

**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**

**Fakulta strojní**

**Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky**



**Analýza vplyvu podmienok siet'ovania na mechanické vlastnosti a degradabilitu  
nanovlákných kolagénových nosičov antibiotík**

**Analysis of Effect of Cross-Linking Conditions on Mechanical Properties and  
Degradability of Nanofibrous Collagen Carriers of Antibiotics**

Diplomová práca

Študijný program: Strojne inžinierstvo

Študijný odbor: Biomechanika a lekárske prístroje

Vedúci práce: Ing. Tomáš Suchý, Ph.D.

**Bc. Ján Kužma**



## I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Kužma** Jméno: **Ján** Osobní číslo: **370768**  
Fakulta/ústav: **Fakulta strojní**  
Zadávající katedra/ústav: **Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky**  
Studijní program: **Strojní inženýrství**  
Studijní obor: **Biomechanika a lékařské přístroje**

## II. ÚDAJE K DIPLOMOVÉ PRÁCI

Název diplomové práce:

**Analýza vlivu podmínek síťování na mechanické vlastnosti a degradabilitu nanovláknenných kolagenových nosičů antibiotik**

Název diplomové práce anglicky:

**Analysis of the Effect of Cross-Linking Conditions on Mechanical Properties and Degradability of Nanofibrous Collagen Carriers of Antibiotics**

Pokyny pro vypracování:

1. Proveďte literární rešerši na téma nosičů antibiotik se zaměřením na polymerní nanovláknenné systémy.
  2. Navrhněte a realizujte experimentální analýzu mechanických vlastností nanovláknenných vrstev síťovaných za různých podmínek.
  3. Navrhněte optimální složení a postup přípravy, a analyzujte jejich degradabilitu v simulovaném tělním prostředí, zpracujte a interpretejte získané výsledky.
- Rozsah grafických prací: cca 10 stran  
Rozsah průvodní zprávy: 50 stran

Seznam doporučené literatury:

1. FRATZL, Peter. Collagen: structure and mechanics. New York: Springer, 2008.
2. SUCHÝ, Tomáš, et al. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2016, 105, 1288-1294.
3. MELOUN, Milan a MILITKÝ, Jiří. Statistická analýza experimentálních dat. Vyd. 2., upr. a rozš. Praha: Academia, 2004.

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) diplomové práce:

**Ing. Tomáš Suchý Ph.D., ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky FS**

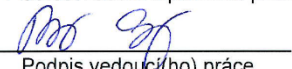
Jméno a pracoviště druhé(ho) vedoucí(ho) nebo konzultanta(ky) diplomové práce:

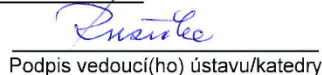
**doc. Ing. Lukáš Horný Ph.D., ústav mechaniky, biomech.a mechatr. FS**

Datum zadání diplomové práce: **21.10.2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **20.01.2017**

Platnost zadání diplomové práce: \_\_\_\_\_

  
Podpis vedoucí(ho) práce

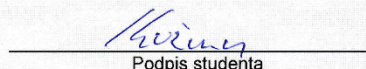
  
Podpis vedoucí(ho) ústavu/katedry

  
Podpis děkana(ky)

## III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

Diplomant bere na vědomí, že je povinen vypracovat diplomovou práci samostatně, bez cizí pomoci, s výjimkou poskytnutých konzultací. Seznam použité literatury, jiných pramenů a jmen konzultantů je třeba uvést v diplomové práci.

27.10.2016  
Datum převzetí zadání

  
Podpis studenta



## Anotačný list

Meno Autora: Ján Kužma

Názov diplomovej práce: Analýza vplyvu podmienok sieťovania na mechanické vlastnosti a degradabilitu nanovláknenných kolagénových nosičov antibiotík

Anglicky názov: Analysis of Effect of Cross-Linking Conditions on Mechanical Properties and Degradability of Nanofibrous Collagen Carriers of Antibiotics

Rok: 2017

Odbor štúdia: Biomechanika a lekárske prístroje

Ústav: Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky

Vedúci práce: Ing. Tomáš Suchý, Ph.D.

Konzultant práce: doc. Ing. Lukáš Horný, Ph.D.

Bibliografické údaje: počet strán - 66

Počet obrázkov - 45

Počet tabuliek - 8

Kľúčové slova: systémy nosičov liečiv, degradačné produkty, polymérne nosiče liečiv, farmakokinetika, protiinfekčnosť

Key words: drug delivery systems, degradation products, polymeric drug delivery systems, pharmacokinetics, anti-infectives

Anotácia: Táto diplomová práca sa zaoberá vplyvom rôznych sieťovacích podmienok na mechanické a štruktúrne vlastnosti elektrostaticky zvlákneneho kolagénu (typu I) s riadeným uvoľňovaním antibiotík. Mechanické vlastnosti boli vyhodnotené jednoosou ťahovou skúškou a štruktúrne vlastnosti boli analyzované pomocou analýzy obrazu SEM. Navyše, boli vykonané degradačné testy.

Abstract: The aim of this diploma thesis was to verify the effect of different cross-linking conditions on mechanical and structural properties of electrospun collagen (type I) mats with the controlled release of antibiotics. Mechanical properties were evaluated by means of conducting the uniaxial tensile tests. Structural properties were analyzed by means of an image analysis of scanning electron microscope. Furthermore, degradation tests were carried out.



## **Pod'akovanie**

Ďakujem predovšetkým Ing. Tomášovi Suchému PhD. za prijatie, múdre vedenie a vecné pripomienky pri jej spracovaní.

Ďakujem tiež doc. Ing. Lukášovi Hornému za vedenie ochotu a pomoc.

### Prehlásenie

Prehlasujem, že som tuto diplomovú prácu vypracoval samostatne s tým, že jej výsledky môžu byť ďalej použité podľa uváženia vedúceho diplomovej práce ako jej spoluautora. Súhlasím tiež s prípadnou publikáciou výsledkov diplomovej práce alebo jej podstatnej časti, pokiaľ budem uvedený ako spolu autor.

Dňa 25.1.2017

Podpis





# Obsah

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 1.     | Úvod a ciele prace .....                             | 13 |
| 2.     | Teoretická časť .....                                | 14 |
| 2.1.   | Osteomyelitída.....                                  | 14 |
| 2.2.   | Protimikrobiálne povlaky, vrstvy a nosiče .....      | 15 |
| 2.3.   | Metalické povlaky .....                              | 15 |
| 2.4.   | Organosilanové vrstvy .....                          | 15 |
| 2.5.   | Lokálne nosiče .....                                 | 16 |
| 2.6.   | Biologicky nerozložiteľné materiály .....            | 16 |
| 2.7.   | Biologicky rozložiteľné materiály .....              | 17 |
| 2.8.   | Účel povrchovej vrstvy.....                          | 18 |
| 2.9.   | Kolagén.....   | 18 |
| 2.10.  | Spracovanie kolagénu - nanovlákná .....              | 20 |
| 2.11.  | Elektrostatické zvlákňovanie (electrospinning) ..... | 21 |
| 2.12.  | Electrospinning pomocou kapiláry .....               | 21 |
| 2.13.  | Sieťovanie .....                                     | 22 |
| 3.     | Experimentálna časť .....                            | 25 |
| 3.1.   | Označenie a príprava vzoriek .....                   | 25 |
| 3.1.1. | Príprava nanovláknenných vrstiev .....               | 25 |
| 3.1.2. | Zosieťovanie kolagenových nanovláknien .....         | 25 |
| 3.2.   | Mechanická skúška.....                               | 26 |
| 3.2.1. | Experimentálne vybavenie.....                        | 26 |
| 3.2.2. | Príprava vzorku pre umiestnenie do trhačky.....      | 27 |
| 3.2.3. | Ťahová skúška.....                                   | 27 |
| 3.3.   | Štatistické vyhodnotenie .....                       | 28 |
| 3.4.   | Vyhodnotenie mechanickej skúšky .....                | 28 |
| 3.4.1. | Rozmery vzorku.....                                  | 28 |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| 3.4.2.    | Napätie v ťahu.....   | 29 |
| 3.4.3.    | Pomerne predĺženie.....   | 29 |
| 3.4.4.    | Grafický výstup.....  | 30 |
| 3.4.5.    | Dotyčnica v počiatku .....  | 32 |
| 3.5.      | Degradačný test .....   | 32 |
| 4.        | Výsledky.....   | 34 |
| 4.1.      | Vyhodnotenie dát podlá koncentrácií .....                             | 34 |
| 4.2.      | Vzorky sieťovane po dobu 24 hodín .....                               | 35 |
| 4.3.      | Vzorky sieťovane po dobu 72 hodín .....                               | 37 |
| 4.4.      | Vzorky sieťovane po dobu 168 hodín .....                              | 39 |
| 4.5.      | Vyhodnotenie podlá doby sieťovania .....                              | 41 |
| 4.6.      | Vzorky sieťovane pri teoretickej koncentrácii .....                   | 42 |
| 4.7.      | Vzorky sieťovane pri dvojnásobnej koncentrácii ako je teoretická..... | 44 |
| 4.8.      | Vzorky sieťovane pri polovičnej koncentrácii ako je teoretická .....  | 46 |
| 4.9.      | Štruktúra .....   | 48 |
| 4.10.     | Degradácia .....  | 50 |
| 4.10.1.   | Vyhodnotenie podľa koncentrácie .....                                 | 50 |
| 4.10.1.1. | Vzorky sieťovane po dobu 24 hodín.....                                | 51 |
| 4.10.1.2. | Vzorky sieťovane po dobu 72 hodín.....                                | 52 |
| 4.10.1.3. | Vzorky sieťovane po dobu 168 hodín.....                               | 53 |
| 4.10.2.   | Vyhodnotenie podlá doby sieťovania .....                              | 54 |
| 4.10.2.1. | Vzorky sieťovane pri teoretickej koncentrácii.....                    | 54 |
| 4.10.2.2. | Vzorky sieťovane pri dvojnásobnej koncentrácii ako je teoretická..... | 55 |
| 4.10.2.3. | Vzorky sieťovane pri polovičnej koncentrácii ako je teoretická .....  | 56 |
| 5.        | Diskusia.....   | 57 |
| 5.1.      | Vnútorá štruktúra.....  | 57 |
| 5.2.      | Mechanické vlastnosti .....   | 58 |

|      |                                  |    |
|------|----------------------------------|----|
| 5.3. | Degradácia .....                 | 58 |
| 5.4. | Celkove vyhodnotenie .....       | 59 |
| 6.   | Záver.....                       | 60 |
| 7.   | Zoznam použitej literatúry ..... | 61 |
| 8.   | Zoznam tabuliek.....             | 63 |
| 9.   | Zoznam obrázkov.....             | 64 |

## 1. Úvod a ciele prace

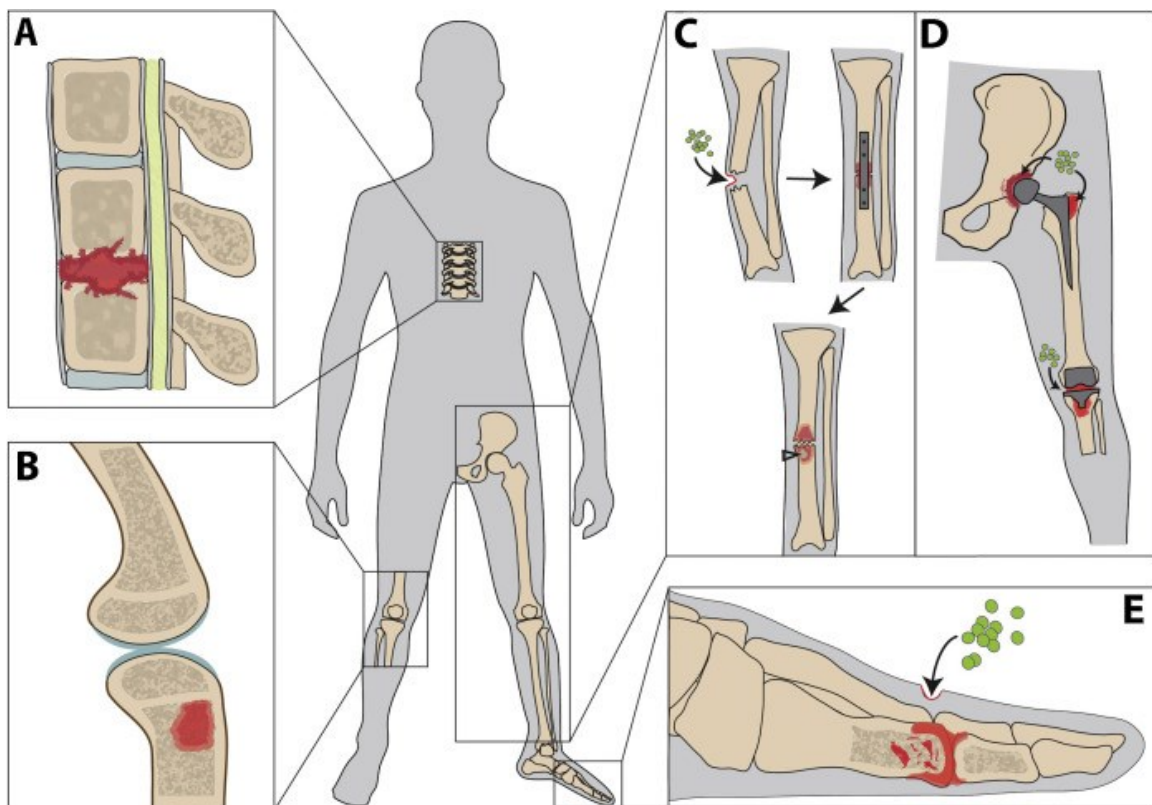
Infekcia pohybového systému predstavuje závažný problém v traumatológii a chirurgii, najme pri implantáciách endoprotéz. Jedným zo spôsobov, ako zvýšiť účinnosť liečby, je používať lokálnu aplikáciu antibiotík. Lokálna antibiotická liečba pri protetickej infekcii kĺbu, na rozdiel od použitia systémových antibiotík, má tu výhodu, že dosiahneme vysokej koncentrácie antibiotika, ktorá presahuje minimálnu inhibičnú koncentráciu (MIC) bez zvýšenia úrovne systémovej toxicity. Lokálne nosiče antibiotík používané v oblasti ortopédie sú klasifikované podľa zloženia ako syntetické a prírodné polyméry, keramiky, kompozitné materiály a kostne štepy. Očakáva sa, že taký lokálny nosič sa použije pravé v prípade známych infekcií protetických kĺbov, alebo ako preventívny postup. Cieľom tejto práce je vývoj kompozitnej nano-štruktúrovanej vrstvy, ktorá bude poskytovať medzi kosťou a implantátom (titánovej zliatiny) bioaktívne rozhranie, čo zrýchli proces hojenia, ktorý bude schopný vyplnenia kostných defektov, a bude pôsobiť ako silné antibakteriálne činidlo proti mikroorganizmom citlivých na vankomycin. Vrstva je vyrobená z kolagénu typu I (izolovanej z teliacej kože) a hydrochloridu vankomycinu. Aplikácia kolagénu v oblasti tkanivového inžinierstva je obmedzená z dôvodu zlých mechanických vlastností, vysokej miere opuchu, nízkej štruktúrnej stability a nízkej odolnosti voči enzymatickej degradácii neupravenej formy kolagénu.

Cieľom experimentu popísaného v tejto práci bolo overiť účinok rôznych sieťovacích podmienok na mechanické a štruktúrne vlastnosti elektrostaticky zvlákneneho kolagénu. Tri rôzne koncentrácie etanolového roztoku N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimidu / N-hydroxysukcinimid (EDC / NHS) boli vybrané pre určenie optimálnych sieťovacích podmienok. Štruktúrne vlastnosti a rýchlosť degradácie boli podrobne skúmané a následne porovnané za účelom určenia optimálnych sieťovacích podmienok, ďalej boli hodnotené mechanické vlastnosti pomocí jednoosých ťahových skúšok.

## 2. Teoretická časť

### 2.1. Osteomyelitída

Toto ochorenie zahŕňa široké spektrum mechanizmov s tromi všeobecne uznávanými kategóriami: hematogénne šírenie krvou, súvislú kontamináciu a cievne alebo neurologicky pribudnú infekciu [1]. Charakteristiky každej kategórie je možné zhrnúť takto: (1) Primárne hematogénne šírenie baktérie postihuje predovšetkým metaphysis zo skeletu nedospelých pacientov alebo stavcov u všetkých vekových kategórií, aj keď sa infekcia môže objaviť i na iných miestach [2]. (2) Infekcia sa môže šíriť z infikovaného miesta na susedne štruktúry, najčastejšie je možné vidieť priamu kontamináciu baktériami pri otvorených zlomeninách alebo endoprotézach. (3) Vaskulárne alebo neurologické nedostatočnosti, osteomyelitída pri zlom krvnom zásobovaní, diabetické rány, strata ochrannej citlivosti a zmena imunitného systému, ktoré spravidla ovplyvňujú dolnej končatiny.



Obrázok 1 Diagram ukazuje tri kategórie osteomyelitídy. (A a B) Primárne hematogénne (krvou) šírenie baktérií postihuje hlavne telá stavcov u všetkých vekových skupín alebo metaphysis zo skeletu nedospelých pacientov. (C a D) Susediace kostnej infekcie je najčastejšie [3].

Základom liečby osteomyelitídy je, ako u iných bakteriálnych infekcií, dlhodobé podávanie antibiotík, minimálne po dobu 4 týždňov, väčšinou však až 8 týždňov. Pravidelne sa odoberajú vzorky na posúdenie účinnosti liečby a dôležitá je aj starostlivosť o vytvorené rany. Končatina je dočasne znehybnená a pri trvalých bolestiach sú podávané lieky na ich zmiernenie. Po vyliečení je nutné znehybnenú končatinu znovu rozhybať a odporučiť pacientovi rehabilitačnú liečbu.

## **2.2. Protimikrobiálne povlaky, vrstvy a nosiče**

### **2.3. Metalické povlaky**

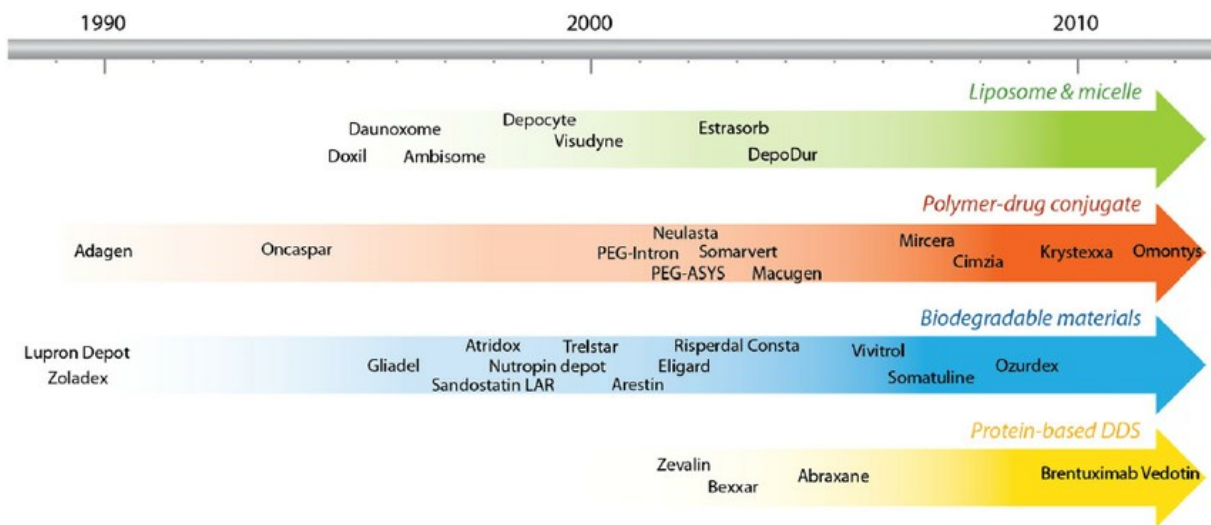
Bolo preukázané, že ióny striebra reagujú s tiolovú skupinou v enzýmoch a deaktivujú ich, čo vedie k bunecnej smrti [4]. Tieto ióny môžu inhibovať oxidačné enzýmy, ako sú napríklad kvasinky alkoholdehydrogenázou [5]. Bolo tiež preukázané, že ióny striebra interagujú s DNA zvýšením pyrimidinovej dimerizácie podľa fotodynamickej reakcie a prípadne zabráni replikácii DNA.

### **2.4. Organosilanové vrstvy**

Organosilanové vrstvy vytvoria nanopovlak, ktorý je vysoko abrazívny pre vírusy, baktérie, huby a ktorá je neškodna pre človeka, ale roztrhne vonkajšej membrány mikróbov, ktoré sa snažia pripojiť k povrchu. Jedná sa o mechanické pôsobenie, ku ktorému nemôže existovať žiadna imunita. [6] Organosilany zanechajú trvalý netoxický povlak, ktorý účinkuje s alebo bez svetla. Organosilany nemajú vplyv na DNA mikróbov, a tak nepredstavujú ohrozenie pri dlhodobej expozícii. Zabránenie mikróbov aby sa naviazali na povrchu ošetrených organosilanmi znemožňuje mikróbov kolonizovať povrch. Organosilany je možné použiť na mäkkom i tvrdom povrchu, takže tento antimikrobiálny povlak môže byť rovnako použitý na oblečenie, koberce a steny. Organosilany môže byť zmiešaný s kvartérnymi amóniami, aby sa dosiahlo rýchleho zabitia mikróbov a ponechanie dlhodobého antimikrobiálneho povlaku.

## 2.5. Lokálne nosiče

Nosné systémy majú široké uplatnenie, ako médium pre lokálnu dodávku antibiotík, využívajú sa experimentálne a klinicky pre liečbu osteomyelitídy. Ich veľkou výhodou je schopnosť poskytovať trvalé vyššie koncentrácie liečiva v mieste infekcie [7] a tiež zamedzenie nožnej toxicity v dôsledku systémovom podaní antibiotika. Koncentrácia antibiotika môže byť lokálne zvýšená viac ako desaťkrát v porovnaní s intravenózne aplikovaným antibiotikom.



Obrázok 2 Časová os ukazuje schválenie a príchod daného nosiča na trh [8]

Vývoj nanočastic využívaných ako nosiče liečiv alebo iných látok do špecifických typov buniek (napríklad rakovinových buniek) je jednou z aplikácií nanotechnológií v medicíne. Častice sú navrhnuté tak, že sú priťahované do chorej bunky, čo umožňuje priamu liečbu týchto buniek. Táto technika redukuje poškodenie zdravých buniek v tele a umožňuje skoršiu detekciu ochorenia.

## 2.6. Biologicky nerozložiteľné materiály

Cementové guľôčky napustené antibiotikom sa používajú pri liečbe mäkkých tkanív a kostných infekcií už posledných niekoľko desaťročí. V roku 1984 to bol prvýkrát použitý profylakticky proti hlbokéj kostnej infekcii v endoprotetickej ortopedickej chirurgii u človeka. Je používaný ako účinná alternatíva pre udržateľnú vysokú úroveň uvoľňovania antibiotík v lokálnom mieste pre liečbu infekcie spojenéj s kostným a mäkkým tkanivom. Najčastejšie sa



na tento účel používa Polymethylmethakrylát (PMMA) z ktorého sú antibiotikom potiahnuté cementové koráliky [9]. PMMA je k dispozícii v dvoch formách, perličkové cementy a korálikové reťaze impregnované antibiotikom, ktoré sa používajú pri infekciách kĺbov a pohybového aparátu, v danom poradí. PMMA nespúšťa v hostiteľovi žiadnu imunitnú reakciu, a preto neexistuje žiadna šanca precitlivenej reakcie. Pre ovplyvnenie uvoľňovania liečiva, sa využívajú rôzne metódy. Najužitočnejšiu metódou je aplikovať dextrans alebo polyetylén glykol na zvýšenie morozity guľčiek, čím sa zvyšuje koncentrácia antibiotík ako povlaku. Aj veľkosť guľčiek je dôležitým určujúcim faktorom pre elúciu liečiv. Menšia veľkosť perličiek spôsobuje lepšie vymývanie z dôvodu väčšieho pomeru plochy k objemu. Okolité prostredie, tkanivá a kvapaliny majú tiež vplyv na uvoľňovanie liečiva. Nevýhodou je, že uvoľňovanie antibiotika z PMMA je malo efektívne

## 2.7. Biologicky rozložiteľné materiály

Môžeme ich rozdeliť do troch skupín proteíny, kostné štepy a náhradky, syntetické polyméry. Existujú druhy biologických látok v skupine proteínov ktoré sa skladajú z biologicky rozložiteľných elementov ako je napríklad: kolagén, želatína, trombín a autológne krvné zrazeniny môžu byť použité na cementovanie kosti. Avšak ich použitie je veľmi obmedzené pri liečbe infekcii vyskytujúcich sa v ortopédii. Tieto materiály poskytujú vystuž okolo štepu a slúžia k obmedzeniu toku tekutiny a poskytujú základ pre proteín viažuci sa na antibiotikum a tým je zaistené, že koncentrácia liečiva jej trvalé udržaná v prostredí. Materiály na báze kolagénu sa obvykle izolujú z kože alebo šliach zvierat a môžu zabezpečiť dostatočnú stimuláciu regenerácie kostného tkaniva. Vzhľadom k tomu, že kolagén sa vyskytuje takmer vo všetkých orgánoch, aj ako elementárna súčasť spojivového tkaniva, je biologicky žiaduci so štepom v hostiteľskom organizme a neindukuje žiadnu toxicitu.

Na kostný štep môže byť antibiotikum pridané pomocou priameho primiešavania vo forme prášku do štepu alebo môže byť kostný štep priamo ponorený do roztoku antibiotík. Využívajú sa materiály ako kalcium fosfáty vo forme hydroxyapatitu, fosforečnanu vápenatého alebo síranu vápenatého [10 a 11].

Biologicky odbúrateľné polyméry sú často považované za alternatívu k proteínovým nosičom pre lepšiu stabilitu *in vivo*. Odbúrateľnosť by mohla byť nástrojom pre riadenie rýchlosti uvoľňovania liečiva. Najčastejšie sa pre vývoj lokálnych nosičov liečiv využíva kyselina poly-mliečna (PLA), kyselina poly-glykolová (PGA) a ich kopolyméry, poly-laktid-

ko-glykolid (PLGA) z dôvodu ich biologickej rozložiteľnosti, bio-kompatibility a jednoduchosti spracovania [12].

Tieto materiály sa dajú s výhodami aplikovať ako povrchové vrstvy implantátov, pretože titan a jeho zliatiny, ktoré sa používa v zdravotníctve majú dobrú biokompatibilitu a mechanické vlastnosti no nemajú bioaktívne povrchové vlastnosti. Hlavne kvôli tomu a ich biokompatibilite a osteokonduktívnym vlastnostiam sa bežne používajú ako poťahové materiály [13].

## **2.8. Účel povrchovej vrstvy**

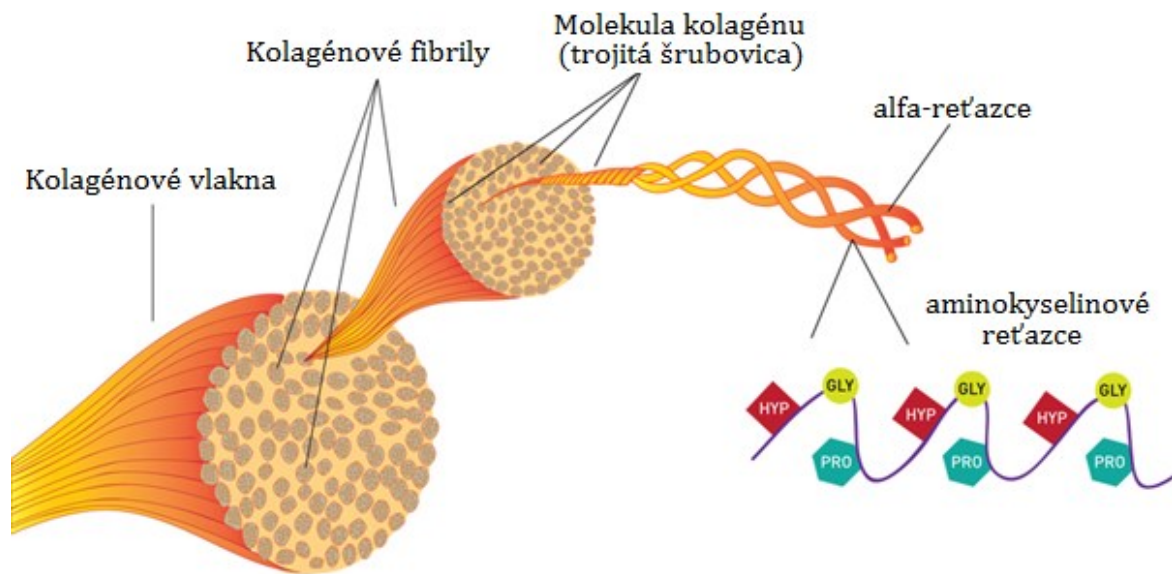
V roku 1987, ortopedický chirurg Anthony G. Gristina použil termín "preteky o povrch" na popis osudu biomateriálu po implantácii [14]. Tento termín popisuje preteky medzi mikrobiálnou adhéziou a rastom biofilmu na implantáte oproti povrchovej integrácii tkaniva. V prípade, že tieto preteky vyhrajú tkanivové bunky, potom tkanivo pokryje povrch, ktorý je následne menej náchylný k vzniku bakteriálnych kolónii. V opačnom prípade ak tieto preteky vyhrajú baktérie, vytvoria na povrchu biofilm, ktorý zhorší možnosti spojenia tkaniva s implantátom pre bakteriálnu virulenciu a toxínom. Tkanivové bunky sú v mnohých prípadoch znevýhodnené, pretože baktérie sa na implantát dostanú ešte počas manipulácie alebo implantácie

Účelom povrchovej vrstvy je zabrániť vzniku infekcie asociovanej s biomateriálmi (používa sa anglická skratka BAI), ktoré predstavujú vážnu komplikáciu. V priemere sa BAI vyskytuje v približne 0,5-6% prípadov [15] vo veľkej závislosti na mieste implantovania alebo poranenia. Pri takejto infekcii vznikne na povrchu implantátu biofilm, ktorý zabraňuje hostiteľskému imunitnému systému a liečbe antibiotikami. U väčšiny prípadov následkom takejto infekcie dochádza k odstráneniu implantátu. Zabrániť vzniku biofilmu je možné pomocou lokálneho prekročenia inhibičnej koncentrácie pre daný mikrobiálny kmeň, ktorú docielime napríklad naviazaním vankomycínu na degradibilnú kolagénu vrstvu, ktorej rozpadom sa bude antibiotikum lokálne vylučovať v dostatočnej miere aj po dostatočne dlhú dobu.

## **2.9. Kolagén**

Kolagén je skleroprotein extracelulárny, vo vode nerozpustná bielkovina tvoriaca základ spojivových, teda väzív, chrupaviek a kosti. Tvorí 25-30% všetkých proteínov v tela

cicavcov, 70% kože, spolu tvorí okolo 10% celkovej hmotnosti. V súčasnosti je známych 28 rozdielnych typov.



Obrázok 3 Štruktúra kolagénových vlákien [16]

## Typy kolagénu

Jednotlivé typy kolagénu sa líšia usporiadaním aminokyselín v polypeptidových reťazcoch. Tieto zmeny sa prejavujú predovšetkým v stupni polymerizácie a agregácie molekúl. V ľudskom tele je najviac zastúpených 11 skupín kolagénu.

**Kolagén typu I** je najrozšírenejším kolagénom v organizme. Fibrily tvoria silné vlákna a zväzky vlákien, ktoré už môžu byť videné voľným okom. Tento typ kolagénu sa nachádza v šľachách, v väzoch, v kostiach, v koži, v puzdrách oranou a v riedkomy väzive.

**Kolagén typu II** sa vyskytuje hlavne v bunecnej hmote hyalinnej a elastickej chrupavky.

**Kolagén typu III** je podobný typu I, ale obsahuje viac proteoglykanov a glykoproteinov. Vlákna sú voľnejšie a menej pravidelne usporiadané ako vlákna kolagénu I. Retikulárne vlákna poskytujú oporu mäkkým, poddajným tkanivám – napr. hladkým svalovým bunkám, nervovým vláknám, adipocytom. Retikulárne vlákna ďalej nachádzame v hemopoetických tkanivách a v retikulárnej lamine bazálnych lamín epitelov.

**Kolagén typu IV** netvorí organizované štruktúry fibril, alebo vlákien. Nachádza sa v oblasti bazálnych lamín.

**Kolagén typu V** je príbuzný typu IV a nachádza sa v vonkajších laminách svalových buniek, adipocytov a gliových buniek.

**Kolagén typu VI** je tiež príbuzný typu IV. Vyskytuje sa v intersticiálnom tkanive.

**Kolagén typu VII** tvoria kotviace fibrily, ktoré spevňujú spojenie dermi a epidermy. Je podobný typu II.

**Kolagén typu X** sa nachádza v matrix, ktorá obklopuje hypertrofické chondrocyty v chrupavke rastové platničky v miestach, kde bude vznikáť kosť.

**Kolagény typu IX a XI** sa nachádza v chrupavke spolu s typom II.

## 2.10. Spracovanie kolagénu - nanovlákná

Jednou z perspektívnych metód spracovania kolagénu je elektrostatické zvlákňovanie. Týmto spôsobom je možné pripraviť nanostrukturované materiály alebo povrchové vrstvy, ktorých morfológia je vhodná z pohľadu adhézie a rastu buniek, pretože napodobuje prirodzenú štruktúru extracelulárnej matrice, ktorý je telu vlastný. V praxi sú považované za nanovlákná také vlákna, ktorých priemer sa pohybuje v rozmedzí desiatok až stoviek nanometrov. Hranice veľkosti priemeru vlákien, ktoré by mohli byť zaradené medzi nanovlákná, sa líši podľa názoru rôznych autorov. Najčastejšie sa v literatúre stretávame s definíciou, že sa, v prípade nanovláken, jedná o vlákna s priemerom menším ako 1  $\mu\text{m}$ . Trochu prísnejšie vymedzenie hranice pre označenie vlákien ako nanovlákná môže byť použité pre vlákna, ktorých priemer je menší ako 100 nm.

Spôsobov prípravy nanovláken je mnoho, sú založené na niekoľkých princípoch. Medzi laboratórne spôsoby prípravy patrí ich ťahanie z kvapôk roztokov a pretlačovanie zvlákňovacími tryskami. Medzi komerčné metódy môžeme zaradiť rozfukovanie taveniny (melt blown), odstredivé zvlákňovanie a elektrostatické zvlákňovanie (elektrospinning), ktoré ďalej popíšem v tejto práci.

## **2.11. Elektrostatické zvlákňovanie (electrospinning)**

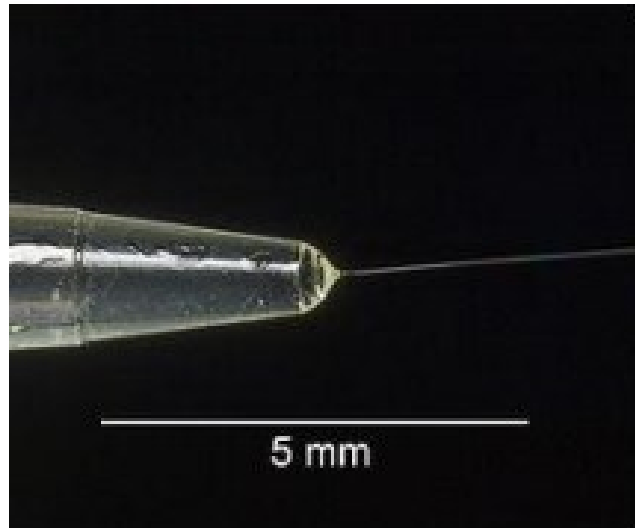
Elektrospining je stará metóda prvýkrát pozorovaná v 1897 Rayleightom. Od roku 1934 do 1944, Formhal publikoval sériu patentov popisujúcich experimentálne nastavenia na produkciu polymérových vlákien s použitím elektrostatickej sily [17]. Taylor (1969) vo svojej práci položil základy elektrostatického zvlákňovania elektricky poháňaným prúdom.

Pri elektrostatickom zvlákňovaní sa využíva vodivosť polymérnych roztokov a tavenín a ich formovanie pôsobením elektrostatického poľa. Vzniknuté vlákna sú za pôsobenia elektrostatického poľa deponované na podložku. Tou býva najčastejšie textilný materiál, ktorý sa pohybuje po povrchu uzemnenej elektródy.

## **2.12. Electrospinning pomocou kapiláry**

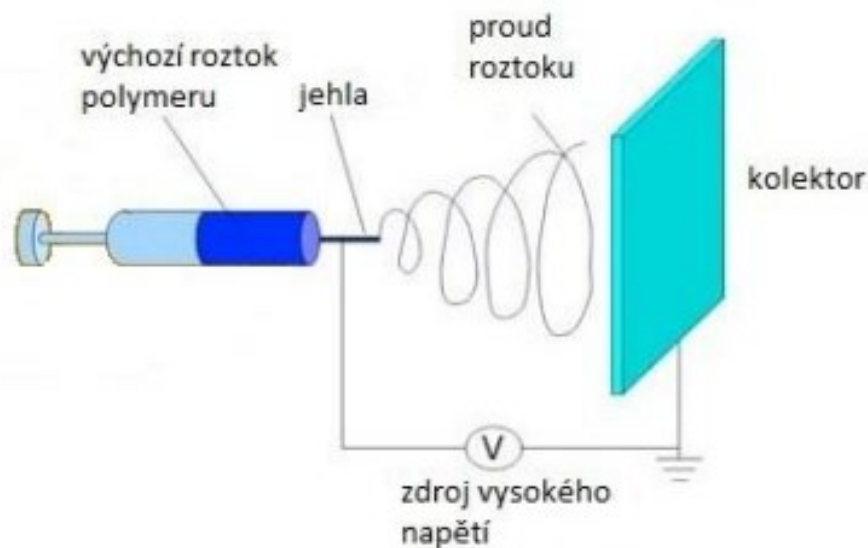
Zvlákňovanie prebieha medzi dvoma elektródami. Prvá z nich má podobu kapiláry, na ktorú je privedené vysoké napätie. Vnútram tejto kapiláry je vytlačovaný roztok polyméru, ktorý je tak v priamom kontakte s elektródou. Na špičke kapiláry vzniká tzv. Taylorov kužeľ. Aby bol udržaný jeho kužeľovitý tvar, musí rýchlosť, s akou je kvapalina od kapiláry odťahovaná odpovedať rýchlosti, s akou je kvapalina vháňaná do kapiláry. Prúd polyméru od napájanej k uzemňujúcej elektróde však môže pokračovať i vtedy, ak by došlo k skroteniu kužeľa. Cestou k uzemnenej elektróde sa odparuje rozpúšťadlo a tvorí sa nabité submikrónové vlákno, ktoré sa následne usadzuje na povrchu materiálu umiestneného pred uzemnenou elektródou.

Pomocou elektrospiningu je možné spracovať v podstate všetky rozpustné, alebo taviteľné polyméry. Pre tvorbu vlákien je lepšia skôr menšia viskozita taveniny. Vďaka tomu, že majú všetky vlákna v elektrickom poli rovnaký náboj, majú tendenciu sa vrstviť na miesto s čo najmenším množstvom vláknitej hmoty. Tak je zaistená pomerne vysoká plošná rovnomernosť. Priemer vznikajúcich vlákien je potom ovplyvnený mnohými faktormi. Je to napríklad vzdialenosť elektród, už spomenutá koncentrácia, viskozita a povrchové napätie roztoku alebo mierou odparovania roztoku zo vznikajúcich vlákien (afinita rozpúšťadla) pred tým, než dopadnú na podložku. V rôznych výskumných strediskách, zaoberajúcich sa elektrostatickým zvlákňovaním, sa používali i rôzne roztoky polymérov a tiež rôzne výrobné zariadenia, aj keď len s minimálnymi rozdielmi. V niektorých prípadoch je kapilára umiestená zvisle a polymérny roztok z nej postupne vyteká vplyvom gravitácie.



Obrázok 4 Taylorov kužeľ na kapiláre [18]

Vlákná získane z kvapaviek vytvárajúcich sa na konci kapiláry sa usadzujú na kolektore. Inokedy môže byť kapilára naklonená do definovaného uhlu z dôvodu kontroly toku. Ďalšou variantnou je horizontálne umiestnenie kapiláry. Pre vytláčovanie polyméru z horizontálnej kapiláry je potom potreba použiť čerpadlo. To je možné použiť pre rýchlejší priebeh i u vertikálneho alebo iného podávania. Elektróda je vložená buď priamo do roztoku, alebo je umiestnená na špičke kapiláry.



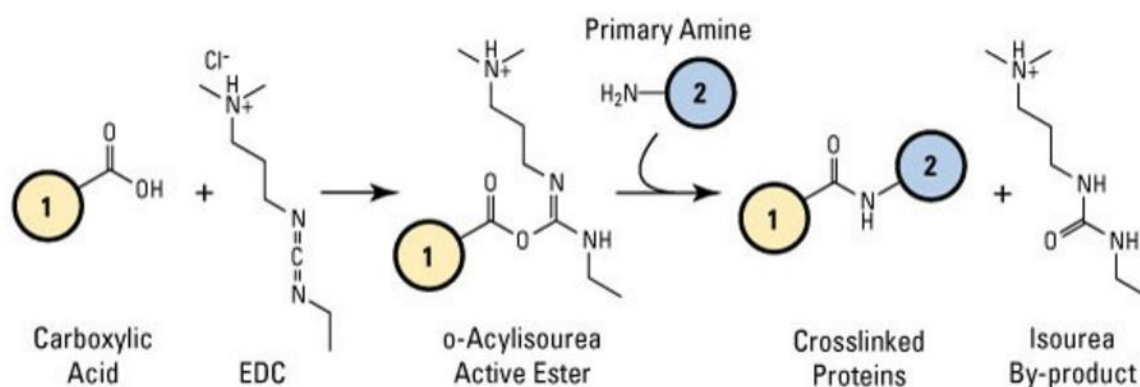
Obrázok 5 Schéma elektrospiningu z kapiláry [19]

### 2.13. Siet'ovanie

V natívnej forme je možné rozpustiť iba agregáčnej formy kolagénu, ktoré ešte neobsahujú intermolekulárne priečne väzby [20]. Nerozpustný kolagén je možné rozpustiť po predchádzajúcej úprave pri ktorej sa rozštiepi časť intermolekulárnych priečných väzieb.

Taktiež sa ukázalo, že vlákna vytvorené elektrostatickým zvlákňovaním sú nestabilne vo vodnom prostredí a preto je nevyhnutne ich zosieťovať a znovu vytvoriť priečne väzby aby bolo docielená stabilizácia týchto vlákien [21].

Sieťovanie je proces chemického spojenia dvoch alebo viacerých molekúl kovalentnou väzbou. Modifikácia zahŕňa pripojenie alebo štiepenie chemických skupín, čím sa získa zmena rozpustnosti alebo inej vlastnosti pôvodnej molekuly. Proteíny sú relatívne jednoduché molekuly na manipuláciu, a sieťovanie proteínov a metódy chemickej modifikácie sa používajú pre určenie úlohy jednotlivých postranných reťazcov aminokyselín na fyzikálne, chemické a biologické vlastnosti proteínov. Napriek zložitosti štruktúry proteínov, vrátane zloženia s 20 rôznych aminokyselín, iba malý počet funkčných skupín proteínov predstavuje cieľ pre praktické metódy sieťovania.



Obrázok 6 Schéma sledovacej reakcie pomocou EDC/NHS [22]

Biomateriály na báze bielkovín môžu byť sieťované s cieľom posilniť ich mechanické vlastnosti a enzymatickú odolnosť. Princíp reakcie sieťovania sa opiera o modifikáciu amidických a karboxylových skupín v rámci molekuly kolagénu, aby vznikla kovalentná väzba. Bolo vyvinutých niekoľko metód pre sieťovanie bielkovín. Tieto techniky sú rozdelené do troch typov: fyzikálne, chemické a enzymatické sieťovanie.

Kolagén je hlavnou bielkovinou spojivových tkanív a hlavnou zložkou pokožky. Kolagén sa hojne používa ako biomateriál pre regeneráciu tkanív a implantácie. Chemické metódy používané na sieťovanie biomateriálov na báze kolagénu sú všestrannejšie. Používanie aldehydov ako sú formaldehyd a glutaraldehyd (GA) bolo značne rozšírené v posledných rokoch. GA bola najviac používaná a študovaná chemická látka slúžiaca na sieťovanie biomateriálov na báze kolagénu a boli u nej preukázane cytotoxické efekty. Ďalšia trieda

chemických látok používaných na zvýšenie mechanickej a enzymatickej rezistencie kolagénnych scaffoldov sú karbodiimidy. Skupina izokyanátov, najmä hexametylén diizokyanáty sa tiež používa na sieťovanie kolagénnych biomateriálov. Genipin, chemické sieťovadlo odvodené z rastlinného zdroja, vykazuje zaujímavý potenciál nahradenia GA vďaka svojej nízkej toxicite, ale je finančne veľmi nákladne.



### 3. Experimentálna časť

#### 3.1. Označenie a príprava vzoriek

##### 3.1.1. Príprava nanovlákných vrstiev

Vrstvy boli pripravené elektrostatickým zvlákňovaním 8%hm. roztoku kolagénu (kolagén typu I izolovaný z teliacej kože, VUP Medical, ČR), v PBS/EtOH (1/1 objemovo), do ktorého bol pridaný PEO v množstve 8%hm. na hmotnosť samotného kolagénu. Vzhľadom k aplikácii finálovej vrstvy, ako nosiča antibiotík, bol do roztoku pridaný vankomycínu (Mylan S.A.S., Francie), a to ako 10% hmotnosti kolagénu a PEO. Zvlákňovanie prebiehalo na zariadení 4Spin (Contipro a.s., ČR) v elektrickom poli v rozmedzí 200 – 300 kV.m<sup>-1</sup> z ihly. Pre zvýšenie stability kolagénu ho ďalej bola potreba zosieťovať.

##### 3.1.2. Zosieťovanie kolagenových nanovlákn

Na zosieťovanie kolagenových vlákien boli vybrané chemické činidlá, menovite EDC a NHS v overenom hmotnostnom pomere 4/1 (EDC/NHS). Teoretická koncentrácia činidiel voči kolagénu bola stanovená na základe zastúpenia jednotlivých aminokyselín s voľnými funkčnými skupinami pre reakciu s EDC a na základe predchádzajúcich experimentov. Teoretická koncentrácia EDC/kolagén: 5g/8g. Mimo teoretické koncentrácie bola ďalej použitá koncentrácia polovičná a dvojnásobná, viz Tab. 1. Cieľom je overenie miery zosieťovania kolagenových vlákien na základe analýz jeho fyzikálne-chemických vlastností.

Tabuľka 1 Použité koncentrácie činidiel na celkovú hmotnosť použitých vrstiev označenie vzoriek

| ozn.         | hmotnosť [g] | EDC [g]            | NHS [g] | poznámky                            |
|--------------|--------------|--------------------|---------|-------------------------------------|
| Original (1) | 0,1262       | <i>nesieťovaný</i> |         | <i>Stav pred zosieťovaním</i>       |
| II           | 0,3023       | 0,1889             | 0,0472  | <i>teor. koncentrácia podľa AMK</i> |
| III          | 0,1241       | 0,1552             | 0,0388  | <i>2 x teoretická koncentrácia</i>  |
| IV           | 0,1974       | 0,0617             | 0,0154  | <i>½ x teoretická koncentrácia</i>  |

#### Vlastný priebeh sietovania

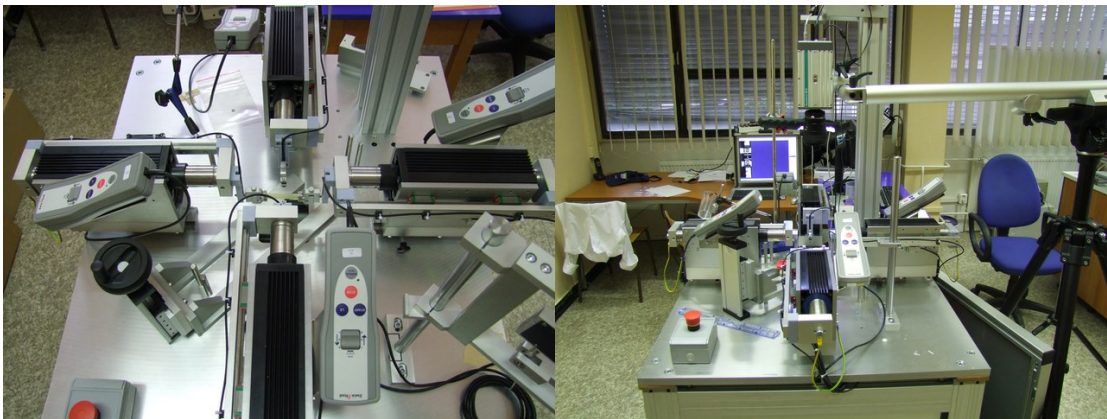
1. 24hod. lúhovanie v roztoku EDC/NHS v 95%EtOH v inkubátore pri 37°C
2. premývanie zosieťovaných vzoriek v 0,1M roztoku Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (20min)
3. premývanie v demi H<sub>2</sub>O (2x20min)
4. zamrazenie na -20°C medzi separačnými fóliami (12hod)
5. lyofilizácia do konštantnej hmotnosti (24hod)

## 3.2. Mechanická skúška

Vplyv spôsobu prípravy kompozitu na jeho mechanické vlastnosti bol vyhodnotený pomocou jednoosej ťahovej skúšky. Sledovane boli tieto veličiny: medze pevnosti, počiatočný modul pružnosti a ťažnosť materiálu.

### 3.2.1. Experimentálne vybavenie

Biaxiálny skúšobný stroj pre mechanické testovanie mäkkého tkaniva a elastomérov. Laboratórium biomechaniky človeka je vybavené skúšobným strojom pre jedno/dvojosé (ťahové a tlakové) namáhanie Zwick/Roell primárne určeným k zisťovaniu mechanických vlastností mäkkých tkanív (tepien, žíl, chlopní, väziva, kože ap.) a elastomérov. V zásade je skúška uskutočniteľná s rovinnými vzorkami všetkých materiálov, pre ktoré sú relatívne sily do 250N.



Obrázok 7 Snímky trhačky

Bola teda použitá jednoosá ťahová skúška s monotónnym kvazistatickým zaťažením vzoriek. Na meranie posuvu bol použitý interný videoextenzometer (Zwick/Roell). Silové snímače mali merací rozsah -250 až +250 newtonov (U9B HBM Data sheet). Dáta sa následne zaznamenávali do excelového súboru. Na riadenie posuvu boli použité elektro-mechanické aktuátory s možným posuvom až 70 milimetrov každým aktuátorom s rýchlosťou od 0 až do 30 mm/s a rozlíšením 1 $\mu$ m. Vzorkovacia frekvencia systému bola 500 Hz a maximálnou frekvenciu záznamu dát na výstupe 20Hz. Vzorky boli rovinné približne o veľkosti 40x10mm.

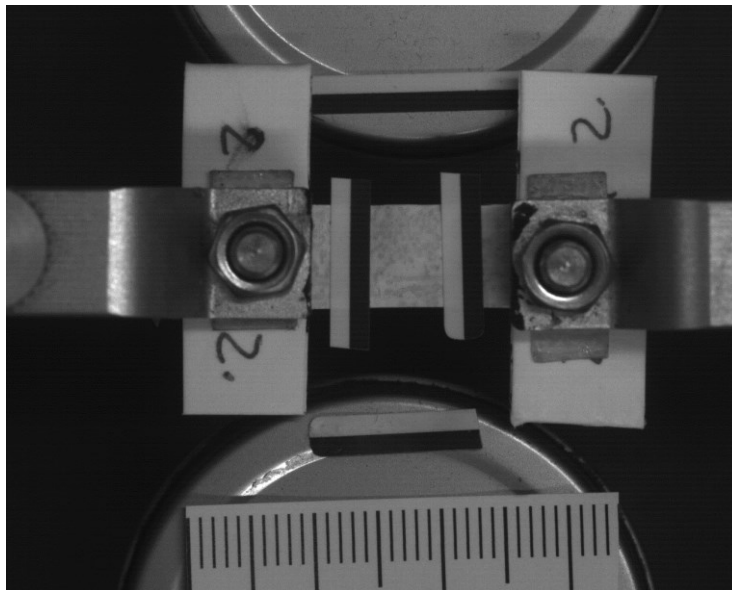
### 3.2.2. Príprava vzorku pre umiestnenie do trhačky

Každá vzorka bola pred meraním odфотографovaná s identifikačným štítkom v blízkosti orientačnej stupnice. Posuvným meradlom sa na troch rôznych miestach v prostrednej tretine odmerala hrúbka vzorku.

Kvôli rovnomernému rozloženiu síl a lepšiemu uchyteniu do čeľustí trhačky, sa na oba konce vzorky prilepili sekundovým lepidlom prúžky tvrdého papiera. Na jednu stranu vzorky sme pridali kontrastne značky ktoré rozpozná kamerový senzor deformácie. Tým bola vzorka pripravená na umiestnenie do trhačky.

### 3.2.3. Ťahová skúška

Vzorka sa umiestnila do trhačky, a overil sa kontrast značiek na povrchu vzorky. Ak senzory správne rozpoznali vertikálne značky, mohla skúška začať.



Obrázok 8 Ukážka ťahovej skúšky

Samotná skúška trvala v priemere okolo 15 sekúnd a bola ukončená z pravidla niekoľko sekúnd po roztrhnutí vzorku. Údaje boli zaznamenávané s frekvenciou 20Hz teda každých päť stotín sekundy. Výstupom bola tabuľka dát v programe Excel.

#### Dáta

- sila na prvej z čeľustí trhačky
- sila na druhej z čeľustí trhačky
- zmena vzdialenosti medzi kontrastnými značkami

Po ukončení skúšky a vyňatí z trhačky sme oba fragmenty pôvodného vzorku označili, aby ich bolo možné neskôr spárovať kvôli meraniu hrúbky, a uložili k príslušnej skupine z ktorej daná vzorka pochádzala.

### 3.3. Štatistické vyhodnotenie

Štatisticky významné rozdiely boli skúmané najmä pomocou neparametrických metód v programe Statgraphics (Centurion XV, StatPoint, USA). K overeniu normality bol použitý Shapiro-Wilkov test, na porušenie homoskedasticity Bartlettov test. Potom Kruskal-Wallisov neparametrický test a následne Mann-Whineyho post-hoc test (M-W). Všetky analýzy variácie boli vykonané na úrovni spoľahlivosti 95% (hodnoty  $p < 0,05$  bola považovaná za významnú). Výsledné hodnoty sú v práci vynesené v krabicových grafoch, kde je medián znázornený čiarou vo vnútri krabice a aritmetický priemer červeným krížom v krabici. Veľkosť krabice je daná 25% a 75% kvartilom. Fúzy krabice udávajú 1,5 násobok medzikvartilového rozpätia (IQR) odčítaného alebo pripočítaného k hodnote 25% alebo 75% kvartilu. Ďalej sú v krabicovom grafe uvádzané tiež samostatné body (odľahlé hodnoty), ktoré sa do tohoto rozpätia nevošli, pokiaľ sú až za trojnásobkom IQR, jedná sa o extrémne odchýlky.

### 3.4. Vyhodnotenie mechanickej skúšky

#### 3.4.1. Rozmery vzorku

Šírku vzorku sme odmerali pomocou fotografií s vysokým rozlíšením z trhačky. Mierka bola spočítaná pomocou odmerania počtu pixelov na stupnici o dĺžke desať centimetrov. Toto meranie sme opakovali päťkrát a spriemerovali. Následne bola určená mierka  $k$  [pixel/mm] ktorá bola použitá k prepočtu na milimetre.

Šírku vzorku sme odmerali z fotografií v pixeloch. Meranie sme opakovali trikrát a nakoniec spriemerovali do jednej hodnoty.

$$\bar{w} = \frac{\sum_{i=1}^n i k}{n} [mm]$$

Hrúbka vzorky bola odmeraná prístrojom Mitutoyo Litematic Series 318 (Mitutoyo, Japonsko) s definovanou prítlačnou silou 0,01N, pre celú skupinu vzoriek na trinástich rôznych miestach a hodnoty sme spriemerovali.

$$\bar{h} = \frac{\sum_{i=1}^n i}{n} [mm]$$

Plocha v reze bola následne získaná pre násobením výšky a šírky.

$$\bar{s} = \bar{w} \cdot \bar{h} [mm^2]$$

### 3.4.2. Napätie v ťahu

Ako prvé boli spriemerované výstupné dáta z čeľustí trhačky, aby sme získali priemernú hodnotu sily ktorá pôsobila na vzorku.

$$\bar{F} = \frac{F_1 + F_2}{2} [N]$$

Následne sa určilo napätie v ťahu.

$$\bar{\sigma} = \frac{\bar{F}}{\bar{s}} [MPa]$$

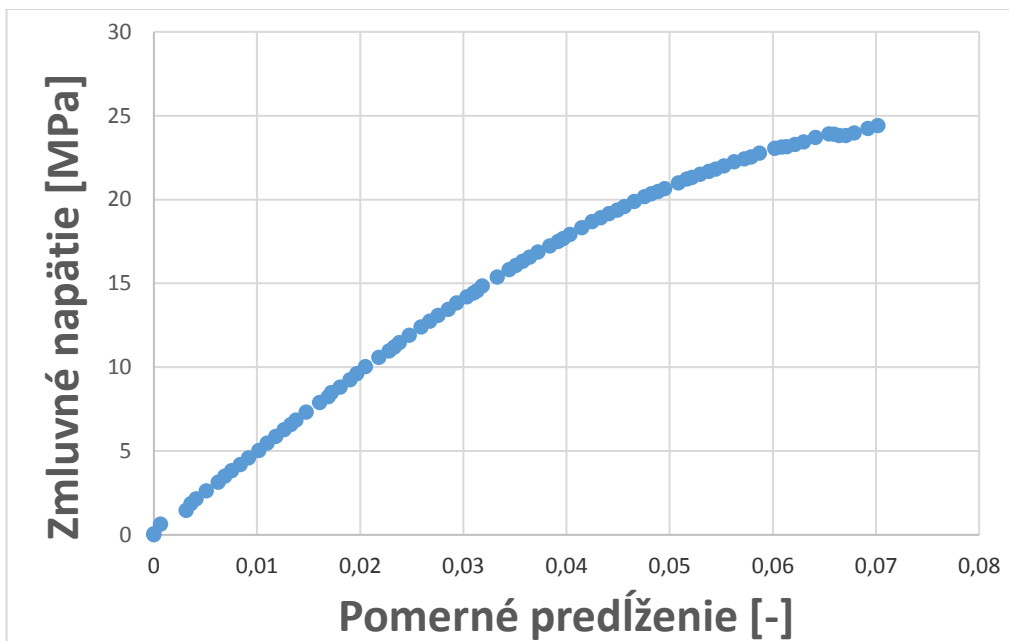
### 3.4.3. Pomerne predĺženie

Predĺženie pri namáhaní v pomere k pôvodnej dĺžke.

$$\varepsilon = \frac{l}{l_0} - 1 [-]$$

### 3.4.4. Grafický výstup

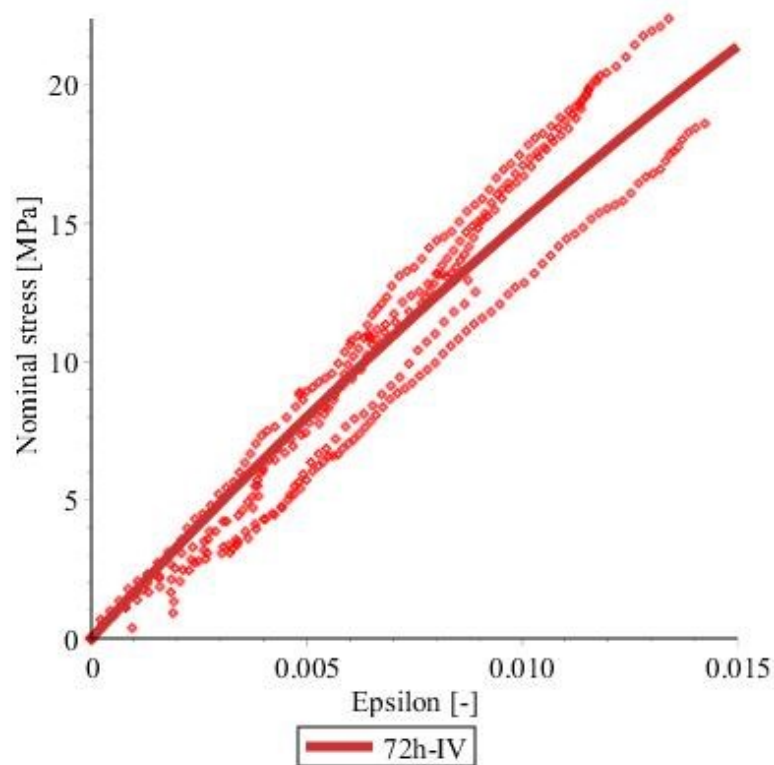
Graf pomerného predĺženia a zmluvného napätia. Pre vytvorenie grafu bolo potrebné odfiltrovať šum pred začiatkom skúšky a po deštrukcii vzorku. Graf teda začína až keď rastie sila  $F$  a zároveň deformácia  $l$ .



Obrázok 9 Ukážka grafu

Bol vytvorený spoločný graf pre každú skupinu vzoriek pre ktorý sa potom navrhol model ktorý by najlepšie odpovedal pozorovaniu. Model bol vybraný na základe dvoch kritérií. Za prvé tak aby sa modelom predpokladane hodnoty nachádzali približne uprostred nameraných dát a razantne sa nevychýľoval mimo pozorovanie. A za druhé aby sa koeficient determinácie blížil čo najviac 1.

$$R^2 = 1 - \frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum(y_i - \bar{y})^2}$$



Obrázok 10 Ukážka grafu hodnôt a modelovej krivky

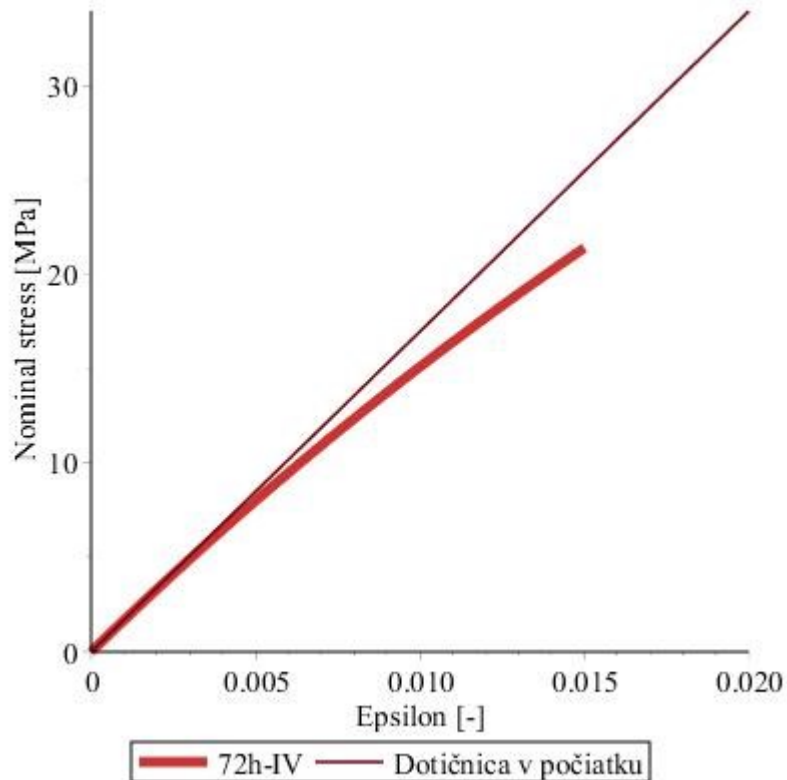
kde  $\hat{y}$  je použitý model,  $y_i$  hodnoty závislej premennej,  $\bar{y}$  je priemer premennej

$$f(x) = 71.147 - 71.147e^{-23.852x}$$

$$R^2 = 0.9199$$

### 3.4.5. Dotyčnica v počiatku

Dotyčnicu v počiatku získame ako deriváciu v bode  $x=0$



Obrázok 11 Ukazka grafu modelu a jeho doticnice v pociatku

$$f'(x) = a - a \cdot e^{-bx}$$

### 3.5. Degradáčny test

Stupeň narušenia štruktúry kolagénu bol porovnaný na základe stanovenia obsahu voľných primárnych aminoskupín v produktoch degradácie, ktoré boli postupne uvoľňované do roztoku.

Nanovlákná vrstva o hmotnosti 125 mg vo forme ústrižku o ploche 3-5 mm<sup>2</sup> bol pridaný do 25ml soľného roztoku s fosfátovým tlmivom (SIGMA: 0,0027 M KCl; 0,137 M NaCl; 0,01 M fosfátový pufer). Uzavreté nádoby s roztokom boli umiestnené do inkubátoru s teplotou 37°C. Roztok bol vzorkovaný po 2, 6 a 24 hodinách a ďalej po 4, 10, 15 a 30 dňoch. Z počiatku boli odberané 2 ml roztoku, neskôr bolo vzorkovanie upravené podľa predpokladaného obsahu aminoskupín.



Postup stanovení voľných primárnych aminoskupín pozostával z 2 ml analyzovaného roztoku do ktorého boli pridané 2 ml 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> a 1 ml vodného 0,01% roztoku TNBS (SIGMA) a zmes bola v tmavej liekovke vo vodnom kúpeli zahrievaná po dobu 2 hodiny na teplotu 40°C. Potom bol pridaný 1 ml 10% roztoku dodecylsulfátu sodného (SIGMA) a 0,5 ml 1 M HCl a meraná absorbanca žltého produktu pri 340 nm (spektrofotometer Unicam UV 500). Za uvedených podmienok je závislosť absorbancie na obsahu aminokyselín značne nelineárne. Pokiaľ nemá byť porovnanie jednotlivých vzorkou kolagénu zakreslene, je nutné odoberať roztoky riediť a robiť kalibráciu postupu, aby bolo možné transformovať namorené absorbancie na koncentráciu aminoskupín. Kalibrácia bola urobená pomocou L-lysinu (SIGMA) a kyseliny L- $\alpha$ -amino-n-maslovej (Lachema). Obe aminokyseliny poskytujú obdobné výsledky, lysín je však pre svoju silnú hydrofobnosť menej vhodný.

## 4. Výsledky

Vyhodnotenie sme rozdelili do šiestich skupín, tri skupiny kde bola premenná koncentrácia sledovacieho činidla a tri skupiny kde sa menila doba sieťovania

### 4.1. Vyhodnotenie dát podľa koncentrácií

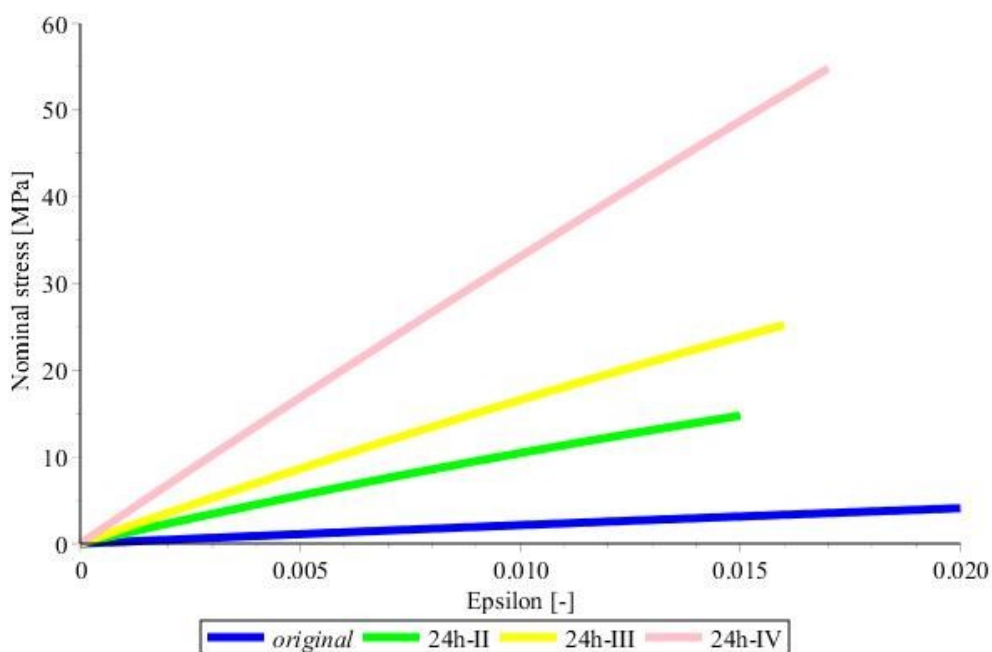
U týchto troch skupín bola doba sieťovania konštantná, a to u prvej skupiny 24 hodín, u druhej 72 hodín a u tretej 168 hodín. Premena bola koncentrácia sledovacieho činidla. Prvá vzorka je vždy referenčná, jedna sa teda o vzorku ktorá nebola zosieťovaná preto je onačená ako originálna (orig.). Druhá vzorka označená rímsky II. je vzorka sieťovaná pri teoretickej koncentrácii sledovacieho činidla, vzorka označená ako rímska III. bola sieťovaná pri dvojnásobnej koncentrácii a posledná vzorka označená ako rímska IV. bola sieťovaná pri polovičnej koncentrácii ako je teoretická koncentrácia vypočítaná na základe voľných aminokyselinových skupín.

Cieľom tejto skúšky bolo zistiť ako sa menia mechanické vlastnosti vzoriek v závislosti na koncentrácii sledovacieho činidla.

## 4.2. Vzorky sieťované po dobu 24 hodín

Všetky vzorky v tomto meraní s výnimkou referenčného (orig.) boli sieťované po dobu 24 hodín a líšia sa koncentráciou sledovacieho činidla.

Vyhodnotenie pozostáva z grafu nominálneho napätia oproti pomernému predĺženiu. Tabuľky hodnôt medzi pevnosti a elastického modulu pružnosti v počiatku a ich smerodajných odchýlok. A dvoch krabicových grafov, elastického modulu a medze pevnosti, na ktorých je tiež zobrazené či sa jednotlivé namerané dáta od seba štatisticky významne líšia.

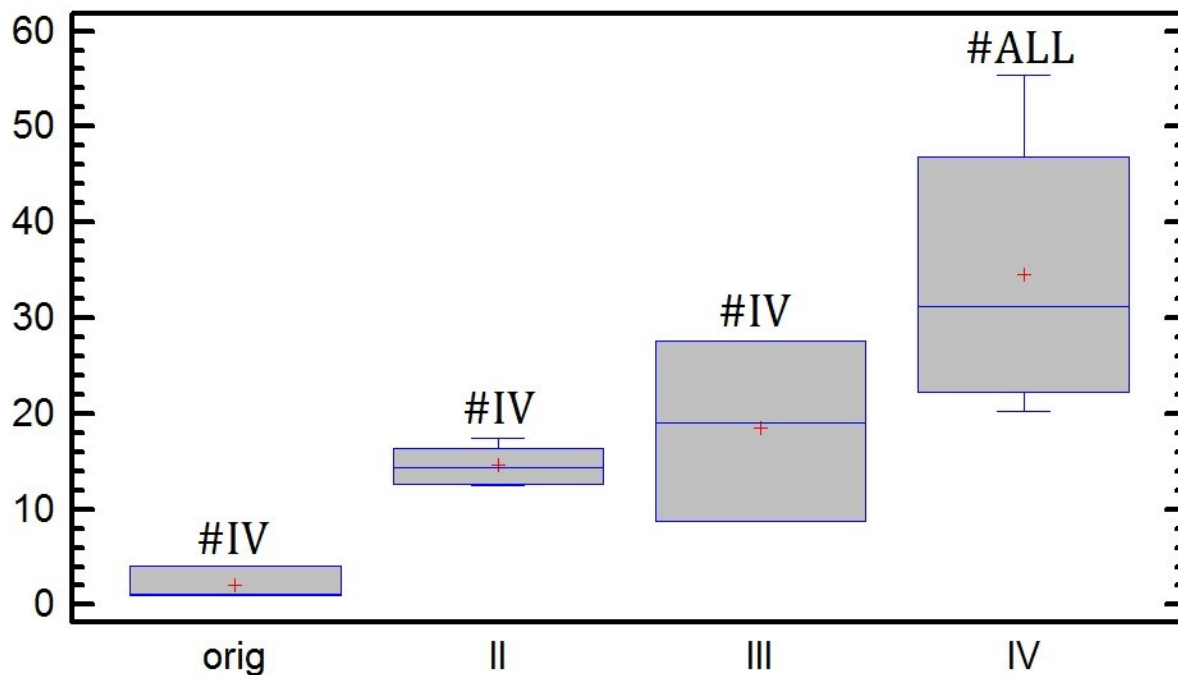


Obrázok 12 Graf zobrazujúci modely jednotlivých vzoriek pre vzorky sieťované po dobu 24 hodín

Tabuľka 2 Tabuľka medzi pevnosti a elastických modulov pružnosti

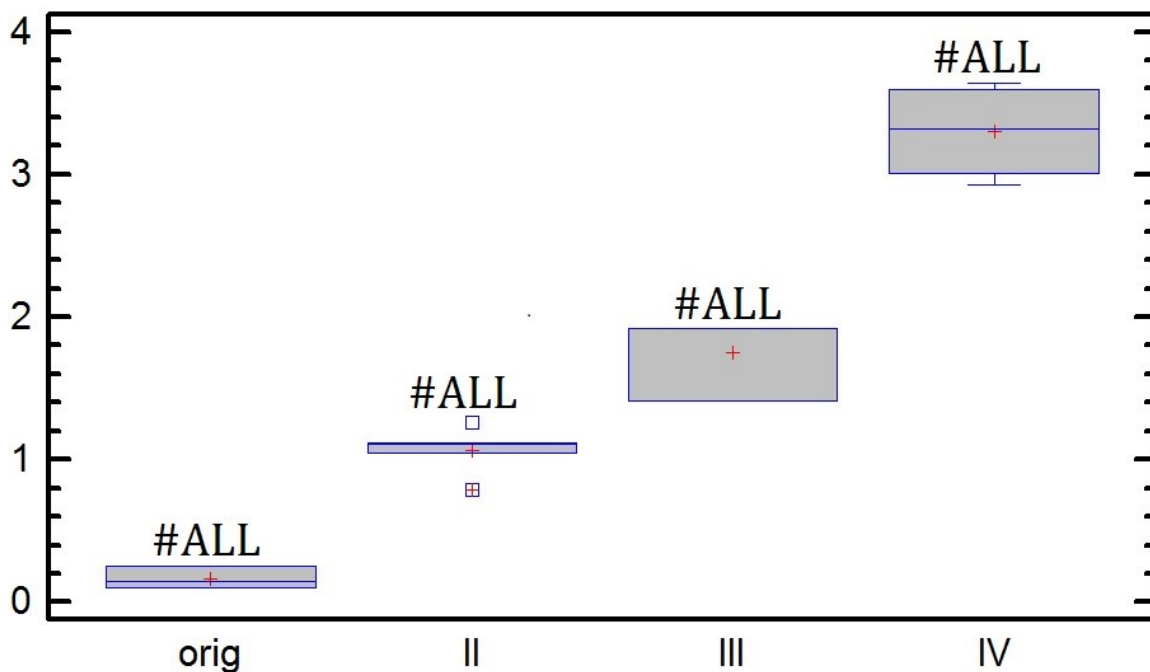
| Vzorka   | Medza pevnosti [MPa] | Smerodajná odchýlka [MPa] | Elastický modul [MPa] | Smerodajná odchýlka [MPa] |
|----------|----------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|
| orig.    | 2.06                 | 1.74                      | 165.07                | 77.88                     |
| 24h-II.  | 14.67                | 2.22                      | 1066.21               | 173.09                    |
| 24h-III. | 18.46                | 9.41                      | 1749.80               | 293.95                    |
| 24h-IV.  | 34.52                | 15.91                     | 3304.32               | 347.13                    |

## MEDZ PEVNOSTI [MPa]



Obrázok 14 Krabicový graf medze pevnosti pre vzorky ktoré boli sieťované 24 hodín. # označuje štatisticky významné rozdiely (Mann-Whitney test, 0,05).

## YOUNGOV MODUL PRUZNOSTI [GPa]

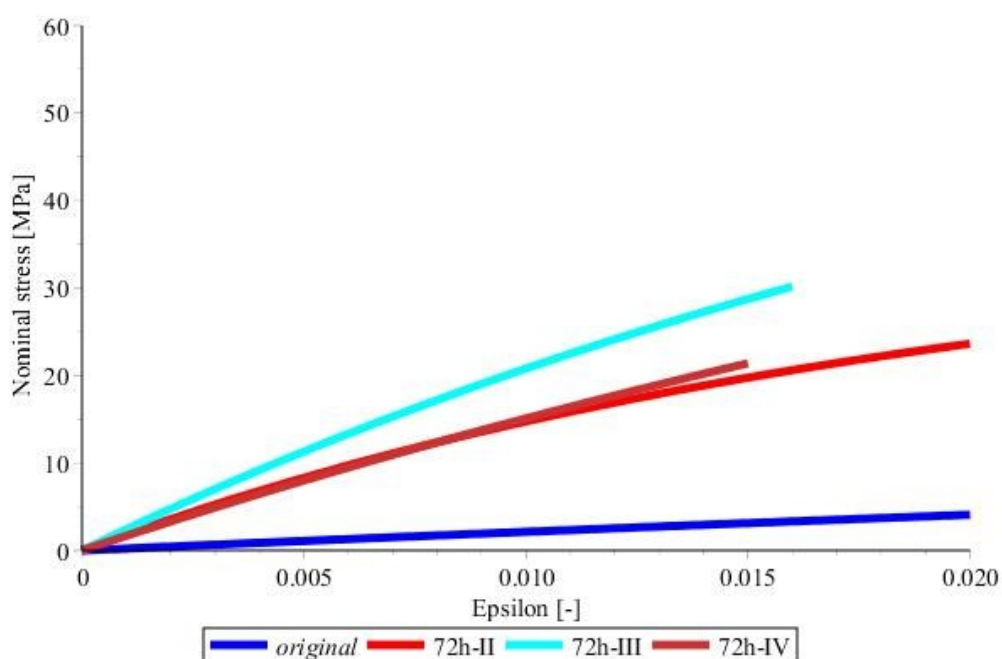


Obrázok 13 Krabicový graf Youngovho modulu pružnosti pre vzorky ktoré boli sieťované 24 hodín # označuje štatisticky významné rozdiely (Mann-Whitney test, 0,05).

### 4.3. Vzorky sieťované po dobu 72 hodín

Všetky vzorky v tomto meraní s výnimkou referenčného (orig.) boli sieťované po dobu 72 hodín a líšia sa koncentráciou sledovacieho činidla.

Vyhodnotenie pozostáva z grafu nominálneho napätia oproti pomernému predĺženiu. Tabuľky hodnôt medzi pevnosti a elastického modulu pružnosti v počiatku a ich smerodajných odchýlok. A dvoch krabicových grafov, elastického modulu a medze pevnosti, na ktorých je tiež zobrazené či sa jednotlivé namerané dáta od seba štatisticky významne líšia.

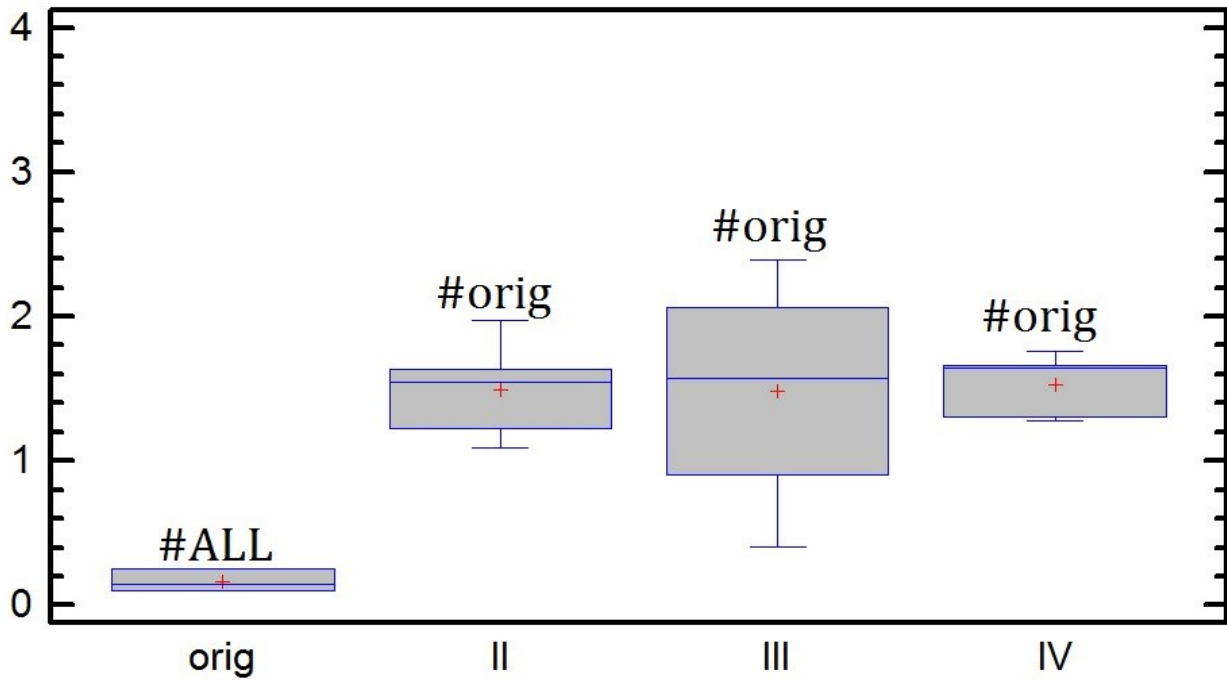


Obrázok 15 Graf zobrazujúci modely jednotlivých vzoriek pre vzorky sieťované po dobu 72 hodín

Tabuľka 3 Tabuľka medzi pevnosti a elastických modulov pružnosti

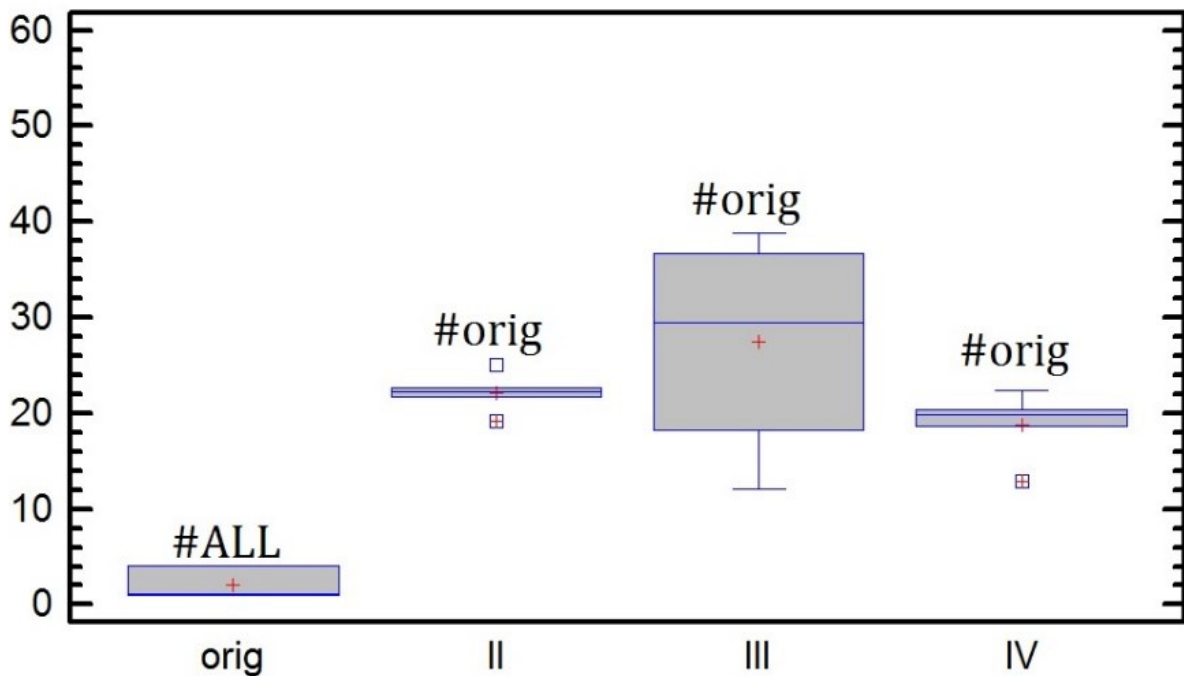
| Vzorka   | Medza pevnosti [MPa] | Smerodajná odchýlka [MPa] | Elastický modul [MPa] | Smerodajná odchýlka [MPa] |
|----------|----------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|
| orig.    | 2.06                 | 1.74                      | 165.07                | 77.88                     |
| 72h-II.  | 22.17                | 2.06                      | 1493.54               | 348.09                    |
| 72h-III. | 27.45                | 11.88                     | 1483.04               | 829.16                    |
| 72h.-IV. | 18.82                | 3.56                      | 1528.70               | 223.01                    |

## YOUNGOV MODUL PRUZNOSTI [GPa]



Obrázok 16 Krabicový graf Youngovho modulu pružnosti pre vzorky ktoré boli sieťované 72 hodín # označuje štatisticky významné rozdiely (Mann-Whitney test, 0,05).

## MEDZ PEVNOSTI [MPa]

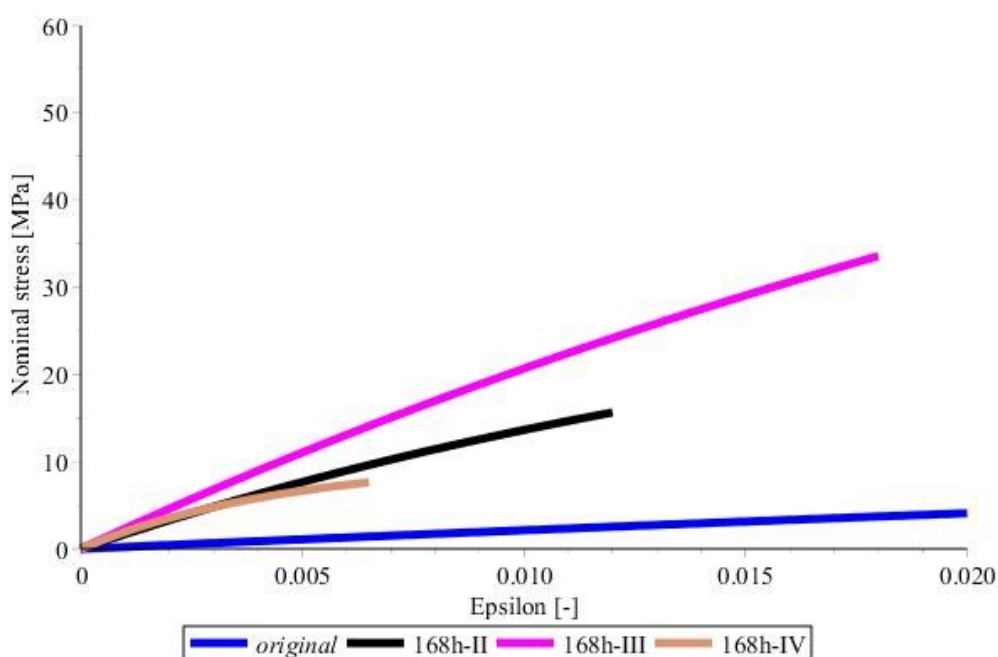


Obrázok 17 Krabicový graf medze pevnosti pre vzorky ktoré boli sieťované 72 hodín # označuje štatisticky významné rozdiely (Mann-Whitney test, 0,05).

#### 4.4. Vzorky sieťované po dobu 168 hodín

Všetky vzorky v tomto meraní s výnimkou referenčného (orig.) boli sieťované po dobu 168 hodín a líšia sa koncentráciou sledovacieho činidla.

Vyhodnotenie pozostáva z grafu nominálneho napätia oproti pomernému predĺženiu. Tabuľky hodnôt medzi pevnosti a elastický modulu pružnosti v počiatku a ich smerodajných odchýlok. A dvoch krabicových grafov, elastický modulu a medze pevnosti, na ktorých je tiež zobrazené či sa jednotlivé namerané dáta od seba štatisticky významne líšia.

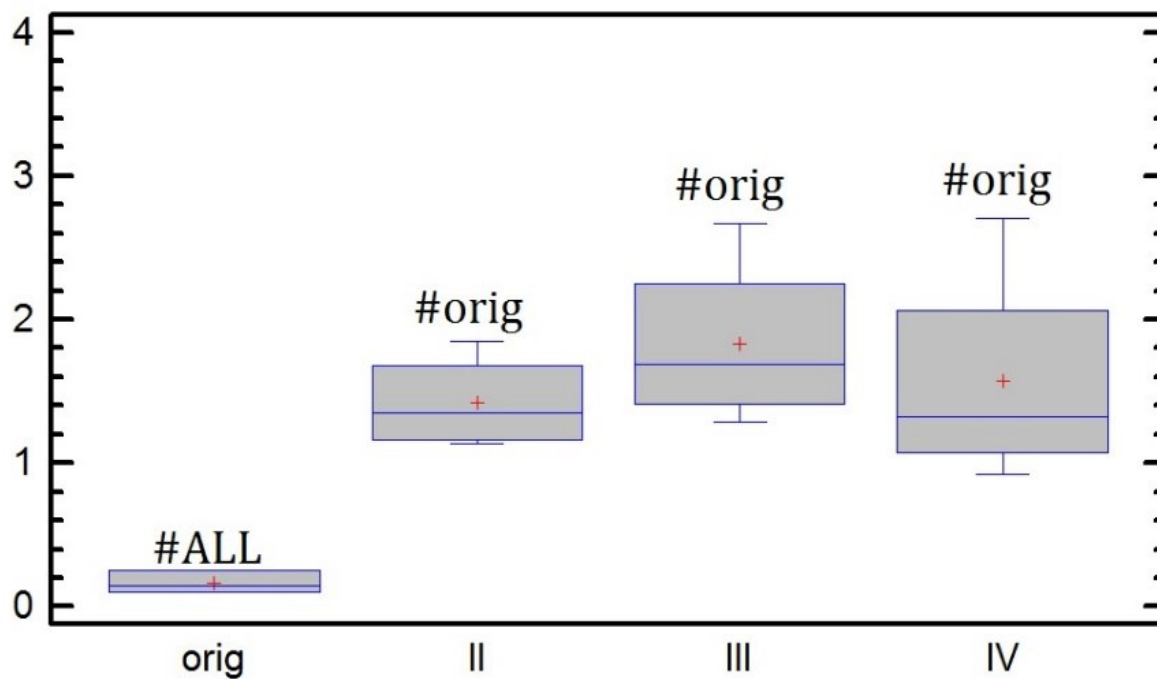


Obrázok 18 Graf zobrazujúci modely jednotlivých vzoriek pre vzorky sieťované po dobu 168 hodín

Tabuľka 4 Tabuľka medzi pevnosti a elastických modulov pružnosti

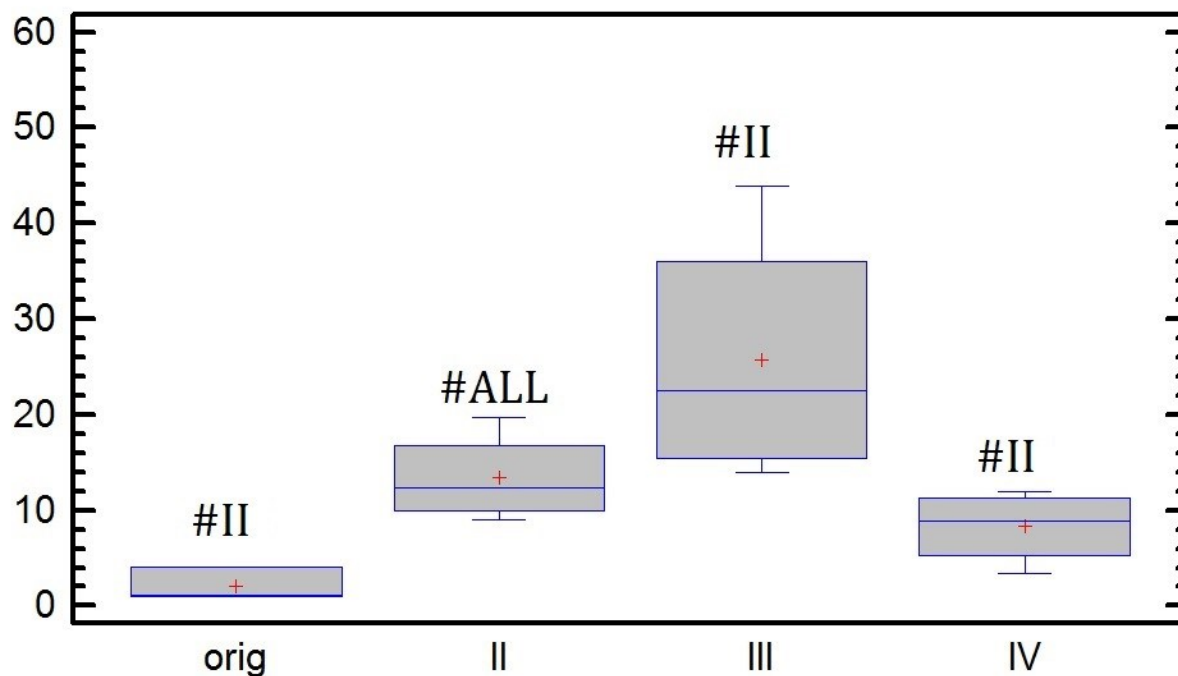
| Vzorka    | Medza pevnosti [MPa] | Smerodajná odchýlka [MPa] | Elastický modul [MPa] | Smerodajná odchýlka [MPa] |
|-----------|----------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|
| orig.     | 2.06                 | 1.74                      | 165.07                | 77.88                     |
| 168h-II.  | 13.36                | 4.70                      | 1421.15               | 329.20                    |
| 168h-III. | 25.76                | 13.54                     | 1834.08               | 601.59                    |
| 168h-IV.  | 8.28                 | 3.84                      | 1569.79               | 786.66                    |

## YOUNGOV MODUL PRUZNOSTI [GPa]



Obrázok 20 Krabicový graf Youngovho modulu pružnosti pre vzorky ktoré boli sieťovane 168 hodín # označuje štatisticky významné rozdiely (Mann-Whitney test, 0,05).

## MEDZ PEVNOSTI [MPa]



Obrázok 19 Krabicový graf medze pevnosti pre vzorky ktoré boli sieťovane 168 hodín # označuje štatisticky významné rozdiely (Mann-Whitney test, 0,05).



#### **4.5. Vyhodnotenie podlá doby sieťovania**

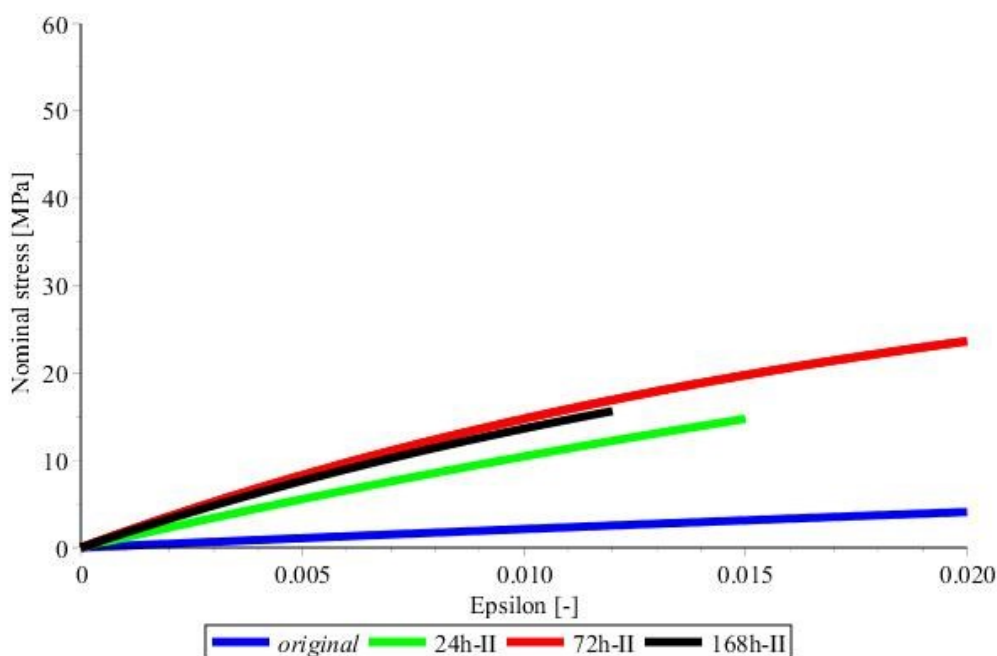
U týchto troch skupín bola koncentrácia sieťovacieho činidla konštantná, a to u prvej skupiny teoretická koncentrácia vypočítaná podlá voľných amonokyselinových skupín, u druhej dvojnásobná a u tretej polovičná koncentrácia oproti tejto teoretickej. Premena bola doba sieťovania. Prvá vzorka je vždy referenčná, jedna sa teda o vzorku ktorá nebola zosieťovaná preto je označená ako originálna (orig.). Druhá vzorka označená 24h je vzorka sieťovaná po dobu 24 hodín, vzorka označená ako 72h. bola sieťovaná po dobu 72 hodín a posledná vzorka označená ako 168h. bola sieťovaná po dobu 168 hodín.

Cieľom tejto skúšky bolo zistiť ako sa menia mechanické vlastnosti vzoriek v závislosti na dobe sieťovania pri konštantnej koncentrácii sledovacieho činidla.

## 4.6. Vzorky sieťovane pri teoretickej koncentrácii

Všetky vzorky v tomto meraní s výnimkou referenčného (orig.) boli sieťované pri konštantnej koncentrácii sieťovacieho činidla a to teoreticky vypočítanej na základe voľných aminokyselinách skupín.

Vyhodnotenie pozostáva z grafu nominálneho napätia oproti pomernému predĺženiu. Tabuľky hodnôt medzi pevnosti a Youngovho modulu pružnosti v počiatku a ich smerodajných odchýlok. A dvoch krabicových grafov, Youngovho modulu a medze pevnosti, na ktorých je tiež zobrazené či sa jednotlivé namerané dáta od seba štatisticky významne líšia.

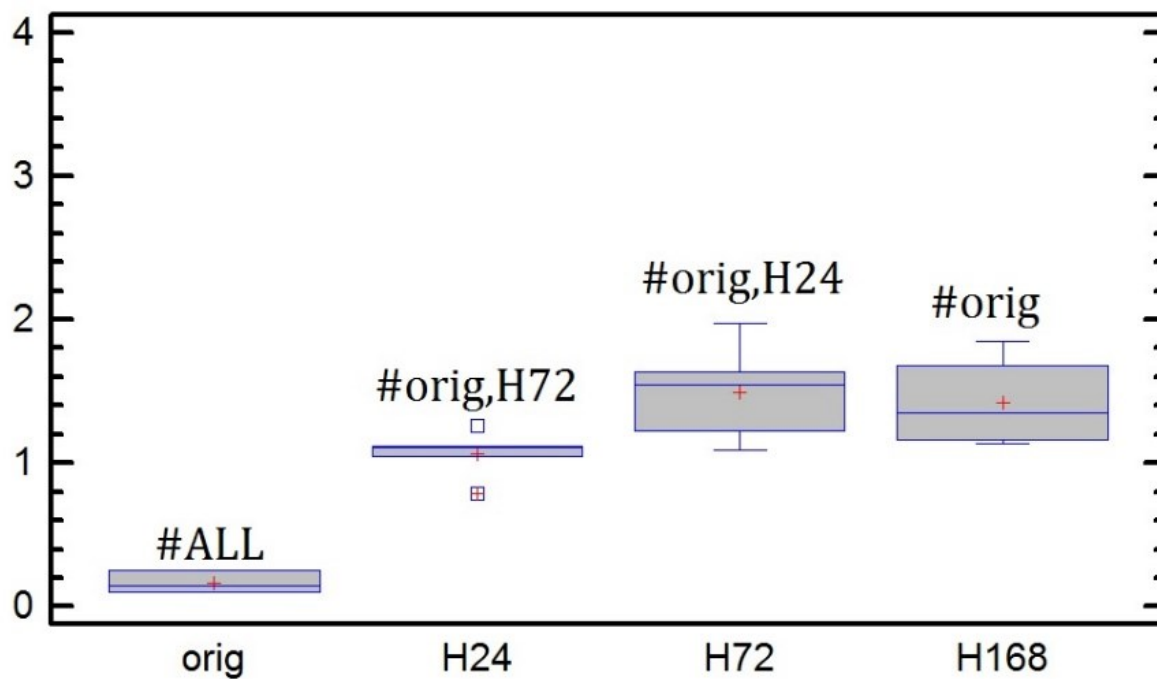


Obrázok 21 Graf zobrazujúci modely jednotlivých vzoriek ktoré boli sieťované pri teoretickej koncentrácii

Tabuľka 5 Tabuľka medzi pevnosti a elastických modulov pružnosti

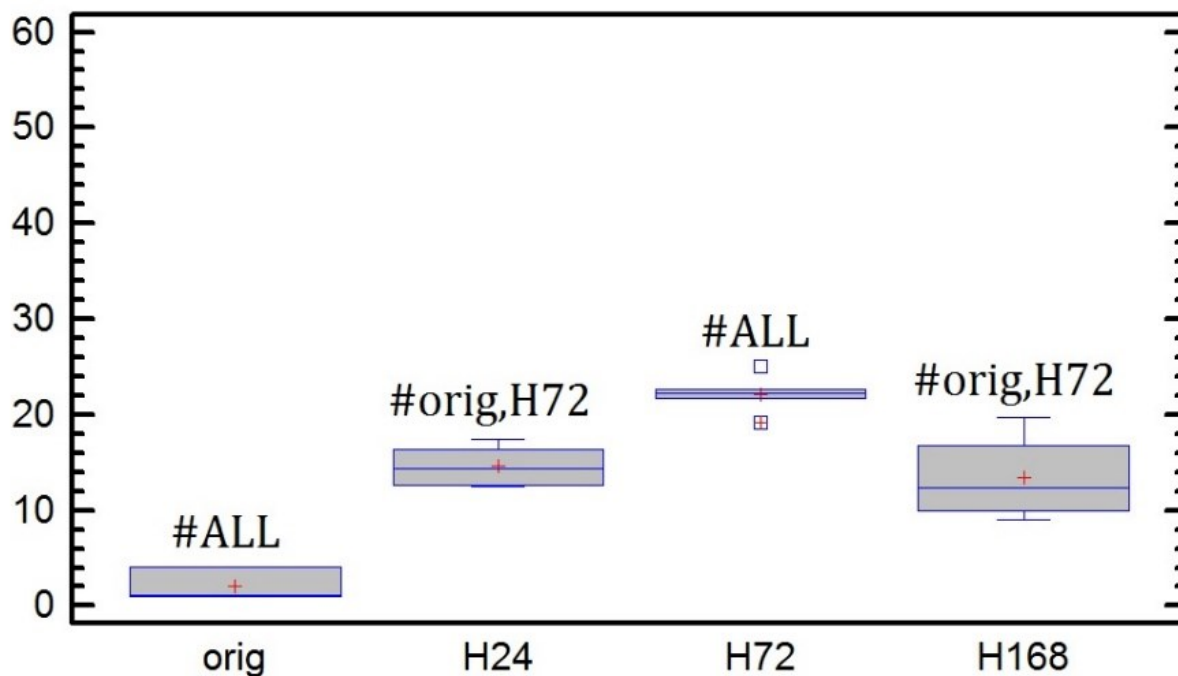
| Vzorka   | Medza pevnosti [MPa] | Smerodajná odchýlka [MPa] | Elasticity modul [MPa] | Smerodajná odchýlka [MPa] |
|----------|----------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|
| orig.    | 2.07                 | 1.74                      | 165.07                 | 77.88                     |
| 24h-II.  | 14.68                | 2.23                      | 1066.22                | 173.10                    |
| 72h-II.  | 22.17                | 2.06                      | 1493.54                | 348.09                    |
| 168h-II. | 13.36                | 4.70                      | 1421.15                | 329.20                    |

## YOUNGOV MODUL PRUZNOSTI [GPa]



Obrázok 23 Krabicový graf Youngovho modulu pružnosti pre vzorky ktoré boli sieťovane pri teoretickej koncentrácii

## MEDZ PEVNOSTI [MPa]

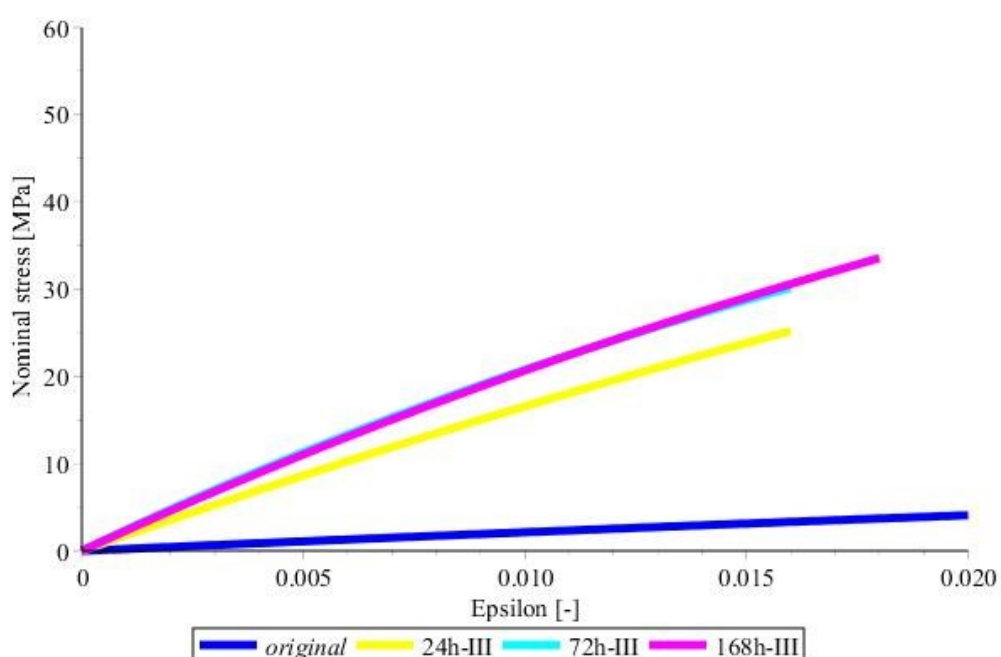


Obrázok 22 Krabicový graf medze pevnosti pre vzorky ktoré boli sieťovane pri teoretickej koncentrácii

#### 4.7. Vzorky sieťovane pri dvojnásobnej koncentrácii ako je teoretická

Všetky vzorky v tomto meraní s výnimkou referenčného (orig.) boli sieťované pri konštantnej koncentrácii sieťovacieho činidla a to dvojnásobne väčšou ako teoreticky vypočítanej na základe voľných aminokyselinách skupín.

Vyhodnotenie pozostáva z grafu nominálneho napätia oproti pomernému predĺženiu. Tabuľky hodnôt medzi pevnosti a Youngovho modulu pružnosti v počiatku a ich smerodajných odchýlok. A dvoch krabicových grafov, Youngovho modulu a medze pevnosti, na ktorých je tiež zobrazené či sa jednotlivé namerané dáta od seba štatisticky významne líšia.

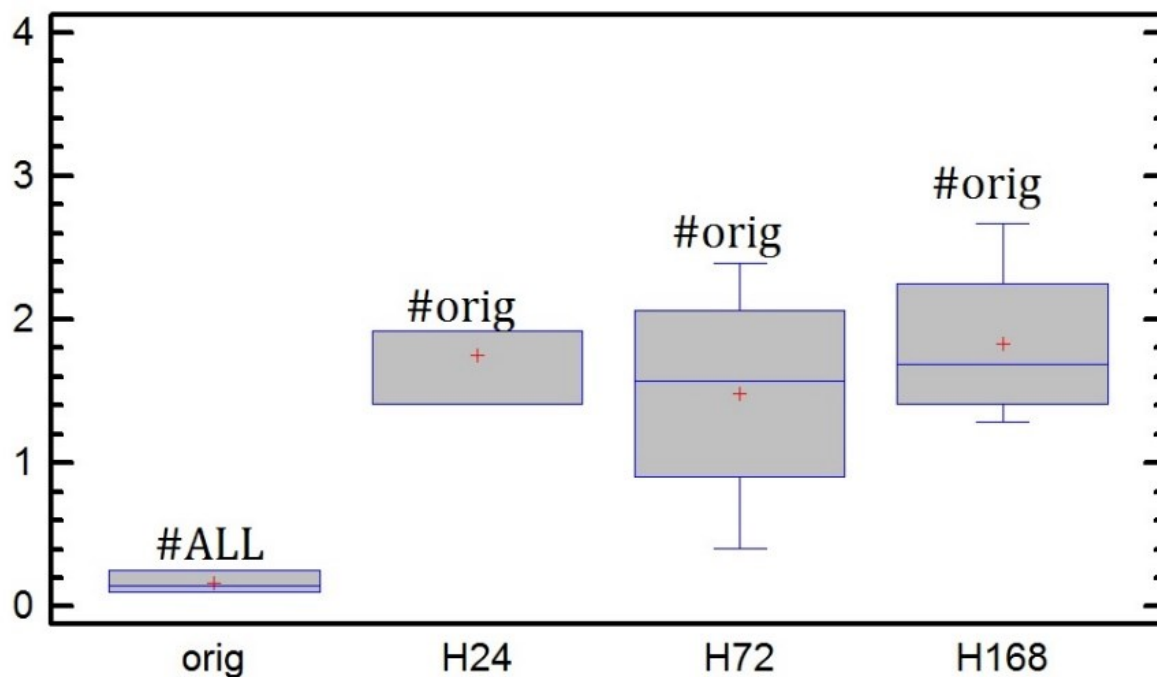


Obrázok 24 Graf zobrazujúci modely jednotlivých vzoriek ktoré boli sieťované pri dvojnásobnej teoretickej koncentrácii

Tabuľka 6 Tabuľka medzi pevnosti a elastických modulov pružnosti

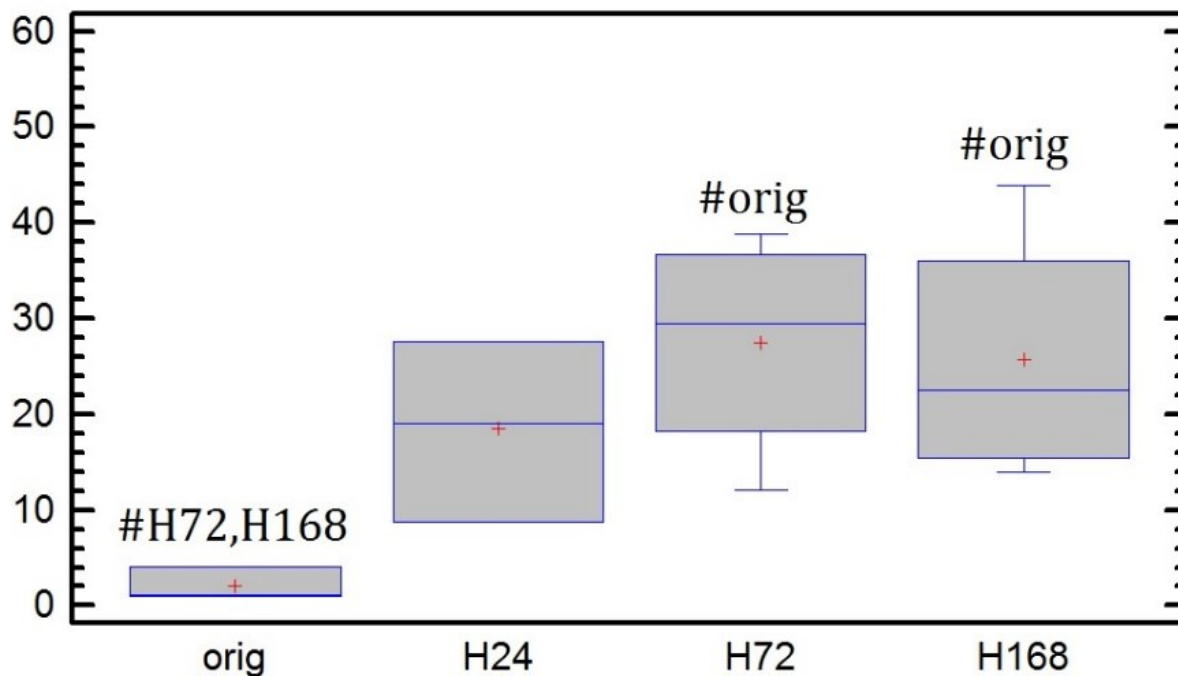
| Vzorka    | Medza pevnosti [MPa] | Smerodajná odchýlka [MPa] | Elasticity modul [MPa] | Smerodajná odchýlka [MPa] |
|-----------|----------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|
| orig.     | 2.07                 | 1.74                      | 165.07                 | 77.88                     |
| 24h-III.  | 18.46                | 9.41                      | 1749.80                | 293.95                    |
| 72h-III.  | 27.46                | 11.88                     | 1483.04                | 829.16                    |
| 168h-III. | 25.76                | 13.54                     | 1834.08                | 601.59                    |

## YOUNGOV MODUL PRUZNOSTI [GPa]



Obrázok 25 Krabicový graf Youngovho modulu pružnosti pre vzorky ktoré boli sieťovane pri dvojnásobnej teoretickej koncentrácii

## MEDZ PEVNOSTI [MPa]

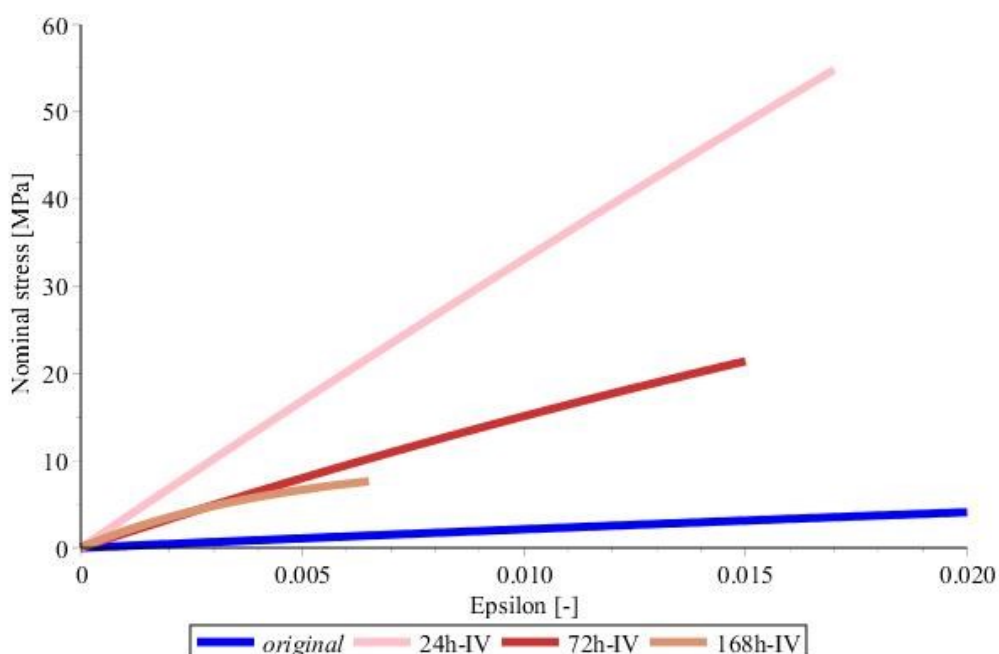


Obrázok 26 Krabicový graf medze pevnosti pre vzorky ktoré boli sieťovane pri dvojnásobnej teoretickej koncentrácii

## 4.8. Vzorky sieťované pri polovičnej koncentrácii ako je teoretická

Všetky vzorky v tomto meraní s výnimkou referenčného (orig.) boli sieťované pri konštantnej koncentrácii sieťovacieho činidla a to polovičnej ako teoreticky vypočítaná na základe voľných aminokyselinách skupín.

Vyhodnotenie pozostáva z grafu nominálneho napätia oproti pomernému predĺženiu. Tabuľky hodnôt medzi pevnosti a Youngovho modulu pružnosti v počiatku a ich smerodajných odchýlok. A dvoch krabicových grafov, Youngovho modulu a medze pevnosti, na ktorých je tiež zobrazené či sa jednotlivé namerané dáta od seba štatisticky významne líšia.

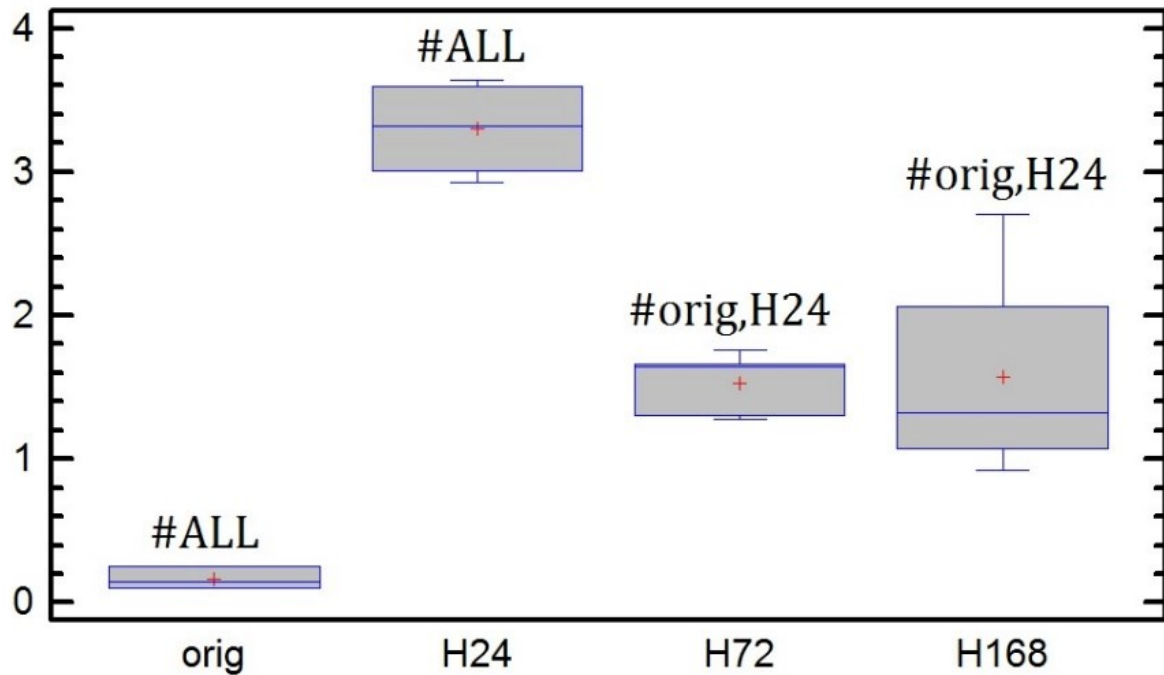


Obrázok 27 Graf zobrazujúci modely jednotlivých vzoriek ktoré boli sieťované pri polovičnej teoretickej koncentrácii

Tabuľka 7 Tabuľka medzi pevnosti a elastických modulov pružnosti

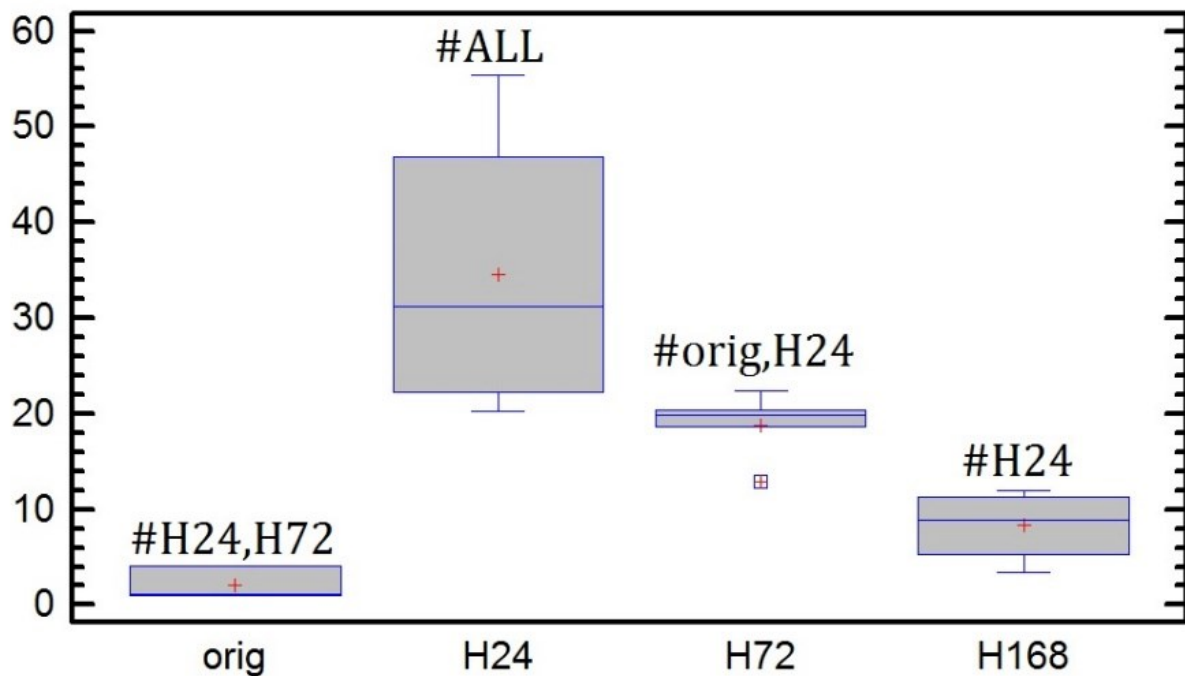
| Vzorka   | Medz pevnosti [MPa] | Smerodajná odchýlka [MPa] | Elasticity modul [MPa] | Smerodajná odchýlka [MPa] |
|----------|---------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|
| orig.    | 2.07                | 1.7411                    | 165.0793               | 77.8817                   |
| 24h-IV.  | 34.53               | 15.92                     | 3304.33                | 347.14                    |
| 72h.-IV. | 18.83               | 3.56                      | 1528.70                | 223.02                    |
| 168h-IV. | 8.28                | 3.84                      | 1569.79                | 786.66                    |

## YOUNGOV MODUL PRUZNOSTI [GPa]



Obrázok 28 Krabicový graf Youngovho modulu pružnosti pre vzorky ktoré boli sieťovane pri polovičnej teoretickej koncentrácii

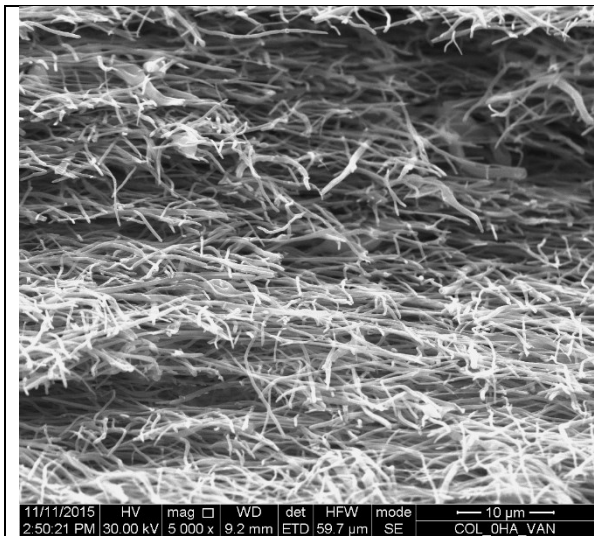
## MEDZ PEVNOSTI [MPa]



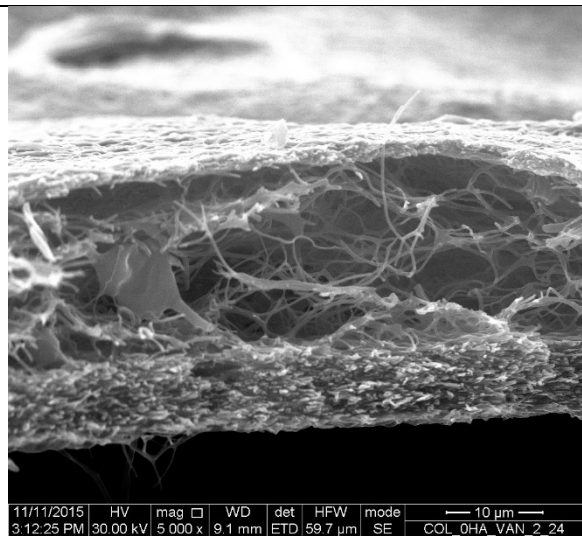
Obrázok 29 Krabicový graf medze pevnosti pre vzorky ktoré boli sieťovane pri polovičnej teoretickej koncentrácii

## 4.9.Štruktúra

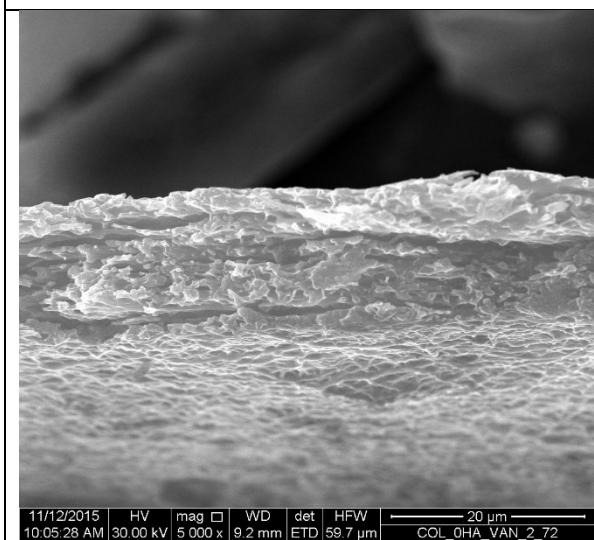
Analýza vnútornej štruktúry vzoriek v reze pomocou obrazovej analýzy fotografií z elektrónového mikroskopu (zväčšenie 5000x).



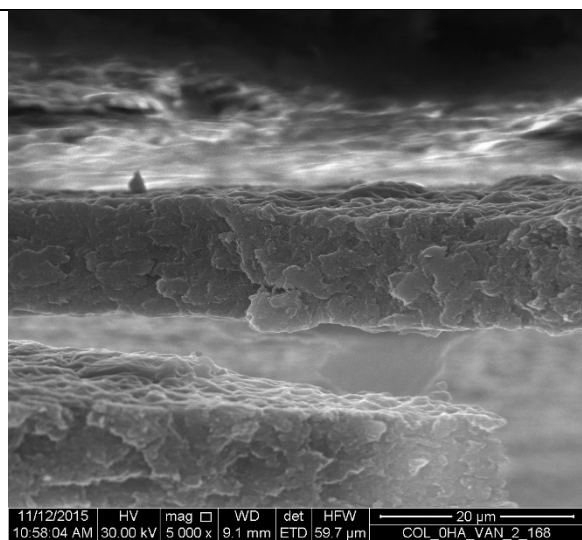
Obrázok 30 Vzorka original



Obrázok 31 Vzorka 24h-II

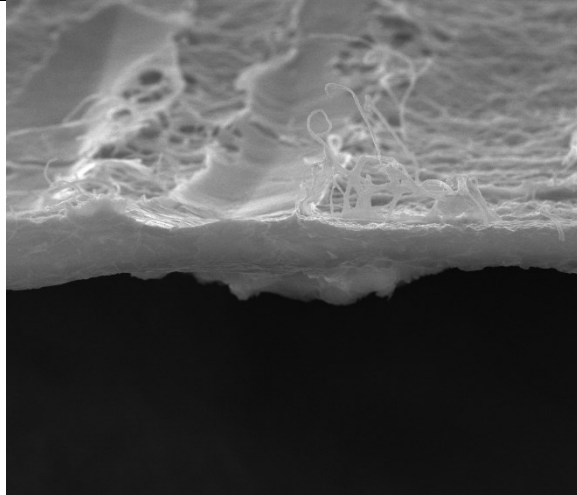


Obrázok 32 Vzorka 72h-II



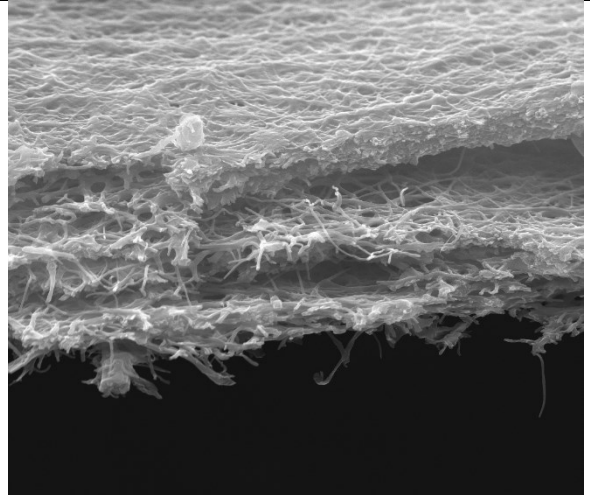
Obrázok 33 Vzorka 168h-II





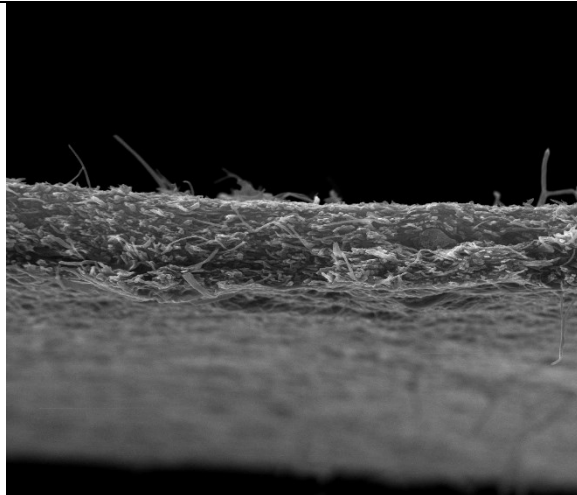
|            |          |         |        |     |         |      |                  |
|------------|----------|---------|--------|-----|---------|------|------------------|
| 11/11/2015 | HV       | mag     | WD     | det | HFV     | mode | 10 µm            |
| 4:17:32 PM | 30.00 kV | 5 000 x | 8.8 mm | ETD | 59.7 µm | SE   | COL 0HA VAN 3 24 |

Obrázok 34 Vzorka 24h-III



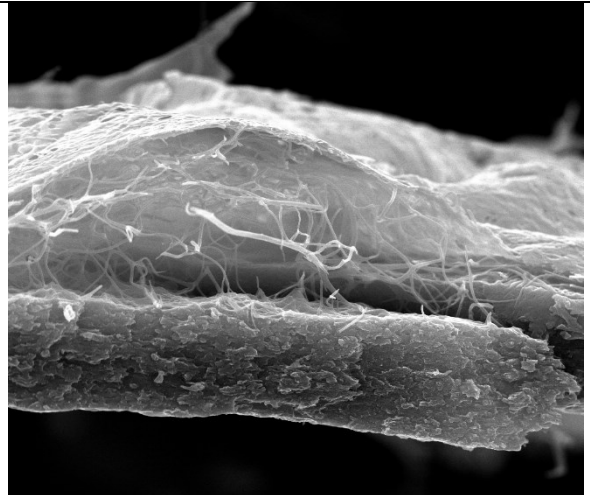
|             |          |         |        |     |         |      |                  |
|-------------|----------|---------|--------|-----|---------|------|------------------|
| 11/12/2015  | HV       | mag     | WD     | det | HFV     | mode | 20 µm            |
| 10:19:58 AM | 30.00 kV | 5 000 x | 9.4 mm | ETD | 59.7 µm | SE   | COL 0HA VAN 3 72 |

Obrázok 35 Vzorka 72h-III



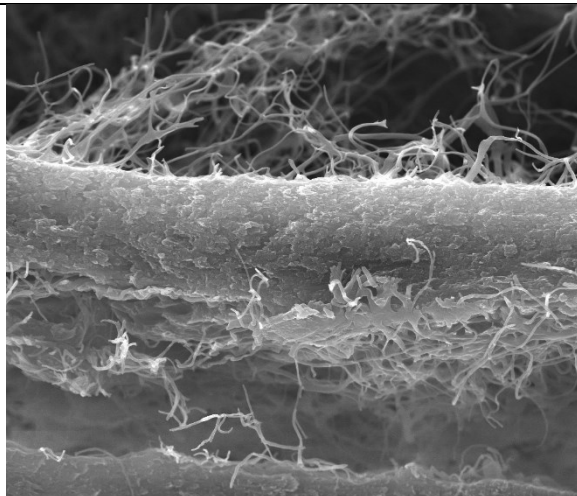
|            |          |         |        |     |         |      |                   |
|------------|----------|---------|--------|-----|---------|------|-------------------|
| 11/12/2015 | HV       | mag     | WD     | det | HFV     | mode | 10 µm             |
| 1:17:43 PM | 30.00 kV | 5 000 x | 9.0 mm | ETD | 59.7 µm | SE   | COL 0HA VAN 3 168 |

Obrázok 36 Vzorka 168h-III



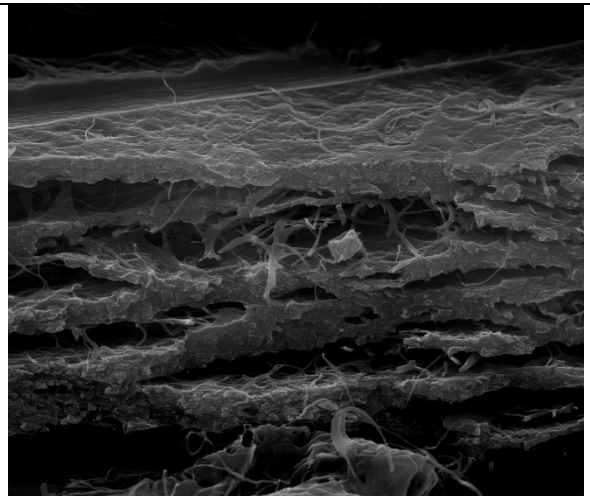
|            |          |         |        |     |         |      |                  |
|------------|----------|---------|--------|-----|---------|------|------------------|
| 11/11/2015 | HV       | mag     | WD     | det | HFV     | mode | 10 µm            |
| 3:37:17 PM | 30.00 kV | 5 000 x | 8.8 mm | ETD | 59.7 µm | SE   | COL 0HA VAN 4 24 |

Obrázok 37 Vzorka 24h-IV



|             |          |         |        |     |         |      |                  |
|-------------|----------|---------|--------|-----|---------|------|------------------|
| 11/12/2015  | HV       | mag     | WD     | det | HFV     | mode | 20 µm            |
| 10:36:59 AM | 30.00 kV | 5 000 x | 9.1 mm | ETD | 59.7 µm | SE   | COL 0HA VAN 4 72 |

Obrázok 38 Vzorka 72h-IV



|            |          |         |        |     |         |      |                   |
|------------|----------|---------|--------|-----|---------|------|-------------------|
| 11/12/2015 | HV       | mag     | WD     | det | HFV     | mode | 10 µm             |
| 2:18:46 PM | 30.00 kV | 5 000 x | 9.4 mm | ETD | 59.7 µm | SE   | COL 0HA VAN 4 168 |

Obrázok 39 Vzorka 168h-IV

## **4.10. Degradácia**

Degradačný test bol taktiež vyhodnotený podľa šiestich skupín. Ktoré môžeme rozdeliť na dve podskupiny a to na skupiny v ktorej bola premenná doba siet'ovania a skupinu u ktorej bola premenná koncentrácia sledovacieho činidla.

Účelom tohto testu bolo vyhodnotiť vplyv sledovacích podmienok na stabilitu vzorkou v biologicky aktívnom prostredí. Za účelom určenia nevhodnejšieho spôsobu prípravy, pretože daný materiál ma slúžiť ako nosič liečiv preto je veľmi dôležité aby sa daná látka do prostredia uvoľňovala postupne a stabilne podanú dobu.

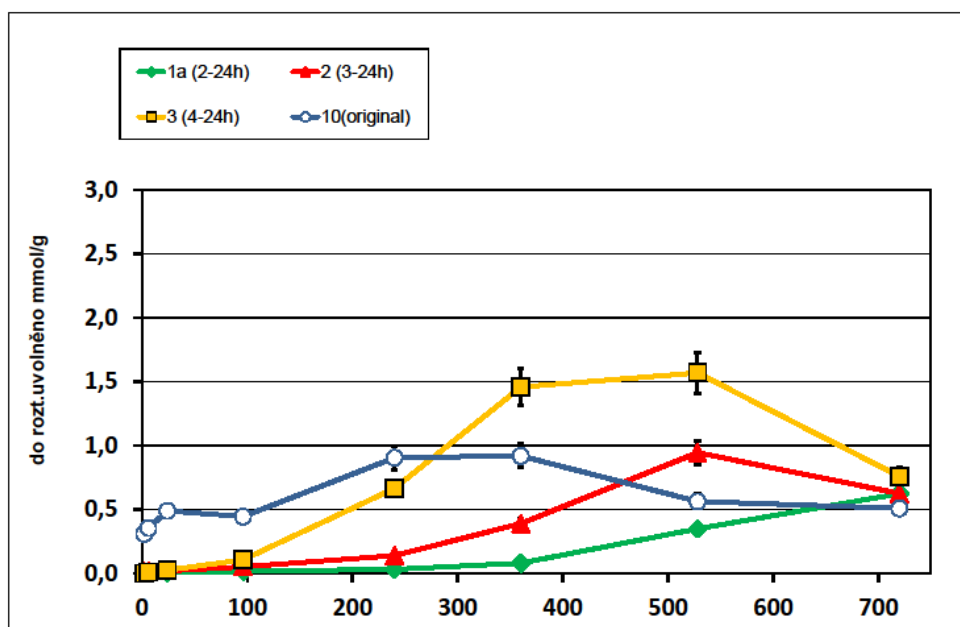
### **4.10.1. Vyhodnotenie podľa koncentrácie**

U týchto troch skupín bola doba siet'ovania konštantná, a to u prvej skupiny 24 hodín, u druhej 72 hodín a u tretej 168 hodín. Premena bola koncentrácia siet'ovacieho činidla. Prvá vzorka je vždy referenčná, jedna sa teda o vzorku ktorá nebola zosiet'ovaná preto je onačená ako originálna (orig.). Druhá vzorka označená 2. je vzorka siet'ovaná pri teoretickej koncentrácii sledovacieho činidla, vzorka označená ako 3. bola siet'ovaná pri dvojnásobnej koncentrácii a posledná vzorka označená ako 4. bola siet'ovaná pri polovičnej koncentrácii ako je teoretická koncentrácia vypočítaná na základe voľných aminokyselinových skupín.

Cieľom tejto skúšky bolo zistiť ako sa mení stabilita vzorky v závislosti na koncentrácii sledovacieho činidla pri konštantnej dobe siet'ovania.

#### 4.10.1.1. Vzorky sieťované po dobu 24 hodín

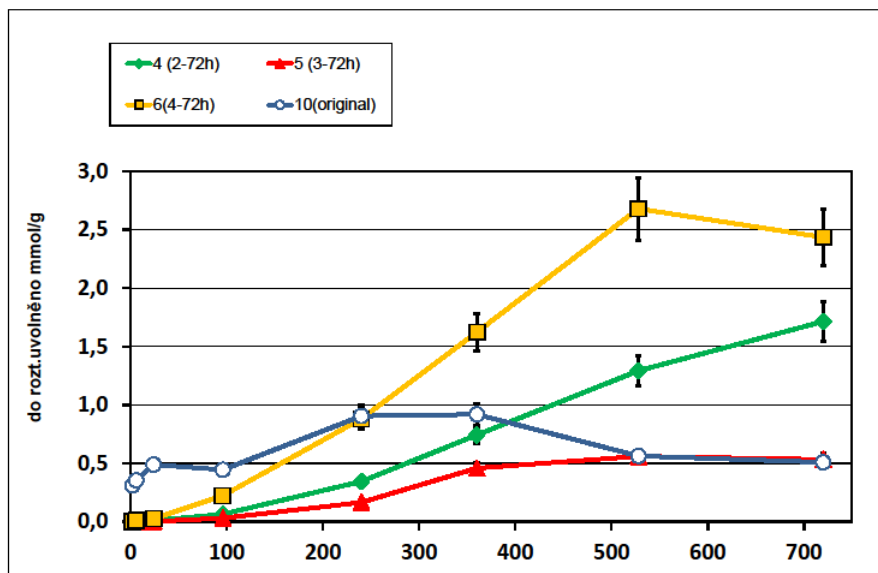
V tejto časti je skúmaný vplyv koncentrácie sieťovacieho činidla na stabilitu materiálu počas degradačného testu. Všetky vzorky boli sieťované po dobu 24 hodín.



Obrázok 40 Koncentrácia uvoľnených aminokyselín z nesieťovaných a sieťovaných vzoriek po dobu 24 hodín (aritmetický priemer, smerodajná odchýlka)

### 4.10.1.2. Vzorky sieťovane po dobu 72 hodín

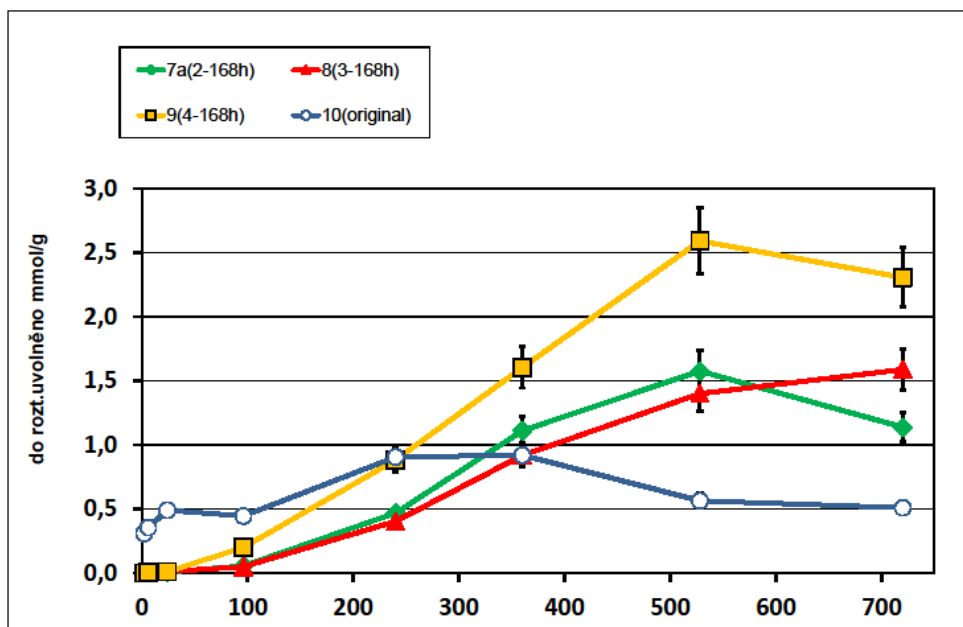
V tejto časti je skúmaný vplyv koncentrácie sieťovacieho činidla na stabilitu materiálu počas degračného testu. Všetky vzorky boli sieťované po dobu 72 hodín.



Obrázok 41 Koncentrácia uvoľnených aminokyselín z nesieťovaných a sieťovaných vzoriek po dobu 72 hodín (aritmetický priemer, smerodajná odchýlka)

### 4.10.1.3. Vzorky siet'ovane po dobu 168 hodín

V tejto časti je skúmaný vplyv koncentrácie siet'ovacieho činidla na stabilitu materiálu počas degradačného testu. Všetky vzorky boli siet'ované po dobu 168 hodín.



Obrázok 42 Koncentrácia uvoľnených aminokyselín z nesiet'ovaných a siet'ovaných vzoriek po dobu 72 hodín (aritmetický priemer, smerodajná odchýlka)

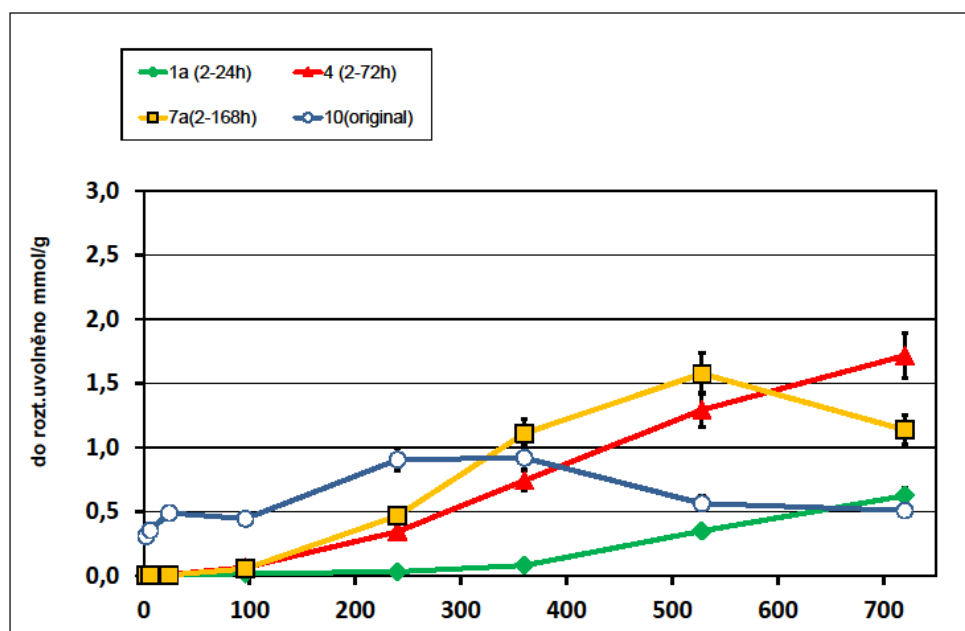
#### 4.10.2. Vyhodnotenie podlá doby sieťovania

U týchto troch skupín bola koncentrácia sledovacieho činidla konštantná, a to u prvej skupiny teoretická koncentrácia vypočítaná podlá voľných amonokyselinových skupín, u druhej dvojnásobná a u tretej polovičná koncentrácia oproti tejto teoretickej. Premena bola doba sieťovania. Prvá vzorka je vždy referenčná, jedna sa teda o vzorku ktorá nebola zosieťovaná preto je onačená ako originálna (orig.). Druha vzorka označená 24h je vzorka sieťovaná po dobu 24 hodín, vzorka označená ako 72h. bola sieťovaná po dobu 72 hodín a posledná vzorka označená ako 168h. bola sieťovaná po dobu 168 hodín.

Cieľom tejto skúšky bolo zistiť ako sa mení stabilita vzorky v závislosti na dobe sieťovania pri konštantnej koncentrácii sledovacieho činidla.

##### 4.10.2.1. Vzorky sieťovane pri teoretickej koncentrácii

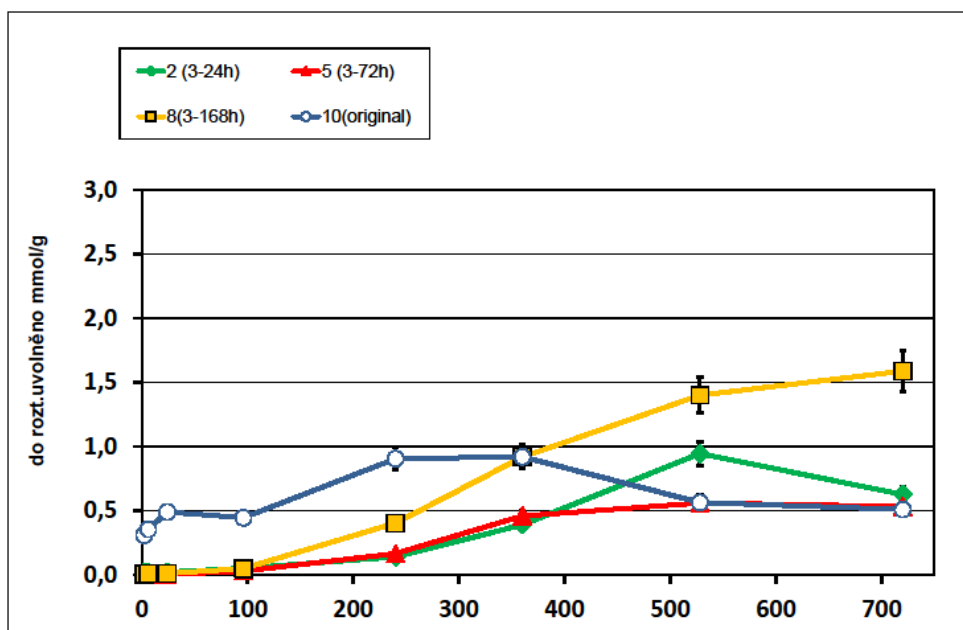
Všetky vzorky v tomto meraní s výnimkou referenčného (orig.) boli sieťované pri konštantnej koncentrácii sieťovacieho činidla a to teoretickej koncentrácii vypočítanej na základe voľných aminokyselinách skupín.



Obrázok 43 Koncentrácia uvoľnených aminokyselín z nesieťovanej a sieťovaných vzoriek pri teoretickej koncentrácii (aritmetický priemer, smerodajná odchýlka)

#### 4.10.2.2. Vzorky sieťované pri dvojnásobnej koncentrácii ako je teoretická

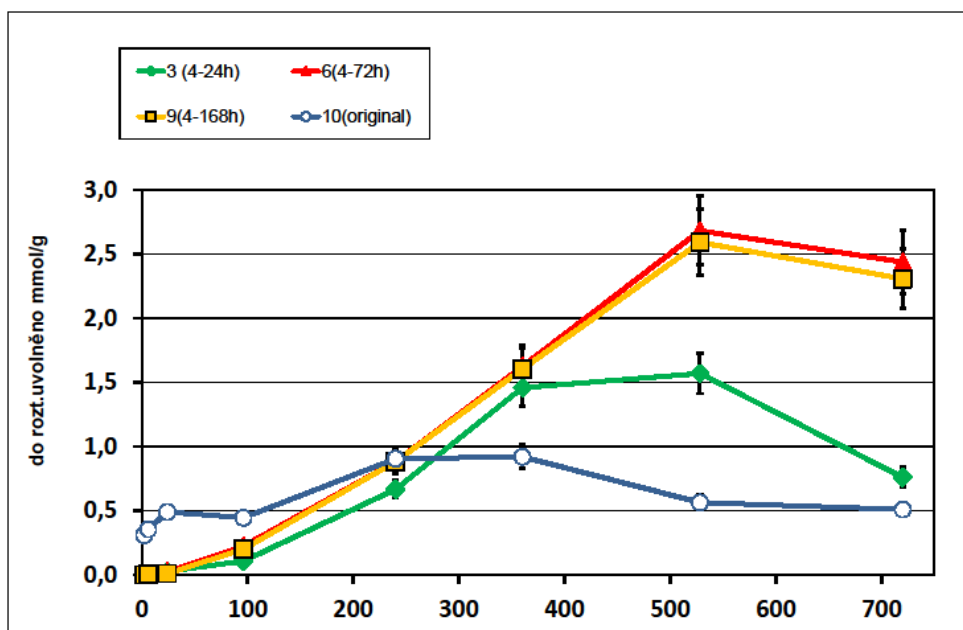
Všetky vzorky v tomto meraní s výnimkou referenčného (orig.) boli sieťované pri konštantnej koncentrácii sieťovacieho činidla a to dvojnásobne väčšou ako teoreticky vypočítanej na základe voľných aminokyselinách skupín.



Obrázok 44 Koncentrácia uvoľnených aminokyselín z nesieťovanej a sieťovanej vzoriek pri dvojnásobnej teoretickej koncentrácii (aritmetický priemer, smerodajná odchýlka)

### 4.10.2.3. Vzorky sieťované pri polovičnej koncentrácii ako je teoretická

Všetky vzorky v tomto meraní s výnimkou referenčného (orig.) boli sieťované pri konštantnej koncentrácii sieťovacieho činidla a to polovičnej ako teoreticky vypočítaná na základe voľných aminokyselín skupín.



Obrázok 45 Koncentrácia uvoľnených aminokyselín z nesieťovanej a sieťovaných vzoriek pri polovičnej teoretickej koncentrácii (aritmetický priemer, smerodajná odchýlka)



## 5. Diskusia

### 5.1. Vnútoraná štruktúra

Na obrázkoch z elektrónového mikroskopu je zjavná rozdielna štruktúra vzoriek. Referenčná vzorka (originálna) ma vláknitú štruktúru (Obr. 30) a nemožno u nej pozorovať žiadnu formu nejakej homogénnej vrstvy alebo filmu.

Ak vezmeme ako premennú dobu sieťovania a koncentrácia sieťovacieho činidla je konštantná, môžeme pozorovať ako sa vláknitá štruktúra s časom mení na homogénnu až nakoniec nepozorujeme žiadne vlákna iba jednoliatu štruktúru. Pri teoretickej koncentrácii (teda vzorkách značených rímskym číslom II) Môžeme pozorovať (Obr. 31) po 24 hodinách vytvorenie homogénnej vrstvy na povrchu vzorku no vnútoraná štruktúra je stále vláknitá. Po 72 hodina (Obr. 32) vlákna pozorujeme len v slabej miere a po 168 hodina (Obr. 33) už je materiál úplne homogénny. Pri koncentrácii ktorá je dvojnásobná oproti teoretickej koncentrácii (vzorkách značených rímskym číslom III.) pozorujeme, že po 24 hodinách (Obr. 34) sú na povrchu zrejme vlákna a jadro vzorky je homogénne s náznakmi vláknitej štruktúry. S pribúdajúcim časom (Obr. 35 a 36) sú vlákna na povrchu menej zrejme ale vnútoraná štruktúra sa už ďalej nemení. Pri polovičnej teoretickej koncentrácii (vzorkách značených rímskym číslom IV) vidíme, že po 24 hodinách (Obr. 37) sa vytvorí na povrchu tenká homogénna vrstva ktorej hrúbka sa s pribúdajúcim časom zväčšuje (Obr. 38 a 39) no ani po 168 hodinách nie je vzorka úplne homogénna.

Ak ako premenu vezmem koncentráciu sieťovacieho činidla a čas po ktorý boli sieťované bude konštantný, môžeme pozorovať jasný trend kedy sa u všetkých skupín (označene podľa doby sieťovania 24h, 72h a 168h) so zvesujúcou sa koncentráciou menila vláknitá štruktúra v homogénnu. Po 24 hodinách ostáva vláknitá štruktúra v jadre vzoriek s 1x (Obr. 31) a 0,5x (Obr. 37) teoretickou koncentráciou. Po 72 hodinách u vzorky s teoretickou koncentráciou (Obr. 32) pozorujeme len v slabej miere zatiaľ čo u koncentrácii polovičnej (Obr. 38) je jadro vzorky stále vláknité. Po 168 hodinách sú patrne vlákna už iba u polovičnej koncentrácii (Obr. 39) a to priamo uprostred vzorky na ktorej okrajoch už vznikli hrubé homogénne vrstvy.

## 5.2. Mechanické vlastnosti

Z výsledkov mechanicky skúšok môžeme pozorovať, že sieťovanie malo významný vplyv na mechanické vlastnosti. U všetkých vzoriek ktoré boli zasieťované bola zaznamenaná štatisticky významná zmena v Youngovom module pružnosti a u väčšiny došlo i k štatisticky významnej zmene medze pevnosti.

Z mechanickej skúšky ale nie je pozorovateľný štatisticky významný vplyv zachovania vláknitej štruktúry na mechanické vlastnosti materiálu. Za zmienku ale stojí vplyv koncentrácie na namerane dáta, kde vzorky ktoré boli zasieťované pri teoretickej koncentrácii mali menší rozptyl opri ostatným koncentraciám.

## 5.3. Degradácia

Úplný rozpad vzorky môžeme na grafe zaznamenať tak, že sa koncentrácia aminokyselín v roztoku prestane zvyšovať a zostane na konštantnej hladine. No z grafov (Obr. 40 až 45) vidíme, že v istom momente tieto koncentrácie začínajú klesať. Z toho dôvodu budeme považovať pri vyhodnotený dobu kedy vzorka dosiahla maximálnej koncentrácie aminokyselín v roztoku, za dobu kedy došlo k jej úplnej degradácii.

Referenčná nesieťovaná vzorka sa ukázala ako najmenej stabilná a trvalo jej približne 200-230 hodín k úplnému rozpadu. Pri posudzovaní na základe koncentracii a doby sieťovania, sa ukazuje, že každá koncentrácia ma inú ideálnu dobu po ktorú by mala byť sieťovaná. Teoretická koncentrácia dosahujem najlepšej stability pri dobe sieťovania 24 hodín zatiaľ čo pri 2x teoretickej koncentrácii je tato doba 72 hodín. V oboch prípadoch nedošlo k úplnej degradácii počas doby sledovania, teda 700 hodín, nerozdelil od polovičnej koncentrácie, pri ktorej sa všetky vzorky plne degradovali za dobu menšiu ako 600 hodín. To môžeme dať do súvislosti z štruktúrou materiálu kedy sa na povrchu vzorky vytvory homogénna vrstva o istej hrúbke ale vnútro si zachová vlákňitú štruktúru. Kedy kombinácia týchto dvoch štruktúr dosahuje väčšej stability ako čisto vlákňitá alebo čisto homogénna.

## 5.4. Celkove vyhodnotenie

Na základe štruktúry, mechanických vlastnosti a stability som zostavil jednoduchú tabuľku pre lepšie zobrazenie vhodnosti prípravy materiálu.

Tabuľka 8 Tabuľka vyhodnotenia štruktúry, mechanických vlastnosti a stability voči referenčnej hodnote

| Vzorky   | Štruktúra          | Mechanické vlastnosti                             | Stabilita  |
|----------|--------------------|---|------------|
| originál | Referenčná         | Referenčná  | Referenčná |
| 24h-II   | Vlákná zachované   | zvýšenie modulu i pevnosti                        | stabilná   |
| 24h-III  | Vlákná nezachované | zvýšenie modulu i pevnosti, vyššia miera rozptilu | nestabilná |
| 24h-IV   | Vlákná zachované   | zvýšenie modulu i pevnosti, vyššia miera rozptilu | nestabilná |
| 72h-II   | Vlákná zachované   | zvýšenie modulu i pevnosti, vyššia miera rozptilu | stabilná   |
| 72h-III  | Vlákná nezachované | zvýšenie modulu i pevnosti, vyššia miera rozptilu | stabilná   |
| 72h-IV   | Vlákná zachované   | zvýšenie modulu i pevnosti                        | nestabilná |
| 168h-II  | Vlákná nezachované | zvýšenie modulu i pevnosti                        | nestabilná |
| 168-III  | Vlákná nezachované | Zvýšenie modulu, pevnosť bez stat. vyz. zmeny     | stabilná   |
| 168-IV   | Vlákná zachované   | Zvýšenie modulu, pevnosť bez stat. vyz. zmeny     | nestabilná |

Na základe tabuľky 8 sa javy ako najlepší spôsob prípravy použitie teoretickej koncentrácie stanovená na základe zastúpenia jednotlivých aminokyselín s voľnými funkčnými skupinami pre reakciu s EDC a na základe predchádzajúcich experimentov. A to po dobu sieťovania 24 hodín. Takto pripravený materiál si zachováva vlákňitú štruktúru, pri štatisticky významnom zvýšený Youngovho modulu pružnosti, medze pevnosti a pomerne nízkej miere rozptilu. Tento materiál tiež sa vyznačuje i dobrou stabilitou pri degradácii.

## 6. Záver

Tejto diplomovej práci bola spracovaná štúdia prípravy materiálu pre využitie ako nosiča liečiv. Bolo pripravených 10 skupín vzoriek, ktoré sa líšili podmienkami prípravy na základe koncentrácie a doby po ktorú trvalo sieťovanie. Išlo o 0,5, 1 a 2 násobok teoretickej koncentrácie sieťovacieho činidla aplikovaný po dobu 24, 72 a 168 hodín. Študovaná bola tiež jedna skupina, ktorá slúžila ako referenčná a nebola sieťovaná. Každá skupina mala minimálne päť vzoriek, ktoré boli následne podrobené ťahovým mechanickým skúškam a ďalším analýzám. V rámci tejto práce bola vyhodnotená štruktúra vzoriek pomocou elektrónovej mikroskopie, pri ktorej sa zisťovalo zachovanie vláknitej štruktúry. Ďalej bola urobená štúdia degradácie, pri ktorej sa sledovala stabilita materiálu, ktorá je dôležitá z hľadiska využitia daného materiálu ako nosiča liečiv. Ďalej sme vykonali ťahové mechanické skúšky. Výsledky experimentov sme vzájomne porovnali a vyhodnotili. Vzhľadom k daným výsledkom sa ako optimálny postup prípravy materiálu javy ten, ktorý bol použitý pri výrobe vzorku 24h-II a teda sieťovaný po dobu 24 hodín pri teoretickej koncentrácii sledovacieho činidla. U tejto skupiny bolo docielene zvýšenie Youngovho modulu pružnosti ako aj medze pevnosti v ťahu. Vzorky si zároveň si zachovali vlákňitú štruktúru, a na základe degradačného testu boli preukázané ako stabilné. Ciele diplomovej práce boli teda splnené.

## 7. Zoznam použitej literatúry

- [1] D.P. Lew, F.A. Waldvogel. Osteomyelitis. *Lancet*, 364 (2004), pp. 369–379.
- [2] M. Paakkonen, M.J. Kallio, H. Peltola, P.E. Kallio. Antibiotic treatment and surgery for acute hematogenous calcaneal osteomyelitis of childhood. *J Foot Ankle Surg*, 54 (2015), pp. 840–843.
- [3] M.C. Birt, D. W. Anderson, E. B. Toby, J. Wang. Osteomyelitis: Recent advances in pathophysiology and therapeutic strategies. *Journal of Orthopaedics* 17 (2017), pp. 45–52.
- [4] S.Y. Liau, D.C. Read, W.J. Pugh, J.R. Furr, A.D. Russell. Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Lett. Appl. Microbiol.* 25 (1997), pp. 279–283.
- [5] P.J. Snodgrass, B.L. Vallee, F.L. Hoch. Effects of silver and mercurials on yeast alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 235 (1960), pp. 504–508.
- [6] BioZone Protectant Organosilane Coating attributes, dostupne z <http://www.biozoneprotectant.com/>
- [7] X. Zhang, W. Jia, Y. Gu, W. Xiao, X. Liu, D. Wang, C. Zhang, W. Huang, M.N. Rahaman, D.E. Day. Teicoplanin-loaded borate bioactive glass implants for treating chronic bone infection in a rabbit tibia osteomyelitis model *Biomaterials*, 31 (2010), pp. 5865–5874.
- [8] Y. Zhang, H.F. Chan, K.W. Leong, Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future, *Advanced Drug Delivery Reviews* 4 (2013), pp. 104-120.
- [9] Z. Wentaoa, G. Leib, Y. Liua, Approach to osteomyelitis treatment with antibiotic loaded PMMA. *Microbial Pathogenesis.* 102 (2011), pp. 42–44.
- [10] L.S. Nair, C.T. Laurencin. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007), pp. 762–98
- [11] K. Park, W. Shalaby, H. Paark, *Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery.* Technomic; Lancaster, PA: 1993
- [12] H. Fessi. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.*, 55 (1989), pp. R1–R4
- [13] S. Anil, J. Venkatesan, M.S. Shim, E.P. Chalisserry, S.K. Kim, Bone response to calcium phosphate coatings for dental implants. *Bone Response to Dental Implant Materials* Pages 65–88
- [14] Gristina AG. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 237 (1987), pp. 1588–95.
- [15] Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials* 27 (2006), pp. 2331–2339.
- [16] proto-col UK, nutrition 30th July 2014, dostupné z <http://www.proto-col.com/blog/2014/07/collagen/>
- [17] Z.M. Huang, Y.Z. Zhang, M. Kotakic, S. Ramakrishna, A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites, *Composites Science and Technology*, 63 (2003), pp. 2223–2253.
- [18] Robert Lamberts - The New Zealand Institute for Plant and Food Research dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Taylor\\_cone#/media/File:Taylor\\_cone\\_photo.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/Taylor_cone#/media/File:Taylor_cone_photo.jpg)

- [19] ZAHŘÁDKOVÁ, Simona. Příprava nanovláknenných vrstev pomocí electrospinningu [online]. Brno, 2012 [cit.2016-08-02]. <http://www1.fs.cvut.cz/stretech/2012/sbornik/31.pdf>
- [20] A. Blažej, Z. Deyl, M. Adam, A. Galatík, I. Michlík, P. Smejkal. Štruktúra a vlastnosti vláknitých bielkovín. VEDA, Bratislava 1978.
- [21] M. Mekhail, K.K. Wong, D.T. Padavan, Y. Wu, D.B. O'Gorman, W. Wan. Genipin-cross-linked electrospun collagen fibers J Biomater Sci Polym 22 (2011), pp. 2241-2259.
- [22] Carbodiimide Crosslinker Chemistry, Protein Biology Resource Library dostupné z <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/carbodiimide-crosslinker-chemistry.html>

## 8. Zoznam tabuliek

|  |    |
|--|----|
| Tabuľka 1 Použité koncentrácie činidiel na celkovú hmotnosť použitých vrstiev označenie vzoriek.....         | 25 |
| Tabuľka 2 Tabuľka medzi pevnosti a elastických modulov pružnosti .....                                       | 35 |
| Tabuľka 3 Tabuľka medzi pevnosti a elastických modulov pružnosti .....                                       | 37 |
| Tabuľka 4 Tabuľka medzi pevnosti a elastických modulov pružnosti .....                                       | 39 |
| Tabuľka 5 Tabuľka medzi pevnosti a elastických modulov pružnosti .....                                       | 42 |
| Tabuľka 6 Tabuľka medzi pevnosti a elastických modulov pružnosti .....                                       | 44 |
| Tabuľka 7 Tabuľka medzi pevnosti a elastických modulov pružnosti .....                                       | 46 |
| Tabuľka 8 Tabuľka vyhodnotenia štruktúry, mechanických vlastností a stability voči referenčnej hodnote ..... | 59 |

## 9. Zoznam obrázkov

|  |    |
|--|----|
| Obrázok 1 Diagram ukazuje tri kategórie osteomyelitídy. (A a B) Primárne hematogénne (krvou) šírenie baktérií postihuje hlavne telá stavcov u všetkých vekových skupín alebo metaphysis zo skeletu nedospelých pacientov. (C a D) Susediace kostnej infekcie je najčastejšie ..... | 14 |
| Obrázok 2 Časová os ukazuje schválenie a príchod daného nosiča na trh .....  | 16 |
| Obrázok 3 Štruktúra kolagénových vlákien .....   | 19 |
| Obrázok 4 Taylorov kužeľ na kapiláre .....   | 22 |
| Obrázok 5 Schéma elektrospinningu z kapiláry .....   | 22 |
| Obrázok 6 Schéma sledovacej reakcie pomocou EDC/NHS .....  | 23 |
| Obrázok 7 Snímky trhačky.....  | 26 |
| Obrázok 8 Ukážka ťahovej skúšky .....  | 27 |
| Obrázok 9 Ukážka grafu .....   | 30 |
| Obrázok 10 Ukážka grafu hodnôt a modelovej krivky .....  | 31 |
| Obrázok 11 Ukazka grafu modelu a jeho doticnice v pociatku .....   | 32 |
| Obrázok 12 Graf zobrazujúci modely jednotlivých vzoriek pre vzorky sieťované po dobu 24 hodín.....   | 35 |
| Obrázok 13 Krabicový graf Youngovho modulu pružnosti pre vzorky ktoré boli sieťovane 24 hodín # označuje štatisticky významné rozdiely (Mann-Whitney test, 0,05). .....  | 36 |
| Obrázok 14 Krabicový graf medze pevnosti pre vzorky ktoré boli sieťovane 24 hodín. # označuje štatisticky významné rozdiely (Mann-Whitney test, 0,05). .....   | 36 |
| Obrázok 15 Graf zobrazujúci modely jednotlivých vzoriek pre vzorky sieťované po dobu 72 hodín.....   | 37 |
| Obrázok 16 Krabicový graf Youngovho modulu pružnosti pre vzorky ktoré boli sieťovane 72 hodín # označuje štatisticky významné rozdiely (Mann-Whitney test, 0,05). .....  | 38 |
| Obrázok 17 Krabicový graf medze pevnosti pre vzorky ktoré boli sieťovane 72 hodín # označuje štatisticky významné rozdiely (Mann-Whitney test, 0,05). .....  | 38 |
| Obrázok 18 Graf zobrazujúci modely jednotlivých vzoriek pre vzorky sieťované po dobu 168 hodín.....  | 39 |
| Obrázok 19 Krabicový graf medze pevnosti pre vzorky ktoré boli sieťovane 168 hodín # označuje štatisticky významné rozdiely (Mann-Whitney test, 0,05). .....   | 40 |
| Obrázok 20 Krabicový graf Youngovho modulu pružnosti pre vzorky ktoré boli sieťovane 168 hodín # označuje štatisticky významné rozdiely (Mann-Whitney test, 0,05). .....   | 40 |



|   |    |
|---|----|
| Obrázok 21 Graf zobrazujúci modely jednotlivých vzoriek ktoré boli sieťovane pri teoretickej koncentrácii .....   | 42 |
| Obrázok 22 Krabicový graf medze pevnosti pre vzorky ktoré boli sieťovane pri teoretickej koncentrácii .....   | 43 |
| Obrázok 23 Krabicový graf Youngovho modulu pružnosti pre vzorky ktoré boli sieťovane pri teoretickej koncentrácii .....                                 | 43 |
| Obrázok 24 Graf zobrazujúci modely jednotlivých vzoriek ktoré boli sieťovane pri dvojnásobnej teoretickej koncentrácii .....                            | 44 |
| Obrázok 25 Krabicový graf Youngovho modulu pružnosti pre vzorky ktoré boli sieťovane pri dvojnásobnej teoretickej koncentrácii .....                    | 45 |
| Obrázok 26 Krabicový graf medze pevnosti pre vzorky ktoré boli sieťovane pri dvojnásobnej teoretickej koncentrácii .....                                | 45 |
| Obrázok 27 Graf zobrazujúci modely jednotlivých vzoriek ktoré boli sieťovane pri polovičnej teoretickej koncentrácii .....                              | 46 |
| Obrázok 28 Krabicový graf Youngovho modulu pružnosti pre vzorky ktoré boli sieťovane pri polovičnej teoretickej koncentrácii .....                      | 47 |
| Obrázok 29 Krabicový graf medze pevnosti pre vzorky ktoré boli sieťovane pri polovičnej teoretickej koncentrácii .....                                  | 47 |
| <i>Obrázok 30 Vzorka original</i> .....   | 48 |
| <i>Obrázok 31 Vzorka 24h-II</i> .....   | 48 |
| <i>Obrázok 32 Vzorka 72h-II</i> .....   | 48 |
| <i>Obrázok 33 Vzorka 168h-II</i> .....  | 48 |
| <i>Obrázok 34 Vzorka 24h-III</i> .....  | 48 |
| <i>Obrázok 35 Vzorka 72h-III</i> .....  | 48 |
| <i>Obrázok 36 Vzorka 168h-III</i> .....   | 49 |
| <i>Obrázok 37 Vzorka 24h-IV</i> .....   | 49 |
| <i>Obrázok 38 Vzorka 72h-IV</i> .....   | 49 |
| <i>Obrázok 39 Vzorka 168h-IV</i> .....  | 49 |
| Obrázok 40 Koncentrácia uvoľnených aminokyselín z nesieťovaných a sieťovaných vzoriek po dobu 24 hodín (aritmetický priemer, smerodajná odchýlka) ..... | 50 |
| Obrázok 41 Koncentrácia uvoľnených aminokyselín z nesieťovaných a sieťovaných vzoriek po dobu 72 hodín (aritmetický priemer, smerodajná odchýlka) ..... | 51 |
| Obrázok 42 Koncentrácia uvoľnených aminokyselín z nesieťovaných a sieťovaných vzoriek po dobu 72 hodín (aritmetický priemer, smerodajná odchýlka) ..... | 52 |

|  |    |
|--|----|
| Obrázok 43 Koncentrácia uvoľnených aminokyselín z nesieťovanej a sieťovaných vzoriek pri teoretickej koncentrácii (aritmetický priemer, smerodajná odchýlka).....              | 53 |
| Obrázok 44 Koncentrácia uvoľnených aminokyselín z nesieťovanej a sieťovaných vzoriek pri dvojnásobnej teoretickej koncentrácii (aritmetický priemer, smerodajná odchýlka)..... | 54 |
| Obrázok 45 Koncentrácia uvoľnených aminokyselín z nesieťovanej a sieťovaných vzoriek pri polovičnej teoretickej koncentrácii (aritmetický priemer, smerodajná odchýlka).....   | 55 |