



Bakalářská práce

Studium tepelné stabilizace nanovláknenných materiálů z polyvinylalkoholu s inkorporovaným lipofosfonoxinem

Studijní program:

B0719A130001 Nanotechnologie

Autor práce:

Roman Janků

Vedoucí práce:

doc. Ing. Věra Jenčová, Ph.D.

Katedra chemie

Konzultant práce:

Ing. Maxim Lisnenko

Katedra chemie

Liberec 2024



Zadání bakalářské práce

Studium tepelné stabilizace nanovláknenných materiálů z polyvinylalkoholu s inkorporovaným lipofosfonoxinem

<i>Jméno a příjmení:</i>	Roman Janků
<i>Osobní číslo:</i>	M21000077
<i>Studijní program:</i>	B0719A130001 Nanotechnologie
<i>Zadávací katedra:</i>	Katedra chemie
<i>Akademický rok:</i>	2023/2024

Zásady pro vypracování:

1. Vypracování rešerše na dané téma
2. Příprava nanovláknenných materiálů DC elektrickým zvlákňováním
3. charakteristika vstupních materiálů (hodnocení morfologie (SEM), chemické složení (FTIR))
4. Tepelná stabilizace připravených vzorků v teplotním intervalu 120°C – 150°C
5. Analýza vlivu tepelné stabilizace na vlastnosti studovaných materiálů (morfologie, chemické složení (FTIR), rozpustnost PVA a uvolňování inkorporované látky (spektrofotometrie))
6. Vyhodnocení výsledků

Rozsah grafických prací: dle potřeby dokumentace
Rozsah pracovní zprávy: 50 stran
Forma zpracování práce: tištěná/elektronická
Jazyk práce: čeština

Seznam odborné literatury:

1. Do Pham, D.D., Jenčová, V., Kaňuchová, M., Bayram, J., Grossová, I., Šuca, H., Urban, L., Havlíčková, K., Novotný, V., Mikeš, P., Mojr, V., Asatiani, N., Košťáková, E.K., Maixnerová, M., Vlková, A., Vítovská, D., Šanderová, H., Nemeč, A., Krásný, L., Zajíček, R., Lukáš, D., Rejman, D., Gál, P., 2021. Novel lipophosphonoxin-loaded polycaprolactone electrospun nanofiber dressing reduces Staphylococcus aureus induced wound infection in mice. Sci Rep 11, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96980-7>
2. Koprivova, B., Lisnenko, M., Solarska-Sciuk, K., Prochazkova, R., Novotny, V., Mullerova, J., Mikes, P., Jencova, V., 2020. Large-scale electrospinning of poly (vinylalcohol) nanofibers incorporated with platelet-derived growth factors. Express Polymer Letters 14, 987–1000. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2020.80>
3. Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E., 2012. Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. Academic Press.
4. Zhang, Q., Li, Y., Lin, Z.Y. (William), Wong, K.K.Y., Lin, M., Yildirimer, L., Zhao, X., 2017. Electrospun polymeric micro/nanofibrous scaffolds for long-term drug release and their biomedical applications. Drug Discovery Today 22, 1351–1366. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.05.007>

Vedoucí práce: doc. Ing. Věra Jenčová, Ph.D.
Katedra chemie

Konzultant práce: Ing. Maxim Lisnenko
Katedra chemie

Datum zadání práce: 11. září 2023

Předpokládaný termín odevzdání: 14. května 2024

L.S.

prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D.
děkan

prof. Ing. Josef Šedlbauer, Ph.D.
garant studijního programu

Prohlášení

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

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

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

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

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

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

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

Studium tepelné stabilizace nanovláknenných materiálů z polyvinylalkoholu s inkorporovaným lipofosfonoxinem

Abstrakt

V posledních desetiletích se výzkum a vývoj zaměřují na inovativní řešení v oblasti léčby kožních ran, přičemž značná pozornost je věnována polymerním nanovláknenným materiálům díky jejich jedinečným vlastnostem, jako je schopnost napodobovat extracelulární matrix. Tyto materiály nabízejí značný potenciál pro začlenění různých bioaktivních látek, včetně nových typů antibiotik, což z nich činí ideální kandidáty pro vytváření funkčních krytů kožních ran. Jednou z hlavních výzev je však kontrolované uvolňování těchto aktivních látek, aby se zabránilo jejich rychlému ztracení a zároveň se udržela efektivní koncentrace na místě aplikace. Tato bakalářská práce se zaměřuje na vývoj a charakterizaci nanovláknenných materiálů na bázi polyvinylalkoholu (PVA) funkcionalizovaných lipofosfonoxinem s cílem zlepšit jejich tepelnou stabilizaci a prodloužit uvolňování aktivních látek. Vzhledem k rostoucímu zájmu o použití polymerních nanovláknenných materiálů pro pokročilé ošetřování kožních ran, které nabízí výhody díky své schopnosti postupně uvolňovat terapeutické látky, se tato práce soustředí na překonání hlavních výzev spojených s rychlým uvolňováním inkorporovaných látek. Tepelná stabilizace byla prozkoumána jako klíčová metoda pro zlepšení fyzikálně-chemických vlastností materiálu, což umožňuje kontrolované uvolňování lipofosfonoxinu. Pro funkční modifikaci nanovláken byl využit experimentální typ antibiotika lipofosfonoxin DR6180 (LPPO). V procesu vytváření nanovláknenných materiálů metodou elektrostatického zvlákňování byl upřednostněn polyvinylalkohol (PVA) s výrazně vysokým stupněm hydrolyzy (98–98,8 %) a molekulovou hmotností 125 000 g/mol. Byly vytvořeny dvě varianty nanovláknenných materiálů – jedna bez přídavku LPPO a druhá s inkorporací LPPO. Tyto materiály byly následně vystaveny procesu tepelné stabilizace (heat treatment, HT) při specifických teplotách v rozmezí 120–150 °C po dobu jedné hodiny. Z analýzy uvolňování LPPO vyplývá, že HT neměla vliv na zpomalení uvolňování LPPO z materiálů. U experimentálního antibiotika LPPO došlo k efektu okamžitého uvolnění (“burst release“) po styku materiálu s vodným prostředím. Stabilizace za pomoci vysokých teplot neovlivnila množství uvolněného LPPO, jelikož se procentuální množství uvolněného LPPO pohybovalo v rozmezí ± 4 až 7 % v porovnání s nestabilizovaným materiálem. Tyto výsledky naznačují, že snížení celkového množství uvolněného LPPO může být také důsledkem jeho degradace ve vodném prostředí.

Klíčová slova

polyvinylalkohol, lipofosfonoxiny, nanovláknenné materiály, tkáňové inženýrství, tepelná stabilizace

Study of thermal stabilization of polyvinyl alcohol nanofibrous materials with incorporated lipophosphonoxine

Abstract

In recent decades, research and development have focused on innovative solutions in the field of skin wound treatment, with considerable attention being paid to polymeric nanofibrous materials due to their unique properties, such as the ability to mimic the extracellular matrix. These materials offer significant potential for incorporating various bioactive substances, including new types of antibiotics, making them ideal candidates for creating functional skin wound dressings. One of the main challenges, however, is the controlled release of these active substances to prevent their rapid loss while maintaining an effective concentration at the application site. This bachelor's thesis focuses on the development and characterization of polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous materials functionalized with lipophosphonoxime to improve their thermal stabilization and prolong the release of active substances. Given the growing interest in the use of polymeric nanofibrous materials for advanced skin wound care, which offers benefits due to their ability to gradually release therapeutic substances, this work focuses on overcoming the main challenges associated with the rapid release of incorporated substances. Thermal stabilization was explored as a key method for improving the physicochemical properties of the material, enabling controlled release of lipophosphonoxime. For the functional modification of the nanofibers, an experimental type of antibiotic, lipophosphonoxime DR6180 (LPPO), was used. In the process of creating nanofibrous materials by electrostatic spinning, polyvinyl alcohol (PVA) with a markedly high degree of hydrolysis (98–98.8%) and a molecular weight of 125,000 g/mol was preferred. Two variants of nanofibrous materials were produced – one without the addition of LPPO and another with the incorporation of LPPO. These materials were subsequently subjected to a thermal stabilization (HT) process at specific temperatures ranging from 120–150 °C for a duration of one hour. The analysis of LPPO release indicates that HT did not affect the slowing down of LPPO release from the materials. For the experimental antibiotic LPPO, a burst release effect occurred upon contact of the material with an aqueous environment. Stabilization using high temperatures did not affect the amount of LPPO released, as the percentage of LPPO released ranged from ± 4 to 7% compared to the non-stabilized material. These results suggest that the reduction in the overall amount of LPPO released may also be a consequence of its degradation in the aqueous environment.

Keywords

Polyvinylalcohol, lipophosphonoxins, nanofibrous materials, tissue engineering, heat treatment

Poděkování

Své poděkování bych chtěl zejména věnovat své vedoucí bakalářské práce, doc. Ing. Věře Jenčové Ph.D., za její cenné připomínky, rady, a především její odborné vedení při vypracovávání mé práce a čas, jenž mi byl z její strany věnován po celou dobu mého studia. Mé poděkování si rovněž zaslouží Ing. Maxim Lisnenko za jeho odbornou pomoc a ochotu při experimentální části prováděné v průběhu mé práce. Mé díky patří také Ing. Luboši Běhálkovi, Ph.D., za provedení analýzy diferenciální skenovací kalorimetrií a Ing. Janě Müllerové, Ph.D., za realizaci analýzy infračervenou spektroskopii.

Mimořádné poděkování si zaslouží servisní služby poskytnuté velkou výzkumnou infrastrukturou NanoEnviCz (Projekt č. LM2023066) podporovanou MŠMT ČR, která umožnila realizaci výše zmíněných analýz. Poděkování také patří nástroji umělé inteligence GPT-4 za pomoc při editaci textu. Nakonec bych rád vyjádřil vděčnost své rodině a přátelům za jejich neocenitelnou podporu a povzbuzení, nejenom při psaní bakalářské práce, ale během celého mého studia.

Obsah

Úvod	15
1 Teoretická část	16
1.1 Kožní tkáňové inženýrství	16
1.2 Materiály v tkáňovém inženýrství	18
1.3 Využití nanovláknenných materiálů	19
1.4 Nanovláknenné materiály a jejich výroba	20
1.5 Funkcionalizace nanovláknenných materiálů.....	21
1.6 Různé typy systémů cílené dopravy léčiv	22
1.7 Polymery používané v tkáňovém inženýrství.....	24
1.8 Stabilizace PVA	28
1.9 Biologicky aktivní látky v tkáňovém inženýrství.....	30
2 Praktická část	33
2.1 Použité chemikálie a roztoky	33
2.2 Použité přístroje a programy.....	34
2.3 Použité metody a postupy	35
2.4 Tepelná stabilizace nanovláknenných materiálů.....	36
2.5 Analýza morfologie materiálů pomocí elektronové mikroskopie	37
2.6 Analýza rozpustnosti PVA a uvolňování aktivní látky pomocí spektrofotometrie ..	37
2.7 Analýza chemických a strukturních změn materiálů pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací	41
2.8 Analýza krystalinity materiálů pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie	41
3 Výsledky a diskuze	43
3.1 Příprava a charakteristika nanovláknenných materiálů z PVA a PVA + LPPO	43
3.2 Tepelná stabilizace nanovláknenného materiálu z PVA a PVA + LPPO	45
Závěr	56
Použitá literatura	57
Přílohy	64

Seznam obrázků

OBRÁZEK 1.1: SCHÉMA STAVBY POKOŽKY; PŘEVZATO A UPRAVENO PODLE [2]	16
OBRÁZEK 1.2: ČTYŘI FÁZE HOJENÍ RÁNY - KAŽDÁ FÁZE JE CHARAKTERIZOVÁNA KOORDINOVANÝMI KLÍČO-VÝMI MOLEKULÁRNÍMI A BUNĚČNÝMI UDÁLOSTMI, KTERÉ ZAJIŠŤUJÍ SPRÁVNOU REAKCI NA HOJENÍ RÁNY PŘEVZATO Z [10]	17
OBRÁZEK 1.3: PROCES UVOLNĚNÍ INKORPOVANÉ LÁTKY A METODY JEJÍ FUNKCIONALIZACE DLE ZPŮSOBU PŘÍPRAVY (A) POVRCHOVOU MODIFIKACÍ, (B) ZVLÁKŇOVÁNÍM ZE SMĚSI, (C) KOAXIÁLNÍM ZVLÁKŇOVÁNÍM (D) A EMULZNÍM ZVLÁKŇOVÁNÍM; PŘEVZATO A UPRAVENO PODLE [35]	22
OBRÁZEK 1.4: VZOREC STRUKTURY PVA Z ČÁSTI HYDROLYZOVANÉHO (A) A ÚPLNĚ (B) PŘEVZATO Z [60]	27
OBRÁZEK 1.5: ÚČINEK TEPELNÉ STABILIZACE NA PVA – TVORBA ETHEROVÝCH MŮSTKŮ PŘEVZATO Z [60]	29
OBRÁZEK 1.6: ÚČINEK TEPELNÉ STABILIZACE NA PVA – TVORBA CYKlickÝCH ACETALOVÝCH A KETALOVÝCH STRUKTUR MEZI PVA A OKYSLIČOVÁNÍ OXIDACE HYDROXYLOVÝCH SKUPIN PŘEVZATO Z [60]	30
OBRÁZEK 1.7: DVĚ GENERACE LPPO (A) PRVNÍ A (B) DRUHÁ A VZORCE JEJICH PŘEVZATO A UPRAVENO PODLE [60]	31
OBRÁZEK 2.1: KALIBRAČNÍ KŘIVKA PVA PRO 10-TI NÁSOBNÉ ŘEDĚNÍ (ABSORBANCE SVĚTLA PŘI 630 NM ZÁVISLÁ NA KONCENTRACI POLYVINYLALKOHOLU V MG/ML)	38
OBRÁZEK 2.2: KALIBRAČNÍ KŘIVKA PVA PRO 20-TI NÁSOBNÉ ŘEDĚNÍ (ABSORBANCE SVĚTLA PŘI 630 NM ZÁVISLÁ NA KONCENTRACI POLYVINYLALKOHOLU V MG/ML)	39
OBRÁZEK 2.3: KŘIVKA KALIBRACE LIPOPHOSPHONOXINU (ABSORBANCE SVĚTLA PŘI 260 NM ZÁVISLÁ NA KONCENTRACI LIPOPHOSPHONOXINU V μ G/ML)	40
OBRÁZEK 2.4: KALIBRAČNÍ KŘIVKA POLYVINYLALKOHOLU PRO OBLAST UV ZÁŘENÍ (ABSORBANCE SVĚTLA PŘI 260 NM ZÁVISLÁ NA KONCENTRACI PVA V MG/ML)	41
OBRÁZEK 3.1: SNÍMKY PVA NANOVLÁKEN BEZ A S OBSAHEM LIPOPHOSPHONOXINU ZE SEM (MĚŘÍTKO STANOVENO 10 μ M) SPOLU S DISTRIBUCÍ PRŮMĚRŮ VLÁKEN ZANESENÉ DO HISTOGRAMU	44
OBRÁZEK 3.2: FTIR METODA ANALÝZY: SPEKTUM INFRAČERVENÉ SLOŽKY SVĚTLA PVA NANOVLÁKEN, PVA+LPPO NANOVLÁKEN BEZ HT A POUŽITÉHO LPPO DR6180 (LPPO)	45
OBRÁZEK 3.3: GRAF UKAZUJÍCÍ STOUPAJÍCÍ ROZPUŠTĚNÍ PVA (ZOBRAZENO V % ÚHRNNÉ VÁHY VZORKU) Z PVA NANOVLÁKEN ZÁVISLÉ NA ČASE ROZPUŠTĚNÍ – SROVNÁNÍ ÚČINKU TEPLoty HT NA STABILITU ZVLÁKNĚNÉHO POLYVINYLALKOHOLU	51
OBRÁZEK 3.4: GRAF UKAZUJÍCÍ STOUPAJÍCÍ ROZPUŠTĚNÍ PVA (ZOBRAZENO V % ÚHRNNÉ VÁHY VZORKU) Z PVA NANOVLÁKEN SE ZAČLENĚNÝM LIPOPHOSPHONOXINEM ZÁVISLÉ NA ČASE ROZPUŠTĚNÍ – SROVNÁNÍ ÚČINKU TEPLoty HT NA STABILITU ZVLÁKNĚNÉHO POLYVINYLALKOHOLU SE ZAČLENĚNÝM LIPOPHOSPHONOXINEM	52

OBRÁZEK 3.5: GRAF UKAZUJÍCÍ STOUPAJÍCÍ UVOLŇOVÁNÍ LIPOPHOSPHONOXINEM (ZOBRAZENO V % ÚHRNNÉ VÁHY VZORKU) Z PVA NANOVLÁKEN SE ZAČLENĚNÝM LIPOPHOSPHONOXINEM ZÁVISLÉ NA ČASE UVOLŇOVÁNÍ – SROVNÁNÍ ÚČINKU TEPLoty HT NA STABILITU ZVLÁKNĚNÉHO POLYVINYLALKOHOLU	53
OBRÁZEK 3.6: FTIR METODA ANALÝZY: SPEKTRUM INFRAČERVENÉ SLOŽKY SVĚTLA PVA A PVA +LPPO NANOVLÁKEN, KTERÉ BYLY TEPELNĚ STABILIZOVÁNY	54
OBRÁZEK 3.7: GRAFICKÉ ZOBRAZENÍ ZMĚNY KRYSTALINITY PVA NANOVLÁKEN BEZ I S LPPO PODROBENÝCH HT	55
OBRÁZEK 3.8: ANALÝZA KRYSTALINITY POMOCÍ DSC PRO PVA	64
OBRÁZEK 3.9: ANALÝZA KRYSTALINITY POMOCÍ DSC PRO PVA 120 °C	64
OBRÁZEK 3.10: ANALÝZA KRYSTALINITY POMOCÍ DSC PRO PVA 130 °C	65
OBRÁZEK 3.11: ANALÝZA KRYSTALINITY POMOCÍ DSC PRO PVA 140 °C	65
OBRÁZEK 3.12: ANALÝZA KRYSTALINITY POMOCÍ DSC PRO PVA 150 °C	66
OBRÁZEK 3.13: ANALÝZA KRYSTALINITY POMOCÍ DSC PRO PVA + LPPO	66
OBRÁZEK 3.14: ANALÝZA KRYSTALINITY POMOCÍ DSC PRO PVA + LPPO 120 °C	
OBRÁZEK 3.15: ANALÝZA KRYSTALINITY POMOCÍ DSC PRO PVA + LPPO 130 °C	
OBRÁZEK 3.16: ANALÝZA KRYSTALINITY POMOCÍ DSC PRO PVA + LPPO 140 °C	67
OBRÁZEK 3.17: ANALÝZA KRYSTALINITY POMOCÍ DSC PRO PVA + LPPO 150 °C	68

Seznam tabulek

TABULKA 1.1: SEZNAM DŮLEŽITÝCH POLYMERŮ VYSKYTUJÍCÍCH SE V PŘÍRODĚ.....	24
TABULKA 2.1: SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLÍ.....	33
TABULKA 2.2: SEZNAM POUŽITÝCH ROZTOKŮ	33
TABULKA 2.3: SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ A PROGRAMŮ	34
TABULKA 2.4: NASTAVENÍ ZAŘÍZENÍ NA VÝROBU POLYVINYLALKOHOLOVÝCH NANOVLÁKEN	35
TABULKA 2.5: NASTAVENÍ ZAŘÍZENÍ NA VÝROBU POLYVINYLALKOHOLOVÝCH NANOVLÁKEN S LPPO	36
TABULKA 3.1: TEPELNĚ NESTABILIZOVANÉ NANOVLÁKENNÉ MATERIÁLY A JEJICH STŘEDNÍ PRŮMĚRY VLÁKEN.....	43
TABULKA 3.2: TEPELNĚ STABILIZOVANÉ NANOVLÁKENNÉ MATERIÁLY A JEJICH STŘEDNÍ PRŮMĚRY VLÁKEN.....	46
TABULKA 3.3: SNÍMKY PVA NANOVLÁKEN ZE SEM (MĚŘÍTKO STANOVENO NA 10 μM) SPOLU S DISTRIBUCÍ PRŮMĚRŮ VLÁKEN ZANESENÉ DO HISTOGRAMŮ	47
TABULKA 3.4: SNÍMKY PVA NANOVLÁKEN S OBSAHEM LPPO ZE SEM (MĚŘÍTKO STANOVENO NA 10 μM) SPOLU S DISTRIBUCÍ PRŮMĚRŮ VLÁKEN ZANESENÉ DO HISTOGRAMŮ.....	49

Seznam zkratek

PVA	Polyvinylalkohol
LPPO	Lipofosfonoxin
PBS	Fosfátový pufr
HT	Tepelná stabilizace (heat treatment)
ECM	Extracelulární matrix
ELP	Elastinové polypeptidy
HA	Kyselina hyaluronová
PGA	Polyglykolová kyselina
PLA	Polylaktidová kyselina
PLGA	Poly(laktid-co-glykolid)
PDLLA	Poly (DL-laktidová kyselina)
PEG	Polyethylenglykol
PCL	Polycaprolakton
PDMS	Polydimethylsiloxan
PET	Polyethylentereftalát
PES	Polyethersulfan
PS	Polystyren
PVAc	Polyvinylacetát
hm%	Hmotnostní procenta
DH	Stupeň hydrolyzy (degree of hydrolysis)
AWD	Aktivní obvaz (active wound dressing)
LPS	Lipopolysacharidy
AV ČR	Akademie věd České republiky
CXI	Ústav pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace
DSC	Diferenciální skenovací kalorimetrie
FS	Fakulta strojní
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
SD	Směrodatná odchylka
TI	Tkáňové inženýrství
TUL	Technická univerzita v Liberci

Úvod

V průběhu posledních desetiletí se nanotechnologie staly klíčovou součástí vědeckého výzkumu a průmyslového vývoje, přičemž nanomateriály nalézají uplatnění v mnoha odvětvích od elektroniky po medicínu. Jedním z přelomových směrů je jejich využití v oblasti tkáňového inženýrství, které si klade za cíl vyvinout inovativní materiály pro opravu a regeneraci poškozených tkání a orgánů. Speciální pozornost je věnována kožnímu tkáňovému inženýrství, které se soustředí na vyvíjení řešení pro léčbu chronických a obtížně se hojících ran, což je problém, který představuje značnou finanční zátěž pro zdravotnické systémy po celém světě. Vývoj nových typů kožních náhrad a obvazů, které by nejen podporovaly rychlé a efektivní hojení ran, ale také by minimalizovaly riziko infekcí, je proto klíčový. Mezi nejperspektivnější materiály v tomto směru patří polymerní nanovláknenné materiály, které díky svým unikátním vlastnostem, jako je například strukturní podobnost s extracelulární hmotou, vysoká porozita a schopnost inkorporace a kontrolovaného uvolňování bioaktivních látek, představují ideální kandidáty pro výrobu pokročilých obvazů. Tyto vlastnosti jim umožňují efektivně napodobovat přirozené prostředí tkáně, což je zásadní pro podporu regenerace a hojení. Avšak, s využitím těchto materiálů souvisí i určité výzvy, především rychlé uvolňování inkorporovaných aktivních látek do vodného prostředí, což může vést k předčasnému ztracení terapeutického účinku. Tento jev, často označovaný pod názvem “burst release“, se můžeme pokusit zmírnit vylepšením stability daného materiálu za pomoci fyzikálních metod, mezi něž patří také tepelná stabilizace.

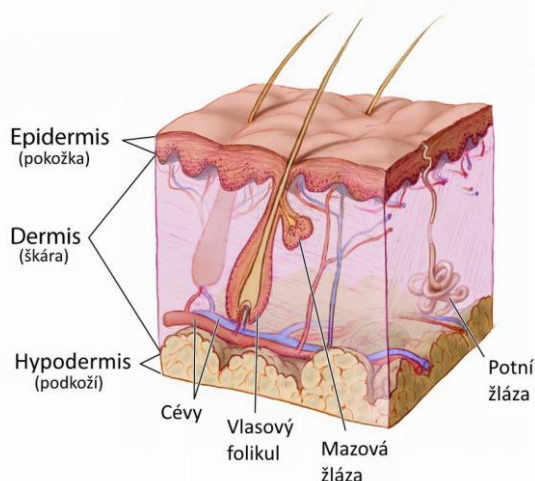
Předkládaná bakalářská práce se zabývá studiem tepelné stabilizace polyvinylalkoholových (PVA) nanovláknenných materiálů funkcionalizovaných lipofosfonoxinem DR6180 (LPPO) nově vyvinutým experimentálním antibiotikem. V práci se klade důraz na zkoumání procesu tepelné stabilizace, který ovlivňuje rozpustnost PVA nanovláken i dynamiku uvolňování LPPO v prostředí fosfátového pufru (PBS), což je realizováno vysokými teplotami.

Cílem je identifikovat optimální podmínky pro tepelnou stabilizaci, které by umožnily dosáhnout kontrolovaného a prodlouženého uvolňování LPPO, a tím zlepšit terapeutický potenciál nanovláknenných materiálů pro léčbu kožních ran. V teoretické části je představen přehled současného stavu v oblasti tkáňového inženýrství a nanovláknenných materiálů, s důrazem na metody jejich přípravy, zejména elektrické zvláknování, a možnosti jejich funkční modifikace. Experimentální část se věnuje detailnímu popisu přípravy nanovláknenných materiálů, postupů jejich tepelné stabilizace, a následně analýze morfologických, chemických a strukturních vlastností, s cílem posoudit vliv různých režimů tepelné stabilizace na rozpustnost PVA a uvolňování LPPO. Výsledky této práce mají potenciál přispět k pokroku v oblasti léčby kožních ran, poskytnout hlubší pochopení vlivu tepelné stabilizace na vlastnosti nanovláknenných materiálů a otevřít cestu k novým aplikacím v medicíně.

1 Teoretická část

1.1 Kožní tkáňové inženýrství

Kůže, největší orgán lidského těla, tvoří asi 15 % celkové hmotnosti dospělého člověka. Slouží jako bariéra mezi vnitřním a vnějším prostředím a poskytuje ochranu proti fyzickým, chemickým a biologickým činitelům. Kůže se skládá ze tří vrstev: epidermis, dermis a hypodermis (podkožní vrstva). Nejbližší část epidermis je ve srovnání s ostatními vrstvami více voděodolná, čímž brání vstupu patogenů a jiných cizích látek do těla. [1]

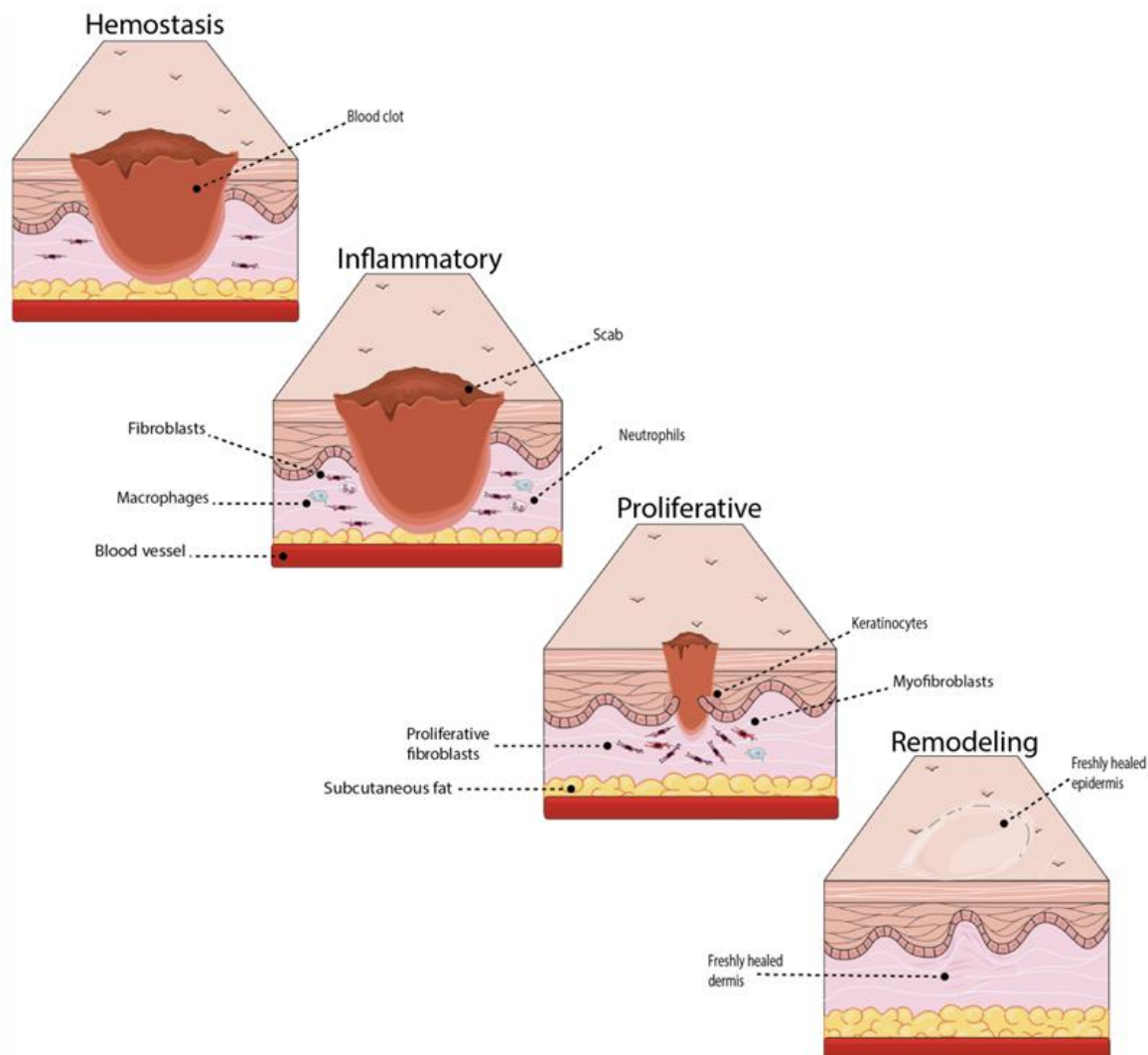


Obrázek 1.1: Schéma stavby pokožky; převzato a upraveno podle [2]

Epidermis, jako vnější vrstva kůže, je komplexním systémem, který zahrnuje několik vrstev od bazální vrstvy až po stratum corneum, zajišťující ochranu před vnějšími vlivy. Keratinocyty, které tvoří většinu buněk epidermis, produkují keratin, esenciální pro strukturální integritu a bariérovou funkci kůže. [2] Kromě toho, melanocyty v bazální vrstvě produkují melanin, který chrání před UV zářením. Langerhansovy buňky a Merkelovy buňky hrají klíčovou roli v imunitní odpovědi a hmatovém vnímání. Tento úžasný systém neustále pracuje na obnově a ochraně těla, přičemž procesy jako keratinizace a produkce melaninu jsou neustále aktivní, reagující na vnější podněty a udržující kůži zdravou a funkční. [3] Dermis, umístěná pod epidermis a oddělená bazální membránou, je bohatá na krevní cévy a nervy a tvoří hlavní část vazivových tkání v kůži. Obsahuje dvě strukturálně odlišné vrstvy: papilární a retikulární. [2] Papilární vrstva je těsně spojena s epidermis, charakterizovaná tenkými kolagenními vlákny, vysokou hustotou buněk a obsahem proteoglykanů, a retikulární vrstva, která je hustší, s tlustšími kolagenními a elastickými vlákny, poskytuje kůži pevnost a pružnost. Fibroblasty produkující kolagen a elastin jsou klíčové pro udržení struktury a elasticity kůže. S věkem papilární dermis ztrácí objem, stává se tenčí a je postupně nahrazována retikulární dermis, což má vliv na její funkčnost a celkovou strukturu kůže. Dermis hraje zásadní roli v termoregulaci, imunitní odpovědi a sensorických funkcích, díky svému vybavení krevními cévami a nervovými zakončeními, a tím podporuje epidermis poskytováním živin. [3, 5]

Kožní tkáňové inženýrství je inovativním přístupem k tradičním strategiím hojení ran a regenerace tkání. Mezi prvními inženýrsky vyvinutými orgány byla právě kůže, která se přesunula

z laboratorního výzkumu do péče o pacienty. [5] V posledních desetiletích byly vyvinuty různé bioinženýrské a syntetické substituty, které se obvykle umísťují do místa zranění a poskytují bariérovou funkci spolu s ochranou proti mikroorganismům, snižují bolest v ranách a podporují hojení ran prostřednictvím regenerace tkání. [6] [7] Kožní tkáňové inženýrství přináší alternativy k tradičním metodám hojení ran a regenerace tkání, zejména v případech hlubokých zranění a popálenin, kde proces hojení není adekvátní, což může vést k chronickým ranám. Ztráta plné tloušťky kůže o průměru více než 4 cm² vyžaduje ošetření transplantací.[8] Mnoho chronických ran se nehojí, což může vést k amputacím a zvýšeným nákladům na zdravotní péči.



Obrázek 1.2: Čtyři fáze hojení rány – každá fáze je charakterizována koordinovanými klíčovými molekulárními a buněčnými událostmi, které zajišťují správnou reakci na hojení rány převzato z [10]

V posledních letech došlo k významným pokrokům ve vývoji kožních substitutů z umělých a přírodních materiálů, s cílem vytvořit uživatelsky přívětivé, komerčně dostupné substituty s delší životností, které efektivně replikují všechny vrstvy a funkce přirozené kůže, včetně její rychlé vaskularizace. [9] Přesto kožní tkáňové inženýrství čelí výzvam, jako je vytvoření substitutu, který by přesně napodoboval komplexní strukturu kůže, zahrnující epidermis, dermis,

hypodermis, vlasové folikuly a potní žlázy, a zajistil správnou integraci s pacientovou kůží. Mimo výzvy, jako je replikace všech kožních vrstev a zajištění integrace s pacientovou kůží, se výzkum zaměřuje také na uzavření rány a efektivní hojení, s cílem získat akceptaci od vědecké komunity, regulačních agentur a pacientů.

Rovněž ukázalo, že role hostitelské imunitní odpovědi je důležitým tématem, které je třeba zvážit. Hlavní úsilí bylo zaměřeno na modulaci chování buněk, aby bylo možné usnadnit normální průběh zánětlivého procesu, granulace tkáně a remodelačních procesů. Tyto typy buněk zahrnují cirkulující monocyty, makrofágy a T buňky, které vykonávají jejich hlavní funkce a současně udržují komplexní prostředí regulačních růstových faktorů. [10]

1.2 Materiály v tkáňovém inženýrství

Aby byly materiály vhodné pro kožní tkáňové inženýrství, musí splňovat několik klíčových požadavků. Prvním kritériem pro jakýkoliv scaffold v tkáňovém inženýrství je, že musí být biokompatibilní. Buňky by měly být schopny přilnout, normálně fungovat a migrovat na povrchu, a nakonec skrz scaffold, a začít proliferovat před vytvářením nové matrice. Po implantaci by scaffold nebo tkáňově inženýrsky vytvořená konstrukce měla vyvolat jen minimální imunitní reakci, aby nedocházelo k závažné zánětlivé odpovědi, která by mohla snížit hojení nebo způsobit odmítnutí tělem.[11]

Bioreabsorbovatelnost umožňuje vlastním buňkám těla postupně nahradit implantovaný scaffold nebo tkáňově inženýrsky vytvořenou konstrukci. Scaffoldy a konstrukce nejsou určeny jako trvalé implantáty. Scaffold by tedy měl být biodegradabilní, aby umožnil buňkám vytvářet vlastní extracelulární matici. Produkty této degradace by měly být netoxické a schopné opustit tělo bez zásahu do jiných orgánů.[12]

Ideálně by měl mít scaffold mechanické vlastnosti odpovídající anatomickému místu, kde je implantován, a z praktického hlediska by měl být dostatečně pevný, aby umožnil chirurgické zpracování při implantaci. Výroba scaffoldů s adekvátními mechanickými vlastnostmi je jednou z velkých výzev při pokusu o vývoj kostního nebo chrupavkového inženýrství.[13]

Architektura scaffoldů používaných v tkáňovém inženýrství je také kriticky důležitá. Scaffoldy by měly mít propojenou porézní strukturu a vysokou porozitu, aby zajistily pronikání buněk a adekvátní difúzi živin k buňkám uvnitř konstrukce a do vytvářené extracelulární matrice. Navíc je vyžadována porézní propojená struktura, aby umožnila difúzi odpadních produktů ze scaffoldu a produkty degradace scaffoldu mohly opustit tělo bez zásahu do jiných orgánů a okolních tkání.

Decelularizované tkáně představují klíčový průlom a významný pokrok v tkáňovém inženýrství, jelikož nabízejí jedinečné struktury a kombinaci vlastností, které jsou nezbytné pro úspěšnou regeneraci a opravu tkání. Zpracované speciálními postupy k odstranění buněčných složek při zachování extracelulární matrix (ECM), tyto tkáně slouží jako biologické scaffoldy (opory), které efektivně napodobují přirozené mikroprostředí tkání. Zachovaná ECM v decelularizovaných tkáních je zásadní pro podporu adheze, růstu, diferenciaci a maturaci buněk, což je klíčové pro proces regenerace tkáně.[14] Dále lze decelularizované tkáně upravit, například na formu hydrogelů, čímž se rozšiřuje jejich použití v regenerativním inženýrství pro aplikace jako je vývoj pokročilých obvazů pro hojení ran, tvorba scaffoldů pro kultivaci buněk, nebo jiné pokročilé terapeutické přístupy. Tyto hydrogely, odvozené od decelularizované ECM, poskytují

optimální prostředí s komplexními signály a environmentálními podmínkami pro zlepšenou adhezi, růst, diferenciaci buněk a formaci nových tkání.[15] Tímto způsobem decelularizované tkáně a od nich odvozené hydrogely představují vynikající materiály pro regenerativní inženýrství různých tkání, zejména pro kosterní svaly, a otevírají nové možnosti v léčbě a regeneraci poškozených tkání.[14]

Hydrogely v tkáňovém inženýrství jsou uznávány pro jejich jedinečné biomimetické vlastnosti, které napodobují ECM a podporují přilnavost a proliferaci buněk. Tyto hydrofilní sítě se skládají z molekul rozptýlených ve vodném prostředí a mohou být tvořeny různými mechanismy síťování, čímž se dosahuje potřebných fyzikálně-chemických vlastností a vysoké napodobení přirozeného ECM tkání.[16] Hydrogely mohou být dále upraveny chemickými a biologicky aktivními molekulami, jako jsou látky reagující na podněty a růstové faktory, které zvyšují jejich biokompatibilitu. Díky těmto vlastnostem poskytují hydrogely ideální prostředí pro růst, diferenciaci a tvorbu tkáňových struktur buněk. V průběhu poslední dekády byla využívána nová generace hydrogelů vyvinutá tak, aby vyhovovala specifickým potřebám tkání a byla použitelná s nejmodernějšími technikami.[17]

Nanovlákná představují důležitou třídu materiálů v tkáňovém inženýrství díky jejich unikátním vlastnostem, jako je vysoký poměr povrchu k objemu, možnost modifikace mechanických a chemických vlastností a schopnost napodobit ECM tkání. Tyto vlastnosti činí nanovlákná vhodnými pro různé aplikace v tkáňovém inženýrství, kde mohou podporovat adhezi, proliferaci a diferenciaci buněk.[18]

V oboru biomateriálů se obvykle používají tři skupiny materiálů: keramika, syntetické polymery a přírodní polymery. V nedávné době se rozšířilo využívání tvrdých biokompatibilních materiálů, jako jsou biokeramika, bioaktivní skla, uhlíkové nanostruktury a hydroxyapatitové nanočástice, v tkáňovém inženýrství pro opravu měkkých tkání. Tyto materiály, původně určené pro interakci s kostmi, ukázaly zlepšení v regeneraci ran a měkkých tkání díky svým vlastnostem, jako je podpora proliferace buněk, angiogeneze a antibakteriální efekty. Jejich aplikace ve formě prášků, granulí nebo mikro/nanočástic může zlepšit mechanické vlastnosti implantátů při léčbě různých poškození, od ran po poranění nervového systému[19]

Přírodní i syntetické polymerní materiály jsou oblíbené pro inženýrství a regeneraci jak tvrdých, tak měkkých tkání díky jejich široké rozmanitosti vlastností. Tyto vlastnosti zahrnují biodegradabilitu, mechanické vlastnosti, vysokou porozitu, poměr povrchu k objemu a malou velikost pórů. Různé typy polymerů jsou využívány na současném trhu pro různé aplikace, včetně kostního a chrupavkového tkáňového inženýrství, hojení ran kůže a cévních graftů.

1.3 Využití nanovláknenných materiálů

Polymerní nanovláknenné materiály nabízejí několik jedinečných vlastností, které je činí vhodnými pro aplikace v tkáňovém inženýrství. Významným rysem nanovláken je vysoký poměr povrchové plochy k objemu, což vede k většímu povrchovému nabití ve srovnání s objemovými materiály. Tato vlastnost zlepšuje přilnavost buněk, proteinů a léčivých molekul. Nanovlákná jsou schopna dosáhnout vyšší plochy při stejném objemu ve srovnání s jinými speciálními typy tkáňových nosičů, jako jsou pěnové a gelové filmy. Navíc, nanovlákná poskytují dostatečnou mechanickou pevnost při zachování vysoké porozity, což je příznivé pro tkáňovou regeneraci.

Porozita nanovláken se pohybuje kolem 90 procent.[20] Takto strukturované porézní struktury se podobají poréznímu uspořádání (ECM), což je klíčové pro regeneraci tkáně. Nanovlákná obvykle vykazují vysoký poměr stran, což je poměr délky k šířce vlákna. Tato vlastnost je spojena s dobrou pevností v tahu vláknité matrice díky delším nanovláknům, které zvyšují celkovou pevnost.[21]

1.4 Nanovláknenné materiály a jejich výroba

Samoorganizace molekul: Tato metoda výroby nanovláken využívá vzájemné asociace peptidů, které se okamžitě skládají do organizovaných, stabilních struktur prostřednictvím nekovalentních sil, jako jsou van der Waalsovy síly, elektrostatické vazby, vodíkové můstky a π - π interakce. Tyto slabé vazby, když jsou kombinovány do jediné jednotky během procesu skládání, ovládají strukturní konformaci a stabilitu shromáždění a silně ovlivňují interakci mezi nadmolekulární konstrukcí a dalšími molekulami, buňkami a tkáněmi. Přítomnost elektrolytů v roztoku může být hnací silou pro samoorganizace peptidů.[22] Peptidové hydrogely jsou ideální platformou pro inženýrství tkání, například kostí, nervů, chrupavek, jater, srdeční tkáně a angiogeneze, protože jsou snadno použitelné, neimunogenní a netoxické. Výhodou je také jejich biodegradabilita a schopnost metabolismu jejich degradačních produktů buňkami. Přestože mají tato nanovlákná řadu výhod, mají také několik omezení: složitý proces výroby, nízkou produktivitu a relativně vysoké náklady.[23]

Fázová separace: Tato metoda se používá k vytváření porézní nanoměřítkové architektury pro 3D tkáňové inženýrství. Vyžaduje tři hlavní kroky: rozpuštění, gelaci a následné odstranění rozpouštědla z gelu vodou, následované zmrazením a lyofilizací ve vakuu.[24] Polymer je nejprve rozpuštěn ve vhodném rozpouštědle za vysoké teploty, poté je indukována fázová separace polymeru chlazením nebo výměnou nerozpustného rozpouštědla. Po odstranění rozpouštědla je struktura zpevněna zamrazením. Výsledkem jsou vysoce porézní fibrozní polymerové scaffoldy s mikroskopickými sférickými póry. Tato metoda umožňuje výrobu 3D struktur s určitými rozměry, ale má několik nevýhod, včetně dlouhé doby zpracování, nestability nanovláken, obtížné kontroly porozity a omezení na polymery vhodné pro proces fázové separace.[25]

Elektrické zvlákňování: Elektrické zvlákňování je metoda, která umožňuje výrobu nanovláken z různých materiálů, včetně polymerů, skrze využití elektrostatického pole. Tento proces začíná roztokem polymerního materiálu, který je vytlačován přes jehlu a vystaven vysokému napětí, což vede k vytvoření velmi jemných vláken s průměrem v rozmezí nanometrů až mikrometrů. Vlákná mají velkou specifickou povrchovou plochu a jsou vysoce porézní, což je činí vhodnými pro řadu aplikací, včetně filtrace, elektroniky, tkáňového inženýrství a ukládání energie.

Základní součásti sestavy pro elektrické zvlákňování zahrnují zdroj vysokého napětí, stříkačkovou pumpu, spinneret (obvykle jehlu s tupým hrotem) a sběrač. Proces elektrického zvlákňování lze rozdělit do několika fází, začínající tvorbou Taylorova kužele na špičce jehly, vystřelením nabitých proudů, které se postupně protahují do jemnějších průměrů, a nakonec dochází

k solidifikaci a ukládání vláken na sběrač. Klíčovou roli v tomto procesu hraje správná formace Taylorova kužele, která je zásadní pro zajištění stabilního procesu a kontrolu nad průměrem a morfologií nanovláken.[26]

Výhody stejnosměrného elektrického zvlákňování zahrnují schopnost vytvářet vlákna s velmi malým průměrem, což vede k vysoké povrchové ploše na jednotku hmotnosti a vysoké porozitě vláknenného materiálu. Tyto charakteristiky jsou žádoucí pro aplikace, kde je potřeba vysoká absorpční kapacita, filtrace, nebo když materiál slouží jako nosič pro různé bioaktivní látky v biomedicínských aplikacích. Elektrické zvlákňování také umožňuje snadné zavádění aditiv do vláken během výroby, což umožňuje funkční modifikace materiálu.[27]

Mezi hlavní nevýhody patří komplikace při výrobě vláken z některých typů materiálů, které vyžadují specifické rozpouštědlo nebo nastavení procesu, což může ztěžovat nebo zdražovat výrobu. Dalším problémem může být obtížná reprodukovatelnost a uniformita vláken, což může být způsobeno fluktuacemi v procesních parametrech, jako je teplota, vlhkost, nebo vlastnosti použitého roztoku. Také sběr vyrobených nanovláken a jejich další zpracování může být náročné, zejména při zachování jejich struktury a vlastností.[28]

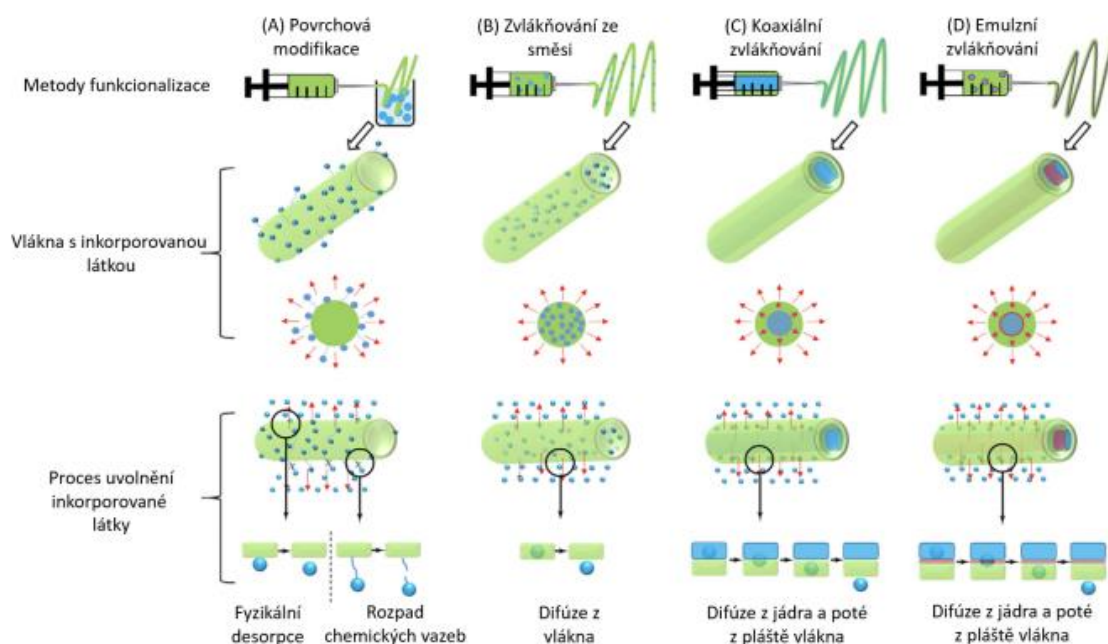
Stejnosemřené elektrické zvlákňování nabízí mnoho příležitostí pro vývoj inovativních materiálů s jedinečnými vlastnostmi, avšak vyžaduje pečlivé řízení procesních podmínek a optimalizaci pro dosažení kvalitních a funkčních výsledků.

1.5 Funkcionalizace nanovláknenných materiálů

Význam kontrolovaného a cíleného uvolňování léčiv v moderní medicíně

Systémy pro dodávání léčiv se zaměřují na zlepšení efektivity a bezpečnosti léčivých přípravků. Současné metody udržení terapeutických hladin léčiv v krevním řečišti jsou omezeny na opakované podávání léků ústy nebo parenterální cestou. Toto může být nejen nepohodlné, ale také zvyšuje riziko neúmyslných nebo úmyslných předávkování. Například opioidní analgetika jsou často podávána po dobu několika týdnů nebo déle pro léčbu pacientů s vážnými bolestmi, například po operaci nebo související s rakovinou.[29] Časté podávání těchto léků však může vést k riziku předávkování, zneužívání nebo závislosti, což může významně omezit jejich terapeutickou účinnost. Proto je důležité vyvinout systémy pro dodávání léčiv, které po jednorázovém podání mohou léky uvolňovat kontrolovaným a udržitelným způsobem, aby bylo dosaženo bezpečného dodání a udržení terapeuticky vhodných hladin léčiv na dlouhou dobu.[30]

Polymerové mikro/nanočásticové nebo mikro/nanovláknové scaffoldy byly intenzivně zkoumány jako nosiče pro doručování terapeutických látek. Tyto scaffoldy mohou léčiva doručovat na specifická předem určená místa, přičemž se vyhýbají systémové distribuci svého nákladu. To činí tyto systémy velmi efektivními a umožňuje použití nižších dávek léčiv, což vede k menšímu množství nežádoucích účinků.[31, 32] Existují různé možnosti přípravy nanovláken pro cílenou dopravu léčiv, z nichž ty hlavní jsou popsány v následující kapitole.



Obrázek 1.3: Proces uvolnění inkorporované látky a metody její funkcionalizace dle způsobu přípravy (A) povrchovou modifikací, (B) zvlákňováním ze směsi, (C) koaxiálním zvlákňováním (D) a emulzním zvlákňováním; převzato a upraveno podle [35]

1.6 Různé typy systémů cílené dopravy léčiv

Povrchová modifikace: Povrchová modifikace elektricky zvlákněných mikro/nanovláken umožňuje chemickou a fyzikální úpravu jejich povrchů s různými bioaktivními molekulami, jako jsou protinádorové léčiva, růstové faktory, nukleové kyseliny a sacharidy. Tato metoda umožňuje připevnit tyto molekuly na povrch vláken, čímž se zabrání jejich nekontrolovanému rozptylu v hmotné fázi polymerových vláken a zároveň se vyhnout náročným podmínkám elektrického zvlákňování, který může některé citlivé bioaktivní látky vhodné pro začleňování jako jsou proteiny a nukleové kyseliny poškodit.[33, 34]

Elektrické zvlákňování ze směsi (Blending electrospinning): Tato technika zahrnuje začlenění léčiv nebo molekul přímo do polymerového roztoku rozpuštěním před elektrickým zvlákňováním. Účinnost zapouzdření léčiv, distribuce léčiv uvnitř mikro/nanovláken a kinetika uvolňování léčiv jsou ovlivněny interakcí mezi polymerem a léčivem a fyzikálně-chemickými vlastnostmi polymeru. Tato metoda může být problematická, pokud má léčivo slabou rozpustnost, což může vést k neuniformní distribuci léčiv v polymerovém roztoku a migraci léčiva k povrchu vlákna, což může vést k nežádoucímu počátečnímu prudkému uvolnění léčiva. [35] Proto je při výběru elektrického zvlákňování ze směsi zásadní zvážit interakce mezi polymerem a léčivem, aby se zajistila efektivní a kontrolovaná distribuce a uvolňování léčiva.[36]

Koaxiální elektrické zvlákňování: U koaxiálního elektrického zvlákňování je biomolekula umístěna ve vnitřní části (jádra) a polymerový roztok ve vnější části (plášti) trysky roztoku. Polymerový plášť chrání jádro biomolekuly před vnějšími vlivy, čímž zachovává bioaktivitu

začleněných biomolekul.[37] Tato technika může být použita pro navázání různých typů farmaceutik, včetně antibiotik nebo antioxidantních léčiv a je schopna prodloužit dobu uvolňování léčiv díky tvorbě vláken se strukturou jádro-plášť. Struktura jádro-plášť prodlužuje cestu difúze léčiva modulací tloušťky a složení pláště, čímž umožňuje kontrolovanější uvolňování léčiva.[38]

Elektrické zvlákňování z emulze: Emulzní elektrické zvlákňování vytváří kapky složené z molekul léčiv, které jsou dispergovány v polymerovém roztoku před elektrospinnin- gem.[39] Tato metoda vytváří strukturu jádro-plášť, kde se makromolekuly shlukují ve vodní fázi tvořící jádro a polymery tvoří plášť. Tento způsob uvolňování léčiva může trvat až 60 dní, protože vnější vrstva pláště působí jako bariéra pro difuzi zapouzdřeného léčiva.[40] Emulzní elektrické zvlákňování navíc nevyžaduje společné rozpouštědlo pro léčivo a polymer, což umožňuje snadný proces elektrospinningu roztoku obsahujícího terapeutické látky a polymeru s velmi odlišnými hydrofilními-hydrofobními vlastnostmi bez významného kontaktu léčiva s organickým rozpouštědlem.[41]

Inkorporace pomocí nano/mikro částic: Tato technika zahrnuje začlenění nano nebo mikro nosičů léčiv, jako jsou nanočástice, nanotrubice, micely, mikrosféry a liposomy do elektricky zvlákněných vláken. elektricky zvlákněná polymerová mikro/nanovláknena hybridizovaná s nanočásticemi byla vyvinuta pro zlepšení účinnosti léčiva, způsobu uvolňování a jeho stability. Modifikace nanočástic s multifunkčními ligandy umožňuje nejen aktivní rozpoznávání cílů, ale také zvyšuje terapeutickou účinnost a snižuje vedlejší účinky.[36] Nanočástice mohou být integrovány do mikro/nanovláken buď shromážděním na jejich povrchu nebo uvnitř mikro/nanovláken, protože mohou udržet stabilitu léčiva v organických rozpouštědlech, kterým jsou vystaveny během výrobního procesu. Tato metoda poskytuje dvojité bariéry pro léčivo, zvyšuje stabilitu a prodlužuje dobu uvolňování léčiva z nosných struktur. [42, 43]

Vícetryskové elektrické zvlákňování (multi-jet electrospinning): Tato metoda zahrnuje začlenění biologicky aktivních látek do roztoku polymeru před samotným elektrickým zvlákněním. Vícetryskové elektrické zvlákňování je variací standardního elektrického zvlákňování, který používá několik tryskových hlavic pro výrobu vláken.[44] Tento přístup umožňuje výrobu složitějších struktur vláken a umožňuje efektivnější a uniformnější náklad léčiv a jiných biologicky aktivních látek do nanovláken. V porovnání s jednotryskovým elektrickým zvlákňováním, vícetryskové elektrické zvlákňování může zlepšit produktivitu a uniformitu výsledných vláken, což je zásadní pro aplikace v oblasti tkáňového inženýrství a systémů pro dodávání léčiv.[45, 46]

Tento přístup je obzvláště užitečný v situacích, kde je potřeba začlenit více typů léčiv nebo biologicky aktivních látek do jediného vlákenného systému. Přesná kontrola nad složením a architekturou vláken získaná pomocí více tryskového elektrického zvlákňování umožňuje vědcům vytvářet sofistikovanější a funkčnější nanovláknenné struktury pro cílené uvolňování léčiv a zvýšení jejich terapeutické účinnosti. Tato technologie je proto klíčová pro vývoj pokročilých léčivých nosičů, které mohou lépe cílit a léčit konkrétní zdravotní stavy. [47]

1.7 Polymery používané v tkáňovém inženýrství

Přírodní polymery

Přírodní polymery jsou klíčové materiály pro tkáňové inženýrství díky své biokompatibilitě, biodegradabilitě a schopnosti napodobovat přirozené buněčné prostředí. Zdroje přírodních polymerů zahrnují jak rostlinný a živočišný původ, tak mikroorganismy, a nabízí jedinečnou kombinaci mechanických a biologických vlastností důležitých pro podporu buněčného růstu, adheze a diferenciace. Kolagen a gelatin získávané z živočišných tkání slouží jako podklad pro inženýrství kostních, chrupavčitých a jiných tkání. Polysacharidy, jako je chitosan a alginát, představují další skupinu s potenciálem pro různé aplikace v tkáňovém inženýrství, od nosičů léčiv po scaffoldy pro regeneraci tkání. Tyto materiály jsou ceněny pro svou funkčnost v rámci regenerativní medicíny a nabízí nové možnosti pro vývoj pokročilých léčebných metod.[48]

Polymery, jako jsou kolagen, chitosan a alginát, nabízejí v tkáňovém inženýrství výhody, jako je vysoká biokompatibilita a bioaktivita, což podporuje proliferaci a diferenciaci buněk. Tyto materiály také mají často schopnost podporovat regeneraci tkání a integraci s hostitelskými tkáněmi díky své podobnosti s přirozenými extracelulárními matrix. Navíc jsou biodegradabilní, což znamená, že se mohou rozložit na netoxické produkty, které jsou snadno odstranitelné z těla, což minimalizuje potřebu chirurgického odstranění implantátu. Na druhou stranu, některé přírodní polymery mohou mít omezenou mechanickou pevnost a mohou být náchylné k rychlé degradaci, což může být nevhodné pro některé aplikace. Také existuje riziko imuno-genní reakce nebo přenosu patogenů, zejména pokud materiál pochází z biologických zdrojů. Tyto nevýhody vyžadují důkladné zpracování a čištění materiálů, aby byly bezpečné pro klinické použití.[49]

Tabulka 1.1: Seznam důležitých polymerů vyskytujících se v přírodě

Polymer	Charakteristika
Kolagen	Kolagen je klíčovým biopolymerem, tvořícím 30% hmotnosti obratlovců a je hlavní složkou pojivových tkání jako jsou kosti, šlachy, kůže a nervy. Jeho hydrogely mohou podporovat regeneraci nervů, zlepšují periferní nervovou regeneraci a jsou schopné obnovit nervové spojení. Rybí kolagen, alternativa k hovězímu kolagenu, vyniká výbornou biokompatibilitou a nízkou antigenicitou, činící ho ideálním pro aplikace na tvrdé i měkké tkáně. Hlavní nevýhody kolagenu pro inženýrství tkání zahrnují neuniformní porozitu a slabé mechanické vlastnosti.[50, 51]
Želatina	Želatina, denaturovaný protein získaný hydrolyzou kolagenu, má řadu výhod včetně nízkých nákladů, snadné dostupnosti, dobré biodegradability a biokompatibility. Je méně antigenická než kolagen a díky modifikované chemické struktuře zlepšuje biologické vlastnosti implantátů. Při elektrospinningu s dalšími polymery poskytuje optimální biologické, mechanické a kinetické vlastnosti, což z ní činí důležitou složku funkčních scaffoldů. Nanostruktury želatiny se využívají

	pro regeneraci nervové tkáně díky zvýšené biokompatibilitě. Mezi hlavní nevýhody patří slabá mechanická pevnost, termální stabilita a rychlejší degradace. [52, 53]
Elastin	Elastin je zásadní pro tkáňové inženýrství díky svým jedinečným vlastnostem, jako je dlouhodobá stabilita, pružnost, schopnost samoorganizace a biologická aktivita. Jeho přítomnost je klíčová v orgánech vyžadujících elasticitu, jako jsou elastické vazy, krevní cévy, kůže a plíce. Vkládání elastinu do biomateriálů je zásadní pro regeneraci měkkých tkání. Materiály na bázi elastinu, jako jsou elastinové polypeptidy (ELP), zvyšují stabilitu a biokompatibilitu polymerních struktur a jsou využívány v systémech pro doručování léčiv s cílem cílit na mozek. Hlavní nevýhodou elastinu pro aplikace v tkáňovém inženýrství je obtížnost jeho čištění a slabé mechanické vlastnosti s nedostatečnou migrací a přilnavostí k buňkám.[51]
Kyselina hyaluronová	Hyaluronová kyselina (HA) se vyznačuje vynikajícími vlastnostmi jako biodegradabilitou, biokompatibilitou a schopností formovat hydrogel, což ji činí vhodnou pro tkáňové inženýrství. Díky své vysoké hydrofilnosti může vytvářet gelové struktury ve vodných roztocích, což přispívá k jejímu významu v regeneraci tkání a hojení ran. HA se však potýká s některými omezeními, jako jsou slabé mechanické vlastnosti a rychlá degradace in vivo, což lze překonat chemickou úpravou zlepšující její mechanické a biologické vlastnosti.[52, 53]
Chitosan	Chitosan je cenný přírodní polymer s mnoha výhodami pro aplikace v tkáňovém inženýrství, včetně schopnosti tvořit gely, vysoké biodegradability, biokompatibility a nekancerogenity. Jeho antifungální, antibakteriální a protinádorové vlastnosti ho činí atraktivním materiálem pro vytváření membrán, gelů, hub, scaffoldů a perel. Chitosan podporuje přilnavost buněk, přežití, interakci a růst neuritů, což je zásadní pro úspěch v tkáňovém inženýrství. Nicméně, chitosan má také nevýhody, jako je jeho tuhost a křehkost, což vede k nízké mechanické pevnosti.[51]
Keratin	Keratin, extracelulární matrix protein, je vysoce hodnocen pro použití v medicínských aplikacích díky své strukturální funkci a pevnosti v tělesných tkáních. Je vynikajícím zdrojem pro výrobu stavebních prvků inženýrských tkáňových scaffoldů. Keratin má výhodu chemických vlastností stimulujících buněčnou přilnavost, což je nezbytné pro správnou tvorbu tkáně. Buňky přilnavé k tomuto biomateriálu nejen sekretují specifické enzymy, které degradují kolagen bez tvorby cytotoxických degradačních produktů, ale jsou také hlavními syntetizéry nového kolagenu, který je vkládán do extracelulárního prostoru, což dává scaffoldům keratinu ideální vlastnosti schopné těsně sledovat proces remodelace kostí.[50, 51]
Alginát	Alginát, získaný z hnědých mořských řas, je oceňován v tkáňovém inženýrství pro svou biokompatibilitu, nízkou toxicitu a dobré gelovací

	vlastnosti, což ho činí významným materiálem pro regeneraci tkání, jako jsou krevní cévy, chrupavka či kosti. Vyznačuje se však určitými nevýhodami, jako je slabá mechanická pevnost a rychlá degradace, což může limitovat jeho použití.[50, 51]
--	--

Syntetické polymery

Syntetické polymery mají výborné zpracovatelské charakteristiky z hlediska molekulární hmotnosti, degradace a mechanických vlastností s výhodou možnosti přizpůsobení pro specifické aplikace. Hydrolyticky degradabilní polymery jsou obvykle vybírány jako implantáty díky minimálním rozdílům mezi jednotlivými místy a pacienty. Příklady nejčastěji používaných syntetických polymerů v tkáňovém inženýrství zahrnují polyglykolovou kyselinu (PGA), polylaktidovou kyselinu (PLA), poly(laktid-co-glykolid) (PLGA), poly(DL-laktidovou kyselinu) (PDLA), polyethylenglykol (PEG) a polycaprolakton (PCL). Tyto polymery nejsou toxické a jsou široce využívány pro výrobu scaffoldů s konkrétní velikostí pórů, větší porozitou a odpovídajícím poměrem povrchu k objemu, což umožňuje difúzi živin nebo léků. [52]

Degradabilní polymery

Biodegradabilní polymery začaly být ve zdravotnictví široce používány od poloviny 20. století, nejprve jako resorbovatelné stehy. Od té doby byly potenciální aplikace těchto polymerů rychle rozšířeny. Po zlepšení vlastností polymerů na bázi kyseliny mléčné se tyto polymery začaly používat nejen z vědeckého hlediska, ale i v kostní chirurgii. Bohužel po implantaci těchto polymerů byly pozorovány různé reakce cizího tělesa, od přítomnosti bílých krvinek až po sterilní sinusy s resorpcí původní tkáně. Toto vedlo k mylné představě, že biodegradabilní polymery vždy způsobují zánět nebo osteolýzu na místě implantace. V současné době máme významné znalosti o biokompatibilitě biodegradabilních polymerů a jsme schopni tyto polymery přizpůsobit konkrétním aplikacím, čímž významně snižujeme výskyt nežádoucích tkáňových reakcí.[53]

Nedegradabilní polymery

Nedegradabilní polymery nabízejí významný potenciál v oblasti tkáňového inženýrství, zejména v aplikacích, kde je požadována dlouhodobá stabilita materiálu a minimální biologická rozložitelnost. Tyto polymery, jako jsou například polyurethan, polydimethylsiloxan (PDMS), polyethylentereftalát (PET), polyethersulfan (PES) a polystyren (PS), jsou vysoce ceněny pro jejich vlastnosti včetně mechanické pevnosti, pružnosti a chemické stálosti.

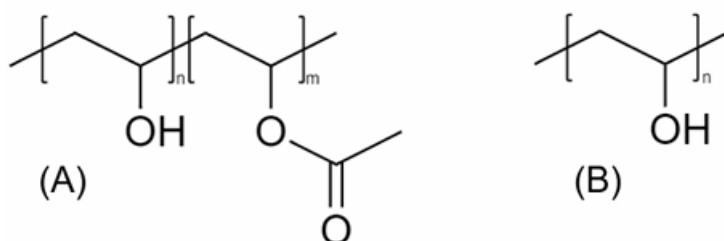
V oblasti regenerace kůže a hojení ran mohou být tyto polymery modifikovány a kombinovány s přírodními polymery nebo bioaktivními molekulami, jako jsou růstové faktory, vitamíny, antioxidanty, antimikrobiální a protinádorové látky, aby bylo dosaženo cílených terapeutických efektů.

Pro aplikace v regeneraci kůže a hojení ran se často používají nejen samotné nedegradabilní polymery, ale také jejich kombinace s přírodními polymery, které mohou zlepšit biokompatibilitu a podporovat kolonizaci buněk. Například, kombinace polyurethanu s přírodními polymery může vytvářet nanovláknenné sítě, které nejenže slouží jako nosiče pro kožní buňky, ale také mohou zabránit pronikání mikrobů do ran a udržovat vhodnou vlhkost v poškozené kůži.[54]

Makromolekuly, které byly připraveny synteticky, mezi něž patří PVA a PEG nebo které se nacházejí v přírodě, jako například želatina nebo kyselina hyaluronová, se nejčastěji používají jako hydrogely, jež jsou nejvhodnější pro syntézu nanovláknenných materiálů. Jelikož jsou tyto hydrogely rozpustné ve vodě, je možné z nich syntetizovat nanovláknna z vodných roztoků náležejících polymerů. Tento způsob je velmi prospěšný pro funkcionalizaci nanovláknenných materiálů biologicky aktivními látkami, jež by nemusely být aktivní v nevodných prostředích. Bohužel uvolňování těchto materiálů ve vodném prostředí urychluje rozpouštění inkorporovaných látek. Proto se tyto materiály obvykle podrobují procesům stabilizace (viz kapitola 1.8), jejichž cílem je snížit uvolňování polymeru nebo alespoň zpomalení uvolňování biologicky aktivní látky.[55]

Význam polyvinylalkoholu (PVA) v nanovláknenných materiálech

Polymer PVA je důležitá makromolekulární látka používaná v tkáňovém inženýrství, zejména pro své unikátní vlastnosti, jako jsou biokompatibilita, není toxický a hydrofilní charakter. PVA, poprvé připravený hydrolýzou polyvinylacetátu v roce 1924, se stalo komerčně vyráběným materiálem, jehož fyzikální charakteristiky a specifické funkční využití závisí na stupni polymerizace a stupni hydrolýzy.[56] Díky své rozpustnosti ve vodě a mírné rozpustnosti v ethanolu, avšak nerozpustnosti v jiných organických rozpouštědlech, nabízí PVA širokou škálu možností využití, z nichž mnohé jsou přínosné v biomedicině a farmacii. [57]



Obrázek 1.4: Vzorec struktury PVA z části hydrolyzovaného (A) a úplně (B) převzato z [72]

Vlastnosti PVA, jako jsou schopnost síťování a hydrofilita, umožňují jeho použití v nanovláknenných, což je zkoumáno pro různé biomedicínské aplikace. PVA je široce uznáván pro svou schopnost vytvářet hydrogely, které lze použít v různých medicínských aplikacích, včetně obvazů na rány a kontaktních čoček, díky své schopnosti napodobit přirozené tkáně a být snadno přijímán lidským tělem.[56, 57] Jeho vlastnosti z něj činí ideálního kandidáta pro vývoj biokompatibilních materiálů, které mají klíčový význam pro pokročilé lékařské oblasti, jako je hemodialýza, systémy pro podávání léčiv a implantovatelná lékařská zařízení.

Krystalinita polyvinylalkoholu (PVA) je klíčovým aspektem jeho použití v tkáňovém inženýrství. PVA je syntetický polymer s hydrofilními skupinami (-OH), určitou úrovní biodegradability a vynikající biokompatibilitou. Jeho výroba se skládá ze dvou kroků: prvním je radikálová polymerizace vinylacetátu v alkoholovém roztoku, a druhým je částečná hydrolýza polyvinylacetátu (PVAc).[58] Kontrolou stupně hydrolýzy lze připravit různé stupně PVA polymerů, což ovlivňuje jeho rozpustnost, krystalinitu a chemické vlastnosti. PVA s nízkým stupněm hydrolýzy (degree of hydrolysis DH) má vyšší rozpustnost ve vodě při nízkých teplotách ve srovnání s PVA s vysokým DH. Přítomnost reziduálních acetátových skupin, které jsou hydrofobní povahy, oslabuje vnitřní a mezimolekulární vodíkové vazby sousedících -OH skupin. U PVA

s vysokým DH je nutné zvýšit teplotu nad 70 °C, aby se PVA rozpustil ve vodě. Přítomnost reziduálních acetátových skupin také pomáhá krystalizovat PVA řetězce během tepelného zpracování, což ztěžuje krystalizaci PVA s vysokým DH. [59]

Polyvinylalkohol (PVA) je znám pro své nekarcinogenní a netoxické vlastnosti, což jej činí ideálním pro široké využití ve farmaceutickém a potravinářském sektoru jakožto obalový materiál nebo pojivo. Je schopný efektivně chránit produkty před vlhkostí a zároveň pohlcovat pach. Biomedicínské využití, mezi něž patří i výroba scaffoldů pro tkáňové inženýrství, využívá biokompatibilitu PVA, která se uplatňuje i ve spojení s nosiči léčiv v systémech cílené dopravy léčiv.[56] PVA v podobě hydrogelů se často využívá v tkáňovém inženýrství, proto je potřeba PVA zesíťovat pomocí fyzikálních nebo chemických metod.[62] Nanovláknenné PVA struktury, které se zvláknují za pomoci elektrospinningu, se rovněž aplikují v tkáňovém inženýrství. Jednou z hlavních předností PVA je možnost tvorby nanovláken přímo z vodných roztoků. Nanovláknenné struktury z PVA vykazují významný potenciál pro různorodé aplikace v tkáňovém inženýrství, včetně regenerace kostí, kůže, chrupavek a dalších tkání.[60]

1.8 Stabilizace PVA

V tkáňovém inženýrství je stabilizace scaffoldů, zejména těch vyrobených z polymerů jako je polyvinylalkohol (PVA), klíčová pro udržení jejich strukturální integrity a funkčnosti po implantaci. Stabilizace lze dosáhnout fyzikálními nebo chemickými metodami, z nichž každá nabízí různé výsledky a strategie, které se upravují dle požadavků pro aplikace, mezi něž patří např. pevnost a rychlost degradace, mechanická pevnost, biokompatibilita.

Chemické metody stabilizace: Chemické metody zahrnují přidání síťovacích činidel, které reagují s funkčními skupinami polymeru, čímž dochází ke kovalentnímu propojení řetězců. Další metodou je modifikace postranních funkčních skupin polymeru, které jsou reaktivní a dochází tak k vytvoření kovalentní sítě. Mezi běžné chemické stabilizační techniky patří:

- **Síťovací činidla:** Chemikálie jako genipin nebo epoxidové sloučeniny se používají ke síťování polymerů. Reagují s funkčními skupinami na polymerových řetězcích, čímž vytvářejí stabilní kovalentní vazby, které zlepšují mechanické vlastnosti a odolnost vůči degradaci.
- **Enzymatické síťování:** Vznik kovalentní vazby mezi specifickými funkčními skupinami polymerních řetězců je katalyzován enzymem. Tato metoda nabízí výhodu výsoce specifického a často mírnějšího procesu ve srovnání s ostatními chemickými metodami.

Fyzikální metody stabilizace: Fyzikální metody stabilizace scaffoldů zahrnují primárně aplikaci vnějších fyzikálních sil nebo podmínek pro indukci změn v polymerové struktuře bez změny její chemické kompozice. Patří sem:

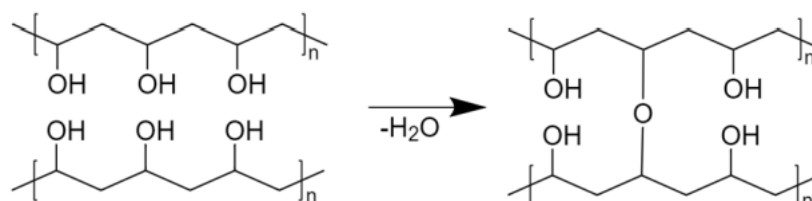
- **Tepelná stabilizace:** Zvyšuje mechanickou pevnost a snižuje rozpustnost v biologických fluidech díky tepelně indukovanému vytváření křížových vazeb mezi polymerovými řetězci.

- **Dehydratační techniky:** Odstraňování vody ze struktury scaffoldu, jako je lyofilizace, což vede k větší porositě a mechanické stabilitě díky formování tužší polymerové sítě.
- **UV záření:** Expozice ultrafialovému světlu může vést k tvorbě křížových vazeb mezi polymerovými řetězci, čímž se zvyšuje strukturální stabilita.

Výběr metody závisí na požadovaných vlastnostech konečného scaffoldu, včetně jeho mechanické síly, biodegradability a schopnosti podporovat přilnutí a růst buněk. Pochopení interakcí mezi scaffoldovým materiálem a biologickým prostředím je klíčové pro výběr optimální stabilizační metody.[61, 62]

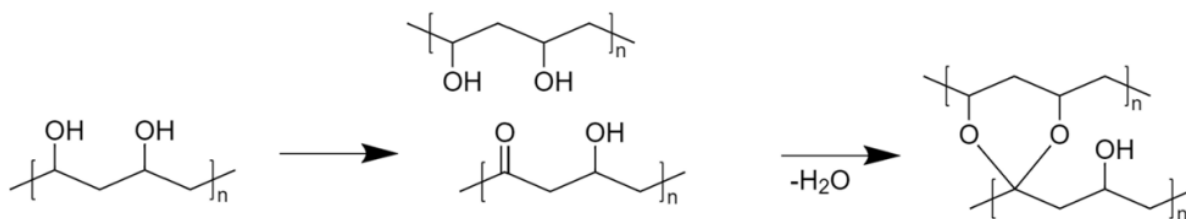
Tepelná stabilizace polyvinylalkoholových (PVA) nanovláknenných materiálů je zásadní pro zachování jejich strukturální integrity a zvyšuje jejich mechanické vlastnosti a snižuje rozpustnost, což je klíčové pro aplikace v tkáňovém inženýrství. Tato metoda indukuje změny v polymeru PVA bez nutnosti použití chemických činidel, což udržuje biologickou aktivitu vkládaných látek. Vysoké teploty při tepelné stabilizaci vedou ke zvýšení krystalinity a k formování pevnější a stabilnější struktury díky mezi řetězcovému propojení, což přispívá k prodloužení doby uvolňování bioaktivních látek a zlepšení biomechanické stability. Tento proces zároveň udržuje poréznost a biokompatibilitu materiálu, což je zásadní pro úspěšnou integraci scaffoldů s hostitelskými tkáněmi a podporuje růst a regeneraci tkání. Změny ve struktuře PVA, jako je zvýšení krystalinity, mají významný dopad na biologickou funkčnost a trvanlivost materiálů, což umožňuje jejich širší použití v regenerativní medicíně a tkáňovém inženýrství, zvyšuje odolnost materiálu vůči rozkladu a přispívá k lepší mechanické odolnosti a odolnosti proti biodegradaci.[63, 64]

Fyzikální síťování zapříčiňuje vyšší stabilitu polyvinylalkoholových nanovláken ve vodném prostředí, jako jest vyšší poměr krystalické fáze, což vede k jejich nižší rozpustnosti. Vrchol v této oblasti může náležet i C–O–C "stretching" vibracím. [76, 77] Vznik takové vazby ve struktuře polyvinylalkoholu za působení vysokých teplot může probíhat dvěma způsoby. Na obrázku 1.5 je vidět, že za přítomnosti kyselé katalýzy může působení vysokých teplot vést k zániku hydroxylových skupin, ale také ke vzniku etherových můstků mezi řetězci. [65, 66]



Obrázek 1.5: Účinek tepelné stabilizace na PVA – tvorba etherových můstků převzato z [72]

Při HT je upřednostňován zánik hydroxylových skupin oproti vzniku etherových můstku za pomoci nukleofilní substituce. Studie [67] naznačuje, že když se karbonylové skupiny nacházejí v polyvinylalkoholu, mohou vzniknout acetalové a ketalové cyklické struktury, jež je zobrazeno na obrázku 1.6. Cyklické struktury by mohly vznikat za podmínky, že tepelná stabilizace vedla k tvorbě karbonylových skupin. Kovalentní síťování polymeru mohlo být vyvoláno oběma zmíněnými mechanismy vzniku vazeb C-O-C.



Obrázek 1.6: Účinek tepelné stabilizace na PVA – tvorba cyklických acetalových a ketalových struktur mezi PVA a oksylování oxidace hydroxylových skupin převzato z [72]

1.9 Biologicky aktivní látky v tkáňovém inženýrství

Biologicky aktivní látky, včetně antimikrobiálních činidel, mají klíčovou roli v tkáňovém inženýrství, zejména v kontextu vývoje pokročilých obvazů pro hojení ran. Moderní obvazové materiály, vyrobené pomocí technologie elektrostatického zvlákňování z polymerů, mohou obsahovat různé aktivní složky, které podporují hojení ran. Tyto zvlákněné materiály mají různou velikost vláken od desítek nanometrů po mikrometry. Správný výběr biopolymerů pro tyto vlákněné materiály může výrazně zlepšit hojení ran ve srovnání s tradičními vlákněnými obvazovými materiály, jako je gáza. Tyto obvazy mohou být speciálně upraveny tak, aby obsahovaly bioaktivní složky, jako jsou antimikrobiální, antibakteriální a protizánětlivé látky, které mohou být uvolňovány do ran a podporovat jejich hojení. Hlavním účelem aktivního obvazu (active wound dressing, AWD) je kontrola biochemických stavů rány za účelem podpory jejího hojícího procesu.[68]

Antibiotika hrají klíčovou roli v prevenci a léčbě infekcí ran, které mohou komplikovat proces hojení. V kontextu tkáňového inženýrství a vývoje obvazů na rány se antibiotika často začleňují do nanostrukturovaných materiálů, jako jsou elektrostaticky zvlákněvané membrány, k dosažení lokálního uvolňování léčiv a poskytnutí antimikrobiální ochrany rány. Ciprofloxacin, gentamicin, tetracyklin a stříbrný sulfadiazin jsou příklady antibiotik, které byly úspěšně začleněny do elektrostaticky zvlákněvaných membrán[47]. Tyto membrány poskytují kontrolované uvolňování antibiotik, čímž vytvářejí aseptické prostředí u místa rány a podporují re-epitelizaci a tvorbu nové tkáně.

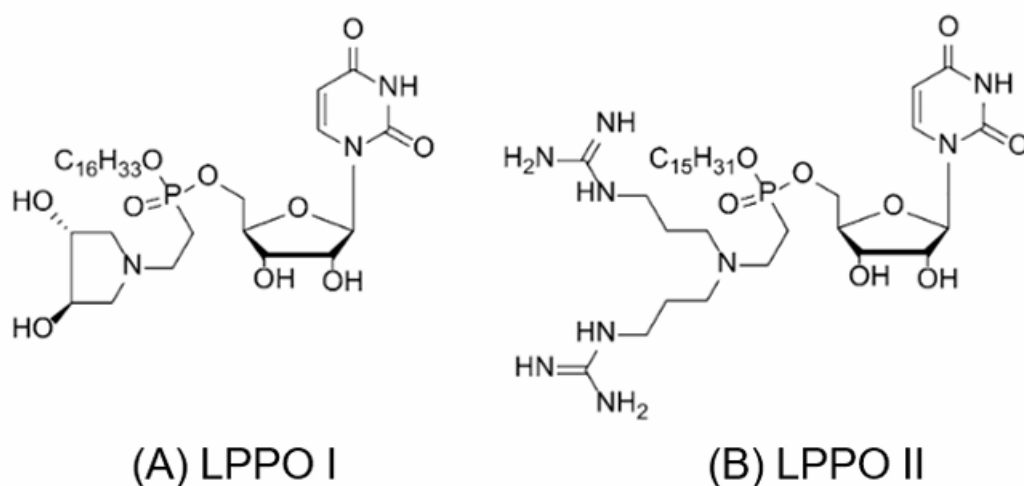
Výskyt bakteriální rezistence proti antibiotikům je vážným problémem ve veřejném zdravotnictví, který se stává čím dál tím větší hrozbou. Rozšířené používání antibiotik vedlo k vývoji mnohočetných rezistentních kmenů bakterií, včetně tzv. super-bakterií, které jsou odolné vůči téměř všem dostupným antibiotikům.[69] Proto je potřeba vyvíjet a zkoumat nové typy antibiotik, proti kterým ještě bakterie nemají rezistenci jako je například LPPO.

Lipofosfonoxiny

Lipofosfonoxiny (LPPO) jsou malé syntetické antibakteriální sloučeniny, které cílí na cytoplazmatickou membránu a prokazují signifikantní antibakteriální aktivity proti širokému spektru bakterií, včetně vícečetných rezistentních kmenů, bez vykazování cytotoxicity na lidské buňky v baktericidních koncentracích. Existují dvě generace LPPO: první generace (LPPO I)

efektivně působí proti Gram-pozitivním bakteriím, zatímco druhá generace (LPPO II) rozšiřuje svoji aktivitu i na Gram-negativní bakterie. Oba typy LPPO tvoří oligomerické vodivé póry a permeabilizují bakteriální membránu citlivých buněk, přičemž jejich aktivita není ovlivněna hodnotou membránového potenciálu cílové membrány, což umožňuje účinnost i proti persisterovým buňkám.[70, 71]

Neúčinnost LPPO I vůči gram-negativním bakteriím se připisuje bariérové funkci vnější membrány s lipopolysacharidy (LPS), kterou LPPO I není schopné překonat, a přítomnost LPS v liposomech významně snižuje jejich aktivitu. Antimikrobiální účinek LPPO je dále ovlivněn fosfolipidovým složením cílové membrány, kde vyšší podíl fosfolipidů s neutrálním nábojem, jako je fosfatidylethanolamin nebo fosfatidylcholin, snižuje permeabilizační potenciál LPPO.[70]



Obrázek 1.7: Dvě generace LPPO (A) první a (B) druhá a vzorce jejich převzato a upraveno podle [72]

Byly syntetizovány a testovány dvě generace LPPO, přičemž další úpravy vedly k druhé generaci s vylepšenou antibakteriální aktivitou jak proti gram-pozitivním, tak gram-negativním bakteriím. Vybrané sloučeniny druhé generace LPPO byly úspěšně hodnoceny jako antibakteriální přísady do kostního cementu, což ukazuje jejich potenciál v medicínském využití.[71]

Konvenční obvazové materiály, jako jsou gáza, polymerní bandáž nebo vata, nemohou zabránit vysychání ložiska rány a bakteriální infekci a vyžadují výměnu, což často vede k poškození hojícího se tkáně. Proto je vývoj aktivního antibakteriálního a podporujícího opravu/regeneraci obvazu (např. prostřednictvím kmenových/progenitorních buněk nebo růstových faktorů), ideálně biodegradovatelného, klíčem k další terapii směřující k normálnímu hojení plně kontrolovaným způsobem.[70, 71]

Mikroorganismy se mohou vyvíjet rezistenci vůči konvenčním antimikrobiálním léčivům. Nicméně, na základě struktury a mechanismu účinku odlišného od klinicky používaných antibiotik, je méně pravděpodobné, že mikroby vyvinou křížovou rezistenci vůči LPPO. Vzhledem k potenciálnímu využití elektrostaticky zvláknovaných nanovláknenných scaffoldů v medicínských aplikacích, jako je hojení ran a dodávání léčiv, byly obvazové materiály na bázi PCL nabitý LPPO otevřeny novým horizontům směrem k novým přístupům kontroly infekce ran. Tento nový koncept byl ověřen na modifikovaném modelu myši s narušeným hojením ran způsobeným *Staphylococcus aureus* a řadou in vitro experimentů provedených na keratinocytech

a fibroblastech.[71] Interakce mezi biologickou látkou je však vždy věcí konkrétní dvojice a je tak nadále potřeba testovat různé kombinace LPPO a polymerního nanovláčenného scaffoldu.

2 Praktická část

Zadání bakalářské práce bylo fakticky obdobné jako u Bc. Holečka [72], práce ale probíhala v jiných podmínkách, které doporučil v závěru své práce Bc. Holeček dále prozkoumat. Práce byla náležitě provedena dle zadání. Důsledek bylo použití stejných experimentálních postupů, jenž použil Bc. Holeček, což se projevuje v popisné části textů, kde se popisují použité metody. Tímto byly získány originální výsledky a následně byly originálně diskutovány.

2.1 Použité chemikálie a roztoky

Tabulka 2.1: Seznam použitých chemikálií

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

Tabulka 2.2: Seznam použitých roztoků

Roztok	Složení	
Fosfátový pufr PBS (1000 ml)	dH ₂ O	900 ml
	KCl	0,2 g
	NaCl	8 g
	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	3,6 g

	KH ₂ PO ₄	0,24 g
Upravit pH roztoku pomocí HCl na hodnotu 7,4. Poté doplnit objem vodou do 1000 ml		
Zvlákňovací roztok 10 % PVA (400 g)	PVA	40 g
	dH ₂ O	324 g
	C ₂ H ₅ OH	36 g
5 % LPPO (10 g)	LPPO	0,5263 g
	dH ₂ O	8,5263 g
	C ₂ H ₅ O	0,9473 g
Zvlákňovací roztok 10 % PVA + 5 % LPPO (100 g)	PVA	10 g
	dH ₂ O	72 g
	C ₂ H ₅ O	8 g
	5 % LPPO	10 g
Roztok H ₃ BO ₃ 40 g/l (1000 ml)	dH ₂ O	1000 ml
	H ₃ BO ₃	40 g
Roztok I ₂ + KI (1000 ml)	dH ₂ O	1000 ml
	I ₂	12,7 g
	KI	25 g

2.2 Použité přístroje a programy

Tabulka 2.3: Seznam použitých přístrojů a programů

Přístroje a programy		Výrobce
Nanospider™	NS 1WS500U	Elmarco
Skenovací elektronový mikroskop	Vega 3	TESCAN
Laboratorní váhy	PA224C	OHAUS Corporation
Laboratorní inkubátor	Q-cell 140/40 Basic	POL-LAB
pH metr	FiveEasy Plus	Mettler-Toledo
Přístroj pro nanášení tenké vrstvy zlata	Quorum Q150R S Plus	Quorum Technologies
Lednice	LCv 4010	Liebherr
Infračervený spektroskop s Fourierovou transformací	Nicolet iZ10	Thermo Fisher Scientific

Laboratorní sušárna	TCF 120 Plus	Giorgio Bormac
Software pro analýzu obrazů	ImageJ	Fiji Contributors
Jazykový model pro editaci textů	GPT-4	OpenAI
Software pro tvorbu grafů, tabulek	Microsoft Office Standart 2016	Microsoft Corporation
	GraphPad Prism 8.0.1	GraphPad Software

2.3 Použité metody a postupy

Příprava roztoků pro zvláknování

Pro proces zvláknování byly namíchaný dva druhy roztoků s polymerem. První byl použit pro zvláknění materiálu z čistého polyvinylalkoholu (PVA) a druhý byl vyroben z PVA spolu s přísadkou lipofosfonoxinu DR6180 (LPPO). Výběr 10% koncentrace PVA v rozpouštědlové směsi voda:ethanol byl inspirován studií [62] avšak s modifikací poměru rozpouštědel na 9:1 hmotnostní poměr. K výrobě 100 g této směsi bylo k 10 g PVA přidáno 81 g destilované vody (což odpovídá 81 ml) a 9 g ethanolu (což odpovídá 11,41 ml). Dokud se úplně polymer nerozpustil, byla tato směs zahřívána na 90 °C, a to po dobu čtyř až šesti hodin. Následně byl roztok před jeho dalším použitím ponechán při pokojové teplotě.

K výrobě nanovláknenného materiálu z PVA s 5% příměsí LPPO bylo použito 50 g 10% roztoku PVA ve stejné směsi voda:ethanol (9:1). Úvodně bylo 5 g PVA rozpuštěno ve 31,25 g destilované vody (což odpovídá 31,25 ml) a 4 g ethanolu (což odpovídá 5,07 ml) při 90 °C. Roztok byl následně ponechán při pokojové teplotě, než se jeho teplota ustálila a poté do něj bylo vmícháno 5 g 5% roztoku LPPO, který byl připraven rozpuštěním 0,25 g LPPO ve 4,75 g destilované vody (což odpovídá 4,75 ml). Tento roztok byl následně uchováván při pokojové teplotě až do momentu jeho využití pro zvláknování.

Stejnoseměrné elektrické zvláknování

Proces zvláknování byl proveden Ing. Maximem Lisnenkem z Katedry chemie na Fakultě Přírodovědecké Technické Univerzity v Liberci. Využitím metody stejnoseměrného elektrického zvláknování na zařízení NanospiderTM byly vyrobeny nanovláknenné struktury. Finální nanovláknenná struktura byla vytvořena dvojím procesem zvláknování na specifickou základní podkladovou textilií. Po dokončení prvního kola zvláknování byla podkladová textilie znovu přetočena na začátek a byl ještě jednou opakován proces zvláknování. V tabulce 2.4 jsou uvedeny detailní podmínky a parametry pro proces zvláknování bez přísadky experimentálního antibiotika. A v tabulce 2.5 je to samé pro materiál s přísadkou aktivní látky.

Tabulka 2.4: Nastavení zařízení na výrobu polyvinylalkoholových nanovláken

Parametr		Hodnota
Elektrické napětí elektrod [kV]	Zvláknovací (struna)	35–40

	Sběrná (kolektor)	-10
Vzdálenost elektrod [mm]		175–180
Průvlak [mm]		0,7
Odtah textilie [mm/min]		7–13
Odtah struny		30
Rychlost cartridge (dávkování) [mm/sec]		290–335
Teplota [°C]		20,8–22
Vlhkost [%]		20–22,4

Tabulka 2.5: Nastavení zařízení na výrobu polyvinylalkoholových nanovláken s LPPO

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

2.4 Tepelná stabilizace nanovláknenných materiálů

Aby bylo možné tepelně stabilizovat materiál pomocí vysoké teploty (HT) musely být nejdříve připraveny vzorky, které předtím prošly zvlákňovacím procesem. Od podkladového materiálu byla opatrně oddělena nanovláknenná vrstva, ze které byl poté vystřižen vzorek o hmotnosti $10 \pm 0,2$ mg. Bylo připraveno celkem pět vzorků, což bylo vyžadováno pro každou nastavenou teplotní podmínku, aby bylo možné provést několik dalších analýz, pro které byl vždy vyžadován alespoň jeden vzorek. Tyto vzorky obsahovaly jeden společný vzorek pro studium morfologie a pro provedení infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR), jeden vzorek pro diferenciální skenovací kalorimetrii (DSC), a tři vzorky určené k analýze rozpustnosti a uvolňování aktivních složek metodou spektrofotometrie. Každý ze vzorků byl umístěn do skleněných Petriho misek, následně byly misky vloženy do sušárny nastavené na požadovanou teplotu HT (120, 130, 140 a 150 °C). Sušení všech vzorků v sušárně trvalo 1 hodinu. Tyto vzorky byly následně uchovávány při pokojové teplotě až do momentu jejich využití k následným analýzám.

2.5 Analýza morfologie materiálů pomocí elektronové mikroskopie

Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) byla využita k pozorování účinku tepelné stabilizace na strukturu materiálů. Materiály byly pozorovány při různých úrovních zvětšení (500×, 1000×, 3000×, 5000×), přičemž urychlovací napětí bylo nastaveno na 15 kV. Oboustranná lepicí páska byla použita pro pečlivé přilepení vzorků na kovové podložky před pozorováním struktury za pomoci SEM. Každý materiál byl reprezentován dvěma ústřížky, zastupujícími jeho obě strany (rub a líc). Jelikož pro SEM analýzu musí být vzorky vodivé, byly na podložky s materiály aplikovány tenké vodivé zlaté vrstvy po dobu 2 minut s využitím zařízení Quorum Q150R S Plus. U obou stran vzorků bylo pořízeno při zvětšení 5000× alespoň pět fotografií pro každý typ materiálu.

Pro měření průměru vláken bylo využito Softwaru Image J, kdy u každého stabilizovaného i nestabilizovaného materiálu bylo změřeno alespoň 50 průměrů vláken. Měření bylo prováděno tak, že se na každé fotografii při zvětšení 5000× změřil průměr vláken podél vybrané diagonály. Program GraphPad Prism verze 8.0.1 byl využit k analýze a následné vizualizaci průměrů vláken ve formě histogramů. Směrodatná odchylka (SD) byla prezentována u každého středního průměru vláken pozorovaných materiálů.

2.6 Analýza rozpustnosti PVA a uvolňování aktivní látky pomocí spektrofotometrie

Spektrofotometrie jako metoda analýzy byla využita na zkoumání účinku HT na uvolňování PVA nanovláken v roztoku PBS i na zkoumání rychlosti uvolňování LPPO z materiálů.

Příprava vzorků

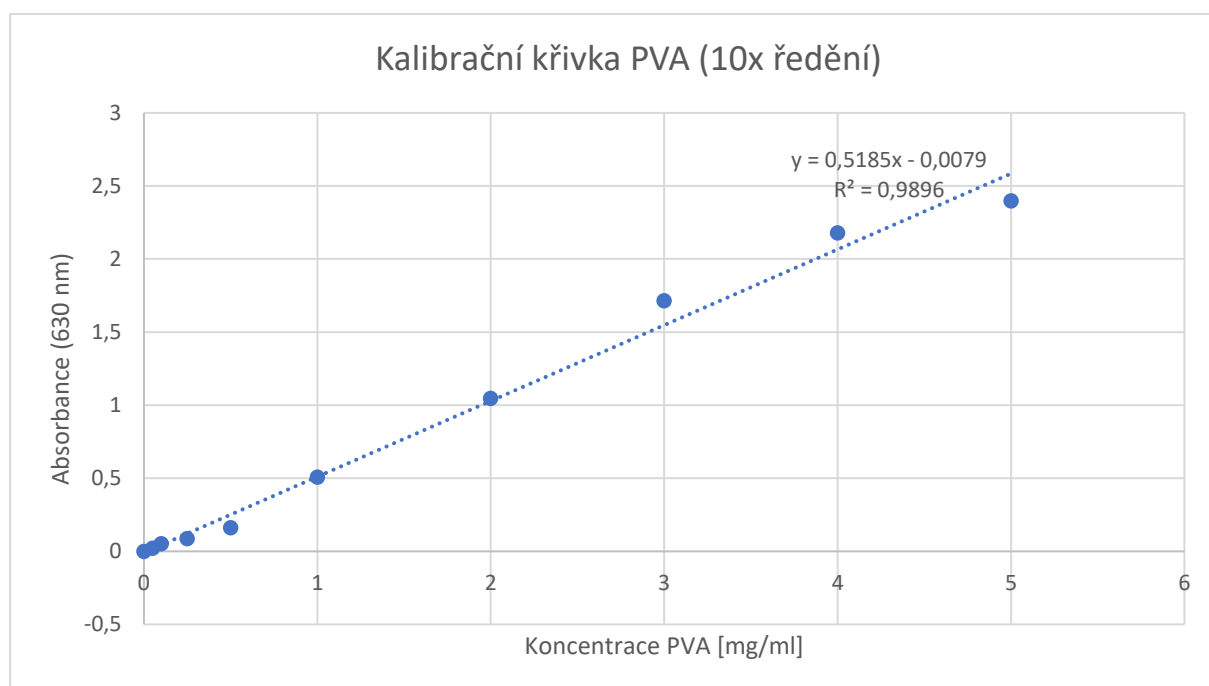
Tři vzorky každého ze stabilizovaných materiálů s hmotností $10 \pm 0,2$ mg (váha určena před procesem tepelné stabilizace) byly vzaty pro každou zkoumanou teplotu stabilizace. Stejným postupem probíhal tento proces i pro nestabilizovaný materiál a jeho vzorky byly použity jako odpovídající negativní kontroly. Do každé 2ml mikrocentrifugační zkumavky byl umístěn jeden vzorek, ke kterému bylo přidáno 1 ml fosfátového pufru (PBS) s koncentrací 0,02 % azidu sodného. Tyto vzorky byly následně inkubovány při teplotě 37 °C. Vzorky byly pravidelně odebírány pro stanovení koncentrace rozpuštěného PVA v časech 1, 2, 4, 6, 8, 24, 72 a 168 hodin po zahájení inkubace. Odběr vzorků spočíval ve vyjmutí 200 μ l z roztoku každé zkumavky v předem stanovených časových intervalech, přičemž tento objem byl umístěn do nové 0,5 ml mikrozkušavky. Objem odebraného roztoku ve zkumavce byl doplněn 200 μ l PBS s 0,02 % azidem sodného. Ihned po odběru byly vzorky odebraného roztoku zmrazeny a uchovávány při teplotě -20 °C a čekaly zde až do další části experimentu.

Analýza rozpustnosti PVA

Postup spektrofotometrie, který je popsán [73] a navazuje na předešlé studie Pritcharda a Akintoly [67] byl využit pro změření koncentrace PVA ve vzorcích. Základem této metody je tvorba barevného komplexu mezi PVA a jodem v kyselém prostředí borité kyseliny. Dle Pritcharda a Akintoly [73] boritá kyselina reaguje s hydroxylovými skupinami v PVA, čímž

dochází k formování cyklických esterů, které omezují flexibilitu polymerového řetězce a umožňují formování barevných komplexů podobných těm, které vznikají mezi amylozou a jodem. Absorbance, která náleží vlnové délce viditelného světla 630 nm byla měřena po vytvoření modrozeleného komplexu.

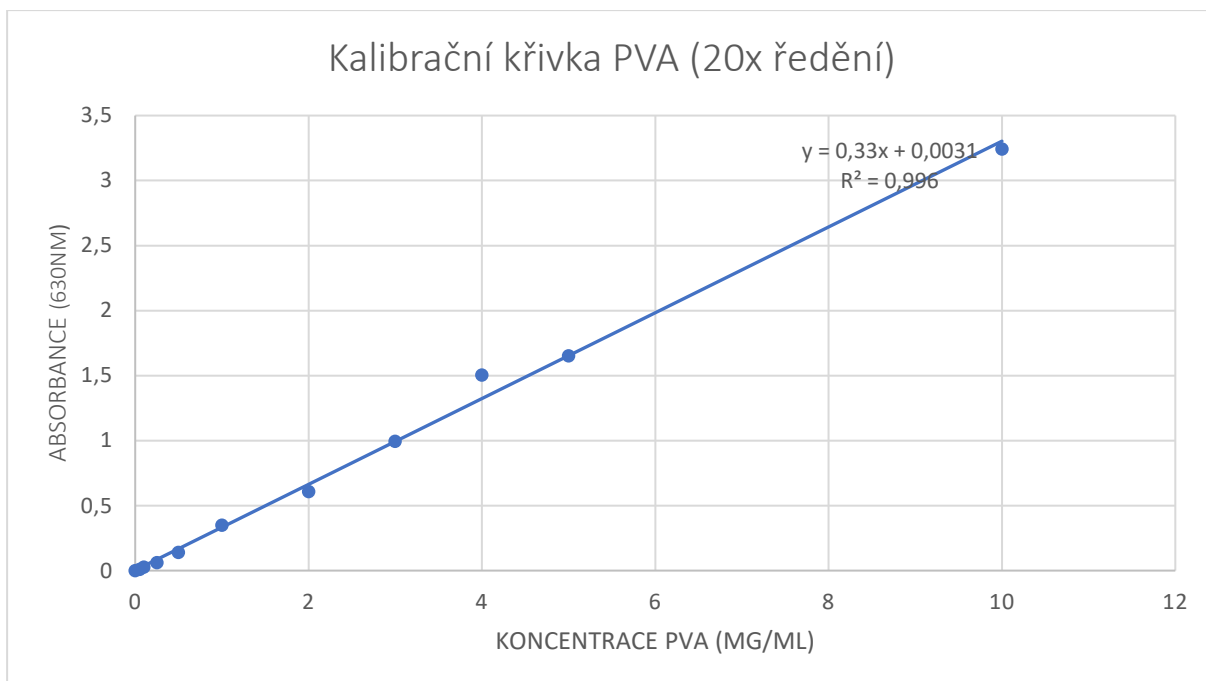
Základy práce Ing. Maxima Lisenka poskytly postup k desetinásobnému ředění vzorků, které bylo nutné z důvodu vysoké koncentrace PVA ve zkoumaných vzorcích. Pro další výpočet uvolňování bylo potřeba vytvořit kalibrační křivku pro desetinásobné ředění ze závislosti absorbance viditelného světla o vlnové délce 630 nm na koncentraci PVA (viz obrázek 2.1). Za tímto účelem byla připravena série kalibračních roztoků PVA s koncentracemi 0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4 a 5 mg/ml, přičemž roztok s 0 mg/ml, označovaný jako slepý vzorek, obsahoval pouze destilovanou vodu. Měření každého kalibračního roztoku bylo provedeno třikrát. Pro indukci barevné reakce bylo do každé jamky mikrotitrační desky (96 jamek) pipetováno 37,5 μ l roztoku I₂ + KI a 187,5 μ l borité kyseliny (40 g/l), následováno přidáním 45 μ l destilované vody a 5 μ l testovaného vzorku, čímž bylo dosaženo desetinásobného ředění. Měření absorbance ze spektra viditelného světla při 630 nm následovalo po důkladném promíchání vzorků.



Obrázek 2.1: Kalibrační křivka PVA pro 10-ti násobné ředění (absorbance světla při 630 nm závislá na koncentraci polyvinylalkoholu v mg/ml)

Pouze desetinásobné ředění u některých vzorků nestačilo, jelikož jejich koncentrace byla příliš vysoká a komplex byl stále příliš zbarvený. To zapříčinilo vysoké hodnoty absorbance, jež se tak nacházely nad horní hranicí měřitelného rozsahu spektrofotometru. Tyto vzorky bylo potřeba ještě jednou zředit, a to na dvacetinásobné zředění. K měření s tímto stupněm ředění byla vytvořena nová kalibrační křivka pro koncentrace 0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 a 10 mg/ml (viz obrázek 2.2). Každý kalibrační roztok byl znovu třikrát testován. K obdržení barevného komplexu bylo napipetováno do jamek mikrotitrační destičky 37,5 μ l roztoku I₂ + KI a 187,5 μ l roztoku H₃BO₃ (40 g/l), k nimž bylo připipetováno 47,5 μ l destilované vody a 2,5 μ l testovaného vzorku, což zajistilo dvacetinásobné ředění. A poté byla stanovena absorbance viditelné složky elektromagnetického spektra při vlnové délce 630 nm.

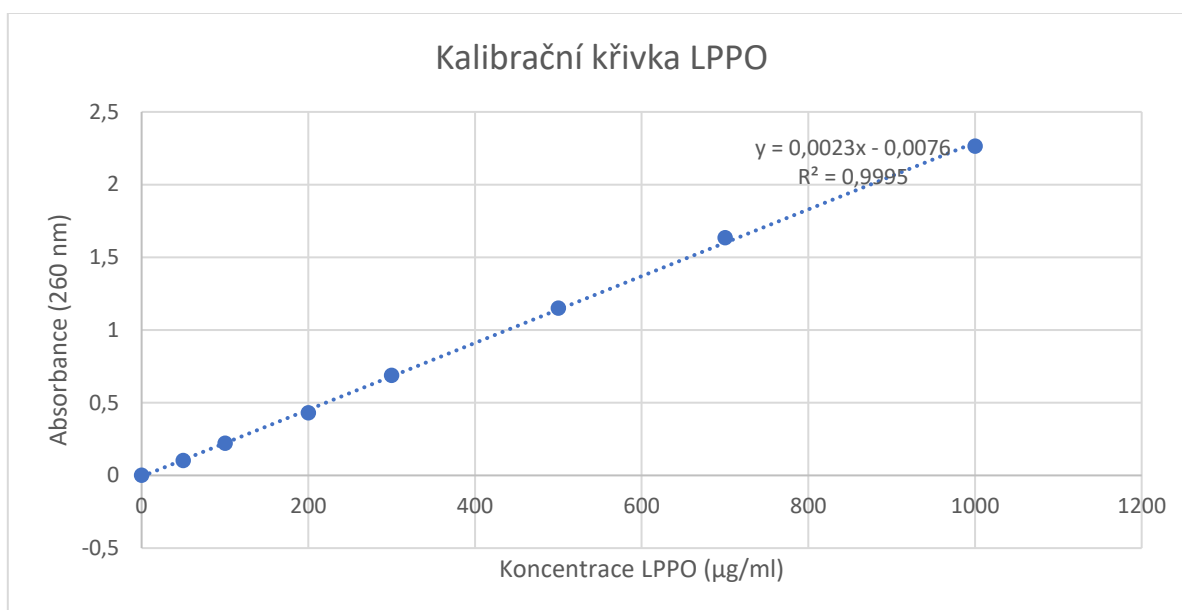
U každé hodnoty z kalibrační řady byly naměřeny tři hodnoty absorbance, z nichž byl vypočítán průměr. Od tohoto průměru byla odečtena průměrná hodnota absorbance slepého vzorku. Vypočítané hodnoty absorbance byly použity pro sestavení kalibrační křivky. Při hodnocení samotných vzorků byla od naměřené absorbance každého vzorku odečtena průměrná hodnota absorbance slepého vzorku a pomocí regresní rovnice z kalibrační křivky byla určena koncentrace PVA v testovaném vzorku. Z níž byl umožněn výpočet celkové hmotnosti rozpouštěného PVA v objemu 1 ml použitého roztoku. Průměrná hmotnost uvolněného PVA a stanovení její směrodatné odchylky byla spočítána u třech vzorků z každého testovaného materiálu.



Obrázek 2.2: Kalibrační křivka PVA pro 20-ti násobné ředění (absorbance světla při 630 nm závislá na koncentraci polyvinylalkoholu v mg/ml)

Analýza uvolňování LPPO

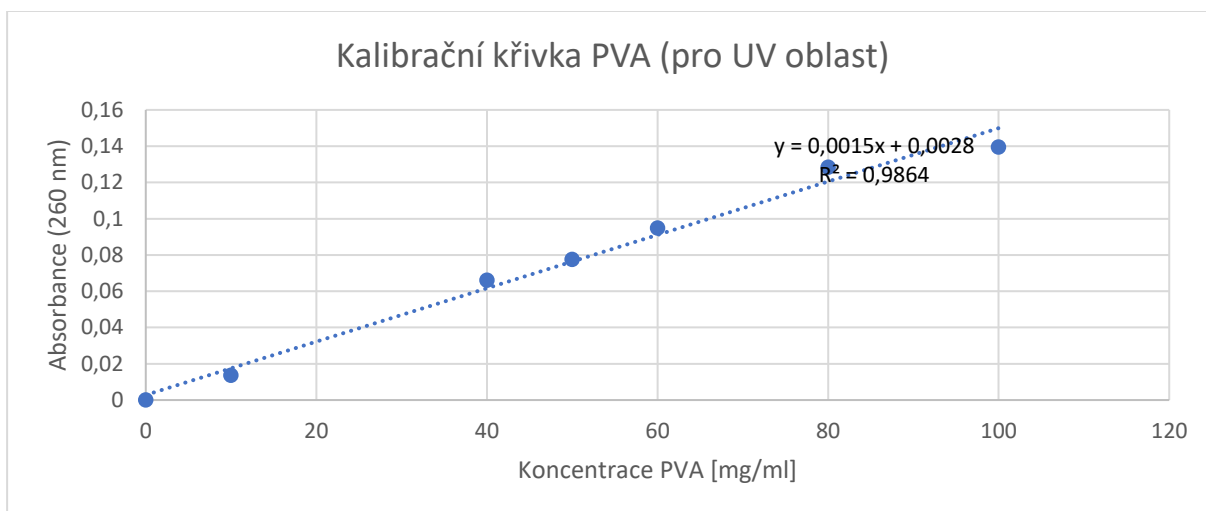
Pro experiment bylo vybráno experimentální antibiotikum Lipophosphonoxin DR6180, které pohlcuje ultrafialové záření s vlnovou délkou 260 nm, a tím je možné pomocí spektrofotometrické analýzy spočítat hmotnost uvolněného LPPO. Na obrázku 2.3. lze vidět kalibrační křivku, která byla vytvořená za pomoci kalibračních roztoků o koncentracích od 0 do 1000 $\mu\text{g/ml}$. Čistá destilovaná voda byla zvolena pro roztok o koncentraci 0 $\mu\text{g/ml}$.



Obrázek 2.3: Křivka kalibrace lipophosphonoxinu (absorbance světla při 260 nm závislá na koncentraci lipophosphonoxinu v μg/ml)

Měření každého kalibračního roztoku bylo provedeno třikrát. Aby bylo možné provést spektrofotometrické měření, bylo do každé z 96 jamek mikrotitrační destičky napipetováno 100 μl testovaného vzorku, a následně byla stanovena absorbance při 260 nm.

Z metodiky použité k analýze rozpustnosti PVA byl odvozen i postup k vytvoření kalibrační křivky pro aktivní látku LPPO. Vzorky nanomateriálu z polyvinylalkoholu s obsahem experimentálního antibiotika byly podrobeny jak ke stanovení uvolňování LPPO, tak i k analýze rozpustnosti PVA. Při vypracovávání kalibrační křivky bylo potřeba z celkové hodnoty absorbance nanomateriálu odečíst jak absorbanci vody, tak PVA s mírným absorpčním peakem v oblasti 260 nm, abychom se dostali k čisté hodnotě absorbance LPPO. K tomuto účelu byla vyhotovena další kalibrační křivka ukazující vztah mezi absorbcí UV záření při 260 nm a koncentrací PVA (viz obrázek 3.4). Kalibrační roztoky o koncentracích od 10 do 100 mg/ml zde byly měřeny třikrát. Na základě kalibrační křivky pro LPPO byla dopředu určena absorbance vody při této vlnové délce. Poté byla odečtena absorbance vody a PVA z celkové naměřené absorbance díky již zjištěné koncentraci PVA ve vzorcích. Rovnice pro lineární regresi z grafu kalibrační křivky následně umožnila zjistit koncentraci aktivní látky ve zkoumaném vzorku. Načež byla stanovena stoupající hmotnost LPPO v celkovém objemu pufru. Z hodnot získaných ze vzorků při různých teplotách stabilizace byla určena průměrná hmotnost uvolněné aktivní látky a její směrodatná odchylka.



Obrázek 2.4: Kalibrační křivka polyvinylalkoholu pro oblast UV záření (absorbance světla při 260 nm závislá na koncentraci PVA v mg/ml)

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

Fyzikální metoda spektroskopie infračerveného záření pracuje s pohlcením infračerveného záření při průchodu vzorkem. Pohlcení záření ve vzorku vyvolává vibrační a rotační změny v molekulách a může ovlivnit jejich dipólový moment a jeho případnou změnu. Modulovaný svazek záření, jenž prošel skrz vzorek a jeho interferogram je analyzován pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací. Na klasické infračervené spektrum světelného záření, které zobrazuje závislost pohlcené nebo prošlé energie na vlnótu nebo vlnové délce záření, je interferogram transformován pomocí Fourierovy transformace. Specifičnost infračerveného spektra záření pro každou molekulu a podobající se absorpční charakteristiky slouží k identifikaci funkčních skupin.

K identifikaci vzorků, jejichž spektra při pokojové teplotě a rozsahu vlnótu 600–2000 cm^{-1} využila k analýze na oddělení nanochemie CXI TUL Ing. Jana Müllerová, Ph.D., posloužil diamantový krystal ATR (attenuated total reflection).

2.8 Analýza krystalinity materiálů pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie

Pro zkoumání tepelných charakteristik materiálů slouží diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC). Souběžné ohřívání nebo ochlazování zkoumaného a referenčního vzorku při konstantní rychlosti je měřeno pomocí této metody, kdy se měří rozdíly u obou vzorků v množství tepla, které je potřebné k udržení stejné teploty. Teplotu endotermického tání materiálu (T_m), teplotu skelného přechodu (T_g) a exotermické reakce krystalizace (T_c), můžeme posoudit z průběhu

křivky DSC. Plocha pod peakem v teplotní oblasti T_c , která stanovuje krystalinitu materiálu, může být určena také touto metodou.

Metoda měření obsahovala vážení malého množství materiálu (3,2–4,2 mg), jenž bylo uloženo na dno hliníkového kelímku o objemu 25 μ l. Tyto kelímky byly následně hermeticky uzavřeny a před měřením byly vzorky materiálu zalisovány. Měření bylo realizováno v inertní atmosféře dusíku při průtoku 50 ml/min a teplotním rozsahu od -20 °C do 260 °C s rychlostí ohřevu 10 °C/min. Tento rozbor byl proveden Ing. Lubošem Běhálkem, Ph.D., z Katedry strojírenské technologie FS TUL.

3 Výsledky a diskuze

Studium tepelné stabilizace nanovláknenných materiálů, jež jsou na bázi polyvinylalkoholu (PVA) s inkorporovanou biologicky aktivní látkou LPPO bylo tématem této bakalářské práce. V oblasti tkáňového inženýrství se nanovláknena vyrobená z PVA uplatňují zejména pro výrobu kožních krytů ran a scaffoldů, a to především kvůli jejich rozpustnosti ve vodném prostředí. Rozpustnost je klíčová vlastnost při výrobě nanovláken z vodného polymerového roztoku, který může být funkcionalizován biologicky aktivní látkou. Tyto látky by ale v organickém rozpouštědle mohly ztratit své funkční vlastnosti. Bohužel nízká stabilita ve vodném prostředí zapříčiňuje urychlené rozpouštění materiálu a efekt okamžitého uvolnění inkorporovaných látek. Tepelná stabilizace vysokými teplotami (HT) je jedna z hlavních fyzikálních metod, která je výhodná za určitých okolností pro stabilizaci zvlákněných materiálů na bázi PVA. Tepelná stabilizace nepředstavuje riziko pro zdraví člověka při medicínském použití na rozdíl od chemických metod stabilizace, jako je využití síťovacích činidel, jež mohou být toxická. Tepelná stabilita experimentálního antibiotika lipofosfonoxinu DR6180 (LPPO) poskytnutého Ústavem organické chemie a biochemie AV ČR ho činí vhodným kandidátem pro funkční modifikaci nanovláknenných materiálů, které jsou podrobené tepelné stabilizaci.

3.1 Příprava a charakteristika nanovláknenných materiálu z PVA a PVA + LPPO

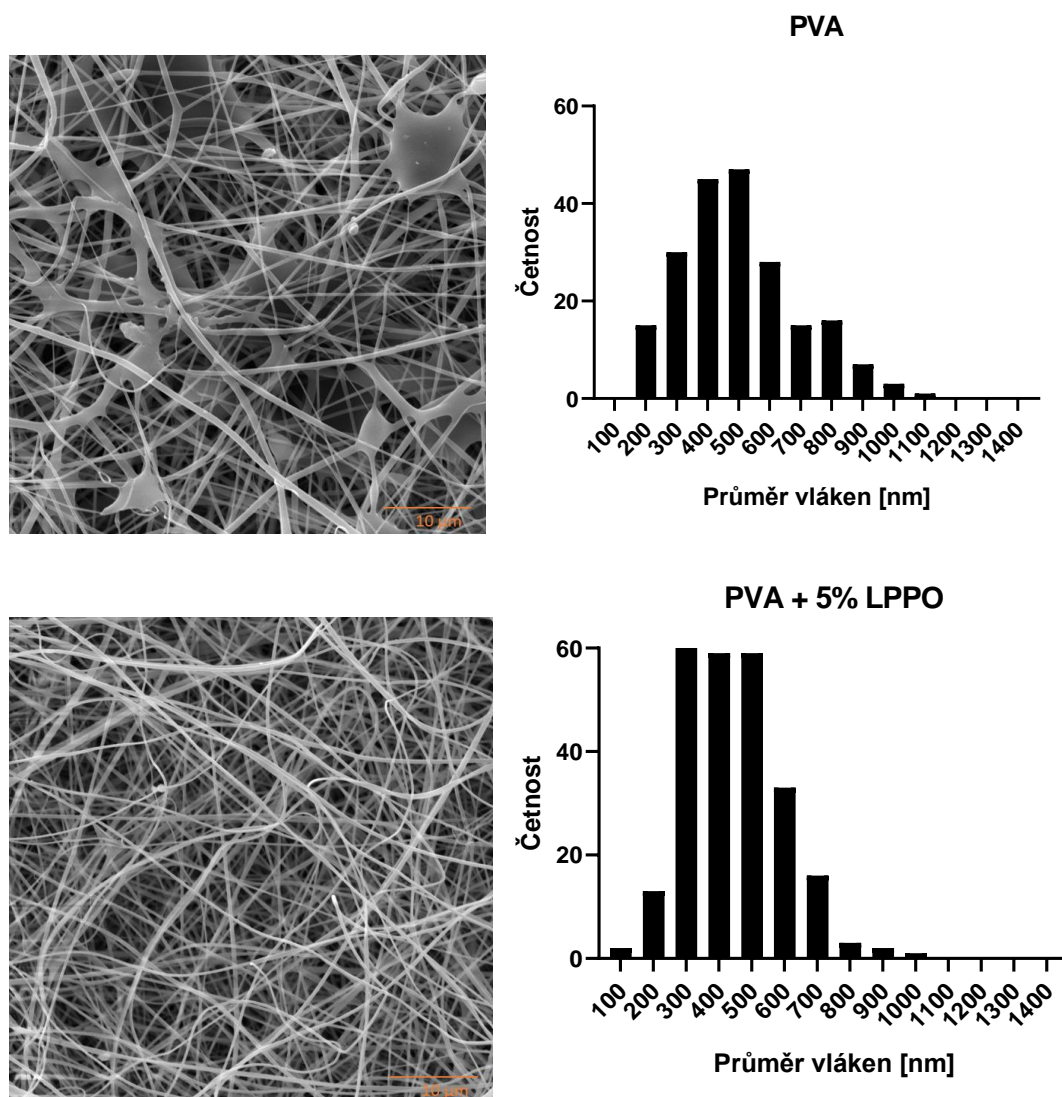
V experimentální části byl zvlákněn nanovláknenný materiál metodou elektrického zvláknování z 10 % roztoku PVA. Zvláknování na zvolený podklad bylo připraveno ve dvou krocích, kde byla nanášena druhá vrstva přímo na první z důvodu dosažení požadované plošné hmotnosti kompaktní vrstvy u nanovláken. Plošná hmotnost $32,42 \pm 3,57 \text{ g/m}^2$ byla dosažena u materiálu z PVA bez aktivní látky, zatímco plošná hmotnost u materiálu s přídavkem LPPO byla $27,82 \pm 2,55 \text{ g/m}^2$. V sušeném materiálu dosahoval teoretický obsah LPPO 5 hm %.

Tabulka 3.1: Tepelně nestabilizované nanovláknenné materiály a jejich střední průměry vláken

Materiál	Průměr [nm]
PVA	488 ± 183
PVA + 5 % LPPO	450 ± 165

Zvláknovací proces technologie Nanospider™ vytvořil materiál PVA, u kterého se pohybovala chyba plošné hmotnosti přibližně 10 %, neboť zvláknování na podkladovou textilií probíhá v její prostřední části. Průměr hodnot plošné hmotnosti u materiálu PVA je vytvořen pouze ze tří hodnot a ne 5 jako je to u materiálu s přídavkem LPPO. Obrázek 3.1 znázorňuje snímek a histogram distribuce průměrů vláken. Jsou zde vidět útvary v podobě kapek, ke kterým došlo nejspíše neúplným vypařením rozpouštědla, zejména vody, jež není tak těkavá jako jsou organická rozpouštědla a hůře se proto odpařuje. Další drobné defekty, jako je shluknutí několika vláken dohromady, nejspíše zapříčinila lokálně zvýšená intenzita elektrického pole, jež může

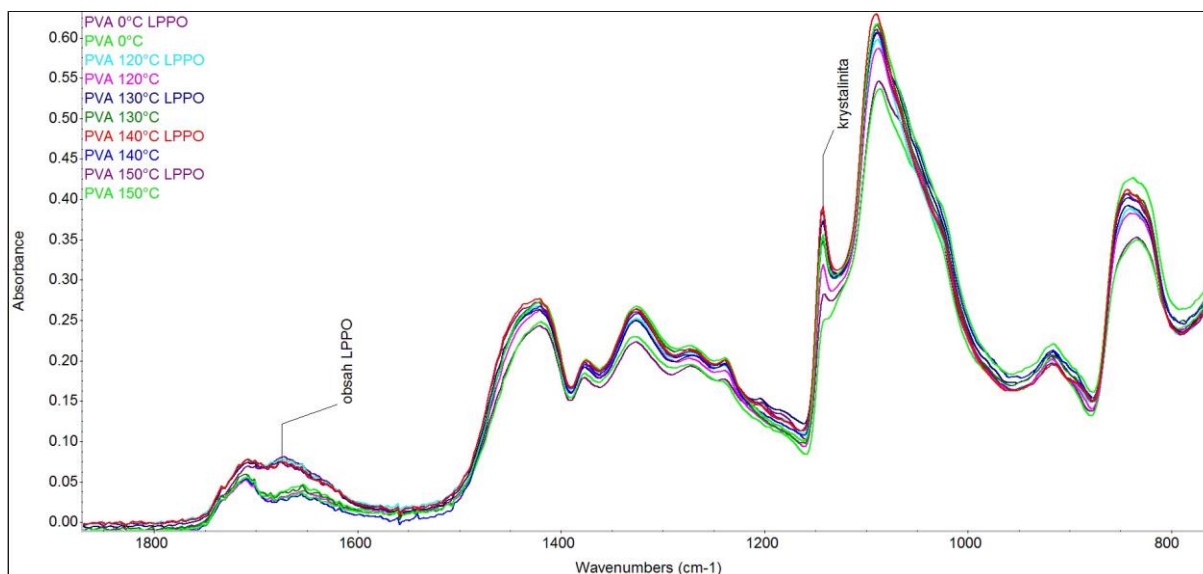
vystřelit kapku rozpouštědla. Tato kapka se může částečně rozpustit při dopadu na zvlákněný materiál.



Obrázek 3.1: Snímky PVA nanovláken bez a s obsahem lipophosphonoxinu ze SEM (měřítko stanoveno na 10 μm) spolu s distribucí průměrů vláken zanesené do histogramů

Metodou analýzy FTIR byla stvrzena v nanovlákněném materiálu přítomnost experimentálního antibiotika LPPO. Na obrázku 3.2. je znázorněn interferogram před a po stabilizaci všech PVA nanovláken s i bez aktivní látky LPPO a také infračervené spektrum použitého LPPO DR6180. Mezi rozsahem vlnočtů od 1 600 cm^{-1} do 1750 cm^{-1} zapříčiňuje obsah aktivní látky v nanovlákněch PVA + LPPO viditelný rozdíl v infračervených spektrech.

Tato PVA nanovláknina byla dále využita k výrobě vzorků, jež byly následně podrobeny tepelné stabilizaci.



Obrázek 3.2: FTIR metoda analýzy: spektrum infračervené složky světla PVA nanovláken, PVA+LPPO nanovláken bez HT a použitého LPPO DR6180 (LPPO)

3.2 Tepelná stabilizace nanovláčenného materiálu z PVA a PVA + LPPO

Kapitola 2.4 popisuje postup tepelné stabilizace, jejíž parametry použité v této bakalářské práci byly již předem navrženy v bakalářské práci Bc. Holečka [72] která se zabývá stabilizací PVA nanovláken pomocí vysokých teplot. Na doporučení v závěru této jeho práce byly pro tepelnou stabilizaci zvoleny teploty 120, 130, 140, a 150 °C a čas 1 hodina.

Dopad HT na vlastnosti zkoumaných materiálů ilustrují výsledky analýz, jež jsou prezentovány v následující části. Nanovláčenný materiál z PVA zde bude pro zjednodušení označován jako PVA nanovláčka a nanovláčenný materiál z PVA s přidavkem LPPO bude označován jako PVA + LPPO nanovláčka. Vzorky, které byly tepelně stabilizovány, budou popisovány jako PVA X, kde „X“ označuje teplotu stabilizace. Všechny tepelně stabilizované materiály s aktivní látkou budou identifikovány jako PVA + LPPO X (X = teplota stabilizace), například PVA + LPPO 120 °C 1 h označuje materiál, který byl stabilizován při teplotě 120 °C po dobu jedné hodiny. Čas již dále nebude nijak určován, protože doba stabilizace je pro všechny vzorky stejná.

Po tepelné stabilizaci materiálů bylo využito dalších metod analýzy. Vnější změny povrchů nanovláken byly skenovány pomocí elektronové mikroskopie (SEM) a změny v uvolňování PVA byly měřeny spektrofotometrií. Chemické změny a změny struktury materiálů byly zkoumány za pomoci Fourierovy transformační infračervené spektroskopie (FTIR). Hodnoty entalpie pro výpočet změn v krystalinitě polymeru byly detekovány diferenciální skenovací kalorimetrií (DSC).

Analýza morfologie PVA nanovláken po HT

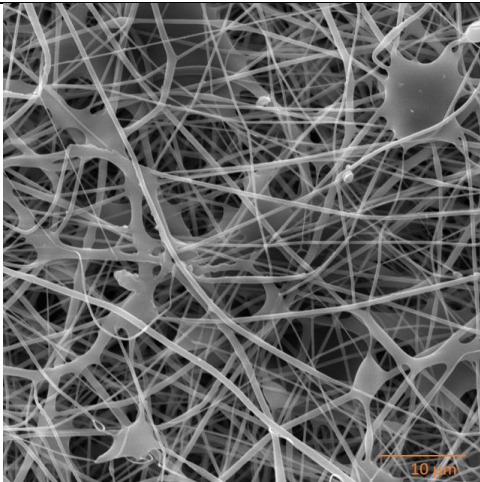
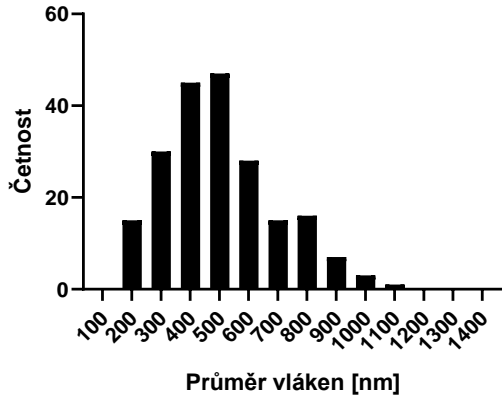
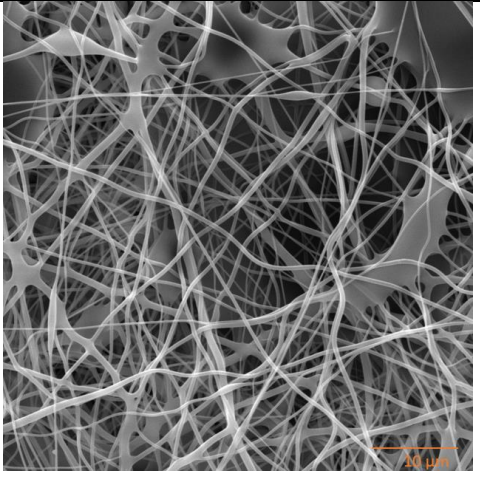
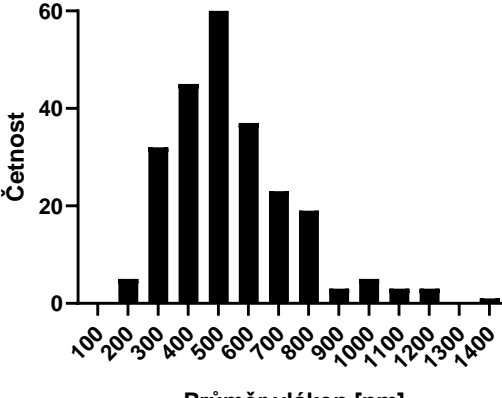
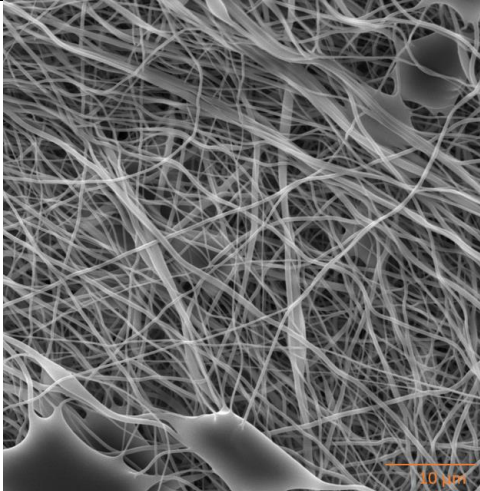
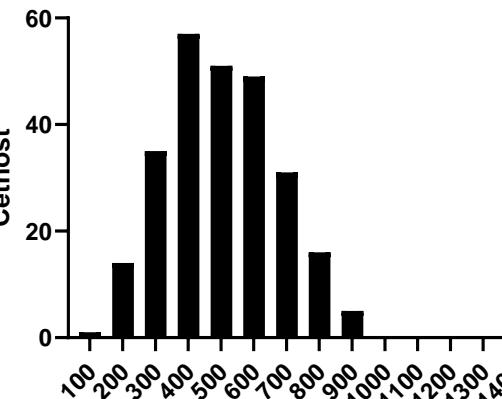
Kapitola 2.5 se detailně zaměřuje na analýzu morfologie, díky které nebyla zaznamenána signifikantní změna v průměrech vláken pod žádnými z testovaných podmínek tepelného zpracování (HT). Většina materiálů vykazovala střední průměr vláken mezi 500 nm a 600 nm, jak je uvedeno v tabulce 3.2. Střední průměry vláken s obsahem LPPO se pohybovaly v rozmezí 490 nm až 550 nm. Výsledky této analýzy ukázaly, že tepelná stabilizace (HT) nezpůsobila žádné signifikantní změny ve středních průměrech vláken.

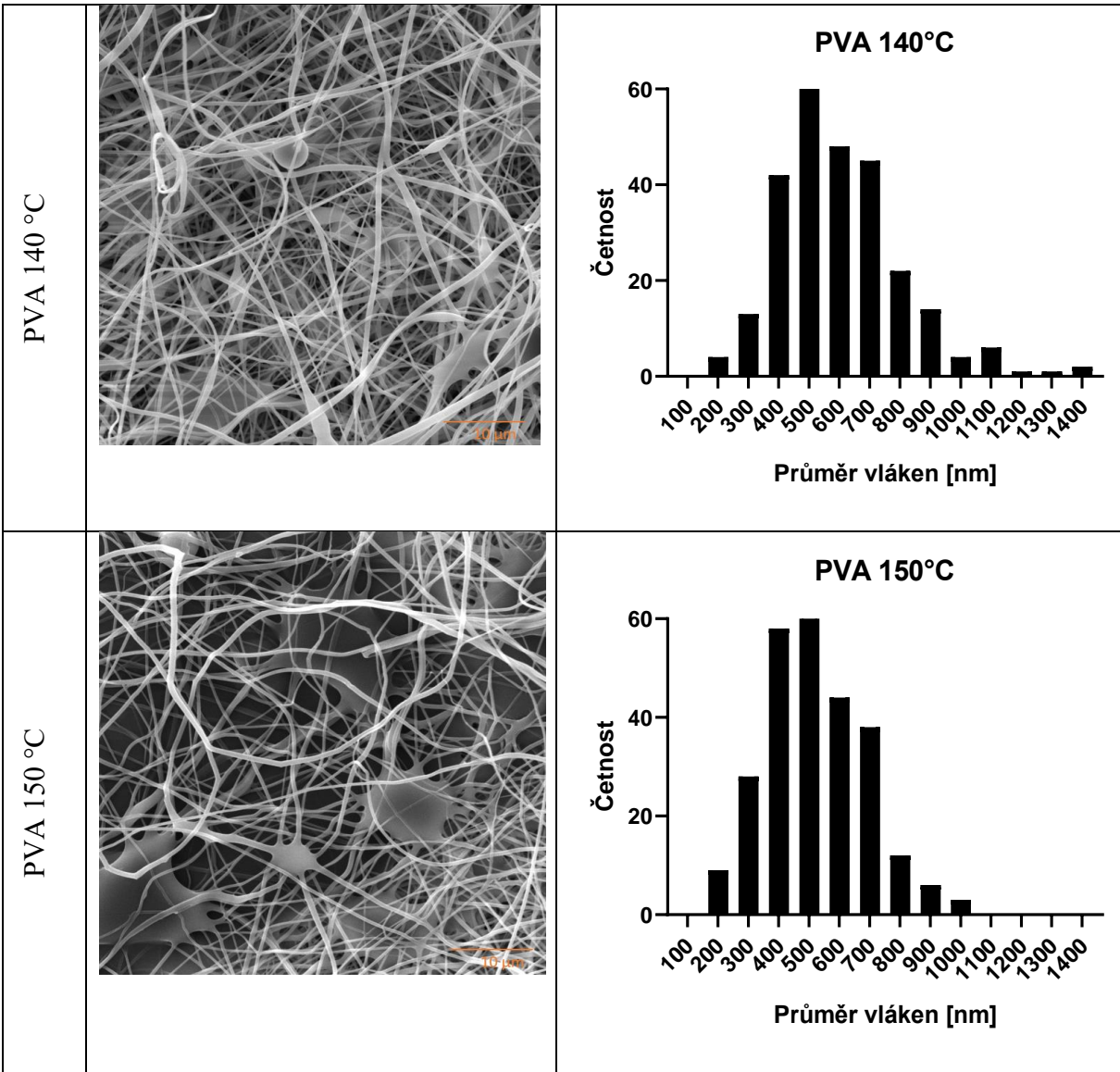
Tabulka 3.2: Tepelně stabilizované nanovláknenné materiály a jejich střední průměry vláken

Materiál	Průměr [nm]
PVA 120 °C	542±204
PVA 130 °C	503±165
PVA 140 °C	601±201
PVA 150 °C	523±160
PVA + 5 % LPPO 120 °C	504±157
PVA + 5 % LPPO 130 °C	547±157
PVA + 5 % LPPO 140 °C	501±169
PVA + 5 % LPPO 150 °C	489±148

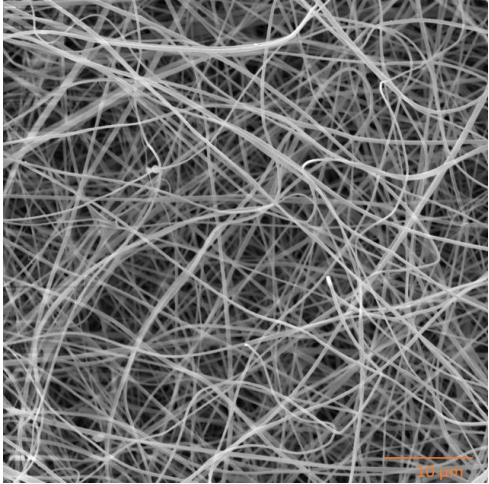
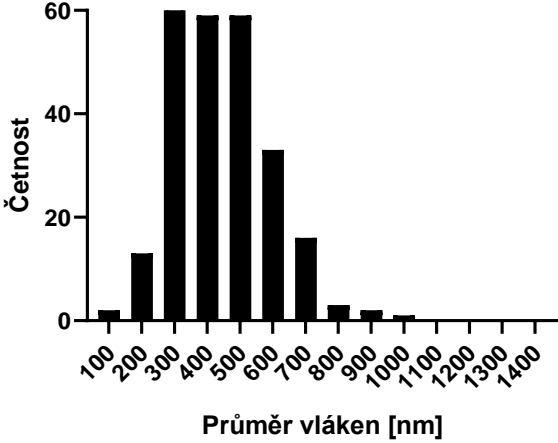
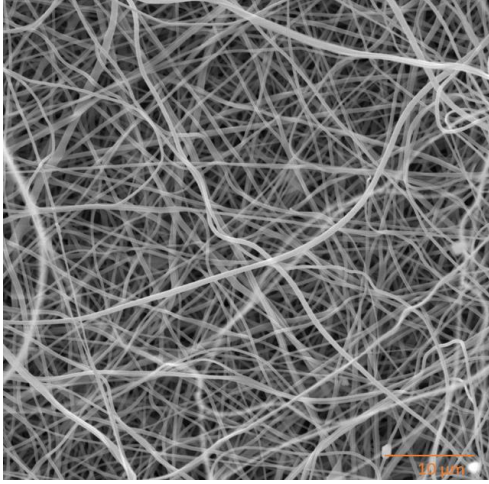
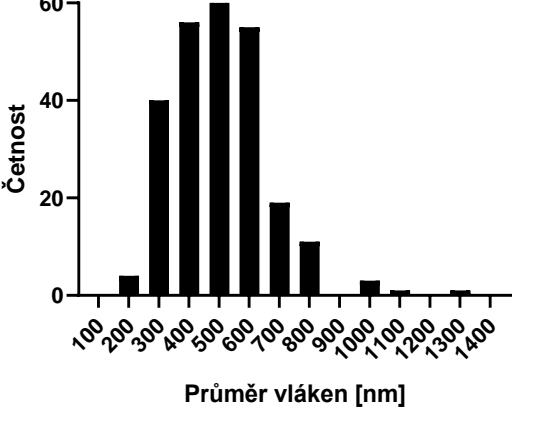
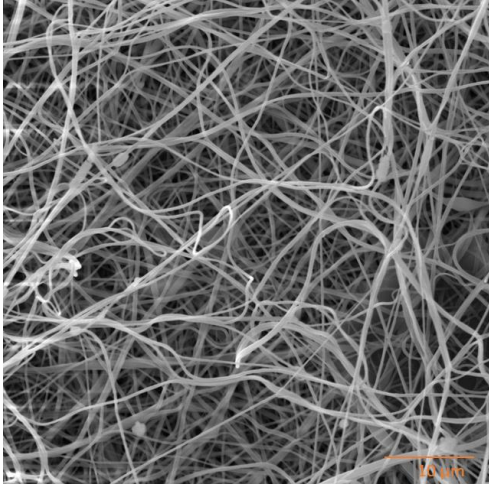
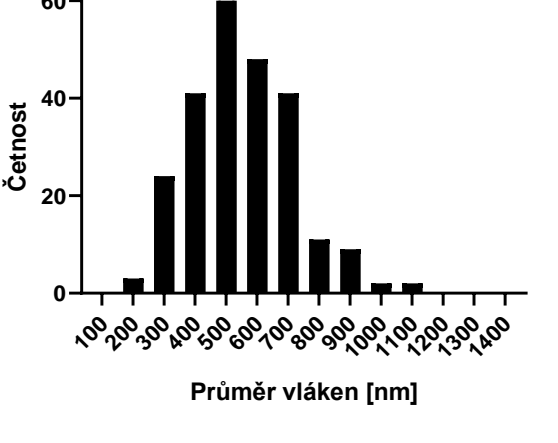
Z hodnot průměrů vláken zvlákněných materiálů můžeme říci, že přidavkem LPPO se nijak výrazně nezměnil průměr vláken, což rozporuje zjištění Bc. Holečka[72]. PVA + LPPO nanovláknena se ale na snímcích ze SEM zdají být menší. Výsledek průměrů vláken toto ale nenaznačuje.

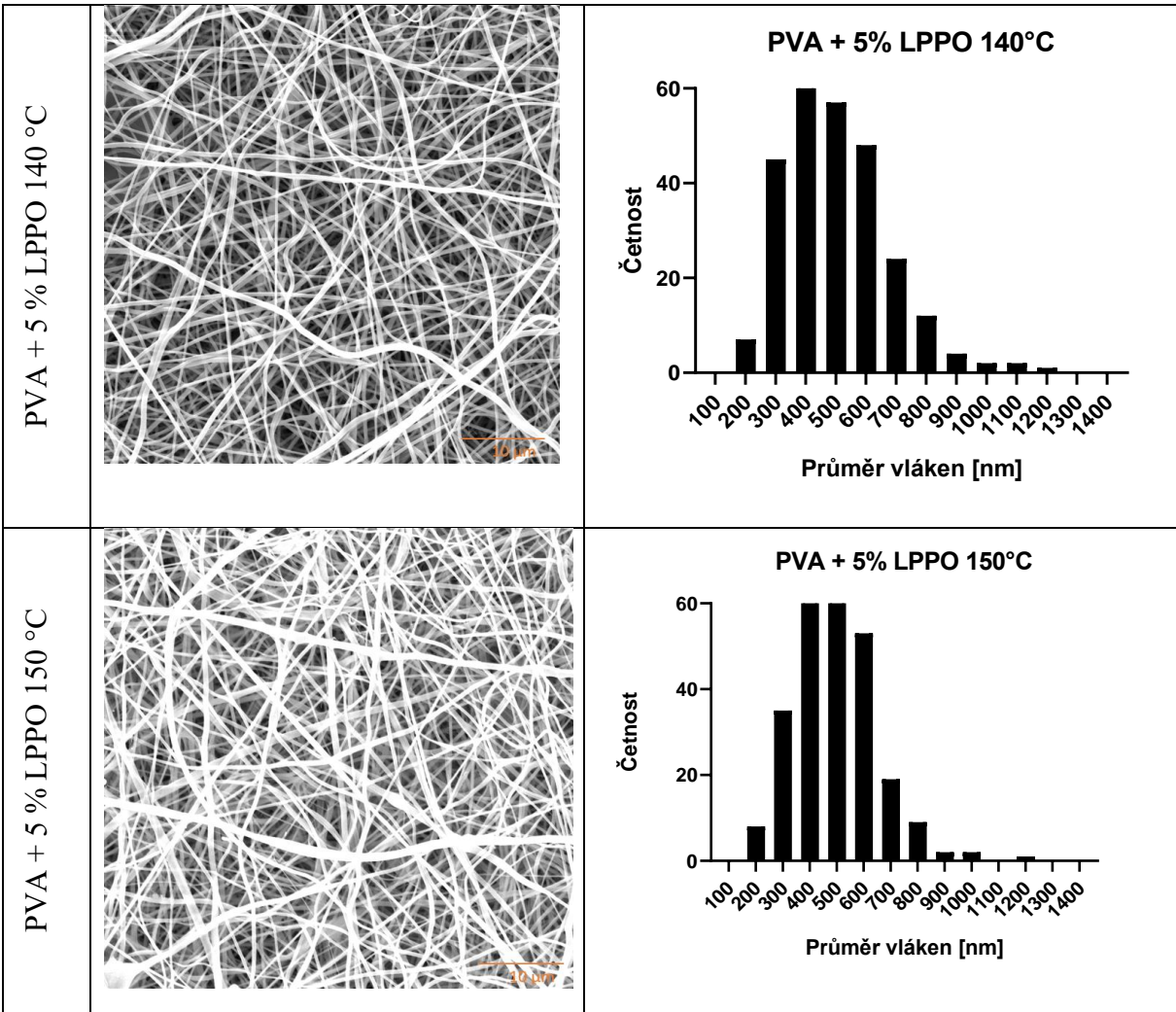
Tabulka 3.3: Snímky PVA nanovláken ze SEM (měřítko stanoveno na 10 μm) spolu s distribucí průměrů vláken zanesené do histogramů

HT	SEM snímek vzorku	Histogram průměrů vláken																												
PVA		<p style="text-align: center;">PVA</p>  <table border="1"> <caption>Data for PVA Histogram</caption> <thead> <tr> <th>Průměr vláken [nm]</th> <th>Četnost</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>200</td><td>15</td></tr> <tr><td>300</td><td>30</td></tr> <tr><td>400</td><td>45</td></tr> <tr><td>500</td><td>48</td></tr> <tr><td>600</td><td>28</td></tr> <tr><td>700</td><td>15</td></tr> <tr><td>800</td><td>16</td></tr> <tr><td>900</td><td>8</td></tr> <tr><td>1000</td><td>4</td></tr> <tr><td>1100</td><td>2</td></tr> <tr><td>1200</td><td>1</td></tr> <tr><td>1300</td><td>1</td></tr> <tr><td>1400</td><td>1</td></tr> </tbody> </table>	Průměr vláken [nm]	Četnost	200	15	300	30	400	45	500	48	600	28	700	15	800	16	900	8	1000	4	1100	2	1200	1	1300	1	1400	1
Průměr vláken [nm]	Četnost																													
200	15																													
300	30																													
400	45																													
500	48																													
600	28																													
700	15																													
800	16																													
900	8																													
1000	4																													
1100	2																													
1200	1																													
1300	1																													
1400	1																													
PVA 120 °C		<p style="text-align: center;">PVA 120 °C</p>  <table border="1"> <caption>Data for PVA 120 °C Histogram</caption> <thead> <tr> <th>Průměr vláken [nm]</th> <th>Četnost</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>200</td><td>5</td></tr> <tr><td>300</td><td>32</td></tr> <tr><td>400</td><td>45</td></tr> <tr><td>500</td><td>60</td></tr> <tr><td>600</td><td>38</td></tr> <tr><td>700</td><td>23</td></tr> <tr><td>800</td><td>19</td></tr> <tr><td>900</td><td>3</td></tr> <tr><td>1000</td><td>5</td></tr> <tr><td>1100</td><td>3</td></tr> <tr><td>1200</td><td>3</td></tr> <tr><td>1300</td><td>1</td></tr> <tr><td>1400</td><td>1</td></tr> </tbody> </table>	Průměr vláken [nm]	Četnost	200	5	300	32	400	45	500	60	600	38	700	23	800	19	900	3	1000	5	1100	3	1200	3	1300	1	1400	1
Průměr vláken [nm]	Četnost																													
200	5																													
300	32																													
400	45																													
500	60																													
600	38																													
700	23																													
800	19																													
900	3																													
1000	5																													
1100	3																													
1200	3																													
1300	1																													
1400	1																													
PVA 130 °C		<p style="text-align: center;">PVA 130 °C</p>  <table border="1"> <caption>Data for PVA 130 °C Histogram</caption> <thead> <tr> <th>Průměr vláken [nm]</th> <th>Četnost</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>200</td><td>15</td></tr> <tr><td>300</td><td>35</td></tr> <tr><td>400</td><td>58</td></tr> <tr><td>500</td><td>52</td></tr> <tr><td>600</td><td>49</td></tr> <tr><td>700</td><td>31</td></tr> <tr><td>800</td><td>16</td></tr> <tr><td>900</td><td>5</td></tr> <tr><td>1000</td><td>1</td></tr> <tr><td>1100</td><td>1</td></tr> <tr><td>1200</td><td>1</td></tr> <tr><td>1300</td><td>1</td></tr> <tr><td>1400</td><td>1</td></tr> </tbody> </table>	Průměr vláken [nm]	Četnost	200	15	300	35	400	58	500	52	600	49	700	31	800	16	900	5	1000	1	1100	1	1200	1	1300	1	1400	1
Průměr vláken [nm]	Četnost																													
200	15																													
300	35																													
400	58																													
500	52																													
600	49																													
700	31																													
800	16																													
900	5																													
1000	1																													
1100	1																													
1200	1																													
1300	1																													
1400	1																													



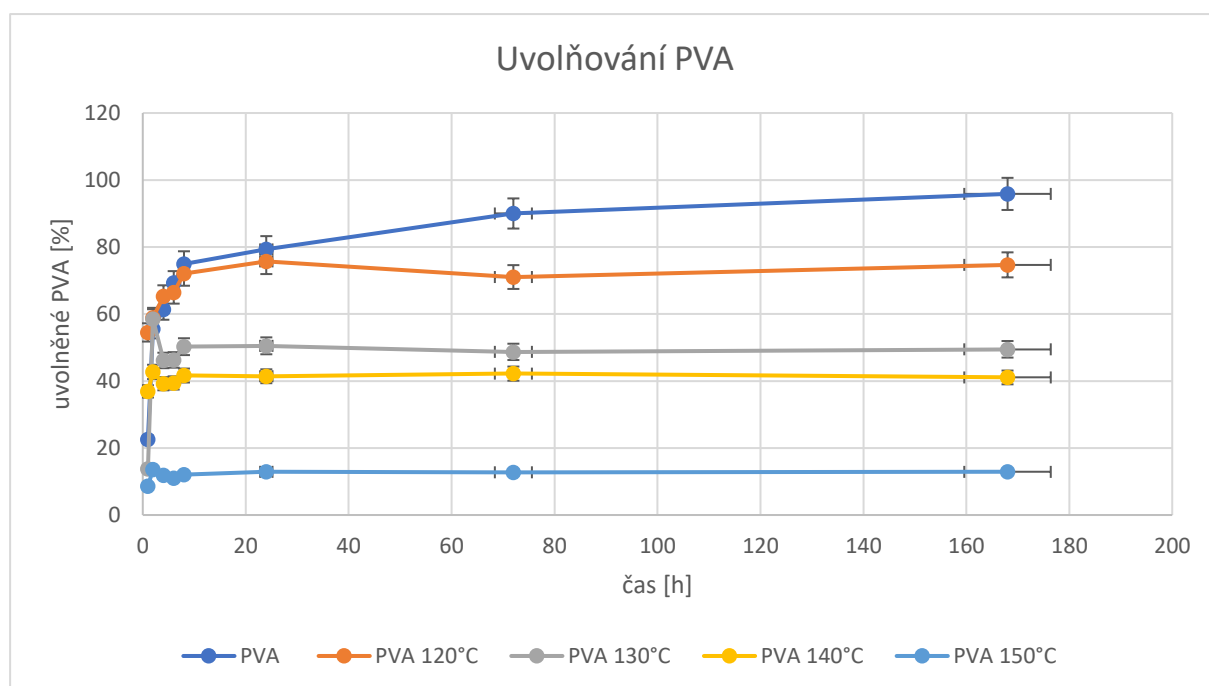
Tabulka 3.4: Snímky PVA nanovláken s obsahem LPPO ze SEM (měřítko stanoveno na 10 μm) spolu s distribucí průměrů vláken zanesené do histogramů

HT	SEM snímek vzorku	Histogram průměrů vláken																														
PVA + 5 % LPPO		<p data-bbox="1034 349 1259 383">PVA + 5% LPPO</p>  <table border="1" data-bbox="826 405 1385 846"> <caption>Data for PVA + 5% LPPO Histogram</caption> <thead> <tr> <th>Průměr vláken [nm]</th> <th>Četnost</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>100</td><td>0</td></tr> <tr><td>200</td><td>2</td></tr> <tr><td>300</td><td>12</td></tr> <tr><td>400</td><td>58</td></tr> <tr><td>500</td><td>58</td></tr> <tr><td>600</td><td>58</td></tr> <tr><td>700</td><td>32</td></tr> <tr><td>800</td><td>15</td></tr> <tr><td>900</td><td>2</td></tr> <tr><td>1000</td><td>1</td></tr> <tr><td>1100</td><td>0</td></tr> <tr><td>1200</td><td>0</td></tr> <tr><td>1300</td><td>0</td></tr> <tr><td>1400</td><td>0</td></tr> </tbody> </table>	Průměr vláken [nm]	Četnost	100	0	200	2	300	12	400	58	500	58	600	58	700	32	800	15	900	2	1000	1	1100	0	1200	0	1300	0	1400	0
Průměr vláken [nm]	Četnost																															
100	0																															
200	2																															
300	12																															
400	58																															
500	58																															
600	58																															
700	32																															
800	15																															
900	2																															
1000	1																															
1100	0																															
1200	0																															
1300	0																															
1400	0																															
PVA + 5 % LPPO 120 °C		<p data-bbox="970 920 1267 954">PVA + 5% LPPO 120°C</p>  <table border="1" data-bbox="826 976 1385 1417"> <caption>Data for PVA + 5% LPPO 120°C Histogram</caption> <thead> <tr> <th>Průměr vláken [nm]</th> <th>Četnost</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>100</td><td>0</td></tr> <tr><td>200</td><td>2</td></tr> <tr><td>300</td><td>40</td></tr> <tr><td>400</td><td>55</td></tr> <tr><td>500</td><td>60</td></tr> <tr><td>600</td><td>55</td></tr> <tr><td>700</td><td>18</td></tr> <tr><td>800</td><td>10</td></tr> <tr><td>900</td><td>2</td></tr> <tr><td>1000</td><td>1</td></tr> <tr><td>1100</td><td>0</td></tr> <tr><td>1200</td><td>0</td></tr> <tr><td>1300</td><td>0</td></tr> <tr><td>1400</td><td>0</td></tr> </tbody> </table>	Průměr vláken [nm]	Četnost	100	0	200	2	300	40	400	55	500	60	600	55	700	18	800	10	900	2	1000	1	1100	0	1200	0	1300	0	1400	0
Průměr vláken [nm]	Četnost																															
100	0																															
200	2																															
300	40																															
400	55																															
500	60																															
600	55																															
700	18																															
800	10																															
900	2																															
1000	1																															
1100	0																															
1200	0																															
1300	0																															
1400	0																															
PVA + 5 % LPPO 130 °C		<p data-bbox="975 1458 1278 1491">PVA + 5% LPPO 130°C</p>  <table border="1" data-bbox="826 1514 1385 1955"> <caption>Data for PVA + 5% LPPO 130°C Histogram</caption> <thead> <tr> <th>Průměr vláken [nm]</th> <th>Četnost</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>100</td><td>0</td></tr> <tr><td>200</td><td>2</td></tr> <tr><td>300</td><td>22</td></tr> <tr><td>400</td><td>40</td></tr> <tr><td>500</td><td>60</td></tr> <tr><td>600</td><td>48</td></tr> <tr><td>700</td><td>40</td></tr> <tr><td>800</td><td>10</td></tr> <tr><td>900</td><td>8</td></tr> <tr><td>1000</td><td>2</td></tr> <tr><td>1100</td><td>1</td></tr> <tr><td>1200</td><td>0</td></tr> <tr><td>1300</td><td>0</td></tr> <tr><td>1400</td><td>0</td></tr> </tbody> </table>	Průměr vláken [nm]	Četnost	100	0	200	2	300	22	400	40	500	60	600	48	700	40	800	10	900	8	1000	2	1100	1	1200	0	1300	0	1400	0
Průměr vláken [nm]	Četnost																															
100	0																															
200	2																															
300	22																															
400	40																															
500	60																															
600	48																															
700	40																															
800	10																															
900	8																															
1000	2																															
1100	1																															
1200	0																															
1300	0																															
1400	0																															



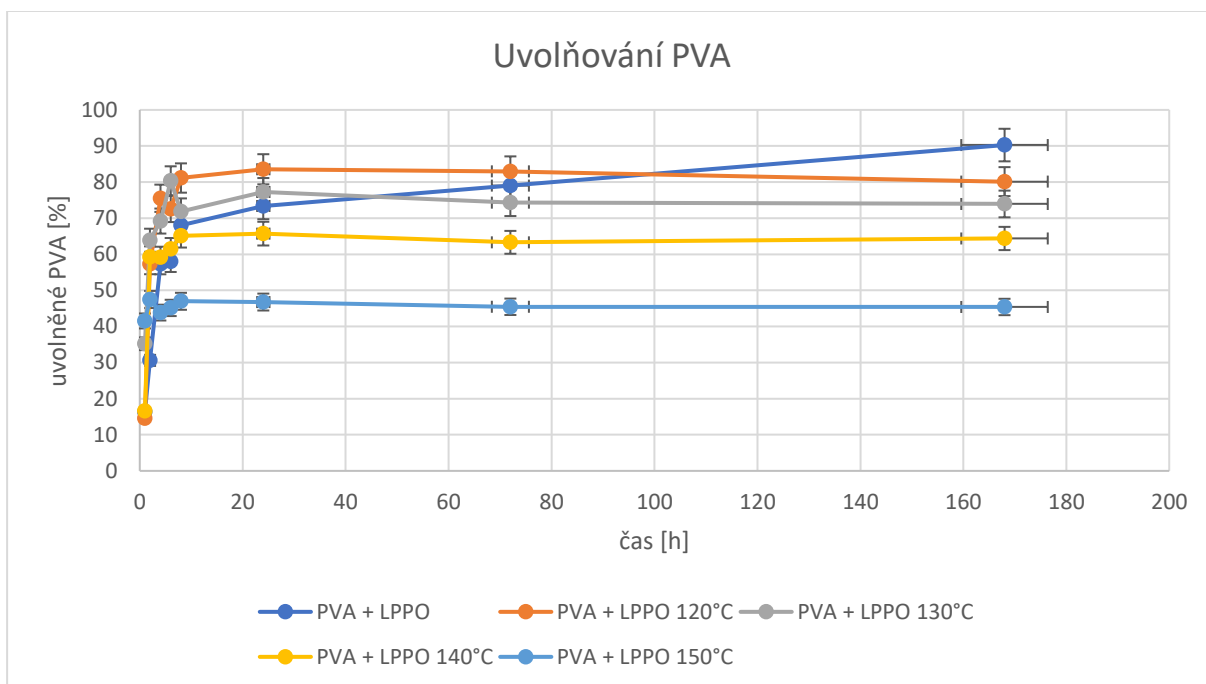
Analýza rozpustnosti PVA z materiálů

Spektrofotometrické metody analýzy a detaily o přípravě vzorků jsou podrobně charakterizovány v kapitole 2.6. Graf, který je prezentován na obrázku 3.3 odhaluje změnu rozpustnosti polyvinylalkoholových nanovláken ve směsi PBS + 0,02 % azid sodný (dále jen PBS) při teplotě 37 °C, která závisí na odlišných teplotách HT při stabilizaci, která trvala 1 hodinu. Na obrázku 3.4 se nachází graf, který odhaluje změnu rozpustnosti nanovláčenného materiálu z polyvinylalkoholu s obsahem LPPO ve směsi PBS při teplotě 37 °C, která závisí na tom, při jaké teplotě byla provedena tepelná stabilizace, která probíhala po dobu 1 hodiny.



Obrázek 3.3: Graf ukazující stoupající rozpuštění PVA (zobrazeno v % úhrnné váhy vzorku) z PVA nanovláken závislé na čase rozpuštění – srovnání účinku teploty HT na stabilitu zvláčeného polyvinylalkoholu

Obrázek 3.3. ukazuje, že teploty stabilizace do 120 °C významně nezměnily rozpustnost nanovláken z PVA ve směsi fosfátového pufru. Od teplot HT 130 °C a vyšších se projevuje evidentní snížení rozpustnosti. U nestabilizovaného materiálu se po 7 dnech uvolnilo 97 % PVA. Za stejný čas se u stabilizovaných nanovláken na 130 °C uvolnilo jen 49 %. U vzorku po HT při 140 °C to bylo 41 %, a pouze 13 % PVA u vzorku po HT při 150 °C. Při teplotě 150 °C došel ke stejnému závěru i Bc. Matěj Holeček [72].

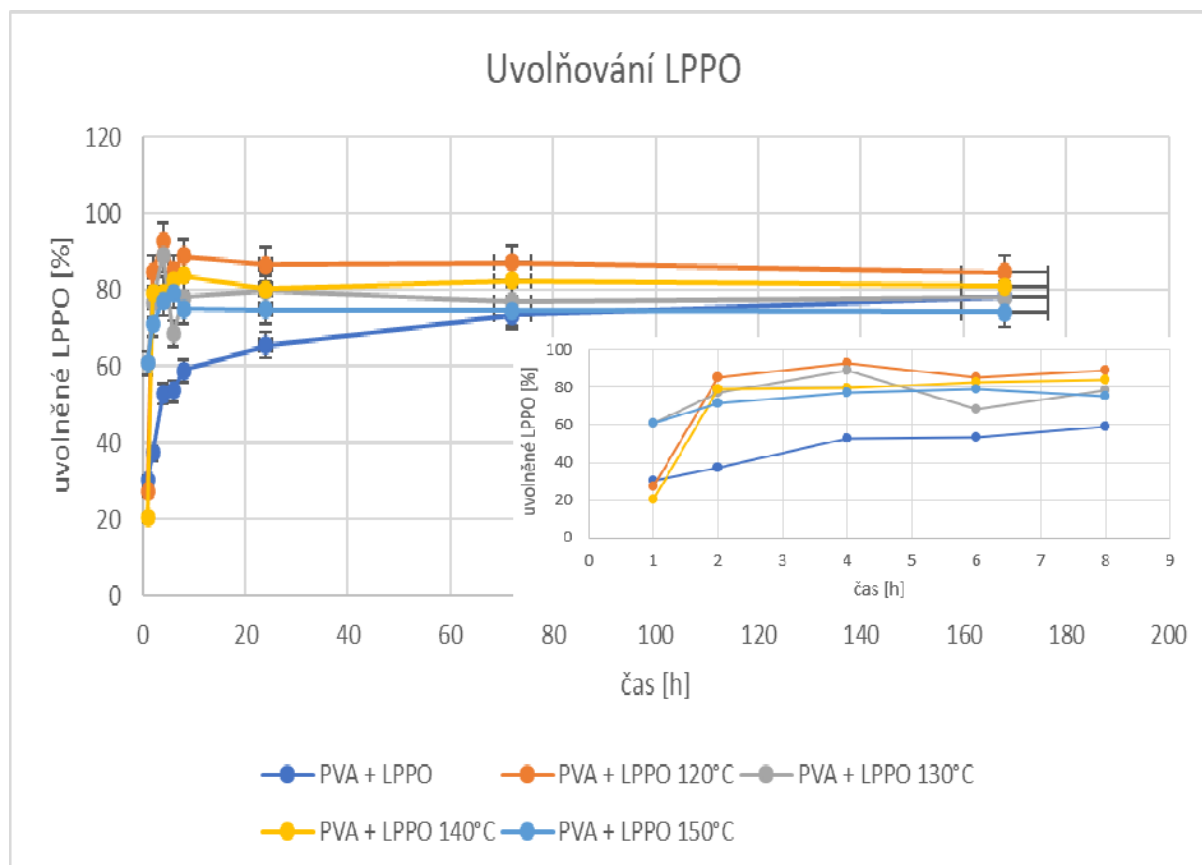


Obrázek 3.4: Graf ukazující stoupající rozpuštění PVA (zobrazeno v % úhrnné váhy vzorku) z PVA nanovláken se začleněným lipophosphonoxinem závislé na čase rozpuštění – srovnání účinku teploty HT na stabilitu zvlákněného polyvinylalkoholu se začleněným lipophosphonoxinem

Obrázek 3.4 zobrazuje graf, z kterého lze zjistit, že přítomnost antibiotika lipophosphonoxinu rozpustnost polymeru polyvinylalkoholu snižuje u vzorku, který nebyl podroben HT. Po HT ale k rychlejšímu uvolňování PVA z nanovláken s LPPO naopak dochází. Podíl v procentech uvolněného PVA klesá oproti materiálu bez LPPO z 97 % na 90 %. Výrazná změna uvolněného PVA ze vzorků PVA + LPPO nastává u tepelně stabilizovaných materiálů. Po HT při 120 °C se uvolnilo o skoro 5 % více PVA než u vzorku bez antibiotika, po HT při 130 °C vzrostlo procento uvolněného PVA téměř o 25 %. U vzorku po HT při 140 °C vystoupalo uvolněné PVA na 64 %, což je nárůst o 23 % oproti vzorku bez LPPO. Největší změna uvolněného PVA však nastala při teplotě 150 °C, kde se uvolnilo 45 % celkového PVA, to činí rozdíl vyšší o 32 % oproti materiálu bez experimentálního antibiotika. Toto zvýšení rozpustnosti materiálu mohlo být způsobeno molekulami LPPO v nanovlákněném materiálu, které brání vytváření vodíkových můstků mezi řetězci polyvinylalkoholu a materiál tak nemůže krystalizovat. Vizuálním pozorováním bylo zjištěno, že materiály po HT v rozmezí 120–150 °C vytvořily po vložení do PBS transparentní hydrogely. Ty se po celých 7 dní trvání experimentu daly pozorovat ve zkumavce. Část hydrogelu mohla být spolu s roztokem zachycena při odebírání vzorků pipetou. To by mohlo vést k umělému navýšení koncentrace PVA v odebraných vzorcích oproti skutečné koncentraci rozpuštěného PVA v PBS, což by mohlo způsobit zkreslení výsledků analýzy. Lze tedy s jistotou konstatovat, že tepelná stabilizace snižuje rozpustnost PVA, zatímco přítomnost LPPO rozpustnost PVA po HT zvyšuje oproti čistému tepelně stabilizovanému PVA, ale rozpustnost je stále o několik desítek procent nižší než nestabilizovaný materiál.

Analýza uvolňování aktivní látky LPPO z materiálu

Tepelná stabilizace a její vliv na rychlost uvolňování aktivní látky LPPO byly analyzovány pomocí spektrofotometru. Proces analýzy a metoda přípravy vzorků byly detailně popsány v kapitole 2.6.



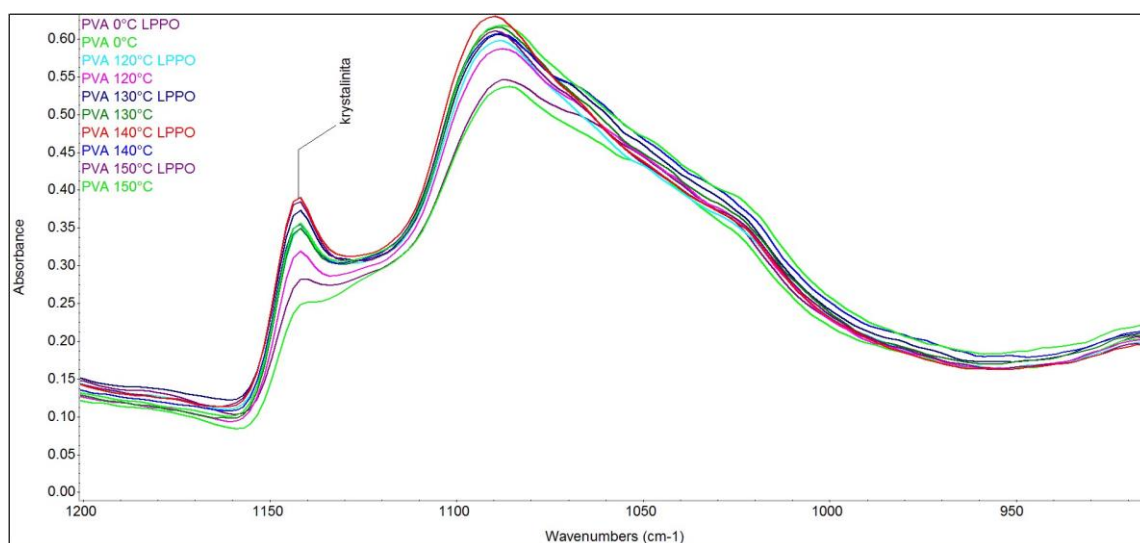
Obrázek 3.5: Graf ukazující stoupající uvolňování lipophosphonoxinem (zobrazeno v % úhrnné váhy vzorku) z PVA nanovláken se začleněným lipophosphonoxinem závislé na čase uvolňování – srovnání účinku teploty HT na stabilitu zvlákněného polyvinylalkoholu

Vliv tepelné stabilizace na uvolňování LPPO při době stabilizace 1 h zobrazuje graf na obrázku 3.5. Stoupající uvolňování experimentálního antibiotika LPPO je zobrazeno jako procento z úhrnné teoretické hmotnosti aktivní látky inkorporované do PVA nanovláken. To odpovídá 0,5 mg ve vzorku nanovláknenného materiálu o hmotnosti 10 mg s 5% obsahem LPPO v sušině. Ze vzorku, který neprošel tepelnou stabilizací se za 7 dní uvolnilo 78 % LPPO a narozdíl od vzorků, které prošly HT, u nestabilizovaného vzorku nedocházelo k efektu „burst-release“. Z grafu na obrázku 3.5 je patrné, že uvolňování LPPO z nanovláknenného materiálu proběhlo téměř okamžitě po jeho vložení do zkumavky s PBS. Během následujících sedmi dní pak došlo k jen minimálnímu nárůstu koncentrace uvolněného LPPO. Efekt rychlého počátečního uvolňování, známý jako „burst-release“, byl pozorován u všech tepelně stabilizovaných materiálů. Nejvíce aktivní látky se po 7 dnech uvolnilo při teplotě 120 °C a to téměř 85 %. Poté se nejvíce LPPO uvolnilo při teplotě 140 °C a to 81 %. Při teplotě 130 °C se za 7 dní uvolnilo skoro stejné množství LPPO jako u nestabilizovaného materiálu. Nejméně aktivní látky se za 7 dní uvolnilo při teplotě 150 °C a to 74 %. Účinek tepelné stabilizace omezoval celkové množství uvolněné aktivní látky LPPO z PVA nanovláken ve vodném prostředí, což potvrdila analýza. Dle teorie by hodnoty uvolněného LPPO neměly klesat, přes tuto skutečnost ale graf zobrazuje pokles.

Tato zdánlivá nesrovnalost mohla být zapříčiněna například rozkladem LPPO, k němuž docházelo po tepelné stabilizaci materiálu při průběhu uvolňování ve vodném prostředí nebo vzájemnou interakci mezi polymerními řetězci PVA a molekulami experimentálního antibiotika.

Analýza krystalinity materiálů

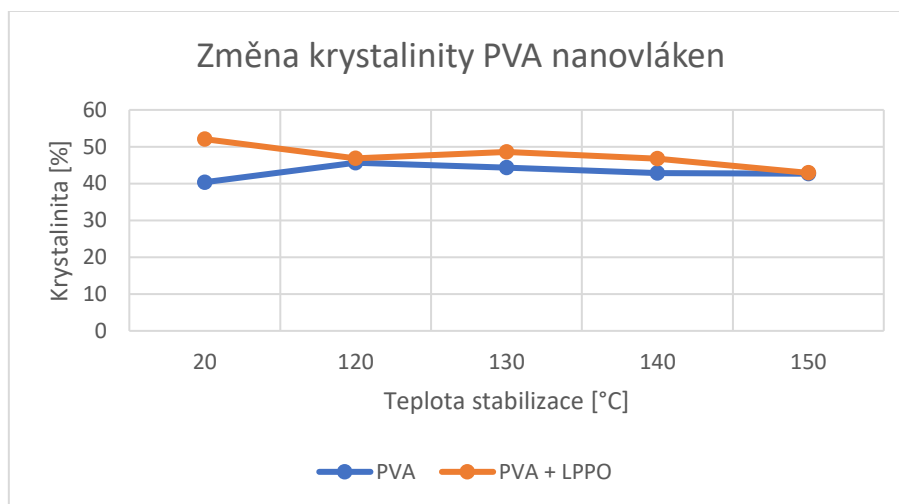
Krystalinita byla hodnocena z analytických metod FTIR a DSC. Metodika FTIR analýzy použitá pro stanovení krystalinity materiálů je podrobně rozvedena v kapitole 2.7. Na obrázku 3.6 je absorpční pík s vlnočtem 1140 cm^{-1} označený jako "krystalinita". Tento peak vykazuje jasný trend růstu absorbance s rostoucí teplotou HT. Zároveň je tento pík spojován se symetrickými C–C "stretching" vibracemi a považuje ho za vysoce citlivý na přítomnost krystalické fáze v PVA, kde polymery s vyšší krystalinitou mají větší absorbanci infračerveného záření v této oblasti. [74, 75]



Obrázek 3.6: FTIR metoda analýzy: spektrum infračervené složky světla PVA a PVA +LPPO nanovláken, které byly tepelně stabilizovány

Při rostoucí teplotě HT roste krystalinita u nanovláčenného materiálu z polyvinylalkoholu s i bez obsahu LPPO, což bylo potvrzeno pomocí infračervené spektroskopie. Tento výsledek byl následně ověřován metodou DSC.

Metodika DSC analýzy použitá pro stanovení krystalinity materiálů je podrobně rozvedena v kapitole 2.8. Výsledky této analýzy jsou souhrnně prezentovány v grafu na obrázku 3.7, který byl zpracován z obrázků 3.8-3.17 umístěných v kapitole přílohy.



Obrázek 3.7: Grafické zobrazení změny krystalinity PVA nanovláken bez i s LPPO podrobených HT

Vzorky podrobené vyšším teplotám stabilizace vykazovaly systematicky se zvyšující absorpci infračerveného záření na vlnočtu $1\ 140\ \text{cm}^{-1}$ ve spektru infračerveného záření u tepelně stabilizovaných nanovláken při vyšších teplotách (viz obrázek 3.6). Zatímco DSC analýza vzorků nezaznamenala pravidelný nárůst krystalinity. Peak v oblasti $1\ 140\ \text{cm}^{-1}$ nemusí reflektovat jen obsah krystalické fáze, ale také ho mohou ovlivňovat další změny materiálu. Například vznik vazby C-O-C (viz obrázek 1.5), který je způsoben vyššími teplotami tepelné stabilizace. Z časových důvodů byla analýza krystalické fáze prováděna pouze na jednom vzorku všech čtyř teplotních podmínek HT. Krystalická fáze v materiálu může být nerovnoměrně rozdělena a zároveň výsledná hodnota krystalinity materiálu může výrazně kolísat dle místa odběru vzorku. Což konstatoval Ing. Luboš Běhálek, Ph.D., který analýzy DSC provedl. Analýza více vzorků pro každou teplotní podmínku by více zpřesnila výsledek krystalinity. Výsledné hodnoty mohly ovlivnit proměnlivé laboratorní podmínky, optimální by bylo použití exikátoru pro kontrolu aspektů prostředí, zejména vlhkosti.

Závěr

Předložená bakalářská práce měla za úkol zkoumat efekt účinku stabilizace za pomoci vysokých teplot (HT) na uvolňování začleněného experimentálního antibiotika LPPO do nanovláknenných materiálů na bázi PVA a na rozpustnost polyvinylalkoholového nanovláknna ve vodném prostředí. V experimentální části byly syntetizovány nanovláknenné materiály z čistého PVA, tak i obsahující LPPO. Nanovláknenný materiál byl zvlákněn z PVA s vysokým stupněm hydrolyzy (98–98,8 %) a vysokou molekulovou hmotností (125 000 g/mol). Pro výrobu nanovláken stejnosměrným elektrickým zvlákněním byla vybrána Technologie Nanospider™, poté proběhla tepelná stabilizace za teplot 120, 130, 140 a 150 °C po dobu 1 hodiny.

Dopad účinku vysokých teplot na vlastnosti zvlákněných materiálů byl v experimentální části posouzen řadou analytických metod. Plošná hmotnost nanovláken z PVA byla $32,53 \pm 3,57$ g/m² a střední průměr jejich vláken se pohyboval v rozmezí 488 ± 183 nm. Rozdíl plošné hmotnosti a středního průměru vláken u PVA+LPPO nanovláken nebyl výrazný, průměr byl 450 ± 165 nm s plošnou hmotností $27,82 \pm 2,55$ g/m². Analýza rozpustnosti prokázala, že materiály po stabilizaci vysokými teplotami byly méně rozpustnější než před stabilizací. U materiálu bez experimentálního antibiotika docházelo u nanovláken ke snižování rozpustnosti PVA, a to až po HT při 130 °C, kdy se v závislosti na době stabilizace rozpustilo 49 % hmotnosti vzorku a dále klesala u HT při 140 °C na 41 % a při HT na 150 °C až na 13 %. U PVA+LPPO nanovláken byla rozpustnost PVA vyšší, a to až o 32 % u HT při 150 °C.

Poměr uvolněného nanovláknna z PVA se zmenšil díky chemickým změnám a změnám ve struktuře, ke kterým docházelo v průběhu HT. Z rozboru uvolňování aktivní látky plyne, že tepelná stabilizace neovlivnila rychlost uvolňování LPPO z PVA nanovláken. U experimentálního antibiotika LPPO došlo k efektu okamžitého uvolnění (“burst release“) po styku materiálu s vodným prostředím. Stabilizace za pomoci vysokých teplot neovlivnila množství uvolněného LPPO, jelikož se procentuální množství uvolněného LPPO pohybovalo v rozmezí ± 4 až 7 % v porovnání s nestabilizovaným materiálem. Tyto výsledky naznačují, že snížení celkového množství uvolněného LPPO může být také důsledkem jeho degradace ve vodném prostředí.

Závěry této práce potvrzují, že HT vede ke stabilizaci nanovláknenných materiálů z PVA ve vodném prostředí, což se projevuje snížením jejich rozpustnosti. Přítomnost LPPO rozpustnost PVA po HT zvyšuje oproti čistému tepelně stabilizovanému PVA. V budoucích experimentech by bylo přínosné provést analýzu DSC na několika stejných vzorcích, aby byla analýza přesnější. Zároveň by bylo přínosné provést další analýzy jako je smáčivost a nukleární magnetická rezonance.

Použitá literatura

- [1] HARVEY, Carol. Wound healing. *Orthopedic Nursing* [online]. 2005, **24**(2), 143–157; quiz 158–159. ISSN 0744-6020. Dostupné z: doi:10.1097/00006416-200503000-00012
- [2] THOMAS M. BROWN; KARTHIK KRISHNAMURTHY. Histology, Dermis. *National Library of Medicine* [online]. 14. listopad 2022. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535346/>
- [3] WICKETT, R. Randall a Marty O. VISSCHER. Structure and function of the epidermal barrier. *American Journal of Infection Control* [online]. 2006, **34**(10), S98–S110. ISSN 01966553. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajic.2006.05.295
- [4] RIPPA, Alexandra L., Ekaterina P. KALABUSHEVA a Ekaterina A. VOROTELYAK. Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved. *Cells* [online]. 2019, **8**(6), 607. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells8060607
- [5] RHEINWALD, J. G. Human epidermal keratinocyte cell culture and xenograft systems: applications in the detection of potential chemical carcinogens and the study of epidermal transformation. *Progress in Clinical and Biological Research*. 1989, **298**, 113–125. ISSN 0361-7742.
- [6] CLARK, Richard A. F., Kaustabh GHOSH a Marcia G. TONNESEN. Tissue engineering for cutaneous wounds. *The Journal of Investigative Dermatology* [online]. 2007, **127**(5), 1018–1029. ISSN 1523-1747. Dostupné z: doi:10.1038/sj.jid.5700715
- [7] DE MEL, Achala, Alexander M. SEIFALIAN a Martin A. BIRCHALL. Orchestrating cell/material interactions for tissue engineering of surgical implants. *Macromolecular Bioscience* [online]. 2012, **12**(8), 1010–1021. ISSN 1616-5195. Dostupné z: doi:10.1002/mabi.201200039
- [8] HERNDON, D. N., R. E. BARROW, R. L. RUTAN, T. C. RUTAN, M. H. DESAI a S. ABSTON. A comparison of conservative versus early excision. Therapies in severely burned patients. *Annals of Surgery* [online]. 1989, **209**(5), 547–552; discussion 552–553. ISSN 0003-4932. Dostupné z: doi:10.1097/00000658-198905000-00006
- [9] VIG, Komal, Atul CHAUDHARI, Shweta TRIPATHI, Saurabh DIXIT, Rajnish SAHU, Shree Kumar PILLAI, Vida DENNIS a Shree SINGH. Advances in Skin Regeneration Using Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2017, **18**(4), 789. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms18040789
- [10] YU, Justine R., Javier NAVARRO, James C. COBURN, Bhushan MAHADIK, Joseph MOLNAR, James H. HOLMES, Arthur J. NAM a John P. FISHER. Current and Future Perspectives on Skin Tissue Engineering: Key Features of Biomedical Research, Translational Assessment, and Clinical Application. *Advanced Healthcare Materials* [online]. 2019, **8**(5), 1801471. ISSN 2192-2640, 2192-2659. Dostupné z: doi:10.1002/adhm.201801471
- [11] BABENSEE, Julia E., James M. ANDERSON, Larry V. MCINTIRE a Antonios G. MIKOS. Host response to tissue engineered devices. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 1998, **33**(1), Tissue Engineering, 111–139. ISSN 0169-409X. Dostupné z: doi:10.1016/S0169-409X(98)00023-4
- [12] LYONS, Frank G., Amir A. AL-MUNAJJED, Stephen M. KIERAN, Mary E. TONER, Ciara M. MURPHY, Garry P. DUFFY a Fergal J. O'BRIEN. The healing of bony defects by cell-free collagen-based scaffolds compared to stem cell-seeded tissue engineered constructs. *Biomaterials* [online]. 2010, **31**(35), 9232–9243. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2010.08.056
- [13] O'BRIEN, Fergal J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* [online]. 2011, **14**(3), 88–95. ISSN 13697021. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-7021(11)70058-X

- [14] BARAJAA, Mohammed A., Debolina GHOSH a Cato T. LAURENCIN. Decellularized Extracellular Matrix-Derived Hydrogels: a Powerful Class of Biomaterials for Skeletal Muscle Regenerative Engineering Applications. *Regenerative Engineering and Translational Medicine* [online]. 2023 [vid. 2024-04-03]. ISSN 2364-4141. Dostupné z: doi:10.1007/s40883-023-00328-8
- [15] AMIRAZAD, Halimeh, Mehdi DADASHPOUR a Nosratollah ZARGHAMI. Application of decellularized bone matrix as a bioscaffold in bone tissue engineering. *Journal of Biological Engineering* [online]. 2022, **16**(1), 1. ISSN 1754-1611. Dostupné z: doi:10.1186/s13036-021-00282-5
- [16] GOMEZ-FLORIT, Manuel, Alberto PARDO, Rui M. A. DOMINGUES, Ana L. GRAÇA, Pedro S. BABO, Rui L. REIS a Manuela E. GOMES. Natural-Based Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Molecules* [online]. 2020, **25**(24), 5858. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25245858
- [17] MOHANKUMAR, B. S., G. PRIYANKA, S. RAJALAKSHMI, Rakesh SANKAR, Taj SABREEN a Jayasree RAVINDRAN. Hydrogels: potential aid in tissue engineering—a review. *Polymer Bulletin* [online]. 2022, **79**(9), 7009–7039. ISSN 1436-2449. Dostupné z: doi:10.1007/s00289-021-03864-x
- [18] BAYRAK, Ece. Nanofibers: Production, Characterization, and Tissue Engineering Applications. In: *21st Century Nanostructured Materials - Physics, Chemistry, Classification, and Emerging Applications in Industry, Biomedicine, and Agriculture* [online]. B.m.: IntechOpen, 2022 [vid. 2024-04-03]. ISBN 978-1-80355-085-5. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.102787
- [19] KARGOZAR, Saeid, Rajendra K. SINGH, Hae-Won KIM a Francesco BAINO. “Hard” ceramics for “Soft” tissue engineering: Paradox or opportunity? *Acta Biomaterialia* [online]. 2020, **115**, 1–28. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2020.08.014
- [20] SAMADIAN, Hadi, Saeed FARZAMFAR, Ahmad VAEZ, Arian EHTERAMI, Arindam BIT, Mostafa ALAM, Arash GOODARZI, Gholamhossein DARYA a Majid SALEHI. A tailored polylactic acid/polycaprolactone biodegradable and bioactive 3D porous scaffold containing gelatin nanofibers and Taurine for bone regeneration. *Scientific Reports* [online]. 2020, **10**(1), 13366. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-70155-2
- [21] PHUTANE, Prasanna, Darshan TELANGE, Surendra AGRAWAL, Mahendra GUNDE, Kunal KOTKAR a Anil PETHE. Biofunctionalization and Applications of Polymeric Nanofibers in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Polymers* [online]. 2023, **15**(5), 1202. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym15051202
- [22] KOUTSOPOULOS, Sotirios. Self-assembling peptide nanofiber hydrogels in tissue engineering and regenerative medicine: Progress, design guidelines, and applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2016, **104**(4), 1002–1016. ISSN 1552-4965. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.35638
- [23] MA, Zuwei, Masaya KOTAKI, Ryuji INAI a Seeram RAMAKRISHNA. Potential of Nanofiber Matrix as Tissue-Engineering Scaffolds. *Tissue Engineering* [online]. 2005, **11**(1–2), 101–109. ISSN 1076-3279. Dostupné z: doi:10.1089/ten.2005.11.101
- [24] WADE, Ryan J. a Jason A. BURDICK. Advances in nanofibrous scaffolds for biomedical applications: From electrospinning to self-assembly. *Nano Today* [online]. 2014, **9**(6), 722–742. ISSN 1748-0132. Dostupné z: doi:10.1016/j.nantod.2014.10.002
- [25] NEMATİ, Sorour, Se-jeong KIM, Young Min SHIN a Heungsoo SHIN. Current progress in application of polymeric nanofibers to tissue engineering. *Nano Convergence* [online]. 2019, **6**(1), 36. ISSN 2196-5404. Dostupné z: doi:10.1186/s40580-019-0209-y
- [26] AHMADI BONAKDAR, Mahboubeh a Denis RODRIGUE. Electrospinning: Processes, Structures, and Materials. *Macromol* [online]. 2024, **4**(1), 58–103. ISSN 2673-6209. Dostupné z: doi:10.3390/macromol4010004

- [27] PROF, Rndr Csc Jirsák Oldřich, Filip SANETRŇÍK, Rndr Csc Lukáš David PROF, Václav KO-TEK, Csc Martinová Lenka ING a Jiří Ing CHALOUPEK. Process for producing nanofibers from polymeric solution by electrostatic spinning and apparatus for making the same [online]. CZ294274B6. 10. listopad 2004. [vid. 2024-04-02]. Dostupné z: <https://patents.google.com/patent/CZ294274B6/en>
- [28] LI, Yawen, Therese BOU-AKL, Yawen LI a Therese BOU-AKL. Electrospinning in Tissue Engineering. In: *Electrospinning - Material, Techniques, and Biomedical Applications* [online]. B.m.: IntechOpen, 2016 [vid. 2024-04-02]. ISBN 978-953-51-2822-9. Dostupné z: doi:10.5772/65836
- [29] *The Effectiveness and Risks of Long-Term Opioid Therapy for Chronic Pain: A Systematic Review for a National Institutes of Health Pathways to Prevention Workshop / Annals of Internal Medicine* [online]. [vid. 2024-04-03]. Dostupné z: <https://www.acpjournals.org/doi/full/10.7326/M14-2559>
- [30] AHLIN GRABNAR, Pegi a Julijana KRISTL. The manufacturing techniques of drug-loaded polymeric nanoparticles from preformed polymers. *Journal of Microencapsulation* [online]. 2011, **28**(4), 323–335. ISSN 0265-2048. Dostupné z: doi:10.3109/02652048.2011.569763
- [31] SHARMA, Rahul, Harmanpreet SINGH, Munish JOSHI, Abhinandan SHARMA, Tarun GARG, Amit GOYAL a Goutam RATH. Recent Advances in Polymeric Electrospun Nanofibers for Drug Delivery. *Critical Reviews & Trade; in Therapeutic Drug Carrier Systems* [online]. 2014, **31**(3) [vid. 2024-04-03]. ISSN 0743-4863, 2162-660X. Dostupné z: doi:10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2014008193
- [32] PELIPENKO, J., P. KOCBEK a J. KRISTL. Critical attributes of nanofibers: Preparation, drug loading, and tissue regeneration. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2015, **484**(1), 57–74. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2015.02.043
- [33] CHENG, Liying, Xiaoming SUN, Xin ZHAO, Lan WANG, Jia YU, Guoqing PAN, Bin LI, Huilin YANG, Yuguang ZHANG a Wenguo CUI. Surface biofunctional drug-loaded electrospun fibrous scaffolds for comprehensive repairing hypertrophic scars. *Biomaterials* [online]. 2016, **83**, 169–181. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2016.01.002
- [34] QIU, Xuefeng, Benjamin Li-Ping LEE, Xinghai NING, Niren MURTHY, Nianguo DONG a Song LI. End-point immobilization of heparin on plasma-treated surface of electrospun polycarbonate-urethane vascular graft. *Acta Biomaterialia* [online]. 2017, **51**, 138–147. ISSN 1742-7061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2017.01.012
- [35] KAIALLY, Waseem, Parastou EMAMI, Kofi ASARE-ADDO, Saeed SHOJAEI a Ali NOKHODCHI. Psyllium: a promising polymer for sustained release formulations in combination with HPMC polymers. *Pharmaceutical Development and Technology* [online]. 2014, **19**(3), 269–277. ISSN 1083-7450. Dostupné z: doi:10.3109/10837450.2013.775156
- [36] ZHANG, Qiang, Yingchun LI, Zhi Yuan (William) LIN, Kenneth K.Y. WONG, Min LIN, Lara YILDIRIMER a Xin ZHAO. Electrospun polymeric micro/nanofibrous scaffolds for long-term drug release and their biomedical applications. *Drug Discovery Today* [online]. 2017, **22**(9), 1351–1366. ISSN 13596446. Dostupné z: doi:10.1016/j.drudis.2017.05.007
- [37] ZAINI, Amiruddin Fadzli, Balu RANGANATHAN, Subramaniam SUNDARRAJAN a Seeram RAMAKRISHNA. Coaxial electrospun nanofibers as pharmaceutical nanoformulation for controlled drug release. In: *14th IEEE International Conference on Nanotechnology: 14th IEEE International Conference on Nanotechnology* [online]. 2014, s. 531–534 [vid. 2024-04-03]. ISSN 1944-9399. Dostupné z: doi:10.1109/NANO.2014.6968190
- [38] SARAF, Anita, L. Scott BAGGETT, Robert M. RAPHAEL, F. Kurtis KASPER a Antonios G. MIKOS. Regulated non-viral gene delivery from coaxial electrospun fiber mesh scaffolds. *Journal*

of Controlled Release [online]. 2010, **143**(1), 95–103. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2009.12.009

[39] HU, Jue, Molamma P. PRABHAKARAN, Lingling TIAN, Xin DING a Seeram RAMAKRISHNA. Drug-loaded emulsion electrospun nanofibers: characterization, drug release and in vitro biocompatibility. *RSC Advances* [online]. 2015, **5**(121), 100256–100267. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/C5RA18535A

[40] ZHAO, Xin, Shichao JIANG, Shen LIU, Shuai CHEN, Zhi Yuan (William) LIN, Guoqing PAN, Fan HE, Fengfeng LI, Cunyi FAN a Wenguo CUI. Optimization of intrinsic and extrinsic tendon healing through controllable water-soluble mitomycin-C release from electrospun fibers by mediating adhesion-related gene expression. *Biomaterials* [online]. 2015, **61**, 61–74. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2015.05.012

[41] WANG, Chong a Min WANG. Emulsion Electrospinning of Nanofibrous Delivery Vehicles for the Controlled Release of Biomolecules and the In Vitro Release Behaviour of Biomolecules. *Advanced Materials Research* [online]. 2012, **410**, 98–101. ISSN 1662-8985. Dostupné z: doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.410.98

[42] GÓRA, Aleksander, Molamma P. PRABHAKARAN, Goh Tze Leng EUNICE, Rajamani LAKSHMINARAYANAN a Seeram RAMAKRISHNA. Silver nanoparticle incorporated poly(l-lactide-co-glycolide) nanofibers: Evaluation of their biocompatibility and antibacterial properties. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2015, **132**(42) [vid. 2024-04-03]. ISSN 1097-4628. Dostupné z: doi:10.1002/app.42686

[43] YU, Deng-Guang, Jie ZHOU, Nicholas P CHATTERTON, Ying LI, Jing HUANG a Xia WANG. Polyacrylonitrile nanofibers coated with silver nanoparticles using a modified coaxial electrospinning process. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2012, **7**, 5725–5732. ISSN 1176-9114. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S37455

[44] DING, Yaping, Wei LI, Feng ZHANG, Zehua LIU, Nazanin ZANJANIZADEH EZAZI, Dongfei LIU a Hélder A. SANTOS. Electrospun Fibrous Architectures for Drug Delivery, Tissue Engineering and Cancer Therapy. *Advanced Functional Materials* [online]. 2019, **29**(2), 1802852. ISSN 1616-3028. Dostupné z: doi:10.1002/adfm.201802852

[45] HU, Xialin, Jing LI, Qiqing CHEN, Zhifen LIN a Daqiang YIN. Combined effects of aqueous suspensions of fullerene and humic acid on the availability of polycyclic aromatic hydrocarbons: Evaluated with negligible depletion solid-phase microextraction. *Science of The Total Environment* [online]. 2014, **493**, 12–21. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2014.05.107

[46] MIGUEL, Sónia P., Daniela R. FIGUEIRA, Déborah SIMÕES, Maximiano P. RIBEIRO, Paula COUTINHO, Paula FERREIRA a Ilídio J. CORREIA. Electrospun polymeric nanofibres as wound dressings: A review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2018, **169**, 60–71. ISSN 0927-7765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2018.05.011

[47] MIGUEL, Sónia P., Rosa S. SEQUEIRA, André F. MOREIRA, Cátia S.D. CABRAL, António G. MENDONÇA, Paula FERREIRA a Ilídio J. CORREIA. An overview of electrospun membranes loaded with bioactive molecules for improving the wound healing process. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2019, **139**, 1–22. ISSN 09396411. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2019.03.010

[48] ASGHARI, Fatemeh, Mohammad SAMIEI, Khosro ADIBKIA, Abolfazl AKBARZADEH a So-odabeh DAVARAN. Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* [online]. 2017, **45**(2), 185–192. ISSN 2169-1401, 2169-141X. Dostupné z: doi:10.3109/21691401.2016.1146731

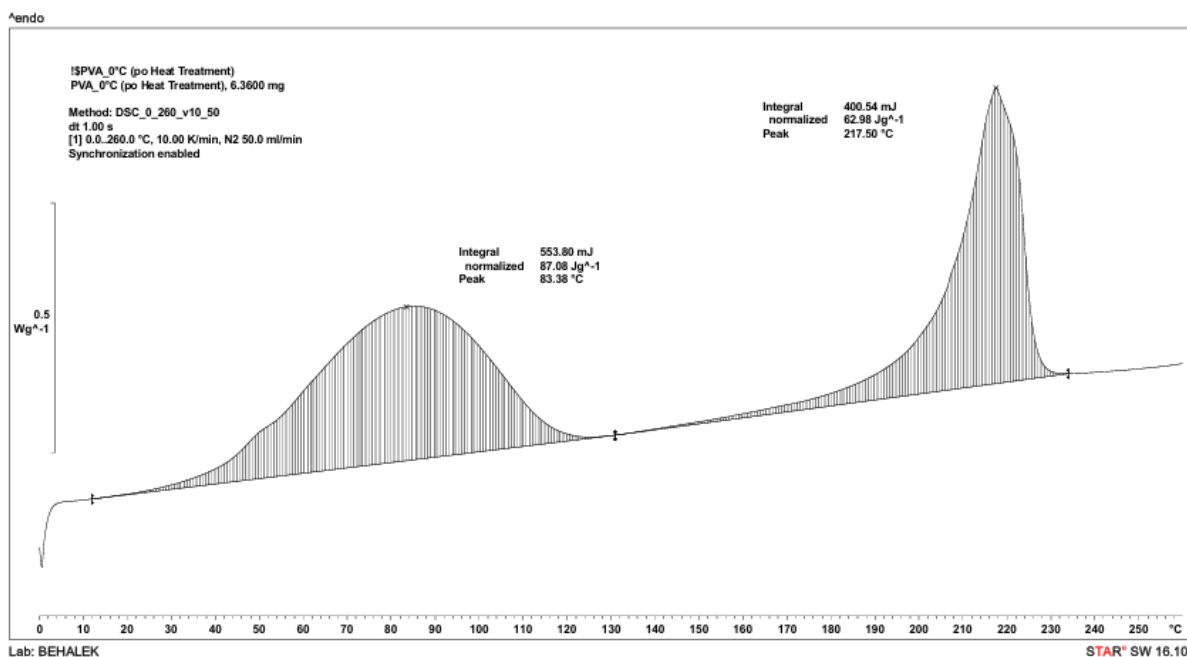
- [49] REDDY, M. Sai Bhargava, Deepalekshmi PONNAMMA, Rajan CHOUDHARY a Kishor Kumar SADASIVUNI. A Comparative Review of Natural and Synthetic Biopolymer Composite Scaffolds. *Polymers* [online]. 2021, **13**(7), 1105. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym13071105
- [50] OZDIL, Deniz a Halil Murat AYDIN. Polymers for medical and tissue engineering applications: Polymers for medical and tissue engineering applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* [online]. 2014, **89**(12), 1793–1810. ISSN 02682575. Dostupné z: doi:10.1002/jctb.4505
- [51] BISWAL, Trinath. Biopolymers for tissue engineering applications: A review. *Materials Today: Proceedings* [online]. 2021, **41**, 397–402. ISSN 22147853. Dostupné z: doi:10.1016/j.matpr.2020.09.628
- [52] CHAUDHARI, Atul, Komal VIG, Dieudonné BAGANIZI, Rajnish SAHU, Saurabh DIXIT, Vida DENNIS, Shree SINGH a Shreekumar PILLAI. Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2016, **17**(12), 1974. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms17121974
- [53] KROEZE, Robert, Marco HELDER, Leon GOVAERT a Theo SMIT. Biodegradable Polymers in Bone Tissue Engineering. *Materials* [online]. 2009, **2**(3), 833–856. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma2030833
- [54] BACAKOVA, Lucie, Marketa ZIKMUNDOVA, Julia PAJOROVA, Antonin BROZ, Elena FILOVA, Andreu BLANQUER, Roman MATEJKA, Jana STEPANOVSKA, Petr MIKES, Vera JENCOVA, Eva KUZELOVA KOSTAKOVA a Alla SINICA. Nanofibrous Scaffolds for Skin Tissue Engineering and Wound Healing Based on Synthetic Polymers. In: Margarita STOYTICHEVA a Roumen ZLATEV, ed. *Applications of Nanobiotechnology* [online]. B.m.: IntechOpen, 2020 [vid. 2024-03-30]. ISBN 978-1-78985-977-5. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.88744
- [55] JENČOVÁ, Věra, Eva KUŽELOVÁ KOŠŤÁKOVÁ, Petr MIKEŠ, Věra HEDVIČÁKOVÁ a David LUKÁŠ. *Nanovlákná: teorie, technologie a použití*. Vydání: 1. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2021. ISBN 978-80-7494-539-7.
- [56] NAGARKAR, Rigved a Jatin PATEL. Polyvinyl Alcohol: A Comprehensive Study. 2019.
- [57] HDIDAR, M., S. CHOUIKHI, A. FATTOUM a M. AROUS. Effect of hydrolysis degree and mass molecular weight on the structure and properties of PVA films. *Ionics* [online]. 2017, **23**(11), 3125–3135. ISSN 1862-0760. Dostupné z: doi:10.1007/s11581-017-2103-0
- [58] SLAUGHTER, Brandon V., Shahana S. KHURSHID, Omar Z. FISHER, Ali KHADEMHOSEINI a Nicholas A. PEPPAS. Hydrogels in Regenerative Medicine. *Advanced Materials* [online]. 2009, **21**(32–33), 3307–3329. ISSN 1521-4095. Dostupné z: doi:10.1002/adma.200802106
- [59] KUMAR, Anuj a Sung Soo HAN. PVA-based hydrogels for tissue engineering: A review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* [online]. 2017, **66**(4), 159–182. ISSN 0091-4037, 1563-535X. Dostupné z: doi:10.1080/00914037.2016.1190930
- [60] TEIXEIRA, Marta A., M. Teresa P. AMORIM a Helena P. FELGUEIRAS. Poly(Vinyl Alcohol)-Based Nanofibrous Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Polymers* [online]. 2020, **12**(1), 7. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12010007
- [61] CAMPIGLIO, Chiara Emma, Nicola CONTESSI NEGRINI, Silvia FARÈ a Lorenza DRAGHI. Cross-Linking Strategies for Electrospun Gelatin Scaffolds. *Materials* [online]. 2019, **12**(15), 2476. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma12152476
- [62] KOPRIVOVA, B., M. LISNENKO, K. SOLARSKA-SCIUK, R. PROCHAZKOVA, V. NOVOTNY, J. MULLEROVA, P. MIKES a V. JENCOVA. Large-scale electrospinning of poly (vinylalcohol) nanofibers incorporated with platelet-derived growth factors. *Express Polymer Letters* [online]. 2020, **14**(10), 987–1000. ISSN 1788618X. Dostupné z: doi:10.3144/expresspolymlett.2020.80

- [63] WONG, Kenneth Kar Ho, Martin ZINKE-ALLMANG a Wankei WAN. Effect of annealing on aqueous stability and elastic modulus of electrospun poly(vinyl alcohol) fibers. *Journal of Materials Science* [online]. 2010, **45**(9), 2456–2465. ISSN 1573-4803. Dostupné z: doi:10.1007/s10853-010-4217-x
- [64] MIRAFTAB, Mohsen, Abu Naser SAIFULLAH a Ahmet ÇAY. Physical stabilisation of electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibres: comparative study on methanol and heat-based crosslinking. *Journal of Materials Science* [online]. 2015, **50**(4), 1943–1957. ISSN 1573-4803. Dostupné z: doi:10.1007/s10853-014-8759-1
- [65] MICHELE, Andre, Patrick PASCHKOWSKI, Christopher HÄNEL, Günter E. M. TOVAR, Thomas SCHIESTEL a Alexander SOUTHAN. Acid catalyzed cross-linking of polyvinyl alcohol for humidifier membranes. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2022, **139**(6), 51606. ISSN 1097-4628. Dostupné z: doi:10.1002/app.51606
- [66] IMMELMAN, E., R. D. SANDERSON, E. P. JACOBS a A. J. VAN REENEN. Poly(vinyl alcohol) gel sublayers for reverse osmosis membranes. I. Insolubilization by acid-catalyzed dehydration. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 1993, **50**(6), 1013–1034. ISSN 1097-4628. Dostupné z: doi:10.1002/app.1993.070500611
- [67] PRITCHARD, J. G. a D. A. AKINTOLA. Complexation of polyvinyl alcohol with iodine: Analytical precision and mechanism. *Talanta* [online]. 1972, **19**(7), 877–888. ISSN 0039-9140. Dostupné z: doi:10.1016/0039-9140(72)80256-X
- [68] ZAHEDI, Payam, Iraj REZAEIAN, Seyed-Omid RANAIE-SIADAT, Seyed-Hassan JAFARI a Pitt SUPAPHOL. A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. *Polymers for Advanced Technologies* [online]. 2010, **21**(2), 77–95. ISSN 1099-1581. Dostupné z: doi:10.1002/pat.1625
- [69] WANG, Linlin, Chen HU a Longquan SHAO. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2017, **12**, 1227–1249. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S121956
- [70] LÁTROVÁ, Klára, Noemi HAVLOVÁ, Renata VEČEŘOVÁ, Dominik PINKAS, Kateřina BOGDANOVÁ, Milan KOLÁŘ, Radovan FIŠER, Ivo KONOPÁSEK, Duy Dinh DO PHAM, Dominik REJMAN a Gabriela MIKUŠOVÁ. Outer membrane and phospholipid composition of the target membrane affect the antimicrobial potential of first- and second-generation lipophosphonoxins. *Scientific Reports* [online]. 2021, **11**(1), 10446. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-021-89883-0
- [71] DO PHAM, Duy Dinh, Věra JENČOVÁ, Miriam KAŇUCHOVÁ, Jan BAYRAM, Ivana GROSSOVÁ, Hubert ŠUCA, Lukáš URBAN, Kristýna HAVLÍČKOVÁ, Vít NOVOTNÝ, Petr MIKEŠ, Viktor MOJR, Nikifor ASATIANI, Eva Kuželová KOŠŤÁKOVÁ, Martina MAIXNEROVÁ, Alena VLKOVÁ, Dragana VÍTOVSKÁ, Hana ŠANDEROVÁ, Alexandr NEMEC, Libor KRÁSNÝ, Robert ZAJÍČEK, David LUKÁŠ, Dominik REJMAN a Peter GÁL. Novel lipophosphonoxin-loaded polycaprolactone electrospun nanofiber dressing reduces *Staphylococcus aureus* induced wound infection in mice. *Scientific Reports* [online]. 2021, **11**(1), 17688. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-021-96980-7
- [72] HOLEČEK, Matěj. Tepelná stabilizace funkcionalizovaných nanovlákných materiálů založených na polyvinylalkoholu. nedatováno.
- [73] PROCHÁZKOVÁ, Lenka, Yadira RODRÍGUEZ-MUÑOZ, Jindřich PROCHÁZKA a Jiří WANNER. Simple spectrophotometric method for determination of polyvinylalcohol in different types of wastewater. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* [online]. 2014, **94**(4), 399–410. ISSN 0306-7319, 1029-0397. Dostupné z: doi:10.1080/03067319.2013.853761

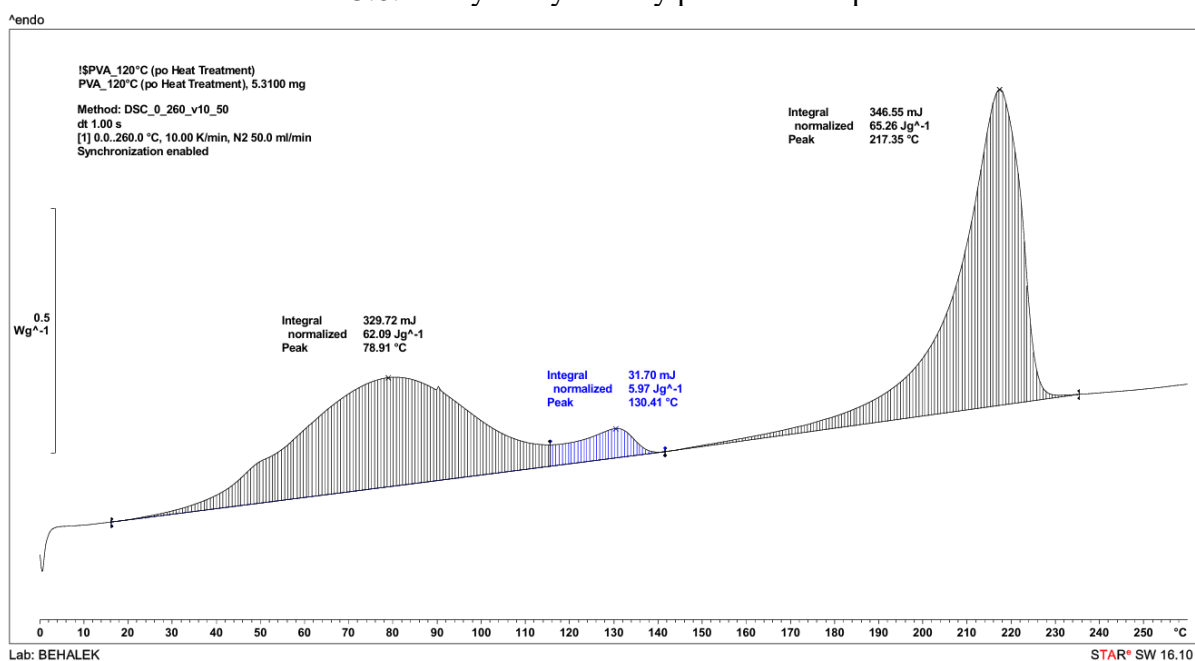
[74] TRETINNIKOV, O. N. a S. A. ZAGORSKAYA. Determination of the degree of crystallinity of poly(vinyl alcohol) by FTIR spectroscopy. *Journal of Applied Spectroscopy* [online]. 2012, **79**(4), 521–526. ISSN 1573-8647. Dostupné z: doi:10.1007/s10812-012-9634-y

[75] PEPPAS, Nikolaos A. Infrared spectroscopy of semicrystalline poly(vinyl alcohol) networks. *Die Makromolekulare Chemie* [online]. 1977, **178**(2), 595–601. ISSN 0025-116X. Dostupné z: doi:10.1002/macp.1977.021780228

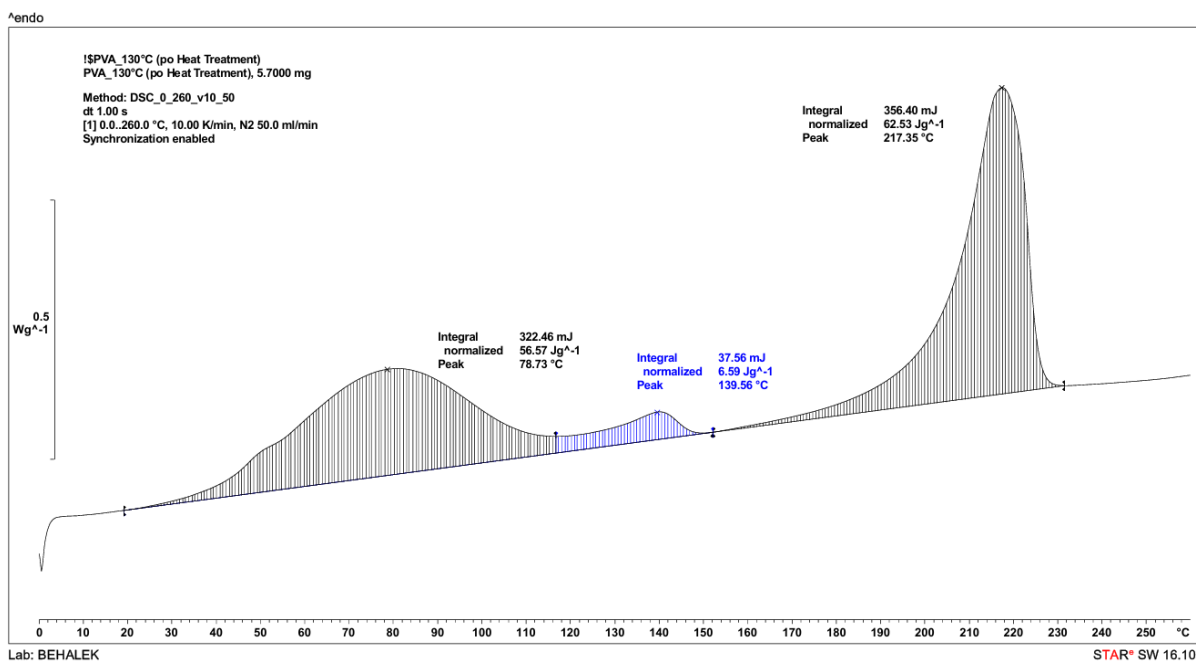
Přílohy



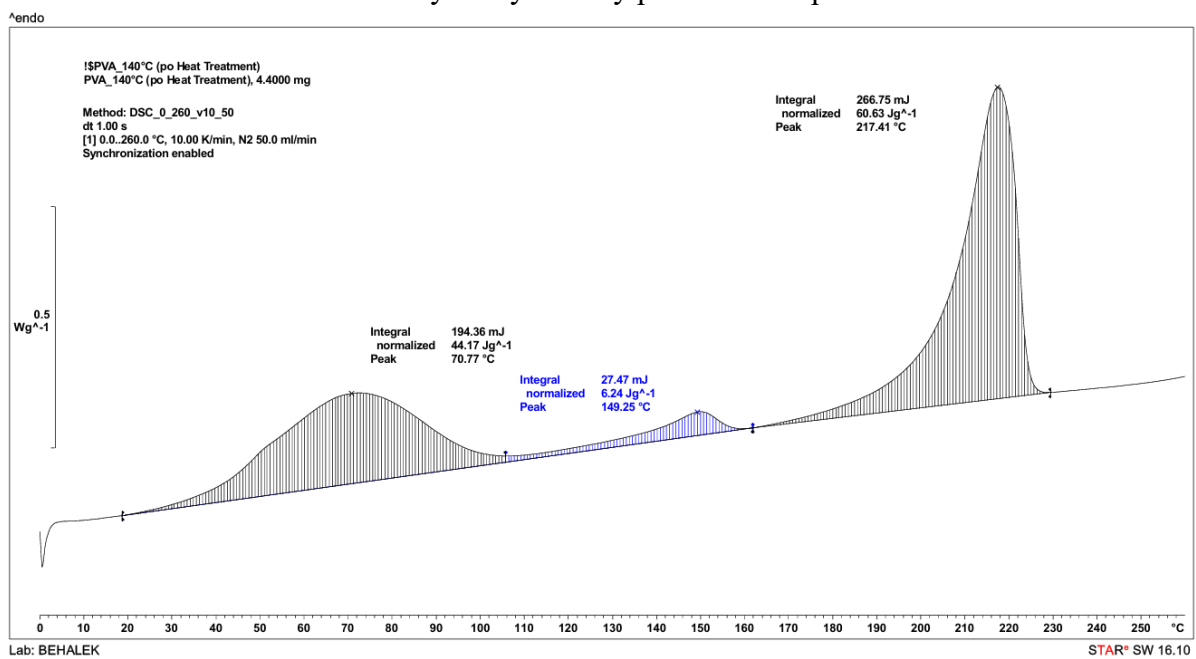
Obrázek 3.8: Analýza krystalinity pomocí DSC pro PVA



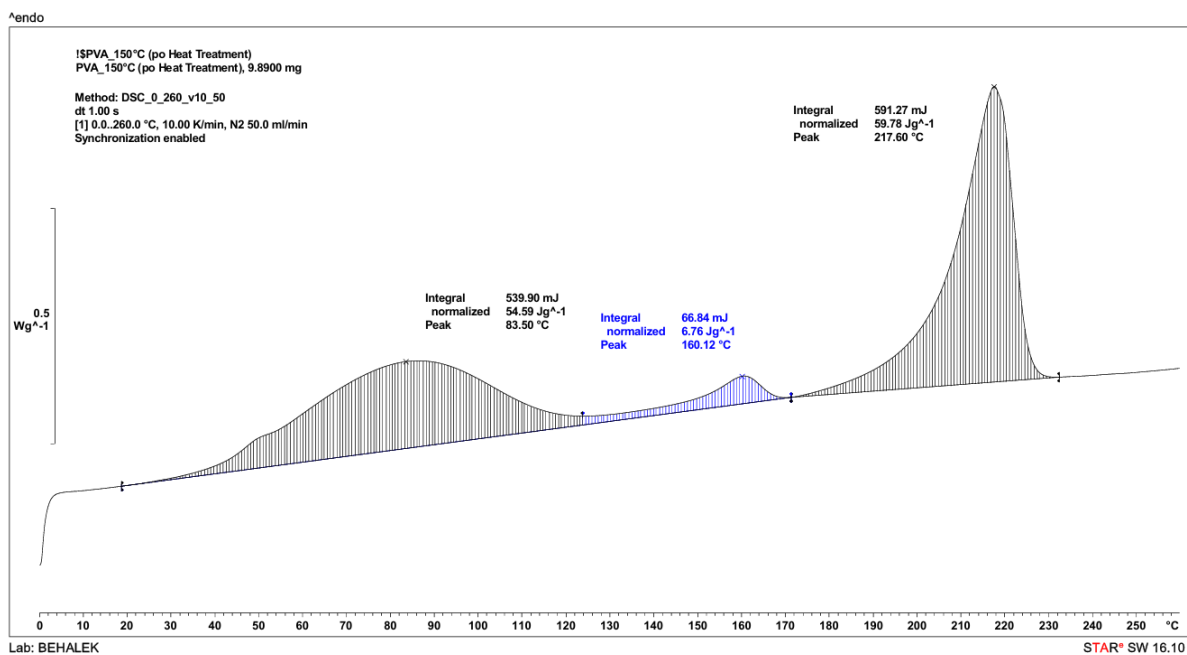
Obrázek 3.9: Analýza krystalinity pomocí DSC pro PVA 120 °C



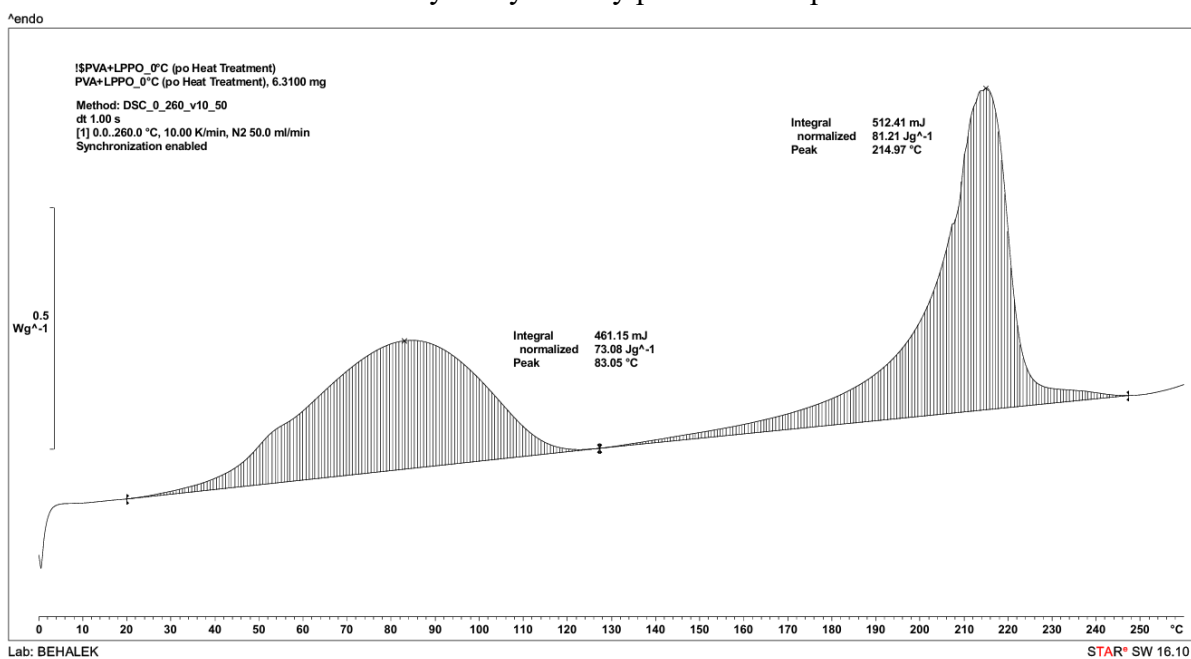
Obrázek 3.10: Analýza krystalinity pomocí DSC pro PVA 130 °C



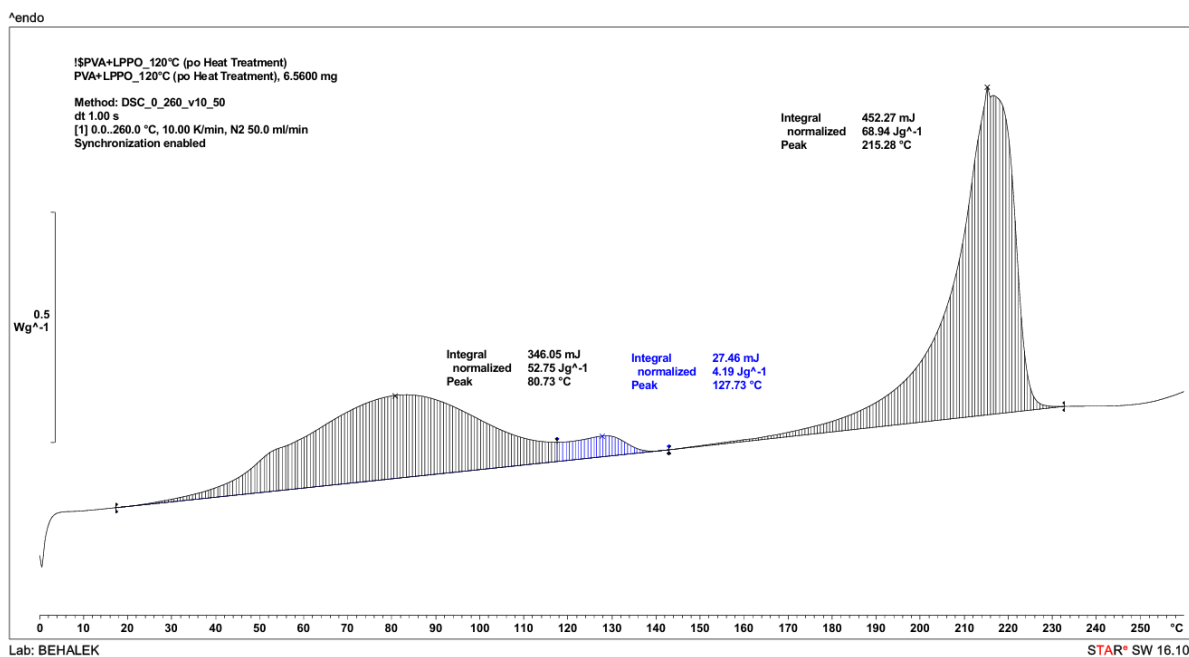
Obrázek 3.11: Analýza krystalinity pomocí DSC pro PVA 140 °C



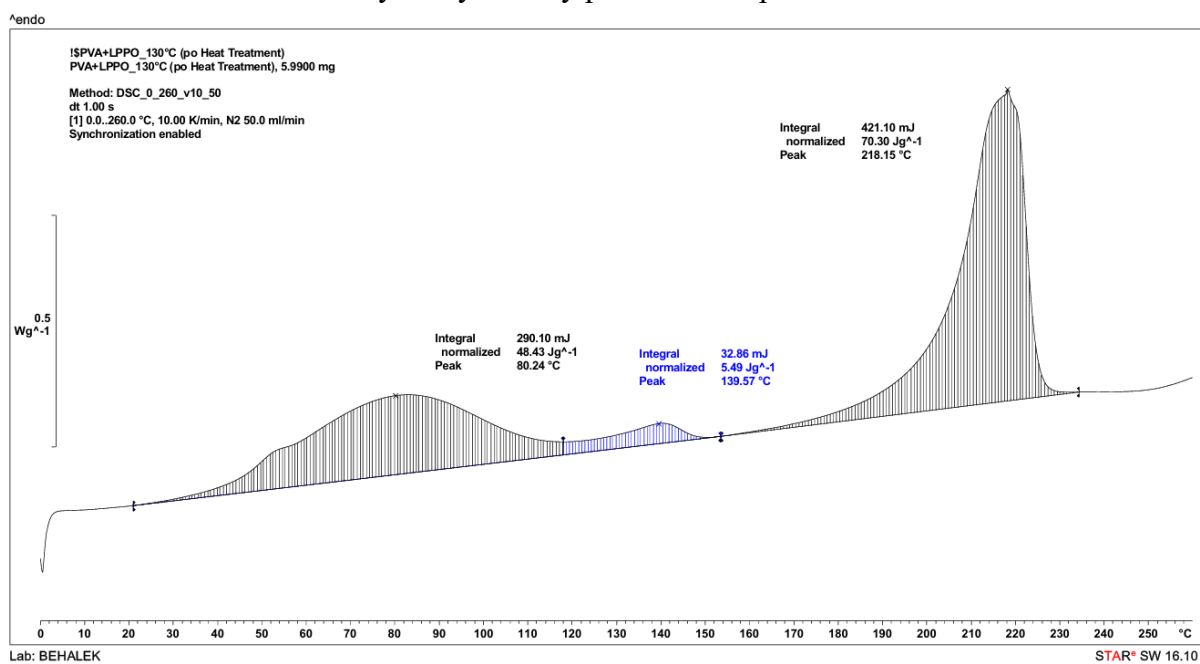
Obrázek 3.12: Analýza krystalinity pomocí DSC pro PVA 150 °C



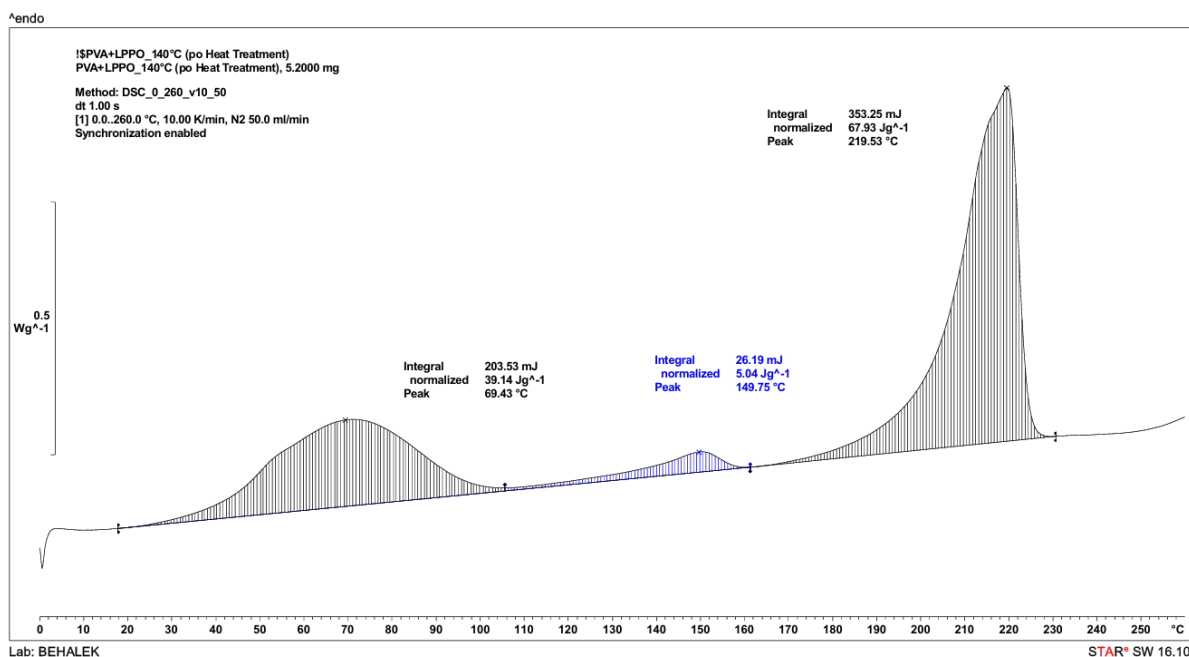
Obrázek 3.13: Analýza krystalinity pomocí DSC pro PVA + LPPO



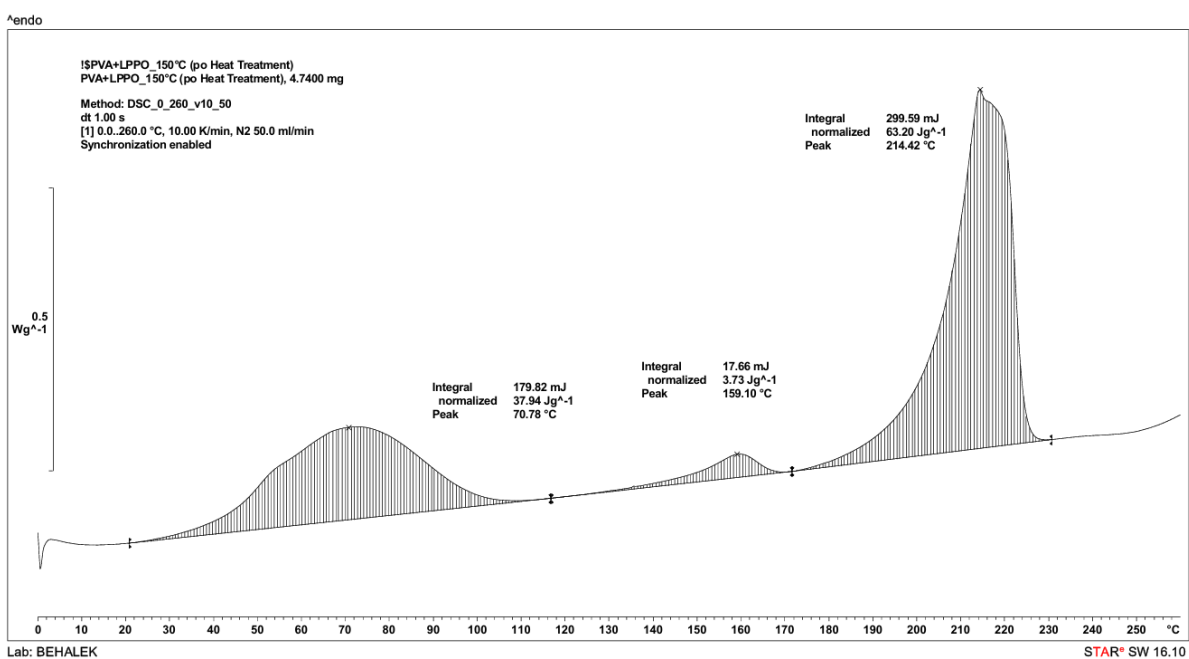
Obrázek 3.14: Analýza krystalinity pomocí DSC pro PVA + LPPO 120 °C



Obrázek 3.15: Analýza krystalinity pomocí DSC pro PVA + LPPO 130 °C



Obrázek 3.16: Analýza krystalinity pomocí DSC pro PVA + LPPO 140 °C



Obrázek 3.17: Analýza krystalinity pomocí DSC pro PVA + LPPO 150 °C