



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

**KORELACE TRANSPORTNÍCH A VISKOELASTICKÝCH
VLASTNOSTÍ HYDROGELŮ S DIFÚZNÍM GRADIENTEM**

CORRELATION OF TRANSPORT AND VISCOELASTIC PROPERTIES OF HYDROGELS WITH DIFFUSION
GRADIENT

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Romana Ščotková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1683/2021
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Romana Ščotková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Jiří Smilek, Ph.D.**

Akademický rok: 2021/22

Název bakalářské práce:

Korelace transportních a viskoelastických vlastností hydrogelů s difúzním gradientem

Zadání bakalářské práce:

- 1) Provést literární rešerši zaměřenou na přípravu gradientových hydrogelů a jejich následnou charakterizaci.
- 2) Optimalizace metodiky přípravy gradientových hydrogelů se zaměřením především na polysacharidové hydrogely.
- 3) Provést sérii experimentů vedoucí k přípravě gradientových hydrogelů a jejich úspěšné charakterizaci – prokázání gradientové struktury.
- 4) Vyhodnotit, diskutovat naměřené výsledky a vyvozovat z nich logické závěry.

Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2022:

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

Romana Ščotková
studentka

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Předložená bakalářská práce si kladla za cíl přípravu hydrogelů s difúzním gradientem a prokázání gradientové struktury hydrogelů z hlediska viskoelastických a transportních vlastností. S ohledem na možné biomedicínské aplikace byl pro přípravu vybrán kationický polysacharid chitosan, a to zejména pro své antimikrobiální a biokompatibilní vlastnosti. Výsledné gradientové hydrogely byly následně charakterizovány pomocí oscilačních testů, při kterých byly sledovány rozdíly při použití různých koncentrací a molekulových hmotností chitosanu, koncentrací síťovacího činidla, disperzních prostředí pro rozpuštění chitosanu a různé doby síťování gelu. Pro potvrzení vytvořené gradientové struktury byly vzorky podrobeny také sušícím experimentům. Schopnost transportu aktivních látek byla u hydrogelů potvrzena vizuálním hodnocením prostupu anionického barviva (bromthymolová modř) při procesu gelace. Z výsledků získaných během experimentální části bakalářské práce lze dojít k závěru, že viskoelastické vlastnosti hydrogelů lze modifikovat změnou vybraných parametrů při samotné přípravě. Potvrzen byl také předpoklad, že s lepšími mechanickými vlastnostmi hydrogelů dochází ke zhoršení vlastností transportních. Metodou řízené difuze bylo možné připravit hydrogel s postupným gradientem hustoty síťování, čímž bylo možné modifikovat viskoelastické a transportní vlastnosti.

KLÍČOVÁ SLOVA

Hydrogely, difúzní gradient, reologie, sušina, transportní vlastnosti, viskoelastické vlastnosti

ABSTRACT

The aim of the presented bachelor thesis was to prepare hydrogels with diffusion gradient and to demonstrate the gradient structure of hydrogels in terms of viscoelastic and transport properties. With regard to potential biomedical applications, the cationic polysaccharide chitosan was selected for the preparation, especially for its antimicrobial and biocompatible properties. The resulting gradient hydrogels were subsequently characterized by oscillation tests to observe the differences using different concentrations and molecular weights of chitosan, crosslinking agent concentrations, dispersion environments for chitosan dissolution, and different gel crosslinking times. The samples were also subjected to drying experiments to confirm the gradient structure formed. The ability of the hydrogels to transport the active species was confirmed by visually evaluating the permeation of the anionic dye (bromothymol blue) during the gelation process. From the results obtained during the experimental part of the bachelor thesis it can be concluded that the viscoelastic properties of hydrogels can be modified by changing selected parameters during the preparation itself. It was also confirmed the assumption that with better mechanical properties of hydrogels there is a deterioration of transport properties. By controlled diffusion method, it was possible to prepare a hydrogel with a gradual gradient of crosslinking density, thus modifying the viscoelastic and transport properties.

KEY WORDS

Hydrogels, diffusion gradient, rheology, dry matter, transport properties, viscoelastic properties

ŠČOTKOVÁ, Romana. *Korelace transportních a viskoelastických vlastností hydrogelů s difúzním gradientem*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138855>.
Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Jiří Smilek.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych nejprve ráda poděkovala vedoucímu své bakalářské práce Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a všudypřítomný optimismus. Poděkování patří také Ing. Natalii Zinkovské, Ph.D. za její ochotu a velkou pomoc při experimentální části i zpracování výsledků. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a příteli za trpělivost a podporu během celého studia.

OBSAH

1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Hydrogely	9
2.1.1 Vlastnosti	9
2.1.2 Aplikace	11
2.2 Hydrogely s difúzním gradientem	12
2.2.1 Vlastnosti	12
2.2.2 Příprava	13
2.2.3 Aplikace	14
2.3 Chitosan	15
2.3.1 Vlastnosti	16
2.3.2 Využití	16
2.4 Transportní vlastnosti.....	17
2.5 Reologie	18
2.5.1 Tokové testy.....	18
2.5.2 Newtonovské a neneutronovské kapaliny	19
2.5.3 Oscilační testy	20
3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	22
3.1 Příprava gradientových hydrogelů.....	22
3.2 Reologické vlastnosti gradientových hydrogelů	27
3.3 Transportní vlastnosti gradientových hydrogelů.....	29
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
4.1 Použité chemikálie.....	31
4.2 Použité přístroje	31
4.3 Příprava vzorků	31
4.3.1 Příprava homogenního hydrogelu.....	31
4.3.2 Příprava hydrogelu s difuzním gradientem.....	31
4.4 Prokázání gradientové struktury.....	32

4.4.1	Charakterizace hydrogelů pomocí oscilačních testů	32
4.4.2	Sušicí charakteristika	33
4.5	Příprava vzorku pro transportní experimenty	34
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	35
5.1	Charakterizace přípravy gradientových hydrogelů.....	35
5.2	Prokázání gradientové struktury pomocí oscilačních testů na reometru	37
5.2.1	Vliv koncentrace chitosanu.....	38
5.2.2	Vliv koncentrace síťovacího činidla	41
5.2.3	Vliv molekulové hmotnosti chitosanu	42
5.2.4	Vliv disperzního prostředí, ve kterém byl chitosan rozpuštěn	44
5.2.5	Vliv doby síťování	46
5.3	Stanovení pevného podílu.....	48
5.4	Transportní experimenty.....	50
6	ZÁVĚR.....	53

1 ÚVOD

Hydrogelové materiály jsou díky svým unikátním vlastnostem a široké možnosti využití již několik let předmětem rozsáhlých studií. Jejich jedinečnou schopností je vykazovat chování podobné pevným látkám, a to i přes to, že pevný disperzní podíl tvoří pouze zlomek jejich celkové hmotnosti. S technologickým pokrokem jsou ale na využívané materiály kladeny vyšší nároky, zejména v oblasti přesnosti a preciznosti jejich působení. Přesnější zaměření a schopnost modifikovat své vlastnosti v závislosti na podmínkách prostředí nabízí tzv. gradientové hydrogely, které vykazují změnu alespoň u jedné vlastnosti ve své struktuře.

Rozdíl mezi uniformními a gradientovými hydrogely je v jejich přípravě, která je u hydrogelů s gradientem vždy alespoň dvoustupňová. Příprava zahrnuje generování gradientu pomocí prekursorního roztoku, který po přidání síťovacího činidla tvoří trojrozměrnou gelovitou strukturu. Řadu výhod, které s sebou tyto inteligentní hydrogely nesou je možné využívat v širokém spektru oblastí lidského působení od medicínských (kontaktní čočky), farmaceutických (nosiče léčiv) a kosmetických aplikací (pleťové krémy) až po potravinářský průmysl a zemědělství. Setkat se s nimi můžeme u kontaktních čoček, nosičů léčiv nebo u pleťových krémů. I přesto, že byly již publikovány studie zabývající se přípravou a charakterizací gradientových gelů, tato problematika zůstává ještě ne zcela probádaná a nabízí mnohé další možnosti pro zkoumání.

Teoretická část této bakalářské práce zahrnuje obecný přehled o hydrogelech jak s uniformní, tak gradientovou strukturou, jejich vlastnostech a využití. Pozornost byla věnována také chitosanu, jako netoxickému kladně nabitému biopolymeru, který nachází uplatnění nejen jako složka hydrogelů. Prostor byl věnován také reologii jako jedné z hlavních metod charakterizace připravených gelů. Jako stručný přehled studie vědeckých článků byla sepsána také literární rešerše pojednávající o různých přístupech při přípravě gradientových gelů a měření jejich viskoelastických a transportních vlastností. Literární rešerše následně sloužila jako inspirace pro experimentální část předložené bakalářské práce.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Hydrogely

Hydrogely jsou sítě tvořeny polymerní sítí rozpustnou ve vodném prostředí, která změnou vnějších podmínek (např. přidavek gelačního činidla, změna fyzikálních podmínek solu) vyvolává gelaci materiálu a vznik trojrozměrné sítě prostupující celým disperzním prostředím. Z fyzikálního hlediska můžeme hydrogely popsat jako disperzní systém s pevnou látkou tvořící spojitý disperzní podíl v koloidních rozměrech a vodou představující disperzní prostředí. Díky schopnosti pohltit velké množství vody mimo jiné za fyziologických podmínek jsou vyznačovány vysokým stupněm flexibility (pružnosti) [1], [2]. Hydrofilní charakter je způsoben přítomností hydrofilních funkčních skupin jako je -OH, -CONH, -CONH₂ nebo -COOH [3]. Vyznačují se pryžovitou strukturou, která je podobná živým tkáním, a tím umožňuje jejich využití pro aplikace. Ve srovnání s jinými typy biomateriálů mají hydrogely výhodu ve zvýšené biokompatibilitě a ladicí rozložitelnosti (biodegradabilitě) a náležité mechanické pevnosti [1], [4].

Voda v hydrogelových materiálech hraje velmi významnou roli. Způsobuje vlhkost prostředí, které je využíváno v medicínských aplikacích (např. mokré hojení ran), ale slouží také jako prostředek pro přenos aktivních látek (např. živin). Bobtnání, zadržování vody ve struktuře hydrogelu bez rozpadu struktury, je poměrně komplikovaný proces. Začíná prostupem molekul vody do sítě hydrogelů a hydratací polárních skupin, které tvoří tzv. primárně vázanou vodu. Druhým krokem je interakce vody s exponovanými hydrofobními skupinami, se kterými tvoří tzv. sekundárně vázanou vodu. Primárně a sekundárně vázaná voda tvoří celkovou vázanou vodu. Objemová nebo volná voda je do vnitřního prostoru gelu absorbována osmotickými silami směrem k nekonečnému zředění, kterému brání kovalentní a fyzikální příčné vazby [5]. V závislosti na použitých polymerech a hustotě uzlů v hydrogelu jsou struktury schopny pojmout různé množství vody, vždy je ale hmotnostní podíl vody vyšší, než hmotnostní podíl polymeru [6].

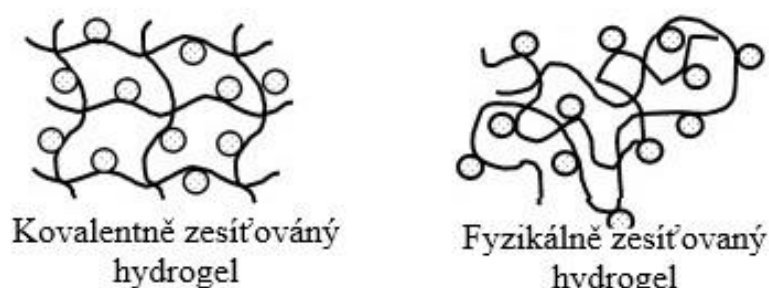
Bobtnací vlastnosti hydrogelů jsou důležitým parametrem při použití v aplikacích, protože rovnovážný bobtnavý poměr (tzn. hmotnostní poměr nabobtnalého gelu k suchému xerogelu) ovlivňuje difúzi rozpuštěných látek, smáčivost povrchu a optické a mechanické vlastnosti [7].

2.1.1 Vlastnosti

Fyzikální vlastnosti hydrogelů jsou regulovány molekulovou hmotností polymeru, náboji na těchto polymerech, hustotou zesíťování a fyzikálními asociacemi, každá z těchto podmínek napomáhá definovat relativní množství vazeb mezi řetězcí polymerů. Například vysokomolekulární hydrogely mají typicky násobně více zesíťování a produkují robustnější hydrogely, zatímco k vytvoření gelu o dostatečné tuhosti jsou menší polymery vyžadovány ve větších koncentracích [7].

Podle povahy zesíťování jsou gely klasifikovány jako fyzikálně a kovalentně síťované gely. Výsledkem kovalentních vazeb a polymerace funkčních skupin na konci řetězců jsou „chemické“ neboli „ireverzibilní“ gely. Pevnost chemické kovalentní vazby mezi polymery je důsledkem vynikající

mechanické pevnosti. Kovalentní gely s nízkou hustotou zesíťování bývají značně elastické, s přibývajícím počtem vazeb se stává gel více rigidní. Chemicky zesíťované gely mohou vznikat podle přítomnosti kapalného disperzního prostředí jako lyogely nebo xerogely. Struktura kovalentně síťovaného hydrogelu může být dosažena např. pomocí síťování lineárního polymeru – vulkanizací. Opakem jsou reverzibilní fyzikální hydrogely, u kterých se ve struktuře nachází slabé vazebné interakce (např. vodíkové můstky, hydrofobní vazby, van der Waalsovy síly). Oblasti vytvořených uzlů se nemusí tvořit na koncích řetězců jako u kovalentně síťovaných gelů, ale mezi libovolnými úseky řetězců makromolekul. Dané interakce mezi molekulami v gelech tohoto typu jsou vratné a rozrušitelné změnou vnějších fyzikálních podmínek. Vratnost fyzikálních hydrogelů je způsobena konformačními změnami, za trvalé chemické vazby je zodpovědné nevratné vnitřní uspořádání (konfigurační změny) [8], [9].



Obrázek 1: Schéma struktury zesíťování kovalentních a fyzikálních hydrogelů [10]

Mohou se ale vyskytovat i nehomogenity nebo síťové defekty způsobené přítomností volných konců řetězců a volných pórů v síti struktury. Rozdělení gelů na reverzibilní a ireverzibilní má svůj význam i při popisu jejich chování ve vysušeném stavu. Zatímco reverzibilní gely při vysušení zmenšují svůj objem odstraňováním disperzního prostředí přecházejí do původního stavu přijímáním disperzního prostředí (bobtnáním), vysušené ireverzibilní xerogely si zachovávají svůj objem a při kontaktu s disperzním prostředím přijímají jen omezené množství kapaliny [9]. Hydrogely můžeme klasifikovat také podle iontových nábojů přítomných v jejich struktuře na aniontové, kationtové a neutrální. Aniontové hydrogely ke své polymerní síti připojují záporně nabitě ionty, zatímco kationtové připojují ty kladné. Neutrální hydrogel má rovnoměrně rozložené záporné i kladné náboje fixované v polymerní matici [11].

Změna teploty, koncentrace látek nebo pH má zásadní vliv na množství přijímané vody, mechanickou pevnost a průběh gelace. Zvýšená teplota zabraňuje gelaci materiálu z důvodu zvýšeného tepelného pohybu částic, čímž dochází k poklesu počtu i trvání makromolekulárních vazeb. Snížení teploty naopak tvorbu gelu podporuje. Zvýšením koncentrace makromolekul mohou být ovlivněny četnosti srážek molekul nebo jejich částí, které napomáhají tvorbě počtu vazeb, které se mohou v objemu gelu tvořit. Na schopnost gelace má velký vliv také hodnota pH, tvorba gelů probíhá nejlépe při hodnotě pH odpovídající pI (izoelektrickému bodu) [9]. Reakce hydrogelů je v případě přechodu prostředí rychlá a princip této změny a biokompatibilita gelů dává možnost je využívat v biomedicínských a farmaceutických systémech, např. v biosenzorech a nosičích léčiv [3]. Disperzní podíl tvořený

polymerními řetězci v disperzním prostředí však není díky vytvořené trojrozměrné matici polymerů volně pohyblivý, což hydrogelům zajišťuje odolnost vůči deformaci. Gely můžeme i přes velké množství vody obsažené ve struktuře stále označit za tuhé látky v důsledku nepohyblivosti disperzních částic [9].

V posledních několika letech je pozornost upínána především na viskoelastické a transportní vlastnosti, které jsou určovány strukturou gelů a dále specificky využívány [12]. Jejich reologické vlastnosti úzce souvisí se síťovanou strukturou přítomnou v systému. Díky svému uspořádání hydrogely vykazují podobné mechanické vlastnosti jako tuhé látky i přesto, že ve své struktuře obsahují majoritní podíl vody coby disperzního prostředí. Gely s pevně spojenými sítěmi nazýváme jako silné gely a vyznačují se vysokou elasticitou. Opakem jsou gely slabé, u kterých je vysoká elasticita způsobena nepevnými a málo trvanlivými spoji (slabé nekovalentní interakce). Struktura a síť gelů mohou být rozrušeny působením síly, která je deformuje při přesažení tzv. kritického napětí [9], [13].

2.1.2 Aplikace

Hydrogelové materiály díky svým jedinečným schopnostem pohlcovat velké množství vody, reverzibilně bobtnat, odolávat mechanickému napětí a zároveň působit vysoce citlivě vůči životnému prostředí přitahují rostoucí zájem o jejich zkoumání a uplatnění v praktickém životě. Jsou slibným materiálem využívaným při dodávání léků, v zemědělství [14], [15], farmacii [16], biomedicině [17] a tkáňovém inženýrství [18], ale také v potravinářském průmyslu a kosmetice. Velkým přínosem gelů je vedle biokompatibility, šetrnosti k životnímu prostředí a rozložitelnosti také jejich viskoelastické chování [11].

V posledních letech se aplikace chytrých sítí hydrogelů v medicínské a farmaceutické oblasti stává nejaktivnější oblastí výzkumu. Hydrogely vykazují schopnost bobtnat v závislosti na změně pH vnějšího prostředí, čímž se stávají vhodnými kandidáty jako nosiče s řízeným uvolňováním léčiv. Důvodem je změna pH vnitřních tekutin v gastrointestinálním traktu, která působí jako stimul pro hydrogel (1–3 v žaludku, 5–8 v tenkém střevě) [2]. Příkladem mohou být iontové hydrogely, které byly navrženy jako systém pro přenos a uvolňování inzulínu citlivého na hladinu glukózy. Nosič inzulínu byl potažen kationtovým hydrogelem s volnými aminovými skupinami a imobilizovanou glukooxidázou na jeho povrchu. V případě kontaktu nosiče s glukózou dochází k přeměně glukooxidázou na kyselinu glukonovou, čímž dojde ke snížení pH vnitřního prostředí. Změna pH způsobí protonaci aminových skupin, bobtnání hydrogelu a uvolnění inzulínu [19]. Další možnou výhodou využití hydrogelů je schopnost léčiv volně difundovat ze struktury gelu. Rychlost uvolňování léčiva lze řídit hustotou zesíťování, využití monomerů s řízenou hydrofilitou nebo poměru hydrofilních a hydrofobních monomerů [20].

Jedním z dalších využití hydrogelů je výroba kontaktních čoček. Měkké kontaktní čočky mohou být vyráběny z polyhydroxymethakrylátu (PHEMA), čímž získávají vhodné fyzikální vlastnosti jako je propustnost světla, index lomu, propustnost kyslíku, smáčivost nebo biokompatibilita. Moderní

technologie umožňují výrobu také ze silikonových hydrogelů, které jsou často žádané pro svou vyšší propustnost kyslíku a tím i pohodlnější nošení [11].

Výzkum v oblasti hydrogelových materiálů se stále více rozšiřuje a zvyšuje poptávku po inteligentních materiálech, které mohou najít uplatnění zejména v biomedicíně a biotechnologii. Nejčastěji využívanými vlastnostmi hydrogelů je jejich schopnost přizpůsobovat a reagovat na různou teplotu a pH prostředí [11].

2.2 Hydrogely s difúzním gradientem

Hydrogely s homogenní strukturou jsou v posledních letech využívány v mnoha odvětvích. Uniformní chemická struktura gelu a rovnoměrné rozložení funkčních skupin zvyšují možnost univerzálních aplikací jak v tkáňovém inženýrství [21], [22], tak ve farmaceutickém průmyslu [23], [24]. S rozvíjejícím se využíváním koloidních materiálů v průmyslu se zvyšuje i poptávka po látkách s preciznějším rozložením skupin ve strukturách se specifickými vlastnostmi, čímž dává za vznik novému typu hydrogelů s kontinuálně na sebe navazujícími vrstvami. Gradientové vrstvy s postupně se měnícími chemickými strukturami a vlastnostmi umožňují preciznější zaměření na specifitu požadavků [25]. Právě těmito gely, jejich přípravou a charakterizací se zabývá předložená bakalářská práce.

2.2.1 Vlastnosti

Hydrogely s difúzními gradienty můžeme definovat jako gely s kontinuálními, nebo skokovými prostorovými změnami v alespoň jednom atributu (hustota síťování, porozita struktury, velikost ok). Jsou skvělým prostředkem pro přesné napodobení biologického prostředí (např. extracelulární matrix). Gradienty hydrogelů mohou být biochemické nebo fyzikální, nejčastěji jsou ale kombinací obou. Většina dnes připravovaných gradientů má statický charakter, což znamená, že fyzikálně-chemické vlastnosti jsou definovány již během doby vytváření gradientu a dále se nemění. U některých aplikací jsou ale připravovány gradienty s časovou složkou, což znamená, že vlastnosti materiálu se s časem mění v důsledku reakce na změnu vnějšího podnětu (pH, teplota). Mezi fyzikální gradienty řadíme gradienty ve viskoelastických vlastnostech, které se liší tuhostí, hustotou síťování a typem a velikostí pórů. Hydrogely s fyzikálním typem gradientu našly využití díky své jedinečné struktuře zejména v tkáňovém inženýrství, jelikož přesněji napodobují 3D síť tkání. Příkladem může být studia autorů Zhu a kol., kteří navrhli hypotézu, že hydrogel s gradientem tuhosti může vyvolat specifickou odpověď enkapsulovaných buněk a gradientové hydrogely tak napodobují organizaci nativní kloubní chrupavky [26]. Gradientovou složkou fyzikálních gelů mohou být také hodnoty Youngova modulu nebo koncentrace bioaktivní molekuly. Biochemické gradienty obsahují více bioaktivních molekul, což může být přínosem při přizpůsobování se kovalentním vazbám peptidů a proteinů [27].

Dle přípravy a vytváření gradientové struktury se mohou rozdělovat do dvou kategorií. První kategorie zahrnuje takové hydrogely, u kterých je gradient vytvářen zdola nahoru. Gradient je budován na povrchu mateřského substrátu s postupným ukládáním bloků gradientů tvořených z monomerů, oligomerů nebo polymerů. Do druhé kategorie patří gradienty vytvářené shora dolů. Při přípravě

je substrát chemicky nebo fyzikálně upravován za vytváření složitých gradientových sítí, u kterých dochází ke změně vlastností ve dvou nebo více nezávislých směrech [28].

Gradientové hydrogely mohou být vytvářeny různými způsoby. Většina zahrnuje vyvolávání síťování prekurzoru, např. fotopolymerizace [27]. Při syntéze vícevrstevných hydrogelů má rozhraní mezi vrstvami určující vliv na celkovou funkci. Při nesprávném propojení vrstev hydrogelu může docházet k jejich rozpojování. Pokud je ale oblast spoje daných vrstev naopak příliš velká, mohou být ovlivněny biochemické a mechanické vlastnosti spojených vrstev a nesplňovat funkční požadavky při aplikacích. Pro dosažení lepších vlastností napříč gradientu vyžadují takové hydrogely složitější přípravu oproti homogenním hydrogelům s uniformní strukturou [29].

2.2.2 Příprava

S rychle postupujícími studiemi v oblasti hydrogelových materiálů a jejich praktických aplikací přichází také snaha posunout tyto homogenní struktury ke komplexnějším strukturám, u kterých bude možné řídit strukturu a vlastnosti v jeho objemu. Díky pokrokům v oblasti chemie materiálů bylo možné připravovat gradientové hydrogely širokou škálou přístupů [30]. Přípravu gradientových hydrogelů můžeme obecně shrnout do dvou základních procedur. Nejprve je vytvořen gradient hydrogelu pomocí prekurzorního roztoku, který je následně stabilizován vhodnou metodou síťování [31].

Jedním z nejčastěji využívaných přístupů pro generování gradientu je metoda vrstvení. Vrstevnatá struktura hydrogelu tvoří prostorový gradient a dochází ke změnám ve vlastnostech gelu napříč vrstvami [30]. Hydrogely se obvykle vrství rotačním nanášením, kapkovým litím nebo tiskovými tryskami, což umožňuje kontrolovat tloušťku jednotlivých vrstev s různými mechanickými a bobtnacími vlastnostmi a schopnost transportu aktivní látky v předem určených parametrech [32]. Příkladem vrstvení pro dosažení gradientového hydrogelu může být studie autorů Radhakrishnan a kol. [33], ve které se zaměřili na přípravu hydrogelového skeletu za pomoci alginátu a poly(vinylalkoholu) (PVA), do kterého byly začleněny vrstvy bioaktivních molekul nanohydroxyapatitu (nHA) a chondroitin sulfátu. Takto vytvořená struktura měla napodobovat kalcifikované a povrchové vrstvy chrupavky. Subchondrální vrstva gelu byla vytvořena smícháním nHA a 2% směsi alginátu a 2% PVA v hmotnostním poměru 1:4. Pro tvorbu chondrálního rozhraní byly použity nanočástice chondroitin sulfátu. Druhým krokem přípravy bylo zesíťování na sebe navrstvených částí pomocí síranu vápenatého. Úspěšnost vytvoření gradientové struktury byla dokázána pomocí obarvení jednotlivých vrstev a snímky vzorků pomocí skenovacího elektronového mikroskopu [33].

Mikrofluidika je oblast zpracování materiálů týkající se řízení tekutin a jejich manipulace v měřítku mikrometrů. Tato pokroková technologie je využívána i při přípravě gradientových gelů, které mohou být velmi přesně smíchány s jinými prekurzory. Pro svou výrobní náročnost je tato metoda v současné době omezena pouze na laboratorní přípravu a do budoucna bude možné ji využít zejména při výrobě specializovaných produktů [30], [32]. Koncept mikrofluidních zařízení pro přípravu hydrogelů obsahujícího vícevrstevnatého polymerního gradientu využili ve svém článku autoři Piraino a kol [34]. Nejprve odděleně připravily tři různé polymerní prekurzory pomocí methakrylátu želatiny (GelMA),

methakrylátu kyseliny hyaluronové (HAMA) a polyethylenglykol-diakrylátu (PEGDA). Vytvoření vrstevnaté struktury bylo dosaženo napipetováním jednoho roztoku prekursoru na druhý a jejich následné fotozesíťování pomocí UV záření. Pro vytvoření třetí vrstvy byl postup opakován i s posledním roztokem prekursoru. Propojení vrstev a vytvoření gelu bylo následně potvrzeno pomocí fluorescenčních barviv v jednotlivých vrstvách [34].

Mezi další slibné přístupy v přípravě gradientových hydrogelů patří 3D tisk [35], kdy jsou hydrogelové prekurzory dodávány z řízené pohyblivé tiskové hlavy, metoda řízeného míchání tekutin [36], které napodobuje mikrofluidní přípravu v makroskopickém měřítku nebo metoda využívající kontrolovaného gelování [25], které je možné dosáhnout řízením koncentrace prekursoru nebo změnou vnějších podmínek [30].

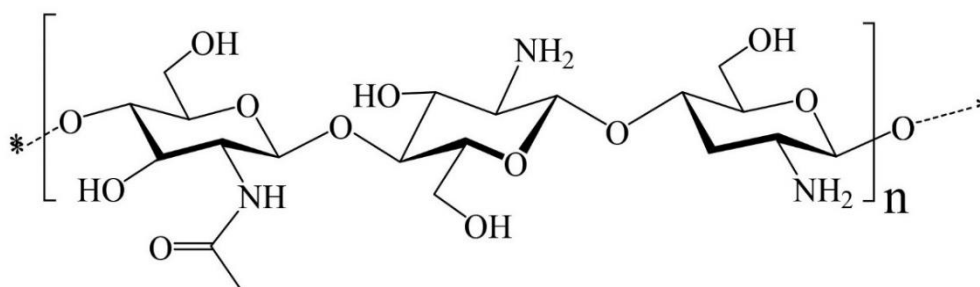
2.2.3 Aplikace

Využití gradientových hydrogelů jako biomateriálů s časově proměnlivým chováním a vlastnostmi měnícími se na základě vnějších fyzikálních a chemických podmínek je jeden z v budoucnu aplikovatelných přístupů v tkáňovém inženýrství. Například biomimetické hydrogely našly své uplatnění jako uměle vytvořené chrupavčité tkáně [37]. Jejich hlavní výhodou je možnost poskytnout časoprostorový gradient v různém stupni porozity a elasticity. Velmi důležitým faktorem pro náhradu chrupavky hydrogelem je fakt, že jsme schopni měnit laditelné mechanické vlastnosti, které souvisí se stupněm síťování a přítomným nábojem. U nabitých hydrogelů vystavených elektromagnetickému poli dochází ke změnám v jejich tvaru a schopnosti bobtnání při změně pH [27]. V nedávné studii autora Offeddu a spol. byl popsán rozdíl kryogenně síťovaných hydrogelů (PVA a kyselina peroctová), jejich morfologie a mechanické odezvy při změně pH. Autoři potvrdili teorii, že modul pružnosti fyzikálních kryogelů se na rozdíl od chemicky síťovaných zvyšuje s aktivací náboje v důsledku elektrostatického tuhnutí polymerních řetězců při vysoké hustotě náboje [38].

Protože se gradientové gely svou strukturou a chováním podobají přirozené extracelulární matrix, poskytují buňkám vyhovující prostředí pro proliferaci a adhezi. Extracelulární matrix (ECM) je důležitým faktorem v biofyzikálním prostředí buněk, má totiž schopnost přímo a nepřetržitě ovlivňovat chování a funkci buněk a poskytuje místo pro připojení adhezivního receptoru nebo samotnou adhezi buněk podporuje. Lidské tkáně a ECM se liší svými mechanickými vlastnostmi. Rozlišujeme velmi měkké tkáně (mozek, játra), tkáně se střední tuhostí zahrnující svaly a velmi ztuhlé tkáně jako kosti [39]. Existují proto případy využití těchto chytrých sítí jako účinného scaffoldu (lešení) pro růst buněk a signálu pro obnovu tkáně [31]. Příkladem může být začlenění BMP-2 proteinu do thiolové želatiny a PEGDA (polyethylenglykol diakrylát) hydrogelové sítě, který napomáhá účinné regeneraci lebečních kostí u krys [40]. Hydrogely jsou jedním z nejběžněji používaných materiálů s laditelnou strukturou, které kombinují schopnost absorbovat vodu, retenci a řízené uvolňování požadovaných látek a možnost je připravit v odlišných tvarech a velikostech. Jejich široká aplikace zahrnuje biosenzory, léčivé obvazy, uvolňování léčiv na makroúrovni nebo interakci buňka-extracelulární matrix na mikroúrovni [39].

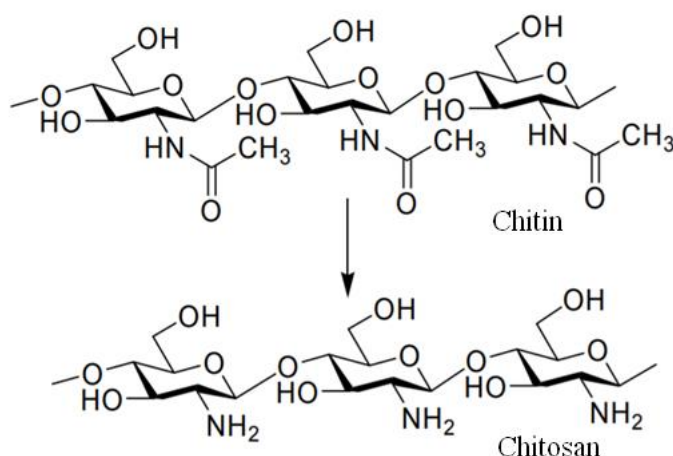
2.3 Chitosan

Chitosan (poly-D-glukosamin) je deacetylovaný derivát chitinu, což je přírodní polysacharid běžně se vyskytující v exoskeletech členovců a některých hub. Chitin je druhým nejrozšířenějším přírodním polysacharidem hned po celulóze. Chitin jako lineární polysacharid obsahuje kopolymery glukosaminu a N-acetyl-D-glukosaminu, které spojuje β (1–4) glykosidická vazba. Chitosan se získává alkalickou deacetylací chitinu, působením 50% hydroxidu sodného za několika hodinového varu nebo působením enzymu N-deacetylasy (EC 3.5.1.41) [41], [42].



Obrázek 2: Struktura chitosanu [43]

Hlavním charakteristickým znakem je stupeň deacetylace, podíl acetylovaných jednotek existujících v kopolymeru [44]. Stupeň deacetylace se udává v procentech, obvykle v rozmezí 60–100 % [42]. Muko a buněčné adheze jsou ovlivňovány stupněm deacetylace a typem buňky prostřednictvím vytváření iontových komplexů. Jako příklad mohou být uvedeny fibroblasty, které mají ve srovnání s keratinocyty větší záporný náboj a tím lépe přilnou ke strukturám chitosanu, který ve vodných roztocích vystupuje jako polykation díky přítomnosti aminoskupiny ve své struktuře, která je schopná se ve vhodných podmínkách protonizovat [45].



Obrázek 3: Deacetylace chitinu [42]

Mimo stupeň deacetylace je molekulová hmotnost chitosanu dalším významným parametrem, jelikož ovlivňuje jeho biologické vlastnosti. Bylo zjištěno, že oligomery chitosanu s rozdílem 1 kDa vykazovaly vyšší antimikrobiální aktivitu. V porovnání s chitinem je chitosan více chemicky i biochemicky aktivní.

Chitosan se liší od ostatních dostupných polysacharidů přítomností aminoskupiny ve svém řetězci a schopností tvořit polykationtové komplexy. Kladné náboje polyelektrolytu ochotně interagují s mnoha zápornými buňkami. Díky své elektrostatické povaze mohou být chitosanové komplexy využity pro enkapsulaci léčiv, přenášení genů nebo fixaci enzymů. Chitosan je jedním ze slibných materiálů využívaných při přípravě hydrogelů. Vyniká svou biologickou rozložitelností, biokompatibilitou a dobrou síťovací schopností [42], [45].

2.3.1 Vlastnosti

Chitosan je rozpustný ve zředěných kyselinách (octová, mravenčí, citrónová). Od ostatních komerčně dostupných polysacharidů se vyznačuje vysokým obsahem dusíku ve své struktuře. Nejčastěji se dusík vyskytuje ve formě primárních alifatických aminoskupin [46]. V molekulové struktuře chitosanu můžeme najít tři aktivní centra: primární aminoskupinu, primární a sekundární hydroxyskupinu. Primární aminoskupina často podléhá syntéze kvartérních amoniových kationtů, která způsobuje lepší rozpustnost ve vodě a vytváření komplexů s kovovými ionty. Primární hydroxyskupina bývá nahrazována „spacery“, které slouží jako vazebné místo pro aktivní složku. Modifikace sekundární hydroxyskupiny podporuje rozpustnost ve vodě [42].

Chitosanové hydrogely můžeme rozdělovat na fyzikální a chemické dle povahy jejich sítě. Chemické gely jsou spojeny pevnými kovalentními vazbami pomocí protonovaných $-NH_3$ skupin. Jako síťovací činidlo může sloužit glutaraldehyd nebo formaldehyd [44]. Tyto látky však mohou způsobovat toxicitu a narušovat biokompatibilitu hydrogelu nežádoucí pro biomedicínské aplikace. Příkladem kovalentního zesílení může být Schiffova reakce, ve které dochází k vazbě aminové skupiny a aldehydu. Chemické sítě lze tvořit také interakcí polymer-polymer mezi aktivovanými funkčními skupinami, pomocí fotosenzitivních činidel nebo za pomoci katalytických enzymů [44], [7].

Fyzikální chitosanové gely jsou spojeny nekovalentními interakcemi – polyelektrolytové, interpolymerní a hydrofobní. Protože jsou všechny zmíněné vazby čistě fyzikální, mají reverzibilní charakter, který je zajištěn opětovným přijímáním disperzního prostředí. Iontové vazby vznikají reakcí kladně nabitých aminoskupin chitosanu a záporně nabitých molekul a aniontů jiných polymerů. Iontové komplexy se smíšeným nábojem jsou výsledkem interakce chitosanu a malých aniontů (např. sírany, citráty, fosfáty). Změnu bobtnání gelu můžeme dosáhnout změnou koncentrace druhé složky použité při procesu přípravy. Fyzikální hydrogely na bázi chitosanu lze připravit pouhým smícháním složek tvořících gel za vhodných fyzikálních podmínek. Krátkou životnost ve fyziologických médiích a slabou mechanickou pevnost kompenzuje fakt, že není nutná přítomnost jiného činidla. Proto jsou vhodnými kandidáty pro aplikaci krátkodobého uvolňování léčiva [7].

2.3.2 Využití

Díky svým vynikajícím vlastnostem, jako je biokompatibilita, biodegradabilita a antimikrobiální účinky je chitosan často vyhledávaným materiálem ve farmaceutických a biomedicínských odvětvích [42]. Roztoky připravené z chitosanu jsou popisovány jako antimikrobiální proti širokému množství

nežádoucích mikroorganismů – grampozitivní bakterie, gramnegativní bakterie, kvasinky, řasy, houby, ale i lidské orální patogeny. Zda chitosan působí jako baktericidní činidlo, tzn. schopné zabít živé bakterie, nebo jako bakteriostatické činidlo, tzn. schopné pouze zastavit bakteriální růst, je stále diskutováno [47].

Zpočátku se chitosan využíval ve farmaceutickém průmyslu jako pomocná látka pro pevné lékové formy a jako činidlo zvyšující viskozitu. Už v této době byly vnímány výhody, které chitosan nabízí – dobrá dostupnost, nízká toxicita a kladně nabitě aminoskupiny umožňující fyzikální a chemické zesíťování [47]. Chitosan lze výhodně využít jako systém pro transport léčiv s řízeným uvolňováním léčiva či jiných aktivních komponent. Velký vliv na polymerní nosiče léčiva má jejich velikost, elektrický náboj, hydrofilní nebo lipofilní vlastnosti které mohou měnit farmakologické a imunologické aktivity přenášených látek. Průnik nosiče do buňky probíhá difúzí uvolněného léčiva do buňky nebo endocytózou, kdy je celý systém vpraven do buňky a uvolňuje léčivo postupně působením enzymů [42]. Běžně používané lékové formy vedou k brzkému uvolňování léčiva po podání, dochází k prudkému nárůstu maximální koncentrace aktivní látky v těle a následnému rychlému poklesu. Předvídatelné a reprodukovatelné uvolňování léčivé látky představuje velkou výhodu, jelikož vytváří požadované prostředí, minimalizuje vedlejší účinky a prodlužuje účinnost [46].

Antibakteriální aktivita chitosanu účinná vůči gramnegativním i grampozitivním bakteriím, kvasinkám i houbám nachází mnohá využití. Kritickou podmínkou je hodnota pH pod 6,5, kdy dochází k ionizaci pozitivně nabitých funkčních skupin. Při pH větší než 7 ztrácí chitosan svou antibakteriální účinnost. Vědci Tokura a spol. [48] objevili schopnost nízkomolekulárního chitosanu inhibovat aktivitu bakterie *Escherichia Coli* oproti jeho neaktivní vysokomolekulární formě [42], [48].

2.4 Transportní vlastnosti

Posunem částic dochází v systémech s koncentračním gradientem k jejich samovolnému přesunu a vyrovnávání koncentrací pomocí difúze. Proces vyrovnávání koncentrací probíhá vždy ve směru koncentračního gradientu. Kinetika procesu klesá s velikostí difundujících částic – v analytických disperzích je difuze výrazně rychlejší než v disperzích koloidních [9], [49]. Rychlost difuzních procesů se liší v závislosti na prostředí. V plynných látkách jsou procesy rychlé, zatímco v kapalinách a pevných látkách dochází ke zpomalení. Přejít částic pomocí difuze přímo úměrně závisí na velikosti částic rozpuštěné látky [50].

Difúzní tok J_i jako veličina úměrná koncentračnímu gradientu při jednorozměrné stacionární difúzi byl definován pomocí 1. Fickova zákona: [9].

$$J_i = -D_i \cdot \frac{dc_i}{dx}. \quad (1)$$

Veličina D_i vyjadřuje difúzní koeficient, který se číselně rovná látkovému množství difundující látky, které projde jednotkovou plochou za jednotku času při jednotkovém koncentračním gradientu. Jednotka

difúzního gradientu je $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ a veličina $\frac{dc_i}{dx}$ označuje koncentrační gradient s jednotkou $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{m}^{-1}$.

V případě stacionární difuze je koncentrační gradient $\frac{dc_i}{dx}$ konstantní [9].

Vztah mezi difuzním koeficientem, koeficientem tření a absolutní teplotou byl popsán Einsteinem a dnes jej známe jako Einsteinovu rovnici [49]:

$$D = \frac{k_b \cdot T}{f}, \quad (2)$$

kde k_b vyjadřuje Boltzmanovu konstantu, T termodynamickou teplotu a f třecí (frikční) koeficient. Difuzní koeficient se také obecně vyjadřuje Stokesovou – Einsteinovou rovnicí [9]:

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta r}, \quad (3)$$

kde η je dynamická viskozita a r poloměr částic. Ze vztahu vyplývá, že s rostoucí teplotou a snižující se viskozitou kapalného prostředí dochází ke zvyšování difúzního koeficientu [49].

Difúze v roztocích polymerů a gelů je složitý proces, který závisí na vlastnostech difundujících částic a polymerní síti. Proces byl již detailně zkoumán za použití nejrůznějších technik od gravimetrie, fluorescence až po dynamický rozptyl světla. Tyto studie nám pomohli pochopit jejich morfologii a strukturu, transportní jevy a možnost využití při řízeném uvolňování léčiv. Vedly i k navržení modelových popisů procesů difuze, které jsou založeny na měnících se fyzikálních faktorech [50].

2.5 Reologie

Reologie je multidisciplinární vědecký obor zabývající se tokem a deformací hmoty působením vnější mechanické síly. Chování hmoty můžeme rozdělit na 3 kategorie [49]:

- 1) elastické chování – hmota se po ukončení působení vnější mechanické síly vrací do svého původního stavu (materiál relaxuje)
- 2) viskózní chování – na hmotu působí nevratná deformace, která způsobuje tok hmoty po dobu silového působení (materiál po ukončení silového působení nezrelaxuje do původní podoby)
- 3) viskoelastické chování – hmota se deformuje vratně či nevratně v závislosti na době a intenzitě silového působení

Reologická měření se neomezují pouze na informace o toku kapalin, ale zabývají se i deformačním chováním pevných látek. Deformační chování úzce souvisí s prouděním tekutiny, jakmile je deformační smyková síla dostatečně velká, způsobuje tok materiálu [49].

2.5.1 Tokové testy

Při proudění kapalin, pohybu vlivem působení sil, dochází k přeskupování molekul kapaliny ve směru proudění. Při malých rychlostech pohybu částic dochází k tzv. laminárnímu proudění, při kterém se silně uplatňují mezimolekulární přitažlivé síly a směr pohybu částic se nemění. Opakem je tok turbulentní, při kterém se pohybují částice s vysokou rychlostí, což má za následek oslabení mezimolekulárních sil. Při turbulentním proudění dochází ke změnám směru pohybu částic a dochází ke vzniku vírů. Viskózní chování kapalin popisuje Newtonův zákon viskózního toku [49]:

$$F = -\eta \cdot S \cdot \frac{dv}{dx}, \quad (4)$$

kde η označuje dynamickou viskozitu [Pa·s], která je mírou vnitřního odporu proti relativnímu pohybu v různých částech tekutiny, S je plocha vrstvy, na kterou působí síla F a $\frac{dv}{dx}$ označuje gradient rychlosti ve směru osy x [9]. Dynamická viskozita je veličina popisující míru brzdícího účinku kapaliny proti relativnímu pohybu, který vzniká důsledkem přeskupování molekul a tepelného pohybu. Dynamickou viskozitu můžeme měřit pomocí tokových neboli viskozitních testů. Kromě dynamické viskozity se zavádí také tzv. kinematická viskozita η_{kin} jako podíl dynamické viskozity a hustoty kapaliny [51]:

$$\nu = \frac{\eta}{\rho}. \quad (5)$$

Jednotkou kinematické viskozity je $m^2 \cdot s^{-1}$. Obrácená hodnota dynamické viskozity se nazývá fluidita. U koloidních systému s polymerními řetězci lze určit relativní molekulovou hmotnost polymeru s Houwinkova-Markova-Kuhnova vztahu [9], [49]:

$$[\eta] = K \cdot (M_{rel})^a. \quad (6)$$

Konstanty K a a ve vztahu jsou specifické pro každý polymer a jsou určovány experimentálně [49], [51].

Pro měření tokových testů u nenewtonovských kapalin se využívají průtokové kapilární viskozimetry s nastavitelným tlakovým spádem. Potřebný tlakový spád může být vytvořen různou výškou sloupce měřené kapaliny, tlakem inertního plynu nebo zatěžovaným pístem. Průtokovými kapilárními viskozimetry můžeme měřit buď tlakový spád nebo objemový průtok [51].

2.5.2 Newtonovské a nenewtonovské kapaliny

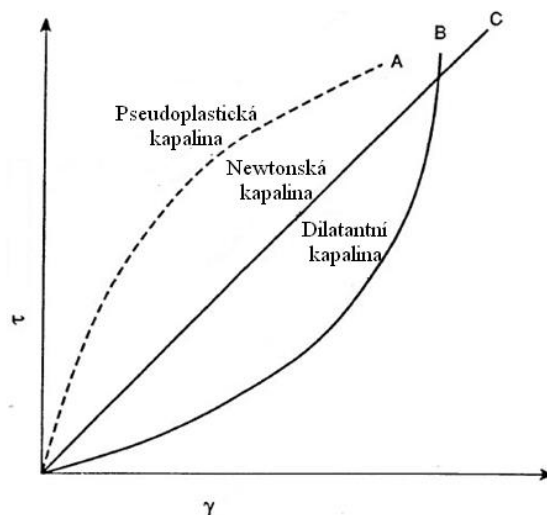
Viskozitu kapalin definujeme za předpokladu laminárního proudění kapalin a je závislá na druhu kapaliny [51]:

- 1) Newtonovské kapaliny – pro tyto kapaliny platí Newtonův zákon a splňují přímou úměru mezi smykovým napětím a gradientem rychlosti. Zároveň platí, že viskozita je nezávislá na měnící se smykové rychlosti [51].
- 2) Ne-newtonovské kapaliny časově nezávislé – hodnota dynamické viskozity u časově nezávislých ne-newtonovských kapalin závisí na rychlostním gradientu a teplotě.

U pseudoplastických kapalin, které řadíme mezi ne-newtonovské časově nezávislé kapaliny, dochází s rostoucí hodnotou rychlostního gradientu k poklesu dynamické viskozity. U vysoce koncentrovaných stabilizovaných suspenzí dochází k dilatanci, která se vyznačuje zvyšováním dynamické viskozity s růstem gradientu rychlosti. Posledním typem časově závislých ne-newtonovských kapalin jsou kapaliny plastické, takové kapaliny se chovají při nízkých napětích jako tuhá tělesa a deformují se pouze elasticky až do hodnoty meze poddajnosti (statická mez toku), při které dochází k trvalé deformaci a rozrušení struktury [9], [51].

- 3) Ne-newtonovské kapaliny časově závislé – pro kapaliny neplatí Newtonův zákon – dynamická viskozita je závislá na čase.

Kapaliny, které mění hodnotu dynamické viskozity v čase označujeme jako ne-newtonovské časově závislé kapaliny a můžeme je rozdělit na kapaliny tixotropní, u kterých v čase klesá viskozita a řídnou, nebo naopak reopektické, u kterých dochází v čase k růstu viskozity a houstnutí [9], [51].



Obrázek 4: Viskózní charakteristiky kapalin, A - Pseudoplastická, B - Newtonovská, C - Dilatantní [52]

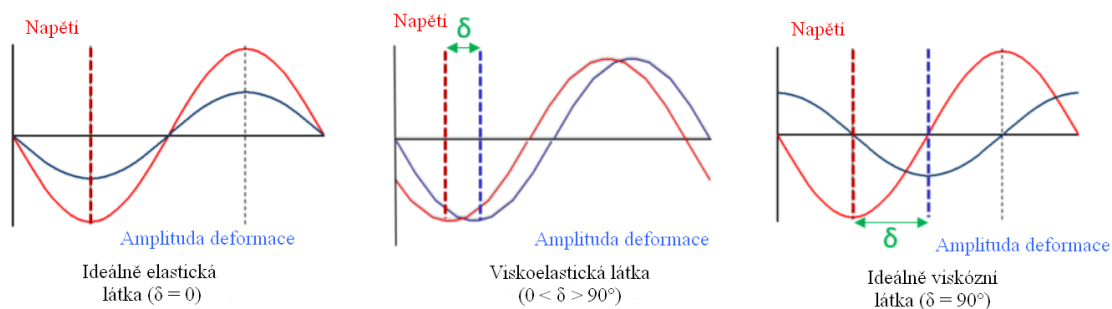
2.5.3 Oscilační testy

Oscilační testy slouží k popisu viskoelastického chování látek. Jedná se o chování na pomezí ideálně viskózních a ideálně elastických látek. Elastické látky zachovávají rovnovážný energetický stav udržováním klidové mikrostruktury. Působením síly nebo deformace na tuto mikrostrukturu posouvá rovnováhu mimo minimální energetický stav a vzniká elastická síla se snahou strukturu látky uvést do původního stavu. Jedním z modelů takového chování bývá uváděna pružina, která se po natažení vrací do nedeformovaného stavu. Hookův zákon toto chování charakterizuje jako závislost tečného napětí a míry deformace úměrné napětí až do překročení meze pružnosti, po které je mikrostruktura látky nenávratně poškozena.

$$G^* = \frac{\tau}{\gamma} \quad (7)$$

Poměr tečného napětí τ [Pa] a míry deformace Hookův zákon definuje jako tzv. komplexní modul G^* [Pa], který vyjadřuje kvantitativní míru tuhosti materiálu proti deformaci. Stejným principem se řídí i smykové deformace [53].

Základem oscilačních testů je měření časově závislé smykové deformace. Vzorek je při měření umístěn mezi dolní statickou a horní oscilující deskou, mohou být použity také geometrie deska-kužel nebo válec-válec. U ideálně viskózních látek bude napětí vzorku přímo úměrné deformaci a při sinusoidní oscilaci mají obě křivky stejnou fázi, zatímco u ideálně elastických látek dochází k fázovému posunu těchto závislostí o $\pi/2$. Viskoelastické látky vykazují fázový posun od 0 do $\pi/2$ [53].



Obrázek 5: Závislost napětí a míry deformace pro elastické, viskoelastické a viskózní látky [53]

Reálná složka komplexního modulu G^* se nazývá paměťový modul G' [Pa] a charakterizuje elastické chování popisované látky. Hodnota paměťového modulu je mírou deformační energie spotřebované látkou, která po odstranění deformace zajišťuje částečné nebo úplné vrácení látky do původní struktury. Imaginární složka komplexního modulu se označuje jako ztrátový modul G'' [Pa] a reprezentuje viskózní chování látky a představuje takovou energii, která je spotřebována během procesu změny struktury materiálu – toku [54]. Při měření definovaných viskoelastických parametrů se měření provádí v lineární viskoelastické oblasti (LVO), ve které jsou napětí a míra deformace úměrné a aplikované napětí není dostatečné velké pro rozpad struktury vzorku a mohou být měřeny mikrostrukturní vlastnosti. Lineární viskoelastickou oblast lze určit provedením zátěžových nebo deformačních testů [53].

Mezi často prováděné oscilační testy patří amplitudové a frekvenční testy. Amplitudové testy jsou měřeny s proměnnými amplitudami deformace, zatímco teplota a frekvence jsou udržovány konstantní. Amplitudové testy mohou být jedním z nástrojů pro určení lineární viskoelastické oblasti. Frekvenční testy slouží k časově závislému popisu chování vzorku v oblasti nedestruktivní deformace. Při frekvenčních testech zůstává se zvyšováním frekvence hodnota deformace neměnná. Vysoké hodnoty frekvence simulují rychlé pohyby vzorku při krátkém časovém úseku, zatímco nízké frekvence simulují pohyb pomalý v dlouhých časových úsecích. V praxi jsou frekvenční testy využívány pro získání informací o chování a vnitřní struktuře polymerů [55].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Příprava gradientových hydrogelů

Přípravou fyzikálně síťovaného gradientového hydrogelu pomocí postupného řízeného síťování se zabýval Yongxiang Xu a kol [56]. Gradientové chitosanové hydrogely připravovali za pomoci dvou síťovacích činidel, tripolyfosfátu sodného (TPP) a hydroxidu sodného (NaOH). Tripolyfosfát je často využíván jako iontové síťovací činidlo při přípravě chitosanových hydrogelových kuliček a nanočástic díky svým netoxickým vlastnostem a stabilitě v kyselém prostředí. Při procesu přípravy byl využit také chlorid sodný (NaCl), který ovlivňoval iontovou sílu roztoku. Hlavním požadavkem této práce byla syntéza hydrogelového materiálu schopného napodobit lidskou tkáň (kost, chrupavku,...) [56].

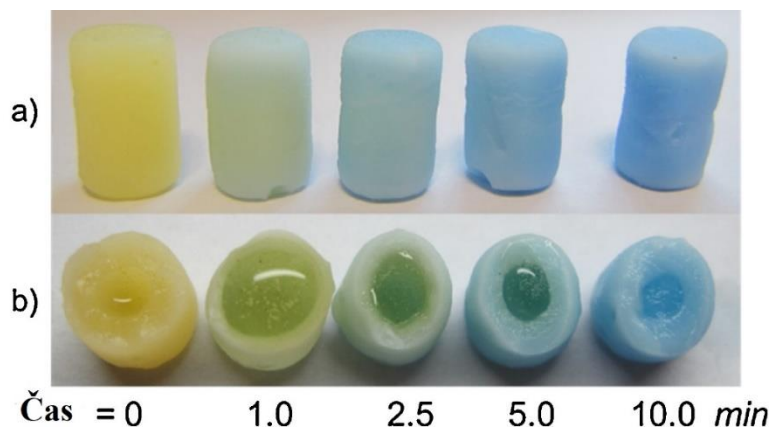
Struktura a vlastnosti připravovaných gelů byly při přípravě modifikovány změnou doby gelování, pH a složením síťovacího roztoku. Přípravě chitosanového hydrogelu předcházelo rozpuštění chitosanu ve vodném roztoku kyseliny octové, tento roztok byl od úplného rozpuštění ponechán stát 24 hodin při 4 °C. Následovalo vstříknutí do předem přichystané válcové formy, ve které se chitosan nechal zmrazit na teplotu -20 °C po dobu 24 hodin. Zmrazený chitosan byl po různou dobu ponořen do prvního gelovacího roztoku (TPP + NaCl) při 4 °C. Po primární gelaci následovalo ponoření do roztoku NaOH, který sloužil jako druhý gelovací roztok. Všechny připravené vzorky byly nakonec opakovaně promyty deionizovanou vodou a před testováním uloženy 24 hodin [56].



Obrázek 6: Hydrogelové vzorky po ponoření do prvního síťovacího činidla [56]

Na Obrázek 6 jsou vyfoceny chitosanové gely připravené primárním síťovadlem (3 M NaCl + 0,5% TPP) v různých časech (1, 2, 4, 8 a 24 hodin) (a). Následně byly tyto gely rozříznuty (b) a promyty deionizovanou vodou pro odstranění NaCl a ponechání pouze TPP vrstvy gelu [56].

Úspěšné zgelování hydrogelu pozorovali přidáváním barevného indikátoru bromthymolové modře. Bromthymolová modř indikuje v oblasti pH 6,0–7,6 změnou ze žluté barvy na modrou. Přidání barviva probíhalo v různých časech síťování k rozříznutému vzorku. Pro pochopení morfologie a rychlosti gelování byla měřena tloušťka modré zgelované vrstvy, která byla předem několikrát promyta deionizovanou vodou [56].



Obrázek 7: Hydrogelové vzorky po ponoření do druhého síťovacího činidla [56]

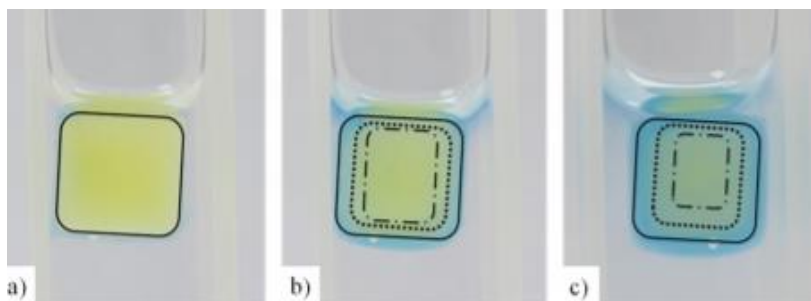
Na Obrázek 7 jsou již plně zesíťované gely, které byly ponořeny do druhého gelovacího roztoku (1 M NaOH) po různou dobu (0, 1, 2, 5 a 10 minut). Změna barvy gelů byla způsobena změnou pH. Pokud byla hodnota pH vyšší než 6,0–7,6, vzorek se zbarvil modře. Po rozříznutí gelů bylo možné určit, že s rostoucí dobou gelování pevná vrstva gelu sílí a zmenšuje se tekutý podíl. Po 10 minutách gelování všechen chitosan vyskytoval ve formě hydrogelu [56].

Metodou řízeného síťování se autorům studie povedlo vytvořit gradientovou strukturu gelu za použití dvou typů síťovacích roztoku – NaCl + TPP a NaOH. Struktura a vlastnosti gelů byly modifikovány změnou doby gelování a složením gelujících činidel. Významnou roli v procesu gelace hrála iontová síla Cl^- . Té bylo využito k navázání NH_3^+ skupin a zabránění rozpouštění chitosanu z důvodu vysoké rychlosti difuze Cl^- do chitosanového roztoku. V rámci měření cytotoxicity připravených vzorků byly takto připravené gely doporučeny pro využití jako scaffoldy v tkáňovém inženýrství. Experimenty ukázaly buněčnou životaschopnost a kompatibilitu pro fibroblastové buňky [56].

V této studii se autor předešlého článku Yongxiang Xu věnoval přípravě vícevrstevnatého chitosanového gelu pomocí řízeného zmrazování, rozmrazování a následné neutralizace. Hlavní motivací této studie byla příprava gradientového hydrogelu bez využití toxických kovalentních síťovacích činidel, které mohou mít negativní vliv při aplikaci v tkáňovém inženýrství. Vlastnosti hydrogelu a morfologie byla upravována změnou rychlosti tání a rychlostí neutralizace zmrazených gelů ať už pomocí teploty tuhnutí, koncentrace chitosanu nebo teploty roztoku NaOH. Pro své výhodné vlastnosti byl vybrán fyzikální chitosanový hydrogel, který byl syntetizován na základě závislosti rozpustnosti chitosanu na pH roztoku. Důležité bylo provádět proces zmrazování a rozmrazování za neutralizace, která zajišťovala deprotonaci NH_3^+ skupin a navázání chitosanových řetězců tvorbou slabých vazebných interakcí pro vytvoření [57].

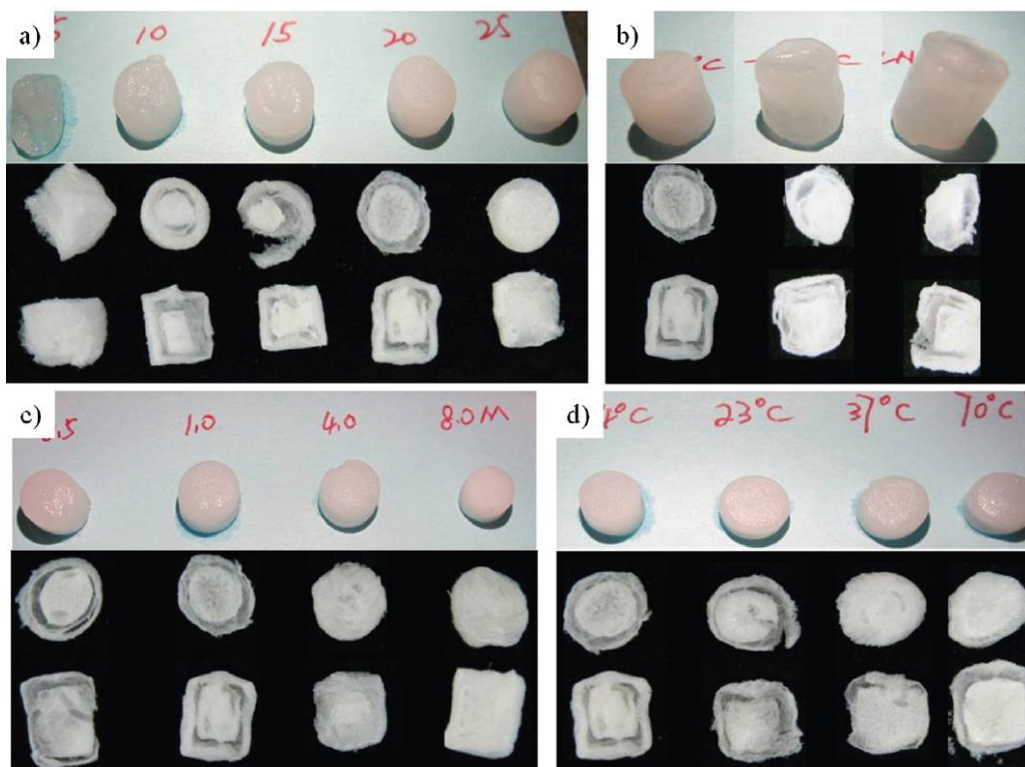
Prvním krokem přípravy fyzikálního gelu bylo rozpuštění chitosanu ve vodném roztoku kyseliny octové. Po úplném rozpuštění byl roztok ponechán stát přes noc bez míchání při teplotě 4 °C. Tento roztok byl vstříkován do válcové formy (9,0 × 9,0 mm) a zmrazen při různých teplotách (−20 °C, −80 °C a −196 °C) po dobu 24 hodin. Zmrazený chitosanový roztok byl poté ihned vložen do 4 ml roztoku NaOH v jeho různých koncentracích (0,5; 1,0; 4,0 a 8,0 M) a teplotě (4, 23, 37 a 70 °C) NaOH a lehce

protřepán po 2 hodiny pro aktivaci aminových skupin polymerního řetězce. Následovalo promytí 20 ml PBS (fosfátový pufr, pH 7,4) do dosažení neutrální hodnoty pH. Pro pozorování procesu gelace byla do roztoku chitosanu přidána bromthymolová modř. Zmrazený roztok chitosanu s bromthymolovým indikátorem byl ponořen do alkalického roztoku v křemenné kyvetě při laboratorní teplotě [57].



Obrázek 8: Pozorování procesu gelování po přidání barevného indikátoru [57]

Obrázek 8 znázorňuje proces přípravy gradientového gelu v různých časech gelace za použití okyseleného roztoku chitosanu o koncentraci 20 mg/ml a teplotě -20°C a 1,0 M roztoku NaOH při teplotě 23°C . Zabarvení bromthymolového indikátoru odpovídá rozsahu vzniklého gelu. Modrá barva značí vzniklý pevný hydrogel, zatímco žluté části gelu odpovídají nezgelovanému zmraženému roztoku [57].

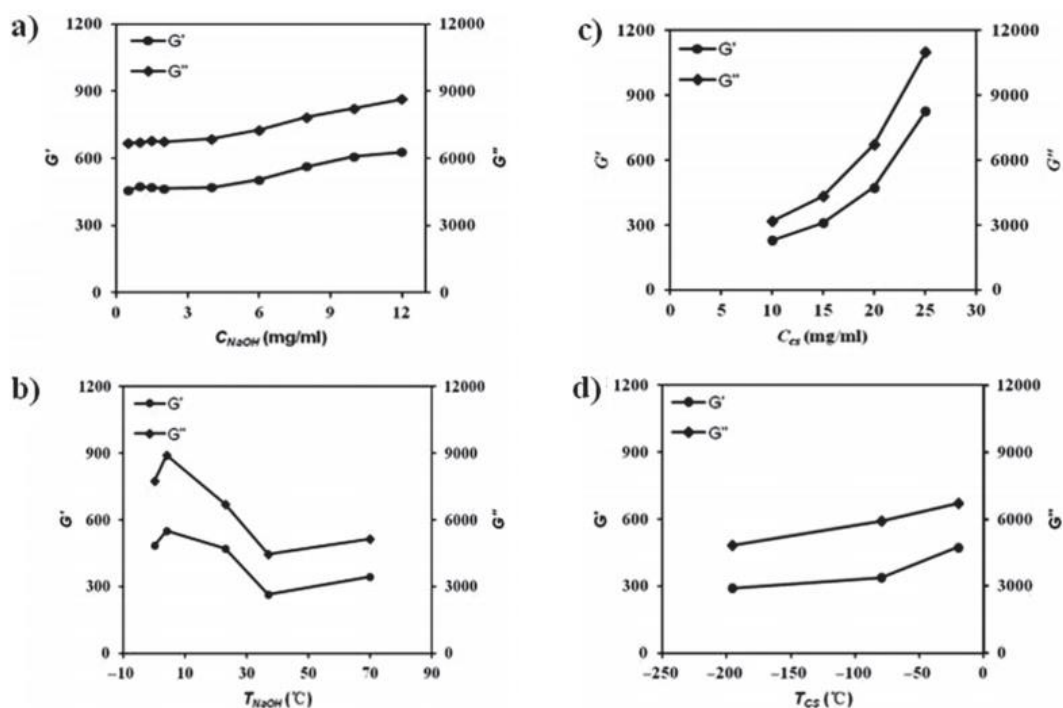


Obrázek 9: Struktura vzorků gelu před a po lyofilizaci [57]

Pro lepší charakterizaci struktury byly gely rozřezány horizontálně a vertikálně a vyfoceny před a po lyofilizaci. Následovalo pozorování mikrostruktury rozřezaných vzorků pomocí rastrovací elektronové mikroskopie. Na Obrázek 9 jsou porovnávány struktury gelů před a po lyofilizaci při změně

koncentrace a teploty používaných roztoků při přípravě. Část a) znázorňuje vliv koncentrace chitosanu na výslednou strukturu ($c(\text{CS}) = 5; 10; 15; 20; 25 \text{ mg/ml}$), část b) vliv teploty chitosanu ($T(\text{CS}) = -20^\circ\text{C}$, -80°C ; -196°C), část c) vliv koncentrace hydroxidu sodného ($c(\text{NaOH}) = 0,5; 1,0; 4,0; 8,0 \text{ M}$) a část d) vliv teploty hydroxidu sodného $T(\text{NaOH}) = 4^\circ\text{C}; 23^\circ\text{C}; 37^\circ\text{C}; 70^\circ\text{C}$ [57].

Gradientová struktura hydrogelu byla dokázána pomocí měření na rastrovacím elektronovém mikroskopu, při které byly zaznamenány 3 části: povrch, který byl složen z těsně propojených pórů o průměru $20\text{--}50 \mu\text{m}$, středová část, která měla vrstevnatou strukturu z nanovláken s radiálně orientovanými mikropóry a spodní část, která měla póry v jednotkách nanometrů. Pro úplné porozumění připravených vzorků byla provedena reologická a transportní měření, která potvrdila vhodnost přípravy. Pro reologická měření byly využity oscilační amplitudové testy s geometrií deska-deska pro zjištění lineární viskoelastické oblasti a potvrzení nezávislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace. Výsledky měření naznačují, že se zvyšující se koncentrací chitosanu a NaOH se navyšují i hodnoty paměťového a ztrátového modulu. Změny v mechanických vlastnostech ovlivňuje obsah pevného podílu polymeru a hustotě zesílení [57].



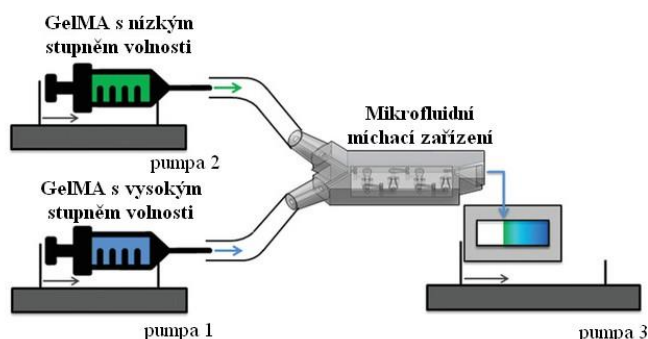
Obrázek 10: Reologická měření pro vzorky s různou koncentrací a teplotou chitosanu a NaOH. a) $c_{\text{CS}} = 10, 15, 20, 25 \text{ mg/ml}$; b) $T_{\text{CS}} = -196^\circ\text{C}, -80^\circ\text{C}, -20^\circ\text{C}$; c) $c_{\text{NaOH}} = 10, 15, 20, 25 \text{ mg/ml}$; $T_{\text{NaOH}} = 4, 23, 37 \text{ a } 70^\circ\text{C}$ [57]

Hydrogel s gradientem tuhosti z fotoaktivních materiálů jako je želatina a metakrylát (GelMA) připravovali autoři Lavrentieva a Fleischhammer [58] pomocí injekční pumpy a 3D tištěného mikrofluidního zařízení za použití několika koncentrací síťovacích činidel. Součástí připravených gradientových gelů byly kultury lidských tkání hAD-MSC a HUVEC, kterými lokalizovali gradientový rozsah [58].

Hlavním úkolem při této studii byla výroba pasivního mikromixéru s vysokou účinností a konstantním prouděním tekutin pro dosažení dokonalého smíchání materiálů. Autoři kombinovali dynamické míchání a mikrofluidiku pro zajištění specifického koncentračního gradientu, úplného promíchání a laminárního proudění. Výzkumné skupiny využívají řízené dynamické míchání pomocí injekčních pump bez popisu postupu míchání. Tato informace je však zásadní pro finální zpracování a zajištění homogenního smíchání roztoků. Proto byl při zpracovávání této studie kladen důraz na detailní popis postupu míchání s dokumentovaným výkonem míchání, který zajišťuje potřebnou reprodukovatelnost experimentů [58].

Mikromixér zároveň s licí formou byly připraveny pomocí 3D tiskárny MultiJet 2500 Plus. Pro odstranění zbytku nosného materiálu byla použita voda a parafrínový olej. Pro přípravu byl použit 5% roztok GelMA rozpuštěný ve fosfátovém pufru (PBS) při teplotě 37 °C až do úplného rozpuštění. Následně byl jako fotoiniciátor přidán 0,1% Irgacure2959 [58].

Při samotné přípravě byly využity 2 injekční pumpy. První pumpa měla počáteční průtok 200 $\mu\text{l/min}$ obsahující GelMA s nízkým stupněm volnosti, průtok lineárně klesal až do hodnoty 0 $\mu\text{l/min}$. Počáteční průtok druhé pumpy, která čerpala GelMA s vysokým stupněm volnosti, byl 0 $\mu\text{l/min}$ s lineárně vzrůstajícím průtokem do hodnoty 200 $\mu\text{l/min}$. Třetí instalovaná pumpa byla připevněna k licí formě s kontinuálním průtokem 120 $\mu\text{l/min}$. Gradientové frakce byly sbírány do zkumavek o objemu 1,5 ml po 45 sekundách [58].



Obrázek 11: Schéma systému 3 pump pro přípravu gelu [58]

Úspěšné dosažení gradientového rozložení v hydrogelu bylo zkoumáno pomocí systému obarvených buněk k jejich detekci v daném materiálu. Ke sledování byly využity modře značené endotelové buňky lidské pupeční šňůry HUVEC suspendované do oblasti GelMA s nízkým stupněm volnosti a zeleně značené hAD-MSC mezenchymální kmenové buňky lidské tukové tkáně do oblasti GelMA s vysokým stupněm volnosti. Gel byl po odlití polymerizován UV zářením po dobu 5 minut a skenován přístrojem Cytation 5-cell imaging multi-mode reader, který zaznamenal přechodnou distribuci buněk [58].

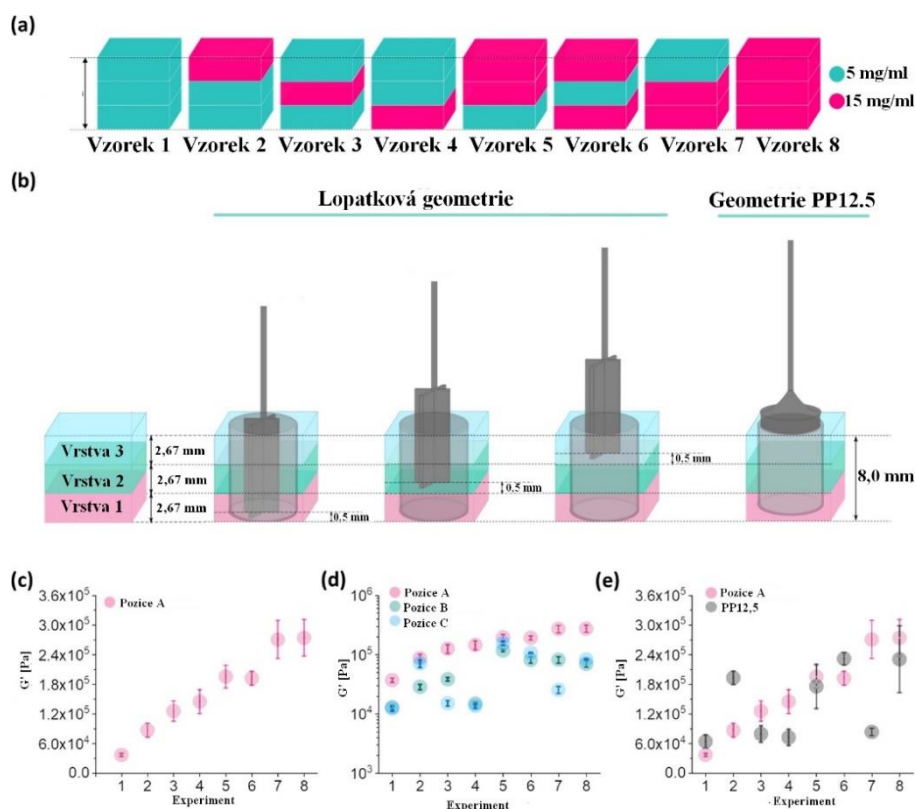
Popsaná příprava představuje inovativní metodu přípravy gradientových gelů s použitím mikromixérů, které mohou být dále použity i pro jiné fotoaktivní hydrogelové materiály. Výhodou této metody je zejména nízká spotřeba materiálu z důvodu malého objemu samotného mixéru [58].

3.2 Reologické vlastnosti gradientových hydrogelů

Autorka článku Fuentes Caparrós se ve své práci [59] zaměřuje mimo jiné na přípravu a reologickou charakterizaci heterogenních třívrstvých gelů připravených pomocí nízkomolekulárních látek metodou 3D tisku. Jako hlavní metoda charakterizace mechanických vlastností gelů a jednotlivých vrstev hydrogelu byla využita oscilační reologie s geometrií deska-deska a lopatkovou geometrií [59].

Pro přípravu gradientových gelů byl využit fluorenylmethyloxykarbonyl-fenylalanin (FmocFF) jakožto nejvíce prostudované dipeptidové gelační činidlo, jehož předností při využití v medicínských aplikacích je schopnost gelovatět při fyziologickém pH. Heterogenní struktura gelu byla dosažena přípravou jednotlivých vrstev samostatně rozpuštěním daného množství FmocFF v 30% dimethylsulfoxidu (DMSO) a vodě, následně byly pipetovány jednotlivé vrstvy gelu na sebe. Jako spojující vrstva byla využita deionizovaná voda. Pro studování struktury a reologických vlastností byl připraven gely o tloušťce 8 mm. Při přípravě gelu byly spojovány jednotlivé vrstvy FmocFF v koncentracích 5 mg/ml a 15 mg/ml v různém pořadí [59].

Reometrická měření byla provedena s využitím jak geometrie lopatkové, tak geometrie deska-deska s průměrem 12,5 mm. Při použití lopatkové geometrie byly zaznamenány měření ve 3 polohách lopatek v různých výškách gelu, které odpovídaly jednotlivým vrstvám s různými mechanickými vlastnostmi. Při použití geometrie deska-deska byl počátečním bodem měření stav, kdy se horní měřicí deska dotýkala nejspodnější vrstvy gelu, což odpovídá normálové síle 0,05 N. Pro měření byly využity hodnoty deformace v rozsahu 0,01 % až 1000 % při úhlové frekvenci 10 rad/s [59].



Obrázek 12: Schéma rozložení vrstev jednotlivých vzorků gelu a výsledky reometrických měření 8 mm gelu pomocí lopatkové geometrie a geometrie PP12,5 [59]

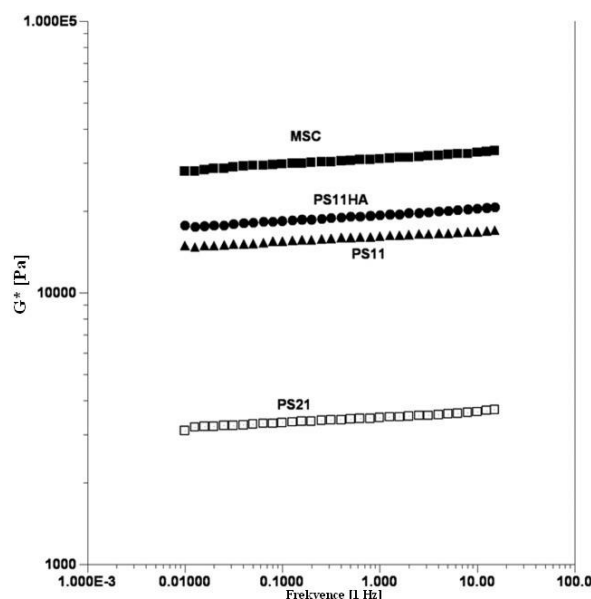
Obrázek 12 naznačuje, že v měřeních dochází k lineárnímu nárůstu tuhosti gelů, které je zapříčiněno specifickou distribucí použitých koncentrací. Měření vzorků 2–4, které jsou tvořeny dvěma vrstvami 5 mg/ml a jednou vrstvou 15 mg/ml potvrdilo, že mechanické vlastnosti gradientových gelů jsou ovlivněny také polohou nejtuzší vrstvy. Pro gel s nejtuzší fází u dna dochází ke zvýšení viskoelastických modulů. Tuto teorii potvrzují také měření vzorků 5–7, kde byly při přípravě použity 2 vrstvy s koncentrací FmocFF 15 mg/ml a jedna vrstva s koncentrací 5 mg/ml. Při porovnání měření na reometru za použití lopatkové geometrie a geometrie deska-deska v poloze A odpovídající nejnižší vrstvě gelu dochází k mírnému odlišení výsledků, které autorka článku přisuzuje proklouzávání desek [59].

Výsledkem této práce je zhodnocení využití reologických testů pro měření jednotlivých vrstev vícevrstevnatého gelu a informace, jak tuhost jednotlivých vrstev ovlivňuje celkové mechanické vlastnosti hydrogelu. Pro měření vícevrstevnatých gelů bylo doporučeno využití lopatkové geometrie, která eliminuje chyby v měření a přechází proklouzávání a delaminaci gelu [59].

Reologickým měřením pro charakterizaci gradientového hydrogelu se také zabývali autoři Leone a Volpato [60], kteří připravili avaskulární materiál napodobující lidskou tkáň chrupavky. Heterogenní struktura byla vytvořena pomocí několika krokového spojování vrstev polyvinylalkoholu (PVA) a nano-hydroxyapatitu (nHA). 5% roztok PVA byl připraven ve vodném roztoku, jehož pH bylo upraveno přidáním 2M NaOH. Následovalo přidání dispergované fáze nHA. Pro vytvoření první vrstvy gelu byl vybrán hmotnostní poměr nHA/PVA 0,015. Trimetafosforečnan sodný (STMP) sloužil jako síťovací činidlo v poměru 1:1 (PS11HA). Druhá i třetí vrstva byla získána síťováním PVA na povrchu první vrstvy pro zajištění navázání gradientu za využití volných funkčních skupin na povrchu polymerního řetězce [60].

Prvním krokem bylo nanesení síťovacího činidla po kapkách a následné přidání roztoku polymeru. Pro druhou vrstvu byly využity poměry 0,020 nHA/PVA, poměr PVA/STMP byl zachován (PS11). Pro nanesení třetí vrstvy byl aplikován stejný postup jako u vrstev předešlých, bylo využito poměru nHA/PVA 0,02 a poměr PVA/STMP byl 2:1 (PS21) [60].

K charakterizaci vytvořené struktury byla využita kromě metody SEM mikroskopie a ATR-IR spektroskopie i reologie. Pro demonstraci charakteru gelu a ověření odolnosti proti zatížení při použití jako náhrady kloubní chrupavky byly provedeny frekvenční testy. Frekvenční testy potvrdily chemické zesíťování gelovité struktury s výsledkem vyššího paměťového modulu nad ztrátový o jeden řád. Obrázek 13 shrnuje výsledky komplexních modulů pro všechny vzorky. Hodnoty pro PS21 se výrazně liší od výsledků PS11, zatímco u vzorku PS11HA byl naměřen zanedbatelný rozdíl. Tento fakt naznačuje, že přítomnost hydroxyapatitu nevyvolává mechanické změny materiálu [60].

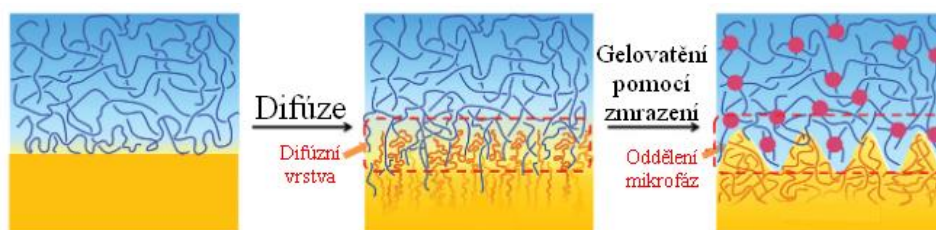


Obrázek 13: Komplexní moduly jednotlivých vrstev gelu měřené frekvenčním testem v rozsahu 0,01–15 Hz [60]

Viditelně nízká hodnota komplexního modulu pro měkkou vrstvu PS21 naznačuje výrazný vliv přítomnosti nano-hydroxyapatitu na reologické vlastnosti materiálu. Získaný materiál vykazuje dle reologických výsledků stejného reologického chování jako chrupavková tkáň. S těmito výsledky a schváleným postupem při využití povolených koncentrací PVA a STMP je připravená látka vhodná pro aplikaci v tkáňovém inženýrství [60].

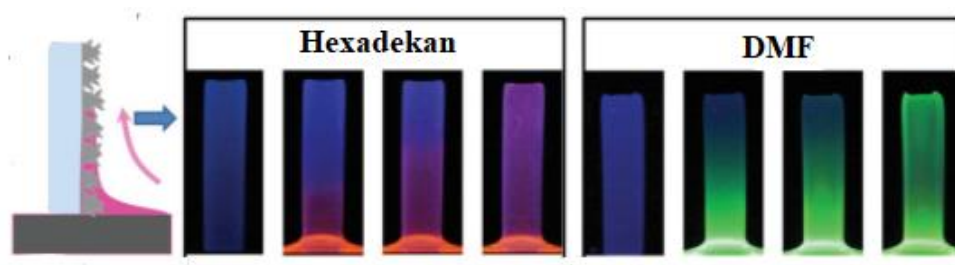
3.3 Transportní vlastnosti gradientových hydrogelů

Gradientové hydrogely s víceúrovňovou strukturou přitahují významnou pozornost pro své cenné vlastnosti v nejrůznějších oblastech, nevýhodou se ale stávají komplikované výrobní procesy s nutností specifického modelování materiálu. Tyto postupy nejsou efektivní pro přípravu většího množství hydrogelu a omezují tím jejich praktické aplikace. Problematiku přípravy gelových povrchů s gradientními strukturami prostřednictvím zavádění teplotního gradientu se zabývají autoři článku Lei a kol [61]. Jednoduchost přípravy doplnili o vytvoření takové gradientové systémy, která obsahuje mikro/nanostrukturované povrchy, které mohou fungovat jako kapiláry pro přenos kapalin. Strategie přípravy využívá vytvoření rozhraní dvou mísitelných polymerů, z nichž jeden musí předem zgelovatět. Pro přípravu je využit přístup řízeného míchání pomocí difuze, po kterém následuje gelování vyvolané zmrazením a separací mikrofází – první polymer tvoří difuzní vrstvu, zatímco druhý vytváří další strukturu uvnitř (Obrázek 14) [61].



Obrázek 14: Postup přípravy gradientové struktury hydrogelu pomocí difúzní vrstvy a zmrazení [61]

Pro přípravu bylo určité množství (5; 7,5 a 10 hmot. %) prášku poly(vinylchloridu) (PVA) rozpuštěno v N-methylpyrrolidonu (NMP) při 90 °C. Po úplném rozpuštění byl homogenní roztok odlit do polystyrenové formy. Během procesu míchání byly řetězce PS rozpuštěny v roztoku PVA/NMP. Po snížení teploty směsi došlo k separaci mikrofáze v difúzní vrstvě. Spolu s fázovou separací se roztok PVA/NMP začal síťovat, zatímco polystyrenová vrstva zůstala kapalná, což umožnilo pohyb řetězce PVA v difúzní vrstvě a vytvoření víceúrovňové struktury. Takto vytvořená mikrostruktura může následně působit jako komplexní otevřený kapilární systém pro absorpci a transport kapaliny kapilární silou ve vertikálním směru. Při zkoumání procesu byla vybrána široká škála kapalin N,N-dimethylformamid (DMF), hexadekan, Rhodamin B, Coumarin 6 nebo Lumogen Red. Pro dokázání difúze byly vybrány vzorky obsahující DMF obarvený kumarinem a hexadekan obarvený pomocí Lumogenua osvětleny UV zářením při 365 nm [61].



Obrázek 15: Fluorescenční měření jako důkaz transportu kapalin ve strukturách hydrogelů pomocí obarvených roztoků Hexadekanu a DMF [61]

Autoři článku dospěli k názoru, že použitá strategie pro přípravu víceúrovňových strukturovaných hydrogelů se potvrdila být svou jednoduchostí vhodnou pro velkoplošnou aplikaci například jako antidehydratační hydrogely [61].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

- Chitosan ($M_w = 250$ kDa), Sigma Aldrich, č. šarže: SLBF6034V
- Chitosan ($M_w = 168$ kDa), Sigma Aldrich, č. šarže: MKBH7256V
- Kyselina citronová, Penta s.r.o., č. šarže: 2002160215
- Kyselina octová, Lach-Ner s.r.o., č. šarže: 607-002-00-6
- Hydroxid sodný, Penta s.r.o., č. šarže: 2204030417
- Bromthymolová modř (sodná sůl), Sigma Aldrich, č. šarže: BCCG4427

4.2 Použité přístroje

- Reometr – Discovery HR-2, TA Instruments
- Sušárna – Durocel BMT
- Analytické váhy – Denver 224A Instrument
- Magnetická míchačka – Thermo Scientific Poly 15

4.3 Příprava vzorků

Náplní experimentální části této bakalářské práce byla příprava fyzikálně síťovaných gradientových hydrogelů za využití chitosanu, organických kyselin a hydroxidu sodného jako síťovacího činidla.

4.3.1 Příprava homogenního hydrogelu

Nejprve bylo nutné provést optimalizaci postupu přípravy a zvolení vhodných koncentrací využívaných látek při přípravě homogenních hydrogelů. Prvním krokem bylo navážení 1, 2 nebo 3 g chitosanu, který byl následně rozpuštěn v 100 ml vodného roztoku 5% kyseliny octové/citronové. 30 ml okyseleného roztoku bylo poté postupně přikapáváno do 15 ml roztoku hydroxidu sodného o koncentracích 1,5; 2 a 3 mol·dm⁻³ až do vytvoření celistvé gelovité struktury. Takto připravené homogenní hydrogely byly měřeny pomocí oscilačních testů na reometru HR-2 Discovery (TA Instruments). Po zhodnocení byly pro další přípravu vyřazeny vzorky s využitím 1% roztoku chitosanu, které vykazovaly nejhorší mechanické vlastnosti a nejdelší dobu gelovatění.

4.3.2 Příprava hydrogelu s difúzním gradientem

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.2.2, příprava gradientových hydrogelů probíhá ve dvou fázích. Prvním krokem je příprava prekurzorního roztoku, která se v této bakalářské práci skládala z navážky 2 g nebo 3 g chitosanu rozpuštěného ve 100 ml 5% vodného roztoku organických kyselin (octová/citronová). Vytvořená suspenze byla v kádince zakryta parafilmem a ponechána nejméně 24 hodin na magnetické míchačce při 300 ot./min za laboratorní teploty. Tímto krokem bylo vlivem kyselého prostředí zajištěno úplné rozpuštění biopolymeru. Druhou částí přípravy je síťování připraveného prekurzorního roztoku pomocí síťovacího činidla, kterým byl v této práci hydroxid sodný. Druhý krok zahrnoval přenesení okyselených roztoků chitosanu do celkem 12 plastových kyvet (1×1×4,5 cm) a jejich vložení do kádinek s předem připravenými roztoky hydroxidu sodného (1,5M; 2M a 3M). Každý ze vzorků chitosanového

roztoku byl v kádince se síťovacím činidlem ponechán nejméně po dobu 48 hodin. Kyvety byly vytaženy až po vizuálním zhodnocení zgelovatění jednotlivých vzorků v celém objemu kyvety.

Kombinací rozdílných koncentrací hydroxidu sodného, chitosanu a typu kyseliny vzniklo celkově 12 vzorků hydrogelů. Vliv jednotlivých měněných parametrů bude dále hodnocen v kapitole 5.2. Pro prokázání gradientové struktury hydrogelů zkoumáním jejich mechanických a transportních vlastností byly vybrány vzorky 3% roztoku chitosanu připravené pomocí 1,5M a 3M NaOH. Pro výsledné vyhodnocení byly vzorky nadále připravovány s oběma typy kyselin.

Dalším měněným parametrem ovlivňujícím tvorbu gradientu a mechanické vlastnosti vzniklého gelu byla také molekulová hmotnost chitosanu. V rámci experimentální části byl proto shodně připraven vzorek 3% roztoku chitosanu o nižší molekulové hmotnosti (168 kDa) s kyselinou citrónovou a zesíťovaný 3M hydroxidem sodným. Celkově byl tedy testován vliv koncentrace chitosanu (1%, 2% a 3%), vliv koncentrace síťovacího činidla – hydroxid sodný (1,5M; 2M; 3M), vliv disperzního prostředí, ve kterém byl chitosan rozpuštěn (kyseliny octová a kyselina citronová), molekulová hmotnost chitosanu (168 kDa, 208 kDa) a doba síťování (1/2 dny).



Obrázek 16: Kyvety s roztoky během a po procesu síťování

4.4 Prokázání gradientové struktury

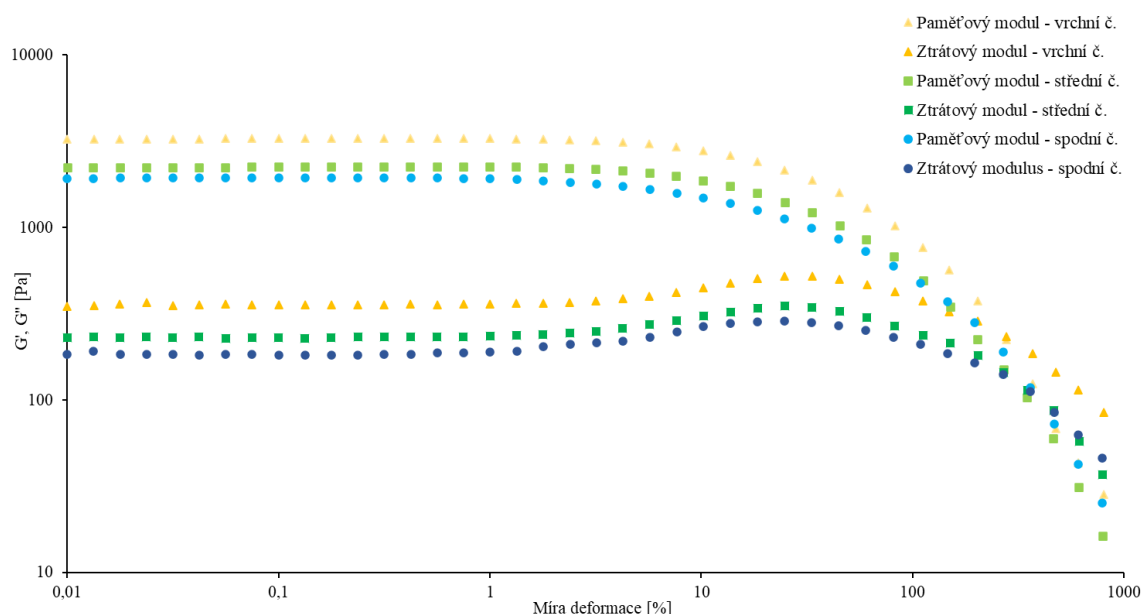
Pro prokázání úspěšného vytvoření postupné gradientové struktury změnou pH v systému chitosan–kyselina bylo využito dvou přístupů: měření viskoelastických vlastností pomocí reometru a metody založené na stanovení „sušiny“ hydrogelových částí.

4.4.1 Charakterizace hydrogelů pomocí oscilačních testů

Pro měření viskoelastických vlastností připravených hydrogelů s gradientovou strukturou byly vybrány oscilační testy měřené pomocí reometru HR-2 Discovery (TA Instruments). Pro všechna prováděná měření byla vybrána geometrie deska-deska s horním senzorem o průměru 20 mm. Pro zabránění prokluzování vzorku při měření byl využit horní senzor se zdrsněním 0,2 mm. Konstantním parametrem při všech měřeních byla nastavená teplota, Peltierovy desky byly temperovány na teplotu 25 °C. Mechanické vlastnosti každého vzorku byly měřeny pomocí dvou typů oscilačních testů – amplitudového a frekvenčního. Amplitudové testy (z anglického *strain sweep*) sloužily k měření deformačního chování hydrogelů a zjištění lineární viskoelastické oblasti (LVO) při konstantní

frekvenci oscilace (1 Hz) a amplitudě deformace v rozmezí 0,01–1000 %. Aplikovaná amplituda deformace v logaritmickém módu měla rostoucí charakter s 8 body na dekádu. Před začátkem měření byla v programu nastavena také doba relaxace vzorku na 180 s a zároveň teplota vzorku na požadovanou teplotu – 25 °C.

Zmiňované frekvenční testy (z anglického *frequency sweep*) byly měřeny při vybrané konstantní amplitudě deformace (0,5 %), která spadá do nedestruktivní oblasti LVO. Hodnoty frekvence pro měření byly nastaveny od 0,01 Hz do 100 Hz s 6 body na dekádu. Stejně jako u amplitudových testů, před měřením byl vzorek relaxován po dobu 180 s a zároveň temperován na 25 °C. Naměřená data byla zpracována v programu Trios (TA Instruments) a poté exportována a upravena do grafů v MS Excel. Pro dokázání vzniklého gradientu byly připravené hydrogely rozřezány na 3 stejně velké části: vrchní část, střední část a spodní část, které byly následně jednotlivě umístěny mezi dvě paralelní desky přístroje a měřeny. Klíčovými parametry porovnávanými u měřených vzorků byla: koncentrace a molekulová hmotnost chitosanu, koncentrace hydroxidu sodného, typ použité kyseliny a doba síťování.



Obrázek 17: Závislost viskoelastických modulů na míře deformace pro gradientový hydrogel

4.4.2 Sušící charakteristika

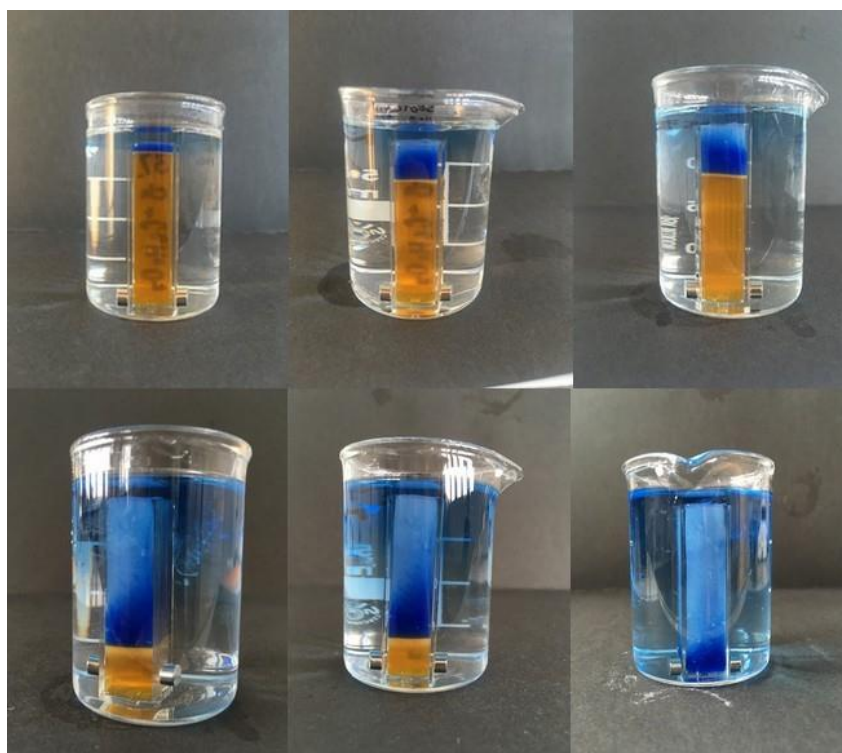
Charakterizace pomocí sušení byla založená na vážení úbytku hmotnosti hydrogelu a určení konečného pevného podílu jednotlivých částí hydrogelů odstraněním jeho disperzního prostředí. Motivací pro tuto charakteristiku byla teorie postupného klesání hmotnosti pevného podílu s nižšími částmi gelu v květu.

Připravené hydrogely byly rozřezány na 3 stejně velké části (vrchní část, střední část a spodní část), umístěny na pergamenový papír na předem zvážené Petriho misky a vloženy do sušárny vyhřáté na 105 °C po dobu alespoň 3 dny. Doba a teplota sušení byly zvoleny tak, aby došlo k odpaření volně

vázané vody a měřená hmotnost byla na konci vážení konstantní. Pro toto měření byly použity hydrogely připravené pro transportní měření, jejichž postup přípravy je uveden v následující kapitole 4.5.

4.5 Příprava vzorku pro transportní experimenty

Pro sledování kinetiky transportu bylo provedeno difúzní stanovení indikačního barviva inkorporovaného do struktury hydrogelu. Pro zkoumání transportních vlastností hydrogelů s difúzním gradientem byla připravena nová sada vzorků, jejichž příprava byla shodná s postupem v kapitole 4.3. Jediným rozdílem bylo využití indikátoru bromthymolové modři o koncentraci 0,005 g/l, který nahradil deionizovanou vodu v prvním kroku přípravy. Jako difundující médium byla vybrána bromthymolová modř na základě literární rešerše proto, že se jedná o aniontové barvivo, které je ochotně interaguje s chitosanovým hydrogelem coby kationaktivním biopolymerem. Kyvety s roztoky o různé koncentraci chitosanu a lišící se organickou kyselinou, ve které byl biopolymer rozpuštěn, byly ponořeny do roztoků 1,5M a 3M NaOH. Kádinky s kyvetami byly přikryté vrstvou parafilmu a ponechány stát při laboratorní teplotě. Difúzní systém byl vizuálně hodnocen a zaznamenáván každé 2 hodiny po dobu 48 hodin.



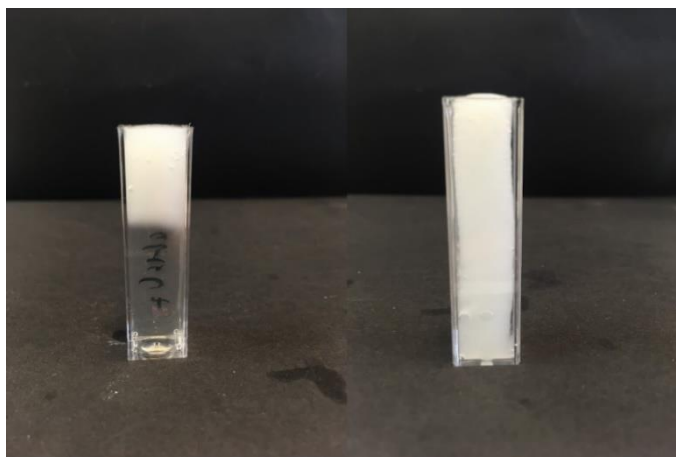
Obrázek 18: Kyvety s hydrogelem ihned po vložení a po 48 hodinách

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Charakterizace přípravy gradientových hydrogelů

Jak již bylo nastíněno v kapitole 4.3.2, pro přípravu hydrogelů s difuzním gradientem byl jako zástupce bipolymeru vybrán polykation chitosan, který byl rozpuštěn ve vhodném vodném prostředí. Pro gelaci chitosanu pomocí změny pH byl zvolen hydroxid sodný. Jako vhodné prostředí byly zvoleny slabé organické kyseliny - kyselina octová a kyselina citronová, jejichž vliv na strukturu gelu byl později testován. Pro přípravu byly využity různé koncentrace chitosanu (2 hm. % a 3 hm. %), dvě koncentrace síťovacího činidla (1,5 M a 3 M), dvě molekulové hmotnosti chitosanu (168 kDa a 208 kDa) a také již zmiňované rozdílné organické kyseliny – kyselina citronová a kyselina octová. Cílem práce byla kromě přípravy gradientových hydrogelů také jejich charakterizace – zejména jejich viskoelastických a transportních vlastností. Počáteční vizuální hodnocení bylo využito při přípravě hydrogelů a výběru vhodných koncentrací využívaných látek. Pro kvalitativní charakterizaci byly hydrogely měřeny pomocí reologických oscilačních testů. V rámci experimentální části byly také transportní experimenty a stanovení sušiny, které značně vypovídaly o struktuře chitosanových hydrogelů a jejich schopnosti tvořit fyzikální gradient. Všechny výsledky těchto měření a jejich srovnání budou popsány v následujících kapitolách.

Pro samotnou přípravu, rychlost síťování i následné vlastnosti gelu byl značně důležitý výběr vhodné koncentrace chitosanu. Pro experimentální část byly vybrány koncentrace 20 g/l a 30 g/l. Jak naznačuje Obrázek 19, při výběru vyšší koncentrace dochází k rychlejšímu síťování hydrogelu. Zároveň měl připravený hydrogel s obsahem koncentrovanějšího chitosanu při vytažení značně lepší mechanické vlastnosti, které umožnila lepší manipulaci. Stabilnější gel s vyšší hustotou síťování zcela jistě ovlivní změnu mechanických vlastností, která bude dále popisována v kapitole 5.2. Pro další experimenty byla koncentrace 2 hm. % chitosanu z důvodu horší manipulace a delší doby síťování vyřazena.



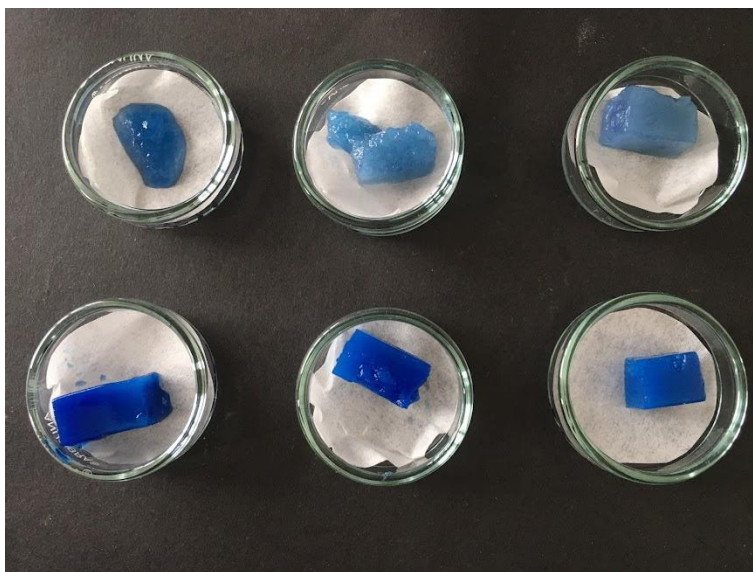
Obrázek 19: Síťování hydrogelu s kyselinou citronovou v 1,5M NaOH po 20 hodinách: koncentrace 2 hm. % chitosan (vlevo) a 3 hm. % chitosan (vpravo)

Na tvorbu gelu a jeho strukturu měl v síťovacím kroku velký vliv hydroxid sodný a jeho koncentrace. Hydrogely síťované pomocí 3M NaOH vykazovaly rychlou dobu síťování (1–2 dny) a také stabilnější

strukturu hydrogelu. Naopak při použití 1,5M NaOH byla doba pro vytvoření kompaktního gelu v objemu celé kyvety až o 48 hodin delší a pojily se s tím také mechanické vlastnosti hydrogelu. Stejně jako u rozdílů při využití rozdílných koncentrací chitosanu, i tady byly vlivem koncentrace hydroxidu sodného předpokládány změny ve viskoelastických i transportních vlastnostech.

Pro zhodnocení závislosti molekulové hmotnosti látky na síťování a struktuře gradientových hydrogelů byly pro tuto bakalářskou práci připraveny také dva vzorky s chitosanem o molekulových hmotnostech 168 kDa a 208 kDa. Z vizuálního hodnocení vyplývá, že se jedná o další faktor, který ovlivňuje výsledné fyzikální vlastnosti (především mechanické vlastnosti). Vzorky s chitosanem o nižší molekulové hmotnosti (168 kDa) vytváří kompaktní gelovou strukturu za stejně dlouhou dobu (48 hodin), jejich struktura je však méně stabilní a nadržuje pevný tvar.

Pozornost byla při přípravě zaměřena také na využití dvou různých kyselin jako disperzního prostředí pro rozpouštění chitosanu – kyselina octová a kyselina citronová. Při přípravě vzorků bylo pozorováno, že hydrogely s kyselinou octovou síťují pomaleji, nicméně mají poté více rigidní strukturu. Na rozdíl od hydrogelů s obsahem kyseliny citronové, které mohou zcela zgelovatět již za 20 hodin, ale jejich struktura byla podstatně slabší a nadržela svůj pevný tvar (Obrázek 20).



Obrázek 20: Vzorky obarvených hydrogelů s rostoucí hustotou síťování (zleva) při využití: kyseliny citronové (nahore) a kyseliny octové (dole)

Postup přípravy hydrogelů má velký vliv na jeho výslednou podobu a možnost jeho využití. Ze zmíněných pozorování může být vyvozen závěr, že všechny zkoumané parametry ovlivňují dobu síťování a výslednou strukturu gradientových hydrogelů. Stabilnější gely s rigidní strukturou vznikají při použití vyšší molekulové hmotnosti i koncentrace chitosanu, ale také s vyšší koncentrací síťovacího činidla. Pro přípravu je směrodatný také typ kyseliny využitý pro rozpuštění chitosanu. Pro přípravu mechanicky pevnějšího hydrogelu je více vyhovující kyselina octová, zatímco kyselina citronová vyniká svou schopností rychlejšího síťování s nižší mechanickou odolností. Tyto závěry byly ověřeny také reometricky, což bude diskutováno v následující kapitole.

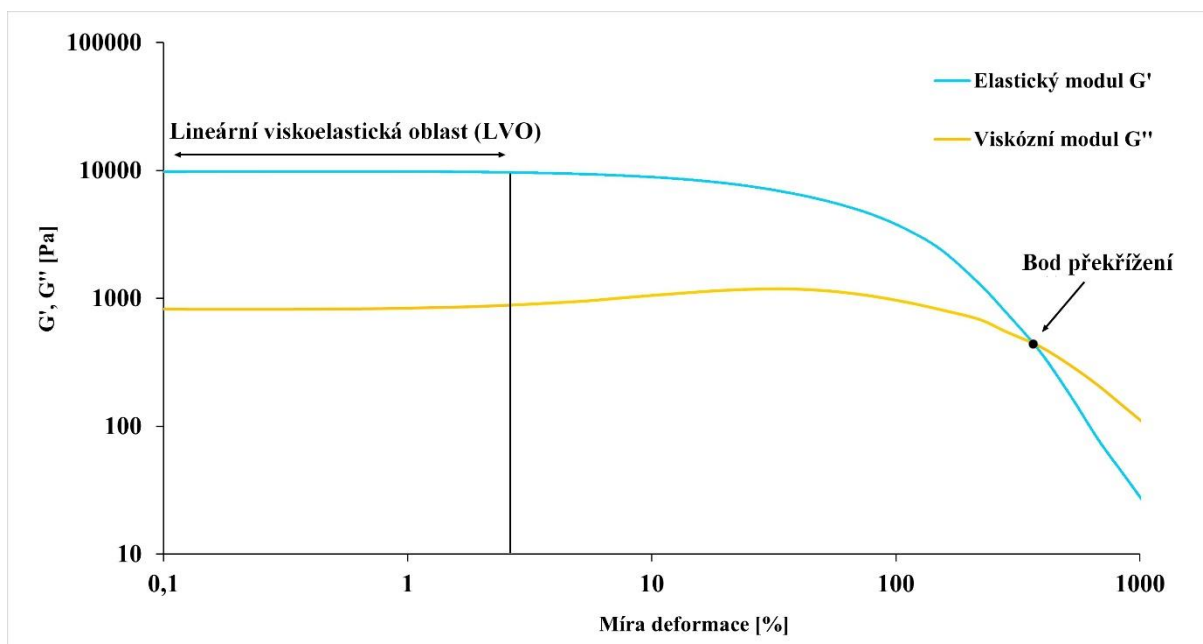
5.2 Prokázání gradientové struktury pomocí oscilačních testů na reometru

Pomocí reologických oscilačních testů s nastavením dle kapitoly 4.4.1 byly charakterizovány viskoelastické vlastnosti připravených chitosanových gelů, které jsou následně porovnávány s vizuálním hodnocením mechanických vlastností při přípravě a také s jejich transportními vlastnostmi. Metoda měření pomocí reometru si také kladla za cíl zkoumat vliv vnějších deformačních sil na jednotlivé části gelu a potvrdit tak vytvoření gradientové struktury hydrogelu. Jak již bylo zmíněno, při experimentech byl sledován vliv změny koncentrace a molekulové hmotnosti chitosanu, koncentrace síťovacího činidla (NaOH), vliv využívané organické kyseliny a doba síťování. Pro každé z měření byly vyhodnocovány viskoelastické moduly – elastický (paměťový) modul G' a viskózní (ztrátový) modul G'' .

Hlavním výstupem z reologických měření byly grafické závislosti viskoelastických modulů na míře deformace nebo frekvenci oscilací. Pro doplnění byly ale také pro hydrogely a jejich postupně zesíťované části vypočteny hodnoty bodu překřížení. Lišící se viskoelastické vlastnosti jednotlivých vzorků a jejich vrstev byly porovnávány také pomocí vypočtených hodnot komplexních modulů.

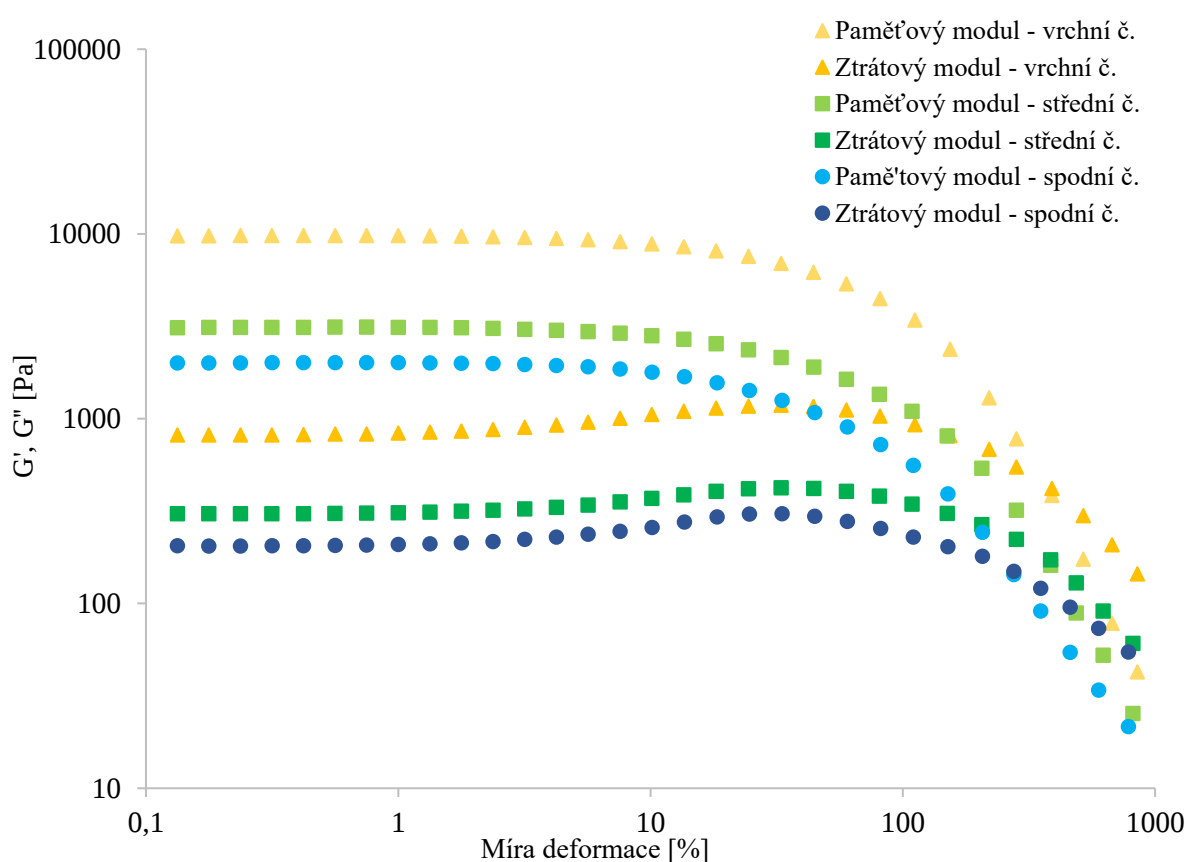
$$G^* = \sqrt{G'^2 + G''^2} \quad (8)$$

Z Obrázek 21, který znázorňuje obecnou grafickou závislost viskoelastických modulů na amplitudě deformace, je patrné, že připravené hydrogely i přes vysoký obsah vody ve své struktuře vykazují viskoelastický charakter chování, který se projevuje až o řád vyšší hodnotou elastického modulu nad modulem viskózním. Za lineární viskoelastickou oblastí dochází ke vzniku mikrotrhlin ve struktuře gelu, které mají za následek pokles elastického modulu a růst viskózního modulu až do jejich překřížení v bodě toku, ve kterém se viskoelastické moduly sobě rovnají a hydrogel při této hodnotě deformace teče.



Obrázek 21: Amplitudový test s definovanou lineární viskoelastickou oblastí a bodu překřížení

Pro všechny připravené vzorky gradientových hydrogelů byly naměřeny jednoduché oscilační testy, kterými se gradientová struktura potvrdila. Pro potvrzení gradientu byl každý gel rozříznut na 3 části a každá část byla individuálně změřena. Výsledné vyhodnocení reologických testů u všech gradientových vzorků ukazuje, že horní vrstva hydrogelu, která měla nejintenzivnější kontakt se síťovacím činidlem je zesíťována nejvíce, což dokazují nejvyšší hodnoty elastických modulů. Naopak spodní část všech gelů vykazovala vždy hodnoty viskoelastických modulů nejnižší. Můžeme proto obecně říct, že při menší interakci solu se síťovacím činidlem dochází ke snižování hustoty zesíťování a menší mechanické odolnosti, což se projeví nižší hodnotou elastického modulu. Z grafu také vyplývá, že rozsah LVO zůstává pro jednotlivé vrstvy hydrogelu neměnný, což značí, že se nemění pevnost uzlů, ale pouze jejich četnost.

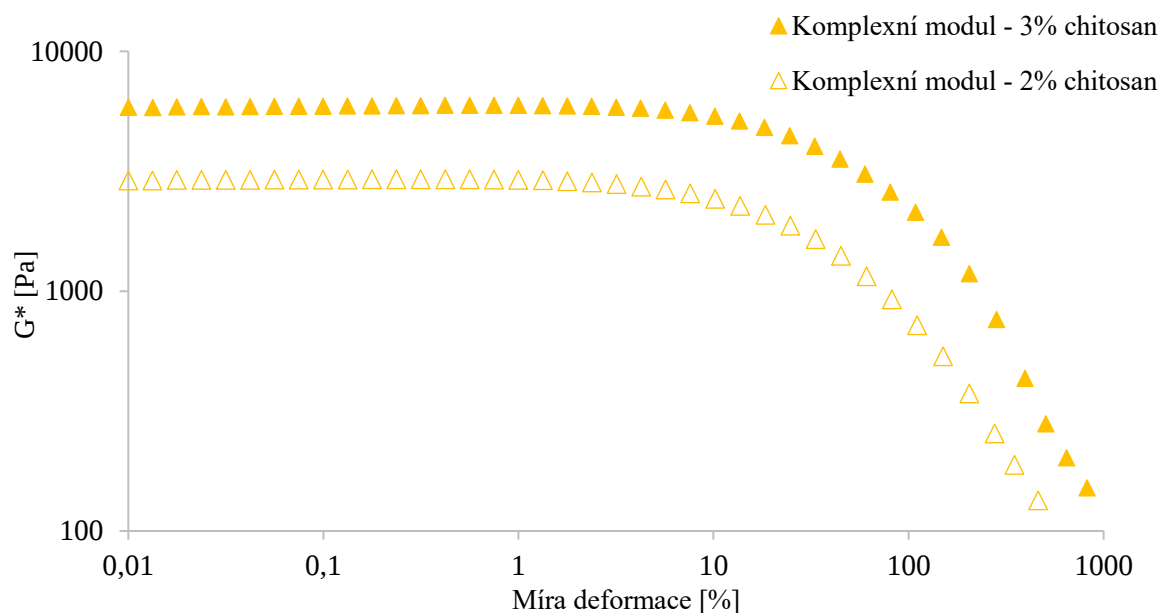


Obrázek 22: Charakteristický amplitudový graf gradientového hydrogelu

5.2.1 Vliv koncentrace chitosanu

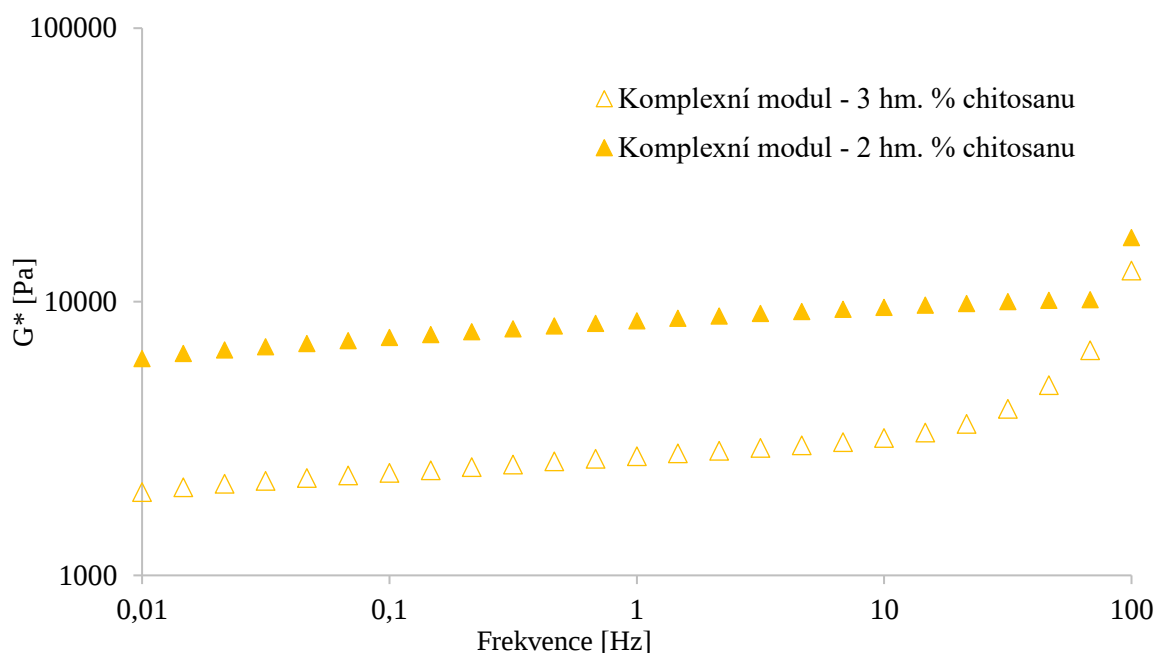
Jako první byla sledována koncentrace chitosanu a její vliv na výsledné mechanické vlastnosti hydrogelu. Pro vzorky obsahující 2 hm. % a 3 hm. % chitosanu byly výsledky amplitudových a frekvenčních testů zpracovávány do grafů a následně mezi sebou srovnávány pomocí komplexních modulů vrchních částí gelu. Jak napovídá Obrázek 23, vliv koncentrace biopolymeru se významně podílí na výsledných hodnotách komplexních modulů. Hodnoty chitosanového hydrogelu obsahujícího 3 hm. % chitosan převyšují hodnoty komplexního modulu vzorku s chitosanem o nižší koncentraci, což

dokazuje pevnější strukturu a vyšší četnost uzlů. Z výsledků lze usoudit, že s rostoucí koncentrací chitosanu přímo úměrně roste také hodnota viskoelastických modulů a mechanická pevnost gelů. Pro přehlednost byly porovnávány pouze vrchní části gelů, trend zvyšujících se modulů s vyšší koncentrací se však opakuje v celém rozsahu gelu.



Obrázek 23: Srovnání komplexních modulů hydrogelů s koncentrací 2 hm. % a 3 hm. % chitosanu a kyselinou octovou u amplitudového testu

Vliv koncentrace chitosanu na výslednou pevnost a mechanické vlastnosti hydrogelů potvrzuje frekvenční test (Obrázek 24) měřený v rozsahu 0,01 až 100 Hz. Komplexní modul hydrogelu s koncentrovanějším chitosanem má taktéž vyšší hodnotu, což potvrzuje vyšší počet vytvořených uzlů v síti hydrogelů. U obou měření i přes rozdílné hodnoty komplexních modulů vykazují vzorky podobný charakter a křivky se navzájem kopírují, což svědčí o podobnosti jejich chování a mechanismu vzniku gelu. Se zvyšující se frekvencí dochází k prokluzu senzoru a strmému nárůstu u hydrogelu s vyšší koncentrací chitosanu, u vzorku s nižší koncentrací dochází k prokluzu a vzniku chyby již při nižší frekvenci.



Obrázek 24: Srovnání komplexních modulů hydrogelů s koncentrací 2 hm. % a 3 hm. % chitosanu a kyselinou octovou u frekvenčního testu

Pevnost řetězců ve vnitřní struktuře hydrogelů může být ověřena pomocí vypočtených komplexních modulů a bodu toku. Čím více byla struktura zesíťovaná, tím dříve dochází k překřížení těchto modulů z důvodu větší pravděpodobnosti tvorby mikrotrhlin ve větším počtu vazebných interakcí.

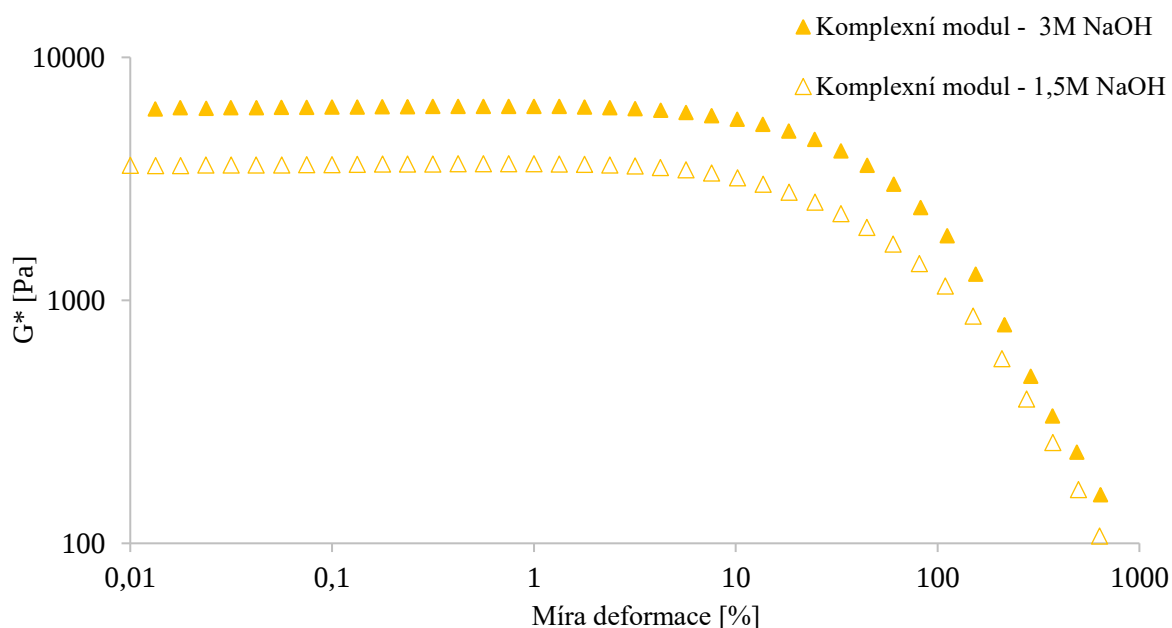
Tabulka 1: Vypočtená data pro hydrogely obsahující 2 hm. % a 3 hm. % chitosanu, kyselinu octovou a 2M NaOH

		Komplexní modul [Pa]	Bod překřížení [%]
2% chitosan	Vrchní část	2841	241,0
	Střední část	2179	111,3
	Spodní část	1415	92,6
3% chitosan	Vrchní část	5790	339,9
	Střední část	4060	322,4
	Spodní část	1480	316,7

Z Tabulka 1 vyplývá, že hodnoty komplexních modulů vzorku s koncentrací 3 hm. % chitosanu jsou až dvakrát větší, což potvrzuje experimentální data grafických závislostí, že hydrogely s vyšší koncentrací chitosanu mají lepší mechanické vlastnosti z důvodu vyššího počtu uzlů. U 3% chitosanového hydrogelu dochází také k pozdějšímu protnutí viskoelastických modulů a k bodu, kdy se hydrogel stává tekutým. Vyšší hodnoty bodu překřížení tedy potvrzují hůře rozrušitelnou strukturu gelu a větší odolnost mechanické deformaci.

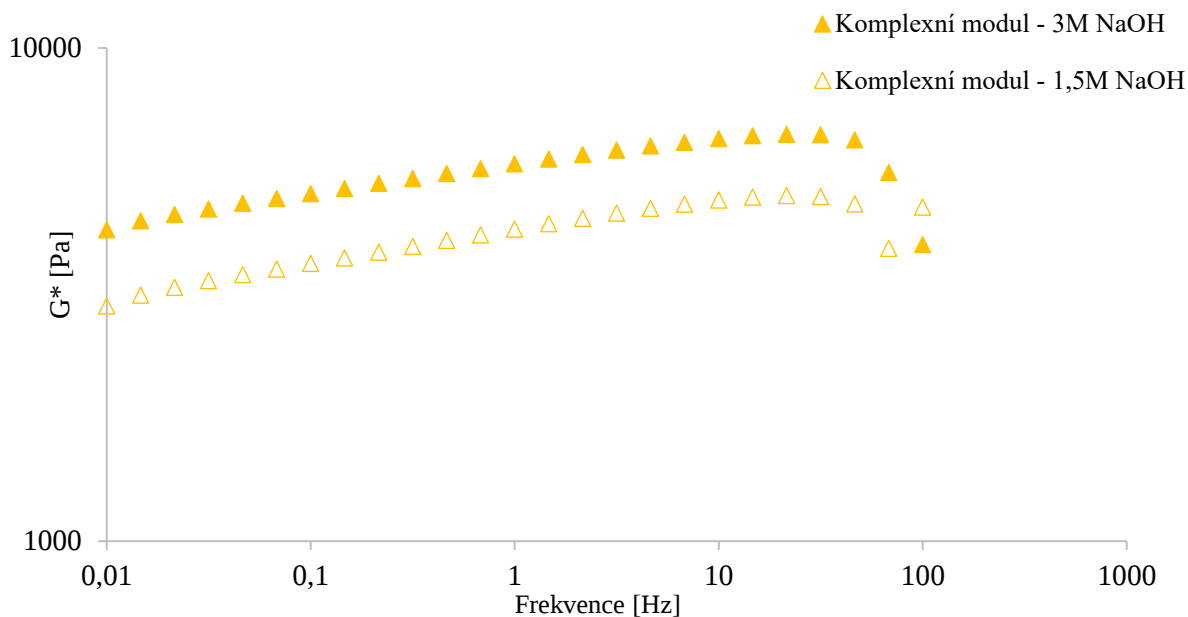
5.2.2 Vliv koncentrace síťovacího činidla

Odlišnosti jednotlivých chitosanových hydrogelů a jejich mechanických vlastností byly reometricky zkoumány také při využití dvou různých koncentrací hydroxidu sodného jako síťovacího činidla (1,5 M a 3 M). Nejprve byly hydrogely podrobeny amplitudovému testu s nastavením uvedeným v kapitole 4.4.1. Stejně jako u předešlých vzorků dochází k převaze elastického modulu nad viskózním v celé oblasti LVO, což značí charakteristické chování gelů. Zároveň je z grafu patrné, že komplexní modul vrchní části hydrogelu síťovaného v 3M NaOH je skoro dvakrát vyšší než komplexní modul vrchní části gelu s 1,5M NaOH. Tento trend naznačuje pozitivní korelaci koncentrace síťovacího činidla a výsledné schopnosti gelu odolávat mechanickým deformacím.



Obrázek 25: Porovnání komplexních modulů pro 3% chitosanový hydrogel s kyselinou citronovou u amplitudového testu za využití dvou koncentrací síťovacího činidla

U vybrané amplitudy deformace byly proměřeny také frekvenční testy, které potvrzují výsledky amplitudových testů. Ze získaných naměřených dat vyplývá, že se zvyšující se frekvencí oscilace dochází k nárůstu komplexního modulu u obou hydrogelů. Dále je viditelný pokles komplexního modulu chitosanového hydrogelu s nižší koncentrací hydroxidu sodného oproti hydrogelu s koncentrací NaOH vyšší. Viditelná podobnost křivek připravených vzorků značí jejich mechanickou podobnost. Při nejvyšší frekvenci oscilace docházelo k prokluzu senzoru a poklesu hodnot komplexních modulů.



Obrázek 26: Porovnání komplexních modulu 3% chitosanového hydrogelu s kyselinou citronovou u frekvenčního testu za využití dvou koncentrací síťovacího činidla

Odlišnosti ve výsledných mechanických vlastnostech jsou ještě více patrné z vypočítaných hodnot komplexních modulů a bodů překřížení. Lepší mechanické vlastnosti a odolnost potvrzují vyšší hodnoty komplexního modulu při využití více koncentrovaného síťovacího činidla. K bodu překřížení dochází u hydrogelu obsahující 3M NaOH dříve, jelikož u více propletených řetězců dochází k dřívější tvorbě mikrotrhlin a možnému podlehnutí působící deformaci.

Tabulka 2: Vypočítané hodnoty komplexních modulů a bodů překřížení pro hydrogely s proměnnou koncentrací síťovacího činidla

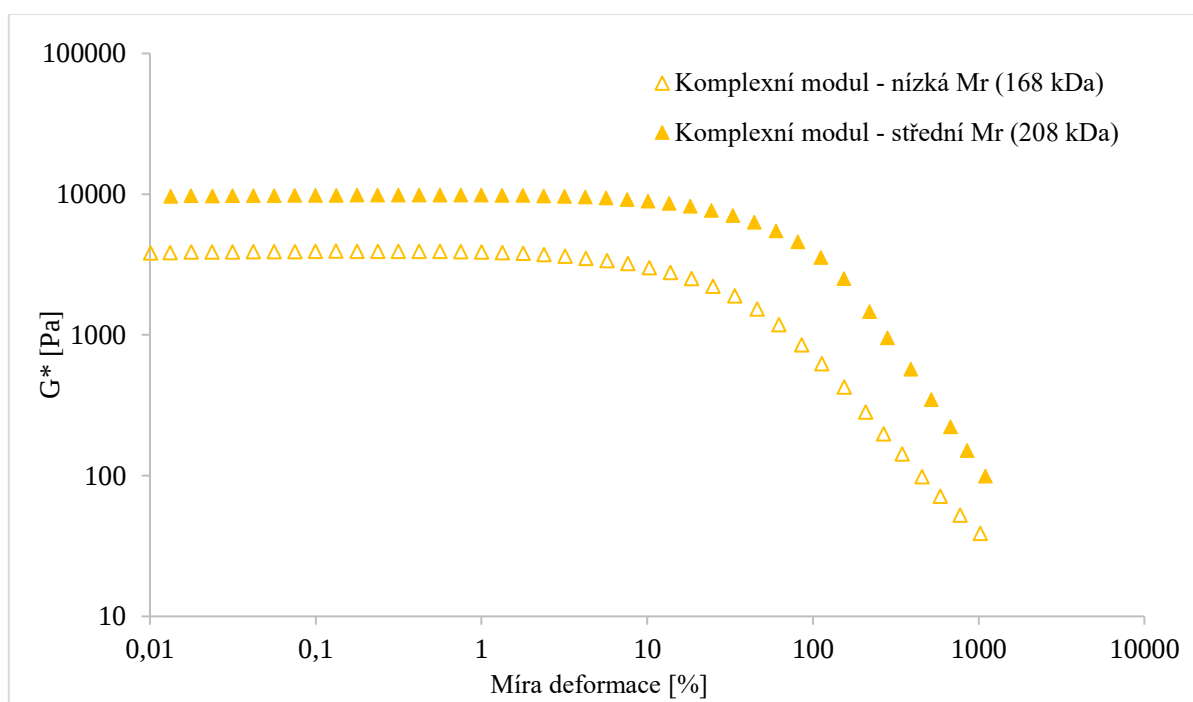
		Komplexní modul [Pa]	Bod překřížení [%]
1,5M NaOH	Vrchní část	3525	435,5
	Střední část	2998	429,9
	Spodní část	2179	316,7
3M NaOH	Vrchní část	6054	252,6
	Střední část	2144	241,1
	Spodní část	596	167,3

Z vypočítaných hodnot z Tabulka 2 byl potvrzen předpoklad, že stejně jako koncentrace využívaného biopolymeru, také koncentrace síťovacího činidla výrazně přispívá k ovlivnění výsledných viskoelastických vlastností a tím nabízí jednoduché řešení pro modifikaci hydrogelů pro potřebné aplikace.

5.2.3 Vliv molekulové hmotnosti chitosanu

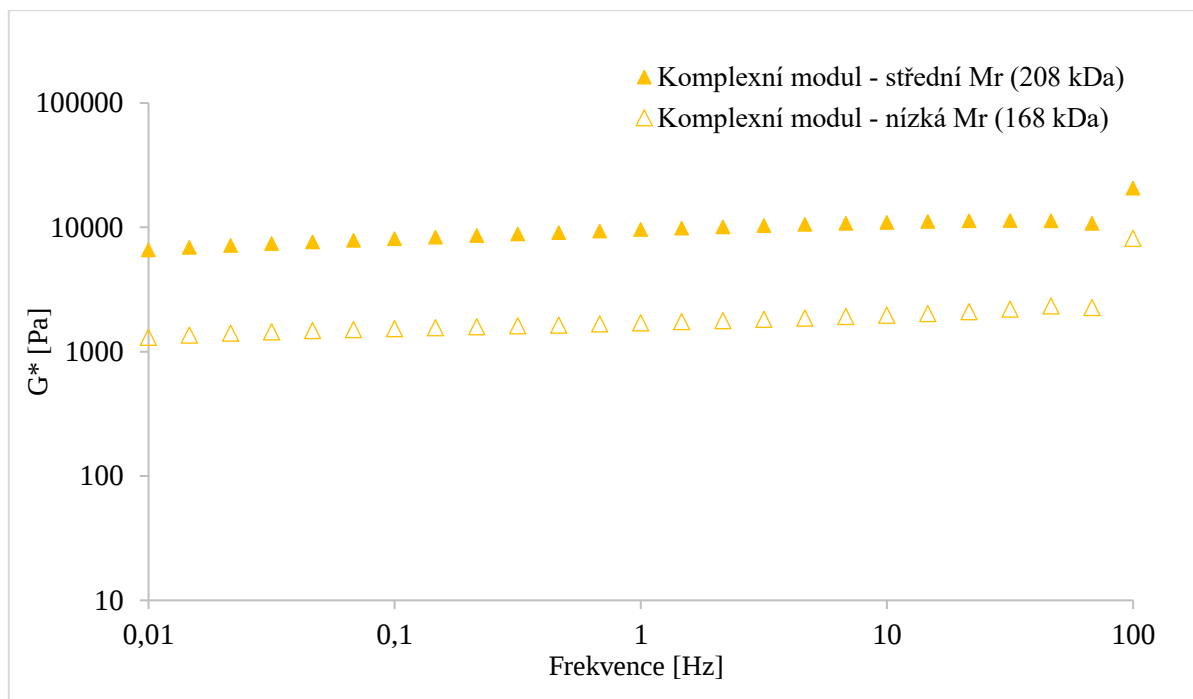
Proměřeny byly také hydrogely s rozdílnou molekulovou hmotností chitosanu – nízká molekulová hmotnost (168 kDa) a střední molekulová hmotnost (208 kDa). Jako první byla opět lineární

viskoelastická oblast a hodnoty bodů toku proměřeny pomocí amplitudových testů. Jak je z výsledného grafu patrné, opět dochází k převaze elastického chování nad viskózním převahou paměťového modulu nad ztrátovým. Na Obrázek 27 můžeme vidět závislost míry deformace komplexních modulů hydrogelu s různou molekulovou hmotností chitosanu. Graf naznačuje trend zvyšujícího se komplexního modulu se zvyšující se molekulovou hmotností. O hydrogelu s molekulovou hmotností chitosanu tedy můžeme říct, že má ve své struktuře vyšší hustotu síťování a je rigidnější.



Obrázek 27: Porovnání komplexních modulů 3% chitosanového hydrogelu s kyselinou citronovou u amplitudového testu při využití dvou různých molekulových hmotností chitosanu

Po určení hodnoty amplitudy deformace byl vliv změny molekulové hmotnosti chitosanu proměřen také frekvenčními testy (Obrázek 28). Stejně jako u amplitudového testu, u testů s proměnnou frekvencí oscilace můžeme pozorovat vyšší hodnoty komplexního modulu se zvyšující se molekulovou hmotností využitého chitosanu. S rostoucí frekvencí oscilace dochází také k nárůstu obou komplexních modulů, což svědčí o plně zesíťované struktuře takto připravených hydrogelů. Hydrogely jakožto viskoelastické materiály jsou schopné po určitou dobu plně odolávat oscilační deformaci při vyšších frekvencích tím, že se budou chovat více elasticky.



Obrázek 28: Porovnání komplexních modulu 3% chitosanového hydrogelu s kyselinou citronovou u frekvenčního testu při využití dvou různých molekulových hmotností chitosanu

Na základě amplitudových měření byl pro tyto vzorky vypočítán komplexní modul v porovnání s bodem toku, což znázorňuje Tabulka 3. Výsledné výpočty potvrzují lepší mechanické vlastnosti hydrogelu připraveného s chitosanem o střední molekulové hmotnosti, což dokazují vyšší hodnoty komplexních modulů. Podobné hodnoty meze toku naznačují schopnost odolávat mechanické deformaci po přibližně stejnou dobu.

Tabulka 3: Vypočítané hodnoty komplexních modulů a bodů překřížení pro hydrogely s proměnnou molekulovou hmotností biopolymeru

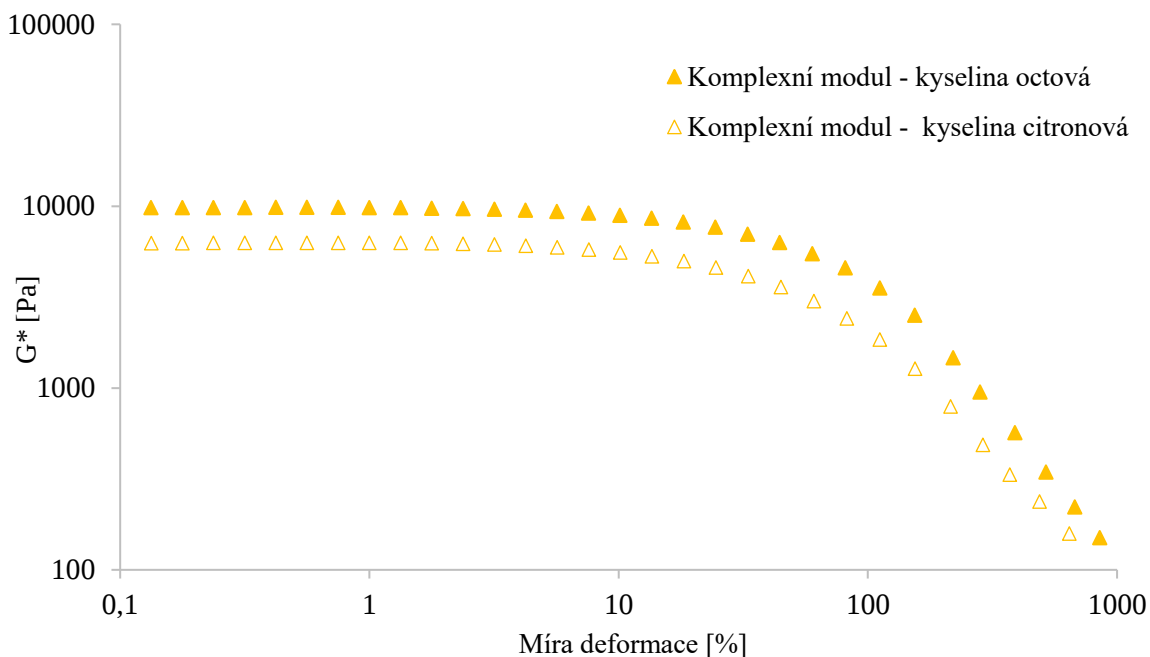
		Komplexní modul [Pa]	Bod překřížení [%]
nízká Mr (168 kDa)	Vrchní část	3785	306,8
	Střední část	1107	221,1
	Spodní část	990	223,3
střední Mr (208 kDa)	Vrchní část	6054	252,6
	Střední část	2144	241,1
	Spodní část	596	167,3

Pro shrnutí lze tedy říct, že vyšší molekulová hmotnost využitého chitosanu vede k vyšším hodnotám komplexních modulů, které značí lepší viskoelastické vlastnosti.

5.2.4 Vliv disperzního prostředí, ve kterém byl chitosan rozpuštěn

Při optimalizaci přípravy popisované v kapitole 4.3.2 byly využívány dvě organické kyseliny – kyselina octová a kyselina citronová. Jak naznačovalo vizuální hodnocení, hydrogely obsahující rozdílné typy kyselin vykazovaly jiné strukturní vlastnosti výsledného vzorku. Ať už to byla pevnost materiálu nebo

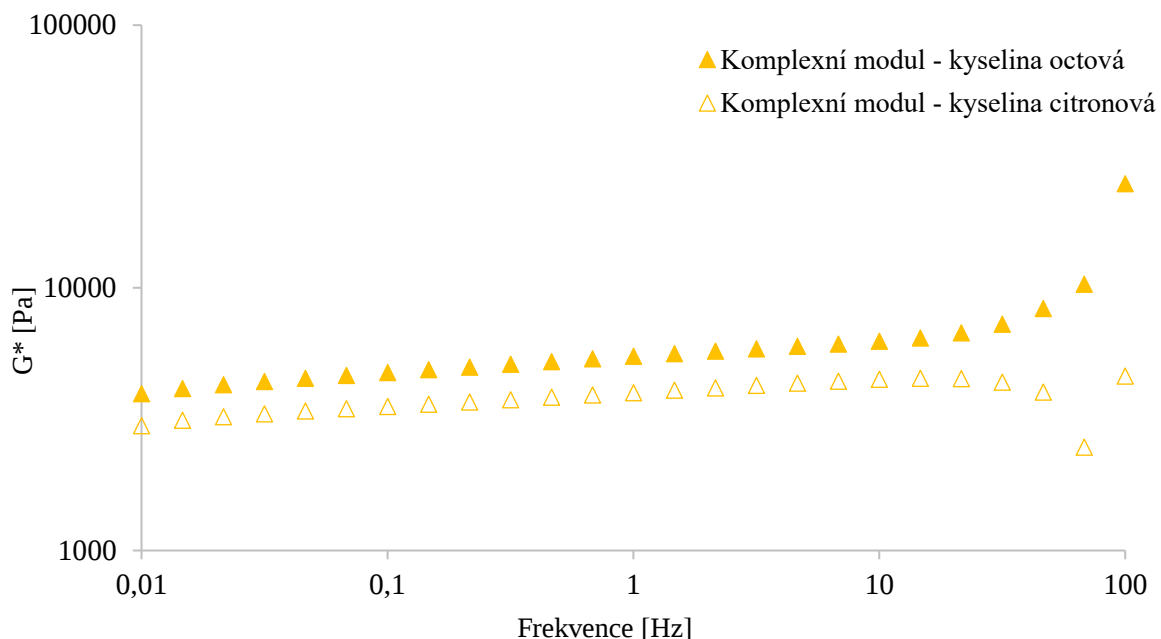
minimální doba potřebná pro síťování. Pro potvrzení předpokladů o rozdílných mechanických vlastnostech byly tyto vzorky také podrobeny amplitudovým a frekvenčním měřením.



Obrázek 29: Porovnání komplexních modulu 3% chitosanového hydrogelu síťovaného 3M NaOH u amplitudového testu při použití dvou typů organických kyselin

Jak je z grafické závislosti patrné (Obrázek 29), vyhodnocená data potvrzují výsledky vizuálního hodnocení hydrogelů. Použití kyseliny octové jako disperzního prostředí pro rozpuštění chitosanu vede k větší hustotě uzlů a rigidnější struktuře. Naopak je tomu u hydrogelů s kyselinou citronovou, které se vyznačují nižší stabilitou a pevností struktury.

Rozdíl v mechanické pevnosti hydrogelů značí také grafy závislosti komplexního modulu na frekvenci oscilace, u kterých pozorujeme vyšší hodnoty komplexního modulu při využití kyseliny octové při přípravě.



Obrázek 30: Porovnání komplexních modulu 3% chitosanového hydrogelu síťovaného 3M NaOH u frekvenčního testu při použití dvou typů organických kyselin

Vypočtená data komplexních modulů a mezí toku taktéž potvrzují vyšší rigiditu struktury hydrogelu s kyselinou octovou, a to jak vyššími hodnotami komplexních modulů, tak hodnotou, ve kterém převažuje viskózní složka nad elastickou a gel začíná téct.

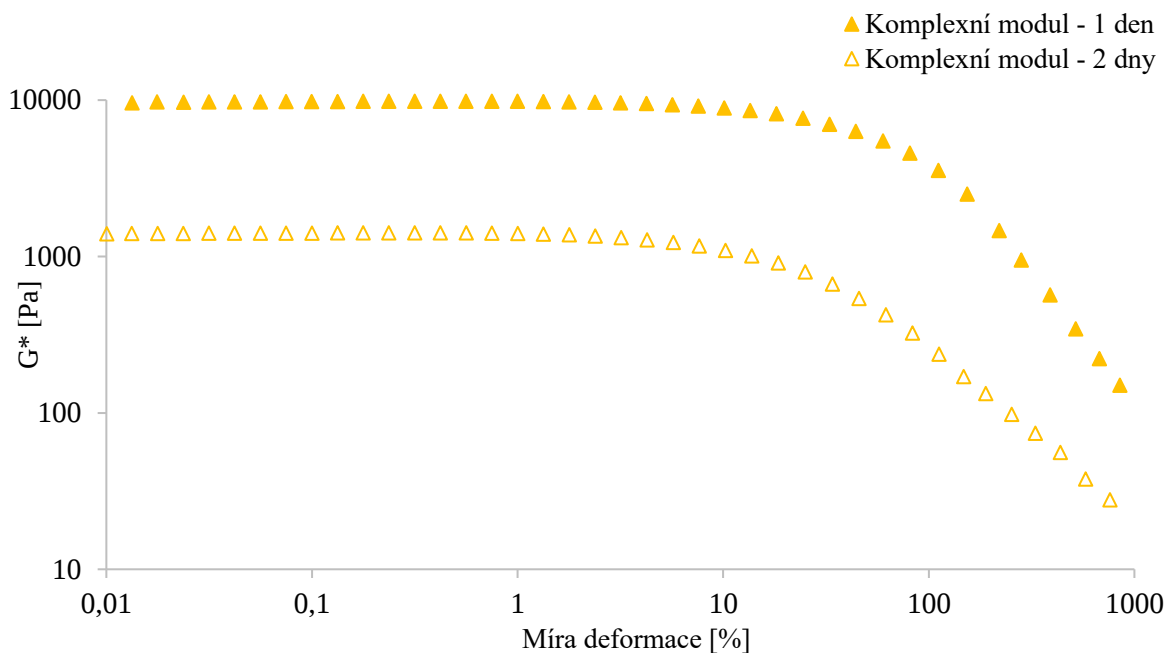
Tabulka 4: Vypočítané hodnoty komplexních modulů a bodů překřížení pro hydrogely s využitím různých kyselin při přípravě

		Komplexní modul [Pa]	Bod překřížení [%]
kyselina octová	Vrchní část	9507	336,1
	Střední část	3031	333,8
	Spodní část	1956	241,5
kyselina citronová	Vrchní část	6054	252,6
	Střední část	2144	241,1
	Spodní část	596	167,3

5.2.5 Vliv doby síťování

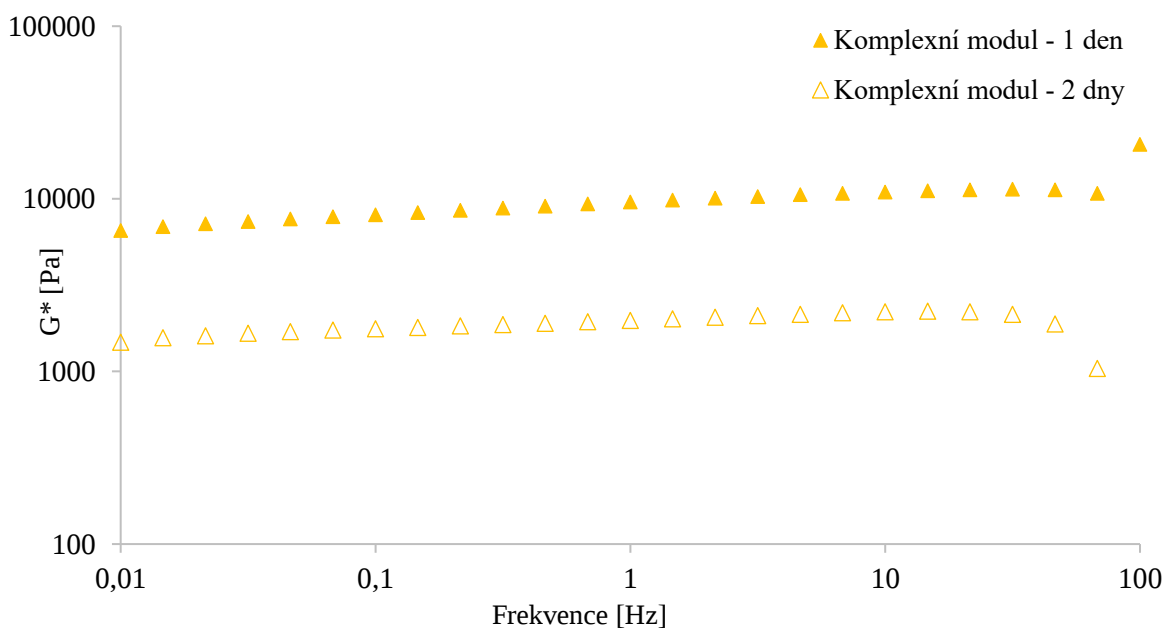
Při přípravě gradietových hydrogelů v experimentální části této bakalářské práce byly všechny vzorky síťovány po dobu 48 hodin. Pro zjištění vlivu tohoto parametru na výsledné viskoelastické vlastnosti hydrogelu byly v této kapitole diskutovány také rozdíly viskoelastických modulů u hydrogelu, který byl v kádince se síťovacím činidlem ponechán pouze jeden den. Stejně jako u předchozích vzorků byly mechanické vlastnosti hydrogelů posuzovány pomocí oscilačních testů. Výstupy z amplitudového testu (Obrázek 31) ukazují, že komplexní modul hydrogelu síťovaného 1 den výrazně převyšuje hodnoty komplexního modulu síťovaného 2 dny. Lze tedy tvrdit, že s nižší dobou síťování lze vytvořit pevnější a mechanicky odolnější hydrogel. Tento výsledek je možné vysvětlit degradací chitosanu z důvodu

vysokého pH síťovacího činidla, jelikož vybraný 3% chitosanový hydrogel byl síťován v 3M roztoku hydroxidu sodného, což odpovídá hodnotě pH 13.



Obrázek 31: Porovnání komplexních modulu 3% chitosanového hydrogelu s kyselinou citronovou u amplitudového testu při různé době síťování

Předpoklad, že po dvou dnech síťování ztrácí hydrogely svoji pevnost, potvrzuje také frekvenční test (Obrázek 32). Komplexní modul hydrogelu síťovaného pouze 1 den dosahuje vyšších hodnot a také dochází ke zvyšování modulu se zvyšující se frekvencí, což odpovídá lepší mechanické odolnosti převahou elastického chování.



Obrázek 32: Porovnání komplexních modulu 3% chitosanového hydrogelu s kyselinou citronovou u frekvenčního testu při různé době síťování

Stejně jako v předchozích kapitolách, k závěrečnému zhodnocení viskoelastických vlastností a potvrzení tvorby difúzního gradientu slouží Tabulka 5 s výpočty komplexních modulů a bodem překřížení. I přes velké rozdíly hodnot komplexních modulů pro oba hydrogely se jejich odezva na deformaci nemění a hodnoty bodů toku jsou blízké. Gel síťovaný dva dny má i přes méně pevnou strukturu, schopnost dlouho odolávat působícímu napětí.

Tabulka 5: Vypočítané hodnoty komplexních modulů a bodů překřížení pro hydrogely s proměnnou dobou síťování

		Komplexní modul [Pa]	Bod překřížení [%]
2 dny	Vrchní část	1651	236,5
	Střední část	1559	169,5
	Spodní část	1244	172,8
1 den	Vrchní část	9507	336,1
	Střední část	3031	333,8
	Spodní část	1956	241,5

Jak je z výše uvedených výsledků patrné, doba síťování má také významný vliv na výsledné vlastnosti hydrogelů. Obecně je z výsledků pozorován trend snižujících se viskoelastických modulů s delší dobou síťování.

5.3 Stanovení pevného podílu

V rámci experimentální části byla pro důkaz gradientové struktury a materiálovou analýzu vybrána také metoda stanovení pevného podílu, která sloužila ke stanovení obsahu sušiny jednotlivých částí připravených gelů. Připravené chitosanové gely byly skalpelem rozřezány na 3 části o velikosti 1,5 cm, umístěny na Petriho misky a vloženy do sušárny vytemperované na 105 °C. Změna hmotnosti byla zaznamenávána v intervalech 24 hodin po dobu nejméně 3 dní. Nastavenou teplotou bylo zajištěno odstranění maximálního množství disperzního prostředí a tím vzniku ireverzibilního xerogelu. Hlavní motivací této charakteristiky byl předpoklad, že při vzniku xerogelu bude u nejvíce zesíťované části hydrogelu (ta s nejintenzivnějším kontaktem síťovacího činidla) také nejvyšší hmotnost pevného podílu. Podíl pevné složky biopolymeru ve vzorku byl vyhodnocen pomocí poměru hmotnosti připraveného hydrogelu (m_0) a hmotnosti vysušeného xerogelu (m_i). Jednotlivé hmotnosti následně porovnány mezi sebou.

$$m = \frac{m_0}{m_i} \cdot 100 \% \quad (9)$$

Tabulka 6: Vypočítané hodnoty hm. % pevného podílu pro hydrogely síťované pomocí 1,5M NaOH

Pevný podíl	3% chitosan + kyselina citronová			3% chitosan + kyselina octová		
	Vrchní část	Střední část	Spodní část	Vrchní část	Střední část	Spodní část
Po 1 dni	56,21%	57,41%	65,93%	57,03%	43,19%	42,83%
Po 2 dnech	10,12%	10,72%	10,50%	9,78%	8,82%	9,41%
Po 3 dnech	10,00%	10,57%	10,39%	9,49%	8,69%	9,23%
Po 6 dnech	8,37%	8,73%	8,72%	8,36%	7,56%	8,07%

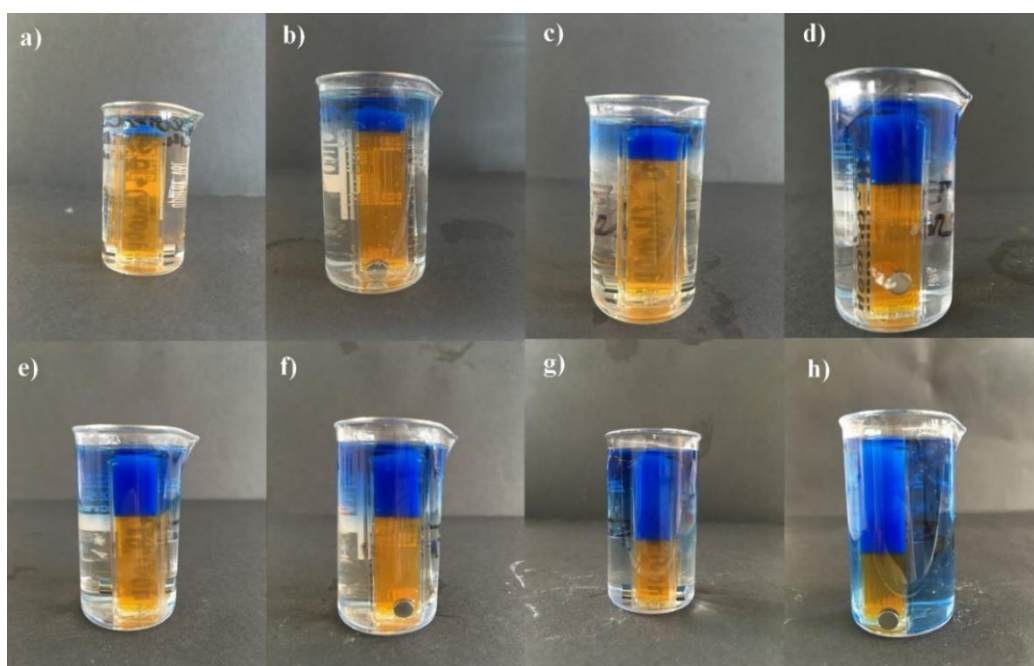
Tabulka 7: Vypočítané hodnoty hm. % pevného podílu pro hydrogely síťované pomocí 3M NaOH

Pevný podíl	3% chitosan + kyselina citronová			3% chitosan + kyselina octová		
	Vrchní část	Střední část	Spodní část	Vrchní část	Střední část	Spodní část
Po 1 dni	15,50%	16,27%	14,94%	12,98%	12,40%	11,11%
Po 2 dnech	15,32%	16,16%	14,68%	12,68%	12,09%	10,88%
Po 5 dnech	15,00%	16,03%	14,35%	12,36%	11,85%	10,70%

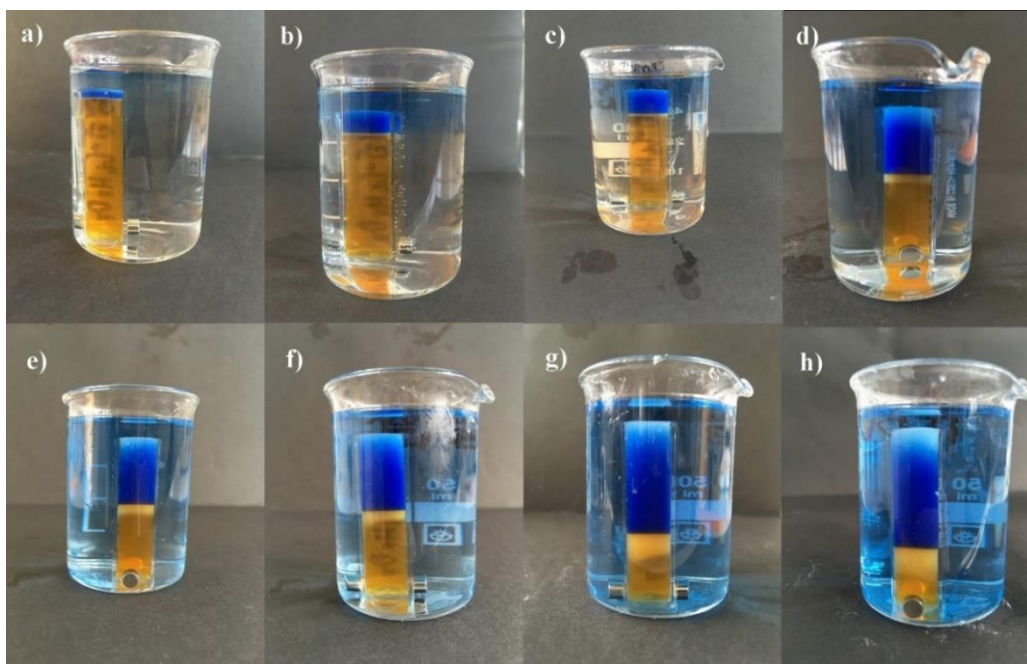
Hmotnostní procenta obsahu pevného podílu shrnují Tabulka 6 a Tabulka 7. Předpoklad nejvyššího zastoupení pevného podílu a jeho postupné klesání potvrzují sušící experimenty pro hydrogely s kyselinou octovou a síťované pomocí 3M hydroxidu sodného. Pro hydrogely síťované stejným síťovacím činidlem za použití kyseliny citronové dochází k poklesu pevného podílu vrchní části hydrogelu, nejvyšší hmotnostní procenta pevného podílu náleží střední části. Z vizuálního hodnocení transportních experimentů může být vysvětlením tohoto poklesu degradace chitosanu a gelové struktury horní části hydrogelu z důvodu vysokého pH síťovacího činidla. Odlišný trend výsledků znázorňuje Tabulka 7 shrnující hmotnost pevného podílu za využití méně koncentrovaného síťovacího činidla. U takto připravených hydrogelů mají všechny 3 části hydrogelu podobné hodnoty obsahu sušiny bez ohledu na využitou kyselinu při přípravě. Možnými důvody pro tyto skutečnosti může být delší doba síťování potřebná pro tyto hydrogely, která minimalizuje rozdíly počtu uzlů v jednotlivých částech hydrogelu. Další příčinou může být negativní vliv vysoké teploty na porušení některých slabých vazeb vytvořených s méně pevným hydrogelu. Gradientová struktura chitosanových hydrogelů by pravděpodobně mohla být lépe prokázána kinetikou sušení hydrogelových vzorků v prvních 24 hodinách. Předpokladem je fakt, že struktura s vyšší hustotou síťování by lépe držela disperzní prostředí a hmotnost sušeného hydrogelu by klesala pomaleji než u hydrogelu s nižší hustotou síťování.

5.4 Transportní experimenty

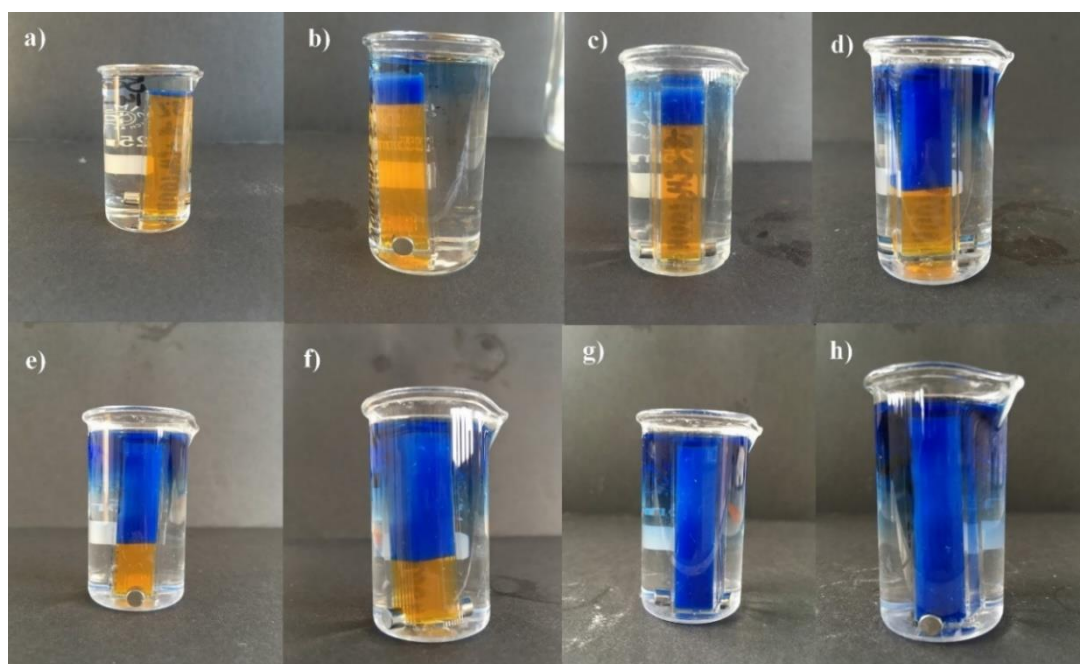
Druhou hlavní složkou experimentální části bakalářské práce bylo vizuální hodnocení prostupu barviva inkorporovaného do struktury solu již při přípravě. Konkrétně se jednalo o prostup bromothymolové modři do struktur hydrogelu již při procesu síťování. Protože bromothymolová modř je používána jako indikátor pH, prostup barviva bylo možné sledovat barevným přechodem z důvodu změny pH při samotném procesu gelace. Stejně jako u sušících experimentů, pro sledování byly připraveny vzorky 3% chitosanu s kyselinou octovou a citronovou a hydroxidem sodným coby síťovacím činidlem v koncentracích 1,5 M a 3 M. Konkrétní postup přípravy takových hydrogelů je detailně popsán v kapitole 4.5. Transport barviva byl sledován po dobu 2 dní a sledovaná kinetika transportu je znázorněna na přiložených fotografiích v časech: a) ihned po vložení, b) 2 hodiny, c) 4 hodiny, d) 22 hodin, e) 24 hodin, f) 26 hodin, g) 43 hodin, h) 48 hodin (Obrázek 33–Obrázek 36).



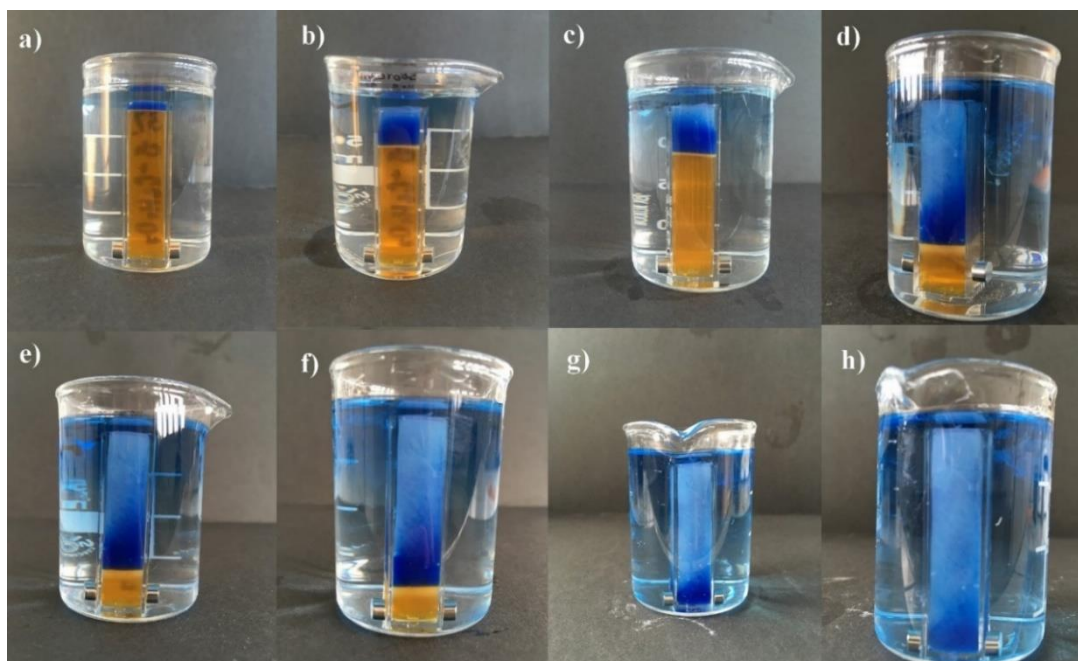
Obrázek 33: Transportní experimenty pro 3% chitosanový hydrogel s kyselinou octovou síťovaný pomocí 1,5M NaOH



Obrázek 34: Transportní experimenty pro 3% chitosanový hydrogel s kyselinou citronovou síťovaný pomocí 1,5M NaOH



Obrázek 35: Transportní experimenty pro 3% chitosanový hydrogel s kyselinou octovou síťovaný pomocí 3M NaOH



Obrázek 36: Transportní experimenty pro 3% chitosanový hydrogel s kyselinou citronovou síťovaný pomocí 3M NaOH

Z vizuálního hodnocení je patrný výrazný vliv koncentrace síťovacího činidla i typ disperzního prostředí, ve kterém byl chitosan rozpouštěn, na schopnost transportu barviva u jednotlivých hydrogelů. Z hodnocení fotografií jednotlivých vzorků v čase 24 hodin po vložení kyvet do síťovacího činidla vyplývá, že s vyšší koncentrací síťovacího činidla je prostup barviva gelem rychlejší. Rychlejší transport barviva umožňují také gely s chitosanem rozpouštěným v kyselině citronové oproti gelům obsahujícím kyselinu octovou. Tyto skutečnosti odpovídají předpokladům vycházejícím z oscilačních testů a vizuálního hodnocení při přípravě. Poddajná méně rigidní struktura hydrogelů s kyselinou citronovou odpovídala nižším hodnotám viskoelastických modulů, ale schopnosti rychlejší difuze na rozdíl od hydrogelů s kyselinou octovou, ty dosahovaly vyšších hodnot komplexních modulů, které způsobovaly pomalejší uvolňování barviva. Vysvětlením může být vyšší pevnost a hustota uzlů v trojrozměrné síti hydrogelů s kyselinou octovou, které brání rychlému postupu barviva. Zajímavým úkazem při transportních experimentech bylo vyblednutí barviva v horních částech gelu a částečné uvolňování barviva do síťovacího roztoku, což mohlo být způsobeno degradací chitosanu v horní části hydrogelu z důvodu intenzivního kontaktu s roztokem o vysokém pH, který štěpí dlouhé chitosanové řetězce a uvolňuje inkorporované barvivo. Závěry této kapitoly potvrzují korelaci transportních a viskoelastických vlastností gradientových hydrogelů.

6 ZÁVĚR

Hlavním cílem předložené bakalářské práce byla příprava hydrogelů s difúzním gradientem, potvrzení vzniku gradientu a následné vyhodnocení korelace viskoelastických a transportních vlastností. První fáze experimentální části byla zaměřena na optimalizaci přípravy gradientových hydrogelů. Jelikož jsou připravované hydrogely určené pro možné biomedicínské využití, byl pro přípravu využit fyzikálně síťovaný hydrogel na bázi polykationtu chitosanu (nabitý polysacharid), pro jehož přípravu není vyžadována přítomnost síťovacího činidla, které může být pro případné využití z důvodu toxicity problematické. Požadavkům biokompatibility a biodegradability odpovídal také chitosan jako hlavní složka hydrogelu. Druhým dílčím krokem práce byla charakterizace připravených vzorků pomocí oscilačních testů, stanovení sušiny a realizace transportních experimentů.

Pro potvrzení gradientové struktury připravených hydrogelů byla vybrána metoda oscilačních měření. Hydrogely rozdělené na 3 části – horní s nejvyšší hustotou zesítění až spodní část s hustotou zesítění nejmenší. Předpoklad snižování mechanické pevnosti (vyjádřené pomocí viskoelastických modulů) s menším zesítěním byly reometricky potvrzen pokles viskoelastických modulů – především elastického.

Následně byly amplitudové a frekvenční testy využity také pro sledování rozdílů mechanických vlastností při změně vybraných parametrů (koncentrace a molekulová hmotnost chitosanu, koncentrace síťovacího činidla, typ kyseliny, doba síťování), které mohou zásadně ovlivňovat finální aplikační vlastnosti, ať už mechanické nebo transportní. Zvýšení koncentrace chitosanu i síťovacího činidla měla za následek zvýšení kompaktnosti a pevnosti hydrogelů, což potvrdily také vyšší hodnoty viskoelastických modulů oproti méně koncentrovaným vzorkům. Rozdílné chování hydrogelů bylo pozorováno také při změně molekulové hmotnosti chitosanu, kdy hydrogely se střední molekulovou hmotností (208 kDa) odpovídaly vyšším hodnotám paměťových a ztrátových modulů. Značný rozdíl viskoelastických modulů vykazovaly i gely s obsahem různých typů kyselin, které byly použity jako disperzní prostředí při rozpouštění chitosanu. Vzorky obsahující kyselinu octovou dosahovaly vyšších hodnot viskoelastických modulů, což odpovídalo delší době síťování a pevnější struktuře již při vizuálním hodnocení. Snižování viskoelastických modulů bylo možné sledovat u hydrogelů s delší dobou síťování, to může být stejně jako u sušících experimentů vysvětleno degradací řetězců chitosanu při dlouhém působení síťovacího činidla o vysoké koncentraci.

Schopnost transportovat aktivní látku byla sledována pomocí začlenění barviva do struktury kyselého solu chitosanu rozpouštěného v příslušném disperzním prostředí před procesem síťování. U transportních experimentů docházelo k potvrzení výsledků reologických měření. Se zvyšující se koncentrací síťovacího činidla docházelo k rychlejšímu síťování a tím i k rychlejšímu transportu barviva ve struktuře. Vliv na transportní vlastnosti měl také výběr organické kyseliny. U gelů s kyselinou citronovou docházelo k rychlejšímu síťování a snadnějšímu transportu, zatímco při využití kyseliny octové byl transport barviva značně pomalejší. Toto chování potvrzuje negativní korelaci mezi

mechanickými vlastnostmi, dobou síťování a transportními vlastnostmi. Rychlejší doba síťování a lepší transportní vlastnosti souvisí se zhoršením mechanických vlastností a poklesem viskoelastických modulů.

Bakalářská práce nabídla další pohled na problematiku gradientových hydrogelů a charakterizace jejich vlastností při změně vybraných parametrů. Metoda difúze, jako způsob přípravy gradientových hydrogelů, se osvědčila jako jednoduše využitelná pro vytvoření gradientu. Nevýhodou této metody však může být omezená schopnost ovlivňovat vytvoření udržitelného gradientu, jelikož dochází k jeho degradaci vlivem vysokého pH. U případných budoucích studií problematiky gradientových hydrogelů se jeví jako vhodné pokračovat ve studiu přípravy a charakterizace struktur gradientových hydrogelů. Další studium by mohlo být zaměřeno na bližší sledování kinetiky gelování a její vliv na výsledný gradient. Vnitřní struktura gelů tohoto typu a rozdíly v hustotě síťování jednotlivých částí by mohla být pozorována například pomocí mikroskopie atomárních sil. Pro porovnání vykazovaných chování a jejich struktur se nabízí také možnost přípravy gradientových hydrogelů při využití opačně nabitých polysacharidů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ULLAH, Faheem, Muhammad OTHMAN, Fatima JAVED, Zulkifli AHMAD a Hazizan AKIL. Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C*. 2015, **57**, 414-433. ISSN 09284931.
- [2] LI, Hua. Introduction. *Smart Hydrogel Modelling*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009, 1-55. ISBN 978-3-642-02367-5.
- [3] PEPPAS, Nikolaos, Atul KHARE, Héloïse MARY et al. Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1993, **11**(1-2), 1-35. ISSN 0169409X.
- [4] CHAI, Qinyuan, Yang JIAO a Xinjun YU. Hydrogels for Biomedical Applications: Their Characteristics and the Mechanisms behind Them. *Gels*. 2017, **3**(1).
- [5] GIBAS, Iwona a Helena JANIK. Review: Synthetic Polymer Hydrogels for Biomedical Applications. 2010, **4**(4), 297-304. ISSN 19964196.
- [6] AHMED, Enas, Marc TARABAN a Y. YU. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. *Journal of Advanced Research*. 2015, **6**(2), 105-121. ISSN 20901232.
- [7] BHATTARAI, Narayan, Jonathan GUNN a Miqin ZHANG. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010, **62**(1), 83-99. ISSN 0169409X.
- [8] ROSIAK, Janusz a Fumio YOSHII. Hydrogels and their medical applications: Synthetic Polymer Hydrogels for Biomedical Applications. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. 1999, **151**(1-4), 56-64. ISSN 0168583X.
- [9] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-7080-579-X.
- [10] HOFFMAN, Allan S. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012, **64**, 18-23. ISSN 0169409X.
- [11] MAHINROOSTA, Yue, Marc TARABAN, Y. YU a Zahra SHAKOORI. The effect of ionic strength on the mechanical, structural and transport properties of peptide hydrogels: A brief review of synthesis, properties and applications. *Soft Matter*. 2012, **8**(46), 42-55. ISSN 1744-683X.
- [12] FENG, Yue, Marc TARABAN a Y. YU. The effect of ionic strength on the mechanical, structural and transport properties of peptide hydrogels. *Soft Matter*. 2012, **8**(46). ISSN 1744-683X.

- [13] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 10.1016/j.carbpol.2005.02.014.
- [14] EL-REHIM, H., El-Sayed HEGAZY a H. EL-MOHDY. Radiation synthesis of hydrogels to enhance sandy soils water retention and increase plant performance. *Journal of Applied Polymer Science*. 2004, **93**(3), 1360-1371. ISSN 0021-8995.
- [15] MONTESANO, Francesco, Angelo PARENTE, Pietro SANTAMARIA, Alessandro SANNINO a Francesco SERIO. Biodegradable Superabsorbent Hydrogel Increases Water Retention Properties of Growing Media and Plant Growth. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 2015, **4**, 451-458. ISSN 22107843.
- [16] KIM, Cherng-Ju a Ping LEE. Composite Poly(vinyl alcohol) Beads for Controlled Drug Delivery. *Pharmaceutical Research*. **09**(1), 10-16. ISSN 07248741.
- [17] MURAKAMI, Yoshihiko a Mizuo MAEDA. DNA-Responsive Hydrogels That Can Shrink or Swell. *Biomacromolecules*. 2005, **6**(6), 2927-2929. ISSN 1525-7797.
- [18] SAWHNEY, Amarpreet, Chandrashekhar PATHAK, Jillian VAN RENSBURG, Randall DUNN a Jeffrey HUBBELL. Optimization of photopolymerized bioerodible hydrogel properties for adhesion prevention. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1994, **28**(7), 831-838. ISSN 0021-9304.
- [19] ISHIIHARA, Kazuhiko, Mineko KOBAYASHI a Naoshi ISHIMARU. Glucose Induced Permeation Control of Insulin through a Complex Membrane Consisting of Immobilized Glucose Oxidase and a Poly(amine). *Polymer Journal*. 1984, **16**(8), 625-631. ISSN 0032-3896.
- [20] PATEL, Alpesh a Kibret MEQUANINT. Hydrogel Biomaterials. *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges*. InTech, 2011. ISBN 978-953-307-309-5.
- [21] KARPIAK, Jerome, Yogesh NER a Adah ALMUTAIRI. Density Gradient Multilayer Polymerization for Creating Complex Tissue. *Advanced Materials*. 2012, **24**(11), 1466-1470. ISSN 09359648.
- [22] DELONG, Solitaire, James MOON a Jennifer WEST. Covalently immobilized gradients of bFGF on hydrogel scaffolds for directed cell migration. *Biomaterials*. 2005, **26**(16), 3227-3234. ISSN 01429612.
- [23] OSTROVIDOV, Serge, Nasim ANNABI, Azadeh SEIDI, Murugan RAMALINGAM, Fariba DEHGHANI, Hirokazu KAJI a Ali KHADEMHOSEINI. Controlled Release of Drugs from Gradient Hydrogels for High-Throughput Analysis of Cell-Drug Interactions. *Analytical Chemistry*. 2012, **84**(3), 1302-1309. ISSN 0003-2700.
- [24] GORGIEVA, Selestina a Vanja KOKOL. Processing of gelatin-based cryogels with improved thermomechanical resistance, pore size gradient, and high potential for sustainable protein drug

- release. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2015, **103**(3), 1119-1130. ISSN 15493296.
- [25] LIU, Peiwen, Carsten MAI a Kai ZHANG. Preparation of hydrogels with uniform and gradient chemical structures using dialdehyde cellulose and diamine by aerating ammonia gas. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*. 2018, **12**(3), 383-389. ISSN 2095-0179.
- [26] ZHU, Danqing, Xinming TONG, Pavin TRINH a Fan YANG. Mimicking Cartilage Tissue Zonal Organization by Engineering Tissue-Scale Gradient Hydrogels as 3D Cell Niche. *Tissue Engineering Part A*. 2018, **24**(1-2), 1-10. ISSN 1937-3341.
- [27] GADJANSKI, Ivana. Recent advances on gradient hydrogels in biomimetic cartilage tissue engineering. *F1000Research*. 2017, **6**. ISSN 2046-1402.
- [28] GENZER, Jan a Rajendra BHAT. Surface-Bound Soft Matter Gradients. *Langmuir*. 2008, **24**(6), 2294-2317. ISSN 0743-7463.
- [29] AZIZ, Aaron, Joseph WAHLQUIST, Aaron SOLLNER, Virginia FERGUSON, Frank DELRIO a Stephanie BRYANT. Mechanical characterization of sequentially layered photo-clickable thiol-ene hydrogels. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2017, **65**, 454-465. ISSN 17516161.
- [30] ZINKOVSKA, Natalia, Jiri SMILEK a Miloslav PEKAR. Gradient Hydrogels—The State of the Art in Preparation Methods. *Polymers*. 2020, **12**(4). ISSN 2073-4360.
- [31] JO, Heejung, Minhyuk YOON, Mani GAJENDIRAN a Kyobum KIM. Recent Strategies in Fabrication of Gradient Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Macromolecular Bioscience*. 2020, **20**(3). ISSN 1616-5187.
- [32] EROL, Ozan, Aishwarya PANTULA, Wangqu LIU a David GRACIAS. Transformer Hydrogels: A Review. *Advanced Materials Technologies*. 2019, **4**(4). ISSN 2365-709X.
- [33] RADHAKRISHNAN, Janani, Amrutha MANIGANDAN, Prabu CHINNASWAMY, Anuradha SUBRAMANIAN a Swaminathan SETHURAMAN. Gradient nano-engineered in situ forming composite hydrogel for osteochondral regeneration. *Biomaterials*. 2018, **162**, 82-98. ISSN 01429612.
- [34] PIRAINO, Francesco, Gulden CAMCI-UNAL, Matthew HANCOCK, Marco RASPONI a Ali KHADEMHOSEINI. Multi-gradient hydrogels produced layer by layer with capillary flow and crosslinking in open microchannels. *Lab Chip*. 2012, **12**(3), 659-661. ISSN 01429612.
- [35] MOTEALLEH, Andisheh, Alicia SCHULTEN a Nermin KEHR. 3D printed step-gradient composite hydrogels for directed migration and osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Nano Select*. 2022, **3**(2), 411-424. ISSN 2688-4011.

- [36] LI, Chunching, Liliang OUYANG, Isaac PENCE, Axel MOORE, Yiyang LIN, Charles WINTER, James ARMSTRONG a Molly STEVENS. Buoyancy-Driven Gradients for Biomaterial Fabrication and Tissue Engineering. *Advanced Materials*. 2019, **31**(17). ISSN 0935-9648.
- [37] YUAN, F., M. MA, L. LU et al. Preparation and properties of polyvinyl alcohol (PVA) and hydroxylapatite (HA) hydrogels for cartilage tissue engineering. *Cellular and Molecular Biology*. 2017, **63**(5), 32-35. ISSN 1165-158X.
- [38] OFFEDDU, G., I. MELA, P. JEGGLE, R. HENDERSON, S. SMOUKOV a M. OYEN. Cartilage-like electrostatic stiffening of responsive cryogel scaffolds. *Scientific Reports*. 2017, **7**(1), 454-465. ISSN 2045-2322.
- [39] XIA, Tingting, Wanqian LIU a Li YANG. A review of gradient stiffness hydrogels used in tissue engineering and regenerative medicine. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2017, **105**(6), 1799-1812. ISSN 15493296.
- [40] KIM, Sungjun, Junhyung KIM, Mani GAJENDIRAN, Minhyuk YOON, Mintai HWANG, Yadong WANG, Byung-Jae KANG a Kyobum KIM. Enhanced Skull Bone Regeneration by Sustained Release of BMP-2 in Interpenetrating Composite Hydrogels. *Biomacromolecules*. 2018, **19**(11), 4239-4249. ISSN 1525-7797.
- [41] RIBEIRO, Maximiano, Ana ESPIGA, Daniela SILVA et al. Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. *Wound Repair and Regeneration*. 2009, **17**(6), 817-824. ISSN 10671927.
- [42] VAVTÍKOVÁ, Eva a Jarmila VINŠOVÁ. Chitosan and Its Pharmaceutical Applications. *Chemické listy*. 2009, **103**(1).
- [43] SAHARIAH, Priyanka a Már MÁSSON. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure–Activity Relationship. *Biomacromolecules*. 2017, **18**(11), 3846-3868. ISSN 1525-7797.
- [44] PEERS, S., A. MONTEBAULT, C. LADAVIÈRE et al. Chitosan hydrogels for sustained drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2020, **326**(6), 150-163. ISSN 01683659.
- [45] AZEVEDO, Eduardo Pereira. Chitosan hydrogels for drug delivery and tissue engineering applications. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2015, **7**(12), 8-14. ISSN 0975-1491.
- [46] RAVI KUMAR, Majeti N.V. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*. 2000, **46**(1), 1-27. ISSN 13815148.
- [47] BELLICH, Barbara, Ilenia D'AGOSTINO, Sabrina SEMERARO, Amelia GAMINI, Attilio CESÀRO, A. BIGI a A. MAGNANI. “The Good, the Bad and the Ugly” of Chitosans. *Marine Drugs*. 2016, **14**(5), 1-27. ISSN 1660-3397.

- [48] TOKURA, Seiichi, Keisuke UENO, Satoshi MIYAZAKI. Molecular Weight Dependent Antimicrobial Activity by Chitosan. *New Macromolecular Architecture and Functions*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1996, 199-207. ISBN 978-3-642-80291-1.
- [49] KVÍTEK, Libor a Aleš PANÁČEK. *Základy koloidní chemie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. ISBN 978-80-2441-669-4.
- [50] MASARO, L a X.X ZHU. Physical models of diffusion for polymer solutions, gels and solids. *Progress in Polymer Science*. 1999, **24**(5), 731-775. ISSN 00796700.
- [51] HOLUBOVÁ, Renata. *Základy reologie a reometrie kapalin*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-4178-8.
- [52] JOHNSON, Richard W. *Handbook of Fluid Dynamics (2nd ed.)*. 2016. Springer Berlin, Heidelberg, 2016. ISBN 9783540646129.
- [53] *A Basic Introduction to Rheology*. Worcestershire, UK, 2016 Dostupné z: <https://cdn.technologynetworks.com/TN/Resources/PDF/WP160620BasicIntroRheology.pdf>
- [54] MEZGER, Thomas G. *The Rheology Handbook*. 4. Hanover, Germany: Vincentz Network, 2014. ISBN 978-3-86630-650-9.
- [55] MEZGER, Thomas G. *Applied rheology: with Joe Flow on rheology road*. 5. Graz, Austria: Anton Paar, 2014. ISBN 9783950401608.
- [56] XU, Yongxiang, Shenpo YUAN, Jianmin HAN, Hong LIN a Xuehui ZHANG. Design and fabrication of a chitosan hydrogel with gradient structures via a step-by-step cross-linking process. *Carbohydrate Polymers*. 2017, **176**, 195-202. ISSN 01448617.
- [57] XU, Yongxiang, Jianmin HAN a Hong LIN. Fabrication of a Multilayered Gradient Self-Crosslinking Chitosan Hydrogel by a Controlled Freeze-Melting-Neutralization Method. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*. 2016, **6**(3), 232-238. ISSN 21579083.
- [58] LAVRENTIEVA, Antonina, Tabea FLEISCHHAMMER, Anton ENDERS, Hamidreza PIRMAHBOUB, Janina BAHNEMANN a Iliyana PEPELANOVA. Fabrication of Stiffness Gradients of GelMA Hydrogels Using a 3D Printed Micromixer. *Macromolecular Bioscience*. 2020, **20**(7). ISSN 1616-5187.
- [59] FUENTES-CAPARRÓS, Ana, Zaloa CANALES-GALARZA, Michael BARROW, Bart DIETRICH, Jörg LÄUGER, Markus NEMETH, Emily DRAPER a Dave ADAMS. Mechanical Characterization of Multilayered Hydrogels: A Rheological Study for 3D-Printed Systems. *Biomacromolecules*. 2021, **22**(4), 1625-1638. ISSN 1525-7797.
- [60] LEONE, G., M. VOLPATO, N. NELLI, S. LAMPONI, E. BOANINI, A. BIGI a A. MAGNANI. Continuous multilayered composite hydrogel as osteochondral substitute. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2015, **103**(8), 2521-2530. ISSN 15493296.

- [61] LEI, Wenwei, Shuanhu QI, Qinfeng RONG et al. Diffusion–Freezing-Induced Microphase Separation for Constructing Large-Area Multiscale Structures on Hydrogel Surfaces. *Advanced Materials*. 2019. ISSN 0935-9648.