



Kombinace elektricky zvlákněných materiálů a hydrogelů

Diplomová práce

Studijní program:

Studijní obor:

Autor práce:

Vedoucí práce:

N3106 Textilní inženýrství

Netkané a nanovláknenné materiály

Bc. Jan Sovina

doc. Ing. Eva Kuželová Košťáková, Ph.D.

Katedra chemie





Zadání diplomové práce

Kombinace elektricky zvlákněných materiálů a hydrogelů

Jméno a příjmení: Bc. Jan Sovina
Osobní číslo: T18000026
Studijní program: N3106 Textilní inženýrství
Studijní obor: Netkané a nanovláknenné materiály
Zadávací katedra: Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů
Akademický rok: 2018/2019

Zásady pro vypracování:

- 1 Seznamte se s odbornou literaturou na téma aplikace hydrogelů v oblasti tkáňového inženýrství
- 2 Vypracujte literární rešerši týkající se kombinace vláknenných elektricky zvlákněných materiálů a hydrogelů pro aplikace v tkáňovém inženýrství
- 3 Zvolte vhodné materiály pro elektrické zvláknění a pro výrobu hydrogelu
- 4 Navrhněte postup výroby materiálů kombinujících elektrostaticky zvlákněný materiál a hydrogel
- 5 Provedte výrobu těchto materiálů a pokuste se je základně zhodnotit
- 6 Diskutujte výsledky a vyvodte závěry

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování práce:
Jazyk práce:

dle potřeby dokumentace
40-60 dle potřeby
tištěná
Čeština



Seznam odborné literatury:

1 Ottenbrite, R., M.: Biomedical Applications of Hydrogels Handbook, SpringerLink: Bücher 2010, ISBN: 144195919X, 9781441959195
2 Xu, S., Deng, L., Zhang, J., Yin, L., Dong, A.: Composites of electrospun-fibers and hydrogels: A potential solution to current challenges in biological and biomedical field, JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART B-APPLIED BIOMATERIALS, Vol.104, Issue 3, 2016, DOI: 10.1002/jbm.b.33420

Vedoucí práce:

doc. Ing. Eva Kuželová Košťáková, Ph.D.
Katedra chemie

Datum zadání práce:

20. února 2019

Předpokládaný termín odevzdání: 15. května 2020

LS

Ing. Jana Drašarová, Ph.D.
děkanka

Ing. Jiří Chvojka, Ph.D.
vedoucí katedry

Prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci jsem vypracoval samostatně jako původní dílo s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé diplomové práce a konzultantem.

Jsem si vědom toho, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu Technické univerzity v Liberci.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti Technickou univerzitu v Liberci; v tomto případě má Technická univerzita v Liberci právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Současně čestně prohlašuji, že text elektronické podoby práce vložený do IS/STAG se shoduje s textem tištěné podoby práce.

Beru na vědomí, že má diplomová práce bude zveřejněna Technickou univerzitou v Liberci v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů.

Jsem si vědom následků, které podle zákona o vysokých školách mohou vyplývat z porušení tohoto prohlášení.

27. května 2020

Bc. Jan Sovina

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval mé vedoucí doc. Ing. Evě Kuželové Košťákové, Ph.D., za velice odborné vedení, obrovskou ochotu a spoustu investovaného času. Bez vší této pomoci a ochoty by práce nikdy nemohla vzniknout. Další poděkování míří Ing. Luboši Běhálkovi, Ph.D., za provedená testování DSC. Za provedení infračervené spektrofotometrie bych rád poděkoval Ing. Janě Müllerové, Ph.D.. Následující poděkování patří Ing. Martinu Stuchlíkovi, Ph.D., za provedení lyofilizace. Dále bych též rád poděkoval Ing. Šárce Hauzerové, která nezištně provedla kompletní testy cytokompatibility, když nám byl znemožněn přístup na akademickou půdu vzhledem k pandemii COVID-19. V neposlední řadě nemohu opomenout mou rodinu, zvláště mé rodiče, kteří mě bezmezně podporují ve všem, co dělám, a bez nich bych nikdy nebyl tam, kde teď jsem.

Abstrakt

Hlavním cílem této diplomové práce je tvorba a základní testování materiálu složeného z hydrogelu a elektrostaticky zvlákněných vláken. Pro tvorbu vláken byla použita metoda elektrostatického zvláknění do kapaliny, a vodný roztok, do kterého byla vlákna zvláknována, byl v druhém kroku, spolu s vlákny uvnitř, fyzikálně síťován pro získání hydrogelu. Vlákna jsou do hydrogelů přidávána zejména pro aplikaci v medicíně pro tvorbu nosičů buněk, tzv. scaffoldů, nebo krytů ran. Jejich přítomnost v hydrogelu zlepšuje mechanickou odolnost, ale také zvyšuje adhezi buněk a umožňuje jejich lepší migraci právě podél vláken. Teoretická část je zaměřena na základní představení hydrogelů obecně a v řešeršní části je pak představeno několik publikací věnujících se právě kombinaci elektrostaticky zvlákněných vláken a hydrogelů. Experimentální část se zabývá kombinací hydrogelu z polyvinylalkoholu (PVA) s vlákny z polykaprolactonu (PCL), tedy biokompatibilními necytotoxickými polymerními materiály, které byly vybrány na základě předchozích zkušeností autora práce a literární řešerše. Největší překážkou této kombinace byla hydrofobita PCL v kombinaci s hydrofilitou PVA. To bylo vyřešeno zejména snížením vzdálenosti zvláknovací elektrody a kapalinového kolektoru. Následně byly vzorky fyzikálně síťovány pomocí postupného opakovaného zmražení a rozmražení, tzv. freeze-thaw. Vybrané vzorky byly lyofilizovány. Výsledné vzorky byly testovány pomocí DSC metody. Byl sledován stupeň botnění a úbytky hmotnosti po ponechání ve vodném prostředí po určité doby, dále byly vybrané vzorky nasnímány pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu. Závěrem byly vybrané vzorky úspěšně testovány na cytokompatibilitu.

Klíčová slova

hydrogel, polyvinylalkohol, polykaprolakton, elektrostatické zvláknění do kapaliny

Abstract

The main goal of this diploma thesis is production and basic testing of materials composed of hydrogel and electrospun fibers. The wet electrospinning was chosen for the production of fibers and the aqueous solution, in which was the fibers electrospun to, was in the second step, along with incorporated fibers, physically cross-linked to form hydrogel. The fibers are added into hydrogels mainly for medical applications, such as scaffolds or wound dressings. Their presence in hydrogels raises mechanical properties, and also raises adhesion and migration of cells, mainly alongside the fibers. Theoretical part is mainly focused on basic introduction of hydrogels in general and in the research part, there are given numerous publications, which are focusing on combining electrospun fibers with hydrogels. Experimental part then covers combination of hydrogel from polyvinyl alcohol (PVA) with fibers from polycaprolactone (PCL), thus biocompatible non-cytotoxic polymer materials, which were chosen on previous experience of the author and literary research. The biggest obstacle of this combination was the hydrophobicity of PCL and PVA hydrophilicity. This was solved mainly by lowering the distance of electrospinning electrode and aqueous collector. The samples were then physically cross-linked by repeating freeze-thaw cycle. Chosen samples were also lyophilized. The resultant samples were tested by DSC. The swelling degree and weight loss were observed after leaving them in aqueous media for a given period. They were also observed by the scanning electron microscope. The selected samples were successfully tested for cytocompatibility at the end.

Keywords

hydrogel, polyvinyl alcohol, polycaprolactone, wet electrospinning

Obsah

Poděkování.....	5
Abstrakt.....	6
Klíčová slova	6
Abstract	7
Keywords.....	7
Seznam použitých symbolů, zkratek, a termínů	10
Úvod	11
1. Teoretická část	12
1.1. Hydrogely	12
1.2. Výroba hydrogelů.....	14
1.2.1. Bloková polymerace	15
1.2.2. Polymerace z roztoku	15
1.2.3. Polymerace ze suspenze nebo inverzní suspenze.....	16
1.2.4. Polymerace ozařováním.....	16
1.2.5. Síťování polymerních řetězců.....	16
1.3. Polymery pro výrobu hydrogelů	17
1.3.1. Polyethylenglykol	19
1.3.2. Želatina.....	20
1.3.3. Algináty	20
1.3.4. Chitosan.....	21
1.3.5. Polyvinylalkohol	23
1.4. Hydrogely s integrovanými nanovláknky a mikrovláknky.....	24
2. Experimentální část.....	35
2.1. Použité materiály	36
2.2. Použité metody	37
2.2.1. Elektrostatické zvlákňování.....	37
2.2.2. Elektrostatické zvlákňování do kapaliny	39
2.2.3. Příprava hydrogelů	42
2.2.4. Elektronová skenovací mikroskopie.....	44
2.2.5. Lyofilizace	45
2.2.6. Metoda DSC.....	47
2.2.7. IR spektrofotometrie.....	47
2.2.8. Hodnocení úbytku hmotnosti a stupně botnění	47
2.2.9. Testování cytotoxicity	48

2.2.10.	Měření povrchového napětí.....	53
2.2.11.	Měření viskozity	53
2.2.12.	Měření elektrické vodivosti.....	53
3.	Výsledky měření a diskuze	54
3.1.	Zvláknování na hliníkovou folii	54
3.2.	Zvláknování do ethanolu	56
3.3.	Volba vzdálenosti elektrod.....	60
3.4.	Volba polymeru pro hydrogel	63
3.5.	Povrchová morfologie vzorků	64
3.6.	Testování vlastností kompozitu	66
3.6.1.	Stupeň botnání.....	67
3.6.2.	Úbytek hmotnosti	71
3.6.3.	DSC	72
3.6.4.	IR spektrofotometrie.....	73
3.6.5.	Cytotoxicita	74
3.7.	Povrchové napětí, viskozita, elektrická vodivost	76
	Závěr.....	78
	Seznam literatury	80
	Příloha 1 – Snímky s elektronového rastrovacího mikroskopu.....	85
	Příloha 2 – Histogramy elektrostaticky zvlákněných vrstev.....	88
	Příloha 3 – Grafy stupně botnání	92
	Příloha 4 – DSC grafy	95

Seznam použitých symbolů, zkratek, a termínů

BMP – 7	bone morphogenic protein 7
CCK – 8	cell counting kit 8
CO ₂	oxid uhličitý
dH ₂ O	destilovaný oxid vodný
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DSC	diferenciální skenovací kalorimetrie
GAG	glykosaminoglykan
IR	infračervená
KCl	chlorid draselný
KH ₂ PO ₄	dihydrogenfosforečnan draselný
Na ₂ HPO ₄ *12 H ₂ O	dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného
NaCl	chlorid sodný
PAA	kyselina polyakrylová
PBS	fosfátový pufr
PCL	polykaprolakton
PEG	polyethylenglykol
PLGA	kopolymer kyseliny mléčné a glykolové
PLLA – CL	kopolymer kyseliny L – polylaktidové a kaprolaktonu
PTFE	polytetrafluorethylen
PVA	polyvinylalkohol
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
UV	ultrafialová

Úvod

Hydrogely jsou velmi zajímavé materiály s častým využitím v medicínských aplikacích. V posledních letech se dostává do oblasti zájmu výzkumníků inkorporace vláknenných materiálů do objemu hydrogelu.

Kombinace hydrogelu a vláknenného materiálu je, dle literární rešerše obsažené v teoretické části této diplomové práce, vytvářena zejména pro zvýšení mechanických odolností celkového kompozitního materiálu. Nicméně tento materiál nachází uplatnění i s ohledem na zlepšení migrace buněk podél vláken či vnitřní organizace buněk v hydrogelu. Též umožňuje lepší adhezi buněk na tento materiál, ať už při použití jako nosič buněk či kryt rány. Konkrétní požadavky na výsledné materiály, kombinující vlákna a hydrogel, musí být vždy specificky stanoveny s ohledem na finální aplikaci daného materiálu.

Elektrostaticky zvlákněné materiály přinášejí do kompozitu relativně vysokou plochu povrchu a variabilitu či modifikovatelnost ve složení, velikosti či topografii. Hydrogely pak vnáší svou trojrozměrnou síť zadržující vodu a vytváří vhodné prostředí z chemického i biologického hlediska. I jednotlivě tyto složky prokazují svůj potenciál ve dvou aplikačních oblastech medicíny, a to v oblasti regenerace tkání a dodávání léčiv. Avšak tyto jednotlivé aplikace stále mohou narážet na určité problémy. Výzvy v této oblasti zahrnují tvorbu materiálů, které by napodobovaly složitou strukturu a výstavbu nativních tkání, tedy napodobení extracelulární matrice neboli mezibuněčné hmoty. Současná dostupnost a rozmanitost elektricky zvlákněvaných materiálů a hydrogelů, spolu s jejich unikátními vlastnostmi, jistě nabádá k jejich kombinování a překonávání individuálních nedostatků.

Tato diplomová práce přináší netradiční postup inkorporace vláken do hydrogelu, a to pomocí elektrostatického zvláknování přímo do roztoku polymeru vhodného pro následné fyzikální síťování. Vybrané finální vzorky hydrogelu s inkorporovanými vlákny byly samozřejmě základně testovány, aby byla prokázána charakteristika hydrogelu a cytokompatibilita výsledného kompozitu.

1. Teoretická část

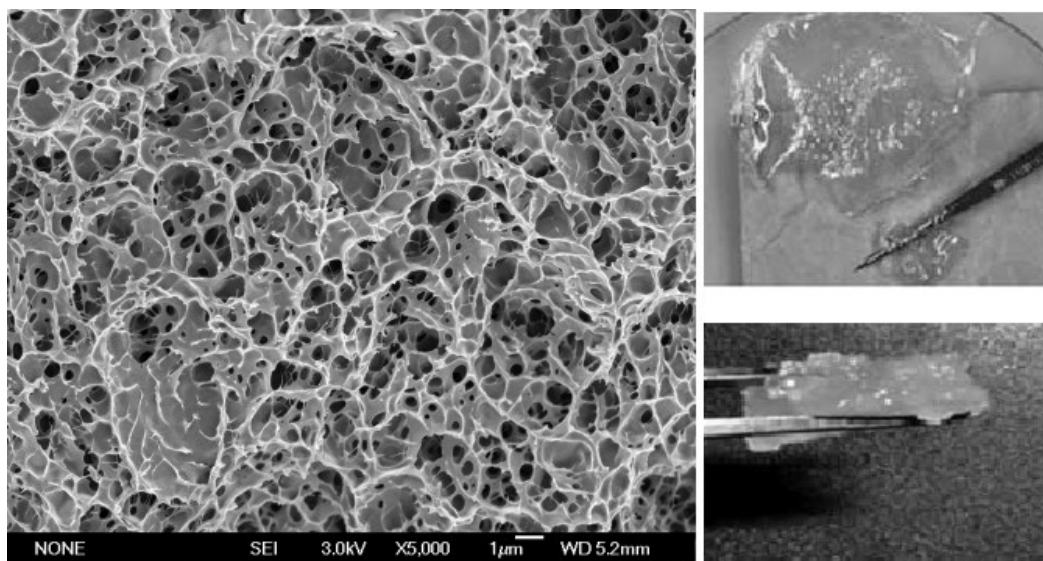
V této kapitole je shrnut celkový náhled na hydrogely, jejich použití a vlastnosti. Následně jsou popsány konkrétní postupy výroby hydrogelu s integrovanými vlákny, tak jako následná aplikace výsledného produktu.

1.1. Hydrogely

Hydrogely jsou vodou nabobtnalé (nabobtnalé či zbotnalé) zesíťované polymerní struktury obsahující buď kovalentní vazby vytvořené jednoduchou reakcí jednoho nebo více komonomerů, nebo fyzikálně zesíťované sekundární (nevazebné) interakce mezi řetězci, případně zesíťované krystality spojující dva nebo více makromolekulární řetězce [1]. Jedná se o jedinečný typ měkkého materiálu tvořeného hydrofilní polymerní sítí, který dokáže zadržet (právě zbotnáním) až 99 hm% vody (tedy výsledný hydrogel poté tvoří 1 hm% sušiny a 99 hm% vody) a to bez rozpouštění nebo rozpadu polymeru ve vodě [2]. Hydrogely jsou tedy trojrozměrné struktury tvořené zesíťovanými hydrofilními polymerními řetězci, které tvoří celek nebo alespoň část, ve vodném prostředí. Hydrofilní vlastnosti těchto materiálů jsou důsledkem přítomných skupin vykazujících afinitu k vodě (-H, -COOH, -CONH₂, -CONH, -SO₃H) a díky 3D struktuře uspořádání polymerních zesíťovaných řetězců dochází k zajištění stability materiálu ve vodě – tedy jeho nerozpustnosti.

Trojrozměrné struktury jsou tvořeny díky kovalentním vazbám mezi jednotlivými polymerními řetězci, nebo pomocí fyzikálních interakcí, jako například vodíkové můstky nebo van der Waalsovy interakce. K získání hydrogelů mohou být použity různé přírodní nebo syntetické hydrofilní monomery a síťovací činidla. Výsledné hydrogely mohou být klasifikovány jako chemické nebo fyzikální, iontové nebo neutrální, amorfní nebo semikrystalické a bioinertní nebo biologicky vstřebatelné. Obecně jsou hydrogely snadno připravovány ve formě 3D objektu podobného houbě, gelu, filmu nebo jako částicové systémy. Hydrogely představují řadu zajímavých vlastností pro použití ve formě biomateriálů, jako je propustnost tekutin, elasticita a jedna z nejdůležitějších je právě botnavost ve vodě, která charakterizuje jejich schopnost absorbovat a udržet vodu bez rozpouštění [3].

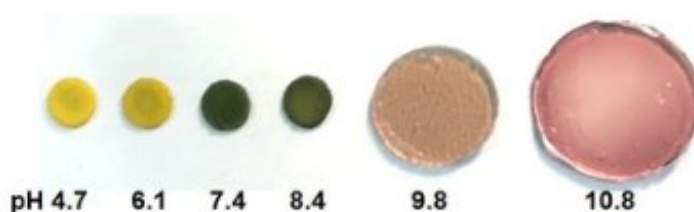
Hydrogely jsou v poslední době velmi zkoumány ať už jako dvou, nebo jako třídimenzionální scaffolds pro kultivaci buněk. Hlavní příčinou velkého zájmu je skutečnost, že dokáží napodobit přirozené buněčné prostředí a to jak chemické, tak fyzické – tedy extracelulární matrix (mezibuněčnou hmotu). Mohou být vyráběny ze syntetických polymerů, jako například polyethylenglykol, polyhydroxyethylmethakrylát, ale i z polymerů vyskytujících se přirozeně v přírodě. Mezi druhé zmíněné patří například kolagen, želatina, hyaluronan, heparin a chitosan. Jedná se o velmi užitečné 3D scaffolds pro tkáňové inženýrství, a to hlavně díky jejich vysokému obsahu vody a skutečnosti, že jsou schopné se tvořit i za přítomnosti buněk, proteinů a DNA. V závislosti na reaktivitě použitých materiálů může tvorba gelu probíhat změnou pH, změnou teploty, elektrostatickými interakcemi, kovalentními vazbami, nekovalentními interakcemi nebo polymerací. [4] Na obrázku 1 je pro představu zobrazen vysušený hydrogel ze směsi PVA/PNIPA (poly(vinylalkohol)/poly(N-isopropylacrylamide) a hydrogel vyrobený z PVA a derivátu celulózy.



Obrázek 1 Vlevo SEM snímek vysušeného hydrogelu vytvořeného ze směsi PVA/PNIPA; převzato z [5], měřítko představuje 1 µm; vpravo fotografie hydrogelu vyrobeného z PVA a derivátu celulózy; převzato z [2] – vysušený hydrogel vpravo nahoře, zdobtný hydrogel vpravo dole

Základní charakteristikou hydrogelů je jejich botnání, které se děje ve třech krocích: I) difuze molekul vody; II) relaxace polymerních řetězců skrze hydrataci; III) expanze zesíťované polymerní sítě po relaxaci. Díky tomuto procesu jsou hydrogely schopny absorbovat vodu do určité maximální míry nebo meze, která se

nazývá rovnovážným obsahem vody v hydrogelu a závisí na interakci voda-polymer a na hustotě zesíťování. Botnání hydrogelů je také ovlivňováno různými změnami či nastaveními okolních podmínek nebo podmínek prostředí jako například teplotou, tlakem, kompozicí rozpouštědla, pH (viz obrázek 2), elektrickým potenciálem atd. [2]



Obrázek 2 Příklad změny botnání hydrogelu vyrobeného z polyethyleniminu v různých pH prostředích; převzato z [6]

1.2. Výroba hydrogelů

Hydrogely jsou připravovány botnáním zesíťovaných struktur ve vodě nebo biologických tekutinách. Při tvorbě vhodného hydrogelu s definovaným tvarem a strukturou, je nutné věnovat dostatečnou pozornost výběru polymerů, jejich tvorbě či postupu výroby a zpracování, jejich síťování atd. Během počáteční přípravy zesíťované struktury může být přítomna voda nebo vodné roztoky [2]. Hydrogely jsou většinou vyráběny z polárních monomerů nebo polymerů. Jak již bylo zmíněno výše, tyto monomery mohou být z hlediska jejich typu syntetické, přírodní, nebo kombinací obou typů. Výroba tedy závisí na jejich typu a jedná se o roubovanou polymerizaci, zesíťující polymerizaci, tvorbu sítě vodorozpuslných polymerů, zesíťování radiací, atd. [7]

Pro přípravu hydrogelů jsou používány, v závislosti na technikách síťování a dalšího zpracování, různé způsoby či postupy. Rozlišují se zejména s ohledem na postup či základní principy na fyzikální a chemické. Tyto způsoby syntézy mohou zahrnovat jednostupňový proces, jako je polymerace a současné zesíťování vícefunkčních monomerů, nebo dvoustupňové či víceetapňové procesy, zahrnující syntézu polymerních molekul obsahujících reaktivní funkční skupiny a jejich následné zesíťování pomocí síťujících činidel či procesů. Proto mohou být hydrogely navrženy a syntetizovány s řízenou strukturou sítě na molekulární úrovni pomocí vhodných hustot zesíťování a způsobů zpracování pro získání požadovaných

vlastností finálního materiálu. Jednotlivé postupy tvorby hydrogelů jsou stručně popsány níže. [2]

1.2.1. Blokovaná polymerace

Jedná se o nejjednodušší výrobu hydrogelu, pro kterou je potřeba pouze monomer a jeho iniciátor. Samotná polymerace probíhá přidáním síťovadla do hydrogelního roztoku a následnou iniciací. Zmíněným iniciátorem bývá při této polymeraci radiace, UV záření, nebo chemický katalyzátor, který je volen dle použitého typu monomeru a použitého rozpouštědla. Díky velké rozmanitosti monomerů je možné vytvářet hydrogely s požadovanými fyzikálními vlastnostmi pro jejich následné užití. Výsledkem blokované polymerace je velmi pevná skelná a průhledná matice, která po ponoření do vody nabobtná, čímž se stane měkkou a ohebnou. Jediným problémem při této výrobě je výrazný nárůst viskozity výsledného polymeru, jelikož vyvolaná reakce generuje během polymerace velké množství tepla. Tento problém se ovšem dá odstranit kontrolovanou polymerací za nízké přeměny [8]. Bohužel ale hydrogely získávané blokovou polymerací mají obecně křehkou strukturu. Aby došlo ke zlepšení mechanických vlastností, může být hydrogel během blokované polymerace roubován na stabilnější nosný povrch. Dochází k uvolňování volných radikálů, které jsou přitahovány na stabilní nosník, kde následně dojde k polymeraci přímo na povrchu, a to díky kovalentním můstkům vznikajícím během řetězové reakce. K syntetizování hydrogelu pomocí roubování bylo použito mnoho různých polymerních nosníků, jak je dále uvedeno v [9].

1.2.2. Polymerace z roztoku

Při procesu roztokové kopolymerace/síťovací reakce mezi sebou reagují ionické nebo neutrální monomery se síťovacím činidlem. Polymerace je následně iniciována termálně buď ozařováním UV světlem, nebo redukčně oxidační reakcí iniciačního systému. Obrovskou výhodou oproti blokované polymeraci je fakt, že zde rozpouštědlo působí jako ochlazovací medium, nedochází tedy k další iniciaci uvolňováním tepla. Typickými rozpouštědly jsou voda, ethanol, jejich směsi, a benzyl alkohol. Pokud jsou použita rozpouštědla syntetická, je nutné je po vytvoření hydrogelu vymýt botnáním ve vodě. Výsledný hydrogel je nutno důkladně a opakovaně opláchnout destilovanou vodou, aby došlo k odstranění zbylých

monomerů, vzniklých oligomerů, zbytků síťovacího činidla, iniciátoru, a zbylých nečistot. [7]

1.2.3. Polymerace ze suspenze nebo inverzní suspenze

Tento typ polymerace je pokročilou metodou, při které hydrogel vzniká v podobě prášku nebo mikrokuliček. Monomery jsou spolu s iniciátorem rozmíchány v uhlovodíkové fázi do homogenní směsi a následně může dojít k polymeraci. Vzhledem k většímu užívání systému voda v oleji, namísto obvyklého systému oleje ve vodě, se tato metoda nazývá polymerací z inverzní suspenze. Viskozita monomerního roztoku, rychlost míchání, konstrukce rotoru, a dispergační činidlo jsou určovány výhradně podle velikosti a tvaru částic disperze. Detailnější popis polymerace z heterofáze byl zpracován v [10] a [11]. Disperze je termodynamicky nestabilní, proto je nutné, aby byl systém neustále míchán a byl zajištěn přísunek slabého činidla zajišťující hydrofilně lipofilní rovnováhu. [11]

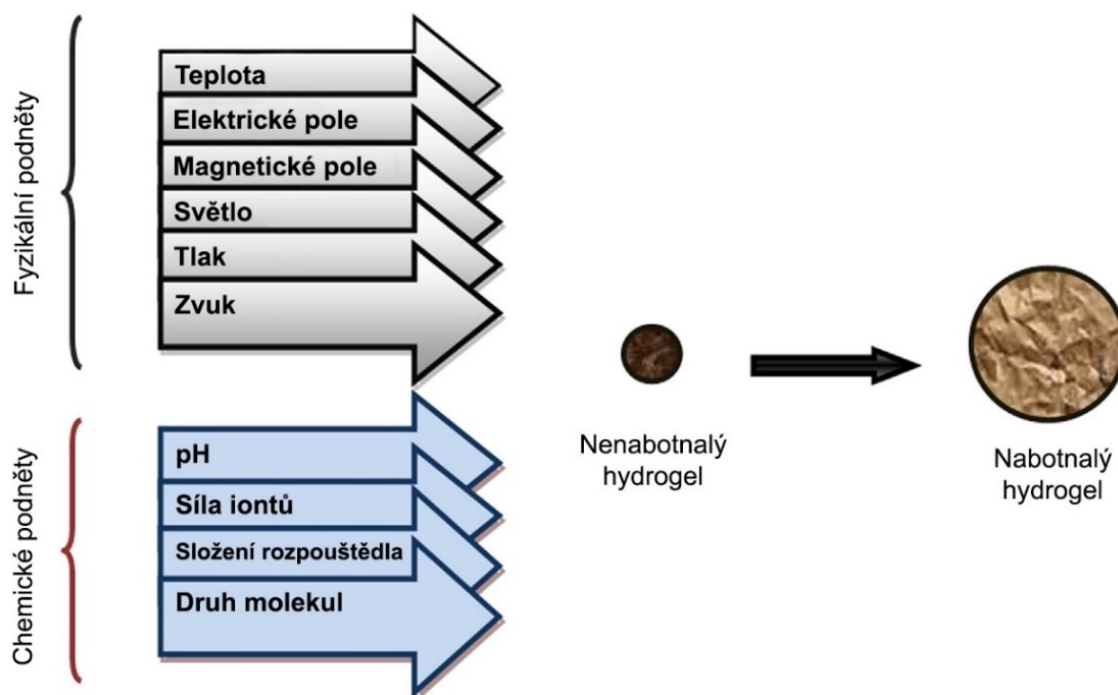
1.2.4. Polymerace ozařováním

K přípravě hydrogelů z nenasyčených sloučenin se dá využít vysokoenergetické ionizující záření, jako třeba gama a elektronové paprsky. Ozařováním vodného polymerního roztoku dochází k formování radikálů na polymerních řetězcích. Následnou radiolýzou molekul vody dochází k formování hydroxylových radikálů, které svým působením dávají vzniknout makroradikálům. Jejich další rekombinace s různými polymerními řetězci má za následek vznik kovalentních vazeb, čímž je vytvořena výsledná zesíťovaná struktura hydrogelu. Pro tento typ přípravy hydrogelu se nejvíce využívá PVA, PEG a PAA. Největší výhodou této metody je relativně čistý hydrogel bez jakéhokoliv iniciátoru. [12]

1.2.5. Síťování polymerních řetězců

Pro dvoustupňovou přípravu hydrogelů jsou používány polymerní roztoky a síťovací prostředky či metody, které se dělí na fyzikální a chemické. V souvislosti s tím se mění i vlastnosti, a tím i možné aplikace hydrogelů. Při přítomnosti kovalentních vazeb mezi polymerními řetězci se hovoří o chemicky zesíťovaných hydrogelech, kde se jedná o permanentní nebo nereverzibilní materiály. Pokud naopak dochází k fyzikálním interakcím mezi polymerními řetězci, jsou výsledné hydrogely označovány za fyzikální, tedy nepermanentní neboli nestálé, které je

možné zničit manipulací, vlivem aplikace napětí nebo určitými fyzikálními podmínkami [13]. Cílem použití jak fyzikálního, tak chemického síťování polymerních řetězců, je bezpochyby zabránění rozpouštění materiálu před, či v průběhu jeho použití [2]. Schématické zobrazení jednotlivých způsobů tvorby hydrogelů síťováním polymerních materiálů je uvedeno na obrázku 3.



Obrázek 3 Způsoby síťování polymerních řetězců pro tvorbu hydrogelu; převzato z [7], upraveno

1.3. Polymery pro výrobu hydrogelů

V této kapitole jsou popsány vybrané polymerní materiály, syntetické i přírodní, používané pro tvorbu hydrogelů. Zajímavou skupinou polymerů jsou právě ty přírodní, jelikož se velmi blíží složení extracelulární matrix. [3]

Hydrogely jsou vodou nabotnalé, zesíťované polymerní struktury obsahující buď kovalentní vazby vznikající jednoduchou reakcí mezi jedním nebo dvěma komonomery, fyzikálním zapletením řetězců, nebo nevazebnými interakcemi, jako například vodíkovými můstky nebo van der Waalsovými interakcemi mezi řetězci. Mohou být rozděleny do několika kategorií, a to podle způsobu přípravy, nabitých iontů, nebo vlastností fyzikální struktury. Podle způsobu přípravy je možné rozeznávat homopolymerní hydrogely, kopolymerní hydrogely, multipolymerní hydrogely, nebo navzájem pronikající polymerní hydrogely. U homopolymerních hydrogelů se jedná o zesíťované řetězce jednoho druhu hydrofilních monomerních

jednotek, oproti tomu u kopolymerních hydrogelů jsou takto zesít'ovány dva druhy komonomerů, přičemž alespoň jeden z nich musí být schopen zajistit botnavost výsledného hydrogelu – tedy musí být hydrofilní. Multipolymerní hydrogely vznikají reakcí tří a více komonomerů. Navzájem pronikající polymerní hydrogely jsou vyrobeny nejprve přípravou sítě, která je následně ponořena do monomeru a druhý použitý polymer vytvoří vzájemně se prolínající strukturu. [14]

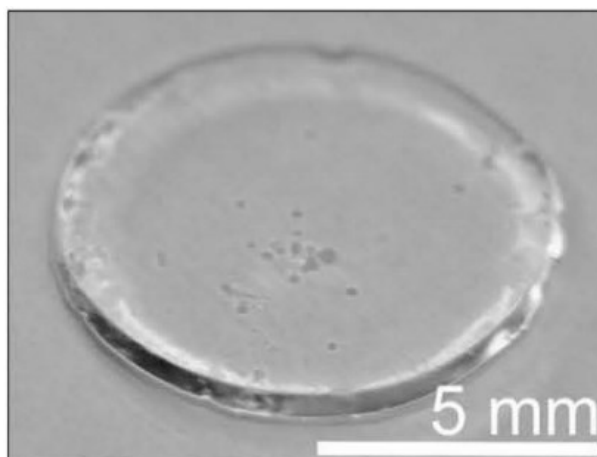
Velmi často používaným způsobem výroby se stala metoda mražení a rozmražení vznikající hydrogelu, tedy freeze-thaw. Při této metodě se cyklicky opakuje doba v mrazu s dobou například v pokojové teplotě. Tato metoda je popisována zejména u vodných roztoků PVA (hydrofilní polymer dále popsán v kapitole 1.3.5) [13]. Toto fyzikální sít'ování hydrogelů zahrnuje silné vodíkové vazby mezi polymerními řetězci za vzniku krystalitů. Míru zesít'ování, a tím i mechanické vlastnosti (tvrdost, elasticitu, pevnost atd.), je možné řídit nastavením procesu zmrazení a rozmrazování [2]. Jedná se v podstatě o proces „krystalizace“ v homopolymerním materiálu a v některých publikacích je výsledný hydrogel nazýván kryogelem [15]. Hydrogely vyrobené touto metodou mají zajímavé vlastnosti pro použití v medicíně zahrnující vhodnou mechanickou pevnost a stabilitu při pokojové teplotě a to při absenci toxických iniciátorů nebo sít'ovacích činidel [16]. Příklady nastavení freeze-thaw postupu pro vodné roztoky PVA jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1 Příklady postupu freeze-thaw pro fyzikální síťování vodných roztoků PVA pro tvorbu hydrogelů a jejich nastavení

Dodavatel PVA	Stupeň hydrolyzy /molekulová hmotnosti	Koncentrace vodného roztoku PVA	Cyklus	Počet cyklů	Odkaz na literaturu
Chemical Plant Rasnov (Rumunsko)	98%/ 48600g/mol	12 hm%	12h při - 20°C a 12 při 20°C	3	[15]
Acros Organics (USA)	98% / 95000 g/mol	10, 12, 14, 16 hm%	při 0°C a při 37°C (hodinový interval neuveden)	15, 30 a 45	[17]
Merck Chemicals (Darmstadt, Německo)	98%/ 72000 g/mol	16hm%	20h při -20°C a 4h při 25°C	4	[18]
Aldrich, ref 36315-4 (země neuvedena)	98-99%/ 115 000 g/mol	11 hm%	20h při -22°C a 4h při 25°C	1 - 9	[19]
Sigma Aldrich (Itálie)	99% / 85000-146000g/mol	10hm%	1h při -20°C a 30min při pokojové teplotě (při prvním cyklu ponecháno při -20°C přes noc)	8	[20]
Aldrich (USA)	87-89% / 85000-124000 g/mol	9hm%	18h při -15°C a 6h při 25°C	3	[16]

1.3.1. Polyethylenglykol

Jedná se o syntetický hydrofilní polymer, který může díky zesíťování zadržet velký objem vody. Dále je to materiál vhodný k biologickým aplikacím, jelikož normálně nedochází k žádným imunitním reakcím. Již od 80. let 20. století se PEG používá ke zvýšení rozpustnosti, snížení toxicity, a k prodloužení doby života terapeutických bílkovin a peptidů. Koncem 80. let se začalo s experimenty PEG hydrogelů pro pěstování buněk. Tyto hydrogely jsou chemicky velmi dobře definované a pro jejich tvorbu i modifikace lze použít více druhů chemikálií. Síťování hydrogelu závisí na koncích řetězců makromerů PEGu, nejčastěji však dochází k síťování přes reaktivní vinylový konec, který je polymerizován iniciátorem volných radikálů. Další možností síťování je iniciace redukčně oxidační reakcí, která generuje volné radikály, nebo radikály generované světlem. [21] Na obrázku 4 je zobrazen hydrogel právě z tohoto polymeru.



Obrázek 4 Hydrogel vyrobený z polyethylenglykolu určený pro aplikaci v tkáňovém inženýrství; převzato z [22]

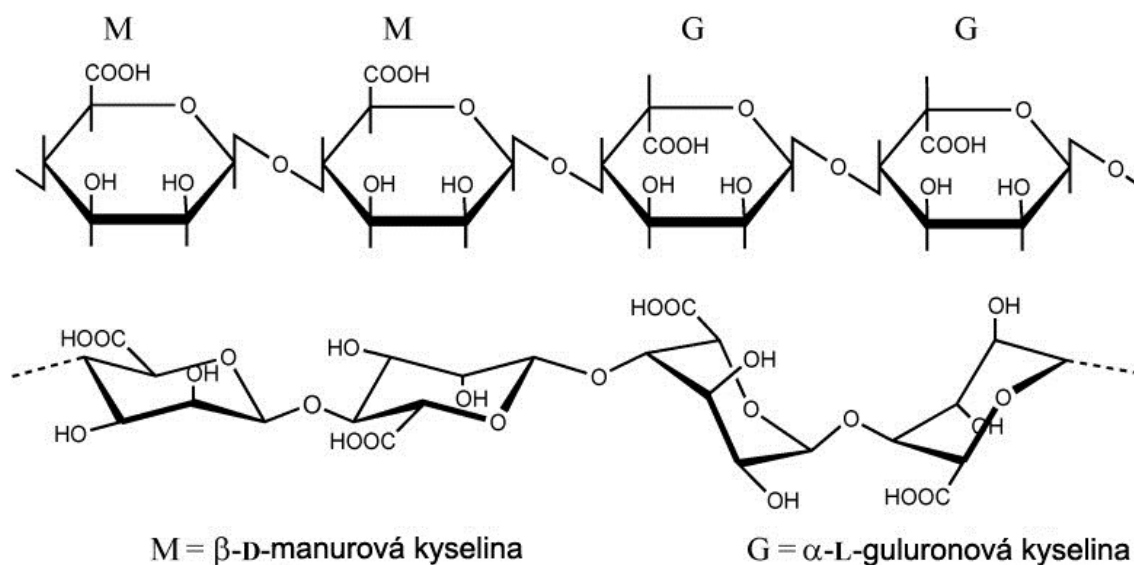
1.3.2. Želatina

Želatina je ve své podstatě derivátem z kolagenu, který je ze všech proteinů obsažen v těle nejvíce. Ve srovnání s prekurzorovým kolagenem vykazuje želatina mnohem nižší antigenicitu, což obvykle bývá problémem u kolagenu živočišného původu. Jedná se o obecně neimunogenní polymer, který je schopen uchovat si informační signály, jako například sekvenci kyseliny arginin-glycin-aspartové (RGD), díky které je podporována buněčná adheze, diferenciací a proliferací. Tyto vlastnosti a jeho jedinečná schopnost tvorby gelu činí želatinu zajímavým biopolymerem pro aplikace tkáňového inženýrství. Avšak čistá želatina se zřídka používá jako scaffold pro mechanicky extrémně namáhané tkáně. Zejména použití pro kloubní chrupavky se u ní jeví nemyslitelným, právě díky špatné mechanické pevnosti. [23]

1.3.3. Algináty

Komerčně dostupné algináty jsou extrahovány z hnědých mořských řas. Dále je možné je získat fermentací určité bakterie. Tento způsob se však příliš pro komerční účely nepoužívá. Roční produkce alginátů vyrobených z řas se odhaduje na zhruba 38 tisíc tun celosvětově a největší část jde do potravinářského a farmaceutického průmyslu. Algináty se též používají v biomedicíně, nejvíce k hojení ran, kostním štěpům nahrazujících páteřní fúze, buněčným terapiím, a zvětšení stěny levé srdeční komory u pacientů s dilatační kardiomyopatií. Jedná se o polysacharidy, které jsou tvořeny z lineárních kyselin manurové a guluronové, viz obrázek 5. Bloky se značně liší délkou a rozložením v závislosti na tom, z jakého

druhu a z jaké části řas se algináty extrahují. Chemické složení a distribuce bloků v alginátové molekule hraje hlavní roli v jejich schopnosti vytvářet iontové gely.



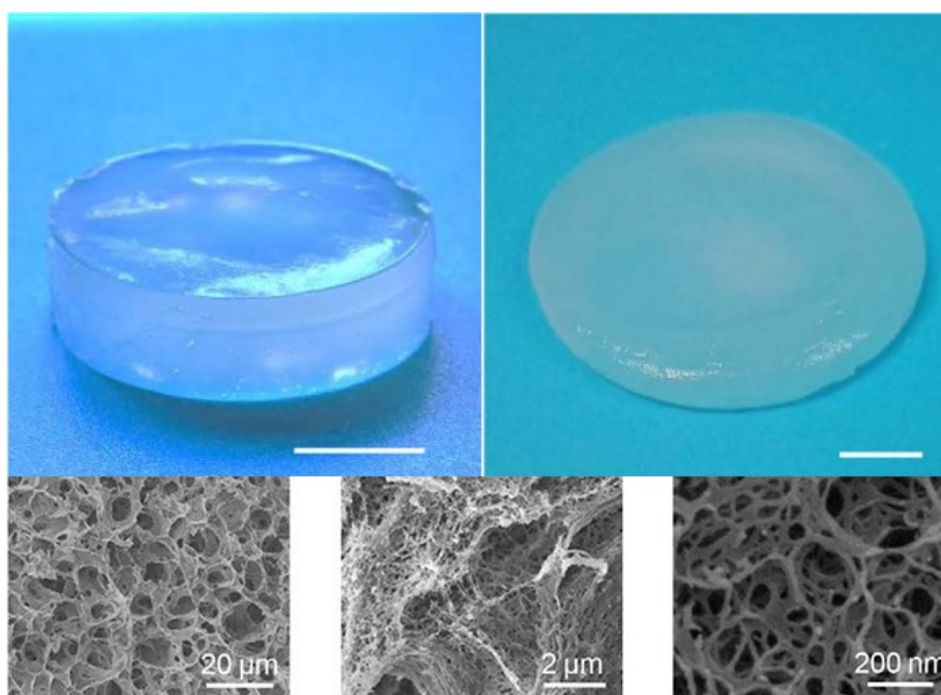
Obrázek 5 Struktura alginátů; převzato z [24]; upraveno

Bloky kyseliny guluronové jsou klíčovými strukturálními prvky v alginátových hydrogelech, ale k tvorbě gelu mohou přispívat také bloky střídavé. Výsledné vlastnosti hydrogelů mohou být ovlivněny výběrem typu a množství iontů, které gel tvoří. Tohoto může být využito i pro optimalizaci elasticity, botnání, a stability hydrogelů. Tyto vlastnosti mohou být též vylepšeny výběrem typu a koncentrace alginátu. Obecně se zvýšením obsahu a délky G bloků zvýší pružnost, pórovitost a stabilita gelu. Poréznost alginátové gelové sítě je na nanoúrovni v rozmezí 5–200 nm a je laditelná. To umožní buněčný přístup k živinám a odstranění odpadních produktů a syntetizovaných produktů, jako jsou inzulin, dopamin, endostatin a nervové růstové faktory. [24]

1.3.4. Chitosan

Díky svým reaktivním aminoskupinám je chitosan jediným přírodním kationtovým polymerem, a zároveň má mnoho komerčních aplikací, jako například urychluje hojení ran, je antimikrobiální, antikoagulační, antibakteriální, protiplísňový a hemostatický. Obecný název, tedy chitosan, popisuje řadu pravděpodobně čistých poly- (beta-1-4) N-acetyl-D-glukosaminových materiálů, jejichž vlastnosti jsou vysoce závislé na stupni jejich deacetylce; průměrné molekulové hmotnosti, polydisperzité, a jejich struktuře. Chitin je přírodní

polysacharid, který byl poprvé identifikován v roce 1811 francouzským chemikem Henri Braconnotem. Tvoří součást extracelulární matrice určitých živých organismů, jako je například proteoglykan. Je syntetizován enormním počtem živých organismů, mezi které se řadí i hmyz a korýši. Dále též hlavonožci, jejichž vedlejší produkty jsou cenným zdrojem chitinu, polynenasycených kyselin a kolagenu. Chitin je též možné extrahovat z exoskeletu různých hlavonožců, jako třeba chobotnic, sépií a oliváků. Chitosan, který byl objeven a pojmenován roku 1859 Rogetem, se získává částečnou deacetylací chitinu v alkalických podmínkách, zároveň je též nejdůležitějším derivátem chitinu. Může být připraven z buněčných stěn hub pomocí fermentace, což se také stalo alternativním ekonomickým způsobem výroby tohoto polymeru. Chemické zesítnění hydrogelu je tvořeno kovalentními vazbami makromerů chitosanu a je nevratné. Hydrogelu se z chitosanu dá dosáhnout několika způsoby, mezi které patří chemické zesíťování pomocí různých aldehydů, síťování ultrafialovým světlem, chemickým a radiačním štěpením, hydrofobickou interakcí, polyelektrolytickou komplexací, a freeze-thaw cyklem [25]. Chitosanový hydrogel pro představu na obrázku 6.



Obrázek 6 Fotografie hydrogelu z chitosanu před (vlevo nahoře) a po (vpravo nahoře) stlačení; měřítko 1 cm; SEM snímky ilustrující strukturu hydrogelu dole; převzato z [26]

1.3.5. Polyvinylalkohol

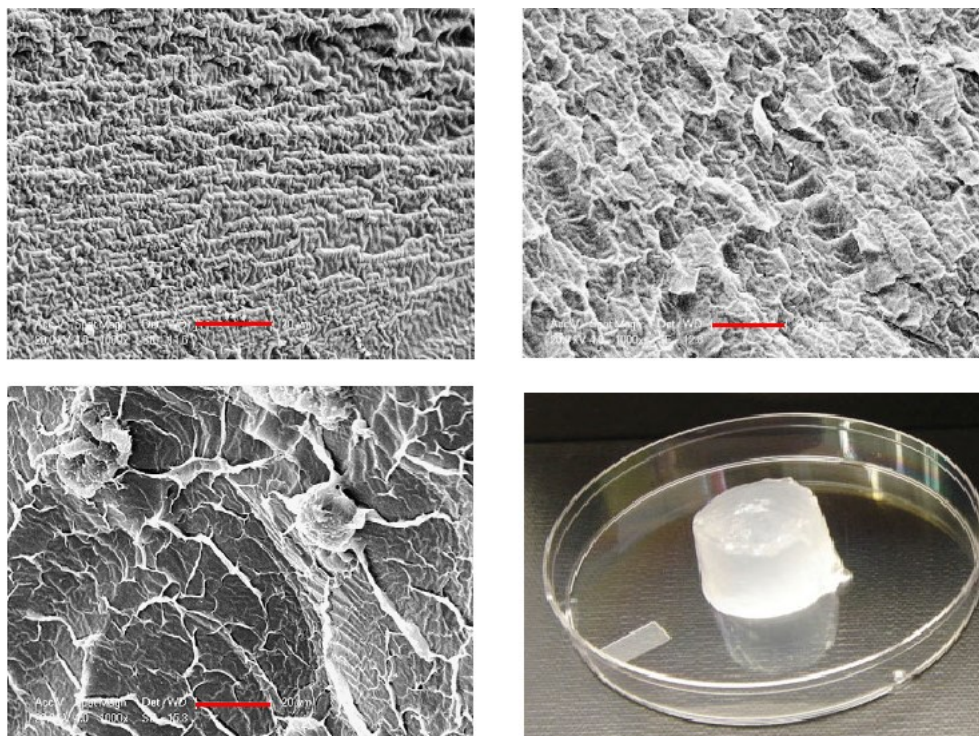
Polyvinylalkohol (PVA) je ve vodě rozpustný polymer, který vzniká hydrolýzou polyvinylacetátu a obsahuje mnoho polárních hydroxylových skupin na molekulárním řetězci. Tomuto polymeru je zde věnována delší část, neboť se jedná o výchozí polymer, který byl zvolen pro práci v experimentální části. Protože molekulární řetězec může snadno tvořit vodíkové vazby a má symetrickou pravidelnou strukturu, vykazuje dobrou tvorbu tenkých vrstev, rozpustnost ve vodě a emulgaci.

PVA je připravován ve dvou krocích kvůli nestabilní formě vinylalkoholů, jako monomerních jednotek, a) radikálovou polymerací vinylacetátu v alkoholovém roztoku a b) částečnou hydrolýzou polyvinylacetátu. Řízením kroku hydrolýzy lze připravit různé stupně hydrolýzy PVA polymeru a tím ovlivnit chování polymerního materiálu, jako například jeho rozpustnost, krystalinitu a chemické vlastnosti. PVA s nízkým stupněm hydrolýzy vykazuje vyšší rozpustnost ve vodě při nízké teplotě, s rostoucím stupněm hydrolýzy jeho odolnost roste též. V PVA mohou zůstat zbytkové acetátové skupiny oslabující intra- a intermolekulární vodíkové vazby sousedících -OH skupin. Pro PVA s vysokým stupněm hydrolýzy pak musí být teplota zvýšena výrazně nad 70 °C, aby došlo k rozpuštění ve vodném systému. Přítomnost zbytkových acetátových skupin pomáhá při krystalizaci řetězců PVA po tepelném zpracování. Proto je obtížnější krystalizovat PVA s vysokým stupněm hydrolýzy. [2]

Polyvinylalkohol má určitou hladinu biodegradovatelnosti, což znamená, že velmi záleží na použitém typu PVA, tedy zejména na jeho molekulové hmotnosti a stupni hydrolýzy, aby bylo možné ho klasifikovat jako biodegradabilní či pouze rozpustný v lidském těle. Tento polymer ale obvykle vykazuje skvělou biokompatibilitu. [2]

PVA hydrogely jsou v literatuře hojně aplikovány jako náhrady umělých cévních materiálů, a to hlavně díky jejich nízké cytotoxicitě, dobré biokompatibilitě, dobrým mechanickým vlastnostem a vysokému obsahu vody. Dokonce bylo prokázáno, že mechanické vlastnosti trubkovité struktury polyvinylalkoholu jsou velmi podobné vlastnostem prasečí aorty. Kromě toho mohou PVA hydrogely

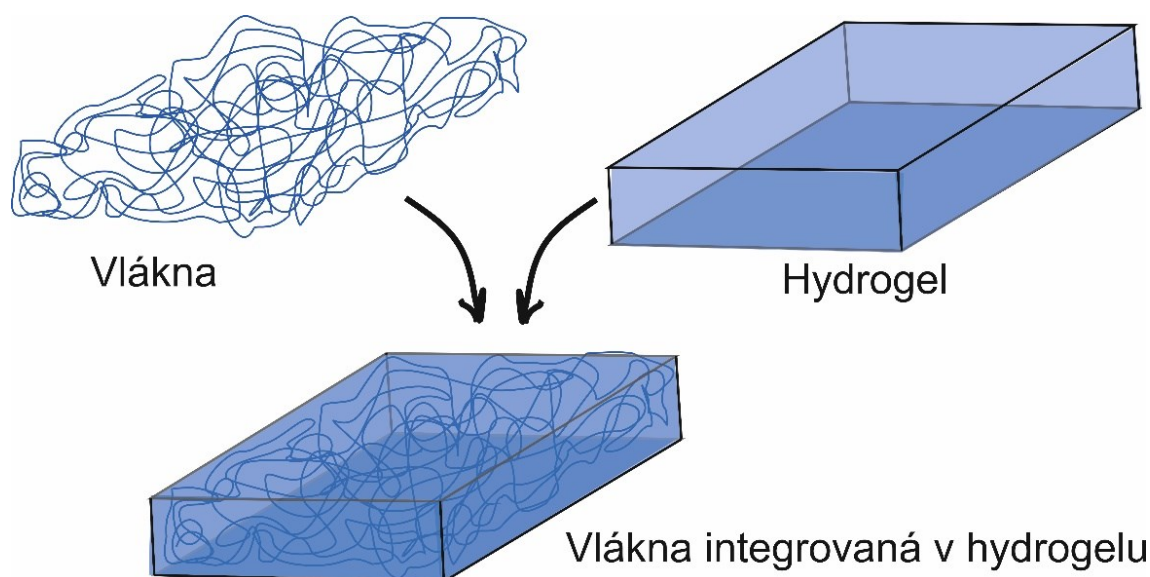
odpovídat mechanickým vlastnostem cévního systému. Zároveň s tím vědci zjistili, že přidáním různých dalších polymerů mohou zlepšit houževnatost, tuhost, biokompatibilitu, pórovitost a degenerační vlastnosti PVA gelů, čímž se rozšíří oblasti použití. Fyzikální zesíťení PVA hydrogelů se často připravuje opakovanou metodou freeze-thaw (blíže popsáno v kapitole 1.2.5). Snímky povrchů vysušených materiálů z PVA vyrobených touto metodou, nasnímaných pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu, jsou uvedeny na obrázku 7. [27]



Obrázek 7 SEM snímky povrchů PVA hydrogelů po různých počtech freeze-thaw cyklů; shora zleva jeden cyklus, tři cykly, pět cyklů; převzato z [28], měřítko 20 μm ; vpravo dole poté fotografie hydrogelu z PVA po síťování postupem freeze-thaw – tři cykly, 18 h při $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 6 h při $25\text{ }^{\circ}\text{C}$; převzato z [16]

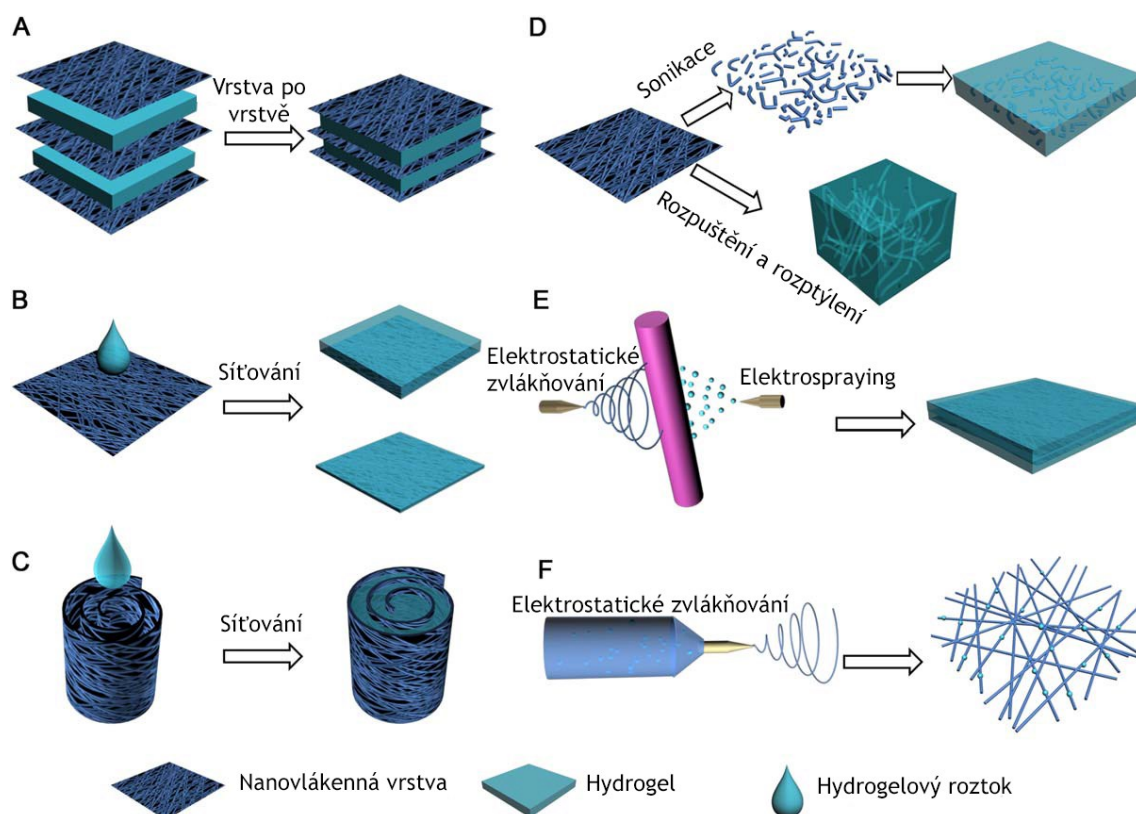
1.4. Hydrogely s integrovanými nanovláknky a mikrovláknky

Jak již bylo zmíněno, hydrogely jsou jedním z nejpoužívanějších trojrozměrných scaffoldů pro tkáňové inženýrství. Poslední dobou se ovšem ukazuje, že pokud je do nich možné inkorporovat nanovláknka nebo mikrovláknka, viz obrázek 8, dojde k výraznému zvýšení mechanických vlastností [29–31]. Dalším možným zkoumaným přínosem přítomnosti vláken je jejich schopnost napomáhat nebo ovlivňovat buněčnou aktivitu ve výsledném kompozitu díky značné podobnosti s extracelulární matrix. [32]



Obrázek 8 Základní náčrtek výsledného hydrogelu s vlákny

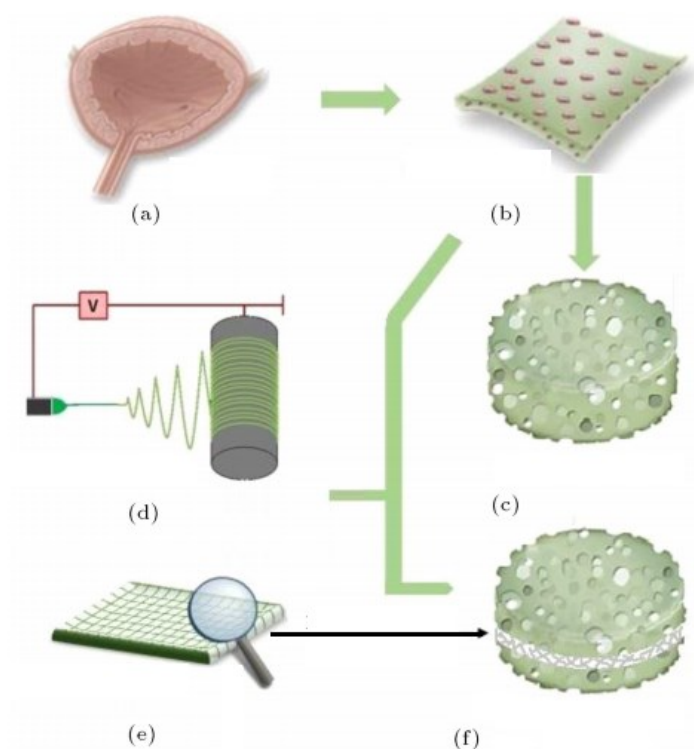
Kombinaci hydrogelu s vlákny je možno provést několika způsoby, které budou následně popsány. Vždy jsou však voleny dle konkrétních požadavků finálního produktu, například zda se bude jednat o nosič buněk pro rohovku či kolenní chrupavku nebo kryt rány. Schémata jednotlivých publikovaných postupů jsou uvedena v [33] a na obrázku 9. Zde je přehledově zobrazena většina již publikovaných procesů výroby kompozitu hydrogelu a nanovláken vyráběných převážně elektrostatickým zvlákněním. Jedná se zejména o postupy skládání vrstev hydrogelu a nanovláken (obrázek 9A), a převrstvení nanovláknenné vrstvy hydrogelem (obrázek 9B). Nanovláknenné vrstvy je možné skládat do prakticky jakéhokoliv tvaru, který může být následně použit jako podpurná konstrukce pro hydrogel, což je znázorněno na obrázku 9C. Pod písmenem D se ukrývá postup inkorporace elektrostaticky zvlákněných vláken, která jsou po zvláknění rozvolněna a vpravena do hydrogelu ještě před jeho zesíťováním. V tomto případě byla použita sonikace, tedy užití ultrazvuku k dokonalému promísení. Dalším způsobem je použití kombinace elektrostatického zvláknění a electrosprayingu hydrogelu, jak je znázorněno na obrázku 9E. Posledním, zde zobrazeným, způsobem je přímo elektrostatické zvláknění hydrogelního roztoku smíšeného s roztokem polymerním. Tak, jak je možné vidět na obrázku 9F, vznikají vlákna obalená kapičkami hydrogelu [9]. Díky podstatě výroby hydrogelu, tedy výrobě z kapalné fáze, je možné docílit smísení s nanovláknem předchozím trháním či řezáním nanovláknenné vrstvy. [18]



Obrázek 9 Schematická znázornění možných kombinací hydrogelu s elektrostaticky zvlákněnými nanovláknými; převzato z [33], upraveno

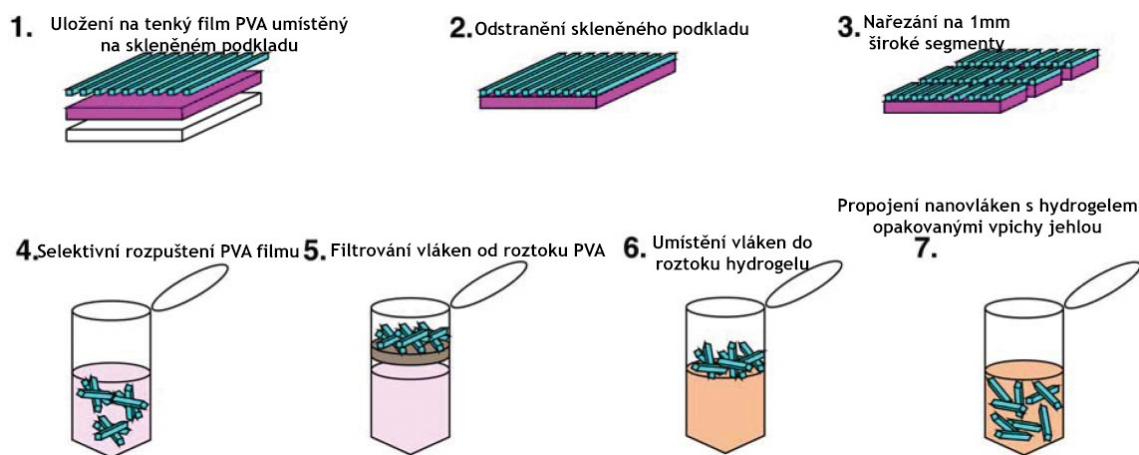
Kompozitu hydrogelu a elektrostaticky zvlákněných vláken se nejčastěji využívá pro tvorbu scaffoldů. Konkrétní publikace, věnující se kombinaci hydrogelu a nanovláknenných materiálů, budou představeny dále.

První vybraná studie představuje použití elektrostaticky zvlákněné vrstvy z polykaprolaktonu spolu s hydrogelem složeným přímo z tkáně močového měchýře krys. Takto bylo možné získat mechanicky stabilní hybridní strukturu, a to s přirozenou extracelulární matrix močového měchýře. Tato struktura byla připravena tak, že gel byl nejprve vpraven do válce, následně na něj byla nanесena elektrostaticky zvlákněná membrána, která byla nakonec opět povrstvena hydrogelem. Postup celého procesu je ilustrován na obrázku 10. Vysoká porozita elektrostaticky zvlákněné membrány, a velký povrch nanovláken, měl pravděpodobně pozitivní vliv pro zajištění integrace s hydrogelem. [34]



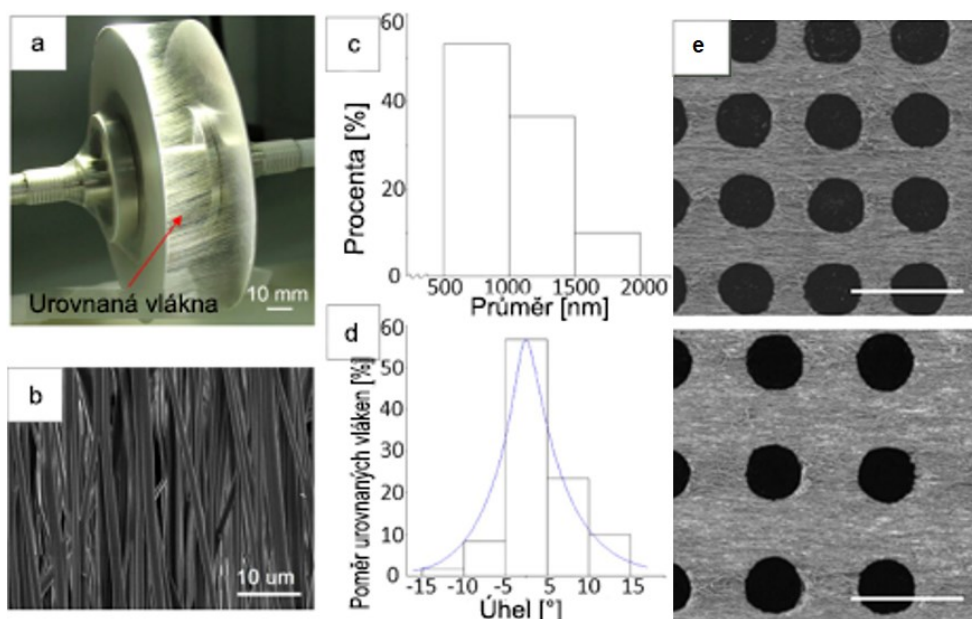
Obrázek 10 Výroba hybridního kompozitu: (a) močový měchýř, (b) tenký plátek nativní tkáně, (c) scaffold z decelularizovaného močového měchýře, (d) elektrostatičké zvlákňování, (e) nanovláknenná vrstva PCL, (f) finální hybridní kompozit; převzato z [34]

Další stručně představovaná publikace se zaměřila na zajištění lepší distribuce elektrostatičce zvlákňovaných vláken v rámci celého hydrogelu, a to pomocí rozdělení vláknenné struktury na jednotlivá vlákna, nebo alespoň pramínky vláken. Byl proveden pokus, při kterém byla elektrostatičce zvlákňovaná vlákna urovnávána a shromažďována na podklad s tenkým filmem polyvinylalkoholu. Ten byl použit jako separační činidlo. Podklad s uloženými urovnanými vlákny byl následně nařezán kolmo k orientaci vláken, na krátké segmenty přibližně 1 mm dlouhé, a PVA bylo z vláken odstraněno rozpuštěním ve vodě. Dispergovaná vlákna byla nakonec smísena s hydrogelem založeným na agaróze a methylcelulóze. Hydrogely obsahující elektricky zvlákňovaná vlákna vpravená tímto postupem do hydrogelu byla vyhodnocena jako vhodná platforma pro podporu regenerace poškozeného mozku. Schéma popisující postup výroby je zobrazeno na obrázku 11. [35]



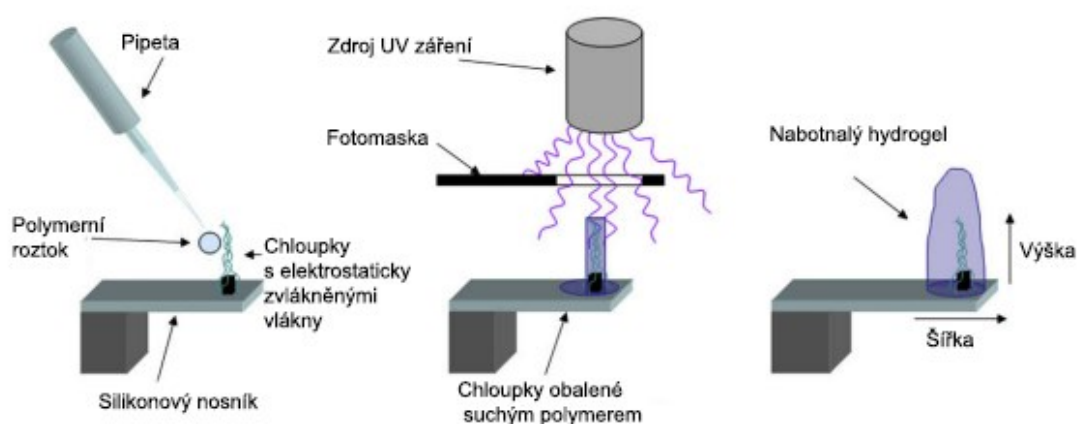
Obrázek 11 Způsob přípravy kompozitu výše zmíněným způsobem; převzato z [35], upraveno

Publikace, zaměřená na tvorbu scaffoldů s větší průhledností, popisuje využití elektrostatických nanovláken v kombinaci s hydrogelem pro tvorbu tkáně rohovky. U elektrostaticky zvlákněných membrán s větší plošnou hmotností je nutné vytvoření otvorů, aby došlo ke zvýšení průhlednosti výsledného kompozitu. U membrán z urovnaných elektrostaticky zvlákněných nanovláken je možné použít laser, aby mohlo dojít k vytvoření perforací. Takto perforovaná elektrostaticky zvlákněná PLGA membrána může být vložena mezi dvě vrstvy kolagenového hydrogelu a stlačena, čímž je docíleno kýženého kompozitu. S perforací byla optická propustnost 15krát vyšší než u kompozitu s neperforovanými membránami. Bylo zjištěno, že tento kompozit vykazuje optickou propustnost 63 % a tato hodnota se zvýšila na 72 % po 7 dnech ponoření do roztoku PBS [36]. Příprava nanovláknenné vrstvy, a laserem perforované vzorky z tohoto pokusu, jsou zobrazeny na obrázku 12.



Obrázek 12 Urovnaná zvlákněná vlákna s měřítkem 10 mm (a), SEM snímek takto zvlákněné vrstvy s měřítkem 10 μm (b), histogram průměrů (c) a úhlů (d) vláken, laserem perforované jednosměrně uspořádané nanovláknenné vrstvy z PLGA s různou hustotou na plochu s měřítkem 200 μm převzato z [36], upraveno

Přítomnost elektrostaticky zvlákněných nanovláken v hydrogelu popisuje další publikace, která prokazuje zvýšení mechanických vlastností hydrogelu právě díky přidání vláken. Bylo použito elektrostaticky zvlákněné PCL jako podporující scaffold vertikální stability stojícího nabotnalého PEG hydrogelu, který obklopoval uměle vytvořené senzorické chloupky. K lokální koncentraci elektrostaticky zvlákněných PCL vláken byl použit zaměřující kroužek, který tato vlákna dávkoval vertikálně na senzorické chloupky těsně předtím, než byla pokryta hydrogelem. S vláknennou podporou mohla být hydrogelová kapsule prodloužena až trojnásobně oproti hydrogelu bez podpory [37]. Schématický postup zobrazen na obrázku 13.

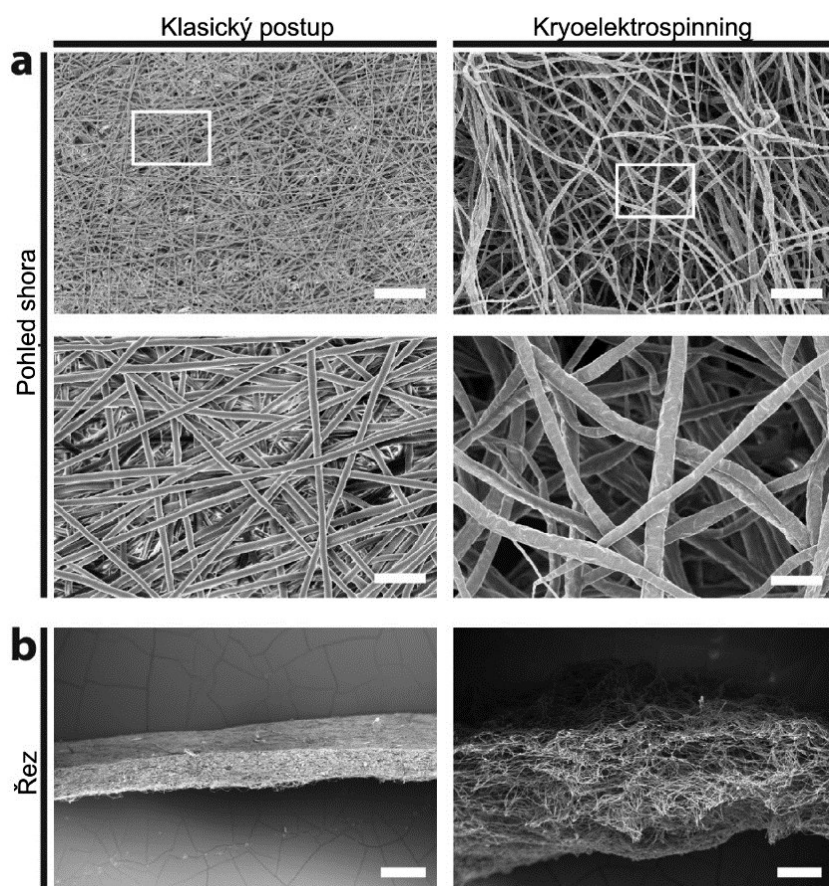


Obrázek 13 Schématický znázorněný postup přípravy uměle vytvořeného senzorického chloupku; převzato z [37], upraveno

Dalším pokusem kombinujícím nanovlákná a hydrogel byla inkorporace elektrostaticky zvlákněné příze vyrobené z PLLA-CL, která byla nasekána na úseky dlouhé přibližně 1 mm, a následně smíchána s hydrogelem z kolagenu. Paměťový modul kolagenního hydrogelu s nanovláknennou přízí byl mnohem vyšší než u čistého hydrogelu z kolagenu. [38]

Jelikož jsou hydrogely obecně založeny na vodní bázi, elektrostaticky zvlákněná membrána by měla být co nejvíce hydrofilní, aby mohlo dojít k plné integraci hydrogelového roztoku do pórů membrány. Bylo prokázáno, že PCL je příliš hydrofobní na to, aby bylo schopné jednoduše absorbovat hydrogel. Avšak použitím PGS (polyglycerol sebarát), přimíchaného do roztoku PCL, získala výsledná PCL membrána dostatečnou hydrofilitu, a tak mohlo k absorpci hydrogelu dojít. Následná kultivace buněk na takovém kompozitu zřejmě naznačuje, že buňky byly schopné proniknout až do vlákenné vrstvy, kdežto buňky kultivované pouze na elektrostaticky zvlákněné membráně zůstaly pouze na povrchu. K tomuto jevu došlo díky botnání hydrogelu, které napomohlo k otevření pórů mezi vlákny natolik, že byly buňky schopné prorůst do struktury. [39]

Veliká výhoda použití hydrogelu v kombinaci s elektrostaticky zvlákněným trojrozměrným scaffoldem spočívá v osazování buněk. Ty mohou být zapouzdřeny v hydrogelu a injekcí vpraveny do zmíněného scaffoldu. Tohoto jevu bylo využito při přípravě nezhuštěné sítě vláken při kryoelektrostatickém zvláknění PCL. Při tomto procesu jsou vlákna uchována na zachytávacím bubnu při teplotě -78 °C. Tím pádem dojde k vytvoření ledových krystalů na povrchu vláken, čímž se vytvoří bariéra pro další dopadající vlákna. Takto vznikne síť vláken s velkými mezerami mezi jednotlivými vlákny, do kterých je následně možné vpravit hydrogel osazený buňkami. Díky tomu je možné získat kompozitní scaffold s velmi rovnoměrnou distribucí buněk [40]. SEM snímky výsledných vlákenných vrstev zachytává obrázek 14.

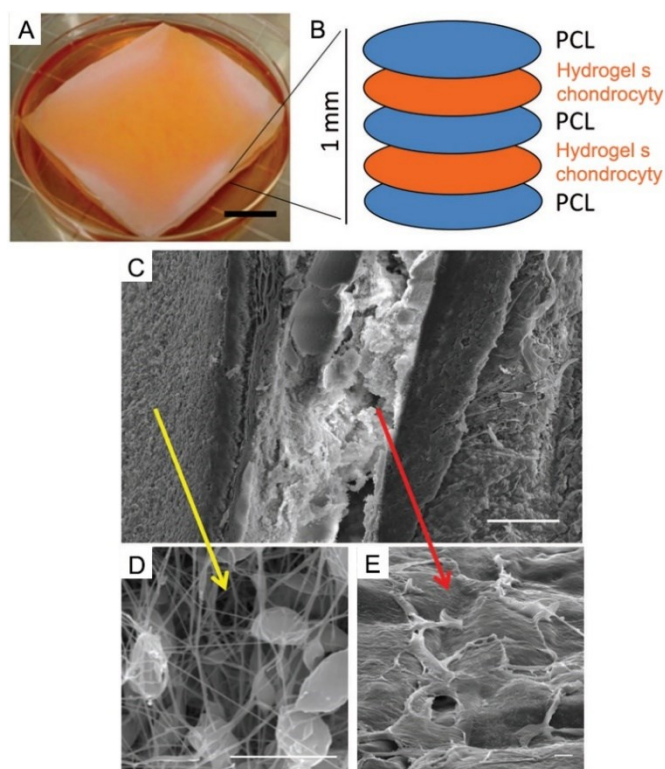


Obrázek 14 Celkový a detailní SEM snímek vrstev (a) a řez těmito vrstvami (b), na kterých je názorně vidět nárůst pórů a celkové tloušťky vrstvy; převzato z [40], upraveno; měřítka pro pohledy shora 50 μm a 10 μm , pro řezy 300 μm

Další výhodou kombinace hydrogelu s elektrostatickým zvlákňováním je možnost zapouzdření buněk do hydrogelu ještě před samotným kombinováním s elektrostaticky zvlákněnými vlákny. Tato výhoda nalézá největší uplatnění v klinických aplikacích, kde je nutná okamžitá inkorporace buněk do scaffoldu. Trypsinizovaným buňkám může trvat až několik hodin, než přilnou k povrchu, což je ale možné eliminovat právě napuštěním scaffoldu hydrogelem, díky kterému buňky adherují okamžitě. Zvláště výhodná je kombinace elektrostatického zvlákňování a tisku buněk, jež byly zapouzdřeny v hydrogelu. Ty jsou tisknuty vrstvu po vrstvě, dokud není docíleno trojrozměrného scaffoldu. Výsledná konstrukce sestávající z elektrostaticky zvlákněných PCL vláken a chondrocytů zapouzdřených do kolagen-fibrinového hydrogelu, vykazovala v in-vitro testech největší aktivitu chondrocytů hlavně v jádře chrupavky, kdežto u jejího vnějšího obvodu byla aktivita buněk minimální. Oproti tomu in-vivo studie na subkutánní imunodeficientní myši prokázaly přítomnost kolagenu typu II a GAG v celém scaffoldu. Toto je pouze jedna

z demonstrací poukazující na výhodnost užití hydrogelu s elektrostaticky zvlákněnými vlákny pro léčení tkání [41]. Jak bylo tohoto výsledku docíleno, je zobrazeno na obrázku 15.

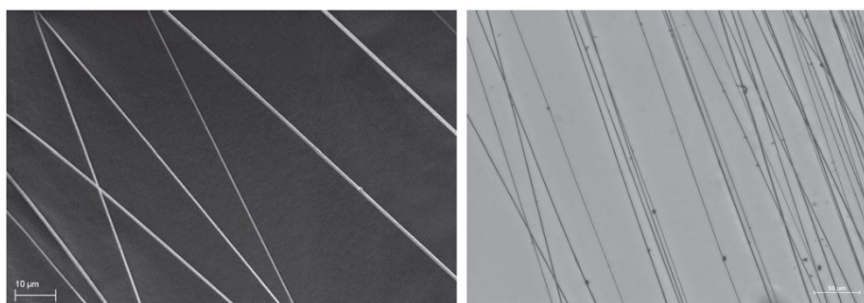
Velice podobně byla zkombinována elektrostaticky zvlákněná nanovláknina s hydrogelem tak, aby byla vytvořena hybridní struktura pro regeneraci chrupavky. Do hydrogelu z alginátu a kyseliny hyaluronové byly ve formě mikrotkáně zavedeny lidské mezenchymální kmenové buňky (hCMSCs) a lidské chondrocyty. Takto připravený systém byl umístěn pod nanovláknennou membránu naplněnou BMP-7. Membrána sloužila pro subchondrální opravu kosti, zatímco hydrogel sloužil k obnově chrupavky. [42]



Obrázek 15 Makroskopický pohled na vytištěný kompozit (A), schematický náčrt kompozitu PCL a hydrogelu s chondrocyty (B), SEM snímek řezu (C), na kterém je vidět vrstva kolagenu uprostřed mezi vrstvami PCL, SEM snímek ukazující strukturu PCL (D), SEM snímek znázorňující adhezi chondrocytů ke kolagenní matrixi; převzato z [41], upraveno, měřítko C 100 μ m, měřítka D a E 10 μ m

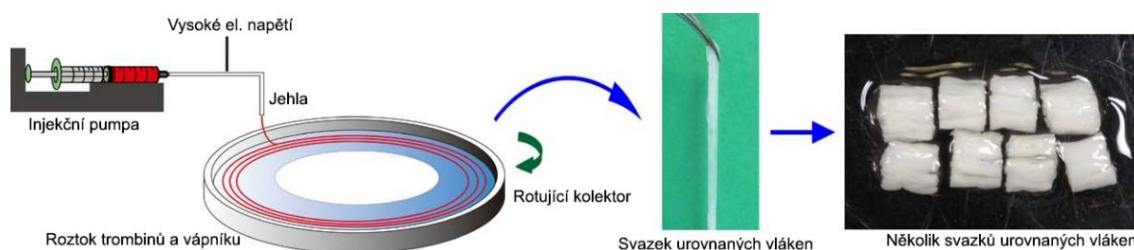
Jedním z omezení hydrogelu je neschopnost ovlivňovat směr buněčného růstu. Navzdory tomu, elektrostaticky zvlákněné scaffoldy, jsou schopny ovlivňovat růst buněk pomocí kontaktu s urovnanými vlákny. Vzhledem k tomu, že je možné snadno vytvořit trojrozměrné prostředí pomocí hydrogelu, smísením s elektrostaticky zvlákněnými vlákny může být stejně snadno dosaženo

usměrňování buněk do zvoleného směru. Kombinací hydrogelu kyseliny hyaluronové s elektrostaticky zvlákněnými urovnanými PCL vlákny, jež byly pokryty lamininem, došlo k podpoře největšího prodloužení neuronální kultury v porovnání se samostatnými urovnanými vlákny a samostatným hydrogelem kyseliny hyaluronové [43]. Snímky výsledných vláken pod rastrovacím elektronovým mikroskopem jsou zobrazeny na obrázku 16.



Obrázek 16 SEM snímek elektrostaticky zvlákněných vláken pokrytých lamininem vlevo, vpravo snímek z optického mikroskopu nanovláken ponořených v hydrogelu z kyseliny hyaluronové; měřítka 10 μm, převzato z [43]

Největším přínosem pro tkáňové inženýrství je fakt, že díky kombinaci elektrostaticky zvlákněné membrány s hydrogelem může dojít k napodobení přirozeného tkáňového prostředí. Konstrukci kompozitu hydrogelů a urovnaných fibrinů, které sestávají z urovnaného elektrostaticky zvlákněného PEG a fibrinového hydrogelu, je možné použít pro obnovu míchy. Přítomnost elektrostaticky zvlákněných vláken v hydrogelu pomáhá napodobovat mechanické vlastnosti nervové tkáně. Tím, že jsou elektrostaticky zvlákněná vlákna v hydrogelu urovnána, dochází k prodloužení neuritů, což napomáhá se zotavením míchy. Pokud dojde k porovnání laboratorní krysy, jež měla implantován hydrogel z urovnaných fibrinů, výsledkem bude zjištění, že k jejímu zotavení došlo výrazně rychleji, než tomu bylo u vzorku s náhodně uspořádanými elektrostaticky zvlákněnými vlákny ve fibrinovém hydrogelu [44]. Výrobní postup uveden na obrázku 17.



Obrázek 17 Schematicky znázorněný postup výroby urovnaných fibrinových vláken pro obnovu míchy; převzato z [44], upraveno

V následující tabulce 2 jsou přehledně sestaveny příklady jednotlivých kombinací materiálů nanovláken a hydrogelů, se zdůrazněním jejich konkrétních aplikací.

Tabulka 2 Přehled vybraných kombinací hydrogelu a nanovláken či mikrovláken pro užití v medicíně publikovaných v odborné literatuře

Materiál hydrogelu	Nanovláknový polymer	Forma nanovláken	Aplikace	Odkaz
decelularizovaný krysí močový měchýř	PCL	trhaná nanovlákná membrána	močový měchýř	[33]
kolagen	PLGA	orientovaná nanovlákná vrstva perforovaná laserem	rohovka	[36]
PEG	PCL	podpora uměle vytvořených syntetických chloupků	podpora	[37]
kolagen	PLLA-CL	elektrostaticky nasekaná příze na 1mm úseky	zvýšení paměťového modulu	[38]
kolagen s fibrinem	PCL	3D tisk	okamžitá adheze buněk	[41]
kyselina hyaluronová	PCL	urovnaná nanovlákná pokrytá lamininem	prodloužení neuritů	[43]
fibrin	PEG	elektrostaticky zvlákněná membrána	obnova míchy	[44]
kolagen	PLA	jednosměrně urovnaná nanovlákná vrstva	není uvedeno; cíl = orientace buněk	[45]
želatina a alginát	PCL	mikrovlákná vytvořená zvlákněním z taveniny	kolenní chrupavka	[30]
želatina	směs PCL/kolagen	kombinace nanovláken (elektrospinning) a hydrogelu (elektrospraying)	kostní tkáň	[46]

2. Experimentální část

Experimentální část této diplomové práce je zaměřena na možnou kombinaci vybraného polymeru ve formě vláken a hydrogelu, s cílem vytvořit biokompatibilní materiál pro aplikaci v medicíně, například jako kryt rány nebo nosič buněk. Pro tvorbu takto složeného materiálu byla použita kombinace dvou postupů – elektrostatického zvlákňování do kapaliny (wet electrospinning), v tomto případě do polymerního roztoku, a následné fyzikální síťování celé vytvořené směsi pomocí postupu freeze-thaw. Volba kombinace hydrofobního polymerního materiálu (PCL) pro tvorbu vláken a hydrofilního polymerního roztoku (PCL) pro přípravu hydrogelu, byla nejjednodušší výzvou.

Polykaprolakton byl pro tvorbu vláken zvolen převážně z důvodu autorových předešlých zkušeností z bakalářské práce, a to přímo s jeho elektrostatickým zvlákňováním na a do jednoduchých kapalin (voda, ethanol, kombinace voda/ethanol) jako kolektorů. PCL je relativně dostupný, dobře zvláknitelný materiál s vhodnými mechanickými vlastnostmi. Též se vyznačuje požadovanou biokompatibilitou a biodegradabilitou.

Pro co nejjednodušší a nejdostupnější tvorbu hydrogelu byly nejprve voleny dva materiály, a to rybí želatina a polyvinylalkohol, avšak v průběhu řešení práce se ukázal PVA jako vhodnějším řešením, zvláště kvůli nemožnosti jednoduchého síťování rybí želatiny bez přítomnosti dalších chemikálií. Výsledným materiálem tedy byla kombinace elektrostaticky zvlákněných PCL vláken a hydrogelu z PVA. Byl nalezen optimální postup výroby takto složeného kompozitu, a na finálních vzorcích byly provedeny vybrané dostupné analýzy. Protože v průběhu sestavování postupu výroby došlo k předpokladu, že by mohly ve výsledném hydrogelu zůstat zbytky toxických rozpouštědel z PCL roztoku, byl na závěr proveden test cytotoxicity.

2.1. Použité materiály

Tato kapitola obsahuje seznam všech materiálů, které byly v této práci použity. Dále též popisuje přípravu polymerních roztoků použitých k přípravě hydrogelů, které byly následně aplikovány jako kapalinový kolektor při elektrostatickém zvlákňování.

- Polykaprolakton, M_n 45,000 g/mol, CAS: 24980-41-4, Sigma Aldrich (PCL 45)
- Polykaprolakton, M_n 80,000 g/mol, CAS: 24980-41-4, Sigma Aldrich (PCL 80)
- Chloroform, CAS: 67-66-3, Penta
- Ethanol, CAS: 64-17-5, Penta
- Polyvinylalkohol, M_w 125,000 g/mol, 98 % hydrolýzy, CAS: 9002-89-5, Sigma Aldrich
- Želatina z kůží studenovodních ryb, CAS: 9000-70-8, Sigma Aldrich
- Roztok PBS (pro 1 litr)
 - 800ml dH₂O
 - 8g NaCl (Penta)
 - 0,2g KCl (Penta)
 - 3,63g Na₂HPO₄ * 12H₂O (Penta)
 - 0,24g KH₂PO₄ (Penta)
- Destilovaná voda, TUL

Prvním používaným polymerním roztokem pro elektrostatické zvlákňování byl 16 hm% PCL 45 v rozpouštědlovém systému chloroform:ethanol, v hmotnostním poměru 8 : 2. Následujícím zvlákňovacím polymerním roztokem byl 20 hm% PCL 45 rozpuštěn v totožném systému jako 16 hm% roztok. Posledním polymerním roztokem byl 10 hm% PCL 80 taktéž rozpuštěn v systému chloroform:ethanol 8 : 2 hmotnostně. Všechny tyto zmíněné materiály byly zváženy na laboratorních vahách KB 2000-2N (Kern, Balingen, Německo). Následně byly přeneseny na magnetické míchadlo a celý roztok byl míchán po dobu 24 hodin, za normální laboratorní teploty, při 300 ot/min.

Dále byly připravovány roztoky hydrogelů, jmenovitě tedy roztoky coldwater fish želatiny a polyvinylalkoholu. Oba tyto roztoky byly připraveny

v rozpouštědlovém systému dH₂O:ethanol, opět hmotnostně 8 : 2, a poté pouze rozpuštěny v dH₂O. Polyvinylalkohol bylo třeba připravit v olejové lázni při 80°C za stálého míchání na magnetickém míchadle při 350 ot/min, což je zobrazeno na obrázku 18.



Obrázek 18 Příprava vodného roztoku PVA v olejové lázni na magnetickém míchadle

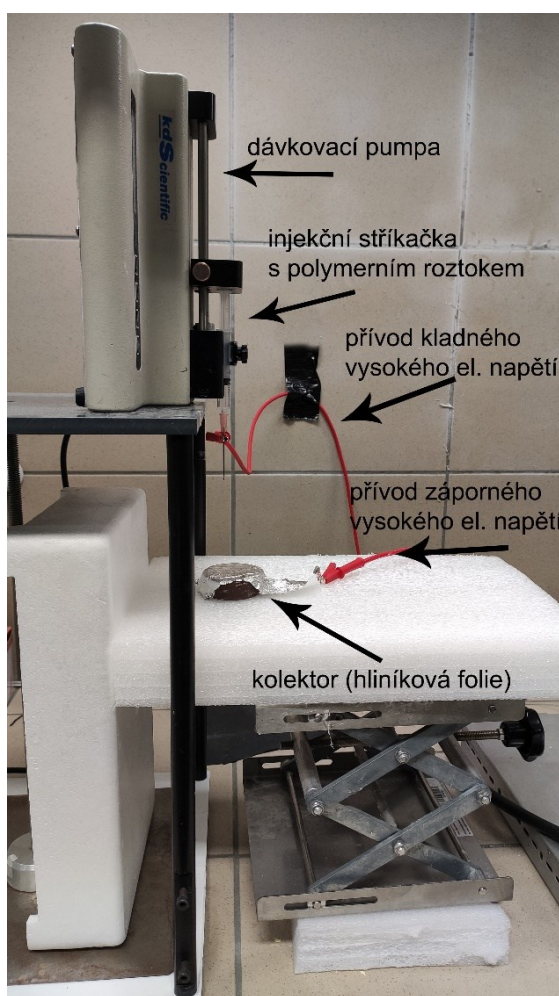
2.2. Použité metody

V této kapitole jsou obsaženy postupy užití v tomto experimentu.

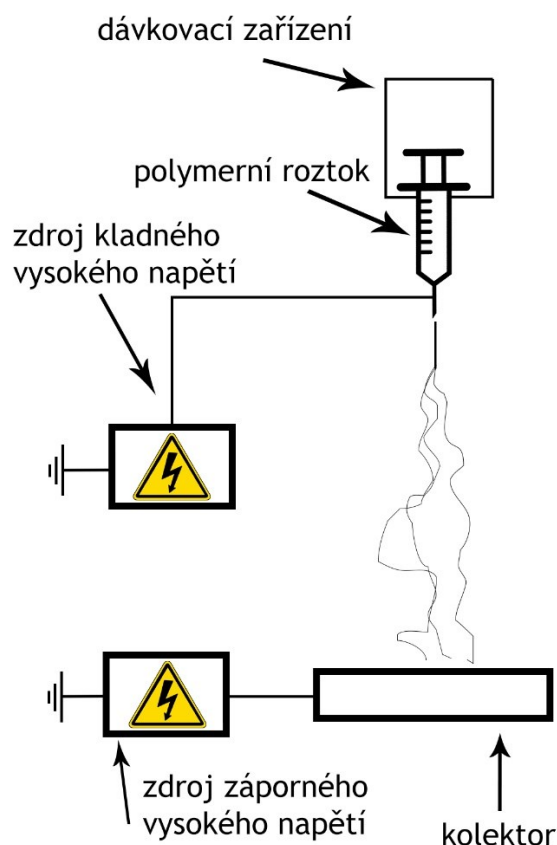
2.2.1. Elektrostatické zvlákňování

V této kapitole je kompletně popsán způsob elektrostatického zvlákňování, který byl při experimentu použit. Základem zvlákňující aparatury byla základna tvořena dvěma plastovými deskami o rozměrech 300x300 mm, které od sebe byly vzdáleny 520 mm, což bylo zajištěno čtyřmi plastovými tyčemi o průměru 16 mm. K dávkování polymerního roztoku byla použita pumpa NE-1000 (New Era Pump Systems Inc., New York, USA). Ta byla vertikálně postavena tak, aby injekční stříkačka s nasazenou jehlou obsahující polymerní roztok směřovala vertikálně dolů. Pod injekční jehlou byla umístěna hliníková folie, vzdálená 165 mm, která sloužila jako kolektor. Dávkovací pumpa byla pro 16 hm% PCL 45 nastavena na dávkování 4 ml/hod, pro 20 hm% PCL 45 na dávkování 10 ml/hod, a pro 10 hm% PCL 80 byla pumpa nastavena na 40 ml/hod. Do této pumpy byla vkládána injekční stříkačka Injekt Luer Solo (Braun, Maria Enzersdorf, Rakousko) o objemu 5ml. Na injekční stříkačku byla nasazena injekční jehla Sterican (Braun, Maria Enzersdorf, Rakousko) o průměru 1,2 mm, jejíž špička byla seříznuta do roviny kolmo k ose jehly. Injekční jehla byla pomocí krokodýlové svorky připojena ke

stejným směrem vysokonapěťovému zdroji Spellman SL 150 (Spellman Highvoltage, New York, USA), ze kterého byla nabíjena elektrickým napětím o velikosti +20,5 kV. Vysokonapěťový zdroj byl stejným způsobem připojen i k hliníkové folii, ta byla ovšem nabíjena záporným elektrickým napětím -10 kV. Hliníková folie byla umístěna na nastavitelném stojanu, který spočíval na desce ze zpěněného polystyrenu k zajištění dokonalé izolace od pracovní plochy. Stejného odstínění bylo třeba docílit i mezi oběma základnami, ovšem ne z důvodu elektrických sil, nýbrž sil větrných. Celý aparát byl umístěn v digestoři, kde i s vypnutou klimatizací stále docházelo k silným proudům vzduchu, a to zřejmě vlivem centrální klimatizace laboratoře. Na nastavitelném stojanu se též nacházela tenčí polystyrenová deska, která sloužila jako ochrana před okolním elektrickým polem. Toto sestavení bylo založeno na zkušenostech z předchozí práce autora [47], kde byla vyhodnocena jako v daných podmínkách optimální. Celá sestava je k nahlédnutí na obrázku 19, případně schematicky na obrázku 20.



Obrázek 19 Fotografie použité aparatury k elektrostatickému zvlákňování na hliníkovou folii

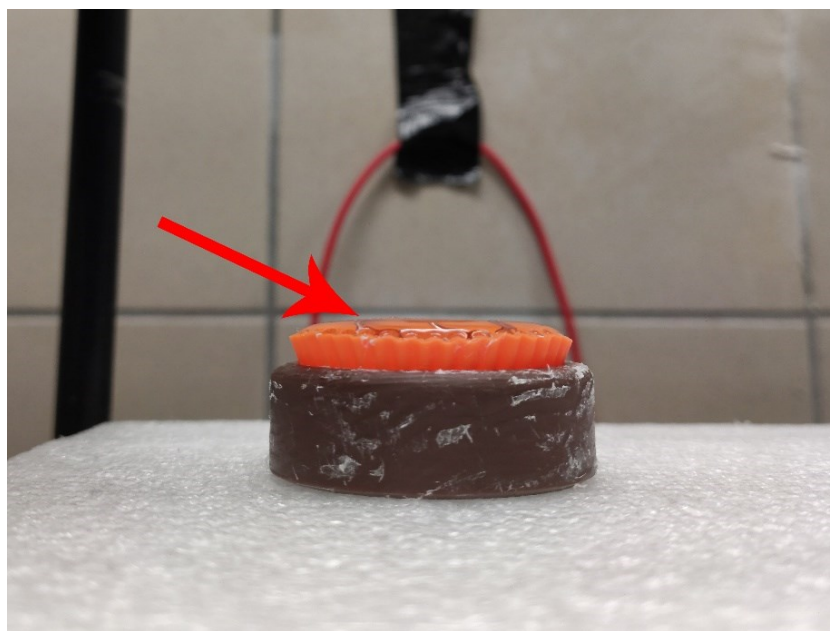


Obrázek 20 Schéma základní použité aparatury pro elektrostatičké zvlákňování na pevný kolektor ve formě hliníkové folie, používané pro tvorbu srovnávacích úvodních vzorků vláken

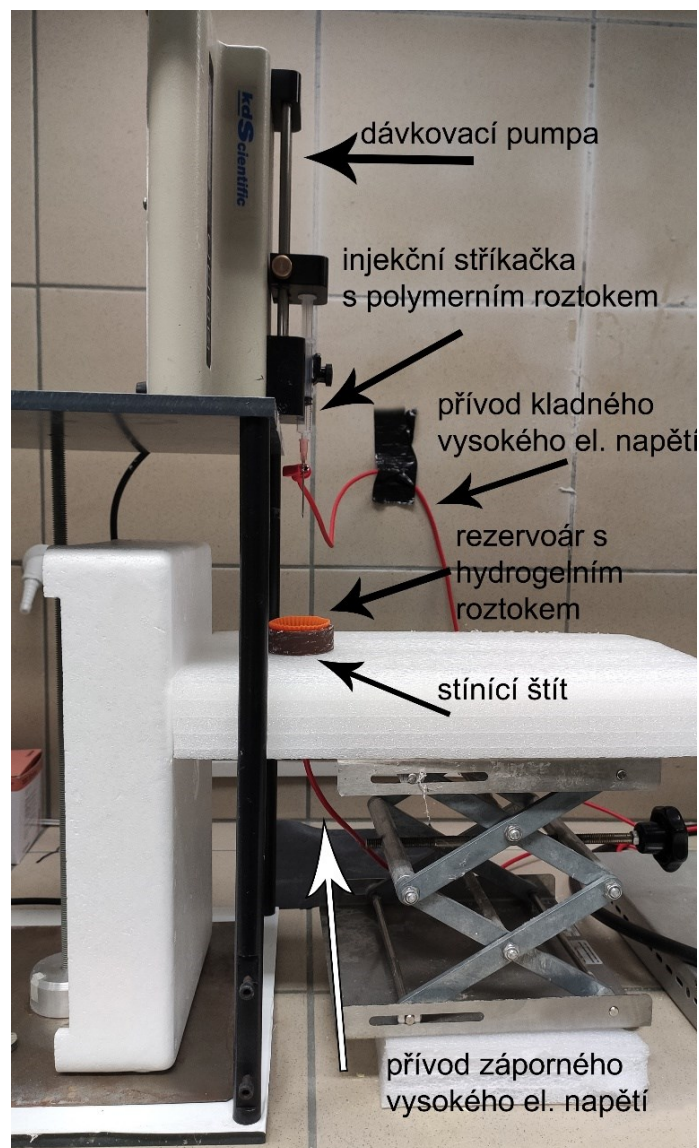
2.2.2. Elektrostatičké zvlákňování do kapaliny

Pro vlastní zvlákňování do kapaliny, v tomto případě do polymerního roztoku, byla dříve popsaná aparatura pozměněna, aby mohlo dojít ke zvlákňování přímo do roztoku pro přípravu hydrogelu. Toho bylo docíleno výměnou hliníkové folie za speciálně upravený silikonový košíček, do kterého byl následně polymerní roztok nalit, a jeho hladina vytvářela kolektor. Výška zakoupeného silikonového košíčku byla upravena na 10 mm a jeho průměr v horní části byl 40 mm. Ve středu jeho dna byl veden drát k přenosu elektrického napětí. Takto připravený košíček byl vložen do PTFE základny, aby nedocházelo k jeho borcení – tvarovým změnám. Drát byl pomocí svorkového „krokodýlu“ opět připojen na zdroj vysokého stejnosměrného napětí Spellman SL 150 (Spellman Highvoltage, New York, USA) a mohl do něj být nalit polymerní roztok. Polymerního roztoku pro tvorbu hydrogelu bylo vždy tolik, aby došlo k vytvoření co největšího povrchu kapaliny, tak aby hladina převyšovala okraje košíčku, tedy dokud nebyla vidět tzv. čepice, která je, zároveň s celým sestaveným kolektorem, k vidění na obrázku 21.

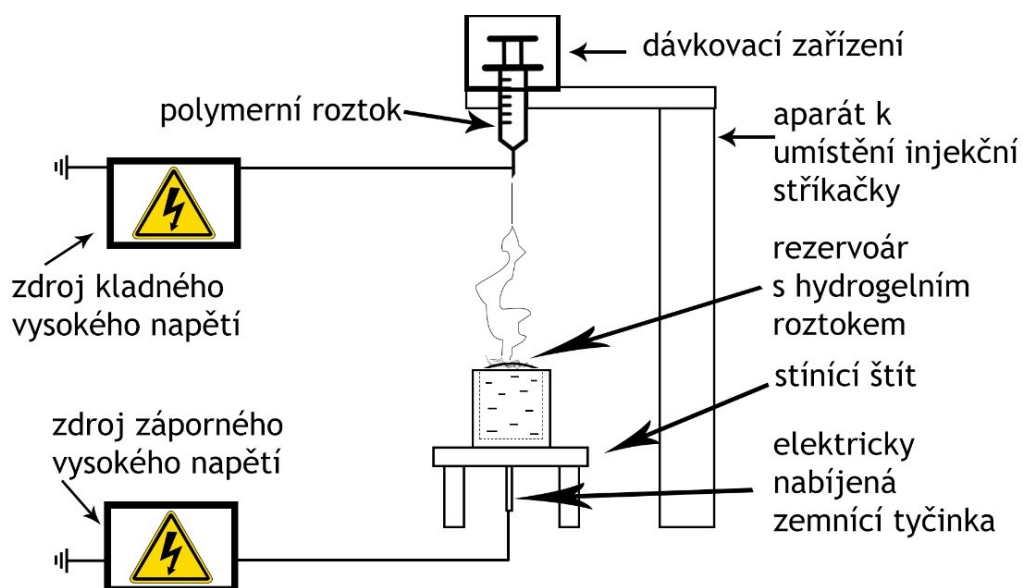
Takto připravený kolektor byl umístěn 165 mm nebo 65 mm od zvlákňovací jehly. Vzdálenosti byly voleny nejprve na 165 mm z důvodu předchozí autorovi práce [47], bohužel ale nebylo možné tuto vzdálenost použít v tomto případě, jelikož jak je uvedeno v [39], PCL je velmi hydrofobní materiál, a proto nemá snahu se nořit. Aby se předešlo složitějším způsobům noření, jako například mechanické převrstvování zvlákněných vláken novým hydrogelním roztokem, a výroba tak byla co nejjednodušší, byla snaha upravit parametry výroby. Nejjednodušším způsobem bylo zvýšení elektrického napětí přiváděného do zvlákňovacího procesu. To bohužel k ničemu nevedlo, a tak byla zvolena změna právě zvlákňovací vzdálenosti. Jakmile došlo ke zkrácení vzdálenosti elektrod na 65 mm, nestihl rozpouštědlový systém ze vznikajících vláken vyprchat, a povrch vláken vykazoval vyšší ochotu ke smáčení, tím pádem se vlákna začala nořit. Sice bylo možné předpokládat, že průměr vláken bude mírně vyšší, avšak byl to zvolený kompromis. Ostatní parametry zvlákňování nebyly měněny. Takto pozměněná aparatura je zobrazena na obrázku 22, schematicky poté na obrázku 23.



Obrázek 21 Sestavený rezervoár s tzv. čepicí hydrogelu označenou šipkou



Obrázek 22 Použitá aparatura pro elektrostatické zvlákňování do hydrogelního roztoku

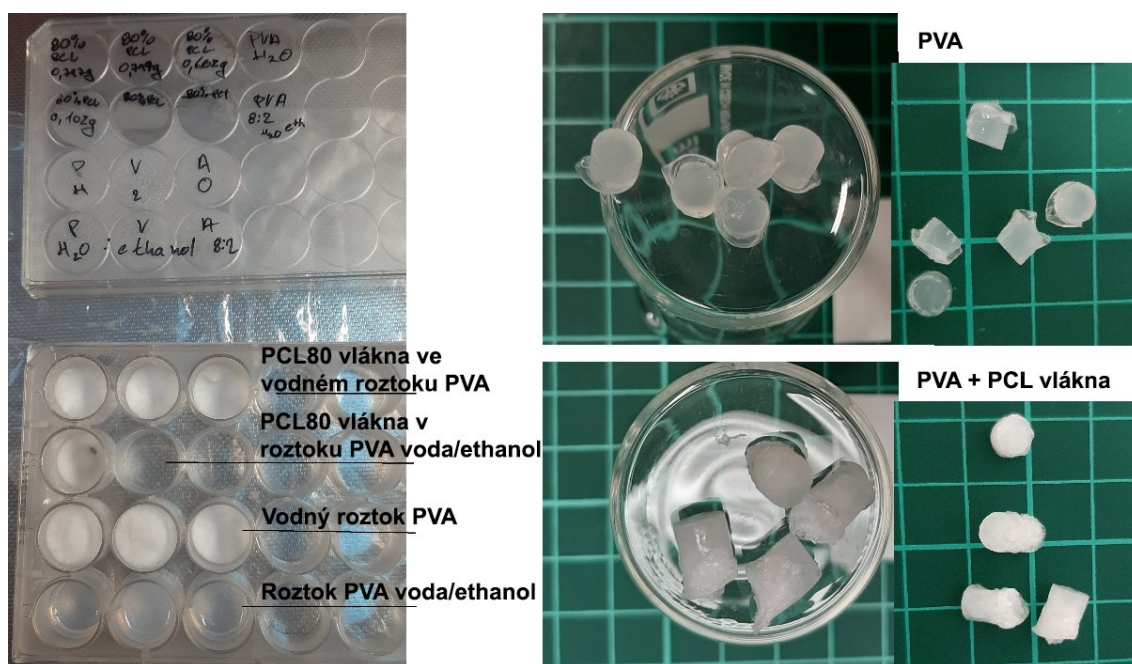


Obrázek 23 Schematicky zakreslená aparatura pro elektrostatické zvlákňování do hydrogelního roztoku

Pro dosažení opakovatelnosti dávkování vláken do kapaliny bylo zvoleno dodržování stále stejného dávkování polymerního roztoku injekční pumpou a dodržování stejné celkové doby zvlákňování na jeden vzorek. Aby mohlo být s vyrobenými vzorky snadno manipulováno, byly vždy přemístěny ze silikonového košíčku nejprve do 24 jamkových a posléze do 96 jamkových destiček, pomocí dvou lžiček. Jednotlivé vzorky byly vždy po dokončení zvlákňování zváženy, aby byla zajištěna hmotnostní podobnost vzorků. Zvlákňovací parametry byly nastaveny tak, aby ve výsledném kompozitu bylo zastoupeno stejné množství sušiny jak PVA, tak PCL, tedy hmotnostně 1:1.

2.2.3. Příprava hydrogelů

Prvotně byly provedeny testy utváření hydrogelů z želatiny z kůží studenovodních ryb a PVA v dH_2O a i ve směsi dH_2O /ethanol v hmotnostním poměru 8 : 2. Ethanol měl v roztoku sloužit ke snížení povrchového napětí kapaliny kolektoru, čímž by bylo umožněno snazší noření vláken v průběhu procesu elektrostatického zvlákňování. Avšak u roztoků s ethanolem nebylo možné dále vhodně tvořit hydrogel pomocí fyzikálního síťování změnami teplot. Následně tedy byly všechny hydrogely připravovány pouze s vodou pomocí fyzikálního síťování metodou freeze-thaw, tedy opakované zmražení a rozmražení. To spočívalo v umístění do mrazáku s teplotou $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, kde byly vzorky ponechány po dobu 20 hodin. Po uplynutí této doby byl vzorek vyndán a umístěn do laboratorní vitríny s okolní teplotou laboratoře, tedy přibližně $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. V této vitríně byl vzorek umístěn po dobu 4 hodin a následně byl umístěn nazpět do mrazáku – tedy cyklus 20 h při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 4 h při $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tento postup byl opakován čtyřikrát, byly tedy provedeny čtyři cykly. Zmíněný počet cyklů byl zvolen na základě inspirace v práci [17] a na základě pětidenního pracovního cyklu. Fotografie z průběhu těchto pokusů jsou uvedeny na obrázku 24.



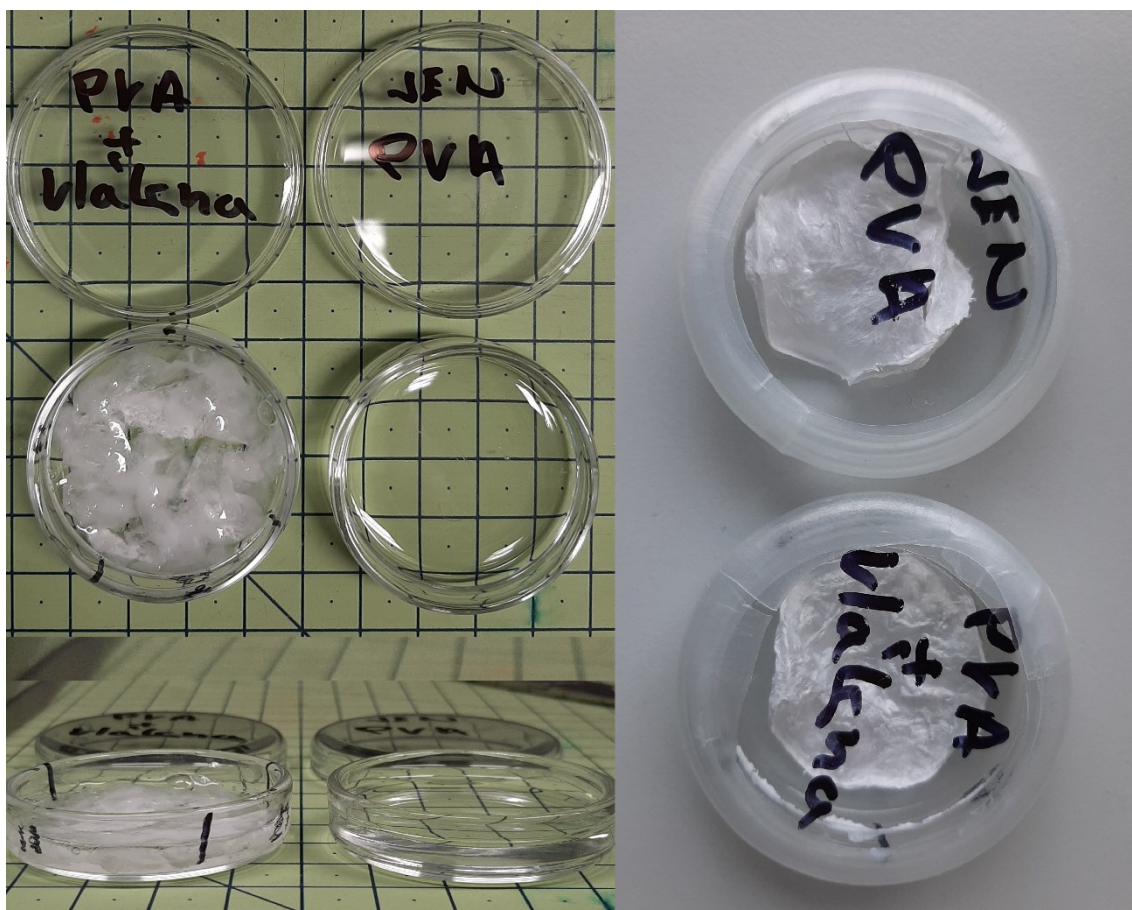
Obrázek 24 Fotografie z prvotního experimentu; vzorky po fyzikálním síťování freeze-thaw (čtyři cykly) těsně po posledním vyjmutí z mrazáku v 24 jamkové destičce (vlevo) a fotografie finálních vzorků kombinace PVA hydrogelu a PCL vláken, a pouze PVA hydrogelu po čtyřech cyklech freeze-thaw v 96 jamkové destičce, a týdenním sušení za laboratorních podmínek (vpravo)

V pracích některých autorů je uváděno, že čím vyšší počet freeze-thaw cyklů, tím více může dojít u hydrogelu ke změnám morfologie, jeho mechanických vlastností a stability (rozpustnosti ve vodě). Čím vyšší počet freeze-thaw cyklů, tím více je výsledný hydrogel zesíťován. Proto byly zkoumány změny i při jednom, dvou a třech cyklech freeze-thaw, aby mohlo na těchto vzorcích dojít k pozorování stupně botnění a úbytku hmotnosti.

Vedle použití freeze-thaw metody byla část vzorků polymerních hydrogelizujících roztoků, bez i s příměsí vláken, ponechána pro porovnání. Byla pouze vysušena při okolní teplotě 20 °C, které probíhalo po dobu tří týdnů, jelikož dříve nedošlo k vysušení vody ze vzorku do konstantní hmotnosti. Jako další porovnávací experiment, pro vysušení roztoku pro tvorbu hydrogelu, bylo zvoleno i vysušení v laboratorní sušárně při teplotě 80 °C, které probíhalo po dobu 4 hodin, opět do konstantní hmotnosti.

Poslední fází zpracování hydrogelu, bylo úvodní testování vlivu lyofilizace na finální podobu hydrogelu, kterému se více věnuje kapitola 2.2.5. Pro tento experiment byly připraveny dva větší vzorky v Petriho miskách o průměru 40 mm, vhodných pro lyofilizaci. Připravenými vzorky byly jen vodný roztok PVA a vzorek

vodného roztoku PVA s integrovanými PCL vlákny zvlákněnými elektrostatickým zvlákněním do kapaliny z roztoku 10 hm% PCL 80. Všechny tyto vzorky byly nejprve podrobeny čtyřem cyklům fyzikálního síťování metodou freeze-thaw a následně byly umístěny na 24 h do hluboko mrazicího boxu s teplotou -80 °C. Odtud byly přeneseny do lyofilizátoru, kde byly ještě lyofilizovány při teplotě -53 °C a tlaku 0,14 mBar. Fotografie z tohoto experimentu jsou uvedeny na obrázku 25.

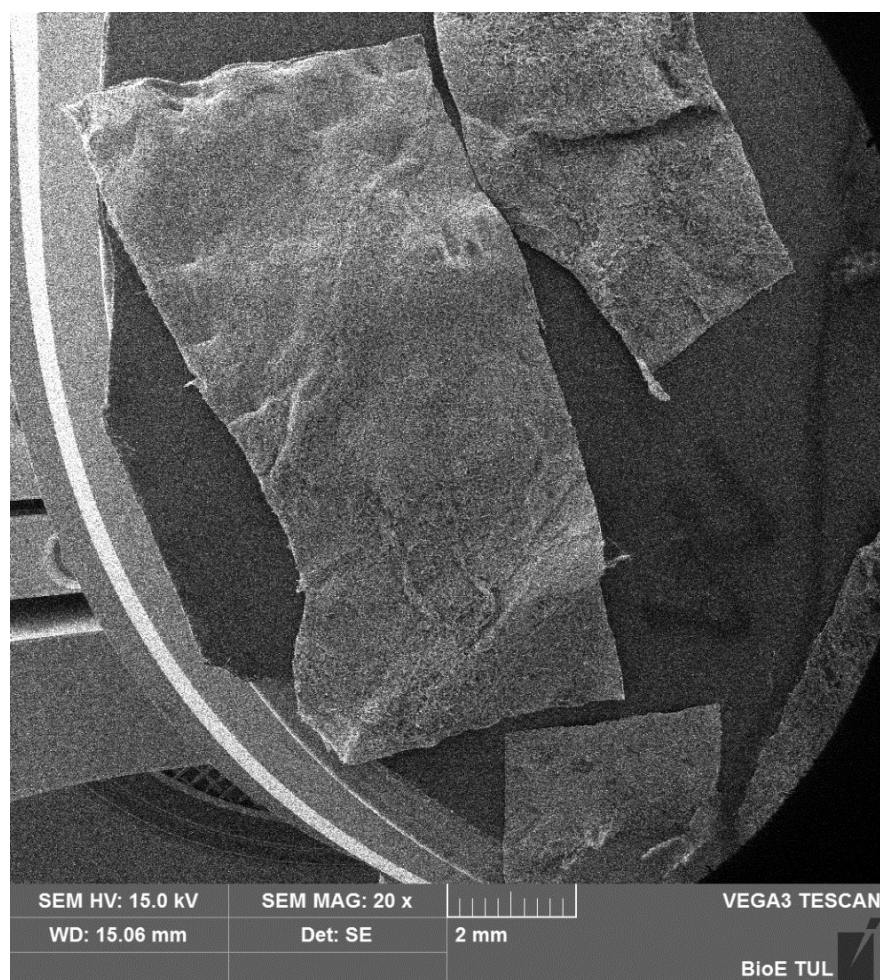


Obrázek 25 Vzorky připravené pro fyzikální síťování metodou freeze-thaw a lyofilizaci v Petriho miskách (vlevo) a vzorky po síťování metodou freeze-thaw, lyofilizaci a vysušení (vpravo)

2.2.4. Elektronová skenovací mikroskopie

Pro snímání vyrobených vlákenných struktur a povrchů hydrogelů či vyrobených kompozitů bylo užito skenovacího elektronového mikroskopu Vega 3 (TESCAN Brno, Brno, Česká republika). Vzorky, zkoumané touto metodou, není třeba nijak upravovat. Jediným limitem je velikost komory, do které se vzorek musí vejít. Na druhé straně je ovšem nutné, aby byl vzorek elektricky vodivý. Pokud tomu tak není, je nutné vzorek před zkoumáním povrstvit tenkou vrstvou elektricky vodivého materiálu, kterým velmi často bývá zlato. [48]

Bylo nutné připravit rovinné vzorky všech vyrobených vláknenných vrstev. Příprava vzorku spočívala v nalepení na oboustrannou lepicí pásku, která byla nalepena na hliníkovém terčíku. Zkoumány byly jak vybrané vzorky elektrostaticky zvlákněné pouze na hliníkovou folii, tak povrchy vysušených vzorků takto zvlákněných do hydrogelu a samotných hydrogelů. U druhých zmíněných byla zkoumána jak strana vláken dopadajících do hydrogelu, tak strana dopadající na již vytvořený „polštář“ z dříve dopadlých vláken. Jakmile byly terčíky se vzorky připraveny, byly vloženy do přístroje Quorum Q150 (Quorum, East Sussex, Velká Británie), kde došlo k jejich povrstvení kovem, tedy zlatem v tloušťce 7 nm. Na obrázku 26 je k vidění pozlacený terčík se vzorky v komoře skenovacího elektronového mikroskopu při minimálním zvětšení.

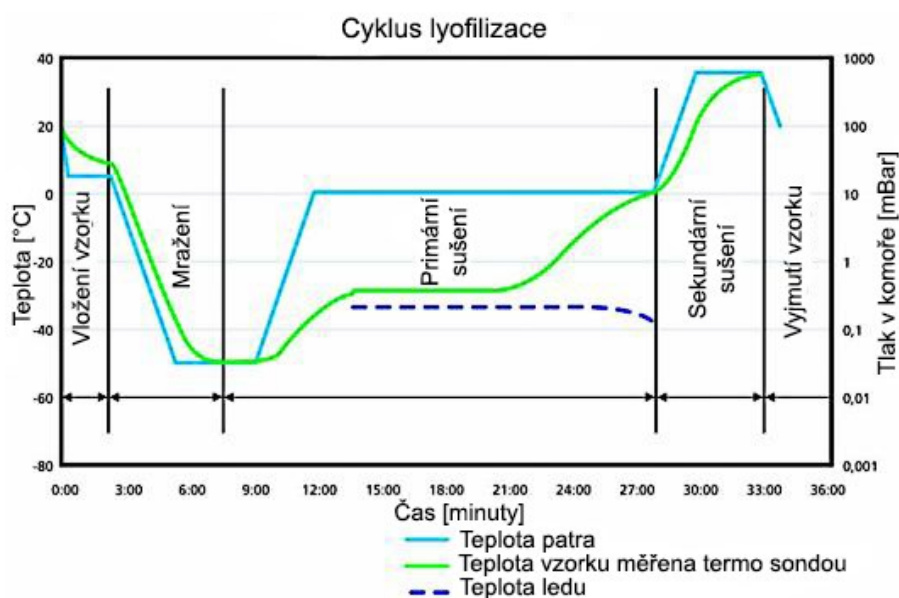


Obrázek 26 Terčík s pozlacenými vzorky v komoře skenovacího elektronového mikroskopu, měřítko 2 mm

2.2.5. Lyofilizace

Lyofilizace je založena na principu sublimace vody, tedy jevu, kdy dochází ke změně vody z pevného skupenství rovnou na páru. Lyofilizovaný vzorek je nejprve

nutné zmrazit a následně vložit do vakua. Sublimace ledu je způsobena tlakovým rozdílem mezi tlakem páry v ledu a parciálním tlakem vody v komoře. Samotný proces sušení mrazem poté sestává z jednotlivých fází, tedy mražení, primární sušení, a sekundární sušení. Nejdůležitější fáze je už z podstaty lyofilizace mražení. Během něj jsou formovány výsledné mikrostruktury, díky kterým je následně ovlivňována kvalita celého výsledku a rychlost jak primárního, tak sekundárního sušení. Ochlazování je voleno v rozmezí od 0,5 °C/min a 1 °C/min, kdy vlivem rychlejšího ochlazení dochází k formování rovnoměrných struktur ledu s jeho střední plochou. Po mražení je aplikována fáze primárního sušení, během kterého je vzorek vystaven teplu nebo změně tlaku, aby mohlo dojít k sublimaci vytvořených ledových krystalků z předchozí fáze, které musí být dodáváno po celou dobu primárního sušení. Jelikož je v této fázi vzorek umístěn ve vakuu, je díky tomu usnadněna migrace vodní páry z ledových krystalů. Během změny dochází k přeměně struktury vzorku ze zmrzlé na porózní. Po primárním sušení musí přijít na řadu sušení sekundární. Zde dochází k odstranění zbytkové vody, která nestihla být zmrazena, a tak je odstraňována desorpcí z kapalné fáze. Díky sekundárnímu sušení je tedy zajištěna optimální vlhkost výsledného vzorku, a to pod 1 %. [49] Lyofilizace probíhala v přístroji FreeZone 2.5 (Labconco Corporation, Kansas City, USA). Schéma celého procesu je uvedeno na obrázku 27.



Obrázek 27 Schematický graf příkladu procesu lyofilizace; převzato z [49], upraveno

Mrazem byly v rámci této diplomové práce vysušeny dva vybrané finální vzorky, jak bylo uvedeno v kapitole 2.2.3. Jeden byl kompozitem vláken PCL a PVA hydrogelu, druhý pouze hydrogel z PVA. Proces lyofilizace probíhal za minimální teploty $-53\text{ }^{\circ}\text{C}$ a tlaku $0,14\text{ mBar}$ po dobu 24 h .

2.2.6. Metoda DSC

Při této metodě jsou zkoumány tepelné vlastnosti vzorku, který je vystaven působení tepla. Celý princip měření spočívá v umístění vzorku do hliníkové pánvičky, která je spolu s referenčním vzorkem, umístěna na váhu do zahřívací pece. Zde dochází k ohřevu či chlazení obou vzorků definovanou rychlostí a veškeré fázové změny, ke kterým dojde, jsou porovnávány právě s referenčním vzorkem. Při těchto fázových přeměnách následně dochází k přenosu energie, díky níž dojde i ke změně v hmotnosti vzorku a ta je následně zanesena do grafu. Tímto způsobem je možné dojít k vyhodnocení teploty tání a skelného přechodu, teploty degradace, tepelné kapacity, a různých stupňů krystalinity. Tato metoda je používána pro studium fázových přechodů a testování kvality polymerních materiálů. Je však možné sledovat například kinetiku chemických reakcí, tepelnou vodivost některých materiálů nebo postup vytvrzování pryskyřic. Veškerá měření probíhají v inertní atmosféře při teplotách mezi $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $650\text{ }^{\circ}\text{C}$. [50] Pro provedení DSC testu byl zvolen přístroj DSC 1/700 (Mettler Toledo, Columbus, Ohio, USA).

2.2.7. IR spektrofotometrie

Jedná se o analytickou metodu, která je používána jak v organické, tak anorganické chemii, kde je uplatňována pro identifikaci různých směsí a zisku informací o molekulárních strukturách zkoumaných látek. Tato metoda je založena na vibraci atomů v molekulách důsledkem působení infračerveného záření, díky kterým je umožněna absorpce dané vlnové délky záření. Tento jev je možné zaznamenat pomocí spektrofotometru, jehož výstupem je infračervené spektrum. Tímto spektrem je přesně popsáno složení a struktura zkoumané látky. [51] Část vzorku byla umístěna na diamantový krystal a podrobena IR záření v přístroji Nicolet iZ10 (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA).

2.2.8. Hodnocení úbytku hmotnosti a stupně botnění

Jakmile byly vybrané vytvořené vzorky vysušeny, došlo k jejich smáčení ve vybrané kapalině po určitou dobu za teploty $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ v inkubátoru, a následně byly

podrobeny zkoumání úbytku hmotnosti. Ten je spojován se schopností hydrogelu udržet kapalinu a svou stavbu i po botnání v kapalině založené na vodném prostředí. Každý vysušený vzorek byl nejprve zvážěn, poté vložen do mikrozkuhavky typu Eppendorf, následně doplněn 1 ml roztoku PBS, a inkubován po stanovenou dobu při 37 °C. Po inkubaci byl vysušen od přebytečného roztoku ulpívajícího na povrchu vzorku, pomocí filtračního papíru, aby mohlo dojít k opětovnému zvážení, a poté byl umístěn do sušárny a sušen až do konstantní hmotnosti. Po sušení byl vzorek opět zvážěn, hodnota byla zanesena do tabulky, a následně mohlo dojít k výpočtu dle vzorců

$$\text{botnání hydrogelu} = \frac{M_s - M_d}{M_d} * 100 [\%] \quad (1)$$

kde M_s – nabotnalý hydrogel, M_d – vysušený hydrogel,

$$\text{úbytek hmotnosti} = \frac{M_i - M_d}{M_d} * 100 [\%] \quad (2)$$

kde M_i – počáteční suchý stav, M_d – hmotnost po opětovném vysušení.

Pro testování stupně botnání a úbytku hmotnosti byl, s ohledem na cíl použití těchto materiálu v medicínských aplikacích, použit roztok PBS jako jednoduché prostředí napodobující in-vitro testování. Jistě by bylo vhodné použití přímo kultivačního média, to ovšem z důvodu jeho vyšší ceny nebylo možné.

2.2.9. Testování cytotoxicity

Měření cytotoxicity bylo provedeno na třech vzorcích, a to fyzikálně zesíťovaném PVA metodou freeze-thaw 4 cykly, fyzikálně zesíťovaném PVA s PCL vlákny metodou freeze-thaw 4 cykly, a nakonec pouze na PCL vláknech zvlákněných na hliníkovou folii bez dalších úprav. Nejprve bylo nutné připravit všechny materiály a potřebné roztoky, v čemž bylo hlavně zahrnuto sterilizování všech vstupních vzorků pomocí ethylenoxidu, viz obrázek 28.



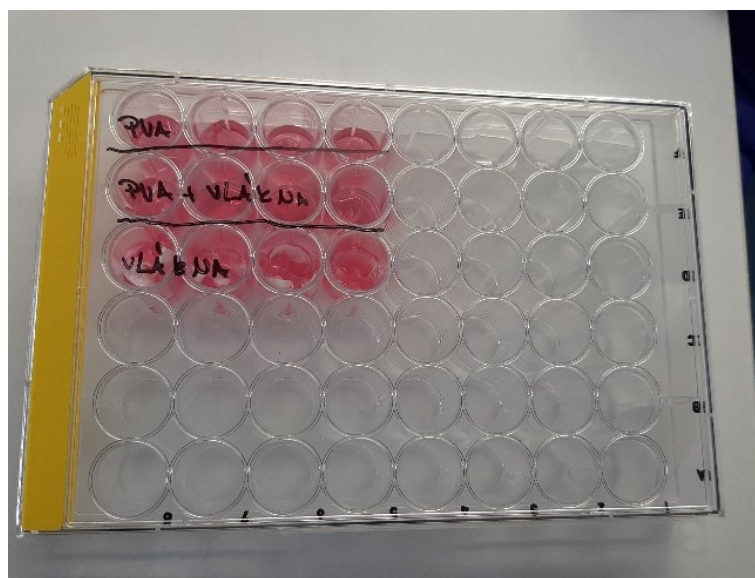
Obrázek 28 Vzorky připravené na sterilizaci ethylenoxidem, zleva: elektrostaticky zvlákněná PCL vlákna jednotlivě umístěna v mikrozkuřkách; vysušené vzorky PVA hydrogelu a vysušené vzorky elektrostaticky zvlákněných PCL vláken do roztoku PVA

Následně mohlo dojít k přípravě kultivačního média, jehož 200 ml bylo složeno ze 176 ml DMEM (Dulbecco's Modified Engle's Medium) High Glucose, 20 ml inaktivovaného fetálního bovinního séra v 10% koncentraci, 2 ml ATB v 1% koncentraci a 2 ml glutaminu též v 1% koncentraci. Dalším potřebným roztokem byl již dříve zmíněný fosfátový pufr PBS. Ten byl použit k oplachování buněčné suspenze od přebytečného média. Na 1 l pufru bylo spotřebováno 800 ml dH₂O, 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 3,63 g Na₂HPO₄ * 12H₂O a 0,24 g KH₂PO₄. Po smísení bylo nutné upravit pH na hodnotu 7,4 pomocí HCl a následně došlo k doplnění do 1 l dH₂O.

Poté mohlo být přistoupeno k přípravě buněčných linií, které musely být nejdříve rozmrazeny z kryogenního stavu, aby mohly být následně přeneseny do připraveného kultivačního média. V tomto médiu musely být třikrát pasážovány, aby došlo k nastartování jejich přirozeného metabolismu a uvolnění stresu buněk. Ke kultivaci buněk byl použit CO₂ inkubátor při 37 °C, kde byly umístěny ve speciálním sterilním plastiku. Před jednotlivými pasážemi bylo nutné zkontrolovat morfologii buněk pod optickým mikroskopem a odhadnout procentuální konfluenci – ideálně by měla být mezi 70 a 90 %. Pro další práce bylo nutné mít předehřáté kultivační médium, PBS a trypsin na teplotu 37 °C. Všechny takto připravené roztoky byly přemístěny do flowboxu, kde mohlo dojít k odsátí média z buněk adherovaných

v kultivační láhvi, následnému opláchnutí pomocí 2 ml PBS a jeho opětovnému odsátí. Následně bylo k buňkám přidáno 1,5 ml trypsinu, aby došlo k oddělení buněk od plastiku a shluků samotných buněk. Takto připravené buňky byly 5 minut inkubovány při 37 °C v CO₂ inkubátoru. Poté bylo k buňkám přidáno 3 ml kultivačního média, provedeno přepipetování k rozbití případných vzniklých buněčných shluků a celá suspenze byla přenesena do sterilního flakonu. Po tomto úkonu mohlo dojít k odebrání 10 µl buněčné suspenze, ke které bylo přidáno 10 µl tropanové modři, čímž došlo k obarvení buněk. Následně bylo možné pozorovat buňky pod mikroskopem s rozlišením mrtvých – sytě modrých, a živých – velmi slabě modrých, buněk. Poté mohlo dojít ke stanovení počtu buněk pomocí Bürkerovy komůrky a následnému naředění buněčné suspenze kultivačním médiem na požadovanou koncentraci buněk.

Finálním krokem už tedy konečně mohlo být samotné měření cytotoxicity. Během prvního dne byla připravená buněčná suspenze o koncentraci $1 \cdot 10^4$ buněk/100 µl ($1 \cdot 10^5$ buněk/1 ml) rozpipetována do 96 jamkové mikrotitrační destičky, kdy do každé jamky bylo přidáno 100 µl buněčné suspenze. Během toho byl připraven výluh ve 48 jamkové mikrotitrační destičce, kam byly umístěny zkoumané vzorky a následně zality 500 µl kultivačního média DMEM. Takto připravovaný výluh je zobrazen na obrázku 29. Mikrotitrační destičky připravené tímto způsobem byly inkubovány v CO₂ inkubátoru při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.



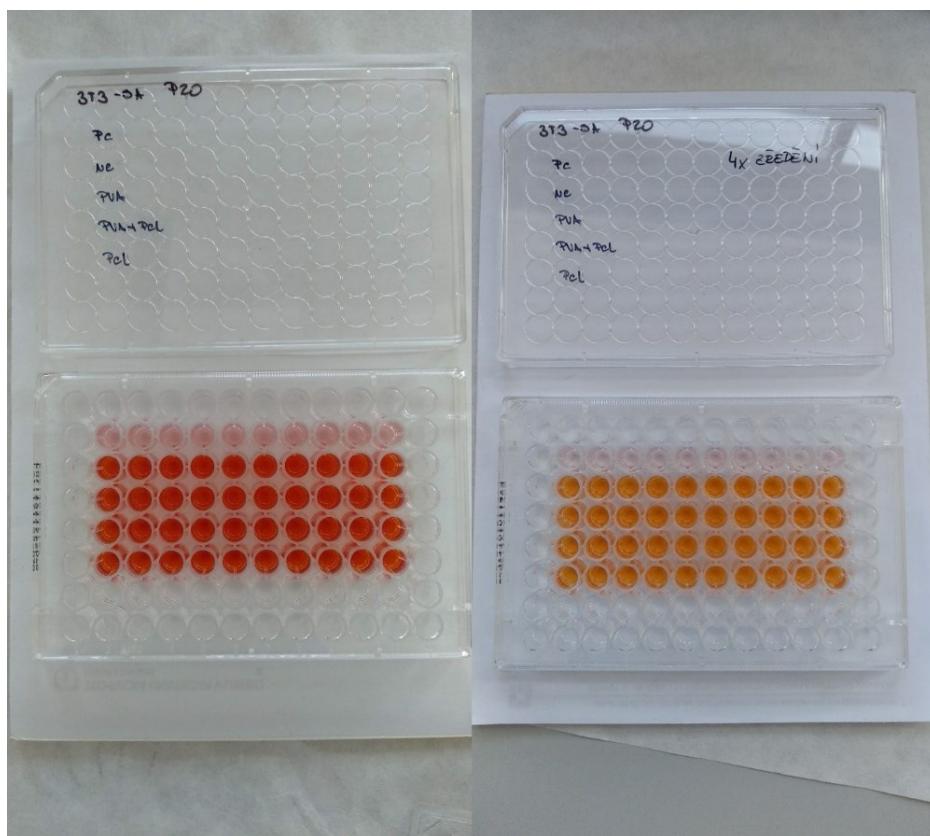
Obrázek 29 Připravovaný výluh ze zkoumaných připravených vzorků

Následující den mohlo dojít k opatrnému odsátí média z 96 jamkových destiček, kde již okometricky byly vidět naadherované buňky. Do jednotlivých jamek bylo připipetováno 100 μ l výluhu z jednotlivých materiálů. Jednalo se o médium, v kterém byly vzorky vyluhovány. To bylo odsáto, a přidáno k buňkám, viz obrázek 30. Takto připravené buňky s výluhem byly opět inkubovány po dobu 24 hodin. Spolu s buňkami s výluhem z testovaných vzorků, byly připraveny další dvě série vzorků a to jako pozitivní (PC) a negativní (NC) kontrola. V 96 jamkové destičce tedy byla ještě PC – 1% roztok Tritonu (povrchově aktivní látka) v médiu, kde se očekává, že žádné buňky nepřežijí. Dalším řádkem navíc je NC, což je samotné médium, které je pro dané buňky optimální a očekává se tedy, že buněčná aktivita bude nejlepší.



Obrázek 30 Připipetování výluhu ze vzorků k buňkám (2. den testování cytotoxicity)

Třetí den již došlo k přípravě 10% roztoku CCK-8 pro stanovení metabolické odezvy buněk v jednotlivých jamkách. Bylo nutné nejprve odsát opatrně médium z každé jamky, aby následně mohlo dojít k napipetování 100 μ l 10% roztoku CCK-8 a následné inkubaci po dobu 3 hodin v CO₂ inkubátoru při 37 °C. Po uplynutí této doby bylo možné provést spektrofotometrické vyhodnocení při vlnové délce 450 nm, kde byla zkoumána absorbance vzorky v jednotlivých jamkách. Tato data mohla být následně statisticky vyhodnocena. Destičky s připravenými vzorky pro tuto analýzu jsou zobrazeny na obrázku 31.



Obrázek 31 Destička s nezředěnými (vlevo) a zředěnými (vpravo) vzorky pro spektrofotometrickou analýzu; shora PC – pozitivní kontrola, NC – negativní kontrola, a tři řady testovaných výluhů ze vzorků: PVA – hydrogel z roztoku PVA po fyzikální metodě síťování freeze-thaw ve čtyřech cyklech; PVA+PCL – elektrostaticky zvlákněná PCL vlákna do PVA roztoku s následným fyzikálním síťováním metodou freeze-thaw ve čtyřech cyklech; PCL – samotné elektrostaticky zvlákněné PCL

V rámci testování buněčné viability pomocí kolorimetrického testu CCK-8, byly buňky adherované na dně mikrotitračních jamek následně zafixovány a obarveny fluorescenčními barvami Phalloidin-FITC (Sigma Aldrich) a DAPI (Sigma Aldrich). Následně byla provedena morfologická analýza buněk v jednotlivých jamkách pomocí fluorescenční mikroskopie.

Jednotlivé jamky byly 2x opláchnuty roztokem PBS, od roztoku použitého pro metabolické testování, a následně byly buňky adherované na dně jamek fixovány pomocí roztoku 2,5% glutaraldehydu (Sigma Aldrich) v PBS po dobu 10 minut. Poté byly jamky opět opláchnuty roztokem PBS a byl přidán roztok 0,1 % Tritonu X-100 (Sigma Aldrich) v 0,1% BSA (hovězí sérový albumin, Sigma Aldrich) v PBS po dobu 10 minut, který byl použit pro imobilizaci buněčné membrány. Buňky byly následně barveny roztokem phalloidin-FITC (aktinová vlákna v cytoplazmě v zeleném spektru) po dobu 30 minut a poté DAPI (barví dvoušroubovici DNA v UV spektru)

po dobu 10 minut ve tmě. Poté byly jamky opláchnuty a zality roztokem PBS a skladovány v lednici při 4°C.

Jednotlivé jamky s obarvenými buňkami byly analyzovány pod fluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse Ti (Nikon Instruments Inc, Melville, New York, USA). Následně byly snímky mezi sebou porovnány a byla sledována morfologie buněk v jednotlivých jamkách.

2.2.10. Měření povrchového napětí

Pro všechny použité materiály bylo experimentálně změřeno povrchové napětí. To probíhalo přenosným tenziometrem PocketDyne (Krüss, Hamburg, Německo). Jeho měření probíhá metodou stanovení maximálního tlaku v bublince, a to za normálních laboratorních podmínek při teplotě 24 °C. Provedeno bylo měření pomocí 10 bublinek, z kterých byla následně stanovena průměrná hodnota.

2.2.11. Měření viskozity

Viskozita byla měřena pomocí rotačního viskozimetru Fungilab Alpha series (Fungilab Inc., New York, USA). Do tohoto přístroje byly vloženy měřicí sondy L3 a L4, a následně mohlo měření proběhnout. Tyto sondy jsou voleny na základě předpokládané viskozity měřeného roztoku. Pokud není možné jeho viskozitu změřit, je nutné volit jinou velikost sondy – vyšší číslo sondy pro méně viskózní roztoky.

2.2.12. Měření elektrické vodivosti

Pro zajištění optimálních zvláknovacích podmínek byla experimentálně zjištěna elektrická vodivost použitého hydrogelu, tedy PVA. Tato veličina byla měřena pomocí laboratorního přístroje Eutech Instruments Con 510 (Eutech Instruments Pte Ltd, Singapur, Singapur). Měření spočívalo v zanoření měřicí sondy do roztoku a probíhalo při laboratorní teplotě 22 °C.

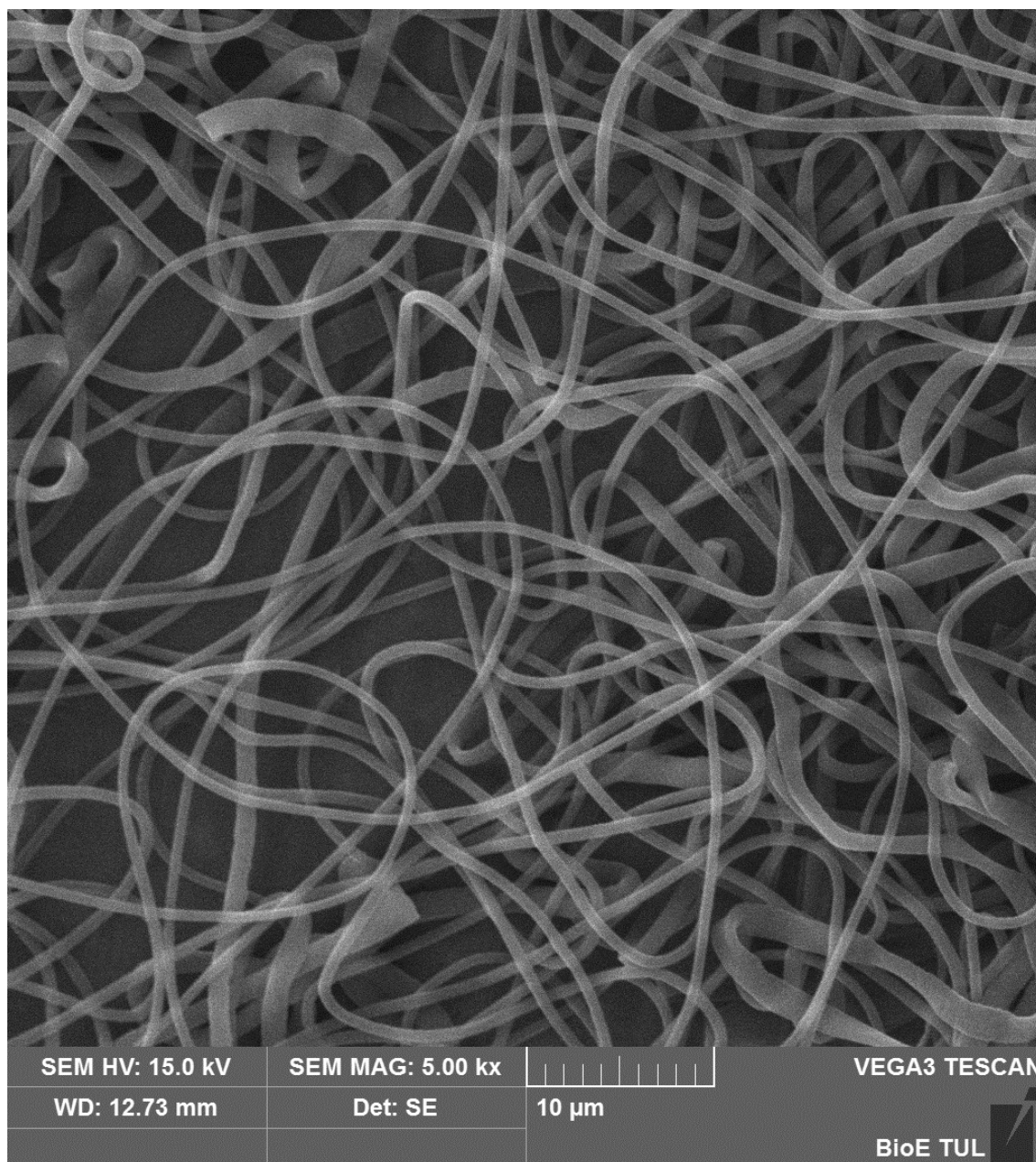
3. Výsledky měření a diskuze

V této kapitole jsou uvedeny a popsány veškeré zkoumané vlivy pro kombinaci hydrogelu a elektrostaticky zvlákněných vláken, spolu se statistickými údaji a grafy. Chronologicky je zde uvedena práce, která vedla k rozhodnutí, s jakými materiály a nastavením pracovat.

3.1. Zvláknování na hliníkovou folii

Aby mohlo dojít k počátečnímu porovnání vznikajících vláken, bylo nutné vybrané polymerní roztoky PCL zvláknit na hliníkovou folii, kde je možné následně vlákna velmi dobře pozorovat. Jako první byl testován vzorek PCL 45 16 hm% v rozpouštědlovém systému chloroform:ethanol 8 : 2 hmotnostně, který bohužel vykazoval tvorbu velkého množství kuliček jako defektů ve vlákenné struktuře. Následně tedy byl zvolen PCL 45 20 hm%, též v rozpouštědlovém systému chloroform:ethanol 8 : 2 hmotnostně, v kterém už tvorba kuliček téměř zcela vymizela, občas ovšem docházelo k defektům na vláknech.

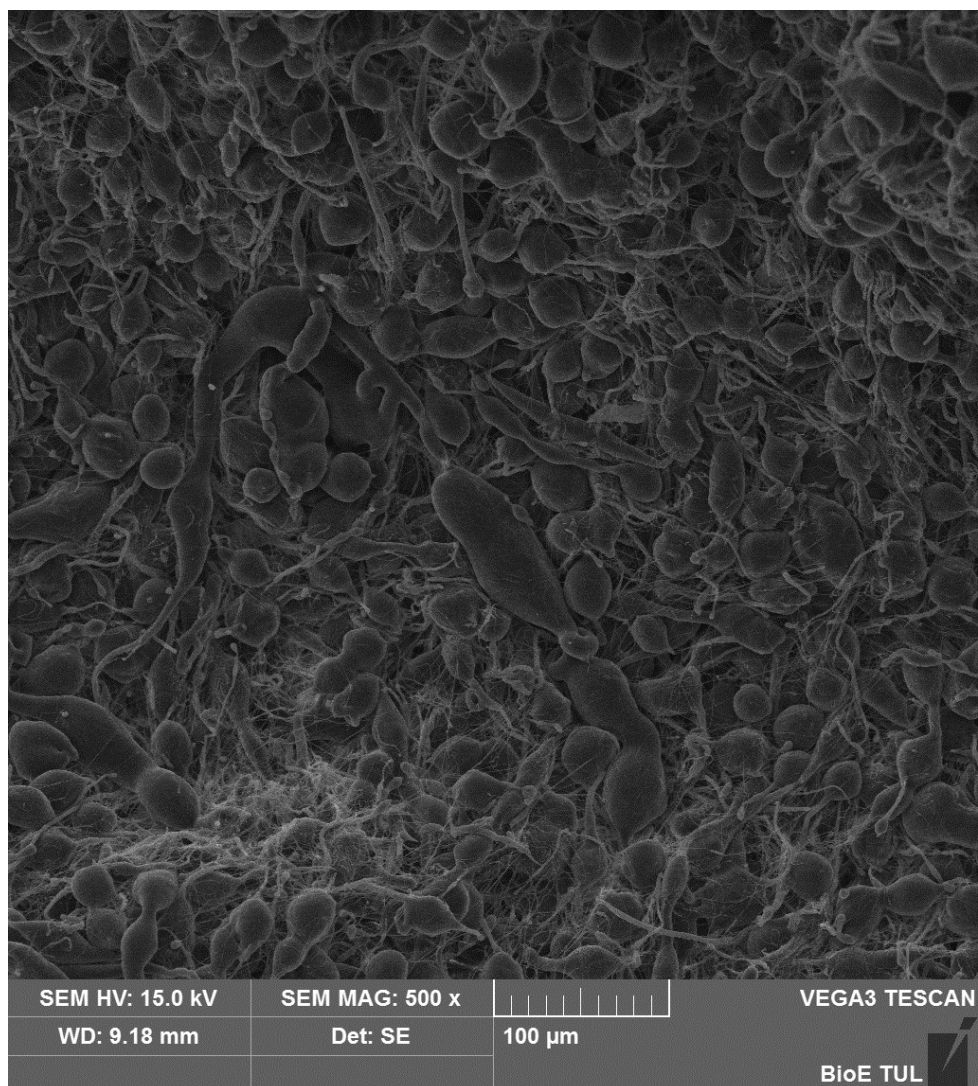
Následně byl tedy zvolen polykaprolakton o molekulové hmotnosti 80 000 g/mol, 10 hm% v rozpouštědlovém systému chloroform:ethanol 8 : 2 hmotnostně. Vrstvy z tohoto polymeru vykazovaly nejuniformnější vlákna a žádné kapkovité defekty. Další výhodou PCL s vyšší molekulovou hmotností je fakt, že díky právě vyšší molekulové hmotnosti mají vznikající vlákna větší průměr a s ním i vyšší hmotnost, a mělo by snáze docházet k noření vláken do kapaliny pomocí větší tíhové síly, která překoná vztlakovou sílu kapaliny. SEM snímek tohoto vybraného materiálu je zobrazen na obrázku 32, 95 % interval spolehlivosti [0,726; 0,800] μm . Všechny histogramy, které jsou vyhodnocením těchto vrstev, jsou obsaženy v příloze 2.



Obrázek 32 SEM snímek PCL 80, 10 hm%, elektrostaticky zvlákněný vzorek z jehly na hliníkovou folii; měřítko 10 µm, střední hodnota průměru vláken 0,763 µm

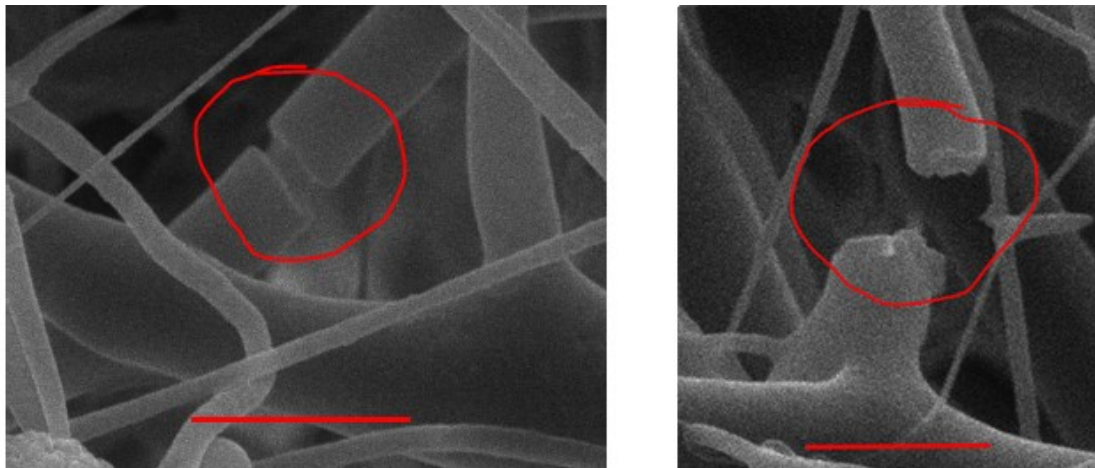
3.2. Zvlákňování do ethanolu

Aby došlo ke kompletnímu porovnání, tedy aby bylo zřejmé chování elektrostaticky zvlákněných vláken z vybrané trojice roztoků polykaprolaktonu nejen na pevném rovinném kolektoru, ale i v kapalném prostředí, bylo provedeno elektrostatické zvláknění do ethanolu. Ethanol byl vybrán na základě nízkého povrchového napětí (tedy 22,32 mN/m [52]), díky které dochází k noření vláken u všech vybraných polykaprolaktonů, které mají povrchové napětí 30,8 mN/m [53]. Prvním testovaným polymerem byl opět PCL 45 16 hm%, rozpouštědlový systém chloroform:ethanol 8 : 2 hmotnostně. Jak tomu bylo i při zvláknování na pevný kolektor, i zde docházelo ke tvorbě spíše kuličkovitých defektů, než vláken, jak je možné vidět na obrázku 33. Vznikající vlákna byla v 95% intervalu spolehlivosti [0,392; 0,507] μm .

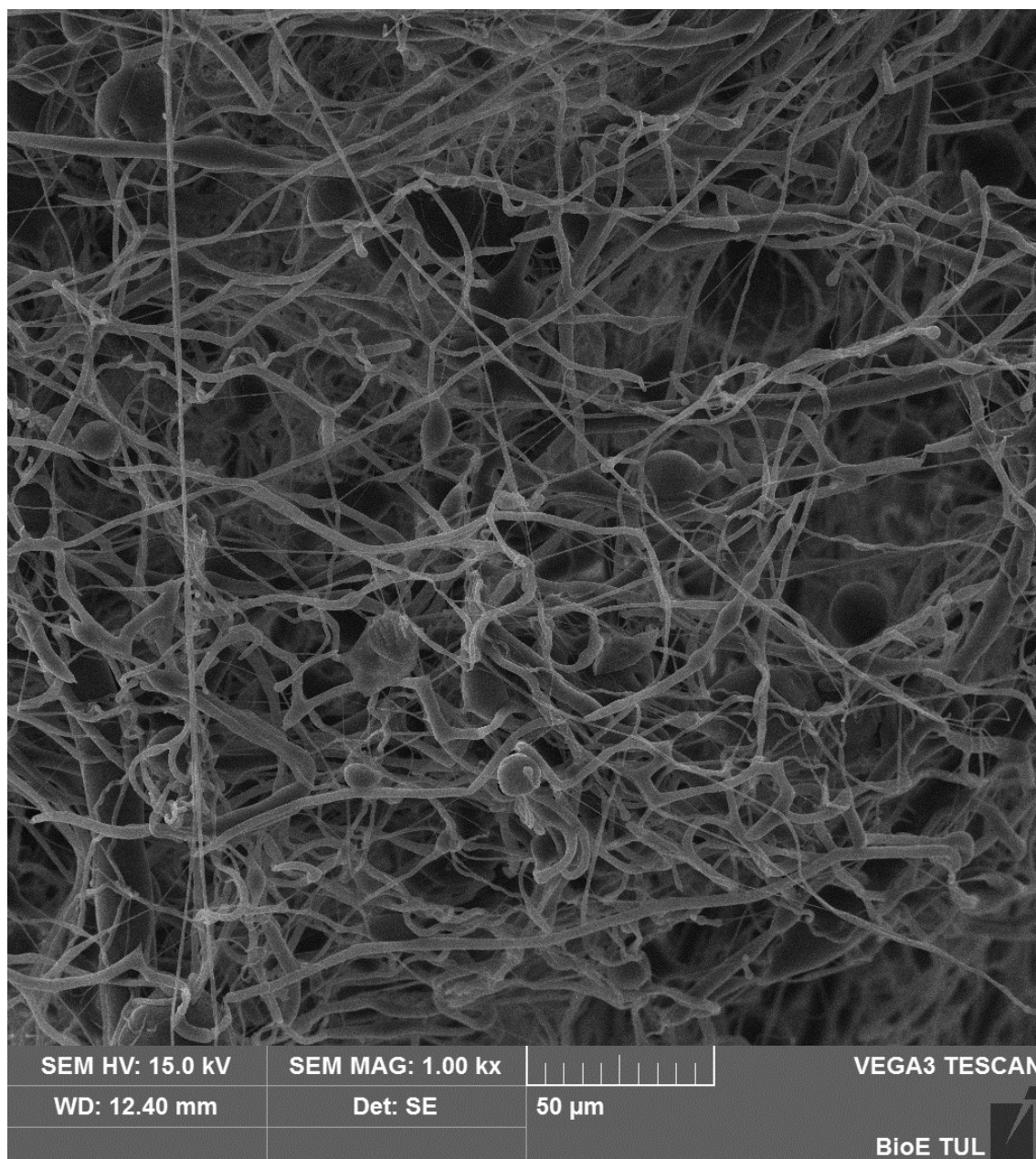


Obrázek 33 SEM snímek PCL 45, 16 hm%, do ethanolu, jasné zřetelný vznik kuličkovitých defektů; měřítko 100 μm , střední hodnota průměru vláken 0,449 μm

Následně byl opět testován PCL o stejné molekulové hmotnosti, pouze ve vyšší koncentraci, tedy 20 hm% v rozpouštědlovém systému chloroform:ethanol 8 : 2 hmotnostně. Díky zvýšení koncentrace roztoku opět došlo k výraznému snížení tvorby kuličkovitých defektů, zde snad ještě výrazněji, než tomu bylo u pevného kolektoru. Oproti tomu docházelo k defektům na vláknech, tak jak je možné vidět na obrázku 34. Výsledná elektrostaticky zvlákněná vrstva je zobrazena na obrázku 35, výsledná vlákna byla s 95% spolehlivostí v intervalu [1,507; 2,063] μm .



Obrázek 34 Defekty vláken při elektrostatickém zvláknění PCL 45 20 hm% do ethanolu; měřítka 10 μm



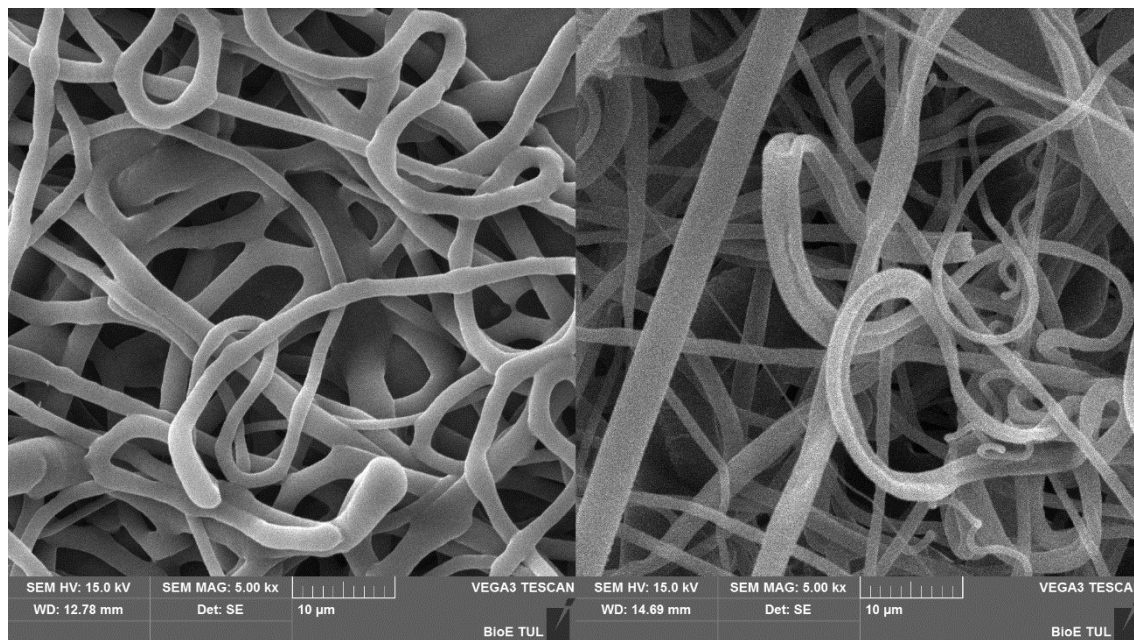
Obrázek 35 SEM snímek PCL 45, 20 hm%, do ethanolu; měřítko 50 µm, střední hodnota průměru vláken 1,784 µm

Posledním zkoumaným polymerem byl tedy opět zvolen polykaprolakton s molekulovou hmotností 80 000 g/mol, v rozpouštědlovém systému chloroform:ethanol 8 : 2 hmotnostně. Nyní již nebylo dosaženo vysoké uniformity dopadajících vláken, avšak nastal velice zajímavý úkaz formování spirálek. Tento úkaz vzniká na základě nárazu ještě ne zcela ztuhlých vláken o hladinu kolektoru, tak jak je popisováno v [54]. Tyto vznikající útvary a kompletní SEM snímek vrstvy jsou uvedeny na obrázku 36, vznikající vlákna byla v 95% intervalu spolehlivosti [2,124; 2,369] μm . Na základě těchto experimentů byl tedy zvolen polykaprolakton o molekulové hmotnosti 80 000 g/mol jako výchozí použitý polymer pro elektrostatické zvlákňování. Všechny histogramy vláken jsou uvedeny v příloze 2.



Obrázek 36 SEM snímek PCL 80, 10 hm%, do ethanolu, zajímavé vznikající spirálky; měřítko 50 μm , střední hodnota průměru vláken 2,246 μm

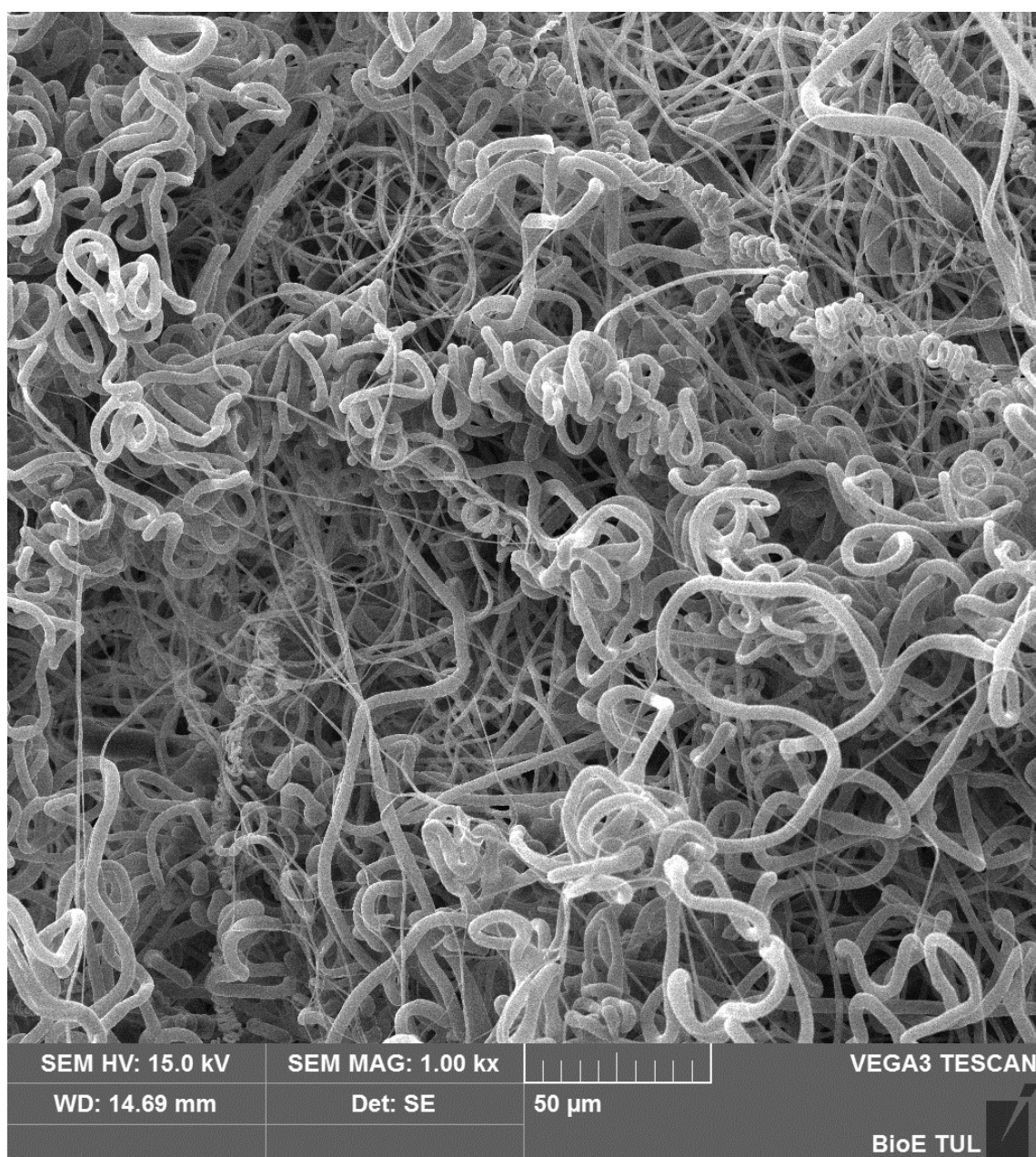
Aby byl vidět rozdíl mezi elektrostatickým zvlákňováním na pevný rovinný kolektor a elektrostatickým zvlákňováním na nebo do kapaliny, jsou na obrázku 37 porovnány SEM snímky takto zvlákněných vláknenných vrstev z PCL 80 při vzdálenosti elektrod 65 mm. Na snímcích je zřetelný rozdíl v morfologii výsledných vrstev, kdy elektrostaticky zvlákněná vrstva na rovinný kolektor vykazuje „slévání“ vláken a výsledná vrstva je spíše filmového charakteru, kdežto vláknenná vrstva v ethanolu vykazuje mnohem nadýchanější strukturu a osamocená vlákna.



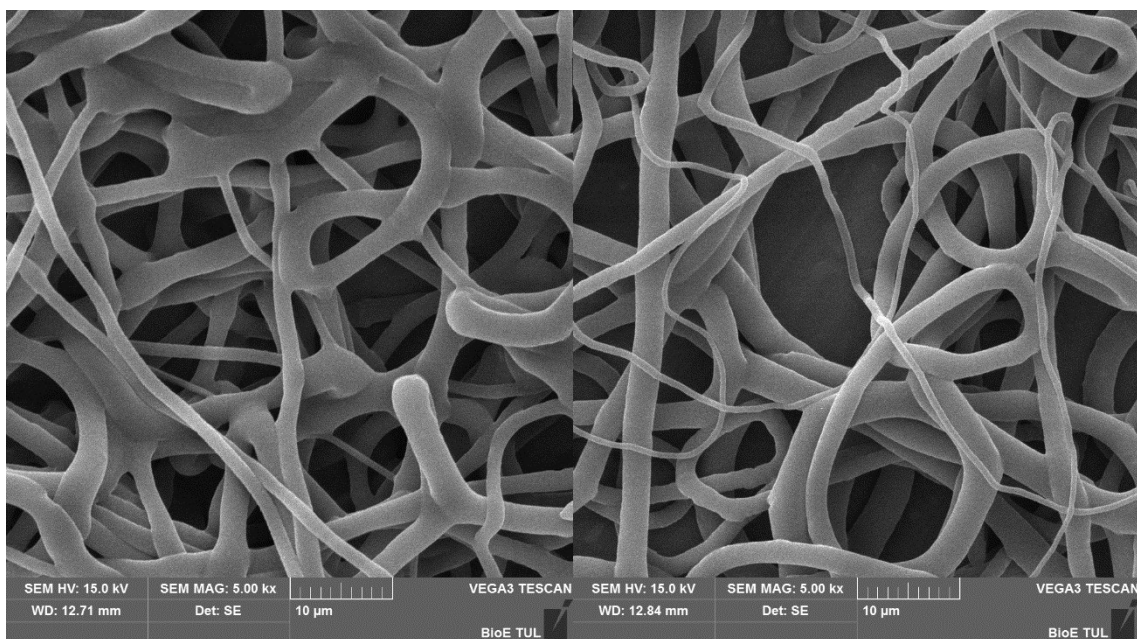
Obrázek 37 Porovnání elektrostaticky zvlákněných PCL vláken na pevný rovinný kolektor (vlevo) a elektrostaticky zvlákněných vláken do ethanolu (vpravo) při vzdálenosti elektrod 65 mm; měřítko 10 µm

3.3. Volba vzdálenosti elektrod

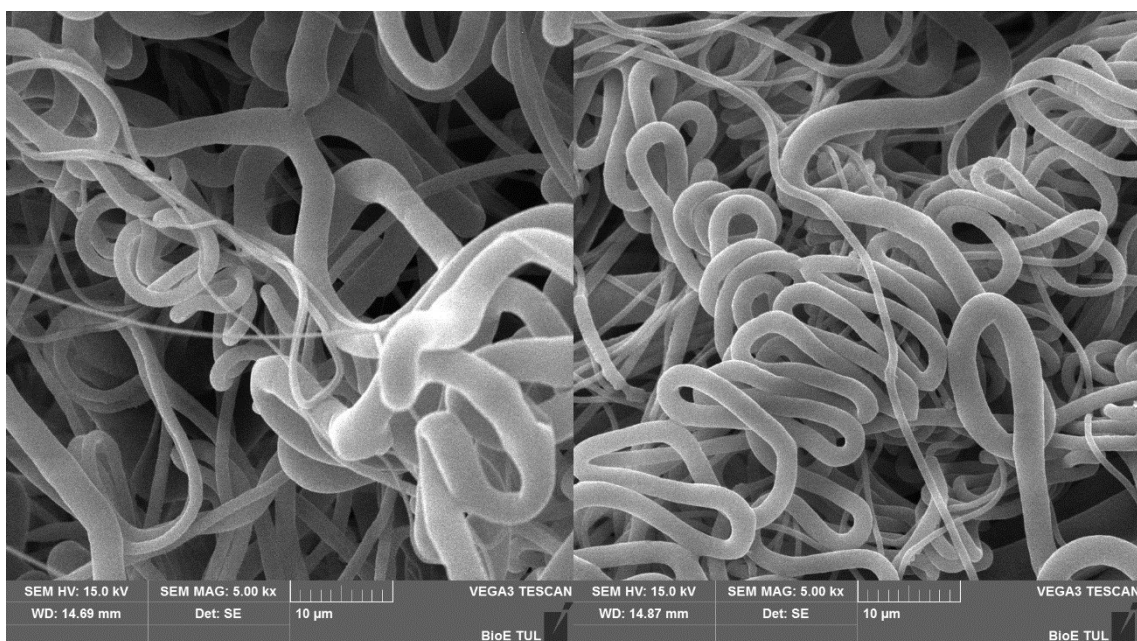
Jakmile bylo rozhodnuto, jaký polymer bude použit, bylo nutné zjistit jeden ze zásadních parametrů, a to vzdálenost zvlákňovacích elektrod, tedy kladně nabitě jehly a záporně nabitého kolektoru. Tento experiment byl prováděn pouze s PCL o molekulové hmotnosti 80 000 g/mol, 10 hm% v rozpouštědlovém systému chloroform:ethanol 8 : 2 hmotnostně, na základě předchozích experimentů. Na obrázku 38 je zobrazena vrstva elektrostaticky zvlákněná ve vzdálenosti 65 mm, a vykazuje mnohem vyšší tvorbu spirálek než tatáž vrstva ve vzdálenosti 165 mm, vznikající vlákna s 95% spolehlivostí v intervalu [2,124; 2,369] µm. To je způsobeno nedostatkem času pro odpaření rozpouštědla, tím pádem vlákna dopadají i s rozpouštědlem, které napomáhá noření vláken, avšak poté dojde k jeho vyprchání. Obě vzdálenosti jsou porovnány na obrázku 39 a 40.



Obrázek 38 SEM snímek PCL 80, 10 hm%, vzdálenost elektrod 65 mm; měřítko 50 μm, střední hodnota průměru vláken 2,246 μm



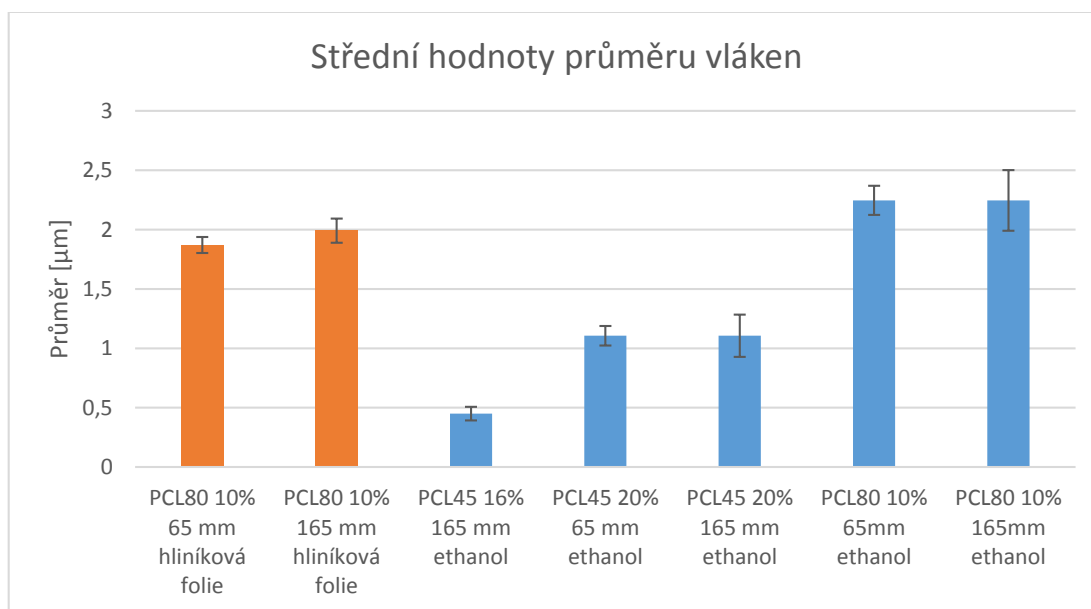
Obrázek 39 Porovnání vzdáleností elektrod pro PCL 80, 10 hm%, vlevo 65 mm, vpravo 165 mm, na hliníkovou folii; měřítka 10 μm



Obrázek 40 Porovnání vzdáleností elektrod pro PCL 80, 10 hm%, vlevo 65 mm, vpravo 165 mm, do ethanolu; měřítka 10 μm

Z předchozích obrázků (obrázek 39 a 40) je patrné, že při menší vzdálenosti docházelo ke vzniku většího počtu spirálek, tak jak bylo předpokládáno z teorie odpařování rozpouštědla. Navíc, jak je možné přesvědčit se na obrázku 39, při nižší vzdálenosti elektrod docházelo ke „slévání“ vznikajících vláken, což bylo zapříčiněno zbytkovým rozpouštědlovým systémem při dopadu na kolektor. Na základě tohoto experimentu bylo, s ohledem na interakci buněk s výsledným kompozitem, zvoleno testování cytotoxicity, aby bylo potvrzeno odpaření veškerých

zbytků rozpouštědel z výsledných kompozitů. Při nižší vzdálenosti elektrod probíhal celý proces elektrostatického zvlákňování jistěji, než při jejich větší vzdálenosti, proto byla zvolena vzdálenost kratší. Na grafu 1 jsou zaznamenány střední hodnoty průměrů vláken testovaných polymerních roztoků. Všechny histogramy jsou uvedeny v příloze 2.



Graf 1 Střední hodnoty průměru vláken z různých polymerních roztoků a kolektorů; chybové úsečky vyjadřují 95% interval spolehlivosti

Z grafu 1 je možné si všimnout, že nedochází k výrazné změně průměrů vláken v případě PCL 80 jak se změnou kolektoru, tak se změnou vzdáleností elektrod. Naopak je zřejmé a očekávané, že s narůstající koncentrací nebo viskozitou (viz graf 11 v kapitole 3.7) se průměry vláken zvyšují.

3.4. Volba polymeru pro hydrogel

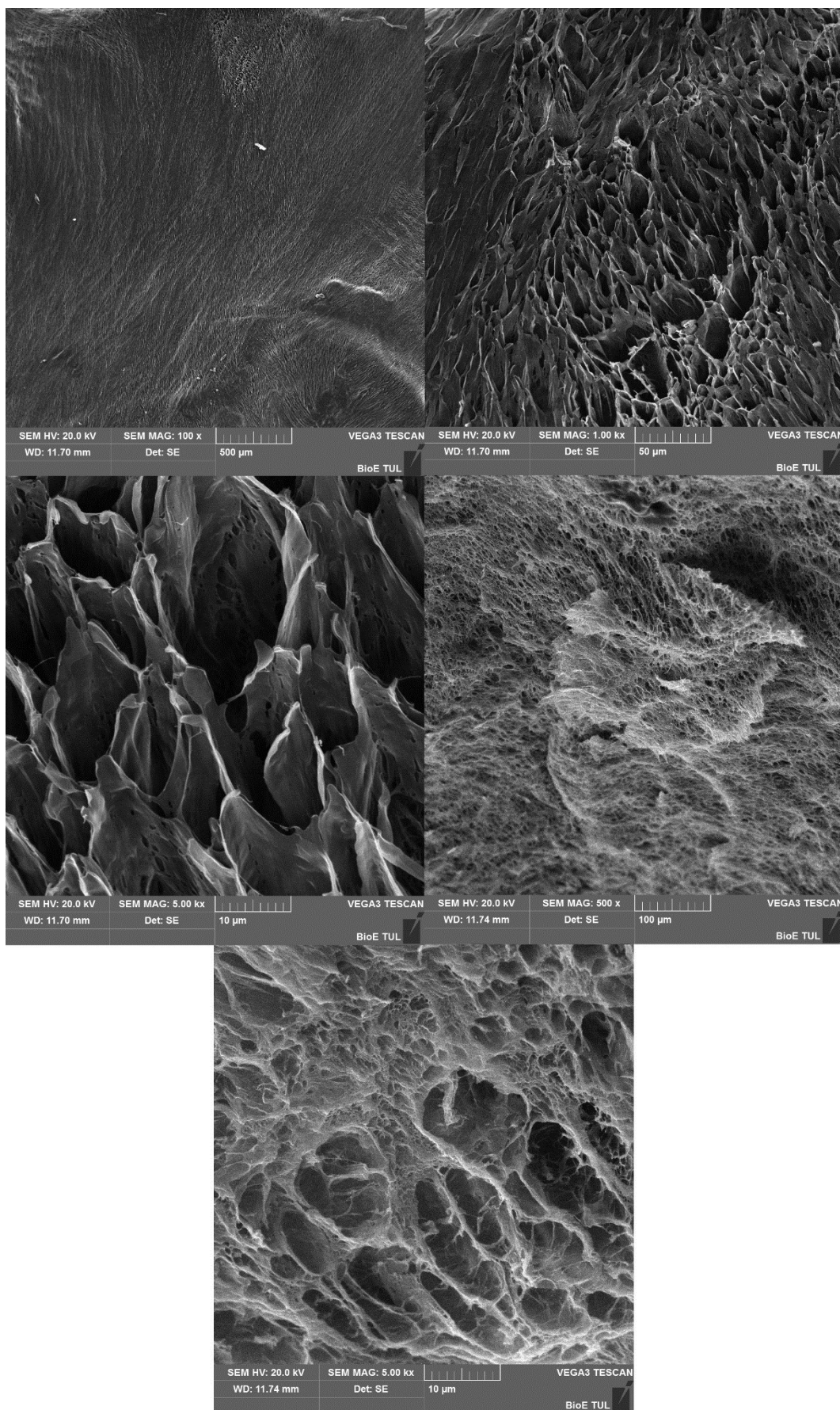
Jelikož byla vize výsledného produktu jasně definována, bylo nutné vybírat z polymerů biokompatibilních. Podle předchozího kritéria byl vybrán polyvinylalkohol a želatina z kůží studenovodních ryb. Během prvotních testů s elektrostatickým zvlákňováním do těchto polymerů bylo zjištěno, že želatinu z kůží studenovodních ryb je možné síťovat pouze chemickou cestou. Z tohoto důvodu bylo od želatinového polymeru odstoupeno. Následně byl tedy vybrán polyvinylalkohol, který byl vždy fyzikálně síťován metodou freeze-thaw. Dalším problémem byl fakt, že polymer, který byl rozpuštěn v rozpouštědlovém systému dH₂O:ethanol 8 : 2 hmotnostně, nikdy dostatečně nevyschl, což bylo zapříčiněno

právě přítomností ethanolu ve směsi, jelikož s jeho narůstajícím podílem klesá bod tuhnutí celého systému. Jakmile byl tentýž polymer připraven rozpuštěním pouze v destilované vodě, výsledný produkt vždy vyschl bezproblémově. Výsledným používaným polymerem byl tedy zvolen polyvinylalkohol, rozpuštěn pouze v destilované vodě, a následně fyzikálně síťován pomocí metody freeze-thaw, jak je popsáno výše v kapitole 2.2.3.

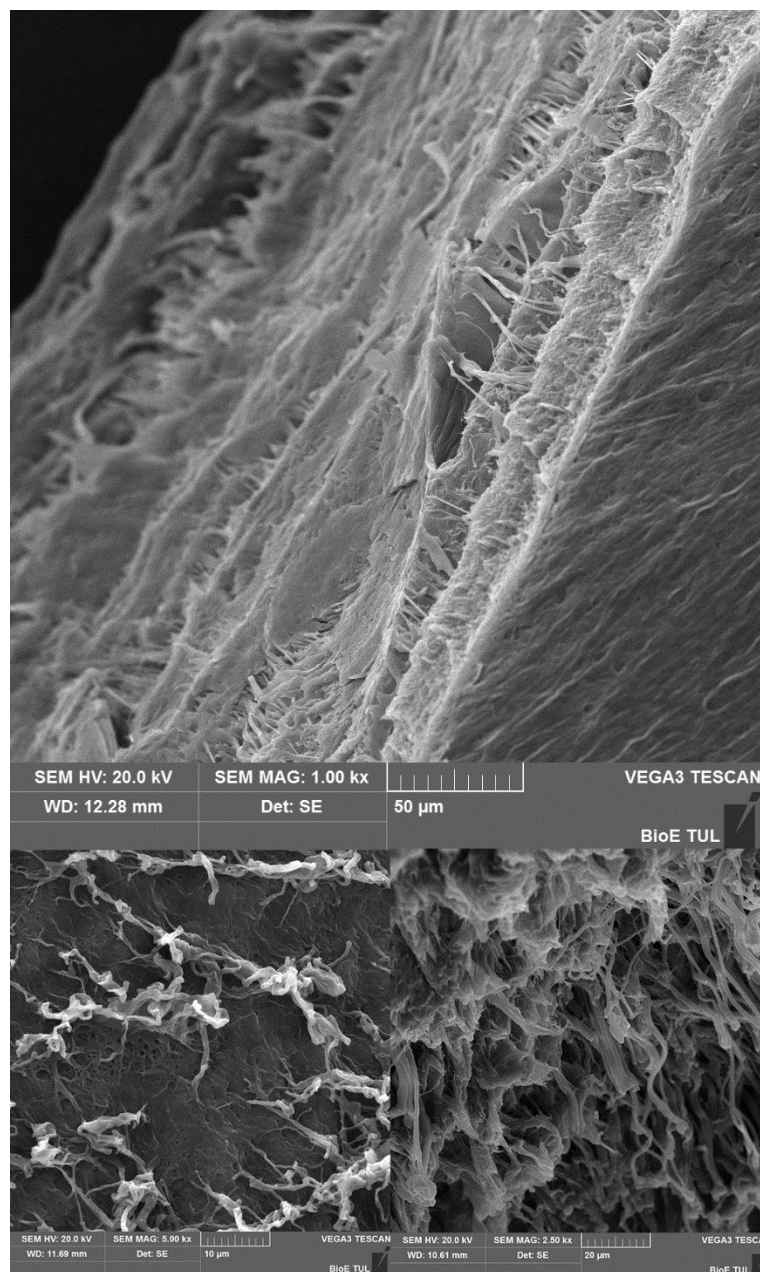
3.5. Povrchová morfologie vzorků

Charakter lyofilizovaných vzorků nedovoluje využití celkového zobrazení ani optickým ani rastrovacím elektronovým mikroskopem. Snímky z optického mikroskopu nepřinášejí, díky malé hloubce ostrosti, relevantní informace. Rastrovací elektronový mikroskop pak, z podstaty fungování, zobrazuje zejména povrch vzorků. Tomuto studiu nebyla věnována přílišná pozornost, avšak povrchy vzorků kombinujících vlákna a hydrogel po vysušení, jsou uvedeny na obrázku 41. Hrubost vzorků je zvyšována přidavkem vláken, která jsou v povrchové vrstvě sice smočena, ale některá z nich vystupují nad povrch hydrogelu.

Proces lyofilizace ukazuje na možnost tvorby porézní struktury. V různých oblastech vzorku byly pozorovány různě formované póry různých velikostí. Při menších zvětšeních jsou dokonce patrná určitá směřování pórů. Proces lyofilizace takového materiálu byl zde jen orientačně použit a ukazuje, že je nutné proces lyofilizace a jeho nastavení hlouběji analyzovat, aby bylo možné opakovatelně vytvářet předvídatelné či řízené morfologie vzorků v celém objemu a povrchu vzorku. Na obrázku 42 je poté zobrazen SEM snímek lomu a povrchu lyofilizovaného vyrobeného kompozitu elektrostaticky zvlákněných PCL vláken do hydrogelního PVA roztoku, který naznačuje přítomnost vláken ve vzorku, a také určitou porozitu tohoto lyofilizovaného materiálu.



Obrázek 41 SEM snímky lyofilizovaného PVA hydrogelu; měřítka shora zleva 500 μ m, 50 μ m, 10 μ m, 100 μ m a 10 μ m



Obrázek 42 SEM snímek lomu (nahore a vpravo dole) a povrchu (vlevo dole) vyrobeného lyofilizovaného kompozitu z elektrostaticky zvlákněných PCL vláken do hydrogelního PVA roztoku; měřítka 50 µm, 10 µm, 20 µm

3.6. Testování vlastností kompozitu

Jakmile byl vybrán polymer pro elektrostatické zvláknování, polymer pro hydrogel, a kompletně odladěné nastavení celého výrobního procesu, mohlo dojít k výrobě finálního kompozitu. Ten byl složen z elektrostaticky zvlákněných vláken z 10 hm% polymerního roztoku PCL 80 do vodného roztoku PVA ze vzdálenosti 65 mm, který byl vždy porovnáván se vzorek pouze PVA bez vláken. Fyzikální síťování roztoků PVA pak bylo vždy provedeno metodou freeze-thaw (cyklus 20 h při -20 °C a 4 h při 20 °C). Výsledky provedených testování těchto finálně zvolených vzorků jsou zaznamenány dále.

3.6.1. Stupeň botnání

Botnání neboli stupeň botnání (degree of swelling), probíhalo dle popisu v kapitole 2.2.8. Pro velký počet vzorků bylo možné testovat vždy pouze jeden vzorek, tudíž jsou uvedené výsledky pouze orientační. Jedinými vzorky, u kterých mohlo být provedeno základní statistické hodnocení, jsou testy počtů freeze-thaw cyklů na proces botnání a úbytek hmotnosti.

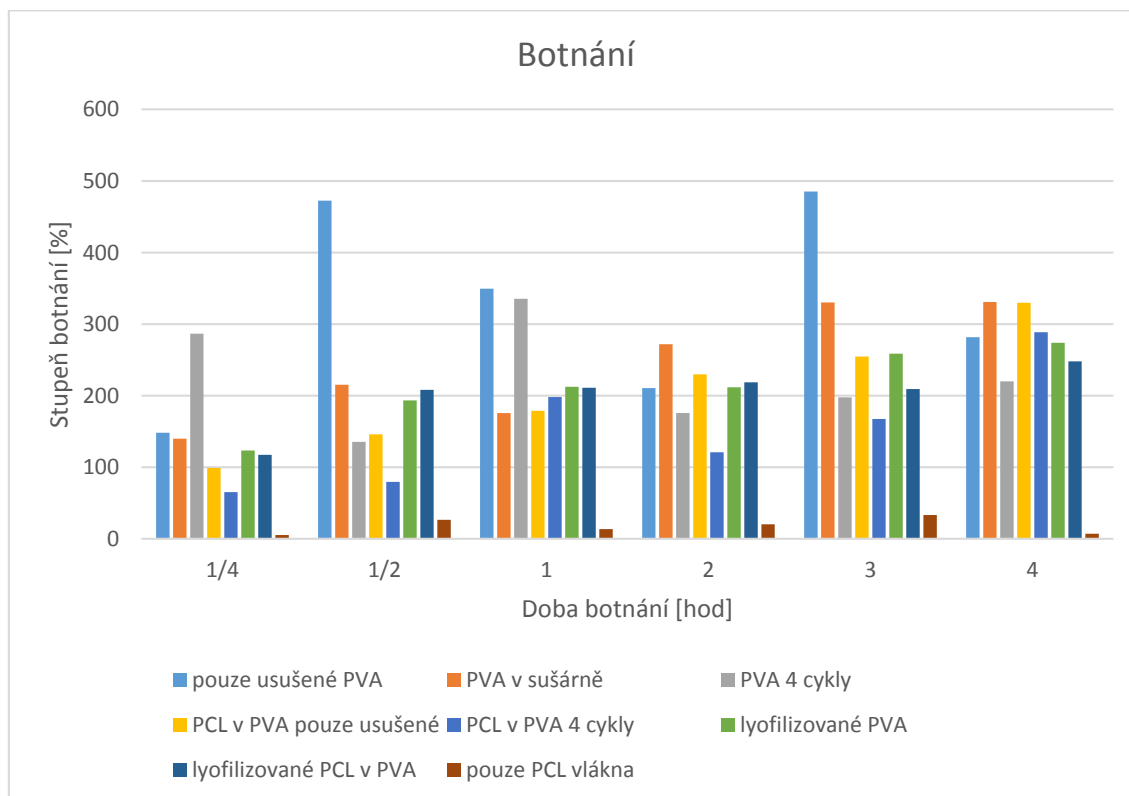
Nejprve byla provedena série testů s různou dobou botnání (vzorky vložené do mikrozkuumavek a umístěné do inkubátoru, viz obrázek 43), která je zobrazena v příloze 3, souhrnný graf s veškerými výsledky dohromady je zobrazen na grafu 2. Vzorky testované v tomto experimentu jsou popsány v tabulce 3.



Obrázek 43 Vzorky připravené pro test stupně botnání a úbytku hmotnosti po určitých časových intervalech smáčení v PBS roztoku, připravené a umístěné do inkubátoru

Tabulka 3 Vybrané vzorky testované na stupeň botnění a úbytek hmotnosti

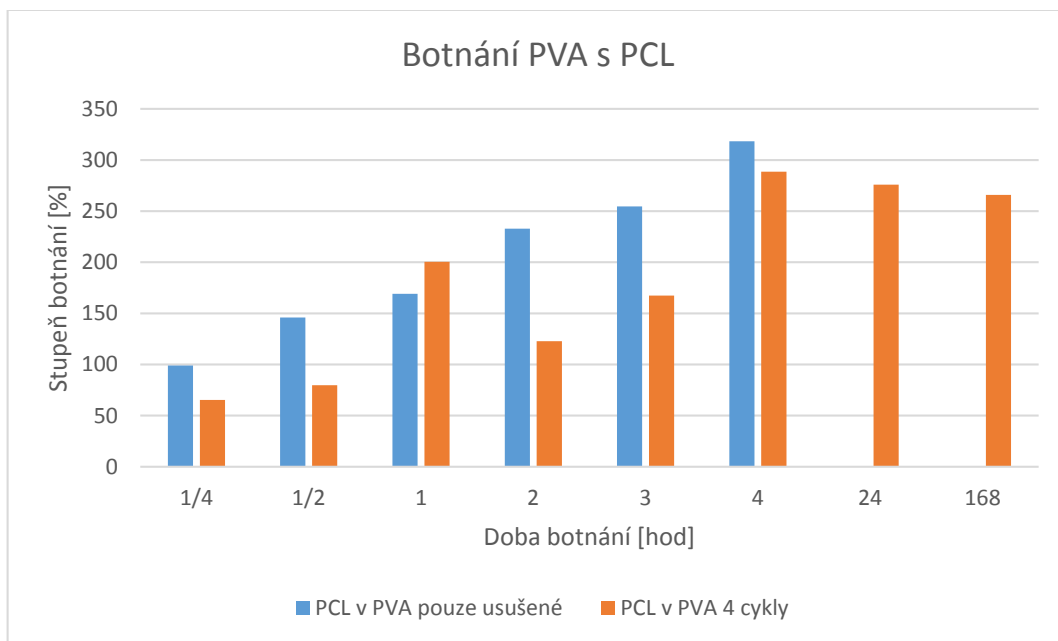
Označení vzorku	popis
Pouze usušené PVA	pouze 3 týdny sušený PVA hydrogel při 20 °C
PVA v sušárně	pouze sušený PVA hydrogel při 80 °C
PVA 4 cykly	pouze PVA hydrogel fyzikálně zesíťovaný metodou freeze-thaw 4 cykly (20 h při -20 °C a 4 h při 20 °C)
PCL v PVA pouze usušené	kompozit PVA hydrogelu a elektrostaticky zvlákněných PCL vláken pouze sušených po dobu 3 týdnů při 20 °C
PCL v PVA 4 cykly	kompozit PVA hydrogelu a elektrostaticky zvlákněných PCL vláken fyzikálně zesíťovaný metodou freeze-thaw 4 cykly (20 h při -20 °C a 4 h při 20 °C)
Lyofilizované PVA	fyzikálně zesíťovaný PVA hydrogel metodou freeze-thaw 4 cykly (20 h při -20 °C a 4 h při 20 °C) následně lyofilizován
Lyofilizované PCL v PVA	kompozit PVA hydrogelu a elektrostaticky zvlákněných PCL vláken fyzikálně zesíťovaný metodou freeze-thaw 4 cykly (20 h při -20 °C a 4 h při 20 °C) následně lyofilizován
Pouze PCL vlákna	pouze elektrostaticky zvlákněný PCL



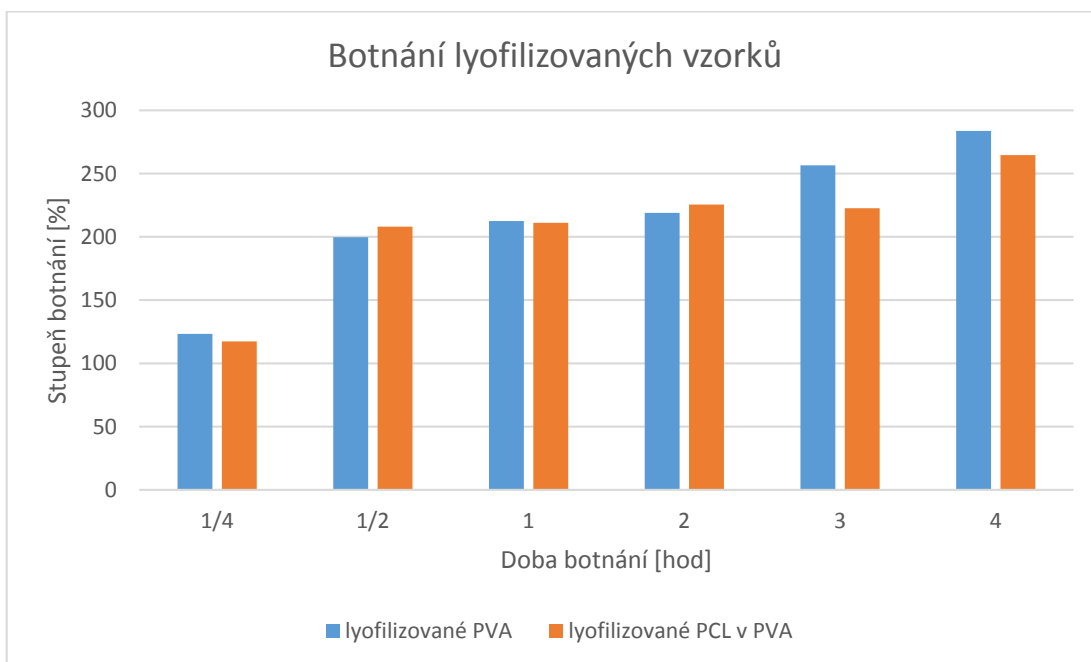
Graf 2 Souhrnný graf stupně botnění všech vzorků při všech délkách testování

Na grafu 2 se právě pro neopakování měření jednotlivých vzorků neprokazují žádné výrazné tendence. U vzorku obsahujícího pouze PCL vlákna se samozřejmě

nejedná o botnání, ale spíše o zadržování vody mezi jednotlivými vlákny působením kapilárních sil. V grafu 2 jsou pro tuto práci důležité hlavně výsledky pro vzorky PCL v PVA pouze sušené, PCL v PVA 4 cykly a lyofilizované PVA a PCL v PVA, proto byl pro tyto vybrané vzorky vytvořen samostatný graf. Pro první dva zmíněné vzorky se jedná o graf 3 a pro zbylé se jedná o graf 4.



Graf 3 Porovnání stupně botnění vzorků PCL v PVA



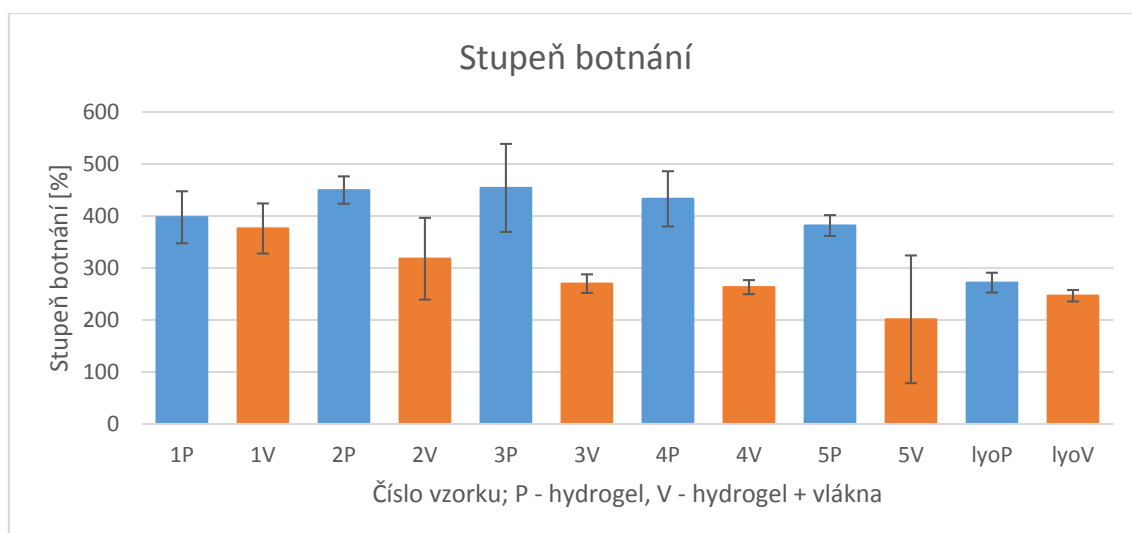
Graf 4 Porovnání stupně botnění lyofilizovaných vzorků

První z grafů (graf 3) je důležitý z hlediska vlivu síťování hydrogelu na jeho chování ve vodě. Z grafu 3 je snadno poznat, že pouze usušené PVA, tedy nezesíťované, nabírá vodu mnohem snadněji, než zesíťované PVA pomocí čtyř cyklů freeze-thaw. To je dáno právě složitě propletenou sítí, která se tvoří při procesu síťování. Zároveň bylo tímto způsobem testování možné si ověřit, že opravdu k síťování hydrogelu dochází. Druhé dva vzorky bylo zajímavé porovnat z hlediska působení vláknenných příměsí přítomných v hydrogelu. Z grafu 4 je patrné, že přidáním PCL vláken do hydrogelu, nedochází k žádnému výraznému úbytku botnění hydrogelu.

Následující graf 5 zobrazuje stupeň botnění série vzorků popsaných v tabulce 4. Všechny testované vzorky byly testovány po trojicích, aby mohla být provedena alespoň základní statistika. Z grafu 5 je patrné, že hydrogel by stačilo fyzikálně síťovat metodou freeze-thaw pouze dvakrát, při více cyklech již nedochází k výraznému nárůstu stupně botnění.

Tabulka 4 Popis testovaných vzorků pro stupeň botnění

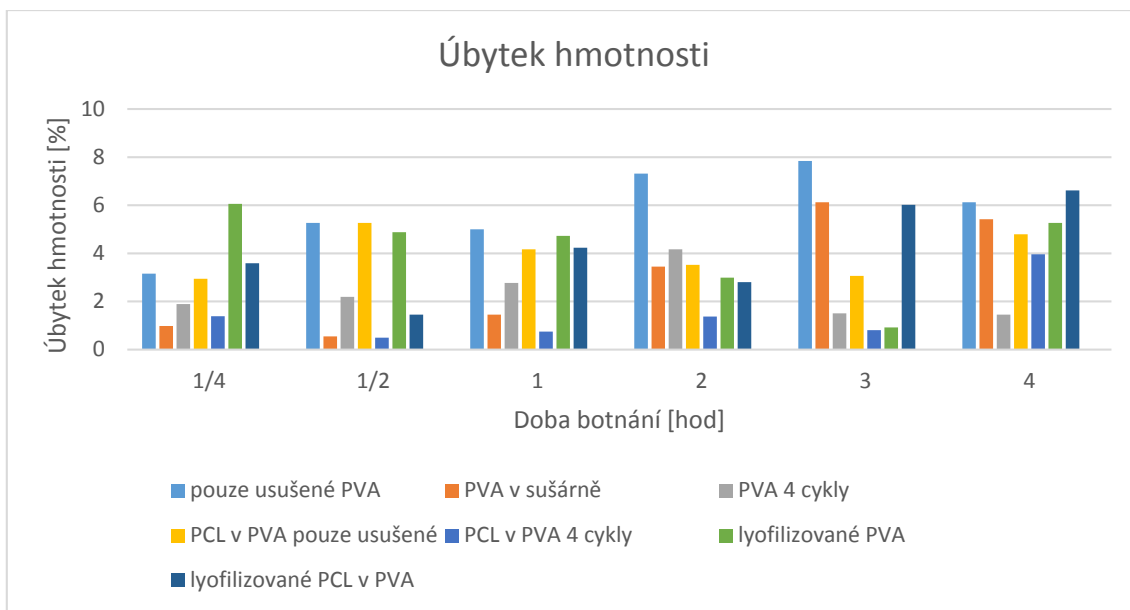
Označení vzorku	Popis vzorku
1	jen zmražení a rozmražení (20 h při -20 °C)
2	1 cyklus fyzikálního freeze-thaw síťování (20 h při -20 °C, 4 h při 20 °C, 20 h při -20 °C)
3	2 cykly fyzikálního freeze-thaw síťování (20 h při -20 °C, 4 h při 20 °C, 20 h při -20 °C, 4 h při 20 °C, 20 h při -20 °C)
4	3 cykly fyzikálního freeze-thaw síťování (20 h při -20 °C, 4 h při 20 °C, 20 h při -20 °C, 4 h při 20 °C, 20 h při -20 °C, 4 h při 20 °C, 20 h při -20 °C)
5	4 cykly fyzikálního freeze-thaw síťování (20 h při -20 °C, 4 h při 20 °C, 20 h při -20 °C, 4 h při 20 °C, 20 h při -20 °C, 4 h při 20 °C, 20 h při -20 °C, 4 h při 20 °C, 20 h při -20 °C)
lyo	lyofilizované vzorky po 4 cyklech fyzikálního freeze-thaw síťování (20 h při -20 °C, 4 h při 20 °C, 20 h při -20 °C, 4 h při 20 °C, 20 h při -20 °C, 4 h při 20 °C, 20 h při -20 °C, 4 h při 20 °C, 20 h při -20 °C, 24 h při -80 °C)



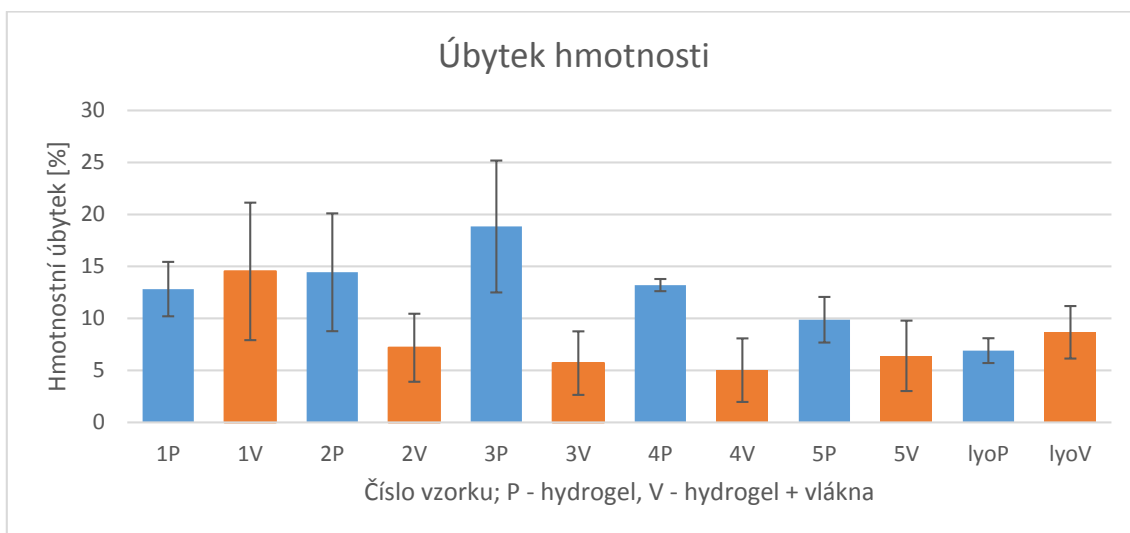
Graf 5 Graf stupně botnání na vzorcích popsaných v tabulce 4

3.6.2. Úbytek hmotnosti

Dalším sledovaným parametrem byl úbytek hmotnosti hydrogelu, kterým je popisována soudržnost, tedy nedestruktibilita, celého hydrogelu. Ten je úzce spjat s jeho botnavostí, proto i zde byl sledován na vzorcích smáčených určitou dobu. Vše je zaznamenáno na grafu 6. Na grafu je patrné, že v případě samotného hydrogelu, dochází k menším úbytkům hmotnosti, pokud byl hydrogel zesíťován. Ještě menší úbytky hmotnosti vykazují vzorky síťovaného hydrogelu s PCL vlákny. Vybrané vzorky popsané v tabulce 4 jsou zobrazeny na grafu 7, z kterého je patrný dostatečný jeden cyklus fyzikálního freeze-thaw síťování. Z grafu 6 je poté patrné, že i nezesíťované vzorky vysušeného PVA roztoku neměly velké úbytky hmotnosti, což je zapříčiněno použitím PVA s vysokým stupněm hydrolýzy a vyšší molekulovou hmotností.



Graf 6 Graf úbytků hmotností na vzorcích smáčených různě dlouhou dobu



Graf 7 Graf úbytku hmotnosti na vzorcích popsanych v tabulce 4

3.6.3. DSC

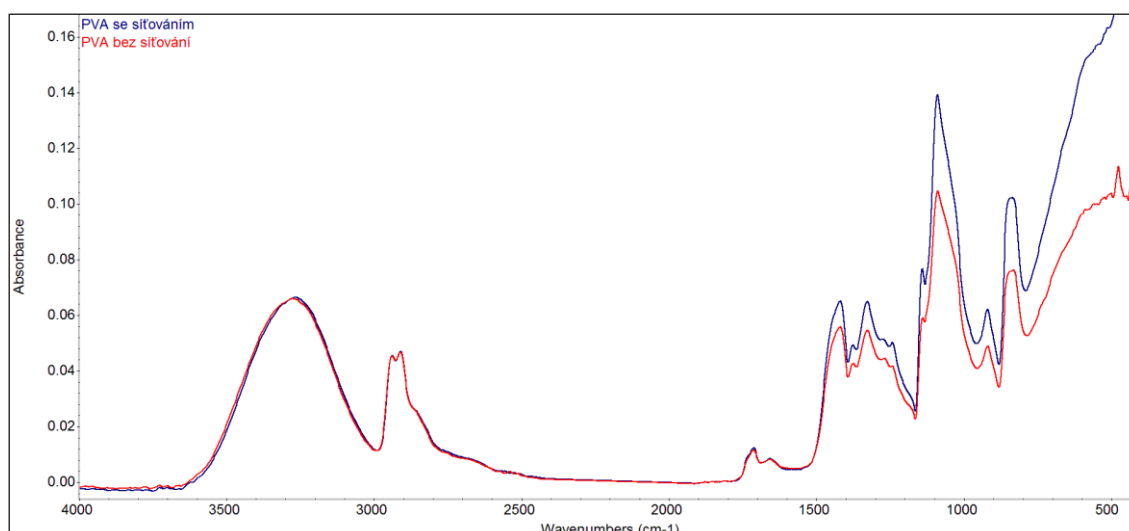
V tomto testu bylo za cíl potvrdit přítomnost fyzikálně zesíťovaných polymerních řetězců v hydrogelu a jejich vliv na výslednou soudržnost celého systému teplotním namáháním. Také bylo pomocí tohoto testu možno zjistit stupeň krystalinity všech testovaných materiálů, kterými byly pouze vysušené PVA při 20 °C a 80 °C, a následně fyzikálně zesíťované PVA metodou freeze-thaw. Poslední zmíněný vzorek by měl vykazovat nejvyšší tepelnou stabilitu ze všech testovaných, stejně tak jako nejvyšší krystalinitu. Výsledné grafy se všemi detaily jsou, pro lepší přehlednost, umístěny v příloze 4. Při prvním ohřevu je zřetelně vidět, že u zesíťovaného PVA metodou freeze-thaw, došlo oproti nezesíťovaným vzorkům

k vymizení teploty skelného přechodu. Zároveň měl tento vzorek nejvyšší krystalinitu, i když nebyla výrazně vyšší než u vzorku PVA vysušeného při 20 °C. Nejhorší průběh byl prokázán u vzorku pouze sušeného PVA při teplotě 80 °C, což je pravděpodobně zapříčiněno vysokou rychlostí vysychání hydrogelního roztoku, díky čemuž nemají polymerní řetězce dostatek času k lepšímu zformování. Na grafu s druhým ohřevem těchto vzorků se dá vyčíst stejný průběh pro všechny vzorky, což je dáno použitím fyzikálního síťování, které není permanentní, a bylo tedy prvním ohřevem zničeno.

Následovala stejná měření pro kompozit PCL v PVA, která jsou zobrazena na dalších grafech v příloze 4. Na těchto grafech jsou zřetelně viditelné dva peaky, jeden okolo oblasti tání PCL, tedy 60 °C, druhý pak okolo oblasti tání PVA, 200 °C. Černou barvou je znázorněn pouze vysušený kompozit PCL s PVA, červenou barvou potom fyzikálně zesíťovaný kompozit PCL s PVA metodou freeze-thaw. Bohužel není možné porovnávat krystalinitu, jelikož fyzikálně zesíťovaný kompozit obsahoval vyšší podíl PCL vláken, než kompozit pouze vysušený. Toto je nejlépe viditelné u jednoho z posledních grafů, kde bylo při tání PCL vláken ve vysušeném kompozitu uvolněno o více jak 30 J/g méně energie, než u kompozitu fyzikálně zesíťovaného. Proto je doporučováno další hlubší zkoumání na větším množství vzorků pomocí DSC analýzy nebo rentgenové difrakce.

3.6.4. IR spektrofotometrie

K podpoření teorie o narůstající krystalinitě s narůstajícím počtem síťování hydrogelu, byla provedena též infračervená spektrofotometrie. Její výstup je zobrazen na grafu 8, kde je červeně znázorněno PVA bez síťování, modře pak fyzikálně zesíťované PVA metodou freeze-thaw. Bohužel nebyl počet cyklů freeze-thaw dostatečně vysoký, aby byl spektrofotometr schopen zaznamenat mezi těmito dvěma vzorky výrazný rozdíl.



Graf 8 Výstup z infračervené spektrofotometrie

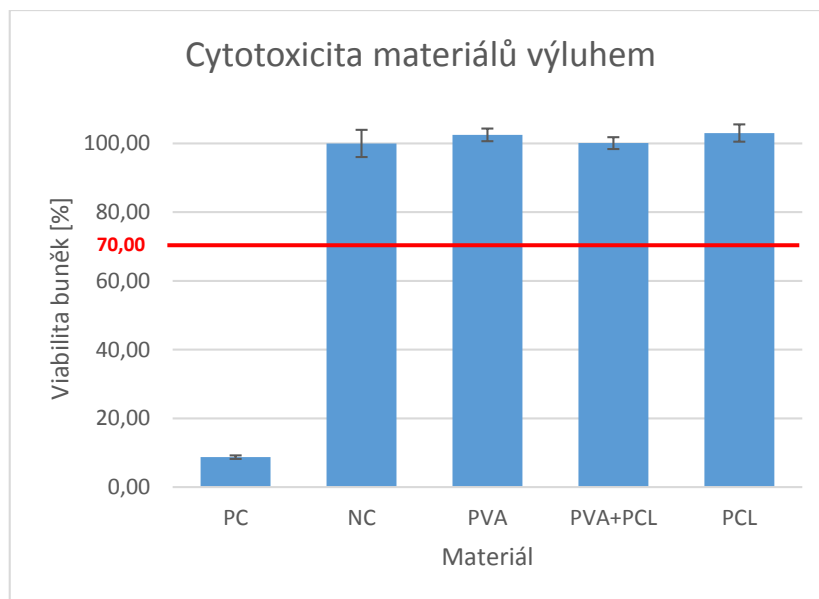
3.6.5. Cytotoxicita

Závěrečným, avšak nejdůležitějším testem, bylo testování vyrobených kompozitů na cytotoxicitu. V tabulce 5 jsou uvedeny hodnoty naměřené spektrofotometrem. A, G, H odpovídají volným řádkům v 96 jamkové destičce, PC je pozitivní kontrola – tedy všechny buňky by měly být mrtvé, NC je poté negativní kontrola – tedy test pouze s kultivačním médiem DMEM, aby byla zajištěna životaschopnost všech buněk, a následně výsledky vyrobených kompozitů PVA, PVA+PCL, a pouze PCL.

Tabulka 5 Výsledky absorbance vlnů výsledných kompozitů ze spektrofotometru

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,049	0,047	0,05	0,05	0,05	0,047	0,047	0,047	0,049	0,048	0,049	0,051
PC	0,05	0,2	0,206	0,211	0,205	0,202	0,2	0,207	0,205	0,206	0,206	0,05
NC	0,048	3,735	3,687	3,794	3,7	3,799	3,802	3,81	3,773	3,73	3,734	0,049
PVA	0,048	3,7	3,597	3,515	3,584	3,459	3,423	3,6	3,578	3,634	3,701	0,049
PVA+PCL	0,049	3,636	3,517	3,544	3,705	3,678	3,703	3,661	3,653	3,623	3,724	0,048
PCL	0,048	3,699	3,708	3,706	3,736	3,669	3,621	3,642	3,625	3,834	3,721	0,048
G	0,049	0,05	0,048	0,047	0,048	0,048	0,048	0,048	0,047	0,048	0,051	0,049
H	0,051	0,048	0,048	0,05	0,048	0,048	0,047	0,047	0,05	0,053	0,048	0,05

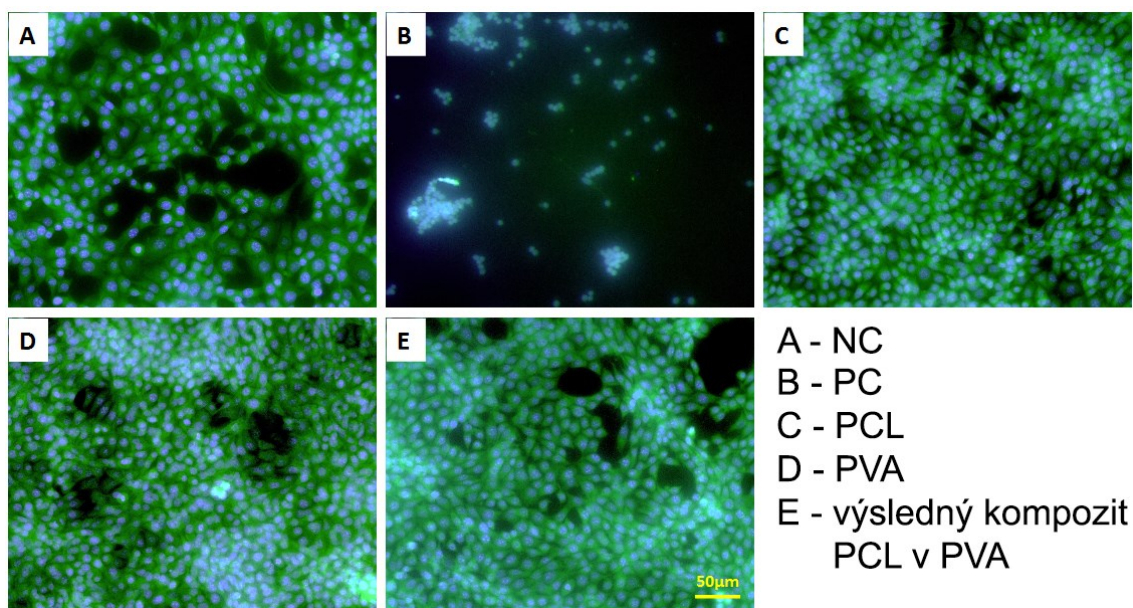
Aby mohly být výsledky lépe interpretovány, byly přepočteny na procento viability buněk, tedy kolik procent z nasazených buněk v přítomnosti materiálu bylo schopno přežít. Tento graf je uveden v grafu 9.



Graf 9 Výsledky cytotoxicity vyrobených kompozitů s vyznačenými 70 % viability

Tak jak bylo předpokládáno, v pozitivní kontrole nebyly schopny buňky přežít, naopak u negativní kontroly přežily buňky všechny. U testovaných vyrobených kompozitů je zřejmé, že došlo k velmi vhodné kombinaci dvou netoxických materiálů, a ani rozpouštědla použitá při výrobě vláken z PCL ve výsledném kompozitu nesetrvávají. V grafu je znázorněna červená linka znázorňující hranici, kdy je ještě možné prohlásit materiál za cytocompatibilní, tedy pokud je pod 70 %, je cytotoxický.

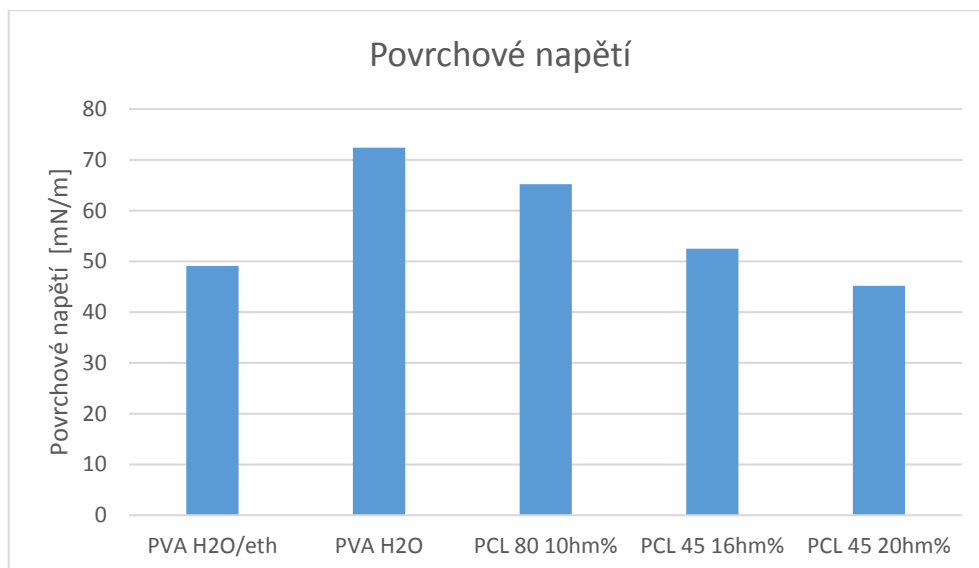
Výsledné snímky z fluorescenční mikroskopie jsou zobrazeny na obrázku 44. Na snímcích nejsou viditelné rozdíly buněčné viability, mimo PC (pozitivní kontrola), kdy byly buňky inkubovány s roztokem 0,1 % Tritonu v plném kultivačním médiu, který je pro ně toxický. Výsledky buněčné morfologie odpovídají metabolickému testu CCK-8, kdy výsledky prokázaly, že materiály neuvolňují ze svého objemu žádné látky, které by byly pro buňky dráždivé a toxické. Morfologie buněk je u buněk inkubovaných s materiálovým výluhem srovnatelná, jako je tomu u buněk inkubovaných v čistém kompletním médiu (NC-negativní kontrola). Lze tedy tvrdit, že materiály jsou cytocompatibilní a vhodné pro tkáňové inženýrství, což je ovšem nutné potvrdit ještě dalším testováním na buněčnou adhezi a proliferaci na sledovaných materiálech.



Obrázek 44 Morfologie buněk adherovaných na dně mikrotitračních jamek obarvených phalloidin-FITC (zelená) a DAPI (modrá), A-negativní kontrola, B-positivní kontrola, C-výluh z materiálu PCL, D-výluh z materiálu PVA a E-výluh z materiálu PVA/PCL; měřítko 50 μm

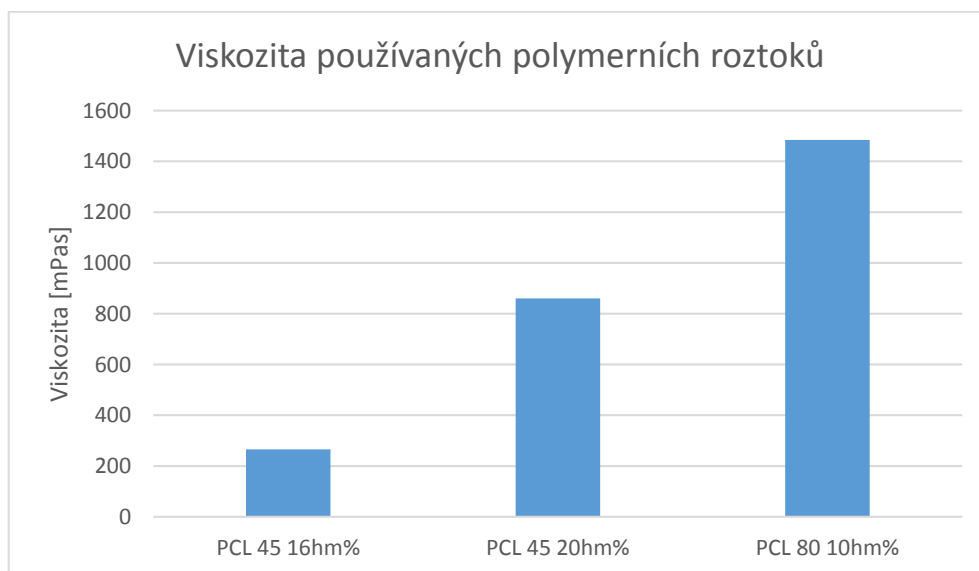
3.7. Povrchové napětí, viskozita, elektrická vodivost

Naměřené hodnoty povrchových napětí veškerých použitých polymerních roztoků jsou uvedeny na grafu 10. Z tohoto grafu je jednoznačně patrné, že k noření elektrostaticky zvlákněných vláken, by mohlo docházet pouze v případě kombinace PVA rozpuštěného v systému dH_2O :ethanol a vláken zvlákněných z roztoků PCL 80 10 hm% nebo PCL 45 16 hm%. Jelikož ale nebylo možné použít tento rozpouštědlový systém pro hydrogelní roztok, je následně zřejmé, že noření vznikajících vláken do PVA rozpuštěného pouze v dH_2O , by mohlo docházet pouze v případě PCL s vyšší molekulovou hmotností, jelikož rozdíl povrchového napětí není ještě tak markantní, jako u PCL s nižší molekulovou hmotností.



Graf 10 Graf naměřených hodnot povrchového napětí všech používaných polymerních roztoků pro elektrostatické zvlákňování

Naměřené hodnoty viskozit používaných polymerních roztoků pro elektrostatické zvlákňování jsou zobrazeny na grafu 11. Stoupající tendence je přirozenou vlastností jak zvyšující se koncentrace roztoku v případě PCL s nižší molekulovou hmotností, tak delších polymerních řetězců v případě PCL s vyšší molekulovou hmotností.



Graf 11 Viskozity používaných polymerních roztoků pro elektrostatické zvlákňování

Elektrická vodivost byla měřena pouze pro hydrogelní roztok PVA v dH₂O, do kterého bylo následně celý experiment elektrostaticky zvlákňováno. Naměřená hodnota byla 69,5 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Závěr

Tato diplomová práce je zaměřena na kombinaci hydrogelu a vlákenného materiálu. Ve své teoretické části se věnuje základnímu představení výroby a vlastností hydrogelů, dále pak popisuje vybrané konkrétní kombinace hydrogelů a vláken, zejména s ohledem na elektrostaticky zvlákněné materiály. V představovaných publikacích jsou popisovány zejména medicínské aplikace, obzvláště tvorba materiálů pro tkáňové inženýrství, dodávání léčiv a kryty ran. Jsou zde popsány příklady technologií výroby materiálů kombinujících hydrogel a vlákna.

V experimentální části je úspěšně prokázána aplikace elektrostatického zvláknování do kapaliny, v tomto případě tedy polymerního roztoku, který je schopen tvořit hydrogel. Vhodným nastavením zvláknovacího procesu bylo dosaženo smáčení vodným roztokem i pro hydrofobní materiál – tedy byla úspěšně vyřešena kombinace PCL vláken a PVA hydrogelu. Zvoleným polymerním roztokem pro tvorbu vláken byl 10 hm% PCL 80, ke kterému byl zvolen vodný roztok PVA, který sloužil jako kolektor při elektrostatickém zvláknování do kapaliny. Následné fyzikální síťování splnilo požadavek na tvorbu hydrogelu, a to bez přídavků dalších chemických látek jako síťovadel. Bylo prokázáno, že hydrogel s integrovanými vlákny vytváří, po fyzikálním síťování, stabilní strukturu, vhodnou pro další testování. Pro celkové testování stupně botnání a úbytku hmotnosti, by bylo v navazujících studiích vhodné testovat opakovaně větší množství vzorků, aby byly tendence, plynoucí ze zde provedených úvodních testů, statisticky vyhodnoceny a potvrzeny. Z testů stupně botnání a úbytků hmotnosti, při testování v PBS pro vybrané materiály po různém počtu freeze-thaw cyklů, vyplývá, že i fyzikální síťování pouze dvěma cykly je dostatečné, avšak je možné, že dochází dále ke změnám mechanických vlastností, a to jistě vyžaduje detailnější studii. Obecně je kombinace hydrogelu a vláken doporučována právě pro zlepšení mechanických vlastností hydrogelu samotného, avšak tento typ testování v této práci prováděn nebyl, proto je doporučován pro navazující experimenty.

Ač bylo noření vlákenného materiálu do vodného roztoku zajištěno snížením vzdálenosti mezi zvláknovacími elektrodami, čímž byla zřejmě ve zvláknovací trysce i po dopadu do kolektorové kapaliny zbytková rozpouštědla – konkrétně chloroform

a ethanol, jak je zřejmé ze snímků vláken dopadajících na pevný kolektor, byl výsledný materiál po fyzikálním síťování úspěšně testován jako cytokompatibilní. Bylo tedy ukázáno, že i když vlákna dopadají do kapalinového kolektoru, ve formě polymerního vodného roztoku, zcela nevysušena, dojde v průběhu fyzikálního síťování metodou freeze-thaw, a následného sušení, k odstranění těchto toxických rozpouštědel a výsledný materiál cytotoxický není.

Úvodní testy lyofilizace, na vybraných finálních vzorcích, prokázaly možnost takovýchto materiálů podrobení lyofilizaci, čímž dojde ke zvýšení jejich povrchu a porozity, díky čemuž se bude dále zvyšovat i stupeň botnání. Lyofilizace však vyžaduje další rozsáhlé testování, zejména s ohledem na vhodné rozměry vzorků před lyofilizací, a na její vhodně nastavené parametry.

Úspěšná výroba vzorků kombinujících PCL vlákna s PVA hydrogelem je nyní připravena pro další, hlubší testování s konkrétním aplikačním zaměřením, které předurčí konkrétní vlastnosti materiálů, jakožto jeho rozměry, poměr vláken a hydrogelu, průměry vláken, atd. Dále by mělo být zahájeno detailnější širší testování, a to nejen s ohledem na vlastnosti samotného kompozitu kombinujícího hydrogel a vlákna, ale i s ohledem na adhezi a migraci konkrétního typu buněk.

Seznam literatury

- [1] RATNER, Buddy D., Allan S. HOFFMAN, Frederick J. SCHOEN a Jack E. LEMONS. *Biomaterials Science* [online]. B.m.: Elsevier, 2013. ISBN 9780123746269. Dostupné z: doi:10.1016/C2009-0-02433-7
- [2] KUMAR, Anuj a Sung Soo HAN. PVA-based hydrogels for tissue engineering: A review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* [online]. 2017, **66**(4), 159–182. ISSN 1563535X. Dostupné z: doi:10.1080/00914037.2016.1190930
- [3] MALMONGE, Sônia M. Biocompatible Hydrogels. In: *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering* [online]. 2018. ISBN 9780128035818. Dostupné z: doi:10.1016/b978-0-12-803581-8.10077-3
- [4] MÄDER, K. *RESOMER®—Biodegradable Polymers for Sutures, Medical Devices, Drug Delivery Systems and Tissue Engineering* [online]. 2011. ISBN 8002274563. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/articles/material-matters/pdf/resomer-biodegradable-polymers.pdf>
- [5] LEI, Yu, Gongzheng ZHANG a Huanjun LI. Thermal-responsive nanocomposite hydrogel based on graphene oxide-polyvinyl alcohol/poly (N-isopropylacrylamide). In: *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* [online]. B.m.: Institute of Physics Publishing, 2017. ISSN 1757899X. Dostupné z: doi:10.1088/1757-899X/274/1/012115
- [6] WU, Shanglin, Mingning ZHU, Dongdong LU, Amir H. MILANI, Qing LIAN, Lee A. FIELDING, Brian R. SAUNDERS, Matthew J. DERRY, Steven P. ARMES, Daman ADLAM a Judith A. HOYLAND. Self-curing super-stretchable polymer/microgel complex coacervate gels without covalent bond formation. *Chemical Science* [online]. 2019, **10**(38), 8832–8839. ISSN 20416539. Dostupné z: doi:10.1039/c9sc02555c
- [7] AHMED, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research* [online]. 2015, **6**(2), 105–121. ISSN 20901232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jare.2013.07.006
- [8] KIATKAMJORNWONG, Suda. Superabsorbent Polymers and Superabsorbent Polymer Composites. *ScienceAsia* [online]. 2007, **33**(1), 39–43. ISSN 1513-1874. Dostupné z: doi:10.2306/scienceasia1513-1874.2007.33(s1).039
- [9] TALAAT, Ha, MH SOROUR, Ag ABOULNOUR, HF SHAALAN, Enas M AHMED, Am AWAD a Ma AHMED. Development of a Multi-Component Fertilizing Hydrogel with Relevant Techno-Economic Indicators. *& Environ. Sci.* 2008, **3**(5), 764–770. ISSN 1818-6769.
- [10] BARARI, Mohammad, Mahdi ABDOLLAHI a Mahmood HEMMATI. Synthesis and characterization of High molecular weight polyacrylamide nanoparticles by inverse-emulsion polymerization. *Iranian Polymer Journal (English Edition)*. 2011, **20**(1), 65–76. ISSN 10261265.
- [11] WATANABE, Naotaka, Yoshio HOSOYA, Akira TAMURA a Hiroshi KOSUGE. Characteristics of water-absorbent polymer emulsions. *Polymer International* [online]. 1993, **30**(4), 525–531. ISSN 10970126. Dostupné z: doi:10.1002/pi.4990300417
- [12] AJJI, Z., G. MIRJALILI, A. ALKHATAB a H. DADA. Use of electron beam for the production of hydrogel dressings. *Radiation Physics and Chemistry* [online]. 2008, **77**(2), 200–202. ISSN 0969806X. Dostupné z: doi:10.1016/j.radphyschem.2007.05.016

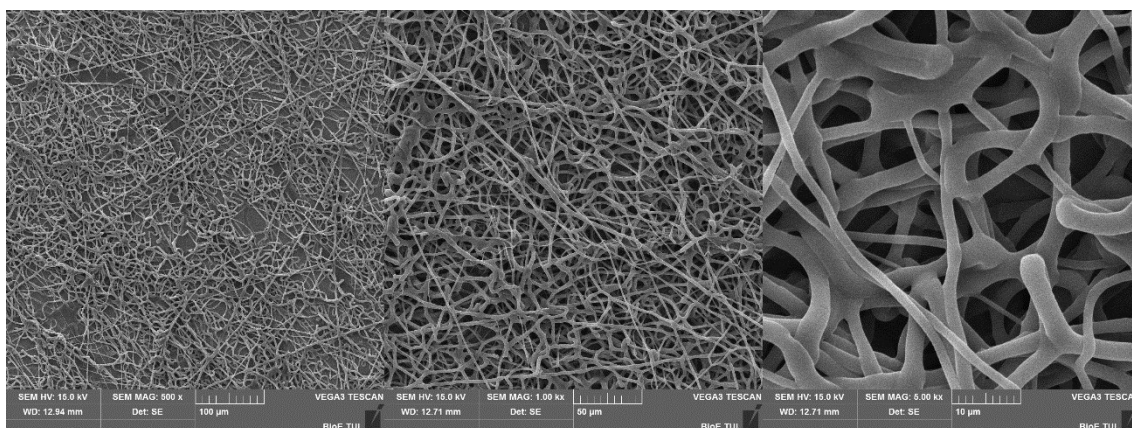
- [13] AKHTAR, Muhammad Faheem, Muhammad HANIF a Nazar Muhammad RANJHA. Methods of synthesis of hydrogels ... A review. *Saudi Pharmaceutical Journal* [online]. 2016, **24**(5), 554–559. ISSN 13190164. Dostupné z: doi:10.1016/j.jsps.2015.03.022
- [14] DONLAN, Rodney M., Peng WU, David W. GRAINGER a RATNER. *An introduction to materials in medicine* [online]. B.m.: Elsevier Science, 2004. ISBN 0125824637. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-087780-8.00025-5
- [15] PAȚACHIA, S., C. FLOREA, Chr FRIEDRICH a Y. THOMANN. Tailoring of poly(vinyl alcohol) cryogels properties by salts addition. *Express Polymer Letters* [online]. 2009, **3**(5), 320–331. ISSN 1788618X. Dostupné z: doi:10.3144/expresspolymlett.2009.40
- [16] HONG, Kyung Hwa a Gang SUN. Photoactive antimicrobial PVA hydrogel prepared by freeze-thawing process for wound dressing. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2010, **116**(4), 2418–2424. ISSN 00218995. Dostupné z: doi:10.1002/app.31827
- [17] GUPTA, Siddhi, Sudipta GOSWAMI a Arvind SINHA. A combined effect of freeze-thaw cycles and polymer concentration on the structure and mechanical properties of transparent PVA gels. *Biomedical Materials* [online]. 2012, **7**(1), 015006. ISSN 1748605X. Dostupné z: doi:10.1088/1748-6041/7/1/015006
- [18] FATHI, Ezatollah, Nahid ATYABI, Mohamad IMANI a Zeinab ALINEJAD. Physically crosslinked polyvinyl alcohol-dextran blend xerogels: Morphology and thermal behavior. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2011, **84**(1), 145–152. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2010.11.018
- [19] RICCIARDI, Rosa, Finizia AURIEMMA, Claudio DE ROSA a Françoise LAUPRÊTRE. X-ray Diffraction Analysis of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels, Obtained by Freezing and Thawing Techniques. *Macromolecules* [online]. 2004, **37**(5), 1921–1927. ISSN 00249297. Dostupné z: doi:10.1021/ma035663q
- [20] CASCONE, Maria Grazia, Luigi LAZZERI, Enzo SPARVOLI, Manuele SCATENA, Lorenzo Pio SERINO a Serena DANTI. Morphological evaluation of bioartificial hydrogels as potential tissue engineering scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2004, **15**(12), 1309–1313. ISSN 09574530. Dostupné z: doi:10.1007/s10856-004-5739-z
- [21] KASKO, Andrea M. Degradable Poly(ethylene glycol) Hydrogels for 2D and 3D Cell Culture. *Material Matters* [online]. 2011, **6**(3), 1–9. Dostupné z: papers3://publication/uuid/8773FB78-E317-4C97-B29B-43B1D9C02F48
- [22] PHELPS, Edward A., Nduka O. ENEMCHUKWU, Vincent F. FIORE, Jay C. SY, Niren MURTHY, Todd A. SULCHEK, Thomas H. BARKER a Andrés J. GARCÍA. Maleimide cross-linked bioactive PEG hydrogel exhibits improved reaction kinetics and cross-linking for cell encapsulation and in situ delivery. *Advanced Materials* [online]. 2012, **24**(1), 64–70. ISSN 09359648. Dostupné z: doi:10.1002/adma.201103574
- [23] ZHAO, Wen, Xing JIN, Yang CONG, Yuying LIU a Jun FU. Degradable natural polymer hydrogels for articular cartilage tissue engineering. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* [online]. 2013, **88**(3), 327–339. ISSN 02682575. Dostupné z: doi:10.1002/jctb.3970
- [24] ANDERSEN, Therese, Pia AUK-EMBLEM a Michael DORNISH. 3D Cell Culture in Alginate Hydrogels. *Microarrays* [online]. 2015, **4**(2), 133–161. ISSN 2076-3905. Dostupné z: doi:10.3390/microarrays4020133
- [25] HAMED, Hamid, Sara MORADI, Samuel M. HUDSON a Alan E. TONELLI. Chitosan based

- hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2018, **199**, 445–460. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2018.06.114
- [26] NIE, Jingyi, Zhengke WANG a Qiaoling HU. Difference between Chitosan Hydrogels via Alkaline and Acidic Solvent Systems. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**(1), 36053. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/srep36053
- [27] MA, Shuaijiang, Shiwei WANG, Qian LI, Yuting LENG, Lianhui WANG a Guo Hua HU. A Novel Method for Preparing Poly(vinyl alcohol) Hydrogels: Preparation, Characterization, and Application. *Industrial and Engineering Chemistry Research* [online]. 2017, **56**(28), 7971–7976. ISSN 15205045. Dostupné z: doi:10.1021/acs.iecr.7b01812
- [28] JIANG, Shan, Sha LIU a Wenhao FENG. PVA hydrogel properties for biomedical application. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* [online]. 2011, **4**(7), 1228–1233. ISSN 17516161. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmbbm.2011.04.005
- [29] KAI, Dan, Molamma P. PRABHAKARAN, Benjamin STAHL, Markus EBLENKAMP, Erich WINTERMANTEL a Seeram RAMAKRISHNA. Mechanical properties and in vitro behavior of nanofiberhydrogel composites for tissue engineering applications. *Nanotechnology* [online]. 2012, **23**(9). ISSN 09574484. Dostupné z: doi:10.1088/0957-4484/23/9/095705
- [30] VISSER, Jetze, Ferry P.W. MELCHELS, June E. JEON, Erik M. VAN BUSSEL, Laura S. KIMPTON, Helen M. BYRNE, Wouter J.A. DHERT, Paul D. DALTON, Dietmar W. HUTMACHER a Jos MALDA. Reinforcement of hydrogels using three-dimensionally printed microfibrils. *Nature Communications* [online]. 2015, **6**, 1–10. ISSN 20411723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms7933
- [31] PAN, Jian Feng, Ning Hua LIU, Hui SUN a Feng XU. Preparation and characterization of electrospun PLCL/ poloxamer nanofibers and Dextran/Gelatin Hydrogels for skin tissue engineering. *PLoS ONE* [online]. 2014, **9**(11), 1–12. ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0112885
- [32] WANG, Xuefen, Minghua MIN, Zongyuan LIU, Yin YANG, Zhe ZHOU, Meifang ZHU, Yanmo CHEN a Benjamin S. HSIAO. Poly(ethyleneimine) nanofibrous affinity membrane fabricated via one step wet-electrospinning from poly(vinyl alcohol)-doped poly(ethyleneimine) solution system and its application. *Journal of Membrane Science* [online]. 2011, **379**(1–2), 191–199. ISSN 03767388. Dostupné z: doi:10.1016/j.memsci.2011.05.065
- [33] XU, Shuxin, Liandong DENG, Jianhua ZHANG, Li YIN a Anjie DONG. Composites of electrospun-fibers and hydrogels: A potential solution to current challenges in biological and biomedical field. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* [online]. 2016, **104**(3), 640–656. ISSN 15524981. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.b.33420
- [34] GHAFARI, A. M., S. RAJABI-ZELETI, M. NAJI, M. H. GHANIAN a H. BAHARVAND. Mechanical reinforcement of urinary bladder matrix by electrospun polycaprolactone nanofibers. *Scientia Iranica* [online]. 2017, **24**(6), 3476–3480. ISSN 10263098. Dostupné z: doi:10.24200/sci.2017.4418
- [35] RIVET, Christopher J., Kun ZHOU, Ryan J. GILBERT, David I. FINKELSTEIN a John S. FORSYTHE. Cell infiltration into a 3D electrospun fiber and hydrogel hybrid scaffold implanted in the brain. *Biomatter* [online]. 2015, **5**(June), e1005527. ISSN 21592535. Dostupné z: doi:10.1080/21592535.2015.1005527

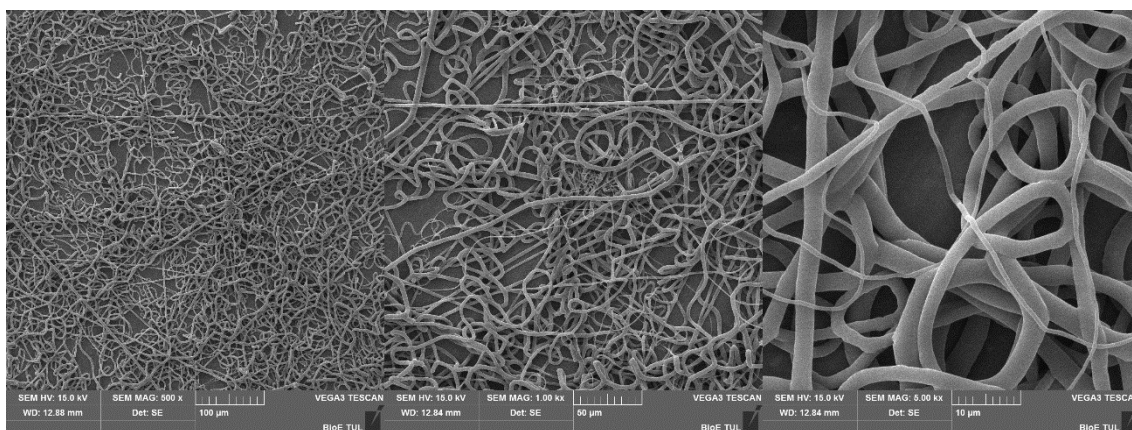
- [36] KONG, Bin, Wei SUN, Guoshi CHEN, Song TANG, Ming LI, Zengwu SHAO a Shengli MI. Tissue-engineered cornea constructed with compressed collagen and laser-perforated electrospun mat. *Scientific Reports* [online]. 2017, **7**(1), 1–13. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-01072-0
- [37] ANDERSON, Kyle D., David LU, Michael E. MCCONNEY, Tao HAN, Darrell H. RENEKER a Vladimir V. TSUKRUK. Hydrogel microstructures combined with electrospun fibers and photopatterning for shape and modulus control. *Polymer* [online]. 2008, **49**(24), 5284–5293. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2008.09.039
- [38] LIU, Wei, Jianchao ZHAN, Yan SU, Tong WU, Seeram RAMAKRISHNA, Susan LIAO a Xiumei MO. Injectable hydrogel incorporating with nanoyarn for bone regeneration. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 2014, **25**(2), 168–180. ISSN 09205063. Dostupné z: doi:10.1080/09205063.2013.848326
- [39] ESLAMI, Maryam, Nihal Engin VRANA, Pinar ZORLUTUNA, Shilpa SANT, Sungmi JUNG, Nafiseh MASOUMI, Ramazan Ali KHAVARI-NEJAD, Gholamreza JAVADI a Ali KHADEMHOSEINI. Fiber-reinforced hydrogel scaffolds for heart valve tissue engineering. *Journal of Biomaterials Applications* [online]. 2014, **29**(3), 399–410. ISSN 15308022. Dostupné z: doi:10.1177/0885328214530589
- [40] FORMICA, Florian A., Ece ÖZTÜRK, Samuel C. HESS, Wendelin J. STARK, Katharina MANIURA-WEBER, Markus ROTTMAR a Marcy ZENOBI-WONG. A Bioinspired Ultraporous Nanofiber-Hydrogel Mimic of the Cartilage Extracellular Matrix. *Advanced Healthcare Materials* [online]. 2016, **5**(24), 3129–3138. ISSN 21922659. Dostupné z: doi:10.1002/adhm.201600867
- [41] XU, Tao, Kyle W. BINDER, Mohammad Z. ALBANNA, Dennis DICE, Weixin ZHAO, James J. YOO a Anthony ATALA. Hybrid printing of mechanically and biologically improved constructs for cartilage tissue engineering applications. *Biofabrication* [online]. 2013, **5**(1). ISSN 17585082. Dostupné z: doi:10.1088/1758-5082/5/1/015001
- [42] BENKIRANE-JESSEL, Nadia. Bi-layered Nano Active Implant with Hybrid Stem Cell Microtissues for Tuned Cartilage Hypertrophy. *Journal of Stem Cell Research & Therapeutics* [online]. 2015, **1**(1), 12–20. Dostupné z: doi:10.15406/jsrt.2015.01.00004
- [43] MCMURTREY, Richard J. Patterned and functionalized nanofiber scaffolds in three-dimensional hydrogel constructs enhance neurite outgrowth and directional control. *Journal of Neural Engineering* [online]. 2014, **11**(6). ISSN 17412552. Dostupné z: doi:10.1088/1741-2560/11/6/066009
- [44] YAO, Shenglian, Shukui YU, Zheng CAO, Yongdong YANG, Xing YU, Hai Quan MAO, Lu Ning WANG, Xiaodan SUN, Lingyun ZHAO a Xiumei WANG. Hierarchically aligned fibrin nanofiber hydrogel accelerated axonal regrowth and locomotor function recovery in rat spinal cord injury. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2018, **13**, 2883–2895. ISSN 11782013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S159356
- [45] YANG, Ying, Ian WIMPENNY a Mark AHEARNE. Portable nanofiber meshes dictate cell orientation throughout three-dimensional hydrogels. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* [online]. 2011, **7**(2), 131–136. ISSN 15499634. Dostupné z: doi:10.1016/j.nano.2010.12.011
- [46] EKAPUTRA, Andrew K., Glenn D. PRESTWICH, Simon M. COOL a Dietmar W. HUTMACHER. Combining electrospun scaffolds with electrosprayed hydrogels leads to three-dimensional cellularization of hybrid constructs. *Biomacromolecules* [online]. 2008, **9**(8), 2097–2103. ISSN 15257797. Dostupné z: doi:10.1021/bm800565u

- [47] SOVINA, Jan. *Elektrostatické zvlákňování do kapaliny*. B.m., 2018. Technická univerzita v Liberci.
- [48] JOY, David C. a Brian J. FORD. Scanning electron microscope. *PCI-Paint and Coatings Industry* [online]. 2016 [vid. 2018-04-04]. Dostupné z: doi:10.1159/000427320
- [49] BISHT, Deepak a Zeenat IQBAL. Lyophilization - Process and Optimization for Pharmaceuticals. *International Journal of Drug Regulatory Affairs* [online]. 2018, **3**(1), 30–40. ISSN 2321-7162. Dostupné z: doi:10.22270/ijdra.v3i1.156
- [50] WELDON, Dwight G. Differential scanning calorimetry. In: *Journal of Protective Coatings and Linings* [online]. B.m.: Elsevier, 2014, s. 21–23. ISSN 87551985. Dostupné z: doi:10.3139/9781569906446.007
- [51] STUART, B H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications* [online]. B.m.: Wiley, 2004. Analytical Techniques in the Sciences (AnTs) *. ISBN 9780470011133. Dostupné z: <https://books.google.pt/books?id=xQVog8RrJKcC>
- [52] VOHLÍDAL, Jiří, Alois JULÁK a Karel ŠTULÍK. *Chemické a analytické tabulky*. B.m.: Grada, 1999. ISBN 978-80-7169-855-5.
- [53] LINS, Luanda, Valeria BUGATTI, Sébastien LIVI a Giuliana GORRASI. Ionic Liquid as Surfactant Agent of Hydrotalcite: Influence on the Final Properties of Polycaprolactone Matrix. *Polymers* [online]. 2018, **10**, 44. Dostupné z: doi:10.3390/polym10010044
- [54] RENEKER, Darrell H. a Alexander L. YARIN. Electrospinning jets and polymer nanofibers. *Polymer* [online]. 2008, **49**(10), 2387–2425. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2008.02.002

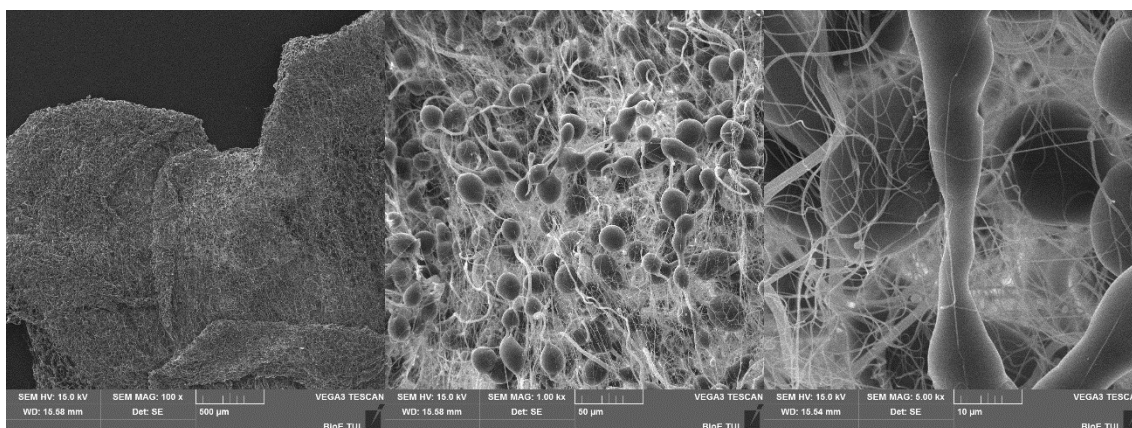
Příloha 1 – Snímky s elektronového rastrovacího mikroskopu



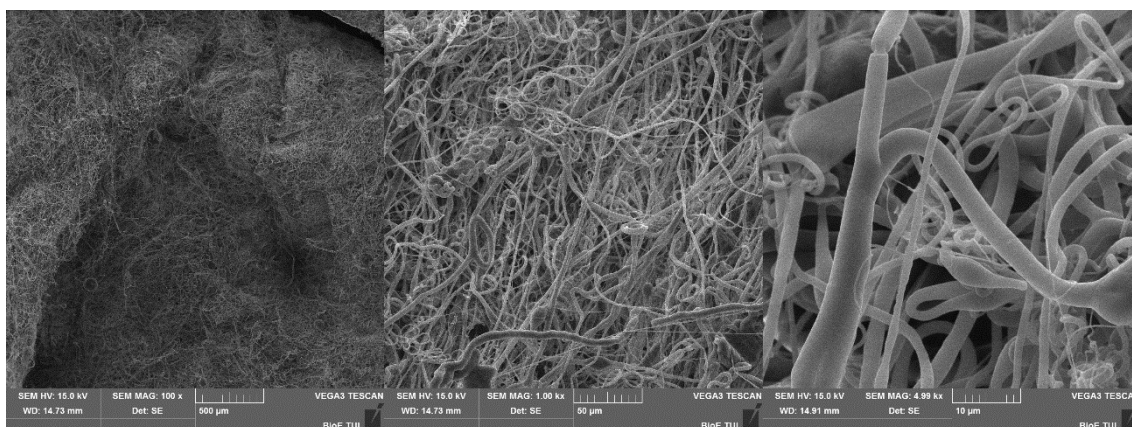
Obrázek 45 Vybrané SEM snímky vlákenné strukturu zvlákněné z 10% PCL 80 při vzdálenosti elektrod 65 mm na hliníkovou folii; měřítka 100 µm, 50 µm, a 10 µm



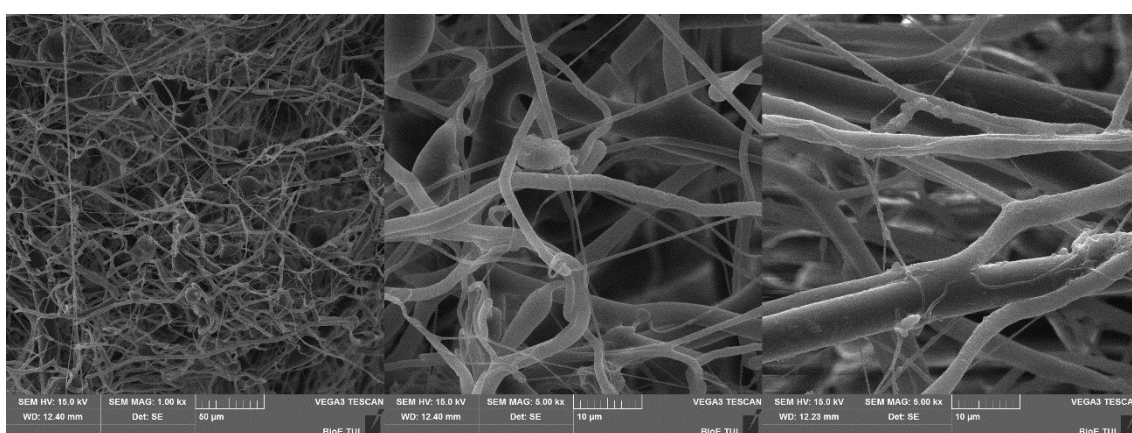
Obrázek 46 Vybrané SEM snímky vlákenné strukturu zvlákněné z 10% PCL 80 při vzdálenosti elektrod 165 mm na hliníkovou folii; měřítka 100 µm, 50 µm, a 10 µm



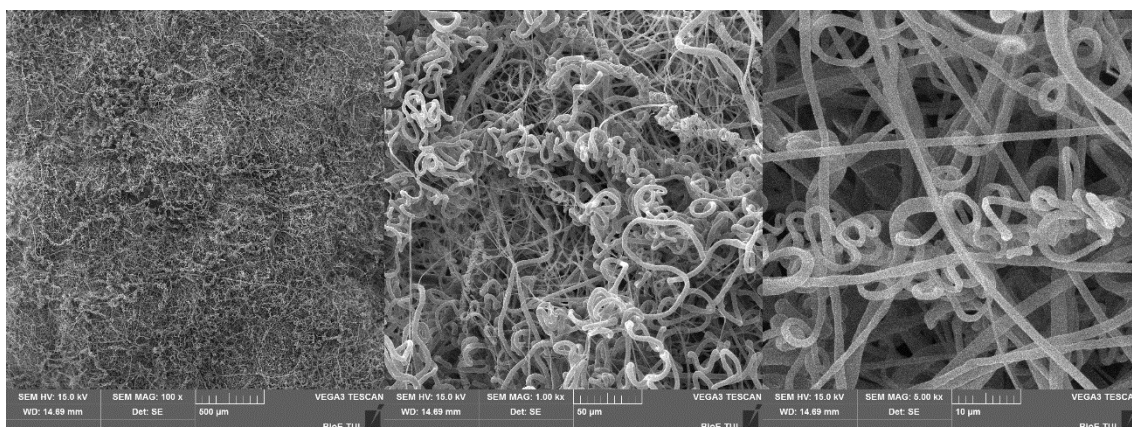
Obrázek 47 Vybrané SEM snímky vlákenné strukturu zvlákněné z 16% PCL 45 při vzdálenosti elektrod 165 mm do ethanolu; měřítka 500 µm, 50 µm, a 10 µm



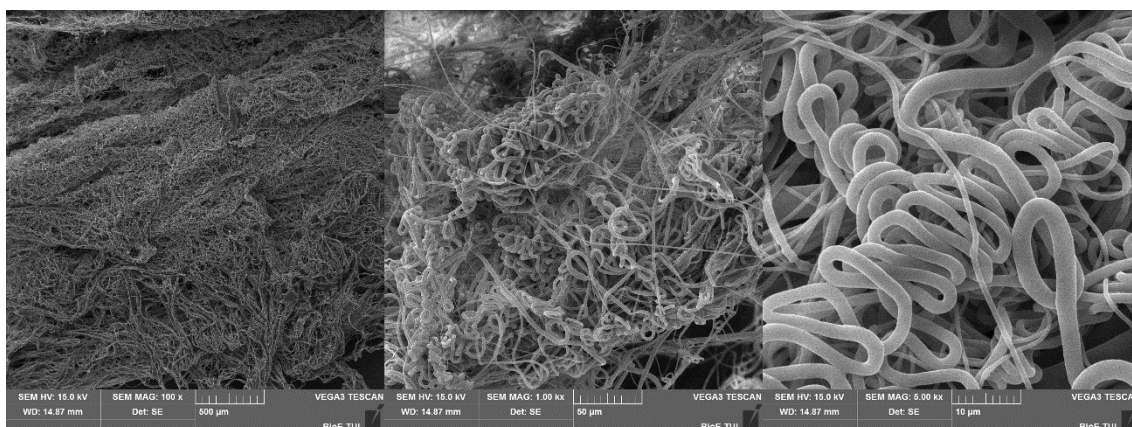
Obrázek 48 Vybrané SEM snímky vlákenné strukturu zvlákněné z 20% PCL 45 při vzdálenosti elektrod 65 mm do ethanolu; měřítka 500 µm, 50 µm, a 10 µm



Obrázek 49 Vybrané SEM snímky vlákenné strukturu zvlákněné z 20% PCL 45 při vzdálenosti elektrod 165 mm do ethanolu; měřítka 50 µm, 10 µm, a 10 µm

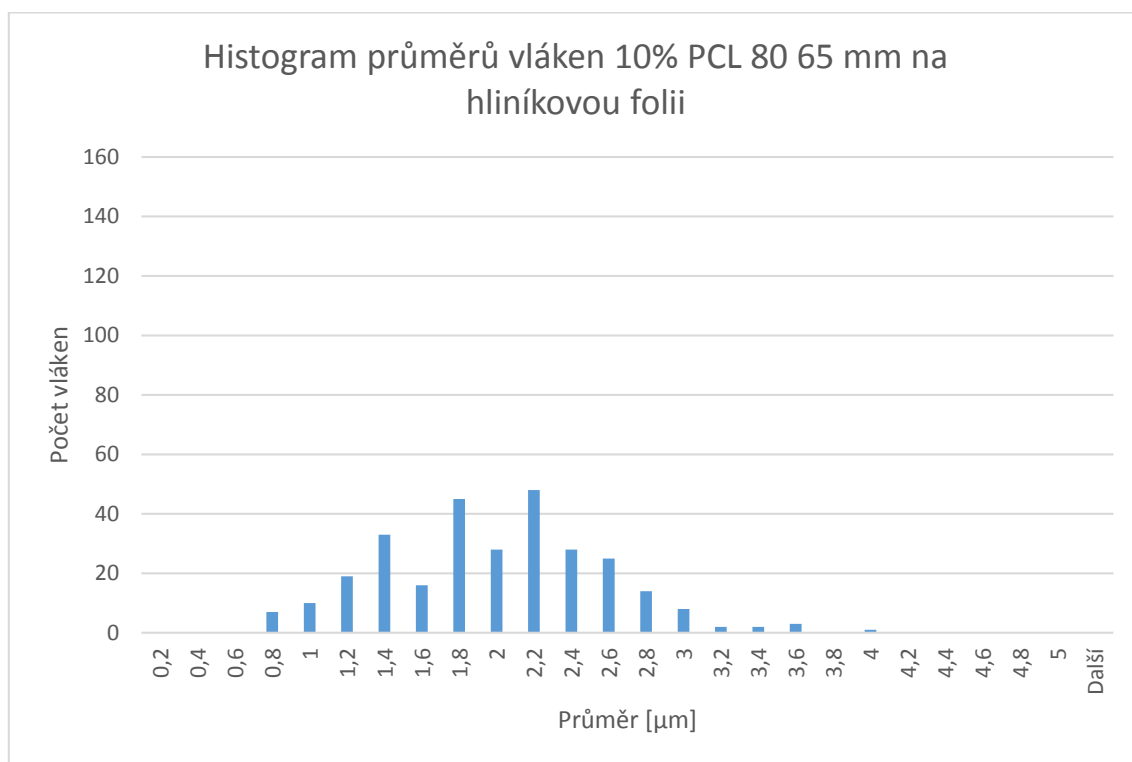


Obrázek 50 Vybrané SEM snímky vlákenné strukturu zvlákněné z 10% PCL 80 při vzdálenosti elektrod 65 mm do ethanolu; měřítka 500 µm, 50 µm, a 10 µm

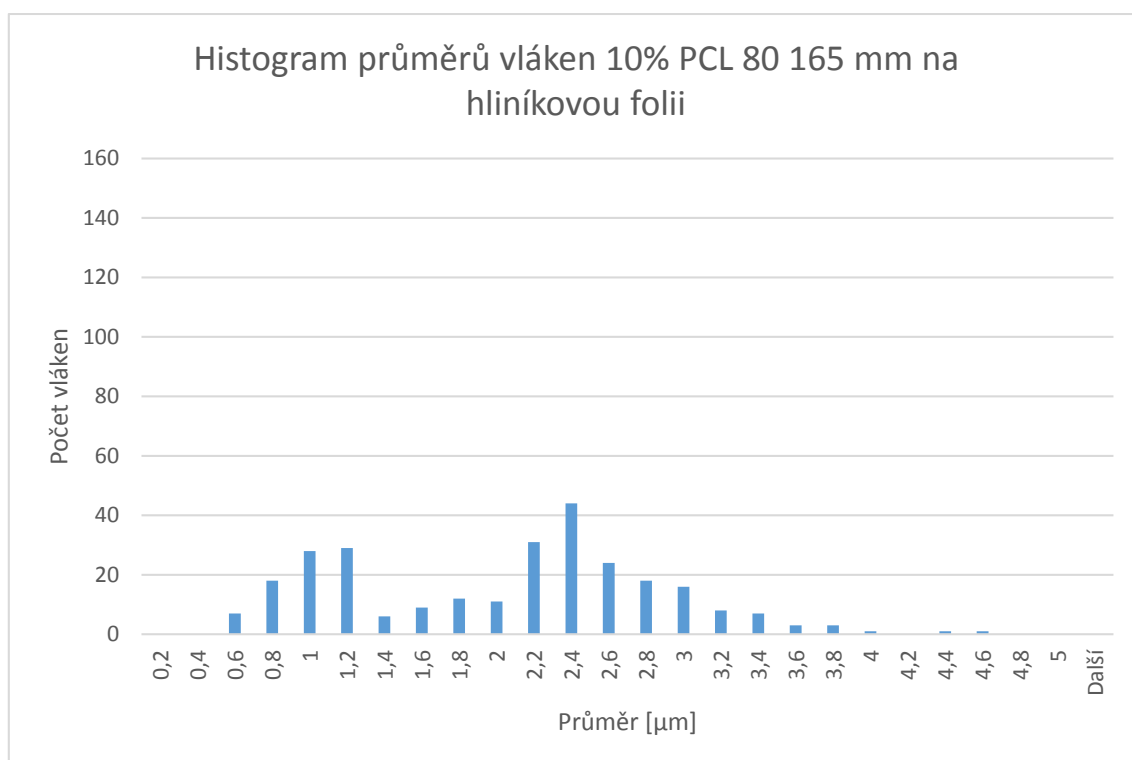


Obrázek 51 Vybrané SEM snímky vláknenné struktury zvlákněné z 10% PCL 80 při vzdálenosti elektrod 165 mm do ethanolu; měřítka 500 µm, 50 µm, a 10 µm

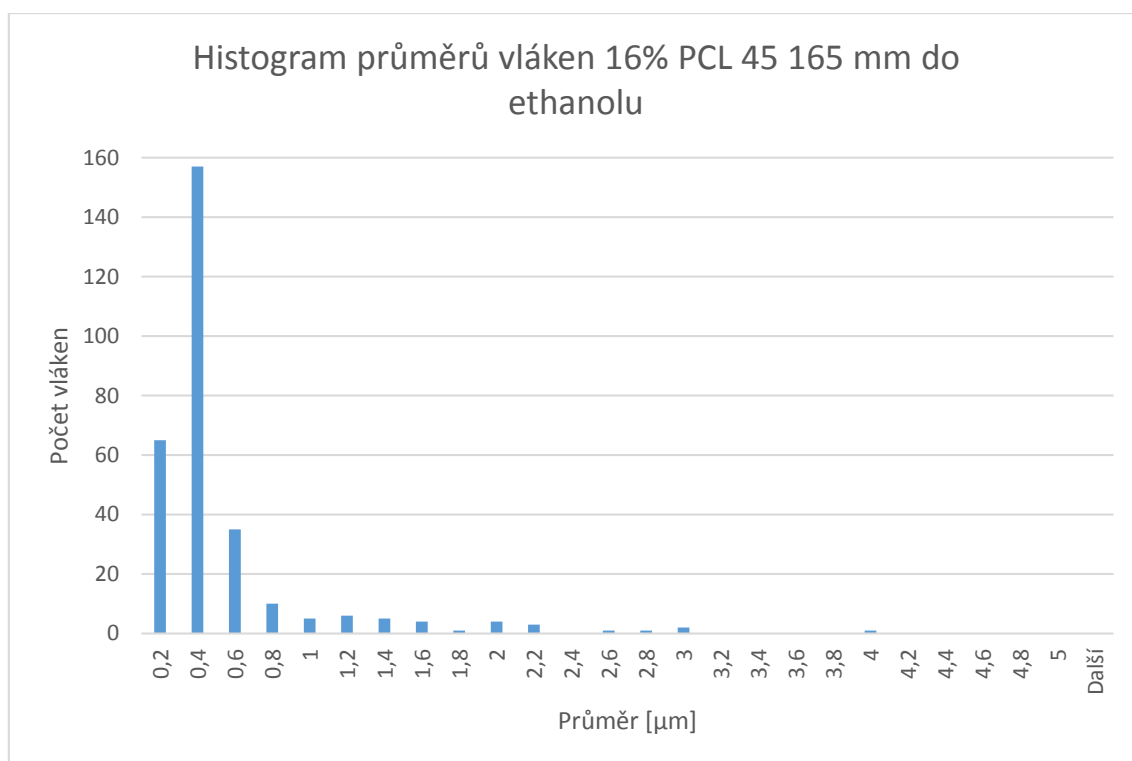
Příloha 2 – Histogramy elektrostaticky zvlákněných vrstev



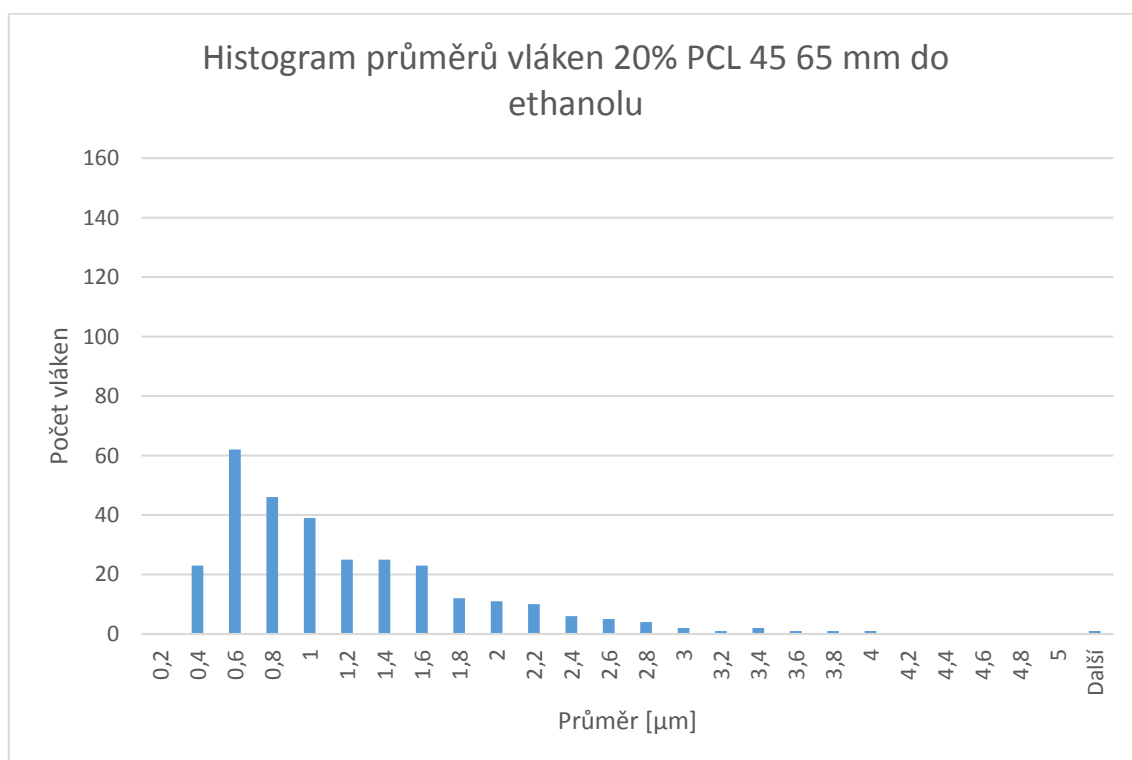
Graf 12 Histogram distribuce průměrů vláken 10% PCL 80 při vzdálenosti elektrod 65 mm na hliníkovou folii



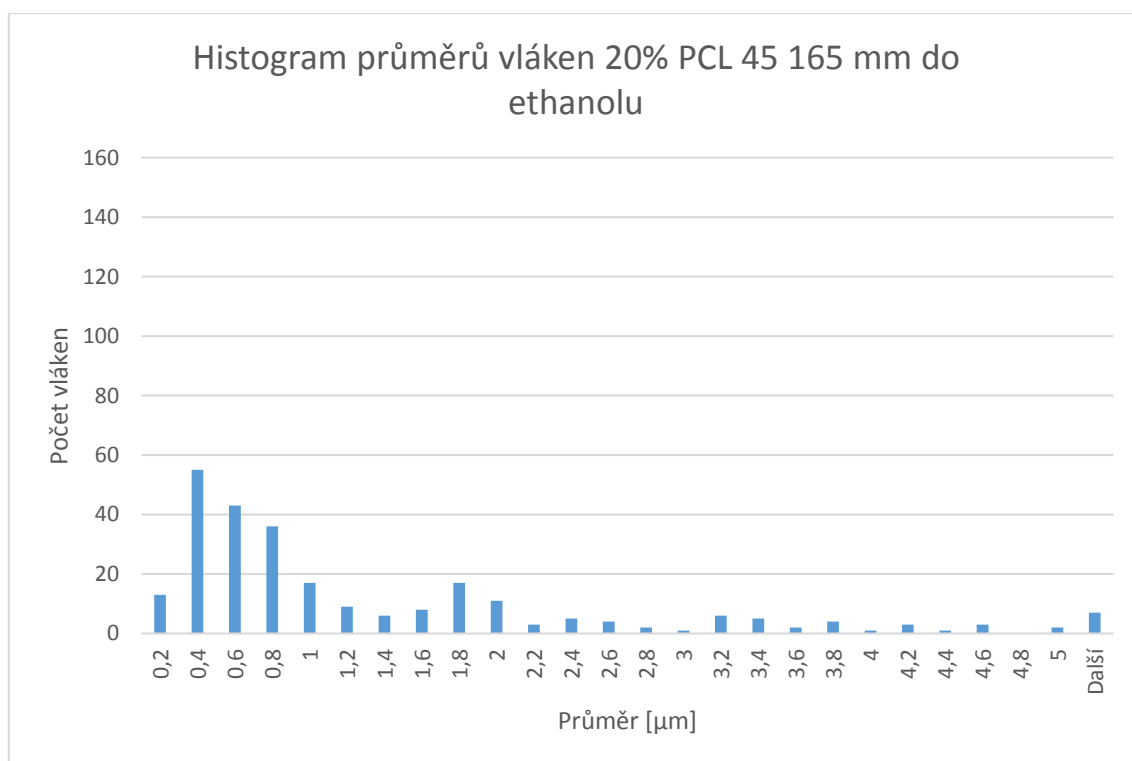
Graf 13 Histogram distribuce průměrů vláken 10% PCL 80 při vzdálenosti elektrod 165 mm na hliníkovou folii



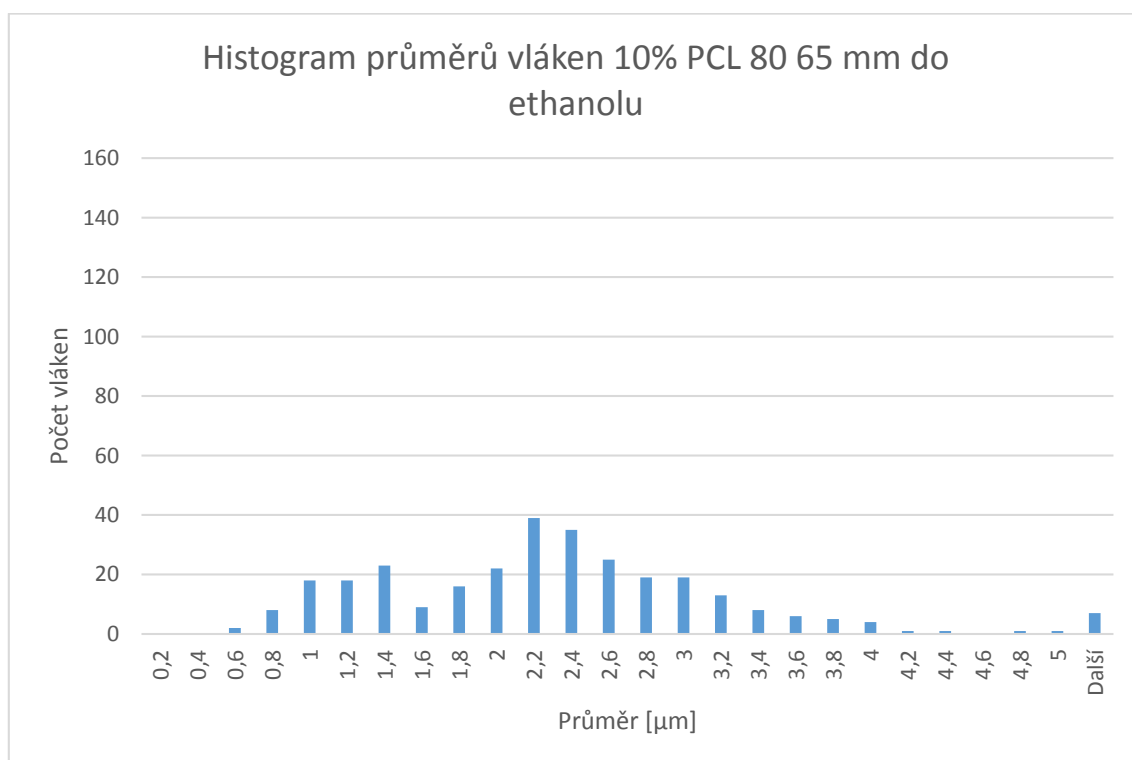
Graf 14 Histogram distribuce průměrů vláken 16% PCL 45 při vzdálenosti elektrod 165 mm do ethanolu



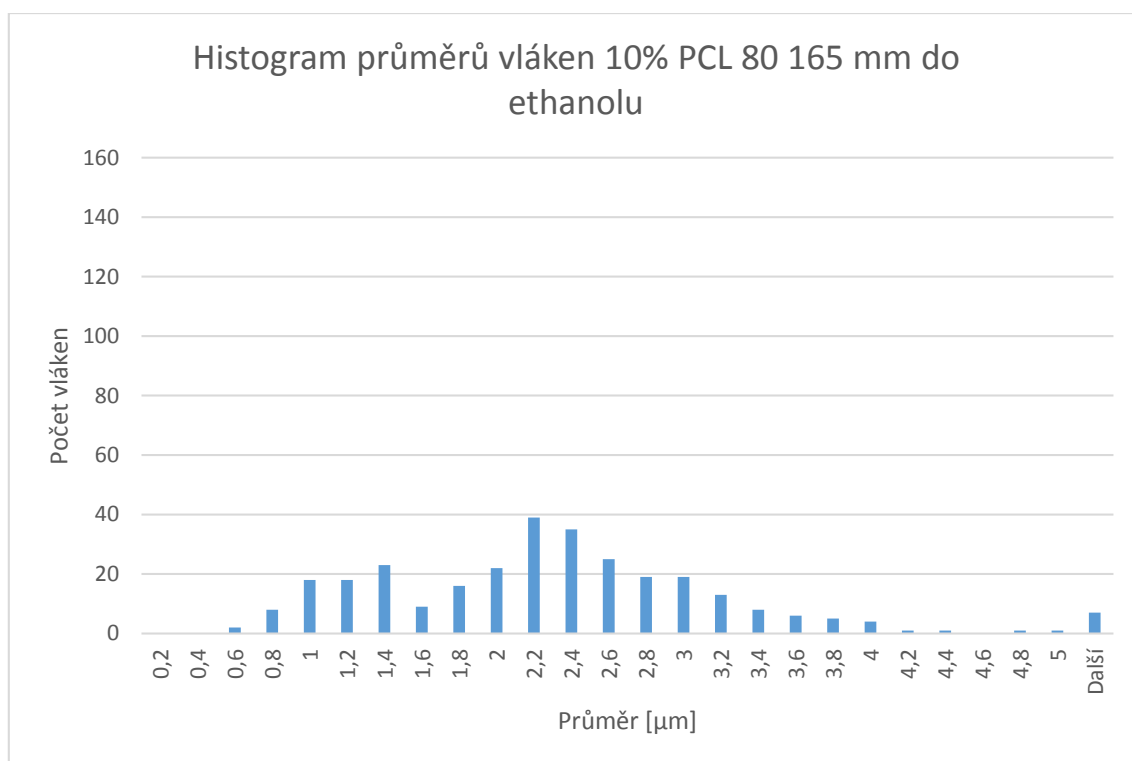
Graf 15 Histogram distribuce průměrů vláken 20% PCL 45 při vzdálenosti elektrod 65 mm do ethanolu



Graf 16 Histogram distribuce průměrů vláken 20% PCL 45 při vzdálenosti elektrod 165 mm do ethanolu

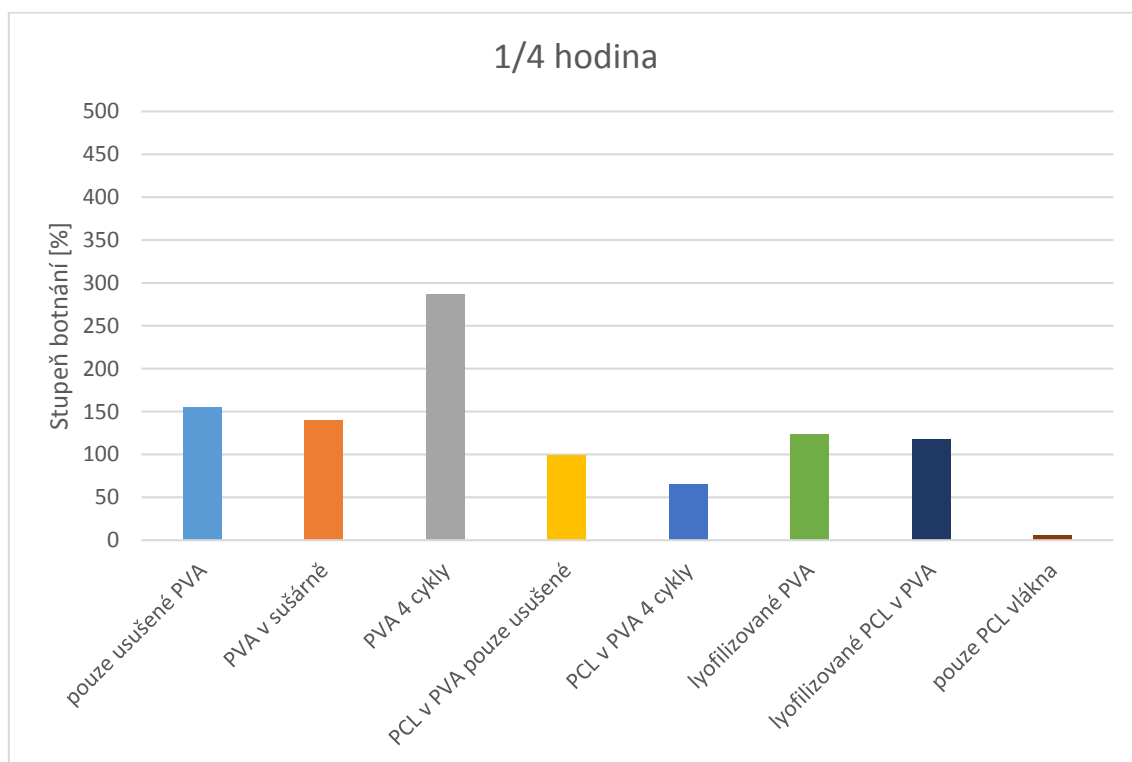


Graf 17 Histogram distribuce průměrů vláken 10% PCL 80 při vzdálenosti elektrod 65 mm do ethanolu

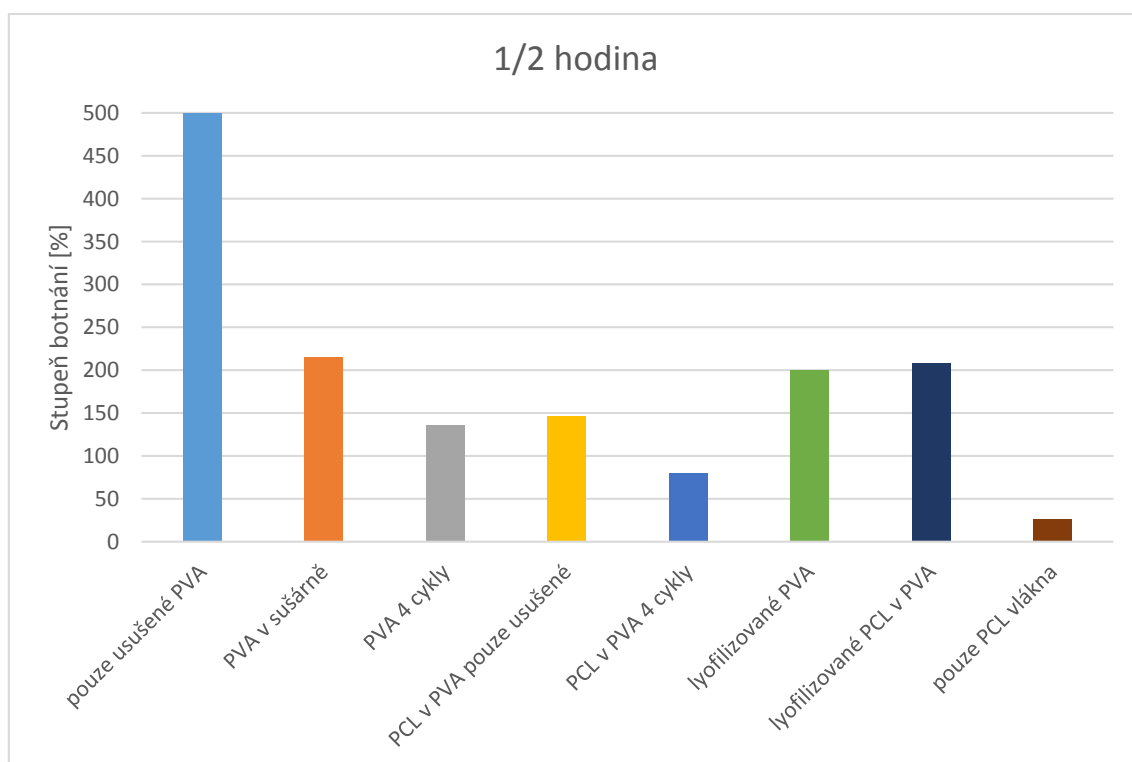


Graf 18 Histogram distribuce průměrů vláken 10% PCL 80 při vzdálenosti elektrod 165 mm do ethanolu

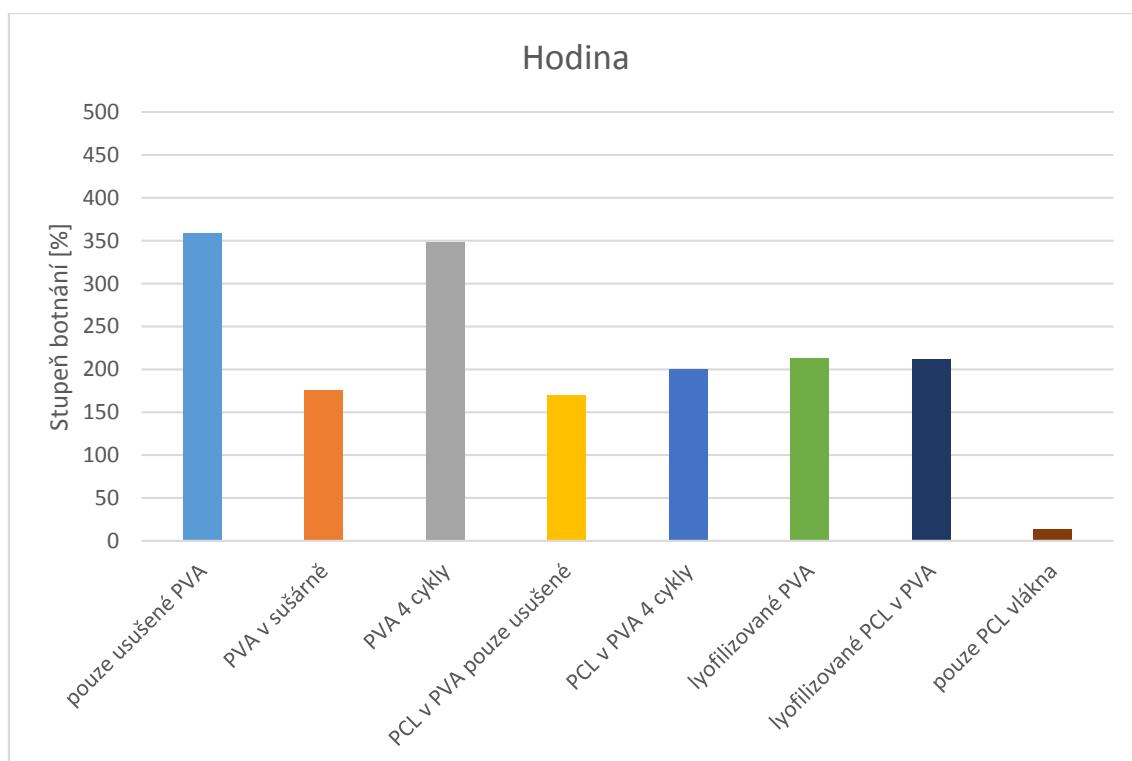
Příloha 3 – Grafy stupně botnání



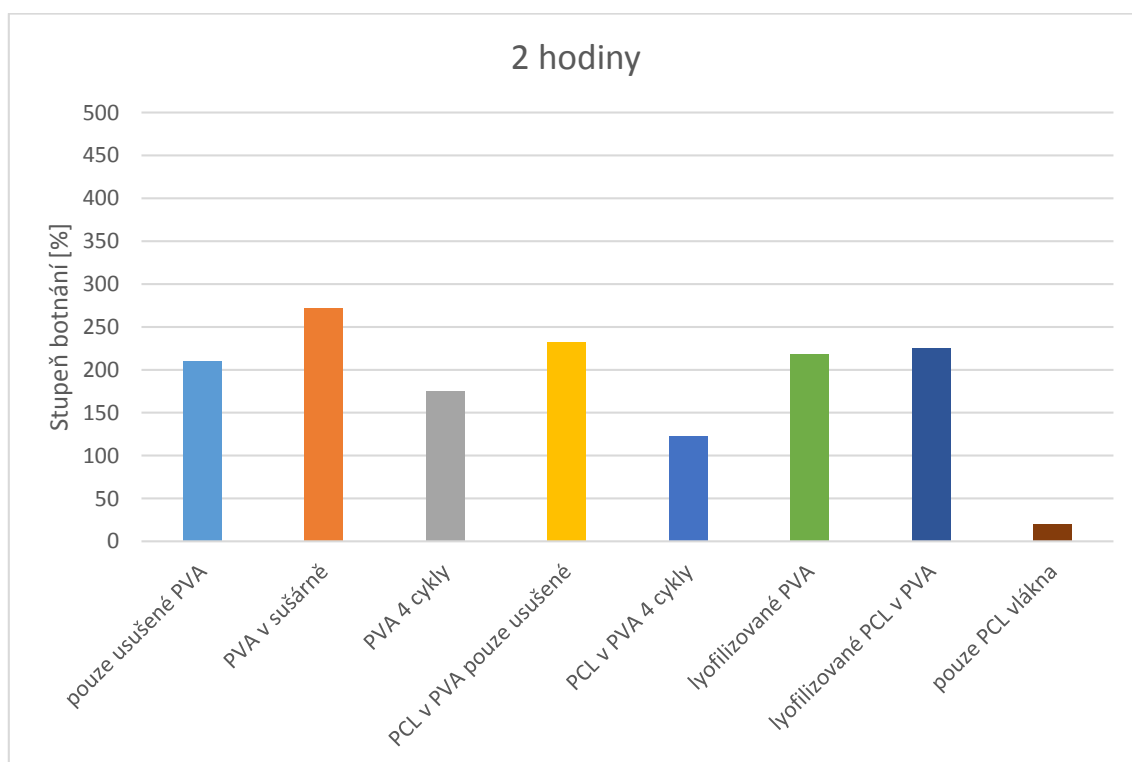
Graf 19 Stupeň botnání pro vybrané vzorky po čtvrt hodině smáčení



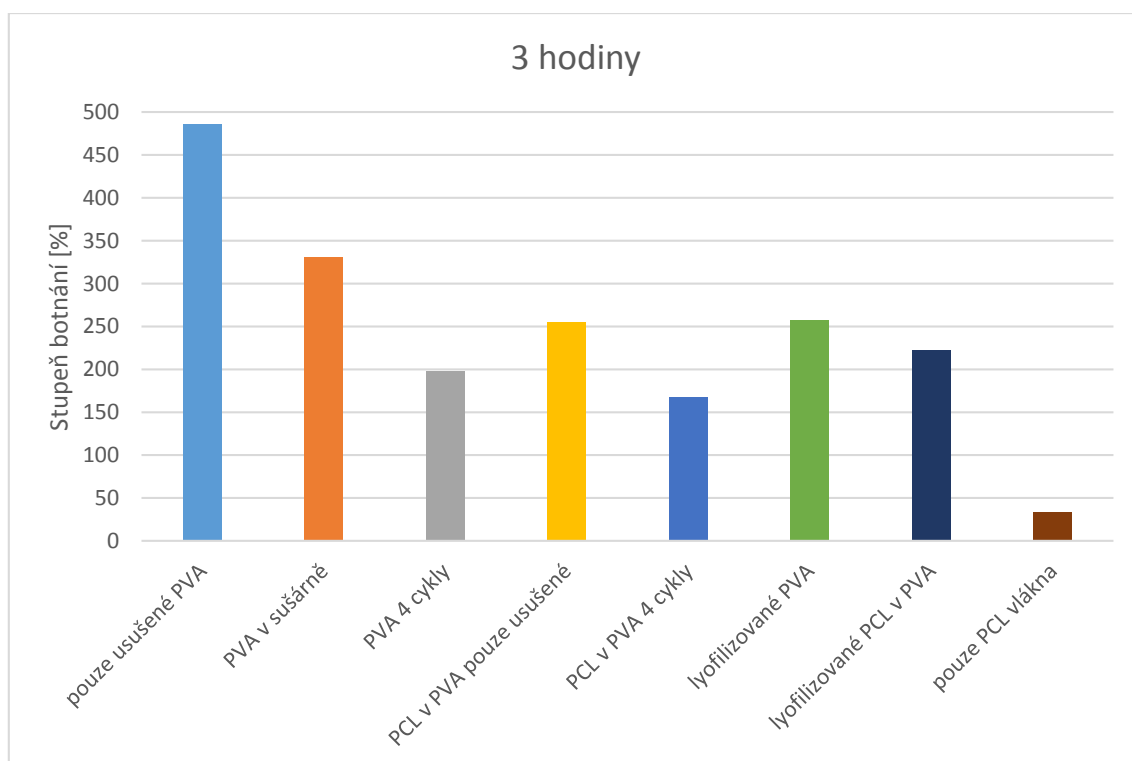
Graf 20 Stupeň botnání pro vybrané vzorky po půl hodině smáčení



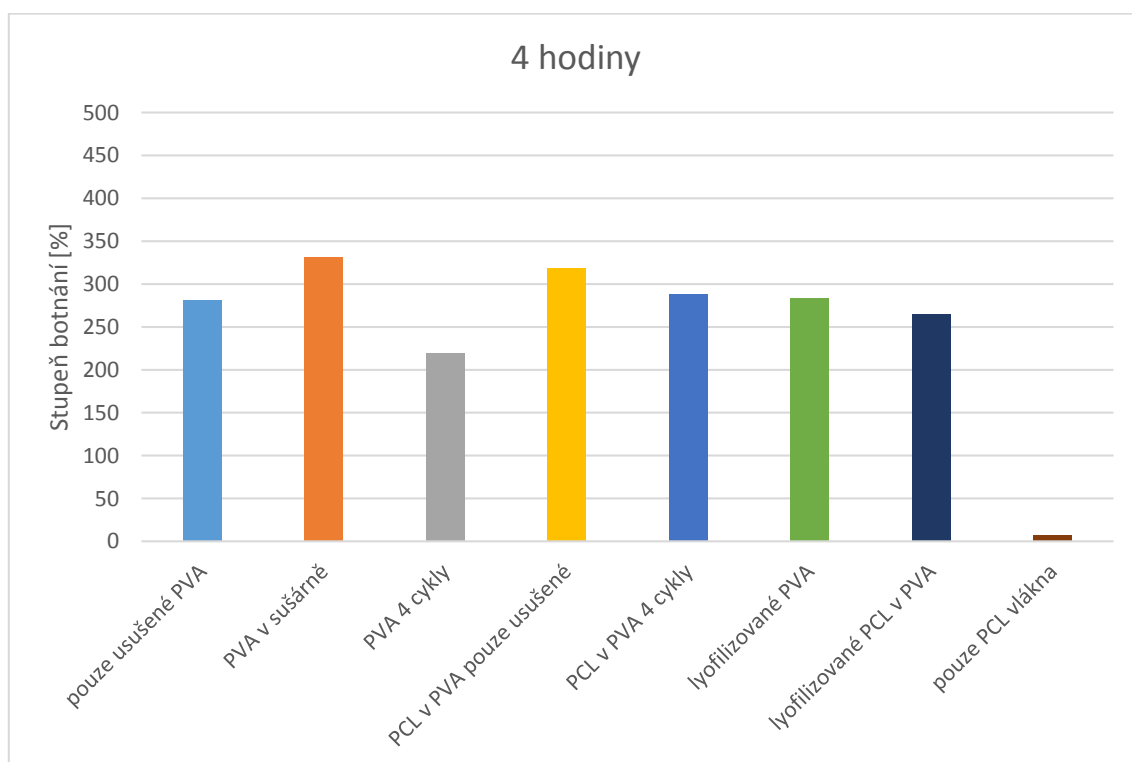
Graf 21 Stupeň botnání pro vybrané vzorky po hodině smáčení



Graf 22 Stupeň botnání pro vybrané vzorky po dvou hodinách smáčení

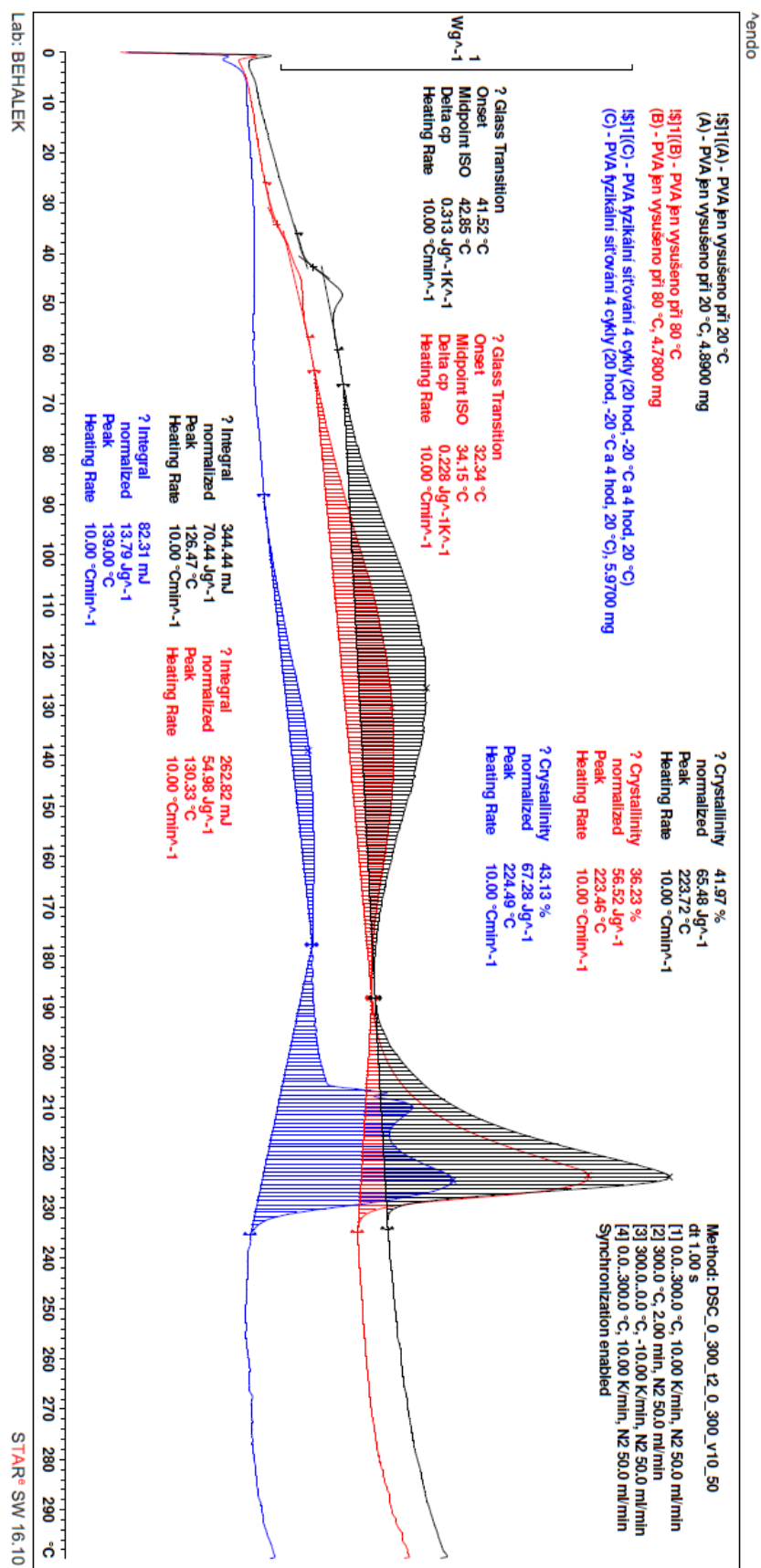


Graf 23 Stupeň botnání pro vybrané vzorky po třech hodinách smáčení

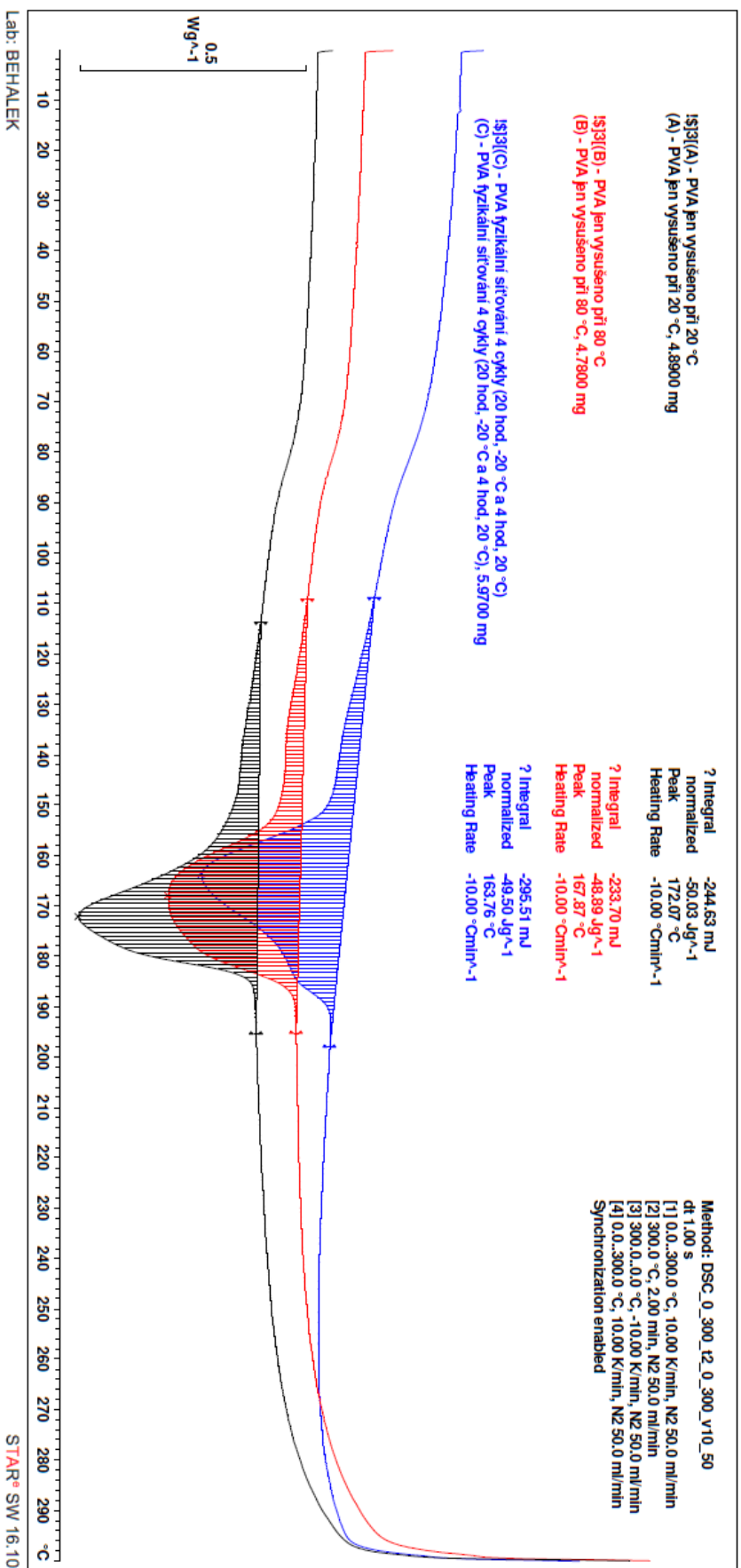


Graf 24 Stupeň botnání pro vybrané vzorky po čtyřech hodinách smáčení

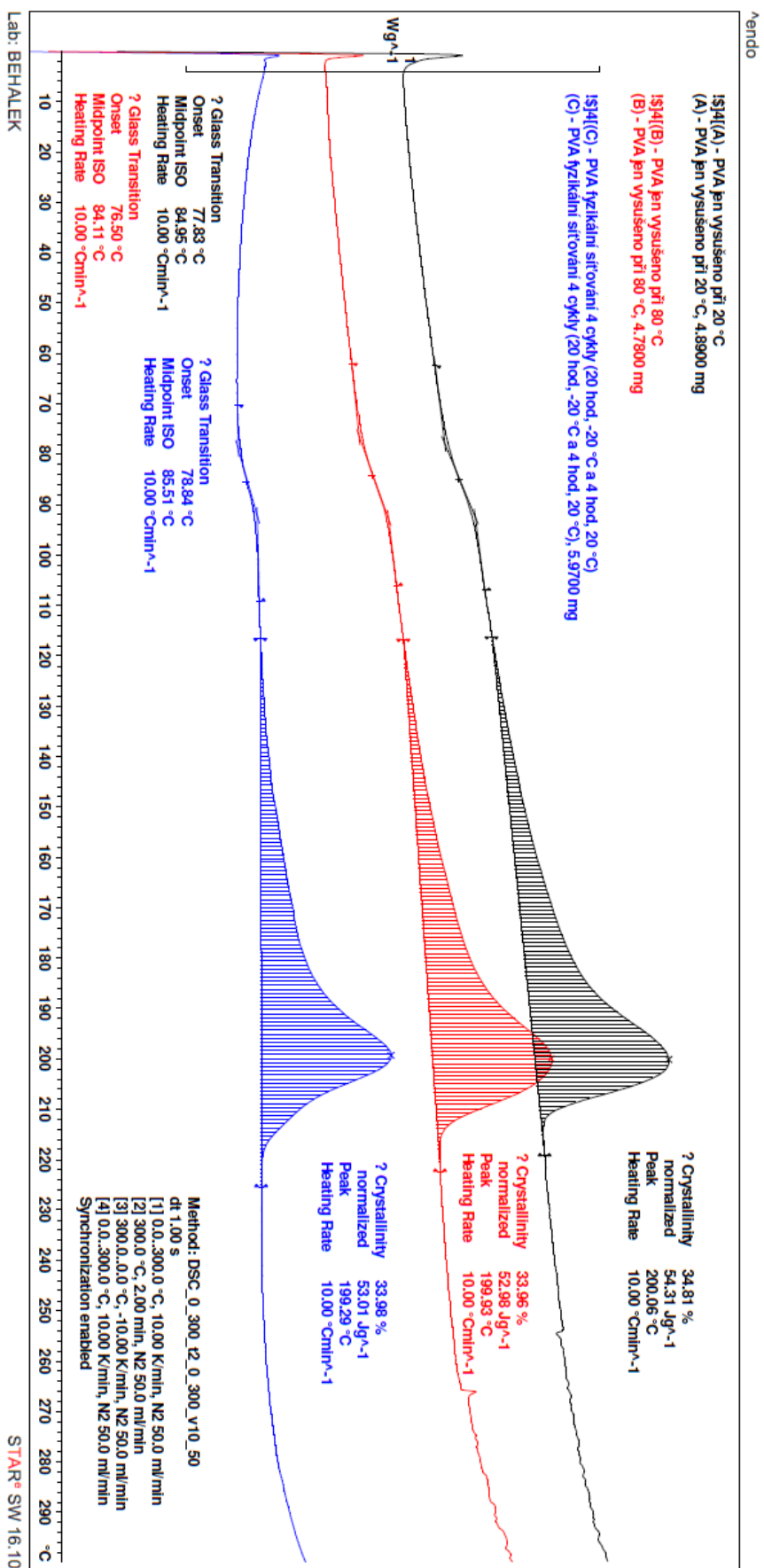
Příloha 4 – DSC grafy



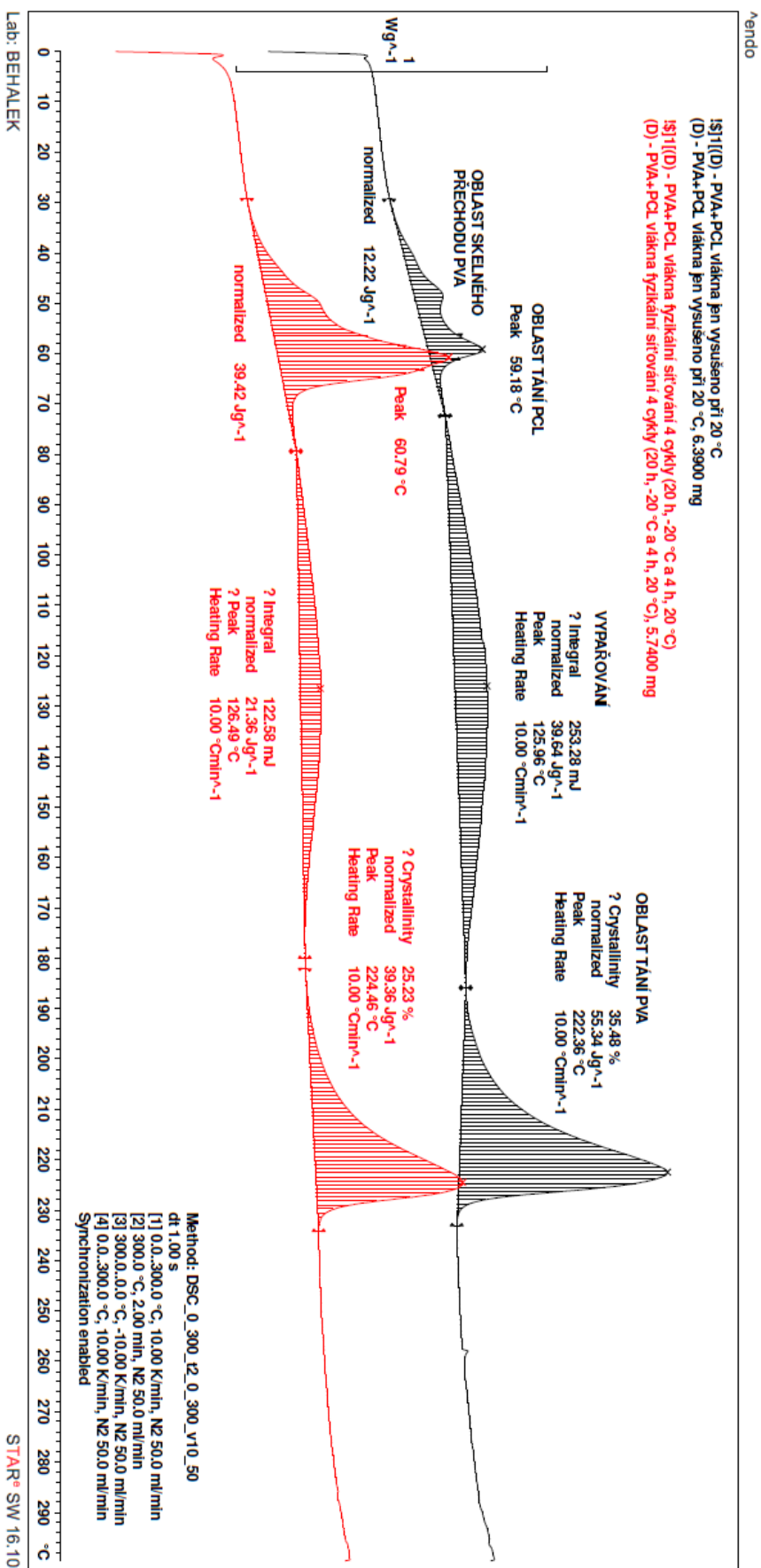
Graf 25 DSC graf prvotního ohřevu pro odstranění tepelné historie PVA vzorků



Graf 26 DSC graf chlazení PVA vzorků

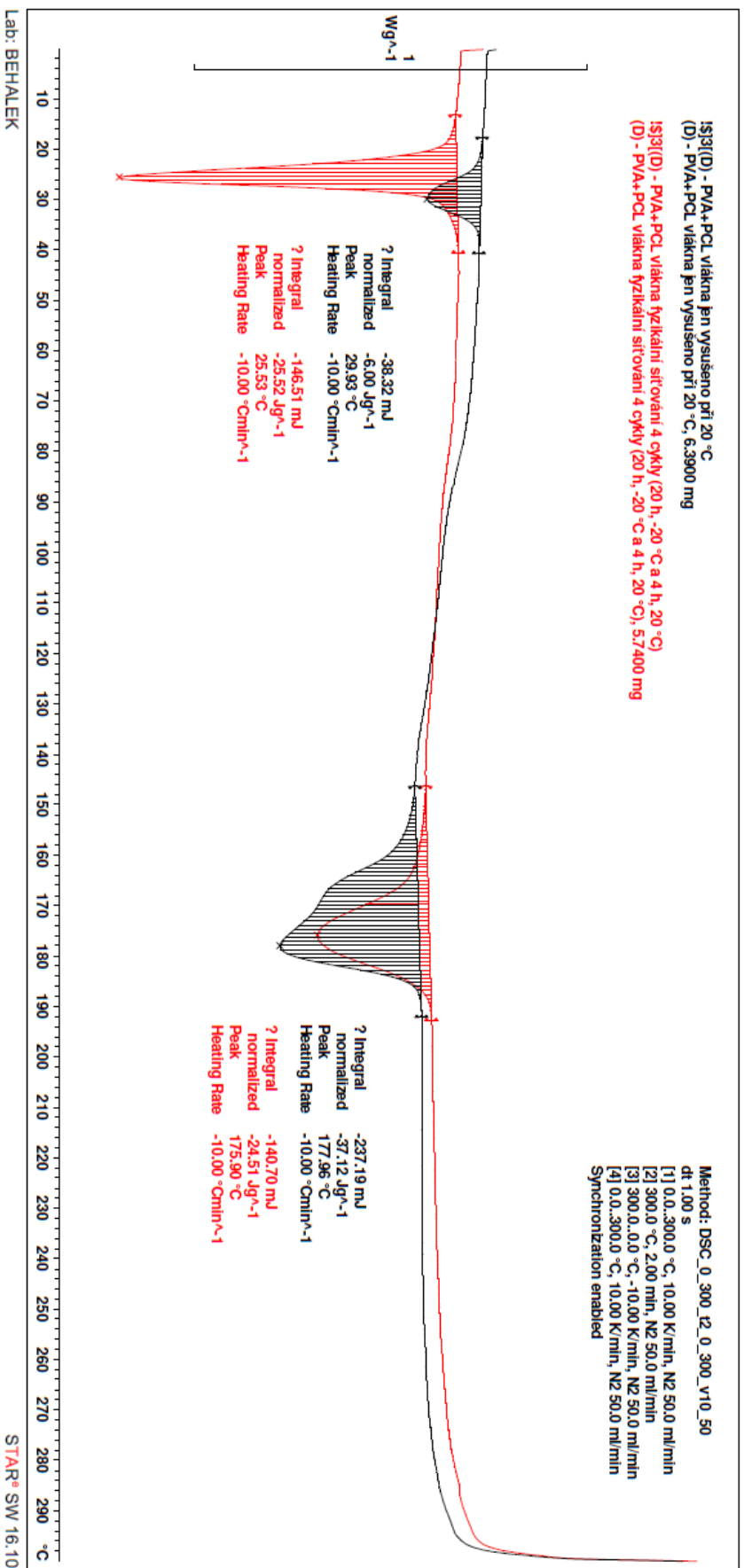


Graf 27 DSC graf druhého ohřevu PVA vzorků; totožný průběh díky zrušení fyzikálního síťování prvním ohřevem



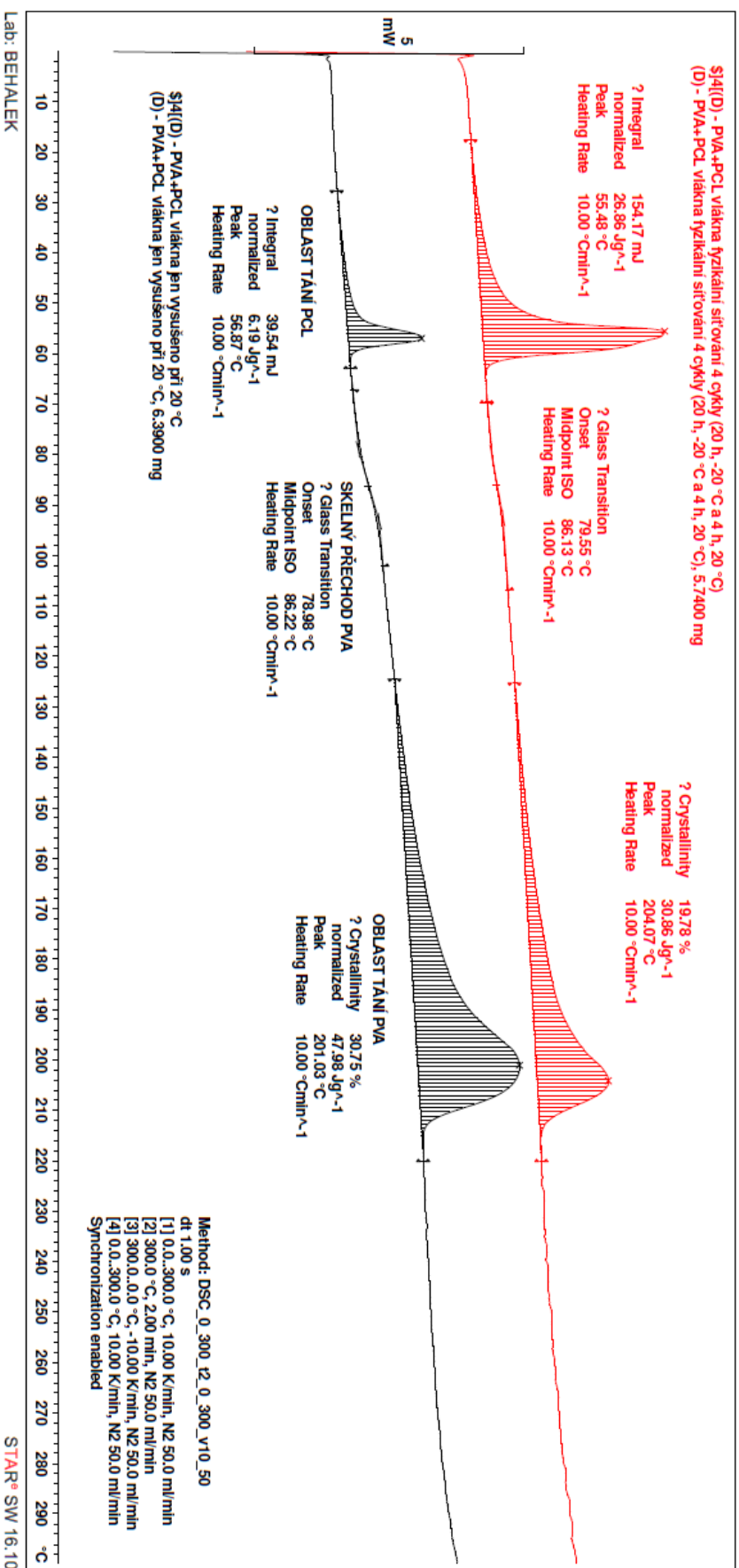
Graf 28 DSC graf prvotního ohřevu kompozitních vzorků pro odstranění tepelné historie

endo



Graf 29 DSC graf chlazení kompozitních vzorků

endo



Graf 30 DSC graf druhého ohřevu kompozitních vzorků