



Vývoj biodegradabilního objemného scaffoldu pomocí elektrostatického zvlákňování do kapaliny

Bakalářská práce

Studijní program: B3107 – Textil
Studijní obor: 3106R016 – Textilní technologie, materiály a nanomateriály
Autor práce: **Radek Němeček**
Vedoucí práce: doc. Ing. Eva Kuželová Košťáková, Ph.D.





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC
Faculty of Textile Engineering ■

Wet electrospun biodegradable scaffolds

Bachelor thesis

Study programme: B3107 – Textil

Study branch: 3106R016 – Textile Technologies, Materials and Nanomaterials

Author: **Radek Němeček**

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



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Radek Němeček**
Osobní číslo: **T12000272**
Studijní program: **B3107 Textil**
Studijní obor: **Textilní technologie, materiály a nanomateriály**
Název tématu: **Vývoj biodegradabilního objemného scaffoldu pomocí elektrostatického zvlákňování do kapaliny**
Zadávací katedra: **Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů**

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

1. Seznamte se s principy elektrostatického zvlákňování.
2. Vypracujte rešerši týkající se elektrostatického zvlákňování na hladinu kapaliny a do kapaliny zejména s ohledem na výrobu materiálů pro tkáňové inženýrství.
3. Navrhněte postup výroby objemnějších scaffoldů pomocí elektrostatického zvlákňování do kapaliny, uskutečňte ho a připravte sérii vzorků.
4. Proveďte základní strukturní analýzu a úvodní in-vitro testy.
5. Diskutujte výsledky, vyvoďte závěry a navrhněte možná vylepšení pro další studie v této oblasti.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

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

Seznam odborné literatury:

- 1) RAMAKRISHNA, Seeram. An introduction to electrospinning and nanofibers. Hackensack, NJ: World Scientific, c2005, xi, 382 p. ISBN 98-125-6454-3.
- 2) Yokoyama, Y. et al.: Novel wet electrospinning system for fabrication of spongiform nanofiber 3-dimensional fabric, Materials Letters 63 (2009) 754-756.
- 3) LIN, Tong a Xungai WANG. Needleless Electrospinning of Nanofibers: Technology and Applications. Boca Raton (Florida, USA): CRC Press Taylor & Francis Group, 2013. ISBN 978-981-4316-35-4.

Vedoucí bakalářské práce:

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

Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

Datum zadání bakalářské práce: **10. března 2015**

Termín odevzdání bakalářské práce: **8. ledna 2016**



Ing. Jana Drašarová, Ph.D.
děkanka



prof. RNDr. David Lukáš, CSc.
vedoucí katedry

V Liberci dne 10. března 2015

Prohlášení

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

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

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

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

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

Datum: 20. prosince 2015

Podpis:



Poděkování

Rád bych poděkoval své vedoucí Doc. Ing. Evě Košťákové, PhD. za neocenitelnou pomoc, cenné rady a připomínky při psaní této práce. Dále děkuji Mgr. Janě Horákové, Ing. Denise Zálešákové a panu Ing. Pavlovi Pokornému, PhD. za pomoc při práci v laboratořích.

Děkuji mým nejbližším za velkou podporu a pevné nervy během celého studia na Technické univerzitě v Liberci.

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je zaměřena na vývoj biodegradabilního scaffoldu elektrostatickým zvlákňováním do kapaliny. Cílem bylo vyvinout a postavit zvlákňovací aparaturu, která umožní zvlákňovat objemné 3D struktury vhodné pro využití v tkáňovém inženýrství.

Pro vývoj byla použita zvlákňovací aparatura, která umožňovala zvlákňovat polymerní roztok do kapaliny. Ta byla modifikována tak, aby splňovala požadavky pro vyvíjený scaffold. Bylo zjištěno, že pro získání homogenní objemné struktury je podstatné, aby zvlákňování probíhalo pouze do kapaliny a nedocházelo k ulpívání nanovláken na stěnách zvlákňovacího bazénku. Během vývoje byly vytvořeny tři série vzorků z polykaprolaktonu, na kterých byla zkoumána morfologie vlákněné struktury. V závěru byly provedeny základní in vitro testy, které měly potvrdit využití pro tkáňové inženýrství.

KLÍČOVÁ SLOVA

elektrostatické zvlákňování do kapaliny, polykaprolakton, nosiče buněk, nanovlákná, tkáňové inženýrství

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on development of biodegradable scaffolds by means of wet electrospinning. The goal was to develop and construct a spinning apparatus that will enable spinning large 3D structures suitable for use in tissue engineering.

A spinning apparatus enabling wet spinning of a polymer solution was used for the development. It was modified to meet requirements for the scaffold. It was determined that in order to obtain homogeneous voluminous structure, it was necessary for the spinning process to be wet. In addition, it was necessary to prevent adhesion of the nanofibres to the collector pool walls. Three series of polycaprolactone materials were produced during the development, on which the morphology of fibrous structure was examined. As a concluding step, elementary in vitro tests were performed to confirm the usability for tissue engineering.

KEYWORDS

wet electrospinning, polycaprolactone, scaffold, nanofibers, tissue engineering

OBSAH

Abstrakt.....	6
Klíčová slova.....	6
Abstract.....	7
Keywords.....	7
OBSAH.....	8
Seznam použitých zkratk.....	10
Úvod.....	11
1. Teoretická část.....	12
1.1 Nanovlákná.....	12
1.2 Elektrostatické zvlákňování.....	12
1.2.1 Stručně do historie.....	12
1.2.2 Elektrostatické zvlákňování z jehly (Needle electrospinning).....	13
1.2.3 Faktory ovlivňující morfologii vláken.....	14
1.2.3.1 Viskozita.....	14
1.2.3.2 Elektrická vodivost a povrchové napětí.....	14
1.2.3.3 Rozpouštědlo.....	15
1.2.3.4 Elektrické napětí.....	15
1.2.4 Elektrostatické zvlákňování do kapaliny (Wet electrospinning).....	16
1.2.4.1 Výroba nanovláknenných nití pomocí zvlákňování na hladinu kapaliny.....	17
1.2.4.2 Nanovláknenné membrány.....	20
1.3 Scaffoldy.....	23
1.3.1 Scaffoldy pro kosti a chrupavky.....	23
1.3.1.1 Požadavky na scaffold pro kosti a chrupavky.....	24
1.3.2 Používané materiály.....	24
1.3.2.1 Syntetické polymery vhodné pro tvorbu scaffoldů pro tkáňové inž.....	25
1.3.3 Struktura scaffoldů.....	26
1.3.4 Aplikace scaffoldů.....	26
1.3.4.1 Vysoce porézní scaffoldy z poly(ϵ -kaprolaktonu).....	26
1.3.4.2 Vysoce porézní scaffold pro regeneraci kostí.....	29
1.4 Lyofilizace.....	31
2. Experimentální část.....	32
2.1 Materiály.....	32
2.2 Metody.....	32
2.2.1 Elektrostatické zvlákňování do kapaliny.....	32
2.2.1.1 Příprava zásobního polymerních roztoku.....	32

2.2.1.2	Konstrukce zvlákňovací aparatury	33
2.2.1.3	Průběh zvlákňování	34
2.2.2	Lyofilizace vzorků	34
2.2.3	Morfologie vláken.....	34
2.2.4	Mikrobiologické in vitro testy	34
2.2.4.1	Příprava nanovláčenného scaffoldu	34
2.2.4.2	Příprava a kultivace buněk.....	35
2.2.4.3	Testování fluorescenční mikroskopii	35
2.2.4.3	Testování na rastrovacím elektronovém mikroskopu.....	36
2.3	Vyhodnocení dat a diskuze	36
2.3.1	Zvlákňovací aparatura a její modifikace	36
2.3.1.1	Vliv bazénku na nanovláčennou strukturu	37
2.3.1.2	Vliv velikosti kolektoru	38
2.3.1.3	Vliv velikosti bazénku	39
2.3.1.2	Usměňování polymerní trysky pomocí elektromagnetického pole.....	41
2.3.1.3	Vliv izolace bazénku na kvalitu zvlákňovacího procesu	42
2.3.1.4	Změna vzdálenosti mezi jehlou a kolektorem.....	43
2.3.3	Vyhodnocení nanovláčenných vzorků	43
2.3.3.1	Nanovláčenné vrstvy na aparatuře bez modifikace.....	44
2.3.3.2	Nanovláčenné vrstvy na aparatuře s velkým bazénkem	45
2.3.3.4	Nanovláčenné vrstvy na aparatuře s usměňovačem.....	48
2.3.3.4	Neobvyklé nanovláčenné struktury.....	50
2.3.4	In vitro testy.....	51
3.	Závěr	53
4.	Použitá literatura	55

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

DMF	dimetylformamid
DMEM	10% bovine calf serum, 1% antibiotikum
ECM	extracelulární matrix / mezibuněčná hmota
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
MPEG	metoxy-polyetylenglykol
MSC	mezenchymální kmenové buňky
NaCl	chlorid sodný
NG	negativní kontrola vzorku bez buněk pro SEM
PAN	polyakrylonitril
PBS	pufrovaný fyziologický roztok
PCL	Poly(ϵ -kaprolakton)
PE	polyetylen
PEI	polyetylenimin
PI	propidium iodid
PP	polypropylen
PTFE	polytetrafluoretylen
PVA	polyvinylalkohol
PVAc	polyvinylacetát
PVDF	polyvinylidenfluorid
PVDF _{co} -HFP	kopolymer polyvinylidenfluoridu a hexafluorpropylenu
SEM	elektronová rastrovací mikroskopie
T _g	teplota zesklňování
T _m	teplota tání
VZ	vzorek s buňkami pro SEM

ÚVOD

V současnosti zažívá naše společnost intenzivní technologický boom, který nám přináší různé výdobytky moderních technologií. Tyto technologie náš život na straně jedné obohacují a ulehčují nám ho a na straně druhé si však něco berou. S poklesem fyzické aktivity, nadměrnou konzumací potravin a celkově zhoršenou životosprávou se dostáváme do situace, kdy naše těla chřadnou a čím dál více podléháme civilizačním nemocem. Opačnou stránkou jsou zranění vzniklá při sportu, adrenalinových aktivitách či tragických událostech. Lékařská věda taktéž nezahálí a ve spojení s novými technologiemi se žene raketovou rychlostí kupředu. Nově vznikající biomedicínské obory, jako je například tkáňové inženýrství, umožňuje i lékařům cíleně aplikovat medikaci, opravovat poškozené tkáně, vytvářet z našich vlastních buněk „nové náhradní díly“. Aby měli lékaři na čem stavět, přichází na řadu materiálové inženýrství. To se v současnosti čím dál více opírá o nanomateriály, které svými rozměry a vlastnostmi vyhovují potřebám medicíny. Ve velkém se nyní používají různé formy netkaných polymerních materiálů tvořených nanovláknem.

Jedním z efektivních a relativně jednoduchých způsobů, jak tyto plošné nanovláknenné materiály vyrábět, je elektrostatické zvlákňování. Jeho modifikací lze v současné době také vyrobit trojrozměrné struktury s řízenými parametry (průměr vláken, porozita vláken i struktury, objemová hmotnost, aj.). Tyto struktury pak nacházejí uplatnění v biomedicíně jako tzv. nosiče buněk, neboli scaffold.

Cílem této práce je pochopit problematiku tvorby trojrozměrných nanovláknenných struktur metodou elektrostatického zvlákňování do kapaliny. Seznámit se s materiály, které se v tkáňovém inženýrství nejčastěji používají, jaké jsou kladeny požadavky na jejich vlastnosti, především na jejich morfologii (typ vláken, jejich rozměry, velikost pórů, aj.). Následně sestavit a otestovat zvlákňovací aparaturu, na které se vyrobí zkušební materiál pro zkoumání morfologie struktury a pro základní in vitro testy.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Nanovlákná

Nanovlákná definuje literatura jako jednorozměrné útvary o průměru menším než 1000 nm s poměrem délka/průměr větším než 100:1 [1]. Lze je vyrábět rozličnými metodami, například tažením, šablonovou syntézou, fázovou separací, samo uspořádáním nebo elektrostatickým zvlákňováním. Na základě použitého způsobu lze získat rozdílné strukturní a funkční vlastnosti nanovláken, které nám předurčují jejich další využití. Mezi největší přednosti nanovláknenných materiálů, připravených elektrostatickým zvlákňováním patří vysoký měrný povrch a vysoká porozita [1] [2].

1.2 Elektrostatické zvlákňování

1.2.1 *Stručně do historie*

V roce 1600 byla Williamem Gilbertem poprvé popsána interakce kapaliny s elektrostatickými silami. Stalo se tak při pokusu, kdy na vodní kapky na suchém povrchu nechal působit elektrostatické pole, vyvolané třením krystalu jantaru. Všiml si, že při působení elektrostatického pole dochází ke změně tvaru kapky z kulového na tvar kuželovitý [1].

V roce 1745 německý vědec George Mathias Bose a Francouz Jean Antoine-Nollet experimentovali nezávisle na sobě s elektrostatickým rozprašováním kapaliny (electrospraying) [3].

Počátkem 20. století pak vznikají mnohé výzkumy, které se dají považovat za první pokusy s elektrostatickým zvlákňováním (electrospinning). Za zmínku stojí patenty Antona Formhalse, který navrhl zařízení na kontinuální výrobu jemných přízí a práce Geoffreyho Ingrama Taylora, který se zabýval matematickým modelováním tvaru kapky zvlákňovaného polymerního roztoku [1].

Výrazný posun z laboratorního prostředí do průmyslového využití byl učiněn na počátku 21. století na Technické univerzitě v Liberci, kdy tým profesora Jirsáka vyvinul přístroj na kontinuální průmyslovou výrobu nanovláknenných vrstev. První experimenty s elektrickým zvlákňováním do kapaliny (wet electrospinning) pak proběhly v roce 2005, kdy byly popsány první experimenty výzkumných týmů z Japonska a USA [4].

Od roku 2009 až do současnosti pak prudce vzrůstá zájem o tento způsob zvlákňování, který se používá převážně pro výrobu 3D vlákněných scaffoldů [4].

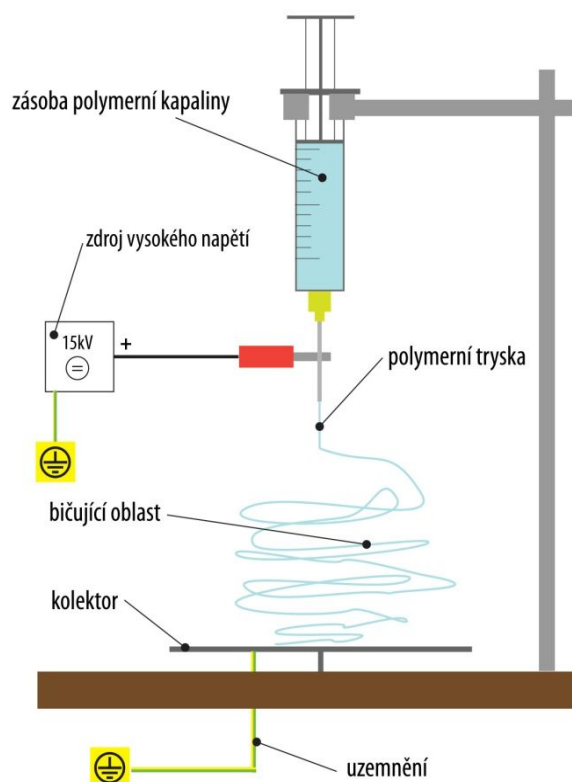
1.2.2 Elektrostatické zvlákňování z jehly (Needle electrospinning)

Elektrostatické zvlákňování z jehly či trysky je jednou z možností, jak lze kontinuálním způsobem vytvářet netkané nanovlákněné materiály. Při tomto procesu vznikají z viskózního roztoku polymeru či polymerní taveniny, za působení vysokého napětí, vlákna, která se svým průměrem pohybují obvykle pod hranicí 1 μm . Ve většině případů vytváří plošné struktury s náhodnou orientací vláken, nicméně vhodně zvoleným kolektorem a způsobem odtahu lze vlákna orientovat a vytvářet tak i nanovlákněné nitě [4] [5].

Základní aparatura pro elektrostatické zvlákňování z jehly se skládá z:

- zásobníku polymerního roztoku či polymerní taveniny,
- zvlákňovací elektrody (jehla, pasteurova trubice, kapilára,...)
- kolektoru,
- a vysokonapěťového zdroje.

Její zapojení je znázorněno na obr. 1 a popisuje zvlákňování na rovinný kolektor. Při tomto typu zapojení je polymerní roztok uložen v injekční stříkačce, ze které je protlačován skrze kovovou jehlu. Ta je elektrovedivě propojena s kladným nebo záporným vysokonapěťovým zdrojem. Injekční stříkačka je umístěna kolmo nad rovinným kolektorem, který je uzemněn nebo je nabíjen opačně než jehla. Konkrétní parametry, například vzdálenost jehly od kolektoru, způsob nabíjení jehly (kolektoru), velikost elektrického napětí, typ polymeru, apod. závisí na konkrétních



Obr. 1: Schéma možné zvlákňovací soustavy pro elektrostatické zvlákňování z jehly na rovinný kolektor.

požadavcích výsledné nanovlákněné struktury [1].

Na polymerní kapalinu působí vysoké elektrické napětí, která se jeho působením deformuje do charakteristického kužele (tzv. Taylorův kužel). Z něho pak vychází polymerní tryska, která je přitahována ke kolektoru. Vznikající vlákno je vlivem elektrického náboje nestabilní, proto tryska po čase přejde do oblasti bičování. V této oblasti dochází k rozpadu trysky na mnoho jemnějších vláken. Vlákna se dluží a vlivem odpařování rozpouštědla vysušují. Po dopadu na kolektor bývá většina vláken téměř suchá. Elektrostatické zvlákňování bývá velmi citlivé na vliv okolního prostředí. Proto je nutné hlídat především relativní vlhkost vzduchu a teplotu okolí [1].

1.2.3 Faktory ovlivňující morfologii vláken

Nanovlákná připravená elektrostatickým zvlákňováním mohou mít značně rozdílnou morfologii (průměr, pórovitost vláken). Ta je dána především faktory, které ovlivňují proces zvlákňování. Jedná se o parametry polymerního roztoku: koncentrace, viskozita, elektrická vodivost, povrchové napětí a použité rozpouštědlo. Dále mají na morfologii nanovlákná vliv parametry zvlákňovací soustavy: velikost elektrického napětí, vzdálenost mezi elektrodou a kolektorem, průtok polymeru, atd. [1] [2].

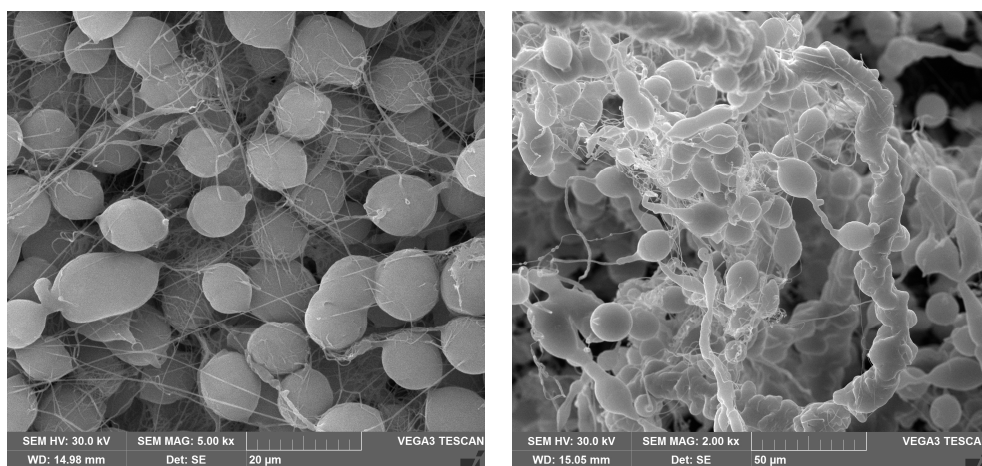
1.2.3.1 Viskozita

Vysoká koncentrace polymeru má za následek zvýšenou viskozitu polymerního roztoku, která ovlivňuje výslednou morfologii vláken. To je dáno hustotou zapletení makromolekulárních řetězců polymeru v roztoku [2]. Vysoko viskózní polymerní roztoky proto u běžně používaných polymerů vytváří vlákna větších průměrů. Některé polymery s vyšší viskozitou naopak vytváří vlákna jemnější. Toto chování je popisováno tím, že vyšší koncentrace způsobuje nárůst hustoty elektrického náboje v roztoku. To pak vede k vyšší dlužící síle působící na vlákno [1].

1.2.3.2 Elektrická vodivost a povrchové napětí

Pro zahájení zvlákňování je nutné, aby byl polymerní roztok nabit dostatečně velkým nábojem. Ten musí dosáhnout takové hodnoty, kdy je elektrické napětí schopno překonat povrchové napětí na povrchu kapky a vytvořit tak polymerní trysku. Zcela nevodivý roztok nemůže být zvlákňován, jelikož u něj nedochází ke kumulaci elektrického náboje [2].

U zvlákňování některých polymerních roztoků vzniká korálkovitá struktura vláken (Obr. 2), i když je použit polymerní roztok o vysoké koncentraci. Aby k tomuto jevu nedocházelo, přidávají se do roztoku různá aditiva, kterými se upravuje jeho elektrická vodivost a povrchové napětí. Mezi nejpoužívanější patří anorganické soli (např. NaCl), minerální a karboxylové kyseliny a povrchově aktivní látky. S nárůstem elektrické vodivosti roztoku, mohou být získávány uspořádanější nanovláknenné struktury, někdy také i vlákna s menšími průměry. Snížením povrchového napětí roztoku se usnadňuje proces zvlákňování. Snižuje se tzv. kritická hodnota napětí elektrického pole, při které dochází k překonání sil povrchového napětí roztoku a zahájení zvlákňování [1].



Obr. 2: Korálková struktura vláken při zvlákňování polymerního roztoku 15 hm% PCL s rozpouštědlem chloroform-ethanol (9:1). Zvlákňování z jehly do bazénku s etanolem. Zleva: perlový efekt, korálky na vlákně.

1.2.3.3 Rozpouštědlo

Použité rozpouštědlo pro tvorbu polymerních roztoků také ovlivňuje morfologii vláken. Pro získání suchých vláken je důležité, aby se rozpouštědlo zcela odpařilo před tím, než vlákna dopadnou na plochu kolektoru. Při malé těkavosti rozpouštědla dopadají vlákna ještě vlhká, to má za následek vytvoření polymerního filmu nebo přílišné slepování vláken. Některá vysoce těkavá rozpouštědla mohou vlivem rychlého odpařování zapříčinit nestabilitu povrchu vlákna, to vede ke vzniku pórovité struktury a částečně i k tvorbě vláken se spíše mikrovláknennými průměry [1] [2].

1.2.3.4 Elektrické napětí

Hodnota elektrického napětí je důležitým faktorem, který ovlivňuje celý proces elektrostatického zvlákňování. Elektrické napětí nabíjí polymerní roztok a je zdrojem tahové síly, která po překonání povrchového napětí vytváří polymerní trysku. Obecně

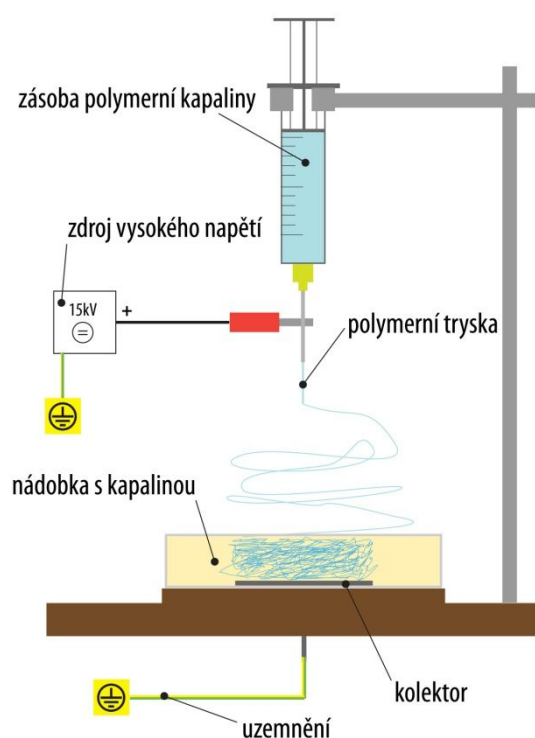
platí, že napětí (kladné či záporné) o velikosti více jak 6 kV dokáže na povrchu polymerní kapky vytvořit Taylorův kužel a zahájit tak proces elektrostatického zvlákňování. Aby byl tento proces stabilní, musí se velikost elektrického napětí nastavit úměrně k průtoku polymerní kapaliny zvlákňovací jehlou. Při zvyšujícím se napětí dochází k urychlování toku elektronů, a tím i ke zvyšování rychlosti průtoku polymerní kapaliny tryskou. Pomocí těchto parametrů je také možné do značné míry ovlivnit výslednou morfologii vláken, zejména jejich průměr. Při nízkém elektrickém napětí a nízké viskozitě polymerního roztoku dochází k tzv. Rayleighově nestabilitě, která má za následek rozpad vláknenné struktury a vzniku perličkového efektu (viz kapitola 1.2.3.2 této práce). Při vysokém elektrickém napětí vznikají další dva druhy nestability (bending a whipping), které ztenčují a prodlužují vlákna [1] [2] [19].

1.2.4 Elektrostatické zvlákňování do kapaliny (Wet electrospinning)

Elektrostatické zvlákňování do kapaliny je modifikací klasického zvlákňování na rovinný kolektor, který je umístěn na vzduchu (obr. 1). Jako kolektor se využívá nádoba s vhodnou kapalinou, která je stejně jako při klasickém elektrostatickém zvlákňování uzemněna nebo nabíjena opačným nábojem než elektroda. Tato metoda umožňuje vytvářet objemné vláknenné struktury, kterých při zvlákňování na vzduchu nelze docílit. Další možné využití je výroba nanovláknenných nití [1] [2] [7] [9].

Parametry zvlákňování jsou obdobné jako u zvlákňování na rovinný kolektor. Důležitou roli zde hraje vhodně použitá

kapalina kolektoru, která výrazně ovlivňuje strukturu vláken a celé vláknenné struktury. Vlivem povrchového napětí kapaliny kolektoru se vlákna budou zachytávat na hladině nebo nořit pod hladinu. Změna povrchového napětí tak umožňuje výrobu rozdílných



Obr. 3: Schéma možné zvlákňovací soustavy pro elektrostatické zvlákňování z jehly do nádoby s kapalinou.

vlákných struktur (nití, chomáčků, aj.). Oproti klasickému zvlákňování spočívá výhoda především v manipulaci s vláknou strukturou. S touto lze libovolně manipulovat, aniž by došlo k výraznému poškození materiálu [7] [8].

Zvlákňování do kapaliny se začalo rozvíjet poměrně nedávno a v současné době se jedná pouze o laboratorní metodu. I přesto však dosahuje poměrně zajímavých výsledků, které se dají využít při výrobě nanovlákných scaffoldů v tkáňovém inženýrství, elektrotechnických aplikacích, sanačních technologiích a dalších odvětvích [7] [8] [9].

1.2.4.1 Výroba nanovlákných nití pomocí zvlákňování na hladinu kapaliny

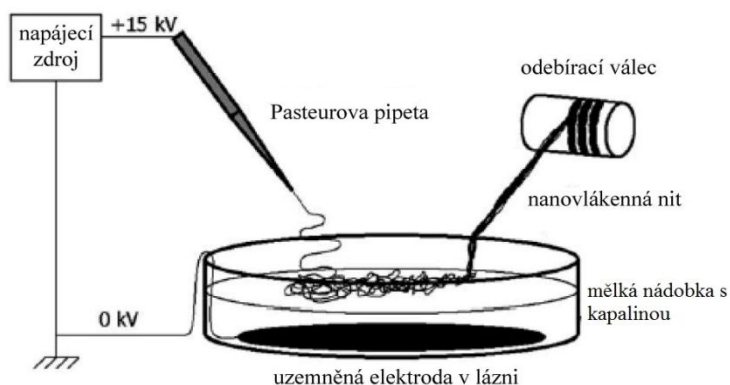
Jedno z možných využití elektrostatického zvlákňování do kapaliny je snímání nanovlákné vrstvy z hladiny. Tímto způsobem se dají vyrábět v laboratorním měřítku nanovlákné příze. Jedná se o poměrně o jednoduchý způsob výroby, který vykazuje vysokou míru uspořádání vláken v přízi.

Nanovlákné nitě byly vytvořeny například z polyvinylidenfluoridu (PVDF), polyvinylacetátu (PVAc) a polyakrylonitrilu (PAN). Jako rozpouštědlo pro PVDF byl použit N,N-dimethylacetamid, pro PVAc a PAN pak N,N-dimethylformamid [7].

Polymer	koncentrace (hm%)		Zvlákňovací napětí (kV)	Vzdálenost mezi kapilárou a kolektorem (cm)
PVDF	15	20	20	20
PVAc	18		15	20
PAN	5		15	20

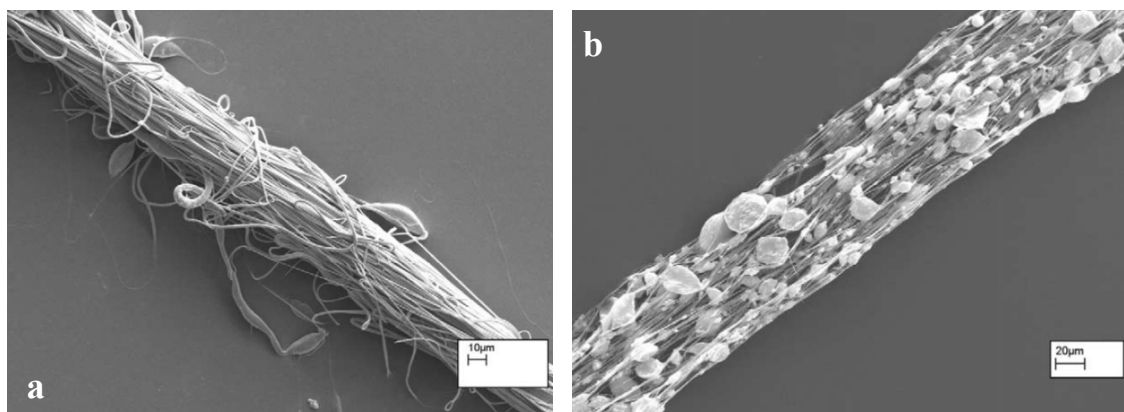
Tabulka 1: Parametry elektrostatického zvlákňování na hladinu kapaliny pro tvorbu nanovlákné příze [7].

Zvlákňovací soustava se skládala ze skleněné pipety, odkud byl vlivem gravitace dávkován roztok polymeru (cca 1 ml/h). Elektrická vodivost polymeru byla zajištěna vložením měděného drátku do roztoku. Pro zachytávání nanovláken byla použita skleněná Petriho miska s vloženou kovovou destičkou, která byla uzemněna pomocí měděného drátku, který byl veden přes okraj misky. Jako lázeň byla použita destilovaná voda. Parametry vzorků a napětí jsou popsány v tabulce 1. Celá zvlákňovací soustava, včetně následného odtahu příze je znázorněna na obr. 4 [7].



Obr. 4: Navíjení nitě z bazénku s uzemněnou elektrodou [7].

Z výsledků bylo patrné, že veškerá příze vykazovala vysokou míru uspořádání vláken. Se zvyšující se koncentrací rostly průměry vláken a snižovalo se množství perliček ve struktuře. Rozdíl je dobře vidět na obr. 5, kde jsou ukázány příze z 20 hm% PVDF (obr. 5a) a 15 hm% PVDF (obr. 5b) [7].



Obr. 5: Příklady nanovláknenných nitě vyrobených elektrostatickým zvlákňováním na hladinu kapaliny
a) 20hm% roztoku PVDF, nit vykazuje nízký počet perliček a vysoký průměr vláken.
b) 15hm% roztok PVDF, nit vykazuje vysoký počet perliček a nízký průměr vláken.[7]

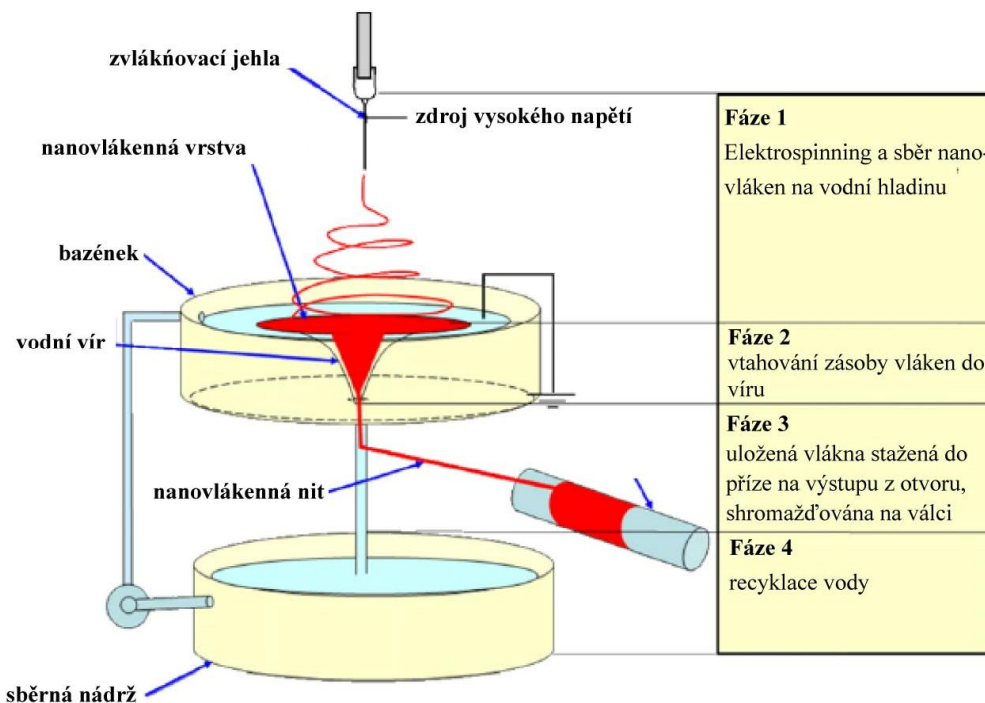
Proces získávání nitě byl autory článku rozdělen do tří fází. V první fázi se shlukovala náhodně orientovaná vlákna na hladině. Za působení tahových sil se ve druhé fázi vlákna formovala do uspořádanějšího napřímeného 2D útvaru a byla tažena směrem k okraji Petriho misky. Třetí fáze pak probíhala na rozhraní voda-vzduch, kdy byl vláknenný útvar vytažen z kapaliny. Vlivem povrchového napětí zbývající vody se vlákna shlukovala do 3D útvaru, který byl nazván nití [7].

Výsledky také ukázaly, že použitím NaCl nebo povrchově aktivních látek, se vlákna neshlukovala na hladině, ale klesala pod ní. To mělo za následek zvýšení tahových sil

na vlákna a zhoršení stejnoměrnosti a napřímení vlákněné struktury. Další vliv elektrické vodivosti a povrchového napětí není v této publikaci popisován [7].

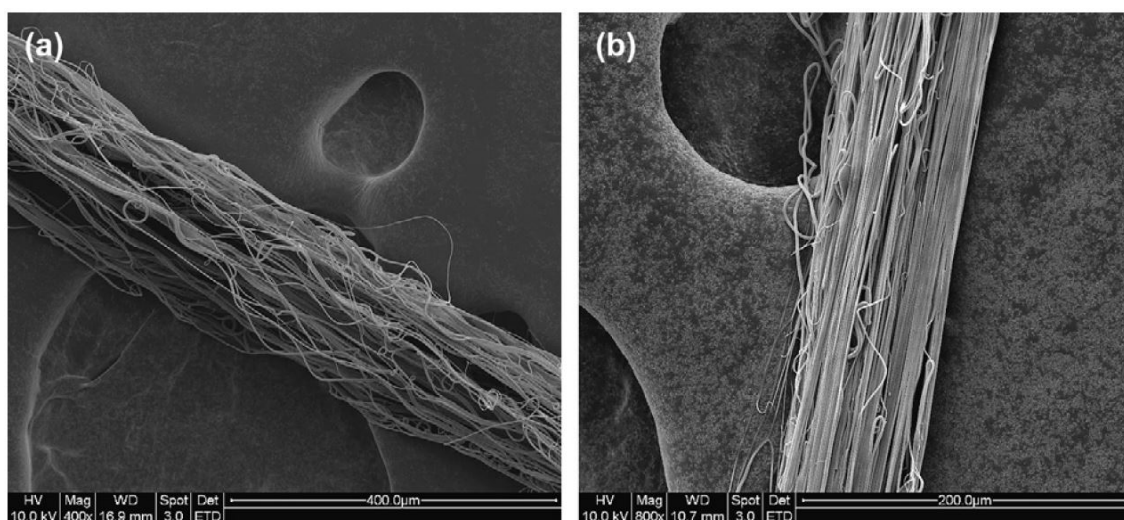
Jiný článek popisuje výrobu nekonečné nanovlákněné nitě pomocí hydrodynamických interakcí, pomocí kterých bylo manipulováno s elektrostaticky zvlákněnými vlákny. Tato manipulace dala vláknům požadovanou orientaci. Pro experiment byl použit kopolymer polyvinylidenfluoridu a hexafluorpropylenu (PVDFco-HFP) v rozpouštědle 40 % dimethylacetamidu a 60 % acetonu v koncentraci 8, 10 a 12 hm% PVDFco-HFP [8].

Zvláknovací sestava byla popsána na následujícím schematickém obr. 6, který znázorňuje jak zvláknovací, tak odtahovou část. Polymer byl přiváděn do tupé jehly připojené na kladný pól zdroje o elektrickém napětí 12 kV. Jehla byla vzdálena od hladiny 12 cm. Odtah nanovláken byl zajištěn pomocí vodního víru, který vznikl ve válcové nádobě vlivem průtoku vody skrze otvor ve dně bazénku o velikosti 5 mm v průměru. Nanovlákněná nit byla odtahována na odtahový válec a přebytečná voda byla zachytávána do spodní nádoby, ze které byla za pomoci čerpadla přečerpávána zpět do bazénku. V bazénku byl umístěn uzemněný drát, který slouží ke sběru náboje po zvláknění [8].



Obr. 6: Schematický postup při výrobě nanovlákněné nitě pomocí hydrodynamických sil [8].

Vlákna dopadala na hladinu a byla okamžitě zachytávána do proudu rotující kapaliny a unášena k otvoru ve dně. V tomto okamžiku docházelo k shlukování nanovláknenné sítě a vzniku příze, která byla dále orientována ve směru vytékající vody. K dalšímu zvyšování orientace a celistvosti příze docházelo pomocí tahové síly při navíjení na odtahový válec. Porovnání příze před odtahem na trn a po působení tahové síly při navíjení, bylo ukázáno na obr. 7 [8].



Obr. 7: SEM snímky nanovláknenné nitě vyrobené elektrostatickým zvlákňováním s využitím hydrodynamických sil: (a) bez tažení na vzduchu; (b) po odtahu na vzduchu při navíjení na sběrný válec. [8]

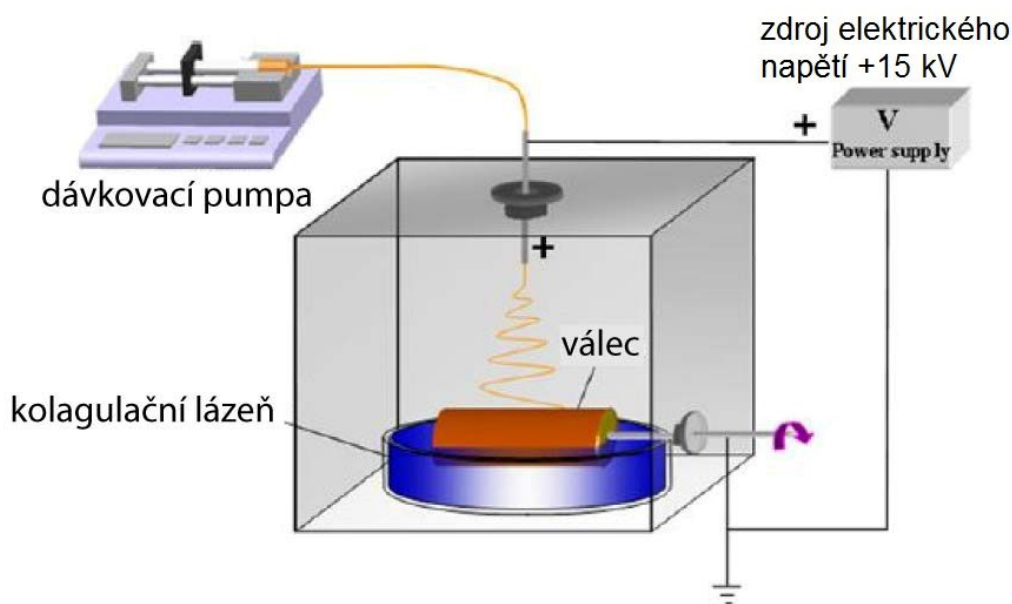
1.2.4.2 Nanovláknenné membrány

Metoda wet elektrospinning se dá také úspěšně využít pro výrobu nanovláknenných membrán, které lze využít jako separátory těžkých kovů z vody. Využívá se zde především vysoký měrný povrch nanovláknenných materiálů a schopnost polymerů, jako je např. polyetylenimin (PEI), adsorbovat na sebe ionty těžkých kovů [9].

Pro výrobu takovéto membrány byl použit roztok ze dvou polymerů: 6 hm % polyvinylalkoholu (PVA) ve vodě a 50 hm % PEI ve vodě. Pro zlepšení zvlákňování byl ještě přidán sodium dodecyl benzensulfonát (SDBS) a to v 0,1% hm koncentraci (vztaženo na hmotnost polymerního roztoku PEI/PVA). PVA zde byl použit jako substrát, ve kterém byly uloženy segmenty z PEI [9].

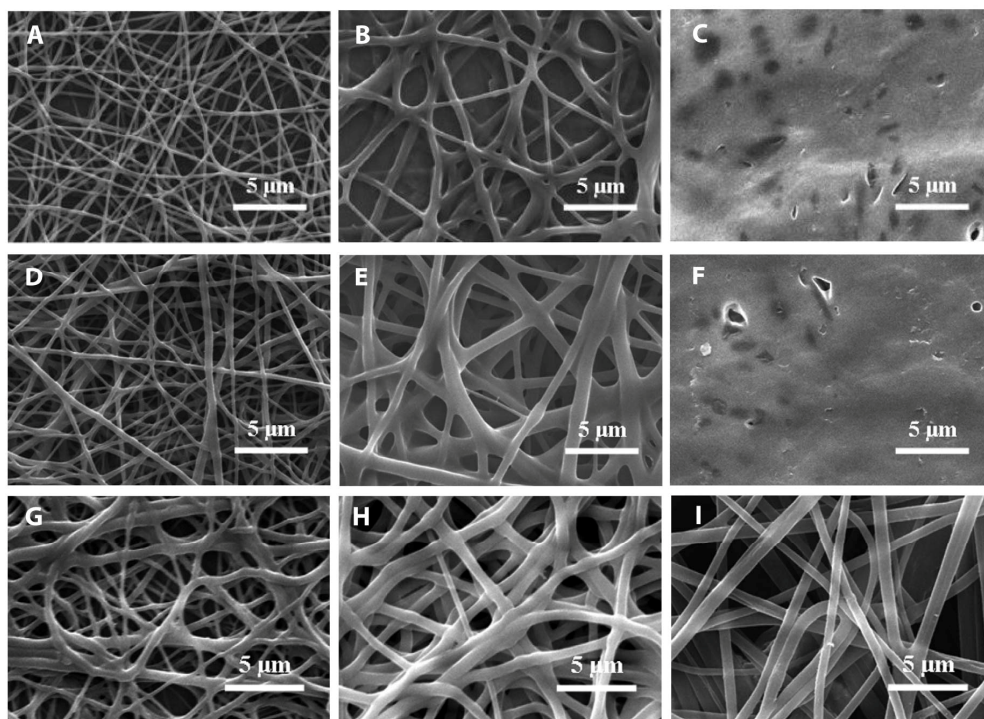
Samotné zvlákňování bylo provedeno na speciálně sestavené zvlákňovací sestavě, která byla svým provedením odlišná od sestav, které byly v této práci doposud uvedeny. Její schematické zapojení je znázorněno obr. 8. Zvlákňovací jehla s polymerem byla připojena na kladný pól stejnosměrného zdroje a napájena 15 kV. Vzdálenost mezi ní

a uzemněným kolektorem byla 15cm a polymerní roztok se dávkoval rychlostí 0,36ml/h. Jako kolektor byl použit kovový buben, který se brodil v koagulační lázni a zachytával nanovláknennou membránu rychlostí cca 3m/min. Kolagulační lázeň byla složena ze síťovacího činidla glutaraldehyd (25% vodný roztok) a N, N - dimethylformamidu (DMF) v poměru 1:20. Takže již při samotné koagulaci docházelo k zesíťování PVA. Tímto bylo dosaženo výrazně lepších výsledků, než při klasickém postupu zvlákňování a síťování ve dvou krocích [9].



Obr. 8: Schematické zapojení sestavy na výrobu nanovláknenných vrstev z PEI/PVA stabilizovaných vůči působení vody[9].

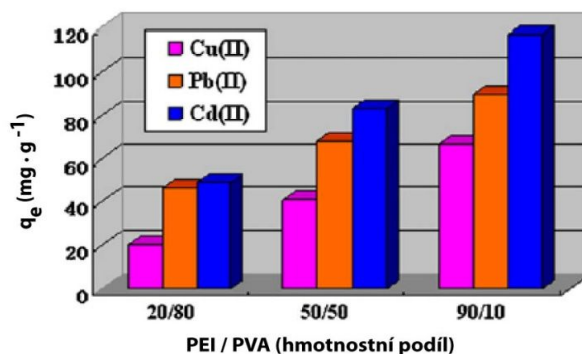
Stejně jako v předešlých popsáných experimentech byla i zde morfologie nanovláknenných membrán ovlivňována především hmotnostním podílem polymeru ve zvlákňovacím roztoku. V tomto případě však záviselo taktéž na poměru mezi oběma polymery (PEI/PVA). Výzkumníci se zaměřili na porovnání dvou metod zvlákňování se síťováním, a to na klasickou dvoustupňovou metodu (zvlákňování a síťování ve dvou krocích) a jednostupňovou metodu (zvlákňování do koagulačně-síťovací lázně). Na obr. 9 A – C je porovnán vliv poměru PEI/PVA ve zvlákňovacím roztoku na morfologii vláken v případě použití dvoustupňové metody. Byl zde jasně patrný nárůst průměru vláken až do překročení kritického poměru, který měl za následek rozpad vláknenné struktury a vznik slepenců, které zcela zalepily póry mezi vlákny (obr. 9 D – E) [9].



Obr. 9: SEM snímky nanovlákněné membrány PVA/PEI elektrostaticky zvlákněných na rotující válec brodicí se v koagulační lázni se síťovadly: suché zvláknění před zesíťením: A 20/80, B 50/50, C 90/10; suché zvláknění po zesíťení: D 20/80, E 50/50, F 90/10; mokré zvláknění: G 20/80, H 50/50, I 90/10; [9]

Při zvláknění jednodušovou metodou byl opět měněn poměr mezi jednotlivými polymery. Bylo dokázáno, že při jednodušovém zvláknění došlo k eliminaci kritického poměru PEI/PVA, a i při poměru 90/10 nedocházelo k zaslepení pórů [9].

Při sledování adsorpčních schopností membrány bylo prokázáno, že s rostoucím podílem PEI v polymerním roztoku, rostla i její adsorpční schopnost. Tato závislost nebyla lineární, jak ukazuje graf 1. Autoři článku toto vysvětlují tak, že při zvyšujícím se podílu PEI v polymerním roztoku docházelo k tvorbě hrubších vláken a tím ke snížení měrného povrchu membrány [9].



Graf 1: Adsorpční kapacita PEI/PVA nanovlákněné membrány s různým hmotnostním podílem PEI/PVA. Počáteční koncentrace kovových iontů 100 mg.l⁻¹ [9].

Pro praktické využití je důležité, aby membrána umožňovala desorpci adsorbovaných iontů kovů za účelem snadné recyklace. Běžně používané postupy desorpce iontů těžkých kovů za použití kyseliny dusičné nebo kyseliny chlorovodíkové zde nebyly použity z důvodu možné degradace PVA. Namísto toho byl použit roztok EDTA (kyselina etylendiamintetraoctová), u kterého se ukázalo, že jeho přítomnost zajišťuje velkou desorpční schopnost membrány (až 99 %) aniž by byla snížena její následná schopnost adsorbovat. [9]

1.3 Scaffoldy

Scaffoldy, neboli nosiče buněk, jsou nedílnou součástí regenerativní medicíny a tkáňového inženýrství. Nabízejí alternativní možnosti k transplantaci celých orgánů a tkání. Aby bylo možné získat novou tkáň, musí být splněny tři faktory: *i*) buňky jsou odděleny a odebírány z dárcovské tkáně pacienta (tzv. autogenní buňky); *ii*) jako tkáňové scaffoldy jsou použity biokompatibilní materiály, ve kterých jsou buňky uchyceny a kultivovány, což umožňuje implantaci na požadované místo v poškozené tkáni; *iii*) je zapotřebí použít růstové faktory, které podporují a / nebo předcházejí adhezi buněk, proliferaci, migraci a prodiferenciaci mezenchymálních kmenových buněk (MSC). Z těchto tří klíčových komponentů mohou právě scaffoldy hrát velmi důležitou roli v regenerativní medicíně a tkáňovém inženýrství. Úkolem scaffoldů je totiž vyvolat a stimulovat růst buněk nasazených v jejich porézní struktuře nebo umožnit migraci buňkám z okolní tkáně, případně napodobovat extracelulární matrix (ECM), (mezibuněčnou hmotu) [10].

1.3.1 Scaffoldy pro kosti a chrupavky

V případě onemocnění chrupavek je každý rok ve Spojených státech amerických provedeno více než tři miliony operací koleních, kyčelních, a jiných kloubů. Mezi nejčastější onemocnění patří artritida, která často vzniká v důsledku poškození chrupavky, zranění při sportu, či jiných traumat nebo nadměrnou zátěží. Tato degenerace chrupavky společně s její neschopností samostatné regenerace vede k další degradaci kloubů. Nejedná se ale pouze o onemocnění kloubů dolních končetin. Velice často bývají postiženy také klouby v oblasti hlavy a krku. Velká část pacientů nakonec potřebuje chirurgickým zákrokem chrupavku nahradit. Podobně lze také postupovat u

rekonstrukce septa (chrupavčitá nosní přepážka), rekonstrukce uší, laryngotracheální výchlípky (výrůstek v oblasti hrtanu), apod. [10]

V praxi (mimo ČR) se využívá k regeneraci chrupavky kmenových buněk, které jsou odebrány z kostní dřeně nebo zdravé chrupavky pacienta. Tyto buňky jsou rozděleny na jednotlivé chondrocytové buňky za použití enzymů, například kolagenázy, a následně kultivovány in vitro, aby bylo získáno jejich dostatečné množství. Chondrocytové buňky nebo chondrogenované kmenové buňky jsou pak nasazeny na porézní syntetický scaffold. Takto připravený štěp je následně kultivován v bioreaktoru, dokud nedojde k uchycení a namnožení buněk. Poškozená tkáň je odstraněna, a štěp je implantován do poškozeného místa v těle pacienta. Biodegradabilní scaffold je díky fyziologickým procesům v těle rozkládán a chondrocytové buňky, produkující kolagen a glykosaminoglykany, si místo něj vytváří své vlastní přirozené ECM, čímž dochází k postupné regeneraci chrupavky [10].

1.3.1.1 Požadavky na scaffold pro kosti a chrupavky

Vzhledem k tomu, že většina typů savčích buněk, tedy i lidských, jsou závislé na uchycení k substrátu, je velice důležité, aby použité scaffoldy splňovaly základní požadavky pro jejich zdárné přežití, proliferaci a migraci buněk do ostatních částí scaffoldu [10].

Fyzikálně-chemické požadavky na scaffold jsou: poskytovat dostatečnou podporu pro růst tkání; zajistit dostatečnou adhezi buněk a podpořit jejich chemickou odezvu (cellular response); biokompatibilita a biodegradabilita; vysoká pórovitost s velkým měrným povrchem a objemem; mechanická odolnost a rozměrová stabilita; sterilizovatelnost, apod [10].

1.3.2 Používané materiály

Porézní 3D scaffoldy lze vyrobit z přírodních nebo syntetických polymerů, keramiky, kompozitních biomateriálů, materiálů uvolňujících cytokiny (signální proteiny) a v menší míře také z kovu [10].

Při výběru vhodného materiálu pro konstrukci scaffoldu hraje hlavní roli požadavek na jeho biokompatibilitu. Rozumí se tím vlastnost materiálu být při specifické aplikaci snášen živým organismem [10]. Biokompatibilní materiál nesmí poškozovat in vivo normální tělní funkce, tedy nesmí vyvolávat žádné zánětlivé, alergické, toxické ani

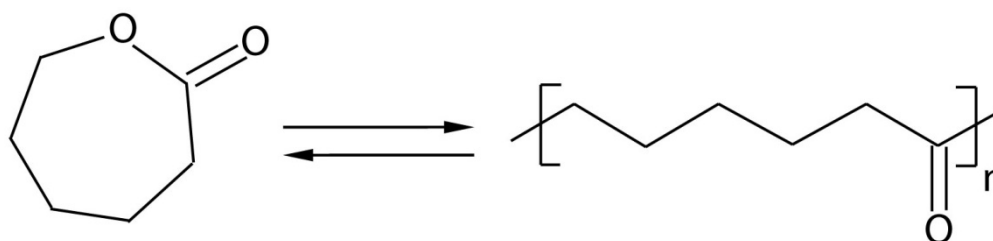
imunologické reakce, nesmí ovlivňovat srážlivost krve nebo stimulovat změny v plazmatických proteinech a enzymech, dále nesmí vyvolávat karcinogenní, mutagenní nebo teratogenní (celkové změny) účinky na okolní tkáň [11].

1.3.2.1 Syntetické polymery vhodné pro tvorbu scaffoldů pro tkáňové inženýrství

Syntetické polymery jsou jedny z nejvíce používaných materiálů v tkáňovém inženýrství. Je to dáno především snadným řízením jejich fyzikálně-chemických vlastností, dobrou mechanickou odolností, zpracovatelností a nevyskytující se imunogenicitních reakcí (obranné reakce organismu). Oproti organickým polymerům je pak výhoda především v ceně a odpadá problém s nechtěnou kontaminací v důsledku jejich izolování z rostlinné, zvířecí nebo lidské tkáň [10] [11].

Poly(ϵ -kaprolakton) PCL

PCL je hydrofobní, semikrystalický, měkký polymer, s T_g (-60 °C) a T_m (55 – 60 °C), chemicky se taktéž řadí mezi polyestery a je připravován katalytickou polymerizací s otevřením laktonového kruhu (ϵ – kaprolaktonu). Autoři článku [23] uvádějí, že za různě definovaných podmínek, lze použít jako katalyzátor různé kovové a nekovové prvky či organické sloučeniny [12] [23].



Obr. 10: Polymerace poly(ϵ -kaprolaktonu) otevřením kruhu ϵ -kaprolaktanu.

PCL je významný také pro svou biokompatibilitu (snášlivost s živými organismy) a biodegradabilitu (schopnost rozkladu živými organismy). Širšímu využití PCL, jako čistého polymeru, v oblasti tkáňového inženýrství, však brání jeho relativně dlouhá doba resorpce (uvolnění a vstřebání) dočasných implantátů [13]. Rychlost této degradace závisí na vhodných okolních podmínkách a také na stupni krystalinity polymeru. S její vzrůstající hodnotou rychlost degradace klesá [24].

V současné době, se PCL používá v mnoha medicínských a biomedicínských aplikacích, například jako šicí nitě, pro dlouhodobé uvolňování léčiv (enkapsulaci),

tkáňové inženýrství, k regeneraci pokožky, tvorbu podpor pro růst fibroblastů a osteoblastů, nebo nanokompozity pro regeneraci kostí [14].

1.3.3 Struktura scaffoldů

Kloubní a kostní štěpy musí splňovat specifické nároky na strukturu scaffoldu. Ten musí být dostatečně objemný a mechanicky odolný, aby plně vyplnil chybějící tkáň a odolal i následnému mechanickému namáhání než dojde k jeho vstřebání tělem pacienta.

Pro tyto aplikace by mohly být vhodné polymerní scaffoldy, které se vyrábí elektrostatickým zvlákněním do kapaliny. Aby bylo dosaženo dostatečně porézní a zároveň co nejvíce homogenní objemné struktury, je nutné po zvláknění do kapaliny vzorek lyofilizovat a po získání dostatečného množství materiálu lisovat za zvýšené teploty [15].

Porézní povrch struktury je důležitý nejenom pro lepší uchycení buněk, ale také pro přenos kyslíku a živin k buňkám a jejich dobrý růst. Velikost lidské buňky není menší než jeden mikrometr, je tedy nutné zajistit dostatečnou velikost pórů, aby bylo umožněno buňkám prorůstát i do vnitřku struktury. Jedině tak je možné, aby scaffold plnil funkci přírodního ECM. Vysoce porézní vláknitá struktura scaffoldu navíc umožňuje odstraňovat metabolické odpady buněčné činnosti. Z těchto důvodů je nezbytné vyvinout techniku zajišťující relativně velké póry uvnitř elektrostaticky zvlákněného scaffoldu, při zachování jeho geometrie a stability během růstu buněk [16].

1.3.4 Aplikace scaffoldů

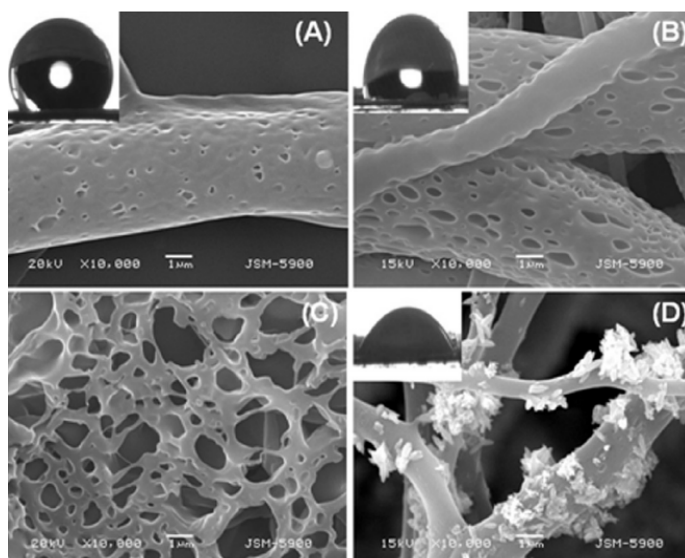
Jako příklady aplikace scaffoldů vyrobených wet elektrospiningem jsou zde uvedeny dva články věnující se vývoji pro aplikaci v oblasti kostí a chrupavek.

1.3.4.1 Vysoce porézní scaffoldy z poly(ϵ -kaprolaktonu)

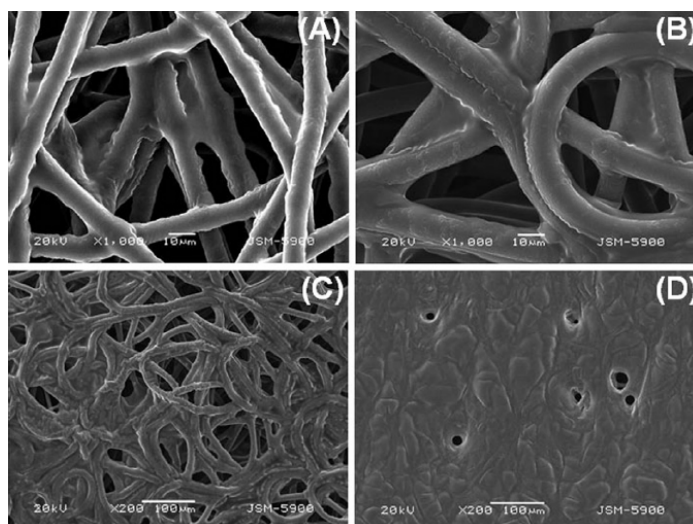
Pro výrobu byl použit roztok 10 hm % poly(ϵ -kaprolaktonu) rozpuštěný v chloroformu s přídavkem (0,5; 1; 2 g) metoxy-polyetylenglykolu (MPEG), který byl následně zvlákněn z jehly při napětí 22kV ve vzdálenosti (jehla-kolektor) cca 18 cm. Jako kolektor byl použit uzemněný bazének s vodní lázní. Nanovlákněná struktura se následně 24 h vakuově vysoušela [16].

Poté byly provedeny testy s myšimi osteoblasty MC 3T3-E1, které byly nasazeny v množství $5 \cdot 10^4$ buněk \cdot cm⁻². Po kultivaci byly testovány po 1. a 3. dni. V každém testovacím dni došlo nejprve k propláchnutí struktury a odstranění neadherovaných buněk pufovaným fyziologickým roztokem (PBS) a fixaci adherovaných buněk pomocí 2% roztoku glutaraldehydu. Po dehydrataci prostřednictvím etanolové řady (50 – 100 %) byly vzorky vysušeny a zkoumány na SEM [16].

Z výsledků je patrné, že při použití čistého PCL bez přídavku MPEG vznikla vlákněná struktura s velkými mezivlákněnými póry, nicméně vlákna mají hladký povrch. Se zvyšující se koncentrací MPEG v polymerním roztoku docházelo k nárůstu průměru vláken, ale zároveň se začala na jejich povrchu objevovat porézní struktura. Při dosažení poměru 25g/4g PCL/MPEG došlo k morfologické změně. Na povrchu vláken se přestaly vyskytovat póry a místo nich se vytvořily oválné útvary, podobné zrnkům rýže. Jak je patrné z obr. 11, mikrovlákna obsahují dostatečně velké póry s dostatečnou hloubkou na to, aby poskytly potřebnou oporu pro růst buněk v celém svém objemu. Vznik pórů autoři připisují rozpouštění a vymývání MPEG ve vodní lázni po zvláknění. Může za to dobrá rozpustnost MPEG v chloroformu, což společně s PCL umožňuje jeho zvláknění a následné rozpuštění ve vodní lázni. Vyplavování MPEG z vláken však není úplné a zůstává zde určité stopové množství, které je na makromolekulární úrovni pevně vázané na PCL. Toto stopové množství má však pozitivní efekt v podobě zlepšené smáčivosti povrchu vlákna, které usnadňuje jeho použití v tkáňovém inženýrství [16]. Pro zjištění adheze a životaschopnosti buněk na vlákněné struktuře bylo provedeno testování v 1. a 3. den po nasazení buněk. Během prvního dne proliferace nebyl patrný žádný rozdíl mezi porézními a neporézními vlákny (s a bez přídavku MPEG). Autoři to připisují tomu, že buňky během prvního dne pronikaly nejprve do pórů, proto nedochází k viditelnému nárůstu na povrchu vláken. Naopak vysoká proliferace byla patrná při třetím dni testování, kdy porézní vlákna vykazovaly daleko lepší výsledky než vlákna neporézních (obr. 12). To by mohlo být způsobeno nejenom porézní strukturou, ale i obsahem stopového množství MPEG, které zlepšuje hydrofilitu povrchu a zajišťuje tak lepší adhezi buněk po celé ploše vlákna [16].



Obr. 11: SEM snímky vlákněné struktury PCL, zvlákněných elektrostatickým zvlákněváním z jehly do bazénku s kapalinou, s obsahem (A) 0,5; (B) 1; (C) 2 a (D) 4 g MPEG v 25 g roztoku PCL. Vložené obrázky znázorňují kontaktní úhel na povrchu vláken [16].

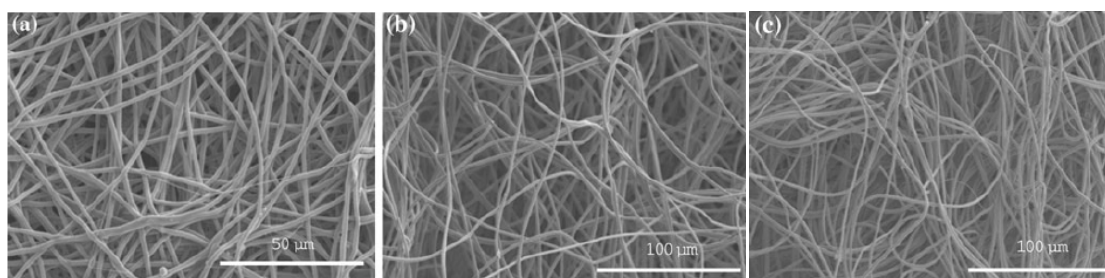


Obr. 12: SEM snímky vlákněné struktury PCL, zvlákněných elektrostatickým zvlákněváním z jehly do bazénku s kapalinou, s obsahem (A) 0,5; (B) 1; (C) 2 a (D) 4 g MPEG v 25 g roztoku PCL. Vložené obrázky znázorňují kontaktní úhel na povrchu vláken. [16].

Z výsledků, které popisuje tento článek, je zřejmé, že tímto způsobem lze úspěšně využít PCL jako výchozí materiál pro tvorbu polymerních scaffoldů za pomoci wet electrospinningu. Z toho důvodu byl použit jako výchozí materiál pro vývoj scaffoldu v této práci [16].

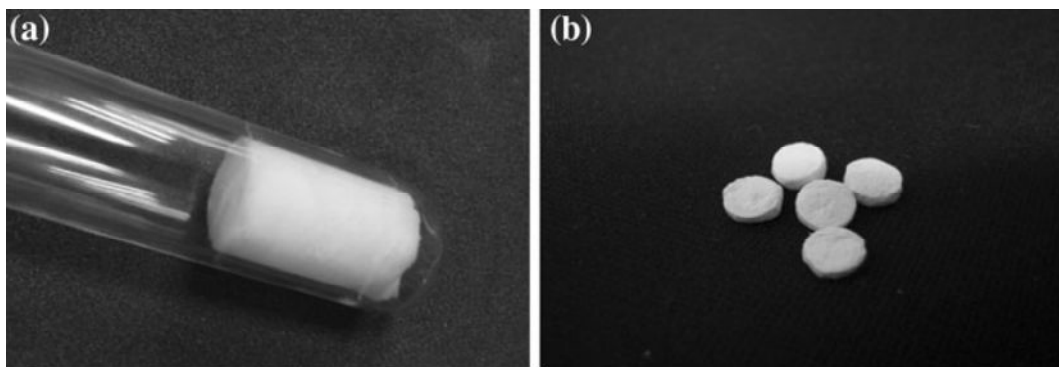
1.3.4.2 Vysoce porézní scaffold pro regeneraci kostí

Pro výrobu tohoto scaffoldu byl použit polymerní roztok 13 hm % poly(p-dioxanon)-b-poly(trimetylen karbonát-co-ε-kaprolakton) v hexafluoroisopropanolu. Ten byl elektrostaticky zvláknován do metanolové koagulační lázně. Jehla byla napájena 13kV⁺ a byla umístěna 15cm nad hladinu uzemněného kolektoru. Výsledkem byla nanovláknenná struktura rozptýlená v koagulační lázni. Pro její separaci byla použita metoda lyofilizace (blíže popsána v kapitole 1.4). Lyofilizovaná nanovláknna byla následně stlačena při teplotě 70°C, aby bylo docíleno homogenní porézní struktury. Výsledkem byla houbovitá 3D struktura, která byla zamražena v tekutém dusíku a rozřezána na vzorky pro testování nasazením myších osteoblastů. Pro biologické testy byly použity myši osteoblasty MC 3T3-E, které byly kultivovány a nasazeny na scaffold v množství $5 \cdot 10^4$ buněk \cdot cm⁻². Následovalo testování v 1., 4. a 7. den po nasazení buněk [15].



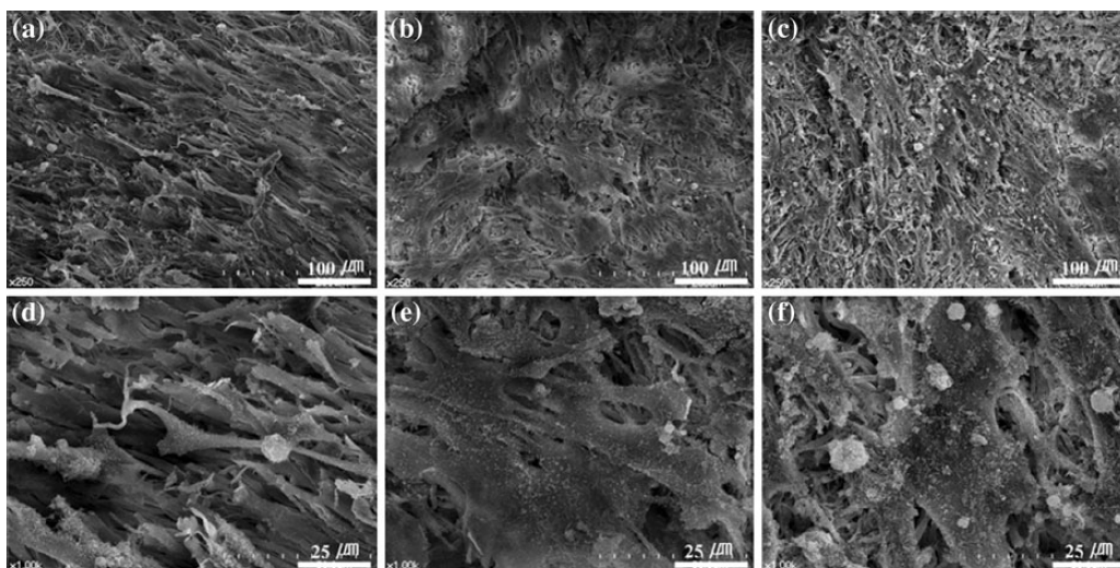
Obr. 13: SEM analýza 3D poly(trimetylnkarbonátu-co-ε-kaprolaktonu)-b-poly(p-dioxanonu) scaffoldu a) po zvláknování na kovovou desku (měřítko 50 μm), b) wet electrospinning před tepelným stlačením (měřítko 100 μm), c) wet electrospinning po tepelném stlačením (měřítko 100 μm). [15]

Při zvláknování na rovinnou desku bylo dosaženo vláknenné struktury se střední hodnotou průměru vláken $1,7 \pm 0,2$ μm. Při stejných parametrech zvláknování do kapaliny se střední hodnota průměru zvýšila na $2,3 \pm 0,3$ μm, nicméně bylo docíleno vyšší poróznosti (obr. 12). Po lyofilizaci vykazoval scaffold 90% poróznosti s velikostí pórů $18,2 \pm 6,6$ μm (obr. 13). Vytváří tak ideální strukturu pro následnou proliferaci, migraci a propojení buněk se sousední tkání pacienta [15].



Obr. 14: 3D scaffold poly(trimetylkarbonátu-co-ε-kaprolaktonu)-b-poly(p-dioxanonu)
 a) vysušený vzorek po lyofilizaci, b) vysušený vzorek po lyofilizaci a následném stlačení. [15]

Při testování buněk v jednotlivých testovacích dnech byla zaznamenána velmi rychlá migrace buněk. V prvním dni byly buňky pozorovány v tenkém a úzkém útvaru (obr. 15 a, d), odkud se následně rozšířily do téměř celého scaffoldu, jak ukazuje snímek ze 4. testovacího dne (obr. 14 b, e). Velikost buňky se pak oproti prvnímu dni zvětšila 5 - 10×. Při sedmém testovacím dni již bylo velmi obtížné rozeznat hranice mezi jednotlivými buňkami, jelikož k sobě velice těsně přilnuly a kompletně obalily strukturu scaffoldu (obr. 14 c, f). Rychlou migraci buněk autoři článku vysvětlují pozitivním vlivem porózní struktury scaffoldu. Byla pozorována vysoká úroveň životaschopnosti buněk ve srovnání s nasazením buněk na strukturu, která byla zvláknována na rovinnou desku. To naznačuje, že scaffold poskytuje příznivé podmínky pro diferenciaci osteoblastů, včetně buněčné migrace a proliferace [15].



Obr. 15: SEM analýza MC3T3-E1 buněk nasazených na scaffold. 1. den (a, d), 4. den (b, e), 7. den (c, f) po nasazení. [15]

1.4 Lyofilizace

Lyofilizace, neboli vakuové vymrazování, je metoda sušení vlhkých materiálů. Využívá se především pro materiál, který nesnese vyšší teploty, jako jsou například buňky nebo bakterie. Jedná se o sublimační metodu sušení při nízkém tlaku. Celý proces lyofilizace lze rozdělit do třech fází [21].

V první fázi se materiál zmrazí na teplotu pod bod mrazu (-10°C – -50°C), kdy se začínou tvořit ledové krystalky, dokud nedojde ke kompletní změně skupenství roztoku. Zmrzlý roztok může být krystalický, semikrystalický nebo amorfní. Ve vzorku i přes úplné zmrazení zůstává malé procento vodních molekul, které se nazývají „vázaná voda“ [21].

Ve zbývajících dvou fázích dochází k sušení materiálu. Během prvního sušení, které probíhá za sníženého tlaku (v řádech jednotek pascalu), dochází k sublimaci krystalků ze zmrzlého vzorku. Police lyofilizátoru jsou vyhřívány takovým množstvím tepla, aby nedocházelo k tání vzorků, ale pouze k přechodu zmrzlé vody z pevné fáze do plynné. Sušicí proces začíná v místě kontaktu sušeného materiálu s polici a postupuje dál k povrchu. Aby nedocházelo, vlivem sublimovaných par, ke zvyšování tlaku v komoře, jsou tyto páry odváděny ke kondenzátoru, kde opět mrznou na led. První stupeň sušení je časově náročný a trvá několik hodin až dní. Pokud je potřeba dosáhnout ještě suššího stavu, přistupuje se k druhé fázi sušení, kdy je odstraněna i absorbovaná voda. Druhá fáze sušení probíhá opět za sníženého tlaku, ale s teplotou nad bodem mrazu. Ta, dle typu lyofilizátoru, může dosahovat až 40°C . Po skončení lyofilizace zůstává ve vzorku 1-4 % vody [21].

Využití lyofilizace pro získání vysoce porézních nanovlákných vrstev, získaných elektrostatickým zvlákňováním, je popsán v článku [15]. Nanovlákná vrstva zde byla vytvořena pomocí elektrostatického zvlákňování do metanolu. Poté byla vymyta destilovanou vodou a získaný vzorek byl lyofilizován (viz kapitola 1.3.4.2 této práce).

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část této práce se zabývá konstrukcí a inovací zvlákňovací soustavy pro elektrostatické zvlákňování do kapaliny se zaměřením na výrobu porézních vlákných materiálů vyšší plošné hmotnosti. Konstrukce zvlákňovací soustavy, parametry zvlákňování, a použité materiály jsou uzpůsobeny výrobě scaffoldů pro tkáňové inženýrství.

2.1 Materiály

V této kapitole jsou vyjmenovány materiály, které byly použity pro výrobu a testování vzorků uvedených v experimentální části této práce.

Poly(ϵ-kaprolakton)	Mn = 45 000, CAS: 24980-41-4, Sigma-Aldrich spol. s r.o.
Trichlotmetan	CAS: 67-66-3, PENTA s.r.o.,
Ethanol p.a.	CAS: 111-42-2, PENTA s.r.o.,
PBS	Fosfátový pufr, 0,15 M NaCl, Lonza Walkersville,
EDTA-Trypsin	CAS: 9002-07-7, Sigma-Aldrich spol. s r.o.,
DNEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich spol. s r.o.,
PI	Propidium jodid, CAS: 25535-16-4, Sigma-Aldrich spol. s r.o.,
Glutaraldehyd	CAS: 111-30-8, Sigma-Aldrich spol. s r.o., č. šarže:
Methanol	CAS: 67-56-1, PENTA s.r.o, č. šarže:
Destilovaná voda	Laboratoře KNT TUL, Ing. Denisa Zálešáková.

2.2 Metody

2.2.1 Elektrostatické zvlákňování do kapaliny

Tato kapitola se bude zabývat přípravou polymerní kapaliny pro elektrostatického zvlákňování do kapaliny, konstrukcí a zdokonalením zvlákňovací aparatury.

2.2.1.1 Příprava zásobního polymerních roztoku

Zásobní roztok byl připraven v koncentraci 15 hm % z PCL a roztoku chloroform-etanolu (9:1). Ten byl následně po dobu 24h míchán na magnetickém míchadle, dokud nedošlo k dokonalému rozpuštění polymeru.

2.2.1.3 Průběh zvlákňování

Zvlákňování probíhalo při napětí +15 kV, které bylo přivedeno na injekční jehlu. Bazének byl zcela naplněn koagulační lázní a uzemněn. Pokud není uvedeno jinak, byla vždy provedena série testů, která čítala pět zvlákňování při vzdálenostech (jehla – hladina koagulační lázně) od 7 do 11 cm s posunem o 1 cm. Rychlost dávkování se pohyboval v rozsahu 1,2 – 1,8 ml/hodinu a byla upravována v závislosti na vzdálenosti jehla – hladina. Okolní podmínky nebyly nijak řízeny. Zvlákňování probíhalo za laboratorní teploty $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ s relativní vzdušnou vlhkostí $35\% \pm 4\%$ v digestoři s odtahem.

2.2.2 Lyofilizace vzorků

Získaný vzorek nanovláken v bazénku se opatrně vymýval slabým proudem destilované vody, dokud nedošlo k odstranění veškerého etanolu. Vzorek byl následně zamražen v hluboko mrazícím boxu na teplotu -81°C po dobu 3 hodin. Zamražené vzorky se následně umístily do lyofilizátoru (Telstar, LyoQuest -85), kde byly po dobu 24 hodin lyofilizovány.

2.2.3 Morfologie vláken

Z vytvořených nanovláknenných struktur byly vytvořeny preparáty, které se pomocí oboustranné lepicí pásky uchytily na hliníkový terčík a potáhly se vodivou vrstvou zlata (tloušťka 7 nm). Následně byly zkoumány na rastrovacím elektronovém rastrovacím mikroskopu VEGA3 SB (TESCAN, ČR).

2.2.4 Mikrobiologické in vitro testy

Aby bylo prokázáno, že je daná struktura vhodná pro tkáňové inženýrství, byly provedeny základní biologické testy nasazením embryonálních myších fibroblastů. Testy trvaly 15 dní. Pozorování chování nasazených buněk probíhalo pomocí fluorescenční mikroskopie a SEM v 1., 4., 8. a 15. den od nasazení.

2.2.4.1 Příprava nanovláknenného scaffoldu

Z vytvořené vláknenné struktury bylo vyřezáno 12 vzorků o průměru 6 mm, které byly umístěny do jamek v kultivační destičce a následně sterilizovány 70% etanolem po dobu 30 minut. Po sterilizaci se vzorky přenesly do sterilní kultivační destičky a byly

zbaveny etanolu trojím vymytím sterilním PBS. Vzorky byly rozděleny do 4 skupin po třech vzorcích a označeny PI (fluorescenční mikroskopie), VZ (vzorek s buňkami na SEM) a NG (negativní kontrola bez buněk na SEM).



Obr. 17: Dezinfekce 12 vzorků 70% etanolem.

2.2.4.2 Příprava a kultivace buněk

Pro testy byly použity myší embryonální fibroblasty 3T3-SA v kultivačním médiu DMEM (10% bovine calf serum, 1% antibiotikum), které byly 10x pasážovány. Pasážování probíhalo každé dva dny až do dosažení 80% konfluence. Následně bylo kultivační médium odsáto a přidáno 3 ml trypsinu – EDTA. Po cca. 5 minutách při 37 °C v inkubátoru se buňky uvolnily ode dna nádoby a bylo přidáno kultivační médium DMEM. Pomocí automatického počítáče buněk LUNA (Logos Biosystems, Inc.-U.S.A) byl stanoven orientační počet uvolněných buněk $5 \cdot 10^4$ buněk \cdot cm⁻². Na připravené nanovláčkové scaffoldy se aplikovalo 200 μ l kultivačního média s $4 \cdot 10^4$ buněk \cdot cm⁻². Každé 3 dny se pak staré médium odsáto a přidalo se 200 μ m nového DMEM.

2.2.4.3 Testování fluorescenční mikroskopii

V testovací dny byl odebrán vzorek, který byl označen jako PI (propidium jodid) pro testování na fluorescenčním mikroskopu. Ze vzorku bylo odsáto kultivační médium a přenesl se do nové kultivační destičky, kde byl 3 \times propláchnut PBS a následně fixován vymraženým metanolem po dobu 10 minut při 4 °C. Po fixaci byl opět propláchnut PBS a nanest se roztok PI, kterým se označily jádra buněk. Po deseti minutách se vzorek 3 \times propláchl PBS a ponechal v temnu na testování. Následovalo testování na fluorescenčním mikroskopu.



Obr. 18: Příprava vzorku na fluorescenční mikroskopii a výměna kultivačního média u ostatních vzorků pro další testovací dny.

2.2.4.3 Testování na rastrovacím elektronovém mikroskopu

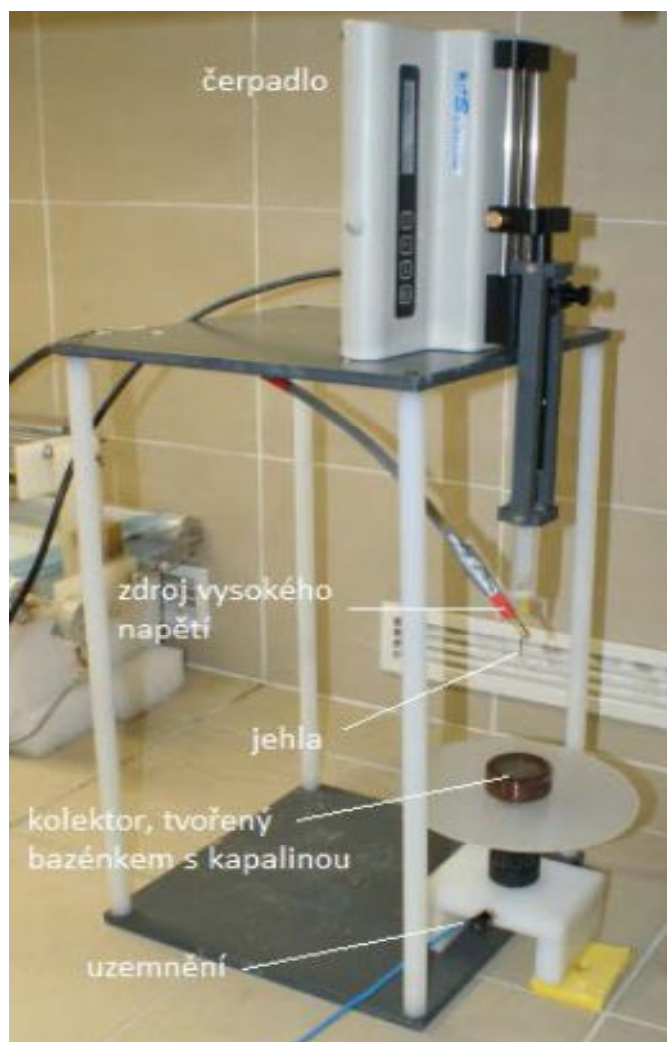
Pro testování na SEM se použily vzorky označené jako VZ a NG. Nejprve bylo odsáto kultivační médium a vzorky se přesunuly do nové kultivační destičky. Zde byly propláchnuty PBS a fixovány 2,5% roztokem glutaraldehydu v PBS po dobu 10 minut při 4 °C. Následně se vzorky 3× propláchly PBS a dehydratovaly etanolovou řadou (60, 70, 80, 90, 96, 100% etanol) a nechaly se vysušit na teflonové podložce po dobu 24 hodin. Před SEM se vzorky pomocí oboustranné lepicí pásky upevnily na terčik a pozlatily se v pokovovacím přístroji Quorum Q150RES (Quorum Technologies, UK) Následně byly zkoumány na rastrovacím elektronovém rastrovacím mikroskopu VEGA3 SB (TESCAN, ČR).

2.3 Vyhodnocení dat a diskuze

2.3.1 Zvláknovací aparatura a její modifikace

Na začátku experimentů byla sestavena zvláknovací soustava dle parametrů, které popsal ve své bakalářské práci Bc. Michal Šeps. Po vytvoření několika zkušebních vzorků nanovláknenné vrstvy bylo konstatováno, že toto technické řešení nezcela vyhovuje pro potřeby vytvoření scaffoldu požadovaných vlastností. Cílem bylo vytvoření struktury, která nebude ulpívat na stěnách bazénku, ale bude celým svým objemem ponořena v koagulační lázni. Proto byly zkoumány vlivy jednotlivých částí aparatury na vznikající nanovláknennou vrstvu. Jednotlivé části byly následně upravovány, dokud nebylo dosaženo požadovaných výsledků. Jako koagulační lázeň byl použit 100% etanol, který dle předchozích pokusů vykazoval nejlepší výsledky při zvláknování PCL s rozpouštědly chloroform-etanol. Pro jeho nízké povrchové napětí se

vlákna nořila do kapaliny a nezůstávala na hladině. Etanol je zároveň dezinfekční prostředek, který neznečišťuje.



Obr. 19: Východí zvlákňovací aparatura, dle návrhu Bc. Michala Šepse [20].

2.3.1.1 Vliv bazénku na nanovláknennou strukturu

Pro první pokusy byl použit bazének z teflonu (PTFE), který byl pro tyto účely použit již při předchozích zvlákňováních. Po zahájení zvlákňování se vytvořila polymerní tryska, která se vychýlila o cca 60 ° od osy zvlákňování. Svou bičující zónu směřovala k místu s největší plošnou hustotou náboje (hrana bazénku). Zde docházelo k prvnímu ulpívání vláken, které se dále šířily po hladině kapaliny, dokud nedošlo k vytvoření souvislé kruhové vrstvy nanovláken. Tato „membrána“ následně nabývala na síle a svou hmotností se ve svém středu částečně nořila pod hladinu. Výsledná vrstva měla sílu 1 mm, přičemž mikroskopické vlastnosti vzniklé vrstvy se nezkoumaly

z důvodu nestálosti výrobního procesu. Tento pokus byl opakován při různém nastavení sestavy (viz kapitola 2.2.1) a vždy docházelo k již zmíněnému ulpívání vrstvy na okrajích bazénku.

Pro lepší porozumění chování vznikající vrstvy bylo rozhodnuto vyzkoušet bazének ze skla, i když se svými fyzikálními vlastnostmi značně liší od PTFE (viz tabulka 2). Pro účely experimentu byly vybrány Petriho misky, které svými rozměry vyhovovaly jejich použití.

Materiál	Konduktivita σ ($S \cdot m^{-1}$) při 20 °C
Sklo	10^{-11} až 10^{-15}
PTFE	10^{-25} až 10^{-23}

Tabulka 2: Vybrané hodnoty elektrické vodivosti materiálů. [18]

Následně byla provedena série testů se stejnými parametry, jako v případě použití bazénku z PTFE. Z makroskopického hlediska se celá soustava chovala stejně, jako při zvlákňování do bazénku z PTFE. Při zvlákňování bylo vidět, jak dochází k ulpívání vláken na hranu a stěnu bazénku a při dostatečně dlouhé době byla vytvořena stejná makro struktura, jako při zvlákňování do bazénku z PTFE. Bazének ze skla byl přesto zvolen jako vhodný pro další sérii pokusů, jelikož umožňoval pozorovat průběh zvlákňování do kapaliny.

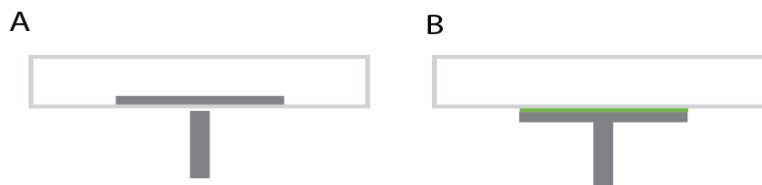
2.3.1.2 Vliv velikosti kolektoru

Aby bylo zamezeno ulpívání nanovláken na stěně bazénku, byl vyzkoušen vliv velikosti kovového kolektoru na jeho dně. Předpokládalo se, že zvětšením vodivé plochy dojde k usměrnění dopadajících vláken do místa s vyšší plošnou hustotou náboje.

Na obr. 20, B) je znázorněna modifikace bazénku s hliníkovým terčikem, který je vodivě propojen s koagulační lázní skrze vrtaný otvor o průměru 4 mm. Při tomto řešení docházelo k ulpívání vláken na stěnách bazénku. Pro zvětšení vodivé plochy byl terčik umístěn do bazénku, tak jak je znázorněno na obr. 20, A), přičemž i zde docházelo při následných testech k zachycení nanovláken na stěnách bazénku.

Pro pokrytí celého dna byla použita destička z nerezové oceli. Ta byla vodivě spojena skrze vrtaný otvor s uzemněným terčikem za pomoci hliníkové folie. Následná série testů však neukázala oproti výše uvedeným modifikacím žádné zlepšení.

Při posledním pokusu bylo dno pokoveno 14nm vrstvou zlata. To bylo provedeno dvěma cykly pokovení na přístroji Q150RES (Quorum Technologies, UK). Ani v tomto případě se však neprojevila žádná změna při následném zvlákňování. Při těchto testech byly zkoumány pouze makroskopické vlastnosti nanovlákněné vrstvy.



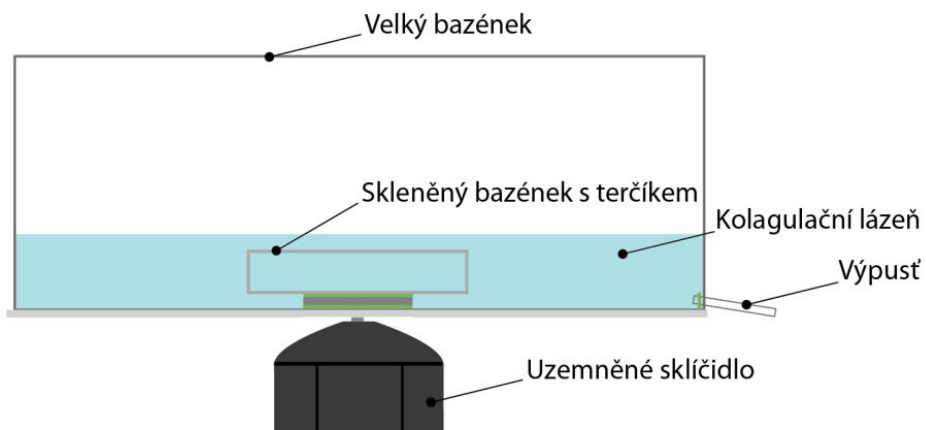
Obr. 20: Upravené Petriho misky s uzemněným AL terčičkem: A) uvnitř bazénku a B) vně bazénku.

2.3.1.3 Vliv velikosti bazénku

Následně byly provedeny testy s rozdílnou velikostí bazénku. Bylo předpokládáno, že dostatečně velkým průměrem se zamezí styku polymerní trysky s okrajem bazénku a zvlákňování proběhne přímo do kapaliny. Pro pokus byl použit bazének o průměru 20 cm z PP.

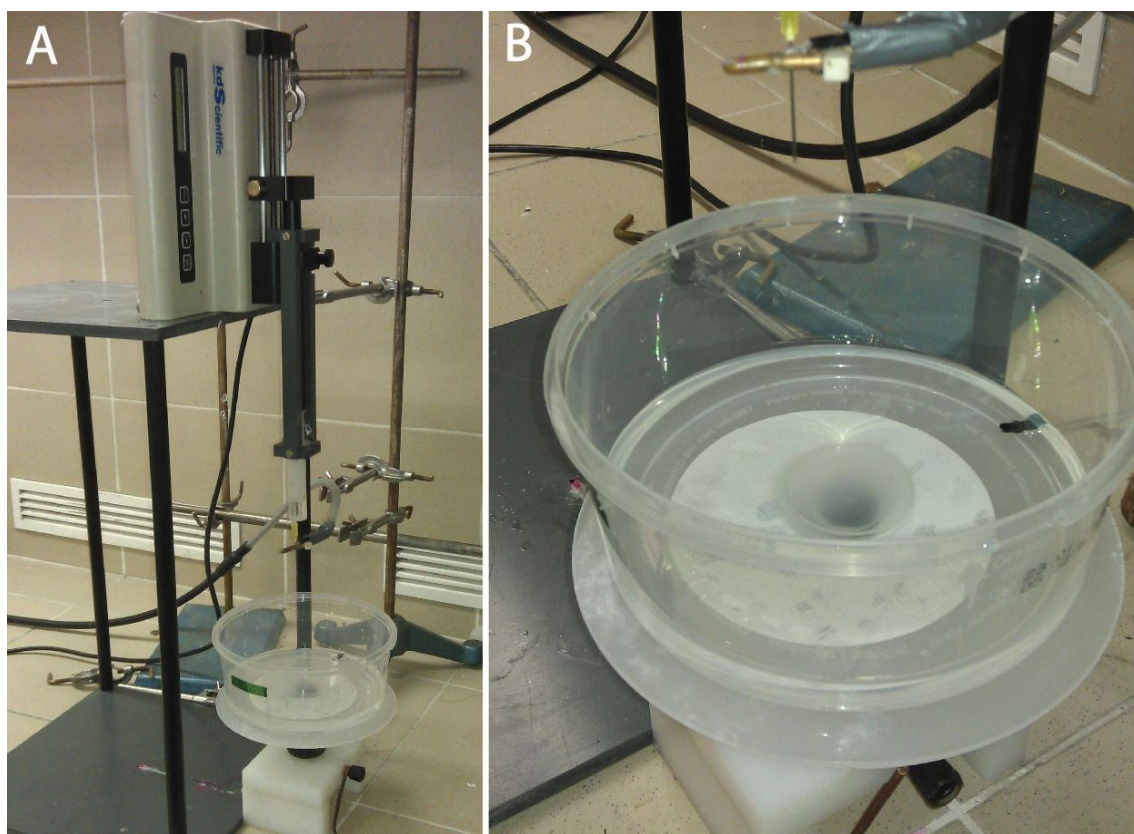
Bazének byl ve svém středu provrtán a utěsněn pomocí hliníkového terčičku. Z boční strany byla umístěna trubička, která umožňovala vypustit koagulační lázeň, což výrazně usnadnilo vyjmutí vzorku. Takto připravený bazének byl postaven na izolační desku a upevněn za stopku terčičku do sklíčidel, která byla uzemněna. Následovala série testů (viz kapitola 2.2.1 této práce), které prokázaly, že takto sestavená aparatura umožňuje zvlákňovat přímo do kapaliny, aniž by docházelo k zachytávání nanovlákněné vrstvy ke stěnám bazénku. Nanovlákněná struktura vypadala jako mléčné zakalení v koagulační lázni, ve kterém bylo později možno pozorovat jednotlivé vrstvy ukládající se na sebe. Tyto vrstvy byly značně rozptýleny kolem středu kolektoru a bylo obtížné je izolovat. Výsledná vrstva pak měla velice nízkou plošnou hmotnost a nespĺňovala požadavky, které se od scaffoldu požadují.

Z toho důvodu byl terčičk vyměněn za skleněný bazének, do kterého byla nanovlákněná vrstva zachytávána. Schematicky je celá sestava znázorněna na obr. 21. Následovala další série testů (viz kapitola 2.2.1 této práce), při které se jednotlivé nanovlákněné vrstvy opět začaly tvořit v okolí kolektoru a překrývaly Petriho misku. Po ukončení zvlákňování byly tyto vrstvy pomocí Pasteurovi pipety nahnuty do Petriho misky, která byla následně vyjmuta a nanovlákněné vrstvy izolovány a vysušeny.



Obr. 21: Schematické znázornění sestavy pro zvlákňování do bazénku o velkém průměru.

Toto uspořádání zvlákňovací soustavy odstranilo problém s ulpíváním nanovláken na stěny bazénku. Vzniklé vzorky však nedosahovaly dostatečné plošné hmotnosti a muselo být s nimi mechanicky manipulováno, jak bylo popsáno výše v této kapitole. Výsledné vlákněné struktury byly diskutovány v této práci dále.



Obr. 22: Elektrostatické zvlákňování z jehly do velkého bazénku. A) Celkový pohled na zvlákňovací sestavu.. B) Detailní pohled na tvořící se vrstvy (mléčné zakalení).

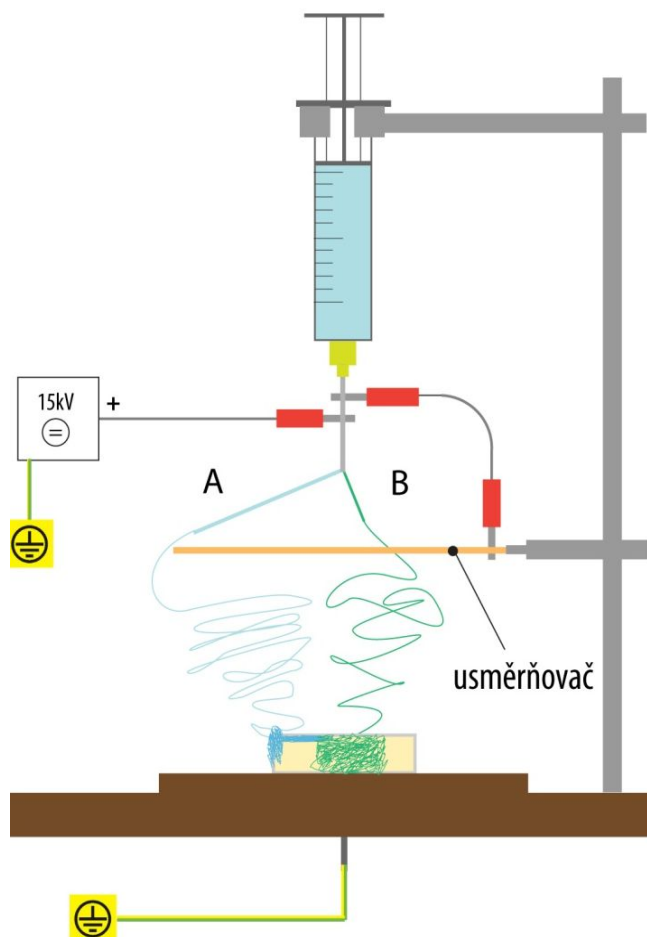
2.3.1.2 Usměrňování polymerní trysky pomocí elektromagnetického pole

Aby bylo docíleno vyšší plošné hmotnosti vzorku, bylo potřeba zvláknovat do bazénku s menším objemem. Zvláknovací aparatura byla osazena ramenem, na kterém byl uchycen měděný vodič (usměrňovač). Ten byl připojen ke stejnému zdroji napětí jako zvláknovací jehla. Ke zvláknování byl použit skleněný bazének.

Prvním usměrňovačem byl měděný vodič o průřezu $1,5 \text{ mm}^2$. Ten byl stočen do spirály s vnitřním průměrem 5 cm, 10 závitů o stoupání 0,5 cm. Usměrňovač byl umístěn tak, aby jeho osa byla shodná s osou zvláknovací jehly. Špička jehly byla nastavena na vrchní okraj usměrňovače. Při spuštění zvláknovacího procesu však nedošlo ke zvláknování, ale pouze k odkapávání polymeru z ústí jehly. Tvořící se kapky nebyly na rozdíl od běžného zvláknování nijak deformovány.

Druhým vyzkoušeným usměrňovačem byla spirála ze stejného vodiče o průměru 10 cm se 4 závitů o stoupání 2 cm. Usměrňovač byl umístěn tak, aby jeho osa byla shodná s osou zvláknovací jehly. Špička jehly byla nastavena na vrchní okraj usměrňovače. Při spuštění zvláknovacího procesu se vytvořil Taylorův kužel a polymerní tryska byla vychýlena do prostoru mimo kolektor. Toto chování se nepodařilo odstranit ani změnami vzdálenosti mezi hrotem jehly a vrchní částí usměrňovače. Proto bylo od použití měděného vodiče stočeného do spirály upuštěno.

Místo spirály byl nakonec použit vodič stočený do kruhu o průměru 10 cm, který byl umístěn ve vzdálenosti 2 cm pod hrotem jehly. Při následném zvláknování byla polymerní tryska



Obr. 23: Schematické znázornění vlivu usměrňovače na polymerní trysku: A) bez použití usměrňovače, B) s použitím usměrňovače.

držena v elektromagnetickém poli vodiče. Během zvlákňování bylo pozorováno, jak se polymerní tryska snaží opustit toto pole a vychylovala se o maximálně 30° na různé strany od osy zvlákňování (viz obr. 23). Tím bylo dosaženo toho, že se nanovláknenné vrstvy začaly tvořit kolem středu kolektoru, aniž by ulpívaly na stěnách bazénku. Další zkoumání vlivu elektromagnetického pole na elektrostatické zvlákňování je mimo rozsah této bakalářské práce a je autorem ještě doporučeno k dalšímu zkoumání v následných pracích. Výsledné vláknenné struktury byly diskutovány v této práci dále.



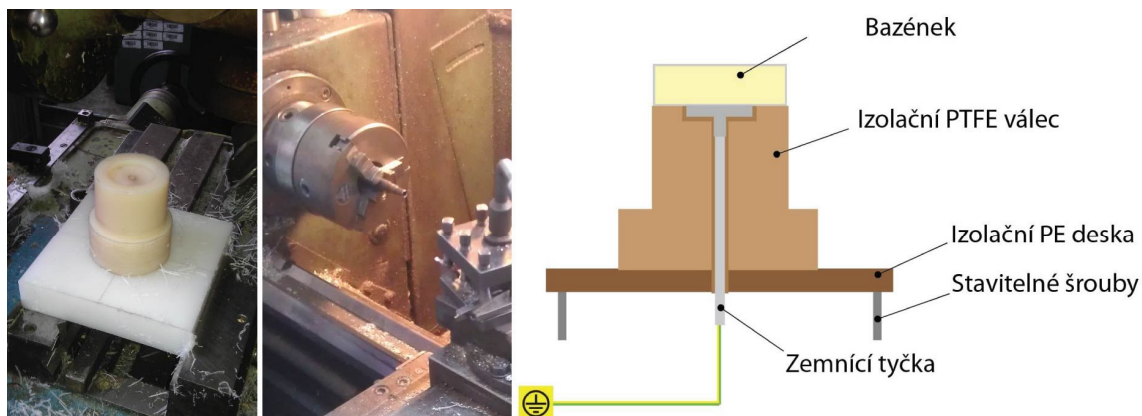
Obr. 24: Průběh elektrostatického zvlákňování do skleněného bazénku s použitím usměrňovacího vodiče.

2.3.1.3 Vliv izolace bazénku na kvalitu zvlákňovacího procesu

Při použití usměrňovače docházelo ke stabilnímu zvlákňování do kapaliny. Vlivem blíže nezjišťovaných sil docházelo nahodile k přeskočení proudu nanovláken z bazénku na jeho vnější stěnu směrem k zemnicímu vodiči. Z toho důvodu bylo potřeba vytvořit dostatečnou izolaci, aby se zabránilo přerušování zvlákňování, které znehodnocovalo vzorek.

Z PTFE tyče byl vysoustružen izolační válec, který měl za úkol zamezit přeskokování proudu nanovláken na uzemněné kovové části bazénku. Do vrchního čela válce bylo vysoustruženo zahlobení, které zároveň sloužilo k pevnému uchycení bazénku. Válec byl pro lepší stabilitu upevněn na čtvercovou desku z PE, která byla zespodu osazena třemi šrouby pro ustavení do vodorovné polohy. Uzemnění bazénku

bylo zajištěno kovovou tyčinkou, která procházela skrze celý stojánek a dotýkala se terčíku. Výroba a schéma izolačního stojánku je vyobrazeno na obr. 25.



Obr. 25: Izolační stojánek. Zleva: výroba těla z PTFE a izolační desky z PE; výroba zemní tyčky; schematické znázornění izolačního stojánku.

Zvlákňování do takto uzemněného a stabilizovaného bazénku přineslo několik výhod. Bylo odstraněno nežádoucí přeskokování bičující oblasti nanovláken na kovové části bazénku a ustavení do rovnovážné polohy mělo příznivý vliv na rovnoměrnější distribuci nanovláken na ploše kolektoru.

2.3.1.4 Změna vzdálenosti mezi jehlou a kolektorem

Vzdálenost mezi hrotem jehly a kolektorem je jedním ze základních parametrů, které ovlivňují proces zvlákňování. Proto bylo důležité, aby její změna byla pokud možno rychlá a snadno měřitelná.

Spodní část zvlákňovací soustavy (patka stojanu, podložka, izolační stojánek, bazének) neumožňoval rychlou změnu výšky, proto docházelo ke změně vzdálenosti pohybem vrchní části aparatury. K posuvu došlo po odjištění jisticího šroubu u ramene se zvlákňovací hlavou. Pro přesné nastavení vzdálenosti bylo na rameno připevněno pevné měřítko, pomocí kterého se odečítala vzdálenost jehla – hladina. Použitá stupnice předpokládá použití injekční stříkačky Omnifix 15ml a jehly s tupým hrotem, která je zbrošena na délku 2 cm.

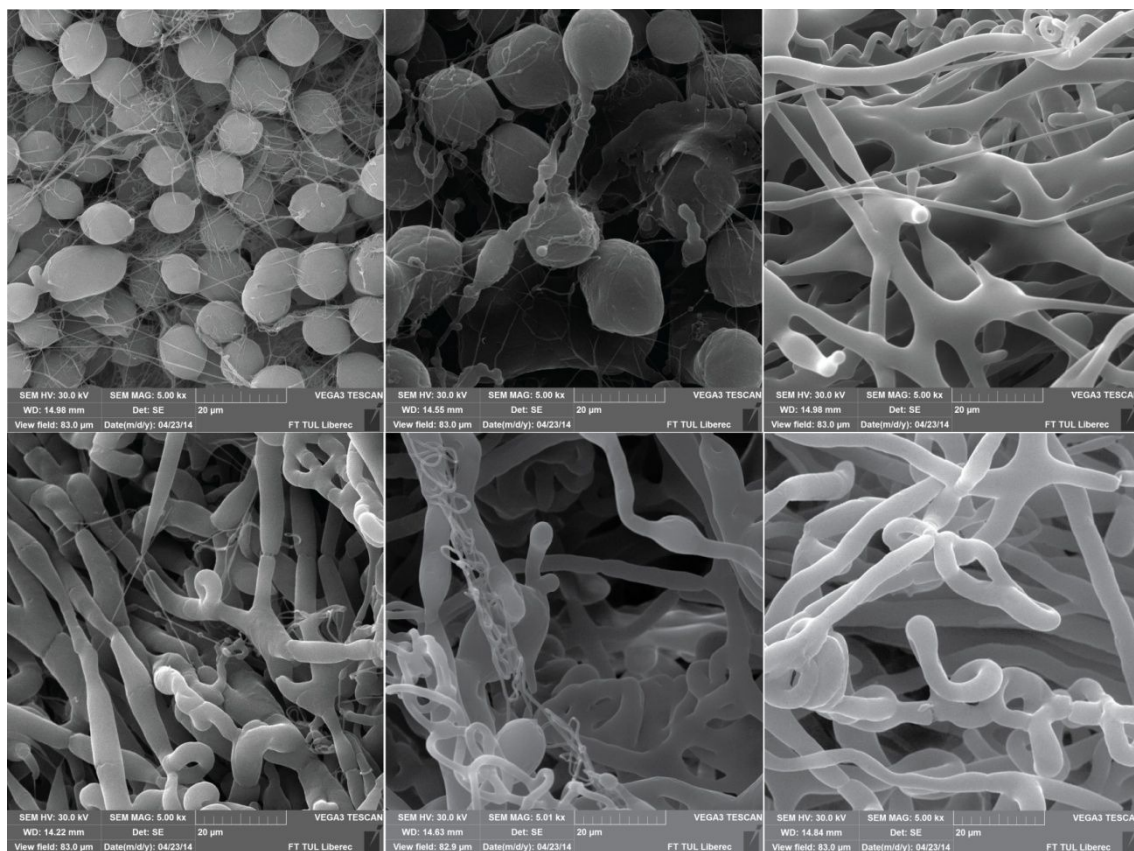
2.3.3 Vyhodnocení nanovlákněných vzorků

Tato práce si nekladla za cíl hlubší zkoumání morfologie nanovlákněných struktur. V průběhu modifikace zvlákňovací aparatury byly vytvořeny tři série vzorků dle parametrů popsanych v odstavci 2.2.1 této práce, které měly ověřit funkčnost vyvíjené

zvlákňovací aparatury. V následující části práce byly zkoumány změny na aparatuře z pohledu morfologie vytvořených vzorků. Cílem bylo vytvořit strukturu, využitelnou jako scaffold, tvořenou dvěma typy vláken. Vlákná o středním průměru 1000 nm, která měla tvořit nosnou část vzorku a zajišťovala mu mechanickou stabilitu a vlákna o středním průměru 200 - 400 nm, která měla sloužit jako podpůrná část pro migraci buněk. Zároveň byl kladen důraz na dostatečnou velikost mezivláknenných pórů, která usnadňuje migraci buněk a umožňuje odstraňování odpadů metabolické činnosti buněk.

2.3.3.1 Nanovláknenné vrstvy na aparatuře bez modifikace

Vzorky zvlákňované na aparatuře bez úpravy byly použity jako referenční série (série A). Bylo vybráno šest struktur na obr. 26, které byly z makroskopického hlediska vhodné k vytvoření preparátu pro SEM. Vzorky pro preparát byly odebírány ze středu nanovláknenné vrstvy, která byla během zvlákňování zcela ponořena v koagulační lázni. Tato série byla použita pro vyhodnocení dopadů změny aparatury na kvalitu nanovláknenné struktury. Jednotlivé snímky znázorňují vzorky při různých nastavené zvlákňovací aparatury. Tyto parametry jsou uvedeny v tabulce 3.



Obr. 26: Snímky ze SEM, zvlákňování na aparatuře bez úpravy. Referenční série A. Měřítka 20 µm. První řádek zleva: vzorek 1a, 3a, 4a. Druhý řádek zleva: vzorek 5a, 6a, 7a.

U vzorků 1a a 3a se vyskytovala požadovaná dvojí struktura vláken, která může být spojována s použitím rozpouštědla chloroform-ethanol. Vlákná o větším průměru se zde vyskytovala ve formě perliček, což pravděpodobně zapříčinila malá vzdálenost mezi jehlou a hladinou. Vlákná tak neměla dostatečně dlouhý čas pro své vysušení a dloužení. Důkazem pro tento jev mohlo být následné porovnání s dalšími vzorky. U nich se se vzrůstající vzdáleností hrubá vlákna vyskytovala bez perličkového efektu. Se vzrůstající vzdáleností se jemná vlákna přestala vyskytovat úplně. Vzrostla naopak velikost vlákenných pórů.

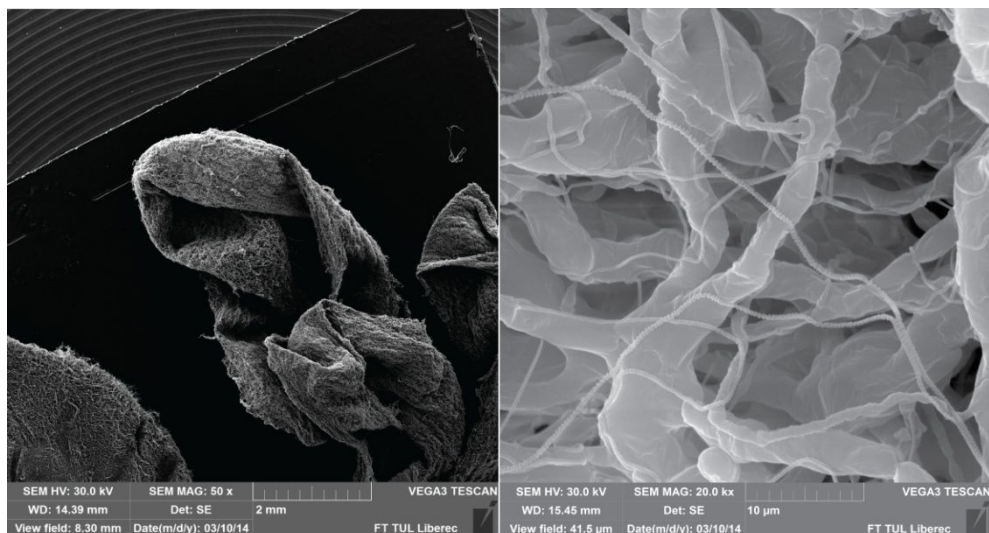
vzorek	napětí [kV]	koncentrace roztoku PCL [hm %]	vzdálenost jehla - hladina [mm]	průtok [ml/h]	čas [min]	Sušení
1a	15	15	7,5	1,2	25	Vzduch
3a	15	15	8	1,2	18	Vzduch
4a	15	15	8,5	1,4	10	Vzduch
5a	15	15	9	1,5	12	Vzduch
6a	14	15	10	1,6	16	Vzduch
7a	16	15	11	1,8	8	Vzduch

Tabulka 3: Parametry zvlákňování pro sérii vzorků před úpravou zvlákňovací aparatury.

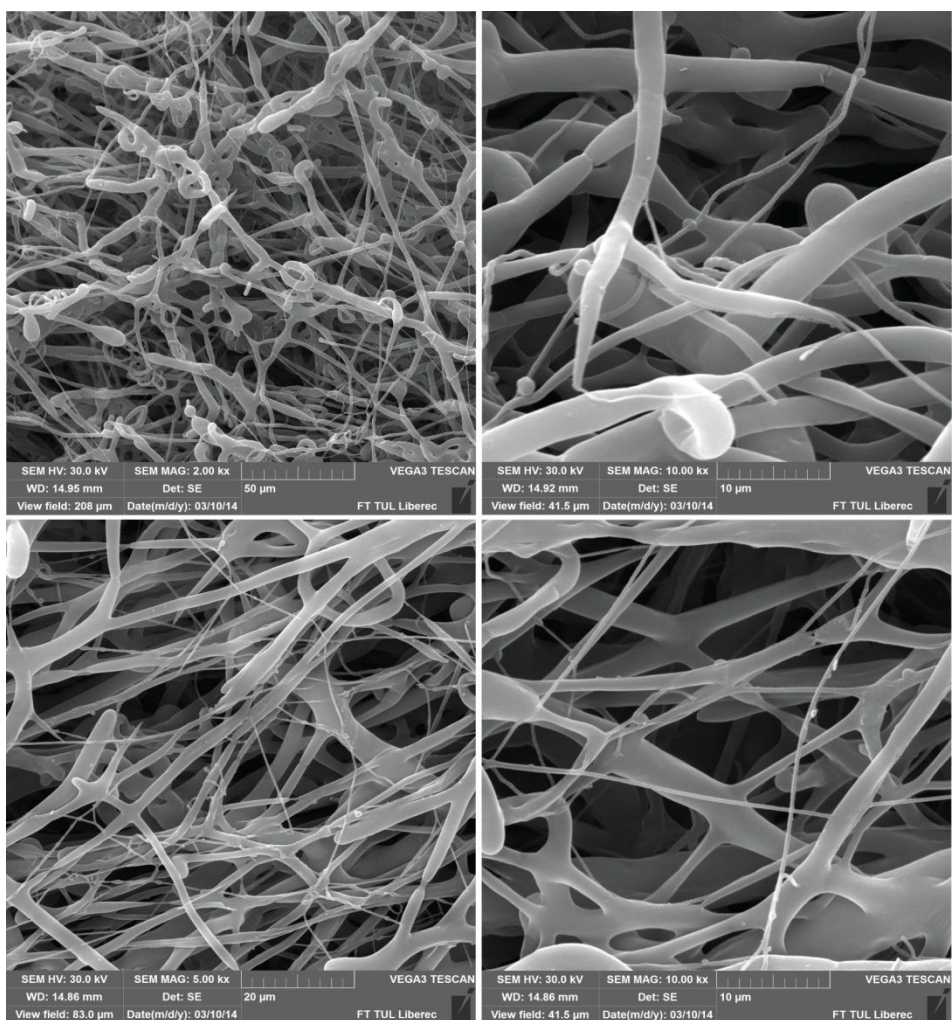
2.3.3.2 Nanovláknenné vrstvy na aparatuře s velkým bazénkem

Druhou testovací sérií (série B) byly vzorky, které vznikly při zvlákňování do velkého bazénku s upravenou Petriho miskou. Výsledná struktura byla daleko objemnější, což bylo zapříčiněno rovnoměrným zvlákňováním do kapaliny bez ulpívání na stěnách bazénku. Parametry zvlákňování jsou uvedeny v tabulce 4.

Při malých vzdálenostech mezi jehlou a hladinou docházelo k zajímavému jevu, kdy místo vláknenné vrstvy, která se lehce snášela z hladiny ke dnu bazénku, vznikaly okem viditelné vláknenné pásy (obr. 27). Tyto pásy se netvořily na hladině, ale vznikaly pod hladinou lázně. Tento jev se projevil u vzorků 1b a 2b a ustal se vzrůstající vzdáleností. Z mikroskopického hlediska se jednalo o dvouvláknennou strukturu, kde měla jemná vlákna povrchovou strukturu. Svým vzhledem se podobala vláknům se strukturou shish-kebab [22], kdy dochází ke střídání různé krystalinity polymeru. Tato vzniklá struktura vyžaduje hlubší znalosti v oblasti materiálů a svým rozsahem překračuje cíle této bakalářské práce, proto se jí dále autor nezabýval.



Obr. 27: Snímky ze SEM, zvlákňování do velkého bazénku (série B). Zleva: pásková struktura vzniklá při zvlákňování vzorku 1b; detail na vlákno se strukturou shish-kebab[22]. Měřitko 2 mm a 10 μm.



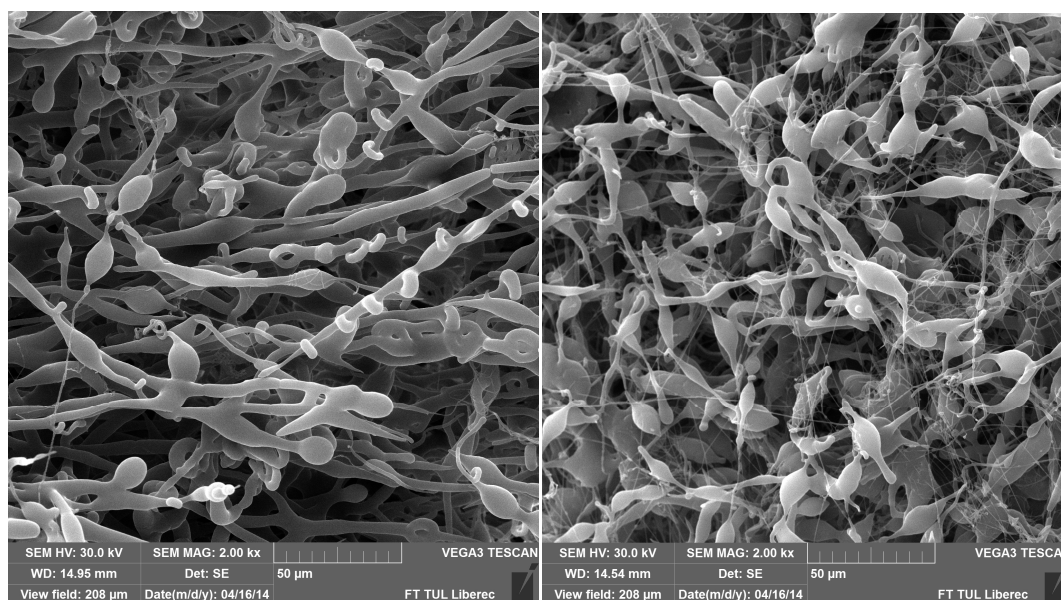
Obr. 28: Snímky ze SEM, zvlákňování do velkého bazénku (série B). První řádek, vrchní stana pásku ze vzorku 1b (měřitko 50 μm, 10 μm). Druhý řádek, spodní stana pásku ze vzorku 1b (měřitko 20 μm, 10 μm).

Mimo páskových struktur se zde objevovaly i klasické nanovláknenné vrstvy, které se tvořily na hladině a postupně klesaly ke dnu. Ze začátku zvláknění se projevovaly jako mléčný zákal, který postupně nabýval bílé barvy, dokud se vláknenné vrstvy nepřestaly ponořovat a zůstaly na hladině. V tuto chvíli bylo zvláknění ukončeno a vzorek vyjmut a vysušen.

vzorek	napětí kV	koncentrace roztoku PCL hm %	vzdálenost jehla - hladina mm	průtok ml/h	čas min	Sušení
1b	15	15	7	1,8	12	vzduch
2b	15	15	7	1,8	18	vzduch
3b	15	15	7	1,8	16	lyofilizace
4b	15	15	8	1,3	14	lyofilizace
5b	15	15	8	1,3	15	vzduch
6b	15	15	8	1,3	10	vzduch
7b	15	15	8	1,3	12	vzduch

Tabulka 4: Parametry zvláknění pro sérii vzorků při zvláknění do velkého bazénku.

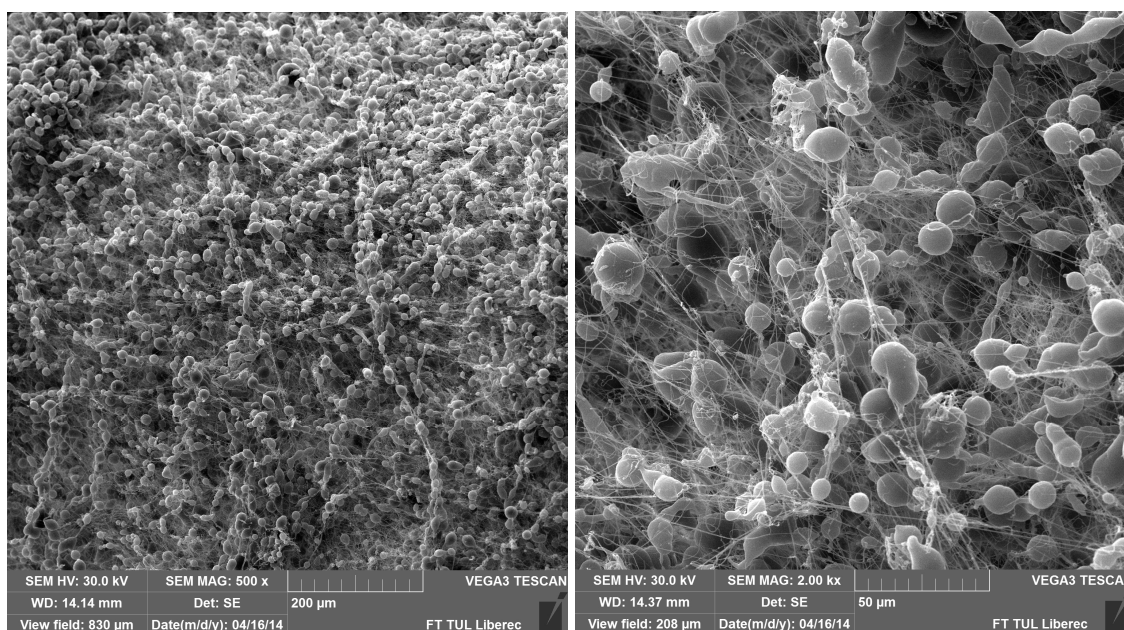
Stejně jako u referenčních vzorků, i zde docházelo ke vzniku koráلكové struktury u hrubých vláken. Tato struktura vznikala u všech zde uvedených vzorků. U vzorku 2b se na hrubých vláknech navíc vyskytovaly jakési prstýnky. Tyto prstýnky se objevily pouze u tohoto vzorku a dají se proto považovat za anomálii.



Obr. 29: Snímky ze SEM, zvláknění do velkého bazénku (série B). Vlevo prstýnky na hrubých vláknech na vzorku č. 2b, vpravo dvojitá struktura na vzorku 5b. Měřítka 50 µm.

U vzorku 3b a 4b byla namísto sušení vzorků na vzduchu vyzkoušena také lyofilizace. Vzorky byly vymyty destilovanou vodou, zamrazeny v hluboko mrazném

boxu na $-81\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně přes noc lyofilizovány. Během testů se zjistilo, že je nutné dodržet přesně tento postup. První lyofilizovaný vzorek byl umístěn do lyofilizátoru v koagulační lázni (etanolu) a následně byl společně s kapalinou rozstříkán po lyofilizační komoře. Vzorky 3b a 4b vykazovaly větší výskyt velmi jemných vláken, pohybujících se svým průměrem kolem 300 nm. Vlákná o větším průměru zde měla především korálkovitou strukturu. Důležité bylo, že si tyto struktury zachovaly vysokou pórovitost a objemnost. Nedošlo zde k sesednutí vláken vlivem jejich hmotnosti při vyklopení a následnému odparu zvlákňovací lázně.



Obr. 30: Snímky ze SEM, zvlákňování do velkého bazénku (série B). Lyofilizovaný vzorek č. 3b, měřítko 200 μm a 50 μm .

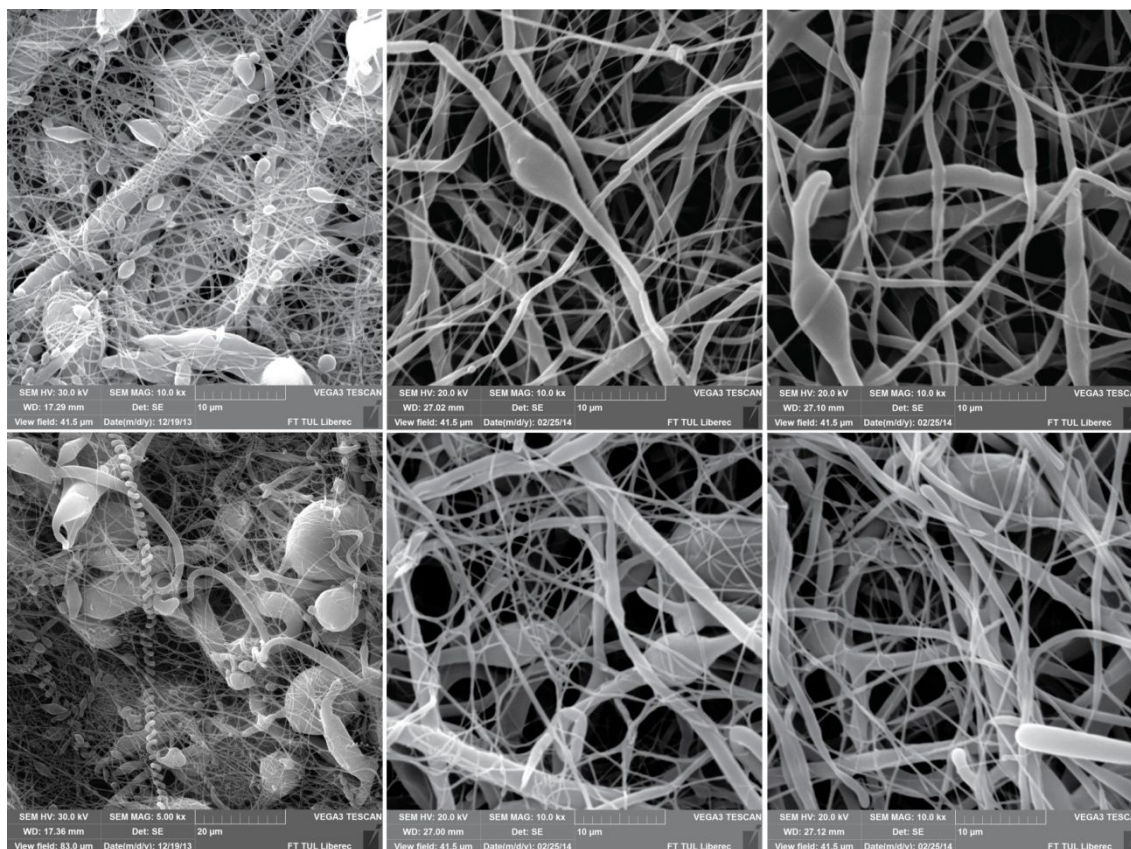
2.3.3.4 Nanovláknenné vrstvy na aparatuře s usměrňovačem

Poslední testovaná série vzorků (série C) pocházela ze zvlákňovací aparatury s usměrňovacím měděným vodičem. Tyto vzorky vykazovaly nejlepší vlastnosti pro potřeby scaffoldu ze všech třech provedených sérií. Parametry zvlákňování této série jsou uvedeny v tabulce 5. Struktura byla dvouvláknenná s dostatečně velkými mezi vláknennými póry. Pro tuto sérii byl namíchán nový zásobní roztok PCL. Bylo použito PCL od stejného výrobce, ale jiné šarže než v případě prvního zásobního roztoku. Nelze tedy ověřit, zda tato výrazná změna struktury nebyla ovlivněna použitím jiného zásobního roztoku, byť vyrobeného se stejnými parametry.

vzorek	napětí kV	koncentrace roztoku PCL hm %	vzdálenost jehla - hladina mm	průtok ml/h	čas min	Sušení
5c	15	15	7	1,4	10	vzduch
6c	15	15	7,5	1,4	9	vzduch
7c	15	15	8	1,4	11	vzduch
8c	15	15	8	1,3	15	vzduch
9c	15	15	8,5	1,3	12	vzduch
10c	15	15	8	1,3	10	vzduch

Tabulka 5: Parametry zvlákňování pro sérii vzorků při použití usměrňovače.

Vzorky vyrobené touto metodou vykazovaly zajímavé parametry také z makroskopického hlediska. Struktura byla vysoká 4 – 8 mm a při vymývání koagulační se chovala podobně jako namočený chomáč viskózní stříže (vata). Na obrázku 31 a 32 můžeme vidět tři vybrané vzorky v makroskopickém a mikroskopickém pohledu. Při zvlákňování vzorku 5c se vytvořil pevný vlákněný ostrůvek, který, jak se později ukázalo při SEM, tvořila hrubá vlákna s perličkami a hustá síť jemných vláken. To může být vysvětleno nízkou vzdáleností mezi jehlou a hladinou, jak se ukázalo u předchozích sérií vzorků.



Obr. 31: Snímky ze SEM. Porovnání vzorků při zvlákňování s usměrňovačem (série C). Nahoře vzorky 5c, 8c, 9c z vrchní strany. Dole vzorky 5c, 8c, 9c z spodní strany. Měřítko 10 µm.

Na vzorku 7c se změna vzdálenosti projevila větší nadýchaností struktury. Byla zachována kompaktní struktura o průměru 2,5 cm a výšce 7 mm. Na snímku ze SEM byla pozorována dvojitá struktura vláken a velké mezivláčenné póry. Podobné výsledky vykazovaly také vzorky 9c a 10c. Výsledná struktura ale postrádala kompaktnost, jak je vidět na obrázku 32.

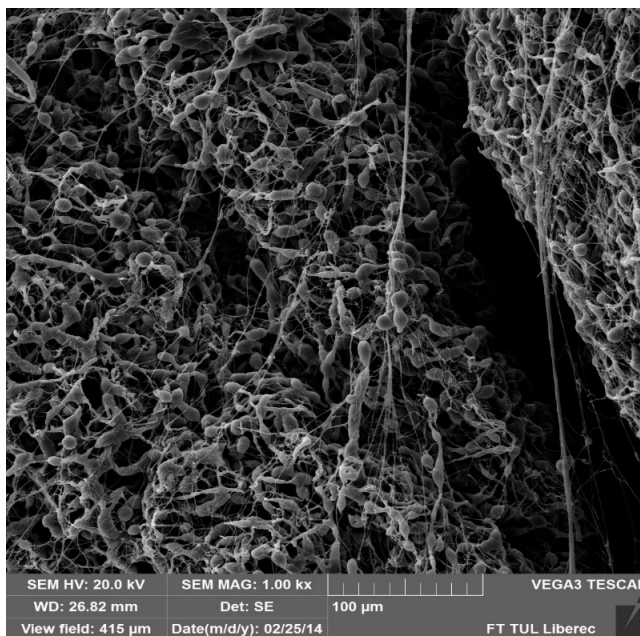


Obr. 32: Tvorba nanovláčenné 3D vrstvy s pomocí usměrňovače, tři různé vzorky v detailu. Zleva: 5c, 7c, 9c.

2.3.3.4 Neobvyklé nanovláčenné struktury

Při zvlákňování s usměrňovačem byla vytvořena také neobvyklá nanovláčenná struktura. Tato struktura vznikla u vzorku 5c vlivem nestálosti procesu a nebyla dále blíže zkoumána.

Při zvlákňování s usměrňovačem vznikl ve vzdálenosti 7 cm mezi hladinou a jehlou již popsány ostrůvek nanovláčenné vrstvy, ze kterého byla po cca 10 minutách vytažena stužka vláken. Ta se postupně prodlužovala směrem k polymerní trysce. Samotná stužka se vlivem manipulace se vzorkem při vysoušení nezachovala. Místo, které se nacházelo nad hladinou, a z kterého se nanovláčenné svazky vytahovaly, je zachyceno na obrázku 33.

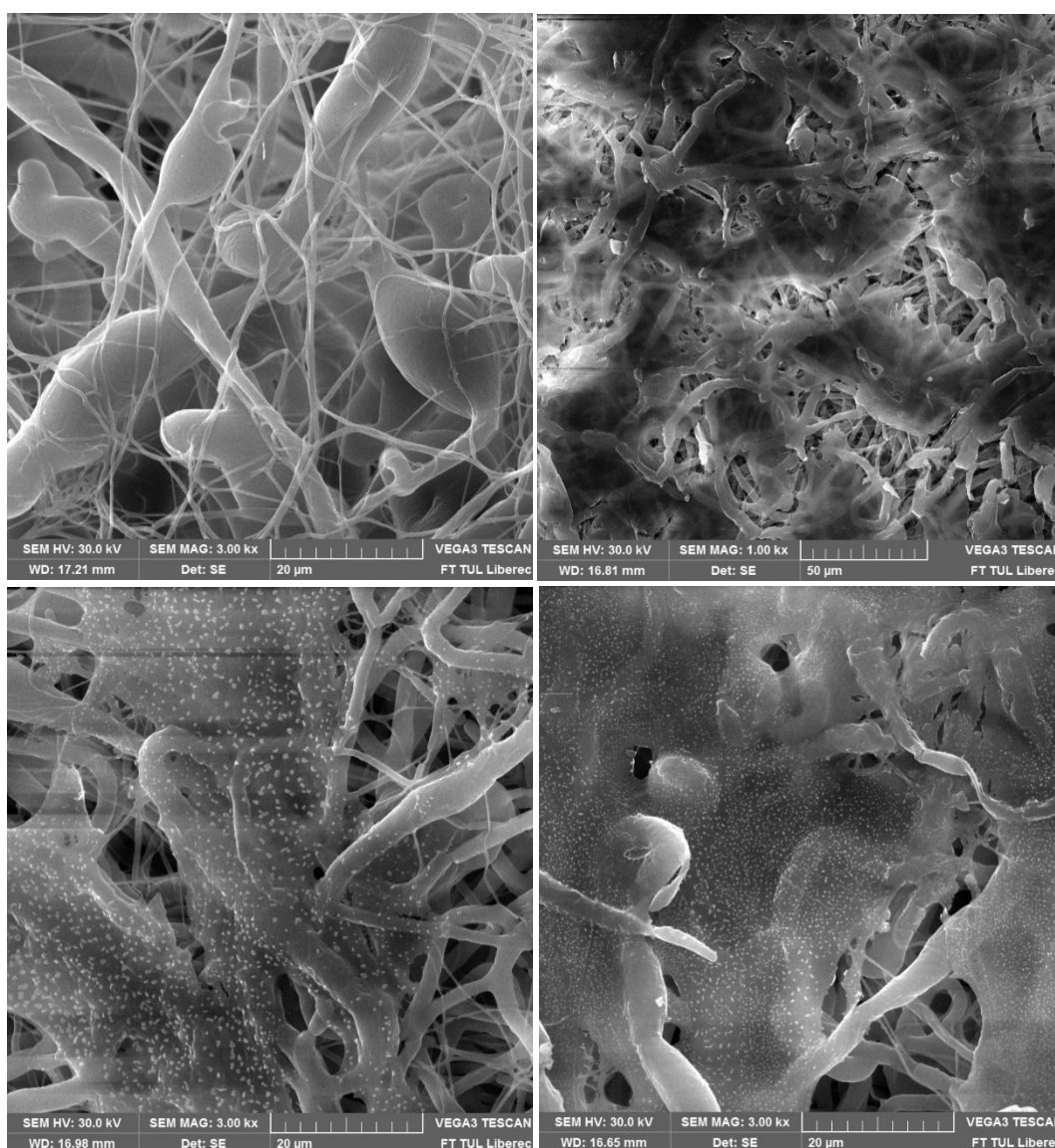


Obr. 33: Místo vzniku nanovláčenné stužky na vzorku 5c. Měřítka 100 µm.

2.3.4 *In vitro* testy

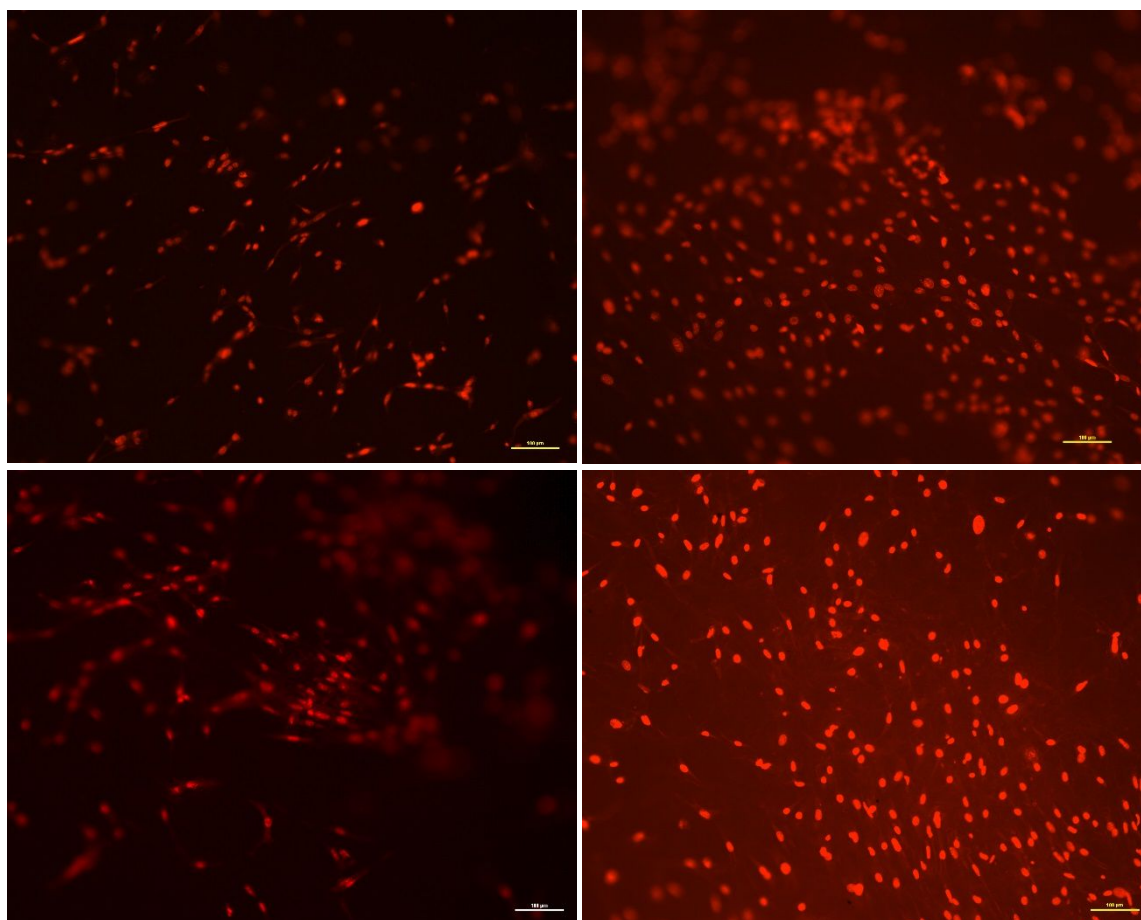
Provedení základních *in vitro* testů mělo ukázat, zda je vyvíjená struktura vhodná pro použití v tkáňovém inženýrství. Při testování byly použity 3T3 myší fibroblasty, které se nasadily na vybrané vzorky za parametrů, definovaných v kapitole 2.2.4 této práce. Pro testy byly vybrány vzorky z druhé série zvláknování do velkého bazénku. Metabolické testování ani kvantifikace buněk nebyla provedena. Testy sloužily pouze pro vizuální posouzení migrace buněk na struktuře.

Průběh osídlování nanovláknenného materiálu byl sledován pomocí SEM (obr. 34) a pomocí fluorescenční mikroskopie (obr. 35). Na snímcích byly v oblasti středu vzorku hledány početnější kolonie buněk. Na vzorcích z 8. a 15 dne bylo patrné, že buňky



Obr. 34: Postupné osídlování scaffoldu buňkami. Buňky lze pozorovat od 4. Dne jako tmavé skvrny na povrchu scaffoldu. 8. a 15. den jsou patrná i jádra buněk. Snímky ze SEM, zleva 1., 4., 8. a 15. den po nasazení. Měřítka 20 a 50 µm.

osídlily většinu povrchu testovaných vzorků. Snímky z fluorescenční mikroskopie také ukazovaly, že buňky ochotně porůstaly povrch nanovlákněné struktury a pomocí různé hloubky ostrosti bylo patrné, že mají tendenci vrůstat i dovnitř.



Obr. 35: Postupné osídlování buněk pod fluorescenčním mikroskopem, zleva 1., 4., 8. a 15. den po nasazení. Měřítko 100 μm [19].

Na základě výsledků těchto testů můžeme předpokládat, že tento typ vlákněné struktury bude vhodným nosičem pro buňky. Na snímcích ze SEM je také patrné, že nebyly použity vzorky s ideální strukturou vláken, jak zde bylo popsáno. To bylo způsobeno souběžným vývojem zvlákňovací soustavy a začátkem testování in vitro.

3. ZÁVĚR

Cílem této práce byl vývoj zvlákňovací soustavy pro elektrostatické zvlákňování do kapaliny, která by umožnila vytvořit objemný, biodegradabilní scaffold využitelný jako nosič buněk pro tkáňové inženýrství.

Zařízení vycházelo ze zvlákňovací soustavy, kterou popisuje ve své bakalářské práci Bc. Michal Šeps [20] a bylo výrazně modifikováno pro výrobu objemné nanovlákněné struktury požadovaných parametrů. Na základě vědeckých článků, popisovaných v teoretické části této bakalářské práce, které se touto problematikou zvlákňování zabývají, byly testovány různé způsoby zachytávání vláken na a pod hladinu koagulační lázně.

První část experimentální části práce se zabývala vytvořením optimalizovaného návrhu zařízení. Ten spočíval ve výrobě skleněného zvlákňovacího bazénku s uzemněným kolektorem. Bylo vyzkoušeno několik řešení, ze kterých vyšel jako nejvhodnější bazének v podobě upravené Petriho misky. Pro vytvoření nanovlákněné struktury s vysokou objemovou hmotností a dostatečnou porositou byly provedeny pokusy s různými typy usměrňovacích měděných vodičů, které vlivem elektromagnetického pole dokázaly nasměrovat proud nanovláken do středu kolektoru. Pro zvýšení stability zvlákňovacího procesu byl vyroben a testován izolační stojánek v podobě soustruženého PTFE válce, skrze nějž vedlo uzemnění bazénku.

V druhé části experimentální kapitoly se zkoumaly jednotlivé zásahy do zvlákňovací soustavy z pohledu mikroskopických vlastností vzniklé nanovlákněné struktury. První sestavení bez jakékoli modifikace vedlo k vytváření plošných vlákněných struktur, které ulpívaly na okrajích bazénku a vytvářely na hladině koagulační lázně nanovlákněnou membránu. Tyto struktury byly z pohledu scaffoldu nevhodné, proto se přistoupilo k použití různých druhů zvlákňovacích bazének. Dobré výsledky přineslo zvlákňování do velkého bazénku, kdy se vlákna začala nořit pod hladinu. Výsledné struktury vykazovaly dvojí strukturu hrubých a jemných vláken s dostatečnou porositou, ale velmi nízkou objemovou hmotností. Pro zvýšení objemové hmotnosti byl bazének zmenšen a proud vláken usměrněn. Tato série testů vykazovala nejlepší výsledky, které se blížily požadovaným parametrům. K izolování vzorků z koagulační lázně byl ve

dvou případech použít lyofilizátor. Lyofilizované vzorky si zachovaly svou vysokou objemnost a pórovitost i po jejich vysušení. Tato metoda izolace se jevila oproti běžnému vysušení na vzduchu jako výhodná.

Poslední kapitola práce byla krátce věnována základním in vitro testům s myšími 3T3 fibroplastickými buňkami. Tyto testy ukázaly, že po 15 denní kultivaci došlo k rovnoměrnému pokrytí buněk po celé nanovláčkové struktuře a mají tendenci do ní i vrůstat. Aby se prokázalo, že takto vzniklé nanovláčkové struktury mohou sloužit jako scaffoldy, bude potřeba daleko hlubšího mikrobiologického zkoumání, než mohla tato práce přinést.

Během psaní této práce bylo objeveno několik zajímavých poznatků, které by mohly být předmětem dalších prací. Jedná se o vliv materiálu zvláčňovacího bazénku na proces zvláčňování, usměrňování polymerní trysky elektromagnetickým polem a lyofilizační izolace nanovláčkové struktury z koagulační lázně.

4. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] LIN, Tong a Xungai WANG. *Needleless Electrospinning of Nanofibers: Technology and Applications*. Boca Raton (Florida, USA): CRC Press Taylor & Francis Group, 2013. ISBN 978-981-4316-35-4.
- [2] RAMAKRISHNA, Seeram et al. *An introduction to electrospinning and nanofibers*. Hackensack, NJ: World Scientific, 2005. ISBN 98-125-6454-3.
- [3] TUCKER, N. et al JOURNAL OF ENGINEERED FIBERS AND FABRICS. The History of the Science and Technology of Electrospinning from 1600 to 1995. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*. Canterbury, New Zealand, 2012, SPECIAL ISSUE - July 2012, s. 11.
- [4] ED. BY GILSON KHANG. *Handbook of intelligent scaffold for tissue engineering and regenerative medicine*. Singapore: Pan Stanford Publ, 2011. ISBN 978-981-4267-854.
- [5] SMIT, Eugene, Ulrich BÜTTNER a Ronald D. SANDERSON. Continuous yarns from electrospun fibers. *Polymer*. 2005, vol. 46, issue 8, s. 2419-2423. DOI: 10.1016/j.polymer.2005.02.002.
- [6] TEO, Wee-Eong, Ryuji INAI a Seeram RAMAKRISHNA. Technological advances in electrospinning of nanofibers. *Science and Technology of Advanced Materials*. Překlad John Bester. 2011-02-01, vol. 12, issue 1, s. 013002-. DOI: 10.1088/1468-6996/12/1/013002.
- [7] SMIT, Eugene, Ulrich /BÜTTNER a Ronald D. SANDERSON. Continuous yarns from electrospun fibers. *Polymer*. 2005, vol. 46, issue 8, s. 2419-2423. DOI: 10.1016/j.polymer.2005.02.002.
- [8] TEO, Wee-Eong, Renuga GOPAL, Ramakrishnan RAMASESHAN, Kazutoshi FUJIHARA a Seeram RAMAKRISHNA. A dynamic liquid support system for continuous electrospun yarn fabrication. *Polymer*. 2007, vol. 48, issue 12, s. 3400-3405. DOI: 10.1016/j.polymer.2007.04.044.
- [9] WANG, Xuefen, Minghua MIN, Zongyuan LIU, Yin YANG, Zhe ZHOU, Meifang ZHU, Yanmo CHEN a Benjamin S. HSIAO. Poly(ethyleneimine) nanofibrous affinity

- membrane fabricated via one step wet-electrospinning from poly(vinyl alcohol)-doped poly(ethyleneimine) solution system and its application. *Journal of Membrane Science*. Překlad John Bester. 2011, vol. 379, 1-2, s. 191-199. DOI: 10.1016/j.memsci.2011.05.065.
- [10] FILIP, Peter. *Progresivní typy biomateriálů*. 1. vyd. Ostrava: Vysoká škola báňská - Technická univerzita, 1995, 118 s. ISBN 80-707-8273-0.
- [11] LOSERTOVÁ, Monika. *Progresivní materiály*. Vyd. 1. Ostrava: Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava, 2012, 1 DVD-ROM. ISBN 978-80-248-2575-5.
- [12] LUBASOVÁ, Daniela a Lenka MARTINOVÁ. MECHANISMUS TVORBY PORÉZNÍCH NANOVLÁKEN Z POLYKAPROLAKTONU PŘIPRAVENÝCH ELEKTROSTATICKÝM ZVLÁKŇOVÁNÍM. *Sborník přednášek: 1. ročník konference s mezinárodní účastí: NANOCON 2009*. 2009, roč. 1, č. 82, s. 6.
- [13] HERMANOVÁ, Soňa. Polykaprolakton-biodegradabilní polyester. *ChemPoint* [online]. Vysoké učení technické v Brně (Fakulta chemická), 2012 [cit. 2014-05-07]. "
- [14] DAI, Weifeng, Jiayun ZHU, Aoyu SHANGGUAN a Meidong LANG. Synthesis, characterization and degradability of the comb-type poly(4-hydroxyl- ϵ -caprolactone-co- ϵ -caprolactone)-g-poly(l-lactide). *European Polymer Journal*. 2009, vol. 45, issue 6, s. 1659-1667. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2009.03.010.
- [15] SHIN, Teo Jeon, Sook Young PARK, Hyun Jeong KIM, Hak Jun LEE a Ji Ho YOUK. Development of 3-D poly(trimethylenecarbonate-co- ϵ -caprolactone)-block-poly(p-dioxanone) scaffold for bone regeneration with high porosity using a wet electrospinning method. *Biotechnology Letters*. 2010, vol. 32, issue 6, s. 877-882. DOI: 10.1007/s10529-010-0235-7.
- [16] PANT, Hem Raj, Madhav Prasad NEUPANE, Bishweshwar PANT, Gopal PANTHI, Hyun-Ju OH, Min Ho LEE a Hak Yong KIM. Fabrication of highly porous poly (ϵ -caprolactone) fibers for novel tissue scaffold via water-bath electrospinning. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011, vol. 88, issue 2, s. 587-592. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.07.045.
- [17] LI, Wan-Ju, Richard TULI, Chukwuka OKAFOR, Assia DERFOUL, Keith G DANIELSON, David J HALL a Rocky S TUAN. A three-dimensional nanofibrous

- scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2005, vol. 26, issue 6, s. 599-609. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.03.005.
- [18] Table of Electrical Resistivity and Conductivity: Flow of Electric Current Through Materials. HELMENSTINE, Anne Marie. *About.com* [online]. 2012 [cit. 2014-05-11].
- [19] BAJI, Avinash, Yiu-Wing MAI, Shing-Chung WONG, Mojtaba ABTAHI a Pei CHEN. Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties. *Composites Science and Technology* [online]. 2010, 70(5): 703-718 [cit. 2016-01-02].
- [20] ŠEPS, Michal. *Elektrostatické zvlákňování do kapaliny*. Liberec, 2013. Bakalářská práce. Technická univerzita v Liberci. Vedoucí práce Eva Košťáková.
- [21] ABDELWAHED, W, G DEGOBERT, S STAINMESSE a H FESSI. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2006, 2015-11-23, 58(15): 1688-1713 [cit. 2015-11-23]. DOI: 10.1016/j.addr.2006.09.017. ISSN 0169409x.
- [22] SOMANI, Rajesh H., Ling YANG, Lei ZHU a Benjamin S. HSIAO. Flow-induced shish-kebab precursor structures in entangled polymer melts. *Polymer* [online]. 2005, 46(20): 8587-8623 [cit. 2016-01-03]. DOI: 10.1016/j.polymer.2005.06.034. ISSN 00323861.
- [23] LABET, Marianne a Wim THIELEMANS. Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chemical Society Reviews* [online]. 2009, 38(12): 3484- [cit. 2016-01-03]. DOI: 10.1039/b820162p. ISSN 03060012.
- [24] JENKINS, M. J. a K. L. HARRISON. The effect of crystalline morphology on the degradation of polycaprolactone in a solution of phosphate buffer and lipase. *Polymers for Advanced Technologies* [online]. 2008, 19(12): 1901-1906 [cit. 2016-01-03]. DOI: 10.1002/pat.1227. ISSN 10427147.