

Studium a výroba nanovláknenných vrstev z biodegradabilních polymerů

Diplomová práce

Studijní program: N3106 – Textilní inženýrství
Studijní obor: 3106T018 – Netkané a nanovláknenné materiály
Autor práce: **Bc. Miroslav Modrák**
Vedoucí práce: Ing. Jiří Chvojka, Ph.D.



Study and production of nanofiber layers of biodegradable polymers

Diploma thesis

Study programme: N3106 – Textile Engineering
Study branch: 3106T018 – Nonwoven and Nanomaterials
Author: **Bc. Miroslav Modrák**
Supervisor: Ing. Jiří Chvojka, Ph.D.



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

P r o h l á š e n í

Byl(a) jsem seznámen(a) s tím, že na mou bakalářskou 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(a) samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím bakalářské práce a konzultantem.

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

Datum:

Podpis:.....

Poděkování

Děkuji svému vedoucímu diplomové práce Ing. Jiřímu Chvojkovi Ph.D, a konzultantům Ing. Jakobovi Erbenovi 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.

Zároveň bych chtěl poděkovat své rodině za podporu a poskytnuté zázemí.

Anotace

Tato práce popisuje výrobu, testování a charakterizaci biodegradabilních scaffoldů pro kostní tkáň, které mají přesné poměry zastoupení mikrovláken tvořené technologií melt blown a nanovláken tvořené technologií elektrického zvlákňování. V experimentu byly vyrobeny tři druhy materiálů o stejné plošné hmotnosti a s rozdílným zastoupením nano a mikro vláken. Veškeré materiály byly vyrobeny z polykaprolaktonu. Všechny materiály se vyznačovaly optimální porézní strukturou pro buněčnou proliferaci a materiály s vyšším obsahem nanovláken prokazovaly dobré mechanické vlastnosti. Důležité strukturní vlastnosti a homogenita každého materiálu byla analyzována pomocí elektronového mikroskopu a obrazové analýzy. Vliv různého poměru nano a mikrovláken ve struktuře na adhezi a proliferaci buněk osteoblastů byl posuzován na základě in - vitro testování.

Annotation

The paper describes the production process, testing and characterization of biodegradable scaffolds for bone tissue, which have the exact ratio of representation of microfibrils formed by the melt blown technology and nanofibrils formed by electric fiber spinning. Three kinds of materials with the same square weight and different representation of nanofibrils and microfibrils were produced in the experiment. All of the materials were made out of polycaprolactone. The materials were characterized by optimal porous structure for cellular poliferation and materials with higher content of nanofibrils indicated good mechanical attributes. The important structural attributes and homogeneity of each material was analysed using the electron microscope and pictorial analysis. The influence of various ratio of nanofibrils and microfibrils in the structure on adhesion and poliferation of osteoblastic cells was evaluated on the basis of the in - vitro testing.

Klíčová slova:

melt blown, elektrické zvlákňování, scaffold, nanovlákná, tkáňové inženýrství, polykaprolakton

Key words:

meltblown, electrospinning, scaffold, nanofibers, tissue engineering, polycaprolactone

Obsah

1	Úvod	- 10 -
2	TEORETICKÁ ČÁST	- 11 -
2.1	Melt blown	- 11 -
2.1.1	Historie.....	- 11 -
2.1.2	Popis technologie melt-blown	- 12 -
2.1.3	Výroba nanovláken technologií Melt-blown	- 14 -
2.1.4	Zvlákňování biodegradabilních polymerů	- 16 -
2.2	Elektrické zvlákňování.....	- 18 -
2.2.1	Historie.....	- 19 -
2.2.2	Princip a způsoby elektrického zvlákňování	- 20 -
2.3	Elektronová mikroskopie	- 21 -
2.3.1	Transmisní elektronová mikroskopie.....	- 22 -
2.3.2	Skenovací elektronová mikroskopie	- 22 -
2.4	Fluorescenční mikroskopie	- 24 -
2.4.1	Fluorescenční mikroskop	- 25 -
2.5	Tkáňové inženýrství	- 26 -
2.5.1	Kultivace buněk na scaffoldech	- 26 -
2.5.2	Morfologie kostní tkáně.....	- 28 -
2.6	Scaffoldy	- 30 -
2.6.1	Příprava scaffoldů	- 31 -
2.6.2	Scaffoldy pro kostní tkáně	- 33 -
2.6.3	Způsoby výroby scaffoldů pro kostní tkáně.....	- 33 -
3	Experimentální část	- 38 -
3.1	Průběh a optimalizace procesu výroby objemných mikro- nanovlákných vrstev s rozdílným zastoupením mikro a nanovláken.....	- 39 -
3.1.1	Optimalizace parametrů technologie melt - blown.....	- 39 -

3.1.2	Optimalizace finálního uspořádání pro kombinaci technologií MB a el. zvlákňování.....	- 42 -
3.1.3	Výroba vrstev z PCL kombinací technologií melt - blown a elektrického zvlákňování	- 42 -
3.1.4	Ověření objemového zastoupení nanovláken ve vyrobených vrstvách	- 44 -
3.2	Měření strukturních vlastností materiálů ME63, ME100 a ME172.	- 45 -
3.2.1	Nasnímání povrchů a tvorba obrazu	- 45 -
3.2.2	Obrazová analýza.....	- 47 -
3.3	Odlišení a vizualizace vláken z různých technologií	- 54 -
3.3.1	Výroba kompozitních vrstev.....	- 55 -
3.3.2	Příprava vzorků a postup měření	- 56 -
3.3.3	Výsledky měření	- 56 -
3.4	Biologické testování materiálů ME63, ME100 a ME172.....	- 57 -
3.4.1	Příprava vzorků.....	- 57 -
3.4.2	Nasazování a kultivace buněk.....	- 58 -
3.4.3	Testování viability buněk - MTT test	- 59 -
3.4.4	Hodnocení adheze a proliferace buněk - Fluorescenční mikroskopie-	62 -
3.4.5	Hodnocení adheze a proliferace buněk - Elektronová mikroskopie ..-	65 -
4	Výsledky a Diskuse	- 71 -
5	Závěr.....	- 73 -
6	Použitá literatura.....	- 75 -
7	Seznam použitých obrázků.....	- 80 -
8	Seznam tabulek.....	- 82 -

Seznam použitých symbolů a zkratk)

kV	kilovolt
μl	objemová jednotka; mikrolitr; dle SI 1×10^{-6} l
mm	délková jednotka; milimetr; dle SI 1×10^{-3} m
μm	délková jednotka; mikrometr; dle SI 1×10^{-6} m
nm	délková jednotka; nanometr; dle SI 1×10^{-9} m
g	hmotnostní jednotka; gram; dle SI 1×10^{-3} kg
PCL	polykaprolakton
PLA	kyselina polyglykolová
PVB	polyvinilbutyral
PVDF	polyvinyliden fluorid
DMAC	dimethylacetamid
SEM	skenovací elektronový mikroskop
FM	fluorescenční mikroskop
ELS	elektrostatické zvlákňování
3D	struktura v třech dimenzích X x Y x Z
°C	stupeň celsia
Mn	hmotnostně početní molekulová hmotnost
Mh	molekulová hmotnost
Mol	látkové množství
Pa	tlak [N/m ²]
f	frekvence [ot./min]

1 Úvod

Budoucností ve vývoji v oblasti regenerativní medicíny kostní tkáně jsou objemové tkáňové nosiče, jež jsou tvořeny biodegradabilními materiály. Vývoj těchto tkáňových nosičů zaznamenal v posledních letech velký progres a objevilo se mnoho vědeckých prací zabývajících se touto tematikou. Hlavní výhodou oproti kostním náhradám z nebiodegradabilních materiálů, jako jsou například materiály na bázi titanových nebo sklokeramických implantátů, je výrazné snížení nebo úplné odstranění rizika spojeného s imunitní reakcí systému pacienta. Toho je docíleno využitím materiálů, které se v těle běžně vyskytují (kolagen, kyselina hyaluronová) a zároveň jsou biodegradabilní. Díky této vlastnosti dochází v těle pacienta k postupnému rozpadání scaffoldu a jeho nahrazení novou tkání.

Cílem diplomové práce je optimalizovat výrobní proces kombinující technologie melt blown a elektrické zvlákňování ve vztahu k tvorbě tkáňových nosičů s rozdílným zastoupením nano a mikrovláken tvořených z biodegradabilního materiálu. Dalším cílem je pomocí obrazové analýzy zjistit odlišné zastoupení nano a mikrovláken ve struktuře vyrobených materiálů, dále provést biologické testování, které posuzuje adhezi a proliferaci buněk na vyrobených tkáňových nosičích ve vztahu k rozdílnému zastoupení nano a mikrovláken v jejich struktuře. Posledním cílem je posouzení vhodnosti vytvořených materiálů pro využití v regenerativní medicíně se zaměřením na kostní tkáň.

Teoretická část práce je věnována popisu technologií melt blown a elektrického zvlákňování a popisu metod pro hodnocení strukturních a biologických vlastností. Dále je popsána morfologie kostní tkáně, základní principy tkáňového inženýrství a poslední kapitola je věnována tkáňovým nosičům. Experimentální část obsahuje popis výroby tkáňových nosičů a následného in vitro testování. Součástí této pasáže je popis optimalizace výroby, příprava scaffoldů, hodnocení strukturních a biologických vlastností vytvořených materiálů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

Hlavním cílem této práce bylo optimalizovat výrobní proces kombinující melt blown a elektrické zvlákňování, následně vytvořit biodegradabilní polymerní vlákenné vrstvy, které by měli rozdílné zastoupení poměrů nano a mikrovláken ve své struktuře. Dalším cílem bylo analyzovat strukturní a biologické vlastnosti takto vytvořených materiálů a na základě analýzy pak určit vhodnost vytvořených materiálů pro využití v regenerativní medicíně jako tkáňový nosič. Proto se teoretická část bude věnovat popisu vybraných technologií tvorby polymerních vlákenných vrstev. Budou přiblíženy metody pro hodnocení strukturních a biologických vlastností. Dále bude popsána morfologie kostní tkáně a základní principy tkáňového inženýrství. Závěrečná kapitola bude věnována tkáňovým nosičům.

2.1 Melt blown

V této kapitole bude přiblížena jedna z technologií tvorby vlákenných vrstev z polymerní taveniny. Jak už z názvu vyplývá, jedná se o metodu melt blown. Z anglického překladu do češtiny můžeme odvodit základní principy této metody, a to melt = tavit a blown = foukat [1].

Typický průměr vyrobených vláken technologií melt blown se pohybuje mezi 2-4 μm . Díky variabilitě procesu lze vyrábět vlákna o daleko větších průměrech a to 10-15 μm nebo naopak menších, kdy mohou vlákna dosahovat průměru pouze 0,1 μm . Vyrobená vlákna se vyznačují velkým měrným povrchem a jsou náhodně orientovaná [1].

V současné době nacházejí takto vyrobené textilie uplatnění především v průmyslu jako ochranné oděvy, filtry nebo jako průmyslové sorbenty pro zachytávání ropných látek. Dále pak ve zdravotnictví, kde se jedná například o jednorázové oděvy, roušky a ložní prádlo [1].

2.1.1 Historie

První výroba mikrovláken je spojena s rokem 1939 a jménem F. Carlton. Carlton představil spray gun jako proces, ve kterém se textilie formuje do tvaru mikrováken. Počátkem roku 1940 americká společnost American Viscose zkoumala výrobu mikrovláken pomocí spray spinning technologie navržené Carltonem a roku

1950 postavila poloprovoz na výrobu mikrovláken. Zároveň s tímto výzkumem zkoumala společnost Down Chemical Company možnost tvorby mikrovláken z polystyrenu. V polovině roku 1960 další americká společnost Chemstrad Company také pracovala na vývoji technologie spray spinning s možností využití této technologie při výrobě filtrů. Vzhledem k tomu, že American Viscose nikdy nepředstavila žádný veřejný produkt, společnost Down Chemical Company neviděla žádný potenciál ve výzkumu výroby mikrovláken z polystyrenu a vliv společnosti Chemstrad Company na trhu v oblasti filtrací nebyl dostatečně velký, byl výzkum všech tří společností přerušen [2].

Počátkem roku 1950 americká armáda zahájila výzkum využití produktu z mikrovláken na sbírání radioaktivních částic v horních částech atmosféry. V polovině téhož roku vědecký tým V. A. Wenteho zaznamenal první úspěšný pokus při výrobě mikrovláken. Týmu se podařilo vytvořit vlákna o průměru 10 μm [2].

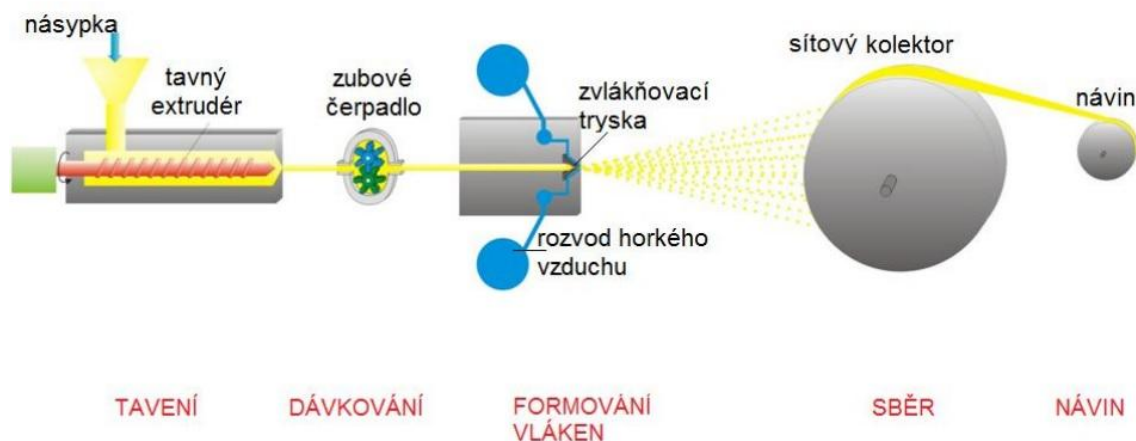
V roce 1960 americká společnost Esso Research and Engineering Company (nyní ExxonMobile Corp.) navázala na Wenteho projekt. Pod záštitou této firmy vedl další vývoj R. Buntin a D. Lohkamp, kterým se o pět let později podařilo patentovat prototyp zařízení pro průmyslovou výrobu mikrovláken [2].

Roku 1970 firma Exxon prodala licenci na výrobu mikrovláken a umožnila tím vznik firem jako například Johnson and Johnson, Kymberley-Clark, WEb Dynamics, Ergon Nonwoven a sama pokračovala s vývojem postupu výroby mikrovláken. V roce 1983 se Exxon spojil s University of Tennessee. Vzniklá spolupráce se ukázala jako velmi prospěšná a firma do roku 2000 vyvinula a patentovala většinu výrobních technologií systému melt blown [1].

První výrobní linka se u nás objevila roku 1992 a vlastnila jí mělnická firma Ecotherm. V současné době je na světě přes 80 výrobních linek a jejich produkce je více než 60 tisíc tun za rok [1].

2.1.2 Popis technologie melt-blown

Jak již bylo zmíněno v úvodu této kapitoly, jedná se o proces, při kterém dochází k tavení polymeru a následnému foukání vzniklé taveniny na kolektor, kde dochází k tvorbě vlákenné vrstvy (Obrázek 1).



Obrázek 1: Schéma melt-blown zařízení [45]

První fází procesu je tavení polymeru v extrudéru. Jedná se o vyhřívaný válec, jehož hlavní funkcí je roztavit polymer, který je většinou na počátku ve formě granulí. Pohyb polymerní taveniny extrudérem směrem k zvlákňovací části zajišťuje šnek, který má různé úhly stoupání závitu. K tavení polymeru dochází díky teplu dodávanému několika ohřívači, jejichž teplota je nastavena v kumulativním pořadí, dále pak díky smykovému tření, které vzniká mechanickým působením šneku o stěny válce. Následně již roztavený polymer míří k zubovému čerpadlu [3].

Zubové čerpadlo, či také dávkovací čerpadlo se skládá ze dvou protiběžných ozubených kol. Účelem čerpadla je postupné dodávání roztaveného polymeru pod konstantním tlakem a teplotou do distribučního systému zvlákňovací hubice [3].

Zvlákňovací hubice je nejdůležitější částí všech melt blown zařízení. Je zakončena výtlačnou částí, která obsahuje desítky až stovky zvlákňovacích otvorů, přičemž širší výtlačné hubice odpovídá výrobní šíři zařízení. K zvlákňovacím otvorům je přiváděn z horní i spodní části horký vzduch, který strhává vytlačovanou taveninu a formuje jí do tvaru vláken, která jsou proudem vzduchu dlužena. Při dosažení určité délky dojde k přetržení vláken a následně jsou proudem vzduchu zanesena až na kolektor [3].

Kolektor je sběrný válec nebo pás, na jehož povrchu dochází k usazování vzniklých polymerních vláken, většinou s náhodnou směrovou orientací. Vzdálenost

mezi kolektorem a zvlákňovací hubicí lze měnit, což má za následek změnu objemové hmotnosti vláken [1][3].

Podrobnější popis technologie melt-blown lze najít na odkazech [1][3]. Základní parametry výroby a některé druhy zvlákňovaných polymerů jsou uvedeny v tabulkách (Tabulka 1 a

Tabulka 2).

Tabulka 1 - Typické hodnoty pro polymery a podmínky tvorby vláken [3]

Teplota (°C)	Viskozita taveniny (Poise)
200	13000
280	3600
310	1400
Teplota taveniny	280-400°C
Teplota vzduchu	290-400°C
Rychlost proudění vzduchu	100-500 m/s
Rychlost výtoky polymeru	ca 1 g/min/otvor
Hmotnostní poměr vzduchu polymeru	ca 100
Vzdálenost hubice od sběrného bubnu	0,2 - 0,5 m

Tabulka 2 - Polymery používané v Melt - blown procesu[1]

Běžné polymery	Ostatní polymery
Polypropylen	EVA, EMA, EVOH
Polystyren	Polybutylen terephthalat
Polyester	Polyphenylen sulfid
Polyurethan	Polymethylen pentene
Nylon 6, 66, 11 12	Polyvinyl alcohol
Polyethylen	Polytrifluorochloroethene
Polycarbonat	Polyethylen terephthalat

2.1.3 Výroba nanovláken technologií Melt-blown

Jak bylo zmíněno na počátku této kapitoly, nejběžněji se technologií melt-blown tvoří vlákna o průměrech 2-4 μm . Avšak s postupujícím vývojem této technologie se objevila otázka, zda by bylo možné vytvářet vlákna o průměrech v řádu nanometrů.

Touto otázkou se začal roku 2007 zabývat vědecký tým chemického inženýrství na univerzitě v Minesotě, který přišel s myšlenkou, že díky snížení molekulové hmotnosti polymeru, snížení hmotnostního průtoku polymeru a zvýšení tlaku vzduchu se může docílit zmenšení průměrů vláken. Pro ověření tohoto předpokladu využili tři druhy polymerů: polystyren (PS), polypropylen (PP) a polybutylen terephthalat (PBT). K zvlákňování výše uvedených polymerů bylo

použito zařízení s tryskou o průměru 0,2 mm, vzduchovými průduchy o průměru 1 mm ve V-slotech vedle sebe s rozstupem 1,5 mm. Polymer byl zpracováván při teplotě polymeru (T_p) a hmotnostním průtokem (m_p) od 0,035 až do 0,35 g/min. Vzduch v průduchu měl teplotu T_a (teplota vzduchu). Pro veškeré testování v této studii se teplota $T_a = T_p$. Každý test trval přibližně 2 hodiny s použitím několika gramů polymeru. Rychlost proudění vzduchu byla mezi 4,5 až 10 ϕ_a (standardních kubických stop za minutu, nebo-li SCFM). Veškeré číselné hodnoty uvedených parametrů pro daný polymer jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 3) Umístění kolektoru bylo ve vzdálenosti 55 cm od trysky. Dále pak byla provedena additivace polymeru PP peroxidem pro snížení jeho molekulové hmotnosti [4].

Dosažené výsledky byly příznivé, neboť ze všech materiálů se podařilo získat vlákna, která měla průměry (d_{av}) menší jak 0,5 μm (Tabulka 3). Tyto výsledky poukazují na fakt, že technologií melt-blown lze vyrábět vlákna o průměrech v řádech stovek nanometrů [4].

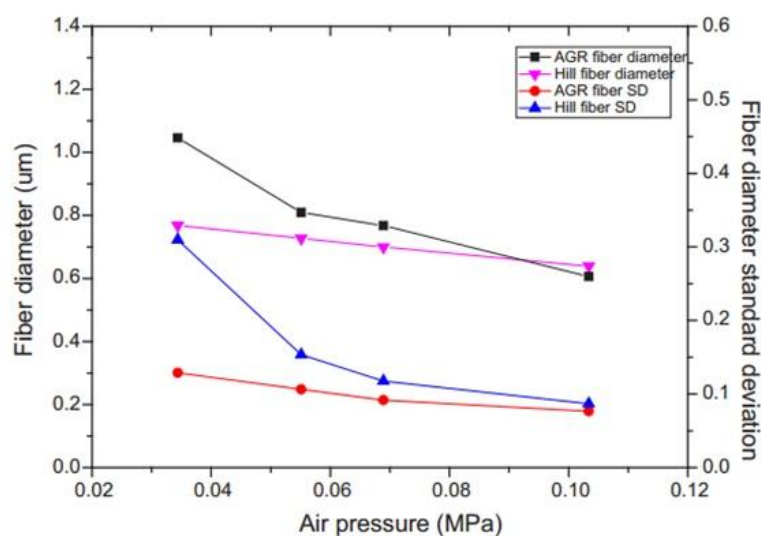
Tabulka 3: Výsledné hodnoty průměrů vláken při rozdílných parametrech výroby a rozdílných materiálech [4]

Run I.D.	T_p, T_a (°C)	η^* at 1 s^{-1} (Pa s)	m_p (g/min)	ϕ_a (SCFM)	Γ	d_{av} (μm)
PS-1	180	23	0.053	8	9	1.61
PS-2	260	1.6	0.07	7.5	6.4	0.62
PS-3	280	1.1	0.07	8	6.8	0.38
PP-1	180	35	0.35	6	0.5	1.23
PP-2	180	35	0.035	8	13.6	0.45
PP-3	220	15	0.035	8	13.6	0.30
PBT-1	265	137	0.35	4.5	0.4	1.22
PBT-2	265	137	0.035	10	17	0.44

Další zajímavá studie na toto téma se objevila roku 2013. Zveřejnilo ji oddělení textilního výzkumu Shanghaiské univerzity v Donguah. Tato studie popisuje strukturu a vzdušnou propustnost nanovlákných pavučin. Mimo jiné, byl při této studii sledován vliv tlaku vzduchu na průměry vláken. Pro tento experiment byly použity dvě rozdílné trysky. První s označením AGR se 14 otvory na jeden centimetr a druhá s označením Hills opatřená 24 otvory na jeden centimetr. Jako zvláknovací materiál

byla použita polypropylenová prskyřice, která byla zvlákňována pomocí čtyř rozdílných tlaků vzduchu: 0.034 MPa, 0.055 MPa, 0.069 MPa a 0.103 MPa [5].

Dosažené výsledky (viz. Graf 1) poukazují na to, že změna tlaku vzduchu má vliv na změnu průměrů vláken. Hodnota tlaku uvedená v megapascálech (MPa) je vynesena v dolní části grafu a hodnota průměrů vláken v mikrometrech (μm) je vynesena v levé části grafu. Na pravém okraji grafu je zanesena standardní odchylka pro průměry vláken [5].



Graf 1: Změna průměrů vláken při rozdílných tlakových hodnotách [5]

2.1.4 Zvlákňování biodegradabilních polymerů

Studie na toto téma byla publikována v časopise international Nonwoven Journal v březnu roku 2001 vědci A. H. Müller a A. Krobjilowski z University of Bremen. Tato práce se zabývala popisem postupu zvlákňování biodegradabilních (tento pojem bude blíže vysvětlen v kapitole 2.4) polymerů technologií melt-blown. Konkrétně se jednalo o polymery uvedené v tabulce (Tabulka 4) společně s parametry jako je hustota (density), teplota při zpracování (processing temperature) a index toku taveniny (melt flow rate) [6].

Tabulka 4: Druhy testovaných polymerů se základními parametry testování [6]

Polymer	Tradename	Density [g/cm ³]	Processing Temperature [°C]	Melt Flow Rate [cm ³ /10 min _{2,16;210}]
Polypropylene (PP)	-	0,91	180...220	25
Poly lactide (PLA)	-	1,25	180...210	142,8 (180 °C)
Polyesteramide (PEA)	BAK 1095	1,16	120...250	21
Polyvinylalcohol (PVAL)	Mowiol 585	1,28	180...220	10,5
Cellulosediacetate (CDA)	Bioceta	1,27	180...220	6
Polycaprolactone/ Thermoplastic Starch PCL/TPS	Bioplast GF 102/14	1,1	< 200	8,6

Experiment byl prováděn na melt-blown lince na University of Tennessee při standardní atmosféře, vlhkosti vzduchu 65% a teplotě okolí 20°C. Všechny materiály byly před zvlákňováním vysoušeny po dobu čtyř hodin a při teplotě 40°C. Průměry vláken byly následně vyhodnocovány pomocí Zellwanger OFDA (optical fiber diameter analyzer). OFDA je metoda založená na obrazové analýze. Snímky pro tuto analýzu byly pořizovány pomocí elektronového mikroskopu [6].

Polypropylen - PP

Tento materiál se dařilo snadno zvlákňovat při širokém rozsahu teplot a tvořil pavučinu z jemných vláken. V tomto případě se ovšem nejednalo o biodegradabilní polymer. PP byl využíván jako kontrolní vzorek pro testování ostatních biodegradabilních polymerů [6].

Poly lactid - PLA

Stejně jako PP se dařilo zvlákňovat při širokém teplotním rozsahu, avšak při teplotě nad 230°C se začala na pavučině tvořit hnědá místa, což znamenalo tepelné přetížení materiálu. Vyrobena pavučina byla křehká v ohybu [6].

Polyesteramide - PEA

Čistý PEA se ukázal jako velmi špatně zvlákňitelný. Výsledná vlákna měla délku jen pár milimetrů a nezachytávala se dobře na kolektor. Pro zlepšení průtoku byl přidán glycerin (3%), což vedlo k zřetelnému zlepšení zvlákňování. Výsledná pavučina měla velmi vysokou kvalitu, přirovnatelnou k pavučině získané z PP [6].

Polyvinylalcohol - PVAL

Materiál využitý pro toto testování již obsahoval 10% glycerinu. Ukázalo se, že PVAL v této formě je pro zvlákňování nepoužitelný. Vlákná se tvořila jen o délce několika milimetrů a nedošlo k žádnému zachycení na kolektor [6].

Cellulosediacetat - CDA

V prvním kole byl testován čistý CDA bez jakýchkoliv přísad. Stejně jako u PVAL došlo k tvorbě vláken o délce jen několika milimetrů a nedošlo k zachycení žádných vláken na kolektor. V druhém kole testování byl přidán glycerin (10%), ale ani to nepřineslo žádné znatelné zlepšení zvlákňovacího procesu [6].

Polycaprolacton/Thermoplastic Starch - PCL/TPS (Bioplats)

V tomto případě se testovala polymerní směs složená z PCL a TPS v poměru 60:40. Z čisté směsi se stejně jako z předešlých dvou polymerů PVAL a CDA nedařilo zvlákňovat. Následně byla testována směs s přidáním glycerinu až do poměru 10%. V tomto případě došlo k mírnému zlepšování. Při 10% obsahu glycerinu došlo dokonce k zvlákňování, avšak vytvořená vlákna byla příliš velká, měla nesouměrný průměr a velmi krátké délky. Vyrobená pavučina byla velmi lepkavá a při pokusech o sejmutí pavučiny z kolektoru docházelo k trhání, což znemožnilo další část testování pomocí obrazové analýzy [6].

Závěrem je možné konstatovat, že lze metodou melt blown zvlákňovat některé biodegradabilní materiály a jejich vlastnosti jsou srovnatelné s tradičními polymery jako například PP. Dále bylo poukázáno na ekologickou výhodnost těchto materiálů a vzhledem ke klesající ceně biodegradabilních polymerů také na velký potenciál pro jejich využití v některých oblastech netkaných textilií [6].

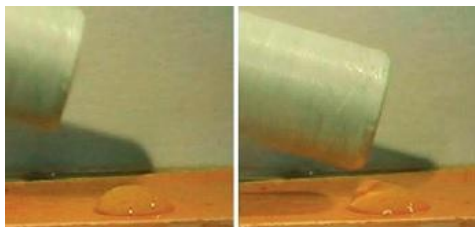
2.2 Elektrické zvlákňování

V této kapitole bude stručně přiblížena jedna z nejpoužívanějších metod tvorby nanovláken, která se nazývá elektrické zvlákňování. *"Elektrostatické zvlákňování je založené na samo-organizovaném vzniku nanovláken z polymerních roztoků, na které působí vnější elektrické pole o vysoké hodnotě intenzity"* [7]. Zařízení využívaná k elektrickému zvlákňování jsou na rozdíl od běžných textilních technologií, jako je například tkaní, pletení, či předení konstrukčně velmi jednoduchá. Složitější strojové části jsou zde nahrazeny fyzikálními jevy, jako je destabilizace volných hladin polymerních

roztoků nebo tavenin, které vedou k tvorbě polymerní trysky, bičování polymerní trysky nebo vypuzování molekul rozpouštědla z polymerní trysky v důsledku nárůstu chemického potenciálu při zmenšování poloměru trysky [7].

2.2.1 Historie

Historie spojená s elektrickým zvlákňováním se datuje již od roku 1600, kdy anglický fyzik, filozof a lékař W. Gilbert uveřejnil svůj výzkum. Zde popisuje svůj experiment, při kterém zelektrizoval jantarovou tyč třením a následně jí přiložil ke kulové kapce umístěné na suchém povrchu. Následkem toho se kapka deformovala do kónického tvaru (Obrázek 2) [8][9].



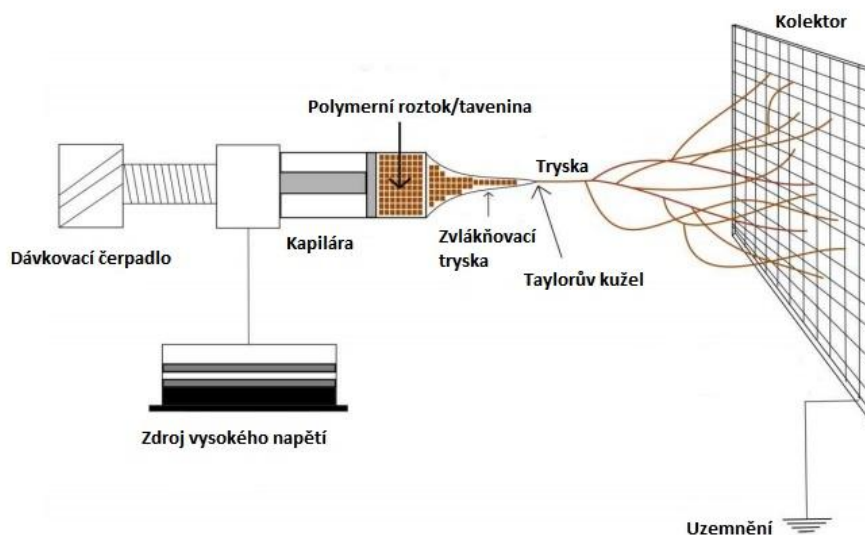
Obrázek 2: Znárodnění změny tvaru kapky při přiložení elektricky nabitě tyčky [9]

Další historické mezníky v oblasti elektrického zvlákňování dělí bezmála 300 let. Roku 1902 J. W. Mortonem vynalezl přístroj na výrobu nanovláken a zároveň si svůj vynález nechal patentovat. Tento přístroj fungoval tak, že polymerní roztok byl z kladně nabytého jiskřiště dopravován na záporně nabyté jiskřiště, k němuž byl připevněn řetěz, jenž zde měl funkci kolektoru. V letech 1934 - 1944 se pak objevil první pokus o průmyslovou výrobu nanovláken, který je spojen se jménem A. Formhals. Roku 1966 H. L. Simon si nechal patentovat přístroj na výrobu ultratenkých a ultralehkých nanovlákných textilií. Roku 1971 se P. K. Baumgartenovi podařilo elektricky zvláknit akrylová vlákna, která dosahovala průměru 0,05 - 1,1 mikrometrů [9]. V roce 2003 vynalezl O. Jirsák a jeho tým na Technické Univerzitě v Liberci způsob výroby nanovláken v průmyslovém měřítku. Jednalo se o revoluční objev, neboť přišel s tím, že je možné vytvořit taylorův kužel z volné hladiny kapaliny a ne jen z vrchu kapiláry jak tomu bylo doposud [10]. Elektrospinning se následně stal jednou z nejrozšířenějších technologií, na jehož principu se připravují materiály pro tkáňové inženýrství, nosiče pro řízené uvolňování léčiv, kryty ran, či vysoce účinné filtry [9].

2.2.2 Princip a způsoby elektrického zvlákňování

Podrobnější popis principů elektrického zvlákňování je uveden například v dílech *Principles of Electrospinning* od D. Lukáše [12], nebo v *A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites* od Z. Huang [13].

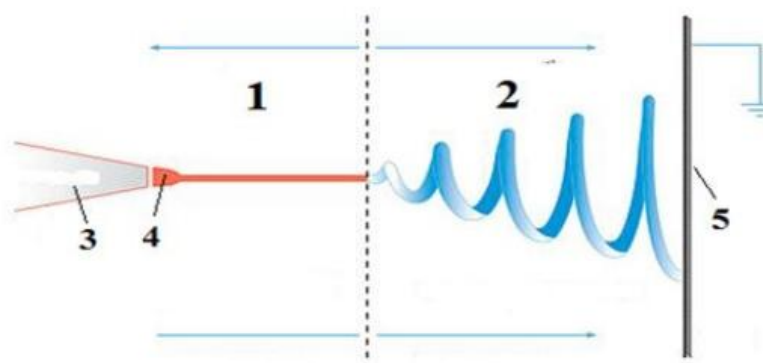
Jako příklad pro stručné vysvětlení principu elektrického zvlákňování zde bude popsána technologie el. zvlákňování z trysky (Obrázek 3). Základní části nutné pro proces el. zvlákňování z trysky jsou zdroj vysokého napětí generující nejčastěji stejnosměrný proud, elektricky nabitá tryska ve formě kapiláry, dávkovací čerpadlo, které má na starosti průběžné dávkování polymerního roztoku a dále uzemněný nebo opačně nabitý kolektor, na kterém se usazují vzniklá vlákna. Tvorba těchto vláken je způsobena vlivem vysokého napětí a rozdílem elektrického potenciálu mezi polymerním roztokem či taveninou a kolektorem. Díky tomu na polymerní roztok působí tři síly a to kapilární, elektrická a povrchové napětí. Tyto síly mají za následek formování Taylorova kužele. Se zvyšujícím se el. napětím dojde k překonání povrchového napětí a k tvorbě trysky z Taylorova kužele [11][12].



Obrázek 3: Základní schéma elektrického zvlákňování z trysky [12]

Proces mezi vznikem trysky a tvorbou vláken lze rozdělit na dvě části, a to na stabilní a nestabilní (Obrázek 4). V první části putuje proud polymeru od elektrody

směrem ke kolektoru přímočaře. Ve druhé části dochází k bičování a k odpařování rozpouštědla. Zároveň v této části dochází ke štěpení a k tvorbě vláken jejichž průměr se nejčastěji pohybuje v rozmezí 100 - 500 nm. Následně vlákna dopadají a usazují se na kolektoru, kde ztrácí zbytkový náboj a tvoří vláknennou vrstvu. Vzniklá vláknenná vrstva se v porovnání s ostatními technologiemi pro tvorbu polymerních nanovláknenných vrstev vyznačuje vysokou homogenitou, což je označováno jako jedna z hlavních výhod tvorby nanovláknenných vrstev technologií elektrického zvlákňování [12][13].



Obrázek 4: Základní schéma proudění polymerního roztoku při tvorbě vláknenné vrstvy z trysky: 1- oblast stabilního proudu, 2 oblast nestabilního proudu, 3- tryska, 4- Taylorův kužel, 5- uzemněný kolektor [1]

2.3 Elektronová mikroskopie

Historie elektronové mikroskopie spadá převážně do 20. století, přičemž se nejednalo o jednu velkou myšlenku jednoho vědce, ale postupné poskládávání celkové mozaiky z mnoha myšlenek a objevů, zároveň s postupným technologickým postupem. Základ této technologie byl položen roku 1897 vědcem J. J. Thompsonem, který jako první objevil a popsal elektron. Objevení elektronu souviselo se studiem elektrických výbojů v Geisslerově trubici. "Dalším krokem vedoucím k použití elektronů k zobrazení mikrosvěta byl poznatek, že rychle letící částice mají nejen korpuskulární, ale i vlnový charakter jako např. viditelné světlo." Tuto myšlenku publikoval roku 1925 Luis de Broglie [14].

Elektronová mikroskopie je metoda která nám umožňuje zkoumání mikrostruktur zvolených objektů. "Mikrostruktura je studována ve vakuu pomocí

elektronové- ho svazku, který vzniká emisí elektronů z katody, jež jsou dále urychlovány k anodě. Svazek je fokusován vhodně upraveným elektrickým, magnetickým nebo elektromagnetickým polem, aby bylo dosaženo požadovaného zvětšení. Elektronový svazek vytváří obraz interakcemi s pozorovaným preparátem". Pro zvýšení kontrastu obrazu pozorovaného preparátu se před samotným procesem mikroskopování provádí pokovování povrchu vzorku těžkými kovy (zlato, olovo, mangan apod.) [15].

Elektronová mikroskopie je rozdělená do dvou základních skupin, a to na transmisní elektronovou mikroskopii (TEM) a skenovací elektronovou mikroskopii (SEM) jejichž základní principy budou vysvětleny v následujících kapitolách.

2.3.1 Transmisní elektronová mikroskopie

První TEM byl sestaven roku 1931 na Vysoké škole technické v Berlíně roku 1931 E. Ruskou a jeho tehdejší profesorem M. Knollem. Jeho maximální zvětšení bylo pouze dvouseťnásobné, což bylo stejné jako u tehdejších optických mikroskopů. Rusk však ve svém vývoji pokračoval a za několik let se mu podařilo TEM zdokonalit natolik, že byl schopný dosáhnout třicetitisícového zvětšení. Na konci třicátých let již dosahovaly elektronové mikroskopy teoretického rozlišení 10 nm (pro srovnání teoretické rozlišení světelného mikroskopu je 200 nm) [14][15].

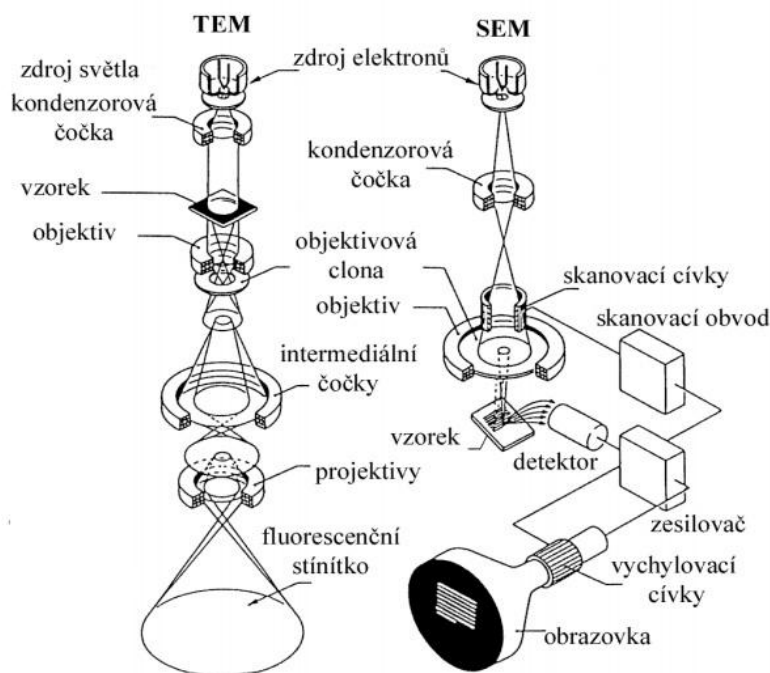
Základním principem transmisní elektronové mikroskopie je to, že elektrony pronikají skrz pozorovaný objekt. Vzhledem k tomu musí být pozorovaný objekt dostatečně tenký (100 - 500 μm dle typu TEM). Procházející elektrony interagují s pozorovaným objektem, čímž se odchylní od původního směru, jímž se pohyboval hlavní elektronový paprsek (někdy označován i jako elektronový svazek). Tyto odchylné elektrony jsou pomocí clony z elektronového svazku vyloučeny. Neodchylné elektrony dopadají na zobrazovací systém, díky němuž jsou transformovány na výsledný obraz [15].

2.3.2 Skenovací elektronová mikroskopie

Prvním impulsem k vývoji SEM byl vynález fotonásobiče, jenž sloužil k detekci sekundárních elektronů. S tímto vynálezem přišel roku 1938 V. Zvorykin, který byl vedoucím výzkumníkem v RCA laboratořích v Camden USA [14]. Jeho mikroskop dosahoval osmitisícového zvětšení a stabilního obrazu, avšak konečná kvalita obrazu nebyla příliš vysoká a tak byl jeho program zastaven. V roce 1948 byl na strojní fakultě

univerzity v Cambridge založen Ph.D. program pod vedením Ch. Oatleye. Oatley a jeho první žák D. McMullan se zabývali vývojem a konstrukcí SEM. O tři roky později se jim podařilo zkonstruovat první skenovací elektronový mikroskop, který dostal označení SEM1 [15].

Hlavním rozdílem oproti TEM je to, že u SEM elektrony neprocházejí skrz pozorovaný objekt, ale jsou odráženy zpět. Stejně jako u TEM se i zde tvoří elektronový paprsek. Tento paprsek se díky soustavě čoček soustřeďuje do co nejmenšího bodu (průměr 5 - 10 nm), jenž dopadá na pozorovaný objekt. Následně elektronový svazek přejíždí přes povrch pozorovaného objektu, což mu umožňují vychylovací cívký. Následkem dopadu elektronového paprsku na povrch jsou z objektu vyzářeny sekundární elektrony. Tyto elektrony jsou následně přitahovány k detektorům, kde dopadají na scintilátor s fotonásobičem. "Elektrický signál z fotonásobiče je zesílen a určuje intenzitu elektronového paprsku na obrazovce", kde je skládán do výsledného obrazu [16].



Obrázek 5: Základní schéma TEM a SEM s popiskem jejich základních částí [16]

2.4 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescence jako jev byl definován roku 1852 G. Stokesem, který si všiml, že vyzářené fluorescenční světlo má delší vlnovou délku než prvotní excitační paprsek, který byl na vzorek aplikován. Na základě Stokesových poznatků byl roku 1908 zkonstruován první fluorescenční mikroskop dvojicí A. Köhler a H. Siedentopf. Současná konstrukce fluorescenčních mikroskopů pochází z roku 1932 a jejímž autorem je E. Singera [17].

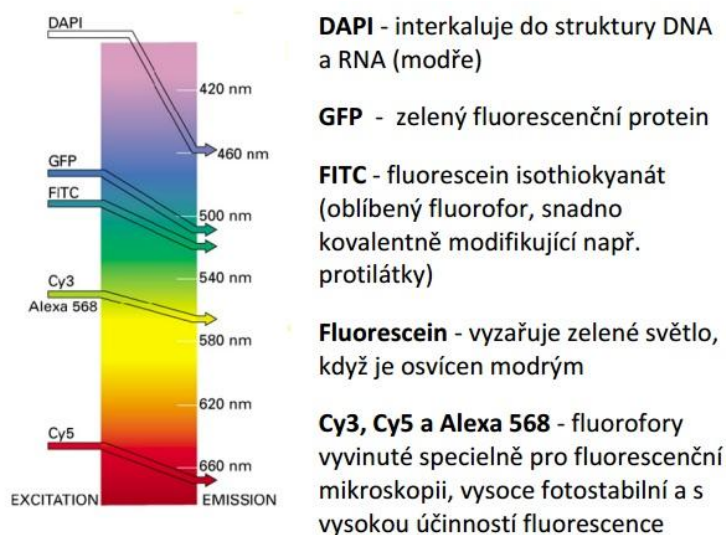
Fluorescenční mikroskopii lze charakterizovat jako světelnou mikroskopii, jež umožňuje pozorování fluoreskujících látek v organických i anorganických strukturách. Toto je způsobeno fluorofory, nebo-li látkami, které jsou po ozáření světlem schopny absorbovat světlo o určitých vlnových délkách a následně vyzářit (emitovat) viditelné světlo o delších vlnových délkách. Při tomto procesu dochází k ozáření atomu, kde za běžných okolností obíhají elektrony kolem jádra ve vrstvách, nebo-li orbitalech, s určitou energetickou hladinou. Tyto elektrony při UV záření absorbují energii a následně jsou excitovány do vyšší energetické hladiny. Ve vyšší hladině jsou však elektrony nestabilní, což vede k tomu, že jsou jádrem přitahovány zpět do původního stavu. Při návratu elektronů z vyšší energetické hladiny následně dochází k vyzáření fotonu. Tento jev se nazývá fluorescence, kterou lze dále rozdělit na dva základní typy a to na primární fluorescenci (autofluorescence) a sekundární fluorescenci [18][19].

Primární fluorescence

Tento typ fluorescence se vyskytuje pouze v některých buňkách jako jsou například rostlinné buňky nebo pletiva, dále u některých materiálů jako je například polycaprolacton (PCL). Vyskytuje se zde pojem autofluorescence, což znamená, že dané buňky či materiály již obsahují fluorescenční molekuly a není potřeba přidávat fluorescenční látky jako je tomu u sekundární fluorescence [19][20].

Sekundární fluorescence

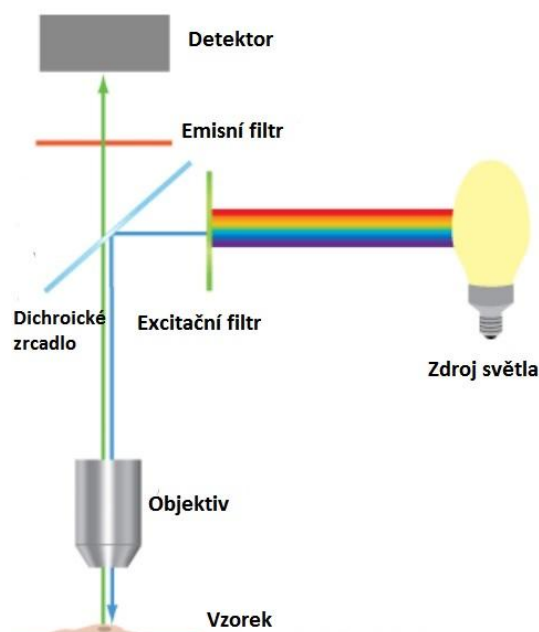
V tomto typu fluorescence musí nejprve dojít k aplikování fluorescenční látky na zkoumanou strukturu, jež nám následně po ozáření umožní její zobrazení. Mezi známé fluorescenční látky patří například 4',6-diamidin-2-fenylindol (DAPI), který se váže na buněčnou DNA a slouží k zobrazování buněčných jader, nebo phalloidin, který se využívá k vizualizaci buněčných membrán. Další příklady barviv i s jejich posunem vlnových délek jsou zobrazeny na obrázku (Obrázek 6) [19][20].



Obrázek 6: Příklady některých fluorescenčních barviv [19]

2.4.1 Fluorescenční mikroskop

Fluorescenční mikroskop je podobný klasickému světelnému mikroskopu, jenž je rozšířený o silný zdroj světla a dva druhy filtrů. Jedná se o excitační filtr a emisní filtr někdy též označovaný jako bariérový filtr (Obrázek 7). Excitační filtr se nachází mezi zdrojem světla a vzorkem, který umožňuje excitovat jednotlivé fluorofory světlem o určitých vlnových délkách. Emisní filtr je umístěn mezi pozorovaným vzorkem a okulárem. Do okuláru proniká pouze pozitivní emitovaný signál na černém pozadí, což má za následek vyšší citlivost. Další důležitou částí fluorescenčního mikroskopu je dichroické zrcadlo, které je nastaveno pod úhlem 45° a pomáhá excitačnímu a emisnímu filtru odstranit nežádoucí světlo. Dalšími částmi je objektiv a detektor, který společně s vhodným softwermem pro obrazovou analýzu umožňuje zpracování obrazového výstupu [19][20].



Obrázek 7: Schéma fluorescenčního mikroskopu [19]

2.5 Tkáňové inženýrství

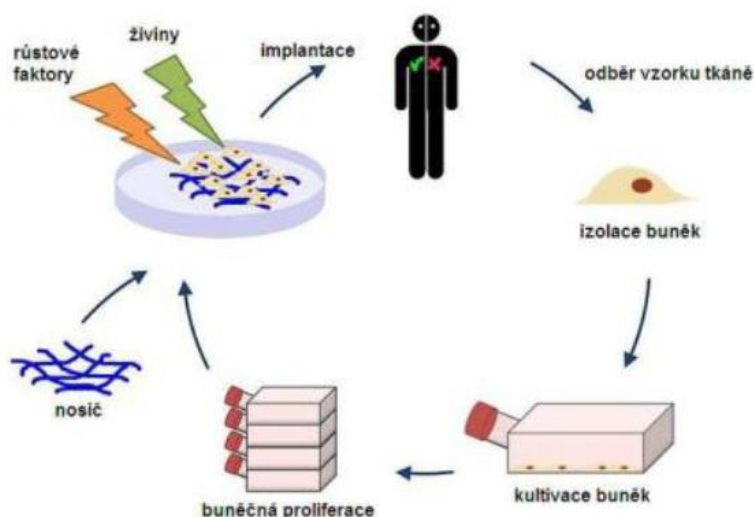
Následující kapitola nebude podrobně vysvětlovat veškerou problematiku tkáňového inženýrství, ale bude se snažit objasnit pojmy a principy z tkáňového inženýrství vztahující se k této diplomové práci. Bude zde přiblížen základní princip tkáňového inženýrství ve vztahu ke scaffoldům společně se základními pojmy jako jsou biodegradabilita a biokompatibilita.

2.5.1 Kultivace buněk na scaffoldech

Tkáňové scaffoldy se využívají především pro stimulaci růstu buněk, proto jsou buňky umístovány na tkáňové nosiče, které mají vhodnou strukturu. Nasazování buněk na nosič probíhá *in vitro*, což znamená mimo tělo. Buňky používané pro tento účel mohou být autologní, tedy takové, které byly odebrány přímo z pacientovy vlastní tkáně. Hlavní výhodou takto odebraných buněk je, že při následné implantaci nosiče do těla pacienta nedochází k imunitní reakci. Další možností je odběr alogenních buněk, což znamená od vhodného dárce. U tohoto způsobu se ovšem zvyšuje riziko následného odmítnutí nosiče při implantaci imunitním systémem pacienta. Poslední možností je odběr buněk heterologních (xenogenních), což znamená od jiného živočišného

druhu. Výhodou využití heterologních buněk je jejich poměrně snadná dostupnost. Nevýhodou je imunitní reakce těla pacienta, neboť se nejedná o buňky těla vlastní. Základní schéma postupu nasazení buněk na tkáňový nosič je znázorněn na obrázku (Obrázek 8) [22].

Další možností využití tkáňového nosiče je zavedení do in vivo prostředí (přímo do těla pacienta) bez předešlé buněčné in vitro kultivace. V tomto případě slouží tkáňový nosič jako náhrada chybějící extracelulární matrice a tím umožňuje tvorbu nové tkáně. Tkáňovým nosičem prorůstají vlastní buňky pacienta, čímž odpadá hrozba imunitní reakce [21].



Obrázek 8: Základní schéma procesu tkáňového inženýrství [26]

Biodegradabilita

Biodegradabilitu lze stručně popsat jako schopnost materiálu se ve fyziologickém prostředí rozpadnout na deriváty těla vlastní, které nezpůsobují nežádoucí odezvu organismu [23].

Například rychlost biodegradability u PCL se obecně pohybuje mezi 1 až 4 roky a je ovlivněna jeho počáteční molekulovou hmotností a mírou podílu krystalické fáze. " *Degradace probíhá rozkladem esterových vazeb polymerního řetězce na karboxylové a hydroxylové zbytky, které se dále rozpadají na metabolity těla vlastní* " [35].

Biokompatibilita

Pojmem biokompatibilita rozumíme vzájemnou interakci mezi neautogenním (nepůsobí sám na sebe) materiálem a vitální biologickou tkání. Lze ji také definovat jako schopnost materiálu, zařízení či systému plnit funkci bez klinicky významné odpovědi hostitele ve specifické aplikaci. U anorganických materiálů implantovaných do živého organismu posuzujeme mimo mechanicko-fyzikálních a chemických aspektů také účinky biologické, tedy reakci organismu s plochou umělého materiálu. Tento kontakt může vyvolat celou řadu následných reakcí a projevů, které se souhrnně označují pojmem bioinkompatibilita [24].

2.5.2 Morfologie kostní tkáně

Kost nebo latinsky os je orgán, na jehož stavbě se podílí kostní tkáň. Je jednou z nejtvrdějších tkání v těle - jedná se o specializované pojivo, které je tvořené buňkami, osteocyty, kolagenními vlákny a mineralizovanou mezibuněčnou hmotou. Kost slouží jako ochrana vnitřních orgánů, opora těla a upínají se na ní svaly a šlachy [27].

2.5.2.1 Kostní tkáň

"Kostní tkáň je mineralizovaná, vysoce vaskularizovaná, živá a adaptabilní pojivová tkáň". Podobně jako jiné, tkáň je kost tvořena buňkami a intercelulární matrix. Přibližně 40% hmotnosti dospělé kosti je tvořeno organickou složkou a to zejména kolagenem, zbytek hmotnosti doplňují anorganické soli převážně kalcium a fosfor. *"Uvnitř kosti vzájemně anastomozují cévní kanálky, které umožňují nutrici buňek, osteocytů, zalitých do kosti".* Kanálky také umožňují pohyb buněk jako osteoblastů (kost tvořící) nebo osteoklastů (kost resorbující). Vzhledem k tomu, že kost je živá a adaptabilní tkáň, tak se výše popsané obecné znaky mohou v detailech lišit dle stupně vývoje, mechanické zátěže a metabolické situace organismu. *"Pevnost a pružnost kostní tkáně jsou závislé na způsobu uspořádání složek její matrix"* [27]. Z tohoto důvodu rozlišujeme organizaci kosti na dva zásadně odlišné typy:

Kost primární (vláknitá)

Tato kost se u člověka vyskytuje za ontogeneze, v dospělosti například v místech drsnatin při úponu svalů a vazů. *"V kosti vláknité jsou kolagenní vlákna i krystalky minerálů mezi vlákny uspořádány nepravidelně".* Tenká vlákna se střídají s vlákny silnými a jejich vzhled připomíná osnovu tkané textilie. Vláknitá kost se v dospělosti objevuje v místech fraktur při nepřiměřené rychlé remodelaci a hojení kosti.

Primární kost je tvořena vysoce aktivními osteoblasty v době vývoje, v dospělosti může být její tvorba ovlivněna frakturou, růstovými faktory nebo prostaglandinem E2 [27].

Kost sekundární (lamelární, vrstvená, Haversova)

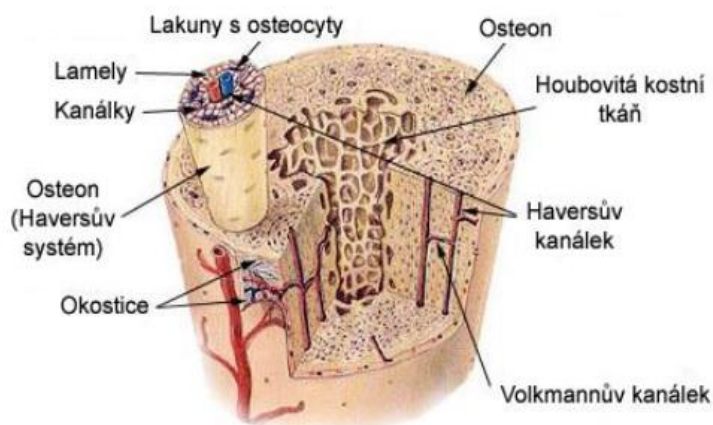
Kost sekundární během vývoje postupně nahrazuje kost primární a tvoří většinu dospělého skeletu. Lamelózní kost se v těle vyskytuje ve dvou formách:

- Kompakta - hutná kostní tkáň, které tvoří plášť kosti
- Spongioza - kostní tkáň houbovitá, která tvoří vnitřek kosti

Základní strukturní jednotku tvoří Haversovy systémy nebo také osteony. Odhaduje se, že v dospělém skeletu je přibližně na 21 miliónů osteonů [29].

2.5.2.2 Stavba kosti

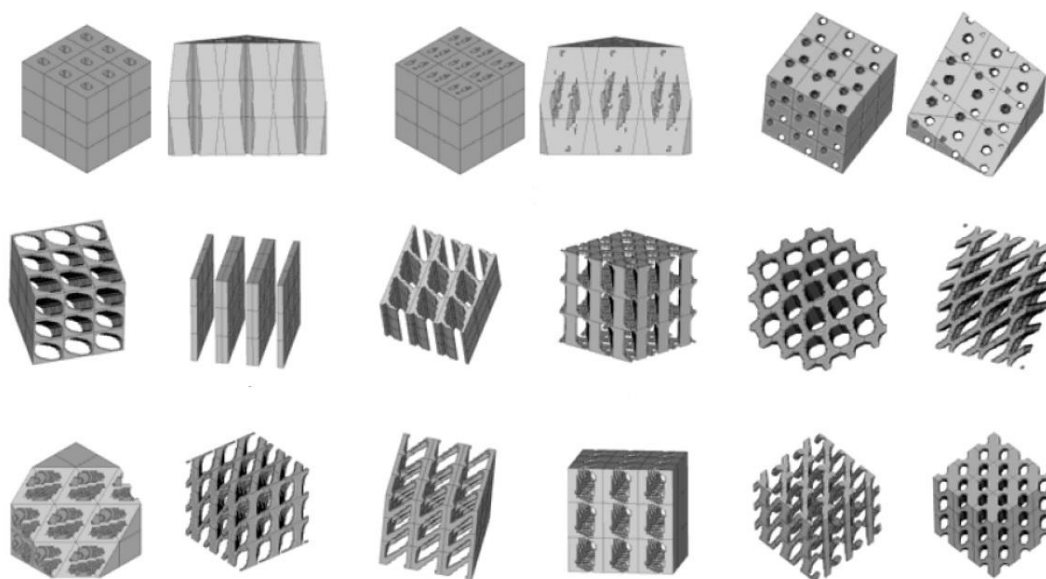
Povrch kosti (mimo například intraartikulárních povrchů) tvoří periost, nebo-li také okostice. Jedná se o tuhou blánu pokrývající kost mimo kloubních konců. Okostice je tvořena kolagenními vlákny a fibroblasty. Jejím zásadním významem je výživa kostí. Periost je inervován a zprostředkovává vedení kostní bolesti. Kost je dále tvořena vlákny zvanými Sharpeyova. Tyto vlákna vybíhají z vnitřní (kombinované) vrstvy periostu a pronikají do kostní matrix [29].



Obrázek 9: Příklad schématu kosti [30].

2.6 Scaffoldy

Scaffold, nebo-li tkáňový nosič, či lešení je speciální struktura využívaná v tkáňovém inženýrství pro podporu růstu buněk a tkání. Lze si ho představit jako houbovitou strukturu (Obrázek 10) vzhledem k jeho pórovitosti, která je důležitá pro správný růst buněk a zásobování těchto buněk potřebnými živinami. Scaffoldy jsou úspěšně využívány v medicíně, kde slouží k rekonstrukci nebo k nahrazení poškozené tkáně přímo v těle pacienta. Scaffoldy se dají připravit řadou postupů, jež lze rozdělit na vlákenné technologie a technologie, které nevyužívají vláken jako stavebního prvku. Do příprava scaffoldů vlákennou technologií patří metody pletení, tkaní, netkaných textilií, nebo kombinací výše zmíněných způsobů. Textilní materiály se využívají pro jejich všestranné a přizpůsobivé vlastnosti. Do skupiny technologií, které nevyužívají vláken jako stavebního prvku, patří metody self-assembly, solvent casting, rapid prototyping a laser-assisted bioprinting [29][28]. Hlavním záměrem u všech uvedených technologií je vyrobit scaffold, který by se co nejvíce blížil svou strukturou ke struktuře mezibuněčné hmoty.



Obrázek 10: Příklady různých struktur scaffoldů [39]

2.6.1 Příprava scaffoldů

„Připravované tkáňové nosiče musí pro jejich správnou funkci splňovat celou řadu vlastností. Strukturou se blíží podobě extracelulární matrice, tedy mezibuněčné tkáňové struktury tak, aby mohly buňky dostatečně proliferovat a popřípadě diferencovat.“ [31]. Těchto vlastností můžeme dosáhnout vhodnou velikostí pórů a jejich vzájemnou kontinuitou. Vzhledem k předpokladu implantace scaffoldu do těla pacienta, musí být tento nosič biokompatibilní a biodegradabilní. Což znamená, že nebude vyvolávat žádnou imunitní reakci v těle pacienta a dále se v průběhu léčebného procesu rozpadne v těle na deriváty tělu vlastní. Dalšími důležitými vlastnostmi při přípravě tkáňového nosiče jsou mechanické vlastnosti a specifický povrch, který bude zajišťovat dostatečnou buněčnou adhezi [32].

Materiály využívané pro přípravu tkáňových nosičů můžeme rozdělit dle původu na přírodní a syntetické. Mezi přírodní materiály patří například:

Kolagen

Kolagen je vláknitá ve vodě nerozpustná bílkovina, která tvoří základ pojivých tkání (vaziv, chrupavek a kostí). V současné době je známo minimálně 27 různých typů kolagenů, jenž každý v organismu plní svou specifickou roli. Nejdůležitějšími kolageny jsou typy I, II, III, IV a V. Nejrozšířenějším typem je kolagen typu I, který představuje přibližně 90% ze všech kolagenů v organismu. Vyskytuje se v pokožce, šlachách a kostech [33].

Želatina

Želatina se připravuje z kolagenu denaturací teplem nebo bazickou či acidickou hydrolyzou. Je rozpustná ve vodě a v ředěných organických nebo minerálních kyselinách. Vzhledem k velmi dobrým biodegradabilním a biokompatibilním vlastnostem mají vlákna tvořená ze želatiny dobré předpoklady pro využití v regenerativní medicíně. Většímu rozšíření tvorby nanovláken ze želatiny však brání problémy s jejím síťováním a vysoká hydrofilita [33]

Celulóza a její deriváty

Nanovláknina tvořená z celulózy se v současné době dostávají stále víc do popředí a to díky své dobré teplotní stabilitě, chemické odolnosti a biodegradabilitě. *"Acetát celulózy patří mezi základní deriváty, které se využívají v tkáňovém inženýrství"*.

Zajímavým materiálem je bakteriální nanocelulóza, která se produkuje pomocí biosyntézy z bakteriálního kmene *Gluconoacetobacter xylinus*. Nanovláknna tvořená z tohoto materiálu pak mají průměry pod 100 nm, což umožňuje velmi dobrou adhezi eukaryotních buněk [34].

Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová je přirozenou součástí lidského těla. Zde slouží k hydrataci pokožky (největší množství je obsaženo v kůži) a je součástí vaziva, oka, kloubů, srdce, cév, mozku a dalších tělních struktur. Dále se vyskytuje u novorozenců (několik dnů po porodu), kde slouží k bezjizvnatému fetálnímu hojení ran. Přední vlastností kyseliny hyaluronové je vysoká afinita k vodě. Této vlastnosti využívá například produkt Hyiodine firmy CONTIPRO Pharma a. s. Jejich produkt obsahuje vysoce kvalitní kyselinu hyaluronovou a jód v necytotoxické koncentraci 0,25%. Kyselina hyaluronová nasává z okolí tkáně tekutinu s růstovými faktory, čímž zajišťuje dostatečnou hydrataci a výživu místa kožního defektu, což vede ke zlepšení procesu hojení [34].

Mezi hlavní vlastnosti výše zmíněných biomateriálů patří jejich velmi dobrá biokompatibilita a biodegradabilita. Nevýhodou je, že nelze ovlivňovat jejich specifické vlastnosti do takové míry, jako toho lze dosáhnout u syntetických biomateriálů. Z tohoto důvodu se při výrobě dává většinou přednost syntetickým biomateriálům jako například:

Kyselina polyglykolová (PGA) a její kopolymery

Jedná se o biokompatibilní a biodegradabilní materiál s velmi dobrými mechanickými vlastnostmi a zvýšenou odolností vůči vnějšímu prostředí. Teplotu tání má PGA 225-230 °C a jedná se o polymer s mnohostranným využitím v medicíně. Nevýhodou PGA je, že při vysoké koncentraci může dojít vlivem poklesu pH v tkáních ke vzniku zánětlivé reakce a tím k jejímu poškození. "*Konečným rozpadovým produktem je konverze na oxid uhličitý a vodu, které jsou z organismu vyloučeny močí a respiračním systémem*" [34].

Polykaprolakton (PCL)

Jedná se o jeden z prvních polymerů syntetických skupin, který byl objeven roku 1930 skupinou Prof. Carathose. V současné době je PCL jedním

z nejpoužívanějších polymerů v oblasti tkáňového inženýrství. PCL je biologicky odbouratelný polyester s nízkou teplotou tání 60°C, jenž patří do skupiny alifatických polyesterů. Vyznačuje se dobrou biodegradabilitou vzhledem k podobnosti jeho chemické struktury s konstitucí tuků a olejů, tedy přirozenému prostředí, které využívají mikroorganismy jako zdroje uhlíku. PCL je také významný z hlediska biokompatibility s živými organismy. I z tohoto důvodu je jeho využití směřováno do oblasti medicíny [35][36].

2.6.2 Scaffoldy pro kostní tkáň

Transplantace buněk/tkání umístěných na tkáňových nosičích je jedním z nejslibnějších technik u ortopedických operací a biomedicínského inženýrství. Léčebné koncepty založené na těchto technikách by měli odstranit problémy vzniklé imunitní reakcí pacienta, nebo přenosem patogenu [37][38].

2.6.3 Způsoby výroby scaffoldů pro kostní tkáň

V současné době je známo více jak 10 technologií výroby scaffoldů pro kostní tkáň. Výběr metody přípravy tkáňových nosičů závisí na chemické struktuře materiálu a na požadovaných chemických a fyzikálních vlastnostech. V této kapitole jsou uvedeny některé příklady metod přípravy scaffoldů pro kostní tkáň.

Pojení vláken (fibre bonding)

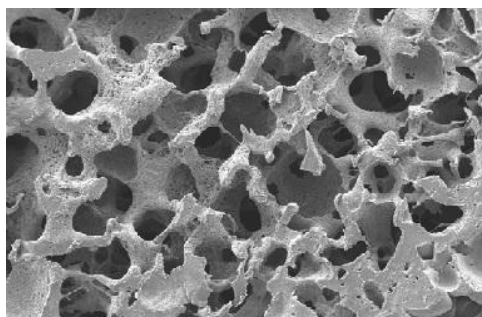
Princip této metody spočívá v tom, že se nejprve vytvoří vlákenná vrstva z PGA vláken a současně se vytvoří roztok PLA a rozpouštědla (methylen chlorid). Následně je roztok nanesen na vlákennou vrstvu z PGA a rozpouštědlo je odstraněno pomocí vakuového sušení. Vzniklý materiál je tvořen nepropojenou vrstvou vláken PGA zapuštěných v matrici z PLA. V další fázi dojde k zahřívání vzniklého kompozitu na teplotu tání PGA, čímž dojde ke spojení PGA vláken. Poté následuje poslední krok výroby, čímž je opětovného aplikování rozpouštědla a odstranění PLA.

Takto vytvořený scaffold má velký měrný povrch a vysokou pórovitost. To napomáhá snadnému uchycení buněk na povrchu a následnému šíření buněk do vnitřku scaffoldu. Nevýhodou je nedostatečná ovlivnitelnost pórovitosti, složitost procesu výroby a toxicita používaného rozpouštědla [37].

Vymývání částic (particle leaching)

V metodě vymývání částic se využívají pro tvorbu pórů porogeny, což mohou být například částice solí, cukrů nebo vosků. Porogeny požadovaných tvarů, rozměrů a vlastností jsou umístěny do formy, v níž mají přesně definované uspořádání. Následně se do formy nalije vhodný v rozpouštědle rozpuštěný polymer. V dalším kroku je odpařeno rozpouštědlo, což vede ke vzniku tuhého materiálu složeného z polymeru a částic porogenu. Konečným krokem je rozpuštění a vmytí částic porogenu.

Hlavní výhodou této metody je regulovatelnost velikosti, tvaru pórů a jejich propojení. Díky tomu se jedná o velmi populární metodu tvorby scaffoldů v tkáňovém inženýrství [39][40].



Obrázek 11: Ukázka finální struktury povrchu scaffoldu - metoda vymývání částic

Formování taveniny (melt molding)

Jedná se o podobnou techniku jako vymývání částic. Metoda zahrnuje směs polymerního prášku smíchanou s želatinovými mikrokuličkami nebo s jiným vhodným porogenem, která je umístěna do formy s požadovaným rozměrem a tvarem. Následně je směs zahřátá nad teplotu skelného přechodu použitého polymeru. Posledním krokem je odstranění porogenu ze vzniklé kompozitní struktury vhodným rozpouštědlem.

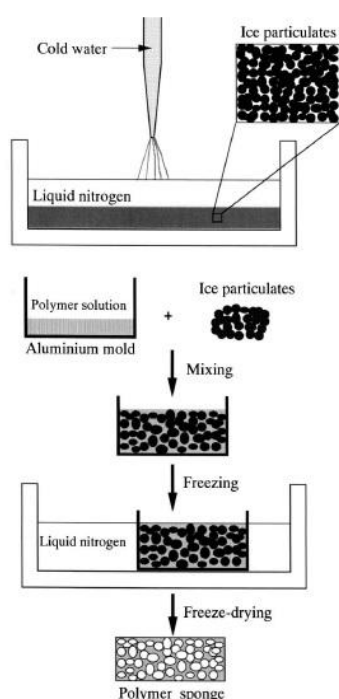
Vzhledem k využívání želatiny jako porogenu není potřeba aplikace žádných toxických rozpouštědel. Menší nevýhodou je nutnost vytvoření vyšší teploty pro překonání skelného přechodu polymeru [39].

Ledové částice jako porogen (ice particles as porogens)

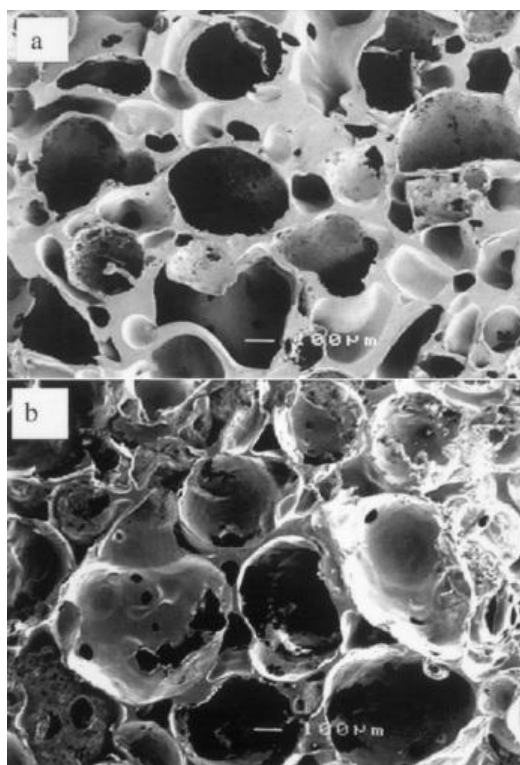
V této metodě se využívalo vody ve formě ledu jako částic k pozdějšímu vmytí. Voda se rozprašuje přes kapalný dusík, což vede k okamžitému zmrznutí vody a zachování kulatého tvaru kapek. Takto zmrzlé kapky se promíchají se směsí polymeru

a rozpouštědla (chloroformu) při okolní teplotě -20°C . Vzniklá směs je následně vystavena sušení za mrazu (přibližně -80°C), přičemž dochází k odstranění/vymražení chloroformu. Poté je vytvořená struktura umístěna do prostředí o pokojové teplotě (okolo 25°C), což vede k roztavení doposud zmrzlých kapiček vody a vzniku porézní struktury (Obrázek 13).

Výhodou této metody je poměrně snadná regulovatelnost velikosti pórů a jejich vzájemného propojení. Nevýhodou je náročnější manipulace s kapalným dusíkem a práce při velmi nízkých teplotách [41].



Obrázek 12: Schéma procesu ice particles as porogens[39]



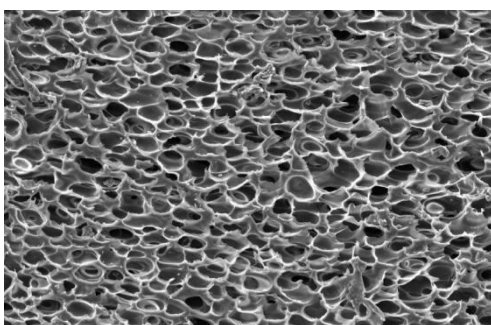
Obrázek 13: Ukázka finální struktury povrchu scaffoldu - metoda ledových částic. A) 70% zastoupení ledových částic z celkového objemu scaffoldu, B) 80% zastoupení ledových částic z celkového objemu scaffoldu [41]

Zpěňování plynem (gas foaming)

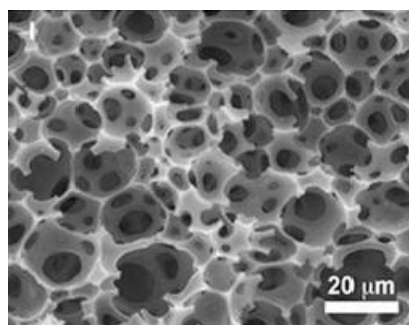
Metoda zpěňování plynem byla vyvinuta se záměrem vyhnout se používání toxických rozpouštědel a pevných porogenů. Namísto porogenů je zde využíván plyn. V první fázi je vytvořena struktura z vhodného polymeru. Jednou z možností je například lisování do vyhřívané formy. Následně je vytvořená struktura umístěna do speciální komory, kde na ní pod vysokým tlakem působí určitý plyn (běžně CO_2). Tlak je postupně snižován až na hodnotu atmosférického tlaku. V průběhu tohoto procesu se

postupně formují póry až do výsledné struktury, které je dostatečně pórovitá (Obrázek 14).

Jak již bylo řečeno v úvodu výhodou tohoto procesu je nepotřeba využití toxických rozpouštědel, dále zpracování za normální teploty, což umožňuje inkorporaci léčiv citlivých na vyšší teplotu. Značnou výhodou je také vysoká porozita (až 90%) vzniklé struktury. Nevýhodou je omezené množství využitelných polymerů vzhledem k potřebě vysokého amorfního podílu. Další nevýhodou je, že pouze 10-30% pórů je propojeno [42].



Obrázek 14: Ukázka finální struktury povrchu scaffoldu - metoda zpěňování plynem [42]



Obrázek 15: Ukázka finální struktury povrchu scaffoldu - metoda separace fází [37]

Separace fází (phase separation)

Princip této metody je založen na mísitelnosti páru rozpouštědlo-nerozpouštědlo pro použitý polymer. Prvním krokem procesu je rozpuštění polymeru ve vhodném rozpouštědle a následné nalití vzniklého polymerního roztoku do rezervoáru s nerozpouštědlem. Díky tomu dojde k vysrážení polymeru a vzniku porézního scaffoldu (Obrázek 15).

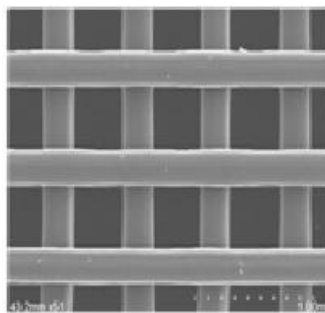
Jako výhody lze jmenovat snadnou ovlivnitelnost výsledné struktury a velikost pórů. Nevýhodou je citlivost metody na přesnost obsluhy a vlivy používaných zařízení [37].

Rapid prototyping

Na rozdíl od všech výše zmíněných metod, kdy se jednalo více či méně o náhodné tvoření a propojování pórů je tato metoda založena na přesném předdefinování požadovaných vlastností před samotným procesem výroby pomocí CAD

systemu (počítačem podporovaný design). To znamená, že model (scaffold) je navržen pomocí počítače a následně jsou data převedena do tiskárny pro trojrozměrný tisk, kde dojde k vytištění navrženého modelu (Obrázek 16). Jako největší výhody této metody lze uvést úsporu času a finančních prostředků potřebných k vývoji nového modelu scaffoldu [43].

V současné době existuje několik metod založených na technice rapid prototyping. Jedná se například o stereolitografii, selektivní laserové spékání, modelování laminovaných objektů, modelování ukládáním taveniny a trojrozměrný tisk [39].



Obrázek 16: Ukázka příkladu finální struktury povrchu scaffoldu - metoda 3D tisk [43]

3 Experimentální část

Experimentální část vychází z poznatků uvedených v Diplomové práci J. Erbena [31]. Ve zmíněné práci se pro využití v tkáňovém inženýrství ve vztahu k regeneraci kostní tkáně jevil velmi slibně materiál, který ve své struktuře obsahoval směs nano a mikrovláken.

Cílem experimentální části bylo optimalizovat výrobní proces kombinující melt blown a elektrického zvlákňování. Následně vytvořit několik druhů materiálů s rozdílným zastoupením nano a mikrovláken ve své struktuře, dále ověřit rozdílné zastoupení nano a mikrovláken ve struktuře vyrobených materiálů pomocí obrazové analýzy. Posledním bodem experimentální části bylo biologické testování, které zkoumalo životaschopnost buněk na materiálech ve vztahu k rozdílnému zastoupení nano a mikrovláken a posouzení vhodnosti vytvořených materiálů pro využití v regenerativní medicíně.

Technologie výroby požadovaných struktur byla založena na kombinaci dvou rozdílných postupů pro výrobu vláken. Pro výrobu mikrovláken byla využita technologie melt blown, zatímco nanovlákná byla tvořena technologií elektrického zvlákňování. Předpokladem pro docílení rozdílného zastoupení nano a mikrovláken ve struktuře byla změna rychlosti šroubu extrudéru a tím ovlivněné množství tvořených mikrovláken. Vláknenné vrstvy byly tvořeny z biodegradabilního polymeru - polycaprolactone (PCL).

Hodnocení strukturních vlastností materiálů bylo prováděno pomocí SEM a obrazové analýzy. Záměrem bylo zhodnotit strukturní vlastnosti vyrobených materiálů ve vztahu k rozdílným výrobním parametrům. Konkrétně bylo hodnoceno zastoupení nano a mikrovláken, průměry vláken a velikosti mezivláknenných prostor. Dalším bodem byl pokus o nalezení vhodnější metody pro hodnocení zastoupení nanovláken ve vrstvách. Pro tyto účely byly vytvořeny vrstvy z dvou rozdílných materiálů. Jeden z materiálů sloužil k tvorbě mikrovláken (PCL) a druhý k tvorbě nanovláken (PVB/PVDF).

Pro biologické testování byly využity buňky lidské nádorové linie kostních osteoblastů označovaných jako MG63, jež byly nasazeny na vyrobené materiály. Záměrem bylo pozorovat a vyhodnotit chování a životaschopnost buněk po dobu čtyř týdnů, dále na základě získaných poznatků posoudit vhodnost materiálů pro využití

v regenerativní medicíně. Konkrétně byla hodnocena viabilita buněk a schopnost buněk šířit se do vnitřních struktur testovaných materiálů. Hodnocení bylo prováděno pomocí MTT testu, SEM a fluorescenční mikroskopie.

3.1 Průběh a optimalizace procesu výroby objemných mikro-nanovlákných vrstev s rozdílným zastoupením mikro a nanovláken

Hlavní náplní této kapitoly byla snaha vytvořit stejnou výrobní technologií tři vláknenné materiály s různým zastoupením mikro a nanovláken ve struktuře. Jedním z těchto materiálů byl zvolen materiál vyráběný a testovaný v předchozím výzkumu [31]. U tohoto materiálu jsou známé přesné technologické proměnné při výrobě, biologická odezva na jeho strukturně, materiálové vlastnosti, struktura samotná a především objemový podíl nanovláken ve struktuře dosahující 1%. Materiál s touto známou strukturou bude tedy sloužit jako výchozí materiál, od kterého se bude odvíjet výroba dalších dvou materiálů, a také jako jistý srovnávací element.

S ohledem na strukturní parametry výchozího materiálu bude snahou vyrobit jeden materiál s objemovým podílem nanovláken 0,5% a druhý s objemovým podílem 2%.

Jako hlavní výrobní proměnná, kterou bylo možno při výrobě regulovat poměr mikro a nanovláken ve struktuře, byla regulace otáček šroubu extrudéru, tedy v důsledku objemu vytlačovaného polymeru a tím i množství tvořených mikrovláken v závislosti na čase. Byl tedy stanoven předpoklad, že snížením otáček šroubu extrudéru o 50 % oproti nastavení pro výchozí materiál vytvoříme materiál s objemovým zastoupením nanovláken 0,5%. Naopak zvýšením otáček šroubu o 100% vyrobíme materiál s objemovým zastoupením nanovláken 2%.

Cílem optimalizace bylo tedy stanovení výrobních rychlostí v závislosti na nastavení koeficientu rychlosti na samotném zařízení, které nedovolovalo nastavení otáček v jednotkách ot/min ale pouze přes koeficient s neznámým přepočtem. Tento koeficient navíc nevykazoval přímý lineární dopad na udělené otáčky šroubu extrudéru.

3.1.1 Optimalizace parametrů technologie melt - blown

Zařízení využívané k výrobě vláknenných vrstev bylo umístěno v prostorách poloprovozu Katedry netkaných textilií a nanovláknenných materiálů. Jednalo se o plně

funkční laboratorní zařízení melt-blown od firmy J & M LABORATORIES (Obrázek 17). Vzhledem ke stáří přístroje (několik desetiletí), nebyla zachována žádná technická dokumentace, proto prvním bodem optimalizace bylo zjistit vztah otáček volitelných na přístroji (přes neznámý koeficient) ke skutečným otáčkám šroubu extrudéru za minutu.



Obrázek 17: Melt - blown zařízení J & M LABORATORIES

Jako výchozí bod byl zvolen koeficient nastavitelný na přístroji s hodnotou 100. K měření otáček šroubu extrudéru byl využit digitální otáčkoměr. Pro danou výchozí rychlost bylo naměřeno 7,5 ot/min. Následně byla hodnota koeficientu na přístroji snížena o polovinu na 50 za účelem zjištění, zda dojde ke snížení rychlosti šroubu extrudéru taktéž o polovinu. Po naměření rychlosti 2,3 ot/min bylo prokázáno, že zde není lineární vztah mezi hodnotou koeficientu nastavitelnou na přístroji a otáčkami šroubu extrudéru. Vzhledem k tomuto faktu byly následně důkladně proměřeny rychlosti šroubu extrudéru ve vztahu k nastavitelným koeficientům na přístroji (Tabulka 5). Zároveň byly stanoveny přesné hodnoty nastavitelného koeficientu na přístroji tak, aby odpovídaly požadovanému snížení o 50% a zvýšení o 100% rychlosti otáček šroubu extrudéru. Pro tyto požadavky odpovídaly hodnoty koeficientu na přístroji 63,100 a 172 (Tabulka 6).

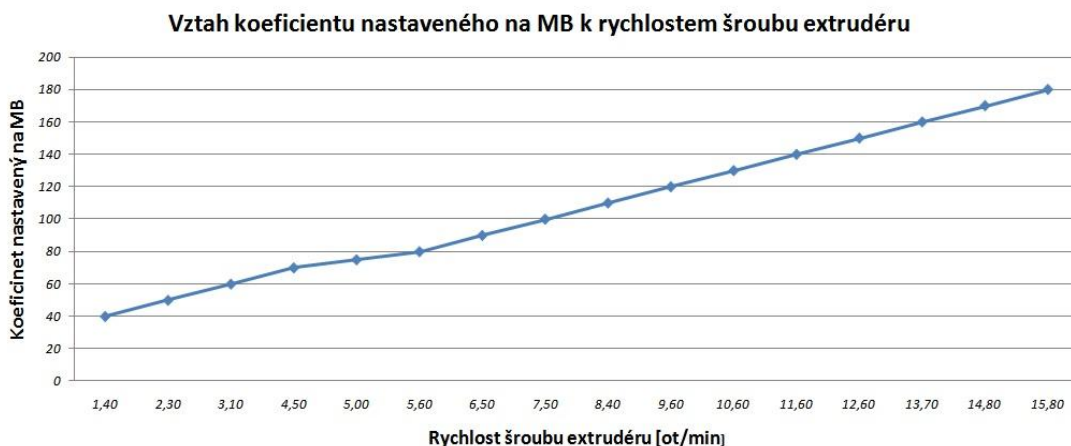
Tabulka 5: Naměřené rychlosti otáček šroubu extrudéru vzhledem ke koeficientu nastavitelnému na MB

Koeficient nastavený na mb	40	50	60	70	80	90	100	110
Rychlost šroubu extrudéru [ot/min]	1,4	2,3	3,1	4,5	5,6	6,5	7,5	8,4

Koeficient nastavený na mb	120	130	140	150	160	170	180
Rychlost šroubu extrudéru [ot/min]	9,6	10,6	11,6	12,6	13,7	14,8	15,8

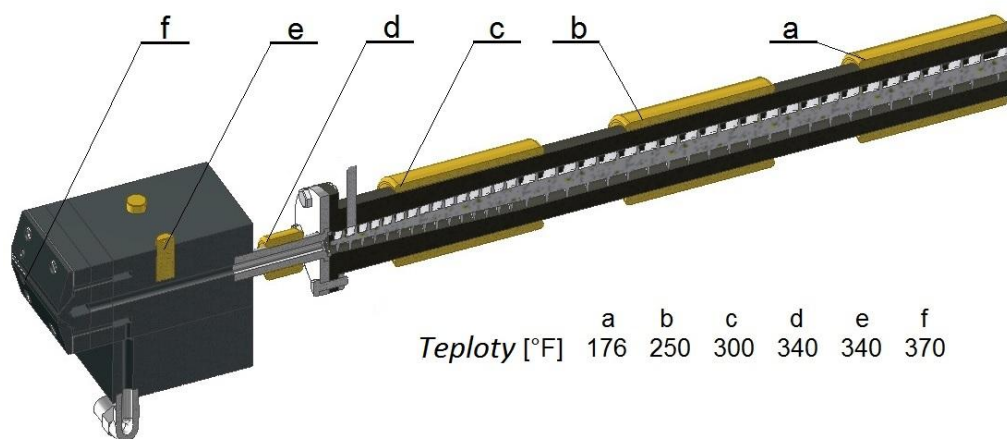
Tabulka 6: Nastavené hodnoty koeficientu na MB v poměru se skutečnými otáčkami využívané v průběhu výrobního procesu

Koeficient nastavený na mb	63	100	172
Rychlost šroubu extrudéru [ot/min]	3,75	7,5	15



Graf 2: Zobrazení vztahu koeficientu nastaveného na MB k rychlostem šroubu extrudéru

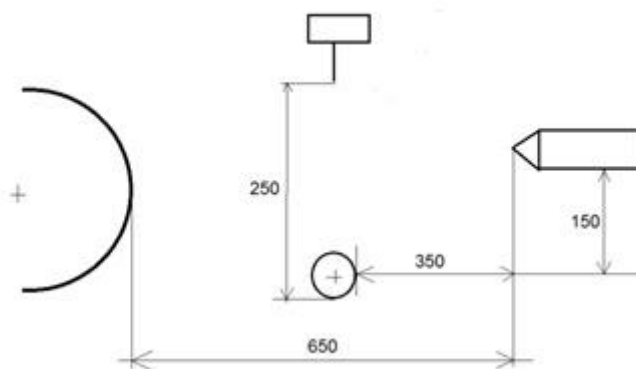
Před samotným procesem výroby bylo dále zapotřebí nastavit teploty jednotlivých vyhřívacích zón zařízení (Obrázek 18). Tyto hodnoty byly převzaty v návaznosti na předešlou diplomovou práci [31] a jeví se jako nejideálnější pro daný polymer.



Obrázek 18: Schéma nastavení hodnot teplot v jednotlivých zónách extrudéru a trysky

3.1.2 Optimalizace finálního uspořádání pro kombinaci technologií MB a el. zvlákňování.

Pro záměr tvorby vlákných vrstev s kombinací nano a mikrovláken bylo zapotřebí začlenit do výrobního procesu zařízení na tvorbu nanovláken, jímž byl strunový spinner s možností regulace otáček. Spinner byl napojený na kladně polarizovaný zdroj vysokého napětí. Kolmo proti spinneru ve vertikálním směru byla umístěna ojhlená protielektroda, která byla napojená na záporně polarizovaný zdroj vysokého napětí. Toto zařízení bylo umístěno mezi MB a kolektor. Vzdálenosti vzájemného prostorového uspořádání byly převzaty z předešlé Diplomové práce [31].



Obrázek 19: Schéma vzájemného uspořádání jednotlivých komponentů výrobních technologií MB a ELS s uvedenými vzájemnými rozměry [31]

3.1.3 Výroba vrstev z PCL kombinací technologií melt - blown a elektrického zvlákňování

Pro výrobu vrstev kombinací technologií melt blown a elektrického zvlákňování byl využit princip unášení nanovláken vzduchem, který byl detailně popsán v Bakalářské práci J. Erbena [44]. Podstatou procesu bylo strhávání nanovláken (jenž byly tvořeny mezi elektrodami) proudem vzduchu, který již unášel mikrovlákna tvořená melt blown zařízením.

Pro proces elektrického zvlákňování byl použit polymerní roztok 16% PCL Mn = 45 000 - Sigma Aldrich. Daný polymer byl rozpuštěn v rozpouštědlovém systému chloroform - etanol v poměru 9:1. K procesu rozpouštění bylo využito mechanické míchání pomocí míchátko, které bylo umístěno do nádoby s polymerním

roztokem. Následně se nádoba umístila na míchačku. Míchačka byla nastavena na 200 ot/min. Proces trval tak dlouho, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění PCL.

Výrobní proces byl zahájen nastavením teplot na MB zařízení. Po 10 min ohřevu byl zapnut pohon a přes násypku dopraven do zařízení PCL ve formě granulí. Rychlost šroubu extrudéru byla nastavena na 2,5 ot/min po dobu 10min, aby došlo k důkladnému roztavení PCL. Následně byla rychlost zvýšena na výrobní (Tabulka 6). Současně byl vlit připravený polymerní roztok do zásobníku, v němž rotoval strunový spinner rychlostí 30 ot/min v protisměru hodinových ručiček. Směr rotace byl zvolen čistě z důvodu usnadnění pozdějšího dolévání polymerního roztoku do zásobníku a na samotný proces výroby neměl vliv. Následně byly puštěny zdroje vysokého napětí. Jako startovní napětí bylo nastaveno -20 kV a +15 kV. Toto napětí se v průběhu procesu postupně měnilo až na hodnoty -35 kV a +20 kV z důvodu změny viskozity polymerního roztoku vlivem postupného odpařování rozpouštědlového systému do ovzduší. Z důvodu potřeby doplňování polymerního roztoku do zásobníku, musela být výroba přerušována a polymerní roztok doplňován. Nutnost přerušování byla posuzována vizuálně (struny spinneru se přestaly smáčet v polymerním roztoku) a to přibližně každých 10min. V době přerušování byla zahrazena dráha mezi MB a kolektorem, aby nedocházelo k nafoukávání pouze mikrovláken, dále k vypnutí zdrojů vysokého napětí a manuálnímu očištění strun na strunovém spinneru. Po doplnění polymerního roztoku následovalo opětovné navrácení předešlých výrobních podmínek. Výrobní proces trval 120 min při koeficientu 63, 60min při koeficientu 100 a 30min při koeficientu 172. Výroba probíhala při okolní teplotě 21,4 °C a vlhkosti vzduchu 29,3%.

Po dokončení výrobního procesu (Obrázek 20) byly vrstvy odebrány z kolektoru. Velikost vyrobených vrstev byla přibližně velikost formátu A4 o tloušťce cca 5mm (Obrázek 21).

Pro veškerá následná testování v této Diplomové práci je využito označování vzorků na základě nastavené hodnoty koeficientu u MB zařízení a to ME63, ME100 a ME172. Zkratka ME označuje kombinaci technologií melt-blown a elektrického zvlákňování.

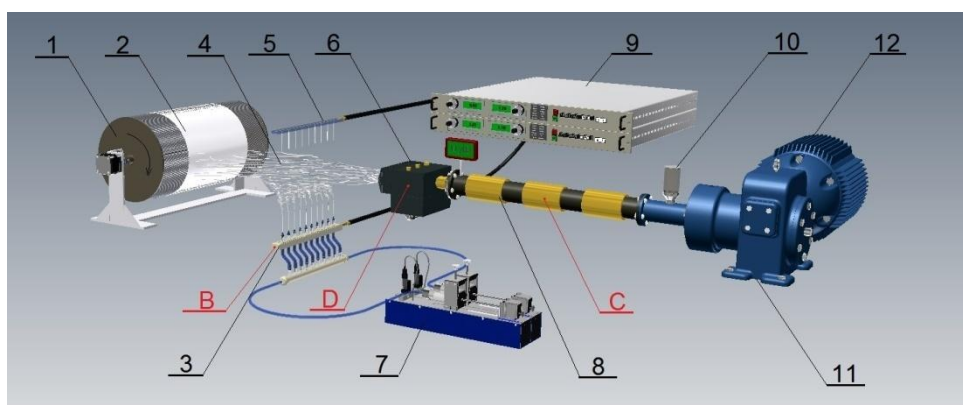


Obrázek 20: Výrobená vrstva před odebráním z kolektoru



Obrázek 21: Ostřížená vrstva

Vzhledem k získaným poznatkům během výrobního procesu byl vytvořen návrh pro inovaci výrobního zařízení. Na schématu (Obrázek 22) jsou znázorněny možnosti vylepšení částí oproti původnímu zařízení, na kterém byl prováděn výrobní proces. Konkrétně by mohlo dojít k nahrazení strunového spinneru řadou jehel do kterých by se přiváděl polymer za pomoci čerpadel. Předpokladem takto navržených změn je zlepšení plynulosti výroby a zjednodušení obsluhy zařízení.



Obrázek 22: Schématické znázornění uspořádání zařízení MB v kombinaci s el. zvlákněním: 1 - kolektor, 2 - vlákenná vrstva, 3 - jehlový kolektor, 4 - proud vzduchu s vlákny, 5 - ojehlená protielektroda, 6 - melt-blown zařízení, 7 - čerpadla, 8 - extrudér, 9 - zdroj vysokého napětí, 10 - násypka, 11 - převodovka, 12 - motor

3.1.4 Ověření objemového zastoupení nanovláken ve vyrobených vrstvách

Tato část experimentu byla prováděna pro ověření cíle vyrobit materiály s objemovým zastoupením nanovláken 0,5%, 1% a 2%. Za tímto účelem byly vyrobeny tři vlákenné vrstvy pouze s využitím technologie melt blown a tři vlákenné vrstvy

kombinací technologií melt blown a elektrického zvlákňování. Postup výroby a výrobní parametry byly stejné jako v kapitole 3.1.3. Změněn byl pouze čas výroby na 30 min pro všechny vyráběné vlákenné vrstvy.

Z každého vyrobeného materiálu se odebraly 4 vzorky o rozměru 50 x 50 mm. Vzorky byly separovány z vrstvy alespoň 20mm od krajů, které byly tenčí a zkreslovaly by plošnou hmotnost. Následně byly vzorky na digitální váze zváženy.

Výsledné hodnoty byly získány vzájemným odečtením vah vzorků vyrobených MB od vzorků vyrobených kombinací MB a ELS pro stejné rychlosti výroby. Získané hodnoty byly převedeny na procenta, která signalizovala objemové zastoupení nanovláken v daných vrstvách. Konkrétně 0,5% pro ME63, 1% pro ME100 a 2% pro ME 172. Tím byl potvrzen původní předpoklad pro výrobu vlákenných vrstev s rozdílným objemovým zastoupením nano a mikrovláken.

3.2 Měření strukturních vlastností materiálů ME63, ME100 a ME172

Následující kapitola se bude věnovat hodnocení strukturních vlastností vyrobených vlákenných vrstev se zaměřením na průměry vláken a velikosti mezivlákněných prostor. K tomuto účelu byl využit rastrovací elektronový mikroskop a počítačový program pro obrazovou analýzu NIS Elements. Takto provedená měření měla za účel zjistit, zda se vytvořené vlákenné vrstvy strukturně podobají extracelulární tkáňové matici a jaký vliv má změna výrobní rychlosti šroubu extrudéru na zastoupení mikro/nanovláken a velikost pórů.

3.2.1 Nasnímání povrchů a tvorba obrazu

K tomuto úkolu byl využit rastrovací elektronový mikroskop TESCAN VEGA TS 530 s rozlišením 3 nm, zvětšením 20 - 50000x, urychlovacím napětím 0,2 - 30 kV a dosahovaným podtlakem 5×10^{-3} Pa, který byl propojen se stolním počítačem, jenž byl doplněn o software umožňující zaznamenávání a ukládání získaných obrazů ve standardním obrazovém formátu (např. JPEG). Takto uložené obrazy mohly být dále zpracovávány v jiných grafických programech. Dále pak zlatička Q150R - Quorum. Veškerá využívaná zařízení byla umístěna v laboratořích pro biologické testování katedry netkaných textilií (KNT).



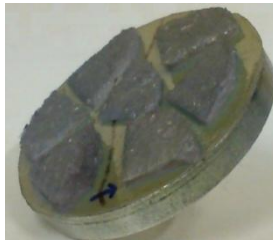
Obrázek 23: Elektronový mikroskop TESCAN



Obrázek 24: Zlaticka Quorum

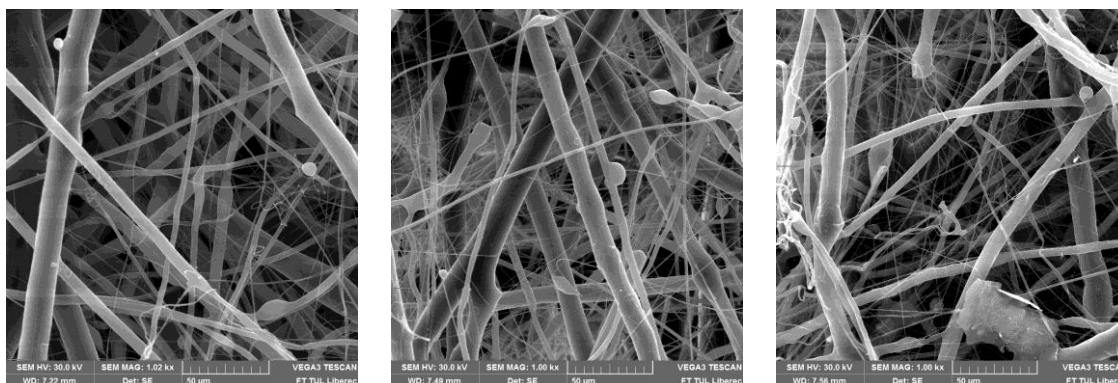
Postup

Z každého analyzovaného materiálu byly odebrány vzorky z přední strany, zadní strany a ze středu o velikosti několik mm². Vzorky se nalepily na kovové terčičky o průměru 30 mm. Následně se terčičky postupně umisťovaly do zlatičky, kde se na jejich povrch nanášela vrstva zlata o tloušťce 5 nm (Obrázek 25). Takto připravené terčičky byly umisťovány do komory elektronového mikroskopu, která byla následně uzavřena a došlo k odčerpání vzduchu. Tato procedura zabrala několik minut a poté bylo možné zahájit pořizování snímků vzorků v požadovaném zvětšení.

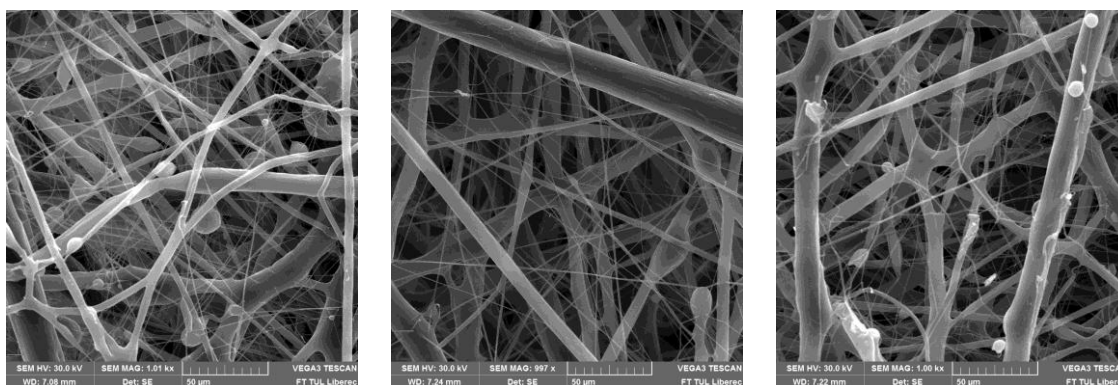


Obrázek 25: Pozlacený terčik se vzorky určenými pro elektronovou mikroskopii

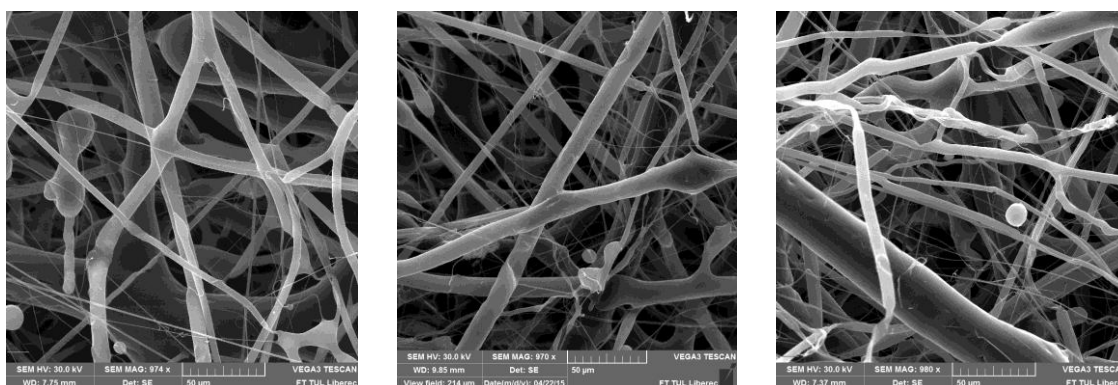
Výsledky



Obrázek 26: ME63 spodní strana, střed a vrchní strana - zvětšení 1000x



Obrázek 27: ME100 spodní strana, střed a vrchní strana - zvětšení 1000x



Obrázek 28: ME172 spodní strana, střed a vrchní strana - zvětšení 1000x

Z pořízených snímků lze poměrně snadno vypozorovat, že vyrobené vláknenné vrstvy se strukturně podobají extracelulární tkáňové matici. Tím pádem všechny tři materiály splnily základní podmínku pro pozdější biologické testování. Dále z pořízených snímků lze odhadnout zastoupení nano a mikrovláken. Jako vzorek s největším zastoupením nanovláken ve své struktuře se jevil vzorek označený ME63, o něco méně nanovláken bylo obsaženo ve vzorku ME100 a nejméně jich bylo pozorováno ve vzorku ME172. Pro potvrzení této domněnky byla využita obrazová analýza.

3.2.2 Obrazová analýza

Měření strukturních parametrů probíhalo pomocí programu pro obrazovou analýzu NIS Elements AR 3.0 dostupného v laboratořích pro biologické testování KNT. Měření se provádělo pro materiály ME63, ME100 a ME172. Zjišťovanými parametry byly průměry vláken a z toho plynoucí zastoupení nano/mikrovláken, dále pak průměrné velikosti mezivláknenných prostor.

Postup měření průměrů vláken

Měření bylo zahájeno spuštěním programu NIS Elements a následnou importací snímků získaných z předešlé elektronové mikroskopie. Dále bylo zapotřebí provést kalibraci (u každého snímku), která přiřazuje snímkům reálný rozměr stanovením jednotky. Ta se provedla pravým kliknutím myši na zvolený snímek a poté se vybrala funkce kalibrovat dokument. Dalším krokem bylo vybrání vhodného stylu měření průměrů vláken. Pro tento případ byl zvolen způsob dvou bodů spojených úsečkou. Způsob měření pak probíhal tak, že se označil jeden okraj vlákna a spojil se s protilehlým okrajem, přičemž bylo dbáno na to, aby oba zvolené body na okrajích vláken byly vzájemně co nejkolměji a nedocházelo tím ke zkreslování výsledků. Pro velkou četnost vláken ve snímcích z SEM a přesnější statistickou hodnotu byla vybírána vlákna, která protínala pomyslnou přímkou v úhlopříčném směru (levý horní roh - pravý dolní roh). Pro každou stranu (vrchní, spodní, střed) materiálů ME63 a ME100 se provádělo 5 měření po 50 zvolených vláknech. U materiálu ME172 došlo ke snížení četnosti měřitelných vláken v úhlopříčném směru, což vedlo k drobnému snížení počtu měřených vláken, i přes tento fakt byl způsob měření vzhledem k předešlým dvěma materiálům zachován. Veškerá měření byla realizována ze snímků z SEM o zvětšení 1000x.

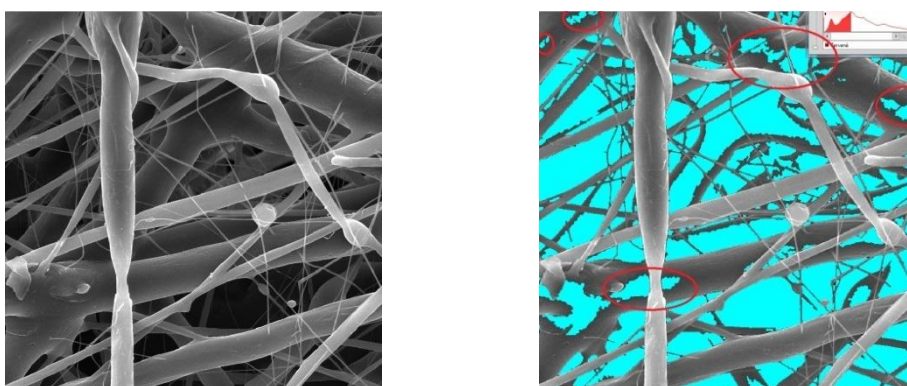
Postup měření průměrů mezivláčenných prostor

Měření bylo zahájeno obdobně jako u měření průměrů vláken spuštěním programu NIS Elements, importací snímků a kalibrací obrazu. Dále bylo provedeno oříznutí obrazu tak, aby na snímku byla pouze plocha s vlákny. Následně se snímek převedl do binární podoby a byly nastaveny hodnoty prahování (Obrázek 29). Nastavené hodnoty prahování byly zvoleny na základě předešlé Diplomové práce [31]. Posléze byl již program schopný sám dokončit měření a číselné hodnoty exportovat do Excelu.

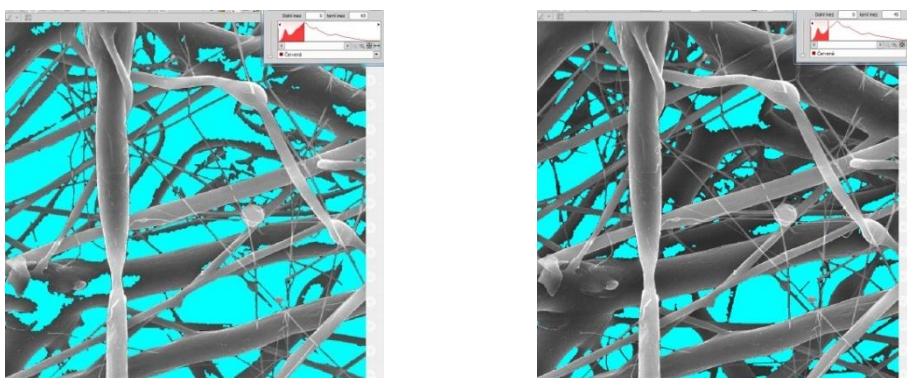


Obrázek 29: Nastavené hodnoty prahování

V průběhu měření byly pozorovány nedostatky programu vzhledem k získávání přesných hodnot průměrů mezivlákněných prostor námi vyrobených materiálů a to z důvodu značné členitosti povrchu. Tento jev vedl k tomu, že program v rámci nastaveného prahování vytvářel neexistující póry na povrchu vláken (Obrázek 30). Následná změna prahování (zejména hodnoty pro horní mez) nebyla úspěšná, neboť když se podařilo odstranit neexistující póry z povrchu původního vlákna, tak se objevily póry na jiném vláknu, nebo se začala do výsledků promítat vlákna, která program doposud nezahrnoval (Obrázek 31). Proto bylo pro všechna měření zachováno původní nastavení prahování. Měření se provádělo 5x pro každou stranu všech tří materiálů. Veškerá měření byla pořizována ze snímků z SEM o zvětšení 1000x.



Obrázek 30: Původní snímek z SEM (vlevo) a ukázka vytvořených neexistujících pórů na povrchu vláken po prahování (vpravo)



Obrázek 31: Ukázka původního prahování 65 (vlevo) a změna prahování na 45 (vpravo)

Výsledky - průměry vláken

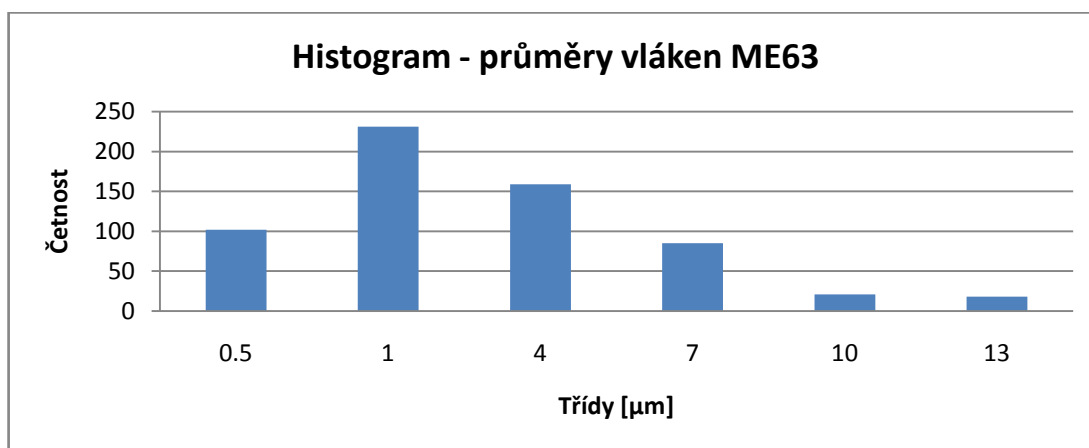
Ke zpracování získaných výsledků byl využit program Microsoft Office Excel 2007. Průměry vláken byly rozděleny do tříd. Z počátku pro lepší transparentnost byl zvolen postup mezi třídami o hodnotu 0,5, což znamenalo 0-0,5 μm a 0,51-1 μm .

Následně byl zvolen postup o hodnotu 3, tudíž 1,01-4 μm , 4,01-7 μm , atd. až do hodnoty 50 μm . Do výsledného grafu se promítly jen ty průměry, které v konečné sumě přesahovaly četnost více jak 10 a to vzhledem k tomu, že menší četnosti byly z pohledu statistiky shledány bezvýznamnými.

Průměry vláken ME63

Tabulka 7: Naměřené hodnoty průměrů vláken - ME63

Průměr [μm]	St.odchylka [μm]	Minimum [μm]	Maximum [μm]	Procento nanovláken [%]
2,634	3,782	0,22	31,96	53

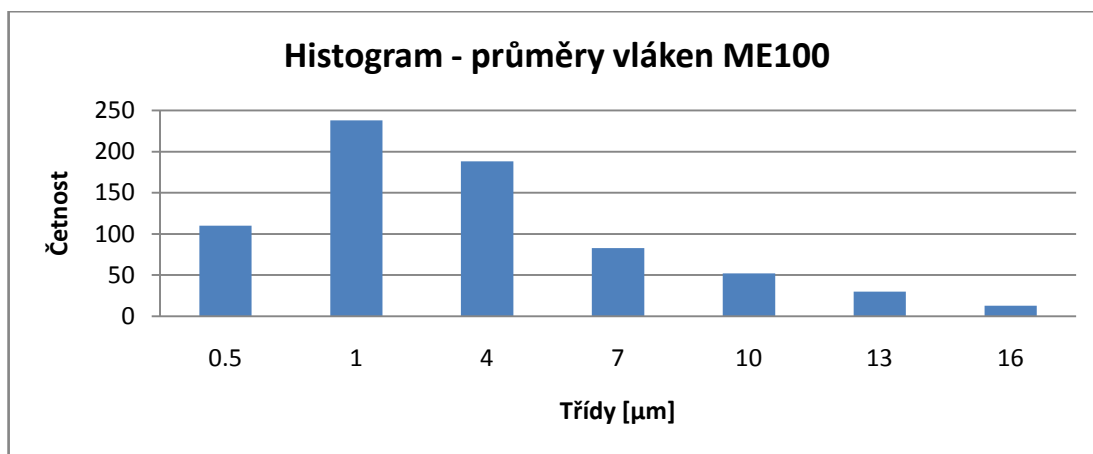


Graf 3: Četnost zastoupení jednotlivých tříd průměrů vláken - ME63

Průměry vláken ME100

Tabulka 8: Naměřené hodnoty průměrů vláken - ME100

Průměr [μm]	St.odchylka [μm]	Minimum [μm]	Maximum [μm]	Procento nanovláken [%]
3,378	5,014	0,2	58,58	48

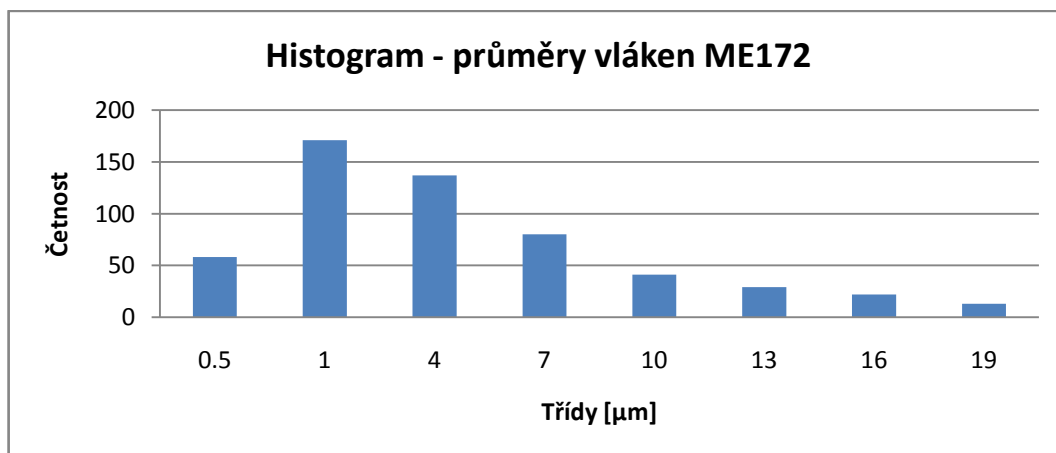


Graf 4: Četnost zastoupení jednotlivých tříd průměrů vláken - ME100

Průměry vláken ME172

Tabulka 9: Naměřené hodnoty průměrů vláken - ME100

Průměr [μm]	St.odchylka [μm]	Minimum [μm]	Maximum [μm]	Procento nanovláken [%]
4,484	6,163	0,23	45,6	40



Graf 5: Četnost zastoupení jednotlivých tříd průměrů vláken - ME172

Z uvedených výsledků je jasně patrná změna zastoupení nano/mikro vláken ve vrstvách vlivem změny rychlosti šroubu extrudéru. Čím byla rychlost extrudéru nižší, tím bylo zastoupení nanovláken ve vyrobené vlákenné vrstvě vyšší. Největší zastoupení nanovláken ve své struktuře měl materiál ME63 a to 53%, naopak nejmenší měl materiál ME172 s 40%.

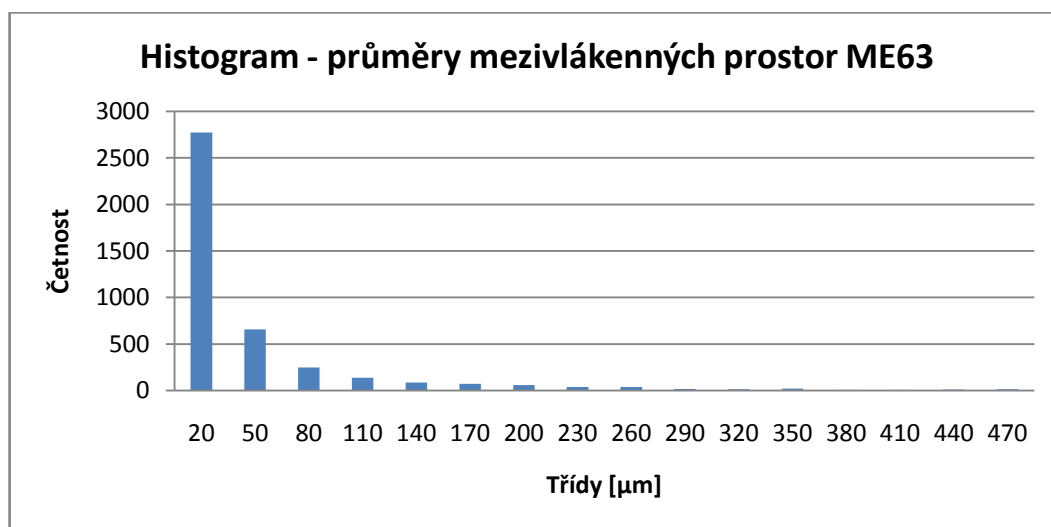
Výsledky - průměry mezivlákných prostor

Ke zpracování získaných výsledků byl využit program Microsoft Office Excel 2007. Průměry mezivlákných prostor byly rozděleny do tříd s postupem o hodnotu 30, mimo první třídu, které byla navýšena o hodnotu 20 tedy: 0-20 μm , 20,01-50 μm , 50,01 - 80 μm atd. až do hodnoty 590. Stejně jako u průměrů vláken se započítaly jen ty průměry, které přesáhly hodnotu četnosti 10.

Průměry mezivlákných prostor ME63

Tabulka 10: Naměřené hodnoty průměrů mezivlákných prostor- ME63

Průměr [μm]	St.odchylka [μm]	Minimum [μm]	Maximum [μm]
48,149	141,732	0,5	3451,01

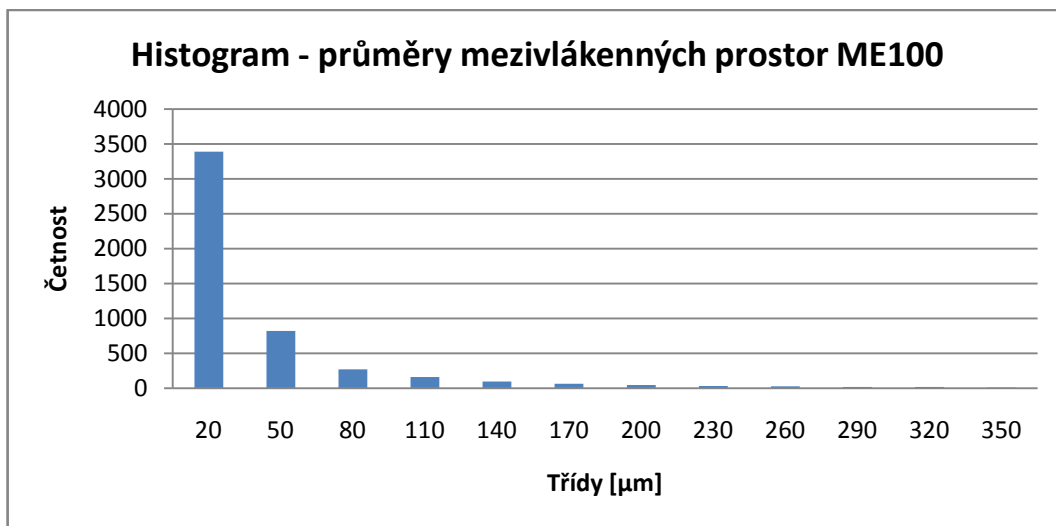


Graf 6: Četnost zastoupení jednotlivých tříd průměrů mezivlákných prostor - ME63

Průměry mezivláknových prostor ME100

Tabulka 11: Naměřené hodnoty průměrů mezivláknových prostor- ME100

Průměr [μm]	St.odchylka [μm]	Minimum [μm]	Maximum [μm]
35,550	90,227	0,56	1844,22

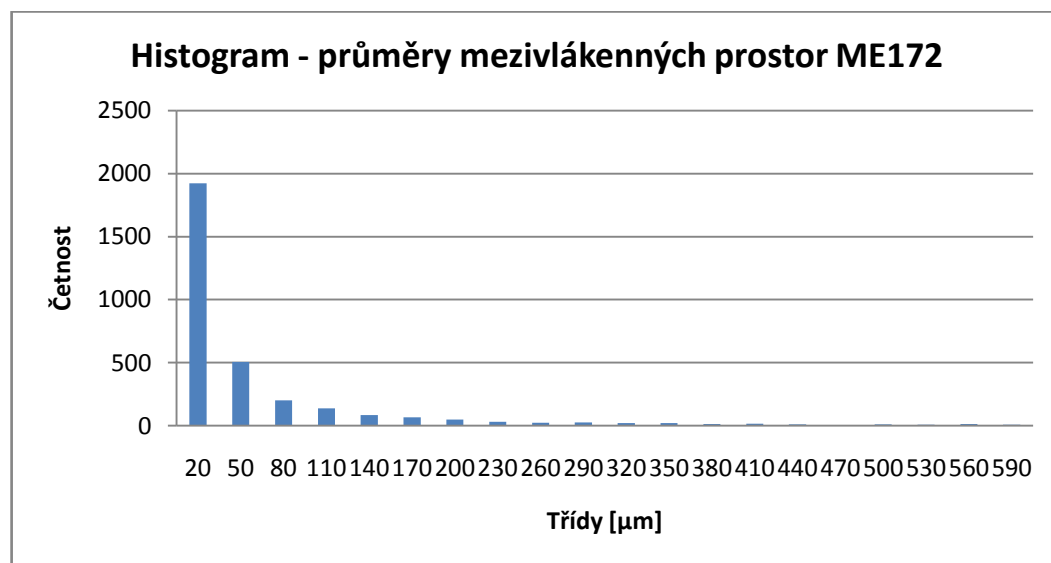


Graf 7: Četnost zastoupení jednotlivých tříd průměrů mezivláknových prostor - ME100

Průměry mezivláknových prostor ME172

Tabulka 12: Naměřené hodnoty průměrů mezivláknových prostor- ME172

Průměr [μm]	St.odchylka [μm]	Minimum [μm]	Maximum [μm]
87,929	293,489	0,36	5763,37



Graf 8 Četnost zastoupení jednotlivých tříd průměrů mezivláknových prostor - ME172

Z uvedených výsledků je patrné, že materiál ME100 měl nejmenší naměřenou průměrnou velikost mezivlákněných prostor. Naopak materiál ME172 měl naměřenou průměrnou velikost mezivlákněných prostor nejvyšší. Společným rysem pro všechny materiály je značná převaha velikosti pórů do 20 μm .

Na základě výše specifikovaného problému při měření se tato metoda nejeví jako zcela přesná. Námětem na další zkoumání by mohlo být nalezení vhodnější metody pro hodnocení velikostí mezivlákněných prostor u takto členitých povrchů. Bylo by zajímavé sledovat, zda by výsledky ukazovaly podobné hodnoty a nebo by došlo ke změně a například materiál ME63 by vzhledem k nejvyššímu obsahu nanovláken ve své struktuře vykazoval nejnížší průměrnou velikost mezivlákněných prostor.

3.3 Odlišení a vizualizace vláken z různých technologií

Cílem této experimentální části bylo pomocí materiálové analýzy vizualizovat a odlišit ve vytvořeném kompozitu nanovláknna vyrobená metodou elektrického zvláknění a mikrovláknna vyrobená metodou melt blown.

Výsledky tohoto experimentu mají sloužit jako důkaz přítomnosti vláken z obou technologií a především pro vyvinutí metodiky vizualizace jednotlivých druhů vláken tak, aby se dalo v dalším výzkumu kvantitativně studovat zastoupení vláken z jednotlivých technologií a homogenita zastoupení.

Jako metoda provedení byla vybrána vizualizace elektrostaticky zvlákněných nanovláken přes obsažený specifický prvek pomocí rastrovací materiálové analýzy EDS spojeného spolu s SEM. Zastoupení mikrovláken z technologie melt blown bylo jak po materiálové tak po technologické stránce totožné, jako při výrobě materiálů pro biologické testování.

- **EDS analyzátor:** slouží k detekci charakteristického RTG záření, jenž se využívá pro analýzu chemického složení vzorků. Metoda dokáže zjistit, jaké prvky a v jakém množství se nacházejí ve vzorku

Podle doporučení byly pro realizaci experimentu vybrány dva prvky které EDS analýze na SEM snímcích velmi dobře kontrastují.

1. Prvním prvkem byl Jód - tento prvek byl inkorporován do nanovláken z polyvinylbutyralu (PVB) ve formě běžně dostupné jodové tinktury, která má s tímto polymerem společný rozpouštědlový systém v podobě ethanolu.

Bylo tedy možné takto připravený roztok převést v elektrostatickém poli do podoby nanovláken.

2. Druhým prvkem byl fluor - jako nosič tohoto prvku byl využit polyvinylidenfluorid (PVDF), který obsahuje kontrastní fluor již přímo ve své molekulární struktuře. Navíc byl tento materiál již dříve úspěšně zvlákňován v elektrostatickém poli.

3.3.1 Výroba kompozitních vrstev

Výroba vrstev probíhala na stejném principu kombinace melt blown a elektrického zvlákňování jako u materiálů pro biologické testování. Pro proces elektrického zvlákňování byli připraveny dva druhy polymerních roztoků:

- **PVB 10%** - připraveno 50 ml roztoku v kombinaci 5g PVB a 45g jodové tinktury
- **PVDF 20%** - připraveno 50 ml roztoku v kombinaci 10g PVDF a 40g DMAC (dimethylacetamid)

Připravené směsi byly umístěny na míchačku a nastaveno 200 ot/min. Doba míchání nebyla nikterak stanovena a míchání probíhalo dokud nedošlo k úplnému rozmíchání PVB/PVDF.

Výrobní proces byl zahájen nastavením teplot na MB zařízení. Po 10min ohřevu byl zapnut pohon a přes násypku dopraven do zařízení PCL ve formě granulí. Rychlost šroubu extrudéru byla snížena na 2,3 ot/min po dobu 10min, aby došlo k důkladnému roztavení PCL, následně byla rychlost zvýšena na 7,5 ot/min. Zároveň s nastavením výrobní rychlosti byl vlit připravený polymerní roztok (PVB/PVDF) do zásobníku. Otáčky strunového spinneru byly nastaveny na 30 ot/min ve směru proti hodinovým ručičkám. Jako startovní napětí pro oba materiálu bylo nastaveno -20 kV a +15 kV. Toto napětí se v průběhu procesu postupně měnilo až na hodnoty -35 kV a +20 kV. Z důvodu potřeby doplňování polymerního roztoku do zásobníku musela být výroba přerušována stejně jako u materiálů přípravy materiálů pro biologické testování. Výrobní proces trval 30 min pro oba roztoky. Výroba probíhala při okolní teplotě 21,6 °C a vlhkosti vzduchu 29,1%.

Po dokončení výroby byly vrstvy sejmuty z kolektoru a přemístěny k dalšímu testování. Vrstvy po odstrižení okrajů měly přibližné rozměry 200 x 200 mm o tloušťce cca 3mm.

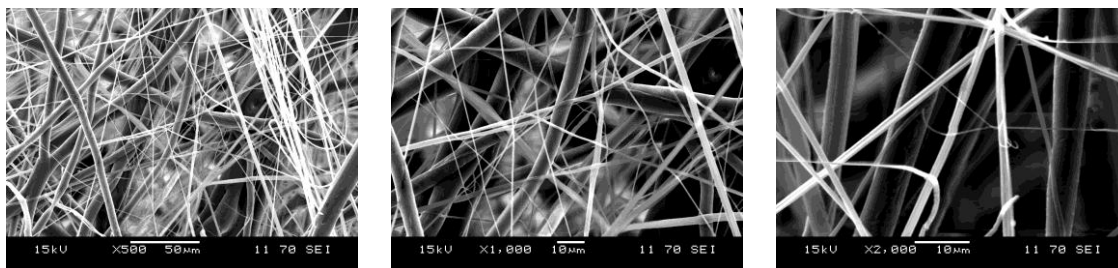
3.3.2 Příprava vzorků a postup měření

Z obou připravených materiálů byly odebrány vzorky o velikosti několika mm², jež se nalepily na kovový terčik o průměru 30 mm. Terčik se následně umístil do zlatičky, kde se na jejich povrch nanasla vrstva zlata o tloušťce 5 nm. Pozlacený terčik byl umístěn do komory elektronového mikroskopu, která byla uzavřena a došlo k odčerpání vzduchu. Po odsátí vzduchu bylo možné zahájit měření.

3.3.3 Výsledky měření

U PVB v kombinaci s jodisolem vlákna na snímcích výrazně kontrastují (Obrázek 32). Z toho vyplývá, že přítomnost jódu je jasně prokazatelná a záměr pozorovat rozdílné složení kompozitní vláknenné struktury byl splněn. Kvůli tloušťce materiálu (více vrstev nad sebou), nebyl elektronový paprsek schopný proniknout do celé struktury daného materiálu a při hodnocení nebylo možné přesně určit zastoupení vláken obsahujících jod. Vzhledem k tomuto problému byla z původního materiálu sejmuta tenká vrstva a podrobena stejné analýze. Ani v tomto případě však nešlo jasně určit pomocí EDS analýzy, že by se jod objevoval pouze v nanovlákních.

Dílním úspěchem u této metody byla možnost jasně pozorovat při dostatečném zvětšení (1000x a více) jednotlivá nanovlákní obsahující jód. Nanovlákní výrazně kontrastovala oproti mikrovláknům bez obsahu jódu. Zároveň tím bylo potvrzeno, že se v daném kompozitu kombinují vlákna z obou výrobních technologií.



Obrázek 32: Ukázka snímků z SEM - materiál s obsahem PVB - zvětšení 500x, 1000x a 2000x

U materiálu obsahujícího PVDF v kombinaci s DMAC nebylo možné pozorovat ani naměřit téměř žádné hodnoty. Jako pravděpodobné příčina se jeví malé zastoupení vláken obsahujících PVDF.

3.4 Biologické testování materiálů ME63, ME100 a ME172

Cílem biologického testování bylo u vyrobených materiálů ME63, ME100 a ME172 analyzovat vlastnosti, na základě kterých lze vyhodnotit vhodnost vyrobených materiálů k využití jako tkáňový nosič pro regenerativní medicínu. Mezi testované vlastnosti patřila míra viability (životaschopnosti) buněk na připravených tkáňových nosičích, míra buněčné adheze na povrch jednotlivých materiálů a schopnost buněk proliferovat do vnitřních struktur testovaných materiálů. Hodnocení bylo prováděno pomocí MTT testu, SEM a fluorescenční mikroskopie.

3.4.1 Příprava vzorků

Z původní vrstvy bylo vyřezáno pro každý materiál 60 vzorků ve formě válečků (disků) o průměru 15 mm a výšce cca 0,5 mm. Průměr 15 mm byl zvolen z důvodu usnadnění pozdější manipulace při biologickém testování a dále, aby bylo možné vzorky umístit do 24 jamkové kultivační desky.

U materiálu ME172 se při vyřezávání zjistilo, že vnitřní struktura není zcela kompaktní jako tomu bylo u zbylých dvou materiálů. Pravděpodobně v důsledku přerušování výrobního procesu z důvodu doplňování polymeru pro proces elektrického zvláknování (viz kapitola: 3.1.3), přičemž docházelo k zasychání vrstvy na kolektoru a následně při obnovení procesu nedošlo k úplnému napojení vrstev.



Obrázek 33: Příprava vzorků

Následně byly vzorky umístěny do zkumavek a odeslány na sterilizaci ethylenoxidem do Ústřední vojenské nemocnice v Praze.

3.4.2 Nasazování a kultivace buněk

Pro biologické testování byly využity buňky lidské nádorové linie kostních osteoblastů označovaných jako MG63. Každý vzorek (mimo negativních kontrol) byl osazen buňkami v celkovém počtu 1×10^5 buněk na vzorek. Manipulace se vzorky v průběhu biologického testování byla prováděna ve Flow Boxu - Teslar bio - II - A.

Roztoky

PBS - fosfátový pufr PBS pH 7,4 (Příloha 1)

EMEM - kultivační medium (Příloha 1)

FBS - fetální telecí sérum (Příloha 1)

ATB - antibiotika

Postup

Sterilní vzorky byly umístěny do kultivačních 24 jamkových desek a byl k nim napipetován 1 ml media, jež se skládalo z 89% EMEM, 10% PBS a 1% ATB. Takto připravené medium se využívalo po celou dobu experimentu. Následně se vzorky vložily na 24 hodin do inkubátoru (37°C a 5% obsah oxidu uhličitého). Nastavení inkubátoru bylo taktéž po celou dobu experimentu neměnné.

Po 24 hodinách bylo pozorováno, že u vzorků ME172 došlo k minimálnímu vsáknutí média a vzorky plavaly. Pravděpodobně z důvodu největších mezivláčenných prostor a tím pádem menších kapilárních sil, které napomáhají průniku media do struktury. Naopak u vzorků ME63 došlo k úplnému vsáknutí media. U ME100 se ve většině případů medium zcela vsáкло, jen ojediněle bylo pozorováno minimální množství nevsáklého media na dně jamky.

Pomocí pipet bylo odsáto nevsáklé medium. Následně byly vzorky osazeny buňkami přidáním 1 ml media s obsahem 1×10^5 buněk na vzorek. U negativních kontrol (NC) se do jamek se vzorky přidalo pouze medium. Pozitivní kontroly (PC) byly prováděny bez materiálu osazením dna kultivační desky buňkami. Veškeré vzorky byly označeny a opět vloženy do inkubátoru.

- Negativní kontrola sloužila k případnému odhalení kontaminace testovaných vzorků a dále k porovnání strukturních změn testovaných materiálů vzniklých vlivem kultivačního prostředí.

- Pozitivní kontrola sloužila k určení procenta buněk, které adherovaly na vzorek v porovnání s dnem kultivační jamky (povrch dna jamky je přijímán jako ideální povrch pro adhezi buněk). Z pravidla bývá během prvních testovacích dnů hodnota absorbance u PC vyšší než-li u vzorků s testovaným materiálem. Tato hodnota je závislá na specifickém povrchu daného materiálu.

Výměna média se prováděla pravidelně každý 3. den u všech vzorků včetně NC. Po 7 dnech byly zbylé vzorky přemístěny do 12 jamkové kultivační desky a obsah média se navýšil na 3 ml. Tato změna byla provedena z důvodu zlepšení výživy vzhledem k narůstajícímu počtu buněk. Vzorky byly odebírány 1., 7., 14., 21. a 28. den po nasazení pro fluorescenční mikroskopii (2 vzorky), SEM (1 vzorek + NC) a MTT (4+NC + PC).

3.4.3 Testování viability buněk - MTT test

V následné kapitole bude popsáno testování a následné hodnocení buněčné viability (biologická aktivita buněčné kultury na vzorcích v závislosti na čase) pomocí MTT testu. K testování byly využity přístroje: spektrofometr BioTek ELX a laboratorní centrifuga LMC 4200R Biosan.

Roztoky

Roztok MTT

IPA (Příloha 1)

PBS - fosfátový pufr PBS pH 7,4 (Příloha 1)

EMEM - kultivační medium (Příloha 1)

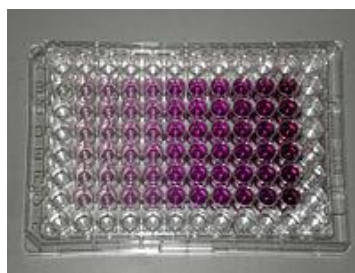
Teorie MTT

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



Obrázek 34: Redukce MTT na formazan mitochondriální reduktázou

Reakce probíhá na mitochondriální membráně živých buněk. Formazan se rozpustí přidáním okyseleného isopropanolu a zbarvení se vyhodnocuje spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm (referenční vlnová délka 650 nm). Hodnota absorbance roztoku odpovídá množství živých buněk, čím tmavší barva a tedy vyšší absorbance, tím vyšší procento živých buněk (Obrázek 35).



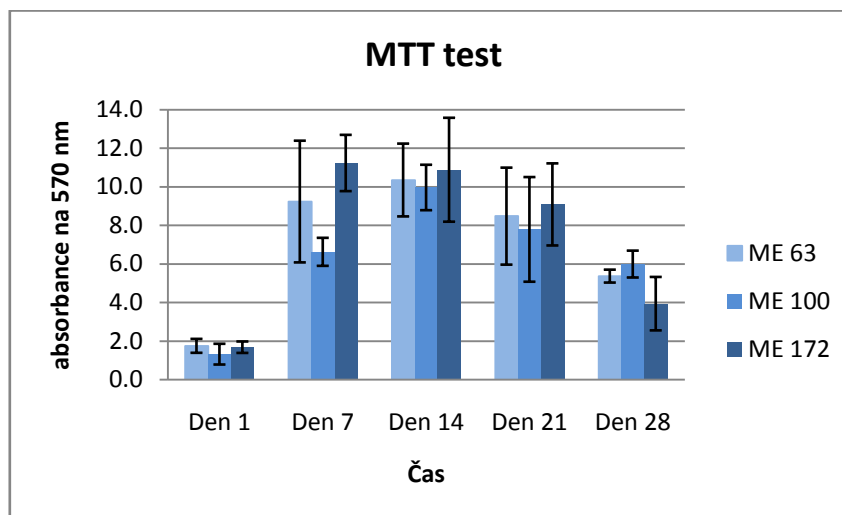
Obrázek 35: Ukázka změny odstínu roztoku v závislosti na procentu živých buněk

Postup

Testované vzorky byly nejprve přemístěny do nových sterilních jamek, aby nedošlo k ovlivnění výsledků viability buňkami adherovanými na povrchu původní kultivační jamky. Do jamek k přemístěným vzorkům bylo přidáno 250 μ l MTT a 750 μ l média EMEM. Následně byly vzorky umístěny na 3 hodiny do inkubátoru (37°C, 5% CO₂). Poté byl roztok odsán a nahrazen 1000 μ l IPA. Vzorky byly v IPA několikrát propláchnuty nasátím a zpětným vypuštěním roztoku z pipety. Proplachování se provádělo z důvodu celkového vyplavení rozpuštěného formazánu ze struktur vzorků pro zpřesnění dosažených výsledků. Poté bylo od každého vzorku odsáto pipetou 600 μ l roztoku, jenž byl napipetován do eppendorfových zkumavek. Zkumavky byly umístěny do centrifugy a centrifugovány po dobu 6min při 1600 RPM. Po dokončení bylo ze zkumavek odsáto 250 μ l IPA a vloženo do 96 jamkové kultivační destičky. Destička byla následně umístěna do spektrofometru, kde se změřila absorbance při vlnové délce 570 a 650 nm.

Výsledky

Naměřené hodnoty z spektrofometru byly importovány a zpracovány v programu Microsoft Office Excel 2007. Výsledný graf (Graf 9) srovnává hodnoty buněčné viability (vypovídá o počtu a metabolické aktivitě buněk) pro testované materiály v jednotlivých testovacích dnech.



Graf 9: Hodnoty absorbance při 570 - 650 nm vlnové délce v závislosti na čase

Testy prováděné 24 hodin po nasazení buněk vypovídají o schopnosti buněk adherovat na testované materiály. Hodnoty absorbance u MTT testu jsou u prvního dne srovnatelné pro všechny testované materiály. Na základě toho lze konstatovat, že rozdílná struktura testovaných materiálů nemá vliv na míru buněčné adheze.

Míra buněčné proliferace byla sledována v průběhu 4 týdnů od nasazení buněk. Z naměřených hodnot absorbance je zřejmý nárůst 7. a 14. den po nasazení osteoblastů a to srovnatelně u všech testovaných materiálů. Od 21 dne dochází k poklesu hodnot absorbance, což indukuje buněčnou smrt. Ke snížení počtu živých buněk na testovaných materiálech od 21 dne došlo zřejmě ze dvou důvodů, a to díky dosažení maximální konfluency buněk na povrchu materiálu, kdy kontaktní inhibice způsobí zastavení dalšího dělení buněk. Druhým důvodem mohla být neschopnost buněk proliferovat dále do vnitřní struktury testovaných materiálů.

Výsledky MTT testu byly u všech materiálů srovnatelné, použité poměry nano a mikrovláknenné složky tedy podporují buněčnou proliferaci na podobné úrovni.

3.4.4 Hodnocení adheze a proliferace buněk - Fluorescenční mikroskopie

V této kapitole bude popsáno testování vzorků pomocí fluorescenční mikroskopie, která nám umožní pozorovat a zhodnotit míru relaxace jednotlivých buněk v závislosti na jejich tvaru a vnitřní struktuře. K tomuto účelu byl využit invertorový fluorescenční mikroskop Eclipse Ti Nikon a fluorescenční aktivní látky DAPI a PI.

Roztoky

PI - propidium iodid (Příloha 1)

DAPI

PBS - fosfátový pufr PBS pH 7,4 (Příloha 1)

Phalloidin

Vymražený methanol - Lach - Ner

Postup

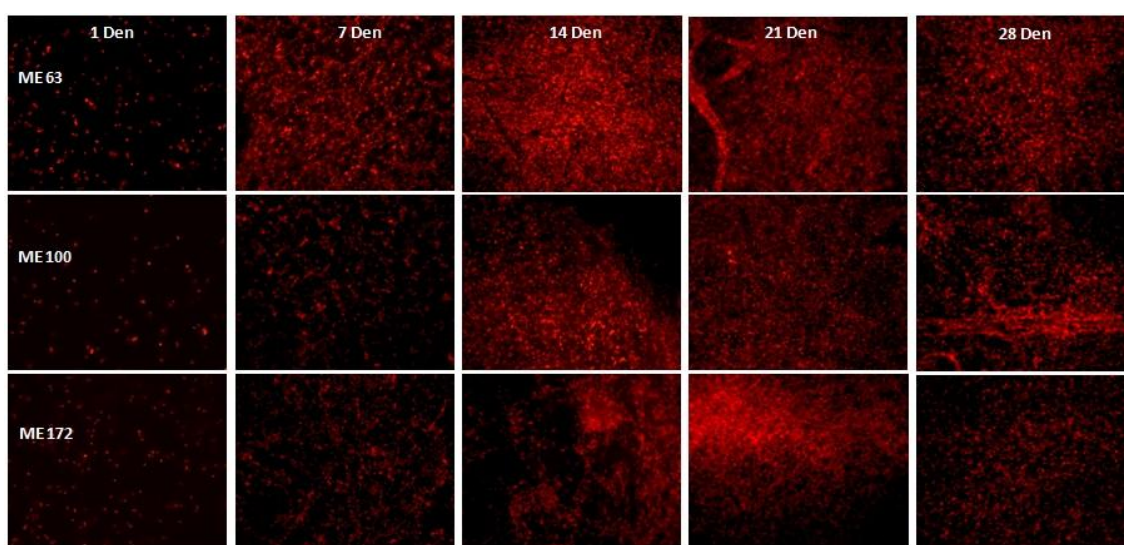
Vzorky byly vyjmuty z původních kultivačních destiček s médiem a přemístěny do nových kultivačních destiček. Následně byl do jamek ke každému vzorku přidán vymražený methanol (0,5 ml) tak, aby vzorky byly zcela ponořené. Poté byly vzorky vloženy do lednice kde byly uchovány po dobu 30min při 4°C. Tímto způsobem se docílilo fixace (usmrcení) buněk.

- **PI:** Po dokončení procesu fixace byly vzorky 2x propláchnuty PBS, poté byl ke vzorkům přidán PI, který se váže na buněčnou DNA. Následně se vzorky zakryly alobalem tak, aby nedošlo k vyzáření fluorescenčního barviva a nechaly se 15 min inkubovat při běžné pokojové teplotě. Po inkubaci byly vzorky 6x propláchnuty PBS, umístěny do temného prostředí (přenosný box s víkem), aby se co nejvíce zamezilo vyzáření barviva a přemístěny k měření na fluorescenčním mikroskopu.
- **DAPI:** Po dokončení procesu fixace byly vzorky 2x propláchnuty PBS, poté byl ke vzorkům přidán Phalloidin a působil 30 minut při pokojové teplotě. Následně byly vzorky opět 2x propláchnuty PBS a ke vzorkům bylo přidáno DAPI. Vzorky byly zakryty alobalem a nechaly se 5 min inkubovat při běžné pokojové teplotě. Po inkubaci byly vzorky 6x propláchnuty PBS, umístěny do temného prostředí a přepraveny k měření na fluorescenčním mikroskopu.

Na fluorescenčním mikroskopu byly vzorky postupně analyzovány z přední strany, zadní strany a středu.

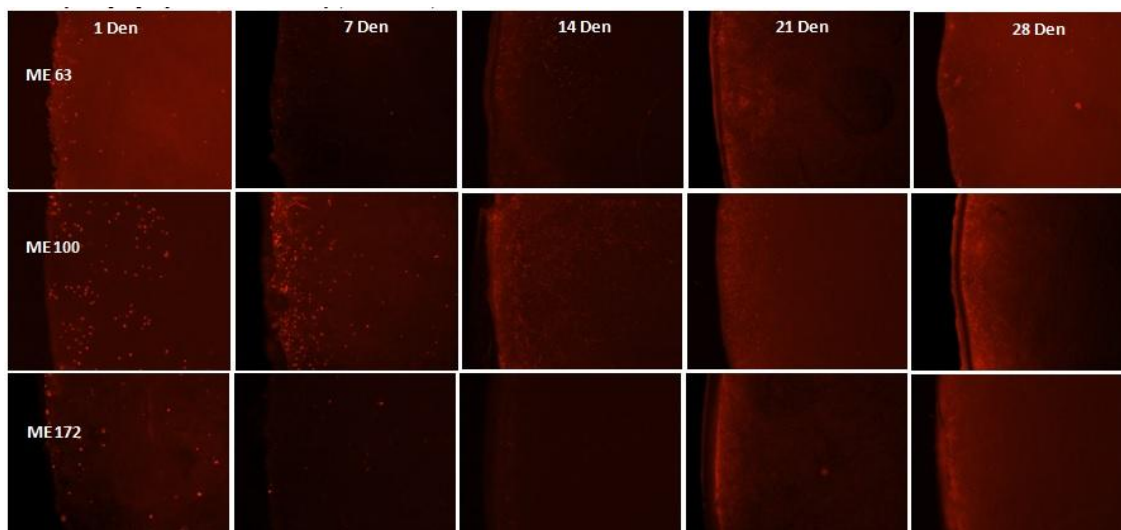
Výsledky

V první sadě obrázků (Obrázek 36) lze vidět barvení buněčných jader PI. Snímky monitorují vrchní vrstvy materiálů v jednotlivých testovacích dnech po nasazení buněk. Řádky reprezentují jednotlivé materiály (ME63, ME100 a ME172), sloupce pak jednotlivé testovací dny (1., 7., 14., 21. a 28.). Uvedené snímky jsou pořízeny při 100x zvětšení.



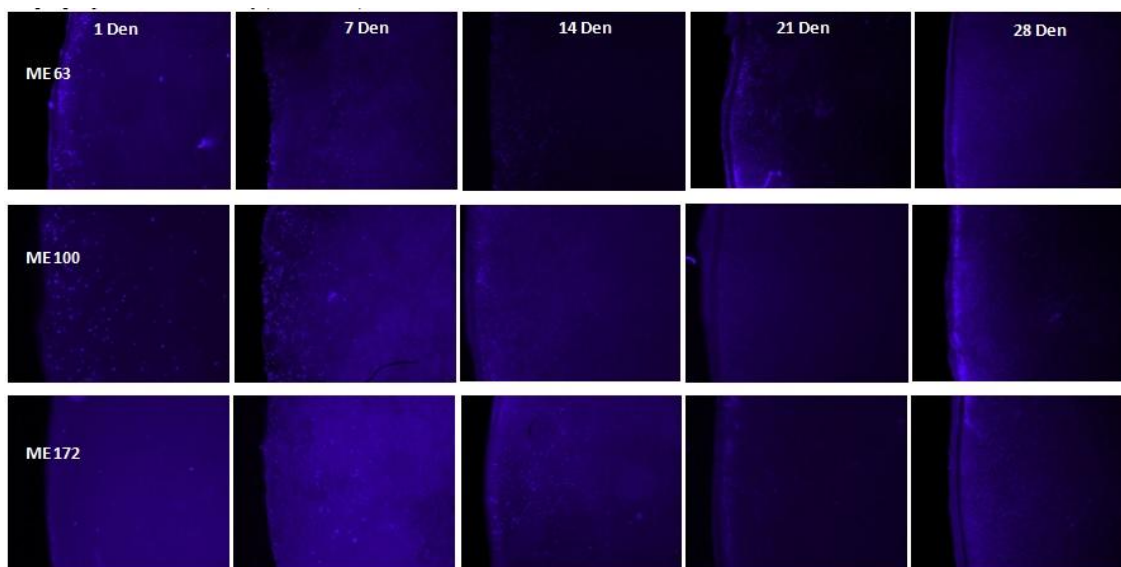
Obrázek 36: Snímky fluorescenční mikroskopie - vrchní vrstva-barvivo PI - zvětšení 100x

V druhé sadě obrázků (Obrázek 37) lze vidět barvení buněčných jader PI. Snímky monitorují střední vrstvy materiálů v jednotlivých testovacích dnech po nasazení buněk. Řádky reprezentují jednotlivé materiály (ME63, ME100 a ME172), sloupce pak jednotlivé testovací dny (1., 7., 14., 21. a 28.). Uvedené snímky jsou pořízeny při 40x zvětšení.



Obrázek 37: Snímky fluorescenční mikroskopie - střední vrstva-barvivo PI - zvětšení 40x

Ve třetí sadě obrázků (Obrázek 38) lze vidět barvení buněčných jader DAPI. Snímky monitorují střední vrstvy materiálů v jednotlivých testovacích dnech po nasazení buněk. Řádky reprezentují jednotlivé materiály (ME63, ME100 a ME172), sloupce pak jednotlivé testovací dny (1., 7., 14., 21. a 28.). Uvedené snímky jsou pořízeny při 40x zvětšení.



Obrázek 38: Snímky fluorescenční mikroskopie - střední vrstva-barvivo DAPI - zvětšení 40x

3.4.5 Hodnocení adheze a proliferace buněk - Elektronová mikroskopie

V této kapitole bude popsána metoda hodnocení buněčné adheze a buněčné proliferace do vnitřních struktur materiálů pomocí rastrovací elektronové mikroskopie. Na rozdíl od MTT testu elektronová mikroskopie umožňuje vizuální hodnocení a dává možnost analyzovat vlastnosti daných materiálů z jiné perspektivy. K tomuto hodnocení byla využita stejná zařízení jako v kapitole 0.

Roztoky

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

PBS - fosfátový pufr PBS pH 7,4 (Příloha 1)

Glutaraldehyd (Příloha 1)

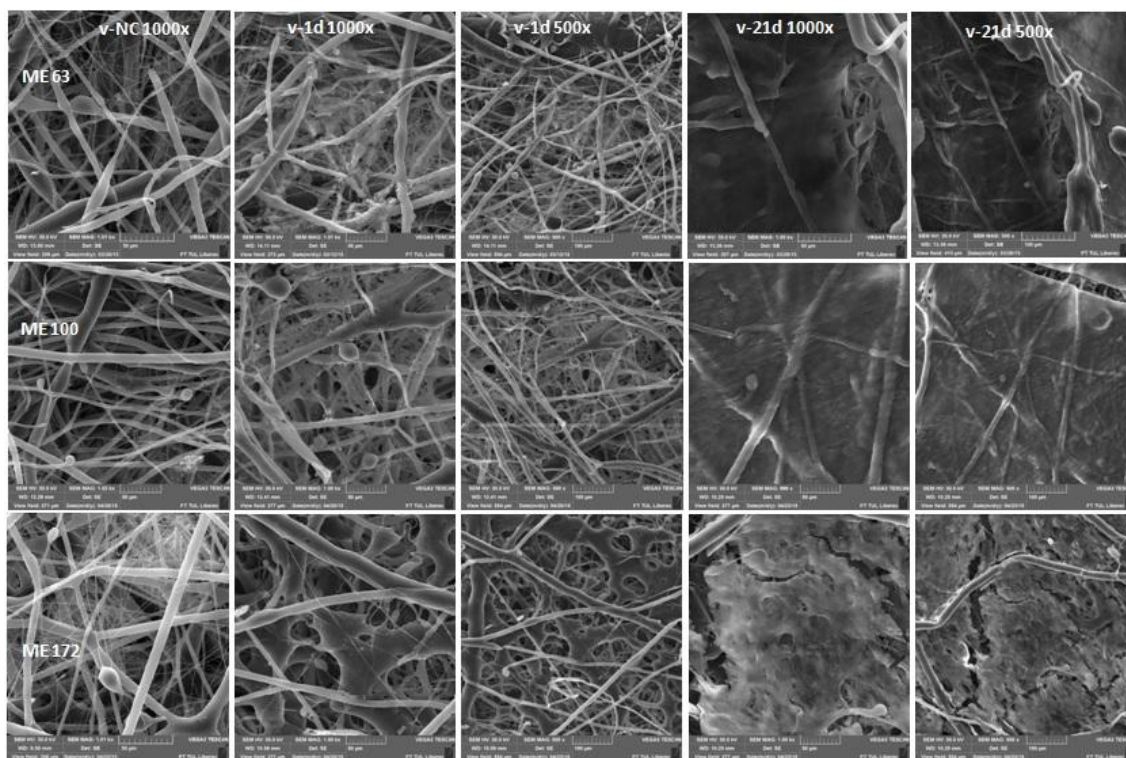
Postup

Vzorky byly vyjmuty z původních kultivačních destiček s médiem a přemístěny do nových destiček. Následně byl do kultivačních destiček se vzorky přidán roztok glutaraldehydu (0,5 ml) tak, aby vzorky byly zcela ponořené. Následně byly vzorky vloženy na 30 min do lednice. Tímto způsobem se docílilo fixace (usmrcení) buněk. Po dokončení procesu fixace byly vzorky vysušeny ethanolovou řadou. Do destiček ke vzorkům byl postupně přidáván 60, 70, 80, 90, 96, 100% absolutní ethanol (tak aby došlo k úplnému ponoření vzorku), který se nechal působit 15 min pro každou koncentraci. Po dokončení ethanolové řady byly vzorky přemístěny na laboratorní parafilm a vloženy na 24 hodin do inkubátoru.

Po vyjmutí z inkubátoru byly z každého analyzovaného materiálu odebrány vzorky z přední strany, zadní strany a ze středu o velikosti několik mm². Vzorky se nalepily na kovové terčíky o průměru 30 mm. Následně se terčíky postupně umisťovaly do zlatičky, kde se na jejich povrch nanášela vrstva zlata o tloušťce 5 nm. Takto připravené terčíky byly umisťovány do komory elektronového mikroskopu, která byla uzavřena a došlo k odčerpání vzduchu. Tato procedura zabrala několik minut a poté bylo možné zahájit pořizování snímků vzorků o požadovaném zvětšení.

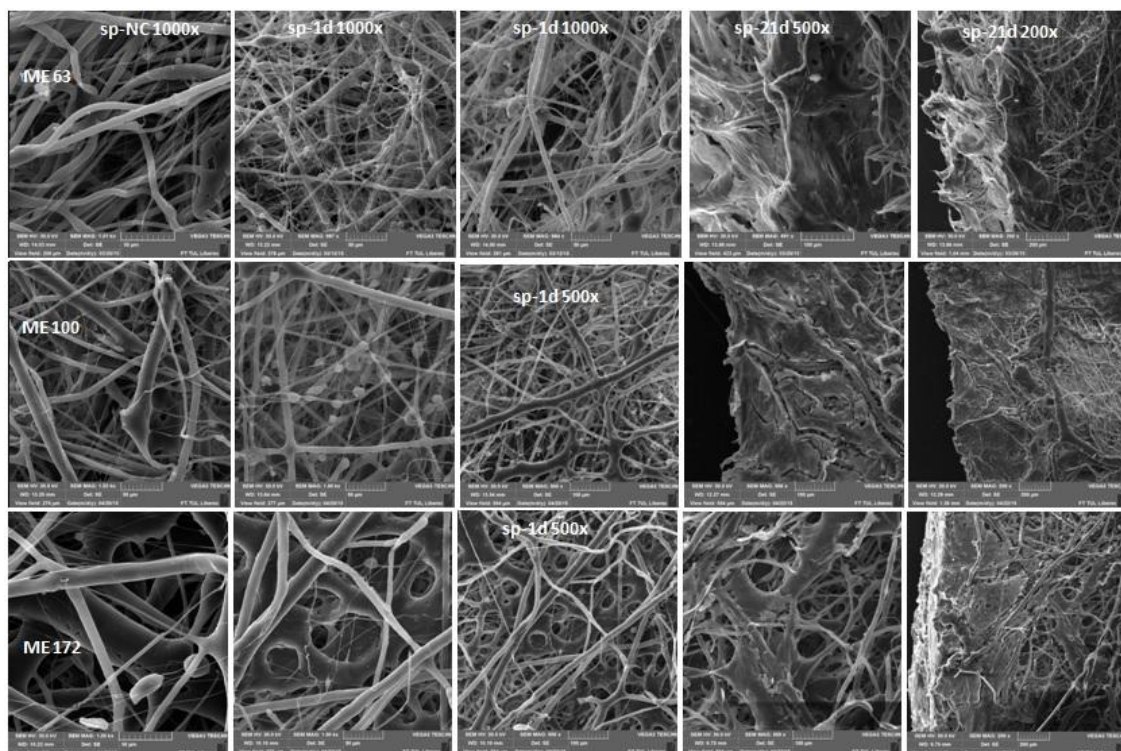
Výsledky

První sada obrázků (Obrázek 39) dokumentuje vrchní stranu materiálů 1. a 21. den po nasazení MG-63 osteoblastů. Řádky reprezentují jednotlivé materiály (ME63, ME100 a ME172). V prvním sloupci jsou prezentovány negativní kontroly se zvětšením 1000x. V druhém a třetím sloupcu jsou zobrazeny snímky pořízené 1. den po nasazení buněk se zvětšením 1000x a 500x. Ve čtvrtém a pátém sloupcu jsou zobrazeny snímky pořízené 21 den po nasazení buněk se zvětšením 1000x a 500x.



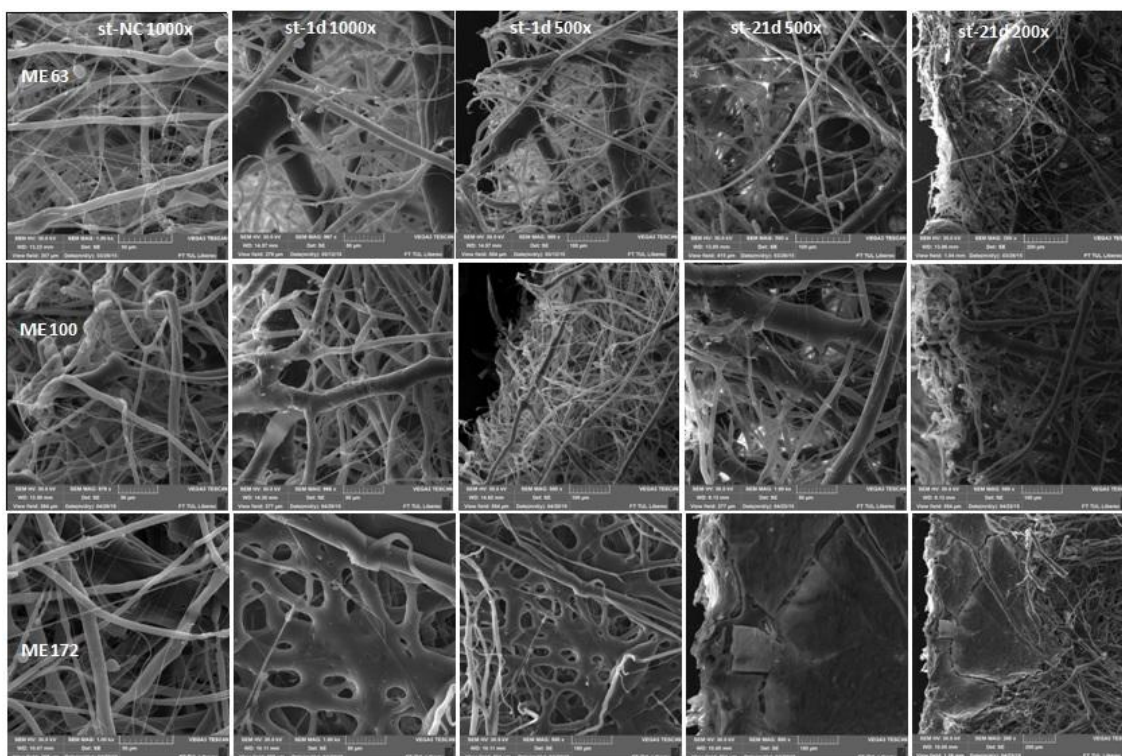
Obrázek 39: Snímky SEM - vrchní vrstva - zvětšení 500x a 1000x

Druhá sada obrázků (Obrázek 40) dokumentuje spodní stranu materiálů 1. a 21.den po nasazení MG-63 osteoblastů. Řádky reprezentují jednotlivé materiály (ME63, ME100 a ME172). V prvním sloupci jsou prezentovány negativní kontroly se zvětšením 1000x. V druhém a třetím sloupcu jsou zobrazeny snímky pořízené 1. den po nasazení buněk se zvětšením 500x a 1000x. Ve čtvrtém a pátém sloupcu jsou zobrazeny snímky pořízené 21. den po nasazení buněk se zvětšením 200x a 500x.



Obrázek 40: Snímky SEM - spodní vrstva - zvětšení 200x, 500x a 1000x

Třetí sada obrázků (Obrázek 40) dokumentuje střední stranu materiálů 1. a 21. den po nasazení MG-63 osteoblastů. Řádky reprezentují jednotlivé materiály (ME63, ME100 a ME172). V prvním sloupci jsou prezentovány negativní kontroly se zvětšením 1000x. V druhém a třetím sloupcu jsou zobrazeny snímky pořízené 1. den po nasazení buněk se zvětšením 500x a 1000x. Ve čtvrtém a pátém sloupcu jsou zobrazeny snímky pořízené 21. den po nasazení buněk se zvětšením 200x a 500x.



Obrázek 41: Snímky SEM - střední vrstva - zvětšení 200x, 500x a 1000x

Fluorescenční mikroskopie potvrdila původní tvrzení z MTT testování a to, že struktura testovaných materiálů nemá vliv na míru buněčné adheze. U všech materiálů byla buněčná jádra vidět ve srovnatelné hustotě (Obrázek 36).

Snímky z fluorescenční mikroskopie potvrdily pokles absorpance od 21. dne, kdy bylo možné vidět vzrůstající počet buněk s fragmentovaným jádrem signalizující buněčnou smrt. Ke snížení počtu živých buněk na testovaných materiálech od 21. dne došlo pravděpodobně ze dvou důvodů. Prvním důvodem bylo dosažení maximální konfluency buněk na povrchu materiálu po 14. dnu (Obrázek 36), kdy kontaktní

inhibice způsobila zastavení dalšího dělení buněk. Druhým důvodem byla neschopnost buněk proliferovat dále do vnitřních struktur scaffoldu (Obrázek 37 a Obrázek 38).

Chování buněk na testovaných materiálech velmi přehledně dokumentují snímky pořízené elektronovou mikroskopií (Obrázek 39, Obrázek 40 a Obrázek 41). Na povrchu (Obrázek 39) vidíme na všech materiálech 21. testovací den buňky ve formě kompaktních povlaků. Nanovláknový povrch umožňoval buňce se rozprostřít a jediná buňka byla v kontaktu s několika nanovláknými zároven. Podobně se chovaly i spodní vrstvy testovaných materiálů (Obrázek 40), které ovšem prorůstaly od okrajů (buňky byly nasazeny pouze na vrchní stranu materiálů). Snímky středních vrstev (Obrázek 41), kdy můžeme pozorovat rozrůstání buněk od okraje materiálů směrem do vnitřních vrstev. Buňky se rozprostírají po nanovláknách, zatímco mikrovlákna udržují porozitu materiálů.

Nabízí se otázka, zda by rychlejší proliferaci nepodpořila ještě více porézní struktura materiálů. Nutno zmínit, že pokud byla testovaná vrstva těsně pod vrchní vrstvou, bylo nalezeno jen velmi málo buněk - z čehož lze odvodit, že vrchní vrstva svým obsahem nanovláken působí zároveň jako bariéra pro prorůstání buněk do vnitřních struktur.

Morfologicky lze vidět na materiálech obohacených nanovláknými buňky ve formě povlaků, kde jsou buňky rozprostřeny přes řadu jednotlivých nanovláken, zatímco u mikrovláknových struktur buňky pouze prorůstají (obalují) jednotlivá vlákna. Nanovláknový povrch umožňuje buňce rozprostřít se a jediná buňka je v kontaktu s více nanovláknými zároven.

V průběhu testování byly materiály tvarově stále, výjimkou byl materiál ME172, který se v průběhu testování začal samovolně rozpadat na jednotlivé vrstvy. Pravděpodobně v důsledku přerušovaného procesu výroby (viz kapitola 3.1.3), kdy bylo nutné doplňovat polymerní směs pro elektrické zvláknování. Tím pádem docházelo k zasychání vytvořené vlákně vrstvy na kolektoru a při zpětném obnovení výrobního procesu nedošlo k úplnému napojení. Proto jsou některé výsledky u tohoto materiálu zavádějící. Zejména snímky dokumentující proliferaci do vnitřních struktur (Obrázek 41) jsou tímto problémem ovlivněny, neboť díky oddělenějším vrstvám buňky snadněji prorůstaly do vnitřních struktur. Buňky se v podstatě šířily do vnitřních struktur po

"povrchu" materiálu. Navíc spodní vrstva u tohoto materiálu vykazovala velké množství rozsáhlých defektů neznámého původu (Obrázek 40).

4 Výsledky a Diskuse

Všechny tři testované vzorky měly stejnou plošnou hmotnost - 250 gm⁻², tloušťku - 5 mm a pórovitost - 95%. Morfologie materiálů (průměry vláken a průměry mezivláknenných prostor) byla analyzována pomocí SEM a obrazové analýzy. Objemový podíl nanovláken v jednotlivých materiálech (postupně pro ME63, ME100 a ME172) byl 2%, 1% a 0,5% z celkového objemu materiálů. Číselný poměr nanovláken oproti mikrovláknům byl 53%, 48% a 40%.

V Průběhu testování materiály ME63 a ME100 prokazovaly velmi dobrou integritu, naopak struktura materiálu ME172 se v průběhu testování začala rozpadat, na základě čehož nebyl shledán vhodným vzhledem k mechanickým vlastnostem.

Výsledky materiálové analýzy pomocí EDS jasně prokázaly obsah mikrovláken (melt blown) a nanovláken (elektrického zvlákňování) ve vyrobených kompozitních vrstvách. Tímto bylo prokázáno, že se v daných kompozitních vrstvách kombinují vlákna z obou technologií.

Biologické testování probíhalo celkově 28 dní s testovacími dny 1. , 7. , 14. , 21. a 28. Test buněčné adheze byla prováděn po 24 hodinách od nasazení buněk a objasňoval schopnost buněk adherovat na povrch jednotlivých materiálů. Výsledky byly u všech materiálů srovnatelné, čímž poukázaly na to, že rozdílná struktura nemá vliv na míru buněčné adheze.

Test buněčné proliferace byl prováděn po dobu 28 dní od nasazení buněk ve stanovených testovacích dnech. Z naměřených hodnot absorbance byl patrný nárůst 7. a 14. den po nasazení osteoblastů a to shodně u všech testovaných materiálů. Od 21. dne docházelo k poklesu hodnot absorbance, což naznačovalo buněčnou smrt. Ke snížení počtu živých buněk došlo pravděpodobně ze dvou důvodů. Prvním důvodem bylo nejspíše dosažení maximální konfluence buněk na povrchu materiálů, kdy kontaktní inhibice způsobila zastavení dalšího buněčného dělení. Druhým důvodem byla zřejmě neschopnost buněk proliferovat dále do vnitřní struktury testovaných materiálů.

Výsledky MTT testu byly u všech sledovaných materiálů srovnatelné, použité poměry nano a mikrovláknenné složky tedy podporují buněčnou proliferaci na stejné úrovni.

Na povrchu všech materiálů buňky 21. testovací den vytvořily kompaktní povlak, což bylo způsobeno díky obsahu nanovláken v dané struktuře. Nanovláknenný povrch způsobil, že buňka měla možnost se rozprostřít díky kontaktu s několika nanovláknny zároveň. Podobně se buňky chovaly i na spodních stranách testovaných materiálů jen s tím rozdílem, že se šířily od okraje, protože byly nasazovány pouze na vrchní strany vzorků. Zajímavé bylo pozorování středních vrstev, kde docházelo k tomu, že se buňky postupně šířily od okraje. K šíření směrem do středu vláknenné struktury buňky využívaly nanovláken, zatímco mikrovlákna sloužila k udržení porozity materiálů.

V průběhu testování se u materiálu ME172 projevovaly jeho špatné mechanické vlastnosti, proto mohou být některé jeho výsledky zavádějící. Zejména pak výsledky proliferace do vnitřní struktury, protože buňky neprorůstaly, ale šířily se po povrchu v důsledku rozpadu materiálu na jednotlivé vrstvy. Dalším negativním aspektem u tohoto materiálu byla jeho spodní strana, na které bylo pozorováno velké množství defektů.

Námětem na další směr vývoje je, zda by rychlejší a snazší proliferaci nepodpořila ještě více porézní vnitřní struktura materiálu. Pokud byla testována vrstva těsně pod vrchní vrstvou, bylo nalezeno jen velmi málo buněk z čehož se zdá, že vrchní vrstva svým obsahem nanovláken působila zároveň jako bariéra pro prorůstání buněk do vnitřních struktur. Vzhledem k tomu by bylo zajímavé pozorovat prorůstání buněk materiálem, jenž by měl horní a spodní vrstvu tvořenou z kombinace mikro a nanovláken a střed scaffoldu by tvořila pouze mikrovlákna.

Další alternativou pro řešení tohoto problému by mohla být modifikace (funkcionalizace) materiálu vhodnými biologicky aktivními molekulami, které by dále stimulovaly buněčnou proliferaci - například růstové faktory.

5 Závěr

Cílem diplomové práce bylo optimalizovat výrobní proces kombinující melt blown a elektrického zvlákňování. Následně bylo záměrem vytvořit několik druhů tkáňových nosičů s rozdílným zastoupením nano a mikrovláken ve své struktuře. Dalším cílem bylo ověřit rozdílné zastoupení nano a mikrovláken ve struktuře vyrobených scaffoldů pomocí obrazové analýzy. Posledním bodem bylo biologické testování, které mělo posoudit adhezi a proliferaci buněk na scaffoldech ve vztahu k rozdílnému zastoupení nano - mikrovláken a zhodnotit využitelnost vytvořených tkáňových nosičů pro aplikaci v regenerativní medicíně se zaměřením na kostní tkáň.

Výrobní proces se podařilo optimalizovat a během výroby vláknenných struktur nebyly zaznamenány žádné závažné problémy. Výrobní proces se bez problému dařilo opakovat a materiály vykazovaly podobné strukturní parametry. Menším nedostatkem byla nutnost přerušování výroby kvůli potřebě doplnění polymerního roztoku do zásobníku a očištění strun spinneru. Na základě těchto nedostatků byla navržena vylepšení v oblasti dávkování polymerního roztoku a nahrazením strunového spinneru ojehlenou proti elektrodou u technologie elektrického zvlákňování.

Regulací otáček šroubu extrudéru se úspěšně podařilo vytvořit tři druhy tkáňových nosičů označených ME63, ME100 a ME172. Pozdější analýza SEM potvrdila rozdílné zastoupení nano a mikrovláken v jejich strukturách. Konkrétní číselné poměry nanovláken byly u materiálu ME63 53%, u materiálu ME100 48% a u materiálu ME172 40%.

Biologické testování prokázalo z hlediska buněčné adheze srovnatelné výsledky u všech tří typů tkáňových nosičů a určilo, že rozdílná struktura nemá vliv na míru adheze osteoblastů.

Míra buněčné proliferace byla sledována v průběhu 4 týdnů od nasazení buněk. Z hodnot absorbance MTT testu a snímků z fluorescenční a elektronové mikroskopie lze říci, že u všech testovaných materiálů byl sledován nárůst buněčné viability v prvních dvou týdnech, v dalším období pak nastává pokles zřejmě vlivem dosažení maximálního nárůstu na povrchu materiálů a nemožnosti proliferace buněk hlouběji do vnitřní struktury materiálu. Morfologicky byly na povrchu u všech tří scaffoldů vidět buňky ve formě povlaků, ve kterých byly buňky rozprostřeny přes řadu jednotlivých vláken, zatímco u mikrovláknenných struktur buňky pouze porůstají (obalují) jednotlivá

vlákna. Nanovláknový povrch tety umožňoval buňce se rozprostřít a jediná buňka byla v kontaktu s několika nanovláknými zároveň. Tento fakt ukazuje na příznivý účinek zvyšujícího se poměru nanovláken na proliferaci buněk. Z hlediska testování proliferace osteoblastů do vnitřní struktury scaffoldů naměřené výsledky ukazovaly, že struktura materiálu umožňuje buňkám pronikat strukturou a proliferovat i ve vnitřních vrstvách, nicméně nedocházelo k zaplnění celého vnitřního prostoru.

Materiál ME172 se v průběhu testování začal rozpadat, proto se jeví obsah nanovláken 40% jako kritická mez.

Na základě výsledků se pro využití jako tkáňový nosič v regenerativní medicíně se zaměřením na kostní tkáň nejlépe jeví materiál ME63.

Prvotní výsledky této práce již byly v roce 2015 prezentovány na konferenci NART v Liberci. Dále byl na základě této práce vytvořen článek: The combination of meltblown and electrospinning – the influence of the ratio of micro and nanofibers to assistance cells viability do časopisu Material Letters, jehož předpokládaná publikace je v roce 2016.

6 Použitá literatura

- [1] JIRSÁK, Oldřich a Klára KALINOVÁ. NETKANÉ TEXTILIE [online]. [cit. 2015-10-07]. Dostupné z:
https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/938/mod_resource/content/1/Oldrich%20Jirsak%20a%20Klara%20Kalinov%C3%A1.pdf
- [2] C. DUTTON, Kathryn. Overview and Analysis of the Meltblown Process and Parameters [online]. [cit. 2015-10-06]. Dostupné z:
<http://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/JTATM/article/view/342/275>
- [3] DAHIYA, Atul a . MELT BLOWN TECHNOLOGY [online]. 2004 [cit. 2015-10-07]. Dostupné z:
<http://www.engr.utk.edu/mse/Textiles/Melt%20Blown%20Technology.htm>
- [4] Ellison, C.J. et al. Melt blown nanofibres (Fiber diameter distributions and onset of fiber breakup). *Polymer* 48, 3306-3316 (2007)
- [5] Han W, Wang X, Bhat GS (2013) Structure and Air Permeability of Melt Blown Nanofiber Webs. *J Nanomater Mol Nanotechnol* 2:3
- [6] MÜLLER, D. H. a A. KROBJILOWSKI. Meltblown fabrics from biodegradable polymers. *International Nonwovens Journal*. 2001. Dostupné také z:
<http://www.tappi.org/Bookstore/Technical-Papers/Journal-Articles/Archive/INJ/Archives/2001/March/Meltblown-fabrics-from-biodegradable-polymers-International-Nonwovens-Journal-March-2001-Vol-10.aspx>
- [7] *Elektrostatické zvlákňování z volné hladiny polymerních roztoků* [online]. In: . [cit. 2015-10-15]. Dostupné z:
https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/5384/mod_resource/content/0/AIII_EIStat%20zvl%C3%A1k%C5%88ov%C3%A1n%C3%AD.pdf
- [8] LUKÁŠ, D. *Fyzikální principy tvorby nanovláken: Historie* [online]. In: . [cit. 2015-10-15]. Dostupné z:
https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/125/course/section/101/2_Historie%20cz.pdf
- [9] KRCHOVÁ, S., L. DZAN, D. LUKÁŠ, P. MIKEŠ, V. JENČOVÁ, J. HORÁKOVÁ a K. PILAŘOVÁ. *Nanovlákná v hojení kožních ran*. Česká dermatologie. 2014.

- [10] Nanospider. *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2014 -10-4 [cit. 2015-10-15]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Nanospider>
- [11] LUKAS, D., A. SARKAR, L. MARTINOVÁ, K. VODSEĎÁLKOVÁ, et al. Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century). *Textile progress*, 2009
- [12] Lukas D. et al., 2008 [Nonwoven Fabrics] Principles of Electrospinning, Lukas D., Sarkar A., Chaloupek J, (Chapter submitted), *Nonwoven Fabrics*, Edited by V. K. Kothari, IAFL Publications, New Delhi, India (Lukas et al. 2008a)
- [13] HUANG, Z., M. KOTAKI a S. RAMAKRISHNA. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *ScienceDirect: Composites Science and Technology* [online]. **2003** [cit. 2015-12-31].
- [14] Elektronová mikroskopie pro biology: Historie [online]. 2001 [cit. 2015-10-21]. Dostupné z: <http://www.paru.cas.cz/lem/book/Podkap/1.0.html>
- [15] HAVLÍČEK, Petr. Design elektronového mikroskopu. Brno, 2010. Diplomová práce. VUT Brno. Vedoucí práce Miroslav Zvonek.
- [16] TEM, SEM, HRTEM [online]. [cit. 2015-10-22]. Dostupné z: <http://physics.ujep.cz/~mkormund/P219/NanoMataChar-prednaska4.pdf>
- [17] Fluorescenční mikroskop: Historie. *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 30.6.2015 [cit. 2015-12-01].
- [18] Mikroskopy: Fluorescence [online]. [cit. 2015-11-09]. Dostupné z: <http://www.mikroskop-mikroskopy.cz/fluorescence/>
- [19] SEHADOVÁ, Hana. Fluorescenční a konfokální mikroskopie [online]. 2011 [cit. 2015-11-09]. Dostupné z: <http://alfa.bc.cas.cz/doc/ekotech/study/Fluorescencni-a-konfokalni-mikroskopie.pdf>
- [20] SPRING, Kenneth R. Fluorescence Microscopy [online]. 2003 [cit. 2015-11-09]. Dostupné z: https://www.microscopyu.com/references/pdfs/Spring_Fluorescence_Microscopy.pdf
- [21] HUTMACHER, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *ScienceDirect: Biomaterials* [online]. 2000 [cit. 2015-12-31].

- [22] 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
- [23] Velký lékařský slovník [online]. [cit. 2015-11-16]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/>
- [24] GURLAND, H., A. DAVISON a V. BONOMINI. *Definitions and terminology in biocompatibility*. Nephro Dial Transplant. 1994.
- [25] *Oddělení nanotechnologií a informatiky: Biodegradabilní materiály*[online]. [cit. 2015-11-16]. Dostupné z: <https://int.cxi.tul.cz/cs/Bidegradabilita>
- [26] BROWN P., STEVENS J., (2007), *Manofibers and nanotechnology in textiles*, Woodhead Publishing, ISBN: 978-184-569-1059
- [27] 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.
- [28] WANG, X., B. DING a B. LI. Biomimetic electrospun nanofibrous structures for tissue engineering. *ScienceDirect* [online]. 2013 [cit. 2015-12-07].
- [29] WANG, Ping, Liang ZHAO a Jasun Liu. Bone tissue engineering via nanostructured calcium phosphate biomaterials and stem cells. *Bone Research*. Sichuan University, 2014 [cit. 2015-12-07].
- [30] FIROZ M., (2008), Presentation – Bone histology, Balkh medical college – Balkh university.
- [31] ERBEN, J. *Vývoj a studium struktury objemových mikro-nanovláčených vrstev pro medicínské aplikace*. Liberec, 2014. Diplomová práce. Technická univerzita Liberec. Vedoucí práce J. Chvojka.
- [32] 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.
- [33] D. ZEUGOLIS, S. KHEW, Y TONG a A. EKAPUTRA. Electro-spinning of pure collagen nano-fibre. Just an expensive way to make gelatin? *ScienceDirect* [online]. 2008 [cit. 2015-12-07].

- [34] KRCHOVÁ, S. Nanovlákná v hojení kožních ran. *Čes. Dermatovenerol* [online]. 2014 [cit. 2015-12-07].
- [35] HERMANOVÁ, S., VYROUBALOVÁ, Z., VOJTOVÁ, L., CABRERA, L., (2011), *Novel triazole-based aluminium complex for ring - opening polymerization of lactones*, *Polymer Bulletin*, [cit. 2015-12-07].
- [36] Polykaprolakton: biodegradabilní polyester. [online]. [cit. 2014-12-16].
Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/polykaprolakton-biodegradabilni-polyester>
- [37] HUTMACHER, D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *ScienceDirect* [online]. 2000 [cit. 2015-12-09].
- [38] MANUELA, M. a E. GOMES. A Bone tissue engineering strategy based on starch scaffolds and bone marrow cells cultured in a flow perfusion bioreactor [online]. UNIVERSIDADE DO MINHO, 2004 [cit. 2015-12-08].
- [39] CARRIÇO, C.A., M. FARRACHO, C. NUNES, A.M. RUELA a J. SEMEDO. Bone Tissue Engineering: Production of Scaffolds. *Introdução Engenharia Biomédica* [online]. 2007/2008 [cit. 2015-12-09].
- [40] WNEK, G.E. a G.L. BOWLIN. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering: Volume 2*. 2004. Marcel Dekker.
- [41] CHEN, G., T. USHIDA a T. TATEISSHI. Development of biodegradable porous scaffolds for Tissue Engineering. *Materials Science and Engineering* [online]. 2001 [cit. 2015-12-09].
- [42] LANZA, R.P., R. LANGER a J. VACANTI. *Principles of Tissue Engineering: Second Edition*. *ScienceDirect* [online]. 2000 [cit. 2015-12-09].
- [43] WOODFIELD, T.B.F., J. MALDA, J. de WIJN, F. PÉTERS a J. REISLE. Design of porous scaffolds for cartilage tissue engineering using a three-dimensional fiber-deposition technique. *ScienceDirect* [online]. 2004 [cit. 2015-12-09].
- [44] ERBEN, Jakub. *Vývoj a testování technologie pro pokrývání tří dimenzionálních struktur nanovláknny*. Liberec, 2012. Bakalářská práce. Technická Univerzita Liberec. Vedoucí práce J. Chvojka.

[45] *Přednášky: Meltblown* [online]. TUL Liberec [cit. 2015-12-31]. Dostupné z: https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/2586/mod_resource/content/0/%C5%A1est%C3%A11%20p%C5%99edn%C3%A1%C5%A1ka.pdf

7 Seznam použitých obrázků

Obrázek 1: Schéma melt-blown zařízení [45]	- 13 -
Obrázek 2: Znárodnění změny tvaru kapky při přiložení elektricky nabitě tyčky [9]-	19 -
Obrázek 3: Základní schéma elektrického zvláknování z trysky [12].....	- 20 -
Obrázek 4: Základní schéma proudění polymerního roztoku při tvorbě vlákněné vrstvy z trysky: 1- oblast stabilního proudu, 2 oblast nestabilního proudu, 3- tryska, 4- Taylorův kužel, 5- uzemněný kolektor [1]	- 21 -
Obrázek 5: Základní schéma TEM a SEM s popisem jejich základních částí[16]..	- 23 -
Obrázek 6: Příklady některých fluorescenčních barviv [19]	- 25 -
Obrázek 7: Schéma fluorescenčního mikroskopu [19].....	- 26 -
Obrázek 8: Základní schéma procesu tkáňového inženýrství [26]	- 27 -
Obrázek 9: Příklad schématu kosti [30].....	- 29 -
Obrázek 10: Příklady různých struktur scaffoldů [39]	- 30 -
Obrázek 11: Ukázka finální struktury povrchu scaffoldu - metoda vymývání částic	- 34 -
Obrázek 12: Schéma procesu ice particles as porogens[39].....	- 35 -
Obrázek 13: Ukázka finální struktury povrchu scaffoldu - metoda ledových částic. A) 70% zastoupení ledových částic z celkového objemu scaffoldu, B) 80% zastoupení ledových částic z celkového objemu scaffoldu [41].....	- 35 -
Obrázek 14: Ukázka finální struktury povrchu scaffoldu - metoda zpěňování plynem [42].....	- 36 -
Obrázek 15: Ukázka finální struktury povrchu scaffoldu - metoda separace fází [37]-	36
-	
Obrázek 16: Ukázka příkladu finální struktury povrchu scaffoldu - metoda 3D tisk [43]-	37 -
Obrázek 17: Melt - blown zařízení J & M LABORATORIES.....	- 40 -
Obrázek 18: Schéma nastavení hodnot teplot v jednotlivých zónách extrudéru a trysky .-	41 -
Obrázek 19: Schéma vzájemného uspořádání jednotlivých komponentů výrobních technologií MB a ELS s uvedenými vzájemnými rozměry [31]	- 42 -
Obrázek 20: Vyrobená vrstva před odebráním z kolektoru	- 44 -
Obrázek 21: Ostřížená vrstva.....	- 44 -
Obrázek 22: Schématické znázornění uspořádání zařízení MB v kombinaci s el. zvláknováním: 1 - kolektor, 2 - vlákněná vrstva, 3 - jehlový kolektor, 4 - proud vzduchu	

s vlákny, 5 - ojhlená protielektroda, 6 - melt-blown zařízení, 7 - čerpadla, 8 - extrudér,	
9 - zdroje vysokého napětí, 10 - násypka, 11 - převodovka, 12 - motor	- 44 -
Obrázek 23: Elektronový mikroskop TESCAN	- 46 -
Obrázek 24: Zlatička Quorum	- 46 -
Obrázek 25: Pozlacený terčík se vzorky určenými pro elektronovou mikroskopii ...	- 46 -
Obrázek 26: ME63 spodní strana, střed a vrchní strana - zvětšení 1000x.....	- 46 -
Obrázek 27: ME100 spodní strana, střed a vrchní strana - zvětšení 1000x.....	- 47 -
Obrázek 28: ME172 spodní strana, střed a vrchní strana - zvětšení 1000x.....	- 47 -
Obrázek 29: Nastavené hodnoty prahování	- 48 -
Obrázek 30: Původní snímek z SEM (vlevo) a ukázka vytvořených neexistujících pórů na povrchu vláken po prahování (vpravo)	- 49 -
Obrázek 31: Ukázka původního prahování 65 (vlevo) a změna prahování na 45 (vpravo)	- 49 -
Obrázek 32: Ukázka snímků z SEM - materiál s obsahem PVB - zvětšení 500x, 1000x a 2000x	- 56 -
Obrázek 33: Příprava vzorků	- 57 -
Obrázek 34: Redukce MTT na formazan mitochondriální reduktázou	- 59 -
Obrázek 35: Ukázka změny odstínu roztoku v závislosti na procentu živých buněk	- 60 -
Obrázek 36: Snímky fluorescenční mikroskopie - vrchní vrstva-barvivo PI - zvětšení 100x	- 63 -
Obrázek 37: Snímky fluorescenční mikroskopie - střední vrstva-barvivo PI - zvětšení 40x	- 64 -
Obrázek 38: Snímky fluorescenční mikroskopie - střední vrstva-barvivo DAPI - zvětšení 40x	- 64 -
Obrázek 39: Snímky SEM - vrchní vrstva - zvětšení 500x a 1000x.....	- 66 -
Obrázek 40: Snímky SEM - spodní vrstva - zvětšení 200x, 500x a 1000x	- 67 -
Obrázek 41: Snímky SEM - střední vrstva - zvětšení 200x, 500x a 1000x.....	- 68 -

8 Seznam tabulek

Tabulka 1 - Typické hodnoty pro polymery a podmínky tvorby vláken [3]	- 14 -
Tabulka 2 - Polymery používané v Melt - blown procesu[1]	- 14 -
Tabulka 3: Výsledné hodnoty průměrů vláken při rozdílných parametrech výroby a rozdílných materiálech [4]	- 15 -
Tabulka 4: Druhy testovaných polymerů se základními parametry testování [6]	- 17 -
Tabulka 5: Naměřené rychlosti otáček šroubu extrudéru vzhledem ke koeficientu nastavitelnému na MB	- 40 -
Tabulka 6: Nastavené hodnoty koeficientu na MB v poměru se skutečnými otáčkami využívané v průběhu výrobního procesu	- 41 -
Tabulka 7: Naměřené hodnoty průměrů vláken - ME63	- 50 -
Tabulka 8: Naměřené hodnoty průměrů vláken - ME100	- 51 -
Tabulka 9: Naměřené hodnoty průměrů vláken - ME100	- 51 -
Tabulka 10: Naměřené hodnoty průměrů mezivlákněných prostor- ME63	- 52 -
Tabulka 11: Naměřené hodnoty průměrů mezivlákněných prostor- ME100	- 53 -
Tabulka 12: Naměřené hodnoty průměrů mezivlákněných prostor- ME172	- 53 -

Příloha 1: Doplnění kapitol 3.4.2 - 3.4.5

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)

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