

Příprava hydrogelů z polymerních filmů pro medicínské aplikace v tkáňovém inženýrství

Tereza Kulendová

Bakalářská práce
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav fyziky a mater. inženýrství

akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Tereza KULEDOVÁ**

Osobní číslo: **T08693**

Studijní program: **B 2808 Chemie a technologie materiálů**

Studijní obor: **Chemie a technologie materiálů**

Téma práce: **Příprava hydrogelů z polymerních filmů pro
medicínské aplikace v tkáňovém inženýrství**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte rešerši na zadané téma s využitím doporučené literatury a databázových informačních zdrojů, zaměřenou na přípravu porézních struktur z hydrogelů.
2. V praktické části práce připravte modelové polymerní filmy s určitým stupněm organizace (samo-organizovanými strukturami).
3. U připravených filmů proveďte řízené bobtnání za rozdílných procesních podmínek, sledujte změny hmotnosti v čase.
4. Získané výsledky přehledně diskutujte v závěrečných kapitolách bakalářské práce a proveďte jejich kritické srovnání.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. Pouchlý, J., Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav, VŠCHT Praha 1998.
2. Morawetz, H., Chování makromolekul v roztoku, nakladatelství Československé akademie věd, Praha 1971.
3. Autissier A., et. al.: Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze-drying/cross-linking process, Acta Biomaterialia, 6, 3640-3648, (2010).
4. Meyers, M.A., et. al.: Biological materials: Structure and mechanical properties, Progress in Materials Science 53, 1-208, (2008).
5. Jagur-Grodzinski, J., Polymers for tissue engineering, medical devices, and regenerative medicine. Concise general review of recent studies, Polymers for advanced technologies, 17, 395-418, (2006).

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Antonín Minařík, Ph.D.

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

14. února 2011

Termín odevzdání bakalářské práce:

19. srpna 2011

Ve Zlíně dne 14. února 2011

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



Mgr. Aleš Mráček, Ph.D.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

Byla zkoumána rychlost botnění polymerních hydrogelů solidifikovaných z roztoku 2-HEC. Studovanými parametry determinujícími rychlost botnění byly distribuce molekulových hmotností, tepelná historie polymerního roztoku a filmu, teplota botnění a čas. Výsledky experimentů demonstrují rozdílný vliv jednotlivých parametrů na rychlost absorpce vody do daných systémů s různě organizovanou polymerní maticí, obsahem samo-organizovaných struktur. Získané informace lze v budoucnu s výhodou využít pro přípravu vysoce organizovaných hydrogelů s aplikacemi v tkáňovém inženýrství.

Klíčová slova: botnění, polymerní hydrogely, samo-organizace, procesní parametry, distribuce molekulových hmotností, tkáňové inženýrství

ABSTRACT

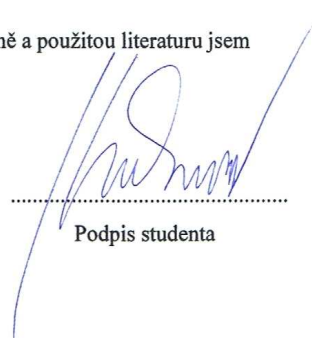
The swelling rate of polymer hydrogels solidificated from a 2-HEC solution was studied. Studied parameters were swelling speed, distribution of molecular weight, thermal history of polymer solution and film, temperature and swelling time. The experimental results demonstrate the influence of different parameters on the rate of absorption of water into the system with differently organized polymer matrix containing self-organized structures. Obtained information could be used in the future for the preparation of highly organized hydrogels for applications in tissue engineering.

Keywords: swelling, polymer hydrogels, self-organization, process parameters, distribution of molecular weight, tissue engineering

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Antonínu Minaříkovi Ph. D. za jeho pomoc, trpělivost, péči a cenné rady při jejím zpracování a především za veškerý svůj čas, který mi obětoval při konzultacích. Také bych chtěla poděkovat svým rodičům a nejbližším, kteří mě po dobu mých studií podporovali.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala.

Ve Zlíně 22.08.2011



.....
Podpis studenta

OBSAH

ÚVOD.....	8
I TEORETICKÁ ČÁST	9
1 POLYMERY	10
1.1 STRUKTURA POLYMERŮ	10
1.1.1 Síťované polymery	11
2 GELY	13
2.1 VLASTNOSTI GELŮ	13
2.2 GELOVÝ STAV HMOTY	14
2.3 PRAKTICKÉ VYUŽITÍ GELŮ	14
3 DRUHY POLYMERNÍCH SÍTÍ (GELŮ)	16
3.1 REVERSIBILNÍ GELY	16
3.1.1 Fyzikálně síťované gely.....	16
3.1.1.1 Amorfní gely, krystality	17
3.1.2 Kovalentně síťované gely.....	18
3.1.3 Faktory ovlivňující průběh gelace u vysokomolekulárních látek.....	18
3.2 IREVERSIBILNÍ GELY	18
3.2.1 Faktory ovlivňující průběh gelace lyofobních solů	19
4 BOTNÁNÍ REVERZIBILNÍCH XEROGELŮ	20
4.1 KVANTITATIVNÍ POPIS OMEZENÉHO BOTNÁNÍ.....	21
5 BIOKOMPATIBILNÍ MATERIÁLY	23
5.1 POŽADAVKY NA HYDROGELY PRO LÉKAŘSKÉ POUŽITÍ.....	23
5.2 LÉČBA TVRDÝCH TKÁNÍ.....	26
<i>Zlomeniny kostí</i>	27
5.3 LÉČBA MĚKKÝCH TKÁNÍ.....	28
<i>Ošetření ran po popálení</i>	28
<i>Regenerace chrupavek</i>	28
5.4 MATRICE PRO ŘÍZENÉ DÁVKOVÁNÍ LÉKŮ	29
5.5 ŽELATINA	30
5.6 POLYSACHARIDY	31
5.6.1 Celulóza.....	31
5.6.1.1 Deriváty celulózy	32
5.6.2 Hydroxyethylcelulóza (HEC).....	32
5.6.2.1 Oblasti aplikace HEC.....	33
5.6.3 Kyselina hyaluronová (HA)	33
5.6.3.1 Příklady aplikací kyseliny hyaluronové	34
5.6.4 Chitosan.....	35
II PRAKTICKÁ ČÁST	36

6	POUŽITÉ SYSTÉMY, JEJICH PŘÍPRAVA A PODMÍNKY MĚŘENÍ.....	37
6.1	ČIŠTĚNÍ LABORATORNÍHO SKLA	37
6.2	PŘÍPRAVA POLYMERNÍCH ROZTOKŮ	38
6.3	PŘÍPRAVA POLYMERNÍCH FILMŮ.....	39
6.4	VLASTNÍ MĚŘENÍ – SLEDOVÁNÍ ZMĚN HMOTNOSTI POLYMERU V ČASE	39
7	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	42
7.1	VLIV TEPLoty BOTNÁNÍ	42
7.2	VLIV ČASU BOTNÁNÍ.....	44
7.3	VLIV TEPELNÉ HISTORIE ROZTOKU A HYDROGELU 2-HEC	48
	ZÁVĚR	51
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	53
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	56
	SEZNAM OBRÁZKŮ	58

ÚVOD

Tkáňové inženýrství je v současné době velmi perspektivní oblastí medicíny. Zabývá se vlastnostmi přírodních a syntetických biokompatibilních materiálů pro nahrazení funkce odumřelých nebo poškozených tkání v lidském těle. Tyto materiály jsou aplikovány v podobě hydrogelů pro léčbu měkkých a tvrdých tkání, přípravu matric pro řízené dávkování léků i jako součásti různých lékařských zařízení. Se stoupajícím počtem pacientů čekajících na transplantace orgánů, stoupá i intenzita výzkumu v oblastech tkáňového inženýrství.

Cílem této práce je prostudovat rychlost botnání polymerních filmů, hydrogelů, schopných nabývat na objemu různou rychlostí v závislosti na molekulové hmotnosti, její distribuci a procesních parametrech přípravy. Výsledky z takto provedených experimentů budou v budoucnu sloužit jako podklad pro řízenou přípravu vysoce organizovaných polymerních hydrogelů s aplikacemi v tkáňovém inženýrství.

V praktické části bude demonstrován vliv molekulové hmotnosti, její distribuce 2-hydroxyethylcelulózy (2-HEC) a sledován nárůst hmotnosti gelu v čase. Dále pak vliv času, teploty botnání, tepelné historie vzorku (teploty přípravy roztoku a polymerního filmu) a hmotnostního podílu 2-HEC.

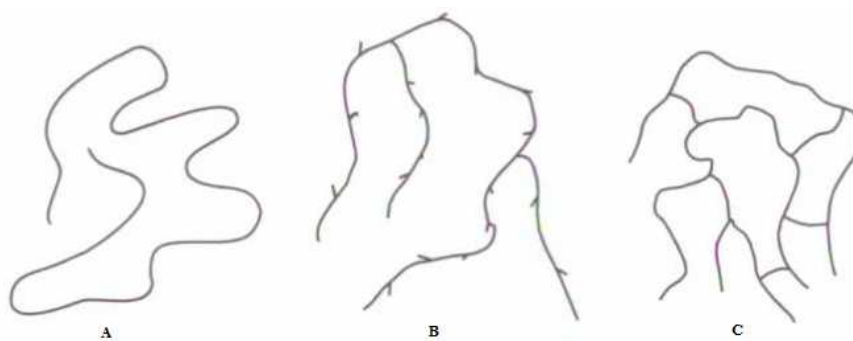
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 POLYMERY

Polymery jsou makromolekulárními látkami, které jsou tvořeny opakujícími se molekulami daného typu (konstituční jednotky), které jsou navzájem spojeny ve velkém počtu, existuje pro ně řada vlastností, které se podstatně nezmění přidáním nebo odebráním jedné či několika konstitučních jednotek. Makromolekuly mohou vznikat z cyklických molekul monomeru anebo z molekul, které obsahují alespoň jednu dvojnou vazbu [6, 14].

1.1 Struktura polymerů

- Podle typu monomeru a reakčních podmínek při polymeraci vznikají lineární, rozvětvené nebo síťované makromolekulární řetězce.
- Makromolekulární řetězce jsou různě geometricky uspořádané v důsledku možných pohybů polymerních segmentů.
- Vlastnosti daného polymeru jsou podmíněny chemickým složením, molekulovou hmotností a fázovým stavem (krystalický, amorfní) [7,14].



Obrázek 1: Tvar polymerních řetězců: A) lineární, B) rozvětvený, C) síťovaný [28].

Lineární makromolekuly jsou prostým typem makromolekul, které vznikají polyreakcí dvojfunkčního monomeru, kde je každá monomerní jednotka spojena se dvěma jednotkami sousedními.

Nejpravděpodobnější a energeticky nejvýhodnější konformací, již mohou lineární makromolekuly zaujmout, je tvar klubka, viz. obr. 1.

Rozvětvené makromolekuly vznikají polyreakcí trojfunkčních a vícefunkčních monomerů nebo vedlejšími polyreakcemi dvojfunkčního monomeru, viz. obr. 1.

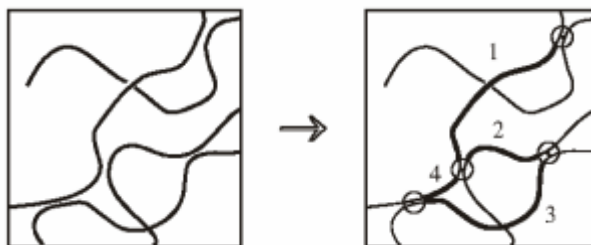
Podle schopnosti nebo neschopnosti krystalizace, která je základní znakem, se lineární a rozvětvené polymery dělí na:

- Polymery inklinující k samovolné krystalizaci.
- Polymery samovolně nekrystalizující.
- Polymery za žádných podmínek nekrystalizující [7,14].

1.1.1 Síťované polymery

Síťované polymery vznikají vzájemným spojením makromolekul chemickými vazbami do trojrozměrných prostorových sítí, které vznikají polyreakcí trojfunkčních a vícefunkčních monomerů, spojením lineárních nebo rozvětvených makromolekul.

Lineárním síťováním řetězců vznikají nejčastěji čtyřfunkční uzly (bod, ve kterém je síť spojena vulkanizací nebo vytvořením vícefunkční monomerní jednotky). Vzdálenost mezi dvěma uzly vyjadřuje délku řetězce.



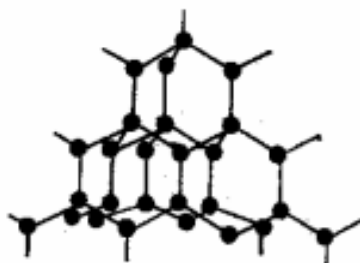
Obrázek 2: Lineární síťování řetězce, očíslované části znázorňují řetězce, kroužky představují uzly [2].

Charakteristickými vlastnostmi síťovaných polymerů je hustota sítě a délka řetězců v místech sesíťování.

V případě vysoce síťovaných polymerů s krátkou délkou sekundárních řetězců a vyšší koncentrací spojovacích bodů, vznikají tvrdé materiály.

U lineárních a rozvětvených polymerů může docházet k nežádoucímu síťování za vysokých teplot a vlivem vedlejších reakcí.

Příkladem ideální tří-dimenzionální sítě může být struktura diamantu, viz. obr. 3.



Obrázek 3: Schéma trojrozměrné struktury diamantu [14].

Proces tvorby polymerního gelu je podmíněn přítomností lineárního polymeru o dané molekulové hmotnosti s následným zavedením příčných vazeb.

Okamžik, kdy dochází ke vzniku gelu lze označit jako bod gelovatění: stoupá molekulová hmotnost a při určité hodnotě koncentrace příčných vazeb dochází k utváření prvních známek trojrozměrné polymerní sítě. V tomto bodě se podstatně mění vlastnosti polymeru. Se vzrůstající koncentrací příčných vazeb klesá tepelná tvarovatelnost polymeru.

Vyšší koncentrace příčných vazeb má za následek rozdělení polymeru na dvě části:

Gel – v rozpouštědlech nerozpustný.

Sol – rozpustný, možnost odstranit extrakcí [2,6,14].

2 GELY

Gel je v makroskopickém měřítku trojrozměrná makromolekulární síť vykazující elastické chování. Charakteristickou vlastností zcela sesíťovaných polymerů je nerozpustnost a netavitelnost.

Gely se mohou vyznačovat vlastnostmi jak pevných látek, tak kapalin. Důležitou roli s ohledem na zpracování a konečné vlastnosti hraje morfologie, molekulární a submolekulární struktura [1,2,3,8].

Gely se vyskytují všude kolem nás, např. v organismech rostlin a živočichů. Gelace je důležitým procesem v biologických procesech, viz. srážlivost krve, při níž dochází ke zvýšení její viskozity, dále pak v průmyslových odvětvích, farmacii a potravinářství [13].

2.1 Vlastnosti gelů

Mechanické vlastnosti

Gely se chovají jako tuhá elastická tělesa, a to až do kritické hodnoty tečného napětí, které závisí na koncentraci vazeb a jejich pevnosti. Některé gely vykazují tixotropní chování.

Elektrická vodivost a difuzivita

Disperzní prostředí hydrogelů může obsahovat disociované nízkomolekulární elektrolyty. V takovýchto případech jsou gely schopny vést elektrický proud, jehož hodnota zcela odpovídá velikosti jako v odpovídajícím solu.

Stárnutí gelů

První známky stárnutí gelů lze pozorovat u čerstvě vytvořené makromolekulární sítě, kdy narůstá počet styčných bodů. Dochází ke smršťování síťovité struktury z důvodu termodynamické nerovnováhy. Další proces degradace polymerní sítě je dán strukturou a vlastnostmi daného polymeru, stabilizátory, jinými aditivami, termodynamickými a povětrnostními podmínkami.

2.2 Gelový stav hmoty

Gely obsahující rozpouštědlo se nazývají lyogely a podle charakteru rozpouštědla se označují jako hydrogely (voda) nebo organogely (organické rozpouštědlo). Xerogely vznikají vysušením lyogelů, jejich nabobtnáním je lze převést do původního stavu lyogelu.

Přidáním elektrolytů či změnou teploty dochází k synerezi – ději, při kterém je kapalina vytlačována z gelu, jehož byla součástí [13].

Podle strukturálních kritérií se gely dělí na:

1. Laminární struktury zahrnující gelové mezifáze.
2. Kovalentní polymerní sítě – uzly sítě vznikly chemickou reakcí.
3. Fyzikálně síťované gely – mezimolekulární působení fyzikálních sil (např. vodíkové vazby, van der Waalsovy síly).
4. Partikulární gely – neuspořádané struktury [1,2].

2.3 Praktické využití gelů

- Bio-medicínské materiály: implantáty, biosenzory, protetické pomůcky.
- Inteligentní materiály: přesné dávkování léčiv, umělé svaly, kontaktní čočky.
- Materiály pro zpracování, záznam a uchování informací.

- Elektronický průmysl: baterie, akumulátory.
- Výroba nanomateriálů, povlaků, tenkých filmů.
- Gelové kuličky do koupele, regenerační gely, gely na vlasy.
- Krémy zklidňující pokožku po opalování zabraňující jejímu stárnutí.
- Repelenty, gely zklidňující bolest, gely s protizánětlivými účinky.
- Gelové svíčky, matrace, atd. [1,12].

3 DRUHY POLYMERNÍCH SÍTÍ (GELŮ)

Gely lze rozdělit podle jejich vlastností, které mají ve vysušeném stavu na reversibilní a ireversibilní.

3.1 Reversibilní gely

Reversibilní gely po vysušení zmenšují svůj objem, vznikají tak xerogely, které jsou schopny vrátit se do původního stavu botnáním.

3.1.1 Fyzikálně síťované gely

Fyzikálně síťované gely – prostřednictvím fyzikálních sil se úseky makromolekulárních řetězců spojují do uzlů, které se vzájemně liší svou velikostí, strukturou, pevností, vznikem a svou životností.

- Slabé gely – elastické pouze při nízkých hodnotách mechanického napětí, po dosažení kritické hodnoty (statická mez kluzu) či zvýšením teploty, se systém trvale deformuje .
- Silné gely – elastické (pevnost spojení uzlů).

Uzlové oblasti se tvoří mezi jednotlivými úseky makromolekul. Jednotlivé řetězce se spojují snížením afinity vysokomolekulární látky k rozpouštědлу:

- Rozpouštědlo o horší kvalitě.
- Snížení teploty.
- Zvýšení koncentrace [2,13].

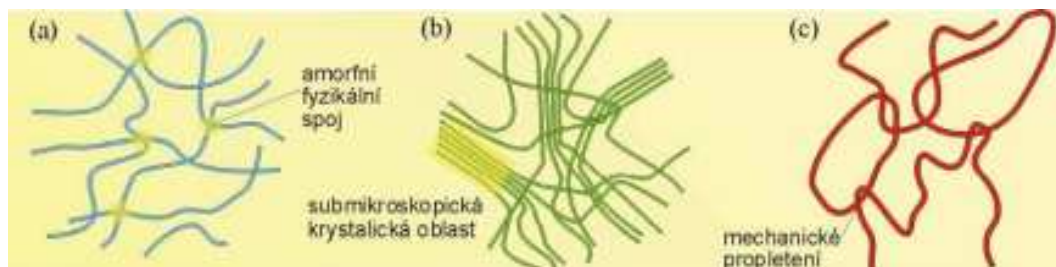
3.1.1.1 Amorfní gely, krystality

Amorfní gely vznikají fyzikálním síťováním za předpokladu, že se jedná o nahodilé a nepravidelné spojování makromolekul.

Pokud se makromolekuly při tvorbě gelu uspořádávají do krátkých rovnoběžných úseků, může dojít ke tvorbě krystalické mřížky. Dochází ke vzniku gelů, ve kterých se amorfní struktura střídá s krystalickou – krystality, viz. obr. 4.

Geometricky síťované gely vznikají krátkodobým mechanickým propletení řetězců v důsledku tepelného pohybu, viz. obr. 4

Termoreverzibilní gely jsou gely, které lze zvýšením teploty změnit na roztok a jeho ochlazením zpět na gel [2,13].



Obrázek 4: Síťovitá struktura vysokomolekulárních gelů - a) amorfní gel, b) gel s submikroskopickými krystalickými oblastmi, c) geometricky síťovaný gel [13].

3.1.2 Kovalentně síťované gely

Pro kovalentně síťované gely je charakteristická jejich vysoká strukturální pevnost. Jsou tvořeny nekonečnou trojrozměrnou sítí, která vzniká v důsledku:

- kondenzačních a adičních polymerací, nebo
- síťováním pre-syntetizovaných polymerů [1,2].

3.1.3 Faktory ovlivňující průběh gelace u vysokomolekulárních látek

- **Teplota:** gely mohou vznikat jak za vysokých tak za nízkých teplot v závislosti na typu vznikající sítě, tj. na typu vznikající vazby mezi jednotlivými řetězci.
- **pH:** vliv pH prostředí je dalším faktorem, který má vliv na vznik polymerní sítě. Nejvýhodnější hodnota pH pro průběh gelace je v oblasti izoelektrického bodu.
- **Koncentrace:** se vzrůstající koncentrací roste množství srážek mezi makromolekulami a zároveň i počet mezimolekulárních vazeb [13].

3.2 Ireversibilní gely

Vznikají gelací lyofobních solů v okamžiku, kdy dojde ke snížení agregátní stálosti systému, v tom okamžiku je narušen ochranný povrch a některé částice ztrácejí stabilitu (narušení například přidáním elektrolytu o nižší koncentraci než je koagulační práh).

Ireversibilní gely mají po vysušení zcela stejný objem jako původní lyogely, při ztrátě disperzního prostředí mohou určité malé množství kapaliny zpět absorbovat, ale nelze je přeměnit zpět na původní xerogely [2,13].

3.2.1 Faktory ovlivňující průběh gelace lyofobních solí

- Teplota: ovlivňuje vlastnosti a rychlost vzniku gelu.
- Tvar částic: nejjednodušší částice pro vznik gelu jsou částice anizometrické.
- Koncentrace disperzního podílu: pod určitou hranicí dochází pouze ke koagulaci, koncentrace disperzního podílu musí být vyšší než tato hranice.
- Mechanické působení: míchání – negativně ovlivňuje vznik gelu [13].

4 BOTNÁNÍ REVERZIBILNÍCH XEROGELŮ

Obecně k botnání polymerních látek v rozpouštědlech dochází za předpokladu, že polymer je sesíťován, popřípadě má vysokou molekulovou hmotnost.

Botnání probíhá pouze u reverzibilních gelů a je definováno jako:

„Pohlcování nízkomolekulárního rozpouštědla xerogelem, který přitom zvětšuje svou hmotnost a nabývá na objemu, vzniká lyogel, v němž pohlcovaná kapalina tvoří disperzní prostředí“ [10,13].

Faktory ovlivňující omezenost a neomezenost botnání:

- Struktura gelu.
- Pevnost uzlů v gelu.
- Afinity polymeru k rozpouštědлу.
- Teplota, tlak.
- Přítomnost dalších rozpuštěných látek.

Omezené botnání:

proces se zastavuje v okamžiku, kdy kapalina už není pohlcována xerogelem (i v případě jejího přebytku), je to stádium elastického lyogelu. Omezené botnání probíhá za předpokladu omezené mísitelnosti polymeru a daného rozpouštědla nebo u gelů, jejichž prostorové sítě jsou složeny z kovalentních vazeb.

Neomezené botnání:

ve stádiu elastického lyogelu se proces pohlcování kapaliny xerogelem nezastaví. Probíhá u gelů s fyzikálními vazbami [13].

4.1 Kvantitativní popis omezeného botnění

Stupeň nabotnění Q:

$$Q = \frac{V}{V^o} = \frac{1}{\varphi_2}$$

kde V - objem nabotněného gelu, V^o - objem suchého gelu, φ₂ - objemový zlomek polymeru v nabotněném stavu [2].

$$Q = \frac{m - m^o}{m^o} \cdot \frac{\rho_2}{\rho_1} + 1$$

kde m - hmotnost gelu před botněním, m^o - hmotnost gelu po botnění, φ₁ - hustota rozpouštědla, φ₂ - hustota suchého gelu [2].

Objemový koeficient botnění Φ: poměr objemu nabotněného gelu k objemu suchého gelu

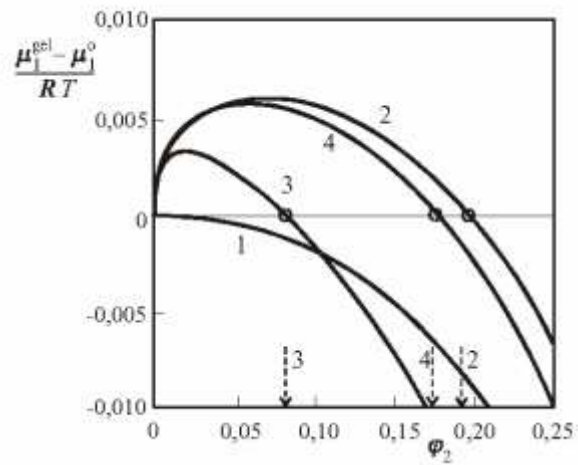
Botnací tlak: botnění lze zastavit přetlakem – botnací tlak

Botnací rovnováha:

je definována jako: „rovnost chemických potenciálů v polymerní a disperzní fázi (rozpouštědle).“

$$\mu_1^{GEL} = \mu_1^o$$

Na obr. 5. jsou znázorněny rovnovážné hodnoty objemového zlomku polymeru v nabotněném stavu φ₂ jako průsečíky křivek s osou nulovým bodě [2,13].



Obrázek 5: Botnání gelů v dobrém rozpouštědle, 1) lineární polymer, 2) nedisociovaný, 3) disociovaný v čisté vodě, 4) disociovaný v přítomnosti vody [2].

5 BIOKOMPATIBILNÍ MATERIÁLY

Jako biokompatibilní jsou označovány přírodní či syntetické materiály (polymery, keramika a jejich kompozity) používané pro doplnění nebo nahrazení funkce odumřelé nebo poškozené tkáně v lidském těle [15].

Tento typ materiálů se mimo jiné používá v oblasti tkáňového inženýrství kde je využíván jako substrát s vhodnou strukturou a složením pro plnění následujících funkcí:

- Vyplňování prostoru.
- Zprostředkování transportu bioaktivních molekul.
- Výživové a řídicí matrice pro růst nových buněk (tkáně) [22].

Povrch biokompatibilního materiálu musí být chemicky, fyzikálně (povrchová morfologie) a biologicky vhodný, aby byl přizpůsoben mechanickým vlastnostem živé tkáně pacienta [19].

Přírodní a syntetické biokompatibilní materiály jsou v tkáňovém inženýrství aplikovány v podobě hydrogelů.

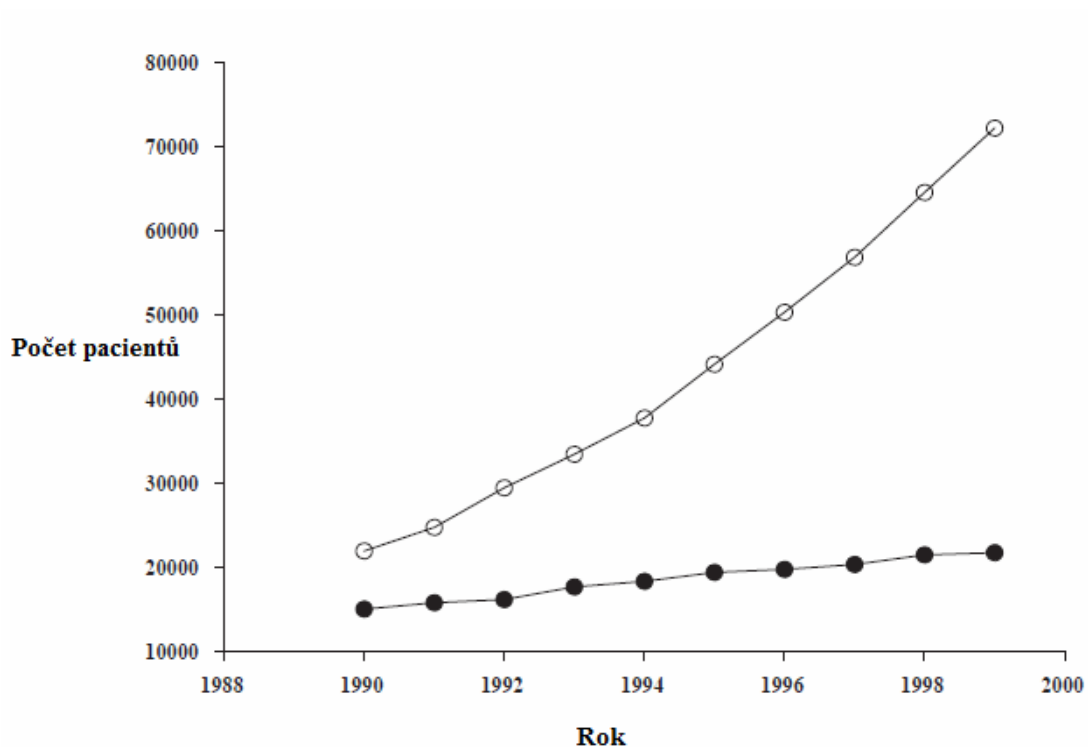
5.1 Požadavky na hydrogely pro lékařské použití

Na polymerní materiály používané v lékařství jsou kladeny vysoké požadavky, jako:

- Maximální čistota, sterilita.
- Vhodné chemické, fyzikální, mechanické vlastnosti pro konkrétní aplikaci.
- Stálý tvar a vlastnosti, které se nepříznivě nemění během trvalého styku s biologickým prostředím.
- Nekarcinogenní.

- Bez zánětlivý, bez alergický účinek v organismu.
- Snášenlivost s krví (předcházení trombózám) [12].

Každým rokem přibývají miliony pacientů, kteří trpí selháním funkce orgánů nebo tkání. Kvůli nedostatku dárců jsou transplantace omezeným řešením viz obr. 22.



Obrázek 6: Graf zobrazující počet uskutečněných transplantací (●) a počet pacientů čekajících na transplantaci (○) v letech 1990-1999 [22].

Revolučními postupy v terapii pacientů se zabývá právě tkáňové inženýrství umělých orgánů a tkání. Hlavním cílem je vhodná kombinace polymerního lešení (scaffoldu) s lidskou buňkou. Postup spočívá v odběru vzorku tkáně a jeho izolaci. Buňky jsou následně zakomponovány do tří-dimenzionální struktury polymerního lešení, který je svou strukturou podobný přirozené extracelulární matici v tkáních pacienta.

Polymerní lešení zprostředkovává transport buněk na konkrétní místo v lidském těle. Vytváří prostředí pro tvorbu nových tkání, kontroluje funkci a nahrazení umělé tkáně, šíří živiny a podporuje růstové faktory [24].

Nejvíce používanými syntetickými hydrogely v tkáňovém inženýrství jsou PEO a PVA.

Mezi přírodní polymery používané pro tkáňové inženýrství patří například kyselina hyaluronová, želatina, chitosan a alginát, vykazující se netoxičností vzhledem k růstu buněk a dobrou biokompatibilitou.

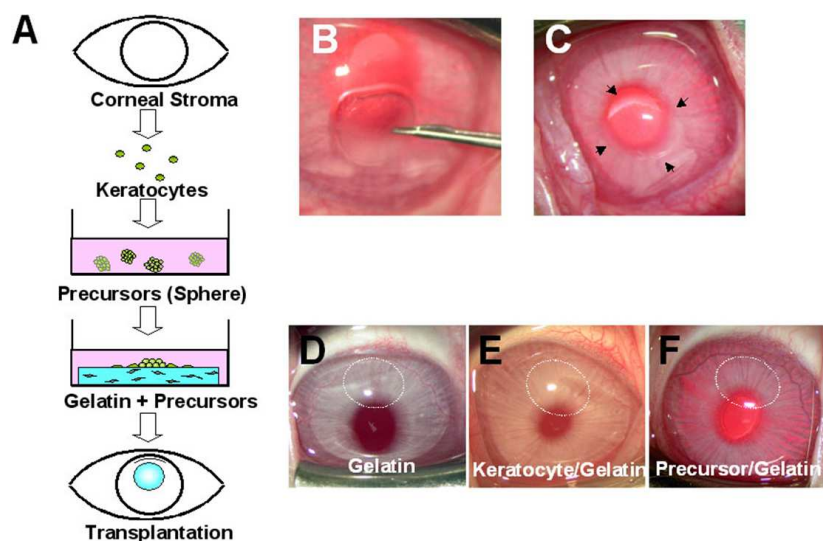
HA matrice v podobě hydrogelů nevytvářejí vhodné podmínky pro adhezi buněk, což je způsobeno aniontovým charakterem HA řetězců. Molekuly HA jsou tedy záporně nabitě stejně jako spousta proteinů a buněk. Přidáním želatiny k HA je tedy posílena schopnost adheze buněk uvnitř tohoto lešení (scaffoldu). Takovýto typ materiálu lze s výhodou použít v měkkém tkáňovém inženýrství.

Mezi zkoumané mechanické vlastnosti vytvářených implantátů patří modul pružnosti, síla, tuhost a optimální přenos zátěže mezi povrchem implantátu a rozhraním živé tkáně.

Přijetí implantované části tkáně, záleží rovněž na mnoha dalších faktorech, jako je například zdravotní stav pacienta, jeho fyzická a psychická kondice, způsob operace, použitá technika, sterilizace atd. [23,24].

Využití biomateriálů, hydrogelů:

- Implantáty: části kostí, šlachy, kloubní náhrady, zubní náhrady, srdeční chlopně, cévní protézy, čočky
- Lékařské zařízení: biosenzory, kardiostimulátory



Obrázek 7: Příklad využití biokompatibilních materiálů při transplantaci oční čočky [4]

Tkáně jsou obecně rozdělovány na měkké a tvrdé, které oproti měkkým mají vyšší modul pružnosti a vyšší pevnost v tahu. Mezi tvrdé tkáně patří zuby a kosti. K měkkým tkáním se řadí cévy, kůže, vazy a chrupavky [19].

5.2 Léčba tvrdých tkání

Tvrdé tkáně jsou nahrazovány různými slitinami kovů a keramik. Nicméně tyto materiály mají spoustu negativních vlastností. Proto jsou navrhovány zejména polymerní kompozitní biomateriály, které mají řadou výhod jako například:

- Absence koroze a únavového lomu kovových slitin.
- Nedochozí k vylučování iontů kovů (Cr, Ni), které vedou k uvolnění implantátu.
- Pohodlí pro pacienta.
- Nevyvolávají alergické kožních reakcí.

- Nevývívějí stres a velkou zátěž na kost – (u kovů a keramiky dochází k remodelaci kosti a zvýšené pórovitosti).
- Mají vynikající mechanické vlastnosti.
- Nízka hmotnost.
- Jsou kompatibilní se současnými diagnostickými metodami jako počítačová tomografie a magnetická rezonance.

Zlomeniny kostí

Léčba zlomeniny kostí pomocí standardních postupů vyžaduje:

- Vnější fixaci Kirschnerovými dráty nebo kolíky, externími fixátory z nerezové oceli, které přinášející nepohodlí pacientovi.
- Vnitřní fixaci včetně nutnosti otevření fraktury s využitím drátů, čepů, šroubů z Ti, Co-Cr slitin.

Tyto problémy řeší biokompatibilní kompozitní materiály jak bylo uvedeno výše.

Díky jejich použití lze přistoupit k méně invazivním metodám mezi které patří injekční aplikace snižující celkové náklady na operace a pooperační péči.

Zejména lepidivé vlastnosti hydrogelu, například na bázi kyseliny hyaluronové podporují splynutí materiálu s živou tkání a zlepšují tak výsledek celého zákroku. Takováto aplikace biomateriálu přímo do místa poškozené kosti tak zajišťuje dokonalé splynutí.

Pro tyto účely se používají vstřebatelné polymery jako například alginát (obsažený v hnědých mořských řasách a bakteriích) a želatina v kombinaci s bioaktivními částicemi přicházejí do přímého kontaktu s živou tkání [19,21].

5.3 Léčba měkkých tkání

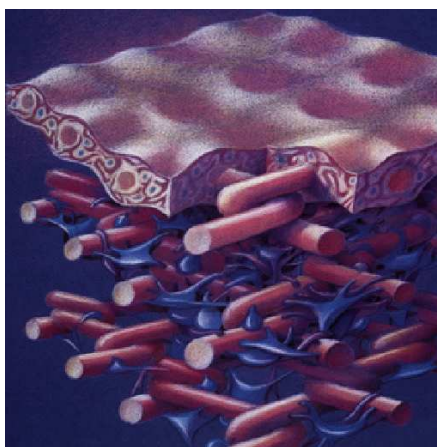
Materiály používané pro léčení měkkých tkání zajišťují mechanickou podporu tkání, izolují, uzavírají, vyplňují poškozený prostor, zajišťují výměnu látek a vytvářejí matrice (scaffold) pro růst tkáně.

Ošetření ran po popálení

Na části těla poraněné popálením jsou aplikovány obvazy, které musí být pevné a ohebné kvůli nepravidelné struktuře povrchu popáleniny. Musí zabraňovat ztrátám tekutin, biomolekul z rány a zároveň vytvářet bariéru proti vstupujícím bakteriím. Zároveň musí být tento obvaz propustný do určité míry, aby mohlo docházet k odpařování vody. Jedním z příkladů takového systému může být kolagenová porézní vrstva.

Regenerace chrupavek

Jednou z významných oblastí aplikace biokompatibilních materiálů je regenerace (léčba, nahrazení) opotřebovaných chrupavek v lidském těle. Materiály pro tyto účely musí být především hydrofilní, musí mít kontrolovatelný obsah vody, pevnost a hladkost, viz. obr. 7 [19,21].



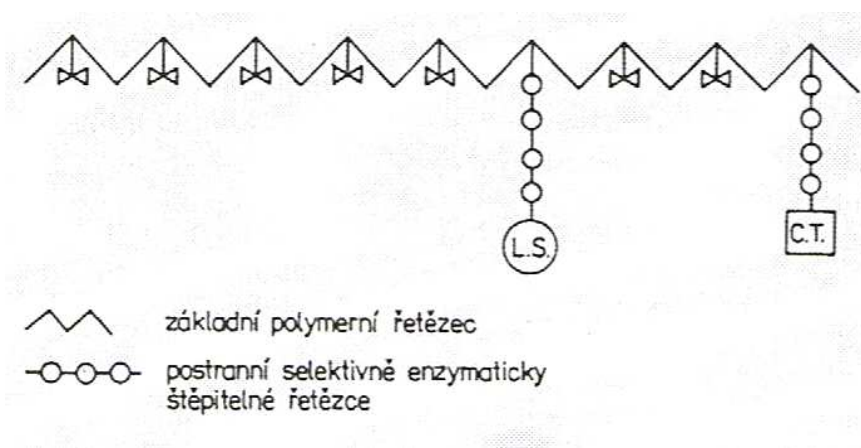
Obrázek 8: Příklad hydrogelu podporujícího růst a interakci chrupavky v poškozené tkáni [27].

5.4 Matrice pro řízené dávkování léků

Jednou z významných oblastí, které je v současné době věnována zvýšená pozornost, je příprava polymerních materiálů pro kontrolované dávkování léků. Lékové formy druhé generace (ve formě tablet, kapslí a injekcí) kontrolovaně uvolňují lékovou substanci a po určitou dobu udržují hodnotu její koncentrace. Stejně podmínky řízeného dávkování léků splňují i léky vstřebávající se kůží a sliznicí.

Nejnověji vyvíjené formy léčiv jsou označovány jako lékové formy třetí generace, viz. obr. 9. Velkou předností lékových forem třetí generace oproti lékům druhé generace, je cílené rozdělení lékové substance do postižených buněk, tkání a orgánů. Tímto mechanismem tato léčiva snižují nežádoucí účinky na jiné části organismu.

Mezi nejpoužívanější polymerní materiály pro orální užívání s kontrolovaným uvolňováním patří želatina, škrob a jeho deriváty a deriváty celulosy (hydroxypropylcelulóza, ethylcelulóza aj.) [12].

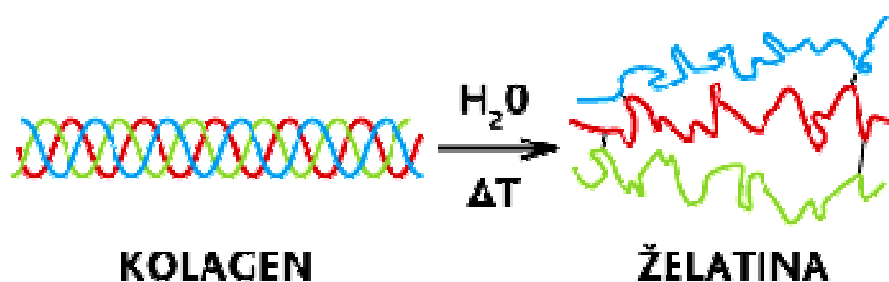


Obrázek 9: Schematické znázornění lékové formy třetí generace

(L.S.-léková substance, C.T. – látka směřující transport) [12].

5.5 Želatina

Zahříváním vlhkého kolagenu při teplotě 60 °C probíhá zvýšené botnání a mění se jeho fyzikálně chemické vlastnosti, vzniká želatina. Ochlazením tohoto systému dochází k želatinizaci – tunutí koloidních roztoků želatiny [11,18].



Obrázek 10: Schéma vzniku želatiny [18].

Kolagen je vláknitá živočišná bílkovina obsažená v orgánech, cévních stěnách, bazálních membránách, v rohovkách, kůži, kostech, chrupavkách a vazivech. Má velkou pevnost v tahu, ale malou schopnost deformace. Kolagen se nerozpouští ve studené vodě.

Kolagen má široké uplatnění ve farmacii jako kolagenové membrány, chirurgické nitě, plstí, pěny, v kosmetickém průmyslu jako složka přípravků oddalujících stárnutí pleti, i v potravinářství jako doplňky stravy pro výživu kloubů a šlach.

Želatina připravovaná z kolagenu patří mezi nejdéle používané polymery v lékařství, využívané pro kontrolované dávkování léků ve formě kapslí [12].

5.6 Polysacharidy

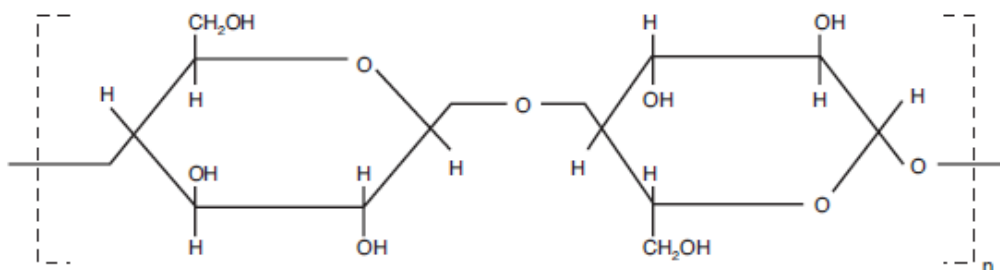
Polysacharidy se řadí mezi přírodní polymery, které mají i široké technické uplatnění. Skládají se z mnoha molekul monosacharidů vzájemně spojených glykosidickými vazbami. Polysacharidy se od sebe liší povahou monosacharidového zbytku, stupněm větvení, délkou řetězce a v neposlední řadě i funkcí, kterou mají v organismu (strukturní, zásobní).

Obecně lze polysacharidy rozdělit na homoglykany obsahující jeden typ monosacharidových jednotek, či heteroglykany, které obsahují dva nebo více monosacharidových jednotek.

Mezi důležité polysacharidy, které budou dále rozvedeny, patří celulóza, hydroxyethylcelulóza a kyselina hyaluronová [9,14].

5.6.1 Celulóza

Celulóza je polysacharid tvořící buněčné stěny rostlin. Z 90% je obsažena v suchém stavu v bavlně, z 50% ve dřevě, z kterého se nejčastěji získává.



Obrázek 11: Strukturní jednotka celulóza [16].

Celulóza tvoří přímé a dlouhé řetězce, viz. obr. 11. Je netavitelná a ve vodě nerozpustná, její vlastnosti se často nemění ani za extrémních podmínek. Obsahuje intramolekulární vodíkové vazby, které jsou příčinou její nerozpustnosti ve vodě.

Odstraněním vodíků na hydroxyly dojde ke snížení koheze řetězců, a tím se v podstatě změni vlastnosti polymeru. Díky čemuž lze celulózu přeměnit na různé deriváty, které se svými vlastnostmi odlišují od původního polymeru.

5.6.1.1 Deriváty celulózy

Nitrocelulóza – střelný prach, celuloid (galanterie), laky na dřevo a kov, lepidla, průmysl hraček, celofánové folie.

Acetát celulózy – vlákna do cigaretových filtrů, výroba plastických hmot a filmových podložek, ochranné koloidy ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu, vodorozpustná lepidla.

Methylcelulóza – příprava zahušťovacích prostředků, aditiva do krémů.

Etylcelulóza – elektroizolační nátěry, filmy, fólie.

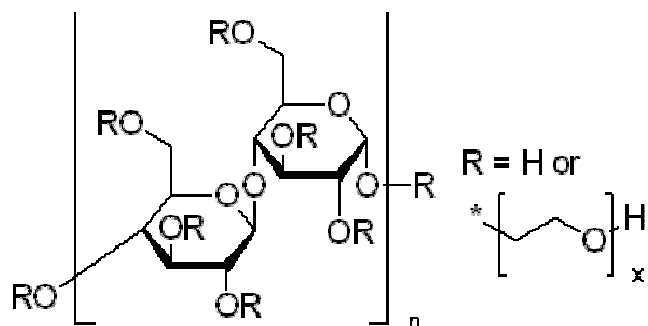
Benzylcelulóza – impregnační prostředky, filmy, fólie, ochranné nátěry.

Karboxymethylcelulóza – lepidla na tapety.

Xantát celulózy – celofán [3,9,10,11,14].

5.6.2 Hydroxyethylcelulóza (HEC)

HEC je složena z dlouhého řetězce celulózy a postranních hydroxyethylových řetězců, viz. obr. 12. Je to nepolární polymer s ochrannými koloidními účinky, je snadno rozpustný ve studené i teplé vodě, má schopnost zadržovat a vázat vodu, vytvářet gely, je netoxická, velmi dobře snáší rozpuštěné elektrolyty [16].



Obrázek 12: Hydroxyethylcelulóza [29].

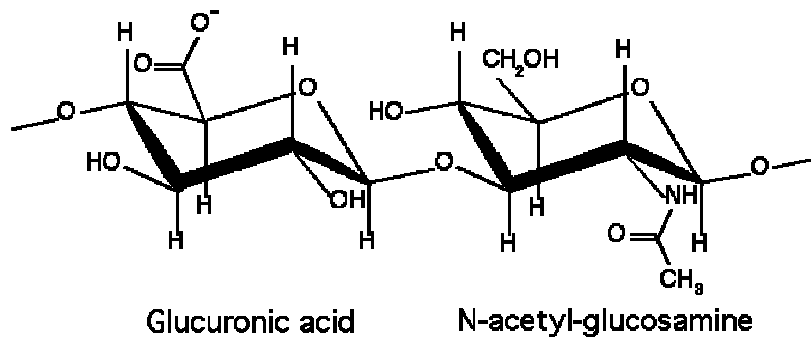
5.6.2.1 Oblasti aplikace HEC

- **Kosmetika:** zahušťovadlo, pojivo a stabilizátor šampónů a sprejů na vlasy, pleťových vod, výroba antibakteriálních gelů na čištění dlaní.
- **Zemědělství:** vodné pesticidní spreje vytvářející ochranné filmy na listech rostlin.
- **Stavební materiály:** aditivum do stavebních hmot (cementu, vápna, sádry, malty, atd.).
- **Zahušťování nátěrových barev.**
- **Prostředky do domácnosti:** jako zahušťovadlo a stabilizátor v tekutých pracích a čisticích prostředcích [16].

5.6.3 Kyselina hyaluronová (HA)

Kyselina hyaluronová je lineární polysacharid, který se řadí mezi heteropolysacharidy. Je složena z D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu, viz. obr. 13.

V menší míře má své zastoupení ve všech druzích pojivových tkání, větší procento kyseliny hyaluronové se nachází ve sklivci, synoviální tekutině a pupečníku [9,16].



Obrázek 13: Strukturní vzorec kyseliny hyaluronové [26].

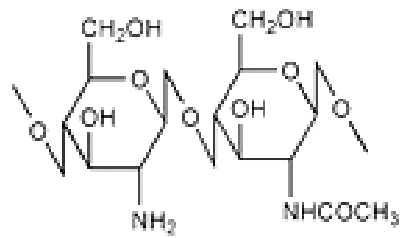
Deriváty kyseliny hyaluronové mají široké uplatnění v medicínských aplikacích (oční chirurgii, v lékových formách, přípravky pro hojení ran, atd.).

5.6.3.1 Příklady aplikací kyseliny hyaluronové

- HA hydrogely pro výplň kloubů a kůže, výroba hydrogelů s časovou a mechanickou odolností, s injekčními aplikacemi, atd.
- Fyzikální hydrogely: alternativa k chemicky síťovaným hydrogelům.
- Lékové formy s cíleným dávkováním. Lék je v takovýchto systémech vázán na HA kovalentně, v okamžiku, kdy dojde ke štěpení kovalentní vazby v organismu, je lék uvolněn (v ideálním případě na požadovaném místě) [17].

5.6.4 Chitosan

Chitosan je polysacharid svou strukturou podobný celulóze, který se získává z chitinu, viz. obr. 14. vyskytuje se v exoskeletu hmyzu, v krunýřích krabů, raků, schránkách mušlí a v houbách. Pro své vlastnosti spojené s jeho strukturou a odbouratelnosti enzymy v lidském těle je zkoumán v mnoha oblastech tkáňového inženýrství [9,25].



Obrázek 14: Strukturální vzorec chitosanu [25]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 POUŽITÉ SYSTÉMY, JEJICH PŘÍPRAVA A PODMÍNKY MĚŘENÍ

S cílem prostudovat rychlost botnání polymerních filmů 2-HEC při rozdílných podmínkách byly nezbytné:

- Pečlivě připravit veškeré substráty (skleněné nádoby) pro přípravu a solidifikaci polymerních roztoků.
- Precizně rozpustit vzorky 2-HEC, provést jejich filtraci a nechat je dorozpouštět za stálé teploty.
- Připravit polymerní filmy za přesně definovaných podmínek (hmotnostní podíl polymeru, teplota).
- Stabilizovat polymerní film a provádět přesné měření jejich hmotností.
- Sledovat změny hmotnosti polymerních filmů v dlouhých časových intervalech.

6.1 Čištění laboratorního skla

Čištění laboratorního skla je základním předpokladem precizního měření, kterému musí být věnována zvýšená pozornost, zejména s ohledem na přítomnost tenzidů.

Pro obzvláště čisté sklo jsou používány speciální lázně se silně toxickými chemikáliemi. Veškeré použité sklo bylo po 15 minutách postupně vkládáno do tří různě koncentrovaných lázní kyseliny chromsírové. V následujícím kroku bylo nezbytné ponořit toto sklo do roztoku kyseliny chlorovodíkové (HCl:H₂O v poměru 1:10) a následně do de-ionizované vody. Poté bylo sklo očištěno acetonem, de-ionizovanou vodou a etanolem. Dále bylo vloženo do sušárny přehřáté na teplotu 120 °C, kde bylo sterilizováno po dobu 20 minut. Laboratorní sklo (misky) pro přípravu polymerních filmů byly bezprostředně po vytáhnutí ze sušárny uloženy do exikátoru, skleněné lahve pro přípravu polymerních roztoků obráceny dnem vzhůru a po vychladnutí uzavřeny plastovými víčky.

Veškeré plastové nádobí jako uzávěry lahví, misky a nádoby byly ošetřeny po sobě jdoucími kroky: de-ionizovaná voda, aceton, de-ionizovaná voda, líc a vysterilizovány v sušárně za stejných podmínek jako u laboratorního skla.

6.2 Příprava polymerních roztoků

Polymerní roztoky byly připravovány z prášků 2-HEC o rozdílných molekulových hmotnostech, zakoupené od společnosti Sigma Aldrich. Byly použity následující vzorky 2-HEC:

- M90, $M_w = 90\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- M720, $M_w = 720\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- M1300, $M_w = 1\,300\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Vzorky 2-HEC byly rozpouštěny za stálé teploty ($T_r = 30\text{ °C}$ nebo $T_r = 70\text{ °C}$) a míchání v temperační lázni na magnetickém míchadle. Rozpouštění probíhalo po dobu 3,5 hodiny. Takto připravené roztoky byly filtrovány pomocí frit S1 a S2, které byly před použitím řádně vyčištěny. Po filtraci byly roztoky přelity do skladovacích nádob a následně uloženy do lednice kde byly udržovány při teplotě cca 5 °C po dobu 3 dnů před použitím. Tento postup uložení vzorků (roztoků) 2-HEC byl zvolen záměrně, aby došlo k jejich dorozpouštění a stabilizaci ve vodném prostředí tvořeném de-ionizovanou vodou.

Zásobní roztoky 2-HEC o různých molekulových hmotnostech (M90 až M1300) obsahovaly 1 hm. % polymeru. Z těchto zásobních roztoků byly připravovány dva různé typy směsí roztoků, tak aby se změnil poměr 2-HEC v roztoku a především distribuce molekulových hmotností tohoto polymeru.

Pro přípravu polymerních filmů byly použity tyto roztoky:

- roztok značený jako **SMW1** se skládal z 75g 1% M90, 6g 1% M720, 4,13g 1% M1300 a 64,87g de-ionizované vody s vodivostí $0,01\text{ }\mu\text{S/cm}$.

Podíl polymeru v roztoku 0,57 g na 100 ml

Podíl jednotlivých frakcí polymeru M90:M720:M1300 = 2:0,16:0,11

- roztok značený jako **SMW2** se skládal z 75g 1% M90, 18,75g 1% M720, 18,75g 1% M1300 a 37,5g de-ionizované vody s vodivostí 0,01 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Podíl polymeru v roztoku 0,75 g na 100 ml

Podíl jednotlivých frakcí polymeru M90:M720:M1300 = 2:0,5:0,5

- roztok značený jako **M90** se skládal z 150g 1% M90,

Podíl polymeru v roztoku 1 g na 100 ml

- roztok značený jako 0,25% **M1300** se skládal z 150g 0,25% M1300,

Podíl polymeru v roztoku 0,25 g na 100 ml

6.3 Příprava polymerních filmů

Polymerní filmy byly solidifikovány ve skleněných Petriho miskách o průměru 7 cm a výšce 1 cm. Do těchto misek bylo navažováno 27,2 g daného roztoku (SMW1, SMW2, M90). Takto připravené vzorky byly umístěny do sušárny značky Memmert bez nucené cirkulace vzduchu a solifikovány (sušeny) za konstantní teploty $T_s = 30\text{ }^\circ\text{C}$ nebo $70\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 1 až 2 dnů. Po vysušení polymerního roztoku došlo k vytvoření polymerního filmu, který byl ponechán na Petriho misce a následně uložen do exikátoru. Vzorky byly v exikátoru skladovány po dobu minimálně 7 dnů, aby došlo k dosušení připravených filmů 2-HEC, vyrovnání zbytkového obsahu vody ve vzorku.

6.4 Vlastní měření – sledování změn hmotnosti polymeru v čase

Podstata experimentu spočívala v umístění Petriho misek s polymerními filmy 2-HEC do plastových dóz s víkem opatřených těsněním, tak aby nedocházelo k výměně atmosféry (vlhkosti) mezi prostorem uvnitř dózy a okolím. Spolu se vzorkem 2-HEC filmu byly do dózy umístěny polystyrenové (PS) misky naplněné 3/4 de-ionizovanou vodou. V průběhu času docházelo k odpařování vody z PS-misek, která následovně kondenzovala na stěnách boxu a zároveň byla sorbována hydroskopickým materiálem, tj. filme 2-HEC. Díky vysoké

vlhkosti uvnitř boxu rostla hmotnost polymerního filmu uvnitř misky a to různě rychle v závislosti na teplotě prostředí, v němž byl box uložen.

Boxy se zkoumanými filmy byly uloženy:

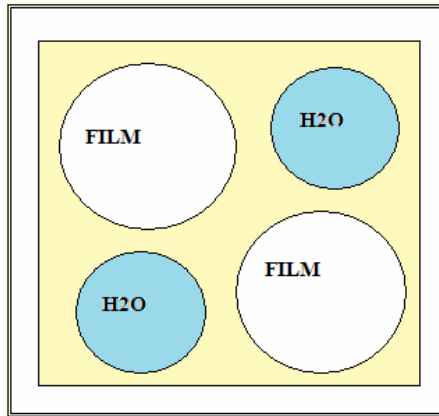
- v lednici při teplotě cca 5 °C,
- v laboratoři při teplotě cca 22 °C,
- v sušárně při teplotě 30 °C,
- v sušárně při teplotě 50 °C,
- v sušárně při teplotě 65 °C.

Hmotnost filmů byla kontrolována v pravidelných časových intervalech (24 nebo 72 hodin) pomocí vážení na analytických vahách pracujících s přesností 0,01 mg.

Vzhledem k nutnosti vyjmutí Petriho misky s filmem 2-HEC z boxu pro jeho pravidelné vážení, mohou být prováděná měření zatížena systematickou chybou. Tuto chybu lze ovšem zanedbat vzhledem k dlouhým časovým intervalům mezi jednotlivými váženími (24-72 hod), které probíhaly velmi rychle (do 10 min.).

Nutno rovněž dodat, že nebyla stanovována vlhkost ani tlak uvnitř boxů, vzhledem k srovnávacímu charakteru experimentu. To znamená, že srovnávané systémy byly umístěny ve stejnou dobu do stejného prostředí, co se všech podmínek týče.

Jednotlivá měření byla vzhledem k časové náročnosti experimentů opakována pouze dvakrát, což je málo na stanovení chyb jednotlivých měření. Nicméně porovnáním výsledků lze konstatovat, že trendy jednotlivých změn byly srovnatelné.

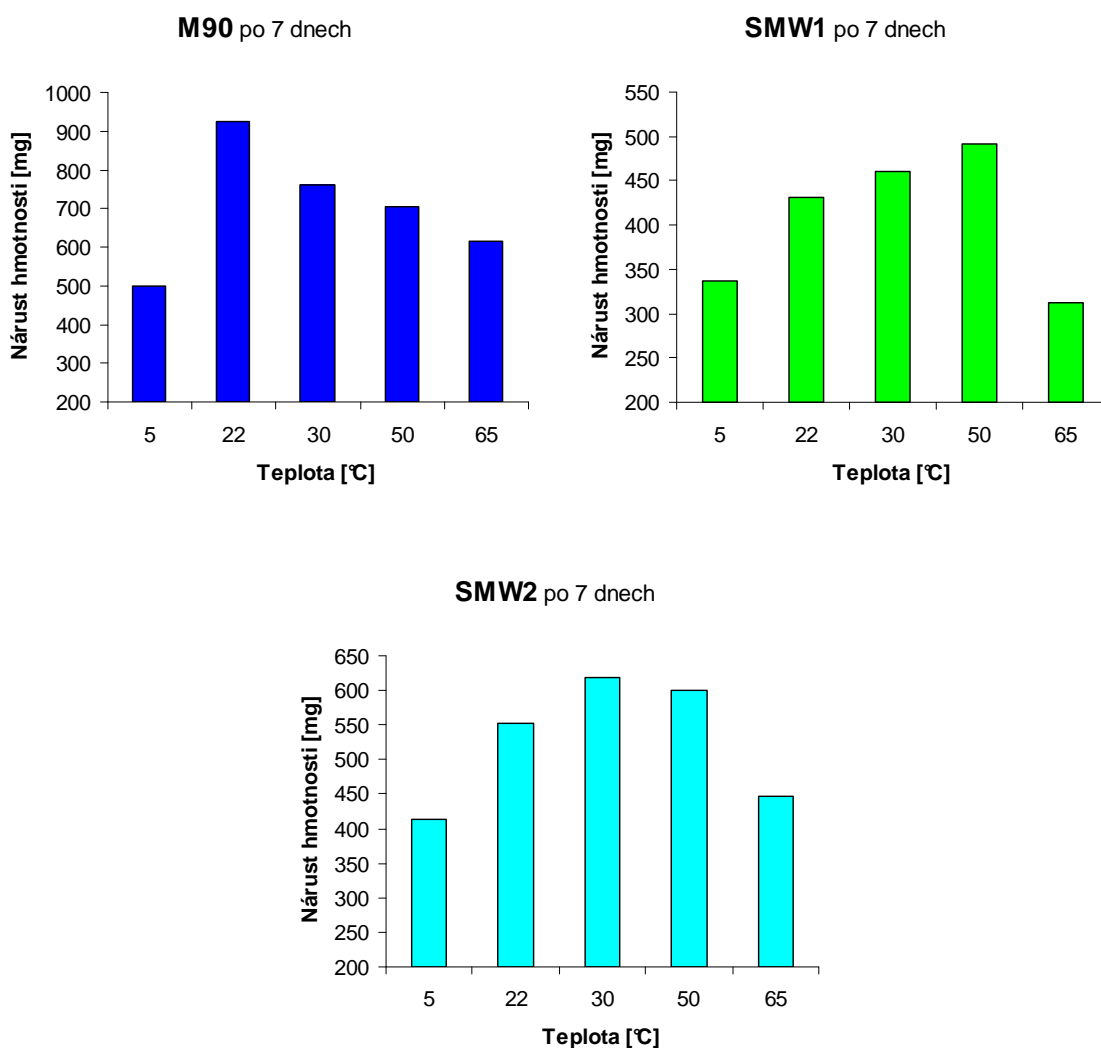


Obrázek 15: Schéma experimentu, umístění vzorků (FILM) do uzavřeného boxu s miskami obsahujícími vodu (H₂O).

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem výše popsaných experimentů, viz. kapitola 6, bylo zjistit vliv teploty a času na změnu hmotnosti polymerního hydrogelu (filmu) 2-HEC o různé tepelné historii a distribuci molekulových hmotností.

7.1 Vliv teploty botnání

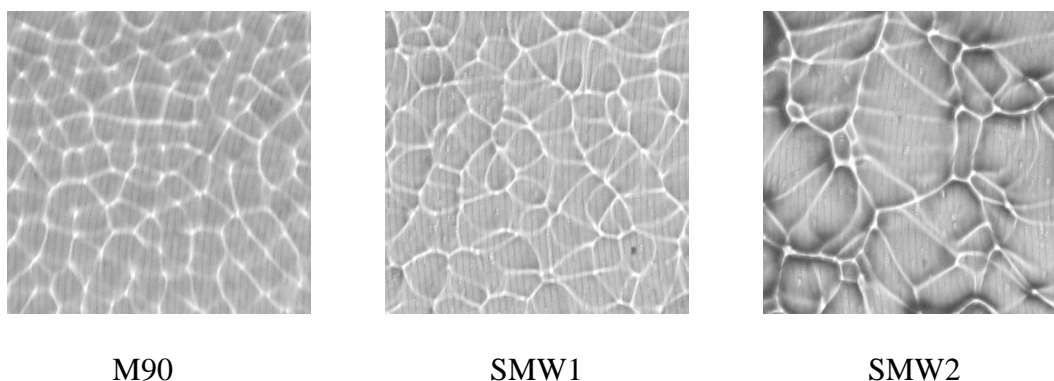


Obrázek 16: Srovnání jednotlivých hydrogelů 2-HEC o různých distribucích Mw (M90, SMW1, SMW2) vzhledem k teplotě botnání po 7 dnech kdy byl film vystaven působení vlhkosti uvnitř plastového boxu.

Z porovnání jednotlivých grafů na obr. 16 lze vypočítat rozdílný vliv teploty na systémy o rozdílné distribuci molekulových hmotností. Systém o M90 dosahuje maxima absorbované vody při teplotě 22 °C s rostoucí teplotou lze dále pozorovat klesající trend v nárůstu hmotnosti. Vzorek SMW1 obsahující malé množství vysokomolekulárních frakcí 2-HEC (M720 a M1300) vykazuje zcela opačný trend oproti vzorku M90 s maximem absorbované vody při 50 °C. Přidáním většího podílu vysokomolekulární frakcí do systému o M90 vznikl vzorek označený jako SMW2, viz. podkapitola 6.2. Tento systém vykazuje zcela odlišný průběh oproti předešlým dvou vzorkům (M90, SMW1). Maximu absorbované vody je v tomto případě (SMW2) je při teplotě 30 °C a následně lze pozorovat pokles hmotnosti vzorku, tj. menší množství absorbované vody. Společným rysem pro všechny systémy je, že vysoká teplota 65 °C má podobný vliv na množství absorbované voda jako nízká teplota 5 °C.

Nárůst hmotnosti (mg), viz. grafech na obr. 16 až 20 odpovídá změně hmotnosti polymerního hydrogelu (filmu) na Petriho misce, tj. od naměřené hmotnosti byla odečtena hmotnost Petriho misky a filmu v ní. Zde nutno dodat, že nárůst hmotnosti uvedený v grafech na obr. 16 až 20 není zanedbatelný vzhledem k hmotnosti polymerního hydrogelu (filmu) v Petriho misce pro M90 = 272 mg, pro SMW1 = 155 mg a pro SMW2 = 204 mg.

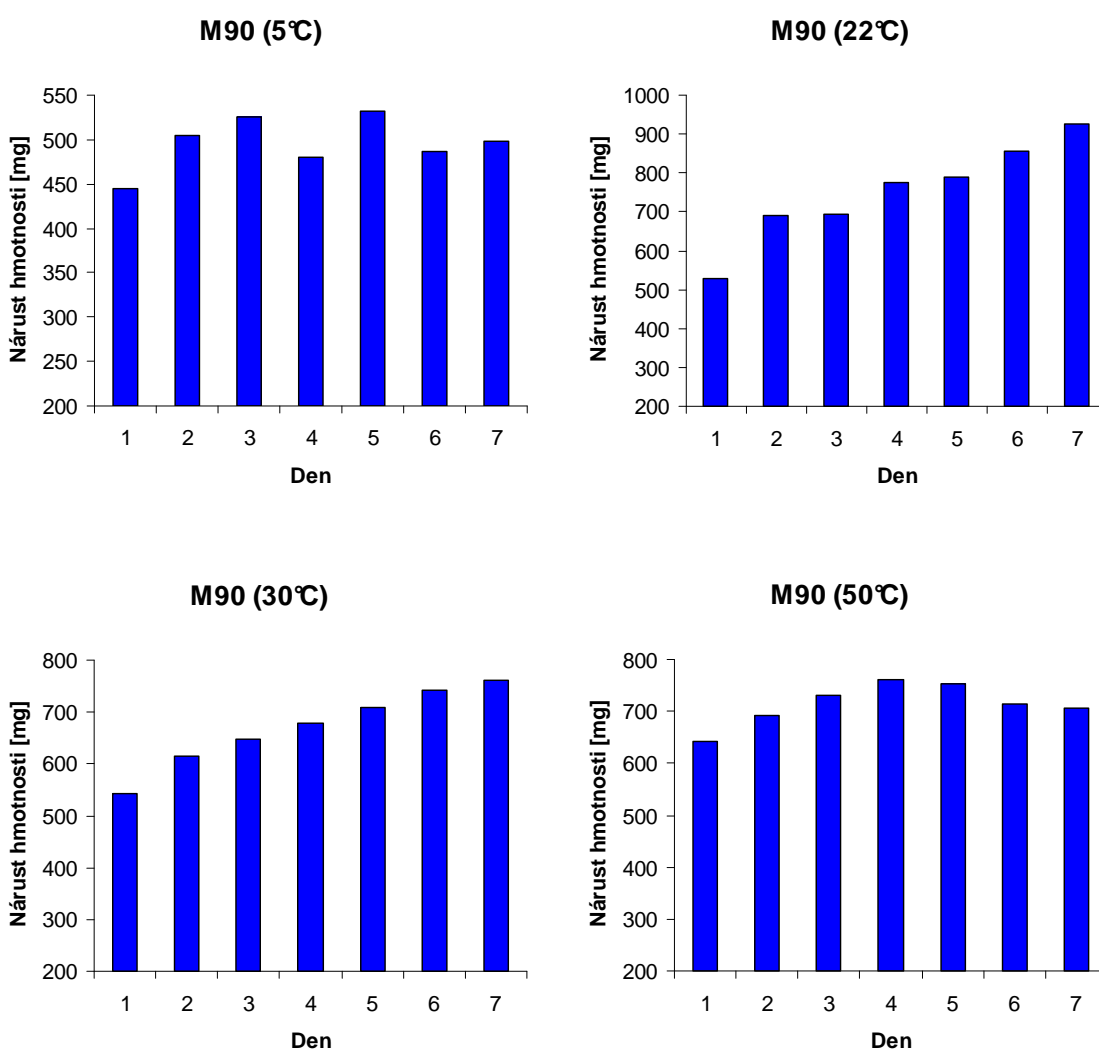
Poznámka: Složení jednotlivých polymerních vzorků (filmů) bylo zvoleno záměrně vzhledem k rozdílnému charakteru vznikajících samo-organizovaných struktur, viz. obr. 17, které byly studovány v disertační práci A. Minaříka [5].



Obrázek 17: Charakteristické samo-organizované struktury v polymerních filmech 2-HEC připravených v teplotních polích z roztoků 2-HEC o rozdílné distribuci molekulových hmotností a viskozitách [5].

7.2 Vliv času botnání

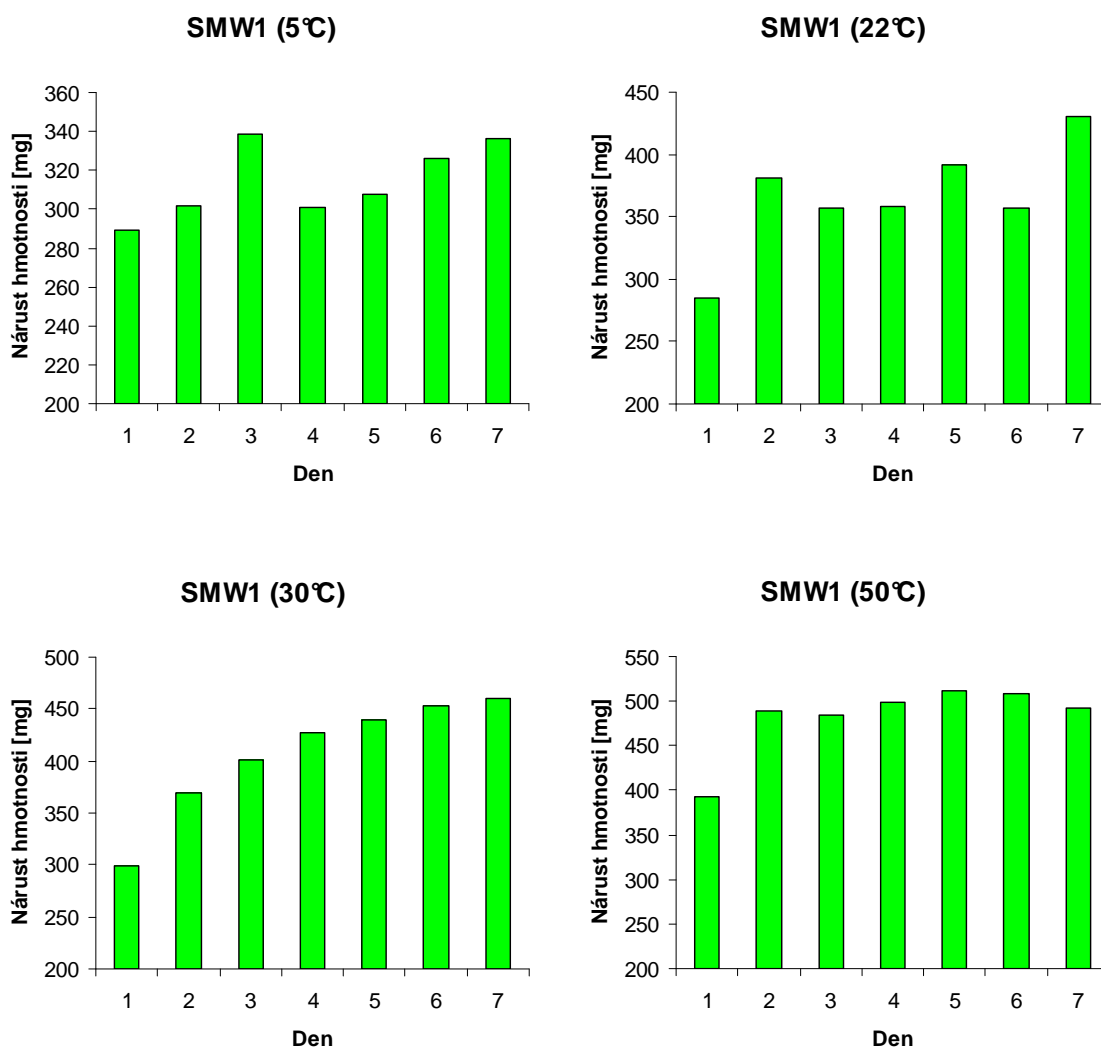
V předešlé podkapitole byl zkoumán vliv teploty na rychlost botnání (nárůst hmotnosti) polymerního hydrogelu 2-HEC. V této části výsledků se zaměříme na vliv času botnání při konstantní teplotě ($T_b = 5; 22; 30; 50\text{ }^\circ\text{C}$). Na následujících obrázcích (grafech) nebudeme srovnávat jednotlivé systémy mezi sebou, ale zaměříme se na každý systém zvlášť.



Obrázek 18: Srovnání změn hmotnosti hydrogelů 2-HEC o M90 při různých teplotách botnání ($T_b = 5; 22; 30; 50\text{ }^\circ\text{C}$) v plastových boxech od 1 po 7 den.

Poznámka: Dny brané v úvahu na grafech v obr. 18 až 20 odpovídají měření změny hmotnosti po 24 hodinách pro první den, respektive až po 168 hodin pro 7 den.

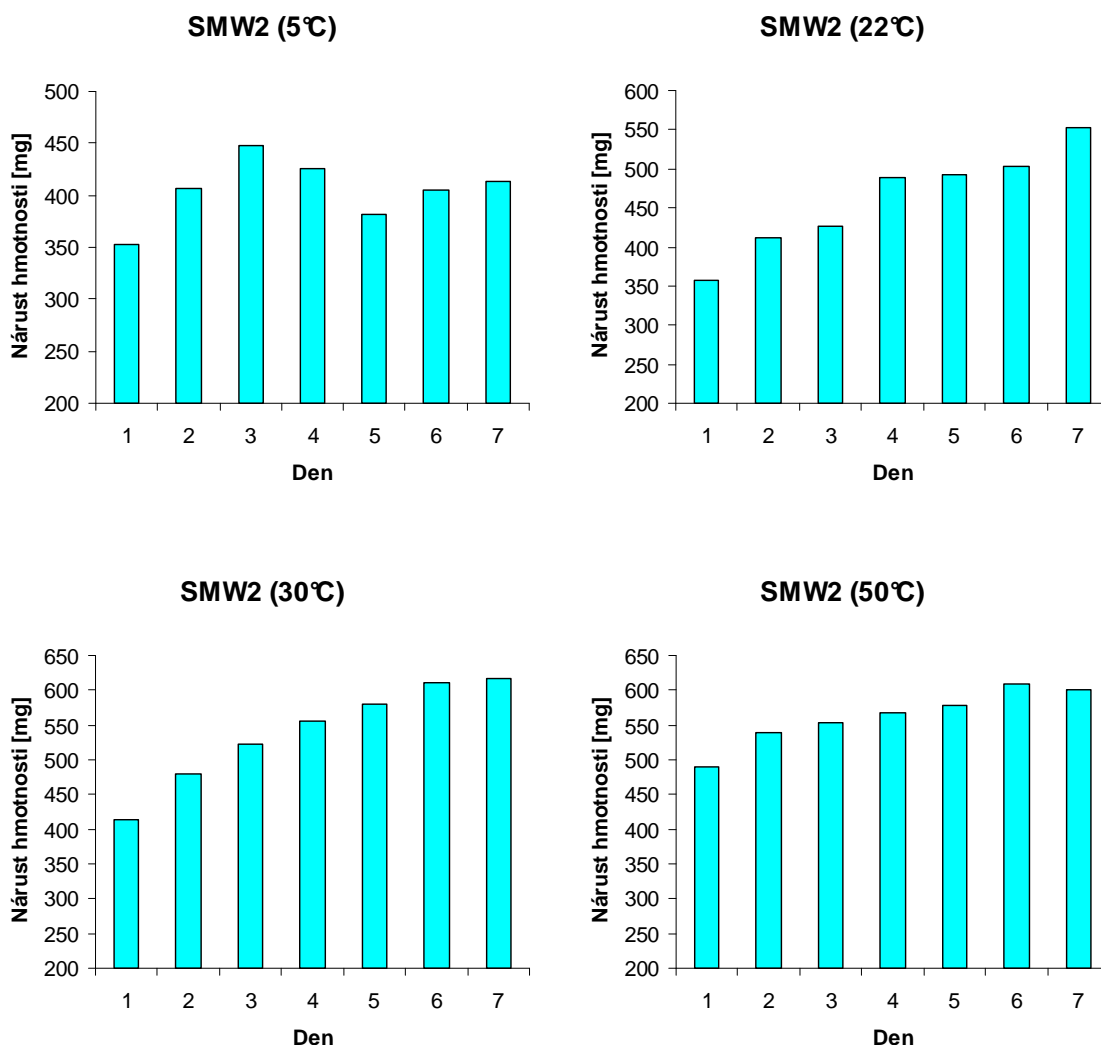
Z porovnání grafů na obr. 18 plyne, že vzorek umístěný do lednice při cca 5 °C vykazuje náhodné skokové změny hmotnosti hydrogelu 2-HEC, což může být způsobeno chybami měření a změnami teploty při vážení, které probíhalo za laboratorní teploty. Nárůst hmotnosti pro tento vzorek je ze všech srovnávaných systémů M90 nejmenší. Druhý vzorek umístěný v laboratoři při cca 22 °C vykazoval systematický nárůst hmotnosti v čase stejně jako vzorek temperovaný na 30 °C. Pozoruhodné chování vykazuje poslední vzorek M90, který byl temperován na 50 °C. Tento vzorek 4. den dosáhl maximální hmotnosti a následně začal vykazovat pokles, který se postupně zastavoval.



Obrázek 19: Srovnání změn hmotnosti hydrogelů 2-HEC o SMW1 při různých teplotách botnání ($T_b = 5; 22; 30; 50$ °C) v plastových boxech od 1 po 7 den.

System SMW1 se choval podobně jako M90 pouze v případě $T_b = 30\text{ }^\circ\text{C}$, viz. srovnání obr. 18 a 19. Zajímavým faktem je že tento vzorek, SMW1, nevykazuje systematický nárůst hmotnosti v čase pro $T_b = 22\text{ }^\circ\text{C}$, viz. obr. 20, jako systém M90 zobrazený na obr. 20. SMW1 při $T_b = 50\text{ }^\circ\text{C}$ se rovněž chová zcela odlišně od vzorku M90, nevykazuje žádný následný pokles v hmotnosti a změna je při této teplotě nejvyšší.

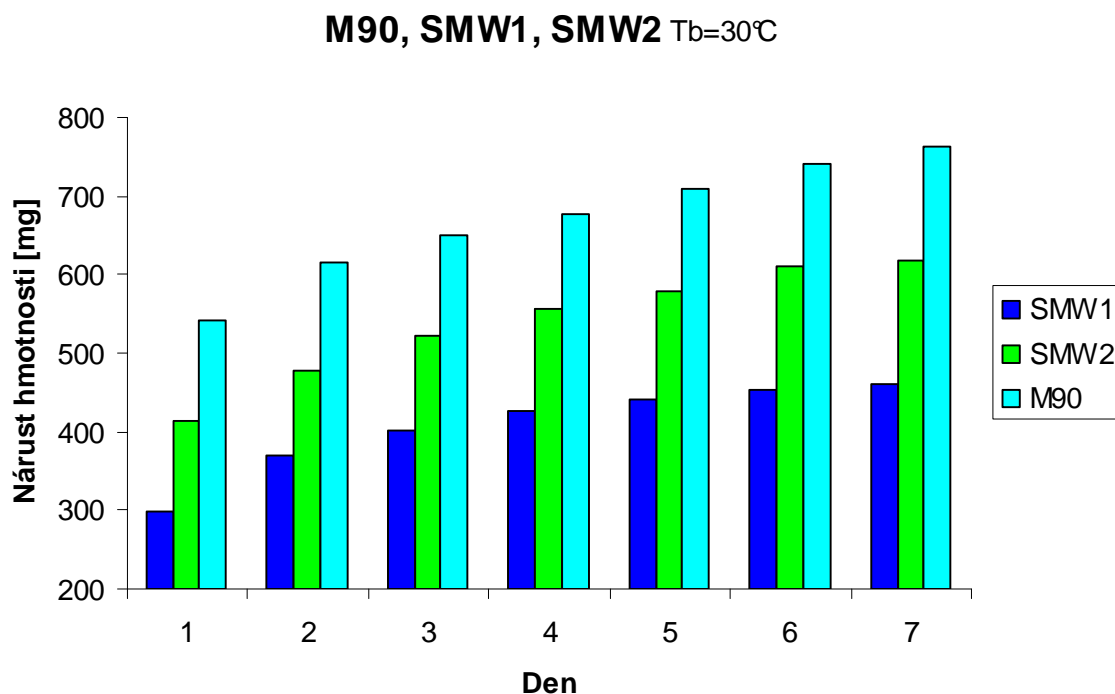
Poznámka: Na tomto místě nutno dodat, jak je patrné ze srovnání obrázků 19 a 20, že každý systém (M90, SMW1, SMW2) vykazuje rozdílný (absolutní) nárůst hmotnosti. Tento fakt je spojen s rozdílnou hmotností polymeru na Petriho misce, jak bude diskutováno níže.



Obrázek 20: Srovnání změn hmotnosti hydrogelů 2-HEC o SMW2 při různých teplotách botnání ($T_b = 5; 22; 30; 50\text{ }^\circ\text{C}$) v plastových boxech od 1 po 7 den.

Poslední ze srovnávaných vzorků, SMW2, viz. obr. 20 vykazuje při všech teplotách kromě $T_b = 5^\circ\text{C}$ systematický nárůst hmotnosti, který je nejvíce patrný (nevyšší po 7 dnech) při teplotě $T_b = 30^\circ\text{C}$. Respektive při $T_b = 50^\circ\text{C}$ kde dochází k rychlému nárůstu hmotnosti v počátku experimentu za následného růstového trendu v dalších dnech oproti vzorku M90, SMW1.

Z obrázků 16 až 20 plyne, že v případě $T_b = 30^\circ\text{C}$ lze pozorovat nejsystematičtější, postupný nárůst hmotnosti polymerního hydrogelu 2-HEC v čase. Z tohoto důvodu je vhodné porovnat jednotlivé systémy mezi sebou, viz. obr. 21. Z výsledný vyobrazených v grafu na obr. 21 by se mohlo zdát, že nejvíce a nejrychleji absorbuje vodu systém o M90 následovaný SMW2 a SMW1. Toto zdání je ovšem mylné, nutno vzít v úvahu rozdílné hmotnosti 2-HEC ve zkoumaných systémech kde M90 obsahoval 272 mg, SMW1 obsahoval 155 mg a SMW2 obsahoval 204 mg. Poměr těchto hmotností odpovídá změně v hmotnosti vzorku vyobrazené na obr. 21. Z toho plyne, že při $T_b = 30^\circ\text{C}$ je změna hmotnosti hydrogelu 2-HEC nezávislá distribuci MW ve vzorku. Toto tvrzení ovšem neplatí pro jiné T_b .

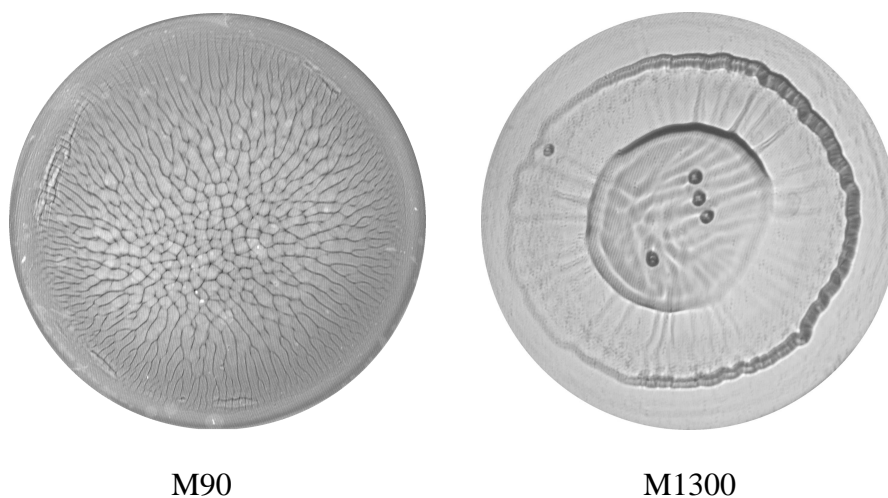


Obrázek 21: Srovnání jednotlivých vzorků (M90, SMW1, SMW2) botnaných při $T_b = 30^\circ\text{C}$ v čase.

7.3 Vliv tepelné historie roztoku a hydrogelu 2-HEC

V předešlých kapitolách byl diskutován vliv teploty botnání (T_b), distribuce molekulových hmotností (M) a času na rychlost nárůstu hmotnosti polymerního hydrogelu (filmu) 2-HEC. V následující části se zaměříme na vliv teploty přípravy roztoku (T_r) 2-HEC a teploty solidifikace (T_s) příslušného filmu (hydrogelu) na Petriho misce.

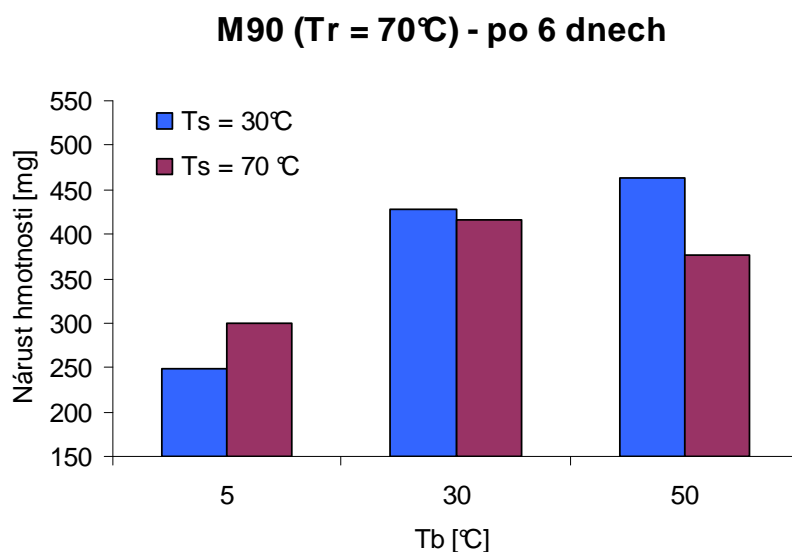
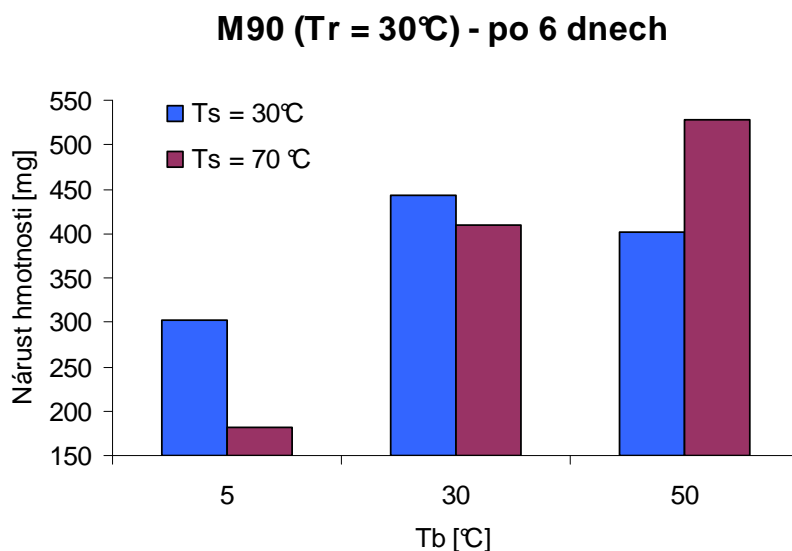
Oproti výše diskutovaným experimentům byly filmy připravovány na Petriho miskách o průměru 6 cm a výšce 1 cm. Do těchto misek bylo navažováno příslušné množství roztoku tak, aby vrstva kapaliny měla tloušťku cca 7,1 mm. Takto připravené roztoky byly solidifikovány při $T_s = 30\text{ °C}$ nebo při $T_s = 70\text{ °C}$ v sušárně značky Memmert bez nucené cirkulace vzduchu. Pro přípravu hydrogelů byly použity dva typy roztoku M90 a 0,25% M1300 rozpouštěné při $T_r = 30\text{ °C}$ nebo $T_r = 70\text{ °C}$. Vznikající filmy vykazují zejména při vyšší teplotě solidifikace ($T_s = 70\text{ °C}$) vznik specifických samoorganizovaných struktur vyobrazených na obr. 22 [5].



Obrázek 22: Charakteristické samo-organizované struktury v polymerních filmech 2-HEC připravených v teplotních polích z roztoků 2-HEC o rozdílné molekulové hmotnosti a viskozitě [5].

Grafy na obrázcích 23 a 24 demonstrují vliv T_s na T_r na rychlost botnání polymerního filmu (hydrogelu) 2-HEC. Systém M90, viz. obr. 23 vykazuje při $T_r = 30\text{ °C}$ daleko vyšší nárůst hmotnosti pro $T_s = 70\text{ °C}$ a $T_b = 50\text{ °C}$, zatímco při $T_b = 30\text{ °C}$ je změna hmotnosti

podobná stejně jako pro M90 a $T_r = 70\text{ }^\circ\text{C}$. Zajímavým faktem je, že systém M90, $T_r = 70\text{ }^\circ\text{C}$ vykazuje opačné chování oproti M90, $T_r = 30\text{ }^\circ\text{C}$ v případech $T_b = 5\text{ }^\circ\text{C}$ a $T_b = 50\text{ }^\circ\text{C}$.

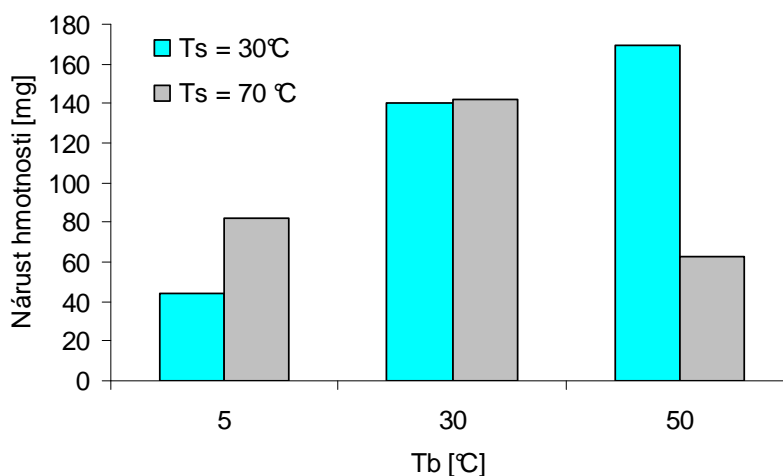


Obrázek 23: Vliv T_r a T_s na rychlost botnání polymerního hydrogelu 2-HEC o $M = 90\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (změna hmotnosti po 6 dnech botnání).

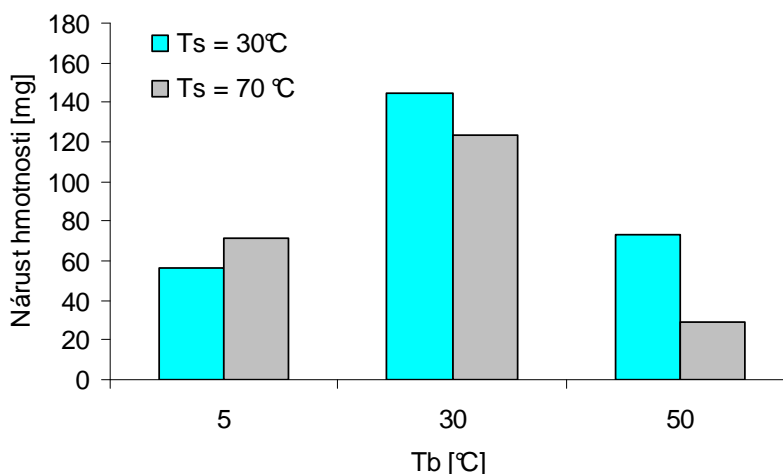
Vzorek 2-HEC o M1300, viz. obr. 24, vykazuje podobné chování jak pro $T_r = 30\text{ }^\circ\text{C}$ tak pro $T_r = 70\text{ }^\circ\text{C}$, kromě vzorku připraveného při $T_r = 30\text{ }^\circ\text{C}$ a $T_s = 30\text{ }^\circ\text{C}$, kde lze pozorovat nejvyšší nárůst hmotnosti absorbované vody v polymerním hydrogelu. Nutno dodat, že systémy botnané při $T_b = 30\text{ }^\circ\text{C}$ se vyznačují podobným nárůstem hmotnosti bez ohledu na T_r nebo T_s .

Poznámka: Rozdílné množství absorbované vody pro systém M90, viz. obr. 23, a systém 0,25% M1300, viz. obr. 24 je dán jiným hmotnostním podílem polymeru na Petriho misce, 271 mg pro M90 a 67,5 mg pro 0,25% M1300. Nižší nárůst hmotnosti při srovnání systémů o M90 viz. obr. 23 a obr. 18 je dán rozdílnými podmínkami (dobou) skladování vzorků v exikátoru a rozdílnou plochou misky pro přípravu polymerního filmu. Vzorky na obr. 23 a 24 byly skladovány po dobu cca 2 měsíců v exikátoru před vlastním botnáním.

0,25% M1300 ($T_r = 30^\circ\text{C}$) - po 6 dnech



0,25% M1300 ($T_r = 70^\circ\text{C}$) - po 6 dnech



Obrázek 24: Vliv T_r a T_s na rychlost botnání polymerního hydrogelu 2-HEC o $M = 1\,300\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (změna hmotnosti po 6 dnech botnání).

ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo prostudování absorpčních vlastností biokompatibilního, modelového systému (2-HEC) v podobě polymerního filmu (hydrogelů). Byly připraveny polymerní roztoky z 2-hydroxyethylcelulózy (2-HEC) o molekulových hmotnostech M90, M720 a M1300. Tyto vzorky 2-HEC byly rozpouštěny za stálé teploty $T_r = 30\text{ °C}$ nebo $T_r = 70\text{ °C}$. Pro přípravu polymerních filmů byly namíchány roztoky M90, 0,25% M1300, SMW1 a SMW2 s různým procentuálním podílem 2-HEC a různou molekulovou distribucí. Polymerní filmy byly sušeny při teplotě $T_s = 30\text{ °C}$ nebo $T_s = 70\text{ °C}$. Takto připravené hydrogely v podobě polymerního filmu vykazovaly určitý stupeň organizace polymerní matrice.

V experimentální části práce byl studován vliv všech procesních a materiálových parametrů na rychlost botnání polymerního filmu (hydrogelu) 2-HEC. Botnání probíhalo v uzavřených boxech s vodou v prostředích o různé teplotě (5 °C , 22 °C , 30 °C , 50 °C a 65 °C) po dobu 1 až 7 dnů.

Z porovnání získaných výsledků vyplynulo, že hmotnost tenkého polymerního filmu (60-280 mg na Petriho misce o průměru 7cm) nemá významný vliv na rychlost botnání daného hydrogelu vzhledem k ostatním zkoumaným parametrům (čas, M, T_r , T_s a T_b). Zásadním parametrem determinujícím rychlost botnání polymerního hydrogelu je teplota botnání (T_b), což není ničím překvapující. V případě tohoto parametru je nutno brát v úvahu střední molekulovou hmotnost (M) 2-HEC a její distribuci. Systémy různé M vykazují rozdílné maxima absorbované vody při rozdílných teplotách a časech. Velmi zajímavým zjištěním je, že při $T_b = 30\text{ °C}$ se všechny studované systémy chovají podobně (absorbují podobné množství vody) nezávisle na ostatních studovaných parametrech.

Doba botnání je dalším parametrem, který nelze opomenout. Zajímavou skutečností v případě tohoto parametru je, že některé systémy botnané zejména při vyšších teplotách

($T_b > 50\text{ }^{\circ}\text{C}$) vykazují v prvních dnech nárůst v hmotnosti polymerního hydrogelu s následným poklesem – repelencí vody ze systému.

Jak bylo uvedeno výše rozdílná molekulová hmotnost, respektive její distribuce se projevuje rozdílnou citlivostí na teplotu (T_b) a čas botnění.

Tepelná historie polymerního roztoku a filmu (hydrogelu) má zcela zásadní vliv na rychlost botnění. Tento fakt je spojen se vznikem samo-organizovaných struktur uvnitř polymerní matrice. Vysoce organizované struktury zpomalují nebo urychlují botnění polymerního gelu a to zejména v závislosti zvolené T_b a M daného vzorku 2-HEC.

Získané výsledky jsou podkladem pro další, intenzivní výzkum v oblasti přípravy vysoce organizovaných hydrogelů s aplikacemi v tkáňovém inženýrství.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] LAPČÍK, L., RAAB, M., *Nauka o materiálech II*, UTB – Academia Centrum Zlín, 2004
- [2] POUCHLÝ, J., *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*, VŠCHT Praha 2008
- [3] STOKLASA, K., *Makromolekulární chemie I*, UTB Zlín, 2005
- [4] Gelatin, Tissue Engineering
<<http://www.molvis.org/molvis/v14/a215/mimura-fig1.html>>
- [5] MINAŘÍK, A., *Studium transportu hmoty v gelových fázích biopolymerů*, Disertační práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008
- [6] PROKOPOVÁ, I., *Makromolekulární chemie*, VŠCHT Praha, 2007
- [7] PTÁČEK, L., *Nauka o materiálu II.*, Brno, Akademické nakladatelství CERM, s.r.o., 2002, ISBN 80-7204-248-3
- [8] MARK, J.E., *Physical Properties of Polymers Handbook*, University of Cincinnati, 2007, ISBN 978-0-387-31235-4
- [9] SOFROVÁ, D., *Biochemie*, Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum, 2009, ISBN 978-80-246-1678-0
- [10] ZÁMORSKÝ, Z., *Nauka o makromolekulárních materiálech, syntetické polymery, jejich výroba, struktura a vlastnosti*, VUT Brno, 1968
- [11] ŠŇUPÁREK, J., *Makromolekulární chemie*, Univerzita Pardubice Fakulta chemicko-technologická, 2009, ISBN 978-80-7395-166-5
- [12] BEDNÁŘ, B., FLEMR, V., KRATOCHVÍL, B., *Nové materiály*, VŠCHT Praha, 1991, ISBN 80-7080-098-4
- [13] BARTOVSKÁ, L., ŠIŠKOVÁ, M., *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*, VŠCHT Praha, 2005, ISBN 80-7080-579-X
- [14] DUCHÁČEK, V., *Polymery: Výroba, vlastnosti, zpracování, použití*, VŠCHT Praha, 1995

- [15] SEDLÁČEK, T., *Advanced biomaterials*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Polymer Processing and Functionalization, Salerno, 2011
- [16] Hydroxyethyl Celulose, Dow Chemici Company, USA
<http://www.dow.com/assets/attachments/industry/building_construction/Cellosize_brochure.pdf>
- [17] SCHANTE, E., ZUBER, G., HERLIN, C., VANDAMME, T.F., *Carbohydrate Polymers*, Science Direct, France, 2010, 469-489
- [18] Kolagen, Hypro Otrokovice, s.r.o., Česká republika
<<http://www.hypro.cz/hyRubrIn.aspx?intRubrKis=1251&intRefRubr=1251&intLang=0&>>
- [19] RAMAKRISHNA, S., MAYER, J., WINTERMANTEL, E., LEONG, K.W., *Biomedical applications of polymer-composite materials*, Composites Science and Technology, 1189-1224, 2001
- [20] GRODZINSKI, J.J., *Polymers for tissue engineering, medicine device, and regenerative medicine*. Incise general rewiw of recent studies, *Polymers for advanced technologies*, 2006, 17: 395-418
- [21] SANZ, E.M., OSSIPOV, D.A., HILBORN, J., *Bone reservoir: Injectable hyaluronic acidhydrogel for minimal invasive bone augmentativ*, *Journal of Controlled Release*, Science Direct, 2011, 232-240
- [22] DRURY, J.L., MOONEY, D.J., *Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications*, *Biomaterials*, 2003, 4337-4351
- [23] ZHANG, F., HE, CH., CAO, L., *Fabrication of gelatin-hyaluronic acid hybrid scaffolds with tunable porous structures for soft tissue engineering*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2011, 474-481
- [24] LEE, K.Y., MOONEY, D.J., *Hydrogels for Tissue Engineering*, American Chemical Society, 2001
- [25] BALAKRISHNAN, B., BANERJEE, R., *Biopolymer-Based Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering*, American Chemici Society, 2011

[26] Hyaluronic acid, MadSci Network

<<http://www.madsci.org/posts/archives/2001-04/986571103.Bc.r.html>>

[27] Hydrogels, Johns Hopkins University, USA

<<http://www.birchbob.com/MarketingPieces/jhu/indexJE.htm>>

[28] ČERMÁK, R., Introduction to Polymer Science, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Polymer Processing and Functionalization, Salerno, 2011

[29] Hydroxyethyl Celulose, Sigma-Aldrich, Czech Republic

<<http://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HA	kyselina hyaluronová
HEC	hydroxyethylcelulóza
2-HEC	2-hydroxyethylcelulóza
°C	stupeň Celsia
Q	stupeň nabotnění
φ_2	objemový zlomek polymeru v nabotnalém stavu
μ_1^{GEL}	chemický potenciál v polymerní fázi
μ_1^o	chemický potenciál v rozpouštědlové fázi
φ_1	hustota rozpouštědla
φ_2	hustota suchého gelu
m	hmotnost gelu před nabotněním
m^o	hmotnost gelu po nabotnění
V	objem nabotnalého gelu
V^o	objem suchého gelu
R	univerzální plynová konstanta
T	teplota
PEO	polyetylenoxid
PVA	polyvinylalkohol
Co	kobalt
Cr	chrom
Ni	nikl
Ti	titan
L.S.	léková substance
C.T.	látka směřující transport

H ₂ O	voda
ΔT	změna teploty
HCl	kyselina chlorovodíková
M _w ,M	molekulová hmotnost
M90	molekulová hmotnost 90 000 g/mol
M720	molekulová hmotnost 720 000 g/mol
M1300	molekulová hmotnost 1 300 000 g/mol
Tr	teplota rozpouštění
Ts	teplota sušení
Tb	teplota botnání
PS	polystyren

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Tvar polymerních řetězců [28]	10
Obrázek 2: Lineární síťování řetězce [2].....	11
Obrázek 3: Schéma trojrozměrné struktury diamantu [14].....	12
Obrázek 4: Síťovitá struktura vysokomolekulárních gelů [13]	17
Obrázek 5: Botnání gelů v dobrém rozpouštědle [2].....	22
Obrázek 6: Graf zobrazující počet uskutečněných transplantací a počet pacientů čekajících na transplantaci v letech 1990-1999 [22]	24
Obrázek 7: Příklad využití biokompatibilních materiálů při transplantaci oční čočky [29].....	26
Obrázek 8: Příklad hydrogelu podporujícího růst a interakci chrupavky v poškozené tkáni [27]	28
Obrázek 9: Schematické znázornění lékové formy třetí generace [12].....	29
Obrázek 10: Schéma vzniku želatiny [18]	30
Obrázek 11: Strukturní jednotka celulóza [16]	31
Obrázek 12: Hydroxyethylcelulóza [29]	33
Obrázek 13: Strukturní vzorec kyseliny hyaluronové [26].....	34
Obrázek 14: Strukturní vzorec chitosanu [25]	35
Obrázek 15: Schéma experimentu	41
Obrázek 16: Srovnání jednotlivých hydrogelů 2-HEC o různých distribucích Mw (M90, SMW1, SMW2) vzhledem k teplotě botnání po 7 dnech kdy byl film vystaven působení vlhkosti uvnitř plastového boxu	42
Obrázek 17: Charakteristické samo-organizované struktury v polymerních filmech 2-HEC připravených v teplotních polích z roztoků 2-HEC o rozdílné distribuci molekulových hmotností a viskozitách [5]	43
Obrázek 18: Srovnání změn hmotnosti hydrogelů 2-HEC o M90 při různých teplotách botnání (Tb = 5; 22; 30; 50 °C) v plastových boxech od 1 po 7 den	44

Obrázek 19: Srovnání změn hmotnosti hydrogelů 2-HEC o SMW1 při různých teplotách botnání ($T_b = 5; 22; 30; 50\text{ }^\circ\text{C}$) v plastových boxech od 1 po 7 den.	45
Obrázek 20: Srovnání změn hmotnosti hydrogelů 2-HEC o SMW2 při různých teplotách botnání ($T_b = 5; 22; 30; 50\text{ }^\circ\text{C}$) v plastových boxech od 1 po 7 den.	46
Obrázek 21: Srovnání jednotlivých vzorků (M90, SMW1, SMW2) botnaných při $T_b = 30\text{ }^\circ\text{C}$ v čase.....	47
Obrázek 22: Charakteristické samo-organizované struktury v polymerních filmech 2-HEC připravených v teplotních polích z roztoků 2-HEC o rozdílné molekulové hmotnosti a viskozitě [5]	48
Obrázek 23: Vliv T_r a T_s na rychlost botnání polymerního hydrogelu 2-HEC o $M = 90\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (změna hmotnosti po 6 dnech botnání).	49
Obrázek 24: Vliv T_r a T_s na rychlost botnání polymerního hydrogelu 2-HEC o $M = 1\ 300\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (změna hmotnosti po 6 dnech botnání).	50