

Mechanical characterization of weak, electrospun and biological fiber texture

Tézisfüzet

Forró Evelin

Semmelweis Egyetem
Elméleti és Transzlációs orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Zrínyi Miklós, PhD, MTA tag, professzor emeritus

Hivatalos bírálók: Dr. Kiss Rita Mária, PhD, MTA tag, egyetemi tanár
Dr. Zsembery Ákos., MD, PhD, egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Losonczy György, MD, DSc, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Kulka Janina, MD, DSc, egyetemi tanár

Dr. Gécz Lajos, MD, PhD, osztályvezető főorvos

Budapest
2021

1. Bevezetés

A sérült szövetek orvosi kezelése napjainkban még mindig nagy kihívást jelent az orvostudomány számára, hiszen a beültetett idegen testet a beteg szervezete nem mindig képes befogadni. Az idegen szövet kilökődésének elkerülése érdekében olyan természetes anyag alkalmazására van szükség, amely biokompatibilis, vagyis nem vált ki immunreakciót. Ez úgy valósítható meg ha az élő szervezet számára ismert, abban megtalálható alapanyagot választunk. Erre nyújthat megoldást a biológiai vegyületekből létrehozott implantátumok használata, amelyeket biodegradábilis tulajdonsággal egyaránt rendelkeznek, vagyis a szervezet sejtei képesek szaporodásuk biztosítására tápanyagként lebontani. Az alapanyagon túl fontos szerepet játszik e mesterséges szövet struktúrája, hiszen ez befolyásolja a sejtek számára az átjárhatóságot, valamint a megfelelő teherbírást.

Az élő szervezetekben a sejtek természetes szaporodási környezete az extracelluláris mátrix (ECM), amely egy makromolekulákból, főként kollagén, elasztin, fibronectin, laminin, és glycoprotein szálakból felépülő háromdimenziós hálózat. A ECM a sejtek számára átjárható, dinamikusan változó rendszer, amely biztosítja a tápanyag- és információ áramlását, valamint segíti a sejtek megtapadását és támasztórendszerként szolgál a sejtosztódás során. Az implantátumként alkalmazandó mesterséges szövetnek hasonlatosnak kell lennie, mind alapanyagában, mind

szerkezetében az ECM-hoz, hogy megfelelően elláthassa feladatát a páciens szervezetében.

A biokompatibilis és biodegradábilis mesterséges szövet előállításához aminosav alapú polimerek, úgynevezett biopolimerek használhatók, melyekből elektrosztatikus szálképzéssel képesek vagyunk az ECM-hez hasonló szálak szerkezeteket létrehozni. Habár az elektrosztatikus szálhúzás technikája ma már jól ismert és széles körben alkalmazott, az így előállított planáris, szálak szerkezetek mechanikai tulajdonságairól még igen kevés ismerettel rendelkezünk, és ezen rostkötegek szakadási mechanizmusának általános elméleti leírása teljes mértékben hiányzik a polimerfizika tárgyköréből. Amennyiben e szálak rendszert be szeretnénk ültetni a sérült szövet helyére, elengedhetetlen, hogy ismerjük a terhelhetőségét, hiszen ellenállónak kell lennie a páciens mozgásából eredő erőhatásokkal szemben. Illetve attól függően, hogy a szerkezet melyik részére kívánjuk beültetni, igen különböző mechanikai kitérítéssel szemben kell ellen tartaniuk ezen struktúráknak.

Az 1927-ben kidolgozott Fiber Bundle Model segítségével a természetben lejátszódó jelenségeket kívánták magyarázni, de ezidáig még nem találtak olyan folyamatot, amelyre tökéletesen illett volna a leírás. Az elmélet fejlesztésével eljuthatunk egy általános leíráshoz, amellyel megjósolhatóvá és tervezhetővé válna az implantátumként alkalmazandó mesterséges szövetek mechanikai viselkedése.

2. Célkitűzés

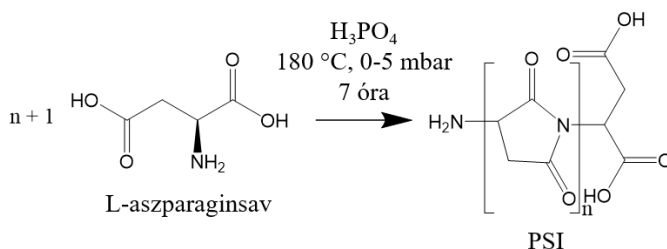
PhD kutatómunkám fő célja elektrosztatikus szálképzéssel biokompatibilis poliszukcinimid (PSI) polimerből vékony szálas szövetek előállítása és mechanikai tulajdonságaik feltérképezése, valamint egy általános mechanikai leírás megalkotása. Célkitűzéseim az alábbi pontokban foglalhatók össze:

1. Planáris, random orientációjú szálas rendszer előállítása és a szálak morfológiájának vizsgálata. Az átlagos szálátmérő meghatározása, valamint a véletlenszerű orientáció igazolása.
2. A szövetek mechanikai viselkedésének feltérképezése a terhelési görbén megjelenő erő esések nagyságának és számának meghatározása révén. A mintát alkotó szálak szakadását jelző erő eséseket azonosítása, mint szakadási erők.
3. A terhelési görbe további analízise és megértése a Fiber Bundle Model (FBM) és a Sacrificial Bond and Hidden Length (SBHL) model segítségével.
4. A szakadási erők kumulatív eloszlásfüggvényének meghatározása és a mechanikai viselkedést leíró egyenlet megadása a Weibull eloszlás alkalmazásával.
5. A mesterséges szöveti struktúra és a humán eredetű szövet mechanikai viselkedésének összehasonlítása, mellyel igazolható a PSI hálók alkalmazhatósága az orvosi implantátumok tervezésének területén.

3. Módszerek

3.1. Poliszukcinimid előállítása

Munkám során poliszukcinimiddal a poli(aszparaginsav) anhidridjével dolgoztam. A hidrolízist az élő szervezeten belül a sejtek képesek elvégezni, így a polimer bekerül a metabolit körforgásba, valamint nem vált ki a szervezetben immunreakciót. A PSI-t L-aszparaginsav termikus polikondenzációjával állítottam elő alacsony nyomáson, 180 °C-on, foszforsav katalizátor jelenlétében (1. ábra).

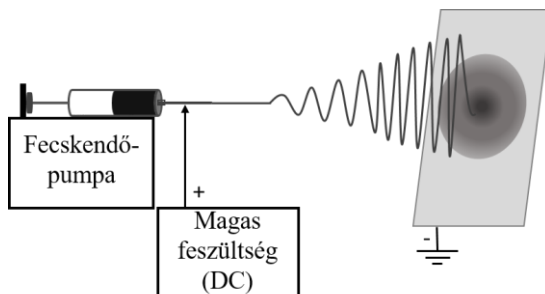


1. ábra: PSI szintézise

3.2. Elektrosztatikus szálképzés

A PSI-t dimetilformamidban oldottam fel, melyet egy fém tűvel ellátott műanyag fecskendőbe töltöttem. A polimer oldat egyenletes kiáramlását a fecskendőpumpa biztosítja, miközben a tűre kapcsolt nagyfeszültségű egyenáram (9 kV) az oldatot az alumínium fóliával fedett, földelt kollektor felé repíti. A polimer oldat a fecskendőt elhagyva az elektromos térben ostromozó mozgással a kollektor felé haladva

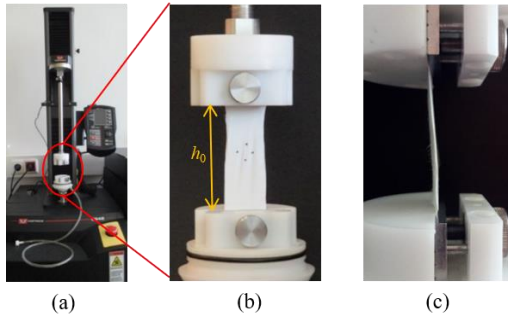
elvékonyodik, megszabadul az oldószertartalmától, így a kollektoron egy oldószertmentes nanoszálás polimer hálózat alakul ki (2. ábra). A tű-kollektor távolság minden esetben 15 cm volt, a polimer oldat áramlási sebessége pedig 1 ml/óra.



2. ábra: Elektrosztatikus szálképzés sematikus ábrája

3.3. Mechanikai mérések kivitelezése

A szálás rendszerből téglalap alakú próbatesteket vágtam ki, melyek vastagsága elhanyagolható a szélességükhöz és hosszúságukhoz képest, így kétdimenziósnek tekinthetők. A mechanikai vizsgálatot Instron 5942 készülékkel végeztem, egyirányú, elmozdulás kontrollált mérések során (3. ábra). A h_0 a kezdeti hosszt jelöli, amely alapján a deformáció mértéke meghatározható. A méréseket szobahőmérsékleten, száraz mintákon végeztem, a mért terhelési görbék kiértékeléséhez a MATLAB programot használtam.

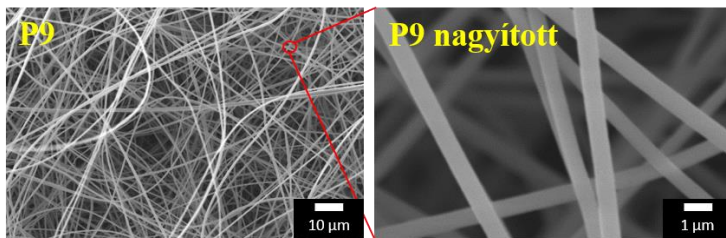


3: ábra: Instron 5942 mechanikai tesztelő (a), illetve a próbatest elől (b) és oldalnézetből (c)

4. Eredmények

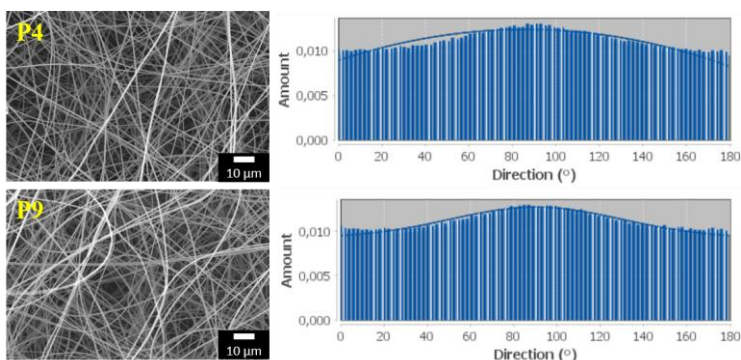
4.1. PSI hálók morfológiai vizsgálata (T1)

A szálak morfológiáját pásztázó elektronmikroszkópiás (SEM) felvételek alapján ImageJ szoftver segítségével jellemeztem. A SEM felvételek (4. ábra) alapján jól megfigyelhetők a sima felülettel rendelkező szálak, sem szálösszeolvadás, sem polimer cseppek nem láthatók a mintákban. 5 különböző minta SEM képei alapján meghatároztam egy minden mintára reprezentatív átlagos szálátmérőt, amely 720 ± 210 nm-nek adódott.



4. ábra: 9-es számú PSI minta SEM felvételei

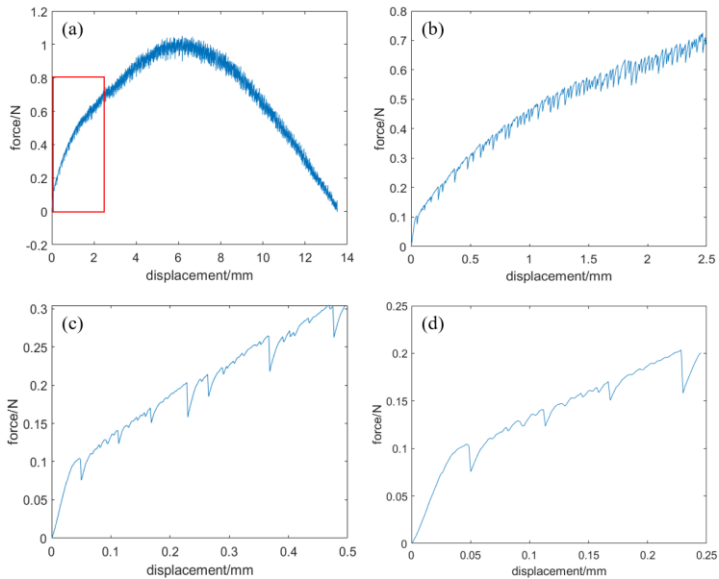
Az orientációs vizsgálat során az ImageJ szoftver a SEM képek alapján képes kirajzolni az 5. ábrán látható orientációs hisztogramot, amelyből megállapítható, hogy a szálak a sík minden irányában ugyanolyan számban fordulnak elő, tehát igazolhatóan random elrendeződésű hálózat keletkezett a szálképzés során.



5. ábra: 4-es és 9-es számú PSI minta SEM képei és orientációs hisztogramjai

4.2. A terhelési görbe kiértékelése (T2)

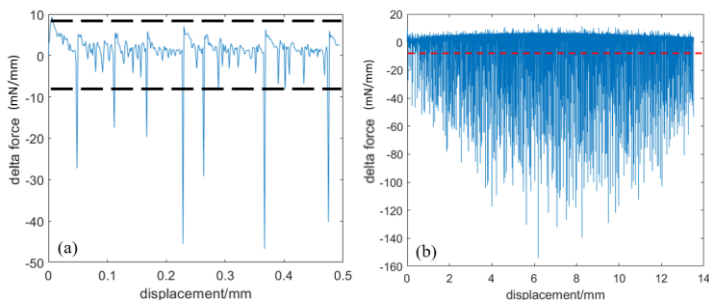
A mechanikai mérések során egyedi görbealak volt megfigyelhető, amely általánosan elmondható az összes vizsgált minta esetében. A tipikus erő-elmozdulás görbe szimmetrikus parabolikus lefutást mutat (6. (a) ábra), amelyen számos fűrészfoghoz hasonló erőesés tapasztalható. Az erőváltozások jól megfigyelhetők a kinagyított ábrákon (6. (b), (c), és (d) ábrák).



6. ábra: A tipikus erő-elmozdulás görbe (a), a pirossal jelzett tartomány nagyított képe (b), és ezen kezdeti rész további nagyításai (c) és (d)

Az erőesések nagysága és előfordulása szemmel láthatóan igen véletlenszerű, melynek tanulmányozása céljából meghatároztam a terhelési görbén bekövetkező szakadási erők számát és nagyságát. Numerikus differenciálás révén a terhelési görbét a 7. ábrán látható grafikonokká alakítottam, amelyen először meghatároztam a pozitív irányban jelentkező erőváltozások nagyságát, ezen értékeket átlagolva megkaptam a fluktuációnak vélt tartományt, amely jelen mintánál 7.1 mN/mm-nek adódott. A fluktuáció mértékének a negatív irányban is ugyanekkorának kell lennie, vagyis a teljes

hibatartomány $-7.1 \leq \Delta f_{\text{error}} \leq 7.1$ mN/mm, melyet a 7. (a) ábrán szaggatott vonalakkal jelöltem. Ez a tartomány minden egyes mérés esetében egyedileg lett meghatározva.



7. ábra: Erőváltozások ábrázolása az elmozdulás függvényében, a 6. (c) ábrán bemutatott görbe részlet (a), és a teljes mechanikai görbe (b) esetében. A szaggatott vonalak a hibahatárt jelzik

Minden olyan erőesés, amely meghaladja a hibahatárt biztosan a szál roncsolódása miatt keletkezett, így a szakadási erő meghatározható az alábbi egyenlettel: $f_i = \Delta f - \Delta f_{\text{error}}$. A 7. (a) ábra alapján könnyedén megszámlálható, hogy 7 darab erőesés ér túl a hibahatáron, míg a teljes görbére (7. (b) ábra) nézve ez az adat 683 darab.

A 7. (b) ábrán látható, hogy az erőesések nagysága igen széles tartományt fed le, a hibahatártól -160 mN/mm-ig terjed. Ezen értékek arra utalnak, hogy minden szál egyedi szakítószilárdsággal rendelkezik, illetve a kisebb erőváltozások utalhatnak a szálak közötti kölcsönhatások, például van der Waals és elektrosztatikus kölcsönhatások vagy szál hurkolódások gyengülésére, valamint megszűnésére. Jelen

eredmények még nem szolgáltatnak elegendő információt ahhoz, hogy ezen jelenségek bekövetkezését egyértelműen társíthassuk az egyes szakadási erőkhöz. Általánosságban azonban elmondható, hogy a húzóerő növekedésével egyre több és ugyanakkor egyre nagyobb erőesések tapasztalhatók, amely arra enged következtetni, hogy először a gyengébb szálak szakadnak el.

4.3. A terhelési görbe matematikai leírása (T3)

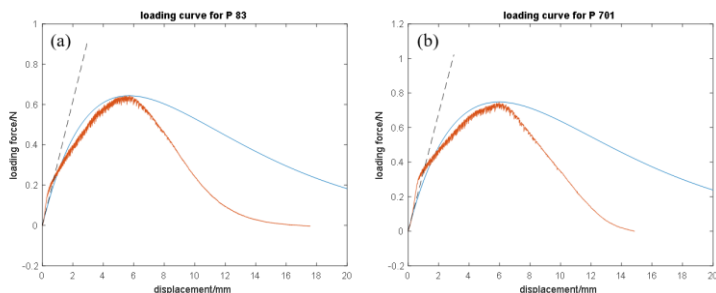
A terhelési görbe értelmezéséhez két modellt használtam. A Fiber Bundle Model segítségével matematikailag leírható az egymástól független szálakból álló rostkötegben fellépő károsodás. A másik a Sacrificial Bond and Hidden Length modell, amellyel a szálak közötti kölcsönhatások gyengüléséből származó változások, azaz maga a fűrészfogas szerkezet magyarázható, de ehhez jelenleg matematikai leírás nem áll rendelkezésre.

A FBM egyenletének megoldásához szükség van a szakadások kifejlődését leíró eloszlásfüggvényre, amely meghatározásához a mérési adatokból számított kumulatív eloszlásfüggvényt hasonlítottam össze több nevezetes eloszlással, melyek közül a Weibull eloszlás mutatta a legjobb egyezést. Ez egy exponenciális eloszlásfüggvény, melyet bevezetve a FBM-be az alábbi egyenlethez jutunk:

$$f = K\varepsilon e^{-(\varepsilon/\lambda)^k}$$

ahol f az erő, K a Young modulusz, ε a deformáció, λ a skálaparaméter és k az alakparaméter. Az egyenlet alapján

felrajzolható a mechanikai görbe várható alakja (8. ábra kék görbe), melyet összehasonlítva a mért görbével (8. ábra piros görbe), az tapasztaltam, hogy a kezdeti szakasznál, a maximum pont eléréséig a modell közelítőleg jó egyezést adott, viszont a görbék leszálló ágai elkülönülve haladnak tovább.



8. ábra: A számított (kék) és a mért (piros) terhelési görbék összehasonlítása. A szaggatott vonal a károsodás nélküli mechanikai viselkedést jelöli

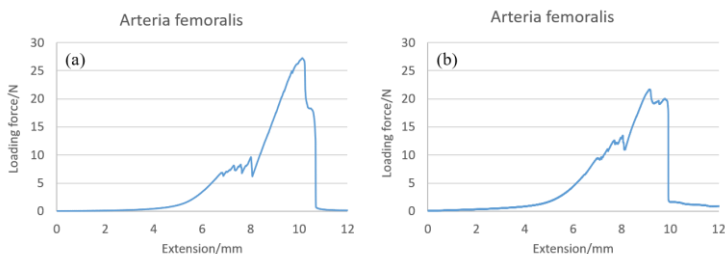
Ennek magyarázata a modell egyszerűségében keresendő. Amíg a modell egymástól független szálak kötegét vizsgálja, addig a mért mintákra ez közel sem igaz, hiszen bennük a szálak adhéziós erők révén is képesek összekapcsolódni, amely szintén erősen befolyásolja a húzóerővel szembeni ellenállóságot.

A pontosabb matematikai leíráshoz, illetve a fűrészfogas szerkezet értelmezéséhez szükség van a Sacrificial Bond and Hidden Length modell bevezetésére is, amellyel a szálszakadás mechanizmusán túl a szálak közötti kölcsönhatás gyengülése is figyelembe vehető. Sajnálatos módon a SBHL

modell segítségével jelenleg még csak az erőesések lehetséges okát tudjuk magyarázni, ezen jelenséget leíró matematikai egyenlet megalkotása további kutatómunkát igényel.

4.4. Biológiai szövet és a PSI hálózat mechanikai viselkedésének összehasonlítása (T4)

A mechanikai leírás mellett végeztem összehasonlító méréseket, melynek keretében biológiai szövet, kipreparált combartéria (arteria femoralis), szakadási tulajdonságait hasonlítottam össze a PSI hálózatok esetén mért adatokkal.



9. ábra: Combartéria gyűrűk mechanikai görbéi

A biológiai szövet terhelési görbéje (9. ábra) élesebb szakadási profilt mutatott, szemben a PSI-nél tapasztalt parabolikus görbealakkal, viszont ugyanúgy jelentkeztek a SBHL modell szerint leírható erőváltozások.

Ezen eredmények alapján a PSI minták jó mesterséges szövet alternatívák lehetnek, és a mechanikai viselkedésük leírásával lehetőség nyílna az irányított mechanikai tulajdonságú minta létrehozására, amellyel még közelebb kerülhetünk a biológiai szövet sajátosságainak lemásolásához.

5. Következtetések

Napjainkban a biopolimerek orvosbiológia kutatása, illetve alkalmazása már széles körben elterjedt biokompatibilis és biodegradábilis tulajdonságaik miatt, viszont a mechanikai viselkedésük leírása még közel sincs megoldva. Egy általános leírás, amellyel jellemezhető és amely által irányítható az elkészült mesterséges szövet mechanikai tulajdonsága elengedhetetlen jelentőségű a rohamosan fejlődő orvostudomány számára. Ezzel lehetővé téve az egyes felhasználási területeknek megfelelő ellenállósággal rendelkező implantátum irányított, és ezáltal gyorsabb előállítását.

Kutatómunkám során ennek a hosszú vizsgálati folyamatnak az első lépéseit végeztem el, amely során PSI-ből szálas szöveteket állítottam elő elektrosztatikus szálképzés segítségével. A SEM felvételek alapján elmondható, hogy a hálózatot sima felszínű, egyedülálló szálak alkotják, amelyek átmérője a 720 ± 210 nanométeres mérettartományba esik. Az orientációs vizsgálat pedig igazolta a teljesen random elrendeződést.

A mechanikai vizsgálatok eredményei parabola típusú görbét mutattak, melybe belenyújtva szokatlan, fűrészfog szerű, hirtelen jelentkező erőesések tapasztalhatók. A szerkezeti felépítést figyelembe véve, ezen esések mindegyike egy vagy több szál szakadásából, illetve a szálak közötti kölcsönhatások gyengüléséből vagy megszűnéséből adódhat. Jelen vizsgálatok alapján a szakadási erő nagyságából

egyértelmű nem határozható meg az azt kiváltó jelenség, de általánosságban elmondható, hogy mind az erőingadozás tartománya mind a szakadások száma nő a terhelés növelésével.

A terhelési görbék matematikai leírása a FBM alapján történt, amely megoldásához szükség van a szakadások kifejlődését leíró eloszlásfüggvényre. A Weibull eloszlás alkalmazásával meghatározott terhelési görbe felszálló szakasza egészen ígéretes egyezést mutat a mérési adatokkal, viszont a maximum pont elérését követően a görbék lefutása elkülönül. A leírás pontosításához a szálszakadás mechanizmusán túl a szálak közötti kölcsönhatások gyengülését is figyelembe kell venni, amelyhez a SBHL modell matematikai leírására és a FBM-be való bevezetésére lenne szükség.

A combartéria mechanikai viselkedése hasonlóságot mutatott a PSI mintákkal, amely alapján a PSI hálók jó alapanyagoknak tűnnek az orvosi biológiai alkalmazáshoz. Egy általánosan alkalmazható egyenlet pedig hatalmas előnyt jelentene a PSI hálók mechanikai tulajdonságának irányított kialakításában.

A dolgozat új tudományos eredményei a következő pontokban foglalhatók össze:

1. Sikeresen állítottam elő PSI-ből elektrosztatikus szálképzéssel szálak szövődéseket, melyben igazoltan random orientációjú, egyedi szálak vannak jelen. (T1)

2. Megállapítottam, hogy a szálas rendszerek terhelési görbéje szimmetrikus parabolikus függést mutat, amelyen a hirtelen jelentkező erőváltozások a szálak szakadásának, illetve a szálak közötti kölcsönhatások gyengülésének vagy megszűnésének a következménye. (T2)
3. Sikeresen kidolgoztam egy kiértékelő programot a MATLAB-ban, amellyel a mechanikai mérések adatainak analízise automatikusan elvégezhető. (T2)
4. Megállapítottam, hogy a PSI hálózatok mechanikai adatai alapján felírható kumulatív eloszlásfüggvény a Weibull eloszlásfüggvényét követi, amelyet a FBM-ben alkalmazva a mérések matematikai leírása jó közelítéssel megadható. (T3)
5. Rámutattam, hogy a szálas rendszer mechanikai görbéjének matematikai leírása közel sem egyszerű csupán egy modellre támaszkodva. Habár a görbe felfutó ágával jó egyezést mutat a FBM alapján kapott görbe, a pontos leíráshoz a SBHL bevezetése elengedhetetlen. (T3)
6. Rámutattam, hogy a mechanikai viselkedés megjósolásával lehetőség nyílik a biológiai szövetekkel még nagyobb hasonlóságot mutató implantátumok gyorsabb és irányított előállítására. (T4)

6. Publikációk

Értekezéshez kapcsolódó közlemények

1. E. Sipos, T. Kaneko, M. Zrinyi (2019) Experimental Investigation of Damage Formation in planar Fibrous Networks During stretching, Scientific Reports, 9:2816. IF₂₀₁₉: 3,998
2. E. Sipos, A. Juhasz, M. Zrinyi (2021) Characteristic load-elongation behavior of weak electrospun fiber texture, Journal of Molecular Liquids, Vol 329, 115459. IF₂₀₂₀: 6,165

Értekezéshez nem kapcsolódó közlemények

1. D. Juriga, E. Sipos, O. Hegedűs, G. Varga, M. Zrínyi, K.S. Nagy, A. Jedlovszky-Hajdú (2019) Fully amino acid-based hydrogel as potential scaffold for cell culturing and drug delivery, Beilstein Journal of Nanotechnology, Vol 10, 2579-2593. IF₂₀₁₉: 2,612
2. O. Hegedűs, D. Juriga, E. Sipos, C. Voniatis, A. Juhasz, A. Idrissi, M. Zrínyi, G. Varga, A. Jedlovszky-Hajdú, K.S. Nagy (2019) Free thiol groups on poly(aspartamide) based hydrogels facilitate tooth-derived progenitor cell proliferation and differentiation, PLoS ONE, Vol 14 (12): e0226363. IF₂₀₁₉: 2,740