



STUDIUM DEGRADACE POLYESTERŮ SE ZAMĚŘENÍM NA POLYKAPROLAKTON

Diplomová práce

Studijní program: N3106 – Textilní inženýrství

Studijní obor: 3106T018 – Netkané a nanovláknenné materiály

Autor práce: **Bc. Zuzana Špecingerová**

Vedoucí práce: Ing. Petr Mikeš, Ph.D.



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Zuzana Špecingerová**
Osobní číslo: **T12000413**
Studijní program: **N3106 Textilní inženýrství**
Studijní obor: **Netkané a nanovláknenné materiály**
Název tématu: **Studium degradace polyesterů se zaměřením na polykaprolakton**
Zadávací katedra: **Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Rešerše na dané téma.
2. Optimalizace postupu enzymatické degradace.
3. Studium degradace vybraných nanovláknenných vrstev.
4. Vyhodnocení výsledků a závěr.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] ALBERTS B. AT ALL., Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky. Přeložili z anglického originálu Arnošt Kotyk, Bohumil Bouzek a Pavel Hozák. 2. vyd. Espero Publishing, 2005. 740 s. ISBN 80-902906-2-0
- [2] WOODRUFF M. A., HUTMACHER D. W. The return of a forgotten polymer Polycaprolactone in the 21st century. Progress in Polymer Science 35 (2010): 1217-1256. Institute of Health and Biomedical Innovation, Queensland University of Technology, 60 Musk Avenue, Kelvin Grove, QLD 4059, Australia
- [3] SCHNABEL W., Polymer degradation: Principles and Practical Applications, Wien: Hanser, 1981. Macmillan Publishing Co., Inc., New York. ISBN 3-446-13264-3 Hanser, ISBN 0-02-949640-3 Macmillan
- [4] DONG, LIAO AT ALL., Degradation Behaviors of Electrospun Resorbable Polyester Nanofibers, Faculty of Engineering, National University of Singapore, Date of publication [2009-7-6]

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Petr Mikeš, Ph.D.

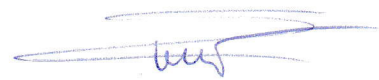
Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

Datum zadání diplomové práce: **17. června 2014**

Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2015**


Ing. Jana Drašarová, Ph.D.
děkanka




prof. RNDr. David Lukáš, CSc.
vedoucí katedry

V Liberci dne 17. června 2014

Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

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

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

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

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

Datum:

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ

Poděkovat bych chtěla především svému vedoucímu práce Ing. Petru Mikešovi, Ph.D. za jeho odborné a věcné připomínky, také za ochotu, cenné rady a veškerý věnovaný čas.

Dále bych ráda poděkovala Ing. Věře Jenčové, Ph.D. za odborné konzultace, vstřícnou pomoc při zpracování této diplomové práce a samozřejmě také za svůj čas, který mi věnovala. Moje poděkování patří také Mgr. Kateřině Pilařové a Ing. Alešovi Šamanovi za přívětivé jednání při zpracování experimentální části v laboratořích katedry netkaných textilií.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a blízkým, kteří mě podporovali během celého mého studia.

ANOTACE

Hlavním cílem této práce bylo testování degradace vybraných nanovlákných vrstev polyesterů pomocí enzymů. Součástí experimentů je optimalizace postupu testovací metody. V teoretické části jsou popsány stručné charakteristiky materiálů, které mají v lékařství široké použití. Dále se tato práce zabývá poznatky z oblasti výroby nanovlákných vrstev pomocí elektrostatičkého zvláknování a různými metodami testování degradace polymerů. Další část tvoří popis fyzikálních, chemických a dalších jevů, které mají vliv na samotnou degradaci. Jednotlivé výsledky jsou v praktické části průběžně zaznamenány do tabulek a grafů a doplněny snímky z elektronového mikroskopu. V samotném závěru jsou vyhodnoceny výsledky práce, které ukazují jakým způsobem je ovlivněna degradace polymerů za určitých podmínek v přítomnosti enzymů.

KLÍČOVÁ SLOVA:

Degradace, polyester, nanovlákn, eroze, enzymy

ANNOTATION

The main aim of this thesis was testing of degradation of chosen nanofiber materials by the help of enzymes. The experiments include optimization of progression testing methods. There are described characteristic materials in theoretic parts of this thesis which are mainly used in the medicine. This work deals furthermore of knowledges from areas production of nanofibre materials by the help of electrostatic spinning as well as by various methods testing of degradation. There are described various phenomena like physical, chemical and others which influence himself degradation. Individual results are continually recorded to the tables and graphs and supplemented by photos from electron microscope. All results are evaluated in the end of the work which explain the way of polymer degradation is influenced by definite conditions in the presence of enzymes.

KEY WORDS:

Degradation, polyesters, nanofibers, erosion, enzymes

Obsah

Seznam zkratk a pojmů	9
1. Úvod.....	11
2. Základní pojmy	12
3. Biodegradabilní polymery.....	14
3.1 Přírodní biodegradabilní polymery	14
Kolagen	14
Želatina.....	15
Chitin a chitosan.....	15
Celulosa a její deriváty.....	15
3.2 Syntetické biodegradabilní polyestery	16
Polyglykolová kyselina	16
Kyselina polymléčná.....	17
Polykaprolakton	18
Kopolymer kyseliny polymléčné a polyglykolové.....	19
Poly(L-lactide-co-ε-caprolactane)	19
Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)	20
4. Úvod do tkáňového inženýrství	20
4.1 Použití nanovláken v tkáňovém inženýrství.....	21
4.1.2 Elektrostaticky zvlákněná nanovláknna jako scaffold tkáňového inženýrství.....	22
5. Elektronová mikroskopie	23
6. Degradace polymerů	23
6.1 Definice	23
6.2 Síťování polymerů	24
6.3 Způsoby degradace polymeru	24
7.1 Degradční mechanismy	26
7.1.1 Jednotlivý krok procesu a řetězová reakce.....	26
8. Morfologie nanovláken během degradace	28
8.1 Degradční mechanismy nanovláken.....	29
8.1.1 Degradace polyesterových nanovláken	30
9. Degradace PCL	31
9.1 Pomalá degradace PCL nanovláken.....	33
10. Faktory ovlivňující degradaci „in vivo“	33
11. Degradace polymerů, analýza	36
11.1 Změny molekulové hmotnosti.....	37
11.2 Analýza a charakteristika polymeru.....	38
12. Vliv sterilizování gama zářením na polycaprolacton (PCL).....	38
13. Metody testování degradace.....	39

Praktická část	40
Materiál	40
Seznam chemikálií	40
Enzymy	41
Roztoky	41
Přístroje	41
14. Popis experimentu: Testování degradace PCL pomocí lipázy	42
14.1 Vyhodnocení:	44
15. Popis experimentu:	47
Testování degradace pomocí lipázy	47
a) Polykaprolakton (PCL)	47
Testování degradace PCL 10 U/ml :	49
Testování degradace PCL 1 U/ml :	52
b) Kopolymer kyseliny polymléčné a polykaprolaktonu (PLC).....	55
Testování degradace PLC 1U/ml :	57
Testování degradace PLC 5 U/ml :	58
c) PLLA.....	60
15.3 Testování PLLA, PLC a PCL lipázou Pseudomonas cepacia o koncentraci 50 U/ml	60
15.3.1 Vyhodnocení:	62
16. Testování degradace PLC, PLLA a PCL Proteinázou K	62
Příloha 1	71
Příloha 2	75
Příloha 3	78
Příloha 4	80
Příloha 5	81
Příloha 6	82
Příloha 7	83
Příloha 8	84
Příloha 9	85
Příloha 10	86
Příloha 11	87
Příloha 12	89
Příloha 13	91
Příloha 14	92

Seznam zkratek a pojmů:

Amorfní látky	jsou látky v pevném skupenství, které nemají pravidelnou (krystalickou) strukturu
Anaerobní	je proces nebo prostředí, kde není přítomen vzdušný kyslík; v takovýchto podmínkách žijí tzv. anaerobní mikroorganismy, které mohou za určitých podmínek produkovat využitelné látky např. metan a etanol
Benzoylperoxid	(kyselina benzoová s odstraněným vodíkem z karboxylové kyseliny) spojených peroxidovou skupinou, používá se jako iniciátor radikálů; homolytické štěpení slabé vazby kyslík-kyslík tvoří volné radikály, které spouští další reakce
Cromophorické	chemické skupiny, které jsou schopné vybrat (oddělit) absorpci světla vyplývající ze zbarvení určitých organických sloučenin
Degradace	z chemického hlediska: odbourávání nebo rozklad chemických sloučenin
Depolymerace	rozklad polymerů většinou na výchozí monomery vyvolaný teplem, světlem, UV zářením, kyslíkem a ozonem, popř. i mikroorganismy nebo enzymy, většinou za současného působení několika faktorů
Enantiomer	je organická sloučenina ze skupiny organických peroxidů, její molekula se skládá ze dvou benzoylových skupin
EtO	sterilizace ethylen oxidem
Exocytóza	je proces, kterým buňky uvolňují (nebo vyvrhují) větší molekuly či struktury (obecně látky, které nejsou schopny samostatného prostupu přes plazmatickou membránu) do svého okolí

In vitro	„ve zkumavce“
In vivo	„v živém“
Krystalinita	krystalická fáze polymeru má vzájemné uložení makromolekul mnohem těsnější než fáze amorfní
NC	negativní kontrola
PBS	Phosphate buffer solution – fosfátový pufr
PCL	Polykaprolakton
PGA	Kyselina polyglykolová
PLA	Kyselina polymléčná
PLC	Kopolymer kyseliny polymléčné a polykaprolaktonu
PLGA	Kopolymer kyseliny polymléčné a polyglykolové
PLLA	Poly-L-laktid
Racemizace	proces, ve kterém je jeden enantiomer přeměněn na racemickou směs, je provázený zvyšováním entropie a může probíhat i samovolně
Scaffold	„lešení“ nebo – li podpůrná konstrukce pro růst buněk a tkání
Sférolit	kulovitý útvar
Tg	skelný přechod
Věňčité tepny	(též koronární tepny) jsou tepny, které přivádí krev do srdeční svaloviny a vyživují ji, jsou proto zcela zásadní pro srdeční činnost

1. Úvod

Tato práce se zabývá degradací polyesterů se zaměřením na polykaprolakton. Studium degradace nanovláknenných materiálů je v současné době velice atraktivním tématem, neboť skýtá nebývalé možnosti využití v oblasti medicíny. Polymerní materiály, ať už přírodní nebo syntetické, jsou využívány například v oblasti výzkumu a výroby cévních náhrad, zubních a kostních implantátů, chirurgických nití, v tkáňovém inženýrství pro náhradu kožní tkáně a podobně.

Na začátku této práce jsou stručně vysvětleny pojmy, jako jsou biopolymery, biodegradace a eroze, které jsou důležité pro pochopení celé problematiky. Na tuto část navazuje charakteristika materiálů běžně používaných v medicíně. Z přírodních materiálů je to kolagen, želatina, celulóza, chitin a chitosan. Ze syntetických pak hlavně polykaprolakton, kyselina polymléčná, kyselina polyglykolová a jejich kopolymery.

Hlavním smyslem a motivací pro moji účast na tomto experimentu byla příležitost spolupodílet se a také svojí prací přispět k výzkumu materiálů, které nabízejí převratné využití v lékařství v podobě náhrad různých částí lidských orgánů a pomoci tak pacientům, kteří v minulosti neměli šanci na přežití nebo byli odkázáni na péči druhých lidí. Tyto prostředky, které se v současné době vyvíjejí, jim mohou výrazně zkvalitnit i prodloužit život.

Další oblastí, kterou se tato práce zabývá, jsou nanomateriály. Je zde popsána jejich výroba elektrostatickým zvlákněním a možnosti využití takto zvlákněné nanovláknenné vrstvy. S těmito postupy souvisí rovněž možnost ovlivňování degradace takto zvlákněných vrstev pro jejich cílené využití.

Hlavní experimentální částí této práce je testování degradace nanovláknenných vrstev ze syntetických materiálů pomocí enzymů, hlavně polykaprolaktonu (PCL), ale také kyseliny polymléčné (PLA) a kopolymeru kyseliny polymléčné a polycaprolactonu (PLC). Použitím enzymů jako

biokatalyzátorů dochází k rozložení polymerů s určitou chemickou stavbou na jednoduché produkty.

Součástí tohoto experimentu je optimalizace jednotlivých postupů při degradaci, míchání roztoků, příprava vzorků, zaznamenávání hodnot, sledování změn během degradace pod elektronovým mikroskopem a vyhodnocení jednotlivých výsledků. Výsledky tohoto experimentu se ukázaly jako zajímavé a přínosné pro pokračování výzkumu v této oblasti.

2. Základní pojmy

V této kapitole budou představeny základní pojmy, se kterými se v této práci dále pracuje. Jejich přiblížení a definování je důležité pro pochopení dalších uvedených souvislostí.

Biopolymery

Biopolymery jsou polymery, které jsou vytvořeny z obnovitelných zdrojů přírodním procesem a jsou biodegradabilní, tzn.: že při jejich rozkladu nevznikají žádné toxické látky. Tyto biopolymery mohou být chemicky syntetizovány z biologických zdrojů např.: z cukru, ze škrobu, z přírodních tuků, olejů a podobně.

Mezi biopolymery řadíme polysacharidy, které mají pravidelnou nebo pravidelně se opakující strukturu: např.: celulózu nebo škrob.

Dále existují i nepravidelné biopolymery, které mají v řetězci různý počet monomerů, např.: nukleové kyseliny ze čtyř různých nukleotidů nebo bílkoviny, které jsou složeny z dvaceti různých aminokyselin. [3]

Biodegradace

Williams definoval biodegradaci jako biologický rozklad polymerních materiálů. [10, str. 72]

Je však důležité si uvědomit, že biopolymery, které jsou schopné se rozložit, nemusí být automaticky bezpodmínečně vstřebatelné. [2] To znamená, že při degradaci a pohybu biopolymerů ven z jejich místa působení in vivo („v živém“), nemusí být bezpodmínečně odstraněny v těle.

Vstřebatelnost bychom mohli definovat jako pojem, který odráží celkové vyloučení výchozích cizích materiálů a množství odbouratelných produktů vedlejšími produkty (sloučeniny nízké molekulární hmotnosti) se žádnými zbytkovými vedlejšími efekty. [2]

Pro Hollanda a další biodegradace svědčí o hydrolytickém, enzymatickém nebo bakteriologickém degradačním procesu, který se vyskytuje uvnitř a/nebo na povrchu polymerního materiálu. Albertsson a Karlsson považovali biodegradaci za přeměnu a poškození polymerů výhradně žijícími organismy (zahrnují mikroorganismy a vnější enzymy). [10]

Eroze (bioeroze)

Pojem eroze zahrnuje procesy rozložení, které se dějí pouze na povrchu polymeru. [8, 10] Materiály se povrchovou erozí zmenší, ale zachovávají svůj původní geometrický tvar. Tato vlastnost může být například užitečná tím, že bude udržovat mechanickou a strukturální nedotčenost materiálu během degradace. [8]

Například Heller definoval pojem bioeroze jako změnu původně nerozpustného materiálu na rozpustný bez toho aniž by nutně zahrnovala chemickou degradaci. [13] Langer a Peppas nejprve nedělali mezi pojmy biodegradabilní a bioerozní žádný rozdíl, ale poté diskutovali o těchto pojmech, jelikož se také týkají kontroly stupně při uvolňování léčiv. [14]

Enzymy

Enzymy jsou proteiny více či méně komplikované chemické struktury o celkem rozdílné molekulové hmotnosti dosahující od 10^3 do 10^6 . Tyto pozoruhodné molekuly řídí všechny chemické přeměny probíhající v buňkách. Vážou se k jednomu

nebo více ligandům zvaným substráty, které přeměňují v chemicky modifikované produkty. Enzymy urychlují reakce aniž by se samy měnily. Jsou to katalyzátory, které buňkám umožňují vytvářet či rušit kovalentní vazby podle potřeby. Katalýza chemických reakcí enzymů vytváří a udržuje buňku a umožňuje život. Zde jsou příklady některých běžných typů enzymů: proteázy – odbourávají proteiny hydrolýzou vazeb mezi aminokyselinami, hydrolázy, nukleázy, syntázy, izomerázy, polymerázy, kinázy, fosfatázy, oxidoreduktázy, adenosintri- fosfatázy. [7,12]

3. Biodegradabilní polymery

Biodegradabilní polymery jsou polymery, ve kterých je degradace zprostředkována přinejmenším částečně biologickým systémem. [10] Biodegradabilní polyestery mohou být zkonstruovány jako tkáňové scaffoldy, protože jsou schopné rozkladu s výsledkem produktů metabolizovanými degradací. [4]

Přestože bychom mohli biopolymery rozdělit podle různých kritérií, pro zjednodušení budeme dále používat rozdělení podle jejich původu. Následuje jejich rozdělení na přírodní a syntetické a popis jednotlivých druhů, které jsou zajímavé pro využití ve tkáňovém inženýrství.

3.1 Přírodní biodegradabilní polymery

Přírozeně se vyskytují v přírodě a v poslední době se ve zdravotnictví používají přírodní biopolymery, jako jsou modifikované polysacharidy: například škrob, chitosan, kyselina hyaluronová, celulóza a bílkoviny: kolagen a želatina. [3]

Kolagen

Kolageny jsou fibrilární bílkoviny, které tvoří pojivovou tkáň např. v chrupavkách, šlachách, kostech a kůži. Buňky, které tvoří pojivovou tkáň a vytvářejí tak extracelulární hmotu se nazývají podle druhu tkáně, kde se vyskytují. Např. ve šlachách a dalších pojivových tkáních jsou fibroblasty, v kostech osteoblasty a v chrupavkách chondrocyty. Buňky extracelulární hmoty syntetizují a exocytózou

uvolňují bílkoviny, do kterých patří i kolagen. Kolageny mají samy o sobě výborné mechanické vlastnosti a současně patří do tzv. nerozpustných bílkovin (skleroproteinů). Přítomností kolagenu v extracelulární hmotě se zvyšuje odolnost pojivových tkání na mechanickou zátěž v tahu. V současné době je popsáno nejméně 27 různých typů kolagenů a každý z nich plní v rámci organismu specifickou roli. [5,6]

Želatina

Želatina je dalším polymerem, který je využitelný v tkáňovém inženýrství. Připravuje se z kolagenu denurací teplem nebo bazickou či kyselou hydrolyzou. Ta způsobí, že se zhroutí sekundární a další vyšší struktury kolagenu, někdy dojde i k částečné hydrolyze samotných peptidických řetězců. Výsledným produktem je želatina, která má jiné vlastnosti než kolagen. Je rozpustná v řadě běžných rozpouštědel (jako je voda, zředěné organické a minerální kyseliny) a také ztrácí mechanické vlastnosti kolagenu. Danou rozpustnost želatiny lze omezit dodatečným chemickým síťováním, např. aldehydy. Vzhledem k biokompatibilitě a biodegradabilitě mají vlákna ze želatiny dobré předpoklady pro využití v regenerativní medicíně. [5]

Chitin a chitosan

Chitosan je biosyntetický materiál, který se získává deacetylací chitinu. Chitin je stejně jako celulóza polysacharid a po celulóze je druhým nejrozšířenějším organickým materiálem. Vytváří základní stavební jednotku u bezobratlých živočichů (např. schránky korýšů, krovky hmyzu) a lze ho nalézt i jako součást buněčných stěn některých mikroorganismů. Chitosan je možné využít v různých oblastech, jako jsou: kryty tkání, kontrolovaný transport léků a jako bioadhezivní materiály. (Teprve nedávno bylo zjištěno, že chitosan může mít vliv na pevnost spojení mezi buňkami díky svému pozitivnímu náboji). Stejně jako kyselina hyaluronová není chitosan antigenní a při implantaci je dobře snášen a jako takový podporuje léčbu zranění (má bakteriostatický efekt). [3,5]

Celulosa a její deriváty

Celulosa je polydisperzním lineárním biopolymerem tvořeným z poly- $\beta(1,4)$ -D-glukosových jednotek s asyndiotaktickou konfigurací. Disponuje velmi silnými intramolekulárními vodíkovými vazbami a z toho důvodu je nerozpustná v běžných

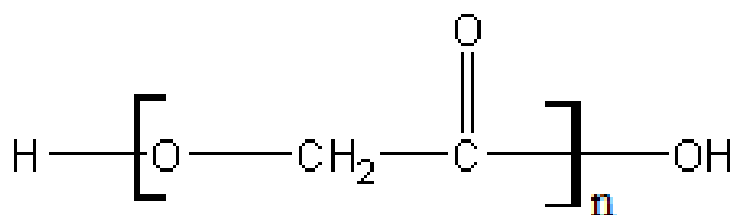
rozpouštědlech. Rozpouští se pouze např. ve směsi dimethylsulfoxidu s paraformaldehydem nebo v N-methylmorfolinu. Běžně se používají deriváty celulosy, které jsou lépe rozpustné. Příkladem může být oxidovaná celulóza, která je biologicky odbouratelná ve fyziologickém prostředí a má hemostatické účinky. [5]

Nanovlákna z oxidované celulosy mohou být v budoucnu zajímavým materiálem v oblasti krytí ran. A to nejen pro vnější poranění, ale i pro ošetření vnitřních ran při chirurgických zákrocích. [5]

3.2 Syntetické biodegradabilní polyestery

Nyní se budeme věnovat syntetickým polyesterům, které jsou pro tuto práci stěžejní. Jejich využití je široké a v této práci se zaměříme na některé z nich.

Polyglykolová kyselina (PGA)

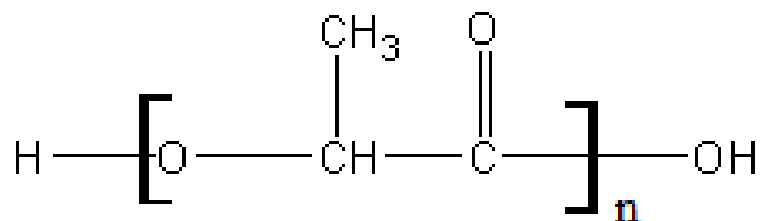


Obr. 1: Vzorec PGA [9]

Z angličtiny polyglycolic acid (PGA) je nejjednodušší lineární alifatický polyester, který je schopný metabolicky degradovat. Má poměrně vysokou teplotu tání T_m , která se pohybuje v rozmezí 220 - 225 °C, jeho T_g odpovídá 35 - 40°C. PGA je tuhý termoplastický polymer s vysokým stupněm krystalinity (45- 55%) a vysokou pevností (až do 250 MPa). [3,4] Kvůli vysoké pevnosti a schopnosti degradace, bylo PGA široce testováno pro fixaci zlomenin. A to v různých formách provedení: jako sponky, šrouby, pláty nebo tyčinky. PGA byl prvním materiálem, který byl použitý jako absorbovatelný steh, označován Davisem a Geckem jako Dexon v šedesátých letech 20. Století. Bohužel komplikace implantačních materiálů z PGA zahrnují: posunutí zlomeniny, selhání fixace a zánětlivá reakce těla na cizí předmět, která je hodně důležitá. Nicméně bylo objeveno, že mladí pacienti s kostními implantáty z PGA měli tyto reakce menší. [4]

Stehy, které jsou vyrobené z PGA, ztrácejí pevnost z 50 % asi po dvou týdnech, po čtyřech týdnech je to 100% ztráta pevnosti. Během tří až šesti měsíců dochází k úplné absorpci PGA. Biodegradace PGA je způsobena kombinací hydrolytického a enzymatického štěpení. [3]

Kyselina polymléčná (PLA)



Obr. 2: Vzorec PLA [9]

Kyselina polymléčná (PLA) je polyester, který je z obnovitelných zdrojů. Běžnými výchozími surovinami je kukuřičný škrob nebo cukrová řepa. Je to biodegradovatelný, alifatický a termoplastický polymer. [3] Připojením metylové skupiny degraduje PLA mnohem pomaleji než PGA s vysokou hydrofobicitou. [4]

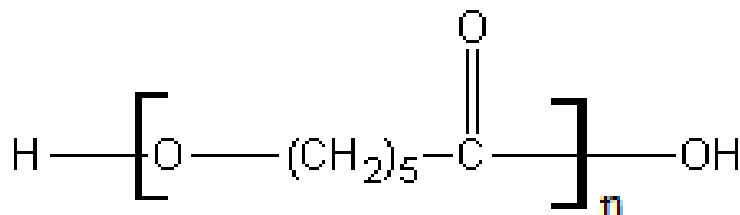
Monomer laktidu (kyseliny mléčné) existuje ve třech různých formách: směs DL, D a L. Asymetrie prostorového rozložení LA jednotek poskytuje způsob jak regulovat stupeň degradace, fyzikální a mechanické vlastnosti. Poly-L-laktid (PLLA) je polokrystalický polymer s teplotou zesklenní T_g 50 – 80 °C a teplotou tání (T_m) mezi 173 a 178 °C. Krystalinita PLLA je vyšší než u Poly-D,L-laktidu. Kyselina DL-polymléčná (DL-PLA) vykazuje náhodné rozdělení izomerických forem kyseliny mléčné a z tohoto důvodu není schopný vytvořit organizované krystalické struktury. Probíhá u něj mnohem rychleji degradace než u Poly(L-laktidu). [3,4,9]

Kyselina polymléčná se může využívat v mnoha aplikacích, zahrnuje: chirurgické šicí nitě, kompostované obaly, nádobí do mikrovlnné trouby, dětské plenky, dámskou hygienu, inženýrské plasty apod.

PLA polymery jsou běžně užívané v rozmanitých variantách medicínských aplikací. Mezi ně patří: vstřebatelné chirurgické nitě, zubní implantáty, kostní šrouby a destičky a kontrolované uvolňování léčiv. Nanovlákná z PLA polymeru se používají

jako scaffoldy pro obnovení nervů, v kostním tkáňovém inženýrství, jako cévní náhrady, atd. Při hydrolytické degradaci PLA vzniká produkt kyselina mléčná, který je typický pro anaerobní metabolismus v lidském těle a je součástí trikarboxylového cyklu. Finálními produkty tohoto cyklu je voda a oxid uhličitý. [3,4]

Polykaprolakton (PCL)



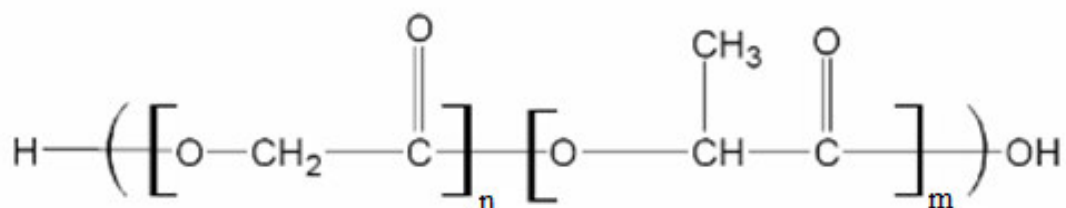
Obr. 3: Opakovaná polymerní struktura PCL [9]

Polykaprolakton je polymer, který je popisován jako vstřebatelný a polokrystalický. [1] Běžně se užívá k vytvoření chirurgických implantátů a scaffoldů ve tkáňovém inženýrství. V článku [1] je popisováno, že jednou z výhod PCL materiálu je pomalejší stupeň hydrolýzy, v porovnání s materiály jako je kyselina polyglykolová (PGA) a kyselina polymléčná (PLA). [1] Dle mého názoru pomalá degradace PCL někdy může být naopak nevýhodou. Záleží vždy na použití materiálu.

Krystalinita PCL je udávána od 45% do 67%. Většinou se PCL méně používá z důvodu pomalé degradace. PCL je ale jinak vhodným polymerem pro dlouhodobé uvolňování léků.

Elektrostaticky zvlákněná nanovlákna z polymeru PCL jsou stále více zajímavá pro výrobu. Je to hlavně z důvodu jejich nízké ceny a snadnosti výroby. Je také známo, že při procesu elektrostatického zvláknování polymeru PCL dochází k znovu zorganizování polymerního řetězce. A proto mají elektrostaticky zvlákněná nanovlákna z PCL menší krystalinitu než nezvlákněný polymer PCL. Elektrostaticky zvlákněný polymer PCL se běžně používá v tkáňovém inženýrství pokožky, pro regeneraci kostí a v srdečním tkáňovém inženýrství. [4]

Kopolymer kyseliny polymléčné a polyglykolové (PLGA)

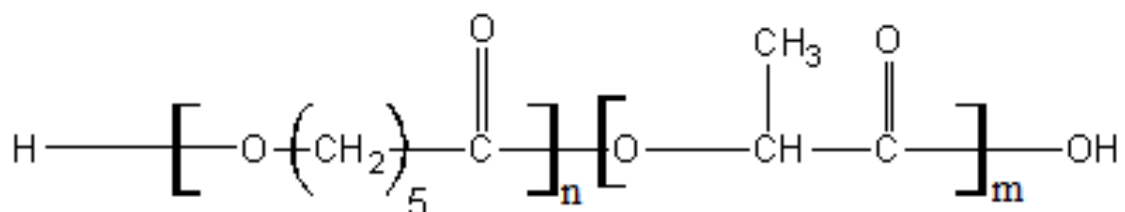


Obr. 4: Vzorec PLGA [2]

PLGA vzniká kopolymerizací dvou monomerů: kyseliny glykolové a kyseliny polymléčné. Kopolymer kyseliny polymléčné a polyglykolové (PLGA) je populárním syntetickým polymerem ve tkáňovém inženýrství (má relativně dobrou biokompatibilitu – snášenlivost v lidském těle a proměnlivou degradaci). Několik výsledných produktů je běžně k dostání na trhu. Příkladem jsou šicí materiály z PGLA ve složení 90% PGA a 10% PLA pod názvem Vicryl a Polysorb, u kterých bylo udáváno, že se absorbují během 8 nebo 10 týdnů. Je dobré si všimnout, že kopolymer ve složení 50% PGA a 50% PLA degraduje rychleji než homopolymer PGA nebo PLA. PLGA mikročástice jsou široce používány pro cílený transport léčiv.

PLGA byl jedním z prvních elektrostaticky zvlákněných biodegradabilních polymerů používaných pro aplikace ve tkáňovém inženýrství. Elektrostaticky zvlákněný PLGA je úspěšně používáný scaffold pro tkáňové inženýrství pokožky, obnovení kostí a nervů a cévního inženýrství. Ma a spol. [4] prováděli studie ohledně smíchání nanovláken z kolagenu a PGLA: zjistili, že se dodatečně zvýšilo uchycení buněk ze 7% (u PGLA) na 23% (u směsi) ve 30 minutách. [3,4]

Poly(L-lactide-co-ε-caprolactane) (P-(LLA-CL))



Obr. 5: Kopolymer kyseliny polymléčné a polykaprolaktonu

Poly(L-lactide-co-ε-caprolactane) je kopolymer PLLA a PCL. Přestože je (P-(LLA-CL)) méně používaný než třeba PLGA, ukázalo se, že elektrostaticky zvlákněný (P-(LLA-CL)) má zvláštní vlastnosti, které by se daly využít ve tkáňovém inženýrství. Dong a další [4] jako první prokázali, že jsou elektrostaticky zvlákněná nanovláknena z kopolymeru PLLA a PCL vhodná pro cévní inženýrství. Dokázali, že tento nanovlákněný materiál biokompatibilní s cévními hladkosvalovými a endoteliálními buňkami v lidské koronární tepně. Dále [4] kultivovali prasečí hladkosvalové buňky na elektrostaticky zvlákněný materiál (P-(LLA-CL)) až po dobu 100 dní. Uvádají, že na povrchu scaffoldu se vytvořilo více vrstev pevně porostlých buňek, ale nepodařilo se dosáhnout úplného shluku prasečích hladkosvalových buněk na scaffoldu z (P-(LLA-CL)). Implantovali také tento scaffold do žíly modelu králíka, kde zůstal zřejmý 7 týdnů po implantaci. Podle Donga a dalších tato studie signalizuje, že elektrostaticky zvlákněný kopolymer PCL a PLLA má dobrý potenciál ve využití pro cévní aplikace ve tkáňovém inženýrství. [4]

Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHVB)

PHVB patří do skupiny polyhydroxyalkanoátů (PHA). Tuto polyesterovou třídu poprvé izoloval francouzský mikrobiolog Maurice Lemoigne z bakterie *Bacillus megaterium* v roce 1925. Několik mikroorganismů jako jsou *Alcaligenes eutropus* nebo *Bacillus megaterium* produkují nejběžnější formu poly (3-hydroxybutyrátu) (PHB) zřejmě jako odpověď na fyziologický stres. PHVB je běžně užívaný jako obalový materiál, např.: pro tenké obalení papíru apod. Poslední dobou se stává PHVB zajímavým polymerním materiálem ve tkáňovém inženýrství. [4] Tímto materiálem se ale hlouběji v této práci zabývat nebudeme.

4. Úvod do tkáňového inženýrství

Pro pochopení celé problematiky tkáňového inženýrství je vhodné popsat jeho princip. Polyestery jsou široce používané syntetické biodegradabilní materiály a mají schopnost se rozložit. Pokroky v tkáňovém inženýrství by mohly přinášet větší pozornost na vlastní výrobu scaffoldů, stejně tak jako na biodegradabilní polyesterová nanovláknena. Důvodem pro používání nanovláken v tkáňovém inženýrství je to, že

nanovlákná polymerní síťovina je blízká podobě nanoměřítku síti proteinových vláken v přírodní extracelulární hmotě (ECM). Elektrostatické zvláknění je slibný způsob jak vytvořit kontrolovatelný a nepřetržitý nanovlákný ‚scaffold‘ připomínající extracelulární strukturu (ECM). Nanovlákná zajišťují velký povrch a vysokou porozitu. Jedním z rozhodujících okolností při zvažování použití polyesterových nanovláken jako scaffoldů se stává jejich degradace. [4]

4.1 Použití nanovláken v tkáňovém inženýrství

Při vysoké poptávce po transplantacích tkání a orgánech se objevuje tkáňové inženýrství jako potenciální řešení. Všeobecné strategie léčby v tkáňovém inženýrství zahrnují použití syntetických a přírodních funkčních scaffoldů, které jsou kultivované s buňkami získaných z pacienta nebo dárce. Poté se „buněčný scaffold“ umístí do těla pacienta, tam, kde je potřebné nahradit tkáň. Základním příslibem „in vitro“ tkáňového inženýrství je začlenění určitých buněk do scaffoldů za vhodných podmínek, které povedou k utváření tkáně. Podstatné záležitosti jako je biokompatibilita, fyzikální vlastnosti a schopnost biodegradace se týkají tkáňových náhrad. Scaffoldy by měly být upravené na míru individuálním požadavkům pro cílenou tkáň. [4]

Rozdílné konstrukce tkání mají specifické požadavky na scaffoldy. Například inženýrství kostní tkáně vyžaduje, aby scaffold byl mechanicky odolný a vodivý, zatímco tkáň jater potřebují vysoce porózní troj – dimenzionální strukturu.

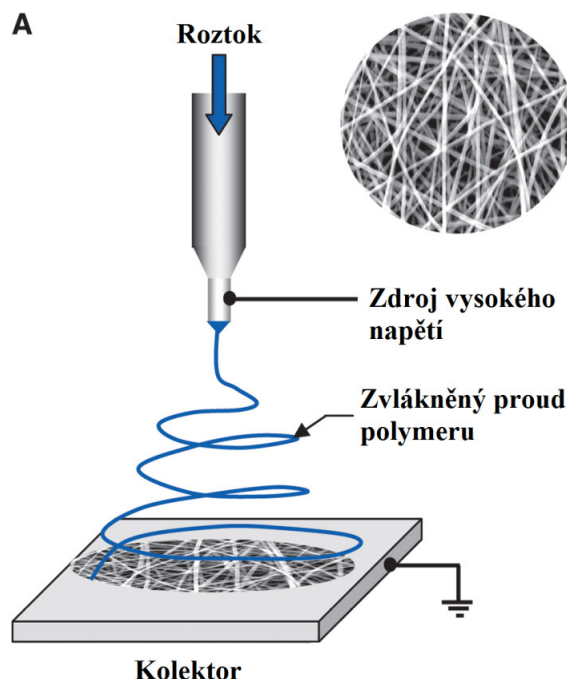
Nanotopografické prostředí je prospěšné pro růst buněk a tkání. Je to z důvodu, že v živém mikroprostředí „in vivo“, které buňky a tkáň osídlují, je tzv.: nanoprostředí složené z porózní a nanovlákné extracelulární hmoty (ECM). Zlepšit buněčnou adhezi může právě nanovlákná struktura, která má v poměru větší povrch než objem. Nanovlákný scaffold je jednou z možností jak zkonstruovat náhradu za extracelulární hmotu (ECM), která má podobnou vláknennou strukturu.

4.1.2 Elektrostaticky zvlákněná nanovláknna jako scaffold tkáňového inženýrství

Tkáňové scaffoldy mohou být vyrobeny různými metodami, ale jen některé jsou vhodné pro výrobu nanovláknenných scaffoldů. Nanovláknenná struktura může být vytvořena různými způsoby, např: samoseskupením, fázovým rozdělením, elektrospinningem, odstředivým zvlákněním, tažením atd. [4, 18, 19, 20, 21] V posledních letech je nejpoužívanější způsob elektrospinning, Obr. 6 využívá statickou elektřinu k dloužení vláken z polymerního roztoku. [4]

Podle přednášek prof. Lukáše se elektrostatické zvlákněování z fyzikálního hlediska podobá stromu neobvyklého tvaru, který vyrůstá z „kořenů“ v tenké povrchové vrstvě polymerního roztoku (slouží jedna ze dvojice elektrod) a pokračuje „kmenem“ představovaným stabilní částí proudu polymeru. Následující bičující zóna proudu polymeru vytváří jednotlivé „větve“ tohoto stromu. Jeho plody, tedy nanovláknna jsou shromážděna na druhé z elektrod spojené se zdrojem vysokého napětí. [18]

Při elektrospinningu lze nanovláknna vyrábět v malém množství pro laboratorní výzkum, ale hlavně také ve větším množství pro využití v průmyslu. Výhodou techniky elektrospinningu je přizpůsobivost a všestrannost.



Obr. 6: Elektrostatické zvlákněování [4]

5 Elektronová mikroskopie

Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM)

Při sledování vzorku pod rastrovacím elektronovým mikroskopem se vzorek pokryje tenkou vrstvou těžkého kovu a poté se po něm přejíždí svazkem elektronů, zaostřeným pomocí elektromagnetického vinutí na zkoumaný vzorek. Toto vinutí funguje jako čočka. Měří se množství elektronů vyražených nebo rozptýlených ze vzorku po dopadu svazku elektronů na jednotlivé body povrchového „rastru“ detektorem. Následně je měření těchto bodů využito pro regulaci obrazu, který je promítán na obrazovku. Mikroskop vytváří trojrozměrné obrazy objektů s rozlišením mezi 3 a 20 nm. [12]

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Transmisní elektronový mikroskop je podobný převrácenému světelnému mikroskopu, ale využívá svazku elektronů a magnetického vinutí místo světelného paprsku a optických skleněných čoček. Vzorek musí být velmi tenký a umístěný ve vakuu. Rozlišení u TEM vzorků je okolo 2 nm a možnost zvětšení až milionkrát. [12]

6 Degradace polymerů

Degradace polymerů je velice širokou vědeckou oblastí, a proto jsou různé zdroje literatury zaměřené vždy na její určitou část. Někteří autoři se zabývají např. biologickou degradací, která zahrnuje chemickou a enzymatickou oxidaci, neenzymatickou hydrolýzu a enzymaticky katalyzovanou hydrolýzu. [8, 10] V literatuře [7] se autoři zabývají rovněž dalšími způsoby degradací jako je např. teplotní, mechanická, světelná atd.

6.1 Definice

Výraz polymerní degradace obvykle značí změny ve fyzikálních vlastnostech, které jsou způsobené chemickými reakcemi. Zahrnují rozštěpení vazby hlavního řetězce makromolekuly a vše probíhá s ohledem na složení materiálů ze syntetických makromolekul. U lineárních (podélných) polymerů vede chemická reakce ke snížení molekulové hmotnosti (tj. úbytek délky řetězce). [7]

Degradace, která je vyvolaná kontaktem s molekulami vody by se dala definovat jako hydrolytické rozštěpení polymerních řetězců, které vedou k poklesu molekulové hmotnosti. V počátečním stádiu nejsou degradační produkty natolik malé, aby se staly rozpustnými. V tomto stádiu není možné zaznamenat změnu hmotnosti materiálu. [8]

Definice polymerní degradace je vzhledem k biopolymerům rozsáhlá. Zahrnuje změny fyzikálních vlastností, které nejsou způsobeny pouze chemickými, ale také fyzikálními reakcemi (zahrnují rozpad výše uspořádaných struktur). Polymerní degradace v obou případech znamená zhoršení funkčnosti polymerních materiálů. V souvislosti s chemickými aspekty polymerní degradace by mělo být zřejmé, že změny fyzikálních vlastností nejsou způsobeny pouze rozštěpením vazeb v hlavním polymerním řetězci. Velmi často jsou také zároveň způsobeny chemickými reakcemi v postranních skupinách nebo u postranních řetězců s výjimkou mezimolekulárního síťování. Nicméně reakce v postranních skupinách lineárních polymerů ovlivňují fyzikální vlastnosti relativně v menším rozsahu s porovnáním s reakcemi v hlavním řetězci. [7]

6.2 Síťování polymerů

Mezimolekulární síťování, tj. formování nových chemických vazeb mezi jednotlivými makromolekulami. Zesíťování vede ke zvětšení molekulové hmotnosti, také ve vyšší přestavbu a k určitému druhu nástavby s charakteristickými fyzikálními vlastnostmi. Zesíťováním selepší jeho fyzikálně – mechanické vlastnosti, stává se nerozpustným, pouze ve vhodném rozpouštědle botná (zvětšuje svůj objem pomocí rozpouštědla). [7,15]

6.3 Způsoby degradace polymeru

Degradace polymeru je způsobena hlavně chemickými reakcemi mezi vazbami řetězců makromolekul. Z praktických důvodů je nicméně běžné dále rozdělit tuto širokou oblast podle různých spouštěcích faktorů. Zahrnují teplotní, mechanickou, fotochemickou, chemicky ozařující, biologickou a chemickou degradaci polymerních

materiálů. Tyto mechanismy mohou pracovat odděleně nebo současně. [7,10 str. 51, kap. 4]

Chemická degradace

Chemická degradace se vztahuje k procesu, který je vyvolaný působením chemikálií na polymer, např.: působení kyselin, bází, rozpouštědel, reaktivních plynů a podobně. Většinou je přeměna způsobena pouze v případě zvýšené teploty. [7]

Teplotní degradace

Degradace teplotou odkazuje na případy, kdy polymer ve zvýšené teplotě začíná podléhat chemickým změnám bez současně zapojených dalších chemických sloučenin. Občas je dosti obtížné rozlišovat mezi teplotně a teplotně-chemickou degradací, protože zřídka kdy jsou polymerní materiály chemicky „čisté“. Přítomnost nečistot a příměsí v materiálu může reagovat s polymerním základem, pokud je teplota dosti vysoká. [7]

Biologická degradace

Chemická degradace s příslušným mikrobiálním působením obvykle silně souvisí s biologickou degradací. Mikroorganismus produkuje výbornou rozmanitost enzymů, které jsou schopny reagovat s přírodními a syntetickými polymery. Enzymatické působení na polymer je chemický proces. Mikrobiální působení na polymer je možné v poměrně širokém teplotním rozsahu. [7]

Do mikrobiálního působení na polymery jako PLA, PGA, PCL, atp. může být zapojeno přírodní prostředí nebo také vedlejší produkty, které jsou generovány abiotickou hydrolyzou zapojením hub nebo bakterií. [10, str. 83]

Mechanická degradace

Mechanicky vyvolaná degradace obecně znamená makroskopické změny, které jsou způsobeny působením smykových a příčných sil. Zvláště důležitou roli hraje lom polymeru při určování upotřebení umělé hmoty. Mechanická degradace polymerních materiálů je běžně doprovázena prasklinami v hlavních polymerních řetězcích. Mechanické vlastnosti polymerů můžeme zjistit pomocí deformačních zkoušek

(statických – smyku, protažení, stlačení; dynamických – harmonických tj. cyklických a neharmonických). [7,17]

Degradace světlem

Degradace polymeru způsobená světlem nebo fotodegradací zahrnuje fyzikální a chemické změny, které jsou způsobené ozářením polymerů ultrafialovým zářením (ve vlnové délce pod 400 nm) nebo viditelným světlem (vždy je k tomu potřeba kyslík). Aby byl postup efektivní, světlo se musí absorbovat do substrátu. Výsledný chemický proces může vést k prudkému zhoršení vlastností. [7, 10 str. 382]

Vysoce energetické záření a elektromagnetické záření

Vysoce energetické elektromagnetické záření (X-paprsky, γ -paprsky) nebo částicové záření (α -paprsky, urychlené elektrony, neutrony, produkty jaderného štěpení) není s ohledem na absorpci specifické. Nepředpokládá se, že existují chromophorické skupiny, stejně tak jako v případě fotodegradace, protože všechny částice molekul jsou schopné interagovat s ozářením. Rozsah a charakter fyzikálních a chemických změn záleží na chemickém složení ozářeného materiálu a na přírodním záření. [7,10]

Lidské využití je založené na tom, že absorpce vysokého energetického záření způsobuje tvorbu meziproductů v základu (volné radikály a ionty). Vysoko energetické záření je metodou běžně aplikovanou k zahájení chemických reakcí dějící se přes základní a iontové mechanismy. [7] Gupta a Deshmukh prohlásili, že γ záření ve vzdušném nebo dusíkatém prostředí může generovat zároveň zesíťování a rozštěpení řetězce. [10, str. 97, kap. 5] To samé tvrdí i Narkis a spol., jejich práce je soustředena na vyšší dávky záření než je potřeba ke sterilizaci (standardem je 25 kGy). [16]

Zdůrazněný by měl být silný vztah mezi jednotlivými způsoby degradace polymeru. Často převládnu okolnosti, které dovolí, aby různé druhy degradace probíhaly současně. [1,7,10]

7.1 Degradční mechanismy

7.1.1 Jednotlivý krok procesu a řetězová reakce

Tato část je věnována základním vlastnostem chemické reakce, která se děje během rozložení makromolekul. Jak bylo zmíněno, chemické reakce mohou být

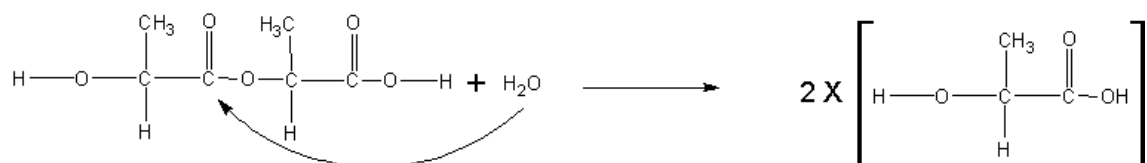
způsobeny mnoha režimy. Reakce mohou být rozlišovány na iontové reakce a na ty, které zahrnují elektricky vybuzené prostředníky. Typickým příkladem jsou fotochemické reakce, kde je jedna vazba hlavního řetězce roztržena po absorpci fotonu. Další příklady se týkají enzymatického útoku, např.: reakce enzymu amylázy se škrobem. Když molekula amylázy interaguje s amylosem (tj. jeden z komponentů škrobu), jedna glykosidová vazba se tímto napadením rozbije. Charakteristickým znakem řetězových reakcí je samovolně řídicí se proces, který jednou začne. Jinými slovy, počátek reakce přináší produkty, které jsou samy schopné podstoupit spontánní reakce s neporušenými molekulami, apod. Pod nepřetržitou iniciací se reakční stupeň zrychluje. Např.: přeměna vzrůstá exponenciálně v závislosti na času reakce. Důležitost řetězových reakcí plyne z kinetické (pohybové) délky, tj.: počet šířících se kroků začíná jednotlivou počáteční reakcí, která je často dosti značná. Tento jev naznačuje násobení škodlivých procesů jako je například depolymerace nebo oxidační degradace. Co se týká stupně příslušné přeměny, je samozřejmě jednotlivý krok procesů méně důležitý než řetězová reakce. Nicméně by to mělo poukazovat na to, že dokonce malé přeměny mohou způsobovat výrazné změny ve fyzikálních vlastnostech. Toto se děje hlavně u lineárních polymerů při procesu rozštěpení hlavního řetězce nebo při zesíťování. Jejich fyzikální vlastnosti jsou závislé na průměrné hodnotě molekulové hmotnosti. [7]

7.1.1.1 Autooxidace (samovolné okysličování), chemická a enzymatická oxidace

Oxidační řetězové reakce nebo autooxidace procházejí přes volné základní mechanismy. Samovolné okysličování polymerů (autooxidace) je základním jevem, jelikož jsou volné radikály vytvořeny v mnoha počátečních reakcích a také protože většinou reagují ihned s molekulou kyslíku. Polymerní biomateriály mohou degradovat pomocí chemické nebo enzymatické oxidace, pokud jsou vystaveny tělním tekutinám a tkáním. Je dobře známo, že během zánětlivé reakce k cizím materiálům jsou aktivovány buňky, částečně makrofágy a leukocyty, které jsou schopné produkovat druh vysoce reaktivního kyslíku tak jako peroxid (O_2^-), peroxid vodíku (H_2O_2), oxid dusnatý (NO) a kyselinu chlornou (HOCl). Tento oxidační efekt může mít vliv na degradaci polymeru, může přispívat k rozštěpení polymerního řetězce. [7,8]

7.1.1.2 Polyestery: Jednoduchá esterová hydrolýza

Důležité je porozumět rozložitelným polymerům (polylaktidu, glykolidu, polykaprolaktonu a jejich kopolymerům). Při hydrolytické reakci dochází k reakci esterových vazeb s vodou, viz.: Obr 7. [9,10]



Obr. 7: Hydrolytická degradace polyesterů: mezi dvěma laktidy spojenými k sobě [9]

Tato reakce vždy rozbíjí ester na odpovídající alkohol a kyselinu a může být katalyzována kyselé nebo zásaditě. [9]

7.1.1.3 Enzymatická hydrolýza

Enzymatická hydrolýza polymerních biomateriálů je proces ovlivněný způsobem vzájemného působení mezi enzymy a polymerními řetězci, které zahrnují čtyři typické kroky: 1) rozšíření enzymu z celého objemu roztoku do celistvého povrchu, 2) adsorpce enzymu do substrátu způsobující formování komplexu enzym-substrát, 3) katalýza hydrolytické reakce a 4) difuze rozpustných degradačních produktů z celistvého substrátu do roztoku. [8]

8. Morfologie nanovláken během degradace

Morfologie nanovláken se významně mění během degradace. Přestože se rychlost degradace mění v závislosti na druhu polymeru, morfologické změny polymerních nanovláken můžeme rozdělit do dvou typů: tavení vlákna (tzv. fiber melting) a lámání vlákna (tzv. fiber breaking). Tavenina jako morfologie je častěji získávána z amorfních nanovláken s nízkou teplotou skelného přechodu (T_g). Věří se, že dochází k tavení vlákna (tzv. fiber melting), pokud je molární hmotnost polymeru snížena k rozsahu, že je jeho T_g blízko nebo pod teplotou degradace, běžně 37°C .

V tomto případě se polymerní řetězce v amorfní oblasti stávají pohyblivými. Nicméně mají vlákna sklon se „tavit“ dohromady, aby snížily povrchové napětí. Na druhou stranu mají polymerní nanovlákná s vysokou krystalinitou nebo s vysokým T_g jako jsou: PGA, PLLA, PCL a jejich kopolymery sklon k rozbití nebo rozlomení nanovláken během degradace. Stává se to, protože polymerní řetězce v krystalické oblasti jsou stabilní, tuhé a nepohyblivé. Vlákno se rozbije (roztrhne), když se v průběhu degradace objeví slabina tzv.: „weak point“ podél vlákna. Rozbité konce vláken jsou tudíž více citlivé k postihnutí hydrolýzy, jelikož jsou více vystavena degradačnímu médiu (okolnímu prostředí). [4]

8.1 Degradační mechanismy nanovláken

Je zřejmé, že se polymerní nanovlákná rozloží rychleji než příslušný polymer v makroměřítku (v řádu milimetrů). Nemusí být vždy pravdou, že je to z důvodu vysoké povrchové plochy nanovláken. Abychom se mohli věnovat této záležitosti, je potřeba analyzovat základní mechanismy hydrolýzy polyesterů.

Hydrolýza polyesterů a eroze

Eroze je definována jako fyzikální rozpad polymerní hmoty, která je výsledkem degradace. Na základě inkubace voda pronikne dovnitř polymerní hmoty postupující směrem ke středu zájmu a zahrnuje rozštěpení polymerního řetězce. Jakmile je dosažena dostatečně nízká molární hmotnost, utvořené degradační produkty se rozptýlí a rozplynou v degradačním médiu a jsou přepraveny od polymerní hmoty ven. [2]

V závislosti na mechanismu eroze klasifikujeme polymer jako erodující objemem nebo povrchově. Degradace nastane v celé hmotě a materiál se ztrácí z veškerého objemu polymeru, pokud voda proniká rychleji než eroze základní hmoty. Toto chování je označováno jako objemová eroze. Někdy je ale uvedena pod názvem homogenní eroze, protože ztráta hmotnosti se získává v celé hmotě ve více či méně jednotné rychlosti. Poté co eroze dojde ke kritickému stupni, časem dochází ke kolapsu celého systému. Speciálním případem objemové eroze je heterogenní (různorodá nehomogenní) degradace. Po fázi degradace jsou vytvořeny rozpustné oligomerní sloučeniny v základní hmotě. Rozpustné oligomery na povrchu základní hmoty jsou

jednoduše rozptýleny v degradačním médiu, zatímco oligomery uvnitř základní hmoty rozptýleny nejsou. Tyto kyselé oligomery se takto nahromadí uvnitř základní hmoty a navodí se tak rychlejší degradace uvnitř hmoty autokatalýzou. V extrémních případech vznikne dutá struktura, když je vnitřní materiál kompletně degradován, viz Obr.: 8 c. Sklon k objemové erozi mají amorfní (beztvaré nekystalické) a hydrofilní polymery.

Na druhou stranu označujeme jako povrchovou erozi v případě, jestliže voda proniká pomaleji než samotný proces eroze a ztráta hmotnosti se týká pouze povrchové vrstvy. V ideálním případě je u povrchové eroze její stupeň přímo úměrný vnějšímu povrchu. Přestože je těžké dosáhnout povrchové eroze, častěji se preferuje, protože je snadněji předvídatelná. Většina polymerů není dostatečně hydrofobních, aby zabránily průniku vody dovnitř základní hmoty. Hydrofobní polymery s vyšší krystalinitou jsou více předurčeny k tomu, aby se u nich projevila povrchová eroze. [2]

Např.: PCL a PLLA jsou polokystalické polymery s vyšší krystalinitou a hydrofobicitou. V těchto případech je těžké, aby voda pronikla dovnitř základní hmoty. Polymery těchto materiálů v nanoměřítku degradují rychleji, než v řádech milimetrů.

Polyesterová nanovlákna degradují povrchovou erozí, protože neobsahují žádný „objemný materiál“. Jestliže neprobíhá žádná autokatalýza v nanovlákně hmotě, znamená to, že čím menší bude průměr vlákna, tím rychleji se rozloží. [2]

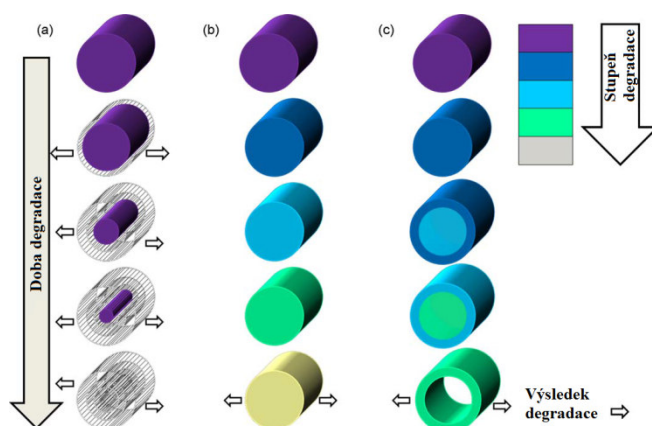
8.1.1 Degradace polyesterových nanovláken

Rychlost degradace polyesteru je ovlivnitelná na základě změny polymeru, který jej vytváří. Jednou z výhod degradace polyesterových nanovláken je, že jejich degradační produkty jsou metabolizovány v lidském těle. Kompletně se adsorbují v lidském těle, z tohoto důvodu se využívají v medicíně. Dalo by se říci, že přestože degradace polyesterových vláken tradičního makro měřítka (pohybující se v řádech milimetrů) byla rozsáhle studována, studie elektrostaticky zvlákněných degradabilních polyesterových nanovláken je na samém počátku. Důvodem, proč se chovají vlákna v makro a mikro měřítku při degradaci jinak je, že nanovlákna mají větší povrch ku objemu než je to u vláken v makro měřítku. Dále by mohla být rozdílná krystalinita, uspořádání a orientace polymerního řetězce, hydrofobicita. Aktivita buněk a tkání může

postupně ovlivnit degradaci nanovláken tím, že budou obklopovat a napodobovat strukturu nanovláken. [4]

9. Degradace PCL

PCL může být degradován pomocí vnějších žijících organismů (bakterií a hub). Nejsou ale vstřebatelné v lidském a živočišném těle, protože postrádají vyhovující enzymy. Nemůžeme říci, že nejsou vstřebatelné, ale spíše, že proces trvá delší dobu, nejdříve šířením hydrolytické degradace. Je přijatelné, že hydrolytická degradace může postupovat přes povrch nebo množství degradačních cest, viz.: Obr. 8.



Obr. 8: a) povrchová eroze, b) celková degradace, c) celková degradace s autokatalýzou [2]

Difuzní jev (rozptylová) reakce určuje způsob, kterými z těchto cest prostupuje. Degradace povrchu nebo eroze zahrnuje hydrolytické štěpení hlavního řetězce polymeru pouze na povrchu. Tato situace nastává při poměru hydrolytických rozštěpených řetězců a produkci oligomerů a monomerů, které jsou rozptýlené do okolí. Jsou rychlejší než poměr vstupu vody do celkového polymeru. Toto má typicky za následek zeslabení polymeru v průběhu času bez ovlivnění molekulové hmotnosti vnitřního objemu polymeru, který by obecně zůstal nezměněn po dobu degradačního procesu obr.: 8 a. Výhodou tohoto typu eroze je její předvídatelnost při uvolňování léků. [2]

Celková degradace nastává, když voda proniká celým množstvím polymeru a způsobuje hydrolýzu skrz celou základní hmotu polymeru, obr. 8 b. Náhodné hydrolytické štěpení řetězce by zaujalo místo a vytvořilo celkové snížení molekulární hmotnosti. Pro difuzně – reakční jev by byla dosažena rovnováha, pokud mohou molekuly vody pronikat do objemu polymeru a hydrolyzovat řetězce umožňující monomery nebo oligomery rozptýlit, eroze se bude vyskytovat postupně.

Pokud by byla rovnováha narušena, mechanismus degradace by mohl dát podnět k vnitřní autokatalýze přes karboxylové a hydroxylové koncové skupiny vedlejších produktů. (obr.: 8 c)

Zatímco oligomery a karboxylové skupiny na povrchu mohou volně pronikat do okolí (situace povrchové eroze, obr.: 8 a), v případě celkové degradace vnitřní koncentrace autokatalýzy produkty mohou produkovat postupně kyselější, tak jako nově generovaný karboxyl koncové skupiny formovaných esterů během nahromaděného štěpení (obr.: 8 c). Tato obrácená vnitřní degradace je zrychlená v porovnání s povrchovou degradací. Vrstva s vyšší molekulární hmotností opouští vnější vrstvu s nižší molekulární hmotností, degraduje a je dutá, obr. 8 c.

Degradační mechanismus se tímto stává definovaný dvou režimovou distribucí molekulární hmotností. Když se stanou vnitřní oligomery dost malé, difundují rapidně skrz vnější vrstvu a to je doprovázeno nápořem ztráty váhy a snížením rychlosti řetězového rozštěpení produkující vyšší molekulární hmotnost vytvořením výdutí ve struktuře. Rapidní nárůst těchto oligomerů a kyselých vedlejších produktů může způsobit zánětlivé reakce „in vivo“. Kromě toho, jestliže není schopná okolní tkáň vyrovnat změnu pH kvůli chudému krevnímu zásobení nebo nízké metabolické aktivitě, potom mohou nastat místní dočasné poruchy, např. může dojít k zvětšení osmotického tlaku skrz hromadění tekutiny v případě rychlé degradace.

Homopolymer PCL úplně degraduje během dvou až čtyř let. Záleží to na počáteční molekulové hmotnosti implantátu. Stupeň hydrolýzy může být změněn pomocí kopolymerací s jinými laktony nebo laktidy. Ze studií degradace v literatuře vyplývají dvě úrovně degradačního procesu PCL:

- a) Neenzymatické hydrolytické štěpení skupin esterů
- b) Enzymatická degradace

Když je polymer s vyšší krystalinitou a o menší molekulové hmotnosti (méně než 3000), polymer se jeví, že podléhá vnitrobuněčné degradaci. Pozorováním fragmentů, fagosomů, makrofágů a obrovských buněk uvnitř fibroblastů, podporuje teorii, že jsou možná úplně absorbovány a degradovány skrz vnitrobuněčný mechanismus.

Bylo také zmíněno, že první stupeň míry degradace je v podstatě identický „in vitro“ hydrolýze ve 40 stupních Celsia. Dále bylo usouzeno, že mechanismus degradace PCL by mohl být přisuzován náhodnému hydrolytickému štěpení řetězce esterových vazeb, který by způsobil pokles molekulové hmotnosti. [2]

9.1 Pomalá degradace PCL nanovláken

Ukázalo se, že mikroorganismy mohou degradovat polykaprolacton. PCL je jinak relativně stabilní vůči hydrolýze „in vitro“ a dokáže degradovat v čisté houbovitě kultuře, kompostu, pomocí enzymů a v hlíně. Při biodegradaci bylo pozorováno, že PCL prudce ztrácí hmotnost povrchovou erozí s menším poklesem molekulové hmotnosti. Degradace PCL nanovláken způsobené enzymaticky a vnějším prostředím bylo také studováno. V článku [4] popisují, že v přítomnosti lipázy se projevila rychlá degradace PCL, že PCL ztratilo během 8,5 hod. 47% své hmotnosti. Krystalinita PCL nanovláken se zvýšila během degradace kvůli teplotně vyvolanému překrystalizování. [4]

10. Faktory ovlivňující degradaci „in vivo“

U syntetických polymerů je důležitá jejich dlouhá časová stabilita. Je potřeba, aby byl způsob rozložení polymerů kontrolovatelný. Biodegradabilní makromolekuly mohou být specificky uzpůsobeny pro kontrolu degradace pod tlakem prostředí v biologických systémech nebo pomocí enzymatických mechanismů. [10]

PLA se od PGA liší jednou methylovou skupinou (CH_3) opakující se jednotky. Tyto podmínky zvyšují prostorovou překážku tak, že vytvářejí PLA více hydrofobním. Proto je více hydrolyticky stabilní. Semikrystalické polymery (pevně zabalené

krystalické části) jsou méně přístupné k degradaci, která se musí rozšířit dovnitř, aby byla efektivní. Z tohoto důvodu nekystalické (amorfní) oblasti degradují první. Pokud se amorfní řetězce vážou dohromady s krystalitami, když jsou hydrolyzovány, zahrnují rozsáhlé mechanické selhání dokonce ještě před ztrátou hmotnosti. V knize [10] je uvedeno, že během hydrolytického testování semikrystalického kopolyesteru chirurgické nitě byla pouze 1,7% ztráta hmotnosti na 66,1% ztráty pevnosti. [10, kap. 2]

Adsorpce a stupeň hydrolytické reakce je ovlivněna fyzikálně chemickými vlastnostmi polymeru jako je molekulová hmotnost, chemické složení (kompozice), krystalinita a také plocha povrchu. Co se týká enzymatické hydrolýzy, tak záleží na specifickém enzymu, jeho aktivitě, stabilitě, koncentraci, kompozici (složení) aminokyselin a na 3D struktuře. V úvahu je třeba brát i podmínky média, kterému je substát vystaven, hlavně pH nebo teplota mají vliv na vlastnosti substrátu a enzymu. [8]

Ve zdroji [10, str. 18] popisují, že výzkum semikrystalického polykaprolaktonu (PCL) potvrdil, že morfologie ovlivňuje degradaci. Po hydrolytickém ataku byla čistě viditelná morfologie sférolitu (kulovitěho útvaru), vzhledem k tomu, že amorfní oblasti jsou prioritně degradovány. Dále hydrolytické studie kopolymerů laktidu a glykolidu (z aj. glycolide) ukazují, že amorfní oblasti jsou také prioritně vyleptány, stejně tak jako v případě PCL. [10]

Komplex chemicky přírodních tělních tekutin a zanícených tkání v okolí implantátu, který může být z různých polymerních materiálů, je doprovázen kolísáním biologických substrátů (tj. stupeň látkové výměny příjemce implantátu), způsobuje celkovou degradaci biomateriálů. První interakcí mezi implantovaným biomateriálem a tkání příjemce je adsorpce proteinů. Posloupnost interakcí je závislá na absorpci přírodních proteinů. Krevní plazma obsahuje přes 150 proteinů a každý z nich se může absorbovat do biomateriálu. Záleží to na schopnosti vázání jednotlivých proteinů. Proteiny se mohou adsorbovat na povrch biomateriálu s nízkou afinitou a mohou být přemístěny jinými proteiny s vyšší vazební afinitou. Na nános proteinů na povrchu biomateriálů následně přilnou buňky běžného typu. Adsorpce ostatních proteinů na povrch polymeru může ovlivnit enzymatickou degradaci biomateriálů. [8]

Sít'ované polymery a jejich degradace

Pokud jsou zesít'ované polymery s nižší krystalinitou, tak by měly degradovat rychleji než lineární polymery. V tomto případě ale neplatí, že by byly všechny vlivy stejné, záleží na chemickém složení materiálu. [10]

Jak již bylo zmíněno, u lineárních polymerů je výsledkem jedné hydrolýzy rozbití jednoho řetězce do dvou řetězců (viz.: degradační mechanismy, obr. 7). [9,10]. Výsledkem jedné hydrolýzy u zesít'ovaného systému (řetězce, sít'ky) není proces formování do dvou nových řetězců. S náhodným zesít'ováním mřížkové struktury se více postupně ztrácí hmotnost bez katastrofického zničení. Jestliže jsou přítomny enzymy, šíření potenciálních degradantů pevně zesít'ovanou mřížkou (sítí) bude klesat. Tzn.: že degradace bude omezena povrchem. Snížením difuze bude také vzrůstat u zesít'ovaných systémů odolnost vůči hydrolýze. Zesít'ování také zbaví pohyblivosti segmenty, kterým nedovolí potřebné utváření pro navázání enzymu. [10]

Chemická modifikace polymerů (odstranění nebo přidání chemických skupin do polymerního řetězce) ovlivňuje stupeň enzymatické degradace. Záleží také na stupni chemické modifikace, protože může ohrozit schopnost enzymu rozpoznat upravený substrát. [8]

Dřívější studie opakujících se kolagenových trubiček s glutaraldehydem vytvořily kovalentní příčné vazby přidávající strukturální a funkční stabilitu a vzrůstající dobu zdržení in vivo. V některých případech může zesít'ování zvyšovat degradaci. Dickenson a spol. pracují na vivo a vitro degradaci hydrogelů z poly(α -amino kyselin), které slouží k zesílení závislosti degradace na mnoha faktorech. Jako prostředek k zesít'ování byl použit dodekan diamine (z aj. dodecane diamine), kde bylo předpokládáno, že dojde ke zvýšení hydrofobity a k podpoření rozptylu lypophilických enzymů, které přispívají k degradaci. [10]

Autor v [10, str. 19] popisuje zkušenosti s PCL, kde bylo PCL vytvrzeno společně s benzoylperoxidem a formováno do sít'ové struktury. Degradace byla v tomto případě nepřímo úměrná hustotě příčných vazeb mezi řetězci (zesít'ování). Po degradaci způsobenou *Cryptococcus laurentii* byl povrch PCL vysoce porózní a struktura pěnová až houbovitá. Po stejném procesu degradace nezesít'ovaného PCL se dle autora ukázaly zbylé krystalické sférolity. Jeden test zesít'ovaného vzorku vypadal porózně, ale udržel

původní rozměry, přestože ztratil 70% hmotnosti. Vyplývající porózní struktura je po degradaci žádanou vlastností, jelikož se ukázalo, že stimuluje růst nové tkáně. [10] Materiály, které jsou vyrobeny z lineárních polymerů, záměrně obsahují odstranitelné uzavřeniny (dutinky), které zanechávají porózní strukturu. [10]

Mnoho okolností může mít vliv na biodegradaci polyesterů „in vitro“. Mezi ně patří již zmíněné pH, iontová síla média a enzymatická aktivita. Ponořením vzorku do fosfátového ochranného fyziologického roztoku (PBS) nebo rovnocenného roztoku pufru o pH 7,4 při 37°C je běžně užívanou metodou „in vitro“ k určení degradace polymeru. Při testování degradace in vivo se kus vzorku jednoduše vkládá do podkoží malého zvířete, tím může být myš nebo potkan. [4]

11. Degradace polymerů, analýza

Životnost polymeru není závislá pouze na oslabení (nedostatečném) spojení uvnitř materiálu, ale také na jeho okolí. K určení upotřebitelnosti a životnosti polymerů v rozdílných aplikacích musí být degradace pozorně monitorována. Když okolní prostředí zvyšuje svůj podíl na degradaci, jsou na místě nové požadavky pro předpověď dlouho – trvajících vlastností, jak přírodních, tak syntetických polymerů. Když jsou polymerní materiály vystaveny souboru prostředí (např. venkovnímu prostředí), můžeme to popsat jako degradaci způsobenou okolním prostředím. Degradace okolním prostředím nastává v důsledku vlivů oxidace účinkem světla, tepla, vlhkosti a eroze způsobenou počasím a chemickou aktivitou v důsledku vlivů škodlivin (imise) a mikro a makroorganismů. [10]

Aby bylo možné předvídat náchylnost polymerů k degradaci, je třeba používat osvědčené (spolehlivé) techniky. Analýza by měla být schopná zaznamenat chemické, fyzikální a mechanické změny, které byly způsobeny během procesu. Testy degradace mohou být dlouho trvající, ale obvykle jsou vhodnější zrychlené testy. Je také důležité monitorovat, jak přísady (přídavné látky) pronikají nebo se stěhují (migrují) v pořadí, které souvisí s formováním degradačních produktů v závislosti na degradačním stupni. [10] Všechny organické polymery jsou v podstatě rozložitelné, lišící se pouze v degradačním režimu a čase rozkladu. V důsledku zvýšeného zájmu o životní prostředí rostou i požadavky pro nové materiály, aby zatěžování okolního prostředí bylo co

nejmenší. Častěji je požadován nový koncept schopnosti degradace nových polymerních materiálů (hlavně v oblasti recyklace, např. obaly apod.).

Bylo navrženo několik zajímavých řešení, aby polyetylen degradoval rychleji. Běžné výrobky se v životním prostředí rozloží během 25-50 let. Začleněním chromoforických skupin se může rozložitelnost urychlit, zvýší se citlivost polyetylenu k světelné oxidaci. Také je známo, že se biopolymery obvykle rozkládají rychleji mikrobiologickou aktivitou. V záměru produkce rozložitelného polyetylenu vede mikrobiologická aktivita k zemědělským výrobkům jako jsou aditiva pro syntetické polymery. V [10] uvádějí, že nejběžněji používaný biopolymer v tomto kontextu je škrob. [10]

11.1 Změny molekulové hmotnosti

Mezi rozmanité metody k detekci chemických změn hrají významnou roli ty, které jsou založeny na molekulové hmotnosti, pokud jde o lineární polymery (tzn., že nejsou zesíťované). V případě náhodného rozštěpení hlavního řetězce, pokud je počáteční molekulová hmotnost dostatečně vysoká, přináší významné změny v průměrné molekulové hmotnosti dokonce i malá přeměna. To samé platí pro mezimolekulové zesíťování, např.: proces se děje v mnoha případech, kde jsou formovány boční makroradikály.

Stanovení molekulové hmotnosti je uskutečnitelné, nicméně je dosti častěji přednější evidovat chemické reakce v hlavních řetězcích nebo ve vedlejších skupinách lineárních polymerů a objasnit reakční mechanismy. Mezi důležité vlastnosti, které charakterizují polymer, patří molekulová hmotnost nebo rozvržení molekulové hmotnosti (z angličtiny Molecular weight-distribution, MWD), jelikož se syntetické polymery obvykle skládají ze směsi chemicky stejných makromolekul rozdílné velikosti. Často je rozvržení molekulové hmotnosti (MWD) změněno na zesíťování nebo roztržení hlavního řetězce. V této souvislosti je důležité si všimnout, že určení rozvržení molekulové hmotnosti (MWD) může být vyneseno hned pomocí gelové chromatografie. [7]

11.2 Analýza a charakteristika polymeru

Mezi chemické, mechanické a fyzikální analýzy, které dávají informace o funkční skupině změn během degradace patří: Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) – experimentální spektroskopická technika, X– Ray diffraction (XRD), vlastnosti: síla – napětí měřitelné Instronem nebo dynamicko – mechanické analýzy (DMA) a teplotní vlastnosti jako je T_g , stupeň krystalinity – pomocí diferenční kompenzační kalorimetrie (měření tepla) – Differential Scanning Calorimetry (DSC). Morfologii lze studovat pod elektronovým mikroskopem (SEM) a přenosovým elektronovým mikroskopem Transmission Elektron Microscopy (TEM).

Gelová chromatografie – Size Exclusion Chromatography (SEC), hmotnostní spektrometrie – Matrix – Assisted Laser Desorption/ Ionisation (MALDI) a formování směsí nízké molekulové hmotnosti, plynová chromatografie- Gas Chromatography (GC), kapalná chromatografie- Liquid chromatography (LC) a plynová chromatografie (GC) spojená s hmotnostní spektrometrií- Mass Spectrometry (MS) jsou metody k získávání výsledků, které se týkají změn v polymerních řetězcích jako molekulové hmotnosti. [10]

U degradace, která je způsobena hydrolýzou (chemicky a/nebo biologicky) je zaznamenán hlavně hmotnostní úbytek. Jestliže se spárují data hmotnostního úbytku s gelovou chromatografií, tak je možné rozlišovat mezi povrchovou erozí doprovázenou podstatným úbytkem váhy (toto bylo zpozorováno u biologicky hydrolyzovaného PCL) a náhodným rozštěpením řetězce s malou povrchovou erozí a menším úbytkem váhy.

Užitečné jsou také změny krystalinity a morfologie, hodnoty teploty tání (T_m) a teploty zesklňování (T_g) při popisování změn dlouho trvajících vlastností. [10]

12. Vliv sterilizování gama zářením na polycaprolacton (PCL)

Ve svém článku autoři Cottam, Hukings, Lee, Hewwit a Jenkins popisují vliv sterilizace gama zářením dávkou 2,5 Mrad (25kGY) na tyto následující vlastnosti:

- 1) Stupeň degradace
- 2) Mechanické vlastnosti
- 3) Schopnost buněk se připojit a následně na povrchu růst

Standardní dávkou pro sterilizaci gama zářením je 2,5 Mrad. Gelová chromatografie (GPC) byla použita k zaznamenání vlivu gama záření na průměrnou hmotnost a průměrnou molekulovou hmotnost. Bylo zjištěno, že se gama zářením významně snížil stupeň degradace polymeru. Dále byl také ovlivněn vzhled vzorků podléhajících degradaci, jestliže máme možnost sledovat vzorky pod elektronovým mikroskopem. V odborném článku [1] bylo také uvedeno, že dávkou záření značně vzrůstá mez průtažnosti. Jinak připojení zralé buňky a její následný růst na polykaprolakton nebyl nijak zásadně gama zářením ovlivněn. [1]

Jako běžná technika sterilizace polymerních implantátů se používá gama záření, je vhodnou metodou pro mnoho implantátů z PCL. Protože se tkáňové inženýrství vyvíjí jako praktický léčebný proces, např.: pro chirurgické opravení tkáně, je zapotřebí sterilizovat scaffoldy metodami, které se konvenčně používají pro jiné implantáty. Jelikož běžně používané scaffoldy mají většinou porózní strukturu, je nutné, aby sterilizace pronikla materiálem bez zanechání zbytkového množství. Je to vhodné hlavně při nasazování buněk, aby nebyla ovlivněna jejich schopnost přichycení a růstu. Gama záření je vysoce razantní a zatím dle článku [1] není známo, jestli má vliv na přichycení a růst buněk na povrchu PCL.

13. Metody testování degradace

V článku autoři Cottam, Hukings, Lee, Hewwit a Jenkins popisují, že použili PCL ve formě peletek, ze kterých připravili filmy o průměru 20 mm a tloušťce 0,5 - 1,5 mm. Ke sterilizaci použili gama záření o velikosti 30,8 kGy. Při testování degradace použili celkem 16 disků o velikosti 10 mm a tloušťce 0,5 mm, z toho byla polovina (8 disků) ozářených. Bylo třeba urychlit degradaci PCL za účelem dokončit experimenty v rozumném čase, protože PCL může znatelně degradovat během 2 let. Získali ztrátu hmotnosti v průměru 1% z PCL disků v PBS (phosphate buffered saline) během 13 měsíců. Za tímto účelem použili katalyzátor lipázu *Pseudomonas cepacia* 7 mg/ml, ale neudávali koncentraci. Pro vzorek použili 5 ml tohoto roztoku do každé ze 16 zkumavek. Před samotným testováním byla zaznamenána váha každého vzorku (v mezích 0,001 g). Každý vzorek byl vložen do zkumavky s roztokem. Zkumavky byly označeny, utěsněny a umístěny do vodní lázně o 37 °C. Dále byly vzorky odstraněny,

usušeny papírovým ručníkem (dokud nezůstala hmotnost konstantní) a váženy po 1, 2, 4, 7 a 24 hodinách, dokud nebyla hmotnost vzorků konstantní. [1]

Praktická část:

V této praktické části experimentu budeme provádět testování vzorků PCL, PLLA a PLC za použití lipázy, protézy v různých časových úsecích s průběžným vyhodnocováním výsledků testování.

Materiál:

Seznam chemikálií

Systematický název	Sumární vzorec	Molární hmotnost g/mol	Výrobce
Chlorid draselný	KCl	74,56	Analytika, spol. s.r.o., ČR
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	358,14	Analytika, spol. s.r.o., ČR
Chlorid sodný	NaCl	58,44	Analytika, spol. s.r.o., ČR
Dihydrogenfosforečnan draselný	KH ₂ PO ₄	136,09	Analytika, spol. s.r.o., ČR
Destilovaná voda	dH ₂ O	–	–
Azid sodný	N ₃ Na	65,01	Sigma – Aldrich, Německo
Kyselina chlorovodíková	HCl	36,46	–
Pufr pH 4.01; 7.00; 10.01	–	–	Hamilton Bonaduz AG, Švýcarsko
2–Amino–2–hydroxymethy l–propan–1,3–diol	C ₄ H ₁₁ NO ₃	121,14	Sigma – Aldrich

Enzymy:

Seznam enzymů	Výrobce a koncentrace
Lipáza z <i>Pseudomonas cepacia</i>	(Sigma Aldrich 62309 \geq 30U/mg)
Proteináza K	Sigma Aldrich; \geq 30U/mg

Roztoky:

Pufr PBS (Phosphate buffer solution):

dH ₂ O	800 ml
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ ; 12H ₂ O (n=141,96 g/mol)	3,63 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g

pH bylo upraveno roztokem HCl na hodnotu 7,4 a poté byl roztok doplněn vodou do objemu 1000 ml. Nakonec jsme přidali 0,2 g NaN₃, aby celkový roztok PBS obsahoval 0,02% NaN₃.

Tris pufr:

dH ₂ O	800 ml
TRIS	12,14 g

pH bylo upraveno kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu 8. Poté se přidalo 0,2 g NaN₃, aby roztok obsahoval 0,02 % azidu sodného. Poté se pufr doplnil do 1000 ml.

Přístroje:

Seznam přístrojů a vybavení	
Zlatící přístroj	Quorum Q 150 R ES
Elektronový mikroskop	TESCAN VEGA 3 _{SEM}
Elektronový mikroskop	PHENOM FEI COMPANY
Analytické váhy	ATILON; ACCULAB SARTORIUS GROUP max. 120 g, d= 0,1 mg
Software	NIS Elements AR 4.30.00

Další vybavení:

Lednička, mraznička, pH metr, pipety, zkumavky o objemu 15 ml s víčkem, mikrozukavky o objemu 1,5 ml, pinzeta, nůžky, parafilm, 12 – ti jamková kultivační deska, laboratorní termostat

14. Popis experimentu: Testování degradace PCL pomocí lipázy

K dispozici jsme měli nanovláknový materiál o molekulové hmotnosti 45 tis., vyrobený na průmyslovém stroji Nanospider NS 1WS500U od firmy Elmarco.

Na základě zadání této práce a prostudování souvisejících článků jsme se rozhodli otestovat nanovláknový materiál PCL, který byl různě sterilizován. A to těmito způsoby: gama zářením – různými dávkami – 20, 30 a 40 kGY, ethylenoxidem, ale také nesterilizovaný PCL materiál. Radiační sterilizace proběhla ve Veverské Bítýšce, Bioster, a.s., Česká republika.

Příprava vzorků

Z tohoto připraveného materiálu- polykaprolaktanu (nesterilizovaného PCL, ozářeného gama zářením – 20, 30 a 40 kGY a ošetřeného ethylenoxidem) jsme nastříhali pět druhů vzorků nanovláknových vrstev o velikosti 2 x 2,5 cm po 16-ti kusech (z toho 8 pro lipázu a 8 pro negativní kontrolu). Poté jsme jednotlivé vzorky zvážili na analytických vahách a vložili do mikrozukavek o objemu 1,5 ml.

Testování:

K dispozici jsme měli lipázu z *Pseudomonas cepacia* (Sigma Aldrich 62309 \geq 30U/mg). Pro první experiment jsme dle výsledků prostudované literatury zvolili koncentraci lipázy 8U/ml PBS pH 7,4. Rozpis přípravy PBS pH 7,4 je uveden v roztocích. Do každé mikrozukavky s patřičným vzorkem jsme napipetovali 1,5 ml PBS pH 7,4 s příslušnou koncentrací lipázy (8U/ml) a 1,5 ml PBS pH 7,4 jako negativní kontrolu. Poté jsme vzorky vložili do termostatu na 37 °C. Každý den (po 24 hodinách) jsme vyjmuli od každého materiálu 1 vzorek z PBS pH 7,4 s lipázou a jeden vzorek (pouze v PBS pH 7,4) pro negativní kontrolu. Dále jsme je propláchli destilovanou vodou a vložili je do jednotlivých jamek destičky. Vzorky jsme nechali uschnout v termostatu při 37°C dokud jejich hmotnost nebyla konstantní. U všech ostatních

mikrozkumavek jsme vyměnili roztok PBS pH 7,4 s lipázou a opět nechali inkubovat v termostatu při 37 °C. Při sušení vzorků nastal problém s jejich přichycením k destičce. Proto jsme tento problém vyřešili tak, že jsme jednotlivé jamky destičky vyložili parafilmem. V tabulkách jsou zaznamenány naměřené hodnoty jednotlivých vzorků před a po inkubaci v PBS pH 7,4 nebo v PBS pH 7,4 s lipázou. Následuje ukázka tabulek 1 a 2 s naměřenými hodnotami, ostatní viz příloha 1.

PCL- 20 kGy v PBS s lipázou 8U/ml								
Vzorek č.	1	2	3	4	5	6	7	8
Hmotnost [g]	0,0021	0,0018	0,0025	0,0019	0,002	0,002	0,0014	0,0014
Po 1 dni	0,0019							
Po 2 dnech		0,002						
Po 3 dnech			0,0016					
Po 4 dnech				0,0018				
Po 5 dnech					0,002			
Po 6 dnech						0,0018		
Po 7 dnech							0,0014	
Po 8 dnech								0,0007

Tabulka 1: Naměřené hmotnosti jednotlivých vzorků PCL 20 kGY před a po působení PBS pH 7,4 s lipázou 8U/ml [g]

PCL- 20 kGy v PBS pH 7,4 (negativní kontrola)								
Vzorek č.	1	2	3	4	5	6	7	8
Hmotnost [g]	0,0018	0,0019	0,0018	0,0019	0,0019	0,0015	0,0014	0,0014
Po 1 dni	0,0018							
Po 2 dnech		0,0013						
Po 3 dnech			0,0017					
Po 4 dnech				0,0019				
Po 5 dnech					0,0019			
Po 6 dnech						0,0015		
Po 7 dnech							0,0011	
Po 8 dnech								0,0011

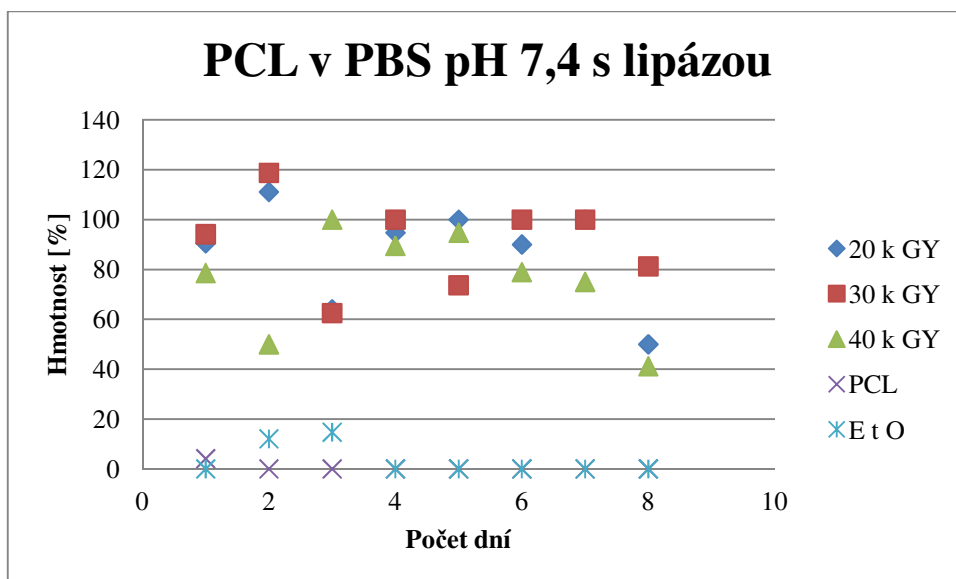
Tabulka 2: Naměřené hmotnosti jednotlivých vzorků PCL 20 kGY před a po působení pufru PBS pH 7,4 [g]

14.1 Vyhodnocení:

Data jsou dále zpracována jako hmotnost jednotlivých vzorků různě sterilizovaných a také nesterilizovaného PCL v procentech po působení lipázy 8U/ml v PBS pH 7,4 o objemu 1,5 ml po inkubaci v 37°C, viz Tab.: 3. Následně jsou data vložena do grafu, viz Graf 1. Z tabulky 3 je zřejmé, že nesterilizované PCL se po 2 dnech v PBS pH 7,4 při působení lipázy rozložilo úplně. Některé vzorky sterilizované ethylenoxidem byly rozloženy již po prvním dni, ale některé nebyly zcela rozloženy ani po třech dnech. Zajímavým a zcela překvapivým výsledkem bylo, že PCL ošetřený γ zářením (různými dávkami) se během osmi testovacích dní působení lipázy 8U/ml v PBS pH 7,4 o objemu 1,5 ml úplně nerozložil. Tento výsledek experimentu potvrzuje teorii, že při ošetření PCL gama zářením dochází jednoznačně k jeho zesíťování. Zvýšení hmotnosti některých vzorků mohlo být způsobeno ulpěním solí z pufru PBS na jejich povrchu z důvodu jejich malé hmotnosti, ale také jejich zesíťováním a možným nabobtnáním.

Hmotnost [%]	20 k GY	30 k GY	40 k GY	PCL	E t O
Po 1 dni	90,48	94,12	78,58	4,11	0
Po 2 dnech	111,11	118,75	50	0	12,07
Po 3 dnech	64	62,5	100	0	14,71
Po 4 dnech	94,74	100	89,47	0	0
Po 5 dnech	100	73,68	94,74	0	0
Po 6 dnech	90	100	78,95	0	0
Po 7 dnech	100	100	75	0	0
Po 8 dnech	50	81,25	41,18	0	0

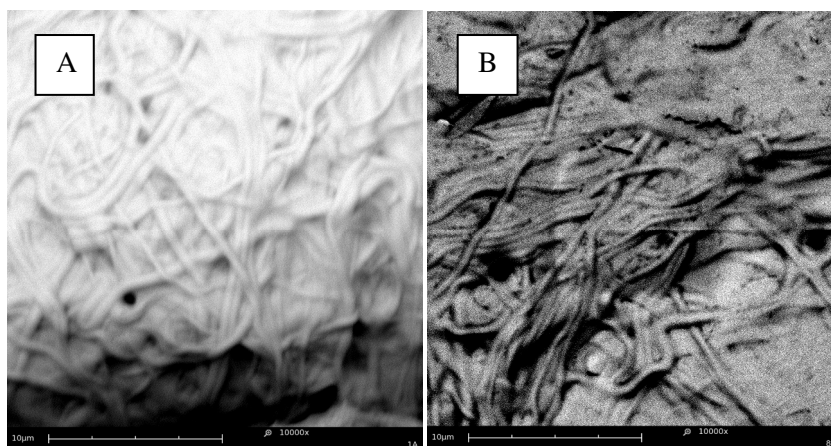
Tab. 3: Hmotnosti jednotlivých vzorků PCL v [%] (20 kGY, 30 kGY, 40kGY, EtO a bez sterilizace) po působení lipázy 8U/ml v PBS pH 7,4 při 37 °C



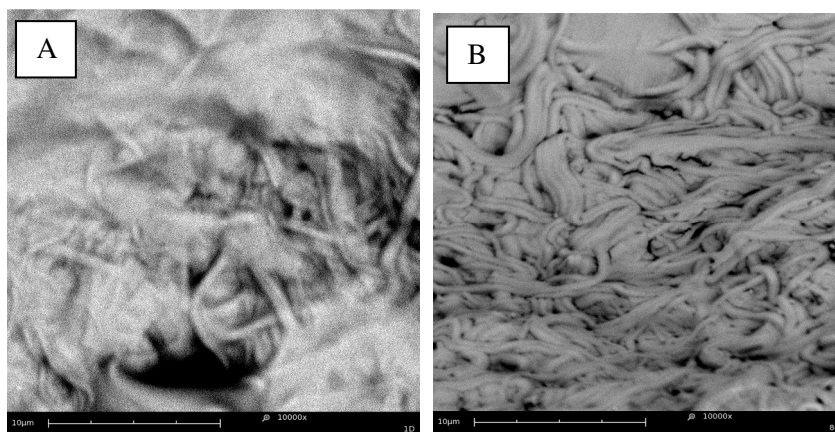
Graf 1: Naměřené hmotnosti vzorků PCL (20 kGY, 30 kGY, 40kGY, EtO a bez sterilizace) po působení lipázy 8U/ml v PBS pH 7,4 při 37 °C; po usušení v termostatu na 37 °C dokud hmotnost jednotlivých vzorků nebyla konstantní

Snímky z elektronového mikroskopu (SEM)

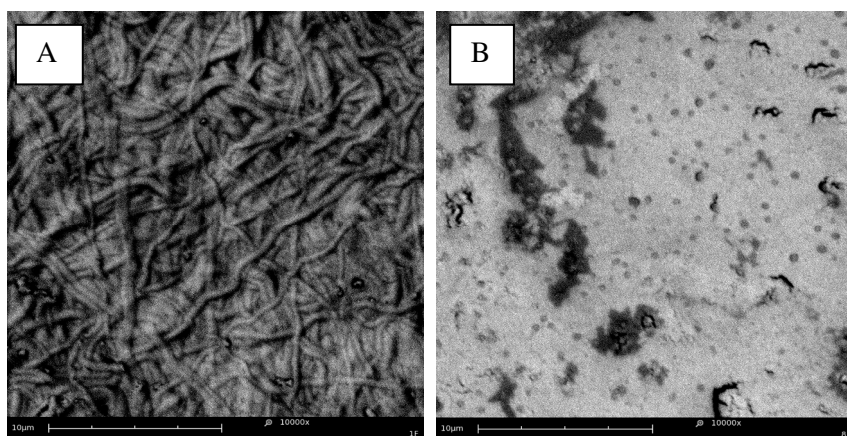
Z jednotlivých testovaných vzorků, které jsme zvažili po degradaci, jsme nastříhali vzorky pro elektronovou mikroskopii. Nalepili jsme je na terčíky a vložili do naprašovačky kovů, kde se vzorek potáhl vrstvou zlata o tloušťce 7 nm. Takto připravené terčíky jsme poté vložili do elektronového mikroskopu a pozorovali jsme změny nanovlákněné struktury.



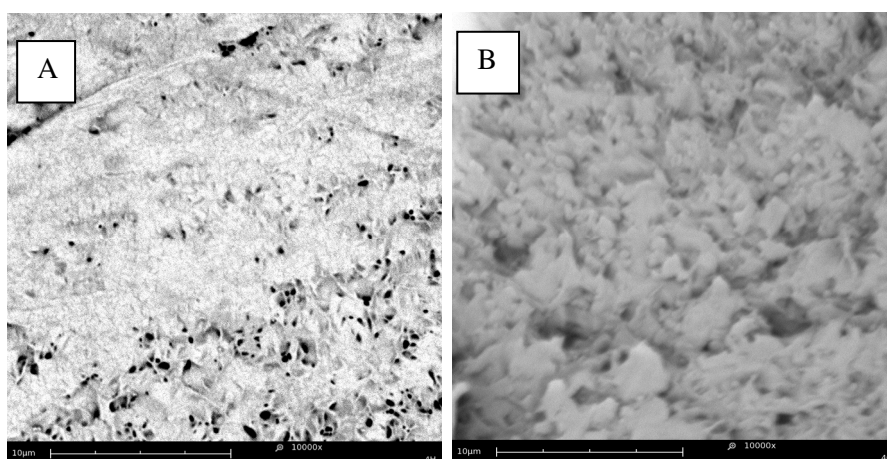
Obr.: 9 A: PCL - 20 kGY v PBS s lipázou o koncentraci 8U/ml po 1 dni; B: PCL - 20 kGY v PBS s lipázou o koncentraci 8U/ml po 8 dnech, zvětšení 10000x, měřítko 10 μ m



Obr.: 10 A: PCL - 30 kGY v PBS s lipázou o koncentraci 8U/ml po 1 dni, B: po 8 dnech, zvětšení 10000x, měřítko 10 μ m



Obr.: 11 A: PCL - 40 kGY v PBS s lipázou o koncentraci 8U/ml po 1 dni, B: po 8 dnech, zvětšení 10000x, měřítko 10 μ m



Obr.:12 A: PCL - EtO v PBS po 4 dnech, B: PCL - EtO v PBS po 4 dnech s lipázou o koncentraci 8U/ml, zvětšení 10000x, měřítko 10 μ m

Na obrázcích 11, 12, 13 a 14 z elektronového mikroskopu můžeme pozorovat, že u polykaprolaktanu sterilizovaného gama zářením různými dávkami nedochází v průběhu testování k žádným viditelným změnám. U polykaprolaktanu sterilizovaného ethylenoxidem docházelo postupně k degradaci, viz Obr. 12, kde 12 A je negativní kontrola PCL - EtO v PBS po 4 dnech a 12 B je PCL - EtO v PBS s lipázou o koncentraci 8U/ml. Na obrázku můžeme ale pozorovat i změny nanovlákněné vrstvy ke kterým došlo pravděpodobně už během sterilizace. Další snímky z el. mikroskopu (SEM) pro experimentální část č. 1 jsou k dispozici v příloze 2.

15. Popis experimentu:

Testování degradace pomocí lipázy

Z předchozího experimentu jsme zjistili, že by bylo dobré zvýšit hmotnost jednotlivých vzorků. V programu NIS Elements AR 4.30.00 jsme změřili tloušťku vláken a poróznost každého materiálu na několika snímcích z elektronového mikroskopu. Níže jsou vypracované charakteristiky materiálů a postup jejich degradace.

Příprava vzorků pro testování degradace

Nejdříve jsme nastříhali vzorky o velikosti 5 x 3 cm o hmotnosti přesně asi 50 mg. Jednotlivé vzorky jsme zvážili na analytických vahách, zaznamenali jejich hmotnost do tabulky a vložili do zkumavek o objemu 15 ml. Pro každý materiál jsme připravili 7 vzorků, pro sedm testovacích dní a dvě negativní kontroly (pro první a poslední den testování). Dále jsme připravili množství pufru PBS pH 7,4 podle potřeby.

Charakteristika jednotlivých materiálů a jejich degradace

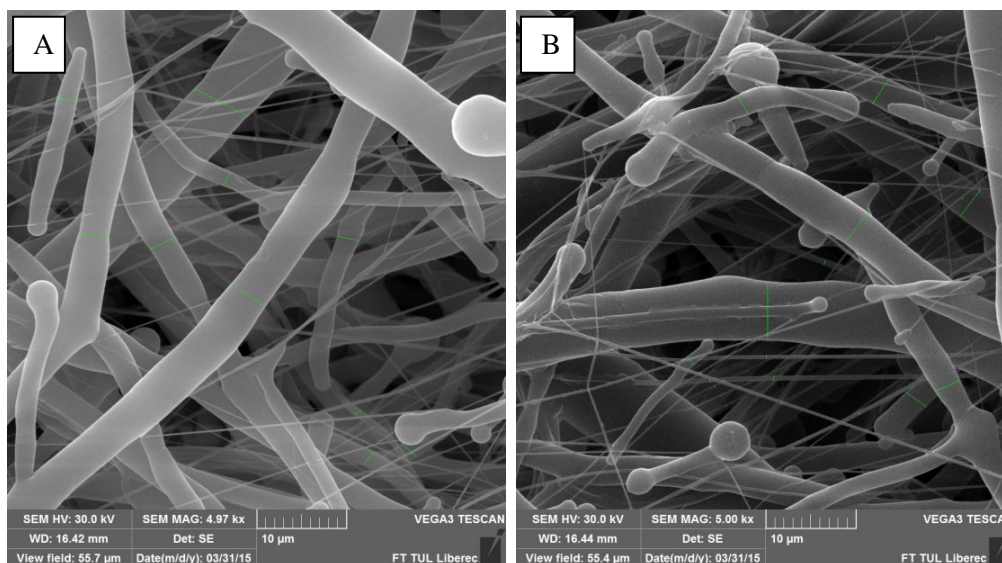
a) Polykaprolakton (PCL)

Byl zde použit nanovlákněný materiál PCL (polymer od firmy Sigma Aldrich o mol. hmotnosti 45 tis.), vyrobený na Nanospideru NS 1WS500U od firmy Elmarco, rozpouštědlo chloroform, etanol v poměru 9:1 při odtahu 15 mm/min.; 16% podíl polymeru.

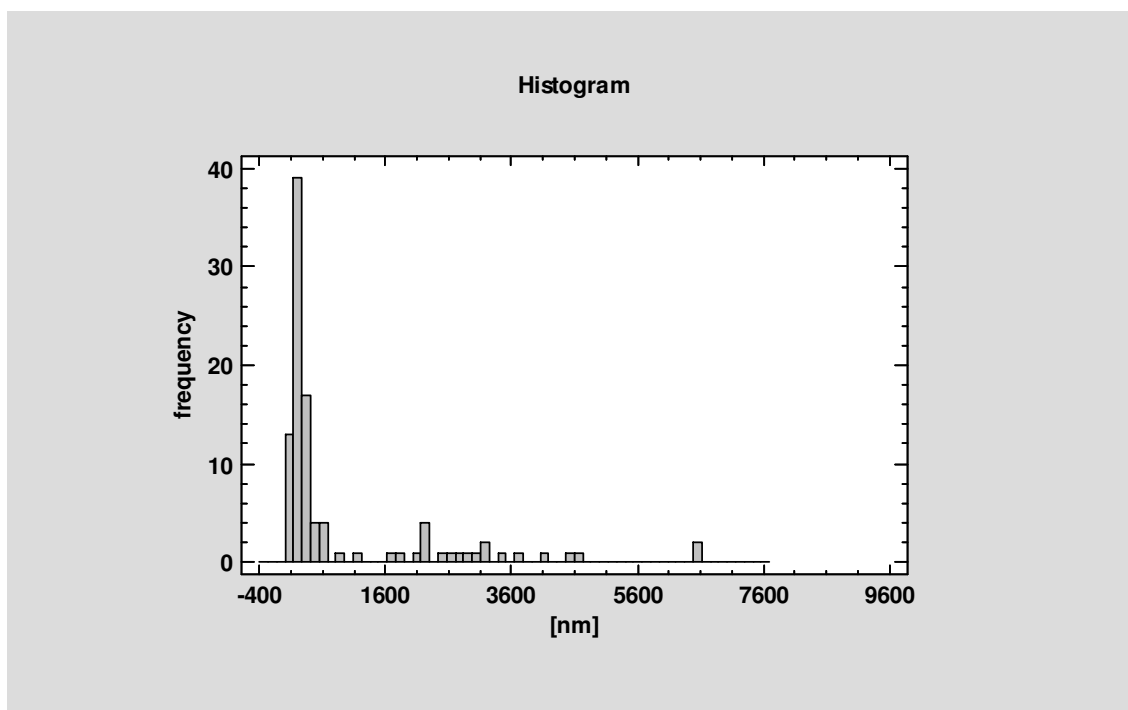
V programu NIS Elements AR 4.30.00 jsme změřili tloušťku 100 vláken jednotlivých materiálů na několika smímcích.

Charakteristika Polykaprolaktonu PCL:

Průběh měření tloušťky vláken lze vidět na Obr. 13 Měření tloušťky vláken v programu NIS Elements. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v příloze 3 i s jejich roztríděním do jednotlivých tříd a souhrnou charakteristikou. Dále z těchto dat je vytvořen histogram průměru vláken testovaného PCL [nm], viz Histogram 1. Z histogramu 1 je zřejmé, že se nejvíce vláken vyskytuje v rozmezí 150 – 300 [nm]. V programu NIS Elements AR 4.30.00 byla změřena průměrná plocha póru ($3,6626 \mu\text{m}^2 \pm 6,7 \mu\text{m}^2$) a plošná poróznost $\psi = 0,18$, kde $\psi = S_p/S_c$. S_p je součet ploch pórů a S_c je celková plocha. Průměrnou tloušťku PCL nanovláken jsme stanovili pomocí programu NIS Elements AR 4.30.00 na hodnotu ($895,58 \pm 1374,02$) nm.



Obr. 13: A, B: Měření tloušťky vláken PCL v programu NIS Elements



Histogram 1: Histogram průměru vláken testovaného PCL [nm]

Testování degradace PCL 10 U/ml :

Na výše popsaném a charakterizovaném nanovlákněném materiálu PCL jsme testovali degradaci lipázou *Pseudomonas cepacia* o zvolené koncentraci 10U/ml a 1U/ml. K dispozici jsme měli lipázu (Sigma Aldrich 62309 \geq 30U/mg). Vzorky nastříhaného nanovlákněného materiálu byly o hmotnosti přesně asi 50 mg a o velikosti 5 x 3 cm. Do každé zkumavky s patřičným vzorkem jsme pipetovali 5 ml PBS (pH 7,4) s příslušnou koncentrací lipázy (10 U/ml) a 5 ml PBS (pH 7,4) pro negativní kontroly. Poté jsme vzorky vložili do termostatu na 37 °C. Každý den (po 24 hodinách) jsme vyjmuli od každého materiálu 1 vzorek z PBS s lipázou a negativní kontroly po 1. a posledním testovacím dni. Všechny vyjmuté vzorky jsme propláchli destilovanou vodou, vložili do jednotlivých jamek destičky vyložené parafilmem a nechali usnout v termostatu při 37°C. U všech ostatních zkumavek jsme vyměnili roztok PBS s lipázou a opět nechali inkubovat v termostatu při 37 °C. V tabulce 4 jsou zaznamenány průměrné hodnoty jednotlivých vzorků před a po inkubaci v PBS pH 7,4 nebo v PBS pH 7,4 s lipázou (10 U/ml), konkrétní naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulkách v příloze 4. V tabulce 5 je uvedena hmotnost v [%] po působení lipázy 10 U/ml a

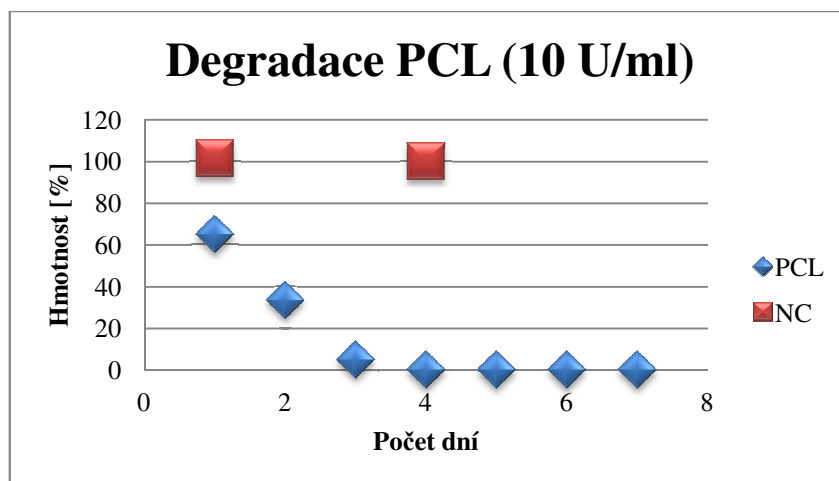
zpracovaná do grafu, viz Graf 2: Hmotnost PCL [%] po působení lipázy Pseudom. sepacia.

Vzorek	Hmotnosti PCL vzorků před působením lipázy (10U/ml)	Hmotnosti PCL vzorků po působení lipázy (10U/ml)	
	Průměrná hmotnost [g]		Průměrná hmotnost [g]
1	0,05558	po 1 dni	0,03606
2	0,05164	po 2 dnech	0,01724
3	0,05078	Po 3 dnech	0,00248
4	0,04896	Po 4 dnech	0
5	0,05754	Po 5 dnech	0
6	0,05684	Po 6 dnech	0
7	0,04288	Po 7 dnech	0
NC1	0,05482	po 1 dni	0,0555
NC2	0,0541	po 4 dnech	0,05406

Tab.: 4 Průměrné hodnoty jednotlivých vzorků před a po inkubaci v PBS pH 7,4 (NC) nebo v PBS pH 7,4 s lipázou (10 U/ml), kde NC= negativní kontrola

Hmotnost [%]	PCL	NC
Po 1 dni	64,88	101,24
Po 2 dnech	33,38	
Po 3 dnech	4,88	
Po 4 dnech	0	99,92
Po 5 dnech	0	
Po 6 dnech	0	
Po 7 dnech	0	

Tab. 5: Naměřené hmotnosti PCL [%] po působení lipázy Pseudomonas cepacia o koncentraci 10U/ml v 5 ml pufru PBS, NC= negativní kontrola, tj.: naměřené hmotnosti PCL [%] po působení 5 ml pufru PBS

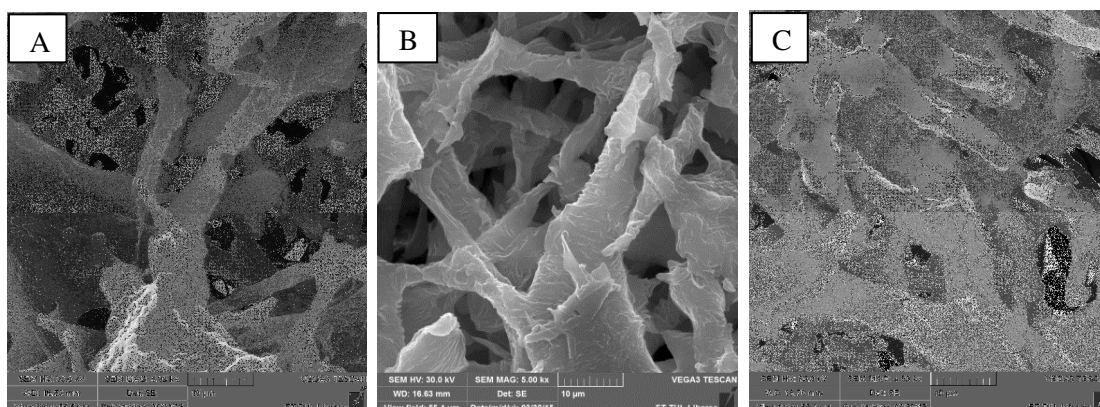


Graf 2: Hmotnost PCL [%] po působení lipázy *Pseudomonas cepacia* o koncentraci 10U/ml v 5 ml pufru PBS, NC = negativní kontrola

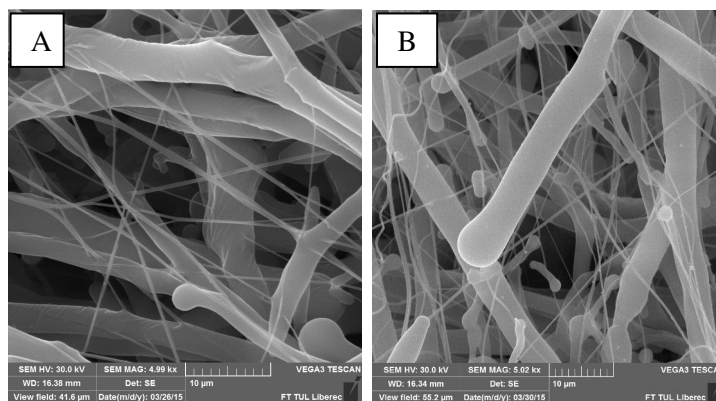
Působením lipázy *Pseudomonas cepacia* o koncentraci 10U/ml, kde v každém vzorku bylo 5 ml PBS s touto zvolenou koncentrací enzymu je možné říci, že na tomto materiálu probíhala degradace relativně rychle. Po 4 dnech enzymatické degradace se testovaný materiál PCL zcela rozložil.

Elektronová mikroskopie (SEM)

Vzorky pro elektronovou mikroskopii SEM byly připraveny podobným způsobem jako u předchozího experimentu. Vzorky byly nastříhány, nalepeny na terčičky a nazlacený 7 nm tenkou vrstvou zlata. Z průběhu degradace je možné vidět na následujících obrázcích snímky z elektronového mikroskopu. Na obr. 14 je možné pozorovat zleva doprava jak se polykaprolakton postupně rozkládal.



Obr.14 : Degradace PCL, A: po 1 dni, B: po 2 dnech a C: po 3 dnech v lipáze *Pseudomonas cepacia* o koncentraci 10 U/ml v pufru PBS 5 ml, zvětšení 5000x, měřítko 10 μ m



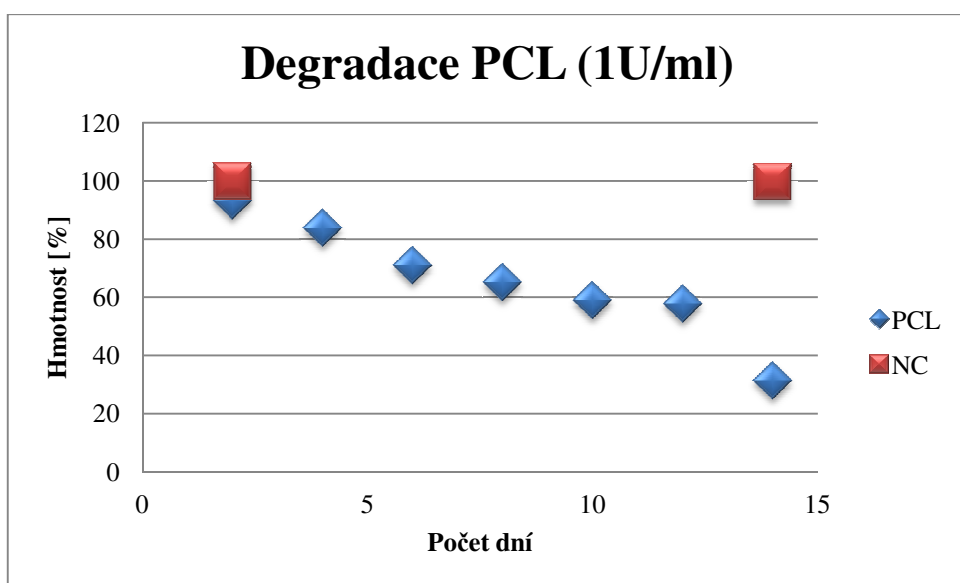
Obr.15 : Negativní kontrola pro degradaci PCL 10U/ml, A: po 1 dni a B: po 4 dnech v 5ml pufru PBS, zvětšení 5000x, měřítko 10 μ m

Testování degradace PCL 1 U/ml :

Stejným způsobem jako předchozí testování degradace PCL 10 U/ml probíhalo testování PCL s 1 U/ml. Do každé zkumavky o objemu 15 ml se vložil vzorek a napipetovalo se k němu 5 ml PBS o koncentraci 1 U/ml lipázy *Pseudomonas cepacia*, pro negativní kontrolu pouze 5 ml pufru PBS. Další postup byl stejný. Následuje tabulka 6 s naměřenými hodnotami PCL před testováním a po testování degradace. Z těchto dat je zpracovaná tabulka 7 s naměřenými hmotnostmi po degradaci v [%]. Dále s tím souvisí graf 3: Hmotnost PCL [%] po působení lipázy *Pseudomonas cepacia* o koncentraci 1U/ml v 5 ml pufru PBS, kde je možné pozorovat jaký vliv má koncentrace enzymu v pufru PBS na tento materiál. Během 14 testovacích dní klesala hmotnost jednotlivých vzorků téměř lineárně a zastavila se na 31%. Aby se nanovláknový materiál PCL zcela rozložil, musel by se experiment naplánovat na delší dobu nebo zvolit vyšší koncentraci lipázy. K úplnému rozložení nanovláknové vrstvy během 14 dní při koncentraci 1U/ml nedošlo. O to postupnější a pomalejší degradace probíhala, právě tento jev lze sledovat na obrázcích 16, 17 a 18 z elektronové mikroskopie SEM.

Hmotnosti PCL vzorků před působením lipázy 1U/ml		Hmotnosti PCL vzorků po působení lipázy 1U/ml	
Vzorek	Průměrná hmotnost [g]		Průměrná hmotnost [g]
1	0,05736	po 2 dnech	0,05338
2	0,05736	po 4 dnech	0,04802
3	0,05274	Po 6 dnech	0,03736
4	0,05732	Po 8 dnech	0,03726
5	0,05682	Po 10 dnech	0,03342
6	0,05626	Po 12 dnech	0,03244
7	0,0553	Po 14 dnech	0,01728
NC1	0,0547	po 2 dnech	0,05456
NC2	0,04716	po 14 dnech	0,04694

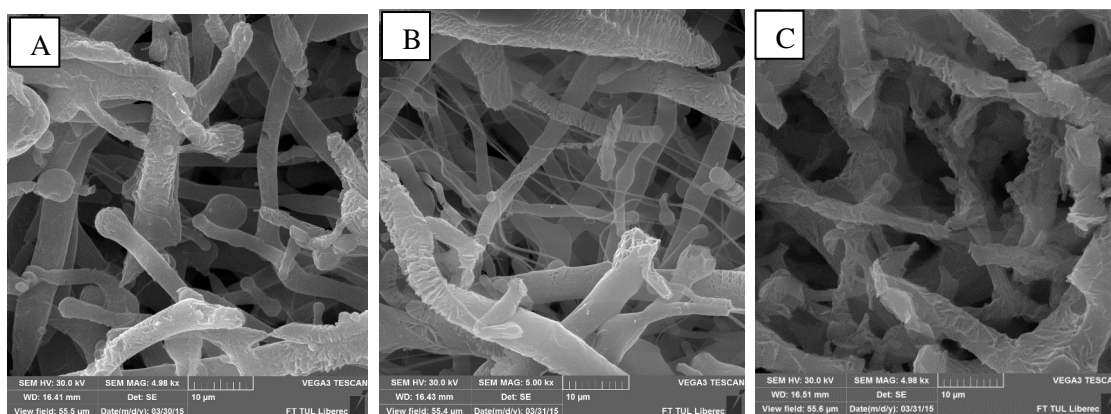
Tab. 6: Průměrné hodnoty jednotlivých vzorků před a po inkubaci v PBS pH 7,4 (NC) nebo v PBS pH 7,4 s lipázou (1 U/ml), kde NC= negativní kontrola



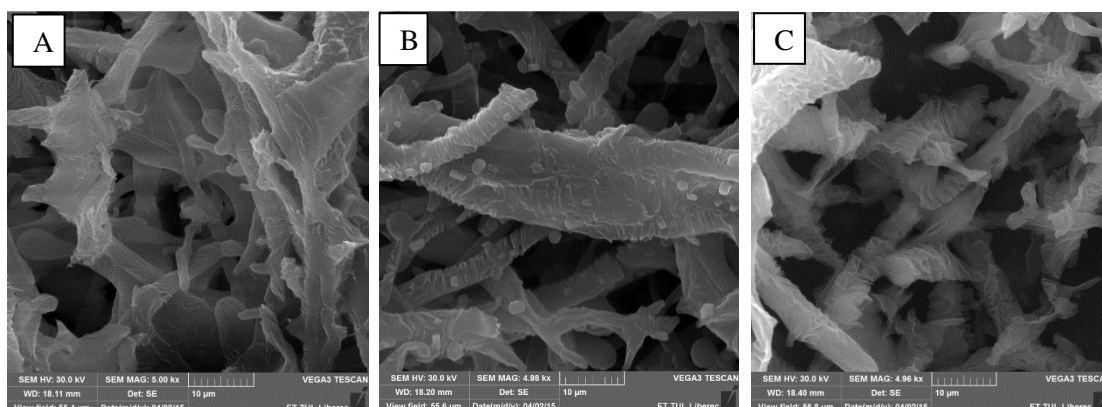
Graf 3: Hmotnost PCL [%] po působení lipázy *Pseudomonas cepacia* o koncentraci 1U/ml v 5 ml pufru PBS, NC = negativní kontrola

Hmotnost [%]	PCL	NC
po 2 dnech	93,06	99,74
po 4 dnech	83,72	
Po 6 dnech	70,84	
Po 8 dnech	65	
Po 10 dnech	58,82	
Po 12 dnech	57,66	
Po 14 dnech	31,24	99,53

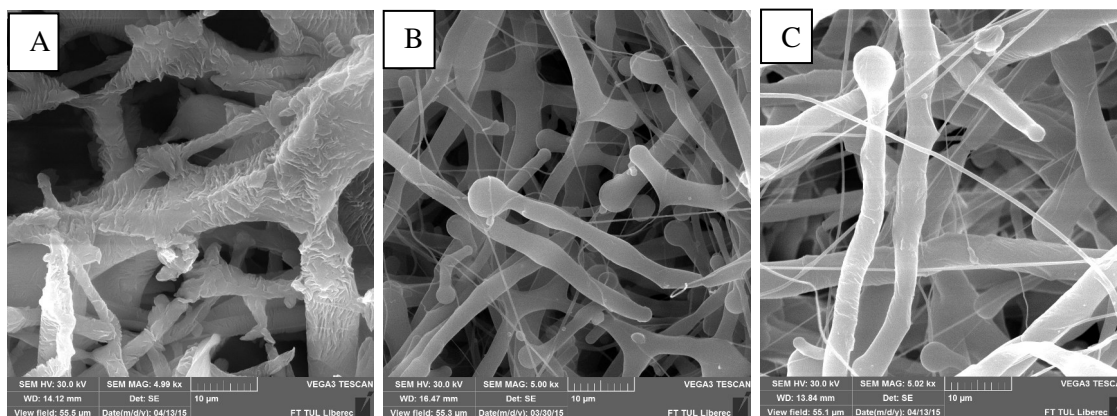
Tab.7: Naměřené hmotnosti PCL [%] po působení lipázy *Pseudomonas cepacia* o koncentraci 1U/ml v 5 ml pufru PBS, NC= negativní kontrola, tj.: naměřené hmotnosti PCL [%] po působení 5 ml pufru PBS



Obr.16 : Nanovláknový materiál PCL po působení lipázy *Pseudomonas cepacia* o koncentraci 1U/ml v 5 ml pufru PBS, A: po 2 dnech, B: po 4 dnech a C: po 6 dnech, zvětšení 5000x, měřítko 10 μm



Obr.17: Nanovláknový materiál PCL po působení lipázy *Pseudomonas cepacia* o koncentraci 1U/ml v 5 ml pufru PBS, A: po 8 dnech, B: po 10 dnech a C: po 12 dnech, zvětšení 5000x, měřítko 10 μm

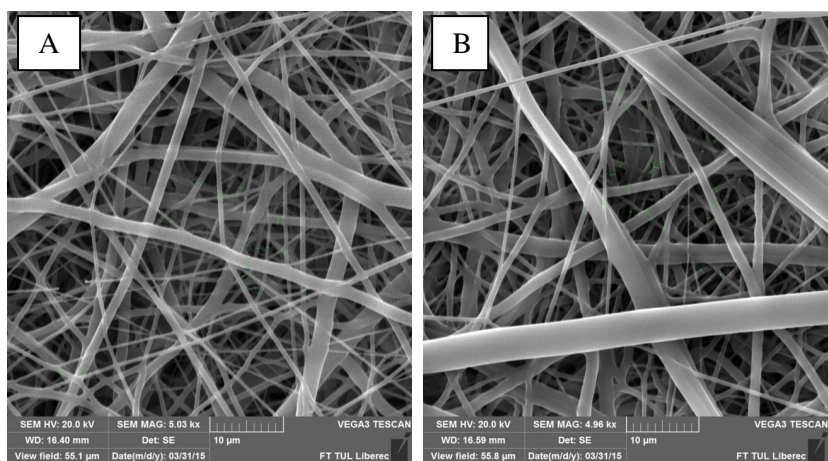


Obr. 18: A: degradace PCL po 14 dnech 1U/ml, B: negativní kontrola PCL v 5 ml PBS pro 1 U/ml po 2 dnech a C: negativní kontrola po 14 dnech; zvětšení 5000x, měřítko 10 μ m

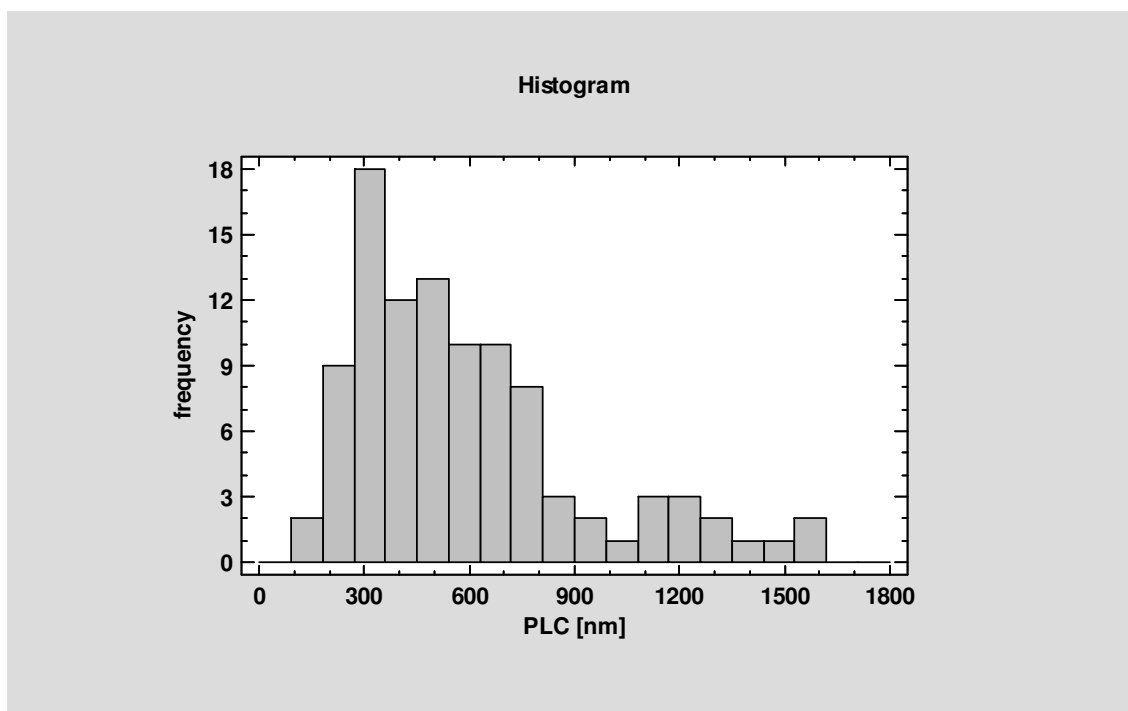
b) Kopolymer kyseliny polymléčné a polykaprolaktonu (PLC)

Další nanovláknenný materiál, u kterého jsme testovali jeho degradaci použitím lipázy *Pseudomonas sepacia*, byl kopolymer kyseliny polymléčné a polykaprolaktonu (PLC) od firmy Purac. Označení výrobku: PURASORB; v poměru PLA:PCL; 70:30 o mol. hmotnosti 90 tis.. K dispozici byla vláknenná vrstva z tohoto polymeru vyrobená na Nanospideru NS 1WS500U od firmy Elmarco (rozpuštědlo: chloroform, etanol a kyselina octová v poměru 8:1:1), 10% podíl polymeru.

V programu NIS Elements AR 4.30.00 jsme změřili tloušťku vláken na několika smívcích z elektronového mikroskopu. Jejich hodnoty jsou uvedeny v příloze 6 i s jejich rozdělením do jednotlivých tříd. S jejich rozdělením souvisí histogram 2, kde můžeme pozorovat, že nejvíce vláken má průměr mezi 300 a 400 nm. Průměrnou plochu póru jsme naměřili pomocí funkce prahování v tomto programu, která činila $(4,7155 \pm 8,8) \mu\text{m}^2$ a plošnou poróznost $\psi = 0,37$, $\psi = S_p/S_c$, kde S_p je součet ploch pórů a S_c je plocha celková. Průměr PLC vláken jsme naměřili $(593,88 \pm 329,1) \text{nm}$, další statistická charakteristika je uvedena v příloze 6. Průběh měření průměrů vláken PLC je vidět na obr. 19.



Obr.19: A,B: Snímky z elektronového mikroskopu při měření průměrů vláken PLC v NIS Elements, měřítko 10 µm



Histogram 2: naměřených průměrů vláken PLC [nm]

Testování degradace PLC

U charakterizovaného a popsaného nanovláknenného materiálu PLC jsme testovali enzymatickou degradaci lipázou *Pseudomonas cepacia* o zvolené koncentraci 5 U/ml a 1 U/ml. Tyto dvě koncentrace jsme zvolili z důvodu předchozí zkušenosti

s testováním enzymatické degradace materiálu PCL, kdy během testování koncentrace 10 U/ml došlo relativně rychle k jeho degradaci. Použili jsme stejnou lipázu (Sigma Aldrich 62309 \geq 30U/mg), aby případné výsledky byly porovnatelné. Vzorky nastříhaného nanovláčenného materiálu byly o hmotnosti přesně asi 50 mg a o velikosti 5 x 3 cm.

Testování degradace PLC 1U/ml :

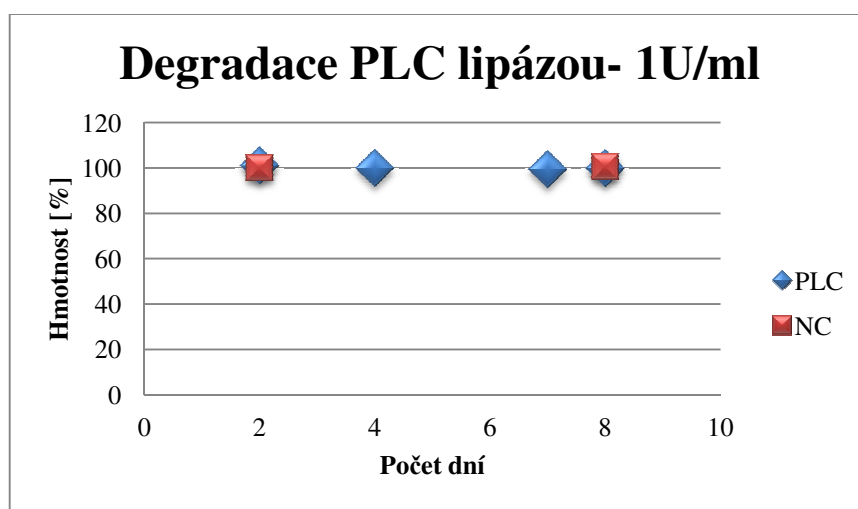
Postup testování enzymatické degradace PLC byl shodný s postupem testování enzymatické degradace PCL s 1 U/ml. Průměrné hmotnosti PLC vzorků jsou před a po působení lipázy 1 U/ml v 5 ml PBS pH 7,4 zaznamenány v tabulce 8. Konkrétní naměřené hmotnosti PLC vzorků a jejich průměrná hodnota před a po testování enzymatické degradace o koncentraci 1 U/ml jsou uvedeny v příloze 7. Dále jsou tyto hodnoty zpracovány v tab. 9, kde je uvedena jejich hmotnost v [%] po působení lipázy 1 U/ml a v grafu 4: Degradace PLC, který následuje tabulku 9.

Hmotnosti PLC vzorků před působením lipázy 1U/ml		Hmotnosti PLC vzorků po působení lipázy 1U/ml	
Vzorek	Průměr [g]		Průměr [g]
1	0,06138	po 2 dnech	0,06186
2	0,04514	po 4 dnech	0,04498
3	0,05746	Po 7 dnech	0,05694
4	0,0631	Po 8 dnech	0,06284
NC1	0,0599	po 2 dnech	0,05974
NC2	0,04556	po 8 dnech	0,04568

Tab. 8 Hmotnosti PLC vzorků před a po působení lipázy 1U/ml v 5 ml PBS pH 7,4

Hmotnost [%]	PLC	NC
po 2 dnech	100,78	99,73
po 4 dnech	99,65	
po 7 dnech	99,09	
Po 8 dnech	99,59	100,26

Tab.: 9 hmotnost PLC v [%] po působení lipázy 1 U/ml



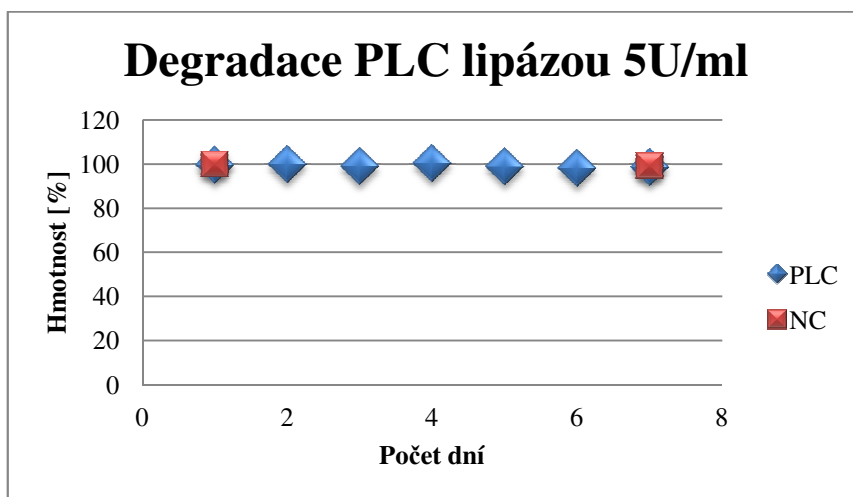
Graf 4: Degradace PLC lipázou *Pseudomonas cepacia* 1U/ml v 5 ml PBS při 37°C

Testování degradace PLC 5 U/ml :

I tento postup byl shodný s předešlými, pouze koncentrace se v tomto případě lišila. V příloze 8 jsou naměřené hmotnosti vzorků před testováním a naměřené hmotnosti po inkubaci vzorků v 5 ml PBS pH 7,4 o dané koncentraci 5 U/ml lipázy *Pseud. cepacia*. Tab.: 10 udává hmotnost PLC v [%] po inkubaci vzorků v PBS pH 7,4 nebo v PBS pH 7,4 s lipázou *Pseud. cepacia* 5 U/ml. Dále jsou hodnoty vyneseny do grafu 5: Degradace PLC lipázou *Pseud. cepacia* 5 U/ml v 5 ml PBS pH 7,4.

Hmotnost [%]	PLC	NC
po 1 dni	99,42	99,89
po 2 dnech	99,69	
po 3 dnech	98,79	
po 4 dnech	100,17	
po 7 dnech	98,7	
Po 8 dnech	97,97	
po 9 dnech	98,43	99,09

Tab.: 10 Hmotnost PLC vzorků v [%] po inkubaci v PBS pH 7,4 nebo v PBS pH 7,4 s lipázou Pseud. cepacia 5 U/ml



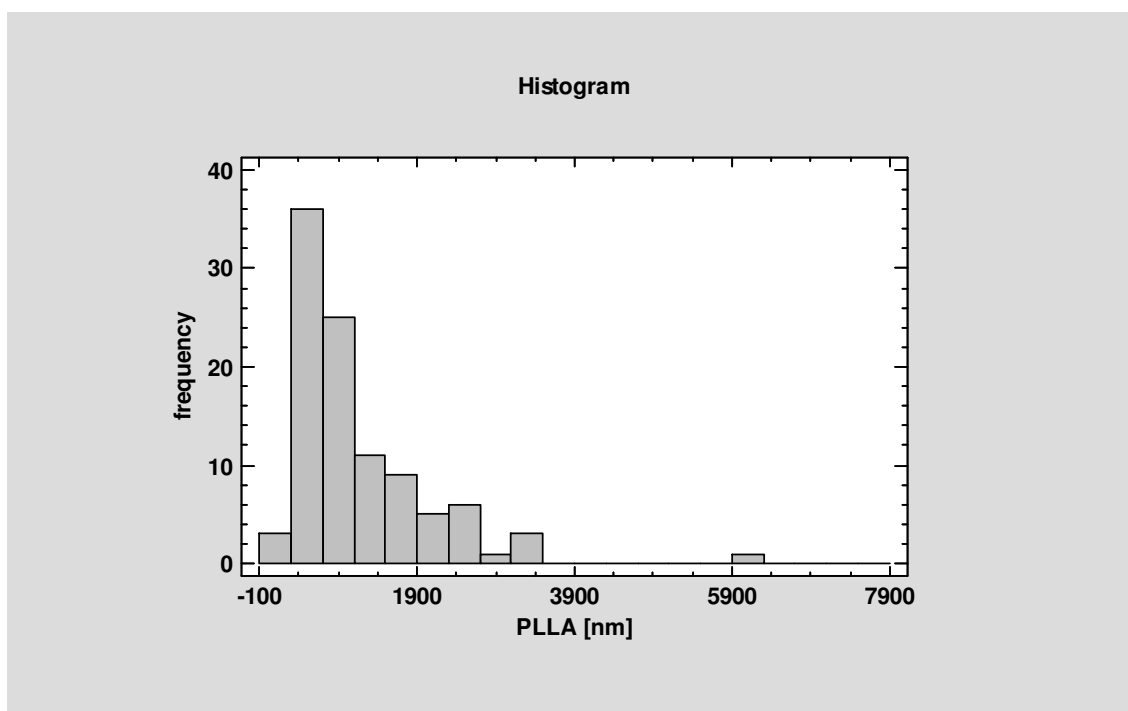
Graf 5: Degradace PLC lipázou Pseud. cepacia 5 U/ml v 5 ml PBS při 37 °C; NC = negativní kontrola, pouze v 5 ml PBS

Vyhodnocení:

Z grafů Degradace PLC lipázou Pseudomonas cepacia o koncentraci 1 U/ml a 5 U/ml v 5 ml PBS při 37°C je zřejmé, že na tento materiál lipáza Pseudomonas cepacia nemá vliv. Z tohoto důvodu jsme v další části testovali vlákenné materiály PCL, PLLA a PLC proteinázou K (viz Kapitola 16.). Snímky z elektronového mikroskopu pro testování PLC 1U/ml a 5U/ml v 5 ml PBS pH 7,4 jsou v příloze 12.

c) Poly-L-laktid (PLLA)

Dále je uvedena další charakteristika vlákenného materiálu PLLA o molekulové hmotnosti 46 tisíc, 12 % podílu polymeru, který byl k dispozici na testování degradace. Vyroben byl na Nanospideru NS 1WS500U od firmy Elmarco. V programu NIS Elements AR 4.30.00 jsme stanovili průměrnou plochu póru na hodnotu $(4,3856\mu\text{m}^2 \pm 9,67\mu\text{m}^2)$, tloušťku vláken na $(1140,59 \pm 907,56)$ nm a plošnou poróznost pomocí vzorce $\psi = Sp/Sc$, kde Sp je součet ploch pórů a Sc je plocha celková, $\psi = 0,27$. V příloze 9 jsou naměřené hodnoty se statistickou analýzou PLLA a rozdělení naměřených hodnot do jednotlivých tříd, které souvisí s histogramem 3.



Histogram 3: Histogram naměřených průměrů vláken PLLA [nm]

15.3 Testování PLLA, PLC a PCL lipázou *Pseudomonas cepacia* o koncentraci 50 U/ml

Z předchozího testování vlákenného materiálu PLC pomocí lipázy *Pseudomonas cepacia* o koncentraci 1 U/ml a 5 U/ml, kdy jsme zjistili, že tento enzym na materiál PLC nemá vliv, jsme se rozhodli vyzkoušet ještě mnohonásobně vyšší koncentraci lipázy *Pseudomonas cepacia*, a to 50 U/ml. Touto koncentrací jsme testovali jak PLC, tak PLLA i PCL. Zkumavky byly opět o objemu 15 ml, kam se

pipetovalo 5 ml PBS s koncentrací 50 U/ml lipázy Pseud. cepacia. Vzorky byly inkubovány v termostatu při 37 °C, poté vyjmuty, opláchnuty destilovanou vodou a vloženy do destičky vyložené parafinem. Tab. 11 obsahuje průměrné naměřené hmotnosti PLLA, PCL a PLC vzorků [g] před působením a po působení lipázy Pseudomonas cepacia o koncentraci 50 U/ml v 5 ml pufru PBS pH 7,4. V Tab. 12 jsou hmotnosti vzorků PLLA, PLC a PCL v [%] po působení lipázy Pseudomonas cepacia o koncentraci 50 U/ml v 5 ml pufru PBS pH 7,4. S Tab. 12 souvisí graf č. 6 a v příloze 10 jsou uvedeny tabulky s konkrétními naměřenými hodnotami.

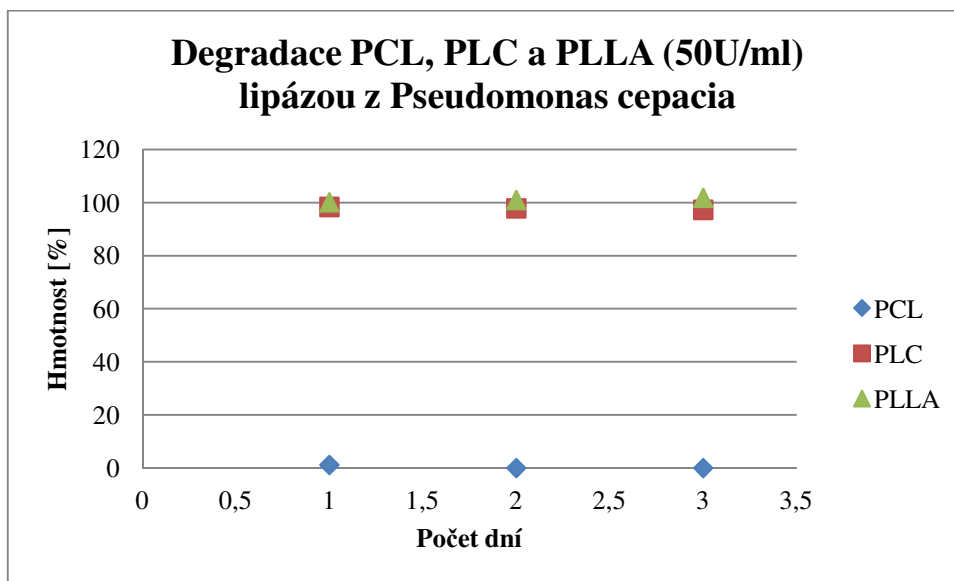
		Hmotnosti PLLA, PCL a PLC vzorků před působením lipázy 50 U/ml	Hmotnosti PLLA, PCL a PLC vzorků po působení lipázy 50 U/ml
Vzorek	Hmotnost [g]	Průměr [g]	Průměr [g]
PLLA 1	po 1 dni	0,061866667	0,06196
PLLA 2	po 2 dnech	0,053266667	0,0538
PLLA 3	po 3 dnech	0,062433333	0,06358
PCL 1	po 1 dni	0,044233333	0,00052
PLC 2	po 2 dnech	0,041033333	0
PCL 3	po 3 dnech	0,038633333	0
PLC 1	po 1 dni	0,055933333	0,05504
PLC 2	po 2 dnech	0,072433333	0,0709
PLC 3	po 3 dnech	0,0648	0,06306

Tab.: 11 Průměrné naměřené hmotnosti PLLA, PCL a PLC vzorků [g] před působením a po působení lipázy Pseudomonas cepacia o koncentraci 50 U/ml v 5 ml pufru PBS pH 7,4

Hmotnost [%]	PCL	PLC	PLLA
po 1 dni	1,18	98,4	100,15
po 2 dnech	0	97,88	101
po 3 dnech	0	97,3	101,84

Tab.:12 Hmotnost nanovláčkových vrstev PCL, PLC a PLLA [%] po působení lipázy Pseudomonas cepacia o koncentraci 50 U/ml v 5 ml pufru PBS pH 7,4

Předchozí hodnoty jsou zpracovány do grafu 6: Degradace PCL, PLC a PLLA v 5 ml PBS s lipázou *Pseudomonas cepacia* o koncentraci 50 U/ml.



Graf 6: Degradace PCL, PLC a PLLA v 5 ml PBS s lipázou *Pseudomonas cepacia* o koncentraci 50 U/ml

15.3.1 Vyhodnocení:

Z testování degradace lipázou z *Pseudomonas cepacia* o relativně vysoké koncentraci 50 U/ml, jsme zjistili, že testované vláknenné materiály PLC a PLLA nezměnily ani po tak vysoké koncentraci svou původní hmotnost. Z tohoto testování lze usuzovat, že na tyto materiály lipáza *Pseudomonas cepacia* nepůsobí. Snímky z elektronového mikroskopu pro PLLA a PLC po působení lipázy 50 U/ml jsou k dispozici v příloze 13. Polykaprolaktonu zbylo po 1 dni kolem 1% původní hmotnosti a po 2 dnech se rozložil úplně.

16. Testování degradace PLC, PLLA a PCL Proteinázou K

Jelikož jsme zjistili, že na PLC a PLLA lipáza *Pseudomonas cepacia* nepůsobí, rozhodli jsme se je i s Polykaprolaktonem otestovat Proteinázou K.

Materiál: Vlákenné materiály, které byly použity pro testování Proteinázou K, byly stejné jako materiály pro testování lipázou *Pseudomonas cepacia* (vlákenné materiály jsou výše charakterizované). Použila se Proteináza K od firmy Sigma Aldrich (30 U/mg). Významnou roli při degradaci hraje hmotnost vzorků, proto jsme u všech zvolili hmotnost přesně asi 50 mg. Vzorky jsme nastříhali a vložili do zkumavek o objemu 15 ml. Dále jsme si připravili Tris pufr pro celý experiment o pH 8. Optimální hodnota pH pro aktivitu Proteinázy K je osm.

Přírava Tris pufru:

dH₂O 800 ml
TRIS 12,14 g

pH bylo upraveno kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu 8. Poté se přidalo 0,2 g NaN₃, aby roztok obsahoval 0,02 % azidu sodného. Poté se pufr doplnil do 1000 ml.

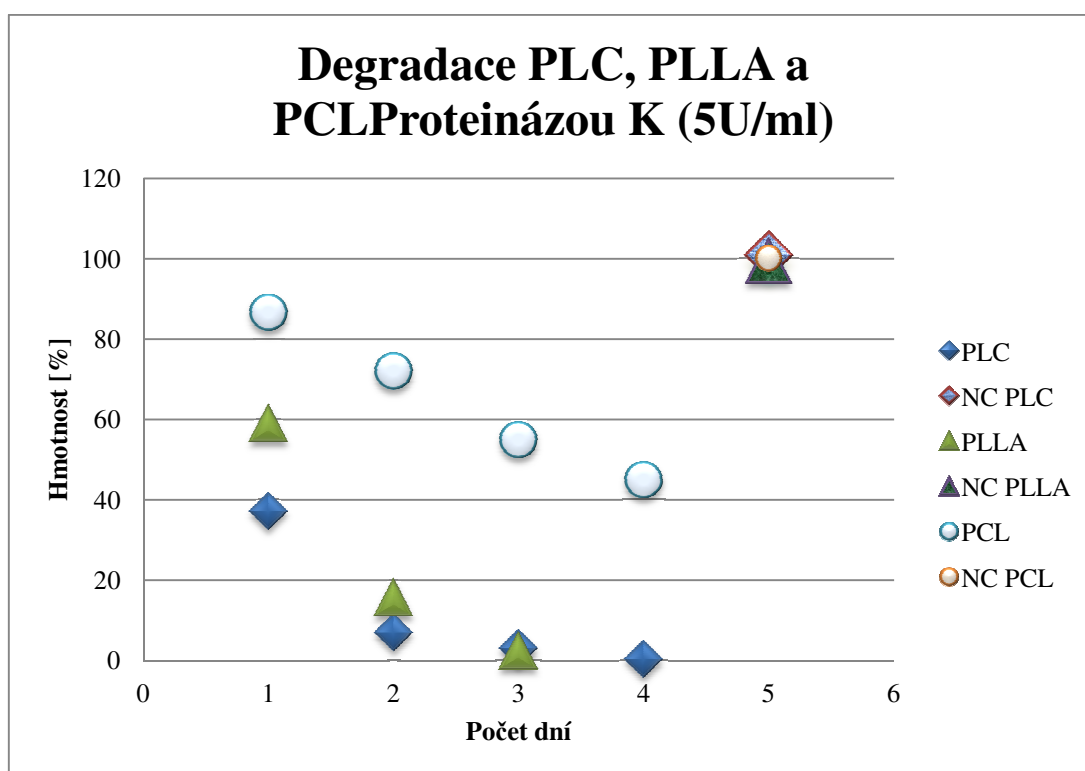
Testování:

Po předchozích zkušenostech jsme testovali všechny materiály (PLLA, PCL a PLC) koncentrací Proteinázy K 5 U/ml. Do každé zkumavky s patřičným vzorkem jsme pipetovali 5 ml Tris pufru s příslušnou koncentrací proteinázy (5U/ml) a 5 ml Tris pufru jako negativní kontrolu. Poté jsme vzorky vložili do termostatu na 37 °C. Každý den (po 24 hodinách) jsme vyjmuli od každého materiálu 1 vzorek z Tris pufru s proteinázou. Vzorky pro negativní kontrolu (pouze v Tris pufru) jsme vyjmuli pouze na konci experimentu. Součástí experimentu byla optimalizace postupu testování. Degradční produkty jednotlivých vzorků jsme získali filtrováním obsahu každé zkumavky přes filtrační papírek, který jsme si předem zvážili a vložili do nálevky. Tyto degradační produkty jsme poté propláchnuli destilovanou vodou a vložili je i s filtračním papírkem do jednotlivých jamek destičky vyložených parafilmem. Vzorky jsme nechali usnout v termostatu při 37°C. U všech ostatních zkumavek jsme vyměnili Tris pufr s proteinázou a opět nechali inkubovat v termostatu při 37 °C. Tímto způsobem jsme postupně vyjmuli všechny vzorky v průběhu testovacího týdne. V příloze 11 jsou tabulky se zaznamenanými naměřenými hodnotami jednotlivých vzorků před inkubací v Tris pufru pH 8 s Proteinázou K a hmotnosti vzorků po inkubaci v Tris pufru s Proteinázou K o koncentraci 5U/ml s hmotností filtračního papírku i bez něho, v další tabulce v příloze 11 je uvedena hmotnost filtrů. Hmotnost vzorků PLC, PLLA a PCL v

[%] po degradaci, tedy po působení Proteinázy K o koncentraci 5 U/ml v pěti mililitrech Tris pufru pH 8 je uvedena v tabulce 13. Dále je z těchto dat zpracovaný graf z průběhu testování degradace PLC, PLLA a PCL v 5 ml Trisu pomocí Proteinázy K o koncentraci 5U/ml, viz Graf 7.

Hmotnost [%]	PLC	NC PLC	PLLA	NC PLLA	PCL	NC PCL
po 1 dni	37,04		58,78		86,52	
po 2 dnech	6,87		15,5		71,92	
po 3 dnech	2,95		2,22		54,84	
po 4 dnech	0,27		-0,32		44,86	
po 5 dnech		100,78		99,25		100

Tab. 13: Hmotnost vzorků PLC, PLLA a PCL [%] po degradaci v 5 ml Trisu pomocí Proteinázy K o koncentraci 5 U/ml



Graf 7: Degradace PLC, PLLA a PCL v 5 ml Trisu pomocí Proteinázy K o koncentraci 5U/ml

Vyhodnocení:

U vláknenného materiálu PLLA došlo po 4 dnech testování degradace Proteinázou K o koncentraci 5 U/ml k jeho úplnému rozložení, u PLC po 4 dnech zbylo hmotnostně nepatrné množství degradačních produktů a Polykaprolakton zmenšil svou hmotnost přibližně o polovinu. Na úbytek hmotnosti materiálu PCL má vliv Proteináza K z těchto testovaných materiálů jednoznačně nejnižší. V příloze 14 jsou snímky z elektronového mikroskopu, kde je možné sledovat, že u materiálu PLLA docházelo proteinázou K k nehomogennímu nebo nestejněměrnému rozkladu. Tento jev byl viditelný už při samotném testování (v makro měřítku), kdy bylo vidět, že se na materiálu PLLA vytvořily degradované otvory.

Závěr

Cílem této práce bylo studium degradace vybraných nanovlákných vrstev, která souvisí s hmotnostním úbytkem nanovlákné vrstvy během degradace. Důležitou součástí bylo vybrat vhodnou testovací metodu a postup testování degradace průběžně optimalizovat.

Nanovláknou vrstvou ze syntetických materiálů, kterou jsme měli k dispozici na tyto experimenty, byla vyrobena na Nanospideru NS 1WS500U od firmy Elmarco. Takto připravené nanovlákné vrstvy pro testování jejich degradace byly vyrobeny z polykaprolaktonu, kyseliny polymléčné a kopolymeru kyseliny polymléčné a polykaprolaktonu. Pro první testování byla vrstva polykaprolaktonu různě sterilizována, gama zářením dávkami 20, 30, 40 kGY a ethylenoxidem.

Testování degradace výše charakterizovaných vrstev proběhlo na základě prostudování odborné literatury. Některé z nich jsou v této práci citované. [1, 4, 7, 8, 10] Výsledek prvního experimentu potvrzuje teorii, že při ošetření polykaprolaktonu gama zářením dochází jednoznačně k jeho zesíťování. Zesíťování polykaprolaktonu zřejmě nejvíce ovlivnilo jeho hořší enzymatickou degradaci lipázou *Pseudomonas cepacia*, v některých případech vedlo ke zvýšení hmotnosti nanovlákné struktury pravděpodobně jeho nabobtnáním. V porovnání s nesterilním nezesíťovaným nanovlákným polykaprolaktonem degraduje sterilizovaný polykaprolakton gama zářením překvapivě pomaleji. Výsledek prvního testování potvrdil již zjištěné skutečnosti, které jsou uvedeny v publikaci [1].

V další části testování enzymatické degradace byla věnována pozornost nesterilnímu nanovláknému materiálu polykaprolaktonu a také jeho charakteristice. Hmotnost testovaných vzorků jsme zvýšili přesně asi na 50 mg, zvětšila se tedy i jejich velikost. V tomto testování jsme se zaměřili na optimalizaci vhodné koncentrace lipázy *Pseudomonas cepacia*, zvolili jsme tedy koncentrace 10 U/ml a 1 U/ml PBS. Z výsledků nám vyšlo, že 10 U/ml degraduje polykaprolakton relativně rychle a 1 U/ml zase příliš pomalu. Z tohoto lze usoudit, že pro další experimenty na tento nanovlákný materiál lze doporučit koncentraci 5 U/ml. Z této části experimentů jsou k dispozici snímky z elektronového mikroskopu, kde je zachycen průběh enzymatické degradace.

Na základě předchozích výsledků jsme i nadále testovali enzymatickou degradaci pomocí lipázy *Pseudomonas cepacia*. Tentokrát jsme testovali kopolymer kyseliny polymléčné a polykaprolaktonu. Koncentraci lipázy *Pseudomonas cepacia* jsme zvolili 1 U/ml a 5 U/ml. Zjistili jsme, že lipáza *Pseudomonas cepacia* pravděpodobně nemá vliv na samotnou degradaci kopolymeru PLC.

Z tohoto důvodu jsme se rozhodli ověřit, zda by přece jen vyšší koncentrace lipázy *Pseudomonas cepacia* nezpůsobila na materiálu PLC enzymatickou degradaci. A proto jsme zvolili koncentraci 50 U/ml, kterou jsme vyzkoušeli na všech charakterizovaných materiálech PLC, PLLA i PCL. Zjistili jsme, že testované vláknenné materiály PLC a PLLA nezměnily ani po tak vysoké koncentraci svou původní hmotnost. Z tohoto lze usuzovat, že na tyto materiály lipáza *Pseudomonas cepacia* skutečně nepůsobí. Polykaprolakton se samozřejmě po dvou dnech zcela rozložil.

Na závěr jsme testovali degradaci PLC, PLLA a PCL Proteinázou K v Tris pufru. Pro všechny nanovláknenné materiály jsme zvolili koncentraci Proteinázy K 5 U/ml. U vláknenného materiálu PLLA došlo po 4 dnech testování k jeho úplné degradaci, PLC zbylo po 4 dnech z hlediska hmotnosti nepatrné množství a polykaprolakton zmenšil svou hmotnost přibližně o polovinu.

Celkově by se tyto výsledky výzkumu daly hodnotit jako přínosné pro další případné budoucí experimenty. Důležitou součástí při zpracování této práce byla důslednost, pečlivost a trpělivost při testování vzorků.

Pro práci na budoucích experimentech (testování degradace) bych navrhovala zpracovat větší počet zkoumaných vzorků pro každý den, a to z důvodu, aby bylo možné tato data statisticky zpracovat. Bylo by také přínosné testovat další materiály, hlavně kopolymery v různých poměrech a v delším nepřetržitém časovém úseku (více kalendářních dnů). Dále bych doporučila se zaměřit na různě sterilizované vláknenné materiály, jelikož sterilizace je potřeba pro jejich cílené využití v lékařství.

Použitá literatura:

- [1] COTTAM AT AL., *Effect of sterilisation by gamma irradiation on ability of polycaprolactone (PCL) to act as a scaffold material*. In: Medical Engineering & Physics 31 (2009) 221-226.
- [2] WOODRUFF M. A., HUTMACHER D. W. *The return of a forgotten polymer – Polycaprolactone in the 21st century*. Progress in Polymer Science 35 (2010): 1217-1256. Institute of Health and Biomedical Innovation, Queensland University of Technology, 60 Musk Avenue, Kelvin Grove, QLD 4059, Australia
- [3] LUKÁŠ, MARTINOVÁ, a spol., *Lékařské textilie 2. Díl*, Asociace inovačního podnikání ČR, Vydání první, 2008. cit.: [2014-10-19]
- [4] DONG, LIAO AT AL., *Degradation Behaviors of Electrospun Resorbable Polyester Nanofibers*, Faculty of Engineering, National University of Singapore, Date of publication [2009-7-6], cit. :[2014-10-20]
- [5] PETRÁŠ, KIMMER, SOUKUP a KLUSOŇ. Chemické listy. *Bezpečná nanovlákná*. 2009, č. 103, s. 1009-1016. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_12_1009-1016.pdf
- [6] AMLER a spol., *Lékařské textilie 1. Díl* [cit. 2014-11-06]
- [7] SCHNABEL W., *Polymer degradation: Principles and Practical Applications*, Wien: Hanser, 1981. Macmillan Publishing Co., Inc., New York. ISBN 3-446-13264-3 Hanser, ISBN 0-02-949640-3 Macmillan
- [8] AZEVEDO H. S., REIS R. L., *Understanding the Enzymatic Degradation of Biodegradable Polymers and Strategies to Control Their Degradation Rate*, [2004-10-6], cit. [2014-11-13]. Dostupné z: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/xmlui/bitstream/handle/1822/14150/file.pdf?sequence=1>
- [9] *Lazy polymer* [online]. [2015-4-21] Dostupné z: <http://lazypolymer.com/>
- [10] SCOTT Gerald. *Degradable Polymers, Principles and applications*. 2nd Edition. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2002. 493 pages. ISBN 1-4020-0790-6 .

- [11] KOLEKTIV Autorů, *Tkáňové inženýrství: WikiSkripta* [online]. ISSN 1804-6517, ©2014. Poslední revize 2014-12-20, [cit. 2015-4-19]. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Tk%C3%A1%C5%88ov%C3%A9_in%C5%BEen%C3%BDrstv%C3%AD
- [12] ALBERTS B. AT ALL., *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. Přeložili z anglického originálu Arnošt Kotyk, Bohumil Bouzek a Pavel Hozák. 2. vyd. Espero Publishing, 2005. 740 s. ISBN 80-902906-2-0.
- [13] HELLER J., *Use of polymers in controlled drug release in biocompatible polymers, metals and composites*, M. Szycher ed., Technomic Pub. Co. Inc., Lancaster, chap. 24, page 551-584, 1983.
- [14] LANGER, PEPPAS, *Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems*, *Biomaterials*, 2, page 201-214, 1981.
- [15] MARTINOVÁ, L. *Průvodce studiem netkaných textilií*, Fakulta textilní, Technická Univerzita v Liberci, Liberec 2003.
- [16] NARKIS M., SIBONY-CHAOUAT S., SIEGMANN A., SHKOLNIK S., BELL JP., *Irradiation effects on polycaprolactone*. *Polymer* 1985; page 26, 50- 4.
- [17] ŠVORČÍK V., *Polymery „stručně“*, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta chemické technologie, Ústav inženýrství pevných látek, [cit. 2015-4-21]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/ipl/osobni/svorcik/Polymery.pdf>
- [18] LUKÁŠ, D., SARKAR, A., MARTINOVÁ, L., VODSEĎÁLKOVÁ, K., LUBASOVÁ, D., CHALOUPEK, J., POKORNÝ, P., MIKEŠ, P., CHVOJKA, J. and KOMÁREK, M., *'Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twentyfirst century)'*, *Textile Progress*, 41:2, 59 — 140, 2009.
- [19] FILATOV Y., BUDYKA A. and KIRICHENKO V., *Electrospinning of micro- and nanofibres: fundamentals in separation and filtration processes*, Begell House Inc., Redding, 2007.
- [20] WEITZ R. T. AT ALL., *Polymer Nanofibers via Nozzle-Free Centrifugal Spinning*, Nano letters, Max Planck Institute for Solid State Research, Heisenbergstr. 1, 70569 Stuttgart, Germany, Max Planck Institute for Metals Research, Heisenbergstr. 3,

70569 Stuttgart, Germany, Institute for Theoretical and Applied Physics, UniVersität Stuttgart, Vol. 8, No. 4,1187-1191, 2008.

[21] XING X., WANG Y., and LI B., *Nanofiber drawing and nanodevice assembly in poly(trimethylene terephthalate)*, Optics Express, Vol. 16, Issue 14, pp. 10815-10822, 2008.

Příloha 1

PCL- 30 kGy v PBS pH 7,4 s lipázou 8U/ml								
Vzorek č.	1	2	3	4	5	6	7	8
Hmotnost [g]	0,0017	0,0016	0,0016	0,0016	0,0019	0,002	0,0014	0,0016
Po 1 dni	0,0016							
Po 2 dnech		0,0019						
Po 3 dnech			0,001					
Po 4 dnech				0,0016				
Po 5 dnech					0,0014			
Po 6 dnech						0,002		
Po 7 dnech							0,0014	
Po 8 dnech								0,0013

Tabulka: Naměřené hmotnosti jednotlivých vzorků PCL 30 kGY před a po působení pufru PBS pH 7,4 s lipázou [g]

PCL- 30 kGy v PBS pH 7,4 (NC)								
Vzorek č.	1	2	3	4	5	6	7	8
Hmotnost [g]	0,0019	0,0017	0,0015	0,0013	0,0015	0,0012	0,0019	0,0011
Po 1 dni	0,0011							
Po 2 dnech		0,0016						
Po 3 dnech			0,0008					
Po 4 dnech				0,0014				
Po 5 dnech					0,0014			
Po 6 dnech						0,0012		
Po 7 dnech							0,0009	
Po 8 dnech								0,0007

Tabulka: Naměřené hmotnosti jednotlivých vzorků PCL 30 kGY před a po působení pufru PBS pH 7,4 [g]

PCL- 40 kGy v PBS pH 7,4 s lipázou 8U/ml								
Vzorek č.	1	2	3	4	5	6	7	8
Hmotnost [g]	0,0014	0,0016	0,0013	0,0019	0,0019	0,0019	0,0016	0,0017
Po 1 dni	0,0011							
Po 2 dnech		0,0008						
Po 3 dnech			0,0013					
Po 4 dnech				0,0017				
Po 5 dnech					0,0018			
Po 6 dnech						0,0015		
Po 7 dnech							0,0012	
Po 8 dnech								0,0007

Tabulka: Naměřené hmotnosti jednotlivých vzorků PCL 40 kGY před a po působení pufru PBS pH 7,4 s lipázou [g]

PCL- 40 kGy v PBS pH 7,4 (NC)								
Vzorek č.	1	2	3	4	5	6	7	8
Hmotnost [g]	0,0014	0,0019	0,0024	0,0021	0,002	0,0022	0,0022	0,0012
Po 1 dni	0,0008							
Po 2 dnech		0,0017						
Po 3 dnech			0,0011					
Po 4 dnech				0,0021				
Po 5 dnech					0,0019			
Po 6 dnech						0,0019		
Po 7 dnech							0,0016	
Po 8 dnech								0,0006

Tabulka: Naměřené hmotnosti jednotlivých vzorků PCL 40 kGY před a po působení pufru PBS/ PBS s lipázou [g]

PCL- ethylenoxid v PBS pH 7,4 s lipazou 8U/ml								
Vzorek č.	1	2	3	4	5	6	7	8
Hmotnost [g]	0,0061	0,0058	0,0068	0,0065	0,0062	0,0064	0,006	0,0066
Po 1 dni	0							
Po 2 dnech		0,0007						
Po 3 dnech			0,001					
Po 4 dnech				0				
Po 5 dnech					0			
Po 6 dnech						0		
Po 7 dnech							0	
Po 8 dnech								0

Tabulka: Naměřené hmotnosti jednotlivých vzorků PCL - ethylenoxid před a po působení pufru PBS pH 7,4 s lipázou [g]

PCL- ethylenoxid v PBS pH 7,4 (NC)								
Vzorek č.	1	2	3	4	5	6	7	8
Hmotnost [g]	0,0067	0,0068	0,0066	0,0068	0,0066	0,0064	0,0073	0,0067
Po 1 dni	0,0067							
Po 2 dnech		0,0072						
Po 3 dnech			0,0066					
Po 4 dnech				0,0075				
Po 5 dnech					0,0063			
Po 6 dnech						0,0064		
Po 7 dnech							0,0072	
Po 8 dnech								0,0066

Tabulka: Naměřené hmotnosti jednotlivých vzorků PCL - ethylenoxid před a po působení pufru PBS pH 7,4 [g]

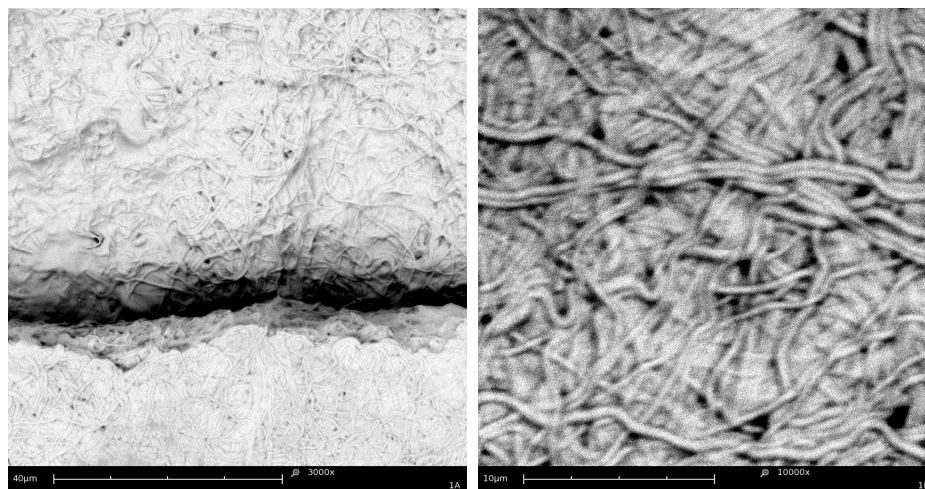
PCL bez sterilizace v PBS pH 7,4 s lipazou 8U/m								
Vzorek č.	1	2	3	4	5	6	7	8
Hmotnost [g]	0,0073	0,0068	0,007	0,0067	0,0058	0,0068	0,0059	0,0069
Po 1 dni	0,0003							
Po 2 dnech		0						
Po 3 dnech			0					
Po 4 dnech				0				
Po 5 dnech					0			
Po 6 dnech						0		
Po 7 dnech							0	
Po 8 dnech								0

Tabulka: Naměřené hmotnosti jednotlivých vzorků PCL před a po působení pufru PBS pH 7,4 s lipázou [g]

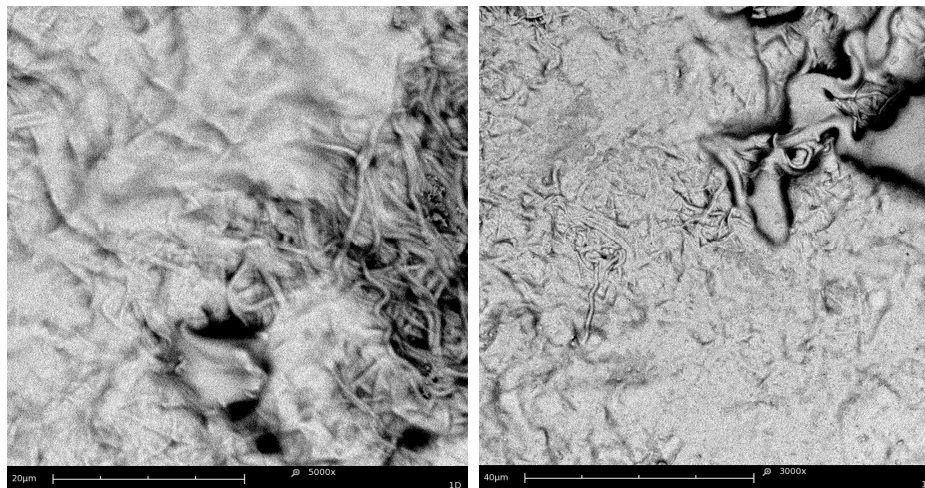
PCL bez sterilizace v PBS pH 7,4 (NC)								
Vzorek č.	1	2	3	4	5	6	7	8
Hmotnost [g]	0,0069	0,0069	0,0061	0,0068	0,0062	0,0066	0,0066	0,0062
Po 1 dni	0,0068							
Po 2 dnech		0,0066						
Po 3 dnech			0,0058					
Po 4 dnech				0,0068				
Po 5 dnech					0,0062			
Po 6 dnech						0,0065		
Po 7 dnech							0,0066	
Po 8 dnech								0,0064

Tabulka: Naměřené hmotnosti jednotlivých vzorků PCL před a po působení pufru PBS pH 7,4 [g]

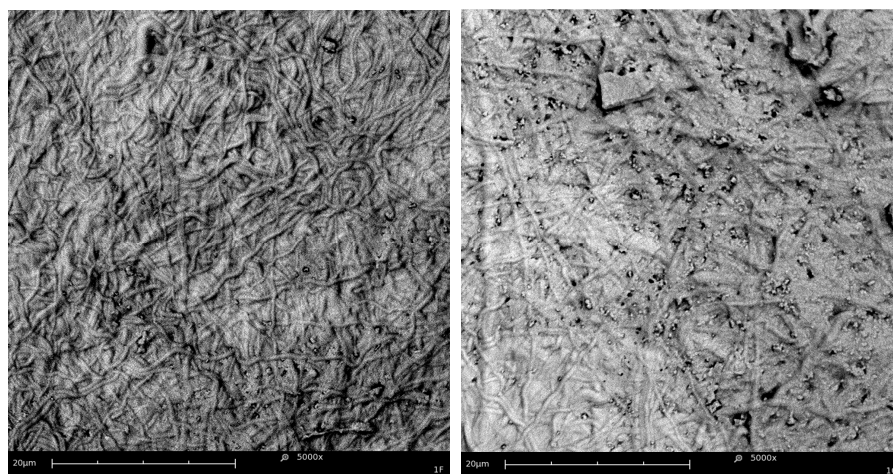
Příloha 2



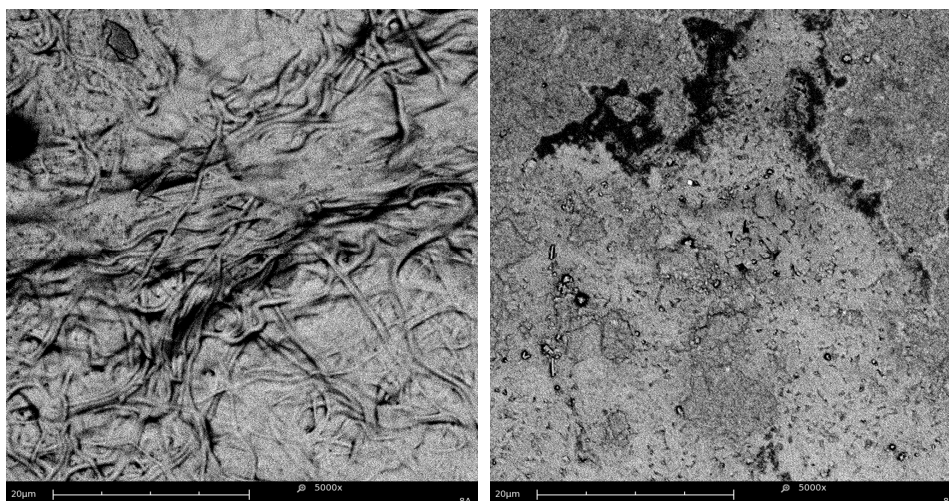
Obr.: Vlevo PCL 20 kGY s lipázou *Pseudomonas cepacia* o koncentraci 8U/ml v 1,5 ml PBS po 1 dni, zvětšení 3000x, měřítko 40 μm, vpravo negativní kontrola PCL 20 kGY v 1,5 ml PBS po 1 dni, měřítko 10 μm, zvětšení 10000x



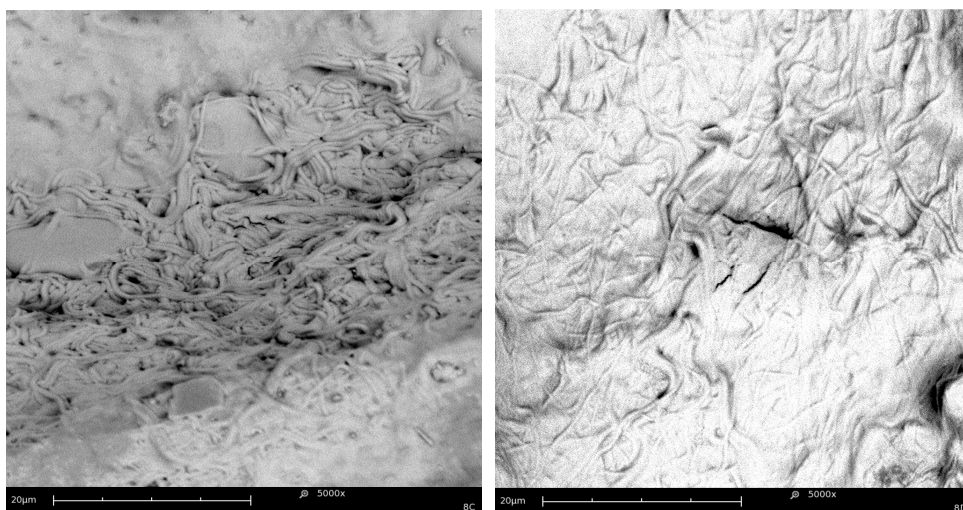
Obr.: Vlevo PCL 30 kGY s lipázou *Pseudomonas cepacia* o koncentraci 8U/ml v 1,5 ml PBS po 1 dni, zvětšení 5000x, měřítko 20 μm, vpravo negativní kontrola PCL 30 kGY v 1,5 ml PBS po 1 dni, měřítko 40 μm, zvětšení 3000x



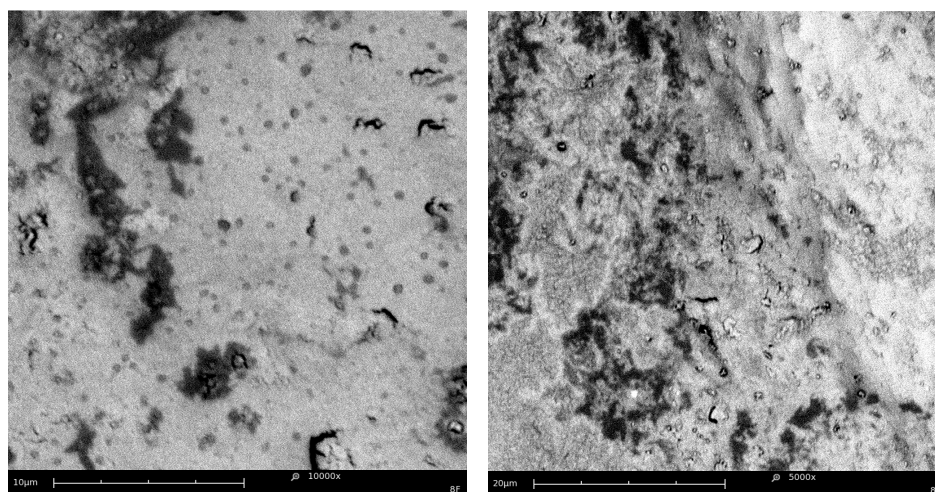
Obr.: Vlevo PCL 40 kGY s lipázou *Pseudomonas cepacia* o koncentraci 8U/ml v 1,5 ml PBS po 1 dni, zvětšení 5000x, měřítko 20 μm, vpravo negativní kontrola PCL 40 kGY v 1,5 ml PBS po 1 dni, měřítko 20 μm, zvětšení 5000x



Obr.: Vlevo PCL 20 kGY s lipázou *Pseudomonas cepacia* o koncentraci 8U/ml v 1,5 ml PBS po 8 dnech, zvětšení 5000x, měřítko 20 μm, vpravo negativní kontrola PCL 20 kGY v 1,5 ml PBS po 8 dnech, měřítko 20 μm, zvětšení 5000x



Obr.: Vlevo PCL 30 kGY s lipázou *Pseudomonas cepacia* o koncentraci 8U/ml v 1,5 ml PBS po 8 dnech, zvětšení 5000x, měřítko 20 µm, vpravo negativní kontrola PCL 30 kGY v 1,5 ml PBS po 8 dnech, měřítko 20 µm, zvětšení 5000x



Obr.: Vlevo PCL 40 kGY s lipázou *Pseudomonas cepacia* o koncentraci 8U/ml v 1,5 ml PBS po 8 dnech, zvětšení 10000x, měřítko 10 µm, vpravo negativní kontrola PCL 40 kGY v 1,5 ml PBS po 8 dnech, měřítko 20 µm, zvětšení 5000x

Příloha 3

6509,22	226,39	148,49	137,47	349,36	221,28	1152,83	3164,07	111,35	443,15
408,03	120,75	343,52	556,72	159,08	225,66	188,06	3386,96	1865,87	136,63
501,69	160,58	309,36	206,53	196,73	197,92	322,19	258,06	645,17	242,63
155,51	301,49	123,52	2170,35	435,47	125,23	3067,74	309,78	2215,17	290,07
188,15	2215,25	1703,86	265,95	158,82	90,55	2896,72	319,14	240,44	363,26
365,04	165,53	364,35	904,18	371,07	137,47	3732	6500,73	184,4	182,36
3204,31	235,11	595,92	354,71	2727,8	4176,24	325,03	243,01	198,62	262,98
288,5	500,38	186,97	140,62	122,85	212,42	166,02	122,96	175,24	2583,04
219,06	122,96	206,53	165,72	2138,03	552,91	168,74	137,85	369,51	162,12
219,03	145,81	2483,19	113,7	2185,44	178,76	4531,34	241,69	4724,88	229,03

Tab. Naměřené hodnoty průměru PCL vláken [nm]; n=100

Počet průměrů vláken	100
Průměr	895,584
Směrodatná odchylka	1374,02
Variační koeficient	153,421%
Minimum	90,55
Maximum	6509,22

Tabulka: Statistická analýza PCL [nm]

	<i>Spodní</i>	<i>Horní</i>			<i>Relativní</i>	<i>Kumulativní</i>	<i>Kum. Rel.</i>
<i>Třída</i>	<i>Hranice</i>	<i>Hranice</i>	<i>Střed</i>	<i>Četnost</i>	<i>Četnost</i>	<i>Četnost</i>	<i>Četnost</i>
	v nebo pod	-399		0	0,0000	0	0,0000
1	-399	-265,0	-332,5	0	0,0000	0	0,0000
2	-264	-130,0	-197,5	0	0,0000	0	0,0000
3	-129	5,0	-62,5	0	0,0000	0	0,0000
4	5	140,0	72,5	13	0,1300	13	0,1300
5	140	275,0	207,5	39	0,3900	52	0,5200
6	275	410,0	342,5	17	0,1700	69	0,6900
7	410	545,0	477,5	4	0,0400	73	0,7300
8	545	680,0	612,5	4	0,0400	77	0,7700
9	680	815,0	747,5	0	0,0000	77	0,7700
10	815	950,0	882,5	1	0,0100	78	0,7800
11	950	1085,0	1017,5	0	0,0000	78	0,7800
12	1085	1220,0	1152,5	1	0,0100	79	0,7900
13	1220	1355,0	1287,5	0	0,0000	79	0,7900

14	1355	1490,0	1422,5	0	0,0000	79	0,7900
15	1490	1625,0	1557,5	0	0,0000	79	0,7900
16	1625	1760,0	1692,5	1	0,0100	80	0,8000
17	1760	1895,0	1827,5	1	0,0100	81	0,8100
18	1895	2030,0	1962,5	0	0,0000	81	0,8100
19	2030	2165,0	2097,5	1	0,0100	82	0,8200
20	2165	2300,0	2232,5	4	0,0400	86	0,8600
21	2300	2435,0	2367,5	0	0,0000	86	0,8600
22	2435	2570,0	2502,5	1	0,0100	87	0,8700
23	2570	2705,0	2637,5	1	0,0100	88	0,8800
24	2705	2840,0	2772,5	1	0,0100	89	0,8900
25	2840	2975,0	2907,5	1	0,0100	90	0,9000
26	2975	3110,0	3042,5	1	0,0100	91	0,9100
27	3110	3245,0	3177,5	2	0,0200	93	0,9300
28	3245	3380,0	3312,5	0	0,0000	93	0,9300
29	3380	3515,0	3447,5	1	0,0100	94	0,9400
30	3515	3650,0	3582,5	0	0,0000	94	0,9400
31	3650	3785,0	3717,5	1	0,0100	95	0,9500
32	3785	3920,0	3852,5	0	0,0000	95	0,9500
33	3920	4055,0	3987,5	0	0,0000	95	0,9500
34	4055	4190,0	4122,5	1	0,0100	96	0,9600
35	4190	4325,0	4257,5	0	0,0000	96	0,9600
36	4325	4460,0	4392,5	0	0,0000	96	0,9600
37	4460	4595,0	4527,5	1	0,0100	97	0,9700
38	4595	4730,0	4662,5	1	0,0100	98	0,9800
39	4730	4865,0	4797,5	0	0,0000	98	0,9800
40	4865	5000,0	4932,5	0	0,0000	98	0,9800
41	5000	5135,0	5067,5	0	0,0000	98	0,9800
42	5135	5270,0	5202,5	0	0,0000	98	0,9800
43	5270	5405,0	5337,5	0	0,0000	98	0,9800
44	5405	5540,0	5472,5	0	0,0000	98	0,9800
45	5540	5675,0	5607,5	0	0,0000	98	0,9800
46	5675	5810,0	5742,5	0	0,0000	98	0,9800
47	5810	5945,0	5877,5	0	0,0000	98	0,9800
48	5945	6080,0	6012,5	0	0,0000	98	0,9800
49	6080	6215,0	6147,5	0	0,0000	98	0,9800
50	6215	6350,0	6282,5	0	0,0000	98	0,9800
51	6350	6485,0	6417,5	0	0,0000	98	0,9800
52	6485	6620,0	6552,5	2	0,0200	100	1,0000
53	6620	6755,0	6687,5	0	0,0000	100	1,0000
54	6755	6890,0	6822,5	0	0,0000	100	1,0000
55	6890	7025,0	6957,5	0	0,0000	100	1,0000
56	7025	7160,0	7092,5	0	0,0000	100	1,0000
57	7160	7295,0	7227,5	0	0,0000	100	1,0000
58	7295	7430,0	7362,5	0	0,0000	100	1,0000
59	7430	7565,0	7497,5	0	0,0000	100	1,0000
60	7565	7700,0	7632,5	0	0,0000	100	1,0000
	celkem	7700		0	0,0000	100	1,0000

Tab.: Rozdělení průměrů PCL do tříd

Příloha 4

Hmotnosti PCL vzorků před působením lipázy (10U/ml)						
Vzorek	Hmotnost [g]					Průměrná hmotnost [g]
1	0,0557	0,0556	0,0556	0,0556	0,0554	0,05558
2	0,0519	0,0514	0,0516	0,0517	0,0516	0,05164
3	0,0509	0,0508	0,0507	0,0509	0,0506	0,05078
4	0,049	0,0488	0,0489	0,0491	0,049	0,04896
5	0,0577	0,0576	0,0575	0,0573	0,0576	0,05754
6	0,057	0,0567	0,0566	0,0569	0,057	0,05684
7	0,043	0,0429	0,0428	0,0426	0,0431	0,04288
NC1	0,0548	0,0546	0,0548	0,055	0,0549	0,05482
NC2	0,0544	0,0545	0,0542	0,0537	0,0537	0,0541

Tab. Hmotnosti PCL vzorků před působením lipázy (10U/ml)

Hmotnosti PCL vzorků po působení lipázy (10U/ml)							
Vzorek		Hmotnost [g]					Průměrná hmotnost [g]
1	po 1 dni	0,0365	0,036	0,0357	0,036	0,0361	0,03606
2	po 2 dnech	0,0177	0,0172	0,0171	0,0168	0,0174	0,01724
3	Po 3 dnech	0,0026	0,0024	0,0026	0,0025	0,0023	0,00248
4	Po 4 dnech	0	0	0	0	0	0
5	Po 5 dnech	0	0	0	0	0	0
6	Po 6 dnech	0	0	0	0	0	0
7	Po 7 dnech	0	0	0	0	0	0
NC1	po 1 dni	0,0552	0,0555	0,0554	0,0557	0,0557	0,0555
NC2	po 4 dnech	0,0543	0,0541	0,054	0,0538	0,0541	0,05406

Tab.: Hmotnosti PCL vzorků po působení lipázy (10U/ml)

Příloha 5

Hmotnosti PCL vzorků před působením lipázy 1U/ml						
Vzorek	Hmotnost [g]					Průměrná hmotnost [g]
1	0,0574	0,0573	0,0574	0,0573	0,0574	0,05736
2	0,0574	0,0573	0,0571	0,0576	0,0574	0,05736
3	0,0531	0,0527	0,0527	0,0524	0,0528	0,05274
4	0,0573	0,0574	0,0574	0,0572	0,0573	0,05732
5	0,0568	0,057	0,057	0,0568	0,0565	0,05682
6	0,0564	0,0562	0,0563	0,0562	0,0562	0,05626
7	0,0555	0,0554	0,0551	0,0552	0,0553	0,0553
NC1	0,0548	0,0547	0,0546	0,0547	0,0547	0,0547
NC2	0,0474	0,0473	0,0471	0,0471	0,0469	0,04716

Tab.: Hmotnosti PCL vzorků před působením lipázy 1U/ml

Hmotnosti PCL vzorků po působení lipázy 1U/ml							
Vzorek	Hmotnost v gramech						Průměrná hmotnost [g]
1	po 2 dnech	0,0536	0,0535	0,0533	0,0532	0,0533	0,05338
2	po 4 dnech	0,0481	0,0482	0,0481	0,0477	0,048	0,04802
3	Po 6 dnech	0,0374	0,0373	0,0374	0,0374	0,0373	0,03736
4	Po 8 dnech	0,0375	0,0375	0,037	0,0368	0,0375	0,03726
5	Po 10 dnech	0,0334	0,0334	0,0334	0,0335	0,0334	0,03342
6	Po 12 dnech	0,0324	0,0325	0,0325	0,0324	0,0324	0,03244
7	Po 14 dnech	0,0173	0,0172	0,0173	0,0173	0,0173	0,01728
NC1	po 2 dnech	0,0533	0,055	0,0548	0,0549	0,0548	0,05456
NC2	po 14 dnech	0,047	0,0469	0,047	0,0469	0,0469	0,04694

Tab.: Hmotnosti PCL vzorků po působení lipázy 1U/ml

Příloha 6

1107,21	346,68	478,19	446,04	301,42	746,66	369,95	179,45	398,95	307,77
613,12	451,28	313,58	490,28	239,08	588,2	671,84	353,99	317,2	461,24
575,29	173,33	299,95	523,22	698,94	355,76	251,29	635,53	241,96	317,7
1292,39	391,03	329,42	391,03	535,25	766,76	471,05	502,29	1082,17	754,29
1142,75	257,94	664,81	984,27	224,31	1306,52	462,22	664,21	950,79	751,67
889,82	540,01	288,94	803,56	1562,8	321,02	346,66	350,07	376,12	571,21
896,55	1506,88	252,06	587,83	1178,76	703,15	670,34	317,7	585,83	420,5
706,44	406,89	993,71	406,89	775,61	732,25	819,33	387,11	228,25	1221,99
764,77	204,38	596,52	474,13	479,39	715,89	299,98	409,9	433,91	527,54
1581,42	675,44	337,17	1359,98	618,69	269,57	1258,77	274,43	620,7	457,01

Tabulka naměřených hodnot průměrů PLC vláken [nm]

Počet průměrů vláken	100
Průměr	593,881
Směrodatná odchylka	329,108
Variační koeficient	55,4164%
Minimum	173,33
Maximum	1581,42

Tabulka: Statistická analýza PLC vláken [nm]

<i>Třída</i>	<i>Spodní Hranice</i>	<i>Horní Hranice</i>	<i>Střed</i>	<i>Četnost</i>	<i>Relativní Četnost</i>	<i>Kumulativní Četnost</i>	<i>Kum. Rel. Četnost</i>
	v nebo pod	0		0	0,0000	0	0,0000
1	0	90,0	45,0	0	0,0000	0	0,0000
2	90	180,0	135,0	2	0,0200	2	0,0200
3	180	270,0	225,0	9	0,0900	11	0,1100
4	270	360,0	315,0	18	0,1800	29	0,2900
5	360	450,0	405,0	12	0,1200	41	0,4100
6	450	540,0	495,0	13	0,1300	54	0,5400
7	540	630,0	585,0	10	0,1000	64	0,6400
8	630	720,0	675,0	10	0,1000	74	0,7400
9	720	810,0	765,0	8	0,0800	82	0,8200
10	810	900,0	855,0	3	0,0300	85	0,8500
11	900	990,0	945,0	2	0,0200	87	0,8700
12	990	1080,0	1035,0	1	0,0100	88	0,8800
13	1080	1170,0	1125,0	3	0,0300	91	0,9100
14	1170	1260,0	1215,0	3	0,0300	94	0,9400
15	1260	1350,0	1305,0	2	0,0200	96	0,9600
16	1350	1440,0	1395,0	1	0,0100	97	0,9700
17	1440	1530,0	1485,0	1	0,0100	98	0,9800
18	1530	1620,0	1575,0	2	0,0200	100	1,0000
19	1620	1710,0	1665,0	0	0,0000	100	1,0000
20	1710	1800,0	1755,0	0	0,0000	100	1,0000
	celkem	1800		0	0,0000	100	1,0000

Tab.: Rozdělení do tříd průměry PLC vláken [nm]

Příloha 7

Hmotnosti PLC vzorků před působením lipázy 1U/ml						
Vzorek	Hmotnost [g]					Průměr [g]
1	0,0614	0,0614	0,0615	0,0613	0,0613	0,06138
2	0,0452	0,0452	0,0451	0,0451	0,0451	0,04514
3	0,0571	0,0573	0,0577	0,0576	0,0576	0,05746
4	0,0631	0,0631	0,0631	0,0631	0,0631	0,0631
NC1	0,06	0,06	0,06	0,0597	0,0598	0,0599
NC2	0,0457	0,0456	0,0455	0,0455	0,0455	0,04556

Tab.: Naměřené hmotnosti PLC vzorků před působením lipázy 1U/ml

Hmotnosti PLC vzorků po působení lipázy 1U/ml							
Vzorek		Hmotnost [g]					Průměr [g]
1	po 2 dnech	0,0619	0,0619	0,0619	0,0618	0,0618	0,06186
2	po 4 dnech	0,0449	0,0449	0,0451	0,045	0,045	0,04498
3	Po 7 dnech	0,057	0,057	0,0569	0,0569	0,0569	0,05694
4	Po 8 dnech	0,0628	0,0628	0,0628	0,0629	0,0629	0,06284
NC1	po 2 dnech	0,0598	0,0597	0,0597	0,0597	0,0598	0,05974
NC2	po 8 dnech	0,0457	0,0456	0,0456	0,0457	0,0458	0,04568

Tab.: Naměřené hmotnosti PLC vzorků po působení lipázy 1U/ml

Příloha 8

Hmotnosti PLC vzorků před působením lipázy 5 U/ml						
Vzorek	Hmotnost [g]					Průměr [g]
1	0,0483	0,0483	0,0483	0,0482	0,0484	0,0483
2	0,0589	0,0589	0,0589	0,0588	0,0587	0,05884
3	0,0361	0,0361	0,0361	0,036	0,036	0,03606
4	0,0469	0,0469	0,0469	0,0468	0,0468	0,04686
5	0,0506	0,0503	0,0508	0,0507	0,0507	0,05062
6	0,0591	0,0591	0,0591	0,0592	0,0592	0,05914
7	0,0372	0,0372	0,0371	0,0371	0,0371	0,03714
NC1	0,0365	0,0365	0,0365	0,0365	0,0365	0,0365
NC2	0,0507	0,0504	0,0504	0,0505	0,0506	0,05052

Tab.: Hmotnosti PLC vzorků před působením lipázy 5 U/ml

Hmotnosti PLC vzorků po působení lipázy 5 U/ml							
Vzorek		Hmotnost [g]					Průměr [g]
1	po 1 dni	0,048	0,048	0,048	0,048	0,0481	0,04802
2	po 2 dnech	0,0587	0,0587	0,0587	0,0586	0,0586	0,05866
3	po 3 dnech	0,0358	0,0356	0,0356	0,0356	0,0355	0,03562
4	po 4 dnech	0,0469	0,0469	0,0469	0,047	0,047	0,04694
5	po 7 dnech	0,0501	0,05	0,0499	0,0499	0,0499	0,04996
6	Po 8 dnech	0,0578	0,0579	0,058	0,058	0,058	0,05794
7	po 9 dnech	0,0367	0,0366	0,0365	0,0365	0,0365	0,03656
NC1	Po 1 dni	0,0365	0,0365	0,0365	0,0364	0,0364	0,03646
NC2	Po 9 dnech	0,05	0,05	0,0501	0,0501	0,0501	0,05006

Tab.: Hmotnosti PLC vzorků po působení lipázy 5 U/ml

Příloha 9

984,02	764,19	624,54	1258,03	1568,36	516,8	696,77	444,7	6131,16	1936,35
439,28	311,14	2552,27	1065,19	662,88	964,71	490,21	826,3	573,65	752,26
501,73	220,77	3163,85	2378,23	592,85	632,21	359,36	1734,65	2216,72	800,1
858,99	384,13	1899,61	692,45	3379,89	1351,44	249,97	2198,85	1052,38	2641,19
330,99	749,85	1899,61	1114,63	2028,37	1343,54	397,04	1585,68	1481,4	549,81
361,76	414,22	1899,61	1062,96	1171,81	766,6	868,65	2071,29	637,08	1145,61
548,16	841,27	1899,61	1305,74	474,94	490,44	457,79	2577,22	842,19	1779,61
709,62	645,98	1899,61	3499,06	415,35	699,88	397,11	472,04	800,14	328,88
2321,39	875,74	1899,61	791,66	1684,36	1253,23	418,17	2784,58	736,79	517,72
527,04	333,91	1899,61	1782,66	1727,74	1116,57	279,98	1082,86	578,07	1817,95

Tab.: Tabulka naměřených hodnot průměrů PLLA vláken [nm]

Počet průměrů vláken	100
Průměr	1140,59
Směrodatná odchylka	907,562
Variační koeficient	79,5693%
Minimum	220,77
Maximum	6131,16

Souhrnná statistika průměrů vláken PLLA [nm]

	<i>Spodní</i>	<i>Horní</i>			<i>Relativní</i>	<i>Kumulativní</i>	<i>Kum. Rel.</i>
<i>Třída</i>	<i>Hranice</i>	<i>Hranice</i>	<i>Střed</i>	<i>Četnost</i>	<i>Četnost</i>	<i>Četnost</i>	<i>Četnost</i>
	v nebo pod	-99		0	0,0000	0	0,0000
1	-99	300,0	100,0	3	0,0300	3	0,0300
2	300	700,0	500,0	36	0,3600	39	0,3900
3	700	1100,0	900,0	25	0,2500	64	0,6400
4	1100	1500,0	1300,0	11	0,1100	75	0,7500
5	1500	1900,0	1700,0	9	0,0900	84	0,8400
6	1900	2300,0	2100,0	5	0,0500	89	0,8900
7	2300	2700,0	2500,0	6	0,0600	95	0,9500
8	2700	3100,0	2900,0	1	0,0100	96	0,9600
9	3100	3500,0	3300,0	3	0,0300	99	0,9900
10	3500	3900,0	3700,0	0	0,0000	99	0,9900
11	3900	4300,0	4100,0	0	0,0000	99	0,9900
12	4300	4700,0	4500,0	0	0,0000	99	0,9900
13	4700	5100,0	4900,0	0	0,0000	99	0,9900
14	5100	5500,0	5300,0	0	0,0000	99	0,9900
15	5500	5900,0	5700,0	0	0,0000	99	0,9900
16	5900	6300,0	6100,0	1	0,0100	100	1,0000
17	6300	6700,0	6500,0	0	0,0000	100	1,0000
18	6700	7100,0	6900,0	0	0,0000	100	1,0000
19	7100	7500,0	7300,0	0	0,0000	100	1,0000

Tab.: Rozdělení průměrů vláken PLLA do jednotlivých tříd [nm]

Příloha 10

Hmotnosti PLLA, PCL a PLC vzorků před působením lipázy 50 U/ml				
Vzorek	Hmotnost [g]			Průměr [g]
PLLA 1	0,0619	0,0619	0,0618	0,061866667
PLLA 2	0,0533	0,0533	0,0532	0,053266667
PLLA 3	0,0624	0,0624	0,0625	0,062433333
PCL 1	0,0442	0,0442	0,0443	0,044233333
PCL 2	0,041	0,041	0,0411	0,041033333
PCL 3	0,0386	0,0386	0,0387	0,038633333
PLC 1	0,0559	0,0559	0,056	0,055933333
PLC 2	0,0724	0,0724	0,0725	0,072433333
PLC 3	0,0649	0,0648	0,0647	0,0648

Tab.: Naměřené hmotnosti PLLA, PCL a PLC vzorků [g] před působením lipázy 50 U/ml

Hmotnosti PLLA, PCL a PLC vzorků po působení lipázy 50 U/ml							
Vzorek		Hmotnost [g]					Průměr [g]
PLLA 1	po 1 dni	0,0618	0,0619	0,062	0,062	0,0621	0,06196
PLLA 2	po 2 dnech	0,0539	0,0539	0,0538	0,0537	0,0537	0,0538
PLLA 3	po 3 dnech	0,0637	0,0635	0,0635	0,0636	0,0636	0,06358
PCL 1	po 1 dni	0,0007	0,0005	0,0005	0,0005	0,0004	0,00052
PLC 2	po 2 dnech	0	0	0	0	0	0
PCL 3	po 3 dnech	0	0	0	0	0	0
PLC 1	po 1 dni	0,0551	0,055	0,055	0,055	0,0551	0,05504
PLC 2	po 2 dnech	0,0708	0,0708	0,0709	0,071	0,071	0,0709
PLC 3	po 3 dnech	0,0631	0,0631	0,0631	0,063	0,063	0,06306

Tab.: Naměřené hmotnosti nanovláčkových vrstev PCL, PLC a PLLA [g] po působení lipázy *Pseudomonas cepacia* o koncentraci 50 U/ml v 5 ml pufru PBS

Příloha 11

Hmotnosti PLC, PLLA a PCL vzorků před působením proteinázy 5 U/ml				
Vzorek	Hmotnost [g]			Průměr [g]
PLC 1	0,0516	0,0516	0,0516	0,0516
PLC 2	0,0515	0,0515	0,0514	0,051466667
PLC 3	0,0519	0,0519	0,052	0,051933333
PLC 4	0,0502	0,0503	0,0502	0,050233333
PLLA 1	0,0513	0,0513	0,0512	0,051266667
PLLA 2	0,0518	0,0518	0,0519	0,051833333
PLLA 3	0,051	0,0511	0,051	0,051033333
PLLA 4	0,0521	0,0521	0,052	0,052066667
PCL 1	0,0515	0,0514	0,0514	0,051433333
PCL 2	0,051	0,0509	0,0509	0,050933333
PCL 3	0,0521	0,052	0,052	0,052033333
PCL 4	0,0519	0,0519	0,0518	0,051866667

Tab.: Hmotnosti PLC, PLLA a PCL vzorků před působením proteinázy 5 U/ml v Tris pufu pH 8

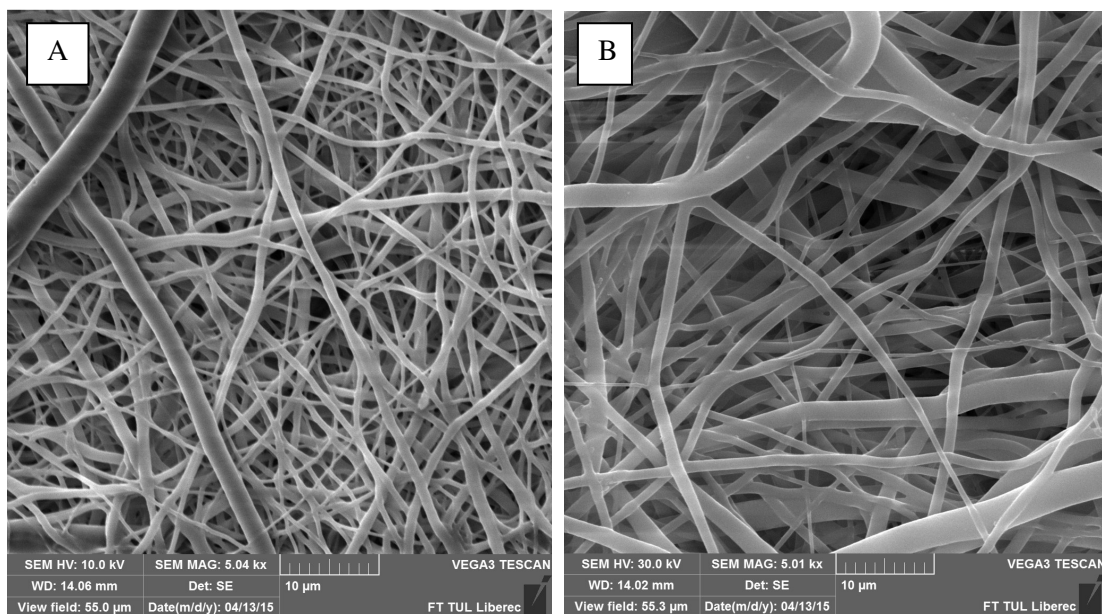
Hmotnosti PLC , PLLA a PCL vzorků po působení proteinázy 5 U/ml v 5 ml Tris pufu						
Vzorek + filtr		Hmotnost [g]			Průměrná hmotnost vzorků s filtrem [g]	Průměrná hmotnost vzorků bez filtru po degradaci [g]
Po 1 dni	PLC 1 + a	0,2076	0,2075	0,2074	0,2075	0,019133
Po 2 dnech	PLC 2 + d	0,1874	0,1874	0,1873	0,187366667	0,003534
Po 3 dnech	PLC 3 + g	0,1978	0,1978	0,1979	0,197833333	0,001533
Po 4 dnech	PLC 4 + j	0,1989	0,1989	0,1988	0,198866667	0,000134
Po 1 dni	PLLA 1 + b	0,2201	0,2199	0,2198	0,219933333	0,030133333
Po 2 dnech	PLLA 2 + e	0,2013	0,2012	0,201	0,201166667	0,008033333
Po 3 dnech	PLLA 3 + h	0,1965	0,1965	0,1964	0,196466667	0,001133333
Po 4 dnech	PLLA 4 + k	0,1942	0,1943	0,1944	0,1943	-0,000166667
Po 1 dni	PCL 1 + c	0,2401	0,2401	0,2401	0,2401	0,0445
Po 2 dnech	PCL 2 + f	0,2245	0,2245	0,2246	0,224533333	0,036633333
Po 3 dnech	PCL 3 + i	0,2181	0,2181	0,2183	0,218166667	0,028533333
Po 4 dnech	PCL 4 + l	0,2143	0,2144	0,2144	0,214366667	0,023266667

Tab.: Hmotnosti PLC , PLLA a PCL vzorků po působení proteinázy 5 U/ml v 5 ml Tris pufu pH 8

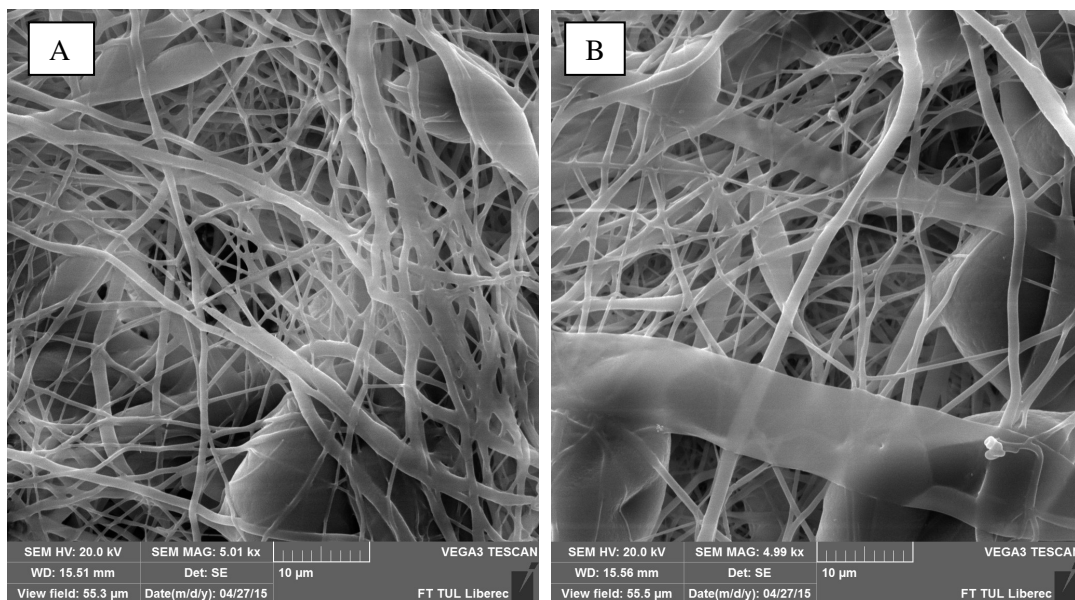
Filtr	Hmotnost filtrů [g]			Průměr [g]
a	0,1884	0,1884	0,1883	0,188366667
b	0,1899	0,1898	0,1897	0,1898
c	0,1957	0,1956	0,1955	0,1956
d	0,1838	0,1838	0,1839	0,183833333
e	0,1932	0,1931	0,1931	0,193133333
f	0,188	0,1879	0,1878	0,1879
g	0,1963	0,1963	0,1963	0,1963
h	0,1955	0,1953	0,1952	0,195333333
i	0,1896	0,1896	0,1897	0,189633333
j	0,1988	0,1988	0,1986	0,198733333
k	0,1945	0,1945	0,1944	0,194466667
l	0,191	0,191	0,1913	0,1911

Tab.: Hmotnosti filtrů [g]

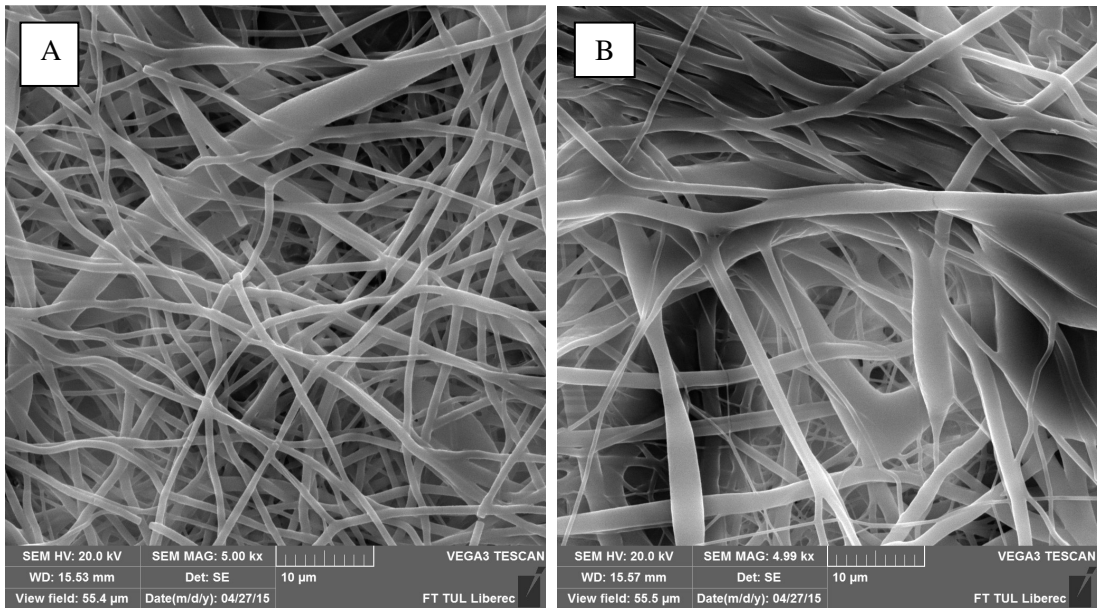
Příloha 12



Obr.: A: PLC po 4 dnech působení lipázy Pseud. cepacia 1 U/ml v 5 ml PBS pH 7,4; zvětšení 5000x, měřítko 10 μm, B: PLC po 2 dnech působení lipázy Pseud. cepacia 1 U/ml v 5 ml PBS pH 7,4; zvětšení 5000x, měřítko 10 μm

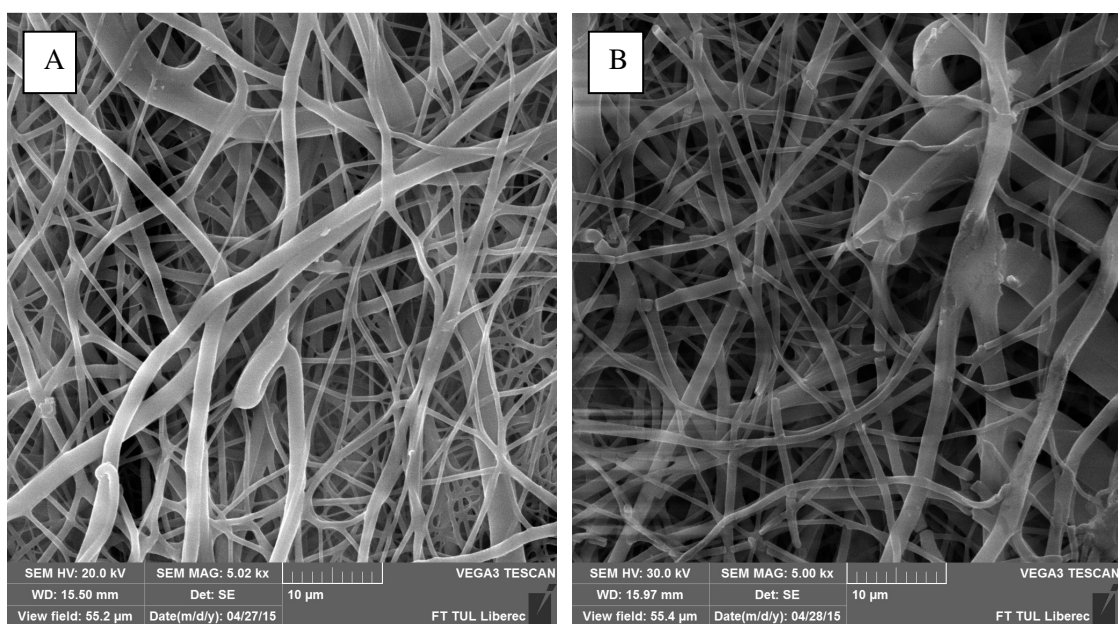


Obr.: A: PLC po 1 dni působení lipázy Pseud. cepacia 5 U/ml v 5 ml PBS pH 7,4; zvětšení 5000x, měřítko 10 μm, B: PLC po 3 dnech působení lipázy Pseud. cepacia 5 U/ml v 5 ml PBS pH 7,4; zvětšení 5000x, měřítko 10 μm

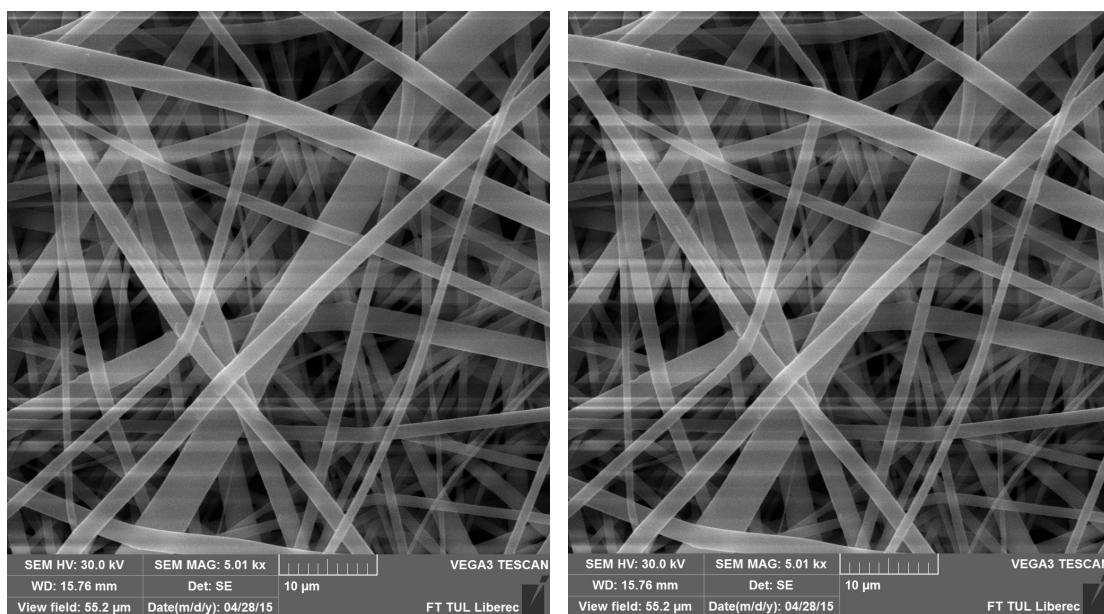


Obr.: A: PLC po 9 dnech působení lipázy *Pseud. cepacia* 5 U/ml v 5 ml PBS pH 7,4; zvětšení 5000x, měřítko 10 μ m, B: PLC po 9 dnech v 5 ml PBS pH 7,4, negativní kontrola; zvětšení 5000x, měřítko 10 μ m

Příloha 13



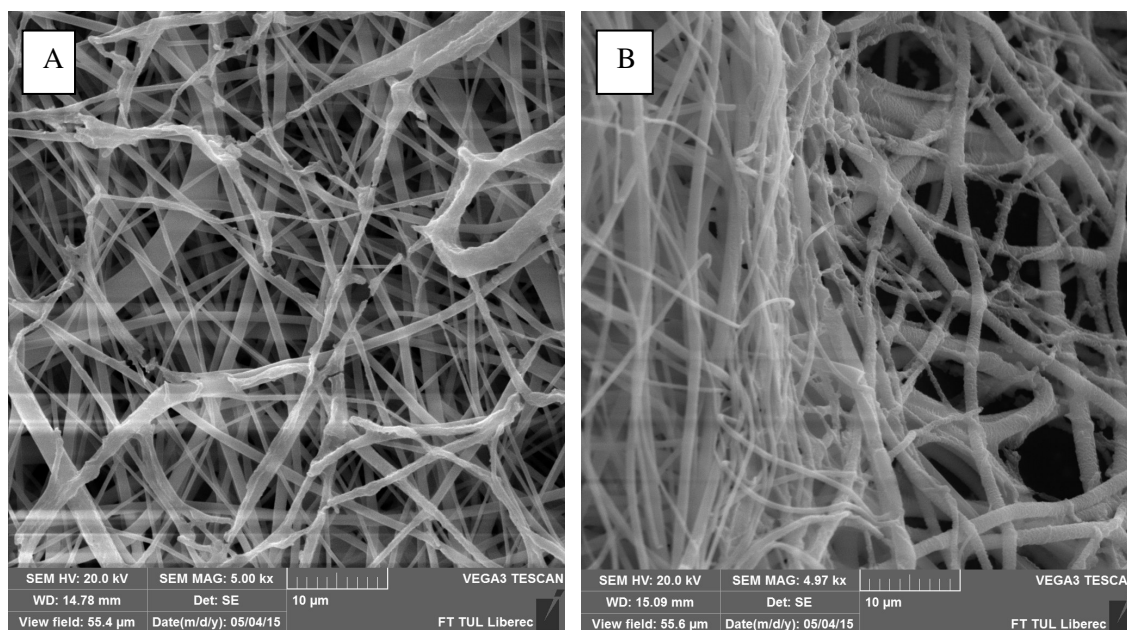
Obr.: A: PLC po 1 dni působení lipázy Pseud. cepacia 50 U/ml v 5 ml PBS pH 7,4; zvětšení 5000x, měřítko 10 μ m, B: PLC po 3 dnech působení lipázy Pseud. cepacia 50 U/ml v 5 ml PBS pH 7,4, zvětšení 5000x, měřítko 10 μ m



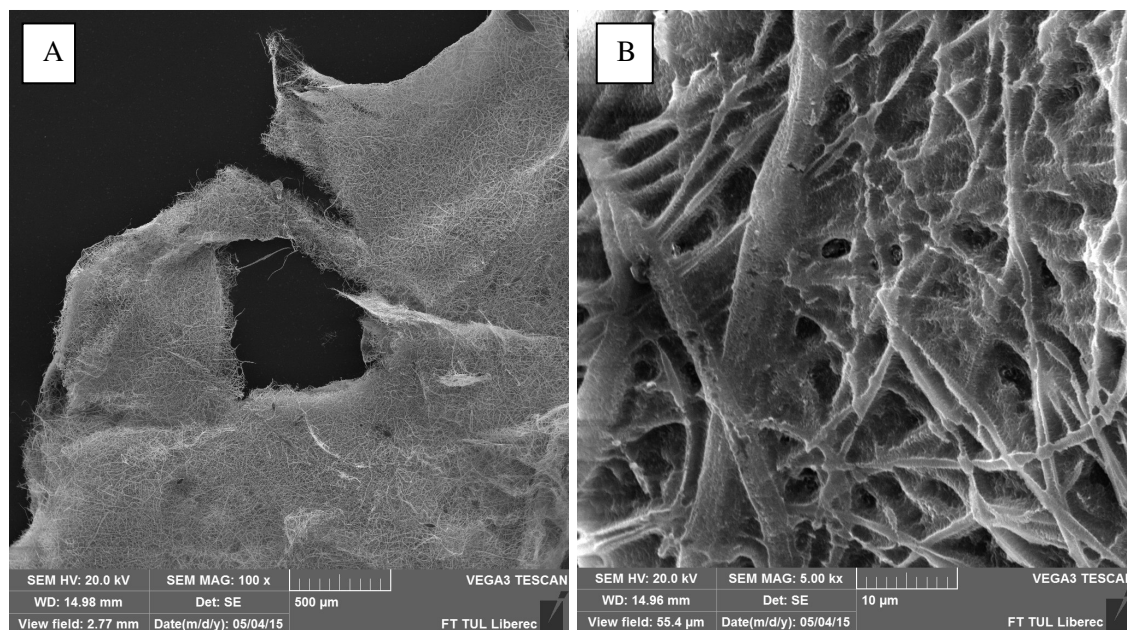
Obr.: A: PLLA po 1 dni působení lipázy Pseud. cepacia 50 U/ml v 5 ml PBS pH 7,4; zvětšení 5000x, měřítko 10 μ m, B: PLLA po 3 dnech působení lipázy Pseud. cepacia 50 U/ml v 5 ml PBS pH 7,4, zvětšení 5000x, měřítko 10 μ m

Příloha 14

Snímky PLLA:

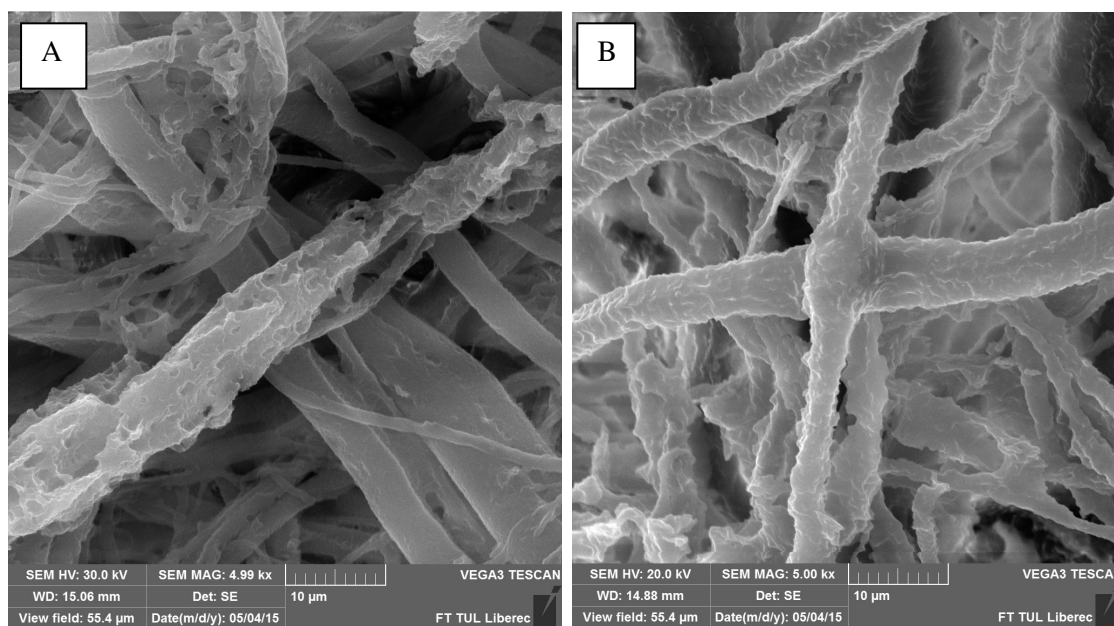


Obr. A: PLLA po 1 dni působení 5U/ml Proteinázy K v 5 ml Tris pufru pH 8, zvětšení 5000x, měřítko 10 μm; B: PLLA po 2 dnech působení 5U/ml Proteinázy K v 5 ml Tris pufru pH 8, zvětšení 5000x, měřítko 10 μm

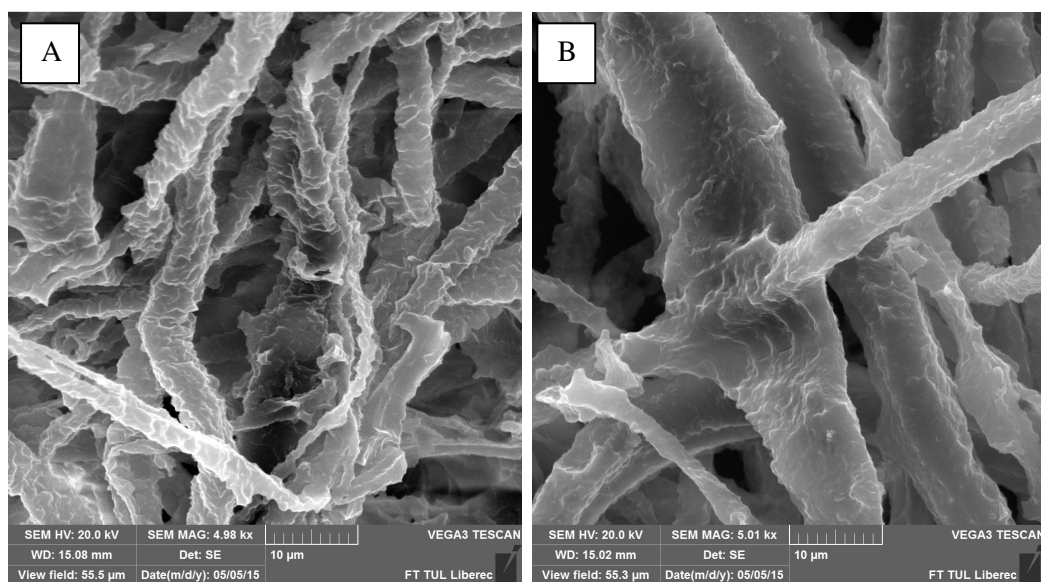


Obr. A: PLLA po 2 dnech působení 5U/ml Proteinázy K v 5 ml Tris pufru pH 8, zvětšení 100x, měřítko 500 μm, B: PLLA po 3 dnech působení 5U/ml Proteinázy K v 5 ml Tris pufru pH 8, zvětšení 5000x, měřítko 10 μm

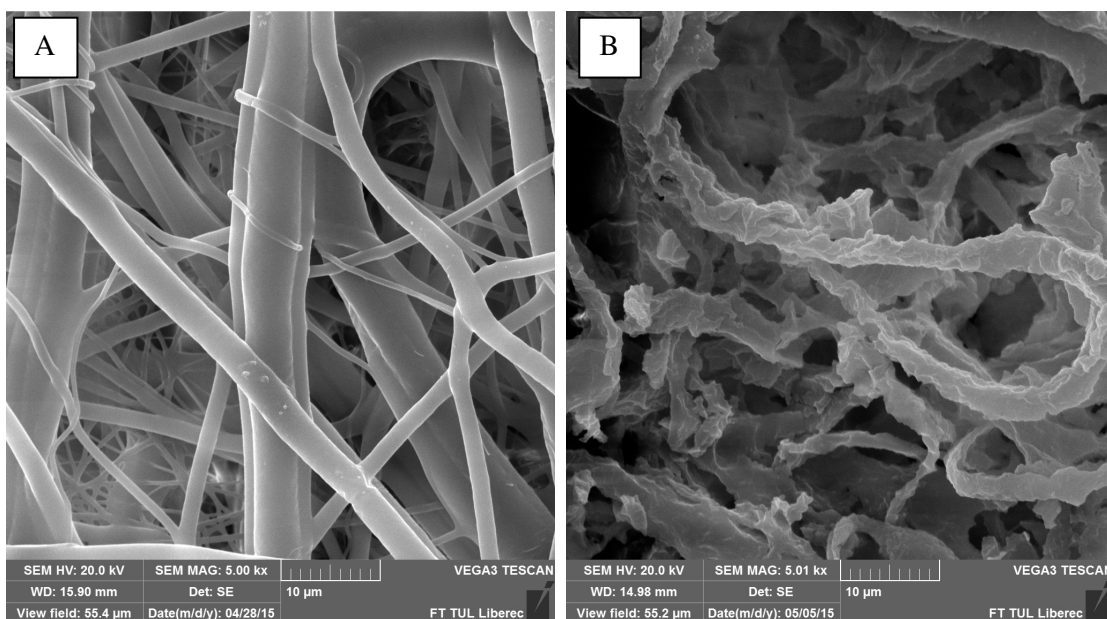
Snímky PLC:



Obr. A: PLC po 1 dni působení 5U/ml Proteinázy K v 5 ml Tris pufru pH 8, zvětšení 5000x, měřítko 10 µm; B: PLC po 2 dnech působení 5U/ml Proteinázy K v 5 ml Tris pufru pH 8, zvětšení 5000x, měřítko 10 µm

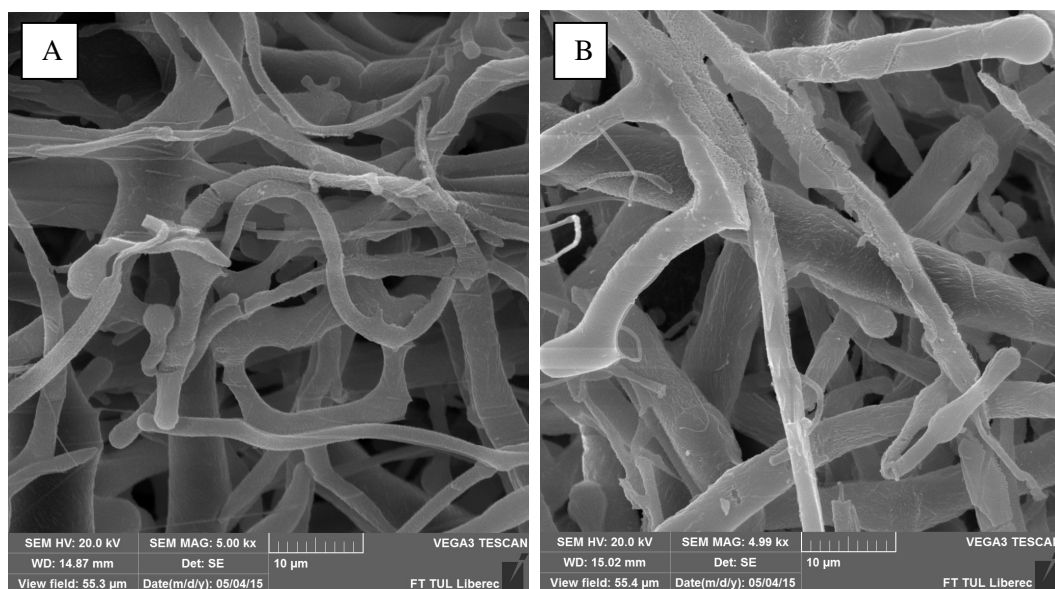


Obr. A: PLC po 3 dnech působení 5U/ml Proteinázy K v 5 ml Tris pufru pH 8, zvětšení 5000x, měřítko 10 µm; B: PLC po 4 dnech působení 5U/ml Proteinázy K v 5 ml Tris pufru pH 8, zvětšení 5000x, měřítko 10 µm

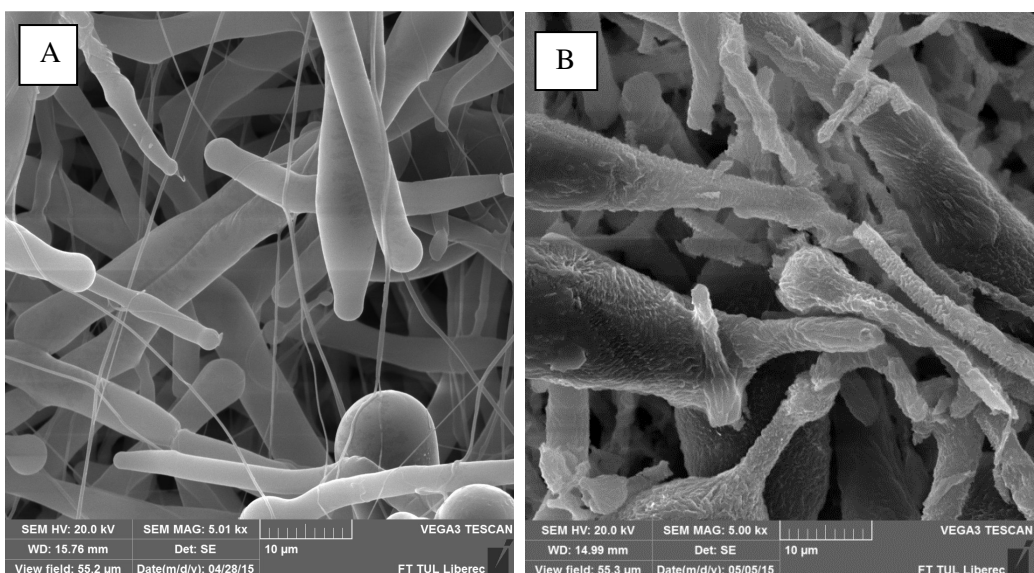


Obr.: A: PLC po 4 dnech působení Tris pufru pH 8 (negativní kontrola), zvětšení 5000x, měřítko 10 µm; B: PLC po 4 dnech působení 5U/ml Proteinázy K v 5 ml Tris pufru pH 8, zvětšení 5000x, měřítko 10 µm

Snímky PCL:



Obr. A: PCL po 1 dni působení 5U/ml Proteinázy K v 5 ml Tris pufru pH 8, zvětšení 5000x, měřítko 10 µm; B: PCL po 2 dnech působení 5U/ml Proteinázy K v 5 ml Tris pufru pH 8, zvětšení 5000x, měřítko 10 µm



Obr.: A: PCL po 4 dnech působení Tris pufru pH 8 (negativní kontrola), zvětšení 5000x, měřítko 10 μ m; B: PCL po 4 dnech působení 5U/ml Proteinázy K v 5 ml Tris pufru pH 8, zvětšení 5000x, měřítko 10 μ m