(1/M_w - 1/M_{w,0})$ na čase hydrolyzy pro acidickou koncentraci (Tømmeraas a Melander 2008)

Ve studii je rovněž uvedena závislost inverzní průměrné hodnoty molekulové hmotnosti na čase pro různé pH koncentrace a také tabulka vypočtených hodnot rychlostních konstant reakce. V tabulce na Obr. 6 je vyznačeno pH, při kterém byla prováděna hydrolyza v této bakalářské práci.

Obrázek 6 - Závislost $(1/M_w - 1/M_{w,0})$ na čase hydrolyzy pro hodnoty pH (Tømmeraas a Melander 2008)





Obrázek 7 - Aparatura ke štěpení HA

Na Obr. 7 je aparatura používaná při hydrolýze. Následná dialýza byla provedena za použití dialyzační celulózy membrány (Sigma-Aldrich) o průměru 25 mm, membrána uchová látky s $M_w \geq 12\,000$ g/mol. Lyofilizace byla provedena na lyofilizátor Labconco Freezezone 2.5. Analýza molekulové hmotnosti rozštěpené HA byla změřena na kapalinovém chromatografu Dionex Ultimate 3000 HPLC.

6.2.3 Charakterizace nanovláken

Morfologie vytvořených vláken byla analyzována na rastrovacím elektronovém mikroskopu Vega TS 5130 (jako vodivá vrstva byl použit nános zlatého (Au) prášku o tloušťce 6 nm) a rastrovacím elektronovém mikroskopu Carl Zeiss ULTRA Plus s mikroanalytickým systémem OXFORD Instruments (jako vodivá vrstva byl použit nános zlatého (Au) prášku o tloušťce 1 nm).

Analýza chemického složení byla provedena na FTIR spektrometru Nicolet iZ10, ATR technikou (totálně zeslabená reflexe) na krystalu z Ge. Spektra byla korigována na vliv atmosféry a na baseline.

Teoretický základ použitých přístrojů byl stručně popsán v teoretické části (viz kapitola 4).

7 Zvlákňování roztoků vysokomolekulární HA

7.1 Příprava zvlákňovacích roztoků

Pro tuto sérii zvlákňovacích roztoků byly připraveny 0,75% (w/w) vodné roztoky vysokomolekulární HA o různých pH. Hodnota pH vodného roztoku byla pH=6. Roztoky byly upraveny na hodnotu pH=4 pomocí 0,01 ml 99% CH₃COOH, podobně na hodnotu pH=5 za přidání 0,002 ml 99% CH₃COOH do 20 ml 0,75% (w/w) vodné roztoky vysokomolekulární HA. Na hodnotu pH=8 a pH=9,5 byly upraveny použitím 0,01 ml 0,25M NaOH a 0,02 ml 0,25M NaOH do 20 ml 0,75% (w/w) vodné roztoky vysokomolekulární HA.

7.2 Vystavení roztoků elektrostatickému poli

Parametry zvlákňování a reakce roztoků na vystavení elektrostatickému poli jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2 - Výsledky vystavení roztoků čisté HA elektrostatickému poli

pH	Příměs	Podmínky (teplota ; vlhkost)	napětí	Reakce na vystavení elst. poli		
				Tvorba Taylorových kuželů (počet)	Přenos hmoty	Tvorba vláken
9,5	1M NaCl	22,1°C 49,6%	50 kV	ano (1)	ne	ne
	DMSO	22,1°C 49,6%	50 kV	ano (1)	ne	ne
	1M NaCl:DMSO (1:1 w/w)	22,1°C 49,6%	50 kV	ano (2)	ne	ne
8	1M NaCl	22,1°C 40,6%	40 kV	ano (1)	ne	ne
	DMSO	22,1°C 40,6%	40 kV	ano (1)	ne	ne

	1M NaCl:DMSO (1:1 w/w)	22,1°C 40,6%	40 kV	ano (1)	ne	ne
6	1M NaCl	22,6°C 52,5%	50 kV	ne	ne	ne
	DMSO	22,6°C 52,5%	50 kV	ne	ne	ne
	1M NaCl:DMSO (1:1 w/w)	22,6°C 52,5%	50 kV	ne	ne	ne
5	1M NaCl	22,5°C 52,5%	50 kV	ne	ne	ne
	DMSO	22,5°C 52,5%	50 kV	ne	ne	ne
	1M NaCl:DMSO (1:1 w/w)	22,5°C 52,5%	50 kV	ne	ne	ne
4	1M NaCl	22,5°C 52,5%	50 kV	ne	ne	ne
	DMSO	22,5°C 52,5%	50 kV	ne	ne	ne
	1M NaCl:DMSO (1:1 w/w)	22,5°C 52,5%	50 kV	ne	ne	ne

7.3 Výsledky

V první části byla ověřena reakce vystavení 0,75% (w/w) vodných roztoků vysokomolekulární HA elektrostatickému poli. Nejlépe na vystavení elektrostatickému poli reagovaly zásadité roztoky o hodnotě pH=8 a pH=9,5. To je vysvětleno tím, že při tomto pH se pohybujeme ve velké vzdálenosti od izoelektrického bodu HA, který je okolo 2,5 (Kong a Park 2011). Jako příměsi byly používány 1M NaCl (Young, Denice Shanette 2006), DMSO (Burgert, Ladislav et al.

2012) a směs 1M NaCl:DMSO (1:1 w/w). Co se vytvoření vláken týká, zvlákňování roztoků nevedlo k úspěšnému výsledku.

7.4 Diskuse výsledků

Jak je zřejmé z tabulky 2, zvlákňovací pokusy s roztoky čisté HA nevedly k vytvoření vláken. Neúspěšné zvlákňování mohlo být ovlivněno přílišnou viskozitou roztoků, ale nelze s určitostí tvrdit, jelikož viskozity nebyly měřeny. Zároveň se zdá, že negativní vliv mohly mít i okolní podmínky, vlhkost vzduchu dosahovala vysokých hodnot, což značně znesnadňuje odpařování rozpouštědla. (Li a Wang 2013) Z tohoto důvodu bylo přistoupeno ke zvlákňování HA ve směsi s nosným polymerem. Vzhledem k negativní reakci, respektive nulovému přenosu hmoty, při vystavení HA elektrostatickému poli bylo rovněž rozhodnuto v dalších pokusech použít látky, které usnadní odpařování rozpouštědla. K tomu účelu byl použit EtOH (Um et al. 2004) a také látky ke snížení povrchového napětí, bude použit ředěný roztok TRITON (Ferri a Stebe 2000), případně IPA. Brenner a kolektiv (2011) také upozorňují na pozitivní vliv NH₄OH, respektive NH₄OH:DMF. (Brenner et al. 2012) DMF nebylo použito vzhledem ke snaze zachování co nejvyšší biokompatibility.

8 Zvlákňování roztoků vysokomolekulární HA ve směsi s nosným polymerem

8.1 Příprava zvlákňovacích roztoků

Byl připraven roztok 1% (w/w) HA v DIW. Rovněž byly připraveny vodné roztoky polymeru PEO. Byl připraven 10% (w/w) PEO ($M_w = 400\,000$ g/mol) v DIW a 10% (w/w) PEO ($M_w = 400\,000$ g/mol) v 50% (w/w) EtOH.

Byly vytvořeny následující řady zvlákňovacích roztoků uvedené v tabulce 3.

Tabulka 3 - Složení a značení roztoků vysokomolekulární HA

Složení a značení (A-F) roztoků			
HA v DIW : PEO v DIW		HA v DIW : PEO v EtOH	
Značení roztoku	Poměr (v/v)	Značení roztoku	Poměr (v/v)
A	3:1	D	3:1
B	2:1	E	2:1
C	1:1	F	1:1

8.2 Vystavení roztoků elektrostatickému poli

Parametry zvlákňování a reakce roztoků na vystavení elektrostatickému poli uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4 - Výsledky vystavení roztoků HA/PEO elektrostatickému poli

Zn.	příměs	Podmínky (teplota ; vlhkost)	napětí	Reakce na vystavení elst. poli		
				Tvorba Taylorových kuželů	Přenos hmoty	Tvorba vláken
A	TRITON: EtOH (1:1 v/v)	23,4°C 27,8%	36 kV	ano	ano	ano
B	TRITON: EtOH (1:4 v/v)	23,7°C 28,6%	36 kV	ano	ano	ano
C	TRITON: EtOH (1:5 v/v)	23,7°C 28,6%	38 kV	ano	ano	ano
D	TRITON: NH ₄ OH (1:1 v/v)	24,9°C 31,4 %	35 kV	ano	ano	ano
E	TRITON: NH ₄ OH: 1M NaCl (1:2:2 v/v)	24,9°C 31,4 %	40 kV	ano	ano	ano
F	TRITON: NH ₄ OH: 1M NaCl (3:5:7 v/v)	24,9°C 31,4 %	38 kV	ano	ano	ano

8.3 Analýza nanovláken a výsledky

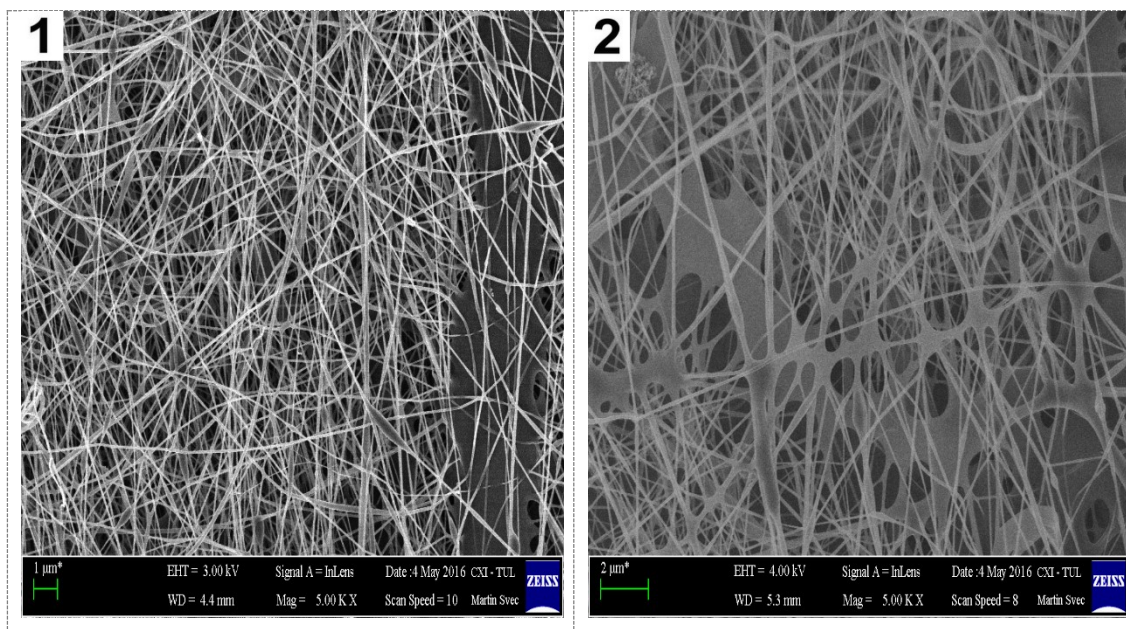
Jak vyplývá z dat uvedených v tabulce 4, podařilo se vytvořit nanovláknennou vrstvu roztoků A – F.

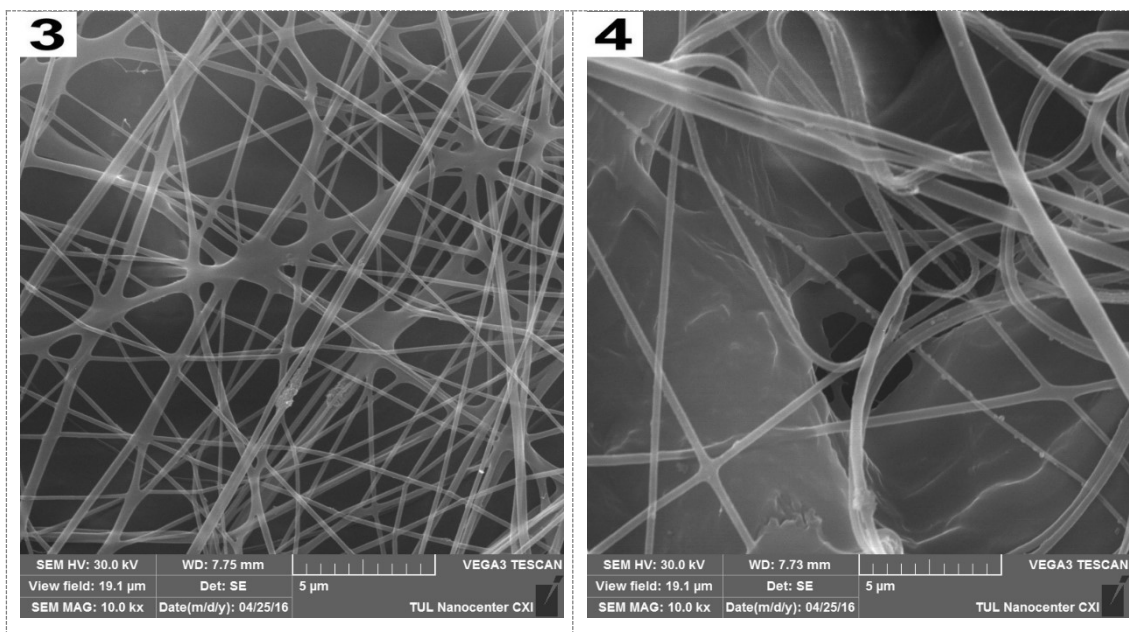
8.3.1 Morfologie vláken

V tabulce 5 jsou vypsány průměry vytvořených vláken. Histogramy četnosti průměrů jsou k nahlédnutí v přílohové části.

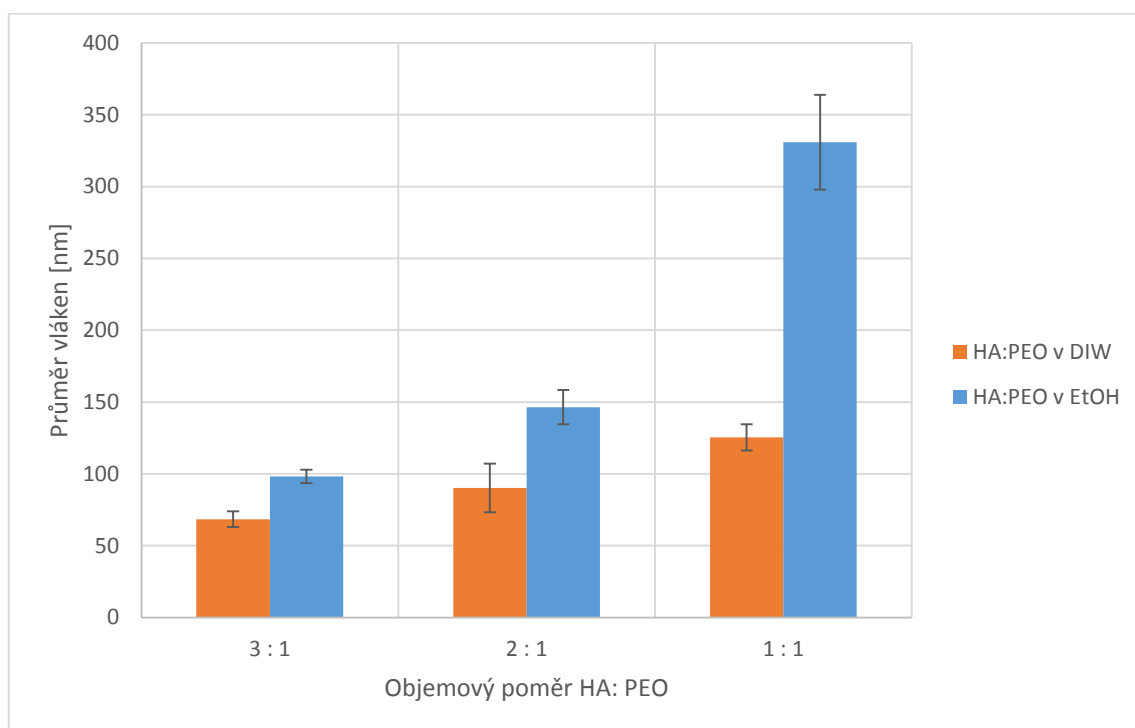
Tabulka 5 - Průměr vláken HMW HA/PEO

Roztok	Průměr vláken (průměr ± SEM)
A	(68,41±5,49) nm
B	(90,17±16,94) nm
C	(125,48±9,14) nm
D	(98,2±4,69) nm
E	(146,45±11,88) nm
F	(330,91±32,98) nm





Obrázek 8 – SEM snímky nanovláken. (1) HA:PEO v DIW, 3:1 (v/v). (2) HA:PEO v EtOH, 3:1 (v/v). (3) HA:PEO v DIW, 1:1 (v/v). (4) HA:PEO v EtOH, 1:1 (v/v).



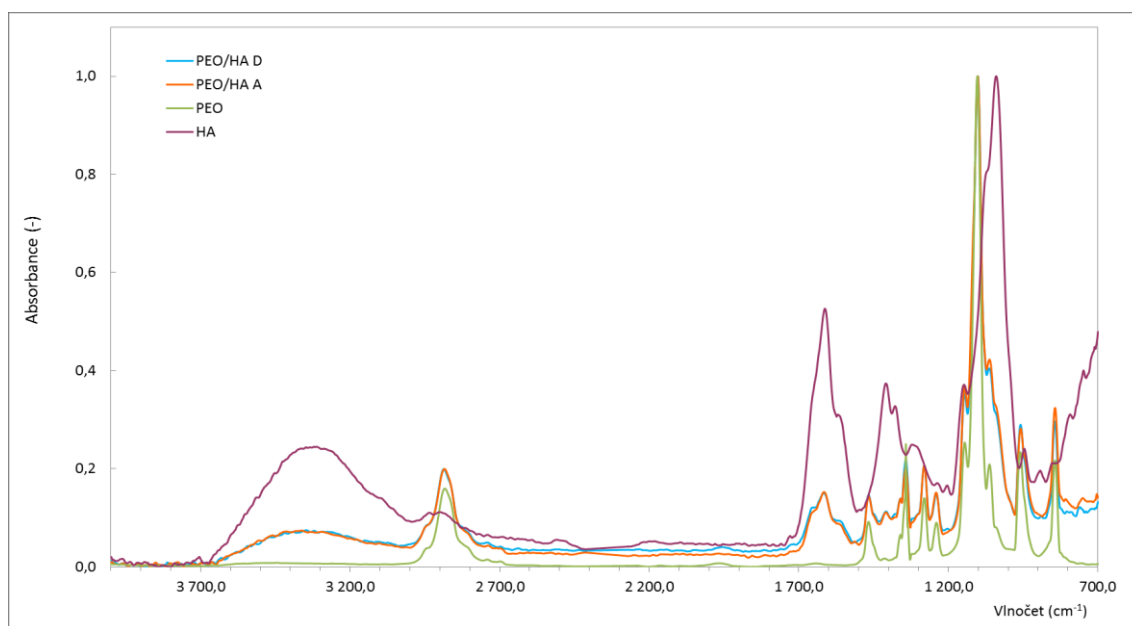
Obrázek 9 - Vliv podílu PEO na průměr vláken

8.3.2 Analýza chemického složení (FTIR)

IR spektrum kyseliny hyaluronové vykazuje několik absorpčních maxim typických pro její makromolekulu. Jedná se především o maxima na vlnových délkách 3400 cm^{-1} , $1550 - 1750\text{ cm}^{-1}$ a 1410 cm^{-1} a 1050 cm^{-1} . Vrchol na 3400 cm^{-1} je připisován především vibracím spojeným vazbou O-H. Absorpční maxima vyskytující se mezi

1630 a 1820 cm^{-1} bývají připisována C=O karbonylu a mohou být dále specifikována dle chemické struktury. Vibrace C=O v oblasti kolem 1750 cm^{-1} bývají připisována karboxylovým kyselinám, zatímco u vibrací s maximem kolem 1650 cm^{-1} se jedná o amid. Amidu jsou také připisovány vibrace v oblasti 1550 cm^{-1} . Maxima vyskytující se v rozmezí 1000 – 1300 cm^{-1} jsou připisována C-O esterů a etherů. Oproti tomu spektrum PEO se vyznačuje dvěma výraznými absorpční maxima v oblastech 2900 cm^{-1} a 1100 cm^{-1} , která jsou připisována vibracím vazby C-H a C-O etheru.

Výrazná odlišnost spekter zvláknovaných polymerů umožnila ověření jejich přítomnosti v připravených nanovláknách. Jak je patrné z grafu na Obr. 10, oba testované vzorky nanovláken PEO/HA vykazují kombinaci výrazných charakteristik obou obsažených složek. Spektra vzorků PEO/HA A a D jsou až na drobné odchylky téměř totožná, což vyplývá ze shodného podílu složek ve směsi. Určení množství HA ve vzorcích však nebylo možné.



Obrázek 10 -FTIR spektrum roztoků HA/PEO (jedná se o roztoky A a D)

8.4 Diskuse výsledků

V této části byly úspěšně zvlákněny roztoky 1% (w/w) HA v DIW ve směsi s 10% (w/w) PEO v DIW a 10% PEO (w/w) v 50% (w/w) EtOH v různých poměrech za přítomnosti NH_4OH a TRITON. Při zvláknování vodných roztoků bylo pozorováno velmi špatné odpařování rozpouštědla, zejména se zvyšujícím se podílem PEO. Vlákna na kolektor dopadala mokrá, tudíž bylo přidáno malé množství EtOH za

výrazného zlepšení odpařování vody. Obrázek 8 ukazuje rozmanitou morfolgickou charakteristiku. Morfologie a průměr vláken byly ovlivněny rozpouštědlem. Z průměru vláken, uvedených v tabulce 5, je patrný výrazný nárůst průměru vláken ve směsi s PEO rozpuštěným v 50% (w/w) EtOH. Na Obr. 8 (1) je vidět, že dochází k mírné tvorbě perliček, jedná se o roztok HA:PEO v DIW v poměru 3:1, koncentrace HA tudíž nejspíš byla příliš nízká. Roztok HA:PEO v 50% (w/w) EtOH v poměru 3:1 (Obr. 8 (2)) tuto charakteristiku nevykazuje, tvoří propojená a spojitá vlákna, bez kapiček, ale jsou patrné vady vláken. HA:PEO v EtOH v poměru 1:1 (Obr. 8 (4)) vykazoval značnou viskozitu a zhoršenou reakci na vystavení elektrostatickému poli. Přenos hmoty nastal až po přidání 1M NaCl. Vlákna nejsou hladká a mají velmi nepravidelný tvar. Průměr vláken by mohl být ovlivněn i parametry okolního prostředí a vzdáleností elektrod, stejně jako použitým napětím, ale tyto hodnoty zůstávaly v průběhu pokusu poměrně fixní. Přítomnost HA ve vytvořené vrstvě vláken byla dokázána pomocí FTIR, viz Obr. 10.

9 Zvláknění roztoků nízkomolekulární HA ve směsi s nosným polymerem

V této části bylo zapotřebí provést:

- štěpení HA,
- analýzu rozštěpené HA,
- zvláknění nízkomolekulární HA.

9.1 Štěpení HA

9.1.1 Příprava roztoku

Byl připraven roztok 0,25 % (w/v) HA o pH=5,9. Byla zvolena hydrolýza při pH=2, roztok byl okyselen použitím 99% CH₃COOH.

9.1.2 Postup

Ve studii, kterou uvádí Tømmeraas a Melander (2008), bylo vypočteno, že při pH=2 (měřeno při 25°C) platí pro kyselé katalyzovanou hydrolýzu při 60°C hodnota rychlostní konstanty $k_h = 4 \cdot 10^{-7} \text{h}^{-1}$ (viz Obr. 6). Hydrolýza byla prováděna 1,2 h; 2,3 h; 4,6 h a 10,5 hodin pro rozštěpení na předpokládanou molekulovou hmotnost 800 000 g/mol, 600 000 g/mol, 400 000 g/mol a 200 000 g/mol. (Tømmeraas a

Melander 2008) Míchání bylo nastaveno na 250 rpm. Teplota vodní lázně byla udržována na 70°C. Vzorky byly následně dialyzovány po dobu 96 hodin a po ukončení dialýzy byla provedena lyofilizace, která trvala 48 hodin.

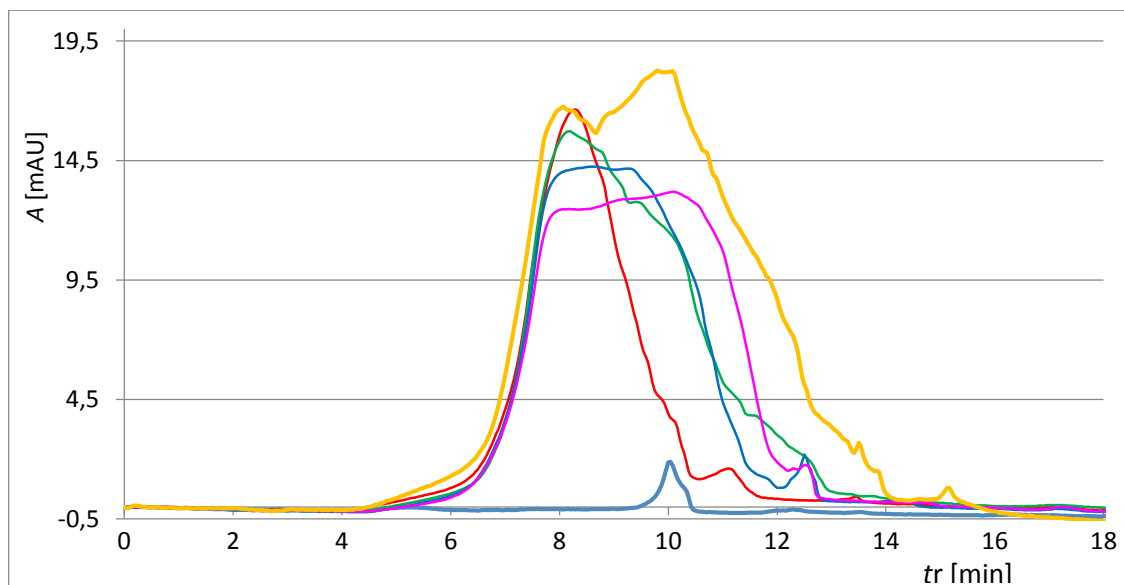
9.1.3 Výsledky štěpení HA a diskuse

Štěpení

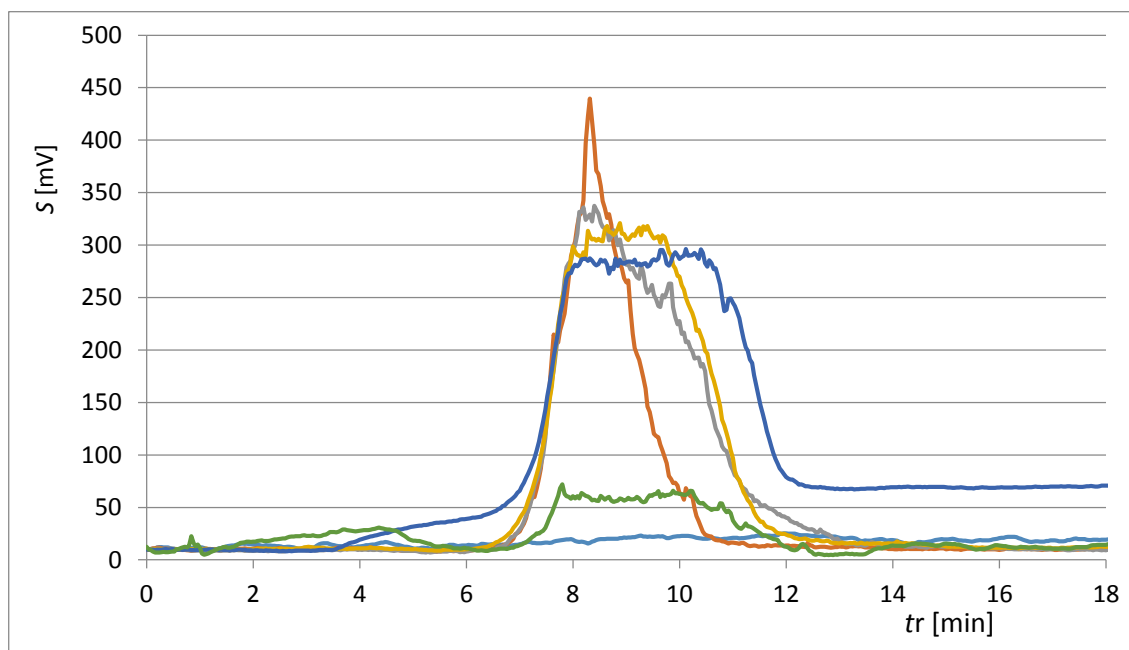
Na základě chromatogramů zaznamenaných pomocí UV detekce (Obr. 11) lze usuzovat, že krátkou hydrolýzou se odstraní nízkomolekulární složky původní kyseliny hyaluronové a zůstane pouze úzký pík s maximem okolo 8 minut (1,5 MDa). Tato složka je přítomná i v průběhu další hydrolýzy, ve vzorku se ovšem vyskytuje stále více složek s nižší molekulovou hmotností. Po 10,5 hodinách hydrolýzy dokonce převládá složka s retenčním časem 10,5 minut (150 KDa).

Data pořízená ELSD detektorem tuto interpretaci potvrzují (Obr. 12). V důsledku nástřiku poloviční koncentrace nativní kyseliny hyaluronové a principiální nelinearity odezvy detektoru je však signál kyseliny hyaluronové velmi nízký a proto obtížně porovnatelný s hydrolyzovanými vzorky. V tomto vzorku je rovněž přítomen signál okolo t_r 5 min (26 MDa). Je ovšem pravděpodobné, že se jedná o asociát nebo o kontaminaci.

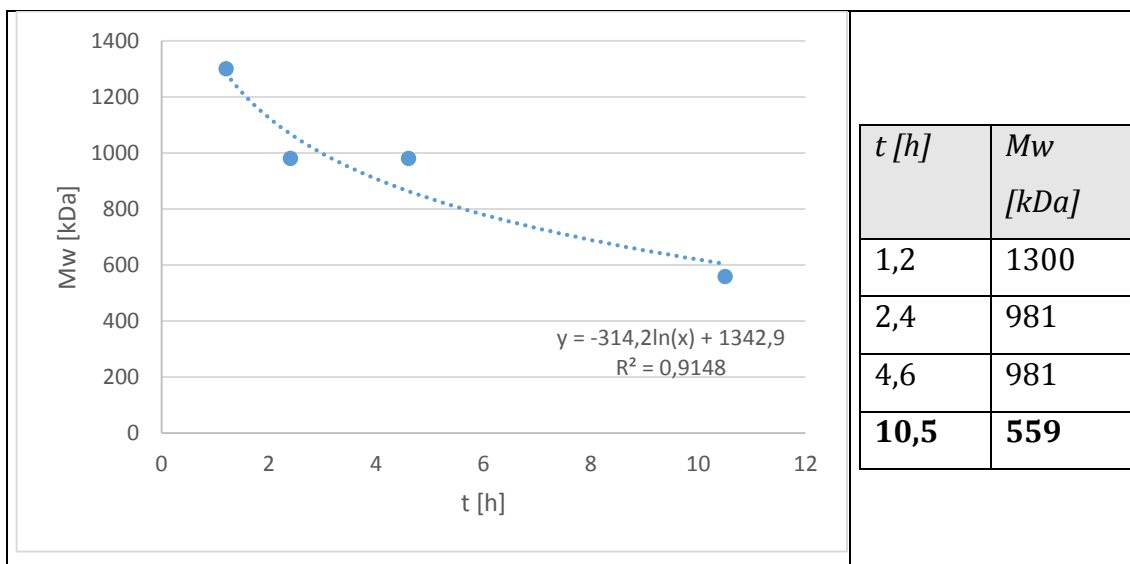
Na Obr. 13 je pro přehlednost znázorněna závislost průměrných molekulových hmotností HA na čase hydrolýzy. Výsledky vykazují odchýlení od teoretických hodnot. Nebyl možný určit hlavní důvod odchýlení od předpokládaných hodnot, hydrolýza však byla prováděna při 60°C. Tuto teplotu se nepodařilo udržet stabilně a docházelo k odchýlkám.



Obrázek 11 - Chromatogramy hyaluronových kyselin zaznamenané při 220 nm. Nativní hyaluronová kyselina (oranžově), hydrolyza 1,2 h (červeně), hydrolyza 2,3 h (zeleně), hydrolyza 4,6 h (modře), hydrolyza 10,5 h (fialově) a slepý vzorek (tmavě modře). Signál nativní kyseliny hyaluronové je pro názornost zdvojnásoben.



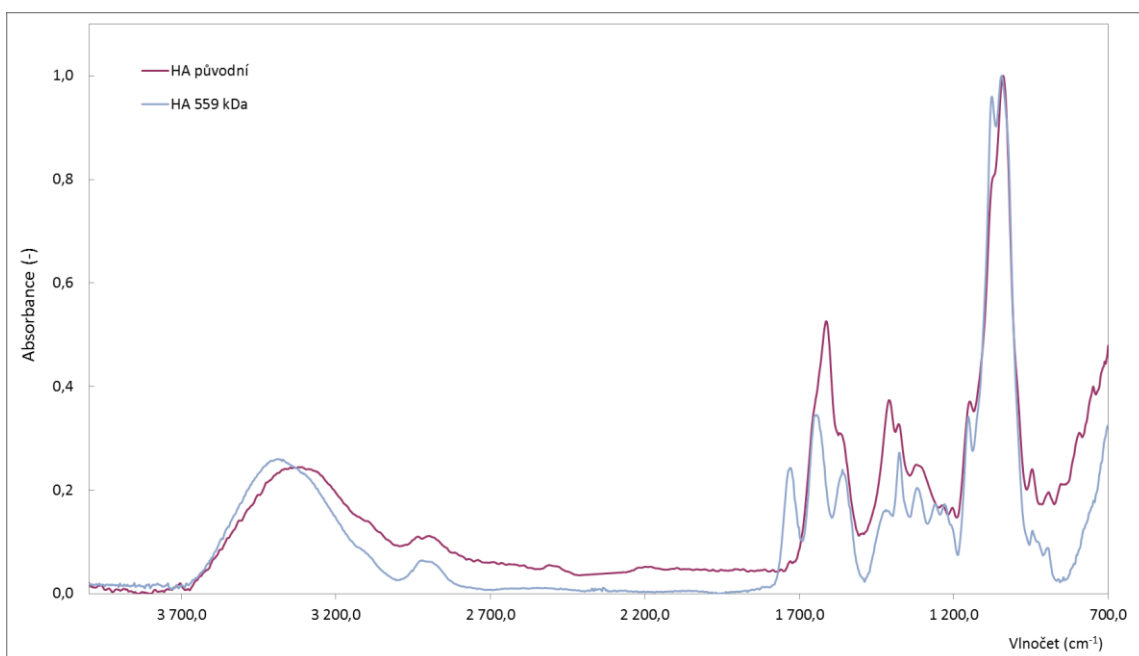
Obrázek 12 - Chromatogramy hyaluronových kyselin zaznamenané ELSD detektorem. Nativní hyaluronová kyselina (oranžově), hydrolyza 1,2 h (červeně), hydrolyza 2,3 h (zeleně), hydrolyza 4,6 h (fialově), hydrolyza 10,5 h (světle modře) a slepý vzorek (tmavě modře).



Obrázek 13 - Závislost dosažené molekulové hmotnosti na čase t [h]

Analýza FTIR

Ze srovnání spekter původní vysokomolekulární kyseliny hyaluronové a téhož po štěpení hydrolýzou po dobu 10,5 hodin (Obr. 14) je patrné, že vlivem štěpení makromolekul došlo ke změně chemické struktury HA - a to zejména v oblasti 1630 a 1820 cm^{-1} . Nejvýznamnější změna byla pozorována u maxima na vlnové délce 1750 cm^{-1} , které souvisí s vazbou $\text{C}=\text{O}$ esteru.



Obrázek 14 - Srovnání spekter původní HA a HA po hydrolýze 10,5 h

9.2 Zvlákňování roztoků nízkomolekulární HA

9.2.1 Příprava roztoků

Byly připraveny 5% (w/w) roztoky nízkomolekulární HA (LMW HA), která byla získána štěpením 10,5 h, popsáním v kapitole 3.2.5 a 6.2.2. Zároveň byly připraveny vodné roztoky polymeru PEO. Byl připraven 10% (w/w) PEO ($M_w = 400\,000$ g/mol) v 50% (w/w) EtOH a 10% (w/w) PEO ($M_w = 400\,000$ g/mol) v DIW.

Byly vytvořeny následující řady zvlákňovacích roztoků uvedené v tabulce 6. Objemové poměry byly voleny stejně jako v kapitole 8 (tabulka 3) pro možnost srovnání.

Tabulka 6 - Složení a značení roztoků vysokomolekulární HA

Složení a značení (G-L) roztoků			
HA v DIW : PEO v DIW		HA v DIW : PEO v EtOH	
Značení roztoku	Poměr (v/v)	Značení roztoku	Poměr (v/v)
G	3:1	J	3:1
H	2:1	K	2:1
I	1:1	L	1:1

9.2.2 Vystavení roztoků elektrostatickému poli

Parametry zvlákňování a reakce roztoků na vystavení elektrostatickému poli uvedeny v Tabulce 7.

Tabulka 7 - Výsledky vystavení roztoků nízkomolekulární HA/PEO elektrostatickému poli

Zn.	příměs	podmínky	napětí	Reakce na vystavení elst. poli		
				Tvorba Taylorových kuželů	Přenos hmoty	Tvorba vláken
G	1M NaCl: TRITON (1:1 v/v)	24,7°C 29,5 %	28 kV	ano	ano	ano
H	1M NaCl: TRITON (1:1 v/v)	24,9°C 31,4 %	32,5 kV	ano	ano	ano
I	1M NaCl: TRITON (1:1 v/v)	24,9°C 31,4 %	27 kV	ano	ano	ano

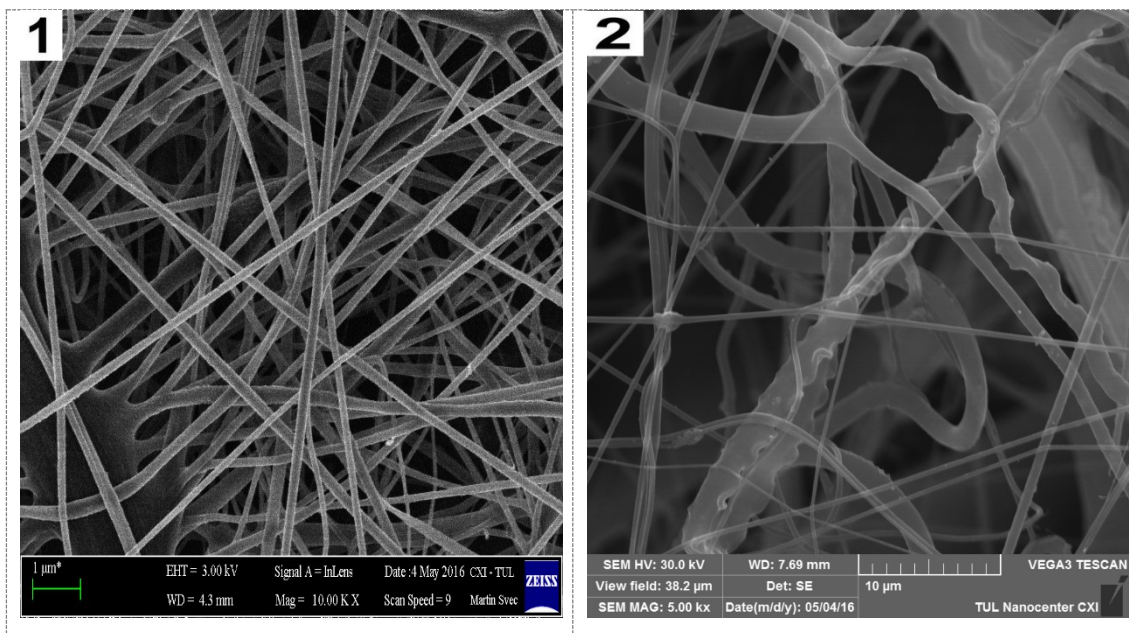
Roztoky J – L nejsou uvedeny v tabulce, jelikož roztoky tvořily gel a zvláknění nebylo možné.

9.2.3 Morfologie vláken

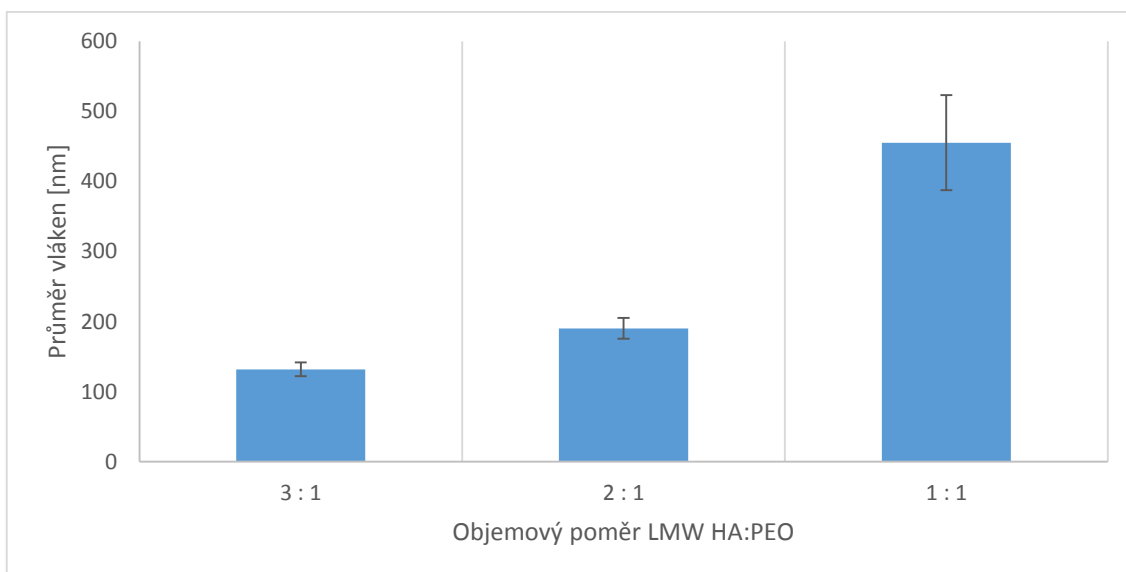
V tabulce 8 jsou vypsány průměry vytvořených vláken. Histogramy četnosti průměrů jsou k nahlédnutí v přílohové části.

Tabulka 8 - Průměr vláken LMW HA/PEO

Roztok	Průměr vláken (průměr ± SEM)
G	(131,83±9,68) nm
H	(190,27±14,74) nm
I	(455,33±67,89) nm



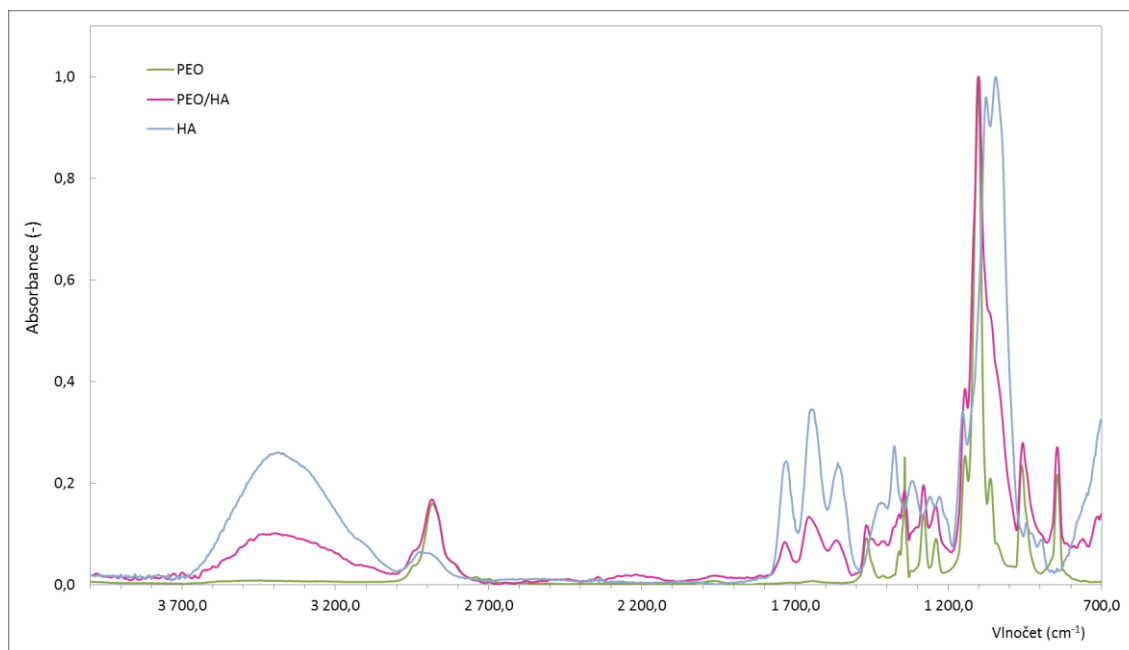
Obrázek 15 - SEM snímky nanovláken. (1) LMW HA:PEO v DIW, 3:1 (v/v). (2) LMW HA:PEO v DIW, 1:1 (v/v).



Obrázek 16 - Vliv podílu PEO na průměr vláken

9.2.4 Analýza chemického složení (FTIR)

FTIR analýza nanovláken LMW HA_{559kDa}/PEO prokázala stejně jako v předchozím případě přítomnost obou složek PEO a HA v připravených nanovláčkách.



Obrázek 17 -FTIR spektrum LMW HA/PEO (jedná se o roztok G)

9.2.5 Diskuse výsledků

Došlo k úspěšnému zvláknění roztoků nízkomolekulární HA o koncentraci 5% (w/w) v DIW ve směsi s 10% (w/w) PEO ($M_w = 400\,000$ g/mol) v DIW. Roztoky ve směsi s 10% (w/w) PEO v 50% (w/w) EtOH nebylo možné zvláknit, jelikož tvořily gel. Poměry LMW HA:PEO byly voleny stejně jako u zvláknování vysokomolekulární HA. V tabulce 8 jsou vypsány průměry získaných vláken. V porovnání se zvláknováním vysokomolekulární HA jsou průměry vyšší, na druhou stranu bylo možné získat hladká vlákna bez kapiček v majoritním objemovém podílu LMW HA (Obr. 10 (1)). Pro úspěšné zvláknění nebyla nutná aplikace tak vysokého napětí jako v případě zvláknování HMW HA. Hodnoty se pohybovaly v rozmezí (27 - 32,5) kV. Pro usnadnění procesu zvláknování byla k roztokům přidána směs 1M NaCl:TRITON (1:1 v/v). Po přidání této směsi probíhalo nejlépe zvláknování právě směsi LMW HA:PEO v DIW v poměru 3:1, zvláknování probíhalo z povrchu celé kapky. Směs LMW HA:PEO v DIW v poměru 1:1 vytvořila neuniformní vlákna, s rozdílným průměrem, pohybujícím se ve vysokých hodnotách, a hrubým povrchem (Obr. 10 (2)). Důkaz přítomnosti HA v nanovlákněné vrstvě byl opět proveden pomocí FTIR. Intenzita absorbance na vlnových délkách typických pro HA byla dostatečně vysoká a je tedy možné říci, že kyselina hyaluronová je v připravených nanovlákněch přítomná v nezanedbatelném a prokazatelném množství (viz Obr. 17).

10 Závěr

Tato práce se zabývala elektrostatickým zvlákněním kyseliny hyaluronové jako přírodního polymeru s širokým využitím v tkáňovém inženýrství. V teoretické části byl objasněn princip elektrostatického zvláknění, přehled parametrů ovlivňujících výsledek a různé modifikace zařízení. Dále se práce zabývala vlastnostmi kyseliny hyaluronové a literární rešerší týkající se možností zpracování kyseliny hyaluronové metodou elektrostatického zvláknění.

Praktická část se, v návaznosti na část teoretickou, zabývá již samotnými pokusy o zvláknění kyseliny hyaluronové, a to především ve směsi s nosným polymerem PEO. Pro usnadnění procesu elektrostatického zvláknění bylo také přistoupeno ke štěpení HA - a to sice kyselé katalyzovanou hydrolýzou. Ve výsledku se tak podařilo vytvořit nanovlákněné vrstvy vysoko- i nízkomolekulární HA ve směsi s PEO. Zvláknění směsi HA/PEO, kde HA tvoří majoritní část objemového podílu (navíc hmotnostní podíl HA ve směsi lze zvýšit použitím nízkomolekulární HA), považuji za celkový přínos s ohledem na to, že zvláknění bylo provedeno z volné hladiny za použití biologicky přijatelných rozpouštědel. Za nejzajímavější z vytvořených nanovlákněných vrstev považuji vzorek G, tedy LMW HA:PEO v DIW (3:1), kde byl dosažen nejvyšší podíl HA a byla formována hladká nanovlákněná s průměrem $131,83 \pm 9,68$ nm.

Nanovlákněné vrstvy s obsahem HA považuji za materiál s potenciálem pro budoucí použití, proto se domnívám, že by bylo vhodné v práci pokračovat. Zjevně je žádoucí ověřit tvorbu těchto vrstev na zařízení Nanospider™ pro produkci vláken v průmyslovém měřítku. Vzhledem k tomu, že oba použité polymery jsou ve vodě rozpustné, bude v budoucnu nutné se zabývat také možnostmi síťování vytvořených nanovlákněných vrstev, tak aby byla zvýšena jejich stabilita při současném zachování biokompatibility.

Literární zdroje

BAILEY, F. E. Jr, 2012. *Poly (Ethylene Oxide)*. 1. vydání. Cambridge: Elsevier. ISBN 978-0-323-16059-9.

BAJÁKOVÁ, Jana, Jiří CHALOUPEK, David LUKÁŠ a Maxime LACARIN, 2011. „Drawing“ - *The production of individual nanofibers by experimental method*. Nanocon, Brno 2011.

BARHATE, R. S. a Seeram RAMAKRISHNA, 2007. Nanofibrous filtering media: Filtration problems and solutions from tiny materials. *Journal of Membrane Science* [online]. 15. 6., roč. 296, č. 1–2, s. 1–8 [vid. 2016-květen-04]. ISSN 0376-7388. Dostupné z: doi:10.1016/j.memsci.2007.03.038

BHARDWAJ, Nandana a Subhas C. KUNDU, 2010. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* [online]. 5., roč. 28, č. 3, s. 325–347 [vid. 2016-březen-30]. ISSN 0734-9750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2010.01.004

BOJIANG, Shen, Wei AIQUN, Bhargav DIVYA a kolektiv, 2010. Hyaluronan: its potential application in intervertebral disc regeneration. *ResearchGate* [online]. 1. 1., roč. 2 [vid. 2016-květen-04]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/49603711_Hyaluronan_its_potential_application_in_intervertebral_disc_regeneration

BRENNER, Eric K., Jessica D. SCHIFFMAN, Ebony A. THOMPSON, Laura J. TOTH a Caroline L. SCHAUER, 2012. Electrospinning of hyaluronic acid nanofibers from aqueous ammonium solutions. *Carbohydrate Polymers* [online]. 4. 1., roč. 87, č. 1, s. 926–929 [vid. 2016-květen-03]. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2011.07.033

BURGERT, Ladislav, Radim HRDINA, David MASEK a Vladimír VELEBNÝ, 2012. Hyaluronan fibres, method of preparation thereof and use thereof [online]. [vid. 2016-květen-05]. 2012. Dostupné z: <http://www.google.com/patents/WO2012089179A1>

- COWMAN, Mary K., Hong-Gee LEE, Kathryn L. SCHWERTFEGER, James B. MCCARTHY a Eva A. TURLEY, 2015. The Content and Size of Hyaluronan in Biological Fluids and Tissues. *Frontiers in Immunology* [online]. 2. 6., roč. 6 [vid. 2016-květen-04]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2015.00261
- ELMARCO [online], 2016. [vid. 2016-duben-28]. Dostupné z: <http://www.elmarco.cz/technologie/nanovlakna/>
- FAKHARI, Amir a Cory BERKLAND, 2013. Applications and Emerging Trends of Hyaluronic Acid in Tissue Engineering, as a Dermal Filler, and in Osteoarthritis Treatment. *Acta biomaterialia* [online]. 7., roč. 9, č. 7, s. 7081–7092 [vid. 2016-květen-06]. ISSN 1742-7061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2013.03.005
- FANUN, Monzer, 2010. *Colloids in Biotechnology*. 1. vydání. New York: CRC Press. ISBN 978-1-4398-3081-9.
- FERRI, James K. a Kathleen J. STEBE, 2000. Which surfactants reduce surface tension faster? A scaling argument for diffusion-controlled adsorption. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 1. 2., roč. 85, č. 1, s. 61–97 [vid. 2016-květen-05]. ISSN 0001-8686. Dostupné z: doi:10.1016/S0001-8686(99)00027-5
- FISCHER, Rachael L., Michael G. MCCOY a Sheila A. GRANT, 2012. Electrospinning collagen and hyaluronic acid nanofiber meshes. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* [online]. 7., roč. 23, č. 7, s. 1645–1654. ISSN 1573-4838. Dostupné z: doi:10.1007/s10856-012-4641-3
- GREINER, Andreas a Joachim H. WENDORFF, 2007. Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 23. 7., roč. 46, č. 30, s. 5670–5703 [vid. 2016-květen-04]. ISSN 1521-3773. Dostupné z: doi:10.1002/anie.200604646
- HONEGROVÁ, Barbora, 2010. *Oligosacharidy hyaluronanu a jejich biologická funkce* [online]. Praha [vid. 2016-květen-04]. Diplomová práce. Univerzita Karlova. Dostupné z: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/67457/>

HOUDEK, Michal a kolektiv, 2007. *Neuromodulace*. 1. vydání. Havlíčkův Brod: Grada Publishing a.s. ISBN 978-80-247-0429-6.

CHEN, Guangkai, Junxia GUO, Jun NIE a Guiping MA, 2016. Preparation, characterization, and application of PEO/HA core shell nanofibers based on electric field induced phase separation during electrospinning. *Polymer* [online]. 28. 1., roč. 83, s. 12–19 [vid. 2016-květen-03]. ISSN 0032-3861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2015.12.002

JIRSÁK, Oldrich, Filip SANETRŇÍK, David LUKÁŠ, Václav KOTEK, Lenka MARTINOVÁ a Jiří CHALOUPEK, 2009. Method of nanofibres production from a polymer solution using electrostatic spinning and a device for carrying out the method [online]. US7585437 B2. [vid. 2016-květen-04]. 8. září 2009. Dostupné z: <http://www.google.ca/patents/US7585437>

Jl, Yuan, Kaustabh GHOSH, Xiao Zheng SHU, Bingquan LI, Jonathan C. SOKOLOV, Glenn D. PRESTWICH, Richard A. F. CLARK a Miriam H. RAFAILOVICH, 2006. Electrospun three-dimensional hyaluronic acid nanofibrous scaffolds. *Biomaterials* [online]. 7., roč. 27, č. 20, s. 3782–3792 [vid. 2016-květen-03]. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2006.02.037

KHAJAVI, R. a M. ABBASIPOUR, 2012. Electrospinning as a versatile method for fabricating coreshell, hollow and porous nanofibers. *Scientia Iranica* [online]. 12., roč. 19, č. 6, s. 2029–2034 [vid. 2016-květen-04]. ISSN 1026-3098. Dostupné z: doi:10.1016/j.scient.2012.10.037

KIM, Taek Gyoung, Hyun Jung CHUNG a Tae Gwan PARK, 2008. Macroporous and nanofibrous hyaluronic acid/collagen hybrid scaffold fabricated by concurrent electrospinning and deposition/leaching of salt particles. *Acta biomaterialia*. roč. 4, č. 6, s. 1611–1619.

KLOUČKOVÁ, Michaela, 2014. *Příprava polymerních nanovláčkových vrstev pro biomedicínální účely*. Brno. Bakalářská práce. Masarykova univerzita.

- KOGAN, Grigorij, Ladislav SOLTÉS, Robert STERN a Peter GEMEINER, 2007. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters* [online]. 1., roč. 29, č. 1, s. 17–25. ISSN 1573-6776. Dostupné z: doi:10.1007/s10529-006-9219-z
- KONG, Ming a Hyun Jin PARK, 2011. Stability investigation of hyaluronic acid based nanoemulsion and its potential as transdermal carrier. *Carbohydrate Polymers* [online]. 30. 1., roč. 83, č. 3, s. 1303–1310 [vid. 2016-duben-28]. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2010.09.041
- KOŠŤÁKOVÁ, Eva, 2016. Parametry ovlivňující proces elektrostatického zvlákňování. Učební materiál. Liberec: Technická Univerzita v Liberci. Dostupné z: <https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/689/course/section/1112/Prezentace%202%20%28parametry%20zvlaknovaciho%20procesu%29.pdf>
- KOŠŤÁKOVÁ, Eva, 2016. Úvod do elektrostatického zvlákňování. Učební materiál. Liberec: Technická Univerzita v Liberci. Dostupné z: https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/689/course/section/267/Predn%C3%A1ska%20%206_TNA_E.Kostakova%20KNT%2CFT%2CTUL.pdf
- LI, Junxing, Aihua HE, Charles C. HAN, Dufei FANG, Benjamin S. HSIAO a Benjamin CHU, 2006. Electrospinning of Hyaluronic Acid (HA) and HA/Gelatin Blends. *Macromolecular Rapid Communications* [online]. 23. 1., roč. 27, č. 2, s. 114–120 [vid. 2016-květen-03]. ISSN 1022-1336, 1521-3927. Dostupné z: doi:10.1002/marc.200500726
- LINHARTOVÁ, Beáta, 2008. *Nanovlákná na bázi hyaluronanu*. Brno. Bakalářská práce. VUT.
- LIU, Yang, Guiping MA, Dawei FANG, Juan XU, Hongwen ZHANG a Jun NIE, 2011. Effects of solution properties and electric field on the electrospinning of hyaluronic acid. *Carbohydrate Polymers* [online]. 10. 1., roč. 83, č. 2, s. 1011–1015 [vid. 2016-květen-03]. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2010.08.061

- LI, Zhenyu a Ce WANG, 2013. Effects of Working Parameters on Electrospinning. In: *One-Dimensional nanostructures* [online]. B.m.: Springer Berlin Heidelberg, SpringerBriefs in Materials, s. 15–28 [vid. 2016-květen-04]. ISBN 978-3-642-36426-6. Dostupné z: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-36427-3_2
- LLORENS, Elena, Elaine ARMELIN, María DEL MAR PÉREZ-MADRIGAL, Luís Javier DEL VALLE, Carlos ALEMÁN a Jordi PUIGGALÍ, 2013. Nanomembranes and Nanofibers from Biodegradable Conducting Polymers. *Polymers* [online]. 17. 9., roč. 5, č. 3, s. 1115–1157 [vid. 2016-květen-04]. Dostupné z: [doi:10.3390/polym5031115](https://doi.org/10.3390/polym5031115)
- MAAREL, Johan R. C. van der, 2008. *Introduction to Biopolymer Physics*. 1. vydání. Singapore: World Scientific. ISBN 978-981-277-603-7.
- MARTIN, Charles R., 1996. Membrane-Based Synthesis of Nanomaterials. *Chemistry of Materials* [online]. 1. 1., roč. 8, č. 8, s. 1739–1746 [vid. 2016-květen-04]. ISSN 0897-4756. Dostupné z: [doi:10.1021/cm960166s](https://doi.org/10.1021/cm960166s)
- MAZÁNEK, Jiří a kolektiv, 2014. *Zubní lékařství: Propedeutika*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing a.s. ISBN 978-80-247-8679-7.
- MICHLÍČEK, Miroslav, 2013. *Plazmochemická depozice vrstev ze směsi hexametyldisiloxanu a argonu na polymerní nanovlákná* [online]. Brno. Bakalářská práce. Masarykova univerzita. Dostupné z: http://is.muni.cz/th/380147/prif_b/bcthesisMM.pdf
- NANOPHARMA [online], 2016. 5. únor 2016. Dostupné z: <http://www.nanopharma.cz/cs/produkty-a-technologie/materialy>
- NAVRÁTILOVÁ, Zuzana, 2007. *Mikrofibrilárně vyztužené polymerní směsi*. Zlín. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.
- NECAS J., L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER a KOLAR J., 2008. *Hyaluronic acid (hyaluronan): a review*. 53.8: 397-411 2008. Brno.: Veterinarni medicina.

NORMAN, James J. a Tejal A. DESAI, 2006. Methods for Fabrication of Nanoscale Topography for Tissue Engineering Scaffolds. *Annals of Biomedical Engineering* [online]. 9. 3., roč. 34, č. 1, s. 89–101 [vid. 2016-květen-04]. ISSN 0090-6964, 1573-9686. Dostupné z: doi:10.1007/s10439-005-9005-4

PEŇÁZOVÁ, Jana, 2009. *Výroba 3D nanovlákných vrstev a struktur pro medicínu: Production of 3D nanofiber layers and structures for medical*. Liberec. Technická univerzita v Liberci.

PETRÁŠ, David, Dušan KIMMER, Karel SOUKUP a Petr KLUSOŇ, 2009. *Bezpečná nanovlákná*. 103):1009 2009. Chem Listy.

RAMAKRISHNA, Seeram, 2005. *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*. 1. vydání. Singapore: World Scientific. ISBN 978-981-256-415-3.

RENEKER, Darrell H., Alexander L. YARIN, Hao FONG a Sureporn KOOMBHONGSE, 2000. Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. *Journal of Applied Physics* [online]. roč. 87, č. 9, s. 4531 [vid. 2016-květen-04]. ISSN 00218979. Dostupné z: doi:10.1063/1.373532

RUYS, Andrew J., 2013. *Biomimetic Biomaterials: Structure and Applications*. 1. vydání. Cambridge: Elsevier. ISBN 978-0-85709-888-7.

RYSOVÁ, Miroslava, 2012. *Příprava podpurných tkáňových struktur z funkcionalizovaných biopolymerů: Preparation of scaffolds from functionalized biopolymers [CD-ROM]*. 2012. Liberec: Technická univerzita v Liberci.

SEKANINOVÁ, Jana, 2014. *Studium přípravy a struktury nanovláken anorganických a organických biomateriálů*. Diplomová práce. 2014. Brno: Vysoké učení technické v Brně.

SCHIFFMAN, Jessica D. a Caroline L. SCHAUER, 2008. A Review: Electrospinning of Biopolymer Nanofibers and their Applications. *Polymer Reviews* [online]. 1. 5., roč. 48, č. 2, s. 317–352 [vid. 2016-květen-04]. ISSN 1558-3724. Dostupné z: doi:10.1080/15583720802022182

SIGMA-ALDRICH [online], 2016. [vid. 2016-květen-04] Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/181986?lang=en®ion=CZ>

- SODOMKA, Lubomír, 2009. Jednoduché teoretické úvahy ke zvlákňování nanovláken. roč. Nanocon.
- SUBBIAH, Thandavamoorthy, G. S. BHAT, R. W. TOCK, S. PARAMESWARAN a S. S. RAMKUMAR, 2005. Electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 15. 4., roč. 96, č. 2, s. 557–569 [vid. 2016-květen-04]. ISSN 1097-4628. Dostupné z: doi:10.1002/app.21481
- SYKÁČKOVÁ, Pavla, 2014. *Vliv hydrofilních/hydrofobních úprav nanovláčkových tkáňových nosičů na buněčnou adhezi: Influence of hydrophilic/hydrophobic properties of nanofibrous scaffolds on cell adhesion*. Bakalářská práce. Liberec: Technická univerzita v Liberci.
- ŠIRC, Jakub, Radka HOBZOVÁ, Nina KOSTINA, Marcela MUNZAROVÁ, Martina JUKLÍČKOVÁ, Miloslav LHOTKA, Šárka KUBINOVÁ, Alena ZAJÍCOVÁ a Jiří MICHÁLEK, 2012. Morphological Characterization of Nanofibers: Methods and Application in Practice. *Journal of Nanomaterials, Journal of Nanomaterials* [online]. 1. 11., roč. 2012, 2012, s. e327369 [vid. 2016-květen-04]. ISSN 1687-4110, 1687-4110. Dostupné z: doi:10.1155/2012/327369, 10.1155/2012/327369
- TØMMERAAS, Kristoffer a Claes MELANDER, 2008. Kinetics of Hyaluronan Hydrolysis in Acidic Solution at Various pH Values. *Biomacromolecules* [online]. 1. 6., roč. 9, č. 6, s. 1535–1540 [vid. 2016-květen-04]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm701341y
- UM, In Chul, Dufei FANG, Benjamin S. HSIAO, Akio OKAMOTO a Benjamin CHU, 2004. Electro-spinning and electro-blowing of hyaluronic acid. *Biomacromolecules*. roč. 5, č. 4, s. 1428–1436.
- VAJTAI, Robert, 2013. *Springer Handbook of Nanomaterials*. 1. vydání. Berlín: Springer Science & Business Media. ISBN 978-3-642-20595-8.
- VASITA, Rajesh a Dhirendra S KATTI, 2006. Nanofibers and their applications in tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 3., roč. 1, č. 1, s. 15–30 [vid. 2016-květen-04]. ISSN 1176-9114. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2426767/>

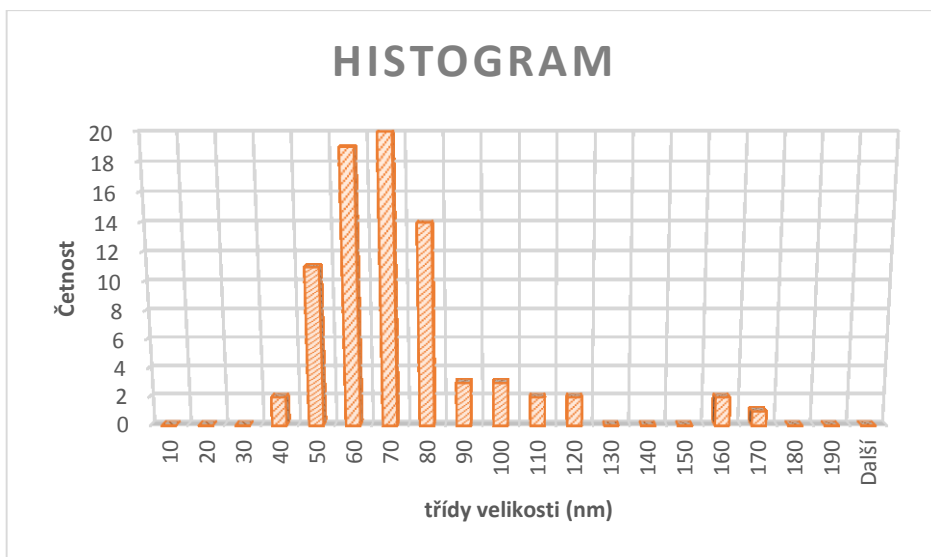
- VELEBNÝ, Vladimír, 2012. *Hyaluronan – biopolymer pro tkáňové inženýrství*. Brno. Teze habilitační práce. Vysoké učení technické v Brně.
- VODIČKOVÁ, Věra, 2016a. Elektronová mikroskopie 1. Učební materiál. Liberec: Technická univerzita v Liberci. Dostupné z: https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/157/mod_resource/content/3/MNI_2_elmi%20I.pdf
- VODIČKOVÁ, Věra, 2016b. Vybrané metody spektrální analýzy. Učební materiál. Liberec: Technická univerzita v Liberci. Dostupné z: https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/3550/mod_resource/content/1/MNI_8_SpektroII_N.pdf
- VODRÁŽKA, Zdeněk, 1969. *Biopolymery*. 1. vydání. Praha: Ústav makromolekulární chemie ČSAV.
- YANG, Xia, 2014. *Multi-functional Hyaluronan Based Biomaterials for Biomedical Applications*. B.m. Dizertační práce. Uppsala University.
- YOUNG, DENICE SHANETTE, 2006. *Hyaluronic Acid-based Nanofibers via Electrospinning*. Raleigh: North Carolina State University.
- ZHANG, Chunxue, Xiaoyan YUAN, Lili WU, Yue HAN a Jing SHENG, 2005. Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats. *European Polymer Journal* [online]. 3., roč. 41, č. 3, s. 423–432 [vid. 2016-květen-04]. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2004.10.027

Přílohy

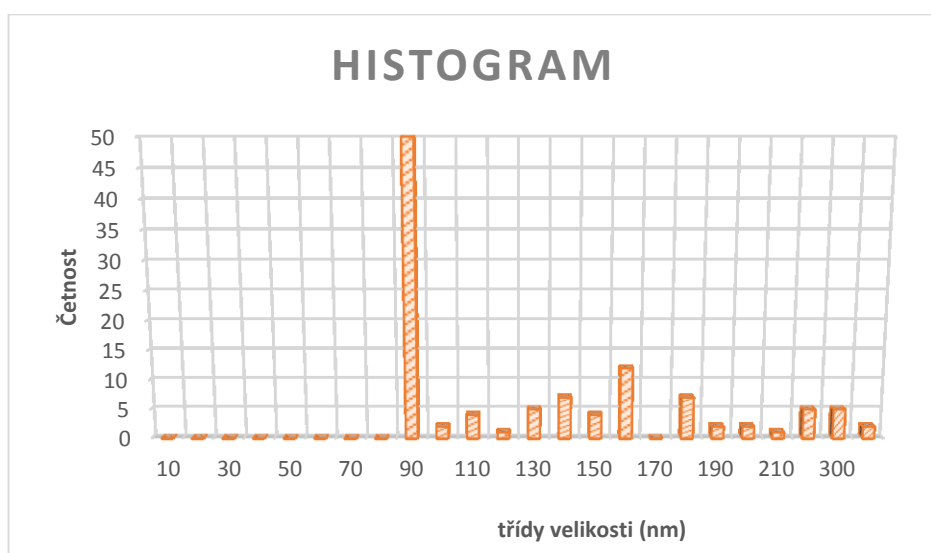
Přílohová část obsahuje histogramy četnosti naměřených průměrů vyrobených nanovláken.

Seznam obrázků

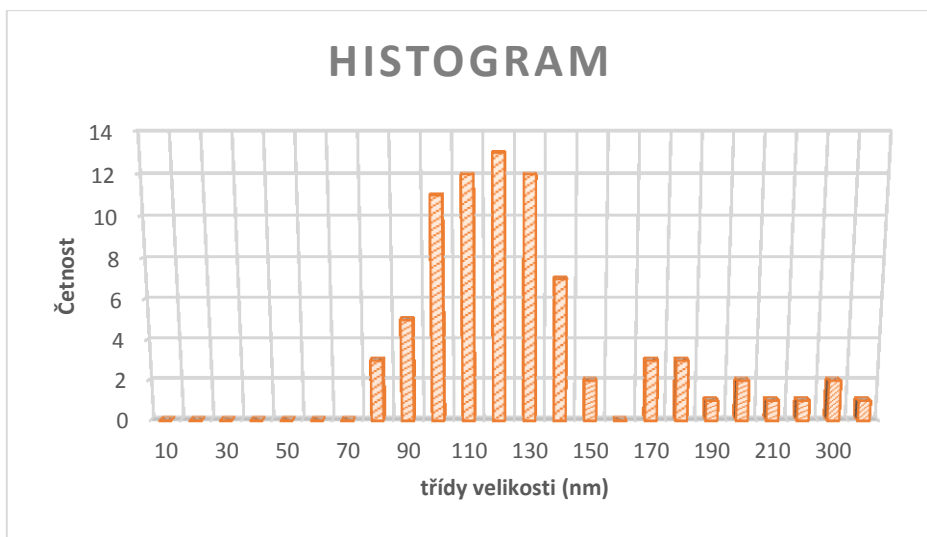
<i>Obrázek A 1 - Histogram četnosti průměru vzorek A</i>	60
<i>Obrázek A 2 Histogram četnosti průměru vzorek B</i>	60
<i>Obrázek A 3 - Histogram četnosti průměru vzorek C</i>	61
<i>Obrázek A 4 - Histogram četnosti průměru vzorek D</i>	61
<i>Obrázek A 5 - Histogram četnosti průměru vzorek E</i>	62
<i>Obrázek A 6 - Histogram četnosti průměru vzorek F</i>	62
<i>Obrázek A 7 - Histogram četnosti průměru vzorek G</i>	63
<i>Obrázek A 8 - Histogram četnosti průměru vzorek H</i>	63
<i>Obrázek A 9 - Histogram četnosti průměru vzorek I</i>	64



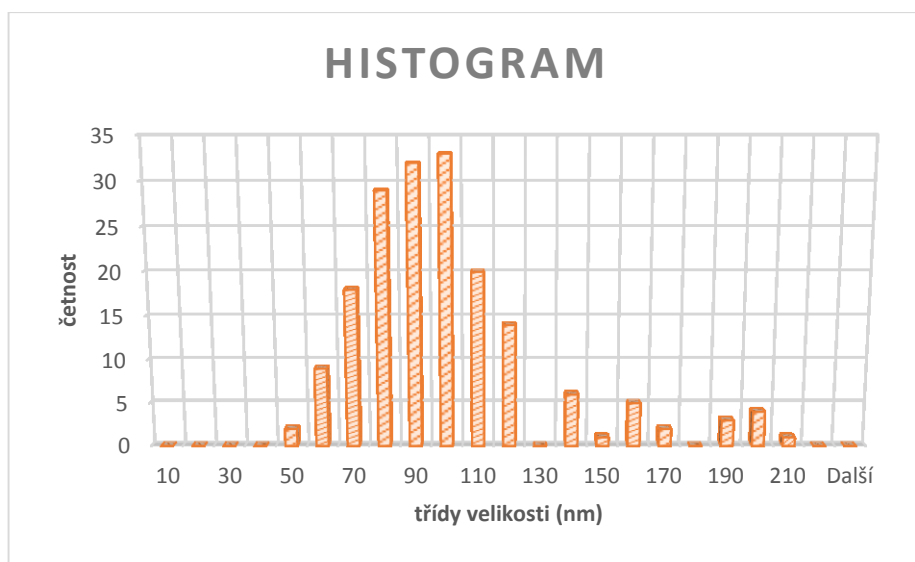
Obrázek A 1 - Histogram četnosti průměru vzorek A



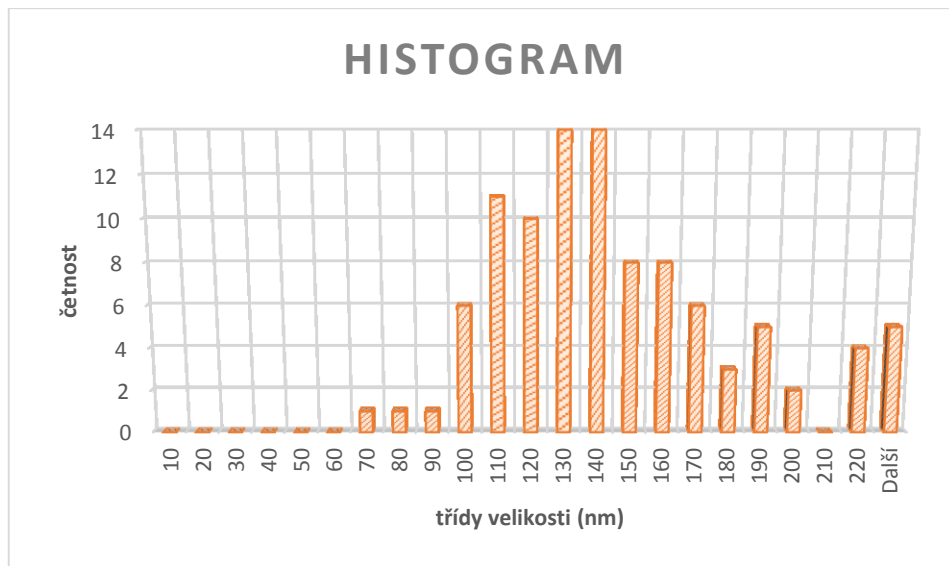
Obrázek A 2 Histogram četnosti průměru vzorek B



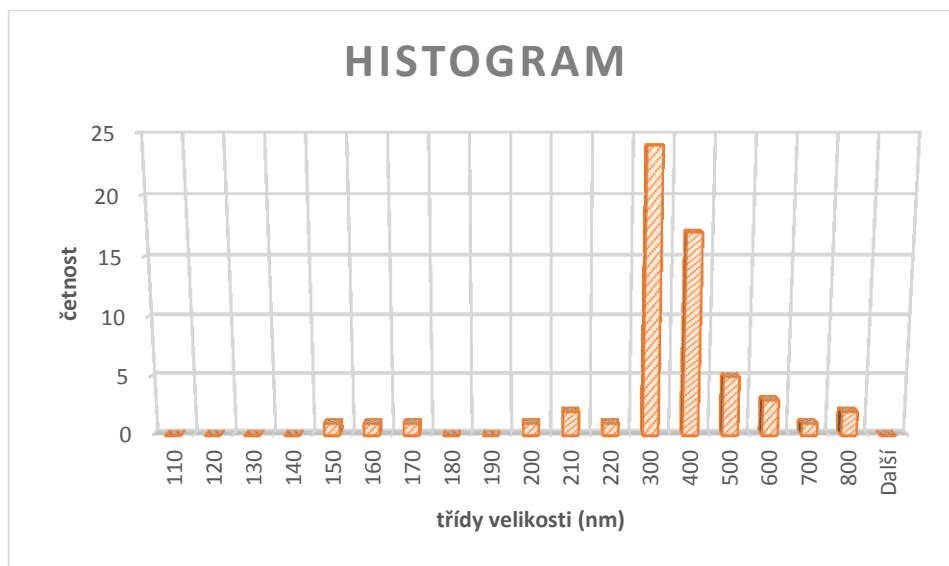
Obrázek A 3 - Histogram četnosti průměru vzorek C



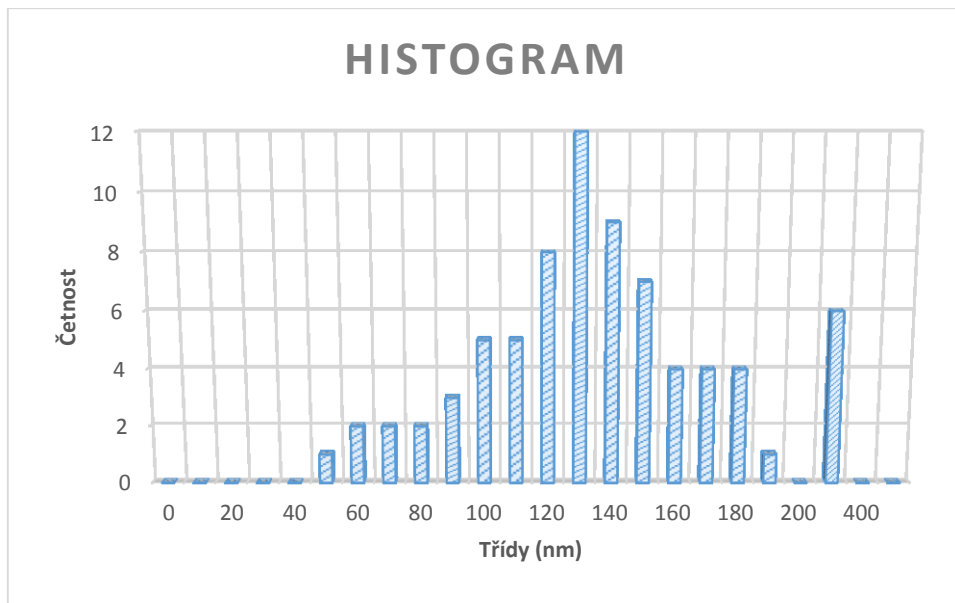
Obrázek A 4 - Histogram četnosti průměru vzorek D



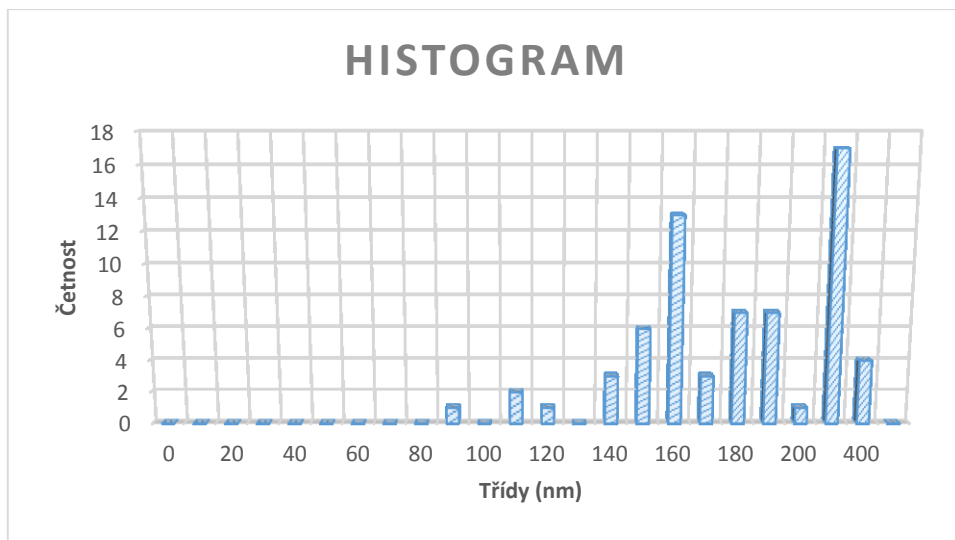
Obrázek A 5 - Histogram četnosti průměru vzorek E



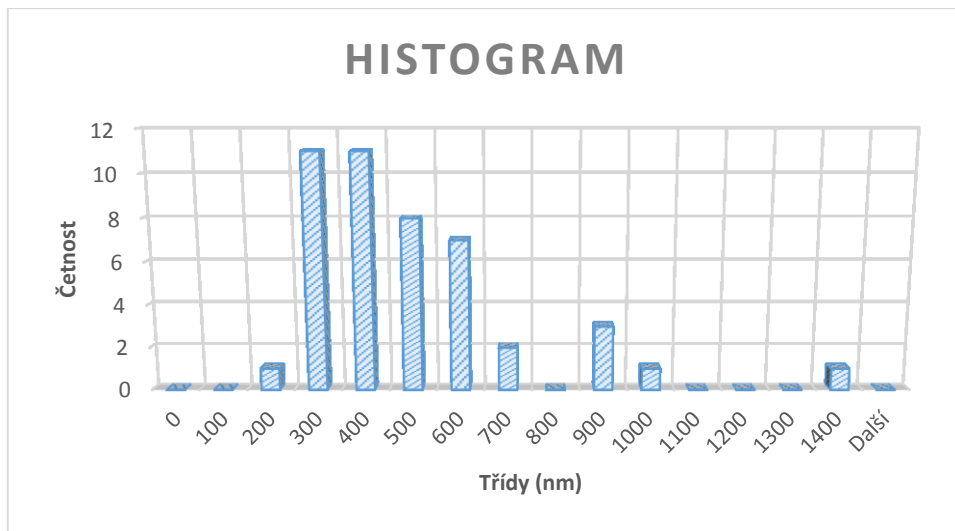
Obrázek A 6 - Histogram četnosti průměru vzorek F



Obrázek A 7 - Histogram četnosti průměru vzorek G



Obrázek A 8 - Histogram četnosti průměru vzorek H



Obrázek A 9 - Histogram četnosti průměru vzorek I