

# Elektrostatické zvlákňování hyaluronanu

Celestýna Sedláčková

---

Bakalářská práce  
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická  
Ústav fyziky a mater. inženýrství

Akademický rok: 2023/2024

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Celestýna Sedláčková  
Osobní číslo: T21072  
Studijní program: B0711A130009 Materiály a technologie  
Specializace: Materiálové inženýrství  
Forma studia: Prezenční  
Téma práce: Elektrostatické zvlákňování roztoků hyaluronanu

## Zásady pro vypracování

- Vypracujte literární rešerši na téma elektrostatické zvlákňování přírodních polymerů.
- Připravte roztoky hyaluronanu ve směsném rozpouštědle voda/ethanol s obsahem různých solí s rostoucí iontovou silou.
- Charakterizujte konformaci polymerního klubka pomocí DLS.
- Připravte z těchto roztoků vlákněné struktury pomocí elektrostatického zvlákňování a charakterizujte jejich morfologii.
- Diskutujte vliv konformace polymerního klubka na zvlákňování roztoku.

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

1. LUKÁŠ, D. a kol. Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century). *Textile Progress*. 2009, **41**(2), 59-140. doi:10.1080/00405160902904641.
2. RENEKER, D. H. a Alexander L. YARIN. Electrospinning jets and polymer nanofibers. *Polymer*. 2008. **49**(10), 2387-2425. doi:10.1016/j.polymer.2008.02.002.
3. MRÁČEK, A. a kol. The Influence of Hofmeister Series Ions on Hyaluronan Swelling and Viscosity. *Molecules*. 2008. **13**(5). 1025-1034. doi: 10.3390/molecules13051025.

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Lenka Musilová, Ph.D.**  
Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání bakalářské práce: **2. ledna 2024**

Termín odevzdání bakalářské práce: **17. května 2024**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**Ing. Petr Smolka, Ph.D.**  
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 20. února 2024

## **PROHLÁŠENÍ AUTORKY BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

### **Prohlašuji,**

- že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studentky:

.....  
podpis studentky

## ABSTRAKT

Předložená bakalářská práce se zabývá problematikou elektrostatického zvlákňování hyaluronanu (HA) a posouzením vlivů chaotropních a kosmotropních iontů na zvlákňovatelnost HA. Běžně se k elektrostatickému zvlákňování HA využívají další nosné polymery jako např. polyethyenglykol. V této práci, však bylo k zvlákňování HA přistoupeno bez pomocných polymerů. Namísto nosného polymeru, byly použity přísady různých solí, s cílem podpořit proces zvlákňování HA, či použitím rozdílnou koncentrací špatného rozpouštědla (EtOH), který byl přidáván, z důvodu úpravy povrchového napětí roztoků HA. Kromě těchto parametrů byl hodnocen vliv uspořádání aparatury při zvlákňování a to (a) z jehly (pozice „shora dolů“) nebo (b) z volné hladiny (pozice „zdola nahoru“). Morfologie a velikost získaných vláken byla charakterizována pomocí elektronové skenovací mikroskopie (SEM). Na základě průběhu procesu zvlákňování doplněné analýzou SEM snímků bylo zjištěno, že kosmotropní ionty rozbalují polymerní řetězec, v důsledku čehož usnadňují proces zvlákňování, zatímco přísada chaotropních iontů polymerní řetězec sbaluje a tím proces zvlákňování podstatně znesnadňuje. K ucelení znalostí řešené problematiky byl provedený experiment doplněn o analýzu velikosti polymerního klubka HA a to pomocí metody dynamického rozptylu světla (DLS), která pozorované chování potvrdila. V budoucnu by určitě stálo za to prostudovat řešenou problematiku mnohem komplexněji, zejména z pohledu např. širší kombinatoriky iontů (zj. aniontů), kombinací dobrého a špatného rozpouštědla.

Klíčová slova: Hyaluronan, Hofmeisterova řada, electrospinning, SEM, DLS

## **ABSTRACT**

The presented bachelor thesis deals with the electrospinning of hyaluronan (HA) and the assessment of the effects of chaotropic and kosmotropic ions on the HA electrospinning. Other carrier polymers such as polyethylene glycol are commonly used for electrospinning of HA. In this work, the electrospinning of HA was approached without other polymers. Instead of the carrier polymer, additions of different salts were used in order to promote the HA electrospinning by changing the concentration of the poor solvent (EtOH), which was used, in order to modify the surface tension of the HA solutions. In addition to these parameters, the influence of the apparatus arrangement during the electrospinning was evaluated, namely (a) from the needle (top-down position) or (b) from the free surface (bottom-up position). The morphology and size of the fibers obtained were characterized by scanning electron microscopy (SEM). Based on the course of the electrospinning, supplemented by the analysis of SEM images, it was found that kosmotropic ions salting-out behavior the polymer chain, as a result of which they facilitate the electrospinning, while the addition of chaotropic ions unfolding (salting in behaviour) the polymer chain and thus makes the electrospinning significantly more difficult. To complete the knowledge of the solve problem, the experiment was complemented by the analysis of the HA polymer coil size using the dynamic light scattering (DLS) method, which confirmed the observed behaviour. In the future, it would certainly be worthwhile to study the solved problem more comprehensively, especially in terms of e.g. broader combinatorics of ions (i.e. anions), combinations of good and bad solvent.

Keywords: Hyaluronan, Hofmeister series, electrospinning, SEM, DLS

Tímto bych chtěla velice poděkovat své vedoucí Ing. Lence Musilové, Ph.D. za její pomoc, spoustu cenných rad, motivaci, a především za nesmírnou trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Lence Vítkové, Ph.D. za zasvěcení do světa electrospinningu a za její pomoc při studiu. V neposlední řadě děkuji Viktorii Daňkové a Martině Brožové za jejich pomoc, cenné rady, a slova povzbuzení.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.



## OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>13</b>
<b>1 BIOMATERIÁLY</b> .....	<b>14</b>
1.1 BIOPOLYMERY .....	14
<b>2 HYALURONAN</b> .....	<b>16</b>
2.1 ZPŮSOB VÝROBY HA .....	16
2.2 STRUKTURA A VLASTNOSTI .....	17
2.3 VYUŽITÍ HA.....	19
<b>3 HOFMEISTEROVA ŘADA SOLÍ</b> .....	<b>21</b>
<b>4 KONFORMACE POLYMERNÍHO ŘETĚZCE</b> .....	<b>24</b>
<b>5 ELEKTROSTATICKÉ ZVLÁKŇOVÁNÍ</b> .....	<b>29</b>
<b>6 CHARAKTERIZACE</b> .....	<b>36</b>
6.1 SEM ANALÝZA .....	36
6.2 DLS ANALÝZA.....	38
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>42</b>
<b>7 POPIS EXPERIMETU</b> .....	<b>43</b>
7.1 POUŽITÉ MATERIÁLY .....	45
7.2 PŘÍPRAVA VZORKŮ .....	45
<b>8 ELEKTROSTATICKÉ ZVLÁKŇOVÁNÍ</b> .....	<b>50</b>
8.1 ZVLÁKŇOVÁNÍ Z VOLNÉ HLADINY .....	50
8.2 ZVLÁKŇOVÁNÍ Z JEHLY .....	50
8.3 CHARAKTERIZACE ZVLÁKNĚNÝCH VZORKŮ POMOCÍ SEM.....	52
<b>9 VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>53</b>
9.1 ELEKTROSTATICKÉ ZVLÁKŇOVÁNÍ.....	53
9.2 SEM ANALÝZA.....	53
9.3 DLS ANALÝZA .....	62
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>66</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>67</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>72</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>72</b>
<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>75</b>

## ÚVOD

Biomateriály tu byly v jisté formě odedávna, důležitá je především jejich definice, a to, jak jsou vnímány dnes. Biomateriál lze v současné době chápat jako materiál či jeho kombinaci látek např. syntetického nebo přírodního původu, který přispívá k léčbě, podpoře nebo náhradě (částečné či kompletní) tkáně, orgánu či funkci těla. Této kategorii je věnována velká pozornost zejména z důvodu zachování nebo zlepšení kvality života jednotlivce.

Jedním z populárních a hojně využívaných biomateriálů resp. biopolymerů je hyaluronan (HA), respektive sodná sůl kyseliny hyaluronové. Tento biopolymer lze získat izolací z některých živočichů (např. z kohoutích hřebínků), nebo v současnosti spíše fermentací mikroorganismů, což minimalizuje projevy imunitní reakce při její aplikaci. Své využití nachází primárně v kosmetice, tkáňovém inženýrství a na poli medicíny ve formě nejrůznějších gelů, hydrogelů či částic. HA má nezaměnitelné vlastnosti, které se odvíjí primárně od nadstandardně vysokých molekulových hmotností, kterých běžně dosahuje, na rozdíl od ostatních biopolymerů. Kromě hydrogelů na bázi hyaluronanu, se můžeme setkat s HA ve formě nejrůznějších vláken. Tak například využitím HA v elektrospinningu, je možné vytvářet různé biokompatibilní matrice pro tkáňové inženýrství, například pro regeneraci kůže, chrupave nebo cév. Nanovlákná z hyaluronanu mohou sloužit i jako nosiče léčiv nebo jako podpora buněčného růstu [1–3].

S přírodními polymery, mezi které hyaluronan neodmyslitelně patří, je spojen fenomén tzv. Hofmeisterovy řady. Jedná se o řadu solí seřazených podle jejich schopností interagovat s polymery (např. proteiny, polysacharidy) ve formě roztoků. F. Hofmeister se svými kolegy se tomuto tématu věnoval už v druhé polovině 19. století, a zjistil, že v přítomnosti těchto solí dochází k tzv. vysolování proteinů z buněčného bílku [4]. Na základě zjištěných výsledků, rozdělil soli na skupinu s chaotropním a kosmotropním účinkem. Chaotropní ionty lze vnímat jako ionty, které se podílí na, v literatuře značovaném, „salt in“ chování, které lze chápat jako sbalování polymerních řetězců. Kosmotropní ionty, které tvoří druhou stranu spektra Hofmeisterovi řady, naopak vykazují tzv. „salting out“ chování, tedy rozbalování polymerních řetězců [5,6]. Vliv konkrétních iontů z Hofmeisterovy řady se odvíjí od jejich chemické povahy a použité koncentrace. Byť toto téma bylo poprvé definováno již před 150 lety, stále obsahuje spoustu neobjasněných věcí, zejména v polymerních roztocích, které nebyly stále plně vysvětleny.

Příčina tohoto nejednoznačného a složitého chování připisovaného účinkům Hofmeisterových řady, souvisí mimo jiné s komplikovaným uspořádáním možných

konformací polymerních řetězců přírodních polymerů. Pohyb makromolekul v roztoku je totiž komplexní vědní obor. Tak například hyaluronan, jehož molekulová hmotnost se běžně pohybuje v jednotkách (MDa)[7,8], a je dána do jisté míry přítomnými funkčními skupinami, které jsou součástí polymerního řetězce. Ty se v daném prostředí (vliv pH, přítomných solí, teploty, koncentrace) mohou různě orientovat, a zaujímat tak mnohé konformace, které lze do jisté míry ovlivnit právě přidavkem vybraných iontů z Hofmeisterových řady solí. Použité soli mohou ovlivnit konformační strukturu hyaluronanu, což se může projevit např. na jeho biologické aktivitě.

Jak už bylo zmíněno, Hofmeisterova řada solí má vliv na chování hyaluronanu v roztocích a může ovlivnit jeho viskozitu a konformační strukturu, proto se část této práce zabývá problematikou vhodného použití správného typu a koncentrace iontů, které by mohly být použity při jeho zpracování pomocí elektrostatického zvlákňování. Zvlákňování hyaluronanu totiž představuje velmi komplikovanou záležitost. Podobně jako tomu je i u některých dalších přírodních polymerů, zvláknitelnost HA je sice velmi obtížná, ale žádaná. Za účelem ulehčení procesu zvlákňování HA, jsou roztoky kombinovány přidavkem dalších polymerů, které fungují jako tzv. „nosné“ polymery. Nosné polymery iniciují zvlákňování a zvyšují mimo jiné její proveditelnost a výtěžnost, jehož výsledkem jsou však tzv. neoddělitelné směsi HA a příslušného nosného polymeru.

Hlavním cílem této práce proto bude zvláknit roztoky HA bez přidavku nosného polymeru. To se v minulosti podařilo autorům L. Vítkové (2019), která se podařilo úspěšně zvláknit samotný hyaluronan vyladěním rozpouštědla za použití izopropylalkoholu (IPA) [9], nebo Li a spol. (2005) požili v rozpouštědle pro změnu dimethylfumarát (DMF) a také se jim tak podařilo zvláknit samostatný hyaluronan [10]. V této práci byl k tomuto účelu použit přidavek iontů z Hofmeisterovy řady solí, u kterých byl prokázán jejich vliv na změnu konformace polymerního řetězce, a to ve smyslu sbalení a rozbalení polymerního klubka. Zvlákňování bude provedeno dvěma způsoby – a to zvlákňováním z volné hladiny a zvlákňováním z jehly. Obě metody budou vzájemně porovnány. Kromě změny uspořádání při spinování, bude v práci řešena změna povrchového napětí vzorků přidavkem špatného rozpouštědla (ethanolu (EtOH)) do roztoků, a to v závislosti na koncentraci. Kromě samotného zvlákňování bude vyšetřen vliv chaotropních a kosmotropních iontů na sbalení a rozbalení polymerního klubka hyaluronanu, což souvisí s prací skupiny L. Musilové (2019), která pojednává o chování hyaluronanu v přítomnosti Hofmeisterových iontů, ne ovšem v kontextu s electrospinningem [6]. Potvrzení těchto předpokladů by mohlo do jisté míry ovlivnit komplikovaný proces zvlákňování hyaluronanu. Získaná vlákna budou dále

analyzovány z pohledu jejich morfologie a velikosti pomocí SEM. Účinnost vybraných iontů z Hofmeisterovy řady bude analyzována z pohledu velikosti polymerního klubka hyaluronanu pomocí DLS.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 BIOMATERIÁLY

V posledních desetiletích lze v oblasti medicínských aplikací zaregistrovat zvýšený výskyt pojmu „biomateriál“. V minulých letech byl biomateriál vnímán jako neživý materiál, umožňující léčbu nebo náhradu poškozené či chybějící tkáně živého organismu, aniž by sám způsobil nežádoucí účinky nebo zapříčinil jiné škody na okolní živé tkáni (např. mechanické poškození okolní zdravé tkáně a nervů, infekci, nekrózu, nebo potíže s hojením). S postupným rozvojem stále širšího uplatnění dostupných biomateriálů bylo potřeba původní definici přizpůsobit aktuálnímu použití, jelikož stávající formulace již nebyly zcela relevantní. [11] Dle nynější definice lze biomateriál chápat jako látku (jiná než lék) či kombinaci látek syntetického nebo přírodního původu, která přispívá k léčbě, podpoře nebo náhradě (částečné či kompletní) tkáně, orgánu či funkci těla, a to libovolnou dobu. [12] Biomateriály jsou aplikovány především v zájmu zachování nebo zlepšení kvality života jednotlivce, to znamená, že vývoj biomateriálů se zaměřuje nejen na přežití jedince, na rozdíl od léků, ale klade si vyšší cíle, jako je celkové zlepšení kvality života.[13]

### 1.1 Biopolymery

Polymery jsou velké molekuly skládající se z mnoha opakujících se elementárních jednotek tzv. monomerů (tj. atom nebo skupina atomů) spojených za sebou do polymerního řetězce. Počet merů v řetězci vyjadřuje polymerační stupeň, se kterým přímo úměrně roste molekulová hmotnost polymeru [14,15].

Biopolymery jsou potom polymery spadající do množiny biomateriálů (viz výše). Podle výchozích zdrojů pro výrobu a typu jejich degradace, lze biopolymery rozřadit do těchto skupin:

- a) Biopolymery, které jsou vyrobeny z obnovitelných přírodních zdrojů a jsou biodegradabilní.
- b) Biopolymery, které jsou vyrobeny z obnovitelných přírodních zdrojů a nejsou biodegradabilní.
- c) Biopolymery, které jsou syntetizovány z fosilních zdrojů a které jsou biodegradabilní.

Za "biodegradabilní" resp. za "biologicky odbouratelný" je materiál považován, rozkládá-li se vlivem působení mikroorganismů, jako jsou plísně, houby a bakterie na oxidu uhličitý, methan, vodu, anorganické sloučeniny, nebo biomasu [16].

## 2 HYALURONAN

Hyaluronan neboli sodná sůl kyseliny hyaluronové (HA) patří mezi přírodní polysacharidy, konkrétně glykosinaminoglykany. Strukturální jednotka je tvořena d-glukuronové kyseliny a N-acetylglukosaminu, které jsou spojeny  $\beta$ -1,3 a  $\beta$ -1,4 glykosidickou vazbou. V závislosti na rozdílné délce polymerního řetězce HA, zdroji a metodě zpracování, se molekulová hmotnost nativní HA pohybuje v rozmezí od jednotek tisíc až po miliony daltonů (Da), jedná se tedy o vysoce viskózní polymer. Mezi nejčastější zdroje HA lze zařadit extracelulární matrix (ECM) mnohých organismů (vyjma hub, rostlin a hmyzu), v lidském těle je součástí např. synoviální tekutiny nebo očního sklivce. Právě z (hovězího) očního sklivce jej poprvé roku 1934 izoloval Karl Meyer a J.W. Palmer v biochemické laboratoři Kolumbijské univerzity. Od té doby se možnosti, jak syntetizovat a extrahovat HA rozšířily a zdokonalily. Produkci HA dnes dominuje fermentace bakteriálních mikroorganismů. [7,17–20] tem

### 2.1 Způsob výroby HA

Jak už bylo naznačeno výše, existuje několik způsobů výroby kyseliny hyaluronové. Mezi nejčastější patří mikrobiální fermentace, extrakce z živočišných tkání (např. kohoutí hřebínky, pupeční šňůra, oční sklivec) nebo enzymatickou či chemickou syntézou. Po řádné purifikaci je i HA získaný právě z kohoutích hřebínků vhodný k použití pro výzkum a některé klinické aplikace. Z ekologického hlediska lze tuto cestu považovat za výhodnou, jelikož je využíván vedlejšího produkt drůbežářského průmyslu. [21–23]

Roku 1995 byl skotské společnosti Fermentech Medical Limited schválen patent na produkci HA prostřednictvím *Streptococců*, kteří jej vytváří fermentačním procesem, jako složku svých ochranných a zásobních kapslí. [23,24]

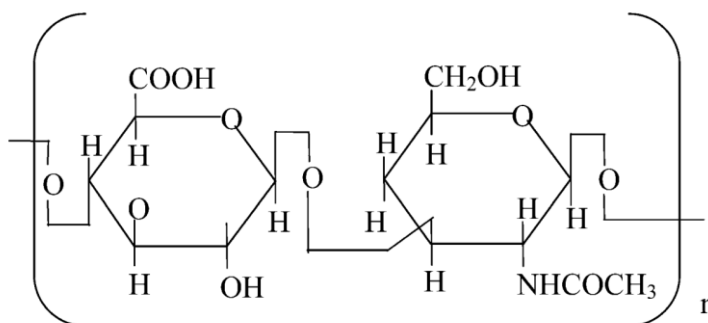
Kvůli riziku v podobě virových a jiných infekcí, které by mohly být přítomny v HA extrahované z živočišných zdrojů, tento způsob produkce v současné době postupně nahrazuje mikrobiální produkce HA. Purifikace mikrobiálního produktu není tak komplikovaná a upřednostňovaným zdrojem jsou mikroorganismy také proto, že nečelí etické otázce týkající se zabíjení zvířat. Také fakt, že mikrobiální produkce HA zahrnuje kroky jako jsou kontrola teploty, míchání a provzdušňování bakteriálních kultur, které lze automatizovat, je jeden z hlavních důvodů, proč se tento způsob výroby nyní nachází na první příčce. [22,23,25]



## 2.2 Struktura a vlastnosti

Monomer hyaluronanu je tvořen dvěma sacharidovými jednotkami, kyselinou D-glukoronovou a N-acetylglukosaminem. Kyselina D-glukoronová je na amino-sacharid navázána  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) glykosidickou vazbou a amino-sacharid je z druhé strany navázán na další jednotku D-glukoronové  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glykosidickou vazbou [26]. Na Obrázku 1 je znázorněna jedna základní disacharidová jednotka, má délku cca 1 nm [27]. Provázané monomerní jednotky jsou za sebou poskládány do lineárního řetězce. Na rozdíl od ostatních glykosaminoglykanů je hyaluronan samostatný, tzn. není enzymy asociován na jádrový protein. [20,28]

Prostorovým uspořádáním se HA velmi podobá glukóze v tzv. beta konfiguraci, která umožňuje prostorově objemným funkčním skupinám (hydroxylová, karboxylová skupina, anomerní uhlíky sousední sacharidové jednotky) nacházet se ve stericky příznivé ekvatoriální poloze (tj. poloha kdy jsou prostorově náročné skupiny od sebe co nejvíce vzdáleny), zatímco všechny ostatní malé atomy vodíku zaujímají méně stericky příznivé axiální polohy, v důsledku čehož lze strukturu disacharidové jednotky považovat za energeticky velmi stabilní. [27]



Obrázek 1 Schéma disacharidové jednotky HA skládající se z meru kyseliny D-glukoronové (vlevo) a meru N-acetylglukosaminu (vpravo) spojených glykosidickou vazbou

Z pohledu jejího strukturního uspořádání rozlišujeme tzv. primární, sekundární, a terciální uspořádání hyaluronanu.

Popis monomeru HA – tedy jeho disacharidové jednotky, je popis tzv. primární struktury. Pro jeho ucelení je nutno zmínit přítomné klíčové funkční skupiny, které strukturní jednotka HA obsahuje a které významně ovlivňují její výsledné prostorové/strukturní uspořádání a vlastnosti. Mezi tyto skupiny patří:

- Karboxylová skupina (-COOH) – karboxylové skupiny jsou umístěny podél řetězce.
- hydroxylová skupina (-OH)
- Acetylová skupina (-COCH<sub>3</sub>)

Dále jsou rozlišovány struktura sekundární a terciální. Sekundární struktura HA se odvíjí od vodíkových můstků, na kterých se ve vodném roztoku podílejí molekuly vody a karboxy- a acetamido- skupiny. Na každou tetrasacharidovou jednotku (tj. na dva mery) připadá 5 vodíkových můstků, přes které se řetězec stáčí do jednovlákně levotočivé šroubovice a stabilizuje se tak [28,29]. Ve fyziologickém roztoku se polymer stabilizuje tak, že dochází k tzv. ztužení hlavního řetězce HA molekuly (tzv. backbone) vlivem vzájemného působení samotné struktury disacharidové jednotky, vnitřních vodíkových vazeb a interakcí s daným rozpouštědlem. Podél šroubovice se střídají nepolární, relativně hydrofobní části, tvořené axiálními vodíky a část polární, spíše hydrofobní, zajištěnou postranním řetězcem, vlivem které dochází k vytvoření prostorového uspořádání tzv. stočené stuhly podobně jako u ostatních aniontových glykosaminoglykanů. Protější strany stuhly jsou identické, ale antiparalelní. Na tři sousední sacharidové jednotky připadá 8 až 9 C-H jednotek, které lemují konfiguraci a přes které je polymerní řetězec schopen interakce s lipidy, membránami nebo za určitých podmínek také sám se sebou. [29] Na rozdíl od primární struktury, ovlivňuje sekundární a terciální struktura hyaluronanu jeho molární hmotnost. Ve vodném prostředí HA disociuje na sodné kationty a kyselinu hyaluronovou (HY). Obecně je HY ve formě soli (např. jako hyaluronát sodný, horečnatý, vápenatý či „metal hyaluronate“) velmi dobře rozpustná ve vodných roztocích, pro které je charakteristická vysoká viskozita (nulová smyková viskozita  $\eta_0 = 10$  [30]) a to i při nízkých koncentracích HA (100 mg/l [30]). Vysokomolekulární HA je na rozdíl od ostatních biopolymerů (uvést příklad schopná tvořit trojrozměrnou síť (při koncentraci  $\leq 0,1$  mg/l). Ostatní biopolymery (např. další aminokyseliny a jejich disacharidy jako 3,5-dimethyl-1-adamantanamin- hydrochlorid, 5-methyl-1-adamantanamin-3-carboxylová kyselina, N-octadecanoyl-1,5-bis(L-glutamic acid)-L-glutamic diamide [31]) mohou tvořit tyto rozsáhlé sítě - pseudo-gely,(tedy polymerní struktury, projevující některé vlastnosti gelů, které jim propůjčují fyzikální propleteniny řetězců, které jsou však dočasné, na rozdíl od vazeb chemických u pravých gelů [32]) až od koncentrace okolo  $10^3$  mg/l a to v důsledku mnohonásobně nižší molární hmotnosti, která se pohybuje okolo 100 - 200 g/mol. Tvoří-li vodné roztoky HA dvou a

vícemocné ionty, dochází ke spojení jednotlivých řetězců příčnými vazbami, vedoucí ke vzniku gelu s velkým obsahem vody. Zapletení řetězců způsobuje nenewtoské chování roztoku. [29,33]

Důsledkem přítomnosti vodíkových můstků je snížení konfigurační flexibility, tedy zvýšená tuhost řetězce [34] jak již bylo zmíněno v souvislosti se sekundární a terciální strukturou řetězce.

## 2.3 Využití HA

Pro svou biokompatibilitu (tzn. schopnost lokálně spouštět a řídit hojení ran, rekonstrukci a integraci tkání [3]) a vysokou biologickou odbouratelnost je dnes HA oblíbeným komerčním produktem. Své místo na trhu a v hledáčku vědců, doktorů i veřejnosti si vydobyl díky široké škále využití v kosmetice pleti po tkáňové inženýrství. Jak už bylo zmíněno v předchozí části teoretické části, molekulová hmotnost HA se v závislosti na zdroji a metodě přípravy se pohybuje v rozmezí hodnot od jednotek tisíc Da, až po miliony Da. Rozdílná molekulová hmotnost zásadně ovlivní biologickou aktivitu, fyzikálně-chemické vlastnosti a konečnou aplikaci.

### Vysokomolekulární HA

- Mw leží v rozsahu stovek kDa až po MDa. V lékařských a terapeutických aplikacích se používá jako tzv. viskosuplementace při léčbě osteoporózy, aplikuje se do kloubů z důvodu zvýšení lubrikační funkce a následně zmírnění bolesti a probíhajícího zánětu spojeného s osteoartrózou.

### Nízkomolekulární HA

- Mw se pohybuje v rozsahu jednotek kDa až stovky kDa. Díky své nízké molekulové hmotnosti proniká HA mnohem snadněji kůží (smaller molecular size). Zlepšuje stimulaci produkce endogenní HA a kolagenu, a proto je součástí kosmetických přípravků k ošetření pleti proti stárnutí. Neméně důležité je její využití při hojení ran a regenerace tkání, protože se podílí na podpoře migrace buněk, procesu obnovy tkáně či modulaci zánětu.

[18,23,28,33]

V oblasti medicíny, kde je HA aplikován nejhojněji, slouží např. jako médium pro podávání účinných látek, injekčně je zaváděn do míst postižených osteoartritidou, kde ulevuje od

bolesti, v očním lékařství se využívá při léčbě např. syndromu suchého oka, napomáhá při regeneraci poškozených tkání protizánětlivými a hojivými účinky v závislosti na interakci s receptory, jako CD44, které iniciují růst buněk. Ve zregenerované tkáni podněcuje tvorbu krevních kapilár zajišťující přívod klíčových živin. [28,35,36]

V oblasti kosmetiky vychází použití HA zejména z jeho hydratačních schopností. HA napomáhá napínání vláken kolagenu, což vede k žádoucí vypínání pleti. Např. německá studie od T. Pavicice a spol.[37], Rzany B. a spol. [38], nebo americká studie skupiny Stacy R. Smithové [39] se soustřeďují na to, jak hydratace tkáni přítomností HA napomáhá redukci kožních defektů, jako jsou vrásky a stárnutí kůže. Pro tyto účely je HA složkou gelů, sér a krémů, nebo intradermálních injekcí a implantátů. [23,40]. Japonská studie z roku 2017 výzkumníků Mariko Oe, Seigo Sakai, Hideto Yoshida a spol. prokázala pozitivní efekt na kvalitu pleti také při orálním užívání HA, jako doplňku stravy, po kterém došlo k úbytku ploch výskytu a ke zmenšení hloubky vrásek. [41,42]

### 3 HOFMEISTEROVA ŘADA SOLÍ

Ve druhé polovině 19. století sepsal německý vědec Franz Hofmeister, spolu se svým studentem S. Lewithem a několika dalšími kolegy, sérii sedmi článků věnované obecně studii solí v roztocích, resp. bílkovinných roztocích [4]. Byly tak tehdy poprvé systematicky studovány specifické efekty iontů (SIE) při kterých hraje roli nejen náboj daného iontu, ale primárně i jeho identita. Hofmeister a Lewith seřadily ionty podle jejich schopnosti srážet proteiny z vodného roztoku a konkrétně se jednalo o proteiny (zejm. globulin a albumin) obsažené v krevním séru a v bílku slepičích vajec. Sestavená série iontů, byla pojmenována jako tzv. Hofmeisterova řada solí a v podstatě do dnes je vynaloženo značné úsilí za účelem podrobněji pochopit její komplexnost. Hofmeisterova řada totiž ovlivňuje srážení proteinů, ale celou řadu jevů roztokového chování (za přítomnosti iontů), jako např. změny povrchového napětí (tj. práce potřebná ke zvětšení povrchu kaliny o jednotku plochy) [43], zeta potenciálu (tj. elektrický potenciál na smykovém rozhraní částic), kritických teplot u termoresponzivních polymerů (teploty při kterých některé polymery přecházejí z roztoku do gelového stavu nebo naopak, včetně HY), vázání proteinů přes iontové vazby, viskozity elektrolytu a další... [44]

Pořadí iontů tak není jednoznačné, tak například autoři L. M. Pegram a M. T. Record mladší (2007) se ve své zaměřili na studium vlivu solí na povrchové napětí vodných roztoků a zjistili, že při měření povrchového napětí (na rozhraní vodného roztoku a okolní atmosféry) se účinky iontů mění v závislosti na přítomném protiontu, tzn., že vliv kationtů ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  a  $\text{Li}^+$ ) se budou odvíjet v závislosti typu soli, ze které budou v roztoku disociovány. Bude-li výchozí solí např.:

- Chlorid – (tzn. protiontem bude anion  $\text{Cl}^-$ ) bude odpovídat vliv kationtu na povrchové napětí tomuto pořadí:  $\text{Na}^+ > \text{K}^+ \approx \text{Li}^+$
- Sulfát – (tzn. protiontem bude anion  $\text{SO}_4^{2-}$ ) bude odpovídat vliv kationtu na povrchové napětí tomuto pořadí:  $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+$
- Iodid – (tzn. protiontem bude anion  $\text{I}^-$ ) bude odpovídat vliv kationtu na povrchové napětí tomuto pořadí:  $\text{K}^+ \approx \text{Na}^+ > \text{Li}^+$

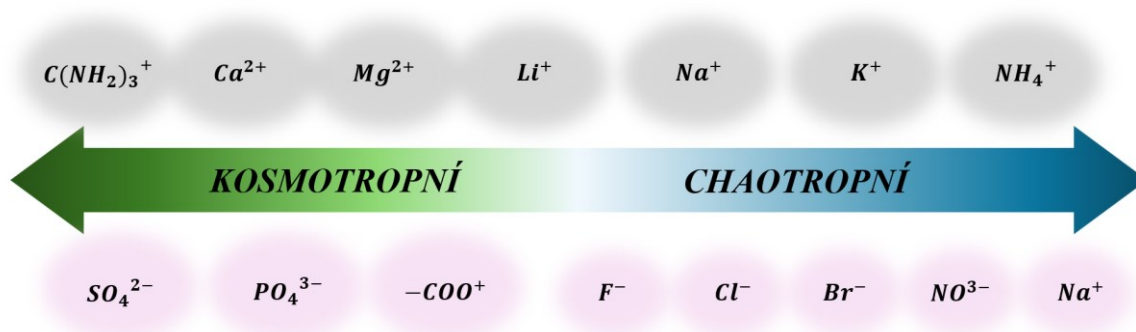
[45]

Tento příklad poukazuje na skutečnost, že změny vyvolané přítomností iontů ve vodných roztocích jsou velmi komplikované, a do současnosti nebyla podstata a mechanismus jejího působení plně rozluštěna a pochopena.

Nicméně Hofmeisterova hypotéza vycházela z předpokladu, že chování jednotlivých disociovaných iontů soli se odvíjí od množství vody, které na sebe jsou v roztoku schopny navázat. [5] Na základě této úvahy byly ionty rozděleny na:

- Kosmotropní ionty – jedná se o ionty, které jsou v roztoku silně hydratované, čímž podporují uspořádanost struktury vody, a proto jsou často označovány jako tzv. „structure makers“. Někdy se ještě můžeme setkat v souvislosti s kosmotropními ionty s pojmem „salting out“, což značí expanzi (resp. „rozbalení“) polymerního řetězce v roztoku v závislosti na uspořádané struktuře prostředí roztoku.
- Chaotropní ionty – jsou naopak ionty, které se hydratují jen slabě, což se následně projeví spíše v tzv. rozrušení struktury vody, a proto se jim často říká tzv. „structure breakers“. V přítomnosti těchto iontů tedy dochází ke „sbalování“ polymerního řetězce, v literatuře označované jako „salting in“ efekt.

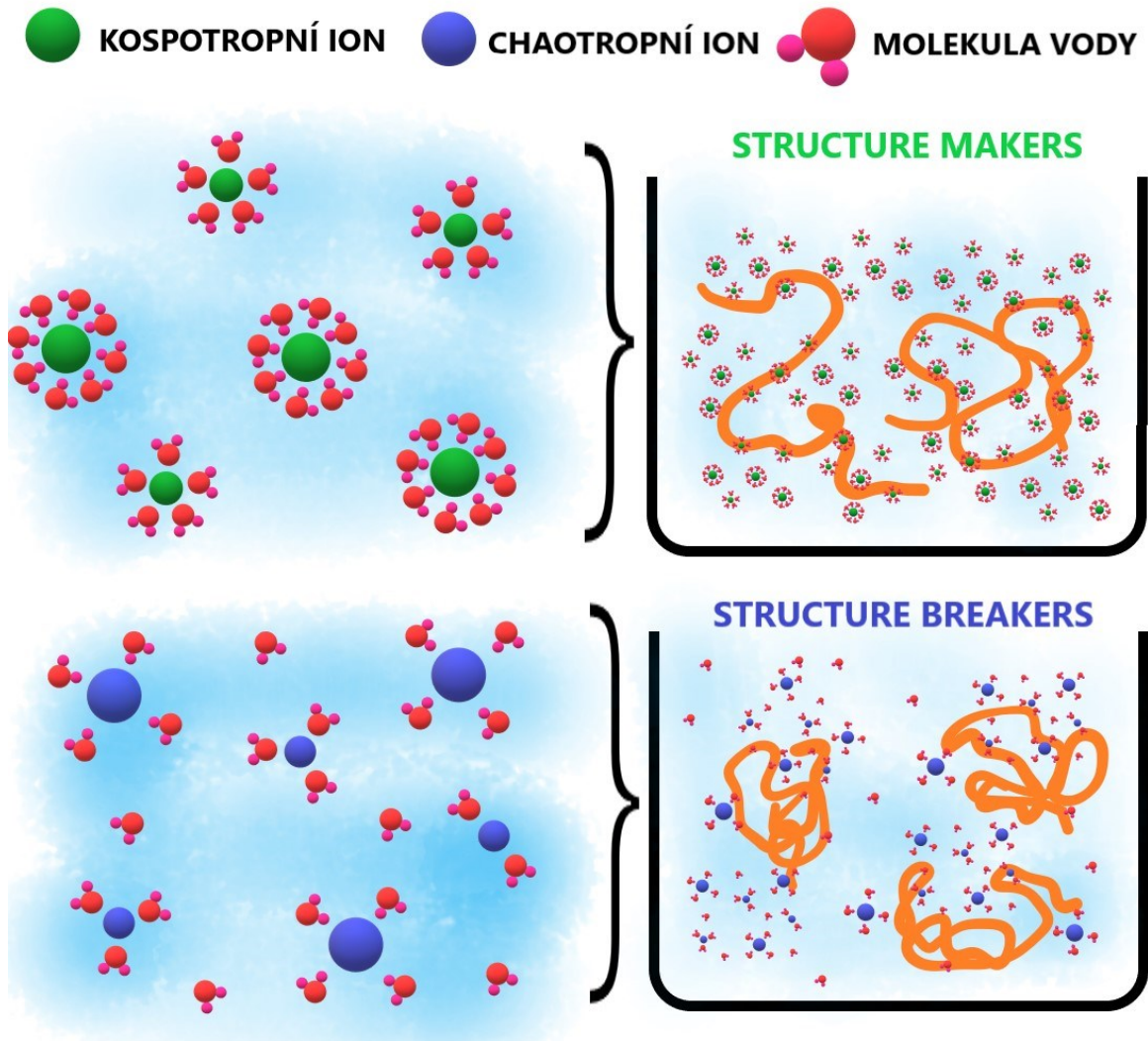
[5,6]



Obrázek 2 Klasické seřazení kationtů a aniontů podle míry jejich kosmotropního/chaotropního charakteru

V literatuře je velmi často poukázáno na rozdílné účinky kationtů a aniontů na stabilitu polymeru. Anionty vykazují výraznější účinek na zmíněné chování než kationty. Rozdíl mezi účinky různých aniontů na stabilitu polymeru v přítomnosti pevného kationtu je tedy výraznější, než v případě různých kationtů (v přítomnosti společného aniontu). Příčinu pozorovaného chování lze najít např. ve větší velikosti, vyšší polarizovatelnosti a odlišným hydratačním vlastnostem aniontů ve srovnání s kationty [46]. Navzdory složitosti problematiky působení vzájemných vlivů v systému rozpouštědlo-ionty-polymer se autorům L. Musilové a spol. (2019) podařilo při studiu chování HA ve vodných roztocích s Hofmeisterovými ionty vyvodit několik důležitých závěrů. Tak například bylo zjištěno, že polymerní klubko HA více expanduje v roztoku s kosmotropními ionty než v roztoku

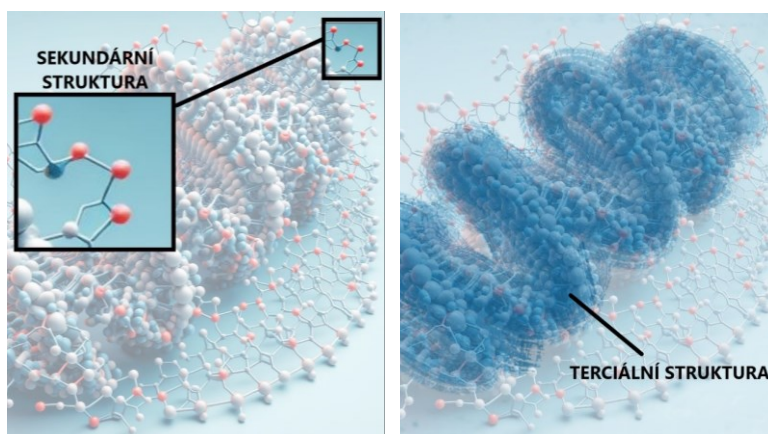
s chaotropními ionty. Dále, že smrštění a expanze polymerního klubka může být způsobena interakcí příslušných iontů s hydrofilními nebo hydrofobními místy na řetězci HA. Nejzásadnějším výsledkem zmíněné práce však bylo zjištění, že sůl disociovaná v roztoku ve formě chaotropní aniont – kosmotropní kationt (nebo naopak) vede ke stabilizaci řetězce v širokém teplotním rozmezí. [6]



Obrázek 3 Vliv kosmotropů/chaotropů na uspořádání vody a následně míru expanze polymerního klubka

## 4 KONFORMACE POLYMERNÍHO ŘETĚZCE

Části polymerního řetězce se mohou různě otáčet a zaujímají tak v prostoru různá uspořádání. Po primární struktuře, která se týká typu a pořadí monomerů a sekundární struktuře, která specifikuje, jak jsou vůči sobě jednotlivé atomy v meru umístěny, zatímco rozmístění polymerních řetězců v prostoru představuje úroveň terciální struktury. Pro představu rozdílu mezi úrovní sekundární a terciální struktury je na schématu na Obrázek 4. Zvýrazněn kousek řetězce znázorňující sekundární strukturu a “nadútvár“ do kterého se řetězce skládají, jímž je terciální struktura.



Obrázek 4 Schématické zobrazení úrovní sekundární a terciální struktury polymerní makromolekuly

Okamžité uspořádání řetězce v prostoru se označuje jako konformace. Jestli se řetězec může v prostoru přejít do jiné konformace, tedy zaujme jiné prostorové uspořádání, se odvíjí od množství energie, kterou je potřeba vynaložit při natočení vazby. Množství konformací, kterých polymer může dosáhnout lze vyjádřit ohebností řetězce. Čím více energie je zapotřebí k překonání energetické bariéry a otočení části řetězce kolem vazby, tím méně konformačních změn takový polymer udělá, a můžeme říct, že polymer má malou ohebnost. Ohebnost řetězce nejčastěji mohou omezit např. objemné funkční skupiny navázané podél řetězce. Naopak např. s rostoucí délkou řetězce (vyšší molekulová hmotnost), či s klesající hustotou kohezní energie (tj. soudržná energie, která drží řetězec pohromadě) se ohebnost řetězce spíše zvyšuje. Polymer v roztoku neustále mění svůj tvar, respektive prostorové uspořádání. V reálném roztoku nebývá polymerní řetězec napřímený, ale z energetických důvodů se spíše vyskytuje ve formě svinutého různě objemného statistického klubka. V případě, že se polymer vyskytuje ve stavu nepravidelného uspořádání, a není schopen se poskládat do pravidelné struktury, mluvíme o polymeru v amorfním stavu. Nastanou-li však

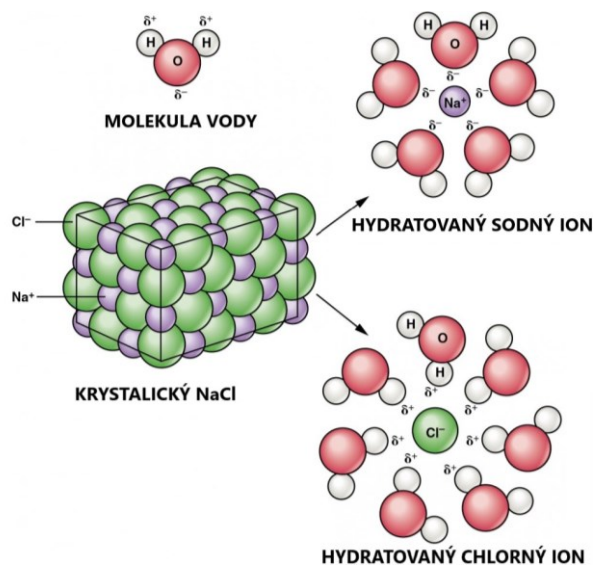


vhodné podmínky (zejm. termodynamické), jsou některé polymery schopny spontánně zaujmout pravidelně uspořádanou konformaci, pak v takovém případě mluvíme o krystalickém stavu, resp. semikrystalickém, jelikož nikdy nedojde ke 100 % pravidelnému uspořádání polymeru [47]. Pro účely této práce pracujeme s konformací HA jako amorfni.

Jak již bylo uvedeno výše v kontextu se strukturou a vlastnostmi HA (viz Kapitola 2.2), HA řetězec se v prostoru stabilizuje vznikem mezimolekulárních vazeb mezi amidovými a karboxylovými skupinami a přeuspořádají prostorově objemné skupiny do energeticky výhodnější ekvatoriální roviny, na úkor čehož jsou přesunuty do polohy stericky méně výhodné, což má za následek vznik hydrofobních a hydrofilních částí řetězce. Pro minimalizaci kontaktu s molekulami vody ve vodných roztocích, se hydrofobní části řetězce shlukují k sobě. Konformace HA reaguje však velice citlivě na změny okolních podmínek a to zejm. na přítomnost iontů, pH či teplotu [48]. V návaznosti na předchozí kapitolu týkající se iontů z Hofmeisterovi řady a jejich chování v přítomnosti vodného prostředí a zároveň v návaznosti na popis konformace polymerního řetězce HA ve vodných roztocích, si nyní přiblížíme samotné dění v roztocích za přítomnosti všech diskutovaných složek, tedy v systému polymer-rozpouštědlo (voda) – sůl. Otázka změn prostorové orientace polymerů v roztoku byla řešena v mnohých kontextech a z různých úhlů pohledu.

Prvními průkopníky zabývající se problematikou interakcí ionty – polymer byli Flory a Osterheld, kteří (1945) sledovali řetězce kyseliny polyakrylové (ve zředěných vodných roztocích), která stejně jako HA patří do skupiny polysacharidů a zároveň je polyelektrolytem se schopností vázat vodu [49]. Na základě jejich výsledků, došli k závěru, že v přítomnosti vápenatých iontů dochází k výrazně většímu sbalení polymerního klubka než za přítomnosti ekvivalentního množství sodných iontů. Pozorovaný jev označili jako osmotický efekt, při kterém jsou elektrostatické interakce vícemocných (divalentních) protiontů s nabitým polyelektrolitickým řetězcem (tj. řetězcem který má náboj, z důvodu disociace iontové skupiny) mnohem silnější než interakce jednomocných iontů. [50]

Na základě měření povrchového napětí a aktivity iontů vybraných z Hofmeisterovi řady byly získány informace o solvatačních vlastnostech iontů a proteinů (za různých termodynamických podmínek). Solvatace lze vnímat jako schopnost makromolekuly navázat kolem sebe molekuly rozpouštědla a vytvořit kolem sebe tzv. solvatační obal.



Obrázek 5 Schéma zobrazující solvatační obal iontů disociovaného NaCl; dostupné z [courses.lumenlearning.com/suny-dutchess-ap1/chapter/water-2/](https://courses.lumenlearning.com/suny-dutchess-ap1/chapter/water-2/)

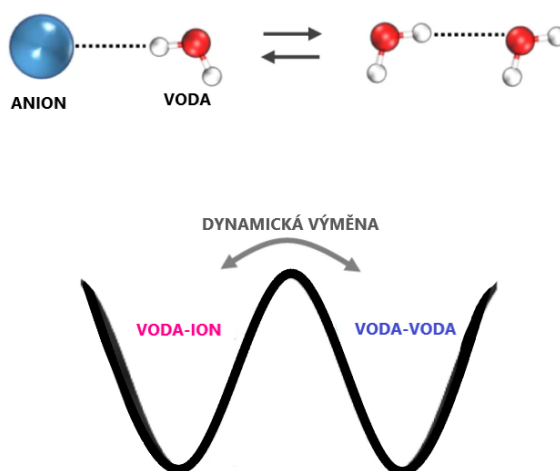
Toto chování je vlastní především polyelektrolitům mezi, které patří i HA. Míra solvatace souvisí se „structure making“ a „structure breaking“ efekty, které byly popsány v souvislosti s projevy kosmotropních a chaotropních iontů [51].

Velmi často je v této problematice opomíjí souhra kation-anion, která hraje velmi důležitou roli. Nelze tedy přisuzovat všechny projevy v systému pouze jednotlivým iontům, ale je potřeba je vnímat s příslušným protiontem. Párování iontů (což je konkrétní příklad iontové kooperativy) přímo koreluje s účinky iontů na dynamiku vody. Literatura také potvrzuje skutečnost, že různé denaturanty a protektanty sekundární struktury proteinů mohou projevit své účinky na protein skrze změnu akceptorové rovnováhy ve vodném roztoku. I když některé výsledky ukazují, že vazebné energie mezi kationty a anionty mohou být významné, tak výsledky výzkumné skupiny Cramera a spol. (2006) neprokázali žádné významné projevy navázání kationtů na proteinovou strukturu [51]. Jejich studie, podobně jako jejich dřívější RTG měření, naznačují pouze přítomnost slabé přímé vazby kationtů, což potvrzuje důležitost nepřímého mechanismu, v rámci, kterého kationty ovlivňují dostupnost vodíkových můstků. Anionty i kationty disociované soli ovlivňují jak sekundární, tak terciální strukturu proteinů. Pro plné pochopení efektů solí na polymer, je nutno vnímat interakce mezi anionty a vodou a stejně, jako interakce částí polymeru o různých polaritách a nábojích [5]. Perspektivou Taylorovi disperzní analýzy (TDA) pohlíželi na chování HA v roztocích autoři L. Musilové a spol. (2021) [52]. TDA umožňuje určit difúzní koeficient molekul, pomocí kterého lze stanovit tzv. hydrodynamický průměr makromolekuly. Z jejich

výsledků vyplývá, že soli tvořené z kombinací iontů *kosmotropní aniont – chaotropní kation* ( $K_A-CH_C$ ) nebo naopak *chaotropní anion - kosmotropní anion* ( $CH_A-K_C$ ) mají prokazatelně výraznější vliv na stabilizaci konformaci HA. Toto tvrzení bylo odvozeno na základě detekovaných změn velikosti polymerního klubka, při určité teplotě, tzv. „breaking pointem“. Na základě dosažených výsledků byla sestavena hypotéza, podle které lze řídit rozpínání a sbalování HA – tedy její konformace použitím správné kombinace chaotropních a kosmotropních iontů. Stabilizace polymerních řetězců může významně ovlivnit i viskozitu roztoku. Čím více bude polymerní řetězec stabilizovaný, tím méně se bude pohybovat, a dojde tak vlivem snížené pohyblivosti k nárůstu viskozity. Jedinou solí (dvojice kosmotropní aniont – kosmotropní kation ( $K_A-K_C$ )), u které se projevil pokles viskozity vody, z řady 7 testovaných solí, byl (konkrétně  $NH_4SCN$ ). Všechny ostatní kombinace iontů v testovaných solích vedly naopak ke zvýšení viskozity. Z toho vyplývá, že kombinace kosmotropní aniont – kosmotropní kation ( $K_A-K_C$ ) destabilizuje polymerní konformaci. [52]

Změnám konformace HA způsobeným iony (disociované NaCl) věnovala pozornost také skupina E. Kutálkové a spol. (2020) [53]. Ti ve své práci zabývající se řešenou problematiku z pohledu molekulových simulací. Modelové chování HA bylo pozorováno při dvou různých teplotách a několika různých koncentracích soli NaCl. Jejich výsledky ukázaly, že počet vodíkových můstků vně molekuly narůstá spolu s teplotou. Opačné trend vykazovaly vodíkové můstky působící mezi makromolekulou a rozpouštědlem, které s rostoucí teplotou klesali. S tím, že nárůst intramolekulárních vazeb byl větší, než pokles vazeb mezi makromolekulou a rozpouštědlem. V důsledku ohřevem tedy došlo k destabilizaci standardní konformace, jinými slovy k rozrušení struktury pozorovaného systému (structure braking). Popsaná změna konformace je specifikum, pro systém polymer-rozpouštědlo-ionty, jelikož v čistě vodném prostředí je tento jev takřka nepozorovatelný. S rostoucí koncentrací soli, docházelo ke snížení počtu všech vodíkových můstků v systému, při obou testovaných teplotách. Na základě těchto výsledků, lze předpokládat, že rostoucí koncentrace NaCl ovlivňuje konformaci polymerních řetězců HA dvěma různými způsoby. Prvním z nich představuje pokles počtu vodíkových můstků mezi makromolekulou a rozpouštědlem (vodou), v důsledku čehož dochází k rozrušení solvatačního obalu molekul (rovnoměrného obalu molekul vody) a současně destabilizaci konformace. Druhý způsob, v podstatě v návaznosti na rozrušení solvatačního obalu, spočívá v přiblížení a zvýšení koncentrace  $Na^+$

kationtů do blízkosti nabitých a iontových částí polymerního řetězce HA, v důsledku čehož je omezena jinak přirozená fluktuace velikosti polymerního klubka [53].



Obrázek 6 *Vzájemně konkurenční interakce anion-voda/voda-voda* [54]

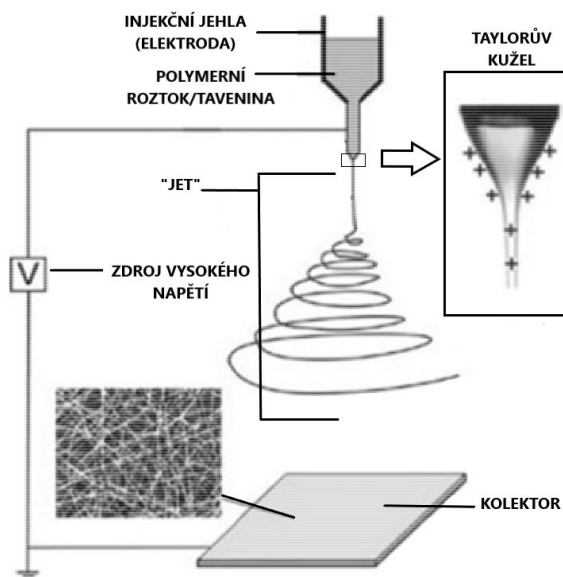
V práci autorů Kutálkové a spol. (2020) je nejednou poukazováno na tzv. “identitu iontů“ a na to, že je třeba neopomíjet ji a neuvažovat iont jen podle velikosti jeho náboje [53]. Předmětem studie Drew F. Parsonsona a spol. roku 2011 byla snaha odhalit specifika Hofmeisterových iontů - resp. definovat jejich identitu. Jako analytický prostředek si zvolili hodnocení ne-elektrostatických interakcí *ion-povrch* a *ion-iontové disperze* a velikostí iontů prostřednictvím iontové polarizace. Hlavními závěry jejich práce předpokládají, že iontová specifita se odvíjí od příslušné elektronové konfigurace, která určuje specifika v chování iontů, molekul a iontů. Nekovalentní a neelektrostatické interakce závisí na přítomnosti dipólů anebo na pohyblivosti elektronového mraku. Proto je polarizace jedním ze zásadních parametrů, se kterým je potřeba počítat, hodnotíme-li interakce *iont-iont*, *iont-rozpouštědlo* a *iont-povrch* [55].

## 5 ELEKTROSTATICKÉ ZVLÁKŇOVÁNÍ

Tato kapitola je věnována jedné ze stěžejních metod, od které se odvíjí experiment popsany v druhé části této práce. Teoretické pozadí na následujících řádcích stručně popisuje princip fungování electrospinningu (aparaturu a proces zvláknění), uvádí některá možná uspořádání a typy aparatury, příp. výhody a nevýhody které skýtají, a následně popis získaných vláken a uvedení souvislostí s problematikou zvláknění HA.

Metoda elektrostatického zvláknění, běžně označovaná jako electrospinnig, je relativně jednoduchá a dlouho známá metoda používaná pro výrobu nano- příp. mikro – vláken z roztoku polymeru nebo jeho taveniny. Technika elektrostatického zvláknění je oblíbená primárně ve tkáčovém a materiálovém inženýrství díky jednoduchosti své podstaty a variabilnímu provedení. Stručně řečeno, základní princip spočívá ve “vytahování“ polymerního vlákna pomocí elektrostatického pole [56].

Aparatura pro zvláknění se skládá ze tří hlavních komponent, jimiž jsou zdroj vysokého napětí, kolektor – tedy uzemněná elektroda, na kterou se upínají vzniklá vlákna a druhá elektroda, přes kterou je přiváděno napětí do roztoku, tou bývá většinou injekční jehla naplněná polymerním roztokem. Obě elektrody mohou být různého typu a mohou k sobě být různě situovány. Konkrétních popis některých používaných aparatur je uveden níže v této kapitole [57]. Proces samotného zvláknění probíhá následovně: Polymerním roztokem (popř. tavenina) je naplněna injekční jehla, případně může být použit jiný typ elektrody. Na danou elektrodu je přiveden náboj. Vzniklé elektrické pole generuje síly, které jsou v roztoku v určitý moment schopny překonat síly povrchového napětí v kapalině, což vede nejprve k deformaci povrchu kapaliny a vzniku kopečkovitého útvaru, tzv. Taylorova kužele (viz Obrázek 7 *Schéma základních komponent zvláknovací aparatury a znázornění Taylorova kužele* [58]Obrázek 7), z jehož špičky následně dochází k vytažení tenkého lineárního proudu (jetu), který je dále urychlovaný směrem k protější uzemněné elektrodě, resp. kolektoru [56].



Obrázek 7 Schéma základních komponent zvlákňovací aparatury a znázornění Taylorova kužele [58]

Jakmile probíhá vytažení tenkého lineárního proudu (jetu), po dobu překonání vzdálenosti ke kolektoru, dochází k jeho prodloužení, čímž narůstá jeho povrch [56]. Mezi elektrodou, od které jet “startuje“ a mezi kolektorem, vykazuje během letu vzestupně parabolickou trajektorii, což lze také vidět na Obrázek 7. Jet má tak dostatečnou dráhu na zúžení svého průměru, navíc během letu vysychá rozpouštědlo a na kolektor dopadají již požadovaná vlákna [59]. Faktory, které ovlivňují průběh a výsledky zvlákňování, lze rozdělit do tří kategorií: na (1) *specifika roztoku* (jako např. koncentrace, molární hmotnost, viskozita polymeru, a hlavně jeho povrchové napětí), (2) *podmínky prostředí* (vlhkost a teplota), a (3) *procesní podmínky zvlákňování* (vzájemná vzdálenost elektrod, napětí mezi elektrody). Každá ze zmíněné skupiny ovlivňuje proces zvlákňování jiným způsobem. Uveďme si pár příkladů. Začneme-li u určujících vlastností roztoku, patří sem ještě třeba *permeabilita*, což je schopnost materiálu odolávat elektrickému poli. S rostoucí permeabilitou je za potřeby přivést na roztok vyšší napětí, aby jej bylo možné zvláknit. Použití vyšší voltáže má při “letu jetu“ za následek jeho větší prodloužení. Výsledná vlákna jsou v důsledku toho tenčí. Někdy může jet spíše tvořit kapičky namísto vláken. Zvýšením permeability a v souvislosti s ní také napětí při zvlákňování, se tendence tvořit kapičky snižuje [60]. Neopomenutelné je dále *povrchové napětí roztoku*. Aby mohlo dojít ke zvlákňování, musí být síly povrchového napětí překonány silami elektrostatickými. V případě, že při zvlákňování je povrchové napětí stále dost vysoké, bude docházet k deformacím vláken a tvorbě tzv. koráلكové

struktury na povrchu vláken (viz blíže níže). Za účelem snížení povrchového napětí se do roztoku přidává těkavá (např. ethanolu) nebo povrchově aktivní látka (např. disociované ionty, které reagují s molekulami vody a omezí tak interakce mezi molekulami voda-voda, čímž sníží její "soudržnost" resp. povrchové napětí). Ne vždy je však snížení povrchového napětí žádoucí. U electrospinningu totiž existuje tzv. horní a dolní hranice povrchového napětí [61]. Jak už bylo zmíněno výše dalším klíčovým aspektem, který ovlivňuje proces zvlákňování je viskozita roztoku. Je-li totiž odpor proti toku příliš vysoký, může zcela bránit zvlákňování případně se namísto vláken tvoří kapičky [62]. Viskozita se značně odvíjí od koncentrace polymeru v roztoku. Případě, že při procesu zvlákňování bude mít roztok nízkou koncentraci a vysoké povrchové napětí, dojde ke ztrátě soudržnosti jetu, což se nakonec projeví vytvořením kapiček namísto vláken [63].

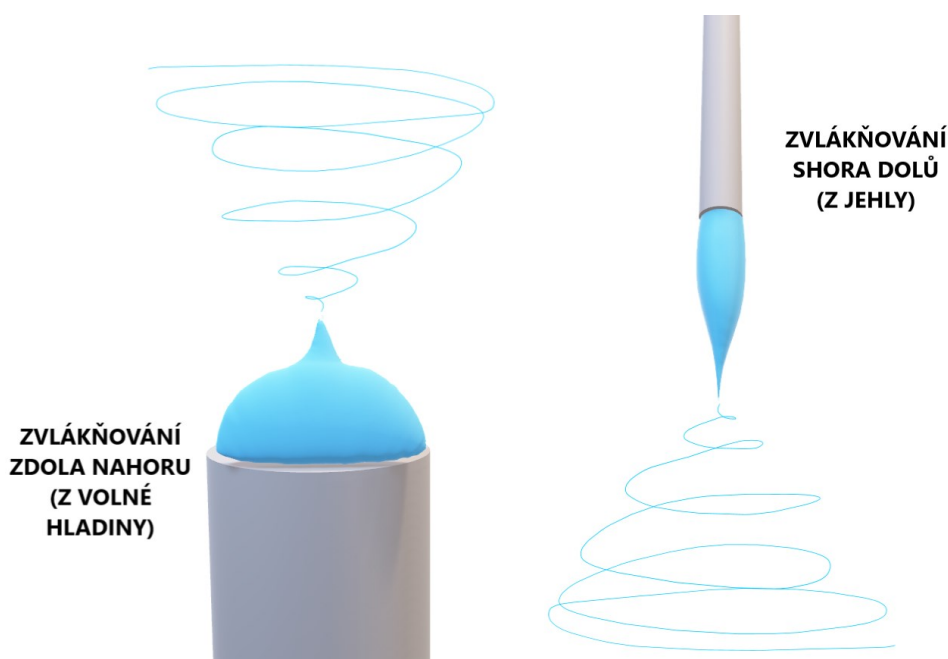
Neméně důležitou roli hraje vliv okolního prostředí, jako je např. vlhkost vzduchu. Autoři Casper a spol. (2003) [64], kteří se ve své práci zabývali zkoumáním vlivu vlhkosti a molekulové hmotnosti na povrch elektrovlákněných polystyrenových (PS) vláken zjistili, že zvýšená vlhkost vzduchu při zvlákňování způsobuje vznik vláken s porézním povrchem. Při zvlákňování za vyšší vlhkosti, se použité rozpouštědlo z vláken nestihne odpařit před dopadem vlákna na kolektor a k vysychání dochází až dodatečně.

Z procesních podmínek na proces zvlákňování nejvíce vliv velikost použitého napětí. Se zvyšujícím napětím, tedy s rostoucí silou, která táhne vlákno ke kolektoru, vzrůstá také odpudivá síla v jetu, což vede k dloužení vláken, a tedy ve výsledku ke snížení jejich průměru. [65]

Kromě zmíněných faktorů, ovlivňují proces zvlákňování i použitý typ a uspořádání aparatury. Procesní parametry a aparatura jako taková se totiž v mnohém překrývají. Např. vzájemná vzdálenost elektrod, která určuje délku trajektorie jetu. Je-li trajektorie příliš krátká, vlákna se nestihnou rovnoměrně prodloužit, v místech spojů a překryvů vláken vznikají nehomogenní vícevrstvé struktury anebo opět defekty v podobě koráلكové morfologie na povrchu vláken (kapiček na vláknech). Vzdálenost elektrod je potřeba řádně koordinovat spolu s použitím napětím, tyto dva parametry se mohou do jisté míry vzájemně kompenzovat [65]. Kromě vzdálenosti mezi elektrodou s roztokem a kolektorem, ovlivňuje proces zvlákňování i kolektor samotný. Jedním z typů kolektoru představuje tzv. plátový statický kolektor, ten je vyroben z vodivého materiálu, a vlákna díky tomu na něj dopadají rovnoměrně po celé ploše, což neplatí v případě, že je kolektor zhotoven z nevodivého materiálu, na kterém se vlákna shlukují nehomogenně, v některých místech je jich více, což může vést ke vzniku deficitů. Kromě statických kolektorů existují i kolektory rotující, na

kteřé se vlákna namotávají. Výhodou použití rotující kolektor spočívá v převážně v možnosti získat vlákna orientovaná v jenom směru. Zároveň, vlivem rotace dopadající vlákna mnohem lépe vysychají, čímž lze předcházet vzniku defektů na povrchu vláken v podobě korálků. [66,67]

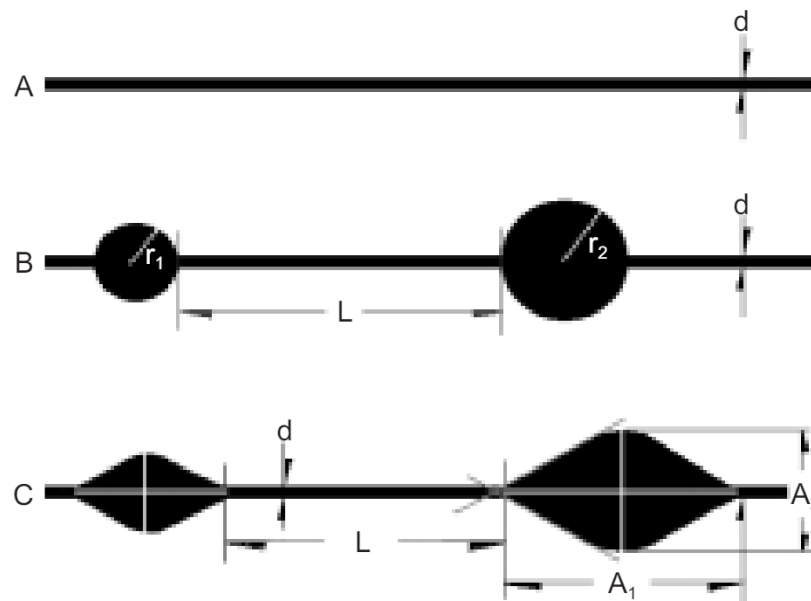
Kromě typu elektrody lze proces zvlákňování ovlivnit samotným uspořádáním aparatury v prostoru, kdy se v podstatě nabízejí tři možnosti. První možností je zvlákňování v pozici „shora dolů“, v tom smyslu, že zvlákňovaný roztok se nachází nahoře a kolektor pod ním. Díky příspěvku gravitační síly, je zapotřebí nižšího napětí, v porovnání s uspořádáním v pozici „zdola nahoru“. Při zvlákňování proti gravitační síle je v důsledku potřebného vyššího napětí a větší odporové síly v jetu dosahováno tenčích vláken. Aparatura orientovaná „zdola nahoru“ rovněž umožňuje zvlákňování z tzv. volné hladiny. Doposud byla jako elektroda, která přivádí napětí na roztok, uvažována injekční jehla, zvlákňujeme-li však z volné hladiny, může být elektroda položena v roztoku, resp. roztok může být volně umístěn na elektrodě [68].



Obrázek 8 ilustrace zvlákňování „shora dolů“ vs. „zdola nahoru“

V rámci popisu parametrů roztoku a procesních parametrů již byly částečně uvedeny morfologie a jejich defekty, které se při elektrostatickém zvlákňování mohou vyskytovat. V krátkosti si je připomeneme. Geometrické znázornění nejčastějších morfologií je na Obrázek 9, reálná podoba těchto morfologií je na snímcích na Obrázek 10.

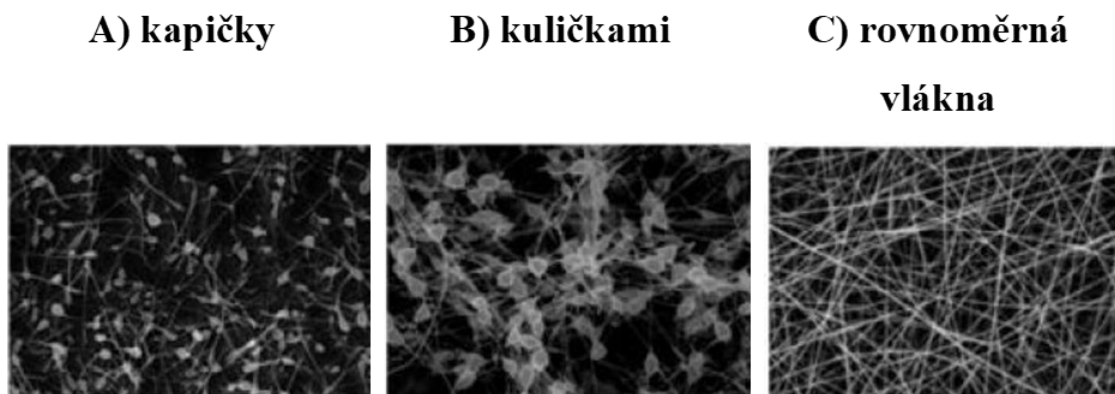




Obrázek 9 Geometrické schéma znázorňující A rovnoměrná vlákna; B vlákna s kuličkami (kořalkami); C vlákna s kapičkami [69]

Tým autorů Ewaldz a spol. (2021) [70] se ve své práci zabývali zvlákňováním polyvinylalkoholu (PVA), polyethylenglykolu (PEO) a Polyvinylpyrrolidonu (PVP), z pohledu morfologie získaných vláken v závislosti na povrchovém napětí a viskozitě výchozího zvlákňovaného roztoku. Na základě jejich pozorování dospěli k následujícím závěrům, že v důsledku nestability jetu může primárně docházet ke vzniku tři základní morfologie vláken:

1. **kapičky (droplets)** - Ty vznikají, v případě, že viskoelasticita roztoku je příliš malá na to, aby zabránila deformaci způsobenou povrchovým napětím, tedy seskupením do kuliček. Tomuto jevu se říká *electrospraying*.
2. **vlákna pokrytá kuličkami (beads-on-string)** - Příčina vzniku této morfologie na povrchu vláken, připomínající korálky navlečených na šňůrce (kapiček propojených vláknem) je připisován propletení polymerních sítí v roztoku.
3. **rovnoměrná vlákna (uniform fibers)** – V případě, že se podaří všechny zmíněné nestability dostatečně potlačit, dochází ke vzniku rovnoměrných vláken.



Obrázek 10 SEM snímky tří nejčastějších morfologií vláken [52]

Zcela jiná situace nastává při zvlákňování hyaluronanu (HA), které se při zvlákňování příliš nevyužívá. V kapitole věnované HA je vysvětleno, že vlivem jeho strukturního uspořádání, stejně jako molekulovou hmotností ( $\geq 1,18$ MDa) je nadstandartní, což z něj sice dělá výjimečný polymer, který je však díky tomu mnohem hůře zpracovatelným právě prostřednictvím electrospinningu [54]. Vyšší molekulová hmotnost může navíc při zvlákňování vést k tvorbě vzniku mikrostruktur [55]. Další komplikací při zvlákňování obecně přírodních polymerů, souvisí se stabilitou jejich terciální struktury, jež snižuje viskoelasticitu roztoku nutnou pro stabilizaci jetu při zvlákňování [56]. Jednou z možností, jak problém zvlákňovatelnosti přírodních polymerů obejít, je v roztoku vhodně kombinovat zvlákňovaný HA (nebo jiný přírodní polymer) s dalšími polymery, které lze zvlákňovat snáze např. (syntetické polymery). Příkladem může být skupina L. Bardoňové (2021) [57], která při zvlákňování kombinovala HA (82 kDa) s PEO (400kDa), díky čemuž se jim podařilo dosáhnout obdivuhodného poměru HA:PEO až (80:20 hm. %) ve vzniklých vláknech. Jiní autoři se s danou problematikou snažili vypořádat vhodnou úpravou složení použitého rozpouštědla. Jako např. L. Vítková a spol. (2019), která do rozpouštědla přidávala izopropylalkohol (IPA) v poměru VODA:IPA (10:7 hm%), nebo methanol (MeOH) a ethanol (EtOH) v poměru VODA:EtOH:MeOH (5:5:1 hm %). Použité kombinace navržených rozpouštědel vedly ke zdárným výsledkům a podařilo se získat vlákněné struktury HA [9]. V rámci stejné práce bylo také testováno zvlákňování s využitím tzv. “nosného polymeru“, konkrétně PVA (800 kDa). Podobným způsobem postupovala i skupina Junxinga Li a spol. (2005) [54], kteří se pokusili zvláknit HA bez přídavku nosného polymeru. V jejich případě řešení tohoto problému spočívalo v použití rozpouštědla s přídavkem dimethylfumarátu (DMF), což se ukázalo jako účinné. I v tomto případě však museli autoři využít nosný polymer želatinu (GE). Použití kombinací HA-

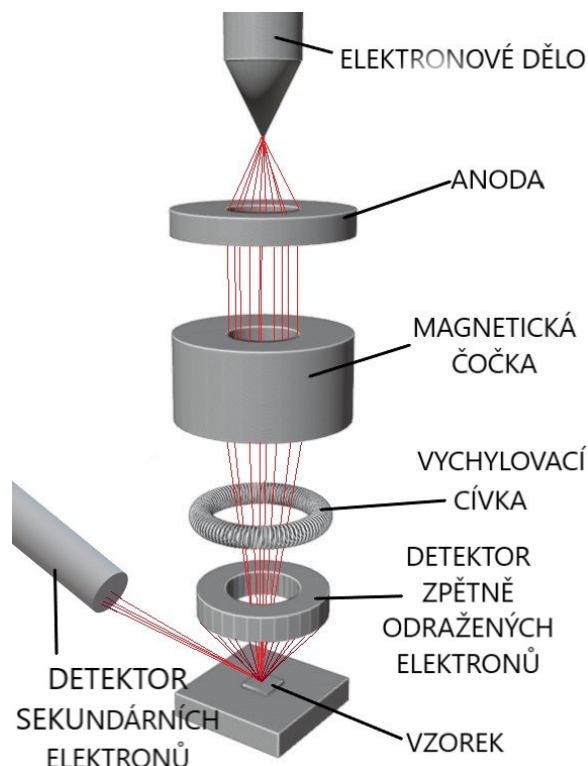
GE se při zvlákňování podařilo připravit homogenních husté vlákenné sítě bez přítomných defektů.

## 6 CHARAKTERIZACE

### 6.1 SEM Analýza

Skenovací neboli rastrovací elektronová mikroskopie (SEM) je vysoce univerzální technika, která v dnešní době představuje jednu z nejpobulárnějších mikroskopických metod, čemuž vděčí, nejen díky jedinečným zobrazovacím možnostem, ale také intuitivní a snadné manipulaci s aparaturou, a relativně nevysokým nárokům na přípravu vzorku [71] Jedná se o techniku používanou zejména k získání snímků s vysokým rozlišením a podrobných informací o povrchu vzorků. Jedná se o typ elektronové mikroskopie, která využívá fokusovaný svazek elektronů ke skenování povrchu vzorku a vytváření snímků s mnohem větším rozlišením než optická mikroskopie. Rozlišení přístrojů SEM se může pohybovat od jednotek nanometrů až po stovky nanometrů. Samotný princip spočívá v promítání a skenování fokusovaného proudu elektronů přes povrch vzorku a pomocí specializovaných detektorů shromažďuje různé signály, které vznikají. Elektrony ve svazku interagují s atomy uvnitř vzorku, čímž vznikají různé signály, které lze využít k získání informací o topografii a složení povrchu. Obrázky se prohlížejí v reálném čase na externím monitoru pomocí softwaru, který koreluje polohu paprsku s intenzitou elektronů získaných detektorem (detektory). Detektor sekundárních elektronů (SED) a detektor zpětně rozptýlených elektronů (BSD) jsou dva nejběžnější typy detektorů používaných pro zobrazování s vysokým rozlišením. Mikroanalýza složení povrchu je přístupná pomocí detektorů pro energetickou disperzní rentgenovou spektroskopii (EDS). Jedinečná konfigurace SEM nakonec určí jeho rozlišení a dostupné režimy zobrazování. Jak už bylo naznačeno výše, aparatura elektronového mikroskopu je tvořena celou řadou součástí, jak je uvedeno na Obrázek 11. V horní části tubusu se zpravidla nachází elektronové dělo, které je zdrojem volných elektronů. Nejběžnějším elektronovým dělem je triodové dělo, to funguje na termonukleární emisi elektronů nejčastěji wolframového vlákna. Vlákno je zahnuto do tvaru písmena V, při jeho zahřátí na teplotu kol 2 700 K, jsou z hrotu pomyslného wolframového V emitovány elektrony směrem dolů do tubusu. Existují však i další typy elektronových děl, lišící se materiálem i tvarem. Negativně nabitě elektrony jsou tedy emitovány ze špičky wolframového vlákna a přitahovány pozitivním elektrickým polem, které zajišťuje anoda s otvorem uvnitř. Napětí mezi katodou (elektronovým dělem) a anodou je v rozmezí 0,5 – 30 kV. Elektrony přitahované k anodě procházejí jejím středem. K urychlení elektronů, slouží série magnetických čoček, na které je přiváděno postupně vyšší a vyšší napětí

(myšleno nejnižší napětí na čočku nejbližze zdroji elektronů a nejvyšší na čočku nejdále vzdálený), elektrony procházející středem magnetických čoček jsou tak elektrostaticky urychlovány. Extrémní rychlost elektronů je důležitá z toho důvodu, že s rostoucí rychlostí elektronů se zkracuje jejich vlnová délka, díky čemuž je možné dosáhnout většího rozlišení. Dále tubus obsahuje skenovací cívky, které lze vychýlit, směřovat jejich prostřednictvím elektronový paprsek a skenovat jím povrch vzorku řádku po řádce (line by line). Na konci tubusu poblíž vzorku se nachází řada detektorů, detekující různé signály (viz níže).



Obrázek 11 hlavní komponenty SEM

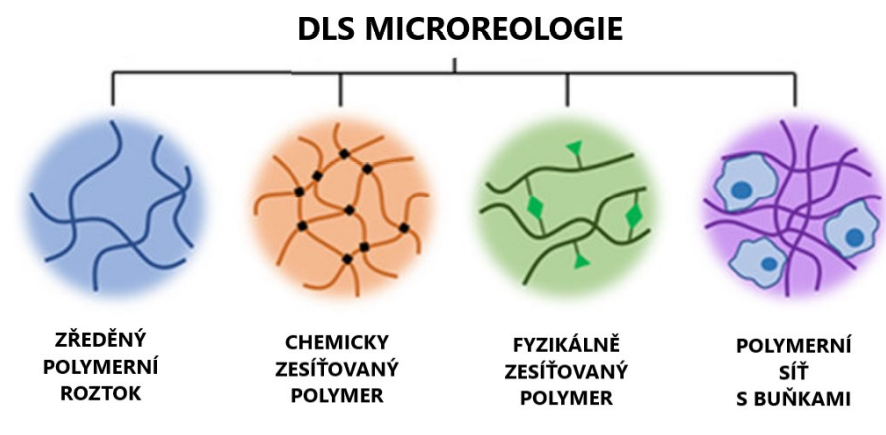
Podmínkou pro správné fungování elektronových mikroskopů je, aby v prostoru, ve kterém prochází elektronový paprsek, a kde se nachází vzorek, bylo vakuum. Vzduch totiž obsahuje molekuly kyslíku, dusíku, oxidu uhličitého a hydrokarbonáty, které mohou způsobit kontaminaci tubusu mikroskopu a vzorku. Vakuové pumpy proto ze zmíněných prostor odsávají molekuly, o které by se elektronový paprsek mohl rozptýlit a znemožnit tak zobrazení analyzovaného vzorku. Tlak v komoře se vzorkem se pohybuje kolem hodnoty  $10^{-4}$  Pa. [72] Jak již bylo zmíněno výše, povrch vzorku skenuje svazek elektronů řádku po řádce. Interakcí mezi elektronovým paprskem a vzorkem vznikají “signály“, které jsou elektronicky detekovány a zesíleny. Tyto signály byly vizualizovány dříve pomocí CRT displejů, dnes digitálně prostřednictvím počítačů [71]. Zmíněnými detekovanými interakcemi mezi elektronovým svazkem a vzorkem jsou myšleny tyto jevy:

- SEKUNDÁRNÍ ELEKTRONY – Elektrony, které tvoří elektronový svazek dopadající na vzorek se nazývají primárními elektrony, a hodnota jejich energie se pohybuje v rozmezí mezi 1-50 keV. Při dopadu na vzorek primární elektrony interagují s elektrony atomů nacházejících se na povrchu vzorku a vyraží je z atomového obalu ven. Vyražené elektrony jsou označovány jako elektrony sekundární a mají podstatně nižší energii než elektrony primární (<200 eV) [71,73].
- ZPĚTNĚ ROZPTÝLENÉ ELEKTRONY – Některé primární elektrony jsou zpětně rozptýleny po interakci s atomy povrchu vzorku. Prakticky je záporně nabitý primární elektron odražen kladným nábojem atomového jádra a stává se z něj zpětně rozptýlený elektron s vysokou energií, blízké energii primárního svazku [71].
- RTG ZÁŘENÍ – Po vyražení sekundárních elektronů z elektronového obalu atomů, spadnou elektrony ze slupky s vyšší energií do vnější elektronové slupky. Při přechodu ze stavu o vyšší energii do stavu o nižší energii elektronu, je emitováno charakteristické rentgenové záření, které jsou některé typy SEM také schopné detekovat. Informace získané z charakteristického rentgenového záření slouží k lokální prvkové analýze [71].
- AUGEROVY ELEKTRONY – Za vznikem Augerových elektronů stojí stejná příčina jako za vyzářením rentgenového záření ze vzorku. Rozdíl je v tom, že pádu elektronů z vyšších energetických slupek na nižší energetické slupky, není uvolněná energie vyzářena jako u rentgenového záření, ale je dodána jinému elektronu v podobě kinetické energie, díky níž je elektron vyražen z elektronového obalu, a právě takovému elektronu se říká Augerův elektron. Augerovy elektrony mají nízkou energii (<1000 eV) a jejich detekce je vhodná k určení rozložení prvků na povrchu metodou zvanou XPS [73,74].

## 6.2 DLS Analýza

Jednou z dalších metod, kterou lze využít například při charakterizaci polymerů či částic představuje metoda dynamického rozptylu světla (DLS). Tato metoda se primárně využívá k měření velikosti částic v roztoku nebo studiu fázových přechodů v koloidních suspenzích. Základem DLS je měření monochromatického koherentního světla v korelaci na čase. Světlo

se rozptyluje na povrchu měřených drobných objektů, jako jsou částice nebo polymerní makromolekuly, rozptýlené v roztoku.

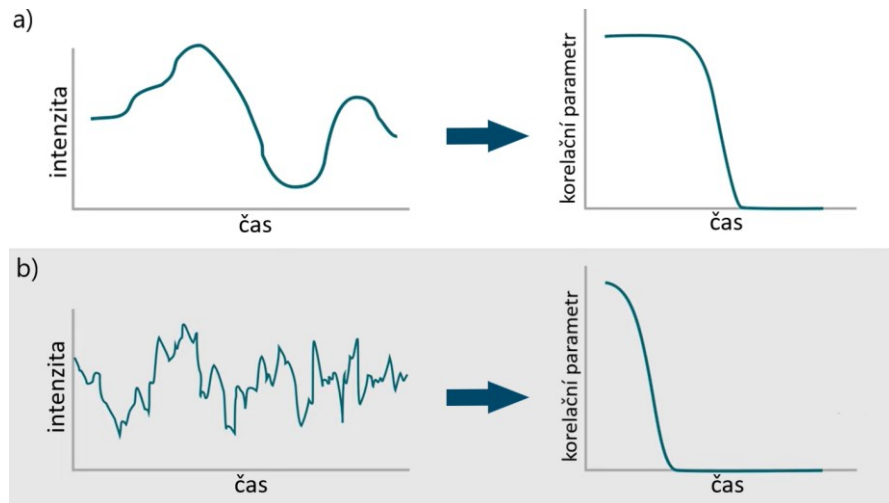


Obrázek 12 ilustrace některých strukturních stavů polymeru, které mohou být analyzovány metodou DLS [75]

Zmíněné objekty se v kapalině fluktuálně pohybují tepelným Brownovým pohybem. DLS detekuje a vyhodnocuje kolísání zpětně detekovaného signálu, které je způsobeno pohybem analyzovaných částic a ze kterého je možno spočítat velikost částic a jejich distribuci. Metoda je omezena v oblasti měření koncentrovaných roztoků, nebo roztoků s příliš velkými částicemi. U příliš koncentrovaných roztoků totiž dochází k vícenásobnému rozptylu světla mezi částicemi, což znemožňuje určení jejich velikosti a distribuce. V ideálním případě by každý foton odražený od částice měl být přímo detekován (což je u koncentrovaného roztoku nemožné), proto jsou analyzovány pouze velmi zředěné roztoky. Jsou-li částice příliš velké ( $\gg 10 \mu\text{m}$ ), dochází např. k jejich sedimentaci, nebo aglomeraci, to znamená, že jejich pohyb je složitější než pouze Brownův pohyb, navíc může docházet k vícenásobnému rozptylu světla. To jsou jevy, které negativně ovlivňují měření [76]. Rozptyl světla je snímán velice intenzivně, jeden snímek za druhým v intervalu v řádu mikro až nanosekund. Získaný intenzitní signál odraženého světla je porovnáván s původním intenzitním signálem a tato data jsou korelována. V závislosti na čase, korelace mezi původním a odraženým intenzitním signálem klesá, až ve finále úplně vymizí. Naměřená závislost intenzity na čase je převedena

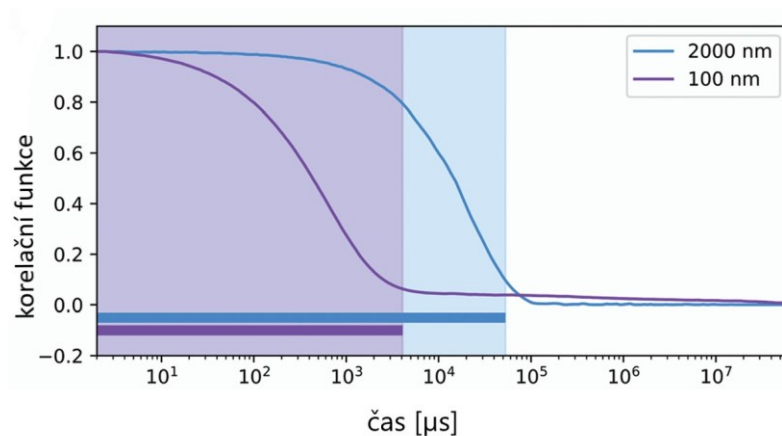
na závislost korelace signálů na čase, kterou znázorňuje tzv. autokorelační křivka. Čím větší částice jsou měřeny, tím pomaleji se pohybují, a trvá déle, než se korelace původního a odraženého signálu vytratí. Naopak u malých částic, které se pohybují rychleji, je korelační křivka strmější, jelikož korelace zmizí rychleji, tak jak je naznačeno na Obrázek 13

Ilustrační zobrazení intenzitní a korelační křivky pro a) velké částice b) malé částice; vytvořeno v Paint 3DObrázek 13[77].



Obrázek 13 Ilustrační zobrazení intenzitní a korelační křivky pro a) velké částice b) malé částice; vytvořeno v Paint 3D

Pamela C. Cai a spol. (2021) se ve své studii zabývali DLS analýzou viskoelastických, a měkkých materiálů, včetně zředěných roztoků polymerů, kovalentně zesíťovaných, polymerních gelů a aktivních biologických tekutin. Z jejich výsledků je zřejmé, že lze poměrně jednoznačně demonstrovat rozdíl korelačních křivek malých a velkých částic, jak naznačuje Obrázek 14 [75].



Obrázek 14 Porovnání závislosti korelačních funkcí na čase HA molekul o velikostech 100 nm a 2000 nm [75]



Přiložené grafické znázornění korelační křivky vysokomolekulárního HA (700 kDa) v roztoku o velikostech makromolekulárních částic 100 nm vs. 2 000 nm, je patrné, že pokles korelace u menších částic (100 nm) probíhá desetkrát dříve [75]. Z dat autokorelační křivky lze získat translační difúzní koeficient  $D$ , díky kterému se po dosazení do Stokes-Einsteinovy rovnice (1) dá vypočítat hydrodynamický průměr částic  $d_H$ :

$$d_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} \quad (1)$$

Kde

$k_B$  ... Boltzmannova konstanta [ $\text{J}\cdot\text{K}^{-1}$ ]

$\eta$  ... dynamická viskozita okolní kapaliny [ $\text{Pa}\cdot\text{s}$ ]

$T$  ... termodynamická teplota. [K]

$D$  .... Difúzní koeficient [ $\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ]

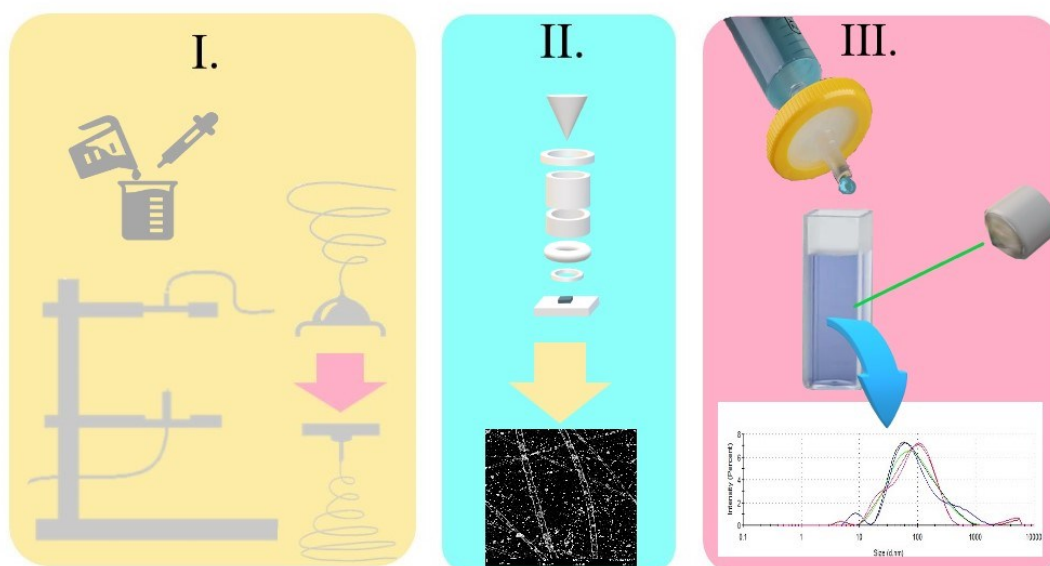
[77]

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 7 POPIS EXPERIMETU

Pro účely experimentu byly vybrány čtyři soli z Hofmeisterovy řady, resp. Chloridy. Konkrétně se jednalo o KCl, NaCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>. Při výběru soli byl vybrán zástupce z řad kosmotropních i chaotropních kationtů, zatímco aniont zůstal zachován stejný, s cílem porovnat vliv kationtů na chování polymerního řetězce HA v roztoku a následně na samotný proces zvláknování. Experimentální část této práce je složena ze tří hlavních částí:

- I. Z přípravy vzorků a jejich zvláknování
- II. Z analýzy morfologií získaných vláken pomocí SEM
- III. Z ověření stanovených hypotéz z pohledu změn velikostí polymerního klubka HA pomocí metody DLS.



Obrázek 15 tři hlavní části experimentu

### I.

Jak už bylo zmíněno výše, první část experimentu se zabývala přípravou vhodné série, které posloužily jako odrazový můstek při návrhu samotného experimentu. Řešilo se zejména:

- a) **složení rozpouštědla**, tzn. koncentrace EtOH ve vodě (1, 5, 10, 15, 30, 40, 50 hm.% EtOH)
- b) **koncentrace a M<sub>w</sub> HA**, tak aby byl výběr co nejpříznivější pro zvláknování (1,5 – 2 hm.%), použitá molekulová hmotnost M<sub>w</sub> HA (1,18MDa)

- c) **iontová síla solí** – byla volena tak, aby se projevila samotná síla danou solí a danou solí bylo možné rozpustit. (pro KCl a NaCl 0,25 M; 0,5 M; 1 M; pro MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> 0,166 M; 0,25 M; 0,333 M)

Pro tento účel bylo zvoleno uspořádání aparatury sestavené ve směru „zdola nahoru“ resp. z volné hladiny kapky roztoků. Jakmile byla škála koncentrací HA; navržena, byly provedeny první pokusy zvlákňování, a to v přítomnosti chloridu s jedním chaotropním (CH<sub>C</sub>-CH<sub>A</sub>) a jedním kosmotropním (K<sub>C</sub>-CH<sub>A</sub>) protiontem. Konkrétně se jednalo o soli NaCl a CaCl<sub>2</sub>. Vzhledem k tomu, že prvotní pokusy zvlákňování za daného uspořádání „zdola nahoru“ vykazovaly velmi nízkou, místy až nulovou výtěžnost, došlo ke změně uspořádání aparatury do pozice „shora dolů“ a místo z volné hladiny, se začalo zvlákňovat z jehly, díky čemuž se předpokládala vyšší výtěžnost. Z důvodu časové náročnosti došlo ke zvlákňování pouze jedné koncentrace u všech čtyř vybraných solí namísto tří koncentrací, při které probíhal zbytek experimentu. V sériích vzorků zvlákňovaných z jehly došlo rovněž, z časových důvodů, k vynechání na začátku zvolené koncentrace EtOH a HA.

## II.

V druhé části experimentu, jakmile se podařilo dokončit zvlákňování nachystané série vzorků, byly získané vzorky vláken pokoveny a následně analyzovány pomocí SEM.

## III.

V poslední fázi experimentu byla provedena analýza DLS, která je svým rozsahem omezena na měření pouze velmi zředěných roztoků. Nejprve tedy bylo nutné najít měřitelnou koncentraci HA v roztoku. Po určení vhodné koncentrace (0,1 hm. %), byly testovány první roztoky vzorků *rozpouštědlo-sůl-polymer*, stejně jako tomu bylo v případě zvlákňování, tedy pro všechny čtyři vybrané chloridy. Aby se předešlo chybným závěrům u interpretace výsledku z DLS, byly pro jistotu proměřeny také systémy:

- *rozpouštědlo-sůl* – ověření, zda je pomocí DLS možno zaznamenat míru solvatace iontů
- *rozpouštědlo-polymer* – ověření detekce vlivu přidaného EtOH na HA
- *voda-sůl-polymer* – zde byla jako rozpouštědlo použita pouze voda bez EtOH, aby bylo možné ověřit pouze vliv soli na řetězec HA.

## 7.1 Použité materiály

V experimentální části této práce byly použity následující materiály. Kyselina hyaluronová (kosmetické čistoty) o molekulové hmotnosti ( $M_w=1,18$  MDa) – od firmy Contipro group, a.s. (Dolní Dobrouč, Česká republika). Dále chlorid draselný (KCl p.a.), chlorid sodný (NaCl p.a.), chlorid hořečnatý ( $MgCl_2$  p.a.) a chlorid vápenatý ( $CaCl_2$  p.a.) byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (ST. Louis, USA). Rozpouštědla byla připravována z absolutního ethanolu od formy EMD Millipore Corporation (Darmstadt, Německo) a ultračisté vody (Qmili vody). Všechny připravené roztoky byly následně přefiltrovány přes  $0,45 \mu m$  filtry z PTFE (*Millipore, UK*). Při procesu zvlákňování byly použity injekční stříkačky značky B/BRAUN s luerlockovým nástavcem (objem 3ml) a dále dávkovací jehly značky NETtechnik v.o.s., o průměru  $0,8$  mm).

## 7.2 Příprava vzorků

### 7.2.1 Příprava roztoků určených pro elektrostatické zvlákňování

První série vzorků určená pro otestování různých koncentrací EtOH v rozpouštědle (1, 5, 10, 15, 30, 40, 50 hm.% EtOH) byla připravena v objemu 1 ml pro každý vzorek. Vzorky byly připravovány do platových lahviček s víčkem uzavíratelným na závit. Nejprve bylo připraveno samotné rozpouštědlo, smíchání vody a EtOH (pro 1 hm% EtOH – (0,99 ml vody + 0,1 ml EtOH)). Do rozpouštědla bylo následně přidáno vypočítané množství soli, jejíž navážka odpovídala příslušné iontové síle (pro KCl o iontové síle 1M – 0,025 g KCl). Takto připravený roztok byl ponechán 1 h na magnetickém míchadle, aby došlo ke kompletnímu rozpuštění. Nakonec byla do nachystaného roztoku přidána navážka HA ve formě prášku (pro 2 hm% - 0,02 g HA). Do směsi bylo vloženo magnetické teflonové míchadélko a lahvička byla uzavřena. Takto připravené vzorky byly umístěny do vodní lázně a ponechány na magnetickém píchadle po dobu 24 hod při teplotě  $50^\circ C$ . Roztoky připravené v první sérii jsou, z důvodu přehlednosti sesumírovány v Tabulce 1:

Tabulka 1 vizualizace připravené první série vzorků

EtOH [hm.%]	IONTOVÁ SÍLA			● KCl ● NaCl ● MgCl <sub>2</sub> ● CaCl <sub>2</sub> ● 1,5% HA ● 2% HA
	0,5 M	0,75 M	1M	
1	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●	
5	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●	
10	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●	
15	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●	
30	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●	
40	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●	
50	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●	

Vzorky označené černým puntíkem (●) představují HA roztoky o koncentraci (2 hm. %), při této koncentraci však byly některé roztoky natolik viskózní, že ani netvořili kapky potřebné pro zvlákňování z volné hladiny. Proto byla v průběhu zvlákňování koncentrace snížena na 1,5 hm% HA. Jak už bylo naznačeno výše, potřebné navážky solí byly vypočítány tak, odpovídali stanovené iontové síle na základě rovnice (2), ze které byla následně vyjádřena potřebná koncentrace dané soli:

$$I = \frac{1}{2} (c_1 z_1^2 + c_2 z_2^2 + \dots) \quad (2)$$

$$c = \frac{I}{x}$$

Kde:

$c_i$  ... je koncentrace iontu [ $mol \cdot L$ ]

$z_i$  ... je náboj iontu

Z vypočítané koncentrace se navážka vypočítala na základě rovnice (3):

$$m = M \cdot V \cdot c \quad (3)$$

Kde:

$m$  ... navážka soli [g]

$M$  ... molární hmotnost soli [ $g \cdot mol^{-1}$ ]

$c$  ... koncentrace soli resp. iontu vypočítaná v předešlém kroku [ $mol \cdot L$ ]

Druhá série vzorků byla připravena obdobně jako první série, s tím rozdílem, že byla rozšířena škála koncentrací HA, a zredukována škála koncentrací EtOH v rozpouštědle.

Tabulka 2 vizualizace druhé série vzorků

			KONCENTRACE HA [hm%]												
			1	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5	1,6	1,7	1,8	1,9	2		
IONTOVÁ SÍLA [M]	0,5	EtOH [hm%]	5	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
			10	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
			15	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	0,75	5	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●
		10	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●
		15	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●
	1	5	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●
		10	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●
		15	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●

Všechny připravené roztoky druhé série, z důvodu přehlednosti shrnuje Tabulka 2.

V průběhu zpracování druhé série bylo odstoupeno od zvlákňování z volné hladiny, kvůli nízké výtěžnosti, na uspořádání z pozice ve směru gravitace „shora dolů“ z jehly, proto tabulka 2 není kompletní.

Poslední série roztoků určených pro zvlákňování byla připravena prakticky totožně jako dvě předcházející. Jediný rozdíl spočíval v objemu potřebného ke zvlákňování, protože při zvlákňování z volné hladiny bylo zapotřebí doslova jen pár kapek, zatímco při zvlákňování z pozice „shora dolů“ je nutné naplnit připraveným roztokem celou injekční stříkačku a jehlu, byl ve třetí sérii navýšen objem potřebného roztoku na 8 ml. Plnění aparatury polymerním roztokem při zvlákňování z jehly a její promývání mezi každým vzorkem, činí tento způsob zvlákňování v porovnání se zvlákňováním z volné hladiny, časově výrazně náročnějším. S ohledem na dosavadní výsledky, proto byla pro třetí sérii zvolena již jen jedna iontová síla (1M), která se jevila jako nejslibnější. Souhrn roztoků s jejich parametry je zobrazen v Tabulce 3:

Tabulka 3 vizualizace třetí série vzorků

		KONCENTRACE HA [hm%]											
		1	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5	1,6	1,7	1,8	1,9	2	
IONTOVÁ SÍLA IM	EtOH [hm%]	5	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●
		10	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●
		15	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●	●●●● ●●●●

### 7.2.2 Příprava vzorků pro SEM analýzu

Elektrostaticky zvlákněné vzorky byly zachytávány na uhlíkovou pásku přilepenou z jedné strany na kus papíru. Papír s páskou byl přiložen na kolektor, na kterém byl přidržován "pacičkami", které jsou součástí aparatury spinneru a slouží právě k uchycení kolektoru (Obrázek 16 část spinneru v okolí kolektoru).



Obrázek 16 část spinneru v okolí kolektoru

Po zvláknění byly vzorků ponecháván dostatečný čas na jejich doschnutí a to min. 12 hod. Následně byly tyto vzorky přeneseny na kovové terčíky určené pro analýzu pomocí SEM. Ze vzorku bylo vždy vybráno místo, s největším zastoupením připraveného materiálu, tato oblast byla poté vystřižena, tak aby se vešla na kovový terčík. Vystřižený kousek byl na terčík přichycen pomocí vodivé oboustranné uhlíkové pásky. Terčíky se vzorky byly dále umístěny do napařovačky a pokoveny tenkou vrstvou směsí zlata a palladia. Doba pokovení byla nastavena na 45 s při proudu 18 mA. Nakonec před SEM analýzou byly vzorky vždy pečlivě ofouknuty stlačeným vzduchem medicínální kvality, aby nezanesly elektronový mikroskop.



### 7.2.3 Příprava vzorků pro DLS analýzu

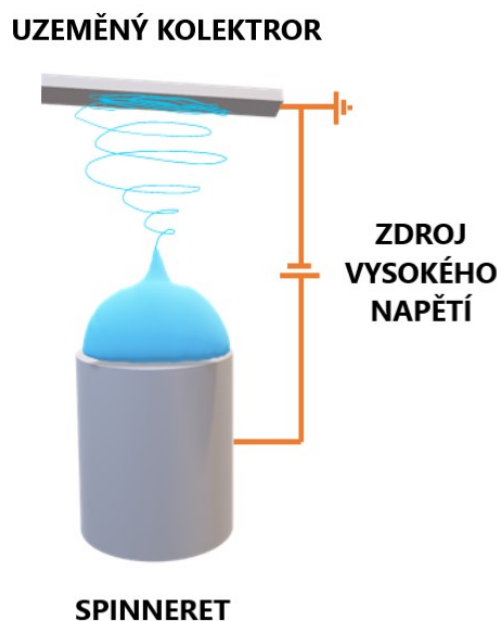
Při hledání vhodné koncentrace HA roztoků pro DLS analýzu byla připravena série vzorků o různé koncentraci 0,1; 0,01 a 0,001 hm% HA, tak jak bylo popsáno v předchizí kapitole „příprava vzorků“. Zkráceně vypočítaná navážka HA byla přidána do roztoku Qmili vody a ponechána se rozpouštět ve vodní lázni při 50 °C za stálého míchání po dobu 24 hod. Při přípravě systému *rozpouštědlo-sůl* byl smíchán EtOH s Qmili vodou ve třech poměrech (v rozpouštědle bylo 5, 10, 15 hm.% EtOH). K připravenému rozpouštědлу byly následně přidány navážky použitých chloridů (iontová síla I=1M). Sůl byla rozpuštěna bez ohřevu.

Při přípravě systému *rozpouštědlo-polymer* byl EtOH smíchán s Qmili vodou ve třech poměrech (v rozpouštědle bylo 5, 10, 15 hm.% EtOH). Do připravené rozpouštědla byla ve formě prášku přidána navážce HA (pro 0,1 % hm. roztok HA) a směs byla ponechána rozpouštět se ve vodní lázni při 50 °C za stálého míchání po dobu 24 hod. Při přípravě posledního systému *rozpouštědlo-sůl-polymer* byl postup totožný jako při přípravě roztoků ze třetí série určené pro zvlákňování, jen s rozdílem v koncentraci HA (která nyní byla 0,1 hm %). Před samotným měřením pomocí DLS, byly všechny připravené roztoky vždy filtrovány přes filtr (0,45 μm, z PTFE). Měření každého ze vzorků bylo provedeno 3krát a z výsledku byl stanoven aritmetický průměr s příslušnou chybou měření.

## 8 ELEKTROSTATICKÉ ZVLÁKŇOVÁNÍ

### 8.1 Zvlákňování z volné hladiny

Jak již bylo uvedeno v úvodu experimentu (kapitola 7) první dvě série vzorku byly zvlákňovány z volné hladiny při uspořádání aparatury „zdola nahoru“. K provedení experimentů s tímto uspořádáním, byl použit na koleně vyrobený elektrospinner. Součástí aparatury byl zdroj vysokého stejnosměrného napětí (Spellman SL150), uzemněný kovovým kolektorem a jednoduchým tyčovým kovem. Schéma uspořádání je uvedena na Obrázek 17. Kolektor byl o průměru 40,3 mm, spinneret, na který byl umístěn roztok byl o průměru 8 mm. Vzdálenost hrotu od kolektoru byla nastavena na 80 mm. Experimenty byly provedeny ve vzdušné atmosféře při teplotě 25°C, a normálním tlaku. Vlákna byla sbírána na na papír přilepený na uhlíkovou pásku.



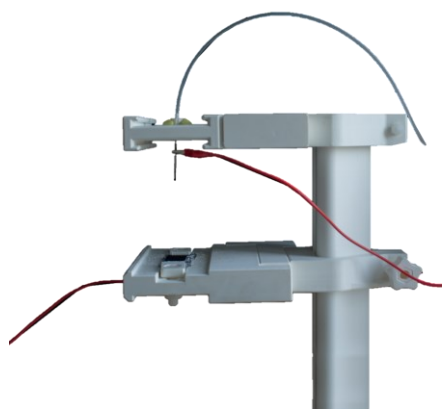
Obrázek 17 Schéma upořádání aparatury pro zvlákňování „zdola nahoru“

Roztoky byly na na spinneret nanесeny skleněnou tyčinkou, tak aby na jeho hrotě ulpěla kapka. Poté bylo na elektrodu přivedeno napětí, které bylo pozvolna zvedáno od 0 do 42 kV. Proces zvedání napětí trval cca 90 s.

### 8.2 Zvlákňování z jehly

Při zvlákňování třetí série roztoků, které jak už bylo zmíněno, probíhalo při uspořádání „shora dolů“ z jehly, byl použit jiný, ale na koleně vyrobený elektrospinner (Obrázek 18).

Zdroj vysokého napětí byl použit stejný jako v případě zvlákňování z volné hladiny. Vzdálenost hrotu jehly od kolektoru byla nastavena na 80 mm. Pro sběr vláken na kolektor byl opět použit pásek papíru polepený oboustrannou uhlíkovou páskou. Roztok byl do jehly (0,8 x 40 mm) přiveden ze stříkačky (5 ml) pomocí teflonové hadičky o délce 27 cm. Roztoky byly ze stříkačky vytlačovány rychlostí 1 ml/h. Schéma aparatury odpovídá Obrázek 7. Stříkačka byla vždy roztokem naplněna tak, aby v ní nezůstaly žádné vzduchové bubliny. K naplněné stříkačce byla přidělena hadička s jehlou umístěnou na jejím konci. Část roztoku byla vytlačena. Stříkačka spojená s jehlou hadičkou byla spojena s externí pumpou, zatímco jehla byla zapojena s aparaturou spinneru. Při samotné zvlákňování byla nejprve zapnuta pumpa, která byla ponechána v režimu vytlačování, dokud se tok dostatečně nestabilizoval. Materiál, který po dobu stabilizace toku, byl ze stříkačky vytlačen, byl zachycen, aby nedopadal na přichystaný kolektor. Jakmile došlo k zastabilizování toku, bylo zapnuto napětí a nastaveno na 15 kV, což byla hodnota, při které se začala kapka na konci jehly viditelně deformovat vlivem působícího elektrostatického pole. Od této chvíle bylo napětí pozvolna zvyšováno max. na hodnotu 29 kV. Při napětí, při kterém chování roztoku v poli bylo nejstabilnější, zvedání napětí bylo přerušeno a ponecháno při dané hodnotě po dobu cca 60 s, bylo provedeno zvlákňování připraveného roztoku. Celková doba zvlákňování jednoho vzorku (ve smyslu od chvíle došlo k nárůstu napětí) odpovídala cca 120 s. Po uplynutí této doby byla nejprve vypnuta pumpa a poté zdroj napětí. Spotřeba roztoku při zvlákňování se pohybovala přibližně mezi 0,1 – 0,3 ml. Zbylý roztok byl vytlačen. Stříkačka, hadička a jehla byly rozebrány a několikrát promyty vodou, tak aby nedošlo ke kontaminaci dalšího vzorku.



Obrázek 18 Snímek aparatury pro zvlákňování z jehly

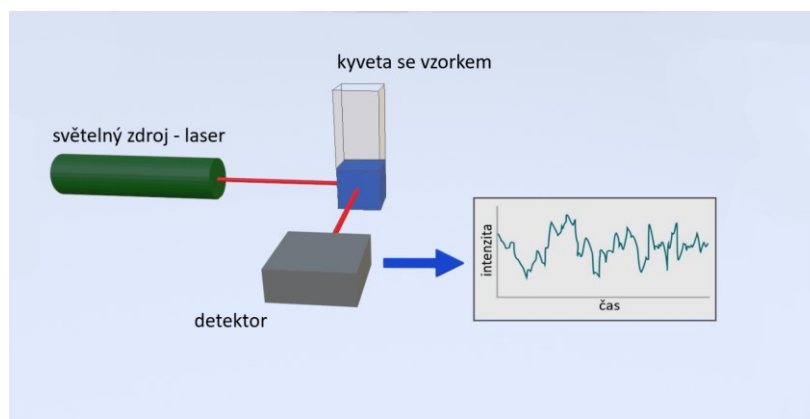
### 8.3 Charakterizace zvlákněných vzorků pomocí SEM

Morfologie a velikost připravených vláken byla charakterizována s využitím elektronového mikroskopu. Vzorky byly upevněny na terčík do držáku určeného pro vodivé vzorky, a umístěny do elektronového mikroskopu, konkrétně se jednalo o skenovací elektronový mikroskop *Phenom G2 Pro (Phenom World)*. Vzorky byly pozorovány v SEM při urychlovacím napětí 5 kV v režimu zobrazení sekundárních elektronů pro malá zvětšení, pro zvětšení nad 510x bylo urychlovací napětí zvednuto na 15 kV.

### 8.4 DLS analýza

Velikost polymerního klubka připravených roztoků byly charakterizovány na přístroji *Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, Velká Británie)*, který slouží k charakterizaci dynamickým rozptylem světla. Přístroj pracuje s 4mW helium neonovým laserem, při vlnové délce 633 nm. Měření probíhalo při úhlu rozptylu 173°. Pro systém *rozpouštědlo-sůl* bylo měření provedeno ve třech opakováních, u systému *rozpouštědlo-polymer* na pět opakování a u posledního systému *rozpouštědlo-sůl-polymer* probíhalo šest opakování měření. Přefiltrované vzorky (celkem 49) v polystyrénových kyvetách byly ponechány cca 15 min stát, aby se systém v roztoku ustálil, a poté byly vloženy do přístroje a změřeny.

Z výsledků měření byla získána tzv. intenzitně vážená distribuce velikostí částic přítomných v analyzovaných roztocích. Výsledná velikost polymerního klubka / iontů byla vyjádřena jako hydrodynamického průměr (RH), tzv. z-average (nm).



Obrázek 19 schéma DLS analýzy

## 9 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 9.1 Elektrostatické zvlákňování

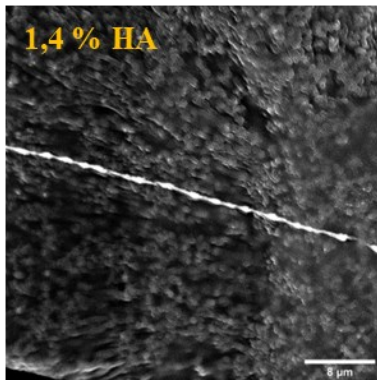
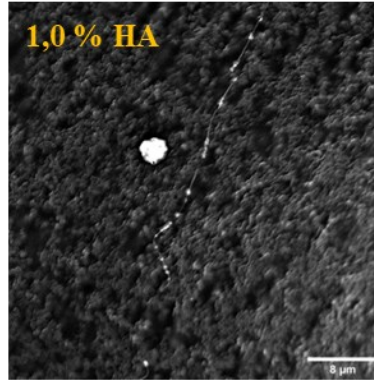
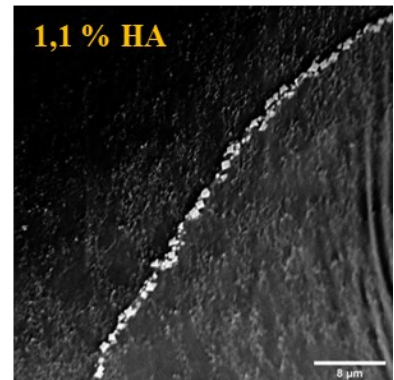
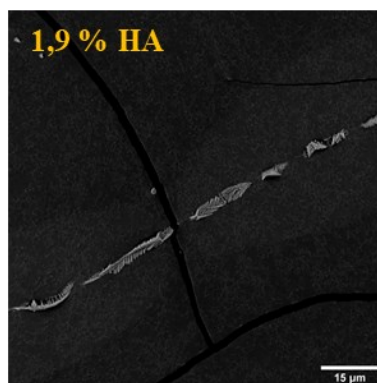
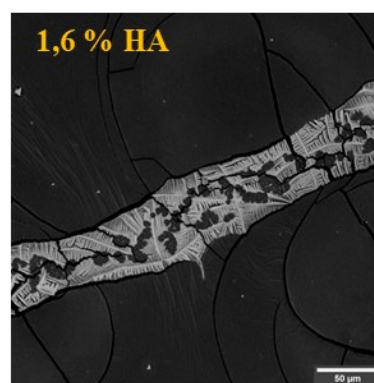
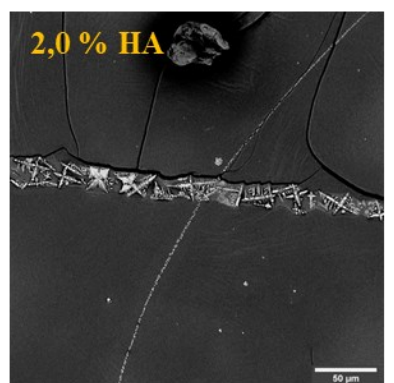
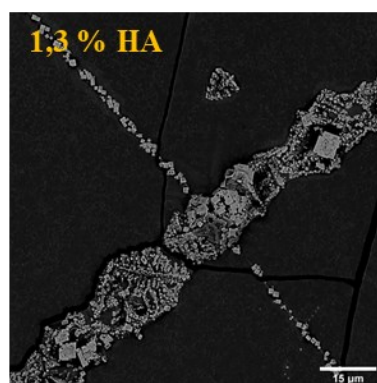
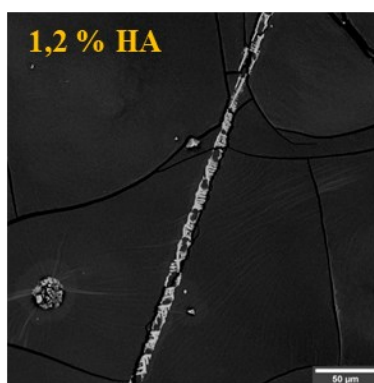
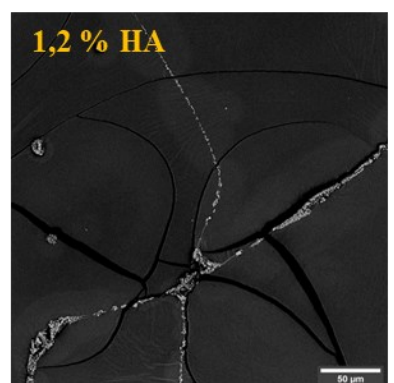
Při přípravě vzorků z první série, kdy bylo testováno sedm různých koncentrací EtOH v rozpouštědle (1, 5, 10, 15, 30, 40, 50 hm.% EtOH) docházelo při koncentracích nad 30 hm% EtOH během procesu rozpouštění polymeru ve vodní lázni k vykrystalizování malých krystalků soli a vysrážení HA. K tomuto jevu došlo, jelikož EtOH je pro HA špatným rozpouštědlem, na rozdíl od vody [78]. Námi navržená koncentrační škála EtOH tedy zahrnovala koncentrace, při kterých dojde k projevu špatného rozpouštědla. Roztoky, ve kterých není polymer rozpuštěn jsou pochopitelně pro elektrostatické zvlákňování nepoužitelné, tímto se výběr vhodného rozpouštědla částečně vyřešil ještě před samotným zvlákňováním a koncentrace nad 30 hm% EtOH v rozpouštědle byly vyřazeny.

Při samotném zvlákňování (stále v kontextu s první sérií) se hladina kapek nanesených na spinneretu začala deformovat průměrně při hodnotě 17 kV. Viditelnému pohybu roztoku až ke kolektoru docházelo výjimečně. Na základě pozorování roztoku v elektrostatickém poli a po analýze snímků ze SEM byly pro další experimenty vybrány koncentrace EtOH v rozpouštědle 5, 10 a 15 hm % EtOH.

### 9.2 SEM analýza

Ze snímků vzorků z druhé série, byl pro z koncentrační řady HA vybrán vždy jeden snímek s nejzajímavější morfologií a uveden jako zástupce do Tabulky 4 pro vzorky s NaCl a do Tabulky 5 pro vzorky s CaCl<sub>2</sub>.

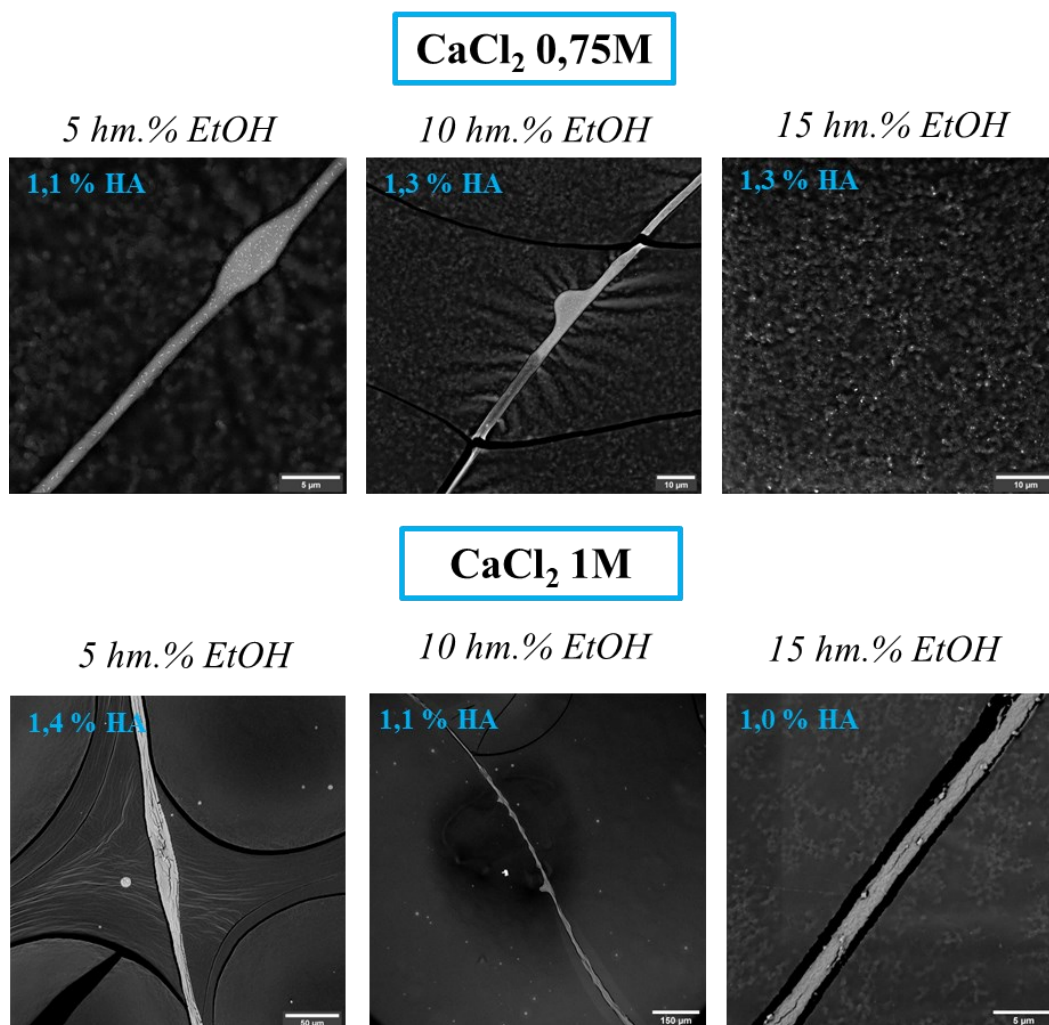
Tabulka 4 vybrané snímky z druhé zvláknované série pro NaCl

**NaCl 0,5M***5 hm.% EtOH**10 hm.% EtOH**15 hm.% EtOH***NaCl 0,75M***5 hm.% EtOH**10 hm.% EtOH**15 hm.% EtOH***NaCl 1M***5 hm.% EtOH**10 hm.% EtOH**15 hm.% EtOH*

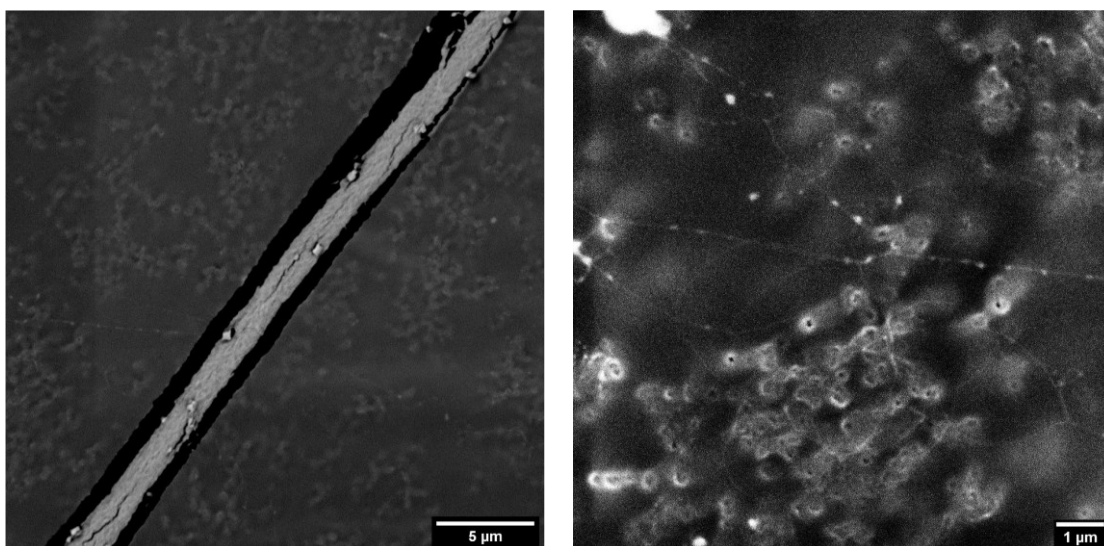
Materiálu, který překonal povrchové napětí roztoku a dostal se pomocí elektrostatických sil až ke kolektor bylo velice málo (ojedinělé struktury). Na převážné většině vzorků se vyskytovaly struktury plně připomínající vlákna o průměru v řádech jednotek a desítek  $\mu\text{m}$ . Pojem *struktury* je použit, jelikož nelze s určitostí říci, zda se v nich nachází polymer, a tedy zda se jedná o vlákna v pravém slova smyslu. V případě, že polymer struktury neobsahují, nebo jej obsahují jen velmi málo, bylo dosaženo pouze vytažení rozpouštědla a soli. Ze snímků je zřejmé, že jsou plně krystalů NaCl. Nic méně vzorek, zvlákněný z roztoku *NaCl 0,5M; EtOH 10hm%; HA 1 %* byl výjimkou a na snímcích se povedlo zachytit vláknenné struktury v jednotkách nm.

Sodný kationt se v Hofmeisterově řadě nachází na pomezí kosmotropních a chaotropních iontů, blíže je však chaotropní straně spektra, a tak od něj byl očekáván spíše efekt sbalení polymerního klubka, což by mělo mít za následek mírné zhoršení zvláknovatelnosti roztoku (viz Kapitola 4). Blíže bude tato hypotéza a její korelace s výsledky popsána níže u výsledků zvláknování 3 série vzorků.

Tabulka 5 vybrané snímky z druhé zvláknované série pro  $\text{CaCl}_2$



V případě  $\text{CaCl}_2$  nastala pozoruhodná změna v morfologii struktur nebo vláken. Nyní totiž struktury nebyly tvořeny jednotlivými krystaly, nýbrž byly celistvé, což by mohlo znamenat, že byly tvořeny polymerem, a tudíž by se jednalo o vlákna. Vápenatý kationt se na rozdíl od sodného kationtu z kosmotropní části spektra Hofmeisterovy řady, a tak by jeho přítomnost měla dle hypotézy zlepšit zvlákňovatelnost HA. Minimálně v případě vzorku ***CaCl<sub>2</sub> 1 M; EtOH 15 hm%; HA 1 %*** byly nalezena vlákna v jednotkách nanometrů po obvodu vlákna v mikroměřítku. Kromě Tabulky 5 jsou snímky daného vzorku ještě na Obrázek 20. Pro pořízení těchto snímků bylo potřeba maximální přiblížení, které námi SEM je ještě schopno zaostřit (tj. 23 500x). Při takovém zvětšení však není možné pracovat dlouhodobě, a ne vždy se při něm dají poříditi vypovídající snímky. Je tedy možné, že podobných vláknenných struktur se povedlo zvláknit více, jen bohužel nebyly detekovatelné při SEM analýze.



Obrázek 20 snímky vzorku  $\text{CaCl}_2$  (1 M; EtOH 15 hm%; HA 1 %) mikrovláknko (vlevo) a nanovláknna po jeho obvodu (vpravo)

Stejně jako u vzorků s NaCl se u  $\text{CaCl}_2$  vyskytovaly na uhlíkové pásce struktury jen ojedinele, nebo jako v příp. např. vzorku ***CaCl<sub>2</sub> 0,75 M; EtOH 15 hm%; HA 1,3 %*** nebylo nalezeno vůbec nic. Proto ve chvíli, kdy se naskytla příležitost přejít na zvlákňování z jehly, bylo tak učiněno pro usnadnění zvlákňovatelnosti, jelikož roztok síla potřebná o zvláknění byla snížena díky gravitační síle ve směru zvlákňování. Proto část druhé série s  $\text{CaCl}_2$  bez výsledků z pro EtOH 5 hm%.

Jak již bylo vysvětleno (viz 7.2.1 Příprava roztoků určených pro elektrostatické zvlákňování) změna metody zvlákňování si vyžádala eliminaci testování pouze pro jednu iontovou sílu (1M). Zvlákňování „shora dolů“ je sice časově náročnější, avšak výhodou se



ukázalo, že použití takto poskládané aparatury opravdu řeší problém s výtěžností, jak bylo předpokládáno.

V následující části jsou popsány výsledky získané po electrospinningu třetí série vzorků. Tabulky 6-9 obsahují vždy tři snímky zastupující sérii zvláknovaných koncentrací HA pro každou koncentraci EtOH v rozpouštědle. Snímky uvedené v tabulkách byly vybrány podle zajímavosti zachycené morfologie vláken potažmo struktur.

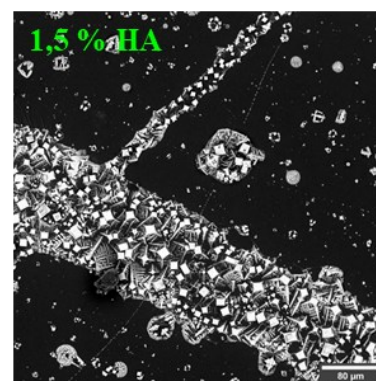
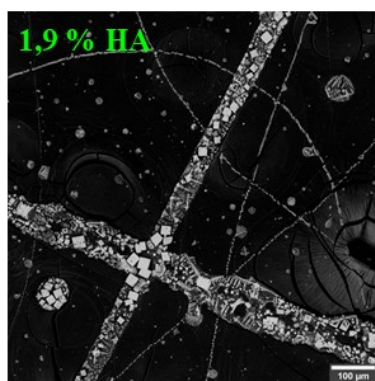
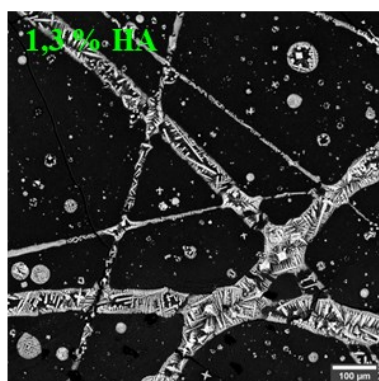
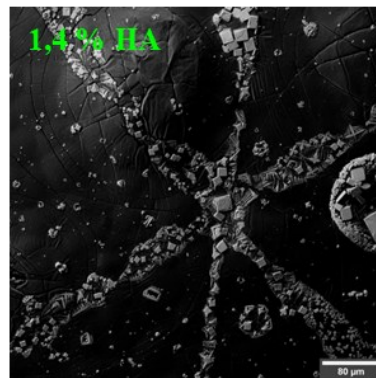
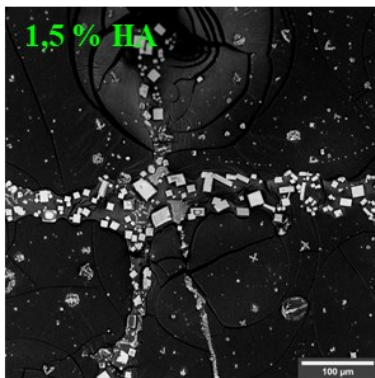
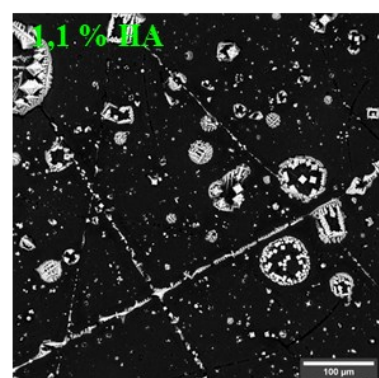
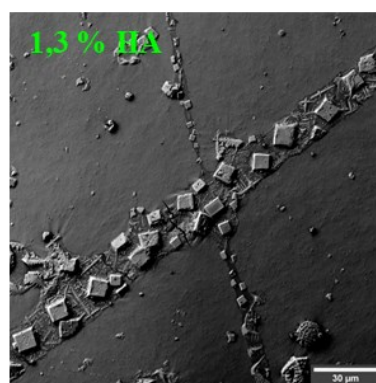
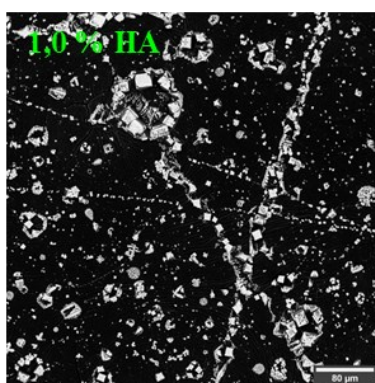
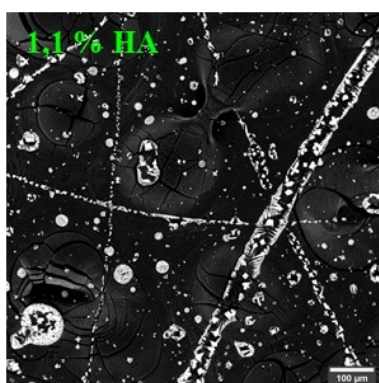
Tabulka 6 vybrané snímky z třetí zvláknované série pro KCl

### KCl 1M

5 hm.% EtOH

10 hm.% EtOH

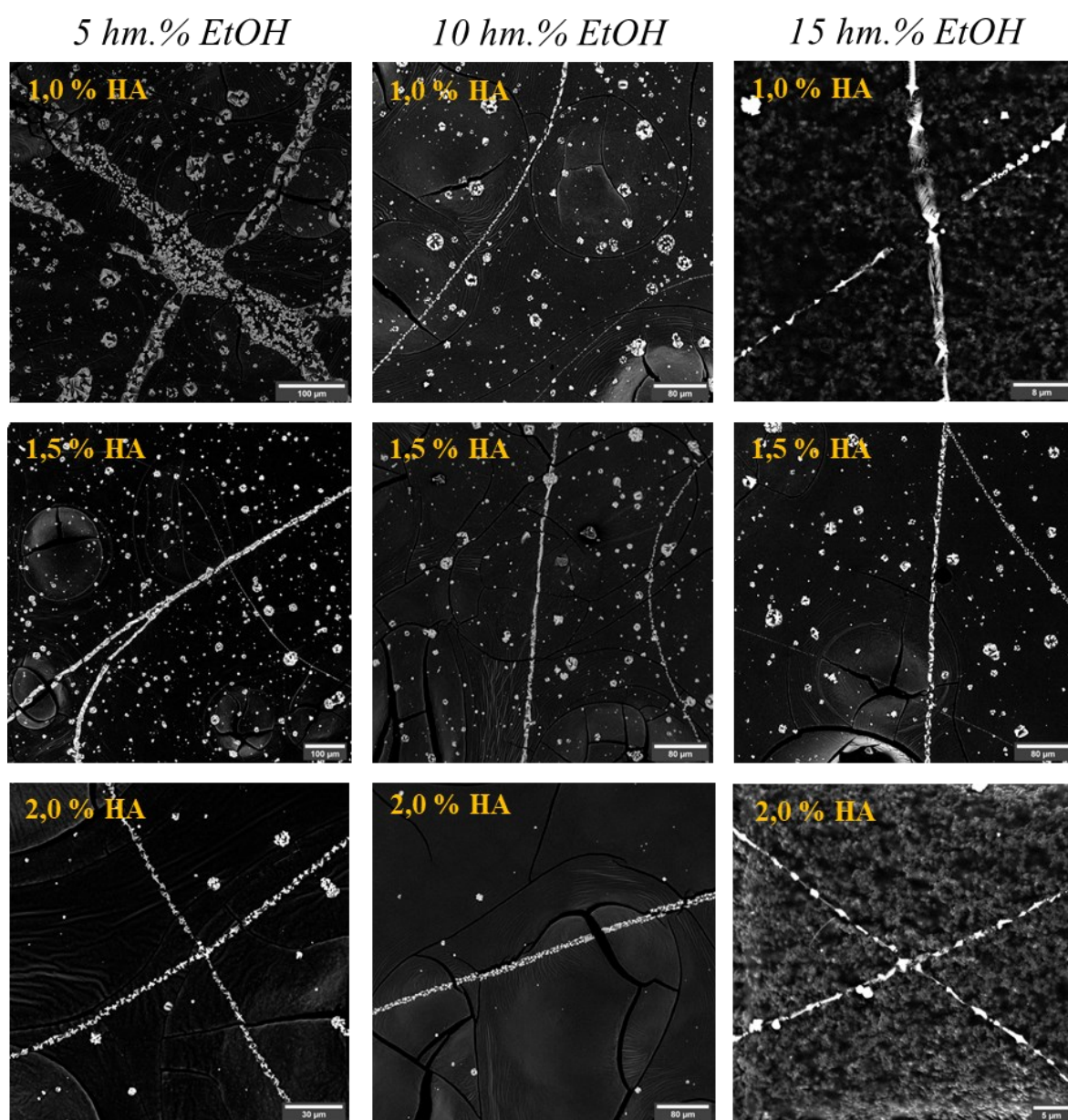
15 hm.% EtOH



Výsledky zvlákněných roztoků KCl jsou obdobné „solným strukturám“ NaCl. Tyto *solné struktury* byly pracovně nazvány jako *krystalické řetízky*. Průměry solných řetízku KCl byly v desítkách  $\mu\text{m}$ . Draselný kationt má podle klasického uspořádání Hofmeisterovi řady silnější kosmotropní účinek než sodný kationt. Naše výsledky s tímto předpokladem souhlasí. Na základě získaných snímků usuzujeme, že zvláknitelnost HA roztoku je za přítomnosti KCl iontů ještě obtížnější než na přítomnosti NaCl.

Tabulka 7 vybrané snímky z třetí zvlákněvané série pro NaCl

### NaCl 1M



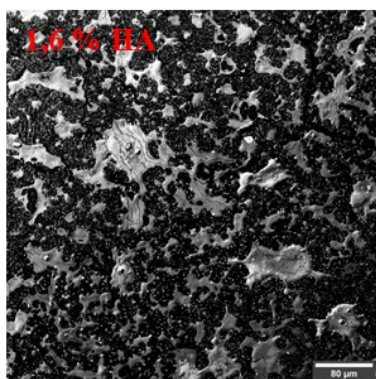
Porovnáme-li snímky zvlákněvaných roztoků HA s NaCl z volné hladiny vs. z jehly, kromě vyšší hustoty solných řetízku u druhé varianty se vcelku neliší. Ovšem po zvlákněvaní

s NaCl ve třetí sérii vzorků nebyly nalezeny nanovlákná, jako tomu bylo při stejném složení roztoku při zvlákňování z volné hladiny. V kapitole 5 *Elektrostatické zvlákňování* je popsáno, jak s rostoucím napětím při zvlákňování dochází zároveň k nárůstu odporové síly v jetu, což má za následek dloužení vláken [65]. Otočením směru zvlákňování jsme snížily potřebné napětí ke zvlákňování a “ochudily“ jsme tak jet o dloužení a úžení, což by vysvětlovalo, proč při zvlákňování *shora dolů* již nebyly nalezeny nanovlákná a proč byly získány tlustější *krystalické řetízky*.

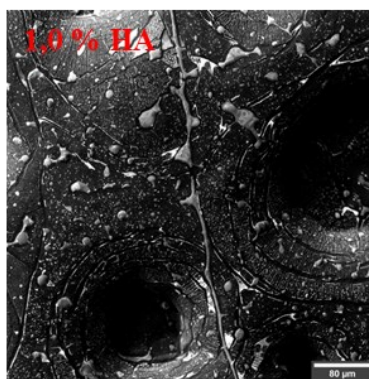
Tabulka 8 vybrané snímky z třetí zvlákňované série pro  $MgCl_2$

**$MgCl_2$  1M**

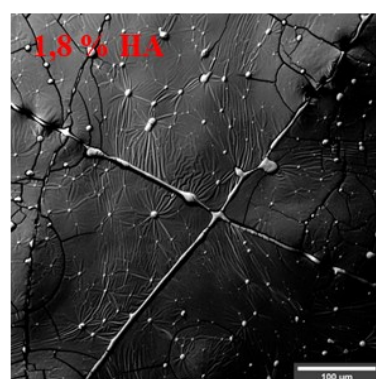
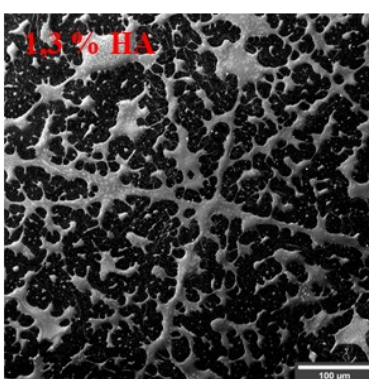
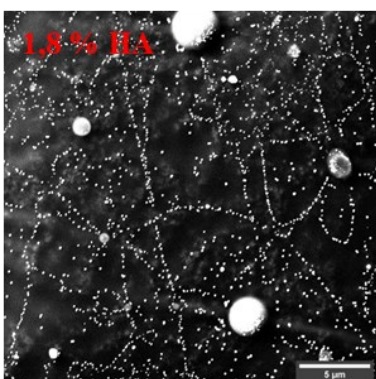
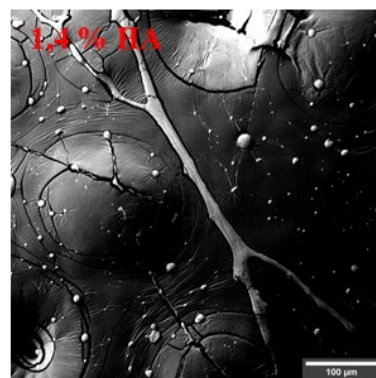
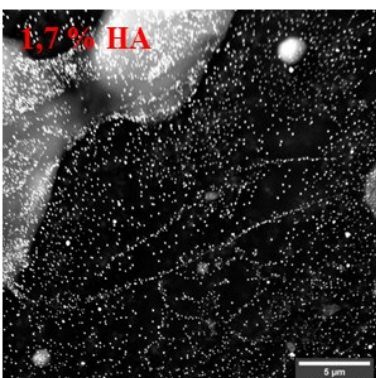
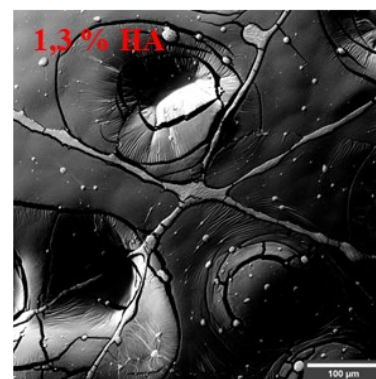
5 hm.% EtOH



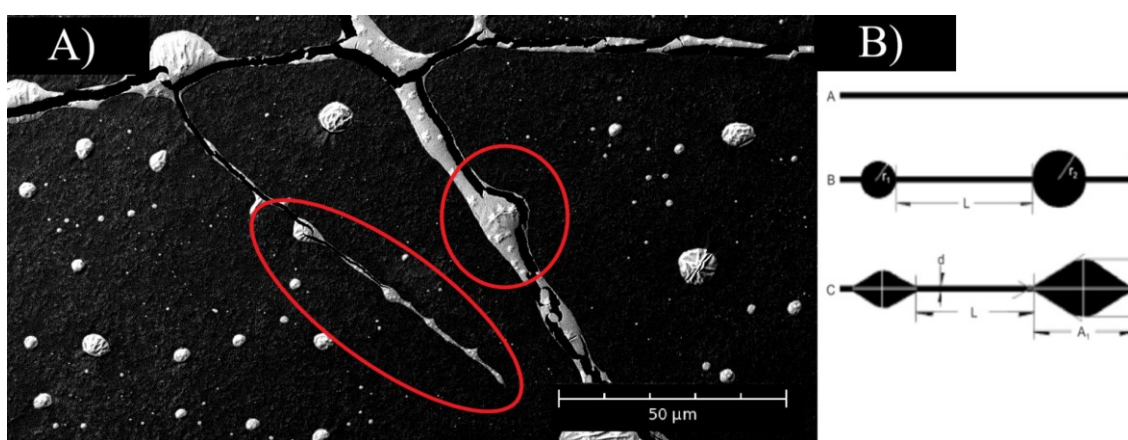
10 hm.% EtOH



15 hm.% EtOH



Zvláknění roztoků s  $MgCl_2$  dalo za výsledek velice pozoruhodné morfologie. Snímek vzorku  $MgCl_2$  1 M; EtOH 5 hm%; HA 1,6 % zastupuje strukturu která vznikla na vzorcích u kterých docházelo k probíjení elektrod při electrospinningu. K probíjení docházelo v případě  $MgCl_2$  často. Jako možné vysvětlení se nabízí vlhkost vzduchu, při které zvláknění probíhalo. Jinak byla na většině vzorků zaznamenána celistvá vlákna se znaky nestabilit typu C resp. s *kapičkami (droplets)*, která je uvedena na obrázku Obrázek 9 Geometrické schéma znázorňující A rovnoměrná vlákna; B vlákna s kuličkami (kořalkami); C vlákna s kapičkami [69], který je pro připomenutí uveden znovu vedle námi pořízeném snímku na Obrázek 21:



Obrázek 21 Deformace typu C na vlákně získaném z roztoku  $MgCl_2$  1 M; EtOH 10 hm%; HA 1,2 % (A) v porovnání se schématem (B)

Tato nestabilita typická pro vlákna získaná electrospinningem může být důkazem, že se skutečně jedná o polymerní vlákna.

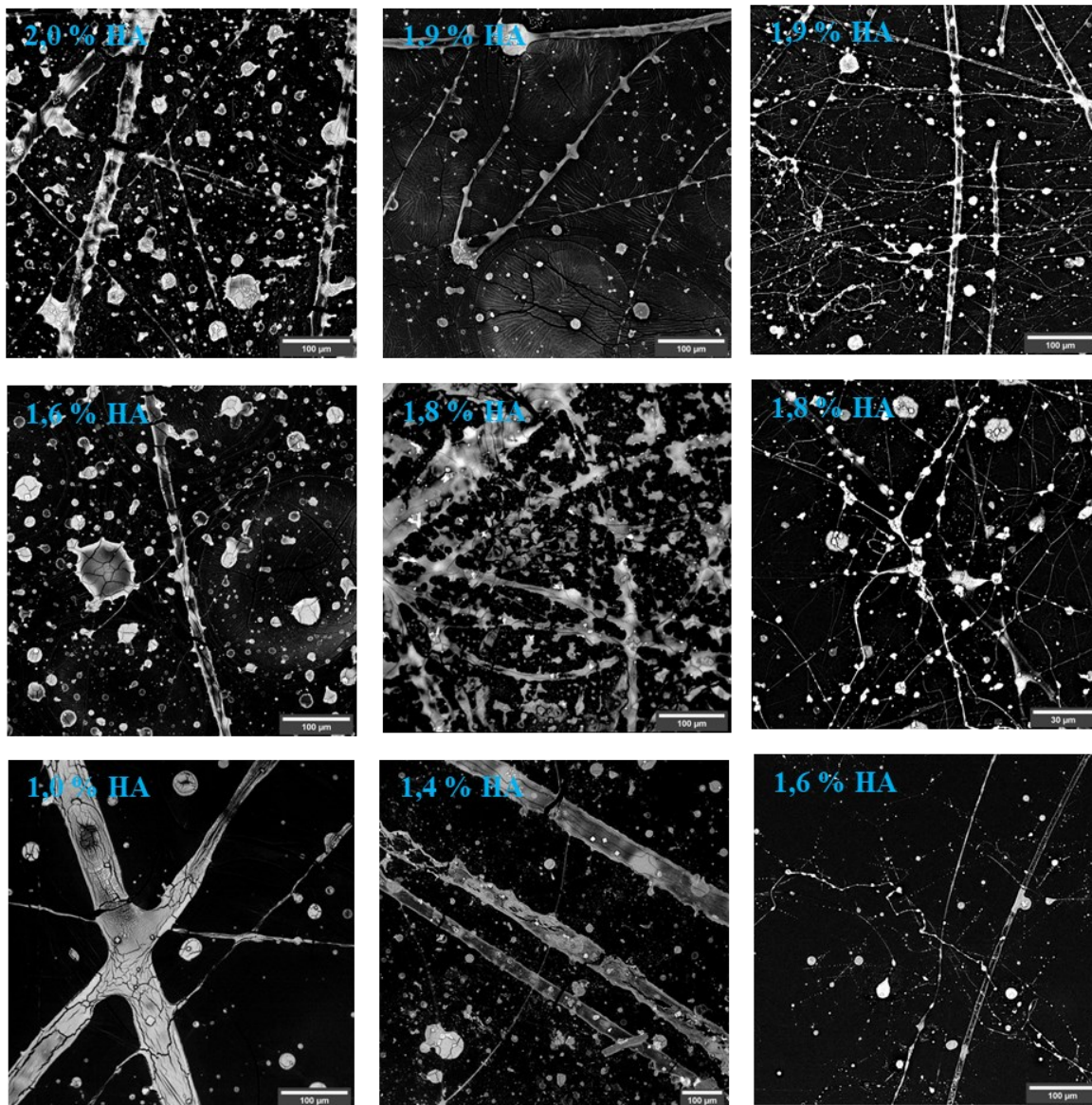
Další zajímavostí jsou drobné perličkové struktury ( $MgCl_2$  1 M; EtOH 10 hm%; HA 1,3 % a  $MgCl_2$  1 M; EtOH 5 hm%; HA 1,8 %) které se bohužel nepodařilo kvalitně vyfotit. Mohlo by se totiž jednat o vlákna s nestabilitou B nebo C v nano měřítku. Do budoucna by byla v případě takovýchto úkazů vhodná analýza lepším elektronovým mikroskopem SEM případně TEM, ovšem v případě TEM je možné, že by došlo k rozkladu vláken v důsledku tepla vznikajícího ve vzorku při prostupu elektronů, které v něm částečně ztrácejí svou kinetickou energii a přeměňují ji na teplo.

Tabulka 9 vybrané snímky z třetí zvláknované série pro  $\text{CaCl}_2$  **$\text{CaCl}_2$  1M**

5 hm.% EtOH

10 hm.% EtOH

15 hm.% EtOH

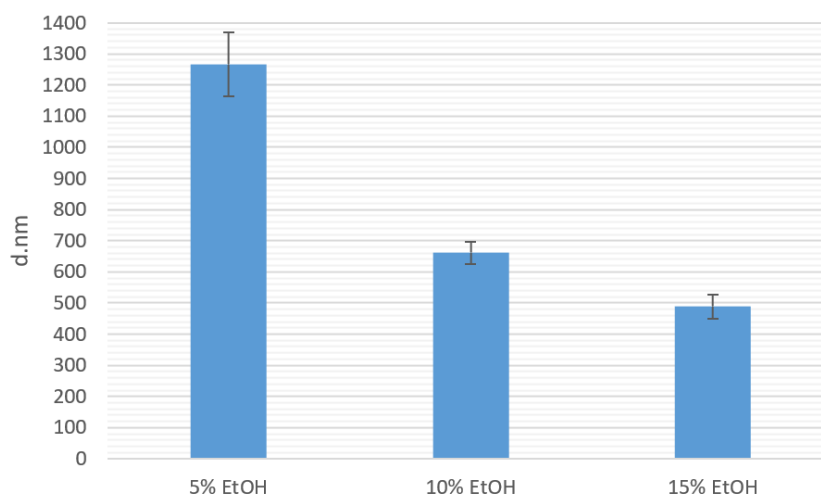


Krom struktur probíjejících vzorků a vláken s podobnými morfologiemi jako u  $\text{MgCl}_2$  byly z roztoků obsahujících u  $\text{CaCl}_2$  získány husté spleteniny tenkých vláken (jednoty  $\mu\text{m}$ ) u tří koncentrací. Z perspektivy kvality i kvantity elektrostatického zvláknování HA jsou tyto výsledky v porovnání se všemi výše uvedenými obrovským úspěchem.

V popisu snímků druhé série vzorků byl nastíněn souhlas mezi hypotézou o sbalování polymerního klubka v přítomnosti sodných iontů, jak popisuje např. E. Kutálková a spol. (viz Kapitola 4) [53] a našimi výsledky. S přihlédnutím k další hypotéze formulované ve článku L. Musilové a spol. [6,52] i obsah experimentální části této práce týkající se electrospinningu souhlasí s tím, že polymerní klubko HA se v přítomnosti chaotropních iontů sbaluje a analogicky za přítomnosti kosmotropních iontů v roztoku expanduje. Námi provedený experiment tyto hypotézy obohacuje o kontext s elektrostatickým zvlákněním, jelikož naše výsledky ukazují na to, že je-li polymerní klubko v roztoku roztažené v důsledku přítomnosti kosmotropních iontů ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) je jeho zvláknovatelnost zvýšena, naopak přítomností chaotropních iontů ( $Na^+$ ,  $K^+$ ) šance na zvláknění snižují.

### 9.3 DLS analýza

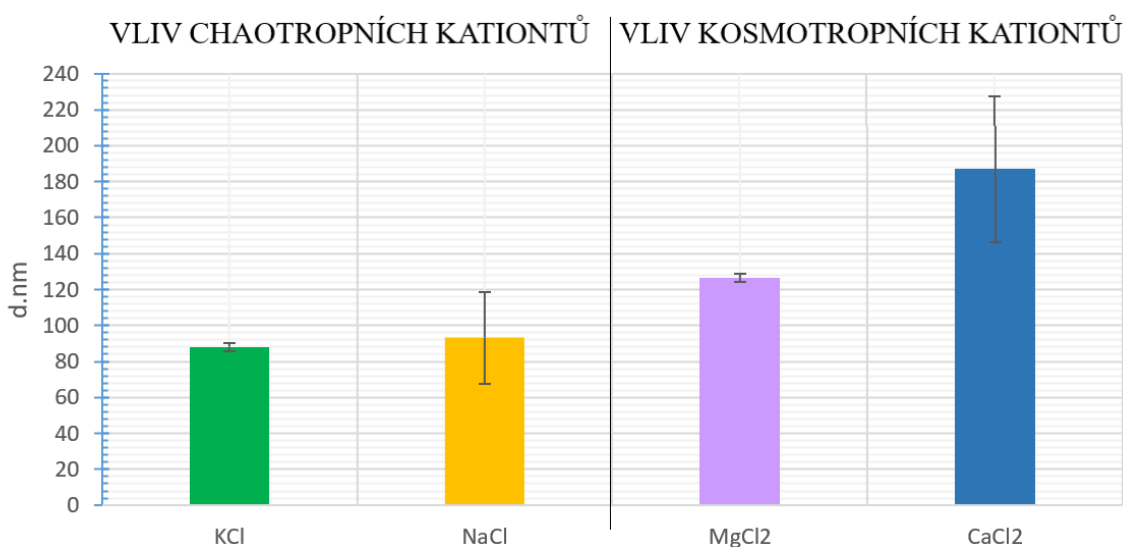
Velikost polymerního klubka HA v závislosti na složení konkrétního roztoku (typ soli, koncentrace EtOH, atd.) byla určena pomocí metody dynamického rozptylu světla. Rovněž je potřeba zmínit, že vzhledem k citlivosti použité metody, musely být všechny roztoky naředěny na nižší koncentraci HA (0,1hm.%). Výsledky DLS analýzy, provedené pro potvrzení námi vyřčené hypotézy, byly shrnuty do následujících grafů na obrázcích (Obrázek 22, Obrázek 23Obrázek 23 Obrázek 24):



Obrázek 22 Závislost velikosti polymerního klubka HA (0,1% hm.) v **systemu rozpouštědlo-polymer** na koncentraci EtOH (ověření detekce vlivu přidaného EtOH na HA)

Z výsledků závislosti velikosti polymerního klubka HA (0,1 hm%) na koncentraci EtOH v roztoku (5, 10 a 15 hm%), jenž shrnuje Obrázek 22, byla potvrzena, určitá míra vlivu EtOH na samotný řetězec HA. Vzhledem k tomu, že EtOH představuje pro hyaluronan tzv. špatné

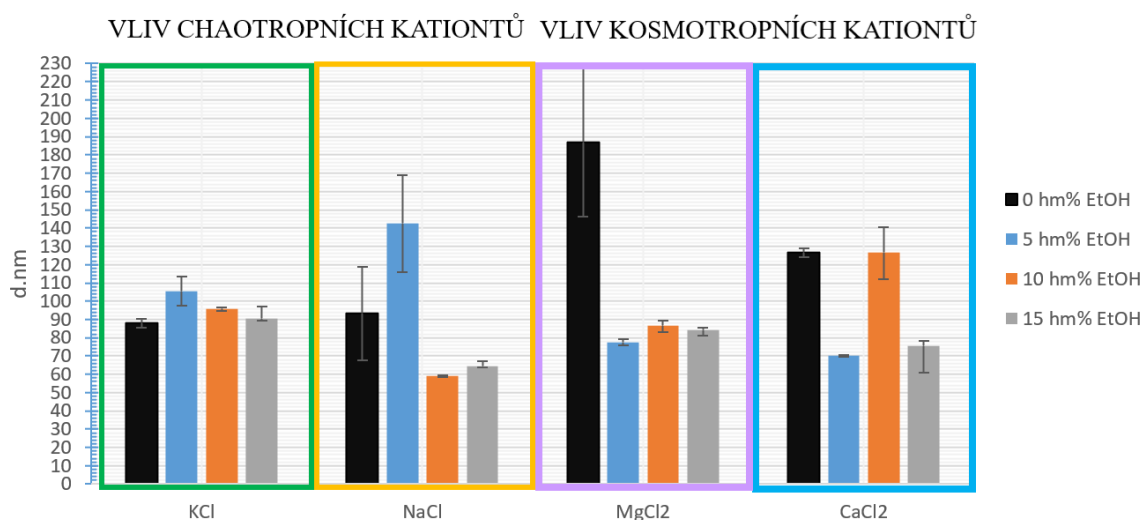
rozpouštědlo, předpokládalo se, že zvyšováním EtOH podílu v roztoku [78], bude velikost polymerního klubka spíše klesat (důsledek srážení HA). Jak jde vidět přímo z uvedené závislosti, při nejnižší koncentraci EtOH, se hodnota hydrodynamického průměru klubka pohybovala okolo  $1\,300 \pm 104$  nm. Zvýšení koncentrace EtOH z 5 na 10 hm%, se projevilo poklesem velikosti na polovinu předchozí velikosti, tedy na hodnotu  $660 \pm 35$  nm. V případě nejvyšší koncentraci EtOH (15 hm%) se polymerní klubko sbalilo ještě o dalších 170 nm, tedy velikost jeho průměru odpovídala hodnotě kolem  $489 \pm 39$  nm.



Obrázek 23 Závislost velikosti polymerního klubka HA (0,1% hm.) v systému voda-sůl-polymer (ověření vlivu samotné soli na řetězec HA)

Kromě již zmíněného vlivu EtOH na velikost polymerního klubka HA, byl analyzován i vliv jednotlivých solí na polymerní řetězec HA a to bez ETOH, z důvodu posouzení vlivu pouze přítomných solí (KCl, NaCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>). Výsledky tohoto měření shrnuje obr. 22. V porovnání s vlivem samotného EtOH na HA řetězec, u kterého se nejnižší hodnoty velikosti průměru klubka pohybovaly průměrně kol. 490 nm, je míra sbalení HA v přítomnosti vybraných solí (systém *voda-sůl-polymer*) vyšší. Nejvyšší velikost klubka HA  $187 \pm 41$  nm. byla potvrzena v případě CaCl<sub>2</sub>. Musíme brát v potaz, že všechny přidané soli obsahují chlorné anionty, které jsou z pohledu pozice v Hofmeisterovy řady solí brány jako tzv. chaotropní, a očekává se od nich spíše sbalení polymerního klubka. Navíc jak je známo z literatury, jsou projevy aniontu výrazně silnější než v případě kationtů. V případě použití solí KCl a NaCl, se v důsledku jejich disociace v roztoku nacházeli jak chaotropní kationty, tak i anionty, díky čemuž se efekt tzv. sbalení polymerního klubka vzájemně umocnil. Průměrné hodnoty průměrů polymerních klubek odpovídaly v případě KCl hodnotě  $88 \pm 3$  nm., a v případě NaCl, u kterého se očekával mírnější účinek, odpovídaly hodnotě

$93 \pm 25$  nm. Zcela jiná situace panovala v případě solí  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ , které se po disociaci rozložili na chaotropní anionty a kosmotropní kationty, které účinek sbalení polymerního klubka vzájemnou přítomností spíše negovaly. Ve vzorcích HA, které obsahovaly chaotropním aniont ( $CH_A-K_C$  ( $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ )), jak je vidět, odpovídala velikost polymerního klubka větším hodnotám ( $125 \pm 3$  nm a  $187 \pm 40$  nm.), než u solí obsahující chaotropní kationt spolu s chaotropním aniontem ( $CH_A-CH_C$  (KCl a NaCl) (velikost  $88 \pm 3$  nm a  $93 \pm 25$  nm).



Obrázek 24 Závislost velikosti polymerního klubka HA (0,1% hm.) v kompletním systému rozpouštědlo-sůl-polymer

V samotném závěru byly pomocí DLS měřeny velikosti polymerních makromolekul roztoků HA, již v kompletních systémech (tj. *rozpouštědlo-sůl-polymer*). Závislost velikosti polymerního klubka HA na typu přítomné soli (chaotropní, kosmotropní kation), ale i na koncentraci použitého EtOH, je zobrazena na Obrázek 24.

U roztoků s KCl došlo v porovnání se systémem neobsahujícím ethanol, nejprve k rozbalení klubka (cca o 20 nm). S dalšími přídávky EtOH, velikost polymerního klubka klesala, docházelo tedy k jeho sbalování, tak jako tomu bylo v systému rozpouštědlo-polymer (Obrázek 22). Efekt přítomné soli v kombinaci s EtOH, se při jeho nejvyšší koncentraci prakticky znegoval. V případě použití NaCl došlo v důsledku jeho přídávky k nárůstu polymerního klubka (rozbalení řetězce). Zvýšením koncentrace EtOH na 10 hm%, už byl účinek ethanolu, v kombinaci s přidanou solí, natolik silný, že došlo ke sbalení polymerního klubka. Zcela jiná situace nastala při použití kombinace špatného rozpouštědla a chaotropního aniontu s kosmotropním kationtem ( $CH_A-K_C$ ). Pozoruhodné je, že přidáním



chaotropního aniontu s chaotropním kationtem k HA (NaCl, KCl)  $CH_A-CH_C$  velikost polymerního klubka vzrostla (na rozdíl od roztoků HA s EtOH bez soli), zatímco v případě přídavku chaotropního aniontu s kosmotropním kationtem  $CH_A-K_C$  (CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>) velikost polymerního klubka HA klesla, v důsledku vyššího zastoupení chaotropních chloridových iontů, které je v případě námi zvolených solí  $CH_A-K_C$  (MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>) z důvodu dvojmocných kationtů vyšší, než u kombinace  $CH_A-K_C$  (KCl, NaCl). S dalším přídavkem EtOH k roztokům HA (koncentrace 10 hm%) převládl efekt kosmotropních kationtů, a to jak v případě Mg<sup>2+</sup> tak v případě Ca<sup>2+</sup>. Ovšem při nejvyšší koncentraci EtOH, byl účinek špatného rozpouštědla natolik silný, že případě MgCl<sub>2</sub> nebyl rozdíl ve velikosti polymerního klubka (špatné rozpouštědlo vs. kosmotropní kationt) nikterak markantní (jednotky nm). Jinak tomu bylo v případě CaCl<sub>2</sub>, u kterého byl efekt rozbalení polymerního klubka nejsilnější, zřejmě díky vápenatým kationtům, které mají, podle jeho pozice v Hofmeisterově řadě solí, silnější kosmotropní efekt než hořečnaté kationty. Jeho vlivem vzrostl průměr polymerního klubka zpět na stejnou hodnotu, jakou mělo klubko před sbalením klubka způsobeným (Cl<sup>-</sup>) anionty (tj, 126 ± 15 nm). Do budoucna by bylo zajímavé zhodnotit vliv chování v systému, kde by místo špatného rozpouštědla EtOH figurovalo naopak dobré rozpouštědlo pro HA (lepší než voda). Dobré rozpouštědlo, by teoreticky mohlo působit ve prospěch kosmotropních kationtů a umocnit tak expandaci polymerního klubka, analogicky k umocnění sbalovací efektu prostřednictvím EtOH.

## ZÁVĚR

Cílem experimentální části této práce bylo otestovat, zda a příp. jaký mají vliv na elektrostatické zvlákňování HA, ionty vybrané z Hofmeisterovi řady solí v souvislosti s jejich chaotropním a kosmotropním charakterem. Kosmotropní a chaotropní chování totiž souvisí, mimo jiné se sbalováním a rozbalováním polymerního klubka a podle kterého je Hofmeisterova řada seřazena. Konkrétně byl porovnán účinek solí s chaotropním kationtem (KCl, NaCl) a solí s kosmotropním kationtem ( $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ ). Kromě vlivu vybraných solí (typ soli, iontová síla (M), byl analyzován účinek rozdílné koncentrace špatného rozpouštědla (EtOH), které mělo podpořit proces zvlákňování změnou povrchového napětí roztoků, koncentraci HA a rozdílným uspořádáním samotného elektrostatického zvlákňování. Morfologie a velikost získaných vláken byla analyzována pomocí metody SEM. Ze získaných výsledků jednak samotného procesu zvlákňování, ale i z pořízených SEM snímků, se podařilo prokázat, že při vyšších koncentracích EtOH se HA v roztoku nerozpouští, ale spíše sráží, a proto nebylo možné tyto roztoky použít ke zvlákňování. Dále bylo zjištěno, že uspořádání aparatury do pozice „*shora dolů*“ zvyšuje výtěžnost vláken, zatímco výhodou uspořádání do pozice „*zdola nahoru*“ spočívá v dosažení tenčích vláken. Rovněž bylo zjištěno, že při změně koncentrace HA ani EtOH se nepodařilo na proces zvlákňování prokázat žádný efekt. Při porovnání účinku přidaných solí na proces zvlákňování HA se ukázalo, že přítomnost KCl, NaCl (sbalují polymerní řetězec) proces zvlákňování zhoršily, zatímco soli  $MgCl_2$  a  $CaCl_2$  procesu zvlákňování prospěly (účinek rozbalení polymerního řetězce). Tyto výsledky tak potvrdili platnost hypotézy stanovenou na základě vlivů kosmotrop vs. chaotrop iontů. Z důvodů potvrzení účinků vybraných solí na proces zvlákňování HA, byla v neposlední řadě charakterizována velikost polymerního klubka HA zvolených systémů *rozpouštědlo-sůl-polymer* a to pomocí metody dynamického rozptylu světla. Výsledky ze stanovení velikosti polymerního klubka v přítomnosti kosmotropních a chaotropních kationtů předpokládaný trend potvrdily.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] A. Fallacara, E. Baldini, S. Manfredini, S. Vertuani, Hyaluronic Acid in the Third Millennium, *Polymers* (Basel) 10 (2018) 701. <https://doi.org/10.3390/polym10070701>.
- [2] Y. JI, K. GHOSH, X. SHU, B. LI, J. SOKOLOV, G. PRESTWICH, R. CLARK, M. RAFAILOVICH, Electrospun three-dimensional hyaluronic acid nanofibrous scaffolds, *Biomaterials* 27 (2006) 3782–3792. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.02.037>.
- [3] B.D. Ratner, The Biocompatibility Manifesto: Biocompatibility for the Twenty-first Century, *J Cardiovasc Transl Res* 4 (2011) 523–527. <https://doi.org/10.1007/s12265-011-9287-x>.
- [4] W. Kunz, J. Henle, B.W. Ninham, ‘Zur Lehre von der Wirkung der Salze’ (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister’s historical papers, *Curr Opin Colloid Interface Sci* 9 (2004) 19–37. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2004.05.005>.
- [5] W.J. Xie, Y.Q. Gao, A Simple Theory for the Hofmeister Series, *J Phys Chem Lett* 4 (2013) 4247–4252. <https://doi.org/10.1021/jz402072g>.
- [6] L. Musilová, V. Kašpárková, A. Mráček, A. Minařík, M. Minařík, The behaviour of hyaluronan solutions in the presence of Hofmeister ions: A light scattering, viscometry and surface tension study, *Carbohydr Polym* 212 (2019) 395–402. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.032>.
- [7] M. O’Regan, I. Martini, F. Crescenzi, C. De Luca, M. Lansing, Molecular mechanisms and genetics of hyaluronan biosynthesis, *Int J Biol Macromol* 16 (1994) 283–286. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(94\)90056-6](https://doi.org/10.1016/0141-8130(94)90056-6).
- [8] M. Serra, A. Casas, D. Toubarro, A.N. Barros, J.A. Teixeira, Microbial Hyaluronic Acid Production: A Review, *Molecules* 28 (2023) 2084. <https://doi.org/10.3390/molecules28052084>.
- [9] L. Vítková, Electrospinning of Biocompatible Polymers, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2019. <http://hdl.handle.net/10563/45099>. (accessed March 17, 2024).
- [10] J. Li, A. He, C.C. Han, D. Fang, B.S. Hsiao, B. Chu, Electrospinning of Hyaluronic Acid (HA) and HA/Gelatin Blends, *Macromol Rapid Commun* 27 (2006) 114–120. <https://doi.org/10.1002/marc.200500726>.
- [11] L. Ghasemi-Mobarakeh, D. Kolahreez, S. Ramakrishna, D. Williams, Key terminology in biomaterials and biocompatibility, *Curr Opin Biomed Eng* 10 (2019) 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2019.02.004>.
- [12] C. Bergmann, A. Stumpf, *Dental Ceramics*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2013. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-38224-6>.
- [13] S. Todros, M. Todesco, A. Bagno, *Biomaterials and Their Biomedical Applications: From Replacement to Regeneration*, *Processes* 9 (2021) 1949. <https://doi.org/10.3390/pr9111949>.
- [14] Prokopová Irena, *Makromolekulární chemie*, Vydavatelství VŠCHT, Praha, 2004. [http://147.33.74.135/knihy/uid\\_isbn-978-80-7080-662-3/pages-img/015.html](http://147.33.74.135/knihy/uid_isbn-978-80-7080-662-3/pages-img/015.html) (accessed February 22, 2024).
- [15] G.D. Fasman, *Macromolecules: Biopolymers*. Alan G. Walton and John Blackwell. With a contribution by Stephen H. Carr. Academic Press, New York, 1973. x, 604 pp., illus. \$35. *Molecular Biology*, *Science* (1979) 185 (1973) 1–18. <https://doi.org/10.1126/science.185.4154.851>.

- [16] M. Niaounakis, Definitions of Terms and Types of Biopolymers, in: *Biopolymers: Applications and Trends*, Elsevier, 2015: pp. 1–90. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35399-1.00001-6>.
- [17] K. Meyer, J.W. Palmer, THE POLYSACCHARIDE OF THE VITREOUS HUMOR, *Journal of Biological Chemistry* 107 (1934) 629–634. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)75338-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)75338-6).
- [18] K. Valachová, L. Šoltés, Hyaluronan as a Prominent Biomolecule with Numerous Applications in Medicine, *Int J Mol Sci* 22 (2021) 7077. <https://doi.org/10.3390/ijms22137077>.
- [19] G. Kogan, L. Šoltés, R. Stern, P. Gemeiner, Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications, *Biotechnol Lett* 29 (2006) 17–25. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9219-z>.
- [20] B. Weissmann, K. Meyer, The Structure of Hyalobiuronic Acid and of Hyaluronic Acid from Umbilical Cord <sup>1,2</sup>, *J Am Chem Soc* 76 (1954) 1753–1757. <https://doi.org/10.1021/ja01636a010>.
- [21] S.S. Kulkarni, S.D. Patil, D.G. Chavan, Extraction, purification and characterization of hyaluronic acid from Rooster comb, *Journal of Applied and Natural Science* 10 (2018) 313–315. <https://doi.org/10.31018/jans.v10i1.1623>.
- [22] A. Shiedlin, R. Bigelow, W. Christopher, S. Arbabi, L. Yang, R. V. Maier, N. Wainwright, A. Childs, R.J. Miller, Evaluation of Hyaluronan from Different Sources: *Streptococcus z ooepidemicus* , Rooster Comb, Bovine Vitreous, and Human Umbilical Cord, *Biomacromolecules* 5 (2004) 2122–2127. <https://doi.org/10.1021/bm0498427>.
- [23] B.F. Chong, L.M. Blank, R. McLaughlin, L.K. Nielsen, Microbial hyaluronic acid production, *Appl Microbiol Biotechnol* 66 (2005) 341–351. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1774-4>.
- [24] D.C. Ellwood, C.G.T. Evans, G.M. Dunn, N. McInnes, K.J. Smith, PRODUCTION OF HYALURONIC ACID, 00541187, 1995.
- [25] A. Rossatto, J. Trocado dos Santos, M. Zimmer Ferreira Arlindo, M. Saraiva de Morais, T. Denardi de Souza, C. Saraiva Ogradowski, Hyaluronic acid production and purification techniques: a review, *Prep Biochem Biotechnol* 53 (2023) 1–11. <https://doi.org/10.1080/10826068.2022.2042822>.
- [26] P. Snetkov, K. Zakharova, S. Morozkina, R. Olekhnovich, M. Uspenskaya, Hyaluronic Acid: The Influence of Molecular Weight on Structural, Physical, Physico-Chemical, and Degradable Properties of Biopolymer, *Polymers (Basel)* 12 (2020) 1800. <https://doi.org/10.3390/polym12081800>.
- [27] J. Necas, L. Bartosikova, P. Brauner, J. Kolar, Hyaluronic acid (hyaluronan): a review, *Vet Med (Praha)* 53 (2008) 397–411. <https://doi.org/10.17221/1930-VETMED>.
- [28] H. Knopf-Marques, M. Pravda, L. Wolfova, V. Velebny, P. Schaaf, N.E. Vrana, P. Lavallo, Hyaluronic Acid and Its Derivatives in Coating and Delivery Systems: Applications in Tissue Engineering, Regenerative Medicine and Immunomodulation, *Adv Healthc Mater* 5 (2016) 2841–2855. <https://doi.org/10.1002/adhm.201600316>.
- [29] J.E. Scott, F. Heatley, Biological Properties of Hyaluronan in Aqueous Solution Are Controlled and Sequestered by Reversible Tertiary Structures, Defined by NMR Spectroscopy, *Biomacromolecules* 3 (2002) 547–553. <https://doi.org/10.1021/bm010170j>.
- [30] F. Yu, F. Zhang, T. Luan, Z. Zhang, H. Zhang, Rheological studies of hyaluronan solutions based on the scaling law and constitutive models, *Polymer (Guildf)* 55 (2014) 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2013.11.047>.

- [31] J. Mayr, C. Saldías, D. Díaz Díaz, Release of small bioactive molecules from physical gels, *Chem Soc Rev* 47 (2018) 1484–1515. <https://doi.org/10.1039/C7CS00515F>.
- [32] A. M., N. B., L. M., Polymer Gel Rheology and Adhesion, in: *Rheology*, InTech, 2012. <https://doi.org/10.5772/36975>.
- [33] P. Snetkov, K. Zakharova, S. Morozkina, R. Olekhovich, M. Uspenskaya, Hyaluronic Acid: The Influence of Molecular Weight on Structural, Physical, Physico-Chemical, and Degradable Properties of Biopolymer, *Polymers (Basel)* 12 (2020) 1800. <https://doi.org/10.3390/polym12081800>.
- [34] J.E. Scott, Secondary Structures in Hyaluronan Solutions: Chemical and Biological Implications, in: 2007: pp. 6–20. <https://doi.org/10.1002/9780470513774.ch2>.
- [35] M. Litwiniuk, A. Krejner, M.S. Speyrer, A.R. Gauto, T. Grzela, Hyaluronic Acid in Inflammation and Tissue Regeneration., *Wounds* 28 (2016) 78–88.
- [36] J. Monslow, P. Govindaraju, E. PurÅ©, Hyaluronan â€“ A Functional and Structural Sweet Spot in the Tissue Microenvironment, *Front Immunol* 6 (2015). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00231>.
- [37] T. Pavicic, G.G. Gauglitz, P. Lersch, K. Schwach-Abdellaoui, B. Malle, H.C. Korting, M. Farwick, Efficacy of cream-based novel formulations of hyaluronic acid of different molecular weights in anti-wrinkle treatment., *J Drugs Dermatol* 10 (2011) 990–1000.
- [38] B. Rzany, H. Cartier, P. Kestemont, P. Trevidic, G. Sattler, N. Kerrouche, J.-C. Dhuin, M.Y. Ma, Full-Face Rejuvenation Using a Range of Hyaluronic Acid Fillers: Efficacy, Safety, and Patient Satisfaction over 6 Months, *Dermatologic Surgery* 38 (2012) 1153–1161. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2012.02470.x>.
- [39] S.R. Smith, D. Jones, J.A. Thomas, D.K. Murphy, F.C. Beddingfield, Duration of wrinkle correction following repeat treatment with Juvéderm hyaluronic acid fillers, *Arch Dermatol Res* 302 (2010) 757–762. <https://doi.org/10.1007/s00403-010-1086-8>.
- [40] S.N.A. Bukhari, N.L. Roswandi, M. Waqas, H. Habib, F. Hussain, S. Khan, M. Sohail, N.A. Ramli, H.E. Thu, Z. Hussain, Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects, *Int J Biol Macromol* 120 (2018) 1682–1695. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.188>.
- [41] M. Oe, S. Sakai, H. Yoshida, N. Okado, H. Kaneda, Y. Masuda, O. Urushibata, Oral hyaluronan relieves wrinkles: a double-blinded, placebo-controlled study over a 12-week period, *Clin Cosmet Investig Dermatol Volume* 10 (2017) 267–273. <https://doi.org/10.2147/CCID.S141845>.
- [42] C. Kawada, T. Yoshida, H. Yoshida, R. Matsuoka, W. Sakamoto, W. Odanaka, T. Sato, T. Yamasaki, T. Kanemitsu, Y. Masuda, O. Urushibata, Ingested hyaluronan moisturizes dry skin, *Nutr J* 13 (2014) 70. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-70>.
- [43] L. Bartovská, M. Šišková, Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav. , Vysoká škola chemicko-technologická v Praze., Praha, 2002.
- [44] K.P. Gregory, G.R. Elliott, H. Robertson, A. Kumar, E.J. Wanless, G.B. Webber, V.S.J. Craig, G.G. Andersson, A.J. Page, Understanding specific ion effects and the Hofmeister series, *Physical Chemistry Chemical Physics* 24 (2022) 12682–12718. <https://doi.org/10.1039/D2CP00847E>.
- [45] L.M. Pegram, M.T. Record, Hofmeister Salt Effects on Surface Tension Arise from Partitioning of Anions and Cations between Bulk Water and the Air–Water Interface, *J Phys Chem B* 111 (2007) 5411–5417. <https://doi.org/10.1021/jp070245z>.

- [46] S.Z. Moghaddam, E. Thormann, The Hofmeister series: Specific ion effects in aqueous polymer solutions, *J Colloid Interface Sci* 555 (2019) 615–635. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.07.067>.
- [47] Stoklasa Karel, *Makromolekulární chemie I.*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín, 2005.
- [48] N.B. Wyatt, C.M. Gunther, M.W. Liberatore, Increasing viscosity in entangled polyelectrolyte solutions by the addition of salt, *Polymer (Guildf)* 52 (2011) 2437–2444. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2011.03.053>.
- [49] P.J. Flory, J.E. Osterheld, Intrinsic Viscosities of Polyelectrolytes. Poly-(acrylic Acid), *J Phys Chem* 58 (1954) 653–661. <https://doi.org/10.1021/j150518a014>.
- [50] F. Horkay, P.J. Basser, D.J. Londono, A.-M. Hecht, E. Geissler, Ions in hyaluronic acid solutions, *J Chem Phys* 131 (2009). <https://doi.org/10.1063/1.3262308>.
- [51] Y. ZHANG, P. CREMER, Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series, *Curr Opin Chem Biol* 10 (2006) 658–663. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.09.020>.
- [52] L. Musilová, A. Mráček, V. Kašpárková, A. Minařík, A.J.M. Valente, E.F.G. Azevedo, L.M.P. Verissimo, M.M. Rodrigo, M.A. Estes, A.C.F. Ribeiro, Effect of Hofmeister Ions on Transport Properties of Aqueous Solutions of Sodium Hyaluronate, *Int J Mol Sci* 22 (2021) 1932. <https://doi.org/10.3390/ijms22041932>.
- [53] E. Kutálková, J. Hrnčířík, R. Witasek, M. Ingr, Effect of solvent and ions on the structure and dynamics of a hyaluronan molecule, *Carbohydr Polym* 234 (2020) 115919. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115919>.
- [54] M. Qiu, P. Sun, K. Han, Z. Pang, J. Du, J. Li, J. Chen, Z.L. Wang, W. Mai, Tailoring water structure with high-tetrahedral-entropy for antifreezing electrolytes and energy storage at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , *Nat Commun* 14 (2023) 601. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36198-5>.
- [55] D.F. Parsons, M. Boström, P. Lo Nostro, B.W. Ninham, Hofmeister effects: interplay of hydration, nonelectrostatic potentials, and ion size, *Physical Chemistry Chemical Physics* 13 (2011) 12352. <https://doi.org/10.1039/c1cp20538b>.
- [56] R. JAYAKUMAR, S.V. NAIR, *Biomedical applications of polymeric nanofibers*, Springer, Berlin, 2012.
- [57] M.S. Islam, B.C. Ang, A. Andriyana, A.M. Afifi, A review on fabrication of nanofibers via electrospinning and their applications, *SN Appl Sci* 1 (2019) 1248. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1288-4>.
- [58] P. Ke, X.-N. Jiao, X.-H. Ge, W.-M. Xiao, B. Yu, From macro to micro: structural biomimetic materials by electrospinning, *RSC Adv.* 4 (2014) 39704–39724. <https://doi.org/10.1039/C4RA05098C>.
- [59] D. Lukáš, A. Sarkar, L. Martinová, K. Vodsed'álková, D. Lubasová, J. Chaloupek, P. Pokorný, P. Mikeš, J. Chvojka, M. Komárek, Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century), *Textile Progress* 41 (2009) 59–140. <https://doi.org/10.1080/00405160902904641>.
- [60] W.K. Son, J.H. Youk, T.S. Lee, W.H. Park, The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly(ethylene oxide) fibers, *Polymer (Guildf)* 45 (2004) 2959–2966. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2004.03.006>.
- [61] A.K. Haghi, M. Akbari, Trends in electrospinning of natural nanofibers, *Physica Status Solidi (a)* 204 (2007) 1830–1834. <https://doi.org/10.1002/pssa.200675301>.
- [62] T. Jarusuwannapoom, W. Hongrojjanawiwat, S. Jitjaicham, L. Wannatong, M. Nithitanakul, C. Pattamaprom, P. Koombhongse, R. Rangkupan, P. Supaphol, Effect of solvents on electro-spinnability of polystyrene solutions and morphological

- appearance of resulting electrospun polystyrene fibers, *Eur Polym J* 41 (2005) 409–421. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2004.10.010>.
- [63] A. Greiner, J.H. Wendorff, Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers, *Angewandte Chemie International Edition* 46 (2007) 5670–5703. <https://doi.org/10.1002/anie.200604646>.
- [64] C.L. Casper, J.S. Stephens, N.G. Tassi, D.B. Chase, J.F. Rabolt, Controlling Surface Morphology of Electrospun Polystyrene Fibers: Effect of Humidity and Molecular Weight in the Electrospinning Process, *Macromolecules* 37 (2004) 573–578. <https://doi.org/10.1021/ma0351975>.
- [65] C.J. Buchko, L.C. Chen, Y. Shen, D.C. Martin, Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films, *Polymer (Guildf)* 40 (1999) 7397–7407. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(98\)00866-0](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(98)00866-0).
- [66] J.M. Deitzel, J. Kleinmeyer, D. Harris, N.C. Beck Tan, The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles, *Polymer (Guildf)* 42 (2001) 261–272. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00250-0](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00250-0).
- [67] C.S. Ki, J.W. Kim, J.H. Hyun, K.H. Lee, M. Hattori, D.K. Rah, Y.H. Park, Electrospun three-dimensional silk fibroin nanofibrous scaffold, *J Appl Polym Sci* 106 (2007) 3922–3928. <https://doi.org/10.1002/app.26914>.
- [68] D. Rodoplu, M. Mutlu, Effects of Electrospinning Setup and Process Parameters on Nanofiber Morphology Intended for the Modification of Quartz Crystal Microbalance Surfaces, *J Eng Fiber Fabr* 7 (2012) 155892501200700. <https://doi.org/10.1177/155892501200700217>.
- [69] M. Spasova, R. Mincheva, D. Paneva, N. Manolova, I. Rashkov, Perspectives On: Criteria for Complex Evaluation of the Morphology and Alignment of Electrospun Polymer Nanofibers, *J Bioact Compat Polym* 21 (2006) 465–479. <https://doi.org/10.1177/0883911506068495>.
- [70] E. Ewaldz, J. Randrup, B. Brettmann, Solvent Effects on the Elasticity of Electrospinnable Polymer Solutions, *ACS Polymers Au* 2 (2022) 108–117. <https://doi.org/10.1021/acspolymersau.1c00041>.
- [71] G.H. Michler, W. Lebek, Electron Microscopy of Polymers, in: *Polymer Morphology*, Wiley, 2016: pp. 37–53. <https://doi.org/10.1002/9781118892756.ch3>.
- [72] N. Erdman, D.C. Bell, R. Reichelt, Scanning Electron Microscopy, in: 2019: pp. 229–318. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-00069-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-00069-1_5).
- [73] R.F. Egerton, *Physical Principles of Electron Microscopy*, Springer US, Boston, MA, 2005. <https://doi.org/10.1007/b136495>.
- [74] B.-H. Jun, ed., *Nanotechnology for Bioapplications*, Springer Singapore, Singapore, 2021. <https://doi.org/10.1007/978-981-33-6158-4>.
- [75] P.C. Cai, B.A. Krajina, M.J. Kratochvil, L. Zou, A. Zhu, E.B. Burgener, P.L. Bollyky, C.E. Milla, M.J. Webber, A.J. Spakowitz, S.C. Heilshorn, Dynamic light scattering microrheology for soft and living materials, *Soft Matter* 17 (2021) 1929–1939. <https://doi.org/10.1039/D0SM01597K>.
- [76] F. Babick, Dynamic light scattering (DLS), in: *Characterization of Nanoparticles*, Elsevier, 2020: pp. 137–172. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814182-3.00010-9>.
- [77] B. W., S. Keen, P. J., Y. Hemar, M. A.K., A Practical Review of Microrheological Techniques, in: *Rheology - New Concepts, Applications and Methods*, InTech, 2013. <https://doi.org/10.5772/53639>.
- [78] E. Antoniou, C.F. Buitrago, M. Tsianou, P. Alexandridis, Solvent effects on polysaccharide conformation, *Carbohydr Polym* 79 (2010) 380–390. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.08.019>.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

CRT	vakuová obrazovka (cathode ray tube)
DLS	dynamický rozptyl světla
DMF	dimethylfumarát
DMF	dimethylfumarát
ECM	extracelulární matric
EDS	energetická disperzní rentgenová spektroskopie
EtOH	ethanol
GE	želatina
HA	hyaluronan
HY	kyselina hyaluronová
IPA	izopropylalkohol
MeOH	methanol
PEO	polyethylenglykol
PS	polystyren
PTFE	polytetrafluorethylen
PVA	polyvinylalkohol
PVP	polyvinylpyrrolidon
SED	detektor sekundárních elektronů
SEM	elektronová skenovací mikroskopie
SIE	specifické efekty iontů
TDA	Taylerova disperzní analýza
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
XPS	rentgenová fotoelektronová spektroskopie



## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Schéma disacharidové jednotky HA skládající se z meru kyseliny D-glukoronové (vlevo) a meru N-acetylglukosaminu (vpravo) spojených glykosidickou vazbou .....	17
Obrázek 2 Klasické seřazení kationtů a aniontů podle míry jejich kosmotropního/chaotropního charakteru .....	22
Obrázek 3 Vliv kosmotropů/chaotropů na uspořádání vody a následně míru expanze polymerního klubka.....	23
Obrázek 4 Schématické zobrazení úrovní sekundární a terciální struktury polymerní makromolekuly.....	24
Obrázek 5 Schéma zobrazující solvatační obal iontů disociovaného NaCl; dostupné z <a href="https://courses.lumenlearning.com/suny-dutchess-ap1/chapter/water-2/">courses.lumenlearning.com/suny-dutchess-ap1/chapter/water-2/</a> .....	26
Obrázek 6 Vzájemně konkurenční interakce anion-voda/voda-voda .....	28
Obrázek 7 Schéma základních komponent zvláknovací aparatury a znázornění Taylorova kužele .....	30
Obrázek 8 ilustrace zvláknování „shora dolů“ vs. „zdola nahoru“ .....	32
Obrázek 9 Geometrické schéma znázorňující A rovnoměrná vlákna; B vlákna s kuličkami (kořalkami); C vlákna s kapičkami .....	33
Obrázek 10 SEM snímky tří nejčastějších morfologií vláken .....	34
Obrázek 11 hlavní komponenty SEM.....	37
Obrázek 12 ilustrace některých strukturních stavů polymeru, které mohou být analyzovány metodou DLS .....	39
Obrázek 13 Ilustrační zobrazení intenzitní a korelační křivky pro a) velké částice b) malé částice; vytvořeno v Paint 3D.....	40
Obrázek 14 Porovnání závislosti korelačních funkcí na čase HA molekul o velikostech 100 nm a 2000 nm; zdroj: <i>Dynamic light scattering microrheology for soft and living materials</i> doi.: 10.1039/D0SM01597K.....	40
Obrázek 15 tři hlavní části experimentu.....	43
Obrázek 16 část spinneru v okolí kolektoru.....	48
Obrázek 17 Schéma upořádání aparatury pro zvláknování „zdola nahoru“ .....	50
Obrázek 18 Snímek aparatury pro zvláknování z jehly .....	51
Obrázek 19 schéma DLS analýzy.....	52
Obrázek 20 snímky vzorku CaCl <sub>2</sub> (1 M; EtOH 15 hm%; HA 1 %) mikrovlákno (vlevo) a nanovlákna po jeho obvodu (vpravo) .....	56
Obrázek 21 Deformace typu C na vlákně získané z roztoku MgCl <sub>2</sub> 1 M; EtOH 10 hm%; HA 1,2 % (A) v porovnání se schématem (B).....	60
Obrázek 22 Závislost velikosti polymerního klubka HA (0,1% hm.) v systému rozpouštědlo-polymer na koncentraci EtOH (ověření detekce vlivu přidaného EtOH na HA) .....	62
Obrázek 23 Závislost velikosti polymerního klubka HA (0,1% hm.) v systému voda-sůl-polymer (ověření vlivu samotné soli na řetězec HA) .....	63

---

Obrázek 24 Závislost velikosti polymerního klubka HA (0,1% hm.) v <i>kompletním systému rozpouštědlo-sůl-polymer</i> .....	64
--	----

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 vizualizace připravené první série vzorků .....	46
Tabulka 2 vizualizace druhé série vzorků .....	47
Tabulka 3 vizualizace třetí série vzorků .....	48
Tabulka 4 vybrané snímky z druhé zvláknované série pro NaCl.....	54
Tabulka 5 vybrané snímky z druhé zvláknované série pro CaCl <sub>2</sub> .....	55
Tabulka 6 vybrané snímky z třetí zvláknované série pro KCl.....	57
Tabulka 7 vybrané snímky z třetí zvláknované série pro NaCl.....	58
Tabulka 8 vybrané snímky z třetí zvláknované série pro MgCl <sub>2</sub> .....	59
Tabulka 9 vybrané snímky z třetí zvláknované série pro CaCl <sub>2</sub> .....	61

