

VÝVOJ A STUDIUM STRUKTURY OBJEMNÝCH MIKRO - NANOVLÁKENNÝCH VRSTEV PRO MEDICÍNSKÉ APLIKACE

Diplomová práce

Studijní program:N3106 – Textilní inženýrstvíStudijní obor:3106T018 – Netkané a nanovlákenné materiály

Autor práce: Vedoucí práce: Jakub Erben Ing. Jiří Chvojka, Ph.D.



Tento list nahraďte originálem zadání.

Prohlášení

Byl jsem seznámen s tím, 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 (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu TUL.

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

Diplomovou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé diplomové práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum: 19.5.2014

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji především svému vedoucímu diplomové práce Ing. Jiřímu Chvojkovi Ph.D, a konzultantům Ing. Petru Mikešovi Ph.D a Ing. Věře Jenčové Ph.D. za příkladné vedení, výbornou spolupráci, odborné rady a doporučení literatury k danému tématu. Děkuji též dalším pracovníkům Katedry netkaných textilií a nanomateriálů.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá vývojem nového druhu biodegradabilního tkáňového nosiče složeného z objemné směsi mikro - nanovláken a jeho další funkcionalizace nanášením částic. Práce klade důraz na ověření využitelnosti vytvořené vlákenné vrstvy v rekonstrukční medicíně kostní tkáně. V teoretické části byly popsány vybrané technologie výroby mikro – nanovláken a technologie funkcionalizace nanášením částic. Dále byla popsána morfologie kostní tkáně a princip tkáňového inženýrství. Experimentální část obsahuje popis vývoje vlákenných vrstev, optimalizace výrobního postupu a výběr vhodného materiálu. V této části je také popsán vliv použitého materiálu a technologických podmínek na strukturní parametry vlákenné vrstvy a následné testování její biokompatibility a biodegradability.

ANOTTATION

This thesis describes the development of a new type of biodegradable tissue carrier composed of a mixture of large micro – nanofibers and other functionalization of coating of particles. The work emphasizes the verification of usability of formed fiber layers in reconstructive medicine of bone tissue. The theoretical part describes selected technology of micro – nanofibers and technology of particle functionalization. Furthermore, the morphology of the bone tissue and the principle of tissue engineering is described. The experimental part describes the development of fiber layers, optimization of the production process and the selection of suitable material. This section also describes the influence of the used polymeric material and technological conditions on the structural parameters of the fiber layer and the subsequent testing of its bicompatibility and biodegradability

KLÍČOVÁ SLOVA

Melt - blown, elektrostatické zvlákňování, scaffold, kost, biodegradace, molekulová hmotnost.

KEY WORDS

Melt - blown, electrospinning, scaffold, bone, biodegradation, molecular weight.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ

f	frekvence [ot./min]
kV	kilovolt
ml	objemová jednotka; mililitr; dle SI 1x10 ⁻³ 1
μl	objemová jednotka; mikrolitr; dle SI 1x10 ⁻⁶ 1
mm	délková jednotka; milimetr; dle SI 1x10 ⁻³ m
μm	délková jednotka; nanometr; dle SI 1x10 ⁻⁶ m
nm	délková jednotka; nanometr; dle SI 1x10 ⁻⁹ m
g	hmotnostní jednotka; dle SI 1x10 ⁻³ kg
mg	hmotnostní jednotka; dle SI 1x10 ⁻⁶ kg
μg	hmotnostní jednotka; dle SI 1x10 ⁻⁹ kg
PCL	polykaprolakton
PLA	kyselina polyglykolová
PVB	polyvinilbutyral
PMGI	polymethylglutarimid
SEM	skenovací elektronový mikroskop
FM	fluorescenční mikroskop
ELS	elektrostatické zvlákňování

3D	struktura v třech dimenzích X x Y x Z
Σ	suma
% hm.	hmotnostní procenta v roztoku
°C	stupeň celsia
°F	stupeň farenheita
Mw	hmotnostně střední molekulová hmotnost
Mn	hmotnostně početní molekulová hmotnost
Mh	molekulová hmotnost
Mol	látkové množství
MFI	mass flow index
HA	hydroxyapatit
Au	zlato
С	uhlík
ОН	hydroxyl
Pa	tlak [N/m]

Obsah

1.	ÚVOD	. 10
2.	TEORETICKÁ ČÁST	. 11
2.1.	Scaffoldy pro tkáňové inženýrství	. 11
2.1.1	. Tkáňové inženýrství	. 11
2.1.2	2. Zásady přípravy scaffoldů	. 12
2.2.	PCL – Polykaprolakton	. 14
2.2.1	. Charakteristika	. 14
2.2.2	Polymerizace	. 14
2.2.3	B. Biodegradabilita	. 15
2.3.	Přehled morfologie kostní tkáně	. 16
2.3.1	. Kostní tkáň	. 16
2.3.2	2. Obecná stavba kosti	. 17
2.3.3	8. Mikroskopická organizace kosti	. 17
2.3.4	I. Klasifikace	. 19
2.3.5	i. Buňky kosti	. 20
2.4.	Nanovlákna a elektrostatické zvlákňování	. 23
2.4.1	. Vlastnosti a použití nanovláken	. 23
2.4.2	2. Princip elektrostatického zvlákňování	. 23
2.5.	Technologie melt-blown	. 26
2.5.1	. Historie	. 26
2.5.2	2. Specifikace procesu melt-blown	. 27
2.5.3	8. Popis technologie melt-blown	. 27
2.5.4	I. Předpoklady budoucího vývoje	. 29
2.6.	Funkcionalizace vláken pomocí pevných částic	. 30
2.6.1	. Způsoby funkcionalizace	. 30
2.6.2	2. Metody nanášení	. 33
2.6.3	8. Materiály	. 35
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	. 39
3.1. kom	Průběh a optimalizace procesu výroby objemných mikro a nanovlákenných pozitních vrstev	40
3 1 1	Otimalizace narametrů technologie melt - blown a výběr vhodného materiálu	. . 0
3 1 7	Výroha finálních vrstev pro hiologické testování	. 4 0 ДО
3.2	Měření strukturních vlastností	
<i>_</i>		

3.2.1	L. Elektronová mikroskopie	54
3.2.2	2. Obrazová analýza – měření strukturních parametrů	57
3.3.	Stanovení molekulové hmotnosti	66
3.3.1	L. Termická gravimetrická analýza	67
3.3.2	2. Viskozimetrické stanovení molekulové hmotnosti	71
3.3.3	3. Gelová chromatografie	72
3.4.	Biologické testování vrstev	75
3.4.1	L. Příprava vzorků	75
3.4.2	2. Kultivace	77
3.4.3	3. MTT test	80
3.4.4	ł. Mikroskopie	85
3.5.	Testování biodegradability	95
3.5.1	L. Stanovení optimální koncentrace enzymu pro další testování	
3.5.2	2. Studium enzymatické degradace materiálu	
4.	DISKUSE	103
5.	ZÁVĚR	108
6.	POUŽITÁ LITERATURA	110
7.	PŘÍLOHY	113

1. ÚVOD

Další výzvou pro budoucí postupy v regenerativní medicíně kostní tkáně je kromě zhojení defektu, kdy je chybějící tkáň nahrazena novou, také aby pro pacienta tento zákrok byl co nejméně invazivní, a aby k vytvoření nové tkáně došlo co nejrychleji. Takovéto vlastnosti splňují struktury složené z biodegradabilních nanovláken díky své adherenci a možnosti funkcionalizace navázáním léčiv nebo částic podporujících buněčnou proliferaci.

Největší zastoupení na současném trhu mají výrobky kostních náhrad z nebiodegradovatelných materiálů na bázi titanových implantátů a sklokeramiky. Díky úspěšnému dlouholetému vývoji, kdy cílem vědců bylo co nejvíce vylepšit vlastnosti implantátů z materiálů, které nejsou tělu vlastní, lze dnes tyto implantáty označit jako "bioaktivní", tedy že umožňují vrůst buněk do povrchových vrstev, kterými je implantát pokryt (např. tenké vrstvy hydroxyapatitu) a tím lepší vhojení implantátu. Problémem však stále zůstává riziko nepřijmutí implantátu imunitním systémem pacienta, jeho postupné odhojení a tím riziko sekundárních operací, což pacientovi může přinést celoživotní diskomfort. Z těchto důvodů je cílem tkáňového inženýrství používat takové materiály, které jsou přirozeně se v těle vyskytující (kolagen, hydroxyapatit) a nejlépe biodegradovatelné, tedy, že je nosič postupně nahrazen novou tkání. Odpadá tak riziko odhojení implantátu, tím, že vzniká nová kostní tkáň, není nahrazena cizím materiálem, pacient není vystaven bolesti, což je dalším nepříznivým faktorem při nutnosti náhrady kostní tkáně. Takovéto možnosti by měl splňovat produkt vytvořený v experimentální části této práce.

Cílem této práce bylo tedy vytvořit objemnou kompozitní nanovlákennou vrstvu ze směsi mikro a nanovláken vyrobenou kombinací dvou metod. Dále funkcionalizovat tyto vrstvy částicemi vhodného materiálu. Poté takto vytvořené vrstvy podrobit strukturní analýze. Následně pomocí biologických a biodegradabilních testů ověřit jejich využitelnost pro reparativní medicínu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

Hlavním cílem této práce je tvorba biodegradabilních polymerních vlákenných vrstev funkcionalizovaných částicemi, které budou určené k využití v regenerativní medicíně jako tkáňové nosiče. Proto se bude teoretická část věnovat popisu vybraných technologií tvorby polymerních vlákenných vrstev a popisu principů jejich funkcionalizace pomocí částic. Dále bude popsána morfologie kostní tkáně, základní principy tkáňového inženýrství a charakteristika používaného polymeru.

2.1. Scaffoldy pro tkáňové inženýrství

V této kapitole bude pojednáno o základních principech tkáňového inženýrství, což je poměrně nový vědní obor, ve kterém jsou mimo jiné využívány nanovlákenné polymerní vrstvy jako tkáňové nosiče. – scaffoldy. Tyto nosiče jsou s úspěchem využívány v regenerativní medicíně k rekonstrukci, nebo nahrazení poškozené tkáně v těle pacienta. Jejich výroba zde bude popsána a rozdělena na textilní a netextilní způsob.

2.1.1. Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství lze vnímat jako multidisciplinární obor spojující poznatky fyziky, molekulární biologie, biochemie, farmacie, a medicíny k obnovení, náhradě nebo regeneraci tkání, tedy pro tzv. regenerativní medicínu. Tohoto cíle je dosaženo vhodným použitím a kombinací buněk, biochemických faktorů a vhodných tkáňových nosičů "scaffoldů". Buňky samotné nejsou většinou schopny růst a vytvářet objemnější strukturu. Pokud jsou ovšem umístěny do trojrozměrného prostředí vhodného materiálu obsahujícího dostatek kyslíku a růstových faktorů, jsou schopny prorůstat tuto strukturu do požadovaného rozměru. Kultivace buněk na nosiči probíhá in vitro za přítomnosti živin, diferenciačních a růstových faktorů. Následná infiltrace buněk a mezibuněčné hmoty do scaffoldu probíhá in vivo, kdy regenerace tkání probíhá v přirozeném prostředí. Poslední fází je biodegradace samotného nosiče na těle vlastní látky (obr. 1), (Liu 2007, Ma2004).

Použité buňky mohou být autologní, tedy vlastní pacientova tkáň, která není spojená s rizikem odmítnutí imunitním systémem. Tato tkáň je odebírána a kultivována ve formě diferencovaných, genitorových a kmenových buněk. V případě, že nelze buňky izolovat od samotného pacienta, je možné odebrat buňky alogenní od dárce stejného druhu. Zde je ovšem zvýšené riziko omítnutí této tkáně imunitním systémem příjemce z důvodu genetické odlišnosti alespoň na jednom pokusu. Třetí možností je odběr buněk z jiného druhu, které se nazývají heterologní nebo také xenogenní (Liu 2007)



Obr. 1: Princip procesu tkáňového inženýrství (Brown 2007).

2.1.2. Zásady přípravy scaffoldů

Připravované tkáňové nosiče musí pro jejich správnou funkci splňovat celou řadu vlastností. Strukturou se blíží podobě extracelulární matrice, tedy mezibuněčné tkáňové struktuře tak, aby mohly buňky dostatečně proliferovat a popřípadě diferencovat (Eberli 2010). Toho lze z části dosáhnout správnou velikostí pórů a jejich dostatečnou kontinuitou. Nosič musí být samozřejmě biokompatibilní a biodegradabilní, tak aby nevyvolával imunologické reakce. Dále je třeba zajistit optimální mechanické vlastnosti a specifický povrch zajišťující dostatečnou buněčnou adhezi (Liu 2007)

Biomateriály používané v tkáňovém inženýrství pro výrobu scaffoldů můžeme rozdělit podle původu na přírodní a syntetické. Většina materiálu je převzata z jiných technologických oborů, například z medicíny (Ma 2004). Syntetické biologicky odbouratelné materiály jsou alifatické polyestery (kyselina polymléčná, polyglykolová a jejich kopolymery) a přirozeně získané materiály jako kolagen a chitin. Přírodní,

přirozeně získané biomateriály se vyznačují velmi dobrou biokompatibilitou a biodegradabilitou. Nemůžeme u nich ovšem ovlivňovat jejich specifické vlastnosti v takové míře jako při výrobě syntetických biomateriálů. Z tohoto důvodu je dávána při výrobě přednost syntetickým biomateriálům (Liu 2007).

2.2. PCL – Polykaprolakton

V této kapitole byla popsána základní charakteristika, výroba a využití polykaprolaktonu, který byl použit pro tvorbu vlákenných vrstev v experimentální části.

2.2.1. Charakteristika

Polykaprolakton (PCL) je jedním z prvních polymerů syntetizovaných skupinou Prof. Carotherse na počátku roku 1930 při snaze identifikovat syntetické polymery, které by mohly být degradovány mikroorganismy.

PCL je syntetický biodegradabilní polymer patřící do skupiny alifatických polyesterů. Je dobře rozpustný v polárních rozpouštědlech, například ve směsi chloroformu a etanolu. PCL je polymer s teplotou skelného přechodu (Tg) kolem -60 °C a nízkou teplotou tání (Tf) 58 – 65 °C. Je hydrofilní, semikrystalický a jeho krystalinita má tendenci klesat se zvyšující se molekulovou hmotností. Dále se PCL vyznačuje velmi dobrými směsnými vlastnostmi s celou řadou dalších polymerů (Woodruff 2010).

Tyto charakteristiky společně s dobrými zpracovatelskými a mechanickými vlastnostmi předurčují tento polymer pro použití v medicíně při tvorbě tkáňových nosičů nebo chirurgických nití. Dále se PCL používá jako přísada do pryskyřic a jiných polymerů, kde modifikuje jejich mechanické vlastnosti (Hermanová 2011).

2.2.2. Polymerizace

...

Připravuje se katalytickou kondenzací ε - kaprolaktonu, kdy je pomocí aniontových, kationtových a koordinačních katalyzátorů za tepla rozpojen hlavní cyklický řetězec (obr. 2). Druhou možností je výroba otevřením cyklu pomocí volného zbytku 2 - methylen -1 - 3 – dioxepanu. Na způsobu polymerizace závisí výsledná molekulová hmotnost, distribuce molekulové hmotnosti a podíl krystalické fáze polymeru. Běžně jo možné syntetizovat PCL o molekulových hmotnostech 3000 – 85 000 (Woodruff 2010).



Obr. 2: Katalitická polymerizace řetězce kaprolaktonu (Labet 2011).

2.2.3. Biodegradabilita

Rychlost biodegradability PCL ovlivňuje jeho počáteční molekulová hmotnost a míra podílu krystalické fáze. Obecně se doba biodegradace pohybuje mezi 1 – 4 roky. Rychlost hydrolýzy může být měněna kopolymerací s jinými laktony nebo glykolidy. Degradace probíhá rozkladem esterových vazeb polymerního řetězce na karboxylové a hydroxylové zbytky, které se dále rozpadají na metabolity tělu vlastní. PCL se vyznačuje podobnou biokompatibilitou jako PLA, ovšem při mnohem nižší rychlosti desorpce (Hermanová 2011, Woodruff 2010).

2.3. Přehled morfologie kostní tkáně

Kost (latinsky os) je orgán vznikající osifikačními procesy, který slouží jako mechanická ochrana vnitřních orgánů a opora těla. Na kosti se upínají svaly a šlachy. Kostní tkáň je jednou z tkání, které se na její stavbě podílejí. Je jednou z nejtvrdších tkání v těle – jedná se o pojivo tvořené buňkami, kolagenními vlákny a mineralizovanou mezibuněčnou hmotou.

2.3.1. Kostní tkáň

Kostní tkáň je mineralizovaná, vysoce vaskularizovaná, živá a adaptabilní pojivová tkáň. Je tvořena buňkami a extracelulární matrix. Asi 40 % hmotnosti vysušení kosti je tvořeno organickou složkou. V největší míře je zastoupen kolagen, zbytek doplňují zejména soli vápníku a fosforu. Uvnitř kosti vzájemně anastomozují cévní kanálky, které umožňují výživu osteocytů. Kanálky také umožňují pohyb buněk jiných, jako osteoblastů nebo osteoklastů. Podle stupně vývoje a metabolické situace organismu se výše popsané obecné znaky v detailech mění (Nedorost 2009).

Pevnost a pružnost kostní tkáně jsou závislé na způsobu uspořádání složek její mezibuněčné matrix. Z tohoto pohledu existují dva odlišné typy organizace kosti:

Kost primární - vláknitá se u člověka vyskytuje během vývoje a je typická pro fetální skelet, v dospělosti se nachází např. při úponu svalů, vazů a v místě zhojených fraktur. V kosti vláknité jsou kolagenní vlákna i krystaly minerálů mezi vlákny uspořádány nepravidelně. Tenká vlákna se střídají se silnými tak, že jejich vzhled připomíná osnovu tkaniny. Primární, vláknitá kost je tvořena vysoce aktivními osteoblasty v době vývoje, v dospělosti může být její tvorba stimulována frakturou, růstovými faktory nebo prostaglandinem E2 (Junqueira 1997).

Kost sekundární – lamelární během vývoje postupně nahrazuje kost vláknitou a tvoří naprostou většinu dospělého skeletu. Lamelární kost se vyskytuje ve dvou makroskopicky snadno rozlišitelných formách: kostní tkáň hutná - kompakta, která tvoří plášť kosti, a kostní tkáň houbovitá – spongióza nacházející uvnitř kosti. Haversovy systémy, osteony (obr. 3, 4), tvoří základní strukturní jednotku. Odhaduje se, že v dospělém skeletu je na 21 milionů osteonů. Na příčném řezu mají elipsovitý tvar s průměrem mezi 100–400 μm. Průměrně velký osteon je tvořen asi třiceti 3 mm

tlustými lamelami. Každý osteon je prostoupen kanálky svých osteocytů, které tvoří cestu pro látkovou difúzi mezi osteocytem a cévami. Z maximálního průměru osteonu lze vyvodit, že žádný osteocyt není od cévy vzdálenější než 200 μm, což je pro přežití buňky pravděpodobně maximální vzdálenost od cévy. Průměrná velikost centrálního kanálu osteonu je 50 μm (Junqueira 1997).

2.3.2. Obecná stavba kosti

Na povrchu kosti je okostice - periost, tuhá vazivová blána pokrývající kost s výjimkou kloubních konců. Periost je tvořen kolagenními vlákny a fibroblasty. Z vnitřní vrstvy periostu vybíhají svazky kolagenních vláken pronikajících do kostní matrix. Tato vlákna fixují periost ke kosti. Fibroblasty - buňky progenitorové, jsou schopny další diferenciace v osteoblasty, což má význam v procesu reparace nebo při dalším růstu kosti (Nedorost 2009).

Bohatě prokrvený periost je zásadní pro výživu kosti. Periost je i bohatě inervován a zprostředkovává vedení takzvané kostní bolesti.

2.3.3. Mikroskopická organizace kosti

Pod periostem je vrstva kompakty tvořící plášť kosti. Jak již bylo zmíněno, kompakta je jednou ze dvou forem uspořádání sekundární kostní tkáně. Základní morfologickou strukturou je zde osteon, neboli Haversův systém (obr. 3 -5). Obecně lze říci, že kompletní osteon je tvořen koncentricky uspořádanými lamelami, které dohromady tvoří válec. Jeho struktura je přizpůsobena jeho základní funkci - nutrici a přestavbě kosti. Haversovy kanálky komunikují s dřeňovou dutinou i periostem sítí Volkmannových kanálků (obr. 1).



Obr. 3: Kompaktní kost (Nedorost 2009).

Obr. 4: Spongiózní kost (Nedorost 2009). 17

Lamely jsou tvořeny svazky paralelně běžících kolagenních fibril, které mají v osteonu celkově spirálovitý průběh. Na fibrilách jsou uloženy štíhlé jehlice minerální složky, zejména hydroxyapatitu sodného. Mineralizovaná matrix lamel obsahuje kolagen typu I, jehož vlákna běží v anastomozujících svazcích asi 3 µm silných. Průběh kolagenních vláken je určován typem zátěže. V místech tahu běží podélně a tlakem se mění na spíše šikmé (Nedorost 2009).

V základní hmotě jsou zality i kostní buňky, osteocyty, které se nacházejí v lamelách uvnitř dutinek lakun. Z nich vystupují kanálky vyplněné výběžky osteocytů. Osteocyty se podílejí na látkové výměně mezi mineralizovanou kostní matrix a krví, ovlivňují hladinu vápníku v tělesných tekutinách. Mezi jednotlivými lamelami se nacházejí ložiska mineralizované amorfní hmoty - cementová substance s malým počtem kolagenních vláken.



Obr. 5: Schéma lamelární kosti (Firoz 2008).

Během růstu dochází k neustálé tvorbě, následné destrukci a obměně Haversových systémů. Čím mladší systém, tím méně lamel a širší centrální kanál, od kterého se lamely tvoří a postupně posouvají do periferie. Endost je vazivová vrstva vystýlající dutinu kosti (obr. 3). Ve srovnání s periostem je tenčí, tvořený jen malým množstvím vaziva a jednou vrstvou osteoprogenitorových buněk (Junqueira 1997).

Uvnitř kosti je spongióza, druhá forma sekundární kosti (obr. 5, 6). Je tvořena vzájemně anastomozujícími kostními trámci tvořícími prostorovou síť vyplněnou kostní dření. Směr trámců je výslednicí mechanického zatížení kosti a je specifický pro každou kost. Tato architektonika trámců umožňuje maximální pevnost při minimu hmoty.

V centrální části dlouhých kostí je dřeňová dutina. Ta je spolu s prostory mezi trámci spongiózy vyplněna kostní dření.



Obr. 6: Výbrus kosti pažní – patrná spongiózní tkáň (Tichý 2006).

Kostní dřeň je orgán, v němž vznikají všechny druhy krevních elementů. Hematogenní červená kostní dřeň je tvořena mezenchymovým vazivem s četnými sinusoidami, osteoblasty a osteoklasty. V průběhu ontogeneze se kostní dřeň mění z aktivní, červené, na žlutou, tvořenou tukovou tkání. V dospělosti přetrvává krvetvorba, tedy i červená kostní dřeň, v kostech axiálního skeletu, tedy v kostech obratlů, kosti hrudní, žebrech a kostech pánve (Junqueira 1997).

2.3.4. Klasifikace

Při klasifikaci kostí lze uplatnit řadu hledisek makro - i mikroanatomických, vývojových apod. Pro přehlednost bude uvedena pouze klasifikace dle tvaru:

Tvar kostí

kosti dlouhé (např. kost pažní, kost stehenní) mají diafýzu, centrální část kosti, která je tvořena tlustým pláštěm kompakty obkružující centrální dutinu, která obsahuje kostní dřeň. Kloubní konce dlouhých kostí jsou tvořeny spongiózní kostí krytou tenkou vrstvou kompakty. V období růstu je epifýza oddělena od diafýzy růstovou ploténkou, která je tvořena hyalinní chrupavkou.

 kosti krátké (např. obratle, kosti zánártní) jsou tvořeny tenkým pláštěm kompakty kryjící spongiózu a kostní dřeň. kosti ploché (např. kosti klenby lební) jsou tvořeny dvěma lamelami kompakty, mezi nimiž je spongióza zvaná diploe.

kosti nepravidelné (např. horní čelist, kost klínová) mají obdobnou stavbu jako kosti krátké.



Obr. 7: Dlouhá a plochá kost – průřez (Nedorost 2009).

2.3.5. Buňky kosti

Osteocyty

Jsou nejpočetnější skupinou buněk zralé kostní tkáně. Vznikají z osteoblastu postupným zalitím do matrix. Zralý, inaktivní osteocyt má tvar elipsoidu běžícího podél obvodu lamely, v níž je v lakuně uložen. Z těla vybíhají četné dendritické výběžky obsahující další mikrofilamenta. Na konci výběžků jsou osteocyty v kontaktu se sousedními buňkami. Tyto spoje umožňují metabolickou i elektrickou interakci.



Obr. 8: Osteocyty (Nedorost 2009).

Zralý, živý osteocyt má vřetenovitý tvar. Aktivní, mladší osteocyt má oválný až sférický tvar, jako známku sekretorické aktivity, dobře vyvinuté granulární endoplazmatické retikulum a Golgiho komplex. Průměrná životnost osteocytu je odhadována na 25 let. Osteocyty mají zásadní význam pro udržování stavby kostní tkáně (Nedorost 2009).

Osteoblasty

Jsou bazofilní, zhruba kubické mononukleární buňky o velikosti kolem 15–30 μm. Vyskytují se v místech tvorby nebo remodelace kosti, kde tvoří souvislou vrstvu. Jsou zodpovědné za syntézu, ukládání i kalcifikaci kostní matrix. V dospělé, nestresované kosti se nacházejí osteoblasty hlavně v hloubce kompakty v blízkosti aktuálně přestavovaných osteonů. Část z nich se poté, co byla zalita do tvořené matrix, přeměňuje v osteocyty (Nedorost 2009).

Základní funkcí osteoblastu je syntéza a sekrece organické složky intercelulární matrix osteoidu, tedy zejména kolagenu I, méně kolagenu V, ale i jiných makromolekul. Neméně významnou funkcí osteoblastu je mineralizace osteoidu, v níž se uplatňuje alkalická fosfatáza. Lokálním zvýšením pH a překročením součinu rozpustnosti hydroxyapatitu se formují krystaly na povrchu vláken organického osteoidu (Nakamura 2007).

Osteoklasty

Jsou polymorfní, zhruba 40 µm velké buňky s velkým počtem jader (obvykle 15 - 20). Nacházejí se v místech kostní přestavby, nebo v blízkosti povrchu kosti, v místech kostní remodelace. Osteoklasty obsahují mnohočetné mitochondrie. Mají relativně řídké, rozptýlené endoplasmatické retikulum, oproti tomu rozsáhlý, perinukleárně uložený Golgiho komplex (Nedorost 2009).

Funkcí osteoklastu je destrukce kosti. Demineralizace dosahují osteoklasty lokálním snižováním pH. Organickou matrix degradují prostřednictvím lysozomálních i nelysozomálních enzymů. Z buněk aktivujících osteoklasty jsou uváděny osteoblasty, makrofágy i lymfocyty. Vzestup intracelulární hladiny vápníku osteoklasty inaktivuje. Po ukončení kostní resorpce se rozpadají na mononukleární buňky. Životnost oskeoklastu se pohybuje od16 dní až do 7 týdnů (Nakamura 2007).

Buňky osteoprogenitorové

Jsou mezenchymového původu. Vyvíjejí se z pluripotentních kmenových buněk přítomných v kostní dřeni i pojivových tkáních, ve kterých se mohou diferencovat do osteoblastů. Osteoprogenitorové buňky jsou zodpovědné za tvorbu kostní tkáně v období vývoje. V průběhu osifikace se tyto buňky shlukují a dělí, poté se přemění v osteoblasty. V průběhu osifikace osteoprogenitorové buňky spolu s cévami penetrují do zóny degenerující chrupavky, kde se pak rovněž diferencují v osteoblasty. Směr výsledné diferenciace je ovlivněn charakterem indukčních podnětů (Nedorost 2009).

Kost lemující buňky

Jsou ploché buňky podobné buňkám epitelárním. Jsou přítomné zejména v adultním skeletu. Nacházejí se na povrchu klidových zón kosti, kde neprobíhají resorpce, ani novotvorba. Buňky tvoří souvislou výstelku, která odděluje kostní dřeň od endostu. Z periostu pak vybíhají jako vrstva vystýlající cévní kanály osteonů.

Kostní matrix

Kostní matrix je mineralizovaná a podobně jako u ostatních typů pojiva je tvořena základní hmotou a kolagenními vlákny. Ta jsou četná a tvoří obvykle paralelní svazky. V adultním skeletu je matrix jen mírně hydratovaná, voda tvoří 10 - 20 % celkové kostní hmoty. Suchou složku tvoří z 60 - 70 % anorganické komponenty - mikrokrystaly vápníku, hydroxyapatit a další hydroxidy. Kolagen tvoří 30 - 40 %. Zbytkových 5 % tvoří zejména glykoproteiny. V kostní tkáni převažuje kolagen typu I, na který jsou vázány dvě třetiny kostních minerálů. Proporce jednotlivých stavebních komponent se mění s věkem, lokací i celkovým stavem metabolismu (Nedorost 2009).

2.4. Nanovlákna a elektrostatické zvlákňování

2.4.1. Vlastnosti a použití nanovláken

Pojmy nanovlákna a nanotechnologie vznikly v průběhu 20. století při dynamicky se rozvíjejícím vývoji technologií a nových vědních oborů. Nanovlákna se dají definovat, jako vlákna o průměru menším než 1000 nm. Tato definice není zcela přesná - v tomto případě lze mluvit spíše o submikronovém rozměru. Lze říci, že dnešními postupy lze vytvořit vlákna o průměru cca 100 nm. Teprve vlákna s průměrem pod 100 nm lze považovat za nanovlákna v pravém smyslu slova. Tato vlákna se vyznačují unikátními vlastnostmi, díky nimž se využívají v mnoha průmyslových aplikacích. Těmito vlastnostmi jsou velmi vysoký měrný povrch, vysoká porozita, malý průměr pórů a velmi malý průměr vláken. Nanovlákenné vrstvy lze díky těmto parametrům s úspěchem používat jako tkáňové nosiče.



Obr. 9: Nanovlákenná vrstva v porovnání s lidským vlasem (Kalinová 2008).

2.4.2. Princip elektrostatického zvlákňování

Detailní popis technologie elektrostatického zvlákňování je uveden v práci Huang (2003). Tento způsob výroby nanovláken je v porovnání s jinými způsoby (například melt blown) technologicky jednoduchý (obr. 10). Proces elektrostatického zvlákňování využívá elektrostatické a kapilární síly pro vytažení vlákna z polymerního roztoku či taveniny, nejčastěji však z roztoku. Kapilára, tryska nebo zvlákňovací kolektor je spojen s elektrodou vysokého napětí v řádech desítek kilovolt a polarizuje polymerní roztok (Jirsák 2003). Protipól v elektrostatickém poli tvoří vodivý sběrný kolektor v podobě

desky, síta, kovového hrotu nebo válečku, který bývá uzemněn nebo připojen k opačně polarizované elektrodě vysokého napětí. Zdroj vysokého napětí vytváří elektrostatické pole formující elektricky nabitý polymerní roztok, který je následně zvlákněn (Růžičková 2004). Vlivem vysokého elektrického napětí a rozdílu elektrických potenciálů mezi polarizovaným polymerním roztokem a uzemněným kolektorem působí na polymerní roztok tři síly. Jde o sílu povrchového napětí, sílu kapilární a elektrostatickou. Tyto síly formují takzvaný Taylorův kužel (Lukáš 2009). Jestliže intenzita elektrického pole dosáhne nadkritické hodnoty, záporná elektrostatická síla překoná povrchové napětí (kapilární sílu) polymerního roztoku a následně je z Taylorova kužele vytažen velmi tenký proud roztoku. Vlivem viskozity polymerního roztoku a existence zapletených polymerních řetězců nedochází k transformaci do sférických kapek (Reneker 2006).



Obr. 10: Schéma obecného procesu elektrostatického zvlákňování z trysky: 1- zdroj vysokého napětí, 2- tryska s polymerním roztokem, 3- proud nanovláken, 4- uzemněný kolektor s nanovlákennou vrstvou (Kalinová 2008).

Dráhu proudu polymerního roztoku mezi elektrodou a kolektorem můžeme rozdělit na dvě části (obr. 11). První je stabilní oblast, ve které proud putuje přímočaře v silném elektrickém poli. Ve druhé, nestabilní oblasti, začne proud rotovat (bičovat) a zároveň se z něho odpařuje rozpouštědlo. V této fázi se polymerní proud dlouží, štěpí a dále se mění na vlákna. Průměr vláken se pohybuje v rozmezí 100 – 500 nm. Dopadající vlákna na povrchu kolektoru ztrácí zbytkový náboj a tvoří vlákennou vrstvu., která se v porovnání s jinými technologiemi výroby polymerních vlákenných vrstev vyznačuje vysokou homogenitou. Vysoká homogenita vzniklých vrstev je jednou z hlavních výhod technologie elektrostatického zvlákňování (Lukáš 2009).



Obr. 11: Znázornění proudění polymerního roztoku: 1- oblast stabilního proudu, 2 oblast nestabilního proudu, 3- tryska, 4- Taylorův kužel, 5- uzemněný kolektor (Kalinová 2010).

2.5. Technologie melt-blown

V této kapitole bude popsána jedny z běžných technologie tvorby polymerních vlákenných vrstev. Jedná se o metodu melt-blown, která je zástupcem produktivní tvorby vlákenných vrstev v oblasti mikronových a submikronových rozměrů.

Vznik a rozvoj výroby polymerních vlákenných vrstev dnes již tradičními termickými a chemickými metodami odstartoval v padesátých letech minulého století. A to z důvodu zvyšujících se požadavků trhu na nové speciální materiálové aplikace, a z důvodu potřeby plošných vlákenných textilních útvarů vyrobených levnějšími a produktivnějšími metodami. Další aspekt, který tomuto vývoji předcházel a umožnil zrod těchto metod, byl v první polovině dvacátého století rozmach makromolekulární chemie a vyvíjení stále nových polymerních materiálů (Jirsák 2003).

V současnosti produkty chemicko-termických technologií výroby polymerních vlákenných vrstev zasahují do mnoha průmyslových odvětví a jejich poptávka neustále stoupá, zejména u termických technologií pro jejich vysokou výrobnost a nízkou finální cenu produktu. Z tohoto důvodu vznikají v dnešní době stále nové výrobní linky po celém světě.

2.5.1. Historie

Základní technologie výroby vlákenných vrstev metodou melt-blown byla vyvinuta v Námořní výzkumné laboratoři pod záštitou americké vlády na počátku padesátých let minulého století. Tento výzkum byl zahájen z důvodu potřeby vytvoření vhodné technologie pro výrobu média zachycujícího radioaktivní částice v horních vrstvách atmosféry.

První použitelné laboratorní výrobky spatřily světlo světa roku 1954 a byly využity pro monitorování světového jaderného výzkumu. Byly vyrobeny vzduchem dlouženou extrudovanou polypropylenovou taveninou procházející přes jednu kapiláru. Díky velmi uspokojivým výsledkům dosavadního výzkumu se v polovině roku 1960 ujala dalšího vývoje nová pobočka ropné společnosti Exxon. O pět let později firma patentovala úspěšný prototyp desetipalcového zařízení pro průmyslovou výrobu mikrovláken, které do dnešních let nedoznalo převratných změn v konstrukci.

Výraznějšímu rozvoji, průmyslové výroby mikrovláken technologií melt-blown, brzdily v sedmdesátých letech nedostatečně produktivní postupy výroby termoplastických polymerů s vyšším indexem toku (MFI). Tato skutečnost se změnila v průběhu osmdesátých let s vyvinutím nových katalytických postupů výroby polymerů (John 1999). Do roku 2000 Exxon vyvinul a patentoval většinu výrobních technologií systému melt-blown. Na přelomu tisíciletí vstoupilo na technologickou scénu více firem vyvíjející nové technologické modifikace, například firma 3M s patenty na výrobu směsi mikrovláken s běžnými textilními vlákny (Zamfir 2003).

2.5.2. Specifikace procesu melt-blown

Technologie melt-blown produkuje v současné době vlákenné vrstvy o plošné hmotnosti 5 – 400 g/m2 při vysoké variabilitě průměru vláken, v rozsahu 0,5 – 20 μm (Jirsák 2003). Rychlosti odtahu vlákenné vrstvy dosahují v současné době rychlost až 1000 m/min při šíři dosahující 2 metrů (Dahiya 2004). Vlákna mají délku od několika milimetrů po několik set milimetrů při hladkém kruhovém průřezu. Produkty se vyznačují vysokým faktorem krytí, měrným povrchem, vysokou pórovitostí a retenčními vlastnostmi při nižší až střední pevnosti vlákenné vrstvy. Využívají se jako filtrační média, zdravotnické textilie, průmyslové sorbenty a hygienické výrobky. Zvlákňovány jsou všechny termoplasty s MFI nad 30, například polyetylen a polypropylen. Úspěšně je využívána technologie výroby bikomponentních vláken (Dahiya 2004).

2.5.3. Popis technologie melt-blown

Technologie melt-blown je odborně popsána ve zdroji (Dahiya 2004). Podle běžně přijímané definice je melt-blown proces, ve kterém se proudem vzduchu s poměrně vysokou rychlostí fouká roztavený polymer vytlačovaný zvlákňovací tryskou z extrudéru na perforovaný sběrný pás či buben. Na sběrném segmentu se již vytvořená vlákna formují a částečně pojí do vlákenné vrstvy, která je dále odvíjena (obr. 12) (Jirsák 2003).

Na počátku procesu polymer prochází extrudérem, který se skládá z vyhřívaného válce s rotujícím vytlačovacím šnekem uvnitř.

Extrudér je vyhříván třemi až čtyřmi ohřívači do určité fáze v přírůstkovém pořadí. Jeho hlavní funkcí je roztavení a homogenizace polymeru vsypaného do prostoru válce ve formě pelet či granulí a jeho následné vytlačovaní přes trysku. Dopředný pohyb granulátu probíhá mezi stěnou válce a spirálovou drážkou vytlačovacího šneku. Tání granulátu v extrudéru je způsobeno výhřevným teplem, třením viskózního proudění a mechanickým působením mezi šnekem a stěnou válce (Wadsworth 1991). Poté

prochází polymerní tavenina přes dávkovací čerpadlo, které usměrňuje jeho další tok při konstantním objemu, tlaku a teplotě, což je nezbytné pro konzistentní přísun taveniny do zvlákňovací hubice. Čerpadlo je zubové, s dvěma protiběžnými ozubenými koly. Tavenina je přiváděna sací stranou k zubovým mezerám. Z distribučního kanálu za zubovým čerpadlem, putuje tavenina přímo ke zvlákňovací hlavici. Hlavice má tvar dlouhé duté kovové lišty trojúhelníkového profilu s několika sty malými kruhovými otvory na jeho čele. Z těchto otvorů vytlačovaná tavenina tvoří vlákenné prameny, které jsou následně formovány horkým vzduchem na jemná vlákna. V porovnání s jinými technologiemi jdou otvory v hlavici malého průměru – nejčastěji 0,4 mm s roztečemi 1 - 4 mm (Dahiya 2004).



Obr.12: Schéma procesu Melt-blown: 1- extrudér, 2- plnící šnek, 3- dávkovací čerpadlo, 4 - vzduchové rozvody, 5- zvlákňovací hubice, 6- kolektor (Kalinová 2004).

Existují dva druhy zvlákňovací hlavice. Dělí se podle technologie výroby otvorů na kapilární typ a typ s vrtanými otvory. U kapilárního typu je hlavice rozdělena na dvě části, jejichž dělící rovinou je podélná středová osa otvorů (Jirsák 2003). Do každé poloviny je na styčné ploše vyfrézována řada půlkulatých drážek. Obě poloviny jsou slícovány tak, aby tvořily ideální kruhové otvory. U vrtaného typu jsou vyrobeny otvory pomocí mechanického vyvrtávání, nebo pomocí elektrického výboje technologií EDM. Zvlákňovací hlavice je vyhřívána externím ohřívačem na provozní teplotu v rozsahu $215 - 340^{\circ}$ C.

Roztavený polymer je po vytlačení ze zvlákňovací hlavice formován horkým vzduchem, který vychází přes otvory v dolní a horní části hlavy (obr. 13). Z důvodu ohřevu vzduchu se jedná o energeticky náročný proces. Rychlost vzduchu vytváří kompresor a ohřev zajišťuje elektricky nebo plynově vytápěná pec. Typická teplota předehřátého vzduchu je 230 - 360 °C při rychlosti 180 - 270 m/s. Vlákno je s rostoucí délkou unášeno vzrůstající silou, nepravidelně dlouženo a odtrháváno. Unášená vlákna

následně ulpívají a úplně tuhnou na perforovaném sběrném kolektoru. Depozice vláken na kolektoru je podpořena vytvořeným podtlakem vně válce. Vlákenná vrstva je většinou pojena pouze samotnou soudržností vláken, nebo je pojena termicky (Wadsworth 1991).



Obr. 13: Proces melt-blown zvlákňování: 1- polymerní tavenina, 2- horký vzduch, 3- studený vzduch, 4- proud dloužených vláken, 5- kolektor, převzato z (Kalinová 2004).

2.5.4. Předpoklady budoucího vývoje

Budoucí uplatnění technologie melt-blown závisí především na zdokonalení homogenity vlákenné vrstvy při velkém obsahu vláken o submikronovém průměru. Jestliže se podaří vyvinout výrobní linky zaručující především dostatečnou homogenitu vlákenné struktury, nahradí technologie melt-blown z velké části technologii elektrostatického zvlákňování v průmyslové výrobě filtračních médií a v dalších odvětví průmyslové výroby, kde není požadována příprava polymerního materiálu studenou cestou. Rychlost odtahu a šíře vlákenné vrstvy se bude zvyšovat s ohledem na limity mechanického namáhání jen mírně. Dalším faktorem je samozřejmě použití nových materiálů a zdokonalení výroby bikomponentních vláken (Nakajima 2007)

2.6. Funkcionalizace vláken pomocí pevných částic

Cílem této práce je popis technologických principů a materiálů používaných v současné době pro funkcionalizaci nejčastěji nanovlákenných, ale i vrstev nevlákenného charakteru pomocí mikro a nano prášků z různých materiálů. Jedná se o principy funkcionalizace na bázi strukturních, materiálových a dalších modifikací.

2.6.1. Způsoby funkcionalizace

V této kapitole budou popsány různé možnosti a způsoby funkcionalizace vlákenných vrstev pomocí částic různých látek.

Strukturní – vymývání částic

Technika vymývání částic (particleleaching, salt leaching) je velmi populárním postupem používaným v tkáňovém inženýrství pro výrobu scaffoldů. Základem tohoto způsobu je příprava formy, do které se vhodně umístí částice tzv. porogenu přesně definovaných tvarů a velikostí. Do formy se nalije polymerní roztok, rozpouštědlo se po čase odpaří. Tím se vytvoří tuhý materiál složený z polymeru a částic. Následně se částice rozpustí vhodným rozpouštědlem. Částice musí být rozpustné jiným rozpouštědlem, nežli je polymerní roztok. Vznikají tak tenké vrstvy požadovaných struktur, které lze dále vrstvit (Lukáš 2005).

Tato technika má svou modifikaci nazývanou formování taveniny (*melt molding*), kde je termoplastický polymerní prášek zamíchán s vhodným porogenem. Směs je umístěna například do teflonové formy a zahřáta nad teplotu tání polymerního materiálu. Po zahřátí je kompozitní struktura vystavena vlivu rozpouštědla porogenu. Vymytím porogenu dojde k vytvoření hotového porézního materiálu. Metoda formování taveniny se snaží eliminovat toxická rozpouštědla či toxické porogeny, které mohou stopově ve scaffoldu zůstat i po vymytí, a proto využívá jako porogen například želatinu (Lukáš 2005).

Postup můžeme použít i pro strukturní modifikaci samotných nanovlákenných vrstev, kde není pro další použití dostačující mezivlákenná struktura vytvořená samotným vrstvením nanovláken. Při procesu ukládání nanovláken je vhodně dispergovaný porogen ukládán či přisypáván do vznikající vrstvy. Následným rozpuštěním těchto částic většinou vznikají objemnější mezivlákenné prostory.

Při tvorbě tkáňových nosičů touto metodou potřebujeme docílit mezivlákenné struktury, která umožňuje buněčnou proliferaci.

Používáme tedy částice porogenu, které respektují velikost těchto buněk. Nejčastěji se jedná o rozměry $15 - 30 \ \mu\text{m}$ o objemovém zastoupení $80 - 90 \ \%$. Nejčastěji používané materiály porogenů jsou částice vosků, solí, hluboce zmraženého ledu nebo vodou rozpustného polymeru (Mikeš 2013).



Obr. 14: Scaffold – 80%porogenu (Lukáš 2005).

Podpůrná funkcionalizace

Jedná se o proces, kdy jsou do vlákenné struktury vpravovány částice, které ulpívají na povrchu vláken. Částice jsou do struktury nejčastěji rozptýleny při samotném procesu ukládání jednotlivých vláken, které následně utvoří kompaktní strukturu. Dalším způsobem je doprava částic pomocí koloidního roztoku, který prostoupí vlákennou strukturu a po vysušení transportní kapaliny ulpí na povrchu vláken samotné částice. Tato metoda neupravuje zásadním způsobem strukturní parametry, ale zvyšuje funkci, pro kterou je výsledná struktura určena (Lukáš 2005, Mikeš 2013).

Metoda má svou modifikaci, která umožňuje obohatit částicemi vrstvy nevlákenného složení. Částice jsou vpravovány mezi tenké vrstvy porózního nevlákenného materiálu. Vrstvy jsou následně nakladeny na sebe pro vytvoření výsledné objemnější vrstvy. Takto funkcionalizovat a dále vrstvit se mohou například struktury připravené výše popsanou metodou vymývání částic, zpěňováním nebo metodou rapid prototyping.

Používané částice jsou připravovány podle požadovaných vlastností z některých těžkých kovů, biopolymerů, různých skupenství uhlíku, různých druhů dřev či biologického materiálu. Materiály mají rozmanité vlastnosti, například antibakteriální

účinky při použití v medicíně. Jsou schopné na sebe vázat různé chemické látky a následně je případně uvolňovat. V tkáňovém inženýrství mohou podporovat růst, diferenciaci či proliferaci buněčných kmenů (Lanza 2000).

Při tomto způsobu modifikace používáme částice podstatně variabilnějších rozměrů než v předešlém případě. Jedná se o rozměry v rozmezí $0,2 - 100 \mu m$. Objemové zastoupení částic se pohybuje v rozsahu 1 - 50 % (Lanza 2000, Mikeš 2013).



Obr. 15: Částice aktivního uhlí na vláknech (Chvojka 2013).

Inkorporační metoda

Funkční částice jsou do materiálu přímo inkorporovány, to znamená, že jsou během procesu zvlákňování zaneseny přímo do vláken. Nejčastěji jsou tedy přidány do polymerního roztoku či taveniny před samotným procesem tvorby vlákna. Polymer je většinou tepelně, enzymaticky či jinak degradovatelný tak, aby při svém pozvolném rozpadu postupně uvolňoval částice k jejich funkci. Principu se nejčastěji využívá při funkcionalizaci nanovlákenných vrstev pro medicínu nebo tkáňové inženýrství. Lze jej stejně úspěšně použít i u nevlákenných porózních vrstev (Lembo 2010).

Inkorporačním uložením enkapsulovaných, vázaných nebo volných léčiv, vitamínů či antibiotik jsou vytvářeny systémy pro cílenou dopravu léčiv. Stejný systém se s úspěchem využívá v tkáňovém inženýrství při postupném uvolňování růstových faktorů při rozpadu tkáňových nosičů. Dále se provádí pokusy s inkorporací uhlíkových nanotrubic nebo uhlíkových fulerénů, které fungují po uvolnění například jako specifické inhibitory (Lukáš 2005, Mikeš 2013).

Velikosti částic se pohybují od 1nm u fulerenu C60 až po 1 μm u enkapsulovaných léčiv. Objemové zastoupení je nepatrné od jednotek promile až po jednotky procent (Lembo 2010).

2.6.2. Metody nanášení

V této části jsou popsány základní způsoby nanášení částic zejména při podpůrné a inkorporační funkcionalizaci. S ohledem na velikost a tvar částic se při jejich nanášení na povrch nebo přímo do materiálu potýkáme s mnoha technologickými problémy. Jedná se zejména o rovnoměrnou dispergaci částic a potlačení jejich koagulace nebo agregace.

Ultrazvuková metoda

Tato metoda využívá ultrazvuk, což je mechanické vlnění ležící nad hranicí slyšitelnosti lidského ucha o frekvencích 20 kHz a vyšších. Jako zdroj ultrazvuku slouží duralová sonotroda (obr. 16) o specifické geometrii, která zajišťuje generování ultrazvuku o požadované frekvenci. Sonotroda přejímá pulzy vznikající při piezolektrickém jevu, které rozechvívají hrot sonotrody (Feynman 2000).

Takto generované mechanické vlnění předává částicím energii překonávající adhezní a hydrofilní síly, které vytváří nechtěné shluky. Částice jsou tedy do značné míry ojednocené a homogenně dispergované. Energie může být částicím předávána na dopravníku, který je transportuje od zásobníku ke vznikající vrstvě během pádu částic z dopravníku na povrch vlákenné struktury nebo až po jejich dopadu na povrch. Nejčastěji jsou ovšem využívány první dvě možnosti.

Při experimentech byla stanovena jako nejvhodnější frekvence spodní hranice ultrazvuku, tedy 20 000 Hz. Jako důvod je udáván fakt, že vyšší frekvence předávají částicím energii o takové intenzitě, která způsobuje jejich termický rozklad (Chvojka 2013).



Obr. 16: Ultrazvuková sonotroda (Chvojka 2013).

Vibrační metoda

Jedná se o generování harmonického mechanického kmitání o specifické frekvenci na určitém mechanickém členu podávací soustavy částic. Jako zdroj vibrací slouží stejnosměrný vibrační motorek. Ten se skládá z magnetického středového trnu, který slouží jako stator a ze samostatného vynutí. Motorek roztáčí excentrické závaží, a to předává přes pevné uložení motorku pravidelné mechanické rázy (vibrace) dalším pevným členům podávací soustavy. Další zdroj vibrací může být dostatečně výkonná zvuková membrána, která se ovšem téměř nepoužívá (Feynman 2000, Snášel 2013).

Princip působení vibrací na částice je zde stejný jako v případě ultrazvuku, kdy míra energie částicím předaná je větší nežli součet jejich adhezních a hydrofilních sil. Tento fakt vede k rozrušení shluků a homogenní dispergaci. Vibrace jsou udávány podávacímu pásu nebo hraně přepadu na zásobníku částic.

Jako ideální frekvence se jeví 100 – 200 Hz. Ovšem tento způsob není tak účinný jako ultrazvukový, a to především u větších objemů částic velikosti pod 1 μm.



Obr. 17: Schéma vibračního motorku (Nedorost 2013)

Další metody

Kromě výše popsaných metod používaných jednotlivě se jako nejúčinnější jeví jejich kombinace, kdy je použitý vibrující podavač a sonotroda.

Dále se používá i čistě mechanický způsob s dopravníkem a ručním vsypáváním částic. Ten je ovšem vhodný jen pro částice větších rozměrů a také tam, kde není kladen velký důraz na homogenní dispergaci částic (Lembo 2010).

Jako doplněk se používá rozvolnění a doprava částic linearizovaným proudem vzduchu, většinou ale v kombinaci s ultrazvukovým nebo vibračním způsobem.

Základním způsobem zamezení vzniku koagulace částic je snížení vzdušné vlhkosti pod 30 %. Vlhkost se váže na povrch částic a je hlavní příčinou agregace. Snížení vlhkosti docílíme kompletním odvlhčením pracovní místnosti pomocí klimatizace. Dále skladováním částic v nádobě se silikagelem či skladováním za zvýšené teploty a následným včasným zpracováním.

Posledním způsobem snížení agregace je povrchová modifikace částic. Jedná se například o modifikaci plasmou, nebo o přidání hydrofobních funkčních skupin. V některých případech navazujeme na částice například OH skupiny jako objemný substituent, který zabraňuje blízkému kontaktu s dalšími částicemi. OH skupiny byly s úspěchem použity u fulerenů C60 (Lembo 2010).

2.6.3. Materiály

V následující části bude pojednáno o vybraných, nejběžněji používaných materiálech částic, kterými lze funkcionalizovat vlákenné i nevlákenné struktury určené především pro medicínu a filtrační aplikace. Nebudou zmíněny materiály pro funkcionalizaci strukturní, protože tyto materiály jsou poměrně běžné a známé.

Hydroxyapatit

Hydroxyapatit (HA) je obecně vnímán jako biokeramický materiál. Jde o sloučeninu přirozených forem vápníku a fosforu s chemickým vzorcem $Ca_5(PO_4)_3(OH)$. Příprava probíhá syntézou prekursorů a následnou krystalizací. Teplotní odolnost dosahuje 800 °C a nevykazuje dobrou mechanickou pevnost. Hydroxyapatit je chemicky podobný minerální složce kostí a tvrdých tkání savců. Je to jeden z mála materiálů, které jsou klasifikovány jako bioaktivní, což znamená, že podporuje oseointegraci kosti při použití v ortopedických, zubních a obličejových aplikací (Com 2013, Mikeš 2013).

HA částice připravené mletím se s úspěchem používají při podpůrné i inkorporační modifikaci vlákenných vrstev zejména v tkáňovém inženýrství kosti.

Použití HA nanočástic se věnuje studie Wang a Co. (2011). Nanočástice HA byly inkorporovány v nanovláknech z kopolymeru kyseliny mléčné a kyseliny glykolové (PLGA) v poměru 95 : 5. Následné in vitro testy novorozeneckých lebečních myších osteoblastů MC3T3 – M1 prokázaly výrazně vyšší biologickou aktivitu a biomineralizaci při podobné životaschopnosti buněk v porovnání se samotnými PLGA nanovlákny (Lihong 2012).

Velice podobné výsledky zvýšení biologické aktivity a mineralizace při použití HA prokázala i studie Jung (2013). Zde byly použity částice pro podpůrnou funkcionalizaci nanovlákenné vrstvy polykaprolaktonu. Částice byly naneseny pomocí vibrací a proudu vzduchu na povrch nanovláken.



Obr. 18: Vykristalizovaný hydroxyapatit (Com 2013).

Zlato

Zlato (Au) je chemicky velmi dobře odolný, poměrně měkký, tepelně a elektricky dobře vodivý kov žluté barvy. Vyznačuje se vysokou hustotou – 19,3 g/cm³ a teplotou tání 1064 °C. V přírodě se vyskytuje jako ryzí kov získávaný gravitační nebo hydrometalurgickou separací. V medicíně se používají koloidní roztoky zlata k léčbě revmatických onemocnění, onemocnění nervové soustavy nebo endokrinního systému (Jung 2012).

Elektrolyticky připravované biokompatibilní nanočástice Au jsou využívány při inkorporačních modifikacích nanovlákenných vrstev v tkáňovém inženýrství a v preparátech pro léčbu rakoviny.

Ve studii Jung a Co. (2012) byly modifikované nanočástice o průměrné velikosti 7 nm inkorporovány do nanovláken tkáňového nosiče z Polymethylglutarimidu (PMGI). Modifikované nanočástice Au v tomto případě tvořily nosiče specifických peptidů, které sloužily jako buněčné lepidlo. Vlivem těchto částic tedy docházelo ke značnému zvýšení buněčné adheze k PMGI nanovláknům a dále k podpoře diferenciace pluripotentních kmenových buněk na kardiomyocyty.
Uhlík – diamant

Diamant je nejtvrdší známý nerost. Jedná se o krystalickou formu uhlíku (C) tvořící krychlovou mřížku. Je transparentní v závislosti na stavu povrchu a příměsích. Vyskytuje se ve všech barevných odstínech, nejčastěji v odstínu bílé. Vyznačuje se hustotou 3,5 g/cm³, vysokým indexem lomu světla – 2,5 a vysokou tepelnou vodivostí. V přírodě se vyskytuje v krystalické formě ve specifických horninách. Lze jej vyrábět i průmyslově za vysokých tlaků a teplot (Moore 2013).

Nanočástice biokompatibilního syntetického diamantu připravované výbuchem v komoře jsou využívány k inkorporační modifikaci vrstev v tkáňovém inženýrství nebo také jako specifické indikátory v diagnostické medicíně.

Moore a Co. (2013) ve své studii používá nanočástice syntetického diamantu (NDS) o velikosti 4 – 5 nm inkorporované do kolagenových vláken tvořících tkáňový nosič. Na tyto nanočástice použité jako nosiče jsou chemicky navázány morfogenetické proteiny (BMP) a základní růstové faktory fibroblastů (bFGF), které se uvolňují při styku s mírně kyselým pH. Tato studie prokázala, že takto uvolňované BMF a bFGF indukují diferenciaci a proliferaci osteoblastů.

Uhlík – uhlí – aktivní uhlí

Uhlí je hnědá až černá fosilní hořlavá hornina s obsahem 50 – 95 % uhlíku (C). Dále obsahuje v největší míře kyslík, vodu a síru. Vzniká rozkladem rostlinných a živočišných zbytků bez přístupu kyslíku. Využívá se v energetickém průmyslu jako zdroj tepla a jako primární surovina pro mnoho odvětví chemického průmyslu (Chvojka 2013).

Aktivní uhlí je vysoce porózní látka s velkým aktivním povrchem a obsahem uhlíku nad 95 %. Nejkvalitnější aktivní uhlí je vyráběno karbonizací černého uhlí, z něhož se při tomto procesu uvolňují všechny těkavé látky a vzniká tak vysoce porózní struktura. Tato látka vykazuje měrný povrch 400 – 1600 m²/g s póry o rozměrech od 1 nm. Z těchto skutečností vyplývá, že aktivní uhlí je velice dobrým absorpčním médiem, proto se používá hlavně pro různé druhy filtrace (Chvojka 2013).



Obr. 19: Pevné a práškové aktivní uhlí (Chvojka 2013).

Nano a mikro částice aktivního uhlí jsou využívány pro podpůrnou funkcionalizaci vlákenných vrstev kde zvyšují jejich filtrační vlastnosti.

V článku Chvojka (2013) je popsáno použití mikročástic aktivního uhlí k funkcionalizaci struktury. Částice o rozměrech 1 – 15 µm byly pomocí ultrazvuku, vibrací a proudu vzduchu rozdispergovány na povrch mikrovláken z polyvinylbutyralu (PVB), které následně tvořily objemnou vrstvu. Takto připravená vrstva vykazovala mimo jiné velmi dobrou sorpci fenolů. Výsledný produkt bude dále testován jako filtr v plynových maskách.



Obr. 20: Vrstva PVB s aktivním uhlím (Chvojka 2013).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentální části bylo vytvořit vlákenný materiál pro přípravu kostních náhrad kombinující mikrovlákna s nanovlákny, který je dále fukcionalizovaný částicemi vhodného materiálu. Vlákenné vrstvy budou mít definovatelný poměr mikro a nanovláken, jejich průměry, orientaci vláken a také v objemnosti vlákenné vrstvy (hustotou). Tyto parametry jsou rozhodující pro typ kompaktní kostní tkáně, která má být nahrazena. Dalším postupem bylo takto vytvořené struktury podrobit strukturní a materiálové analýze. Poslední částí experimentu bylo zhodnocení využitelnosti materiálu pro regenerativní medicínu pomocí biologického testování.

Technologie výroby požadované struktury, kombinující mikro a nanovlákna, je založena na propojení dvou zcela odlišných postupů výroby vláken. Pro výrobu mikrovláken je použita technologie melt - blown. Jedná se o produkci vláken zvlákňováním taveniny z trysek o malém průměru s následným dloužením horkým vzduchem. Vznikající vlákna mají průměr mezi 2 až 5 mikrometry. Ke zvlákňování lze použít různé druhy termoplastických polymerů, včetně biodegradabilních. Vznikající mikrovlákenná vrstva má isotropní charakter, přičemž lze dosahovat významných tlouštěk této vrstvy při zachování velmi dobrých mechanických vlastností a vysoké porozity nutné pro proliferaci buněk.

Nanovlákenná vrstva je vytvářena elektrostatickým zvlákňováním, kdy vlákna vznikají dloužením polymeru pomocí elektrostatických sil mezi elektrodam. Použít lze jak stejnosměrného elektrického pole, tak s výhodou i střídavého pole, které umožnuje dosáhnout vyšší intenzity zvlákňování. Získaná vlákna mají průměr od 100 do 500 nm. Vrstva nanovláken má opět isotropní charakter, její tloušťka a mechanické vlastnosti nebývají často dostatečné.

Spojením obou technologií lze získat kompozitní vlákenný materiál, který spojuje ideální porozitu, tloušťku a pevnost vlákenné vrstvy potřebné pro prorůstání buněk a nanovlákenná vrstva zajistí buňkám vysoce adhezivní povrch, potřebný pro jejich ukotvení a tvorbu tří dimenzionální vrstvy. Vrstva s těmito vlastnostmi byla navíc dále funkcionalyzována nanesením částic hydroxyapatitu, který by měl podle předpokladů zvyšovat schopnost buněčné adheze, proliferace a mineralizace nově vzniklé kostní tkáně.

3.1. Průběh a optimalizace procesu výroby objemných mikro a nanovlákenných kompozitních vrstev.

Tato kapitola popisuje postup testování procesních charakteristik zařízení pro testované druhy polykaprolaktonu (PCL). Na základě těchto testů byl proveden výběr nejvhodnějšího materiálu pro výrobu finálních vrstev k biologickému testování. V poslední části této kapitoly je popsána samotná výroba finálních vrstev a proces zvýšení funkcionalizace těchto vrstev pomocí naprašování částic.

3.1.1. Otimalizace parametrů technologie melt - blown a výběr vhodného materiálu.

V první části tohoto experimentu bylo třeba stanovit optimální hodnoty výrobních proměnných procesu melt – blown pro PCL o různých molekulových hmotnostech. Dále bylo potřeba pro každý testovaný materiál zhodnotit morfologii jeho vlákenné struktury a mechanické vlastnosti. Na základě tohoto hodnocení vybrat pro výrobu finálního produktu vhodný druh PCL a přiřadit k němu ideální výrobní parametry procesu.

Snahou bylo vybrat pro výrobu finálního produktu PCL s co nejnižší molekulovou hmotností. Pokud by tedy zároveň vyhovoval tento materiál svými strukturními a mechanickými parametry dalšímu použití. Důvodem této snahy byl předpoklad, že PCL o nižších molekulových hmotnostech se rozpadá v organismu rychleji, což by pro tkáňový nosič určený pro rekonstrukci kostní tkáně bylo výhodné.

Materiál

S ohledem na dostupnost a cenu byly testovány PCL Mw = 10 000 – Wako, PCL Mw = 45 000 – Sigma a jejich připravená směs v poměru 50 : 50.

Zařízení melt – blown

Pro celý proces testování a následnou finální výrobu vlákenných vrstev bylo využíváno melt – blown zařízení nacházející se v poloprovozu Katedry netkaných textilií a nanovlákenných materiálů. Jednalo se o plně funkční laboratorní zařízení dnes

již neexistující americké firmy J & M LABORATORIES (obr. 21, 22), které je staré několik desetiletí a nezachovala se bohužel žádná dokumentace o technických parametrech.



Obr. 21: Melt – blown zařízení J & M LABORATORIES.



Obr. 22: Schématické znázornění zařízení melt – blown a jeho uspořádání během testování PCL materiálů: 1- sběrný kolektor, 2 – tryska, 3 – ovládací panel, 4 – extrudér, 5 – zásobník, 6 – převodovka, 7 – motor.

Během procesu testování jednotlivých druhů PCL materiálů byly pro přehlednost regulovány pouze následující parametry: otáčky šneku extrudéru, tlak vzduchu v trysce a především teplota jednotlivých vyhřívacích zón zařízení (obr. 23).



Obr. 23: Schéma rozložení vyhřívacích zón extrudéru a trysky.

Testování PCL Mw = 45 000

Prvním testovaným materiálem byl PCL Mw = 45 000. S ohledem druh polymeru bylo zvoleno prvotní nastavení stroje, tak aby nedošlo k zatuhnutí polymeru v extrudéru nebo jeho degradaci (tab. 1).

Nevýhodou testů teplotního nastavení zařízení je fakt, že teplota jednotlivých zón nelze během jedné zkoušky regulovat směrem dolů. Proto je nutné zvyšovat teplotu s ohledem na tento fakt. Pro toto testování bylo postupně zaznamenáno 7 teplotních charakteristik stroje a jejich průvodních jevů, pro přehlednost byly tyto výsledky zaznamenány do tabulky (tab. 1). Uvedené teploty byly vždy zaznamenány ve stupních Farenheita.

Během testování rotoval šnek extrudéru konstantními otáčkami 40 ot./min. To znamená cca 100g polymeru na 1 hodinu provozu. Kolektor při těchto testech nevykonával žádný rotační pohyb. Tyto podmínky testování byly použity pro všechny testované materiály.

Tab. 1: Jednotlivá teplotní nastavení [°F] při testování PCL Mw = 45 000.

1						
Prohřátí m	at. cca 20 m	in.				
Drátování	а					
chuchvalce	2.					
Vysoký nár	růst tlaku uv	nitř extrudér	u - vysoká v	viskozita.		2 00
	1	-		-1	1	
1	2	3	Flange	Tryska	Vduch	
176	212	212	250	250	350	A
2						e la
Chuchvalce	e a doletujíc	í kapky.				
Náznak ryc	hle se trhají	cích vláken.				(a"
Menší pok	les tlaku v e	ktrudéru - m	írné snížení	viskozity.		
1	2	3	Flange	Tryska	Vduch	
176	250	250	300	300	400	
3						
Opět zlepš	– ení oproti pi	ředchozímu i	nastavení - d	částečné zvla	ákňování.	
Infračerve	eným čidler	n naměřena	a teploty tr	ysky		
140°C.						100
Pokles tla	ku uvnitř e	xtrudéru na	běžnou ho	odnotu - pr	ohřátí mat.	
Tlak vzdu	chu 10 PSI.					
1	2	3	Flange	Tryska	Vduch	
176	250	250	320	320	400	
4						C
Plynulá tv	_ orba hrubý	ch vláken.				100
, Odebrán	, vzorek č. 1	pro SEM an	alýzu.			0
Zvýšení tl	aku vzduch	u na 12 PSI	- hrubší vla	ákna - sníže	ení na 10	
PSI.						
1	2	3	Flange	Tryska	Vduch	
176	250	250	320	320	440	©,,
E						
		no 16 DCI			I	
Infračerve	ným čidler	na 10 PSI. n naměřen	a tenlota tr	wsky		
145°C		in numerent		yJily		
Opět lenš	í plynulost	tvorbv vlák	en.			
Odebrán	vzorek č. 2	na SEM ana	alýzu.			
1	2	3	Flange	Tryska	Vduch	
176	250	300	320	320	440	
	200	550	520	520	1.0	

6							
Vlákna op	ět jemnější	í oproti pře	dchozímu i	nastavení.			
Tlak vzduo	chu snížen i	na 13 PSI.					
Odebrán vzorek č. 3 na SEM analýzu.							
	1	. <u></u>	. <u></u>	. <u></u>			
1	2	3	Flange	Tryska	Vduch		
176	250	300	340	340	440		
7							
Při stejném nastavení poklesl po 15 minutách opět tlak.							
Tvorba ještě jemnějších vlák.							
Odebrán vzorek č. 4 pro SEM analýzu.							
1	2	3	Flange	Tryska	Vduch		
176	250	300	340	340	440		

SEM analýza – zvětšení 100x, 500x, 5000x

VZOREK 1







VZOREK 2







VZOREK 3



Tab. 2: Měření průměrů vláken – 100 měření na jeden vzorek.

VZOREK	STŘEDNÍ HODNOTA [µm]	SMĚRODATNÁ ODCHYLKA [µm]
1	30,79	16,30
2	23,60	14,79
3	14,42	7,04
4	11,07	6,07

Z uvedených výsledků a snímků jasně vyplývá, že se stoupající teplotou rostla kvalita vznikající vlákenné vrstvy z hlediska průměrů vláken jejich homogenity i provázanosti. Z rozdílů vzorků 3 a 4 odebraných při posledním natavení jasně plyne, že je žádoucí vyčkat na ustálení tepelných toků v jednotlivých částech zařízení. Doporučená doba je cca 15 minut. Tím se zajistí ohřev taveniny na teploty indikované mařícími čidly zařízení. Jako ideální je zvoleno nastavení č.7.

Testování PCL Mw = 10 000

S ohledem na molekulovou hmotnost, deklarovaný index toku a teplotu tání tohoto PCL byly jako počáteční nastavení zvoleny hodnoty s minimálním možným teplotním nastavením, tak aby nehrozila teplotní degradace polymeru a zároveň zadření šneku extrudéru v první vyhřívací části (tab. 3).

Tab. 3: Jednotlivá teplotní nastavení [°F] při testování, PCL Mw =10 000.

1 Prohřátí ma Zvýšení a po Vysoký nári Vlákna jen	at. cca 5 min. okles talku v ůst tlaku uvn nná, trhající					
1	2	3	Flange	Tryska	Vduch	
158	194	194	212	212	302	
2 Vlákna se ji natavená. Materiál sta Snížení otáš	ž netrhají al ále vykazova áek šneku ex					
1	2	3	Flange	Tryska	Vduch	
140	158	158	176	176	194	Jacob Ja

PCL 10 000 ovšem téměř ihned po natavení vykazuje tak nízkou viskozitu, že i při sníženém objemu plnění projede materiál zařízením neúměrně rychle a špatně se tedy provádějí změny experimentálních podmínek. Z tohoto důvodu jsou další experimenty nevhodné ekonomického hlediska.

Dalším a **hlavním problémem** je fakt, že vrstva vytvořená z PCL 10 000 má nežádoucí mechanické vlastnosti: je velmi křehká – tedy nevhodná k dalšímu testování a použití. Z těchto důvodů nemělo smysl provést obrazovou analýzu a měření průměrů vláken.

Testování PCL Mw = 45 000/10 000, 50 : 50

Jako poslední materiál připravený pro testování, byl blend obou předchozích testovaných polymerů v poměru 50 : 50. Očekáváním bylo v nejlepším případě spojení

vlastností obou polymerů výhodných pro další použití v této práci. U PCL Mw = 45 000 ideální strukturní parametry vlákenné vrstvy a mechanické vlastnosti. Pro PCL Mw = 10 000 je to nízká molekulová hmotnost a tím snížená doba biodegradability.

Blend byl připraven smícháním granulí obou materiálů v hmotnostním poměru 50:50 v keramické misce a vložen do horkovzdušné komory nastavené na 100°C, kdy oba polymery nevykazovaly žádné známky degradace a zároveň měla tavenina dobrou viskozitu. Tavenina byla 1 hodinu po 5 minutách pravidelně ručně promíchávána. Následně byla miska vytažena z komory a tavenina na vzduchu zchladla (obr. 24). Dále bylo potřeba takto ztuhlý kopolymer zpracovat na granule o velikosti 5 – 10 mm. Ovšem pomocí žádného dostupného zařízení se nepodařilo takto kopolymer zpracovat. Proto byl nakonec dělen ručně pomocí štípacích kleští po dobu 5 hodin. (obr. 24).





Obr. 24: Blend polymerů PCL a vyrobené granule.

1						
Tvorba pě	kných vlák	en.				
Plynulé zv materiálu.	lákňování a	ale velké šo	oty			
Ouebran	/201ek C. 1	pro seivi ai	idiyzu.			Le.
1	2	3	Flange	Tryska	Vduch	
176	212	212	250	250	350	

Tab. 4: Jednotlivá teplotní nastavení [°F] při testování, PCL Mw =45 000/10 000.

2 Stále tvorb Plynulé zvla Odebrán vz	a pěknýc ákňování zorek č. 2						
1	2	3	Flange	Tryska	Vduch	E.	
176	180	200	270	270	370		
3	3						
Stále tvorba pěkných vláken							
Plynulé zvlákňování s malými šoty.							
Vlákna dop							
Odebrán vzorek č. 3 pro SEM analýzu.							
1	2	3	Flange	Tryska	Vduch		
176	180	200	300	300	400		

SEM analýza – zvětšení 100x, 500x, 5000x















VZOREK 1

VZOREK 3



Tab. 5: Měření průměrů vláken – 100 měření na jeden vzorek.

VZOREK	STŘEDNÍ HODNOTA [µm]	SMĚRODATNÁ ODCHYLKA [µm]
1	43,79	30,30
2	17,60	14,79
3	25,42	19,23

Z výsledků jasně vyplývá, že nejlepší nastavení pro tento blend bylo č. 2. Při třetím nastavení už dopadala vlákna na kolektor mírně natavená, což se odráží i na morfologii struktury patrné ze SEM analýzy. I vrstva vyrobená při druhém teplotním nastavení vykazovala v celku rozsáhlé strukturní defekty. Tento fakt v kombinaci se zdlouhavou přípravou blendu podpořil nakonec výběr čistého **PCL Mw = 45 000** pro výrobu finálních vrstev.

3.1.2. Výroba finálních vrstev pro biologické testování

V této části bude popsán způsob výroby finálních vlákenných vrstev pro biologické testování. Po předchozím testování byl jako vhodný polymer pro tuto výrobu vybrán PCL Mw = 45 000 – Sigma.

Byly vyrobeny 4 rozdílné vlákenné vrstvy pro vzájemné porovnávání při biologickém testování:

- 1. Vrstva PCL vyrobená pouze technologií melt blown.
- 2. Vrstva PCL vyrobená technologií melt blown s částicemi hydroxyapatitu.
- Vrstva PCL vyrobená kombinací technologií melt blown a elektrostatického zvlákňování.
- Vrstva PCL vyrobená kombinací technologií melt blown a elektrostatického zvlákňování s částicemi hydroxyapatitu.

Výroba vrstev PCL technologií melt – blown s částicemi hydroxyapatitu

K výrobě první vrstvy bylo použito naprosto stejného nastavení zařízení jako pro testování PCL Mw = 45 000 a to jak pro rozmístění jednotlivých komponent (obr. 22), tak pro teplotní nastavení č. 7 (tab. 6) Kolektor během výrobního procesu, kdy zachytával vlákna unášená proudem vzduchu, nerotoval s ohledem na potřebnou velikost vyrobené vrstvy a úsporu materiálu. Pouze automaticky šanšíroval o frekvenci 0,1 Hz bez rotace. Po 20 minutovém prohřevu materiálu trval samotný výrobní proces 30 minut.

Tab. 6: Teplotní nastavení při výrobě finální vrstvy PCL.

1	2	3	Flange	Tryska	Vzduch
176	250	300	340	340	440

Výroba druhé vrstvy PCL s částicemi hydroxyapatitu následovala bezprostředně po sejmutí první. Proces byl tedy v plném chodu a pouze bylo zapnuto vibrační naprašovací zařízení (obr. 25). Vibrační motorky byly zapnuté pomocí regulátoru na maximum a do zařízení vsypán vysušený hydroxyapatit – Sigma – powder. Vibrace rozvolňovali postupně částice podávací štěrbinu do prostoru, které následně strhával vzduch unášející vlákna z trysky. Velké shluky částic vzduch neunášel a volně propadávaly. Proces výroby trval tak jako v prvním případě 30 minut.



Obr. 25: Vibrační naprašovací zařízení a schéma jeho umístění.

Výroba vrstev PCL technologiemi melt – blown a elektrostatického zvlákňování s částicemi hydroxyapatitu.

Pro výrobu zbylých dvou vrstev kombinací melt – blown technologie a technologie elektrostatického zvlákňování byl použit princip unášení nanovláken vzduchem popsaný v bakalářské práci (Erben 2012). K zařízení melt - blown byt tedy přidán rezervoár na polymerní roztok, strunový spinner s regulací otáček napojený na zdroj kladně polarizovaného vysokého napětí a ojehlená protielektroda napojená na záporně polarizovaný zdroj (obr. 26 – 28). Principem procesu bylo strhávání mezi elektrodami se tvořících nanovláken proudem vzduchu, který již unášel mikrovlákna od trysky zařízení melt –blown.



Obr. 26: Melt – blown zařízení J & M LABORATORIES v kombinaci se zařízením elektrostatického zvlákňování.

Pro elektrostatické zvlákňování byl použit polymerní roztok 16% PCL Mw = 45 000 - Sigma v rozpouštědlovém systému chloroform – Penta/ ethanol – Penta v poměru 9:1. Pro technologii melt – blown bylo nepatrně změněno nastavení teplot ohledem na podmínky procesu a jiné teplotní spády způsobené výměnou pojistky (tab. 7).

1	2	3	Flange	Tryska	Vduch
176	250	300	340	340	370

Tab. 7: Teplotní nastavení při výrobě finální vrstvy PCL melt -blown/ELS.



Obr. 27: Schématické znázornění uspořádání zařízení melt – blown v kombinaci s elektrostatickým zvlákňováním a vibračním naprašováním částic: 1- sběrný kolektor, 2 - polyamidový zásobník polymerního roztoku, 3 – zdroje vysokého napětí, 4 – jehlový kolektor, 5 – vybrační naprašovací zařízení, 6 – proud vzduchu s vlákny a částicemi, 7 – elektromotor, 8 – tryska, 9 – extrudér, 10 – zásobník, 11 – převodovka, 12 – motor.



Obr. 28: Schéma prostorového uspořádání procesu melt – blown/ELS.

Samotný proces výroby opět započal po 20 minutovém ohřevu materiálu v extrudéru a následném vlití polymerního roztoku to zásobníku. Spinner rotoval rychlostí 50 ot/min. v protisměru hodinových ručiček. Jako startovací napětí bylo nastaveno + 25 kV a – 10 kV. Během procesu docházelo vlivem proudícího vzduchu ke výšení viskozity polymerního roztoku a v důsledku toho bylo napětí na elektrodách postupně zvyšováno až na hodnoty + 35kV a – 20 kV. Každých 10 minut musel být proces přerušen z důvodu doplnění polymerního roztoku do zásobníku a vyčištění strun spinneru. Kolektor během výrobního procesu, kdy zachytával vlákna unášená proudem vzduchu, opět nerotoval s ohledem na potřebnou velikost vyrobené vrstvy a úsporu materiálu. Pouze automaticky šanšíroval o frekvenci 0,1 Hz bez rotace.

Výroba třetí vlákenné vrstvy kombinací metod melt – blown a elektrostatického zvlákňování probíhala opět 30 minut. Po sejmutí takto vyrobené vrstvy, byla ihned vyrobena totožným způsobem čtvrtá testovací vrstva s částicemi hydroxyapatitu. Opět šlo pouze o zapnutí naprašovacího zařízení na maximální výkon a vsypání vysušeného prášku hydroxyapatitu. Výroba probíhala taktéž 30 minut.

Vyrobené vlákenné vrstvy byly vždy sejmuty z kolektoru, ostřiženy od slabé části vrstvy a uloženy. Vrstvy se vyznačovaly tloušťkou cca 5 mm a jednotlivě od sebe byly vizuálně a hmatem takřka nerozeznatelné. Pouze vrstvy s hydroxyapatitem byly na omak mírně hrubší. Vyrobené vrstvy se vyznačovaly plošnou hmotností 250g/m², plošná hmotnost vrstev s hydroxyapatitem byla o 10% vyšší, z toho tedy vyplývá, že hydroxyapatit byl zastoupen 10 hm. %.



Obr. 29: Vyrobené PCL vrstvy před finálním ostřižením.

3.2. Měření strukturních vlastností

Prvními testy pro zjištění využitelnosti vytvořených struktur v regenerativní medicíně byly testy strukturních vlastností. Konkrétně se jedná o měření průměrů vláken, mezivlákenných prostor a naprášených částic pomocí obrazové analýzy. Z takto získaných výsledků lze určit, zda se vytvořené vrstvy strukturně podobají extracelulární tkáňové matrici.

Testované vzorky

Testovány byly tři vzorky: vrstva PCL vyrobená technologií melt – blown Vrstva PCL vyrobená pomocí strunového spinneru metodou elektrostatického zvlákňování. Posledním vzorkem byla vrstva vyrobená kombinací dvou předešlých metod. Jako doplněk byly měřeny průměry částic hydroxyapatitu (HA) naprášeného do struktur vyrobených metodou melt – blown.

3.2.1. Elektronová mikroskopie

V první části bylo nutné nasnímat a analyzovat snímky vlákenných struktur, které budou vhodné k provedení obrazové analýzy a také k vizuálnímu zhodnocení struktury jednotlivých vrstev. S ohledem na nano – mikrometrickou strukturu vrstev byla použita rastrovací elektronová mikroskopie (SEM).

Zařízení

Rastrovací elektronový mikroskop TESCAN VEGA TS 5130 - rozlišení 3nm, zvětšení 20 – 50000 x, urychlovací napětí 0,2 – 30kV, dosahovaný podtlak 5x10⁻³ Pa (Obr. 30). Zlatička Q150R – Quorum (obr. 30).



Obr. 30: Elektronový mikroskop TESCAN - vlevo, zlatička Quorum – vpravo.

Princip

Kromě názvu "rastrovací" se používá i označení "skenovací" nebo "řádkovací" elektronový mikroskop, z čehož vyplývá, že při práci mikroskopu se primární svazek elektronů pohybuje po řádcích po preparátu a vyráží sekundární elektrony, které jsou snímány sondou, převáděny na videosignál a zobrazeny na monitoru počítače. Mikroskop je plně řízen počítačem. Doplňkový software umožňuje zaznamenávání a archivování zvětšených obrazů ve standardním obrazovém formátu na počítačová záznamová média. Uložené obrazy mohou být dále upravovány v jiných grafických programech. Obraz povrchu vzorku vzniká v části, která se skládá z tubusu, komory, vakuového systému a detektorů. V této části mikroskopu je formován a vychylován fokusovaný elektronový svazek, který dopadá na povrch zkoumaného objektu, jež je umístěn v komoře mikroskopu a je polohován pomocí manipulátoru. Celý prostor zařízení je vakuován pomocí vývěv, což je nutného pro činnost mikroskopu.

Postup

Z každé analyzované vrstvy byly odděleny vzorky o velikosti několika mm². Ty byly pokryty vrstvou zlata silnou 5 nm a nalepeny na kovový terčík o průměru 30 mm (obr. 31). Následně byl terčík se vzorky vložen do komory mikroskopu a po dobu několika minut byl odsáván vzduch. Poté mohlo být započato pořizování snímků o požadovaném zvětšení (Obr. 32 – 35).



Obr. 31: Nepozlacený terčík se vzorky připravenými na elektronovou mikroskopii.

Výsledky



Obr. 32: PCL - technologie melt - blown, zvětšení 500x, 1000x, 5000x.



Obr. 33: PCL – kombinace technologie melt – blown/elektrospining, zvětšení 500x, 1000x, 5000x.



Obr. 34: PCL – technologie elektrospining, zvětšení 500x, 2500x, 5000x.



Obr. 35: PCL – kombinace technologie melt – blown/elektrospining – částice hydroxyapatitu, zvětšení 500x, 1000x, 5000x.

Z přiložených snímků lze jasně vypozorovat, že vlákenné vrstvy obsahují především vlákna o jemnosti specifické pro použitou výrobní technologii. Je tedy patrné, že vrstva vyrobená pouze technologií melt-blown obsahuje především mikrovlákna. Naproti tomu vrstva vyrobená pouze elektrostatickým zvlákňováním obsahuje především nanovlákna. U vrstvy vyrobené kombinací obou metod je ze snímků dobře patrné, zastoupení obou jemností vláken, lze tedy říci, že v tomto předchozí experiment proběhl úspěšně. Dále je potřeba uvést, že všechny vrstvy vykazují dobrou vlákennou homogenitu. Poslední série snímků ukazuje dobrou lokální míru homogenity částic HA na vláknech. Tento fakt není bohužel patrný v celém objemu. Proto je potřeba samotnou technologii naprašování dále intenzivně vyvíjet.

3.2.2. Obrazová analýza – měření strukturních parametrů

V druhé části této kapitoly byla provedena samotná obrazová analýza obrazu vytvořených snímků a určeny strukturní parametry pro každou ze tří testovaných vlákenných vrstev. Tyto parametry zahrnují průměry vláken, průměry mezivlákenných prostor. Dále byla určena velikost částic HA, která se pro jednotlivé vrstvy zásadně neliší.

Obrazový analyzátor NIS Elements AR 3.0

NIS-Elements Advanced Research je program určený pro širší použití v laboratořích, školách a vědeckých ústavech, využívající při svojí činnosti moderní metody matematické analýzy obrazu. Nabízí úplné řešení zahrnující snímání obrazu, archivaci i analýzu. Program úspěšně zvládá snímání a zobrazení vícedimenzionálních obrázků až v šesti dimenzích najednou (X, Y, Z, vlnová délka, čas, multipoint). Dále disponuje škálou přídavných nástrojů pro modifikace nasnímaných obrazů: odstraňování neostrých částí obrazu, tedy těch částí, které ležely při snímání mimo rovinu ostrosti, modul rozšíření hloubky ostrosti (EDF), obrazová databáze atd.

Princip

Princip analýzy obrazu spočívá v počítačovém vyhodnocení digitálního obrazu sledovaného objektu sejmutého digitální kamerou, digitálním fotoaparátem nebo scannerem. Obraz (rozdělený na jednotlivé body – pixely) lze rovnou zpracovat přímo ve formátu *.jpg, nebo jej příslušný software převede na grafický soubor *.lim.

Prvním krokem při zpracování obrazu je snímání vzorků a uložení obrazu v číselné formě do počítače. Při snímání dochází k digitalizaci obrazu, tj. k přechodu od spojité fyzikální funkce k diskrétní funkci elektrického signálu. Digitalizace se odehrává ve dvou nezávislých krocích, jimiž jsou kvantování a vzorkování. Kvantování je diskretizace oboru hodnot obrazové funkce, vzorkováním (spojité funkce) rozumíme odebrání hodnot vzorků ve stejných intervalech. Tím se získají v počítači jednotlivé obrazové plochy tzv. pixely.

Druhým krokem je předzpracování obrazu. Vstupem i výstupem je diskrétní (digitální) obraz. Cílem předzpracování obrazu je potlačit šum a zkreslení vzniklé při digitalizaci a přenosu. Třetím krokem je segmentace. Umožňuje nalézt v obrazu části objektů, se kterými se pracuje a odstraní ty části, které z hlediska dalšího zpracování nejsou zajímavé. Základní metodou segmentace je prahování, které je založeno na konstantní odrazivosti či pohltivosti objektů a tyto objekty se poté oddělí od pozadí. Výsledkem je výstupní binární obraz. Popis nalezených objektů je čtvrtým krokem zpracování obrazu. Objekty lze popsat kvantitativně pomocí číselných hodnot nastavených parametrů. Posledním krokem je zpracování obrazu, a to porozumění jeho obsahu a zpracování, a nakonec interpretace získaných dat.

Postup měření

Po spuštění programu NIS – Elements a vybrání importování snímku bylo nutné provést kalibraci. Kalibrace přiřazuje snímku reálný rozměr stanovením její jednotky. Většinou byla hodnota velikosti rozlišení snímku v programu již nastavena, tudíž stačilo použít příslušnou ikonu. V nabídce programu se dále použila ikona šipky, kterou bylo možné měřit délky tím, že křížkem označíme začátek a konec úsečky. V našem případě nám délka úsečky stanovovala okraje vlákna a tedy jeho tloušťku. Při měření bylo důležité udržovat určitou kolmost dané úsečky vůči poloze vlákna, abychom zbytečně nevytvářeli odchylky a nezkreslovali tak výsledek (obr. 36). Pro každé měření jednoho vzorku bylo proměřeno 140 vláken z jednoho snímku. Při měření velikosti mezivlákenných prostor byl formát snímku převeden do binární podoby podle světlosti jednotlivých bodů. Tmavý bod -0, světlý bod -1. Mezivlákenný prostor se zobrazoval jako soustava tmavých bodů s přiřazenou hodnotou 0 a vlákna jako soustava světlých bodů s hodnotou 1. Pro samotné měření program vyplnil soustavu bodů s hodnotou 0 červenými vektorovými plochami (obr. 36), ze kterých program dopočítal a zaznamenal rozměry jednotlivých prostor. Hodnota kontrastu, při kterém program přiřazoval hodnoty jednotlivým obrazovým bodům, byla 65. Pro všechna měření byly použity snímky z elektronového mikroskopu o zvětšení 500x.



Obr. 36: Měření průměrů vpravo a mezivlákenných prostor vlevo.

Výsledky

PCL – technologie melt-blown

Průměry vláken:

Tab. 8: Naměřené hodnoty průměrů vláken, PCL – melt - blown.

Průměr [µm]	St. Odchylka [µm]	Minimum [µm]	Maximum [µm]
7,70	7,09	0,48	34,62



Graf 1: Četnost zastoupení jednotlivých tříd průměrů vláken.

Průměry mezivlákenných prostor:

Tab. 9: Naměřené hodnoty mezivlákenných prostor, PCL – melt – blown.

Průměr [µm]	St. Odchylka [µm]	Minimum [µm]	Maximum [µm]
356,11	519,70	1,11	5190,40



Graf 2: Četnost zastoupení jednotlivých tříd průměrů mezivlákenných prostor [µm].

PCL – technologie melt-blown/elektrospining

Průměry vláken:

Tab. 10: Naměřené hodnoty průměrů vláken, PCL – melt – blown/elektrospinig.

Průměr [µm]	St. Odchylka [µm]	Minimum [µm]	Maximum [µm]
5,76	8,12	0,39	35,95



Graf 3: Četnost zastoupení jednotlivých tříd průměrů vláken.

Průměry mezivlákenných prostor:

Tab. 11: Naměřené hodnoty průměrů mezivlákenných prostor, PCL – melt – blown/elektrospinning.

Průměr [µm]	St. Odchylka [µm]	Minimum [µm]	Maximum [µm]
172,35	209,28	0,36	1675,72



Graf 4: Četnost zastoupení jednotlivých tříd průměrů mezivlákenných prostor [µm].

PCL – elektrospining

Průměry vláken:

Tab. 12: Naměřené hodnoty průměrů vláken, PCL – elektrospinig.

Průměr [µm]	St. Odchylka [µm]	Minimum [µm]	Maximum [µm]
3,71	3,82	0,36	14,95



Graf 5: Četnost zastoupení jednotlivých tříd průměrů vláken.

Průměry mezivlákenných prostor:

Tab. 13: Naměřené hodnoty mezivlákenných prostor, PCL – elektrospining.

Průměr [µm]	St. Odchylka [µm]	Minimum [µm]	Maximum [µm]
43,24	95,76	0,21	995,72



Graf 6: Četnost zastoupení jednotlivých tříd průměrů mezivlákenných prostor [nm].

HA – všechny vrstvy

Průměry částic:

Tab. 14: Naměřené hodnoty průměrů částic.

Průměr [µm]	St. Odchylka [µm]	Minimum [µm]	Maximum [µm]
3,71	3,82	0,36	14,95



Graf 7: Četnost zastoupení jednotlivých tříd průměrů částic.

Výsledky z výše uvedených grafů jasně ukazují konkrétní rozdíly mezi strukturními vlastnostmi jednotlivých vlákenných vrstev vyrobených různými metodami. Vrstva vyrobená pouze metodou melt – blown má většinu průměrů vláken v mikronové oblasti a poměrně malé procento vláken v oblasti submikronové, to se promítá i v průměrech mezivlákenných prostor, jejichž průměry vykazují nedostatečnou distribuci průměrů v oblasti 50 - 100µm. To v kombinaci s mikronovými průměry vláken nebude pravděpodobně vhodné pro dostatečnou buněčnou adhezi. Vrstva vyrobená pouze elektrostatickým zvlákňováním jasně vykazuje přítomnost průměrů vláken hlavně v submikronové oblasti při velkém procentu průměrů vláken v oblasti 50 - 100 µm. Ovšem tyto parametry nejsou zastoupené v takové variabilitě, jaká by umožňovala dostatečnou buněčnou proliferaci do vnitřního objemu materiálu při dostatečné mechanické pevnosti vrstvy. U vrstvy vyrobené kombinací těchto metod je jasně patrné

odstranění nedostatků vrstev vyrobených pouze jednou metodou. Tedy dostatečné procento průměrů vláken v submikronové oblasti pro dobrou buněčnou adhezi ale zároveň dostatečné zastoupení mikronových průměrů vláken, tak aby vrstva vykazovala dostatečné mechanické vlastnosti. Tento výsledek v kombinaci s vysokou variabilitou průměrů mezivlákenných prostor bude nejspíše umožnovat dostatečnou buněčnou adhezi a vnitřní proliferaci buněk.

3.3. Stanovení molekulové hmotnosti

Během zpracování PCL metodou melt-blown je polymerní tavenina při průchodu extrudérem vystavena tepelnému, tlakovému a smykovému namáhání. U většiny termoplastů mají tyto druhy namáhání s největší pravděpodobností za následek v různé míře snížení molekulové hmotnosti. Podle předpokladů má snížení molekulové hmotnosti u PCL vliv na snížení doby jeho biodegradace jak při testech in vitro tak in vivo. V předchozích kapitolách byl pro finální tvorbu tkáňového nosiče zvolen PCL s molekulovou hmotností 45 000, který se při své výchozí molekulové hmotnosti vyznačuje v některých aplikacích dlouhou dobou biodegradace. Snížení Mw by bylo výhodné pro další využití výsledného produktu.

Tato kapitola se tedy věnovala stanovení změny molekulové hmotnosti PCL po průchodu extrudérem. Pro toto stanovení byly vybrány tři rozdílné metody.

První metodou je viskozimetrické stanovení molekulové hmotnosti pomocí ubbelohdeho viskozimetru. Na základě rozdílné dynamické viskozity polymerních roztoků téhož materiálu před a po zatížení lze přibližně vypočítat změnu střední molekulové hmotnosti. Tato metoda je dostupná přímo na Katedře Netkaných textilií a nanovlákenných materiálů.

Další metodou je analýza tepelného rozkladu pomocí termické gravimetrické analýzy. Tato metoda vyhodnocuje průběh rozkladu materiálu při termickém zatížení. Z rozdílných průběhů hmotnostního úbytku pro materiál před a po termickém zatížení lze stanovit, že v materiálu proběhly strukturní změny, které poukazují na změnu molekulové hmotnosti. Termická gravimetrická analýza je dostupná na Oddělení analytické chemie na CxI.

Jako třetí metoda byla použita gelová chromatografie, která po změření stanový velmi přesné výsledky případných rozdílů molekulových hmotností a jejich distribučních křivek. Tato metoda je oproti předchozím dvěma poměrně nákladná, složitá a nedostupná na TU v Liberci.

Cílem této kapitoly tedy bylo stanovení případné změny molekulové hmotnosti pomocí tří rozdílných analytických metod. Dále porovnání metod přibližného určení melekulové hmotnosti dostupných pouze na TUL s metodou přesnou, která je dostupná na Ústavu makromolekulární chemie v Praze. Na základě tohoto vyhodnocení lze stanovit, zda jsou pro budoucí určení změny molekulové hmotnosti dostačující metody dostupné na TUL. Testovány budou tři páry vzorků, kde se každý pár skládá z materiálu

před termickým zatížením v podobě granulátu a po termickém zatížení v podobě vláken. Jedná se o PCL s molekulovou hmotností $Mw = 45\ 000$, dále s $Mw = 10\ 000$ a jejich směs v poměru 50 : 50 hm.

3.3.1. Termická gravimetrická analýza

První použitou metodou byla termická gravimetrická analýza (TGA) umístěná na ústavu CxI oddělení analytické chemie Technické Univerzity v Liberci.

Zařízení

TGA Q500 od firmy TA Instruments využívající vertikální váhy pracující v rozsahu od laboratorní teploty do 1000°C (obr. 37). Přístroj využívá i technologie Hi-Res[™] TGA (termogravimetrie s vysokým rozlišením), která zvyšuje citlivost metody v případě na sebe navazujících termických rozkladů vzorku.



Obr. 37: Termický gravimetrický analyzátor TA Q500.

Princip

Jedná se o nejjednodušší metodu termické analýzy kdy je kompaktní vzorek o hmotnosti v řádu miligramů až gramů umístěný na platinové tavné pánvičce vystaven v peci přesně regulovanému radiačnímu ohřevu. Na připojených citlivých vahách je pak sledován hmotnostní úbytek vzorku v závislosti na čase a teplotě, která je zaznamenávána pomoci termočlánku. Proces probíhá v předem volitelné syntetické atmosféře, která může mít inertní nebo oxidační povahu.

Postup

Analýze byly podrobeny všechny tři PCL materiály vyrobené technologií melt-blown: PCL o molekulové hmotnosti Mw = 45 000, PCL o molekulové hmotnosti Mw = 10 000 a jejich směs v poměru 50 : 50 hm. Bylo potřeba připravit vzorky ve vhodné formě, tedy ve formě pevného objemového tělesa – granulí. Dále upravit jejich váhu přibližně na hodnotu 4,5 mg (tab. 15). Od každého materiálu bylo nutné připravit vzorek nezatížený tepelným namáháním. Vzorky po termickém namáhání byly z vlákenné podoby slisovány do formy co nejpodobnější granulím.

Materiál	Hmotnost vzorků nezatížených namáháním [mg]	Hmotnost vzorků po namáhání [mg]
PCL Mw=45 000	3,5890	3,3040
PCL Mw=10 000	4,5340	5,0200
PCL Mw=45K/10K 50 : 50	3,2610	3,7330

Tab. 15: Hmotnosti připravených vzorků.

Vzorky byly jednotlivě podrobeny radiačnímu ohřevu na platinové pánvičce. Ohřev probíhal konstantně o 10°C/min v rozmezí 20 – 560°C za průtoku oxidační atmosféry v podobě syntetického vzduchu o obsahu 80% dusíku a 20% kyslíku Atmosféra protékala komorou rychlostí 60ml/min. Oxidační atmosféra byla volena s ohledem na primární použití testovaných materiálů v prostředí za přítomnosti kyslíku.

Výsledky

Výsledky měření byly zpracovány programem TA universal analysis do podoby grafů (graf 8 -10) kde křivka znázorňuje derivaci míry hmotnostního úbytku v závislosti na teplotě. Derivační úpravou průběhu byly získány inflexní body průběhu pro vyhodnocení míry úbytku hmotnosti v závislosti na teplotě – zelené křivky.

PCL $Mw = 45\ 000$



Graf znázorňující průběh závislosti rozpadu pro vzorek tepelně zatížený (Vla) a nezatížený (Gra).

Graf 8: Graf termického rozpadu pro PCL Mw = 45 000.

PCL Mw = 10 000

Graf znázorňující průběh závislosti rozpadu pro vzorek tepelně zatížený (Vla) a nezatížený (Gra).



Graf 9: Graf termického rozpadu pro PCL Mw = 10 000.

PCL Mw = 45K/10K 50 : 50



Graf znázorňující průběh závislosti rozpadu pro vzorek tepelně zatížený (Vla) a nezatížený (Gra).

Graf 10: Graf termického rozpadu pro PCL Mw = 45K/10K 50 : 50.

Dle předpokladů bylo očekáváno, že s ohledem na nestejnou konzistenci vzorků před termickým zatížením (granule) a po termickém zatížení (lisovaná vlákna) budou jednotlivé křivky vykazovat teplotní posun. Tento předpoklad je na uvedených grafech jasně pozorovatelný. Ovšem samotný odlišný průběh křivek jasně dokazuje, že u vzorků tepelně namáhaných v extrudéru došlo k materiálovým změnám. Pokud se jedná o změnu molekulové hmotnosti, pak by křivka pro tepelně nezatížený vzorek musela být posunuta více vpravo od křivky pro tepelně zatížený materiál. Z grafů je patrné, že je tomu přesně naopak. Pak lze spíše říci, že termicky zatížené vzorky v extrudéru nesnížily svojí molekulovou hmotnost, ale nejspíše došlo k částečnému fyzikálnímu zesíťování materiálu. Analýza tedy nepotvrdila prvotní předpoklad, ale ukázalo se, že teplota tání u vláken stoupá, což je dáno vyšším podílem krystalické fáze oproti polymeru, který nebyl tepelně zatěžován.

3.3.2. Viskozimetrické stanovení molekulové hmotnosti

Proto tuto metodu realizovanou na Ubbeluhdeho kapilárovém viskozimatru se bohužel nepodařilo nalézt v literatuře přesné přepočtové koeficienty pro PCL o příslušné molekulové hmotnosti pro konkrétní rozpouštědlový systém. Předběžné výpočty s těmito koeficienty se ukázaly jako velmi nepřesné a bylo opuštěno od využití této metody.

Při zkušební přípravě roztoku PCL Mw = 45 000, který prošel tepelným zatížením v extrudéru, došlo jen k částečnému rozpuštění materiálu v tetrahydrofuranu. Tento fakt poukazuje na částečné fyzikální zesíťování tepelně namáhané polymerní struktury a nebo, na změnu poměru krystalické a amorfní fáze. Toto zjištění vyvolávalo obavu o zachování schopnosti biodegradace vlákenné striktury tepelně namáhaného PCL.

3.3.3. Gelová chromatografie

Poslední použitou metodou byla gelová chromatografie, která není bohužel dostupná na TUL. Byla tedy použita chromatografie na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd v Praze. Tato metoda by měla stanovit poměrně přesně celkovou molekulovou hmotnost jednotlivých vzorků i s distribucí jednotlivých frakcí.

Zařízení

Kapalinový chromatograf AGILENT 1260 Infinity (obr. 38) s limitním tlakem 600 bar, osazený čerpadlem DeltaChrom (Watrex Comp.) s automatickým dávkovačem. Dvě kolony se stacionární gelovou fází MIXED-B-LS, velikost částic 10 μm, oddělující v rozmezí molekulové hmotnosti přibližně 400 --- 10 000 000 g.mol⁻¹. Dynamická fáze: tetrahydrofuran – Penta. Odpařovací detektor rozptylu světla PL ELS-1000 - Polymer Laboratories.



Obr. 38: Kapalinový chromatograf AGILENT 1260.

Princip

Principem metody je rozdílná rychlost pohybu látek v soustavě mobilní a stacionární fáze. Vzorek, který obsahuje několik složek je unášen mobilní fází. Podle toho, jak jsou jednotlivé složky poutány k stacionární a mobilní fázi dochází k tomu, že některé složky se pohybují rychleji a jiné pomaleji. Výstupem metody chromatografie je chromatogram. Z chromatogramu lze pro každou látku určit buď retardační faktor, nebo retenční čas záchytu makromolekul.

Gelová chromatografie funguje jako velikostně-vylučovací. Stacionární fází jsou částice gelu, který pojímá malé molekuly, čímž způsobují jejich zadržení na koloně. Fungují jako molekulární síto pro molekuly do určité velikosti. Velké molekuly
tyto částice gelu obtékají kolem. Metoda se využívá především u dělení makromolekulárních látek, proteinů, enzymů, polysacharidů apod. Částice gelu jsou polysacharidy dextriny, zesíťované epichlorhydrinem, nazývané sephadexy. Tyto útvary obsahují dutiny schopné pojmout molekuly menších rozměrů a vhodných tvarů. Malé molekuly pronikají hluboko do gelu, což způsobuje jejich zadržení na koloně.

Postup

Analýze byly podrobeny všechny tři PCL materiály testované technologií melt-blown: PCL o molekulové hmotnosti 45 000, PCL o molekulové hmotnosti 10 000 a jejich směs v poměru 50 : 50 hm. Bylo potřeba připravit vzorky ve vhodné formě, tedy ve formě roztoků v dynamické fázi o velmi malé koncentraci.

Koncentrace roztoků byly 0.8 - 1.4 mg/ml, protože evaporační rozptylový detektor je velmi citlivý a při vyšší koncentraci elektronicky ořezává píky, protože přestane detekovat při stejném průběhu závislosti. Roztoky byly postupně vkládány do dávkovače a konstantně přečerpávány přes kolonu se stacionární gelovou fází.

Výsledky

Výsledky měření byly zpracovány programem TriSEC 3.0 – Viscotek Co. do podoby tabulky (tab. 16) kde byla pro každý materiál zaznamenána střední hodnota číselně střední molekulové hmotnosti (Mn), hmotnostně střední molekulové hmotnosti (Mw) a jejich indexu uniformity (Mw/Mn).

PCL Mn = 45 000				
	Peak	Mn	Mw	Mw/Mn
PCL Mn = 45 000 před zatížením	Celek	1878	48040	25,58
	1	55630	75100	1,35
	2	718	1097	1,53
PCL Mn = 45 000 po zatížení		56290	76230	1,35
PCL Mn = 10 000				
	Peak	Mn	Mw	Mw/Mn
PCL Mn = 10 000 před zatížením		23850	34500	1,45
PCL Mn = 10 000 po zatížení	Celek	1892	23400	12,37
	1	24890	36610	1,47
	2	746	1023	1,37
PCL Mn = 45 000/10 000				
	Peak	Mn	Mw	Mw/Mn
PCL Mn = 45 000/10 000 před zatížením		19370	53060	2,74
PCL Mn = 45 000/10 000 po zatížení		34510	55270	1,60

Tab. 16: Výsledky středních molekulových hmotností testovaných materiálů.

Pro PCL Mw = 10 000 je zřejmé, že po tepelném zatížení vykazoval bimodální distribuci Mn zastoupenou dvěma peaky. Nově vzniklý peak reprezentoval zřejmě rozpad části makromolekul s vyšší hmotností na makromolekuly s nižší hmotností. Podle výsledků v tabulce 2 lze říci, že střední hmotnostní molekulová hmotnost se u materiálu po tepelném zatížení téměř nezměnila.

Pro PCL Mw = 45 000 je z tabulky patrné, že vykazoval bimodální distribuci pouze materiál před zatížením. A to opět bez výrazné změny molekulové hmotnosti. Přítomnost bimodálního průběhu u materiálu před tepelným zatížením je překvapující a málo pravděpodobná, je tedy možné že došlo k záměně vzorků nebo k jejich kontaminaci. Tento výsledek by byl potřeba ověřit opakovaným provedením měření.

U PCL Mw = $45\ 000/10\ 000$ došlo pouze k většímu úbytku frakce s nižší molekulovou hmotností.

Souhrnně lze říci, že se nepotvrdil úbytek molekulové hmotnosti u materiálů tepelně zatížených. Výsledky pouze naznačují strukturní změnu materiálu doprovázenou rozpadem části makromolekul na nižší molekulové hmotnosti. Pro ověření těchto závěrů by bylo potřeba zopakovat měření.

3.4. Biologické testování vrstev

Hlavním cílem tohoto experimentu bylo u vybraných vlákenných vrstev analyzovat vlastnosti, na základě kterých lze vyhodnotit využitelnost připravených objemných vlákenných vrstev jako tkáňového nosiče pro regenerativní medicínu defektů kompaktní kostní tkáně. Mezi tyto testované vlastnosti patří především míra cytotoxicity a biokompatibility testovaných vrstev. Další důležitou testovanou vlastností byla míra buněčné adheze na jednotlivé materiály a schopnost proliferace buněk do vnitřní struktury vrstev.

Pro biologické testy byl použit MTT test, elektronová a fluorescenční mikroskopie.

3.4.1. Příprava vzorků

Pro biologické testování byly vybrány 4 vlákenné materiály a jeden materiál referenční.

První vlákennou vrstvou byla vrstva PCL Mw = 45 000 připravená pouze technologii melt – blown (M). Podle provedené strukturní analýzy tato vrstva vykazuje v průměru největší mezivlákenné prostory a průměry vláken (mikrovlákna). U této vrstvy byly očekávány nejhorší výsledky týkající se buněčné adheze a proliferace, v porovnání s ostatními materiály.

Druhou vrstvou byla vrstva PCL Mw = 45 000 připravená pouze technologií melt – blown s naprášenými částicemi hydroxyapatitu na povrch vláken (MH). Částice měly podle předpokladů zvýšit schopnost buněčné adheze a proliferace oproti samotné melt – blown vrstvě.

Třetím testováním materiálem byla vrstva PCL Mw = 45 000 vytvořená kombinací technologií melt – blown a elektrostatického zvlákňování (MN). Jednalo se o finální produkt, určený v rámci projektu k dalšímu podrobnějšímu testování. Vrstva podle strukturní analýzy vykazovala požadovaný obsah mikro i nanovláken při dostatečné velikosti mezivlákenných prostor. Tyto parametry měly zajistit vhodné podmínky pro buněčnou adhezi a proliferaci.

Poslední testovanou byla tak jako v předešlém případě vrstva PCL Mw = 45 000 vyrobená kombinací technologií melt – blown a elektrostatického zvlákňování, kde byly na povrchu vláken naneseny mikročástice hydroxyapatitu (MNH). Ty měly podle

předpokladů ještě zvýšit míru buněčné adheze a proliferace. U tohoto materiálu byly tedy očekávány nejlepší testovací výsledky.

Jako referenční materiál byla použita plošná vrstva nanovláken PCL Mw = 45 000 vyrobená metodou elektrostatického zvlákňování na zařízení Spider Superlab (PCL – S). U této vrstvy bylo již známo chování buněčné kultury v průběhu experimentu a sloužila ke kontrole správnosti testů

Postup

Pro testy byly připraveny vzorky v podobě objemných tablet o průměru 15 mm a tloušťce 3 - 6 mm pro kultivaci v jamkách o průměru 17,4mm. Tato velikost byla volena s ohledem na další použití podle technických požadavků projektu a preklinických testů a s ohledem na dobrou manipulovatelnost se vzorky. Od každého materiálu bylo připraveno 50 vzorků, z kterých bylo následně 10 nejméně kvalitních vzorků s nejvyšší maximální a minimální tloušťkou vyřazeno. Preparace vzorků z vrstev byla provedena pomocí ostrého trubkového břitu (obr. 39), kterým bylo možno oddělit vzorky mírným tlakem na materiál a rotačním pohybem nože. Takto vypreparované vzorky měly oproti klasickému stříhání mnohem méně zdeformované okraje a strukturu (obr. 39)



Obr. 39: Příprava vzorků.

Připravené vzorky následně byly v kultivačních jamkách sterilizovány po dobu 30 minut 70% roztokem absolutního ethanolu. Roztok ethanolu byl s ohledem na objemnou nasákavou strukturu vzorků dvakrát měněn, aby došlo k důkladnému proplachu.

3.4.2. Kultivace

S ohledem na využití finálně vybrané vrstvy v reparativní medicíně kostní tkáně byly pro testování použity buňky lidské nádorové linie kostních osteoblastů (MG – 63) (obr. 40). Byly použity buňky po 3. pasáži, na každý vzorek v počtu 1×10^5 celkem.



Obr. 40: Adherovaná konfluentní vrstva MG 63 na dně kultivační nádoby (zvětšeno 100x).

Přístroje

Flow Box pro biologické manipulace – TELSTAR bio – II – A (obr. 41).

Inkubátor – Biotech s automatickou regulací teploty a obsahu oxidu uhličitého. Vodní lázeň s regulací teploty.



Obr. 41: *Flow Box* – *TELSTAR bio* – *II* – *A*.

Roztoky

ATB – antibiotika FBS – fetální telecí sérum - Lonza Fosfátový pufr PBS pH 7,4 (příloha 1) Kultivační médium EMEM - Lonza (příloha 1)

Postup

Vzorky byly po sterilizaci v ethanolu 6x propláchnuty sterilním roztokem PBS a následně přemístěny do sterilních kultivačních jamek o průměru 17,4 mm. K takto propláchnutým vzorkům bylo přidáno do každé jamky po 1 ml kultivačního média EMEM s koncentrací buněk 1x10⁵ na ml/jamku. Takto připravené vzorky (obr. 42) byly inkubovány při teplotě 37°C s 5% obsahem oxidu uhličitého.



Obr. 42: Vzorky umístěné v kultivačních jamkách s kultivačním médiem těsně před výměnou.

Jako testovací dny byly stanoveny 1., 3., 7., 14. a 21. den. Na každý testovací den byly připraveny 4 vzorky na MTT test + 1 pro negativní kontrolu (NC). 1 vzorek na fluorescenční mikroskopii. A 1 vzorek na elektronovou mikroskopii + 1 jako negativní kontrola. Pro MTT test byla také nasazena pozitivní kontrola, tj. Buňky bez přítomnosti vzorku (PK).

Pozitivní kontrola spočívá v kultivaci buněk v jamkách bez přítomnosti vzorku. Povrch kultivační jamky je přijímán jako ideální povrch pro adhezi buněk, proto na něm adheruje většina viabilních buněk a lze pak 1. testovací den zhodnotit, jaké procento jich adherovalo na vzorek v porovnání se dnem kultivační jamky. Zpravidla během prvních testovacích dnů bývá hodnota absorbance PK vyšší a v dalších dnech tato skutečnost závisí na specifickém povrchu materiálu. Proto by měly být při správném provedení testování hodnoty PK v prvních dnech vždy vyšší oproti testovaným vzorkům. Tato kontrola tedy mimo jiné slouží jako monitoring průběhu testování.

Negativní kontrola je kontrola, kdy je vzorek inkubován pouze s médiem bez buněk. To je také pravidelně měněno jako u vzorků s buňkami. NK slouží k případnému odhalení kontaminace testovaného systému a k porovnání strukturních změn na testovaném materiálu vzniklých vlivem kultivačního prostředí. NC tedy slouží také jako monitoring průběhu testování.

Kultivační médium bylo měněno s ohledem na změnu jeho zabarvení z růžové na žlutou (oranžovou) (obr. 42). Změnu zabarvení média způsobuje změna pH média v závislosti na metabolitech vyloučených buňkami. Kyselé metabolity snižují pH média a to má za následek změnu barvy. Médium bylo vždy před výměnou zahřáto na 37°C ve vodní lázni. Prvních 6 dnů bylo médium měněno každé dva dny při objemu 1 ml na jamku. Později bylo médium měněno každé dva dny při objemu 1,5 ml na jamku. Dalších 5 dní probíhala výměna 1,5 ml média každý druhý den. V poslední fázi kultivace byly zbylé vzorky přemístěny do kultivačních jamek o průměru 60 mm a médium bylo měněno každý druhý den o objemu 5 ml. Tento postup byl zvolen na základě stálého masivního nárůstu buněk na materiálu a rychlejšího vyčerpání živin z média. Tento průběh byl nepřímým ukazatelem úspěšného průběhu testování.

3.4.3. MTT test

V tomto oddílu bude popsáno testování buněčné viability – tedy biologické aktivity buněčné kultury na vzorcích v závislosti na čase pomocí kvantifikačního MTT testu.

Přístroje

Spektrofotometr – BioTek ELX 808 (obr. 43),

Inkubátor – BioTech s automatickou regulací teploty a obsahu oxidu uhličitého.

Laboratorní centrifuga - LMC 4200R Biosan





Obr. 43: Spektrofotometr - BioTek ELX 808 – vlevo, Centrifuga – Biosan LMC 4200R – vpravo.

Roztoky

Roztok MTT (příloha 1).

Fosfátový pufr PBS pH 7,4 (příloha 1).

Kultivační médium EMEM (příloha 1)

IPA (příloha 1)

Princip

Tato metoda je založena na redukci žlutého solubilního 3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan (fialové krystalky).



Obr. 44: Redukce MTT na formazan mitochondriální reduktázou.

Reakce je katalyzována enzymy, které jsou součástí mitochondriální membrány živých buněk. Formazan se rozpustí přidáním okyseleného isopropanolu a zabarvení se vyhodnocuje spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm (vlnová délka pozadí je 650 nm). Hodnota absorbance roztoku odpovídá množství živých buněk (čím tmavší barva a tedy větší absorbance, tím vyšší množství živých buněk).

Postup

Pro MTT test byly vzorky nosičů přesunuty do nově připravených sterilních jamek, aby se zamezilo měření viability buněk adherovaných na povrchu kultivační jamky. K nosičům bylo přidáno 250 µl MTT a 750 µl kultivačního média EMEM. Poté byly vzorky inkubovány 3 h při 37°C, 5% CO₂. Po uplynutí této doby bylo médium s MTT odsáto a bylo přidáno 1000 µl IPA. Vzorek byl v IPA několikrát propláchnut pro celkové vyplavení rozpuštěného formazanu ze struktury (obr. 45). V takto připraveném roztoku se ovšem objevil kal v podobě neznámých částic vyplavených patrně ze vzorků. Proto bylo od každého vzorku odsáto 500 µl IPA, vloženo do eppendorfových zkumavek a centrifugováno po dobu 5 minut. Následně bylo z každé zkumavky odsáto 250 µl IPA bez kalu do 96 jamkové kultivační destičky (obr. 45). Po vložení destičky do spektrofotometru byla změřena absorbance při vlnové délce 570 a 650 nm.



Obr. 45: Vzorky + IPA v 24 jamkové destičce – vlevo, IPA v 96 jamkové destičce – vpravo.

Výsledky

Naměřená data byla importována do excelu. Naměřené hodnoty absorbance při 570 - 650 nm zkušebních vzorků byly od sebe odečteny a byl z nich vypočten průměr se směrodatnou odchylkou (graf 11 – 13).



Graf 11 : Hodnoty absorbance v závislosti na testovaném materiálu.

Ze všech tří grafů je jasně patrný progresivní nárůst metabolické aktivity pro všechny testovací materiály. Z toho vyplývá, že žádný materiál nevykazuje cytotoxické účinky a buňky úspěšně proliferují.

Největší míra absorbance je jasně viditelná u kontrolního materiálu PCL – S, to je dáno pravděpodobně nanovlákennou strukturou, která výrazně podporuje buněčnou adhezi. PCL – S nebude dále porovnáván s ostatními materiály, protože oproti ostatním materiálům u tohoto materiálu nedochází k vnitřní proliferaci ale pouze ke konfluentnímu porůstání povrchu. Proto již výsledky pro tento materiál nebudou ve srovnání s ostatními materiály komentovány. Podle předpokladů by se měla v dalším časovém průběhu testování tato dominance vytrácet z důvodu vyčerpání kapacity povrchu materiálu.

Z míry absorbance pro jednotlivé materiály v první testovací den můžeme jasně porovnat množství buněk uchycených a adherovaných ihned po nasazení. Z tohoto pohledu byl nejlepším materiálem MNH.

Materiál vyrobený pouze metodou melt – blown (M) vykazoval podle předpokladů všechny testovací dny nejmenší míru absorbance ze všech testovaných materiálů. Což je pravděpodobně dáno značnou velikostí pórů v kombinaci s vysokou průměrnou hodnotou průměrů vláken, na které nejsou buňky ochotné tolik adherovat.

Materiál vyrobený metodou melt – blown s částicemi hydroxyapatitu (MH) vykazoval oproti stejnému materiálu bez částic všechny testovací dny vyšší míru absorbance. To potvrzuje účinnost funkcionalizace vrstev částicemi hydroxyapatitu. Materiál lze tedy v porovnání s ostatními zařadit na třetí místo, což opět potvrdilo předpoklad průběhu testování pro tento materiál.

U posledních dvou materiálů je z výsledků jasně viditelný synergický efekt kombinace metod melt – blown a elektrostatického zvlákňování a tedy přítomnosti nanovláken ve vrstvě. Nanovlákna jasně přinesla do vrstvy adherentní složku podporující buněčnou proliferaci. Hodnoty absorbance pro tyto vrstvy byly v porovnání s materiály bez nanovláken jasně vyšší, což opět potvrdilo očekávání. Tento rozdíl se s postupem času zvyšoval.

Mírně překvapující byly pro první 4 testovací dny vyšší hodnoty absorbance vrstvy ze směsi nanovláken s mikrovlákny bez částic hydroxyapatitu (MN) oproti stejné vrstvě s částicemi (MNH). Poslední testovací den se ovšem průběh výsledků změnil a vrstva MNH vykazovala vyšší míru absorbance oproti MN.

Je možné se domnívat, že při větším objemu přísunu živin během testován, by byly hodnoty absorbance pro testované materiály o poznání vyšší. Tento fakt může být způsobený určitým nedostatkem živin z média a to především proto, že množství média je limitováno objemem kultivační jamky. Jak bylo uvedeno výše v této kapitole, během druhé poloviny experimentu bylo nutné měnit médium každý den. Další možností je, že konfluentní vrstva buněk na povrchu vzorku omezovala přísun živin do vnitřní struktury. Na základě těchto poznatků lze doporučit kultivaci buněk na materiálech tohoto typu ve větším objemu média.

Pole výsledků je tedy jasné, že nejlepším materiálem pro další využití v reparativní medicíně kostní tkáně je vlákenná vrstva vyrobená kombinací metody melt – blown a elektrostatického zvlákňování funkcionalizovaná čísticemi hydroxyapatitu (MNH).

Podle průběhu výsledků byl pro další analýzu vybrán materiál MNH. U tohoto materiálu bude potřeba tyto výsledky potvrdit rozsáhlejším testováním a statistickým vyhodnocením.



Graf 12: Hodnoty absorbance materiálu v závislosti na testovacím dnu.



Graf 13: Hodnoty absorbance v materiálu v závislosti na testovacím dnu + NC.

3.4.4. Mikroskopie

ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE

V tomto případě byla použita vysoká rozlišovací schopnost rastrovací elektronová mikroskopie ke zhodnocení buněčné adheze v závislosti na lokální morfologii vlákenné struktury. Zkoumána byla také schopnost buněčné proliferace do struktury vzorku. Použití mikroskopie je na rozdíl od MTT testu vizuálně kvalitativní proces a umožňuje zhodnocení analyzovaných vlastností z jiné perspektivy.

Zařízení

Rastrovací elektronový mikroskop TESCAN VEGA TS 5130 - rozlišení 3nm, zvětšení 20 – 50000 x, urychlovací napětí 0,2 – 30kV, dosahovaný podtlak 5x10-3 Pa (obr. 46).

Zlatička Q150R – Quorum (obr. 46).



Obr. 46: Elektronový mikroskop TESCAN - vlevo, zlatička Quorum - vpravo.

Roztoky

Ethanol absolutní - Penta - koncentrace 60, 70, 80, 90, 96, 100%

Glutaraldehyd (příloha 1).

Fosfátový pufr PBS pH 7,4 (příloha 1).

Princip

Při práci mikroskopu se primární svazek elektronů pohybuje po řádcích po preparátu a vyráží sekundární elektrony, které jsou snímány sondou, převáděny na videosignál a zobrazeny na monitoru počítače. Mikroskop je plně řízen počítačem. Doplňkový software umožňuje zaznamenávání a archivování zvětšených obrazů ve standardním obrazovém formátu na počítačová záznamová média. Uložené obrazy mohou být dále upravovány v jiných grafických programech. Obraz povrchu vzorku vzniká v části, která se skládá z tubusu, komory, vakuového systému a detektorů. V této části mikroskopu je formován a vychylován fokusovaný elektronový svazek, který dopadá na povrch zkoumaného objektu, jež je umístěn v komoře mikroskopu a je polohován pomocí manipulátoru. Celý prostor zařízení je vakuován pomocí vývěv, což je nutného pro činnost mikroskopu

Postup

Vzorky byly vyjmuty z kultivačního média a přeneseny do nových kultivačních destiček kde byly buňky ihned fixovány pomocí roztoku glutaraldehydu po dobu 20 minut při teplotě 4°C. Následně došlo k vysušení vzorků ethanolovou řadou: 60% - 70% - 80% - 90% - 96% - 100%, 15 min každá koncentrace. Vzorky byly přeneseny na laboratorní parafilm (obr 47.) a vysušeny v inkubátoru po dobu 24 hodin.



Obr. 47: Vzorky PCL pro SEM analýzu.



Obr. 48: Preparece PCL vzorku pro SEM.

Díky velmi dobrým mechanickým a strukturním vlastnostem bylo možno vzorky v podobě tablet dělit na jednotlivé vrstvy (obr. 48). Proto byly připraveny pro elektronovou mikroskopii od každého vzorku pro daný testovaný den 4 menší plochy z vnějších i vnitřních stran vrstev podle schématu na obrázku 49. Tak bylo možno pomocí SEM zhodnotit i míru proliferace buněk do vnitřních vrstev materiálu. Vzorky

byly nalepeny na kovový terčík a pozlaceny vrstvou silnou 5 nm. Dále už probíhalo jenom samotné snímkování každého vzorku.



Obr. 49: Schéma zhotovení a rozmístění vzorků na terčíku.

FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE

Podobně jako u elektronové mikroskopie je fluorescenční mikroskopie vizuálně kvalitativní proces hodnocení buněčné proliferace a adheze. Jelikož se jedná o metodu pozorování v temném poli, kdy byla barvena pouze buněčná jádra, nedala se pozorovat buněčná adheze v závislosti na lokální struktuře materiálu. Na základě této metody bylo ovšem možno pozorovat míru relaxace jednotlivých buněk v závislosti na jejich tvaru a vnitřní struktuře.

Přístroje

Invertorový fluorescenční mikroskop - Eclipse Ti Nikon (obr. 50).



Obr. 50: Fluorescenční mikroskop Nikon.

Roztoky

Vymražený methanol – Lach – Ner Fosfátový pufr PBS pH 7,4 (příloha 1) Propidium iodid (příloha 1)

Princip

Fluorescence je sekundární záření, které je charakterizováno vyzářením energie ve velmi krátké době, řádově 10^{-9} s až 10^{-6} s. Emitované záření je vyzářeno excitovanými elektrony atomu, který energii pohltil. Jedná se o přechod z prvního singletového stavu (S₁) do singletové hladiny (S₀)

Princip fluorescenční mikroskopie v biologii je založen na světelném zobrazení buněčných preparátů díky záření (fluorescenci) molekuly (fluoroforu) po dopadu světla o určité vlnové délce. Nejčastěji se využívá vazby fluoroforu na molekulu proteinu či specifickou sekvenci nukleových kyselin. Fluorofor v excitačním (budícím) světle září. Interferenci excitačního světla při pozorování lze odstranit filtrem, který do okuláru nebo kamery propustí jen světlo emitované – charakteristické pro fluorofor navázaný na pozorované molekule. Výsledkem jsou struktury barevně zářící v temném poli.

Postup

Vzorky byly vyjmuty z kultivačního média a přeneseny do nových kultivačních destiček V dalším kroku byly buňky fixovány pomocí vymraženého methanolu po dobu 20 minut při teplotě 4°C a opět 2 x promyty roztokem PBS. Poté byl ke vzorkům přidán PI, který se navazoval na buněčnou DNA při inkubaci za běžné laboratorní teploty po dobu 15 minut. Následně byly vzorky 6 x propláchnuty roztokem PBS a analyzovány po vrstvách pod mikroskopem podle stejného schématu jako vzorky na SEM.

Výsledky - Snímky – fluorescenční mikroskopie/elektronová mikroskopie

M – Vršek: 1. – 4. – 7. – 14. d. + ZSeries 14. d. – zvětšení 100x

M – Vnitřek: 1. – 4. – 7. – 14. d. – zvětšení 100x









M - Vršek - Vnitřek: 14. d. – zvětšení 200x



MH – Vršek: 1. – 4. – 7. – 14. d. + ZSeries 14. D. – zvětšení 100x



MH – Vnitřek: 1. – 4. – 7. – 14. d. – zvětšení 100x









MH – Vršek - Vnitřek: 14. d. – zvětšení 500x



MN – Vršek: 1. – 4. – 7. – 14. d. + ZSeries 14. D. – zvětšení 100x



MN – Vnitřek: 1. – 4. – 7. – 14. d. – zvětšení 100x









MH – Vršek - Vnitřek: 14. d. – zvětšení 500x







MNH – Vnitřek: 1. – 4. – 7. – 14. d. – zvětšení 100x









MH – Vršek - Vnitřek: 14. d. – zvětšení 500x



Ze snímků z FM a SEM byl potvrzen pro všechny materiály patrný progresivní nárůst buněčné hmoty pro všechny testovací materiály, tak jako u MTT testu. Z toho vyplývá potvrzení, že žádný materiál nevykazuje cytotoxické účinky a buňky úspěšně proliferují.

Ze snímků pro jednotlivé materiály z prvního testovacího dne můžeme potvrdit adhezi buněk po nasazení na materiál. Ovšem stanovení a porovnání počtu uchycených buněk nelze podle snímků objektivně porovnat.

Ze všech testovaných materiálů pouze Materiál vyrobený metodou melt – blown (M) vykazoval podle předpokladů všechny testovací dny nejmenší míru proliferace. To je dáno pravděpodobně značnou velikostí pórů oproti ostatním materiálům v kombinaci s vysokou průměrnou hodnotou průměrů vláken a tedy horšími vlastnostmi materiálu s ohledem na podporu buněčné adheze.

Materiál vyrobený metodou melt – blown s částicemi hydroxyapatitu (MH) vykazoval oproti stejnému materiálu bez částic poslední dva testovací dny znatelně vyšší míru proliferace. To opět potvrzuje účinnost funkcionalizace vrstev částicemi hydroxyapatitu. Materiál lze tedy v porovnání s ostatními zařadit na třetí místo i podle mikroskopické analýzy, což opět potvrdilo předpoklad průběhu testování pro tento materiál.

U posledních dvou materiálů je z výsledků jasně prokazatelný synergický efekt kombinace metod melt – blown a elektrostatického zvlákňování a tedy přítomnosti nanovláken ve vrstvě. Nanovlákna jasně zvýšila schopnost buněk adherovat. Buněčná proliferace pro tyto vrstvy byla v porovnání s materiály bez nanovláken jednoznačně vyšší a poslední testovací den byl na povrchu jasně patrný konfluentní nárůst buněk. Ze vzájemného porovnání těchto konfluentních vrstev poslední testovací den je patrné, že souvislejší vrstva buněk se vytvořila na materiálu MNH.

Fluorescenční mikroskopie dále potvrdila buněčnou proliferaci do vnitřku materiálu. Při nasazení pokusu určité množství buněk propadlo většími póry dovnitř struktury a tyto buňky se uchytily uvnitř materiálu, kde začaly v určité míře proliferovat. Progres proliferace buněk vnitřní strukturou je ze snímků patrný. U materiálu MNH je viditelný útlum vnitřní proliferace buněk. Tento fakt může být způsobený určitým nedostatkem živin z média a to především proto, že množství média je limitováno objemem kultivační jamky. Jak bylo uvedeno výše v této kapitole, během druhé poloviny experimentu bylo nutné měnit médium každý den. Další možností je, že

konfluentní vrstva buněk na povrchu vzorku omezovala přísun živin do vnitřní struktury. Na základě těchto poznatků lze doporučit kultivaci buněk na materiálech tohoto typu ve větším objemu média. Celkově lze říci, že míra vnitřní proliferace buněk byla opět lepší u materiálů ze směsi mikro a nanovláken.

Také podle výsledků z mikroskopie je jasné, že **nejlepším materiálem** pro další využití v reparativní medicíně kostní tkáně je **vlákenná vrstva vyrobená kombinací metody melt – blown a elektrostatického zvlákňování funkcionalizovaná částicemi hydroxyapatitu (MNH).**

3.5. Testování biodegradability

Cílem této kapitoly je čtenáře seznámit s provedenými testy biodegradability vlákenných vrstev směsi mikrovláken a nanovláken materiálu PCL Mn = 45000. Bylo potřeba ověřit samotnou biodegradabilitu produktu s ohledem na rozporuplné výsledky v kapitole ověřující molekulovou hmotnost, kde se nepodařilo vrstvu PCL Mn = 45000 vyrobenou technologií melt - blown rozpustit v tetrahydrofuranu. Dále byla porovnána míra biodegradability finálního vrstvy s vrstvou tvořenou samotnými nanovlákny navrstvenými také proudem vzduchu a s vrstvou mikrovláken vytvořenou pouze technologií metl – blown. Všechny tři porovnávané vlákenné vrstvy byly ze stejného materiálu – PCL Mn = 45000.

S ohledem na časovou náročnost celého experimentu a na vlastnosti materiálu vzorků byla zvolena pro testy biodegradability hydrolytická degradace ve fosfátovém pufru (PBS) katalyzovaná enzymem Lipázou z bakteriálního kmene *Pseudomonas cepacia*. Tato metoda je obecně uznávaným krátkodobým testovacím systémem pro pozorování průběhu biodegradace u PCL. Vyhodnocení tohoto testu bylo provedeno na základě hmotnostního úbytku vzorků v závislosti na čase (graf 14).

Princip

Jak již bylo zmíněno v teoretické části, biodegradabilní polymer PCL patří do skupiny alifatických polyesterů. Hlavním mechanismem degradace těchto polyesterů ve vodném prostředí (tedy i v organismu) je hydrolýza esterových vazeb polymerního řetězce, která vede ke snižování molekulové hmotnosti. Snižování molekulové hmotnosti je způsobeno postupným dělením hlavních polymerních řetězců na kratší úseky v důsledku porušení kovalentních vazeb. Tyto úseky se v konečné fázi procesu rozpadnou na deriváty, které je schopen organismus metabolizovat.

Míra degradace je určována mnoha faktory. Zastoupením krystalické fáze polymeru, kdy se stoupajícím procentem krystalické fáze klesá schopnost biodegradace v čase. Míru degradace ovlivňuje také počáteční molekulová hmotnost. Se zvyšující se molekulovou hmotností schopnost degradace materiálu v závislosti na čase klesá. Dalším faktorem je teplota a pH prostředí, kdy do určitého bodu se stoupající teplotou míra degradace materiálu stoupá. V případě hydrolytického štěpení katalyzovaného

enzymaticky se používá teplota 37°C a pH 7 – 7,4. Podstatným faktorem je také prostředí, v tomto případě PBS. V první fázi dochází pouze k povrchové degradaci.

Je tedy možné předpokládat, že významná je při počáteční degradaci také velikost specifického povrchu materiálu. V další fázi proniká médium amorfní fází polymeru do materiálu, kde začne probíhat degradace vnitřní – po pozdějším proniknutí média do krystalických oblastí probíhá v celém objemu materiálu. Degradace u alifatických polyesterů probíhá rozkladem esterových vazeb polymerního řetězce na karboxylové a hydroxylové zbytky, které se dále rozpadají na metabolity tělu vlastní.

Laboratorní hydrolýza PCL pouze ve fosfátovém pufru probíhá v řádu týdnů až měsíců. Proto bývá reakce katalyzována enzymaticky tak, jak je to organismu vlastní. Enzymy sníží aktivační energii chemických vazeb, čímž se snižuje množství energie potřebné pro degradaci polymeru.

Konkrétně pro PCL jsou nejčastější používány lipázy. Nejčastěji používaná je lipáza získávána z bakteriálního kmene *Pseudomonas cepacia*. Lipázy jsou hydrolázy, které štěpí esterové vazby PCL za uvolnění mastných kyselin a glycerolu. Tyto enzymy jsou běžné v rostlinných a živočišných tkáních. Mohou být také produkované mikroorganismy (viz. *Pseoudomonas cepacia*).

Zařízení

Laboratorní analytické váhy – Acculab s přesností na 4 desetinná místa, Inkubátor – Biotech s automatickou regulací teploty a obsahu oxidu uhličitého.

Materiál

Vlákenné vrstvy PCL Mn = 45 000, fosfátový pufr PBS (příloha 1), Enzym - Pseudemonas cepacia Lipase – Sigma, 500 mg, 35U/mg, azid sodný – Penta.

3.5.1. Stanovení optimální koncentrace enzymu pro další testování

V první fázi bylo třeba stanovit vhodnou koncentraci enzymu pro finální pětidenní test biodegradace. Optimální koncentrace pro samotný pokus měla být taková, aby se v ní testované materiály nerozpustily v řádu hodin a zároveň, aby se testované materiály za 5 dnů zdegradovaly alespoň o 50% jejich původní hmotnosti. Pro tento test byla vybrána jako nejvhodnější vrstva ze samotných nanovláken PCL, která bude podle prvotního předpokladu degradovat ze všech třech testovaných vzorků nejrychleji z důvodu svého největšího specifického povrchu.

Postup

Byly připraveny tři enzymatické roztoky o koncentracích lišících se vzájemně o řád, aby byl pokrytý co možná největší koncentrační rozsah a určení správné koncentrace bylo co nejefektivnější. Jednalo se tedy o roztoky lipázy v PBS s pH 7,2 o koncentraci 0,1 ; 1 ; 10 U/ml. Kvůli desinfekci byl přidán do PBS azid sodný (Na₃N) v koncentraci 0,02% hm..

Tři vzorky nanovlákenné vrstvy byly nastříhány a naváženy v hmotnostech pohybujících se přibližně okolo hodnoty 50 mg. Následně byl každý vzorek vložen do 15 ml zkumavky s 5 ml enzymatického roztoku o příslušné koncentraci (obr. 51). Falkony byly následně uloženy v inkubátoru při teplotě 37°C. Každých 24 hodin byl roztok ve zkumavkách vyměněn za nově připravený. Po pěti dnech byly vzorky odebrány, vyprány v destilované vodě a vysušeny na vrstvě laboratorního parafilmu (obr. 52). Vysušené byly vzorky zváženy a zaznamenána jejich konečná hmotnost. Konkrétní hodnoty hmotností připravených vzorků a jejich hmotnostních úbytků obsahuje příloha 2.



Obr. 51: 15ml zkumavky se vzorky PCL.



Obr. 52: Vysušené degradované vzorky PCL v závislosti na koncentraci enzymu.

Výsledky

Po zvážení vyschlých degradovaných vzorků byla zaznamenána jejich konečná hmotnost a vypočten jejich procentuální hmotnostní úbytek (příloha 2) v závislosti na koncentraci enzymu, který je vynesený do sloupcového grafu (graf 14). Počáteční hmotnost všech tří vzorků nebyla zcela totožná, proto byly výsledky hmotnostního úbytku pro větší přehlednost vyjádřeny v procentech.



Degradace nanovláken v závislosti na koncentraci enzymu

Graf 14: Hmotnostní úbytky degradovaných nanovláken v závislosti na koncentraci enzymu.

Podle výsledků uvedených v grafu 14 a podle obrázku 52 lze jasně říci, že koncentrace Lipázy 10U/ml se jeví s hmotnostním úbytkem 81% za 5 dnů jako naprosto ideální a bude v experimentu dále použita.

3.5.2. Studium enzymatické degradace materiálu

Byla provedena finální analýza biodegradability testovaných vrstev. Analýza měla za cíl především ověření biodegradability mikro – nanovlákenné vrstvy vyrobené kombinací metod melt - blown a elektrostatického zvlákňování. Dalším cílem bylo průběh degradace této vrstvy porovnat s degradací vrstvy samotných nanovláken vyrobených metodou elektrostatického zvlákňování a vrstvy vyrobené pouze metodou melt – blown.

Postup

Od každého materiálu bylo připraveno 7 vzorků s hmotností blížící se co nejvíce hmotnosti 0,05g (obr. 53). 5 vzorků od každého materiálu bylo připraveno pro pětidenní testování v enzymatickém roztoku PBS s pH 7,2 a 0,02% hmotnostního přídavku azidu sodného a koncentraci lipázy 10U/ml. Další dva vzorky od každé vrstvy byly vloženy do samotného PBS s Na₃N, které sloužili jako negativní kontrola 1. a 5. testovací den. Negativní kontrola v tomto případě sloužila pro ověření správného fungování testovacího systému. Při správném fungování by vzorky negativní kontroly neměly 1. ani 5. den vykazovat relevantní hmotnostní úbytek.



Obr. 53: Vysušené degradované vzorky: první řada shora – melt-blown/el. spinning, druhá řada – melt-blown, třetí řada- el. spinnig.

Všechny vzorky byly vloženy do zkumavek o objemu 15ml, které obsahovaly 5ml testovacího roztoku (obr. 54). Zkumavky byly uchovávány v inkubátoru při teplotě 37°C. Každých 24 hodin byl měněn u všech vzorků příslušný roztok za nový o stejném složení. Roztok pro negativní kontroly byl každý den doplňován ze zásobního roztoku. Roztok s lipázou byl každý den připravován čerstvý. A to pokaždé o objemu 100ml, aby byla eliminována chyba v navážce enzymu.



Obr. 54: Zkumavky se vzorky.

Každý testovací den byl odebrán z roztoku vzorek pro příslušný testovací den, propláchnut destilovanou vodou a vysušen na laboratorním parafilmu (obr. 55). Po vysušení byly vzorky zváženy a zaznamenána jejich konečná hmotnost. Konkrétní hodnoty hmotností připravených vzorků a jejich hmotnostních úbytků obsahuje příloha 2.



Obr. 55: Vysušené vzorky vrstev po degradaci – vlevo, negativní kontrola – vpravo.

Výsledky

Po zvážení vyschlých degradovaných vzorků byla zaznamenána jejich konečná hmotnost a vypočten jejich procentuální hmotnostní zůstatek (příloha 2) v závislosti na testovacím dnu jsou vyneseny grafu (graf 17). Počáteční hmotnost všech tří vzorků nebyla zcela totožná, proto byl hmotnostní úbytek vyjádřen v procentech.



Enzymatická degradace PCL vlákenných vrstev

Graf 17: Průběh degradace testovaných vrstev v závislosti na čase.

Dle dosažených výsledků lze říci, že se podařilo s úspěchem prokázat schopnost biodegradace u vrstev vyrobených technologií melt – blown a určit přibližný průběh degradace všech testovaných vrstev. Jak je patrné s grafu 17 a obrázku 55, probíhala degradace u čistě nanovlákenné vrstvy podle očekávání v prvních dvou dnech výrazně rychleji oproti zbylým vrstvám. Tento fakt je podle předpokladů způsoben vyšším měrným povrchem při povrchové degradaci a nejspíše i menším procentem krystalické fáze, což umožnovalo vznik "vnitřní" degradace již od prvního dne. Naproti tomu u vrstev vznikajících technologií melt-blown se v prvních dnech projevil nižší měrný povrch a vyšší podíl krystalické fáze vzniklé tepelným namáháním a dloužením vláken. Vyšší podíl krystalické fáze zpomaloval proniknutí enzymu do materiálu a následnou "vnitřní" degradaci. Od třetího testovacího dne bylo na vrstvě nanovláken patrné zpomalení degradačního procesu z důvodu celkové degradace amorfní fáze a pomalejší degradace zbytkové fáze krystalické. U vrstev vytvořených technologií melt - blown se od třetího testovacího dne projevilo plné rozvinutí "vnitřní" degradace a celkové zrychlení degradace. Pátý testovací den byl u melt – blown vrstev patrný celkový rozpad amorfní fáze a nástup pomalejší degradace fáze krystalické. Zajímavý byl průběh degradability u námi nejvíce sledované vrstvy ze směsi mikro – nanovláken, kde se poslední dva dny oproti předpokladům dostává míra degradace dokonce i pod úroveň samotných nanovláken. Tento fakt je třeba ověřit rozsáhlejším testováním a dalšími analytickými metodami. Ovšem takovýto průběh degradace této finální vrstvy by byl naprosto ideální pro její další využití jako biodegradabilního tkáňového nosiče.

4. DISKUSE

Na základě předběžných testů byl proveden výběr nejvhodnějšího materiálu pro výrobu finálních vrstev k biologickému testování. Snahou bylo vybrat pro výrobu finálního produktu PCL s co nejnižší molekulovou hmotností. Pokud by tedy zároveň vyhovoval tento materiál svými strukturními a mechanickými parametry dalšímu použití. Důvodem této snahy byl předpoklad, že PCL o nižších molekulových hmotnostech degraduje v organismu rychleji, což by pro tkáňový nosič určený pro rekonstrukci kostní tkáně bylo výhodné.

Ukázalo se, že vrstva vytvořená z PCL Mw = 10 000 má nežádoucí mechanické vlastnosti, je velmi křehká – tedy nevhodná k dalšímu testování. Křehkost materiálu nejspíš přímo způsobuje jeho nízká molekulová hmotnost.

Vrstva blendu PCL Mw = 45k/10k 50 : 50 hm. měla při celkem dobrých mechanických vlastnostech rozsáhlé strukturní defekty. Tento fakt v kombinaci se zdlouhavou přípravou blendu podpořil nakonec výběr čistého PCL Mw = 45 000 pro výrobu finálních vrstev, který se vyznačoval dobrými mechanickými vlastnostmi při požadované morfologii vlákenné struktury. Jediná nevýhoda této volby byla vysoká molekulová hmotnost zvoleného materiálu. Ovšem v budoucnu by se dále mělo pokračovat v testování blendu PCL o jiných hmotnostních podílech jednotlivých složek.

Inovativní výrobní postup vytvořený kombinací technologií melt – blown, elektrostatického zvlákňování a vibračního naprašování částic prokázal při výrobě vlákenných kompozitů svou funkčnost. Pro další testy se jeví jako výhodné použití kontinuálního dávkování polymeru, aby nemusel být proces neustále přerušován při jeho doplňování. Problém postupného tuhnutí polymerního roztoku vlivem velmi rychlého odpařování rozpouštědla by mohl být vyřešen například použitím kruhové kapiláry, kde by byl polymerní roztok chráněn před proudícím vzduchem.

Vyrobené finální vrstvy se vyznačovaly tloušťkou cca 5 mm a jednotlivě od sebe byly vizuálně a hmatem takřka nerozeznatelné. Pouze vrstvy s hydroxyapatitem byly na omak mírně hrubší. Vrstvy se vyznačovaly plošnou hmotností 250g/m², plošná hmotnost vrstev s hydroxyapatitem byla o 10% vyšší, z toho tedy vyplývá, že hydroxyapatit byl zastoupen 10 hm. %. V dalších experimentech by mělo dojít k experimentování s technologickými nastaveními, které by ovlivňovali podíl mikrovláken a nanovláken ve struktuře. Taktéž by měl být proveden důkaz podílu vláken ve výsledné vrstvě vyrobených jednotlivými technologiemi. Bylo by výhodné

obarvit taveninu i polymerní roztok fluorescenčním barvivem Při fluorescenční mikroskopii v temném poli by nám rozdílně barevná mikro a nanovlákna celkem jasně udávala jejich přítomnost a podíl ve vrstvě.

Ze snímků vytvořených pomocí elektronové mikroskopie lze jasně vypozorovat, že vlákenné vrstvy obsahují především vlákna o jemnosti specifické pro použitou výrobní technologii. Je tedy patrné, že vrstva vyrobená pouze technologií melt-blown obsahuje především mikrovlákna. Naproti tomu vrstva vyrobená pouze elektrostatickým zvlákňováním obsahuje především nanovlákna. U vrstvy vyrobené kombinací obou metod je ze snímků dobře patrné, zastoupení obou jemností vláken, lze tedy říci, že v tomto předchozí experiment proběhl úspěšně. Dále je potřeba uvést, že všechny vrstvy vykazují dobrou vlákennou homogenitu. Poslední série snímků ukazuje dobrou lokální míru homogenity částic HA na vláknech. Tento fakt není bohužel patrný v celém objemu. Proto je potřeba samotnou technologii naprašování dále intenzivně vyvíjet. Do dalších experimentů by bylo například výhodné zavést naprašování částic metodou ultrazvukovou, která by zajistili vetší můru homogenity porytí. Ultrazvuková metoda by mohla být dále doplněna o kontinuální dopravník částic. Rovněž zajímavé by mohlo být nasnímání vyrobené vlákenné vrstvy pomocí mikrotomografie a volbou vhodného smešování proložit vytvořený digitální model polygonální sítí, která by umožňovala pomocí počítačového algoritmu určit například míru kontinuity mezivlákenných prostor.

Výsledky obrazové analýzy jasně potvrdily konkrétní rozdíly mezi strukturními vlastnostmi jednotlivých vlákenných vrstev vyrobených různými metodami. Vrstva vyrobená pouze metodou melt – blown má většinu průměrů vláken v mikronové oblasti a poměrně malé procento vláken v oblasti submikronové, to se promítá i v průměrech mezivlákenných prostor, jejíž průměry vykazují nedostatečnou distribuci průměrů v oblasti 50 - 100µm. To v kombinaci s mikronovými průměry vláken nebude pravděpodobně vhodné pro dostatečnou buněčnou adhezi. Vrstva vyrobená pouze elektrostatickým zvlákňováním jasně vykazuje přítomnost průměrů vláken hlavně v submikronové oblasti při velkém procentu průměrů vláken v oblasti 50 - 100 µm. Ovšem tyto parametry nejsou zastoupené v takové variabilitě, jaká by umožňovala dostatečnou buněčnou proliferaci do vnitřního objemu materiálu při dostatečné mechanické pevnosti vrstvy. U vrstvy vyrobené kombinací těchto metod je jasně patrné odstranění nedostatků vrstev vyrobených pouze jednou metodou. Tedy dostatečné

procento průměrů vláken v submikronové oblasti pro dobrou buněčnou adhezi ale zároveň dostatečné zastoupení mikronových průměrů vláken, tak aby vrstva vykazovala dostatečné mechanické vlastnosti. Tento výsledek v kombinaci s vysokou variabilitou průměrů mezivlákenných prostor bude nejspíše umožnovat dostatečnou buněčnou adhezi a vnitřní proliferaci buněk.

Při stanovení změny molekulové hmotnosti u tepelně zatížených vzorků pomocí termické gravimetrie vyšlo najevo, že u vzorků tepelně namáhaných v extrudéru došlo k materiálovým změnám. Pokud se jedná o změnu molekulové hmotnosti, pak by křivky průběhu měření pro tepelně nezatížený vzorek musely být posunuty více vpravo od křivky pro tepelně zatížený materiál. Z výsledků je patrné, že je tomu přesně naopak. Pak lze spíše říci, že termicky zatížené vzorky v extrudéru nesnížily svojí molekulovou hmotnost, ale nejspíše došlo k částečnému fyzikálnímu zesíťování materiálu. Analýza tedy nepotvrdila prvotní předpoklad, ale ukázalo se, že teplota tání u vláken stoupá, což je dáno vyšším podílem krystalické fáze oproti polymeru, který nebyl tepelně zatěžován.

U výsledků stanovených pomocí gelové chromatografie lze říci, že PCL Mw = 10 000 po tepelném zatížení vykazoval bimodální distribuci Mn zastoupenou dvěma peaky. Nově vzniklý peak reprezentoval zřejmě rozpad části makromolekul s vyšší hmotností na makromolekuly s nižší hmotností. Podle výsledků v tabulce 2 lze říci, že střední hmotnostní molekulová hmotnost se u materiálu po tepelném zatížení téměř nezměnila. PCL Mw = 45 000 vykazoval bimodální distribuci pouze materiál před zatížením. A to opět bez výrazné změny molekulové hmotnosti. Přítomnost bimodálního průběhu u materiálu před tepelným zatížením je překvapující a málo pravděpodobná, je tedy možné že došlo k záměně vzorků nebo k jejich kontaminaci. Tento výsledek by byl potřeba ověřit opakovaným provedením měření. U PCL Mw = 45 000/10 000 došlo pouze k většímu úbytku frakce s nižší molekulovou hmotností. Souhrnně lze říci, že se nepotvrdil úbytek molekulové hmotnosti u materiálů tepelně zatížených. Výsledky pouze naznačují strukturní změnu materiálu doprovázenou rozpadem části makromolekul na nižší molekulové hmotnosti. Ale i tento fakt by mohl mít příznivý vliv na zkrácení doby biodegradace. Pro ověření těchto závěrů by bylo potřeba zopakovat několikrát měření

Dle buněčných testů byl potvrzen pro všechny materiály patrný progresivní nárůst buněčné hmoty během všech testovacích dnů pro všechny testované materiály. Z toho vyplývá potvrzení, že žádný materiál nevykazuje cytotoxické účinky a buňky úspěšně proliferují. Z výsledků můžeme potvrdit adhezi buněk po nasazení na materiál.

Ze všech testovaných materiálů Materiál vyrobený pouze metodou melt – blown (M) vykazoval podle předpokladů všechny testovací dny nejmenší míru proliferace. To je dáno značnou velikostí pórů oproti ostatním materiálům v kombinaci s vysokou průměrnou hodnotou průměrů vláken a tedy horšími vlastnostmi materiálu pro adhezi buněk.

Materiál vyrobený metodou melt – blown s částicemi hydroxyapatitu (MH) vykazoval oproti stejnému materiálu bez částic poslední dva testovací dny znatelně vyšší míru proliferace. To opět potvrzuje účinnost funkcionalizace vrstev částicemi hydroxyapatitu. Materiál lze tedy v porovnání s ostatními zařadit na třetí místo i podle mikroskopické analýzy, což opět potvrdilo předpoklad průběhu testování pro tento materiál.

U posledních dvou materiálů je z výsledků jasně prokazatelný synergický efekt kombinace metod melt – blown a elektrostatického zvlákňování a tedy přítomnosti nanovláken ve vrstvě. Nanovlákna jasně přinesla do vrstvy adherentní složku podporující buněčnou proliferaci. Buněčná proliferace pro tyto vrstvy byla v porovnání s materiály bez nanovláken jednoznačně vyšší a poslední testovací den byl na povrchu jasně patrný konfluentní nárůst buněk. Ze vzájemného porovnání těchto konfluentních vrstev poslední testovací den je patrné, že souvislejší vrstva buněk se vytvořila na materiálu MNH.

Mikroskopie potvrdila buněčnou proliferaci do vnitřku materiálu. Při nasazení pokusu určité množství buněk propadlo většími póry dovnitř struktury a tyto buňky se uchytily uvnitř materiálu, kde začaly v určité míře proliferovat. Progres proliferace buněk vnitřní strukturou pro jednotlivé dny je dle mikroskopie patrný. U materiálu MNH je patrný útlum vnitřní proliferace buněk. Tento fakt může být způsobený určitým nedostatkem živin z média a to především proto, že množství média je limitováno objemem kultivační jamky. Během druhé poloviny experimentu bylo nutné měnit médium každý den. Další možností je, že konfluentní vrstva buněk na povrchu vzorku omezovala přísun živin do vnitřní struktury. Na základě těchto poznatků lze doporučit

kultivaci buněk na materiálech tohoto typu ve větším objemu média. Celkově lze říci, že míra vnitřní proliferace buněk byla lepší u materiálů ze směsi mikro a nanovláken.

Podle výsledků je jasné, že nejlepším materiálem pro další využití v reparativní medicíně kostní tkáně je vlákenná vrstva vyrobená kombinací metody melt – blown a elektrostatického zvlákňování funkcionalizovaná částicemi hydroxyapatitu (MNH). V další fázi testování by tedy bylo vhodné provést podrobnější testování ro tento vybraný materiál a potvrdit tak předchozí výsledky. Dalším zajímavým testem by mohl, být test přestupu buněk z prostředí na nosič, který by byl realizovaný přes kolagenní gel. Pro další testování bude určitě výhodné kultivovat vzorky v jamkách o objemu 5 ml, aby se vyloučila limitace buněčné proliferace vlivem nedostatku živin

Pomocí enzymatických testů byla analyzována schopnost biodegradability vytvořených vrstev. Jako ideální se ukázala koncentrace enzymu 10 U/ml, což potvrdilo i další testování. Podařilo se s úspěchem prokázat schopnost biodegradace u vrstev vyrobených technologií melt – blown a určit přibližný průběh degradace všech testovaných vrstev. Degradace probíhala u čistě nanovlákenné vrstvy podle očekávání v prvních dvou dnech výrazně rychleji oproti zbylým vrstvám. Tento fakt je podle předpokladů způsoben vyšším měrným povrchem při povrchové degradaci a nejspíše i menším procentem krystalické fáze, což umožnovalo vznik "vnitřní" degradace již od prvního dne. Naproti tomu u vrstev vznikajících technologií melt-blown se v prvních dnech projevil nižší měrný povrch a vyšší podíl krystalické fáze vzniklé tepelným namáháním a dloužením vláken. Vyšší podíl krystalické fáze zpomaloval proniknutí enzymu do materiálu a následnou "vnitřní" degradaci. Od třetího testovacího dne bylo na vrstvě nanovláken patrné zpomalení degradačního procesu z důvodu celkové degradace amorfní fáze a pomalejší degradace zbytkové fáze krystalické. U vrstev vytvořených technologií melt - blown se od třetího testovacího dne projevilo plné rozvinutí "vnitřní" degradace a celkové zrychlení degradace. Pátý testovací den byl u melt – blown vrstev patrný celkový rozpad amorfní fáze a nástup pomalejší degradace fáze krystalické. Zajímavý byl průběh degradability u námi nejvíce sledované vrstvy ze směsi mikro – nanovláken, kde se poslední dva dny oproti předpokladům dostává míra degradace dokonce i pod úroveň samotných nanovláken. Tento fakt by byl třeba ověřit a objasnit rozsáhlejším testováním, mikroskopickým pozorováním degradovaného materiálu a dalšími analytickými metodami. Pokud by se takovýto průběh degradace potvrdil, byl by naprosto ideální pro další využití pro biodegradabilní tkáňové nosiče.

5. ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo vytvořit vlákenný materiál pro přípravu kostních náhrad kombinující mikrovlákna s nanovlákny, který je dále fukcionalizovaný částicemi vhodného materiálu. Vlákenné vrstvy budou mít definovatelný poměr mikro a nanovláken, dále jejich průměry, orientace vláken. Objemnost vlákenné vrstvy. Dalším postupem bylo takto vytvořené struktury podrobit strukturní a materiálové analýze. Poslední částí experimentální části bylo zhodnocení využitelnosti materiálu pro regenerativní medicínu pomocí biologického a biodegradabilního testování.

Výsledkem experimentu bylo vybrání vhodného biopolymeru a stanovení ideálních technologických parametrů pro výrobu objemné vlákenné vrstvy inovativní kombinací technologií melt – blown, elektrostatického zvlákňování a naprašování částic vibrační metodou. Samotná technologie výroby se ukázala takřka bezproblémovou, naprosto funkční a úspěšně kombinovala všechny tři technologie. Výhodou této technologie je také možnost použití poměrně velkého množství různých polymerů a jejich možná kombinace.

Úspěšně vyrobený objemný vlákenný kompozit ze směsi nanovláken, mikrovláken a částic hydroxyapatitu vykazoval během prvních strukturních testů velmi dobré mechanické a strukturní parametry. Na základě těchto zjištění lze tedy konstatovat, že kompozit splňuje základní požadavky kladené na tkáňový nosič. Tato skutečnost byla potvrzena následnými biologickými testy buněčné proliferace a viability, kdy byly vrstvy kultivovány liniemi lidských nádorových buněk. Buňky se na kompozitu úspěšně množily a prorůstaly vnitřní strukturou při velmi dobré povrchové adhezi. Potvrzení buněčné proliferace do vnitřní struktury lze označit za velký úspěch. Pomocí biologických testů byl také úspěšně ověřen přínos funkcionalizace struktury částicemi hydroxyapatitu. Dalším velmi dobrým výsledkem bylo také potvrzení enzymatické biodegradability kompozitní vlákenné struktury, což bylo umocněno výsledným velmi výhodným průběhem této degradace.

Postup výroby pomocí kombinace výše zmíněných technologií se s ohledem na vlastnosti vytvořeného materiálu jeví jako velmi perspektivní a je možné dále navazovat širokou škálou dalších vědeckých postupů. Hlavním přínosem bylo vytvoření třídimenzionálního vlákenného kompozitu funkcionalizovaného částicemi hydroxyapatitu, který standardně vyrobeným kompozitům disponuje většími a do značné míry kontinuálně navazujícími mezivlákennými prostory, i při velmi dobrých
mechanických vlastnostech. Vlákenný kompozit a technologii jeho výroby projevilo zájem již několik komerčních subjektů a dalších vědeckých pracovišť.

V současné době probíhá další podrobnější biologické testování připravených struktur a také optimalizace výrobního postupu. Současně probíhá příprava tříměsíčního preklinického in vivo testování na Institutu tkáňového inženýrství AV ČR.

Prvotní výsledky této práce již byly v roce 2013 prezentovány na mezinárodní vědecké konferenci FiberSociety v USA. Z dalšího průběhu testování a vývoje je připravován odborný článek do impaktovaného vědeckého periodika. Současně s tím probíhá příprava podkladů pro tvoru patentové přihlášky výrobní technologie. Dalším výstupem této diplomové práce bude snaha komercionalizaci vyrobeného vlákenného kompozitu.

6. POUŽITÁ LITERATURA

LUKÁŠ D., (2005), *Lékařské textilie*, 1. a 2. díl, Centrum pro podporu konkurenceschopnosti v biomedicínckých technologií, Vydala Asociace inovačního podnikání ČR

LANZA R., LANGER R., VACANTI, J., (2000), *Principles of Tissue Engineering*. Academic Press, second edition. 995 s., ISBN-13 : 978-0-124-36630-5.

CHVOJKA J., (2013), Influences of particles and electrostatic blowing on forming composite materials, Nanocone 2013.

LEMBO D., CAVALLI R., (2010), Nanoparticulate delivery systems for antiviral drugs, *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 21, s.53-70.

FEYNMAN, R., F., (2000), *Feynmanovy přednášky z fyziky s řešenými příklady 1/3*, Fragment CZ, 732 s., ISBN:80-7200-405-0.

SNÁŠEL J., (2013), *Už vím, jak pracuje vibrační vyzvánění*. [online]. 25.12.2013, Dostupné z: http://www.mobilmania.cz/clanky/uz-vim-jak-pracuje-vibracni-vyzvaneni/sc-3-a-1108267/ default.aspx

COM M., (2013), *The a to z materials: hydroxyapatite – applications*. [online]. 25.12.2013, Dostupné z: http://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=107

LIHONG L., YINGJUN W., YANG Z.,(2010), Changyou GaoPoly(lactide-co-glycolide)/ hydroxyapatite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for bone tissue engineering, Springer Science+Business Media, 30.10.2010

JUNG et al., (2012) Incorporation of functionalized gold nanoparticles into nanofibers for enhanced attachment and differentiation of mammalian cells, Journal of Nanobiotechnology MIKEŠ P., (2013), Nevlákenné nosiče pro tkáňové inženýrství, Přednáška předmětu Materiály pro tkáňové inženýrství, TUL – KNT

MIKEŠ P., (2013), Vybrané materiály pro tkáňové inženýrství, Přednáška předmětu Materiály pro tkáňové inženýrství, TUL – KNT

MOORE L, GATICA M, KIM A, OSAWA E, (2013), *Multi-protein Delivery by Nanodiamonds Promotes Bone Formation*, Journal of dental research

JOHN W., MCCULLOCH P., (1999), *The history of the development of melt blowing technology*. Nonwovens Conference/119, [online]. [cit. 2013-03-30]. Dostupné z: http://www.tappi.org/Downloads/unsorted/UNTITLED---NW99109pdf.aspx

ZAMFIR M., MCCULLOCH J., BEHMAN O., (2003), *Recent developments in spunbonding and metblowing technologies have seen varietly of inovations over the years*. [online]. June, 2003 [cit. 2013-03-31]. Dostupné z: http://findarticles.com/p/articles/mi_hb6618

JIRSÁK O., KALINOVÁ K., (2003), Netkané textilie. Liberec: TUL, 129 s., ISBN 8070837462.

WADSWORTH L., MALAKAN S., (1991), A review of melt blowing technology. INB Nonwovens, p. 2,

DAHIYA A., (2004), *Melt blown technology*, University of Tennessee, [cit. 2014 -04-09]. [online]. Dostupné z: http://www.engr.utk.edu/mse/pages/Textiles/ Melt% 20Blown %20Technology.htm

NAKAJIMA T., KAJIWARA K. a McINTYRE J., (2007), *Edvanced fiber spinning technology*, English ed. ed. Cambridge, England: Woodhead, 2007. ISBN 18-557-3182-7.

RŮŽIČKOVÁ J., (2004), *Elektrostatické zvlákňování nanovláken*, Liberec: TUL, 54 s., ISBN 80-7083-867-1.

KALINOVÁ K., (2010), *Thermal and chemical technologies of nonwovens production*. TUL Liberec, Part I [online]. [cit. 2014-04-09]. Dostupné z: http://www.ft.vslib.cz/depart /knt/web/index.php?option=com_docman&tas=cat_view&gid=47&Itemid=36

RENEKER D., FONG H., (2006), *Polymeric nanofibers*. American Chemical Society, New York

HUANG Z., RAMAKRISHNA S., ZHANG Y., (2003), A review on polymer nanofibers by *electrospinning and their applications in nanocoposites*. Composites Science and Technology, November 2003, vol. 63, iss. 15, p. 2223-2253.

LUKÁŠ D., SARKAR A., MARTINOVÁ L., VODSED'ÁLKOVÁ K., LUBASOVÁ D., CHALOUPEK J., POKORNÝ J., MIKEŠ P., CHVOJKA J., KOMÁREK M., (2009), Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century), *Textile Progress*, Vol. 41, No. 2, s. 59-140.

CHEW S., et al.: *The role of electrospinning in the emerging field of nanomedicine. Curr Pharm Des*, [online]. 25.4.20014, 12(36), [cit. 2014-03-26]. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2396225

NEDOROST L., TOMANOVÁ V., EBERLOVÁ L., (2009), Atlas histologie tvrdých tkání, *Příručka pro studenty*, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze, s. 32 – 38. ISSN 1804-4409.

JUNQUEIRA L., CARNEIRO J., KELLEY O., (1997), Základy histologie, *Medicalbook*, Vol. 7, s. 502, ISBN 80-85787-37-7.

NAKAMURA H., (2007), Morphology, function and differentiation of bone cells, *Journalof Hard Tissue Biology*, Department of Oral Histology, Matsumoto Dental University, Shiojiri, Japan, s. 8, ISSN 1341-7649.

FIROZ M., (2008), Prezentation – Bone histology, Balkh medical college – Balk university.

LIU C., XIA Z., CZERNUSZKA Z., (2007), Design and Development of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering. *Chemical Engineering Research and Design*, Vol. 85, No. 7, s. 1051–1064.

EBERLI D., (2010), Tissue ingeneering. Rijeka, Croatia: Intech, ISBN 978-953-3070-797.

BROWN P., STEVENS J., (2007), *Manofibers and nanotechnology in textiles*, Woodhead Publishing, ISBN: 978-184-569-1059

Woodruff W., Hutmacher D., (2010), *The return of a forgotten polymer*—*Polycaprolactone in the 21st century*, Institute of Health and Biomedical Innovation, Queensland University of Technology, s. 1 - 10.

LABET L., MARIANNE S., HIELEMANS B., (2011), *Synthesis of polycaprolactone: a review*", Chemical Society Reviews 38: 3484–3504. (2009).

SHERMANOVÁ S., OMELKOVÁ J., VOBĚRKOVÁ S., BÁLKOVÁ K., RICHTERA L., MRAVCOVÁ L., (2011), *Dependence of biodegradation behavior of polycaprolactone film on the way of its preparation*, Chemické listy, Praha: Česká společnost chemická, 2011. s. 1022 ISSN: 0009-2770.

HERMANOVÁ, S., VYROUBALOVÁ, Z., VOJTOVÁ, L., CABRERA, L., (2011), Novel triazole-based aluminium complex for ring - opening polymerization of lactones, Polymer Bulletin, s. 1751-1760. ISSN: 0170-0839.

7. PŘÍLOHY

Příloha 1	Doplnění kapitoly 3.4.
Příloha 2	Doplnění kapitoly 3.5.

Příloha 1. Doplnění kapitol 3.4.2 – 3.4.4.

PBS pufr – phosphate-buffered saline, fosfátový pufr – výroba 1 litru PBS - Smíchání 800 ml dH₂O, 8 g NaCl (137mM), 0,2 g KCl (2,7mM), 3,63 g NaH₂PO₄.12 H₂O (10mM), 0,24 g KH₂PO₄ (1,76mM), rozpustit mícháním, kyselinou HCl upravit pH na 7,4, doplnit do 1 l dH₂O.

EMEM - Bazální - Eagle's minimal Essentials medium – bazální kultivační médium; obsahuje glukózu, aminokyseliny, vitamíny, soli, antibiotika a další látky, jako např. železo a fenolovou červeň. Ta slouží ke sledování změn pH v médiu během kultivace buněk. Odpadní produkty metabolizujících, rostoucích buněk jsou kyselé, snižují pH média a barva média se mění do oranžova až do žluta, protože představuje indikátor pH – barví se podle pH.

EMEM – kultivační – 89% EMEM bazální, 10 % FBS, 1% ATB.

Propidium iodid - 50 µl PI - Sigma + 10 ml PBS.

IPA – okyselený isopropanol, 1 µl HCl na 10 ml isopropanolu/ 40 mM HCl)

FBS - Fetal bovine serum – část krevní plazmy plodu skotu.

Glutaraldehyd – 2,5% roztok glutaraldehydu - Sigma v PBS.

Příloha 2. Doplnění kapitoly 3.5.1. – 3.5.2.

Tab. P2a: Počáteční a koncové hmotnosti jednotlivých vzorků v závislosti na enzymatické koncentraci.

Nanovlákna			
Enzymatická koncentrace [U/mg]	Počáteční hmotnost [g]	Konečná hmotnost [g]	Hmotnostní úbytek [%]
0,1	0,0413	0,0353	14,60
1	0,0602	0,0412	31,61
10	0,0670	0,0124	81,49

Tab. P2b: Počáteční a koncové hmotnosti jednotlivých vzroků: Melt-blown.

Melt-blown			
Testovací	Počáteční	Konečná	Hmotnostní
den	nmotnost [g]	nmotnost [g]	ZUSTATEK [%]
1.D	0,0540	0,0482	89,26
2.D	0,0502	0,0305	60,76
3.D	0,0493	0,0204	41,38
4.D	0,0507	0,0093	18,34
5.D	0,0504	0,0076	15,08
1.D. NK	0,0493	0,0490	99,39
5.D. NK	0,0510	0,0513	100,59

Tab. P2c: Počáteční a koncové hmotnosti jednotlivých vzorků: Melt-blown/nanovlákna.

Melt-blown/nanovlákna			
Testovací	Počáteční	Konečná	Hmotnostní
den	hmotnost [g]	hmotnost [g]	zůstatek [%]
1.D	0,0527	0,0435	82,54
2.D	0,0520	0,0269	51,73
3.D	0,0492	0,0053	10,77
4.D	0,0511	0,0020	3,91
5.D	0,0500	0,0011	2,20
1.D. NK	0,0508	0,0503	99,02
5.D. NK	0,0510	0,0512	100,39

Nanovlákna			
Testovací	Počáteční	Konečná	Hmotnostní
den	hmotnost [g]	hmotnost [g]	zůstatek [%]
1.D	0,0501	0,0254	50,70
2.D	0,0524	0,0118	22,52
3.D	0,0504	0,0082	16,27
4.D	0,0530	0,0080	15,09
5.D	0,0520	0,0064	12,31
1.D. NK	0,0484	0,0486	100,41
5.D. NK	0,0530	0,0526	99,25

Tab. P2d: Počáteční a koncové hmotnosti jednotlivých vzorků: nanovlákna.