



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE MATERIÁLŮ

INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE

# PŘÍPRAVA MIKROVLÁKENNÝCH STRUKTUR NA BÁZI KOPOLYMERU PHB

PREPARATION OF MICROFIBER STRUCTURES BASED ON PHB COPOLYMER

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Alžbeta Kecíková

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Radek Přikryl, Ph.D.

BRNO 2022

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1746/2021 Akademický rok: 2021/22  
Ústav: Ústav chemie materiálů  
Studentka: **Bc. Alžbeta Kecíková**  
Studijní program: Chemie, technologie a vlastnosti materiálů  
Studijní obor: Chemie, technologie a vlastnosti materiálů  
Vedoucí práce: **Mgr. Radek Přikryl, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Příprava mikrovláknenných struktur na bázi kopolymeru PHB

### Zadání diplomové práce:

Vypracování rešerše na téma odstředivé zvláknění biopolymerních vláken na bázi kopolymerů PHB, zejména s ohledem na zvláknitelnost a možnosti modifikace výsledných povrchových vlastností vláken. Optimalizace procesu zejména pomocí viskozity, složení polymerního roztoku a procesních parametrů zvláknovacího procesu. Charakterizace fyzikálních a biochemických vlastností výsledných vláken (mechanické vlastnosti, smáčivost a nasákavost, množství zbytkového rozpouštědla, biokompatibilita).

### Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Alžbeta Kecíková  
studentka

-----  
Mgr. Radek Přikryl, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
doc. Ing. František Šoukal, Ph.D.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

-----  
prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan



## **ABSTRAKT**

Diplomová práca sa zaoberá prípravou mikrovláknitých štruktúr na báze poly(3-hydroxybutyrátu) (P3HB) a jeho kopolyméru s poly(4-hydroxybutyrátom) technológiou odstredivého zvlákňovania. Mikrovlákna boli taktiež modifikované prídavkom oligoméru P3HB a zmäkčovadla. Proces odstredivého zvlákňovania bol pre každý materiál optimalizovaný viskozitou roztoku, molekulovou hmotnosťou polyméru, rýchlosťou otáčania zvlákňovacej hlavy a prítomnosťou rozpúšťadla. V rámci optimalizácie bola úprava rozpúšťacieho systému pridaním kyseliny mravčej a octovej. Mikrovláknité štruktúry boli skúmané z hľadiska morfológie, mechanických vlastností, zmáčania a biokompatibility. Vlákna P3HB boli taktiež povrchovo upravované roztokmi lipáz k zníženiu ich hydrofóbnosti. Pripravené objemné kokóny vlákien majú vhodnú 3D mikroštruktúru na sledovanie a testovanie biologických vlastností v prostredí in vitro. Potenciálna aplikácia mikrovláknitých štruktúr je teda ako 3D nosiče bunkových kultúr v in vitro systéme.

## **ABSTRACT**

Master's thesis deals with the preparation of microfibrinous structures based on poly(3-hydroxybutyrate) (P3HB) and its copolymer with poly(4-hydroxybutyrate) using centrifugal spinning technology. The microfibers were modified by the addition of oligomer P3HB and a plasticizer. The centrifugal spinning process was optimized for each material by solution viscosity, polymer molecular weight, speed of spinneret, and presence of solvent. One of the part of optimalization was the addition of formic acid and acetic acid to the dissolution system. Microfibrinous structures have been investigated in terms of morphology, mechanical properties, wetting and biocompatibility. P3HB fibers were also surface treated with lipase solutions to reduce their hydrophobicity. The prepared bulky fiber cocoons have a suitable 3D microstructure for monitoring and testing biological properties in vitro. Thus, a potential application of microfiber structures is as 3D cell culture carriers in an scaffolds in vitro system.

## **KĽÚČOVÉ SLOVÁ**

Mikrovlákna, poly(3-hydroxybutyrát), odstredivé zvlákňovanie, 3D skaffold, hydrofobilita

## **KEYWORDS**

Microfibers, poly(3-hydroxybutyrate), centrifugal spinning, 3D scaffold, hydrophobicity

KECÍKOVÁ, Alžbeta. Příprava mikrovlákných struktur na bázi kopolymeru PHB. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/137417>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie materiálů. Vedoucí práce Radek Přikryl.

### **Prehlásenie**

Prehlasujem, že diplomovú prácu som vypracovala samostatne pod vedením a konzultáciou Mgr. Radka Přikryla PhD. a Ing. Zuzany Greguškovéj, a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť použitá ku komerčným účelom iba so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....

Podpis študenta

### **Pod'akovanie**

Z tohto miesta by som veľmi chcela poďakovať môjmu vedúcemu Mgr. Radkovi Přikrylovi PhD. a konzultantke Ing. Zuzane Greguškovéj za ich odbornú pomoc, cenné rady, trpezlivosť a psychickú podporu počas celej doby štúdia. Taktiež sa chcem poďakovať celému tímu End-of-life laboratory za vytvorenie príjemného pracovného prostredia. V neposlednom rade chcem poďakovať mojej rodine a priateľom, ktorí pri mne stáli počas celej doby štúdia.

## OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická časť.....	8
2.1	Mikrovlákna.....	8
2.2	Produkcia mikrovlákien.....	8
2.2.1	Odstredivé zvlákňovanie .....	11
2.3	Polyhydroxyalkanoáty .....	13
2.3.1	Poly(3-hydroxybutyrát).....	14
2.3.2	Poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát) .....	15
2.4	Povrchová úprava .....	15
2.5	Potenciálna aplikácia pripravených mikrovláknitých štruktúr .....	16
2.6	Charakterizácia povrchových vlastností vláknitých štruktúr.....	18
2.6.1	Zmäčanie a nasiakavosť vlákien .....	18
3	Experimentálna časť .....	22
3.1	Materiály.....	22
3.2	Zloženie a príprava roztokov na odstredivé zvlákňovanie .....	22
3.3	Úprava roztokov a vlákien k zvýšeniu hydrofilnosti (nasiakavosti) P3HB vlákien..	24
3.4	Procesné podmienky odstredivého zvlákňovania.....	24
3.5	Charakterizácia roztokov a mikrovlákien.....	25
3.5.1	Meranie viskozity .....	25
3.5.2	Stanovenie molekulovej hmotnosti .....	26
3.5.3	Diferenčná kompenzačná kalorimetria.....	26
3.5.4	Infračervená spektroskopia s Fouierovou transformáciou .....	27
3.5.5	Röntgenová fotoelektrónová spektroskopia .....	27
3.5.6	Skenovací elektrónový mikroskop .....	27
3.5.7	Meranie zmáčania a nasiakavosti .....	28
3.5.8	Mechanické vlastnosti .....	29
3.5.9	Stanovenie zvyškového rozpúšťadla .....	30
3.5.10	Biologické testy – test metabolickej aktivity, bunkovej proliferácie a distribúcie buniek v mikrovláknitých štruktúrach.....	30
4	Výsledky a diskusia.....	32

4.1	Optimalizácia procesu odstredivého zvlákňovania .....	32
4.1.1	Vlastnosti roztoku .....	32
4.1.2	Procesné parametre .....	35
4.2	Vplyv rozpúšťacieho systému na zvlákňovanie .....	36
4.3	Úbytok rozpúšťadla .....	38
4.4	Morfológia mikrovláknitých štruktúr .....	39
4.5	Mechanické vlastnosti .....	45
4.6	Zmáčanie a nasiakavosť .....	47
4.7	Biologické vlastnosti .....	57
5	Záver .....	64
6	Zoznam použitej literatúry .....	66
7	Zoznam príloh .....	76

# 1 ÚVOD

V poslednej dobe dochádza k veľkému rozvoju poznatkov v medicínskej a farmaceutickej oblasti nových implantátov do tela alebo štúdia nových liečiv. Výskum a vývoj pre medicínske aplikácie alebo testovanie nových liečiv sa nezaobíde bez predchádzajúcej štúdie na bunkách v prostredí *in vitro*. Už pri sledovaní správania sa buniek *in vitro* ako je ich rast, adhézia či proliferácia alebo diferenciácia v závislosti na napríklad vyvíjanom materiály alebo liečive, je možné stanoviť následné kroky ďalšieho výskumu v tejto oblasti. Biologické testy buniek sú štandardne prevádzané na 2D substrátoch spravidla polystyrénových testovacích dosiek. Nevýhodou týchto testov však je, že bunky rastú len v jednej rovine. Ich správanie by teda neodpovedalo typickému prostrediu *in vivo*. Pre lepšiu porovnateľnosť odozvy buniek v prostredí *in vivo* a *in vitro* je vhodné ich testovanie na 3D nosičoch. Keďže prostredie v živom organizme je predovšetkým porézne a často i vláknitého charakteru, je vhodné použiť 3D nosič práve o tejto štruktúre [1].

Technológiou odstredivého zvlákňovania dochádza k produkcii mikrovláknitej štruktúry a za vhodných procesných podmienok vzniká pomerne objemná vláknitá štruktúra podobná vate s porozitou až 95 %. Táto technológia je pre zamyslený účel vhodná taktiež z dôvodu jednoduchosti procesu aj jej cenovej výhodnosti. Spracovávaný materiál nie je navyše termicky namáhaný.

K úspešnej kultivácii buniek a následné sledovanie správania sa buniek vplyvom zvolených testovaných faktorov na 3D nosičoch je predovšetkým potrebné, aby materiál nosiča bol biokompatibilný. Medzi veľkú skupinu takýchto (biokompatibilných) materiálov patria polyhydroxyalkanoáty. Medzi najčastejšie zastúpený a skúmaný polymér zo skupiny polyhydroxyalkanoátov patrí poly(3-hydroxybutyrát) (P3HB) a jeho kopolyméry s 4-hydroxybutyrátom a 3-hydroxyvalerátom.

Práca sa preto zaoberá technológiou odstredivého zvlákňovania materiálu na báze P3HB a ich kopolyméru. V teoretickej časti je zhrnutý proces výroby mikrovlákien a materiály vhodné k odstredivému zvlákňovaniu. Ďalej sa v teoretickej časti nachádzajú možné povrchové úpravy hydrofóbných povrchov P3HB a potenciálna aplikácia mikrovlákien ako 3D nosiča.

V experimentálnej časti je opísaná optimalizácia procesu odstredivého zvlákňovania a následná charakterizácia mikrovlákien z hľadiska morfológie, mechanických vlastností zmáčania a biologických vlastností. Diskutovaný je vplyv prídavku aditív a použitie kopolyméru poly(3-hydroxybutyrátu-co-4-hydroxybutyrátu) na výsledné vlastnosti vláknitých štruktúr.

## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

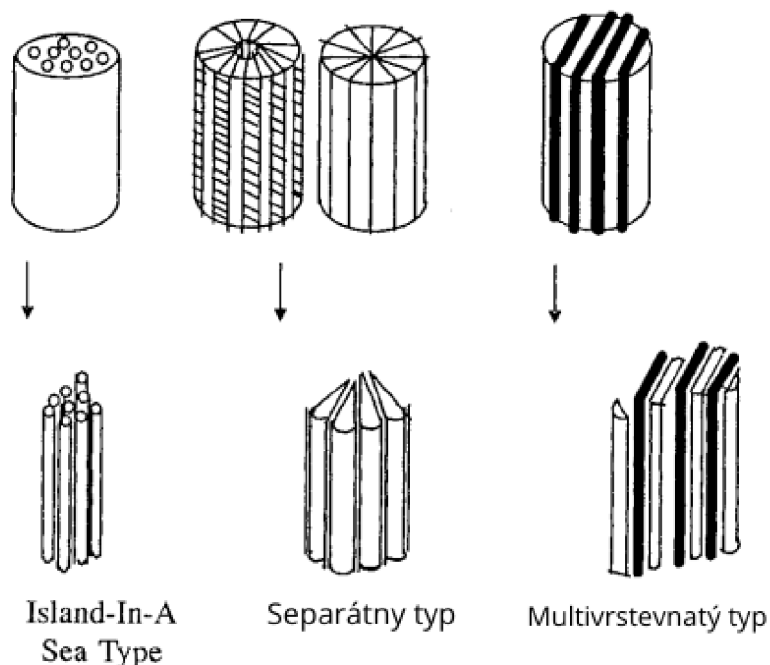
V teoretickej časti diplomovej práce je rozobraná problematika mikrovláknien a ich príprava odstredivým zvlákňovaním. Ďalej sú v práci popísané materiály použiteľné k ich výrobe, hlavne so zameraním na polyhydroxyalkanoáty. Následne je popísaná potenciálna aplikácia mikrovláknitých štruktúr ako 3D nosiče pre bunkové kultúry, tzv. skaffoldy a ich možná povrchová modifikácia.

### 2.1 Mikrovláknna

V súčasnej dobe ešte stále neexistuje presná definícia mikrovláknien [2]. Všeobecne však definície mikrovláknien súvisia s ich priemerom, dĺžkou alebo hmotnosťou vlákna [3]. Pomocou parametru jemnosti v jednotkách dtex sa mikrovláknna označujú ako vlákna v rozsahu 0,3–1 [4]. Veľkosť polyesterového vlákna o rozmere 1 dtex je približne rovná priemeru vlákna 10  $\mu\text{m}$  [5]. Ďalej niekoľko publikácií uvádza mikrovláknna s priemerom menším alebo rovným 10  $\mu\text{m}$  [6]. Vďaka malému priemeru, väčšiemu povrchu, pórovitej štruktúre mikrovláknien a ich prispôsobivosti je možné mikrovláknna použiť v rôznych aplikáciách ako sú módný a športový priemysel, filtračné tkaniny, medicínske aplikácie, tkaninové inžinierstvo a iné [7].

### 2.2 Produkcia mikrovláknien

Existuje mnoho technológií, ktorými je možné produkovať mikrovláknna. Všeobecne sa technológie rozdeľujú podľa typu mikrovláknien na: mikrovláknna kontinuálneho typu vlákna a mikrovláknna s diskontinuálnym usporiadaním [3]. V nasledujúcich tabuľkách (Tab. 1, Tab. 2) je zhrnutý stručný prehľad jednotlivých technológií k produkcii mikro–nanovláknien.



Obr. 1: Typy konjugovaného zvlákňovania [4]

Tab. 1: Prehľad technológií k produkcii kontinuálnych mikro až nanovlákien

Technológia	Princíp	Výhoda	Nevýhoda	Ref.
Priame zvlákňovanie (direct spinning)	<p><b><i>Melt spinning</i></b></p> <p>Polymér je extrudovaný do zvlákňovacej hlavice (obsahuje niekoľko dier) a tavenina polyméru prechádza prúdom vzduchu.</p>	<p>Jednoduchá a ľahko kontrolovateľná, získanie jemného vlákna, vysoká produkcia vlákien, na výrobu netkanej textílie</p>	<p>Zlomenie taveniny, variácia hrúbky filamentu, upchatie zvlákňovacej hlavice, citlivá na obsah vlhkosti</p>	[8] [3]
	<p><b><i>Solution spinning</i></b></p> <p>Polymér je rozpustený vo vhodnom rozpúšťadle a extrudovaný zo zvlákňovacej hlavice v koagulačnej nádrži (wet spinning) alebo v odparovacej komore (dry spinning).</p>	<p>Vhodný na tepelne citlivé polyméry (wet spinning), Flexibilný proces zvlákňovania (dry spinning), vhodný k produkcii ultra-jemných vlákien</p>	<p>Pomalší proces zvlákňovania ako melt a dry spinning, zvyškové nečistoty (wet spinning), nutná pozvlákňovacia úprava (dry), vysoká teplota</p>	[9]
Konjugované zvlákňovanie	<p>Spriadanie/zvlákňovanie mikrovlákien s viacerými typmi materiálov. Medzi najznámejšie technológie konjugovaného zvlákňovania patrí island-in-an sea, separátne a multyvrstevnatý typ.</p>	<p>Pomer zložiek a tvar jednotlivých komponentov je rôznych</p>	<p>Náročné farbenie vlákien</p>	[3] [10]
Polymer blend spinning	<p>Touto metódou sa vyrábajú konjugované vlákna vytláčaním a ťahaním zmiešanej polymérnej taveniny z dvoch zložiek.</p>	<p>Vlákna z dvoch polymérov</p>	<p>Nezískavajú sa ultra-jemné vlákna, [3] častý rozpad vlákien počas zvlákňovania, stabilita zvlákňovania závisí na kombinácií polymérov</p>	[3]

Tab. 2: Stručný prehľad technológií k produkcii diskontinuálnych mikro až nanovlákien

Technológia	Princíp	Výhoda	Nevýhoda	Ref.
Melt-blown Spunbond	<p>Tavenina polyméru je cez trysku zvlákňovacej hlavy vysokou rýchlosťou rozfukovaná horúcim vzduchom. Vlákna sa následne zachytávajú na pásovom alebo rotačnom kolektore.</p> <p>Podobný proces zvlákňovania ako melt-blown. Rozdiel je v zostave formy, pri melt-blown technológií sa prúd vzduchu zbieha rovnobežne s vláknom vychádzajúceho z trysky. Pri spunbonde je prúd horúceho vzduchu v kolmom prúde k vznikajúcemu vláknu</p>	<p>Rozmer vlákien 1–10 <math>\mu\text{m}</math></p> <p>Objemná výroba mikrovlákien</p> <p>Variácia priemerov vlákien pri melt-blown oproti spunbond</p> <p>Filtračné textílie zo spunbond a melt-blown procesu sú schopné spájať sa s inými netkanými štruktúrami, možná funkcionalizácia vlákien</p>	<p>Jemná, slabá sieť mikrovlákien</p> <p>Vysokorýchlostný prúd horúceho vzduch</p>	<p>[11]</p> <p>[12]</p> <p>[13]</p>
Elektrospinning	<p>Pri elektrospinningu prechádza vysoké elektrostatické napätie cez kvapku roztoku polyméru. Po prekonaní povrchového napätia kvapky je z hrotu kapiláry produkovaný prúd nanovlákien, ktoré dopadajú na kolektor.</p>	<p>Nanovláknité textílie, Vysoký pomer povrchu k objemu</p>	<p>Vysoké napätie (5kV–60kV), vysoké vstupné a prevádzkové náklady, obmedzené použitie rozpúšťadiel, vodivý roztok polyméru</p>	<p>[14]</p> <p>[15]</p>
Centrifugal spinning (odstredivé zvlákňovanie)	<p>Roztok polyméru je nadávkovaný do zvlákňovacej hlavice. Pôsobením odstredivej sily dochádza k zvlákňovaniu z roztoku a vlákna dopadajú na kolektory.</p>	<p>Objemnejšia produkcia vlákien vo forme kokónu oproti elektrospinningu, nepoužívanie vysokonapäťového elektrostatického poľa, cenovo výhodná produkcia mikrovlákien</p>		<p>[16]</p> <p>[17]</p>



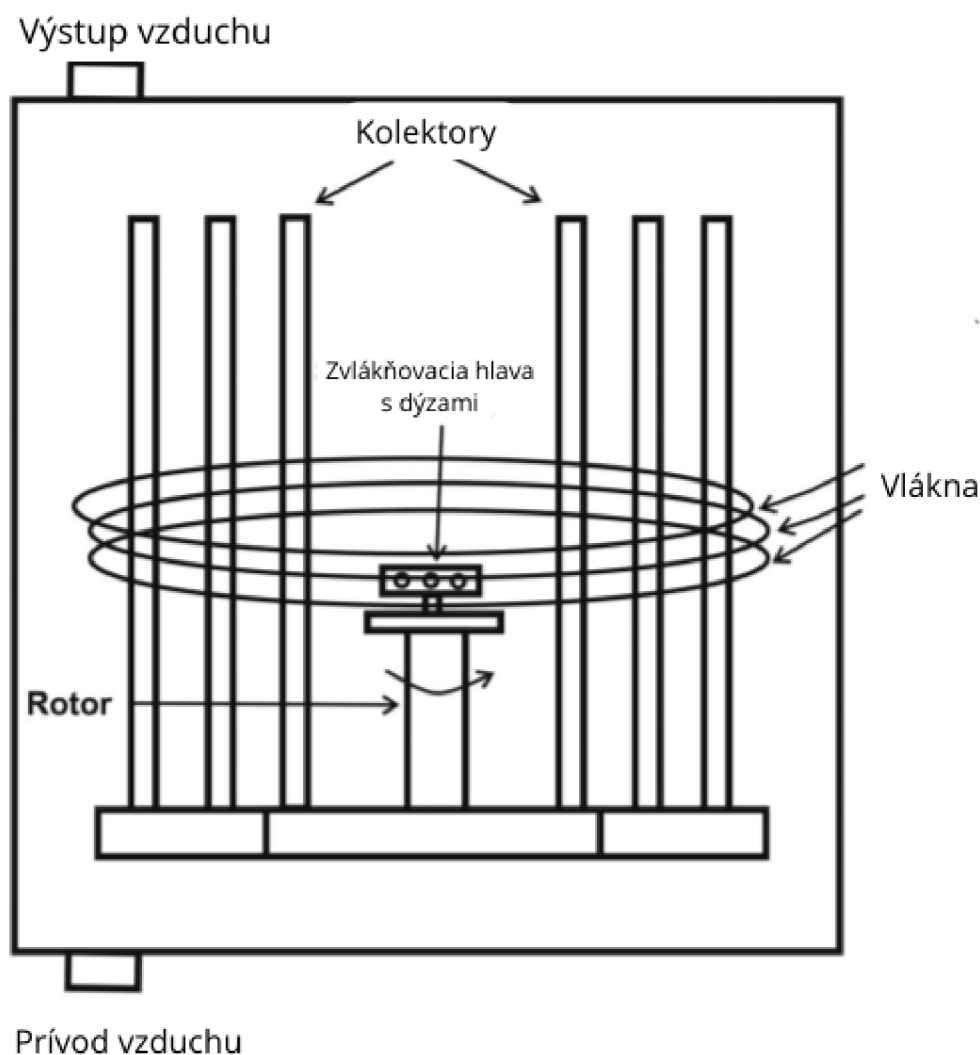
Zvýšený záujem o mikrovlákná je v oblasti tkaninového inžinierstva (TE), ako možná aplikácia v regeneračnej medicíne, náhrade poškodených orgánov a náhrada testovaniu liekov na zvieratách [18]. Väčšina ľudských orgánov alebo tkanív má mikro–nanovláknitú štruktúru. Preto sa TE zaoberá aj vývojom skaffoldov (nosičov). Skaffoldy predstavujú *porézne* štruktúry vyrobené z biologicky odbúrateľných materiálov. Ich hlavnou funkciou je podpora proliferácie, diferenciácie, signalizácie bunka-bunka, produkcie biomolekúl a tvorby extracelulárnej matrice (ECM) [19]. Základné požiadavky na skaffoldy sú [20] sú: (i) vhodná makroštruktúra na podporu bunkovej proliferácie, (ii) dobre definovaná geometria pórov s vysoko poréznym povrchom a mikroštruktúrou, ktorá umožňuje rast buniek, (iii) optimálna veľkosť pórov na podporu regenerácie tkaniva a zabránenie uzatváraniu pórov, (iv) vhodná povrchová morfológia a fyzikálno-chemické vlastnosti na podporu intracelulárnej signalizácie a riadeného bunkového rastu. Okrem toho musí materiál skaffoldu vykazovať biokompatibilitu a degradovať predvídateľnou rýchlosťou (pokiaľ sa použije skaffold *in vivo*).

Technológie elektrospinning a odstredivé zvlákňovanie patria medzi dobre známe a často používané technológie k príprave mikro–nanovláknitých skaffoldov [21] [22] [23] [24] [25]. Rozdiely medzi elektrospinnigom a odstredivým zvlákňovaním, ako je zobrazené v tab., sú dôvodom prečo k produkcii mikrovláknitých štruktúr bola použitá technológia odstredivého zvlákňovania. V nasledujúcich kapitolách je podrobnejšie popísaný proces odstredivého zvlákňovania, a materiály vhodné k produkcii touto technológiou.

### **2.2.1 Odstredivé zvlákňovanie**

Vo všeobecnosti zvlákňovanie je schopnosť natiahnuť kvapalinu do vlákna. Táto schopnosť je podmienená niekoľkými faktormi ako sú gravitácia, zotrvačnosť, odpor vzduchu a silami povrchového napätia. Veľkosť týchto faktorov závisí na prevádzkových parametroch, ako je napr. geometria zvlákňovacej dýzy a jej teplota, a na vlastnostiach zvlákňovacej tekutiny [26].

Zariadenie odstredivého zvlákňovania sa skladá zo zvlákňovacej hlavy obsahujúcej roztok polyméru, motora, ktorý roztáča zvlákňovaciu hlavu, a kolektorov, na ktoré dopadajú vlákna. Technológia odstredivého zvlákňovania je zobrazená na Obr. 2.



Obr. 2: Schéma procesu odstredivého zvlákňovania [27]

Proces odstredivého zvlákňovania prebieha v troch fázach. V prvej fáze je roztok polyméru nadávkovaný do zvlákňovacej hlavy. Po roztočení zvlákňovacej hlavy pôsobí na roztok niekoľko síl (frikčná, gravitačná, odstredivá a povrchové napätie roztoku). Ako sa zvlákňovacia hlava otáča, kvapka roztoku dosahuje spodného okraja zvlákňovacej dýzy pôsobením odstredivej sily. V druhom štádiu je kvapka roztoku vylúčená zo zvlákňovacej hlavy, pokiaľ je prekonané povrchové napätie roztoku odstredivou silou. V treťom štádiu dochádza k produkcii vlákien. Vylúčená kvapka roztoku prechádza zakrivenou trajektóriou, rozpúšťadlo sa odparuje a vlákna dopadajú na stenu kolektora. Pokiaľ je odstredivá sila príliš veľká dochádza k tvorbe kvapiek polyméru [28].

Medzi komerčne veľkoobjemové prístroje k veľkovýrobe polymérnych nano–mikrovlákien sú FiberRio's Cyclone FE 1.1M/S a Cyclone FS 1.1 založené na patentovej technológii Forcespinning® [29].

### 2.2.1.1 Faktory ovplyvňujúce odstredivé zvlákňovanie

Produkcii vlákien bez defektov procesom odstredivého zvlákňovania je ovplyvňovaná mnohými parametrami ako sú vlastnosti roztoku a procesné podmienky [30]

## Vlastnosti roztoku

- Povrchové napätie
- Viskozita roztoku
- Molekulová hmotnosť polyméru

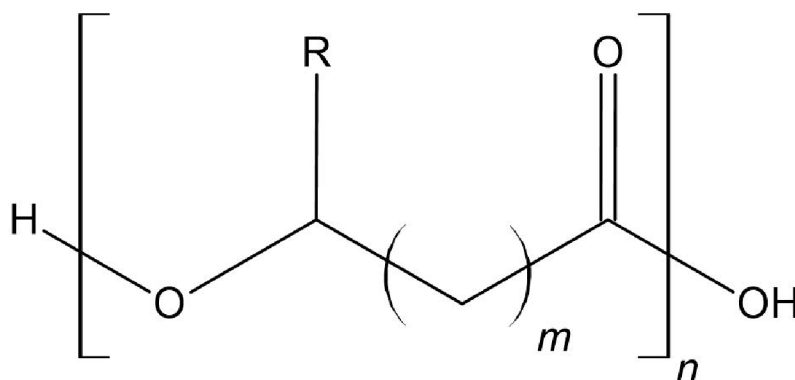
## Procesné parametre

- Rýchlosť otáčania zvlákňovacej hlavy
- Priemer a tvar dýz, ihiel
- Vzdialenosť kolektorov
- Teplota, vlhkosť

Technológiou odstredivého zvlákňovania je možné pripraviť vlákna z rôznych biopolymérov ako sú kyselina polymliečna (PLA) [31], [32], polykaprolaktón (PCL) [33], [34] P3HB [35].

## 2.3 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) patria medzi skupinu syntetických biopolymérov, ktoré sú produkované baktériami rôznych typov. Baktérie produkujú PHA ako svoj zásobný zdroj energie pri podmienkach s obmedzeným množstvom živín (dusík, fosfor, kyslík, síra alebo horčík) a s prebytkom uhlíka [36]. Obsah PHA v podobe cytoplazmatických inklúzií tvorí až 90 % suchej hmotnosti baktérie [37] [38]. Existujú tri skupiny PHA (Obr. 3) na základe počtu uhlíka v monomérnej jednotke: PHA s krátkym reťazcom (*short-chain-length*(SCL)) s obsahom 3–5 uhlíka, so stredne dlhým reťazcom (*medium-chain-length*(MCL)) obsahujúci 6–14 atómov uhlíka a s dlhým reťazcom (*long-chain-length*(LCL)) s počtom uhlíku nad 14. Medzi SCL PHA patria poly(3hydroxybutyrát) (P3HB), poly(4-hydroxybutyrát) (P4HB) a poly(3-hydroxyvalerát) (P3HV). Poly(3-hydroxyhexanoát) (P3HHx) a poly(3-hydroxyoktanoát) (P3HO) patria medzi MCL PHA [39]. PHA sú biokompatibilné, biodegradovateľné, dobre spracovateľné, netoxické polyméry [39]. Mechanické a tepelné vlastnosti PHA sa odlišujú v závislosti od monomérnej jednotky, vid' Tab. 3 [38].



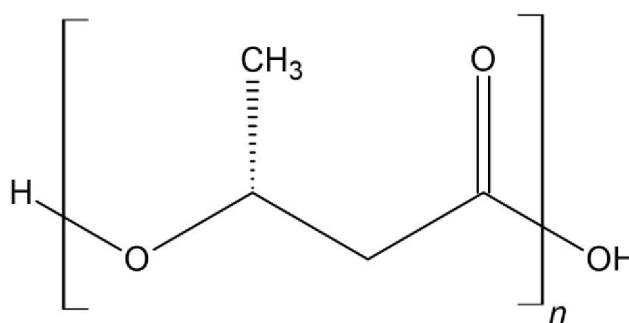
Obr. 3: Všeobecný vzorec PHA, kde R je H alebo alkylová skupina

Tab. 3: Charakteristické teplotné (teplota topenia  $T_m$ , teplota sklovitého prechodu  $T_g$ ) a mechanické vlastnosti PHA v porovnaní s PP, PE [40]

Polymér	$T_m$ [°C]	$T_g$ [°C]	Pevnosť v ťahu [MPa]	Ťažnosť [%]
P3HB	173–180	5–9	40	6
P4HB	60	–50	104	1000
Polypropylén (PP)	170–186	–10	29,3–38,6	400–900
Vysokohustotný polyetylén (HDPE)	112–135	–80	17,9–33,1	12–700
Nízkohustotný polyetylén (LDPE)	88–130	–36	15,2–78,6	150–600

### 2.3.1 Poly(3-hydroxybutyrát)

Medzi najvýznamnejší a prvý produkovaný polymér zo skupiny PHA bol poly(3-hydroxybutyrát) (P3HB) [41]. Aj napriek tomu, že je P3HB produkovaný rôznymi biosyntetickými cestami počas fermentácie, vykazuje reťazec P3HB 100% izotacticitu v R konformácií monomérnych jednotiek (Obr. 4) [13]. Vďaka tomu P3HB vykazuje vysoký stupeň biodegradability [42].



Obr. 4: Poly(3-hydroxybutyrát)

#### Chemické vlastnosti

Molekulová hmotnosť P3HB sa odvodzuje od typu baktérií, podmienkach pri produkcii P3HB a extrakčnej metódy a môže variovať od 50 000–1 000 000 [10.3144/expresspolymlett.2014.82]. Ako najčastejšie rozpúšťadlo PHA je chloroform. P3HB je navyše rozpustný aj v kyseline octovej, čo poskytuje ekologickejšiu náhradu za chloroform [14; 15]. Anbukarasu a kol. zistili pri prípravách fólie z P3HB, že náhradou chloroformu za kyselinu octovú sa získajú podobné vlastnosti fólií ako u fóliách získaných odparením chloroformu [43].

#### Fyzikálne a mechanické vlastnosti

Vysoký stupeň kryštalinity P3HB, okolo 60-70 %, výrazne ovplyvňuje mechanické a fyzikálne vlastnosti, ako je krehkosť a tuhosť materiálu. Práve vysoká krehkosť polyméru často

obmedzuje jeho použitie bez prísad [13]. Navyiac s časom môže P3HB rekryštalizovať a meniť tak svoje vlastnosti [42].

Vlastnosti tuhého a krehkého P3HB je možné zmeniť začlenením ďalšieho monoméru akým je 3-hydroxyvalerát (3HV) alebo 4-hydroxybutyrát (4HB). Výsledné vlastnosti kopolymérov sú mäkké, pružné, húževnaté s vysokou ťažnosťou [36].

### 2.3.2 Poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát)

Kopolymér poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát) (P3,4HB) je jedným z dôležitých materiálov používaný v medicínskych a farmaceutických aplikáciách, vďaka prirodzenému výskytu 4HB v mozgu, srdci, pečeni, obličkách a svaloch. Začlenením 4HB monoméru sa získa kopolymér s rôznymi fyzikálnymi a mechanickými vlastnosťami (Tab. 4). Prítomnosťou 4HB v reťazci P3HB sa znižuje vysoká kryštalinita P3HB

Tab. 4: Fyzikálne a mechanické vlastnosti kopolymérov P3,4HB [44]

Vlastnosti	Obsah 4HB [mol%]						
	0	16	64	78	82	90	100
$T_m$ [°C]	178	130	50	49	52	50	53
$T_g$ [°C]	4	-7	-35	-37	-39	-42	-48
Kryštalinita [%]	60	45	15	17	18	28	34
Pevnosť v ťahu (MPa)	43	26	17	42	58	65	104
Ťažnosť (%)	5	444	591	1120	1320	1080	1000

## 2.4 Povrchová úprava

PHA sú sľubnými materiálmi v 3D bunkových štruktúrach vďaka vysokej biokompatibilite in vitro [45] [46] [47] [48] [49] [50] [51] [52]. Vlastnosti polymérov ako sú chemická štruktúra, povrchová energia či hydrofóbnosť hrajú dôležitú rolu v živatoschopnosti buniek a ich rastu. Medzi najčastejšie metódy k zlepšeniu bunkovej adhézie a rastu na PHB substrátoch je možné dosiahnuť enzymatickou, chemickou a fyzikálnou (napr. zmenou veľkosti pórov) úpravou [53].

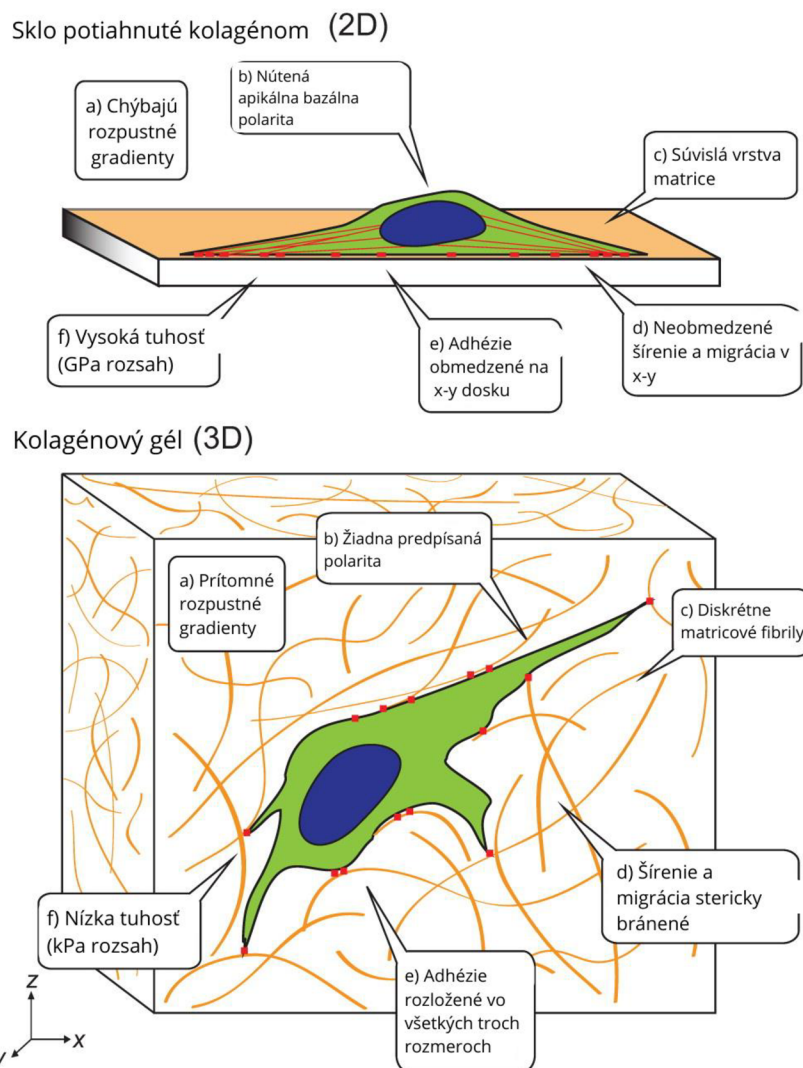
Enzymatickou úpravou pomocou lipázy a kyselinou hyaluronovou (HA) sa zaoberali Wang a kol. Zistili, že aplikáciou lipázy, HA a ich kombináciou na fóliách z P3HB a PHBHHx dochádza k poklesu kontaktného uhlu vody oproti neupraveným fóliám. Proliferácia buniek (lína myšich fibroblastov L929) na 3D skaffoldoch upravených lipázou bola najvyššia, u 3D skaffoldu PHBHHx bol až takmer dvojnásobná v porovnaní s referenciou [54]. Zhao a kol, taktiež porovnávali vlastnosti fólií P3HB a PHBHHx a ich zmesí upravených lipázou. Zistili, že rast buniek L929 na fóliách so zvyšujúcim obsahom PHBHHx rastie a na fólii PHBHHx je až 56-násobne väčšia ako u P3HB fólie. Pretože lipáza napáda primárne esterové väzby, je možné predpokladať chemické a fyzikálne štruktúrne zmeny. Keďže štiepením esterových väzieb vzniká na povrchu množstvo hydroxylových skupín, môže to mať za následok zmenu hydrofóbnosti P3HB, resp. PHBHHx filmu [55].

Zmenu chemického zloženia povrchu substrátov k prispôsobeniu adhézných a zmáčaných vlastností je možné doceliť pôsobením plazmy [56]. Xiang-HuaQu a kol. k povrchovej úprave PHBHHx filmov použili plazmu v prítomnosti bezvodého amoniaku. Po pôsobení plazmy došlo k zníženiu kontaktného uhlu vody. Navyiac proliferácia buniek (ľudské endotelové bunky z pupočníkovej žily (HUVEC)) plazmou modifikovaných fólií bola vyššia ako na čistých fóliách PHBHHx [57].

## 2.5 Potenciálna aplikácia pripravených mikrovláknitých štruktúr

Jednou z možných aplikácií, ktoré využívajú mikrovláknitú štruktúru je sledovanie správania sa bunkových kultúr. Bunkové kultúry sa využívajú v biologických, biochemických a biomedicínskych výskumoch. Vďaka tomu, že sú bunkové kultúry dobre definované, umožňujú prácu s jedným typom buniek. Je tak jednoduchšie pôsobiť na cieľové bunky a kontrolovať reakciu na externé podmienky (toxíny, liečivá atď.) [58]. Doterajšie zistenia mnohých biologických procesov boli získané na základe pozorovania populácií buniek v rovinnom priestore (2D). V živom organizme je však správanie buniek ovplyvnené okolitým mikroprostredím bohatým na informácie, ako sú zložky extracelulárnej matrice, prítomnosť iného typu buniek a ich sekréty. Preto procesy pozorované *in vitro* v 2D priestore, často neodpovedajú priebehu reakcií v *in vivo* [59]. Pri obývaní buniek na 2D substrátoch sú bunky vystavené dramatickej adaptácii k prežitiu z dôvodu nedostatočného prostredia ECM. Následkom toho sa môže zmeniť metabolizmus buniek a klesnúť ich funkčnosť [60].

Procesy odohrávajúce sa v *in vivo*, ako je napr. bunková adhézia, je možné priblížiť pozorovaním správania sa bunkových kultúr v *in vitro* 3D substrátoch. Výrazne rozdielnym znakom bunkových kultúr na 2D a 3D substrátoch je rozdielna morfológia buniek. Bunky, ktoré sú pestované na 2D substrátoch, majú plochý tvar a môžu sa šíriť len v horizontálnej rovine a vytvoriť tak priľnavú vrstvu. Dôsledkom toho môže nastať, že bunky budú podliehať apikálno-bazálnej polarite. Pre určitý typ buniek, napr. epitelové, je táto polarita významná. Neprirodzená je však pre väčšinu mezenchymálnych buniek, u ktorých je typická hviezdicová morfológia [1]. Rozdiel morfológie buniek na 2D a 3D nosičoch je zobrazený na Obr. 5.



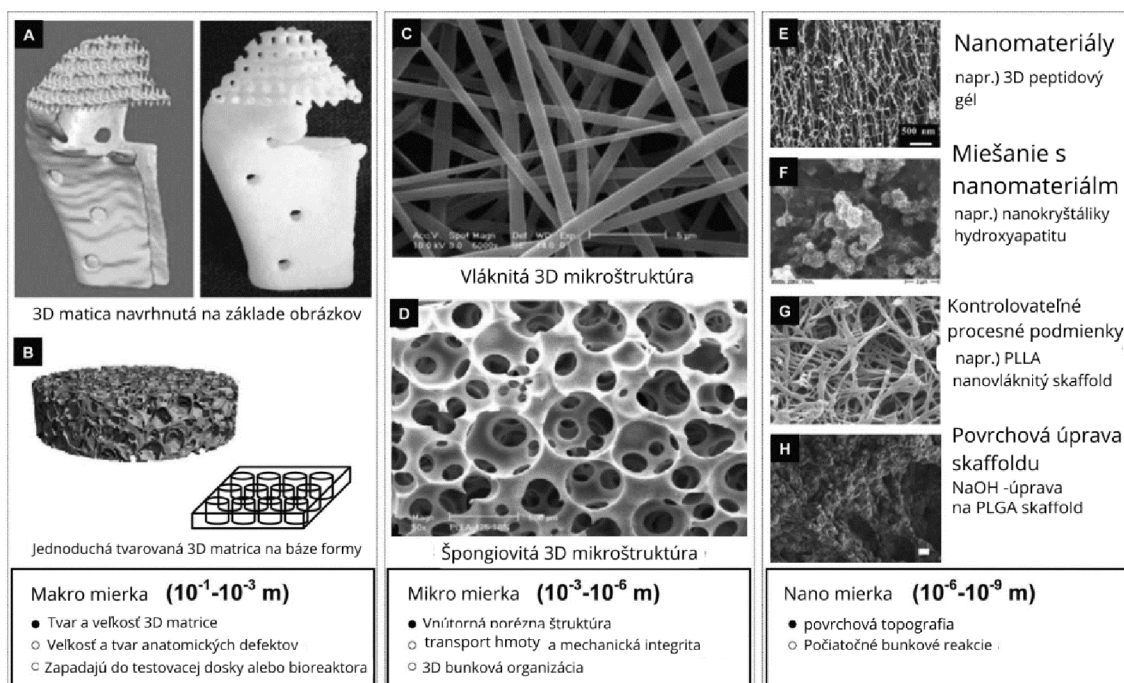
Obr. 5: Adhézne, topografické, mechanické podnety s ktorými sa bunka stretáva v 2D a 3D substrátoch. Podnety sú výrazne odlišné medzi 2D skleneným povrchom potiahnutým kolagénom a typickým 3D substrátom ako je kolagén [1].

Aplikáciou mikrovláknitých poréznych štruktúr v 3D kultivácii buniek sa dosahuje lepšieho predpokladu správania sa a usporiadania buniek v *in vivo*. 3D kultivácia buniek prebieha na viacvrstvových či poréznych skaffoldoch. Vďaka svojej vysokej pórovitosti je bunkám zabezpečený dostatočný transport kyslíka a živín. Prostredníctvom 3D pórovitej štruktúre skaffoldu dochádza k výraznejšej proliferácii a migrácii buniek [61]. Za ideálnych podmienok by mala 3D pórovitá štruktúra pozostávať z 90 % pórov [62]. Vhodná veľkosť pórov je však rozdielna pre každý typ buniek. Napr. veľkosť pórov 200–400  $\mu\text{m}$  k produkcii kostného tkaniva [63], pre rast buniek hladkého svalstva je vhodná veľkosť pórov 50–200  $\mu\text{m}$  [64]. Póry o veľkosti viac ako 400  $\mu\text{m}$  však znižujú kontaktný pomer medzi bunkami [65].

Rôznorodosť výroby 3D poréznych skaffoldov z niekoľkých materiálov je vyššia ako u 2D substrátoch. 3D substráty by mali spĺňať základné štruktúrne a materiálové podmienky [60]. Cieľom dizajnu 3D nosiča bunkovej kultúry je čo najviac napodobniť prirodzené vlastnosti ECM v *in vivo* systéme. Lee, J. a kol. ako prví spísali kritéria 3D bunkových nosičov zo

štruktúrného a materiálového pohľadu. Štruktúrne vlastnosti boli rozobrané z makro až nano merítka [60]. Zhrnutie z rôznych rozmerových pohľadov je na Obr. 6.

K výrobe 3D nosičov sa používajú prírodné a syntetické polyméry. Kompozit oboch typov materiálov nachádza taktiež uplatnenie [66]. Hlavným parametrom k výberu materiálu je jeho biokompatibilita. Ďalšími parametrami sú zmáčavosť, biodegradovateľnosť či mechanické vlastnosti. Pretože ECM je plne hydratovaný gél, kľúčovým faktorom je zmáčanie [60]. Materiály s viac hydrofilným charakterom lepšie napodobňujú vodný roztok v *in vitro*. Vďaka tomu sa hydrogély používajú v 3D substrátoch [60] [67]. Alginát je jedným z hydrogélom používaným na výrobu 3D nosičov [68] [69] [70]. Obmedzením alginátových gélov je ich nedostatočná bunková adhézia [71]. Medzi ďalšie syntetické polyméry využívané k výrobe 3D nosičov patria poly(mliečna-*co*-glykolová kyselina) (PLGA), poly(etylénoxid)(PEO) [23] [72], PLA [73] [21], PCL [74] [75].



Obr. 6: Pohľad na 3D nosiče z makro až nano rozmerov [60]

## 2.6 Charakterizácia povrchových vlastností vláknitých štruktúr

Keďže mikrovláknité štruktúry budú použité pre sledovanie správania bunkových kultúr, ktoré sa predovšetkým nachádzajú vo fyziologickom roztoku, je kľúčovou vlastnosťou hydrofilnosť vlákien.

### 2.6.1 Zmäčanie a nasiakavosť vlákien

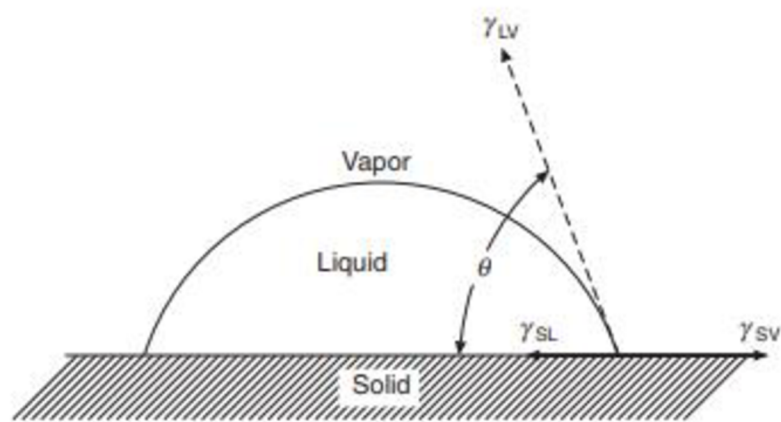
Pri interakcií vlákno-kvapalina dochádza k základným mechanizmom ako sú zmáčanie a nasiakavosť, ktoré slúžia na popis transportu kvapaliny vo vláknitých materiáloch.

#### Zmäčanie



Prvotný kontakt materiálu/vlákien/textílií s kvapalinou predstavuje jeho schopnosť byť zmáčaný. Proces zmáčania prebieha na rozhraní troch fáz: pevná látka-vzduch, pevná látka-kvapalina, kvapalina-vzduch. Zmáčanie vlákien je tak závislé na povrchu, geometrii a chemickej štruktúry vlákna. Taktiež sa uvádza, že proces zmáčania predchádza procesu nasiakavosti [76].

Medzi najčastejšie techniky merania zmáčania patrí meranie kontaktného uhla (CA). Kontaktný uhol súvisí so všeobecnými termodynamickými veličinami a prezentuje sa ako uhol vytvorený medzi dotyčnicou rozhrania kvapalina-para a rozhraním tuhá látka-kvapalina na priesečníku troch rozhraní. Ak je kontaktný uhol medzi kvapalinou a pevnou látkou menší ako  $90^\circ$ , dochádza k zmáčaniu, pri uhle vyššom ako  $90^\circ$  dochádza medzi kvapalinou a pevnou látkou k odpudzovaniu [77].



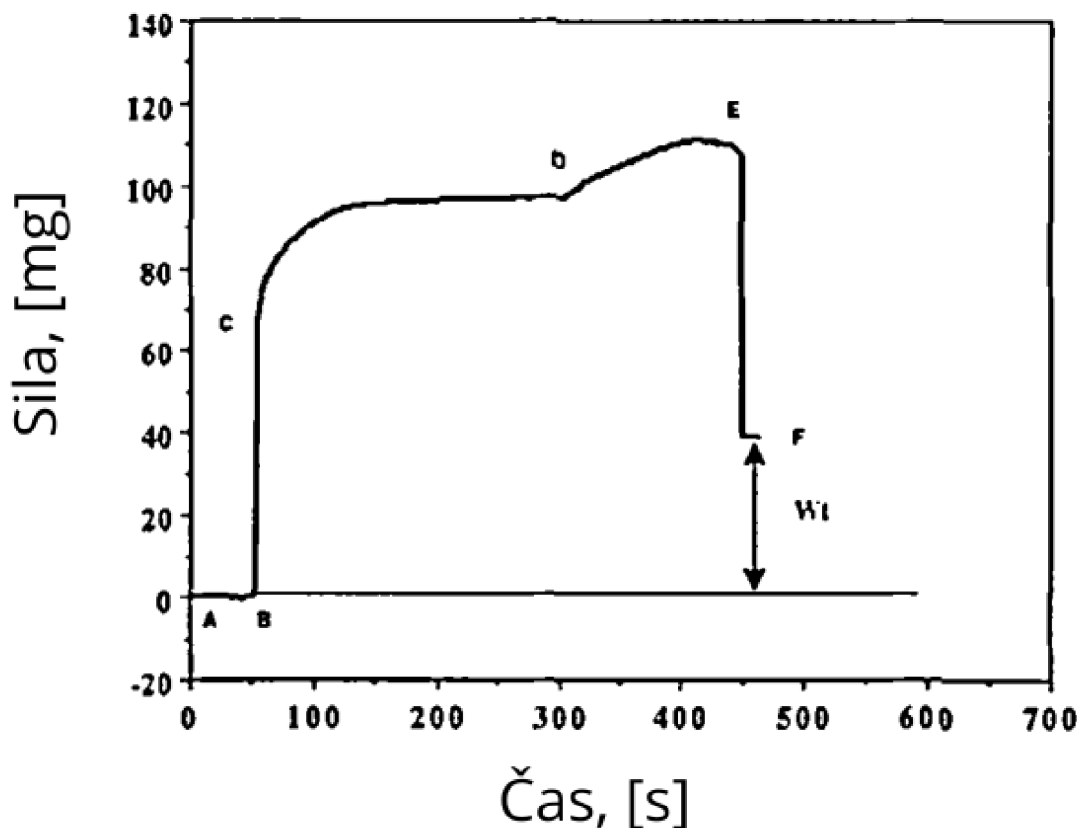
Obr. 7: Rovnovážny stav kvapky tekutiny na pevnom povrchu [78]

Zmáčanie vlákna je možné z merania zmáčanej sily pomocou Wilhelmyho metódy. Meranie zmáčanej sily na textíliách je náročné zmerať, pretože pri kontakte kvapalina-vlákno v tkaninách prebieha viac procesov, ako je zmáčanie, absorpcia kvapaliny v póroch, prípadne aj absorpcia do vlákien [79].

Popisom zmáčania a vzlínivosti tkanín gravimetrickým meraním sa zaoberal Hsieh [80]. Zistil, že pri počiatočnom kontakte tkaniny s kvapalinou je kapilárny tlak väčší ako hmotnosť kvapaliny v tkanine a kvapalina naďalej stúpa. Zastavenie kvapaliny nastáva v rovnovážnej výške, keď sú kapilárne sily vyvážené s hmotnosťou kvapaliny. Po dosiahnutí rovnováhy – ustálenie procesov zmáčania a nasiakavosti, je sila konštantná ( $\Delta B_{eq}$ ). Po oddelení tkaniny od kvapaliny je zistené množstvo zadržanej kvapaliny v tkanine ( $W_t$ ). Výsledná zmáčacia sila ( $F_w$ ) tkaniny sa rovná

$$F_w = \Delta B_{eq} - W_t \quad [g] \quad (1)$$

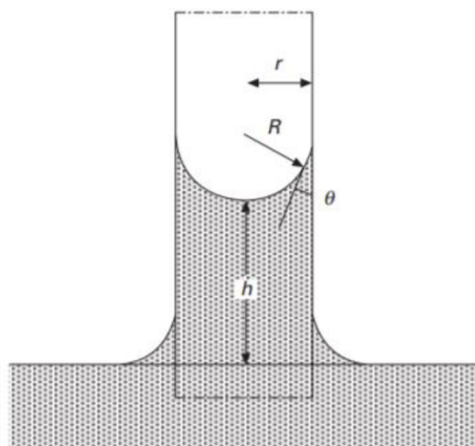
Na Obr. 8 je zobrazený proces zmáčania a nasávania zaznamenaný pomocou Wilhelmyho metódy.



Obr. 8: Krivka zobrazujúca zmeny hmotnosti v čase po kontakte kvapaliny so spodným okrajom tkaniny (zo 100% bavlny). Body A–B zobrazujú pred úplným kontaktom materiálu s kvapalinou, negatívne hodnoty predstavujú vzostupujúcu silu nezmáčavých vlákien. Body B–D znázorňujú zvýšenie sily od kvapaliny, ktorá prichádza do kontaktu s tkaninou a súčasne nasávanie. Prudký nárast sily z bodu B do C je väčšinou spôsobený zmáčaním s príspevkom absorpcie kvapaliny. Následné vzlínanie kvapaliny je indikované pomalšou zmenou sily z bodu C do D. Po dosiahnutí ustáleného stavu dosiahla tkanina svoju maximálnu absorpčnú kapacitu kvapaliny vo vertikálnom smere. Body D–E znázorňujú oddeľovanie tkaniny od kvapaliny. V bode F je tkanina úplne oddelená od kvapaliny. Zaznamenaná zvyšková hmotnosť predstavuje celkovú zadrž kvapaliny vo vzorke [79].

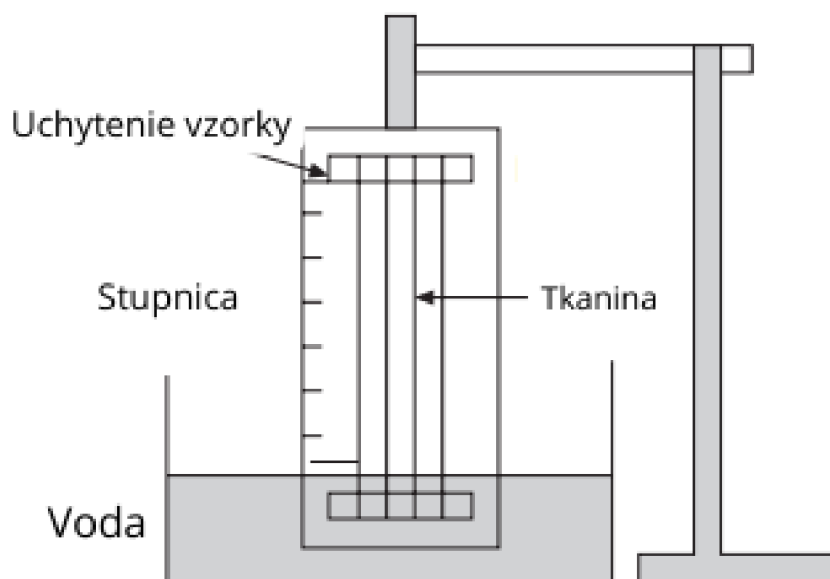
### *Nasiakavosť*

Nasiakavosť textílií je reakciou na transport kvapaliny v pórovitých štruktúrach, poháňaný kapilárnymi silami. Proces nasiakavosti môže nastať len, keď je tkanina s kapilárnymi priestormi zmáčaná [81]. V najjednoduchšom kapilárnom systéme, Obr. 9, sa tvorí meniskus. Vďaka povrchovému napätiu kvapaliny nastáva tlakový rozdiel na zakrivenom rozhraní kvapalina-vzduch [78].



Obr. 9: Nasiakavosť kvapaliny v kapiláre [78]

Nasiakavosť je teda podmienená kapilárnemu tlaku a priepustnosti. Keď nastane nasýtenie pórov kvapalinou, kapilárny tlak dosiahne nulovú hodnotu a priepustnosť média je vtedy najvyššia [77]. Stanovenie rýchlosti nasiakavosti je možné jednoduchou technikou sledovania vzliavosti kvapaliny vo vertikálne zavesenej textílie (Obr. 10).



Obr. 10: Schematické meranie rýchlosti nasiakavosti tkaniny [82]

## 3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 3.1 Materiály

**Poly(3-hydroxybutyrát)** (P3HB) prečistený acetónom bol dodaný vo forme bieleho prášku od firmy NAFIGATE<sup>®</sup> s označením 2189 ( $M_w = 456\ 000$  g/mol,  $T_m = 172$  °C).

**Poly(3-hydroxybutyrát)** (HYDAL M01) získaný novou extrakčnou metódou tzv. mydlová cesta [83] s charakteristickými vlastnosťami  $M_w = 409\ 100$  g/mol,  $T_m = 173$  °C,  $T_g = 2$  °C.

**Kopolymér poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát)** v pomere P3HB/P4HB 70/30 s komerčným označením Mirel<sup>™</sup> M4300 (označenie MI) dodávaný od firmy METABOLIX<sup>®</sup> ( $M_w = 234\ 100$  g/mol,  $T_m = 100$  °C).

**Kopolymér poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát)** v pomere P3HB/P4HB 93/7 s komerčným označením Mirel<sup>™</sup> P1004 (označenie MI\_P) dodávaný od firmy METABOLIX<sup>®</sup> vo forme bieleho granulátu ( $M_w = 112\ 600$  g/mol).

**Oligomér P3HB** (ozn. Olig. P3HB) bol pripravený *Ing. Silvestrom Figallom PhD.* na Fakulte chemickej VUT v Brne vo forme tuhej hnedožltej lepkavej hmoty s  $M_w = 1\ 007$  g/mol,  $T_m = 98$  °C,  $T_g = -33$  °C.

**Syncroflex<sup>™</sup> 3114** (ozn. SYN) oligomérený adipátový ester od firmy CRODA bol použitý ako plastifikátor.

**Chloroform** (CHCl<sub>3</sub>) anhydridového typu bol dodaný firmou SIGMA-ALDRICH<sup>®</sup> a obsahoval 0,5 – 1 % etanolu ako stabilizátoru.

**Kyselina mravčia** (FORM) s koncentráciou 98 % ( $T_v = 100$ – $101$  °C) bola dodaná od firmy PENTA s. r. o.

**Kyselina octová** (HAc) s koncentráciou 99,8 % bola dodaná firmou PENTA s. r. o.

**LIPÁZA** (ozn. LIP\_C) z *Candida rugosa* typ VII v lyofilizovanej forme so špecifickou aktivitou  $\geq 700$  unit/mg pevnej látky dodanou od SIGMA-ALDRICH<sup>®</sup>.

**LIPÁZA** (ozn. LIP\_P) z *Pancreas porcine* (L-3126) typ II s aktivitou 30–90 unit/mg proteínu (s použitím triacetín) dodanou od firmy SIGMA-ALDRICH<sup>®</sup>.

### 3.2 Zloženie a príprava roztokov na odstredivé zvlákňovanie

Na základe predchádzajúcej štúdie [84], boli pripravené roztoky o 7% koncentrácií. Táto koncentrácia roztokov polymérov bola považovaná za ideálnu k odstredivému zvlákňovaniu. Ako rozpúšťadlo bol použitý chloroform stabilizovaný 1% etanolom. Roztoky polymérov boli pripravené vo varných fľašiach s uzáverom, ktoré boli ponorené vo vodnom kúpeli pri teplote 60 °C po dobu min 2 hod, pokiaľ neboli polyméry úplne rozpustené.

Ako referenčné roztoky bez obsahu kopolyméru alebo iných aditív boli použité dva materiály poly(3-hydroxybutyrátu) – jeden komerčného typu (P3HB) a druhý získaný novou extrakčnou cestou (HYDAL M01) [83]. Zloženie roztokov je zobrazené v Tab. 5.

Tab. 5: Zloženie P3HB roztokov

Označenie roztoku	Koncentrácia roztoku [hm. %]	Množstvo polyméru [g]	CHCl <sub>3</sub> [g]
P3HB	7	18,9	251,1
HYDAL M01	5	13,5	256,5

### Prídavok kopolymérov do roztoku P3HB

Keďže samotné P3HB je veľmi krehké, boli pripravené roztoky s obsahom kopolymérov poly(3-hydroxybutyrátu-co-4-hydroxybutyrátu) (P3,4HB). K príprave roztokov s P3,4HB boli použité dva materiály (ozn. MI, MI\_P). Množstvo kopolyméru v roztoku bolo vzťahnuté na hmotnosť P3HB. Označenie roztoku a koncentrácia jednotlivých polymérov sa nachádza v Tab. 6.

Tab. 6: Zloženie a koncentrácia jednotlivých roztokov s obsahom kopolyméru MI, resp. MI\_P

Označenie roztoku	Koncentrácia roztoku [%]	Hmot. % P3HB	Hmot. % MI (MI_P)
75P3HB/25MI	7	75	25
80P3HB/20MI	7	80	20
85P3HB/15MI	7	85	15
90P3HB/10MI	7	90	10
95P3HB/5MI	7	95	5
MI	7	-	100
MI_P	7	-	100

### Prídavok modifikátoru

V predchádzajúcej štúdie [84] boli k úprave mechanických vlastností použité rôzne typy zmäkčovadiel. Ako najvhodnejšie zmäkčovadlo sa preukázal Syncroflex<sup>TM</sup> (SYN) s hmotnostným obsahom 10 % vzťahnutým na hmotnosť polyméru. Zmäkčovadlo bolo pridané do roztoku P3HB (P3HB\_10Syn) a HYDAL M01 (HYDAL M01\_10SYN) až po úplnom rozpustení polyméru.

### Úprava rozpúšťacieho systému

Medzi časté rozpúšťadlá pre P3HB patrí chloroform. Výhoda chloroformu je aj v tom, že pri príprave roztoku za vyššej teploty nastáva úplne rozpustenie polyméru a po schladení roztoku na laboratórnu teplotu ostáva roztok stály/nezmenený. Naopak z environmentálneho a zdravotného hľadiska je používanie chloroformu veľmi škodlivé. Na základe rešerše v teoretickej časti bol upravený rozpúšťací systém a to nahradením časti chloroformu rozpúšťadlami kyseliny mravčej a octovej.

Pripravené boli roztoky P3HB rozpustené v chloroforme podľa postupu v kapitole 3.2. Po dokonalom rozpustení polyméru a vychladnutí roztoku bolo doňho pridaná kyselina mravčia, resp. octová. Presné zloženie a koncentrácie roztokov sa nachádzajú v Tab. č. 1.

Tab. č. 1: Zloženie roztokov P3HB s prídavkom HCOOH, resp. HAc

Označenie roztoku	Koncentrácia roztoku [%]	Hmot. % CHCl <sub>3</sub>	Hmot. % HCOOH	Hmot. % HAc
P3HB_FORM	6	75	25	-
P3HB_HAc	8,75	93,7	-	6,3

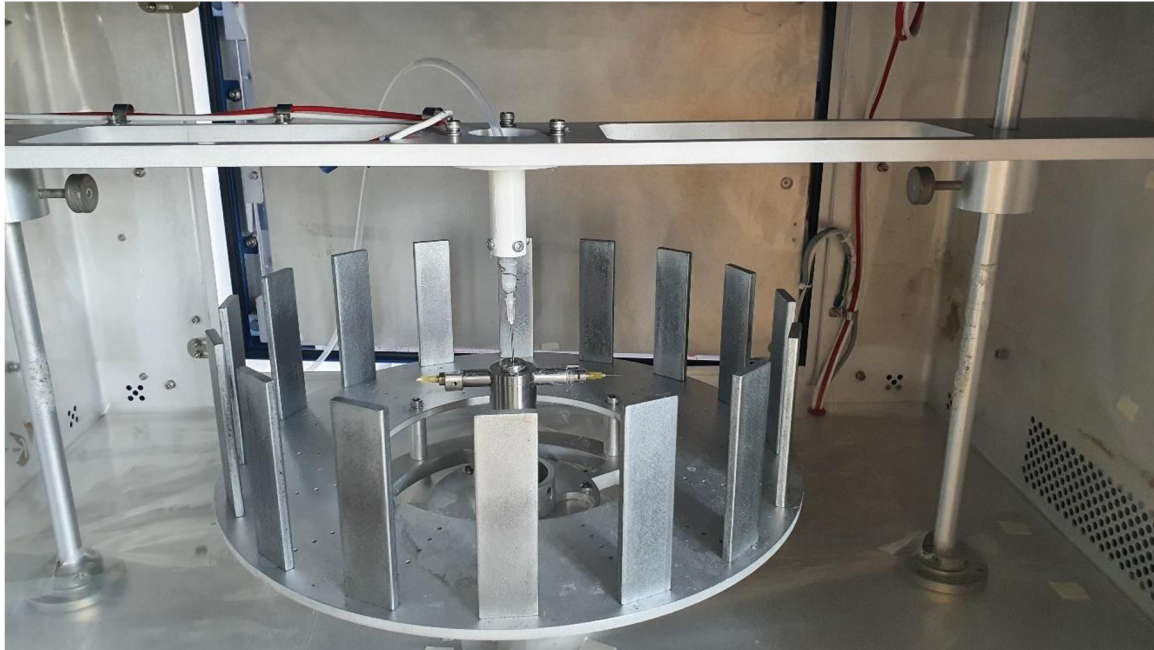
### 3.3 Úprava roztokov a vlákien k zvýšeniu hydrofilnosti (nasiakavosti) P3HB vlákien

Jednou z možností k zvýšeniu hydrofilnosti mikrovlákien bolo pomocou oligoméru P3HB (Olig.P3HB). Vďaka oligoméru je možné predpokladať zvýšený počet hydrofilných hydroxylových skupín. Koncentrácia roztoku bola opäť 7% a použité rozpúšťadlo bol chloroform stabilizovaný etanolom. Hmotnostný pomer P3HB/olig.P3HB bol 75/25. K úplnému rozpusteniu materiálov bol roztok ponorený do vodného kúpeľa pri 60 °C po dobu 2 hod.

Ako bolo spomenuté v teoretickej časti, k zvýšeniu hydrofilnosti P3HB bolo dosiahnuté za pomoci roztoku lipázy. Sledované zmeny vlastností boli skúmané na planárnych vzorkách s hustotou 9,35 g/m<sup>2</sup> (PLANÁR\_P3HB) a mikrovláknach z P3HB (VATA\_P3HB). Vzorky boli ponorené do roztokov 2 typov lipáz (LIP\_C, LIP\_P) o koncentráciách 0,1 g/l (LIP\_C(P)\_1) a 1 g/l (LIP\_C(P)\_2) pri pH 7 po dobu 24 hodín a pri teplote 35 °C. Po vybratí vlákien z roztoku lipázy, boli vlákna premyté destilovanou vodou. Následne boli mikrovlákna dané do vákuovej sušiarne s teplotou 50 °C po dobu min 2 hod. Pre porovnanie boli mikrovlákna ponorené aj do destilovanej vody pri rovnakých podmienkach.

### 3.4 Procesné podmienky odstredivého zvlákňovania

Laboratórna príprava mikrovlákien technológiou odstredivého zvlákňovania bola vykonávaná na prístroji FibeRio CycloneL1000. Prístroj je nastavený k produkcii vlákien z 2ml zásobníka. Aby bola produkcia vlákien rýchlejšia a väčšia, získané sú tak objemné kokóny vlákien, bolo použité automatické dávkovanie. Ku kontinuálnemu dávkovaniu mimo prístroja bola použitá injekčná striekačka naplnená roztokom polyméru, napojená na injekčnú pumpu (LAMBDA VIT-FIT (HP)). Roztok polyméru bol dávkovaný injekčnou pumpou cez hadičku až do zvlákňovacej hlavy skrz dávkovaciu ihlu 18G s vonkajším priemerom 1,2 mm. Na Obr. 11 je zobrazená zvlákňovacia hlava s upraveným kontinuálnym dávkovaním.



Obr. 11: Prístroj FibeRio CycloneL1000 s upraveným kontinuálnym dávkovaním

V teoretickej časti diplomovej práce boli spomenuté, že aj procesné parametre (rýchlosť otáčania zvlákňovacej hlavy, priemer zvlákňovacích ihiel, rýchlosť dávkovania či vzdialenosť kolektorov) výrazne ovplyvňujú produkciu vlákien. Z predchádzajúcej štúdie [84] bolo zistené, že najvhodnejšou veľkosťou zvlákňovacích ihiel je 30 G. Ihly s vonkajším priemerom 0,3 mm a skosením  $11^\circ$  boli dodávané od Terumo®. Dávkovanie roztokov bolo konštantné a to rýchlosťou 50, čo odpovedá rýchlosti dávkovania 40 ml roztoku za 90 sekúnd. K získaniu rovnako veľkých kokónov vlákien, bolo trvanie jedného zvlákňovacieho cyklu 2 min pre 7% roztoky a 2,5 min pre 5% roztoky polymérov. Vzdialenosť kolektorov bola taktiež nemenná a to 130 mm od zvlákňovacej hlavy. Rozloženie 16 kolektorov o rozmeroch  $115 \times 32 \times 7$  mm bolo rovnomerné po celom obvode. Najčastejšie meniacim sa procesným parametrom bola rýchlosť otáčania zvlákňovacej hlavy za minútu (RPM). Rýchlosť otáčania bola nastavená tak, aby nastala tvorba kokónu mikrovlákien. Pre väčšinu vzoriek bola ideálna rýchlosť zvlákňovania 10 000 RPM. Pre niektoré roztoky bola táto rýchlosť však veľká. Preto bola rýchlosť otáčania zvlákňovacej hlavy v rozsahu od 6 000 do 10 000 RPM.

### 3.5 Charakterizácia roztokov a mikrovlákien

#### 3.5.1 Meranie viskozity

Medzi hlavné faktory ovplyvňujúce tvorbu vlákien z roztoku je jeho viskozita. Pre každý roztok je viskozita charakteristickou materiálovou vlastnosťou, ktorá je závislá od teploty a tlaku. Pri prúde kvapaliny dochádza k odporu voči toku alebo šmyku kvapaliny, ktorý je definovaný práve ako viskozita. Viskozita roztokov udáva aj odozvu molekulovej hmotnosti polyméru. Čím je vyššia molekulová hmotnosť polyméru, tým má roztok vyššiu viskozitu. Taktiež so zvyšujúcou koncentráciou polyméru v roztoku viskozita narastá [85] [86].

Viskozita polymérnych roztokov bola meraná pred a po zvlákňovaní. Viskozita bola zmeraná rotačným viskozimetrom Brookeld RVDV II + PX. Meranie bolo prevedené za použitia spindlu 6 v objeme 50 ml roztoku a pri laboratórnej teplote 22–23 °C.

### 3.5.2 Stanovenie molekulovej hmotnosti

Stanovenie molekulových hmotností vzoriek bolo metódou gélovej permeačnej chromatografie (GPC). Princípom GPC je separácia molekúl v závislosti na ich veľkosti a tvare [12]. Separácia prebieha s využitím pórovitého gélu, kde sú najmenšie molekuly zadržované v póroch najdlhšie a najväčšie molekuly polyméru putujú chromatografickým systémom najrýchlejšie.

Keďže molekulová hmotnosť materiálov taktiež ovplyvňuje proces zvlákňovania, bolo stanovenie molekulových hmotností nevyhnutnou súčasťou experimentu. Pri úprave rozpúšťacieho systému navyše môže prítomnosť kyselín pôsobiť degračne na polymér.

Stanovené molekulové hmotnosti a stupeň polydisperzity boli vykonané na prístroji Agilent Technologies 1100 Series. Teplota kolóny bola 30 °C, štandardy polystyrénu boli o koncentrácii 0,8–1,5 mg/ml (podľa druhu štandardu, vyššia koncentrácia pre nižšiu  $M_w$ ). Chloroform stabilizovaný 1 % etanolu bol použitý ako mobilná fáza. Stacionárnou fázou bol PLgel column mixed-B. Vzorky boli koncentrované na 5 mg/ml.

Metóda GPC bola použitá na vstupnú charakterizáciu materiálov.

### 3.5.3 Diferenčná kompenzačná kalorimetria

Diferenčná kompenzačná kalorimetria (DSC) sa zaoberá študovaním tepelne zafarbených dejov prebiehajúcich vo vzorke v porovnaní s referenciou spravidla pri ich lineárnom zahrievaní, resp. ochladzovaní. Pri fázovej premene vzorky, chemickej, biologickej reakcii či inej entalpickej zmene nastáva rozdiel tepelných tokov medzi referenciou a skúmanou vzorkou. Pokiaľ nedochádza k žiadnej reakcii či fázovej premene, je rozdiel tepelných tokov nulový a na DSC krivke sa zobrazuje ako tzv. baselína. Metódou DSC je teda možné získať napr. charakteristické teploty topenia ( $T_m$ ), sklovitého prechodu ( $T_g$ ), polymérov, stupeň kryštalinity semikryštalických termoplastov.

K získaniu charakteristických teplôt vstupných materiálov a stupňa kryštalinity (rov. 2) bol použitý prístroj Discovery DSC 2 500 od spoločnosti TA INSTRUMENTS, navážka vzorky bola približne 10 mg. Meranie prebiehalo v inertnej atmosfére s prietokom dusíku 50 ml/min. Rýchlosť ohrevu a chladenia vzoriek bola 10 °C/min. Ohrev vzorky Olig.P3HB začal od –80 °C do 180 °C s predchádzajúcou 1 minútovou izotermickou výdržou. Po minútovej izotermickej výdržii pri 180 °C bola vzorka schladená opäť na –80 °C. Po 1 min izotermickej výdržii bol teplotný cyklus zopakovaný. Pre vzorky MI, P3HB\_M, P3HB začal teplotný program na –30 °C s minútovou izotermickou výdržou. Ohrev vzoriek bol do teploty 200 °C s následnou minútovou izotermou. Ochladenie vzoriek bolo znovu na –30 °C s minútovou izotermou a celý cyklus bol zopakovaný.

$$K = \frac{\Delta H_m - H_{cc}}{\Delta H_m^0} \cdot 100\% \quad (2)$$



Kde  $H_m$  je entalpia topenia polyméru ( $H_{m\text{ P3HB}}$  bola 82 J/g,  $H_{m\text{ HYDAL M01}}$  bola 81 J/g),  $H_{cc}$  je entalpia studenej kryštalizácie a  $H_m^0$  je entalpia 100% polyméru (146 J/g pre P3HB). Pre  $K_{\text{P3HB}}$  je 56 %, pre  $K_{\text{HYDAL M01}}$  je rovná 55%. Metóda DSC bola použitá k vstupnej charakterizácii materiálov. Záznamy z DSC merania materiálov sa nachádzajú v prílohe.

### 3.5.4 Infračervená spektroskopia s Fouierovou transformáciou

Pri infračervenej spektrometrii dochádza k absorpcii elektromagnetického žiarenia vo vlnochte ( $\tilde{\nu}$ ) 12 500–20  $\text{cm}^{-1}$  ( $\lambda$ : 800 nm – 0,5 mm). Interakciou infračerveného žiarenia s látkou dochádza k zmene rotačne vibračných energetických stavov molekuly. Prejavia sa však len prechody, ktoré súvisia so zmenou dipólového momentu. Infračervené spektrum je charakteristické pre každú látku a zároveň jednotlivé funkčné skupiny sa vo spektrách prejavujú takmer rovnako.

Meranie prebiehalo za atmosférické tlaku pri laboratórnej teplote na infračervenom spektrometre s Fourierovou transformáciou (FTIR) TENSOR 27. Vzorky mikrovlákien boli podrobené meraniu metódou na odraz (ATR) na diamantovom kryštáli v spektrálnom rozsahu 4 000 – 6 000  $\text{cm}^{-1}$ . Meranie prebiehalo v absorpčnom móde, s rozlíšením 4  $\text{cm}^{-1}$  a počtom skenov 32. Každá vzorka bola meraná z 3 rôznych miest.

### 3.5.5 Röntgenová fotoelektrónová spektroskopia

K povrchovej analýze niektorých vzoriek bola použitá röntgenová fotoelektrónová spektroskopia (XPS). Jedná sa o analýzu prvkového zloženia s citlivosťou cca 1 000 ppm. Pri ožiarovaní vzorky rentgénovým lúčom o určitej energii dochádza k vyrazeniu elektrónov z vnútornej vrstvy atómu. Váznobná energia elektrónov je charakteristická pre každý prvok periodickej sústavy prvkov okrem H, He.

Analýzy XPS boli prevedené na spektrometri Axis Ultra DLD s použitím monochromatického zdroja röntgenového žiarenia Al K $\alpha$  ( $h\nu = 1486,7$  eV) pracujúceho pri 75 W (5 mA, 15 kV). Spektrá vzoriek boli získané z analyzovanej oblasti o veľkosti  $\sim 300 \times 700$   $\mu\text{m}$ . Spektrá s vysokým rozlíšením bola meraná s krokom 0,1 eV a 20 eV priechodnou energiou (pass energy) a široké spektrá s veľkosťou kroku 0,7 eV a 160 eV priechodnou energiou. Vákuum prístroja bolo v priebehu merania cca  $2 \cdot 10^{-8}$  Pa. Získané spektrá boli analyzované pomocou softwaru CasaXPS (verzia 2.3.15) a boli skorigované na hlavný pík C 1s (280,0 eV). Pre všetky spektrá vzoriek bolo použité štandardné Shirleyho poradie.

### 3.5.6 Skenovací elektrónový mikroskop

Skenovací elektrónový mikroskop (SEM) umožňuje pozorovať a charakterizovať povrch vzorky použitím primárneho elektrónového lúča. SEM snímka zobrazujúca morfológiu vzorky (mikrovlákien) je výsledkom detegovaných sekundárnych elektrónov (SE) z povrchu vzorky.

Vzorky boli pozlatené využitím naprašovačky Polaron, typ POLARON RANGE SC7640. Pozlatenie vzoriek bolo v manuálnom režime v prítomnosti zlata a paládia, argónovej atmosfére o 99,996% čistote argónu. Čas zlatenia bol 60 s, pod napätím 1,5 kV a prúdom 14 mA. K zdroju elektrónov bolo použité volfrámové vlákno. Mikrovláknité štruktúry boli pozorované skenovacím elektrónovým mikroskopom ZEISS EVO LS10.

Snímky získané z elektrónového mikroskopu boli ďalej použité aj na stanovenie priemeru vlákien prostredníctvom obrazovej analýzy softwaru ImageJ. Približná pórovitosť mikrovláknitých štruktúr bola stanovená gravimetricky a s využitím aplikácie SEMIPE.

### 3.5.7 Meranie zmáčania a nasiakavosti

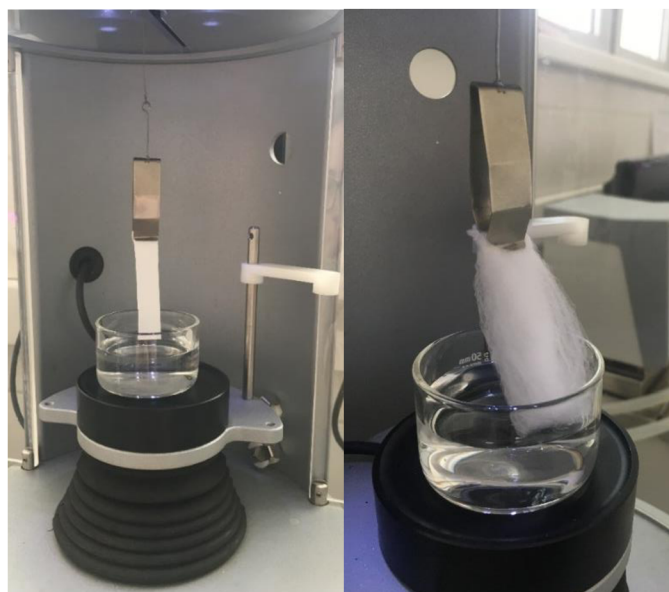
#### Zmäčanie

Ako bolo spomenuté v teoretickej časti, vzťah mikrovlákien s vodným prostredím vplýva na správanie buniek v kultivačnom médiu. Prvotný kontakt kvapaliny s materiálom bol pozorovaný pomocou kontaktného uhlu (CA). Keďže meranie CA je obtiažné na mikrovláknach v podobe typu VATA, boli pripravené fólie na podložných sklíčkach z roztokov polymérov. Tvorba fólii bola vykonávaná pomocou automatického filmového aplikátora TQC Sheen. Pohyb záterového noža bol rýchlosťou 5 cm/s vo dvoch vrstvách. Celková vrstva fólie bola 240  $\mu\text{m}$ . Pripravené fólie na sklíčkach, boli následne dané do vákuovej sušiarne pri teplote 50 °C po dobu min 3 hod, aby sa odparilo zvyškové rozpúšťadlo.

Po ochladení fólií na laboratórnu teplotu boli kontaktné uhly a povrchová energia vzoriek merané s použitím See Systému od firmy Advex Instrument s. r. o. K meraniu CA boli použité tri kvapaliny (destilovaná voda, etylénglykol a dijódmetán) o objeme kvapky 15  $\mu\text{l}$ . Každá kvapalina bola meraná na vzorke min 6x. Na vyhodnotenie povrchovej energie bol použitý Owens-wend model.

#### Nasiakavosť

Po zmeraní CA fólií a planárnych vzoriek boli vybrané materiály k určeniu miery nasiakavosti materiálov. Pozorované boli vzorky vo forme typu VATA a PLANÁR. K meraniu nasiakavosti bol použitý Force Tenziometer Sigma 701, ktorý zaznamenával nárast hmotnosti na zavesenej vzorke po ponorení vzorky pod hladinu vody 1 mm v čase 10 min. Rozmery planárnych vzoriek boli 1x5 cm, pre vzorky typu VATA bola dĺžka vzorky 5 cm. Zobrazenie metódy merania je možné vidieť na Obr. 12.



Obr. 12: Zobrazenie metódy merania nasiakavosti planárneho a vatičkového typu vzorky

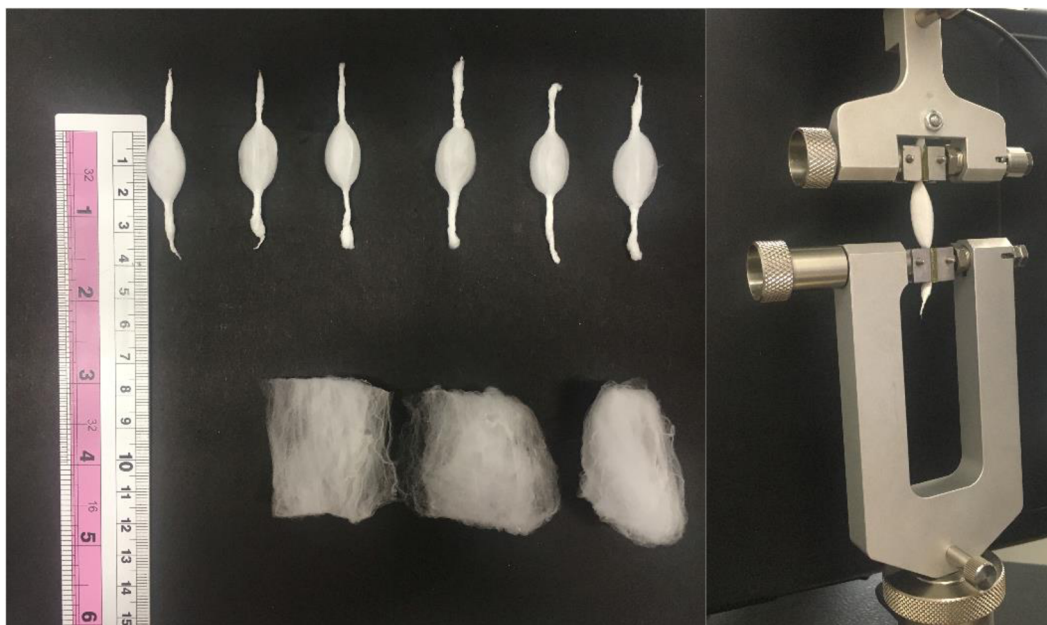
### 3.5.8 Mechanické vlastnosti

Mechanické vlastnosti vlákničných vzoriek boli sledované ťahovou skúškou za sucha a za mokra, nakoľko koncová aplikácia mikrovlákničných štruktúr je vo vodnom prostredí. Ťahová skúška patrí medzi základné statické mechanické charakteristiky materiálov. Pri je testovacie teleso (tzv. „dog bone“, ktoré zabezpečuje najväčšiu koncentráciu napätia v strednej časti telesa) upnuté do čelustí trhacieho stroja a teleso sa konštantnou rýchlosťou naťahuje. Pôsobením síl sa teleso predlžuje najskôr pružne, následne dochádza k plastickej deformácii až ku konečnému pretrhnutiu. Výsledkom merania je ťahová krivka, ktorá predstavuje závislosť pôsobiaceho napätia  $\sigma$  na relatívnej deformácii  $\varepsilon$ . Z lineárnej časti krivky je možné vypočítať Youngov modul pružnosti  $E$ , ktorý je jej smernicou. Ďalej je možné stanoviť medzu klzu, pevnosť materiálu v ťahu či ťažnosť (deformácia pri pretrhnutí). Výsledný tvar ťahovej krivky je závislý aj od typu skúšaného materiálu. Materiály, ktoré sa správajú krehko, sa prejavujú vysokými hodnotami pevnosti bez prítomnosti medze klzu a veľmi nízkou ťažnosťou. Naopak húževnaté polyméry dosahujú najvyššie hodnoty ťažnosti spomedzi polymérnych materiálov.

Na meranie ťahovej skúšky boli použité dve formy mikrovlákničných štruktúr. Vzorky v rovinatej forme (PLANÁR) boli dodané od firmy Nano4Fibers. Z tejto kontinuálnej netkanej textílie boli rozličnou v tvare dog bone typu 5A pripravené vzorky na meranie. Mikrovlákna vo forme kokónu (VATA) nebolo možné pripraviť do tvaru dog-bone, preto boli upravené do takej formy, ako je vidieť na Obr. 13. Výsledná pevnosť vlákien bola počítaná cez plošnú (pre PLANÁR vzorky) a dĺžkovú (pre vzorky typu VATA) hmotnosť.

#### Ťahová skúška za sucha

Meranie ťahovej skúšky prebiehalo na prístroji ZWICK Z 010 s 10 N meracou hlavou. Vzorky boli uchytené do čelustí pre 10 N hlavu s počiatočnou vzdialenosťou čelustí 20 mm, čo predstavovalo počiatočnú dĺžku testovacích vzoriek. Rýchlosť testu všetkých vzoriek bola 10 mm/min a ukončenie testu bolo pri dosiahnutí 80% sily z maximálnej hodnoty.



Obr. 13: Vzorky typu VATA pripravené k meraniu ťahovej skúšky za sucha

### Ťahová skúška za mokra

Meranie ťahovej skúšky za mokra bolo za prístroji RSA-G2 Solids Analyzer (TA Instrument). Na zistenie správania sa materiálu vo vodnom prostredí boli vzorky P3HB\_VATA a P3HB\_10Syn\_PLANÁR ponechané po dobu 5 min vo vode. Vzorky boli následne upnuté do čeľustí a opatrené nádobou s vodou (Obr. 14). Počiatočná vzdialenosť čeľustí bola 20 mm, rýchlosť testu bola 10 mm/min a ukončenie skúšky bolo pri dosiahnutí 80 % max sily. Pre porovnanie bolo meranie prevedené aj za sucha.



Obr. 14: Upnutie vzorky P3HB\_VATA a uzatvorenie vzorky do nádoby s vodou

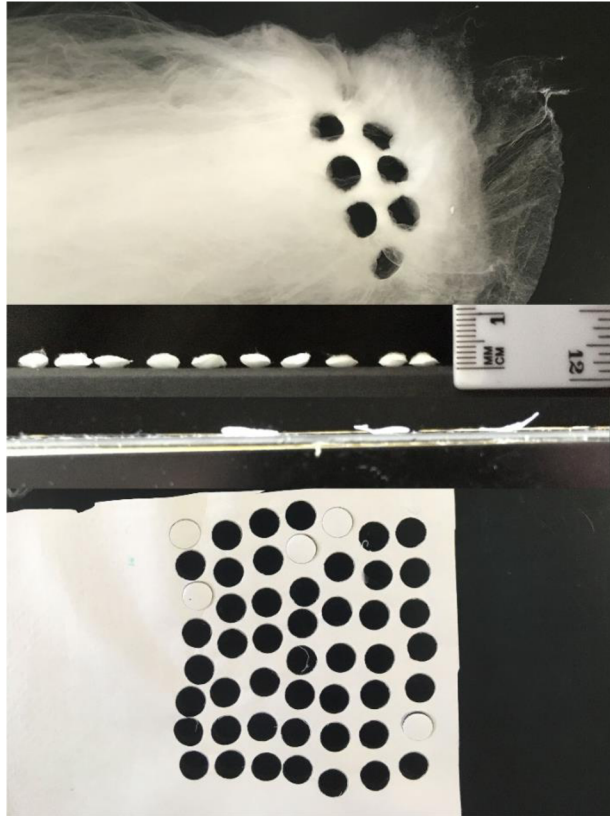
#### 3.5.9 Stanovenie zvyškového rozpúšťadla

Pri tvorbe mikrovlákien technológiou odstredivého rozpúšťadla dochádza k odparovaniu rozpúšťadla z roztoku. Po získaní mikrovlákien sa môže vo vláknach vyskytnúť určité množstvo neodpareného rozpúšťadla. Ku sledovaniu odparovaniu rozpúšťadla boli kokóny čerstvo pripravených mikrovlákien v časovom horizonte vážené na analytických váhach.

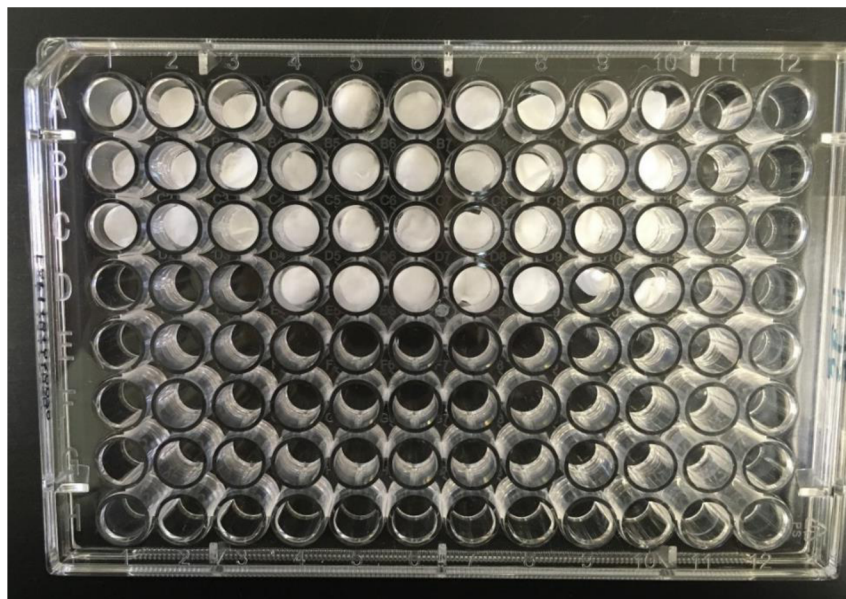
#### 3.5.10 Biologické testy – test metabolickej aktivity, bunkovej proliferácie a distribúcie buniek v mikrovláknitých štruktúrach

Cieľom pripravených mikrovlákien je ich použitie ako nosiče pre bunky v testovacej doske (ang. well plate). Aby sa získané kokóny mikrovlákien, resp. planárnych vzoriek, zmestili do testovacej doske, bolo potrebné ich upraviť do požadovaného kruhového tvaru s priemerom 6 mm. Vzorky nosičov boli manuálne vyseknuté oceľovou raznicou o danom tvare a priemere (Obr. 15). Vzorky mikrovláknitých štruktúr boli prenesené do testovacej dosky (Obr. 16). Priemerná výška vzoriek typu VATA bola  $2,9 \pm 0,3$  mm. Pripravené vzorky boli sterilizované v testovacej doske parami etylén oxidu.





Obr. 15: Príprava mikrovlnáknitých štruktúr, ich bočný pohľad typu VATA a PLANÁR na biologické testy



Obr. 16: Osadenie testovacej dosky vysekanými mikrovlnáknitými štruktúrami

Biologické testy boli vykonané v spolupráci s Inštitutom Experimentálnej medicíny Akadémie vied Českej republiky, oddelení Tkáňového Inžinýrství, ktorý zaslal podrobnú správu o postupe testovania a vyhodnocovania výsledkov. Táto správa je súčasťou prílohy.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

### 4.1 Optimalizácia procesu odstredivého zvlákňovania

Proces odstredivého zvlákňovania je ovplyvňovaný rôznymi parametrami ako bolo spomenuté v teoretickej časti. Úspešné zvlákňovanie predstavuje získanie nadýchaného kokónu vlákien zachyteného na kolektoroch po celom priestore medzi zvlákňovacou hlavou a kolektormi ako je vidieť na obr. . Ideálne získané vlákna z procesu odstredivého zvlákňovania neobsahujú kvapôčky polyméru, nezlepujú sa, nie sú prilepené na kolektory a neroztrhujú sa. K získaniu kokónu vlákien o predchádzajúcich parametroch vedie však niekoľko procesných podmienok a vhodné vlastnosti roztoku, ktoré navzájom súvisia.



Obr. 17: Tvorba ideálneho „nadýchaného“ kokónu vlákien procesom odstredivého zvlákňovania

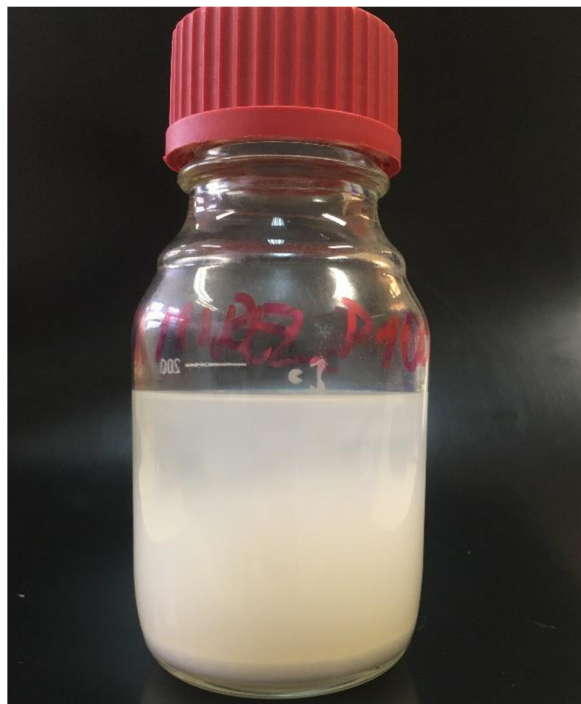
#### 4.1.1 Vlastnosti roztoku

Významnými parametrami ovplyvňujúce produkciu vlákien sú viskozita roztoku a molekulová hmotnosť polyméru. Tieto dva dôležité parametre sú ovplyvňované aj prítomnosťou rôzneho typu rozpúšťadla.

##### 4.1.1.1 Meranie viskozity a molekulová hmotnosť

Proces zvlákňovania bol výrazne ovplyvňovaný viskozitou roztoku. Viskozita roztoku je ovplyvňovaná molekulovou hmotnosťou, koncentráciou roztoku a teplotou. Pri vysokej koncentrácii polyméru v roztoku, nad 10%, má roztok zväčša vysokú hodnotu viskozity, ktorá nie je vhodná na zvlákňovanie. Záleží však od molekulovej hmotnosti polyméru a jeho samotných vlastností. Napríklad z materiálu MI\_P04 bol pripravený o koncentrácii 7%. Jeho  $M_w$  bola oproti referenčnému materiálu P3HB o 80% menšia. Roztok navyše po rozpustení granulí viditeľne obsahoval plnivo vid' . Termogravimetrickou analýzou bol zistené, že MI\_P obsahoval až 10 % plniva z celkovej hmotnosti polyméru. Viskozita 7% MI\_P bola 40 mPa·s.

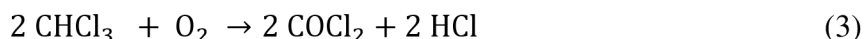
V porovnaní s 7% s roztokom P3HB ide o približne 99% pokles viskozity. Takýto roztok nebolo možné zvlákniť.



Obr. 18: 7% roztok MI\_P v  $\text{CHCl}_3$

Z predchádzajúcej štúdie [84] bolo zistené, že ideálna viskozita na zvlákňovanie roztoku je v rozmedzí od 3500–4500 mPa·s, čo odpovedalo najčastejšie cca 7% roztoku. Pri zvlákňovaní niektorých 7% roztokov a úprave možných technologických parametrov (zmena rýchlosti otáčania zvlákňovacej hlavy, priemer zvlákňovacích ihiel, rýchlosť dávkovania) nebolo možné získať ideálny kokón vlákien. Keďže vlastnosti roztoku, ako je viskozita, priamo ovplyvňujú proces zvlákňovania, ďalším riešením problému bola úprava koncentrácie, ktorá ovplyvňuje viskozitu roztoku. Pridaním rozpúšťadla došlo k poklesu viskozity. Množstvo rozpúšťadla bolo pridávané postupne až pokiaľ nenastala tvorba kokónu z vlákien. Zo získaných skúseností boli niektoré pripravené 7% roztoky zriedené priamo pred zvlákňovaním. Ideálne kokóny mikrovlákien boli teda pripravené z roztoku o viskozite v rozmedzí od 800–1900 mPa·s. Rozdiel ideálnych viskozít oproti predchádzajúcej práci je zrejme spôsobený modifikáciou odsávania priestoru zvlákňovania. V predchádzajúcom prípade nebol zabezpečený dostatočný prietok vzduchu v priestore zvlákňovania. Po úprave (odstránení zapchaného filtra) bola dosiahnutá vynikajúca cirkulácia vzduchu, a tým aj rýchlejšieho odparovania rozpúšťadla. Vlákna z roztoku o nižších viskozitách daných väčším množstvom rozpúšťadla v roztoku sa potom zvlákňovali omnoho lepšie. Viskozita zásobného roztoku sa bohužiaľ mierne mení aj počas procesu prípravy vlákien. Rozpúšťadlo sa totiž pri manipulácii s roztokom odparuje. Môže však taktiež dochádzať k poklesu viskozity z dôvodu poklesu  $M_w$  polyméru v roztoku vďaka reakcii (rov. 3). Preto bola viskozita zásobného roztoku kontrolovaná ako po samotnej príprave (po rozpustení polyméru) tak aj po procese zvlákňovania. Viskozity roztokov pred

a po zvlákňovaní je vidieť v Tab. 7. Aj keď sa bolo snaženie eliminovať tento jav, bola u roztokov obsahujúcich SYN pozorovaný mierny nárast viskozity.



### Výpočet koncentrácie po zvlákňovaní

Keďže niektoré pripravené roztoky museli byť zriedené, aby sa získal „nadýchaný“ kokón z mikrovlákien, bola výsledná koncentrácia stanovená hmotnostne. Výpočet koncentrácie zriedeného roztoku bol podľa rov. 4

$$w(A) = \frac{m(A)}{m(R)} \cdot 100\% \quad (4)$$

kde  $m(A)$  je hmotnosť polyméru po odparení rozpúšťadla a  $m(R)$  je hmotnosť roztoku po zvlákňovaní.

Tab. 7: Koncentrácia a viskozita roztokov pred a po zvláknení

<b>Roztok materiálu a jeho koncentrácia</b>	<b><math>\mu_{\text{pred}}</math> (mPa·s)</b>	<b>Koncentrácia roztoku pri zvlákňovaní</b>	<b><math>\mu_{\text{po}}</math> (mPa·s)</b>
7% P3HB	4310	5,53%	810
7% P3HB_10SYN	3740	7%	3900
5% HYDAL M01	400	5%	350
7%(HYDAL M01_10SYN)	1440	7%	1550
7% (P3HB/Olig.P3HB)	1370	7%	1310
7% (P3HB/5MI)	3700	6,04%	1870
7% (P3HB/10MI)	3550	5%	940
7% (P3HB/15MI)	3550	5%	990
7% (P3HB/20MI)	3150	5%	880
7% (P3HB/25MI)	2820	6,57%	1880
7% MI	1260	7%	-
7% MI_P	60	-	-
6% P3HB_FORM	80	6%	70
8,75% P3HB_HAc	3840	8%	1080

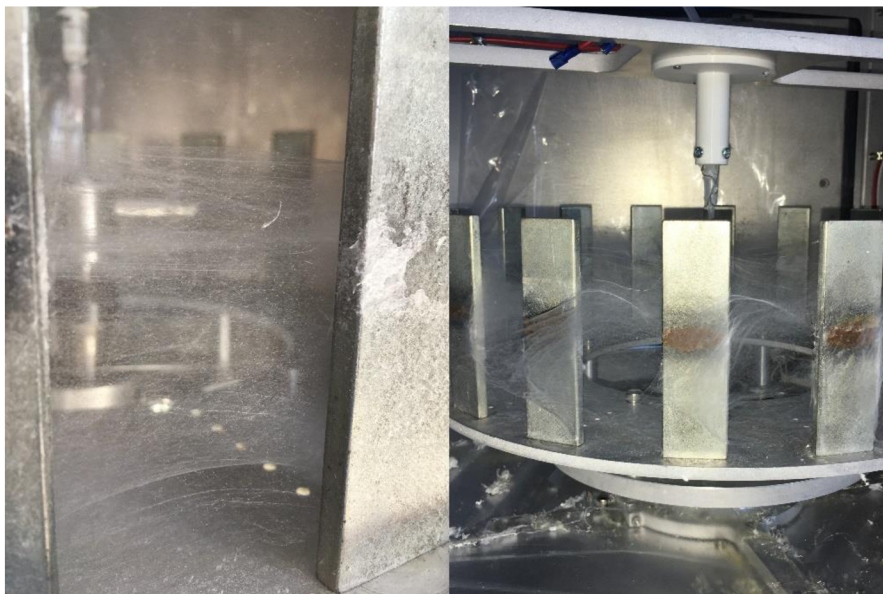
Podmienkou k úspešnému získaniu vlákien nie je len ich úspešná zvlákňiteľnosť daná molekulovou hmotnosťou a viskozitou roztoku, ale taktiež mechanickými vlastnosťami samotného polyméru. Napr. u roztoku 7% MI bola viskozita podľa skúseností vhodná na zvlákňovanie. Pri procese zvlákňovania dokonca nastala aj tvorba vlákien bez defektov. Avšak



pri zbere vlákien z kolektorov boli vlákna mnohonásobne ťažnejšie oproti vláknám z P3HB, čo ovplyvnilo ich odber. Pri ich zbere, sa vlákna naťahovali a strácali tak svoju pôvodnú štruktúru. Taktiež manipulácia s takýmito vláknami bola náročná. Pripravené vlákna z čistého MI ako aj ich zber, bol tak výrazne ovplyvnený prítomnosťou 4HB jednotiek v polymérom reťazci, ktorých je podľa meranie NMR v 30%. Z dôvodu riadenia obsahu 4HB v polyméru bol MI miešaný s P3HB. Pri zvlákňovaní roztokov MI s obsahom P3HB bolo zistené, že maximálna možná koncentrácia MI v roztokoch je 25%. Pri vyššej koncentracii MI v roztoku P3HB nastávajú problémy s odobratím vlákien z kolektorov a dochádza tak k zmene štruktúry pripravených vlákien.

#### 4.1.2 Procesné parametre

Medzi najčastejšie meniace sa procesné parametre patrí rýchlosť otáčania zvlákňovacej hlavy. Pre každý roztok polyméru je však rôzna ideálna rýchlosť otáčania. Vo všeobecnosti bolo pozorované, že pri vyššej rýchlosti otáčania oproti ideálnej rýchlosti sa vo vláknach vyskytovali kvapky polyméru. Taktiež pri vysokej rýchlosti sa vlákna trhali a vyletovali spomedzi kolektorov ako je zobrazené na Obr. 19: Neúčinné zvlákňovanie; snímka vľavo zachytáva vlákna s veľkým množstvom kvapiek polyméru, snímka vpravo zobrazuje roztrhané vlákna, ktoré pretŕčajú až za kolektory Obr. 19. Naopak pri nižších otáčkach ako je ideálna rýchlosť zvlákňovacej hlavy vlákna dostatočne nedržali na kolektoroch. Po krátkom čase tak spadli z kolektorov. Tým, že sa znížila rýchlosť otáčania, vlákna neboli dostatočne natiahnuté a často sa namotali na ihly, resp. na zvlákňovaciu hlavu. Optimálnu rýchlosť zvlákňovania ovplyvňujú aj laboratórne podmienky. Počas niekoľkohodinového zvlákňovania sa motor, ktorý otáča zvlákňovaciu hlavu, výrazne zahrieva. To má za následok zvýšenie teploty vo zvlákňovacom priestore. Pri vyššej teplote dochádza k rýchlejšiemu odparovaniu prchavého rozpúšťadla. Vlákna sú tak tvorené oveľa rýchlejšie a nedopadajú účinne na stenu kolektorov. Následným riešením je tak pri dlhodobom zvlákňovaní zvýšenie otáčok. Presné otáčky pri ktorých boli získané ideálne vlákna sa nachádzajú v Tab. 8.



Obr. 19: Neúčinné zvlákňovanie; snímka vľavo zachytáva vlákna s veľkým množstvom kvapiek polyméru, snímka vpravo zobrazuje roztrhané vlákna, ktoré pretŕčajú až za kolektory

Tab. 8: Presné procesné podmienky pre každý roztok

Roztok materiálu	Rýchlosť otáčania × 10 <sup>3</sup> (RPM)	Doba zvlákňovania (min)	Priemerná hmotnosť kokónov (mg)
P3HB	9*	3	277 ± 29
P3HB_10SYN	10	2	288 ± 18
HYDAL M01	6**	2,5	249 ± 20
HYDAL M01_10SYN	8	2	312 ± 32
P3HB/Olig.P3HB	10	2	268 ± 12
P3HB/5MI	10	2,5	279 ± 29
P3HB/10MI	10	2,5	237 ± 7
P3HB/15MI	10	2,5	248 ± 8
P3HB/20MI	10	2,5	235 ± 18
P3HB/25M	10	2,5	286 ± 20
MI	6	2	-
P3HB_FORM	8 000	2,5	-
P3HB_HAc	10 000	2	243

\* Roztok P3HB bolo možné zvlákniť aj pri 10 000 RPM

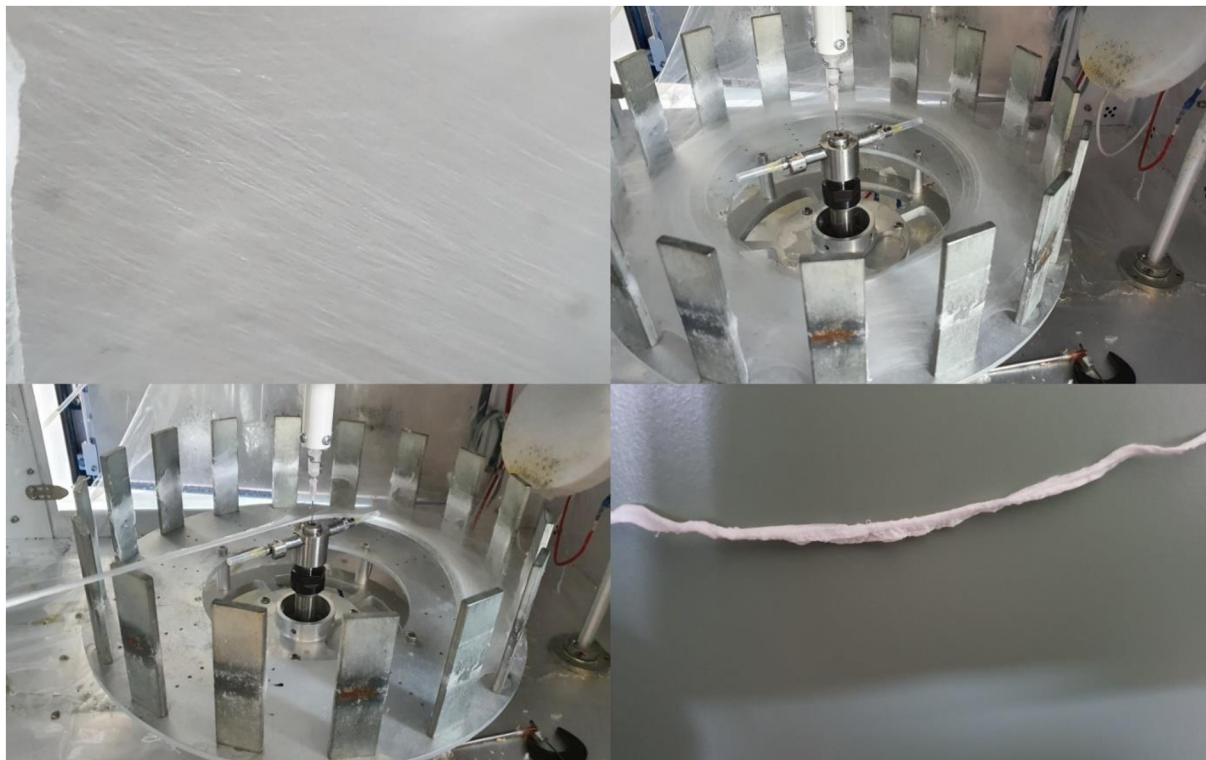
\*\* Roztok HYDAL M01 bolo možné zvlákňovať aj pri 4 000, 8 000, 10 000 RPM bez výrazných defektov vlákien

## 4.2 Vplyv rozpúšťacieho systému na zvlákňovanie

Medzi najčastejšie rozpúšťadla P3HB polymérov patrí chloroform. Z predchádzajúcej štúdie [84] bolo zistené, že získanie ideálnych vlákien je závislé na type použitého CHCl<sub>3</sub> stabilizátoru. Pretože z ekologického dôvodu dochádza k tlaku na postupné znižovanie chlórovaných rozpúšťadiel, v tejto práci bola taktiež skúmaná náhrada určitého množstva CHCl<sub>3</sub> iným rozpúšťadlom.

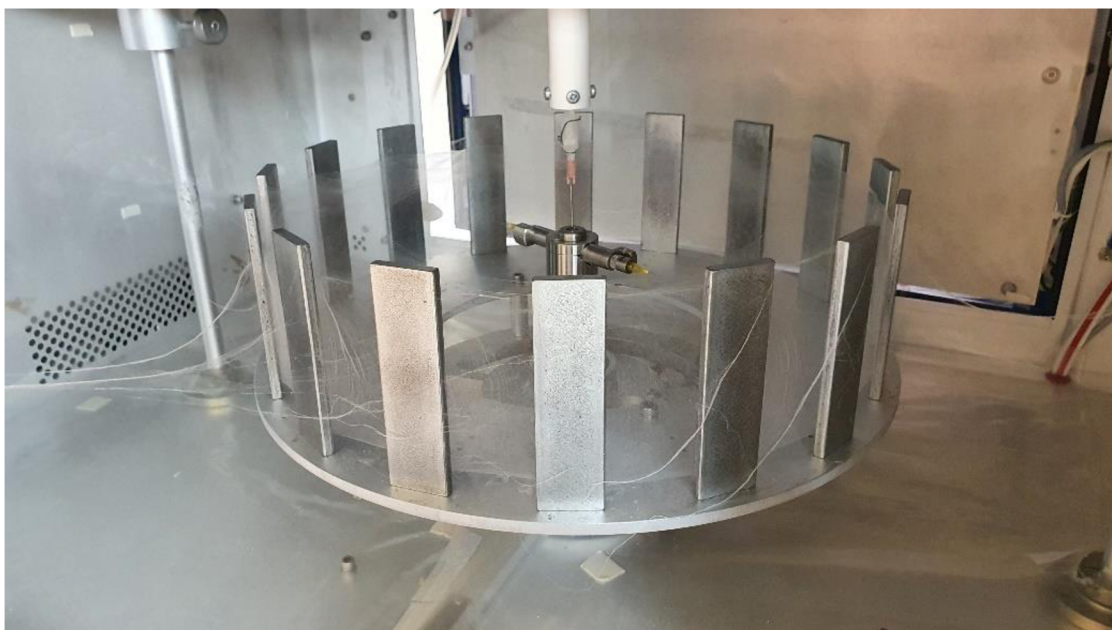
K čiastočnej náhrade chlórovaných rozpúšťadiel bola použitá kyselina mravčia a kyselina octová. Tieto kyseliny boli zvolené na základe literárnej rešerše. Pridaním FORM k roztoku P3HB bol získaný číry, transparentný roztok. Počas zvlákňovania z tohto roztoku sa vytvorili vlákna bez výrazných defektov ako je vidieť na Obr. 20. Pri odbere vlákien z kolektorov nastal problém, kedy vlákna zostali silno prilepené na kolektoroch. Počas zberu sa kokón naťahoval a strácal tak svoju pôvodnú „nadýchanú“ štruktúru. Po konečnom odbere vlákien z kolektorov sa vlákna zlepili do tenkého zhluku vlákien vid' Obr. 20. Zlepenie vlákien mohlo nastať z dôvodu pomalého odparovania kyseliny z vlákien. Vlákna tak mohli byť ihneď po zvláknení ešte čiastočne namäkčené neodpareným rozpúšťadlom, čo mohlo spôsobiť ich zlepenie. Taktiež mohla nastať kyslá hydrolyza P3HB, a tým pokles molekulovej hmotnosti. Po 2 týždňoch od

prípravy roztoku klesla jeho  $M_w$  o 50 % oproti referenčnému roztoku P3HB. Optimalizovanie prípravy roztoku P3HB s použitím kyseliny mravčej a účinne získaný kokón P3HB vlákien z tohto roztoku je tak predmetom ďalšej štúdie.



Obr. 20: Zvlákňovanie roztoku P3HB\_FORM; horné fotky zobrazujú ideálne vlákna ihneď po zvláknení, spodné fotky zobrazujú proces zberu vlákien a získané vlákna

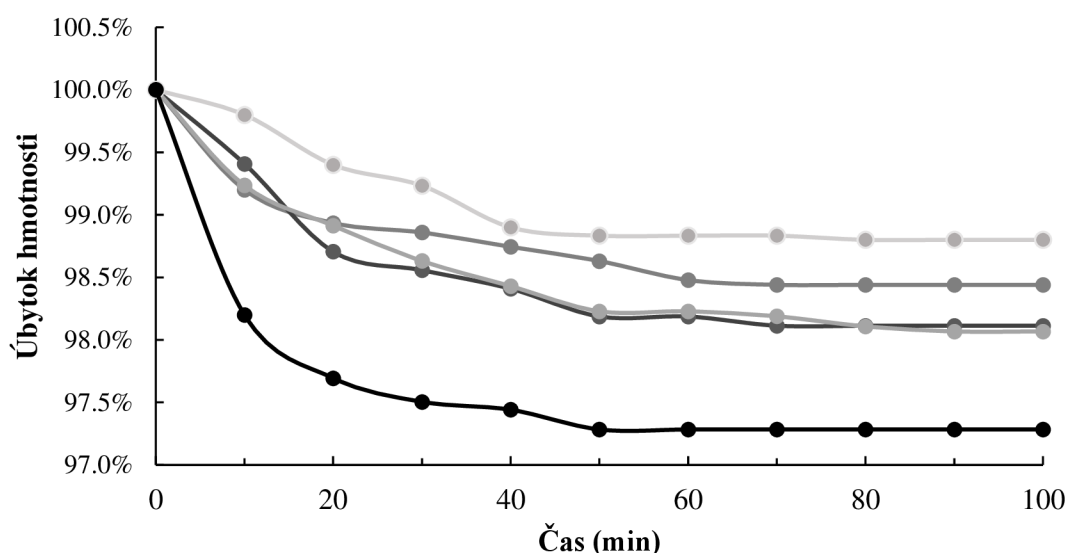
Prítomnosť HAc v roztoku P3HB nespôsobila viditeľné vizuálne zmeny ako u roztoku s FORM. Po zoptimalizovanej viskozite roztoku, ako bolo spomenuté v kapitole 4.1.1.1, sa získali kokóny vlákien ako pri roztokoch polymérov obsahujúcich  $\text{CHCl}_3$  ako rozpúšťadlo. Roztok s obsahom HAc, bol tak vhodný na produkciu „nadýchaných“ kokónov vlákien. Po 3 týždňoch od zvlákňovania roztoku, bol roztok opäť použitý k zvlákňovaniu. Tentokrát však bolo zvlákňovanie neúspešné. Pri rovnakých podmienkach zvlákňovania ako pri prvotnom zvlákňovaní, sa vlákna roztrhali a zároveň obsahovali početné množstvo kvapiek polyméru (viď . Ani po možných procesných úpravách (zníženie počtu otáčok, zmena rýchlosti dávkovania, zmena priemeru zvlákňovacích ihliel) neboli z roztoku produkované kokóny vlákien. Získaných bolo len pár vlákien s veľkým počtom defektov. Pri odbere vlákien nastlal rovnaký problém ako u zvlákňovania z roztoku s obsahom FORM. Vlákna boli navyše veľmi krehké a rýchlo sa rozpadali. Dôvodom tohto javu je, že počas 3 týždňov došlo k výraznej hydrolýze P3HB kyselinou octovou. Tento jav bol potvrdený GPC analýzou, kedy  $M_w$  roztoku polyméru P3HB\_HAc klesla na približne 73 %  $M_w$  z referenčného roztoku P3HB. Skladovanie roztokov s prídavkom kyselín s cieľom použiť roztok na následné zvlákňovanie je tak nevhodné.



Obr. 21: Zvlákňovanie roztoku P3HB\_HAc po 3 týždňoch od prípravy roztoku

### 4.3 Úbytok rozpúšťadla

Pri procese zvlákňovania dochádza k odparovaniu rozpúšťadla. Po zvlákňovaní sa však vyskytuje vo vláknach určité množstvo rozpúšťadla. Sledovaný bol úbytok hmotnosti kokónov VATA\_P3HB (viď Obr. 22: Závislosť úbytku hmotnosti kokón pripravených z roztoku P3HB na čase Obr. 22) po ich okamžitom zvlákňovaní. Táto zmena hmotnosti predstavovala odparovanie rozpúšťadla – chloroformu. Najväčšia strata chloroformu bola zaznamenaná v priebehu 20–30 minút. Po 50 minútach od zvlákňovania sa odparovanie chloroformu zastavilo a hmotnosť zostala takmer rovnaká.



Obr. 22: Závislosť úbytku hmotnosti kokón pripravených z roztoku P3HB na čase

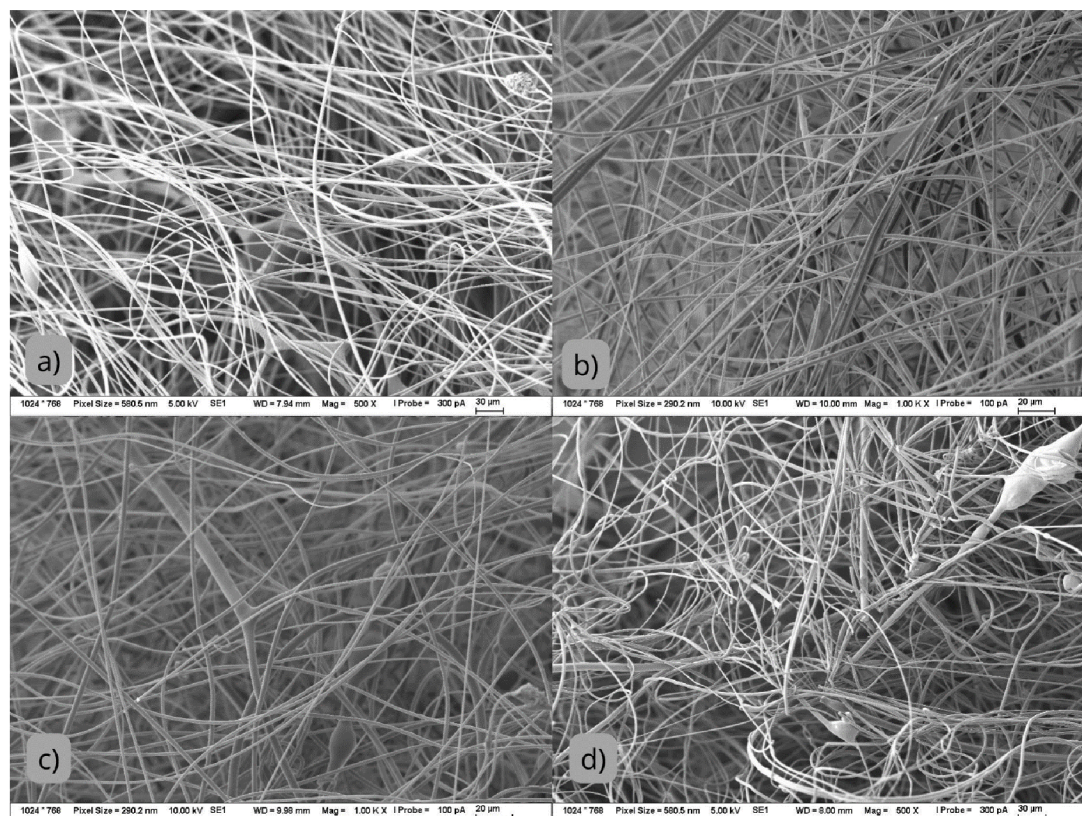


Počas 4 nasledujúcich dní po zvlákňovaní bola zaznamenávaná taktiež hmotnosť kokónov. Cieľom bolo overiť, či nedochádza naďalej k odparovaniu zvyškového rozpúšťadla. Pri sledovaní hmotností kokónov VATA\_P3HB bolo zistené, že na 3. a 4. deň je hmotnosť rovnaká. Keďže zmeny v hmotnostiach medzi 2. a 3. dňom boli v desatinách mg, môže sa teda predpokladať, že na tretí deň bol chloroform odparený z vlákien. Pre presné stanovenie obsahu rozpúšťadla vo vláknach po ich zvlákňovaní je možné stanoviť metódou headspace, ktorá je veľmi citlivá na prchavé látky. V predchádzajúcej práci [84] bolo overené, že po týždni od prípravy vlákien nebolo metódou headspace zachytené merateľné množstvo  $\text{CHCl}_3$ .

#### 4.4 Morfológia mikrovláknitých štruktúr

Snímky vzoriek získaných prostredníctvom SEM poskytujú prehľad o morfológií mikrovláknitých štruktúr. Pozorované boli vzorky P3HB typu VATA s prídavkom MI, Olig.P3HB a SYN.

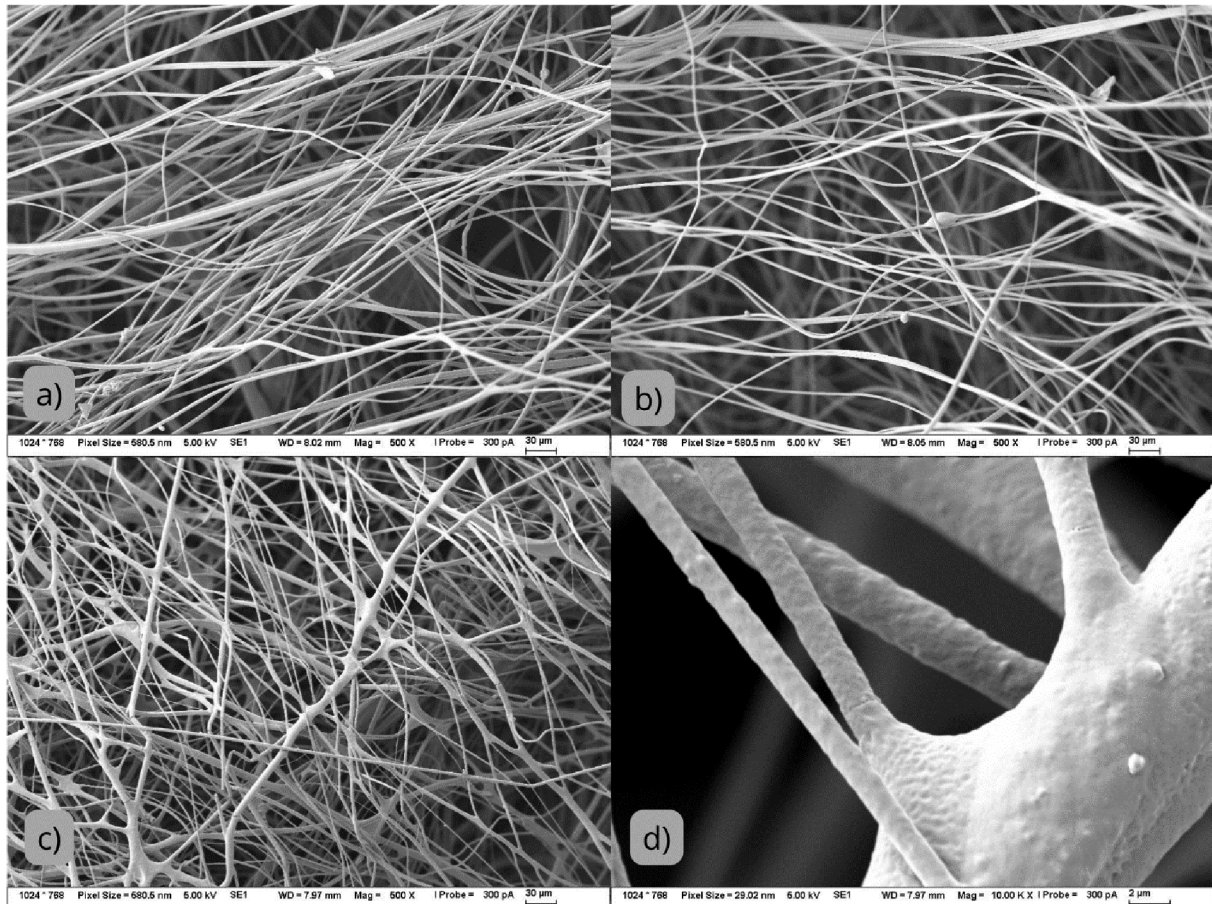
Vzorky typu P3HB sa vyznačujú prítomnosťou kvapôčok polyméru, zhlukov vlákien a drsným povrchom. S prídavkom MI sa povrch vlákien stáva jemnejším/hladším bez ohľadu na percentuálne zastúpenie MI. Množstvo kvapiek a zhlukov polyméru je do 15% MI takmer minimálny. Od 20% MI sa počet kvapiek vo vzorkách zvyšuje. Pri 25% MI je výskyt kvapiek výrazný, vlákna sú navyše potrhane. Vzorka P3HB/25MI vykazuje najväčšiu nehomogenitu v porovnaní s ostatnými vzorkami obsahujúcich kopolymér P3,4HB. Pozorované zmeny morfológie mikrovláknitých štruktúr s obsahom MI je možné vidieť na Obr. 23.



Obr. 23: SEM snímky vlákien a) VATA\_P3HB pri zväčšení 500, b) VATA\_P3HB/15MI pri zväčšení 1 000, c) VATA\_P3HB\_20MI pri zväčšení 1 000, d) VATA\_P3HB/25MI pri zväčšení 500

Prídavkom zmäkčovadla majú vlákna hladší povrch a homogénnejšiu štruktúru bez výrazných kvapiek polyméru a zhlukov vlákien. Ďalším použitým modifikátorom P3HB vlákien bol prídavok oligoméru P3HB v pomere 75/25. Vlákna vytvorili homogénnu štruktúru s hladkými vláknami s minimálnou prítomnosťou kvapiek.

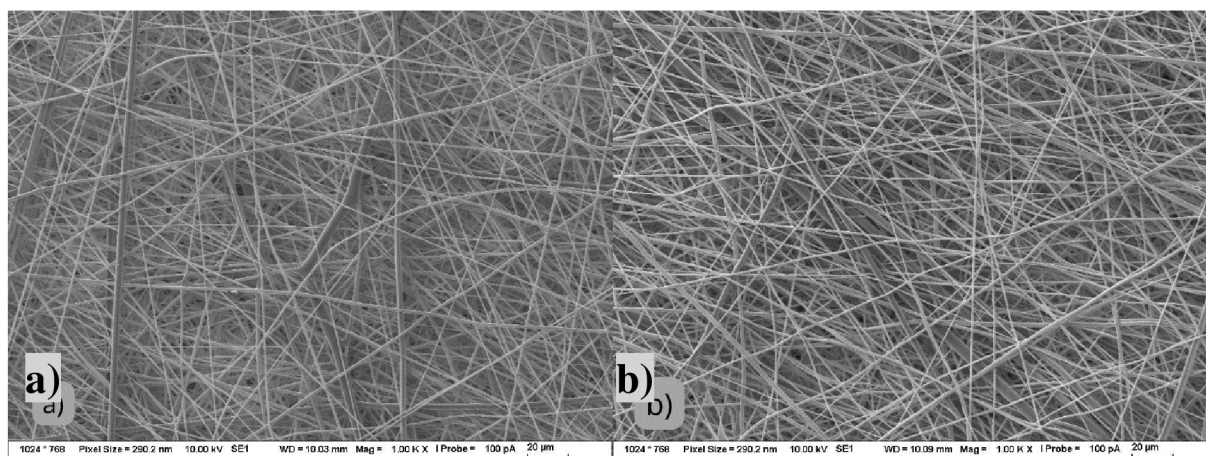
Sledované boli aj mikrovlákná pripravené z P3HB\_M. Mikrovlákná P3HB\_M tvoria spleť štruktúru, v ktorej sa vyskytujú často zhluky vlákien. Tie sa ďalej rozvetvujú. Povrch vlákien P3HB\_M je jemne drsný až pórovitý s občasným výskytom výčnelkov.



Obr. 24 SEM snímky vlákien a) VATA\_P3HB\_10SYN pri zväčšení 500, b) VATA\_P3HB/Olig.P3HB pri zväčšení 500, c) VATA\_HYDAL M01 pri zväčšení 500, d) VATA\_HYDAL M01 pri zväčšení 10 000

Ďalej boli analyzované vzorky P3HB typu PLANÁR v neupravenej forme, po pôsobení vody a roztoku LIP\_C\_1. Vzorky planárneho typu P3HB sa oproti typu VATA líšia oveľa jemnejšou a hustejšou štruktúrou. Planárny typ vzorky má vyššiu homogenitu vlákien ako u typu VATA, kde sa často vyskytujú kvapôčky polyméru. Vlákna P3HB typu VATA majú výrazne drsný povrch oproti vláknam typu PLANÁR pripravených komerčnou výrobou. Po 24 hodinovom ponorení planárnych vzoriek P3HB vo vode a roztoku LIP\_C\_1 a ich vysušení neboli pozorované žiadne viditeľné zmeny. Analyzovaním SEM snímok si vzorky zachovali svoju pôvodnú morfológiu ako je vidieť na Obr. 25.





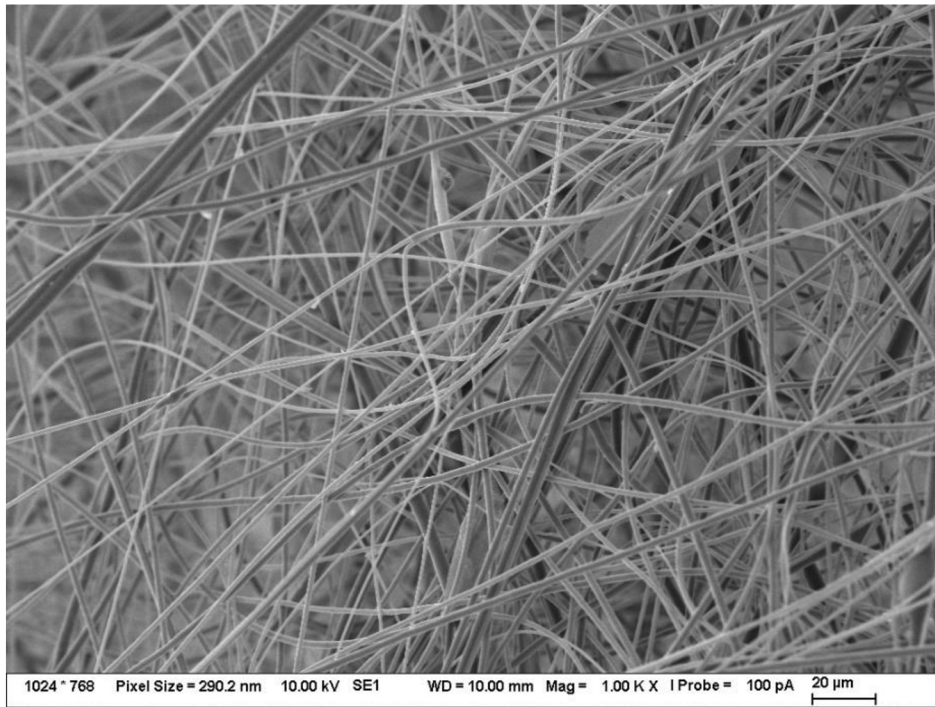
Obr. 25: SEM snímky vlákien a) PLANÁR\_P3HB\_LIP\_CR\_1 pri zväčšení 1 000, b) PLANÁR\_P3HB pri zväčšení 1 000

Z prehľadových SEM snímok všetkých materiálov je vidieť, že vlákna sú náhodne orientované a vytvárajú tak 3D spleť, poréznu štruktúru. Stanovenie porozity a priemeru vlákien je ďalej diskutované.

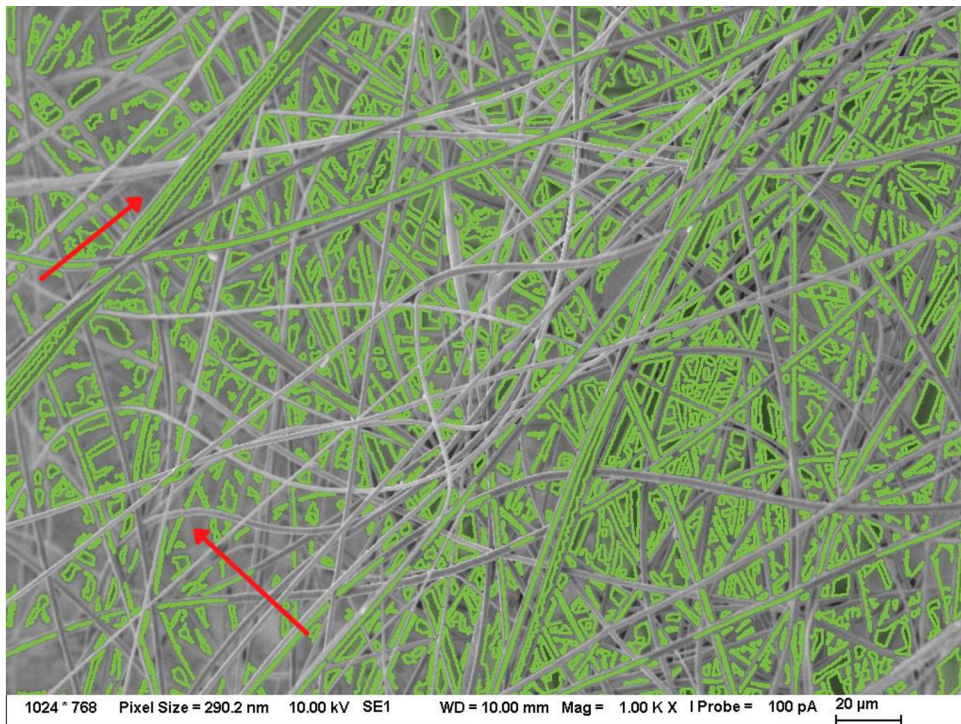
### Porozita 3D nosičov

Ako bolo spomenuté v teoretickej časti, veľkosť, resp. objem 3D nosičov patria medzi hlavné konštrukčné faktory ovplyvňujúce životaschopnosť a proliferáciu buniek. Pri výrobe vlákien technológiou odstredivého zvlákňovania sa objem a veľkosť pórov neustále mení. Rozdielna je pri priamom skončení procesu, kedy sú vlákna zachytené na kolektor, následne však po ich odobratí a manipulácii sa veľkosť pórov mení. Pri uchytení 3D nosičov do pinzety nastáva taktiež určitá zmena veľkosti pórov. Aby sa čo najmenej obmedzila manipulácia so vzorkami a zabránilo sa tak zmenám veľkosti pórov, bola veľkosť pórov skúmaná pomocou SEM snímok 3D nosičov softwarovou SEMIPE analýzou.

Pri vyhodnocovaní veľkosti pórov obrazovou analýzou nastali určité komplikácie. Jednou z nich je limitná úroveň, tzv. treshold, ktorá stanovuje rozsah detekcie pórov. Ako je vidieť na obr. pri hodnotách tresholdu 50 a 60 je stanovený rozdielny počet pórov (910 pre treshold 50, 1099 pre treshold 60). Výsledok ovplyvňuje aj rozdelenie jednotlivých pórov. Na Obr. 28 (zakrúžkované) je možné pozorovať, že v pozadí software vyhodnotil malé póry rozdelené vláknami. Z pôvodnej snímky (Obr. 26) je však vidieť, že toto rozdelenie neodpovedá skutočnosti, naviac nie sú zobrazené do úvahy póry najbližšie k objektívu (zobrazené na 4 obrázku). Ďalej software vyhodnotil aj ako pór spojené dve vlákna s tmavšou farbou na snímke (šípka na 3. obrázku). Stredné hodnoty veľkosti pórov získané zo softwaru pohybujúce sa od 9,36  $\mu\text{m}$  pre P3HB/15MI a 13,9  $\mu\text{m}$  pre P3HB/Olig.P3HB neodpovedajú reálnym hodnotám. Stanovenie veľkosti pórov pripravených 3D mikrovláknitých skaffoldov je tak náročné aj z dôvodu neurčenia hĺbky nosiča zo SEM snímok. Z obrazovej analýzy analySIS je však vidieť (Obr. 29), že skaffold z P3HB/15MI má dostatočne veľkú plochu pórov v jednej rovine.

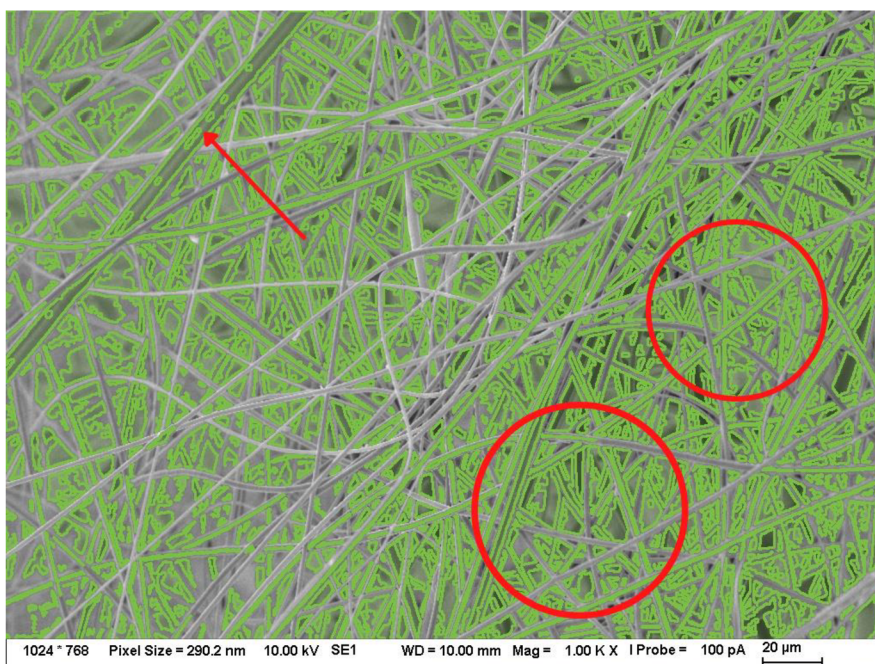


Obr. 26: SEM snímka vzorky VATA\_P3HB/15MI, zväčšenie 1 000



Obr. 27: Vyhodnotenie porozity vzorky VATA\_P3HB/15MI softwarom SEMIPE pri hodnote tresholdu 50, minimálna veľkosť detegovaných pórov bola 5 μm





Obr. 28: Vyhodnotenie porozity vzorky VATA\_P3HB/15MI softwarom SEMIPE pri hodnote tresholdu 60, minimálna veľkosť detegovaných pórov bola 5  $\mu\text{m}$

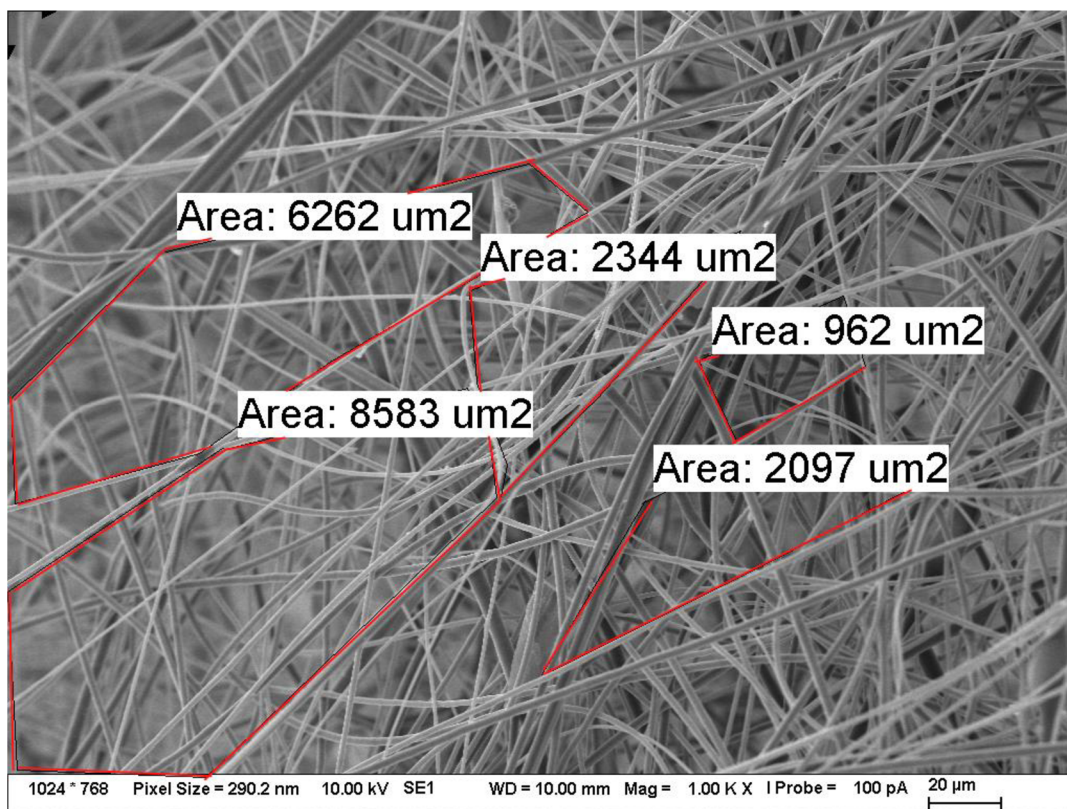
Ako ďalším spôsobom určenia pórozity bolo prostredníctvom objemu a hmotnosti nosičov. Priemerná výška a hmotnosť nosičov je  $2,9 \pm 0,3$  mm a  $1,4 \pm 0,3$  mg. Priemer nosičov bol 6 mm. Objem nosičov  $V_n$  bol teda (rov. 5). Objem zastupujúceho polyméru  $V_{PHB}$  s hustotou  $1,23$  g/cm<sup>3</sup> v nosičov je (rov. 6)

$$V_n = S_p \cdot v = \pi r^2 \cdot v = \pi \cdot 3^2 \cdot 2,9 = (82,4 \pm 8,9) \text{mm}^3 \quad (5)$$

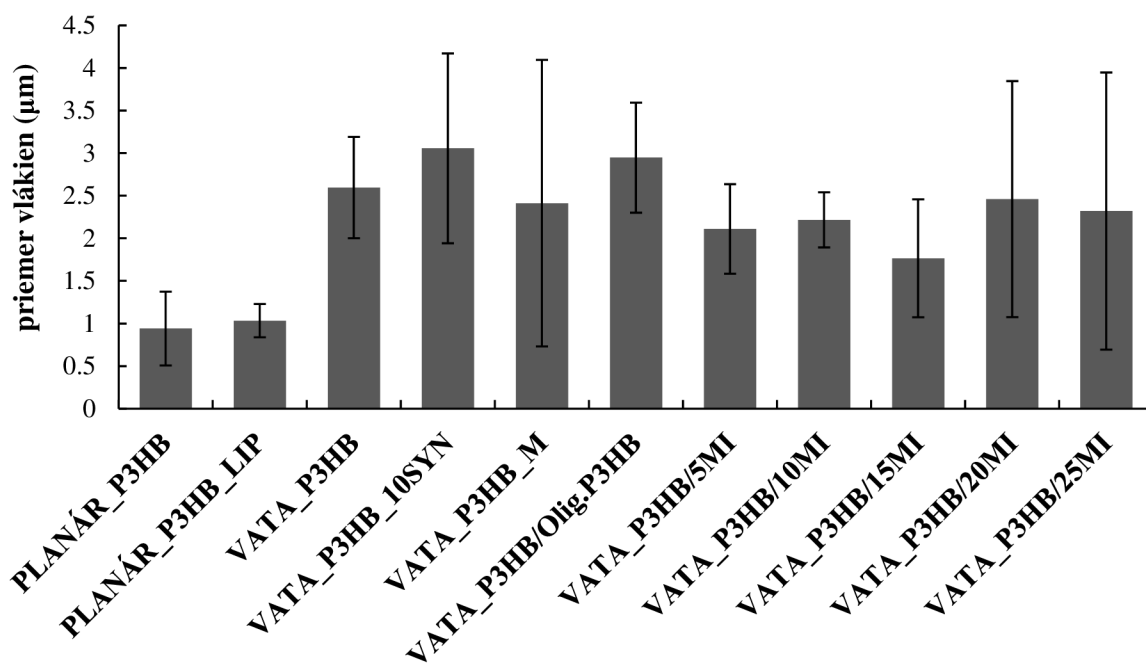
$$V_{P3HB} = \frac{m}{\rho} = \frac{0,0014}{1,23} = (1,2 \pm 0,2) \text{mm}^3 \quad (6)$$

Percentuálny objem materiálu v 3D nosiči je 1,43 %, celková porozita je tak približne  $98,57 \pm 2,74$  %.

Ďalej pomocou obrazovej analýzy analySIS zo SEM snímok bol stanovený priemer vlákien jednotlivých materiálov. Na Obr. 30 je vidieť zastúpené priemery vzoriek. Už aj pri prehľadových snímkach niektorých materiálov vyššie je vidieť, občasnú prítomnosť hrubších, resp. tenších vlákien. Z toho dôvodu je odchýlka priemeru vlákna vyššia (od 20–60%). Väčšia odchýlka je pri vzorkách s väčšou nehomogenitou štruktúry a s prítomnosťou kvapôčok (vzorky P3HB\_10SYN, P3HB\_M, P3HB/20,25MI). Z merania priemerov bolo zistené, že vzorky typu PLANÁR majú menší priemer ako vzorky typu VATA.



Obr. 29: zobrazenie plochy pórov vzorky VATA\_P3HB/15MI, zväčšenie 1 000, pomocou obrazovej analýzy analySYS

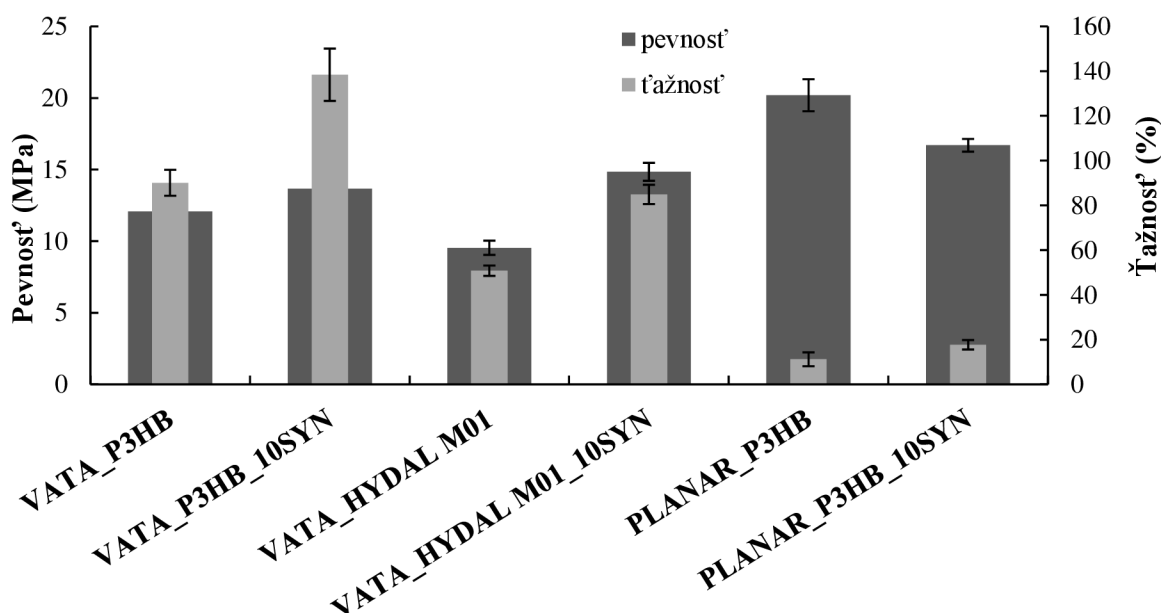


Obr. 30: Zobrazenie priemeru vlákien pre jednotlivé vzorky

## 4.5 Mechanické vlastnosti

Mechanické vlastnosti mikrovláknitých štruktúr sú dôležitým parametrom pri účinnom používaní ako 3D nosiče. Mikrovlákná by mali mať dostatočnú pevnosť a optimálnu ťažnosť k udržaniu svojho tvaru pri procese spracovania do finálneho tvaru i pri manipuláciách v procese testu na bunkách. Stanovenie týchto hodnôt je však náročné z dôvodu komplexnosti mikrovláknitej štruktúry. Taktiež presný postup stanovenia mechanických vlastností mikrovláknitých štruktúr pripravených technológiou odstredivého zvlákňovania a definovaný tvar testovacej vzorky nie je normou určený. Pre približnú charakterizáciu pevností a ťažností mikrovláknitých štruktúr bola prevedená ťahová skúška. Keďže mikrovláknité štruktúry sú porézne a nemajú presne stanovenú plochu prierezu bola výsledná pevnosť v ťahu prepočítavaná cez plošnú hmotnosť (pre vzorky typu PLANÁR) a dĺžkovú hmotnosť (pre vzorky typu VATA). Plošná hmotnosť vzoriek bola vyjadrená ako hmotnosť testovacej vzorky na jej plochu (plocha raznice 5A). Dĺžková hmotnosť bola počítaná ako celková dĺžka zväzku vlákien z kokónu k jeho hmotnosti.

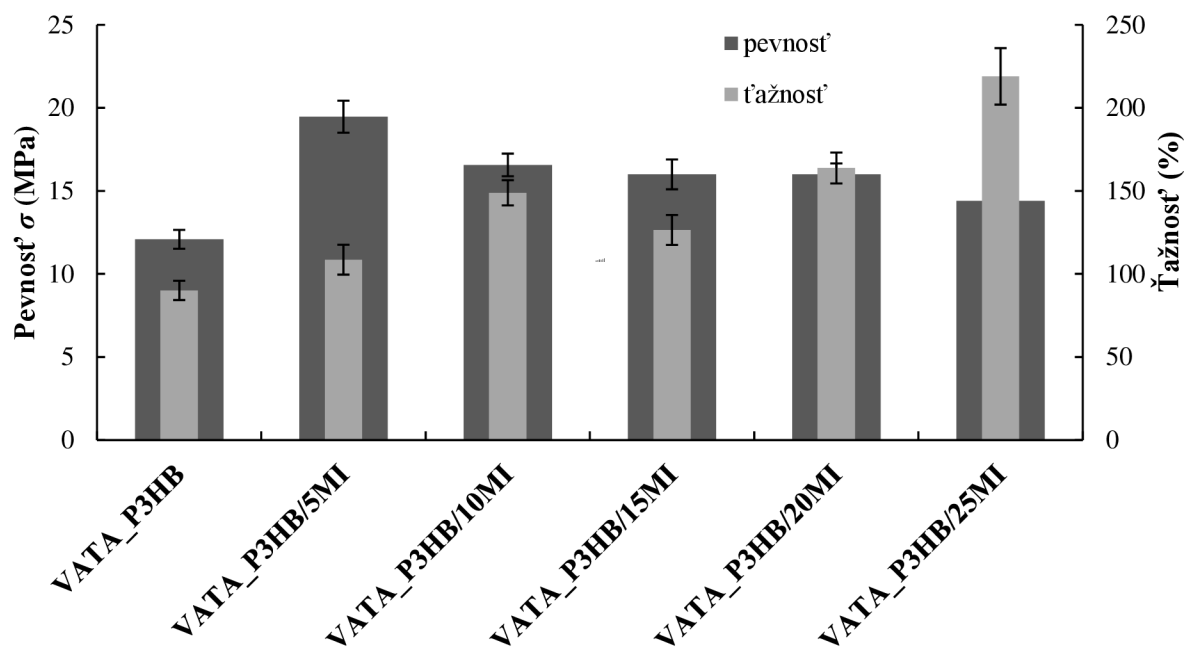
Vlákná pripravené z čistého polyméru P3HB typu VATA sa vyznačujú nízkou pevnosťou. Vzorky typu VATA\_HYDAL M01 dosahujú nižších pevností oproti VATA\_P3HB čo môže byť dôvodom nižšej molekulovej hmotnosti polyméru oproti P3HB. Prídavkom zmäkčovadla došlo k zvýšeniu pevností a ťažnosti vlákien vo všetkých vzorkách. U vzorkách PLANÁR\_P3HB a PLANÁR\_P3HB\_SYN bola pevnosť vyššia ako u rovnakých materiáloch vo forme VATA. Ťažnosť planárnych vzoriek bola niekoľkonásobne nižšia ako u vzoriek typu VATA. Orientácia vlákien v planárnych vzorkách je náhodná vo všetkých smeroch, pri vzorkách typu VATA je orientácia vlákien v jednom smere, preto je ťažnosť vyššia pri vzorkách typu VATA. Vplyv zmäkčovadla je vidieť na Obr. 31.



Obr. 31: Mechanické vlastnosti planárnych a „vatičkových“ vzoriek s obsahom polyméru P3HB, s obsahom SYN

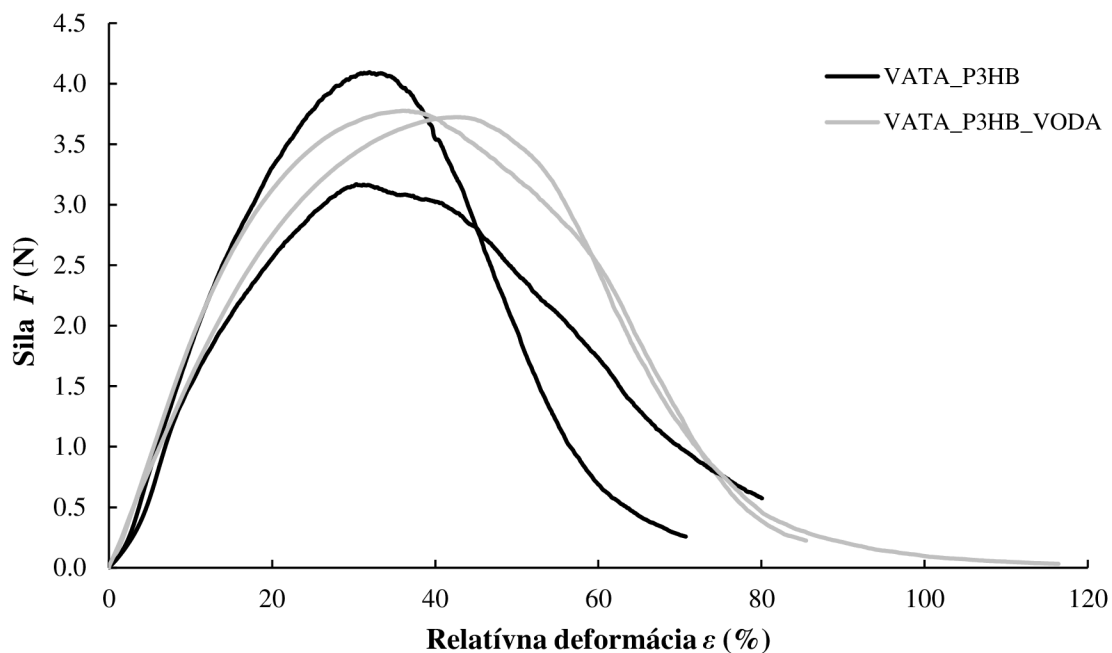
Pridaním MI do roztoku bolo predpokladaný nárast mechanických vlastností materiálu ako je uvádzané v teoretickej časti. Už pri obsahu 5 % MI došlo k najvyššiemu nárastu pevnosti vlákien oproti vláknám P3HB. So zvyšujúcim obsahom MI postupne pevnosť klesala. Pri 25% obsahu MI bola však pevnosť vlákien vyššia ako pri P3HB vláknach. So zvyšujúcim obsahom MI narastala ťažnosť vlákien a pri 25% obsahu bola ťažnosť až 219%, ako je vidieť na Obr. 32

Mechanické vlastnosti vzorky VATA\_P3HB/Olig.P3HB preukázali najnižšie hodnoty spomedzi všetkých vzoriek typu VATA

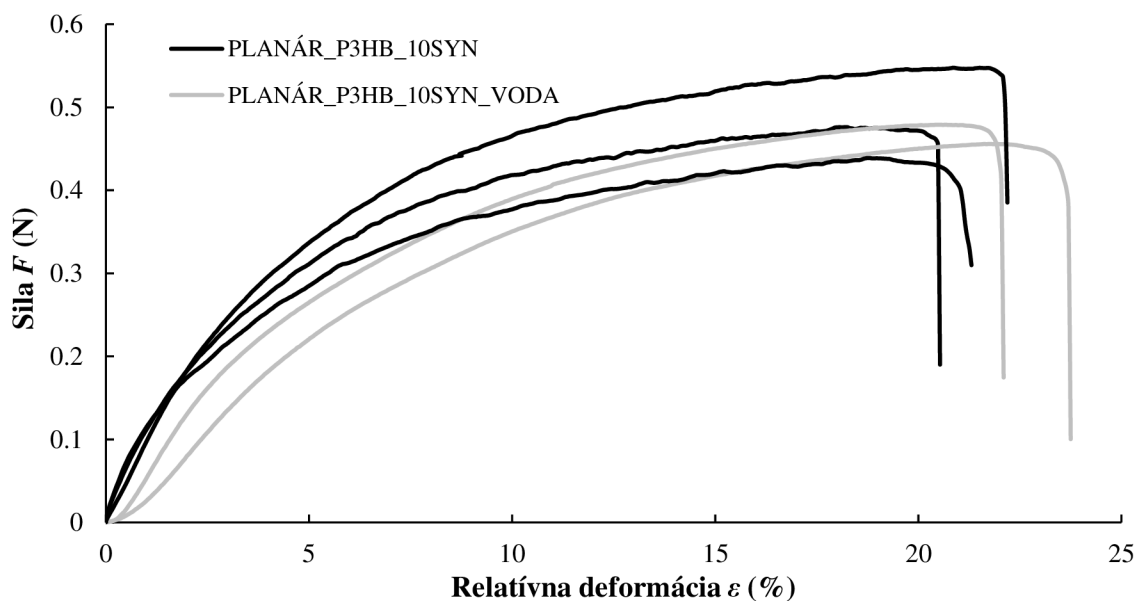


Obr. 32: Mechanické vlastnosti vzoriek s obsahom MI

Pretože potenciálnou aplikáciou mikrovláknitých štruktúr je ako 3D nosič pre bunkové kultúry, ktoré žijú v fyziologickom (vodnom) prostredí, boli pozorované mechanické vlastnosti vlákien vo vodnom prostredí. Pre porovnanie vplyvu vodného prostredia na vlákna, boli taktiež zmerané vlákna aj za bežných podmienok. Zo záznamov merania vzoriek typu VATA (Obr. 33) a PLANÁR (Obr. 34) nie je pozorovateľný žiaden výrazný rozdiel medzi vzorkami meranými vo vodnom prostredí a za bežných podmienok. Z toho je možné usudzovať, že vlákna po krátkej expozícii vo vodnom prostredí nemenia svoje mechanické vlastnosti ani nedochádza k významnej zmene interakcií medzi vláknami v štruktúre.



Obr. 33: Záznam ťahovej skúšky vzorky VATA\_P3HB za mokra a za sucha



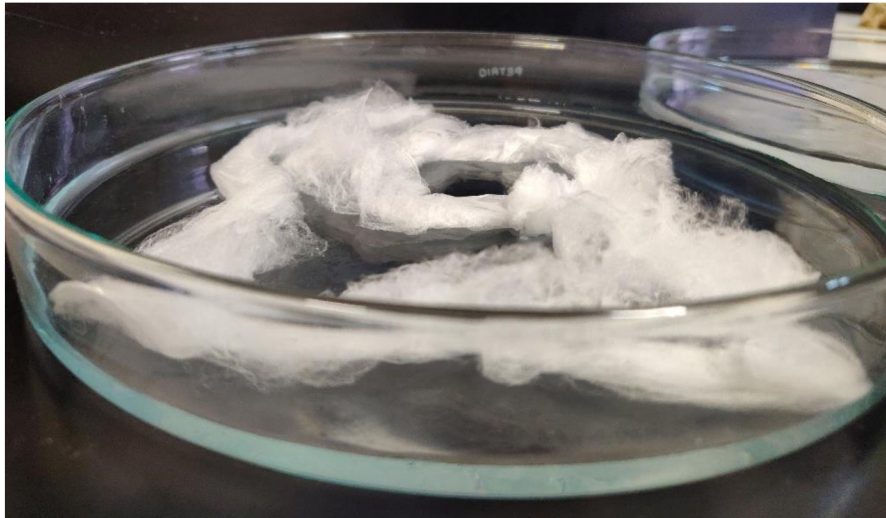
Obr. 34: Záznam ťahovej skúšky vzorky PLANÁR\_P3HB\_10SYN za mokra a za sucha

#### 4.6 Zmäčanie a nasiakavosť

Pretože sú povrchy PHA hydrofóbné, nastáva obmedzenie ich využitia ako 3D nosičov pre rast a adhéziu bunkových kultúr. Bunkové kultúry sú kultivované vo fyziologickom roztoku, ktorý je hydrofilný. Aby sa zlepšila biokompatibilita (rast, adhézia a proliferácia buniek) je nevyhnutná chemická či morfológická modifikácia 3D nosičov.

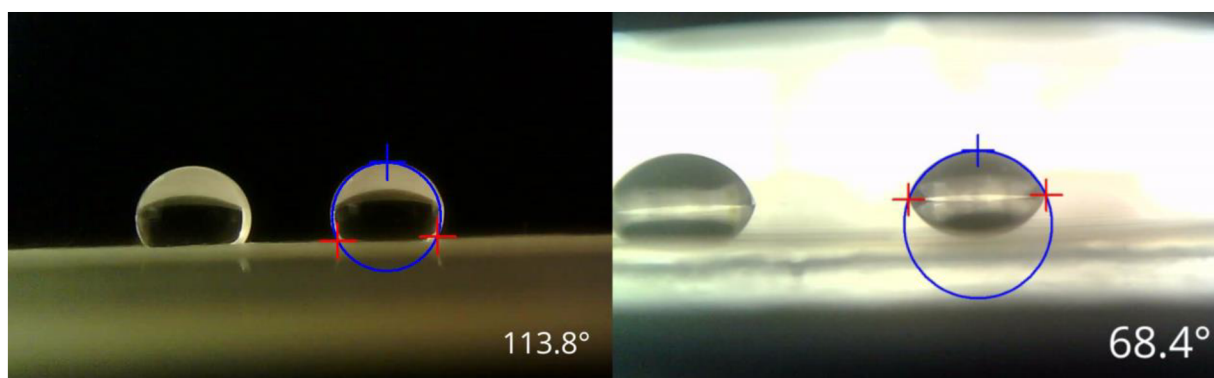


Ako je vidieť na Obr. 35 kokón vlákien pláva na povrchu hladiny i pod dlhšej dobe niekoľkých minút, nedochádza k nasiakavosti. Takýto nosič je preto komplikované osadiť bunkami, samotné presýtenie každej vzorky roztokom je veľmi náročné. Preto je vhodné určiť ako sa materiál správa pri prvotnom kontakte s vodou, resp. kvapalinou. Tento prvotný kontakt je možné stanoviť pomocou merania kontaktného uhlu (CA).



Obr. 35: Kokón z P3HB plávajúci na hladine niekoľko minút

Keďže sa CA na vláknach obťažne meria, navyše by bol CA ovplyvňovaný morfológiou vlákien, ako je porozita a nehomogénosť povrchu, bol CA meraný na fóliách pripravených z roztokov použitých pri zvlákňovaní. Pre porovnanie bol CA vody meraný aj na vzorke typu PLANÁR\_P3HB. Táto hodnota však nie je úplne presná, na približnú predstavu CA vody však postačí. Rozdiel CA vody medzi fóliu P3HB a PLANÁR\_P3HB je výrazný. Planárna vzorka sa po kontakte s vodou vôbec nezamáča (Obr. 36). K hydrofóbnosti vláknitých vzoriek prispieva aj statický náboj, ktorým sú vlákna nabité. Tento statický náboj odpudzuje navyše vodu.



Obr. 36: Kontaktný uhol vody na PLANÁR\_P3HB (vľavo), kontaktný uhol vody na P3HB fólií

Z merania CA fólií polymérov P3HB a s kopolymérom MI nebola preukázaná žiadna významná zmena. Sledovaná bola zmáčavosť aj na fóliách P3HB s obsahom zmäkčovadla Syncroflex. Keďže z chemickej štruktúry je zmäkčovadlo oligomérený adipátový ester, ktorý je nepolárny, neboli pozorované žiadne zmeny v CA oproti fóliám z P3HB, resp. s 25MI. Ako jednou z možností úpravy hydrofóbnosti PHA, bolo zakomponovanie oligoméru na báze 3HB k P3HB v pomere 25/75. Prítomnosťou Olig.P3HB sa predpokladal zvýšený počet polárnych skupín, a teda zvýšenie polárnej zložky voľnej povrchovej energie, atým aj hydrofilnosť vlákien (fólií). Po meraní CA sa však opäť žiadna zmena nepreukázala. Taktiež povrchové energie všetkých materiálov mali takmer rovnakú hodnotu. Bolo to zrejme spôsobené nedostatočnou koncentráciou polárnych skupín.

Ďalšou modifikáciou testovanou za účelom zmeny hydrofóbnosti vlákien bola metóda za pomoci lipázy. Ako prvotné merania prebiehali na fóliách z P3HB, ktoré boli ponechané 24 hod pôsobeniu lipázy LIP\_CR a to o dvoch koncentráciách (LIP\_CR\_1 a 2). Následným meraním CA sa preukázalo zníženie CA vody o približne 60 % po pôsobení LIP\_CR\_1, resp. 70 % po LIP\_CR\_2 (viď Tab. 9). Ako ukazuje **Error! Reference source not found.**, povrchová energia lipázou upravených fólií sa zvýšila, zrejme vďaka nárastu polárnej zložky na cca štvornásobok. Vyššie hodnoty povrchovej energie vzoriek naznačujú, že materiál je zmáčavý kvapalinami s vysokou povrchovou energiou (povrchová energia vody je  $72 \text{ mJ/m}^2$ ) [87]. Na základe tohto výsledku, boli mikrovlákná P3HB a PLANÁR\_P3HB, ponechané pôsobeniu lipázy.

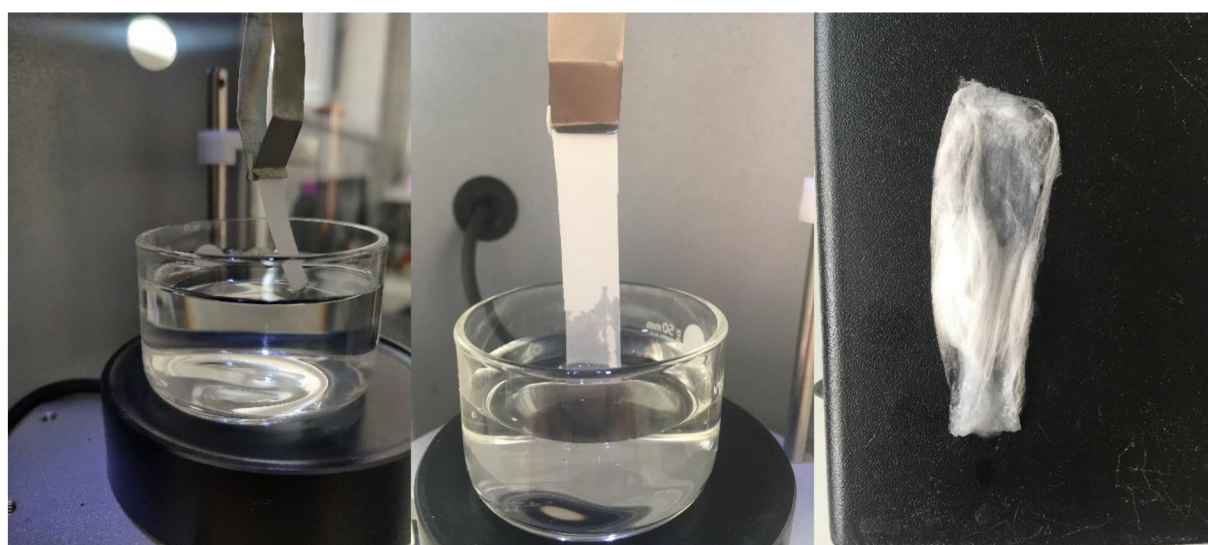
Tab. 9: Kontaktné uhly vody, etylénglykolu a dijódetánu na fóliách roztokov

Materiál	Kontaktný uhol (°)		
	Voda	Etylénglykol	Dijódetán
P3HB	$70 \pm 2$	$54 \pm 1$	$33 \pm 3$
HYDAL M01	$68 \pm 5$	$53 \pm 1$	$31 \pm 3$
P3HB/25MI	$72 \pm 3$	$59 \pm 3$	$30 \pm 3$
HYDAL M01_10SYN	$69 \pm 7$	$55 \pm 3$	$34 \pm 5$
P3HB/olig.P3HB	$70 \pm 1$	$49 \pm 1$	$31 \pm 1$
PLANÁR_P3HB	$112 \pm 3$	-	-
P3HB_LIP_CR_1	$28 \pm 6$	$30 \pm 20$	$34 \pm 4$
P3HB_LIP_CR_2	$23 \pm 4$	$23 \pm 23$	$32 \pm 2$
PLANÁR_po 24h H2O	$120 \pm 7$	-	-

Tab. 10: Povrchová energia a jej disperzná a polárna zložka jednotlivých materiálov

<b>Materiál</b>	<b>Povrchová energia Owens-wend model (mJ/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Disperzná zložka povrch. Energie</b>	<b>Polárna zložka</b>
P3HB	43	37	6
HYDAL M01	44	37	7
P3HB/25MI	42	37	5
HYDAL M01_10SYN	43	36	6
P3HB/olig.P3HB	45	39	6
P3HB_LIP_CR_1	53	28	25
P3HB_LIP_CR_2	63	34	29

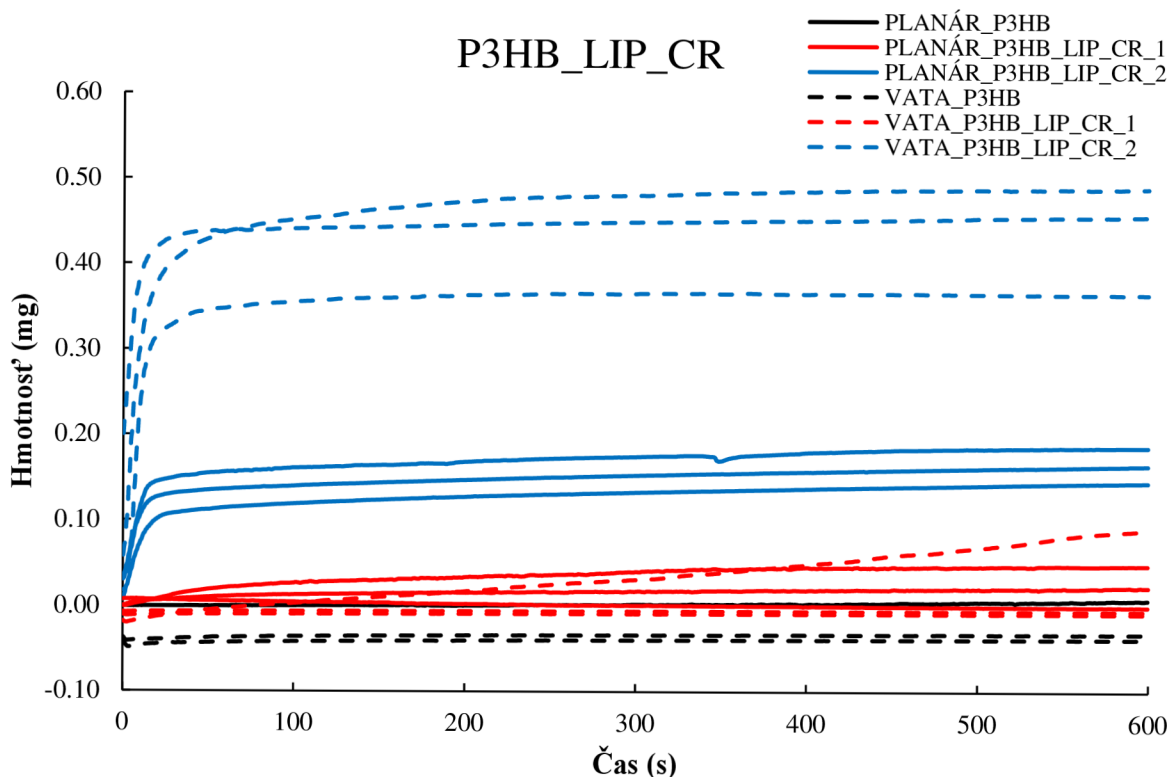
Následne boli k zmene hydrofóbnosti mikrovláknitých štruktúr P3HB použité dva druhy lipáz o dvoch koncentráciách (LIP\_CR(PP)\_1(2), číslo 2 značí vyššiu koncentráciu). Po vypratí vlákien a ich vysušení bola pozorovaná nasiakavosť ako nárast hmotnosti vzorky, ponorenej pod 1 mm hladiny vody počas 10 min. Priebeh nasiakavosti vzoriek je zobrazený na Obr. 38 Obr. 39. Taktiež bola pozorovaná nasiakavosť na referenčných materiáloch VATA\_P3HB a PLANÁR\_P3HB. Nárast hmotnosti bol zaznamenávaný až po dosiahnutí 1mm ponorenia vzorky. Kým sa vzorka ponorila na danú výšku, došlo už k zmáčaniu a nasiakavosti vody. Preto v niektorých prípadoch v čase 0 s bola zaznamenaná vyššia hmotnosť. Naopak u niektorých vzoriek bola zaznamenaná mínusová hodnota hmotnosti. Záporné hodnoty hmotnosti sa preukázali u referenčných vzorkách PLANÁR\_P3HB, VATA\_P3HB a pri niektorých vzorkách, ktoré boli vystavené pôsobeniu lipáz o nižšej koncentrácii.



Obr. 37: Priebeh nasiakavosti vláknitých vzoriek zľava: PLANÁR\_P3HB, PLANÁR\_P3HB\_LIP\_PP\_2, PLANÁR\_P3HB\_LIP\_2

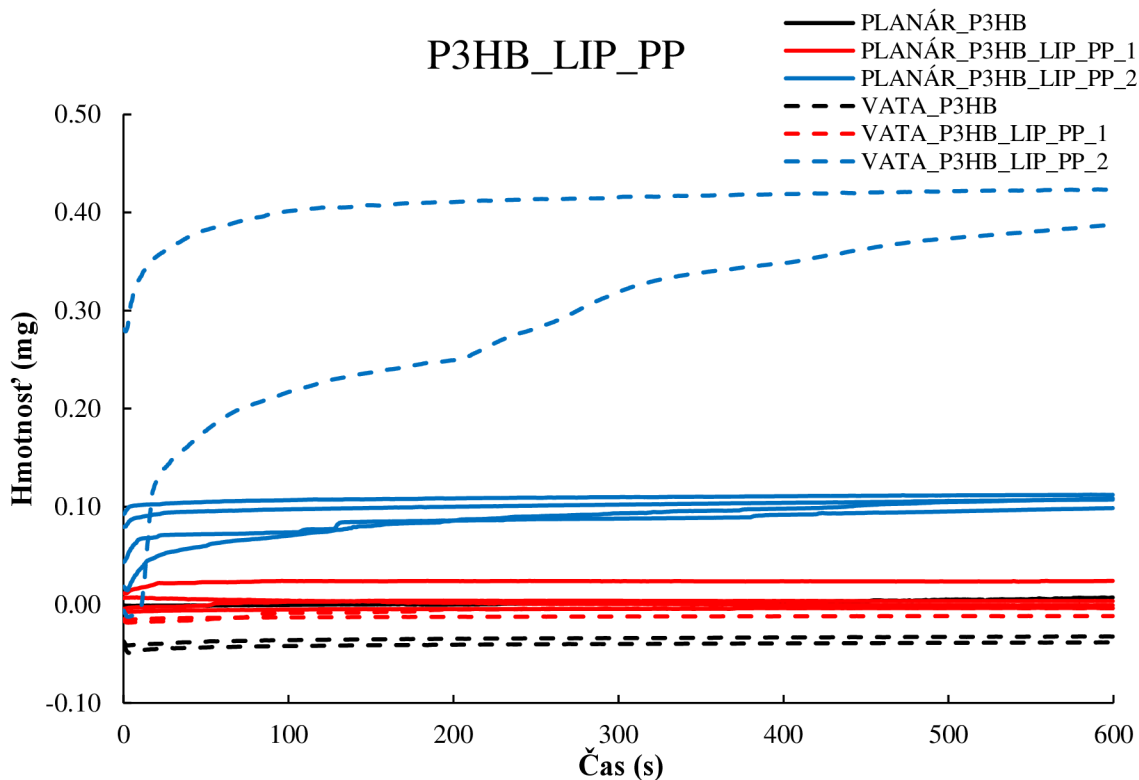


Z tvaru nasiakavosti kriviek v závislosti hmotnosti na čase pri vzorkách ponechaných pôsobeniu LIP\_CR je vidieť, že pri vyššej koncentracii LIP\_CR majú krivky typický priebeh pre nasiakavý materiál. Sklon a výška počiatočnej fázy krivky naznačuje, mieru absorpcie/nasiakavosti vody do vzorky. Rovnobežná časť krivky zobrazuje proces vzlínania vody, hmotnosť absorbovanej vody zostáva konštantná. Tento ustálený stav naznačuje, že vzorka dosiahla svoju maximálnu absorpčnú kapacitu vody vo vertikálnom smere. Na Obr. 37 je vidieť vzorku VATA\_P3HB\_LIP\_2 po meraní nasiakavosti. Po 10 min meraní bola vzorka úplne nasiaknutá vodou.



Obr. 38: Časový priebeh nasiakavania vzoriek po pôsobení LIP\_CR

Vzorky po pôsobení LIP\_PP, taktiež vykazujú nasiakavosť pri vyššej koncentracii lipázy. Pri nasiakavosti vody do PLANÁRnej vzorky sa vyskytovali občasné miesta, ktoré nenasiakali (Obr. 37). Tieto miesta spomaľovali proces nasiakavosti a vzlínania vody vo vzorke (skoky na krivkách nasiakavosti Obr. ). Dôvodom výskytu týchto oblastí je možno nedokonalé pôsobenie LIP\_PP v nehomogénnom nemiešanom roztoku alebo lokálne veľmi hustej mikrovláknitej štruktúre, skrz ktorú je transport vody náročnejší.

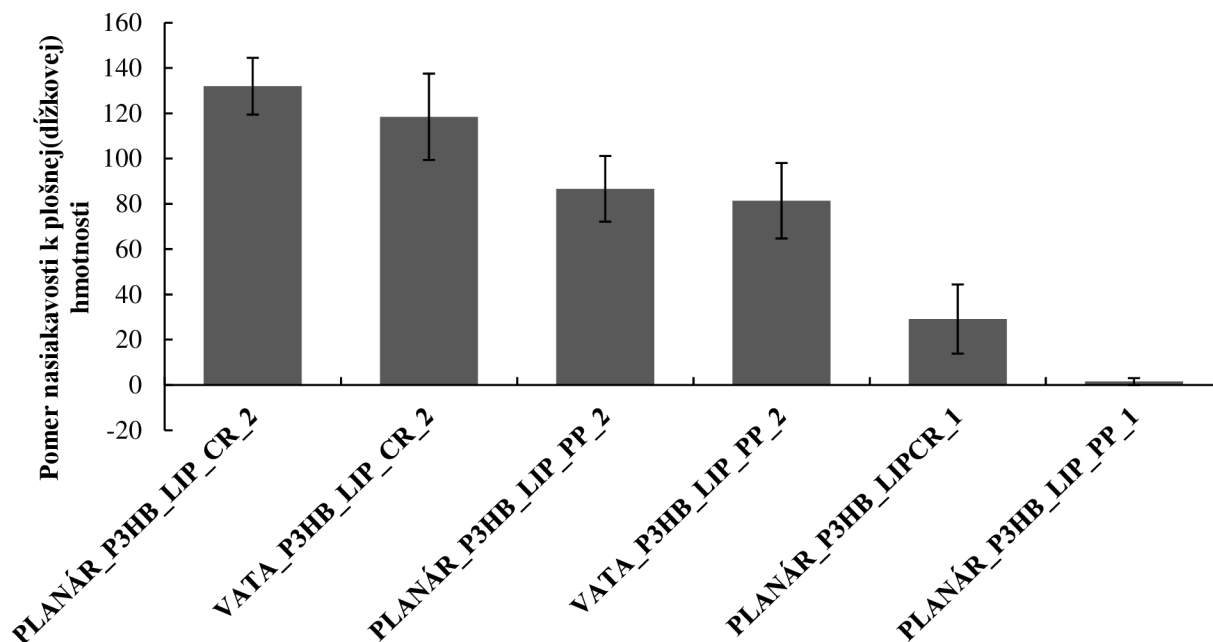


Obr. 39: Časový priebeh nasiakavania vzoriek po pôsobení LIP\_PP

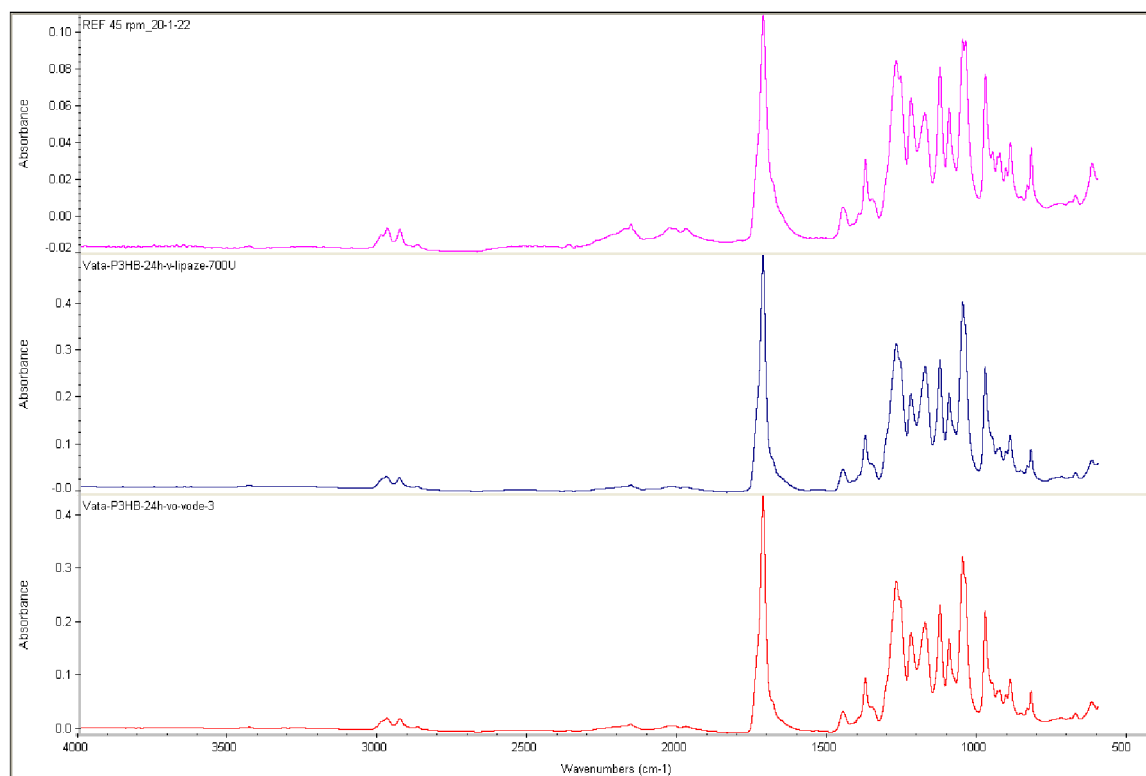
Z Obr. 40 je vidieť, že pri vzorkách typu VATA dochádza k väčšej absorpcii vody do vzorky ako pri vzorkách typu PLANÁR. Počiatočná hmotnosť vzorky typu VATA bola však približne 3-násobná. Je teda pravdepodobná aj vyššia nasiakavosť vody do vzorky u typu VATA. Pre porovnanie účinnosti v závislosti na type lipázy na nasiakavosť vody do materiálu bolo maximálne množstvo vody vsiaknuté do materiálu vztiahnuté na plošnú hmotnosť pre vzorky typu PLANÁR a na dĺžkovú hmotnosť pre vzorky typu VATA. Výsledný pomer nasiaknutej vody ku plošnej, resp. dĺžkovej hmotnosti vzorky je zobrazený na obr. . Z Obr. je vidieť, že účinnosť pôsobenia lipázy na vzorky typu VATA a PLANÁR je rovnaká. Rozdiel nasiakavosti vody je pri pôsobení rôzneho typu lipázy. Najvyššia účinnosť bola u použitia LIP\_CR\_2. U vzoriek, ktoré boli vystavené pôsobeniu LIP\_PP, sa účinnosť znížila. Tento rozdiel bol pozorovaný aj vizuálne. Vzorky PLANÁR(VATA)\_P3HB\_LIP\_CR\_2 boli celé nasiaknuté zatiaľ čo vzorky PLANÁR(VATA)\_P3HB\_LIP\_PP\_2 nasiakli maximálne do polovice svojej výšky (Obr. 37).

Na pozorovanie zmeny štruktúry P3HB po pôsobení lipázy boli vzorky podrobené FTIR analýze. Ako bolo spomenuté v teoretickej časti, účinkom lipázy, by sa mohlo dôjsť k štiepeniu esterových väzieb, a tak k nárastu polárnych hydroxylových skupín. Z dôvodu potvrdenia týchto skupín v povrchových vrstvách materiálu bolo zmerané FTIR spektrum. Pre porovnanie boli zvolené vzorky vlákien čistého P3HB ako referencie, P3HB vlákna po pôsobení prostredia destilovanej vody a P3HB vlákien po pôsobení lipázy. Výsledky sú prezentované v grafu na Obr. 41. Meranie VATA\_P3HB\_voda bolo prevedené z dôvodu potvrdenia, že samotná destilovaná voda nemá žiaden vplyv na zmenu hydrofóbnosti P3HB vlákien. Zo záznamu FTIR

analýzy nie je vidieť zmenu v charakteristických pásoch IČ spektra vzoriek. Lipáza teda pôsobí len na povrchu vlákien a FTIR spektrometer zmenu koncentrácie hydrofilných skupín nie je schopný zachytiť.

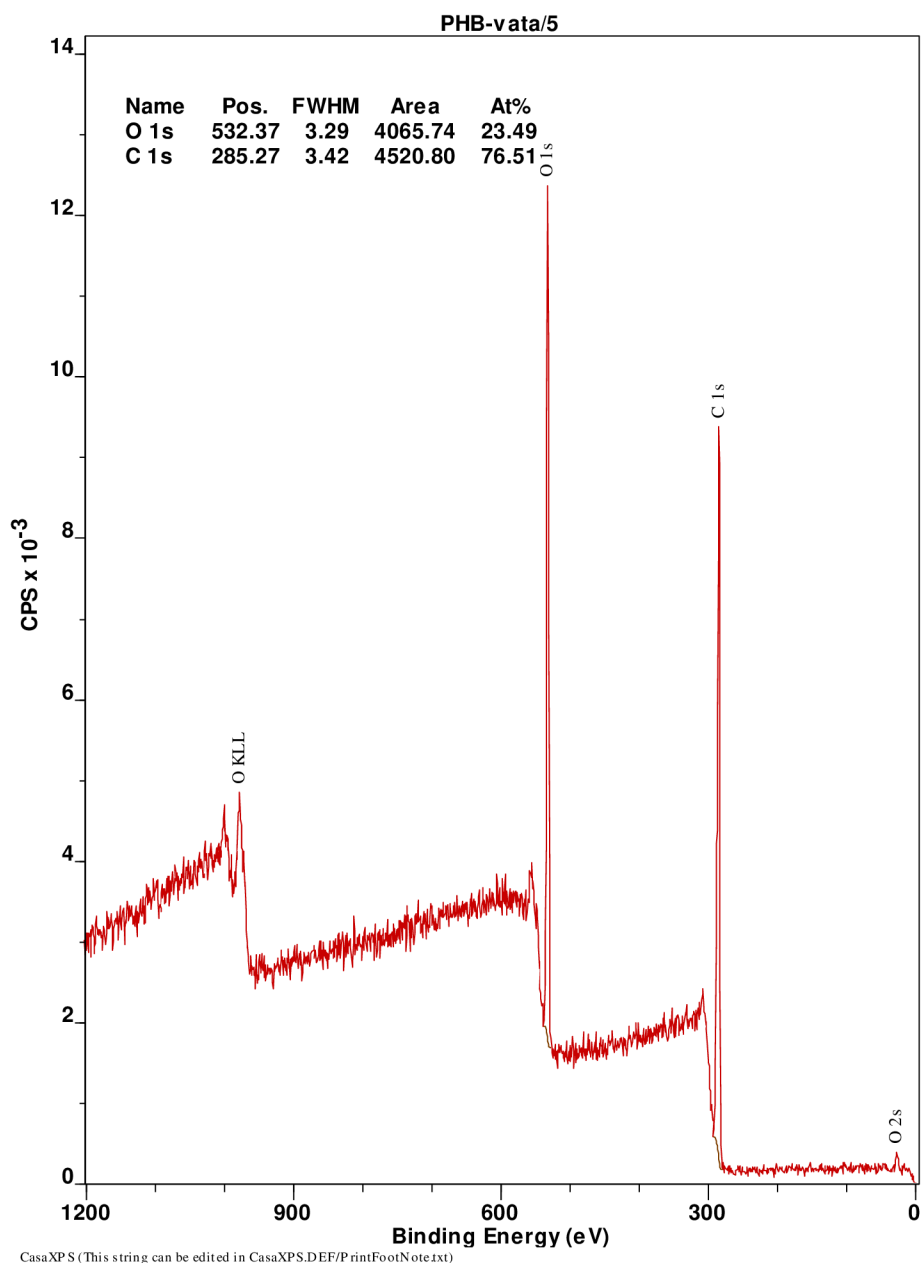


Obr. 40: Pomer nasiakavosti k plošnej (dĺžkovej) hmotnosti v závislosti na type modifikovaného materiálu

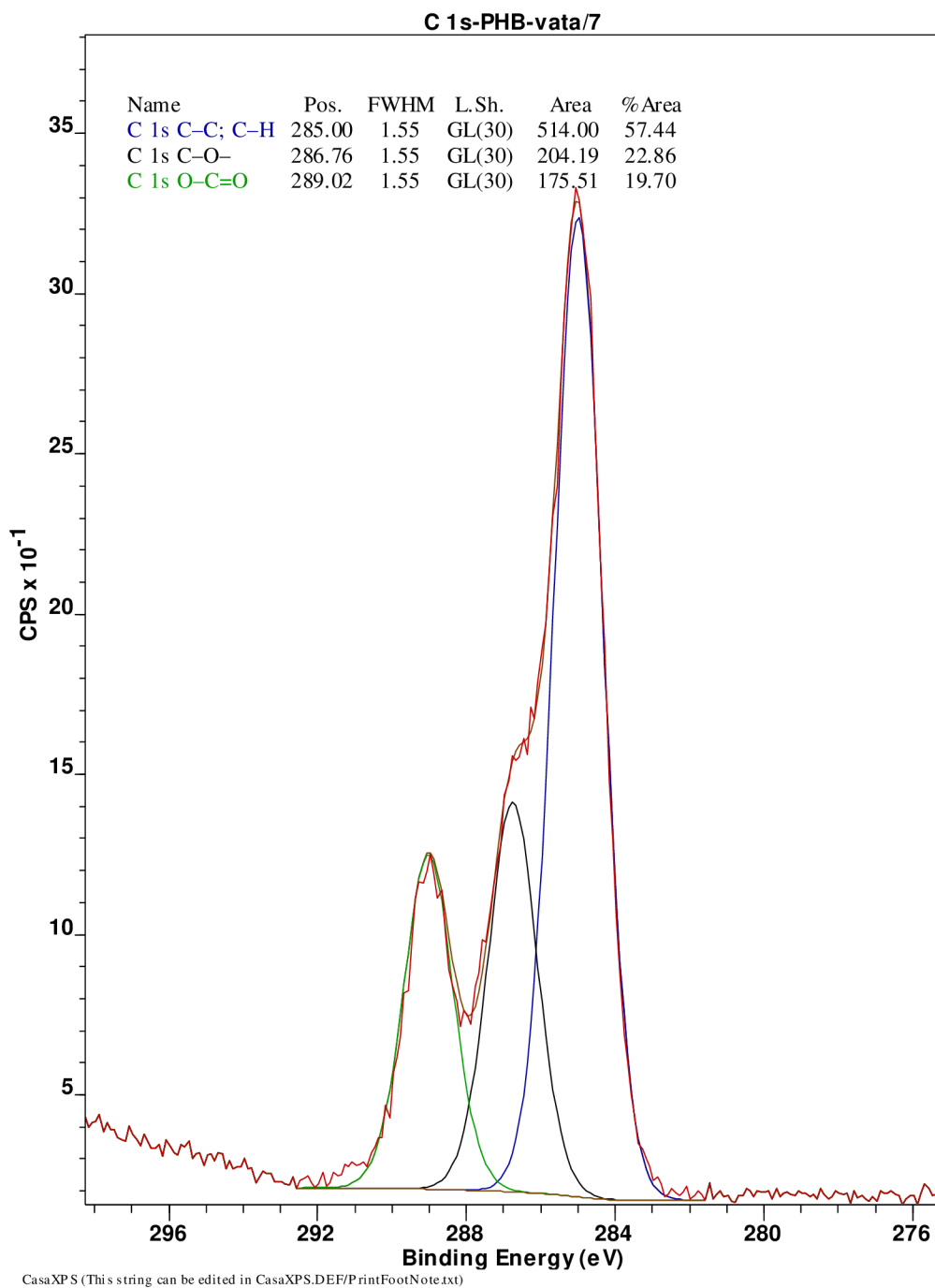


Obr. 41: FTIR spektrum P3HB referenčných vlákien, po pôsobení vody a lipázy

Keďže FTIR analýzou neboli preukázané žiadne štruktúrne zmeny, boli vzorky VATA\_P3HB pred a po pôsobení lipázy analyzované pomocou XPS. Táto metóda je veľmi citlivá na chemické zloženie meranej plochy, a preto meria aj do hĺbky niekoľkých nanometrov vrstvy, má dostatočnú citlivosť na preukázanie zmien na samotnom povrchu. Zo záznamu spektra XPS VATA\_P3HB (Obr. 42), je vidieť, že vzorka obsahuje vo svojej štruktúre prvky C, O (H nie je možné analyzovať XPS). Pri bližšej analýze uhlíkového píku, je vidieť, že pík v sebe obsahuje ďalšie dva píky. Na základe štruktúry P3HB boli predpokladané väzby C–C, C–H, C–O a O–C=O. Aplikovaním spektier týchto väzieb došlo k dokonalému nafitovaniu uhlíkového spektra (Obr. 43).



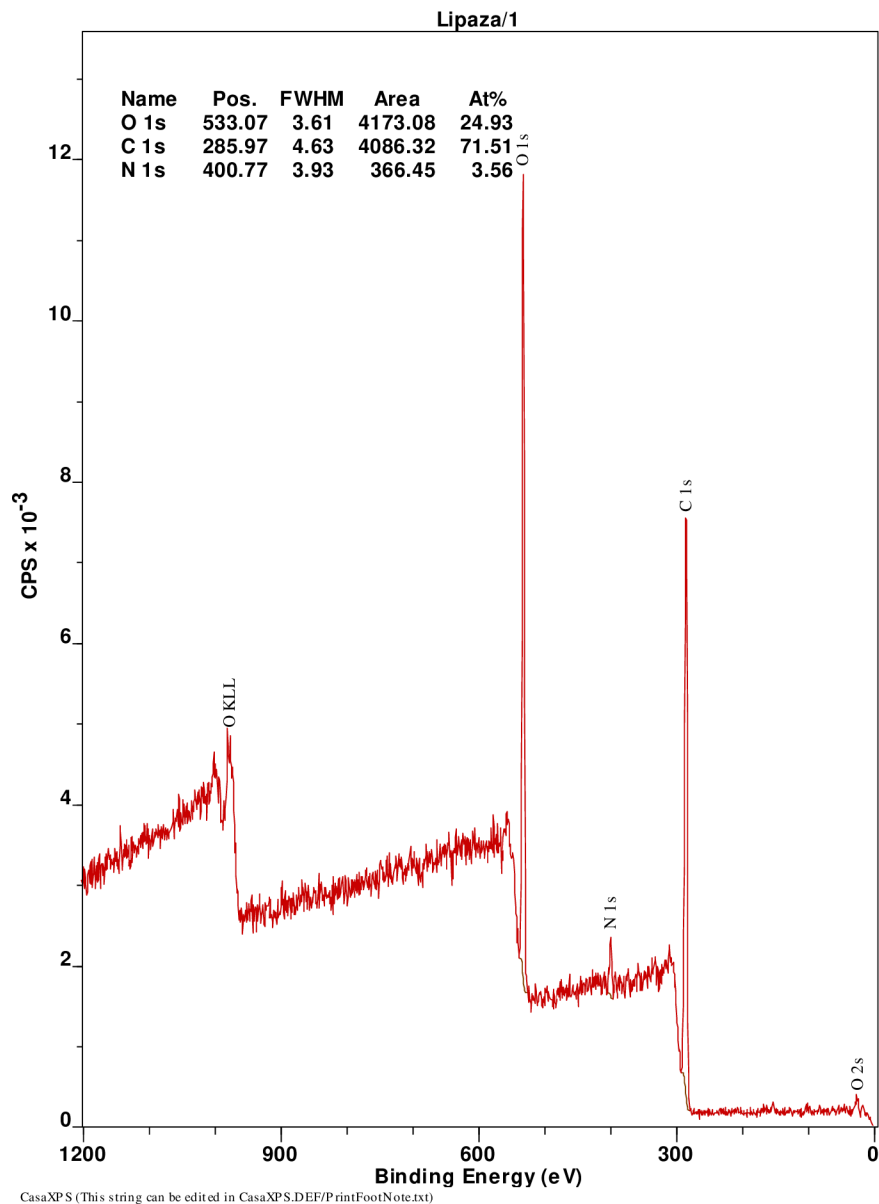
Obr. 42: XPS spektrum vzorky VATA\_P3HB



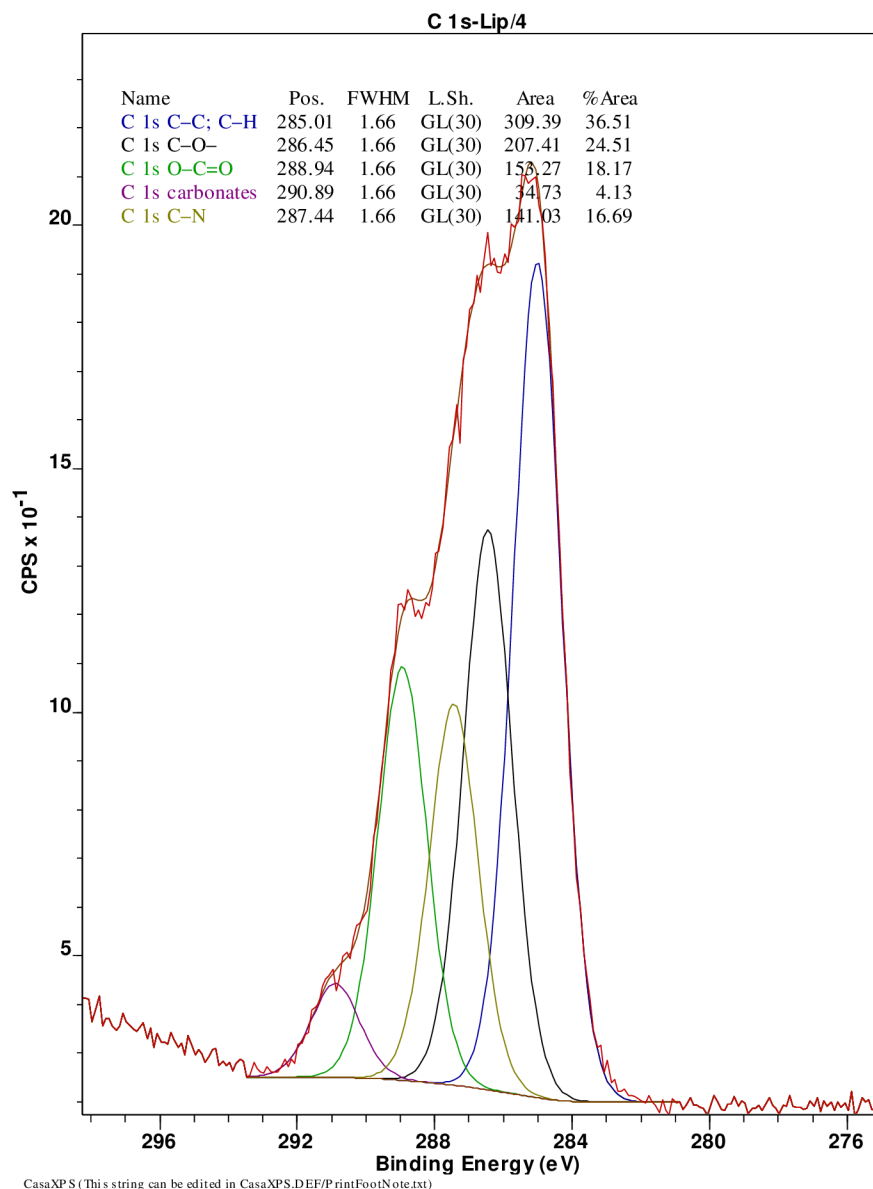
Obr. 43: XPS spektrum vzorky VATA\_P3HB zamerané na C

Pri XPS analýze vzorky VATA\_P3HB\_LIP\_1 sa navyše okrem C a O vyskytol pík pripadajúci energii atómu dusíku N (Obr. 44). Analýzou uhlíkového píku, je vidieť, že pík sa líši od píku predchádzajúceho, obsahuje navyše niekoľko ramien (). Ramená píku naznačujú prítomnosť rôznych typov väzieb s C. Okrem väzieb C-C, C-H, C-O a O-C=O, ktoré značia štruktúru P3HB, sa vyskytli aj väzby C-N a minimálne množstvo karbonátových skupín. Percentuálne zastúpenie väzieb C-O a O-C=O je takmer rovnaké ako pri vzorke VATA\_P3HB. Z toho vyplýva, že predpokladaná hydrolyza P3HB nenastala. Dôsledkom zvýšenia hydrofilnosti materiálov po pôsobení lipázy je teda prítomnosť C-N väzieb a zníženie nepolárnych väzieb

C–C a C–H v štruktúre. Dusíkaté skupiny pochádzajú z lipázy, je otázkou, či je len nedokonalou vypraná zo štruktúry vlákna alebo došlo k jej reakcii s povrchom vlákien. Tento efekt je potrebné ďalej preštudovať, bol však nad časový rámec a možnosti práce.



Obr. 44: XPS spektrum vzorky VATA\_P3HB\_LIP\_1



Obr. 45: XPS spektrum vzorky VATA\_P3HB\_LIP\_1 zameraná na C

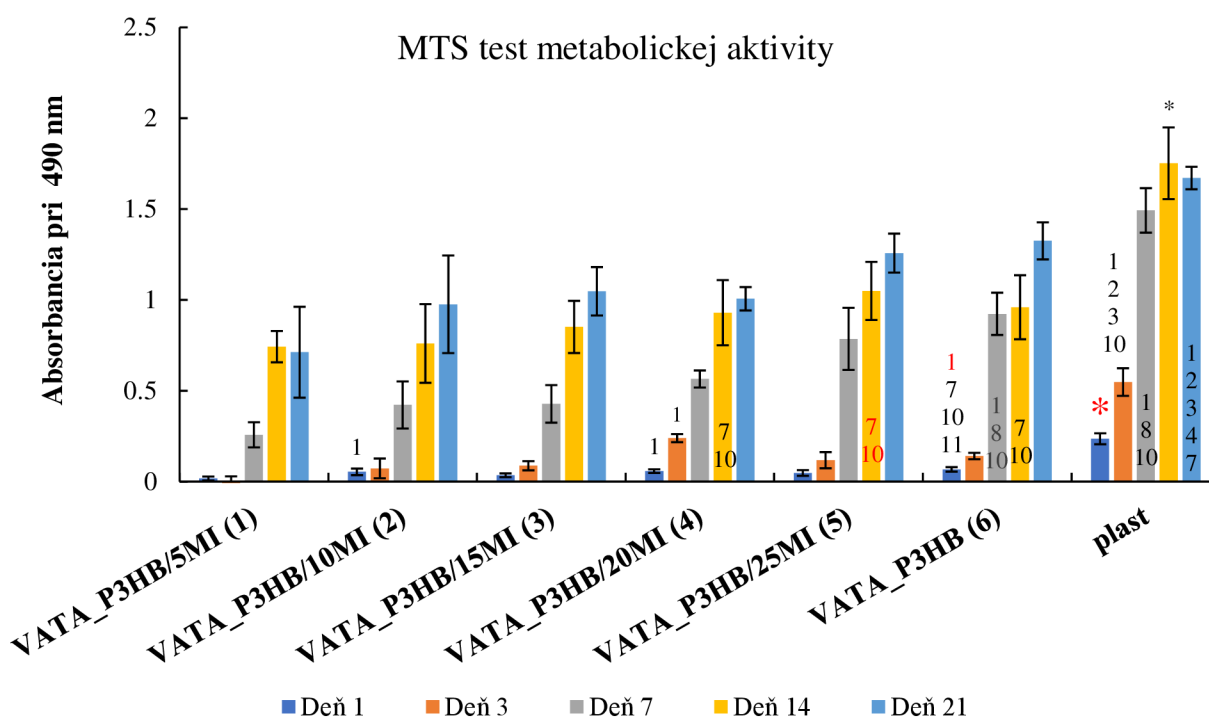
## 4.7 Biologické vlastnosti

Ako cieľovou aplikáciou mikrovlných štruktúr na báze P3HB a jeho kopolymérov je ich využitie ako 3D nosič pre bunkové kultúry. Biologické vlastnosti boli pozorované na 3D nosičoch (viď Tab. 11), ktoré predstavujú typ VATA a na 2D nosičoch typ PLANÁR. Vzorky, na ktorých boli pozorované biologické vlastnosti ako sú metabolická aktivita buniek, bunková proliferácia a penetrácia buniek do nosiča sú zobrazené v tab. Biologické vlastnosti mikrovlných štruktúr vzorky VATA\_P3HB/Olig.P3HB boli vyradené z dôvodu žiadnej zmeny hydrofóbnosti vlákien. K sledovaniu biologických vlastností bola použitá línia myšacích fibroblastov 3T3. Ako referencia (pozitívna kontrola) boli použité 3T3 fibroblasty nasadené priamo na kultivačný plast bez nosiča.

Tab. 11: Označenie a názov jednotlivých nosičov, ktoré boli podrobené biologickým testom

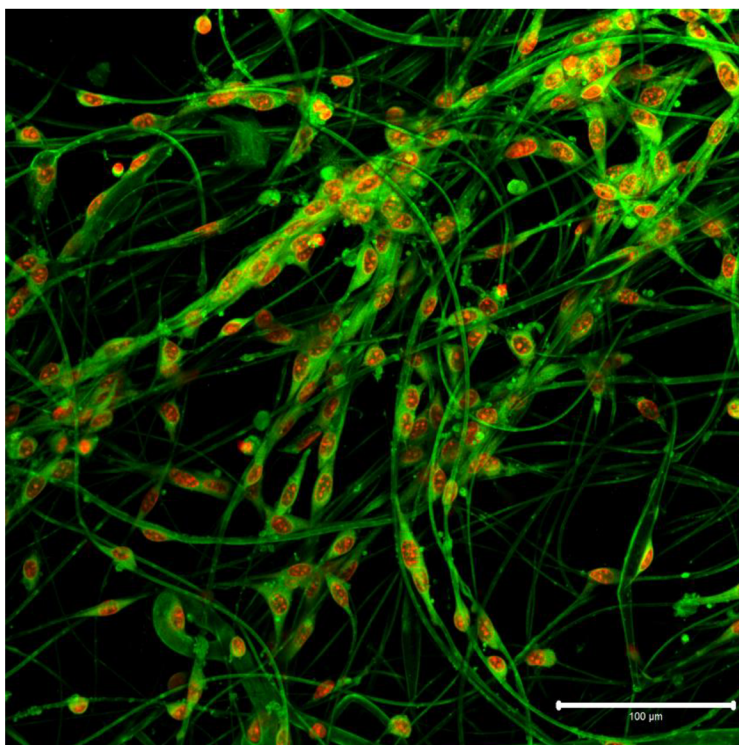
Názov vzorky	Označenie	Názov vzorky	Označenie
VATA_P3HB/5MI	1	VATA_P3HB_10SYN	7
VATA_P3HB/10MI	2	VATA_HYDAL M01	8
VATA_P3HB/15MI	3	VATA_HYDAL M01_10SYN	9
VATA_P3HB/20MI	4	PLANÁR_P3HB	11
VATA_P3HB/25MI	5	PLANÁR_P3HB_LIP_CR_	12
VATA_P3HB	6		

Zo sledovania biologických vlastností boli všetky skafoldy biokompatibilné. U nosičov s obsahom MI bol pozorovaný lineárny nárast metabolickej aktivity buniek počas testovacej doby. Na 21. deň sledovania metabolickej aktivity bola metabolická aktivita buniek na nosičoch VATA\_P3HB/25MI štatisticky rovnaká ako na kultivačnom plaste (viď Obr. 46). Najvyššia metabolická aktivita buniek na vzorke VATA\_P3HB/25MI mohla byť spôsobená prítomnosťou kvapiek polyméru v štruktúre ako bolo pozorované na SEM snímka. Z konfokálnej mikroskopie, ktorá zachytáva bunkovú distribúciu na nosičoch je vidieť, že na zhlukoch vlákien a kvapkách polyméru je výskyt buniek najvyšší. Je teda možné usudzovať, že relatívne veľkým 3T3 bunkám vyhovuje viac väčšia plocha, a tým pádom v prípade tenkých vlákien nehomogénnosť morfológie nosiča v podobe uzla a kvapky (viď).

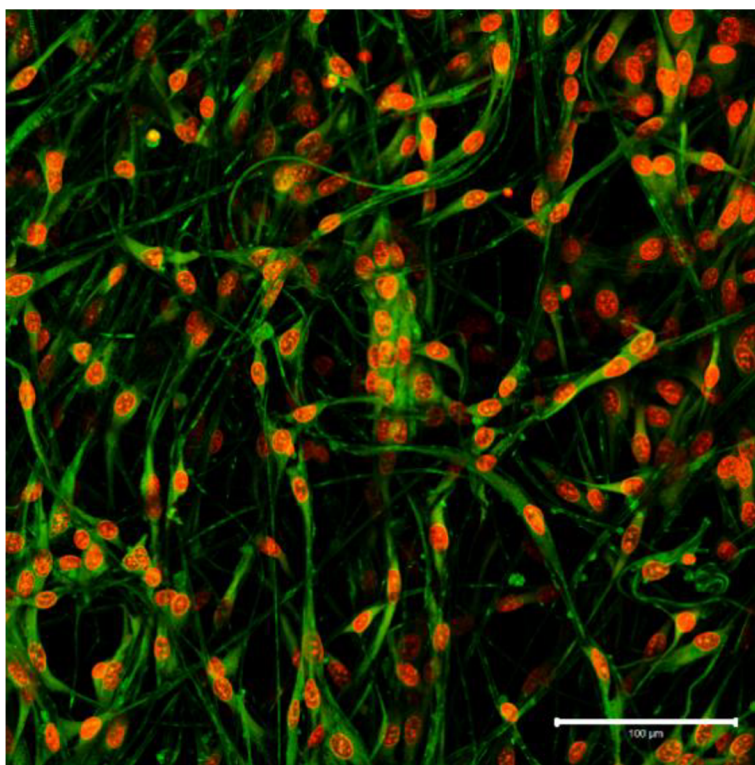


Obr. 46: Metabolická aktivita buniek na vláknitých nosičoch meraná pomocou MTS. Ako kontrola boli použité 3T3 myši fibroblasty nasadené na kultivačnom plaste (plast). Čísla nad stĺpcami značia štatisticky významné rozdiely, čierne čísla  $p < 0.05$ , červené čísla  $p < 0.001$ .



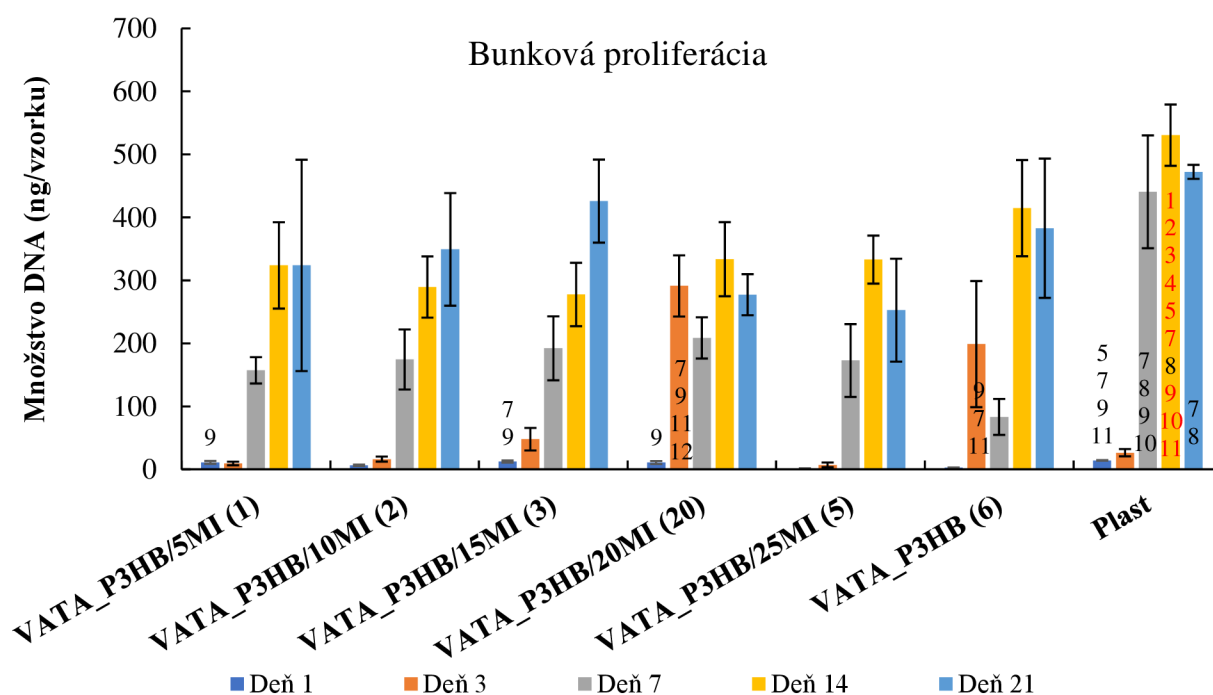


Obr. 47: Bunková distribúcia na nosiči VATA\_P3HB/25MI 14. deň testu. Bunkové jadrá boli zafarbené propidium jodidom (červeno), intracelulárne membrány pomocou DiOC6(3) (zelene), mierka 100 μm.



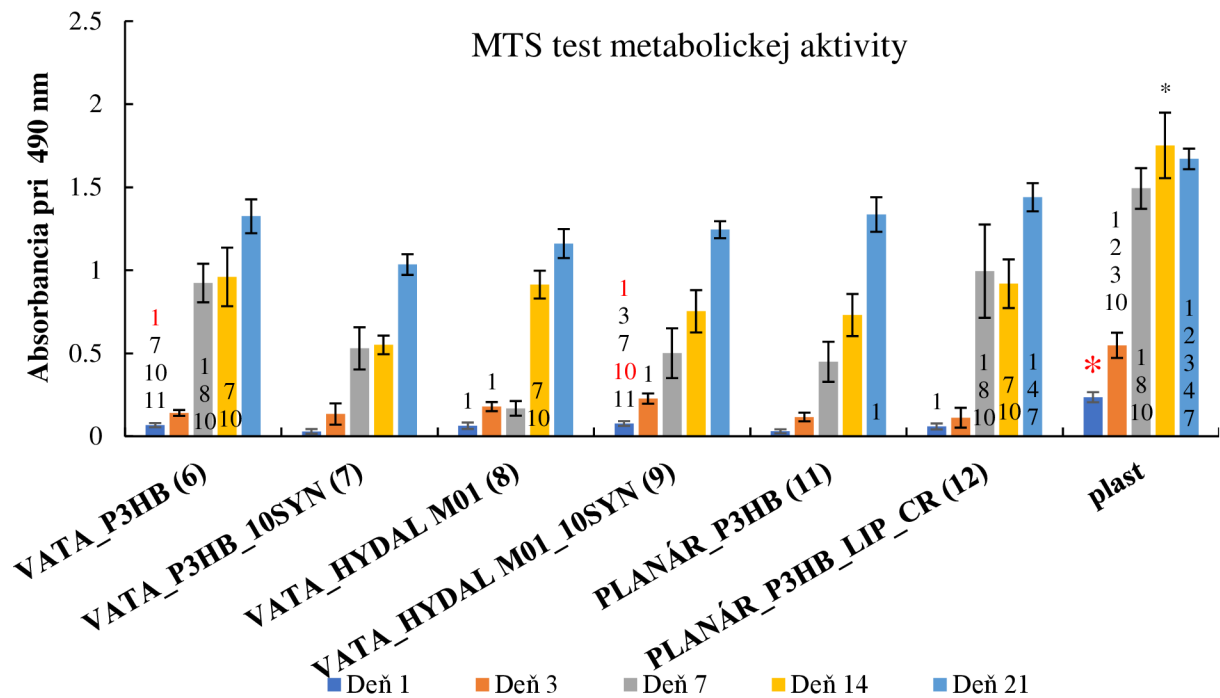
Obr. 48: Bunková distribúcia na nosiči VATA\_P3HB/15MI 21. deň testu. Bunkové jadrá boli zafarbené propidium jodidom (červeno), intracelulárne membrány pomocou DiOC6(3) (zelene), mierka 100 μm.

Sledovaním bunkovej proliferácie na vzorkách s MI bola zistená znížená proliferácia na 14. deň oproti bunkovej proliferácii na plaste (viď Obr. 49). Pri sledovaní bunkovej proliferácie na 21. deň testu bola bunková proliferácia štatisticky rovnaká ako na kultivačnom plaste. Pre vzorky s obsahom do 15MI bol pozorovaný lineárny nárast bunkovej proliferácie. U nosičoch s obsahom 20 a 25MI bola bunková proliferácia nekonzistentná. Tento jav môže byť spôsobený taktiež morfológiou 3D nosičov. Zo SEM snímok bolo zistené, že vlákna do obsahu 15MI sú jednotné a neobsahujú vo svojej štruktúre zhluky vlákien a kvapky polyméru. Bunky mohli tak jednoducho proliferovať. Distribúcia buniek na 3D nosiči VATA\_P3HB/15MI je zobrazená na Obr. 48.



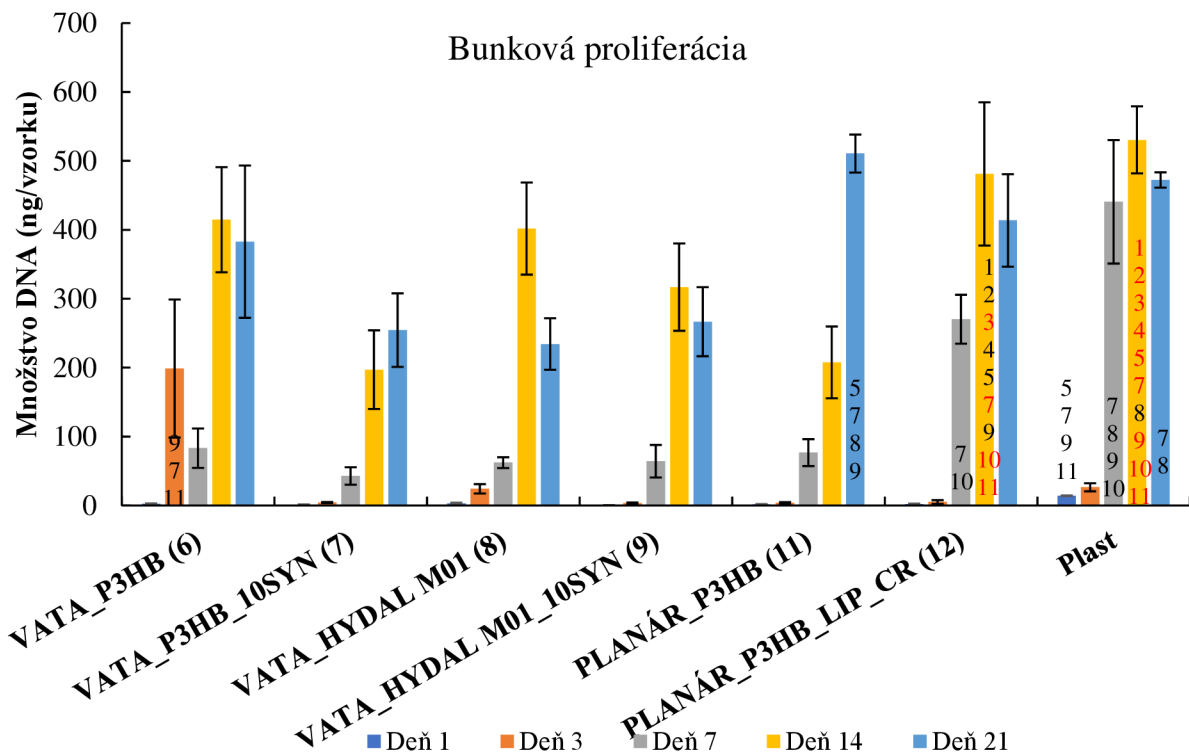
Obr. 49: Bunková proliferácia meraná pomocou kvantifikácie bunkovej DNA. Ako kontrola boli použité 3T3 myši fibroblasty nasadené na kultivačnom plaste (plast). Číslo nad stĺpcami značia štatisticky významné rozdiely, čierne čísla  $p < 0.05$ , červené čísla  $p < 0.001$ .

Pozorovaním metabolickej aktivity na 3D nosičoch z P3HB polyméru a s obsahom SYN, bolo pozorované, že vzorky na 21. deň testu mali štatisticky rovnakú aktivitu ako na kultivačnom plaste, okrem vzorky VATA\_P3HB\_10SYN (viď Obr. 50). Prítomnosť SYN na metabolickú aktivitu buniek má znižujúci efekt pre P3HB u HYDAL M01 je prítomnosť SYN takmer bezvýznamná. Bunková proliferácia na 14. deň bola na vzorke VATA\_P3HB rovnaká ako na kultivačnom plaste. Proliferácia na ostatných vzorkách sa štatisticky odlišovala.

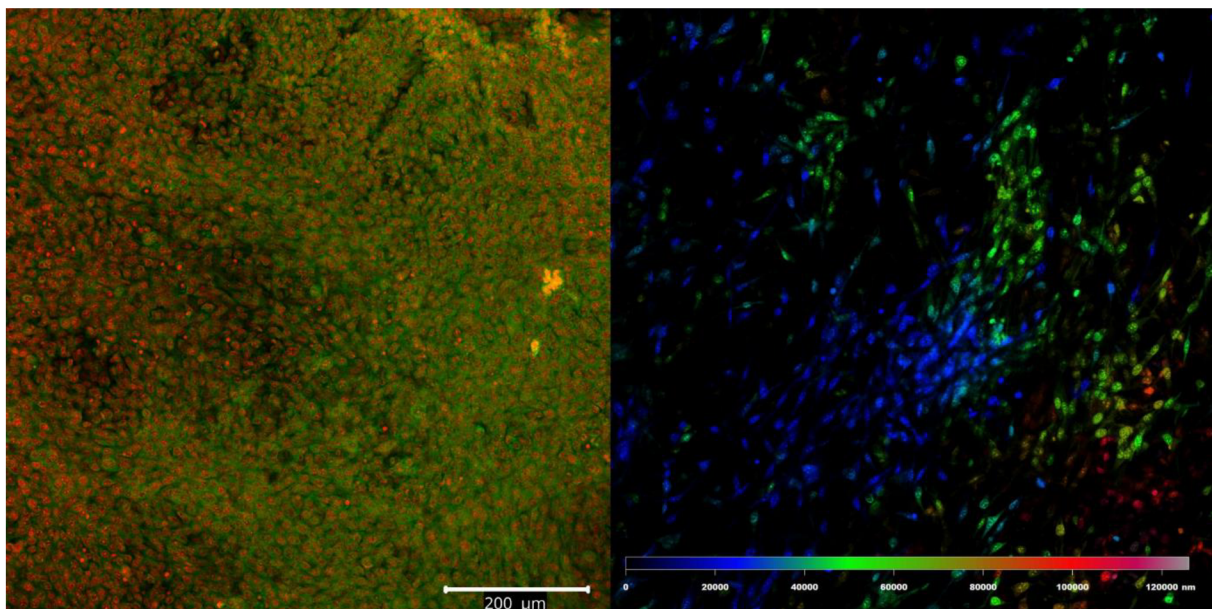


Obr. 50: Metabolická aktivita buniek na vláknitých nosičoch meraná pomocou MTS. Ako kontrola boli použité 3T3 myši fibroblasty nasadené na kultivačnom plaste (plast). Čísla nad stĺpcami značia štatisticky významné rozdiely, čierne čísla  $p < 0.05$ , červené čísla  $p < 0.001$ .

Metabolická aktivita buniek na vzorkách typu VATA a PLANÁR P3HB sa štatisticky nelíšila a bola rovnaká ako na kultivačnom plaste na 21. deň. testu. Bunková proliferácia na vzorkách PLANÁR\_LIP\_CR a VATA\_P3HB bola 14. deň najvyššia v porovnaní na kultivačnom plaste. Na všetkých ostatných testovaných vzorkách v tento deň (14. deň) bola výrazne znížená bunková proliferácia buniek. Bunková proliferácia na vzorke PLANÁR\_LIP\_CR je pravdepodobne vďaka zvýšenej hydrofilnosti nosiča pôsobením lipázy. Obrázky X, Y zachytávajú distribúciu buniek na nosičoch. Z obr. Y je vidieť premnoženie buniek na povrchu skaffoldu (bunky naadherovali maximálne do hĺbky nosiča okolo 60 nm). Premnoženie buniek v jednej rovine môže vytvoriť vrstvu buniek, ktorá sa môže následne odlúpiť z nosiča. Na obr. X je naopak vidieť, že bunky sú rozmiestnené až do 120 nm hĺbky nosiča.

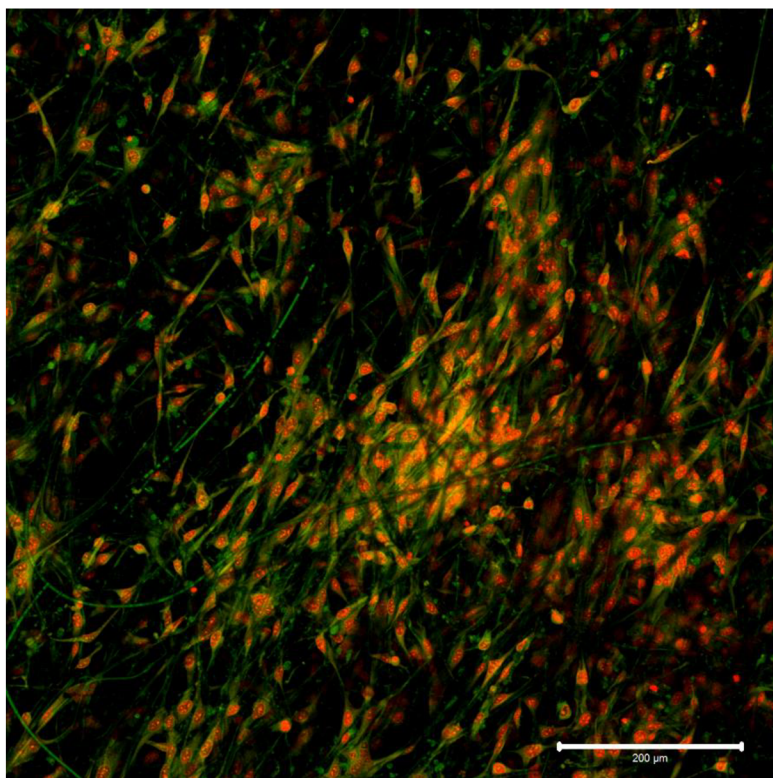


Obr. 51: Bunková proliferácia meraná pomocou kvantifikácie bunkovej DNA. Ako kontrola boli použité 3T3 myši fibroblasty nasadené na kultivačnom plaste (plast). Číslo nad stĺpcami značia štatisticky významné rozdiely, čierne čísla  $p < 0.05$ , červené čísla  $p < 0.001$ .

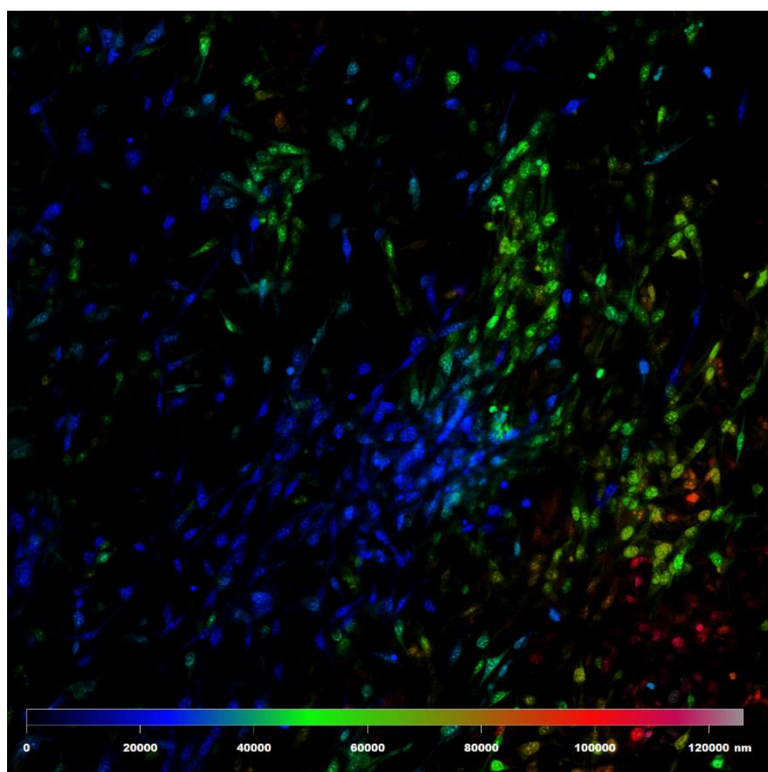


Obr. 52: Vľavo - Bunková distribúcia na nosiči PLANÁR\_P3HB\_LIP\_CR 21. deň testu. Bunkové jadrá boli zafarbené propidium jodidom (červeno), intracelulárne membrány pomocou DiOC6(3) (zeleno), mierka 100 µm. Vpravo - Hĺbková projekcia nosiči PLANÁR\_P3HB\_LIP\_CR 21. deň testu. Bunkové jadrá určitej farby sa nachádzajú v hĺbke zodpovedajúcej farbe na farebnej škále.





Obr. 53: Bunková distribúcia na nosiči VATA\_P3HB 21. deň testu. Bunkové jadrá boli zafarbené propidium jodidom (červeno), intracelulárne membrány pomocou DiOC6(3) (zeleno), mierka 100  $\mu\text{m}$ .



Obr. 54: Hĺbková projekcia nosiči VATA\_P3HB 21. deň testu. Bunkové jadrá určitej farby sa nachádzajú v hĺbke zodpovedajúcej farbe na farebnej škále

## 5 ZÁVER

Diplomová práca sa zaoberá výskumom mikrovláknitých štruktúr na báze kopolymérov P3HB. Mikrovláknité štruktúry predstavujú rozsiahlu „siet“ náhodne orientovaných neusporiadaných mikrovlákien v 2D (planárnom) ale aj v 3D rozmere. Takýto typ vláknitej štruktúry môže byť za určitých podmienok podobný prostrediu pre rast buniek *in vivo*. Štúdiou na substrátoch 3D vláknitej štruktúre v podmienkach *in vitro* je možné docieľiť presnejšiu charakterizáciu správania sa buniek v prostredí *in vivo*. Vďaka vysokej biokompatibilite P3HB a jeho kopolymérov je vhodné tieto materiály použiť k výrobe takýchto mikrovláknitých štruktúr.

K ich výrobe bola použitá technológia odstredivého zvlákňovania. Princíp tejto technológie je pomerne jednoduchý, samotné prevedenie procesu je však ovplyvňované mnohými parametrami. Medzi hlavné parametre ovplyvňujúce proces zvlákňovania patrí viskozita roztoku, ktorá je ovplyvnená koncentráciou polyméru aj molekulovou hmotnosťou polymérneho materiálu, typ rozpúšťadla a rýchlosť otáčania zvlákňovacej hlavy. Variáciou a optimalizáciou týchto parametrov je možné získať mikrovlákna vo forme objemného, „nadýchaného“ kokónu mikrovlákien. Takéto typy vlákien označované ako VATA boli produkované na laboratórnom prístroji. Nami navrhnuté roztoky boli firmou NANO4FIBERS s. r. o. otestované na priemyselnej technológii odstredivého zvlákňovania a boli spracované do formy mikrovláknitej membrány pripravené na podkladovú netkanú textíliu (mikrovláknité štruktúry typu PLANÁR).

K príprave roztokov boli použité dva homopolyméry P3HB s označením P3HB a HYDAL M01. Zvlákňovaním roztokov P3HB a HYDAL M01 boli po optimalizácii podmienok získané vlákna vo forme spomínaného objemného kokónu bez viditeľnej prítomnosti nehomogenít v podobe kvapiek či zhlukov. Nevýhodou P3HB je jeho vysoký stupeň kryštalinity, vďaka ktorému je polymér krehký. Preto boli študované vlákna i na báze kopolyméru P3,4HB. Tento materiál sa využíva ako modifikátor húževnatosti a má vysokú ťažnosť. K dispozícii bol Mirel M4300<sup>TM</sup> (MI, kopolymér na báze P3,4HB s koncentráciou 4HB cca 33%). Tento samotný polymér bolo možno úspešne zvlákniť, pre jeho vyššie popísané vlastnosti ho však nebolo možno odoberať z kolektorov. Za účelom nastavení vhodnejšej koncentrácie 4HB vo finálnom vlákne boli kopolymér P3,4HB a homopolymér P3HB miešané v koncentračnej rade piatich vzoriek. Vlastnosti boli následne porovnávané v závislosti na tomto miešacom pomere.

Ďalšou nevýhodou, na ktorú sa v predchádzajúcej štúdií narazilo, bola hydrofóbnosť P3HB. Cieľovou aplikáciou mikrovláknitých štruktúr je ich použitie ako 3D skaffold pre sledovanie správania sa buniek. Bunky sa však kultivujú v hydrofilnom médiu, a preto použitie hydrofóbného skaffoldu P3HB spôsobuje problém pri jeho účinnom osadení bunkami. Na základe literárnej rešerše bola navrhnutá a otestovaná zmena hydrofóbnosti prevedená pôsobením roztokov lipáz o rôznych koncentráciách (LIP\_CR(PP)\_1(2)). Následná zmena polárnej zložky povrchovej energie bola detegovaná znížením kontaktného uhlu vody na za týmto účelom pripravených fóliách P3HB. Zmena povrchovej energie sa v prípade vláknitých vzoriek pozitívne prejavila aj významným zvýšením nasiakavosti vody. Množstvo nasiaknutej vody do mikrovláknitých vzoriek P3HB bolo najvyššie po pôsobení LIP\_CR\_2.

Pre manipuláciu s vláknami, ako v prípade procesu výroby, tak v prípade použitia ako nosiča pre rast buniek, sú dôležité mechanické vlastnosti. Tie boli charakterizované prostredníctvom ťahovej skúšky v bezvodom a vodnom prostredí. Bol sledovaný vplyv zloženia zmesi P3HB a P3,4HB, ako aj prídavok zmäkčovadla na báze adipátov. Prídavok zmäkčovadla sa podľa očakávania prejavil zvýšením ťažnosti vzoriek. V prípade vzoriek typu VATA prekvapivo nedošlo k poklesu maximálneho napätia, v prípade planárnych vzoriek však došlo k poklesu o cca 30 %. Prídavkom 4HB do polymérnej štruktúry došlo podľa predpokladu k zvýšeniu ťažnosti, maximálne napätie s koncentráciou 4HB mierne kleslo. Maximálna hodnota však bola pri prídavku 5% MI, čo môže byť spôsobené lepšou kvalitou vlákien z tohto materiálu oproti referencii z homopolyméru. Túto skutočnosť potvrdili aj snímky vlákien zo SEM, kde je rozdiel kvality vlákien viditeľný. Testy na referenčnej vzorke P3HB vo vodnom prostredí preukázali, že základné vlastnosti v ťahu sa po krátkej expozícii vo vodnom prostredí nemenia

Testovanie biologických vlastností 3T3 myšacích fibroblastov na 3D nosičoch typu VATA a 2D nosičoch typu PLANÁR bolo vykonané v spolupráci s Ústavom experimentálnej medicíny Akadémie vied Českej republiky. Všetky vzorky preukázali vysokú biokompatibilitu. Metabolická aktivita buniek sledovaná MTS testom v priebehu 21 dní experimentu postupne narastala na nosičoch s obsahom MI. Posledný deň experimentu bola metabolická aktivita na nosičoch s obsahom MI najvyššia u vzorky P3HB/25MI. Sledovaním distribúcie buniek pomocou konfokálneho mikroskopu bolo zistené, že bunky lepšie rástli (adherovali) na nehomogénnej štruktúre 3D nosičoch. Naopak bunková proliferácia na vzorkách s MI postupne narastala u vzoriek s homogénnou štruktúrou. Vysoká metabolická aktivita a bunková proliferácia bola pozorovaná aj na vzorkách VATA\_P3HB a PLANÁR\_P3HB\_LIP\_CR.

V rámci tejto práce sa podarilo pripraviť niekoľko typov vláknitých štruktúr na báze P3HB modifikovaných aditívami na báze oligoméru 3HB, zmäkčovadlom i rôznym obsahom 4HB pomocou zmesi P3HB s P3,4HB kopolyméru. V rámci optimalizácie boli vyskúšané aj kombinácie kyseliny mravčej a octovej s chloroformom ako možnosť modifikácie rozpúšťadlového systému. Pomocou váhovej metódy bol sledovaný priebeh zmeny množstva zvyškového rozpúšťadla vo vláknach. Vybrané vlákna boli povrchovo modifikované použitím lipázy za účelom zvýšenia povrchovej energie, a tým zlepšenia zmáčania vodným roztokom. Výsledné vlákna boli charakterizované s ohľadom na ich priemer, porozitu, mechanické vlastnosti a biokompatibilitu. Výsledky preukázali, že používané materiály sú vo výsledku biokompatibilné a metóda prípravy poskytuje vláknité štruktúry, na ktorých je možno úspešne kultivovať bunky. Istým obmedzením je porozita vláknitých štruktúr, ktorá síce dosahuje až 95 %, ale veľkosť pórov je zrejme stále malá pre ideálny rast zvolených buniek do celej hĺbky 3D štruktúry.

## 6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

## 7 REFERENCES

- [1] BAKER, Brendon a Christopher CHEN. Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *Journal of Cell Science* [online]. [cit. 2022-05-11]. ISSN 1477-9137. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.079509
- [2] KBRA, Hatice a Osman BABAARSL. Polyester Microfilament Woven Fabrics. JEON, Han-Yong, ed., Han-Yong JEON. *Woven Fabrics* [online]. InTech, 2012 [cit. 2022-05-11]. ISBN 978-953-51-0607-4. Dostupné z: doi:10.5772/38483
- [3] MUKHOPADHYAY, S. a G. RAMAKRISHNAN. Microfibres. *Textile Progress* [online]. 2008, **40**(1), 1-86 [cit. 2022-05-11]. ISSN 0040-5167. Dostupné z: doi:10.1080/00405160801942585
- [4] Microfibre: Processing and Applications. *Journal of the Textile Association* [online]. 2010, (70), 223-229 [cit. 2022-05-12]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/profile/Ravindra-Kale-7/publication/272892162\\_Microfibre\\_Processing\\_and\\_Applications/links/5858e15308aeffd7c4fc6313/Microfibre-Processing-and-Applications.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Ravindra-Kale-7/publication/272892162_Microfibre_Processing_and_Applications/links/5858e15308aeffd7c4fc6313/Microfibre-Processing-and-Applications.pdf)
- [5] KBRA, Hatice a Osman BABAARSL. Polyester Microfilament Woven Fabrics. JEON, Han-Yong, ed., Han-Yong JEON. *Woven Fabrics* [online]. InTech, 2012 [cit. 2022-05-12]. ISBN 978-953-51-0607-4. Dostupné z: doi:10.5772/38483
- [6] Understanding Microfiber's Role in Infection Prevention. In: *Infectioncontroldtoday* [online]. 2008 [cit. 2022-05-12]. Dostupné z: <https://www.infectioncontroldtoday.com/view/understanding-microfibers-role-infection-prevention>
- [7] Microfiber : Properties | Application | Manufacturing Process. In: *TextileTuts* [online]. 2022 [cit. 2022-05-12]. Dostupné z: <https://textiletuts.com/microfiber/>
- [8] OKAMOTO, Miyoshi. Spinning of ultra-fine fibers. *Advanced Fiber Spinning Technology* [online]. Elsevier, 1994, s. 187-207 [cit. 2022-05-12]. ISBN 9781855731820. Dostupné z: doi:10.1533/9781845693213.187
- [9] *Advanced Fiber Spinning Technology* [online]. Reprint. Elsevier, 1994 [cit. 2022-05-12]. ISBN 9781845693213.



- [10] BURKINSHAW, S. M. *Chemical Principles of Synthetic Fibre Dyeing* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 1995 [cit. 2022-05-12]. ISBN 978-94-010-4263-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-011-0593-4
- [11] HUTTEN, Irwin M. Processes for Nonwoven Filter Media. *Handbook of Nonwoven Filter Media* [online]. Elsevier, 2007, s. 195-244 [cit. 2022-05-12]. ISBN 9781856174411. Dostupné z: doi:10.1016/B978-185617441-1/50020-2
- [12] UGBOLUE, Samuel C.O. Testing, product evaluation and quality control of polyolefins. *Polyolefin Fibres* [online]. Elsevier, 2017, s. 313-338 [cit. 2022-05-11]. ISBN 9780081011324. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-101132-4.00010-2
- [13] MAO, N. Nonwoven fabric filters. *Advances in Technical Nonwovens* [online]. Elsevier, 2016, s. 273-310 [cit. 2022-05-12]. ISBN 9780081005750. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100575-0.00010-3
- [14] PRZYBORSKI, Stefan, ed. *Technology Platforms for 3D Cell Culture* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017 [cit. 2022-05-12]. ISBN 9781118851647. Dostupné z: doi:10.1002/9781118851647
- [15] *Advances in Filament Yarn Spinning of Textiles and Polymers (eBook)* [online]. Prve. Elsevier Science, 2014 [cit. 2022-05-12]. ISBN 978-0-85709-917-4. Dostupné z: <https://www.lehmanns.de/shop/naturwissenschaften/29306897-9780857099174-advances-in-filament-yarn-spinning-of-textiles-and-polymers>
- [16] ZHANG, Zhiming, Jun SUN, H.L. YUAN, R.K. AGARWAL, P. TANDON a E.X. WANG. Research on the development of the centrifugal spinning. *MATEC Web of Conferences* [online]. 2017, **95** [cit. 2022-05-12]. ISSN 2261-236X. Dostupné z: doi:10.1051/mateconf/20179507003
- [17] PADRON, Simon, Arturo FUENTES, Dumitru CARUNTU a Karen LOZANO. Experimental study of nanofiber production through forcespinning. *Journal of Applied Physics* [online]. 2013, **113**(2) [cit. 2022-05-12]. ISSN 0021-8979. Dostupné z: doi:10.1063/1.4769886
- [18] SHI, Xuetao, Serge OSTROVIDOV, Yihua ZHAO et al. Microfluidic Spinning of Cell-Responsive Grooved Microfibers. *Advanced Functional Materials* [online]. 2015, **25**(15), 2250-2259 [cit. 2022-05-11]. ISSN 1616301X. Dostupné z: doi:10.1002/adfm.201404531

- [19] ANDERSSON, Helene a Albert BERG. Microfabrication and microfluidics for tissue engineering: state of the art and future opportunities. *Lab on a Chip* [online]. 2004, **4**(2) [cit. 2022-05-11]. ISSN 1473-0197. Dostupné z: doi:10.1039/b314469k
- [20] JUN, Yesl, Edward KANG, Sukyoung CHAE a Sang-Hoon LEE. Microfluidic spinning of micro- and nano-scale fibers for tissue engineering. *Lab Chip* [online]. 2014, **14**(13), 2145-2160 [cit. 2022-05-11]. ISSN 1473-0197. Dostupné z: doi:10.1039/C3LC51414E
- [21] SUN, Tao, David NORTON, Robert MCKEAN, John HAYCOCK, Anthony RYAN a Sheila MACNEIL. Development of a 3D cell culture system for investigating cell interactions with electrospun fibers. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 2007, **97**(5), 1318-1328 [cit. 2022-05-11]. ISSN 00063592. Dostupné z: doi:10.1002/bit.21309
- [22] LI, Mengyan, Mark MONDRINOS, Xuesi CHEN, Milind GANDHI, Frank KO a Peter LELKES. Co-electrospun poly(lactide-co-glycolide), gelatin, and elastin blends for tissue engineering scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2006, **79**(4), 963-973 [cit. 2022-05-11]. ISSN 15493296. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.30833
- [23] RIHOVA, Martina, Ahmet INCE, Veronika CICMANCOVA, Ludek HROMADKO, Klara CASTKOVA, David PAVLINAK, Lucy VOJTOVA a Jan MACAK. Water-born 3D nanofiber mats using cost-effective centrifugal spinning: comparison with electrospinning process. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2021, **138**(5) [cit. 2022-05-11]. ISSN 0021-8995. Dostupné z: doi:10.1002/app.49975
- [24] AZURAINI, Mat, Kai-Hee HUONG, H. KHALIL a A. AMIRUL. Fabrication and characterization of P(3HB-co-4HB)/gelatine biomimetic nanofibrous scaffold for tissue engineering application. *Journal of Polymer Research* [online]. 2019, **26**(11) [cit. 2022-05-11]. ISSN 1022-9760. Dostupné z: doi:10.1007/s10965-019-1925-z
- [25] JOYYI, Lee, Amirul ABDULLAH, Kumar SUDESH, Nanthini SRIDEWI a Ken-ichi KASUYA. Fabrication and Degradation of Electrospun Polyhydroxyalkanoate Film. *Journal of Siberian Federal University. Biology* [online]. 2015, **8**(2), 236-253 [cit. 2022-05-11]. ISSN 19971389. Dostupné z: doi:10.17516/1997-1389-2015-8-2-236-253
- [26] LARSON, R.G. Spinnability and viscoelasticity. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics* [online]. 1983, **12**(3), 303-315 [cit. 2022-05-11]. ISSN 03770257. Dostupné z: doi:10.1016/0377-0257(83)85004-6
- [27] RIHOVA, Martina, Ahmet INCE, Veronika CICMANCOVA, Ludek HROMADKO, Klara CASTKOVA, David PAVLINAK, Lucy VOJTOVA a Jan MACAK. Water-born 3D nanofiber mats using cost-effective centrifugal spinning: comparison with

- electrospinning process. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2021, **138**(5) [cit. 2022-05-11]. ISSN 0021-8995. Dostupné z: doi:10.1002/app.49975
- [28] ZHANG, Zhiming, Jun SUN, H.L. YUAN, R.K. AGARWAL, P. TANDON a E.X. WANG. Research on the development of the centrifugal spinning. *MATEC Web of Conferences* [online]. 2017, **95** [cit. 2022-05-12]. ISSN 2261-236X. Dostupné z: doi:10.1051/mateconf/20179507003
- [29] LOZANO, Karen a Kamalaksha SARKAR. *Superfine fiber creating spinneret and uses thereof*. European Patent Office. EP2265752A1.
- [30] ZHANG, Xiangwu a Yao LU. Centrifugal Spinning: An Alternative Approach to Fabricate Nanofibers at High Speed and Low Cost. *Polymer Reviews* [online]. 2014, **54**(4), 677-701 [cit. 2022-05-12]. ISSN 1558-3724. Dostupné z: doi:10.1080/15583724.2014.935858
- [31] BOSCHETTO, F., H.N. DOAN, P.P. VO et al. Effect of BaTiO<sub>3</sub> on the aging process of PLA fibers obtained by centrifugal spinning. *Materials Today Chemistry* [online]. 2021, **20** [cit. 2022-05-12]. ISSN 24685194. Dostupné z: doi:10.1016/j.mtchem.2021.100461
- [32] XIA, Lei, Lin-lin LU a Yu-xia LIANG. Preparation and Characterization of Poly(lactic acid) Micro- and Nanofibers Fabricated by Centrifugal Spinning. *Fibers and Polymers* [online]. 2020, **21**(7), 1422-1429 [cit. 2022-05-12]. ISSN 1229-9197. Dostupné z: doi:10.1007/s12221-020-9993-6
- [33] ZANDER, Nicole E. Formation of melt and solution spun polycaprolactone fibers by centrifugal spinning. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2015, **132**(2) [cit. 2022-05-12]. ISSN 00218995. Dostupné z: doi:10.1002/app.41269
- [34] SUN, Jun, Zhiming ZHANG, Binbin LU, Shunqi MEI, Qiao XU a Fang LIU. Research on parametric model for polycaprolactone nanofiber produced by centrifugal spinning. *Journal of the Brazilian Society of Mechanical Sciences and Engineering* [online]. 2018, **40**(4) [cit. 2022-05-12]. ISSN 1678-5878. Dostupné z: doi:10.1007/s40430-018-1131-7
- [35] UPSON, Sarah, Tom O'HAIRE, Stephen RUSSELL, Kenneth DALGARNO a Ana FERREIRA. Centrifugally spun PHBV micro and nanofibres. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2017, **76**, 190-195 [cit. 2022-05-12]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2017.03.101
- [36] KUKADE, Pranav, Stephen MCCARTHY, Rajendra KRISHNASWAMY, Xiudong SUN a Yossi SHABTAI. Breaking Down: Biodegradation of PHB Copolymer Mulch Films in Soil. *Plastics Engineering* [online]. 2011, **67**(2), 6-11 [cit. 2022-05-11]. ISSN 00919578. Dostupné z: doi:10.1002/j.1941-9635.2011.tb00680.x

- [37] PHILIP, S., T. KESHAVARZ a I. ROY. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* [online]. 2007, **82**(3), 233-247 [cit. 2022-05-11]. ISSN 02682575. Dostupné z: doi:10.1002/jctb.1667
- [38] REDDY, C.S.K, R GHAI, RASHMI a V.C KALIA. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology* [online]. 2003, **87**(2), 137-146 [cit. 2022-05-11]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/S0960-8524(02)00212-2
- [39] GRIGORE, Mădălina, Ramona GRIGORESCU, Lorena IANCU, Rodica-Mariana ION, Cătălin ZAHARIA a Elena ANDREI. Methods of synthesis, properties and biomedical applications of polyhydroxyalkanoates: a review. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 2019, **30**(9), 695-712 [cit. 2022-05-11]. ISSN 0920-5063. Dostupné z: doi:10.1080/09205063.2019.1605866
- [40] ISRANI, Neetu a Srividya SHIVAKUMAR. Polyhydroxyalkanoates in Packaging. KALIA, Vipin Chandra, ed., Vipin KALIA. *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates* [online]. Singapore: Springer Singapore, 2019, s. 363-388 [cit. 2022-05-12]. ISBN 978-981-13-3758-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-13-3759-8\_14
- [41] DAWES, Edwin a Peter SENIOR. The Role and Regulation of Energy Reserve Polymers in Micro-organisms. *Advances in Microbial Physiology Volume 10* [online]. Elsevier, 1973, s. 135-266 [cit. 2022-05-11]. Advances in Microbial Physiology. ISBN 9780120277100. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-2911(08)60088-0
- [42] BUGNICOURT, E., P. CINELLI, A. LAZZERI a V. ALVAREZ. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters* [online]. 2014, **8**(11), 791-808 [cit. 2022-05-11]. ISSN 1788618X. Dostupné z: doi:10.3144/expresspolymlett.2014.82
- [43] ANBUKARASU, Preetam, Dominic SAUVAGEAU a Anastasia ELIAS. Tuning the properties of polyhydroxybutyrate films using acetic acid via solvent casting. *Scientific Reports* [online]. 2016, **5**(1) [cit. 2022-05-11]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep17884
- [44] Polyhydroxyalkanoates: Bio-based microbial plastics and their properties. *Malaysian Polymer Journal (MPJ)* [online]. 2007, (2), 31-57 [cit. 2022-05-12]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/228650294\\_Polyhydroxyalkanoates\\_Bio-based\\_microbial\\_plastics\\_and\\_their\\_properties](https://www.researchgate.net/publication/228650294_Polyhydroxyalkanoates_Bio-based_microbial_plastics_and_their_properties)
- [45] KUNZE, C, H EDGARBERND, R ANDROSCH, C NISCHAN, T FREIER, S KRAMER, B KRAMP a K SCHMITZ. In vitro and in vivo studies on blends of isotactic

- and atactic poly (3-hydroxybutyrate) for development of a dura substitute material. *Biomaterials* [online]. 2006, **27**(2), 192-201 [cit. 2022-05-11]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2005.05.095
- [46] WOLLENWEBER, Marcus, Hagen DOMASCHKE, Thomas HANKE, Sabine BOXBERGER, Gerhilt SCHMACK, Konrad GLIESCHE, Dieter SCHARNWEBER a Hartmut WORCH. Mimicked Bioartificial Matrix Containing Chondroitin Sulphate on a Textile Scaffold of Poly(3-hydroxybutyrate) Alters the Differentiation of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering* [online]. 2006, **12**(2), 345-359 [cit. 2022-05-11]. ISSN 1076-3279. Dostupné z: doi:10.1089/ten.2006.12.345
- [47] WANG, Ya-Wu, Qiong WU, Jinchun CHEN a Guo-Qiang CHEN. Evaluation of three-dimensional scaffolds made of blends of hydroxyapatite and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for bone reconstruction. *Biomaterials* [online]. 2005, **26**(8), 899-904 [cit. 2022-05-11]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2004.03.035
- [48] NEBE, Barbara, Christina FORSTER, Hagen POMMERENKE, Gerhard FULDA, Detlef BEHREND, Ulrich BERNEWSKI, Klaus-Peter SCHMITZ a Joachim RYCHLY. Structural alterations of adhesion mediating components in cells cultured on poly- $\beta$ -hydroxy butyric acid. *Biomaterials* [online]. 2001, **22**(17), 2425-2434 [cit. 2022-05-11]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(00)00430-0
- [49] WANG, Ya-Wu, Fei YANG, Qiong WU, Yin-chung CHENG, Peter YU, Jinchun CHEN a Guo-Qiang CHEN. Effect of composition of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) on growth of fibroblast and osteoblast. *Biomaterials* [online]. 2005, **26**(7), 755-761 [cit. 2022-05-11]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2004.03.023
- [50] QU, Xiang-Hua, Qiong WU a Guo-Qiang CHEN. In vitro study on hemocompatibility and cytocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 2012, **17**(10), 1107-1121 [cit. 2022-05-11]. ISSN 0920-5063. Dostupné z: doi:10.1163/156856206778530704
- [51] DENG, Y. Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) promoted production of extracellular matrix of articular cartilage chondrocytes in vitro. *Biomaterials* [online]. 2003, **24**(23), 4273-4281 [cit. 2022-05-11]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(03)00367-3
- [52] QU, Xiang-Hua, Qiong WU, Juan LIANG, Bing ZOU a Guo-Qiang CHEN. Effect of 3-hydroxyhexanoate content in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) on in vitro growth and differentiation of smooth muscle cells. *Biomaterials* [online]. 2006,

- 27(15), 2944-2950 [cit. 2022-05-11]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.013
- [53] ARTSIS, M., A. BONARTSEV, A. IORDANSKII, G. BONARTSEVA a G. ZAIKOV. Biodegradation and Medical Application of Microbial Poly(3-Hydroxybutyrate). *Molecular Crystals and Liquid Crystals* [online]. 2012, **555**(1), 232-262 [cit. 2022-05-11]. ISSN 1542-1406. Dostupné z: doi:10.1080/15421406.2012.635549
- [54] WANG, Ya-Wu, Qiong WU a Guo-Qiang CHEN. Reduced mouse fibroblast cell growth by increased hydrophilicity of microbial polyhydroxyalkanoates via hyaluronan coating. *Biomaterials* [online]. 2003, **24**(25), 4621-4629 [cit. 2022-05-11]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(03)00356-9
- [55] KAI, Zhao, Deng YING a Chen GUO-QIANG. Effects of surface morphology on the biocompatibility of polyhydroxyalkanoates. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2003, **16**(2), 115-123 [cit. 2022-05-11]. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-703X(03)00029-9
- [56] *Membrane Modification (eBook)* [online]. CRC Press, 2016 [cit. 2022-05-12]. ISBN 978-1-4398-6636-8.
- [57] QU, Xiang-Hua, Qiong WU, Juan LIANG, Xue QU, Shen-Guo WANG a Guo-Qiang CHEN. Enhanced vascular-related cellular affinity on surface modified copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyhexanoate (PHBHHx). *Biomaterials* [online]. 2005, **26**(34), 6991-7001 [cit. 2022-05-11]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2005.05.034
- [58] KULTIVÁCIA BUNIEK - POPIS METÓDY. In: *Virtualne labororium molekularnej biologie* [online]. Nitra: Katedra botaniky a genetiky FPV, 2020-2021 [cit. 2022-05-12]. Dostupné z: [http://www.kbg.fpv.ukf.sk/LMB/VLMB/kultivacia\\_popis.html](http://www.kbg.fpv.ukf.sk/LMB/VLMB/kultivacia_popis.html)
- [59] EDMONDSON, Rasheena, Jessica BROGLIE, Audrey ADCOCK a Liju YANG. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *ASSAY and Drug Development Technologies* [online]. 2014, **12**(4), 207-218 [cit. 2022-05-11]. ISSN 1540-658X. Dostupné z: doi:10.1089/adt.2014.573
- [60] LEE, Jungwoo, Meghan CUDDIHY a Nicholas KOTOV. Three-Dimensional Cell Culture Matrices: State of the Art. *Tissue Engineering Part B: Reviews* [online]. 2008, **14**(1), 61-86 [cit. 2022-05-11]. ISSN 1937-3368. Dostupné z: doi:10.1089/teb.2007.0150
- [61] INTRODUCTION ABOUT 3D CELL CULTURE. In: *Elveflow an Elvesys brand* [online]. 2022 [cit. 2022-05-12]. Dostupné z: <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/organs-on-chip-3d-cell-culture/3d-cell-culture-methods-and-applications-a->



short-review/?fbclid=IwAR0PVtgbV-5-LoNOFpQ8jdwzXt6iN0Em-Tzez8CadHKPvSFCJ459oUt4BfQ#\_ftn27

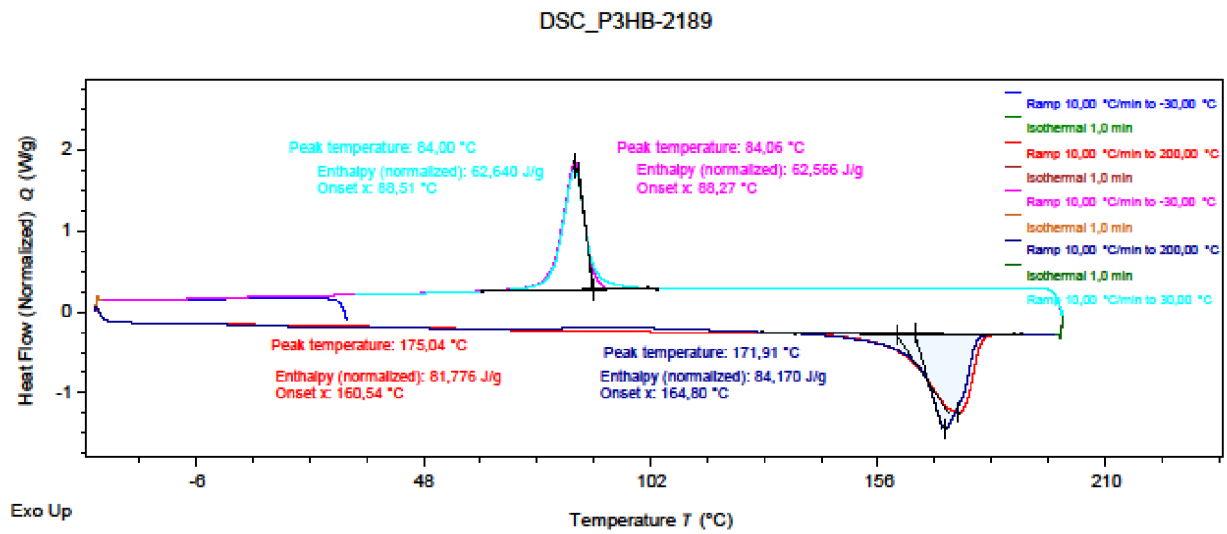
- [62] SHRUTI, Shruti, Antonio SALINAS, Gigliola LUSVARDI, Gianluca MALAVASI, Ledi MENABUE a M. VALLET-REGI. Mesoporous bioactive scaffolds prepared with cerium-, gallium- and zinc-containing glasses. *Acta Biomaterialia* [online]. 2013, **9**(1), 4836-4844 [cit. 2022-05-11]. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2012.09.024
- [63] BOYAN, B. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* [online]. 1996, **17**(2), 137-146 [cit. 2022-05-11]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/0142-9612(96)85758-9
- [64] LEE, Min, Benjamin WU a James DUNN. Effect of scaffold architecture and pore size on smooth muscle cell growth. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2008, **87**(4), 1010-1016 [cit. 2022-05-11]. ISSN 15493296. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.31816
- [65] MARRELLA, Alessandra, Tae LEE, Dong LEE, Sobha KARUTHEDOM, Denata SYLA, Aditya CHAWLA, Ali KHADEMHOSEINI a Hae JANG. Engineering vascularized and innervated bone biomaterials for improved skeletal tissue regeneration. *Materials Today* [online]. 2018, **21**(4), 362-376 [cit. 2022-05-11]. ISSN 13697021. Dostupné z: doi:10.1016/j.mattod.2017.10.005
- [66] RAVI, Maddaly, V. PARAMESH, S.R. KAVIYA, E. ANURADHA a F.D. SOLOMON. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. *Journal of Cellular Physiology* [online]. 2015, **230**(1), 16-26 [cit. 2022-05-11]. ISSN 00219541. Dostupné z: doi:10.1002/jcp.24683
- [67] LEE, Jungwoo, Sachin SHANBHAG a Nicholas KOTOV. Inverted colloidal crystals as three-dimensional microenvironments for cellular co-cultures. *Journal of Materials Chemistry* [online]. 2006, **16**(35) [cit. 2022-05-11]. ISSN 0959-9428. Dostupné z: doi:10.1039/b605797g
- [68] LU, Bingchuan, Mingfeng LI, Yongcong FANG, Zibo LIU, Ting ZHANG a Zhuo XIONG. Rapid Fabrication of Cell-Laden Microfibers for Construction of Aligned Biomimetic Tissue. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2021, **8** [cit. 2022-05-11]. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2020.610249
- [69] DVIR-GINZBERG, Mona, Tsiona ELKAYAM a Smadar COHEN. Induced differentiation and maturation of newborn liver cells into functional hepatic tissue in macroporous alginate scaffolds. *The FASEB Journal* [online]. 2008, **22**(5), 1440-1449 [cit. 2022-05-11]. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fj.07-9277com

- [70] LEE, Philip, Rob LIN, James MOON a Luke LEE. Microfluidic alignment of collagen fibers for in vitro cell culture. *Biomedical Microdevices* [online]. 2006, **8**(1), 35-41 [cit. 2022-05-11]. ISSN 1387-2176. Dostupné z: doi:10.1007/s10544-006-6380-z
- [71] DRURY, Jeanie a David MOONEY. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* [online]. 2003, **24**(24), 4337-4351 [cit. 2022-05-11]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(03)00340-5
- [72] RANJAN, Vivek, Peiqin ZENG, Boyuan LI a Yilei ZHANG. In vitro cell culture in hollow microfibers with porous structures. *Biomaterials Science* [online]. 2020, **8**(8), 2175-2188 [cit. 2022-05-11]. ISSN 2047-4830. Dostupné z: doi:10.1039/C9BM01986C
- [73] SERRA, T., J.A. PLANELL a M. NAVARRO. High-resolution PLA-based composite scaffolds via 3-D printing technology. *Acta Biomaterialia* [online]. 2013, **9**(3), 5521-5530 [cit. 2022-05-11]. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2012.10.041
- [74] LI, Junda, Meilin CHEN, Xiaoying WEI, Yishan HAO a Jinming WANG. Evaluation of 3D-Printed Polycaprolactone Scaffolds Coated with Freeze-Dried Platelet-Rich Plasma for Bone Regeneration. *Materials* [online]. 2017, **10**(7) [cit. 2022-05-11]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma10070831
- [75] Products - 3D Insert-PCL. In: *3Dbiotek* [online]. 3D Biotek LLC, 2007-2022 [cit. 2022-05-12]. Dostupné z: [https://3dbiotek.com/prod\\_3dpcl.aspx](https://3dbiotek.com/prod_3dpcl.aspx)
- [76] *EFFECT OF FABRIC STRUCTURE ON THE LIQUID TRANSPORT CHARACTERISTICS OF NONWOVEN WOUND DRESSINGS*. The University of Leeds, 2000. Doctor of Philosophy. School of Textile Industries.
- [77] MECHANISM OF LIQUID WATER TRANSPORT IN FABRICS; A REVIEW. *Fibres and Textiles* [online]. 2017, **4**, 58-65 [cit. 2022-01-20]. Dostupné z: [http://vat.ft.tul.cz/2017/4/VaT\\_2017\\_4\\_10.pdf](http://vat.ft.tul.cz/2017/4/VaT_2017_4_10.pdf)
- [78] PATNAIK, A., R. RENGASAMY, V. KOTHARI a A. GHOSH. Wetting and Wicking in Fibrous Materials. *Textile Progress* [online]. 2006, **38**(1), 1-105 [cit. 2021-12-02]. ISSN 0040-5167. Dostupné z: doi:10.1533/jotp.2006.38.1.1
- [79] HSIEH, You-Lo a Bangling YU. Liquid Wetting, Transport, and Retention Properties of Fibrous Assemblies: Part I. *Textile Research Journal* [online]. 1992, **62**(11), 677-685 [cit. 2022-05-11]. ISSN 0040-5175. Dostupné z: doi:10.1177/004051759206201108

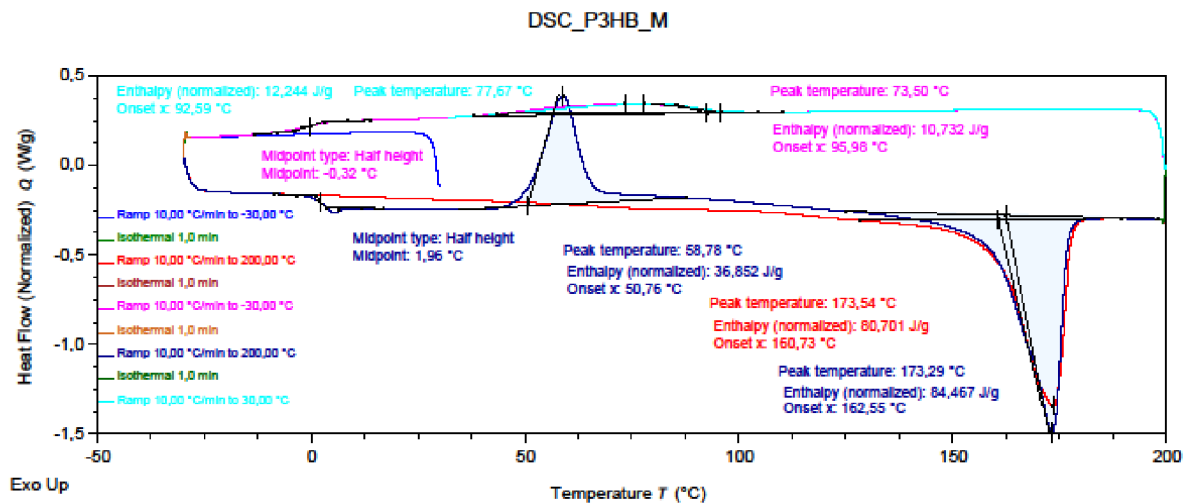
- [80] HSIEH, You-Lo. Liquid Transport in Fabric Structures. *Textile Research Journal* [online]. 1995, **65**(5), 299-307 [cit. 2022-05-11]. ISSN 0040-5175. Dostupné z: doi:10.1177/004051759506500508
- [81] KISSA, Erik. Wetting and Wicking. *Textile Research Journal* [online]. 1996, **66**(10), 660-668 [cit. 2022-05-11]. ISSN 0040-5175. Dostupné z: doi:10.1177/004051759606601008
- [82] Wetting and Wicking in Fibrous Materials. *Textile Progress* [online]. 2010, (8), 105 [cit. 2022-05-12]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1533/jotp.2006.38.1.1>
- [83] POSPISILOVA, Aneta, Ivana NOVACKOVA a Radek PRIKRYL. Isolation of poly(3-hydroxybutyrate) from bacterial biomass using soap made of waste cooking oil. *Bioresource Technology* [online]. 2021, **326** [cit. 2022-05-11]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.124683
- [84] GREGUŠKOVÁ, Zuzana. *Microfibers based on polyhydroxybutyrate for medical application*. Brno, 2021. Master's thesis. University of Technology, Faculty of Chemistry.
- [85] Viscosity of polymers in solution. In: *Aimplas* [online]. Spain [cit. 2022-05-12]. Dostupné z: <https://www.aimplas.net/blog/viscosity-polymers-solution/>
- [86] RUBINSTEIN, Michael a Ralph COLBY. *Polymer physics*. Oxford: Oxford University Press, 2003. ISBN 019852059x.
- [87] HWANG, Geelsu, Chang-Ha LEE, Ik-Sung AHN a Byung MHIN. Determination of reliable Lewis acid–base surface tension components of a solid in LW–AB approach. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* [online]. 2011, **17**(1), 125-129 [cit. 2022-05-11]. ISSN 1226086X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jiec.2010.12.009

## 8 PRÍLOHY

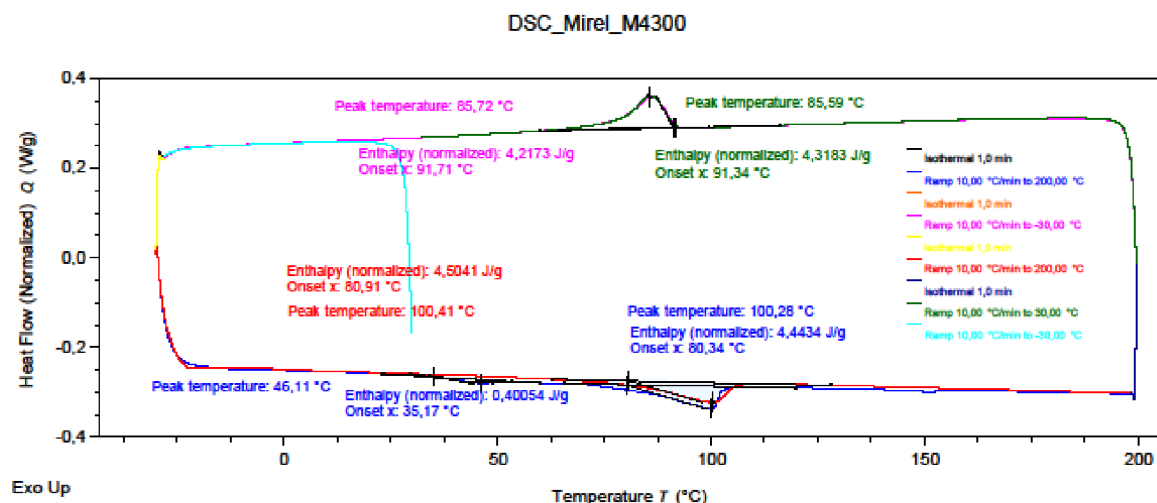
### Diferenčná kompenzačná kalorimetria



Obr. 55: DSC záznam P3HB



Obr. 56: DSC záznam HYDAL M01



Obr. 57: DSC záznam MIREL\_4300

## Správa z merania biologických testov

### Osadenie nosičov bunkami

Sterilizované nosiče (skaffoldy) boli prenesené do testovacej dosky, kde na dne jamôk bolo 20  $\mu\text{l}$  kultivačného média kvôli prichyteniu nosičov na dno jamiek. Kultivačné médium bolo zostavené z Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma Aldrich) obohatené o 10 % fetálneho bovinného séra (FBS; Gibco), 1 % antibiotika (100 U/ml penicilínu a 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycínu; Sigma Aldrich®) a 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycínu; Sigma Aldrich®). K nosičom bolo pridaných ďalších 20  $\mu\text{l}$  kultivačného média a následne boli vzorky inkubované pri teplote 37 °C po dobu 30 min. Následne boli nosiče osadené 3T3 myšacími fibroblastami (ECACC) o hustote  $5 \times 10^3$  buniek/vzorka v 30  $\mu\text{l}$  kultivačného média. Vzorky osadené bunkami boli po dobu 2 hod vložené do inkubátoru, aby bola umožnená dobrá bunková adhézia a nenastal tak odplav buniek mimo nosič. Následne bolo doplnené kultivačné médium do objemu 250  $\mu\text{l}$  na jamku. Nosiče s osadenými bunkami boli po dobu 21 dní kultivované v inkubátore s vysokou vlhkosťou vzduchu a 10 %  $\text{CO}_2$  pri 37 °C. Kultivačné médium bolo vymieňané 2 $\times$  do týždňa, v poslednom týždni kultivácie až 3 $\times$ .

### Test metabolickej aktivity

K stanoveniu metabolickej aktivity buniek bol použitý MTS test (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay; Promega). Do čistej testovacej 96-jamkovej dosky boli prenesené vzorky, aby sa zabránilo ovplyvneniu hodnôt bunkami, ktoré rástli na dne kultivačných jamiek pod nosičom. Následne bolo pridaných 20  $\mu\text{l}$  roztoku MTS a 10  $\mu\text{l}$  čerstvého kultivačného média. U kontrolnej skupiny bolo odsaté len médium a nahradené roztokom MTS a čerstvým médiom. Vzorky boli potom inkubované v roztoku 2 hod v inkubátore pri 37 °C. Počas inkubácie došlo k sfarbeniu oranžového roztoku na fialový formazán, čo predstavuje metabolizovaný MTS substrát mitochondriálnymi enzýmami. Po inkubácii bolo 100  $\mu\text{l}$  roztoku z každej jamky prevedených do čistých jamôk testovacej dosky.

Následne bola zmeraná absorbanca pri 490 nm (absorpcia svetla formazánu) a referenčnej vlnovej dĺžke 690 nm na prístroji Infinite M200 PRO (Tecan, Švajčiarsko). Z nameraných dát bola navyše ešte odčítaná hodnota samotnej vzorky inkubovanej bez buniek, u kontrolnej skupiny bola odčítaná hodnota nameraná u kultivačného média s MTS.

### **Detekcia bunkovej proliferácie**

Na stanovenie bunkovej proliferácie bola použitá kvantifikácia bunkovej DNA. Vzorky boli analyzované prostredníctvom kitu Quant-iT™ dsDNA Assay Kit (Life Technologies). Vzorky po meraní MTS boli vložené do 100 µl lyzačného pufru (0,2 % v/v Triton X-100, 10 mM Tris (pH 7,0), a 1 mM EDTA) pomocou 3 cyklov zmrazenia/rozmrazenia boli lyzované. K analýze bolo odobraných 20 µl lyzovaného roztoku a pridaného k 200 µl reakčnému roztoku, ktorý sa viaže na dvojzávitnicovú DNA a následne emituje fluorescenčný signál. Výsledná intenzita fluorescenčného signálu bola meraná prostredníctvom fluorescenčného readru (Infinite M200 PRO, Tecan, Switzerland;  $\lambda_{ex} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 523 \text{ nm}$ ). Výsledky boli vyhodnotené s využitím kalibračnej krivky, ktorá je súčasťou kitu.

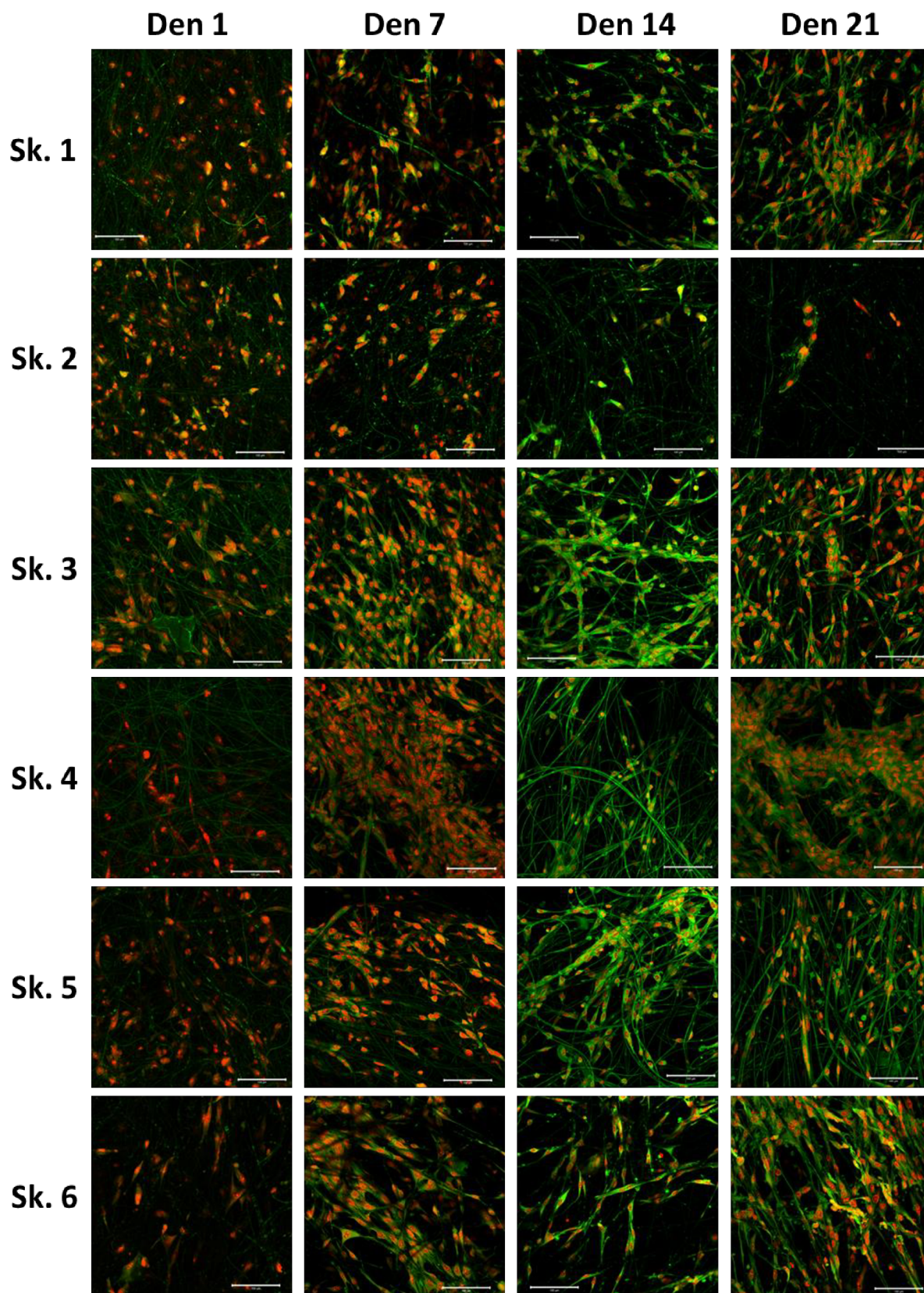
### **Distribúcia buniek v mikrovláknitých štruktúrach**

Distribúcia buniek na mikrovláknitých skaffoldoch bola vizualizovaná pomocou konfokálnej mikroskopie. Vzorky boli fixované mrazeným metanolom ( $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) 10 min. Následne bola pridaná fluorescenčná sonda 3,3'-diethyloxycarbocyanine iodide (DiOC6(3), Invitrogén, 1 µg/ml v PBS (pH 7,4), ktorá farbí intracelulárne membrány (zelené časti na snímkach z mikroskopu), a inkubovaná so vzorkami 30 min pri izbovej teplote. Následne bol pridaný propidium jodid (PI; 5 µg/ml v PBS, 5 min RT; Sigma Aldrich®), ktorý je interkalovaný do bunkovej DNA (červená jadrá buniek zobrazené na snímkach). Následne boli vzorky opláchnuté PBS, a vizualizované pomocou konfokálneho mikroskopu (Zeiss LSM 880 Airyscan). Použité boli vlnové dĺžky  $\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$  a  $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$  pre DiOC6(3) a  $\lambda_{ex} = 560 \text{ nm}$  a  $\lambda_{em} = 580 \text{ nm}$  pre propidium iodide. Obrázky získané z konfokálnej mikroskopie boli ďalej použité na analýzu hĺbkovej penetrácie buniek. Pomocou softwaru Zeiss Zen bola jednotlivým snímkam z rôznej hĺbky nosiča priradená farba, ktorá zodpovedá farbe na škále publikovanej v obrázku.

### **Štatistika**

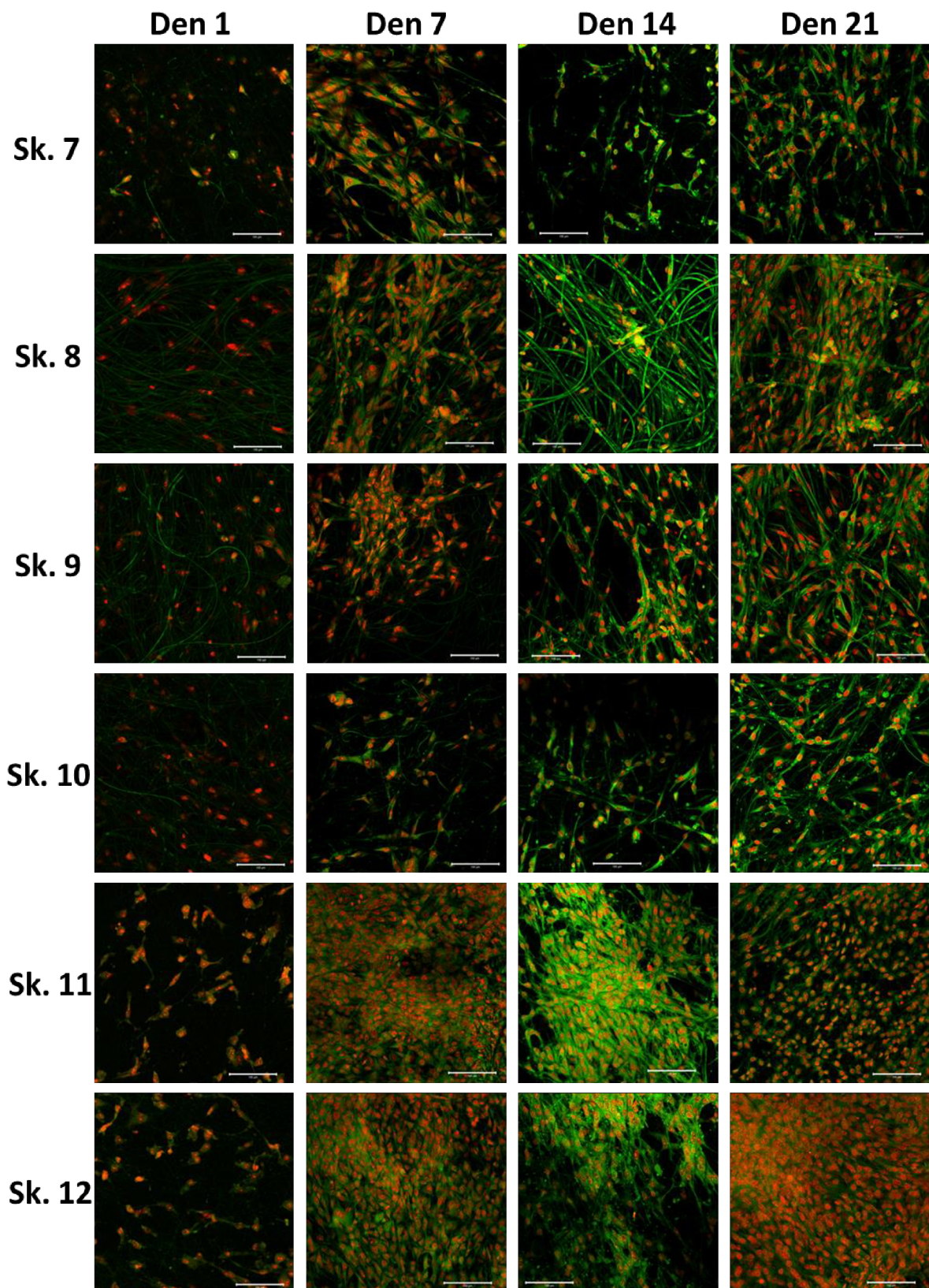
Pre MTS test a kvantifikáciu DNA bolo použitých 6 nezávisle pripravených vzoriek. Vďaka veľkým odchýlkam boli u niektorých vzoriek odstránené krajné hodnoty, avšak pre štatistické hodnotenie boli použité vždy najmenej 4 hodnoty. Dáta sú prezentované ako priemer  $\pm$  smerodatná odchýlka (SD). Výsledky boli štatisticky vyhodnotené pomocou softvéru SigmaStat 12.0, Systat. Pokiaľ dáta prešli testom normality a testom rovnosti rozptylov, bola vykonaná párová analýza pomocou testu ANOVA a Tukeyho porovnávacieho testu pre post-hoc analýzu. Pokiaľ dáta boli bez normálnej distribúcie, bola párová analýza vykonaná pomocou Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks a Dunnovho testu viacnásobného porovnania pre post hoc analýzu. Všetky výsledky boli považované za štatisticky významné, ak  $p < 0,05$ .





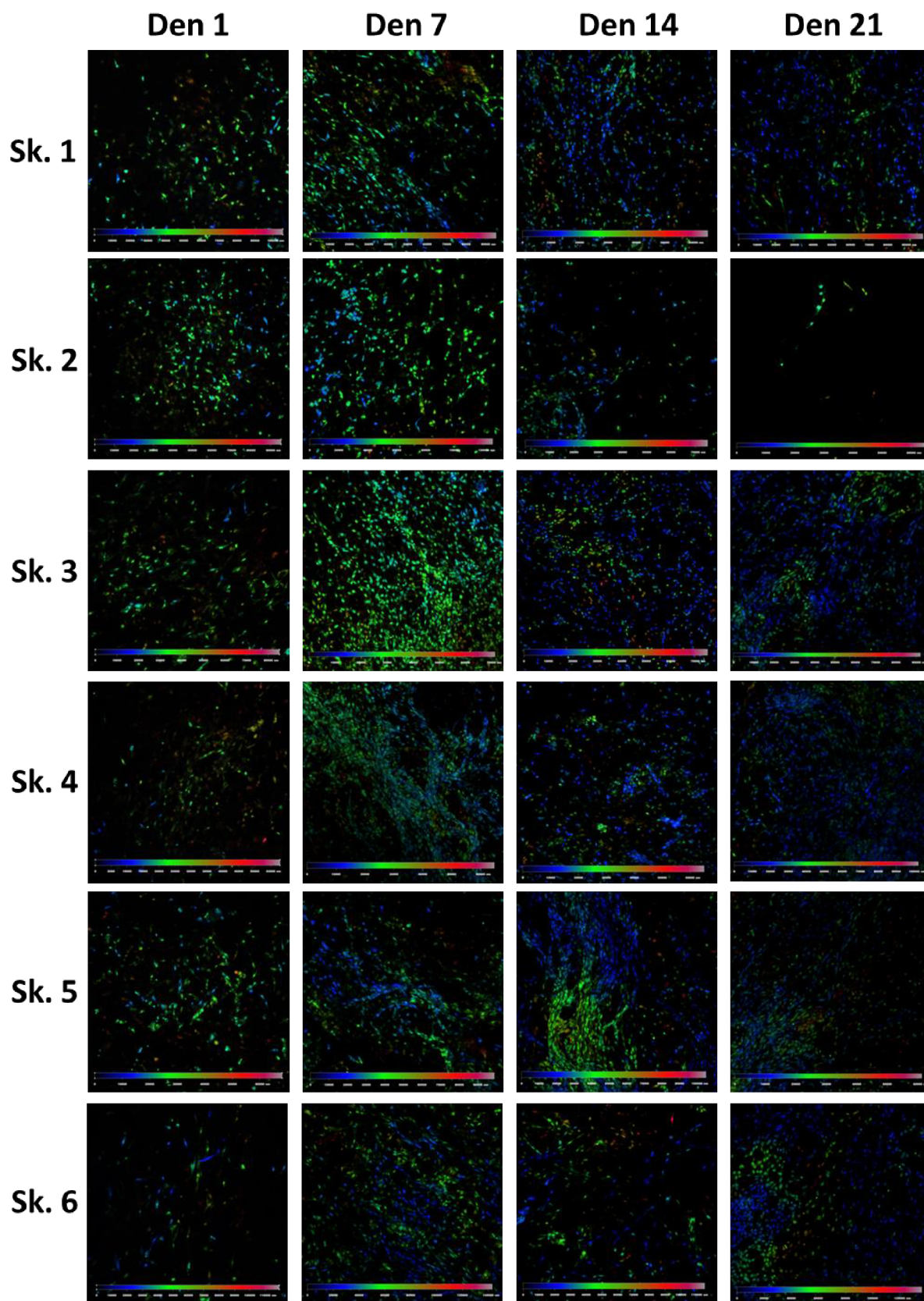
Obr. 3: Buněčná distribuce ve vlákenných nosičích Sk. 1 – 6 v den 1, 7, 14 a 21. Buněčná jádra byla obarvena propidium jodidem (červeně), intracelulární membrány pomocí DiOC6(3) (zeleně), měřka 100  $\mu\text{m}$ .





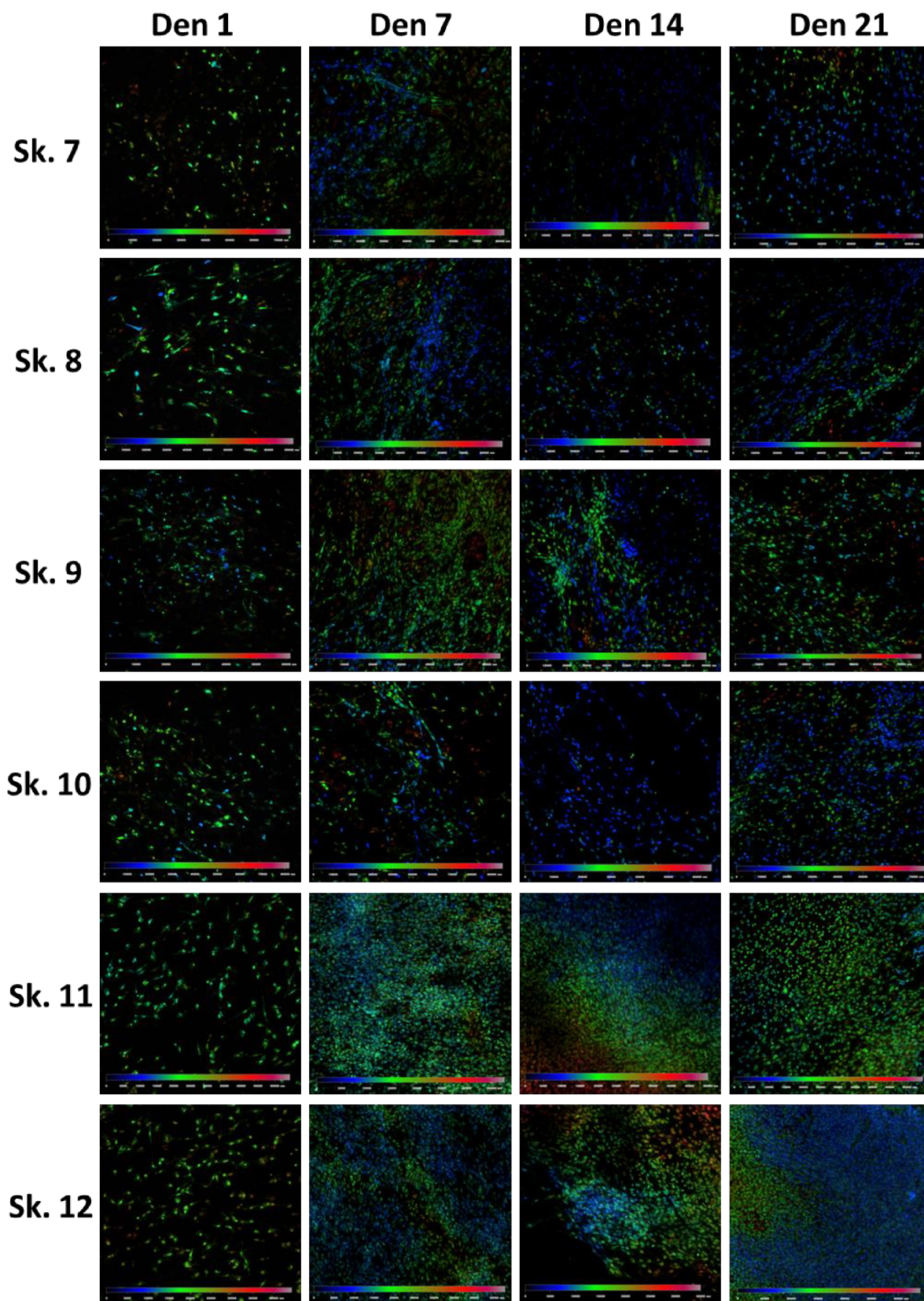
Obr. 4: Buněčná distribuce ve vlákněných nosičích Sk. 7 - 12 v den 1, 7, 14 a 21. Buněčná jádra byla obarvena propidium jodidem (červeně), intracelulární membrány pomocí DiOC6(3) (zeleně), měrka 100  $\mu\text{m}$ .





Obr. 5: Hlubkové projekce u skupin 1 – 6 v den 1, 7, 14 a 21. Buněčná jádra určité barvy se nachází v hloubce odpovídající barvě na barevné škále.





Obr. 6: Hloubkové projekce u skupin 7 - 12 v den 1, 7, 14 a 21. Buněčná jádra určité barvy se nachází v hloubce odpovídající barvě na barevné škále.

