

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Fakulta tělesné výchovy a sportu

**Analýza strukturálních změn nanovláknenných scaffoldů
vzhledem k jejich relativnímu prodloužení**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

Ing. František Lopot Ph.D.

Vypracoval:

Bc. Martin Morávek

Praha, srpen 2016

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

V Praze, dne

podpis:

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:

Poděkování

Rád bych poděkoval Ing. Františkovi Lopotovi za odborné vedení práce a podnětné nápady, Mgr. Danielovi Hadrabovi za metodologické připomínky a Ing. Margit Žaloudkové, Ph.D. za odborné rady a obsluhu mikroskopu při měření.

Abstrakt

Cílem práce bylo nalézt vhodnou metodu pro hodnocení strukturálních změn scaffoldů vlivem působení vnější mechanické zátěže a ověřit platnost hypotéz, které předpokládají změnu směrovosti vláken a také zužování vláken v závislosti na protažení scaffoldu. Předpoklady formulované ve třech hypotézách byly prověřeny na scaffoldu s povrchovou úpravou plazmováním a na scaffoldu bez povrchové úpravy plazmováním.

Ke zkoumání strukturálních změn bylo využito snímání povrchu scaffoldu pomocí elektronového mikroskopu. Vzniklé snímky byly dále zpracovávány pomocí automatické softwarové obrazové analýzy a získaná data statisticky vyhodnocována.

Výsledkem experimentu je popis použité metodiky, kterou lze v budoucnu uplatnit k rozsáhlejšími studiím. Bylo zjištěno, že u zkoumaných scaffoldů vlivem vnější mechanické zátěži dochází ke směrování vláken ve směru tahu. Dále bylo zjištěno, že průměrná tloušťka vláken se nemění.

Výsledky práce dávají vhled do problematiky hodnocení strukturálních změn scaffoldů vlivem působení vnější mechanické zátěže a otvírají možnosti pro hlubší a cílenější zkoumání této problematiky.

Klíčová slova: scaffold, obrazová analýza, směrovost vláken, tloušťka vláken.

Abstract

The goal of this thesis was to find a suitable method for evaluating structural changes of scaffolds as influenced by external mechanical pressure and to verify the validity of hypothesis which assumes a change of directionality of fibers and also thinning of fibers according to the stretching of a scaffold. Assumptions formulated in these three hypothesis were tested on a scaffold with a plasma surface treatment and without any plasma surface treatment.

To examine structural changes an electron microscope was used to observe the surface of scaffolds. Incurred photos were then processed with the help of automatic software picture analysis and observed data were statistically evaluated.

The result of this experiment is a description of used method which can be used in future for larger studies. It was found that by the effect of external mechanical pressure fibers of examined scaffolds turn in the direction of the pull. It has also been found that the average thickness of fibers didn't change.

Results of this work give insight into the evaluation of structural changes of scaffolds when pressured by an external mechanical power and open possibilities for deeper and more exact research in this field.

Key words: scaffold, picture analysis, fiber directionality, fiber thickness

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Teoretická východiska.....	11
2.1	Tkáňové nosiče - scaffoldy	11
2.1.1	Výroba scaffoldů.....	11
2.1.2	Používané materiály.....	13
2.1.3	Vlastnosti scaffoldů	14
2.1.4	Vliv plazmování (sítování) na mechanické vlastnosti scaffoldů.....	16
2.2	Rastrovací elektronová mikroskopie.....	17
2.2.1	Vznik obrazu.....	17
2.2.2	Příprava vzorků.....	17
2.2.3	Kontaminace vzorku	18
2.3	Rešerše souvisejících informačních pramenů	18
3	Cíl a hypotézy práce	20
4	Experiment	21
4.1	Přístrojové vybavení.....	21
4.2	Výzkumný soubor	24
4.3	Příprava přístroje.....	25
4.4	Příprava vzorku	25
4.5	Metodika vyhodnocování dat.....	27
4.5.1	Směrovost vláken scaffoldu.....	29
4.5.2	Tloušťka vláken scaffoldu	32
4.5.3	Vyhodnocování snímků scaffoldů při otočení o 90 stupňů	35
5	Výsledky měření.....	36
5.1	Přehled výsledků scaffoldů bez povrchové úpravy.....	36

5.1.1	Vyhodnocení směrovosti vláken.....	36
5.1.2	Vyhodnocení změny tloušťky vláken	41
5.2	Přehled výsledků scaffoldů s povrchovou plazmatickou úpravou	43
5.2.1	Vyhodnocení změny směrovosti vláken	43
5.2.2	Vyhodnocení změny tloušťky vláken	49
5.3	Porovnání výsledků scaffoldů s povrchovou úpravou a bez povrchové úpravy..	52
5.3.1	Porovnání změny směrovosti vláken	52
5.3.2	Porovnání změny tloušťky vláken	53
5.4	Pohled z boku.....	54
5.5	Některé faktory ovlivňující výsledky měření.....	55
5.5.1	Nezmapovaný vliv zlacení.....	55
5.5.2	Praskání vláken	55
5.5.3	Pohled na povrch	56
5.5.4	Možná nehomogenita scaffoldu.....	56
5.5.5	Chyby použité obrazové analýzy	57
5.5.6	Adaptace materiálu scaffoldu	58
6	Diskuze.....	59
6.1	Vývoj přístroje a metodiky upínání vzorku	59
6.2	Použité zvětšení a počty snímků	59
6.3	Vyhodnocení hypotéz.....	60
7	Závěr.....	63
8	Reference.....	64
9	Seznam příloh.....	66
	Příloha č. 1 Seznam obrázků.....	66
	Příloha č. 2 Seznam grafů	68
	Příloha č. 3 Seznam tabulek.....	69

Seznam zkratek

DNA - deoxyribonukleová kyselina

HAP - hydroxylapatit

PGA - polyglykolová kyselina

PLA - polylactidová kyselina

PLGA - kopolymery kyseliny DL-lactidové

PLLA - poly-L-lactidová kyselina

RNA - ribonukleová kyselina

RTG - rentgen, rentgenové

SEM - rastrovací elektronová mikroskopie

TCP - fosforečnan vápenatý

1 Úvod

Současné trendy v rekonstrukční medicíně se spíše než na totální umělé náhrady tkáně zaměřují na postupy vedoucí k její regeneraci nebo náhradě tkáně uměle připravenou. Autologní rekonstrukce tkáně, kdy dárcem je sám pacient, stejně tak jako alogenní, kdy je dárcem jiná osoba, jsou dnes běžnými technikami regenerativní medicíny. Zřídka je transplantovaná tkáň schopna zcela nahradit funkci tkáně původní a zároveň tato rekonstrukce přináší riziko komplikací. Největším úskalím této regenerační techniky je limitované množství vhodných autologních tkání pro daný typ rekonstrukce. Často nelze poškozenou tkáň zcela nahradit štěpem z jiné tkáně pacienta a je nutné hledat řešení, která by vedla co nejpřirozenější cestou k funkční náhradě. Tkáňové inženýrství jako směr regenerativní medicíny se výrazně rozvinulo na počátku 90. let 20. století. Je to interdisciplinární obor, který kombinuje inženýrský přístup s poznatky věd o životě za účelem vývoje biologické náhrady, která by mohla obnovit, zajistit či zlepšit funkci poškozených tkání či orgánů. Dosažení takového cíle prostřednictvím tkáňového inženýrství v sobě zahrnuje kombinaci živých buněk, v optimálním případě odebraných od postiženého pacienta, které by zajistily biologickou funkci, a podpůrného materiálu, většinou ve formě trojrozměrné matrice (scaffold). Tato matrice zajišťuje osídlujícím buňkám dočasnou či trvalou podporu pro migraci, růst a stimuly pro následné buněčné pochody, například pro diferenciaci kmenových buněk do buněk zralé tkáně.

Problematika přípravy tkáňových náhrad se s rozvojem technických možností stává velice aktuální a vzniká potřeba garance vlastností používaných materiálů jak ze strany výrobců, kteří ji využijí pro monitoring svých výrobních procesů, tak ze strany uživatelů, tedy výzkumných a klinických pracovišť, pro které je důležitá mimo jiné také informace o strukturálních změnách nosičů vlivem vnějšího zatěžování.

2 Teoretická východiska

Následující text přináší informace o testovaných materiálech a použitých metodách a slouží k vybudování kvalitního teoretického základu pro návrh a zpracování vlastní experimentální činnosti.

2.1 Tkáňové nosiče - scaffoldy

Doslovný překlad slova „scaffold“ z angličtiny zní „lešení“ nebo „konstrukce“, ze kterého je dobře zřejmá hlavní role scaffoldu, kterou je poskytnout trojrozměrnou kostru pro umožnění anebo usnadnění efektivního růstu aplikovaných buněk (Brahatheeswaran, 2011). Scaffoldy mohou mít tvar přizpůsobený jejich aplikaci od jednoduchých membrán po složité prostorové útvary. Aby mohl scaffold dobře plnit svoji funkci, měl by mít následující vlastnosti:

- Musí být dostatečně porézní, aby umožňoval dostatečnou výživu i okysličení buněk, jejich růst a adekvátní odvod metabolitů (Brahatheeswaran, 2011).
- Mechanické vlastnosti aplikovaného scaffoldu by se měly shodovat či co nejvíce blížit nahrazované tkáni (Brahatheeswaran, 2011).
- Musí být biokompatibilní, aby nedocházelo k imunitním reakcím příjemce, a pro tělo nesmí být toxický (Brahatheeswaran, 2011).

Scaffoldy lze dělit do skupin podle řady hledisek. Nejčastěji využívaná hlediska jsou podle použitých materiálů (biologický vs. umělý) a podle technologie výroby (především v případě syntetických materiálů).

2.1.1 Výroba scaffoldů

Metod pro výrobu scaffoldů je velké množství. Každá metoda má své výhody a nevýhody. Přehled základních metod výroby a jejich popis následuje:

1. Solvent casting

Při této výrobě dochází ke smíchání polymeru s roztokem soli. Tento roztok je umístěn do formy, která obsahuje porogen. Po vypaření vody zůstává polymerní struktura s krystaly soli. Ta je dále až dva dny proplachována vodou k odstranění porogenních

částic. Výsledná porozita scaffoldu je ovlivnitelná množstvím přidané soli a velikost pórů je ovlivněna velikostí krystalů použité soli (Miko, 2000).

2. Gas foaming

Při této výrobě dochází k vytváření velkého tlaku na biodegradabilní polymery nasycené plynem, například oxidem uhličitým nebo dusíkem. Plyn v polymeru vytváří bubliny různých velikostí v řádech stovek mikrometrů. Velkou nevýhodou této metody je, že většina bublin nemusí být vůbec propojena a povrch nemusí být porézní. Výhodou je, že se při výrobě nepoužívají žádná rozpouštědla (Quirk, 2004).

3. Phase separation

Tato procedura charakteristicky zahrnuje pět kroků:

1. rozpuštění polymeru,
2. fázovou separaci a gelovatění,
3. extrakci roztoku,
4. zmrazování,
5. studené vysychání (Holzwarth, 2011)(Nguyen, 2013).

Polymer je rozpuštěn v roztoku. Za určitých podmínek se roztok stane termodynamicky nestabilní a rozdělí se do dvou fází - na část bohatou na polymer a na část s nízkým obsahem polymeru. Část s nízkým obsahem polymeru je odstraněna a část s vysokým obsahem polymeru se nechá ztvrdnout. Výsledná polymerní struktura závisí na použitém polymeru a rozpouštědle a na podmínkách fázové separace jako je rychlost a teplota krystalizace. Díky nízké výrobní teplotě je snadné začlenění bioaktivních molekul do struktury. Výhodou této metody je relativní nenáročnost výroby.

Velice podobnou metodou je „Freeze drying“, kde se zchladí daný roztok na teplotu, při které dochází ke zmrazení všech částí roztoku a vytvoření krystalické formy rozpouštědla. Dále je směs vystavena tlaku, kterým je odstraněno rozpouštědlo (Liu, 2007).

4. Melt molding

Při této výrobě se naplní forma směsí práškového polymeru s porogenními složkami. Celá tato směs je zahřáta nad teplotu skelného přechodu polymeru a je na ni aplikován

tlak. V průběhu výroby dojde ke spojení surovin a vytvoření scaffoldu se specifickým tvarem dle formy. Po odstranění formy dojde k uniknutí porogenní složky a scaffold je vysušen. Tento proces výroby umožňuje kontrolování výsledného tvaru. Nevýhodou je vysoká teplota zpracování, která znemožňuje schopnost včlenění bioaktivních molekul do scaffoldu (Zhu, 2013).

5. Elektrospinning

Elektrostatické zvlákňování je metoda využívající elektrického náboje k vytvoření tenkých vláken až do tenkosti v řádech nanometrů (Zhu, 2013). Rozměr v řádech nanometrů je velice podobný uspořádání přírodní mimobuněčné hmoty a proto vytváří ideální podmínky pro přilnutí buněk a jejich množení (Yoshimoto, 2003).

Silné elektromagnetické pole, které působí na roztok polymeru, je vytvářeno mezi záporně nabitou elektrodou, na kterou je nanesen roztok, a kladně nabitou elektrodou, tzv. kolektorem. V důsledku kolísání povrchového napětí roztoku vznikne působením elektrostatických sil tzv. Taylorův kužel. Dále dojde k uvolnění kapky roztoku, na kterou jsou navázány další kapky roztoku díky síle molekulárních vazeb, a tím vzniká vlákno. Před dopadem vlákna na kolektor dochází k odpařování rozpouštědla a prodloužení vlákna a tedy i k jeho zúžení (Buzgo, 2010).

Tloušťka vláken je ovlivněna použitým polymerem. Při použití polymeru s větší molekulární hmotností je zhoršeno uvolnění kapky a vznikají tak vlákna většího průměru. Další možností, jak ovlivnit tloušťku vlákna, je velikost použitého elektromagnetického pole, které je závislé na vzdálenosti elektrod. Při větší vzdálenosti elektrod je menší intenzita pole, delší dráha letu a tedy vzniká tenčí vlákno. Velice důležitým faktorem jsou i teplota a vlhkost vzduchu při výrobě, které ovlivňují odpařování rozpouštědla z roztoku.

2.1.2 Používané materiály

Kritéria pro biomateriál v medicíně jsou založena především na chemickém složení materiálu, jeho molekulární hmotnosti, tvaru, struktuře, rozpustnosti, hydrofilite nebo hydrofobite, kluzkosti, povrchové energii, degradaci, erozních mechanismech a dalších faktorech. Pro výrobu scaffoldů jsou velmi často využívány polymery. Scaffoldy vytvořené z polymerů mají velký poměr povrchu k objemu, vysokou pórovitost s malou velikostí pórů, jsou biodegradabilní a mají vhodné mechanické vlastnosti. Nabízejí různé výhody jako biokompatibilitu, různost chemického složení a biologické vlastnosti vhodné

pro tkáňové inženýrství. Scaffolds můžeme rozdělit podle materiálu použitého pro výrobu:

1. Přírodní polymery

Jako první byly klinicky použity biodegradabilní materiály z přírodních polymerů. Díky svým bioaktivním vlastnostem mají daleko lepší interakci s buňkami dané tkáně. Jejich mechanické vlastnosti jsou však horší než u syntetických polymerů. Mezi tyto materiály řadíme proteiny (kolagen, hedvábí, fibrinogen, elastin, actin, myosin), polysacharidy (celulóza, chitin, glycosaminoglycan) a polynukleotidy (DNA, RNA) (Brahatheeswaran, 2011).

2. Syntetické polymery

Velkou výhodou syntetických polymerů je možnost ovlivňování mechanických vlastností při výrobě dle potřeby aplikace. Výrobní cena je často nižší než u přírodních polymerů, mohou být produkovány ve velkém množství a mají dlouhou trvanlivost. Mohou být vytvářeny za konstantních podmínek, což umožňuje vytvářet scaffolds s předvídatelnými a reprodukovatelnými mechanickými vlastnostmi. Nejčastější materiály využívané k výrobě jsou PLA – Polylactide, PGA – Polyglycolide a PLGA – Poly(lactide-oc-glycolide acid) (Brahatheeswaran, 2011).

3. Keramické, kovové, či jiným materiálem sycené polymery

Scaffolds vytvořeny z těchto materiálů jsou často pevnější, ale křehčí. Jejich velkou nevýhodou je horší biokompatibilita. Často jsou tvořeny z HAP – Hydroxyapatite nebo TCP – tricalcium phosphate (Brahatheeswaran, 2011).

Povrchová úprava plazmou se zejména používá ke změně povrchových vlastností daného scaffoldu. K vytvoření plazmy se používá plyn, nejčastěji kyslík nebo amoniak. Tento plyn v podobě plazmy je stříkán na daný scaffold v rádech sekund pro amoniak a do 3 minut pro kyslík (Yoon, 2013).

2.1.3 Vlastnosti scaffoldů

1. Biokompatibilita

Nejdůležitější vlastností scaffoldu, který má být využit k implantaci do živého organismu, je biokompatibilita. Biokompatibilita daného scaffoldu je závislá především

na materiálu, z kterého je vyroben. Je nutné, aby povrch scaffoldu vytvářel vhodné prostředí pro uchycení buněk a jejich následné dělení. V těle příjemce by po implantaci neměl vyvolat žádnou toxickou či jinou vedlejší nežádanou reakci. Imunitní odpověď organismu na implantovaný scaffold by měla být přiměřená, aby nevyvolala velké zánětlivé reakce, které by mohly vést až k odmítnutí implantátu tělem příjemce (Brahatheeswaran, 2011).

2. Biodegradabilita

Tato vlastnost je důležitá u scaffoldů, které mají poskytnout pouze dočasnou oporu pro růst buněk. Chceme-li, aby došlo k úplné náhradě tkáně novou, tak by scaffold neměl být implantátem trvalým, ale měl by být biologicky odbouratelný. Předpokladem je, že scaffold poskytne dočasnou kostru pro buňky a podporu jejich množení. Postupem času by si buňky měly vytvořit vlastní mezibuněčnou hmotu. V tento moment vzniká potřeba, aby scaffold zanikl, a měl by se začít biologicky odbourávat. Při rozkladu nesmí docházet ke vzniku toxických látek, které by jakýmkoli způsobem poškodily tělo příjemce implantátu (Brahatheeswaran, 2011).

Degradace scaffoldu může proběhnout prostřednictvím mechanismů zahrnujících fyzikální nebo chemické procesy nebo biologické procesy řízené enzymy (Brahatheeswaran, 2011). Existují dva základní typy rozpadu: povrchový a objemový. Odstranění scaffoldu může proběhnout rozpuštěním daného scaffoldu nebo jeho resorbací (Middleton, 2000).

Objemová degradace znamená, že dochází k rozpadu scaffoldu zevnitř. Rozrušuje se jeho vnitřní struktura a dochází tak ke zmenšování molekulární hmotnosti (Woodruff, 2010).

Brahatheeswaran povrchovou degradaci popisuje jako rozpouštění mýdla, kde dochází k úbytku scaffoldu z venku dovnitř. (Brahatheeswaran, 2011).

3. Mechanické vlastnosti

Potřeba mechanických vlastností je dána typem aplikace. V ideálním případě by měl mít scaffold stejné mechanické vlastnosti jako tkáň či anatomický útvar, který nahrazuje. Důležité je, aby bez problémů zvládl implantaci, tudíž musí být odolný vůči operativnímu vložení. Na mechanických vlastnostech scaffoldu může také záviset jeho stabilita. Ideálně by scaffold měl být stabilní s neměnnými mechanickými vlastnostmi do té doby, než si

buňky implantované tkáně začnou vytvářet sami vlastní mezibuněčnou hmotu (Brahatheeswaran, 2011).

4. Struktura scaffoldů

Předpokládá se, že hlavní roli v úspěchu hraje rovnováha mezi mechanickými vlastnostmi scaffoldu a jeho porézní strukturou, která by umožnila dostatečné podmínky pro růst buněk. Řada scaffoldů má dobré mechanické vlastnosti ale nízkou porozitu. Mnoho materiálů, které se při zkouškách in vitro jeví jako dobré, selhaly při implantaci in vivo pravděpodobně v důsledku nízké porozity. Tato nízká porozita neumožňovala dostatečné prorůstání cév do tkáně (O'Brien, 2011).

Vhodnou strukturou scaffoldu je propojená pórovitá struktura s vysokou porozitou. Právě tato struktura zajišťuje dostatečný přísun živin buňkám, odvod odpadních látek při degradaci scaffoldu a také zajišťuje možnost adekvátního cévního zásobení. Podle tkáně, pro kterou je scaffold určen k aplikaci, se liší optimální velikost pórů.

Optimální velikost pórů pro neovaskularizaci je 5 μm , pro fibroblasty 5 – 15 μm , pro hepatocyty 20 μm , pro kůži savců 20 – 125 μm , pro kost 200 – 300 μm . Toto bylo experimentálně prokázáno ve studiích (Yang, 2001) (Salgado, 2004) (Brahatheeswaran, 2011).

2.1.4 Vliv plazmování (sítování) na mechanické vlastnosti scaffoldů

Dolci se snažil ve svém experimentu odhalit vliv úpravy povrchu scaffoldu plazmou. Použil scaffold PLLA a plazmovou úpravu 20 kV s frekvencí pulzu 1 kHz po dobu 20 s. K pozorování povrchu scaffoldu použil mikroskop Philips 515 a zvětšení 1000x a 8000x. Na náhodně vybraných místech měl scaffold bez povrchové úpravy průměr vláken 820 ± 200 nm a scaffold s povrchovou úpravou pomocí plazmy 730 ± 200 nm. Nebyl patrný žádný důkaz o změně struktury a průměru vlákna scaffoldu s povrchovou úpravou plazmou. Při testování mechanických vlastností v tahu našel změnu Youngova modulu o 25 – 30 % dolů u scaffoldů s povrchovou úpravou pomocí plazmy oproti neupravenému scaffoldu. Na druhou stranu deformace ve zlomu byla proporcionálně zvětšena u scaffoldů ošetřených plazmou v důsledku ztráty tuhosti (Dolci, 2014).

2.2 Rastrovací elektronová mikroskopie

Rastrovací elektronová mikroskopie (angl. Scanning Electron Microscopy – SEM) je metoda k zobrazení struktury látek na úrovni jednotek nanometrů a provádí se pomocí speciálních elektronových mikroskopů. V některých mikroskopech je kromě rekonstruování obrazu sledované struktury možné měřit její fyzikální vlastnosti a provádět prvkovou analýzu (Mao, 2006).

2.2.1 Vznik obrazu

Celé snímání probíhá ve vakuu, které je v mikroskopu vytvořeno pomocí vakuové pumpy. Elektrony emitované elektronovou tryskou jsou urychlovány směrem k vzorku urychlovacím napětím. Svazek elektronů je zaostřován elektromagnetickými čočkami a je zaměřen na povrch vzorku. Dopadá řádově do okruhu 1 nm. Paprsek elektronů je vychylován cívkami ve dvou na sebe kolmých směrech, což zajišťuje postupné posouvání místa dopadu paprsku. Při dopadu elektronu na povrch vzorku dojde k emisi sekundárních elektronů, zpětně odražených elektronů, RTG záření a jiných signálů ze vzorků. Tyto sekundární elektrony snímá detektor zabudovaný v mikroskopu. Data z detektoru jsou zpracovávána a uchovávána počítačem, který následně složením informací odrazu z jednotlivých paprsků vytvoří celkový obraz (FEI, 2010).

2.2.2 Příprava vzorků

Většina vzorků nepotřebuje před vložením do elektronového mikroskopu žádnou speciální přípravu. Vzhledem k tomu, že snímání probíhá ve vakuu, je potřeba, aby daný vzorek ve vakuu vydržel. Pokud vzorek obsahuje nějakou těkavou komponentu, jako je třeba voda, musí být vysušen nebo za určitých okolností může být zmražen. Nevodivé vzorky musí být pokryty vodivou vrstvou. Například iridium nebo zlato dávají dostatečný potah a jsou snadno aplikovatelné.

Jakýkoliv předmět, který se vkládá do mikroskopu, musí být vodivý, aby bylo možné jeho uzemnění (FEI, 2010).

2.2.3 Kontaminace vzorku

Za kontaminaci vzorku se označuje případ, kdy je povrch vzorku pokryt cizí látkou. Nejčastěji k tomu dochází molekulami uhlíku, který vzniká rozpadem uhlovodíků. Při zobrazování se to často projevuje jako „skenovací čtverce“, které jsou patrné při změně přiblížení, kde je vidět výrazněji čtverec předchozího místa pozorování.

Dalším problémem je teoretické poškození vzorku, které vzniká energií, kterou materiál přijímá od paprsku elektronů. Může dojít k jeho zahřátí a změně struktury.

2.3 Rešerše souvisejících informačních pramenů

V rámci práce se provedená rešeršní činnost v zásadě ubírala dvěma směry hledání prací:

1. o mechanických vlastnostech scaffoldů,
2. studií o strukturálních změnách scaffoldů.

K vyhledávání podkladů byly použity dostupné databáze PubMed, Scopus, Web of Science a EI Compendex. S ohledem na počet nalezených studií nebylo vyhledávání omezeno (rok publikování, počet autorů, impact factor apod.).

Nejčastěji používanou metodou pro stanovování mechanických vlastností scaffoldů je dle dostupné literatury jednoosá tahová zkouška a jednotliví autoři se liší pouze v technických detailech konkrétního provedení.

Například Lin pracoval se vzorky o rozměrech 4,0 x 0,5 cm o tloušťce 0,7 – 1,0 mm. Vzorek byl upevněn do čelistí a byl položen na smirkový papír drsnosti 80 (bližší informace neuvedeny). Scaffold byl zatěžován 10 sinusovými cykly na 5 % prodloužení o frekvenci 0,1 Hz, kvůli stabilizaci vzorku. Zkouška v tahu byla provedena konstantním natahováním 0,1 %/s. Z lineární oblasti naměřené křivky byl počítán modul pevnosti (Lin, 2003).

V České republice se zkouškou v tahu zabývala J. Anděrová ve své diplomové práci Biomechanická reflexe scaffoldu na mechanické zatěžování. Délka testovaného vzorku byla konstantní (10 cm), ale šířka byla proměnlivá 1,0 – 2,5 cm. Okraje vzorku byly podlepeny lepenkami. Rozměr mezi lepenkami byl konstantní, a to 7 cm. Uprostřed vzorku byl z obou stran vytvořen vrub o velikosti 1 mm, aby došlo k jeho přetržení

uprostřed. Pro měření tahové zkoušky byl použit přístroj Mikro-Tester na katedře Anatomie a Biomechaniky FTVS UK. Natahování probíhalo rychlostí 1,5 mm/s se vzorkovací frekvencí 20 Hz (Anděrová, 2014).

Při rešerši nebyla nalezena práce, která by se zabývala změnou struktury scaffoldu v souvislosti s jeho mechanickým zatěžováním v reálném čase. Byly nalezeny studie, ve kterých je elektronový mikroskop využit k porovnání struktur scaffoldů nebo ke zjištění spolupráce s biologickým materiálem.

Pavia a spol. využívali elektronový mikroskop k porovnání struktury scaffoldů s jinými výrobními parametry. SEM zde byl využit k pozorování příčného řezu scaffoldu (Pavia a spol., 2012).

Shi a spol. využili SEM k průkazu propojení buněk a scaffoldu (Shi a spol., 2007).

Madurantakam a spol. ve své práci využili SEM na zkoumání povrchu scaffoldu a ověření jeho změny z důvodu mineralizace (Madurantakam a spol., 2009).

3 Cíl a hypotézy práce

Právě souvislostmi mezi aplikovaným vnějším zatížením a změnami struktury se zabývá předkládaná práce, která danou problematiku zkoumá pro případ syntetických polymerních nanovlákných scaffoldů.

Cílem práce je nalézt vhodnou metodu pro hodnocení strukturálních změn scaffoldů vlivem působení vnější mechanické zátěže a ověřit existenci předpokládané souvislosti. V rámci tohoto úkolu byla vypracována rešerše souvisejících studií a navrženo a provedeno vlastní experimentální měření.

Pro snazší a jednoznačné komentování dosažených výsledků byly s ohledem na experimentální možnosti Katedry anatomie a biomechaniky a spolupracujících pracovišť vysloveny následující hypotézy:

1. Hypotéza

Vlákná scaffoldů bez povrchové plazmatické úpravy se budou orientovat do směru působícího zatížení.

2. Hypotéza

Vlákná scaffoldů s povrchovou plazmatickou úpravou jsou vzájemně fixována, což se projeví menší orientací vláken do směru působícího zatížení než u vláken scaffoldů bez povrchové plazmatické úpravy.

3. Hypotéza

Vlákná scaffoldů se budou ztenčovat při působícím zatížení.

4 Experiment

4.1 Přístrojové vybavení

Pro snímání struktury scaffoldů byl využit rastrovací elektronový mikroskop Quanta 450 od firmy FEI, který vlastní Ústav struktury a mechaniky hornin AV ČR, v.v.i., zobrazený na obrázku č. 1.



Obrázek č. 1: Rastrovací elektronový mikroskop Quanta 450

Vzorky byly snímány ve vysokém vakuu, řádově 10^{-4} Pa, při urychlovacím napětí 10 kV, v pracovní vzdálenosti 20 – 45 mm. Byl použit režim sekundárních elektronů snímaných na Everhart-Thornley detektoru.

Prvním velkým úkolem bylo navrhnout a zkonstruovat zařízení, které bude kompatibilní s tímto elektronovým mikroskopem a umožní nám testované scaffoldy sledovat v natažení uvnitř mikroskopu.

Zařízení muselo splňovat následující požadavky:

- konstrukce z vodivého materiálu,
- velikost přístroje musí být přizpůsobena vnitřním prostorům mikroskopu,
- kompatibilní uchycení ke stolku uvnitř mikroskopu,

- kvalitní uchycení měřeného scaffoldu,
- možnost uchycený scaffold natahovat o přesně známou vzdálenost,
- možnost manipulovat s uchyceným vzorkem, aby ho bylo možné sledovat z více úhlů.

Ve spolupráci s Ing. Lopotem a Mgr. Hadrabou byl navržen a sestrojen přístroj, který je vidět na obrázcích č. 2 a 3. Celý přístroj je vyroben z oceli.



Obrázek č. 2: Vyrobený přístroj pro natahování scaffoldů v elektronovém mikroskopu

Přístroj se skládá z hlavního nosného rámu ve tvaru písmene U, který je vidět vpravo na obrázku č. 2. Tento rám je zakončen dvěma podstavci, které ve svém středu mají kolík o průměru odpovídajícím průměru děr ve stolku elektronového mikroskopu. Rozpětí těchto dvou kolíků odpovídá rozpětí děr ve stolku.

Druhou část přístroje tvoří dvoje kleště pro uchycení vzorku a jejich vzájemné spojení. Na obrázku č. 3 uprostřed nosného rámu je vidět šroub, kterým jsou uchyceny bližší kleště k rámu, a tím jsou propojeny tyto dva celky. Tento šroub také slouží k možnosti měnit polohu kleští vůči hlavnímu rámu. Na obrázku č. 2 jsou kleště ve vodorovné pozici vůči rámu, na obrázku č. 3 jsou o 90 stupňů pootočený. Malá díra na

obrázku č. 3 v hlavním rámu vedle šroubu slouží k aretaci vodorovné pozice kleští a pozice kleští o 90 stupňů otočené vůči rámu.

Kleště se skládají ze dvou čelistí, které jsou spojeny. Jedna čelist je pevná a druhá pohyblivá. Uchycení vzorku mezi čelistmi je zajištěno dvěma šrouby po stranách čelistí.

Kleště jsou na jedné straně spojeny tyčí, po které mohou vzdálenější kleště klouzat, a na straně druhé jsou spojeny tyčí s metrickým závitem se stoupáním na jednu otáčku 0,5 mm. Tato tyč se závitem je na konci opatřena kolečkem pro lepší obslužnost. Míru natažení lze odečíst dle počtu otočení kolečka, případně v kleštích blíže k rámu je zabudován vrut, který vždy cvakne při jedné plné otáčce (viz obrázek č. 2).



Obrázek č. 3: Vyrobenný přístroj pro natahování scaffoldů v elektronovém mikroskopu

4.2 Výzkumný soubor

Předmětem experimentu byly nanovláknité scaffoldy vyrobeny z kyseliny polymléčné (označovány PLA). Jednalo se konkrétně o dva druhy materiálu s plošnou hustotou udávanou od výrobce 16 g/cm^2 . Oba scaffoldy byly vyráběny stejným postupem, ale jeden z nich prošel na závěr povrchovou úpravou plazmováním po dobu 30 sekund při 75 W.

Zkoumané materiály byly dodány ve formátu A4 na nosné modré tkanině, foto zkoumaného materiálu je na obrázku č. 4. Materiál na tkanině byl uložen v ochranné fólii. Při uchovávání materiálu bylo potřeba zabránit kontaktu scaffoldu s tekutinou, aby nedošlo k absorpci vlhkosti scaffoldem. Mohlo by dojít k poškození materiálu následnou manipulací či transportem.



Obrázek č. 4: Zkoumaný scaffold PLA 16 g/cm^2 na nosné modré tkanině

4.3 Příprava přístroje

Před měřením je nutné připravit přístroj pro jeho použití v rastrovacím elektronovém mikroskopu. Jedná se především o jeho očištění od mechanických nečistot tak, aby nebyl obraz rušen. Čištění přístroje probíhalo pomocí ultrazvuku v roztoku ethanolu. Po vyčištění bylo potřeba maximálně eliminovat možnost znečištění přístroje a bylo s ním i se vzorky zacházeno pouze v chirurgických rukavicích.

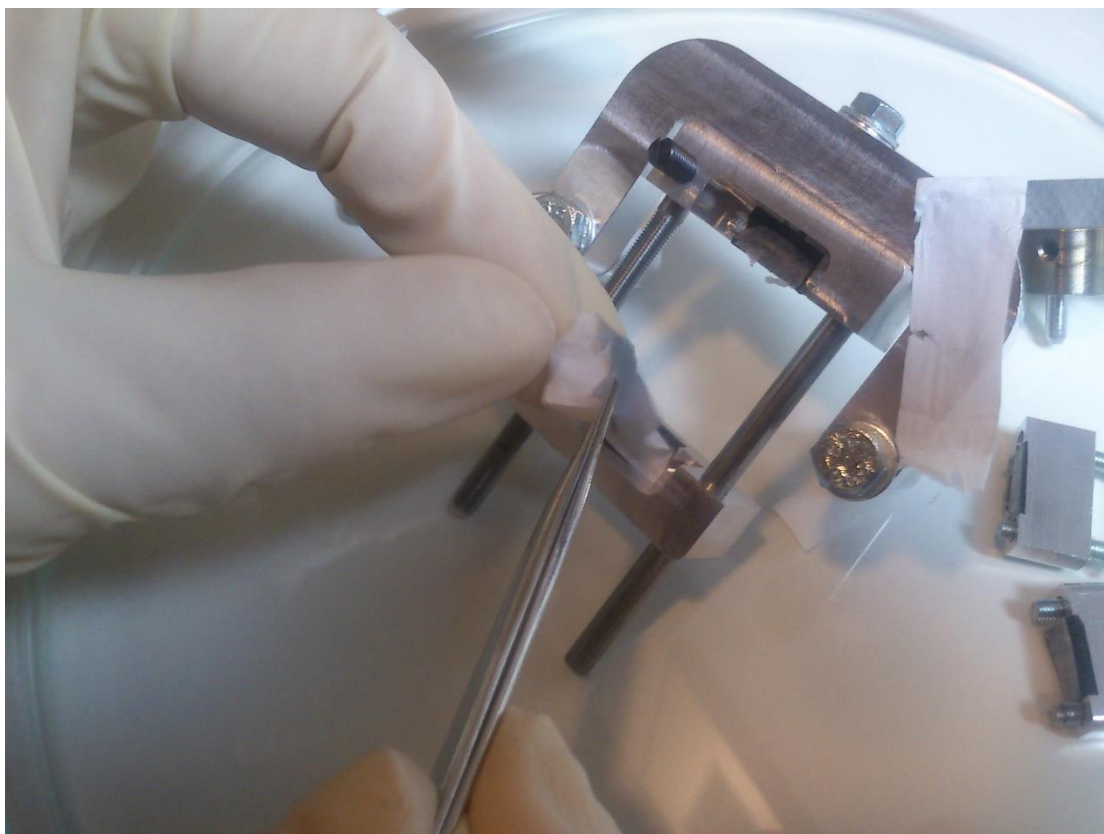
4.4 Příprava vzorku

Před měřením byly scaffoldy zkontrolovány, zda nevykazují známky mechanického poškození.

Po zkontrolování scaffoldu byla provedena vlastní příprava vzorku. Nejdříve bylo potřeba z daného scaffoldu získat vzorek patřičných rozměrů vhodný pro uchycení do kleští. Optimální šířka vzorku byla 1 cm. U širších vzorků by mohlo dojít ke kontaktu vzorku se šroubem, který spojoval jednotlivé čelisti, a tím k poškození daného vzorku. Maximální roztažitelnost čelistí od sebe je 4 cm. Zamýšlené natažení vzorku bylo až 50 % relativního prodloužení. Tudíž vzorek vložený do kleští nesměl mít klidovou délku mezi kleštěmi větší než 2,5 cm. Z dodaného scaffoldu byla z celého vzorku pomocí nůžek vystřižena část o rozměrech 2,5 x 1,0 cm.

Povrch tohoto vzorku byl následně před snímáním pokryt zlatem v naprašovačce K550X v atmosféře argonu.

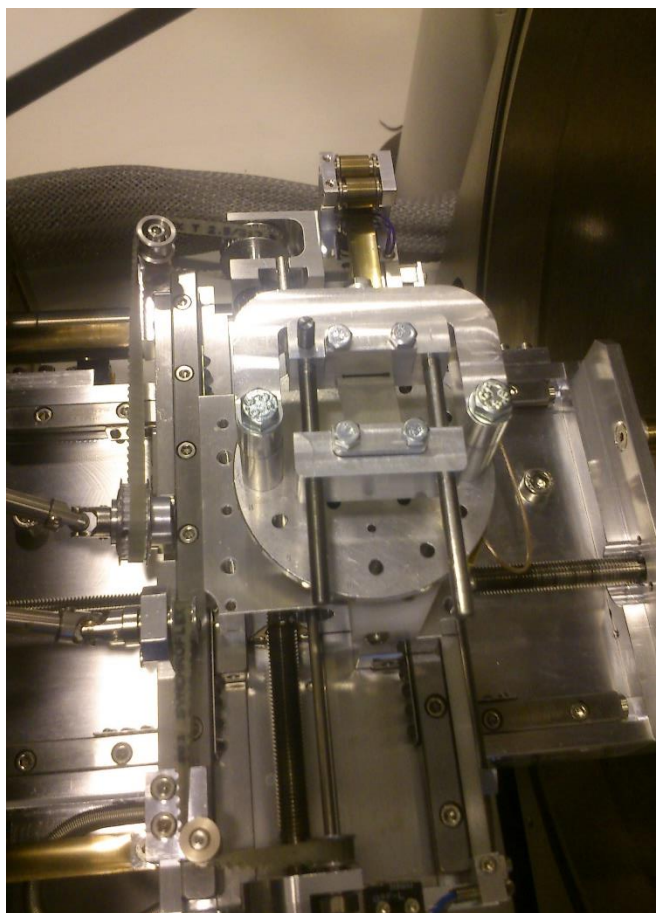
Teprve s touto povrchovou úpravou byl vzorek uchycen do čelistí připraveného přístroje, jak je vidět na obrázku č. 5.



Obrázek č. 5: Uchycení vzorku do přístroje

Pro lepší manipulaci byla k uchycení navíc použita oboustranně lepicí páska. Páska byla nejdříve nalepena na obě pevné čelisti, následně k ní byl přilepen vzorek a až poté byly pohyblivé čelisti přišroubovány k pevným a tím zajištěn vzorek.

Přístroj s takto připraveným a uchyceným vzorkem byl připevněn na pracovní stůl elektronového mikroskopu, zobrazeno na obrázku č. 6.



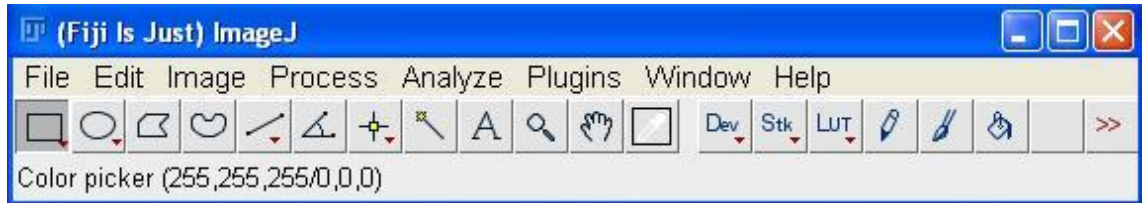
Obrázek č. 6: Připevnění přístroje se vzorkem ke stolku v elektronovém mikroskopu

4.5 Metodika vyhodnocování dat

K identifikaci základních parametrů vzorků jsme použili automatizovaných postupů s využitím počítačové technologie. Starší manuální způsoby vyhodnocování zahrnující například měření pomocí digitálního pravítka jsou časově velice náročné a mnohdy i velice subjektivní.

Standardně používaným programem pro vyhodnocování je ImageJ (Image Processing and Analysis in Java). Pro potřeby této práce byl vybrán počítačový program s názvem Fiji, který lze jednoduše popsat jako distribuci programu ImageJ spolu s Javou a mnoha dalšími pluginy uspořádanými do přehledného kompletního menu (obrázek č. 7). Hlavním cílem distribuce tohoto programu je podpořit výzkum. Jedná se o volně šiřitelný program, který lze stáhnout z internetu (<http://imagej.net/Fiji/Downloads>). Program má snadnou instalaci a zajištěnou automatickou aktualizaci. Z vývojářského hlediska se jedná o open source, který může dále rozvíjet kdokoli. Oproti ImageJ má výhodu ve

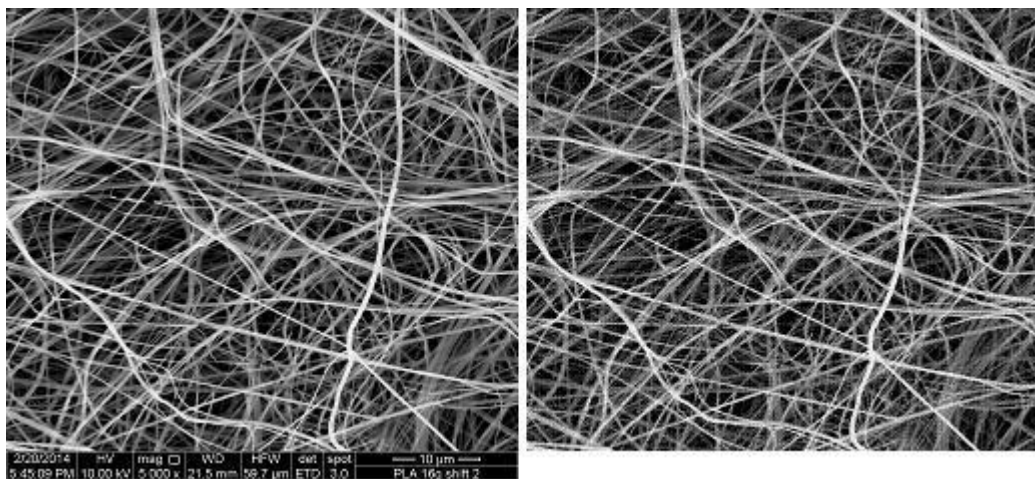
velkém množství volně dostupných pluginů, které spoustu procesů obrazové analýzy automatizují a ulehčují.



Obrázek č. 7: Fiji - program využíván k automatické obrazové analýze

Výstupní obrázky z rastrovacího elektronového mikroskopu mají rozlišení 1024 na 943 pixelů. Při zvětšení 500x odpovídá sedmnáct pixelů deseti mikrometrům, při zvětšení 1000x odpovídá sedmnáct pixelů pěti mikrometrům, při zvětšení 5000x odpovídá sedmnáct pixelů jednomu mikrometru.

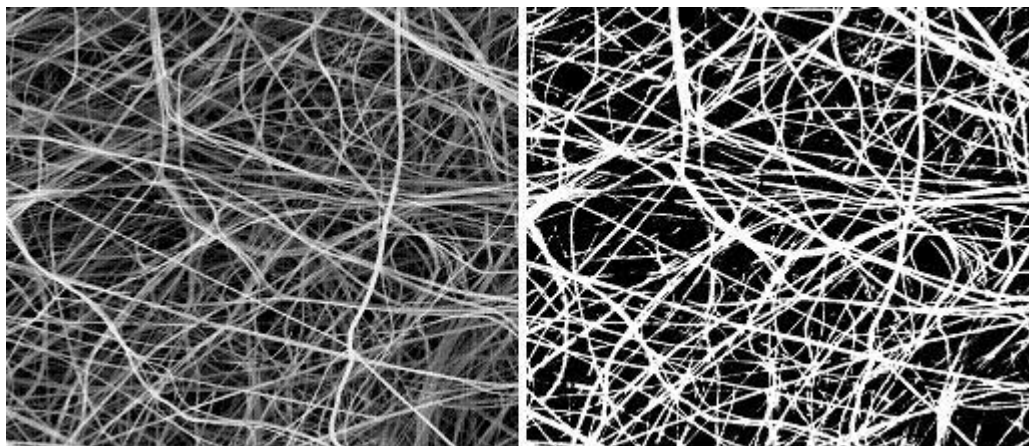
Prvním krokem zpracování obrazu je určení oblasti z daného obrázku, kterou chceme vyhodnocovat. Vzhledem k tomu, že obrazový výstup z rastrovacího elektronového mikroskopu v sobě nesl i opticky zanesená metadata měření, bylo potřeba o tato data vyhodnocovanou oblast zmenšit. K tomu slouží funkce „crop“, která ořízne obraz pouze na vybranou oblast. Na obrázku č. 8 je vlevo vidět výchozí obrázek, vpravo obrázek oříznutý o metadata.



Obrázek č. 8: Vlevo původní obrázek, vpravo upravený obrázek

Druhým krokem zpracování obrazu je rozdělení jednotlivých pixelů na pixely objektů a na pixely pozadí. V našem případě za pixely objektu považujeme vlákna. Cílem je získat binární obraz, kde jsou pixely černé nebo bílé. Slouží k tomu funkce prahování („threshold“). Při použití této funkce dochází k tomu, že program postupně vyhodnocuje

každý pixel a na základě uživatelem stanoveného prahu označí pixel za černý nebo bílý. Nastavení prahu v našem případě bylo pomocí funkce „mean“. Jedná se o stanovení prahu pomocí distribuce škály šedosti. Výsledek je znázorněn na obrázku č. 9 vpravo, vlevo je patrný obrázek před změnou.



Obrázek č. 9: Druhý krok úpravy obrazu – převedení na binární obraz

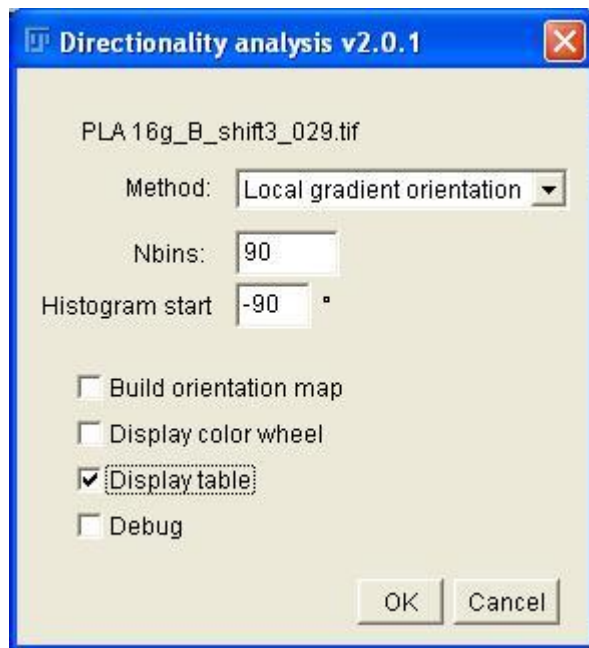
Další úprava obrazu byla závislá na sledovaném parametru.

4.5.1 Směrnost vláken scaffoldu

Jedním ze základních vyhodnocovaných parametrů byla orientace vláken v daném scaffoldu. Při vyhodnocování tohoto parametru byly použity snímky při zvětšení 500x ze dvou důvodů:

1. Vlákná scaffoldů nejsou přímá, proto menší zvětšení nám umožňuje pozorovat větší plochu a určit přesněji převládající směr vláken.
2. Zvětšení 500x je dostatečně velké, aby bylo možné odlišit směrnost jednotlivých vláken.

Pro vyhodnocení tohoto parametru byl využit plugin programu Fiji „Directionality.“ Jedná se o funkci využívanou k odvození preferovaného směru na vloženém obrázku. Před zahájením zpracování je možno nastavit některé parametry patrné na obrázku č. 10.



Obrázek č. 10: Nastavení parametru pluginu „Directionality“

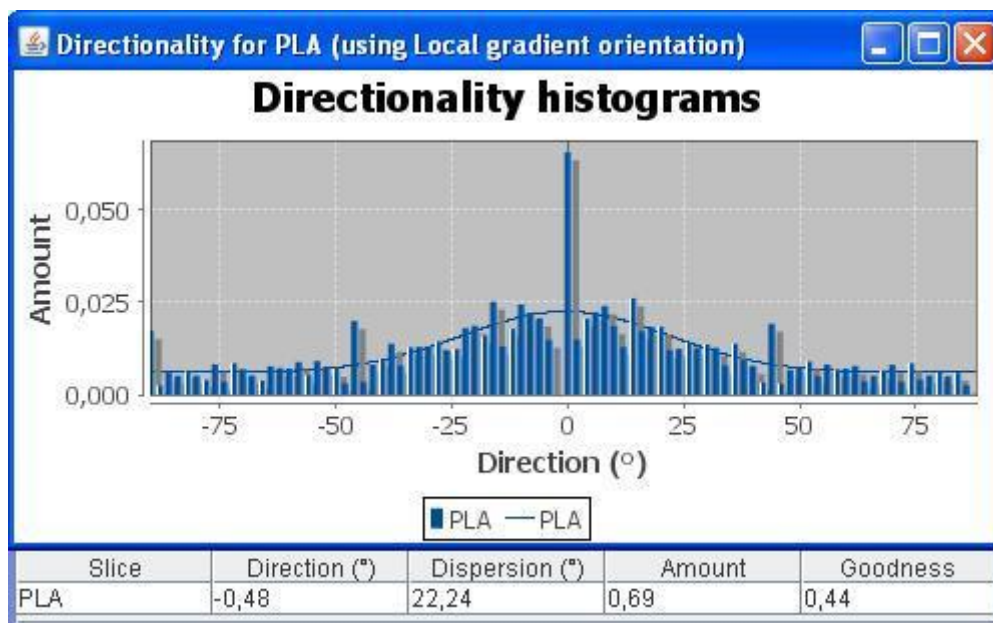
Nabídka „Method“ dovoluje vybrat mezi metodou lokálního gradientu nebo metodou založenou na analýze Furierova spektra. Pro účely této práce byla využita metoda lokálního gradientu. Jedná se o lokální metodu využívající 5x5 Sobel filtr k odvození orientace lokálního gradientu. Histogram je vytvořen nanesením čtverce daného gradientu do příslušného binu.

Další možností je nastavení množství binů a počátek histogramu. Počet binů určuje, do kolika úseků bude rozděleno 180 stupňů. Standardní nastavení je 90 binů, kde tedy jeden bin (úsek) odpovídá 2 stupňům. Začátek histogramu určuje, jakým úhlem bude začínat graf.

Možnost označení „Build orientation map“ umožňuje zobrazení vyhodnocovaného obrázku nabarveného podle lokální orientace. Tato funkce nebyla využívána.

„Display color wheel“ znázorňuje spektrum barev. Vzhledem k tomu, že k vyhodnocování byly použity černobílé obrázky, je tato možnost bezpředmětná. Tato funkce nebyla využívána.

„Display table“ umožňuje zobrazení číselných hodnot pro všechny zpracovávané biny. Zobrazuje číslo binu, velikost úhlu, změřenou hodnotu i hodnotu proložené křivky, kterou program automaticky doplňuje k výsledkům. Tato funkce byla využita.



Obrázek č. 11: Výstup při zpracování pomocí pluginu „Directionality“

Výsledky jsou zobrazeny histogramem zobrazeným na obrázku 11. Na ose x grafu je úhel směrovosti a na ose y je procentuální množství vláken vyjádřené desetinným číslem. Program zároveň generuje statistické údaje o nejvyšším nalezeném vrcholu. Nejvyšší vrchol je vytvořen pomocí Gaussovy funkce a bere v potaz periodickou povahu histogramu. Výstupem jsou 4 hodnoty.

1. „Direction (°)“ udává střed Gaussovy křivky,
2. „Dispersion (°)“ udává směrodatnou odchylku Gaussovy křivky,
3. „Amount“ je suma histogramu od středu \pm směrodatná odchylka dělená celkovou sumou histogramu,
4. „Goodness“ informuje o míře shody proložené křivky s naměřenými daty, kde hodnota 1 znamená absolutní shodu, hodnoty blížíící se 0 znamenají velkou nepřesnost.

Spolu s tímto histogramem byly zobrazeny výchozí hodnoty tohoto histogramu, které byly poté dále zpracovány pomocí programu Microsoft Office Excel. Pro každý bin v daném relativním prodloužení scaffoldu byla určena průměrná hodnota μ podle vzorce:

$$\mu = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

kde N je počet měření s hodnotami x_i .

Tímto postupem byl vytvořen soubor, který obsahoval průměrnou hodnotu μ ke každému z 90 binů.

Za účelem potlačení šumu byla data transformována z binování po 2° na binování po 20° .

Následně byla takto upravená data fitována pomocí programu gnuplot Gaussovou distribucí s konstantním pozadím.

$$f(x) = A \exp\left(-\frac{(x - \mu)^2}{2\sigma^2}\right) + B.$$

V klidovém stavu byly fitovány všechny parametry μ , σ , A a B , u protažených vzorků byl fixován parametr $\mu = 0$.

V některých případech fit nekonvergoval (tj. vzorek lze považovat v rámci chyby měření za izotropní), v těchto případech byl proveden fit pouze konstantního pozadí (parametr B).

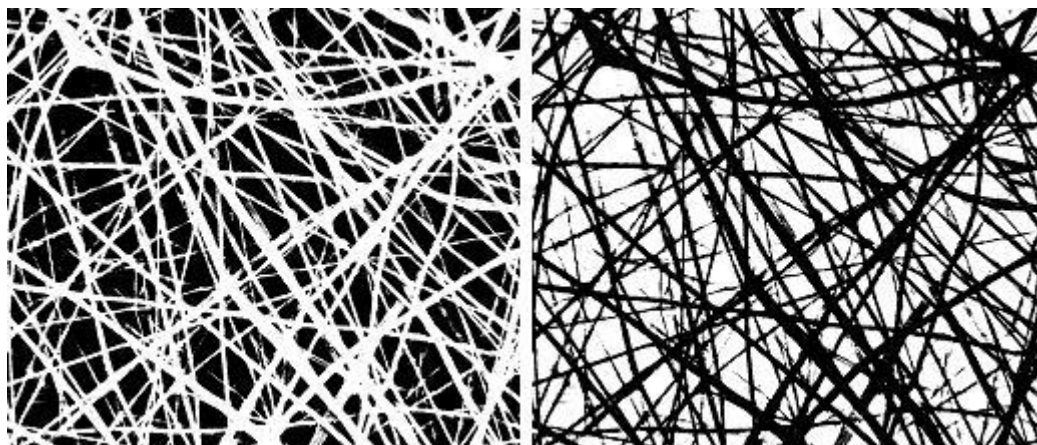
Relativní zastoupení neorientovaných vláken v každém vzorku bylo určeno podle vzorce:

$$p = \text{počet binů} \times B.$$

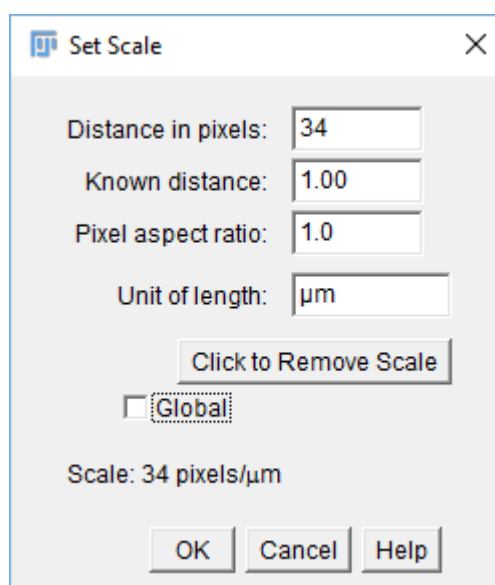
4.5.2 Tloušťka vláken scaffoldu

K určení tloušťky vláken byl použit volně dostupný plugin BoneJ pro program Fiji. Jedná se o plugin s funkcí „thickness“ pro určení tloušťky vláknenných struktur. Pro vyhodnocování tloušťky vláken byly použity snímky se zvětšením 5 000x a 10 000x. Na snímcích s menším rozlišením je rozlišovací schopnost obrázku pro tyto účely velice malá. Při zvětšení 500x a standardním rozlišení odpovídá jednomu pixelu vzdálenost 0,588 μm . Vzhledem k předpokladu, že vlákna jsou tlustá v řádu stovek nanometrů, je nutno dosáhnout lepší rozlišovací schopnosti.

Vstupem pro tento plugin musí být binární obrázek se znázorněním vláken v černé barvě a pozadí v bílé. K převrácení bílé a černé barvy slouží funkce invert. Na obrázku č. 12 je vlevo znázorněn vstupní obrázek a vpravo po použití funkce invert. Takto upravený obrázek je připraven k dalšímu zpracování tímto pluginem.



Obrázek č. 12: Vlevo binární obrázek, vpravo invertovaný



Obrázek č. 13: Nastavení poměru mezi pixely a jednotkou délky

Před pristoupením ke zpracování je nutno nastavit převod mezi pixely a jednotkou délky. Toto měřítko se liší podle zvětšení a rozlišení použitého k získání obrázků elektronovým mikroskopem. U vzorku 1 byly použity snímky ve zvětšení 5 000x a menším rozlišení, takže 17 pixelů odpovídalo 1 μm . U vzorku 2 byly použity snímky ve zvětšení 5 000x, ale s dvojnásobným rozlišením než v případě prvního vzorku, tedy převod odpovídal 34 pixelů na 1 μm . Snímání ve větším rozlišení ale výrazně časově

prodloužilo snímání jednoho obrázku, a proto u vzorku 3 byly použity snímky ve zvětšení 10 000x, ale v původním rozlišení, tedy převod byl opět 34 pixelů na 1 μm. Tento údaj zadáme do programu pomocí funkce „set scale“, viz obrázek č. 13.



Obrázek č. 14: Nastavení pluginu „BoneJ Thickness“

Základní možnosti nastavení zpracování obrázku pluginem BoneJ Thickness jsou zobrazeny na obrázku č. 14. Funkce „Thickness“ umožňuje vypočítat šířku vláknitých struktur na obrázku. Funkce „Spacing“ vypočítává šíři mezer mezi vlákny. „Graphic Result“ pro provedení zpracování graficky znázorní místa měření. Měřená vlákna znázorní barevně, prostor mezi vlákny znázorní černou barvou. „Use ROI Manager“ dovoluje výpočet šíře vláken a šíře prostorů mezi vlákny limitovat specifickým nastavením.

Pro účely práce bylo využito funkce programu „Graphic result“, která umožňuje následně díky funkci histogram vytvořit histogram zastoupení jednotlivých tlouštěk vláken ve snímku. Binování bylo nastaveno u vzorku 1 po 0,6 μm a u vzorků 2 a 3 po 0,3 μm. Velikost binů byla odvozena od vzdálenosti, která na zkoumaném snímku odpovídá jednomu pixelu. Na snímcích docházelo k překryvům vláken a automatické zpracování tato vlákna nebylo schopno od sebe odlišit, a tak je měřila jako jedno vlákno. K omezení těchto chyb zpracováním obrazu byl stanoven rozsah měření na tloušťku vláken od 0 μm do 1,5 μm. Pro každý bin v daném relativním prodloužení scaffoldu byla určena průměrná hodnota μ podle vzorce:

$$\mu = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

kde N je počet měření s hodnotami x_i .

Tímto postupem byl vytvořen soubor, který obsahoval průměrnou hodnotu μ ke každému z binů.

Z tohoto souboru byl vytvořen histogram, který udává, jakou plochu v procentech celkové plochy vláken na snímku zaujímají vlákna určité tloušťky, a z toho spočítána průměrná tloušťka vláken se směrodatnou odchylkou.

4.5.3 Vyhodnocování snímků scaffoldů při otočení o 90 stupňů

Snímky scaffoldů provedené v této poloze nebyly dále vyhodnocovány z důvodu popsaných v kapitole 5. Výsledky měření.

5 Výsledky měření

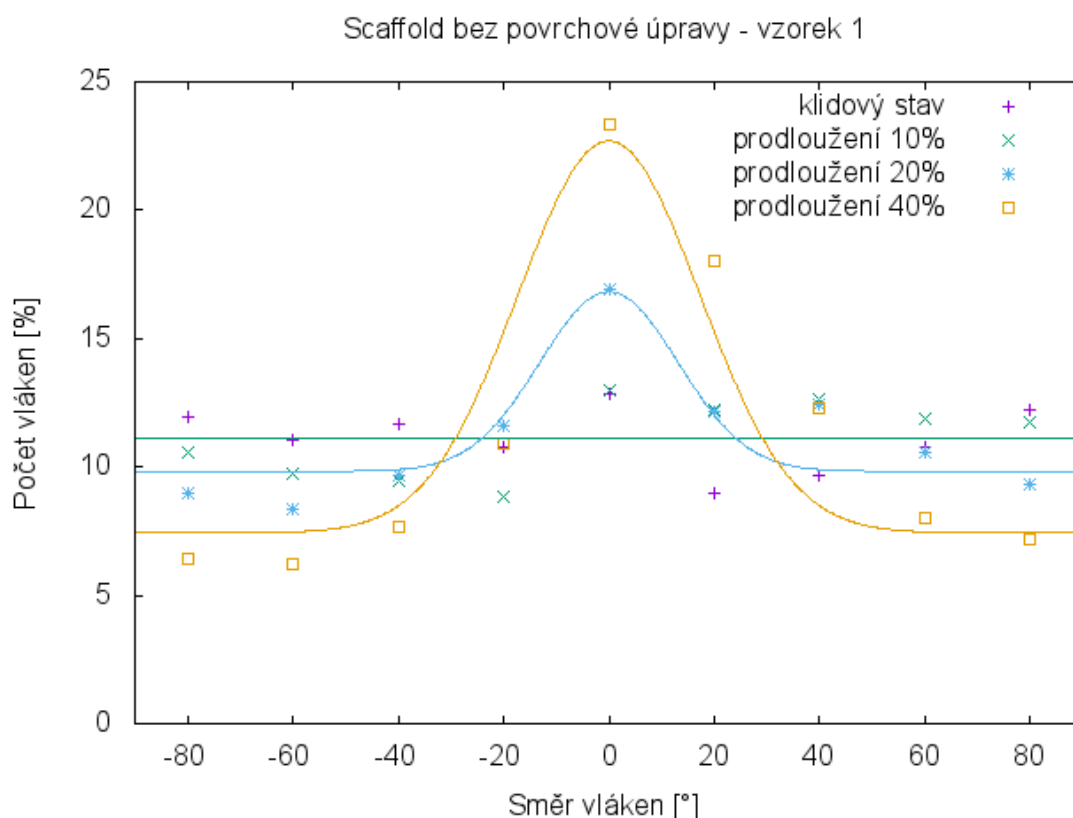
5.1 Přehled výsledků scaffoldů bez povrchové úpravy

5.1.1 Vyhodnocení směrovosti vláken

Byly vyhodnocovány snímky tří vzorků scaffoldu bez povrchové úpravy se zvětšením 500x ve 4 stavech. V klidovém stavu, při relativním prodloužení 10 %, 20 % a 40 %.

5.1.1.1 Scaffold bez povrchové úpravy – vzorek 1

Na tomto vzorku metodikou popsanou v kapitole 4.5.1 byly vyhodnoceny 4 snímky pro každý stav prodloužení scaffoldu. Výsledky zpracování jsou zobrazeny v grafu č. 1. Důležité parametry jsou uvedeny v tabulce č. 1.



Graf č. 1: Směrovost vláken vzorku 1 bez úpravy

Tabulka č. 1: Směrnost vláken vzorku 1 bez úpravy

prodloužení [%]	A	μ [°]	σ	B	p [%]
0				$11,1 \pm 0,4$	100 ± 4
10				$11,1 \pm 0,5$	100 ± 4
20	$7 \pm 1,4$	0	13 ± 3	$9,8 \pm 0,6$	89 ± 5
40	15 ± 3	0	17 ± 4	$7,4 \pm 1,3$	67 ± 12

V klidovém stavu nebyl nalezen žádný převládající směr. Nebylo možno uplatnit Gaussovo rozložení, proto byla proložena pouze přímka znázorňující rovnoměrné rozložení s parametrem $B = 11,1 \pm 0,4$. 100 % ± 4 % vláken je považováno za izotropní ve smyslu směrnosti.

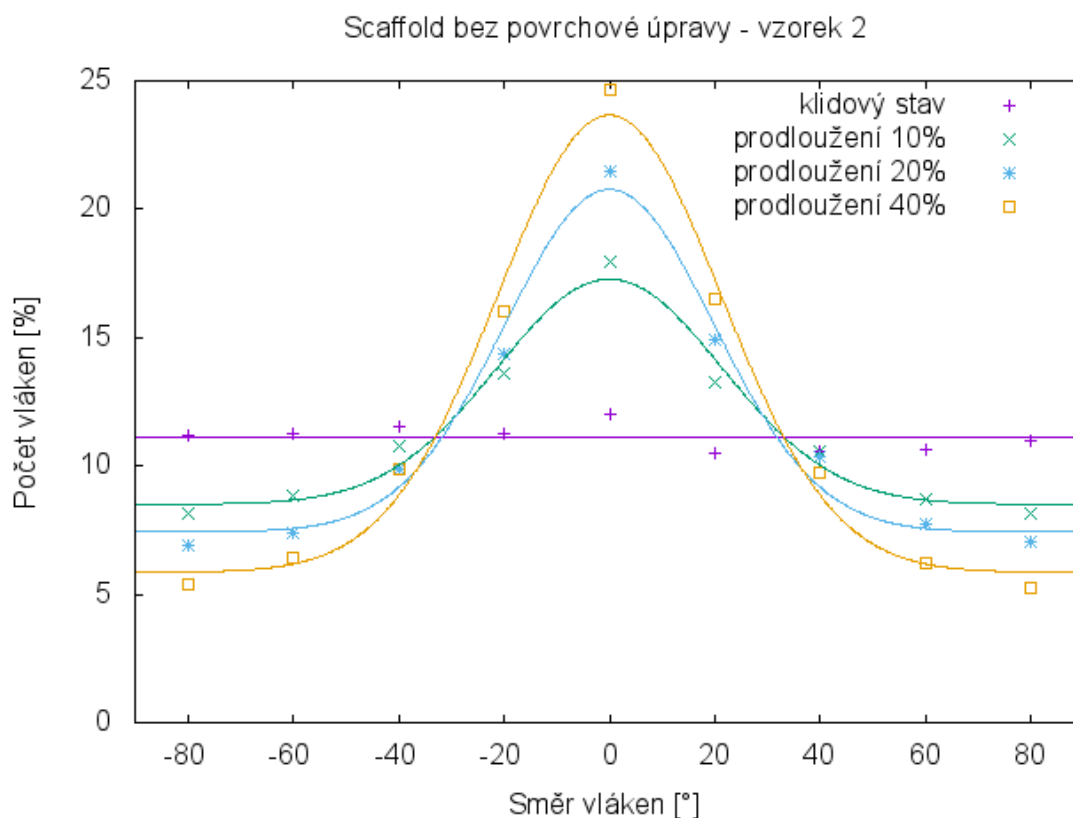
V relativním prodloužení 10 % také nebyl nalezen žádný převládající směr a nebylo možno uplatnit Gaussovo rozložení. Daty opět byla proložena přímka s parametrem $B = 11,1 \pm 0,5$. Chyba je větší než u klidového stavu, což vypovídá o menší shodě s rovnoměrným rozložením a může ukazovat na počínající směřování vláken scaffoldu.

V relativním prodloužení 20 % bylo 89 % ± 5 % vláken považováno za izotropní ve smyslu směrnosti, což odpovídá přímce s parametrem $B = 9,8 \pm 0,6$. Hodnotami pro zbývající vlákna bylo možno proložit křivku Gaussova rozložení s parametry $A = 7,0 \pm 1,4$ a $\sigma = 13 \pm 3$.

V relativním prodloužení 40 % bylo 67 % ± 12 % vláken považováno za izotropní ve smyslu směrnosti, což odpovídá přímce s parametrem $B = 7,4 \pm 1,3$. Hodnotami pro zbývající vlákna bylo možno proložit křivku Gaussova rozložení s parametry $A = 15 \pm 3$ a $\sigma = 17 \pm 4$.

5.1.1.2 Scaffold bez povrchové úpravy – vzorek 2

Na vzorku 2 metodikou popsanou v kapitole 4.5.1 bylo vyhodnoceno 6 snímků pro každý stav prodloužení scaffoldu. Výsledky zpracování jsou zobrazeny v grafu č. 2. Důležité parametry jsou uvedeny v tabulce 2.



Graf č. 2: Směrovost vláken vzorku 2 bez úpravy

Tabulka č. 2: Směrovost vláken vzorku 2 bez úpravy

prodloužení [%]	A	μ [°]	σ	B	p [%]
0				$11,1 \pm 0,2$	100 ± 1
10	$8,8 \pm 0,7$	0	21 ± 2	$8,5 \pm 0,4$	77 ± 3
20	$13,3 \pm 0,8$	0	20 ± 2	$7,4 \pm 0,4$	67 ± 4
40	$17,8 \pm 0,9$	0	$21,2 \pm 1,5$	$5,9 \pm 0,5$	53 ± 5

V klidovém stavu nebyl nalezen žádný převládající směr. Nebylo možno uplatnit Gaussovo rozložení, proto byla proložena pouze přímka znázorňující rovnoměrné rozložení s parametrem $B = 11,1 \pm 0,2$. Bez převládajícího směru bylo $100 \% \pm 1 \%$ vláken.

V relativním prodloužení 10 % bylo $77 \% \pm 3 \%$ vláken považováno za izotropní ve smyslu směrovosti, což odpovídá přímce s parametrem $B = 8,5 \pm 0,4$. Hodnotami pro zbývající vlákna bylo možno proložit křivku Gaussova rozložení s parametry $A = 8,8 \pm 0,7$ a $\sigma = 21 \pm 2$.

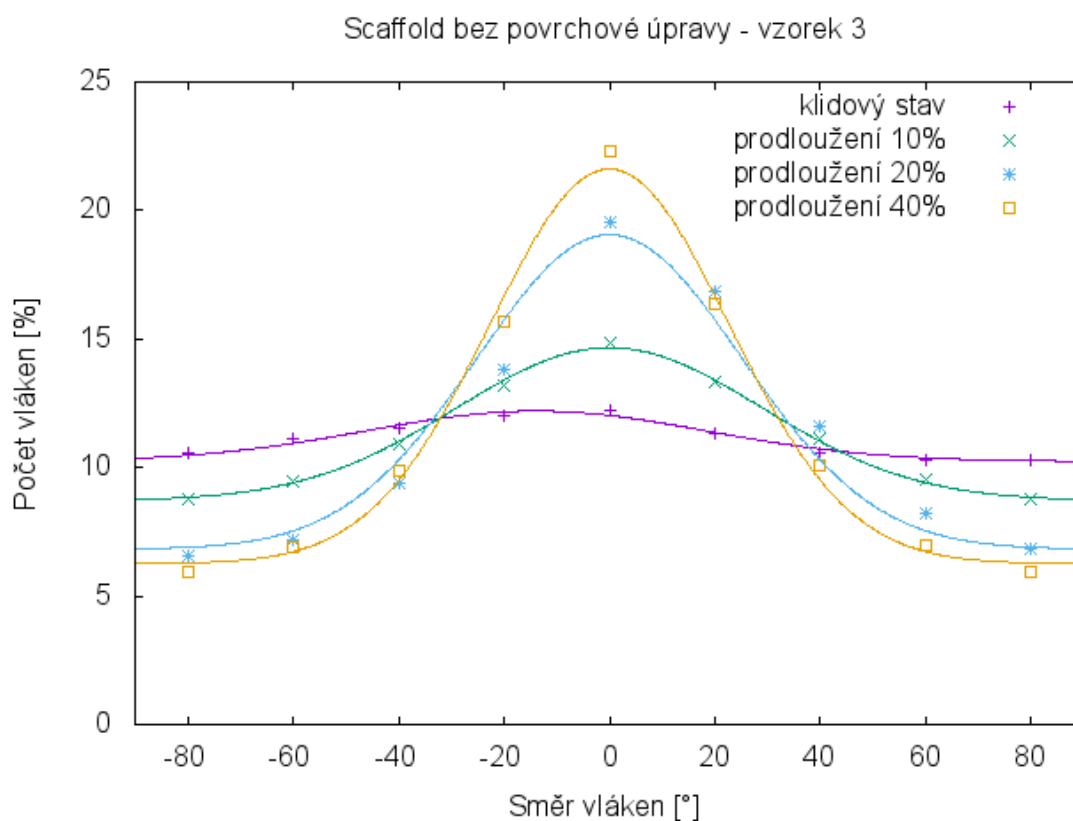
V relativním prodloužení 20 % bylo $67 \% \pm 4 \%$ vláken považováno za izotropní ve smyslu směrovosti, což odpovídá přímce s parametrem $B = 7,4 \pm 0,4$. Hodnotami pro

zbývající vlákna bylo možno proložit křivku Gaussova rozložení s parametry $A = 13,3 \pm 0,8$ a $\sigma = 20 \pm 2$.

V relativním prodloužení 40 % bylo 53 % ± 5 % vláken považováno za izotropní ve smyslu směrovosti, což odpovídá přímce s parametrem $B = 5,9 \pm 0,5$. Hodnotami pro zbývající vlákna bylo možno proložit křivku Gaussova rozložení s parametry $A = 17,8 \pm 0,9$ a $\sigma = 21,2 \pm 1,5$.

5.1.1.3 Scaffold bez povrchové úpravy – vzorek 3

Na vzorku 3 metodikou popsanou v kapitole 4.5.1 bylo vyhodnoceno 20 snímků pro každý stav prodloužení scaffoldu. Výsledky zpracování jsou zobrazeny v grafu č. 3. Důležité parametry jsou uvedeny v tabulce č. 3.



Graf č. 3: Směrovost vláken vzorku 3 bez úpravy

Tabulka č. 3: Směrovost vláken vzorku 3 bez úpravy

prodloužení [%]	A	μ [°]	σ	B	p [%]
0	$2 \pm 0,2$	-14 ± 2	32 ± 4	$10,2 \pm 0,2$	92 ± 1
10	$6 \pm 0,1$	0	29 ± 1	$8,7 \pm 0,1$	78 ± 1
20	$12,2 \pm 1,1$	0	25 ± 3	$6,8 \pm 0,8$	61 ± 7
40	$15,4 \pm 0,6$	0	$22,7 \pm 1,2$	$6,3 \pm 0,4$	56 ± 3

V klidovém stavu byl nalezen převládající směr o orientaci $-14^\circ \pm 2^\circ$. $92\% \pm 1\%$ vláken bylo považováno za izotropní ve smyslu směrovosti, což odpovídá přímce s parametrem $B = 10,2 \pm 0,2$. Hodnotami pro zbývající vlákna bylo možno proložit křivku Gaussova rozložení s parametry $A = 2 \pm 0,2$, $\mu = -14 \pm 2$ a $\sigma = 32 \pm 4$.

V relativním prodloužení 10 % bylo $78\% \pm 1\%$ vláken považováno za izotropní ve smyslu směrovosti, což odpovídá přímce s parametrem $B = 8,7 \pm 0,1$. Hodnotami pro zbývající vlákna bylo možno proložit křivku Gaussova rozložení s parametry $A = 6 \pm 0,1$ a $\sigma = 29 \pm 1$.

V relativním prodloužení 20 % bylo $61\% \pm 7\%$ vláken považováno za izotropní ve smyslu směrovosti, což odpovídá přímce s parametrem $B = 6,8 \pm 0,8$. Hodnotami pro zbývající vlákna bylo možno proložit křivku Gaussova rozložení s parametry $A = 12,2 \pm 1,1$ a $\sigma = 25 \pm 3$.

V relativním prodloužení 40 % bylo $56\% \pm 3\%$ vláken považováno za izotropní ve smyslu směrovosti, což odpovídá přímce s parametrem $B = 6,3 \pm 0,4$. Hodnotami pro zbývající vlákna bylo možno proložit křivku Gaussova rozložení s parametry $A = 15,4 \pm 0,6$ a $\sigma = 22,7 \pm 1,2$.

5.1.1.4 Scaffold bez povrchové plazmatické úpravy – srovnání vzorků

U vzorků jedna a dva nebyla prokázána jednoznačná směrovost vláken v klidovém stavu. To odpovídá předpokladu, že scaffold je tvořen vlákny rovnoměrně položenými ve všech směrech. U vzorku tři byla v klidu zjištěna převládající směrovost $-14^\circ \pm 2^\circ$. Nelze prokázat, čím je tato směrovost dána, zda došlo ke směrovosti manipulací vzorku, či byl takto vyroben.

Z výsledků statistického zpracování dat u jednotlivých vzorků vyplývá, že u vzorků jedna a dva byl počet snímků, ze kterých byly výsledky vyhodnocovány, malý (3 snímky). To je vidět na poměrně velké odchylce ve všech parametrech v porovnání se vzorkem tři, který byl vyhodnocován z 20 snímků. To ukazuje, že pro využití výše popsané metodiky při dalších měřeních je potřeba provádět více jak 3 snímky u daného vzorku v daném stavu. Počet 20 snímků u daného vzorku v daném stavu je vyhovující.

U vzorku jedna nebyla prokázána směrovost vláken ve směru tahu při relativním prodloužení 10 %. U všech vzorků je patrná tendence se směřovat ve směru tahu. Tato převládající směrovost roste s relativním prodloužením vzorku. U vzorků dva a tři se

vlákná směřují ve směru tahu v podobné míře. U vzorku jedna se vlákna směřují v menší míře k danému relativnímu prodloužení, než u vzorků dva a tři. Nelze rozhodnout, zda k tomuto jevu došlo vlastností materiálu, či chybou upnutí vzorku v přístroji.

5.1.2 Vyhodnocení změny tloušťky vláken

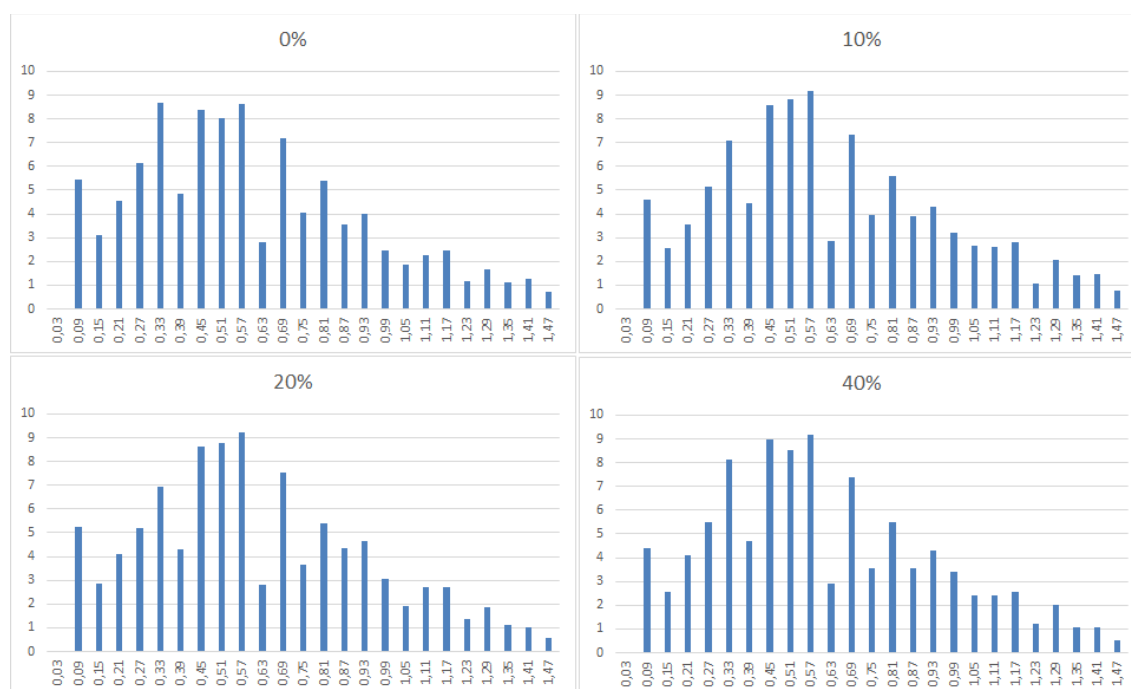
5.1.2.1 Vzorek 1

Na tomto vzorku byly metodikou popsanou v kapitole 4.5.2 vyhodnoceny 3 snímky pro každý stav prodloužení scaffoldu.

Histogramy zastoupení jednotlivých tlouštěk vláken v procentech pro jednotlivá prodloužení jsou uvedeny v obrázku č. 15. Výsledky průměrné tloušťky vlákna jsou uvedeny v následující tabulce č. 4.

Tabulka č. 4: Průměrná tloušťka vláken vzorek 1 bez úpravy

prodloužení [%]	0	10	20	40
μ [nm]	600 ± 330	640 ± 330	620 ± 330	620 ± 330



Obrázek č. 15: Histogramy zastoupení jednotlivých tlouštěk vláken v procentech pro jednotlivá prodloužení

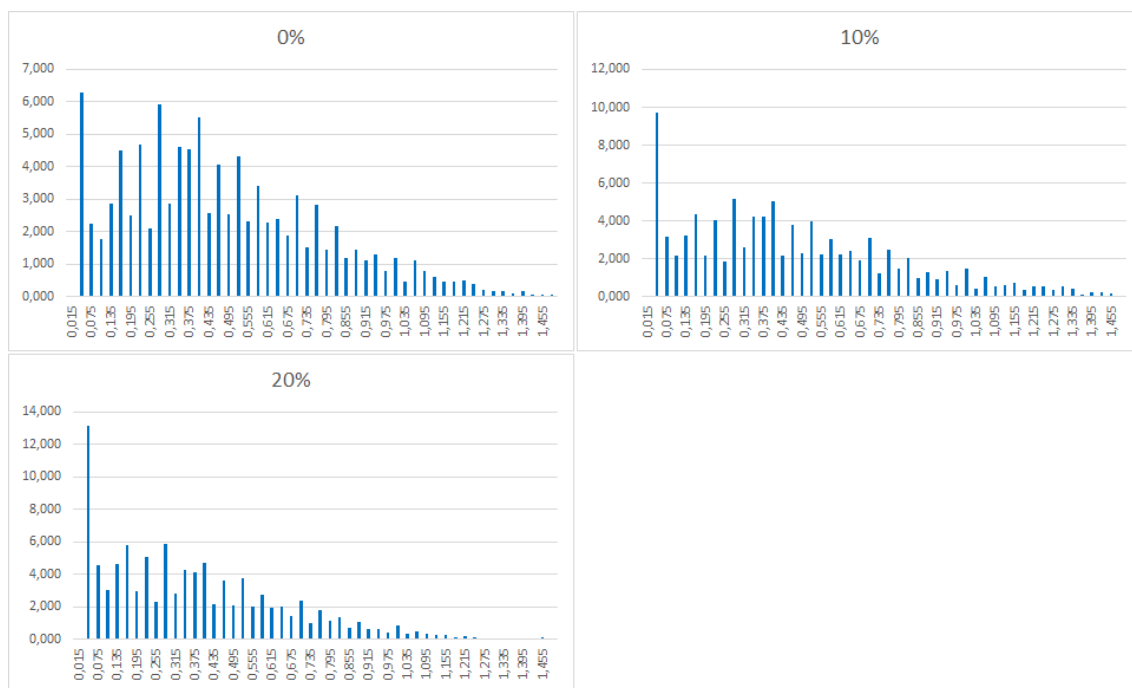
5.1.2.2 Vzorek 2

Na vzorku 2 byly metodikou popsanou v kapitole 4.5.2 vyhodnoceny 3 snímky pro každý stav prodloužení scaffoldu. U tohoto vzorku z technických důvodů nebyly pořízeny snímky v relativním prodloužení 40 %.

Histogramy zastoupení jednotlivých tlouštěk vláken v procentech pro jednotlivá prodloužení jsou uvedeny v obrázku č. 16. Výsledky průměrné tloušťky vlákna jsou uvedeny v následující tabulce č. 5.

Tabulka č. 5: Průměrná tloušťka vláken vzorek 2 bez úpravy

prodloužení [%]	0	10	20
μ [nm]	480 ± 220	470 ± 240	370 ± 190



Obrázek č. 16: Histogramy zastoupení jednotlivých tlouštěk vláken v procentech pro jednotlivá prodloužení

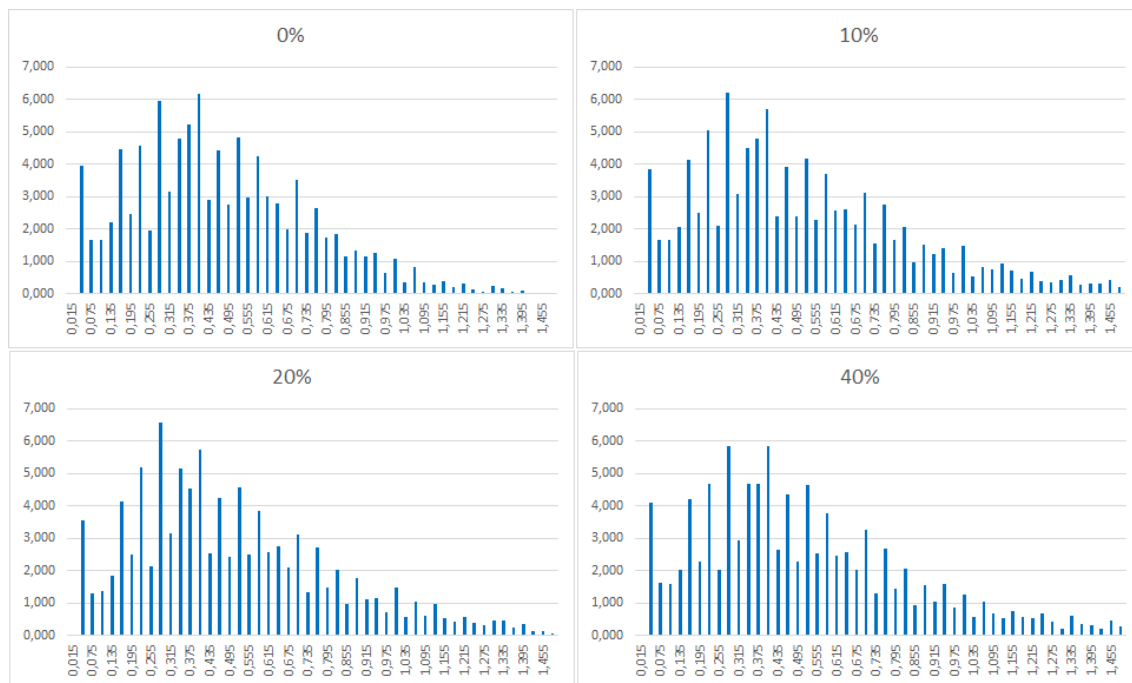
5.1.2.3 Vzorek 3

Na vzorku 3 bylo metodikou popsanou v kapitole 4.5.2 vyhodnoceno 10 snímků pro každý stav prodloužení scaffoldu.

Histogramy zastoupení jednotlivých tlouštěk vláken v procentech pro jednotlivá prodloužení jsou uvedeny v obrázku č. 17. Výsledky průměrné tloušťky vlákna jsou uvedeny v následující tabulce č. 6.

Tabulka č. 6: Průměrná tloušťka vláken vzorek 3 bez úpravy

prodloužení [%]	0	10	20	40
μ [nm]	480 ± 190	510 ± 240	510 ± 230	520 ± 240



Obrázek č. 17: Histogramy zastoupení jednotlivých tlouštěk vláken v procentech pro jednotlivá prodloužení

5.2 Přehled výsledků scaffoldů s povrchovou plazmatickou úpravou

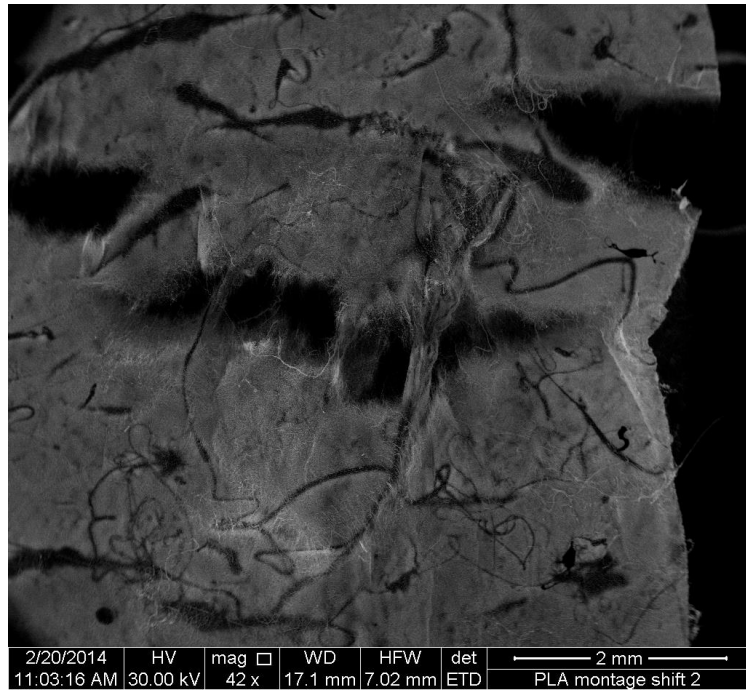
5.2.1 Vyhodnocení změny směrovosti vláken

Byly vyhodnocovány snímky tří vzorků scaffoldu s povrchovou úpravou se zvětšením 500x ve 4 stavech. V klidovém stavu, při relativním prodloužení 8 %, 12 % a 20 %.

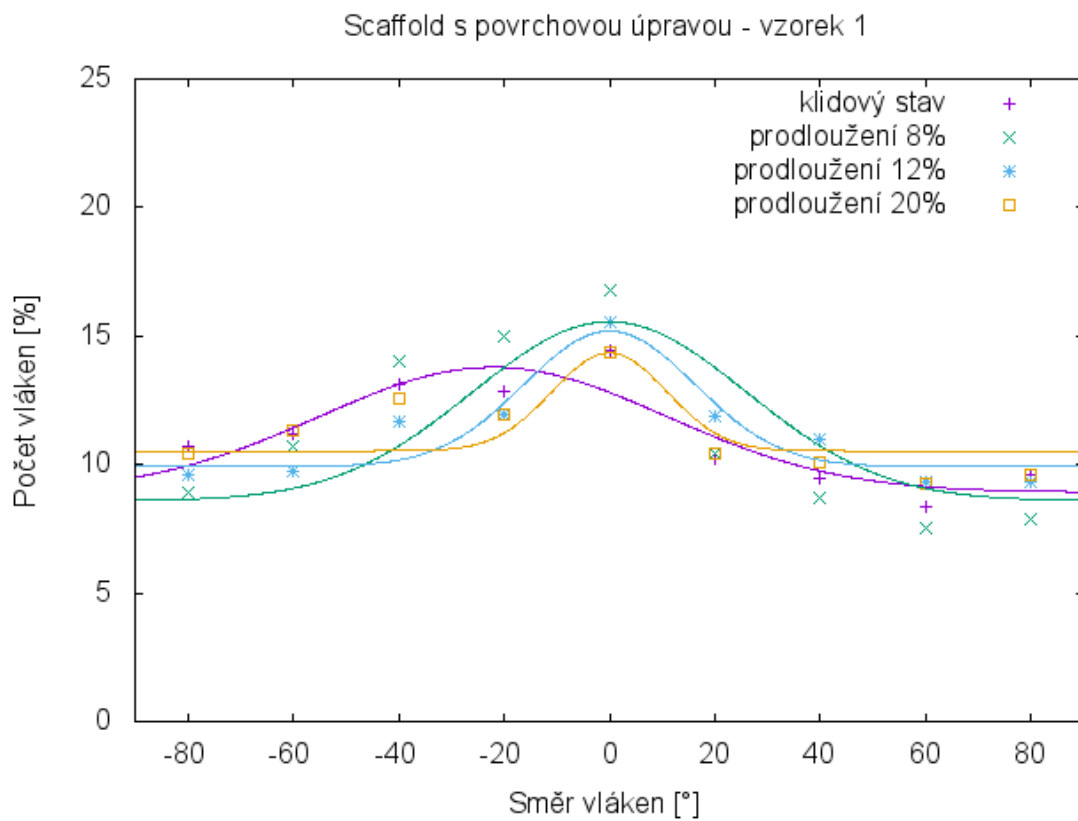
5.2.1.1 Scaffold s povrchovou úpravou – vzorek 1

Na tomto vzorku byly metodikou popsanou v kapitole 4.5.1 vyhodnoceny 4 snímky pro každý stav prodloužení scaffoldu. Při tomto měření došlo při natažení o 12 % k popraskání vzorku, které je viditelné na obrázku 18.

Výsledky zpracování jsou zobrazeny v grafu č. 4. Důležité parametry jsou uvedeny v tabulce č. 7.



Obrázek č. 18: Snímek popraskání vzorku 1 při prodloužení o 12 %



Graf č. 4: Směrnost vláken vzorku 1 s úpravou

Tabulka č. 7: Směrnost vláken vzorek 1 s úpravou

prodloužení [%]	A	μ [°]	σ	B	p [%]
0	$4,9 \pm 1,1$	-22 ± 6	33 ± 10	$8,9 \pm 0,9$	80 ± 8
8	7 ± 2	0	26 ± 12	$8,6 \pm 1,7$	77 ± 15
12	$5,3 \pm 0,9$	0	16 ± 3	$9,9 \pm 0,4$	89 ± 4
20	$3,8 \pm 1,3$	0	11 ± 4	$10,5 \pm 0,5$	95 ± 4

V klidovém stavu byl nalezen převládající směr o orientaci $-22^\circ \pm 6^\circ$. $80\% \pm 8\%$ vláken bylo považováno za izotropní ve smyslu směrnosti, což odpovídá přímce s parametrem $B = 8,9 \pm 0,9$. Hodnotami pro zbývající vlákna bylo možno proložit křivku Gaussova rozložení s parametry $A = 4,9 \pm 1,1$, $\mu = -22^\circ \pm 6^\circ$ a $\sigma = 33 \pm 10$.

V relativním prodloužení 8 % bylo $77\% \pm 15\%$ vláken považováno za izotropní ve smyslu směrnosti, což odpovídá přímce s parametrem $B = 8,6 \pm 1,7$. Hodnotami pro zbývající vlákna bylo možno proložit křivku Gaussova rozložení s parametry $A = 7 \pm 2$ a $\sigma = 26 \pm 12$.

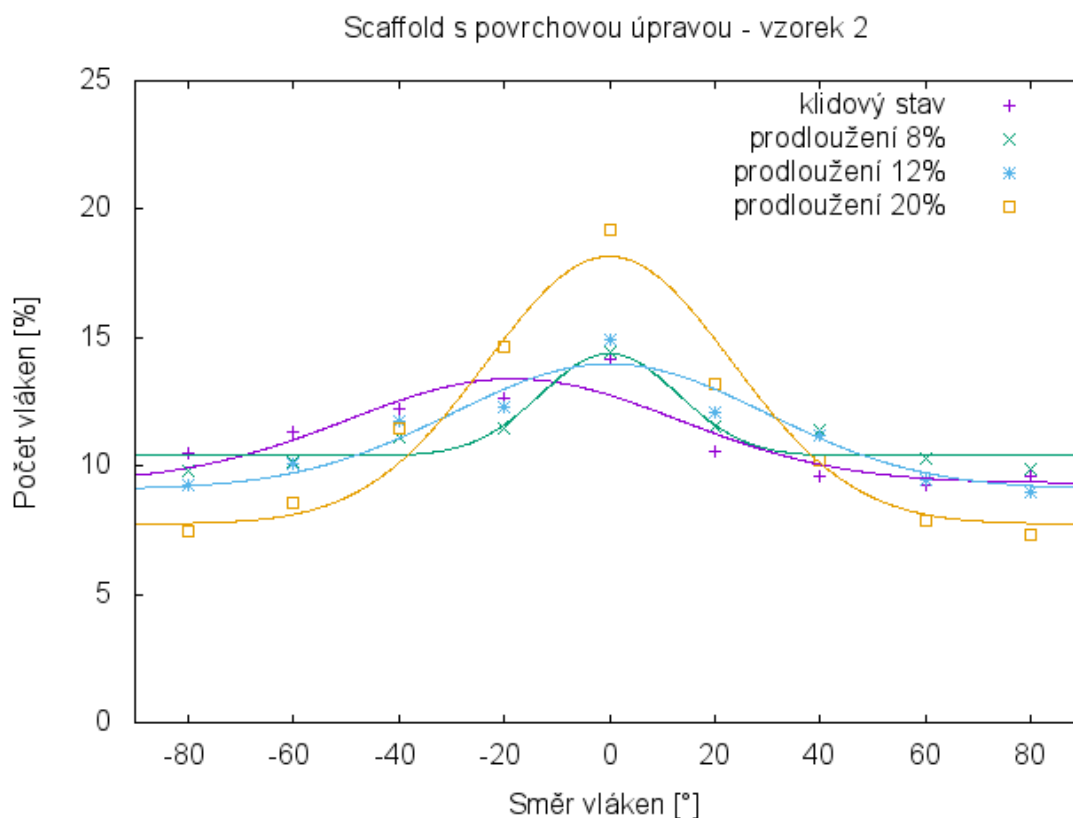
V relativním prodloužení 12 % bylo $89\% \pm 4\%$ vláken považováno za izotropní ve smyslu směrnosti, což odpovídá přímce s parametrem $B = 9,9 \pm 0,4$. Hodnotami pro zbývající vlákna bylo možno proložit křivku Gaussova rozložení s parametry $A = 5,3 \pm 0,9$ a $\sigma = 16 \pm 3$.

V relativním prodloužení 20 % bylo $95\% \pm 4\%$ vláken považováno za izotropní ve smyslu směrnosti, což odpovídá přímce s parametrem $B = 10,5 \pm 0,5$. Hodnotami pro zbývající vlákna bylo možno proložit křivku Gaussova rozložení s parametry $A = 3,8 \pm 1,3$ a $\sigma = 11 \pm 4$.

5.2.1.2 Scaffold s povrchovou úpravou – vzorek 2

Na vzorku 2 bylo metodikou popsanou v kapitole 4.5.1 vyhodnoceno 6 snímků pro každý stav prodloužení scaffoldu.

Výsledky zpracování jsou zobrazeny v grafu č. 5. Důležité parametry jsou uvedeny v tabulce č. 8.



Graf č. 5: Směrovost vláken vzorku 2 s úpravou

Tabulka č. 8: Směrovost vláken vzorek 2 s úpravou

prodloužení [%]	A	μ [°]	σ	B	p [%]
0	$4,1 \pm 0,9$	-18 ± 6	31 ± 9	$9,3 \pm 0,7$	84 ± 7
8	$4,0 \pm 0,7$	0	13 ± 2	$10,4 \pm 0,3$	94 ± 2
12	$4,9 \pm 0,7$	0	30 ± 6	$9,1 \pm 0,6$	82 ± 6
20	$10,4 \pm 1$	0	23 ± 3	$7,7 \pm 0,6$	70 ± 6

V klidovém stavu byl nalezen převládající směr o orientaci $-18^\circ \pm 6^\circ$. $84\% \pm 7\%$ vláken bylo považováno za izotropní ve smyslu směrovosti, což odpovídá přímce s parametrem $B = 9,3 \pm 0,7$. Hodnotami pro zbývající vlákna bylo možno proložit křivku Gaussova rozložení s parametry $A = 4,1 \pm 0,9$, $\mu = -18^\circ \pm 6^\circ$ a $\sigma = 31 \pm 9$.

V relativním prodloužení 8 % bylo $94\% \pm 2\%$ vláken považováno za izotropní ve smyslu směrovosti, což odpovídá přímce s parametrem $B = 10,4 \pm 0,3$. Hodnotami pro zbývající vlákna bylo možno proložit křivku Gaussova rozložení s parametry $A = 4 \pm 0,7$ a $\sigma = 13 \pm 2$.

V relativním prodloužení 12 % bylo $82\% \pm 6\%$ vláken považováno za izotropní ve smyslu směrovosti, což odpovídá přímce s parametrem $B = 9,1 \pm 0,6$. Hodnotami pro

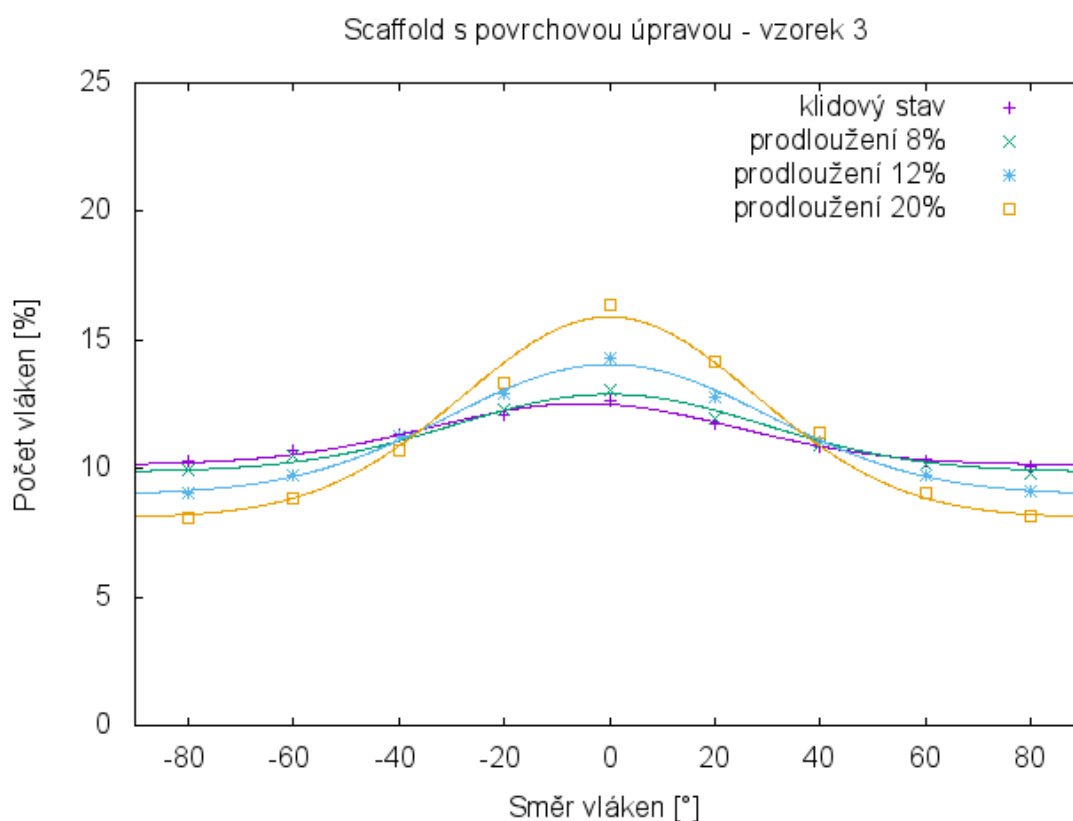
zbývající vlákna bylo možno proložit křivku Gaussova rozložení s parametry $A = 4,9 \pm 0,7$ a $\sigma = 30 \pm 6$.

V relativním prodloužení 20 % bylo 70 % ± 6 % vláken považováno za izotropní ve smyslu směrnosti, což odpovídá přímce s parametrem $B = 7,7 \pm 0,6$. Hodnotami pro zbývající vlákna bylo možno proložit křivku Gaussova rozložení s parametry $A = 10,4 \pm 1$ a $\sigma = 23 \pm 3$.

5.2.1.3 Scaffold s povrchovou úpravou – vzorek 3

Na vzorku 3 bylo metodikou popsanou v kapitole 4.5.1 vyhodnoceno 20 snímků pro každý stav prodloužení scaffoldu.

Výsledky zpracování jsou zobrazeny v grafu č. 6. Důležité parametry jsou uvedeny v tabulce č. 9.



Graf č. 6: Směrnost vláken vzorku 3 s úpravou

Tabulka č. 9: Směrovost vláken vzorek 3 s úpravou

prodloužení [%]	A	μ [°]	Σ	B	p [%]
0	$2,4 \pm 0,1$	-5 ± 2	29 ± 3	$10,1 \pm 0,1$	91 ± 1
8	$3,0 \pm 0,2$	0	29 ± 3	$9,9 \pm 0,2$	89 ± 2
12	$5,1 \pm 0,2$	0	30 ± 2	$9,0 \pm 0,2$	81 ± 2
20	$7,8 \pm 0,4$	0	28 ± 2	$8,1 \pm 0,3$	73 ± 3

V klidovém stavu byl nalezen převládající směr o orientaci $-5^\circ \pm 2^\circ$. $91\% \pm 1\%$ vláken bylo považováno za izotropní ve smyslu směrovosti, což odpovídá přímce s parametrem $B = 10,1 \pm 0,1$. Hodnotami pro zbývající vlákna bylo možno proložit křivku Gaussova rozložení s parametry $A = 2,4 \pm 0,1$, $\mu = -5^\circ \pm 2^\circ$ a $\sigma = 29 \pm 3$.

V relativním prodloužení 8 % bylo $89\% \pm 2\%$ vláken považováno za izotropní ve smyslu směrovosti, což odpovídá přímce s parametrem $B = 9,9 \pm 0,2$. Hodnotami pro zbývající vlákna bylo možno proložit křivku Gaussova rozložení s parametry $A = 3 \pm 0,2$ a $\sigma = 29 \pm 3$.

V relativním prodloužení 12 % bylo $81\% \pm 2\%$ vláken považováno za izotropní ve smyslu směrovosti, což odpovídá přímce s parametrem $B = 9 \pm 0,2$. Hodnotami pro zbývající vlákna bylo možno proložit křivku Gaussova rozložení s parametry $A = 5,1 \pm 0,2$ a $\sigma = 30 \pm 2$.

V relativním prodloužení 20 % bylo $73\% \pm 3\%$ vláken považováno za izotropní ve smyslu směrovosti, což odpovídá přímce s parametrem $B = 8,1 \pm 0,3$. Hodnotami pro zbývající vlákna bylo možno proložit křivku Gaussova rozložení s parametry $A = 7,8 \pm 0,4$ a $\sigma = 28 \pm 2$.

5.2.1.4 Scaffold s povrchovou úpravou – srovnání

U všech vzorků byla zjištěna směrovost vláken v klidovém stavu. U vzorku jedna byla směrovost $-22^\circ \pm 6^\circ$, u vzorku dva $-18^\circ \pm 6^\circ$ a u vzorku tři $-5^\circ \pm 2^\circ$. Toto zjištění neodpovídá předpokladu, že scaffold je tvořen vlákny rovnoměrně položenými ve všech směrech.

Z výsledků statistického zpracování dat u jednotlivých vzorků vyplývá, že u vzorků jedna a dva byl počet snímků, ze kterých byly výsledky vyhodnocovány, malý (3 snímky). To je vidět na poměrně velké odchylce ve všech parametrech v porovnání se vzorkem tři, který byl vyhodnocován z 20 snímků. To ukazuje, že pro využití výše popsané metodiky

při dalších měřeních je potřeba provádět více jak 3 snímky u daného vzorku v daném stavu. Počet 20 snímků u daného vzorku v daném stavu je vyhovující.

U vzorku jedna je patrná směrovost vláken ve směru tahu při relativním prodloužení 8 %. Při natažení o 12 % došlo k popraskání scaffoldu a směrovost vláken se zmenšila. Při dalším natahování docházelo ke zvětšování prasklin a směrovost vláken ve směru tahu dále klesala.

U vzorků dva a tři je viditelná postupně se zvětšující směrovost vláken ve směru tahu s rostoucím relativním prodloužením.

5.2.2 Vyhodnocení změny tloušťky vláken

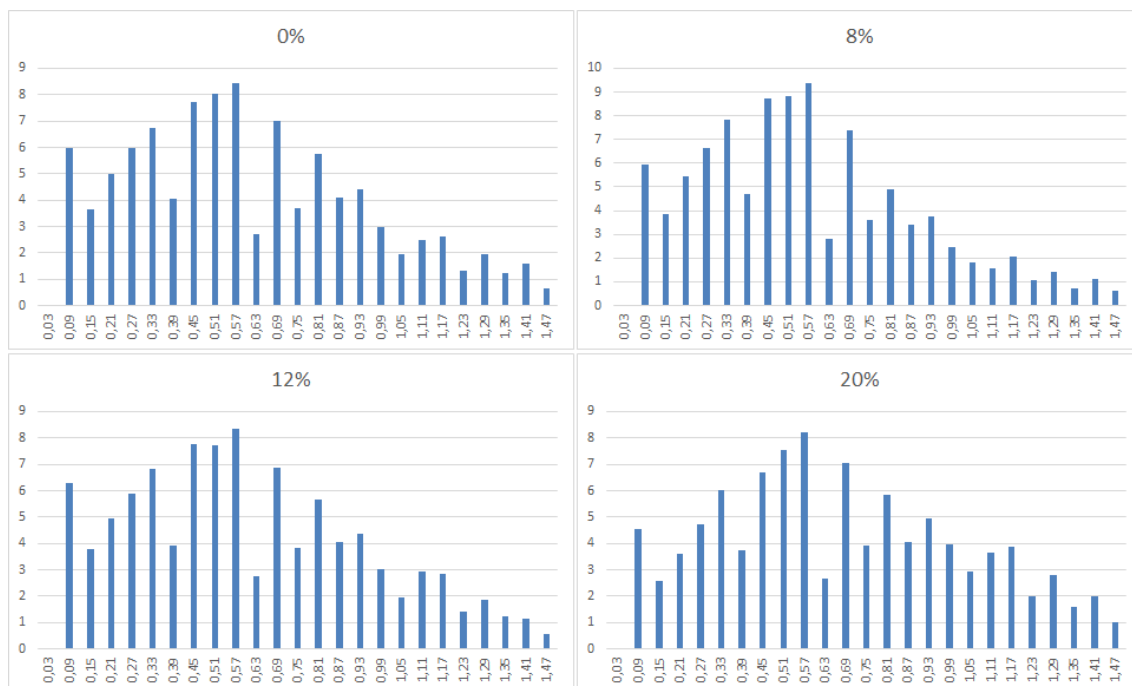
5.2.2.1 Vzorek 1

Na tomto vzorku byly metodikou popsanou v kapitole 4.5.2 vyhodnoceny 3 snímky pro každý stav prodloužení scaffoldu.

Histogramy zastoupení jednotlivých tlouštěk vláken v procentech pro jednotlivá prodloužení jsou uvedeny v obrázku č. 19. Výsledky průměrné tloušťky vlákna jsou uvedeny v následující tabulce č. 10.

Tabulka č. 10: Průměrná tloušťka vláken vzorek 1 s úpravou

prodloužení [%]	0	8	12	20
μ [nm]	610 ± 340	570 ± 320	610 ± 340	680 ± 360



Obrázek č. 19: Histogramy zastoupení jednotlivých tloušťek vláken v procentech pro jednotlivá prodloužení

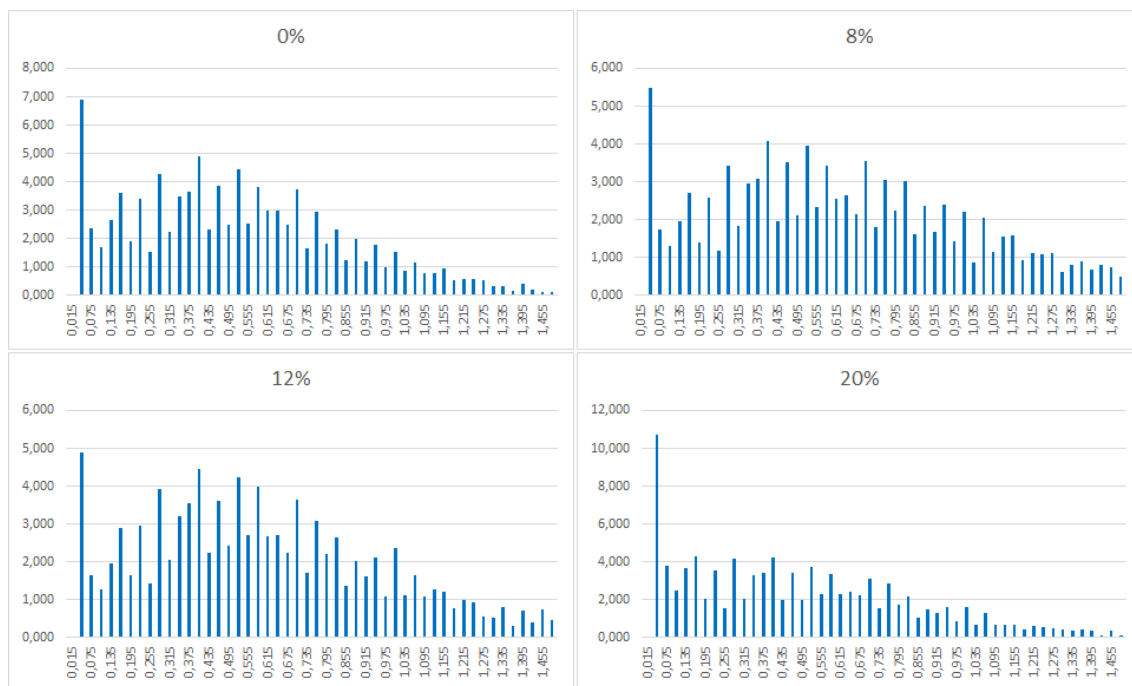
5.2.2.2 Vzorek 2

Na vzorku 2 byly metodikou popsanou v kapitole 4.5.2 vyhodnoceny 3 snímky pro každý stav prodloužení scaffoldu.

Histogramy zastoupení jednotlivých tloušťek vláken v procentech pro jednotlivá prodloužení jsou uvedeny v obrázku č. 20. Výsledky průměrné tloušťky vláken jsou uvedeny v následující tabulce č. 11.

Tabulka č. 11: Průměrná tloušťka vláken vzorek 2 s úpravou

prodloužení [%]	0	8	12	20
μ [nm]	520 ± 240	630 ± 270	620 ± 260	490 ± 260



Obrázek č. 20: Histogramy zastoupení jednotlivých tlouštěk vláken v procentech pro jednotlivá prodloužení

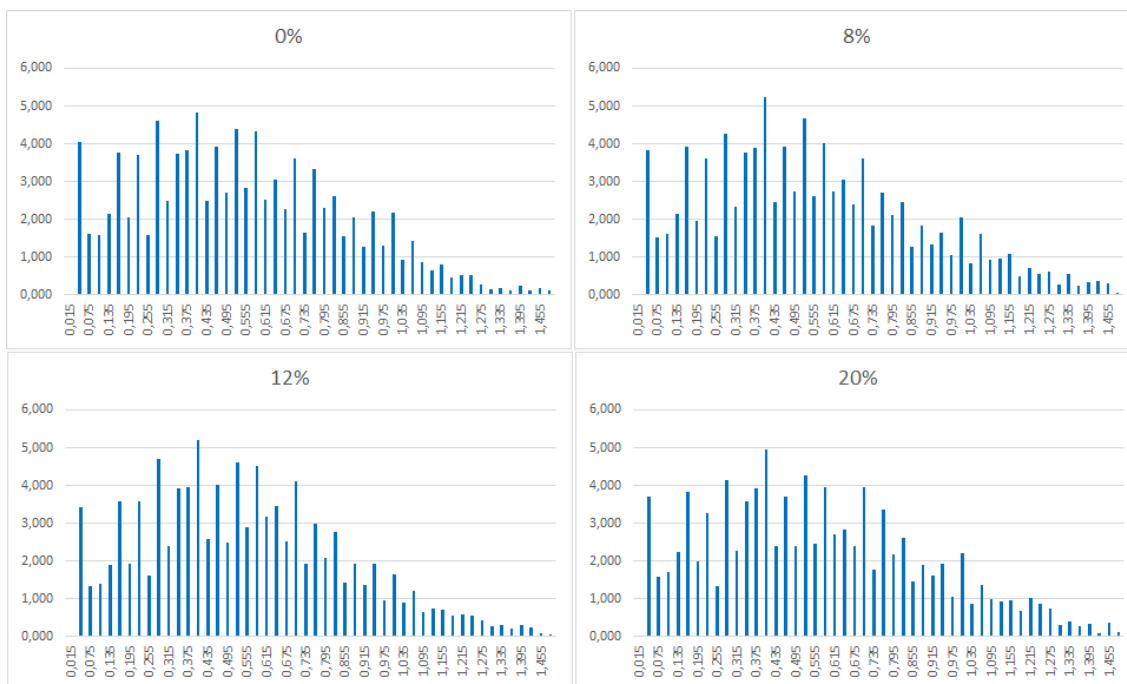
5.2.2.3 Vzorek 3

Na vzorku 3 bylo metodikou popsanou v kapitole 4.5.2 vyhodnoceno 10 snímků pro každý stav prodloužení scaffoldu.

Histogramy zastoupení jednotlivých tlouštěk vláken v procentech pro jednotlivá prodloužení jsou uvedeny v obrázku č. 21. Výsledky průměrné tloušťky vlákna jsou uvedeny v následující tabulce č. 12.

Tabulka č. 12: Průměrná tloušťka vláken vzorek 3 s úpravou

prodloužení [%]	0	8	12	20
μ [nm]	540 ± 230	560 ± 240	550 ± 220	570 ± 240



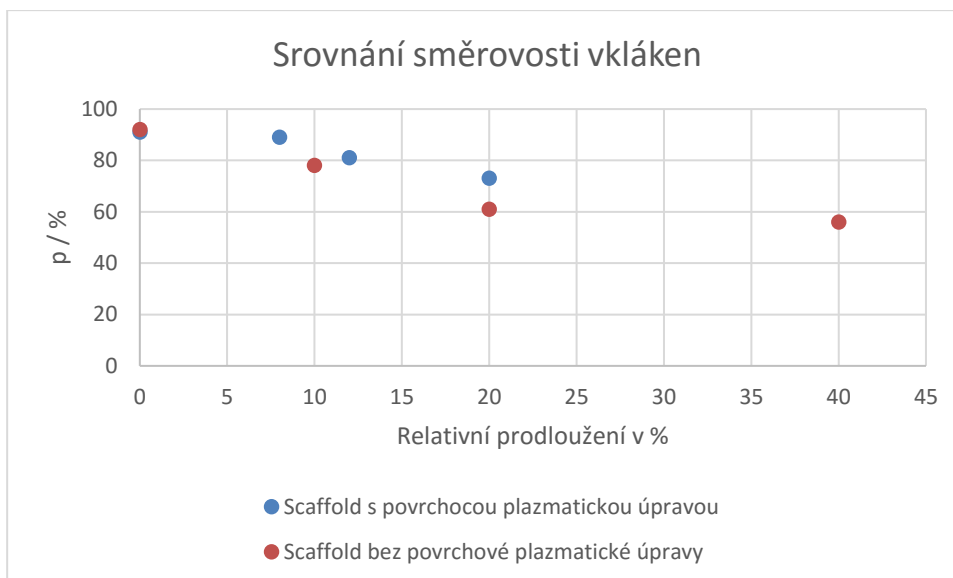
Obrázek č. 21: Histogramy zastoupení jednotlivých tloušťek vláken v procentech pro jednotlivá prodloužení

5.3 Porovnání výsledků scaffoldů s povrchovou úpravou a bez povrchové úpravy

5.3.1 Porovnání změny směrovosti vláken

Pro srovnání chování materiálu scaffoldu s povrchovou plazmatickou úpravou a scaffoldu bez povrchové plazmatické úpravy byly použity vzorky číslo tři, které při vyhodnocování vycházejí s nejmenší odchylkou ve všech parametrech v důsledku dostatečného počtu vyhodnocovaných snímků.

Relativní zastoupení nesměrovaných vláken vzorků číslo tři s povrchovou plazmatickou úpravou a bez povrchové plazmatické úpravy ukazuje následující graf č. 7 a tabulka č. 13.



Graf č. 7: Porovnání směrovosti vláken

Tabulka č. 13: Porovnání směrovosti vláken

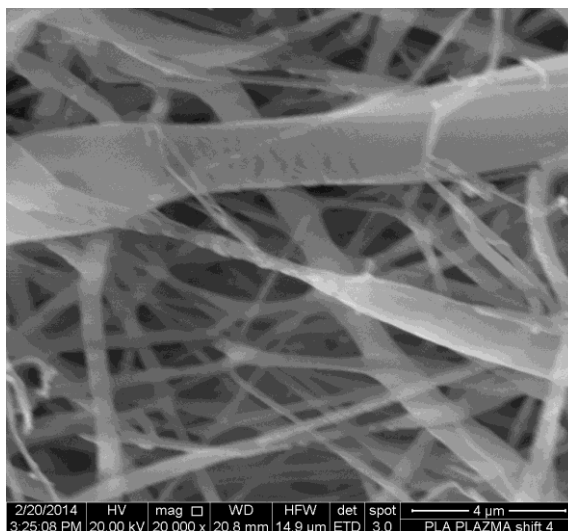
relativní prodloužení [%]	0	8	10	12	20	40
scaffold s úpravou - p [%]	91	89		81	73	
scaffold bez úpravy - p [%]	92		78		61	56

Výše uvedené srovnání ukazuje, že u scaffoldu bez povrchové plazmatické úpravy dochází se vzrůstajícím protažením vzorku ke snižování relativního počtu nesměrovaných vláken ve větší míře než u scaffoldu s povrchovou plazmatickou úpravou. To znamená, že vlákna scaffoldu s povrchovou plazmatickou úpravou se při srovnatelném prodloužení směřují v menší míře než vlákna scaffoldu bez povrchové plazmatické úpravy.

5.3.2 Porovnání změny tloušťky vláken

U žádného vzorku nebyla prokázána tendence změny tloušťky vláken vzhledem k relativnímu prodloužení scaffoldu. Hodnoty průměrné tloušťky sice kolísají, ale v rámci rozsahu směrodatné odchylky. Směrodatná odchylka u všech vzorků je relativně velká k naměřené hodnotě. To může být způsobeno velkým rozptylem tlouštěk vláken scaffoldu, což je patrné z histogramů, či optického pozorování snímků. Dále se na velké směrodatné odchylce může projevit nehomogenita rozložení vláken různé tloušťky v scaffoldu.

Z pohledu sledování změny tloušťky vláken byl na některých pořízených snímcích pozorován jev lokálního ztenčení vláken. Pravděpodobně k tomuto jevu dochází těsně před přetržením vláken v místě přetržení. Tento jev byl pozorován pouze na několika snímcích. V jednom případě byl pořízen detailní záběr tohoto jevu ve zvětšení 20 000x, viz obrázek č. 22.



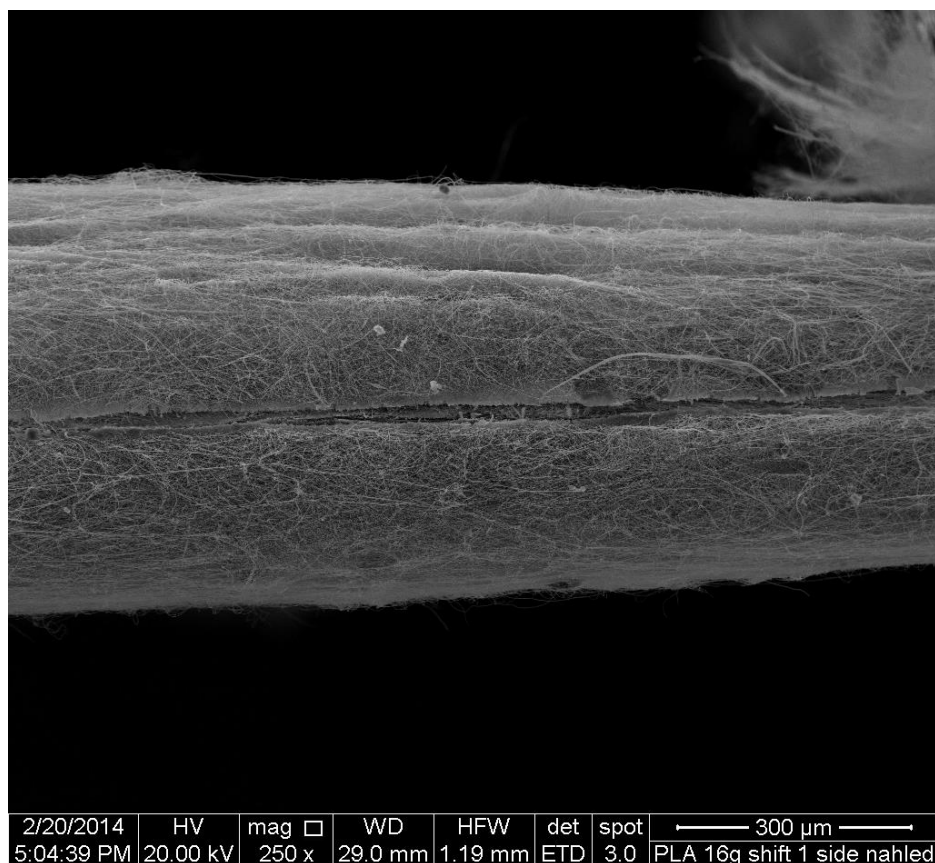
Obrázek č. 22: Jev lokálního zúžení vláken

Tento jev nebyl vyhodnocován z následujících důvodů:

- Jednalo se o nahodilý jev, který na řadě snímků nebyl pozorován.
- Zvolená metodika pro vyhodnocování průměrné tloušťky vláken není vhodná pro vyhodnocování lokálního zúžení vláken.
- V použitém programu pro vyhodnocování snímků není funkce pro vyhodnocování lokálního zúžení vláken.

5.4 Pohled z boku

Pohled z boku nebyl vyhodnocován, protože pořízené snímky nebyly vhodné pro zvolenou automatickou obrazovou analýzu (obrázek č. 23). Na boku vzorku byla patrná deformita, ke které pravděpodobně docházelo při přípravě vzorku. Vzorek byl na požadované rozměry stříhán nůžkami. Na takto ustřiženém vzorku scaffoldu jsou při pohledu z boku patrné známky deformity, kde se scaffold směrem ke středu zužuje. Pravděpodobně dochází tlakem nůžek ke stlačování vláken k sobě a v místě stříhu tím zůstává trvalá deformace struktury scaffoldu.



Obrázek č. 23: Deformita hrany vzorku

5.5 Některé faktory ovlivňující výsledky měření

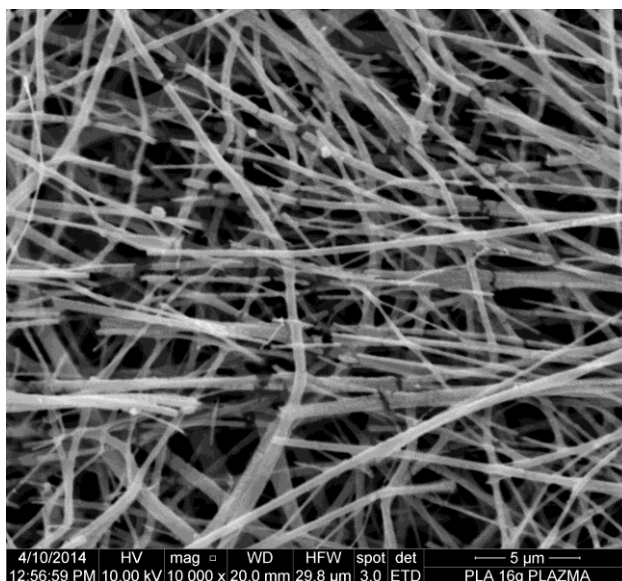
5.5.1 Nezmapovaný vliv zlacení

Pro potřeby sledování v elektronovém mikroskopu musí být povrch scaffoldu pozlacen. Vliv na mechanické i strukturální vlastnosti scaffoldu této úpravy není znám. Touto úpravou je pravděpodobně nejvíce ovlivněna povrchová vrstva vláken scaffoldu, na kterou je nanášeno zlato. Právě tato povrchová vrstva vláken byla zvolenou metodikou vyhodnocována.

5.5.2 Praskání vláken

Na pořízených snímcích v tahu jsou patrná přetržená vlákna scaffoldů (obrázek 24). Tento parametr nebyl sledován a nebyla vypracována metodika pro jeho sledování. Vliv počtu prasklých vláken na orientaci vláken a jejich tloušťku není znám. Je možné, že na některých snímcích byla orientace vláken ve směru tahu menší, protože byla většina

vláken na snímku přetržená. Do budoucna je toto jeden z dalších parametrů, který by mohl být sledován a pomohl by nám pochopit chování struktury scaffoldů v tahu.



Obrázek č. 24: Jev praskání vláken

5.5.3 Pohled na povrch

Elektronovým mikroskopem jsme schopni pozorovat jen několik horních vrstev vláken. Tato technologie snímání obrazu spolu s metodikou zpracování má následující nevýhody:

- Hloubka snímané části povrchu není známa.
- Následným zpracováním snímku pro obrazovou analýzu dochází ke ztrátě vláken s menší jasností zobrazení, což jsou pravděpodobně vlákna hlouběji uložena.
- Veškerá vyhodnocená data platí pro povrchové vrstvy scaffoldu a nelze z nich dokázat nebo vyvrátit, zda se scaffold chová stejně i uvnitř.

5.5.4 Možná nehomogenita scaffoldu

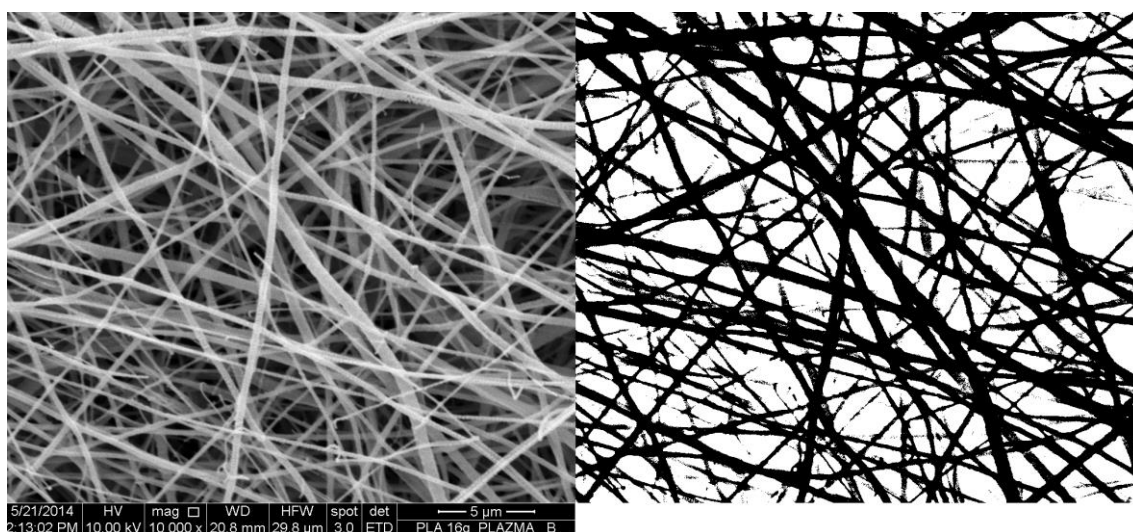
Scaffold na svém pozorovaném povrchu nemusí být homogenní. Je možné, že elektronovým mikroskopem při snímání obrazu dojde k zaměření místa s nějakou anomálií jako je atypická tloušťka vláken, chybějící vlákna, zvětšená hustota vláken, převládající směrovost vláken nebo místo, u kterého došlo k poškození při manipulaci,

například úchopem pinzetou. K vyloučení této chyby je potřeba pořízení více snímků daného vzorku při dané velikosti protažení scaffoldu.

Pro určení směrovosti vláken scaffoldu se ukázal počet 3 snímků nedostačující a 20 snímků vyhovující.

Pro určení průměrné tloušťky vláken scaffoldu se ukázal počet 3 snímků nedostačující. Vyhodnocování z 10 snímků dává výsledky s menším rozptylem, ale pravděpodobně je to stále nedostačující počet.

5.5.5 Chyby použité obrazové analýzy



Obrázek č. 25: Chyby obrazové analýzy, vlevo původní obrázek, vpravo binární obrázek

Při převádění snímku do binárního obrázku dochází k jevu, kdy dvě či více částečně se překrývajících vláken směřovaných ve stejném či velice podobném směru se spojí v jedno vlákno. Na snímku pořízeném elektronovým mikroskopem jsme schopni rozeznat jednotlivá vlákna od sebe díky rozdílné intenzitě jasu. Tato rozdílná intenzita jasu se převedením na binární obraz ztrácí a při následném vyhodnocení obrazovou analýzou jsou vlákna programem považována za jedno vlákno v daném úseku (viz obrázek č. 25).

Při určování směrovosti vláken tento jev výsledky významným způsobem neovlivňuje, protože k němu dochází jen u vláken se stejnou či velice podobnou směrovou orientací.

Při určování průměrné tloušťky vláken tento jev výsledky ovlivňuje a pravděpodobně zkresluje. Dochází k započítání jednoho vlákna s velkou tloušťkou místo započítání několika s menší tloušťkou. Vliv tohoto jevu na výsledky byl snížen v metodice

vyhodnocování dat, kde bylo nastaveno hodnotící spektrum tloušťky vláken mezi 0 μm a 1,5 μm .

5.5.6 Adaptace materiálu scaffoldu

Získávání snímků z elektronového mikroskopu je časově náročný proces. Snímání snímků jednoho vzorku v daném stavu prodloužení trvalo 1 – 2 hodiny. Jelikož vzorek v přístroji na natahování musel být natahován manuálně, tak bylo potřeba vždy při změně prodloužení otevřít elektronový mikroskop natáhnout vzorek a opět uzavřít elektronový mikroskop a vytvořit vakuum.

Všechny vyhodnocované snímky jsou pořízeny v časovém intervalu 1 – 2 hodiny od změny prodloužení scaffoldu. V tomto časovém úseku mohlo docházet k adaptaci vzorků na relativní prodloužení. Schopnost a míra adaptace materiálu scaffoldu, který byl použit v této práci, není znám.

6 Diskuze

6.1 Vývoj přístroje a metodiky upínání vzorku

Metodika měření se v průběhu experimentu postupně vyvíjela. Prvním velkým úkolem experimentu bylo navrhnout a zkonstruovat zařízení, které bude kompatibilní s použitým elektronovým mikroskopem a umožní nám testované scaffoldy sledovat v prodloužení uvnitř mikroskopu. Ve spolupráci s Ing. Lopotem a Mgr. Hadrabou byl navržen a sestaven přístroj popsáný v kapitole 4.1 Přístrojové vybavení. V průběhu experimentu byla ověřena praktická použitelnost tohoto přístroje. Možnost sledování vzorků v jiném úhlu se ukázalo jako nepotřebné pro cíle tohoto experimentu, jelikož snímky pořízené v otočení o 90 stupňů byly nepoužitelné pro následnou obrazovou analýzu. Manuální ovládání přístroje se potvrdilo jako dostačující, ale celý proces měření časově prodlužoval. Při výrobě dalšího přístroje z důvodu časové úspory doporučuji navrhnout ovládání bez nutnosti otvírání elektronového mikroskopu. Dalším vhodným vylepšením přístroje by byla možnost sledovat sílu, kterou působí scaffold na kleště přístroje, a tím lépe určit klidovou pozici vzorku a možnost sledovat míru adaptace materiálu na tah při měření.

6.2 Použité zvětšení a počty snímků

V průběhu experimentu byla postupně zdokonalována metodika měření dle potřeb zvolené metodiky obrazové analýzy.

Pro určování směrovosti vláken byly použity snímky se zvětšením 500x, což umožnilo sledování co největší plochy scaffoldu a zároveň zachovalo schopnost odlišit jednotlivá vlákna od sebe dle rozlišovacích schopností použitého elektronového mikroskopu. Sledování co největší plochy scaffoldu je důležité pro omezení ovlivnění výsledků nehomogenitou povrchu scaffoldu. Schopnost rozlišit jednotlivá vlákna od sebe je stěžejní pro následné zpracování pomocí obrazové analýzy. Při vyhodnocování dat bylo zjištěno, že je nutné sledovat daný vzorek v daném prodloužení na více náhodně vybraných místech. Experimentem bylo ověřeno, že pro použité materiály počet vyhodnocovaných snímků 3 s sebou nese stále velkou chybu. Počet vyhodnocovaných snímků 20 se ukázal jako dostatečný.

Pro určování průměrné tloušťky vláken se ukázalo jako stěžejní rozlišovací schopnost snímku, čímž je myšleno jaké vzdálenosti ve skutečnosti odpovídá jeden pixel na pořízeném snímku. Zlepšení této rozlišovací schopnosti bylo možno dosáhnout dvěma způsoby:

- Zvětšením rozlišení pořizovaného snímku (použito u vzorku 2).
- Zvětšením přiblížení (použito u vzorku 3).

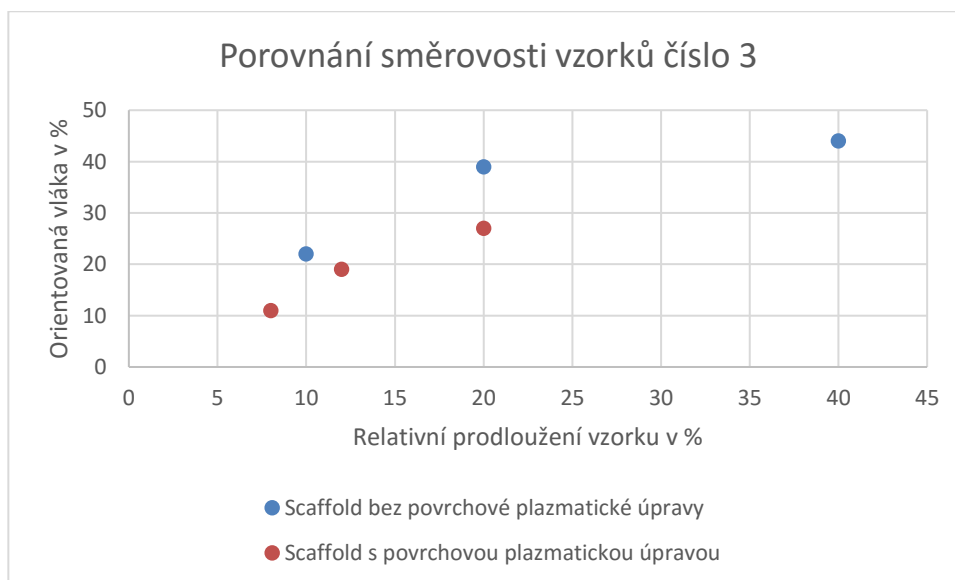
Zvětšení rozlišení pořizovaného snímku umožňuje zlepšit rozlišovací schopnost bez potřeby zvětšovat přiblížení. To umožňuje sledovat větší část scaffoldu a zmenšit tím chybu způsobenou nehomogenitou scaffoldu. Na použitém elektronovém mikroskopu pořizování snímků s větším rozlišením trvalo výrazně delší časový úsek, a proto bylo pro měření vzorku 3 použito druhé možnosti zvětšení přiblížení. Tímto způsobem se také zlepšila rozlišovací schopnost snímků, ale je sledována menší část povrchu vzorku. Oba zvolené postupy ukazují při určování průměrné tloušťky vláken řádově stejné výsledky. Při porovnání histogramů se ukazuje, že při použití většího rozlišení snímaných snímků se výrazně zvětšuje zastoupení nejmenších měřených vláken o průměru 45 nm. Počet vyhodnocovaných snímků 3 se ukázal jako nedostačující pro velkou různorodost jednotlivých měření. Počet 10 měření se ukázal jako více vyhovující.

6.3 Vyhodnocení hypotéz

Hypotéza 1 - Vlákná scaffoldů bez povrchové plazmatické úpravy se budou orientovat do směru působícího zatížení, byla ověřena jako pravdivá na vzorku 3, kde v klidovém stavu byla nalezena převládající orientace vláken v úhlu $-14^\circ \pm 2^\circ$. 92 % \pm 1 % vláken bylo považováno za izotropní ve smyslu směrovosti. Při relativním prodloužení 10 % bylo relativní zastoupení neorientovaných vláken 78 % \pm 1 %. Hodnotami pro zbývající vlákna bylo možno proložit křivku Gaussova rozložení s parametry $A = 6 \pm 0,1$ a $\sigma = 29 \pm 1$. Při relativním prodloužení 20 % bylo relativní zastoupení neorientovaných vláken 61 % \pm 7 %. Hodnotami pro zbývající vlákna bylo možno proložit křivku Gaussova rozložení s parametry $A = 12,2 \pm 1,1$ a $\sigma = 25 \pm 3$. Při relativním prodloužení 40 % bylo relativní zastoupení neorientovaných vláken 56 % \pm 3 %. Hodnotami pro zbývající vlákna bylo možno proložit křivku Gaussova rozložení s parametry $A = 15,4 \pm 0,6$ a $\sigma = 22,7 \pm 1,2$. Z uvedených výsledků je patrné, že vlákna zkoumaného

scaffoldu mají tendenci se směřovat ve směru tahu. Tato tendence roste s relativním prodloužením vzorku.

Hypotéza 2 - Vlákná scaffoldů s povrchovou plazmatickou úpravou jsou vzájemně fixována, což se projeví menší orientací vláken do směru působícího zatížení než u vláken scaffoldu bez povrchové plazmatické úpravy, byla ověřena jako pravdivá na experimentem zkoumaných vzorcích díky porovnání vzorku 3 scaffoldu bez povrchové plazmatické úpravy a scaffoldu s povrchovou plazmatickou úpravou. U scaffoldu bez povrchové plazmatické úpravy při relativním prodloužení 10 % bylo relativní zastoupení neorientovaných vláken 78 %, při relativním prodloužení 20 % bylo relativní zastoupení neorientovaných vláken 61 %, při relativním prodloužení 40 % bylo relativní zastoupení neorientovaných vláken 56 %. U scaffoldu s povrchovou plazmatickou úpravou při relativním prodloužení 8 % bylo relativní zastoupení neorientovaných vláken 89 %, při relativním prodloužení 12 % bylo relativní zastoupení neorientovaných vláken 81 %, při relativním prodloužení 20 % bylo relativní zastoupení neorientovaných vláken 73 %. Při porovnání těchto hodnot je patrné, že vlákna scaffoldu bez povrchové plazmatické úpravy podléhají větší orientaci ve směru tahu než vlákna scaffoldu s povrchovou plazmatickou úpravou. Výsledky graficky znázorňuje následující graf č. 8, který ukazuje procento vláken, která jevila tendenci se orientovat ve směru působení tahu u vzorků tři v uvedeném relativním prodloužení.



Graf č. 8: Porovnání směrovosti vláken vzorků 3

Hypotéza 3 - Vlákná scaffoldů se budou ztenčovat při působícím zatížení, nebyla prokázána. U vzorků číslo 3, které byly vyhodnocovány z nejvíce snímků a měly by být nejpřesnější, není patrná žádná změna v průměrné tloušťce vlákna sledovaných scaffoldů vzhledem k jejich relativnímu prodloužení. Průměrnou tloušťku vláken vzorků při relativním prodloužení ukazují tabulky č. 14 a 15.

Tabulka č. 14: Průměrná tloušťka vláken vzorek 3 bez úpravy

Prodloužení [%]	0	10	20	40
μ [nm]	480 ± 190	510 ± 240	510 ± 230	520 ± 240

Tabulka č. 15: Průměrná tloušťka vláken vzorek 3 s úpravou

prodloužení [%]	0	8	12	20
μ [nm]	540 ± 230	560 ± 240	550 ± 220	570 ± 240

Na některých pořízených snímcích byl sledován jev lokálního zúžení vlákna popsany v kapitole 5.3.2 Porovnání změny tloušťky vláken.

7 Závěr

Cíl práce nalézt vhodnou metodu pro hodnocení strukturálních změn scaffoldů vlivem působení vnější mechanické zátěže a ověřit existenci předpokládané souvislosti byl splněn. V průběhu experimentu byla metodika postupně zdokonalována a prakticky odzkoušena.

Hypotéza 1 - Vlákná scaffoldů bez povrchové plazmatické úpravy se budou orientovat do směru působícího zatížení, byla dosaženými výsledky potvrzena.

Hypotéza 2 - Vlákná scaffoldů s povrchovou plazmatickou úpravou jsou vzájemně fixována, což se projeví menší orientací vláken do směru působícího zatížení než u vláken scaffoldu bez povrchové plazmatické úpravy, byla výsledky experimentu potvrzena

Hypotéza 3 - Vlákná scaffoldů se budou ztenčovat při působícím zatížení, nebyla výsledky experimentu potvrzena

Během experimentu bylo na pořízených snímcích pozorováno několik jevů, jejichž budoucí prozkoumání by mohlo pomoci pochopit další strukturální změny scaffoldů vlivem působení vnější mechanické zátěže. Jedná se o tyto jevy:

- Lokální zúžení vlákna.
- Praskání vláken.

8 Reference

ANDĚROVÁ, J. *Biomechanická reflexe scaffoldu na mechanické zatěžování*. Praha, 2014. 59 s. Diplomová práce na UK FTVS. Vedoucí diplomové práce Karel Jelen.

BRAHATHEESWARAN, D. Polymeric Scaffolds in tissue engineering application: A review. *International Journal of Polymer Science*, 2011, roč. 11, s. 1–19.

BUZGO, M. *Riadené uvoľňovanie autológnych rastových faktorov s využitím nanovláknenných nosičov*. Praha, 2010. 60s. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě UK. Vedoucí diplomové práce Evžen Amler.

DOLCI, L. S. *Atmospheric non-thermal plasma surface modification of poly(L-lactic acid) electrospun nanofibers affects scaffold hydrophilicity and fibroblast morphological response* [online]. 2012, [cit. 2015-04-06]. Dostupné z: <http://www.ispc-conference.org/ispcproc/ispc21/ID490.pdf>

FEI™. *An introduction to electron microscopy* [online]. 2010 [cit. 2015-05-06]. Dostupné z: http://www.nanolab.ucla.edu/pdf/Introduction_to_EM_booklet_July_10.pdf

HOLZWARTHA, J. M. Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2011, roč. 32, s. 9622–9629.

LIN, A. Microarchitectural and mechanical characterization of oriented porous polymer scaffolds. *Biomaterials*, 2003, roč. 24, s. 481–489.

LIU, C. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Chemical Engineering Research and Design*, 2007, roč. 85, č. 7, s. 1051–1064.

MADURANTAKAM, P., aj. Multiple factor interactions in biomimetic mineralization of electrospun scaffolds. *Biomaterials*, 2009, roč. 30, č. 29, s. 5456–5464.

MAO, C. Nanomaterials Characterization: Structures, Compositions and Properties. *Microscopy Research and Technique*, 2006, roč. 69, č. 7, s. 519–521.

MIDDLETON, J. T. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*, 2000, roč. 21, č. 23, s. 2335–2346.

MIKO, A. T. Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2000, roč. 3, č. 2, s. 114–119.

- NGUYEN, P. Clickable Poly(ethylene glycol)-Microsphere-Based Cell Scaffolds. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2012, sv. 214, č. 8, s. 948–956.
- O'BRIEN, F. Biomaterial and scaffolds for tissue engineering. *Materials today*, 2011, roč. 14, č. 3, s. 88–95.
- PAVIA, F. *Poly Lactic Acid Based Scaffolds for Vascular Tissue Engineering* [online]. 2012, [cit. 2015-04-06]. Dostupné z: <http://www.aidic.it/cet/12/27/069.pdf>.
- QUIRK, R. F. Supercritical fluid technologies and tissue engineering. *Current opinion in solid state and materials science*, 2004, roč. 8, č. 3–4, s. 343–346.
- SALGADO A. J., aj. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromolecular bioscience*, 2004, roč. 4, č. 8, s. 743–765.
- SHI, X., aj. Fabrication of porous ultra-short single-walled carbon nanotube nanocomposite scaffolds for bone issue engineering. *Biomaterials*, 2007, roč. 28, č. 28, s. 4078–4090.
- WOODRUFF, M. H. The return of a forgotten polymer-polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*, 2010, roč. 35, č. 10, s. 1217–1256.
- YANG, S. E. The design of scaffolds for use in tissue Engineering. Part I. Traditonal Factors. *Tissue Engineering*, 2001, roč. 7, č. 6, s. 679–689.
- YOSHIMOTO, H., aj. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2003, roč. 24, s. 2077–2082.
- ZHU, N., aj. Biofabrication of Tissue Scaffolds. *Advances in Biomaterials Science and Biomaterial Applications* [online]. 2013, s. 315–328. [cit. 2015-04-05]. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-biomaterials-science-and-biomedical-applications/biofabrication-of-tissue-scaffolds>
- YOON, Y., aj. Fabrication of Microfibrous and Nano-/Microfibrous Scaffolds: Melt and Hybrid Electrospinning and Surface Modification of Poly(L-lactic acid) with Plasticizer. *BioMed Research International* [online]. 2013, s. 10. [cit. 2015-04-05]. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/309048/>

9 Seznam příloh

Příloha č. 1 Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Rastrovací elektronový mikroskop Quanta 450	21
Obrázek č. 2: Vyrobený přístroj pro natahování scaffoldů v elektronovém mikroskopu	22
Obrázek č. 3: Vyrobený přístroj pro natahování scaffoldů v elektronovém mikroskopu	23
Obrázek č. 4: Zkoumaný scaffold PLA 16g/cm ² na nosné modré tkanině.....	24
Obrázek č. 5: Uchycení vzorku do přístroje	26
Obrázek č. 6: Připevnění přístroje se vzorkem ke stolku v elektronovém mikroskopu .	27
Obrázek č. 7: Fiji - program využíván k automatické obrazové analýze	28
Obrázek č. 8: Vlevo původní obrázek, vpravo upravený obrázek.....	28
Obrázek č. 9: Druhý krok úpravy obrazu – převedení na binární obraz.....	29
Obrázek č. 10: Nastavení parametru pluginu „Directionality“	30
Obrázek č. 11: Výstup při zpracování pomocí pluginu „Directionality“	31
Obrázek č. 12: Vlevo binární obrázek, vpravo invertovaný	33
Obrázek č. 13: Nastavení poměru mezi pixely a jednotkou délky	33
Obrázek č. 14: Nastavení pluginu „BoneJ Thickness“	34
Obrázek č. 15: Histogramy zastoupení jednotlivých tlouštěk vláken v procentech pro jednotlivá prodloužení	41
Obrázek č. 16: Histogramy zastoupení jednotlivých tlouštěk vláken v procentech pro jednotlivá prodloužení	42
Obrázek č. 17: Histogramy zastoupení jednotlivých tlouštěk vláken v procentech pro jednotlivá prodloužení	43
Obrázek č. 18: Snímek popraskání vzorku 1 při prodloužení o 12 %	44

Obrázek č. 19: Histogramy zastoupení jednotlivých tloušťek vláken v procentech pro jednotlivá prodloužení	50
Obrázek č. 20: Histogramy zastoupení jednotlivých tloušťek vláken v procentech pro jednotlivá prodloužení	51
Obrázek č. 21: Histogramy zastoupení jednotlivých tloušťek vláken v procentech pro jednotlivá prodloužení	52
Obrázek č. 22: Jev lokálního zúžení vláken	54
Obrázek č. 23: Deformita hrany vzorku	55
Obrázek č. 24: Jev praskání vláken	56
Obrázek č. 25: Chyby obrazové analýzy, vlevo původní obrázek, vpravo binární obrázek.....	57

Příloha č. 2 Seznam grafů

Graf č. 1: Směrovost vláken vzorku 1 bez úpravy.....	36
Graf č. 2: Směrovost vláken vzorku 2 bez úpravy.....	38
Graf č. 3: Směrovost vláken vzorku 3 bez úpravy.....	39
Graf č. 4: Směrovost vláken vzorku 1 s úpravou.....	44
Graf č. 5: Směrovost vláken vzorku 2 s úpravou.....	46
Graf č. 6: Směrovost vláken vzorku 3 s úpravou.....	47
Graf č. 7: Porovnání směrovosti vláken.....	53
Graf č. 8: Porovnání směrovosti vláken vzorků 3	61

Příloha č. 3 Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Směrovost vláken vzorku 1 bez úpravy	37
Tabulka č. 2: Směrovost vláken vzorku 2 bez úpravy	38
Tabulka č. 3: Směrovost vláken vzorku 3 bez úpravy	39
Tabulka č. 4: Průměrná tloušťka vláken vzorek 1 bez úpravy	41
Tabulka č. 5: Průměrná tloušťka vláken vzorek 2 bez úpravy	42
Tabulka č. 6: Průměrná tloušťka vláken vzorek 3 bez úpravy	43
Tabulka č. 7: Směrovost vláken vzorek 1 s úpravou	45
Tabulka č. 8: Směrovost vláken vzorek 2 s úpravou	46
Tabulka č. 9: Směrovost vláken vzorek 3 s úpravou	48
Tabulka č. 10: Průměrná tloušťka vláken vzorek 1 s úpravou	49
Tabulka č. 11: Průměrná tloušťka vláken vzorek 2 s úpravou	50
Tabulka č. 12: Průměrná tloušťka vláken vzorek 3 s úpravou	51
Tabulka č. 13: Porovnání směrovosti vláken.....	53
Tabulka č. 14: Průměrná tloušťka vláken vzorek 3 bez úpravy	62
Tabulka č. 15: Průměrná tloušťka vláken vzorek 3 s úpravou	62