



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE**

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**KOMPLEXNÍ STRUKTURNÍ CHARAKTERIZACE  
SEMI-INTERPENETROVANÝCH BIOPOLYMERNÍCH  
HYDROGELŮ**

COMPLEX STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF HYDROGELS BASED ON SEMI  
INTERPENETRATING BIOPOLYMER NETWORKS.

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. Monika Trudičová**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**

**BRNO 2018**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1157/2017  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Monika Trudičová**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**  
Akademický rok: 2017/18

### Název diplomové práce:

Komplexní strukturní charakterizace semi–interpenetrovaných biopolymerních hydrogelů

### Zadání diplomové práce:

- 1) Zpracovat aktuální literární rešerši zaměřenou na metody strukturní analýzy hydrogelových systémů.
- 2) Na základě zpracované rešerše zvolit vhodný modelový hydrogelový systém a dostupné techniky jeho strukturní analýzy.
- 3) Otestovat využitelnost jednotlivých testovaných technik strukturní analýzy, diskutovat jejich výhody a nevýhody.
- 4) Experimentálně ověřit vliv změny kompozice studovaného hydrogelového systému na jeho strukturní parametry.

### Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

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

---

Bc. Monika Trudičová  
student(ka)

---

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.  
vedoucí práce

---

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

---

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Náplní této diplomové práce bylo otestovat využitelnost dostupných technik strukturní analýzy na vhodném modelovém hydrogelovém systému. Hlavním cílem bylo zhodnotit výhody a nevýhody vybraných technik strukturní analýzy a vliv změny kompozice daného hydrogelového systému na jeho vnitřní strukturu. Jako modelový systém byly zvoleny semi-interpenetrované hydrogely na bázi agarózy o různé koncentraci, tento typ materiálu byl vybrán pro jednoduchou a opakovatelnou přípravu a taktéž pro jeho aplikační potenciál. Technikami strukturní analýzy byly zvoleny elektronová mikroskopie (SEM, kryoSEM), rtuťová porozimetrie a turbidimetrie. Získané informace poslouží k prohloubení znalostí o vlivu kompozice hydrogelu na jeho strukturu a porovnání vybraných technik poslouží pro volbu vhodných strukturních analýz v budoucnu, které budou aplikovatelné i na jiné hydrogelové systémy.

## **ABSTRACT**

The content of this diploma thesis was testing the applicability of available structural analysis techniques on a appropriate model hydrogel system. The main aim was to evaluate the advantages and disadvantages of selected structural analysis techniques and the influence of the composition change of the hydrogel system on its internal structure. Semi-interpenetrated hydrogels based on agarose of different concentration were chosen as model system, this type of material was chosen for simple and repeatable preparation and also for its application potential. Electron microscopy (SEM, cryoSEM), mercury porosimetry and turbidimetry were chosen as structural analysis techniques. Experimental results could be used to improve knowledge about the influence of hydrogel composition on its structure and the comparison of chosen techniques will be used for the choice of appropriate structural analysis in the future, which will be applicable to other hydrogel systems as well.

## **KLÍČOVÁ SLOVA:**

hydrogely; agaróza; strukturní analýza; elektronová mikroskopie; rtuťová porozimetrie; turbidimetrie

## **KEY WORDS:**

hydrogels; agarose; structural analysis; electron microscopy; mercury porosimetry; turbidimetry

TRUDIČOVÁ, M. *Komplexní strukturní charakterizace semi-interpenetrovaných biopolymerních hydrogelů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 68 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D..

## PROHLÁŠENÍ

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

.....  
Bc. Monika Trudičová

*Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Petru Sedláčkovi, Ph.D. za veškerý jeho vynaložený čas, odborné vedení, trpělivost, velmi cenné a přínosné rady, a hlavně za velkou motivaci při tvorbě této práce.*

*Dále bych chtěla poděkovat všem z Fakulty chemické VUT v Brně, především Ing. Evě Bartoníčkové, Ph.D., a všem z Ústavu přístrojové techniky Akademie věd České Republiky, kteří mi pomohli práci realizovat.*

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>8</b>
2.1	Hydrogely .....	8
2.1.1	Vznik hydrogelů .....	9
2.1.2	Klasifikace hydrogelů .....	10
2.1.3	Inteligentní hydrogely .....	10
2.1.4	Hydrogely v medicíně .....	13
2.2	Biopolymery .....	13
2.2.1	Agaróza .....	14
2.2.2	Alginát .....	16
2.2.3	Chitosan .....	16
2.3	Metody strukturní analýzy hydrogelových systémů .....	16
2.3.1	Techniky sorpční a porozimetrické .....	16
2.3.2	Techniky zobrazovací .....	19
2.3.3	Rozptylové a difrakční techniky .....	21
2.3.4	Techniky chemické a fyzikálně-chemické .....	23
2.4	Současný stav řešené problematiky .....	24
2.4.1	Strukturní analýzy gelových materiálů .....	24
2.4.2	Vývoj kompozitních hydrogelů pro biomedicínské aplikace .....	25
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>27</b>
3.1	Chemikálie .....	27
3.2	Přístroje .....	27
3.3	Příprava gelů .....	27
3.3.1	Agarózové gely bez přídavku polyelektrolytů .....	27
3.3.2	Agarózové gely se semi-interpenetrovanými polyelektrolyty .....	28
3.4	Strukturní analýzy .....	28
3.4.1	Přímé metody .....	28
3.4.2	Nepřímé metody .....	30
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>32</b>
4.1	Přímá vizualizace lyofilizovaných vzorků .....	32
4.1.1	Sušení na vzduchu .....	32
4.1.2	Lyofilizace s pomalým mražením .....	33
4.1.3	Lyofilizace s rychlým mražením .....	36
4.2	Přímá vizualizace vzorků v hydratovaném stavu .....	39

4.3	Kvantitativní zhodnocení přímé vizualizace .....	43
4.3.1	Lyofilizované vzorky .....	44
4.3.2	Vzorky v hydratovaném stavu .....	46
4.4	Rtuťová porozimetrie .....	48
4.5	Turbidimetrie.....	51
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....</b>	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM PŘÍLOH .....</b>	<b>64</b>
<b>9</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>65</b>

# 1 ÚVOD

Hydrogelům, které byly nedávno definovány jako dvou- nebo vícesložkové systémy sestávající se z trojrozměrné sítě polymerních řetězců a vody, která vyplňuje prostor mezi makromolekulami, se v posledních pár desetiletích věnuje velká pozornost hlavně pro jejich aplikační potenciál v oblasti biomedicíny, jako například krytí ran, řízené uvolňování léčiv či jako scaffolds v tkáňovém inženýrství. Hydrogely mohou být připraveny jak ze syntetických, tak z přírodních polymerů. Mezi přírodní polymery využívajícími se pro tvorbu hydrogelů patří také agaróza, která byla v této práci použita jako základ pro modelový hydrogelový systém.

Kromě zmíněného zájmu v oblasti biomedicíny se hydrogely na bázi agarózy také široce využívají např. v potravinářském průmyslu či analytické chemii. Tokové, transportní a bariérové vlastnosti těchto gelů hrají klíčovou roli pro jejich vhodnou aplikaci ve všech zmíněných odvětvích. Tyto vlastnosti jsou závislé na jejich chemickém složení a struktuře. Důkladné prozkoumání vlivu změny složení na jejich strukturu a vlastnosti by mohlo mít významný dopad na výzkumy, které využívají tyto hydrogely. Tato skutečnost byla motivací pro experimentální část této práce zaměřující se na vliv změny složení hydrogelového systému na jeho mikrostrukturu, konkrétně přinášející informaci o struktuře a změně struktury pro hydrogely o různé koncentraci agarózy s nebo bez přídavku polyelektrolytové složky.

Náležitě zvolené metody strukturní analýzy jsou klíčové pro důkladné a korektní prozkoumání struktury na úrovni nanometrů. Z tohoto důvodu se experimentální část této práce taktéž zaměřuje na vyzkoušení zvolených technik strukturní analýzy, diskutování jejich výhod a nevýhod. Metody byly vyzkoušeny přímé i nepřímé pro vzorky v původním nabotnalém stavu i pro vzorky lyofilizované, které byly buďto rychle nebo pomalu zmrazeny. Přímými metodami byla zvolena elektronová mikroskopie, pro původní vzorky se jednalo o tzv. kryoSEM (skenovací elektronová mikroskopie pro hydratované kryogenně fixované vzorky) a pro lyofilizované vzorky byla použita SEM (skenovací elektronová mikroskopie). Byly pořízeny mikrofotografie pro různé kompozice hydrogelového systému, které byly následně porovnány pomocí softwaru ImageJ pro obrazovou analýzu. V této práci jsou také srovnány a diskutovány dvě odlišné možnosti obrazové analýzy v rámci tohoto programu. Jako nepřímé metody byly použity rtuťová porozimetrie a turbidimetrie.

Teoretická část této diplomové práce se věnuje přehledu metod strukturní analýzy, zaměřené především na hydrogelové systémy, ať už v původním hydratovaném či vysušeném (lyofilizovaném) stavu. Nemalá část se také věnuje popisu a možnostem využití používaných materiálů (agaróza, alginát) a interpenetrovaných hydrogelů obecně.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Hydrogely

V průběhu let byly hydrogely definovány různými způsoby. Nejběžnější definicí je ta, že hydrogel je zesítená polymerní síť naplněná vodou vytvořená jednoduchou reakcí jednoho nebo více monomerů. Další definice spočívá v tom, že se jedná o polymerní materiál, který má díky své struktuře schopnost botnat a udržet si významnou část vody, ale zároveň není ve vodě rozpustný. Hydrogely jsou tedy trojrozměrné, hydrofilní polymerní sítě schopné zadržovat velké množství vody nebo biologické tekutiny, tyto sítě jsou charakteristické měkkou a gumovou konzistencí, a tudíž jsou podobné živým tkáním. Hydrogely mohou být připraveny ze syntetických či přírodních polymerů. [1, 2]

Schopnost hydrogelů absorbovat vodu vychází z hydrofilních funkčních skupin připojených k polymernímu řetězci, zatímco jejich odolnost vůči rozpouštění vychází z vazeb mezi jednotlivými řetězci [3]. Mnoho materiálů, jak přirozeně se vyskytujících, tak syntetických, vyhovuje definici hydrogelu. Syntetické polymery mají obvykle dobře definovanou strukturu, kterou mohou být modifikovány tak, aby bylo možné přizpůsobit jejich vlastnosti daným potřebám, například odbouratelnost organismu. Hydrogely vyrobené z přírodních polymerů oproti syntetickým nevykazují dostatečnou mechanickou pevnost, mohou obsahovat patogeny nebo vyvolat imunitní reakci, ovšem nabízí také několik výhodných vlastností jako je biokompatibilita, biodegradabilita a možnost podpory buněčné aktivity. Syntetickým polymerům schází biokompatibilita, která je charakteristická pro polymery přírodní. [4]

Historie syntetických hydrogelů pochází z konce padesátých let, kdy Wichterle a Lim syntetizovali první hydrogely pro biomedicínské aplikace, konkrétně první kontaktní čočky na bázi polyhydroxyethylmethakrylátu (PHEMA) zesítené ethylendimethakrylátem [5]. Toto průkopnické použití měkkých hydrogelů vyvolalo zcela novou vlnu výzkumů při hledání nových biomateriálů s "chytřejšími" schopnostmi.

Technologie hydrogelů může být aplikovaná v různých odvětvích, jako v zemědělství [6], hygienických prostředcích [7], systémech pro dodání léčiv [8], potravinových doplňcích [7], léčivech [9], biomedicínských aplikacích [10], tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně [10], diagnostice, ošetření ran, separaci biomolekul či buněk, bariérových materiálech pro regulaci biologických adhezí a biosensorech [8].

### 2.1.1 Vznik hydrogelů

Proces vzniku gelů se nazývá gelace. Gelací se rozumí spojení makromolekulárních řetězců, které zpočátku vedou k větším rozvětveným, avšak rozpustným polymerům. Směs polydisperzního rozpustného rozvětveného polymeru se nazývá "sol". Pokračování procesu spojování má za následek zvýšení velikosti rozvětveného polymeru spolu s klesající rozpustností. Tento "nekonečný polymer" se nazývá "gel" nebo "sít". Přejít ze systému s konečným rozvětveným polymerem na nekonečné molekuly se nazývá "přechod sol-gel" (nebo "gelace") a kritický bod, kdy se gel objeví, se nazývá "bod gelace". Gelace může probíhat buď fyzikálními, nebo chemickými vazbami. Obecné způsoby přípravy fyzikálních a chemických gelů jsou popsány níže. [9]

#### 2.1.1.1 Fyzikální sítě

Díky poměrně snadné výrobě a výhodě, že se nepoužívají síťovací činidla, se zvýšil zájem o fyzikální neboli reverzibilní gely. Pečlivá volba hydrokoloidního typu, koncentrace a pH může vést k tvorbě široké škály gelových struktur [9]. Různé způsoby popsané v literatuře pro získání fyzikálně zesíťovaných hydrogelů jsou:

##### *Zahřívání/chlazení roztoku polymeru*

Fyzikálně síťované gely se tvoří při ochlazení horkých roztoků, takto se připravují hydrogely například želatiny či karagenanu. Tvorba gelu je způsobena tvorbou šroubovic, spojením šroubovic a vytvářením spojovacích zón, tedy uzlů. [10]

##### *Iontové interakce*

Iontové polymery mohou být síťovány přidáním di- nebo tri-valentních protiiontů. Tato metoda je základem principu gelace roztoku polyelektrolytu (například Na + alginátu) s multivalentním iontem opačného náboje (např.  $\text{Ca}^{2+} + 2\text{Cl}^-$ ). [9]

##### *Vodíkové vazby*

Vodíkově vázaný hydrogel může být získán snížením pH vodného roztoku polymerů nesoucích karboxylové skupiny. Příkladem takového hydrogelu je síť CMC (karboxymethylcelulóza), která je tvořena disperzací CMC do 0,1M HCl. Vodíkové vazby indukují snížení rozpustnosti CMC ve vodě a výsledkem je vytvoření pružného hydrogelu. Hydrogely karboxymethylovaného chitosanu (CM-chitosan) se mohou také připravit síťováním v přítomnosti kyselin nebo polyfunkčních monomerů. [9, 10]

#### 2.1.1.2 Chemické sítě

Chemické sítě zahrnuje roubování monomerů na řetězec polymerů nebo použití síťovacího činidla pro spojení dvou řetězců. Síťování přírodních a syntetických polymerů lze dosáhnout reakcí jejich funkčních skupin (jako je OH, COOH a  $\text{NH}_2$ ) se síťovacími činidly, jako je například aldehyd (například glutaraldehyd). Síťovací činidla je potřeba před aplikací gelu odstranit, protože při aplikaci mohou negativně působit na látky, které mají být gelem zachyceny (například buňky, proteiny atd.). Existuje řada metod, které jsou uvedeny v literatuře, k získání chemicky síťovaných trvalých hydrogelů. Mezi které patří například polymerace monomeru v jiném pevném polymeru za vzniku interpenetrované síťové struktury. [8, 9]

### 2.1.2 Klasifikace hydrogelů

Hydrogely mohou být široce rozděleny na gely permanentní a reverzibilní. "Permanentními" nebo "chemickými" gely jsou nazývány gely, které jsou kovalentně síťovány. "Reverzibilními" nebo "fyzikálními" gely jsou nazývány gely, pokud jsou síť drženy dohromady spletenými látkami na molekulové úrovni nebo sekundárními silami včetně iontových, vodíkových vazeb nebo hydrofobních interakcí. U fyzikálně zesíťovaných gelů je zabráněno rozpouštění fyzikálními interakcemi, které existují mezi různými řetězci polymerů. Všechny tyto interakce jsou reverzibilní a mohou být narušeny změnami fyzikálních podmínek nebo aplikací stresu. [1]

Dále mohou být na základě zdroje rozděleny na syntetické a přírodní. Na základě složení gelu mohou být rozděleny na hydrogely homopolymerní, kopolymerní a multipolymerní interpenetrované hydrogely. U *homopolymerních* se jedná o polymerní síť odvozenou z jediného druhu monomeru, který je základní strukturální jednotkou daného polymeru. Homopolymery mají strukturu skeletu síťovanou v závislosti na povaze monomeru a polymerizační technice. *Kopolymerní* hydrogely jsou takové, které obsahují dva nebo více různých monomerních druhů s alespoň jednou hydrofilní složkou uspořádanou v náhodném, blokovém nebo střídavém uspořádání podél řetězce polymerní sítě. A *multipolymerní interpenetrované hydrogely* jsou důležitou skupinou gelů, které jsou vyrobeny ze dvou nezávislých syntetických nebo přírodních polymerních složek obsažených v síťové formě. V semi-interpenetrovaném hydrogelu je jednou složkou zesíťovaný polymer a další složka je nezesíťovaný polymer. [1, 11]

Na základě konfigurace je možné hydrogely rozdělit na amorfní, semikrystalické (složená směs amorfní a krystalické fáze) a krystalické. [1]

Hydrogely mohou být také rozděleny do čtyř skupin na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti elektrického náboje umístěného na řetězcích, a to na neionické (neutrální), iontové (včetně aniontových nebo kationtových), amfoterní (obsahující kyselé i bazické skupiny) a zwitterionové (obsahující jak aniontové, tak kationtové skupiny v každé strukturální opakuji se jednotce). [1, 11]

### 2.1.3 Inteligentní hydrogely

Uvolňování léků z vhodné lékové formy v předem stanoveném čase, intervalech a v předdefinovaných dávkách představuje pro vědce ve farmaceutickém odvětví hlavní cíl. Ačkoli v posledních letech došlo v rámci řízeného uvolňování léčiv k velkému pokroku, nabízí se ještě mnoho milníků, které je třeba pokořit pro léčení patologických onemocnění. Rychlý vývoj v oblasti tkáňového inženýrství stimuluje výzkum a vývoj nových biokompatibilních materiálů vhodných pro adhezi a proliferaci různých buněk. [4 – 8, 12]

Hydrogely citlivé na malé změny určitých parametrů okolního prostředí byly zkoumány jako "inteligentní" systémy pro dodávání léčiv, schopné uvolnit zachycené léky v reakci na specifické fyziologické spouštěče ve vhodném čase a místě účinku, například hydrogely citlivé na pH či teplotu. Hydrogely s jednou sítí mají však slabé mechanické vlastnosti. V posledních letech byly vyvinuty multikomponentní systémy pro podávání léků s potenciálními terapeutickými a diagnostickými aplikacemi, mezi nimiž se objevily semi-interpenetrované polymerní síť (semi-IPN) a interpenetrované polymerní síť (IPN) jako inovativní biomateriály pro dodávání léků a jako scaffoldy pro buněčné kultury. Tyto síť nejčastěji vykazují fyzikálně-chemické vlastnosti, které se mohou výrazně lišit od vlastností

makromolekulárních složek. Důležité je, že vlastnosti sítě mohou být přizpůsobeny typu polymeru a jeho koncentraci, aplikováním vhodného způsobu síťování, jakož i celkovým postupem použitým pro jejich přípravu. V mnoha případech jsou vybrány pro tvorbu IPN hydrogelů polysacharidy. Někdy jsou oba typy makromolekul nacházející se v dané síti polysacharidy, ale často se také používají kombinace syntetických polymerů a polysacharidových řetězců, které vytvářejí semi-IPN. [13]

### **2.1.3.1 Interpenetrované a semi-interpenetrované polymerní sítě**

Interpenetrované polymerní sítě (IPN) získaly velkou pozornost v posledních desetiletích hlavně díky jejich potenciálním biomedicínským aplikacím. Ačkoli IPN byly poprvé popsány v roce 1914, kdy Aylsworth navrhl první syntetickou IPN s cílem použít ji na výrobu gramofonových desek, zájem o tyto složité struktury se projevil až počátkem šedesátých let 20. století. Millar byl první, kdo zkoumal vlastnosti těchto materiálů a zavedl termín "Interpenetrating Polymer Network" [14].

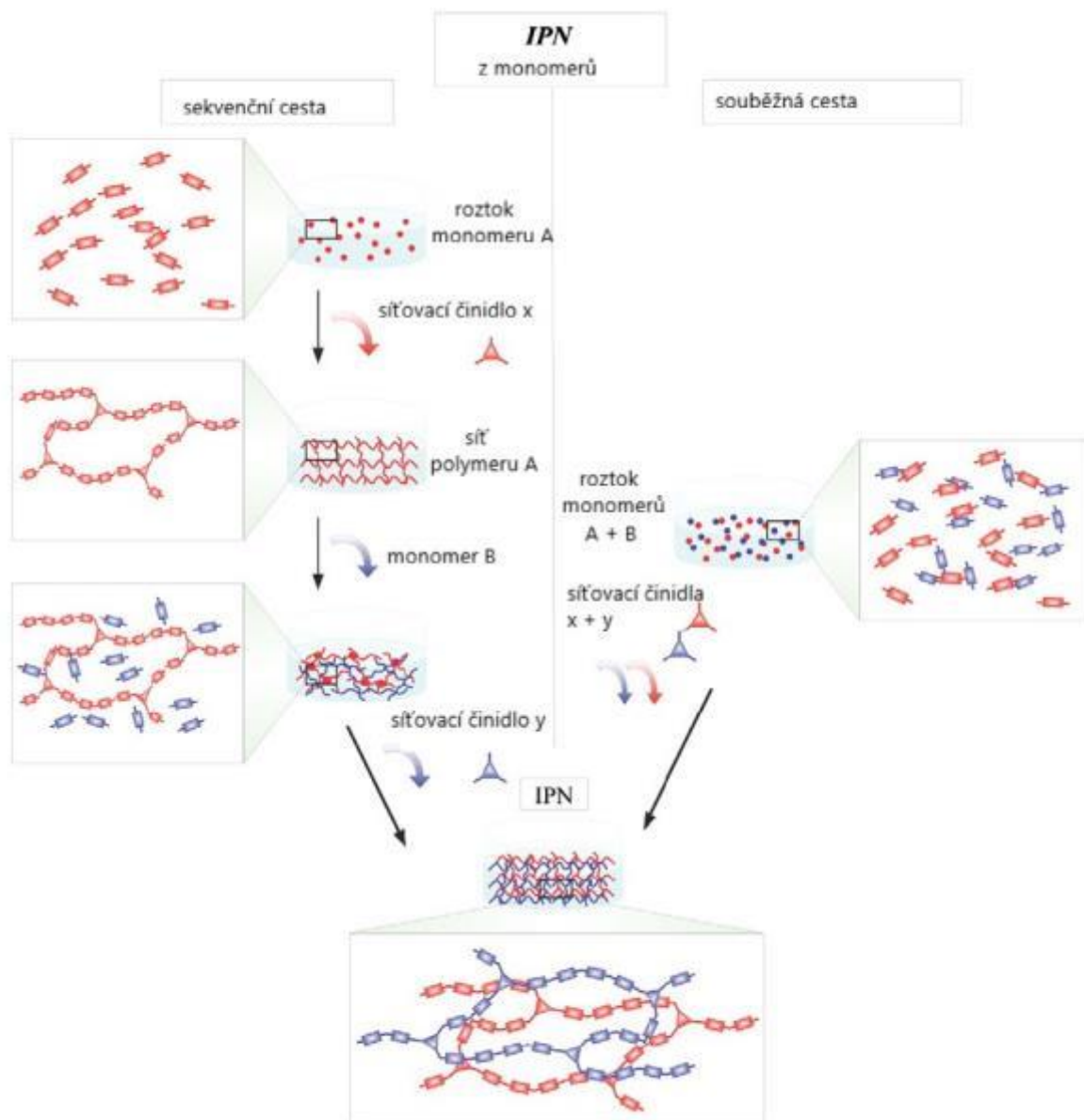
IPN jsou "slitiny" polymerních sítí, z nichž alespoň jedna je syntetizována nebo síťována v bezprostřední přítomnosti druhé bez jakýchkoliv kovalentních vazeb mezi nimi. Jednotlivé polymerní komponenty tak nemohou být odděleny, pokud nebudou porušeny chemické vazby [13 – 15]. Kombinace polymerů musí účinně produkovat pokročilý vícesložkový polymerní systém s novým profilem materiálových vlastností a parametrů [13].

Definice IUPAC pro IPN je následující: "*Polymer obsahující dvě nebo více sítí, které jsou přinejmenším částečně propletené v molekulárním měřítku, ale nejsou vzájemně kovalentně vázané a nemohou být odděleny, pokud nebudou chemické vazby přerušeny. Směs dvou nebo více předem vytvořených polymerních sítí není IPN*" [15]. Poslední věta se přidává jako poznámka ke zdůraznění rozdílu mezi IPN a směsí polymerů. Pokud je síťována pouze jedna složka, výsledná síť je definována jako semi-IPN, přičemž definice IUPAC je následující: "*Polymer obsahující jednu nebo více sítí a jeden nebo více lineárních nebo rozvětvených polymerů vyznačující se pronikáním na molekulární úrovni alespoň jedné ze sítí alespoň některými z lineárních nebo rozvětvených makromolekul*" [15]. Také v tomto případě byla přidána poznámka ke zdůraznění rozdílu mezi semi-IPN a IPN: "*Semi-IPN se odlišují od IPN, protože lineární nebo rozvětvené polymery tvořící síť mohou být principiálně odděleny od sítě polymerů, bez porušení chemické vazby*" [15].

Nejčastěji používaným postupem pro vytvoření IPN je příprava in situ, kde se reaktanty (monomery nebo polymery) smísí v roztoku před síťováním, jak je znázorněno na Obr. 1. V případě IPN mohou být vytvořeny dvě sítě buď současně, nebo postupně, v závislosti na síťovacích reakcích těchto dvou systémů. Alternativní postup je založen na postupné tvorbě semi-IPN. Nejprve se připraví polymerní síť a následně se monomery nebo další polymer nanese do připravené sítě, což vede k semi-IPN. Semi-IPN je převeden na IPN, když přidaný polymer vytvoří druhou síť. Je třeba poznamenat, že při přípravě vzorků ve velkém měřítku je možné, že vzájemná penetrace není plně zajištěna v celém materiálu, a proto mohou být přítomny smíšené oblasti rozptýlené v pravých IPN doménách. [13 – 16]

V závislosti na povaze a vnitřních vlastnostech těchto složek může vzájemná penetrace polymerních řetězců vést k tvorbě hydrogelu. Kombinace příznivých vlastností každého polymeru tvořícího IPN vede k novým systémům se zlepšenými vlastnostmi pro biomedicínské a farmaceutické aplikace, které se zcela často podstatně liší od vlastností

jednotlivých polymerů. Důležité je, že v několika systémech je také pozorován synergismus vlastností. [14 – 16]



Obr. 1: Schématické znázornění tvorby IPN z monomerů (obdobně také z polymerů). [13]

Kombinace a synergie vlastností lze využít k úpravě a přizpůsobení charakteristik výsledného materiálu tak, aby odpovídaly specifickým potřebám. Navíc kombinací přírodních a syntetických polymerů lze rozšířit rozsah dosažitelných vlastností. Vzhledem k těmto vlastnostem přitahují hydrogely IPN značný zájem a mnoho studií bylo provedeno na vývoji IPN vhodných pro různé aplikace, zejména v biomedicínských a farmaceutických oblastech. [3, 9]

Mohou být rozlišeny dvě hlavní třídy fyzikálních teplotně citlivých hydrogelů IPN, a to hydrogely, které vykazují horní kritickou rozpouštěcí teplotu, tj. které ukazují přechod z gelu na solový stav, když je teplota nad touto teplotou zvýšena a hydrogely, které vykazují dolní kritickou rozpouštěcí teplotu, tj. které ukazují přechod z hydrogelu na sol, když je teplota nižší než tato teplota. [13]

#### 2.1.4 Hydrogely v medicíně

Pokrok v technologii rekombinantních proteinů identifikoval četné množství proteinů, které mají potenciál v léčbě nemocí. Nicméně efektivita dodání těchto biomolekul je výzvou zejména pro jejich velkou molekulovou hmotnost a unikátní 3D strukturu. Intravenózní nebo podkožní injekce jsou doposud nejpoužívanější formou podání těchto molekul jako léčiv. Ovšem tyto biomolekuly mají tendenci k proteolytické degradaci, proto podléhají velmi krátké cirkulaci v plazmě a velmi rychle se odbourají v ledvinách, to vede k nutnosti několikanásobných denních injekcí nebo zvýšené dávce k udržení lékové koncentrace potřebné pro terapeutické účinky. [17]

Některé unikátní vlastnosti, které hydrogely mají, je činí užitečnými v dodání těchto biomolekul ve formě léčiv. Jednou z těchto vlastností je například jejich reakce na okolní podmínky, která může být snadno vnesena do hydrogelové sítě při výrobě. Reagují na změny okolního prostředí jako je pH nebo teplota, například pH senzitivní hydrogely jsou užitečné při orálním podání, kdy dokáží ochránit peptidy/proteiny léků před trávicím traktem. [18, 19]

Kyselina akrylová a kyselina methakrylová [17] jsou nejčastěji používané monomery pro výrobu aniontových hydrogelů citlivých na pH, zatímco pro výrobu kationtových hydrogelů se používá 2-(dimethylamino)ethylmethakrylátu [18]. N-isopropylakrylamid [19] a blokové kopolymery polypropylenoxid-polyethylenoxid-polypropylenoxidu (poloxamery) jsou vhodné pro výrobu hydrogelů citlivých na teplotu.

Hydrogely mohou být také konstruovány tak, aby vykazovaly bioadhezivitu pro usnadnění cílení léku, zejména prostřednictvím hlenových membrán, pro neinvazivní podávání léčiva. Jak přírodní polymery (například chitosan), tak i syntetické monomery (například kyselina akrylová) poskytují tuto výhodnou vlastnost. Některé bioadhezivní polymery byly použity k výrobě hydrogelů pro perorální a bukalní podávání léků. Další perspektivní využití hydrogely nachází jako materiály pro scaffoldy v aplikacích tkáňového inženýrství. Vynikajícími příklady jsou umělá chrupavka a nervové tkáňové inženýrství. [20]

Výroba a modelování hydrolyticky degradovatelných hydrogelů jsou dobře rozvinuté. Například West a Hubbell vyráběli hydrogely složené z blokových kopolymerů polymléčné kyseliny a polyethylenglykolu pro použití při uvolňování proteinů [21]. Metters a kol. vytvořili zákony, které umožnily předpovídat rychlost degradace těchto hydrogelů na základě makroskopických vlastností, jako je kompresní modul a objemový poměr botnání [22]. Hennink a spolupracovníci nedávno využili simulační techniku Monte Carlo (algoritmy využívané pro simulaci systémů), aby mikroskopicky předpověděli chování mikrokuliček tvořených směsí hydroxyethylmethakrylátu a dextransu [23].

Kromě hydrolyticky degradovatelných hydrogelů jsou také intenzivně zkoumány syntetické gely obsahující biologické části, které mohou být enzymaticky degradovány. Jedním ze způsobů výroby tohoto typu hydrogelu je začlenění peptidových substrátů do tvorby hydrogelu jako nosiče enzymu. [24]

## 2.2 Biopolymery

Biopolymery jsou látky, které vznikají v organismech kondenzací stejných či různých nízkomolekulárních látek. Z chemického hlediska hovoříme o polysacharidech, proteinech a nukleových kyselinách. Níže jsou popsány vybrané gelotvorné biopolymery, které mají zajímavý aplikační potenciál. [25, 26]

### 2.2.1 Agaróza

Agaróza je lineární polysacharid se základními strukturními jednotkami D-galaktózou a 3,6-L-galaktózou, které se střídavě opakují. Jedná se o přírodní polysacharid, který se získává extrakcí z červených a hnědých mořských řas. Agaróza nenes náboj, díky tomu se stává zajímavou, obzvláště pro využití jako inertního nereaktivního nosiče pro další látky. [27 – 29]

Agaróza je tzv. termoreverzibilním polysacharidem, což znamená, že se při změně teploty v určitém rozsahu projeví hystereze. Za normální teploty je ve vodných roztocích nerozpustná, zahříváním (cca na teplotu 85 °C) dochází k dobrému rozpouštění. Díky výše zmíněným reverzibilním vlastnostem, při ochladnutí (cca na teplotu 40 °C) dojde k vytvoření polotuhé hmoty, tedy ke gelaci agarózy. Agarózové gely vykazují jak syneresi, tak hysterezi, to znamená, že mají tendenci vylučovat vodu při stání a bod tání gelů (přibližně 90 °C) je mnohem vyšší než bod vzniku hydrogelu (přibližně 40 °C). [29, 30]

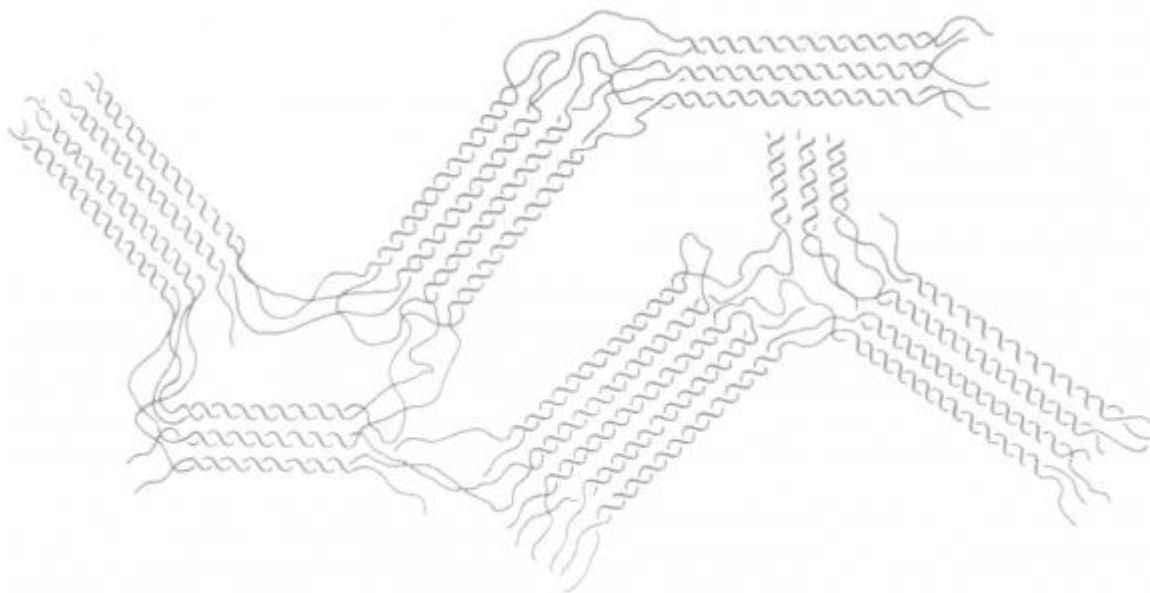
Agaróza je hlavní složkou agaru, ovšem v komerčně dostupných přípravcích se mohou objevovat i nečistoty, kterými nejčastěji bývá materiál vzniklý nahrazením zbytku D-galaktózy v poloze 6 (6-methylether a 6-sulfát) a materiál vzniklý substitucí anhydridu v poloze 2 (2-sulfátový derivát). Kromě těchto a dalších možných nečistot, se mohou řetězce agarózy odchylovat od ideálního opakování. Věř se, že tyto odchylky od struktury hrají důležitou roli při gelaci agarózy, zabraňují dokonalému uspořádání, a tím srážení řetězců během sol-gel přechodu. [29]

#### 2.2.1.1 Struktura agarózy v gelu

V pevném stavu zaujímá agaróza konformaci jednoduché nebo dvojitě helikální struktury. Po dlouhou dobu se předpokládalo, že agarózová vlákna v hydrogelové formě mají konformaci dvojitě šroubovice. Guenet a kol. objasnili, že řetězové konformace agarózy v gelové formě jsou většinou jednoduché helixy. Navíc, v případě agarózy v systému s vodou a dalším ko-rozpouštědlem, Guenet a kol. prokázali, že molekuly rozpouštědla jsou organizovány společně s agarózovými řetězci za vzniku ternárních komplexů uvnitř gelových vláken. Dosud byla struktura agarózových hydrogelů (Obr. 2) objasněna do stupně popsaného výše. Avšak forma šroubovice, kterou agarózová vlákna přijímá v hydrogelu, je stále sporná. [31]

Z výsledků jiných technik se však zdá, že struktura sítě agarózy zahrnuje více než jen formování dvojitě šroubovice. Podstatně agregovanější strukturu spojovacích zón dokazují data jak z vlastností hystereze, tak z optické aktivity a experimentů zahrnující rozptyl světla, dále z elektronové mikroskopie a gelové permeační chromatografie. Pevné uzly agarózových řetězců, které vytváří gelové spojovací zóny, byly také identifikovány na základě viskozimetrických a fluorescenčních depolarizačních studií. [30]

Vnitřní strukturu agarózového gelu rozumíme velký počet tuhých řetězců agarózy konstruovaných a uspořádaných tak, že mohou vznikat větší mezery prázdných prostor, označovaných jako póry. Velikost, tvar a uspořádání těchto pórů ovlivňuje mnoho fyzikálních a chemických vlastností těchto gelů. Například právě pórovitost určuje, kolik specifického léčiva může být nanášeno hydrogelem, nebo jak odolný gel bude v různých aplikacích spojených s mechanickou zátěží. [30, 31]



Obr. 2: Model agarózové sítě. [27]

### 2.2.1.2 Využití agarózových gelů

Díky svým termickým vlastnostem nachází agaróza uplatnění v oblasti analytické chemie, biomedicínských aplikacích, biochemii, potravinářském průmyslu, dále se využívá ve výzkumech v oblasti farmacie a mikrobiologickém průmyslu. V analytické chemie našla agaróza uplatnění hlavně jako stacionární fáze při gelové permeační chromatografii, případně jako nosič elektricky nabitých molekul u gelové elektroforézy, toto převládající použití může být spojeno s pevností a pórovitostí agarózového gelu. S rostoucí koncentrací agarózy se její póry zmenšují a prodlužuje se tím doba, která je potřebná pro separaci iontů elektroforézou. Údaje pro permeabilitu agarových gelů pro kapaliny se shodují, že jak se zvyšuje koncentrace polymeru, propustnost se snižuje, což znamená, že účinná velikost pórů také klesá. Agaróza je také součástí výzkumu v oblasti fyzikální chemie, protože vykazuje velmi nízkou afinitu k interakcím se studovaným materiálem, lze s její pomocí studovat polymery (a jiné látky) v hydrogelovém agarózovém médiu. [28 – 34]

Strukturní podobnost agarózového hydrogelu s živou tkání a extracelulární maticí usnadňuje její aplikaci v inovativních biomedicínských technologiích. Díky této podobnosti se často používá k zapouzdření léčiv a k simulaci tkání, agarózový hydrogel má tedy nepopíratelný užitek a potenciál pro využití v biomedicíně. [13]

Tyto gely jsou také cennou součástí mnoha nových technologií, od potravinářských věd, přes farmakologii až po tkáňové inženýrství a genetiku. Ovšem nedostatečné porozumění struktuře těchto gelů, zejména povaze pórů v ní, značně omezuje přesnost výzkumu, který využívá agarózový hydrogel, protože oddělit výsledky výzkumu od vlivu těchto pórů je téměř nemožné. Důkladné prozkoumání struktury agarózy s rozlišením na úrovni nanometrů by mohlo mít významný dopad na projekty a odvětví, která využívají agarózové hydrogely. [35]

## 2.2.2 Alginát

Kyselina alginová, také nazývaná algin nebo alginát, je aniontový polysacharid, který je široce distribuován v buněčných stěnách hnědých řas, kde díky vazbě s vodou vytváří viskózní gumu. Je to také významná složka biofilmů produkovaných bakterií *Pseudomonas aeruginosa*. Jeho barva se pohybuje od bílé až do žlutavě hnědé. Prodává se ve formě vláken, granulí nebo prášku. [36]

Alginát sodný je lineární polysacharid, složený z kyseliny  $\beta$ -D-manuronové (M) a kyseliny  $\alpha$ -L-guluronové (G), tyto kyseliny jsou blokově uspořádány, a to buď jako homopolymerní bloky (MM, GG) nebo střídající se bloky M a G s různým poměrem M/G. Fyzikálně-chemické vlastnosti alginátu silně závisí na tomto poměru. [25]

Hydrogely alginátu se široce využívají ve farmaceutickém průmyslu jako nosiče léčiv pro uvolňování léků a proteinů ve formě filmů, mikrokuliček a v tkáňovém inženýrství jako scaffoldy pro regeneraci chrupavky, kostí a měkkých tkání. Díky své vysoké všestrannosti a schopnosti přizpůsobit se mechanickým vlastnostem je alginát jeden z nejvíce studovaných gelových materiálů. [23]

## 2.2.3 Chitosan

Chitosan je lineární kationtový polysacharid, skládající se z  $\beta(1\rightarrow4)$  spojených částí 2-amino-2-deoxy-D-glukopyranosy a 2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosy. Vyrábí se N-deacetylací chitinu, na který se působí koncentrovanou zásadou (40-50 hm.% hydroxid sodný či draselný), při teplotách 100 °C a vyšších. Chitosan přitahuje mnoho vědců kvůli svým vynikajícím biologickým vlastnostem, jako je biologická rozložitelnost, kompatibilita a antibakteriální aktivita. Při vysokém obsahu aminoskupin a hydroxylových funkčních skupin chitosan také upoutá pozornost jako biosorbent, který vykazuje vysoký potenciál pro adsorpci proteinů, barviv a kovových iontů. [24, 25]

## 2.3 Metody strukturní analýzy hydrogelových systémů

Fakt, že některé fyzikální děje probíhají v pórech o různé velikosti odlišným mechanismem, je základem pro jejich klasifikaci podle rozměru. Běžně používaná klasifikace je podle Dubinina, a to na *mikropóry* (menší než 2 nm), *mesopóry* (2 – 50 nm) a *makropóry* (větší než 50 nm). Mikropóry se někdy dále rozlišují na *ultramikropóry* a *supermikropóry* (blíže k hranici s mesopóry). [37]

### 2.3.1 Techniky sorpční a porozimetrické

Rtuťová porozimetrie či sorpce plynů jsou klasické metody aplikované pro stanovení distribuce pórů. Pro výpočet specifického povrchu vzorku lze použít řadu matematických metod, které jsou založeny na modelových situacích vždy v určitém intervalu odpovídajících tlaků. [37, 38]

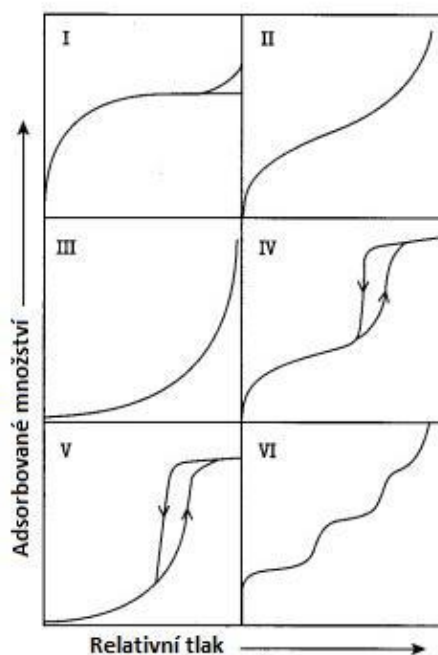
#### 2.3.1.1 Teorie Brunauer-Emmett-Teller

Teorie Brunauer-Emmett-Teller (BET) má za cíl vysvětlit fyzikální adsorpci molekul plynu na pevném povrchu a slouží jako základ pro důležitou analytickou techniku pro měření specifického povrchu materiálů. Podobně jako povrchové napětí je adsorpce důsledkem povrchové energie. Většina atomů, které tvoří pevnou látku, jsou ze všech stran obklopeny jinými atomy. Atomy na povrchu pevné látky (či na povrchu pórů) jsou však neúplně vázány. Vzhledem k silám Van der Waalsových interakcí jsou tyto povrchové atomy reaktivní a

přitahují plyny, páru a kapaliny. Proto existuje množství metod, které k určení specifického objemu pórů či specifického povrchu porézních látek využívá právě adsorpci. Nejčastěji se ke sledování adsorpčních izoterem využívá jako adsorbát dusík, také se často pracuje s argonem. Adsorpci můžeme klasifikovat podle sil působícími mezi adsorbentem a adsorbátem na fyzikální, chemickou či elektrickou. Fyzikální sorpce je reverzibilní proces vyvolaný Van der Walsovými silami, naproti tomu chemická adsorpce je ireverzibilní proces, vyvolaný silami na úrovni chemických vazeb. Působením Coulombovských sil vzniká elektrická adsorpce. [39]

Většinu adsorpčních izoterem pro fyzikální adsorpci lze zařadit do jedné z šesti tříd, navržených Brunauerem, Emmetem a Tellerem, známých jako klasifikace BET. Charakteristické typy těchto isoterem jsou shrnuty v Obr. 3. [37]

V roce 1938 vydali Stephen Brunauer, Paul Hugh Emmett a Edward Teller první článek o teorii nazývané BET v časopise Journal of the American Chemical Society. Tato teorie je dodnes základem pro standardní způsob vyhodnocení specifického povrchu látek, předpokládá systém vícevrstvé adsorpce a obvykle využívá adsorbáty, které chemicky nereagují s povrchy materiálu. Dusík je nejčastěji používaný plynný adsorbát používaný pro povrchové analýzy BET. Z tohoto důvodu se nejčastěji provádí standardní BET analýza při teplotě varu  $N_2$ . [40]



Obr. 3: Typ I: Čistě mikroporézní adsorbent. Typ II: Neporézní, případně čistě makroporézní adsorbenty. Typ III: Neporézní adsorbentys velmi slabou interakcí adsorbát – adsorbent. Typ IV: Mesoporézní adsorbent. Tyto isotermy se vyskytují velmi často. Typ V: Mesoporézní adsorbent vyskytující se poměrně zřídka. Platí zde to, co bylo řečeno u typu III. Typ VI. Řídký případ, kdy adsorpce probíhá v několika oddělených krocích v různých intervalech tlaku adsorbátu. [37]

Systém vícevrstvé adsorpce předpokládá, že dochází k adsorpci současně v různých vrstvách, tedy zatímco první adsorpční vrstva není zcela zaplněna, k adsorpci dochází již

v druhé případně další vrstvě. Statická monovrstva,  $a_m$ , označuje množství adsorbátu potřebného k vytvoření monovrstvy. Ve skutečnosti nedochází k vytvoření této vrstvy, ovšem z průběhu adsorpční isotermy BET je možné hodnotu  $a_m$  určit, z této hodnoty lze poté určit specifický povrch adsorbentu, a to podle následujícího vztahu (1):

$$S = a_m \cdot A \cdot \Sigma \quad (1)$$

, kde  $a_m$  je kapacita monovrstvy (mol/g),  $A$  je Avogadrova konstanta a  $\Sigma$  je velikost povrchu, kterou zaujímá jedna adsorbovaná molekula adsorbátu. Pro dusík při 77 K se standardně užívá hodnota  $\Sigma(N_2) = 0,162 \text{ nm}^2$ . [37]

U porézních látek je třeba znát i rozdělení objemu podle velikosti pórů, je potřeba tedy určit jaký objem odpovídá pórům o různé velikosti. Vzhledem k faktu, že póry vyskytující se v látkách mají různé velikosti a tvary, při provádění matematických operací je nutné vytvořit modelový systém. [41 – 44]

#### *Metoda Barreta, Joynera a Halendy (BJH)*

Standartní způsoby výpočtů, jako například BJH metoda umožňující vypočítat distribuci šířek pórů, jsou odvozeny ze zjednodušeného makroskopického popisu kapilární kondenzace, tyto výpočty bývají nejčastěji aplikovány na desorpční část izotermy.

BJH metoda je tedy jedním ze způsobů výpočtů distribuce pórů využívající Kelvinovu rovnici, jejíž výpočet byl zobrazen Robertsem [41]. Robertsův algoritmus byl shrnut Satem, který ho definoval jako řešení integrální rovnice (2) pro hledanou distribuční funkci  $f(r)$  při znalosti adsorpční isotermy [42]:

$$a(x) = \int_{(r_k)_{min}}^{r_k(x)} f(r) dr + \int_{r_k(x)}^{(r_k)_{max}} f(r) \left( \frac{r}{r-t(x)} \right)^2 dr \quad (2)$$

Distribuce pórů podle BJH předpokládá, že póry jsou válce nebo štěrbiny, které se neprotínají. Výpočet lze tedy provést pro modelovou představu.

#### *Teorie hustotního funkcionálu (DFT)*

Nový způsob analýzy adsorpčních izoterm byl zpracován Olivierem a Conklinem a Seatonem, Waltonem a Quirkem. Ti za pomoci statistické fyziky pro daný relativní tlak získali hustotu adsorbované látky v póru o definovaném tvaru a velikosti. Tyto složité a časově náročné výpočty byly formulovány jako adsorpční izotermy pro přibližně 100 velikostí pórů. Díky statisticko-fyzikálnímu zpracování není třeba uvažovat separátně vícevrstvou sorpci, kapilární kondenzaci ani objemové zaplňování pórů. Distribuce pórů metodou DFT se získává tak, že se najdou vhodné (statistické) váhy izotermem pro póry různých velikostí, které v součtu odpovídají experimentální izotermě. [43, 44]

Stejně jako ostatní metody je DFT analýza postavena na jednoduchých tvarech pórů, tedy na neprotínajících se válcích a štěrbinách.

#### **2.3.1.2 Rtut'ová porozimetrie**

Další metodou, která umožňuje určit velikost pórů je rtuťová porozimetrie. Jedná se o metodu založenou na zvyšování tlaku nesmáčivé kapaliny (tedy nejčastěji rtuti), zvyšováním tlaku se postupně zaplní póry od největších po nejmenší. Přístroj pracuje ve dvou režimech: 1. v nízkotlakém se evakuovaný vzorek začíná zaplňovat a pokračuje přes normální tlak až do 4

atmosfér (4  $\mu\text{m}$  velkých pórů). 2. režim znamená, že se vzorek přesune do vysokotlaké části, kde se měří mezi atmosférickým a maximálním (414 MPa) tlakem. [37, 38]

Z vtačeného objemu při daném tlaku se podle Washburnovy rovnice (3) kde  $d$  je průměr póru,  $p$  působící tlak,  $\gamma$  povrchové napětí rtuti a  $\theta$  její kontaktní úhel, vypočítá distribuce velikosti pórů. [38]

$$d = \frac{-4 \cdot \gamma \cdot \cos \theta}{p} \quad (3)$$

### 2.3.2 Techniky zobrazovací

Zobrazovací techniky patří mezi přímé metody strukturní analýzy. U analyzovaného vzorku přímo zobrazí jeho vnitřní strukturu s rozlišením v závislosti na zvolené technice. Patří zde například optická mikroskopie, transmisní elektronová mikroskopie či skenovací elektronová mikroskopie. [9]

#### 2.3.2.1 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Elektronová mikroskopie je mikroskopie, která narozdíl od optické využívá místo světla paprsek zrychlených elektronů. Zrychlené elektrony nesou velké množství kinetické energie, která je rozptýlena na řadu různých alternativních forem vznikajících interakcemi elektron-vzorek, jestliže jsou elektrony zpomalovány dopadem na pevný vzorek. Těmito formami jsou teplo, emise nízkoenergetických sekundárních elektronů, elektrony zpětného odrazu s vysokou energií, emise světla (katodoluminiscence) nebo rentgenové emise. Obraz zobrazený SEM mapuje měnící se intenzitu kteréhokoli z těchto signálů v poloze odpovídající poloze paprsku na vzorku, když byl signál generován. [45]

Sekundární elektrony a zpětně rozptýlené elektrony se běžně používají pro zobrazování vzorků, přičemž sekundární elektrony jsou nejcennější pro zobrazování morfologie a topografie vzorků a zpětně rozptýlené elektrony jsou nejcennější pro ilustraci kontrastů ve vícefázových vzorcích. Analýza SEM je považována za "nedestruktivní", to znamená, že rentgenové záření generované interakcemi elektronů nevede ke ztrátě objemu vzorku, takže je možné opakovaně analyzovat stejné materiály. [45]

SEM lze tedy použít k poskytnutí informací o povrchové topografii, složení a dalších vlastnostech, jako je elektrická vodivost. Zvětšení v rámci této metody může být řízeno v rozmezí až 6 řádů, od 10 do 500 000krát. [46, 47]

Pro měření pomocí SEM je nutno hydrogely vysušit, sušením ovšem může docházet k různým artefaktům, které zastíní přirozenou původní strukturu. Vzhledem k faktu, že tyto matrice se aplikují a zastávají svou funkci ve svém hydratovaném stavu, jsou relevantnějšími informacemi ty, které jsou získané při analýze v jejich přirozeně hydratovaném stavu pomocí SEM za nízkých teplot. [46 – 48]

### 2.3.2.2 *KryoSEM*

Kryo-skenovací elektronová mikroskopie byla poprvé provedena v 60. letech, ale až v 80. letech se díky komerčně dostupným systémům stala rutinní záležitostí mnoha laboratoří. KryoSEM je formou elektronové mikroskopie, kde hydratovaný, ale kryogenně fixovaný vzorek je zobrazen při nízkých teplotách, což umožňuje zachovat a zaznamenat vzhled vzorku v plně hydratovaném a chemicky nemodifikovaném stavu. [48, 49]

Vzorky se kryogenně fixují obvykle ponořením do kapalného dusíku. Potom se vzorek přenesení ve vakuu do kryo-komory pro přípravu vzorků pro SEM, kde podle potřeby dochází k porušení vzorku (pro zobrazení vnitřní, a ne povrchové struktury). Po porušení povrchu kovem (obvykle zlatem nebo platinou) se vzorek přenesení do komory SEM, kde zůstává zmrazen dusíkem během zobrazování. KryoSEM biologických vzorků s vysokým obsahem vlhkosti lze provést rychleji, s méně kroky přípravy vzorků než konvenční SEM. Navíc procesy dehydratace potřebné pro přípravu biologického vzorku pro konvenční SEM komoru způsobují četné deformace v tkáni vedoucí ke strukturálním artefaktům během zobrazování. Ukázalo se, že technika kryoSEM je vynikající pro studium detailní morfologie a nabízí mnoho výhod oproti normálním SEM postupům. [49]

### 2.3.2.3 *ImageJ*

Technologie v mikroskopii rychle postupuje, je tedy stále dostupnější, rychlejší a přesnější v kvantitativním biomedicínském zobrazování, což vyžaduje odpovídající zpracování a analýzu obrazu. K dispozici je široká škála různých softwarů od komerčních po akademické či specializované. Klíčovou vlastností softwaru adekvátního pro vědecké výzkumy je jeho přístupnost. Open source softwary jsou ideální pro vědecké využití, protože mohou být volně kontrolovány, modifikovány a redistribuovány. [50]

Bylo napsáno velké množství review na téma zpracování obrazu a analytických nástrojů obecně. Existují také celé knihy zaměřené na téma zpracování obrazu psané pro konkrétní vědecké disciplíny; v samotné mikroskopii mohou čtenáři najít vynikající zdroje pro zpracování obrazu a digitální mikroskopii. [51 – 54]

V roce 1987 vydal Wayne Rasband, který v té době pracoval v Národním zdravotním ústavu, "NIH Image", předchůdce programu ImageJ. NIH Image vstoupil na trh, který byl již přeplněn vysoce pokročilým vědeckým softwarem pro zpracování obrazu zaměřeného pro vědce v oblasti počítačů. Několik vlastností odlišuje tento program od konkurentů a tyto nuance jsou zachovány dodnes: aplikace a zdrojový kód byly k dispozici zdarma, měly velmi jednoduché uživatelské rozhraní a mohly běžet na cenově dostupných počítačích. Navíc, jako projekt, který vítá příspěvky do zdrojového kódu, ImageJ přitahuje jako uživatele i programátory. [50]

Od svého založení se společnost ImageJ výrazně rozrostla právě proto, že byla volně dostupná a také díky její uživatelské komunitě. Různorodí vědci jako zanícení zájemci, techničtí asistenti, studenti, vědecký personál a výzkumní pracovníci pokročilé biologie používají ImageJ na denní bázi. Využití ImageJ je možné v rozsahu od vizualizace dat a výuku až po pokročilé zpracování obrazu a statistické analýzy. Rozšířitelnost softwaru nadále přitahuje biology, stejně jako počítačové vědce, kteří chtějí efektivně implementovat specifické algoritmy zpracování obrazu. V přehledu Schindelin a spol. [50] používali autoři projekt ImageJ jako případovou studii o tom, jak open-source softwary vědecké komunitě

snadno zpřístupňují množství technologií analýzy obrazu. Konkrétně zkoumali, co činí ImageJ tak oblíbeným, jaký dopad má na vědu, jak inspiruje další projekty a jak je ovlivňován souběžnými projekty v rámci komunity uživatelů ImageJ. Také se vzhledem k rozsáhlosti softwarových projektů, které fungují v rámci ImageJ, zaměřili na funkce, které je od sebe navzájem odlišují. Z technického hlediska ImageJ poskytuje uživatelské rozhraní s funkcemi pro načítání, zobrazení a ukládání obrázků; základní funkce zpracování obrazu, jako jsou filtry s konvolucí; a rozšířený mechanismus včetně podpory pro pluginy a makra. Jeho rozšiřitelnost je skutečně základem efektivity ImageJ: pokročilé metody zpracování obrazu (např. aktivní segmentace obrysů) nejsou poskytovány základní aplikací, ale jsou zpřístupněny pluginy specialistů v odpovídajících odvětvích. Do ImageJ jsou také snadno instalovatelná makra a pluginy určená pro demonstraci koncepcí analýzy obrazu. Stále více vědců uznává skutečnost, že software hraje stejně důležitou roli ve výzkumu jako materiály a metody. [50 – 55]

### 2.3.3 Rozptylové a difrakční techniky

Interakce záření s optickými nehomogenitami, např. s disperzními částicemi se projevuje různými jevy, například rozptylem světla či difrakcí. K rozptylu světla dochází, pokud se světlo odráží různými směry. Rozptyl je dobře pozorovatelný např. na kouři (částičky pevné látky v plynu), mlze (kapky vody ve vzduchu) či suspenzi (částičky pevné látky v kapalině). Metody využívající ke strukturní analýze tyto jevy jsou popsány níže.

#### 2.3.3.1 Turbidimetrie

Když paprsek světla prochází materiálem, jeho intenzita je snížena, buď absorpcí, nebo rozptylem. Turbidita je definována pomocí celkového rozptýleného světla, ovšem v praxi je záření, které je rozptýleno v úhlech nižších než úhel měření daného přístroje, změřeno jako prošlé, což komplikuje aplikovatelnost této techniky. [56]

Turbidita je počítána ze vztahu (4):

$$\tau(\lambda) = 2,3 \cdot (A)/L \quad (4)$$

, kde  $A$  je absorbance a  $L$  optická dráha. Vlnový exponent se získá ze směrnice rovnice lineární regrese, závislosti dekadického logaritmu turbidity na dekadickém logaritmu vlnové délky. Vlnový exponent je závislý na korelační délce a korelační délka je přímo úměrná velikosti pórů. [57]

#### 2.3.3.2 SAXS

SAXS (small angle x-ray scattering) patří mezi metody zvané SAS (small angle scattering), tedy metody měření rozptylu, kdy jsou podmínky měření nastaveny tak, aby byl tento rozptyl světla zaznamenáván v malých úhlech ( $0,1 - 10^\circ$ ). [9]

Tato metoda k analýze využívá koherentního rozptylu elektromagnetického záření v oblasti vlnových délek rentgenového (RTG) záření. Princip této metody spočívá v ostřelování vzorku paprskem RTG záření, čímž dojde k vytvoření koherentního rozptylu. Dojde tedy k interakci elektrického pole daného záření s elektrony vzorku, což způsobí oscilaci daných elektronů a dojde ke vzniku druhotného RTG záření se stejnou vlnovou délkou, ale rozdílnou fází ve srovnání s původním paprskem. Struktura, tvar a velikost částice jsou hlavní parametry ovlivňující velikost rozptylu RTG záření. SAXS tedy může poskytnout

informace o velikosti pórů, velikosti a uspořádání makromolekul, vzdálenosti mezi částicemi materiálu a další informace dle nastavení experimentu. [27]

### 2.3.3.3 SANS

Stejně jako SAXS metoda SANS (small angle neutron scattering) patří mezi tzv. SAS metody. Jedná se o experimentální techniku, která používá rozptyl elastického neutronu při malých rozptylových úhlech, aby zkoumala strukturu různých látek v měřítku přibližně 1 – 100 nm. Během experimentu SANS je paprsek neutronů namířen na vzorek, kterým může být vodný roztok, pevná látka, prášek či krystal. Neutrony jsou elasticky rozptýleny interakcí s jádry nebo interakcí s nepárovými elektrony. [27]

SAXS a SANS jsou experimentální techniky, které umožňují určit strukturu kondenzovaných látek. Oba způsoby poskytují informace o tvaru, velikosti a prostorové organizaci studovaných objektů o velikosti řádově několika desetin až stovek nanometrů. Dostupné rozmezí těchto velikostí je zvláště zajímavé pro měkké kondenzované látky, včetně polymerních vzorků, koloidních částic nebo agregátů povrchově aktivních látek. [9]

### 2.3.3.4 Dynamický rozptyl světla

Dynamický rozptyl světla (DLS, také známý jako fotonová korelační spektroskopie nebo kvazi-elastický rozptyl světla) je jednou z nejpobulárnějších technik rozptylu světla. Typickými aplikacemi jsou emulze, micely, polymery, bílkoviny, nanočástice nebo koloidy. Základní princip je jednoduchý: Vzorek je osvětlen laserovým paprskem a fluktuace rozptýleného světla je detekována pod známým rozptylovacím úhlem rychlým fotonovým detektorem. Jednoduché přístroje DLS, které měří při stanoveném úhlu, mohou určit střední velikost částic v omezeném rozsahu velikostí. Více propracované přístroje s možností více úhlů mohou určit úplné rozložení velikostí částic. [9, 27]

Ke fluktuaci intenzity rozptýleného světla dochází vlivem interferencí záření s částicemi, které podléhají Brownovu pohybu. Se zvyšující se rychlostí částic se zvyšuje i rychlost změny intenzity rozptýleného světla, tato rychlost je tedy přímo závislá na pohybu molekul. Experimentálně se charakterizuje fluktuace intenzity výpočtem intenzity autokorelační funkce pro monodisperzní systém, která je definována vztahem (5):

$$g(\tau) = e^{-\tau/\tau_c} \quad (5)$$

, kde  $\tau_c$  je relaxační čas (doba nutná k návratu fluktuace k průměrné hodnotě intenzity rozptýleného záření). Tato hodnota je ve vztahu s difúzním koeficientem částic  $D$  podle následující rovnice (6):

$$\tau_c = 1/D \cdot q^2 \quad (6)$$

, kde  $q$  je absolutní hodnota vlnového vektoru (7):

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \cdot \sin \frac{\theta}{2} \quad (7)$$

, kde  $\lambda$  je délka primárního světelného paprsku a  $\theta$  úhel pod nímž je měřena intenzita rozptýleného záření.

Prostřednictvím Stokesovy-Einsteinovy rovnice lze poté z difúzního koeficientu vypočítat velikost částic podle následujícího vztahu (8):

$$d(H) = k \cdot T / 3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D \quad (8)$$

, kde  $d(H)$  je hydrodynamický průměr částice,  $k$  je Boltzmannova konstanta,  $T$  je absolutní teplota a  $\eta$  je viskozita disperzního prostředí. [27]

Dynamický rozptyl světla (DLS) se obecně používá ke studiu dynamiky a relaxačních procesů v sol-gelových systémech. Velikost pórů lze vypočítat z difuzního koeficientu. Měření DLS jsou komplikovány značnými fluktuacemi intenzity a relaxační doby v průběhu gelace a několikanásobného rozptýlení pro vysoké koncentrace. Turbidimetrická měření jsou v porovnání rychlá, méně komplikovaná, a tedy vhodnější pro koncentrované vzorky. [58]

Gelová permeační chromatografie spojená na linii s víceúrovňovým rozptylem laserového světla je široce používanou technikou pro stanovení molekulární distribuce a parametrů polymerního systému. Hydrogel v polymerním systému lze kvantifikovat pomocí této techniky. Tato technika je široce používána při kvantifikaci hydrogelů několika hydrokoloidů, jako je arabská guma, želatina a pullulan. [58, 59]

### 2.3.4 Techniky chemické a fyzikálně-chemické

Mezi další techniky charakterizující hydrogelové systémy patří například infračervená a Ramanova spektroskopie. Tyto techniky spektroskopického měření mají základ ve změnách molekulárních vibračních energiích. Tyto změny jsou způsobeny skutečností, že základní složky látky, tj. chemické vazby, mohou být obvykle vzrušeny a absorbují infračervené světlo. Ramanova spektrometrie sleduje vibrace spojené se změnou molekulární polarizovatelnosti a infračervená spektrometrie sleduje vibrace spojené se změnou dipólového momentu. Dalším rozdílem mezi těmito dvěma technikami je, že zatímco absorpce vody má tendenci skrývat IR spektra biopolymerních roztoků a gelů, v Ramanově spektrometrii je v podstatě neviditelná. FTIR (infračervená spektroskopie s Furierovou transformací) je užitečná technika pro identifikaci chemické struktury látky. Tato metoda je používána ke zkoumání strukturního uspořádání hydrogelu ve srovnání s výchozím materiálem. [60, 61]

Při charakterizaci hydrogelů se také používají metody diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) a nukleární magnetická rezonance (NMR) k charakterizaci a kvantifikaci množství volné a vázané vody. [62]

Metoda nukleární magnetická rezonance (NMR) má své kořeny v padesátých letech v USA, poskytuje informace o přítomnosti funkčních skupin v molekule. NMR spektroskopie je v současnosti jedním z hlavních zdrojů poskytujících informaci o chemické struktuře látek. Princip této metody spočívá v absorpci záření v oblasti krátkých rádiových vln, absorpce probíhá v jádrech atomů látky, která je vložena do vnějšího magnetického pole. Jádra vlivem této absorpce přechází z orientace o nižší energetické hladině na orientaci o vyšší energetické hladině. Protonová NMR poskytuje informace o výměně molekul vody mezi takzvanými volnými a vázanými stavy. [62]

Diferenciální skenovací kalorimetrie je experimentální metoda pro zkoumání tepelných efektů souvisejících s fázovými přeměnami v materiálech. Tyto tepelné efekty lze studovat v závislosti na teplotě nebo čase během definovaného teplotního programu. V experimentu DSC se rozdíl v toku tepla na vzorek a referenci měří během předem definovaného teplotního programu. Inertní materiál (tj. materiál, který neprochází žádnými fázovými přechody ve zkoumaném teplotním rozmezí) se používá jako reference – nejčastěji prázdný

kelímek. Použití DSC je založeno na předpokladu, že pouze volná voda může být zmrzlá, takže se předpokládá, že endoterma měřená při zahřátí zmrzlého gelu představuje tavení volné vody a tato hodnota dá množství volné vody v testovaném vzorku hydrogelu. Navázaná voda se pak získá rozdílem naměřeného celkového obsahu vody v hydrogelovém zkušebním vzorku a vypočteného obsahu volné vody. Mezi první materiály, které byly podrobeny této metodě, byly hliník a hydratovaný oxid křemičitý. [27, 63]

## **2.4 Současný stav řešené problematiky**

### **2.4.1 Strukturní analýzygelových materiálů**

Tvar pórů látek je velmi těžce definovaný pojem, protože póry jsou velmi malé, pouze elektronová mikroskopie umožňuje jejich přímé pozorování. Výhoda této metody spočívá ve velkém přiblížení, ovšem toto se pro zpracování výsledků větší plochy stává i nevýhodou, protože vyžaduje neúměrně vysoký počet snímků. Další nepříjemnou vlastností elektronové mikroskopie je, že poskytuje pouze dvojrozměrný obraz pro trojrozměrné vzorky. V poslední době dochází v této oblasti k pokroku, jsou k dispozici konfokální mikroskopy, které poskytují alespoň částečně obraz zasahující do jisté hloubky. [27]

V poslední době byl gel vytvořený z pektinátu vápenatého použit při různých aplikacích v gastrointestinálním traktu, například pro řízené uvolňování léčiv. Pro studium změn vnitřní struktury vlivem tepelného ošetření matric složených právě z pektinátuvápenatého byla použita také technika kryoSEM. [63]

Za účelem pochopení strukturních změn perliček pektinátu vápenatého, jejichž příprava byla popsána již dříve, byly kuličky (o velikosti 2 až 3 mm) čerstvě připraveny a zkoumány. Tyto kuličky byly poté podrobeny strukturní analýze pomocí SEM i kryoSEM, přičemž vzorky pro SEM analýzu byly lyofilizovány. Byl pozorován rozdíl v morfologické struktuře pro tyto dvě analýzy. KryoSEM byla pro vzorky méně destruktivní a poskytovala realističtější obraz struktury sítě, vyhnula se tak mnoha artefaktům spojeným se sušením vzorku. [63, 64]

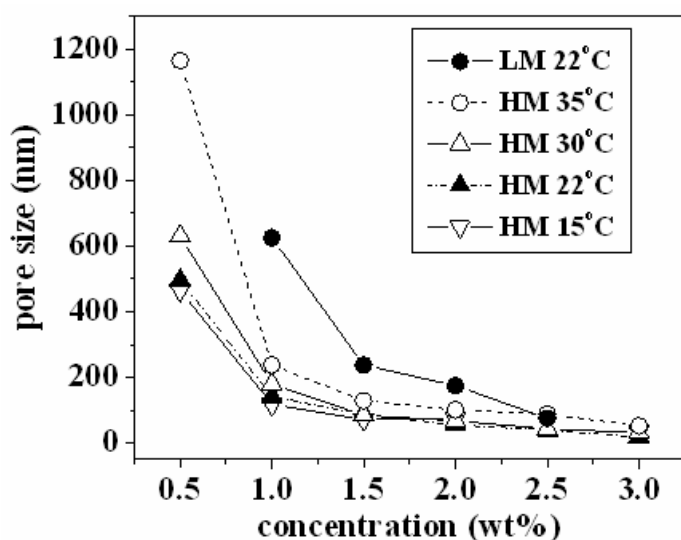
Podle Maaloum et al. [65] struktura agarózových gelů závisí primárně na iontové síle roztoku a na koncentraci gelu. Což potvrzuje i studie [66], která zkoumala a snažila se objasnit strukturu agaru a želatiny v nativní formě a vytvořit vztah mezi strukturou a fyzikálními vlastnostmi daných gelů. Pro definování struktury a kvantitativní vyhodnocení velikosti a počtů pórů využili autoři techniky kryoSEM. Došli k závěru, že velikost pórů se s nárůstem koncentrace snižuje. Velikost a distribuce pórů, závisující na typu a koncentraci agarózy, do značné míry rozhoduje o mechanických vlastnostech gelu.

Kromě přímých metod (mikroskopie) jsou i nepřímé metody, které póry sice nevizualizují, ale poskytují nepřímý parametr, který na velikosti a tvaru pórů závisí. Jednou takovou technikou je metoda měření velikosti částic založená na závislosti turbidity na vlnové délce, která byla ověřena simulacemi a ukázala se jako užitečná v reálných aplikacích. Práce Aymarda a kol. demonstruje užitečnost turbidimetrie při studiu fázového chování biopolymerních směsí, a to konkrétně směsi želatiny s maltodextrinem. [56]

V jiné studii [67] sledovali Narayanan a kol. turbiditu, a tedy velikost pórů v procesu gelace agarózy. V první fázi, kdy vzorek zůstává ve stavu sol, zůstala absorbance velmi nízká. Při postupu gelace, absorbance a s ní vlnový exponent rapidně stoupaly. Lokální spojování polymerů vedlo ke stále rostoucí velikosti pórů. V pozdější fázi gelace je většina agarózových

řetězců imobilizovaných a lokální koagulace se tedy stává obtížnější. Agregace agarózových řetězců od fáze poklesu polymerů k vytvoření sítě vedla k postupnému zvyšování absorpce, zatímco velikost pórů zůstávala téměř konstantní. V tomto experimentu srovnávali dvě různé agarózy, a to SeaKem LE Agarose (vysokotající, teploty gelace pro 1,5 %: 34,5-37,5 °C) a Bio-Rad certifikovanou nízkotající agarózu. Výsledky toho srovnání jsou zobrazena na následujícím grafu (Obr. 4).

Nedelec a kol. [68], prokázali, že také metoda s využitím DSC je vhodnou technikou pro studium gelů. Což bylo demonstrováno na dvou různých příkladech: polyolefinů a silikonů nacházejících se v různých stupních zesílení. Jako adsorbát byl použit aceton. Při měření byl vzorek nejprve ochlazen na teplotu, kdy všechna kapalina zkrystalizovala, poté byl ohříván do rovnovážného bodu tání (tedy pouze dokud neroztála kapalina uzavřená v pórech).



Obr. 4: Graf závislosti velikosti pórů na koncentraci ze studie prováděné Narayanan a kol. [67]

#### 2.4.2 Vývoj kompozitních hydrogelů pro biomedicínské aplikace

Jednou z mnoha používaných biopolymerních komponent využívající se široce pro přípravu kompozitních hydrogelových materiálů je například alginát. Pro přípravu kompozitních hydrogelů IPN byl alginát kombinován s různými syntetickými polymery [25]. Hydrogely IPN reagující na teplotu a pH, složené z alginátu a poly(diallyldimethylamoniumchloridu), byly připraveny Kim et al. postupnou strategií [69]. pH reakce hydrogelů IPN v rozmezí pH 2 až 6 ukázala, že poměry botnání vzrůstaly se zvyšující se hodnotou pH, mající maximální hodnotu při pH 4, ale poklesly v rozmezí 4-6. Pokud jsou skupiny karboxylových kyselin pod hodnotami pKa, jsou ve formě COOH. Jak se pH roztoku zvětšilo, byly -COOH ionizovány na COO<sup>-</sup> a výsledná elektrostatická odpudivá síla způsobila, že hydrogely expandovaly. Na druhé straně, v tomto rozsahu pH, COO<sup>-</sup> v alginátu a amoniové lokality v poly(diallyldimethylamoniumchloridu) koexistovaly a vytvářely polyelektrolytové komplexy vedoucí ke snížení stupně botnání IPN.

Je známo, že poly(N-isopropylakrylamid), jeden z nejpoužívanějších termoreaktivních polymerů, má při teplotních změnách pomalou odezvu. Syntéza multi-citlivých IPN kompozitních hydrogelů založených na alginátu a poly(N-isopropylakrylamidu) představuje

jednu ze strategií přijatých četnými skupinami pro zvýšení pórovitosti gelů a tím dosažení gelů s rychlejší odezvou, jak je požadováno pro systémy uvolňování léčiv. Byly zkoumány semi-IPN a IPN hydrogely [70]. Účinné uvolňování indometacinu z hydrofilních perliček semi-IPN gelů složených z Ca-alginátu a dříve syntetizovaného poly(N-isopropylakrylamidu) bylo popsáno Shi a kol. [71]. Drastická změna uvolňování léčiva byla dosažena střídáním pH pufovacího roztoku mezi 2 a 7. Uvolňování léčiva bylo vyšší při 37 °C než při 25 °C a ukázalo se tak, že perličky Ca-alginát/poly(N-isopropylakrylamid) mají potenciál jako účinný systém dávkování bioaktivních látek reagující na pH a teplotu. Zajímavý přístup pro syntézu hydrogelů semi-IPN alginát/poly(N-isopropylakrylamid) se zvýšenou rychlostí rozpadu ve srovnání s čistým poly(N-isopropylakrylamidem) spočívá v in situ generování magnetických oxidů železa oxidací železných kationtů koordinovaných se sítí alginátu [72]. Bylo prokázáno, že syntéza nanočástic oxidů železa in situ zabraňuje jejich difuzi ze semi-IPN a že pórovitost gelů se zvýšila.

Jak je již výše uvedeno, hydrogely jsou díky svým vlastnostem velmi podobné extracelulární matici, také podporují migraci buněk, jejich adhezi a růst, tyto vlastnosti jsou rozhodující v případě regenerace tkáně pokožky, proto jsou právě hydrogely mezi různými možnostmi krytí ran v poslední době vyhledávány a zkoumány. Pokud jsou hydrogely aplikovány na rány, podporují vlhké hojení a zároveň ochladí povrch dané rány, což může vést ke značnému snížení bolesti, právě z tohoto důvodu jsou hydrogely kladně přijímány pacienty. Pro tyto aplikace se v poslední době stal velmi zajímavým a zkoumaným biopolymerem chitosan. [2 – 9]

Miguel a kolegové [73] skombinovali deacetylovaný chitosan s agarózou, aby prozkoumali, jestli je vhodný k použití na krytí ran, také se zaměřili na prozkoumání polymerních interakcí a termo-senzitivního charakteru agarózy pro výrobu hydrogelu. Na základě všech shromážděných údajů došli k závěru, že vyráběný hydrogel poskytuje vhodné prostředí pro hojení ran. Rány pokryté tímto hydrogelem byly vlhké a hydratované, což dokazovalo, že bylo zabráněno dehydrataci rány. Vysoká proliferace buněk na povrch naznačuje, že došlo i k výměně živin, také nebyly pozorovány žádné příznaky bakteriální infekce.

S cílem navrhnout nové a účinnější systémy uvolňování léků bylo provedeno mnoho experimentů pro přípravu hydrogelů IPN složených z chitosanu nebo jeho derivátů. Yang a kol. [74] nedávno popsali přípravu nových hydrogelů složených z polyethylenglykolu navázaného na karboxymethyl chitosan a alginátu a bylo zjištěno zlepšení uvolňování proteinu při pH 7,4, což naznačuje, že tento kompozitní hydrogel je slibný pro dodávání proteinových léčiv ve střevě. Guo a spolupracovníci [75] uvádějí zajímavý přístup k získání termoplastických polyamfolytických hydrogelů na bázi karboxymethylchitosanu a polydimethylaminoethylmethakrylátu, které reagují na teplo a pH. Kim a kol. [76] popsal zajímavý přístup k přípravě semi-IPN složeného z chitosanu a poloxameru (triblokové kopolymery polypropylenoxid-polyethylenoxid-polypropylenoxidu). Jejich strategie byla založena na síťování poloxameru v přítomnosti chitosanu spolu s lyofilizací za účelem získání hydrogelů houbovitého typu. Tyto kompozitní hydrogely IPN prokázaly rychlou adsorpci vody, vysokou mechanickou pevnost a propojené póry, díky těmto vlastnostem mají potenciál i pro aplikaci jako krytí na rány.

### **3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

#### **3.1 Chemikálie**

agaróza, Sigma-Aldrich, medium EEO, CAS: 9012-36-6

alginát sodný, Sigma-Aldrich, CAS: 9005-38-3

polystyrensulfonát sodný, Sigma-Aldrich, CAS: 25704-18-1 ( $M_w \sim 70,000$ )

#### **3.2 Přístroje**

kryo-skenovací elektronový mikroskop Magellan 400 (ThermoFisher)

skenovací elektronový mikroskop ZEISS EVO LS 10

rtuťový porozimetr PoreMaster 33 (QUANTACHROME INSTRUMENTS)

UV-VIS spektrometr Hitachi U-3900H

high pressure freezer Leica EM HPM100

lyofilizátor VirTis BenchTop K (Biotrade)

PURELAB® ClassicUltrapure Water Purification Systems (ELGA)

sušárna Venticell

ultrazvuková lázeň UCC 1 Ultrasonic Compaq Cleaner powersonic

analytické váhy Sealtex SBC 31

přenosný teploměr GMM 175 Greisinger

#### **3.3 Příprava gelů**

##### **3.3.1 Agarózové gely bez přídavku polyelektrolytů**

Byly připraveny gely o koncentraci agarózy: 0,5; 1; 2 a 4 hm. %, a to následovně: potřebné množství agarózy bylo odváženo s přesností na tři platné číslice a smícháno s 10 ml deionizované vody. Pomocí vařiče za stálého míchání byla navážka agarózy s vodou ohřáta na 80 °C, při této teplotě byla disperze míchána, dokud se veškerá agaróza nerozpustila a roztok se nevyčeřil. Poté byl roztok vložen do vyhřátého ultrazvuku (80 °C) přibližně na 1 minutu. Takto připravený odplyněný roztok se nechal ochladit na pokojovou teplotu v exsikátoru nad vrstvou vody (do ztuhnutí gelu). V případě měření absorbance pro výpočet velikosti pórů, byly vzorky před umístěním do exsikátoru rozděleny (přelitím horkého odplyněného roztoku) do plastových kyvet.

Takto připravené gely se podrobovaly strukturním analýzám, v případě analýzy v suchém stavu byly předem lyofilizovány či vysušeny na vzduchu.

### 3.3.2 Agarózové gely se semi-interpenetrovanými polyelektrolyty

Byly připraveny zásobní roztoky polyelektrolytů (PSS, alginát) v deionizované vodě o koncentraci 1 g/l. Podle Tab. 1 byly smíchány vstupní látky, poté se pokračovalo stejně jako při přípravě čistých agarózových gelů, jak je uvedeno výše.

Tab. 1: Schéma pro přípravu hydrogelů s polyelektrolyty.

Koncentrace polyelektrolytu [%]	Koncentrace agarózy [%]	Navážka agarózy [g]	Přidaný objem polyelektrolytu [ml]	Přidaný objem vody [ml]
0,002	1	0,1	0,2	9,8
0,005	1	0,1	0,5	9,5
0,01	1	0,1	1	9
0,1	1	0,1	10	0
0,01	0,01	0,01	1	9
0,01	0,05	0,05	1	9

### 3.4 Strukturní analýzy

Byla provedena podrobná strukturní analýza reprezentativní skupiny studovaných gelů, a to jak pro vzorky ve formě původního hydrogelu, tak i pro vzorky v suché podobě (tzv. xerogelu).

Pro obě formy byly techniky charakterizace vnitřní struktury zvolené přímé i nepřímé. V obou případech je ovšem většina analytických technik určena především pro analýzu xerogelů. V našem případě byla pro vysušené vzorky využita skenovací elektronová mikroskopie jako metoda přímá, z nepřímých technik byla implementována rtuťová porozimetrie. Zástupcem přímých metod pro vzorky ve formě původního hydrogelu byla taktéž skenovací elektronová mikroskopie, ale tzv. kryoSEM technika, kterou je možno použít na mokré vzorky s využitím kryogenní fixace. Nepřímou metodou zvolenou pro analýzu nevysušených hydrogelů byla turbidimetrie.

#### 3.4.1 Přímé metody

Jak je již výše uvedeno přímé metody byly prováděny s využitím elektronové mikroskopie, analýza lyofilizovaných vzorků byla prováděna na mikroskopu ZEISS EVO LS 10 na Fakultě chemické VUT v Brně a analýza vzorků v původním stavu byla prováděna na mikroskopu Magellan 400 na Ústavu přístrojové techniky Akademie věd České republiky.

##### 3.4.1.1 SEM

Skenovací elektronová mikroskopie byla použita pro zobrazení struktur vysušených vzorků hydrogelů. V rámci této analýzy byly použity 3 způsoby sušení. Jako první byla použita technika lyofilizace pomalým zmražením vzorků (v mrazáku, teplota cca – 15 °C), o lyofilizaci je známo, že vyvolává podstatně menší rozdíly ve vnitřní struktuře gelu narozdíl například od prostého sušení na vzduchu, které bylo použito jako druhý způsob sušení. Jako třetí způsob byly vzorky nejprve rychle zmrazeny v tekutém dusíku v laboratorních

podmínkách a následně lyofilizovány. Z takto připravených vzorků byla skalpelem vyříznuta reprezentativní část a ta byla pozorována pomocí SEM.

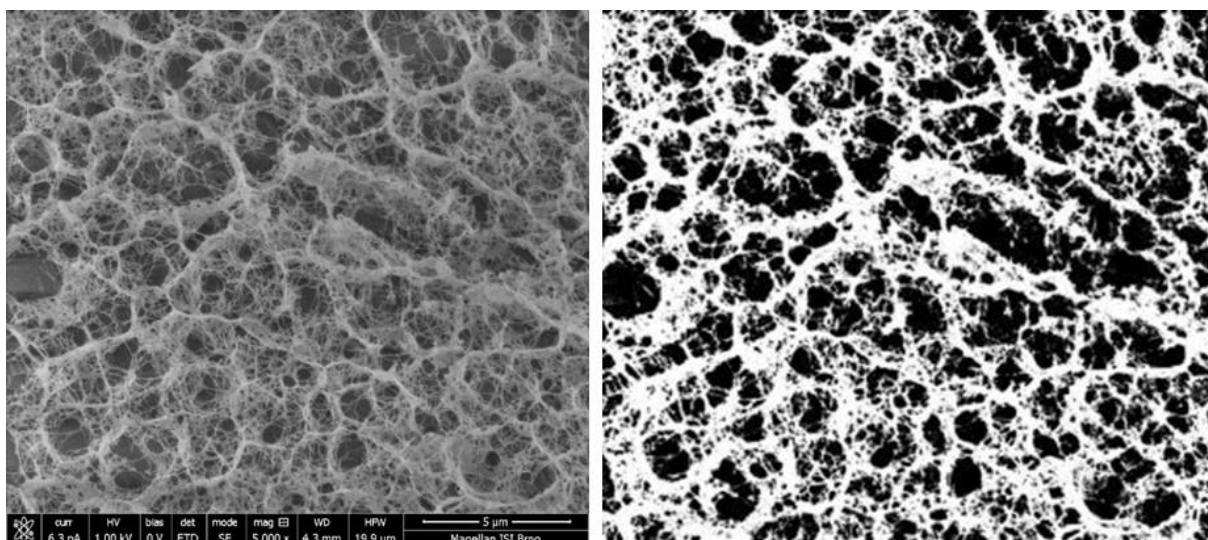
### 3.4.1.2 KryoSEM

Pro zobrazení struktury mokrých vzorků byla použita kryo-skenovací elektronová mikroskopie. V rámci této analýzy byly vyzkoušeny dva způsoby kryogenní fixace vzorků, první spočívala pouze ve zmrazení vzorků tekutým dusíkem, takto fixovaný vzorek byl ve vakuu přenesen do kryo-komory, kde byl porušen jeho povrch, poté byla pomocí mikroskopu zobrazena jeho struktura. Tento způsob kryogenní fixace vzorků je sice v rámci provedení nejjednodušší, ovšem pokud se jedná o kvalitu, nedosahuje úrovně jiných technik.

Dalším způsobem fixace bylo vysokotlaké mražení, které bylo prováděno v Biotechnologickém a biomedicínském centru Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci. Tyto dvě techniky byly následně porovnány. Pro vysokotlaké mražení byl použit přístroj Leica EM HPM100 (tlak: 2100 bar), v rámci přípravy vzorků pro tento způsob mražení bylo potřeba připravit tenké plátky vzorku o tloušťce 0,1 – 0,2 mm. Při přípravě těchto vzorků bylo postupováno následovně: kapka horkého roztoku agarózy o dané koncentraci byla nanášena na sklíčko, které bylo přiklopeno dalším sklíčkem. Mezi tyto dvě sklíčka byl vložen distančník o šířce 0,1 mm. Po ztuhnutí gelu bylo z takto připraveného plátku pomocí speciální formy vyřezáno potřebné množství vzorku.

### 3.4.1.3 Obrazová analýza SEM fotografií

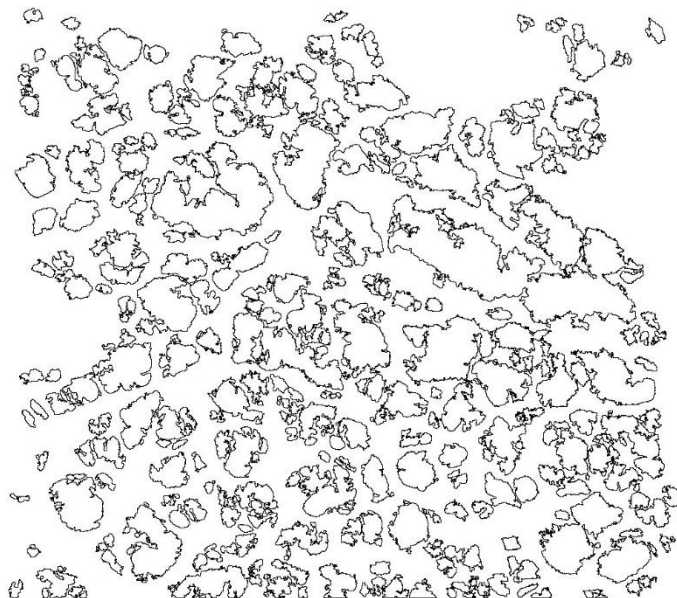
Fotografie pořízené z elektronové mikroskopie byly následně podrobeny obrazové analýze. K této analýze byl zvolen software ImageJ. Tento software byl vybrán hlavně pro svou dostupnost a také pro své uživatelsky přívětivé prostředí, které umožňuje jednoduchou a podrobnou obrazovou analýzu. V rámci ImageJ byly vyzkoušeny dva způsoby analýzy, a to manuální a automatický s využitím nástroje „Analyze particles“. Pro obě tyto techniky bylo vždy důležité nastavit správné měřítko. Manuální bylo následně prováděno výběrem reprezentativních pórů a jejich ručním označením středního průměru.



Obr. 5: Vlevo původní fotografie zachycena pomocí mikroskopu v odstínech šedi, vpravo upravená fotografie do binární podoby nástrojem „Treshold“ pro automatickou analýzu.

Pro automatickou analýzu fotografií byla zvolena možnost „Analyze particles“, před samotnou analýzou bylo nutné obraz upravit, aby byl software schopný danou fotografii

analyzovat. Úprava byla prováděna přes tzv. „Threshold“, kde se pomocí jednoduchého nastavení z kontrastu označila oblast, která měla značit póry a ta se následně po aplikaci tohoto nastavení vybarvila černě (viz. Obr. 5, ukázka nastavení tresholdu – viz. příloha 1). Pro takto upravenou černobílou fotografii už software automaticky vykreslil póry s použitím nástroje „Analyze Particles“ (Obr. 6, ukázka nastavení – viz. příloha 2) a vyhodnotil jejich plochu, nastavení intervalu velikostí pórů bylo zvoleno v rozmezí 0,05 – 100  $\mu\text{m}$ .



Obr. 6: Automaticky vykreslené póry pro zvolené rozmezí velikostí nástrojem „Analyze particles“.

Distribuce pórů byla jednoduše zpracována z naměřených hodnot pomocí funkce softwaru ImageJ. V rámci této práce byly tyto metody použity pouze pro porovnání jednotlivých vzorků, nebylo pořízeno dostatečné množství fotografií o potřebné kvalitě, aby mohly být výsledky statisticky zpracovány a mít vypovídající hodnotu o jednotlivých vzorcích.

### 3.4.2 Nepřímé metody

Jak je již výše uvedeno nepřímé metody byly prováděny s využitím rtuťové porozimetrie a turbidimetrie.

#### 3.4.2.1 Rtuťová porozimetrie

Nepřímou metodou analýzy pro vysušené vzorky byla zvolena rtuťová porozimetrie, která byla provedena rtuťovým porozimetrem PoreMaster 33 na Fakultě chemické VUT v Brně. Rtuťová porozimetrie byla zvolena jako dostupná a spolehlivá metoda pro určení distribuce velikosti pórů.

Dle výše uvedených postupů byly připraveny vzorky s přídavkem i bez přídavku polyelektrolytové složky, které byly následně vysušeny na vzduchu, pomalu zmrazeny a lyofilizovány nebo rychle zmrazeny a lyofilizovány. Byla zvážena prázdná měřicí cela, poté byl do cely umístěn vzorek, předem upravený skalpelem na požadované rozměry. Cela se vzorkem byla zvážena a byla zjištěna hmotnost měřeného vzorku. Vzorky nebyly pro vlastní měření dále upravovány.

Povrchové napětí rtuti bylo 480 erg/cm<sup>2</sup>, kontaktní úhel 140°. Při nízkotlakém měření byl rozsah tlaků 0,2 - 50 PSIA (1 Pa = 0,00014503773800722 PSIA). Při vysokotlakém 20 – 33 000 PSIA. Vyhodnocení výsledků proběhlo pomocí softwaru Poremaster.

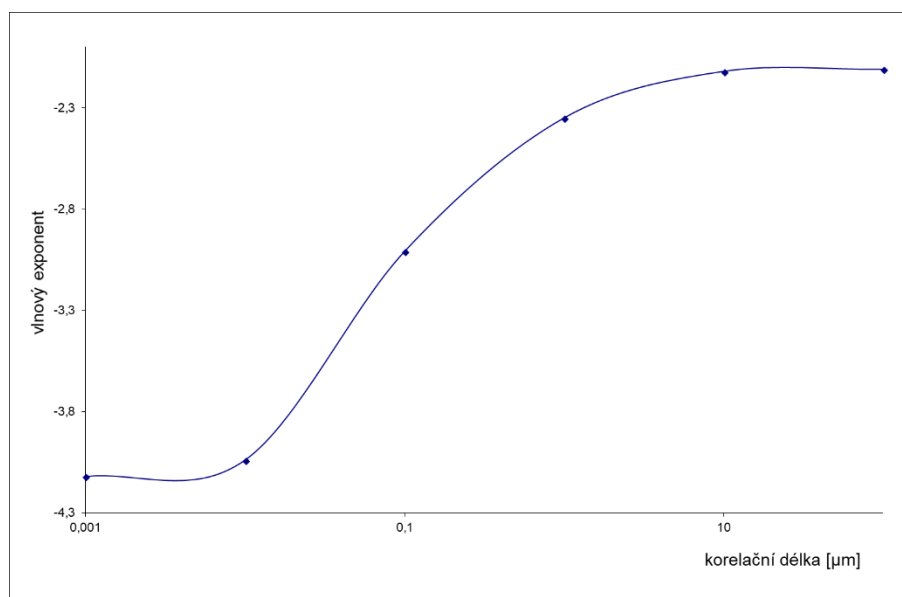
### 3.4.2.2 Turbidimetrie

Nepřímou metodou charakterizace hydrogelů v hydratovaném stavu byl experiment vycházející ze závislosti vlnového exponentu na korelační délce dle Aymarda [56].

Dle výše uvedeného postupu byly připraveny v plastových kyvetách (optická délka 1 cm) jak čisté agarózové gely, tak i s přidávkem polyelektrolytu. Byla změřena jejich absorpční spektra UV-VIS spektrofotometrem typu Hitachi v rozmezí 800 – 400 nm. V tomto rozmezí byla taktéž změřena jejich absorpční spektra se speciálním nástavcem měřícím i rozptýlené světlo, jak bylo očekáváno, toto měření potvrdilo, že světlo bylo skutečně rozptýleno. Pro výpočet velikosti pórů bylo počítáno s absorpčním spektrem v rozmezí 800 – 700 nm [56].

Z naměřených hodnot absorbance byla podle vzorce (9) vypočtena turbidita, následně byl její logaritmus vynesena v závislosti na dekadickém logaritmu vlnové délky. Vlnový exponent byl určen ze směrnice této závislosti, vlnový exponent je dle Aymarda [56] závislý na korelační délce dle následujícího grafu (Obr. 7). Korelační délka je pak přímo úměrná velikosti pórů.

$$\tau(\lambda) = 2,3 \cdot A(\lambda) / L \quad (9)$$



Obr. 7: Závislost vlnového exponentu na korelační délce dle Aymarda [56].

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Přímá vizualizace lyofilizovaných vzorků

Pro přímou vizualizaci byla použita technika skenovací elektronové mikroskopie. V rámci této metody bylo nutné mít vzorky před samotnou vizualizací v suchém stavu. Jak je již zmíněno, vzorky byly sušeny různými způsoby. Jednalo se o prosté vysušení na vzduchu a lyofilizaci s pomalým či rychlým zmražením vzorku. Tyto jednotlivé způsoby sušení a jejich vliv na strukturní parametry jsou popsány v následujících kapitolách.

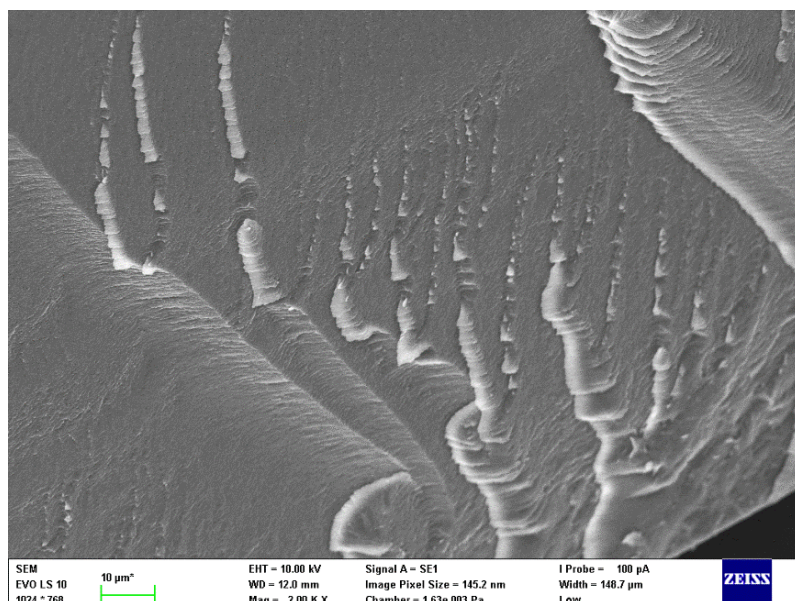
Už na první pohled byl viditelný rozdíl mezi jednotlivými způsoby mražení (Obr. 8). Vzorky rychle zmrazeny a lyofilizovány si ponechaly hustší síť narozdíl od vzorků pomalu zmražených, tento poznatek naznačuje možnost, že lyofilizace s rychlým mražením je vhodnější a nezpůsobuje tak viditelnou deformaci jako lyofilizace s pomalým mražením.



*Obr. 8: Vlevo je vzorek pomalu zmražený a lyofilizovaný, vpravo vzorek rychle zmražený dusíkem a lyofilizovaný. Fotografie byly pořízeny digitálním fotoaparátem (13Mpx).*

#### 4.1.1 Sušení na vzduchu

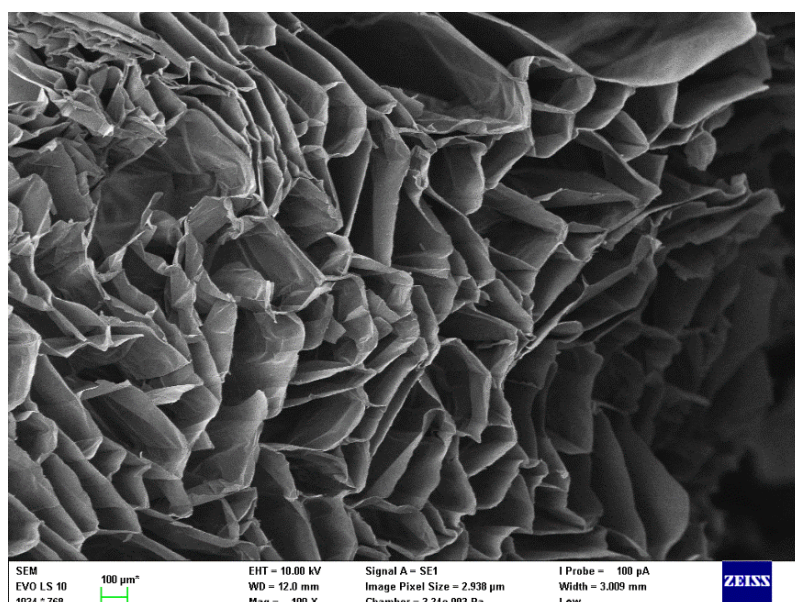
Jako první způsob sušení bylo zvoleno prosté sušení na vzduchu. U tohoto způsobu sušení bylo očekáváno, že bude docházet k rozpadu porézní struktury testovaných hydrogelů. Tento předpoklad potvrdila i vizualizace daných vzorků, která prokázala, že sušením na vzduchu dochází ke ztrátě porézní struktury u všech vzorků, jako příklad je dále na Obr. 9: zobrazena struktura pro vzorek hydrogelu o koncentraci agarózy 1 hm. %, je patrné, že struktura je hladká bez viditelných pórů. Při tomto způsobu sušení dochází ke smršťování sítě hydrogelu až do bodu, kdy už je hydrogel natolik smrštěný, že netvoří žádné póry.



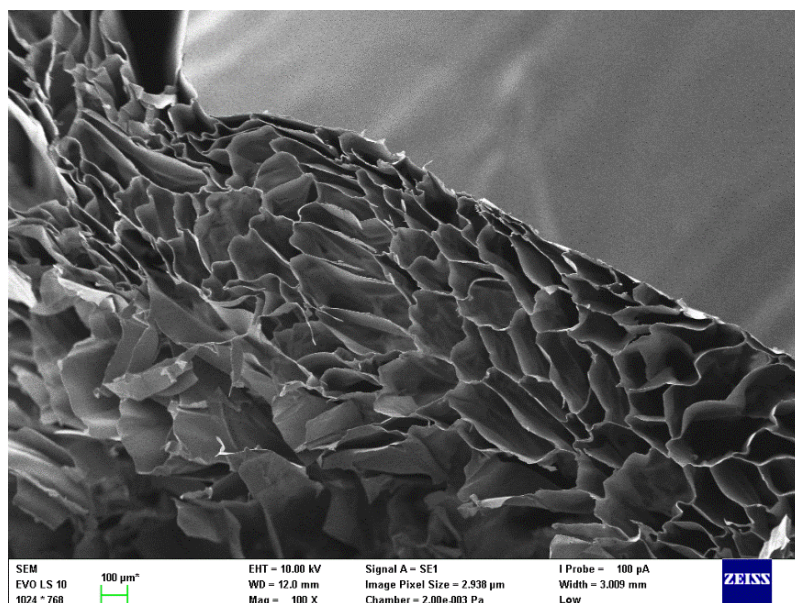
Obr. 9: Fotografie pořízená SEM pro hydrogel o koncentraci agarózy 1 hm. %vysušený na vzduchu (zvětšení: 2000x).

#### 4.1.2 Lyofilizace s pomalým mražením

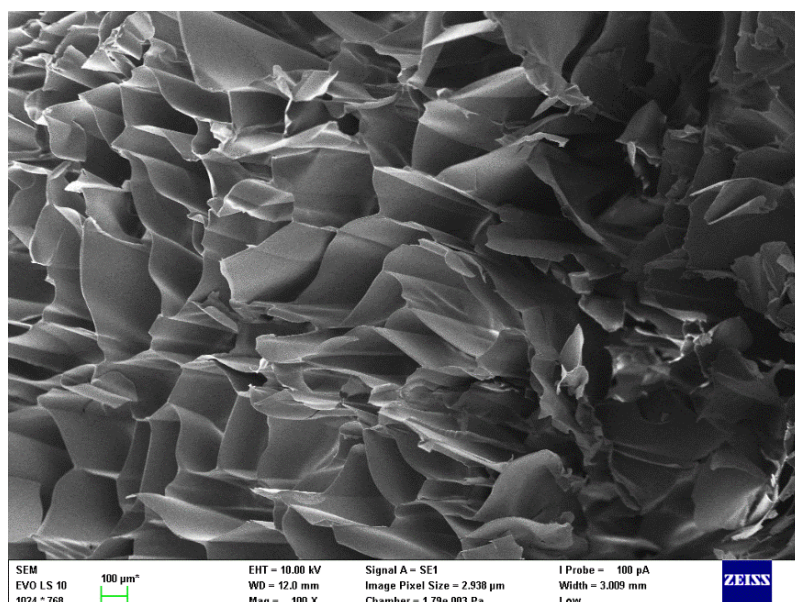
Jako další způsob sušení bylo použito pomalé mražení ve spojení s následnou lyofilizací. Dle literatury [64] by struktura agarózového hydrogelu měla být izotropní síť s velikostí pórů v řádu desítek až stovek nm, případně jednotek  $\mu\text{m}$ . Ovšem struktura vzorků vysušených tímto způsobem byla překvapivě makroporézní a tvořená kanálkovitými póry o průměru v řádu desítek až stovek mikrometrů. Tento rozdíl je s největší pravděpodobností spojen s deformací struktury vlivem krystalů vody, které vznikají právě pomalým mražením.



Obr. 10: Fotografie pořízená SEM pro pomalu zmražený a lyofilizovaný hydrogel o koncentraci agarózy 1 hm. %(zvětšení: 100x).



Obr. 11: Fotografie pořízená SEM pro pomalu zmražený a lyofilizovaný hydrogel o koncentraci agarózy 2 hm. % (zvětšení: 100x).

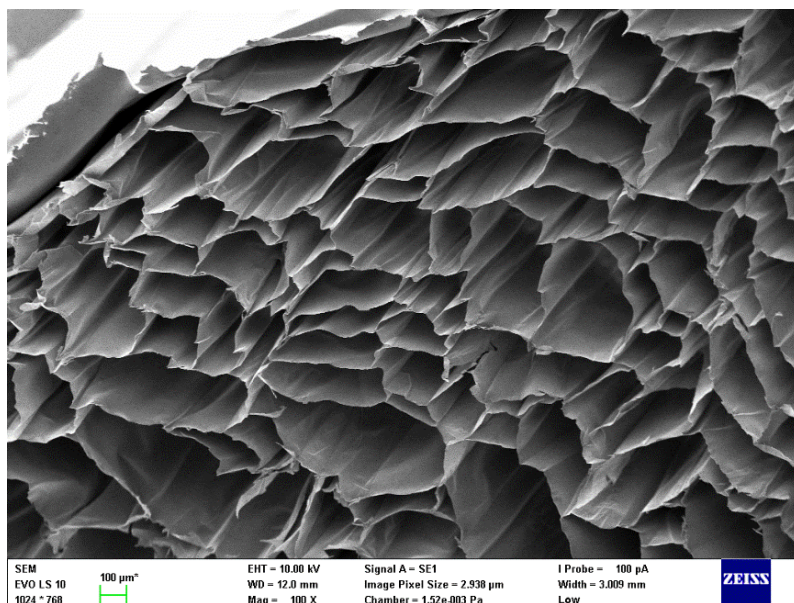


Obr. 12: Fotografie pořízená SEM pro pomalu zmražený a lyofilizovaný hydrogel o koncentraci agarózy 4 hm. % (zvětšení: 100x).

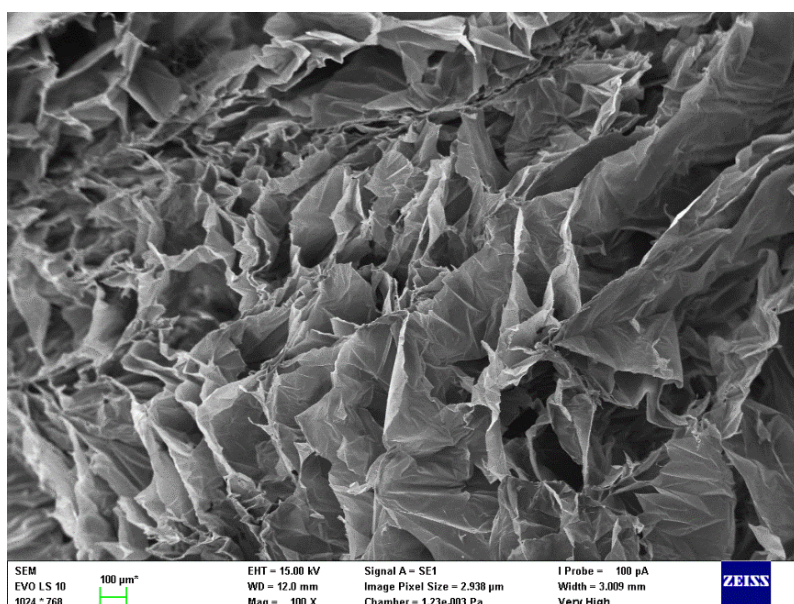
Na zobrazených fotografiích (Obr. 10 – 12) jsou vzorky hydrogelů o různých koncentracích agarózy, které byly nejprve pomalu zmrazeny a následně lyofilizovány. Jak již bylo zmíněno, struktura je makroporézní s póry o průměru v řádu desítek až stovek  $\mu\text{m}$ . Dle literatury [28 – 32] by se velikost pórů měla se zvyšující se koncentrací agarózy snižovat. Navzdory očekávání zde ovšem není viditelný rozdíl mezi strukturou vysušených gelů o různé koncentraci agarózy. Lze tedy předpokládat, že pomalým mražením dochází vlivem deformace vnitřní struktury způsobené krystaly ledu ke vzniku makroporézní anizotropní struktury nezávisle na kompozici daného hydrogelu.

Pro tento způsob sušení byly také porovnány vzorky o koncentraci agarózy 1 hm. % s přidavkem polyelektrolytové složky. Na obrázcích níže (Obr. 13 – 15) jsou zobrazeny

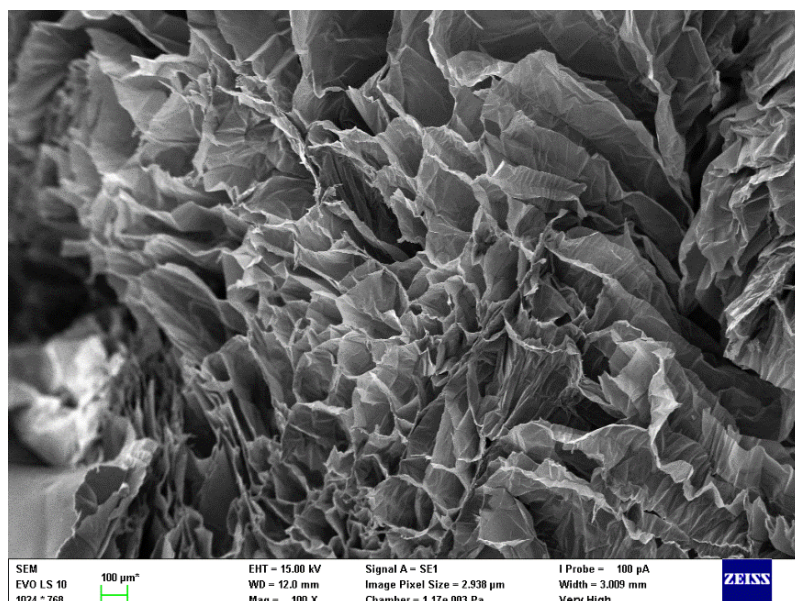
fotografie pro vzorky lyofilizovaných gelů s 1 hm. % agarózy, 1 hm. % agarózy a 0,01 hm. % alginátu a 1 hm. % agarózy a 0,01 hm. % PSS. Srovnání těchto lyofilizovaných vzorků hydrogelu pouze s agarózou a hydrogelů s přidavkem polyelektrolytů ukazuje, že v použitém koncentračním rozmezí se lyofilizované gely bez či s přidavkem polyelektrolytové složky neliší svou vnitřní strukturou. Tudíž by tyto složky neměly mít vliv na strukturální parametry, ovšem v nabotnalém hydrogelu tyto látky zásadně ovlivňují chemické vlastnosti. Vzhledem k výše zmíněnému předpokladu, že makroporézní struktura vzniká v důsledku pomalého mražení nezávisle na kompozici, nelze z těchto výsledků jednoznačně stanovit vliv polyelektrolytové složky na strukturu.



Obr. 13: Fotografie pořízená SEM pro pomalu zmražený a lyofilizovaný hydrogel o koncentraci agarózy 1 hm. % (zvětšení: 100x).



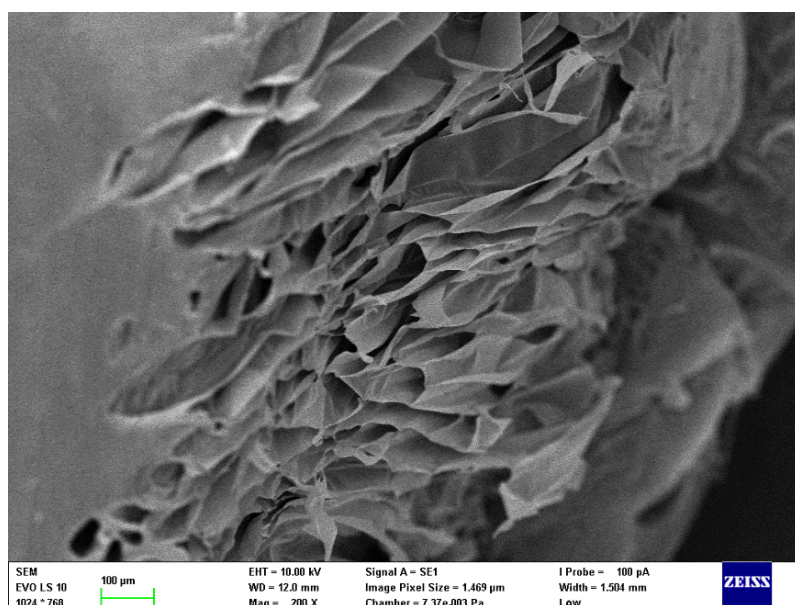
Obr. 14: Fotografie pořízená SEM pro pomalu zmražený a lyofilizovaný hydrogel o koncentraci agarózy 1 hm. % a alginátu 0,01 hm. % (zvětšení: 100x).



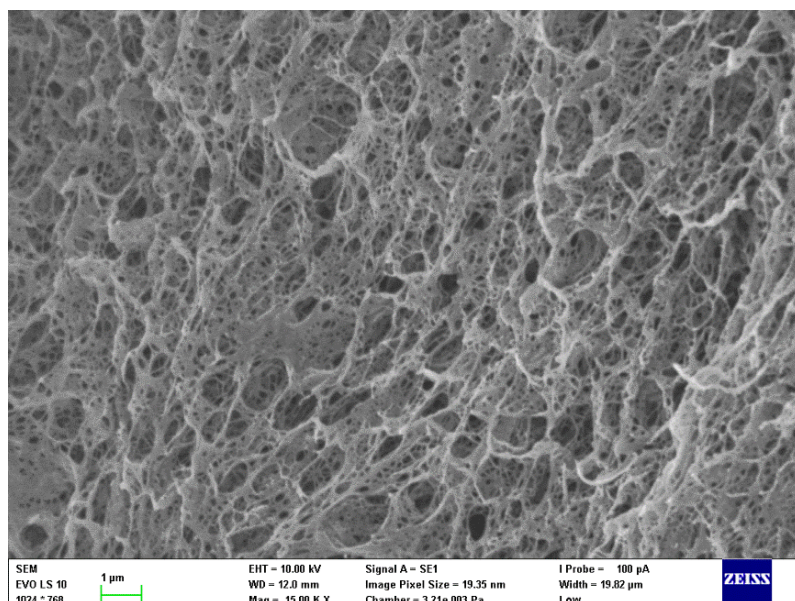
Obr. 15: Fotografie pořízená SEM pro pomalu zmražený a lyofilizovaný hydrogel o koncentraci agarózy 1 hm. % a PSS 0,01 hm. % (zvětšení: 100x).

#### 4.1.3 Lyofilizace s rychlým mražením

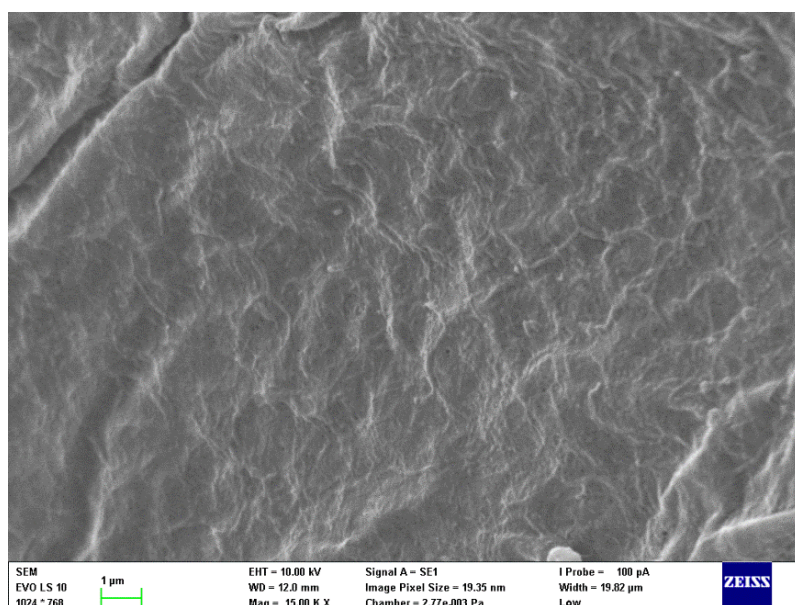
Posledním testovaným způsobem sušení bylo rychlé (šokové) zmražení s následnou lyofilizací. Tímto způsobem došlo k viditelnému rozdílu ve struktuře ve srovnání s technikou pomalého mražení. Struktura byla dosti nepravidelná, ve struktuře jednoho vzorku se nacházely jak části obsahující makropóry (Obr. 16), tak také části hladké bez pórů (Obr. 17), ovšem z velké části byla struktura izotropní s velikostí pórů v řádu stovek nm, případně jednotek µm (Obr. 18). V původním stavu hydrogelu se struktura dle literatury [64] popisuje jako izotropní s póry o velikostech v řádu desítek až stovek nm, jak je již výše zmíněno. Při použití tohoto způsobu mražení si tudíž vzorky zanechaly částečně svou původní strukturu.



Obr. 16: Fotografie pořízená SEM pro šokově zmražený a lyofilizovaný hydrogel o koncentraci agarózy 1 hm. % (zvětšení: 200x) – anizotropní struktura, makropóry.

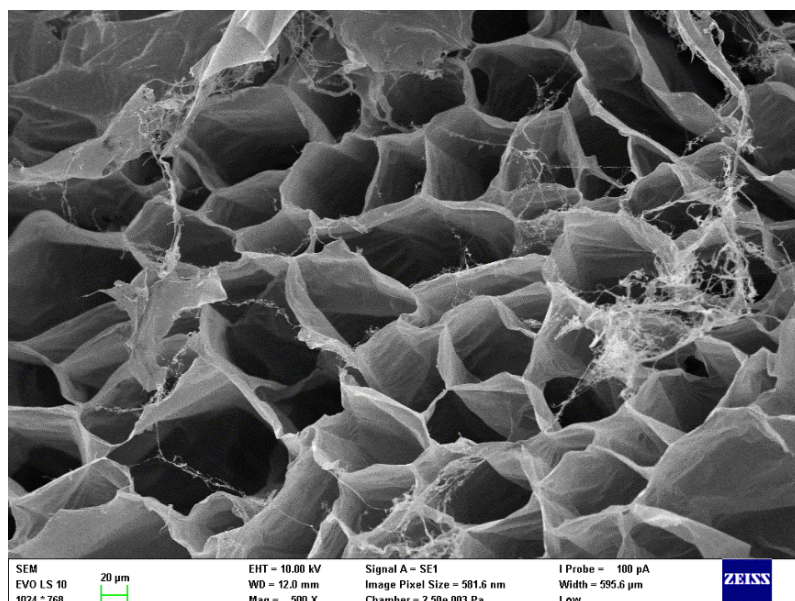


Obr. 17: Fotografie pořízená SEM pro šokově zmražený a lyofilizovaný hydrogel o koncentraci agarózy 1 hm. % (zvětšení: 15000x) – izotropní struktura s póry o velikostech v řádech nm, případně jednotek  $\mu\text{m}$ .

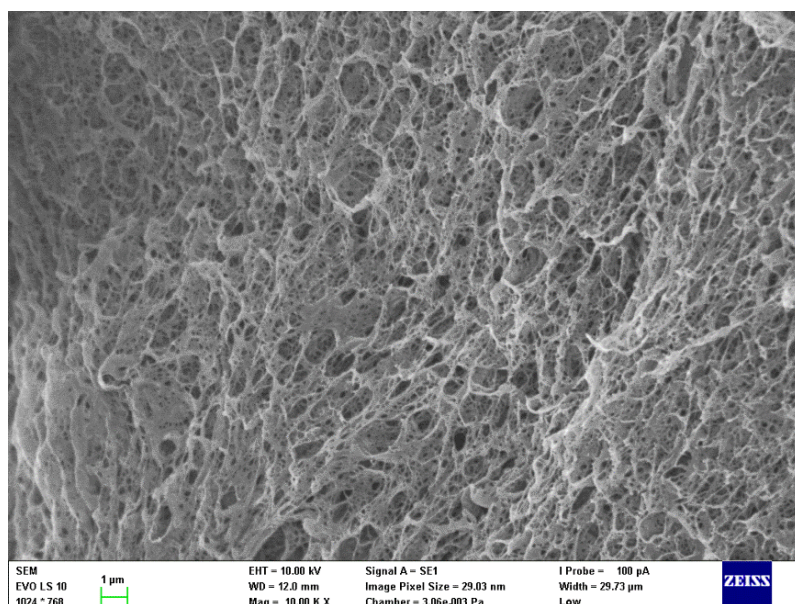


Obr. 18: Fotografie pořízená SEM pro šokově zmražený a lyofilizovaný hydrogel o koncentraci agarózy 1 hm. % (zvětšení: 15000x) – hladký povrch bez pórů.

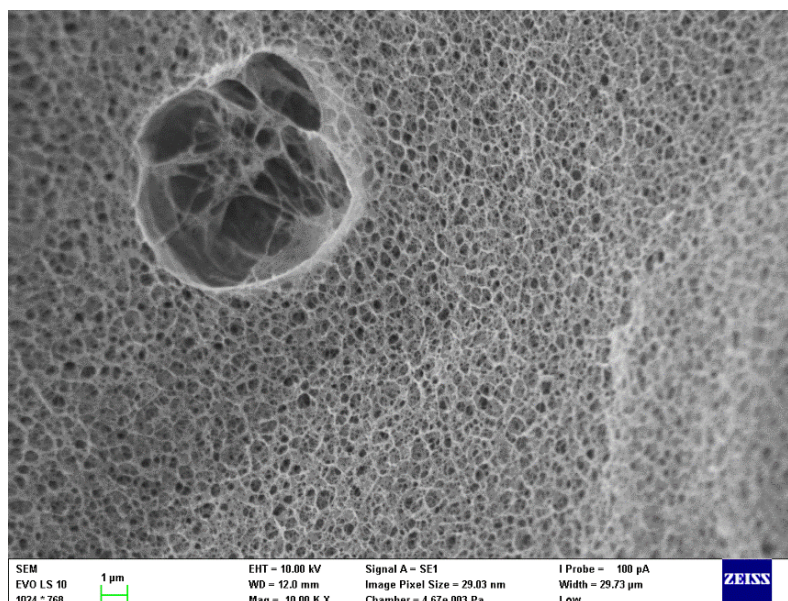
V rámci tohoto způsobu sušení byly porovnány pouze agaróзовые hydrogely o různé koncentraci bez přídavku polyelektrolýtů. Nižší jsou zobrazeny mikrofotografie (Obr. 19 – 21) pro odlišné koncentrace agarózy v hydrogelu, očekávaný rozdíl ve struktuře pro odlišné koncentrace byl viditelný v částech struktury obsahující izotropní síť, tedy v těch částech, které si ponechaly svou původní strukturu a nebyly poznamenány patrnou deformací. Síť pro 2% agaróзовý gel je hustší a s více póry než pro 1% agaróзовý hydrogel.



Obr. 19: Fotografie pořízená SEM pro šokově zmražený a lyofilizovaný hydrogel o koncentraci agarózy 0,5 hm. % (zvětšení: 500x) – anizotropní struktura.



Obr. 20: Fotografie pořízená SEM pro šokově zmražený a lyofilizovaný hydrogel o koncentraci agarózy 1 hm. % (zvětšení: 10000x) – izotropní struktura.



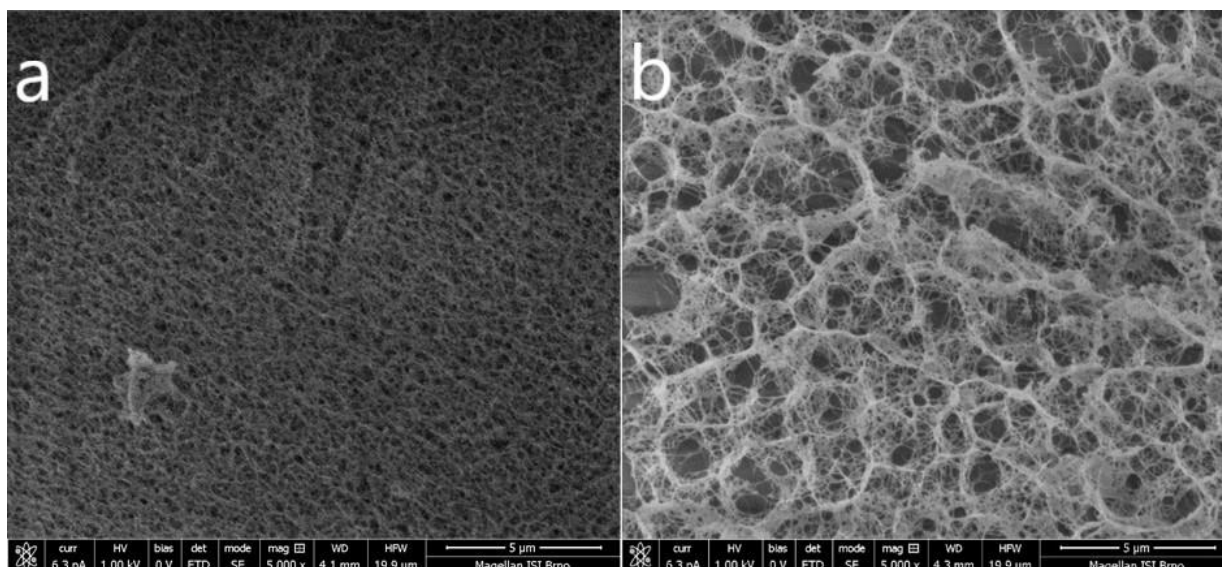
Obr. 21: Fotografie pořízená SEM pro šokově zmražený a lyofilizovaný hydrogel o koncentraci agarózy 2 hm. % (zvětšení: 10000x) – izotropní struktura.

Ve srovnání s ostatními koncentracemi vzorek s 0,5 hm.% agarózy neobsahoval části s izotropní strukturou, jeho póry měly kanálikovité tvary jako v případě sušení pomalým mražením, ovšem průměr těchto pórů se pohyboval v rozmezí desítek  $\mu\text{m}$ , v případě pomalého mražení se pohyboval v rozmezí desítek až stovek  $\mu\text{m}$ . Tato skutečnost mohla být způsobena jistými nedostatky v této technice sušení (např. nedostatečné promražení způsobené přípravou příliš objemného vzorku či přesun do lyofilizátoru v laboratorních podmínkách) nebo faktem, že tento vzorek má nejmenější strukturu, která je oproti ostatním vzorkům náchylnější k deformaci. Pro vyšší koncentrace už nerovnoměrná struktura vypovídá s největší pravděpodobností o nedostatcích tohoto způsobu sušení, při rychlém zmražení vzorků kapalným dusíkem by neměly vznikat krystaly vody, které jsou zodpovědné za strukturní deformaci. Ovšem při provedení rychlého zmražení dusíkem v rámci této práce nemuselo dojít k dokonalému promražení celého vzorku, což by korespondovalo s přímou vizualizací daných vzorků, totiž faktem, že je struktura nerovnoměrná místy s makropóry (nedostatečně promražená místa s krystalickou vodou) a místy s mikropóry (dostatečně promražená místa). Podrobnější prozkoumání vlivu tohoto způsobu sušení na strukturu gelů by mohlo vést k optimalizaci techniky sušení pro strukturní analýzu hydrogelů s využitím techniky SEM, která je narozdíl od techniky kryoSEM dostupnější.

#### 4.2 Přímá vizualizace vzorků v hydratovaném stavu

Pro vzorky v původním hydratovaném stavu hydrogelu byla použita kryoSEM technika. Pro tuto metodu není potřeba vzorky vysoušet, je nutné je ovšem kryogenně fixovat, byly vyzkoušeny a porovnány dvě metody této fixace. První spočívala pouze ve fixaci v tekutém dusíku v laboratorních podmínkách, druhá byla založena na zmražení za vysokého tlaku. Z Obr. 22 je patrné, že rozdílná fixace má vliv na strukturu, oba způsoby kryogenní fixace potvrzují očekávanou vnitřní strukturu gelu, tedy izotropní síť (velikost pórů se pohybuje v řádu stovek nm, případně jednotek  $\mu\text{m}$ ). Ovšem v případě fixace vysokotlakým mražením struktura obsahuje viditelně hustší síť s menšími póry. Pro tuto fixaci je ovšem nutné připravit vzorek ve formě tenkého plátku (0,1 – 0,2 mm), aby bylo dosaženo tohoto plátku byl postup velmi odlišný od postupu obecně používaného v této práci (viz. kapitola 3.3). V rámci tohoto

postupu může docházet k jistým deformacím, např. vlivem osychání na vzduchu, které je při tak tenkém vzorku rychlejší nebo tlakem vyvíjeným na vzorek při přípravě.

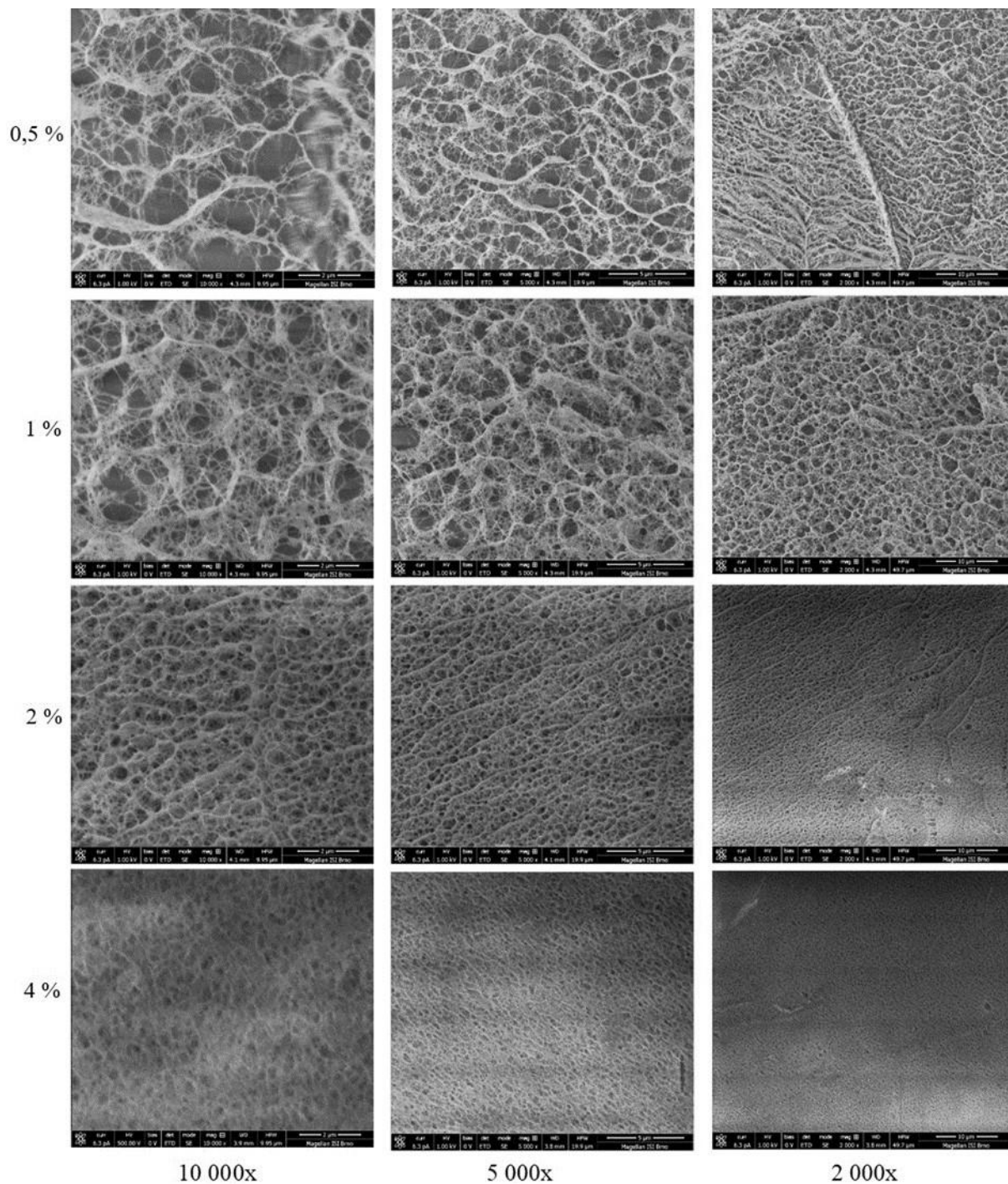


Obr. 22: Fotografie pořízená kryoSEM technikou pro hydrogel o koncentraci agarózy 1 hm. %: a) vzorek kryogenně fixovaný vysokotlakým mražením a b) vzorek kryogenně fixovaný kapalným dusíkem v laboratorních podmínkách.

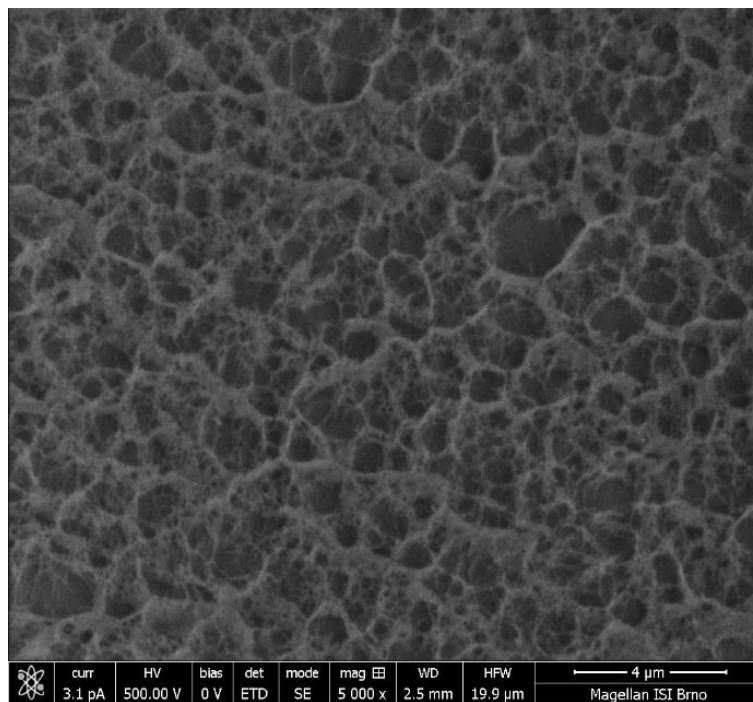
Tato skutečnost navzdory faktu, že kryogenní fixace vysokotlakým mražením je přesnější technikou, omezuje její využitelnost pro tuto práci, kdy je důležité připravovat vzorky pro různé techniky strukturní analýzy totožným způsobem v rámci srovnání těchto technik. Dalším faktem omezujícím využitelnost tohoto způsobu kryogenní fixace je dostupnost přístroje pro vysokotlaké mražení. V rámci porovnání jednotlivých technik byly dále porovnávány pouze vzorky připravené pomocí jednoduché a dostupné techniky fixace ponořením do tekutého dusíku v laboratorních podmínkách.

Aplikace kryoSEM techniky na hydrogelové vzorky v mokřém (nabotnalém) stavu tedy potvrdila očekávanou vnitřní strukturu gelu. Dle literatury [28 – 32] by s nárůstem koncentrace měla klesat velikost pórů, což technika kryoSEM, narozdíl od SEM prováděné pro pomalu zmrazené a lyofilizované vzorky, potvrdila. Rozdíl byl patrný už při pohledu na fotografie, které jsou zobrazeny pro přehled na Obr. 23. Se zvyšující se koncentrací agarózy v daném vzorku je síť hustší a póry v ní se zmenšují.

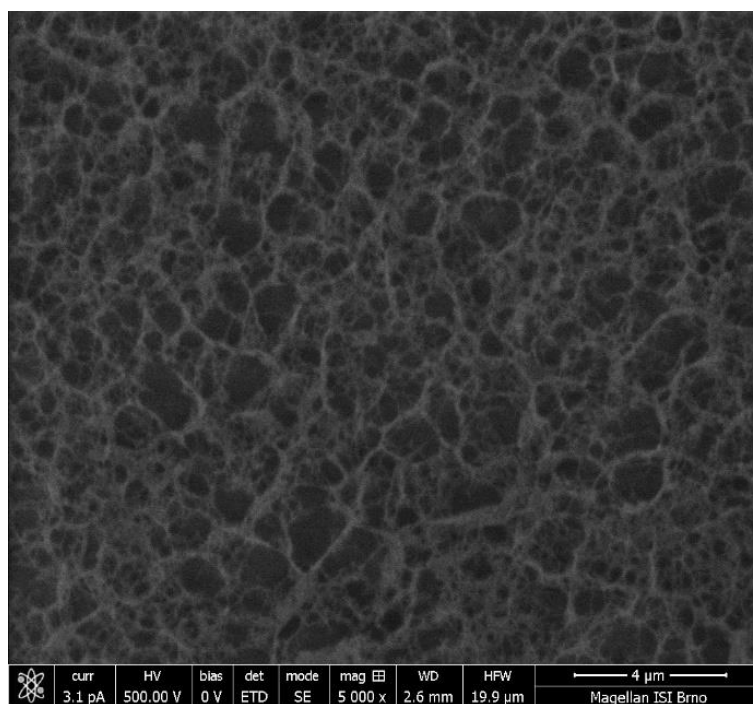
Technikou kryoSEM byly také porovnány vzorky hydrogelů s přidavkem polyelektrolytů. Na obrázcích níže (Obr. 24 – 26) jsou fotografie těchto gelů, konkrétně s 1 hm. % agarózy, 1 hm. % agarózy a 0,01 hm. % alginátua 1 hm. % agarózy a 0,01 hm. % PSS. Z porovnání jednotlivých fotografií lze usoudit, že základní struktura agarózového hydrogelu se s přidavkem polyelektrolytové složky v použitém rozmezí zásadním způsobem nemění, jak je patrné i z fotografií pořízených technikou SEM. Ovšem přidavek polyelektrolytů významně ovlivní chemické složení vzorků, a tím i některé chemické či fyzikálně-chemické vlastnosti. Struktura a s ní například mechanické či tokové vlastnosti mohou být ovlivněny změnou koncentrace gelotvorné složky, v našem případě agarózy.



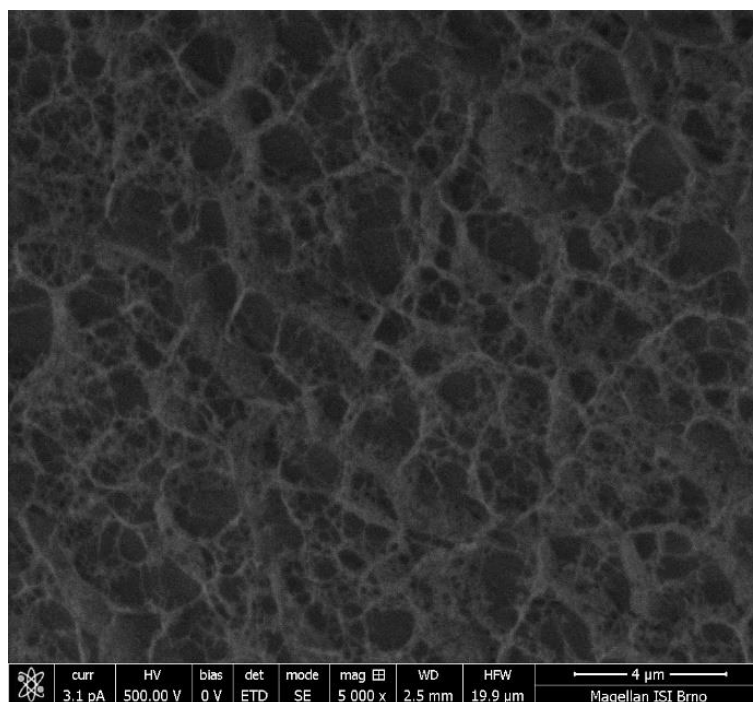
Obr. 23: Mikrofotografie pořízené kryosem technikou pro gely s různou koncentrací agarózy a odlišným přiblížením.



Obr. 24: Fotografie pořízená kryoSEM technikou pro hydrogel o koncentraci agarózy 1 hm. %.



Obr. 25: Fotografie pořízená kryoSEM technikou pro hydrogel o koncentraci agarózy 1 hm. % a alginátu 0,01 hm. %.



Obr. 26: Fotografie pořízená kryoSEM technikou pro hydrogel o koncentraci agarózy 1 hm. % a PSS 0,01 hm. %.

### 4.3 Kvantitativní zhodnocení přímé vizualizace

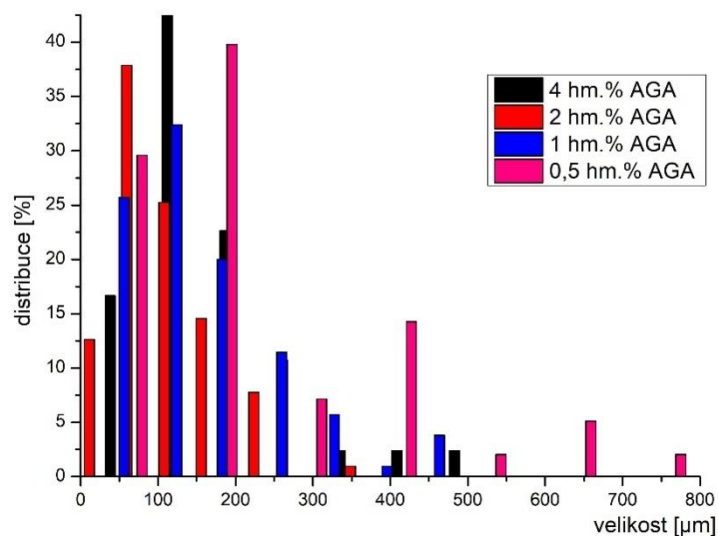
Jak je již zmíněno, fotografie pořízené elektronovým mikroskopem byly podrobeny obrazové analýze pomocí softwaru ImageJ, a to manuálně i automaticky s využitím nástroje „Analyze particles“. Manuálně zpracovaná data jsou uváděna jako průměr pórů, tedy v  $\mu\text{m}$ , ovšem při automatickém vyhodnocení program pracuje s plochou pórů, data jsou tedy uváděna v  $\mu\text{m}^2$ . Tuto skutečnost je nutné brát v potaz při porovnání jednotlivých výsledků těchto dvou způsobů. ImageJ také disponuje nástrojem, který pro naměřená data zpracuje distribuci, a který byl použit v rámci této práce, což má za následek, že výsledné intervaly velikostí pórů jsou pro jednotlivé vzorky rozdílné, ovšem měly by být charakterističtější pro dané vzorky.

Automatické zpracování je sice principiálně rychlejší a při správně zvolených podmínkách i přesnější, ovšem nastává zde problém nutnosti optimální kvality fotografie. Fotografie musí být dostatečně ostrá a mít vhodný kontrast, aby póry mohly být rozpoznány programem a následně správně interpretovány. Problémem je také správné nastavení podmínek, například vhodným nastavením „Tresholdu“, aby bylo možné póry správně označit (zde je důležité mít vhodnou fotografii, pro fotografie rozmazané či příliš tmavé/světlé se stává téměř nemožným označit póry), či nastavením měřítka a intervalu měřených velikostí.

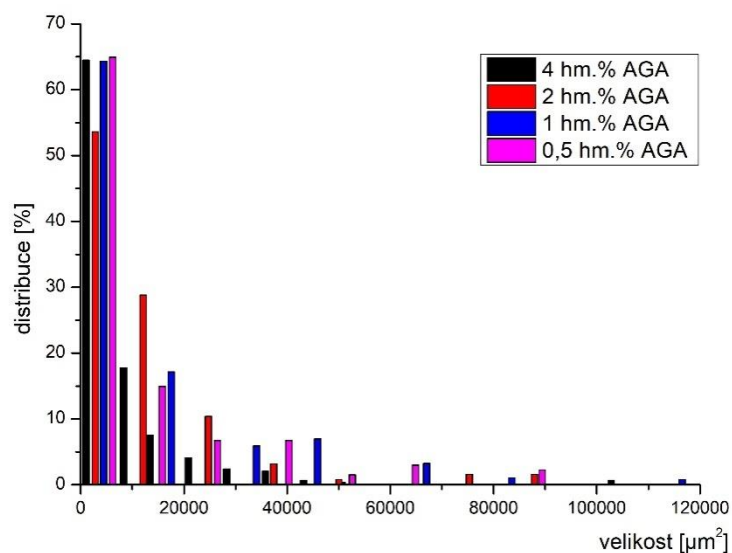
Manuální zpracování nevyžaduje tak kvalitní fotografii ani vhodné nastavení podmínek, zde je důležité pouze správně nastavit měřítka a mít fotografii s dostatečným přiblížením, aby bylo možné póry označit individuálně. Ovšem tímto zpracováním nedojde k analýze všech pórů zobrazených na dané fotografii, pouze k jejich reprezentativního výběru. Další nevýhodou tohoto zpracování je také fakt, že ruční označení průměru jednoho póru je poměrně subjektivní, takto zpracované výsledky nejsou tedy tak přesné, jako ty dosažené automatickou analýzou daného vzorku.

### 4.3.1 Lyofilizované vzorky

Níže v grafech (Obr. 27 – 28) jsou porovnány výše zmíněné způsoby obrazové analýzy v rámci programu ImageJ na příkladu lyofilizovaných gelů s různou koncentrací agarózy, přičemž se distribuce pórů pro různé koncentrace zásadně neliší, což potvrzuje předchozí vizuální hodnocení fotografií (viz. kapitola 4.1.2).

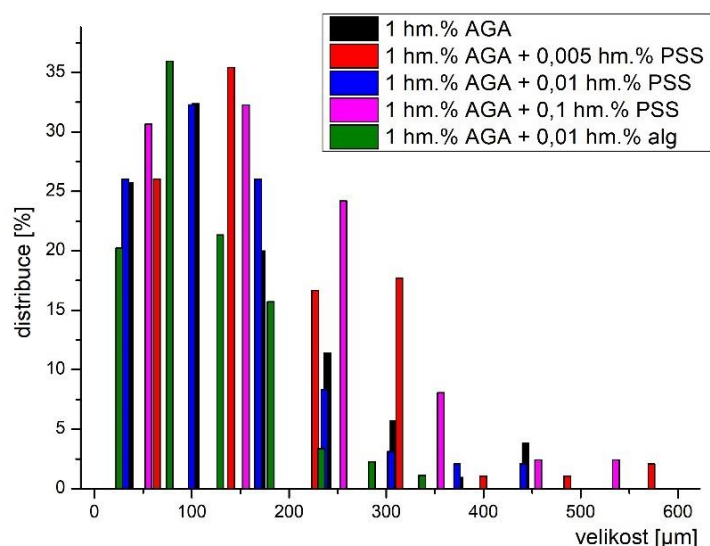


Obr. 27: Graf distribuce pórů pro pomalu mražené a lyofilizované vzorky o různé koncentraci agarózy, manuální zpracování.



Obr. 28: Graf distribuce pórů pro pomalu mražené a lyofilizované vzorky o různé koncentraci agarózy, zpracování nástrojem „Analyze particles“.

Rozdílem mezi těmito způsoby analýzy je procentuální distribuce pórů, zatímco u zpracování manuálního nepřesahuje zastoupení určité velikosti pórů 50 %, u automatického zpracování se nejmenší velikost pórů v distribuci pohybuje kolem 70 %. Rozdíl mezi procentuálním zastoupením může být způsoben faktem, že při manuálním zpracování nejsou zahrnuty do distribuce všechny zobrazené póry, zvláště ty nejmenší vzhledem k obtížnosti označení malých pórů ručně.



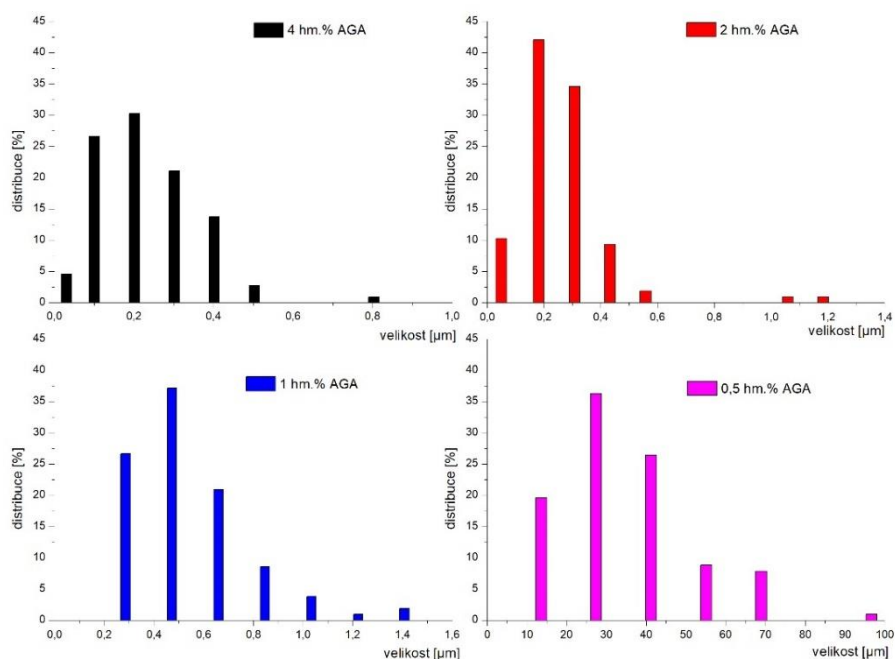
Obr. 29: Graf distribuce pórů pro pomalu mražené a lyofilizované vzorky agarózových gelů s přidávkou polyelektrolytů, manuální zpracování.

Na grafu uvedeném výše (Obr. 29) je zobrazena distribuce pórů pro lyofilizované vzorky s různými přidávkami polyelektrolytové složky. Z grafu je patrné, že velikost pórů nacházející se ve vzorcích s různými přidávkami této složky se od sebe příliš neliší, pohybují se v rozmezí stovek nanometrů, jak je tedy již výše zmíněno, obrazová analýza prokázala, že přidávek polyelektrolytu v použitém koncentračním rozmezí neovlivňuje výrazným způsobem vnitřní strukturu a s ní ani velikost pórů pro lyofilizované vzorky, které byly zmrazeny pomalu.

Distribuce (Obr. 30) získané z analýzy vzorků sušených za pomoci rychlého zmrazení a lyofilizace naznačují, že touto metodou sušení si vzorky částečně zachovávají svou původní strukturu, jak již bylo zmíněno, a mohlo by docházet k nejmenší deformaci struktury, tudíž by se tato metoda sušení mohla stát vhodnou pro charakterizaci struktury hydrogelů metodami, které vyžadují bezvodé vzorky.

Je zde patrný i jemný rozdíl v distribuci pro jednotlivé koncentrace, zatímco nejvyšší koncentrace obsahuje póry s největšími průměry v řádu stovek nm, u ostatních koncentrací dosahují průměry pórů i jednotek μm, v případě nejnižší koncentrace dokonce desítek μm. Tento fakt může být způsoben i již výše zmíněnými nedostatky v této technice sušení. Vzhledem ke skutečnosti, že bylo pořízeno omezené množství fotografií (z důvodu nedostatku času) a struktura takto vysušených vzorků je velmi komplexní a nepravidelná,

výsledky jsou pouze orientační a naznačující možnou techniku sušení s velmi malou deformací struktury, pro přesnější závěry by bylo potřeba dalších experimentů.

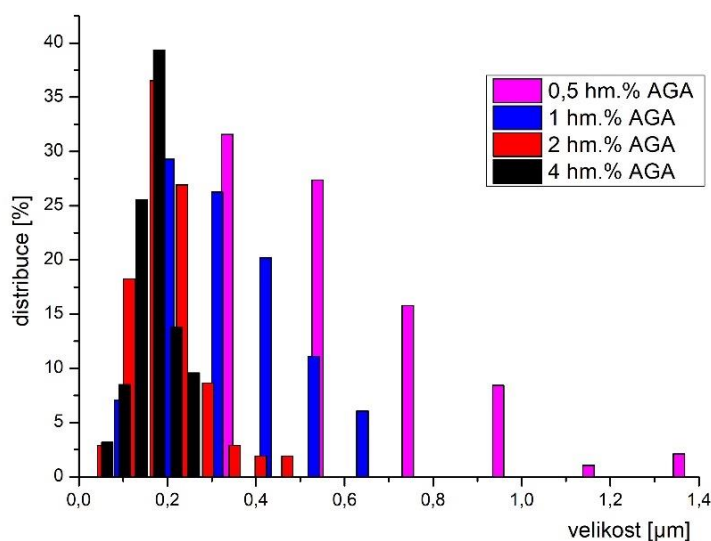


Obr. 30: Grafy distribuce pórů pro vzorky gelů o různé koncentraci agarózy, které byly nejprve šokově zmrazeny dusíkem a poté lyofilizovány, manuální zpracování.

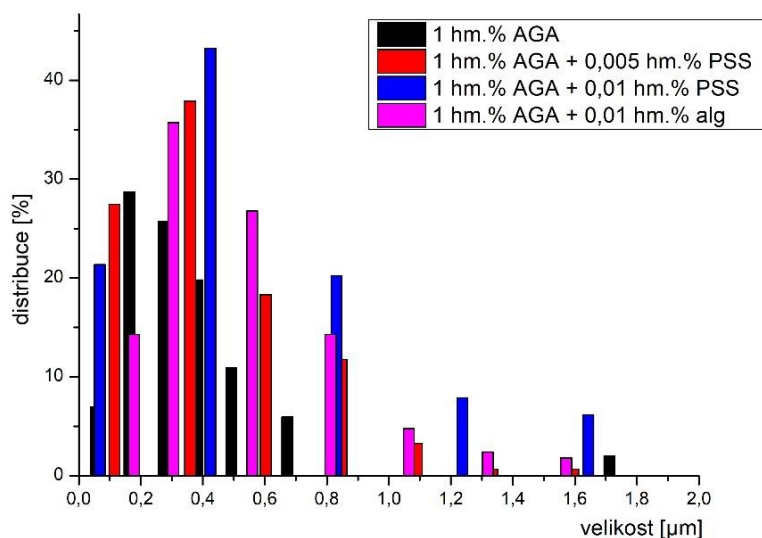
#### 4.3.2 Vzorky v hydratovaném stavu

Rozdíl ve struktuře hydrogelů o různých koncentracích agarózy byl potvrzen i obrazovou analýzou fotografií pořízených pro vzorky v původním stavu. Distribuce těchto pórů je vyobrazena na Obr. 31, jak lze vidět, velikost pórů vyskytujících se v daných vzorcích s rostoucí koncentrací snižuje svůj rozsah (od jednotek µm po desítky nm). Tento jev je způsoben přiblížením agarózových řetězců při vyšších koncentracích a vzájemné interakci těchto řetězců. Tímto lze vysvětlit například i fakt, že difúze v gelech s vyšší koncentrací probíhá daleko pomaleji, než v případě hydrogelů s nižší koncentrací.

Rozdíl mezi manuálním a automatickým zpracováním výsledků byl taktéž jako v případě SEM zanedbatelný. Velikosti pórů si byly blízké a pouze procentuální zastoupení se pro nejmenší pohybovalo okolo 70 – 80 % při automatickém zpracování, zatímco pro manuální zpracování procentuální zastoupení nepřesáhlo 50 %. Jak již bylo zmíněno, rozdíl mezi procentuálním zastoupením může být způsoben faktem, že při manuálním zpracování nejsou zahrnuty do distribuce všechny zobrazené póry.



Obr. 31: Graf distribuce pórů pro vzorky v původním stavu hydrogelu o různých koncentracích agarózy, manuální zpracování.



Obr. 32: Graf distribuce pórů pro vzorky v původním stavu 1% agarózového gelu s různými přísadkami polyelektrolytů, manuální zpracování.

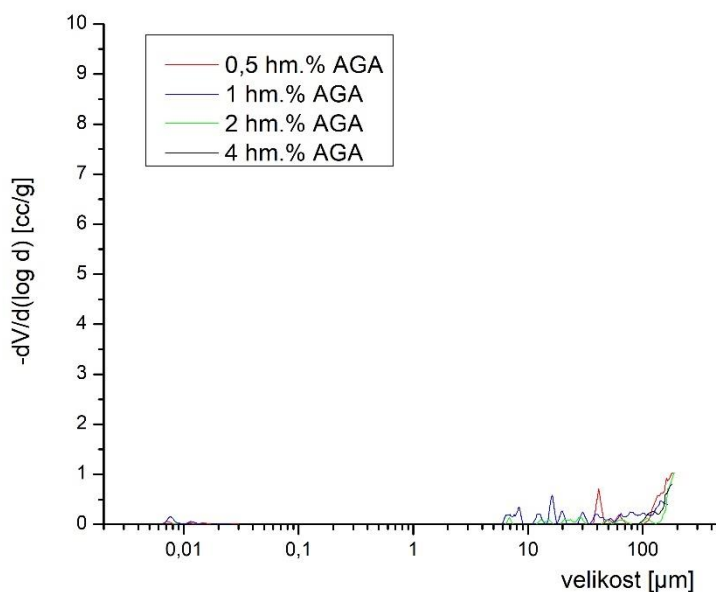
Jak již bylo zmíněno v rámci strukturní charakterizace s využitím kryoSEM byly porovnány i vzorky s přísadkou polyelektrolytu. Distribucí pórů (Obr. 32) bylo potvrzeno domněnka, že základní struktura agarózového hydrogelu se s přísadkou polyelektrolytové složky v použitém rozmezí zásadním způsobem nemění, ovšem mění se jeho chemické či fyzikálně-chemické vlastnosti, jak je již výše uvedeno.

Tato strukturní analýza vzorků v nabotnalém stavu, jak je již výše uvedeno, tedy potvrdila očekávanou vnitřní strukturu gelu (izotropní síť s velikostí pórů v řádu desítek až stovek nm, případně jednotek  $\mu\text{m}$ ). Odpovídá tedy i výsledkům dosažených v jiných studiích [65, 66], kde se velikost pórů pro stejné koncentrační rozpětí pohybuje v řádech desítek až stovek nm a s nárůstem koncentrace klesá velikost pórů.

Výsledky výše uvedené analýzy lyofilizovaných gelů s využitím SEM prokázaly patrnou deformaci vnitřní struktury gelu při pomalém zmražení s následnou lyofilizací (anizotropní a makroporézní struktura) narozdíl od techniky kryoSEM, o tomto rozdílu ve využití SEM a kryoSEM vypovídá například i studie Sriamornsaka a kol. [64]. Pro správné pochopení chování hydrogelů je tedy potřebné jejich strukturu sledovat v původním stavu.

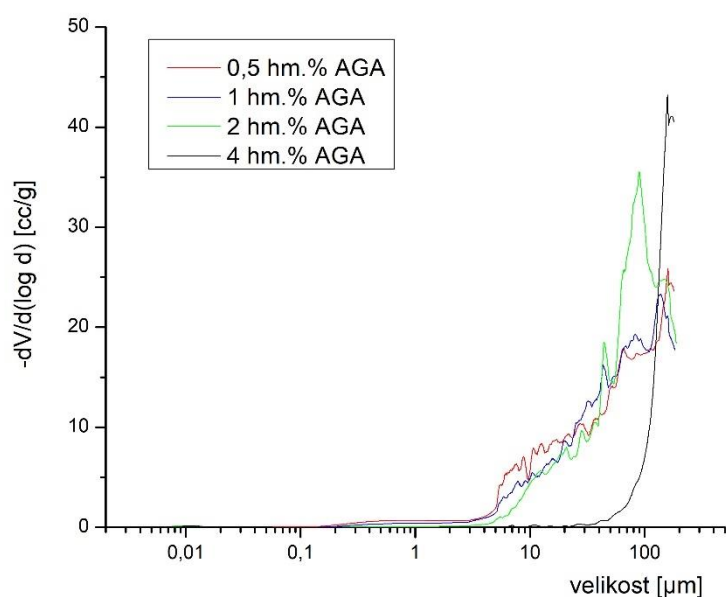
#### 4.4 Rtuťová porozimetrie

Pro vzorky vysušené (na vzduchu či lyofilizací) byla provedena rtuťová porozimetrie jako zástupce techniky nepřímé analýzy. U vzorků vysušených na vzduchu bylo očekáváno, že budou neporézní, jak je již výše uvedeno (viz. kapitola 4.1.1). Strukturní charakterizace metodou rtuťové porozimetrie (Obr. 33) potvrdila očekávanou strukturu, tedy neporézní.



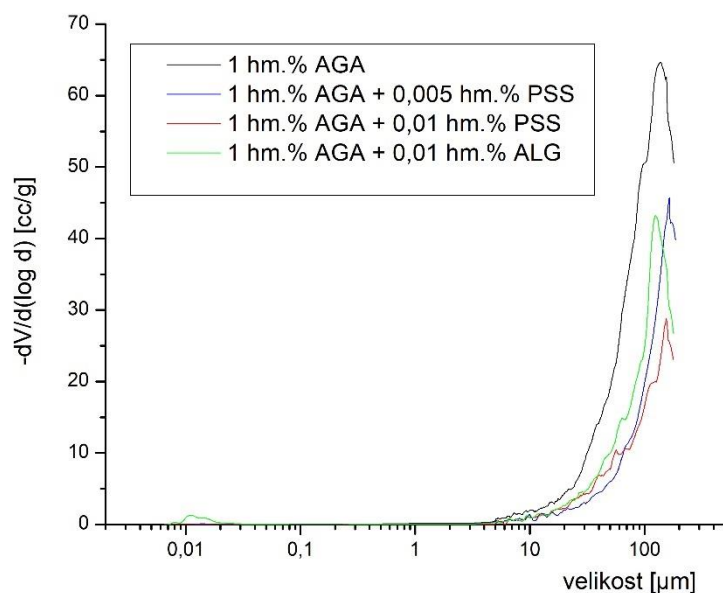
Obr. 33: Distribuční křivka průměrů pórů pro různé koncentrace agarózy v gelech sušených na vzduchu.

Distribuce pórů pro vzorky pomalu zmražené a lyofilizované (Obr. 34) neprokázala významný rozdíl ve velikosti daných pórů mezi jednotlivými koncentracemi, velikost průměrů pórů se pohybuje v rozmezí desítek až stovek  $\mu\text{m}$ , což odpovídá výsledkům dosažených přímou vizualizací (4.1.2). Velikost pórů mezi jednotlivými koncentracemi těchto vzorků se sice výrazně neliší, ovšem rozdíl byl patrný v deformaci po měření, čím nižší koncentraci vzorek měl, tím snadněji podléhal deformaci (Obr. 37).

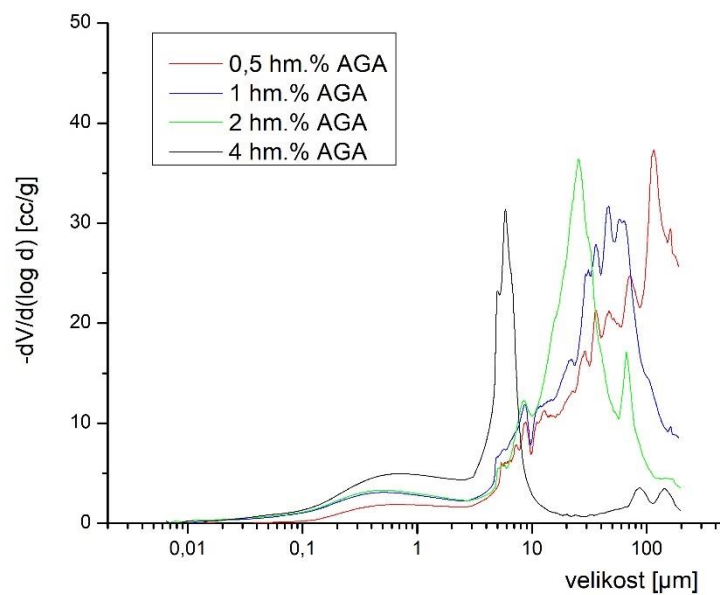


Obr. 34: Distribuční křivka průměrů pórů pro různé koncentrace agarózy v gelech sušených pomalým mražením a následnou lyofilizací.

Pro potvrzení domněnky, že vnitřní struktura gelů se s přidavkem polyelektrolytu nemění zásadním způsobem, byla rtuťové porozimetrii podrobena série pomalu zmražených a lyofilizovaných gelů s přidavkem polyelektrolytové složky. Distribuce pórů pro toto měření (Obr. 35) potvrdila uvedenou domněnku.



Obr. 35: Distribuční křivka průměrů pórů pro 1 hm. % agarózový hydrogel s různými přidavky polyelektrolytů sušených pomalým mražením a následnou lyofilizací.



Obr. 36: Distribuční křivka průměrů pórů pro různé koncentrace agarózy v gelech sušených rychlým zmražením a následnou lyofilizací.

Distribuce pro vzorky zmražené rychle a následně lyofilizované (Obr. 36) potvrzuje domněnku, že tento způsob sušení je ze všech tří nejvhodnější, velikosti pórů se pohybují v rozmezí stovek nm až stovek μm, což odpovídá nerovnoměrné struktuře pozorované pomocí SEM (viz. kapitola 4.1.3). Je zde vidět i očekávaný rozdíl v distribuci pórů mezi jednotlivými koncentracemi, čím je vzorek koncentrovanější, tím jsou jeho velikosti průměru pórů posunuty k menším hodnotám. Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky obrazové analýzy daných vzorků, ovšem tato technika jako technika nepřímá neposkytuje dostatečnou informaci o struktuře vzorků. Klíčovou informací při strukturní analýze těchto vzorků je fakt, že ve struktuře se nachází části jak s izotropní, tak anizotropní sítí, tuto informaci nám poskytuje pouze přímá metoda (SEM).

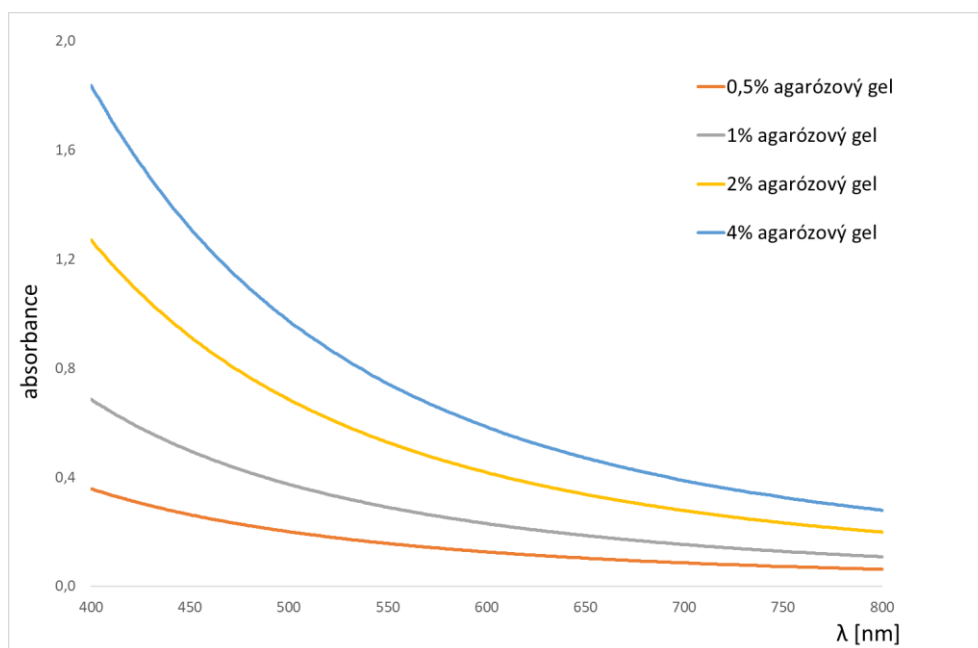


Obr. 37: Vzorky lyofilizovaných hydrogelů o různých koncentracích (zleva: 0,5 hm.%, 1 hm.%, 2 hm.% a 4 hm.%) po analýze.

Metoda rtuťové porozimetrie je spolehlivá metoda pro určení distribuce pórů pevných látek, vzhledem k faktu, že lyofilizované hydrogely jsou v nižších koncentracích dost jemné a snadno podléhají deformaci při vyšších tlacích, může se stát, že menší póry v daných vzorcích nebudou změřeny. Jak již bylo zmíněno, sušením také dochází k patrné deformaci vnitřní struktury, je tedy žádoucí ke strukturní charakterizaci využít metody zaměřující se na analýzu vzorků v původním nabotnalém hydrogelu.

#### 4.5 Turbidimetrie

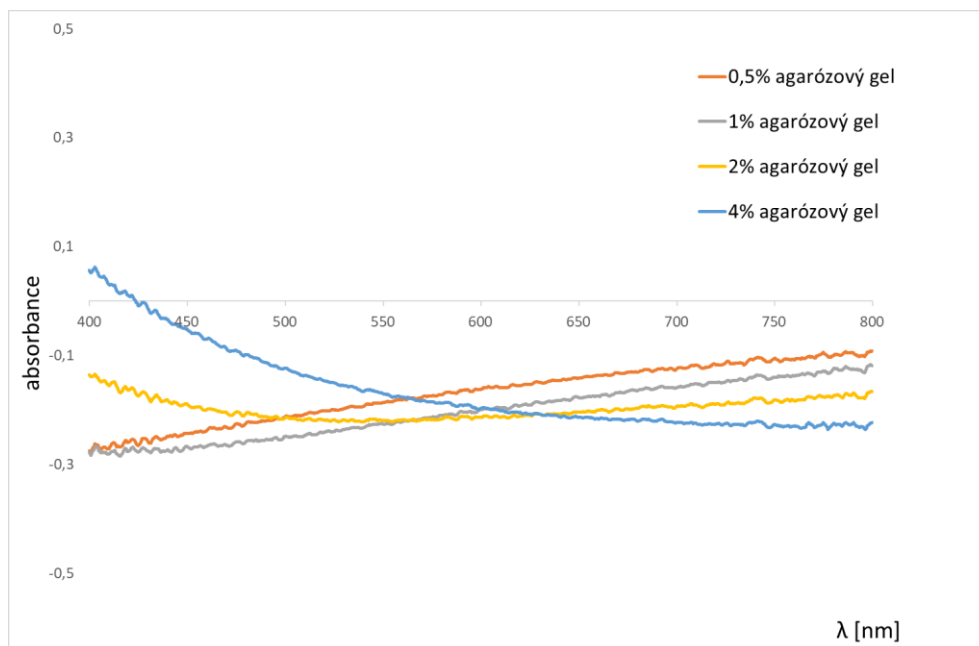
V rámci turbidimetrických měření bylo pro připravené vzorky v původním stavu hydrogelu změřeno absorpční spektrum v rozsahu 800 – 400 nm, jako příklad těchto spekter je níže zobrazeno spektrum pro hydrogely o různé koncentraci agarózy (Obr. 38).



Obr. 38: Absorpční spektrum pro hydrogely v hydratovaném stavu o různé koncentraci agarózy v rozmezí 800 – 400nm.

Bylo předpokládáno, že absorbované záření je rozptýlené, měření s integrační koulí mělo potvrdit tento předpoklad, toto měření by odhalilo záření, které bylo absorbováno, nikoliv rozptýleno. Na absorpčním spektru pro hydrogely o různé koncentraci agarózy měřené s integrační koulí (Obr. 39) není v rozmezí 800 – 400 viditelný pík, což potvrzuje předpoklad, že docházelo pouze k rozptylu světla. Záporné hodnoty absorbance mohou být způsobeny experimentálním artefaktem spojeným s měřením integrační koulí, pro tuto práci ovšem tento fakt není relevantní, bylo důležité, že se v daném rozmezí nenachází žádný pík.

Z naměřených hodnot absorbance v rozmezí 800 – 700 [56] byla podle již uvedeného vzorce (viz. kapitola 3.4.2.2) vypočtena turbidita, následně byl její logaritmus vynesena v závislosti na dekadickém logaritmu vlnové délky. Vlnový exponent byl určen ze směrnice této závislosti. Dále byla z již uvedené závislosti vlnového exponentu na korelační délce (viz. kapitola 3.4.2.2) vypočtena korelační délka, která je přímo úměrná velikosti pórů. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 2.



Obr. 39: Absorpční spektrum pro hydrogely v hydratovaném stavu o různé koncentraci agarózy v rozmezí 800 – 400 nm, měřené s integrační koulí.

Tab. 2: Hodnoty vlnového exponentu a velikosti pórů pro agarózové gely s různou koncentrací a různými přísadkami polyelektrolytů (turbidimetrická měření hydratovaných vzorků).

Vzorek	Vlnový exponent	Velikost pórů [ $\mu\text{m}$ ]
0,5 hm.% aga	-2,3883	0,867
1 hm.% aga	-2,5826	0,378
2 hm.% aga	-2,5022	0,519
4 hm.% aga	-2,4456	0,662
1 hm.% aga + 0,002 hm.% PSS	-2,4394	0,681
1 hm.% aga + 0,005 hm.% PSS	-1,8275	-
1 hm.% aga + 0,01 hm.% PSS	-2,3496	1,056
1 hm.% aga + 0,1 hm.% PSS	-2,1394	5,774
0,5 hm.% aga + 0,01 hm.% PSS	-2,1751	3,637
1 hm.% aga + 0,002 hm.% alg	-2,5265	0,470
1 hm.% aga + 0,005 hm.% alg	-2,4225	0,736
1 hm.% aga + 0,01 hm.% alg	-1,9271	-
1 hm.% aga + 0,1 hm.% alg	-2,4362	0,691

Velikosti pórů vypočteny pro turbidimetrická měření řádově odpovídají výsledkům zjištěným kvantitativním zhodnocením přímé vizualizace (viz. kapitola 4.3.2), ovšem při porovnání jednotlivých vzorků se liší. Pro zvyšující se koncentraci velikosti pórů nemají klesající charakter a pro vzorky s přídavkem elektrolytu se velikost pórů pro jednotlivé vzorky od sebe výrazně liší, i přes to, že při přímé vizualizaci nebyl pozorován žádný zásadní rozdíl. Hodnoty vlnového exponentu pro dva vzorky byly dokonce mimo rozsah závislosti, z které byly velikosti pórů vypočteny, nebylo pro ně tedy možné určit velikost pórů. Tato technika strukturní analýzy je s velkou pravděpodobností nedostatečně citlivá pro určení rozdílů ve struktuře mezi jednotlivými vzorky, které byly použity v rámci této práce. Je tedy vhodná pouze pro přibližné a orientační určení velikosti pórů, pro určení rozdílu je nutné použít techniky přímé.

## 5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo diskutovat výhody a nevýhody vybraných dostupných technik strukturní analýzy zvoleného modelového hydrogelového systému a také vliv jeho kompozice na jeho mikrostrukturní parametry. Jako hydrogelový systém byly zvoleny hydrogely na bázi agarózy o různé koncentraci a také hydrogely na bázi agarózy s přidavkem polyelektrolytů o různých koncentracích. Techniky strukturní analýzy byly zvoleny přímé (SEM, kryoSEM) i nepřímé (rtuťová porozimetrie, turbidimetrie) a vzorky byly charakterizovány jak ve formě původního nabotnalého hydrogelu (kryoSEM, turbidimetrie), tak ve formě vysušené, tzv. xerogelu (SEM, rtuťová porozimetrie).

V rámci otestování dostupných technik strukturní analýzy bylo zjištěno, že pomalým mražením s lyofilizací dochází k deformaci vnitřní struktury (makroporézní anizotropní struktura), je tedy žádoucí hydrogely studovat v jejich původním hydratovaném stavu (mikroporézní izotropní struktura), vhodnými metodami k analýze struktury těchto gelů jsou tedy ty, které umožní takovýto vzorekanalyzovat. V této práci byly z těchto metod vyzkoušeny techniky kryoSEM a turbidimetrie, obě tyto techniky potvrdily velikosti průměru pórů v řádech desítek až stovek nm, případně jednotek  $\mu\text{m}$ . Turbidimetrie ale nebyla dostatečně citlivá pro určení rozdílů ve struktuře mezi jednotlivými vzorky, ty byly spolehlivě určeny technikou kryoSEM.

Ovšem dostupnost techniky kryoSEM omezuje její použitelnost pro rutinní aplikace. Naproti tomu technika SEM je dostupnější, její nevýhodou je potřeba sušení vzorků před samotnou analýzou. Jak již bylo zmíněno, v rámci této práce bylo prokázáno, že lyofilizací s pomalým mražením dochází k patrné deformaci a toto sušení tedy není vhodné. Při sušení šokovým zmražením a lyofilizací si ovšem vzorky částečně ponechaly svou strukturu, s přihlédnutím k faktu, že tento způsob sušení provázely jisté nedostatky v technice provedení (např. příliš objemný vzorek), by optimalizace tohoto postupu sušení mohla vést k technice analýzy odpovídající kryoSEM technice. Nepřímá technika měření pro vysušené vzorky (rtuťová porozimetrie) řádově odpovídala přímé vizualizaci (SEM) a narozdíl od techniky turbidimetrie pro hydratované vzorky byla dostatečně citlivá i pro určení rozdílu pro jednotlivé koncentrace agarózových hydrogelů šokově zmražených a lyofilizovaných, ovšem postrádala klíčovou informaci o tom, že struktura takto vysušených gelů je nerovnoměrná (místy anizotropní, místy izotropní), což bylo s největší pravděpodobností způsobeno nedostatky v tomto způsobu sušení. Technika SEM je tedy v případě strukturní charakterizace takto připravených vzorků nenahraditelná.

V rámci porovnání vlivu kompozice hydrogelového systému na jeho vnitřní strukturu bylo zjištěno, že přidavkem polyelektrolytové složky v použitém koncentračním rozmezí nedochází k zásadním změnám strukturních parametrů, tudíž tyto složky nemají vliv na vnitřní strukturu gelu, ovšem zásadně ovlivňují chemickou strukturu, a s tím spojenou i chemickou interaktivitu. Při použití rozdílných koncentrací agarózy už byl rozdíl ve struktuře patrný na první pohled, póry se se zvyšující se koncentrací agarózy zmenšovaly. Množství agarózy, jako gelotvorné složky, tedy zásadním způsobem ovlivňuje fyzikální mikrostrukturu gelů.

Získané informace o rozdílu v přímých a nepřímých technikách poukazují na fakt, že přímé zobrazovací techniky jsou pro strukturní analýzy nezastupitelné. V navazujících experimentech by bylo zajímavé zaměřit se na optimalizaci způsobu sušení založeného na

šokovém zmražení pro vytvoření dostupnější techniky strukturní analýzy s využitím SEM. Nebo na aplikování zjištěných informací o vlivu změny složení na strukturní parametry na jiné hydrogelové systémy s cílem vytvořit hydrogel o požadovaných vlastnostech.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] AHMED, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. *Journal of Advanced Research* [online]. 2015, 6(2), 105-121 [cit. 2018-02-20]. DOI: 10.1016/j.jare.2013.07.006. ISSN 20901232.
- [2] LI, Yuhui, Guoyou HUANG, Xiaohui ZHANG, Baoqiang LI, Yongmei CHEN, Tingli LU, Tian Jian LU a Feng XU. Magnetic Hydrogels and Their Potential Biomedical Applications. *Advanced Functional Materials*[online]. 2013, 23(6), 660-672 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1002/adfm.201201708.
- [3] LIN, Chien-Chi a Andrew T. METTERS. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2006, 58(12-13), 1379-1408 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1016/j.addr.2006.09.004.
- [4] COLOMBO, Paolo. Swelling-controlled release in hydrogel matrices for oral route. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 1993, 11(1-2), 37-57 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1016/0169-409X(93)90026-Z.
- [5] WICHTERLE, O. a D. LÍM. Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature*[online]. 1960, 185(4706), 117-118 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1038/185117a0.
- [6] HAMIDI, Mehrdad, Amir AZADI a Pedram RAFIEI. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*[online]. 2008, 60(15), 1638-1649 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1016/j.addr.2008.08.002.
- [7] STAMATIALIS, Dimitrios F., Bernke J. PAPENBURG, Miriam GIRONÉS, Saiful SAIFUL, Srivatsa N.M. BETTAHALI, Stephanie SCHMITMEIER a Matthias WESSLING. Medical applications of membranes: Drug delivery, artificial organs and tissue engineering. *Journal of Membrane Science* [online]. 2008, 308(1-2), 1-34 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1016/j.memsci.2007.09.059.
- [8] ROY, Debashish, Jennifer N. CAMBRE a Brent S. SUMERLIN. Future perspectives and recent advances in stimuli-responsive materials. *Progress in Polymer Science* [online]. 2010, 35(1-2), 278-301 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2009.10.008.
- [9] H. GULREZ, Syed K., Saphwan AL-ASSAF a Glyn O. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. CARPI, Angelo, ed. *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications* [online]. InTech, 2011, 2011-08-01 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.5772/24553.
- [10] FUNAMI, Takahiro, Sakie NODA, Makoto NAKAUMA, et al. Molecular Structures of Gellan Gum Imaged with Atomic Force Microscopy in Relation to the Rheological Behavior in Aqueous Systems in the Presence or Absence of Various Cations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2008, 56(18), 8609-8618 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1021/jf8007713.
- [11] MAOLIN, Zhai, Li JUN, Yi MIN a Ha HONGFEI. The swelling behavior of radiation prepared semi-interpenetrating polymer networks composed of polyNIPAAm and hydrophilic polymers. *Radiation Physics and Chemistry* [online]. 2000, 58(4), 397-400 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1016/S0969-806X(99)00491-0.
- [12] COVIELLO, Tommasina, Pietro MATRICARDI, Carlotta MARIANECCI a Franco ALHAIQUE. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *Journal of*

- Controlled Release* [online]. 2007, 119(1), 5-24 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2007.01.004.
- [13] MATRICARDI, Pietro, Chiara DI MEO, Tommasina COVIELLO, Wim E. HENNINK a Franco ALHAIQUE. Interpenetrating Polymer Networks polysaccharide hydrogels for drug delivery and tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2013, 65(9), 1172-1187 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1016/j.addr.2013.04.002. ISSN
- [14] MILLAR, J. R. 263. Interpenetrating polymer networks. Styrene–divinylbenzene copolymers with two and three interpenetrating networks, and their sulphonates. *J. Chem. Soc* [online]. 1960, , 1311-1317 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1039/JR9600001311.
- [15] JENKINS, A. D., P. KRATOCHVÍL, R. F. T. STEPTO a U. W. SUTER. Glossary of basic terms in polymer science (IUPAC Recommendations 1996). *Pure and Applied Chemistry* [online]. 1996, 68(12), 2287-2311 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1351/pac199668122287.
- [16] CHIKH, Linda, Virginie DELHORBE a Odile FICHET. (Semi-)Interpenetrating polymer networks as fuel cell membranes. *Journal of Membrane Science* [online]. 2011, 368(1-2), 1-17 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1016/j.memsci.2010.11.020.
- [17] KHARE, Atul R. a Nikolaos A. PEPPAS. Release behavior of bioactive agents from pH-sensitive hydrogels. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 1993, 4(3), 275-289 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1163/156856293X00564.
- [18] BRAHIM, Sean, Dyer NARINESINGH a Anthony GUISEPPI-ELIE. Release Characteristics of Novel pH-Sensitive p(HEMA-DMAEMA) Hydrogels Containing 3-(Trimethoxy-silyl) Propyl Methacrylate. *Biomacromolecules* [online]. 2003, 4(5), 1224-1231 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1021/bm034048r.
- [19] RUEL-GARIÉPY, Eve a Jean-Christophe LEROUX. In situ-forming hydrogels—review of temperature-sensitive systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2004, 58(2), 409-426 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1016/j.ejpb.2004.03.019. ISSN 09396411.
- [20] ACHAR, L. a N.A. PEPPAS. Preparation, characterization and mucoadhesive interactions of poly (methacrylic acid) copolymers with rat mucosa. *Journal of Controlled Release* [online]. 1994, 31(3), 271-276 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1016/0168-3659(94)90009-4. ISSN 01683659.
- [21] WEST, Jennifer L a Jeffrey A HUBBELL. Photopolymerized hydrogel materials for drug delivery applications. *Reactive Polymers* [online]. 1995, 25(2-3), 139-147 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1016/0923-1137(94)00096-N.
- [22] METTERS, Andrew T., Kristi S. ANSETH a Christopher N. BOWMAN. A Statistical Kinetic Model for the Bulk Degradation of PLA- b -PEG- b -PLA Hydrogel Networks: Incorporating Network Non-Idealities. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2001, 105(34), 8069-8076 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1021/jp004083h.
- [23] VLUGT-WENSINK, Karin D.F., Thijs J.H. VLUGT, Wim JISKOOT, Daan J.A. CROMMELIN, Ruud VERRIJK a Wim E. HENNINK. Modeling the release of proteins from degrading crosslinked dextran microspheres using kinetic Monte Carlo simulations. *Journal of Controlled Release* [online]. 2006, 111(1-2), 117-127 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.11.021.

- [24] HU, Bi-Huang a Phillip B. MESSERSMITH. Rational Design of Transglutaminase Substrate Peptides for Rapid Enzymatic Formation of Hydrogels. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2003, 125(47), 14298-14299 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1021/ja038593b.
- [25] DRAGAN, Ecaterina Stela. Design and applications of interpenetrating polymer network hydrogels. A review. *Chemical Engineering Journal*[online]. 2014, 243, 572-590 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1016/j.cej.2014.01.065.
- [26] LOZINSKY, Vladimir I., Igor Yu. GALAEV, Fatima M. PLIEVA, Irina N. SAVINA, Hans JUNGVID a Bo MATTIASSON. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. *Trends in Biotechnology* [online]. 2003, 21(10), 445-451 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1016/j.tibtech.2003.08.002.
- [27] CLARK, Allan H. a Simon B. ROSS-MURPHY. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Biopolymers* [online]. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 1987, s. 57-192 [cit. 2018-04-20]. Advances in Polymer Science. DOI: 10.1007/BFb0023332.
- [28] ITAGAKI, Hideyuki, Hiroyasu FUKIISHI, Tomoe IMAI a Mineo WATASE. Molecular structure of agarose chains in thermoreversible hydrogels revealed by means of a fluorescent probe technique. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* [online]. 2005, 43(6), 680-688 [cit. 2018-01-20]. DOI: 10.1002/polb.20374. ISSN 0887-6266.
- [29] RENN, Donald W. Agar and agarose: indispensable partners in biotechnology. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development* [online]. 1984, 23(1), 17-21 [cit. 2018-01-20]. DOI: 10.1021/i300013a004. ISSN 0196-4321.
- [30] XIONG, Jun-Ying, Janaky NARAYANAN, Xiang-Yang LIU, Tan Kok CHONG, Shing Bor CHEN a Tai-Shung CHUNG. Topology Evolution and Gelation Mechanism of Agarose Gel. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2005, 109(12), 5638-5643 [cit. 2018-01-20]. DOI: 10.1021/jp044473u. ISSN 1520-6106.
- [31] RAMZI, Mohamed, Cyrille ROCHAS a Jean-Michel GUENET. Structure–Properties Relation for Agarose Thermoreversible Gels in Binary Solvents. *Macromolecules* [online]. 1998, 31(18), 6106-6111 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1021/ma9801220.
- [32] OYEN, M. L. Mechanical characterisation of hydrogel materials. *International Materials Reviews* [online]. 2013, 59(1), 44-59 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1179/1743280413Y.0000000022.
- [33] JOHNSON, Erin M. a William M. DEEN. Hydraulic permeability of agarose gels. *AIChE Journal* [online]. 1996, 42(5), 1220-1224 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1002/aic.690420504.
- [34] STEPHEN, Alistair M., Glyn O. PHILLIPS a Peter A. WILLIAMS. *Food polysaccharides and their applications*. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC/Taylor & Francis, 2006. Food science and technology (Taylor & Francis). ISBN 978-082-4759-223.
- [35] FATIN-ROUGE, Nicolas, Konstantin STARCHEV a Jacques BUFFLE. Size Effects on Diffusion Processes within Agarose Gels. *Biophysical Journal* [online]. 2004, 86(5), 2710-2719 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1016/S0006-3495(04)74325-8.

- [36] LEE, Kuen Yong; MOONEY, David J. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*, 2012, 37.1: 106-126.
- [37] SCHNEIDER, Petr. *Textura porézních látek* [online]. Praha, 2007 [cit. 2018-01-20]. Dostupné z: <http://uchp.icpf.cas.cz/transtex/textbooks/Skripta-textura%202007.pdf>. Skripta. Ústav chemických procesů AV ČR.
- [38] DUDÁK, Michal a Marek VÁCLAVÍK. *Rtuťová porozimetrie* [online]. [cit. 2018-01-20]. Dostupné z: <https://fchi.vscht.cz/files/uzel/0010367/RP.pdf?redirected>
- [39] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-7080-579-x.
- [40] BRUNAUER, Stephen, P. H. EMMETT a Edward TELLER. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 1938, 60(2), 309-319 [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1021/ja01269a023.
- [41] OBERTS, B.F. A procedure for estimating pore volume and area distributions from sorption isotherms. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 1967, 23(2), 266-273 [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1016/0021-9797(67)90111-7.
- [42] SATO, SHIMIO. General method of evaluating pore size distribution of solids using nitrogen adsorption isotherm. *Journal of Chemical Engineering of Japan* [online]. 1988, 21(5), 534-535 [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1252/jcej.21.534.
- [43] LASTOSKIE, Christian, Keith E. GUBBINS a Nicholas QUIRKE. Pore size distribution analysis of microporous carbons: a density functional theory approach. *The Journal of Physical Chemistry* [online]. 1993, 97(18), 4786-4796 [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1021/j100120a035. ISSN 0022-3654.
- [44] OLIVIER, James P. Modeling physical adsorption on porous and nonporous solids using density functional theory. *Journal of Porous Materials* [online]. 1995, 2(1), 9-17 [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1007/BF00486565.
- [45] REICHEL, Rudolf. Scanning Electron Microscopy. HAWKES, Peter W. a John C. H. SPENCE, ed. *Science of Microscopy* [online]. New York, NY: Springer New York, 2007, s. 133-272 [cit. 2018-01-20]. DOI: 10.1007/978-0-387-49762-4\_3. ISBN 978-0-387-25296-4.
- [46] EL FRAY, Mirosława, Agnieszka PILASZKIEWICZ, Wojciech SWIESZKOWSKI a Krzysztof J. KURZYDŁOWSKI. Morphology assessment of chemically modified cryostructured poly(vinyl alcohol) hydrogel. *European Polymer Journal* [online]. 2007, 43(5), 2035-2040 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2007.02.024.
- [47] POURJAVADI, A. a M. KURDTABAR. Collagen-based highly porous hydrogel without any porogen: Synthesis and characteristics. *European Polymer Journal* [online]. 2007, 43(3), 877-889 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2006.12.020.
- [48] SRIAMORNSAK, Pornsak, Nartaya THIRAWONG, Kamonrak CHEEWATANAKORNKOOL, Kanokporn BURAPAPADH a Witoon SAE-NGOW. Cryo-scanning electron microscopy (cryo-SEM) as a tool for studying the ultrastructure during bead formation by ionotropic gelation of calcium pectinate. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2008, 352(1-2), 115-122 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2007.10.038. ISSN 03785173.

- [49] *Low-Temperature Microscopy and Analysis*. Boston, MA: Springer US, 1992. ISBN 9781489923028.
- [50] SCHINDELIN, Johannes, Curtis T. RUEDEN, Mark C. HINER a Kevin W. ELICEIRI. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Molecular Reproduction and Development* [online]. 2015, 82(7-8), 518-529 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1002/mrd.22489. ISSN 1040452X.
- [51] ELICEIRI, Kevin W, Michael R BERTHOLD, Ilya G GOLDBERG, et al. Biological imaging software tools. *Nature Methods* [online]. 2012, 9(7), 697-710 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1038/nmeth.2084. ISSN 1548-7091.
- [52] PHAM, Dzung L., Chenyang XU a Jerry L. PRINCE. Current Methods in Medical Image Segmentation. *Annual Review of Biomedical Engineering* [online]. 2000, 2(1), 315-337 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.2.1.315.
- [53] INOUE, S. Video image processing greatly enhances contrast, quality, and speed in polarization-based microscopy. *J. Cell Biol.* 1981. 89: 346–356.
- [54] EDITED BY GREENFIELD SLUDER AND DAVID E. WOLF. *Digital microscopy*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2007. ISBN 9780080544342.
- [55] BURGER, Wilhelm. a Mark. BURGE. *Principles of digital image processing: core algorithms*. London: Springer, c2009. Undergraduate topics in computer science. ISBN 978-1848001909.
- [56] AYMARD, P., M. A. K. WILLIAMS, A. H. CLARK a I. T. NORTON. A Turbidimetric Study of Phase Separating Biopolymer Mixtures during Thermal Ramping. *Langmuir* [online]. 2000, 16(19), 7383-7391 [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1021/la000549b.
- [57] TORRES, R., J. USALL, N. TEIXIDO, M. ABADIAS a I. VINAS. Liquid formulation of the biocontrol agent *Candida sake* by modifying water activity or adding protectants. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2003, 94(2), 330-339 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.01843.x.
- [58] AL-ASSAF, Saphwan, Glyn O. PHILLIPS a Peter A. WILLIAMS. Controlling the molecular structure of food hydrocolloids. *Food Hydrocolloids* [online]. 2006, 20(2-3), 369-377 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2005.03.017.
- [59] AL-ASSAF, S., S. NAVARATNAM, B.J. PARSONS a G.O. PHILLIPS. Chain scission of hyaluronan by carbonate and dichloride radical anions: Potential reactive oxidative species in inflammation?. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2006, 40(11), 2018-2027 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.01.033.
- [60] AYMARD, Pierre, David R. MARTIN, Kevin PLUCKNETT, Tim J. FOSTER, Allan H. CLARK a Ian T. NORTON. Influence of thermal history on the structural and mechanical properties of agarose gels. *Biopolymers* [online]. 2001, 59(3), 131-144 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1002/1097-0282(200109)59:3<131::AID-BIP1013>3.0.CO;2-8.
- [61] MANSUR, Herman S., Rodrigo L. ORÉFICE a Alexandra A.P. MANSUR. Characterization of poly(vinyl alcohol)/poly(ethylene glycol) hydrogels and PVA-derived hybrids by small-angle X-ray scattering and FTIR spectroscopy. *Polymer* [online]. 2004, 45(21), 7193-7202 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1016/j.polymer.2004.08.036.

- [62] Phillips, G. O., Plessis, T. A. D., SaphwanAl-Assaf & Williams, P. A. Biopolymers obtained by solid state irradiation in an unsaturated gaseous atmosphere, *Vol. 6,610,810*, (ed. U. S. Patent), Phillips Hydrocolloid Research limited, UK. 2003.
- [63] SERP, D., M. MUELLER, U. VON STOCKAR a I. W. MARISON. Low-temperature electron microscopy for the study of polysaccharide ultrastructures in hydrogels. II. Effect of temperature on the structure of Ca<sup>2+</sup>-alginate beads. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 2002, 79(3), 253-259 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1002/bit.10287. ISSN 0006-3592.
- [64] SRIAMORNSAK, Pornsak. Effect of calcium concentration, hardening agent and drying condition on release characteristics of oral proteins from calcium pectinate gel beads. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 1999, 8(3), 221-227 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1016/S0928-0987(99)00010-X.
- [65] MAALOU, Mounir, Nadine PERNODET a Bernard TINLAND. Agarose gel structure using atomic force microscopy: Gel concentration and ionic strength effects. *Electrophoresis* [online]. 1998, 19(10), 1606-1610 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1002/elps.1150191015.
- [66] RAHBANI, Janane, Ali R. BEHZAD, Niveen M. KHASHAB a Mazen AL-GHOUL. Characterization of internal structure of hydrated agar and gelatin matrices by cryo-SEM. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2013, 34(3), 405-408 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1002/elps.201200434.
- [67] NARAYANAN, Jaaky, Jun-Ying XIONG a Xiang-Yang LIU. Determination of agarose gel pore size: Absorbance measurements vis a vis other techniques. *Journal of Physics: Conference Series* [online]. 2006, 28, 83-86 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1088/1742-6596/28/1/017.
- [68] NEDELEC, Jean-Marie, Jean-Pierre E. GROLIER a Mohamed BABA. Thermoporosimetry: A powerful tool to study the cross-linking in gels networks. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* [online]. 2006, 40(2-3), 191-200 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1007/s10971-006-9115-y.
- [69] KIM, Seon Jeong, Seoung Gil YOON a Sun I. KIM. Synthesis and characteristics of interpenetrating polymer network hydrogels composed of alginate and poly(diallyldimethylammonium chloride). *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2004, 91(6), 3705-3709 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1002/app.13615.
- [70] ZADRAŽIL, Aleš a František ŠTĚPÁNEK. Investigation of thermo-responsive optical properties of a composite hydrogel. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2010, 372(1-3), 115-119 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2010.09.039.
- [71] SHI, Jun, Natália M. ALVES a João F. MANO. Drug Release of pH/Temperature-Responsive Calcium Alginate/Poly(N-isopropylacrylamide) Semi-IPN Beads. *Macromolecular Bioscience* [online]. 2006, 6(5), 358-363 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1002/mabi.200600013.
- [72] HERNÁNDEZ, Rebeca a Carmen MIJANGOS. In situ Synthesis of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles in Thermally Responsive Alginate-Poly( N - isopropylacrylamide) Semi-Interpenetrating Polymer Networks. *Macromolecular Rapid Communications* [online]. 2009, 30(3), 176-181 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1002/marc.200800602.

- [73] MIGUEL, Sónia P., Maximiano P. RIBEIRO, Hugo BRANCAL, Paula COUTINHO a Ilídio J. CORREIA. Thermoresponsive chitosan–agarose hydrogel for skin regeneration. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2014, 111, 366-373 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.04.093.
- [74] YANG, Ji, Jie CHEN, Dan PAN, Ying WAN a Zheng WANG. PH-sensitive interpenetrating network hydrogels based on chitosan derivatives and alginate for oral drug delivery. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2013, 92(1), 719-725 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.09.036.
- [75] GUO, Baolin, Jinfang YUAN, Li YAO a Qingyu GAO. Preparation and release profiles of pH/temperature-responsive carboxymethyl chitosan/P(2-(dimethylamino) ethyl methacrylate) semi-IPN amphoteric hydrogel. *Colloid and Polymer Science* [online]. 2007, 285(6), 665-671 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1007/s00396-006-1611-7.
- [76] KIM, In-Yong, Mi-Kyong YOO, Bom-Chol KIM, Se-Kwon KIM, Hyun-Chul LEE a Chong-Su CHO. Preparation of semi-interpenetrating polymer networks composed of chitosan and poloxamer. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2006, 38(1), 51-58 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2005.12.020.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

PHEMA	polyhydroxyethylmethakrylát
CMC	karboxymethylcelulóza
IPN	interpenetrované polymerní sítě
semi-IPN	semi-interpenetrované polymerní sítě
BET	Brunauer-Emmett-Teller teorie
BJH	metoda Barreta, Joynera a Halendy
DFT	teorie hustotního funkciónálu
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
kryoSEM	kryo-skenovací elektronová mikroskopie
DLS	dynamický rozptyl světla (dynamic light scattering)
FTIR	infračervená spektroskopie s Furierovou transformací
RTG	rentgenové záření
SAXS	měření rozptylu RTG záření v malých úhlech (small angle x-ray scattering)
SAS	měření rozptylu v malých úhlech (small angle scattering)
DSC	diferenciální skenovací kalorimetrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
AGA	agaróza
PSS	polystyrensulfonát
ALG	alginát
$S$	specifický povrch adsorbentu [ $\text{m}^2/\text{g}$ ]
$a_m$	kapacita monovrstvy [ $\text{mol}/\text{g}$ ]
$\Sigma$	velikost povrchu jedné molekuly adsorbentu [ $\text{nm}^2$ ]
$\tau$	turbidita
$A$	absorbance
$L$	optická dráha
$\tau_c$	relaxační čas
$D$	difúzní koeficient
$q$	absolutní hodnota vlnového vektoru
$\lambda$	délka primárního světelného paprsku
$\theta$	úhel měření (DLS)
$\eta$	viskozita
$k$	Boltzmannova konstanta [ $\text{J}/\text{K}$ ]
$T$	absolutní teplota

## 8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Práce s ImageJ: názorné nastavení „Tresholdu“ (pro vzorek 1% agarózového hydrogelu v hydratovaném stavu).

Příloha 2: Práce s ImageJ: Ukázka nastavení nástroje „Analyze Particles“.

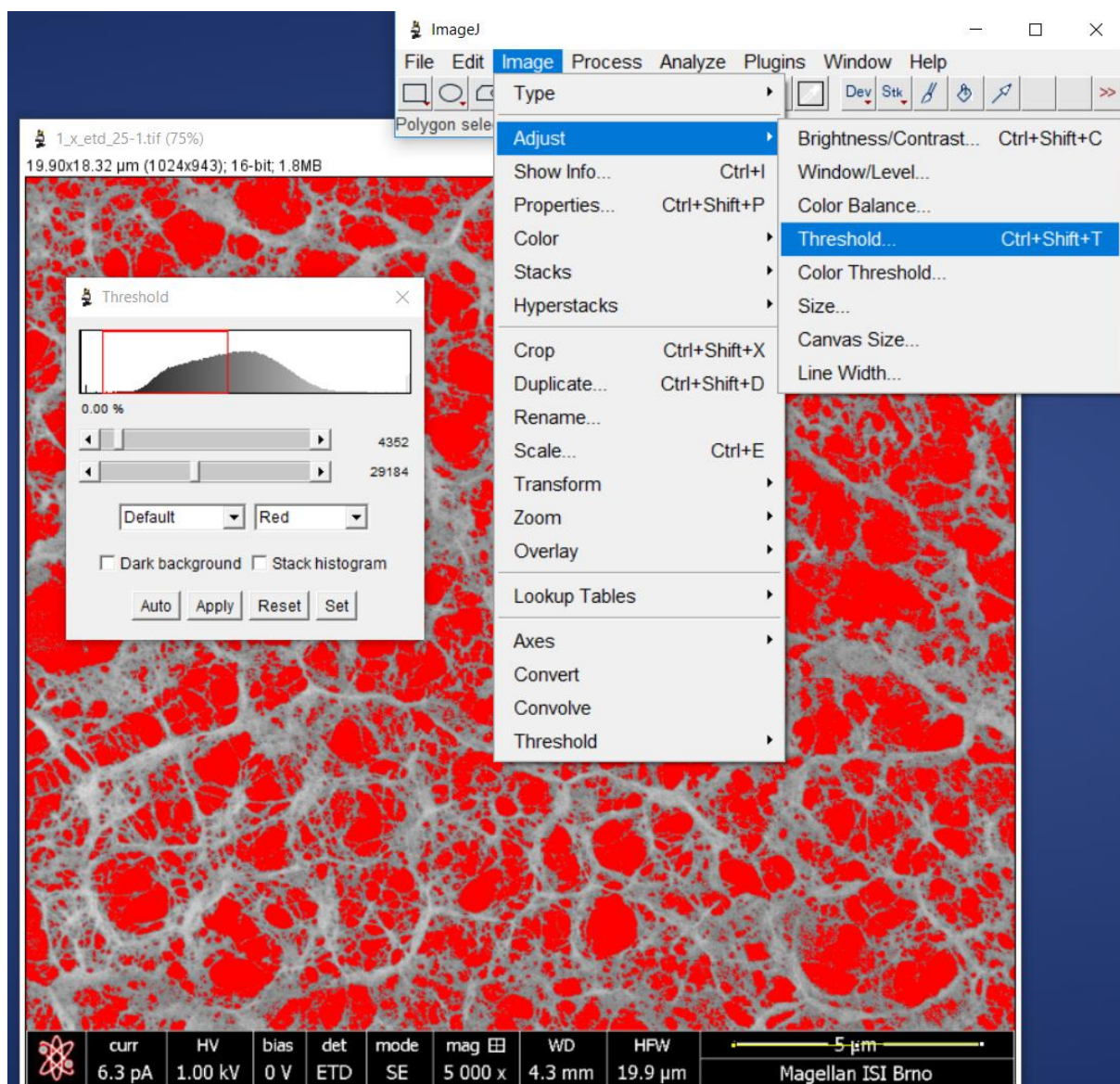
Příloha 3: Absorpční spektrum pro hydrogely v hydratovaném stavu, 1% agarózový hydrogel s přídavkem PSS v rozmezí 800 – 400 nm.

Příloha 4: Absorpční spektrum pro hydrogely v hydratovaném stavu, 1% agarózový hydrogel s přídavkem PSS v rozmezí 800 – 400 nm, měřené s integrační koulí.

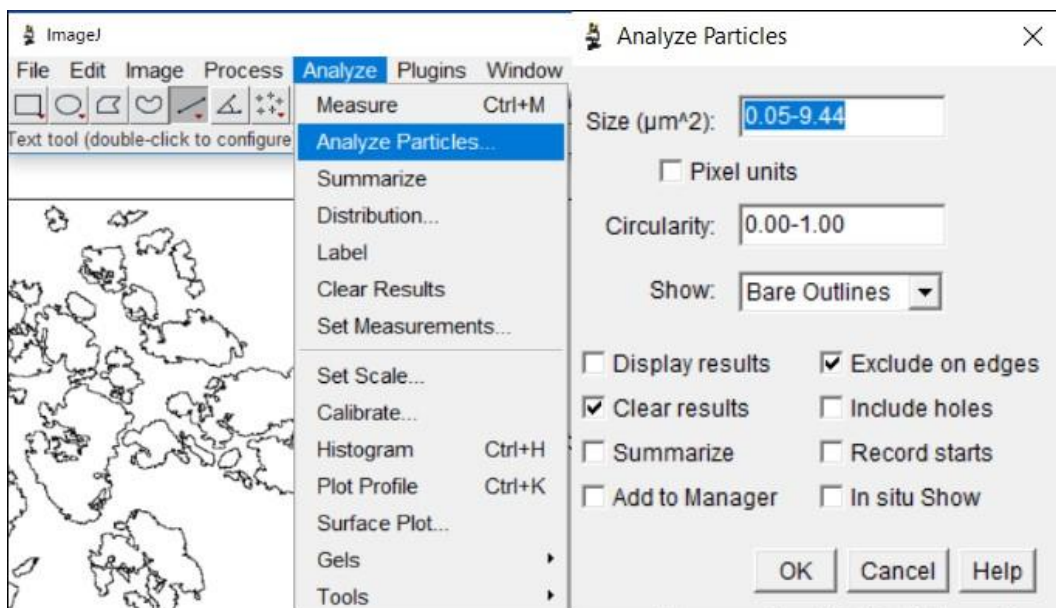
Příloha 5: Absorpční spektrum pro hydrogely v hydratovaném stavu, 1% agarózový hydrogel s přídavkem alginátu v rozmezí 800 – 400 nm.

Příloha 6: Absorpční spektrum pro hydrogely v hydratovaném stavu, 1% agarózový hydrogel s přídavkem alginátu v rozmezí 800 – 400 nm, měřené s integrační koulí.

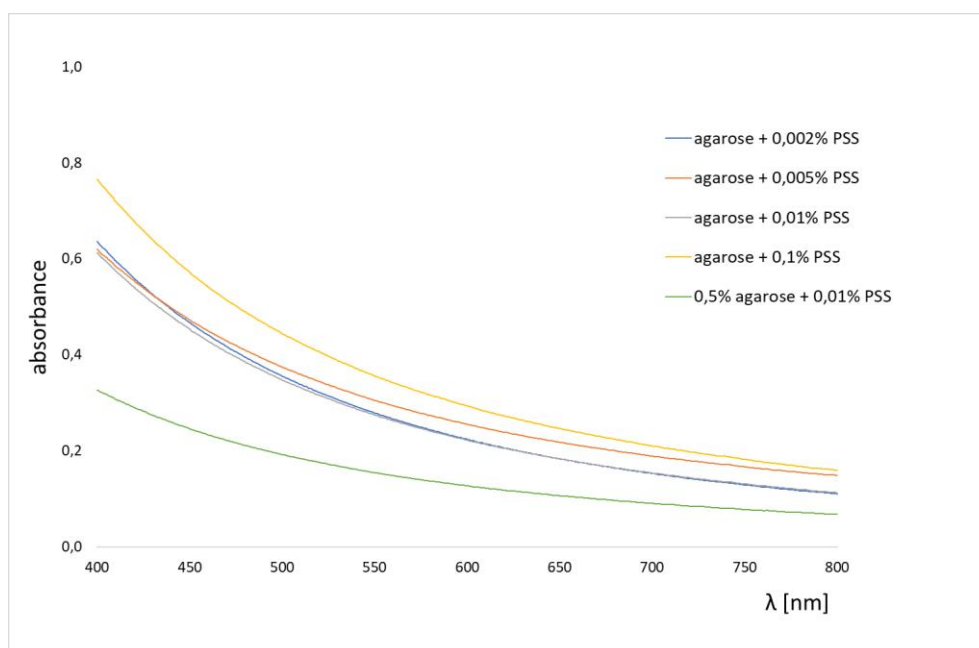
## 9 PŘÍLOHY



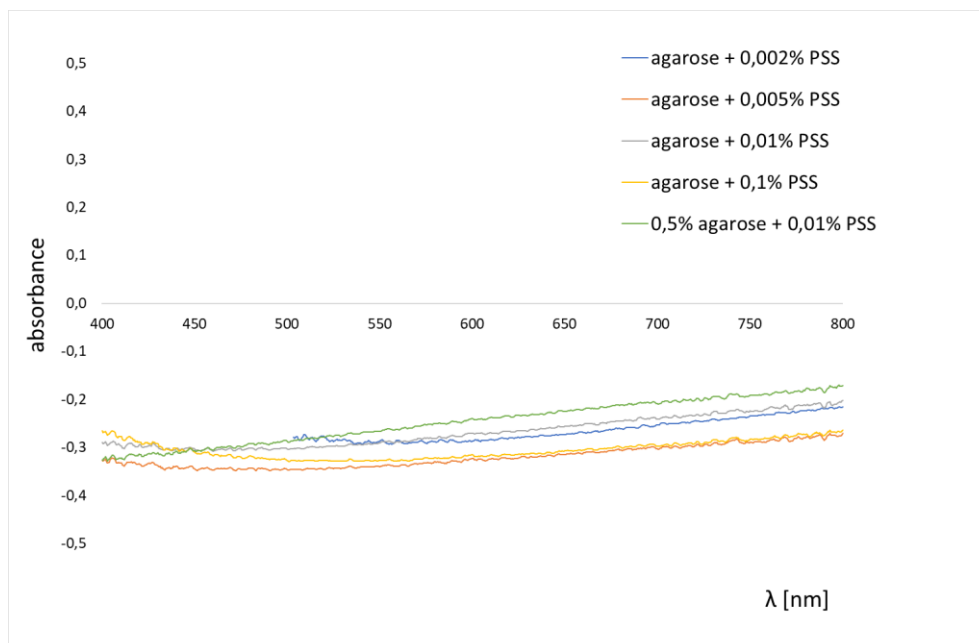
Příloha 1: Práce s ImageJ: názorné nastavení „Tresholdu“ (pro vzorek 1% agarózového hydrogelu v hydratovaném stavu).



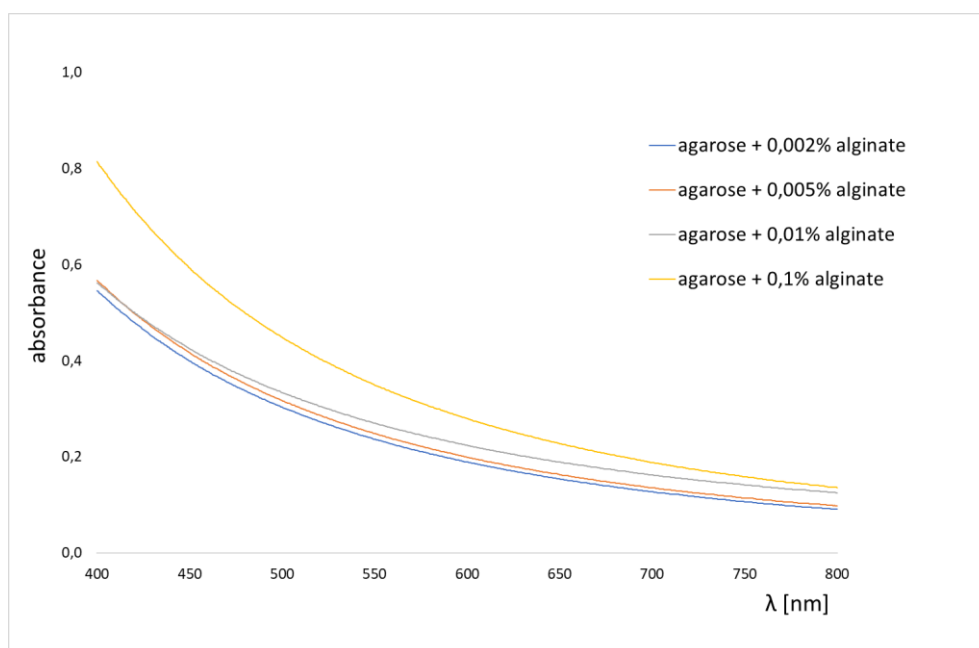
Příloha 2: Práce s ImageJ: Ukázka nastavení nástroje „Analyze Particles“ (pro vzorek 1% agaróзовého hydrogelu v hydratovaném stavu).



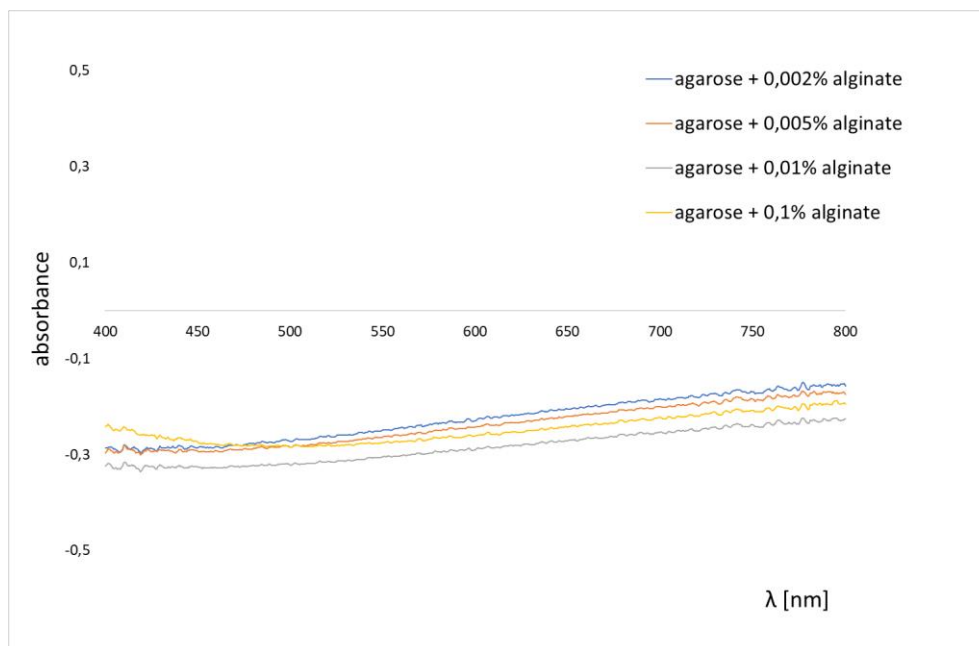
Příloha 3: Absorpční spektrum pro hydrogely v hydratovaném stavu, 1% agaróзовý hydrogel s přísávkem PSS v rozmezí 800 – 400nm.



*Příloha 4: Absorpční spektrum pro hydrogely v hydratovaném stavu, 1% agarózový hydrogel s přidavkem PSS v rozmezí 800 – 400 nm, měřené s integrační koulí.*



*Příloha 5: Absorpční spektrum pro hydrogely v hydratovaném stavu, 1% agarózový hydrogel s přidavkem alginátu v rozmezí 800 – 400 nm.*



*Příloha 6: Absorpční spektrum pro hydrogely v hydratovaném stavu, 1% agarózový hydrogel s přidavkem alginátu v rozmezí 800 – 400 nm, měřené s integrační koulí.*