

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2019

Andrei Alkhov

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Ústav chemie a technologie makromolekulárních látek

Oddělení syntetických polymerů, vláken a textilní chemie

Příprava nanovláknenných materiálů z chemicky modifikované kyseliny
hyaluronové s vázanými antioxidačními látkami

Andrei Alkhov

Diplomová práce

2019

University of Pardubice

Faculty of chemical technology

Institute of chemistry and technology of macromolecular materials

Department of synthetic polymers, fibers and textile chemistry

Nanofibrous materials prepared from chemically modified hyaluronic acid with
bound antioxidants

Andrei Alkhou

Diploma thesis

2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Andrei Alkhov**
Osobní číslo: **C17533**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Technologie výroby a zpracování polymerů**
Název tématu: **Příprava nanovláknenných materiálů z chemicky modifikované kyseliny hyaluronové s vázanými antioxidačními látkami**
Zadávací katedra: **Ústav chemie a technologie makromolekulárních látek**

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

1. Vypracujte literární rešerši na téma přírodní polymery se zaměřením na kyselinu hyaluronovou, její deriváty a popište možnosti její modifikace.
2. V teoretické části se také zaměřte na problematiku nanomateriálů s popisem jejich výhod a základními metodami jejich charakterizace. Následně popište základní principy elektrostatického zvlákňování.
3. Připravte nanovláknenné vrstvy složených z přírodního polymeru - chemicky modifikované kyseliny hyaluronové jako nosiče antioxidačních látek pomocí metody zvlákňování ve vysokém elektrostatickém poli "Electrospinning".
4. Nově vytvořené materiály charakterizujte pomocí vybraných analytických metod. Studujte optimální složení vlákního roztoku a najděte optimální procesní podmínky pro zvlákňování.
5. Srovnajte a diskutujte zjištěné vlastnosti u testovaných vzorků. Zhodnoťte vliv složení a procesních parametrů na vlastnosti nově připravených nanostrukturovaných vrstev s potenciálním využitím v kosmetických nebo farmaceutických aplikacích.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Luboš Prokúpek, Dr.

Ústav chemie a technologie makromolekulárních látek

Konzultant diplomové práce:


Ing. Marek Pokorný, Dr.

Ostatní konzultanti:


Mgr. Jan Klemeš

Datum zadání diplomové práce: **21. prosince 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**


prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.


Ing. David Veselý, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlášení autora

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 7. 5. 2019

Andrei Alkhov

Poděkování

Děkuji vedoucímu diplomové práce Ing. Luboši Prokūpku, Dr. za velmi užitečnou pomoc a také cenné rady. Dále bych rád poděkoval Ing. Marku Pokornému, Dr. a Mgr. Janu Klemešovi za pomoc a rady s touto prací spojené. Velké poděkování, patří také firmě Contipro, a.s. za možnost vypracování experimentální části v jejich prostorách. Taky bych rád poděkoval mé rodině a blízkým přátelům za podporu během studia na Univerzitě.

Anotace:

Tato práce se zabývá přípravou nanovláknenných materiálů z chemicky modifikované kyseliny hyaluronové s vázanými antioxidantními látkami. V teoretické části je popsána kyselina hyaluronová, antioxidanty, nanomateriály a možnosti jejich charakterizace. Praktická část je zaměřena na přípravu nanovláken z derivátů kyseliny hyaluronové a na metody používané k jejich charakterizaci pomocí vybraných analytických a biologických metod.

Klíčová slova:

Kyselina hyaluronová, antioxidanty, nanovláknena, elektrostatické zvlákňování, skenovací elektronová mikroskopie

Annotation:

This thesis is focuses on the preparation of nanofiber materials from chemically modified hyaluronic acid with bound antioxidants. The theoretical part describes hyaluronic acid, antioxidants, nanomaterials and possibilities of their characterization. The practical part is focuses on preparation of nanofibers with hyaluronic acid derivatives and methods used for their characterization by selected analytical and biological methods.

Key worlds:

Hyaluronic acid, antioxidants, nanofibers, electrostatic spinning, scanning electron microscopy

Obsah

Obsah	9
Seznam obrázků, tabulek a grafů	12
Seznam použitých zkratek	16
1. Úvod.....	17
2. Teoretická část	18
2.1 Přírodní polymery	18
2.1.1 Polysacharidy	18
2.1.1.1 Celulóza	19
2.1.1.2 Škrob.....	21
2.1.2 Bílkoviny	22
2.2 Kyselina hyaluronová.....	22
2.2.1 Historie	22
2.2.2 Chemická struktura.....	22
2.2.3 Modifikace.....	23
2.2.4 Deriváty HA	24
2.2.5 Vlastnosti	24
2.2.6 Výroba	25
2.2.7 Využití v medicíně	25
2.2.7.1 Antiadhezní aplikace.....	26
2.2.7.2 Dermatologie a aplikace hojení ran	26
2.2.7.3 Kardiovaskulární aplikace	26
2.2.7.4 Oftalmologie	26
2.3 Antioxidanty.....	27
2.3.1 Kyselina α -lipoová	28
2.3.2 Tokoferol	28
2.3.2.1 Aplikace	30
2.3.3 Vitamin A	30
2.3.4 Vitamin C	31
2.3.5 Vitamin B2	32
2.3.6 Vitamin B5	32
2.4 Nanomateriály	33
2.4.1 Historie	33

2.4.2 Klasifikace nanomateriálů	33
2.4.2.1 Nanovláknenné materiály	35
2.4.3 Využití nanomateriálů	35
2.5 Příprava roztoků pro vláknění	36
2.6 Určení roztokových parametrů	36
2.6.1 Měření viskozity	36
2.6.2 Měření vodivosti roztoků	37
2.6.3 Měření povrchového napětí pomocí metody Wilhelmyho destičky.....	38
2.7 Zvlákňování.....	39
2.7.1 Historie	39
2.7.2 Princip metody.....	40
2.7.3 Přístroj 4SPIN®	40
2.7.4 Využití	42
2.8 Charakterizace nanovláknenných materiálů	42
2.8.1 Skenovací (rastrovací) elektronový mikroskop (SEM)	42
2.8.2 Ramanova spektroskopie.....	43
2.8.3 Obrazová analýza	45
2.8.4 Měření cytotoxicity a buněčné aktivity	46
3. Experimentální část.....	47
3.1 Použité chemikálie.....	47
3.2 Příprava roztoků	48
3.3 Zvlákňování	50
3.4 Určení roztokových parametrů	51
3.4.1 Měření povrchového napětí	51
3.4.2 Měření vodivosti roztoků.....	52
3.4.3 Měření viskozity	53
3.5 Hodnocení nanovláknenných materiálů	54
3.5.1 SEM a obrazová analýza.....	54
3.5.2 Ramanova spektroskopie	55
3.6 Měření cytotoxicity a buněčné aktivity	55
4. Výsledky a diskuze	56
4.1 Charakterizace morfologie nanovláknenných vrstev	56
4.1.1 SEM	56
4.1.1.1 Nanovláknna s obsahem nativní kyseliny hyaluronové.....	56
4.1.1.2 Nanovláknna s obsahem derivátu HA-Lipoic.....	58

4.1.1.3 Nanovláknna s obsahem derivátu HA-Toco	70
4.1.2 Obrazová analýza.....	73
4.1.3 Ramanova spektroskopie	75
4.2 Charakterizace vybraných roztoků pro zvlákňování	77
4.2.1 Vodivost roztoků.....	77
4.2.2 Povrchové napětí roztoků	79
4.2.3 Viskozita roztoků.....	80
4.3 Měření cytotoxicity a buněčné aktivity	83
5. Závěr	84
6. Seznam použité literatury	86

Seznam obrázků, tabulek a grafů

Seznam obrázků

Obrázek 1: Biomedicínské aplikace polysacharidů.....	19
Obrázek 2: Struktura celulózy.....	19
Obrázek 3: Viskózní vlákno.....	20
Obrázek 4: Struktura škrobu.....	21
Obrázek 5: Chemická struktura kyseliny hyaluronové.....	23
Obrázek 6: Primární místa vhodná pro chemickou modifikaci HA.....	23
Obrázek 7: Deriváty HA.....	24
Obrázek 8: Elektronová mikroskopie Streptokoku.....	25
Obrázek 9: Struktura kyseliny α -lipoové.....	28
Obrázek 10: Struktury α , β , γ a δ tokoferolu.....	29
Obrázek 11: Struktura tokoferol sukcinátu.....	29
Obrázek 12: Struktura vitamínu A.....	31
Obrázek 13: Struktura vitamínu C.....	31
Obrázek 14: Struktura vitamínu B2.....	32
Obrázek 15: Struktura vitamínu B5.....	33
Obrázek 16: Klasifikace nanomateriálů podle Ziegela.....	34
Obrázek 17: Nanobot.....	36
Obrázek 18: Rotační viskozimetr kužel-deska.....	37
Obrázek 19: Konduktometr.....	38
Obrázek 20: Princip metody odtahování desky (A) a statické metody (B).....	38
Obrázek 21: Princip výroby nekonečných vláken za pomoci elektrického pole.....	39

Obrázek 22: Princip metody elektrostatického zvlákňování.....	40
Obrázek 23: Přístroj 4SPIN®.....	41
Obrázek 24: E1 - E4 emitory.....	41
Obrázek 25: C1 - C4 kolektory.....	42
Obrázek 26: Schéma skenovacího elektronového mikroskopu.....	43
Obrázek 27: Schéma Ramanova mikroskopu.....	44
Obrázek 28: Spektrum Ramanova rozptylu.....	45
Obrázek 29: Struktura HA-Toco.....	47
Obrázek 30: Struktura HA-Lipoic.....	48
Obrázek 31: Připravené roztoky č. 2 – 7.....	50
Obrázek 32: Zvlákňování v zařízení 4SPIN®.....	50
Obrázek 33: Přístroj Tensiometer K9.....	52
Obrázek 34: Přístroj inoLab WTW se sondou TetraCon 325.....	53
Obrázek 35: Rotační reometr AR-G2.....	54
Obrázek 36: Snímky nanovlákněné struktury ze SEM nativní kyseliny hyaluronové (vzorek č. 1), (I – nízká vlhkost).....	57
Obrázek 37: Snímky nanovlákněné struktury ze SEM při různém poměru rozpouštědel ethanol/voda (vzorky č. 2, 3 a 4), (I – nízká vlhkost).....	58
Obrázek 38: Snímky nanovlákněné struktury ze SEM při různém poměru rozpouštědel IPA/voda (vzorky č. 5 a 6), (I – nízká vlhkost).....	59
Obrázek 39: Snímky nanovlákněné struktury ze SEM při různém poměru rozpouštědel ethanol/voda (vzorky č. 2, 3 a 4), (II – střední vlhkost).....	60
Obrázek 40: Snímky nanovlákněné struktury ze SEM při různém poměru rozpouštědel IPA/voda (vzorky č. 5 a 6), (II – střední vlhkost).....	61
Obrázek 41: Snímky nanovlákněné struktury ze SEM při různých koncentracích roztoků (vzorky č. 8, 9 a 10), (I – nízká vlhkost).....	63

Obrázek 42: Snímky nanovláknenné struktury ze SEM při různých koncentracích roztoků (vzorky č. 8, 9 a 10), (II – střední vlhkost).....	64
Obrázek 43: Snímky nanovláknenné struktury ze SEM při různých poměrech polymerů HA-Lipoic/PEO (vzorky č. 12 a 13), (I – nízká vlhkost).....	66
Obrázek 44: Snímky nanovláknenné struktury ze SEM při různých poměrech polymerů HA-Lipoic/PEO (vzorky č. 14 a 15), (I – nízká vlhkost).....	67
Obrázek 45: Snímky nanovláknenné struktury ze SEM při různých poměrech polymerů HA-Lipoic/PEO (vzorky č. 12 a 13), (II – střední vlhkost).....	68
Obrázek 46: Snímky nanovláknenné struktury ze SEM při různých poměrech polymerů HA-Lipoic/PEO (vzorky č. 14 a 15), (II – střední vlhkost).....	69
Obrázek 47: Snímky nanovláknenné struktury ze SEM HA-Toco (vzorek č. 17), (I – nízká vlhkost).....	71
Obrázek 48: Snímky nanovláknenné struktury ze SEM HA-Toco (vzorek č. 17), (II – střední vlhkost).....	71
Obrázek 49: Morfologie nanovláken (vzorky č. 1 - 4).....	74
Obrázek 50: Morfologie nanovláken (vzorky č. 5 - 6).....	74
Obrázek 51: Morfologie nanovláken (vzorky č. 10 - 14).....	74
Obrázek 52: Morfologie nanovláken (vzorky č. 15 a 17).....	75
Obrázek 53: Porovnání Ramanových spekter HA-Lipoic (prášek) s práškem PEO a s práškem HA.....	76
Obrázek 54: Porovnání Ramanových spekter HA-Lipoic (vlákno a prášek).....	76

Seznam tabulek

Tabulka 1: Použité chemikálie.....	47
Tabulka 2: Příprava roztoků.....	49
Tabulka 3: Parametry vláknění.....	51

Tabulka 4: Průměry vláken (vzorek č. 1), (I – nízká vlhkost).....	57
Tabulka 5: Průměry vláken (vzorky č. 2 – 7), (I – nízká vlhkost).....	62
Tabulka 6: Průměry vláken (vzorky č. 2 – 7), (II – střední vlhkost).....	62
Tabulka 7: Průměry vláken (vzorky č. 8 – 11), (I – nízká vlhkost).....	65
Tabulka 8: Průměry vláken (vzorky č. 8 – 11), (II – střední vlhkost).....	65
Tabulka 9: Průměry vláken (vzorky č. 12 – 15), (I – nízká vlhkost).....	69
Tabulka 10: Průměry vláken (vzorky č. 12 – 15), (II – střední vlhkost).....	70
Tabulka 11: Průměry vláken (vzorky č. 16 a 17), (I – nízká vlhkost).....	72
Tabulka 12: Průměry vláken (vzorky č. 16 a 17), (II – střední vlhkost).....	72
Tabulka 13: Vodivost roztoků.....	78
Tabulka 14: Povrchové napětí roztoků.....	79
Tabulka 15: Viskozita roztoků.....	81

Seznam grafů

Graf 1: Porovnání průměrů vláken.....	73
Graf 2: Porovnání vodivosti roztoků.....	78
Graf 3: Porovnání povrchového napětí roztoků.....	80
Graf 4: Viskozita roztoku (vzorek č. 1).....	81
Graf 5: Viskozita roztoku (vzorek č. 12).....	82
Graf 6: Viskozita roztoku (vzorek č. 17).....	82
Graf 7: Grafické srovnání usmrcených buněk	83

Seznam použitých zkratk

ALA – kyselina alfa-lipoová

BDDE – butan-1,4-diol diglycidyl ether

Da – Dalton

DMEM – modifikované Dulbecco Eagleovo médium

DNA – deoxyribonukleová kyselina

D_s – stupeň substituce

ES – electrospinning, elektrostatické zvlákňování

HA – kyselina hyaluronová

HA-Lipoic – derivát HA s kyselinou lipoovou

HA-Toco – derivát HA s tokoferol sukcinátem

IPA – izopropylalkohol

MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-tetrazoliumbromidu

M_w – hmotnostně střední molekulová hmotnost

PEO – polyethylenoxid

ROS – reaktivní forma kyslíku

RS – Ramanova spektroskopie

SEM – skenovací elektronová mikroskopie

1. Úvod

V současné době jsou nanomateriály předmětem zájmu vědců po celém světě, patří mezi materiály s velkým rozvojem a použitím ve velmi široké škále aplikací. Jako nanomateriály se obecně označují takové, které mají rozměry řádově v nanometrech (obvykle cca 1–100 nm), tzn. 10^{-9} m (miliardtina metru), což je přibližně tisícina tloušťky lidského vlasu. Nanomateriály lze využít, např. v letectví (odlehčené materiály, odolné barvy a nátěry pro aerodynamické plochy), v automobilovém průmyslu (barvy a nátěry odolné proti poškrábání, plasty, maziva, kapaliny, pneumatiky), v zemědělství a potravinářství (senzory pro optimalizaci produkce potravin), ve stavebnictví (izolace, odolné stavební materiály), při výrobě energie (fotovoltaika), životní prostředí (remediace půdy a podzemních vod), v kosmetice (opalovací krémy, zubní pasty, krémy na pleť), ve zdravotnictví (cílený transport léčiv), v textilním průmyslu (ochranné oděvy), v elektronice a nanobiotechnologii. Nanomateriály jsou velmi užitečné v mnoha směrech. Mohou zachraňovat životy v případě cíleného transportu léků, chemoterapeutik a radioterapeutik, mohou dosahovat zásadních objevů ve výzkumu, pomáhají snižovat dopady na životní prostředí v případě fotovoltaických článků a baterií či zdokonalovat funkce výrobků pro denní potřebu. Všichni lidé se s nanomateriály setkávají každý den, aniž by si to uvědomovali. Z důvodu toho, že hodně nanomateriálů je možné vyrobit z biologických složek, se vědci snaží vynalézt nové technologie a produkty výroby. A kvůli tomu cílem mé práce bylo vyrobit nanovlákná s derivátů kyseliny hyaluronové s potenciálním využitím v kosmetických nebo farmaceutických aplikacích. Pro tyto oblasti využití je velmi cenné, že se jedná o přírodní materiál, tvořící jednu z hlavních složek buněčné hmoty a tím je kompatibilní s lidským organismem. Kyselina hyaluronová je tedy přírodní biopolymer, který se také nachází v lidské pokožce, a proto byla vybraná jako hlavní složka připravených nanovláken s dvěma typy přírodních antioxidantů, které jsou také velmi významné v této oblasti využití, neboť inhibují oxidaci jiných molekul, a tím např. zabraňují vypuknutí a rozvoji některých onemocnění. Pro charakterizace připravených nanovláken a možnost potenciálního využití v daných oborech byly provedeny analytické a biologické zkoušky.

Tato diplomová práce obsahuje teoretickou a praktickou část. Praktická část byla plně zpracovaná ve firmě Contipro, a. s. v Dolní Dobrouči.

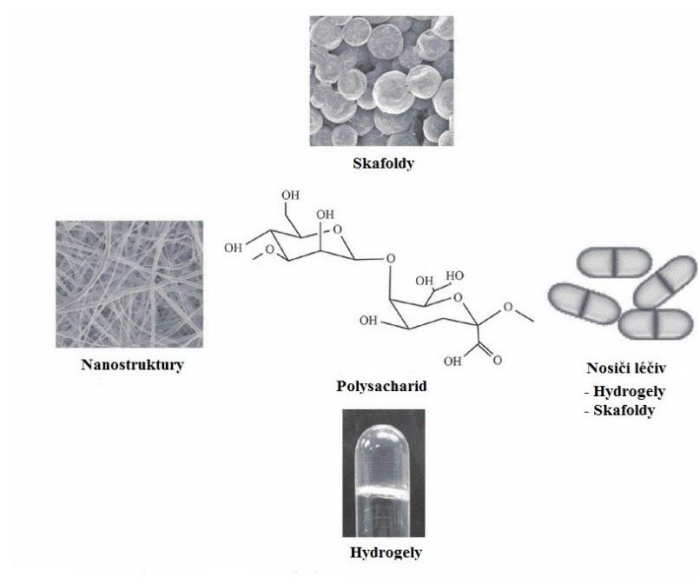
2. Teoretická část

2.1 Přírodní polymery

Polysacharidy, proteiny a polyestery odvozené z rostlinných i živočišných říší tvoří skupinu přírodních polymerů. Některé z těchto polymerů jsou součástí stravy a jsou také používány v různých farmaceutických aplikacích.^[1] Přírodní polymery vykazují velkou rozmanitost poměrně složitých struktur a různých fyziologických funkcí a mohou nabízet řadu potenciálních aplikací, díky jejich různým vlastnostem, jako je schopnost gelace, schopnost vázat vodu, biologická degradace a mnoho dalších. Kromě toho mají velký počet funkčních skupin (aminoskupiny, karboxylové a hydroxylové skupiny), které jsou dostupné pro chemickou reakci (hydrolyza, oxidace, redukce, esterifikace, etherifikace, zesíťovací reakce atd.) a enzymatické modifikace nebo konjugace s jinými molekulami.^[2]

2.1.1 Polysacharidy

Polysacharidy se skládají z monosacharidů (cukrů) spojených dohromady ortho-glykosidickými vazbami. Rozdíly v monosacharidové kompozici, typu vazeb, tvarech řetězců a molekulové hmotnosti určují jejich fyzikální vlastnosti, jako je rozpustnost, viskozita, povrchové a mezifázové vlastnosti. Kromě toho polysacharidy vykonávají různé fyziologické funkce, a proto mají velké potenciální aplikace v oblasti tkáňového inženýrství a regenerační medicíny. Biomedicínské aplikace polysacharidů jsou ukázány na Obrázku 1.^[1]

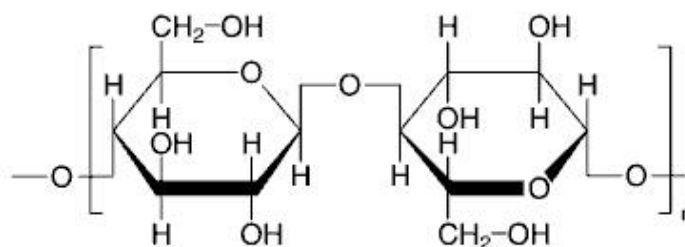


Obrázek 1: Biomedicínské aplikace polysacharidů ^[1]

2.1.1.1 Celulóza

Celulóza je přírodní polymer, obsažený v bavlně a dřevu. Bavlna obsahuje v suchém stavu 90 % celulózy, dřevo asi 50 %. Dalších přibližně 30 % obsahu dřeva tvoří lignin - přírodní fenolický polymer zpevňující strukturu dřeva, zbytek pak cukry a soli.^[3]

Celulóza se skládá z molekul glukosy spojených v polohách 1,4 β -glykosidickou vazbou (viz Obrázek 2).^[4]



Obrázek 2: Struktura celulózy ^[5]

Celulóza je netavitelná a nerozpustná. Dokud je chemicky nezměněna, nelze ji tvářet. Proto ji přeměňujeme na deriváty, které lze tvářet snadno. Z nejznámějších jsou to, např. amyloid - průsvitný pergamen, vznikající působením zředěné kyseliny sírové na celulózu, nebo nitrát celulózy, který je základem k výrobě, tzv. viskózy, suroviny pro celofán a viskózové hedvábí. Nitrát celulózy se používá také k výrobě lepidel a nátěrových hmot určených pro kovy, dřevo a celofánové fólie.

Reakčním produktem působení koncentrované kyseliny octové je triacetát celulózy, který se jen v některých případech přímo zpracovává jako polymer (na filmy a vlákna). Většinou se však triacetát celulózy hydrolyzuje na diacetát přidávkem vody. Celulóza se také používá pro výrobu viskózového vlákna (Obrázek 3).^[3]



Obrázek 3: Viskózové vlákno ^[6]

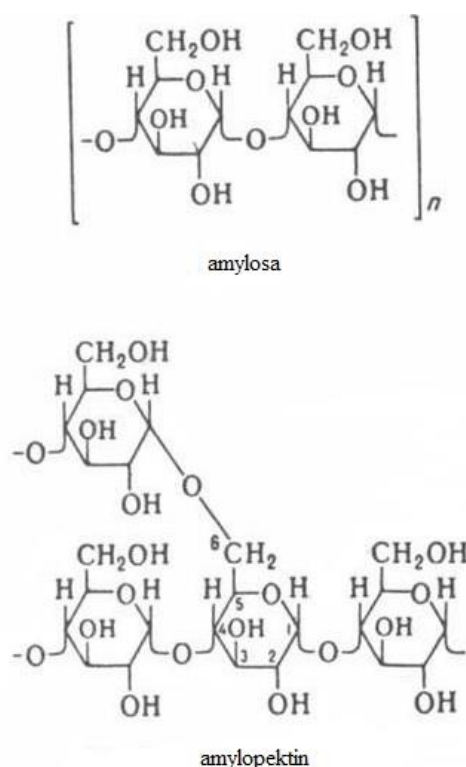
Diacetát celulózy se používá k výrobě fólií, vláken a nátěrových hmot.

Ostatní používané ethery celulózy jsou vodorozpustné polymery, které nacházejí uplatnění jako ochranné koloidy ve farmaceutických a kosmetických přípravcích, jako přísady do vodorozpustných nátěrových hmot, impregnační činidla pro papír a textil, vodorozpustná lepidla apod.^[3]

2.1.1.2 Škrob

Škrob je látka, která se nachází v některých rostlinách, např. v bramborách, kukuřici, rýži, ve formě škrobových zrn. Ta se skládají ze dvou polysacharidů - lineární amylozy rozpustné v horké vodě a rozvětveného amylopektinu ve vodě nerozpustného (Obrázek 4). V běžných škrobech bývá podstatně více amylopektinu, asi 80 %. Proto se škrobové zrna ve studené vodě nerozpouštějí a v teplé bobtnají. Po delším zahřívání na 60 °C až 70 °C přecházejí do koloidního roztoku, známého jako škrobový maz. Ten ochlazením vytváří gel, což je podstatou přípravy pudinků.

Škrob snadno podléhá hydrolýze, oxidaci, tepelnému a mechanickému odbourávání. Produkty hydrolýzy škrobu jsou tzv. dextriny, více nebo méně rozpustné ve studené vodě. Používají se k výrobě lepidel a pojiv.^[3]



Obrázek 4: Struktura škrobu ^[7]

2.1.2 Bílkoviny

Bílkoviny mají mezi všemi přírodními látkami zcela zvláštní postavení, neboť bez nich není možná existence žádného živého organismu.^[4] Z molekulárního hlediska mohou být proteiny považovány za polymerní struktury složené z 20 aminokyselin vázaných amidovými (nebo peptidovými) vazbami. Aminokyseliny jsou proto stavebními bloky polypeptidů a proteinů.^[2]

Podle tvaru molekul bílkoviny rozdělujeme na vláknité a globulární.

Vláknité bílkoviny jsou konstrukčním materiálem těl živočichů, podobně jako celulóza těl rostlin. Patří mezi ně fibroin (v přírodním hedvábí), keratin (v nehtech a vlasech), myosin (ve svalovině) a kolagen (ve vazivových a pojivových tkáních).

Ke globulárním bílkovinám patří kasein (ve mléku), albumin (ve vejcích) a zein (v kukuřici).^[3]

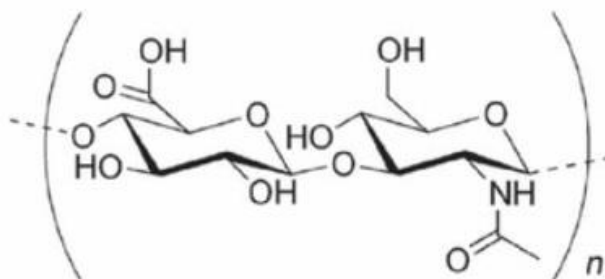
2.2 Kyselina hyaluronová

2.2.1 Historie

V roce 1934 Karl Meyer a John Palmer popsali postup pro izolaci nového glykosaminoglykanu ze sklivce skotu. Tato látka obsahovala kyselinu uronovou a aminocukr, kterou pojmenovali „kyselina hyaluronová“ (HA), někdy se označuje též jako „hyaluronan“. Jedná se o polymer, jehož základní jednotka obsahuje dva různé sacharidy.^[8]

2.2.2 Chemická struktura

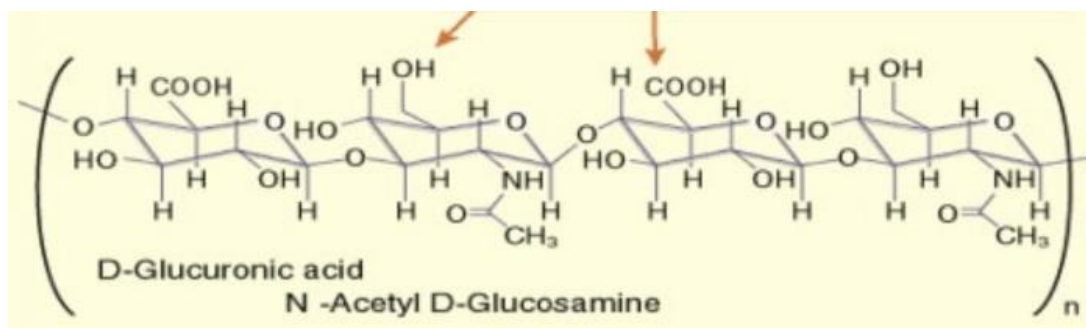
HA je rovnoměrně se opakující lineární glykosaminoglykan složený z 2 000 – 25 000 disacharidů kyseliny glukuronové a N-acetylglukosaminu spojených střídajícími se $\beta 1 \rightarrow 4$ a $\beta 1 \rightarrow 3$ glykosidickými vazbami, viz Obrázek 5.^[8]



Obrázek 5: Chemická struktura kyseliny hyaluronové ^[9]

2.2.3 Modifikace

HA obsahuje karboxylové kyseliny a hydroxylové funkční skupiny, které mohou být použity pro modifikace (viz Obrázek 6). Hydroxylové skupiny na HA mohou být zesíťovány etherovou vazbou a karboxylové skupiny prostřednictvím esterové vazby.

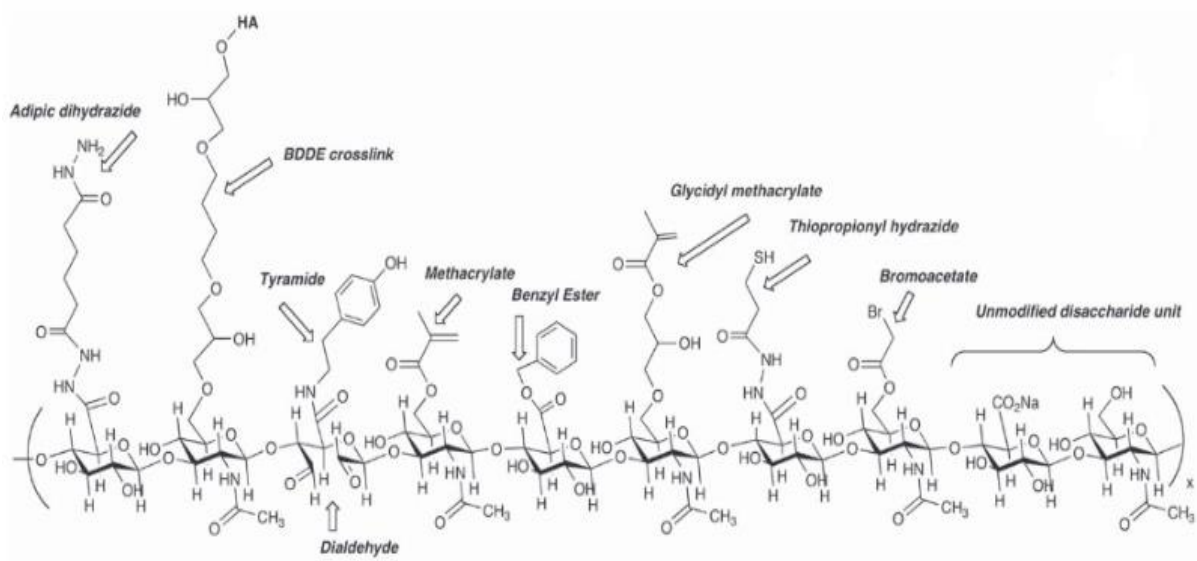


Obrázek 6: Primární místa vhodná pro chemickou modifikaci HA

HA je možné chemicky modifikovat před zesíťováním za vzniku jiných funkčních skupin. Například HA může být deacetylována kyselinou nebo bází, což vede k přítomnosti volných aminoskupin. Tyto aminoskupiny mohou být zesíťené amidovou, iminovou vazbou nebo jako sekundární amin. Iminová vazba může být dále převedena na aminovou vazbu v přítomnosti redukčního činidla. Reakce zesíťení mohou být provedeny za kyselých, neutrálních a alkalických podmínek za použití karbodiimidů, aldehydů, sulfidů a polyfunkčních epoxidů.^[9]

2.2.4 Deriváty HA

Obrázek 7 ilustruje vybrané chemické modifikace HA: dihydrazid kyseliny adipové pro použití při dalším zesítnění; butan-1,4-diol diglycidyl ether (BDDE); tyramid pro peroxidázové zesítnění; dialdehyd získaný oxidací jodistanu; methakrylát na primární 6-hydroxylové skupině; benzyl ester; glycidyl methakrylát; thiopropionyl hydrazid; bromacetát; nemodifikovaná disacharidová jednotka pro srovnání.^[10]



Obrázek 7: Deriváty HA ^[10]

V diplomové práci byly použity 2 deriváty: derivát kyseliny hyaluronové s kyselinou lipiovou (HA-Lipoic) a derivát kyseliny hyaluronové s tokoferol sukcinátem (HA-Toco).

2.2.5 Vlastnosti

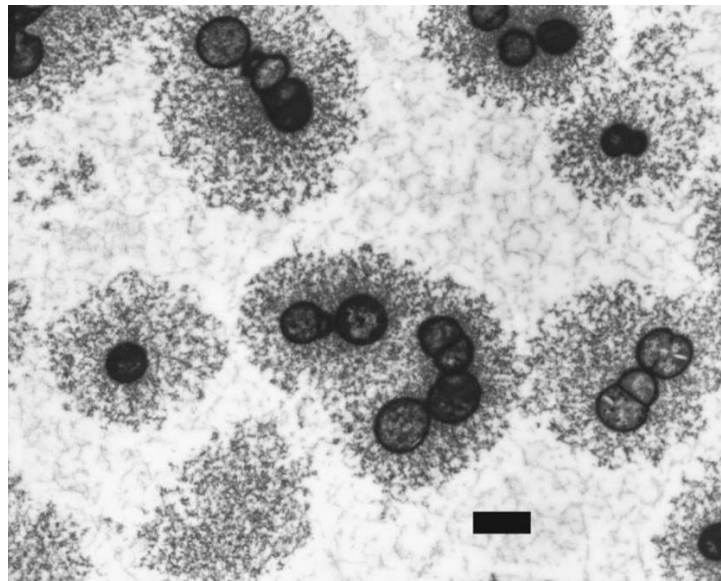
Kyselina hyaluronová podporuje hydrataci a pružnost pleti. Působí i jako antioxidant, likviduje škodlivé volné radikály. HA se využívá v lokální léčbě popálenin a kožních vředů. Někteří odborníci uvádějí, že zabraňuje vytváření jizev tím, že brání ukládání kolagenu při

hojení rány. V organismu se HA nachází v mezibuněčné hmotě a synoviální tekutině. Úbytek kyseliny hyaluronové s věkem je provázen zvýšenou tvorbou vrásek a dehydratací pleti.^[11]

Vzhledem ke schopnosti vázat vodu a biokompatibilitě je kyselina hyaluronová ideálním materiálem pro využití v oblasti tkáňového inženýrství a regenerativní medicíny.^[11]

2.2.6 Výroba

HA může být produkována mikrobiální fermentací. HA je syntetizována jako extracelulární kapsle streptokoků skupiny A a C. Pod mikroskopem se tyto nesporulující a nepohyblivé bakterie jeví jako sférické nebo oválné buňky, které jsou typicky uspořádány ve dvojicích nebo řetězcích obklopených rozsáhlou extracelulární kapslí (viz Obrázek 8).



Obrázek 8: Elektronová mikroskopie Streptokoku ^[12]

2.2.7 Využití v medicíně

HA je použitelná pro různé medicínské aplikace, příklady jsou uvedeny v následujících kapitolách.

2.2.7.1 Antiadhezní aplikace

Z důvodu toho, že HA je vysoce hydrofilní polymer, je vhodný pro aplikace vyžadující minimální buněčnou adhezi. Pooperační adheze, které vznikají mezi sousedními vrstvami tkáně po chirurgickém zákroku, brání hojení ran. Bariéry vytvořené ze zesítené HA se používají k zabránění tvorby těchto adhezí. Kromě toho může adheze bakterií k biomateriálům vyvolat infekce a představovat velké riziko pro pacienta. S ohledem na to se esterifikovaná HA také používá k prevenci adheze bakterií k zubním implantátům, intraokulárním čočkám a katetru.^[13]

2.2.7.2 Dermatologie a aplikace hojení ran

HA je přítomna ve vysokých koncentracích v kůži a měkkých pojivových tkáních. HA je proto vhodnou matricí pro podporu dermální regenerace a augmentace. Např. Prestwich a spolupracovníci zjistili, že zesíťované hydrogelové filmy s HA urychlují hojení ran. Kromě toho, v důsledku své schopnosti vytvářet hydratované, expandované matrice, byla HA také úspěšně použita v kosmetických aplikacích pro augmentace měkkých tkání.^[13]

2.2.7.3 Kardiovaskulární aplikace

HA je účinný pro zvýšení kompatibility kardiovaskulárních implantátů, jako jsou vaskulární štěpy a stenty. Například povrchy biomateriálů ošetřené zesítenou HA snižují tvorbu trombů. Kromě toho mohou sulfátované deriváty HA působit jako napodobeniny heparinu. Deriváty HA s vyššími stupni sulfatace zvyšují schopnost zabránění srážení krve.^[13]

2.2.7.4 Oftalmologie

HA je přirozenou složkou sklivce oka, našla mnoho úspěšných aplikací v oční chirurgii. HA se používá jako matrice pro zaplnění prostoru oka. Intraokulární injekce HA se během

operace používá k udržení tvaru přední komory. Dále roztoky HA slouží jako složka oční kapky zvyšující viskozitu a jako pomocná látka při opravě oční tkáně.^[13]

2.3 Antioxidanty

Antioxidant je molekula, která inhibuje oxidace jiných molekul. Oxidace je chemická reakce, která může produkovat volné radikály, což vede k řetězovým reakcím, které mohou poškodit buňky. Antioxidanty, např. kyselina askorbová (vitamin C), ukončují tyto řetězové reakce. Různé abiotické stresy vedou k nadprodukci reaktivní formy kyslíku (ROS) (například hydroxylové radikály HO• a peroxylové skupiny ROO•) v rostlinách a zvířatech, které jsou nesmírně citlivé, což vede k poškození bílkovin, lipidů, škrobů a deoxyribonukleové kyseliny (DNA).

Proces oxidace vyvolává různé neurotické stavy, zánět kloubů, astma, onemocnění imunitního systému, kardiovaskulární onemocnění, diabetes, neurodegenerativní onemocnění, Alzheimerovy choroby, Parkinsonova demence atd. Antioxidanty vyrovnávají vliv ROS a tímto způsobem pomáhají v boji proti těmto onemocněním.

Léčivé rostliny jsou důležitým zdrojem antioxidantů. Přírodní antioxidanty zvyšují antioxidantní kapacitu plazmy a snižují riziko některých onemocnění, jako je rakovina a srdeční onemocnění. Sekundární metabolity, jako jsou flavonoidy z rostlin, jsou uváděny jako účinné lapače volných radikálů. Nacházejí se ve všech částech rostlin, jako jsou listy, plody, semena, kořeny a kůra. V přírodě existuje hodně antioxidantů, které jsou rozdílné ve složení, fyzikálních a chemických vlastnostech, mechanismu a místě působení.

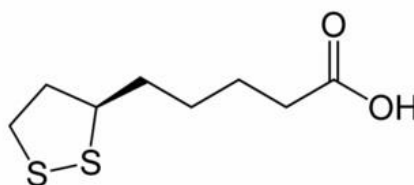
Pro maximální účinnost se primární antioxidanty často používají v kombinaci s jinými fenolovými antioxidanty nebo s různými činidly pro sekvestraci kovů, např. tokoferoly s kyselinou citrónovou a isopropylcitrátem.

Nejdůležitějšími komerčně dostupnými přírodními antioxidanty jsou tokoferoly (vitamin E), kyselina askorbová (vitamin C) a extrakt z rozmarýnu.^[14]

2.3.1 Kyselina α -lipoová

Kyselina α -lipoová (ALA) je disulfidový derivát kyseliny oktanové (Obrázek 9). ALA je přirozený mitochondriální koenzym multienzymového komplexu, který katalyzuje oxidační dekarboxylace α -keto kyselin, jako jsou pyruvát a α -ketoglutarát. ALA je silný antioxidant, který umožňuje terapeutické využití. ALA byla objevena v roce 1951, její první klinické studie byly provedeny ve stejném roce.

Kyselina α -lipoová je rozpustná v tuku a ve vodě, takže může proniknout do jakékoli tkáně v těle, což má antioxidační účinek nejen vně, ale také uvnitř buňky. Aktivuje také činnost dalších antioxidantů - vitaminů A, C, glutathionu a koenzymu Q10. ALA má unikátní vlastnosti, které umožňují její použití při léčbě a prevenci širokého spektra onemocnění, především periferního nervového systému a mozku, protože nervová tkáň je extrémně citlivá na toxické účinky volných radikálů. Tradičně se ALA používá při léčbě diabetické polyneuropatie.



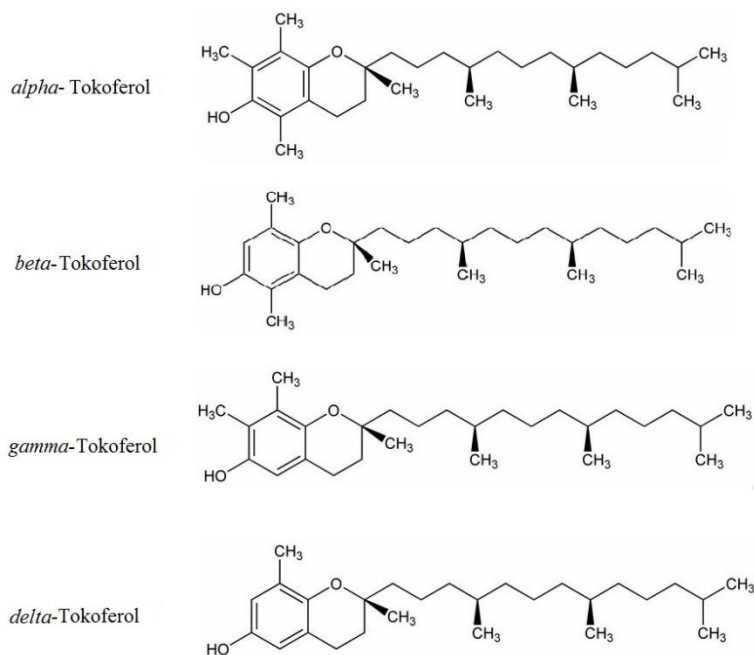
Obrázek 9: Struktura kyseliny α -lipoové ^{[15], [16]}

2.3.2 Tokoferol

Vitamin E je souhrnné pojmenování přírodních chemických látek: čtyři tokoferoly a čtyři tokotrienoly.^[17] Vitamin E je vitamin rozpustný v tucích s antioxidačními vlastnostmi, který chrání buněčné membrány před poškozením volnými radikály.^[18]

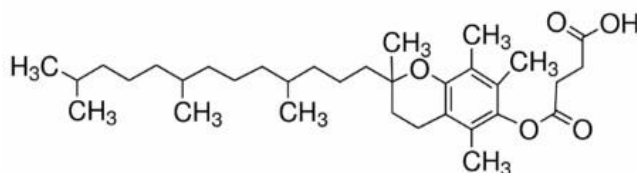
Tokoferoly byly poprvé izolovány v roce 1936. Jejich struktura byla popsána v roce 1938 Femholzem.^[19]

Tokoferoly jsou přirozeně přítomny v rostlinných olejích, ořechách, ovoci a zelenině. Tokoferoly se vyskytují v α (alpha), β (beta), γ (gamma) a δ (delta) – formách a liší se pouze počtem a polohou methylových skupin na aromatickém kruhu (Obrázek 10).^[20] Relativní antioxidační aktivity tokoferolů v lipidových systémech jsou $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ – isomery.^[17]



Obrázek 10: Struktury α , β , γ a δ tokoferolu ^[21]

α -tokoferol a tokoferol sukcinát (Obrázek 11) se vyrábějí synteticky.^[20]



Obrázek 11: Struktura tokoferol sukcinátu ^[22]

Antioxidační účinek tokoferolů lze zvýšit smícháním s kyselinou askorbovou, lecitinem nebo kyselinou citrónovou.^[20]

2.3.2.1 Aplikace

Jedna z možností aplikace tokoferolů s přidavkem jiných antioxidantů, jako jsou askorbylpalmit, lecitin nebo kyselina citrónová je cukrářství. Základ žvýkačky lze doplnit α - a γ -tokoferolem, aby se prodloužila doba použitelnosti.^[20]

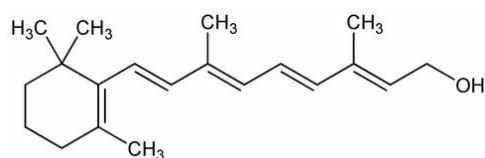
Estery tokoferolu, zejména tokoferol acetát, sukcinát a linoleát, se ukázaly jako slibné látky při snižování poškození kůže způsobeného UV zářením. Jejich ochranné účinky jsou však méně výrazné ve srovnání s tokoferolem. To je zcela pochopitelné, protože estery tokoferolů musí být nejprve hydrolyzovány během absorpce v kůži, aby vykazovaly antioxidační aktivitu.^[17]

2.3.3 Vitamin A

Vitamin A a jeho deriváty jsou široce používanými prostředky pro úpravu kůže nebo normalizátory v kosmetice. Mohou regulovat buněčný růst a diferenciaci v kůži, normalizovat keratinizaci, zmenšovat vrásky a dodávat hladkou a vláčnou pokožku. Vitamin A a jeho deriváty zvyšují obrat kožních buněk, kontrolují nadměrnou sekreci kožního mazu a zabraňují ucpávání pórů.

Jednou z forem vitamínu A (Obrázek 12) používaného v kosmetice je β -karoten, účinné fotoprotektivní činidlo používané v kosmetických prostředcích. β -karoten je velmi populární v barvivech nebo kosmetických prostředcích používaných při opalování. Analýza in vivo Ramanovy spektroskopie ukázala, že lokálně aplikovaný karotenoid proniká hluboko do pokožky a urychluje antioxidační potenciál kůže.

Okolo 15 % průmyslového β -karotenu je produkováno mikroorganismy.



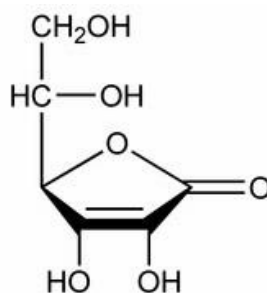
Obrázek 12: Struktura vitamínu A

2.3.4 Vitamin C

Potenciálními farmaceutickými funkcemi vitamínu C (kyselina askorbová) jsou antioxidační aktivita a fotoprotektivní působení zhašením volných radikálů indukovaných UV zářením. Má mírnou protizánětlivou aktivitu, a proto může být použit na poškozené kůži, aby se snížila přecitlivělost.

Vitamin C (Obrázek 13) hraje důležitou roli v biosyntéze kolagenu a je běžně používán v kompozici bělení kůže, díky své antimelanogenní vlastnosti.

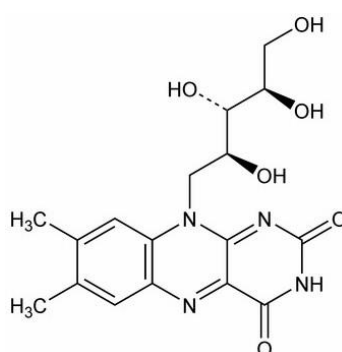
Jsou dvě metody výroby vitamínu C. Jednou z nich je Reichsteinův proces, který využívá krátký fermentační krok využívající druhy *Gluconobacter* a různé chemické konverzní kroky. Druhá metoda je dvoustupňová fermentace s použitím různých druhů. Mikrořasy, jako je *Chlorella pyrenoidosa*, jsou schopny produkovat kyselinu l-askorbovou jednostupňovým procesem, ale hlavní nevýhodou je nízký výtěžek ve srovnání s jinými metodami.



Obrázek 13: Struktura vitamínu C ^[23]

2.3.5 Vitamin B2

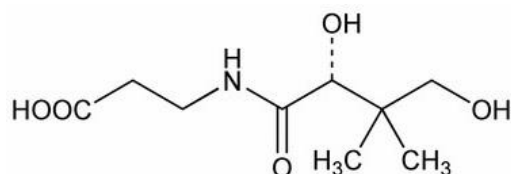
Riboflavin je známý jako vitamin B2 (Obrázek 14). Riboflavin je přírodní barvivo používané v potravinách. Hodně mikrobů syntetizuje riboflavin, ke kterým patří vláknité houby, kvasinky a bakterie. Nutritional Products je hlavním výrobcem riboflavinu s použitím geneticky modifikovaného *Bacillus subtilis*. Vitamin B2 je nezbytný vitamin a dodává jasně žlutou barvu. Riboflavin je silné fotosenzitivní činidlo a může být použit ke stabilizaci bioaktivních molekul v krémech na ochranu proti slunečnímu záření.



Obrázek 14: Struktura vitaminu B2 ^[23]

2.3.6 Vitamin B5

Vitamin B5 nebo kyselina pantothenová (Obrázek 15) je ve vodě rozpustný vitamin, který se vyrábí hlavně chemickými způsoby. K normální funkci pokožky je zapotřebí kyselina pantothenová, která vede k tvorbě koenzymu Q a podílí se na metabolismu sacharidů, proteinů a lipidů. Kyselina pantothenová zlepšuje hojení ran, regeneraci pokožky a také snižuje zjizvení. Kyselina pantothenová může být použita v různých přípravcích pro péči o pleť. Kyselina pantothenová se používá v přípravcích pro péči o vlasy, protože hydratuje vlasy a chrání vlasy před chemikáliemi a UV paprsky.



Obrázek 15: Struktura vitamínu B5 ^[23]

2.4 Nanomateriály

2.4.1 Historie

Termín „nanotechnologie“ byl poprvé použit v roce 1974 japonským vědcem N. Taniguchi. V roce 1981 německý vědec G. Glater se zmínil o možnosti vytvoření materiálů s velikostí zrna menší než 100 nm, které budou mít jedinečné vlastnosti.

Současně se rozvíjely i koncepty nanomateriálů. Které byly poprvé formulovány ve vztahu ke kovovým materiálům G. Glaterem (1981). Uvedl také pojem „nanokrystalické materiály“.^[24]

2.4.2 Klasifikace nanomateriálů

Problematika nanomateriálů je extrémně široká, protože zahrnuje veškeré strukturní složky v nanoměřítku. Předpona nano- (pochází z řeckého slova „trpaslík“) představuje miliardtinu jednotky metru, takže nanočástice se obvykle považují v rozpětí od 1 do 100 nanometrů.^[25]

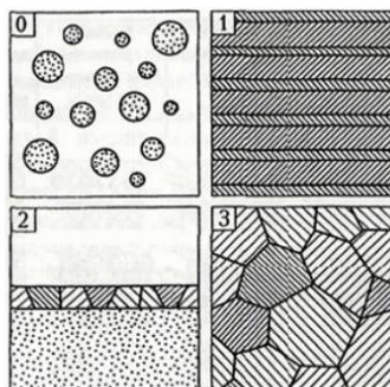
G. Glater navrhl rozdělit nanomateriály do tří kategorií. První kategorie zahrnuje materiály ve formě nanočástic, jemných vláken a filmů, které jsou izolovány, uloženy na substrátu nebo vloženy do matrice. Materiály této kategorie získané kondenzačními a aerosolovými metodami, se používají například v polovodičové technologii a jako katalyzátory.

Druhá kategorie zahrnuje materiály, ve kterých je nanostruktura omezena na tenkou povrchovou vrstvu masivního materiálu. Pro získání takové vrstvy se používají různé metody, například iontová implantace a laserové obrábění.

Třetí kategorie zahrnuje masivní materiály s nanostrukturami, které mohou být rozděleny do dvou tříd. První zahrnuje materiály, jejichž atomová struktura nebo chemické složení se liší podle objemu materiálu na atomové úrovni. K této třídě patří: skla nebo implantované materiály (získané například iontovým bombardováním). Nanomateriály druhé třídy se skládají z nanočástic (krystalitů), které se liší atomovou strukturou, krystalografickou orientací, chemickým složením a oblastmi mezi sousedními bloky (hranice zrn). Tyto materiály jsou strukturně nehomogenní, na rozdíl od materiálů první třídy, které jsou strukturně homogenní.

Chemické složení, atomová struktura, tvar a velikost krystalitů, stejně jako rozhraní, se značně liší a tento rozdíl má významný vliv na vlastnosti nanostrukturovaných materiálů.

Podle geometrické klasifikace nanomateriálů, kterou nabízel P. Ziegel (Obrázek 16) lze rozlišovat 0 - nanodisperze (atomové klastry a nanočástice), 1 - vícevrstevné nanomateriály, 2 - nanostrukturované povlaky a 3 - objemové nanostrukturované materiály.



Obrázek 16: Klasifikace nanomateriálů podle Ziegela ^[24]

Nanomateriály je také možné rozdělit na anorganické nekovové nanomateriály (např. oxid titaničitý), kovové nanočástice (např. nanozlato, nanostrříbro), uhlíkové nanomateriály (např.

uhlíkové nanotrubičky a fullereny) a organické, makromolekulární nebo polymerní částicové materiály (např. dendrimery).^[26]

2.4.2.1 Nanovláknenné materiály

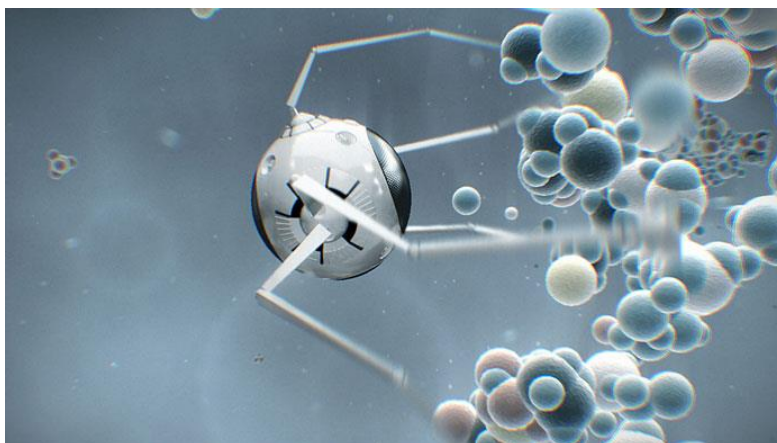
K nanomateriálům patří nanovláknenné materiály a jsou to vrstvy složené z jednotlivých vláken o průměru v rozsahu desítek nanometrů až jednotek mikrometrů (takto jsou obecně popisovány vrstvy vytvářené metodou elektrostatického zvlákňování). Nanovláknena mají vysokou porozitu, malou velikost pórů a malý průměr vláken.^[27]

Nanovláknena lze připravit s širokého spektra přírodních a syntetických biomateriálů. V současné době jsou k dispozici různé techniky pro syntézu nanovláken, např. elektrospinning, samosestavení a separace fází. Jednou z potenciálních aplikací je vývoj nosičů léčiv na bázi nanovláken, které napodobují strukturu tkáně v nanoměřítku.^[28]

2.4.3 Využití nanomateriálů

Využití nanomateriálů je velice rozmanité, od aplikací ve výrobcích každodenní potřeby až po vysoce specializované malosériové technické aplikace, např. v elektronice a biomedicíně. Zdaleka největší využití nacházejí nanomateriály jako zpevňující látky v pneumatikách a ostatních pryžových výrobcích. Následují funkční plniva v polymerech, různá použití v elektronice, v kosmetice, ve zdravotnictví, medicíně a nanobiotechnologii (např. cílený transport léčiv).^[26]

Jednou z atraktivních aplikací nanomateriálů v medicíně je vytvoření zařízení v nanoměřítku pro zlepšení terapie a diagnostiky. Taková zařízení s nanoúrovněmi jsou označována jako nanoroboti nebo nanoboti (Obrázek 17).^[29]



Obrázek 17: Nanobot ^[30]

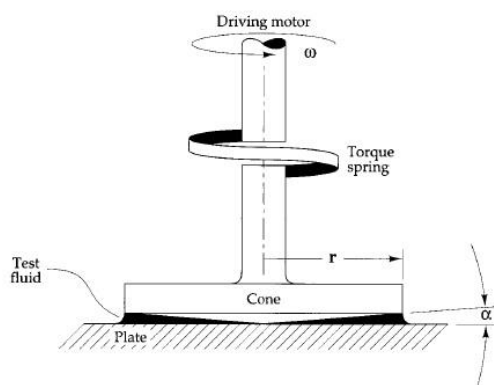
2.5 Příprava roztoků pro vlákňení

Roztok HA má neobvykle i při poměrně nízké koncentraci vysokou viskozitu, což významně brání procesu elektrostatického zvlákňování. Další překážkou pro dosažení úspěšného elektrostatického zvlákňování roztoků HA je relativně vysoké povrchové napětí. Se zvyšující se molekulovou hmotností není schopná tato kyselina vlákňit samostatně.^[31] Pro zlepšení vlákňení se přidává syntetický polymer, např. polyethylenoxid (PEO), který slouží jako nosný polymer. Pro snížení viskozity a povrchového napětí se volí různá rozpouštědla. V mojí práci jsem použil izopropylalkohol (IPA) a ethanol.^[32]

2.6 Určení roztokových parametrů

2.6.1 Měření viskozity

Viskozimetry jsou určeny k využití teoretického vztahu mezi smykovým napětím a rychlostí deformace pro měření viskozity. Existují tři hlavní typy styčných ploch rotačních viskozimetrů: dva válce, kužel a deska, paralelní desky. Rotační viskozimetr kužel-deska (viz Obrázek 18) poskytuje rovnoměrnou smykovou rychlost přes rotující desku. Skládají se z kuželové plochy a ploché desky oddělené malou mezerou, která se naplní kapalným vzorkem. Jedna z desek se otáčí a měří se točivý moment potřebný k držení druhé desky na místě.^[33]



Obrázek 18: Rotační viskozimetr kužel-deska ^[34]

2.6.2 Měření vodivosti roztoků

Pro měření vodivosti roztoků se používá konduktometr (Obrázek 19). Hodnota měrné vodivosti (konduktivity) je sumární parametr pro koncentraci iontů měřeného roztoku. Čím více solí, kyselin nebo také zásad měřený roztok obsahuje, tím vyšší je jeho vodivost. Jednotkou měrné vodivosti je S/m, často také S/cm.

Měření konduktivity se provádí měřením elektrochemického odporu. Používaná měřicí cela se v nejjednodušším případě skládá ze dvou elektrod stejného druhu. Střídavé napětí přiložené na elektrody způsobí na elektrodách uspořádaný pohyb iontů, přítomných v měřeném roztoku. Čím více iontů měřený roztok obsahuje, tím větší je proud protékající mezi elektrodami. Měřicí přístroj nejprve vypočte, na základě Ohmova zákona, ze změřeného proudu, vodivost měřeného roztoku a potom, při zohlednění parametrů cely, hodnotu měrné vodivosti. V praxi slouží měření konduktivity, např. ke sledování procesů, při výrobě vysoce čistých vod nebo ke stanovení salinity mořské vody.



Obrázek 19: Konduktometr ^[35]

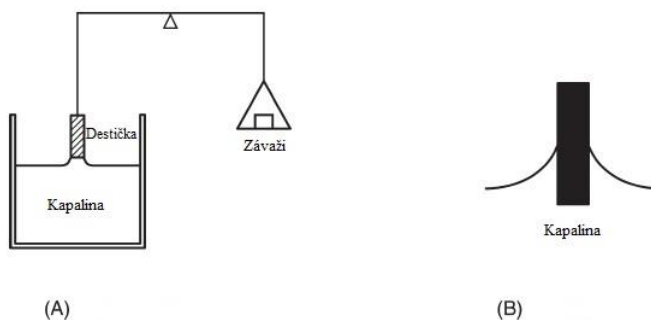
2.6.3 Měření povrchového napětí pomocí metody Wilhelmyho destičky

Tato metoda zahrnuje několik způsobů měření povrchového napětí, buď odtahování skleněné nebo platinové desky od rozhraní měřeného roztoku, nebo povrchové napětí se měří staticky s použitím přesné mikrobilance (Obrázek 20). V metodě odtahování desky je celková síla F dána hmotností desky W a mezifázovou napínací silou γ ,

$$F = W + \gamma p$$

kde p je "kontaktní délka" desky s kapalinou, tj. obvod desky. ^[36]

Statická metoda se používá k měření změny síly potřebné k udržení desky na konstantní úrovni při změnách povrchového napětí. Tato metoda je zvláště účinná a užitečná, když povrchové napětí roztoku se mění při změně vlastností roztoku. Vlastnosti roztoku se mohou měnit, když se změní chemické složení roztoku. Takové změny jsou běžné v reakčním systému.



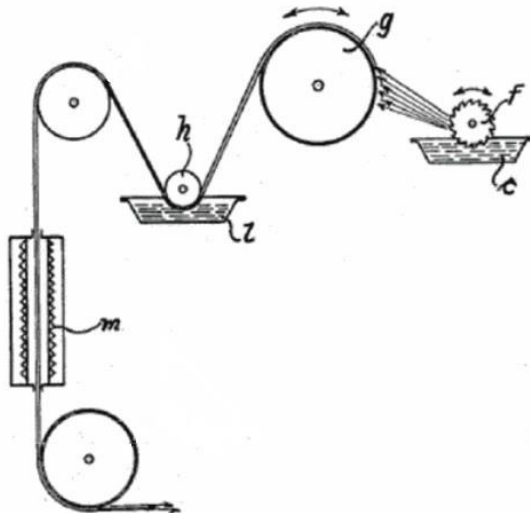
Obrázek 20: Princip metody odtahování desky (A) a statické metody (B) ^[37]

2.7 Zvlákňování

2.7.1 Historie

Principem elektrostatického zvlákňování (z anglického jazyka převzat pojem „Electrospinning“, ES) je fenomén elektrostatické atrakce, která byla objevena před více než 400 lety. V roce 1600 Angličan William Gilbert zjistil, že když byl kousek odtrženého jantaru držen blízko vodní kapky, mohla být kapka přitahována k jantaru a přitom vytvářela kuželovitý tvar.

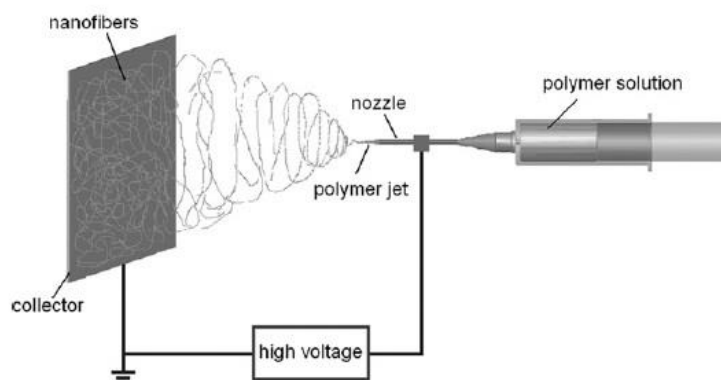
Dalším velkým přispěvatelem k ES je Anton Formhals, který podal řadu patentů o ES sestavách mezi lety 1931 a 1944. V jednom z těchto patentů navrhl myšlenku pro výrobu nekonečných vláken za pomoci elektrického pole. Obrázek 21 ukazuje základní sestavení. Bylo vytvořeno elektrické pole mezi ozubeným kolem [obr. 21 (f)] a kovovým kroužkem [obr. 21 (g)]. Otáčením kolečka a kroužku ve stejném nebo opačném směru se roztok pohyboval z nádoby [obr. 21 (c)] kolem kola. Návrh dokonce obsahoval mycí zařízení [obr. 21 (h) a (l)] a topné zařízení [obr. 21 (m)] pro kontinuální výrobu.



Obrázek 21: Princip výroby nekonečných vláken za pomoci elektrického pole ^[38]

2.7.2 Princip metody

Metoda ES pro svoji funkci vyžaduje vysokonapěťový zdroj elektrické energie a dvě elektrody připojené k opačnému potenciálu (Obrázek 22). Jedna z elektrod (emitor nebo tryska) přivádí roztok polymeru a tvaruje ho do výchozích tvarů. Síly vysokonapěťového elektrického pole vytvářejí na roztoku takzvaný Taylorův kužel, ze kterého je dále vytvářeno vlákno. Vlákno je vytahováno elektrostatickými silami směrem k druhé, opačně nabitě elektrodě (kolektoru), která slouží k sběru letících vláken. Během letu vlákna dochází k extrémně rychlému odpařování rozpouštědla a tunutí roztoku. Celý pohyb vlákna mezi oběma elektrodami je velmi složitý a je charakterizován náhodnou trajektorií. Tento chaotický pohyb způsobí, že vlákna se nanáší náhodně na sběrnou elektrodu, kde se vytváří vrstva vláken s průměrem od desítek nanometrů do desítek mikrometrů (v závislosti na typu zvlákněvaného polymeru, parametrech roztoku a procesních podmínkách).^[39]



Obrázek 22: Princip metody elektrostatického zvláknování^[39]

2.7.3 Přístroj 4SPIN®

Přístroj 4SPIN® (Obrázek 23) zahrnuje metody elektrospinning, elektrobloving a elektrospaying, které umožňují přípravu nanostrukturálních materiálů. Devět emitorů a čtyři kolektory umožňují provádět různé typy experimentů. 4SPIN® umožňuje provádět zvláknování přírodních a syntetických polymerů.^[40]



Obrázek 23: Přístroj 4SPIN® [41]

Emitory neboli zvlákňovací elektrody jsou připojeny ke zdroji vysokého napětí a ke stříkačce s roztokem. Základní typy emitorů (E1 - E4) (Obrázek 24) jsou E1 - jednoduchá tryska, E2 - vícenásobná tryska, E3 - bezjehlová tryska (trn) a E4 - bezjehlová vícenásobná tryska.



Obrázek 24: E1 - E4 emitory

4SPIN[®] má různé typy sběrných elektrod neboli kolektorů, které určují konečnou velikost, tvar a strukturu materiálu (např. i orientaci vláken). Základní typy kolektorů C1 - C4 (Obrázek 25) jsou C1 - statický kontinuální, C2 - statický dělený, C3 - rotační kontinuální a C4 - rotační dělený. V diplomové práci byly použity emitor E1 a kolektor C1.



Obrázek 25: C1 - C4 kolektory ^[40]

2.7.4 Využití

Zařízení je určeno pro použití v různých oblastech výzkumu a vývoje nanovláknenných materiálů. Schopnost zpracovat i vysoce viskózní roztoky přírodních polymerů, jako je kyselina hyaluronová, je klíčová pro vývoj nových aplikací, zejména v medicíně, tkáňovém inženýrství, dodávání léčiv nebo hojení ran.

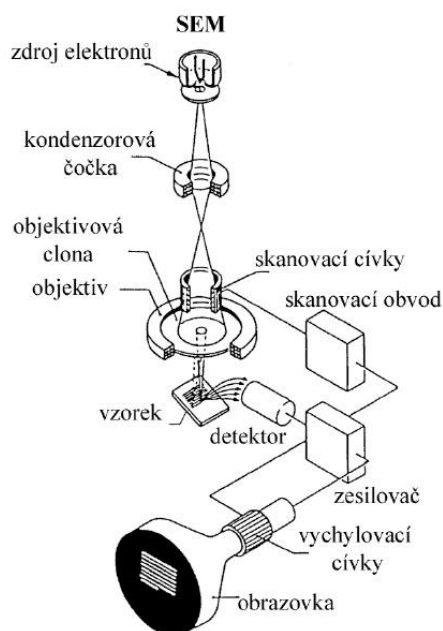
2.8 Charakterizace nanovláknenných materiálů

2.8.1 Skenovací (rastrovací) elektronový mikroskop (SEM)

Skenovací elektronový mikroskop (Obrázek 26) je jedním z nejpoužívanějších přístrojů v laboratořích pro výzkum materiálů a je běžný v různých formách ve výrobních závodech.^[42]

Při metodě SEM je elektronový paprsek usměrněn na vzorek způsobem podobným tomu, který je používán u staromódních televizorů s obrazovkami. Počet zpětně odražených elektronů nebo sekundárních elektronů generovaných paprskem, který vychází ze vzorku, závisí na lokálním složení a topografii vzorku. Odražené sekundární elektrony emitované z povrchu vzorku jsou elektronicky detekovány.^{[43], [44]}

SEM poskytuje informace týkající se topografických znaků, morfologie, rozložení fází, kompozičních rozdílů, krystalové struktury, orientace krystalů, přítomnosti a umístění elektrických defektů. Výhoda SEM spočívá v širokém rozsahu zvětšení a vynikající hloubce ostrosti.^[42]



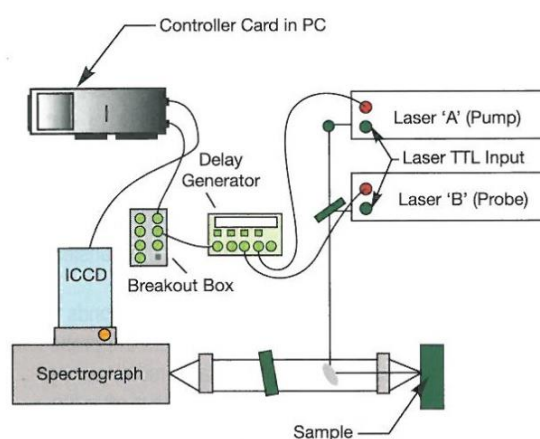
Obrázek 26: Schéma skenovacího elektronového mikroskopu ^[45]

2.8.2 Ramanova spektroskopie

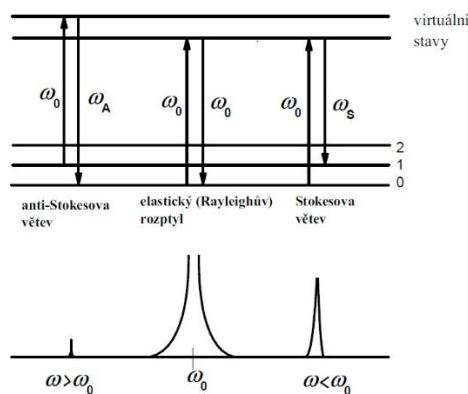
Ramanův jev je nepružný rozptyl světla na částicích (molekulách a atomech), při kterém částice přejdou do některého z kvantových stavů předáním kvanta energie. Ramanova spektroskopie představuje velmi efektivní a nedestruktivní techniku, která poskytuje informace o vibračních a rotačních přechodech v molekulách. Nachází uplatnění v mnoha

aplikacích, včetně základního výzkumu, rutinního řízení procesů a identifikace materiálů. Schéma Ramanova mikroskopu je znázorněno na Obrázku 27.

Molekula nejprve absorbuje foton budícího záření (je excitována z počátečního stavu do virtuálního energetického stavu). Při relaxaci pak molekula emituje foton a dostane se do koncového (vibračního nebo rotačního) stavu, který není totožný s počátečním energetickým stavem molekuly. Energetický rozdíl mezi počátečním a koncovým stavem vede k posunu frekvence emitovaných fotonů dále od excitační frekvence (ω_0). Pokud koncovému vibračnímu stavu přísluší vyšší (resp. nižší) hodnota energie než počátečnímu stavu, pak emitovaný foton bude posunut směrem k nižším (resp. vyšším) frekvencím. Spektrum Ramanova rozptylu se tedy skládá z dvojic čar, které jsou symetricky rozloženy vůči čáře elasticky rozptýleného záření o frekvenci ω_0 . Oblast nižších frekvencí se nazývá Stokesovou, a oblast vyšších frekvencí anti-Stokesovou větví Ramanova spektra (Obrázek 28).^[46]



Obrázek 27: Schéma Ramanova mikroskopu ^[46]



Obrázek 28: Spektrum Ramanova rozptylu [46]

Ramanova spektroskopie je výhodná, protože umožňuje rychlé a přesné změření chemického složení vzorku. Tímto způsobem se dají měřit pevné, kapalné nebo plynné vzorky a to i s minimální přípravou vzorku.^[47]

2.8.3 Obrazová analýza

Systém pro počítačovou analýzu obrazu je složen z digitalizačního zařízení a počítače, který je vybaven speciálním softwarem (např. aplikace ACC od firmy SoFo Brno nebo LUCIA od Laboratory Imaging Praha). Klíčovým krokem v celém postupu je získání kvalitního digitalizovaného obrazu předlohy (např. mikroskopického preparátu). K digitalizaci lze užít skener nebo mikroskop, který je propojen s digitální kamerou. Poté je obraz v nekomprimované podobě uložen v počítači a s pomocí výše zmíněných aplikací dále upravován a hodnocen. Klíčovým krokem analýzy obrazu je tzv. segmentace, při které jsou v obraze označeny objekty určené k hodnocení, teprve pak je možné provést měření a stanovit požadované morfometrické nebo denzitometrické vlastnosti objektů, např. plochu, obvod, délku, kulatost objektů nebo intenzitu zvolené barevné složky.

Obrazová analýza se využívá ve výzkumu živé i neživé hmoty. V biologických vědách se pomocí ní hodnotí, např. počty objektů (buněk, bakterií) ve zkoumaném vzorku, intenzita barevné reakce nebo fluorescenčního signálu při kvantitativním hodnocení průběhu metabolických reakcí. S jejím užitím se můžeme setkat i v patologii jako s pomocnou diagnostickou metodou, např. při stanovení obsahu DNA v tkáňových řezech nebo při

zjišťování morfologických vlastností buněk a tkání. V laboratoři se může uplatnit rovněž jako nástroj pro kvantifikaci výsledků elektroforetické separace.^[48]

2.8.4 Měření cytotoxicity a buněčné aktivity

Od osmdesátých let dvacátého století se používají alternativní biologické modely k minimalizaci počtu pokusných zvířat nebo k jejich úplnému nahrazení za účelem studia toxicity různých léčiv a sloučenin. Jedním z těchto modelů je buněčná kultura. Lidské a zvířecí buněčné kultury, jako biologické testovací systémy, jsou stále více využívány výzkumnými pracovníky z důvodu jejich snadné kultivace, kontrolovatelnosti a větší reprodukovatelnosti ve srovnání se systémy *in vivo*. Důležitou roli navíc hraje snižování časových a ekonomických nákladů. Hlavní výhodou kultivovaných buněk je možnost intravitálního vizuálního pozorování buněk, které zůstávají životaschopné v průběhu experimentu, za použití mikroskopu. Použití buněčných kultur umožňuje stanovit povahu biologické aktivity studovaných sloučenin přímo na buněčné úrovni.

Pojem cytotoxicita znamená výskyt patologických změn v buňkách působením fyzikálních, chemických a biologických činidel. Pro experimenty *in vitro* se běžně používají zvířecí nebo lidské buňky odebrané mimo tělo zvířete.^[49]

3. Experimentální část

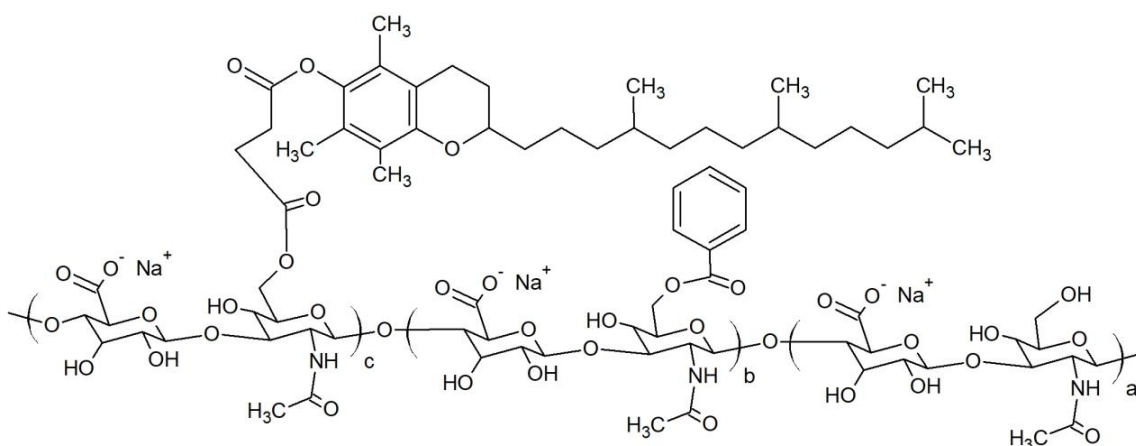
3.1 Použité chemikálie

V Tabulce 1 jsou znázorněny všechny použité látky pro přípravu roztoků pro elektrostatické zvláknění.

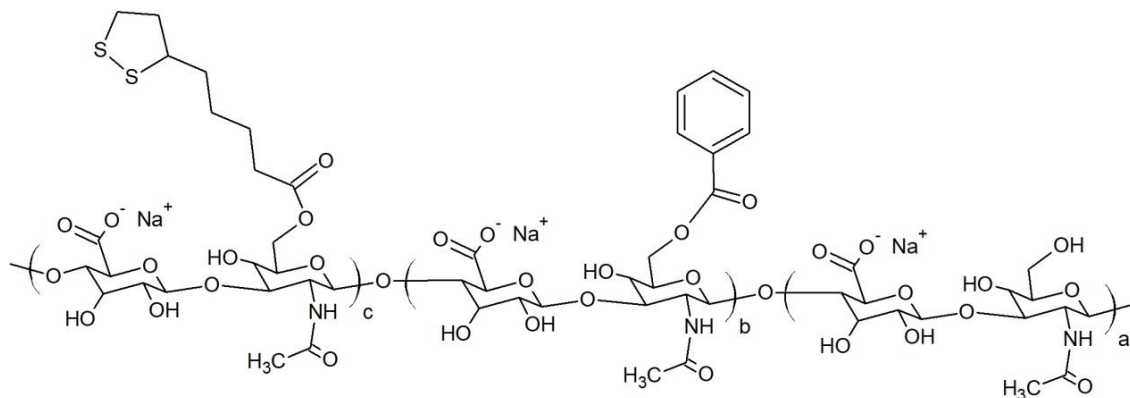
Tabulka 1: Použité chemikálie

Název	Vzorek	Vlastnosti	Výrobce
Nativní kyselina hyaluronová	$(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$	$M_w = 70-90$ kDa	Contipro, a.s.
HA-Toco		$M_w = 82$ kDa, $D_s = 2,11$ %	Contipro, a.s.
HA-Lipoic		$M_w = 84$ kDa, $D_s = 24,6$ %	Contipro, a.s.
PEO	$(-CH_2CH_2O-)_n$	$M_w = 600$ kDa	Sigma-Aldrich
IPA	C_3H_8O	100%, $M = 60,1$ g/mol, $\rho = 0,785$ g/cm ³	Contipro, a.s.
Ethanol	C_2H_5OH	96%, $M = 46,07$ g/mol, $\rho = 0,785$ g/cm ³	Lach-Ner, s.r.o.

Pod Tabulkou 1 jsou ukázané struktury HA-Toco (Obrázek 29) a HA-Lipoic (Obrázek 30).



Obrázek 29: Struktura HA-Toco



Obrázek 30: Struktura HA-Lipoic

3.2 Příprava roztoků

Pro diplomovou práci byly použity deriváty kyseliny hyaluronové s navázanou kyselinou lipoovou (HA-Lipoic), se stupněm substituce 24,6 % a s navázaným tokoferol sukcinátem (HA-Toco), se stupněm substituce 2,11 %. Z literatury je známo, že kyselina hyaluronová (HA) je samostatně obtížně zvláknitelný polymer. Z tohoto důvodu se zvláknuje ve směsi s dalšími pomocnými syntetickými polymery, nejčastěji se jedná o polyethylenoxid (PEO).

Pro prvotní experiment byl připraven roztok z nativní kyseliny hyaluronové ve směsi s pomocným polymerem PEO pro seznámení s procesem vláknění.

Dalším krokem byla navržena směs polymerů HA-Lipoic/PEO nejprve v poměru 1:1. Pro proces zvláknování je potřeba vytvořit roztok. Derivát HA-Lipoic není rozpustný ve vodě, v PEO je naopak rozpustný. Míchání probíhalo vždy do druhého dne, poté se sledovala kvalita roztoku. Jako rozpouštědlový systém byly vytipovány směsi voda/IPA a voda/etanol v různých poměrech v řadě 70/30, 50/50 a 30/70. Připravované roztoky byly nejprve s koncentrací polymerů 5 %. Tímto způsobem bylo připraveno 6 vzorků, viz Obrázek 31. Tento dílčí experiment měl prokázat rozpustnost směsi polymerů ve vytipovaných rozpouštědlových systémech a tvorbu vláken při procesu zvláknování.

Další experimentální kroky byly navrženy až na základě vyhodnocení výsledků charakterizace připravených původních 6 vzorků pomocí SEM.

Celkem bylo tedy připraveno 17 roztoků (viz Tabulka 2).

Tabulka 2: Příprava roztoků

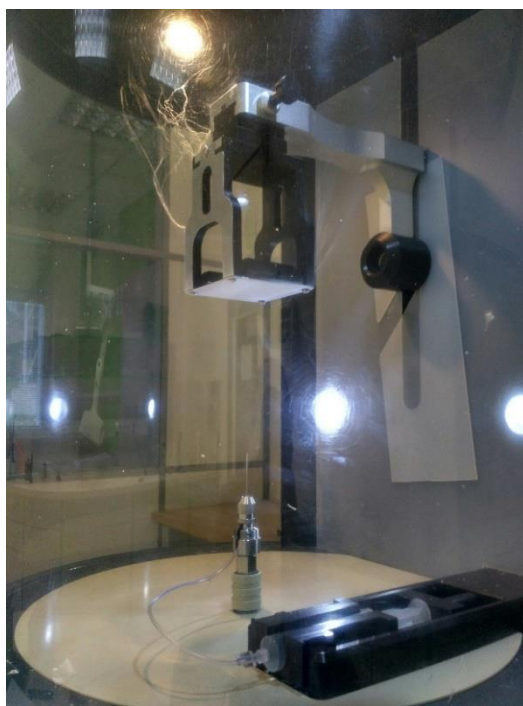
Označení roztoku	Použité polymery	Poměr polymerů (-)	Rozpouštědla	Poměr rozpouštědel (-)	Hmotnostní koncentrace (%)
1	Kyselina hyaluronová, PEO	1:1	voda	-	5
2	HA-Lipoic, PEO	1:1	Ethanol/voda	50:50	5
3	HA-Lipoic, PEO	1:1	Ethanol/voda	30:70	5
4	HA-Lipoic, PEO	1:1	Ethanol/voda	70:30	5
5	HA-Lipoic, PEO	1:1	IPA/voda	50:50	5
6	HA-Lipoic, PEO	1:1	IPA/voda	30:70	5
7	HA-Lipoic, PEO	1:1	IPA/voda	70:30	5
8	HA-Lipoic, PEO	1:1	Ethanol/voda	30:70	3
9	HA-Lipoic, PEO	1:1	Ethanol/voda	30:70	4
10	HA-Lipoic, PEO	1:1	Ethanol/voda	30:70	6
11	HA-Lipoic, PEO	1:1	Ethanol/voda	30:70	7
12	HA-Lipoic, PEO	9:1	Ethanol/voda	30:70	5
13	HA-Lipoic, PEO	8:2	Ethanol/voda	30:70	5
14	HA-Lipoic, PEO	7:3	Ethanol/voda	30:70	5
15	HA-Lipoic, PEO	6:4	Ethanol/voda	30:70	5
16	HA-Toco, PEO	9:1	Ethanol/voda	30:70	3
17	HA-Toco, PEO	1:1	Ethanol/voda	30:70	3



Obrázek 31: Připravené roztoky č. 2 – 7

3.3 Zvlákňování

Samotný zvlákňovací proces probíhal v zařízení 4SPIN[®] (Obrázek 32).



Obrázek 32: Zvlákňování v zařízení 4SPIN[®]

Připravené roztoky byly vlákněny při dvou různých vlhkostech: I) nízká vlhkost pod 15 % a II) střední vlhkost větší než 25 %. Různá vlhkost byla docílena přiváděním suchého vzduchu do depoziční komory různou rychlostí, tj. 99 l/min pro případ (I) a 6 l/min pro případ (II). Parametry vláknění jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: Parametry vláknění

	I	II
Kolektor:	K 1	K 1
Emitor:	E 1	E 1
Napětí (kV):	40	40
Dávkování (µL/min):	30	30
Substrát:	alobal	alobal
Vzdušná vlhkost (%):	<15 %	>25 %
Teplota (°C):	23-26	23-26
Vzdálenost E a K (cm):	18	18
Průměr jehly:	21	21
Doba vláknění (min):	10	10
Průtok vzduchu (L/min):	99	6

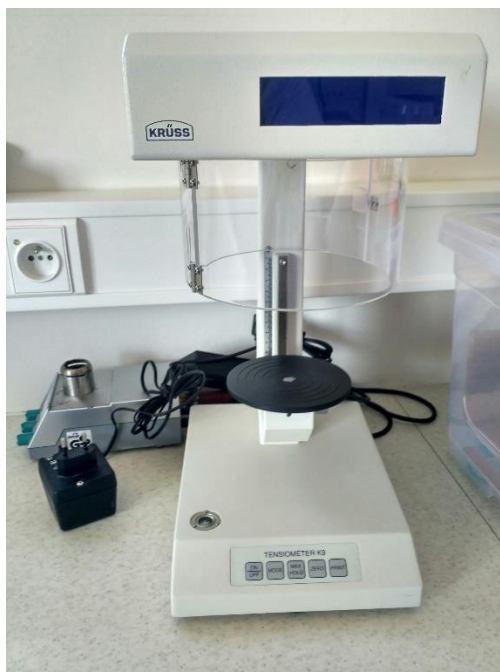
3.4 Určení roztokových parametrů

Ze všech 17 roztoků na základě vyhodnocení snímků ze SEM byly vybrány nejvhodnější roztoky (1, 12 a 17) pro další použití a pouze ty byly zpětně charakterizovány pomocí měření vodivosti, povrchového napětí a viskozity.

3.4.1 Měření povrchového napětí

Na měření povrchového napětí byl použit přístroj Tensiometer K9 (Obrázek 33). Na začátku měření se platinová destička ožihá plamenem pro odstranění nečistot a pak se zavěsí na rameno vah. V průběhu měření je destička částečně ponořena do roztoku a na ní se vytvoří

meniskus kapaliny. Meniskus na destičce vytváří sílu, která ji táhne dolů. Tato síla je zobrazena přístrojem a rovna povrchovému napětí. Každé měření trvalo 20 minut. Měření povrchového napětí se provádělo 3 - krát pro jednotlivé vzorky.



Obrázek 33: Přístroj Tensiometer K9

3.4.2 Měření vodivosti roztoků

Na měření vodivosti roztoků byl použit přístroj inoLab WTW se sondou TetraCon 325 (Obrázek 34). Připravené roztoky byly nality do kádínek. Měření probíhalo při teplotě 25 °C. Měrná elektroda byla kompletně ponořena do roztoku. Každé měření probíhalo po dobu 5 minut. Každý vybraný vzorek se měřil 3 - krát.



Obrázek 34: Přístroj inoLab WTW se sondou TetraCon 325

3.4.3 Měření viskozity

Na měření viskozity byl použit rotační reometr kužel – deska, typ AR-G2 (Obrázek 35). Před přidáním polymerního roztoku na povrch desky byl přístroj nastaven a vytemperován na požadovanou teplotu. V průběhu měření se chování vzorku sledovalo na monitoru počítače. Po ukončení měření byl vypracován graf v Excelu na základě získaných dat. Každý vybraný vzorek se měřil 3 - krát.



Obrázek 35: Rotační reometr AR-G2

3.5 Hodnocení nanovláknenných materiálů

3.5.1 SEM a obrazová analýza

Morfologie nanovláken byla pozorována pomocí skenovacího elektronového mikroskopu od firmy ZEISS a pomocí digitálního mikroskopu Keyence VHX-6000. Před analýzou metodou SEM byl povrch nanovláken pokryt vodivou vrstvou zlato/paladium (80:20) v naprašovacím přístroji Leica EM ACE 600, vodivá vrstva na povrchu preparátu umožnila co největší „zisk“ vyzářených sekundárních elektronů. Takto připravený materiál byl následně použit pro analýzu SEM.

Měření průměru nanovláken probíhalo ze snímků při 5 000x zvětšení pomocí programu ImageJ a statistické zpracování dat v programu OriginPro. Z 30 naměřených hodnot na fotce byl vypočítán průměr vláken.

Obrazová analýza sloužila pro zjišťování průměrů vrstev, velikosti pórů a různých defektů.

3.5.2 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektra v této práci byla měřena pomocí Ramanova mikroskopu inVia™ Qontor® confocal Raman microscope. Navlákněná vrstva byla sundána z alobalu, umístěna na sklo a vložena pod laser. Prášek byl nasypán do kovové nádoby. Byl použit laser o vlnové délce 532 nm. Vyhodnocení nanovláken bylo prováděno pomocí programu Origin.

3.6 Měření cytotoxicity a buněčné aktivity

Pro měření cytotoxicity byl vybrán vzorek č. 12 ve formě nanovláknů.

Stanovení cytotoxicity bylo prováděno na buňkách NIH-3T3 myších fibroblastech v modifikovaném Dulbecco Eagleově médiu (DMEM). Testování probíhalo při teplotě 37 °C pro koncentrace 10, 100, 500 a 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Vzorky byly měřené v triplicátu. Bunečná viabilita (životnost) byla stanovena pomocí MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-tetrazoliumbromidu) testu po 24, 48 a 72 hodinách. Výsledky poskytlo biologické oddělení firmy Contipro.

4. Výsledky a diskuze

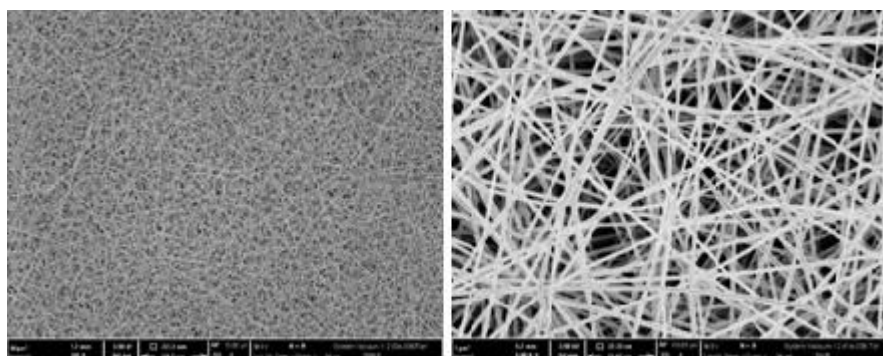
4.1 Charakterizace morfologie nanovlákněných vrstev

Celkem bylo připraveno 16 roztoků kyseliny hyaluronové s různými antioxidanty a jeden roztok samotné HA, který byl použit jako určitý standard pro hodnocení kvality zvláknění a dalších charakteristik roztoků a vláken. Jako antioxidanty byly použity kyselina lipová a tokoferol sukcinát. Jednotlivé roztoky se dále lišily poměry polymerů, použitými rozpouštědly, jejich poměry a hmotnostní koncentrací. Tři roztoky nebyly, z důvodu rozpuštění či zatuhnutí, zvlákněny (vzorky č. 7, 11 a 16). Zvlákněné vzorky byly dále charakterizovány pomocí SEM, obrazové analýzy a Ramanovy spektroskopie.

4.1.1 SEM

4.1.1.1 Nanovláknna s obsahem nativní kyseliny hyaluronové

Prvním krokem v experimentální části byla příprava nanovlákněných vrstev z nativní kyseliny hyaluronové ve směsi s pomocným polymerem PEO. V tomto případě se jedná pouze o seznámení se s procesem vláknění HA a získání vláken pro srovnání s dalšími výsledky. Roztokové parametry a procesní podmínky byly obdrženy z interních zpráv firmy Contipro. Z důvodu toho, že samotná kyselina hyaluronová při střední vlhkosti (II) se nevlákní, vláknění probíhalo jen při nízké vlhkosti (I). Na Obrázku 36 je znázorněna morfologie vláken získaná pomocí měření SEM.



Obrázek 36: Snímky nanovláčkové struktury ze SEM nativní kyseliny hyaluronové (vzorek č. 1), (I – nízká vlhkost)

Vlevo (zvětšení 500x), vpravo (zvětšení 5 000x).

Roztokové parametry: rozpouštědlo – voda, kyselina hyaluronová: PEO (1:1) – 5%.

Vyhodnocení průměrů vláken shrnuje Tabulka 4.

Tabulka 4: Průměry vláken (vzorek č. 1), (I – nízká vlhkost)

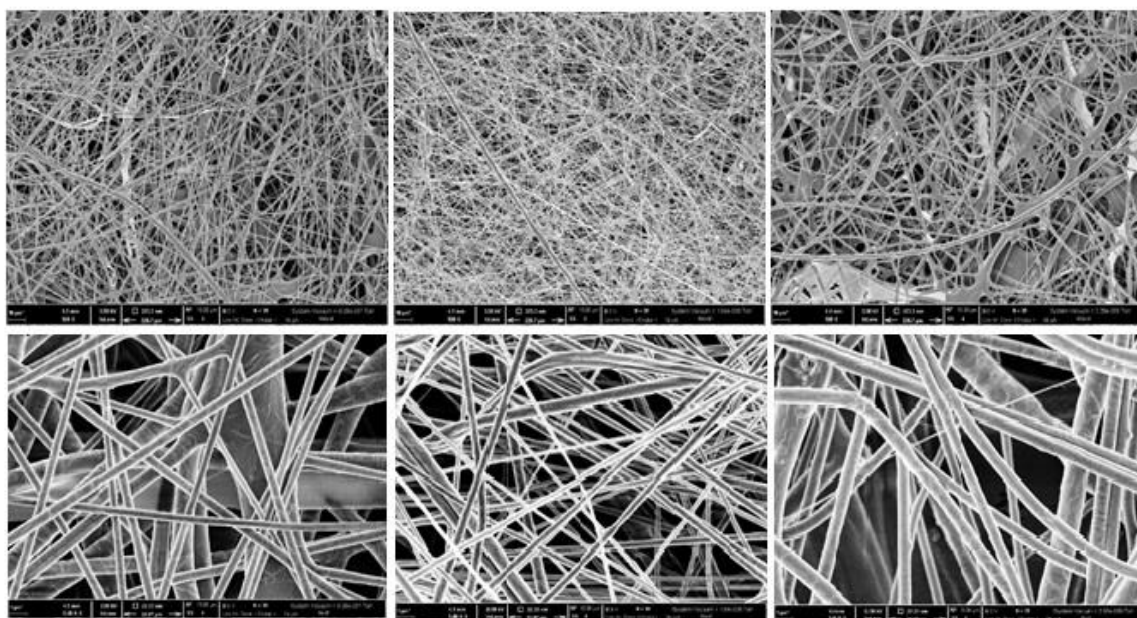
Číslo vzorku	voda, kyselina hyaluronová: PEO (1:1) – 5%
1	(230 ± 18) nm

Roztok samotné kyseliny hyaluronové, jeho zvláknění a následná charakterizace byla provedena z důvodu porovnání s ostatními připravenými roztoky derivátů HA a v neposlední řadě také z důvodu seznámení s procesem zvláknění na přístroji 4SPIN® na známém roztoku.

4.1.1.2 Nanovláknna s obsahem derivátu HA-Lipoic

a) Vliv typu a poměru rozpouštědel

První část výsledků ukazuje vliv použitého rozpouštědlového systému na morfologii nanovláknenných vrstev. Vzorky č. 2 až 4 (Obrázek 37) jsou připraveny v rozpouštědlech ethanol/voda v různých poměrech a vzorky č. 5 až 6 (Obrázek 38) jsou připraveny v systému rozpouštědel IPA/voda. Roztok s poměrem IPA/voda 70:30 (vzorek č. 7) nebyl rozpuštěn.

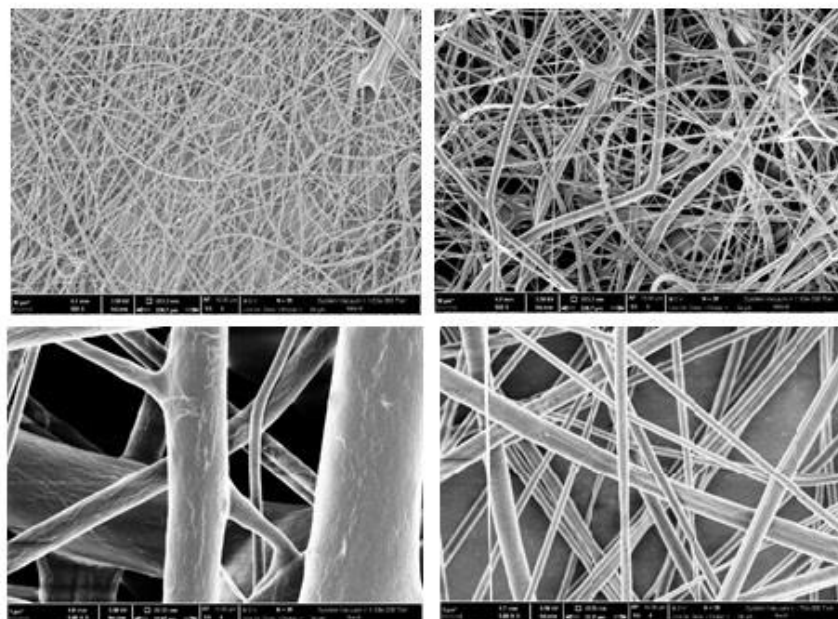


Obrázek 37: Snímky nanovláknenné struktury ze SEM při různém poměru rozpouštědel ethanol/voda (vzorky č. 2, 3 a 4), (I – nízká vlhkost)

Horní řada (zvětšení 500x): 50:50 vlevo, 30:70 uprostřed a 70:30 vpravo.

Dolní řada (zvětšení 5 000x): 50:50 vlevo, 30:70 uprostřed a 70:30 vpravo.

Ostatní roztokové parametry jsou zachovány stejné: HA-Lipoic/PEO 1:1, celkově 5 % roztok.



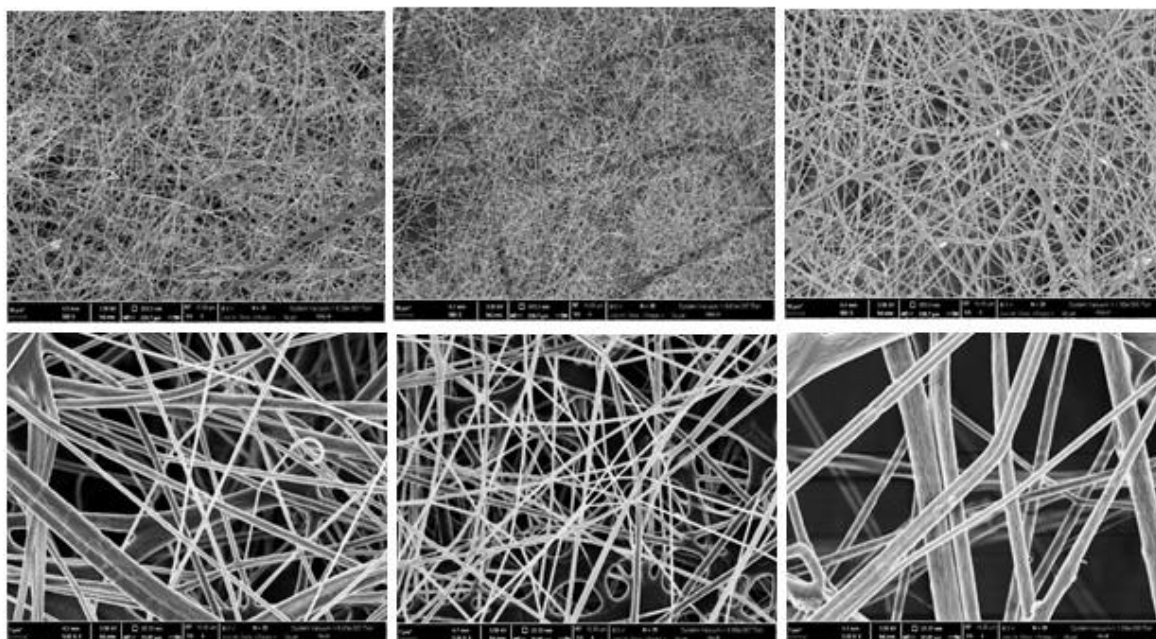
Obrázek 38: Snímky nanovlákněné struktury ze SEM při různém poměru rozpouštědel IPA/voda (vzorky č. 5 a 6), (I – nízká vlhkost)

Horní řada (zvětšení 500x): 50:50 vlevo, 30:70 vpravo.

Dolní řada (zvětšení 5 000x): 50:50 vlevo, 30:70 vpravo.

Ostatní roztokové parametry jsou zachovány stejné: HA-Lipoic/PEO 1:1, celkově 5 % roztok.

Ze stejných roztoků jako byly připraveny vzorky č. 2 - 6 jsou navlákněny vrstvy na Obrázcích 39 a 40, které byly připraveny za stejných podmínek, pouze vlhkost prostředí byla vyšší (nad 25 %).

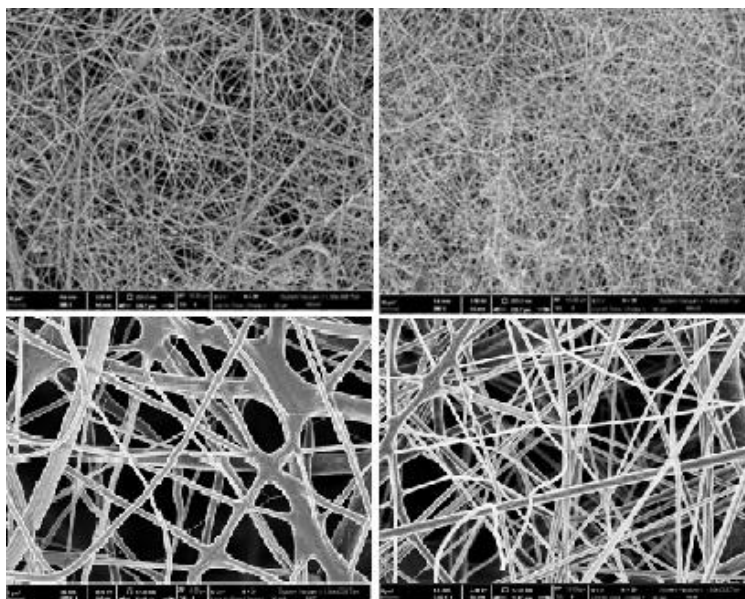


Obrázek 39: Snímky nanovláknenné struktury ze SEM při různém poměru rozpouštědel ethanol/voda (vzorky č. 2, 3 a 4), (II – střední vlhkost)

Horní řada (zvětšení 500x): 50:50 vlevo, 30:70 uprostřed a 70:30 vpravo.

Dolní řada (zvětšení 5 000x): 50:50 vlevo, 30:70 uprostřed a 70:30 vpravo.

Ostatní roztokové parametry jsou zachovány stejné: HA-Lipoic/PEO 1:1, celkově 5 % roztok.



Obrázek 40: Snímky nanovláknenné struktury ze SEM při různém poměru rozpouštědel IPA/voda (vzorky č. 5 a 6), (II – střední vlhkost)

Horní řada (zvětšení 500x): 50:50 vlevo, 30:70 vpravo.

Dolní řada (zvětšení 5 000x): 50:50 vlevo, 30:70 vpravo.

Ostatní roztokové parametry jsou zachovány stejné: HA-Lipoic/PEO 1:1, celkově 5 % roztok.

Nejvýhodnější systém a poměr rozpouštědel pro zvláknování byl vybrán na základě vyhodnocení snímků nanovláken ze SEM. Předpokládáme, že nejlepšího rozpuštění směsi polymerů a nejlepšího procesu zvláknování je dosaženo v případě, že pozorujeme:

- morfologie vláken je bez defektů,
- průměrů vláken dosahuje nejmenších hodnot,
- rozptyl průměrů vláken dosahuje nejmenších hodnot.

Vyhodnocení průměrů vláken shrnuje Tabulka 5 (nízká vlhkost) a Tabulka 6 (střední vlhkost).

Tabulka 5: Průměry vláken (vzorky č. 2 – 7), (I – nízká vlhkost)

Číslo vzorku	Poměr rozpouštědel	Ethanol/voda, (5 %) HA-Lipoic, PEO (1:1)
2	50:50	(610 ± 29) nm
3	30:70	(400 ± 31) nm
4	70:30	(850 ± 41) nm
Číslo vzorku	Poměr rozpouštědel	IPA/voda, (5 %) HA-Lipoic, PEO (1:1)
5	50:50	(1760 ± 78) nm
6	30:70	(620 ± 42) nm
7	70:30	roztok nebyl rozpuštěn

Tabulka 6: Průměry vláken (vzorky č. 2 – 7), (II – střední vlhkost)

Číslo vzorku	Poměr rozpouštědel	Ethanol/voda, (5 %) HA-Lipoic, PEO (1:1)
2	50:50	(380 ± 62) nm
3	30:70	(260 ± 43) nm
4	70:30	(810 ± 41) nm
Číslo vzorku	Poměr rozpouštědel	IPA/voda, (5 %) HA-Lipoic, PEO (1:1)
5	50:50	(470 ± 57) nm
6	30:70	(300 ± 46) nm
7	70:30	roztok nebyl rozpuštěn

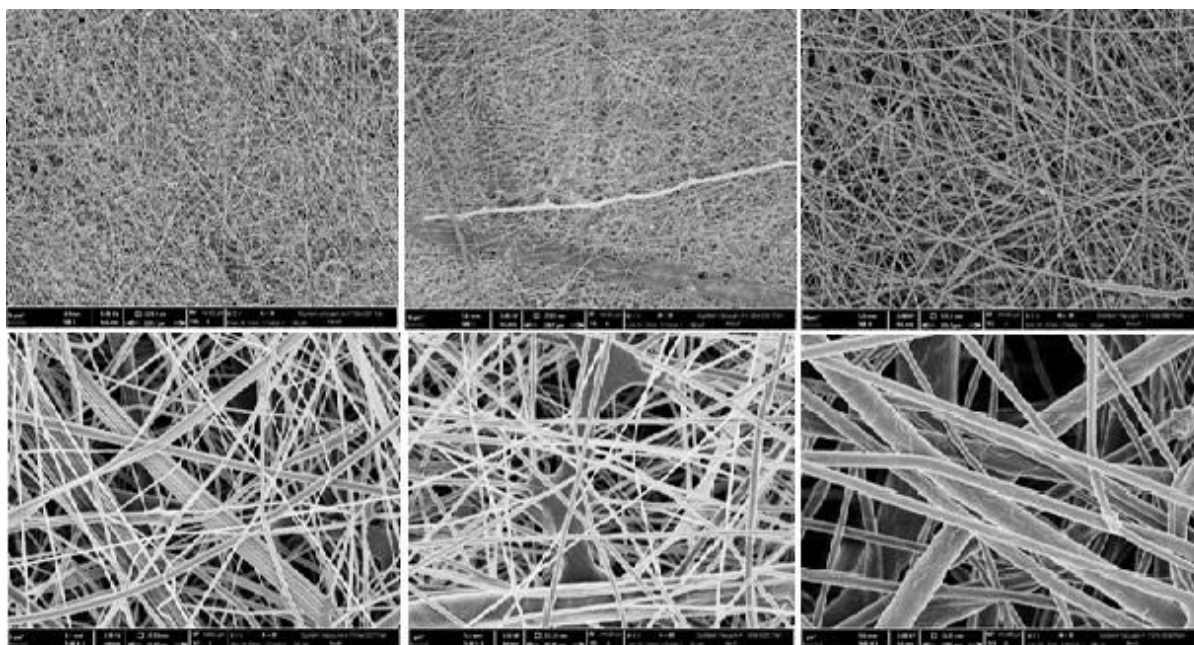
Porovnáním snímků viz Obrázky 37 - 40 lze usoudit, že vláknění probíhá s lepšími výsledky morfologie při malé vlhkosti (I) v depoziční komoře. Při střední vlhkosti (II) jsou ve struktuře patrné defekty v podobě slitých vláken do fólií, např. Obrázek 40 (dolní řada).

Při porovnání hodnot z Tabulek 5 a 6 lze usoudit, že více vyhovujícím systémem pro rozpouštění je směs kapalin ethanol/voda v poměru 30/70. Důvodem jsou nejnižší hodnoty průměrů vláken a zároveň nejmenší směrodatné odchylky (číslo vzorku 3). Dále je z tabulky patrné, že nižší průměry vláken byly získány při střední vlhkosti pro stejné typy vzorků.

U vzorků 2 až 7 byla koncentrace roztoku 5 % vytipována jako počáteční hodnota, proto bylo dále ověřeno, zda nebude pro tvorbu nanovláken výhodnější jiná koncentrace. Koncentrační řada byla doplněna o koncentrace v hodnotách 3, 4, 6 a 7 %. Rozpouštědlový systém ethanol/voda v poměru 30/70 byl nadále zachován.

b) Vliv koncentrace polymer v roztoku

V první části byl vybrán nejvhodnější rozpouštědlový systém na základě vyhodnocení výsledků morfologie vláken připravených z roztoků o vytipované koncentraci 5 %. V dalším kroku se stejným způsobem studuje vliv koncentrace polymerů v roztoku ve zvolené řadě od 3 do 7 % (Obrázky 41 a 42). V tomto případě je snahou vytvořit nanovlákná s dostatečně kvalitní morfologií z roztoku s co největší koncentrací, protože vyšší koncentrace roztoku vede k rychlejší produkci nanovláknenných vrstev. Roztok s koncentrací polymerů 7 % (vzorek č. 11) zatuhl.

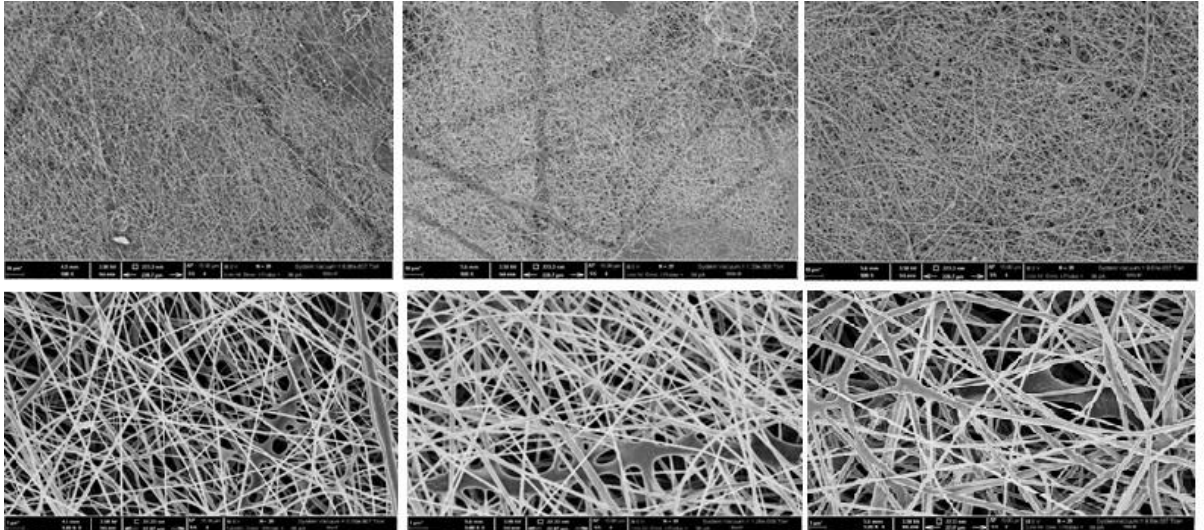


Obrázek 41: Snímky nanovláknenné struktury ze SEM při různých koncentracích roztoků (vzorky č. 8, 9 a 10), (I – nízká vlhkost)

Horní řada (zvětšení 500x): 3 % vlevo, 4 % uprostřed a 6 % vpravo.

Dolní řada (zvětšení 5 000x): 3 % vlevo, 4 % uprostřed a 6 % vpravo.

Ostatní roztokové parametry jsou zachovány stejné: HA-Lipoic/PEO 1:1, ethanol/voda 30/70.



Obrázek 42: Snímky nanovlákněné struktury ze SEM při různých koncentracích roztoků (vzorky č. 8, 9 a 10), (II – střední vlhkost)

Horní řada (zvětšení 500x): 3 % vlevo, 4 % uprostřed a 6 % vpravo.

Dolní řada (zvětšení 5 000x): 3 % vlevo, 4 % uprostřed a 6 % vpravo.

Ostatní roztokové parametry jsou zachovány stejné: HA-Lipoic/PEO 1:1, ethanol/voda 30/70.

Vyhodnocení průměrů vláken shrnuje Tabulka 7 (nízká vlhkost) a Tabulka 8 (střední vlhkost).

Tabulka 7: Průměry vláken (vzorky č. 8 – 11), (I – nízká vlhkost)

Číslo vzorku	Koncentrace roztoků	Ethanol/voda 30:70 HA-Lipoic, PEO (1:1)
8	3%	(280 ± 48) nm
9	4%	(380 ± 70) nm
10	6%	(750 ± 50) nm
11	7%	zatuhl

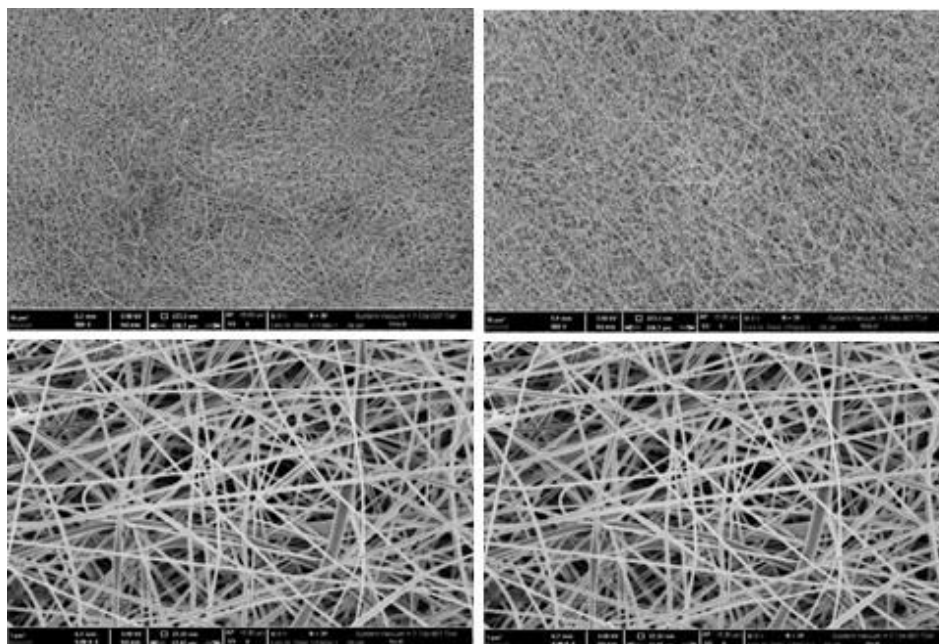
Tabulka 8: Průměry vláken (vzorky č. 8 – 11), (II – střední vlhkost)

Číslo vzorku	Koncentrace roztoků	Ethanol/voda 30:70, HA-Lipoic, PEO (1:1)
8	3%	(270 ± 54) nm
9	4%	(290 ± 57) nm
10	6%	(340 ± 43) nm
11	7%	zatuhl

Roztok (5 %) měl menší průměr vláken (260 ± 43) nm než 3 %, 4 %, 6 % a 7 % roztoky viz Tabulky 6 a 8. Protože původní 5 % roztok vytvářel vlákna s nejmenším průměrem než ostatní koncentrace mezi 3 a 7 %, byla právě 5 % koncentrace určena jako optimální hodnota.

c) Vliv poměru směsi vlákněných polymerů

Dále nás zajímalo, zda lze navýšit obsah derivátu kyseliny hyaluronové v poměru vůči pomocnému polymeru (PEO) ve vlákněném roztoku tak, že se vlákna budou stále vytvářet stabilním procesem a budou bez morfologických defektů. Byl tedy připraven roztok s optimálním složením rozpouštědlového systému kapalin ethanol/voda v poměru 30:70 (viz 4.1.1 bod a) a s optimální koncentrací 5 % (viz 4.1.1 bod b). Nyní je studovanou změnou v roztoku pouze poměr polymerů HA-Lipoic/PEO, který byl v jednotlivých vzorcích následující: 9:1 (vzorek č. 12), 8:2 (vzorek č. 13), 7:3 (vzorek č. 14) a 6:4 (vzorek č. 15) (Obrázky 43 - 46).

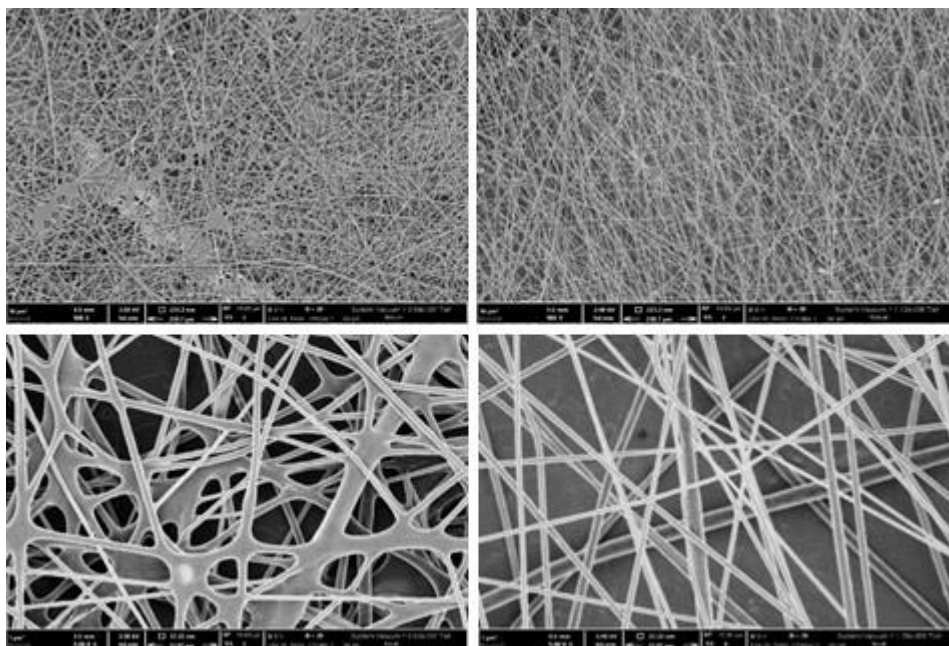


Obrázek 43: Snímky nanovláknenné struktury ze SEM při různých poměrech polymerů HA-Lipoic/PEO (vzorky č. 12 a 13), (I – nízká vlhkost)

Horní řada (zvětšení 500x): 9:1 vlevo, 8:2 vpravo.

Dolní řada (zvětšení 5 000x): 9:1 vlevo, 8:2 vpravo.

Ostatní roztokové parametry jsou zachovány stejné: ethanol/voda 30/70, celkově 5 % roztok.

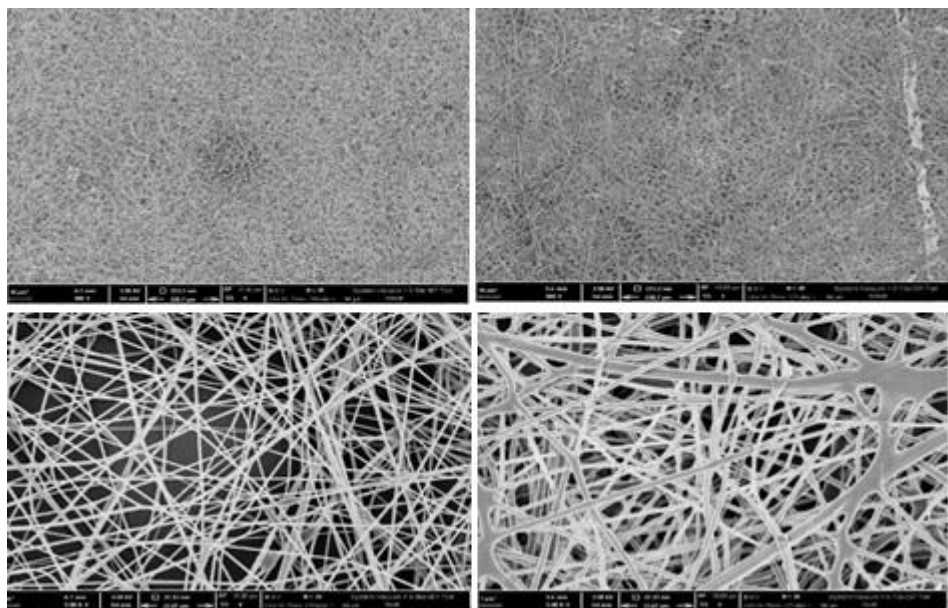


Obrázek 44: Snímky nanovláknenné struktury ze SEM při různých poměrech polymerů HA-Lipoic/PEO (vzorky č. 14 a 15), (I – nízká vlhkost)

Horní řada (zvětšení 500x): 7:3 vlevo, 6:4 vpravo.

Dolní řada (zvětšení 5 000x): 7:3 vlevo, 6:4 vpravo.

Ostatní roztokové parametry jsou zachovány stejné: ethanol/voda 30/70, celkově 5 % roztok.

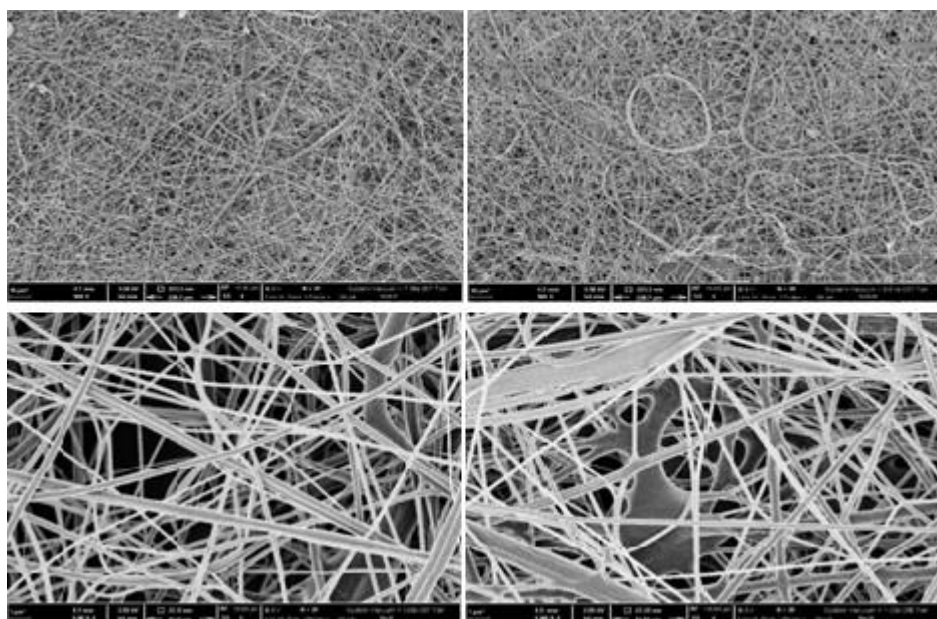


Obrázek 45: Snímky nanovláknenné struktury ze SEM při různých poměrech polymerů HA-Lipoic/PEO (vzorky č. 12 a 13), (II – střední vlhkost)

Horní řada (zvětšení 500x): 9:1 vlevo, 8:2 vpravo.

Dolní řada (zvětšení 5 000x): 9:1 vlevo, 8:2 vpravo.

Ostatní roztokové parametry jsou zachovány stejné: ethanol/voda 30/70, celkově 5 % roztok.



Obrázek 46: Snímky nanovláknenné struktury ze SEM při různých poměrech polymerů HA-Lipoic/PEO (vzorky č. 14 a 15), (II – střední vlhkost)

Horní řada (zvětšení 500x): 7:3 vlevo, 6:4 vpravo.

Dolní řada (zvětšení 5 000x): 7:3 vlevo, 6:4 vpravo.

Ostatní roztokové parametry jsou zachovány stejné: ethanol/voda 30/70, celkově 5 % roztok.

Vyhodnocení průměrů vláken shrnuje Tabulka 9 (nízká vlhkost) a Tabulka 10 (střední vlhkost).

Tabulka 9: Průměry vláken (vzorky č. 12 – 15), (I – nízká vlhkost)

Číslo vzorku	Poměr polymerů HA-Lipoic, PEO	Ethanol/voda 30:70, (5 %) HA-Lipoic, PEO
12	9:1	(220 ± 27) nm
13	8:2	(190 ± 24) nm
14	7:3	(370 ± 38) nm
15	6:4	(380 ± 27) nm

Tabulka 10: Průměry vláken (vzorky č. 12 – 15), (II – střední vlhkost)

Číslo vzorku	Poměr polymerů HA-Lipoic/PEO	Ethanol/voda 30:70, (5 %) HA-Lipoic, PEO
12	9:1	(180 ± 33) nm
13	8:2	(390 ± 45) nm
14	7:3	(290 ± 61) nm
15	6:4	(380 ± 42) nm

Z vyhodnocených výsledků z Tabulek 9 a 10 je patrné, že vzorky se zastoupením polymerů 9:1 a 8:2 mají dost podobné průměry vláken (220 ± 27) nm a (190 ± 24) nm. Pokud se podíváme na stejné vzorky, které byly zvláknované při různé vlhkosti (I) a (II) je jasné, že vzorek se zastoupením polymerů 9:1 je nejlepší (180 ± 33) nm, neboť byly získány vlákna o nejmenším průměru. Na základě měření při nízké vlhkosti byly vytipovány jako nejvhodnější vzorky 12 a 13, ale při měření při střední vlhkosti se zcela jasně jevil lépe vzorek č. 12. Z porovnání vzorku č. 12 při nízké vlhkosti se samotnou HA vyplývá podobný průměr vláken (230 ± 18) nm.

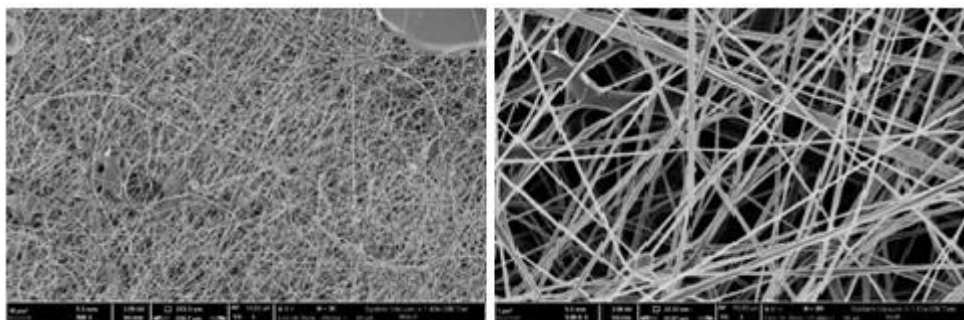
Studiem vlivu rozpouštědlového systému, vlivu koncentrace polymerů a jejich poměrů na morfologii nanovlákných vrstev připravených při nízké a střední vlhkosti byl jako optimální vytipován roztok a podmínky shodné se vzorkem č. 12.

4.1.1.3 Nanovlákná s obsahem derivátu HA-Toco

Pro porovnání postupu přípravy nanovlákných vrstev s obsahem derivátu HA-Lipoic jsme vybrali další derivát s navázaným antioxidantem. V tomto případě se jedná o derivát s nízkým stupněm substituce 2,1 % HA-Toco. Cílem tohoto experimentu bylo ověřit, zda je možné při stejných podmínkách zvláknit jiný derivát bez optimalizace složení zvláknovaného roztoku.

Roztok s polymery v poměru 1:1 byl vytipován jako výchozí parametr, se kterým lze srovnávat další výsledky. Další roztok s poměrem polymerů 9:1 byl připraven na zkoušku, na základě dobrých zkušeností s roztokem HA-Lipoic ve stejném poměru k PEO. V obou případech bylo očekáváno, že roztoky se budou při procesu vláknění chovat odlišně. Nicméně roztok HA-Toco (5 %) v poměru 9:1 zatuhl a nebylo možné ho zvláknit. Z tohoto důvodu byl

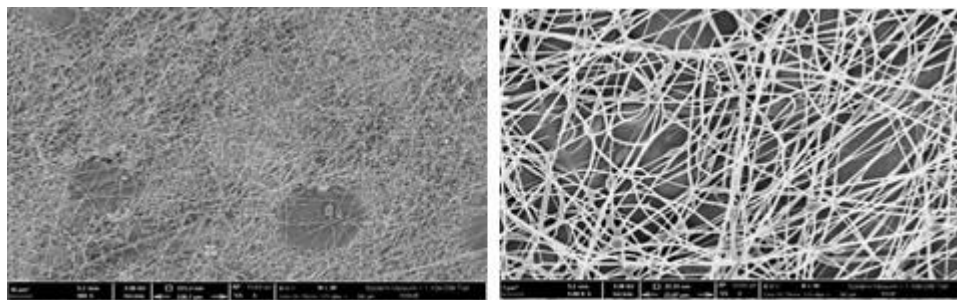
dále roztok naředěn na 3 %, který ovšem také zatuhl, proto pro měření byl k dispozici pouze jeden roztok v poměru 1:1 (Obrázky 47 a 48). Pro dosažení optimálního složení roztoku s HA-Toco pro zvláknění bude nutné provést optimalizaci obdobným postupem jako v případě HA-Lipoic (mimo rámec této práce).



Obrázek 47: Snímky nanovláknenné struktury ze SEM HA-Toco (vzorek č. 17), (I – nízká vlhkost)

Horní řada: vlevo (zvětšení 500x), vpravo (zvětšení 5 000x).

Roztokové parametry: Ethano/voda (30:70), HA-Toco: PEO (1:1) – 3 %.



Obrázek 48: Snímky nanovláknenné struktury ze SEM HA-Toco (vzorek č. 17), (II – střední vlhkost)

Horní řada: vlevo (zvětšení 500x), vpravo (zvětšení 5 000x).

Roztokové parametry: Ethano/voda (30:70), HA-Toco: PEO (1:1) – 3 %.

Vyhodnocení průměrů vláken shrnuje Tabulka 11 (nízká vlhkost) a Tabulka 12 (střední vlhkost).

Tabulka 11: Průměry vláken (vzorky č. 16 a 17), (I – nízká vlhkost)

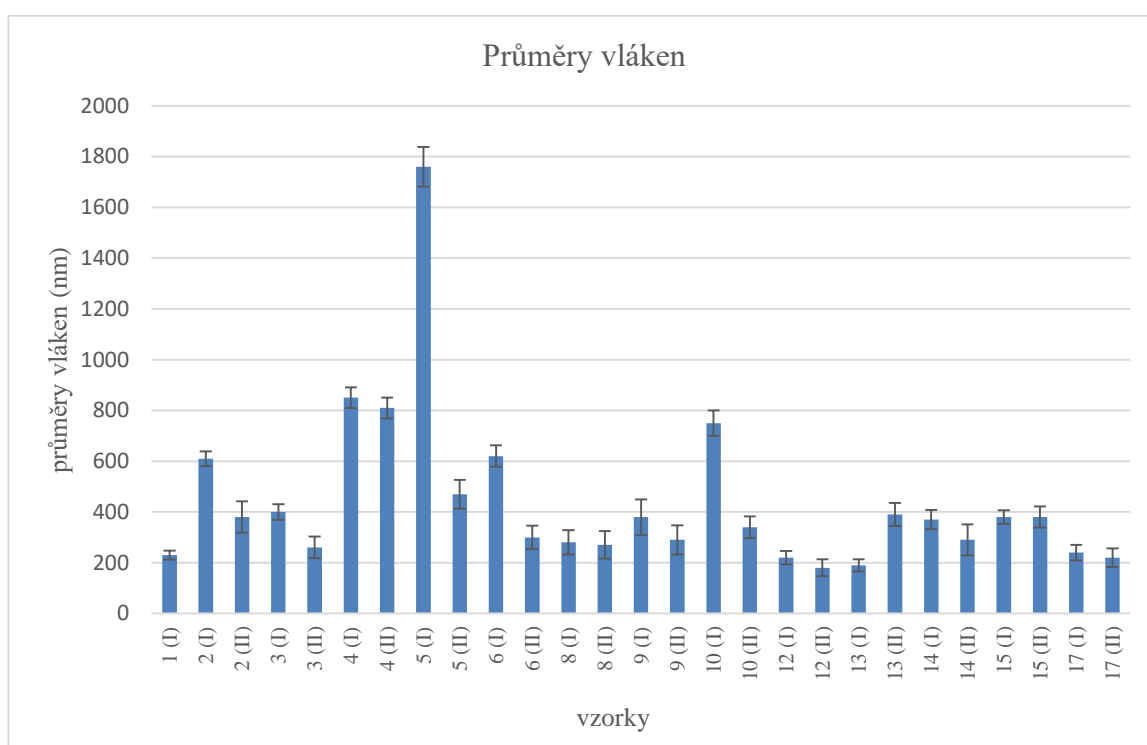
Číslo vzorku	Poměr polymerů HA-Toco/PEO	Ethanol/voda (30:70) (3 %) HA-Toco, PEO
16	9:1	zatuhl
17	1:1	(240 ± 31) nm

Tabulka 12: Průměry vláken (vzorky č. 16 a 17), (II – střední vlhkost)

Číslo vzorku	Poměr polymerů HA-Toco/PEO	Ethanol/voda (30:70) (3%) HA-Toco, PEO
16	9:1	zatuhl
17	1:1	(220 ± 37) nm

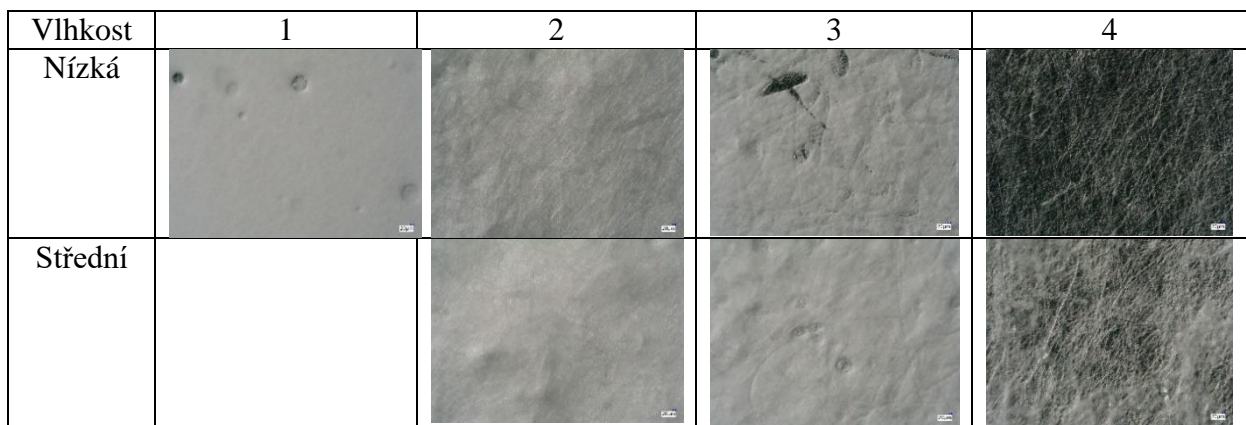
Nanovlákná s obsahem derivátu HA-Toco se podařilo připravit za obdobných podmínek jako derivát HA-Lipoic, avšak depoziční proces nebyl stabilní a vrstvy zahrnovaly morfologické defekty. Pro dosažení lepších výsledků by musel být proces přípravy optimalizován ve stejných krocích, jako tomu bylo v případě derivátu HA-Lipoic. Z porovnání vzorku č. 17 při nízké vlhkosti se samotnou HA vyplývá podobný průměr vláken (230 ± 18) nm. V Grafu 1 jsou shrnuty všechny průměry vláken (vzorky č. 1 – 17 s výjimkou vzorků č. 7, 11 a 16) při vlhkosti I a II, které byly získané v rámci této práce. Grafická závislost potvrzuje již výše diskutované závěry.

Graf 1: Porovnání průměrů vláken

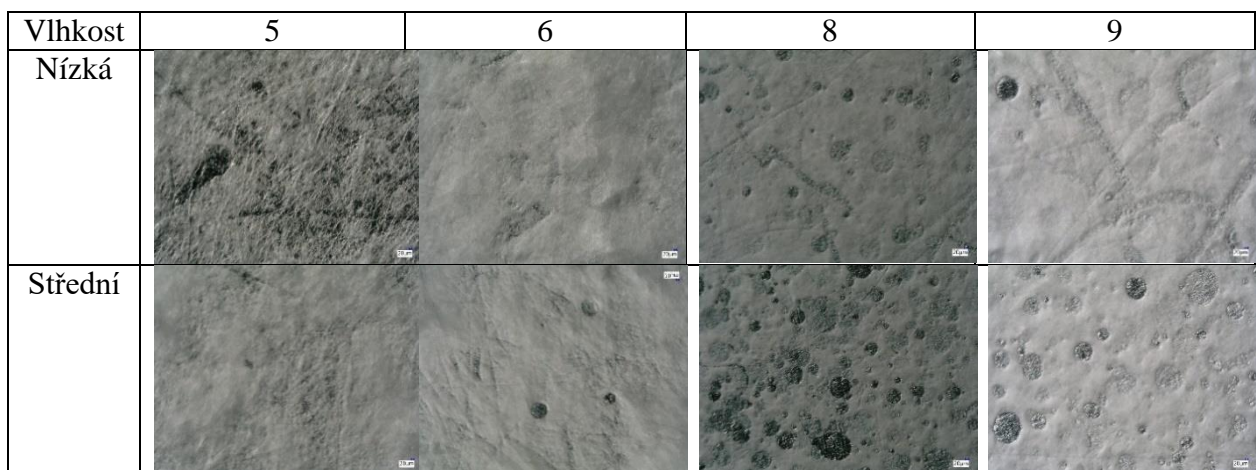


4.1.2 Obrazová analýza

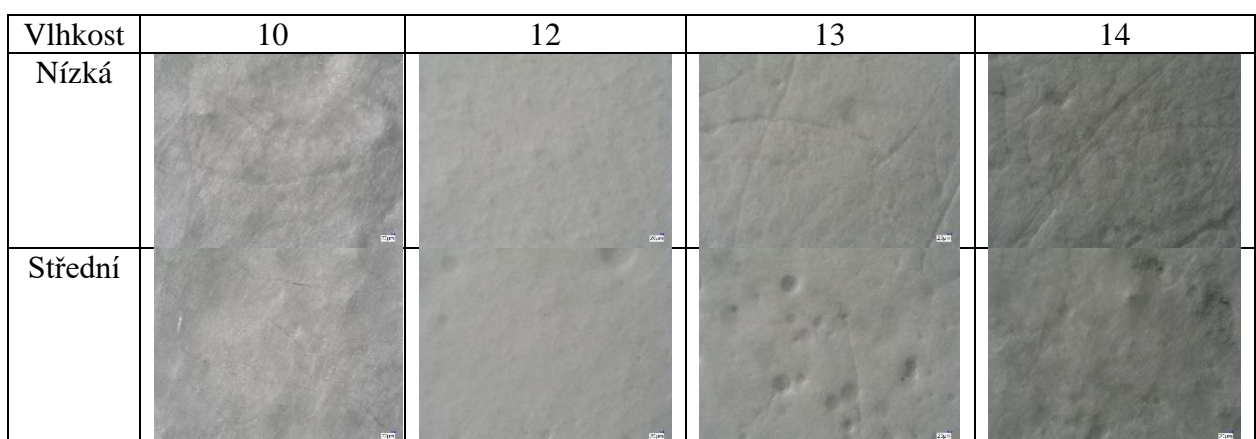
Byla provedena obrazová analýza, při 200x zvětšení, která sloužila pro zjišťování morfologie nanovláken. Tři vzorky nebyly hodnoceny, z důvodu nerozpuštění či zatuhnutí jejich roztoků (vzorky č. 7, 11 a 16). Výsledky této analýzy jsou uvedené na Obrazcích 49 - 52.



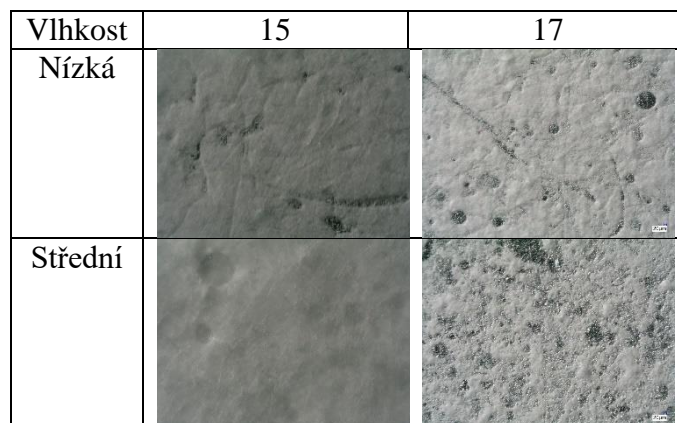
Obrázek 49: Morfologie nanovláken (vzorky č. 1 - 4)



Obrázek 50: Morfologie nanovláken (vzorky č. 5 - 6)



Obrázek 51: Morfologie nanovláken (vzorky č. 10 - 14)

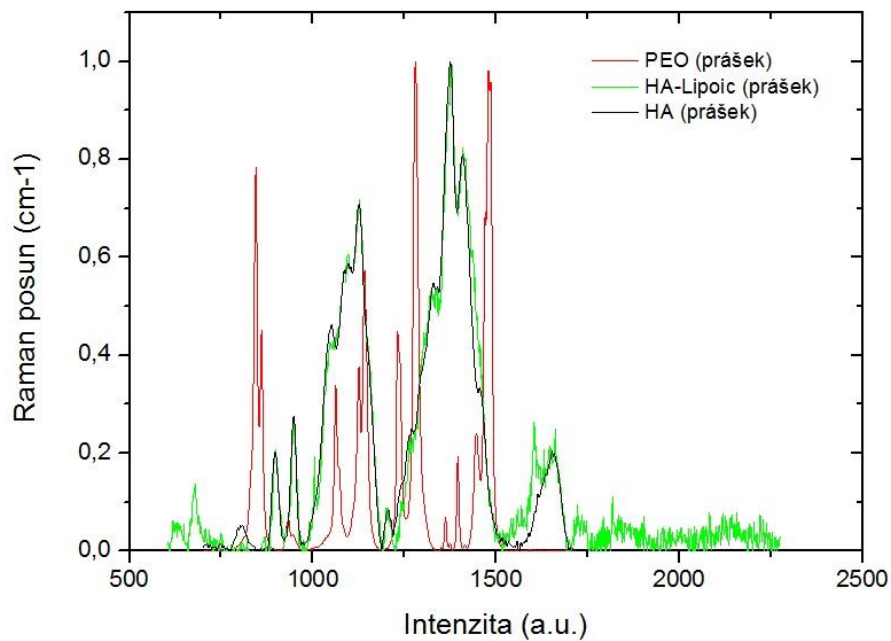


Obrázek 52: Morfologie nanovláken (vzorky č. 15 a 17)

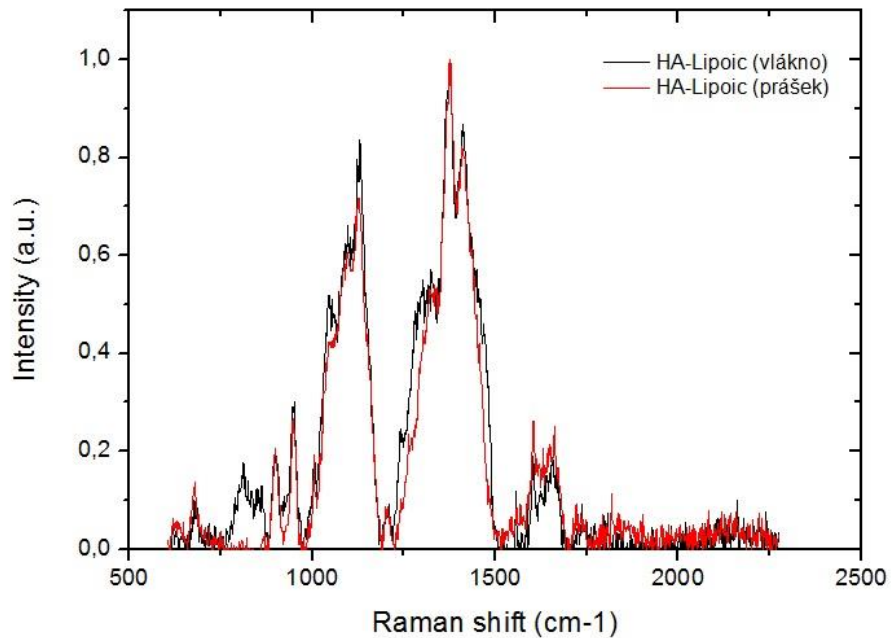
Při vyhodnocení morfologie vláken na Obrázcích 49 - 52 je patrně vidět, že některé vzorky mají různé defekty, a to bylo následkem různých faktorů, např. při elektrostatickém zvlákňování část roztoku v elektrickém poli se neodpařilo a na povrchu vrstvy vznikly „krátery“ (vzorky č. 8, 9 a 17). U vzorku 4 je vidět černé pozadí a to je substrát (alobal). Vzorek 12 měl hladký, skoro bezdefektní povrch vrstvy a ten samý vzorek měl nejmenší průměr vláken.

4.1.3 Ramanova spektroskopie

Toto měření bylo provedeno na vybraném vzorku č. 12 (ve formě prášku a vlákna) a na vstupních surovinách v práškové formě (HA a PEO). Výsledné grafy na obrázcích 53 a 54 porovnávají spektra vstupních materiálů použitých pro přípravu roztoků a porovnávají spektra v práškové a nanovláčenné formě derivátu HA-Lipoic. Z naměřených spekter je nejprve odstraněno pozadí a poté jsou spektra pro přehlednost normována (v programu OriginPro).



Obrázek 53: Porovnání Ramanových spekter HA-Lipoic (prášek) s práškem PEO a s práškem HA



Obrázek 54: Porovnání Ramanových spekter HA-Lipoic (vlákno a prášek)

První Obrázek 53 je graf, který porovnává spektra výchozího derivátu HA-Lipoic s PEO a HA v práškové formě. Z obrázku vyplývá, že vzorky HA a HA-Lipoic mají poměrně podobná spektra, což je dáno relativně nízkým stupněm substituce derivátu kyseliny hyaluronové. Nejvýraznější pás ve spektru v okolí 1375 cm^{-1} odpovídá vibračním vazeb CH_3 skupin, druhý v okolí 1130 cm^{-1} pak COH a CH.^[50] Nejvýraznější pásy ve spektrech prášku PEO jsou v okolí 1280 cm^{-1} a 1480 cm^{-1} odpovídající CH_2 skupinám.

Na dalším obrázku č. 54 je graf, který porovnává spektra výchozího derivátu HA-Lipoic a připravených nanovláken obsahující příměs PEO (poměr polymerů 9:1). Výrazný pás v okolí 1375 cm^{-1} je vlivem příměsi viditelně rozšířen, u nanovláknenné formy se dále objevuje pás v okolí 850 cm^{-1} , jež je výrazným u samotného prášku PEO. Avšak důležité je, že spektrum připravené nanovláknenné formy se vzhledem k výchozí práškové formě derivátu HA-Lipoic změnilo pouze v oblastech charakterizující známou příměs polymeru PEO.

4.2 Charakterizace vybraných roztoků pro zvlákňování

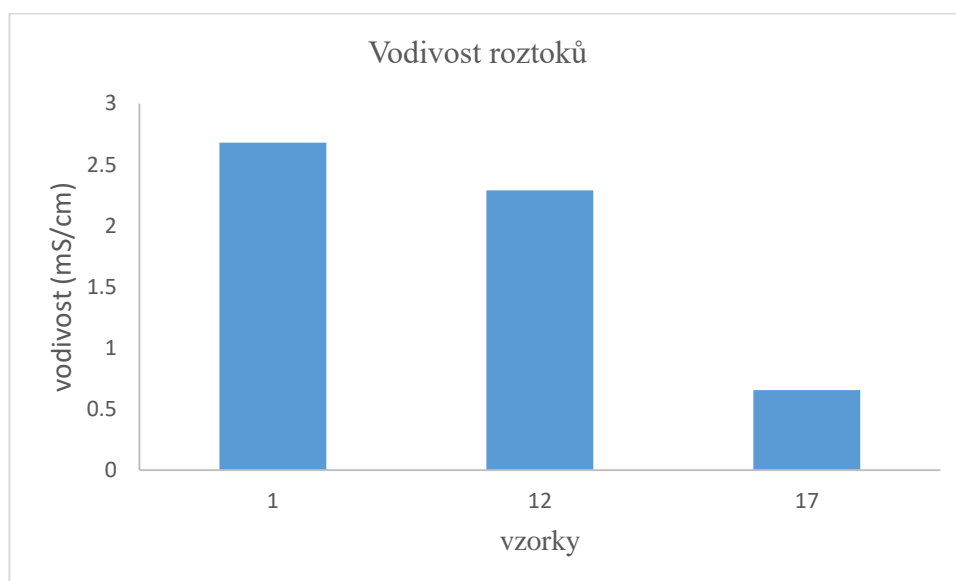
Pro charakterizaci roztoků byly na základě hodnocení průměru vlákna pomocí metody SEM vybrány tři roztoky (č. 1, 12 a 17). Tyto roztoky byly charakterizovány pomocí měření vodivosti, povrchového napětí a viskozity roztoků.

4.2.1 Vodivost roztoků

Elektrická vodivost zvlákňovaných roztoků je důležitým parametrem, protože roztok je zpracováván ve vnějším elektrickém poli. Vyšší elektrická vodivost roztoku vede k jeho vyšší hybnosti vlivem působícího pole a tím i k vyšší produkci nanovláknenných vrstev. Elektrická vodivost nebyla, ale záměrně navyšována, z důvodu zachování čistoty vrstev a minimálního počtu složek roztoku. V Tabulce 13 a Grafu 2 jsou znázorněny hodnoty vodivosti roztoků.

Tabulka 13: Vodivost roztoků

Číslo vzorku	Složení vzorků	Vodivost (mS/cm)
		Průměr
1	Voda, kyselina hyaluronová: PEO (1:1) – 5 %.	(2,680 ± 0,002)
12	Ethanol/voda (30:70), HA-Lipoic, PEO (9:1) – 5 %	(2,290 ± 0,020)
17	Ethanol/voda (30:70), HA-Toco: PEO (1:1) – 3 %.	(0,654 ± 0,004)

Graf 2: Porovnání vodivosti roztoků

Z naměřených výsledků je patrné, že vodivost roztoku s obsahem derivátu HA-Lipoic je podobná roztoku s nativní kyselinou hyaluronovou a proces zvláknění by z tohoto pohledu neměl být výrazně ovlivněn. Naopak vodivost roztoku s obsahem derivátu HA-Toco je přibližně 5x menší a může se tak negativně projevit na procesu zvláknování (to podporuje i výsledek experimentu).

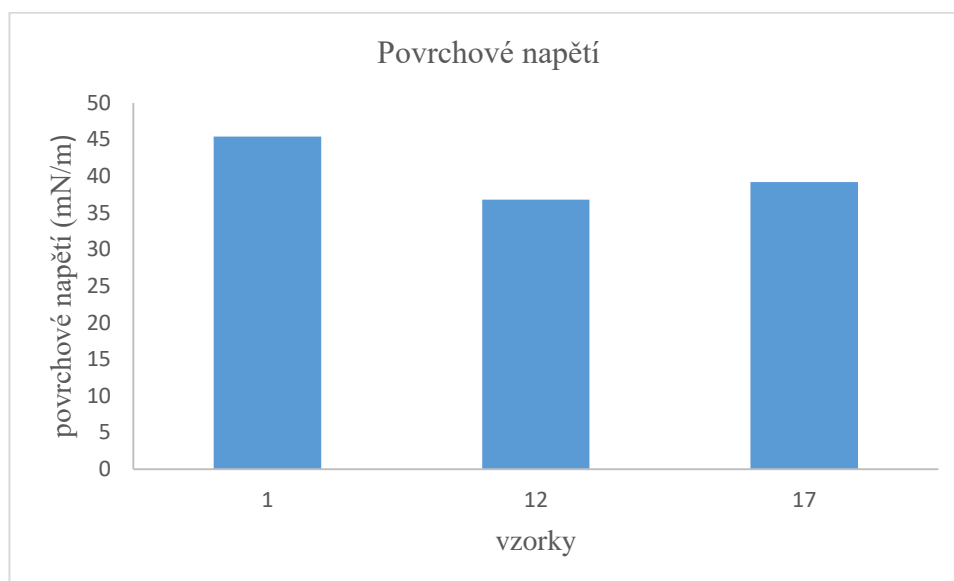
4.2.2 Povrchové napětí roztoků

Povrchové napětí je při vzniku vlákna překročeno silami vnějšího působícího elektrostatického pole. Z tohoto pohledu jsou pro proces výhodnější roztoky s menším povrchovým napětím (obecně rozpouštědla). Vodné roztoky mají větší povrchové napětí a proto je jejich zvláknění obtížnější. Povrchové napětí se snižuje pomocí povrchově aktivních látek, kterým se v našem případě chceme vyvarovat z důvodů čistoty. V Tabulce 14 a Grafu 3 jsou znázorněny hodnoty povrchového napětí roztoků.

Tabulka 14: Povrchové napětí roztoků

Číslo vzorku	Složení vzorků	Povrchové napětí (mN/m)
		Průměr
1	Voda, kyselina hyaluronová: PEO (1:1) – 5 %.	(45,40 ± 0,11)
12	Ethanol/voda (30:70) HA-Lipoic, PEO (9:1) – 5 %	(36,80 ± 0,03)
17	Ethanol/voda (30:70), HA-Toco: PEO (1:1) – 3 %.	(39,20 ± 0,01)

Graf 3: Porovnání povrchového napětí roztoků



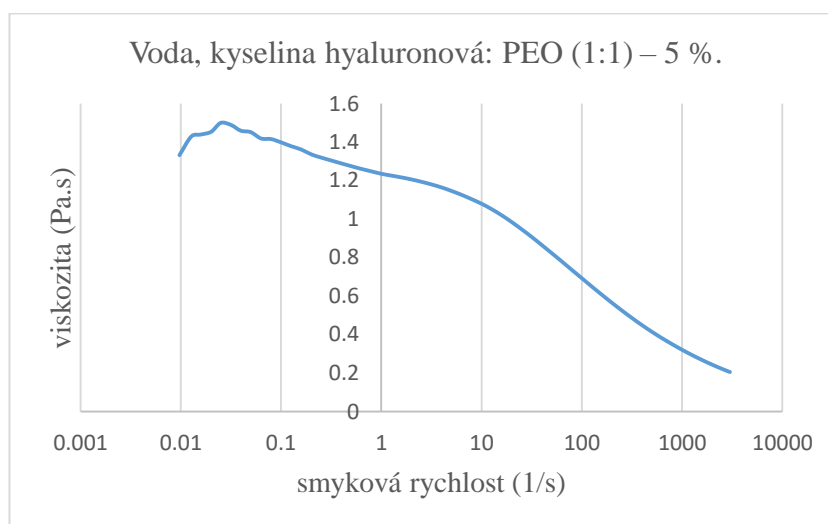
Výsledky ukazují na nižší povrchové napětí v případech použití ethanolu ve složce rozpouštědla. Ten tedy snižuje povrchové napětí oproti vodě. To by mohlo vézt k lepšímu zvláknění takových roztoků, případně postačujícímu menšímu působícímu napětí pro zvláknění. Rozdíly povrchových napětí testovaných roztoků jsou ale pravděpodobně zanedbatelně malé.

4.2.3 Viskozita roztoků

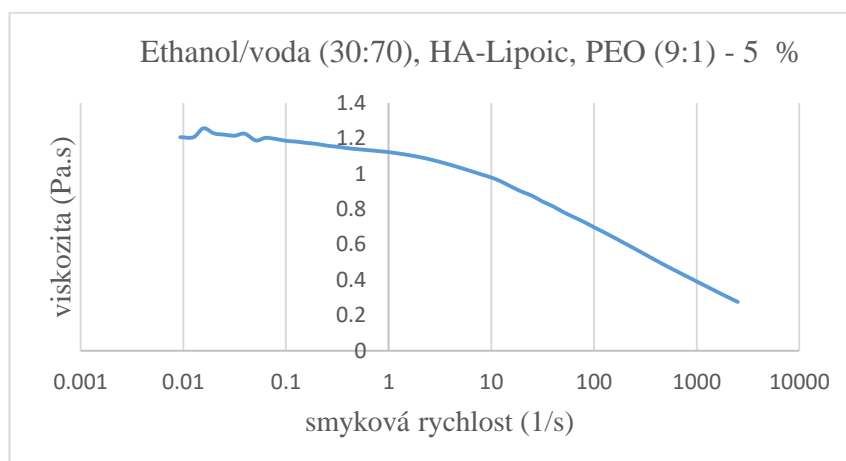
Viskozita zvlákněvaného roztoku ovlivňuje nejen proces zvláknění, ale i výslednou morfologii, protože se zapojuje do celé hydrodynamiky podílející se na transformaci roztoku do vláken. Pokud je viskozita nízká, polymerní roztok vylétající z trysky se rozpadá na kapky a výsledkem je defektní morfologie. Naopak vyšší viskozita vede k tvorbě vláken s velkým průměrem nebo zamezí vytvoření vlákna elektrickým polem úplně. V Tabulce 15 a Grafech (4 - 6) jsou znázorněny hodnoty viskozity roztoků.

Tabulka 15: Viskozita roztoků

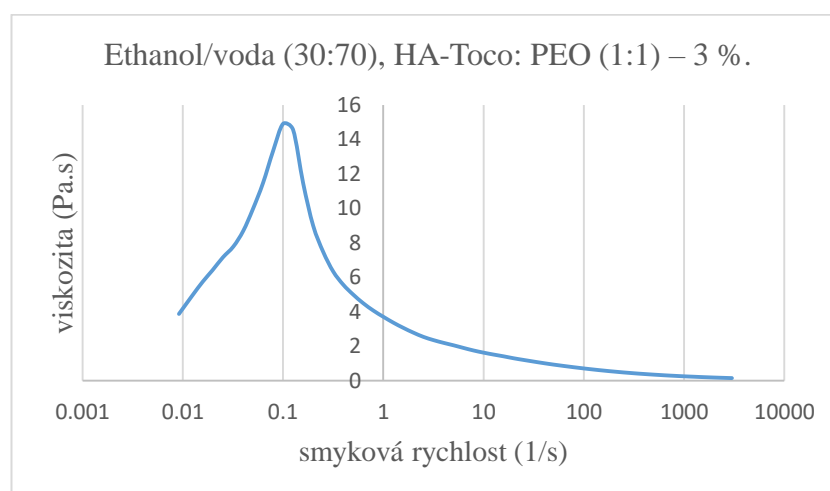
Číslo vzorku	Složení vzorků	Viskozita při smykové rychlosti (1/s)
1	Voda, kyselina hyaluronová: PEO (1:1) – 5 %.	1,24
12	Ethanol/voda (30:70), HA-Lipoic, PEO (9:1) – 5 %	1,12
17	Ethanol/voda (30:70), HA-Toco: PEO (1:1) – 3 %.	3,7

Graf 4: Viskozita roztoku (vzorek č. 1)

Graf 5: Viskozita roztoku (vzorek č. 12)



Graf 6: Viskozita roztoku (vzorek č. 17)

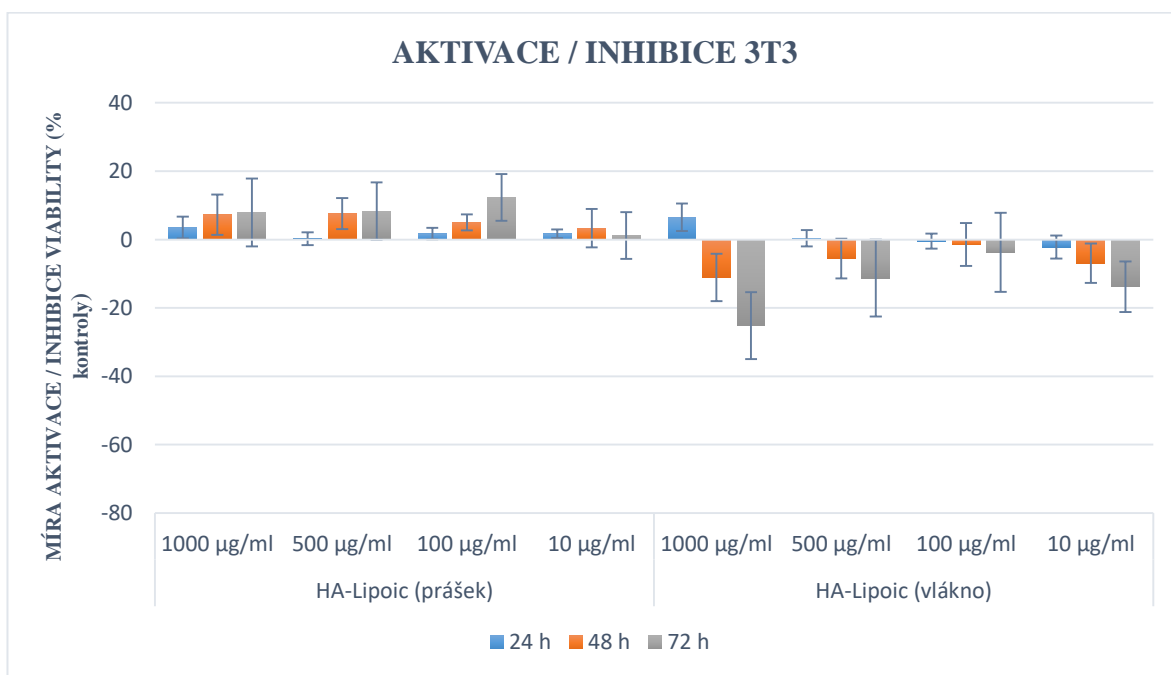


Obdobně jako v případě výsledků měření elektrické vodivosti, i zde je výrazně odlišná viskozita v případě roztoku s derivátem HA-Toco. Výsledek tedy také poukazuje na odlišnost při procesu zvláknování, která byla potvrzena experimentálně. Naopak charakteristiky viskozit nativní HA i roztoku s HA-Lipoic jsou velmi podobné a nelze tedy předpokládat větší problémy při zvláknění nebo defekty v nanovláknenné struktuře.

4.3 Měření cytotoxicity a buněčné aktivity

Pro měření cytotoxicity byl vybrán vzorek č. 12. Výchozí materiál (derivát HA-lipoic ve formě prášku) i výsledná nanovláknenná vrstva byla podrobena biologickému testování aktivace a inhibice linií 3T3 buněk. Testování probíhalo v širokém spektru koncentrací testovaného materiálu vůči buněčnému médiu (10 až 1000 $\mu\text{g/ml}$) a odběry proběhly po 24, 48 a 72 hodinách. Výsledky cytotoxicity jsou přehledně ukázány v Grafu 7. Výsledky poskytlo biologické oddělení firmy Contipro. Z grafu je jasně vidět, že po 24 hod oba testované vzorky nejsou cytotoxické, což odpovídá normám stanoveným Státním zdravotnickým ústavem. Na srovnávacím grafu je patrné, že ve všech případech byla míra aktivace přibližně v rozmezí $\pm 20\%$. Přitom výchozí materiál působil na buňky příznivě, naopak nanovláknenné vrstvy spíše negativně. Nicméně výsledný materiál není pro buňky toxický, pouze mírně zpomaluje jejich aktivitu a růst. Výchozí derivát v podobě prášku nijak výrazně nepodporuje buňčnou aktivitu, i když ji nepatrně posiluje (cca $+10\%$). Pro materiály používané v kosmetických a farmaceutických aplikacích je toto chování velice běžné a standardní. Můžeme tedy konstatovat, že z hlediska viability (životnosti) lze tento derivát HA použít pro kosmetický či farmaceutický průmysl, což naplnilo cíl diplomové práce.

Graf 7: Grafické srovnání usmrcených buněk



5. Závěr

Celkem bylo připraveno 16 roztoků kyseliny hyaluronové s různými antioxidanty a jeden roztok samotné HA, který byl použit jako určitý standard pro hodnocení kvality zvláknění a dalších charakteristik roztoků a vláken. Jako antioxidanty byly použity kyselina lipoová a tokoferol sukcinát. Jednotlivé roztoky se dále lišily poměry polymerů, použitými rozpouštědly, jejich poměry a hmotnostní koncentrací.

Zvlákněné vzorky byly charakterizovány pomocí SEM, obrazové analýzy a Ramanovy spektroskopie.

Porovnáním výsledků lze usoudit, že vláknění probíhá s lepšími výsledky morfologie při malé vlhkosti v depoziční komoře. Při střední vlhkosti jsou ve struktuře patrné defekty v podobě slitých vláken do fólií. Více vyhovujícím systémem pro rozpouštění je směs kapalin ethanol/voda v poměru 30/70. Důvodem jsou nejnižší hodnoty průměrů vláken a zároveň nejmenší směrodatné odchylky. Je patrné, že nižší průměry vláken byly získány při střední vlhkosti pro stejné typy vzorků.

Nanovláknina s obsahem derivátu HA-Toco se podařilo připravit za obdobných podmínek jako derivát HA-Lipoic, avšak depoziční proces nebyl stabilní a vrstvy zahrnovaly morfologické defekty. Pro dosažení lepších výsledků by musel být proces přípravy optimalizován ve stejných krocích, jako tomu bylo v případě derivátu HA-Lipoic.

Při vyhodnocení morfologie vláken z obrazové analýzy vyplývá, že některé vzorky mají různé defekty, a to bylo následkem různých faktorů, např. při elektrostatickém zvláknění část roztoku v elektrickém poli se neodpařilo a na povrchu vrstvy vznikly „krátery“. Vzorek č. 12 měl hladký, skoro bezdefektní povrch vrstvy a ten samý vzorek měl nejmenší průměr vláken a z hlediska všech měřených vlastností se jevil jako nejlepší varianta pro dané aplikace.

V případě výsledků měření elektrické vodivosti i viskozity jsou výrazně odlišné vlastnosti v případě roztoku s derivátem HA-Toco. Výsledek tedy také poukazuje na odlišnost při procesu zvláknění, která byla potvrzena experimentálně. Naopak charakteristiky viskozitativní HA i roztoku s HA-Lipoic jsou velmi podobné a nelze tedy předpokládat větší problémy při zvláknění nebo defekty v nanovláknenné struktuře.

Oba testované vzorky nejsou cytotoxické (24 hod), ve všech případech byla míra aktivace přibližně v rozmezí ± 20 %. Můžeme tedy konstatovat, že z hlediska viability (životnosti) lze tento derivát HA použít pro kosmetický či farmaceutický průmysl, což naplnilo cíl diplomové práce.

6. Seznam použité literatury

1. ARAVAMUDHAN Aja, RAMOS Daisy M., NADA Ahmed A., KUMBAR Sangamesh G. Natural Polymers: Polysaccharides and Their Derivatives for Biomedical Applications. In: KUMBAR Sangamesh G., LAURENCIN Cato T., DENG Meng. *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*. USA: Elsevier, 2014, s. 67–81. ISBN 978-0-12-396983-5
2. GOMES Manuela, AZEVEDO Helena, MALAFAYA Patricia, SILVA Simone, OLIVEIRA Joaúim, SILVA Gabriela, SOUSA Rui, MANO João and REIS Rui. Natural Polymers in Tissue Engineering Applications. In: BLITTERSWIJK van Clemens. *Tissue Engineering*. UK: Elsevier, 2008, s. 146–180. ISBN 978-0-12-370869-4
3. DUCHÁČEK Vratislav. *Polymery: výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. 2nd ed. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2006, s. 56–64. ISBN 80-7080-617-6
4. ŠŇUPÁREK Jaromír. Celulosa. *Makromolekulární chemie*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2014, s. 127–135. ISBN 978-80-7395-761-2
5. Celulosa. [Online]. [cit. 10. 04. 19]. Dostupné z: <https://leporelo.info/celulosa>
6. Viscord. [Online]. [cit. 10. 04. 19]. Dostupné z: <https://www.glanzstoff.com/en/products/viscose-filament-yarn/viscord>
7. КрахмаЛ. [Online]. [cit. 10. 04. 19]. Dostupné z: <http://www.xumuk.ru/encyklopedia/2156.html>
8. COLLINS Maurice N., BIRKINSHAW Colin. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering – A review. *Carbohydrate Polymers*. **2013**, 92 (2), s. 1262–1279. ISSN 0144-8617
9. GUPTA Ramesh C. Nutraceuticals in Arthritis. *Nutraceuticals - Efficacy, Safety and Toxicity*. USA: Elsevier, 2016, s. 161–172. ISBN 978-0-12-802147-7
10. BURDICK Jason A., PRESTWICH Glenn D. Formation of Hydrogels Using Addition and Condensation Reactions. *Advanced Materials*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2011**, 23 (12), s. 41–52. DOI: 10.1002/adma.201003963
11. Kyselina hyaluronová proti stárnutí pokožky, na klouby i jako antioxidant. 2018. [Online]. [cit. 10. 04. 19]. Dostupné z:

<https://www.celostnimedica.cz/kyselina-hyaluronova-proti-starnuti-pokozky-na-klouby-i-jako-antioxidant.htm>

12. CHONG Barrie Fong, BLANK Lars M., MCLAUGHLIN Richard a NIELSEN Lars K. Microbial hyaluronic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2005**, 66 (4), s. 341–351. ISSN 0175-7598.
13. NECAS J., BARTOSIKOVA L., BRALTNER P. a KOLAR J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni medicina*. **2008**, 53 (8), s. 397–411. DOI: 10.17221/1930-VETMED
14. SHARMA Monica. Antioxidant and its Applications. *Journal of Pharmacology and Toxicology*. **2016**, 4 (4), s. 28–31. ISSN: 2322-0120
15. SASO Luciano, FIRUZI Omidreza. Pharmacological applications of antioxidants-lights and shadows. *Current Drug Targets*. **2014**, 15 (13), s. 1–23. DOI: 10.2174/1389450115666141024113925
16. КАЛИНЧЕНКО С. Ю., Ворслов Л. О., КУРНИКОВА И. А., ГАДЗИНВА И. В. Современный взгляд на возможности применения альфа-липоевой кислоты. "Эффективная Фармакотерапия. Урология и Нефрология" №1. [Online]. [cit. 10. 04. 19]. Dostupné z: http://umedp.ru/articles/sovremennyy_vzglyad_na_vozmozhnosti_primeneniya_alfalipoevoy_kisloty.html
17. RATAN K. Chaudhuri. Antioxidants in Cosmetics for Anti-Aging. In: ROSEN Meyer R. *Harry's Cosmeticology*, USA: Chemical Publishing Company Inc, **2015**, 2 (9), s. 1073–1088. ISBN 978-0-8206-01779
18. HAJIBABAEI Khadije. Antioxidant properties of vitamin E. *Ann Res Antioxid*. **2016**, 1 (2), s.1–2. ISSN: 2476-5511
19. BOCKISCH Michael. Vitamin E (Tocopherol). *Fats and Oils Handbook*. Hamburg: AOCS Press, 1998, s. 109–112. ISBN 978-0-935315-82-0
20. EDWARDS, W. P. Tocopherols. *Science of Bakery Products*. UK: Royal Society of Chemistry, 2007, s. 102–120. ISBN 978-0-85404-486-3
21. Tocopherol. [Online]. [cit. 10. 04. 19]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/merck-index>
22. Tocopherol succinate. [Online]. [cit. 10. 04. 19]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com>

23. SAJNA Kuttuvan Valappil, GOTTUMUKKALA Lalitha Devi, SUKUMARAN Rajeev K., PANDREY Ashok. White Biotechnology in Cosmetics. In: PANDREY Ashok, HÖFER Rainer, LARROCHE Christian, TAHERZADEH Mohammad, NAMPOOTHIRI K., Madhavan. *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. UK: Elsevier, 2015, s. 608–644. ISBN 978-0-444-63453-5
24. МАТРЕНИН С. В., ОВЕЧКИН Б. Б. Общая характеристика нанотехнологий и наноматериалов. *Наноструктурные Материалы в Машиностроении*. Томск: Издательство томского политехнического университета, 2009, s. 7–15. ISBN 978-5-98298-699-3
25. ASHBY Michael F., FERREIRA Paulo J., SCHODEK Daniel L. Material Classes, Structure, and Propertie. *Nanomaterials, Nanotechnologies and Design - An Introduction for Engineers and Architects*. UK: Elsevier, 2009, s. 88–90. ISBN 978-0-7506-8149-0
26. DANIHELKA Pavel. Nanomateriály, jejich použití a přínosy. 2016. [Online]. [cit. 10. 04. 19]. Dostupné z:
https://www.enviprofi.cz/33/nanomaterialy-jejich-pouziti-a-prinosy-uniqueidmRRWSbk196FNf8-jVUh4EpXiviHrqwHVORj8i2aK3-o/?uid=1xLs0gNgcvrMHsLeRhQMVEw&e=1Fp45avhilF6_bgWAQpy4jIPIsMfv0Qe
27. Electrospun fibrous membrane general characteristics. [Online]. [cit. 10. 04. 19]. Dostupné z:
<http://electrospintech.com/generalcharacteristics.html#.XLWNN2BR2Hs>
28. VASITA Rajesh, KATTI Dharendra S. Nanofibers and their applications in tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*. **2006**, 1 (1), s. 15–30. PMID: 17722259
29. GUOZHONG Cao. Applications of Nanomaterials. *Nanostructures and Nanomaterials - Synthesis, Properties and Applications*. London: World Scientific, 2004, s. 391–405. ISBN 978-1-86094-415-4
30. Нанороботы: будущее в настоящем. [Online]. [cit. 10. 04. 19]. Dostupné z:
<https://www.13min.ru/nauka/nanoroboty-budushhee-v-nastoyashhem/>
31. UM In Chul, FANG Dufei, HSIAO Benjamin S., OKAMOTO Akio, CHU Benjamin. Electro-Spinning and Electro-Blowing of Hyaluronic Acid. *Biomacromolecules*. **2004**, 5 (4), s. 1428–1436. DOI: 10.1021/bm034539b

32. AHIRE J. J., ROBERTSON D. D., REENEN van A. J., DICKS L. M. T. Polyethylene oxide (PEO)-hyaluronic acid (HA) nanofibers with kanamycin inhibits the growth of *Listeria monocytogenes*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **2017**, 86, s. 143–148. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.12.006
33. ANDERSON Ann M., BRADFORD A., SAFFORD SMITH Bruno and Lilla. Viscosity Background. In: KUTZ, Myer. *Handbook of Measurement in Science and Engineering*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2013, s. 966–970. Vol. 2. ISBN 978-1-118-38464-0
34. STACHOWIAK Gwidon W. BATCHELOR, Andrew W. Physical properties of lubricants. *Engineering Tribology*. 4th ed. UK: Elsevier, 2014, s. 28–34. ISBN 978-0-12-397047-3
35. WTW laboratorní katalog. s, 1–83. [Online]. [cit. 10. 04. 19]. Dostupné z: <http://www.wtwcz.com/wtw-laboratorni-katalog-156/>
36. TADROS, Tharwat F. Surfactant adsorption at interfaces. *Introduction to Surfactants*. UK: De Gruyter, 2014. s. 59–63. ISBN 978-3-11-031212-6
37. KENNETH N. Han. Interfacial Phenomena. *Fundamentals of Aqueous Metallurgy*. USA: Society for Mining, Metallurgy, and Exploration (SME), 2002, s. 1–10. ISBN 978-0-87335-215-4
38. TONG Lin, JIAN Fang. Electrospinning. *Fundamentals of Electrospinning & Electrospun Nanofibers*. USA: DEStech Publications, 2017, s. 25–35. ISBN 978-1-60595-160-7
39. POKORNY Marek, NOVAK Jindrich, REBICEK Jiri, KLEMES Jan, VELEBNY Vladimir. An Electrostatic Spinning Technology with Improved Functionality for the Manufacture of Nanomaterials from Solutions. *Nanomaterials and Nanotechnology*. 2015, s. 1–6. DOI: 10.5772/60773
40. 4spin. [Online]. [cit. 10. 04. 19]. Dostupné z: <https://www.4spin.info/>
41. POKORNY Marek, REBICEK Jiri, KLEMES Jan, VELEBNY Vladimir. Introduction of new laboratory device 4SPIN® for nanotechnologies. *Proceedings of the Advanced Architectures in Photonics*. **2014**, 1, s. 20–21. ISSN 2336-6036
42. DONOVAN Leonard N., CHANDLER Gary W., SUPAPAN Seraphin. Scanning Electron Microscopy. Shirley Ann Jackson. *Characterization of Materials*. USA: John Wiley & Sons, 2012, s. 1721–1735. ISBN: 978-0-47126-882-6

43. DAHMAN Yaser. Scanning Electron Microscopy. *Nanotechnology and Functional Materials for Engineers*. Canada: Elsevier, 2017. s. 31–35. ISBN 978-0-32-351256-5
44. COOPER Alan. Electron Microscopy. *Biophysical Chemistry*. 2nd ed. UK: Royal Society of Chemistry, 2011, s. 187–190. ISBN 978-1-84973-081-5
45. Elektronová mikroskopie transmisní a rastrovací. [Online]. [cit. 10. 04. 19].
Dostupné z: http://jointlab.upol.cz/soubusta/OSYS/El_mikr/El_mikr.html
46. Ramanova Spektroskopie. [Online]. [cit. 10. 04. 19]. Dostupné z:
<http://www.optixs.cz/aplikace-53/spektroskopie-145/ramanova-spektroskopie-198>
47. The United States Pharmacopeial Convention. Raman Spectroscopy. *Food Chemicals Codex*. 11th ed. USA: The United States Pharmacopeial Convention, 2018, s. 1613–1620. ISBN 978-1-936424-77-1
48. Obrazová analýza. [Online]. [cit. 10. 04. 19]. Dostupné z:
<http://biologie.upol.cz/mikroskopie/obrazova%20analyza.htm>
49. РОМАНОВА М. А., ДОДОНОВА А. Ш. Изучение цитотоксичности биологически активных соединений на культуре клеток. *Молодой ученый*. **2016**, 18 (122), s. 110–114. ISSN 2072-0297
50. CHMELÁŘ Josef, KOTZIANOVÁ Adéla, HERMANNOVÁ Martina, ŠULÁKOVÁ Romana, ŠMEJKALOVÁ Daniela, KULHÁNEK Jaromír, VELEBNÝ Vladimír. Evaluating the degree of substitution of water-insoluble acyl derivatives of hyaluronan using Raman spectroscopy: method development and comparison with gas chromatography and ¹H NMR. *Analytical Methods*. **2017**, s. 232–238. DOI: 10.1039/c6ay03067j

ÚDAJE PRO KNIHOVNICKOU DATABÁZI

Název práce	Příprava nanovláknenných materiálů z chemicky modifikované kyseliny hyaluronové s vázanými antioxidantními látkami
Autor práce	Andrei Alkhou
Obor	Technologie výroby a zpracování polymerů
Rok obhajoby	2019
Vedoucí práce	Ing. Luboš Prokůpek, Dr.
Anotace	Tato práce se zabývá přípravou nanovláknenných materiálů z chemicky modifikované kyseliny hyaluronové s vázanými antioxidantními látkami. V teoretické části je popsána kyselina hyaluronová, antioxidanty, nanomateriály a možnosti jejich charakterizace. Praktická část je zaměřena na přípravu nanovláken s derivátů kyseliny hyaluronové a metody používané k jejich charakterizaci pomocí vybraných analytických metod.
Klíčová slova	Kyselina hyaluronová, antioxidanty, nanovláknna, elektrostatické zvlákňování, skenovací elektronová mikroskopie