

Univerzita Karlova
Fakulta tělesné výchovy a sportu
Katedra fyzioterapie

Diplomová práce

**Metodologické řešení detekce
odpovědi scaffoldů na mechanické namáhání
v závislosti na stupni hydratace**

Vedoucí práce:

Doc. PaedDr. Karel Jelen, CSc.

Vypracovala:

Bc. Kateřina Mejzlíková

Praha, duben 2014

Prohlašuji, že jsem závěrečnou diplomovou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne..... 2014

.....

podpis diplomantky

Kateřina Mejzlíková

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala mému vedoucímu práce Doc. PaedDr. Karlu Jelenovi, CSc. za odborné vedení, poskytnutí potřebných informací a cenných rad při zpracování práce. Rovněž bych chtěla poděkovat Ing. Františku Lopotovi za odborné konzultace a obětavý přístup. Dále mé poděkování patří mým blízkým, kteří měli se mnou trpělivost při dokončování této práce.

Evidenční list

Souhlasím se zapůjčením své diplomové práce ke studijním účelům. Uživatel svým podpisem stvrzuje, že tuto diplomovou práci použil ke studiu a prohlašuje, že ji uvede mezi použitými prameny.

Jméno a příjmení:

Fakulta / katedra:

**Datum
vypůjčení:**

Podpis:

Abstrakt

- Název:** Metodologické řešení detekce odpovědi scaffoldů na mechanické namáhání v závislosti na stupni hydratace
- Cíle:** Určení míry příčné deformace u scaffoldů vyrobených z PVA polymerů technikou elektrostatického zvlákňování.
Zjistit míru odlišnosti příčné deformace u různých skupin nanovlákných scaffoldů vyrobených z PVA polymerů technikou elektrostatického zvlákňování.
- Metody:** Pro výzkum scaffoldů jsme použili měřicí zařízení μ -tester, které disponuje dvěma čelistmi. Pro měření jsme zvolili zkoušku jednoosým tahem v μ -testeru a pro záznam byl použit fluorescenční mikroskop s HD kamerou Olympus 320 pro online obrazový záznam.
- Výsledky:** Z výsledků této práce vyplynulo, že poměr vzorků U:L a doba síťování má vliv na míru příčné deformace vzorků scaffoldů.
Vzorky scaffoldů jsou stlačitelné, některé skupiny dosáhly dokonce meze nestlačitelnosti 0,5 Poissonova čísla.
- Klíčová slova:** Poissonovo číslo, Poissonův poměr, scaffold, nanovlákný scaffold, hydratovaný scaffold, příčná deformace

Abstract

Title: Methodological detection solution scaffolds response to mechanical stress, depending on the degree of hydration

Objectives: Determining the extent of lateral deformation u scaffolds made of PVA polymer electrospinning technique.

Identify the extent of differences in transverse deformation for different groups of nanofiber scaffolds made of PVA polymer electrospinning technique.

Methods: Research scaffolds, we used a measuring device μ -tester, which has two jaws. For the measurement, we chose uniaxial tension test in μ -tester and record the fluorescence microscope was used with HD camera Olympus 320 for online video recording.

Results: The results of this study showed that the ratio of the samples U: L and crosslinking time affects the degree of lateral deformation of the samples scaffolds.

Samples scaffolds are compressible, some groups even reached the limits of incompressibility 0.5 Poisson's ratio.

Keywords: Poisson, Poisson's ratio, scaffold, nanofiber scaffold, scaffold hydrated, electrospun scaffold, lateral deformation

Obsah

1	ÚVOD	10
2	TEORETICKÁ VÝCHODISKA PRÁCE	11
2.1	Co je to „scaffold“?	11
2.2	Využití scaffoldů	12
2.3	Vlastnosti scaffoldů	14
2.4	Druhy materiálů pro výrobu scaffoldů	15
2.5	Výroba scaffoldů	18
2.5.1	Konvenční techniky výroby scaffoldů	18
2.5.2	Pokročilé techniky výroby scaffoldů	20
2.6	Možnosti popisu materiálových vlastností obecně	21
2.7	Možnosti detekce reologických vlastností materiálů	23
2.8	Vztah poměrné a příčné deformace	26
2.8.1	Historie Poissonova čísla	26
2.8.2	Poissonovo číslo	26
3	CÍLE A ÚKOLY PRÁCE, HYPOTÉZY	28
3.1	Cíle práce	28
3.2	Úkoly práce	28
3.3	Hypotézy	28
4	METODIKA PRÁCE	29
4.1	Popis výzkumného souboru	29
4.2	Příprava měřených vzorků	31
4.3	Měření	34
4.3.1	Postup měření pro suché vzorky	35
4.3.2	Postup měření pro hydratované vzorky	37
4.4	Zpracování dat	43
5	VÝSLEDKY	49

5.1	Vzorky scaffoldů - rozdělení dle poměru U:L.....	49
5.1.1	Suché vzorky scaffoldů dle poměru U:L	49
5.1.2	Hydratované vzorky scaffoldů dle poměru U:L	51
5.2	Vzorky scaffoldů - rozdělení dle doby síťování.....	53
5.2.1	Suché vzorky scaffoldů dle doby síťování.....	53
5.2.2	Hydratované vzorky scaffoldů dle doby síťování.....	55
6	DISKUSE.....	57
7	SHRNUTÍ	60
8	ZÁVĚR	62
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	63
10	SEZNAM TABULEK, OBRÁZKŮ, FOTOGRAFIÍ A GRAFŮ	67

SEZNAM ZKRATEK

Tzv.	- takzvané
Tzn.	- to znamená
Stol.	- století
DNA	- deoxyribonukleová kyselina
RNA	- ribonukleová kyselina
ECM	- extracelulární matrix (mezibuněčná hmota)
In vivo	- v živém nebo na živém těle, zaživa
Atd.	- a tak dále
PVA	- polyvinylalkohol
PGA	- polyglykolová kyselina
PLA	- polymléčná kyselina
PLLA	- poly-L-mléčná kyselina
PLGA	- kopolymery kyseliny DL-mléčné
Tj.	- to jest
μm	- mikrometr
Např.	- například
CO ₂	- oxid uhličitý

1 ÚVOD

S narůstající četností úrazů pohybového aparátu v dnešní době, kdy je prováděno tisíce chirurgických zákroků denně, se zvýšily i potřeby klinické medicíny v oblasti náhrad nemocných či poškozených tkání. V současné medicíně jsou hojně využívány umělé náhrady, při jejichž využití však vyvstávají rizika infekce, či vzniku trombu. Výraznou negativní vlastností je většinou jejich omezená životnost. Proto je nutné hledat řešení, která by vedla co nejpřirozenější cestou k funkční náhradě poškozené tkáně.

Jedním z odvětví, které se začalo rozvíjet na začátku 90 let, je takzvaná regenerativní medicína. Hlavním odvětvím regenerativní medicíny je tkáňové inženýrství. Rozvíjející se oblasti tkáňového inženýrství mají za cíl regeneraci poškozené tkáně pomocí kombinace buněk z těla s vysoce porézními biomateriály, tzv. scaffoldy, které působí jako „nosiče“ a řídicí jednotky růstu nové tkáně. Osídlujícím buňkám zajišťuje dočasnou či trvalou podporu pro migraci, růst a stimuly pro následné buněčné pochody, např. pro diferenciaci kmenových buněk do buněk zralé tkáně. Biomateriály mohou přispět k reprodukci či opravě tkáně, aby nedocházelo k odmítnutí umělých či cizích implantátů. Moderní tkáňové inženýrství se tedy snaží vyvíjet takové materiály, které budou organismem snáze přijímány.

Vzniká potřeba studií, které budou nějakou technicky přijatelnou (proveditelnou) a dostupnou metodikou poskytovat stabilní výsledky v oblasti hodnocení materiálových vlastností scaffoldů.

Tato práce je jedna ze vstupních studií v řešení otázky strukturálních změn scaffoldů posuzovanou makroskopickou (dostupnou) metodou, která jednoduchým standardizovaným procesem poskytne informace jak uživatelům scaffoldů, tak i jejich výrobcům. Mohou tak získat představu o kvalitě a stabilitě své výroby.

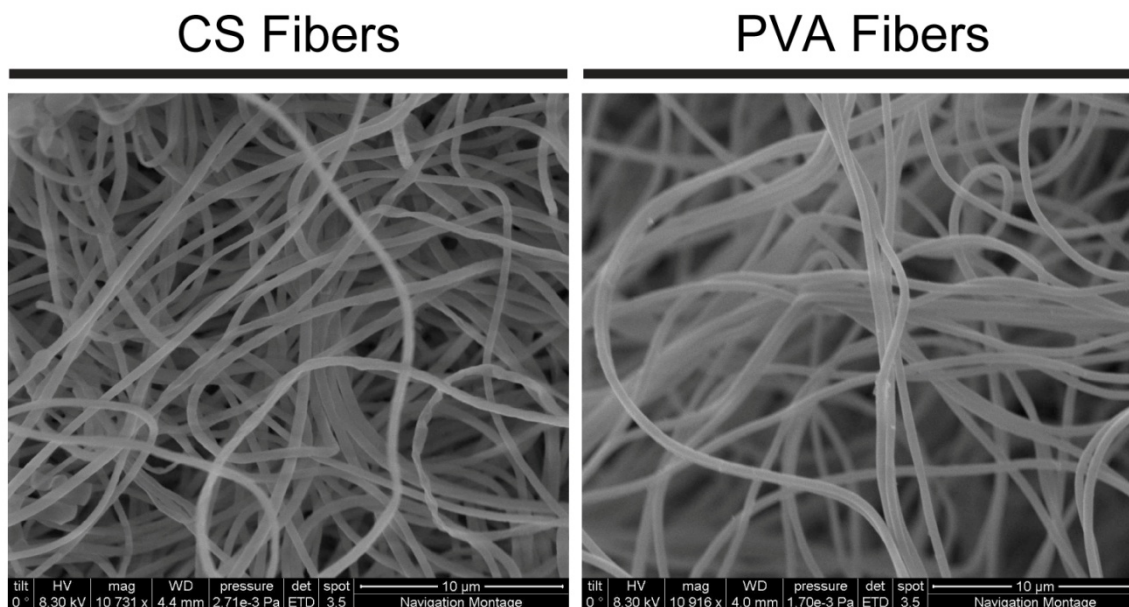
2 TEORETICKÁ VÝCHODISKA PRÁCE

2.1 Co je to „scaffold“?

Doslovný překlad pojmu „scaffold“ do českého jazyka zní „lešení“. Tento překlad je výstižný, jelikož se jedná o lešení ve smyslu vytvoření podpůrné sítě, na které je pak umožněna výstavba nové tkáně. Vzhledem k tomu, že se jedná o tenké vrstvy buněk, je možná výstižnější překlad „nosič“ nebo „podpůrná matrice“. V této práci bude používán termín scaffold.

Scaffold je podpůrný materiál, většinou ve formě trojrozměrné matrice, vytvářený nejčastěji z polymerů (viz kap. 2.4). Tyto trojrozměrné matrice by měly mít co nejvíce stejné vlastnosti a schopnosti jako extracelulární matrix (Wenguo, a další, 2010).

Před pár lety se tvrdilo, že scaffolds musejí mít podobné vlastnosti jako tkáň samotná, což už není pravda. Dnes se scaffolds koncipují tak, aby až poté, co tkáň proroste scaffoldem, měla stejné vlastnosti tkáně. Vytváří se přímo scaffolds z kolagenních vláken a buňky použijí k vytvoření ECM. Podpůrná matrice se stane součástí nové narostlé tkáně.

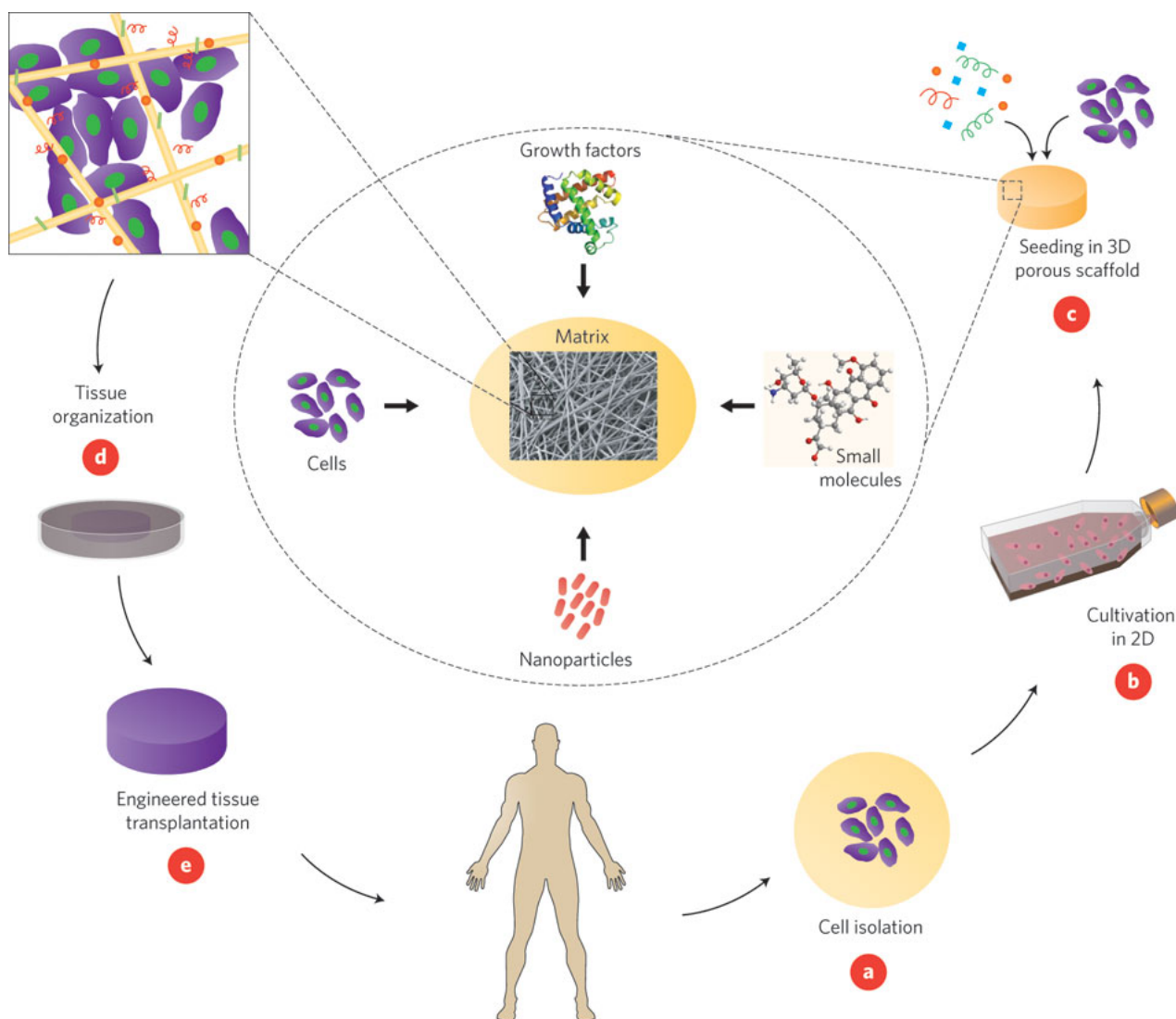


Obrázek č. 1 - Snímek elektronové mikrofotografie ukazující chondroitin sulfátová (CS) a poly (vinyl alkohol)-methakrylátová (PVA) nanovláknna, vyrobená elektrostatičkým zvláčkňováním a zpracována k biostabilitě těchto scaffoldů (Huang, 2012)

2.2 Využití scaffoldů

V současné medicíně jsou hojně využívány umělé náhrady, které mají omezenou životnost, a s kterými vznikají různá rizika. Jedná se především o nebezpečí infekce, vznik trombózy nebo embolie. U transplantací tkání a orgánů nás limituje především nedostatek donorů a možnost imunosuprese. S těmito a mnoha dalšími komplikacemi roste i nutnost reoperací. Proto vznikl požadavek regenerační medicíny na tvorbu náhrad nebo procesů, které umožní regeneraci tkáně tak, aby tyto rizika a problémy nevznikaly. Etabloval se proto obor tkáňové inženýrství, který se tímto zabývá. Snaží se vyvíjet živou tkáň tak, aby vyhovovala potřebám pacienta (Amler).

Pojem tkáňové inženýrství byl představen v roce 1987 na konferenci „National science foundation“ v USA a o rok později byla uspořádána první konference tohoto nově vzniklého oboru. Kořeny tkáňového inženýrství sahají do 70. a 80. let 20. stol., kdy byla vyvíjena náhrada kožní tkáně. Jedná se o interdisciplinární obor zahrnující principy samotné výroby a přírodních věd s vývojem biologických náhrad pro zachování, udržení nebo zlepšení funkce tkáně. Díky rychlému pokroku vědy a techniky dochází v 90. letech 20. stol. k celosvětovému rozvoji tohoto oboru a stále se dynamicky vyvíjí (Ratner, a další, 2013). Schematický popis tkáňového inženýrství zobrazuje Obrázek č. 2.



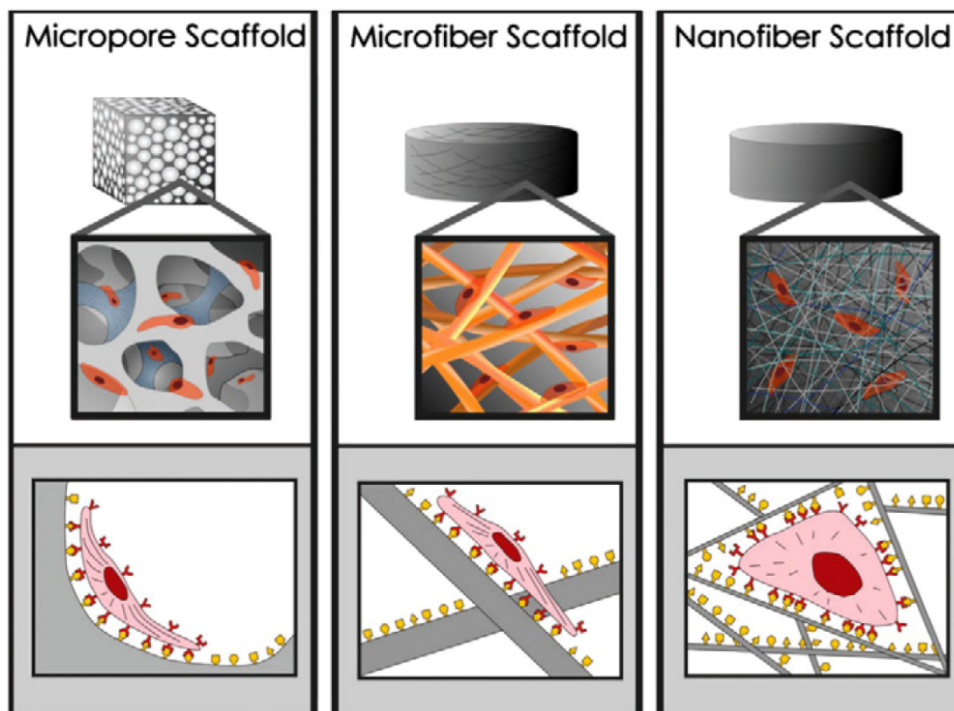
Obrázek č. 2 - Schématický popis tkáňového inženýrství (dostupný z: http://www.centropede.com/UKSB2006/ePoster/images/background/TE_model_large.jpg)

Scaffolds se mohou využívat nejen k regeneraci, tvorbě či náhradě tkání, ale i k řízenému uvolňování antibiotik, protirakovinných léčiv, DNA a RNA (Bhardwaj, a další, 2010) (Wenguo, a další, 2010).

2.3 Vlastnosti scaffoldů

Scaffold, podle definice, je dočasná nosná konstrukce pro pěstování buněk a tkání (Murugan, a další, 2007). Jedná se o tzv. syntetickou extracelulární matrix (ECM) a hraje rozhodující roli v podpoře buňky. Tyto buňky pak podstoupí proliferaci, migraci a diferenciaci ve třech rozměrech, což vede k tvorbě specifické tkáně s příslušnými funkcemi, jako se nacházejí v lidském těle. Pro splnění těchto požadavků by měly mít scaffoldy několik základních obecných vlastností (Chen, a další), (O'Brien, 2011):

- povrch by měl umožnit adhezi buněk, čímž podporuje růst buněk a umožňuje zachování diferencovaných buněčných funkcí
- scaffold musí být biokompatibilní (polymer a jeho vedlejší produkty při degradaci nesmí vyvolat zánět nebo toxicitu in vivo)
- scaffold musí být biologicky rozložitelný a nakonec odstranitelný
- implantovaný scaffold musí mít dostatečnou mechanickou integritu a fungovat od okamžiku implantace do dokončení remodelačního procesu. Důležitost při výrobě scaffoldů má rovnováha mezi mechanickými vlastnostmi a dostatečnou porézní strukturou, která umožňuje infiltraci buněk a vaskularizaci
- pórovitost by měla být dostatečně vysoká, aby umožnila adhezi buněk, regeneraci a minimální difúzní omezení ECM během kultivace. Struktura pórů by měla být propojena tak, aby vznikla prostorově homogenní stavba tkáně. Kontakt buňky se scaffoldem dochází pomocí chemických skupin (ligandů) na jeho povrchu. Hustota ligandů je ovlivněna specifickým povrchem pórů, na kterém mohou buňky přilnout. Póry tak musejí být dostatečně velké, aby umožnily migraci buněk konstrukcí, kde se nakonec navážou na ligandy scaffoldu, ale i dostatečně malé, aby vytvořily dostatečně vysoký měrný povrch. Proto je určení velikosti pórů scaffoldu velmi důležité, v závislosti na použitém typu buněk (O'Brien, 2011) (Obrázek č. 3)
- materiál by měl být reprodukovatelný a zpracovatelný do trojrozměrné struktury s vlastnostmi šitými na míru pro zamýšlené použití scaffoldu (Birkinshaw, a další, 2013).



Obrázek č. 3 - Architektura scaffoldů ovlivňující buněčné vazby (Stevens, a další, 2005)

2.4 Druhy materiálů pro výrobu scaffoldů

Výroba nové tkáně vzniká pomocí kombinace buněk z těla pacienta s vysoce porézními biomateriály, scaffoldy, které působí jako „nosiče“ a řídicí jednotky růstu nové tkáně (O'Brien, 2011).

Volba materiálu scaffoldu v tkáňovém inženýrství závisí především na:

- biokompatibilitě materiálu (tzn. neprovokovat jakékoliv nežádoucí reakce tkáně na implantát)
- biologické rozložitelnosti (tzn. rozložitelné na netoxické produkty) (Cohen, a další, 1993).
- vhodných mechanických vlastnostech napodobujících určitou tkáň
- poróznosti a propustnosti materiálu k umožnění pronikání buněk a živin
- vhodné povrchové struktury a chemii pro upevnění buněk (Yang, a další, 2001)

Používané materiály s těmito vlastnostmi jsou:

- keramika
- kovy
- polymery (přírodní, syntetické)
- a kombinace materiálů (keramiky a polymerů)

Keramika

Biokeramika jako hydroxyapatit, bioaktivní skla, vápenatofosfátové keramiky atd., prezentují bioaktivní, biokompatibilní chování a byly použity jako plniva pro opravu defektů kostí a jako umělé kostní matrix.

Kovy

V průběhu minulého století, biokompatibilní materiály jako jsou kovy, keramika a polymery, byly značně používány pro chirurgické implantace. Kovy a keramika přispěly k velkým pokrokům v lékařství, zejména v oblasti ortopedických tkáňových náhrad. Typické kovové implantáty jsou z nerezové oceli, slitiny na bázi kobaltu a slitiny na bázi titanu (Brunski, 1996). Typické keramické materiály jsou z oxidu hlinitého, oxidu zirkoničitého a fosforečnanu vápenatého (Hench, 1996). Kovy a keramiky mají dvě hlavní nevýhody pro aplikaci v tkáňovém inženýrství.

- Za prvé, nejsou biologicky odbouratelné (s výjimkou biologicky odbouratelných, jako jsou biokeramiky α -fosforečnan vápenatý, β -fosforečnan vápenatý)
- a druhým je jejich velmi omezená zpracovatelnost.

Z těchto důvodů se začaly vědecké a zdravotnické obory zajímat o polymerní materiály.

Polymery

Tato práce se zabývá scaffoldy vyrobenými synteticky na polymerní bázi, konkrétně z polyvinylalkoholu – PVA. Proto jsme tomuto odstavci s polymery věnovali větší pozornost.

- Přírodní polymery, jako je kolagen, glykosaminoglykan, škrob, chitin, (Mano, a další, 1999) a chitosan, byly použity pro opravu nervů, kůže, chrupavky a kosti. Scaffoldy z přírodních polymerů, jako jsou kolagen a chitin, mají špatné mechanické vlastnosti pro transplantaci tkáně, protože nemohou být snadno tavené za tepla, ale vyžadují speciální rozpouštědlo.
- Mnoho syntetických resorbovatelných polymerů, jako je například poly (α - hydroxy esteru), polyanhydridy, polyorthoestery a polyphosphazens byly vyvinuty k překonání výše uvedených problémů spojených s přírodními polymery.

Většina syntetických polymerů jsou degradovány chemickou hydrolýzou a citlivé na enzymatické procesy tak, aby se jejich degradace přizpůsobila od pacienta k pacientovi. Důležitou třídou syntetických vstřebatelných polymerů zahrnuje poly (α - hydroxy ester) a kopolyestery kyseliny mléčné a kyseliny glykolové. Ve Spojených státech kyselina polyglykolová nebo polyglykolid (PGA), polymléčná kyselina nebo polylaktid (PLA), polydioxanon a jejich kopolymery jsou pouze syntetické odbouratelné polymery s rozsáhlou historií. Byly v provozu více než 20 let jako chirurgické šicí materiály a mají dlouhý a příznivý klinický záznam. Skupina PLA je nejvíce běžně používaný syntetický biomateriál.

Široké škály fyzikálních vlastností biomateriálů a jejich degradační doby může být dosaženo změnou poměrů monomeru v laktid/glykolid kopolymerů:

- poly-L-laktid (PLLA) a PGA vykazují vysoký stupeň krystality a rozkládají se poměrně pomalu,
- zatímco kopolymery PLLA a PGA (tj. PLGA) jsou amorfní a rozkládají se rychle (Perrin, a další, 1997)

Kombinace materiálů (keramika a polymery)

Osvědčují se i kombinace těchto materiálů. Vhodnou kombinací materiálů se dokážou přizpůsobovat vlastnosti scaffoldu tak, aby buňky jednak dobře rostly a jednak měly dobrou mechanickou odezvu. Zatím největší pokrok je dělaný na poli keramických nosičů, kdy se kombinují s polymery.

2.5 Výroba scaffoldů

Výrobu scaffoldů lze rozdělit do dvou hlavních kategorií:

- konvenční
- pokročilé.

2.5.1 Konvenční techniky výroby scaffoldů

1. Solné louhování (Solvent-casting and particulate-leaching)

Tato technika výroby spočívá v rozpuštění polymeru v rozpouštědle a následném smíchání roztoku s částicemi soli konkrétního průměru. Poté, co se rozpouštědlo odpaří, nám zůstane pevný polymer obsahující částičky soli. Vzniklý kompozit se poté ponoří do vody, kde dochází k vymývání solných částic. Takto nám vzniká vysoce pórovitý scaffold (s pórovitostí až 93%) a s průměrným průměrem pórů až 500 μm . Nevýhoda této techniky je omezení maximální tloušťky membrány na 3 mm (Mikos, a další, 1994), (Mikos, a další, 1996).

2. Vysokotlaké zplynování (Gas foaming)

Tato metoda výroby probíhá tak, že se biodegradabilní polymer natlakuje např. CO_2 , dusíkem, vodou nebo fluorofórmem dokud není polymer nasycen. Vlivem nukleace vzniknou v polymeru bublinky plynu o průměrech 100 až 500 μm . Tato metoda má výhodu v nepoužívání rozpouštědel. Hlavní nevýhodou je možnost vzniku struktur s málo propojenými póry (Di Mario, a další, 2005), (Haugen, a další, 2004), (Quirk, a další, 2004).

3. Inverze fází (Phase separation)

Během této metody se roztok polymeru prudce ochladí a nechá se usadit. Vzniknou nám dvě fáze, jedna bohatá na polymer a druhá chudá. Fáze s malým obsahem polymeru se odebere a vznikne nám vysoce porózní polymerová síť. Makro- a mikro- struktura výsledného scaffoldu je ovlivňována několika parametry výroby jako je např. koncentrace polymeru, teplota chlazení a rychlost chlazení. Výroba probíhá za nízkých teplot, které napomáhají začlenění bioaktivních molekul do struktury scaffoldu. Díky použití fázové separace vznikají nanovláknenné struktury, které napodobují přírodní extracelulární stavbu, která napomáhá k lepšímu uchycení buněk (Ma, a další, 1999), (Lee, a další, 2004).

4. Tavení (Melt molding)

Polymerní prášek smíchaný s pórotvornou sloučeninou je nasypán do formy a pod tlakem je forma zahřívána. V průběhu výrobního procesu se surové materiály spojí dohromady a vytvoří scaffold daného tvaru (té formy). Jakmile je výlisek vyndán, je pórotvorná látka vypláchnuta a po usušení dostaneme pórovitý scaffold. Tento výrobní proces neobsahuje žádná rozpouštědla, což umožňuje nezávislou kontrolu morfologie a tvaru. Mezi nevýhody patří jak možnost uvíznutí pórotvorné látky, tak zahřívání na vysokou teplotu, což zabraňuje zapracování bioaktivních molekul (Thomson, a další, 1995).

5. Zmrazování (Freeze drying)

Rozpuštěný polymer se zmrazí, a vlivem tvorby krystalků rozpouštědla polymer zvětší svůj objem. V druhé fázi je rozpouštědlo odstraněno za použití tlaku nižšího, než je bod rovnováhy plynného a pevného stavu rozpouštědla, tím pádem se rozpouštědlo vypaří a vznikne nám suchý polymerní scaffold, ve kterém zůstanou propojené póry a mikrostruktury. Pórovost závisí na koncentraci roztoku a velikosti pórů na bodu mrazu. Mimo výrobu pórovitých scaffoldů se tato technika také používá k sušení biologických vzorků pro ochranu jejich bioaktivity (Pikal, a další, 1990), (Liapis, a další, 1994).

2.5.2 Pokročilé techniky výroby scaffoldů

1. Elektrostatické zvlákňování (Electrospinning)

Využívá elektrického náboje k umístění vláken v rozměrech nanometrů. Touto metodou byly vytvořeny vzorky scaffoldů zkoumané v této práci (Obrázek č. 4).

Struktury vyrobené pomocí nanovláken jsou známy pro svoji schopnost modelovat širokou škálu chování buněk. Tyto struktury mají pozitivní dopad na přichycení buněk a jejich šíření v porovnání s mikrovláknými a mikropórovými strukturami. Struktury mají větší povrch pro absorbování proteinů než mikrostruktury, což umožňuje lepší přichycení membrán.

Výrobní sestava obsahuje tři hlavní části: stříkačka na polymerický materiál, zdroj vysokého napětí a kolektor, na které jsou vlákna nanášena. Při výrobě scaffoldů touto metodou jsou velmi důležité tyto parametry: vlastnosti roztoku polymeru (viskozita, molekulární hmotnost polymeru, vodivost polymeru a povrchové napětí roztoku), parametry zpracování roztoku (napětí, vzdálenost stříkačky a kolektoru, rychlost proudění roztoku) a parametry vnějšího prostředí (**vlhkost a teplota**). Pro tkáňové inženýrství se nejvíce hodí nanovlákna s velkým poměrem povrchu k objemu (Stevens, a další, 2005), (Huang, a další, 2003), (Jain, 2006).



Obrázek č. 4 - Elektrostatické zvlákňování Nanospider (<http://www.filtsep.com/view/4480/integrating-nanofibres-into-filtration-media/>)

2. „Rapid prototyping“

Jsou alternativou k zaběhnutým metodám výroby scaffoldů. Nedávno se začalo používat i v tkáňovém inženýrství. Metody RP jsou založeny na počítačem asistovaným návrhem (CAD) a výrobou (CAM). RP metody umožní lepší kontrolu výroby vnitřní mikrostruktury a vnější tvar. Mezi základní RP metody patří stereolithografie (SLA), selektivní laserové spékání (SLS), nanášení taveného materiálu (FDM) a 3D tisknutí. Pro RP metody můžeme vybírat z materiálů jako jsou polymery, keramika a kovy. RP metody umožňují zapracování živých buněk a růstových faktorů do scaffoldů.

2.6 Možnosti popisu materiálových vlastností obecně

Popisem materiálových vlastností a jejich vývojem v čase se zabývá reologie. Reologie je vědní obor mechaniky spojitého prostředí (mechaniky kontinua), který se věnuje zkoumání a modelování deformačních vlastností látek, zejména závislosti deformace a napětí (Plánička, a další, 2007).

Mikrostruktura pevných látek výrazně ovlivňuje jejich mechanické vlastnosti – jejich pružnost a pevnost. Řada látek používaných v technické praxi má charakter pružně-spojitého prostředí, takže z hlediska zkoumání deformačních dějů z makroskopického hlediska se k těmto látkám přistupuje jako ke kontinuu.

Tento model kontinua umožňuje využít matematickou teorii spojitého prostředí jedné nebo více proměnných, přičemž rozpor s nespojitou fyzikální realitou, projevující se ve velmi malých objemech, překleneme tak, že jednotlivým bodům kontinua připsáme veličiny, které jsou středními hodnotami z dostatečně velkého okolí bodu kontinua. Uplatňuje se zde jevová metoda, přičemž fyzikální vlastnosti látky, podmíněné jejich mikrostrukturou, jsou popsány obecně spojitými funkcemi místa v tělese. Některé z nich lze považovat za konstanty, nazývané materiálové konstanty (Vybíral).

Působení vnějších sil na jakékoliv těleso způsobuje uvnitř tělesa mechanické napětí. V důsledku vnitřního napětí působícího v tělese dochází k příslušné deformační odezvě závislé na mechanických vlastnostech materiálu (Tlapák, 2004).

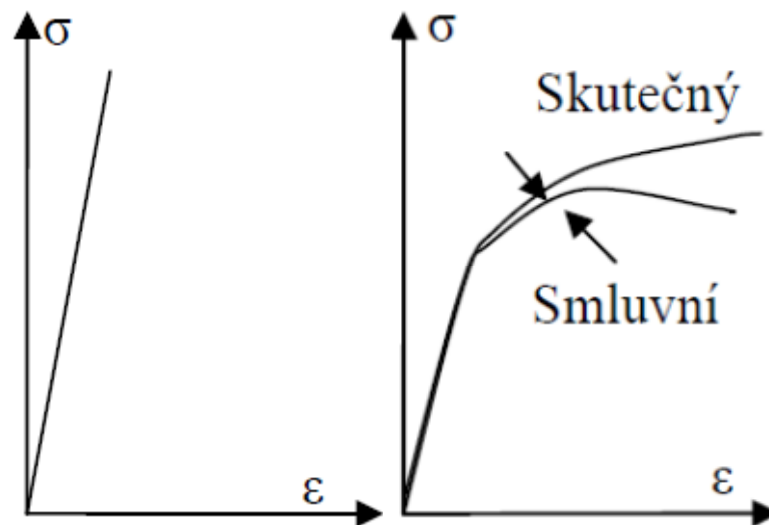
Pro popis těchto mechanických vlastností nám slouží diagram $\sigma - \varepsilon$ dle obrázku Obrázek č. 5.

σ je vztažena k příčnému průřezu tělesa a nabízí se dva přístupy:

- Buď vztáhnout působící sílu k průřezu na **počátku** sledovaného děje, pak se mluví o **smluvním napětí**,
- nebo k **aktuálnímu** průřezu, který se samozřejmě v průběhu deformačního děje mění. Pak se mluví o **skutečném napětí**.

Skutečná napětí, jak dokumentuje Obrázek č. 5, v limitních stavech deformační odezvy tělesa jsou pochopitelně očekávaně vyšší, než napětí smluvní, protože zde dochází k příčným deformacím.

Výrazný rozdíl mezi smluvním a skutečným napětím je u tvárných materiálů (Obrázek č. 5).



Obrázek č. 5 - Vlevo: diagram tahové zkoušky v tahu u křehkých materiálů. Vpravo: diagram tahové zkoušky v tahu u tvárných materiálů.

Levá část Obrázek č. 5 nám zobrazuje oblast lineární odezvy, kde se předpokládá, že deformace mají elastický, tedy vratný charakter. Pro popis téhle oblasti platí tzv. **Hookův zákon**, což je lineární závislost napětí na deformaci.

Konstantou úměrnosti je tzv. **Youngův modul pružnosti**. Youngův modul nám tedy udává výchozí materiálovou charakteristiku pro většinu materiálů, důležitou proto, abychom materiály používali v jejich elastické oblasti a nedocházelo k jejich nevratnému poškození v průběhu jejich používání.

V pravé části Obrázek č. 5, ve druhé části tahového diagramu (za mezí kluzu) dochází k nárůstu deformace při podstatně pomalejším nárůstu síly. Při odlehčení vzorku v této části zatěžování se vzorek nevrátí do původního tvaru – vzniká trvalá deformace. Celkovou deformaci můžeme rozložit do dvou částí, elastické (vratné, lineární části) a plastické (trvalé, nelineární části). V plastické oblasti je Poissonovo číslo $\mu \geq 0,5$, protože nedochází již ke změně objemu ve vzorku, ale ke strukturálním změnám vláken ve vzorku (viz kap. 0) (Hamala, a další, 2011).

2.7 Možnosti detekce reologických vlastností materiálů

Vlastnosti materiálů se „získávají“ pomocí experimentů – zkoušek. Mezi nejznámější patří např. tahová zkouška, torzní – krutová zkouška, pěchovací zkouška, zkoušky ohybem atd. Výše uvedené zkoušky patří mezi tzv. destruktivní metody zkoušení.

V této práci využíváme, s ohledem na dostupné vybavení, tahovou zkoušku jednoosým tahem.

Zkušební vzorek je uchycen do zkušebního stroje. Vzorek je zatěžován rostoucí jednoosou silou, která způsobí prodloužení vzorku až do jeho přetržení.

Základním výsledkem zkoušky je tedy **závislost mezi osovou silou a prodloužením vzorku**

$$F - \Delta L.$$

Tento graf se ovšem běžně nepoužívá, častěji se používá graf **závislosti napětí - poměrné podélné prodloužení**

$$\sigma - \varepsilon.$$

Zjednodušeně můžeme říci, že hlavní výhodnou zobrazení ($\sigma - \varepsilon$) je nezávislost na průměru a délce zkušební části vzorku.

K přepočtu grafu ($F - \Delta l$) použijeme vzorce:

$$\sigma = \frac{F}{S_0}$$

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0},$$

kde F je zatěžující síla, S_0 je počáteční plocha průřezu, Δl je prodloužení zkušební části vzorku a l_0 je počáteční délka zkušební části vzorku.

- Diagram ($\sigma - \varepsilon$) popisuje chování materiálu „v bodě“, je nezávislý na tvaru vzorku a závisí pouze na použitém materiálu (technologii výroby apod.).
- Naopak diagram ($F - \Delta l$) popisuje chování „celého vzorku“ a závisí nejen na materiálu, ale i na tvaru.

V této oblasti tahových jednoosých zkoušek je k dispozici řada studií. Do vlastní rešeršní části, ve které jsme hledali inspiraci pro nastavení vlastního experimentu, jsme vybrali některé studie.

Li a další srovnávali mechanické vlastnosti kolagenu, želatiny (denaturovaný kolagen), rozpuštěného alphaelastinu a, jako první, rekombinantního lidského tropoelastinu jako biopolymerních materiálů pro zhotovení nanovlákných scaffoldů pomocí metody elektrostatického zvlákňování. Tyto scaffoldy, mající rozměry: výška přibližně 0,2 mm – 0,5 mm, šířka 5 mm a délka 25/50 mm, podrobili tahové zkoušce tak, že vzorek scaffoldu byl upevněn do svislých čelistí přístroje měřícího tah o rozměru 1x1 cm. Volná délka vzorků byla nastavena na 15/40 mm, rychlost zatížení byla 0,2 mm/s a frekvence 50 Hz. Z vyexportovaných dat byla vyhotovena deformační křivka nanovlákných scaffoldů. Pro výpočet tahové zkoušky použili vzorec: napětí = síla/ plošná hustota x šířka, kde plošná hustota je hmotnost vzorku/délka x šířka (Li, a další, 2002).

Mauck, Soltz a další měřili mechanické vlastnosti scaffoldů v tahu na vzorcích o tloušťce 0,7-1 mm, délky 4 cm a šířky 0,5 cm. Rozměry vzorků a jejich hmotnost byla měřena před každou zkouškou k vypočítání zdánlivé hustoty. Parametry byly nastaveny na sinusový cyklus 5%, napětí 0,1 Hz, konstantní rychlost 0,1 %. Modul pevnosti v tahu byl počítán z lineární části křivky napětí-deformace (Mauck, a další, 2000), (Soltz, a další, 1998), (Soltz, a další, 2000).

Mechanickými vlastnostmi modulu pružnosti v ohybu vzorků scaffoldů se zabýval Salvetat et. al. Elastické vlastnosti nanovlákných scaffoldů byly měřeny pomocí AFM NANOSKOP III a Multimode a křemíkovou konzolí s nominální pružinovou konstantou 0,58 N/m k vytvoření třibodového ohybu. Jako podklad se využívá kalibrační AFM mřížka, na které je měřen ohyb nanovláken. Byla odečtena hodnota z hrotu ve středu scaffoldu, a i další dvě měření podél nanovláken scaffoldu. Účelem tohoto měření bylo zjištění ohybu pružnou modulu pružnosti v ohybu (Humar, a další, 2006), (Salvetat, a další, 1999).

Mnoho zahraničních studií se tedy zabývá měřením Youngova modulu pružnosti v tahu či ohybu, jakožto testování elastické složky scaffoldů.

Předpokládá se, že mechanické vlastnosti polymerních nanovláken vyrobených elektrostatickým zvlákněním jsou ovlivněny průměrem vlákna, molekulární geometrií, molekulární orientací a stupněm krystalinity.

Youngův modul pružnosti v tahu je hodnocen od počátku jako lineární elastická deformace a je citlivý na globální deformace testovaných vzorků. Hodnoty s vysokou pevností v tahu a jedinečným deformačním chování lze přičíst k posílení anizotropie vzorků (Wong, a další, 2008).

Pro tuto práci a jeho měřicí protokol ovšem tyto informace nebyly stěžejní, z hlediska definic mechanických vlastností, protože nás zajímala pouze deformační odezva.

Míru odlišnosti mezi skutečným a smluvním diagramem (viz Obrázek č. 5) nám pomůže osvětlit měření další elastické konstanty, jako je Poissonův poměr.

2.8 Vztah poměrné a příčné deformace

Tato práce je zaměřená na sledování deformační odezvy, především stanovení souvislosti podélné a příčné deformace. K tomu jsme použili v technických oborech zavedený parametr, kterému se říká Poissonovo číslo.

2.8.1 Historie Poissonova čísla

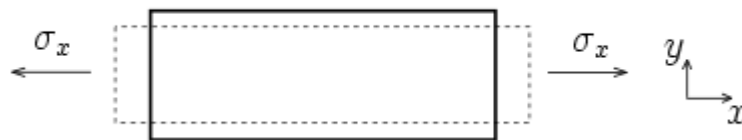
V literatuře se setkáváme s pojmem Poissonův poměr, Poissonův koeficient či Poissonovo číslo.

„Poissonovo číslo“ nese název po francouzském teoretickém fyzikovi a matematikovi, Siméona Denise Poissona (1781-1840). Siméon Poisson byl profesorem matematiky, následně profesorem racionální mechaniky a působil též na Sorbonně.

S jeho jménem je spjato mnoho dalších pojmů, např. *Poissonova rovnice* (udává souvislost mezi tlakem a objemem při adiabatické stavové změně ideálního plynu), *Poissonova konstanta* (podíl molových tepel plynů při stálém tlaku a objemu), *Poissonovy závorky* (operátor), *Poissonovo rozdělení* (statistická fyzika) (Jáchim, 2011).

2.8.2 Poissonovo číslo

Poissonovo číslo vyjadřuje poměr relativního prodloužení vzorku k jeho relativnímu příčnému zkrácení (zúžení) při zatížení jednoosým tahem dle obrázku (Obrázek č. 6) (UK, 2013).



Obrázek č. 6 - Vyjádření Poissonova poměru graficky (2005-05-18 13:54 Pgaige 385×135×8 (3641 bytes)
Illustration du coefficient de Poisson `{{GFDL}}` réalisé à l'aide de sodipodi+gimp (fichiers originaux à disposition sur demande)

Poissonův koeficient či poměr se označuje řeckým písmenem „ ν “ [ný] a vychází ze vztahu:

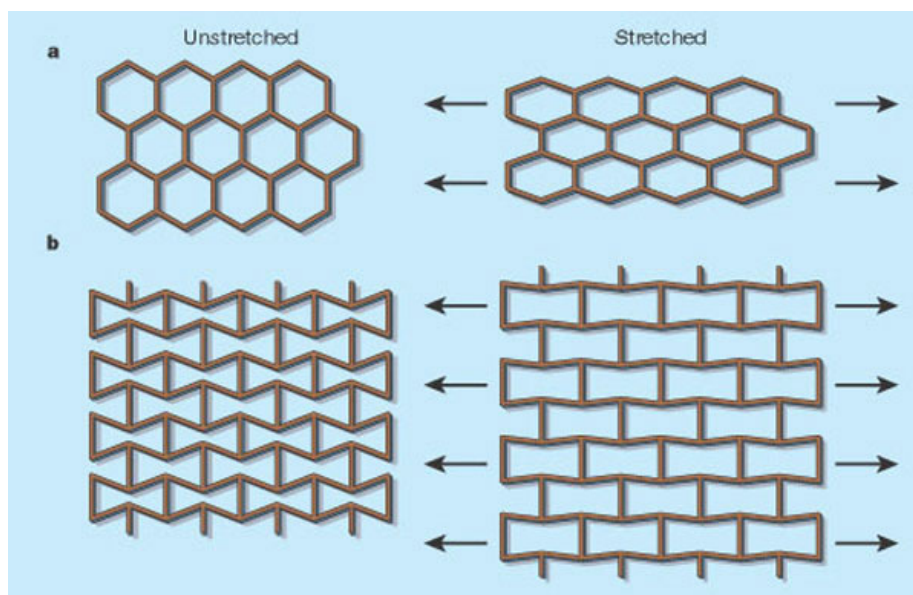
$$\nu = - \frac{\Delta D/D}{\Delta L/L},$$

kde ν je Poissonův poměr, D je počáteční šířka vzorku, L je počáteční délka vzorku, ΔD a ΔL je změna šířky a délky vzorku při měření v tahu (Moroni, a další, 2005)

Poissonovo číslo se u většiny materiálů pohybuje v rozmezí od 0 do 0,5. Pro nestlačitelná tělesa je hodnota Poissonova čísla 0,5 (potencionálně až do hodnoty 1), protože ve vzorku již nedochází ke změně objemu, ale struktury.

Poissonovo číslo může být i záporné. U materiálů s kladným Poissonovým číslem, kterých je většina, dochází v tahu k prodloužení délky a ke zmenšení šířky vzorku. Existují však i materiály, u kterých je to obráceně. Znamená to, že se v tahu vzorek prodlužuje a šířka se zvětšuje. Označují se jako auxetické materiály, které jsou charakterizované záporným Poissonovým číslem (Cambell, a další, 2002).

Vliv na pozitivitu či negativitu Poissonova čísla má vliv struktura materiálu (Obrázek č. 7).



Obrázek č. 7 - Auxetické a neauxetické materiály (Prall, a další, 1997)

3 CÍLE A ÚKOLY PRÁCE, HYPOTÉZY

3.1 Cíle práce

S ohledem na rešeršní a teoretické zpracování částí práce jsou cíle práce formulované takto:

1. Určení míry příčné deformace u nanovláknenných scaffoldů vyrobených z PVA polymerů technikou elektrostatického zvlákňování.
2. Zjistit míru odlišnosti příčné deformace u různých skupin nanovláknenných scaffoldů vyrobených z PVA polymerů technikou elektrostatického zvlákňování.

3.2 Úkoly práce

Pro splnění cílů práce bylo nutné vytvoření metodiky vlastního měření. Pořadí činností v rámci plnění úkolů bylo stanoveno následovně:

1. provedení rešerše dostupné literatury
2. návrh metodiky měření
3. návrh a realizace experimentu
4. zpracování a vyhodnocení experimentálních dat
5. interpretace výsledků

3.3 Hypotézy

Hypotézy práce byly definované s ohledem na cíle práce.

1. Nanovláknenné scaffoldy vyrobené z PVA elektrostatickým zvlákňováním technologií Nanospider jsou stlačitelné vzhledem k jejich velké pórovitosti.
2. Na míru příčné deformace má vliv poměr $U:L$ ¹ vzorků.
3. Na míru příčné deformace má vliv doba síťování vzorků.
4. Na míru příčné deformace nemá vliv hydratace.

¹ $U:L$ viz kapitola 4.1

4 METODIKA PRÁCE

4.1 Popis výzkumného souboru

Testovaný soubor se skládal z **15 typů scaffoldů** (jeden vzorek o rozměru 10x10 cm), které byly rozřezány a připraveny na **90 vzorků**. Pro výzkum jsme měli k dispozici scaffoldy z poly-vinyl-alkoholu vyrobené hladinovým elektrostatickým zvlákněním technologií Nanospider 2. generace. Zkoumané typy scaffoldů se od sebe liší dobou síťování, poměrem U:L, a zda jsou v suchém či hydratovaném stavu. Doba síťování nám určuje hydrofóbnost (odolnost vůči vodnímu prostředí) daného vzorku. Poměr roztoků (U:L) nám značí poměr nízkomolekulární (molekulární hmotnost poly-vinyl-alkoholu 40 kDa) a vysokomolekulární (molekulární hmotnost poly-vinyl-alkoholu 220 kDa) hmotnosti látky v roztoku. Hydratovaný vzorek byl ponořen do Ringerova roztoku² a následně měřen.

Parametry výroby nanovlákněných PVA scaffoldů:

- Napětí: 40-60 kV
- Vzdálenost od kolektoru: 150 mm
- Proud: nezaznamenáván
- Vlhkost: Stabilní vzdušná vlhkost laboratoře (neovlivňováno)
- Teplota: Pokožová teplota (neovlivňováno)
- Molekulární hmotnost roztoků: 40 kDa, 220 kDa
- Látka použitá k síťování: Glyoxal
- Teplota síťování: 60°C
- Doba síťování (hodiny): 24, 48, 72
- Poměr roztoků (U:L): 1:1, 1:2, 1:3, 2:1, 3:1

² Ringerův roztok obsahuje: Natrii chloridum 8,60 g, Kalii chloridum 0,30 g, Calcii chloridum 2 H₂O 0,33 g, Agua pro iniectione ad 1000ml. Osmolarita roztoku činí 309 mOsm/l. Titrační acidita (pH 7,4) < 0,3 mmol/l. pH 5,0 – 7,0

Obsah elektrolytů: Natrii 147 mmol/l, Kalii 4,0 mmol/l, Calcii 2,3 mmol/l, Chloridi 156 mmol/l.

Přehled zkoumaných vzorků viz Tabulka č. 1:

Tabulka č. 1 - Přehled zkoumaných vzorků

Doba síťování	U:L	Počet celých vzorků	Počet měřených vzorků	Počet suchých vzorků	Počet hydratovaných vzorků
24 hodin	1:1	1	6	3	3
	1:2	1	6	3	3
	1:3	1	6	0	3
	2:1	1	6	0	1
	3:1	1	5	3	2
48 hodin	1:1	1	6	3	3
	1:2	1	6	3	3
	1:3	1	5	3	2
	2:1	1	6	3	3
	3:1	1	6	0	3
72 hodin	1:1	1	6	3	3
	1:2	1	6	3	3
	1:3	1	6	3	3
	2:1	1	5	3	2
	3:1	1	5	2	3

Barevně označená čísla poměrů vzorků nám zobrazují ty vzorky, které nebyly zahrnuty do celkového hodnocení. Jejich testování se nezdařilo pro jejich přílišnou křehkost, vzorky pocházely z jiné šarže a nekorespondovaly se zbytkem souboru (vzorky s poměrem U:L 1:3, U:L 2:1, U:L 3:1).

Červeně označené počty vzorků označují takové vzorky, u kterých se měření nezdařilo z důvodu manuálního poškození vzorku již při dodání nebo při přípravě.

4.2 Příprava měřených vzorků

Příprava vzorků scaffoldů pro náležité měření byla inspirována prací „Biomechanická reflexe scaffoldu na mechanické zatěžování“ (Anděrová, 2014). Proces byl modifikován pro účely vlastní práce a jeho popis je soustředěn do následujících kapitol.

1. Vytvoření dílčích vzorků

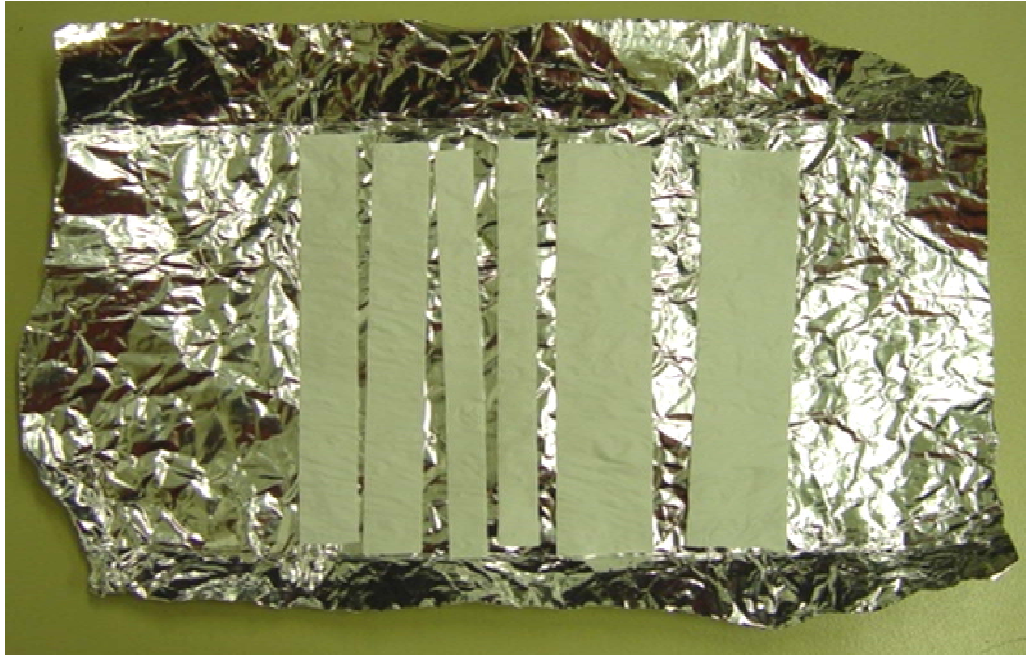
Vzorky scaffoldů jsme obdrželi v podobě čtverců o rozměru 10x10 cm (Fotografie č. 1), které jsme museli upravit do odpovídajících rozměrů, použitelných k upevnění do čelistí μ -testeru (Fotografie č. 2):

- 2 cm
- 1,5 cm
- 1 cm.

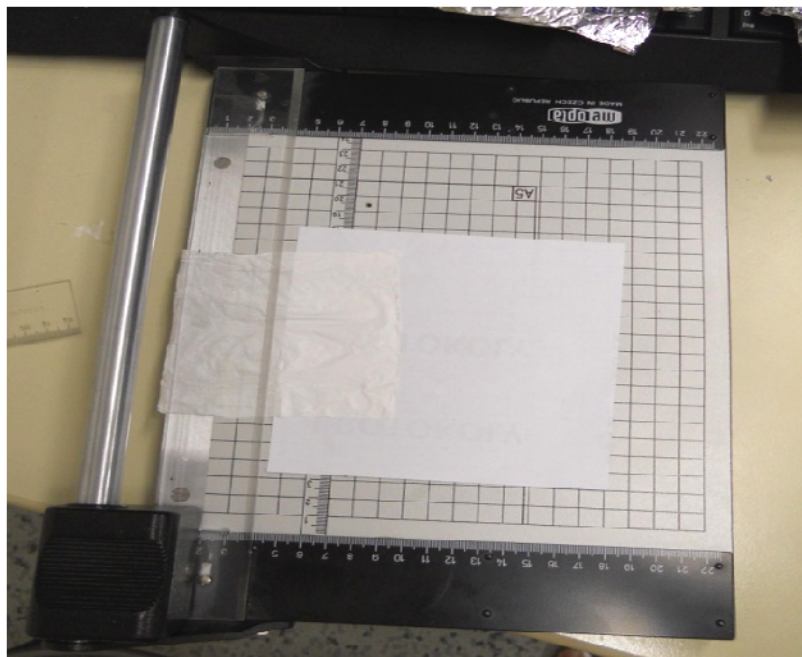
Tento krok jsme uskutečnili pomocí řezačky na fotografie Meopta (Fotografie č. 3).



Fotografie č. 1 - Celý vzorek scaffoldu



Fotografie č. 2 - Rozřezané scaffoldy



Fotografie č. 3 - Řezačka na fotografie Meopta

2. Podlepení vzorků

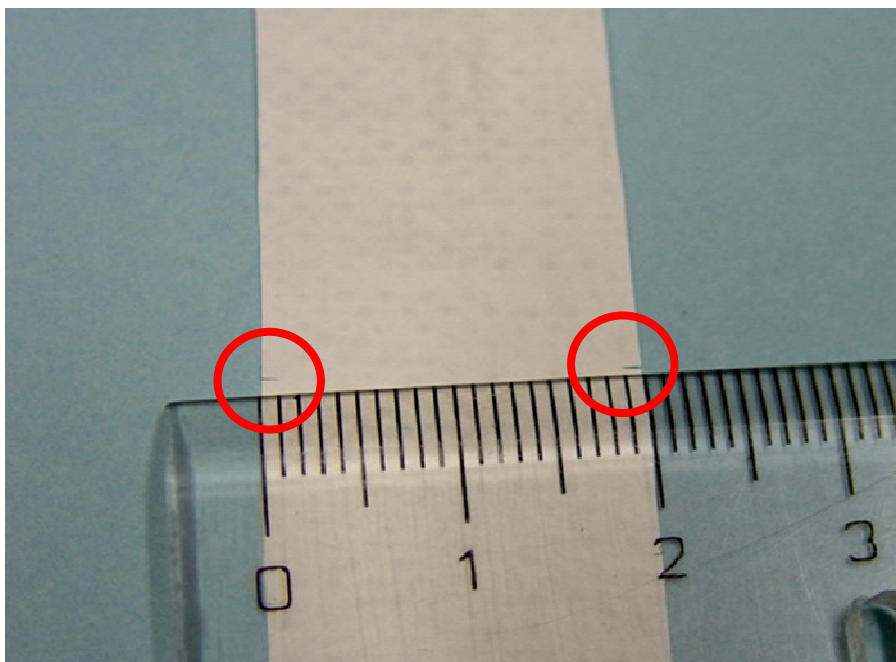
Rozřezané scaffolds jsme na každém konci podlepili papírovou lepicí páskou, což se nám osvědčilo pro lepší uchycení a neporušení vzorku v čelistích μ -testeru (Fotografie č. 4). Mezi páskami je volná délka scaffoldu 7 cm.



Fotografie č. 4 - Podlepené scaffolds lepicí páskou

3. Vytvoření vrubu

Dalším krokem je vytvoření vrubu na obou okrajích vzorku hlubokého 1 mm, u jednocentimetrových vzorků 0,5 mm na každé straně. Vrubem jsme si definovali koncentraci napětových sil právě do středu vzorku za účelem standardizace podmínek jeho porušení (Fotografie č. 5).



Fotografie č. 5 - Vytvoření vrubu

Takto hotové a popsané vzorky byly připraveny k měření.

V případě přípravy hydratovaných vzorků byl postup shodný s přípravou suchých vzorků. Hydratace vzorku byla ale provedena až po upevnění vzorku do čelistního systému, kvůli nevyhovujícímu stáčení se okrajů vzorků. Podrobnější popis a zdůvodnění se řeší v kapitole 4.3.2. (viz kapitola 4.3.2).

4.3 Měření

Měření probíhalo na Fakultě tělesné výchovy a sportu Univerzity Karlovy v Praze v laboratoři Biomechanika Extrémní Zátěže (BEZ). V laboratoři se teplota vzduchu po dobu všech měření pohybovala mezi 21 - 24 °C a vlhkost mezi 60 - 65%. Nejdříve proběhlo měření suchých vzorků a následně hydratovaných vzorků.

Pro výzkum scaffoldů jsme použili měřicí zařízení μ -tester, které disponuje dvěma čelistmi. Čelisti jsou univerzální, umožňují výškové nastavení. μ -tester je vybavený jedním siloměrným čidlem, které je umístěno na nepohyblivé čelisti, což tvoří pevný rám. V případě našeho měření použité čidlo umožňovalo nastavení síly v rozmezí od 10 N do 250 N s přesností 0,01% z rozsahu. Pohyb druhé, posuvné čelisti je zajištěn pomocí lineárního elektromotoru a je snímán nezávislým systémem pomocí indukčního čidla s přesností 0,025

mm. Průběh pohybu čelistí je softwarově řízen pomocí jednoduchých příkazů. Z příkazů je možné vytvořit sekvenci, se kterou ve formě textového souboru pracuje ovládací software μ -testeru. Pohyb je tak po spuštění přístroje obsluhou vykonáván automaticky.

K μ -testeru je připojený fluorescenční mikroskop s HD kamerou Olympus 320 pro online obrazový záznam.

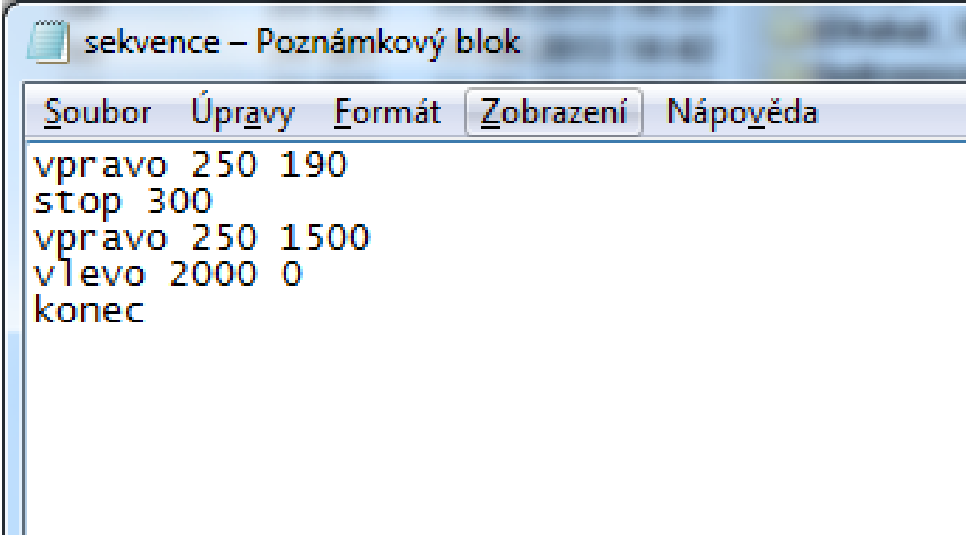
4.3.1 Postup měření pro suché vzorky

Měření pro vzorky v suchém stavu probíhalo pro každý vzorek v následujících krocích:

1. Nastavení μ -testeru.

Tento skript nám zajistí pohyb čelistí vpravo rychlostí 250 jednotek o 190 kroků (1 krok = 0,025 mm). Následně se čelisti zastaví na 300 framů (1 frame = 0,05 s), pak se čelisti posunují rychlostí 250 jednotek na pozici 1500 a poté se čelisti vrátí rychlostí 2000 jednotek do výchozí polohy (Obrázek č. 8).

Nastavení proběhlo vždy na počátku měření vzorků dané skupiny. Přístroj si sekvenci pamatoval a nebylo tedy nutné tento krok opakovat pro každý vzorek zvlášť.

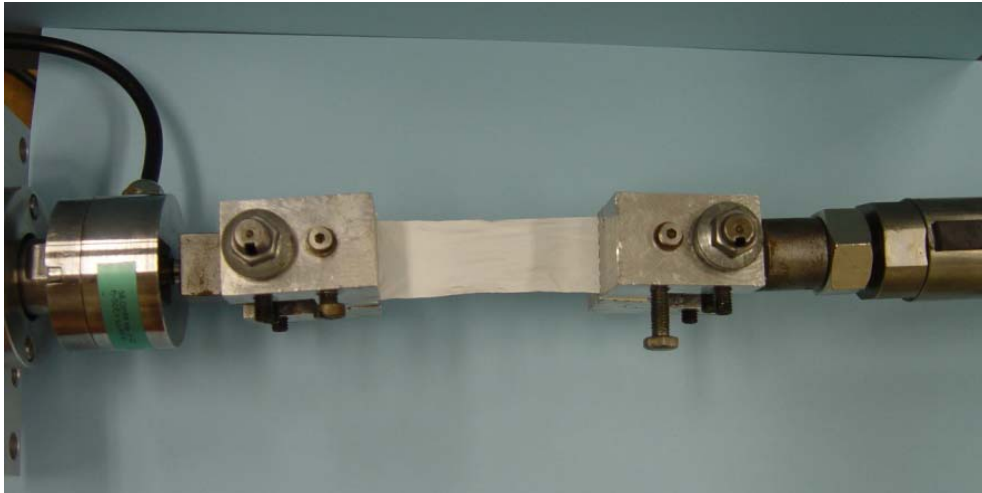


```
sekvence - Poznámkový blok
Soubor Úpravy Formát Zobrazení Nápověda
vpravo 250 190
stop 300
vpravo 250 1500
vlevo 2000 0
koniec
```

Obrázek č. 8 - Sekvence pro pohyb μ -testeru

2. Upevnění vzorku do čelistí μ -testeru (Fotografie č. 6)

Nastavili jsme si čelisti μ -testeru tak, aby byly ve stejné výšce a stejně orientované. Poté jsme do nich upnuli vzorek scaffoldu tak, aby okraje lepicí pásky korespondovaly s okraji čelistí. Scaffold jsme nastavili do volné délky, čili 7 cm.



Fotografie č. 6 - Upevnění suchého vzorku do čelistí μ -testeru

3. Nastavení kamery (zaostření, nastavení clony apod.)

Pro kvalitní dokumentaci průběhu měření jsme v ovládacím programu HD kamery Olympus 320 nastavili:

- zaostření
- clonu
- počet snímků jednoho měření, který čítal 304 snímků (Obrázek č. 9)



Obrázek č. 9 - Prostředí ovládacího softwaru kamery

4. Spuštění měření

Po provedení předchozích kroků bylo spuštěno měření. Synchronizace spuštění měřicího a zobrazovacího zařízení není dostupná, proto měření započalo spuštěním HD kameru Olympus 320 a následně μ -testeru.

5. Ukládání a zálohování dat

Po ukončení pohybu čelistí jsme vyexportovali snímky z HD kamery do souborového formátu TIFF a naměřená data z μ -testeru ve formátu TXT.

4.3.2 Postup měření pro hydratované vzorky

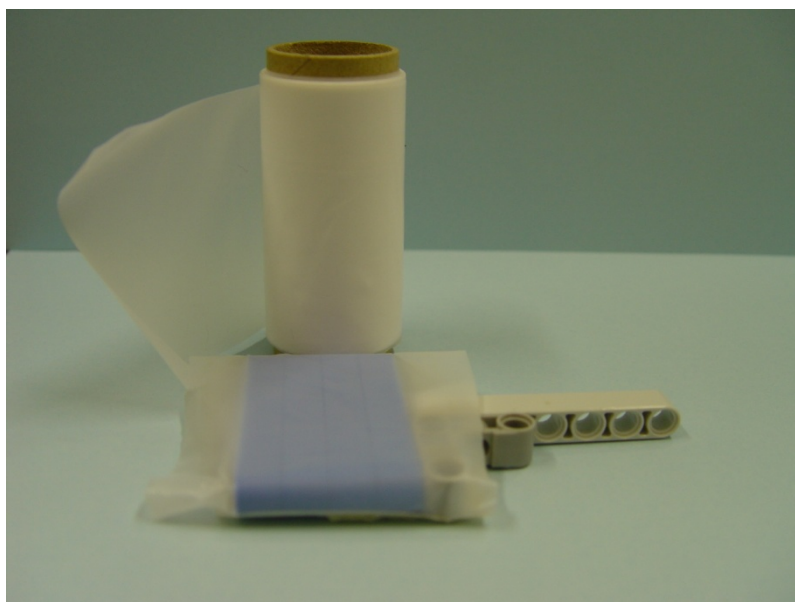
Programové nastavení se shoduje s nastavením měření suchých vzorků. Odlišnost najdeme ve volné počáteční délce vzorku, která se měnila vlivem jejich bobtnání ve vlhkém prostředí.

Zásadně rozdílné je ovšem uchycení vzorků mezi čelistmi, a to z důvodu jejich tendence ke stáčení okrajů (Fotografie č. 7). V důsledku tohoto jevu bychom nebyli schopni odečítat sledovanou okamžitou šířku vzorků.



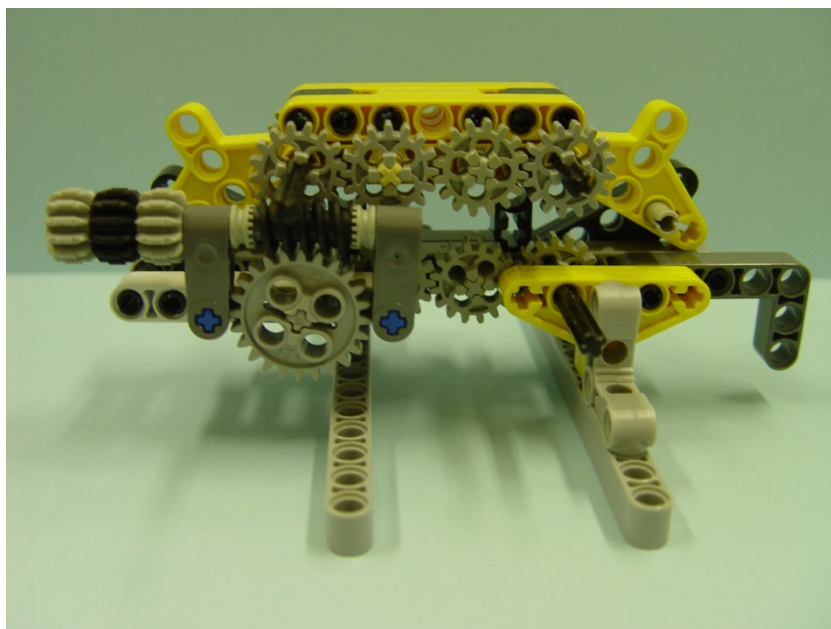
Fotografie č. 7 - Nevyhovující metodika hydratovaného vzorku scaffoldu

Problém se stáčením okrajů vzorků jsme vyřešili jejich podložením. K tomu jsme použili teflonovou pásku, která se nám ze zkoušených materiálů osvědčila nejlépe (Fotografie č. 8).

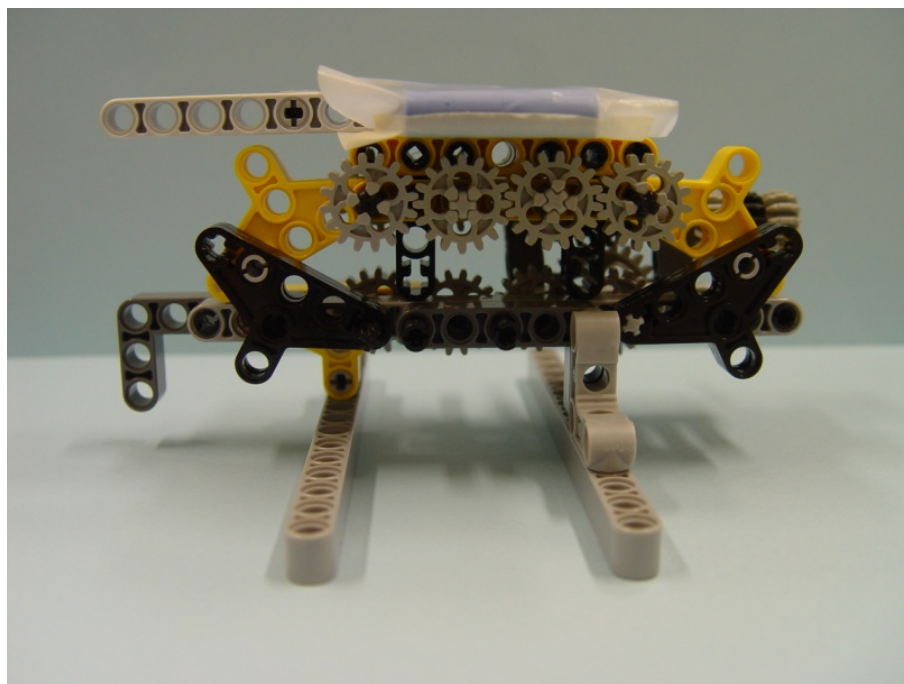


Fotografie č. 8 - Podložení z teflonové pásky

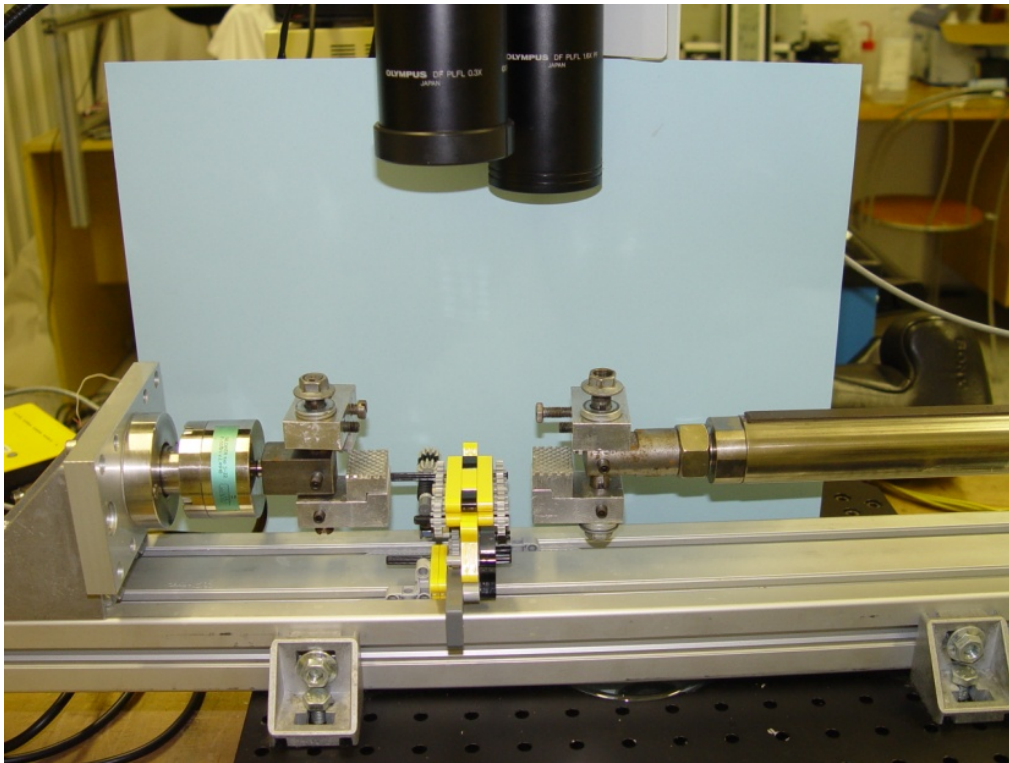
Pro zachování vodorovnosti vzorku a minimalizace vlivu přidané hmotnosti teflonové pásky a podložky jsme použili pomocnou konstrukci ze stavebnice Lego, která byla výškově nastavitelná a stabilní (Fotografie č. 9), (Fotografie č. 10), (Fotografie č. 11).



Fotografie č. 9 - Podpůrná nastavitelná konstrukce bez podložky s teflonovou páskou

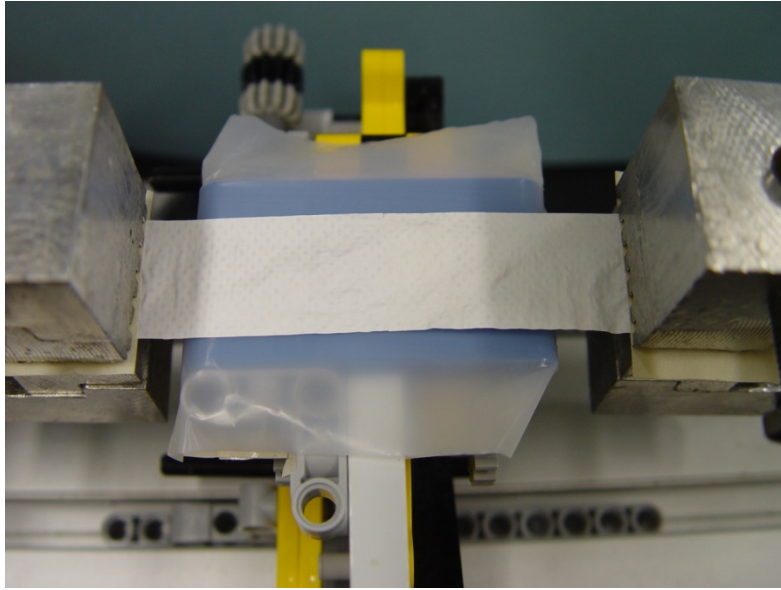


Fotografie č. 10 - Celkový vzhled podpůrné konstrukce

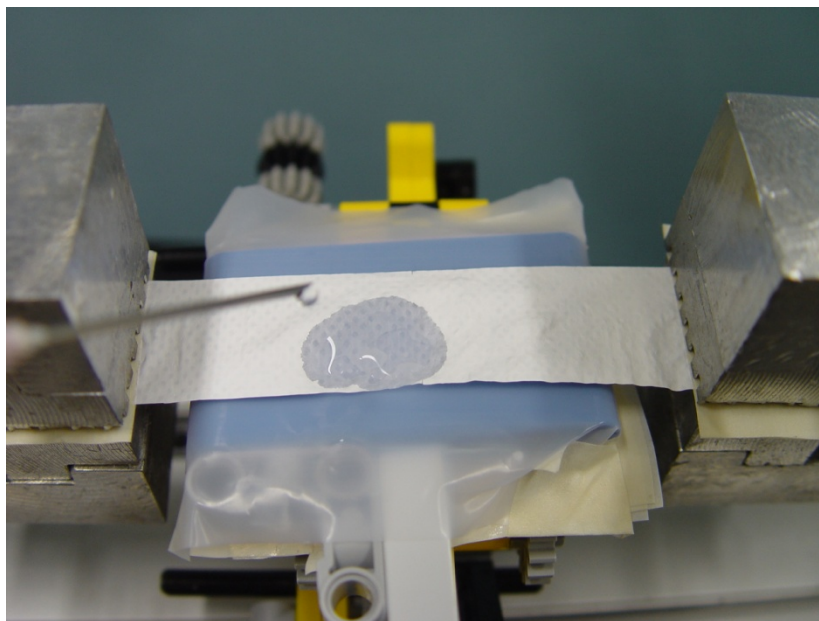


Fotografie č. 11 - Nainstalovaná podpůrná konstrukce do μ -testeru

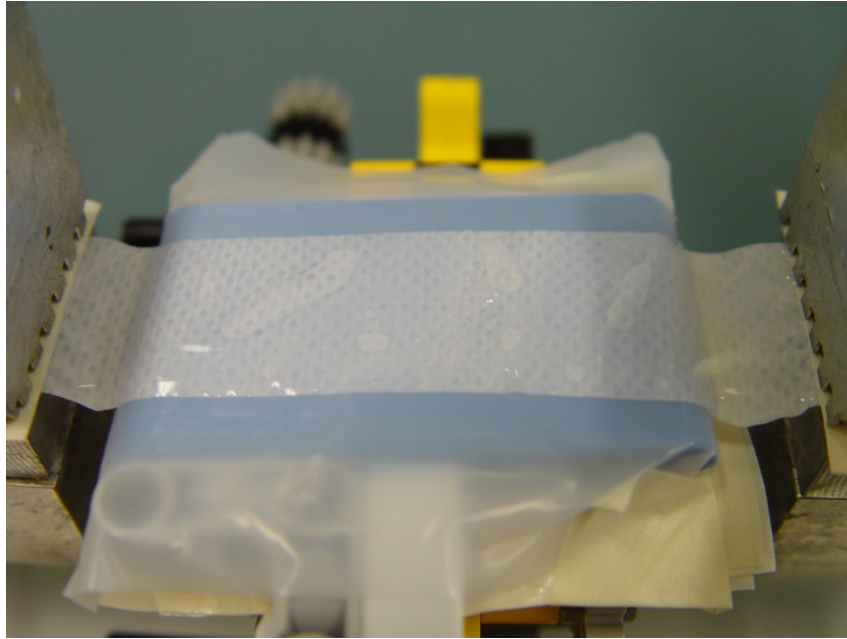
Pro zamezení stočení okrajů byly vzorky do čelistí μ -testeru upínány suché. Hydratace vzorku byla provedena po nastavení podpůrné konstrukce, kdy byl zajištěn dostatečný a rovnoměrný kontakt vzorku s teflonovou páskou (Fotografie č. 12, Fotografie č. 13, Fotografie č. 14).



Fotografie č. 12 - Upnutí suchého vzorku do μ -testeru na podpůrné konstrukci



Fotografie č. 13 - Hydratace vzorku



Fotografie č. 14 - Hydratovaný vzorek na podpůrné konstrukci

Přebytečný roztok byl z teflonové pásky odsáván papírovým kapesníkem. Hydratací se počáteční délka vzorků prodloužila o $0,3 \text{ cm} \pm 0,1 \text{ cm}$.

4.4 Zpracování dat

Vyexportovaná data z μ -testeru jsme zpracovali v prostředí programu MS Excel (Obrázek č. 10) a zároveň jsme veličiny přepočítali z framů a kroků do soustavy jednotek SI (1 frame = 0,05 s; 1 krok = 0,025 mm), (Obrázek č. 11).

	A	B	C	D	E	F
1	Čas [frame]	Poloha [krok]	Síla [mV/V]			
2	1	0	-0,29712554			
3	2	0	-0,29081309			
4	3	0	-0,28825614			
5	4	1	-0,29360974			
6	5	4	-0,29241118			
7	6	6	-0,29360974			
8	7	9	-0,28897528			
9	8	13	-0,29033366			
10	9	15	-0,30327819			

Obrázek č. 10 - Vyexportovaná data z μ -testeru do programu MS Excel (např. vzorek 1. 20130730T194408, 1-1 24 hod, č. 1, 1,5cm, N S)

Legenda k Obrázek č. 10:

20130730T194408 - identifikační číslo vzorku

1-1 - poměr U:L vzorku

24 hod - doba síťování vzorku

č. 1 - první vzorek ze šesti z jednoho scaffoldu 10x10 cm

1,5 cm - šířka vzorku 1,5 cm

S - suchý vzorek

	A	B	C	D	E	F	G
1	Čas [s]	Poloha [mm]	Síla [mV/V]	Max. polohy	Max. síly	Derivace polohy	
2	-0,8	-1,05	0,6272675			0	
3	-0,75	-1,05	1,17786811			0	
4	-0,7	-1,05	1,40089692			0	
5	-0,65	-1,025	0,93393157			0,025	
6	-0,6	-0,95	1,03847543			0,075	
7	-0,55	-0,9	0,93393157			0,05	
8	-0,5	-0,825	1,33817026			0,075	
9	-0,45	-0,725	1,21968618			0,1	
10	-0,4	-0,675	0,09060537			0,05	
11	-0,35	-0,575	0,31363331			0,1	

Obrázek č. 11 - Převedená data do jednotek soustavy SI (např. vzorek 1. 20130730T194408, 1-1 24 hod, č. 1, 1,5cm, N S)

Legenda k Obrázek č. 11:

20130730T194408 - identifikační číslo vzorku

1-1 - poměr U:L vzorku

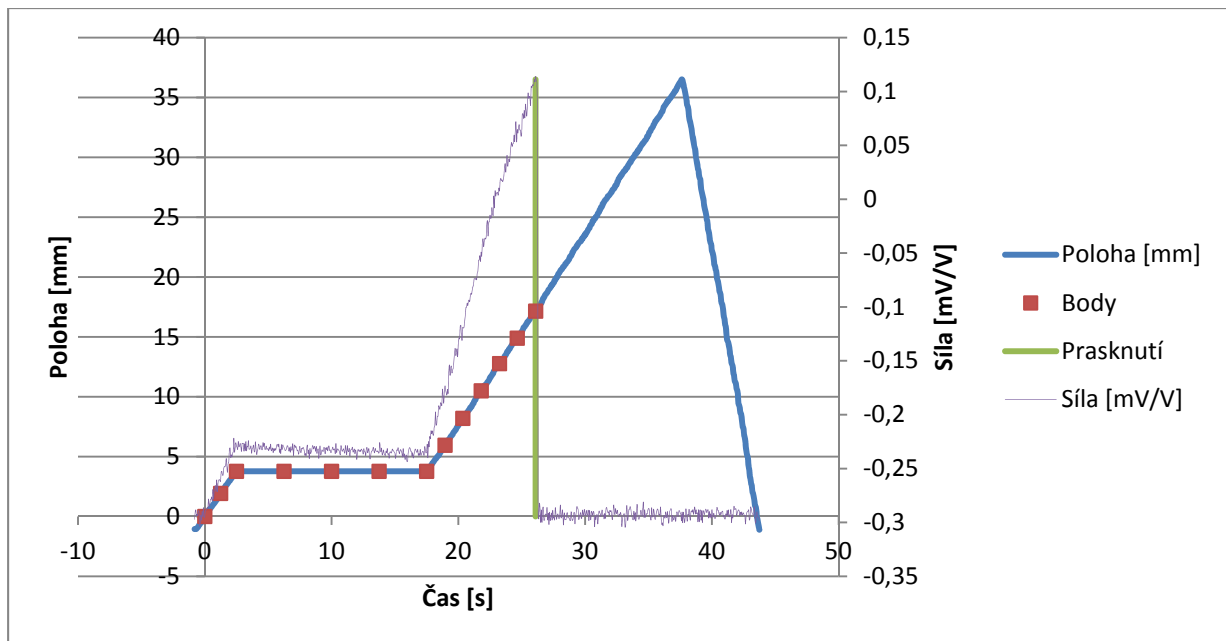
24 hod - doba síťování vzorku

č. 1 - první vzorek ze šesti z jednoho scaffoldu 10x10 cm

1,5 cm - šířka vzorku 1,5 cm

S - suchý vzorek

Průběh pohybu čelisti μ -testeru je znázorněn modrou čarou. V grafu jsou rovněž patrné body, které byly definovány v rámci zpracování dat jako okamžiky odečtů podélné a příčné deformace vzorků. Volba těchto bodů vychází z průběhu pohybu čelisti μ -testeru a je provedena tak, aby každá oblast protahování vzorku byla dostatečně monitorována alespoň ve třech místech (Graf č. 1).



Graf č. 1 - Časový průběh vzdálenosti čelistí a body odečtu hodnot v grafu (např. vzorek 1. 20130730T194408, 1-1 24 hod, č. 1, 1,5cm, N S)

Legenda ke Graf č. 1:

20130730T194408 - identifikační číslo vzorku

1-1 - poměr U:L vzorku

24 hod - doba sít'ování vzorku

č. 1 - první vzorek ze šesti z jednoho scaffoldu 10x10 cm

1,5 cm - šířka vzorku 1,5 cm

S - suchý vzorek

Komentář ke Graf č. 1:

V Graf č. 1 je zanesen i průběh síly. Velikost síly nám ukazuje pouze její změnu, ne přesnou hodnotu. Neprováděli jsme přepočítání jednotek síly [mV/V] na jednotky soustavy SI [N]. V této práci jsme se silou, kterou kladly scaffoldy při jednoosém tahu, nezabývali, protože jsme ji k měření experimentu a vyhotovení výsledků nepotřebovali. Zanesený průběh síly v grafu je jen pro znázornění všech sebraných dat, které budou využity v dalších navazujících studiích.

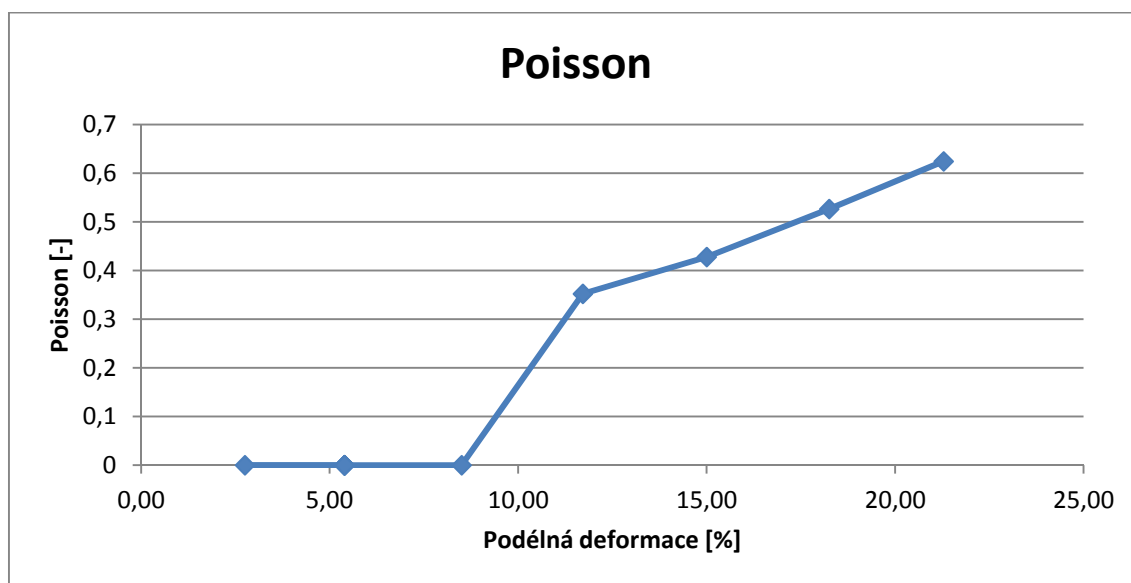
Ve 13 bodech byla z hodnot μ -testeru odečtena podélná a z obrazového záznamu příčná deformace vzorku. Tato data byla uspořádána do tabulek

Tabulka č. 2) pro výpočet Poissonova čísla (viz kap. 2.8.2) jako sledovaného parametru, který byl předmětem závěrečného vyhodnocení měření.

Tabulka č. 2 - Tabulka s daty pro výpočet Poissonova čísla

Bod na grafu	Čas [s]	Podélná deformace [%]	Příčný rozměr [mm]	Příčná deformace [%]	Poisson	Číslo snímku	Příčný rozměr [pixel]
1	0	0,00	13,00	0,00		0	218,08
2	1,25	2,75	13,00	0,00	0,00	12	218,08
3	2,5	5,39	13,00	0,00	0,00	25	218,08
4	6,25	5,39	13,00	0,00	0,00	62	218,08
5	10	5,39	13,00	0,00	0,00	100	218,08
6	13,75	5,39	13,00	0,00	0,00	137	218,08
7	17,5	5,39	13,00	0,00	0,00	175	218,08
8	18,95	8,50	13,00	0,00	0,00	189	218,08
9	20,35	11,71	12,46	4,13	0,35	203	209,08
10	21,8	15,00	12,17	6,42	0,43	218	204,08
11	23,25	18,25	11,75	9,61	0,53	232	197,12
12	24,65	21,29	11,27	13,29	0,62	246	189,09
13	26,1					261	

Hodnoty z Tabulka č. 2 jsou pro lepší představu převedeny do grafické podoby.



Graf č. 2 - Vyhodnocení naměřených výsledků u jednoho vzorku (1. POSUN 20130730T194408, 1-1 24 hod, č. 1, 1,5cm, N S)

Legenda ke Graf č. 2:

20130730T194408 - identifikační číslo vzorku

1-1 - poměr U:L vzorku

24 hod - doba síťování vzorku

č. 1 - první vzorek ze šesti z jednoho scaffoldu 10x10 cm

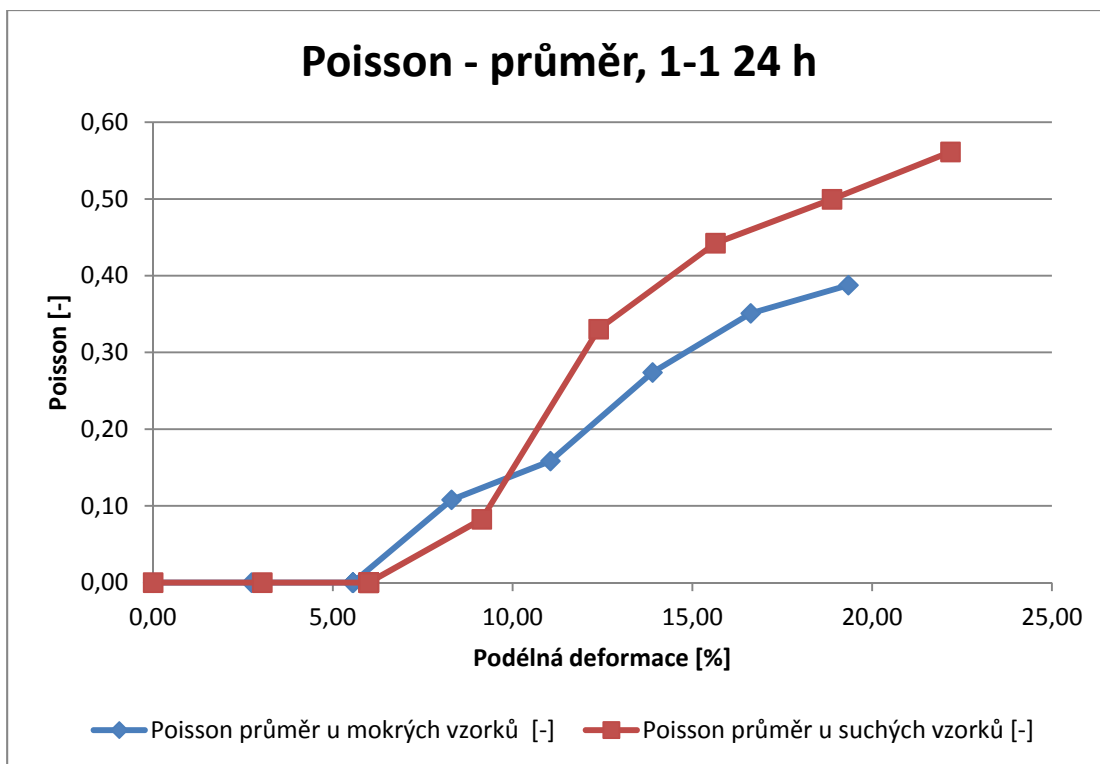
1,5 cm - šířka vzorku 1,5 cm

S - suchý vzorek

Komentář ke Graf č. 2:

Na tomto grafu vidíme, že hodnota Poissonova čísla je 0,62. Vysvětlení hodnoty Poissonova čísla větší než 0,5 je vysvětleno v kap. 2.6 a 2.8.2.

Pro každý měřený vzorek byl postup analýzy dat stejný. Jak je popsáno v kap. 4.1, byla provedena 3 měření v každé skupině, tzn. 90 měření. Z každého měření byl použit výsledný graf do celkového shrnutí (Graf č. 2), ze kterého pak byly vytvořeny výsledné grafy rozdělené dle poměru U:L, hydratace a doby síťování (Graf č. 3).



Graf č. 3 - Celkový graf pro shrnutí vzorků 1:1 24 hodin

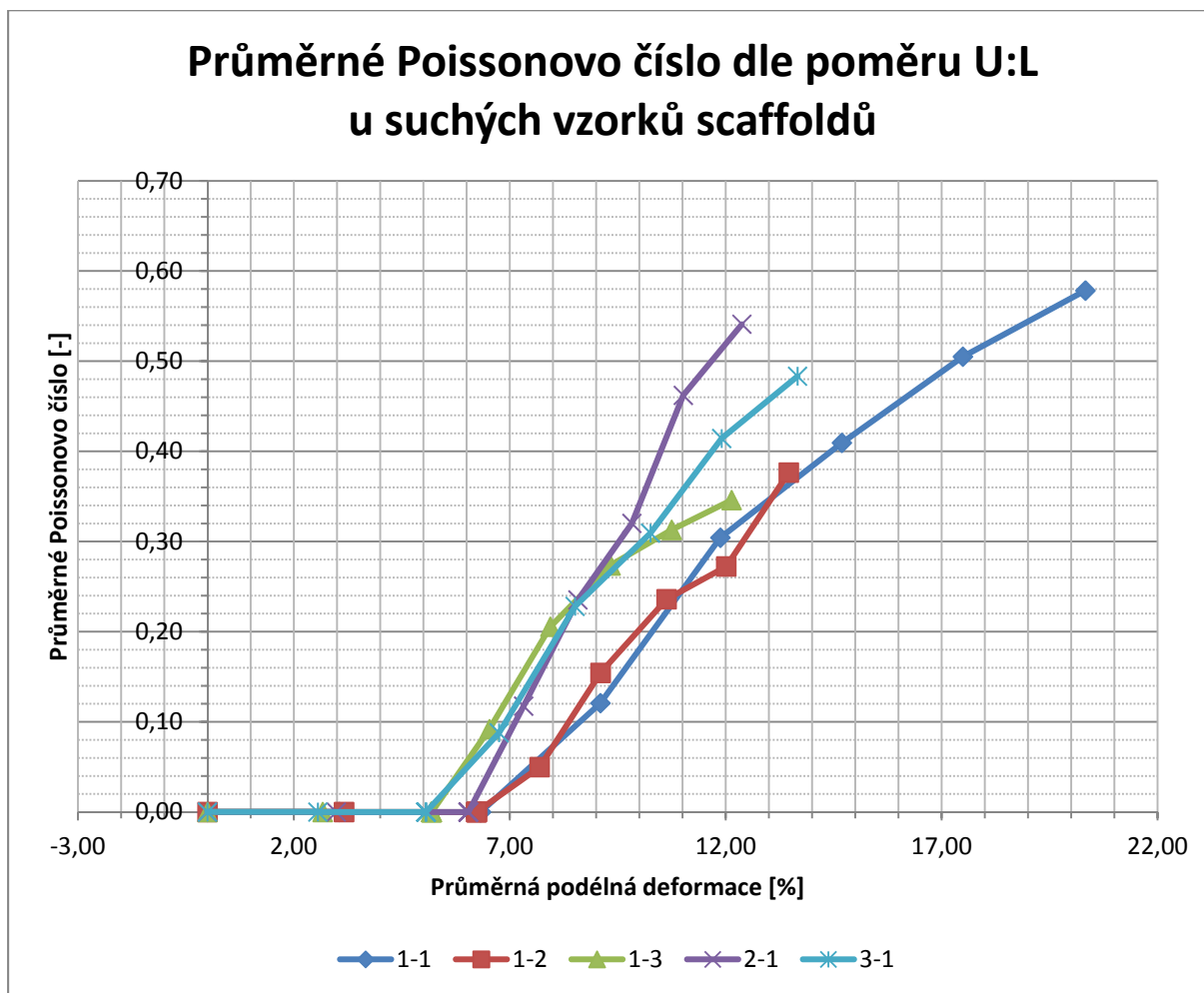
Takto se analyzovala data u všech testovaných skupin.

5 VÝSLEDKY

V následující kapitole jsou zpracovány výsledky měřicího experimentu.

5.1 Vzorky scaffoldů - rozdělení dle poměru U:L

5.1.1 Suché vzorky scaffoldů dle poměru U:L



Graf č. 4 - Průměrné Poissonovo číslo dle poměru U:L u suchých vzorků scaffoldů

Tyto skupiny vzorků - 1-3 24 hod.; 2-1 24hod.; 3-1 48 hod. - nebyly zahrnuty do celkových výsledných grafů (viz kap. 6).

Komentář ke Graf č. 4:

Poissonovo číslo se u suchých vzorků očekávaně zvyšuje vzhledem ke zvyšující se podélné deformaci.

Scaffoldy s poměrem U:L 1:1 u suchých vzorků nám vykazují největší míru podélné deformace, která dosahuje nárůstu o 20,33 %. Suché vzorky nám začínají reagovat na tah téměř ve stejném bodě, což je v průměru na 6% podélné deformace ($\pm 0,52\%$). Čím větší poměr U:L, tím dochází ke strmějšímu nárůstu Poissonova čísla a menší podélné deformaci. Výjimku nám tvoří vzorky poměru U:L 2:1, které mají strmější trend než vzorky s poměrem U:L 3:1.

S klesajícím poměrem klesá přípustná deformace, z čeho plyne větší křehkost vzorků. Výjimku zde tvoří vzorky s poměrem U:L 1:3.

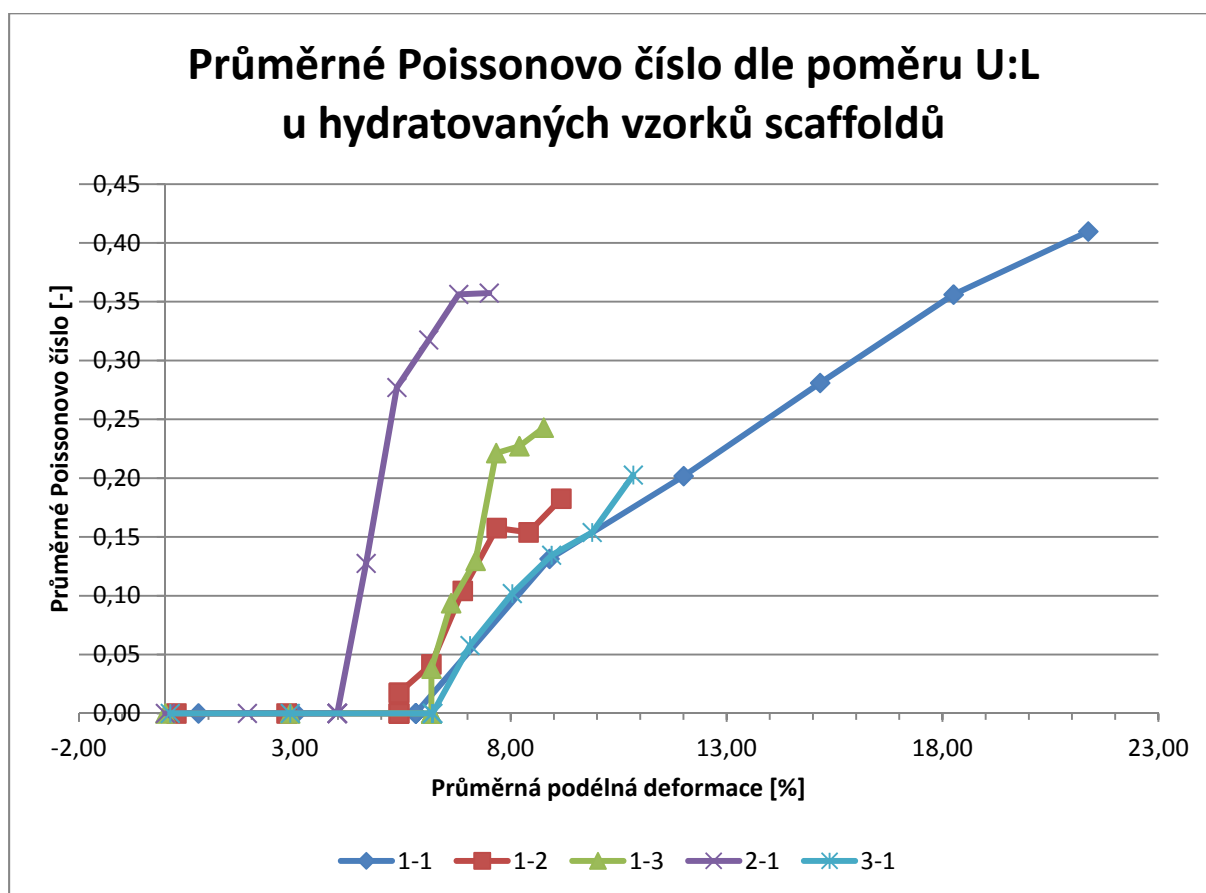
Vzhledem k hodnotám kolem 0,5 lze vzorky na mezních deformacích považovat za nestlačitelné.

Konkrétní maximální hodnoty jsou vypsány v Tabulka č. 3 a umožňují tak porovnání naměřených hodnot.

Tabulka č. 3 - Naměřené hodnoty ke Graf č. 4

1:1		1:2		1:3		2:1		3:1	
(1:1 24h, 1:1 48h, 1:1 72h)		(1:2 24h, 1:2 48h, 1:2 72h)		(1:3 48h, 1:3 72h)		(2:1 48h, 2:1 72h)		(3:1 24h, 3:1 72h)	
Podélná def. [%]	Poissonovo číslo [-]	Podélná def. [%]	Poissonovo číslo [-]	Podélná def. [%]	Poissonovo číslo [-]	Podélná def. [%]	Poissonovo číslo [-]	Podélná def. [%]	Poissonovo číslo [-]
20,33	0,58	13,46	0,38	12,14	0,35	12,38	0,54	13,66	0,48

5.1.2 Hydratované vzorky scaffoldů dle poměru U:L



Graf č. 5 - Průměrné Poissonovo číslo dle poměru U:L u hydratovaných vzorků scaffoldů

Tyto skupiny vzorků - 1-3 24 hod.; 2-1 24hod.; 3-1 48 hod. - nebyly zahrnuty do celkových výsledných grafů (viz kap. 6).

Komentář ke Graf č. 5:

U poměru 1:1 se podélná deformace pohybuje v hodnotě 21,38 %, což je téměř stejná hodnota jako u suchých vzorků. Z toho vyplývá, že hydratace nemá u toho poměru vzorků tak velký vliv na podélnou deformaci. Rozdíl shledáme u velikosti Poissonova čísla, které u hydratovaných vzorků dosáhne 0,41. Vzorky prasknou dříve a nedosáhnou meze nestlačitelnosti.

Poměrné deformace jsou u hydratovaných vzorků menší než u suchých vzorků řádově o několik procent, takže můžeme konstatovat, že vlivem hydratace se vzorky stávají křehčí.

Poměry 1:2 a 1:3 mají stejný trend křivky, strmější než u 1:1, k prasknutí vzorků došlo při téměř stejné podélné deformaci.

Vzorky poměru 3:1 nám kopírují trend křivky vzorků 1:1, ale dosáhnou poměrných deformací necelých 11%.

Úplně odlišně se nám v této skupině hydratovaných vzorků chovaly vzorky s poměrem 2:1. Poissonova čísla dosáhly, hned po vzorcích 1:1, největšího, ale poměrné deformace byly minimální. K prasknutí vzorků došlo již při 7,5% prodloužení, což je téměř polovina délky u stejného poměru suchých vzorků (12,5%).

Nečekaným fenoménem, který zde můžeme pozorovat, je zalomení všech křivek (kromě poměru 1:1) převážně až těsně před prasknutím. Důvodem, proč to tak je, by mohla být přítomnost molekul Ringerova roztoku, které během tahu znemožňovaly plynulé vyplnění prostoru vlákniny.

Téměř u všech skupin (kromě 1:1 a 1:3) kleslo vlivem hydratace Poissonovo číslo na cca polovinu.

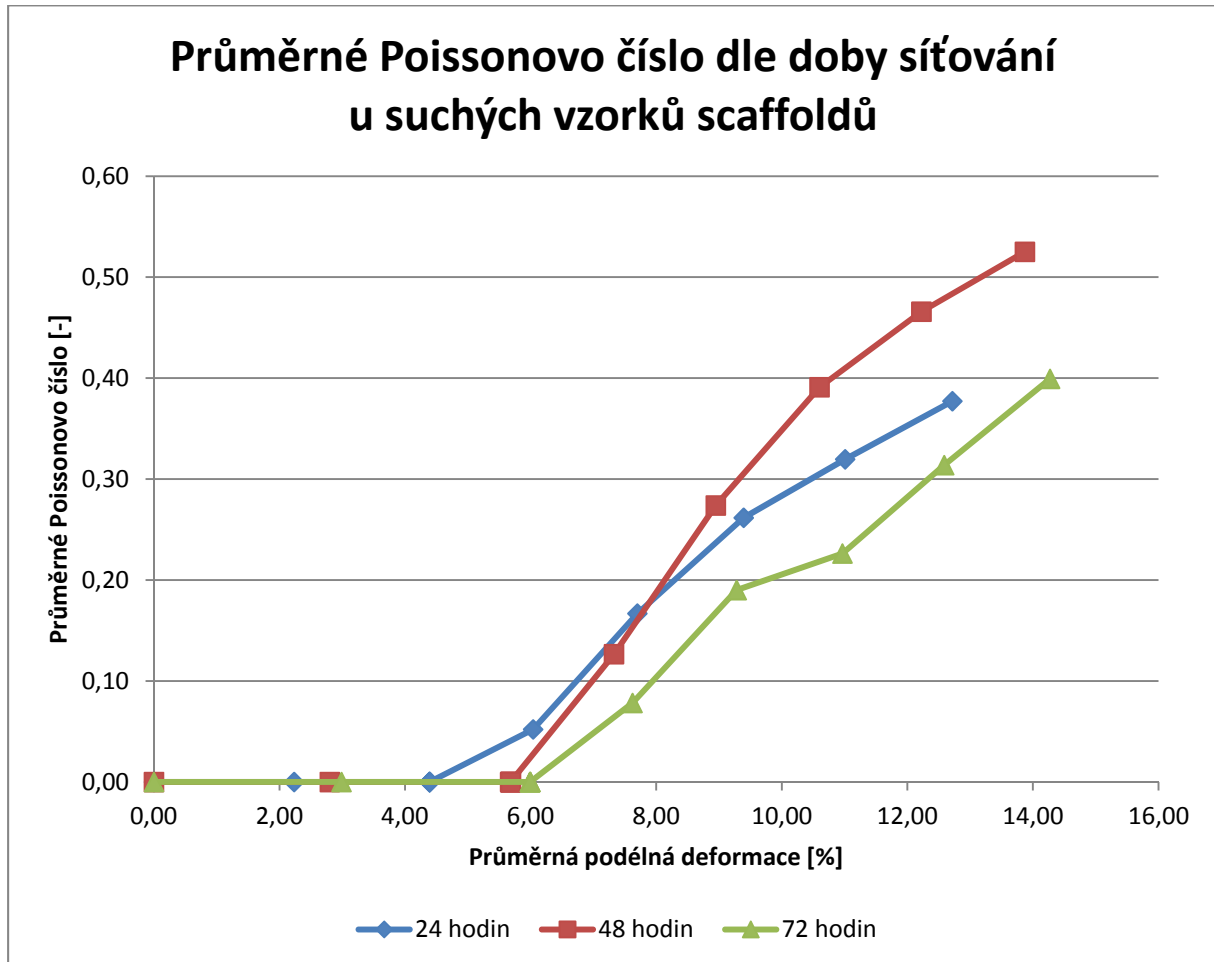
Konkrétní maximální hodnoty jsou vypsány v Tabulka č. 4 a umožňují tak porovnání naměřených hodnot.

Tabulka č. 4 - Naměřené hodnoty ke Graf č. 5

1:1		1:2		1:3		2:1		3:1	
(1:1 24h, 1:1 48h, 1:1 72h)		(1:2 24h, 1:2 48h, 1:2 72h)		(1:3 48 h, 1:3 72h)		(2:1 48h, 2:1 72h)		(3:1 24h, 3:1 72h)	
Podélná def. [%]	Poissonovo číslo [-]	Podélná def. [%]	Poissonovo číslo [-]	Podélná def. [%]	Poissonovo číslo [-]	Podélná def. [%]	Poissonovo číslo [-]	Podélná def. [%]	Poissonovo číslo [-]
21,38	0,41	9,17	0,18	8,76	0,24	7,50	0,36	10,84	0,20

5.2 Vzorky scaffoldů - rozdělení dle doby síťování

5.2.1 Suché vzorky scaffoldů dle doby síťování



Graf č. 6 - Průměrné Poissonovo číslo dle doby síťování u suchých vzorků scaffoldů

Tyto skupiny vzorků - 1-3 24 hod.; 2-1 24hod.; 3-1 48 hod. - nebyly zahrnuty do celkových výsledných grafů (viz kap. 6).

Komentář ke Graf č. 6:

Výsledný graf měření u vzorků vytvořený podle doby síťování nám ukazuje, že největší podélnou deformaci snesly vzorky s dobou síťování 72 hodin (14,27%) a nejmenší podélnou deformaci jsme naměřili u vzorků s dobou síťování 24 hodin (12,72%).

Vzorky s dobou síťování 48 hodin jako jediné dosáhly meze nestlačitelnosti, Poissonova čísla 0,53.

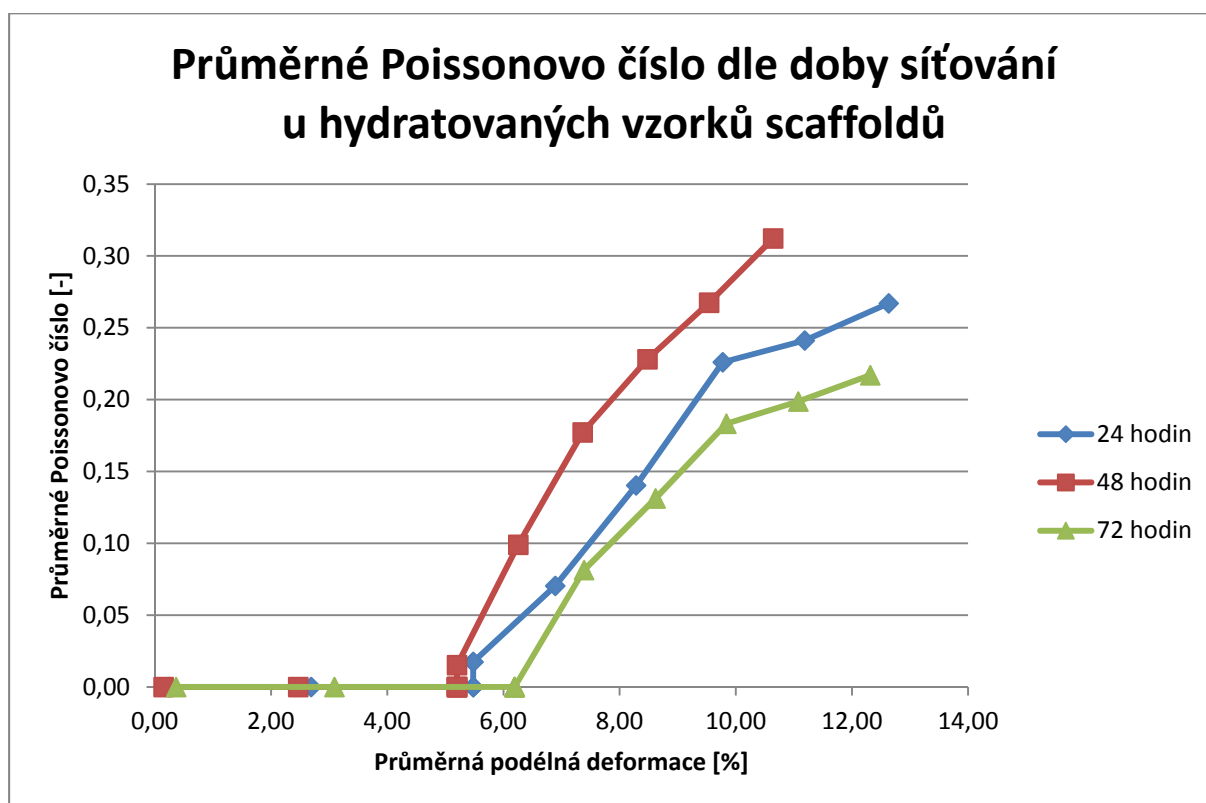
Trend křivek grafu má velmi podobnou tendenci u všech tří skupin doby síťování.

Konkrétní maximální hodnoty jsou vypsány v Tabulka č. 5 a umožňují tak porovnání naměřených hodnot.

Tabulka č. 5 - Naměřené hodnoty ke Graf č. 6

24 hodin		48 hodin		72 hodin	
(1:1 24h, 1:2 24h, 3:1 24h)		(1:1 48h, 1:2 48h, 1:3 48h, 2:1 48h)		(1:1 72h, 1:2 72h, 1:3 72h, 2:1 72h, 3:1 72h)	
Podélná def. [%]	Poissonovo číslo [-]	Podélná def. [%]	Poissonovo číslo [-]	Podélná def. [%]	Poissonovo číslo [-]
12,72	0,38	13,87	0,53	14,27	0,40

5.2.2 Hydratované vzorky scaffoldů dle doby síťování



Graf č. 7 - Průměrné Poissonovo číslo dle doby síťování u hydratovaných vzorků scaffoldů

Tyto skupiny vzorků - 1-3 24 hod.; 2-1 24hod.; 3-1 48 hod. - nebyly zahrnuty do celkových výsledných grafů (viz kap. 6).

Komentář ke Graf č. 7:

Výsledný Graf č. 7 u hydratovaných vzorků vytvořený podle doby síťování nám ukazuje, že největší podélnou deformaci snesly vzorky s dobou síťování 24 hodin (12,63%) a nejmenší podélnou deformaci jsme naměřili u vzorků s dobou síťování 48 hodin.

Trend křivek grafu má velmi podobnou tendenci u všech tří skupin doby síťování.

Největších hodnot Poissonova čísla (0,31) dosáhly vzorky s dobou síťování 48 hodin, což je méně než u suchých vzorků této skupiny.

Vlivem hydratace kleslo Poissonovo číslo u všech skupin vzorků rozdělených dle doby síťování.

Konkrétní maximální hodnoty jsou vypsány v Tabulka č. 6a umožňují tak porovnání naměřených hodnot.

Tabulka č. 6 - Naměřené hodnoty ke Graf č. 7

24 hodin		48 hodin		72 hodin	
(1:1 24h, 1:2 24h, 3:1 24h)		(1:1 48h, 1:2 48h, 1:3 48h, 2:1 48h)		(1:1 72h, 1:2 72h, 1:3 72h, 2:1 72h, 3:1 72h)	
Podélná def. [%]	Poissonovo číslo [-]	Podélná def. [%]	Poissonovo číslo [-]	Podélná def. [%]	Poissonovo číslo [-]
12,63	0,27	10,64	0,31	12,32	0,22

6 DISKUSE

Práce přinesla svým způsobem očekávané závěry, ale přinesla i mnoho nevyřešených otázek, které jsou nad rámec řešení této práce a jsou to tak možné náměty pro další navazující studie.

Jsou zde otázky související s měřicím protokolem a provedení měření, otázky zabývající se vysvětlením příčin a vzniku sledovaných projevů a otázky ohledně vzorků, které nebyly zahrnuty do celkového hodnocení.

Provedení měření hydratovaných vzorků

Aby bylo možné odečíst z obrazového záznamu příčnou deformaci hydratovaných vzorků scaffoldů, zakomponovali jsme do měření podpurnou konstrukci k zabránění stáčení okrajů vzorků (viz kap. 4.3.2). Dalo by se zde diskutovat o míře ovlivnění výsledků tahové zkoušky vlivem tření. Vzhledem k tomu, že odečtení míry příčné deformace bylo pro tuto práci zásadní, tuto skutečnost jsme více neřešili.

Vysvětlení nárůstu Poissonova čísla

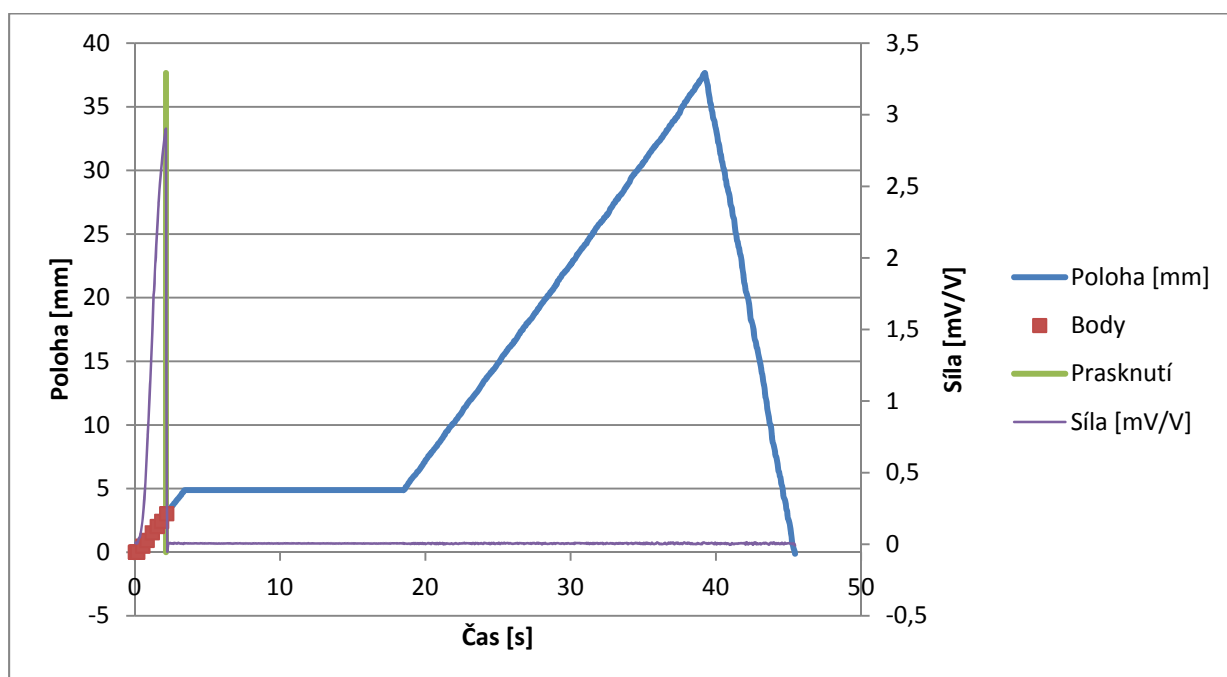
Nanovlákněné scaffoldy jsou vysoce porézní materiály. Proto se domníváme, že tahovou zkouškou dochází ve scaffoldu k pozvolnému směřování a přibližování nanovláken, a tím pádem k vyplňování jejich pórů. U suchých vzorků scaffoldů (viz Graf č. 4) se Poissonovo číslo pohybovalo kolem hodnot 0,5, a proto se domníváme, že pravděpodobně došlo k úplnému vyplnění prostoru vláknou, a proto jsme se dostali na mez nestlačitelnosti. V tahové zkoušce zde dochází již ke změně struktury vzorků, ne jen objemu vzorků.

U hydratovaných vzorků (viz Graf č. 5) dochází pravděpodobně k vyplňování prostoru výrazně rychleji, Poissonovo číslo nedosáhlo meze nestlačitelnosti (nejvyšší hodnoty 0,41). Domníváme se, že tento fenomén nastal navázáním molekul vody na nanovlákně scaffoldu, a proto bylo znemožněné úplné vyplnění prostoru mezi vlákny a dosažení meze nestlačitelnosti.

Tato tvrzení by byla určitě vhodná objasnit např. rastrovacím elektronovým mikroskopem (SEM) a hlouběji se této otázce věnovat. V této době již vzniká navazující práce, která využije sebraná data síly, kterým se tato práce nevěnovala (viz komentář ke Graf č. 1).

Vzorky scaffoldů nezahrnuté do celkového hodnocení

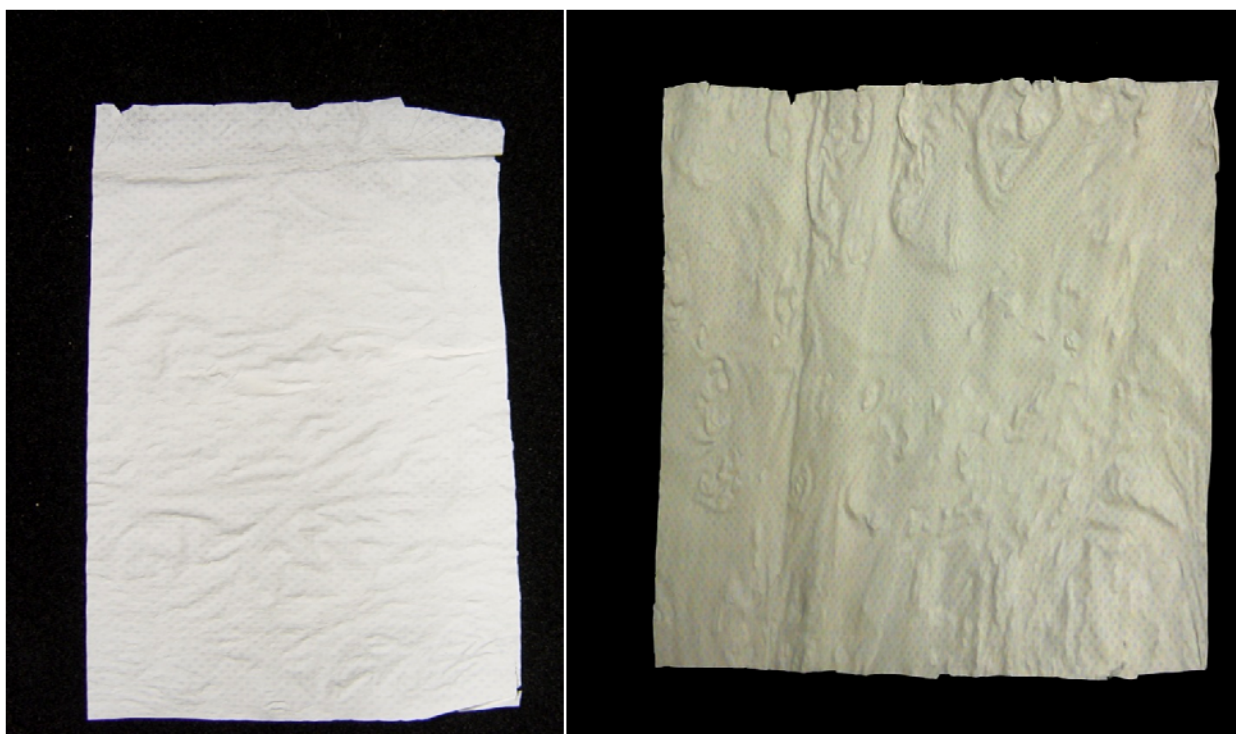
Vzorky s poměrem U:L 1:3 a dobou síťování 24 hodin; U:L 2:1 a dobou síťování 24 hodin; U:L 3:1 a dobou síťování 48 hodin nebyly zahrnuty do celkových výsledných grafů, protože jejich testování se nezdařilo pro jejich přílišnou křehkost. Vzorky pocházely z jiné šarže a nekorespondovaly se zbytkem souboru. K prasknutí vzorků došlo již v první fázi grafu (viz Graf č. 8).



Graf č. 8 - Graf nehodnoceného vzorku (např. 91. 20131122T180841, 1-3 24 h, č. 1, 2 cm, po, S)

Legenda ke Graf č. 8:

- 91. - celkové číslo vzorku
- 20131122T180841 - identifikační číslo vzorku
- 1-3 - poměr U:L vzorku
- 24 h - doba síťování vzorku
- č. 1 - první vzorek ze šesti z jednoho scaffoldu 10x10 cm
- 2 cm - šířka vzorku 1,5 cm
- S - suchý vzorek



Fotografie č. 15 - Porovnání struktury scaffoldu. Vlevo – změřený vzorek scaffoldu. Vpravo – neměřený křehký vzorek scaffoldu.

Neměřené vzorky vykazovaly na pohled jiné vlastnosti, než vzorky z první šarže. Vzorky byly velmi křehké, měly šustivou strukturu, po hydrataci byly lepkavé a velmi rychle schly. Zřejmě došlo k pozměnění výrobních podmínek, proto se tyto neměřené scaffoldy tak lišily od první šarže.

V této práci nebyly měřené vzorky nesíťované, tzn. s dobou síťování 0 hodin.

Pokud by byly do této práce zahrnuty i tyto skupiny vzorků popsané v předešlých odstavcích, výsledné hodnocení vzorků by podalo přesnější informace.

7 SHRNU TÍ

Výsledky práce nám umožní vyjádřit se k jednotlivým hypotézám:

Hypotéza č. 1 – „*Nanovláknenné scaffoldy vyrobené z PVA elektrostatickým zvlákněním technologií Nanospider jsou stlačitelné vzhledem k jejich velké pórovitosti*“

Tato hypotéza je potvrzena. U některých skupin suchých vzorků jsme se dokonce dostali na mez nestlačitelnosti (Poissonova čísla 0,5) (viz 5.1.1).

Hypotéza č. 2 – „*Na míru příčné deformace má vliv poměr U:L vzorků*“

Tato hypotéza je potvrzena. Se změnou poměru U:L se mění i míra příčné deformace (viz kap. 5).

U suchých vzorků scaffoldů:

V našem analyzovaném souboru scaffoldů se hodnoty příčné deformace vzorků s poměrem U:L měnili v rozmezí 0,58 – 0,35.

U hydratovaných vzorků scaffoldů:

V našem analyzovaném souboru scaffoldů se hodnoty příčné deformace vzorků s poměrem U:L měnili v rozmezí 0,41 – 0,18.

Hypotéza č. 3 – „*Na míru příčné deformace má vliv doba síťování vzorků*“

Tato hypotéza je potvrzena. Se změnou doby síťování se mění i míra příčné deformace (viz kap. 5).

U suchých vzorků scaffoldů:

V našem analyzovaném souboru scaffoldů se hodnoty příčné deformace vzorků s dobou síťování v rozmezí 0,53 – 0,38.

U hydratovaných vzorků scaffoldů:

V našem analyzovaném souboru scaffoldů se hodnoty příčné deformace vzorků s dobou síťování v rozmezí 0,31 – 0,22.

Hypotéza č. 4 – „Na míru příčné deformace nemá vliv hydratace“

Tato hypotéza je nepotvrzená. Hydratace má na scaffoldy vliv. Klesá jak příčná, tak limitní podélná deformace vzorků (viz kap. 5.1.2 a 5.2.2).

8 ZÁVĚR

Výsledky práce poukazují na to, že struktura vzorků scaffoldů se mění vlivem zatížení (i z makroskopického hodnocení), což nám dokazuje změna Poissonova čísla. Vzhledem k tomu, že Poissonovo číslo narůstalo (a u některých skupin dosahovali meze stlačitelnosti; Poissonova čísla=0,5) usuzujeme, že dochází k postupnému zmenšování pórovitosti.

S ohledem na dosažený rozptyl naměřených hodnot můžeme konstatovat, že výroba PVA scaffoldů metodou elektrozvlákňování nepodává zcela stabilní výstupy. Tato informace je cenná zejména pro výrobce scaffoldů.

Pro možnost zobecnění výsledků této práce, pro určování míry stlačitelnosti různých skupin scaffoldů (skupiny lišící se poměrem U:L, dobou síťování a stupněm hydratace) by bylo nezbytné udělat rozsáhlejší studii s více vzorky.

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

LITERATURA

1. **Amler, E.** Nové trendy v regenerativní medicíně. *Studijní materiál - přednáška*.
2. **Anděrová, Jana. 2014.** Biomechanická reflexe scaffoldu na mechanické zatěžování. Praha : autor neznámý, 2014.
3. **Bhardwaj, Nandana a Kundu, Subhas C. 2010.** Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*. 2010, Sv. 28, 3, stránky 325-347.
4. **Birkinshaw, C. a Collins, M. N. 2013.** Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review. *Carbohydrate Polymers*. 2013, Sv. 92, stránky 1262-1279.
5. **Brunski, J. B. 1996.** Metals. [autor knihy] Buddy D. Ratner, a další. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. New York : Academic Press, 1996, stránky 37-50.
6. **Cambell, D. J. a Querns, M. K. 2002.** Using Paper Cutouts to Illustrate Poisson's Ratio. *J. Chem.Educ.* 2002, Sv. 79, 76.
7. **Cohen, S., a další. 1993.** Design of synthetic polymeric structures for cell transplantation and tissue engineering. *Clinical materials*. 1993, Sv. 13, 3.
8. **Di Mario, E., a další. 2005.** Structure optimization of polycaprolactone foams by using mixtures of CO₂ and N₂ as blowing agents. *Polymer Engineering and Science*. 2005, Sv. 45, 3, stránky 432-441.
9. **Hamala, Radim, a další. 2011.** *Pružnost a pevnost*. Ostrava : Investice do rozvoje vzdělávání, 2011.
10. **Haugen, H., a další. 2004.** Water as foaming agent for open cell polyurethane structures. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*. 2004, Sv. 15, 4, stránky 343-346.
11. **Hench, L. L. 1996.** Ceramics, glasses, and glass-ceramics. [autor knihy] B. D. Ratner, A. S. Hoffman a F. J. Schoen. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. New York : Academic Press, 1996, stránky 73-83.
12. **Huang, Audrey. 2012.** [Online] 2012. [Citace: 14. září 2013.] <http://inbt.jhu.edu>.

13. **Huang, Z. M., a další. 2003.** A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*. 2003, Sv. 63, 15.
14. **Humar, M., a další. 2006.** Mechanical properties of titania-derived nanoribbons. *Nanotechnology*. 2006, Sv. 17, stránky 3869-3872.
15. **Chen, G. P., Ushida, T. a Tateishi, T.** Scaffold design for tissue engineering. *Macromolecular Bioscience*. Sv. 2, 2, stránky 67-77.
16. **Jáchim, F. 2011.** Všestranný fyzik Siméon Denis Poisson. *Matematika Fyzika Informatika: časopis pro výuku na základních a středních školách*. 2011, Sv. 20, 8, stránky 505-507.
17. **Jain, K. K. 2006.** Role of nanotechnology in developing new therapies for diseases of the nervous system. *Nanomedicine*. 2006, Sv. 1, 1, stránky 9-12.
18. **Kaiser, J., a další. 1990.** *Pružnost' a plasticita 1*. Bratislava : Alfa, 1990. ISBN 8005005792.
19. **Krynický, M. 2010.** ucebnice.krynicky.cz. [Online] 24.. duben 2010.
<http://ucebnice.krynicky.cz/Fyzika/index.html>.
20. **Lee, K. W. D., Chan, P. K. a Feng, X. S. 2004.** Morphology development and characterization of the phase-separated structure resulting from the thermal-induced phase separation phenomenon in polymer solutions under a temperature gradient. *Chemical Engineering Science*. 2004, Sv. 59, 7, stránky 1491-1504.
21. **Li, W. J., a další. 2002.** Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. *J Biomed Mater Res*. 2002, Sv. 60, 4, stránky 613-621.
22. **Liapis, A. I. a Bruttini, R. 1994.** A theory for the primary and secondary drying stages of the freeze-drying of pharmaceutical crystalline and amorphous solutes - comparison between experimental - data and theory. *Separations Technology*. 1994, Sv. 4, 3, stránky 144-155.
23. **Ma, P. X. a Zhang, R. Y. 1999.** Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1999, Sv. 46, 1, stránky 60-72.
24. **Mano, J. F., a další. 1999.** Dynamic mechanical properties of hydroxyapatite-reinforced and porous starch-based degradable biomaterials. *J. Mater. Sci.* 10, 1999, Sv. 857.

25. **Mauck, R. L., a další. 2000.** Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels. *Journal of Biomechanical Engineering*. 2000, Sv. 122, stránky 252-260.
26. **Mikos, A. G., a další. 1996.** *Biocompatible polymer membranes and methods of preparation of three dimensional membrane structures*. 5514378 USA, 1996.
27. **Mikos, A. G., a další. 1994.** Preparation and characterization of poly(L-lactic acid) foams. *Polymer*. 1994, Sv. 35, 5, stránky 1068-1077.
28. **Moroni, L., Wijn, de J. R. a Blitterswijk, van C. A. 2005.** 3D fiber-deposited scaffolds for tissue engineering: Influence of pores. *Biomaterials*. 2005, Sv. 7.
29. **Murugan, R. a Ramakrishna, S. 2007.** Design strategies of tissue engineering scaffolds with controlled fiber orientation. *Tissue Engineering*. 2007, Sv. 13, 8, stránky 1845-1866.
30. **O'Brien, Fergal J. 2011.** Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Materials today*. Březen 2011, 14, stránky 89-95.
31. **Perrin, D. E. a English, J. P. 1997.** Polyglycolide and polylactide. [autor knihy] A. J. Domb, J. Kost a D. M. Wiseman. *Handbook of Biodegradable Polymers*. New York : Harwood Academic Publishers, 1997, stránky 3-27.
32. **Pham, Q. P., Sharma, U. a Mikos, A. G. 2006.** Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: A review. *Tissue Engineering*. 2006, Sv. 12, 5, stránky 1197-1211.
33. **Pikal, M. J., a další. 1990.** The secondary drying stage of freeze-drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure. *International Journal of Pharmaceutics*. 1990, Sv. 60, 3, stránky 203-217.
34. **Plánička, F., Zajíček, M. a Adámek, V. 2007.** Podpůrné materiály pro studium předmětu Pružnost a pevnost 1 : Shrnutí základních poznatků. [Online] 2007. [Citace: 24. říjen 2013.] <http://www.kme.zcu.cz/kmet/pp/tah-tlak/shrnuti.pdf>.
35. **Prall, D. a Lakes, R. S. 1997.** Properties of a chiral honeycomb with a poisson's ratio of -1. *International Journal of Mechanical Sciences*. 1997, Sv. 39, 3, stránky 305-307.
36. **Quirk, R. A., a další. 2004.** Supercritical fluid technologies and tissue engineering scaffolds. *Current Opinion in Solid State & Materials Science*. 2004, Sv. 8, 3-4, stránky 313-321.

37. **Ratner, Buddy D. a Hoffman, Allan S. 2013.** *Biomaterial science an introduction to materials in medicin.* 2013. ISBN 978-0-12-37462-9.
38. **Salvetat, J. P., a další. 1999.** Elastic and shear moduli of single-walled carbon nanotube ropes. *Phys. Rev. Lett.* 1999, Sv. 82, stránky 944-947.
39. **Soltz, M. A. a Ateshian, G. A. 2000.** A conewise linear elasticity mixture model for the analysis of tension–compression nonlinearity in articular cartilage. *Journal of Biomechanical Engineering.* 2000, Sv. 122, stránky 576-586.
40. —. **1998.** Experimental verification and theoretical prediction of cartilage interstitial fluid pressurization at an impermeable contact interface in confined compression. *Journal of Biomechanics.* 1998, Sv. 31, stránky 927-924.
41. **Stevens, M. M. a George, J. H. 2005.** Exploring and engineering the cell surface interface. *Science.* 2005, Sv. 18, 310, stránky 1135-1138.
42. —. **2005.** Exploring and engineering the cell surface interface. *Science.* 2005, Sv. 310, stránky 1135-1138.
43. **Thomson, R. C., a další. 1995.** Biodegradable polymer scaffolds to regenerate organs. *Advances in Polymer Science.* 1995, Sv. 122, stránky 245-274.
44. **Tlapák, J. 2004.** Patobiomechanika a patokinesiologie kompendium. [Online] 2004. [Citace: 26. září 2013.] <http://biomech.ftvs.cuni.cz/pbpbk/kompendium/biomechanika>.
45. **UK, Matematicko-fyzikální fakulta. 2013.** Matematicko-fyzikální fakulta UK. [Online] 2013. http://physics.mff.cuni.cz/kfpp/skripta/kurz_fyziky_pro_DS/www/fyzika.html.
46. **Vybíral, Bohumil.** [Online] [Citace: 13. září 2013.] <http://fyzikalniolympiada.cz/texty/pruznost.pdf>.
47. **Wenguo, C. a al., et. 2010.** Electrospun nanofibrous materials for tissue engineering and drug delivery. *Science and Technology of Advanced Materials.* 2010, Sv. 11.
48. **Wong, S. Ch., Baji, A. a Leng, S. 2008.** Effect of fiber diameter on tensile properties of electrospun poly(3-caprolactone). *Polymer.* 2008, Sv. 49, stránky 4713-4722.
49. **Yang, S., a další. 2001.** The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue engineering.* 2001, Sv. 7, 6.

10 SEZNAM TABULEK, OBRÁZKŮ, FOTOGRAFIÍ A GRAFŮ

Seznam tabulek

Tabulka č. 1 - Přehled zkoumaných vzorků.....	30
Tabulka č. 2 - Tabulka s daty pro výpočet Poissonova čísla.....	46
Tabulka č. 3 - Naměřené hodnoty ke Graf č. 4	50
Tabulka č. 4 - Naměřené hodnoty ke Graf č. 5	52
Tabulka č. 5 - Naměřené hodnoty ke Graf č. 6	54
Tabulka č. 6 - Naměřené hodnoty ke Graf č. 7	56

Seznam obrázků

Obrázek č. 1 - Snímek elektronové mikrofotografie ukazující chondroitin sulfátová (CS) a poly (vinyl alkohol)-methakrylátová (PVA) nanovlákna, vyrobená elektrostatickým zvlákněním a zpracována k biostabilitě těchto scaffoldů (Huang, 2012).....	11
Obrázek č. 2 - Schématický popis tkáňového inženýrství (dostupný z: http://www.centropede.com/UKSB2006/ePoster/images/background/TE_model_large.jpg).....	13
Obrázek č. 3 - Architektura scaffoldů ovlivňující buněčné vazby (Stevens, a další, 2005)	15
Obrázek č. 4 - Elektrostatické zvláknění Nanospider (http://www.filtsep.com/view/4480/integrating-nanofibres-into-filtration-media/).....	20
Obrázek č. 5 - Vlevo: diagram tahové zkoušky v tahu u křehkých materiálů. Vpravo: diagram tahové zkoušky v tahu u tvárných materiálů.	22
Obrázek č. 6 - Vyjádření Poissonova poměru graficky (2005-05-18 13:54 Pgaige 385×135×8 (3641 bytes) Illustration du coefficient de Poisson {{GFDL}} réalisé à l'aide de sodipodi+gimp (fichiers originaux à disposition sur demande)	26
Obrázek č. 7 - Auxetické a neauxetické materiály (Prall, a další, 1997)	27
Obrázek č. 8 - Sekvence pro pohyb μ -testeru	35
Obrázek č. 9 - Prostředí ovládacího softwaru kamery	37
Obrázek č. 10 - Vyexportovaná data z μ -testeru do programu MS Excel (např. vzorek 1. 20130730T194408, 1-1 24 hod, č. 1, 1,5cm, N S)	43
Obrázek č. 11 - Převedená data do jednotek soustavy SI (např. vzorek 1. 20130730T194408, 1-1 24 hod, č. 1, 1,5cm, N S).....	44

Seznam fotografií

Fotografie č. 1 - Celý vzorek scaffoldu.....	31
Fotografie č. 2 - Rozřezané scaffoldy	32
Fotografie č. 3 - Řezačka na fotografie Meopta.....	32
Fotografie č. 4 - Podlepené scaffoldy lepicí páskou	33
Fotografie č. 5 - Vytvoření vrubu.....	34
Fotografie č. 6 - Upevnění suchého vzorku do čelistí μ -testeru.....	36
Fotografie č. 7 - Nevyhovující metodika hydratovaného vzorku scaffoldu.....	38
Fotografie č. 8 - Podložení z teflonové pásky	38
Fotografie č. 9 - Podpůrná nastavitelná konstrukce bez podložky s teflonovou páskou	39
Fotografie č. 10 - Celkový vzhled podpůrné konstrukce	39
Fotografie č. 11 - Nainstalovaná podpůrná konstrukce do μ -testeru	40
Fotografie č. 12 - Upnutí suchého vzorku do μ -testeru na podpůrné konstrukci.....	41
Fotografie č. 13 - Hydratace vzorku.....	41
Fotografie č. 14 - Hydratovaný vzorek na podpůrné konstrukci.....	42
Fotografie č. 15 - Porovnání struktury scaffoldu. Vlevo – změřený vzorek scaffoldu. Vpravo – neměřený křehký vzorek scaffoldu.	59

Seznam grafů

Graf č. 1 - Časový průběh vzdálenosti čelistí a body odečtu hodnot v grafu (např. vzorek 1. 20130730T194408, 1-1 24 hod, č. 1, 1,5cm, N S)	45
Graf č. 2 - Vyhodnocení naměřených výsledků u jednoho vzorku (1. POSUN 20130730T194408, 1-1 24 hod, č. 1, 1,5cm, N S)	46
Graf č. 3 - Celkový graf pro shrnutí vzorků 1:1 24 hodin.....	48
Graf č. 4 - Průměrné Poissonovo číslo dle poměru U:L u suchých vzorků scaffoldů	49
Graf č. 5 - Průměrné Poissonovo číslo dle poměru U:L u hydratovaných vzorků scaffoldů...	51
Graf č. 6 - Průměrné Poissonovo číslo dle doby síťování u suchých vzorků scaffoldů.....	53
Graf č. 7 - Průměrné Poissonovo číslo dle doby síťování u hydratovaných vzorků scaffoldů	55
Graf č. 8 - Graf nehodnoceného vzorku (např. 91. 20131122T180841, 1-3 24 h, č. 1, 2 cm, po, S).....	58

Výpočty a grafy k některým vzorkům scaffoldům jsou nahrané na přiloženém CD.