



# 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

# CÍLENÁ MODIFIKACE TRANSPORTNÍCH A STRUKTURNÍCH VLASTNOSTÍ BIOMEDICÍNSKÝCH HYDROGELŮ

TARGETED MODIFICATION OF TRANSPORT AND STRUCTURAL PROPERTIES OF BIOMEDICAL  
HYDROGELS

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Zuzana Bayerová

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.

BRNO 2021

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1482/2020 Akademický rok: 2020/21  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Zuzana Bayerová**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Jiří Smilek, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Cílená modifikace transportních a strukturních vlastností biomedicínských hydrogelů

### Zadání diplomové práce:

- 1) provést literární rešerši věnující se tématu diplomové práce
- 2) navrhnout vhodné systémy k cílené modifikaci transportních a mechanických vlastností hydrogelů
- 3) připravit hydrogelové systémy s modifikovanými transportními a mechanickými vlastnostmi
- 4) charakterizovat připravené hydrogely s ohledem na transportní a mechanické vlastnosti
- 5) diskutovat naměřené výsledky a vyvozovat logické závěry

### Termín odevzdání diplomové práce: 30.7.2021:

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

---

Bc. Zuzana Bayerová  
student(ka)

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.  
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

---

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

## **ABSTRAKT**

Předložená diplomová práce se zabývá cílenou modifikací strukturních vlastností hydrogelů, která úzce souvisí s aplikačními vlastnostmi těchto materiálů (např. transportními). Vzhledem ke kýženým farmakologickým aplikacím spočívajících ve využití těchto materiálů k cílenému uvolňování léčiv byly pro studium vybrány hydrogely na bázi chitosanu a polyvinylalkoholu, jakožto látky s dobrou biokompatibilitou. Kombinací těchto polymerů byly zajištěny schopnosti botnací (regulováno přítomností chitosanu) a viskoelastické (ovlivněny přítomností polyvinylalkoholu), které byly charakterizovány za pomoci široké škály analytických a fyzikálně-chemických metod (botnání, pevnost v tahu, reologie, mikroskopie atomárních sil či stanovení měrného povrchu, aj.). Informace o strukturních vlastnostech sehrály stěžejní roli nejenom pro detailní popis studovaných materiálů z pohledu toho, zda lze cíleně měnit strukturní vlastnosti, ale posloužily také jako výklad rozdílného uvolňování aktivní látky diklofenaku z hydrogelové matrice. S ohledem na vypracovanou literární rešerši byl pro modifikaci vlastností vybrán vliv pH a síťování. Z naměřených výsledků bylo zjištěno, že i nepatrná změna pH má vliv na transport či uvolňování aktivní látky. Výsledky získané v této práci mohou být užitečné při tvorbě hydrogelových matic s léčivou v závislosti na zamýšlených medicínských aplikacích.

## **ABSTRACT**

The presented diploma thesis deals with a targeted modification of the structural properties of hydrogels, which is closely related to the application properties of these materials (eg transport). Due to the desired pharmacological applications of the use of these materials for targeted drug release, hydrogels based on chitosan and polyvinyl alcohol as substances with good biocompatibility were selected for the study. The combination of these polymers ensured swelling (controlled by the presence of chitosan) and viscoelastic (influenced by the presence of polyvinyl alcohol) properties, which were characterized by a wide range of analytical and physicochemical methods (swelling, tensile strength, rheology, atomic force microscopy or specific surface area, etc.). Information on structural properties played a crucial role not only for a detailed description of the studied materials in terms of whether the structural properties can be changed in a targeted manner, but also served as an explanation for the different release of the active substance diclofenac from the hydrogel matrix. With regard to the literature search, the effect of pH and crosslinking was chosen to modify the properties. From the measured results it was found that even a slight change in pH has an effect on the transport or release of the active substance. The results obtained in this work may be useful in the formation of hydrogel matrices with drugs depending on the intended medical applications.

## **KLÍČOVÁ SLOVA:**

chitosan, polyvinylalkohol, hydrogel, pH citlivé materiály

## **KEY WORDS:**

chitosan, polyvinylalcohol, hydrogel, pH sensitive materials

BAYEROVÁ, Zuzana. *Cílená modifikace transportních a strukturních vlastností biomedicínských hydrogelů*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/130552>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Jiří Smilek.

## PROHLÁŠENÍ

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

.....  
Bc. Zuzana Bayerová

### *Poděkování:*

*Na tomto místě bych chtěla vyjádřit nesmírný vděk svému vedoucímu diplomové práce Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D. za jeho neustále optimistickou náladu, povzbuzení při psaní a výzkumu na diplomové práci, a především za to, že mi byl skvělým vedoucím během celého studia od začátku až do úplného konce.*

*Obrovský dík patří akademickým pracovníkům, kteří mi pomáhali s výzkumem a výsledky.*

*Speciální poděkování patří i mé rodině a přátelům, kteří mne při vysokoškolském studiu neustále podporovali a věřili ve mě.*

*A hlavně díky Bohu, že už je to za mnou!*

## Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>8</b>
2.1	Polymery .....	8
2.1.1	Biopolymery .....	8
2.1.2	Syntetické polymery .....	10
2.1.3	Sít'ování .....	11
2.1.4	Interpenetrovatelné a semiinterpenetrovatelné polymerní sítě.....	12
2.2	Hydrogely .....	13
2.2.1	Klasifikace .....	13
2.2.2	Aplikace .....	15
2.2.3	Chování hydrogelů při změně pH .....	16
2.3	Řízené uvolňování léčiv .....	18
<b>3</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>19</b>
3.1	Kompozice hydrogelů s polyvinylalkoholem .....	19
3.2	Změny strukturních a mechanických vlastností v závislosti na pH .....	23
3.3	Studium uvolňování aktivních látek .....	26
<b>4</b>	<b>CÍL PRÁCE</b> .....	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>30</b>
5.1	Použité chemikálie .....	30
5.2	Použité přístroje .....	30
5.3	Příprava vzorků .....	31
5.3.1	Chemicky sít'ované hydrogely .....	31
5.3.2	Fyzikálně sít'ované hydrogely .....	32
5.3.3	Hydrogely s přídavkem diklofenaku .....	32
5.4	Charakterizace strukturních a fyzikálních vlastností .....	33
5.4.1	pH .....	33
5.4.2	Botnání .....	33
5.4.3	Pevnost v tahu .....	34
5.4.4	Stanovení viskoelastických vlastností .....	34
5.4.5	Rentgenová difrakční analýza .....	35
5.4.6	Infračervená a Ramanova spektrofotometrie .....	35

5.4.7	Mikroskopie atomárních sil.....	35
5.4.8	Skenovací elektronová mikroskopie .....	36
5.4.9	Stanovení měrného povrchu.....	36
5.5	Charakterizace transportních vlastností .....	37
5.5.1	Uvolňování léčiva .....	38
5.5.2	Franzovy cely .....	39
<b>6</b>	<b>DISKUZE A VÝSLEDKY .....</b>	<b>42</b>
6.1	Strukturní a fyzikální vlastnosti .....	42
6.1.1	Vizuální zhodnocení.....	42
6.1.2	Stanovení botnavého chování.....	43
6.1.3	Zhodnocení botnání z hlediska poměru šířka – délka.....	44
6.1.4	Pevnost v tahu .....	47
6.1.5	Stanovení viskoelastických vlastností.....	49
6.1.6	Rentgenová difrakční analýza .....	52
6.1.7	Infračervená a Ramanova spektrofotometrie .....	54
6.1.8	Mikroskopie atomárních sil.....	58
6.1.9	Skenovací elektronová mikroskopie .....	60
6.1.10	Stanovení měrného povrchu.....	61
6.2	Transportní vlastnosti .....	62
6.2.1	Uvolňování léčiva .....	62
6.2.2	Franzovy cely .....	68
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>72</b>
<b>9</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>75</b>

# 1 ÚVOD

Hydrogely jsou materiály, se kterými se setkáváme dnes a denně. Využíváme je tak často, že si toho občas sami nejsme vědomi. Zahrnují totiž nepřeberné množství aplikací jako jsou například medicínské (kontaktní čočky), kosmetické (antibakteriální gely) nebo i domácí (vonící gel v toaletách).

Co už tak zřejmé není je otázka, proč každý vykazuje jiné schopnosti? Odpověď je jednoduchá. Záleží na procesu přípravy a výběru komponent, které vnitřní strukturu tvoří. Ten se skládá z několika důležitých kroků od výběru činidel schopných gelace, přes volbu okolních podmínek (např. pH, druh síťování nebo teplota), až po způsob zpracování. Všechny tyto kroky ovlivní výsledný produkt z hlediska strukturálních vlastností, jejichž změna úzce souvisí se změnou finálních aplikačních vlastností (například transportních). Obzvláště je kladen důraz na postup přípravy produktů pro medicínské aplikace. Jakýkoliv špatný přípravek či postup by mohl mít fatální následky pro lidský organismus.

Z tohoto důvodu je důležitá znalost základních komponent, jejich chování a možnosti síťování s ostatními látkami. V medicínských oblastech se proto využívají často polymery na přírodní bázi, čímž je zajištěna lehká odbouratelnost v lidském organismu (biodegradabilita) a kompatibilita se systémem (lidským organismem), tzv. biokompatibilita. Teoretická část této práce se zaměřuje na přiblížení vlastností a aplikací vybraných polymerů a jejich možnostech síťování. Studium vědeckých článků vznikla literární rešerše, která pojednává o již vytvořených hydrogelových systémech na bázi chitosanu a polyvinylalkoholu. Především zde byly vyzdviženy informace, jak vlivem pH dochází ke změnám strukturálních a mechanických (viskoelastických) vlastností. Tato skutečnost byla motivací pro zkoumání vlivu experimentálních podmínek, a to konkrétně změny pH a způsobu síťování, které jsou úzce spjaty se schopností uvolňování aktivních látek.

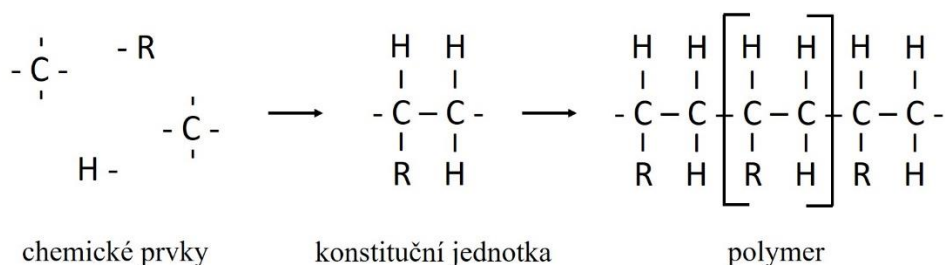
Vytvořené hydrogely by tak své uplatnění mohly najít například při krytí ran. Takovéto materiály dokážou ránu nejen překrýt, ale i podpořit proces hojení pomocí zakomponovaných léčiv, která mohou být z hydrogelové matrice cíleně uvolňována. Záleží však na pevnosti a vzájemném propletení složek tvořící trojrozměrnou hydrogelovou síť, jejíž součástí je i účinná léčivá látka. Složité podmínky přípravy dávají vzniku „inteligentním gelům“, které mají schopnost léčivo uvolnit na základě vnějších podmínek, kterými může být změna teploty, pH a jiné. Postupem času proto vznikly hydrogely, jež mají modulovatelné mechanické vlastnosti, které lze upravit změnou podmínek přípravy hydrogelů. Mezi ně řadíme například interpenetrující polymerní sítě (IPN = *interpenetrating polymer networks*), které se tvoří vzájemným propletením více sítí a tím získávají svou pevnost.

Záleží proto už jen na aplikaci a využití hydrogelu, abychom mohli určit správné sestavení gelové sítě. Toto sestavení pak ovlivní strukturální a tím i transportní vlastnosti, které jsou u hydrogelů pro medicínské aplikace klíčové.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

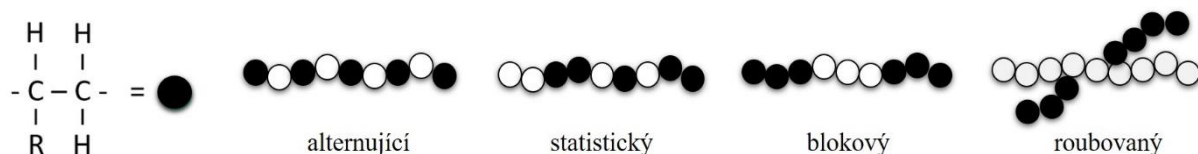
### 2.1 Polymery

Stejně jako se věda rozvíjí od svých základů, tak se i chemické látky skládají postupně z atomů, jednotlivých molekul, až k tomu že mohou tvořit složité makromolekulární látky. Aby se mohl *chemický prvek* stát součástí makromolekulárního řetězce, musí být minimálně dvojjazný a vytvořená chemická vazba musí být dostatečně pevná. Většinu prostudovaných makromolekulárních látek představují látky s řetězcem -C-C- nebo -C-O- případně s řetězcem -C-N-. Takto vytvořené články řetězců označujeme jako *konstituční jednotky* (mery) [1]. Makromolekuly jsou poté tvořeny vzájemným spojením merů, proto jsou označovány jako *polymery*. Výběrem těchto jednotek ovlivňujeme povahu celého řetězce [2].



Obrázek 1: Jednotkové složení polymeru

Polymery složené z chemicky stejných jednotek (merů) se nazývají homopolymery. Je-li řetězec složen z více druhů opakujících se jednotek, je označován jako heteropolymer – kopolymer. Příkladem nejjednoduššího polymeru je nevětvená lineární makromolekula. Mohou vznikat i složitější struktury a to větvené, zesítěné nebo dendritické. Základní konstituční jednotky lze kombinovat rozmanitým způsobem a podle toho je můžeme dělit do různých kategorií podle struktury a tvaru jednotlivých merů jako je na *obrázku 2*. Polymery můžeme rozdělovat i dle jejich původu na přírodní biopolymery (chitosan), polosyntetické (trimethylchitosan) a syntetické (polyvinylalkohol) [3]. V následujících kapitolách jsou zmíněny pouze ty polymery, které jsou použity v praktické části práce.



Obrázek 2: Kopolymery dle řazení monomerů

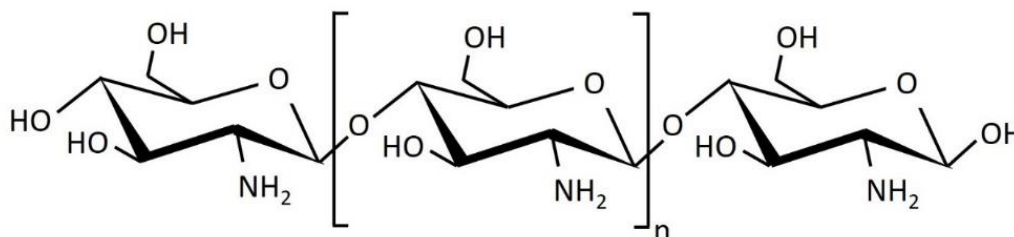
#### 2.1.1 Biopolymery

Přírodní polymery jsou polymery izolované z rostlin, zvířat či získané činností mikroorganismů. Existuje šest hlavních typů biopolymerů: proteiny, polysacharidy, polynukleotidy, polyisopreny, polyestery a lignin. Zahrnují mimo jiné uhlohydráty a proteiny, které poskytují strukturální podporu rostlinám a zvířatům. Biopolymery jsou ve srovnání s dalšími dvěma třídami podstatně lépe dostupné, ekonomicky výhodné, potenciálně biologicky rozložitelné a biokompatibilní díky jejich původu [3].

## CHITOSAN

### Struktura

Na obrázku 3 je struktura chitosanu, což je kladně nabitý přírodní polysacharid, který se skládá z glukosaminových a N-acetylglukosaminových jednotek, které jsou spojeny pomocí  $\beta$ -glykosidických vazeb [4]. Na těchto jednotkách se nacházejí tři nukleofilní funkční skupiny, které umožňují modifikaci struktury. Právě tyto skupiny dělají polymer hydrofilním a v kyselém prostředí nese pozitivní náboj. Zavedením jiných skupin do struktury dochází ke změnám fyzikálně-chemických vlastností, dle nově vybraných skupin [5].



Obrázek 3: Struktura chitosanu

### Vlastnosti

Mimo přítomnost amino skupiny, která z něj ve vodných roztocích činí polykationt, se chitosan vyznačuje i jinými přednostmi. Vykazuje protizánětlivé a antimikrobiální účinky, což je žádoucí u využití v medicínském průmyslu v širším měřítku [6]. Dále je netoxický, biokompatibilní, bioaktivní a biodegradabilní. Veškeré tyto „bio“ vlastnosti jsou neodmyslitelnou součástí a podmínkou *drug-delivery* (nosičů léčiv) systémů, které tyto schopnosti vyžadují [7]. V neposlední řadě můžeme jmenovat jeho antioxidační a terapeutické účinky, které byly prokázány v nedávné studii, a mohl by tak působit protinádorově [7]. Chitosan nachází mnohé využití v různých aplikačních formách (kuličky, prášek, gel, vlákna či roztoky), a tudíž jej můžeme využít ve tkáňovém inženýrství. Uplatnění nachází také u krycích obvazů, a to díky svému mukoadhezivnímu charakteru. Tato vlastnost umožňuje přilnutí na povrchy (tzv. bioadhezi), a mohou tak modifikovat absorpci systémově účinkujících léčiv a dále prodlužovat účinek lokálně působících léčiv [8].

### Využití

Všechny zmíněné vlastnosti a schopnosti chitosanu směřují k uplatnění ve farmaceutickém a biomedicínském průmyslu. Jedná se totiž o skvělý nosič léčiv, ale také se z něj dají vyrobit hydrogely, které podporují vlhké hojení ran. Je hojně využíván pro výrobu samovstřebávací chirurgické nitě, které jsou pevné a pružné a napříč tomu nezanechávají stehy, protože jsou biodegradabilní [9]. Další z oblastí využití je kosmetika, která počítá se zvlhčujícími a antibakteriálními vlastnostmi chitosanu. Využití najde i u potravinových doplňků, v zemědělství nebo v potravinářství [10].

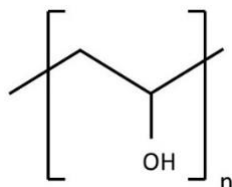
## 2.1.2 Syntetické polymery

Tyto polymery vznikají laboratorně polymerací, tudíž známe jejich přesnou strukturu, a můžeme tak předpovídat jejich chování v kontaktu s buňkami a organismem. Vyznačují se dobrými mechanickými vlastnostmi. Některé z nich mohou být biologicky rozložitelné a obecně je výroba těchto materiálů nákladově efektivní ve srovnání s přírodními polymery, u jejichž přípravy hraje zásadní vliv purifikace materiálu. Jejich největší nevýhodou je jejich relativně špatná buněčná interakce. Z tohoto důvodu se většinou povrchově upravují, nebo jsou kombinovány do kompozitního materiálu s biopolymery (polylaktid s přidavkem přírodních vláken kokosu), aby se zlepšila jejich buněčná komptabilita [3].

### POLYVINYLALKOHOL

#### *Struktura*

Tento polymer známý pod zkratkou PVA je syntetický polymer rozpustný ve vodě. Vzniká částečnou nebo úplnou hydroxylací polyvinylacetátu. Jeho struktura je tvořená opakující se hydroxylovou skupinou, jako je vidět na *obrázku 4*. Populární je PVA díky svému použití jako hydrogel, který může být vytvořen fyzikálním, chemickým nebo radiačně iniciovaným zesítením [1]. Fyzikální zesítení probíhá za stálého zmrazování a rozmrazování, díky čemuž se do struktury zavádějí krystalické oblasti, což způsobí tvorbu pevného a elastického hydrogelu. Chemické zesítení je zapříčiněno pomocí jiné látky (síťovací činidlo), kterou může být například glutaraldehyd, a dochází k vyvážení kovalentní vazby mezi polymerními řetězci, což zvyšuje mechanické vlastnosti jako pevnost a tuhost [11].



*Obrázek 4: Struktura polyvinylalkoholu*

#### *Vlastnosti*

PVA je jedinečný materiál, protože i ve své ataktické formě vykazuje semikrystalické vlastnosti. Při koncentraci vyšší než 1 % dokáže ve vodných roztocích tvořit propletené polymerní sítě. Ke krystalizaci dochází při fyzikální metodě zmrazování a rozmrazování [12]. Mezi další jeho vlastnosti a přednosti řadíme biokompabilitu, netoxicitu, hydrofilitu, rozpustnost ve vodě. Dále je velice žádaný díky snadné dostupnosti [11].

#### *Využití*

Polyvinylalkohol nachází své uplatnění jako materiál pro výrobu náplastí na hojení ran. Ve zdravotnictví se také uplatňuje u měkkých kontaktních čoček, očních kapek nebo jako umělá chrupavka či meniskus [13]. Nadále se široce využívá k posílení textilních přízí a papírů, aby se staly odolnější vůči olejům. Lze také použít jako potahovací prostředek pro doplňky stravy, protože nepředstavuje žádné zdravotní riziko. Můžeme jej také nalézt v průmyslovém využití, jako je laminování bezpečnostních skel pro vozidla anebo k izolaci vodičů [14].

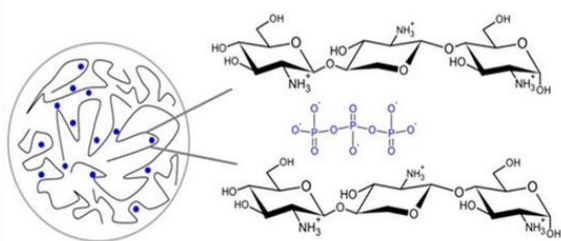
### 2.1.3 Síťování

Pojmem síťování se rozumí vytvoření vazeb mezi makromolekulami (bio)polymerů. Propojení polymerních řetězců dává vzniku dlouhým větveným sítím. Nabývající složitostí celé sítě vzniká i četné množství uzlů mezi jednotlivými polymery. Vyšší počet uzlů přispívá k nižší rozpustnosti celé sítě. O pevnosti a charakteru vznikajícího materiálu rozhoduje i podnět, který vedl k zesítnění jednotlivých polymerů [15]. Můžeme tak síťování rozdělit na chemické a fyzikální a jejich názorné příklady můžeme pozorovat na *obrázku 5*.

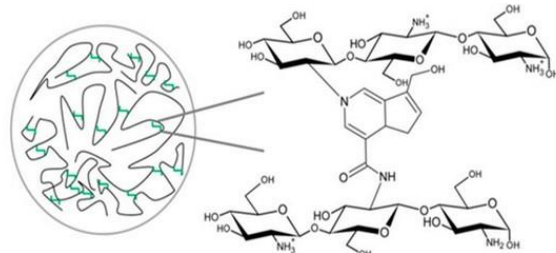
*Chemické síťování* je *nevratné* neboli permanentní (ireverzibilní) a tím jsou materiály výhodně stabilizovány do laditelných struktur. Většinou se vyznačují výbornými mechanickými vlastnostmi. Vznikají polymerizací adiční, kondenzační, proudem elektronů nebo za pomoci gama záření. Dále mohou zesíťovat za přítomnosti vhodného síťovacího činidla (např. glutaraldehyd). V případě medicínských aplikací je síťovací činidla třeba před aplikací do organismu odstranit, protože by mohla vyvolat negativní reakci například s léky. Neplatí to však pro všechna síťovací činidla [16] [17].

*Fyzikální* trojrozměrné sítě jsou tvořeny převážně kovaletními vazbami, mezi které patří elektrostatická interakce, vodíková vazba nebo hydrofobní interakce. Tyto vazby nejsou nikterak pevné a mají omezenou životnost. V čase, kdy některé spoje zanikají, mohou nové vznikat na jiném místě. Tvoří tak uzlové oblasti, které propojují strukturu v závislosti na koncentraci či teplotě [18]. Fyzikálního síťování můžeme docílit i opakovaným zahříváním a zchlazováním. Tyto 3D sítě vykazují *reverzibilní* přeměnu solů na gel (například hydrolyza tetraethylortosilikátu za kyselých podmínek vede k tvorbě SiO<sub>2</sub>), protože k přerušení fyzikálních interakcí mezi molekulami jsou zapotřebí velmi nízké energie. V tomto případě není třeba žádného chemického síťování a podmínky přípravy jsou velice mírné [19].

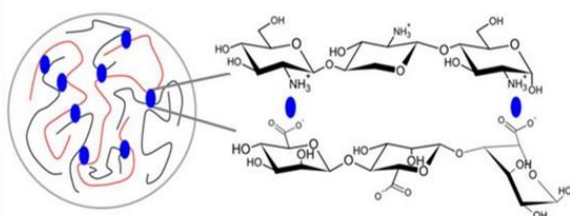
A - iontové síťování



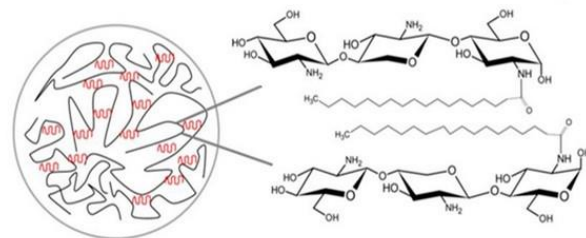
B - kovalentní síťování



C - komplexování polyelektrolytů (PEC)



D - samosestavení



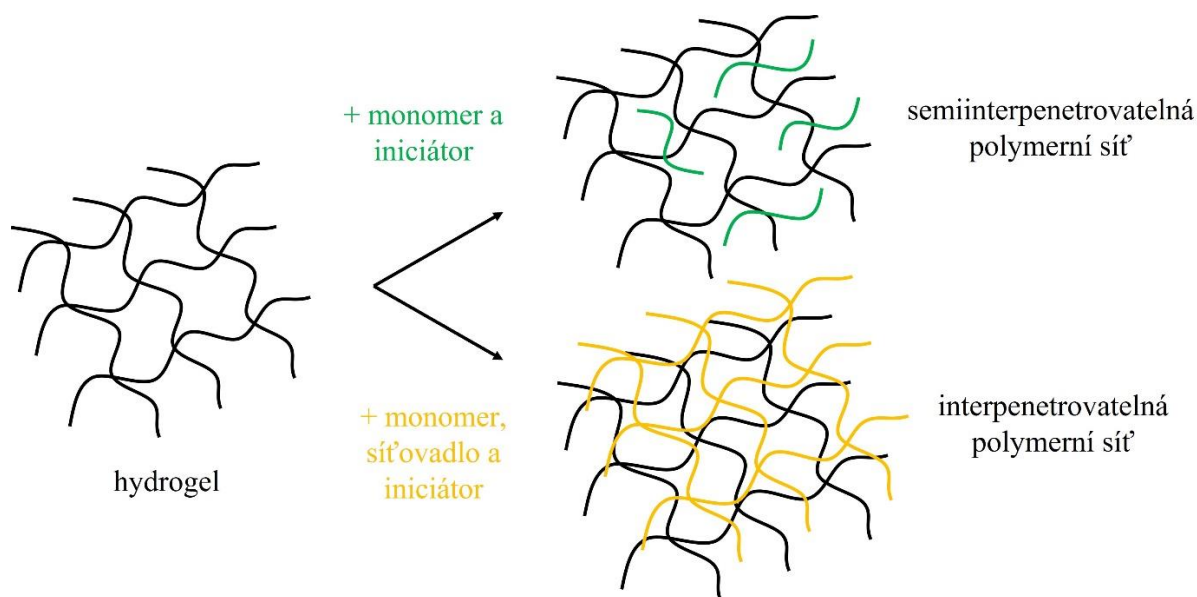
Obrázek 5: Typy síťování polymerů

## 2.1.4 Interpenetrovatelné a semiinterpenetrovatelné polymerní sítě

Předmětem zájmu začaly být interpenetrovatelné polymerní sítě (IPN) představující nové typy síťovaných polymerů. Nejčastěji se IPN sítě vytvářejí *in situ*, a proto o nich můžeme mluvit jako o hydrogelech. Obyčejné hydrogely mají však velice slabé mechanické vlastnosti kvůli jednoduché síti. Zároveň však poskytují vysoký obsah vodného disperzního prostředí, což nabízí zajímavé vlastnosti transportního média. V posledních letech proto byly vyvinuty multikomponentní systémy – interpenetrovatelné polymerní sítě. Tyto materiály jsou žádoucí z důvodu uplatnění v medicínských aplikacích, kde by mohly regulovat řízené uvolňování léčiv [20].

Interpenetrovatelné polymerní sítě (z anglického *interpenetrating polymer networks*) jsou sítě založené na kombinaci chemických a fyzikálních vlastností sestávající se z kombinace dvou a více polymerních sítí. Polymery jsou tedy ireverzibilně provázány a nelze je oddělit díky jejich vzájemnému propletení. Definice IUPAC pro IPN je následující: "*Polymer obsahující dvě nebo více sítí, které jsou přinejmenším částečně propletené v molekulárním měřítku, ale nejsou vzájemně kovalentně vázány a nemohou být odděleny, pokud nejsou chemické vazby přerušeny. Směs dvou nebo více předem vytvořených polymerních sítí není IPN* [21].“ V případě, že nejsou polymery syntetizovány nebo síťovány v bezprostřední vzájemné přítomnosti (myšleno každý polymer syntetizován zvláště), nemůžeme mluvit o IPN [22].

Semiinterpenetrovatelné polymerní sítě (sIPN z anglického *semi interpenetrating polymer networks*) se od interpenetrovatelných polymerních sítí liší tím, že jsou složeny jen z jednoho lineárního polymeru propleteného v síti jiného polymeru. Na rozdíl od IPN je u sIPN možnost separace polymerní složky bez přerušování chemických vazeb díky tomu, že je zde zesítěná pouze jedna složka. Toto tvrzení vychází z definice IUPAC: „*Polymer obsahující jednu nebo více sítí a jeden nebo více lineárních nebo rozvětvených polymerů, které se vyznačují penetrací alespoň jedné ze sítí na molekulové úrovni alespoň některými z lineárních nebo rozvětvených makromolekul* [23].“



Obrázek 6: Způsob syntézy semi-IPN a IPN

## 2.2 Hydrogely

V předchozích kapitolách jsme se seznámili s polymery. Jejich zesíťováním ve vodném prostředí dostáváme hydrogelové systémy. Hydrogely si můžeme představit jako trojrozměrné sítě polymerních řetězců skládající se z více složek, jejichž meziprostor vyplňuje voda (disperzní prostředí). Voda je zde disperzní médium a ve většině případů tvoří 90 % hmotnosti celého celku. Díky své struktuře má systém možnost botnat, a tím si udržet významnou část vody, díky čemuž lze dosáhnout cíleného transportu aktivních farmaceutických ingrediencí (API z anglického *active pharmaceutical ingredient*). Výhodou však zůstává, že hydrogel dokáže udržet svou strukturu, protože jakožto celek není ve většině případů rozpustný ve vodě. Polymerní síť je výsledkem toho, že jsou hydrofilní polymerní řetězce zesíťené díky inherentním silám [24].

Tyto sítě jsou charakteristické svou typickou konzistencí, která může nápadně připomínat živé tkáně. Hydrogelové vlastnosti umožňují jejich použití v široké škále aplikací: v chemickém, biomedicínském nebo tkáňovém inženýrství, u nosičů léčiv, v zemědělství nebo potravinářském průmyslu [3].

### 2.2.1 Klasifikace

Hydrogely jsou velice širokou skupinou materiálů, která může vzniknout nebo reagovat velice rozličnými způsoby, proto si vyžaduje následné a do jisté míry spletné dělení v závislosti na [25]:

- **polymerním zdroji**, což ovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti výsledného hydrogelu. Každý polymer má specifické rysy a charakteristiku, která ovlivňuje strukturu materiálu. Prvním krokem je výběr zdroje polymerních řetězců, který může být:
  - *přírodní* a jeho specifika jsou zmíněna v kapitole 2.1.1,
  - *syntetický*, jež byl více popsán v kapitole 2.1.2.
- **rozložitelnosti**, což je většinou ovlivněno právě výběrem polymeru. Připravené systémy potom můžeme dělit na:
  - *biodegradabilní* u nichž je známo, že se jedná o snadno odbouratelné zdroje, protože jejich původ je z přírodních zdrojů. Trojrozměrné struktury těchto hydrogelů mohou být zničeny působením mikroorganismů anebo enzymy, jež se přirozeně vyskytují v přírodních podmínkách. Pevnost vazby mezi molekulárními řetězci se tak sníží a závěrem je úplně přerušena. Nakonec je hydrogel rozložen na malé molekuly, které musí být také biokompatibilní s organismem.
  - *nedegradabilní*, což jsou hydrogely necitlivé na podněty prostředí, a mohou si tak dlouhodobě udržovat stabilní strukturální, fyzikální i chemické vlastnosti. Není to pravidlem, ale většinou můžeme mluvit o hydrogelech syntetického původu, které jsou připraveny chemickým zesíťením.
- **způsobu síťování**, kde záleží na způsobu gelace. Hydrogel může vznikat díky:
  - *chemickému síťování* – potom mluvíme o chemické reakci,
  - *fyzikálním síťování* – změnou fyzikálního stavu koloidního.O této problematice pojednává kapitola 2.1.3.

- **konzistenci** mohou být následně děleny na:
  - *objemové hydrogely*, které většinou vidáváme ve formě želé s nízkou pevností, určitou tekutostí a viskozitou. Takováto forma má velice omezené využití, a proto své uplatnění nachází například v potravinářství nebo trochu v tkáňovém inženýrství. Vznikla snaha o vylepšení mechanických vlastností těchto hydrogelů, které by následně měly větší uplatnění jako nanokompozitní materiály.
  - *mikrohydrogely* jak název napovídá mají rozměry polymerní sítě v rámci mikronů nebo submikronů. Jejich síť je nerozpustná ve vodě, ale velice dobře botná. Své uplatnění nacházejí v oblasti mechaniky, elektroniky, optiky, magnetismu a katalýzy díky velkým povrchovým plochám v malém měřítku hydrogelu.
- **citlivosti** v reakci na vnější podněty. Můžeme rozpoznávat hydrogely reagující nebo naopak nereagující na okolní prostředí.
  - *Běžné hydrogely* se vyznačují tím, že jsou odolné vůči okolním vlivům, a tím si zachovávají svou strukturu. Příkladem může být termoreverzibilní polysacharid agaróza, která je vysoce hydrofilní, biologicky rozložitelná a nemá téměř žádné nabitě skupiny. Jako hydrogel je málokdy destruován okolními vlivy, a proto se často využívá jako podpůrná matrice.
  - *Inteligentní hydrogely* jsou materiály reagující na podněty jako jsou teplota, pH, iontová síla, elektrické pole, světlo, stres, magnetické pole a jiné. V závislosti na vlivu okolí se mění jeho trojrozměrná struktura sítě tak, že botná, nebo se zmenšuje, nové spoje vznikají nebo naopak zanikají. Těmito změnami dochází i k rozdílným optickým a mechanickým vlastnostem [25]. Těchto vlastností se nadále využívá ve farmaceutickém průmyslu, kdy jsme schopni uvolňovat vazby léčiv například v předem stanoveném čase, intervalech a přesně definovaných dávkách léků [26].
    - a) **Na tepelné podněty** hydrogel reaguje tak, že se smršťuje, nebo naopak botná. Pokud se teplota sníží, dochází k interakci hydrofilních skupin řetězce s molekulami vody. Řetězec se tím narovná a zvyšuje svoji linearitu. V případě opačném, při zvyšování teploty, dochází k rozvolňování vazeb hydrofilních skupin a vody. Hydrofobní skupiny interagují v řetězci mezi sebou.
    - b) Jsou **citlivé na změnu pH** vnějšího prostředí, čehož se hojně využívá pro cílené podávání léčiv. Tato změna je způsobena disociací vazeb, které nastává v závislosti na tom, v jakém prostředí se hydrogel nachází (viz kapitola 2.2.3).
    - c) **Na vnější elektrické pole** jsou hydrogely citlivé díky přítomnosti iontů. Gradient koncentrace iontů uvnitř a vně gelové sítě mění osmotický tlak a hydrogely jsou tak v elektrickém poli deformovány.
    - d) Reagují **na tlakové podněty**, na magnetické pole, jsou citlivé na chemické změny, fotocitlivé hydrogely [24].
    - e) **Na přítomnost soli nebo obecně přídavek polyelektrolytu** hydrogely reagují v závislosti na iontové síle, která ovlivňuje elektromechanické chování těchto materiálů [27].

## 2.2.2 Aplikace

Uplatnění v praxi hydrogely nacházejí

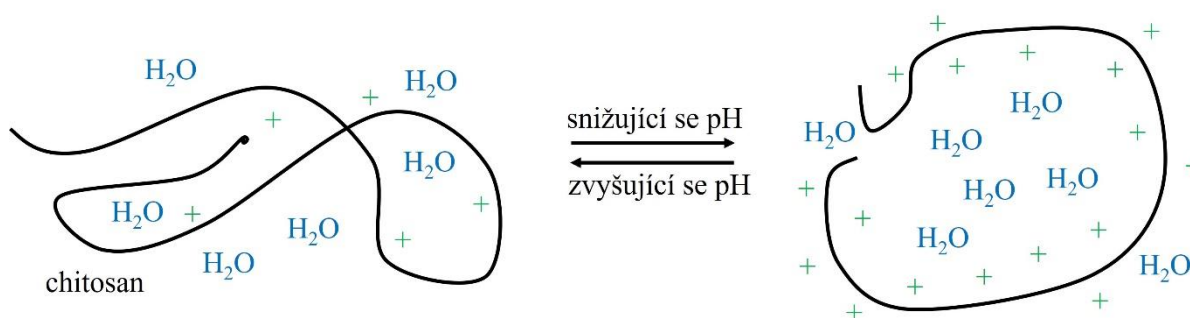
- **in situ**, a to kvůli své reverzibilní povaze. Po zavedení solu *in situ* se za rozdílných fyziologických podmínek zformuje na hydrogel, a dokáže tak působit například jako nosič léčiv. Pokud dojde ke změně vnějšího prostředí, jako je teplota, pH nebo iontová síla, způsobí fázový přechod z roztoku na hydrogel *in situ*. Toho se využívá ve farmacii, kdy jsou hydrogelem přenášena léčiva různými cestami, jako jsou oční, transdermální, rektální či injekční. Dochází tak k lepšímu cílení, protože se léčivo vyhne trávení v gastrointestinálním traktu a eliminaci v játrech. Dávka léků může být z tohoto důvodu nízká, a přesto s vysokou biologickou dostupností [28].
- jako **nanohydrogely**. Jsou to vysoce zesítené hydrogely nano-rozměrů připravené chemickými nebo fyzikálními metodami. Mohou být absorbovány buňkami, a proto jsou účinnými nosiči pro intracelulární dodávání.
- jako **porézní hydrogely**. Poskytují velkou specifickou povrchovou plochu, kde více hydrofilních skupin může interagovat s vodou, což napomáhá absorpci vody v hydrogelu. Obecně platí, že čím poréznější se hydrogel jeví, tím vykazuje rychlejší reakci a lepší citlivost například v interakci s vodou [24].
- jako **obvazové materiály**, jež mohou napomáhat hojení ran. Hydrofilní prostředí podporuje vlhké hojení a nelepí se tak na kůži [29].
- jako **nosiče léčiv**, které jsou významným odvětvím hydrogelů. Díky své struktuře dokáže hydrogel léčivo ochránit před vnějšími podmínkami, a zajistí tak cílené a řízené uvolňování léčiva, jehož transport lze navíc modulovat změnou mechanických vlastností matrice v podobě hydrogelu.
- ve **tkáňovém inženýrství**, kde zajišťuje náhradu orgánů či tkání s přírodní nebo syntetickou náhražkou. I v tomto případě se využívá hydrogelů, kvůli jejich schopnosti pojmout živé buňky.
- v **zemědělství a zahradnictví**. Využívá absorpční schopnosti hydrogelů pojmout velké množství vody. Užívá se při řízeném uvolňování vody a živin v hnojivech. Cíleným dávkováním vody a hnojiv by mohlo být následně omezeno touto aplikací.
- jako **hygienické výrobky**, jsou taktéž postaveny na absorpčních vlastnostech hydrogelů. Využívá se zde materiálů s vysokým stupněm botnání. Jedná se zejména o pleny a dámské hygienické potřeby.
- jako **separační technologie** fungující na bázi vycytávání toxických barviv a jiných látek v textilním průmyslu, čističkách vod a jiných aplikacích.
- v **kosmetice** [25].
- jako **náhrady nerozložitelných obalů** a jsou v dnešní době velice vyhledávané. Vědci navíc vymysleli způsob, jak indikovat změny stavu potravin bez rozbalení. Dle barvy obalu budeme jednou schopni rozpoznat, zda je potravina zkažená, či ne.
- jako **kapsle a tablety**. Také obsahují na povrchu obal tvořený hydrogelem, který ovlivňuje cílení a dávkování léčiva [30].

### 2.2.3 Chování hydrogelů při změně pH

Významnou kapitolou v modulaci strukturních vlastností hydrogelů je změna vnějších podmínek, při kterých jsou hydrogely připravovány, uchovávány nebo aplikovány. Jeden z nejzásadnějších vlivů hraje změna pH, která se dá začlenit nejen při výrobě hydrogelu, ale i při samotném využití. Během přípravy hydrogelu je třeba dbát na potřeby jednotlivých komponent. Každý polymer má charakteristický rozsah, kdy se nejlépe rozpouští a disponuje například větším množstvím disociovaných skupin. Tyto skupiny dále tvoří iontové vazby, které se mohou propojit s jiným polymerem nebo léčivem [31].

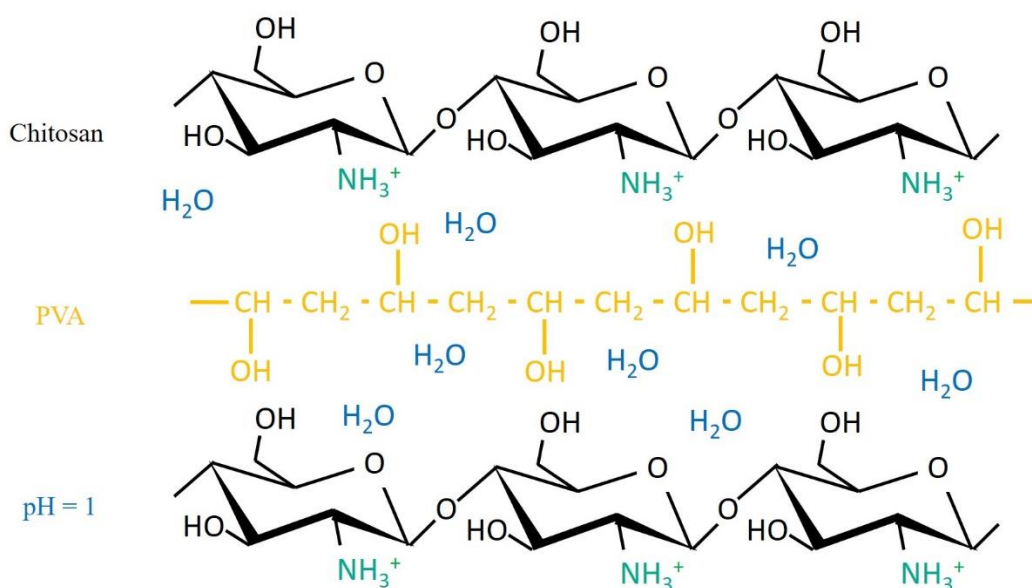
Na druhou stranu musíme dávat důraz na pH prostředí, ve kterém se bude výsledný produkt nacházet. Finální forma hydrogelu se může chovat jinak při neutrálním pH a jinak při pH kyselém či zásaditém. Pokud tedy uvažujeme nad gelovou tobolkou, která musí putovat trávicím traktem, musíme mít na paměti, že prochází různým prostředím s rozdílnými pH [32]. V současné době se vědci zabývají i zkoumáním pH tumorů. Tato hodnota pH je jiná než okolního prostředí, a tak lehce detekovatelná. Zde nacházejí využití pH senzitivní hydrogely jako nosiče léčiv [28].

Vzorovým příkladem je chitosan, který je rozpustný za kyselého pH. Za této situace vznikají disociované skupiny  $-\text{NH}_3^+$ , protože z kyselého prostředí difunduje  $\text{H}^+$  na amido skupinu  $-\text{NH}_2$ . Názorně to ukazuje *obrázek 7*. Kladně nabitá skupina zvyšuje botnání hydrogelu. Je to způsobeno vyšší koncentrací nabitých iontových skupin, které se navzájem odpuzují, a dávají tak možnost osmózy vody do systému. Rozpustnost tedy stoupá s kyselostí a přítomností  $\text{H}^+$ . Logicky tedy vychází, že pokud se sníží stupeň ionizace, sníží se i schopnost botnání. Množství skupin schopných disociovat tedy udává pomyslnou hranici, jak moc je iontový polymerní hydrogel schopen botnat [33]. Otok ovlivňuje fyzikální vlastnosti hydrogelu, které lze řídit změnami hustoty zesíťování, náboji, hodnotami pKa ionizovatelných skupin a povahou polymerů [32].



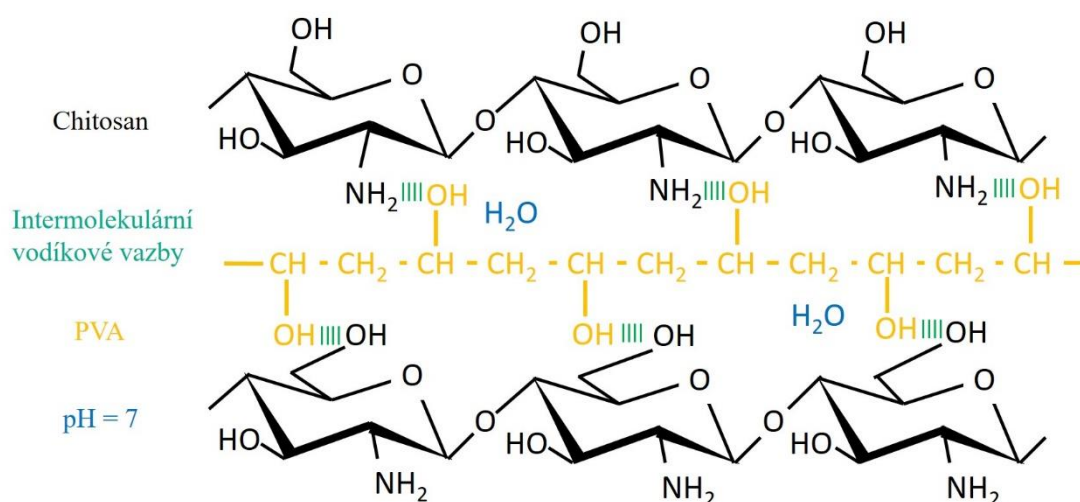
*Obrázek 7: Disociovatelnost chitosanu a jeho chování v prostředí s rozdílným pH*

Mimo jiné jsou nabitě konce schopné se navázat na opačně nabitý protějšek. Pokud uvažujeme o hydrogelu z dvou komponent, musíme pak brát v potaz funkční skupiny obou zástupců. Hydrogely vznikající z PVA a chitosanu jsou zesíťovány pomocí hydroxylové skupiny PVA a amidové skupiny u chitosanu. Tyto dvě skupiny tvoří vodíkové vazby mezi  $-\text{NH}_2$  a  $-\text{OH}$ . Pokud se tento systém nachází v kyselém prostředí (viz *obrázek 8*), tak dochází k protonaci skupin. Tím se zničí interakce vodíkových vazeb mezi  $-\text{NH}_2$  a  $-\text{OH}$ , takže se sníží hustota fyzického bodu zesíťování a děj je doprovázen zvýšením botnavého poměru.



Obrázek 8: Síťování PVA a chitosanu v kyselém prostředí

Avšak za slabě kyselých a bazických podmínek (pH od 4 do 13) je nízká koncentrace  $H^+$ , tudíž je obtížné zničit vodíkové vazby. V důsledku toho zůstává rychlost botnání a síla zesílení nezměněna jako to ukazuje obrázek 9. Modelový systém vykazuje reverzibilitu destrukce a rekonstrukce vodíkové vazby citlivé na pH [34].



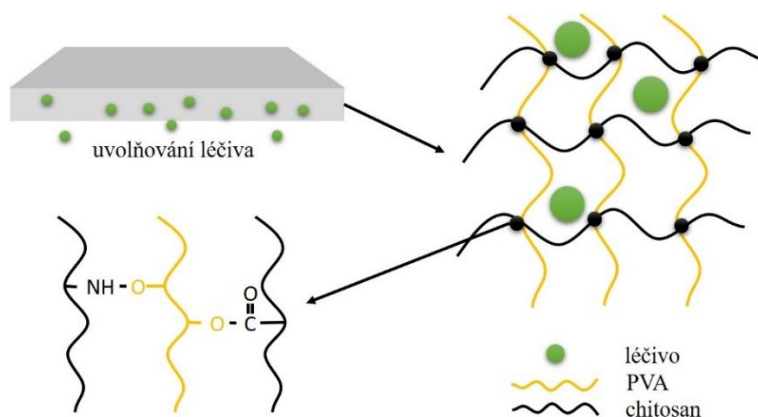
Obrázek 9: Síťování PVA a chitosanu v neutrálním prostředí

Směrodatné jsou také poměry, v jakém jsou polymery zastoupeny. Při hmotnostním poměru, kde je chitosan v nadbytku nad PVA, je botnání vyšší v kyselém prostředí. Je to způsobeno protonací amidových skupin, které se díky kladnému náboji odpuzují, a dávají tak prostup vodě, což zvyšuje botnavost. Naopak v případě, kde je PVA v nadbytku, je vyšší botnání v zásaditém pH. PVA je vysoce hydrofilní, což způsobuje botnání. Důležitější z těchto komponent v závislosti na pH bude chitosan, protože jeho funkční aminoskupina má za následek ovlivnění botnání. Čím více funkčních skupin chitosanu bude, tím více může botnat [35].

## 2.3 Řízené uvolňování léčiv

Při změnách teploty, iontové síly, pH nebo za přítomnosti jiných chemikálií může hydrogel ztratit svůj původní tvar, nebo naopak se může několikanásobně zvětšit. Nemusí to však nutně znamenat nevýhodu, ale naopak se dá těchto změn využít. Významné působení těchto senzitivních hydrogelů můžeme najít při cíleném dodávání léčiv, kdy díky změně sítě hydrogelu dokážeme snadněji uvolňovat navázané léčivo [32].

Mechanismus uvolňování a prostupu léčiv závisí na interakcích, kterými jsou aktivní látky drženy, vnitřní struktura hydrogelu (pórovitost, tortuozita) a mechanických vlastnostech hydrogelu. V praxi to znamená, že čím je hydrogel rigidnější (čím má vyšší viskozitu a viskoelastické moduly), tím má větší zauzlení. Čím je vyšší zauzlení (tortuozita), tím dochází k pomalejšímu uvolňování a prostupu léčiva (uzly překážejí). Naopak, pokud je nižší propletení, má hydrogel více pórů, kterými je látka schopná rychleji procházet, a tím se uvolňovat [17].



Obrázek 10: Hydrogel z PVA a chitosanu znázorňující strukturu s léčivem

Abychom vylepšili terapeutický efekt a redukovali nežádoucí účinky při podávání léků *per os*, je nutné se zaměřit na cestu léčiva trávicím traktem. Existuje spousta univerzálních postupů, které zajišťují to, že léčivo dorazí zdárně do svého působení. Pokud však chceme eliminovat příliš vysoké koncentrace a tím i nežádoucí účinky, je vhodné se soustředit na přesné cílení. Velice vhodným prostředkem sloužící pro řízené uvolňování léčiv je změna pH. Hydrogely reagují při rozdílných pH prostředí rozlišným způsobem, proto jsou žádoucí při aplikaci v gastrointestinálním traktu. Osud léčiva při polykání tablet je provázen odlišným pH vně, v ústech, jícnu či žaludku [36].

V dutině ústní se hodnota pH pohybuje v oblasti 7–7,4, což odpovídá téměř neutrálnímu prostředí. V žaludku je velice kyselé prostředí (pH 1–2). Při tomto pH nejlépe pracují proteázy štěpící proteiny. Pokud tedy pozřeme maso nebo něco s velkým množstvím bílkovin, dopomáhá tento faktor k lepšímu trávení. Pokud jíme lehce stravitelné jídlo, tak se pH žaludku drží na hodnotě 4–5. Na kůži je pH 4,5–5,5, čímž se přirozeně bráníme bakteriím a jiným mikroorganismům, které na kůži během dne ulpí. Tyto rozdílné hodnoty pro jednotlivé oblasti můžeme využít pro rozvolňování lékové formy v místě určení za pomoci pH. V závislosti na cílení a nejlepší rozložitelnost je třeba vybrat látky takové, které se v příslušné oblasti rozpouštějí [37].

### 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

#### 3.1 Kompozice hydrogelů s polyvinylalkoholem

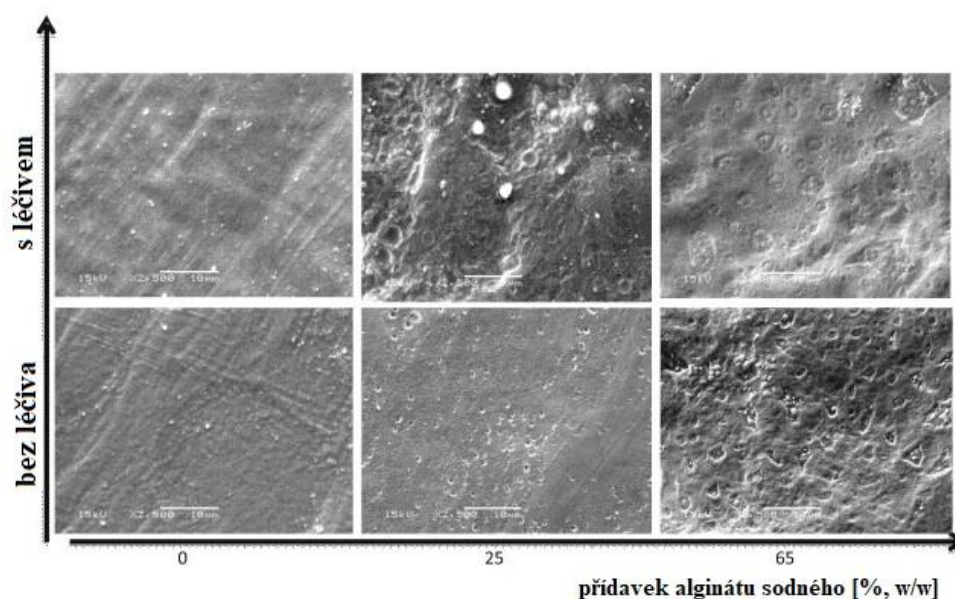
Díky tomu, jak se dokážou hydrogely sIPN síťovat, nabízí kompozice hydrogelů s polyvinylalkoholem širokou variabilitu. Díky možným morfologickým a chemickým modifikacím dokážeme řídit uvolňování látek a celkové chování hydrogelu. Tato skutečnost nám nabízí slibnou perspektivu obzvláště u biomedicínských aplikací těchto unikátních materiálů. Vzhledem k problematice řešené v rámci předložené diplomové práce byly v následujícím textu vybrány články, jež se zabývají síťováním PVA v kombinaci s jinými materiály.

V rešerši vydané v roce 2014 **Gondalez a kol.** vyšla studie o *nanokompozitních celulózových materiálech* v kombinaci s PVA. Pomocí techniky mrazení a tání byly připraveny materiály s různou distribucí pórů, která byla díky celulózové složce regulovatelná. K tomuto výsledku dospěli při porovnávání snímků materiálů PVA a celulózy z emisní rastrovací elektronové mikroskopie (FESEM). Díky vynikající kompatibilitě obou složek (matrice a plniva) dosáhli zvýšení mechanických a bariérových (transportních) vlastností kompozitních hydrogelů. Zdokonalení těchto vlastností způsobil přídavek celulózy, která má silné tendence aglomerovat uvnitř polymerních matic. Kvůli silné hydrofilní povaze obou složek dochází k tvorbě vodíkových řetězců mezi PVA a celulózou. Celulóza tak dokáže vyplnit póry vznikající mrazením a táním PVA sítě. Velikost pórů polymerních matic PVA s hodnotou  $8,5 \pm 4,0 \mu\text{m}$  dokázali snížit přidáním celulózy na  $4,9 \pm 3,6 \mu\text{m}$ . Taktéž nabyly antimikrobiálních vlastností (15 dní nepozorovali žádnou penetraci bakterií jejich systémy), zvýšené tepelné stability, lepších mechanických vlastností a převodu vodních par, čehož se může hojně využívat u obvazových materiálů [38].

Se stejnými materiály poté pracují i **Tang a kol.**, kteří vidí využití také v biomedicínských aplikacích, konkrétně pro umělé krevní cévy. Materiál totiž díky své morfologii a mechanickým vlastnostem, jako jsou pevnost, roztažení, retence stehů, slibuje možné využití pro biokompatibilní vaskulární štěpy. Pro takovéto využití je třeba kontrolované propustnosti vody a živin, což je kontrolováno silnou provázaností sítě z *PVA a celulózy*. Autoři zároveň poukazují na důležitost tažnosti a pružnosti materiálu, kterou regulují dle pěti modelů kombinací PVA a celulózy. Výsledky ukazují, že ideální bakteriální nanocelulózový hydrogel musí obsahovat oba komponenty pro dosažení ideálních vlastností. Hydrogel tvořený pouze z PVA nebo z celulózy je nedostačující pro tuto aplikaci, protože samotné materiály nedosahují všech požadavků pro umělé krevní cévy, zatímco kombinací materiálů ano [39].

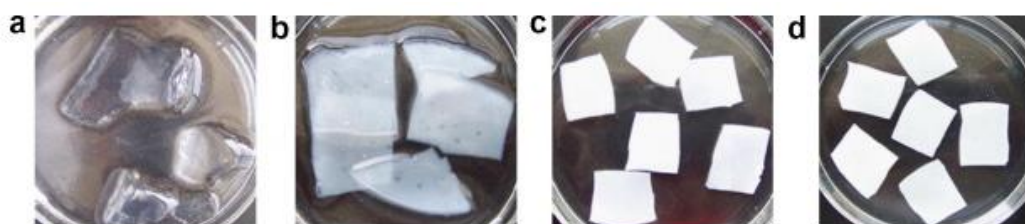
Dalším slibným materiálem pro přípravu reprodukovatelných hydrogelových systémů je polysacharid *alginát sodný*. Autorský kolektiv v čele s **E. A. Kamounem** vedl studii za účelem vytvoření obvazů na rány fyzikálním zesítním, čímž se vyhnul rizikovosti chemických činidel a zesíťovadel. Tyto hydrogely byly naplněny *ampicilinem sodným* a byly pozitivně testovány na biokompabilitu s krví. Obecně byla pozorována nižší tvorba zesítnění PVA s narůstajícími přísadkami ampicilinu a alginátu. Přídavek těchto komponent snížil zapletení PVA, avšak poskytl vyšší absorpci vody. To však může vést k částečnému nebo úplnému zničení hydrogelu. Tyto poznatky potvrzují i snímky pořízené z rastrovacího elektronového mikroskopu, které

jsou vidět na *obrázku 11*. Absence alginátu a ampicilinu (v PVA hydrogelu) má za následek velmi hladký a rovnoměrný povrch bez pórů. Jejich přidavkem se úměrně zvedá distribuce a velikost pórů ve struktuře. V závislosti na těchto poznacích autoři dále zkoumali způsob uvolňování léčiva s ohledem na kompozici hydrogelu. Zjistili, že ke značnému uvolnění dochází při prvních 15 minutách v fosfátovém pufru a následujících 6 hodin nebyly pozorovány žádné významné rozdíly. Pomalejší uvolňování však nastalo s vyšším přidavkem alginátu sodného. Obsah alginátu bránil difúzi ampicilinu do fosfátového pufru, a to zřejmě kvůli vazbě záporně nabitě alginátové skupiny  $\text{COO}^-$  s kladně nabitými  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$  skupinami léku [40].



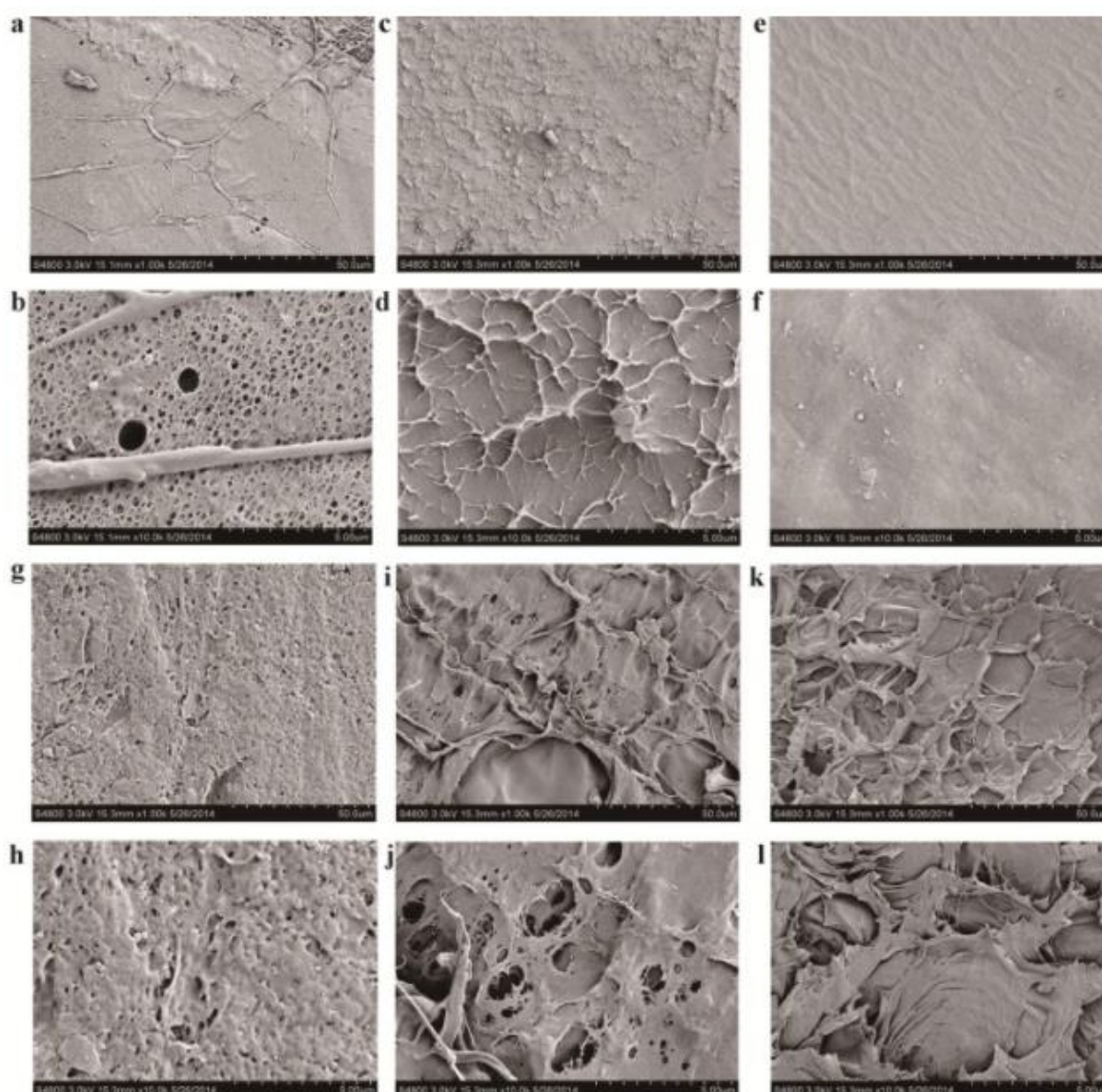
*Obrázek 11: Rozdílná morfologie PVA hydrogelů při různém obsahu alginátu [40]*

Autoři **X. Yang a kol.** se zabývali hydrogely PVA a *chitosanu* vznikajícími různými cestami. Porovnávali rozdíl mezi čtyřmi fyzikálně rozdílně síťovanými hydrogely (viz *obrázek 12*), které byly připraveny buďto (a) pouhým  $\gamma$  zářením, nebo (b) v kombinaci s následným zmrazováním a rozmrazováním, nebo (c) naopak připraveny nejdříve zmrazováním a rozmrazováním a dále ozářením. Poslední variantou (d) jsou hydrogely připravené pouze zmrazením a rozmrazením. Nejjednodušší a zároveň nejméně kineticky stabilní vyšly hydrogely vzniklé pouhým ozářením (a). V závislosti na prvním kroku se ukázalo, že materiály, jež jsou první ozářeny a následně tepelně zpracovány (b) vykazují větší botnavost, mechanickou pevnost, vyšší tepelnou stabilitu, nižší odpaření vody a jsou méně zakalené než materiály připravované inverzní procedurou (c) [41].



*Obrázek 12: Morfologie hydrogelů připravovaných rozdílnými postupy při ozáření [41]*

Polyvinylalkohol v modifikované formě využívají ve své práci **D. Zhang a kol.**, jejichž cílem bylo vyvinout nový zesítěný *polyvinylalkohol s karboxylovou skupinou* (PVA-COOH) pomocí *chitosanu*. Dosáhli tak výrazně vyššího poměru botnání a zachovali hydrogelu cytotoxicitu. *Obrázek 13* ukazuje snímky ze SEM, které názorně ukazují, že u xerogelů obsahujících PVA-COOH a chitosan v různém poměru (*obrázky g až l*) jsou viditelné poréznější struktury než u xerogelů vzniklých z PVA (a, b), chitosanu (c, d), nebo jejich kombinace (e, f). Na obrázcích g až l jsou vidět rozdílné porézní struktury v závislosti na množství PVA-COOH a chitosanu v poměrech 70:30, 50:50, 20:80 (příklad nomenklatury P70C30 značí, že je ve vzorku zastoupeno 70 hm. % PVA-COOH a 30 hm. % chitosanu). S rostoucím podílem PVA-COOH vykazují xerogely poréznější strukturu s větší distribucí pórů, což je pravděpodobně způsobeno nehomogenním zesítováním chitosanu. Nový krycí materiál zajišťuje vlhké prostředí nad potenciální ránou [42].



*Obrázek 13: Snímky xerogelů z kombinací PVA, chitosanu a PVA-COOH; PVA (a,b), chitosan (c, d), PVA-chitosan (e, f), P70C30 (g, h), P50C50 (i, j), P20C80 (k, l) při různých zvětšeních [42]*

Zajímavou studii vydali **S. R. Kanatt a kol.**, kteří se zbývají výrobou aktivních biofilmů z *chitosanu* a polyvinylalkoholu s vodnými extrakty z máty a granátového jablka. Přídavkem extraktů pozorovali zvýšenou ochranu před UV zářením a vyšší pevnost v tahu připravených xerogelů. Vyšší pevnost v tahu může být ovlivněna přídavkem extraktů. Jedná se o fenolické sloučeniny, které obsahují skupiny OH, které tvoří vodíkové vazby s chitosanem. Tento xerogel je slibným systémem pro zlepšení kvality a prodloužení trvanlivosti potravin. Studie tedy ukazuje potenciál přídavku přírodních extraktů k bioaktivním materiálům a budoucnost v nových obalových materiálech [43].

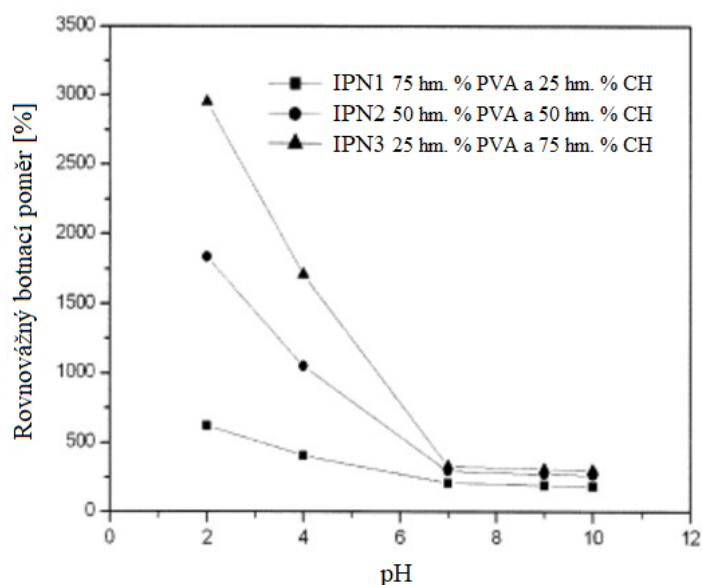
**I. M. Garnica-Palafox a kol.** použili ve svých hydrogelech kromě *chitosanu* i *epichlorhydrin*. Jimi vyrobený hybridní hydrogel umožňoval růst buněk a tvorbu extracelulární matrice a vykazoval dostatečné mechanické, strukturální a biologické vlastnosti pro potenciální použití v aplikacích tkáňového inženýrství [44]. Navazující studie poté využívají tentýž hydrogel pro náhradu ušní chrupavky v praxi na myších. Byly použity chondrocyty izolované z králíka a prasečí hyalinní chrupavky. Výsledný materiál se lišil na základě toho, z jakého zdroje byl poskytnutý materiál. Prasečí chondrocyty odpovídaly ušní chrupavce, zatímco králičí se diferenciovaly na kost [45].

Interpenetrující polymerní sítě byly vytvořeny **S. J. Kimem a kol.** z polyvinylalkoholu a *chitosanu* za UV záření. Díky svému zkoumání přišli na to, že poměr botnání PVA/*chitosanu* závisí na dvou faktorech, a to teplotě a pH. Výsledky jejich zkoumání jsou shrnuty v následující kapitole 4.2 [32].

Semiinterpenetrující polymerní sítě pak zkoumali **T. Peng a kol.** opět na bázi *chitosanu*, PVA a tentokrát za přítomnosti *glutaraldehydu*. Jejich tým se zaměřil na cílené dodávání léčiv, a to díky změnám pH, které je v gastrointestinálním traktu jiné než v ostatních oblastech. Studie byla tedy zaměřena na chování sIPN hydrogely v prostředí s rozdílným pH. Výsledkem bylo zjištění, že záleží na protonizaci aminoskupin a disociaci vodíkové vazby v síti, která souvisí s pH roztoku [36].

### 3.2 Změny strukturních a mechanických vlastností v závislosti na pH

Způsob, jakým zkoumali změny vlastností hydrogelů **S. J. Kim a kol.**, je velice snadný a efektivní. Poměr botnání byl změřen po 24 hodinách od doby, kdy vysušený vzorek z PVA a chitosanu ponořili do roztoků s různými hodnotami pH a teplotami. Poté co hydrogel dosáhl rovnováhy, byl vysušen filtračním papírem a zvážen. Výsledkem jejich zkoumání je zjištění, že hydrogely vykazovaly *nižší hmotnosti při pH 7, 9 a 10* v porovnání s pH 2 a 4. Potvrdil se tedy předpoklad, že ke zvýšení botnání dochází v přítomnosti vyšší koncentrace nabitých iontových skupin. Toho je dosaženo právě přítomností kyselého prostředí, kdy je chitosan v disociované formě a disponuje  $\text{NH}_3^+$  skupinami. Tyto skupiny zaštiťují iontovou vazbu a lepší botnání [32] [46].

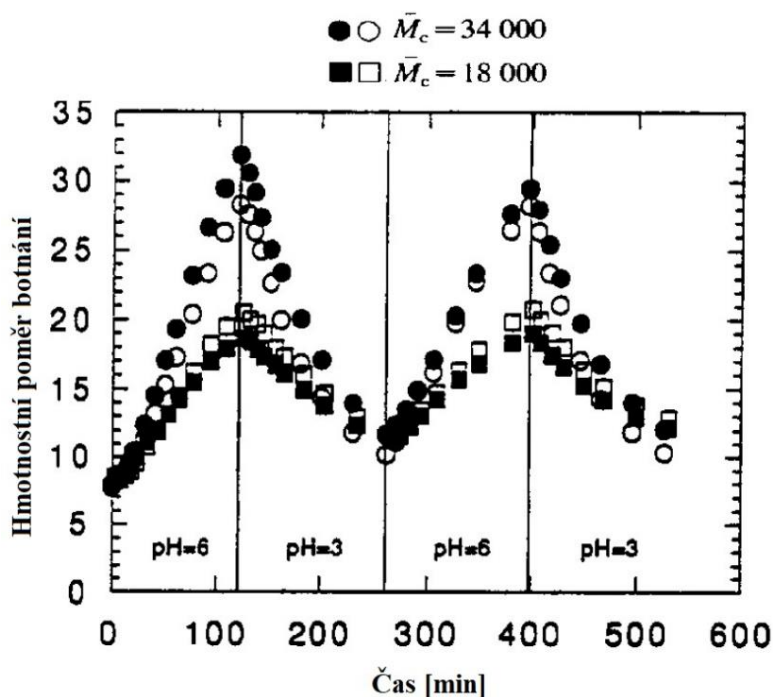


Obrázek 14: Syntéza hydrogelu pomocí acryloyl chloridu [32]

**I. Gholamali a kol.** rozšiřují předchozí teorii o další chování hydrogelů na bázi PVA a karboxymethyl chitosanu (CMCS) a  $\text{Ag}^+$ . Poměr botnání byl vyšší při pH 2,1 než pH 7,4 pro hmotnostní poměr CMCS:PVA 3:1. To bylo způsobeno jako v předchozím případě protonací amonných skupin CMCS ve vodném médiu. Naopak pak *poměr botnání při pH 7,4 byl mírně vyšší než při pH 2,1, když byl hmotnostní poměr CMCS:PVA 1:3*. Jelikož je PVA vysoce hydrofilní, zvyšuje se tak i poměr botnání se zvyšujícím se množstvím PVA ve struktuře hydrogelu. Hydrogel jako celek i s  $\text{Ag}^+$  má větší rychlost botnání. Celý proces probíhá kvůli osmotickému vyrovnání nabitých stříbrných částic [35].

**R. R. Mohamed a kol.** pracuje se stejným průběhem botnání za stejných pH podmínek jako již bylo zmíněno [32][35][46]. Jeho tým však použil namísto chitosanu *trimethylchitosan* (TMC), a tím vytvořil lépe rozpustný hydrogel na bázi TMC a PVA zesíťovaných s glutaraldehydem v hmotnostních poměrech 1:3, 1:1 a 3:1. Výsledky botnavosti ukazují, že *hydrogely s větším obsahem PVA mají nejvyšší botnavost ze všech díky vysokému obsahu PVA a botnají většinou v bazickém médiu (pH 9)*, hydrogely s větším obsahem TMC *botnají v neutrálním médiu (pH 7)*, pokud nejsou chemicky zesíťeny. Hydrogely s vyrovnaným poměrem složek botnají většinou v neutrálním médiu (pH 7) [47].

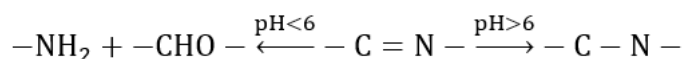
Další z přístupů ověřili **L. F. Gudeman a kol.**, když vytvořili hydrogel z PVA a polyakrylové kyseliny (PAA). Veškeré měření prováděli v reakci na změny pH a iontové síly botnavého média. Zjistili, že *hydrogely s velkou molekulovou hmotností botnají více a rychleji než hydrogely s nižší molekulovou hmotností*, jak je to vidět na obrázku 15. Společně s rychlejším botnáním dochází ke dvojnásobně rychlejšímu stárnutí. Změna hodnoty pH způsobila kromě zvýšení hmotnosti i zvýšení průměrné velikosti ok (pórovitosti). Veškeré tyto změny jsou zapříčiněny vlivem iontového obsahu polymerů. Je tedy důležité brát v potaz i poměry polymerů a jejich strukturu. Závislost botnání na pH je dána množstvím ionizované složky PAA. Zatímco homopolymer obsahující 50 mol % PAA botnal při pH 8, vzorek s 60 mol % PAA botnal znatelně při pH 6 [48] [49].



Obrázek 15: Vliv pH na botnání hydrogely s různou molekulovou hmotností [49]

**H. S. Shin a kol.** navazovali na práci L. F. Gudemana [48]. Studovali botnání stejných hydrogelů akorát v roztoku s 5 různými polyelektrolyty. Objevili rozdíly mezi chováním iontově nabitých a neiontových látek v okolním roztoku. Jmenovitě se jednalo o teofylin, hovězí sérový albumin, vitamín B12, cefazolin a riboflavin. *Změnou pH došlo k ionizaci polyakrylové kyseliny a následně k interakcím s elektrolyty v médiu.* Prostupnost rozpuštěných látek tak byla významně ovlivněna svými iontovými vlastnostmi. V případě permeace neiontových rozpuštěných látek se permeabilita změnila podle změny botnání hydrogelu IPN. Menší rozpuštěné látky a vyšší botnání hydrogelu IPN vedly k vyššímu difúznímu koeficientu. Prošlé množství rozpuštěné látky lze selektivně regulovat změnou molekulárního složení v IPN hydrogelu. Prostupnost iontových látek však vykazovala opačný trend. Permeace iontových rozpuštěných látek při pH 7 přes IPN se snížila, zatímco botnání IPN hydrogelu se zvýšilo. To je způsobeno přitažlivostí nebo odpudivostí mezi ionizovanými PAA v hydrogelu a ionizovanými elektrolyty v roztoku při různém pH [50].

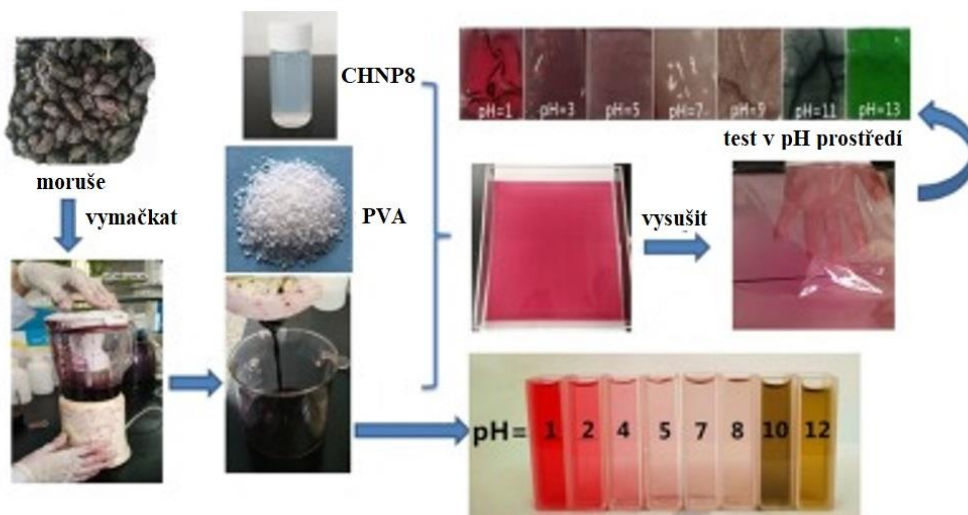
Existuje mnoho dalších, kteří porovnávali vzniklé hydrogely v různých pH prostředích. Mezi nimi například **T. Peng a kol.**, kteří došli k zjištění, že botnání hydrogelů začíná klesat poté, co hydrogely nabotnaly do určité míry. Pro tyto účely pracovali s hydrogely složenými z chitosanu a polyetheru. Usoudili, že *tendence botnat přechází do stavu rozpouštění* [36]. Tento fakt potvrdili měřeními, kde zjistili, že dochází ke štěpení iminových vazeb. Avšak pokud se hydrogel nachází v pH 1 a poté je přemístěn do pH 7,8 *může se formace hydrogelu navrátit*. Také záleží na zastoupení jednotlivých složek hydrogelu [51] [52].



Obrázek 16: Reverzibilní tvorba a rozvolňování vazeb při rozdílném pH [51]

**B. Huang a kol.** vytvořili srážecími reakcemi za pomoci vodíkových vazeb z PVA a regenerovaného chitosanu (RCS) vysoce funkční kompozit. *Tahové zkoušky prokázaly, že díky RCS došlo ke zlepšení mechanických vlastností*. Jak se koncentrace chitosanu zvyšovala, botnací poměr PVA kompozitů se postupně snižoval, což bylo způsobeno fyzikálním zesítním. Silná interakce s vodíkovou vazbou snižuje počet volných hydroxylových skupin. Propletení chitosanu a PVA zabraňuje vstupu molekul vody, čímž se sníží poměr botnání. Obecně můžeme říct, že se poměr botnání projevil v kyselém prostředí více než v alkalickém prostředí. Výsledný produkt je lehce tvarovatelný pro dobrou citlivost na pH díky vnitřní vodíkové vazbě. Autoři si slibují rozmanité použití právě pro plastičnost a vysokou pevnost vodou indukovaných polymerů [34].

Hydrogel reagující na změnu pH změnou barvy vytvořili **Q. Ma a kol.** z PVA, chitosanových nanočástic a extraktu z moruše. Moruše patří mezi antokyany, což jsou přírodní ve vodě rozpustná barviva, která poskytují barvy indikující změny pH. Tento film byl využit v potravinářství při balení ryb. Jeho schopnost měnit barvu ze zelené na červenou indikovala jakost ryb a jejich kažení [52].



Obrázek 17: Vliv změny pH na hydrogel z PVA, chitosanu a extraktu moruše [52]

### 3.3 Studium uvolňování aktivních látek

**I. Gholamali a kol.** představili své nanokompozitní hydrogely na bázi karboxymethyl chitosanu (CMCS) a PVA společně se zakomponovanými  $Ag^+$  částicemi. Bylo zde potvrzeno trvalé a kontrolované uvolňování léčiva, které se prodlužovalo se zvyšujícím se obsahem stříbrných nanočástic [54]. Za cíl si celý kolektiv dal připravit a zlepšit uvolňování léčiva pomocí pH citlivých polymerů. Pro tyto účely použili pH roztoků 2,1 (žaludeční šťáva) a 7,4 (střevní tekutina), do kterých umístili hydrogel se zakomponovaným léčivem. Během určitých časových úseků tak odebírali daný objem uvolňovacího média a množství uvolněného léčiva zkoumali metodou UV-VIS. Zjistili, že poměr uvolňování léčiva se snižuje se zvyšujícím se množstvím PVA ve struktuře, což je způsobeno silnější vazbou hydrofilního PVA [35].

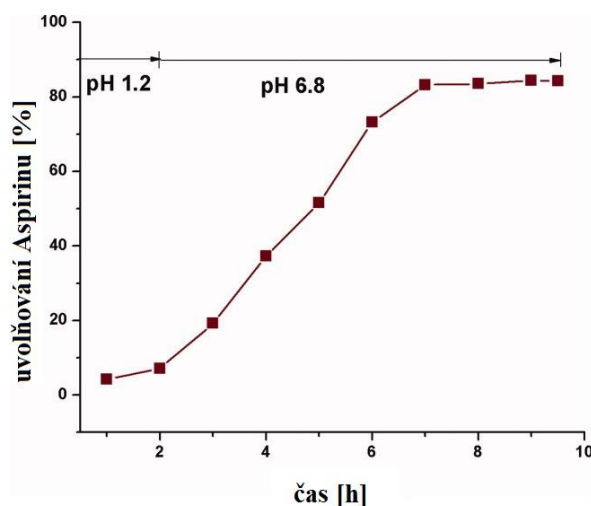
**A. Güngör a kol.** nasyntetizovali hydrogel z PVA a chitosanu. Ve svém výzkumu odhalili, že zvýšená koncentrace PVA zajišťuje větší teplotní a pH citlivost hydrogelu. PVA také přispívá k tvorbě hydrogelů s vyšší hustotou, nižší velikostí pórů, pevnějšími stěnami pórů a snížením volných prostor mezi řetězci, což může vést k menšímu zachycení molekul léčiva. Na tomto systému studovali dodávání léčiva nahrazené modelovým hydrofilním barvivem *Rhodaminem B*. Hydrogel byl ponořen do barviva na 48 hodin a následně byl vložen do pufrů s rozdílným pH. Došli ke zjištění, že dochází k šestinásobně většímu uvolňování obsahu při pH 7,4 ve srovnání s prostředím o pH 4,4 [55].

**H. Wang a kol.** sledovali difúzi léčiva *Nisinu* z hydrogelu tvořeného z PVA a chitosanu. Nisin se uvolňoval ze začátku s vyšším difúzním koeficientem a postupem času došlo z hlediska kinetiky uvolňování ke zpomalení. Tento jev je způsoben lehkou odbouratelností léčiva z povrchu, přičemž část zachycená ve vnitřní struktuře se uvolňovala pomaleji kvůli delší difúzní dráze. Bylo pozoruhodné, že kumulativní procento uvolňování se snižovalo s poklesem poměru chitosanu/PVA. Začlenění chitosanu do PVA matrice zvýšilo hydrofobicitu systému, což vedlo k tomu, že *uvolňování léčiva se přímo úměrně zvyšovalo s přítomností chitosanu*. Nisin se svou amfifilní povahou ukázal lepší afinitu k hydrofilním materiálům [56].

**A. Chhatri a kol.** vyvinuli antibakteriální biomateriál pro hojení ran. Takové materiály musejí udržovat vlhké prostředí, chránit ránu před infekcí, snižovat nekrózu rány a zajišťovat výměnu plynů. Z tohoto důvodu se rozhodli do PVA a chitosanového hydrogelu zakomponovat léčivo *Savlon*, které zaštití antibakteriální aktivitu v ráně. Společně s množstvím přídatku léčiva narůstala i schopnost hydrogelu botnat a uvolňovat léčivý prvek. Připravený hydrogel nejevil známky trombogenní povahy, naopak vykazoval antibakteriální účinky, což bylo pozorováno na bakterii *E. coli* [57].

**S. Y. Kim a kol.** zkoumali chování léčiv prostupujících polymerními sítěmi složenými z PVA a polyakrylové kyseliny (PAA) za účinku elektrického pole. Množství léčiva významně vzrostlo s obsahem ionizovatelných skupin PAA. Obsah zavedeného iontového léčiva (*celazolin*) byl vyšší než množství neiontového léčiva (*teofylin*). Uvolňování iontového léčiva bylo mnohem účinnější než u neiontového. Aplikovaný proud ovlivnil nejen nabitou PAA, ale také přídatek léčiva [58].

**A. Islam a kol.** vytvořili levný enterosolventní povlak citlivý na pH z chitosanu a PVA v poměru 1:5. Do tohoto povlaku zabalili Aspirin a sledovali jeho uvolňování. Botnání hydrogelu bylo nepatrné jak při kyselém, tak i zásaditém prostředí. Naopak při pH neutrální bylo botnání maximální. Test rozpouštění tablety probíhal v simulovaných podmínkách, jak ukazuje – v žaludečních kyselinách (pH 1,2) se uvolnilo 7,11 % Aspirinu po dobu 2 hodin a ve střevní tekutině (pH 6,8) bylo pozorováno trvalé uvolňování Aspirinu (83,25 %) za pomoci HPLC. Pro Aspirin je žádoucí, aby se uvolňoval v prostředí střeva, tudíž byl původní účel splněn [32].

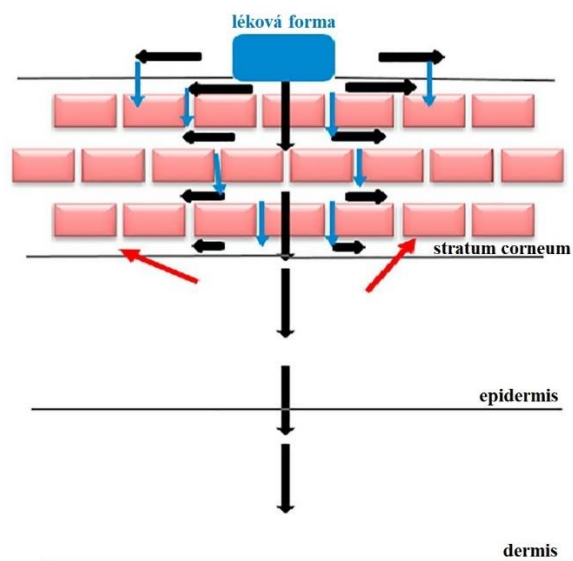


Obrázek 18: Uvolňování Aspirinu z hydrogelu při rozdílných pH [32]

**Y. Li a kol.** přidali léčivo proteinového charakteru do hydrogelu tvořeného z karboxymethyl chitosanu (CMCS) a PVA. Nejvyšší poměr botnání měl hydrogel s poměry 80 % CMCS a 20 % PVA a nejmenší botnání vykazoval při izoelektrickém bodu. V pravidelných rozestupech poté pozorovali uvolňování proteinu do pufovacího roztoku, do kterého hydrogel uložili. Měření probíhalo pomocí UV spektroskopie při 280 nm. Pufovací roztok měl různé hodnoty pH. Nejpomalejší uvolňování bylo za kyselých podmínek, a naopak nejvyšší při bazických podmínkách [59].

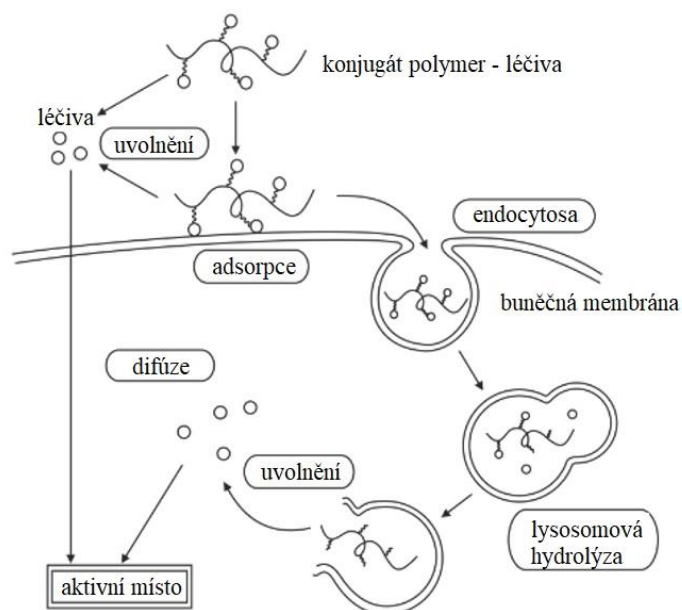
**H. H. Sokker a kol.** na svém systému z PVA, chitosanu, PAA a polyhydroxypropyl methakrylátu srovnávali účinek pH na rychlost uvolňování. Uvolňování léčiva se výrazně zvýšilo společně s pH (od 2 do 9). To může být způsobeno skutečností, že tyto typy hydrogelů botnají v alkalickém prostředí snadněji než v neutrálním. V kyselém pH se uvolnilo jen velmi malé množství díky vodíkové vazbě mezi  $-\text{COOH}$  a  $-\text{OH}$  [60].

**H. X. Nguyen a kol.** udělali z PVA hydrogel pro dermální užití, který měl na povrchu mikro Jehličky naplněné léčivem doxorubicinem. Minimalizovali tak plýtvání léčivem a využili přesné cílení v místě nejpravděpodobnějšího výskytu rakoviny. Uvolňování léčiva měřili mimo jiné i na lidské kůži pomocí Franzových cel. Alikvoty odebírali v 0, 1, 2, 4, 6, 8, 22 a 24 hodin a ty následně měřili na HPLC. Na základě dat dostali informaci o rovnovážném toku, času průchodu propustnosti a stanovili difúzní koeficient [61]. V dalším článku [62] autor potvrdil, že pomocí mikro Jehliček dochází k neúčinnějšímu uvolňování aktivní látky – diklofenaku.



Obrázek 19: Průchod aktivní látky přes stratum corneum

**S. F. Taveira a kol.** zkoumali účinky doxorubicidu v chitosanovém hydrogelu pomocí iontoforézy. Tento experiment je zajímavý, protože používá kladně nabitý chitosan na záporně nabitou kůži, tudíž dochází k vzájemnému vyrušení nábojů. Kladně nabité léčivo může pomocí iontoforézy prostoupit do hlubších vrstev kůže. Tyto výsledky potvrdili pomocí HPLC [63].



Obrázek 20: Proces prostupu léčiva přes kůži [7]

Autoři **E. Dathathri a kol.** [64] a **Y. Zu a kol.** [65] taktéž zkoumali dermální působení hydrogelů. Zaměřili se však na vylepšení mechanických vlastností a z tohoto důvodu použili kombinaci PVA a chitosanu v poměru 6:1. Díky chitosanu došlo k vyšší difúzi a PVA sehrál roli při uvolňování léčiva *diklofenaku* ve větší míře. Celkově se jim podařilo vytvořit pevnější matici pro kontrolované uvolňování aktivních látek. Sledování uvolňování diklofenaku probíhalo ve fosfátovém pufru, který byl poté spektroskopicky analyzován při 276 nm.

## 4 CÍL PRÁCE

Zadané cíle této diplomové práce jsou shrnuty v následujících bodech:

- na základě vybraného tématu diplomové práce sepsat literární rešerši věnující se kompozici hydrogelů s polyvinylalkoholem a dále popsat jejich změny strukturních a mechanických vlastností v závislosti na pH a jak budou ovlivněny vlastnosti transportní
- navrhnout vhodné systémy k cílené modifikaci transportních a mechanických vlastností hydrogelů
- připravit vybraným způsobem hydrogelové systémy, které se vzájemně liší vnitřní hodnotou pH a druhem síťování, a z tohoto důvodu modifikují transportní a mechanické vlastnosti
- definovat rozdíly mezi připravovanými hydrogely za pomoci analytických a fyzikálně-chemických metod s ohledem na transportní a mechanické vlastnosti
- diskutovat naměřené výsledky a vyvozovat logické závěry

## 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 Použité chemikálie

	vzorec	Mr	CAS	dodavatel	šarže
Chitosan	$C_{56}H_{103}N_9O_{39}$	350 KDa	9012-76-4	Sigma Aldrich	419419-50G
Hydroxid sodný	NaOH	40,00	1310-73-2	Lach-Ner, s.r.o.	PP/2013/06111
Kyselina octová	$C_2H_4O_2$	60,05	64-19-7	Lach-Ner, s.r.o.	PP/2019/05927
Polyvinylalkohol	$(C_2H_4O)_x$	130 KDa	9002-89-5	Sigma Aldrich	563900-500G
Epichlorohydrin	$C_3H_6ClO$	92,52	106-89-8	Sigma Aldrich	45340-500ML
Chlorid sodný	NaCl	58,44	7647-14-5	Lach-Ner, s.r.o.	PP/2011/02369
Diklofenak sodný	$C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$		15307-79-6	Sigma Aldrich	D6899-10G

### 5.2 Použité přístroje

Tloušťkoměr	Trevicto
Třepačka	Vibramax 10 Heidolph, Vitrum
pH metr	SevenEasy, Mettler Toledo S20 SE
UV-Lampa	Benda NU-6 KL, 6701000
Reometr	TA Instruments HR 2 Discovery
UV-VIS spektrometr	Hitachi U-3900H, 2J2-0032
Lyofilizátor	VirTis BenchTop K, 4KBTZL-105
Přístroj pro přípravu ultra čisté vody	Elga, Purelab Classic
Sušárna	Memmert UFP 400 double
Analytické váhy	Scaltec SB31
Magnetická míchačka s ohřevem	Heidolph Instruments Hei-Standard
Trhačka	AGS-X I33065435807
Infračervený spektrofotometr	Thermo Scientific Nicolet iS50
Skenovací elektronový mikroskop	Zeiss EVO LS 10
Naprašovací zařízení	Polaron SC 7640
Mikroskop atomárních sil	NanoWizard 4 Bruker
Průtokový regulátor teploty (termostat)	ED-5, Julabo
Vícemístná magnetická míchačka	Thermo SCIENTIFIC i Poly 15
Rentgenový difrakční mikroskop	Empyrean, PANalytical
Franzovy difúzní cely	Permegear, SES GmbH-Analysesysteme

### 5.3 Příprava vzorků

Autor práce Garnica-Palafox [44] navrhl postup zesíťení polyvinylalkoholu a chitosanu pomocí síťovacího činidla epichlorhydrinu. Tento článek byl hlavní inspirací pro syntézu hydrogelových systémů, u kterých dále byly modifikovány strukturální i transportní vlastnosti pomocí změny pH při syntéze. Dle zmíněného postupu byly připraveny chemicky síťované hydrogely, které byly původním autorem použity díky své biokompatibilitě jako náhrada ušní chrupavky u myši. Tyto hybridní hydrogely vykazují dostatečné mechanické, strukturální a biologické vlastnosti pro potenciální použití v aplikacích tkáňového inženýrství.

#### 5.3.1 Chemicky síťované hydrogely

Pro vznik hydrogelů byl připraven vodný roztok 2,5 obj. % chitosanový roztok, který byl připraven rozpuštěním 2,5 g chitosanu v 100 ml 0,4 M kyselině octové mícháním, aby bylo po 24 hodinách docíleno úplného rozpuštění biopolymeru v kyselém prostředí kyseliny octové (1). Druhým roztokem byl 7,8 obj. % PVA rozpuštěním 7,8 g PVA ve 100 ml deionizované vody ve vodní lázni při 80 °C po dobu tří hodin (2). Oba roztoky byly míchány při 500 otáčkách za minutu (RPM) do úplného rozpuštění.

Vzniklé roztoky PVA a chitosanu byly smíchány v poměru 3:4 (15 ml PVA (3) a 20 ml chitosanu (4)) a po dobu tří hodin byly míchány na třepačce (800 RPM) při laboratorní teplotě (5). Poté byl do polymerní směsi přidán 1 ml regulátoru pH odpovídající koncentrace (2 M / 1 M / 0,5 M NaOH; 0,15 M NaCl nebo bez přísady) a 0,9 ml síťovacího činidla – epichlorhydrinu (což odpovídá 0,25 obj. % směsi) (6). Tato směs byla míchána ve vodní lázni po dobu jedné hodiny při 40 ± 2 °C v atmosféře dusíku (7). Následně bylo 15 g polymerní směsi nalito na dvě plastové Petriho misky o průměru 10 cm. V závěru byly hydrogely vysušeny při 37 °C po dobu 72 hodin do tenkých xerogelů.

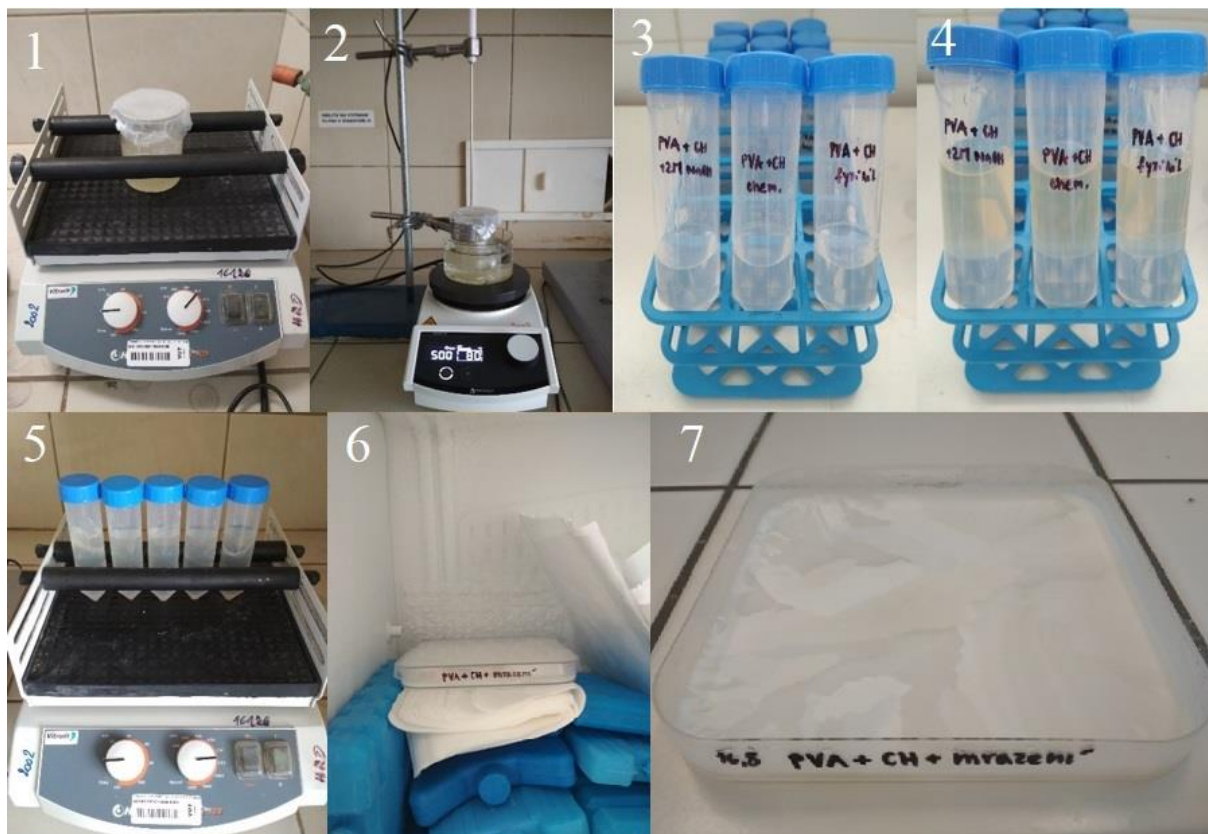


Obrázek 21: Pracovní postup u chemicky síťovaných hydrogelů

### 5.3.2 Fyzikálně síťované hydrogely

Abychom si ověřili, zda lze strukturní a transportní vlastnosti hydrogelů modifikovat nejenom změnou fyzikálně-chemických podmínek (pH a iontová síla) při chemickém síťování (viz kapitola 5.3.1), ale také odlišným typem síťování, bylo přistoupeno k přípravě PVA/chitosan hydrogelů pomocí opakovaného mražení a rozmrazování polymerní směsi PVA/chitosan. Tento typ přípravy sebou přináší několik výhod, a to konkrétně proto, že lze připravit hydrogely různých vlastností a hlavně, že se zbavíme chemického síťovacího činidla.

Objemy 20 ml chitosanového (1) a 15 ml PVA (2) roztoku byly míchány v poměru 4:3 (3-4) při 800 otáčkách za minutu po dobu 3 hodin za laboratorní teploty (5). Pečlivě promíchaná směs byla nalita na plastové Petriho misky tak, aby se vytvořila souvislá vrstva. Toto množství odpovídá 15 g na Petriho misku o průměru 10 cm. Takto připravené vzorky byly ponechány v mrazničce po dobu 24 hodin (6) a ve třech cyklech byly rozmrazeny (7) a opět po dobu jednoho dne zamrazeny. Názorný postup je ukázán na obrázku 22.



Obrázek 22: Pracovní postup u fyzikálně síťovaných hydrogelů

### 5.3.3 Hydrogely s přídavkem diklofenaku

Pro studium transportních vlastností hydrogelů byly připraveny vzorky s modelovým léčivem. Zvolené léčivo diklofenak bylo přimícháno do vzorků tak, aby celková koncentrace léčiva činila 150 mg/l. Navážka 0,0055 g diklofenaku byla zakomponována do 20 ml roztoku PVA. Dle výše zmíněného postupu byly připraveny xerogely chemicky síťované s přídavkem 2M NaOH, bez přídavku a také fyzikálně síťované opět bez přídavku regulátoru vnitřního pH.

## 5.4 Charakterizace strukturních a fyzikálních vlastností

### 5.4.1 pH

Základním rysem celé práce je vliv modifikace hydrogelů na jejich strukturní, viskoelastické a transportní vlastnosti. Jako hlavní vliv modifikace byla vybrána změna pH. Tato změna byla realizována při přípravě vzorků (viz kapitola 5.3.1), které obsahují různě koncentrovaný regulátor pH, vždy na bázi hydroxidu sodného, případně regulátor iontové síly na bázi chloridu sodného, který pH mění, jako je vidět v následující tabulce 1. Hodnota pH byla zaznamenána pomocí měřicího zařízení před vysušením hydrogelu a odpovídá řádku v tabulce pH hydrogelu.

Tabulka 1: Vliv různě koncentrovaných přísadků hydroxidu sodného na pH systému a přísadku chloridu sodného jakožto regulátoru iontové síly

faktory ovlivňující pH						
síťování	chemicky					fyzikálně
přísadky	2M NaOH	1M NaOH	0,5M NaOH	bez	0,15M NaCl	bez
pH hydrogelu	4,80	4,61	4,45	4,35	4,21	4,30

### 5.4.2 Botnání

Získané PVA – chitosanové hydrogely byly vysušeny do tenkých xerogelů při 37 °C. Za účelem měření a sledování botnání byly xerogely rozřezány na kousky odpovídající potenciálním aplikacím hydrogelu při krytí ran. Při pozorování změny délky / tloušťky a hmotnosti byly použity rozměry 2 x 2 cm. Za suchého stavu ( $T_0$ ) byla změřena délka / tloušťka nebo hmotnost xerogelů. Vysušené vzorky byly namáčeny v deionizované vodě a v 5sekundových časových intervalech opět měřena tloušťka / délka případně hmotnost do ustáleného stavu (rovnováhy) po dobu 180 sekund, kdy byly rozměry vzorků finálně změřeny a zaznamenány ( $T_{180}$ ). Všechna měření byla opakována 5krát. Výsledky z této charakterizace jsou sumarizovány v kapitolách 6.1.2 a 6.1.3. Z naměřených hodnot byl stanoven přírůstek délky / tloušťky nebo hmotnosti dle následující rovnice (1):

$$\text{přírůstek [\%]} = \frac{(T_{180} - T_0)}{T_0} \cdot 100 \quad (1)$$

Hmotnostní příjem vody hydrogelovými vzorky (botnání) byl měřen pomocí několika metod. Nejvíce se osvědčilo položení xerogelů na sítko s většími póry. Po namočení bylo sítko i s hydrogelem vytaženo, okapáno a okraje s přebytečnými kapkami vody byly osušeny. Testovány byly i jiné možnosti stanovení botnání xerogelů, jako například botnání v kyvetách, aj. Tyto metody se ovšem neosvědčily, proto byl charakter botnání xerogelů stanovován dle výše uvedeného postupu.

### 5.4.3 Pevnost v tahu

Pro finální aplikace, ať už hydrogelů nebo samotných xerogelů, je nutná především jejich mechanická pevnost a odolnost. Proto byla jako jedna z charakterizačních metod použita i metoda stanovení maximální pevnosti v tahu. Maximální pevnost v tahu a tažnost při maximální síle xerogelu byla provedena pomocí trhačky AGS-X. Xerogely byly nařezány na velikost 2,5 x 10 cm a takto byly upevněny do čelistí, které od sebe byly vzdáleny 2,5 cm. Analýza byla prováděna při rychlosti natahování 100 mm/min. Pro měření chemicky síťovaných vzorků byl použit 100 N snímač, který byl nedostačující pro vzorky fyzikálně síťované a s přídavkem 0,15 M NaCl. Pro tyto materiály byl použit snímač 500 N.

### 5.4.4 Stanovení viskoelastických vlastností

Důležitým parametrem z hlediska aplikačního a transportního je nejenom informace o tažnosti xerogelů, ale také informace o mechanických (viskoelastických) vlastnostech nabotnaných hydrogelů. Vzhledem k tomu, že změnou viskoelastických vlastností lze modulovat i kinetiku uvolňování aktivních látek (transportní vlastnosti), bylo nutné stanovit tyto viskoelastické vlastnosti pomocí vhodného prostředí – reometru.

Hodnoty míry deformace hydrogelů byly zjištěny z amplitudových testů měřených na reometru TA Instruments HR 2 Discovery. Xerogely byly hydratovány po dobu 24 hodin do úplného nabotnání. Z celku byl vyříznut požadovaný rozměr odpovídající ploše deskových senzorů s horní ocelovou geometrií 20 mm s definovaně zdrsňelým povrchem a odpovídající spodní (stacionární) vyhřívanou Peltierovou deskou s definovaně zdrsňelým povrchem komplementárním k horní pohyblivé desce, která byla nastavena na 37 °C. Tato teplota byla vybrána pro simulaci prostředí lidského těla. Jelikož jde o velice tenké vzorky, které botnají více do stran než do šířky, byla měřicí štěrbinou 250 μm. Viskoelastické vlastnosti nabotnaných hydrogelů byly porovnávány pomocí oscilačních testů, konkrétně se jednalo o amplitudový test s konstantní hodnotou frekvence oscilací. Frekvence oscilace byla nastavena na hodnotu 1 Hz a čas relaxace před začátkem měření byl stanoven na 120 s. I v tomto relaxačním kroku byl vzorek zároveň temperován na požadovanou teplotu 37 °C. Amplitudové testy byly prováděny v nastavení s kontrolovanou mírou deformace tzv. *strain sweep* v rozmezí hodnot se vzestupnou tendencí od 0,01 do 1000 %. Pro ověření reprodukovatelnosti dat byly testy prováděny vždy minimálně ve dvojím opakování s nově nadávkovaným vzorkem. Výsledky z těchto měření jsou uvedeny v kapitole 6.1.5.

### 5.4.5 Rentgenová difrakční analýza

Rentgenová difrakční analýza neboli anglicky *X-Ray Diffraction* (XRD) je metoda sloužící k určení struktury krystalických látek. Za použití monochromatického svazku rentgenového záření jsou ozařovány krystaly a vzniká tak difrakční obraz. Dopadající (primární) záření se elasticky rozptýluje na elektronech měřeného krystalu a vzniká difraktované (sekundární) záření. Tato metoda byla zvolena z důvodu zkoumání potenciální krystalinity materiálu. Při zkoumání rozdílů mezi chemicky a fyzikálně síťovanými hydrogely je důležité vědět, jaké vazby vznikají a zda vzniká nějaká pravidelnost ve vaznosti. Tato metoda nám napomáhá nahlédnout do struktury hydrogelu, zda zde dochází k mikroskopickým krystalickým oblastem, které dodávají řetězci struktuře pravidelnost.

Pro účely tohoto měření byly vyříznuty xerogely o tvaru kolečka s průměrem 3 cm. Tyto xerogely byly umístěny do přístroje a měřena od 4,50 do 89,99 °2 $\theta$  po krocích o velikosti 0,01 °2 $\theta$ , tak, že výsledný počet kroků byl 6512.

### 5.4.6 Infračervená a Ramanova spektrofotometrie

Zmíněné spektrofotometrie jsou velice účinné metody pro pochopení vznikajících vazeb. V případě studovaného materiálu je žádoucí detekovat, jakým stylem se při různých změnách pH hydrogely síťují, a to hlavně v případě chemického síťovačla. Vzájemná provázanost je klíčovým faktem, který ovlivňuje botnání, viskoelastické vlastnosti, ale i pórovitost.

Molekulárně-spektroskopická analýza vzorků (se zkratkou FTIR) byla realizována na spektrometru Nicolet iS50 a to za použití technik ATR FTIR (úplný zeslabený odraz) a FT-RAMAN. ATR analýza byla provedena s využitím jednodrazového diamantového ATR nástavce s parametry měření: 32 skenů, rozlišení 4. ATR spektra byla měřena na 5 nezávislých místech vzorku. PCA analýza byla provedena na SW naprogramovaného a laskavě poskytnutého pracovníky ÚPT AV ČR. Ramanská spektra vzorků byla získána s využitím FT-RAMAN modulu ke spektrometru s excitačním laserem o vlnové délce 1064 nm (výkon 0,5 mW). Parametry FT-RAMAN analýzy: 1024 skenů, rozlišení 4.

### 5.4.7 Mikroskopie atomárních sil

Touto metodou je získán snímek povrchu vzorku, který poskytuje informaci o mechanických a strukturních vlastnostech xerogelů. Tato metoda byla vybrána z toho důvodu, že nám spolehlivě poskytne údaje o velikosti pórů a také podá informaci o struktuře povrchu hydrogelů, což dopomůže k osvětlení botnavého chování, které je s velikostí pórů úzce spojeno.

Pro měření byl použit přístroj NanoWizard 4 (JPK Instruments) s nosníkem (kantileverem) TESPA-V2 (délka 123  $\mu\text{m}$ , šířka 40  $\mu\text{m}$ , konstanta kantileveru 7 N/m, frekvence 320 kHz). Pro naše účely měření byl nastaven režim QI<sup>TM</sup> mode pro kvantitativní zobrazování, ve kterém se lze měřit mimo 3D struktury i adhezní vlastnosti a tuhost. Pro fixaci vzorku k podložnímu sklíčku byla použita oboustranná lepicí páska (vlnitý povrch xerogelu znehodnocoval měření) a takto připravený preparát byl umístěn do svorek, aby nedošlo k posunu. Pohyb kantileveru ve vertikální ose byl nastaven na 150 nm, Rychlost skenování byla nastavena na 62,5  $\mu\text{m/s}$  a pixelové rozlišení na 6,0 ms. Hodnota přitlačné síly byla ponechána na základě automatické kalibrace kantileveru.

#### 5.4.8 Skenovací elektronová mikroskopie

K vyobrazení strukturních vlastností byla použita skenovací elektronová mikroskopie jako nástroj zobrazení morfologie xerogelů. Pro tuto metodu bylo třeba xerogely rehydratovat a zmrazit za použití tekutého dusíku. Metoda mrazení dusíkem a následná lyofilizace byla oproti sušení v proudové sušárně pro přípravu vzorků šetrnější. Struktura hydrogelu se sušením v sušárně doslova potrhá, což je způsobeno unikající vodou, která se dere ven vlivem teploty, a dochází tak k borcení struktury. U lyofilizace, kde je vzorek skokově zmrazen za velmi nízkého tlaku, zůstává struktura hydrogelu zachována. Tento postup je šetrnější vůči vzorku díky fázovému přechodu vody, který je jiný než u odpařování. Takto připravené vzorky byly vloženy po dobu 3 dní v lyofilizátoru. Před samotným měřením byly vzorky pokoveny zlatem ve vakuovém naprašovacím zařízení Polaron a poté byly pozorovány elektronovým mikroskopem v módu sekundárních elektronů s urychlovacím napětím 5 kV. Šířka dopadů elektronů byla nastavena na 60 pA a pracovní vzdálenost na kolem 10 mm. Každý ze vzorků byl proměřen ve třech různých přiblíženích na průřezu a na povrchu.

#### 5.4.9 Stanovení měrného povrchu

Pro doplnění informací o pórovitosti byla navržena zkouška stanovení měrného povrchu (BET). Výsledky této metody jsou pro porovnání s informacemi z mikroskopie atomárních sil a také skenovací elektronové mikroskopie, které mimo informace o pórovitosti ukazují strukturu studovaných materiálů.

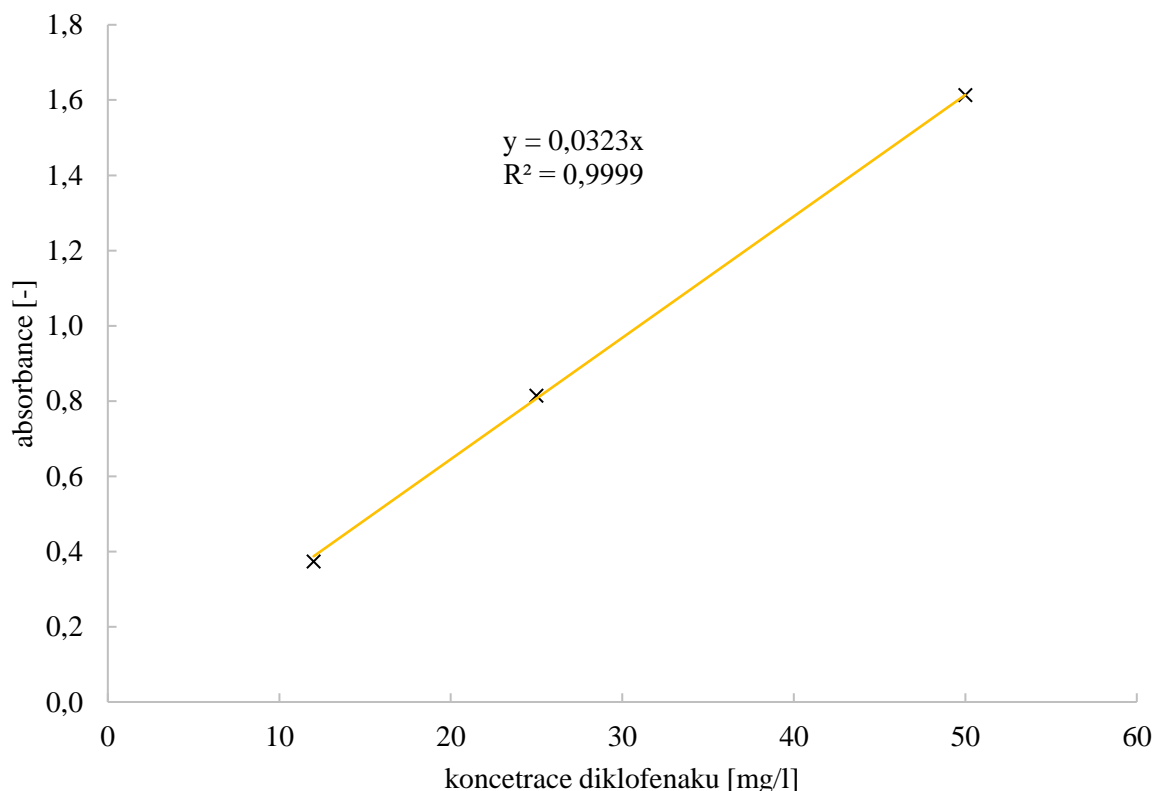
Ke stanovení specifického povrchu byl použit vysokorychlostní analyzátor sorpce plynu NOVA 2200e (Quantachrome Instruments). Vzorky byly naváženy do měřicí cely. Hmotnost se řádově pohybovala okolo 0,1 g. Měřicí cela byla umístěna do odplyňovací komory, kde byl odplyňovací proces prováděn při 40 °C po dobu 20 hodin. Po ochlazení byly vzorky umístěny do měřicí komory. Parametry měření byly nastaveny následovně: termální zpoždění – 900 s, tolerance tlaku – 0,1 mmHg, doba na uvedení do rovnováhy – 20 s a překročení časového limitu na uvedení do rovnováhy – 60 s. Adsorpční a desorpční izotermy byly měřeny v prostředí kapalného dusíku (při teplotě 77 K) od 0,05 do 0,95 relativního tlaku  $P/P_0$ . Získaná data byla zpracována softwarem NovaWin a měrný povrch byl vypočítán metodou vícebodové BET metody.

## 5.5 Charakterizace transportních vlastností

Uvolňování modelového léčiva – diklofenaku z připravených hydrogelů (viz kapitola 5.3.3) bylo experimentálně realizováno pomocí difúzních experimentů. Pro tento účel byly využity difúzní cely ve vertikálním uspořádání, tzv. Franzovy cely a také uvolňovací experimenty v deionizované vodě při laboratorní teplotě a teplotě 37 °C pro vzájemné porovnání.

Z šesti různě síťovaných hydrogelů, jejichž příprava byla zmíněna v kapitole 5.3, byly vybrány 2 nejvíce odlišné chemicky síťované vzorky, a to s přídavkem 2M NaOH a také bez přídavku regulátoru vnitřního pH. Jako třetí typ vzorku podrobený dalším analýzám z hlediska transportních vlastností byl vybrán fyzikálně síťovaný hydrogel bez přídavku regulátoru vnitřního pH, aby bylo možné porovnávat uvolňovací schopnosti fyzikálních a chemických hydrogelů. Do těchto druhů hydrogelů bylo zabudována koncentrace 150 mg/l diklofenaku a v závislosti na strukturních vlastnostech bylo pozorováno různé uvolňování této modelové aktivní substance.

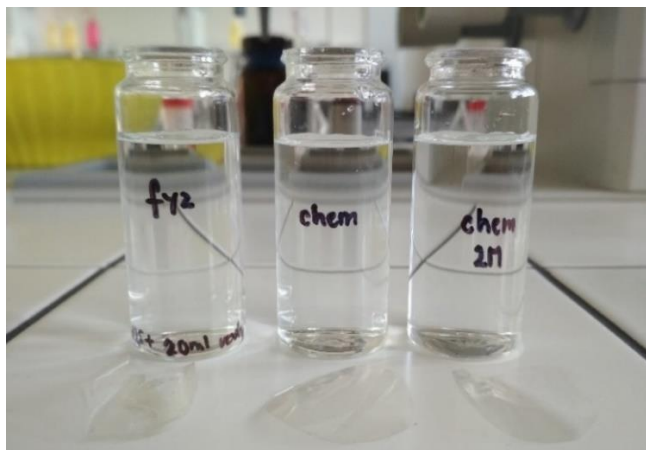
Každých 24 hodin po dobu 4 týdnů byly prováděny odběry roztoku, do kterého procházel diklofenak z již zmíněných hydrogelů. Časový průstup léčiva bych detekován pomocí UV-VIS při vlnové délce 280 nm, jakožto absorpčního maxima. Naměřená absorbance poté byla přepočtena na koncentraci pomocí kalibrační křivky, která vznikla z koncentrační řady 12, 25 a 50 mg/l roztoku Diklofenaku. Lineární závislost a zobrazení rovnice přímky ve tvaru  $y = kx + q$  s nulovým posunutím ( $q = 0$ ) je na obrázku 23.



Obrázek 23: Kalibrační křivka pro diklofenak

### 5.5.1 Uvolňování léčiva

Za účelem sledování kinetiky bezprostředního uvolňování aktivní farmaceutické substance byly realizovány následující experimenty. Šest vialek bylo naplněno 20 ml vody a magnetickým míchadélkem. Pro studium uvolňování byly nastříhány 3 různé xerogely ve tvaru kruhu (2M NaOH, bez chemicky a bez fyzikálně s diklofenakem viz kapitola 5.3.3) po dvou sériích a vloženy po jedné do připravených vialek s vodou jako to ukazuje obrázek 24.



Obrázek 24: Experiment s uvolňováním diklofenaku z xerogelu do vody

Rozměry a hmotnosti nastříhaných xerogelů s léčivem jsou zmíněny v tabulce 2 a pro porovnání byly do grafů převedeny na jednotkovou hmotnost. Půlka ze zmíněných vialek byla vložena do vodní lázně a každý roztok s hydrogelem byl míchán při 250 RPM a temperován na 37 °C, aby simuloval prostředí lidského těla a dal se poté porovnat s Franzovými celami. Druhá polovina byla udržována při laboratorní teplotě a také míchána při 250 RPM.

Tabulka 2: Velikosti a hmotnosti xerogelů v suchém stavu před vložením do vialky s vodou

teplota	laboratorní			37 °C		
sítování	chemicky		fyzikálně	chemicky		fyzikálně
přídavky	2M NaOH	bez	bez	2M NaOH	bez	bez
průměr [cm]	2,5	2,5	2,5	1,6	1,2	1,4
hmotnost [mg]	18,8	17,1	30,4	12,0	8,2	17,0

#### Odběr vzorku pro měření

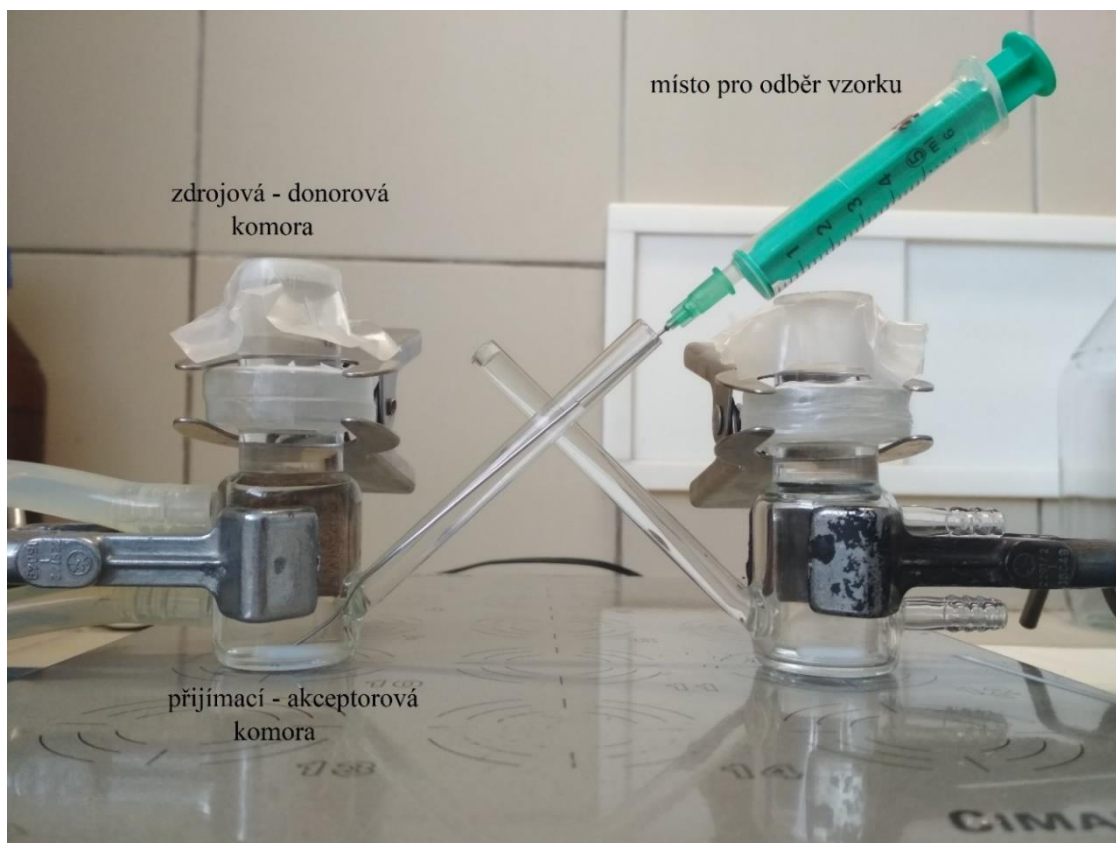
V rozmezí 4 týdnů byla v intervalu 24 hodin zjišťována koncentrace diklofenaku pomocí UV-VIS spektrometru. Pokaždé došlo k odlití 3 ml roztoku z vialky, kde probíhalo uvolňování léčiva z již nabotnaného hydrogelu. Pro měření absorbance byla využita křemenná kyveta, protože diklofenak má své absorpční maximum při vlnové délce 280 nm. Objem celého vzorku byl po změření navrácen zpět do původní vialky, aby byla zachována původní koncentrace a objem.

### 5.5.2 Franzovy cely

Franzovy cely byly použity pro studium transportu aktivní látky (diklofenaku) přes membrány simulující lidskou kůži (StratM®). Tyto membrány nahrazují lidskou kůži a slouží jako přirozená bariéra při pozorování transportu léčiva ze zdroje (hydrogelu / roztoku léčiva) do akceptorové tkáně. Díky tomuto pozorování máme možnost porovnávat prosté uvolňování léčiva v rozpouštědle s průchodem léčiva přes membránu.

#### *Sestavení aparatury Franzových cel*

Difúzní aparatury se skládají z několika částí. Jak je vidět na *obrázku 25* jsou zde 2 komory – vrchní tzv. zdrojová (donorová) a spodní přijímací neboli akceptorová. Objem přijímací komory byl u všech tří používaných aparatur proměřen na 20 ml a tento objem byl doplněn deionizovanou vodou a malým magnetickým míchadélkem (1). Styčné plochy obou komor byly namazány inertní silikonovou pastou na zábrusy Lukosanem (2-3), což zajišťovalo dokonalé těsnění a neschopnost vody difundovat mezi celami jinak než přes membránu. Na takto připravenou přijímací komoru byla umístěna lesklou stranou nahoru membrána StratM® simulující lidskou kůži (4).



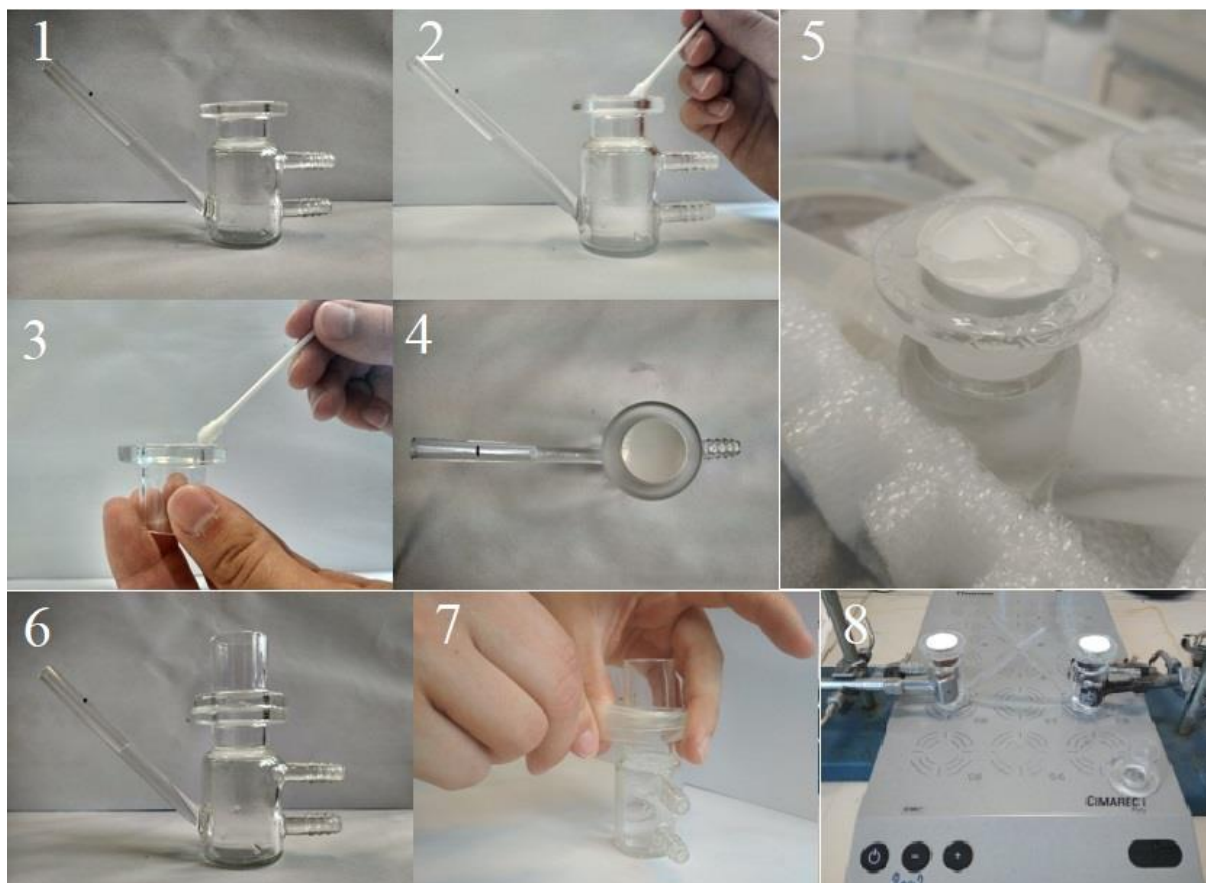
*Obrázek 25: Sestavené Franzovy cely a odběr vzorku*

V tomto kroku se liší postup přípravy v závislosti na tom, z jakého média byl pozorován vstup léčiva. V případě xerogelů s léčivem byl vždy ustřižnut požadovaný kousek xerogelu (tvaru kruhu) a přímo na StratM® membráně botnán do rozměrů StratM® membrány (2,5 cm) (5). Tyto velikosti byly vypočítány na základě znalostí botnání do délky z *kapitoly 6.1.2*. Konkrétní průměry a hmotnosti jsou zmíněny v *tabulce 2*. V závěru došlo k propojení obou komor přiložením natřených styčných částí k sobě (6).

Tabulka 3: Velikosti a hmotnosti xerogelů v suchém stavu před umístěním na StratM<sup>®</sup> membránu

druh xerogelu	chemicky + 2M NaOH	chemicky – bez	fyzikálně – bez
průměr [cm]	1,6	1,2	1,4
hmotnost [mg]	12,0	8,0	14,3

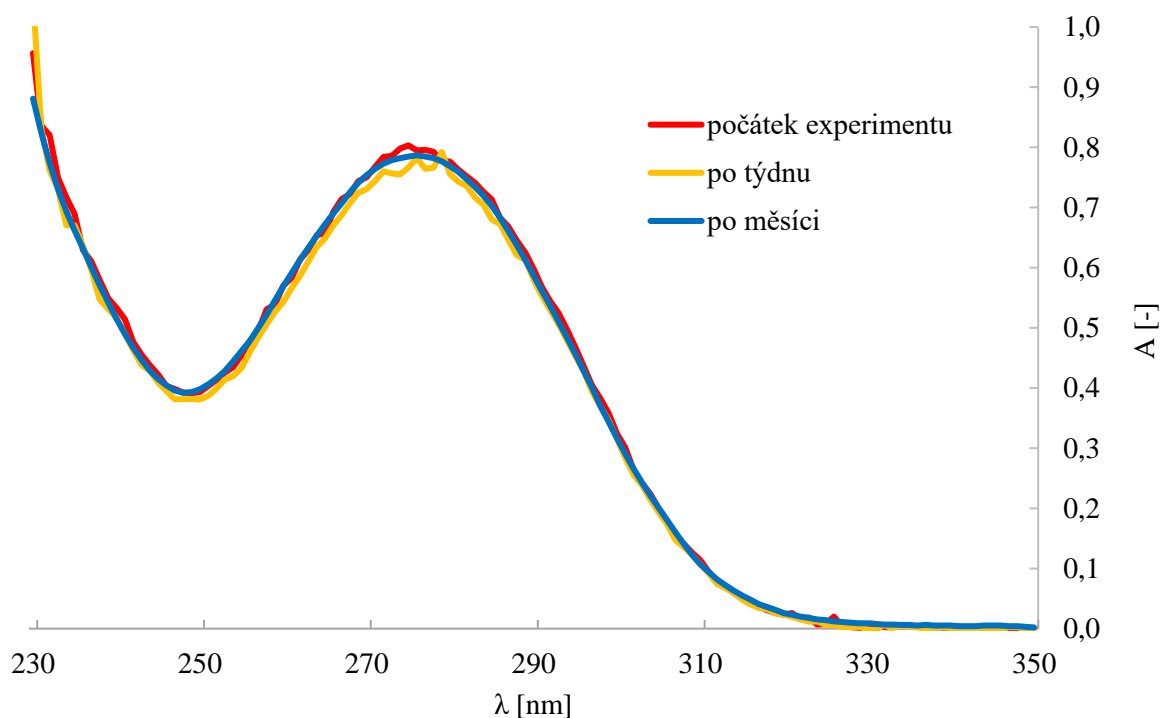
V případě prostupu vodného roztoku diklofenaku byly prvotně obě komory sestaveny styčnými, namazanými částmi k sobě a poté bylo do donorové komory nalito 5 ml 150 mg/l roztoku diklofenaku. Pro zajištění dokonalého těsnění byly okraje styčných částí oblepeny parafilmem (7), který byl aplikován i na vrchní část donorové komory a na odebírací trubičku, což zabraňovalo odpařování roztoků a vysušování hydrogelů. Pro vytvoření vhodných podmínek simulujících lidskou kůži byl vnější plášť aparatury temperován za pomoci termoregulátoru na 37 °C. Současně byla připravena i aparatura bez termoregulátoru za laboratorní teploty za účelem porovnání rychlosti prostupu léčiva z roztoku diklofenaku v závislosti na teplotě (8). Připravené aparatury byly umístěny na míchačku, uchyceny do laboratorních stojanů svorkami. Rychlost míchání byla nastavena na hodnotu 250 RPM.



Obrázek 26: Příprava Franzových cel pro transportní experimenty

## Membrána StratM<sup>®</sup>

Prvotním experimentem před samotnými transportními experimenty ve Franzových celách bylo zjištění, zda membrána neabsorbuje dané léčivo a nedocházelo by tak ke zkreslenému průběhu. Pro tyto potřeby byla membrána umístěna do roztoku 150 mg/l roztoku diklofenaku a v časových intervalech po týdnu a měsíci byla zaznamenána absorbance roztoku. Před každým měřením byla třeba 150 mg/l roztok naředit na 50 mg/l, aby byla absorbance v rámci měřitelnosti přístroje.



Obrázek 27: Míra ovlivnění absorbance roztoku 50mg/l vloženou membránou StratM<sup>®</sup>

Při pohledu na obrázek 27 není detekovatelný markantní rozdíl mezi měřenými hodnotami. Drobné nuance lze vysvětlit provedeným ředěním. Můžeme tak předpokládat, že k ukládání léčiva v membránách nedochází, a tedy neovlivňuje negativním způsobem výsledky měření. Stanovené koncentrace difundujícího diklofenaku jsou skutečné koncentrace, které propenetrovaly skrz membránu, a ne záchyt léčiva v membráně.

### Odběr vzorku pro měření

Nápadnou částí Franzových cel je trubička vycházející ze spodní části přijímací cely (jak ukazuje obrázek 25). Právě tímto otvorem byl odebírán injekční stříkačkou s dlouhou jehlou objem 3 ml roztoku, každých 24 hodin po dobu až 4 týdnů. Odebraný objem byl kvantitativně převeden do křemenné kyvety a měřen spektrofotometricky. Při vlnové délce 280 nm byla odečtena hodnota absorbance v programu MS Excel. Za účelem udržení konstantního objemu v cele byl celý objem navrácen nazpět injekční stříkačkou.

## 6 DISKUZE A VÝSLEDKY

### 6.1 Strukturní a fyzikální vlastnosti

Hlavním cílem této diplomové práce bylo navrhnout a připravit hydrogely s modifikovanými strukturními a transportními vlastnostmi. Pro tyto účely byly zvoleny na základě studia literatury (*kapitola 4.1*) polymery biokompatibilní, a to chitosan a polyvinylalkohol, které jsou vhodné pro přípravu hydrogelů pro biomedicínské aplikace a také vykazují rozdílná chování při změně pH (viz *kapitola 4.2*). Právě změna pH je hlavním faktorem, který modifikuje připravované hydrogely a jejich strukturní a transportní vlastnosti. Cílená modifikace hydrogelů je navíc doplněna o porovnání chemického [44] a fyzikálního [12][41] síťování, které bylo v rámci experimentální práce provedeno a popsáno (*kapitola 5.3*).

Celkový postup přípravy hydrogelů je důležitým faktorem, který udává konečné vlastnosti materiálu. Při bližším zkoumání a charakterizaci připravených materiálů můžeme vnímat markantní rozdíly při nikterak závratných změnách pH, které jsou uvedeny v *tabulce 1*. Cílená modifikace může být žádaná obzvláště pak v medicínských aplikacích, kdy konkrétní materiál musí vykazovat přesné vlastnosti, které jsme schopni vhodnou přípravou ovlivnit. Tyto rozdílné strukturní a fyzikální vlastnosti se promítnou i do vlastností transportních, což je žádoucí z hlediska ovlivnění kinetiky distribuce aktivních látek.

#### 6.1.1 Vizuální zhodnocení

Změna strukturních i fyzikálních vlastností při změně pH je patrná již na pohled. Vysušené xerogely s různými přídávky NaOH a NaCl, coby regulátoru iontové síly, změnily svou strukturu, vzhled a celkový dojem z vytvořeného xerogelu. Jejich změna je znatelná jak na dotyk, vzhled, tak při osvětlení UV lampou při vlnových délkách 254 a 365 nm (viz *obrázek 28*), a to následovně:

**2M NaOH** – xerogel je zkroucený a nejužší ze všech, při osvětlení UV lampou se objeví velké množství malinkých zjasněných teček.

**1M NaOH** – materiál se mírně kroutí a na pohmat je tuhý, ozářením lze detekovat desítku teček na xerogelu velikosti 2 x 2 cm.

**0,5M NaOH** – xerogel je rovný, pružný a při osvětlení lze pozorovat pár fluoreskujících teček.

**bez chemicky** – velice podobný xerogelu s přídávkem 0,5M NaOH, akorát se jeví poddajnější a měkčí. Při osvětlení nejeví téměř žádné zjasnění.

**0,15M NaCl** – mléčně zbarvený xerogel, který je měkký a poddajný. Při osvětlení není zjevné jakékoliv světélkování kromě bublin zvýrazněných světlem.

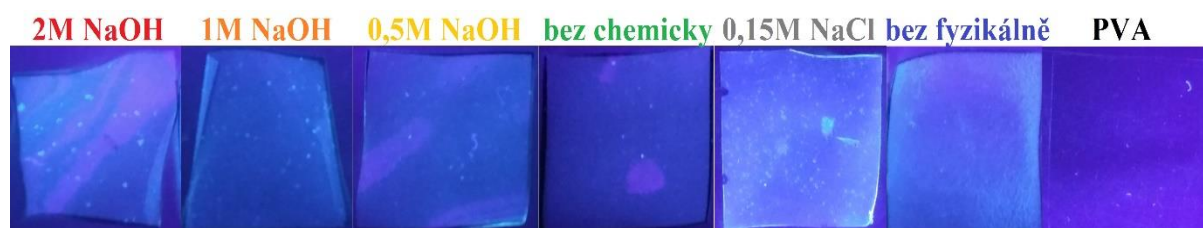
**bez fyzikálně** – velice tuhý, hrubý xerogel mléčného zbarvení, bez žádné známky zjasnění.

**PVA** – naprosto průhledný, pružný xerogel bez zjasnění (pouze malinké nečistoty).

Ukazuje se zde trend, kdy se zvyšujícím se pH (tedy přídávkem NaOH) je xerogel rigidnější a více se kroutí. Pohmatem se materiál zdá pevnější, čím vyšší koncentrace NaOH byla přidána a lze tak usuzovat, že při vyšších koncentracích hydroxidu dochází k lepšímu síťování. V porovnání chemického a fyzikálního síťování jsou vidět jasné změny v barvě, která se

u fyzikálního síťování zdá zakalenější. Díky fotce čistého PVA můžeme usuzovat, že za mléčné zbarvení je zodpovědný chitosan, který se vyskytuje ve všech ostatních vzorcích. Již na *obrázku 21* je vidět rozdílná změna zbarvení roztoku chitosanu v porovnání s průhledným roztokem PVA.

Zajímavostí zde je výskyt fluoreskujících teček, jejichž počet se zvyšuje se zvyšujícím se pH. Výskyt takovýchto teček připadá pouze na xerogely, které jsou chemicky síťovány, a obsahují tak epichlorhydrin. V publikacích [66] a [67] popisují nejlepší síťování epichlorhydrinu při vyšších hodnotách pH. Dalším z faktorů výskytu těchto teček může být fakt, že se zvyšujícím se pH se snižuje rozpustnost chitosanu, což by mohlo naznačovalo, že fluoreskující místa jsou lokálně nerozpuštěný chitosan.

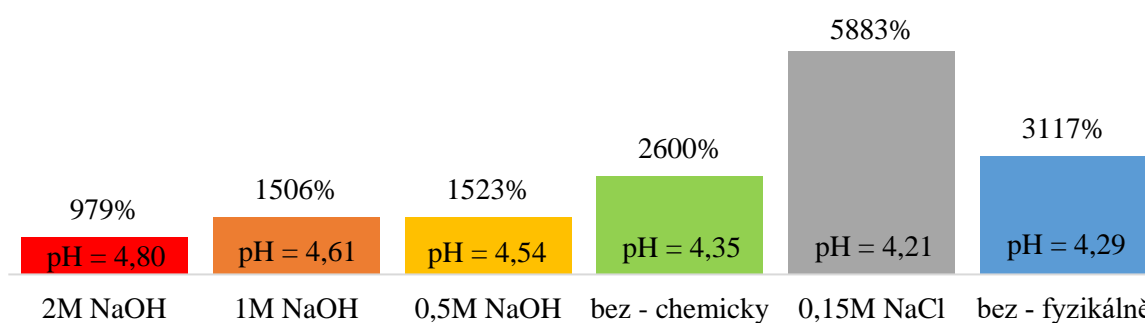


Obrázek 28: Vysušené xerogely po osvětlení UV lampou při vlnových délkách 254 nm a 366 nm

### 6.1.2 Stanovení botnavého chování

Botnací kapacita se může jevit jako jedna z nejjednodušších zkoušek, avšak poskytuje velice cenné poznatky, které vysvětlují chování zkoumaného materiálu u dalších metod. Především si těchto informací ceníme, protože dokážou osvětlit transportní vlastnosti, což je spojené s množstvím pohlceného disperzního prostředí.

Po třech minutách od počátku botnání došly všechny materiály (kromě fyzikálně síťovaného) do maximální hodnoty absorpce vody. Kinetika botnání fyzikálně síťovaného xerogelu byla mírně pomalejší, a proto byly finální hodnoty zaznamenány po hodině botnání všech systémů, kdy se jevíly hodnoty pro všechny hydrogely neměnné, případně byly rozdíly hmotnosti v čase zanedbatelné. Měření botnání bylo provedeno pětkrát a výsledné hodnoty byly zaznamenány do grafu na *obrázku 29*.



Obrázek 29: Poměr nabotnění suchých xerogelů do maximálního stavu po době 24 hodin

Jak *obrázek 29* ukazuje, projevuje se zde trend botnání úměrný k různě koncentrovaným přísadkům NaOH. Čím nižší hodnota pH byla u xerogelu naměřena (viz *tabulka 1*), tím větší množství vody byl materiál schopen pohltit. Hraje zde roli několik faktorů. Prvním z nich je zmíněné pH, které ovlivňuje stupeň disociace chitosanových skupin, které jsou schopny vázat

vodu. V kyselém prostředí se amidové skupiny  $-NH_2$  protonizují za přítomnosti  $H^+$  na  $-NH_3^+$  a získávají tak kladné náboje, které se vzájemně odpuzují. Dávají tak možnost většímu prostupu vody a tím i celkovému botnání, jako je více popsáno v kapitole 2.2.3.

Dalším z důvodů vysvětlující takovéto chování je míra zesítnění. Čím je lepší zesítnění materiálu, tím dochází ke zhoršení rozpustnosti, díky tvorbě uzlů, které síťováním vznikají. Čím hustější je zesítnění, tím obtížněji vnikají do polymeru nízkomolekulární látky jako je například disperzní prostředí – voda. V důsledku toho klesá botnavost. Pro porovnání nám může sloužit příklad chemického a fyzikálního síťování bez jakékoliv vnitřní změny pH hydrogelu. Oba materiály pobírají obdobné množství vody, avšak v případě hydrogelu vzniklého fyzikálním síťováním po hodině botnání vykazuje vyšší hodnoty stupně nabotnání. Vysvětlení můžeme hledat v síle vazby, která vzniká. Jak je popsáno v kapitole 2.1.3 síťování, fyzikální síťování je reverzibilní a uzly, které vznikají, mohou stejně tak i zanikat v rámci nekovalentních vazeb. Také to může být důvodem, proč fyzikálně zesítněný hydrogel botná pomaleji.

Již samotný *vzhled* napovídá o výsledcích botnání. Ty xerogely, které se zdály na pohmat rigidnější a kompaktnější, ve výsledku neabsorbovaly tolik vody jako xerogely poddajnější a měkčí. Je to dáno kombinací předchozích dvou faktorů, a to vlivem pH a síťováním. V důsledku různého pH prostředí jsou polymery schopné rozdílně síťovat a vytvářet tak větší množství uzlů, které brání průchodu vody do systému. Ve vyšších hodnotách pH skupiny  $-NH_2$  a  $-OH$  tvoří více vodíkových můstků a provázanost materiálu je tak silnější.

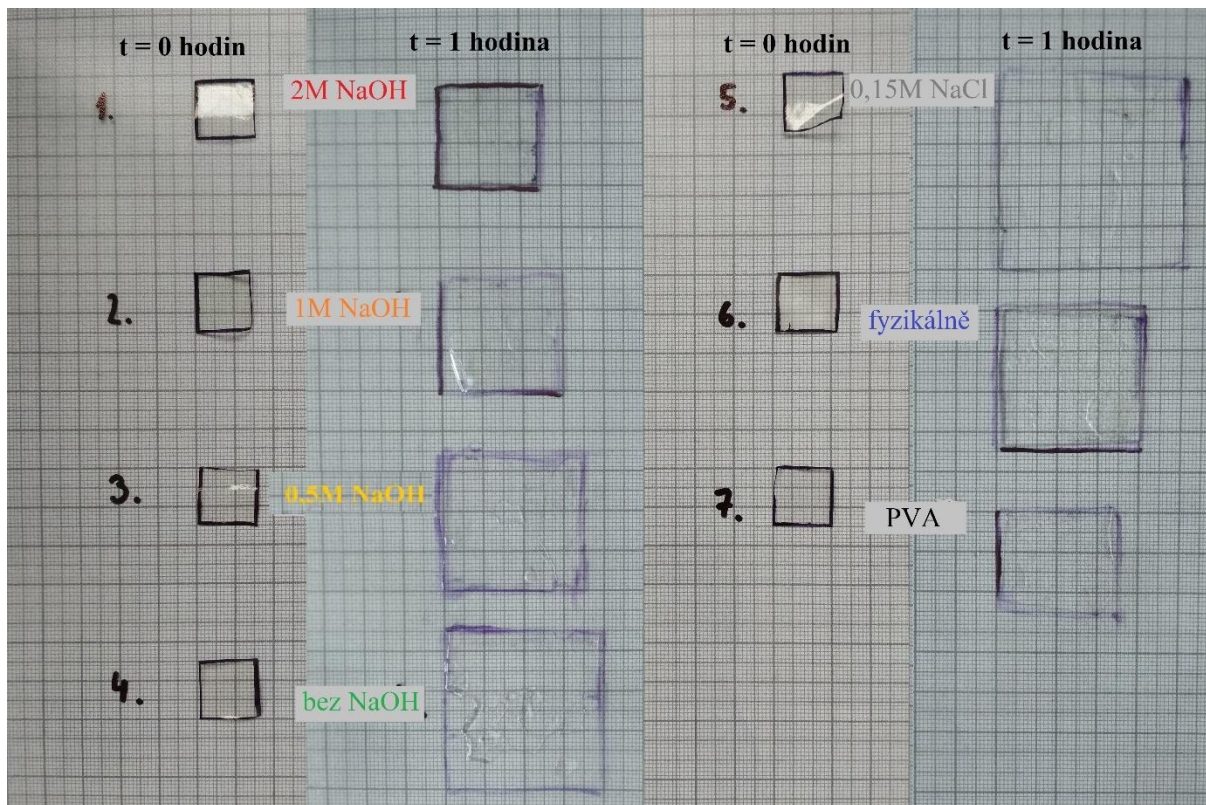
### 6.1.3 Zhodnocení botnání z hlediska poměru šířka – délka

Kapitolou navazující na předchozí problematiku je změna šířky a délky v rámci experimentu botnání. Velice zajímavým se ukázal poměr botnání xerogelů do šířky a do délky. Průběžným měření v čase v intervalech po 5 sekundách byl měřen přírůstek, který se ustálil po 3 minutách botnání.

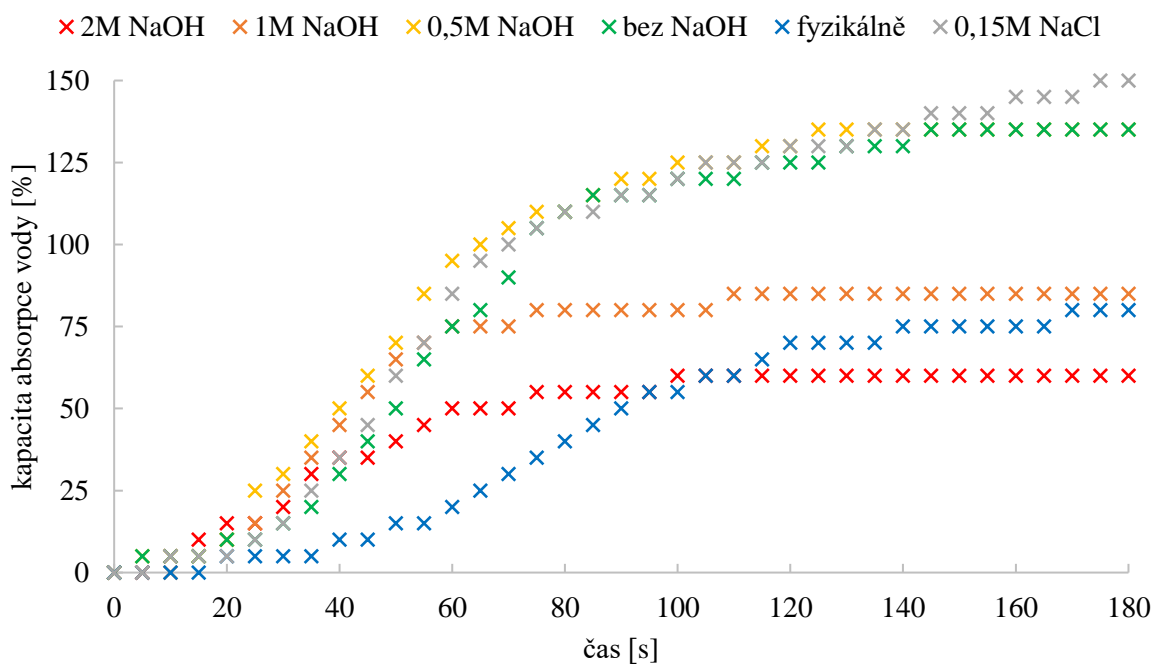
Tabulka 4: Změna délky a šířky při botnání po dobu 3 minut

síťování	chemicky					fyzikálně
přídavky	2M NaOH	1M NaOH	0,5M NaOH	bez	0,15M NaCl	bez
změna šířky při botnání [ $\mu$ m]						
0 minut	63 ± 11	40 ± 5	58 ± 4	53 ± 4	71 ± 7	72 ± 18
3 minuty	78 ± 8	64 ± 17	78 ± 8	80 ± 6	140 ± 18	120 ± 7
<b>poměr botnání</b>	<b>28 %</b>	<b>44 %</b>	<b>35 %</b>	<b>52 %</b>	<b>97 %</b>	<b>120 %</b>
změna délky při botnání [cm]						
0 minut	2,0 ± 0,0					
3 minuty	3,2 ± 0,3	3,7 ± 0,3	4,7 ± 0,4	4,7 ± 0,4	5,0 ± 0,5	3,6 ± 0,3
<b>poměr botnání</b>	<b>60 %</b>	<b>85 %</b>	<b>135 %</b>	<b>135 %</b>	<b>150 %</b>	<b>80 %</b>

Změna šířky byla měřena tloušťkometrem a prodloužení bylo realizováno na milimetrovém papíře jako je vidět na *obrázku 30*. Jsou zde patrné rozdíly botnání diskutované již v předchozí kapitole, kdy se potvrzuje, že čím koncentrovanější přídavek NaOH, tím k menšímu botnání a tím i roztažnosti dochází. K největšímu prodloužení došlo u xerogelu s přídavkem 0,15M NaCl.



Obrázek 30: Maximální prodloužení xerogelů po hodinovém botnání

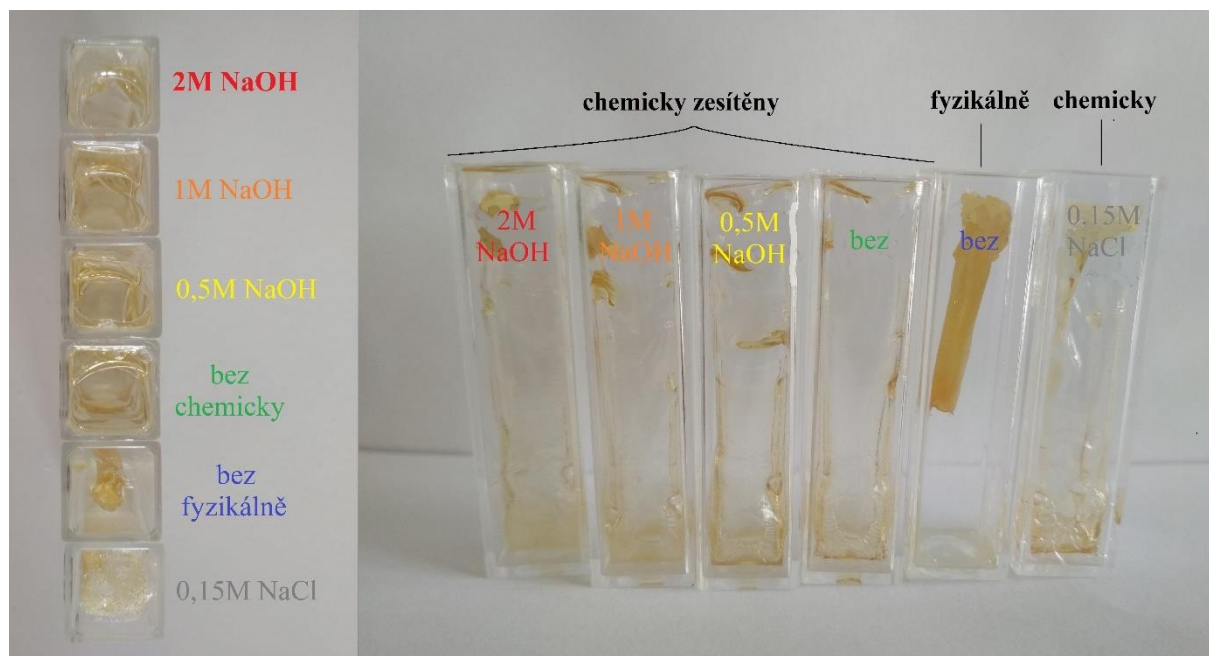


Obrázek 31: Poměr botnání v závislosti na měřeném prodloužení v čase

Jak je vidět v *tabulce 4* všechny xerogely se chovají anizotropně, a to v závislosti na pH i na způsobu síťování. U chemicky zesíťovaných hydrogelů je větší roztažnost do délky, zatímco u fyzikálně síťovaného hydrogelu je větší tendence botnat do výšky. Tato skutečnost je dána povahou vazeb. Zatímco síťovací činidlo tvoří pevné chemické vazby, které dělají materiál kompaktní a rigidní, tak ne vazebné fyzikální interakce dávají vzniku vyšších struktur. Propojují polymery do složitějších 3D sítí, které se pak projevují při botnání sítě do tloušťky. Toto zjištění je zajímavé z hlediska aplikací, protože změnou typu síťování jsme schopni ovlivnit i způsob botnání.

Epichlorhydrin síťuje nejen chitosan, ale v tomto případě hlavně PVA, protože je v majoritním množství a také protože prostředí pH má kyselé hodnoty. To ovlivňuje jeho síťovací preference. Mnohem větší tendenci tvořit 3D strukturu se jeví při zásaditém pH. Tuto skutečnost lze pozorovat při přidávání různě koncentrovaného hydroxidu. S rostoucí koncentrací sodného hydroxidu dochází k tvorbě pevnějších a rigidnějších struktur. Změny délky jsou tedy mnohem razantnější díky utváření dlouhých polymerních PVA řetězců, které zesíťovaly pomocí epichlorhydrinu do dlouhých spletených sítí.

Na *obrázku 32* je vizuálně patrná tendence chemicky síťovaných hydrogelů zachovávat při vysušení co největší prostor a tenkou strukturu. Po 3denním sušení chemicky síťované hydrogely zaujaly tvar kyvety, do kterých byly odlity, a vytvořily tak povlak lemující tvar kyvety. Naopak fyzikálně síťovaný hydrogel po vysušení stáhl svou 3D síť do kompaktního tvaru. Zde se potvrzuje předpoklad sestavení 3D sítě, která je v případě chemicky vázaných hydrogelů provázala do délky propojováním PVA řetězců a chitosanu. Fyzikální síťování je dle předpokladu uskupeno do prostornějších sítí, které tak dávají vzniku vysušené kompaktní struktury nebo při botnání většímu prostupu do šířky než do délky.

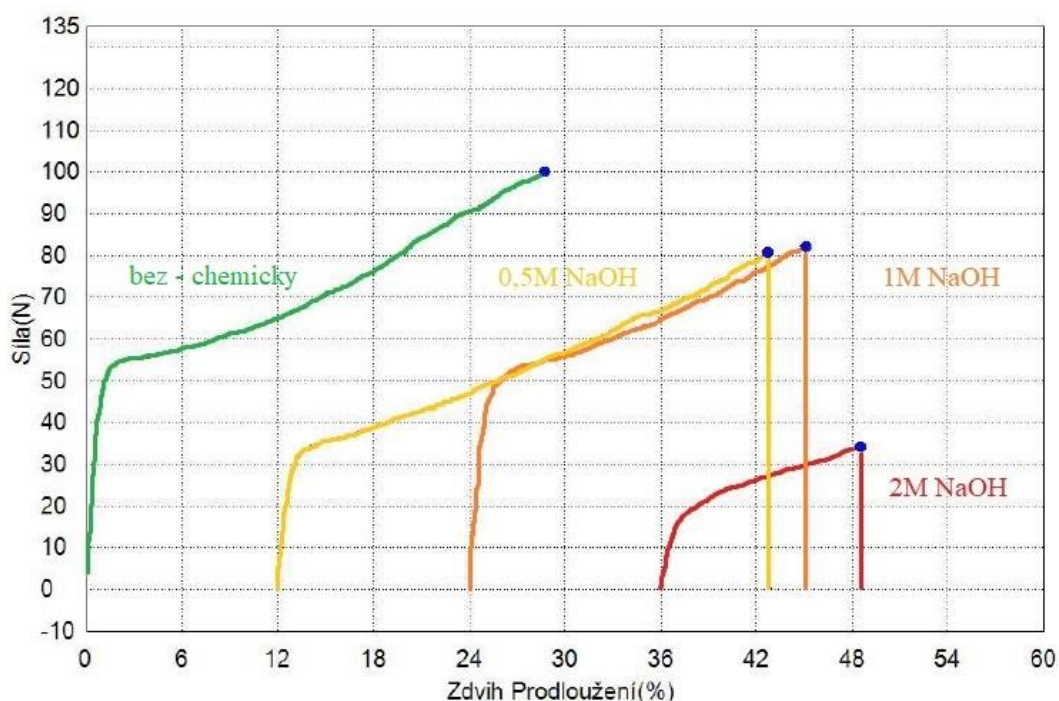


Obrázek 32: Hydrogely sušené v kyvetě zaujímají tvar v závislosti na druhu zesíťení

#### 6.1.4 Pevnost v tahu

Sítě s menším množstvím vazeb bývají zpravidla více elastické, protože nabízí větší variabilitu konformace makromolekuly. S přibývajícím počtem spojů (uzlů) pak počet možností uspořádání klesá a síť se stává propletenější.

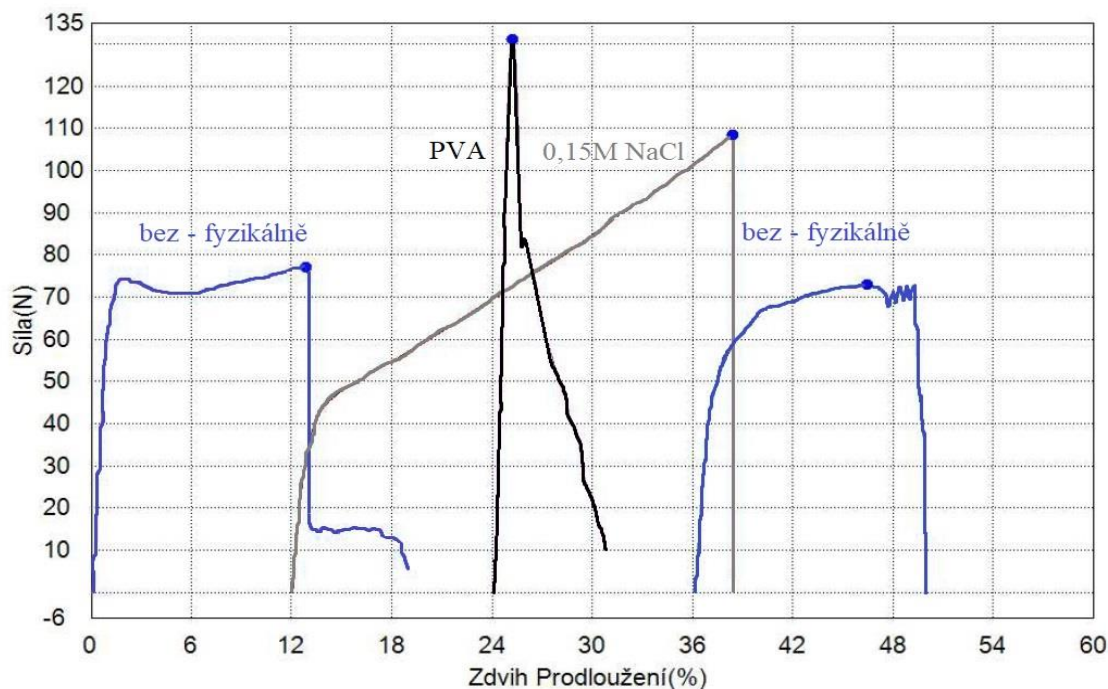
Tuto teorii si můžeme v praxi ověřit na *obrázku 33*, kde vidíme postupně snižující se sílu, která je potřebná pro roztržení chemicky síťovaných xerogelů. Vyšší pevnost materiálu vykazují vzorky se zvyšujícím se množstvím NaOH. Čím zásaditější prostředí při síťování bylo, tím propletenější struktury vznikly, a tudíž ubylo na elasticitě vytvořených xerogelů. Za povšimnutí stojí i podobný průběh prodloužení u všech těchto chemicky síťovaných xerogelů. První je třeba dodat vyšší sílu pro minimální natažení a po překročení této hodnoty se xerogel snadno protahuje jen s malým navýšením síly. Průběhy natažení souhlasí i se změnou délky při botnání, které jsou taktéž zapříčiněny složitostí propletené sítě.



Obrázek 33: Pevnost v tahu chemicky síťovaných gelů s různě koncentrovaným přídavkem NaOH

Rozmanitější průběhy jsou vidět na *obrázku 34*, kde můžeme porovnat pevnost v tahu u chemicky a fyzikálně síťovaných materiálů (hydrogelových sítí). Xerogel 0,15M NaCl má stejný průběh, který je již popisován na předchozím obrázku, protože se jedná o chemicky síťovaný hydrogel. Za povšimnutí stojí **fyzikálně** síťovaný xerogel, pro jehož natažení je třeba vysoká počáteční síla, která po překonání potřebného minima je téměř neměnná a xerogel se pouze dále natahuje do úplného utržení. Druhý záznam, který je vidět v grafu je zkouška natažení již použitého fyzikálního xerogelu. Jejich průběh je velice podobný nenamáhaným xerogelům, což značí velké množství nekovalentních vazeb, které se zachovávají i přes předcházející namáhání materiálu. Tato informace je výhodná z toho důvodu, že i pokud je xerogel na začátku mechanicky namáhán, tak si zachovává jakousi pevnost, což je další přidaná hodnota materiálu.

Hlavní elastickou složkou xerogelů je PVA, jehož pevnost v tahu má specifický průběh. Aby se xerogel vůbec natáhl je třeba vysoké síly, která se po dosažení maxima snižuje a xerogel se prodlužuje bez další potřeby dodat vyšší síly. Oba polymery v těchto xerogelech plní svou zásadní funkci – chitosan je v tomto hydrogelu zodpovědný za botnání a PVA za mechanickou pevnost v tahu. Kombinací obou složek, které jsou biokompatibilní vytváří z xerogelů velice užitečné materiály.



Obrázek 34: Pevnost v tahu různě síťovaných hydrogelů

V příložené tabulce 5 jsou hodnoty maximální síly a tažnosti materiálů, jejichž průběh byl komentován v předchozích grafech. Hodnoty maximální síly jsou úměrné složitosti propletení chemicky zesíťovaných materiálů. Čím komplikovanější a zapletenější struktura vzniká, tím menší maximální síla je pro natažení potřebná. S narůstajícím počtem vazeb klesá ochota roztahovat se, a proto větší elasticitu a tažnost mají sítě s méně propletenou strukturou. Při porovnání chemicky a fyzikálně síťovaných hydrogelů bez přídavku regulátoru vnitřního pH, můžeme konstatovat, že fyzikálně vznikají propletenější struktury, které nejsou tolik elastické jako chemické, a proto i tažnost je mnohem nižší u fyzikálních hydrogelů.

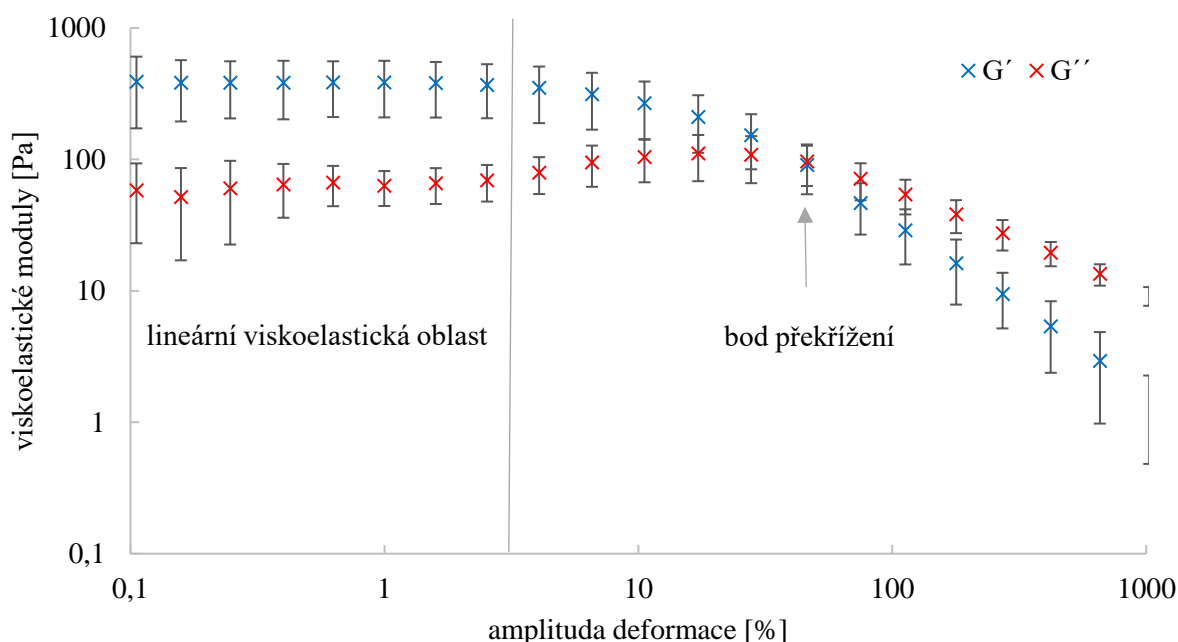
Tabulka 5: Přehled potřebné maximální síly a tažnosti pro jednotlivé materiály

síťování	chemicky					fyzikálně
přidávky	2M NaOH	1M NaOH	0,5M NaOH	bez	0,15M NaCl	bez
maximální síla [N]	34,3	82,2	80,7	100,1	108,4	76,9
tažnost při maximální síle [%]	12,5	21,1	30,8	28,8	26,4	12,8

### 6.1.5 Stanovení viskoelastických vlastností

V předchozí kapitole byla popsána pevnost v tahu a s ní i elasticita připravených xerogelů. Výše byly porovnávány mechanické vlastnosti xerogelů a v této kapitole budou zjišťovány mechanické vlastnosti samotných hydrogelů. Viskoelastické vlastnosti byly dále měřeny pomocí reologických testů, konkrétně se jednalo o oscilační měření (amplitudový test s konstantní frekvencí oscilací).

Závislost viskoelastických modulů na měnící se míře amplitudy deformace je zachycen na obrázku 35. Všechny vzorky vykazují obdobné chování a to takové, že při nízkých hodnotách amplitudy deformace mají stejný průběh (hodnoty se s rostoucí amplitudou deformace nemění) – paměťový modul ( $G'$ ) svou absolutní hodnotou převyšuje modul ztrátový ( $G''$ ). Takovýto průběh potvrzuje fakt, že se ve všech případech jedná o gely. Vzorky byly proměřeny s konstantní hodnotou frekvence oscilací (1 Hz) od 0,01 do 1000 % amplitudy deformace. Pro výsledkovou část jsou však použity pouze hodnoty od 0,1 % z důvodu citlivosti přístroje.

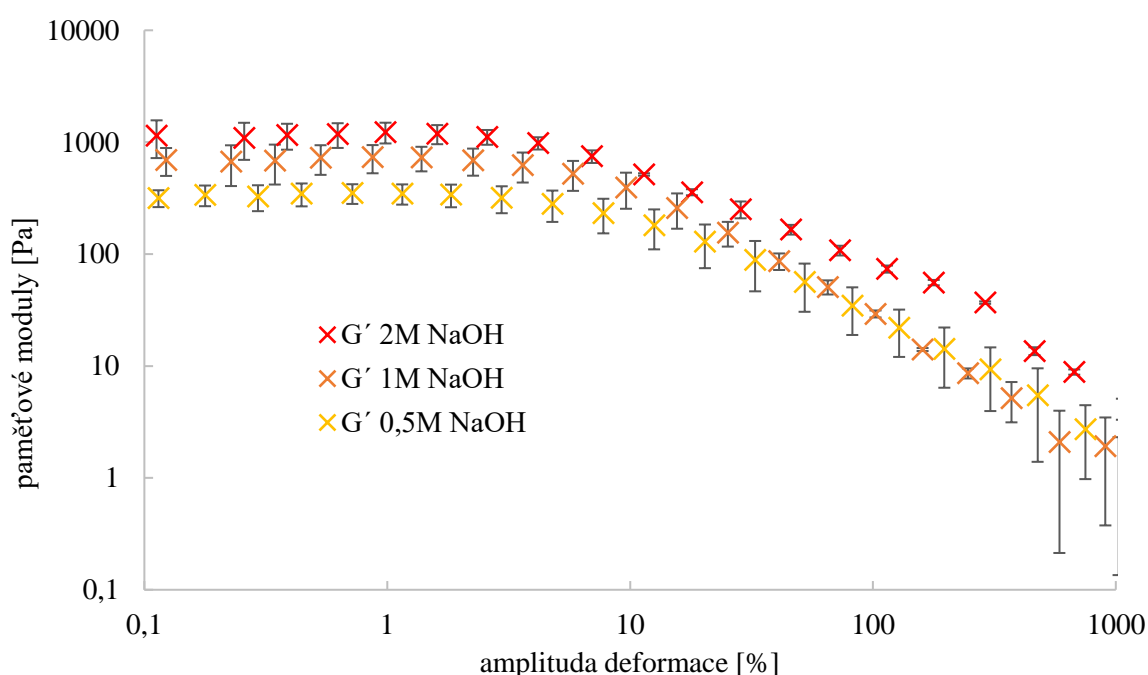


Obrázek 35: Závislost viskoelastických modulů na měnící se míře deformace pro chemicky síťovaný hydrogel bez změny pH vnitřního prostředí

V grafu je mimo jiné vyznačena i lineární viskoelastická oblast (LVO), která je v tomto případě detekovatelná do amplitudy deformace odpovídající 3,3 %, protože do tohoto bodu jsou oba moduly neměnné v závislosti na rostoucí amplitudě deformace (při konstantní frekvenci oscilací). Od této hodnoty dochází k poklesu paměťového modulu a mírnému nárůstu modulu ztrátového. Děje se tak z důvodu tvorby mikroskopických trhlin v materiálu, které přecházejí do makroskopických trhlin v bodě překřížení. V tomto rozmezí (mezi změnou LVO a bodem překřížení) dochází k poničení struktury studovaného materiálu, přesto však vzorek vykazuje chování hydrogelu ( $G' > G''$ ). Přímo v bodě překřížení s amplitudou deformace 46,2 % nepřevažuje elastická ani viskózní modul. Za tímto bodem dochází k poklesu obou modulů, kde po překřížení převyšují hodnoty ztrátového modulu nad paměťovým. V úplném závěru tedy převažuje viskózní chování hydrogelu.

S ohledem na to, že materiál vykazuje při nižších hodnotách amplitudy deformace viskoelastické chování s převahou elasticity, bude pro porovnávání mechanických vlastností hydrogelů a větší přehlednost využito paměťových modulů.

Na *obrázku 36* můžeme vidět paměťové moduly pro chemicky síťované hydrogely s rozdílnými přídávky NaOH. Graf ukazuje trend zvyšujících se hodnot modulů s rostoucím přídávkem sodného hydroxidu. Čím vyšší hodnoty modulu hydrogel vykazuje, tím více uzlů síť obsahuje, což je v souladu s vizuálním zhodnocením xerogelů (viz *kapitola 6.1.1*). V závislosti na množství uzlů mají materiály tendenci botnat. Nejméně ze všech materiálů botnal právě chemicky síťovaný hydrogel s nejkonzentrovanejším přídávkem NaOH. Visokoelastické zkoušky potvrzují, že v tomto materiálu je největší zauzlení, které zabraňuje prostupu vody mnohem více, než je tomu u méně propletených struktur.

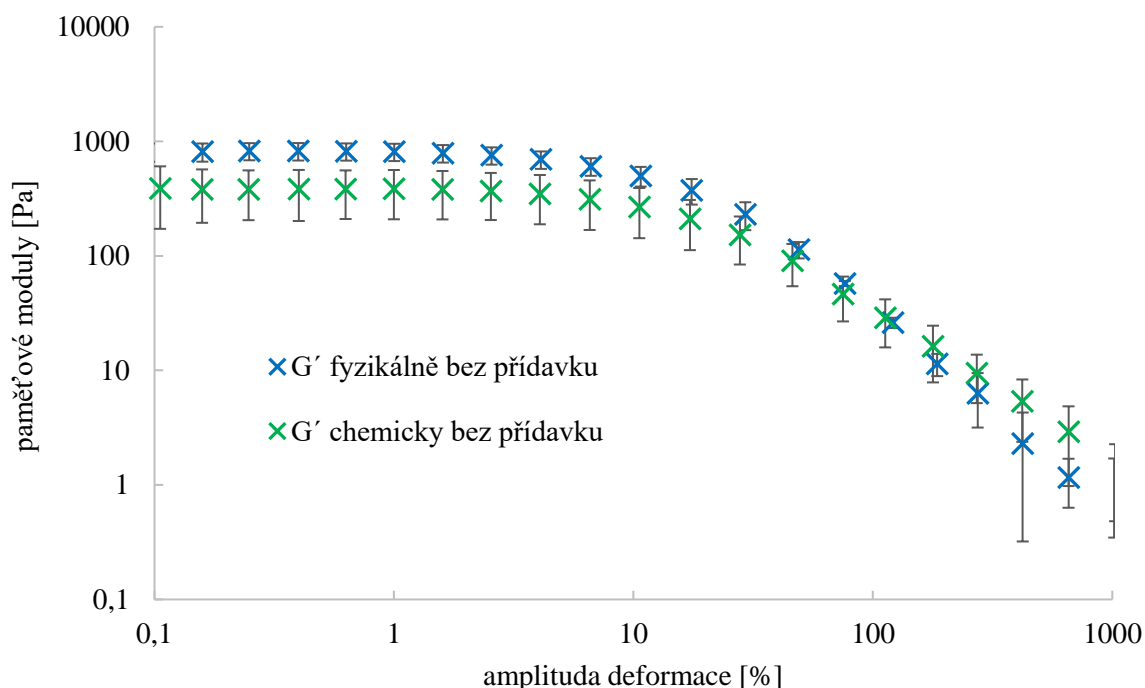


*Obrázek 36: Paměťové moduly pro chemicky síťované hydrogely s rozdílným přídávkem NaOH*

Taktéž toto tvrzení můžeme podložit výsledky ze zkoušek pevnosti v tahu, kdy elastické vlastnosti jsou závislé na míře propletení struktury. Čím více uzlů ve struktuře vzniká, tím menší elasticitu materiál vykazuje a mnohem dříve se jeho vnitřní struktura hrouť. V grafu můžeme sledovat tendenci zkracování LVO se zvyšujícím vnitřním pH hydrogelu a tomu trendu pak odpovídají i snižující se hodnoty míry deformace, ve které dochází ke křížení modulů. Na této hodnotě se ukazuje, jak pevné jsou vzniklé uzly a kdy dochází k deformaci na makroskopické úrovni. Platí tedy, že čím větší hodnotou amplitudy deformace má bod překřížení, tím je větší pevnost uzlů. Tato data jsou pro lepší přehlednost zaznamenána v *tabulce 6* a jednotlivé průběhy všech amplitudových testů jsou přiloženy v přílohách.

Rozdíl viskoelastických vlastností fyzikálně a chemicky síťovaných hydrogelů vidíme na *obrázku 37*. Fyzikální hydrogel má vyšší viskoelastické moduly díky menšímu nasorbovanému množství vody, ale bod překřížení je při nižších hodnotách amplitudy deformace, protože jeho fyzikální vazby jsou slabší než chemické. Stejně to platí u chemicky

sít'ovaných hydrogelů, které se zvyšující se koncentrací sodného hydroxidu vykazují vyšší moduly a analogicky nižší botnavost.



Obrázek 37: Paměťové moduly pro různě sít'ované hydrogely v závislosti na míře deformace

Životností a pevností uzlů se od sebe mohou hydrogely značně lišit. Tyto rozdíly můžeme vidět v hodnotách míry deformace od posledního bodu LVO do bodu překřížení. Životnost spojů můžeme vidět v *tabulce 6* v hodnotách pro LVO, kdy dochází k prvním mikrotrhlinám. Zde dochází k prvotním deformaci vazeb. Body překřížení jsou v rozmezí od 12,34 do 77,30 % hodnoty míry amplitudy deformace a tato čísla udávají pevnost uzlů. Obecně tedy platí, že čím vyšší modul, tím více uzlů a čím vzdálenější bod překřížení, tím větší pevnost uzlů. Je-li překročena hodnota napětí nad hodnotu meze toku, dochází k rozrušení vazeb a hydrogel se deformuje trvale.

Tabulka 6: Hodnoty nejdůležitějších ukazatelů z amplitudových testů ovlivňující viskoelastické vlastnosti materiálů

vzorky	LVO	bod překřížení	G'	G''
	hodnota amplitudy deformace [%]		průměrná hodnota modulů [Pa]	
2M NaOH	1,61	17,55	1160	508
1M NaOH	2,26	12,34	704	307
0,5M NaOH	2,96	20,21	336	135
bez – chemicky	3,30	46,12	378	62
0,15M NaCl	1,60	77,30	637	59
bez – fyzikálně	1,60	49,96	806	133

Rapidní nárůst bodu překřížení můžeme pozorovat u vzorku s přísávkem 0,15M NaCl. Kontrastní je zde fakt, že lineární viskoelastická oblast u toho vzorku má jednu z nejnižších hodnot amplitudy deformace. Toto chování značí, že je materiál početně propleten, ale první mikrotrhliny se tvoří velice brzy. K úplnému zničení struktury hydrogelu, kdy začne převažovat viskózní část, dojde v hodnotě amplitudy deformace 77,30 %.

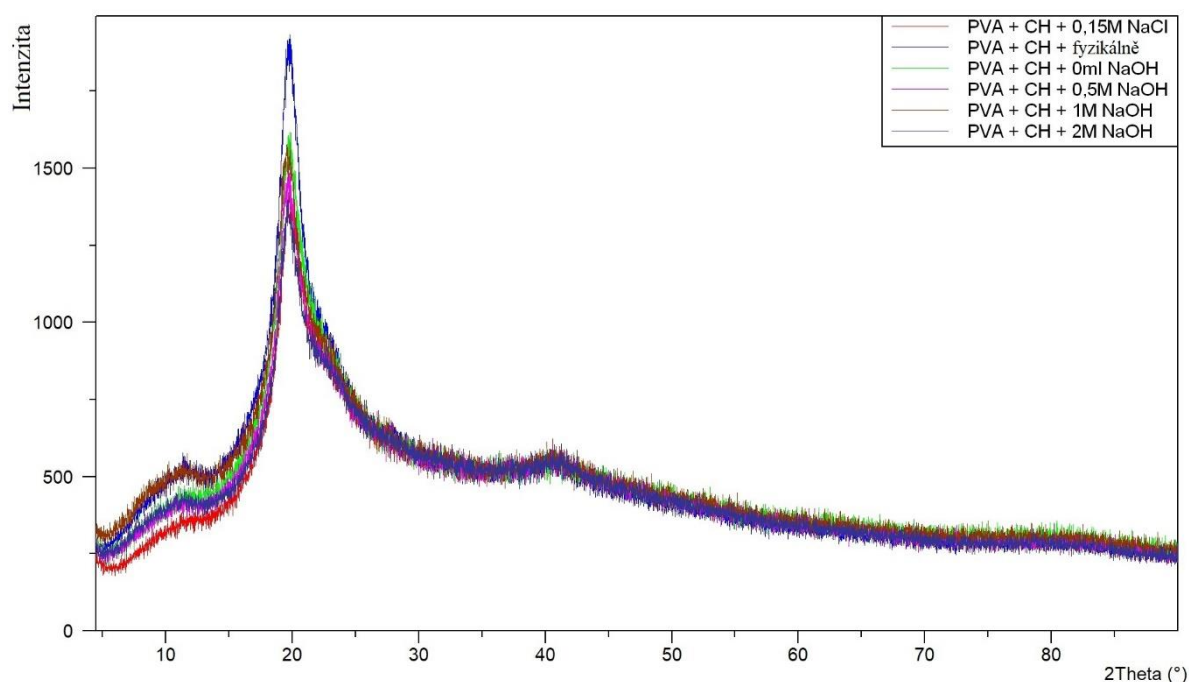
Závěrem lze o zkoumaných materiálech říci, že se jedná o hydrogely, protože ve všech případech převažuje paměťový modul nad ztrátovým. Viskoelastické testy napomohly k pochopení provázanosti a pevnosti vznikajících 3D sítí, které jsou značně ovlivněny vnitřní hodnotou pH, při kterých se síť vytváří. Prakticky platí, že se zvyšujícím se pH se i zvyšuje počet uzlů a jejichž zánik je rychlejší než u hydrogelů méně propletených.

### 6.1.6 Rentgenová difrakční analýza

Předchozí techniky potvrdily, že jsou připravené vzorky zesíťovány. Cíleně byly vzorky rozděleny na chemicky a fyzikálně síťované dle jejich přípravy. Neznamená to však, že nemůže vznikat kombinace obou druhů síťování.

Tuto otázku nám pomůže rozluštit rentgenová difrakční analýza, která zkoumá krystalinitu materiálů. Z pohledu krystality lze hydrogely dělit na amorfnní a s mikroskopickými krystalickými oblastmi. Krystalická oblast je taková, kde je možno pozorovat mezi řetězci makromolekul určitou pravidelnost. Amorfnní hydrogely jsou takové, jejichž umístění vzájemných spojů je náhodné.

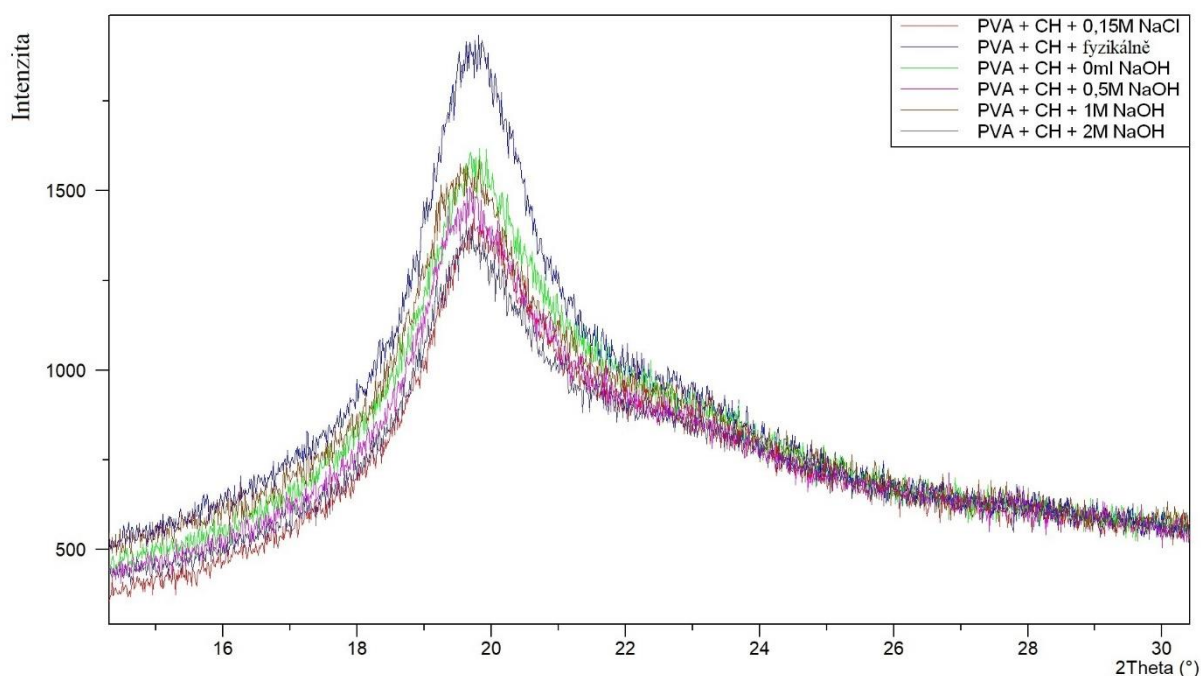
Studované látky jsou polymery, u nichž se předpokládá, že bude jejich struktura převážně amorfnní. Konkrétně však bylo pracováno s PVA a chitosanem, jejichž struktura sama o sobě obsahuje krystalické fáze charakteristické pro jejich strukturu. Chitosan má významný pík blízko 20° a PVA kolem 19,5° 2theta. Jelikož jsou tyto píky velice blízko, splývají ve výsledku do jednoho, jako je vidět na obrázku 38.



Obrázek 38: Spektrum XRD pro všechny zkoumané materiály

Ve větším přiblížení, jak je patrné z *obrázku 39*, můžeme detekovat různé intenzity jednotlivých měření. Dochází k fázovému posunu polohy maxima píků dle očekávání – největší intenzitu vykazuje fyzikálně síťovaný hydrogel, což potvrzuje největší přítomnost fyzikálních vazeb. Tento hydrogel vznikl záměrně fyzikálním síťováním a tím, že nebylo přidáno síťovací činidlo, vzniklo více možností propojit vazby fyzikálním zesílením.

Chemicky síťované hydrogely mají zhruba stejné zastoupení krystalické fáze dle projevené intenzity. Můžeme tak konstatovat, že se chemicky připravované hydrogely síťují převážně epichlorhydrinem. Byl zde předpoklad, zda se chitosan nesráží do krystaličtějších struktur hydroxidem, což bylo vyvráceno, protože s přidavkem NaOH nedochází k postupně navyšující nebo snižující se intenzitě. Můžeme tím předpokládat, že změnou pH dochází primárně k ovlivňování chování síťovacího činidla. V závislosti na pH dochází k různě intenzivnímu síťování pomocí epichlorhydrinu. S vyšší koncentrací hydroxidu dochází k intenzivnější reaktivitě síťovacího činidla, a tím se tvoří pevnější hydrogely, jak již bylo potvrzeno dle vzhladu, botnáním, změnou šířky a tloušťky, pevnosti v tahu a samotnou reologií.



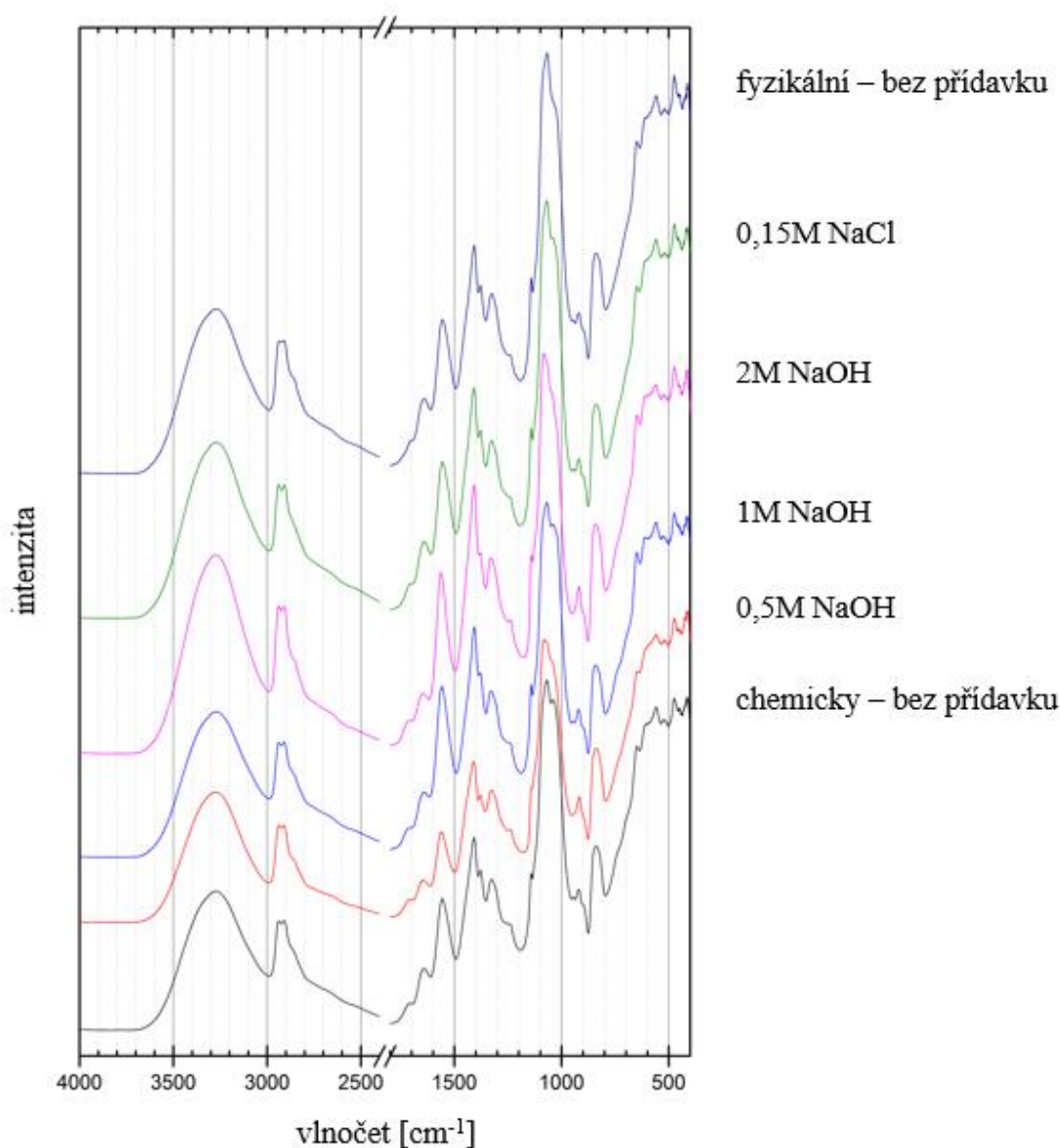
*Obrázek 39: Spektrum XRD v přiblížení na konkrétní pík*

Intenzita signálů je pro chemicky síťované xerogely podobná. Pokud bychom chtěli hledat rozdíly intenzit, byla by sestavena vzestupná řada nejspíše takto: **1M NaOH** < **bez – chemicky** < **2M NaOH** < **0,5M NaOH** < 0,15M NaCl. Logická návaznost chybí i z toho důvodu, že tloušťka xerogelů byla různá, tudíž rozdílné píky mohou být způsobeny tím, že nebyly nastaveny naprosto přesné podmínky měření pro všechny xerogely.

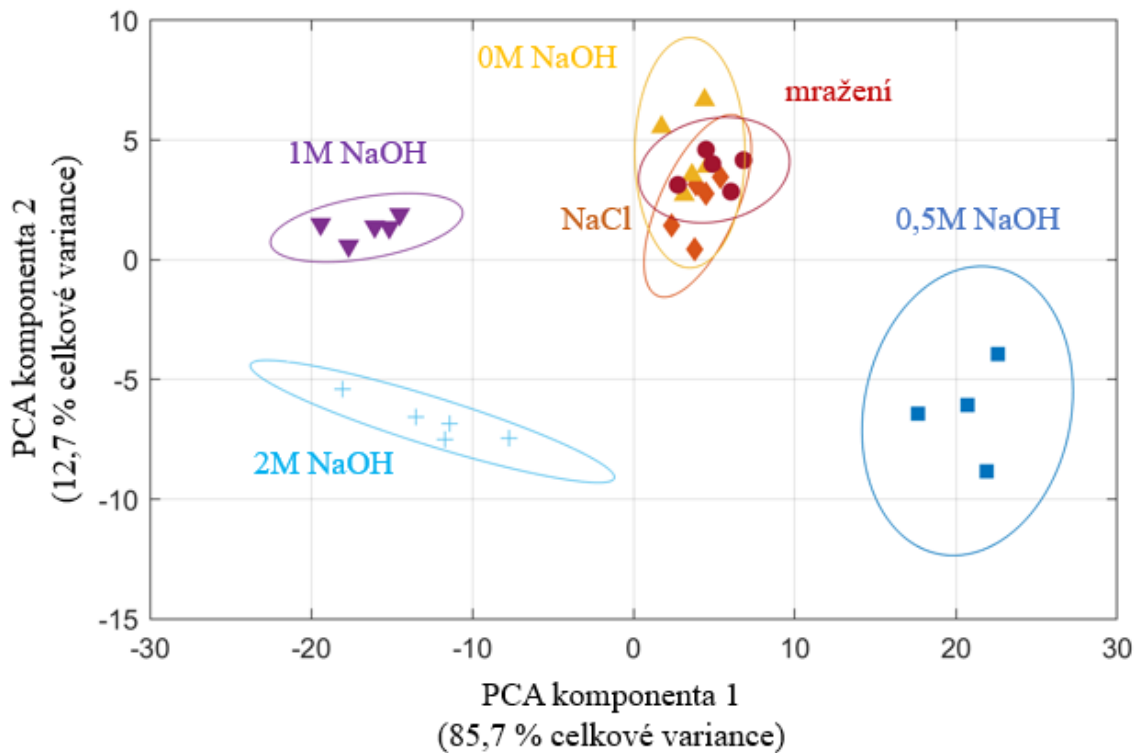
### 6.1.7 Infračervená a Ramanova spektrofotometrie

Hlavním účelem této charakterizace bylo pochopení síťování PVA a chitosanu při různých hodnotách vnitřního pH. Právě hodnota pH má vliv nejen na rozdílné síťování fyzikální, ale i chemické. Použité síťovací činidlo (epichlorhydrin) je silně ovlivněno pH prostředím, a z tohoto důvodu je třeba využít dané metody pro správné pochopení chování zkoumaných hydrogelů při změně vnitřních podmínek.

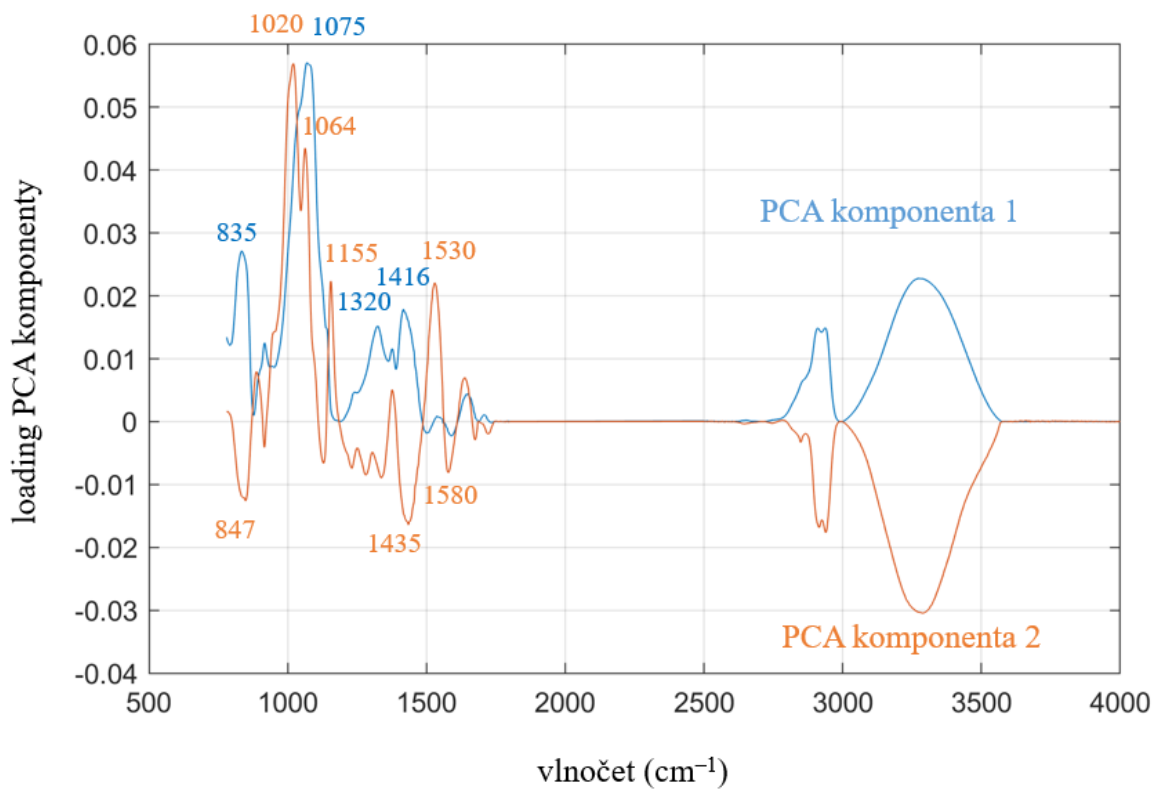
Prvotním měřením byla infračervená spektrometrie, která se na první pohled nejeví úplně jasnou pro přímou interpretaci. FTIR spektra si jsou velmi podobná, až nerozlišitelná, jako je vidět na *obrázku 40*, a z toho důvodu musela být použita analýza hlavních komponent (*principal component analysis – PCA*) (viz *obrázek 41*), aby jednotlivé vzorky mohly být odlišeny. PCA nám poskytuje informaci o tom, které píky přispívají k největší odlišnosti spekter. Na *obrázku 42* je také naznačeno, kterými pásy se liší nejvíce.



Obrázek 40: ATR spektra, která jsou k nerozeznání bez podrobnější PCA analýzy



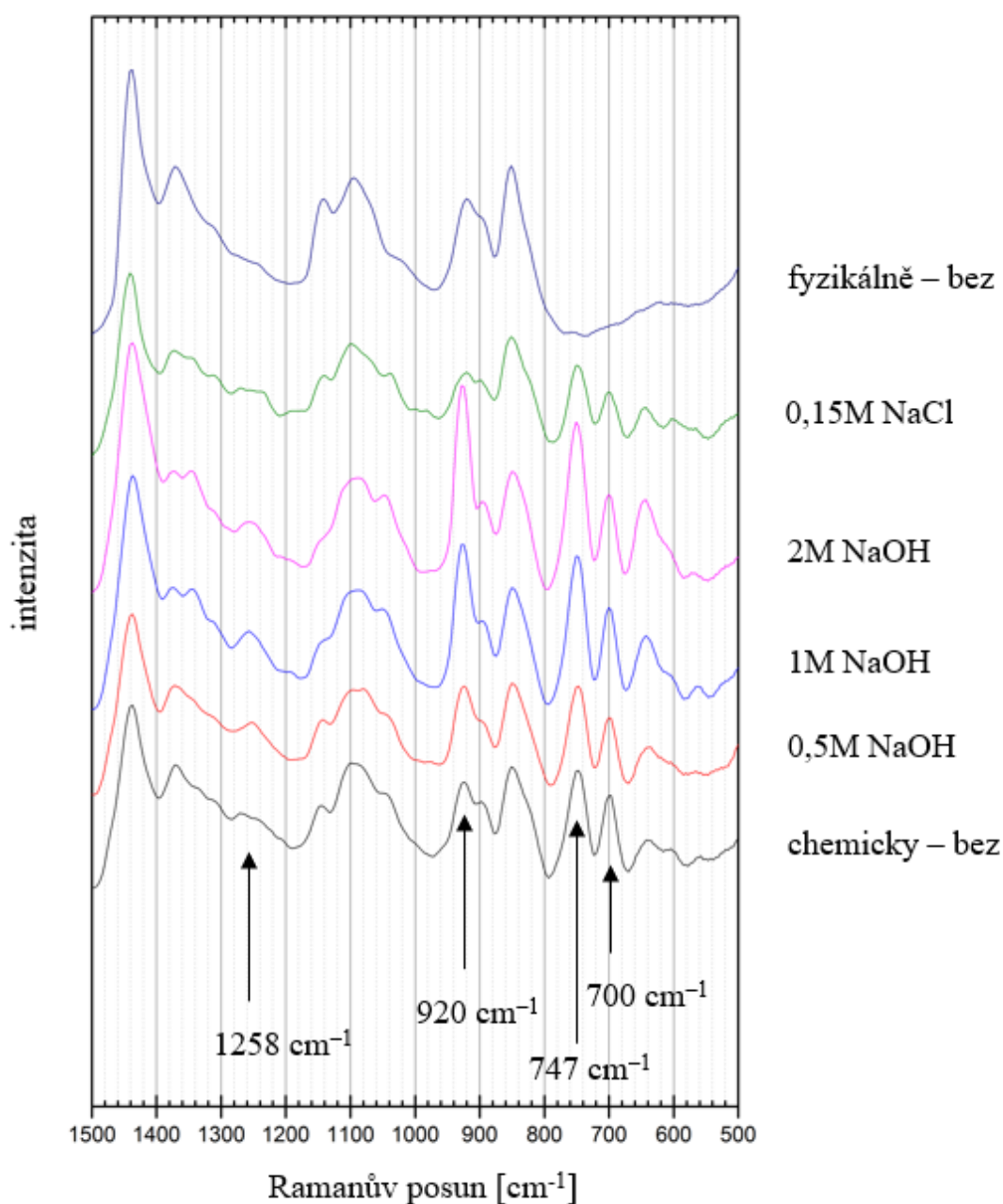
Obrázek 41: Analýza hlavních komponent (PCA) ukazující nejrozdílnější vzorky a v které komponentě se nejvíce odlišují



Obrázek 42: ATR PCA loading zobrazující konkrétní vlnočty, u kterých se intenzita signálu liší nejvíce

Abychom byli schopni výsledky interpretovat, tak musíme provést diagnostiku na FT-RAMAN, jehož měření říká to stejné jako FTIR, akorát na jiných pících. Tato spektra jsou mnohem jednoznačnější a provádí se tak lepší identifikace, protože zde nejsou všechny vibrace, které obsahuje IČ. Píky v Ramanovém spektru značí vibrace konkrétních vazeb ve zkoumaném vzorku. Čím více je vazeb daného druhu ve vzorku, tím větší je jeho intenzita. Spektra jsou ovlivněna měněním se parametrem (pH a druhem síťování), a proto je snadnější pozorovat změny zejména intenzit některých píků (někdy i posuny vlnočtu píku).

Ramanské spektrum z *obrázku 43*, vykazuje několik symbolických píků, které charakterizují především oxiranové kruhy. Jejich zkoumáním a přesnou diskusí se zabývají v článku [68], dle kterého byly porovnávány spektra i pro materiály diskutované v této práci.



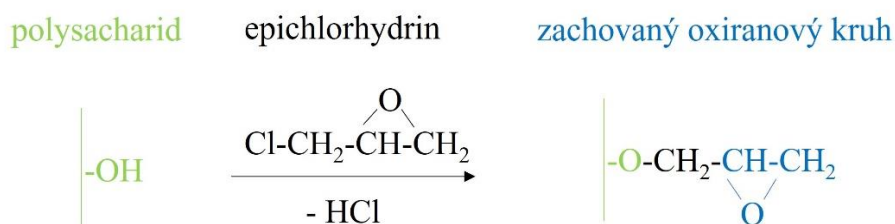
Obrázek 43: Ramanův posun s vyznačením specifických pásů oxiranového kruhu

Sítovacím činidlem, které bylo použito pro chemické sítování, byl epichlorhydrin, který obsahuje oxiranový kruh. Epichlorhydrin bude při různé koncentraci NaOH nebo NaCl, sloužícího jako regulátor vnitřního pH hydrogelu, rozdílně využitý. Díky ramanově spektroskopii dokážeme detekovat navázané množství epoxidových skupin a i to, jakými novými vibracemi budou přispívat do systému.

Strukturní stopy epichlorhydrinu jsou viditelné v místě  $1258\text{ cm}^{-1}$  a intenzita píku odpovídá koncentraci epoxidových skupin. Pík  $1258\text{ cm}^{-1}$  je poměrně slabý a široký u vzorků  $0,15\text{M NaCl}$  a **chemicky bez přídavku**, tudíž u nich očekáváme menší množství navázaného epoxidových skupin než u více koncentrovaných přídavku NaOH. Pochopitelně tento charakteristický pás není detekovatelný u **fyzikálně sítovaného bez přídavku** vnitřního regulátoru pH, který je bez přídavku sítovacího činidla.

Pásky odpovídající hodnotám  $920, 747$  a  $700\text{ cm}^{-1}$  náleží deformačním vibracím epoxidových skupin. Nejvyšší hodnoty vykazují píky u nezákladnějšího prostředí. Úměrně ke klesajícímu pH tedy klesá i intenzita signálu a s ním i množství skupin navázaných ve struktuře. Nejvíce navázaných oxiranových kruhů můžeme tedy pozorovat u přídavku **2M NaOH** a dále pak s ubývající intenzitou u **1M NaOH**, **0,5M NaOH**, **bez přídavku** a nejméně u  $0,15\text{M NaCl}$ . Tento postup odpovídá i výsledkům ze všech předchozích strukturních zkoušek, kdy nejvíce sítované materiály s nejvyšším přídavkem hydroxidu tolik nebotnají a jejich provázanost se odráží i na zkoušce tahem a měření na reometru.

Dle předpokladu na základě článků [66] [67] mělo docházet při vyšších pH primárně k otevírání oxiranového kruhu a vazbě polymerů přes otevřený kruh. Z výsledků ramanské spektroskopie však musíme konstatovat, že se zvyšující se koncentrací NaOH sice dochází k lepší vaznosti epichlorhydrinu, ale nedochází k otevírání oxiranových kruhů, které vydávají námi sledovaný signál. K vazbě tedy musí docházet přes O-C vazbu s polymery, jak je vyobrazeno na *obrázku 44*.

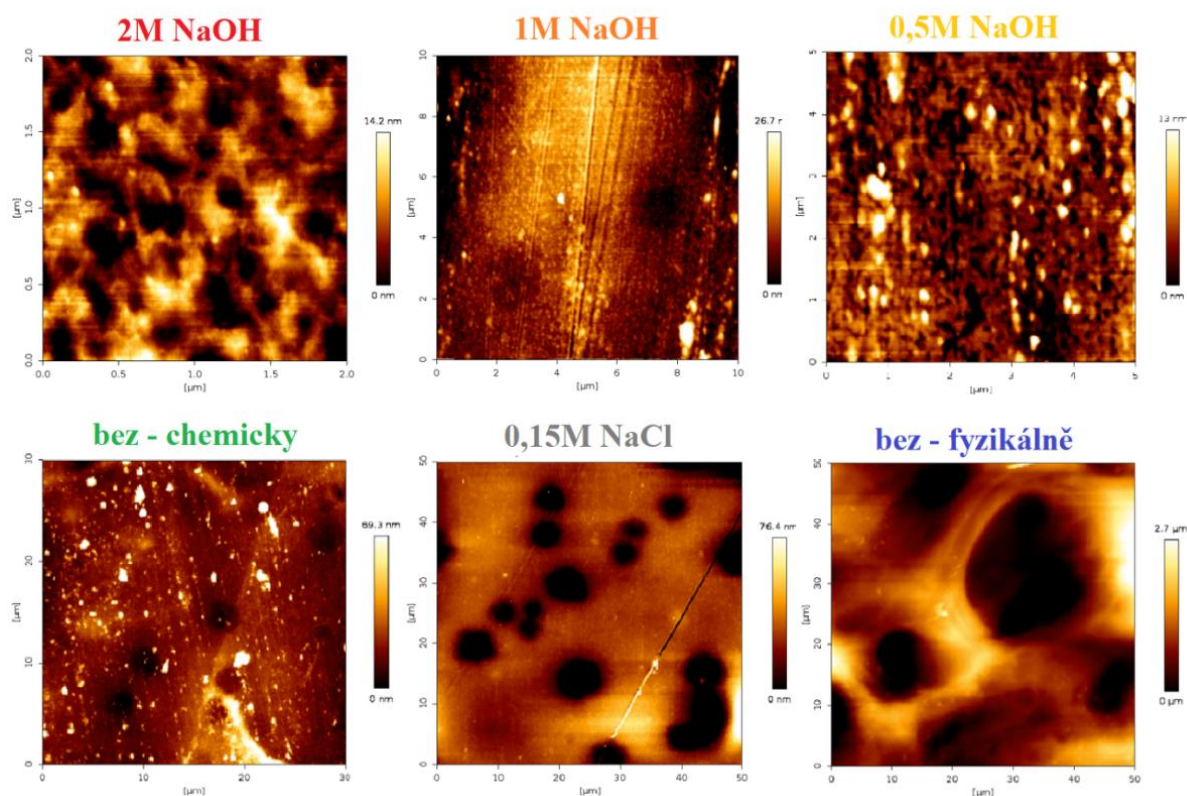


*Obrázek 44: Způsob sítování předpokládáný díky výsledkům z ramanské spektroskopie*

Toto chování je způsobeno zvoleným pH prostředím, které při přípravě nedosáhlo zásaditých hodnot, jež je pro otevírání oxiranových kruhů potřebné [66]. Dále zde hraje roli i fakt, že přídavkem epichlorhydrinu se celkové pH ještě sníží. Jeho přídavkem jsou pH hodnoty kyselé, jako je vidět v *tabulce 1*.

### 6.1.8 Mikroskopie atomárních sil

Tato metoda poskytuje náhled na velikost pórů a míru zesítnění. Mikroskopie atomárních sil (AFM) využívá velmi ostrý hrot, který následkem působících sil ohýbá nosník, který skenuje povrch a veškeré jeho nerovnosti. Na základě těchto údajů dokážeme sestavit zvětšený obraz vzorku, jako je například vidět na *obrázku 45*. Intenzita zesítnění stoupá se vzrůstajícím pH a naopak klesá velikost pórů. Můžeme také pozorovat rozdílné struktury a drsnosti povrchů v závislosti na vnitřním pH hydrogelu, jako to ukazuje *obrázek 46*.



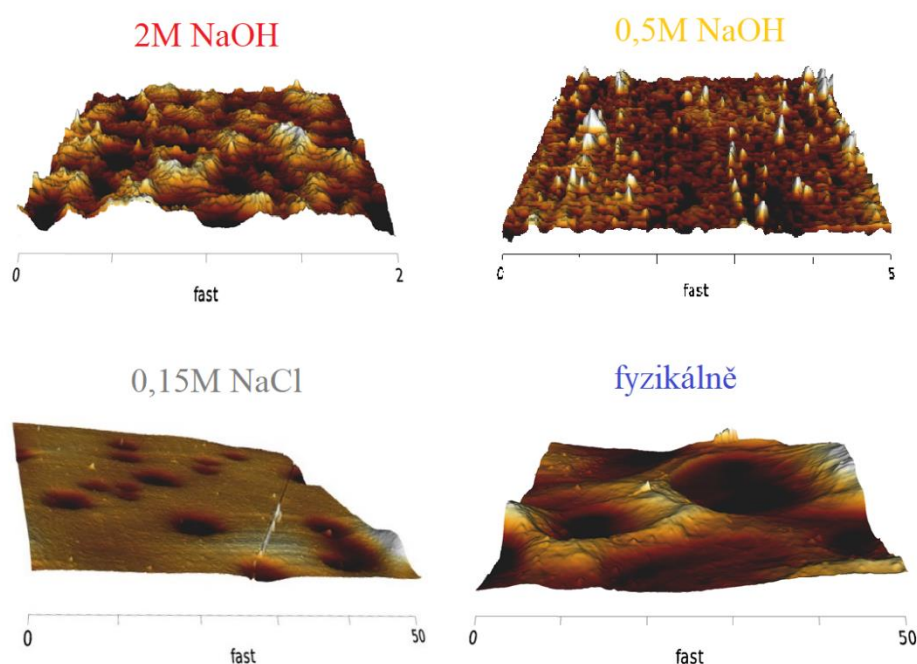
*Obrázek 45: 2D zobrazení pórovitosti připravených materiálů*

V návaznosti na tom pozorujeme, že se se snižující koncentrací NaOH zvětšuje i velikost pórů ve vnitřní struktuře hydrogelu. Jejich velikosti jsou zaznamenány v *tabulce 7*. Fyzikálně síťované hydrogely obsahují největší rozměry pórů, což je dáno rozdílným postupem přípravy při síťování. S měnícími se přísadkami regulátoru vnitřního pH se mění i velikosti pórů. Ve výsledcích naměřených na AFM je vidět značná návaznost na zvyšující se koncentraci hydroxidu sodného.

*Tabulka 7: Velikost naměřených pórů v souvislosti se změnou pH*

2M NaOH	1M NaOH	0,5M NaOH	bez – chemicky	0,15M NaCl	bez – fyzikálně
0,2 $\mu\text{m}$	1,0 $\mu\text{m}$	1,2 $\mu\text{m}$	2,5 $\mu\text{m}$	3,5 $\mu\text{m}$	jednotky až desítky $\mu\text{m}$

Póry udávají informaci o množství absorbované kapaliny. Mnohem větší a rychlejší absorpce vody se očekává u materiálů s většími póry. Kinetika botnání probíhala nejrychleji u chemicky síťovaných hydrogelů, a to v závislosti na velikosti jejich pórů. Jako to ukazuje *obrázek 31*, nejrychleji nabotnaly hydrogely s nejvyššími přídávky hydroxidu, a to **2M NaOH**, následně **1M NaOH**, **0,5M NaOH** a v neposlední řadě **bez přídávku**. Konkrétní botnavé chování bylo zmíněno v *kapitole 6.1.2*, kde se potvrzuje fakt, že čím menší póry xerogel měl, tím méně, ale za to rychleji nabotná. Fyzikálně síťovaný hydrogel obsahuje největší póry, ale jeho kinetika botnání je mnohem pomalejší než u chemicky síťovaných vzorků. Botnání tak koreluje s velikostí pórů.

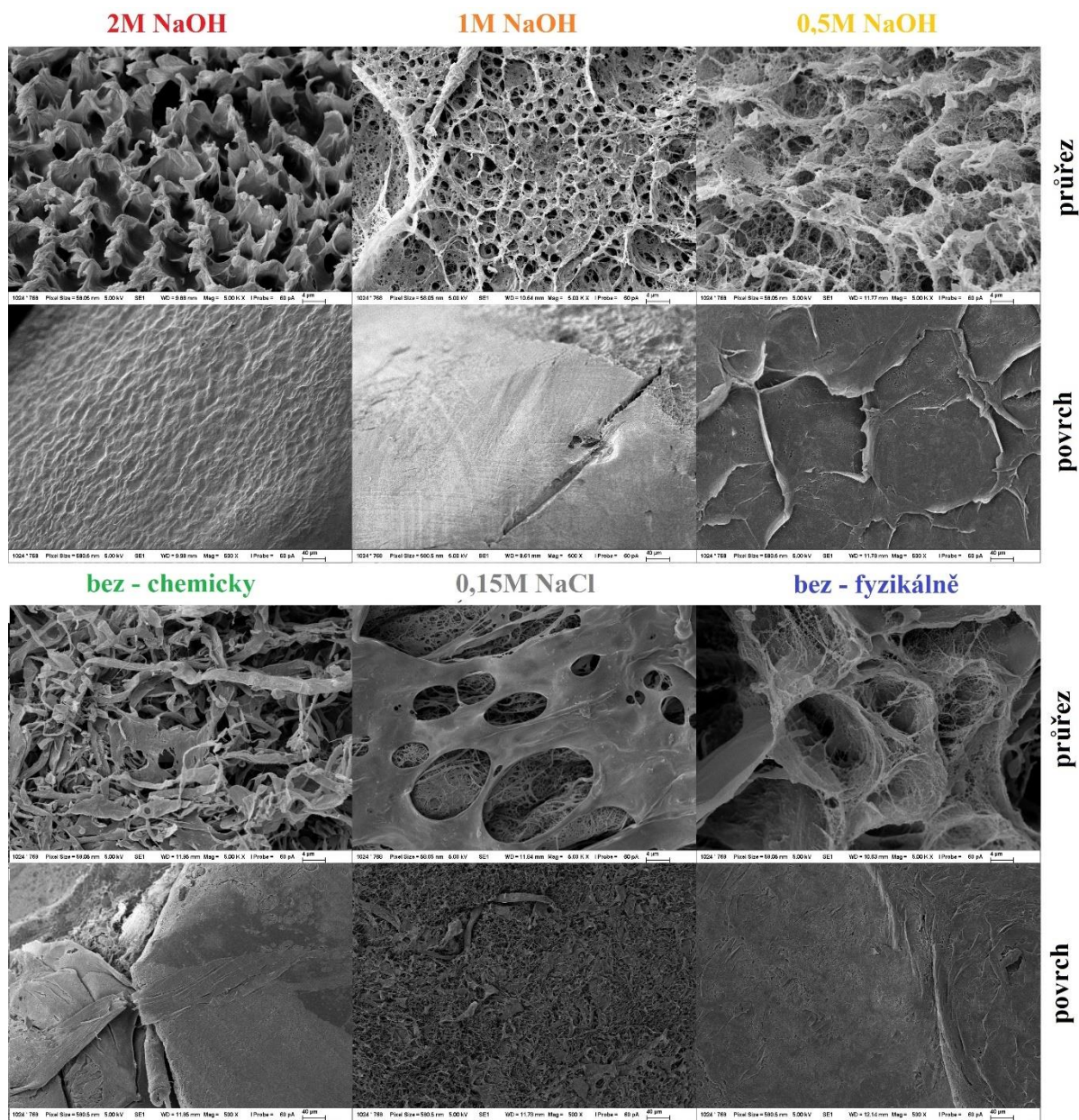


*Obrázek 46: Převedení snímků xerogelů do 3D roviny k vyobrazení pórů a nerovností*

Rozdílné botnání může být také způsobeno nerovností povrchu, jak vidíme na obrázku výše (viz *obrázek 46*). Přídavkem hydroxidu došlo k zvrásnění povrchu, který může napomáhat snadnému prostupu vody do struktury. U dalších dvou případů se povrch jeví hladce, ale s většími póry. V těchto případech dochází k mnohem vyššímu botnání, ale kinetika není tak rychlá jako u zvrásněných vzorků.

### 6.1.9 Skenovací elektronová mikroskopie

Mikroskopie atomárních sil nám odhalila konkrétní velikosti pórů. Díky skenovací elektronové mikroskopii (jejíž snímky jsou vidět na *obrázku 47*) se může podívat na reálné záběry vnitřní struktury hydrogelů a můžeme je porovnávat s AFM metodou. Po nahlédnutí je možné sledovat změny, které byly způsobeny různými přísadkami regulátoru ovlivňující pH a druhem síťování. Při přiblížení mají všechny vzorky na průřezu jasně pórovitou strukturu a velikost pórů je zde ovlivněna hodnotou vnitřního pH hydrogelu.



Obrázek 47: Snímky ze skenovací elektronové mikroskopie s přiblížením 500x a 5000x

Dle snímků můžeme usuzovat o velikosti pórů a konstatovat, že v závislosti na prostředí se rovnoměrně zvětšuje velikost pórů se snižujícím se pH. V případě fyzikálně síťovaného hydrogelu jsou póry největší, což je způsobeno nepřítomností chemického síťovacího činidla. Tyto snímky napovídají i to, jaká bude kinetika uvolňování léčiva v závislosti na velikosti pórů. Informace jsou velice podstatné pro výběr jednotlivých zástupců na uvolňování léčiva.

Struktura odpovídá stupni botnání zmíněnému již v předchozích kapitolách 6.1.2 a 6.1.3. Čím menší póry materiál má, tím méně botná. Dle snímků je povrch hladký a uvnitř materiálu jsou póry (jak je vidět na průřezu), které xerogel roztahují do šířky. Anizotropie je znatelná při porovnání pohledu z průřezu a na povrchu. Vysvětluje se tím fakt, že se xerogel roztahuje více do délky než do šířky.

### 6.1.10 Stanovení měrného povrchu

Tato metoda nazývaná také BET analýza byla pojmenována podle svých tvůrců – S. Brunauera, P. Emmetta a E. Tellera. Díky ní může potvrdit předchozí výsledky měření z mikroskopie atomárních sil a skenovací elektronové mikroskopie. Hodnoty, které jsou vyobrazeny v tabulce 8, udávají velikost měrného povrchu studovaných materiálů.

Tabulka 8: Hodnoty měrného povrchu v souvislosti se změnou pH

	2M NaOH	1M NaOH	0,5M NaOH	bez – chemicky	0,15M NaCl	bez – fyzikálně
měrný povrch [m <sup>2</sup> /g]	65,920	67,611	82,806	29,301	62,734	68,746
C konstanta	13,796	9,226	5,255	3,162	10,080	18,750

Prvotně byly pro tuto metodu připraveny vzorky sušením v běžné sušárně. Ukázalo se však, že materiály mrazené kapalným dusíkem a následně lyofilizované mají mnohem menší chybovost, která byla součástí vyhodnocení. Chybovost jsme schopni odvodit od C konstanty, která by v ideální případě měla být 100. Konstanta C se vztahuje k energii adsorpce v první adsorbované vrstvě, a tudíž její hodnota indikuje sílu interakce adsorbent-adsorbát. Čím vyšší hodnota, tím větší důvěryhodnosti hodnota nabývá. Pokud se však pohybujeme při hodnotách konstanty C = 10 může být chybovost maximálně 20 %. Sušené vzorky s hodnotami konstanty C = 3 nebyly brány v potaz, protože jejich chybovost může odpovídat až 50 %.

Měření dvou sérií vzorků byl potvrzen trend, že se vzrůstající koncentrací NaOH se zmenšuje měrný povrch. Ten nám udává informaci, že čím je větší měrný povrch, tím více porézní materiál je. Můžeme si to představit díky jednotce měrného povrchu tak, že kdybychom vzali 1 g studovaného materiálu a rozprostřeli jej do 1 m<sup>2</sup>, tak by tomu odpovídala i pórovitost takto shromážděného materiálu.

Výsledky z tohoto měření podporují i hodnoty naměřené z mikroskopie atomárních sil a skenovací elektronové mikroskopie. Velikost pórů udávaná z AFM koresponduje s trendem zvyšujících se hodnot s klesající hodnotou pH. Také tak snímky z SEM poskytují náhled, že pórovitost vzorků s koncentrovanějšími přísadky NaOH je menší, zatímco nejpozvolnější strukturu mají vzorky fyzikálně síťované.

Hodnoty chemicky síťovaného vzorku bez NaOH a 0,5M NaOH mají velice nízkou hodnotu konstanty C, a tudíž jejich výsledky musíme brát s rezervou. Chemicky síťovaný materiál bez NaOH svou hodnotou nezapadá do trendu, což odpovídá 50 % možné chybovosti, kterou dle konstanty C má.

## 6.2 Transportní vlastnosti

V první fázi výzkumu bylo úkolem vytvořit cíleně modifikovatelné materiály nejenom z hlediska změny strukturních vlastností, ale především s ohledem na jejich vlastnosti charakterizovat (viz *strukturní a fyzikální vlastnosti*). Druhá část celého výzkumu si klade za cíl využít připravené hydrogely pro transportní účely a sledovat tak inkorporované (modelové) léčivo (diklofenak) a jeho uvolňování. Diklofenak byl vybrán na základě své lehké dostupnosti, jeho množství lze stanovit pomocí UV-VIS a také protože je to jedno z nejvyužívanějších léčiv pro lidi s bolestmi pohybového aparátu. Na základě výsledků z první fáze zkoumání byli vybráni 3 zástupci ze všech zkoumaných materiálů. Výběr byl proveden v závislosti na rozdílném chování (díky změně pH hydroxidem sodným) nebo pro porovnání rozlišného síťování (chemicky vs fyzikálně). Vybranými zástupci proto byly **chemicky** síťované hydrogely s přísádkem **2M NaOH**, **bez přísádku** a **fyzikálně bez přísádku** jakéhokoliv regulátoru vnitřního pH. Na těchto materiálech byly ověřeny transportní vlastnosti a jejich schopnost uvolňování modelové aktivní farmaceutické substance.

Toto pozorování studuje uvolňování léčiva diklofenaku, které bylo zabudováno do struktury xerogelů v koncentraci 150 mg/l. V daných systémech pozorujeme, jak rychle a v jakém množství se bude uvolňovat léčivo. V závislosti na těchto faktorech pak můžeme určit pro jakou aplikaci by byly připravené xerogely nejvhodnější. Zda by se jednalo o léčivou náplast s účinky zklidňující bolest rány nebo jako *scaffold* (lešení) zajišťující postupné uvolňování léčiva v organismu. Biokompatibilita sice nebyla v rámci této práce testována, avšak existují studie, které potvrzují snášenlivost a nezávadnost připravených hydrogelů pro organismus [69][70].

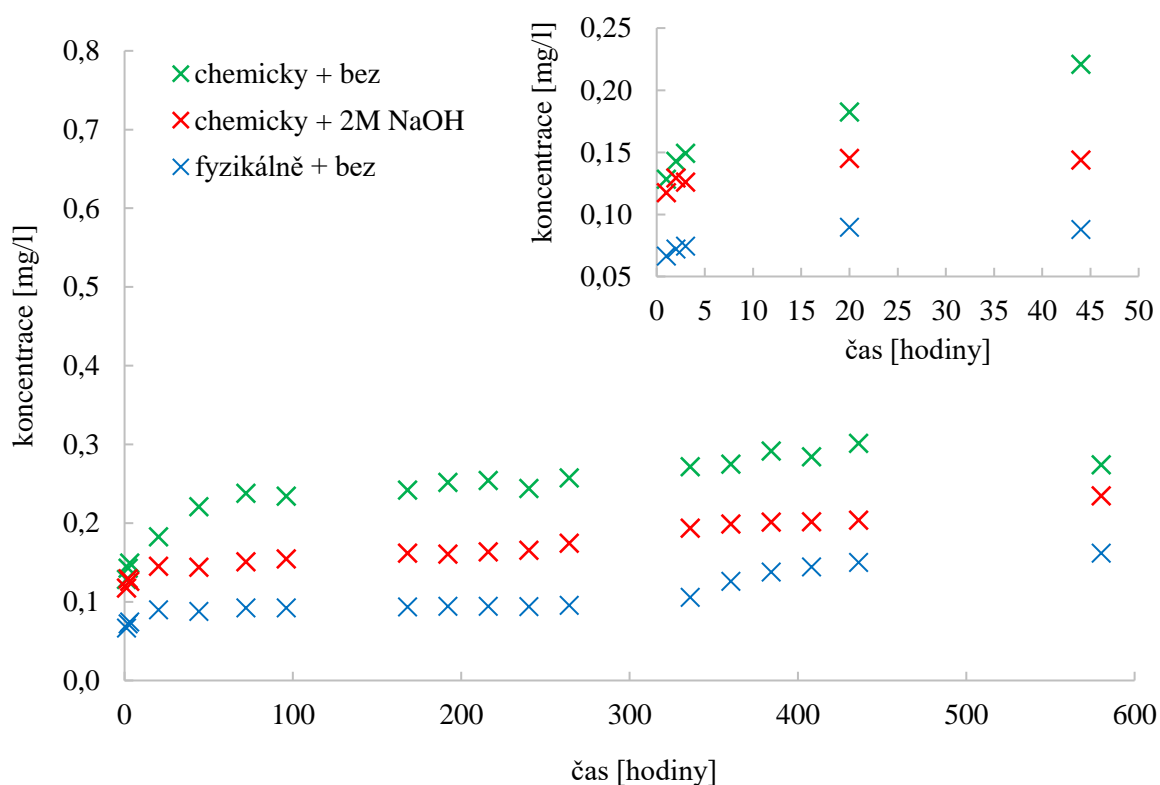
### 6.2.1 Uvolňování léčiva

Diklofenak je lékem užívaným na bolesti, záněty či na onemocnění dna. Jeho nejznámější užití je ve formě masti, kterou se potírá namáhaná oblast. První bariérou je tedy kůže, která činí značnou překážku pro transport léčiva do organismu. Pro úplné pochopení difúzních vlastností tohoto léčiva bylo vyzkoušeno samotné uvolňování do vody při laboratorní teplotě a teplotě lidského těla. Následovaly experimenty simulující transport přes lidskou kůži s využitím syntetických membrán StratM<sup>®</sup> (viz. kapitola 5.5).

Kinetika uvolňování diklofenaku z hydrogelů/xerogelů lišících se svými strukturními a mechanickými vlastnostmi je vidět na *obrázku 48* pro teplotu místnosti a na *obrázku 49* pro teplotu lidského těla tedy 37 °C. Při laboratorní teplotě docházelo k postupnému uvolňování, které se projevovalo malým nárůstem koncentrace léčiva ve vodě. Lze pozorovat rychlejší nárůst v prvních 50 hodinách, který se postupem času ustaluje do rovnoměrných přírůstků.

Přírůstek koncentrace léčiva v čase byl vztažen na jednotkovou hmotnost studovaných chitosan/PVA xerogelů s diklofenakem. Můžeme tak porovnávat uvolňování léčiva u různých materiálů, jež byly pro tento účel připraveny. V grafu vidíme, že značně dominuje uvolňování z **chemicky** připraveného hydrogelu **bez přísádku** disperzního prostředí čili bez úprav vnitřního pH hydrogelu. Byl zde jistý předpoklad, že k tomu bude docházet kvůli studovaným strukturním vlastnostem. Tento hydrogel dokázal nasát 2600 % vody své původní váhy. Voda hydrogel roztahuje převážně do stran a vykazuje tak anizotropické chování. To je dáno velikostí

jeho pórů, které byly na AFM detekovány na 2,5  $\mu\text{m}$ . Se schopností silně natahovat vodu uvolňuje materiál léčivo, které má malou molekulovou hmotnost a uniká tak velkými póry. Opačné strukturální vlastnosti byly naměřeny u **chemicky** síťovaného hydrogelu s přidavkem **2M NaOH**. Malé póry a nejmenší botnací schopnost (979 %) byly způsobeny silnějším propletením pomocí síťovacího činidla, jako to vysvětlují spektra z ramanské spektroskopie. Síťování se negativně odráželo i na viskoelastické vlastnosti, které byly měřeny pomocí reologických testů a na trhače. Pochopitelně tedy dochází k menšímu uvolňování léčiva. Nejméně diklofenaku však uvolňoval hydrogel **fyzikálně** síťovaný **bez přidavku** regulátoru vnitřního pH. Tento materiál sice vykazuje nejvyšší botnací kapacitu až 3117 %, ale také se roztahuje především do šířky. Výše zmíněné materiály botnají převážně do strany, čímž zvětší svůj povrch několikanásobně a vypuzují tak léčivo účinněji. Výsledky z XRD ukazují, že se jedná o velice dobře fyzikálně propletenou síť, která i přes značnou velikost pórů a měrného povrchu nepropouští diklofenak tak efektivně.

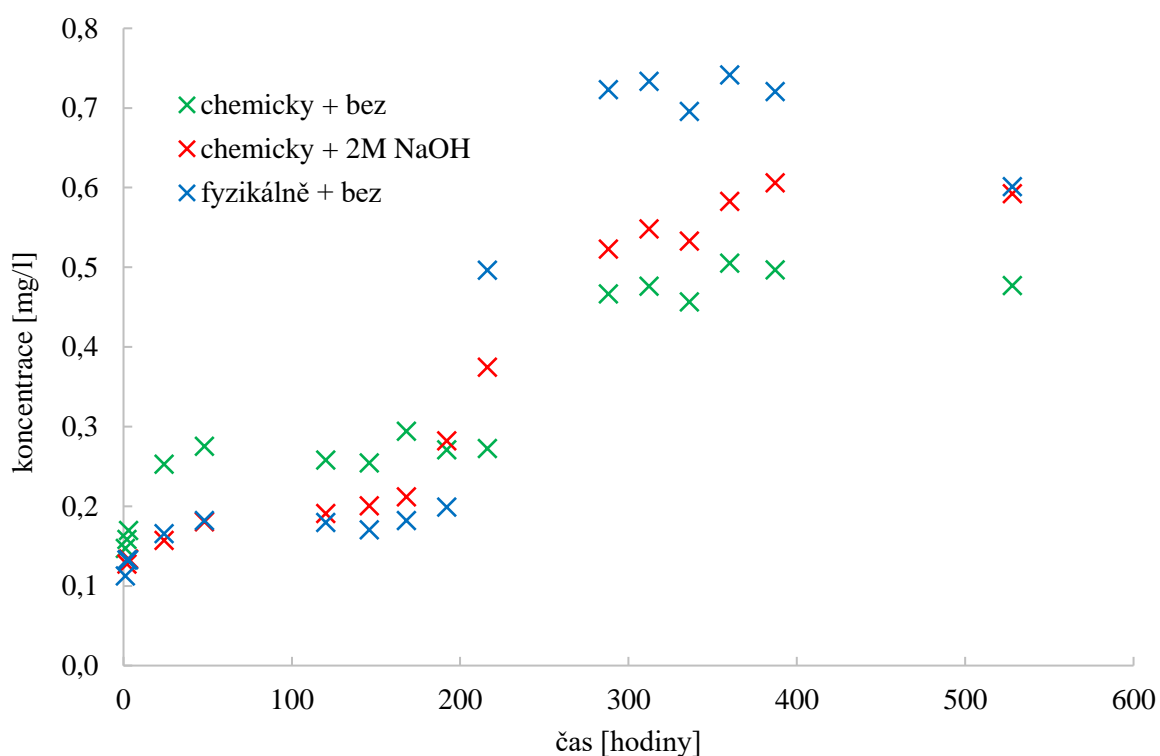


Obrázek 48: Koncentrace uvolněného diklofenaku z xerogelů ve vialce při laboratorní teplotě a detail zachycující prvotní a největší uvolňování léčiva

Při teplotě 37  $^{\circ}\text{C}$  dochází k rychlému nárůstu koncentrace již v prvních 24 hodinách. Tento průběh se ustaluje od počátku uvolňování do dvouseté hodiny, kdy dochází k markantním změnám kvůli částečnému rozpouštění hydrogelu. V tento moment můžeme pozorovat největší uvolňování, které se následující týden ustaluje do rovnovážných koncentrací, kdy se další modelové léčivo neuvolňuje a koncentrace tedy zůstává konstantní. Dochází zde také ke změně pořadí hydrogelů, kdy **fyzikálně** síťovaný hydrogel přebírá první pozici a **chemicky** síťovaný hydrogel **bez přidavku** zastává pozici poslední. V čase tohoto zlomu bylo pozorováno rozpouštění **fyzikálně** síťovaného hydrogelu, čímž došlo k porušení slabých nekovalentních

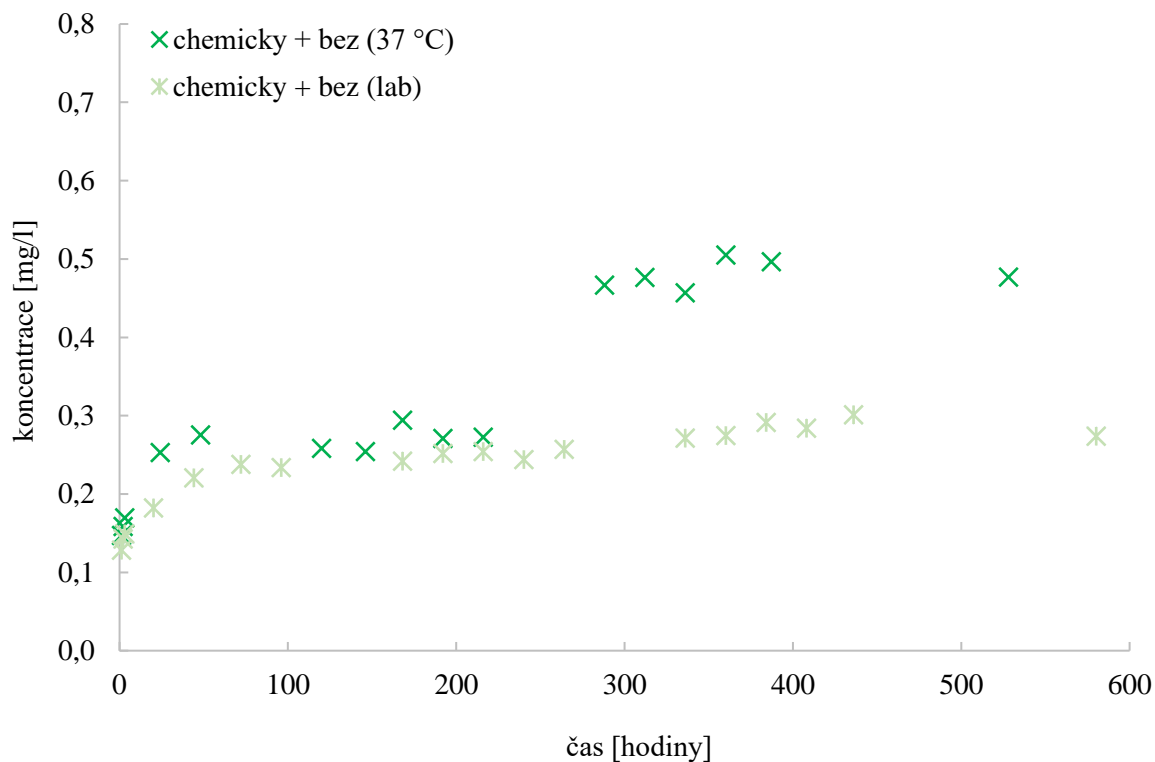
vazeb a díky tomu zakomponované léčivo rychleji uniká. Chemicky připravovaný hydrogel bez přísady rozpouští svou strukturu postupně, tudíž nedochází k tak razantnímu skoku změny koncentrací jako u ostatních dvou materiálů.

Zajímavostí je, že oba experimenty po první hodině mají podobné koncentrace ve všech studovaných vzorcích při různých teplotách. Můžeme tak usuzovat, že teplota má vliv na dlouhodobější uvolňování. Pokud bychom hledali mechanismus pro ustálené dávkování malých dávek léčiva, rozhodně bychom volili systém s nižší teplotou. Uvolňování při 37 °C by mohlo najít své uplatnění při uvolňování léčiva z tablet, kterým trvá cesta traktem značný čas a k největšímu uvolňování by došlo na tíženém místě.

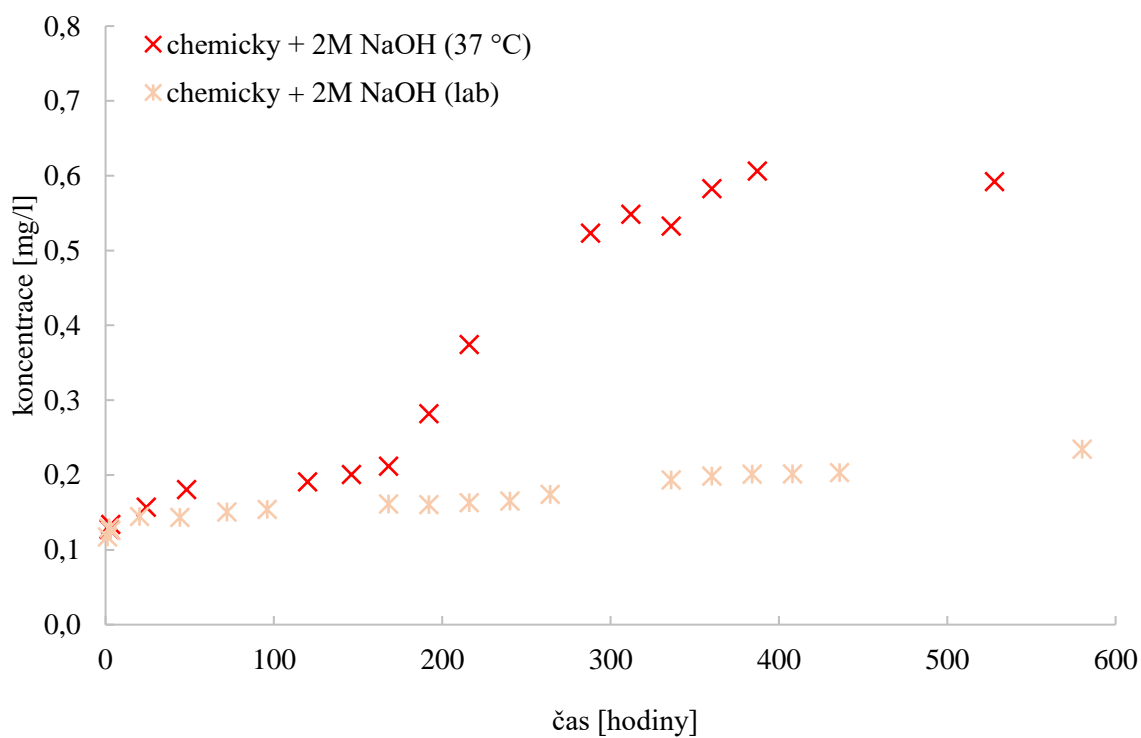


Obrázek 49: Koncentrace uvolněného diklofenaku z xerogelu ve vialce při 37 °C

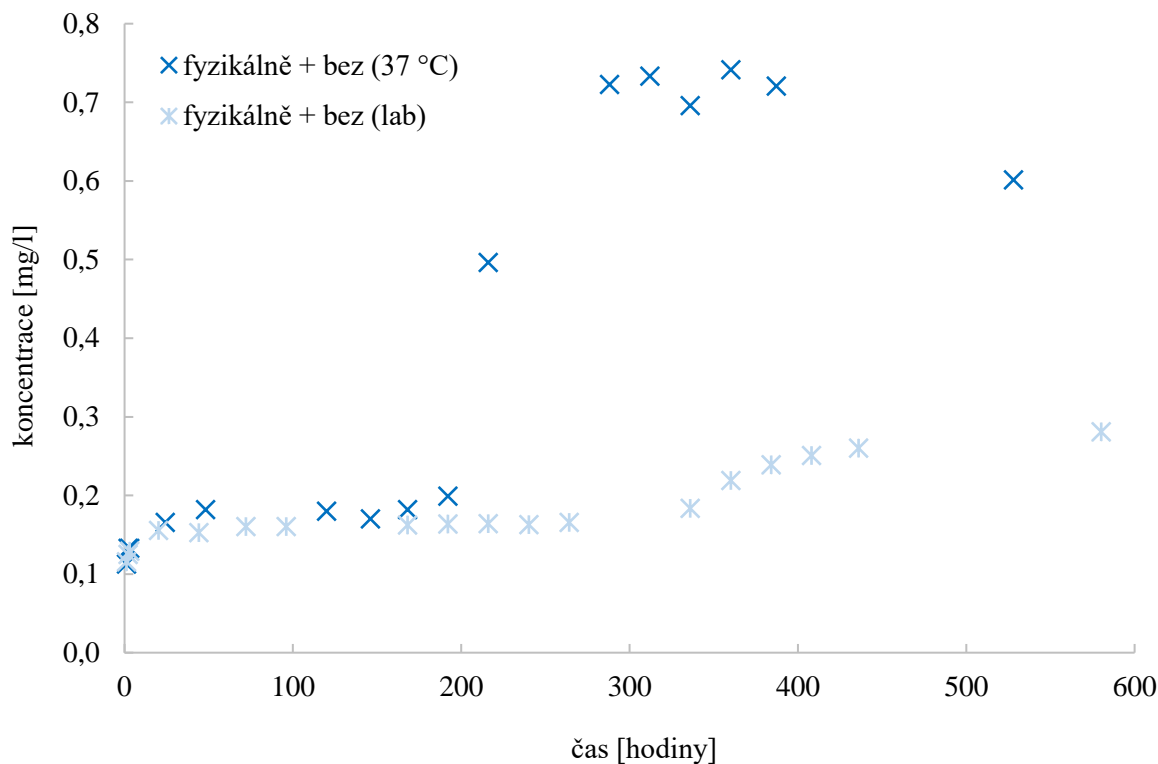
Na obrázcích 50, 51 a 52 je zobrazen průběh uvolňování jednotlivých hydrogelů. V každém grafu můžeme najít porovnání obou teplot a jejich průběh. Obecně platí, že uvolněné množství léčiva vzrůstá společně s teplotou a průběh je rychlejší. Stejně uvolňování probíhá prvních 200 hodin a po této době razantně stoupá koncentrace uvolněného diklofenaku s teplotou.



Obrázek 50: Průběh uvolňování léčiva z chemicky síťovaného xerogelu bez přidavku regulátoru vnitřního pH při různých teplotách

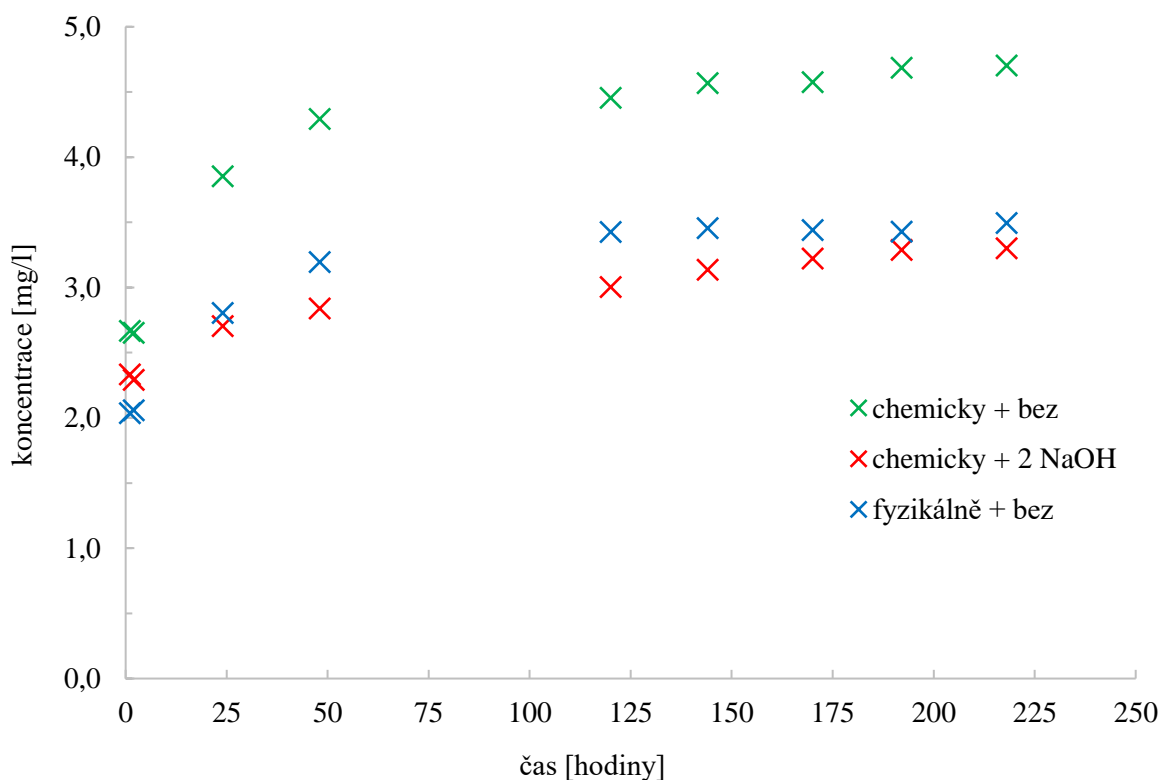


Obrázek 51: Průběh uvolňování léčiva z chemicky síťovaného xerogelu s přidavkem 2M NaOH při různých teplotách



Obrázek 52: Průběh uvolňování léčiva z fyzikálně síťovaného xerogelu bez přidavku regulátoru vnitřního pH při různých teplotách

Byly testovány i sorpční procesy hydrogelů neboli jaké množství modelového léčiva mohou jednotlivé hydrogely nasorbovat z roztoku. Po ponoření všech tří čistých xerogelů do roztoku diklofenaku došlo k okamžitému nasorbování až 50 % množství léčiva díky vytvořenému síťování. Po hodině botnání byl změřen roztok diklofenaku a jeho zbytkové množství léčiva. Nejvíce diklofenaku nabral **fyzikálně** síťovaný hydrogel, a to díky svým velkým pórům a největšímu měrnému povrchu. Přispívá k tomu i fakt, že léčivo má molekulovou hmotnost  $M_r = 296 \text{ g/mol}$ , což není mnoho. Došlo však i k pomalému vylučování diklofenaku zpět do roztoku, a to právě kvůli malé molární hmotnosti léčiva. K rozdílnému přijímání, a hlavně poté uvolňování, docházelo v závislosti na spletitosti struktur vytvořených rozdílným postupem přípravy xerogelů.



Obrázek 53: Změna koncentrace roztoku diklofenaku po absorpci léčiva čistým xerogelem při 37 °C

Vyrobené hydrogely uvolňují relativně malé množství léčiva. Jako vzor si můžeme vzít do porovnání fyzikální hydrogel, který uvolnil největší množství aktivní látky. I přesto, že se po 24 hodinách při teplotě 37 °C fyzikálně síťovaný hydrogel úplně rozpustil, tak nevydal ani po 528 hodinách více jak 12,3 mg/l aktivní látky. I přes velké póry, které byly potvrzeny na AFM (viz 5.4.7), SEM (viz 5.4.8) a také na BET (viz 5.4.9) se z koncentrace 150 mg/l léčiva zabudovaného do hydrogelu neuvolnilo ani 10 %.

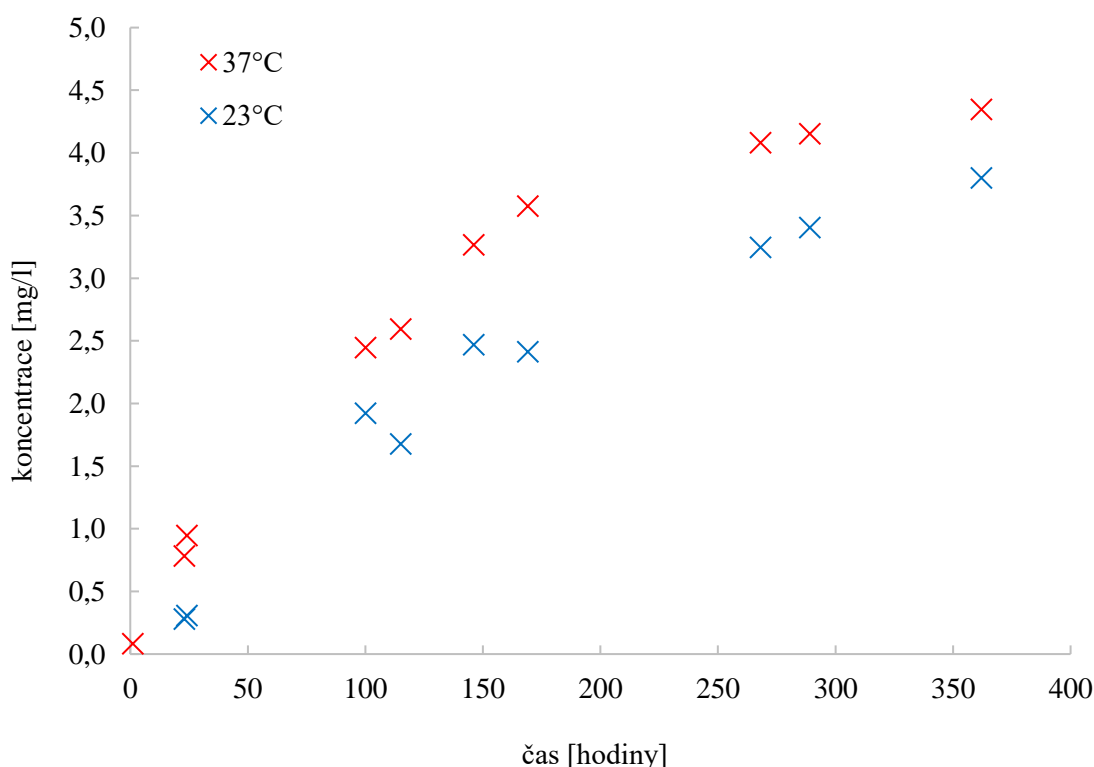
Léčivo totiž nebude drženo jen v pórech hydrogelu, ale můžete být zabudováno do struktury hydrogelu, kde drží poměrně pevně (viz malá uvolněná koncentrace). Dle výsledků uvolňování je diklofenak nejvíce zadržen u hydrogelu fyzikálně síťovaného, ze kterého se vlivem času a teploty postupně uvolňuje, a vyrovnává se tak koncentracím uvolněných u chemicky síťovaných. Tyto hydrogely zadržují léčivo v závislosti na síle zesítění, což je dáno změnou vnitřního prostředí pH. U zástupce s přísadkou 2M NaOH dochází k většímu zadržování než u bez přísadku. Je to dáno vazností a množstvím uzlů, které byly potvrzeny reologickým měřením, zkouškou tažnosti a také snímky z mikroskopii, které podávají vizuální doklad o 3D strukturách.

Aktivita hydrogelu k diklofenaku je viditelná i při opačném postupu (viz obrázek 53), kdy byly čisté xerogely vloženy do roztoku diklofenaku. Byl tak potvrzen fakt, že je léčivo uvnitř zachytáváno, protože došlo k sorpci až 50 %.

## 6.2.2 Franzovy cely

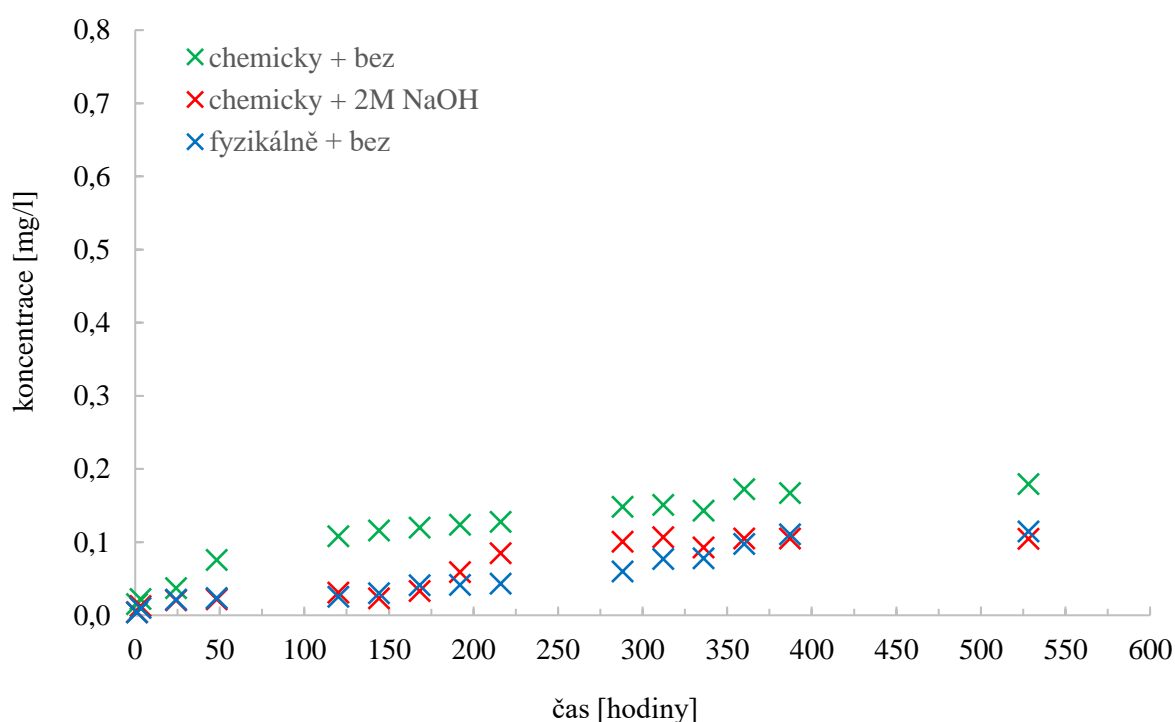
Franzovy cely byly nástrojem pro zkoumání penetrace diklofenaku přes membránu StratM<sup>®</sup> simulující lidskou kůži. Jejich sestavení a příprava vzorků je podrobně popsána v kapitolách 5.3 a 5.5.2. Transdermální podávání má mnoho výhod – léky se vyhnou střetu s játry, které mají samočisticí efekt, dále zabrání degradaci léku ve střevech a umožňuje dodávat léky kontrolovanou rychlostí. Na druhou stranu vrstva kůže přirozeně bojuje s vnějšími vlivy a prostup žádaného léčiva přirozeně zpomaluje. Další obtíží může být i styl podávání diklofenaku. Ten může být rozpuštěn ve vodě, nebo v případě této práce zabudován do pevného materiálu hydrogelu. Z tohoto důvodu byla provedena studie prostupu léčiva v roztoku i v pevné matici.

Uvolňování roztoku diklofenaku s koncentrací 150 mg/l přes StratM<sup>®</sup> membránu do přijímací komory je znázorněno na obrázku 54. V grafu můžeme porovnávat průběh uvolňování při různých teplotách. Při teplotě 37 °C se uvolňuje větší množství léčiva s podobným průběhem, který lze pozorovat i u teploty laboratorní. I přesto, že je uvolňování rychlejší a markantnější, hodnoty prostoupené koncentrace diklofenaku nejsou příliš vysoké. I přestože byl experiment realizován přes dva týdny, maximální naměřená hodnota koncentrace byla 4,3 mg/l v přijímací cele z původní koncentrace 150 mg/l, což činí necelá 3 %. Kvůli membráně, která zpomaluje prostup, došlo k razantnímu zpomalení, a to i přes zvýšenou teplotu a formě vodnému roztoku diklofenaku.



Obrázek 54: Prostup roztoku diklofenaku s koncentrací 150 mg/l do přijímací cely při různých teplotách

Transportní charakteristiky z hydrogelové matrice lze pozorovat na *obrázku 55*. Z nabitých vědomostí o prostupu diklofenaku lze porovnat signifikantní rozdíl pomalejšího prostupu z pevného materiálu. Objevuje se zde trend zmíněný již u *obrázku 48* a částečně *obrázku 49*. Pro možnost porovnání množství uvolňovaného léčiva bylo zvoleno i u *obrázku 55* stejné měřítko osy y jako přechozích dvou grafech. Největší množství léčiva uvolnil materiál **chemicky zesíťovaný bez přídavku** regulátoru vnitřního pH, za ním také chemicky síťovaný s **2M NaOH** a nejméně a nejpomaleji uvolňoval **fyzikálně síťovaný**. Velkou roli zde hraje síťování, které je v případě chemických vazeb sice pevné, ale nejspíše ne tolik spleťité, jako je tomu u fyzikálně síťovaného hydrogelu. Již na pohled se tento xerogel jevil velice kompaktně a rigidně. Botnací testy sice vykazují nejvyšší hodnoty právě u fyzikálního hydrogelu, ale tento údaj byl zaznamenán až po hodině botnání. Chemické hydrogely měly svou maximální absorpci v rámci 3 minut, což se projeví právě u transportů přes kůži, kde veškeré dění probíhá mnohem pomaleji. Po 528 hodinách byl experiment ukončen, ale i přesto je zde vidět tendence fyzikálního hydrogelu dorovnávat koncentrace chemicky síťovaných, což se mu nakonec podařilo.



*Obrázek 55: Koncentrace diklofenaku v přijímací cele Franzových cel*

Uvedený experiment tak jednoznačně prokázal, že cílená modifikace připravovaných hydrogelových matic může být nástrojem k účelné kontrole transportních vlastností. Malá změna pH prostředí dává vzniku rozdílných strukturních vlastností připravovaného hydrogelu. Strukturní rozdíly se odrážejí signifikantně na uvolňování zakomponovaného léčiva. S tímto vědomím lze vytvářet systémy na míru pro žádané aplikace.

## 7 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se zaměřuje na cílenou modifikaci strukturních, a v závislosti na tom i transportních vlastností biomedicínských hydrogelů. Prvotní fází celé práce je příprava zkoumaných hydrogelů, jejichž modifikace je realizována rozdílných druhem síťování (fyzikální a chemické) a změnou pH přídavky různě koncentrovaných disperzních prostředí neboli regulátorů vnitřního pH. V medicínských aplikacích je velice důležité, aby látky figurující v organismu byly biokompatibilní, biodegradabilní a netoxické. Je nezbytné brát v úvahu, pokud nějaký systém tvoříme, aby všechny tyto vlastnosti splňoval. Toho docílíme pečlivým výběrem materiálu a postupem přípravy. Jako modelové gelotvorné materiály byly zvoleny polyvinylalkohol a chitosan, které je možné síťovat chemicky i fyzikálně. Druhou částí práce bylo pozorování uvolňování modelové aktivní látky (diklofenaku) z těchto biomedicínských hydrogelů.

Hodnota pH při výrobě hydrogelu hraje významnou roli, protože při jeho změně dochází ke změně strukturních vlastností celého systému. Čím vyšší je hodnota pH, tím kompaktnější a rigidnější materiál připraven, což je možné pozorovat i vizuálně.

Ověření těchto předpokladů z pozorování bylo realizováno stanovením botnavého chování, které bylo při přídavku 0,15M NaCl až 5883 % vody. Při vzpomínaném jevu se projevilo anizotropní chování připravovaných systémů, kde bylo možné pozorovat rozdílná botnavost hydrogelu. U chemicky síťovaných převládalo botnání do roviny délky, zatímco u fyzikálně síťovaných se projevilo botnání hlavně v šířce. Tento experiment byl zajímavý i tím, že chemicky síťované materiály nabyly maximální míry absorpce vody již po 3 minutách, zatímco fyzikálně připravovaný hydrogel botnal do maximálních hodnot hodinu. Botnací schopnost, a tím i roztahování své sítě, vzrůstala se snižující se koncentrací přidaného hydroxidu, tedy se snižujícím se pH.

Zvýšení pH přídavkem NaOH mělo za následek provázanější a méně elastickou 3D strukturu materiálu, což je dokázáno testy viskoelastických vlastností a zkouškou tahu. Na reometru byly sledovány tvorby mikro a makrotrhlin. Mikrotrhliny značící pomalý rozpad hydrogelu byly prvně pozorovány u fyzikálně síťovaného hydrogelu, avšak charakter gelu si udržel delší dobu než chemicky připravované hydrogely. Jejich struktura se se stoupající koncentrací přidaného NaOH hroutila dříve. Zkouška pevnosti v tahu na tato pozorovaná data navazuje a potvrzuje, že čím propletenější strukturu zkoumáme, tím nižší elastické vlastnosti naměříme.

V závislosti na druhu síťování (fyzikální / chemické) můžeme sledovat rozličnou pevnost vazeb mezi polymery. Z toho důvodu byly vytvořeny dva přístupy pro syntézu hydrogelů – chemický s přídavkem epichlorhydrinu a fyzikální. Při prvním zmíněném přístupu jsme zkoumali jeho síťování v závislosti na měněném pH na FT-RAMAN a druhý vznikl metodou cyklického zmrazování a rozmrazování a jeho potenciální krystalinita byla zkoumána na XRD.

Tyto dva rozdílné přístupy daly vzniku různé porézních struktur, jak to ukazují snímky ze skenovací elektronové mikroskopie. Data byla potvrzena mikroskopií atomárních sil, která nám poskytla přesné údaje o velikosti pórů, které byly v rozmezí 0,2  $\mu\text{m}$  až desítek  $\mu\text{m}$  v závislosti na změně vnitřního pH hydrogelu. Komplexnost těchto dat je završena stanovením měrného povrchu, který definuje poréznost struktury hydrogelu.

V druhé části práce byly pro studii transportních vlastností vybráni tři zástupci zkoumaného materiálu:

1. chemický s přídavkem 2M hydroxidu,

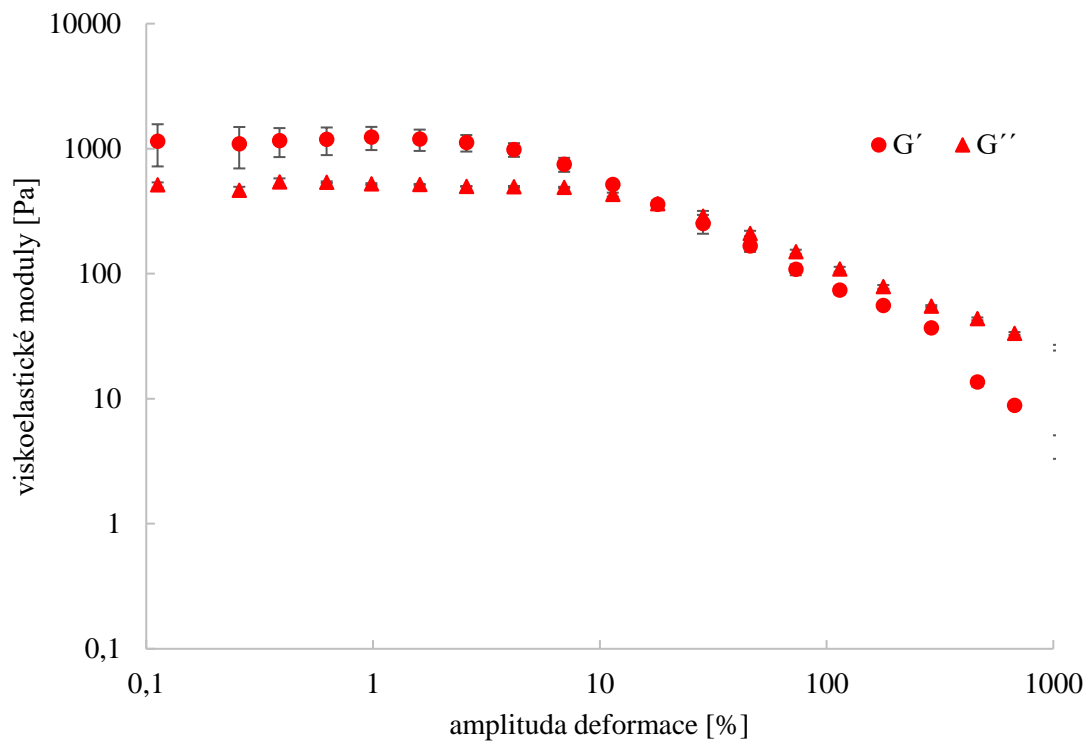
2. chemický bez přídavků,

3. fyzikální bez přídavků.

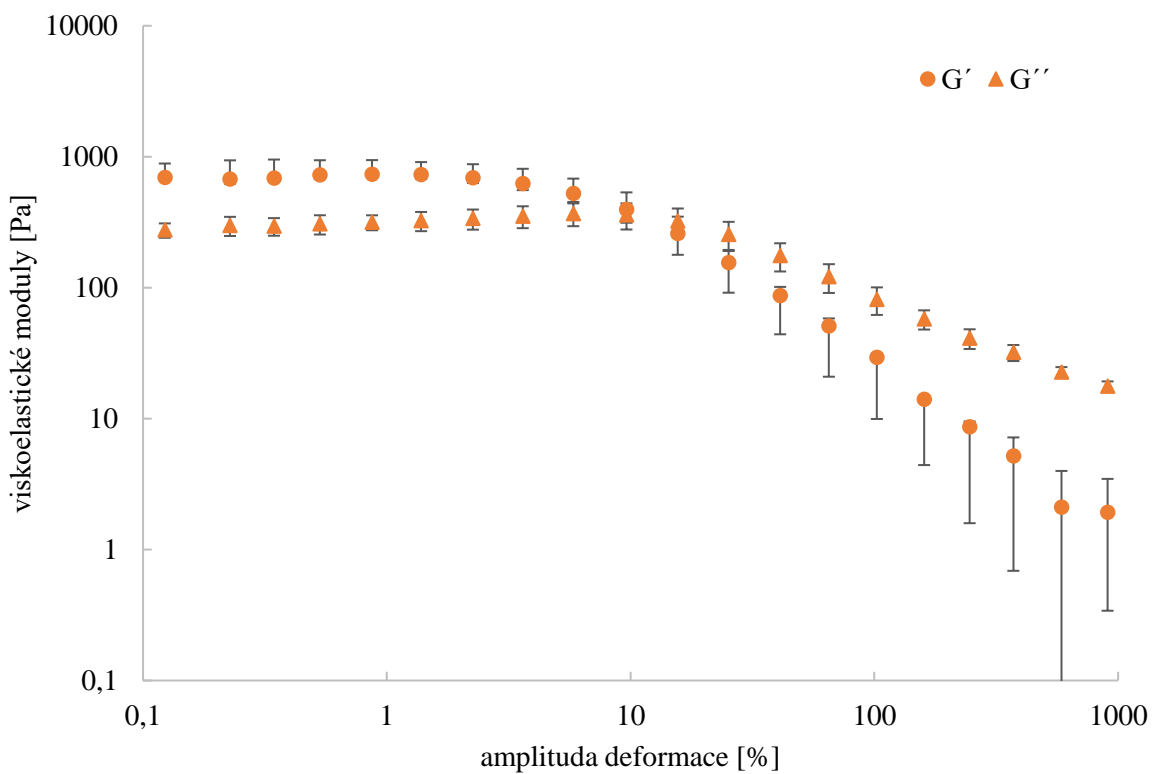
Výběr byl realizován na základě zkoumaných strukturních a fyzikálních vlastností a jejich největší odlišnosti v rámci výzkumu. Tato diference se prokázala při studiu transportu aktivní látky při laboratorní teplotě následovně: k největšímu uvolňování docházelo u chemicky síťovaného hydrogelu bez přídavků, následně při chemickém síťování s přídavkem 2M NaOH a nejmenší uvolňování probíhalo při fyzikálním síťování bez změny pH vnitřního prostředí. Paradoxem zkoumání bylo zjištění, že při fyzikálním síťování, kde vznikají ve struktuře materiálu velké póry, docházelo k nejmenšímu uvolňování aktivní látky. Toto uvolňování se postupem času navyšovalo až dorovnávalo uvolňování chemicky síťovaných hydrogelů. Na druhé straně jsme mohli pozorovat, že při navýšení teploty na 37 °C došlo k prudkému uvolnění diklofenaku u fyzikálně síťovaného hydrogelu, což dokazuje, v jaké velké míře je závislé fyzikální síťování na vnějších podmínkách prostředí. Prosté uvolňování léčiva do vody při různých teplotách bylo doplněno o studium difúzních vlastností přes vertikální cely přes membrány simulující kůži. Pochopitelně docházelo k mnohem menšímu prostupu aktivní látky v čase, avšak trend zmiňovaný výše byl zachován.

Výsledkem by měl být hydrogel, který můžeme připravit jako „šitý na míru“ s ohledem na transportní, mechanické a vnitřní strukturní vlastnosti, a to jen tím, že budeme měnit poměr síťovacích činidel fyzikálně-chemické podmínky hydrogelu. Doufám, že tomuto výzkumu se bude v budoucnu věnovat větší pozornost z důvodu eliminace nadměrného užívání léčiv bez 100% účinku na organismus.

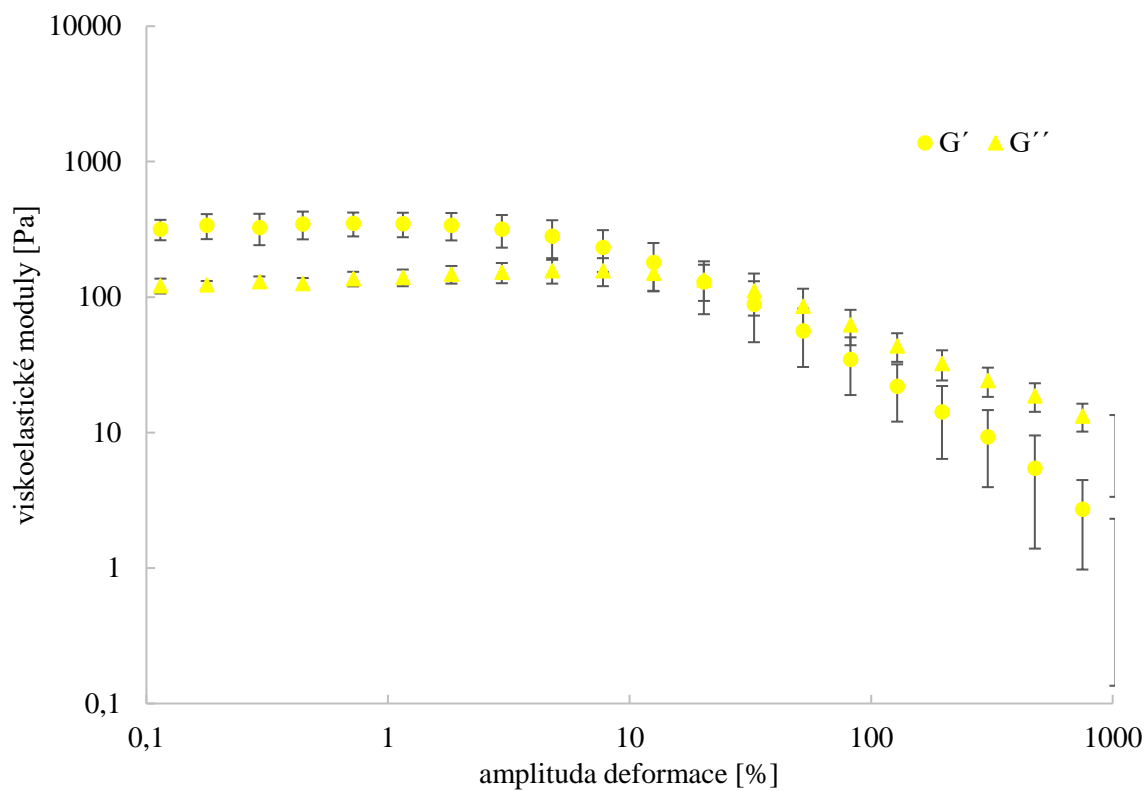
## 8 PŘÍLOHY



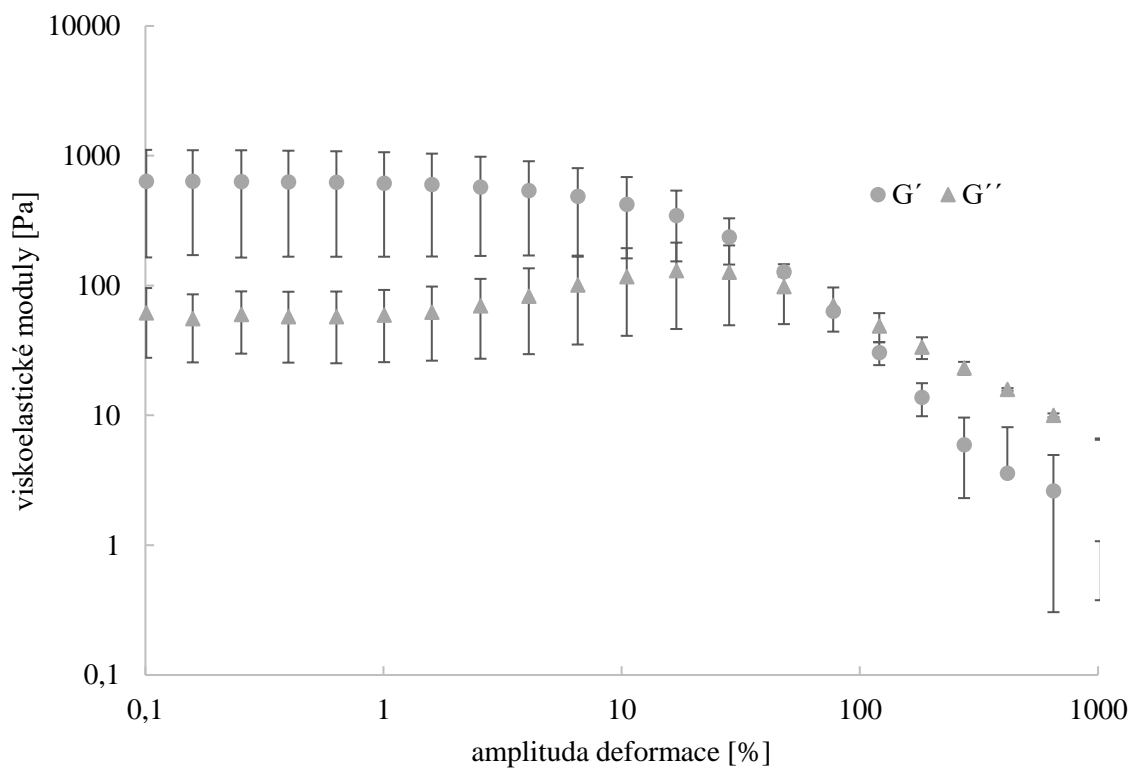
Obrázek 56: Závislost viskoelastických modulů na měnící se míře deformace pro chemicky síťovaný hydrogel s přidavkem 2M NaOH



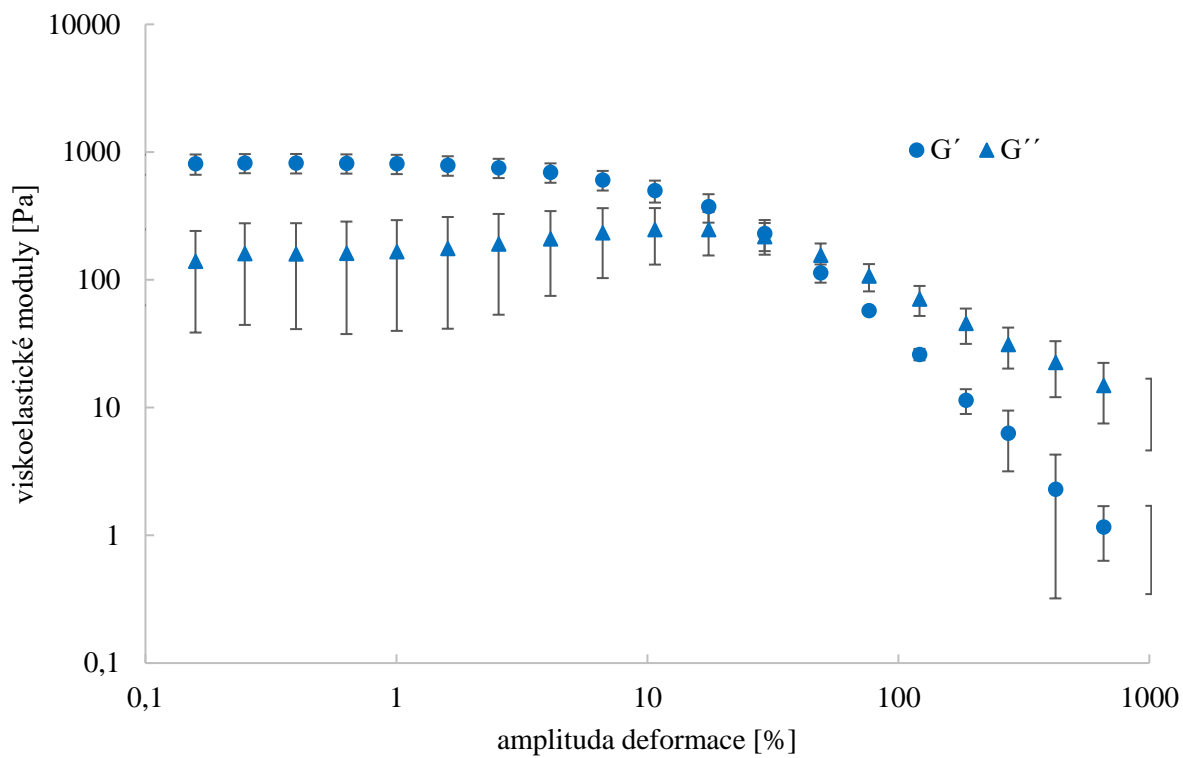
Obrázek 57: Závislost viskoelastických modulů na měnící se míře deformace pro chemicky síťovaný hydrogel s přidavkem 1M NaOH



Obrázek 58: Závislost viskoelastických modulů na měnící se míře deformace pro chemicky síťovaný hydrogel s přidavkem 0,5M NaOH



Obrázek 59: Závislost viskoelastických modulů na měnící se míře deformace pro chemicky síťovaný hydrogel s přidavkem 0,15M NaCl



Obrázek 60: Závislost viskoelastických modulů na měnící se míře deformace pro fyzikálně síťovaný hydrogel bez přídavku disperzního prostředí

## 9 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] VESELÝ, Karel, 1992. *Polymery: Struktura, syntéza, vlastnosti, zpracování: Určeno posluchačům vys. škol a všem pracovníkům, kteří se zabývají problematikou polymerů*. Brno: Česká společnost průmyslové chemie – pobočka Uniplast. ISBN 80-020-0951-7.
- [2] ŠŇUPÁREK, Jaromír, 2006. *Makromolekulární chemie: úvod do chemie a technologie polymerů*. Pardubice: Univerzita Pardubice. ISBN 80-719-4863-2.
- [3] CHEN, Yu, 2020. Properties and development of hydrogels. *Hydrogels Based on Natural Polymers*. Elsevier, 2020, 3-16 [cit. 2020-05-02]. ISBN 9780128164211. DOI: 10.1016/B978-0-12-816421-1.00001-X.
- [4] LIU, Haiyang, Bimlesh OJHA, Clifford MORRIS, Mengting JIANG, Ewa P. WOJCIKIEWICZ, Praveen P. N. RAO a Deguo DU, 2015. Positively Charged Chitosan and N-Trimethyl Chitosan Inhibit A $\beta$ 40 Fibrillogenesis. *Biomacromolecules*. **16**(8), 2363-2373 [cit. 2020-05-01]. ISSN 1525-7797. DOI: 10.1021/acs.biomac.5b00603.
- [5] SAHARIAH, Priyanka a Már MÁSSON, 2017. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure–Activity Relationship. *Biomacromolecules*. **18**(11), 3846-3868 [cit. 2020-05-01]. ISSN 1525-7797. DOI: 10.1021/acs.biomac.7b01058.
- [6] CHEUNG, Randy, Tzi NG, Jack WONG a Wai CHAN. Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Marine Drugs*. 2015, **13**(8), 5156-5186 [cit. 2020-05-01]. ISSN 1660-3397. DOI: 10.3390/md13085156.
- [7] VAVŘÍKOVÁ, Eva a Jarmila VINŠOVÁ. Chitosan and Its Pharmaceutical Applications. In: *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2009 [cit. 2020-05-01]. ISSN 0009-2770.
- [8] AHMED, Shakeel a Saiqa IKRAM, 2017. *Chitosan: derivatives, composites and applications*. Hoboken, NJ, USA: Wiley [cit. 2020-05-01]. ISBN 978-111-9364-818.
- [9] UENO, Hiroshi, Takashi MORI a Toru FUJINAGA, 2001. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **52**(2), 105-115 [cit. 2020-05-02]. DOI: 10.1016/S0169-409X(01)00189-2. ISSN 0169409X.
- [10] DE BRITTO, Douglas, Lucimara Aparecida FORATO a Odílio B.G. ASSIS, 2008. Determination of the average degree of quaternization of N,N,N-trimethylchitosan by solid state <sup>13</sup>C NMR. *Carbohydrate Polymers*. **74**(1), 86-91 [cit. 2020-05-01]. ISSN 01228617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2008.01.021.
- [11] KOHLI, Nupur, Vaibhav SHARMA, Stuart J. BROWN a Elena GARCÍA-GARETA, 2019. Synthetic polymers for skin biomaterials. *Biomaterials for Skin Repair and Regeneration*. Elsevier, 2019, 125-149 [cit. 2020-05-01]. ISBN 9780081025468. DOI: 10.1016/B978-0-08-102546-8.00005-4.

- [12] MC GANN, Michael J., Clement L. HIGGINBOTHAM, Luke M. GEEVER a Michael J.D. NUGENT, 2009. The synthesis of novel pH-sensitive poly(vinyl alcohol) composite hydrogels using a freeze/thaw process for biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics*. **372**(1-2), 154-161 [cit. 2021-04-01]. ISSN 03785173. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.01.008
- [13] BODUGOZ-SENTURK, Hatice, Celia E. MACIAS, Jean H. KUNG a Orhun K. MURATOGLU. Poly(vinyl alcohol)–acrylamide hydrogels as load-bearing cartilage substitute. *Biomaterials*. 2009, **30**(4), 589-596. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.10.010
- [14] BAKER, Maribel I., Steven P. WALSH, Zvi SCHWARTZ a Barbara D. BOYAN, 2012. A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. **100B**(5), 1451-1457 [cit. 2020-05-01]. ISSN 15524973. DOI: 10.1002/jbm.b.32694.
- [15] DVOŘÁČKOVÁ, Svatava, 2011. *Chemie pro každého, aneb, Rychlokurz chemie*. Olomouc: Rubico. ISBN 978-80-7346-098-3.2
- [16] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 3., přeprac. a rozš. Praha: VŠCHT, 1999. ISBN 8070803371.
- [17] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [18] MEZGER, Thomas, 2015. *Applied rheology: with Joe Flow on Rheology Road*. Graz: Anton Paar, 192 s. ISBN 9783950401608.4
- [19] BERGER, J, M REIST, J.M MAYER, O FELT a R GURNY, 2004. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **57**(1), 35-52 [cit. 2020-10-27]. ISSN 09396411. DOI: 10.1016/S0939-6411(03)00160-7
- [20] THOMAS, D.A. a L.H. SPERLING, 1978. Interpenetrating Polymer Networks. *Polymer Blends*. Elsevier, 1978 [cit. 2020-05-01]. ISBN 9780125468022 DOI: 10.1016/B978-0-12-546802-2.50007-5.
- [21] *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, 2009. Research Triangle Park, NC: IUPAC [cit. 2020-05-02]. ISBN 0-9678550-9-8.
- [22] 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*. 2013, **65**(9), 1172-1187 [cit. 2020-05-04]. DOI: 10.1016/j.addr.2013.04.002.
- [23] 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*. 1996, **68**(12), 2287-2311 [cit. 2020-05-04]. DOI:10.1351/pac199668122287.
- [24] CHAI, Qinyuan, Yang JIAO a Xinjun YU, 2017. Hydrogels for Biomedical Applications: Their Characteristics and the Mechanisms behind Them. *Gels*. **3**(1) [cit. 2020-05-02]. ISSN 2310-2861. DOI: 10.3390/gels3010006.

- [25] BATISTA, Rejane Andrade, Caio Gomide OTONI a Paula J.P. ESPITIA, 2019. Fundamentals of chitosan-based hydrogels: elaboration and characterization techniques. *Materials for Biomedical Engineering*. 2019, 61-81 [cit. 2020-05-02]. ISBN 9780128169018. DOI: 10.1016/B978-0-12-816901-8.00003-1.
- [26] COVIELLO, Tommasina, Pietro MATRICARDI, Carlotta MARIANECCI a Franco ALHAIQUE. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *Journal of Controlled Release*. 2007, **119**(1), 5-24 [cit. 2020-05-01]. ISSN 01683659. DOI: 10.1016/j.jconrel.2007.01.004
- [27] SHANG, Jing, Zhengzhong SHAO a Xin CHEN, 2008. Electrical Behavior of a Natural Polyelectrolyte Hydrogel: Chitosan/Carboxymethylcellulose Hydrogel. *Biomacromolecules*. **9**(4), 1208-1213 [cit. 2021-7-19]. ISSN 1525-7797. DOI:10.1021/bm701204j
- [28] M. WAYS, Twana, Wing LAU a Vitaliy KHUTORYANSKIY, 2018. Chitosan and Its Derivatives for Application in Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Polymers*. **10**(3), 267 [cit. 2020-05-01]. ISSN 2073-4360. DOI: 10.3390/polym10030267.
- [29] FAN, Lihong, Huan YANG, Jing YANG, Min PENG a Jin HU. Preparation and characterization of chitosan/gelatin/PVA hydrogel for wound dressings. *Carbohydrate Polymers*. 2016, **146**, 427-434 [cit. 2020-09-22]. ISSN 01448617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.03.002
- [30] APICELLA, A., B. CAPPELLO, M.A. DEL NOBILE, M.I. LA ROTONDA, G. MENSITIERI a L. NICOLAIS, 1993. Poly(Ethylene oxide) (PEO) and different molecular weight PEO blends monolithic devices for drug release. *Biomaterials*. **14**(2), 83-90 [cit. 2020-09-23]. ISSN 01429612. DOI: 10.1016/0142-9612(93)90215-N
- [31] PARHI, Rabinarayan, 2017. Cross-Linked Hydrogel for Pharmaceutical Applications: A Review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. **7**(4), 515-530 [cit. 2020-10-27]. ISSN 2228-5881. DOI: 10.15171/apb.2017.064
- [32] KIM, Seon Jeong, Sang Jun PARK a Sun I. KIM, 2003. Swelling behavior of interpenetrating polymer network hydrogels composed of poly(vinyl alcohol) and chitosan. *Reactive and Functional Polymers*. **55**(1), 53-59 [cit. 2020-05-03]. ISSN 13815148. DOI: 10.1016/S1381-5148(02)00214-6.
- [33] ISLAM, Atif, Tariq YASIN, Ijaz BANO a Muhammad RIAZ. Controlled release of aspirin from pH-sensitive chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogel. *Journal of Applied Polymer Science*. 2012, **124**(5), 4184-4192 [cit. 2020-09-23]. ISSN 00218995. DOI: 10.1002/app.35392
- [34] HUANG, Bai, Hui HE, Hao LIU, Yue ZHANG, Handong CHEN a Yuanbin MA, 2020. Co-precipitated poly(vinyl alcohol)/chitosan composites with excellent mechanical properties and tunable water-induced shape memory. *Carbohydrate Polymers*. **245** [cit. 2020-09-21]. ISSN 01448617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116445
- [35] GHOLAMALI, Iman, Manzarbanou ASNAASHARIISFAHANI a Eskandar ALIPOUR, 2020. Silver Nanoparticles Incorporated in pH-Sensitive Nanocomposite Hydrogels Based on Carboxymethyl Chitosan-Poly (Vinyl Alcohol) for Use in a Drug Delivery System. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*. **6**(2), 138-153 [cit. 2020-09-21]. ISSN 2364-4133. DOI: 10.1007/s40883-019-00120-7

- [36] PENG, Tao, Kang De YAO, Chen YUAN a Mattheus F. A. GOOSEN, Structural changes of pH-sensitive chitosan/polyether hydrogels in different pH solution. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. **32**(3), 591-596 [cit. 2020-05-03]. ISSN 0887624X. DOI: 10.1002/pola.1994.080320322.
- [37] AJAY, K Banga, 2011. *Transdermal and Intradermal Delivery of Therapeutic Agents: Application of Physical Technologies*. Boca Raton: CRC Press [cit. 2020-10-27]. ISBN 9780429191534. DOI: 10.1201/b10906
- [38] GONZALEZ, Jimena S., Leandro N. LUDUEÑA, Alejandra PONCE a Vera A. ALVAREZ, 2014. Poly(vinyl alcohol)/cellulose nanowhiskers nanocomposite hydrogels for potential wound dressings. *Materials Science and Engineering: C*. **34**, 54-61 [cit. 2020-05-03]. ISSN 09284931. DOI: 10.1016/j.msec.2013.10.006.
- [39] TANG, Jingyu, Luhan BAO, Xue LI, Lin CHEN a Feng F. HONG, 2015. Potential of PVA-doped bacterial nano-cellulose tubular composites for artificial blood vessels. *Journal of Materials Chemistry B*. **3**(43), 8537-8547 [cit. 2020-05-03]. ISSN 2050-750X. DOI: 10.1039/C5TB01144B.
- [40] KAMOUN, Elbadawy A., El-Refaie S. KENAWY, Tamer M. TAMER, Mahmoud A. EL-MELIGY a Mohamed S. MOHY ELDIN, 2015. Poly (vinyl alcohol)-alginate physically crosslinked hydrogel membranes for wound dressing applications: Characterization and bio-evaluation. *Arabian Journal of Chemistry*. **8**(1), 38-47 [cit. 2020-05-03]. ISSN 18785352. DOI: 10.1016/j.arabjc.2013.12.003.
- [41] YANG, Xiaomin, Qi LIU, Xiliang CHEN, Feng YU a Zhiyong ZHU, 2008. Investigation of PVA/ws-chitosan hydrogels prepared by combined  $\gamma$ -irradiation and freeze-thawing. *Carbohydrate Polymers*. **73**(3), 401-408 [cit. 2020-05-03]. ISSN 01448617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2007.12.008.
- [42] ZHANG, Di, Wei ZHOU, Bing WEI, Xin WANG, Rupei TANG, Jiemin NIE a Jun WANG, 2015. Carboxyl-modified poly(vinyl alcohol)-crosslinked chitosan hydrogel films for potential wound dressing. *Carbohydrate Polymers*. **125**, 189-199 [cit. 2020-05-03]. ISSN 01448617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.02.034.
- [43] KANATT, Sweetie R., M.S. RAO, S.P. CHAWLA a Arun SHARMA, 2012. Active chitosan-polyvinyl alcohol films with natural extracts. *Food Hydrocolloids*. **29**(2), 290-297 [cit. 2020-05-03]. ISSN 0268005X. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2012.03.005.
- [44] GARNICA-PALAFOX, I.M., F.M. SÁNCHEZ-ARÉVALO, C. VELASQUILLO, et al., 2013. Mechanical and structural response of a hybrid hydrogel based on chitosan and poly(vinyl alcohol) cross-linked with epichlorohydrin for potential use in tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. **25**(1), 32-50 [cit. 2020-05-03]. ISSN 0920-5063. DOI: 10.1080/09205063.2013.833441.
- [45] GARCÍA-LÓPEZ, J., D. GARCIADIEGO-CÁZARES a Y. MELGAREJO-RAMÍREZ, 2015. Chondrocyte differentiation for auricular cartilage reconstruction using a chitosan based hydrogel. *Histol Histopathol*. **30**(12), 1477-1485 [cit. 2020-05-03]. ISSN 1699-59848 DOI: 10.14670/HH-11-642.
- [46] SIEGEL, Ronald A. a Bruce A. FIRESTONE, 1988. PH-dependent equilibrium swelling properties of hydrophobic polyelectrolyte copolymer gels. *Macromolecules*. **21**(11), 3254-3259 [cit. 2020-05-03]. ISSN 0024-9297. DOI:10.1021/ma00189a021

- [47] MOHAMED, Riham R., Mahmoud H. Abu ELELLA a Magdy W. SABAA, 2015. Synthesis, characterization and applications of N- quaternized chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules*. **80**, 149-161 [cit. 2020-09-23]. ISSN 01418130. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.06.041
- [48] GUDEMAN, Linda F. a Nikolaos A. PEPPAS. Preparation and characterization of pH-sensitive, interpenetrating networks of poly(vinyl alcohol) and poly(acrylic acid). *Journal of Applied Polymer Science*. **55**(6), 919-928 [cit. 2020-09-18]. ISSN 00218995. DOI: 10.1002/app.1995.070550610
- [49] GUDEMAN, Linda F. a Nikolaos A. PEPPAS, 1995. PH-sensitive membranes from poly(vinyl alcohol)/poly(acrylic acid) interpenetrating networks. *Journal of Membrane Science*. **107**(3), 239-248 [cit. 2020-09-18]. ISSN 03767388. DOI: 10.1016/0376-7388(95)00120-7
- [50] SHIN, H.S., S.Y. KIM a Y. M. LEE, 8 July 1998n. 1. Permeation of solutes through interpenetrating polymer network hydrogels composed of poly (vinyl alcohol) and poly (acrylic acid). *Journal of Applied Polymer Science*. **69**(3), 479-486 [cit. 2020-09-18]. ISSN 00218995. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4628(19980718)69
- [51] YAO, Kang De, Tao PENG, M. F. A. GOOSEN, Ji Mei MIN a Yu Yin HE. PH-sensitivity of hydrogels based on complex forming chitosan: Polyether interpenetrating polymer network. *Journal of Applied Polymer Science*. **48**(2), 343-354 [cit. 2020-09-18]. ISSN 00218995. DOI: 10.1002/app.1993.070480218
- [52] YAO, Kang De, Tao PENG, Han Bao FENG a Yu Ying HE. Swelling kinetics and release characteristic of crosslinked chitosan: Polyether polymer network (semi-IPN) hydrogels. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. **32**(7), 1213-1223 [cit. 2020-09-18]. ISSN 0887624X. DOI: 10.1002/pola.1994.080320702
- [53] MA, Qianyun, Tieqiang LIANG, Lele CAO a Lijuan WANG, 2018. Intelligent poly (vinyl alcohol)-chitosan nanoparticles-mulberry extracts films capable of monitoring pH variations. *International Journal of Biological Macromolecules*. **108**, 576-584 [cit. 2020-09-22]. ISSN 01418130. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.049
- [54] FIROUZABADI, Vahide Jamali a Mehrdad KOKABI, 2019. Triple stimuli responsive poly(vinyl alcohol)chitosan/ nanoclay/nanosilver nanocomposite hydrogel. *Iranian Journal of Polymer Science and Technology*. **32**(1), 3-14 [cit. 2020-09-22]. ISSN 1016-3255. DOI: 10.22063/JIPST.2019.1631
- [55] GÜNGÖR, Ahmet, Didem DEMIR, Nimet BÖLGEN, Tonguç ÖZDEMİR a Rükân GENÇ. Dual stimuli-responsive chitosan grafted poly(NIPAM-co-AAc)/poly(vinyl alcohol) hydrogels for drug delivery applications. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 1-10 [cit. 2020-09-22]. ISSN 0091-4037. DOI:10.1080/00914037.2020.1765355
- [56] WANG, Hualin, Ru ZHANG, Heng ZHANG, Suwei JIANG, Huan LIU, Min SUN a Shaotong JIANG, 2015. Kinetics and functional effectiveness of nisin loaded antimicrobial packaging film based on chitosan/poly(vinyl alcohol). *Carbohydrate Polymers*. **127**, 64-71 [cit. 2020-09-23]. ISSN 01448617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.03.058

- [57] CHHATRI, Amita, Jaya BAJPAI a A.K. BAJPAI, 2014. Designing polysaccharide-based antibacterial biomaterials for wound healing applications. *Biomatter*. **1**(2), 189-197 [cit. 2020-09-23]. ISSN 2159-2535. DOI: 10.4161/biom.19005
- [58] KIM, So Yeon, Young Moo LEE, 1999. Drug release behavior of electrical responsive poly(vinyl alcohol)/poly(acrylic acid) IPN hydrogels under an electric stimulus. *Journal of Applied Polymer Science*. **74**(7), 1752-1761 [cit. 2020-09-23]. ISSN DOI: 10.1002/(SICI)1097-4628(19991114)74:7<1752::AID-APP18>3.0.CO;2-H
- [59] LI, Yan, Yumin DU, Yufeng TANG a Xiaoying WANG, 2009. A novel pH-sensitive and freeze-thawed carboxymethyl chitosan/poly(vinyl alcohol) blended hydrogel for protein delivery. *Polymer International*. **58**(10), 1120-1125 [cit. 2020-09-24]. ISSN 09598103. DOI: 10.1002/pi.2639
- [60] SOKKER, H.H., A.M. ABDEL GHAFAR, Y.H. GAD a A.S. ALY, 2009. Synthesis and characterization of hydrogels based on grafted chitosan for the controlled drug release. *Carbohydrate Polymers*. **75**(2), 222-229 [cit. 2020-09-24]. ISSN 01448617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2008.06.015
- [61] NGUYEN, Hiep X., Behnam Dasht BOZORG, Yujin KIM, Alena WIEBER, Gudrun BIRK, Dieter LUBDA a Ajay K. BANGA, 2018. Poly (vinyl alcohol) microneedles: Fabrication, characterization, and application for transdermal drug delivery of doxorubicin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **129**, 88-103 [cit. 2020-09-30]. ISSN 09396411. DOI: 10.1016/j.ejpb.2018.05.017
- [62] NGUYEN, Hiep X., Ashana PURI, Sonalika Arup BHATTACCHARJEE a Ajay K. BANGA, 2018. Qualitative and quantitative analysis of lateral diffusion of drugs in human skin. *International Journal of Pharmaceutics*. **544**(1), 62-74 [cit. 2020-09-30]. ISSN 03785173. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.04.013
- [63] TAVEIRA, Stephânia F., Auro NOMIZO a Renata F.V. LOPEZ, 2009. Effect of the iontophoresis of a chitosan gel on doxorubicin skin penetration and cytotoxicity. *Journal of Controlled Release*. **134**(1), 35-40 [cit. 2020-09-30]. ISSN 01683659. DOI: 10.1016/j.jconrel.2008.11.002
- [64] DATHATHRI, Eshwari, Satyapriya LAL, Mohit MITTAL, Goutam THAKUR a Shounak DE, 2020. Fabrication of low-cost composite polymer-based micro needle patch for transdermal drug delivery. *Applied Nanoscience*. **10**(2), 371-377 [cit. 2020-09-30]. ISSN 2190-5509. DOI: 10.1007/s13204-019-01190-3
- [65] ZU, Yuangang, Ying ZHANG, Xiuhua ZHAO, Chang SHAN, Shuchong ZU, Kunlun WANG, Yong LI a Yunlong GE, 2012. Preparation and characterization of chitosan–polyvinyl alcohol blend hydrogels for the controlled release of nano-insulin. *International Journal of Biological Macromolecules*. **50**(1), 82-87 [cit. 2020-09-30]. ISSN 01418130. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2011.10.006
- [66] JÓZWIĄK, Tomasz, Urszula FILIPKOWSKA, Paula SZYMCZYK, Joanna RODZIEWICZ a Artur MIELCAREK, 2017. Effect of ionic and covalent crosslinking agents on properties of chitosan beads and sorption effectiveness of Reactive Black 5 dye. *Reactive and Functional Polymers*. **114**, 58-74 [cit. 2021-6-21]. ISSN 13815148. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2017.03.007

- [67] ROMANO, Keith P., Adam G. NEWMAN, Rami W. ZAHRAN a Julie T. MILLARD, 2007. DNA Interstrand Cross-Linking by Epichlorohydrin. *Chemical Research in Toxicology*. **20**(5), 832-838 [cit. 2021-6-21]. ISSN 0893-228X. DOI:10.1021/tx700066h
- [68] VASKOVA, Hana, Vojtěch KŘESÁLEK, 2011. Quasi real-time monitoring of epoxy resin crosslinking via Raman microscopy. *International Journal of Mathematical Models and Methods in Applied Sciences*. **5**, 1197-1204 [cit. 2021-07-09].
- [69] MELGAREJO-RAMÍREZ, Yaaziel, Roberto SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, Zaira GARCÍA-CARVAJAL, Julieta GARCÍA-LÓPEZ, Claudia GUTIÉRREZ-GÓMEZ, Gabriel LUNA-BARCENAS, Clemente IBARRA a Cristina VELASQUILLO, 2014. Biocompatibility of Human Auricular Chondrocytes Cultured onto a Chitosan/Polyvinyl Alcohol/Epichlorohydrin-Based Hydrogel for Tissue Engineering Application. *International Journal of Morphology*. **32**(4), 1347-1356. ISSN 0717-9502. DOI:10.4067/S0717-95022014000400036
- [70] SONG, Qingping, Jiangang GAO, Ying LIN, Ze ZHANG a Yixin XIANG, 2020. Synthesis of cross-linking chitosan-PVA composite hydrogel and adsorption of Cu(II) ions. *Water Science and Technology*. **81**(5), 1063-1070. ISSN 0273-1223. DOI: 10.2166/wst.2020.204