



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra biomedicínské techniky

Vlastnosti tubulárních nosičů připravených z nanovláken

Properties of tubular scaffolds prepared from nanofibers

Diplomová práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika

Studijní obor: Biomedicínský inženýr

Vedoucí diplomové práce: Ing. Jana Štěpanovská, Ph.D.

Bc. František Zima

Kladno 2021

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Zima** Jméno: **František** Osobní číslo: **465468**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra biomedicínské techniky**
Studijní program: **Biomedicínská a klinická technika**
Studijní obor: **Biomedicínský inženýr**

II. ÚDAJE K DIPLOMOVÉ PRÁCI

Název diplomové práce:

Vlastnosti tubulárních nosičů připravených z nanovláken

Název diplomové práce anglicky:

Properties of tubular scaffolds prepared from nanofibers

Pokyny pro vypracování:

Připravte planární vzorky nanovláken připravených z polykaprolaktonu, přičemž optimalizujte koncentraci polymeru v rozpouštědle. Charakterizujte geometrické a mechanické vlastnosti vyrobených vláken, smáčivost a ověřte cytotoxicitu. Výsledky měření korelujte s viskozitou a vodivostí polymerních roztoků. Vybrané koncentrace polymerů pak použijte pro výrobu planárních a tubulárních nosičů. Optimalizujte návrh kultivační komory bioreaktoru pro uchycení připravených substrátů a proveďte test s kmenovými buňkami (lidské nebo zvířecí).

Seznam doporučené literatury:

- [1] Rajesh Vasita, Dharendra S Katti, Nanofibers and their applications in tissue engineering, Int J Nanomedicine, ročník 1, číslo 1, 2006
[2] Md. Mahabub Hasan, Abu Yousuf Mohammad Anwarul Azim and Md. Shamim Reza, Effect of Electrospinning Parameters on Fiber Morphology of Tissue Engineering Scaffolds: A Review, Journal of Fashion Technology & Textile Engineering, ročník 2, číslo 3, 2014

Jméno a příjmení vedoucí(ho) diplomové práce:

Ing. Jana Štěpanovská

Jméno a příjmení konzultanta(ky) diplomové práce:

Ing. Roman Matějka, Ing. Monika Šupová, Ph.D.

Datum zadání diplomové práce: **15.02.2021**

Platnost zadání diplomové práce: **18.09.2022**

Doc. Ing.
Martin
Rožánek, Ph.D.
Digitálně podepsal
Doc. Ing. Martin
Rožánek, Ph.D.
Datum: 2021.03.03
22:05:40 +01:00'...

doc. Ing. Martin Rožánek, Ph.D.
podpis vedoucí(ho) katedry

prof. MUDr.
Jozef Rosina,
Ph.D., MBA
Digitálně podepsal prof.
MUDr. Jozef Rosina, Ph.D.,
MBA
Datum: 2021.03.04
11:54:47 +01:00'

prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA
podpis děkana(ky)

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem „Vlastnosti tubulárních nosičů připravených z nanovláken“ vypracoval samostatně a použil k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k diplomové práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu §60 Zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně 18. 5. 2021

.....

Bc. František Zima

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval vedoucí své diplomové práce Ing. Janě Štěpanovské, Ph.D. za ochotnou pomoc a cenné rady.

Tato práce vznikla za podpory projektů Ministerstva zdravotnictví České Republiky, Agentury pro zdravotnický výzkum s reg. č. NV18-02-00422 a NV19-02-00068; dále projektu a projektů Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy České Republiky, Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání, s reg. č. CZ.02.2.69/0.0/0.0/16_018/0002242 a CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_017/0002244



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

ABSTRAKT

Vlastnosti tubulárních nosičů připravených z nanovláken

Práce charakterizuje polymerní roztoky a nanovláknenné struktury vyrobené metodou elektrostatického zvlákňování. Je zde vyhodnocen vliv mechanických a geometrických vlastností na proliferaci buněk na jednotlivých vzorcích. Bylo připraveno a zvlákněno celkem šest vzorků s různou koncentrací PCL v různých rozpouštěcích systémech. Viskozitu roztoků určoval pádový čas kuličky v jednotlivých roztocích. Smáčivost byla určena pomocí velikosti kontaktního úhlu přisedlé kapky. Geometrické vlastnosti vzorků byly stanoveny ze snímků z elektronového mikroskopu. Pro tento účel byl vytvořen skript v programu MATLAB pro zpracování SEM snímků s cílem stanovení velikosti pórů a vláken. Při mechanickém testování byla stanovena mez pevnosti jednotlivých vzorků. Vliv vlastností vzorků byl hodnocen na základě buněčných experimentů, pro jejichž účel byla navržena a vyrobena kultivační komora. Pro měření počtu buněk byl vytvořen skript v programu MATLAB. Proliferace buněk na jednotlivých vzorcích byla hodnocena pomocí barvení jader a cytoskeletu a následné analýzy mikroskopických snímků. Byla prokázána závislost mezi jednotlivými proměnnými. Dle výsledků v této práci uvedených se pro buněčnou proliferaci jeví jako nejvhodnější vzorek s koncentrací 16 % PCL. Nejvyšší mechanickou pevnost prokázal vzorek s nejvyšší koncentrací PCL.

Klíčová slova

nanovláknena, polykaprolakton, elektrostatické zvlákňování, smáčivost nanovláken, průměr vláken a velikost pórů

ABSTRACT

Properties of tubular scaffolds prepared from nanofibers

This study characterizes polymer solutions and nanofiber structures produced by electrospinning. The influence of mechanical and geometric properties on cell proliferation on individual samples is evaluated here. A total of six samples with different PCL concentrations in different dissolution systems were prepared and spun. The viscosity of the solutions was determined by the fall time of the metal ball in the individual solutions. The wettability was determined by the size of the contact angle of the sessile drop. The geometric properties of the samples were determined from electron microscope images. For this purpose, a script was created in MATLAB to process SEM images to determine the size of pores and fibers. During mechanical testing, the ultimate strength of individual samples was determined. The influence of the properties of the samples was evaluated on the basis of cell experiments, for the purpose of which a culture chamber was designed and manufactured. A script in MATLAB was created to measure the number of cells. Cell proliferation on individual samples was assessed by staining the nuclei and cytoskeleton and subsequent analysis of microscopic images. The dependence between the individual variables was proved. According to the results presented in this study, a sample with a concentration of 16% PCL appears to be the most suitable for cell proliferation. The highest mechanical strength was demonstrated by the sample with the highest concentration of PCL.

Keywords

nanofibers, polycaprolactone, electrospinning, nanofibers wettability, fiber diameter and pore size

Obsah

Seznam symbolů a zkratk	9
1 Úvod	10
2 Přehled současného stavu	11
2.1 Obecná stavba cévy	11
2.1.1 Mezibuněčná hmota	12
2.2 Tkáňové inženýrství	13
2.2.1 Vlastnosti tkáňového nosiče	13
2.3 Nanotechnologie a nanovlákná	14
2.3.1 Nanovláknenné tkáňové nosiče	14
2.4 Výroba nanovláken elektrostatickým zvlákňováním	15
2.5 Procesní parametry	16
2.5.1 Aplikované napětí	16
2.5.2 Průtok	16
2.5.3 Pracovní vzdálenost.....	17
2.6 Parametry polymerního roztoku.....	17
2.6.1 Koncentrace polymeru	17
2.6.2 Těkavost rozpouštědla.....	18
2.6.3 Viskozita polymerového roztoku	18
2.7 Povrchová modifikace vláken	18
2.7.1 Smáčivost povrchů	19
2.8 Polymery využívané pro výrobu nanovláken.....	19
2.8.1 Syntetické polymery.....	20
3 Cíle práce	21
4 Metody	22
4.1 Roztoky polymerů	22
4.2 Proces elektrostatického zvlákňování	23
4.3 Sterilizace nanovláken, hodnocení cytotoxicity vláken	24
4.4 Měření smáčivosti	25
4.5 Skenovací elektronová mikroskopie, měření průměru vláken a velikosti pórů ..	26
4.6 Měření viskozity.....	29

4.7	Měření mechanické pevnosti.....	30
4.8	Návrh komory pro uchycení nanovláken	32
4.9	Vliv povrchových vlastností vláken na adhezi a buněčnou proliferaci.....	32
4.10	Statistické zhodnocení.....	34
5	Výsledky.....	35
5.1	Připravené roztoky	35
5.2	Elektrostatické zvlákňování	35
5.3	Sterilizace nanovláken.....	38
5.4	Měření smáčivosti	40
5.5	Měření průměru vláken a velikosti pórů	41
5.6	Měření viskozity.....	45
5.7	Měření mechanické pevnosti.....	48
5.8	Komora pro uchycení nanovláken.....	49
5.9	Buněčná adheze a proliferace.....	50
5.10	Shrnutí	52
6	Diskuze.....	53
7	Závěr	57
	Seznam použité literatury	58
	Seznam příloh.....	62
	Příloha A: Technický výkres	63
	Příloha B: Výsledky statistických testů	65
	Příloha C: Obsah přiloženého CD.....	69

Seznam symbolů a zkratek

Seznam symbolů

Symbol	Jednotka	Význam
θ	°	Kontaktní úhel pro vyhodnocení smáčivosti
η	mPa·s	Dynamická viskozita
η	poise	Dynamická viskozita (1 poise = 0,1 Pa·s)
T	s	Pádový čas kuličky pro měření viskozity
ρ_K	(g/cm ³)	Hustota kuličky pro měření viskozity
ρ_T	(g/cm ³)	Hustota roztoku

Seznam zkratek

Zkratka	Význam
ABAM	Antibiotikum-antimikotikum
ADMSC	Mezenchymální kmenové buňky izolované z tuku prasete (<i>Adipose-derived mesenchymal stem cells</i>)
ANOVA	Analýza rozptylu (<i>Analysis of variance</i>)
DAPI	4', 6-diamidin-2-fenylindol
DMEM	Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium (<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>)
ECM	Extracelulární matrix
FGF2	Bazický fibroblastový růstový faktor (<i>Basic fibroblast growth factor</i>)
PBS	Fosfátový pufr (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCL	Polykaprolakton
PGA	Polymer kyseliny glykolové
PLA	Polymer kyseliny mléčné
PLCL	Kopolymer kyseliny mléčné a kaprolaktonu
PLGA	Kopolymer kyseliny glykolové a mléčné
SEM	Skenovací elektronový mikroskop (<i>Scanning Electron Microscope</i>)
TRITC	Tetramethylrhodamin

1 Úvod

V důsledku kardiovaskulárních onemocnění zemřou v Evropě každý rok 4 miliony osob [1]. Tato onemocnění mohou vznikat různými způsoby. Nejčastěji bývají zapříčiněna arteriální hypertenzí, aterosklerózou či srdeční ischemií, kvůli čemuž dochází k nedostatečnému prokrvování příslušných částí lidského těla. Jednou z možností, jak řešit tato onemocnění je náhrada poškozené cévy, a to buď štěpem autologním, který je získán z vlastní tkáně, xenogenním anebo štěpem umělým [2]. Omezená dostupnost zdravých autologních cév pro roubování pomocí bypassu vedla k výrobě protetických vaskulárních trubic. Syntetické štěpy, vyrobené z polytetrafluorethylenu či z polyethylentereftalátu, jsou úspěšně používány k nahrazování cév s velkým průměrem (> 6 mm). Problém však nastává u náhrady cév s malým průměrem, kdy tyto štěpy vykazují vysokou míru selhání v důsledku trombózy, stenózy a okluze [3]. Cévní náhrada by se měla co nejvíce podobat cévě nativní. Požadavky, které by měla náhrada splňovat, jsou zejména biokompatibilita s okolním prostředím cévy, dostatečné mechanické vlastnosti, které si musí zachovat během remodelace cévního systému, a biodegradabilita, díky níž dojde s postupem času k přirozenému začlenění do lidské tkáně [4]. Možným řešením cévních náhrad s malým průměrem s požadovanými vlastnostmi by mohla být nanotechnologie. Díky ní je možné pomocí elektrostatického zvlákňování polymerů do nanovláken vyrobit tkáňový nosič tzv. scaffold. Na tento nosič lze nasadit buňky dané tkáně a vytvořit náhradu pro poškozenou cévu. Případně je možností nosič implantovat do těla pacienta, kdy osídlení proběhne přímo v organismu. Důležité však je zvolit vhodný polymer syntetického nebo přírodního původu, z kterého budou nanovláknena vytvořena tak, aby buňky vykazovaly vysoký stupeň proliferace. Konečným cílem nanovláknenného tkáňového nosiče je výroba ideální struktury, která bude nahrazovat přirozenou mezibuněčnou hmotu do té doby, než budou hostitelské buňky schopny znovu osídlit a resyntetizovat novou přirozenou mezibuněčnou hmotu [5]. Cílem této práce je porovnání nanovláknenných struktur, vyrobených z různých koncentrací polymeru, změření jejich vlastností a ověření vhodnosti nanovláken pro buněčné kultury.

2 Přehled současného stavu

V poslední době se zvýšila pozornost na využití nanovláken v oboru tkáňového inženýrství. Především proto, že svými vlastnostmi jsou odlišné od stávajících materiálů pro náhradu cév. Důraz je přitom kladen zejména na biokompatibilitu a biodegradabilitu materiálu. Při poškození cév může dojít k nadměrnému ukládání extracelulární matrice, které vede k patologickému stavu známému jako intimální hyperplázie. V krevních cévách s velkým průměrem se toto onemocnění projevuje zúžením lumen a způsobuje tedy změnu v průtoku krve. Nicméně úplné uzavření ve velkých cévách se vyskytuje velmi vzácně. V cévách s menším průměrem je však okluze závažný a často fatální stav, protože cévy postrádají prostor pro expanzi během fáze remodelace. Tento patologický stav lze nejlépe léčit pomocí bypassových roubovacích postupů, které používají *venu saphenu*. Množství kvalitních autologních cévních štěpů bývá však omezené, stejně jako množství vhodných štěpů od dárců. Častým problémem je také vysoké riziko trombózy či infekce. Proto jsou vyráběny štěpy umělé. Syntetické vaskulární štěpy z polytetrafluorethylenu, které se ukázaly být vhodné jako náhrady krevních cév velkého průměru, byly zkoumány i u malých průměrů. Zde však značně snížily průchodnost, a vykazovaly vysokou míru selhání, protože se jim nepodařilo dostatečně napodobit nativní funkci štěpu [6].

Elektrostaticky vytvořená nanovláknna se velmi podobají mezibuněčné hmotě, která se rovněž skládá z tenkých vláken. Tato vlákna kolagenu a elastinu a jiných látek tvoří trojrozměrné mikroprostředí, ve kterém buňky získávají snadno určitý funkční tvar a ve kterém se vytváří spojení mezi buňkami. Elektrosvlákněné polymery ve formě nanovláken jsou v tkáňovém inženýrství používány jako lešení s porézní strukturou, což umožňuje buňkám udržovat vzájemnou interakci. Mimo lešení a buňky hrají důležitou roli v tkáňovém inženýrství i růstové faktory, které podporují intracelulární signální efekty. Vhodnou kombinací přírodních a syntetických polymerů lze vyrobit nanovláknna, která umožňují buňkám dynamický růst a diferenciaci, což vede k vhodným regeneračním účinkům. Přesto však existují stále možnosti ke zlepšení a vytvoření prostředí srovnatelného s podmínkami *in vivo* [7].

2.1 Obecná stavba cévy

Krev cirkuluje tělem prostřednictvím cév, které se dělí na tepny, žíly a kapiláry. Podobně jako u jiných tkání, je hlavní součástí cév extracelulární matrix (ECM). Struktura cév sestává ze tří vrstev. Jedná se o vrstvy:

- *tunica intima*,
- *tunica media*
- *tunica adventitia*

Tunica intima tvoří nejnvnitřnější vrstvu, která je v kontaktu s krví. Skládá se z endotelu a subendotelové vrstvy tvořené řídkým kolagenním vazivem. Endotel je hladká, nesmáčivá vrstva složená z plochých endotelových buněk, které brání styku krevních destiček s vazivem subendotelové vrstvy a jejich následnému shlukování, a tím vzniku sraženiny (trombu). Tyto buňky zároveň vykazují vysokou metabolickou aktivitu [8].

Střední vrstva *tunica media* se obvykle skládá z husté populace koncentricky uspořádaných buněk hladkého svalstva, které produkují mezibuněčnou hmotu. Tato vrstva umožňuje změnu průsvitu cév a zároveň dodává cévní stěně pružnost. *Tunica media* je oddělena od vrstvy *tunica intima* pomocí vnitřní elastické laminy [9].

Tunica adventitia tvoří vnější povrchovou vrstvu cévy a obsahuje kolagenní a elastická vlákna. Tato vlákna se kříží a přecházejí do okolního vaziva [8].

Z pohledu odlišnosti stěn mezi tepnami a žilami, je rozdíl v tloušťce jednotlivých vrstev. U tepen je nejsilnější vrstvou *tunica media*, naopak u žil je nejsilnější *tunica adventitia*. To znamená, že tepny si díky své silné svalové vrstvě udržují téměř za všech podmínek okrouhlý průměr. Žíly mají svalovou vrstvu slabou, a proto se jejich průsvit často mění podle tlaku struktur, které jsou s nimi v kontaktu [8]. Je však nutné si uvědomit, že přirozené krevní cévy tvoří rozvětvené systémy tepen a žil, které se liší velikostí, mechanickými vlastnostmi, biochemickým a buněčným obsahem a ultrastrukturální organizací v závislosti na svém umístění a specifické funkci. Proto je vhodné připravovat vaskulární štěpy podle specifických požadavků, které zohledňují mechanické a antitrombogenní vlastnosti nativních krevních cév [3].

2.1.1 Mezibuněčná hmota

Každá tkáň se skládá z mezibuněčné hmoty (ECM) a určitého počtu buněk. Mezibuněčná hmota, která obklopuje cévní buňky je tvořena zejména kolagenem typu I a III, elastinem, proteoglykany a glykoproteiny. ECM představuje v podstatě lešení, které udržuje tvarovou strukturu stěny cévy. Zároveň ECM nese stálé mechanické síly vyvolané na cévu pulzním krevním tokem v tepnách. Díky ní buňky drží pohromadě a jsou schopny adheze, proliferace a diferenciace [10]. Z hlediska mechanických vlastností poskytuje kolagen tahovou pevnost a odolnost proti prasknutí. Zároveň udržuje tvar tkáně a přenáší a rozptyluje zátěž[4]. Elastin poskytuje především elastické vlastnosti, díky kterým je céva schopna vrátit se při deformaci do původního tvaru. Proteoglykany přispívají k odolnosti proti tlaku. Céva je tak schopna díky svým vlastnostem vyrovnávat pulzaci krve [9].

2.2 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství znamená *in vitro* vývoj a modulace různých molekul a buněk v přírodních a syntetických konstruktech za účelem nahrazení poškozené tkáně. Důležitou roli hrají porézní materiály, které jsou vyráběny jako vhodná náhrada ECM a tvoří tak substrát pro podporu dynamického růstu buněk. Ke zvýšení buněčné adaptace jsou na substráty vázány různé růstové faktory a cytokiny. Zásadním strukturou je takzvané lešení (nosič), které sestává hlavně z přírodních nebo syntetických materiálů. Toto lešení ukotvuje buňky a poskytuje jim vhodné prostředí pro adhezi, růst a proliferaci. Poté, co dochází ke správnému růstu buněk na porézním lešení, může být konstrukt transplantován do cílového místa *in vivo*. Lešení slouží však jen jako dočasná mechanická opora. Díky biodegradabilitě je totiž absorbováno okolní tkání, aniž by bylo nutné ho chirurgicky odstraňovat [7].

2.2.1 Vlastnosti tkáňového nosiče

Při výběru materiálů pro aplikaci v tkáňovém inženýrství musí být splněna řada požadavků. Tkáňový nosič by měl být biomateriálem. Tedy látkou umělého či přírodního původu, která nahrazuje či rozšiřuje po určitou dobu danou funkci lidského systému. Od takového materiálu se vyžaduje, aby se co nejvíce podobal nahrazované tkáni, nebyl toxický pro lidské tělo a nevyvolával alergickou reakci. V případě umělých cévních štěpů je navíc důležité zajistit antitrombogenní vlastnosti a taktéž odolnost vůči krevnímu tlaku a mechanickému pnutí. Udržení těchto vlastností je klíčové zejména v časných stádiích proliferace buněk *in vitro*, kdy tkáň roste a dosud nemá vysokou mechanickou pevnost. Lešení by navíc mělo udržovat pružnost bez významné trvalé deformace, aby se převedly příslušné mechanické podněty buněk. Dále pak mechanickou stabilitu, dokud nebude buňkami tvořená ECM schopna nést zátěž, na kterou je stavěn tkáňový nosič. S ohledem na přirozené vrstvy normální cévy se jeví konstrukce vícevrstvého vaskulárního lešení jako optimální pro zlepšení mechanických vlastností [7].

Vyrobené lešení by mělo být porézní se vzájemně propojenými dutinami. Vysoký poměr plochy k objemu podporuje růst buněk a usnadňuje jejich rovnoměrnou distribuci. S tím souvisí též velikost pórů, která v případě malých pórů blokuje penetraci buněk a produkci ECM. Vhodné rozmezí velikost pórů bylo stanoveno na (91 – 150 μm) [11]. Povrchové vlastnosti lešení, jako je topografie a chemické vlastnosti, jsou rozhodující při adhezi buněk a jejich proliferaci. Zejména přilnavost k syntetickým materiálům pak závisí právě na vlastnostech chemických [7].

Dalším rysem vytvořeného lešení schopnost biodegradace, která by měla být při výrobě zohledněna. Biodegradace zajišťuje, že se nosič v těle po čase rozloží na netoxické monomery, je vyloučen a nahrazen vlastní tkání. Je však nezbytné, aby se rychlost degradace shodovala s rychlostí tvorby nové tkáně. Pokud je rychlost

degradace příliš nízká, bude bráněno tvorbě nové tkáně. Pokud je však rychlost degradace příliš vysoká, pak bude narušena mechanická stabilita lešení [12].

2.3 Nanotechnologie a nanovlákná

Mezi čím dál více se rozvíjející odvětví patří nanotechnologie, což je vědecká oblast, která se zabývá tvorbou a využíváním struktur v měřítkách nanometrů. Ve srovnání s makroskopickými materiály mají nanomateriály docela odlišné vlastnosti a chování. V případě nanovláken se jedná především o mimořádně vysoký poměr plochy k objemu.

Využití nanovláken je rozmanité. Využívají se v oblasti filtrace, biosenzorů, vojenských ochranných oděvů, fotovoltaiických zařízení, vysoce účinných katalyzátorů, kosmetiky a také v oblasti biomedicíny, přesněji řečeno tkáňového inženýrství. Zde jsou nanovlákná užívána jako nosiče pro dodávání léčiv, obvazové materiály nebo jako porézní trojrozměrné lešení pro náhradu různých tkání (kůže, krevní cévy, nervy, šlachy, kosti a chrupavky) [6].

2.3.1 Nanovláknenné tkáňové nosiče

Jako nanovlákná jsou označovány vláknenné struktury s průměrem menším než 1 μm . Nanovlákná mají díky svému vysokému poměru povrchu k objemu několik specifických vlastností, jako je nízká hustota, velký objem pórů s proměnnou velikostí a výjimečné mechanické vlastnosti. Ačkoli je chemická struktura polymerů pro výrobu nanovláken stejná jako pro výrobu jiných makroobjektů, vede velký povrch nanovláken ke zvýšené schopnosti interagovat s okolním prostředím a okolními částicemi, což v důsledku vede ke zlepšení jiných vlastností, jako jsou chemické vazby či mechanická a teplotní odolnost [13]. Elektrozvláknenné nanovláknenné matrice vykazují morfológickou podobnost s přirozenou ECM, která obsahuje ultrajemná kontinuální vlákná s velkou plochou, vysokou porozitou a variabilní distribucí velikosti pórů, což umožňuje buňkám usadit se i uvnitř nosiče. Na chování buněk má významný vliv nanotopografie vytvořeného tkáňového nosiče. Póry, zářezy a vyvýšeniny na materiálu totiž ovlivňují buněčnou adhezi, proliferaci a genovou expresi. Na tyto faktory má vliv v živé tkáni ECM, která se v zásadě skládá z hierarchicky uspořádaného kolagenu, lamininu, dalších fibril a proteoglykanů v rozsahu nanometrů. Průměr a orientace vláken mají také významný vliv na buněčnou odpověď. Změny v buněčném chování mohou být způsobeny změnami povrchových vlastností, jako je smáčivost, morfologie povrchu a změny v pórovitosti a průměru pórů. To může vést k adsorpci více ECM proteinů, jako je vitronektin, fibronektin a vést tak ke zlepšení adheze a proliferace buněk ve srovnání s plochými nebo 2D povrchy [6].

Nanovlákná musí mít dostatečné mechanické vlastnosti, aby byla vhodná pro danou aplikaci. Mezi nejčastěji prováděné zkoušky patří měření Youngova modulu pružnosti a

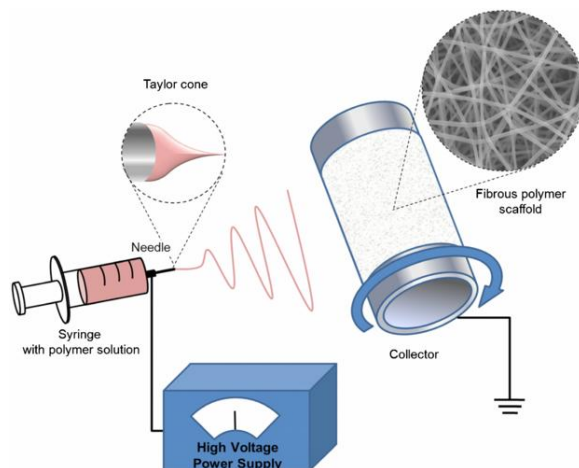
měření pevnosti v tahu. Mechanická pevnost a vlastnosti vláken závisí na chemickém složení polymeru, výrobním postupu, průměru vláken a jejich celkovém uspořádání. Navíc lze jejich vlastnosti významně ovlivňovat parametry elektrostatického zvlákňování [6].

Nejběžněji používanými materiály v tkáňovém inženýrství jsou syntetické polymery a molekuly extracelulární matrice izolované ze živočišných tkání. Nejrozšířenějším přírodním materiálem je kolagen typu I a ze syntetických polymerů to jsou polykaprolakton (PCL), polymer kyseliny glykolové (PGA), polymer kyseliny mléčné (PLA) a kopolymery kyseliny mléčné a glykolové (PLGA). Tyto polymery jsou široce považovány za biokompatibilní, přičemž je lze vyrobit do různě tvarovaného lešení [14].

2.4 Výroba nanovláken elektrostatickým zvlákňováním

Jednou z metod pro výrobu nanovláken je elektrostatické zvlákňování, také jinak zvané elektrospínování, díky kterému je možné vyrobit vlákna o průměru od několika nanometrů až po stovky nanometrů a délky několika metrů [6]. Elektrospínování je jednoduchý nástroj pro výrobu nanovláken nepřetržitým procesem pomocí přístroje zvaného nanospinner. Pomocí této metody je možné vyrobit nanovlákna z přírodních i syntetických polymerů, jež mohou nahradit ECM [15].

Při elektrostatickém zvlákňování dochází k formování roztoku polymerů do vlákných útvarů vlivem vysokého elektrického potenciálu (řádově desítky kV). Síly tohoto elektrostatického pole musí překonat povrchové napětí roztoku. Napětí nejprve způsobí vytrysknutí pramínků z kapky polymerního roztoku vytvořené na spodní elektrodě (tzv. emitoru). Pak aktivují i jeho pohyb k protilehlé uzemněné elektrodě (tzv. kolektoru). Během pohybu dochází k tenčení, dloužení a tunutí zvlákňovaného roztoku, který ve formě vláken dopadá na kolektor (viz Obr. 2.1). Celý tento pohyb vlákna mezi oběma elektrodami je velice komplikovaný a je veden po zcela náhodné trajektorii. Doslova chaotický pohyb letícího vlákna způsobí jeho náhodné ukládání na protilehlou elektrodu, kde se vytváří netkaný vlákný materiál. Ačkoli existuje velké množství typů kolektorů, kam dopadají vlákna, lze je zpravidla rozdělit na stacionární a rotující. Na stacionární kolektory se vlákna ukládají v náhodném uspořádání, zatímco u rotujících lze vhodnou rychlostí rotace vytvořit orientovanou strukturu vláken. Pokud je rotace vyšší než určitá mez, dojde k potrhání vláken. Chceme-li však vyrobit tubulární tkáňový nosič, je zapotřebí využít rotujícího cylindrického kolektoru o průměru takovém, jaký chceme, aby tkáňový nosič měl [16]. V tkáňovém inženýrství se spíše využívají rotující kolektory, které vytvoří orientovanou strukturu. Buňky totiž lépe proliferují ve směru orientace vláken a vytvářejí kompaktní vrstvu. Vytvořený tubulární nosič lze nadále modifikovat a zlepšit tak jeho mechanické vlastnosti [12].



Obrázek 2.1: Schéma principu elektrostatického zvlákňování. Převzato z [17].

Výsledné vlastnosti a morfologie nanostruktury jsou ovlivněny jednak procesními parametry a jednak parametry polymerního roztoku.

2.5 Procesní parametry

Tyto parametry mají vliv na proces elektrostatického zvlákňování a na tvorbu nanostruktury. Zpravidla se nastavují přímo na hlavním panelu nanospineru. Patří mezi ně zejména aplikované elektrické napětí, rychlost dávkování roztoku, vzdálenost emitor - kolektor, případná rychlost rotace kolektoru, rychlost proudícího vzduchu či jeho teplota. Všechny tyto parametry spolu více či méně souvisí a projeví se na vytvořené struktuře.

2.5.1 Aplikované napětí

Mezi základní parametry elektrostatického zvlákňování patří aplikované napětí, bez něhož nedojde ke tvorbě paprsku. Zvyšování intenzity elektrického pole začne vyvíjet tahové síly na kapalinu, čímž se prodlužuje kapka na špičce kapiláry. Při dalším zvyšování intenzity, dosáhneme bodu, ve kterém jsou elektrostatické síly rovny povrchovému napětí kapaliny, což vede k vytvoření tzv. Taylorova kužele (viz Obr. 2.1). Je-li aplikované napětí zvýšeno za tento bod, jsou vlákna vystřelena z vrcholu kužele a urychlena směrem ke kolektoru. V případě velmi vysokého napětí však může dojít ke tvorbě kuličkových formací [12]. Obecně lze říci, že průměr vlákna klesá s rostoucím napětím, což lze přičíst rostoucí tažné síle [18].

2.5.2 Průtok

Velikost průtoku polymeru má přímý vliv na rychlost výroby vláken. S rostoucím průtokem se také zvyšuje jak průměr vláken, tak i velikost pórů. Nicméně při vysokých průtocích dochází k defektům vlákna ve formě kuliček, jelikož vlákno zcela nevyschne

před dosažením kolektoru. To pak může vést i ke tvorbě zploštělých vláken a nikoli vláken s kruhovým průřezem [18]. Na dostatečné odpaření rozpouštědla má dále i vliv vzdušná vlhkost a teplota. Vysoká vlhkost totiž způsobuje nedostatečné odpaření rozpouštědla, zatímco vysoká teplota naopak může způsobit předčasné vysušení polymeru a tím i zaschnutí polymeru na emitoru [12].

2.5.3 Pracovní vzdálenost

Vzdálenost emitor-kolektor hraje neméně důležitou roli při tvorbě vlákna, zejména pak určuje velikost jeho průměru, který se zmenšuje se vzrůstající vzdáleností. Zároveň ovlivňuje i intenzitu elektrického pole, která se snižuje se vzrůstající délkou mezi elektrodami. Rozpouštědlo musí mít dostatek času na odpaření a přeměnu proudu na suchá vlákna. S tím souvisí vznik korálovitých struktur, které lze na vláknech pozorovat při zkracování vzdálenosti od kolektoru, což je přičítáno právě neúplnému vysušení polymerního vlákna [12].

2.6 Parametry polymerního roztoku

Přestože lze vyvodit obecné vztahy mezi jednotlivými parametry, je důležité zmínit, že pro každý jednotlivý polymer a rozpouštědlo se vztah bude více či méně lišit. Nelze tedy přesně říct, jaké hodnoty parametrů jsou neoptimalnější. Mezi důležité faktory zvláknovaného polymerního roztoku patří koncentrace polymeru a těkavost rozpouštědla, které určují, zda budou vlákna tvořena, dále vodivost roztoku, která určuje, jakou tahovou silou budou vlákna vystavena v přítomnosti elektrického pole, směs rozpouštěcího systému či viskozita roztoku.

2.6.1 Koncentrace polymeru

Koncentrace polymeru je velmi důležitý parametr, neboť určuje, zda se vlákno tvoří či ne. Roztok musí mít dostatečně vysokou koncentraci, aby došlo ke spletní řetězců, ale nesmí být naopak příliš zředěný, protože pak by se vlákna už nevytvořila. Koncentrace polymeru ovlivňuje jak viskozitu, tak i povrchové napětí roztoku. Pokud je roztok příliš zředěný, polymerní vlákno se rozpadne na kapičky před dosažením kolektoru kvůli účinkům povrchového napětí. Tento jev se nazývá „electrospraying“. Nízká koncentrace polymeru může také vést k tvorbě korálovité struktury na vláknech. S rostoucí koncentrací tento jev mizí až k tvorbě homogenních vláken [6]. Pokud má však roztok příliš vysokou koncentraci, nemohou se vlákna vytvářet kvůli vysoké viskozitě. Polymer tak často zasychá, ucpává kapiláru a je tak znemožněno jej zvláknit. Pracujeme-li ve vhodném rozmezí koncentrací, lze zvýšením koncentrace zvýšit i průměr spřádáných vláken, ale i variabilitu průměrů [12].

2.6.2 Těkavost rozpouštědla

Volba rozpouštědla má vliv na schopnost tvoření vláken a také jejich pórovitost. Aby mohlo dojít k dostatečnému odpařování rozpouštědla mezi kapilárním hrotem a kolektorem, musí být použito těkavé rozpouštědlo. Je-li použito málo těkavé rozpouštědlo, nestihne se během letu mezi elektrodami odpařit, takže se na kolektor ukládá nevlákenný roztok polymeru [12].

2.6.3 Viskozita polymerového roztoku

Související veličinou, jejíž hodnota je dána druhem a množstvím polymeru a rozpouštědla je viskozita. Bylo pozorováno, že není možné vytvořit souvislá nanovlákná s velmi malými hodnotami viskozity ($\eta < 1$ poise). Stejně tak není možné použít polymer s velmi vysokými hodnotami viskozity ($\eta > 20$ poise), jelikož pak je téměř nemožné vytvořit proud polymeru z emitoru. Se vzrůstající viskozitou se zvětšuje průměr vláken. Stejně tak dochází i k absenci korálkovitých útvarů na vláknech. Samotná hodnota viskozity je pak závislá na koncentraci a molekulové hmotnosti polymeru. Molekulová hmotnost sama o sobě též ovlivňuje přítomnost korálek na vláknech. Čím je hmotnost vyšší, tím spíše se za stejných podmínek na vláknech korálky neobjevují [19].

2.7 Povrchová modifikace vláken

Vlastnosti vláken připravených procesem elektrovláknění lze upravit pomocí různých technik povrchové modifikace. Pro aplikaci vláken v biomedicínské oblasti se povrchy modifikují chemicky a fyzikálně. Nanovlákná pak mohou poskytovat biomimetická mikroprostředí okolním buňkám a tkáním. Různé techniky mění chemické složení povrchu nanovláken, porozitu, drsnost či hydrofilnost povrchu, což může poskytovat příznivější prostředí pro buněčnou adhezi. Povrchová modifikace navíc zvyšuje biologickou kompatibilitu polymerních materiálů a zavádí různé funkční skupiny vhodné pro buněčný růst [17].

Mezi běžně užívané úpravy patří ošetření plazmou, což je vysokoenergetický stav hmoty, ve kterém je plyn částečně ionizován na nabitě částice. Tato úprava slouží k imobilizaci polárních skupin, jako jsou karboxylové nebo aminové zbytky na povrchu za účelem zlepšení smáčivosti. Například elektrovlákněná PLGA nanovlákná byla modifikována plazmou za přítomnosti kyslíku a amoniaku, a po úpravě vykazovala zvýšenou hydrofilitu povrchu a došlo tak ke zlepšení adheze i proliferace fibroblastových buněk [20].

2.7.1 Smáčivost povrchů

Zmíněná hydrofilita či smáčivost povrchu je důležitou vlastností biomateriálů a může ovlivnit připojení, proliferaci, migraci a životaschopnost buněk. K hodnocení smáčivosti se používá kontaktní úhel vody s povrchem. Většina syntetických polymerů, včetně PCL, je hydrofobní povahy, zatímco kolagen a želatina jsou povahy hydrofilní [21].

Jak bylo ukázáno v několika studiích, lze zvýšením smáčivosti povrchu zlepšit životaschopnost buněk. A to buď již zmíněnou plazmou, nebo pomocí potahování jiných polymerů například polydopaminem či želatinou [22], [23].

Smáčivost je ovlivněna ale i vytvořenou vláknennou morfologií. Vlákná s korálkovitými strukturami se totiž chovají více hydrofobně, než vlákna bez korálků, vytvořená ze stejného polymeru. V případě tkáňového inženýrství, kdy je potřeba nahradit určitou tkáň, mohou tyto korálkovité struktury podporovat buněčnou adhezi. S výhodou lze využít těchto útvarů také při terapeutických účelech, jako je například doprava léků na určitá místa v lidském organismu nebo hojení ran [19].

2.8 Polymery využívané pro výrobu nanovláken

Při navrhování nosiče musí mít daný polymer vhodné mechanické vlastnosti pro cílovou aplikaci a jeho produkty rozkladu během implantace by měly být metabolické látky produkované živým tělem, čímž by byla zaručena netoxičita. Často se pro výrobu nanovláken nepoužívají pouze čisté syntetické polymery, nýbrž i sloučeniny s proteiny ECM, jako je kolagen a elastin. Přimícháním těchto složek do roztoku polymeru zaručuje příhodné podmínky pro podporu růstu buněk a pro pronikání buněk do nově vytvořené matrice. Lešení, které je vyrobené pouze ze syntetického polymeru, postrádá životně důležité receptory na bázi integrinu, které jsou důležité pro buněčné funkce. Ačkoli polymery podobné ECM často postrádají požadované fyzikální vlastnosti a je obtížné je zvláknovat samotné, podporují nepochybně biologické reakce buněk a poskytuje příznivější mikroprostředí pro buněčné funkce [24]. Dá se tedy říct, že zatímco přírodní polymery jsou příhodnější pro buněčnou adhezi, proliferaci a diferenciaci, syntetické materiály se naopak vyznačují vyšší mechanickou odolností. Proto se využívá kombinace obou polymerů [7]. To je například ukázáno i ve studii, kde byla sledována proliferace lidských buněk hladké svaloviny na třech elektrospledovaných povřích vytvořených z PCL, z kolagenu a sloučením PCL a kolagenu. Proliferace na PLC/kolagenové struktuře byla vyšší ve srovnání s PCL strukturou. Nejvyšší proliferace byla prokázána na kolagenové struktuře. Nicméně PCL/kolagenová struktura prokázala nejvhodnější mechanické vlastnosti, ale také potřebnou amidovou skupinu, díky které byla vytvořena rovnoměrná distribuce buněk hladkého svalstva [4].

V jiné studii, ve které bylo vytvořeno a zkoumáno nanovláknenné lešení ze směsi kolagenu, elastinu a syntetických polymerů PLGA, PLA, PCL a PLCL, byla vyrobena vlákna s průměry v rozmezí od 477 nm do 765 nm. Největší pevnost v tahu prokázal polymer PLA, naopak nejmenší hodnoty byly zjištěny u roztoku pouze s přírodními polymery. Viabilita byla na všech nanovláknenných strukturách téměř stejná, mírně však převažovalo lešení pouze z kolagenu a elastinu. Toto lešení se ale po několika dnech kultivace zhroutilo. Všechna lešení se však chovala netoxicky a biodegradabilně [3].

2.8.1 Syntetické polymery

Mezi jedny z nejběžněji užívaných látek k výrobě scaffoldů patří polymer kyseliny glykolové (PGA), kyseliny mléčné (PLA), polykaprolakton (PCL) a jejich různé kopolymery. Skoro tím nejužívanějším polymerem pro různé biomedicínské aplikace je právě polykaprolakton (PCL).

PCL je semikrystalický syntetický polymer s poměrně nízkou teplotou tání (55–60 °C), který je široce používán v tkáňovém inženýrství. Vyznačuje se biokompatibilitou, biodegradabilitou a poskytuje vynikající mechanické vlastnosti pro různé aplikace, a to jak v medicíně, tak i v tkáňovém inženýrství. Bylo však také zjištěno několik nevýhod PCL, jako je vnitřní hydrofobní povaha a špatná interakce s biologickými tekutinami, což snižuje účinnost adheze a proliferace buněk [24]. Jelikož PCL je možné míchat s řadou přírodních i syntetických polymerů, lze upravit jeho smáčivost a biologickou interakci [25].

Syntetické polymery na výrobu nanovláken jsou většinou dodávány ve formě pevných peletek. Proto je nutné pro vytvoření kapalného roztoku využít vhodné rozpouštědlo. Je však zapotřebí vybírat rozpouštědlo s ohledem na účel daného polymeru a vyvarovat se tedy toxicitě rozpouštědla, která by mohla být zásadní při použití v dalších aplikacích.

3 Cíle práce

Cílem práce je vytvořit nanovláknenné nosiče z polykaprolaktonu pomocí metody elektrosvláknění a tyto nosiče charakterizovat z hlediska smáčivosti, mechanické pevnosti, velikosti pórů a průměru vláken. Za účelem hodnocení mechanických i povrchových vlastností vyrobených vláken mají být použita různá rozpouštědla a různé koncentrace polymeru. Vlastnosti nosičů mají být otestovány na planárních vzorcích. Na základě výsledků bude vybrán nejvhodnější nosič pro implantaci do těla a osídlení buňkami a z něj bude vyrobena tubulární struktura. U roztoků má být zjištěna dynamická viskozita. K určení geometrických vlastností má být vytvořen vlastní skript analyzující vlastnosti pórů a vláken. K určení mechanických vlastností je cílem stanovit tahový diagram vzorků. U vytvořených nanovláknenných struktur je cílem najít vhodný typ sterilizace tak, aby vzorek nebyl cytotoxický.

Dalším cílem je navrhnout a vyrobit kultivační komoru pro násadu buněk na planární nanovláknenné nosiče tak, aby všechny její části byly sterilizovatelné a pro buňky netoxické. Pro stanovení buněčné proliferace má být vytvořen skript analyzující mikroskopické snímky buněk. Ke zjištění vlivu mechanických a povrchových vlastností na proliferaci kmenových buněk mají být provedeny buněčné experimenty a vyhodnocena závislost mezi těmito proměnnými.

4 Metody

Bylo připraveno sedm roztoků. Z roztoků byly pomocí metody elektrovlákňování vytvořeny nanovláknenné struktury. U zvlákněných vzorků byl vybrán vhodný typ sterilizace na základě primárních buněčných experimentů. Následně byla metodou přisedlé kapky změřena smáčivost jednotlivých vzorků před sterilizací a po sterilizaci. Jednotlivé vzorky byly nasnímány skenovacím elektronovým mikroskopem a z obrazových dat byl změřen průměr vláken a velikost pórů. Dále pak byl proveden test mechanické pevnosti. Před zvlákněním byla změřena viskozita jednotlivých roztoků. U vybraných zvlákněných vzorků proběhla kultivace buněk v navržené kultivační komoře. Jednotlivé metody jsou popsány v následujících podkapitolách.

4.1 Roztoky polymerů

Pro přípravu roztoků byl použit syntetický polymer polykaprolakton - PCL (Sigma Aldrich, USA, $M_w = 45\,000$ g/mol), který byl rozpuštěn v různých rozpouštěcích systémech. Jako rozpouštědlo byl použit:

- Chloroform (Penta, čistý)
- Ethanol (Lachner, 96%)
- Kyselina octová (Lachner, 80%)
- Aceton (Lachner)
- Dimethylformamid (Lachner)

Pro elektrostatické zvlákňování byly připraveny následující roztoky:

- PCL 12 hm % + Chloroform : Ethanol : Kyselina octová (8:1:1 v/v/v)...roztok/vzorek A
- PCL 16 hm % + Chloroform : Ethanol : Kyselina octová (8:1:1 v/v/v)...roztok/vzorek B
- PCL 20 hm % + Chloroform : Ethanol : Kyselina octová (8:1:1 v/v/v)...roztok/vzorek C
- PCL 16 hm % + Chloroform : Ethanol : Kyselina octová (7:1:2 v/v/v)...roztok/vzorek D
- PCL 16 hm % + Chloroform : Ethanol : Kyselina octová (6:1:3 v/v/v)...roztok/vzorek E
- PCL 14 hm % + Chloroform : Dimethylformamid (7:3 v/v).....roztok/vzorek F
- PCL 20 hm % + Aceton : Kyselina octová (1:1 v/v).....roztok/vzorek G

U jednotlivých roztoků byla následně měřena hustota. Z každého roztoku bylo vždy odpipetováno 0,5 ml a tento objem byl zvážen. Pro každý roztok proběhlo toto měření desetkrát. Z těchto dat byla určena hustota, její průměr a směrodatná odchylka.

4.2 Proces elektrostatického zvlákňování

Připravené roztoky byly zvlákňeny metodou elektrostatického zvlákňování v přístroji nanospinner 4SPIN (Contipro, ČR) (viz Obr. 4.1 - 4.3), čímž bylo vytvořeno několik typů nanostruktur. Zvlákňování probíhalo na statický i rotující kolektor. Parametry procesu byly nastaveny tak, aby polymer vytvářel Taylorův kužel a byl tak rovnoměrně rozprostřen na vybraný kolektor. Konkrétní parametry jsou uvedeny v tabulce 4.1. Pro každý roztok probíhalo zvlákňování v přístroji po dobu jedné hodiny. Bližší vysvětlení metody je uvedeno v podkapitole 2.4.

Tabulka 4.1: Parametry při elektrostatickém zvlákňování.

Roztok	Napětí (kV)	Dávkování ($\mu\text{l}/\text{min}$)	Vzdálenost elektrod (cm)	Vlhkost (%)	Teplota ($^{\circ}\text{C}$)
A	22	31	15,4	32	21
B	22	25	18,4	33	22
C	20	28	17,4	32	21
D	23	22	17,4	29	22
E	20	28	17,4	34	22
F	18	32	17,4	33	22



Obrázek 4.1: Elektrozvlákňování na statický kolektor. Foto: autor.



Obrázek 4.2: Detail proudu polymeru, tryskajícího z emitoru. Foto: autor.



Obrázek 4.3: Elektrosvláknování na rotující tyčkový kolektor. Foto: autor.

4.3 Sterilizace nanovláken, hodnocení cytotoxicity vláken

Ke sterilizaci nanovláken byly použity následující typy sterilizace:

- V autoklávu (121 °C, 1 atm, 5 minut)
- Ethanolem (PA, 70%, 30 minut)
- UV zářením (30 minut)
- UV zářením a ethanolem (kombinace výše uvedeného)

K ověření cytotoxicity vláken byly vzorky vysterilizovány výše uvedenými způsoby a čtverce vzorků o rozměrech 1x1 cm byly vloženy do 24jamkové kultivační desky a po iniciálním opláchnutí PBS zality kultivačním médiem. Po 24 hodinách byla do jamek vstříknuta kultura mezenchymálních kmenových buněk izolovaných z tuku prasete v hustotě 30 tis.b./cm² a buňky byly v jamkách kultivovány po dobu 3 dnů. Poté byla hodnocena morfologie buněk a zdánlivý počet buněk. Jako netoxické byly označeny ty vzorky, kdy buňky byly protáhlé, přisedlé ke dnu komory a dosahovaly

min. 70 % konfluence. Od každého typu vláken byly testovány 4 vzorky. Podrobný popis použitých buněk a kultivačních médií je uveden v kapitole 4.9.

Pro následující experimenty byla vybrána sterilizace ethanolem, která probíhala následujícím způsobem:

- 1) Vybrané nanovlákněné struktury byly 30 minut naloženy do 70% PA ethanolu
- 2) Po uplynulé době byly struktury opláchnuty 2x v PBS, uchyceny do komory a následně na ně byly nasazeny buňky

4.4 Měření smáčivosti

Když je umístěna kapka vody nebo jiné kapaliny na pevný vzorek, je rozloha plochy, kterou kapka zaujme na povrchu, dána právě smáčivostí. Tu určujeme pomocí kontaktního úhlu (θ), jehož velikost nám udává míru přilnavosti kapky k povrchu. Kontaktní úhel je úhel, který svírá tečna k povrchu kapky, vedená v bodě styku kapky s rozhraním. Úhel může nabývat hodnot od 0° (povrch je dokonale smáčivý) do 180° (povrch je dokonale nesmáčivý). Povrchy, které mají kontaktní úhel nižší než 30° jsou označovány jako hydrofilní, zatímco povrchy, které mají kontaktní úhel větší než 90° jsou označovány jako hydrofobní. Povrchy, které mají kontaktní úhel mezi těmito hodnotami, jsou označovány jako mírně smáčivé [13].

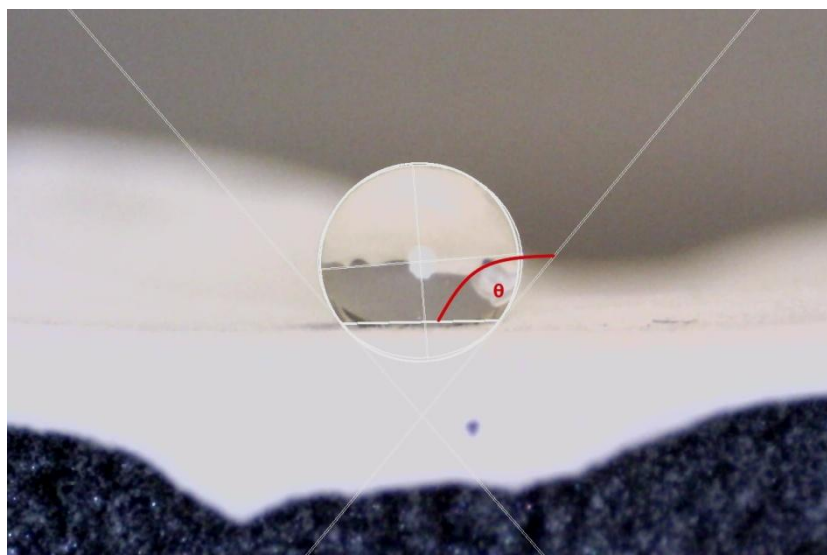
Měření smáčivosti proběhlo na pěti zvlákněných vzorcích, a to před sterilizací ethanolem a po sterilizaci ethanolem. Na povrchy byla mikropipetou odměřena kapka vody. Pomocí mikroskopického kamerového systému Dino-Lite (AM7515MZTL) byly následně pořízeny snímky přisedlé kapky, viz Obr. 4.4. Pro každý jednotlivý povrch proběhlo deset měření, z nichž byl určen průměr a směrodatná odchylka. Určení velikosti kontaktních úhlů probíhalo v softwarovém prostředí ImageJ, viz Obr. 4.5. Ke statistickému zhodnocení byla použita analýza rozptylu.

Použité parametry:

- Objem kapky $V=5 \mu\text{l}$
- Zvětšení mikroskopu $Z=19,5x$



Obrázek 4.4: Mikroskopický kamerový systém Dino-Lite. Foto: autor.



Obrázek 4.5: Měření kontaktního úhlu θ pomocí softwaru ImageJ. Foto: autor.

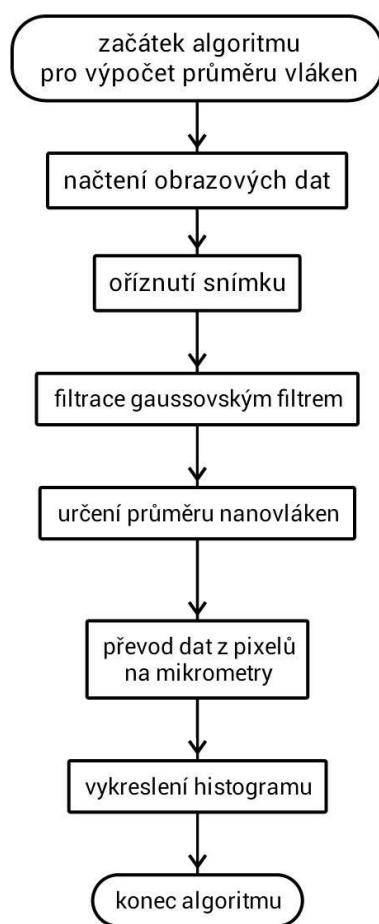
4.5 Skenovací elektronová mikroskopie, měření průměru vláken a velikosti pórů

Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) patří mezi běžně užívané metody k zobrazení povrchové struktury vzorku. Díky elektronovému vysokoenergetickému svazku elektronů je možné vytvářet snímky s vysokým zvětšením a rozlišením. Hlavní výhodou SEM je jednoduché použití a jednoduchá údržba. Princip je založen na svazku elektronů, který postupně po řádcích skenuje daný povrch. Pomocí elektromagnetických čoček je svazek ostřen a zužován. Pomocí detektoru jsou snímány sekundární elektrony, které putují od vzorku, a v počítači pak vznikne výsledný obraz. Pro použití této metody

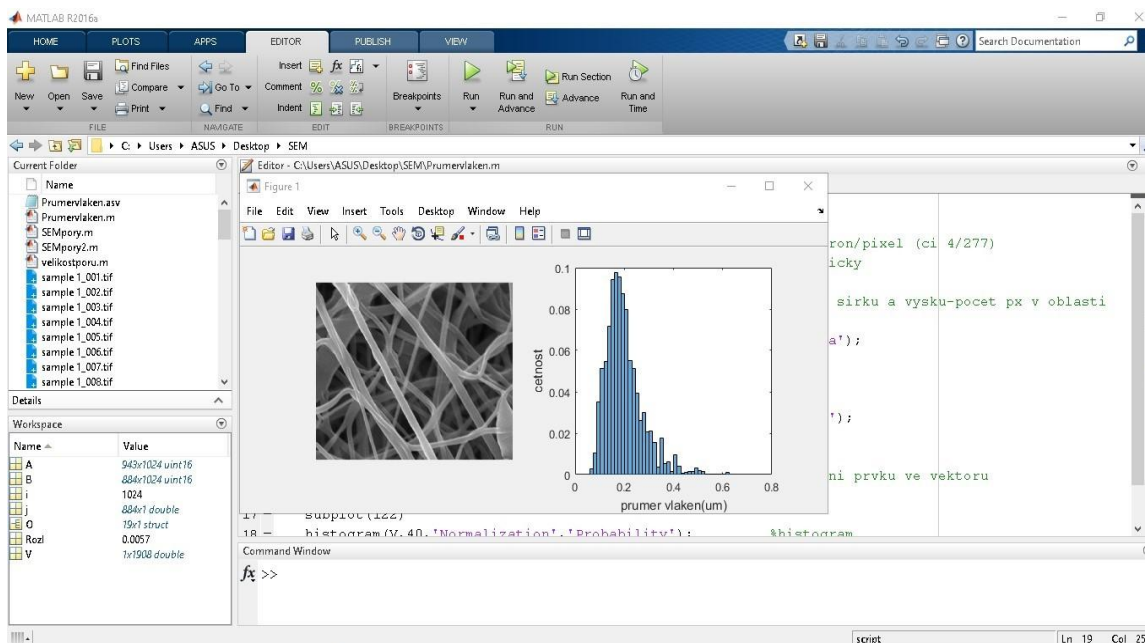
je však potřeba, aby byl vzorek vodivý. Z toho důvodu se používají v případě potřeby metody naprašování, které zajistí vodivost povrchu.

U vybraných nanovlákných struktur byly pořízeny snímky právě pomocí skenovacího elektronového mikroskopu při urychlovacím napětí 30 kV. Jednotlivé snímky byly podrobeny analýze v softwarovém prostředí MATLAB.

Průměr vláken je určován pomocí skriptu vytvořeného v programu MATLAB. Vývojový diagram skriptu je zachycen na obrázku 4.6. Poté, co je snímek načten a upraven, je změřena plocha vláken na snímku a změřena sada vzdáleností jednotlivých vláken (viz Obr. 4.7). Z naměřených dat je určen průměr a směrodatná odchylka. Pro statistické zhodnocení dat byla užita analýza rozptylu. Celý skript je nahrán na příloženém CD.

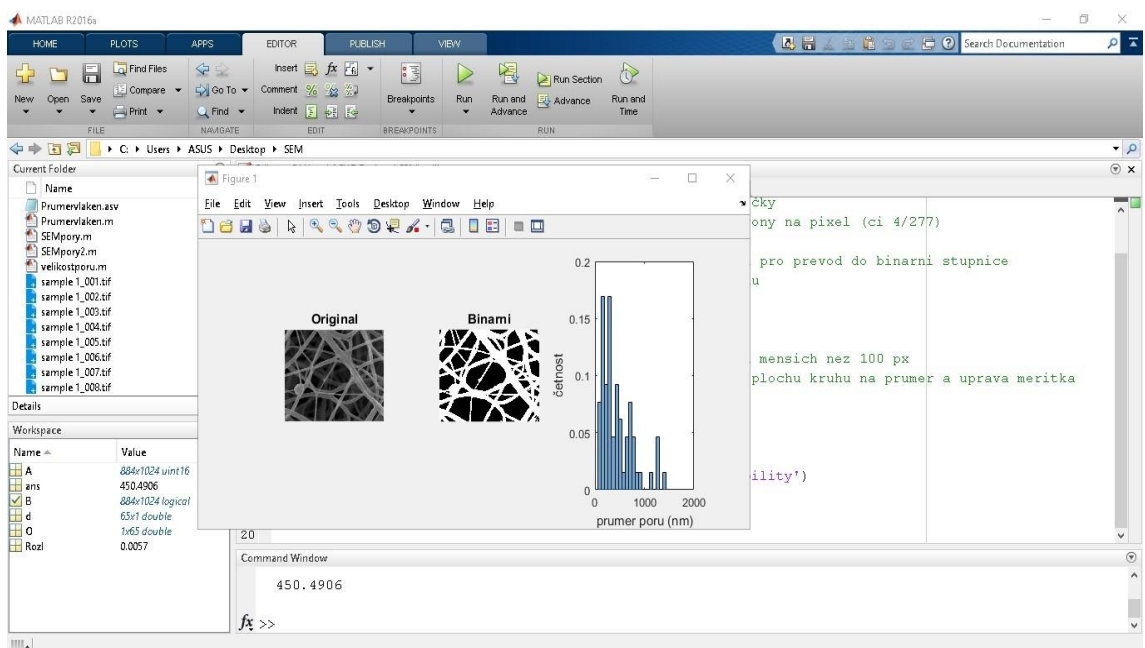


Obrázek 4.6: Vývojový diagram algoritmu. Foto: autor.

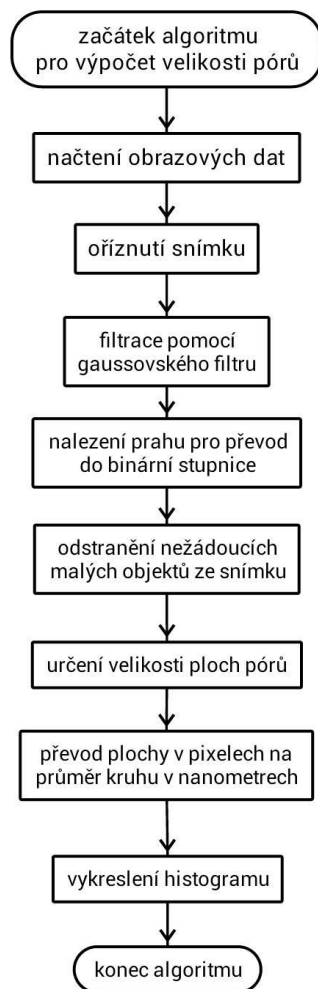


Obrázek 4.7: Měření průměru vláken v programu MATLAB. Foto: autor.

Velikost pórů je určena opět pomocí skriptu vytvořeném v programu MATLAB (viz Obr. 4.8). Vývojový diagram algoritmu je uveden na obrázku 4.9. Snímek je načten a je z něj odfiltrován šum. Po nalezení vhodného prahu je snímek převeden na binární. Černé plochy jsou pak považovány za pór, jehož velikost je změřena a následně převedena na shodnou plochu kruhu, z kterého je určen průměr pórů. Z naměřených dat byl určen průměr a směrodatná odchylka a data byla podrobena Kruskal-Wallisovu testu. Celý skript je nahrán na příloženém CD.



Obrázek 4.8: Měření průměru pórů v programu MATLAB. Foto: autor.



Obrázek 4.9: Vývojový diagram algoritmu. Foto: autor.

4.6 Měření viskozity

Viskozita charakterizuje vnitřní tření kapaliny. Určuje tedy sílu tření, která vzniká mezi dvěma vrstvami proudící kapaliny. K měření dynamické viskozity byl použit Höpplerův viskozimetr KF 3.2 (Haake Medingen), viz Obr. 4.10. U jednotlivých roztoků byl měřen pádový čas kuličky v roztocích, na jehož základě byla stanovena hodnota dynamické viskozity η (mPa·s) pro každý roztok dle vzorce 4.1

$$\eta = t \cdot (\rho_K - \rho_T) \cdot K \quad (4.1)$$

, kde t (s) je pádový čas kuličky, ρ_K (g/cm³) hustota kuličky, ρ_T (g/cm³) hustota roztoku a K (mPa·cm³/g) konstanta charakterizující použitou kuličku.

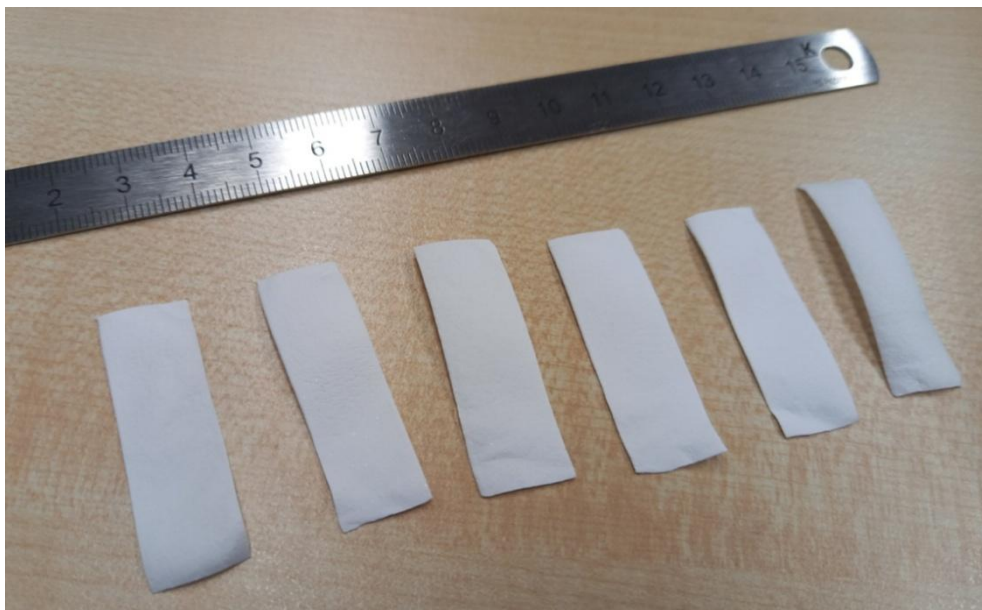


Obrázek 4.10: Viskozimetr se sadou kuliček. Foto převzato z [26].

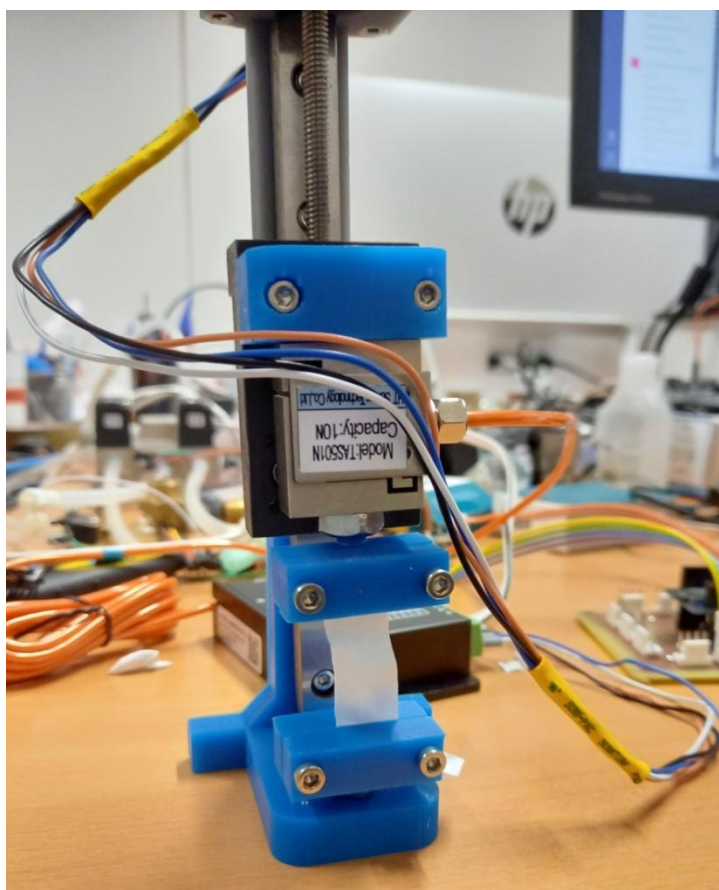
Pro každý roztok byla viskozita měřena desetkrát. Byla určena průměrná hodnota a směrodatná odchylka. Měření probíhalo za konstantní teploty.

4.7 Měření mechanické pevnosti

Pevnost nanovláken je důležitou veličinou, pro danou aplikaci. Měření tahového napětí v závislosti na deformaci poskytuje informaci o maximální síle, která může působit na vzorek, aniž by došlo k jeho nevratné deformaci. Pro měření je nutné znát působící sílu a plochu vzorku. K vytvoření vzorku o přesně určených rozměrech byl použit skalpel, neboť laserový gravírovací stroj se ukázal jako nevhodná metoda. Pomocí skalpelu byly vyříznuty z planárních vzorků pruhy s rozměry 40 x 13 mm (viz Obr. 4.12). Tyto pruhy byly uchyceny do trhačího stroje (viz Obr. 4.13), díky kterému byla změřena pevnost jednotlivých vzorků zkoumaných struktur. Pro měření byl použit měřicí systém vyvinutý k těmto účelům (Ing. Roman Matějka, Ph.D.). Od každého vzorku bylo provedeno několik měření, nicméně vzhledem k nepublikovatelnosti výsledků byl vybrán jeden reprezentativní tahový diagram. Vzorky jsou v diagramu porovnávány vůči sobě pouze relativně.



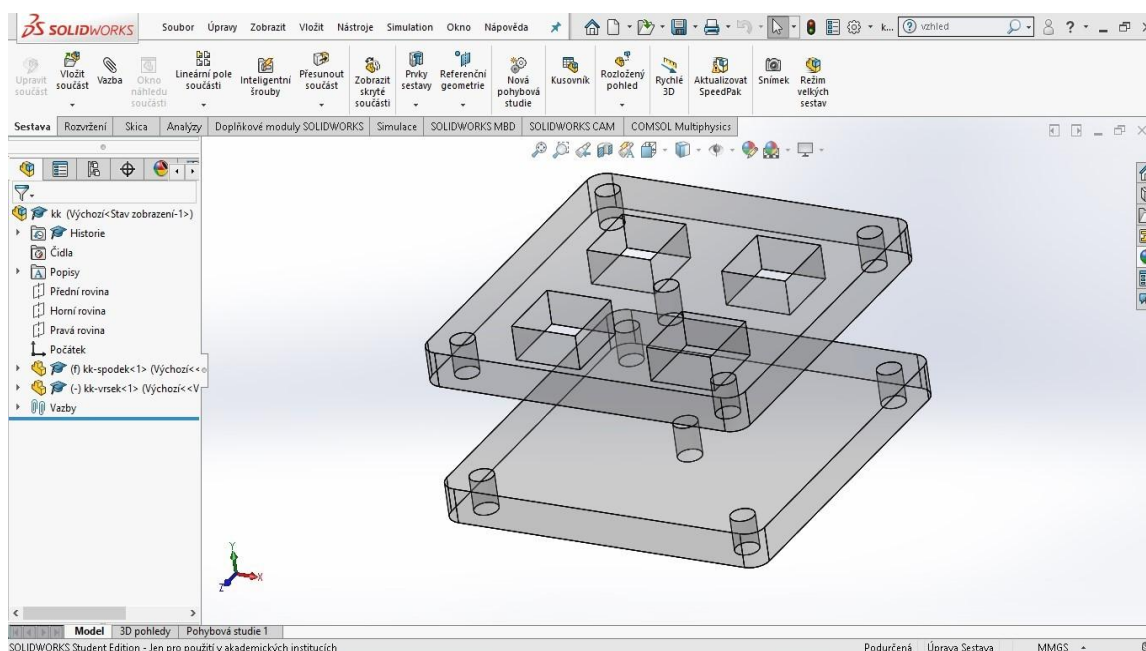
Obrázek 4.12: Připravené nanovláknenné vzorky. Foto: autor.



Obrázek 4.13: Trhací stroj. Foto: autor.

4.8 Návrh komory pro uchycení nanovláken

Aby bylo možné na nanovláčenné struktuře provádět buněčné testy, je zapotřebí ji určitým způsobem pevně uchytit a předejít tak případným nerovnostem, srolování struktury a kultivaci buněk mimo vymezenou oblast. Za tímto účelem byla navržena kultivační komora pro uchycení 4 planárních vzorků nanovláken. Návrh probíhal v softwarovém prostředí SolidWorks (viz Obr. 4.14). Technický výkres komory je k nalezení v příloze. Kultivační komora byla vyrobena na CNC systému z polykarbonátu, materiálu, který je možné snadno třískově obrábět, je sterilizovatelný v autoklávu a k buňkám netoxický. Komora byla doplněna silikonovým těsněním a nerezovými šrouby M4 s matkami.



Obrázek 4.14: Návrh v softwarovém prostředí SolidWorks. Foto: autor.

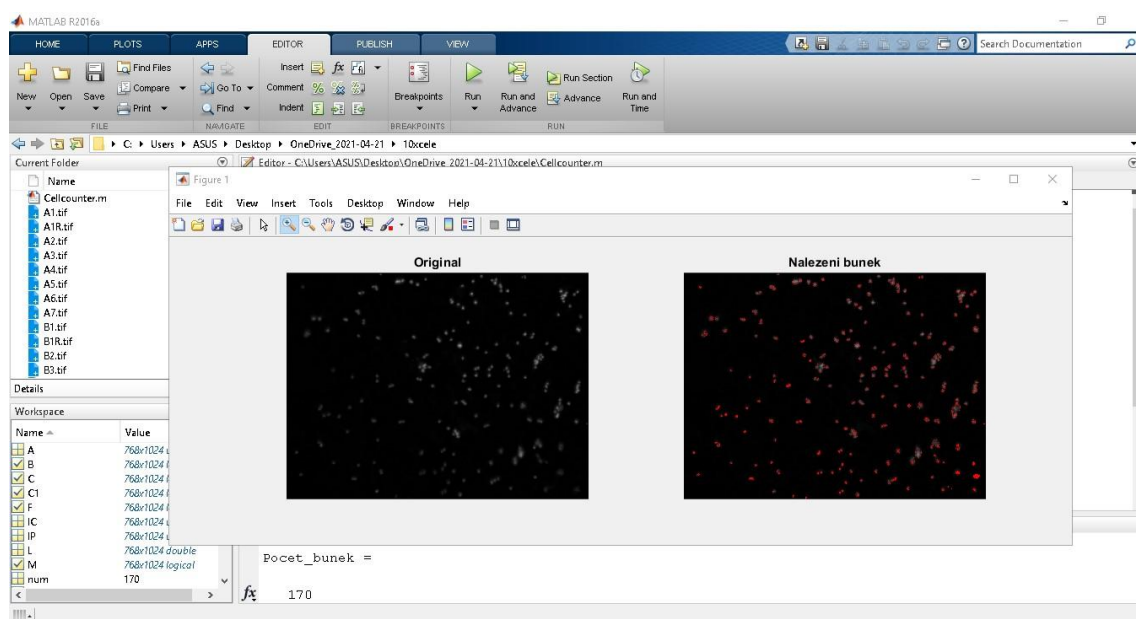
4.9 Vliv povrchových vlastností vláken na adhezi a buněčnou proliferaci

Kultivace buněk probíhala na pěti typech nanovláčenných struktur a na kontrolním sklu. Každý vzorek byl připraven 4x pro statistické porovnání. Nanovláčenné vzorky byly nastříhány na čtverce 3x3 cm. Před experimentem byly všechny substráty, včetně kontrolního skla, sterilizovány po dobu 30 minut v 70% ethanolu. Pro experimenty byly použity mezenchymální kmenové buňky izolované z tuku prasete (ASC). Na jednotlivé vzorky, umístěné do navržených kultivačních komor, byly nasazeny buňky v hustotě 30 000 buněk/cm². Pokus probíhal za statických podmínek. Jako kultivační médium bylo použito médium DMEM s 10 % fetálního séra, 1 % antibiotik ABAM (100 IU/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu, a 0,25 µg/ml Amphotericinu B; vše Sigma-

Aldrich (MO, USA) a 10 ng/ml FGF2. Buňky byly staticky kultivovány v inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂) po dobu 7 dnů, přičemž každé 3 dny bylo vyměněno kultivační médium za čerstvé.

Po kultivaci byly všechny vzorky zafixovány methanolem a následně byla jádra nabarvena barvivou DAPI a F-aktinová vlákna cytoskeletu phalloidinem konjugovaným s tetramethylrhodaminem (TRITC), (Sigma-Aldrich). Povrchy byly poté vyfotografovány pomocí fluorescenčního mikroskopu.

Z jednotlivých snímků byl určen počet buněk pomocí skriptu vytvořeného v programu MATLAB (viz Obr. 4.15). Vývojový diagram je uveden na obrázku 4.16. Snímek je načten a je odfiltrován nežádoucí šum. Po převodu snímku na binární, je nalezen obvod jednotlivých elementů. Pomocí segmentace rozvodím jsou překrývající se buňky analyzovány ne jako jedna, ale jako více buněk. Jednotlivé elementy jsou pak spočteny. Počet buněk byl pro každý vzorek spočten z deseti snímků. Pro každý vzorek byl určen průměr a směrodatná odchylka. Celý skript je nahrán na příloženém CD.



Obrázek 4.15: Počítání buněk v programu MATLAB. Foto: autor.



Obrázek 4.16: Vývojový diagram algoritmu. Foto: autor.

4.10 Statistické zhodnocení

Pro statistické zhodnocení byla data podrobena testu normality a testu shody rozptylů. K ověření normality byl použit Shapirův-Wilkův test. K ověření shody rozptylů byl použit Bartlettův a Leveneův test. Kde byla splněna podmínka normality a shodnosti rozptylů, byla použita metoda ANOVA. Pokud tyto podmínky splněny nebyly, byl použit Kruskal-Wallisův test. Testování probíhalo vždy na hladině významnosti 5 %. Pro zjištění signifikance výsledků byl použit Tuckeyho test mnohočetného porovnání. Výsledné tabulky pro statistické testy, signifikanci výsledků a korelaci dat jsou uvedeny v příloze.

5 Výsledky

5.1 Připravené roztoky

Pro elektrostatické zvlákňování musel být vyřazen roztok G (PCL 20 hm % + aceton : kyselina octová (1:1 v/v)), neboť pelety polymeru se v rozpouštědlu ani po několika hodinách nerozpustily. V ostatních případech rozpuštění polymeru zcela proběhlo a roztoky tak mohly být zvlákňeny a podrobeny dalším experimentům. Přestože vzorek F byl zvlákňen, byl pro další experimenty vyřazen z důvodu velmi nepravidelné struktury s různou tloušťkou vrstvy. Stručnou specifikaci vzorků, na nichž byly prováděny experimenty, uvádí tabulka 5.1.

Tabulka 5.1: Specifikace jednotlivých vzorků.

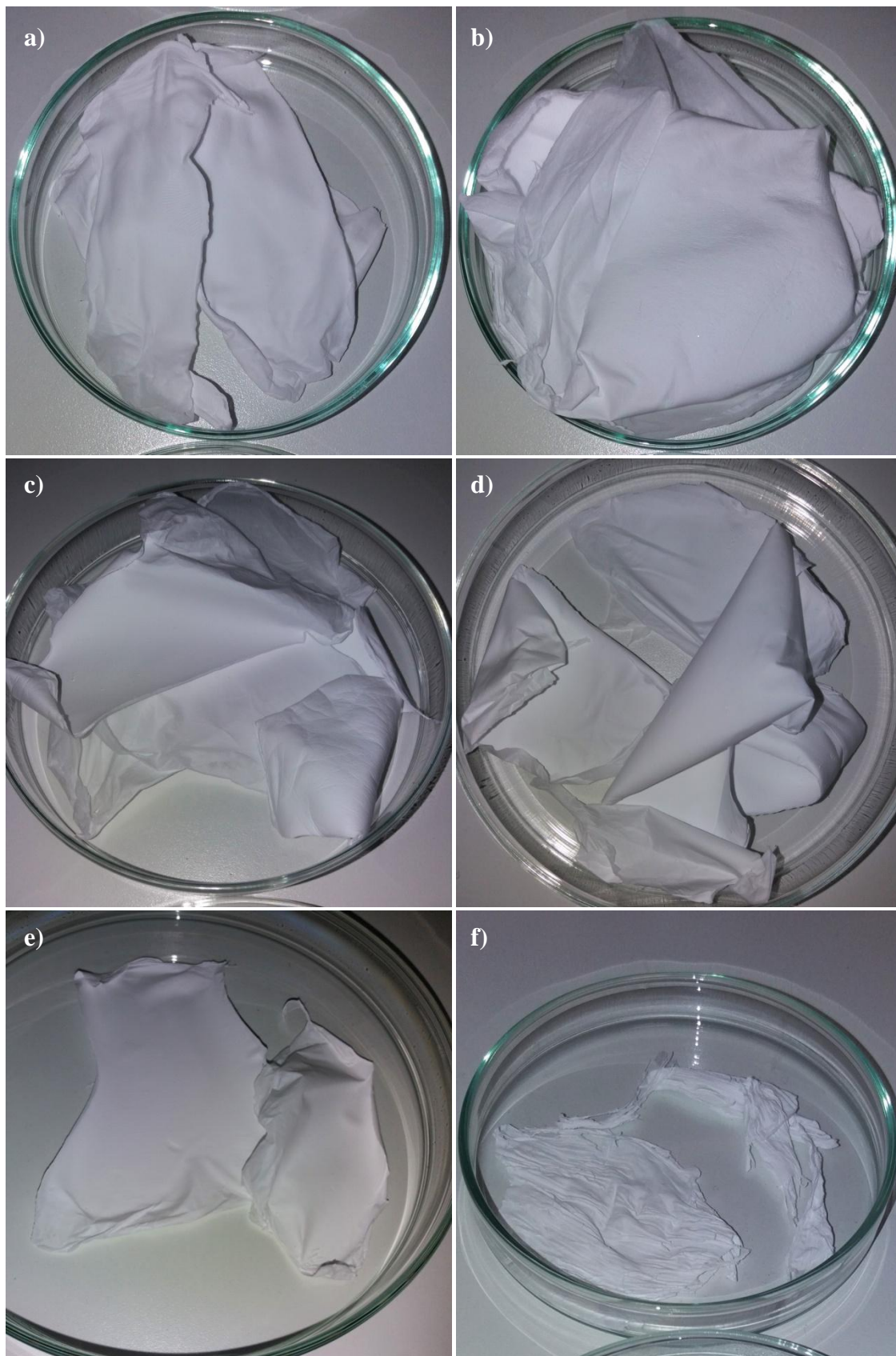
Vzorek	Koncentrace PCL (%)	Poměr (chloroform : ethanol : kyselina octová)	Naměřená Hustota (g/cm ³)
A	12	8 : 1 : 1	1,36±0,16
B	16	8 : 1 : 1	1,13±0,09
C	20	8 : 1 : 1	1,20±0,13
D	16	7 : 1 : 2	1,04±0,07
E	16	6 : 1 : 3	0,99±0,07

5.2 Elektrostatické zvlákňování

Všechny výše uvedené roztoky byly zvlákňeny v nanospinneru. Při procesu zvlákňování nastaly jevy, při nichž kapka polymeru skapávala z emitoru, či při nichž stahovaná struktura ulpívala z části na kolektoru. Tyto jevy a struktura vzorků je popsána v tabulce 5.2. Vytvořené vzorky jsou zachyceny na obrázku 5.1. Ze zmíněných vzorků se jevil při stahování strukturou nejlépe vzorek B.

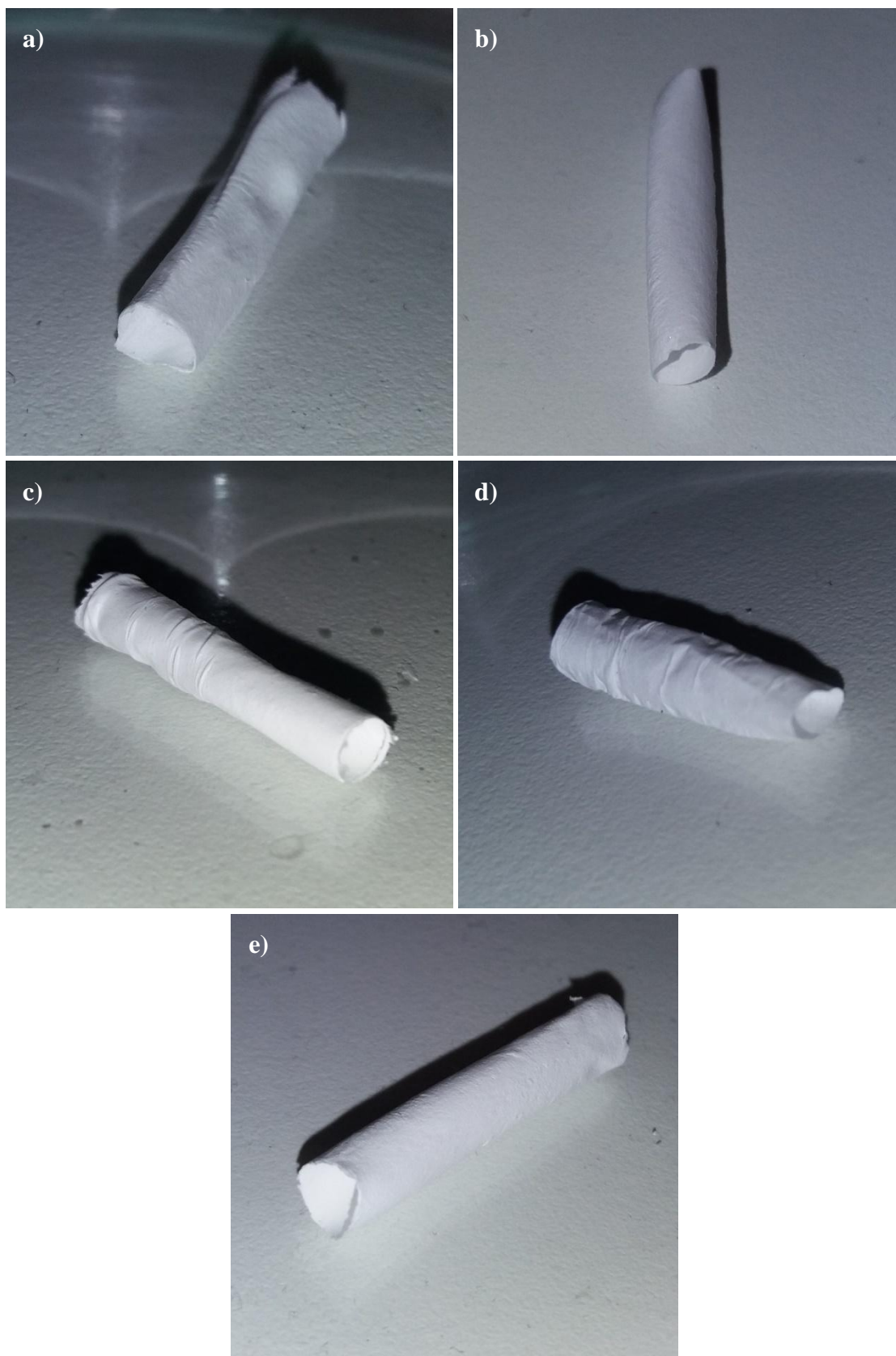
Tabulka 5.2: Stručný popis nanovlákněných struktur.

Vzorek	Popis struktury
A	Vrstevnatá struktura, z části ulpívala na kolektoru; Mírně pěnovitá struktura;
B	Oproti ostatním se lépe stahoval; Mírně pěnovitá elastická struktura;
C	Vrstevnatá struktura, z části ulpívala na kolektoru;
D	Kapka skapávala z emitoru; Vrstevnatá struktura, z části ulpívala na kolektoru;
E	Kapka mírně skapávala z emitoru; Mírně ulpívala na kolektoru;
F	Obtížné stahování z kolektoru; Nerovnoměrné potrhané struktury;



Obrázek 5.1: Snímky vytvořených nanovláknenných nosičů: a) PCL 12% (8:1:1);
b) PCL 16% (8:1:1); c) PCL 20% (8:1:1); d) PCL 16% (7:1:2);
e) PCL 16% (6:1:3). Foto: autor.

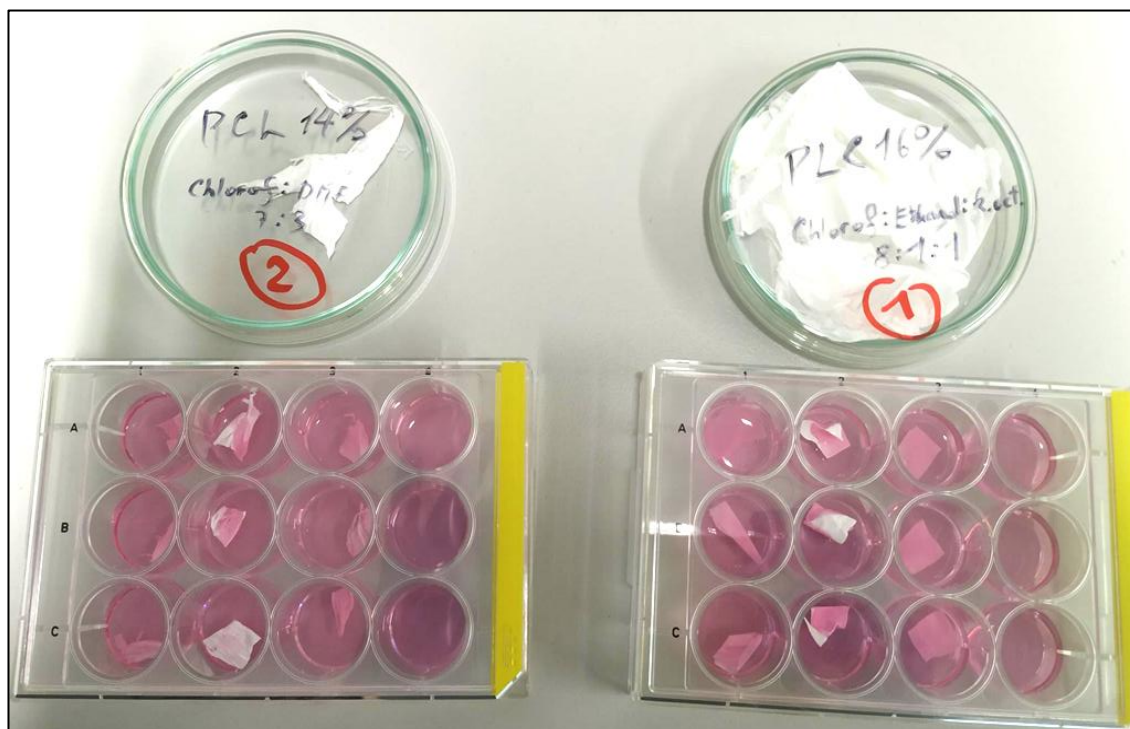
Mimo planárních vzorků byly vyrobeny i vzorky tubulární s průměrem 4 mm (viz Obr. 5.2). Zvláknění probíhalo na rotujícím tyčkovitém kolektoru.



Obrázek 5.2: Snímky tubulárních nosičů: a) PCL 12% (8:1:1); b) PCL 16% (8:1:1); c) PCL 20% (8:1:1); d) PCL 16% (7:1:2); e) PCL 16% (6:1:3). Foto: autor.

5.3 Sterilizace nanovláken

Z vybraných metod byla vyřazena sterilizace v autoklávu, neboť došlo kvůli vysoké teplotě ke zhroucení nanovláčkové struktury z důvodu tání polymeru. UV záření struktury vysterylizovalo, ale neučinilo je smáčivými (viz Obr. 5.3).

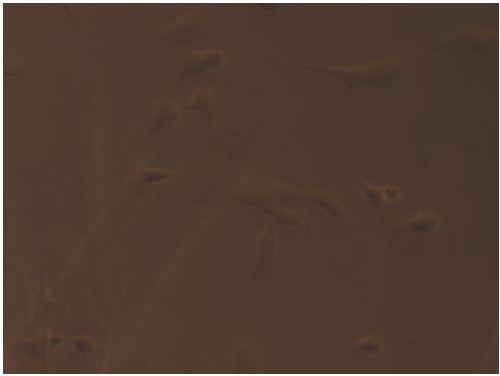
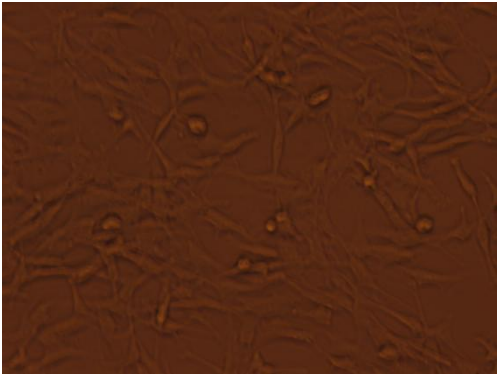

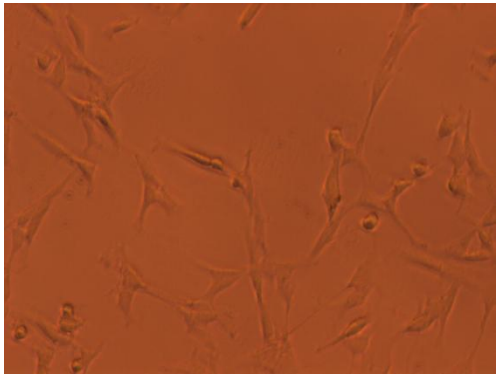

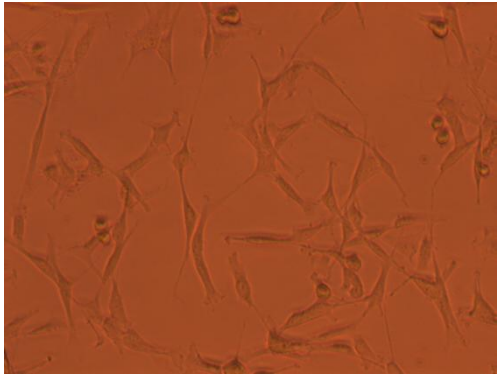
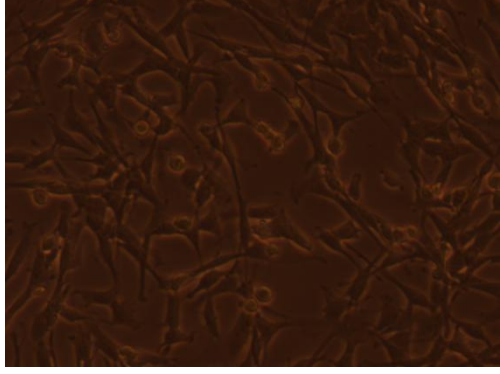
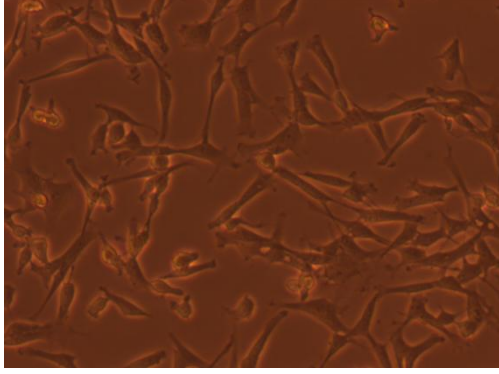


Obrázek 5.3: Nanovláčka v médiu po sterilizaci. Vlevo vzorek F, vpravo vzorek B. Typy sterilizace ve sloupcích kultivační desky: 1-ethanolem, 2-UV zářením (patrná nesmáčivost-vzorky nejsou ponořeny do média), 3-ethanolem a UV zářením, 4-kontrolní vzorky. Foto: autor.

Po kultivaci a nabarvení buněk na nanovláčkových strukturách byl vzorek F vyhodnocen pro buňky jako toxický (viz Tab. 5.3). Z tabulky je patrná téměř nulová hustota osídlení buněk na vzorku F, který obsahuje dimethylformamid. Vzorek B naopak cytotoxicitu neprokázal. Pro další experimenty byl ze zmíněných druhů sterilizace vybrán způsob sterilizace pomocí ethanolu.

Tabulka 5.3: Mikroskopické snímky vzorků pro různé druhy sterilizace.

(Foto: Ing. Jana Štěpanovská, Ph.D.)

	Vzorek F (chloroform : dimethylformamid)	Vzorek B (chloroform : etanol : kys.octová)
Ethanol		
UV zářením		
Ethanol a UV zářením		
Kontrolní vzorky		

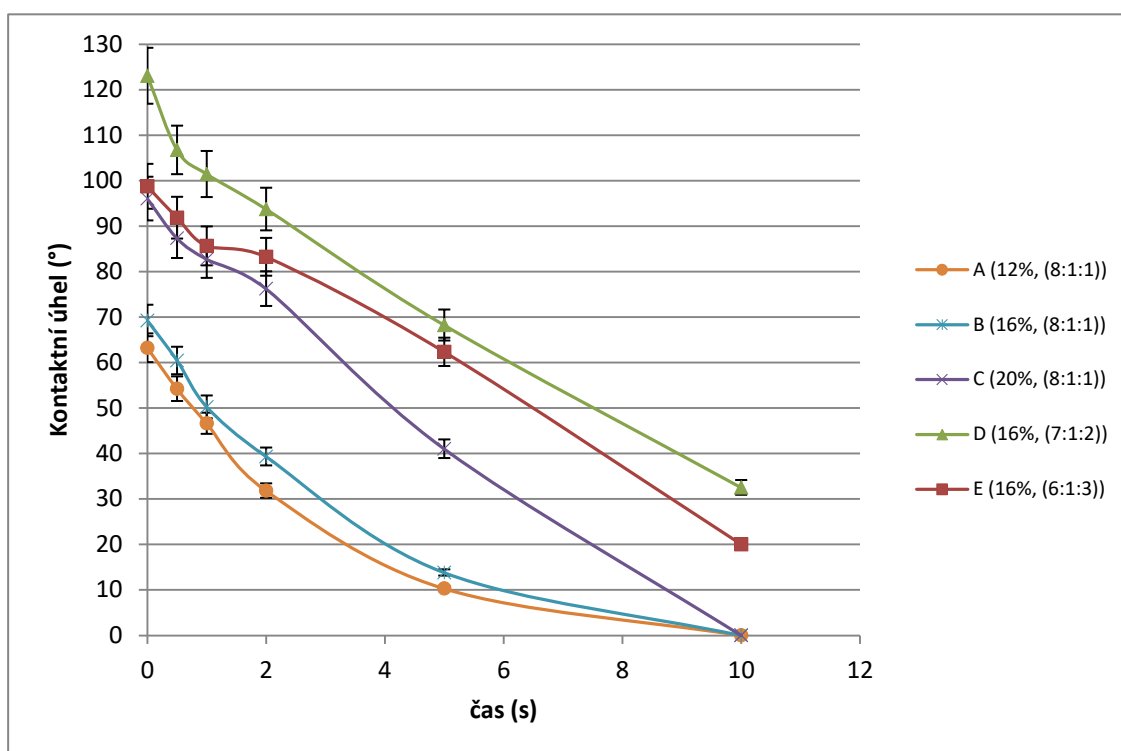
5.4 Měření smáčivosti

Kontaktní úhel byl měřen před sterilizací a po ní. Velikost úhlu byla před sterilizací stacionární (viz Tab. 5.4). Po sterilizaci však jeho hodnota klesala s časem (viz Graf 5.1).

Tabulka 5.4: Velikost kontaktních úhlů měřených před sterilizací.

Vzorek	Kontaktní úhel (°)				
	A	B	C	D	E
	127,2±3,8	124,4±3,9	120,3±3,4	117,6±3,8	113,9±4,6

Data byla měřena pro každý vzorek 10krát a jsou uvedena jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka.

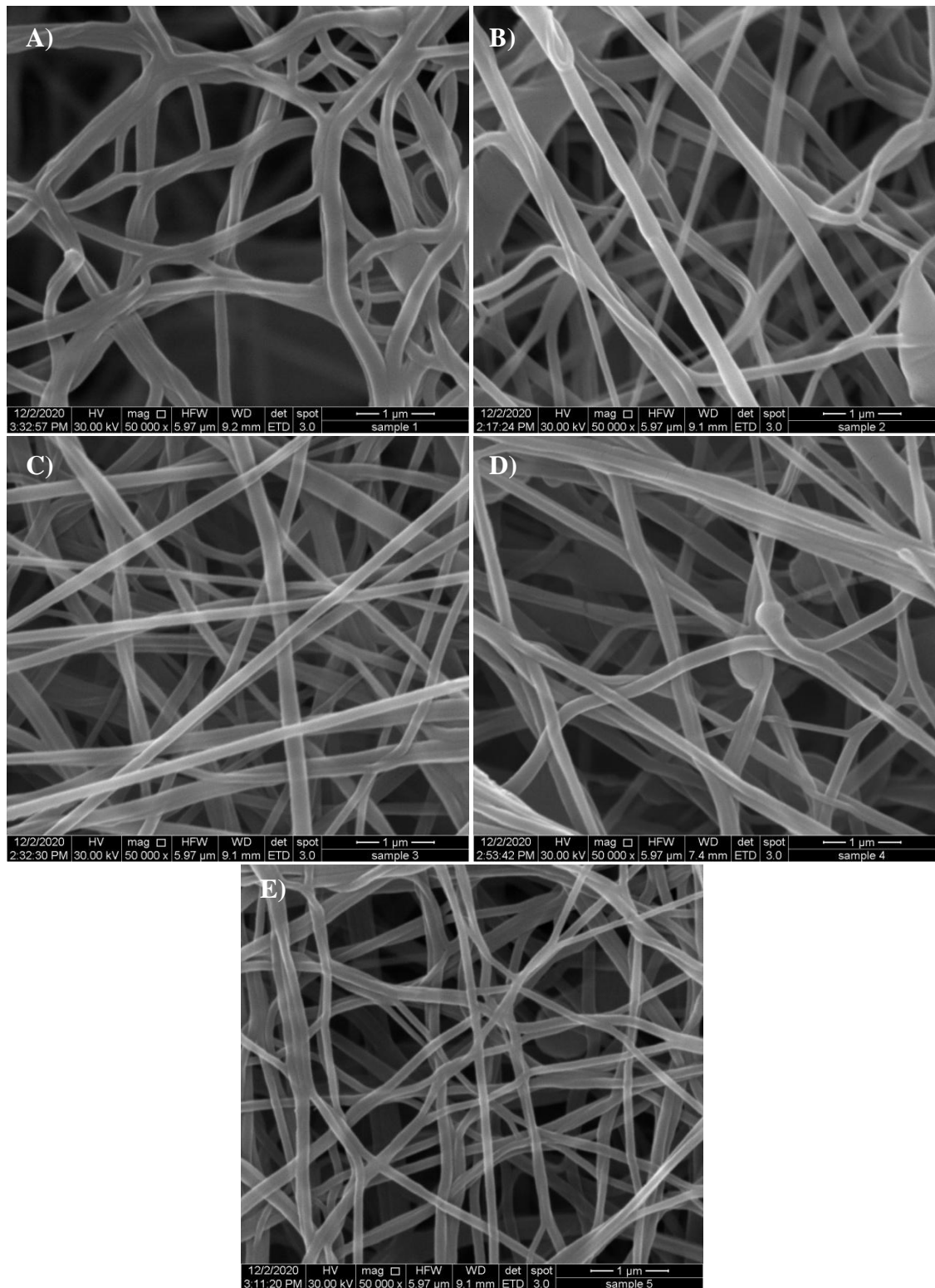


Graf 5.1: Závislost velikosti kontaktního úhlu na čase při měření po sterilizaci.

Dle provedené statistické analýzy lze tvrdit, že velikost kontaktního úhlu závisí na použitém polymerním roztoku. Se vzrůstající koncentrací klesá kontaktní úhel, který naopak roste s přidávkem chloroformu v roztoku. Výsledky statistických testů a signifikance výsledků jsou uvedeny v příloze.

5.5 Měření průměru vláken a velikosti pórů

Jednotlivé snímky z elektronového mikroskopu byly analyzovány pomocí softwaru MATLAB. Pořízené snímky jsou zachyceny na obrázku 5.4.



Obr. 5.4: Snímky nanovláken pořízené skenovacím elektronovým mikroskopem při zvětšení 50 000x. (Označení snímků je shodné s označením vzorku.)

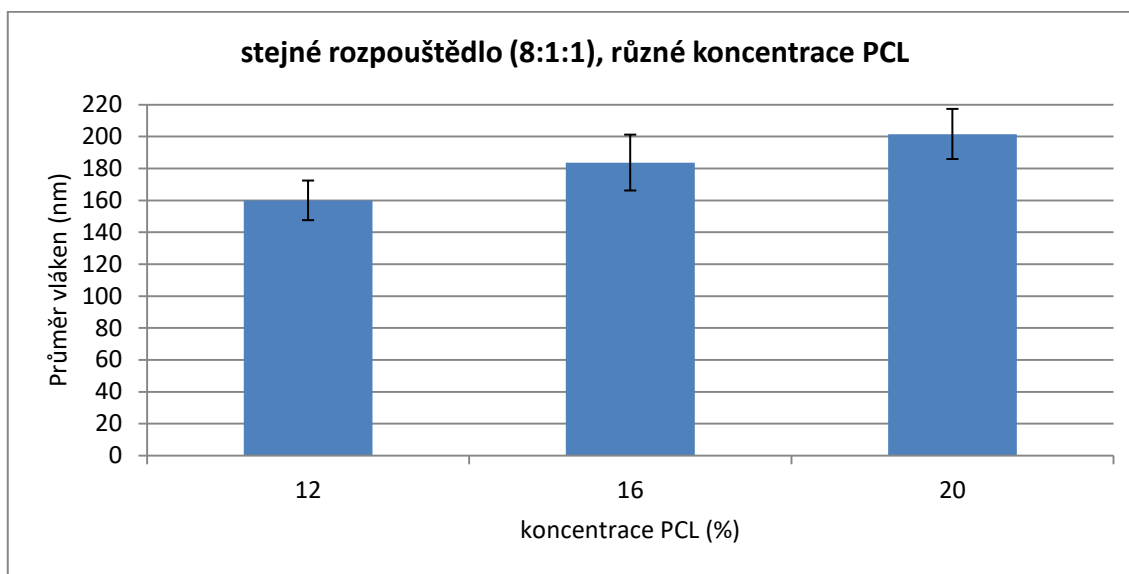
Foto: Ing. Monika Šupová, Ph.D.

Pomocí programu MATLAB a vytvořeného kódu byl změřen na jednotlivých SEM snímcích průměr vláken. Pro tuto veličinu byl určen pro každý jednotlivý povrch průměr a směrodatná odchylka (viz Tab. 5.5). Grafické vyjádření a srovnání naměřených veličin je znázorněno v grafech 5.2 a 5.3.

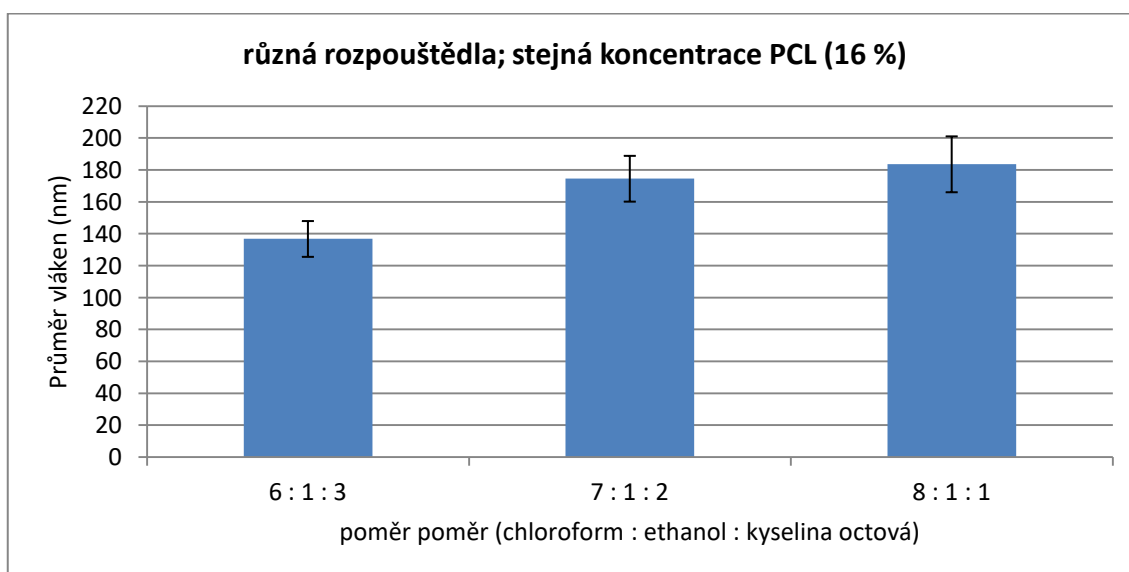
Tabulka 5.5: Průměry vláken naměřené ze snímků SEM.

Vzorek	Průměr vláken (nm)				
	A	B	C	D	E
	159,9±12,6	183,6±17,8	201,5±15,9	174,6±15,4	136,8±11,4

Data byla měřena pro každý vzorek 33krát a jsou uvedena jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka.



Graf 5.2: Závislost velikosti průměrů vláken na koncentraci polymeru PCL, při použití shodného rozpouštěcího systému.



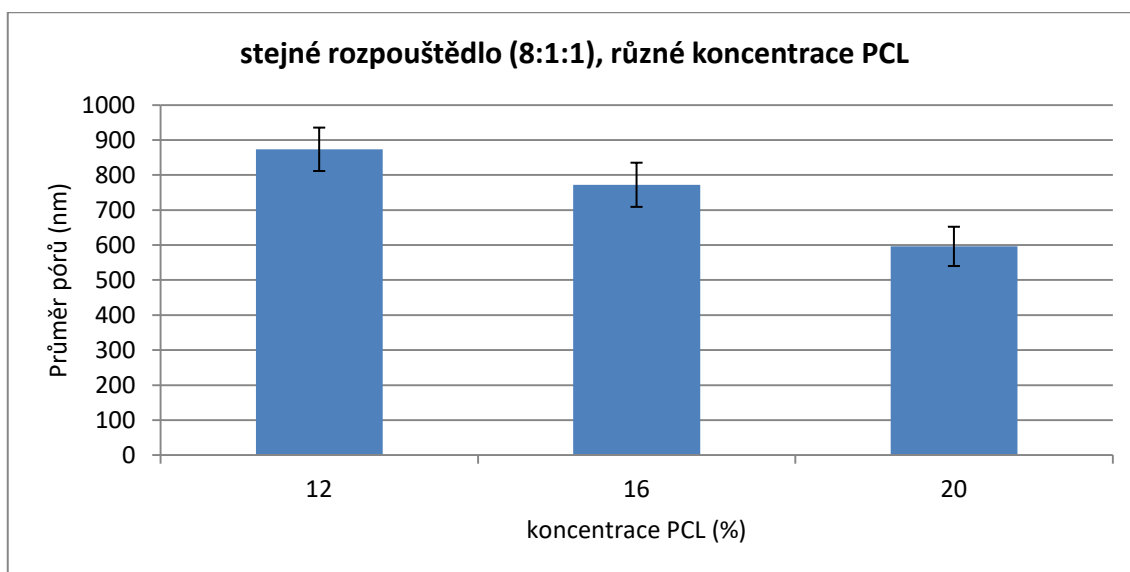
Graf 5.3: Závislost velikosti průměrů vláken na rozpouštěcím systému, při zachování koncentrace polymeru PCL.

Z pořízených snímků byla zjištěna i velikost pórů. Pro tuto veličinu byl určen pro každý jednotlivý povrch průměr a směrodatná odchylka (viz Tab. 5.6). Grafické vyjádření a srovnání naměřených veličin je znázorněno v grafech 5.4 a 5.5.

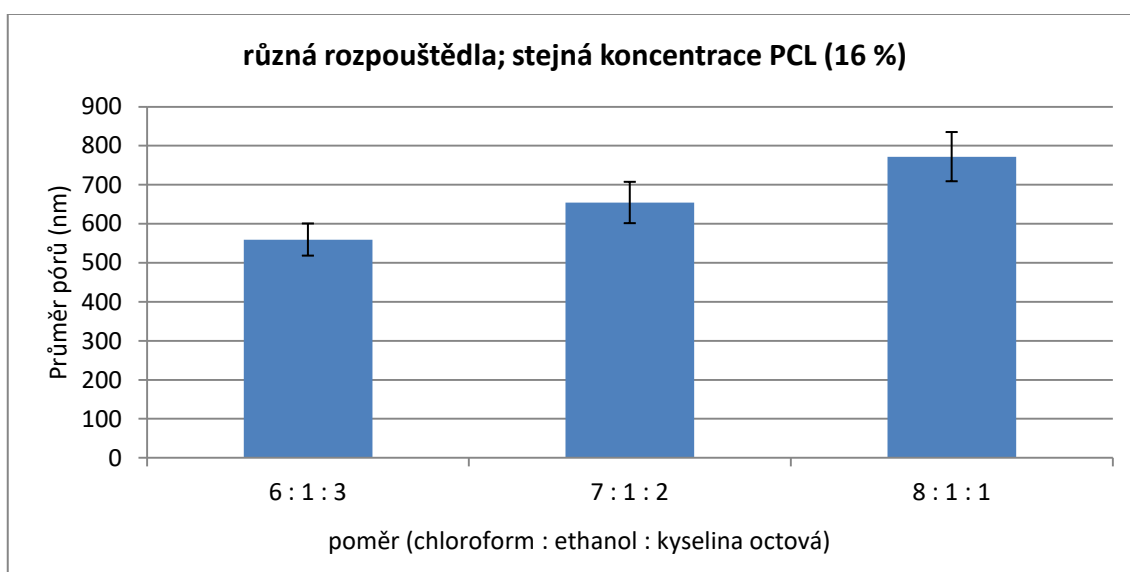
Tabulka 5.6: Průměr pórů naměřené ze snímků SEM.

Vzorek	Průměr pórů (nm)				
	A	B	C	D	E
	873,3±62,0	772,0±63,1	596,0±56,1	654,4±53,0	559,4±41,2

Data byla měřena pro každý vzorek 40krát a jsou uvedena jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka.

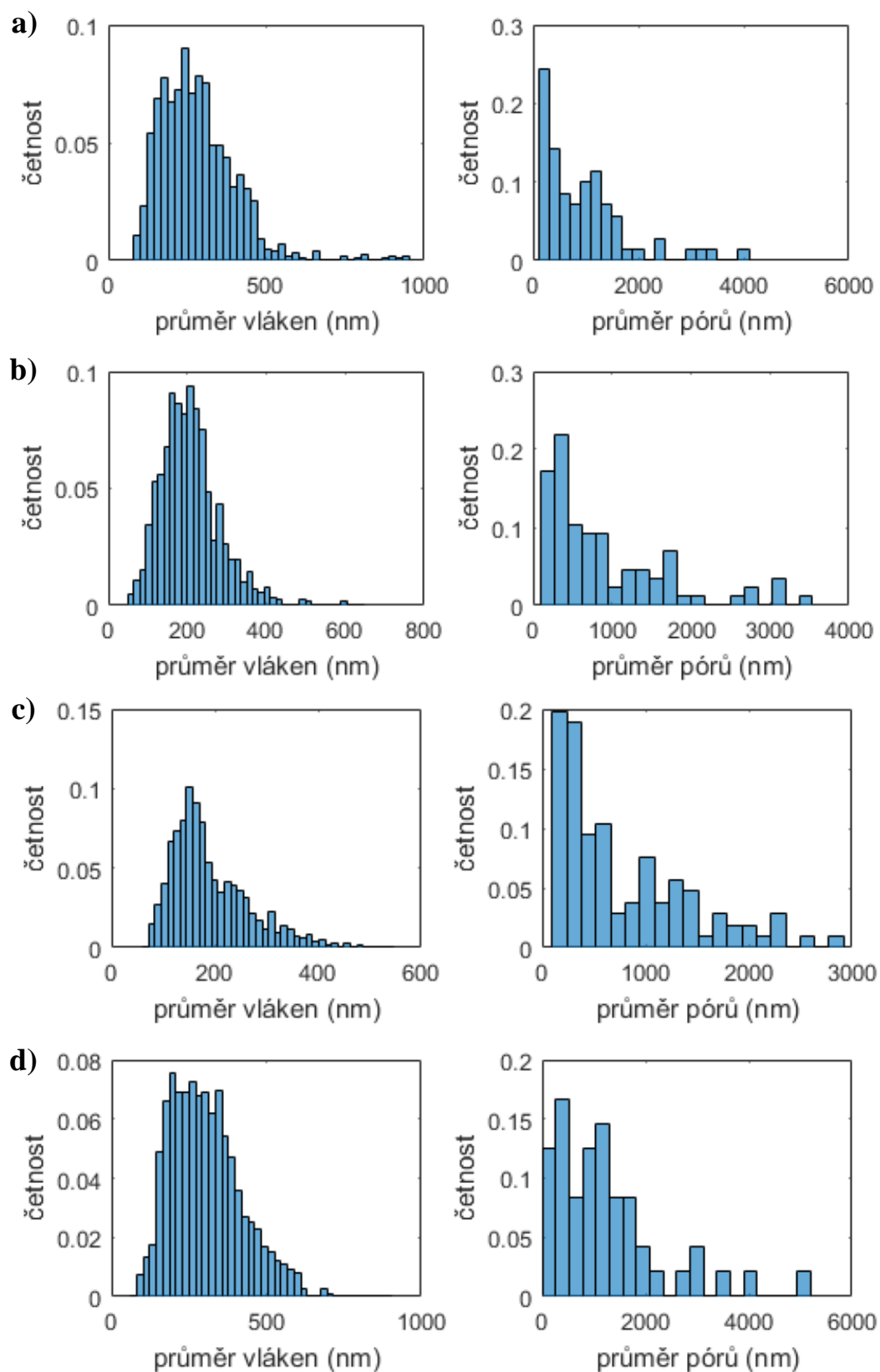


Graf 5.4: Závislost velikosti pórů na koncentraci polymeru PCL, při použití shodného rozpouštěcího systému.

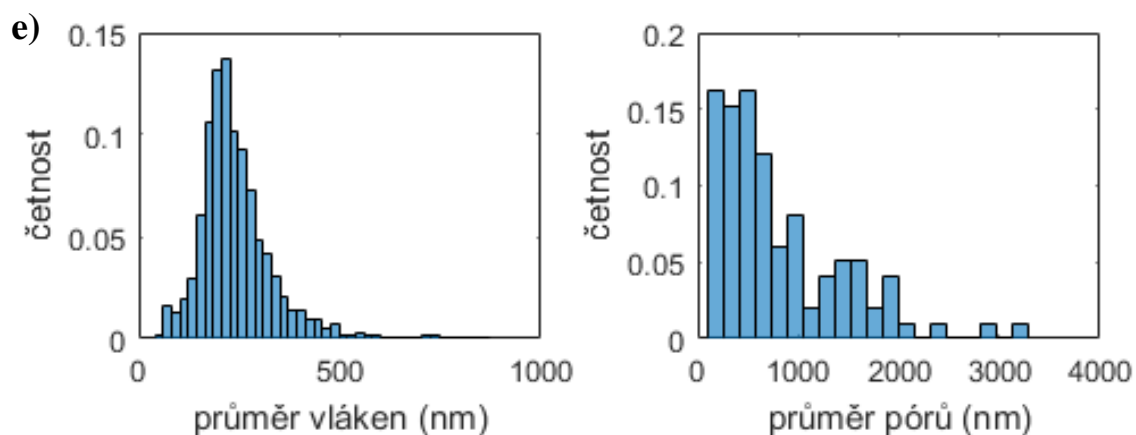


Graf 5.5: Závislost velikosti pórů na rozpouštěcím systému, při zachování koncentrace polymeru PCL.

Pomocí algoritmů byly stanoveny histogramy pro průměr vláken a velikost pórů z jednotlivých snímků. Některé z nich jsou zachyceny na obrázku 5.5 a 5.6.



Obr. 5.5: Histogramy získané ze SEM snímků: a) vzorek A; b) vzorek B; c) vzorek C; d) vzorek D. Foto: autor.



Obr. 5.6: Histogramy získané ze SEM snímků: e) vzorek E. Foto: autor.

Dle provedeného statistického testu lze tvrdit, že průměr vláken i velikost pórů závisí na použitém polymerním roztoku. Průměr vláken roste jak se vzrůstající koncentrací PCL, tak se vzrůstajícím přidavkem chloroformu v roztoku. Se vzrůstající koncentrací PCL ale klesá velikost pórů. Roste naopak s přidavkem chloroformu v roztoku. Výsledky statistických testů a signifikance výsledků jsou uvedeny v příloze.

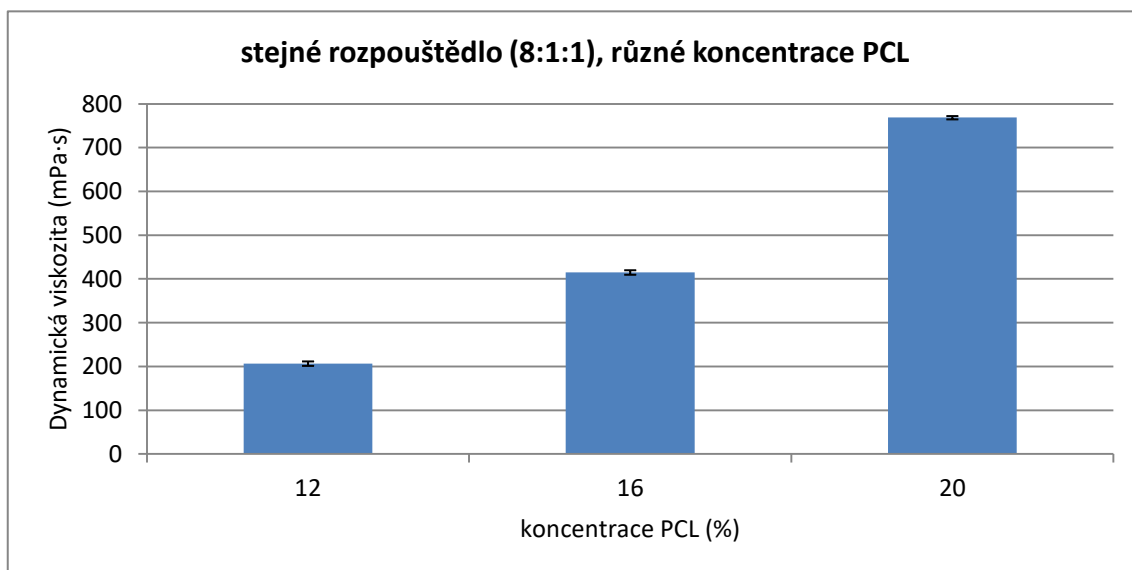
5.6 Měření viskozity

Dynamická viskozita byla určena pomocí vztahu 4.1, a to změřením pádového času kuličky v jednotlivých roztocích. Viskozity pro jednotlivé roztoky jsou uvedeny v tabulce 5.7 a grafické srovnání následně v grafech 5.6 a 5.7.

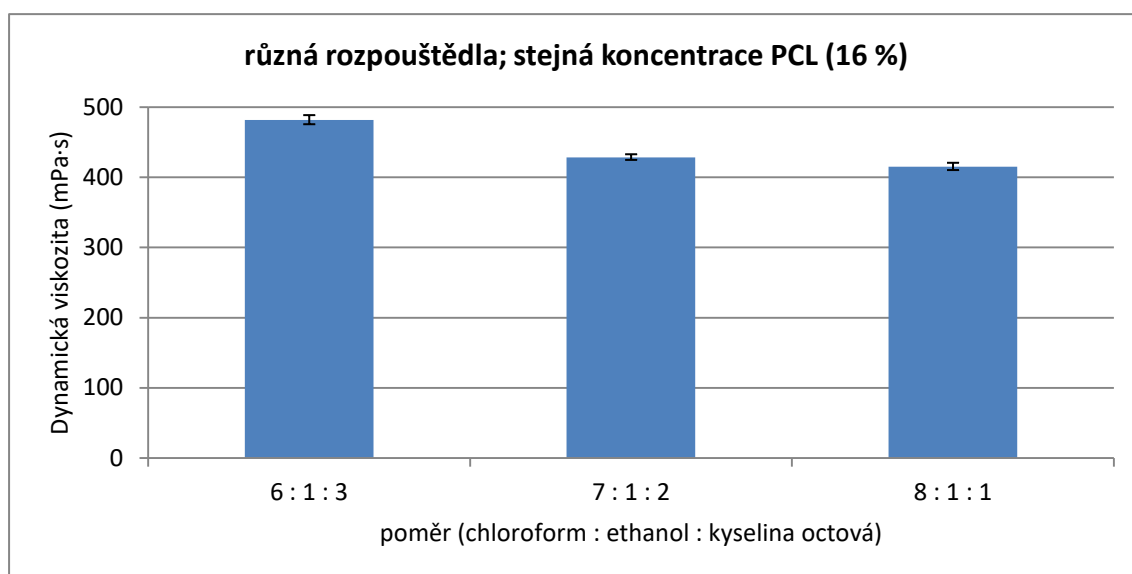
Tabulka 5.7: Dynamická viskozita jednotlivých roztoků.

Vzorek	Dynamická viskozita (mPa·s)				
	A	B	C	D	E
	206,8±5,1	415,1±5,2	768,7±3,8	428,4±4,0	481,7±6,5

Data byla měřena pro každý vzorek 10krát a jsou uvedena jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka.



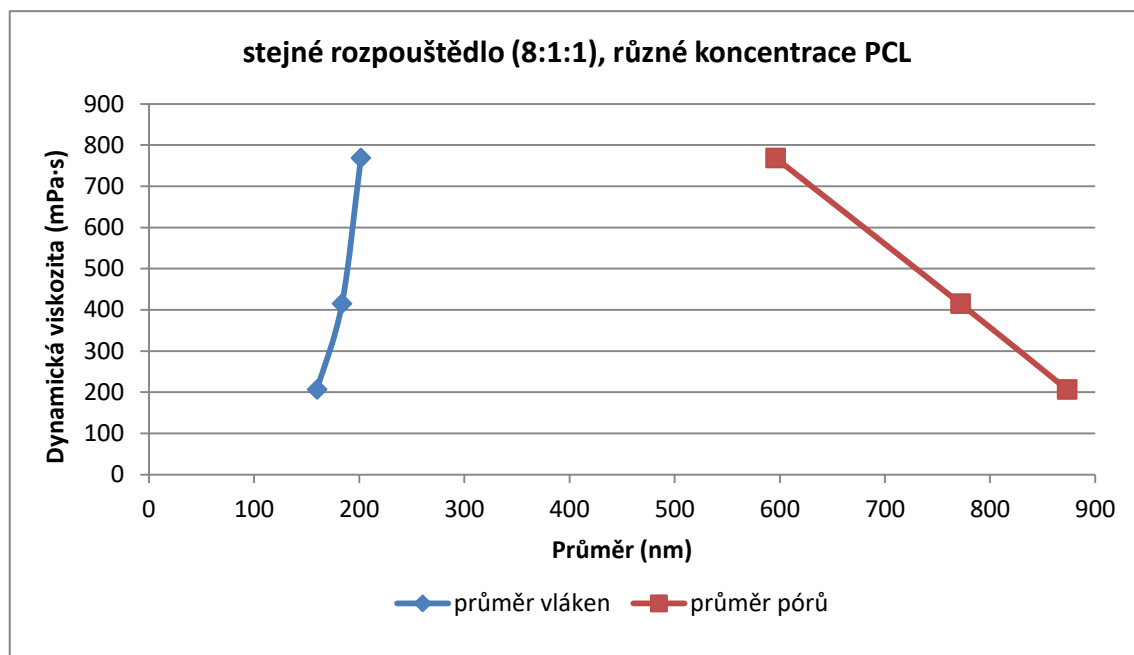
Graf 5.6: Závislost viskozity na koncentraci polymeru PCL, při použití shodného rozpouštěcího systému.



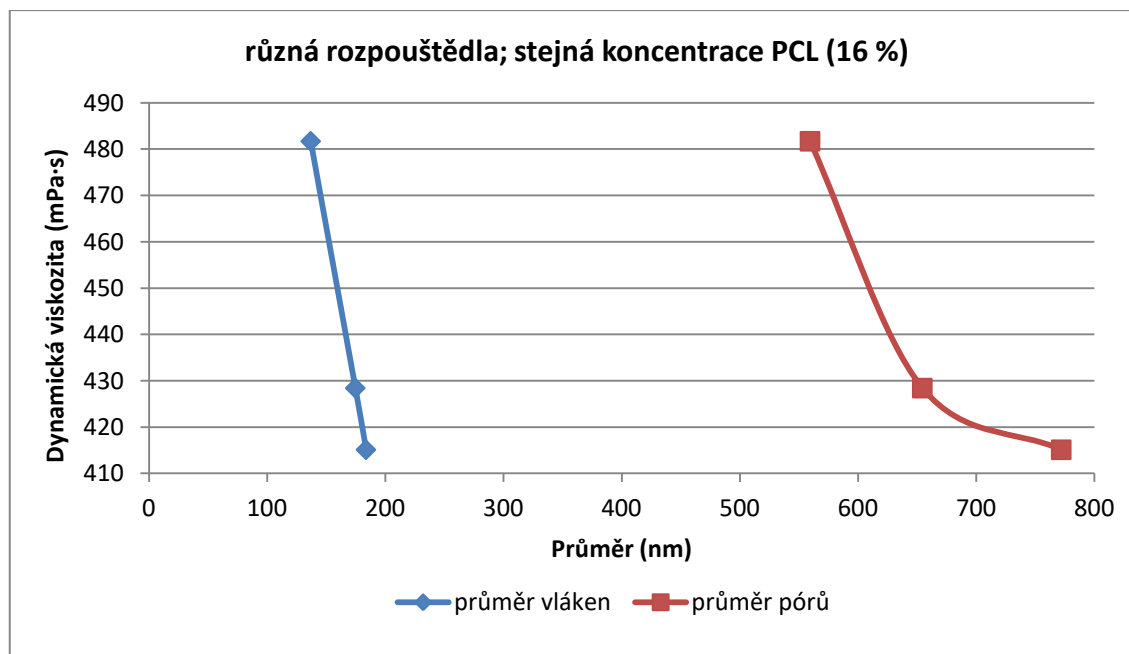
Graf 5.7: Závislost viskozity na rozpouštěcím systému, při zachování koncentrace polymeru PCL.

Dle provedeného statistického testu lze tvrdit, že dynamická viskozita závisí na použitém polymerním roztoku. Se vzrůstající koncentrací PCL, roste i viskozita. Naopak s přidáním chloroformu viskozita klesá. Výsledky statistických testů a signifikance výsledků jsou uvedeny v příloze.

Vztah mezi viskozitou roztoků, průměrem vláken a průměrem pórů pro různé koncentrace PCL je znázorněn v grafu 5.8. Závislost pro různé rozpouštědla je pak znázorněn v grafu 5.9



Graf 5.8: Závislost viskozity na průměru vláken a pórů pro vzorky A, B a C.



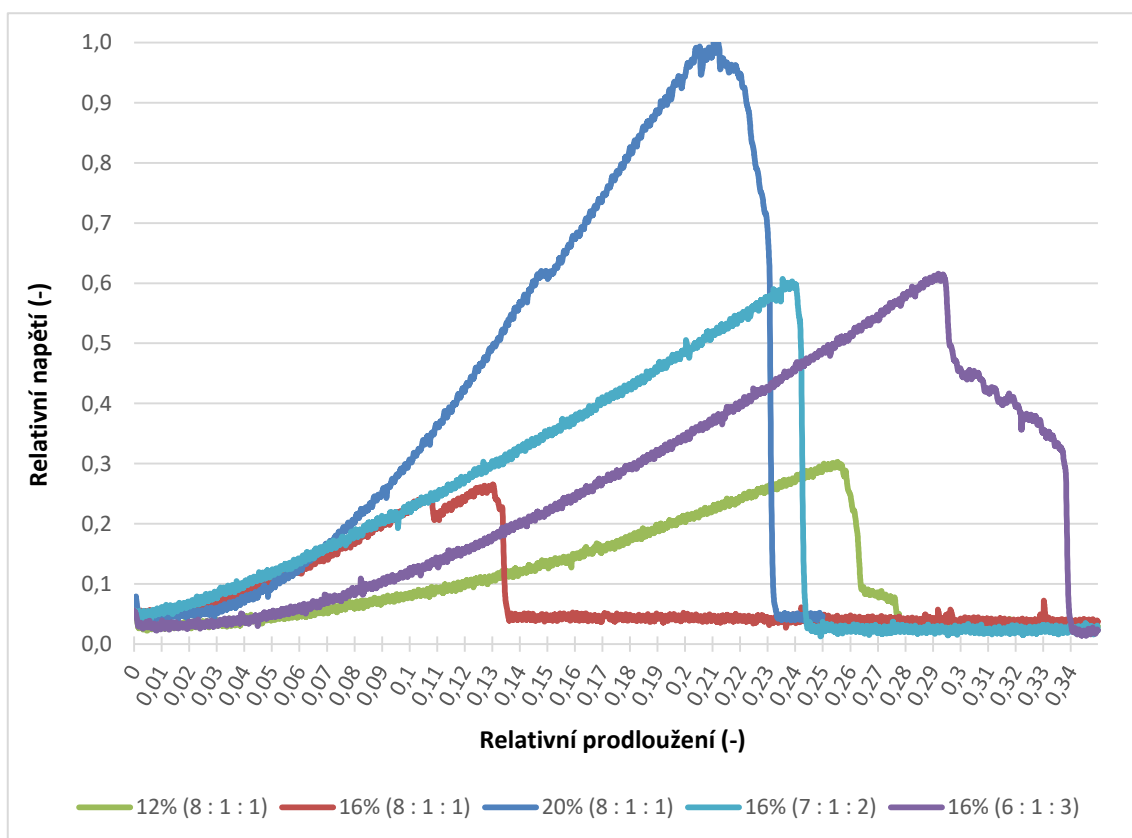
Graf 5.9: Závislost viskozity na průměru vláken a pórů pro vzorky B, D a E.

5.7 Měření mechanické pevnosti

Pro získání vzorku o přesných rozměrech byl použit skalpel, neboť řez laserem se ukázal jako nevhodný. U vytvořených vzorků byla provedena tahová zkouška. Mez pevnosti jednotlivých vzorků je zaznamenána v tabulce 5.7. Reprezentativní tahový diagram je znázorněn v grafu 5.8. Tlak je porovnáván vzhledem k nejvyšší dosažené hodnotě u vzorku C.

Tabulka 5.7: Mez pevnosti nanovláknenných vzorků.

	Vzorek				
	A	B	C	D	E
Relativní napětí (-)	0,30	0,27	1,00	0,61	0,62
Relativní prodloužení (-)	0,26	0,13	0,21	0,24	0,29



Graf 5.8: Tahový diagram nanovláknenných vzorků.

5.8 Komora pro uchycení nanovláken

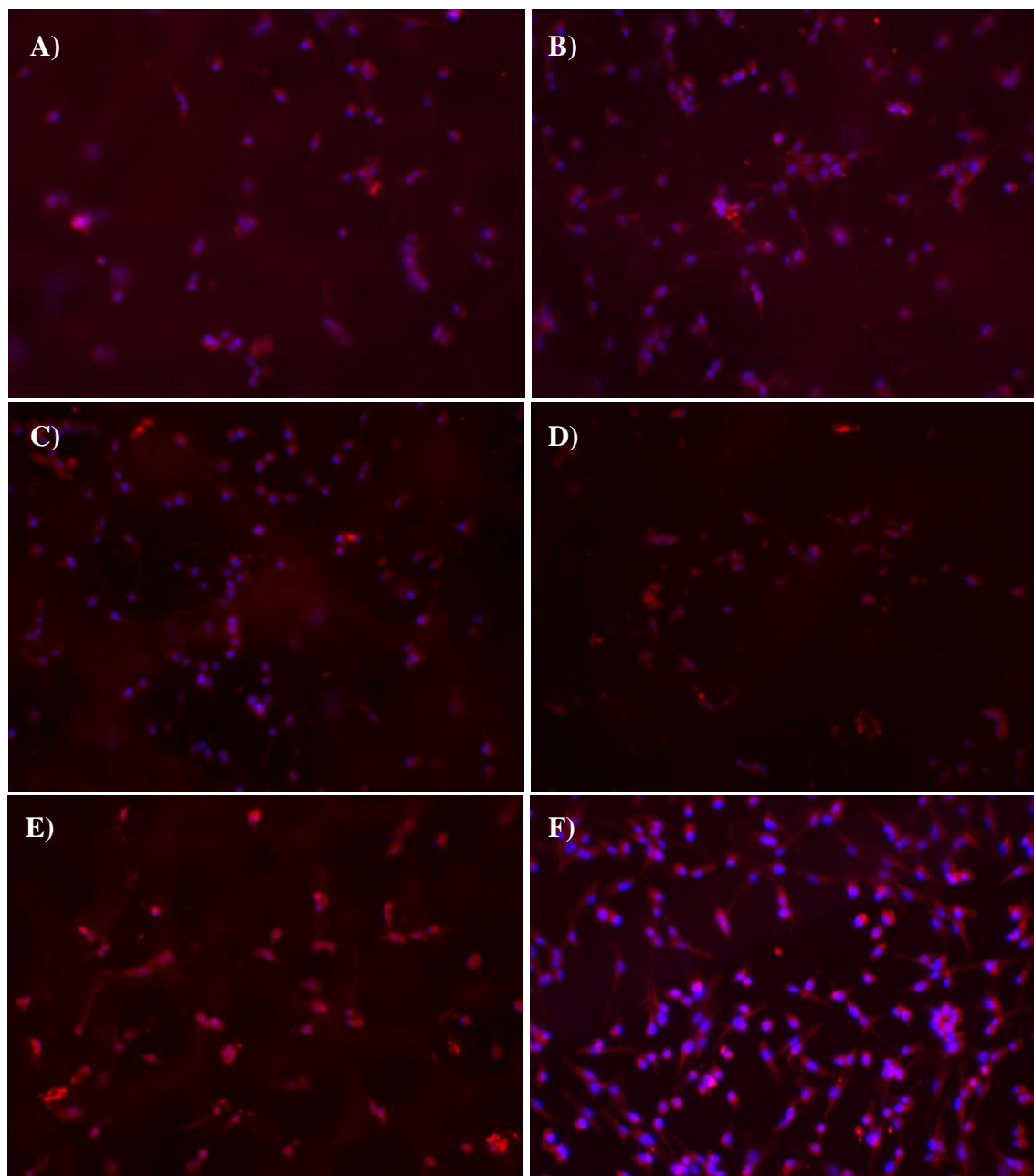
Návrh komory probíhal v softwarovém prostředí SolidWorks. Dle návrhu byla kultivační komora vytištěna pomocí 3D tisku. Na spodní část komory jsou uloženy nanovláknenné vzorky, které jsou následně překryty vrchní částí komory (viz Obr. 5.7). Mezi částí komory je vloženo silikonové těsnění, aby médium nevyteklo mimo komoru. Obě dvě části jsou následně spolu sešroubovány. Z vrchní strany lze na vzorcích provádět experimenty. Při buněčných pokusech je tento celek vložen do Petriho misky, aby bylo zamezeno vniku nečistot na struktury. Technický výkres komory je k nalezení v příloze.



Obrázek 5.7: Vytištěná kultivační komora se vzorky. Foto: autor.

5.9 Buněčná adheze a proliferace

Kultivace probíhala za statických podmínek v navržené kultivační komoře. Jádra buněk a cytoskelet byla následně nabarvena a vyfotografována při desetinásobném zvětšení (viz Obr. 5.8).



Obrázek 5.8: Buňky na vzorcích. (Označení snímků je shodné s označením vzorku.)

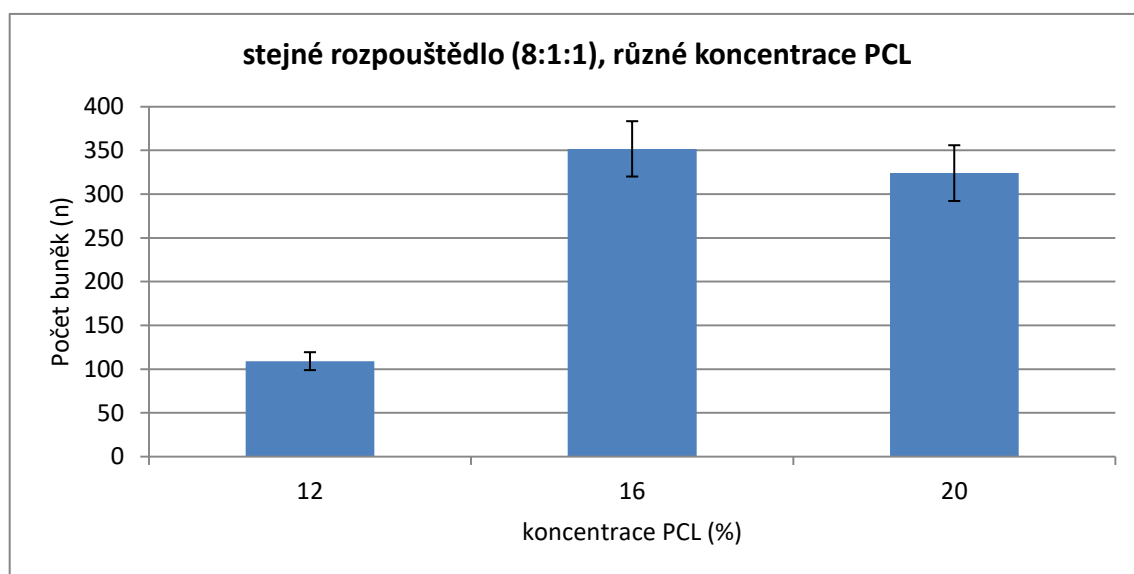
F) kontrolní sklo. Foto: Ing. Jana Štěpanovská, Ph.D.

Pro každý vzorek a kontrolní sklo (označení K) bylo pořízeno deset snímků, na kterých byly spočteny buňky na zorné pole (viz Tab. 5.8). Grafické srovnání je zobrazeno v grafech 5.9 a 5.10.

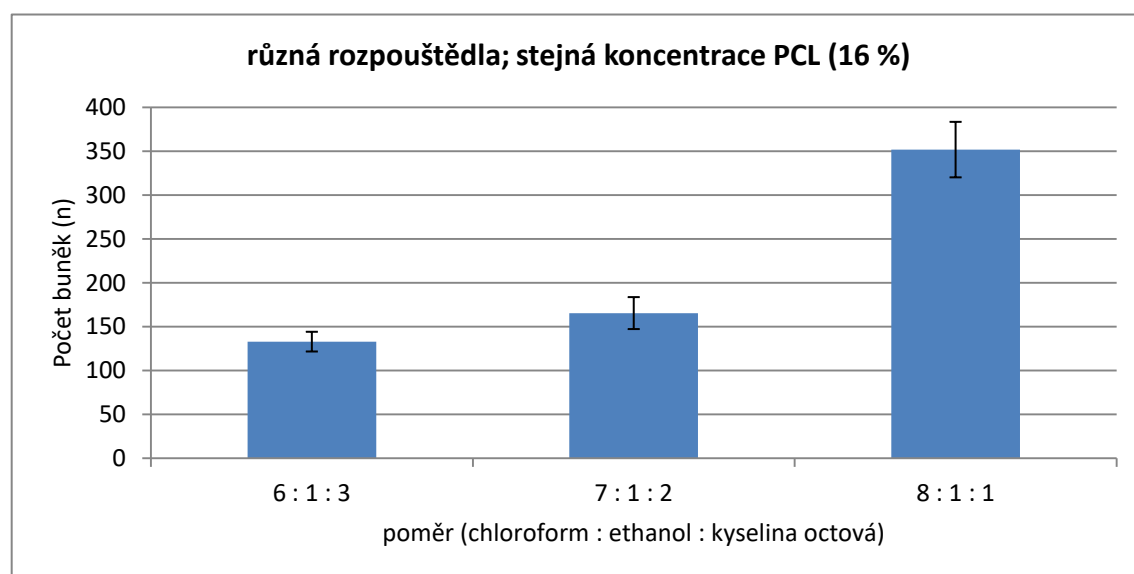
Tabulka 5.8: Počet buněk na jednotlivých vzorcích.

Vzorek	Počet buněk (-)					
	A	B	C	D	E	K
	109,1±10,3	351,7±31,6	324,0±31,9	165,5±18,2	132,9±11,2	489,8±48,3

Data byla měřena pro každý vzorek 10krát a jsou uvedena jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka.



Graf 5.9: Závislost počtu buněk na koncentraci polymeru PCL, při použití shodného rozpouštěcího systému.



Graf 5.10: Závislost počtu buněk na rozpouštěcím systému, při zachování koncentrace polymeru PCL.

Dle provedeného statistického testu lze konstatovat, že počet buněk závisí na použitém vzorku. U vzorků s vyšší koncentrací PCL byl počet buněk vyšší než u vzorku s nejnižší koncentrací PCL. Nejvyšší počet buněk byl zaznamenán u vzorku B. S přidavkem chloroformu počet buněk roste. Výsledky statistických testů a signifikance výsledků jsou uvedeny v příloze.

5.10 Shrnutí

Srovnání naměřených výsledků uvádí tabulka 5.9, ve které jsou zaznamenány průměrné naměřené hodnoty. Ke zjištění míry lineární asociace mezi jednotlivými měřeními byl použit Pearsonův korelační koeficient, jelikož všechna data pocházejí z normálního rozdělení. Korelační tabulka je vyhotovena pro vzorky A, B a C, které měly shodný rozpouštěcí systém s různou koncentrací, a pro vzorky B, D a E, u kterých byla shodná koncentrace PCL, ale rozdílný rozpouštěcí systém. Výsledné korelace jsou uvedeny v příloze.

S vyšší koncentrací PCL ve vzorcích klesala smáčivost a velikost pórů. Naopak s koncentrací rostl průměr vláken, viskozita a do jisté míry i počet buněk. S vyšším poměrem chloroformu, a tedy nižším poměrem kyseliny octové klesala smáčivost, viskozita a mechanická pevnost vzorků. Veličiny, které narůstaly, jsou průměr vláken, velikost pórů a počet buněk.

Tabulka 5.9: Tabulka shrnující naměřené výsledky.

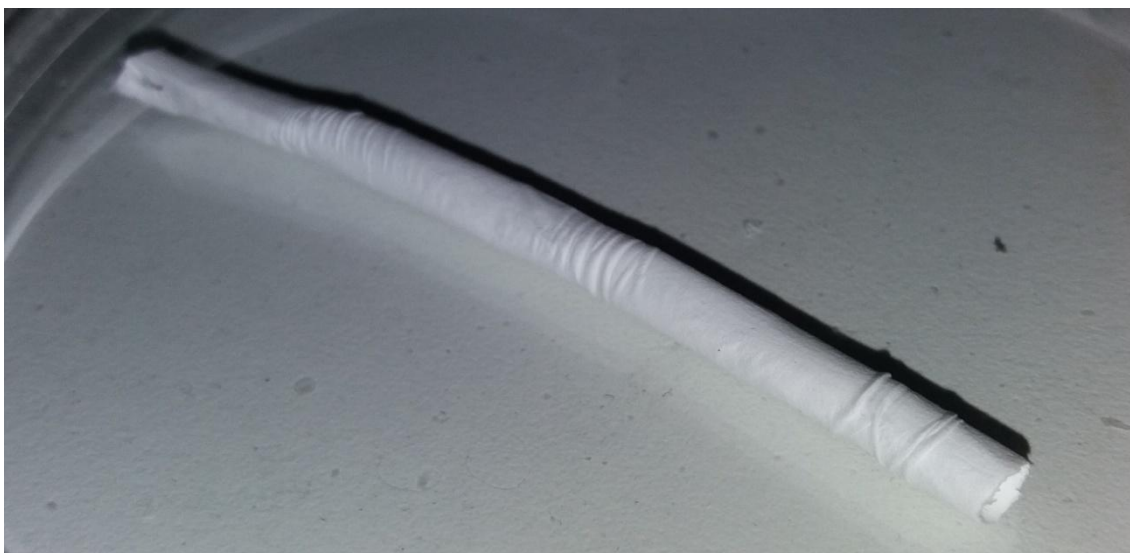
Vzorek	Smáčivost (°)	Průměr vláken (nm)	Velikost pórů (nm)	Viskozita (mPa.s)	Počet buněk (n)	Relativní napětí (-)
A	127,2	159,9	873,3	206,8	109,1	0,30
B	124,4	183,6	772,0	415,1	351,7	0,27
C	120,3	201,5	596,0	768,7	324,0	1,00
D	117,6	174,6	654,4	428,4	165,5	0,61
E	113,9	136,8	559,4	481,7	132,9	0,62

6 Diskuze

Hlavním výsledkem diplomové práce jsou zjištěné hodnoty mechanických a geometrických vlastností, smáčivosti a viskozity pro jednotlivé vyrobené nanostruktury a jejich souvislost s buněčnou proliferací. Dalšími výsledky jsou pak data získaná z buněčných experimentů a vymodelovaná kultivační komora.

Roztoky polymerů byly namíchány dle údajů z literatury. Koncentrace polymeru PCL v roztocích byla zvolena v rozmezí 12 % až 20 % tak, aby nedocházelo k nepříznivým vlivům, jako je v případě řídkého roztoku skapávání kapky z emitoru či naopak v případě hustého roztoku ucpání trysky v emitoru. Podobné rozmezí koncentrací je v souladu s pracemi, kde byly zkoumány také roztoky s příměsí PCL [27], [28]. Ze zkoumaných roztoků v této práci musel být vyřazen vzorek F (PCL 14 hm % + chloroform : dimethylformamid (7 : 3)) z důvodu nepravidelné struktury (viz Obr. 5.1). V podobné studii byla však tato koncentrace použita bez větších problémů [29]. Rozhodujícím faktorem ale mohla být odlišná molekulová hmotnost použitých polymerů. Vzorek F byl navíc při testování druhů sterilizace vyhodnocen pro buňky jako toxický. Ve studii z roku 2020 byla vyrobena struktura obsahující jak PCL, tak i dimethylformamid, u které byly zajištěny antibakteriální vlastnosti pomocí implementace částic stříbra do struktury [30]. Roztok G (PCL 20 hm % + aceton : kyselina octová (1 : 1)) byl pro další analýzu také vyřazen, neboť nedošlo k dokonalému rozpuštění polymeru. Tato skutečnost je v rozporu se studií, kde roztok s touto koncentrací byl zvlákněn bez problémů [31]. Rozpustnost bylo však možné do jisté míry podpořit zvýšením teploty. Následná analýza probíhala tedy na zbývajících pěti vzorcích vzniklých smísením PCL, chloroformu, ethanolu a kyseliny octové v různých poměrech. U těchto vzorků testování sterilizace neprokázalo cytotoxicitu pro buňky.

Při elektrostatickém zvláknování docházelo ke skapávání roztoku D a E z trysky emitoru, patrně kvůli vysoké viskozitě a nízké hustotě. Naopak při použití roztoku C s koncentrací 20 % PCL docházelo k mírnému ucpávání trysky během procesu zvláknování. To mohlo být způsobeno naopak tím, že byl roztok moc hustý. Při stahování planárních nanovlákněných struktur z kolektoru docházelo občas k mírnému ulpívání struktur na kolektoru. Bylo tak zřetelné, že struktura se skládá z několika vrstev. U tubulárních struktur mohly být stahovány pouze kratší úseky dlouhé 3 – 4 cm, neboť jinak docházelo k potrhání struktury. Vzorek C, který obsahoval nejvyšší koncentraci PCL, však oproti ostatním projevil mnohem větší mechanickou odolnost a podařilo se tak stáhnout několikanásobně delší strukturu (viz Obr. 6.1).



Obrázek 6.1: Tubulární nosič – vzorek C. Foto: autor.

K otestování cytotoxicity vláken a zvolení vhodného typu sterilizace, byly provedeny čtyři druhy sterilizací. A to pomocí autoklávu, ethanolu, UV záření a kombinací ethanolu a UV záření. Následně byl na vláknech proveden buněčný test a byla sledována buněčná odezva. Z vyzkoušených druhů sterilizace byla vybrána ta pomocí ethanolu. V případě sterilizace autoklávem došlo ke zhroucení struktur, neboť vysoká teplota způsobila tání polymerního vzorku. V případě sterilizace pomocí UV došlo ke sterilizaci, nikoli však ke zvýšení smáčivosti. Jak bylo uvedeno, vzorek F byl těmito testy vyhodnocen jako cytotoxický. U vzorků, které obsahovaly chloroform, ethanol a kyselinu octovou, cytotoxicita nebyla potvrzena.

Na zvlákněných vzorcích bylo provedeno měření smáčivosti pomocí kontaktního úhlu přisedlé kapky. Jeho velikost byla před sterilizací ethanolem v čase konstantní. Nejvyšší kontaktní úhel, a tedy nejvíce hydrofobní byl vzorek A. Se vzrůstající koncentrací klesal kontaktní úhel a vzorky byly více hydrofilní. Zajímavé je také porovnání úhlů při konstantní koncentraci PCL v roztoku, kdy povrchy byly více hydrofilní, pokud byl nižší poměr chloroformu v roztoku (čili vyšší poměr kyseliny octové v roztoku). Jako nejvíce smáčivý povrch byl vyhodnocen vzorek E. Z hlediska vztahu mezi průměrem vláken a kontaktním úhlem lze u vzorků B, D a E sledovat, že s narůstajícím průměrem se zvyšuje i kontaktní úhel, klesá tedy smáčivost. Tuto skutečnost dokládá i práce z roku 2016, ve které je definován stejný trend [32]. Po sterilizaci vzorků ethanolem velikost kontaktního úhlu v čase klesala. Jeho velikost byla měřena v časech 0, 0,5, 1, 2, 5 a 10 sekund. Velikost úhlu v čase 0 sekund sleduje téměř opačný trend než před sterilizací. Vzorky s vyšším úhlem měřeným před sterilizací měly nyní úhel nižší a naopak. V čase 10 sekund byl kontaktní úhel u vzorků A, B a C roven 0. U vzorků D a E, které měly nyní nejvyšší kontaktní úhel, by se dal očekávat stejný trend. Z těchto výsledků se dá tedy tvrdit, že pomocí provedené

sterilizace ethanolem lze učinit z nanovláknenných struktur povrchy hydrofilní povahy. Ke zvýšení smáčivosti vláken bývá používána i úprava pomocí plazmy [33].

Z výsledků měření průměru vláken vyplývá, že se vzrůstající koncentrací polymeru roste i průměr vláken (viz Tab. 5.4). Tento trend bývá obecně pozorován [9], [34]. Důvodem je, že roztok s vyšší koncentrací PCL má vyšší viskozitu, a tím pádem je za stejných podmínek z emitoru vytahován tlustší proud roztoku, čímž vznikají i vlákna s vyšším průměrem (viz Graf 5.8). Porovnáme-li roztoky z hlediska rozdílných rozpouštěcích systémů (při stejné koncentraci PCL), lze pozorovat snižování průměru vláken se snižováním poměru chloroformu v roztoku. Tento trend lze vysvětlit tak, že při snižování poměru chloroformu v roztoku a zvyšování poměru kyseliny octové v roztoku, klesá hustota roztoků, a tím tedy klesá i průměr vláken. S rostoucím průměrem vláken u vzorků A, B a C došlo ke snížení kontaktního úhlu, což bylo pozorováno i u studie zkoumající taktéž nanovláknenné struktury[35]. Z hlediska velikosti pórů lze sledovat, že se vzrůstající koncentrací PCL jejich velikost klesá. Naopak roste s přidavkem chloroformu v roztoku.

Dynamická viskozita roztoků byla měřena pomocí Höpplerova viskozimetru. Z výsledků je patrné, že se hodnota viskozity zvyšuje s rostoucí koncentrací. Z hlediska rozpouštěcího systému, při zachování koncentrace PCL, její hodnota klesá s rostoucím poměrem chloroformu v roztoku, a tedy s rostoucí hustotou. Stejný trend je uváděn i v jiných studiích, kdy též se vzrůstající koncentrací polymeru PCL docházelo ke zvyšování viskozity [36].

Měření vodivosti roztoků nebylo vzhledem k nedostupnosti vhodného přístroje provedeno. Důvodem byl fakt, že při vložení sondy do roztoku došlo patrně k zalepení elektrod a nebyla tak naměřena žádná smysluplná hodnota. Roztoky byly proto měřeny i jiným kontaktním konduktometrem, avšak se stejným neúspěšným výsledkem. Příčinou, proč nešla změřit vodivost, bylo použití rozpouštědel, která naleptávala povrch sondy a znemožňovaly tak měření. Řešením této situace může být použití bezkontaktního konduktometru, který měří vodivost pomocí cívek, umístěných mimo roztok.

Testování mechanické pevnosti vláken prokázalo, že nejpevnější vlákna poskytuje vzorek C, který obsahuje nejvyšší koncentraci PCL. Což vysvětluje mimo jiné i důvod, proč bylo možné stáhnout z kolektoru, oproti ostatním strukturám, delší tubulární nosič. Naopak nejméně pevná vlákna byla pozorována u vzorku B. Vzorek C, který obsahoval nejnižší koncentraci PCL, měl mez pevnosti vyšší než vzorek B. Z hlediska porovnání vzorků s rozdílným rozpouštědlem se s rostoucím poměrem chloroformu a zároveň klesajícím poměrem kyseliny octové snižovala mez pevnosti. Ve studii, kdy byl zkoumán polymer PLCL s průměry od 0,3 do 7 μm , dospěli autoři po testování mechanických vlastností k závěru, že snížení průměru vlákna zvyšuje mechanickou pevnost pravděpodobně v důsledku zvýšení hustoty vlákna [37]. To může vysvětlovat,

proč měl vzorek A vyšší pevnost než vzorek B. U tenčích vláken byla ve zmíněné studii zároveň pozorována vyšší proliferace buněk oproti vláknům s větším průměrem. Tuto skutečnost lze pozorovat také mezi vzorky B a C. K podobným závěrům, že tenčí vlákna poskytují vyšší pevnost, dospěli i ve studii z roku 2016 [32]. Stejný trend lze pozorovat mezi vzorky B, D a E.

Z výsledků buněčných testů, které probíhaly ve vymodelované kultivační komoře lze vidět, že nejvyšší počet buněk byl zaznamenán po vzorku s kontrolním povrchem na vzorku B. Druhá největší populace buněk byla zaznamenána na vzorku C s nejvyšší použitou koncentrací. Naopak nejméně buněk bylo na vzorku A, který měl nejnižší použitou koncentrací. Z toho vyplývá, že buněčná proliferace je určena koncentrací PCL jen do určité míry. Při srovnání vzorku B, D a E, které vznikly z roztoku se shodnou koncentrací PCL, můžeme vyčíst, že s přidavkem chloroformu v roztoku se zvyšuje i počet buněk na těchto vzorcích.

Z hlediska vztahu mezi jednotlivými naměřenými veličinami lze mezi všemi nalézt určitou relaci, což podporuje fakt o vzájemné provázanosti jednotlivých proměnných, který byl nastíněn v úvodu. Tabulka korelačních koeficientů (viz Tab. 11 a 12 uvedené v příloze) ukazuje závislost proměnných z velké části v lineárním vztahu. Korelační koeficienty jsou určeny jak pro roztoky se stejnou koncentrací PCL v různých rozpouštěcích systémech, tak pro roztoky s rozdílnými koncentracemi ve shodném rozpouštěcím systému.

7 Závěr

V této práci bylo charakterizováno a srovnáno několik polymerních roztoků PCL a z nich vyrobených nanovláknenných vzorků, a to z hlediska vlivu fyzikálních vlastností na proliferaci kmenových buněk. Z vybraných roztoků byly vyrobeny jak planární, tak i tubulární vzorky. U jednotlivých vzorků byla určena hydrofilita, geometrické a mechanické vlastnosti. U roztoků byla určena viskozita. Pro buněčné experimenty na jednotlivých vzorcích byla navržena a vyrobena kultivační komora.

Ke sterilizaci vzorků byl použit ethanol. Jako nejvíce hydrofobní byl vyhodnocen vzorek A s koncentrací PCL 12 %. Nejvíce smáčivým se jeví vzorek E s nejnižším poměrem chloroformu v roztoku. Po sterilizaci ethanolem byla smáčivost vzorků téměř opačná. Vlákna s největším průměrem byla zaznamenána u vzorku C, který měl nejvyšší koncentraci PCL. Tento vzorek zároveň prokázal největší pevnost. Nejnižší průměr vláken byl zaznamenán u vzorku E. Pomocí korelačních koeficientů byly porovnány vzorky s rozdílnými koncentracemi při shodných rozpouštěcích systémech a dále roztoky se shodnou koncentrací při rozdílných rozpouštěcích systémech. Koeficienty v obou případech ukazují, že jednotlivé parametry roztoku i vytvořených struktur spolu úzce souvisí. Jako nejvhodnější se dle výsledků buněčných experimentů na nanovláknenných substrátech jeví vzorek B s koncentrací 16 % PCL v rozpouštěcím systému chloroform : ethanol : kyselina octová (8 : 1 : 1). Z hlediska mechanických vlastností se jeví nejvhodnějším vzorek C s koncentrací 20 % PCL, který prokázal zároveň dostatečnou pevnost při sundávání z tyčkovitého kolektoru.

Seznam použité literatury

- [1] STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV: *Srdečně-cévní nemoci* [online]. 2017 [cit. 2020-04-12]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/srdecne-cevni-nemoci>
- [2] RAVI, Swathi a Elliot CHAIKOF. Biomaterials for vascular tissue engineering. *Regenerative Medicine*. 2010, **5**(1), 107-120. ISSN 1746-0751. Dostupné z: doi:10.2217/rme.09.77
- [3] LEE, Sang, James YOO, Grace LIM, Anthony ATALA a Joel STITZEL. In vitro evaluation of electrospun nanofiber scaffolds for vascular graft application. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2007, **83**(4), 999-1008. ISSN 15493296. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.31287
- [4] VENUGOPAL, J, Y ZHANG a S RAMAKRISHNA. Fabrication of modified and functionalized polycaprolactone nanofibre scaffolds for vascular tissue engineering. *Nanotechnology*. 2005, **16**(10), 2138-2142. ISSN 0957-4484. Dostupné z: doi:10.1088/0957-4484/16/10/028
- [5] VENUGOPAL, J. a S. RAMAKRISHNA. Applications of Polymer Nanofibers in Biomedicine and Biotechnology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2005, **125**(3), 147-158. ISSN 0273-2289. Dostupné z: doi:10.1385/ABAB:125:3:147
- [6] KUMBAR, S, R JAMES, S NUKAVARAPU a C LAURENCIN. Electrospun nanofiber scaffolds: engineering soft tissues. *Biomedical Materials*. 2008, **3**(3). ISSN 1748-6041. Dostupné z: doi:10.1088/1748-6041/3/3/034002
- [7] KARKAN, Sonia, Soodabeh DAVARAN, Reza RAHBARGHAZI, Roya SALEHI a Abolfazl AKBARZADEH. Electrospun nanofibers for the fabrication of engineered vascular grafts. *Journal of Biological Engineering*. 2019, **13**(1). ISSN 1754-1611. Dostupné z: doi:10.1186/s13036-019-0199-7
- [8] HUDÁK, Radovan a David KACHLÍK. *Memorix anatomie*. Vyd. 2. Praha: Triton, 2013. ISBN 978-80-7387-712-5.
- [9] BAHRAMI, Hajir. Review on Electrospun Nanofibers Scaffold and Biomedical Applications. *Trends in biomaterials & artificial organs*. 2010, **24**.
- [10] EBLE, Johannes a Stephan NILAND. The Extracellular Matrix of Blood Vessels. *Current Pharmaceutical Design*. 2009, **15**(12), 1385-1400. ISSN 13816128. Dostupné z: doi:10.2174/138161209787846757
- [11] O'BRIEN, F.J., B.A. HARLEY, I.V. YANNAS a L.J. GIBSON. The effect of

- pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*. 2005, **26**(4), 433-441. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2004.02.052
- [12] SILL, Travis a Horst VON RECUM. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*. 2008, **29**(13), 1989-2006. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2008.01.011
- [13] AGRAWAL, C. *Introduction to biomaterials: basic theory with engineering applications*. New York: Cambridge University Press, 2014. Cambridge texts in biomedical engineering (Cambridge University Press). ISBN 978-052-1116-909.
- [14] NIKOLOVSKI, Janeta a David MOONEY. Smooth muscle cell adhesion to tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*. 2000, **21**(20), 2025-2032. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/S0142-9612(00)00079-X
- [15] *BIOMATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING*. Rijeka: InTech, 2011. ISBN 978-953-307-609-6.
- [16] *Uživatelská příručka 4SPIN*. Dolní Dobrouč, 2017.
- [17] RIM, Nae, Choongsoo SHIN a Heungsoo SHIN. Current approaches to electrospun nanofibers for tissue engineering. *Biomedical Materials*. 2013, **8**(1). ISSN 1748-6041. Dostupné z: doi:10.1088/1748-6041/8/1/014102
- [18] NIU, Haitao, Hua ZHOU a Hongxia WANG. Electrospinning: an advanced nanofiber production technology. *Energy Harvesting Properties of Electrospun Nanofibers*. IOP Publishing, 2019. ISBN 978-0-7503-2005-4. Dostupné z: doi:10.1088/978-0-7503-2005-4ch1
- [19] MOHAMMAD ANWARUL AZIM, Abu. *Effect of Electrospinning Parameters on Fiber Morphology of Tissue Engineering Scaffolds: A Review*. 2014, **02**(03). ISSN 23299568. Dostupné z: doi:10.4172/2329-9568.1000114
- [20] PARK, Honghyun, Kuen LEE, Seung LEE, Ko PARK a Won PARK. Plasma-treated poly(lactic-co-glycolic acid) nanofibers for tissue engineering. *Macromolecular Research*. 2007, **15**(3), 238-243. ISSN 1598-5032. Dostupné z: doi:10.1007/BF03218782
- [21] FU, Wei, Zhenling LIU, Bei FENG et al. Electrospun gelatin/PCL and collagen/PLCL scaffolds for vascular tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*. 2014. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S61375
- [22] HE, Wei, ZuWei MA, Thomas YONG, Wee TEO a Seeram RAMAKRISHNA. Fabrication of collagen-coated biodegradable polymer nanofiber mesh and its potential for endothelial cells growth. *Biomaterials*. 2005,

- 26**(36), 7606-7615. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2005.05.049
- [23] KU, Sook a Chan PARK. Human endothelial cell growth on mussel-inspired nanofiber scaffold for vascular tissue engineering. *Biomaterials*. 2010, **31**(36), 9431-9437. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2010.08.071
- [24] YAO, Ruijuan, Jing HE, Guolong MENG, Bo JIANG a Fang WU. Electrospun PCL/Gelatin composite fibrous scaffolds: mechanical properties and cellular responses. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2016, **27**(9), 824-838. ISSN 0920-5063. Dostupné z: doi:10.1080/09205063.2016.1160560
- [25] FADAIE, Milad, Esmail MIRZAEI, Bitá GERAMIZADEH a Zahra ASVAR. Incorporation of nanofibrillated chitosan into electrospun PCL nanofibers makes scaffolds with enhanced mechanical and biological properties. *Carbohydrate Polymers*. 2018, **199**, 628-640. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2018.07.061
- [26] *Viskozimetr kuličkový Höppler KF 3.2* [online]. [cit. 2021-04-05]. Dostupné z: <https://www.verkon.cz/viskozimetr-kulickovy-hoppler-kf-3-2/>
- [27] KLICOVA, Marketa, Andrea KLAPSTOVA, Jiri CHVOJKA, Barbora KOPRIVOVA, Vera JENCOVA a Jana HORAKOVA. Novel double-layered planar scaffold combining electrospun PCL fibers and PVA hydrogels with high shape integrity and water stability. *Materials Letters*. 2020, **263**. ISSN 0167577X. Dostupné z: doi:10.1016/j.matlet.2019.127281
- [28] NOVÁK, Patrik. *Nanovláknenné cévní náhrady*. Liberec, 2014. Diplomová práce. Technická univerzita v Liberci.
- [29] WANG, Xiaofeng, Haibin ZHAO, Lih-Sheng TURNG a Qian LI. *Crystalline Morphology of Electrospun Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) Nanofibers*. 2013, **52**(13), 4939-4949. ISSN 0888-5885. Dostupné z: doi:10.1021/ie302185e
- [30] BALLESTEROS, Camilo, Daniel CORREA a Valtencir ZUCOLOTTO. Polycaprolactone nanofiber mats decorated with photoresponsive nanogels and silver nanoparticles: Slow release for antibacterial control. *Materials Science and Engineering: C*. 2020, **107**. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2019.110334
- [31] COLMENARES ROLDÁN, Gabriel, Yeixon QUINTERO MARTÍNEZ, Liliana AGUDELO GÓMEZ, Luis RODRÍGUEZ VINASCO a Lina HOYOS PALACIO. Influence of the molecular weight of polymer, solvents and operational condition in the electrospinning of polycaprolactone. *Revista Facultad de*

- Ingeniería Universidad de Antioquia*. 2017, (84), 35-45. ISSN 01206230. Dostupné z: doi:10.17533/udea.redin.n84a05
- [32] KIM, Hyung, Min KIM, Su RYU, Chang KI a Young PARK. Effect of fiber diameter on surface morphology, mechanical property, and cell behavior of electrospun poly(ϵ -caprolactone) mat. *Fibers and Polymers*. 2016, **17**(7), 1033-1042. ISSN 1229-9197. Dostupné z: doi:10.1007/s12221-016-6350-x
- [33] YAN, Da. *Journal of Medical and Biological Engineering*. 2013, **33**(2). ISSN 1609-0985. Dostupné z: doi:10.5405/jmbe.1072
- [34] SEMNANI, Dariush, Mina NASARI a Aref FAKHRALI. PCL nanofibers loaded with beta-carotene: a novel treatment for eczema. *Polymer Bulletin*. 2018, **75**(5), 2015-2026. ISSN 0170-0839. Dostupné z: doi:10.1007/s00289-017-2141-9
- [35] CUI, Wenguo, Xiaohong LI, Shaobing ZHOU a Jie WENG. Degradation patterns and surface wettability of electrospun fibrous mats. *Polymer Degradation and Stability*. 2008, **93**(3), 731-738. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2007.12.002
- [36] DU, Lei, Huaizhong XU, Ying ZHANG a Fengyuan ZOU. Electrospinning of polycaprolactone nanofibers with DMF additive: The effect of solution properties on jet perturbation and fiber morphologies. *Fibers and Polymers*. 2016, **17**(5), 751-759. ISSN 1229-9197. Dostupné z: doi:10.1007/s12221-016-6045-3
- [37] KEUN KWON, Il, Satoru KIDOAKI a Takehisa MATSUDA. Electrospun nano- to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential. *Biomaterials*. 2005, **26**(18), 3929-3939. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2004.10.007

Seznam příloh

Příloha A: Technický výkres

Příloha B: Výsledky statistických testů

Příloha C: Obsah přiloženého CD

Příloha A: Technický výkres

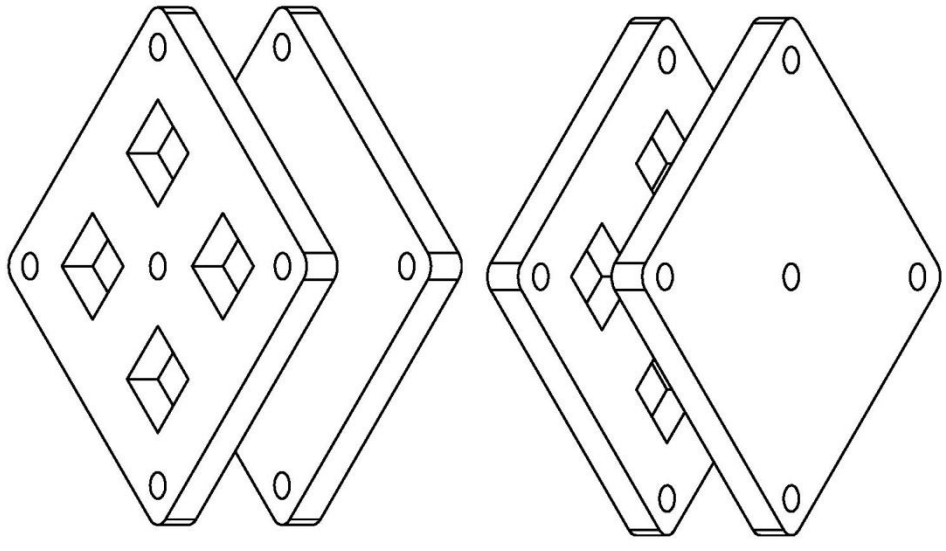
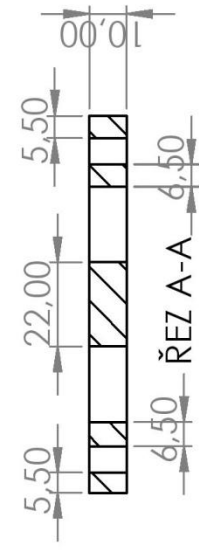
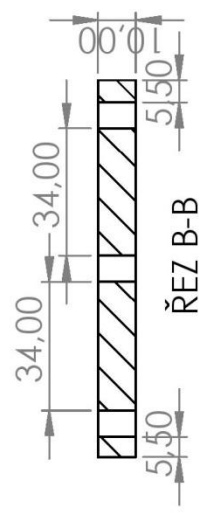
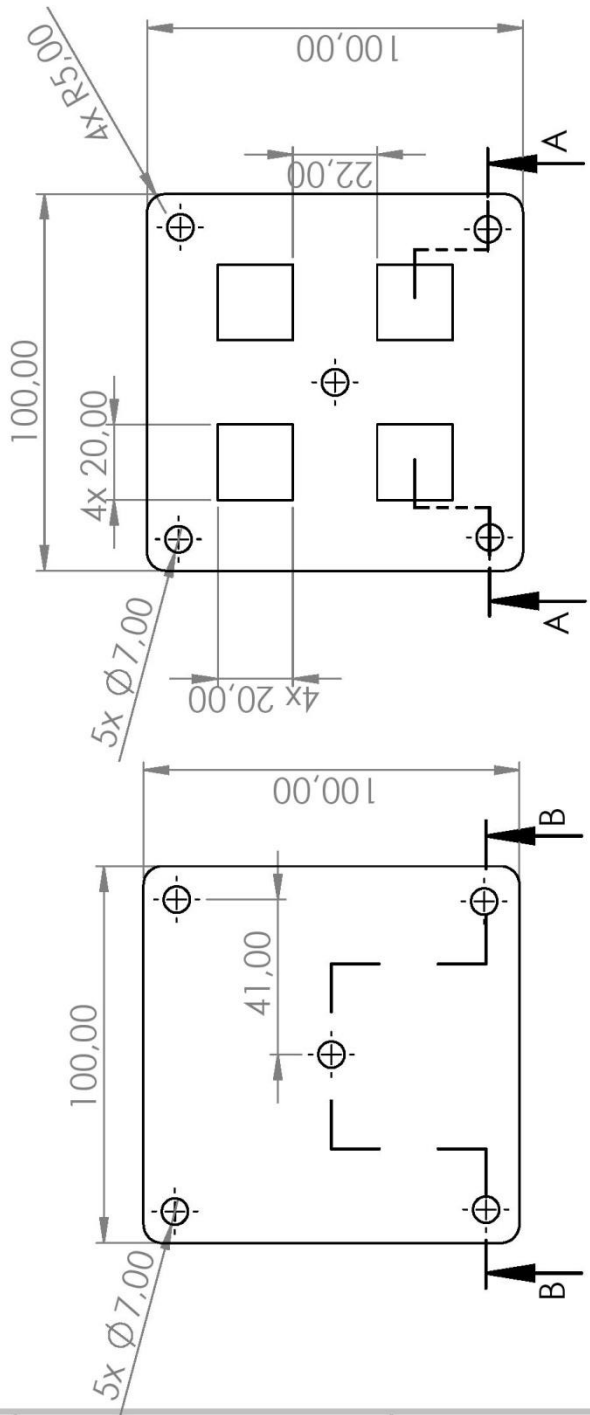
1 Kultivační komora

6 5 4 3 2 1

D C B A

Č.POLOŽKY: 1

Č.POLOŽKY: 2



Č. POLOŽKY	Č. DÍLU	Množství
1	Spodní díl	1
2	Vrchní díl	1

JMÉNO			
NAVŘHL	Bc. František Zima		
KONTROLA	Ing. Jana Štěpanovská, Ph.D.		
SCHVÁLIL	Ing. Jana Štěpanovská, Ph.D.		
Kultivační komora			
		1	
		1:2	A4

Příloha B: Výsledky statistických testů

Výsledky pro měření smáčivosti (kap. 5.4)

Tabulka 1: Výsledná ANOVA tabulka.

Zdroj variability	Stupně volnosti	Suma čtverců	Průměr čtverců	F	P-hodnota	F kritické
Meziskupinový	4	1107,967	276,992	18,209	<0.0001	2,586
Uvnitř skupin	45	684,546	15,212			
Celkem	49	1792,513				

Tabulka 2: Výsledná tabulka Tuckeyho testu mnohonásobného porovnání.

	Průměr	A	B	C	D	E
A	127,2					
B	124,4	Ne				
C	120,3	Ano	Ne			
D	117,6	Ano	Ano	Ne		
E	113,9	Ano	Ano	Ano	Ne	

Ano-značí signifikanci, Ne- značí nesignifikanci (obdobně u dalších tabulek)

Výsledky pro měření průměru vláken (kap. 5.5)

Tabulka 3: Výsledná ANOVA tabulka.

Zdroj variability	Stupně volnosti	Suma čtverců	Průměr čtverců	F	P-hodnota	F kritické
Meziskupinový	4	78997,487	19749,372	90,067	<0.0001	2,400
Uvnitř skupin	160	35083,873	219,274			
Celkem	164	114081,360				

Tabulka 4: Výsledná tabulka Tuckeyho testu mnohonásobného porovnání.

	Průměr	A	B	C	D	E
A	159,9					
B	183,6	Ano				
C	201,5	Ano	Ano			
D	174,6	Ano	Ne	Ano		
E	136,8	Ano	Ano	Ano	Ano	

Výsledky pro měření velikosti pórů (kap. 5.5)

Tabulka 5: Vyhodnocení Kruskal-Wallisova testu.

Výsledná statistika:

Vzorek	Počet měření	Minimum	Maximum	Střední hodnota	Směrodatná odchylka
A	101	755,572	1049,527	873,339	61,967
B	101	681,690	901,500	771,969	63,105
C	101	503,367	702,202	596,016	56,061
D	101	569,051	763,875	654,421	52,992
E	101	488,527	629,574	559,397	41,205

Kruskal-Wallis test:

K	404,128
K kritické	9,488
p-hodnota	<0,0001
alfa	0,050

Tabulka 6: Výsledná tabulka mnohonásobného porovnání.

	Průměr	A	B	C	D	E
A	873.3					
B	772.0	Ano				
C	596.0	Ano	Ano			
D	654.4	Ano	Ano	Ano		
E	559.4	Ano	Ano	Ne	Ano	

Výsledky pro měření dynamické viskozity (kap. 5.6)

Tabulka 7: Výsledná ANOVA tabulka.

Zdroj variability	Stupně volnosti	Suma čtverců	Průměr čtverců	F	P-hodnota	F kritické
Meziskupinový	4	1629214,031	407303,508	16194,676	<0.0001	2,586
Uvnitř skupin	45	1131,771	25,150			
Celkem	49	1630345,802				

Tabulka 8: Výsledná tabulka Tuckeyho testu mnohonásobného porovnání.

	Průměr	A	B	C	D	E
A	206,8					
B	415,1	Ano				
C	768,7	Ano	Ano			
D	428,4	Ano	Ano	Ano		
E	481,7	Ano	Ano	Ano	Ano	

Výsledky pro měření počtu buněk (kap. 5.9)**Tabulka 9:** Vyhodnocení Kruskal-Walissova testu.

Vzorek	Počet měření	Minimum	Maximum	Střední hodnota	Směrodatná odchylka
A	11	90,00	125,00	109,09	10,25
B	11	315,00	404,00	351,73	31,62
C	11	282,00	386,00	324,00	31,88
D	11	138,00	201,00	165,50	18,21
E	11	118,00	148,00	132,91	11,24
K	11	425,00	574,00	489,82	48,35

Kruskal-Wallis test:

K	64,005
K kritické	11,070
p-hodnota	<0,0001
alfa	0,050

Tabulka 10: Výsledná tabulka mnohonásobného porovnání.

	Průměr	A	B	C	D	E	K
A	109,1						
B	351,7	Ano					
C	324,0	Ano	Ne				
D	165,5	Ne	Ne	Ne			
E	132,9	Ne	Ano	Ano	Ne		
K	489,8	Ano	Ne	Ne	Ano	Ano	

Výsledky testování lineární závislosti (kap. 5.10)

Tabulka 11: Lineární závislost dle korelačních koeficientů vzorků A, B a C.

Proměnná	Koncentrace PCL	Viskozita	Smáčivost	Průměr vláken	Velikost pórů	Hustota	Počet buněk
Koncentrace PCL							
Viskozita	L						
Smáčivost	L	L					
Průměr vláken	L	L	L				
Velikost pórů	L	L	L	L			
Hustota	L	L	L	L	L		
Počet buněk	N	N	N	N	L	N	

L = lineární závislost; N = nelineární závislost; za hranici linearity byla považována hodnota korelačního koeficientu 0,92

Tabulka 12: Lineární závislost dle korelačních koeficientů vzorků B, D a E.

Proměnná	Poměr chloroformu	Poměr kyseliny octové	Viskozita	Smáčivost	Průměr vláken	Velikost pórů	Hustota	Počet buněk
Poměr chloroformu								
Poměr kys. octové	L							
Viskozita	L	L						
Smáčivost	L	L	N					
Průměr vláken	L	L	L	N				
Velikost pórů	L	L	L	N	L			
Hustota	L	L	L	L	L	L		
Počet buněk	L	L	N	L	N	N	L	

L = lineární závislost; N = nelineární závislost; za hranici linearity byla považována hodnota korelačního koeficientu 0,92

Příloha C: Obsah přiloženého CD

Klíčová slova česky

Klíčová slova anglicky

Abstrakt česky

Abstrakt anglicky

Naskenované zadání diplomové práce

Kompletní diplomová práce

Zdrojové kódy