



## Diplomová práce

# Výroba nanovláknenných biodegradabilních materiálů technologií solution blow spinning a jejich testování pro in situ aplikace

*Studijní program:*

N0719A270001 Nanotechnologie

*Autor práce:*

**Bc. Ema Chudobová**

*Vedoucí práce:*

doc. Ing. Eva Kuželová Košťáková, Ph.D.

Katedra chemie

*Konzultant práce:*

doc. Ing. Věra Jenčová, Ph.D.

Katedra chemie

Liberec 2024



## Zadání diplomové práce

# Výroba nanovláknenných biodegradabilních materiálů technologií solution blow spinning a jejich testování pro in situ aplikace

*Jméno a příjmení:*

**Bc. Ema Chudobová**

*Osobní číslo:*

M22000065

*Studijní program:*

N0719A270001 Nanotechnologie

*Zadávající katedra:*

Katedra chemie

*Akademický rok:*

2023/2024

### Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte podrobnou literární rešerši na téma zvláknování biodegradabilních polymerních nanovláken pomocí technologie solution blow spinning (SBS) s ohledem na pokroky zejména v posledních dvou letech.
2. Popište vybrané procesní parametry procesu zvláknování technologií pomocí zařízení airbrush.
3. V experimentální části hledejte méně zdravotně riziková rozpouštědla pro vhodné polymerní materiály (PVA a PCL) využitelné pro medicínské aplikace in situ.
4. Proveďte in vitro testování vybraných biodegradabilních vláken vytvářených metodou SBS s ohledem na jejich aplikaci in situ.
5. Diskutujte výsledky hodnocení procesních parametrů, alternativních rozpouštědel a in vitro analýzy in situ aplikace nanovláken na buněčnou kulturu. Vyvoďte závěry a doporučení pro další výzkum.

*Rozsah grafických prací:* dle potřeby dokumentace  
*Rozsah pracovní zprávy:* 50 stran  
*Forma zpracování práce:* tištěná/elektronická  
*Jazyk práce:* čeština

### **Seznam odborné literatury**

- [1] Dadol, Glebert C., Ali Kilic, Leonard D. Tijing, Kramer Joseph A. Lim, Luis K. Cabatingan, Noel Peter B. Tan, Elena Stojanovska, a Yusuf Polat. „Solution Blow Spinning (SBS) and SBS-Spun Nanofibers: Materials, Methods, and Applications“. *Materials Today Communications* 25 (prosinec 2020): 101656. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.101656>.
- [2] Gao, Yuan, Jun Zhang, Ying Su, Hang Wang, Xiao-Xiong Wang, Lin-Peng Huang, Miao Yu, Seeram Ramakrishna, a Yun-Ze Long. „Recent Progress and Challenges in Solution Blow Spinning“. *Materials Horizons* 8, č. 2 (2021): 426–46. <https://doi.org/10.1039/D0MH01096K>.

*Vedoucí práce:* doc. Ing. Eva Kuželová Košťáková, Ph.D.  
Katedra chemie

*Konzultant práce:* doc. Ing. Věra Jenčová, Ph.D.  
Katedra chemie

*Datum zadání práce:* 11. října 2023  
*Předpokládaný termín odevzdání:* 14. května 2024

prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D.  
děkan

LS

prof. Ing. Josef Šedlbauer, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Liberci dne 13. listopadu 2023

## Prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci jsem vypracovala samostatně jako původní dílo s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé diplomové práce a konzultantem.

Jsem si vědoma toho, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu Technické univerzity v Liberci.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti Technickou univerzitu v Liberci; v tomto případě má Technická univerzita v Liberci právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Současně čestně prohlašuji, že text elektronické podoby práce vložený do IS STAG se shoduje s textem tištěné podoby práce.

Beru na vědomí, že má diplomová práce bude zveřejněna Technickou univerzitou v Liberci v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů.

Jsem si vědoma následků, které podle zákona o vysokých školách mohou vyplývat z porušení tohoto prohlášení.

14. května 2024

Bc. Ema Chudobová

## Abstrakt

Tato diplomová práce je zaměřena na metodu solution blow spinning (SBS) pro budoucí použití přímého nanášení nanovlákných krytů ran. V práci je uvedena analýza proudového pole za výstupem zvlákňovacího zařízení airbrush, zvlákňování metodou SBS roztoků s benigními rozpouštědly a roztoků vodorozpustných polymerů. Dále byly vybrané materiály připravené metodou SBS testovány z hlediska biokompatibility in vitro. Následně byly studovány mechanické vlastnosti vybrané nanovlákné vrstvy. Výsledky ukázaly, že nejvyšších hodnot rychlosti dosahuje proud vzduchu za výstupem airbrushu ve středové části proudu. Roztoky s benigními rozpouštědly vykazují zvláknitelnost, avšak je třeba stále hledat vhodnější rozpouštědla a parametry daných roztoků. Zvláknitelnost vodných roztoků je ovlivnitelná relativní vlhkostí vzduchu. In vitro testování prokázalo biokompatibilitu vláken z roztoku 8% polycaprolaktonu v dichlormethanu nanosených metodou SBS přímo na hydrogely s buněčnou kulturou lidských tukových mezenchymálních stromálních buněk. Dle výsledných dat lze konstatovat, že metoda SBS je potenciálně vhodná pro využití v medicíně za předpokladu dalšího výzkumu.

### Klíčová slova

Solution blow spinning, airbrush, in situ aplikace, benigní rozpouštědla, vodorozpustné polymery

## Abstract

This thesis focuses on the solution blow spinning (SBS) method for possible direct application of nanofibrous wound dressings. The thesis presents an analysis of the airflow field behind the outlet of the airbrush, SBS of solutions with benign solvents and solutions of water-soluble polymers. Furthermore, selected materials prepared using the SBS method were tested for biocompatibility in vitro. Subsequently, the mechanical properties of the selected nanofibrous layer were studied. The results showed that the airflow of the airbrush outlet in the central part of the stream achieves the highest velocity values. The solutions with benign solvents showed spinnability, but more suitable solvents and parameters of the solutions still need to be sought. The relative humidity influences the spinnability of aqueous solutions. In vitro testing has demonstrated the biocompatibility of fibres from a solution of 8% polycaprolactone in dichloromethane applied by SBS directly to cell culture hydrogels of human adipose-derived mesenchymal stromal cells. According to the resulting data, it can be concluded that the SBS method is potentially suitable for use in medicine provided further research is conducted.

### Key words

Solution blow spinning, airbrush, in situ applications, benign solvents, water-soluble polymers

## Poděkování

Chtěla bych moc poděkovat své vedoucí práce doc. Ing. Evě Kuželové Košťákové, Ph.D. za vedení práce, konzultace, rady, věnovaný čas a nesmírnou vstřícnost. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Šárce Hauzerové za vedení při biologickém testování in vitro, konzultace a veškerý věnovaný čas. Ráda bych poděkovala Ing. Josefu Skřivánkovi, Ph.D. za spolupráci při měření proudového pole a Mgr. Eleně Filové, Ph.D. za spolupráci při in vitro testování s využitím hydrogelů. Chtěla bych poděkovat Ing. Jaroslavu Mikule za spolupráci při měření mechanických vlastností nanovláknenných vrstev. Také děkuji doc. Ing. Věře Jenčové, Ph.D. za poskytnuté konzultace. Chtěla bych poděkovat své rodině a přátelům za podporu při studiu.

Děkuji za podporu svého výzkumu projektu Excellence v regenerativní medicíně CZ.02.01.01/00/22\_008/0004562, který je spolufinancován Evropskou unií. Hlavním cílem projektu je rozvoj excelentního výzkumu v oblasti léčebných metod regenerativní medicíny.

## Obsah

Úvod .....	10
1 Teoretická část.....	11
1.1 Metoda solution blow spinning .....	11
1.1.1 Fyzikální princip metody solution blow spinning .....	11
1.1.2 Zařízení pro zvlákňování metodou solution blow spinning .....	12
1.1.3 Parametry procesu metody solution blow spinning.....	15
1.1.4 Pokrok ve výzkumu aplikace metody solution blow spinning v medicíně.....	18
1.2 Benigní rozpouštědla pro tvorbu nanovláken pro medicínské aplikace .....	20
1.2.1 Vlastnosti a výběr benigních rozpouštědel pro přípravu roztoků .....	21
1.2.2 Voda jako benigní rozpouštědlo pro solution blow spinning.....	24
2 Experimentální část .....	26
2.1 Použité přístroje a materiály .....	26
2.2 Metody .....	28
2.2.1 Zvlákňování metodou solution blow spinning .....	28
2.2.2 Měření průměru vláken.....	29
2.2.3 Měření rychlosti proudu vzduchu za výstupem airbrushe .....	29
2.2.4 Solution blow spinning roztoků s benigními rozpouštědly .....	32
2.2.5 Solution blow spinning vodorozpustných polymerů.....	33
2.2.6 Test cytotoxicity metody solution blow spinning přímým kontaktem.....	36
2.2.7 Sledování vlivu in situ aplikace nanovláken na buněčnou kulturu v hydrogelu .....	41
2.2.8 Měření mechanických vlastností vybraných materiálů .....	48
3 Výsledky a diskuse.....	51
3.1 Zmapování proudového pole za výstupem airbrushe .....	51
3.2 Solution blow spinning polymerních roztoků s benigními rozpouštědly .....	52
3.3 Solution blow spinning roztoků vodorozpustných polymerů.....	57
3.3.1 Solution blow spinning roztoků polyvinylalkoholu s nízkým obsahem ethanolu....	63
3.3.2 Zvlákňování roztoků PVA s nanokrystalý celulózy solution blow spinningem.....	66
3.4 Test cytotoxicity metody solution blow spinning přímým kontaktem.....	67
3.4.1 Optimalizace experimentu koncentrační řadou buněk .....	70
3.5 Sledování vlivu in situ aplikace nanovláken na buněčnou kulturu v hydrogelu.....	73
3.6 Mechanické vlastnosti vybraných materiálů.....	77
4 Závěr.....	81
Použitá literatura.....	84
Seznam obrázků .....	88
Seznam tabulek .....	91

## Seznam zkratek

Ace	aceton
ACV	acyclovir
ASC	lidské tukové mezenchymální stromální buňky
AV ČR	Akademie věd České republiky
b.v.	bod varu
bFGF	základní fibroblastový růstový faktor
CCK	Cell Counting Kit-8
CF	chloroform
CFD	computational fluid dynamics
CNC	celulózové nanokrystaly
CS	chitosan
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
DCM	dichlormethan
DiOC	3,3'-dihexyloxakarbocyanin jodid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMM	methylal (dimethoxymethan)
DSC	diferenciální skenovací kalorimetrie
ES	elektrické zvlákňování
EtOAc	ethylacetát
EtOH	ethanol
FBS	fetální bovinní sérum
FDA	Food and Drug Administration
FGÚ	Fyziologický ústav
FP	Fakulta přírodovědně-humanitní a pedagogická
FS	Fakulta strojní
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
IS	interval spolehlivosti
KCH	Katedra chemie
KTS	Katedra textilních a jednoúčelových strojů
$M_w$	střední molekulová hmotnost polymeru
NC	negativní kontrola



P	buněčná pasáž
PBS	fosfátový pufr
PC	pozitivní kontrola
PCL	polykaprolakton
PEG	polyethylenglykol
PEO	polyethylenoxid
PLA	kyselina polyléčná
PVA	polyvinylalkohol
QC	quercetin
RH	relativní vlhkost
SBS	solution blow spinning
SD	směrodatná odchylka
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
TUL	Technická univerzita v Liberci
W	demineralizovaná voda
w <sub>t</sub>	hmotnostní zlomek
XRD	rentgenová difrakční analýza

## Úvod

Během několika posledních let zaznamenaly nanovláknenné materiály rozvoj v oblasti medicíny jako materiály pro podporu hojení, a to především jako kryty kožních ran. S tímto rozvojem je spojen i zvýšený zájem o další výzkum technologií pro tvorbu nanovláken. Kromě technologií využívající elektrické síly, které jsou nejběžnějšími a nejvyužívanějšími metodami pro výrobu nanovláknenných materiálů, se rozvíjí i řada dalších možností. Jednu z těchto zvláknovacích metod představuje metoda „solution blow spinning“ (SBS). Tato technologie je založena na vysokorychlostním proudění stlačeného vzduchu nebo plynu kolem polymerního roztoku.

Část výzkumu technologií zvláknování pro medicínské aplikace je zaměřena i na nanášení vláken přímo na místo potřeby (in situ) – poranění. Z výběru technologií je tak vyřazeno elektrické zvláknování, kde pacientovi či obsluze zvláknovacího zařízení hrozí úraz vysokým elektrickým napětím. Jako přijatelnou variantou se tak jeví metoda SBS, která využívá relativně bezpečně proud vzduchu, nikoliv vysoké elektrické napětí pro tvorbu nanovláken. Velká výhoda metody SBS tedy bezpochyby tkví v aplikovatelnosti nanovláknenné vrstvy přímo na pacienta pomocí proudu vzduchu. Potenciální využití metody SBS se jeví jako vhodné pro přímé aplikace nanovláknenných krytů pro podporu hojení tkáně v místě úrazu.

Kromě bezpečnosti použité technologie zvláknování pro medicínské technologie je důležité brát v úvahu i použité rozpouštědlo pro přípravu roztoku. Rozpouštědlo se při procesu zvláknování dostává do okolního vzduchu. V případě toxického rozpouštědla je tak ohrožen na zdraví nejen samotný pacient ale i případný zdravotník (obsluha zvláknovacího zařízení). Je proto nutné vyřešit otázku použití méně zdravotně rizikových rozpouštědel a jejich výběru pro zvláknování.

Tato diplomová práce se zabývá studiem zvláknovací metody SBS pro in situ nanášení nanovláknenných vrstev vzhledem k možnému uplatnění metody v lékařství. V teoretické části jsou shrnuty základní principy a parametry metody SBS. Dále je uveden progres ve výzkumu této technologie především od roku 2022. Z důvodu častého používání toxických rozpouštědel pro zvláknování pomocí SBS jsou popsána v teoretické části i tzv. benigní rozpouštědla, jakožto zdravotně méně riziková alternativa k toxickým rozpouštědlům. Následně jsou zmíněny vlastnosti benigních rozpouštědel a nároky na ně pro výběr rozpouštědla vzhledem k zvláknování především pro medicínské užití. Jedním z benigních rozpouštědel je voda, jejíž používání pro přípravu a zvláknování vodorozpustných polymerních roztoků je rozebráno v jedné z kapitol. V experimentální části je popsáno a vyhodnoceno měření rychlosti proudu vzduchu za výstupem zvláknovacího zařízení airbrush. Poté následuje popis přípravy a studie zvláknování metodou SBS roztoků s benigními rozpouštědly a vodorozpustnými polymery. Dále je uvedeno in vitro testování cytotoxicity přímým kontaktem s buněčnou kulturou. Následně je prezentováno měření a vyhodnocení mechanických vlastností vybraných materiálů vyrobených metodou SBS. Veškeré výsledky jsou poté diskutovány.

# 1 Teoretická část

V teoretické části je popsána metoda solution blow spinningu (SBS), její princip, zařízení využívaná k tvorbě nanovláken pomocí SBS a parametry samotného procesu zvlákňování. Jedna z kapitol teoretické části je věnována pokroku ve výzkumu metody SBS od roku 2022. Autorka této diplomové práce zpracovávala na téma související s SBS i svou bakalářskou práci, z toho důvodu je rešeršní část soustředěna na aktuální vývoj popisovaný v odborné literatuře od roku 2022. Po úvodu do metody SBS následují kapitoly týkající se benigních rozpouštědel a jejich výběr pro zvlákňovací roztoky s ohledem na nízké zdravotní riziko jejich používání při zvlákňování.

## 1.1 Metoda solution blow spinning

Metoda SBS je jednou ze zvlákňovacích metod rozvíjející se především v posledních několika letech. Jednu z prvních publikací týkajících se SBS vydal Medeiros et al. [1] v roce 2009. V anglické literatuře není termín „solution blow spinning“ zatím ustálený. Tato metoda je uváděna pod různými názvy: solution blowing spinning, solution blowing, air jet spinning nebo air-jet spinning. Český název by bylo možné zavést jako „rozfukování polymerních roztoků“.

K výrobě mikro či nanovláken dochází působením vysokorychlostního proudu vzduchu (popř. čistého stlačeného plynu) na polymerní roztok. Pro zvlákňování je možné využít různá zařízení, ať už vlastní výroby či např. komerční airbrush. Většinou se jedná o systém koaxiálních trysek – vnitřní trysku, kterou protéká polymerní roztok a vnější trysku, kterou proudí vzduch (nebo plyn) o vysoké rychlosti obvykle v stovkách metrů za sekundu [2].

Elektrické zvlákňování (electrospinning, ES) je momentálně jedna z nejrozšířenějších zvlákňovacích metod zejména pro tvorbu polymerních nanovláken na světě využívající stejnosměrného nebo střídavého proudu [3]. U ES je tedy zapotřebí, aby byl daný roztok elektricky vodivý. Tato podmínka však neplatí pro zvlákňování metodou SBS. Škála polymerních roztoků metodou SBS je tedy širší než škála roztoků pro ES [4]. SBS také na rozdíl od ES nevytváří vlákna pomocí vysokého elektrického napětí. Z hlediska obsluhy a např. přímého nanášení nanovláken in situ proudem vzduchu je tak SBS pro lidský organismus bezpečnější. Další výhodou metody SBS je její vysoká rychlost výroby vláken, která může být až 33,3krát vyšší oproti ES [5], avšak jistě závisí na nastavených parametrech a zvlákňovaných materiálech.

Metoda SBS představuje mnoho výhod v oblasti zvlákňování, kdy lze pro zvlákňování využít přenosné a finančně nenákladné zařízení s možností aplikace nanovláken in situ. SBS má potenciál v široké řadě použití, a to od medicíny až po stavebnictví. Pro další aplikace metody SBS je však stěžejní pochopit její fungování na základě fyzikálních principů.

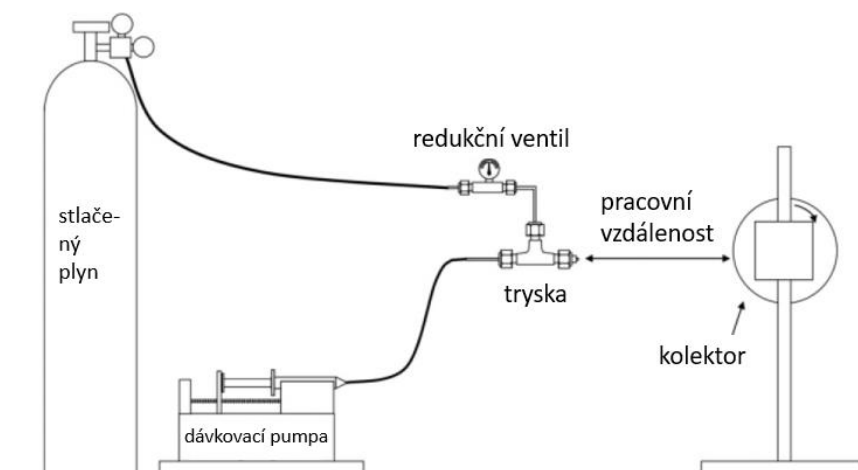
### 1.1.1 Fyzikální princip metody solution blow spinning

Jak popisuje Gao et al. [4], hlavní teoretický základ pro SBS tvoří Bernoulliho princip. Ve chvíli, kdy proud plynu o vysokém tlaku opouští vnější trysku, se tlak sníží na hodnotu

atmosférického tlaku. V tento moment se zvýší rychlost proudu plynu, a podpoří se tak snížení tlaku ve středu trysky. Vytvoří se hnací síla pro urychlení roztoku polymeru. Proud plynu o vysoké rychlosti způsobuje tření na rozhraní plyn–polymerní roztok. Tím se kapka polymerního roztoku deformuje v ústí vnitřní trysky. Z kulatého tvaru přechází kapka na kónický tvar. Jakmile překoná vyvolaná třecí síla povrchové napětí polymerního roztoku, vznikají na povrchu polymerního roztoku trysky. Ty jsou během letu dlouženy. Z trysek se současně odpařuje rozpouštědlo a jsou tvořena polymerní vlákna, která jsou sbírána na kolektor. Tento fyzikální princip využívá celá řada zařízení pro zvlákňování metodou SBS.

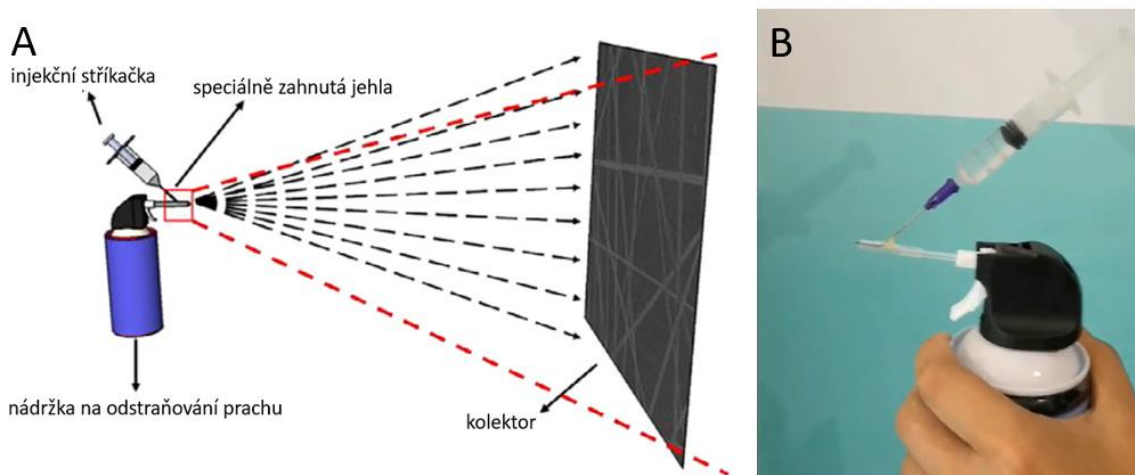
### 1.1.2 Zařízení pro zvlákňování metodou solution blow spinning

Existuje celá řada zařízení pro zvlákňování metodou SBS. Základní aparatura se skládá ze zdroje stlačeného plynu nebo vzduchu (např. tlakové lahve nebo kompresoru), hadic, dávkovače polymerního roztoku a systému koaxiálních trysek. V literatuře se mnohdy vyskytují i vlastnoručně vyrobená zařízení. Medeiros et al. [1] používají pro zvlákňování roztoků aparaturu, která se skládá z výše zmíněných komponentů. Základní zvlákňovací soustava je doplněna o redukční ventil k regulaci tlaku proudu plynu, pumpu pro dávkování roztoku a rotační kolektor (viz Obr. 1).



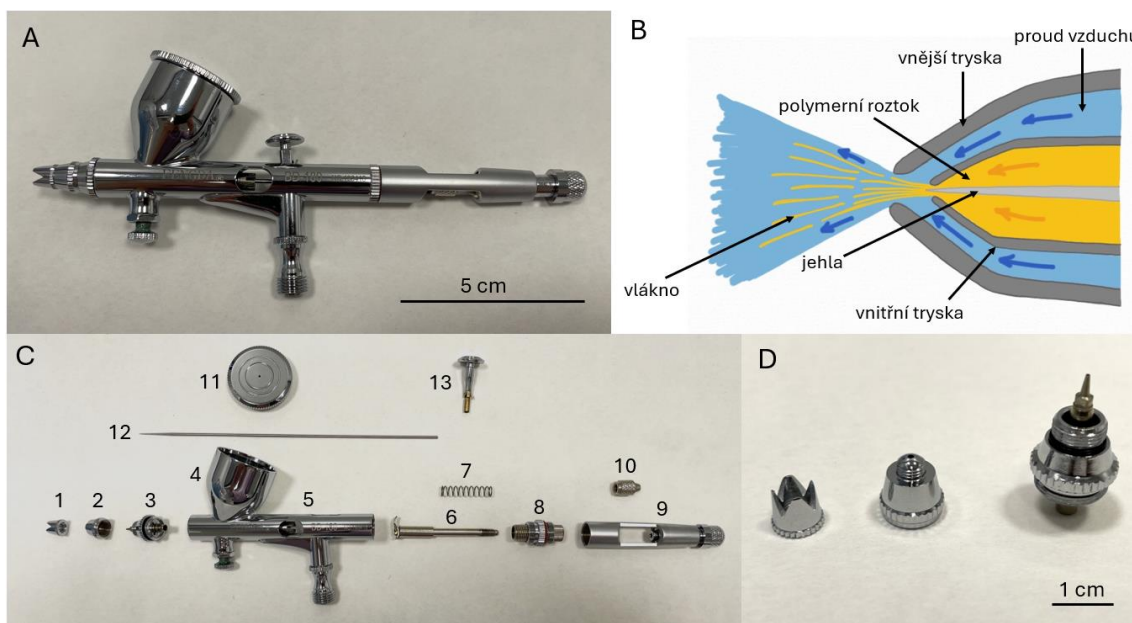
Obr. 1: Aparatura pro zvlákňování metodu SBS, převzato z Medeiros et al. [1].

V literatuře je popsáno i relativně nově zkonstruované zvlákňovací zařízení. V roce 2020 publikoval Gao et al. [6] článek o ručním zařízení (viz Obr. 2) pro aplikace nanovláken na místo určení (in situ). Cílem je využívat tohoto aparátu v medicíně na zastavování krvácení nanosením nanovláken přímo na ránu. Zařízení se sestává z nádoby na stlačený plyn (využívané jako sprej na odstraňování prachu z povrchů), injekční stříkačky se speciálně zahnutou jehlou a tenké plastové trubičky. Nádoba obsahuje stlačený plyn. K výstupu nádoby byla připevněna plastová trubička, do které byl vsunut konec jehly. Následně byla jehla připojena k injekční stříkačce. Tímto byl sestaven systém koaxiálních trysek pro zvlákňování metodou SBS. Injekční stříkačka byla naplněna polymerním roztokem. Zmáčknutím spouště nádoby a současným stlačováním pístu stříkačky byla z polymerního roztoku formována vlákna vlivem proudu stlačeného plynu.



Obr. 2: Přenosné ruční zařízení využívající metodu SBS k aplikaci nanovlákněných krytů pro zastavení krvácení – (A) schéma zařízení, (B) snímek sestaveného zvlákňovacího zařízení, převzato z [6].

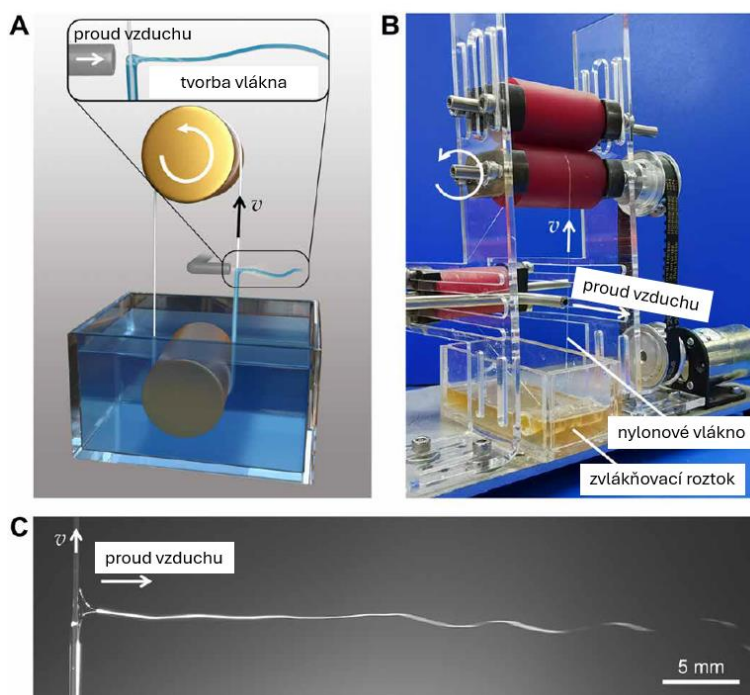
Dalším často zmiňovaným zařízením, které může být využíváno pro účely zvlákňování metodu SBS, je airbrush (česky „americká retuš“, doslovně „vzdušný štětec“). Airbrush je běžně využíván na nanášení barev na různé povrchy (ať už přímo na malířská plátna, nebo modely např. letadélek apod.). Jeho cena se pohybuje v jednotkách tisíc korun. Menší modely jsou velké přibližně 15 cm. Zařízení je možné připojit jak ke kompresoru, tak tlakové láhvi. Airbrush disponuje systémem koaxiálních trysek. Ve vnitřní trysce je zasunuta jehla, která je propojena s rezervoárem a spouští. Ve chvíli, kdy je rezervoár naplněn polymerním roztokem, lze zmáčknout a zatahnout spoušť airbrushu. Zmáčknutím spouště se uvolní proud vzduchu a může putovat vnější tryskou kolem vnitřní trysky. Zatažením spouště je také zatažena jehla, po které stéká polymerní roztok do ústí vnitřní trysky. Čím více je spoušť zatažena, tím více je zatažena jehla do vnitřku airbrushu a roztok může téct ve větší míře z ústí trysky. Takto je regulován průtok polymerního roztoku pro zvlákňování. Detail zařízení je možné vidět na Obr. 3.



Obr. 3: Zařízení airbrush – (A) airbrush, (B) detail principu metody SBS pomocí airbrushu, převzato z [7], (C) jednotlivé součástky airbrushu: 1. korunka trysky, 2. difuzér, 3. hlava trysky s tryskou, 4. rezervoár,

5. tělo airbrushe, 6. táhlo jehly, 7. pružina, 8. ložisko táhla jehly, 9. zadní kryt jehly, 10. aretační matka, 11. víčko rezervoáru, 12. jehla, 13. spoušť, (D) detail přední části airbrushe: vlevo korunka trysky, uprostřed difuzér, vpravo tryska nasazená na hlavu trysky

Metoda SBS pomocí zařízení, které ve své soustavě obsahuje jehlu, se jeví jako jedno z optimálních pro zvlákňování díky možnosti regulace průtoku polymeru právě jehlou. Při samotném procesu se však může vyskytnout několik problémů. Nelze opomenout, že během zvlákňování dochází k vysokému průtokovému odporu nebo zaschnutí polymeru na jehle a ucpaní trysky [8]. Takovéto nežádoucí jevy by mohla vyřešit aparatura, která je popsána v publikaci z roku 2022 – Li et al. [8] sestrojili zařízení pro zvlákňování metodou SBS (viz Obr. 4), které nevyužívá jehlu k dávkování roztoku (tzv. needleless Kármán vortex SBS) ani systém koaxiálních trysek. Zařízení pro zvlákňování je sestaveno z válečků, nádoby naplněné zvlákňovacím roztokem, smyčky z nylonové niti a systému trubek, které působí proudem vzduchu kolmo na smyčku. Roztok je průběžně vynášen z nádržky cirkulujícím nylonovým vláknem, které touto nádobou prochází. Nylonová smyčka byla pokryta po celém povrchu roztokem díky vhodné viskozitě roztoku. Roli také hraje optimální smáčivost nylonu roztokem. Z trubky, která směřuje kolmo na průběh vlákna s roztokem, vychází proud vzduchu o vysoké rychlosti. Ten působí na nanesený roztok na vlákně. Třecí silou se vytvoří tryska z polymerního roztoku, která je následně dlužena do podoby vlákna. Vysycháním rozpouštědla vznikají pevná polymerní nanovlákná, která jsou sbírána na kolektor. Nylonová smyčka se poté opět vrací do roztoku a celý proces se opakuje.



Obr. 4: Bezjehlová zvlákňovací aparatura pro SBS – (A) ilustrace zvlákňovacího procesu, (B) fotografie zařízení pro bezjehlový SBS, (C) snímek z vysokorychlostní kamery tvorby vlákna, převzato z [8].

Pro průmyslovou produkci vláken metodou SBS existuje zařízení s názvem „AeroSpinner“ vyráběné tureckou firmou Areka Group Advanced Technologies. Dané zařízení není přenosné, a neumožňuje tak in situ aplikace nanovláknenné vrstvy. Zařízení je vhodné pro vysokou produkci vláken. S využitím tohoto zařízení lze také zvlákňovat klasickou

metodou ES, které je možné kombinovat s SBS nebo jednotlivé metody používat samostatně [9]. AeroSpinner je uveden na Obr. 5.



Obr. 5: Zvlákňovací zařízení AeroSpinner, převzato z [9].

Na proces zvlákňování metodou SBS má v určitých ohledech vliv samotné zařízení. Je však třeba se zabývat i dalšími parametry zvlákňování metodou SBS, které jsou sepsány v následující kapitole.

### 1.1.3 Parametry procesu metody solution blow spinning

Proces zvlákňování metodou SBS lze ovlivnit několika faktory. Tyto parametry lze rozdělit do několika kategorií: parametry roztoku, procesní parametry a okolní parametry. Jednotlivé vlivy působící na proces SBS jsou sepsané níže v Tab. 1.

Tab. 1: Parametry ovlivňující proces SBS, inspirováno publikací [4]

Kategorie parametrů	Parametr
Roztokové parametry	Viskozita polymerního roztoku
	Koncentrace polymerního roztoku
	Povrchové napětí polymerního roztoku
	Rychlost vypařování rozpouštědla roztoku
Procesní parametry	Tlak proudu vzduchu/plynu
	Vzdálenost tryska–kolektor (pracovní vzdálenost)
	Průtok roztoku
	Průměr trysky
Okolní parametry	Atmosférický tlak
	Teplota
	Relativní vlhkost

Vliv jednotlivých zmíněných parametrů na proces SBS a vliv parametrů na následnou morfologii vláken je obecně popsán v bakalářské práci [10], na niž navazuje tato diplomová práce. Gao et al. [4] se ve své publikaci zaměřují i na konkrétní hodnoty daných zvlákňovacích parametrů: koncentrace roztoku, tlak proudu vzduchu pracovní

vzdálenost, objemový průtok roztoku zařízením a průměr vnitřní trysky zvláknovacího zařízení. Vzhledem k těmto parametrům je udávána i hodnota průměru vzniklých nanovláken.

Ve výše zmíněném článku je např. pro polymerní roztoky z polymerů, které jsou dále použity v experimentech v kapitole 2, také sepsány konkrétní hodnoty. Především se jedná o polykaprolakton (PCL) a polyvinylalkohol (PVA). Konkrétní hodnoty parametrů pro SBS roztoků těchto polymerů a hodnoty průměrů následně vyrobených vláken jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2: Parametry zvláknování roztoků PCL a PVA, převzato z [4].

Polymer	Koncentrace roztoku [hmotnostní procenta]	Tlak proudu plynu [MPa]	Průtok roztoku [ml · h <sup>-1</sup> ]	Průměr vnitřní trysky [cm]	Pracovní vzdálenost [cm]	Průměr vzniklých vláken [nm]
PCL	6–8	0,1–0,3	-	-	10–18	939,4–1714,1
PVA	13,8	0,55	7,2	0,7	-	450 ± 155

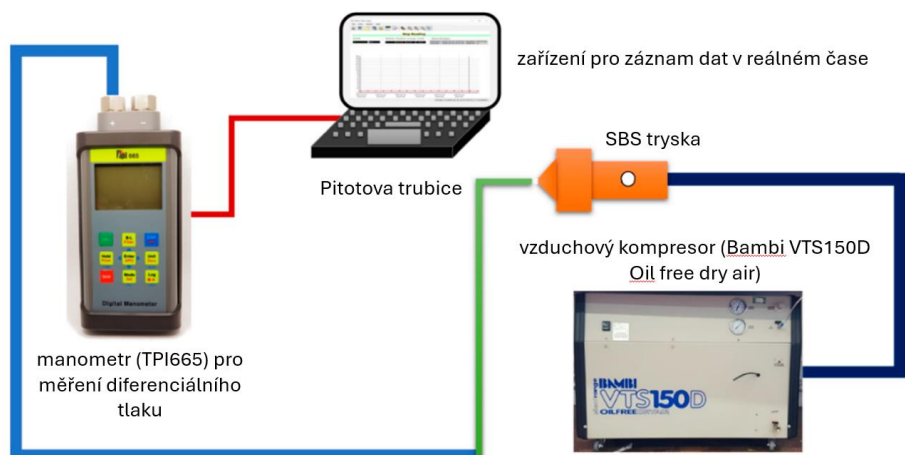
### Role tlaku a rychlosti proudu vzduchu při zvláknování metodou SBS

Velkou kapitolu procesních parametrů představuje i proudové pole proudu vzduchu za výstupem zvláknovacího zařízení. Morfologie vlákna je velmi závislá na charakteristice proudu vzduchu. Prouděním vzduchu může být ovlivněn rozsah velikosti kapiček, protože může podporovat srážky zvláknovaného roztoku, a ty buď vedou ke srážení nebo rozdělení kapek, jak popisuje Atif et al. [2]. Velikost kapek je pak jedním ze zásadních parametrů při SBS, protože určuje průměr vyrobených vláken.

Dále Atif et al. uvádějí, že pokud nemá proud dostatečný tlak a rychlost k překonání povrchového napětí polymerního roztoku, kapka roztoku nebude dostatečně prodloužena nýbrž ztuhne odpařením rozpouštědla. Proto by vstupní tlak a rychlost proudu vzduchu měly mít nadkritickou hodnotu pro zvláknování v závislosti na typu a viskozitě polymerního roztoku a průměru kapky. Se zvyšující se hodnotou vstupních proudových parametrů (tlaku a rychlosti) by se měl průměr vzniklých vláken snižovat. Ovšem čím vyšší budou tyto parametry, tím bude proud turbulentnější. To může způsobovat náhodné odlišnosti v průměru vláken nebo jejich přetržení. Je tedy nutné zvolit vhodné vstupní podmínky proudu. Z tohoto důvodu je nutné dále zkoumat vlastnosti proudového pole při zvláknování metodou SBS.

V publikaci [2] je uvedena experimentální studie týkající se výstupního tlaku z ústí trysky zvláknovacího zařízení pro SBS. Výstupní tlak vycházející z trysky byl naměřen pomocí Pitotovy trubice. Tlak byl stanoven na celkem 11 různých místech v rámci linie proudění za výstupem trysky. Z hodnot dynamického tlaku byla pak vypočítána rychlost proudícího vzduchu. Schéma měřící aparatury je uvedeno na Obr. 6.





Obr. 6: Schéma aparatury pro měření výstupního tlaku proudu vzduchu SBS trysky, převzato z [2].

Získané hodnoty tlaku byly porovnány s obdrženými daty z výpočetní dynamiky tekutin (computational fluid dynamics, CFD). V datech byla nalezena významná shoda. Dále byl zvlákněn roztok polyvinylidenfluoridu v dimethylformamidu. Roztok byl zvlákněn při třech různých hodnotách vstupního tlaku. K příslušným hodnotám vstupního tlaku byly naměřeny hodnoty výstupního tlaku a hodnoty výstupní rychlosti proudu vzduchu. Poté byla sledována střední hodnota průměru nanovláken při změně těchto parametrů. Změna střední hodnoty průměru vláken odpovídá předem předpokládanému trendu, tedy že se zvyšujícím se tlakem proudu vzduchu se snižuje průměr vláken. Naměřené hodnoty jsou zaznamenány v Tab. 3.

Tab. 3: Hodnoty parametrů ovlivňující průměr vláken a příslušné střední hodnoty průměru vláken, převzato z [2].

Vstupní tlak proudu vzduchu [bar]	Výstupní tlak proudu vzduchu [kPa]	Výstupní rychlost proudu vzduchu [ $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ]	Střední hodnota průměru vláken [nm]
2	177	379,9	530
3	121	384,4	420
4	123	386,9	250

Proudové pole a jeho chování v rámci zvláknování lze sledovat i za využití výpočetní techniky a simulací. Lou et al. [11] se zabývali numerickou studií proudu vzduchu využívaného při SBS a její korelace s morfologií vláken. Obecně je výhodné, pokud je v místě polymerního vlákna proudění hladké, tedy v blízkosti linie symetrie proudu plynu. Dále by turbulentní změny měly být co nejmenší, aby se zabránilo nestabilitě proudění plynu při tvorbě polymerních vláken. Pro experimentální část byl zvlákněn roztok polyakrylonitrilu v N,N-dimethylacetamidu s použitím zvláknovacího zařízení vlastní výroby. Zvláknovací proces byl zaznamenán pomocí vysokorychlostní kamery. Na vytvoření modelu proudové trysky byla vygenerována výpočetní doména a mřížky pomocí programu FLUENT 6.3. K analýze získaných dat turbulentního proudění byla

využita CFD. Následně byly nastaveny počáteční podmínky simulace pro zvlákňování – vstupní tlak o třech různých hodnotách, teplota 300 K, předpoklad použití ideálního plynu, konstantní viskozita roztoku apod. Dle očekávání se dva paralelní proudy obtékající trysku spojily v jeden. Rychlost proudu plynu se snižuje se zvyšující se vzdáleností od trysky a směrem dolů od SBS linie. Nejvyšších rychlostí ( $170\text{--}180\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) dosahuje proud ve vzdálenosti 0,01–0,02 m pod úrovní trysky. S rostoucí vzdáleností podél stanovených os se zvyšuje intenzita turbulence proudu. Se zvyšujícím se vstupním tlakem se výstupní rychlost proudu plynu také zvyšuje. Byla přijata hypotéza, že tyto parametry ovlivnily morfologii vláken. Vlákná vytvořená při nízké hodnotě tlaku vykazovala vyšší střední hodnotu průměrů vláken než vlákná vytvořená při vyšších hodnotách tlaku. Usuzuje se tak, že turbulentní fluktuace při vyšších tlacích byly natolik silné, že zhoršily morfologii vláken. Vyšší rychlost proudění také urychlila odpařování rozpouštědla z polymerní trysky, což vedlo k rychlejšímu tuhnutí vlákna. Předpoklady studie byly tedy naplněny.

Všechny výše uvedené parametry jsou velmi důležité pro samotný proces zvlákňování metodou SBS. Velkou roli hrají parametry zvlákňování i v pokroku metody SBS pro medicínské aplikace.

#### **1.1.4 Pokrok ve výzkumu aplikace metody solution blow spinning v medicíně**

Struktura nanovláknenných materiálů vytvořených metodou SBS (a jinými zvlákňovacími metodami jako je zejména elektrické zvlákňování) vykazuje značnou shodu s extracelulární matrix. Materiál tak umožňuje dočasnou buněčnou adhezi, proliferaci buněk a jejich diferenciaci. [12] Implantací tohoto vláknenného materiálu na poraněné místo je podpořena tvorba nové tkáně. Materiály vykazující tyto vlastnostmi jsou pak nazývány jako nanovláknenné tkáňové nosiče (tzv. scaffoldy) [12].

Během posledních několika let se zvýšil zájem o zvlákňovací metodu SBS zejména pro oblast regenerativní medicíny. SBS, jak bylo již výše poznamenáno, nevyužívá k tvorbě nanovláken elektrické síly nýbrž proudu vzduchu. Jeví se tak jako relativně bezpečná metoda pro zvlákňování. S tím je spojena výhoda metody SBS, která přináší možnost relativně bezpečného přímého nanášení scaffoldů na poranění člověka.

Od roku 2022 jsou zaznamenány další pokroky v metodě SBS pro medicínské aplikace. Výzkum metody SBS pro medicínské aplikace v posledních letech směřuje spíše k tvorbě vrstev externě a následné aplikaci materiálu do místa rány. V literatuře se vyskytují zmínky o optimalizaci materiálů pro scaffoldy s cílenou dopravou léčiv a případná vylepšení technologického postupu SBS výroby nanovláken.

Regenerace kostí je velmi náročný proces. Pro lepší zhojení rány je možné využít 3D scaffoldy jako kostní náhrady. Je zásadní, aby případná kostní náhrada měla správné vlastnosti scaffoldu. Silva et al. [13] ve své publikace uvádějí studii zabývající se 3D nanovláknennými scaffoldy obsahující dvoufázový fosforečnan vápenatý. Struktura těchto scaffoldů připomíná strukturu bavlny v její nejjemnější a nejměkčí formě (anglicky cotton-wool-like structure). Nejprve byl připraven roztok polyvinylpyrrolidonu v ethanolu obsahující množství vodného roztoku fosforečnanu vápenatého. Následně byl

roztok zvlákněn s využitím vlastnoručně sestaveného zařízení na SBS. Pro podporu vypařování rozpouštědel (vody a ethanolu) byly umístěny dvě horkovzdušné pistole pod zvláknovací trysku. Teplý vzduch působil ve směru proudu vzduchu při zvláknování, a tím nedocházelo k narušování samotného procesu. Vyrobený scaffold byl kalcinován v muflové peci. Materiál byl dále charakterizován s využitím termogravimetrické analýzy, rentgenové difrakční analýzy (XRD), skenovací elektronové mikroskopie (SEM) a infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR). Dále byla zkoumána bioaktivita a degradabilita materiálu in vitro. Na základě výsledků lze předpokládat, že 3D kalcinované scaffoldy s dvoufázovým fosforečnanem vápenatým mají potenciál pro použití jako náhrady kostí.

Příprava roztoku je velmi důležitá pro SBS. Lze tak ovlivnit parametry roztoku, které mají poté vliv na samotnou zvláknitelnost roztoku a výslednou morfologii vláken. Yang et al. [14] připravili pomocí SBS nanovláknena silk-fibroinu v kombinaci se sójovým proteinem. Pro zvláknování byly připraveny roztoky silk-fibroinu s různými přísadami sójového proteinu. Směsi byly ošetřeny pomocí ultrazvukového zařízení po dobu rozdílných časových úseků. Dále byly roztoky zvlákněny a byla obdržena finální nanovláknenná membrána. Následně byly zkoumány vlastnosti vrstvy pomocí SEM, FTIR, XRD, diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) atd. Na závěr byly provedeny testy biodegradability a cytotoxicity. Ukázalo se, že doba působení ultrazvuku má vliv na viskozitu roztoku, a tím také i na morfologie výsledných vláken. Sonifikace ultrazvukem může působit i na stavbu řetězců silk-fibroinu a krystalinitu vláknenného materiálu. Z celkových výsledků zvláknování a testování lze usoudit, že materiál připravený metodou SBS z roztoku silk-fibroinu a sójového proteinu je vhodným potenciálním kandidátem pro regeneraci tkání, kryty ran nebo systémy pro cílenou dopravu léčiv.

Rozsáhlým tématem v regenerativní medicíně jsou materiály pro náhradu a regeneraci kůže. Tien et al. [15] uvádějí postup pro výrobu nanovláknenných scaffoldů z chitosanu (CS) pro hojení kožních poranění. Pro experiment byl zvolen CS s vysokým stupněm deacetylace. Roztoky CS/PEO byly zvlákněny pomocí SBS zařízení sestaveného na zakázku. PEO byl později z vláken odstraněn. Ošetření ve vodném roztoku uhličitanu draselného udržuje strukturální integritu vláken a usnadňuje odstraňování PEO. Mechanické vlastnosti vrstvy byly zkoumány v suchém i mokřem stavu. Následně byly provedeny testy in vitro, které potvrdily biokompatibilitu nanovláknenné vrstvy. Materiál připravený pomocí SBS z CS se zdá nadějným scaffoldem pro náhradu kůže a obecně kožní tkáňové inženýrství.

Mezi běžná onemocnění kůže patří i např. akné či orální opar. Tato onemocnění jsou značně nepříjemná, v některých případech se kůže špatně hojí a může docházet k její skarifikaci. To má pak za následek neestetický vzhled pokožky. Průběh daných kožních onemocnění může být i značně bolestivý. Yang et al. [16] ve své publikaci řeší problematiku výroby nanovláknenných dvojvrstev určených k urychlení léčby akné metodou SBS. Jako léčivá látka byl využit quercetin (QC), který poskytuje antioxidační, protizánětlivé a antibakteriální vlastnosti. QC byl přidán do roztoku směsi CS a PEO. Malé množství PEO je zde přidáno pro zlepšení zvláknitelnosti roztoku. Zvláknění metodou SBS bylo provedeno pomocí vlastnoručně sestaveného zařízení. Na vzniklou vrstvu CS/PEO/QC byl zvlákněn i roztok PLA, aby se při následné aplikaci vrstvy na kůži předešlo

jejímu lokálnímu podráždění. Poté byla zjištěna dobrá propustnost vzduchu dvojvrstvy, což mohlo být způsobeno vlivem metody SBS na rozložení vláken v prostoru. Dále byl zkoumán i charakter uvolňování QC po dobu 24 hod. Vrstva vykazuje antibakteriální účinky a biokompatibilní charakter. Připravená dvojvrstva se jeví jako vhodný materiál pro léčbu akné a infekčních ran.

Ferreira et al. [17] se zabývali kontrolovaným uvolňováním a antivirotickými účinky nanovlákněné vrstvy dopované antivirotickými pro léčbu herpatické dermatitidy a recidivujícího orálního oparu. Pro výrobu vrstvy byl použit roztok kyseliny polymlečné (PLA) a polyethylenglykolu (PEG) s příměsí antivirotika – acycloviru (ACV). S využitím systému soustředných trysek byl roztok zvlákněn do podoby koaxiálních vláken. ACV byl obsažen v jádře vláken. Vlastnosti vlákněných vrstev z připravených roztoků byly popsány s využitím různých analýz jako např. SEM, DSC aj. Později bylo prokázáno, že ACV nemá vliv na morfologii vláken. Profil uvolňování ACV po dobu 21 dnů byl získán pomocí UV-Vis spektroskopie. Dále byly provedeny i testy cytotoxicity in vitro. Studie ukazuje velký potenciál vláken PLA/PEG vyrobených metodou SBS při řízeném uvolňování ACV k vývoji praktických materiálů pro léčbu oparů s jejich současným překrytím náplastí pro estetický vzhled.

Pokrok ve výrobě materiálů metodou SBS pro medicínské účely směřuje stále k rozšiřování škály zvlákněných roztoků biokompatibilních polymerů. Avšak u in situ aplikací nanovlákněných scaffoldů je zapotřebí, aby také použité rozpouštědlo bylo kompatibilní s lidským organismem a nepředstavovalo zdravotní riziko.

## **1.2 Benigní rozpouštědla pro tvorbu nanovláken pro medicínské aplikace**

K tvorbě nanovláken je využíváno polymerních roztoků (některé technologie zvlákněování využívají polymerní taveniny, nicméně tento případ zde není uvažován) [3]. Polymerní roztok se obvykle skládá z polymerní sušiny a rozpouštědla. Při zvlákněování působí na polymerní roztok určitá forma síly, která na hladině roztoku utvoří trysky [3]. Ty jsou dále dlouženy do podoby vláken. Ke ztuhnutí vlákna dochází po odpaření rozpouštědla do okolí. Pro snadné a rychlé odpařování by mělo mít rozpouštědlo relativně nízký bod varu a vysokou tenzi par. Rozpouštědlo by mělo mít i nízké povrchové napětí pro snadnou tvorbu zvlákněovacích trysek. Často jsou rozpouštědla s náležitými vlastnostmi pro zvlákněování toxická. Při použití těchto rozpouštědel představuje jejich odpařování značný problém nejen pro životní prostředí ale také samotné lidské zdraví.

Toxická rozpouštědla jsou především problematická v použití pro medicínské účely. Pokud se jedná o aplikaci nanovlákněné vrstvy, která byla vyrobena externě, rozpouštědla se stihnou zcela z vrstvy odpařit. Nezpůsobují tak pacientovi obtíže. Nebezpečná jsou především pro obsluhu zvlákněovacího zařízení při přípravě polymerního roztoku a výrobě nanovlákněné vrstvy.

Jiná situace může nastat při nanášení vlákněné vrstvy in situ. Zde spočívá potíž v nedostatečném čase pro odpaření rozpouštědla. To pak zůstává déle ve vrstvě, která je již aplikována na pacientovu ránu. Zbytkové rozpouštědlo poté může negativně působit

na lidský organismus. Obtíže může rozpouštědlo vytvářet i zdravotníkovi, který vrstvu aplikuje. Při nanášení vláken se část rozpouštědla dostává do okolí a tím ohrožit zdraví samotné obsluhy zvlákňovacího zařízení.

Důležitá je tedy volba rozpouštědla pro tvorbu nanovláken. Použité rozpouštědlo by mělo být v ideálním případě zcela netoxické pro lidský organismus. Tuto vlastnost mají tzv. benigní rozpouštědla (občas nazývaná také jako šetrná). V literatuře se rovněž vyskytuje pojem „zelená rozpouštědla“. Někdy se tato dvě slova zaměňují jako synonyma [18]. Ovšem některé články oba pojmy rozlišují. Název „benigní rozpouštědla“ je vytyčen pro netoxická rozpouštědla pro lidský organismus, kdy by neměla ohrožovat lidské zdraví. Kdežto pojem zelená rozpouštědla znamená, že výrobou a následným použitím rozpouštědla se nezatíží životní prostředí [19]. Dalším rozdílem mezi benigními a zelenými rozpouštědly může být u ES, kdy zelené ES implikuje zvlákňování emulzí [18].

Klasifikací rozpouštědel se zabývá Food and Drug Administration (FDA). Mezinárodní rada pro harmonizaci technických požadavků na humánní léčivé přípravky pro průmysl vydala seznam „Q3C Nečistoty: Zbytková rozpouštědla“ [20], kde jsou rozpouštědla rozřazena do tří tříd pro farmaceutický průmysl. Jednotlivé charakterizace tříd jsou blíže vysvětlené v kapitole 1.2.1. Pokyny popisující současný názor FDA na toto téma jsou považovány za pouhá doporučení. Dodržování daných postupů je jedině vyžadováno v případech, kde jsou v seznamu FDA citovány konkrétní regulační nebo zákonné požadavky. Seznamem se však lze řídit při výběru rozpouštědla pro zvlákňovací roztok.

### **1.2.1 Vlastnosti a výběr benigních rozpouštědel pro přípravu roztoků**

Pro tvorbu polymerních roztoků jsou běžně užívána rozpouštědla, která mohou poškozovat lidský organismus. Mezi takováto rozpouštědla patří např. chloroform (CF), dichlormethan (DCM) nebo dimethylformamid [21]. Používaná rozpouštědla mohou způsobovat různé typy karcinomů, mutací a další [21]. Samozřejmě vždy záleží na dávce a době působení. Případnou náhradou těchto toxických rozpouštědel za méně toxická či netoxická by bylo možným negativním účinkům předejít.

Jako vhodnou alternativou se jeví benigní rozpouštědla. Obecné vlastnosti benigních rozpouštědel by měly být, jak uvádí Liverani et al. [18]:

- vysoký bod varu,
- nízká tenze par,
- netoxický charakter,
- schopnost rozpustit velkou škálu organických sloučenin,
- finanční nenáročnost,
- recyklovatelné.

Z výše uvedených vlastností je pro medicínské aplikace důležitý vysoký bod varu, nízká tenze par a netoxický charakter. Přestože by mělo být rozpouštědlo netoxické, je žádoucí, aby se do těla dostávalo co nejméně xenobiotik. Vysoký bod varu způsobuje, že se rozpouštědlo hůře odpařuje. Uvolňuje se tak méně par do vzduchu, které by mohly být vdechnuty. Vysoký bod varu je však problematický pro samotné zvlákňování. Rozpouštědlo s vysokým bodem varu má malou tendenci se odpařovat, a obtížněji se tak

tvorí vlákna. S rychlostí vypařování souvisí i tenze par, kdy s nižší tenzí par se rozpouštědlo obtížněji (pomaleji) vypařuje. U použití benigních rozpouštědel v medicíně je tento parametr žádoucí ze stejného důvodu jako vysoký bod varu.

Co se toxicity rozpouštědel týče, v úvodu kapitoly 1.2 bylo zmíněno, že dle FDA lze použitá rozpouštědla rozdělit do tří tříd [20]. Podle charakteristiky je rozpouštědlo zařazeno do určité třídy. Rozpouštědla **Třídy 1** by se neměla používat při výrobě léčivých látek a léčivých přípravků z důvodu jejich nepřijatelné toxicity nebo škodlivého vlivu. Zde jsou zařazeny látky jako např. benzen, tetrachlormethan nebo 1,2-dichlorethan. Ve **Třídě 2** se nacházejí rozpouštědla, která by měla být ve farmaceutických přípravcích omezena kvůli jejich vlastní toxicitě. Mezi tato rozpouštědla se řadí např. DCM či CF. **Třída 3** představuje rozpouštědla, která lze považovat za méně toxická a méně riziková pro lidský organismus. V této třídě nejsou zahrnuta žádná rozpouštědla, o nichž by bylo známo, že jsou nebezpečná pro lidský organismus v dávkách běžně přijímaných v léčivých přípravcích. Zároveň pro mnoho rozpouštědel Třídy 3 neexistují žádné studie dlouhodobé toxicity. Tato rozpouštědla jsou méně toxická v akutních nebo krátkodobých studiích a nemají genotoxické účinky. Do této třídy patří např. ethylacetát (EtOAc) a aceton (Ace).

Seznam tříd obsahuje skupinu rozpouštědel, pro kterou nebyly doposud nalezeny dostatečné toxikologické údaje pro rozřazení do předešlých tříd. Tato rozpouštědla by však mohla být stále zajímavá z hlediska jejich vlastností pro výrobu léčivých látek nebo jejich přípravu. Do této kategorie spadá např. methylal (dimethoxymethan, DMM).

Jak bylo poznamenáno výše, rozdělení rozpouštědel s využitím ve farmaceutickém průmyslu dle FDA je pouhým doporučením nikoliv však nařízením. Tímto seznamem je možné se řídit při výběru rozpouštědla pro zvláknovací roztok.

Při výběru vhodného benigního rozpouštědla jako náhrady za běžně využívané rozpouštědlo pro medicínské aplikace lze brát v potaz seznam FDA a další vlastnosti rozpouštědla. Benigní rozpouštědla by v ideálním případě měla vykazovat kromě netoxického charakteru i vysoký bod varu a nízkou tenzi par, což bylo poznamenáno výše. Jak vysoký bod varu, tak nízká tenze par negativně ovlivňují proces zvláknování. Rozpouštědlo se špatně a pomalu odpařuje. Vlákna se tak mohou tvořit obtížně a případně s nežádoucími defekty apod. Oba parametry benigních rozpouštědel jsou tedy na opačné straně vlastností, než je potřeba pro zvláknování. Proto je nutné hledat jistý kompromis mezi charakteristikami rozpouštědla pro samotný proces zvláknování a jeho bezpečnějším užitím pro zdraví člověka.

Avossa et al. [19] se ve svém článku zabývají tématem benigních a zelených rozpouštědel pro zvláknování. V kapitole o definici benigních rozpouštědel jsou obsaženy informace o různých rozděleních rozpouštědel do kategorií bezpečnosti. Je zde uvedeno několik možných rozřazení, které stanovily firmy jako je např. Pfizer, GlaxoSmithKline nebo Sanofi. Většinou se jedná o tabulky s barevným rozlišením vhodnosti rozpouštědla pro farmaceutický sektor. Z této klasifikace vychází samozřejmě jako nejméně problematické rozpouštědlo voda. Tabulky lze také prakticky využít k výběru vhodného benigního rozpouštědla.

Jedním z používaných rozpouštědel pro přípravu zvláknovacích roztoků PCL pro SBS je DCM [22]. DCM je podezřelý z karcinogenity [23] a je dle FDA zařazen do Třídy 2. Pro použití ve farmacii by měl být tedy omezen. Nicméně jeho vlastnostmi představuje DCM vhodné rozpouštědlo pro zvláknování, především pro metodu SBS. Díky relativně nízkému bodu varu a vysoké tenzi par se snadněji odpařuje. To je při SBS, kde je často krátká pracovní vzdálenost (10–20 cm), velice žádoucí. Jeho vlastní toxicita však může představovat komplikace při aplikaci nanovláknových vrstev in situ. Proto je nutné hledat jistou netoxickou náhradu za toto rozpouštědlo. V úvahu by měla být brána benigní rozpouštědla, která mají podobné vlastnosti jako DCM. Je zapotřebí, aby daná benigní rozpouštědla dokázala rozpustit požadovaný polymer a aby se při zvláknování metodou SBS co nejrychleji odpařovala. Hlavním požadavkem na rozpouštědlo však zůstává jeho bezpečné užití pro lidské zdraví.

Nárokům na benigní rozpouštědlo pro zvláknování PCL metodou SBS odpovídají nejlépe rozpouštědla uvedená v Tab. 4. V tabulce jsou kromě hodnot bodů varu a tenzí par také hodnoty povrchového napětí, což je další velmi důležitý parametr pro zvláknování (viz kapitola 1.1.3). Jejich vlastnosti jsou porovnávány s vlastnostmi DCM. EtOAc a Ace spadají v seznamu FDA do Třídy 3, což značí jejich možné použití v medicíně. Současně splňují požadavky i pro zvláknování. Vlastnosti vody nejsou plně ideální pro zvláknování – voda má vysoký bod varu, velmi nízkou tenzi par a vysoké povrchové napětí (viz Tab. 4). Přestože voda není tedy pro zvláknování zcela vhodným rozpouštědlem, tak z hlediska toxicity nepředstavuje žádné zdravotní riziko pro aplikace nanovláken in situ ve zdravotnictví.

Tab. 4: Srovnání parametrů benigních rozpouštědel s parametry DCM. Hodnoty tenze par a povrchového napětí jsou uvedeny pro teplotu, která je napsána v závorce (°C) za danou hodnotou veličiny.

<b>Rozpouštědlo</b>	<b>Bod varu [°C]</b>	<b>Tenze par [kPa]</b>	<b>Povrchové napětí [mN/m]</b>	<b>Zdroj</b>
DCM	39	47,4 (20 °C)	26,5 (20 °C)	[23]
EtOAc	77,1	12,4 (25 °C)	24 (20 °C)	[24]
Ace	56,08	30,8 (25 °C)	23,7 (20 °C)	[25]
DMM	42,3	42,6 (20 °C)	21,2 (20 °C)	[26]
Voda	99,974	3,17	72,75 (20 °C)	[27, 28]

Literatura pro SBS s benigními rozpouštědly je omezená. Většina článků se zabývá ES. Jako benigní rozpouštědlo je často volena kyselina mravenčí a kyselina octová. Ty jsou dle FDA zařazeny do Třídy 3. Pro zvláknování SBS jsou však nevhodné. Materiál, ze kterého je komerční airbrush vyroben, není vůči kyselinám inertní. Kyseliny způsobují korozi tohoto zařízení. Dochází tak k nevratnému poškození airbrushu. Dalším důvodem, proč kyseliny nejsou vhodné pro SBS pomocí airbrushu, je snaha o potenciální aplikaci této metody ve zdravotnictví. Při in situ aplikaci nanovláken z roztoku s kyselinami na ránu by mohlo dojít k naleptání rány působením kyseliny. To je však nepřípustné. Koncentrované organické kyseliny (zejména kyselina mravenčí) mohou působit v roztoku na polymer (např. polykaprolakton) a tím dochází k snižování jeho molekulové hmotnosti, a tedy k degradaci díky kyselinou katalyzované hydrolýze [29].

Je třeba zvolit taková benigní rozpouštědla, která jsou vhodná jak pro danou technologii, tak pro užití v medicíně. Behrens et al. [30] se věnují zvláknování metodou SBS za účelem aplikace nanovlákného chirurgického tmelu in situ. Ve své publikaci uvádějí pro zvláknování roztok kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové rozpuštěné v acetonu. Výše je zmíněno, že je aceton možné používat v lékařství. Lze ho dle uvedeného článku a kategorie bezpečnosti případně použít jako benigní rozpouštědlo pro in situ aplikace SBS.

Výběr rozpouštědla se tedy řídí několika kompromisy. Je důležité zvážit nároky na technologii zvláknování a zároveň brát v potaz toxicitu rozpouštědla pro medicínské účely. Exaktní postup pro výběr rozpouštědla však není doposud zcela jistý.

### **1.2.2 Voda jako benigní rozpouštědlo pro solution blow spinning**

Voda je zcela bezrizikovým rozpouštědlem z hlediska bezpečnosti pro lidský organismus. Vodu lze použít k přípravě roztoků z vodorozpustných polymerů, jako je např. polyvinylalkohol (PVA) nebo polyethylenoxid (PEO). Ve zdravotnictví by bylo možné vodné roztoky PVA nebo PEO a jejich směsí využít k tvorbě nanovlákných scaffoldů, u nichž se cíleně očekává rychlé rozpuštění či nabobtnání v tělních kapalinách např. pro uvolnění nesené aktivní látky. Pomocí metody SBS by bylo možné scaffoldy nanášet přímo na pacientovo postižené místo. Přestože voda je vhodná pro použití jako rozpouštědlo, problém jejího využití jako rozpouštědla pro medicínské aplikace spočívá v jejích vlastnostech a vlastnostech výsledného materiálu.

Pro proces zvláknování metodou SBS představují roztoky s vodou jisté potíže. Jak bylo uvedeno již dříve, voda má negativní vliv na proces zvláknování kvůli svým vlastnostem. Vysoký bod varu, nízká tenze par a vysoké povrchové napětí zapříčiňují to, že se vlákna zcela před dopadem kolektoru nevysuší [31]. Dané vlastnosti ztěžují tvorbu samotných vláken. Produktivita vláken tak může být velmi nízká či přímo nulová. Jedním z řešení této situace je přidáním zařízení dodávající teplo do zvláknovací aparatury. Santos et al. [31] inovovali zvláknovací soustavu pro SBS vodných roztoků PVA. K zvláknovací trysce přidali Bunsenův kahan. Trysku zahřívají na teplotu 45 °C. Toto řešení je vhodné pro samotný proces zvláknování vodných roztoků. Ovšem pro in situ aplikace vláken je možnost ohřevu vyloučena. Vlivem vysoké teploty by mohlo docházet k dalšímu poškození rány.

Při potenciální aplikaci scaffoldu vyrobeného z vodného polymerního roztoku přímo na ránu, by se vlivem vodného prostředí scaffold mohl rozpustit. V případě externí výroby vlákného materiálu je takový polymer zesítován, aby k jeho rozpuštění po aplikaci na ránu nedošlo [32]. Sítování polymeru se provádí fyzikálně (např. vysokou teplotou, UV zářením...) nebo chemicky (pomocí síťovacího činidla) [33]. Ani jedna z uvedených možností není pro in situ aplikace akceptovatelná. Vysoká teplota nebo UV záření by mohly způsobit větší poškození poranění, na které by byl síťovaný scaffold aplikován. Síťovací činidla nejsou vhodná pro přímé nanášení nanovláken z důvodu jejich vlastní toxicity.

Rozpustnost materiálu vyrobeného a aplikovaného metodou SBS in situ by však mohla být výhodou při jemném dodávání léčiv do rány. Přímé nanesení léčiva na poranění ve vysoké koncentraci může vést k nežádoucím účinkům – pálení, svědění, nebo případně



zarudnutí. Pokud by však léčivo bylo rozptýleno na ránu v nanovlákněch, jeho koncentrace by byla v dostatečně nízká a zároveň účinná pro dané účely. Nemusely by být tedy způsobeny nežádoucí efekty.

Oblast zvlákňování vodných polymerních roztoků metodou SBS pro medicínské aplikace je stále nepříliš prozkoumána. Hledání správných parametrů vodných roztoků, správného nastavení technologie a sledování různých vlivů na proces zvlákňování metodou SBS je pro potenciální využití v medicíně stěžejní.

## 2 Experimentální část

Experimentální část této diplomové práce se věnuje zmapování proudového pole za výstupem zvlákňovacího zařízení airbrush. Dále je představeno zvlákňování metodou SBS roztoků s benigními rozpouštědly a roztoků vodorozpustných polymerů. Následně práce představuje nanovláknenné materiály vyrobené metodou SBS vybrané pro další testování, a i proces tohoto in vitro testování. Na závěr je uvedeno testování mechanických vlastností vybraných materiálů.

### 2.1 Použité přístroje a materiály

Níže jsou uvedeny přehledové tabulky se všemi přístroji (viz Tab. 5) a materiály (viz Tab. 6 a Tab. 7) použitými v experimentální části této diplomové práce.

Tab. 5: Použité přístroje

<b>Přístroj</b>	<b>Model</b>	<b>Výrobce/dodavatel</b>
Airbrush	BD-180	Fengda, Čína
Kompresor	AS-186	Fengda, Čína
Thermoanemometrické čidlo	ALMEMO FVA935-TH5	Ahlborn, Německo
Ruční měřicí přístroj	ALMEMO 2890-9	Ahlborn, Německo
Nanospider™	Elmarco NS 1S500U s klimatizační jednotkou NSAC150, Česká republika	Elmarco, Česká republika
Skenovací elektronový mikroskop	Tescan Vega S3B,	Tescan Orsay Holding a.s., Česká republika
Naprašovací zařízení	Q150R Plus	Quorum, Velká Británie
Ethylenoxidový sterilizátor	Anprolene, model AN74	Andersen Sterilizer, Velká Británie
CO <sub>2</sub> inkubátor	Heracell™ VIOS 160i CO <sub>2</sub> Incubator, 165 L	ThermoFisher Scientific, Spojené státy americké
Laminární box	Telstar Bio II Advance Plus	Azbil Telstar, S.L.U., Španělsko
Kompresor	AS-186	Fengda, Čína
Airbrush	BD-180	Fengda, Čína
Optický mikroskop	Olympus CKX53	Olympus, Japonsko
Spektrofotometr	Tecan Spark	Tecan, Švýcarsko
Fluorescenční mikroskop	Axio Observer	Carl Zeiss AG, Německo
Konfokální mikroskop	model Dragonfly 600	Andor Technology, Velká Británie
Trhací stroj	LabTest 6.0051	LaborTech s.r.o., Česká republika

Tab. 6: Použité polymery, PVA značí polyvinylalkohol, PEO je polyethylenoxid a PCL polykaprolakton

Označení polymeru	Molekulová hmotnost (hmotnostně střední molekulová hmotnost, $M_w$ ) [ $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]	Stupeň hydrolyzy PVA [%]	Dodavatel/výrobce
PVA98-125	125 000	98	Merck, Německo
PVA88-80	80 000	88	Merck, Německo
PVA88-67	67 000	88	Merck, Německo
PVA89-130	87 000–130 000	87–89	Merck, Německo
PVA98-85	50 000–85 000	98,0–98,8	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
PVA98-61	61 000	98	Merck, Německo
PVA88-31	31 000	4–88	Merck, Německo
PVA90-70	30 000–70 000	87–90	Merck, Německo
PEO100	100 000	-	Merck, Německo
PEO300	300 000	-	Merck, Německo
PCL	45 000	-	Merck, Německo
Nanocelulóza (celulose nanocrystals, CNC)	-	-	University of Waterloo, Ontario, Kanada

Tab. 7: Použité chemikálie

Chemikálie	Specifikace	Dodavatel/výrobce
Ethanol	absolutní	Penta, Česká republika
Destilovaná voda	-	Oddělení Bioinženýrství, TUL, Česká republika
Ethylacetát (EtOAc)	Čistota min 99,5 %	Carl Roth, Německo
Methylal (DMM)	Čistota min 99,5 %	Carl Roth, Německo
Aceton (Ace)	Pro analýzu	Penta, Česká republika
Dichlormethan (DCM)	čistota 99,5 %	Penta, Česká republika
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	médium bylo obohaceno o 1 % antibiotik a 10 % fetálního bovinního séra	Merck, Německo

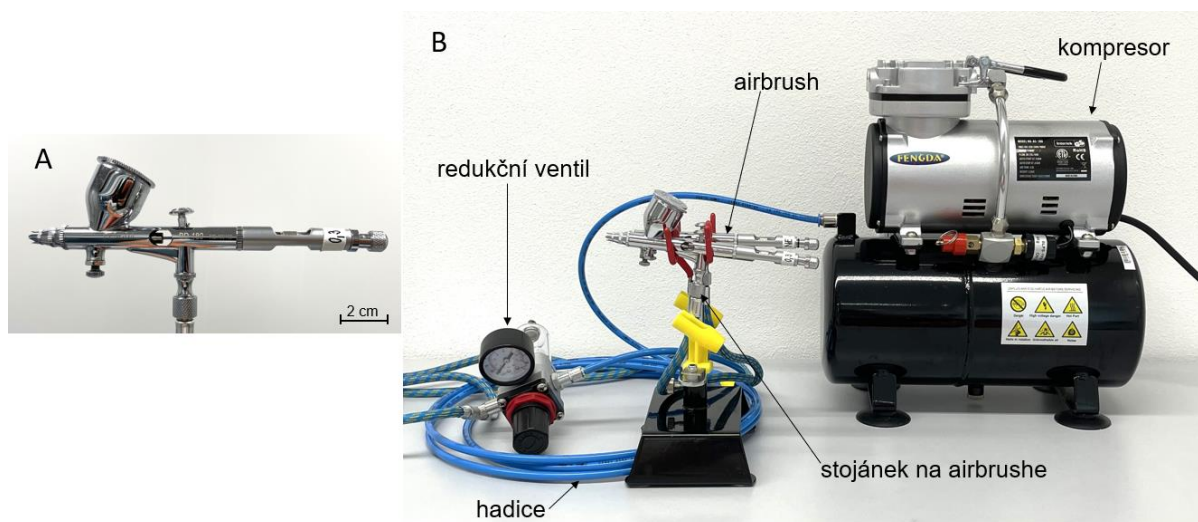
Cell Counting Kit-8 (CCK)	-	Merck, Německo
Fosfátový pufr (PBS)	-	oddělení BioIng, TUL
DiOC	-	Merck, Německo
DAPI	-	Merck, Německo
Bovinní sérový albumin (BSA)	-	Merck, Německo
Phalloidin-FITC	-	Abcam, Velká Británie
Médium pro experiment na AVČR	Médium obsahuje následující složky: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 10% fetální bovinní sérum (FBS)</li> <li>• Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)</li> </ul> základní fibroblastový růstový faktor (bFGF)	Fyziologický ústav, Akademie věd České republiky

## 2.2 Metody

V následujících podkapitolách jsou uvedeny metody a postupy pro měření proudového pole za výstupem airbrushu, přípravu roztoků s benigními rozpouštědly a vodorozpustnými polymery a jejich následné zvlákňování metodou SBS. Dále jsou popsány metody pro testování in vitro vybraných materiálů vyrobených metodou SBS. Na závěr této kapitoly je prezentován postup mechanického testování vybraných nanovlákných vrstev.

### 2.2.1 Zvlákňování metodou solution blow spinning

K zvlákňování pomocí metody SBS pro experimentální část je využíváno zařízení airbrush. Průměr vnitřní trysky airbrushu pro zvlákňování je 0,3 mm. Airbrush je připojen pomocí hadic k redukčnímu ventilu. Ten reguluje výstupní tlak proudu vzduchu. Hodnota tlaku proudu vzduchu pro SBS činí 1,8 bar. Z redukčního ventilu vedou hadice, které propojují celou soustavu s kompresorem. Celá zvlákňovací aparatura je uvedena na Obr. 7. Výběr zařízení i nevhodnějšího průměru trysky atd. byl proveden v rámci řešení bakalářské práce [10].



Obr. 7: Zvlákňovací aparatura pro metodu SBS – (A) zařízení airbrush, (B) celá aparatura pro zvlákňování – airbrush, stojánek na airbrushe, hadice, redukční ventil, kompresor

### 2.2.2 Měření průměru vláken

Zvlákňování rozfukováním polymerního roztoku tedy SBS je prováděno na černý papír nebo kovové sítko pro tvorbu snímatelné vlákenné vrstvy. Vhodně velký vzorek vláken z černého papíru nebo vrstvy ze sítka je pak nalepen oboustrannou lepicí páskou na kovový terčík pro skenovací elektronovou mikroskopii. Vzorek je následně pokryt vrstvou zlata. Proces nanášení zlata trvá 2 minuty a tloušťka výsledné zlaté vrstvy je cca 7 nm. Snímky vláken jsou pořízeny pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM). Průměry vláken jsou měřeny pomocí softwaru ImageJ (Fiji). Přes snímek se zvětšením 3 000× (případně 5 000×) je vedena úhlopříčka. V místě prvního dotyku úhlopříčky s vláknem na snímku je změřen průměr vlákna. Za plnohodnotný statistický soubor dat je považován soubor s minimálně 40 hodnotami. Pro jeden vzorek jsou takto proměřeny průměry vláken na pěti snímcích. Na každém snímku je naměřeno 8–20 hodnot, celkově je tak stanoveno 40–100 hodnot průměru vláken pro jeden vzorek. Dále je vypočtena střední hodnota průměru vláken, směrodatná odchylka (standard deviation, SD) a 95% interval spolehlivosti (IS). Průměry vláken neodpovídají normálnímu rozdělení. SD a 95% IS jsou však určeny dle normálního rozdělení a tyto údaje mají pouze přibližný informační význam.

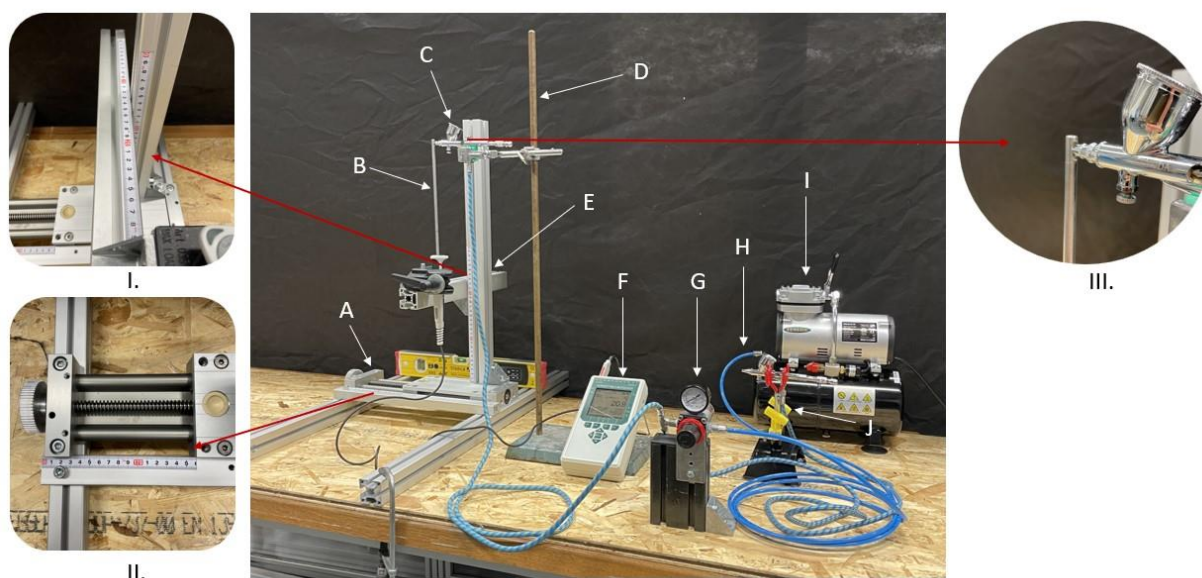
### 2.2.3 Měření rychlosti proudu vzduchu za výstupem airbrushe

Metoda solution blow spinning (SBS) využívá k tvorbě nanovláken stlačeného proudu vzduchu. Ten vstupuje do zařízení airbrush pod nastaveným vstupním tlakem, který je regulován redukčním ventilem. Následně je proud směřován do vnější trysky koaxiálního systému trysek. Zde proudí vzduch o vysoké rychlosti okolo vnitřní trysky, ze které stéká polymerní roztok. Vlivem proudu vzduchu jsou následně z kapky roztoku vytahována vlákna a vynášena ven z airbrushe. Parametry výstupního proudu vzduchu patří mezi procesní parametry zvlákňování metodou SBS a jsou zásadní pro charakterizaci tvorby nanovláken a jejich morfologii. Měření proudového pole za

výstupem z airbushe bylo provedeno ve spolupráci s Ing. Josefem Skřivánkem, Ph.D. (TUL, FS, KTS).

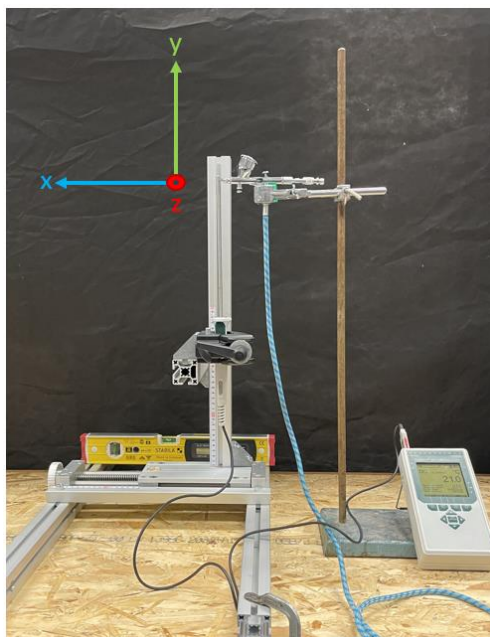
### Měření výstupního proudového pole

Před samotným měřením rychlosti proudu vzduchu za výstupem ze zařízení airbrush, byla sestavena konstrukce pro posun thermoanemometrického čidla v prostoru po zvolených osách souřadného systému. Konstrukce se skládá z pěti částí hliníkových profilů a posuvného stolku. Na horizontální profil bylo upevněno thermoanemometrické čidlo. Na jednotlivé profily byla umístěna měřítka za účelem měření vzdálenosti v prostoru thermoanemometrického čidla od ústí airbushe. Airbrush byl stabilně upevněn do klemy na stojan a připojen přes redukční ventil ke kompresoru. Thermoanemometrické čidlo bylo zapojeno do ručního měřicího přístroje. Kompletní sestavu zařízení pro měření lze vidět na Obr. 8.

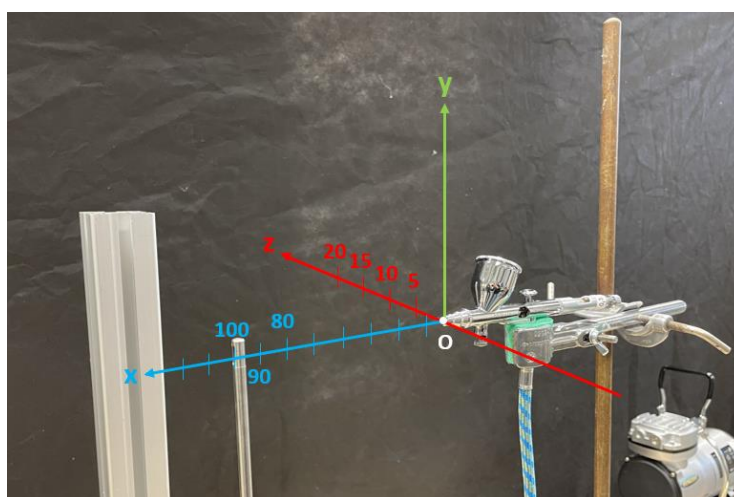


Obr. 8: Soubava pro měření z jednotlivých dílů: (A) pohyblivý stolek, (B) thermoanemometrické čidlo, (C) airbrush, (D) stojan, (E) vertikální a horizontální posuvná část konstrukce, (F) ruční měřicí přístroj, (G) redukční ventil pro regulaci tlaku proudu vzduchu, (H) hadice, (I) kompresor, (J) stojánek s druhým airbrushem. Fotografie na okrajích vlevo a vpravo zobrazují detaily důležitých částí: (I.) pro měření posunu po ose y a z byla na konstrukci nalepena měřítka, (II.) pohyblivý stolek, pro posun na ose x bylo konstrukci nalepeno měřítka (III.) detail sondy a výstupu airbushe.

Dále byly zvoleny souřadný systém v prostoru (viz Obr. 9), jehož počátek O byl umístěn ke koncovému ústí trysky airbushe. Dále byly zvoleny osy x, y a z, které jsou navzájem kolmé. Osa x je pomyslně v prostoru umístěná rovnoběžně s imaginárním prodloužením jehly airbushe. Airbrush uchycený v klemě na stojanu měl během měření neměnnou stabilní pozici. Pohyblivým prvkem bylo thermoanemometrické čidlo upevněné na hliníkovém profilu. K posunu ve směru osy x bylo použito pohyblivého stolku. Souřadný systém a jednotlivé kroky posunu čidla jsou naznačeny na Obr. 10.



Obr. 9: Stanovení souřadného systému v prostoru pro zaznamenávání hodnot rychlosti proudu vzduchu



Obr. 10: Osy posunů thermoanemometrického čidla

Nejprve byl spuštěn kompresor a pomocí regulačního ventilu byl nastaven vstupní tlak proudu vzduchu do airbrushu na hodnotu 2 bar. Po několika zkušebních měřeních bylo zjištěno, že se kompresor přehřívá. To je při dlouhodobém měření nežádoucí kvůli možné poruše kompresoru. Proto byl kompresor ze soustavy měření odpojen a přívodová hadice proudu vzduchu z kompresoru byla přepojena do sítě stlačeného vzduchu. Tato hadice byla poté napojena na regulační ventil.

Zkoumaná oblast proudového pole byla vytyčena ve směru osy x od 80 mm do 280 mm a osy z od -35 mm do 35 mm. Oblast tak odpovídá koncové pracovní vzdálenosti zvláknování metodou SBS, která činí 100–250 mm, a části oblasti proudového pole před a za pracovní vzdáleností. Thermoanemometrické čidlo bylo uvedeno do výchozí pozice (80; 0; 0) pro měření v souřadnicovém systému. Čidlo bylo následně posunováno z výchozí pozice na pozici  $(80 + n \cdot t_1; 0; 0)$ , kde  $t_1$  představuje krok posunutí ve směru osy x o velikosti 10 mm a n je přirozené číslo. Hodnota rychlosti proudu vzduchu byla

vždy změřena po posunutí v daném místě a čidlo bylo dále posunuto opět o parametr  $t_1$  až do hodnoty 280 mm. Po naměření hodnot ve výchozí pozici, bylo thermoanemometrické čidlo posunuto na ose z do nové pozice o souřadnicích (80; 0; 5). Měření bylo opakováno jako v předešlém případě, kdy byly měřeny hodnoty ve směru osy x s krokem 10 mm. Tento postup byl zopakován pro všechny pozice na ose x od 80 do 280 mm a ose z od 0 do 35 mm, kde krok posunutí po ose z činil 5 mm.

#### 2.2.4 Solution blow spinning roztoků s benigními rozpouštědly

V bakalářské práci [10] je uveden roztok 8% PCL v DCM jako jeden z nejvhodnějších roztoků z celé škály připravených roztoků ke zvláknování a zároveň se zdá jako nejvíce cytocompatibilní. Dle FDA [20] je DCM klasifikován v Třídě 2, což značí jeho omezené používání ve farmacii. S ohledem na potenciální medicínské použití metody SBS je nutné zvolit optimální náhradu toxického DCM mezi benigními rozpouštědly.

Za použití benigních rozpouštědel – DMM, EtOAc a Ace byly připraveny roztoky polykaprolaktonu (PCL,  $M_w = 45\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) o různých koncentracích. Připravené roztoky PCL v benigních rozpouštědlech jsou sepsány v Tab. 8.

Tab. 8: Seznam připravených roztoků PCL s benigními rozpouštědly

Koncentrace PCL [wt %]	Rozpouštědlový systém
8	DMM
10	DMM
12	DMM
14	DMM
16	DMM
20	DMM
25	DMM
30	DMM
14	DMM/Ace
10	EtOAc
14	EtOAc
16	EtOAc
10	Ace

Pomocí výpočtu rozpustnosti PCL v uvedených rozpouštědlech van Krevelenovou metodou bylo zjištěno, že DMM není dokonalé rozpouštědlo pro PCL. Roztoky s DMM nebyly pro jeho nízký bod varu (b.v. 42,30 °C) zahřívány a byly pouze ponechány míchat po dobu 72 hod. Po uplynutém čase byly roztoky stále nehomogenní – v rozpouštědle se nacházely viditelné kusy polymeru o přibližné velikosti jednoho mm. Aby nedocházelo k ucpávání trysky kusy polymeru, byly roztoky s DMM přefiltrovány přes spunbond. Polymerní roztoky PCL v DMM o hmotnostní koncentraci 25 % a 30 % byly příliš viskózní a nebylo možné je přes spunbond přefiltrovat, proto nebyly dále zvláknovány. Roztoky s DMM byly po filtraci zvlákněny metodou SBS.



EtOAc je dle výpočtů rozpustnosti van Krevelenovou metodou blíže středu sféry rozpustnosti polymeru, a je tedy považován za lepší rozpouštědlo pro PCL než DMM. Ace se svou polohou oproti sféře nachází ve vnějším prostoru, je tedy špatným rozpouštědlem. Při pokojové teplotě se PCL v těchto kapalinách nerozpouští. Roztoky s EtOAc (b.v. 77,10 °C) a Ace (b.v. 56,08 °C) byly pro zlepšení rozpouštění zahřívány pod jejich body varu. Roztoky PCL v EtOAc byly míchány za stálého zahřívání ve vodní lázni při teplotě 50 °C po dobu 4 hod. Roztok PCL v Ace byl za stálého zahřívání ve vodní lázni při teplotě 40 °C po dobu 4 hod. Roztoky PCL v EtOAc a Ace byly po vychladnutí zvlákněny airbrushem.

## 2.2.5 Solution blow spinning vodorozpustných polymerů

Pro přípravu roztoků vodorozpustných polymerů o různých hmotnostních procentech ( $w_t$ ) byly použity granule polyvinylalkoholu (PVA) s různými molekulovými hmotnostmi a stupni hydrolyzy (konverze). PVA jsou označeny ve formátu PVAX-Y, kde X značí příslušný stupeň hydrolyzy a Y molekulovou hmotnost. Jako příměs sušiny polymeru byl použit prášek polyethylenoxidu (PEO) o molekulové hmotnosti  $100\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  a  $300\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . PEO je označeno ve stylu PEOY, kde Y značí příslušnou molekulovou hmotnost. Jako rozpouštědlový systém byla použita směs demineralizované vody (W) a ethanolu (EtOH) o hmotnostních poměrech W/EtOH (8 : 2), (7 : 3), (6 : 4) a (5 : 5). Příslušné hmotnosti sušiny polymerů a rozpouštědel byly odváženy na digitálních vahách. Jednotlivé roztoky PVA byly připravovány ve vodní lázni při 80 °C po dobu 24 hod na magnetickém míchadle (300–350 rpm) nebo bez vodní lázně při 80 °C po dobu 24 hod. Připravené roztoky jsou uvedeny v Tab. 9. Roztoky byly poté zvlákněny metodou SBS s nastavenými parametry zvláknění, které jsou uvedeny v kapitole 2.2.1.

Tab. 9: Seznam připravených roztoků PVA

Označení roztoku	Hmotnostní procenta ( $w_t$ ) [%]	Polymer (směs polymerů)	Rozpouštědlový systém	Způsob přípravy
A	4	PVA98-125	W/EtOH (8 : 2)	Bez vodní lázně, 80 °C, 24 hod
B	8	PVA98-85	W/EtOH (8 : 2)	Bez vodní lázně, 80 °C, 24 hod
C	8	PVA98-61	W/EtOH (8 : 2)	Bez vodní lázně, 80 °C, 24 hod
D	10	PVA90-70	W/EtOH (6 : 4)	Vodní lázeň, 80 °C, 24 hod
E	6	PVA89-130	W/EtOH (8 : 2)	Bez vodní lázně, 80 °C, 24 hod
F	4	PVA88-80	W/EtOH (8 : 2)	Bez vodní lázně, 80 °C, 24 hod
G	6	PVA88-80	W/EtOH (8 : 2)	Bez vodní lázně, 80 °C, 24 hod

H	10	PVA88-80	W/EtOH (8 : 2)	Bez vodní lázně, 80 °C, 24 hod
I	10	PVA88-67	W/EtOH (8 : 2)	Bez vodní lázně, 80 °C, 24 hod
J	10	PVA88-67	W/EtOH (7 : 3)	Bez vodní lázně, 80 °C, 24 hod
K	10	PVA88-67	W/EtOH (6 : 4)	Vodní lázeň, 80 °C, 24 hod
L	20	PVA88-31	W/EtOH (6 : 4)	Vodní lázeň, 80 °C, 24 hod
M	20	PVA88-31	W/EtOH (5 : 5)	Vodní lázeň, 80 °C, 24 hod
N	10	PVA88-67	W/EtOH (7 : 3)	Vodní lázeň, 80 °C, 24 hod
O	10	PVA88-67	W/EtOH (6 : 4)	Vodní lázeň, 80 °C, 24 hod
P	12	PVA88-67	W/EtOH (6 : 4)	Vodní lázeň, 80 °C, 24 hod
Q	10	PVA88-67/PEO100 (49 : 1)	W/EtOH (8 : 2)	Vodní lázeň, 80 °C, 24 hod
R	10	PVA88-67/PEO100 (49 : 1)	W/EtOH (7 : 3)	Vodní lázeň, 80 °C, 24 hod
S	10	PVA88-67/PEO300 (49 : 1)	W/EtOH (8 : 2)	Vodní lázeň, 80 °C, 24 hod
T	17	PVA88-31/PEO100 (49 : 1)	W/EtOH (5 : 5)	Vodní lázeň, 80 °C, 24 hod
U	20	PVA88-31/PEO100 (49 : 1)	W/EtOH (5 : 5)	Vodní lázeň, 80 °C, 24 hod
V	20	PVA88-31/PEO100 (24 : 1)	W/EtOH (5 : 5)	Vodní lázeň, 80 °C, 24 hod

### Sledování vlivu relativní vlhkosti na zvlákňování roztoků polyvinylalkoholu metodou solution blow spinning

Při zvlákňování roztoků PVA se ukázala relativní vlhkost (RH) jako velmi důležitý parametr. Zvlákňovaný roztok při vysokých hodnotách RH (nad 50 %) ulpívá na kolektoru ve formě kapek. Pro pozorování vlivu RH na produktivitu nanovláken metodou SBS byly vybrány roztoky U – 20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (5 : 5) a V – 20% PVA88-31/PEO100 (24 : 1) ve W/EtOH (5 : 5) pro jejich možnou zvláknitelnost při běžných laboratorních podmínkách (cca 40% RH, 25 °C). Tyto roztoky byly poté zvlákněny v komoře zařízení Nanospider™ při 20% RH nejprve na papír a poté na sítko.

Dále byl sledován vliv vlhkosti o hodnotách 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 a 50 % na zvláknování vybraných roztoků P – 12% PVA88-67 ve W/EtOH (6 : 4) a U – 20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (5 : 5). Roztoky byly zvláknovány při daných RH v komoře zařízení Nanospider™.

### **Solution blow spinning roztoků polyvinylalkoholu s malým obsahem ethanolu**

Předpokládanou aplikací nanovláken metodou SBS jsou kryty ran. Do těchto materiálů je v některých případech žádoucí přidávat podpůrné látky hojení. Jednou skupinou těchto látek jsou proteiny, které mohou zajistit lepší adhezi buněk k nanovláknům a celkovou buněčnou proliferaci materiálem. V případě zvláknování vodorozpustných polymerů metodou SBS, které jsou částečně rozpustné v EtOH, je záměrem použít co největší možný podíl EtOH v roztoku pro lepší odpařování rozpouštědlového systému. V laboratorních oddělení Bioinženýrství, TUL bylo experimentálně zjištěno, že při vyšším obsahu EtOH v roztoku s proteiny jak 20 % dochází k denaturaci proteinů. Obsah EtOH v připravených a zvláknitelných roztocích PVA pomocí SBS tuto hodnotu překračuje (obsah EtOH v roztoku je obvykle 50 %). V případě přidání proteinů do takového roztoku PVA pro SBS by vedlo ke ztrátě požadované vlastnosti proteinu pro zlepšení hojení rány. Roztoky PVA s obsahem EtOH pod 50 % jsou obtížně zvláknitelné metodou SBS nebo také vlákna netvoří vůbec při běžných laboratorních podmínkách (30–70% RH, 25 °C), jak bylo zjištěno z předešlých experimentů. Zvláknitelnost roztoku lze ovlivnit změnou RH.

Pro experiment byly vybrány koncentrace polymerů v roztocích PVA s příměsí PEO na základě předešlé zkušenosti, že dané roztoky jsou zvláknitelné. U roztoků byl poté snížen poměr EtOH a ve druhém případě byly polymery rozpuštěny pouze ve W. Připravené roztoky s nízkým podílem EtOH:

- a. 20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (8 : 2),
- b. 20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W

byly zvlákněny v komoře zařízení Nanospider™ při 10, 15, 20 a 25% RH.

### **Solution blow spinning roztoků polyvinylalkoholu s nanocelulózou**

Nanovlákna jsou vhodná i pro funkcionalizaci. Do vláken lze přidat různé částice a ty je možné dále funkcionalizovat. Pro nanovlákna s potenciálním využitím v medicíně je vhodné využívat biokompatibilní a biodegradabilní částice jako je např. nanocelulóza (také nanocelulózové krystaly nebo celulózové nanokrystaly, CNC) [34].

Celkem byly připraveny tři roztoky s různou koncentrací PVA s příměsí PEO a CNC, které byly darovány z Univerzity ve Waterloo (Ontario, Kanada). Procentuální zastoupení CNC v roztoku představuje hmotnostní množství z původní hmotnosti sušiny. Procentuální zastoupení směsi PVA a PEO odpovídá  $w_t$  % z roztoku bez přidaných CNC. Roztoky byly připravovány ve vodní lázni o teplotě 80 °C za stálého míchání po dobu 24 hod.

- I. 5% CNC 10% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (5 : 5)
- II. 5% CNC 15% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (5 : 5)
- III. 5% CNC 20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (5 : 5)

Následně byly roztoky zvlákněny při 22,2 °C a 14,0% RH.

## 2.2.6 Test cytotoxicity metody solution blow spinning přímým kontaktem

Na základě předešlých testů cytotoxicity výluhem materiálů vyrobených SBS byl v bakalářské práci [10] vybrán k testování cytotoxicity aplikace nanovláken in situ roztok 8% PCL v DCM. Nanovláknenný materiál z tohoto roztoku vykazoval viabilitu buněk 124 %. Je tak dle výše uvedené normy brán za netoxický. Pro testování byl dále vybrán materiál 16% PCL v chloroformu a ethanolu (CF/EtOH) (8:2) vyrobeného metodou ES na zařízení Nanospider™, jehož biokompatibilita a netoxické chování bylo již dříve sledováno a byl shledán vhodným materiálem pro aplikace v medicíně. Tento materiál slouží pro porovnání materiálu vyrobeným SBS z hlediska cytotoxicity. Je tak možné diskutovat, zda metoda SBS pro in situ aplikace nanovláken je vhodná pro medicínské účely. Oba materiály byly testovány po dobu tří dnů. Testování cytotoxicity metody SBS přímým kontaktem bylo provedeno a vyhodnoceno na základě normy ČSN EN ISO 10993-5 (855220). Experiment byl proveden ve spolupráci s Ing. Šárkou Hauzerovou (TUL, FP, KCH, oddělení Bioinženýrství).

Pro experiment byly nejprve vysterilizovány pomocí ethylenoxidu potřebné komponenty:

- airbrush,
- přívodové hadice,
- stojánek na airbrush,
- regulátor tlaku proudu vzduchu,
- odvážené množství polymeru pro přípravu roztoku na zvlákňování,
- množství kontrolního nanovláknenného materiálu z 16% PCL v chloroformu a ethanolu (CF/EtOH) (8:2)

dle normy ČSN EN ISO 11135-1 (855252). Sterilizace probíhala celkem 12 hod při pokojové teplotě. Po ukončení sterilizace byla zařízení a polymer ponechána odvětrávat po dobu 14 dnů ve sterilních obalech. Kompresor byl sterilizován v laminárním boxu 57 min pod UV zářením. Spunbond v dřevěném rámu pro zakrývání byl sterilizován v laminárním boxu UV zářením po dobu 40 min.

### 1. testovací den

Pro testování cytotoxicity in situ aplikace nanovláken byla zvolena buněčná linie 3T3-NIH myších fibroblastů (pasáž 17, P17). Do třech 6jamkových mikrotitračních destiček byly nasazeny buňky o koncentraci  $2,6 \cdot 10^5$ /jamku ve 3 ml kompletního kultivačního média Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). V každé mikrotitrační destičce byla ponechána jedna jamka s čistým DMEM bez obsahu buněk. Tato jamka slouží jako negativní kontrola (negative control, NC) k určení, zda materiál nemění svou strukturu v samotném DMEM a následně nevhodně neinteraguje s testem metabolické aktivity. Buněčná suspenze v jamkách byla následně zkontrolována pod optickým mikroskopem a poté byly kultivační destičky vloženy do CO<sub>2</sub> inkubátoru na 24 hod.

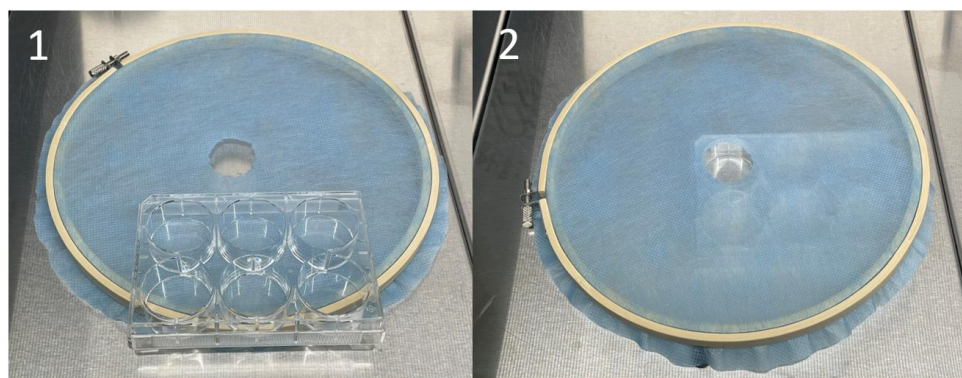
Dále byl připraven roztok 8% PCL v DCM. Vysterilizované granule PCL byly přidány do nádoby s víčkem k potřebnému množství DCM. Roztok byl míchán v laminárním boxu na magnetickém míchadle při 200 rpm po dobu 20 hod.

## 2. testovací den

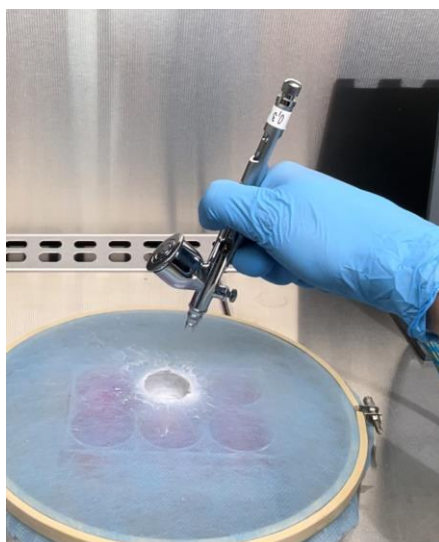
Po uplynutí 24 hod byly buňky adherované na dně jamek opět zkontrolovány pod optickým mikroskopem. Uprostřed dna jamek byla konfluence buněk vyšší jak 70 %. Tím byla překročena optimální míra pokrytí jamky buňkami. Později by mohlo během testování docházet i k jejich snížené metabolické aktivitě či úhynu vlivem nedostatečného prostoru kolem nich. Zdá se tedy, že použitá koncentrace buněk  $2,6 \cdot 10^5$ /jamku je příliš vysoká.

Jednotlivé vysterilizované komponenty zvlákňovací soustavy byly dány do laminárního boxu. Následně byla sestavena aparatura na SBS. Do laminárního boxu byly přeneseny tři mikrotitrační destičky s dříve nasazenými buňkami. První mikrotitrační destička byla určena pro zvlákňování in situ SBS, druhá pro negativní kontrolu (materiál vyrobený pomocí ES) a třetí k pozorování samotných buněk bez materiálu.

Podmínky pro zvlákňování v laminárním boxu byly 22,2 °C a 48,8% RH. Z první jamky mikrotitrační destičky bylo odsáto DMEM. Destička byla zakryta spunbondem s otvorem pro jednu jamku upevněným ve dřevěném rámu, aby se vlákna nezachytávala mezi jamkami a nenarušovala růst buněk v jednotlivých jamkách (viz Obr. 11). Poté bylo do jamky zvlákňováno metodou SBS přímo na buňky adherované na dně jamky s využitím zařízení airbrush po dobu 15 s (viz Obr. 12). Jamka byla ihned po zvlákňování doplněna 3 ml DMEM. Tento postup byl zopakován pro dalších pět jamek.

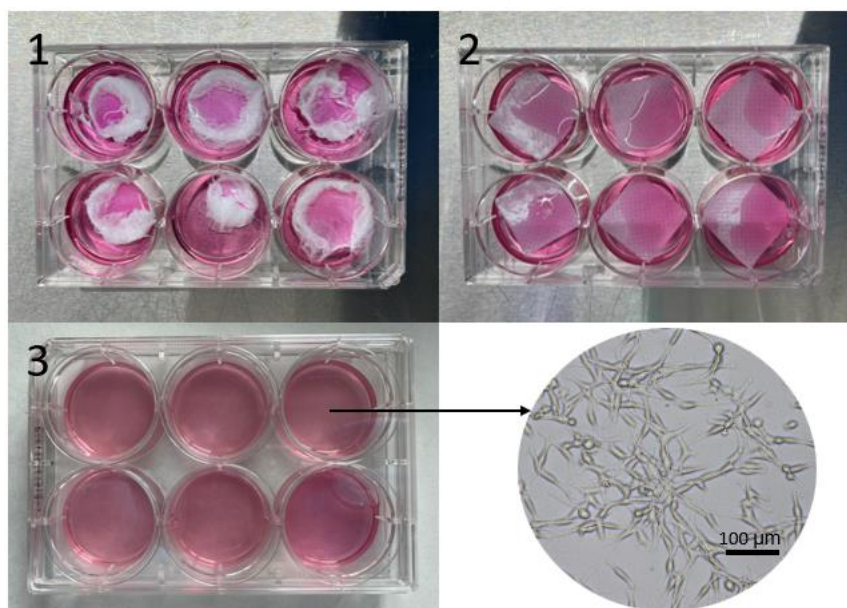


Obr. 11: (1) Spunbond v dřevěném rámu na zakrývání jamek a mikrotitrační destička, (2) zakryté jamky mikrotitrační destičky



Obr. 12: Zvlákňování in situ na buňky. Mikrotitrační destička je zakryta spunbondem v dřevěném rámu. Odkrytá je pouze jamka, do níž je v daný moment zvlákňováno.

Z jamek druhé mikrotitrační destičky bylo odsáto DMEM. Do jamek byl umístěn vzorek materiálu vyrobený metodou ES, který byl následně zalit 3 ml DMEM. Vzorek představuje čtverec materiálu připraveného z 16% PCL v CF/EtOH (8:2) o rozměrech  $2,5 \times 2,5$  cm. Velikost tohoto vzorku byla stanovena na základě podobné plošné hmotnosti ( $24 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ ) s materiálem vyrobeným metodou SBS, který je zvlákňován 15 s. V šesté jamce bylo vyměněno DMEM. Třetí mikrotitrační destička slouží jako kontrola samotných buněk a jejich vývoje během testovacích dnů. V jamkách destičky bylo pouze vyměněno DMEM – médium bylo odsáto a následně byly přidány 3 ml nového DMEM. Všechny mikrotitrační destičky byly vráceny do CO<sub>2</sub> inkubátoru na 24 hod. Na Obr. 13 lze vidět mikrotitrační destičky v nichž probíhá testování cytotoxicity materiálů.



Obr. 13: Mikrotitrační destičky, v jejichž jamkách jsou buňky, DMEM a (1) materiál z 8% PCL v DCM vyrobený metodou SBS aplikovaný in situ na buňky, (2) materiál z 16% PCL v CF/EtOH (8 : 2). Mikrotitrační destička (3) obsahuje pozitivní kontrolu (pouze buňky s DMEM). V pravém dolním rohu je snímek z optického mikroskopu myších fibroblastů 3T3-NIH v jamce.

### 3. testovací den

Jedním z možných způsobů hodnocení cytotoxicity je stanovení procentuální viability buněk po vystavení buněk materiálu po určitou dobu. V experimentální části byl použit k posouzení viability buněk předem namíchaný kolorimetrický test Cell Counting Kit-8 (CCK). Test cytotoxicity pomocí CCK používá tetrazoliovou sůl, při jejíž redukci vzniká barevný produkt. Při expozici této soli buňkám je barvivo redukováno dehydrogenázami v buňce za vzniku oranžového formazanu. Množství formazanového barviva vzniklého dehydrogenázovou aktivitou je přímo úměrné počtu živých buněk. Následně je pomocí spektrofotometru naměřena absorbance při vlnové délce 450 nm. Na základě těchto hodnot je určena viabilita buněk.

Třetí testovací den byl připraven 10% roztok Cell Counting Kit-8 (CCK) v DMEM, pro sledování metabolické aktivity buněk. Mikrotitrační destičky s buňkami a materiály byly vyndány z CO<sub>2</sub> inkubátoru a následně zkontrolovány pod optickým mikroskopem. Destičky byly následně vloženy do laminárního boxu, kde bylo z jamek odsáto DMEM. Do každé jamky byly pak přidány 3 ml 10% CCK v DMEM. Mikrotitrační destičky byly poté umístěny zpět do CO<sub>2</sub> inkubátoru na dobu 2 hod.

Po uplynutí doby inkubace byly destičky opět vyndány z inkubátoru. Z každé jamky bylo následně odebráno dvakrát 100 µl do 96jamkové destičky. Poté byla změřena absorbance metabolického produktu buněk pomocí spektrofotometru při vlnové délce 450 nm. Z naměřených hodnot absorbance byly vypočítány hodnoty životaschopnosti (viability) buněk na jednotlivých materiálech.

#### **Morfologická analýza buněk pomocí fluorescenční mikroskopie**

Z jamek 6jamkové mikrotitrační destičky byl odsán 10% roztok CCK v DMEM. Obsah jamek byl opláchnut fosfátovým pufrém (PBS). PBS bylo odsáno a do jednotlivých jamek (mimo jamek s negativními kontrolami) bylo přidáno po 3 ml 2,5% roztoku glutaraldehydu v PBS. Roztok glutaraldehydu byl po 15 min odsán. Následovalo opláchnutí jamek pomocí PBS. Do jamek bylo poté přidáno 1,5 ml DiOC na dobu 20 min. Po uplynutí potřebného času pro obarvení buněčné membrány bylo množství DiOC odsáno z jamek a obsah jamek byl dvakrát opláchnut PBS. K buňkám bylo přidáno 1,5 ml DAPI na dobu 10 min pro specifické barvení DNA. DAPI bylo poté odsáto a obsah jamek byl dvakrát opláchnut PBS. Druhý oplach PBS byl v jamkách ponechán. Takto mohly být pozorovány buňky pomocí fluorescenčního mikroskopu.

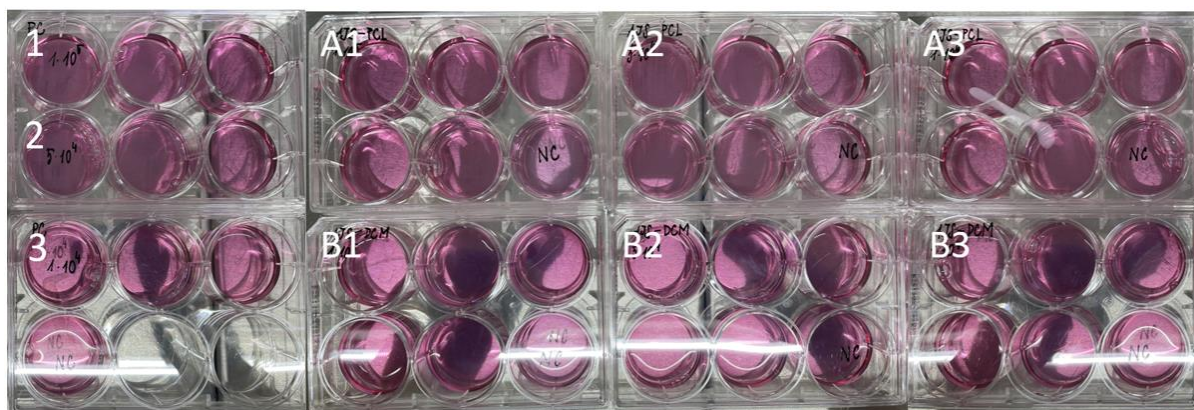
#### **OPTIMALIZACE EXPERIMENTU KONCENTRAČNÍ ŘADOU BUNĚK**

Koncentrace buněk  $2,6 \cdot 10^5$ /jamku se zdá pro experiment příliš vysoká. Experiment bylo nutné optimalizovat z hlediska koncentrace buněk, aby nedocházelo k jejich nadměrnému početnímu růstu. Při nižší koncentraci buněk by nemuselo docházet ke snížení adheze buněk ke dnu jamky mikrotitrační destičky a šlo by zamezit odsátí buněk během výměny DMEM. Dalším krokem je tedy nalézt vhodnou koncentraci buněk na jamku s využitím koncentrační řady. Postup spočívá ve výběru několika různých buněčných koncentrací, které se nasadí do jednotlivých mikrotitračních destiček. Poté je zkoumána cytotoxicita přímým kontaktem materiálu pomocí metabolického testu CCK dle normy ČSN EN ISO 10993-5 (855220).

Optimalizace testování cytotoxicity přímým kontaktem materiálů aplikovaných na buňky probíhala celkem tři dny identickým postupem, jako je uvedeno výše. V rámci jednotlivých testovacích dnů optimalizace byl celý postup testování zopakován, pokud není uvedeno jinak. Dále jsou uvedeny pouze odlišnosti od předešlého testování (zvolené koncentrace buněk apod.). Z hlediska cytotoxicity bylo testováno i čisté rozpouštědlo DCM aplikované na buňky airbrushem, aby byl zjištěn vliv přímého kontaktu tohoto rozpouštědla s buňkami.

## 1. testovací den

Pro optimalizaci byla použita buněčná linie 3T3-NIH myších fibroblastů (P11). Nejprve byly nastaveny tři různé koncentrace buněk o hodnotách:  $1 \cdot 10^5$ /jamku,  $5 \cdot 10^4$ /jamku a  $1 \cdot 10^4$ /jamku. Každá koncentrace buněk byla nasazena do dvou 6jamkových mikrotitračních destiček ve 3 ml DMEM. Jedna destička jedné buněčné koncentrace byla určena pro testování vláken vyrobených metodou SBS a testování samotného rozpouštědla DCM aplikovaného na buňky metodou SBS. V každé mikrotitrační destičce byla ponechána jedna jamka jako negativní kontrola. Pozitivní kontrola pro každou koncentraci byla nasazena do tří jamek dalších dvou 6jamkových mikrotitračních destiček. Mikrotitrační destičky a systém nasazení buněk do nich lze vidět na Obr. 14.



Obr. 14: 6jamkové mikrotitrační destičky s nasazenými buňkami o koncentraci (1)  $1 \cdot 10^5$ /jamku, (2)  $5 \cdot 10^4$ /jamku a (3)  $1 \cdot 10^4$ /jamku. Do mikrotitračních destiček označených (A) s příslušnými buněčnými koncentracemi (1), (2) a (3) bude nasazen materiál z 8% PCL v DCM. Do mikrotitračních destiček označených (B) s příslušnými buněčnými koncentracemi (1), (2) a (3) bude nasazen samotný DCM.

## 2. testovací den

Po uplynutí 24 hod byly mikrotitrační destičky vyndány z  $\text{CO}_2$  inkubátoru. Ve sterilním laminárním boxu bylo ze všech 6 jamek mikrotitrační destičky s koncentrací buněk  $1 \cdot 10^5$ /jamku odsáto DMEM. Mikrotitrační destička byla zakryta spunbondem ve dřevěném rámu s otvorem pro cílovou jamku. Následně byl aplikován DCM vždy do jedné jamky po dobu 15 s. Po aplikaci DCM byly přidány 3 ml nového DMEM na jamku. Pod optickým mikroskopem bylo patrné, že buňky mají kulatý tvar, což může značit jejich negativní reakci na okolní prostředí, a i vést až k buněčné smrti. Předpokladem tedy je, že kromě DCM mohla buňky ovlivnit i delší doba v jamce bez přístupu k DMEM. Pro další mikrotitrační destičky byl proto zvolen postup odsátí DMEM z jedné jamky, následná aplikace zkoumaného materiálu z hlediska cytotoxicity a přidání nového DMEM do jamky.



Tento postup byl zopakován pro mikrotitrační destičky s koncentracemi buněk  $5 \cdot 10^4$ /jamku a  $1 \cdot 10^4$ /jamku a následně i při SBS nanovlákného materiálu.

Pro zvláknění materiálu metodou SBS na buňky byl použit roztok 8% PCL v DCM. Při zvláknění do mikrotitračních destiček byla okolní teplota vzduchu v laminárním boxu 22,6 °C a relativní vlhkost 37,6 %.

V jamkách s pozitivní kontrolou bylo odsáto DMEM a do každé jamky byly přidány 3 ml nového DMEM. Buňky byly poté zkontrolovány pod optickým mikroskopem. Všechny mikrotitrační destičky byly umístěny zpět do CO<sub>2</sub> inkubátoru na 24 hod.

### **3. testovací den**

Nejprve byl připraven 10% roztok CCK v DMEM. Destičky se vzorky byly přeneseny do laminárního boxu, kde bylo z jamek odsáto DMEM. Do každé jamky byly pak přidány 3 ml 10% CCK v DMEM. Mikrotitrační destičky byly umístěny zpět do CO<sub>2</sub> inkubátoru na 2 hod. Poté byl zopakován postup pro evaluaci absorbance při vlnové délce 450 nm a výpočet viability buněk.

### **Pozorování buněk na materiálu fluorescenčním mikroskopem**

Z jamek 6jamkové mikrotitrační destičky byl odsán 10% roztok CCK v DMEM. Obsah jamek byl dvakrát opláchnut PBS. Poté PBS bylo odsáno a do jednotlivých jamek (mimo jamek s negativními kontrolami) bylo přidáno po 3 ml 2,5% roztoku glutaraldehydu v PBS. Roztok glutaraldehydu byl po 15 min odsán. Následovalo dvakrát opláchnutí jamek pomocí PBS. Dále bylo přidáno 1,5 ml bovinního sérového albuminu (BSA) do každé jamky. Jamky byly zality BSA po dobu 5 min. K množství BSA bylo přidáno 1,5 ml Phalloidin-FITC s BSA (1 : 1000). Mikrotitrační destičky byly zakryty alobalem na 30 min. vzorky byly dvakrát opláchnuty v PBS. K buňkám bylo přidáno 1,5 ml DAPI na dobu 10 min pro specifické barvení DNA. DAPI bylo poté odsáto a obsah jamek byl dvakrát opláchnut PBS. Druhý oplach PBS byl v jamkách ponechán. Vzorky s buňkami byly poté prohlédnuty pomocí fluorescenčního mikroskopu.

### **2.2.7 Sledování vlivu in situ aplikace nanovláken na buněčnou kulturu v hydrogelu**

Z předešlých experimentů se jeví, že nanosení nanovláken in situ má negativní vliv na viabilitu buněk. Pravděpodobnou příčinou cytotoxického efektu může být toxické rozpouštědlo a krátkodobé snížení teploty v okolí buněk metodou SBS. Nicméně dle provedených testů cytotoxicity přímým kontakt se tyto dva faktory neprojevují jako hlavní důvod nízké viability buněk. Dalším negativním vlivem se tedy zdá znemožnění přístupu vyživujícího média k buňkám kvůli přílišné adhezi nanosených vláken na buněčnou kulturu. Tomuto jevu je možné předejít pomocí nasazení buněk do hydrogelu, který zajišťuje výživu pro buňky i v případě překrytí buněk nanovláknem. Experiment vlivu přímého nanosení nanovlákné vrstvy na buňky v hydrogelu metodou SBS byl proveden ve spolupráci s Mgr. Elenou Filovou, Ph.D. v laboratořích Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky (FGÚ, AV ČR). První experiment byl proveden 1. 12. 2023. Druhý experiment pro opakování výsledků a zkoumání vlivu roztoku s benigním rozpouštědlem proběhl 15. 3. 2024.

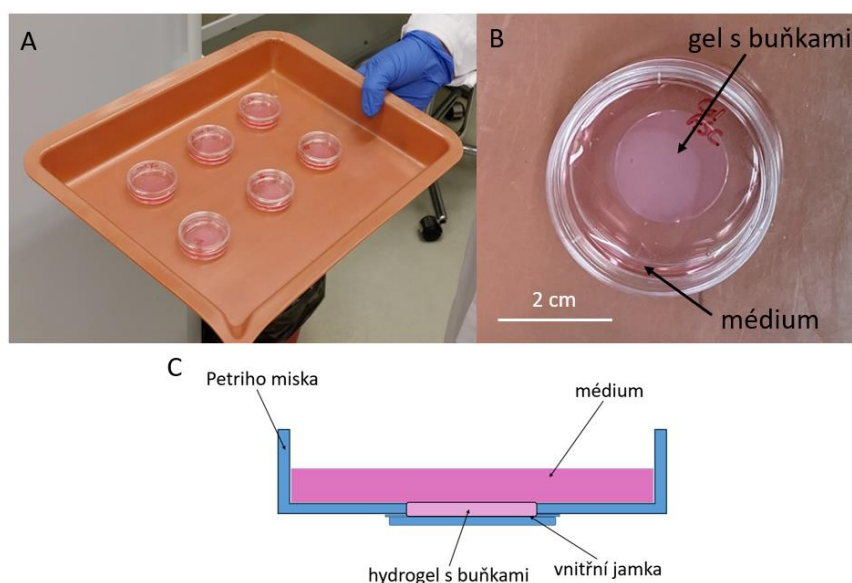
## EXPERIMENT 1. 12. 2023

Aparatura s airbrushem určená pro zvlákňování SBS (uvedena v kapitole 2.2.1, viz Obr. 7) byla rozložena na jednotlivé komponenty. Jednotlivé součástky byly umístěny do obalů určených pro sterilizaci. Pro experiment byly vysterylizovány součástky SBS na oddělení Bioinženýrství (TUL) aparatury a potřebná množství polymeru pro přípravu roztoků:

- airbrush,
- přívodové hadice,
- stojánek na airbrush,
- kulatý dřevěný rám,
- spunbond,
- regulační ventil tlaku výstupního proudu vzduchu a
- 8 g polykaprolaktonu (PCL)

ethylenoxidem dle normy ČSN EN ISO 11135-1 (855252). Sterilizace probíhala celkem 12 hod při pokojové teplotě. Předměty pak byly ponechány 14 dnů odvětrávat ve sterilních obalech. Kompresor byl osvětlen UV zářením po celkovou dobu 40min a umístěn do sterilního igelitového pytle. Sterilní roztok 8% PCL v DCM byl připraven 24 hod před začátkem experimentu. V laminárním boxu bylo odváženo potřebné množství DCM. To bylo poté přidáno k patřičným množství polymerů. Nádobka se směsí byla ponechána na magnetickém míchadle při 330 rpm.

Na FGÚ, AV ČR byly připraveny kolagenové hydrogely s buněčnou kulturou lidských tukových mezenchymálních stromálních buněk (ASC). Celkem bylo připraveno šest hydrogelů po 300  $\mu$ l do Petriho misek s vnitřní skleněnou miskou (viz Obr. 15). Petriho misky s hydrogely s buňkami byly poté ponechány v CO<sub>2</sub> inkubátoru do druhého dne. Výška hydrogelu ve vnitřní jamce činí cca 2 mm. Vrstva hydrogelu je u okraje skleněné misky mírně vyšší než v jejím středu.

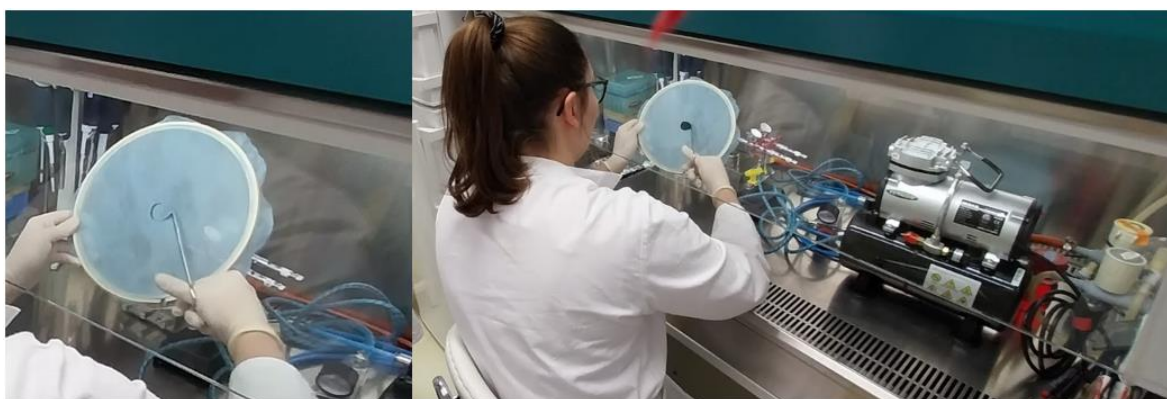


Obr. 15: (A) Devět (plus jedna) připravených Petriho misek s hydrogely s buňkami na plastovém tácu, (B) detail Petriho misky s hydrogelem s buňkami a médiem, (C) schéma Petriho misky s vnitřní skleněnou miskou

Vysterilizované součástky aparatury a sterilní roztoky pro zvláknění metodou SBS byly převezeny do laboratoří FGÚ. Součástky byly vloženy ve sterilních obalech do laminárního boxu. Poté byla aparatura složena do výsledné podoby. Z CO<sub>2</sub> inkubátoru byly vyndány Petriho misky s hydrogely a buňkami, které byly umístěny do laminárního boxu ke zvláknovací soustavě. Po uložení Petriho misek s hydrogely do laminárního boxu bylo vypnuto osvětlení v boxu pro ochranu přidaného zeleného fluorescenčního barviva k buňkám před ozářením.

Zvláknění metodou SBS bylo prováděno s nastavenými parametry, jak bylo uvedeno v kapitole 2.2.1. Pracovní vzdálenost činila 10 cm. Doba zvláknění roztoku 8% PCL v DCM činila 15 s.

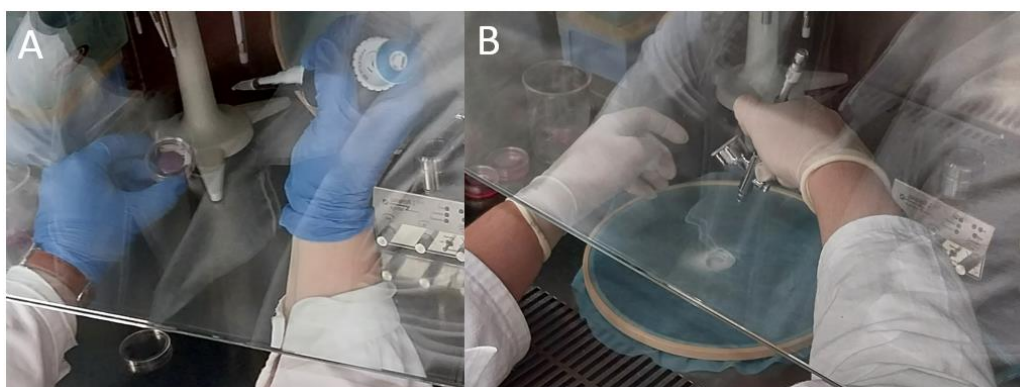
Rezervoár airbrushu byl poté naplněn sterilním roztokem PCL. Následně byl spunbond upnut do dřevěného rámu. V jeho středu byl vystřižen otvor o velikosti hydrogelu pro přesnější cílené zvláknění a vlákna se nezachytávala v okolí hydrogelu (viz Obr. 16).



Obr. 16: Vystřihování otvoru do napnutého spunbondu v dřevěném rámu

### Příprava vzorku 1

Nejprve bylo odsáto médium téměř o celém objemu 2 ml z první Petriho misky. Na misku byl umístěn rám se spunbondem a otvor byl nasměrován nad hydrogel. Poté bylo zvláknováno na hydrogel dle výše uvedených parametrů. Proces lze vidět na Obr. 17.



Obr. 17: (A) Odsátí média, (B) zvláknování in situ metodou SBS

Zachycené okraje výsledná nanovláknenné vrstvy na spunbondu byly odstříhány tak, aby zůstal jen příslušný vzorek nanovláken na hydrogelu s buňkami v Petriho misce, jak je

uvedeno na Obr. 18. Vzorek byl zalit 2 ml nového média (viz Obr. 19), přiklopen víčkem a vložen zpět do inkubátoru.



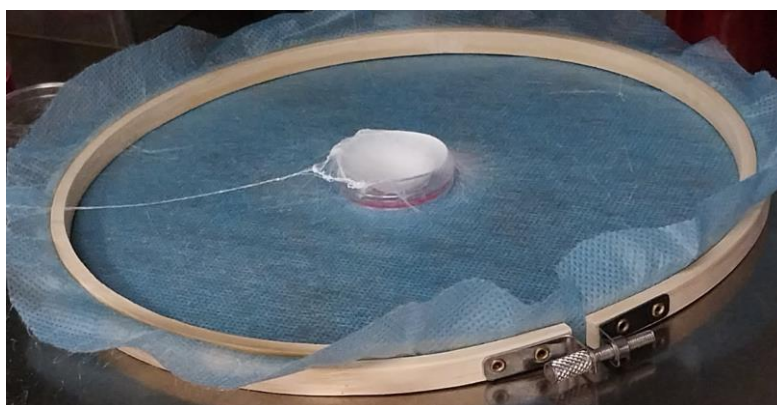
Obr. 18: Odstrhávání nanovláknenného vzorku ze spunbondu



Obr. 19: Zalití vzorku 2 ml média (vlevo), výsledný vláknenný vzorek s hydrogelem zalitý médiem (vpravo)

## Příprava vzorku 2

Z Petriho misky s gelem s buňkami bylo odebráno médium o celém objemu. Následně byla miska umístěna na vypnutý spunbond v rámu. Na celou vnitřní plochu Petriho misky byla nanášena nanovláknena metodou SBS. Nanovláknenná vrstva byla oddělena od vnitřního okraje misky sterilními nůžkami a sterilní pinzetou, tak aby vlákna ležela na povrchu hydrogelu s buňkami a zároveň nevisela na okrajích misky. Vzorek byl opět zalit 2 ml nového média. Miska byla zakryta víčkem a vložena zpět do inkubátoru. Výsledky přípravy vzorku 2 je možné vidět na Obr. 20 a Obr. 21.



Obr. 20: Vzorek 2 bezprostředně po zvláknění

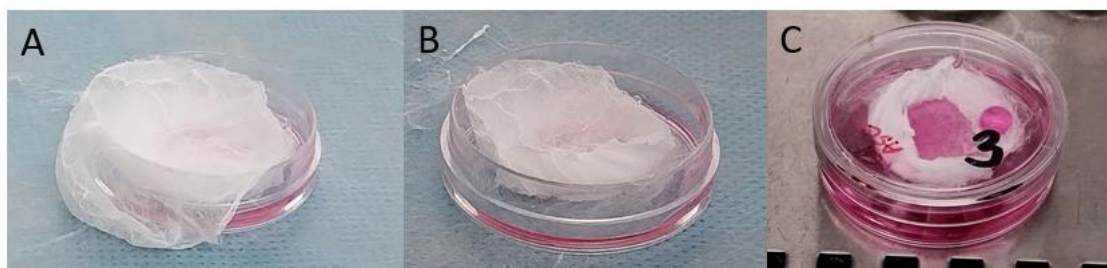


Obr. 21: (A) Ostříhnutý vláknenný vzorek, (B) zalitý vzorek médiem, (C) výsledný vzorek 2

### Příprava vzorku 3

Před přípravou vzorku 3 bylo zjištěno, že polymerní roztok vyschl v difuzéru airbrushe při delší časové prodlevě mezi přípravami vzorků. Vzduch tedy nemohl proudit okolo trysky. Difuzér byl vyčištěn a nasazen na tělo druhého airbrushe. Při výměně airbrushe došlo k posunutí jehly v trysce. Jehla byla více vysunutá než v předešlých případech. To může mít vliv na mírnou změnu průměru nanovláken.

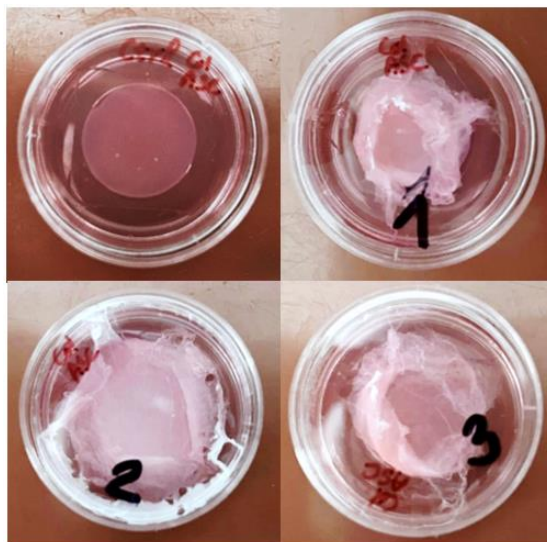
Z Petriho misky bylo opět odebráno médium. Vzorek byl umístěn na spunbond v dřevěném rámu. Vlákna byla do Petriho misky nanášena stejným způsobem jako v případě přípravy vzorku 2. Následně byla nanovláknina oddělena od okraje misky na vnitřní straně nůžkami a zbytek nanovláken přesahující okraj misky byl odstraněn. Ke vzorku nanovláken byly nanášeny 2 ml média. Dále byl vzorek zakryt víčkem a Petriho miska byla umístěna do inkubátoru. Průběh přípravy vzorku 3 je zachycen na Obr. 22.



Obr. 22: (A) Vlákenná vrstva v Petriho misce bezprostředně po zvláknění, (B) ostříhnutá vláknenná vrstva od okraje, (C) výsledný vzorek 3 zalitý médiem

### Doplnění média ke vzorkům

Vzorky nanovláken nebyly stále po několika hodinách smočeny. Okraje vláknenných vrstev byly proto mírně přitlačeny do média pomocí sterilní pinzety. Dále byl celkový objem média doplněn na 4 ml. Vzorky byly po 48 hodinách zkontrolovány. Vlákenné materiály již vykazovaly smočení médiem (Obr. 23).



Obr. 23: Snímek kontrolní Petriho misky s hydrogelem s buňkami (horní levý roh) a Petriho misky s materiály a hydrogely po 48 hodinách (3. testovací den)

### Fluorescenční mikroskopie

Čtvrtý testovací den byly buňky v hydrogelech zafixovány 4% paraformaldehydem a poté obarveny roztokem DAPI v PBS (1 : 2 000) pro fluorescenční mikroskopii. Následně byly vzorky pozorovány pomocí konfokálního mikroskopu. Vyhodnocení hustoty buněk v daném objemu bylo provedeno pomocí software Imaris a Excel.

### EXPERIMENT 15. 3. 2024

Pro tento experiment byly zvoleny dva roztoky – 8% PCL v DCM a 14% PCL v EtOAc. Roztok s benigním rozpouštědlem EtOAc byl vybrán z důvodu porovnání vůči DCM. Aparatura pro zvláknění a potřebná množství polymeru byla vysterilizována stejným způsobem jako pro experiment 1. 12. 2023. Roztoky byly připraveny 24 hod před začátkem experimentu. Roztok 8% PCL v DCM byl připraven stejným způsobem jako v předešlém případě, 14% PCL v EtOAc byl po dobu 5 hod zahříván při teplotě 50 °C a míchá po celou dobu přípravy při 330 rpm.

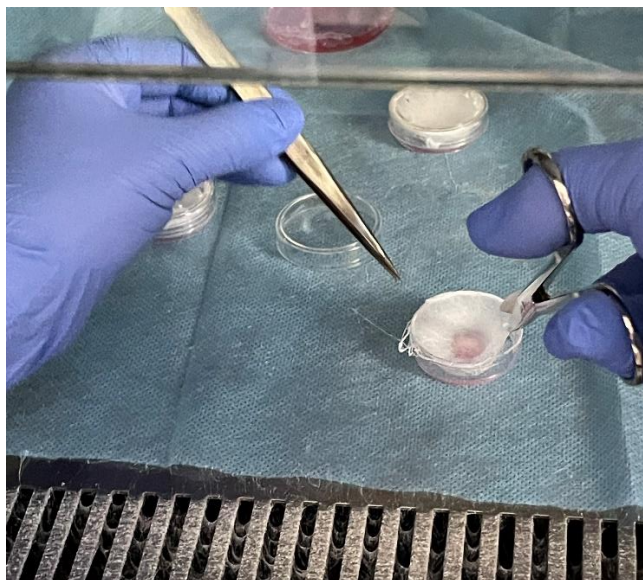
Na FGÚ, AV ČR byly připraveny kolagenové hydrogely s buněčnou kulturou ASC. Celkem bylo připraveno devět hydrogelů po 300 µl do Petriho misek s vnitřní skleněnou miskou. Petriho misky s hydrogely s buňkami byly poté ponechány v CO<sub>2</sub> inkubátoru do druhého dne.

Parametry zvláknění byly zachovány. Doba zvláknění se lišila pro oba roztoky, kdy 8% PCL v DCM byl zvlákněn po dobu 15 s a 14% PCL v EtOAc po dobu 30 s.

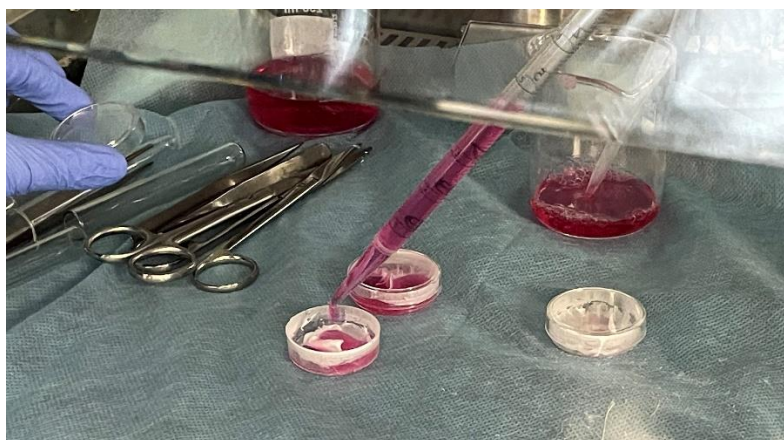
### Příprava vzorků s 8% PCL v DCM

Nejprve bylo odsáto médium téměř o celém objemu 2 ml ze tří Petriho misek. Do tří čtvrtin rezervoáru airbrushu byl nalit roztok 8% PCL v DCM. Poté byl roztok zvlákněn metodou SBS s využitím zařízení airbrush. Vlákna byla přímo aplikována na hydrogely s buňkami.

Výsledná nanovláknenná vrstva byla po okrajích Petriho misky odstříhána tak, aby zůstal jen příslušný vzorek nanovláken na hydrogelu s buňkami v Petriho misce (viz Obr. 24). Každý ze tří vzorků byl zalit 3 ml nového média (viz Obr. 25), přiklopen víčkem, očíslován a vložen zpět do inkubátoru.



Obr. 24: Ostřívání okrajů nanovláknenné vrstvy od okraje Petriho misky



Obr. 25: Doplnování 3 ml média ke vzorku s nanovláknennou vrstvou a hydrogelem s buňkami

#### **Příprava vzorků s 14% PCL v EtOAc**

Po přípravě vzorků z 8% PCL v DCM byly připraveny vzorky s vlákny z 14% PCL v DCM. Ze tří Petriho misek s hydrogely obsahující buňky bylo odebráno médium o objemu 2 ml. Rezervoár airbushe byl naplněn do tří čtvrtin celkového objemu roztokem 14% PCL v EtOAc. Na vnitřní plochu Petriho misky byla nanosená nanovláknenná vrstva metodou SBS vyrobená z roztoku 14% PCL v EtOAc. Nanovláknenná vrstva byla oddělena od vnitřního okraje misky sterilními nůžkami tak, aby vlákna ležela na povrchu hydrogelu s buňkami a zároveň nevisela na okrajích misky. Jednotlivé vzorky byly opět zality 3 ml nového média. Miska byla zakryta víčkem, očíslována a vložena zpět do inkubátoru.

## Příprava buněčných kontrol a vyhodnocení vzorků

Jako buněčné kontroly byly vzaty další tři Petriho misky s hydrogely obsahující ASC. Z Petriho misek bylo odebráno veškeré médium, 2 ml z každé misky. Dále bylo do misek doplněno nové médium o objemu 3 ml. Vyhodnocení hustoty buněk jednotlivých vzorků bylo provedeno dle postupu z experimentu provedeného 1. 12. 2023.

### 2.2.8 Měření mechanických vlastností vybraných materiálů

Pro efektivní použitelnost nanovlákněných vrstev nejen v medicíně je stěžejní znát jejich mechanické vlastnosti. Při stanovování mechanických vlastností je třeba počítat s vysokou porézností materiálu, celkovou pružností a deformovatelností materiálu, které velmi ovlivňují spolehlivost výsledků [35]. Jedním z podceňovaných parametrů pro vyhodnocení výsledků tahových zkoušek je také tloušťka vrstvy [35]. Ta hraje velkou roli při porovnávání nanovlákněných materiálů a jejich vlastností. Celkové stanovení mechanických vlastností nanovlákněných vrstev lze tedy považovat za komplexní úlohu. Měření mechanických vlastností vybraných nanovlákněných materiálů bylo provedeno ve spolupráci s Ing. Jaroslavem Mikule (TUL, FP, KCH, oddělení Bioinženýrství).

Pro měření mechanických vlastností byly připraveny nanovlákněné vrstvy metodou SBS a ES. Na výrobu vrstev byl použit roztok 8% PCL v DCM jakožto vybraný materiál dle bakalářské práce [10] a předešlého biologického testování in vitro. Pro srovnání mechanických vlastností materiálů vytvořených metodou SBS byly připraveny vrstvy o dvou různých plošných hmotnostech. Pro výrobu bylo využito zařízení airbrush. Jako kolektor byl využit tyl vypnutý v dřevěném rámu (viz Obr. 26). Okolní teplota při zvlákňování metodou SBS byla 21 °C a relativní vlhkost 23,8 %. První typ vrstvy byl zvlákňován s využitím airbrushe po dobu 1 min. Plošná hmotnost této vrstvy činila 17 g/m<sup>2</sup>. Druhý typ vrstvy byl zvlákňován 1,5 min. Plošná hmotnost druhého typu vrstvy odpovídala 20 g/m<sup>2</sup>.



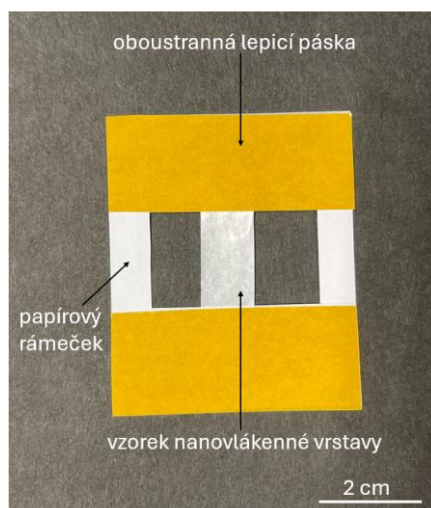
Obr. 26: Kolektor pro nanovlákněné vrstvy vyrobené metodou SBS a aplikovaná nanovlákněná vrstva z roztoku 8% PCL v DCM



Pro porovnání mechanických vlastností materiálu vyrobených metodou SBS a materiálu vyrobeného běžně užívanou metodu zvlákňování byla vybrána nanovláknenná vrstva o plošné hmotnosti 21 g/m<sup>2</sup> vyrobená pomocí ES. Vrstva byla vyrobena z roztoku 16% PCL v CF/EtOH (8 : 2) na zařízení Nanospider™ při následujících parametrech:

- pojezd hlavy: 1 s,
- vzdálenost elektrod: 200 mm,
- napětí na elektrodách: 40 kV (zvlákňovací elektroda) a -10 kV (kolektor),
- velikost průvlaku: 0,7 mm,
- průtok vzduchu: na vstupu 90 m<sup>3</sup>/h a na výstupu 110 m<sup>3</sup>/h,
- relativní vlhkost: 55 %,
- teplota: 22 °C,
- odtahová podkladového materiálu: 45 mm/min.

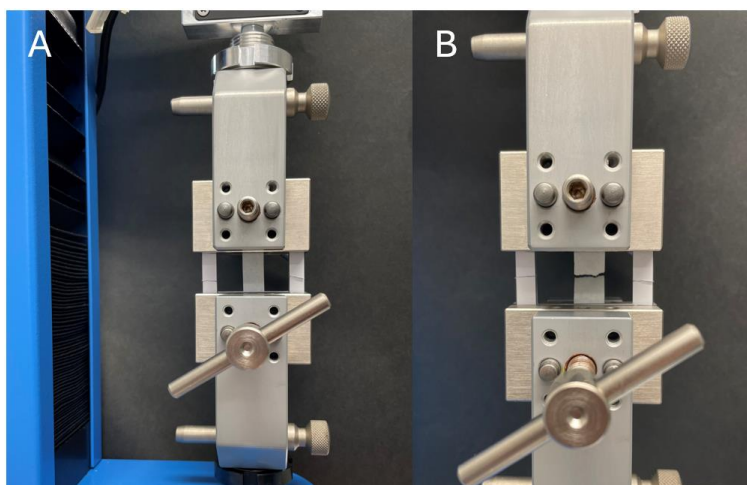
Z vrstev byly připraveny vzorky pro měření mechanických vlastností. Nejprve byly kruhovým řezačem a skalpelem vyříznuty části vrstev do tvaru obdélníku o rozměrech 10 × 50 mm. Tyto obdélníky byly poté vypnuty pomocí oboustranné lepicí pásky do papírových rámečků o vnitřním výřezu 18 × 31 mm (viz Obr. 27).



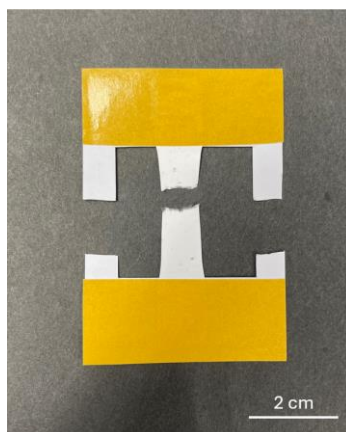
Obr. 27: Nanovláknenný vzorek upevněný v papírovém rámečku pro tahovou zkoušku

Následně byl zapnut trhací stroj se senzorem třídy přesnosti 1 od 0,3 N a třídy přesnosti 0,5 od 0,1 N dle normy EN ISO 7500-1. Pomocí softwaru Test & Motion bylo nastaveno oddělování upínacích hlav o rychlosti 10 mm · min<sup>-1</sup>. Daný vzorek byl nejprve upevněn v dolní upínací hlavě trhacího stroje a poté v horní upínací hlavě. Dále byly přeříznuty strany papírového rámečku kolmo na směr působení tahu při tahové zkoušce. Dopnutý vzorek v upevňovacích hlavách lze vidět na Obr. 28. Následně byl test spuštěn. Tahová zkouška byla ukončena při hodnotě 30% tažnosti materiálu vyrobeného metodou SBS. V případě materiálu vyrobeném pomocí ES byl test ukončen při hodnotě tažnosti 100 %. K přetržení vzorku došlo vždy v daném rozmezí tažnosti. Porušení vzorku při tahové zkoušce lze vidět na Obr. 29. Pro každý materiál bylo takto provedeno celkem 10 měření. Průběh tažnosti vzorku a působící síly byl zaznamenáván do grafu pomocí

softwaru. Na základě měření byly stanoveny z grafů střední hodnoty meze pevnosti pro dané materiály.



Obr. 28: Vzorek v upevňovacích hlavách – (A) před tahovou zkouškou, (B) po tahové zkoušce



Obr. 29: Porušený vzorek nanovláčenného materiálu vyrobeného metodou ES z roztoku 16% PCL v CF/EtOH (8 : 2).

Před zpracováním dat byla naměřena tloušťka jednotlivých materiálů. Nanovláčenné materiály byly podchlazeny v tekutém dusíku. Následně byl proveden řez vrstvou přímo v tekutém dusíku pro zjištění její tloušťky. Část vrstvy s řezem byla nalepena na stojatý terčík pro SEM. Následně byly vrstvy pozlaceny. Poté byly pořízeny snímky pomocí SEM, ze kterých byly následně určeny střední hodnoty tloušťky vrstev. Tloušťka vrstvy společně s plošnou hmotností daného materiálu a tabulkovou hodnotou hustoty PCL byly využity ke stanovení objemové hustoty materiálu.

Pomocí programového prostředí Matlab a tabulkového procesoru Microsoft Excel byla zpracována a vyhodnocena data z tahové zkoušky. Naměřená tahová síla působící na nanovláčenné vrstvy byla normována na příslušnou objemovou hustotu daného materiálu. Hodnoty normované tahové síly byly poté využity k výpočtu normované meze pevnosti.

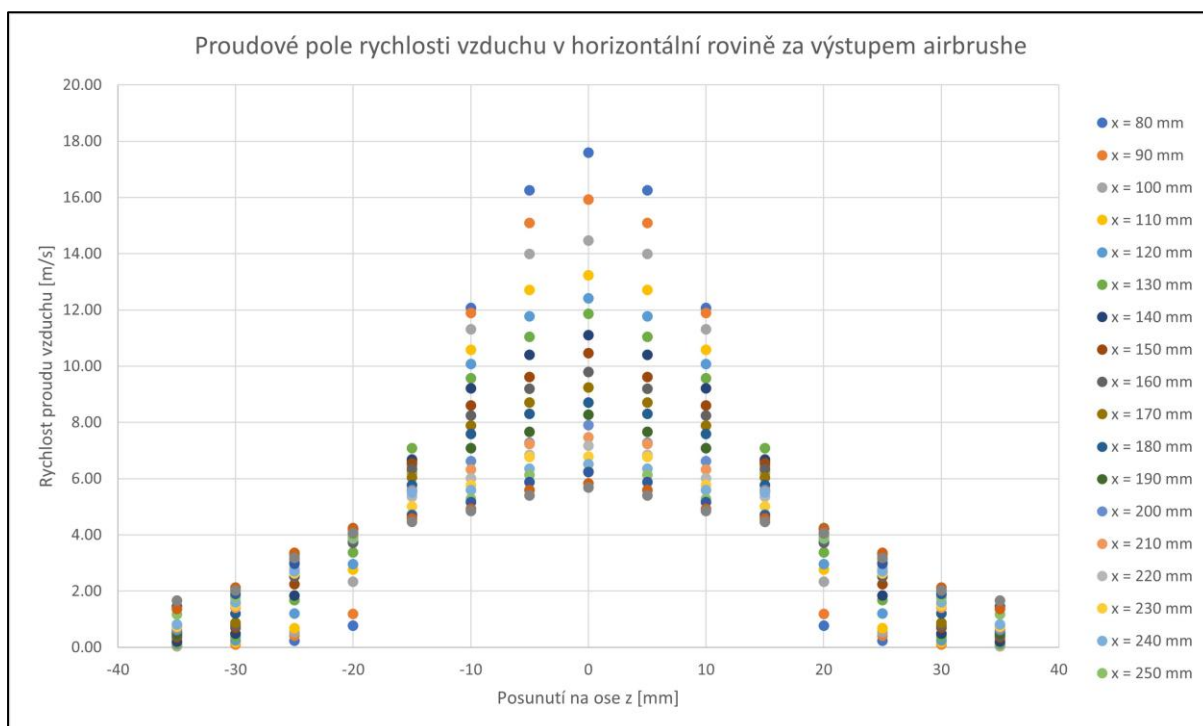
### 3 Výsledky a diskuse

Výsledky jednotlivých experimentů z kapitoly 2 jsou níže diskutovány s případným ohledem na potenciální využití metody SBS v medicíně.

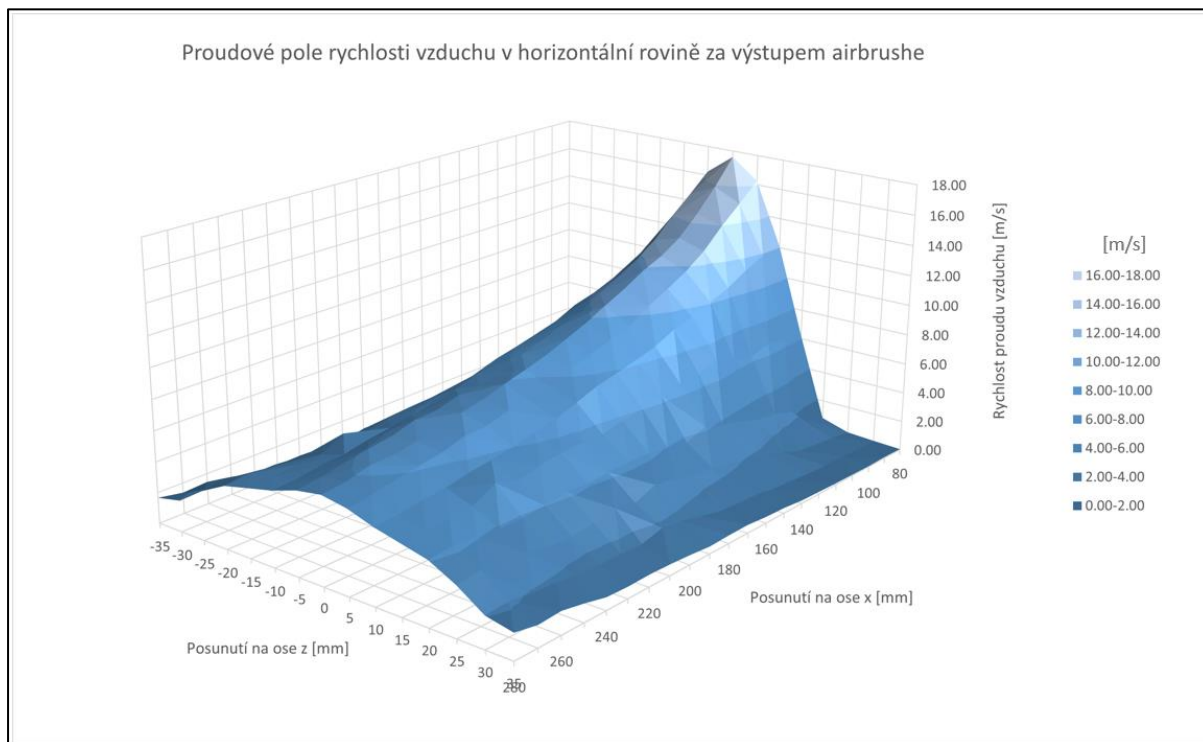
#### 3.1 Zmapování proudového pole za výstupem airbushe

Z naměřených hodnot rychlosti proudu vzduchu v horizontálním směru byl sestrojen spojnicový graf (viz Obr. 30) a prostorový spojnicový graf (viz Obr. 31). Z grafů je zřejmé, že hodnoty rychlosti proudu vzduchu jsou nejvyšší v prostřední části proudu o souřadnicích (80; 0; 0) a ve směru osy z k hranicím zkoumané oblasti tyto hodnoty klesají od polohy (80 + 1 · t<sub>1</sub>; 0; 5) do polohy (80 + 20 · t<sub>1</sub>; 0; 35). Rychlost proudu vzduchu také klesá s narůstající hodnotou posunutí na ose x. Nejvyšší hodnoty rychlosti dosahuje proudu vzduchu na pozici (80; 0; 0) o velikosti 17,59 m · s<sup>-1</sup>. Zde bylo čidlo naměřeno přímo ve směru proudění. Nejnižší hodnota rychlosti 0,04 m · s<sup>-1</sup> byla naměřena v místě o souřadnicích (80; 0; 35) a (100; 0; 35).

Předpokladem je, že proud vzduchu vystupující z airbushe má kónický tvar. Na krajích by tak čidlo mělo být naměřeno tímto směrem. K naměření nejnižších hodnot v pozicích (80; 0; 35) a (100; 0; 35) mohl způsobit směr natočení čidla, jehož vstup byl kolmo na osu z. Tím mohlo dojít k podhodnocení rychlosti proudu v místě měření. Hodnoty rychlosti se v krajních pozicích s rostoucím posunutím na ose x zvyšují. Na tento jev mohlo mít také vliv natočení vstupu čidla, kdy se vzrůstající hodnotou posunutí x se zvyšovala pravděpodobnost vstupu proudu vzduchu do čidla.



Obr. 30: Graf naměřených rychlostí proudu vzduchu vzhledem k stanovenému souřadnicovému systému



Obr. 31: Graf 3D reprezentace naměřených rychlostí proudu vzduchu vzhledem k stanovenému souřadnicovému systému

### 3.2 Solution blow spinning polymerních roztoků s benigními rozpouštědly

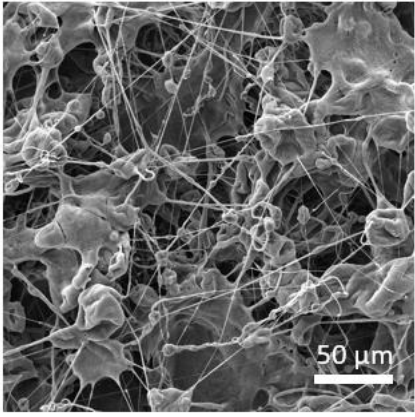
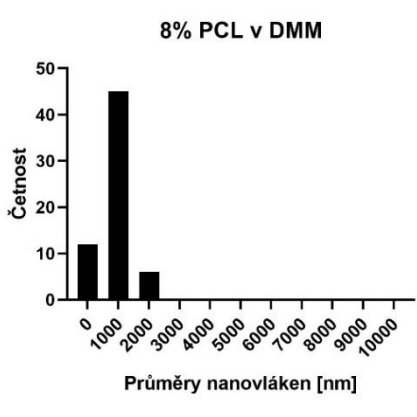
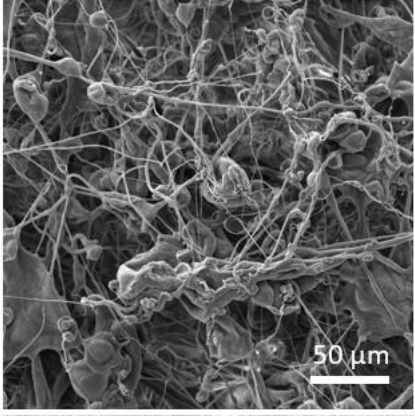
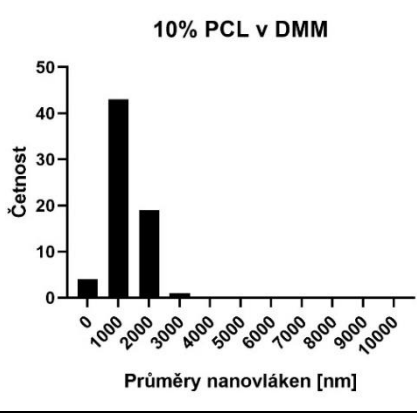
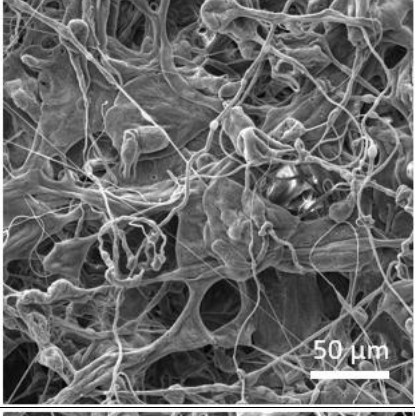
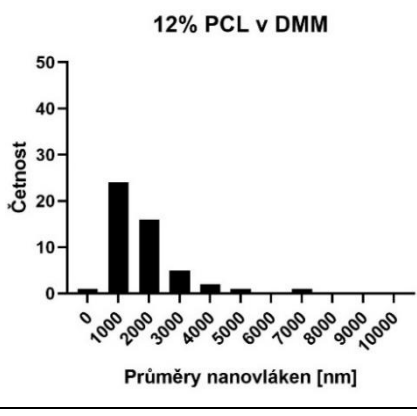
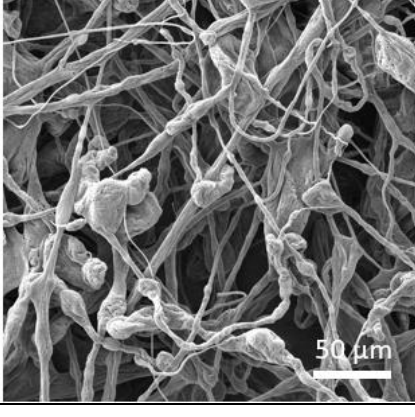
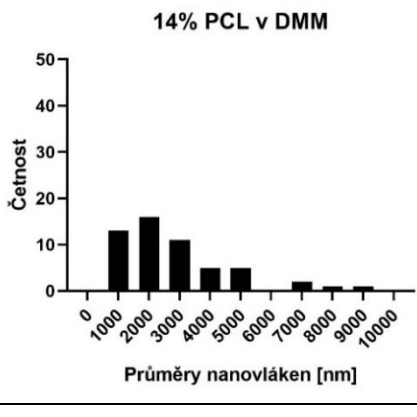
Během zvlákňování bylo pozorováno, že roztoky velmi rychle zasychají na konci vnitřní trysky v airbrushi. Je tak naprosto nutné celý objem roztoku v rezervoáru airbrushu vyzvláknit a ihned trysku airbrushu vyčistit. V opačném případě dochází k ucpání trysky airbrushu a jejímu nevratnému zanesení. Připravené roztoky z benigních rozpouštědel a průběh jejich zvlákňování je zaznamenán v Tab. 10. Snímky vláken a histogramy průměrů nanovláken jsou uvedeny v Tab. 11.

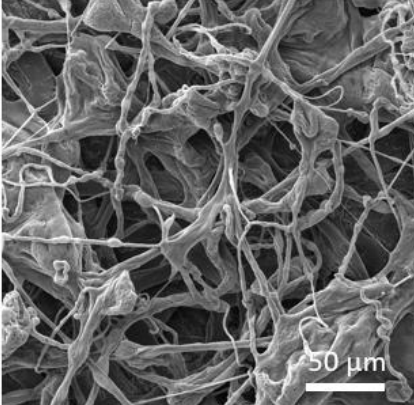
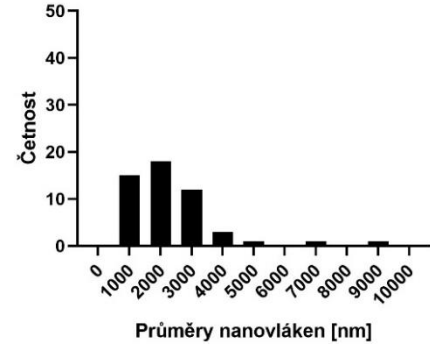
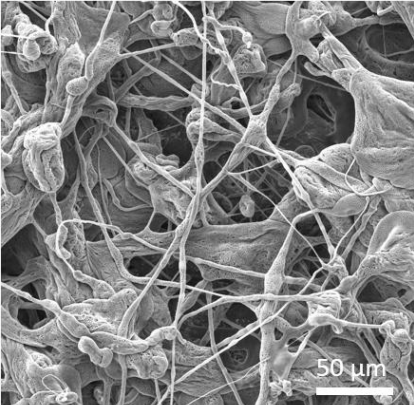
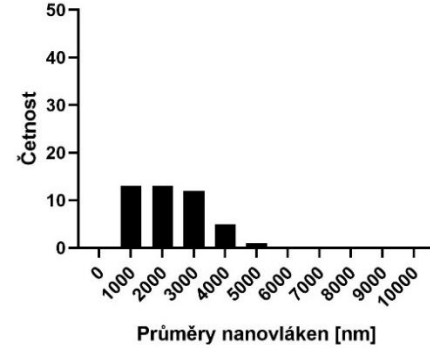
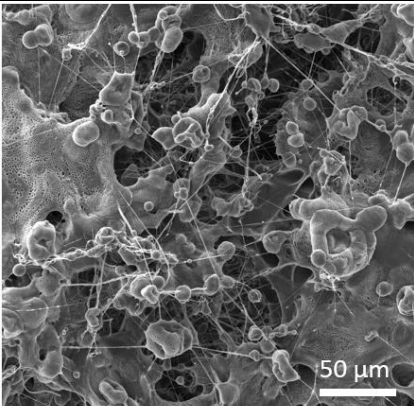
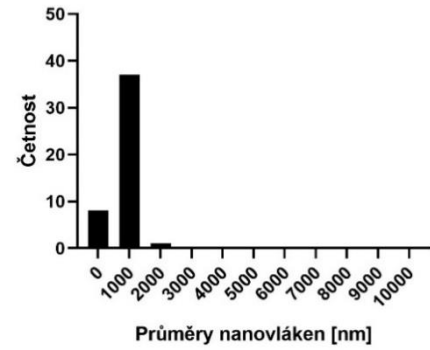
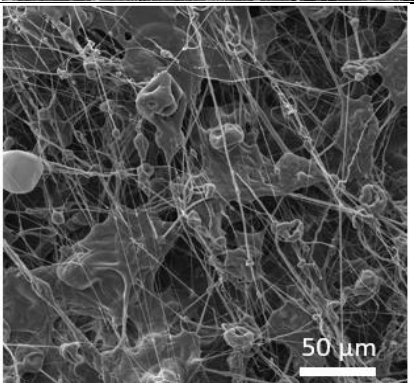
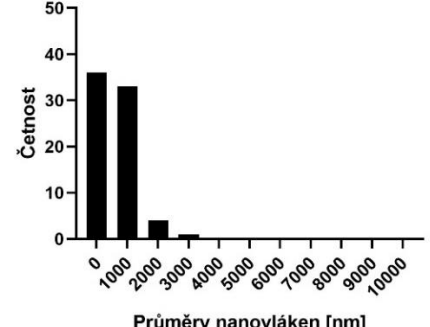
Tab. 10: Výsledek zvlákňování roztoků PCL s benigními rozpouštědly

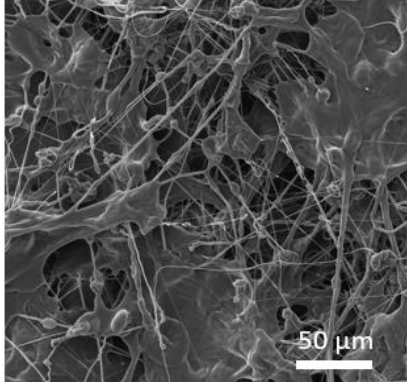
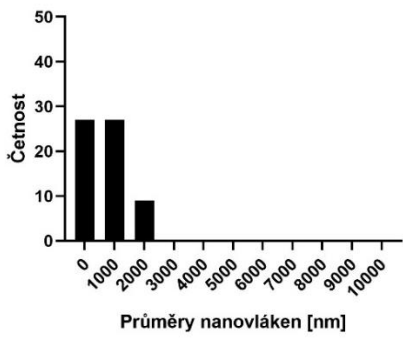
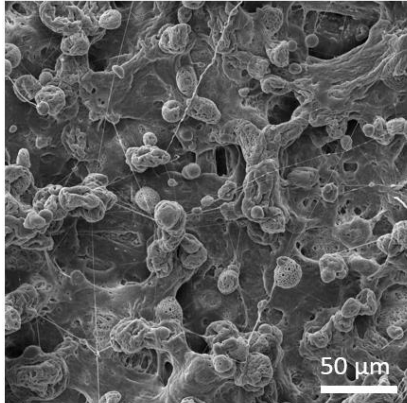
Koncentrace PCL [wt %]	Rozpouštědlový systém	Okolní teplota [°C]	RH [%]	Průběh a výsledek zvlákňování
8	DMM	21,5	44,8	Roztok obtížně zvlákňuje. Tryska se při zvlákňování snadno zanáší. Výsledkem je jednolitá kapkovitá vrstva na papíře, která se tvoří snadno a ihned. Pod optickým mikroskopem jsou vidět ve velké míře defekty. Mezi nimi vlákna.
10	DMM	21,5	44,8	Roztok obtížně zvlákňuje. Tryska se při zvlákňování snadno zanáší. Výsledkem je jednolitá kapkovitá vrstva na papíře, která se tvoří snadno a ihned. Pod optickým mikroskopem jsou vidět ve velké míře defekty. Mezi nimi se vyskytují vlákna více než u 8% roztoku. Při aplikaci roztoku na sítko se

				hromadí hrudkovitá hmota mezi očky. Vlákna se zjevně netvoří.
12	DMM	21,5	44,8	Roztok obtížně zvlákňuje. Tryska se při zvlákňování snadno zanáší. Výsledkem je jednolitá kapkovitá vrstva na papíře, která se tvoří snadno a ihned. Pod optickým mikroskopem jsou vidět ve velké míře defekty. Mezi nimi jsou vlákna méně než u 10% roztoku.
14	DMM	21,5	44,8	Roztok obtížně zvlákňuje. Tryska se při zvlákňování snadno zanáší. Výsledkem je jednolitá kapkovitá vrstva na papíře, která se tvoří snadno a ihned. Pod optickým mikroskopem jsou vidět ve velké míře defekty. Mezi nimi lze vidět vlákna méně než u 10 a 12% roztoku.
16	DMM	21,5	44,8	Roztok obtížně zvlákňuje. Tryska se při zvlákňování snadno zanáší. Výsledkem je jednolitá kapkovitá vrstva na papíře, která se tvoří obtížněji než u předešlých roztoků. Pod optickým mikroskopem jsou vidět ve velké míře defekty. Mezi nimi jsou vlákna podobně jako u 14% roztoku.
20	DMM	21,5	44,8	Roztoky je výrazně viskóznější než předešlé roztoky, má větší tendenci ucpávat trysku. Z trysky vychází roztok velmi obtížně. Pod optickým mikroskopem pouze kapkové defekty.
25	DMM	-	-	Roztok je příliš viskózní. Nebylo možné ho přefiltrovat. Nebyl tedy ani zvlákňován.
30	DMM	-	-	Roztok je příliš viskózní. Nebylo možné ho přefiltrovat. Nebyl tedy ani zvlákňován.
14	DMM/Ace	?	?	Roztok zvlákňuje podobně jako 12% PCL v DMM. Roztok prská v menší míře z trysky. Zvlákňuje s menšími obtížemi než výše uvedené roztoky.
10	EtOAc	22,9	35,6	Roztok zvlákňuje bez obtíží ihned. Rychle se však ucpává ústí trysky. Uprostřed papíru se tvoří bílá kapkovitá vrstva. Na okraji papíru se zachytávají znatelná vlákna. Při zvlákňování na sítko se tvoří velmi tenká vrstva, kde se mezi očky tvoří vlákna.
14	EtOAc	22,5	26,4	Roztok zvlákňuje ihned. Vlákna jsou především viditelná na okrajích papíru. Uprostřed papíru se tvoří bílý útvar. Tryska se během zvlákňování neucpává.
16	EtOAc	22,5	26,4	Roztok zvlákňuje s prodlevou. Tryska se během zvlákňování neucpává. Vrstva se tvoří pomaleji a s obtížemi. Vlákna jsou především viditelná na okrajích papíru. Uprostřed papíru se tvoří bílý útvar.
10	Ace	22,9	35,6	Na papíru se okamžitě tvoří bílá jednolitá vrstva. Při okraji papíru se nachází náznak vláken. Tryska airbrushe se při zvlákňování neucpává. Na sítku se tvoří vrstva pouze na kovových očkách nikoli mezi nimi.

Tab. 11: Snímky a průměry nanovláken s jejich histogramy

	SEM snímky	Průměr vláken ± SD (95% IS) [nm]	Histogramy průměrů vláken
8% PCL v DMM		$877 \pm 414 (104)$	<p>8% PCL v DMM</p> 
10% PCL v DMM		$1217 \pm 542 (132)$	<p>10% PCL v DMM</p> 
12% PCL v DMM		$1878 \pm 1214 (345)$	<p>12% PCL v DMM</p> 
14% PCL v DMM		$2909 \pm 1859 (508)$	<p>14% PCL v DMM</p> 

16% PCL v DMM		2322 ± 11453 (409)	<p style="text-align: center;"><b>16% PCL v DMM</b></p> 
14% PCL v DMM/Ace		2362 ± 1081 (329)	<p style="text-align: center;"><b>14% PCL v DMM/Ace</b></p> 
10% PCL v EtOAc		730 ± 262 (78)	<p style="text-align: center;"><b>10% PCL v EtOAc</b></p> 
14% PCL v EtOAc		644 ± 482 (112)	<p style="text-align: center;"><b>14% PCL v EtOAc</b></p> 

14% PCL v EtOAc		834 ± 575 (145)	<p>16% PCL v EtOAc</p> 
10% PCL v Ace		-	Nelze vyhodnotit pro nízký počet vláken ve vrstvě.

Zvláknitelnost roztoků připravených z DMM se zdá pouhým okem velmi podobná. Ze SEM snímků jsou patrné rozlétlé kapky způsobené zřejmě rychlým vyschnutím rozpouštědla. Při rychlém odpařování rozpouštědla jsou vlákna dloužena po kratší dobu. Z tohoto důvodu mohou být průměry vláken v řádu jednotek mikrometrů nikoliv stovek nanometrů. Z hlediska produktivity vláken z koncentrační řady roztoků s DMM se jeví, že nejvíce vláken bylo vyrobeno z 10% PCL v DMM, a je tedy prozatím označen jako nejvhodnější pro zvláknění z DMM roztoků.

Roztok 10% PCL v Ace jeví možnost zvláknitelnosti, jak je patrné ze SEM snímku v Tab. 11. Zdá se, že viskozita roztoku pro SBS je nízká. Je tedy nutné dále hledat optimální parametry roztoku pro vyšší produkci vláken. Jedním z řešení zvláknitelnosti roztoků PCL v Ace by mohl být vhodný rozpouštědlový systém více rozpouštědel.

Roztok 10% PCL v EtOAc při zvláknění velmi rychle zasychá za ústím trysky a občasně přerušuje samotný proces zvláknění. Na snímcích z SEM jsou patrná vlákna s kapkami. Tento defekt je nejspíše způsoben nízkou koncentrací polymeru v roztoku. Při zvláknění roztoku 14% PCL v DMM/Ace se tryska airbrushu ucpávala minimálně. K tomu zřejmě dochází kvůli zvýšení b.v. roztoku přidáním Ace, a tím zpomalení odpařování rozpouštědla. Výsledná vlákna obsahují defekty a zdají se na povrchu pórovitá. Ze všech roztoků s EtOAc se zdá nejlépe zvláknitelný 14% PCL v EtOAc. Ze SEM snímků je také patrná vyšší produktivita vláken než u předešlých koncentrací. Ve srovnání s produktivitou vláken z roztoků s DMM je produktivita vláken z roztoků s EtOAc také vyšší. Roztok 14% PCL v EtOAc se tedy z hlediska zvláknitelnosti a produktivity jeví jako nejlepší pro metodu SBS z připravené škály roztoků s benigními rozpouštědly.



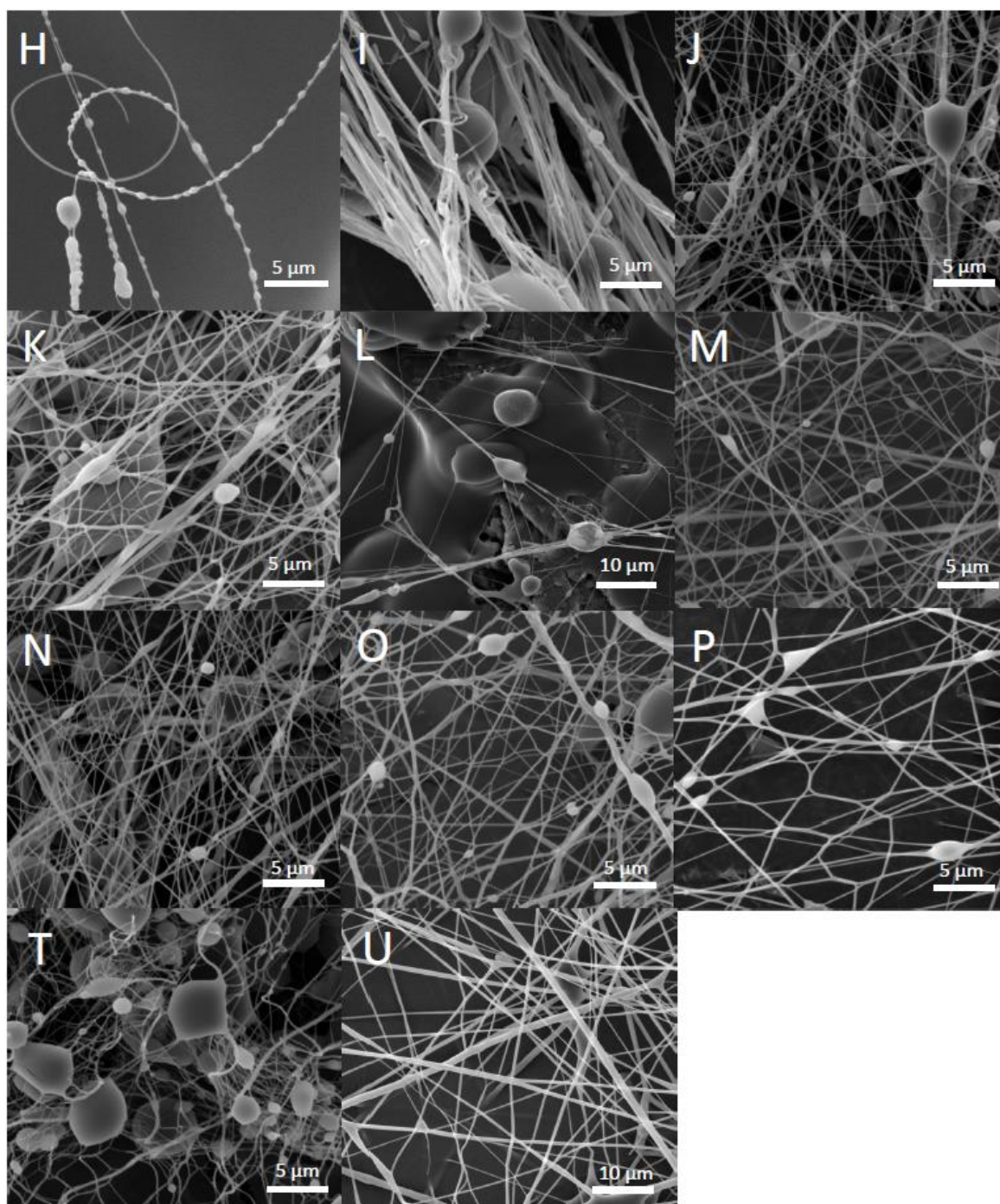
### 3.3 Solution blow spinning roztoků vodorozpustných polymerů

Roztoky uvedené v Tab. 12 byly zvlákňovány v různé dny, tedy byly zvlákňeny při různých relativních vlhkostech (RH) a teplotách. Výsledky zvlákňování metodou SBS PVA roztoků jsou uvedeny v Tab. 12 a na Obr. 32.

Tab. 12: Výsledky zvlákňování roztoků PVA

Označení roztoku	Teplota [°C]	RH [%]	Roztok zvlákňuje	Výsledek zvlákňování
A	21,6	45,8	ne	Kapky
B	22,3	47,6	ne	Kapky
C	22,3	47,6	ne	Kapky, nejspíše je roztok málo viskózní.
D	23,3	53,9	ne	Kapky, nejspíše je roztok málo viskózní, mnoho vody.
E	21,7	43,0	ne	Vlákna lze vidět v malé míře v digestoři.
F	21,7	51,5	ne	Nezvlákňuje, tvoří se pouze hrudky.
G	21,7	51,5	ne	Hojně se vyskytují kapky i s využitím fěnu při zvlákňování, pouhý náznak vláken.
H	21,6	45,8	ne	Kapky
I	21,7	43,0	ano	Jemná vlákna, která se především odráží do digestoře, občasné kapky.
J	22,3	47,6	ano	Vlákna lze vidět v digestoři, na rukavici vrstva, na papíru jsou místy vlákna.
K	23,3	53,9	ano	Vlákna je možné vidět v digestoři.
L	23,3	53,9	ano	Vlákna se tvoří na papíře i ve velké míře v digestoři.
M	?	60,0	ano	Kapky, viditelná vlákna v digestoři i na papíře, na sítku je jemná vrstva.
N	22,6	53,3	ano	Kapky na papíře, okolo vlákna
O	22,6	53,3	ano	Kapky na papíře, okolo vlákna
P	22,8	49,1	ano	Kapky a několik svazků vláken
Q	23,3	53,9	ne	Kapky
R	23,3	53,9	ne	Kapky, pevné hrudky tvoří nejspíše PEO.
S	23,3	53,9	ne	Kapky a bílé hrudky, roztok je zřejmě málo viskózní.

T	22,6	53,3	ano	Vznikají vlákna, na sítku špatně tvoří vrstvu.
U	22,6	37,0	ano	Mnoho vláken, méně kapek, vlákna ve svazcích kolem papíru, tvoří vrstvu na sítku
V	22,7	51,7	ano	Vlákna se vytváří na papíře a lze je vidět i v digestoři.



Obr. 32: Výsledná vlákna z PVA roztoků vytvořená metodou SBS. Označení snímků písmeny odpovídá označení roztoků (viz Tab. 9). Měřítka snímků je 5 μm. Měřítka snímků vláken z roztoků M a U je 10 μm.

### **Vliv rozpouštědel na proces solution blow spinningu**

PVA je vodorozpustný polymer a zároveň je částečně rozpustný i v ethanolu. Voda má vyšší teplotu varu i povrchové napětí než ethanol, což má vliv i na samotné zvlákňování. Díky nižším hodnotám uvedených parametrů, než má voda, se EtOH při procesu SBS snadněji odpařuje a snadněji se tvoří vlákna. Pro zvlákňování by bylo optimální, pokud by roztok měl co největší podíl EtOH (ideálně roven jedné). Z připravených roztoků bylo zjištěno, že největší podíl ethanolu v roztoku může být 50 % z hmotnosti rozpouštědla při 88% stupni hydrolýzy PVA o molekulové hmotnosti  $31\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Množství EtOH v roztoku limituje stupeň hydrolýzy a molekulová hmotnost PVA. S nižším stupněm hydrolýzy a molekulové hmotnosti polymeru dochází k vyšší afinitě k EtOH. V roztoku se polymerní řetězce k sobě a k vodě vážou vodíkovým můstkem v menší míře z důvodu většího počtu acetátové skupiny v polymeru. Řetězce tak nedrží přílišnou silou mezimolekulových vazeb u sebe a mohou se lépe formovat do trysek. Následně vznikají vlákna.

### **Vliv molekulové hmotnosti polyvinylalkoholu a polyethylenoxidu na proces solution blow spinningu**

Při molekulové hmotnosti  $31\,000$ ,  $61\,000$  a  $67\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , které jsou pro zvlákňování relativně nízké, dochází nejspíše stále k dostatečnému zaplétání polymerních řetězců pro tvorbu vláken. Řetězce polymeru při těchto nižších molekulových hmotnostech jsou kratší. Netvoří se příliš mohutné zapleteniny, které by mohly zhoršit orientaci řetězců do podoby trysky. Tvorba trysek a následně vláken je tak snazší při dané rychlosti proudu vzduchu. Roztoky PVA s nižšími molekulovými hmotnostmi ( $31\,000$ ,  $61\,000$  a  $67\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) tedy zvlákňují lépe oproti roztokům z PVA s vyšší molekulovou hmotností ( $70\,000$ ,  $80\,000$ ,  $85\,000$ ,  $125\,000$  a  $130\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

Dalším faktorem přispívajícím k relativně snadné zvlákňovatelnosti roztoku je přídavek PEO. Dlouhé řetězce  $100\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  PEO zřejmě fungují jako pomocný „nosič“ pro polymerní řetězce PVA. Molekulová hmotnost  $300\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  PEO je však pro zvlákňování metodou SBS příliš vysoká. Daný řetězec se může obtížně formovat ve směru trysky kvůli jeho přílišné délce. Pro jeho vytažení do trysky by bylo také zapotřebí mnohem větší třecí síly vyvolané na rozhraní roztoku a proudu vzduchu.

### **Vliv stupně hydrolýzy polyvinylalkoholu na proces solution blow spinningu**

Vliv na zvlákňování má i stupeň hydrolýzy PVA. Při nižším stupni hydrolýzy jsou zastoupeny ve vyšším počtu acetátové skupiny, a tedy se snižuje počet hydroxylových skupin. S nízkým stupněm hydrolýzy se sníží počet vazeb vodíkovým můstkem mezi hydroxylovými skupinami polymerních řetězců. Jednotlivé řetězce nejsou tak pevně vázané k sobě. Trysky a poté vlákna se tvoří poměrně snadno. Zdá se, že roztoky PVA s nižším stupněm hydrolýzy (88 % a níže) zvlákňují lépe než s vyšším stupněm hydrolýzy (98 % a výše).

Při pozorování zvlákňování se jeví, že nejlépe zvlákňují roztoky U – 20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (5 : 5) a V – 20% PVA88-31/PEO100 (24 : 1) ve W/EtOH

(5 : 5), kdy použitá PVA pro přípravu roztoků mají nízkou molekulovou hmotnost i nízký stupeň hydrolyzy.

### Vliv relativní vlhkosti na zvlákňování pomocí solution blow spinningu

Při vysokých hodnotách RH se voda nemůže v dostatečné míře odpařovat ze vzniklé a následně dloužené trysky roztoku. Nedochozí tak k tvorbě vláken. Zvlákňovaný roztok ulpívá na kolektoru ve formě kapek. Z tohoto důvodu nebylo nejspíše možné zvláknit roztoky nad hodnotou RH 60 %, které byly zvláknitelné při hodnotách nižších než 60% RH.

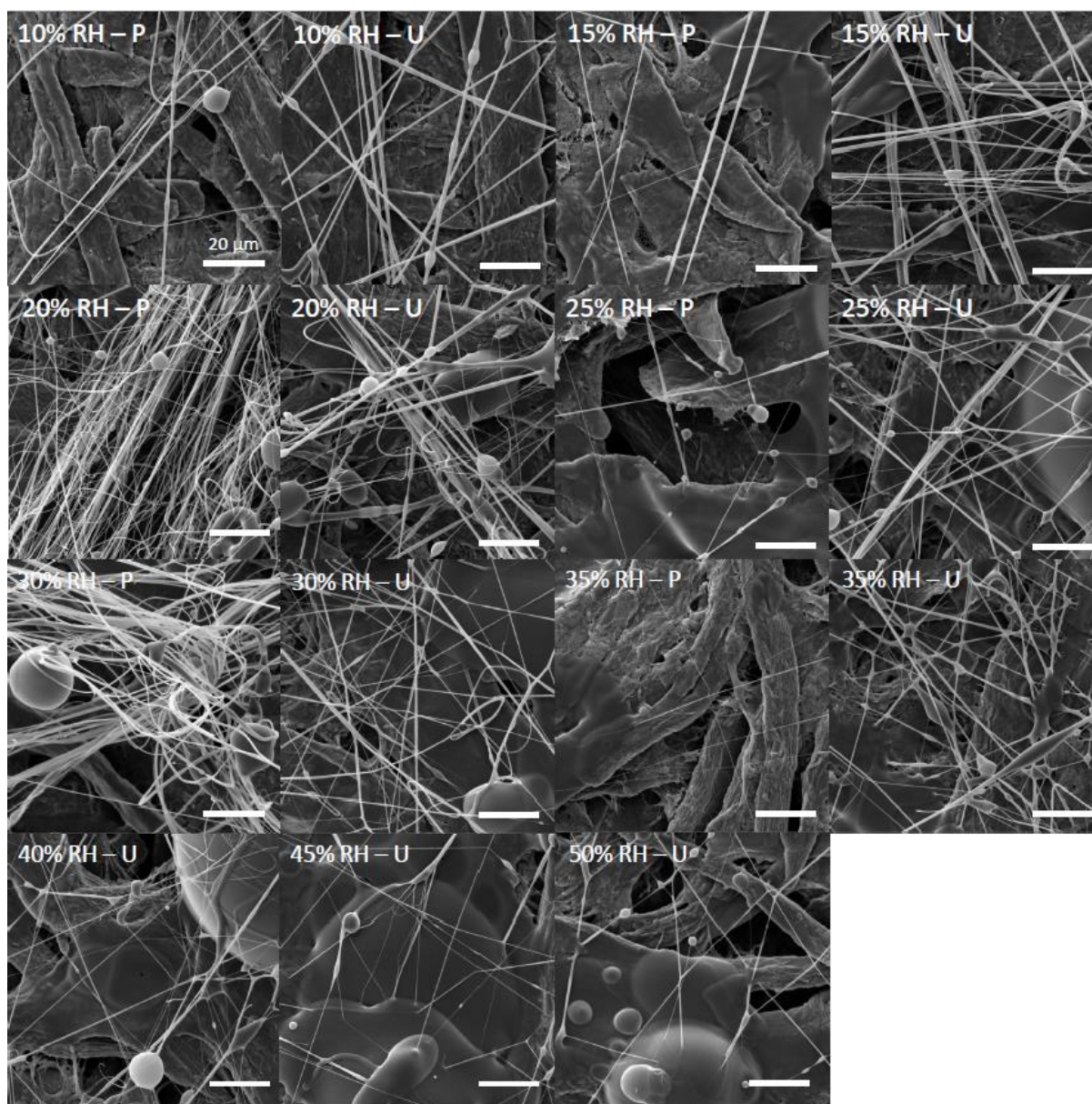
Při sledování zvlákňování roztoků U – 20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (5 : 5) a V – 20% PVA88-31/PEO100 (24 : 1) ve W/EtOH (5 : 5) bylo pozorováno, že dochází k rychlejší tvorbě vláken bez většího počtu kapek roztoku na kolektoru. Produkce vláken v komoře při 20% RH se jeví vyšší než produkce vláken v digestoři při vyšších hodnotách RH. Vzniklá vlákna roztoku U a V při 20% RH byla ponechána v otevřeném prostoru laboratoře po dobu čtyřech dní. Výsledná vlákna se zcela rozpustila nejspíše z důvodu vysoké RH (nad 60 %).

Roztoky P – 12% PVA88-67 ve W/EtOH (6 : 4) a U – 20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (5 : 5) se podařilo při běžných podmínkách v laboratoři zvláknit. Produktivita vláken se však zdála nízká a je tedy třeba zkoumat, při kterých hodnotách RH se produktivita vláken případně zvýší. Výsledky zvlákňování roztoků P a U při různém RH jsou uvedeny v Tab. 13 a na Obr. 33.

Tab. 13: Výsledky zvlákňování metodou SBS roztoků P – 12% PVA88-67 ve W/EtOH (6 : 4) a U – 20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (5 : 5) při různých hodnotách RH

RH [%]	Roztok	Průběh a výsledek zvlákňování	Střední hodnota průměru vláken ± SD [nm]
10	P	Vlákna se převážně odráží od papíru do komory, na papíru zůstávají v malé míře. Vlákna jsou na okrajích papíru, uprostřed se nacházejí kapky roztoku.	615 ± 232
	U	Vlákna se tvoří pomalu a bez kapek roztoku na papíře. Roztok nejspíše zasychá v trysce kvůli nízké vlhkosti a velkému podílu EtOH v roztoku. Po chvíli se vlákna přestala tvořit.	912 ± 412
15	P	Uprostřed papíru se tvoří kapky roztoku, vlákna se odráží do komory.	579 ± 321
	U	Vlákna se tvoří ihned a ve velké míře bez zasychání roztoku v trysce.	748 ± 556
20	P	Vlákna se tvoří v mírně vyšší míře než při předešlých vlhkostech. Vlákna se odráží od papíru, na kterém ulpívají kapky roztoku. Vlákna se vyskytují občasné ve svazcích.	310 ± 112

	U	Vlákna se tvoří ihned a ve velké míře bez zasychání roztoku v trysce.	669 ± 448
25	P	Vlákna se odrážejí od papíru, produktivita klesá. Na papíře se vyskytují kapky roztoku.	408 ± 266
	U	Byla pozorována vysoká produktivita vláken, která se odráží od papíru.	591 ± 286
30	P	Vlákna se odrážejí od papíru, produktivita vláken klesá. Na papíře se vyskytují kapky roztoku. Vlákna se vyskytují občasně ve svazcích.	519 ± 178
	U	Produktivita vláken klesá. Obtížněji se zvláknuje. Na papíře se tvoří bílé smotky.	505 ± 239
35	P	Vlákna téměř nevznikají. Vyrobená vlákna se odrážejí od papíru.	286 ± 119
	U	Zvláknování probíhá pomaleji. Smotky vláken jsou větší než při 30% RH.	499 ± 300
40	P	Vlákna, vzniklá v malé míře, se odrážejí od papíru.	-
	U	Vlákna se spíše odráží do komory. Na papíře zůstávají	367 ± 181
45	P	Vlákna se netvoří. Na papíře jsou pouze kapky roztoku.	-
	U	Produktivita vláken stále klesá, na papíře se vyskytují smotky vláken.	335 ± 137
50	P	Vlákna se netvoří.	-
	U	Téměř žádná vlákna.	344 ± 159



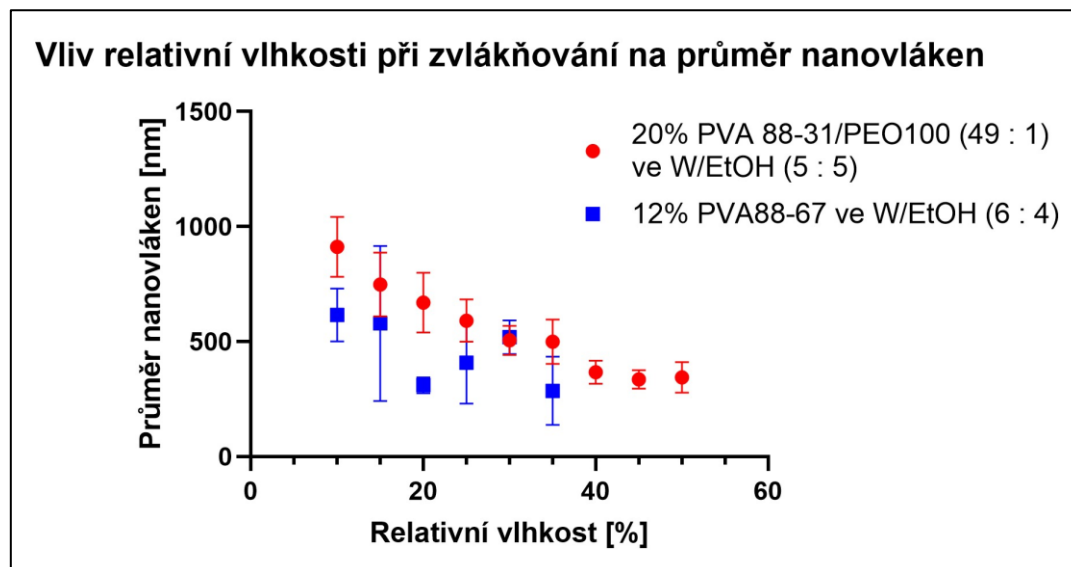
Obr. 33: SEM snímky nanovláken z roztoku P – 12% PVA88-67 ve W/EtOH (6 : 4) a U – 20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (5 : 5) vzniklých při různých RH. Měřítka všech snímků je 20  $\mu\text{m}$ .

Oba roztoky bylo možné zvláknit v rozmezí 10 až 35% RH. Roztok P – 12% PVA88-67 ve W/EtOH (6 : 4) při RH vyšší než 35 % netvořil vlákna. Na kolektoru zůstávaly pouze kapky. Stalo se tak nejspíše z důvodu vysokého obsahu vody v roztoku, kdy vyšší RH se již voda neodpařovala dostatečně při procesu SBS. Vlákna z roztoku P v rozmezí 10 až 35 % RH vznikala v malé míře. Počet naměřených hodnot průměrů nanovláken byl při některých RH nižší než 40 hodnot. Statisticky se tedy nejedná o významný soubor dat, a nelze tak určit přesný trend závislosti průměru nanovláken na RH (viz Obr. 34).

Roztok U – 20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (5 : 5) bylo možné zvláknit i nad hodnotu 35% RH. Roztok U obsahuje větší množství EtOH oproti P. Roztok U má tak nižší povrchové napětí a EtOH se snadněji odpařuje než voda díky nižšímu bodu varu. Při vyšších hodnotách RH se tedy snadněji tvoří vlákna než u roztoku P. Počet naměřených hodnot průměrů nanovláken vzniklých při dané RH přesahuje ve většině případů počet

40 hodnot. Jedná se tedy o statisticky významný soubor dat a lze vyhodnotit trend závislosti průměrů nanovláken (Obr. 34).

U vodorozpustných polymerů, jako je PVA, se při nízké RH voda z roztoku rychle vypaří a vzniklá tryska v letu vyschne. Vlákno z trysky se tak dále nemůže dloužit. Vlivem vysoké RH se směs vody a ethanolu z roztoku vypařují obtížněji, vlákno příliš rychle nevyschne a může se dále dloužit. Průměry vláken se tedy budou snižovat se zvyšující se RH. Tomuto trendu odpovídají naměřené průměry nanovláken vytvořených metodou SBS. Daná závislost průměrů nanovláken hydrofilních polymerů na RH je popsána v literatuře pro ES [36, 37].



Obr. 34: Vliv RH při zvlákňování na průměr nanovláken, chybové úsečky představují 95% interval spolehlivosti.

### 3.3.1 Solution blow spinning roztoků polyvinylalkoholu s nízkým obsahem ethanolu

Průběh a výsledky zvlákňování roztoků s malým obsahem alkoholu a – 20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (8 : 2) a b – 20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W jsou zaznamenány v Tab. 14. V Tab. 15 lze pak vidět snímky výsledných nanovláken a histogramy jejich průměrů.

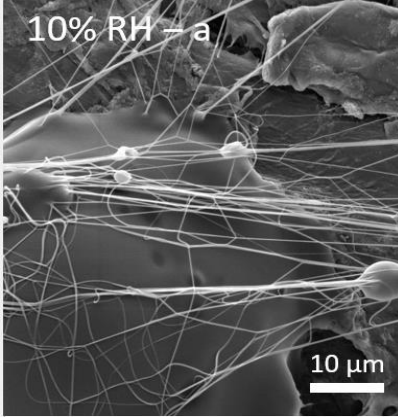
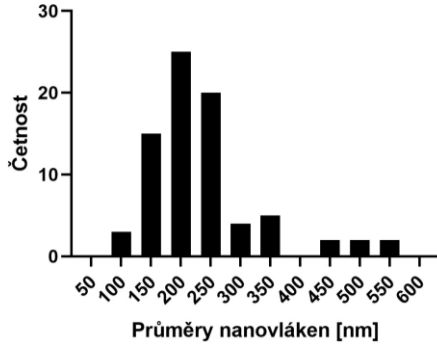
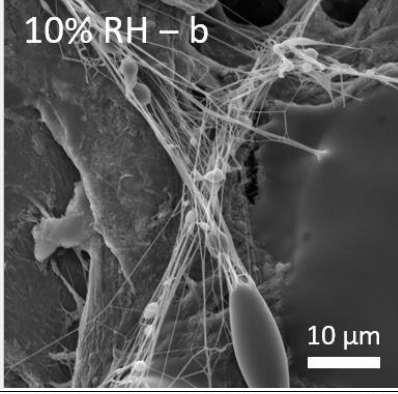
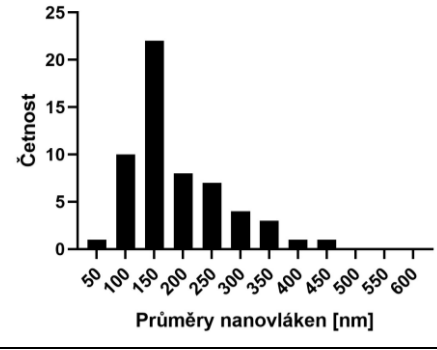
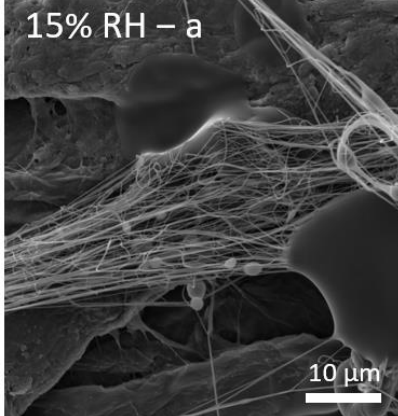
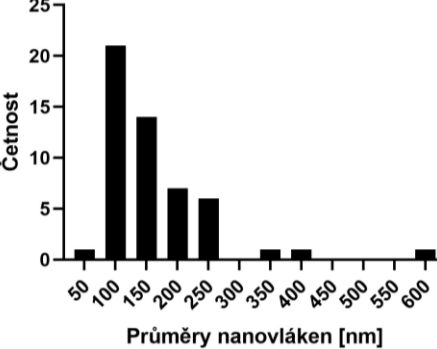
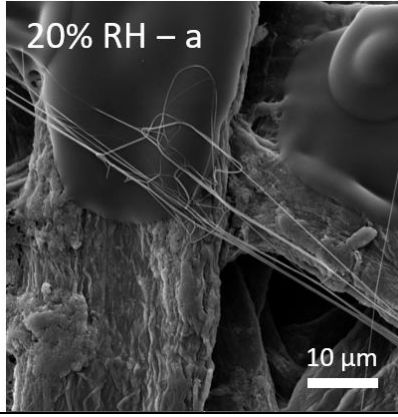
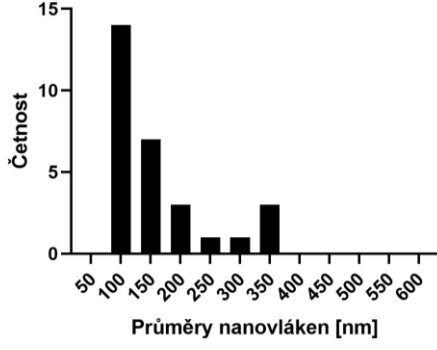
Tab. 14: Výsledky zvlákňování roztoku a – 20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (8 : 2) a b – 20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W při 10, 15, 20 a 25% RH

RH [%]	Roztok	Průběh a výsledek zvlákňování	Střední hodnota průměru vláken ± SD [nm]
10	a	Roztok zvlákňuje téměř okamžitě, vlákna se odrážejí od papíru do komory. Tvoří se svazky vláken. Produktivita je relativně vysoká.	237 ± 96
	b	Zvlákňuje ihned s velkou produktivitou. Vlákna se ve velké míře odrážejí od papíru.	193 ± 83

15	a	Zvlákňování začíná s prodlevou. Vlákna se odrážejí od papíru a odlétají do komory. Na papíře se tvoří shluky hmoty, které se vyskytují ve větší míře než vlákna.	164 ± 90
	b	Roztok nezvlákňuje.	-
20	a	Velká prodleva ve zvlákňování a malá produktivita vláken. Opět se jedná spíše o shluky hmoty nežli vlákennou vrstvu. Vlákna se v malé míře odrážejí od papíru.	163 ± 80
	b	Roztok nezvlákňuje.	-
25	a	Roztok nezvlákňuje.	-
	b	Roztok nezvlákňuje.	-



Tab. 15: Snímky a histogramy vláken z roztoku a – 20% PVA88-31/PEO100 (49 : ) ve W/EtOH (8 : 2) a b – 20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W při 10, 15 a 20% RH.

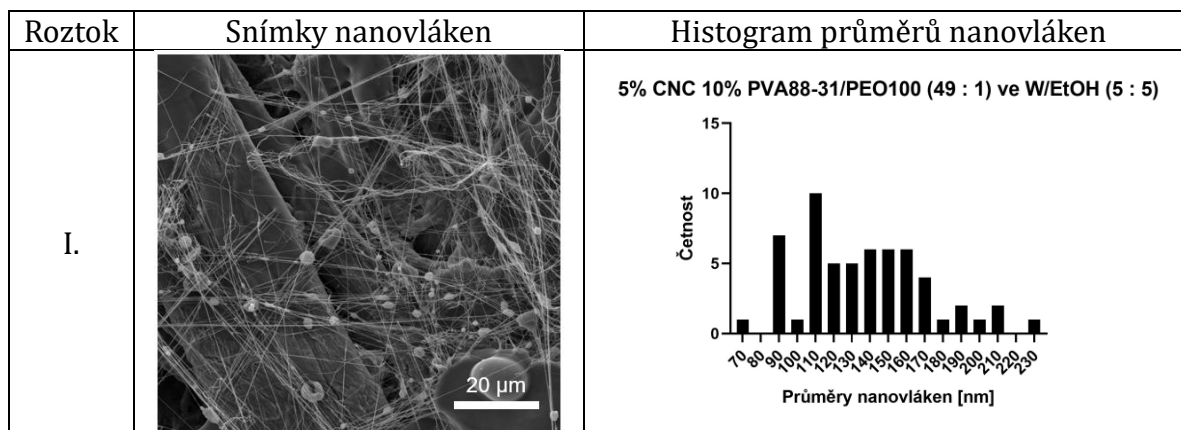
Snímky nanovláken	Histogramy průměrů nanovláken
<p>10% RH – a</p> 	<p>20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (8 : 2) při 10% RH</p> 
<p>10% RH – b</p> 	<p>20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W při 10% RH</p> 
<p>15% RH – a</p> 	<p>20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (8 : 2) při 15% RH</p> 
<p>20% RH – a</p> 	<p>20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (8 : 2) při 20% RH</p> 

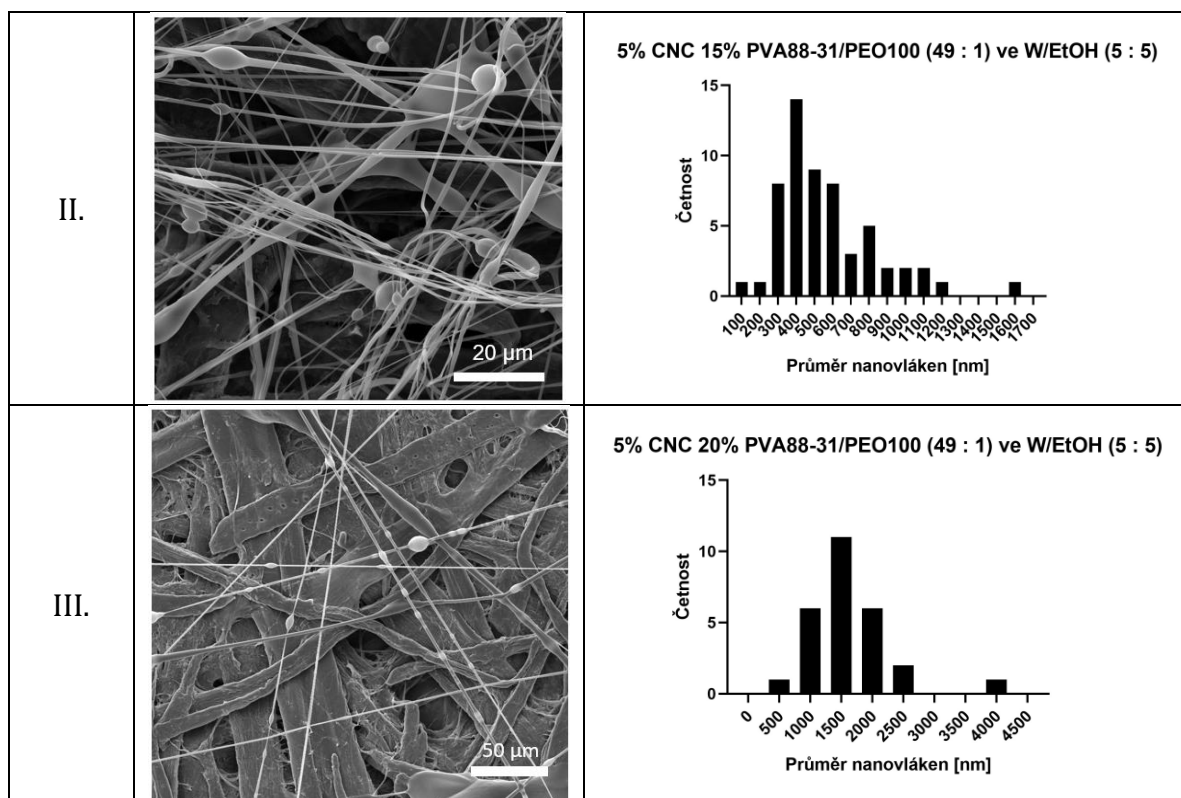
Roztok a – 20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (8 : 2) je zvláknitelný při 10 a 15% RH. Zdá se, že při vyšších hodnotách RH se již netvoří nanovláknena vlivem špatného odpařování rozpouštědlového systému. Oproti roztoku a je rozpouštědlový systém roztoku b – 20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) tvořen pouze vodou. Při vyšších hodnotách RH je větší podíl vodní páry ve vzduchu. Voda z roztoku se hůře vypařuje a k tvorbě nanovláken nemusí docházet. Roztok b ve W se podařilo zvláknit pouze při 10% RH, což je nejnižší hodnota RH, které lze v komoře dosáhnout. Při vyšších hodnotách než 10 % se voda z roztoku b špatně odpařuje, a tedy se nanovláknena netvoří.

### 3.3.2 Zvláknování roztoků PVA s nanokrystaly celulózy solution blow spinningem

Roztok I. – 5% CNC 10% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (5 : 5) zvláknuje s velmi malou produktivitou vláken. Zdá se, že roztok je pro zvláknování málo viskózní. Vlákna se zdají krátká a většina z nich byla odražena při zvláknění od papíru do digestoře. Na papíře se pak místy tvořily bílé hrudky, které mohou být shluky PEO a CNC. Střední hodnota průměru vláken z roztoku I. s SD je  $140 \pm 36$  nm. Roztok II. zvláknuje s vysokou produktivitou. Viskozita je zřejmě optimální pro zvláknění roztoku. Zdá se, že produktivita vláken je vyšší u roztoku s CNC a s nižší koncentrací polymeru než je u původního zvláknovacího roztoku bez nanočástic s vyšší koncentrací polymeru (20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (5 : 5)). CNC nejspíše pozitivně ovlivňují parametry roztoku pro zvláknovací proces. Průměr vláken s SD byl stanoven  $567 \pm 280$  nm. Roztok III. nezvláknuje téměř vůbec. Vlákna je možné pozorovat až pomocí SEM. Průměr vláken a SD byly určeny  $1678 \pm 710$  nm. Snímky vláken a histogramy průměrů vláken jsou uvedeny v Tab. 16.

Tab. 16: Snímky vláken z roztoků I. – 5% CNC 10% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (5 : 5), II. – 5% CNC 15% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (5 : 5) a III. – 5% CNC 20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (5 : 5) a histogramy průměru nanovláken z roztoků I, II. a III. PVA a PEO s CNC



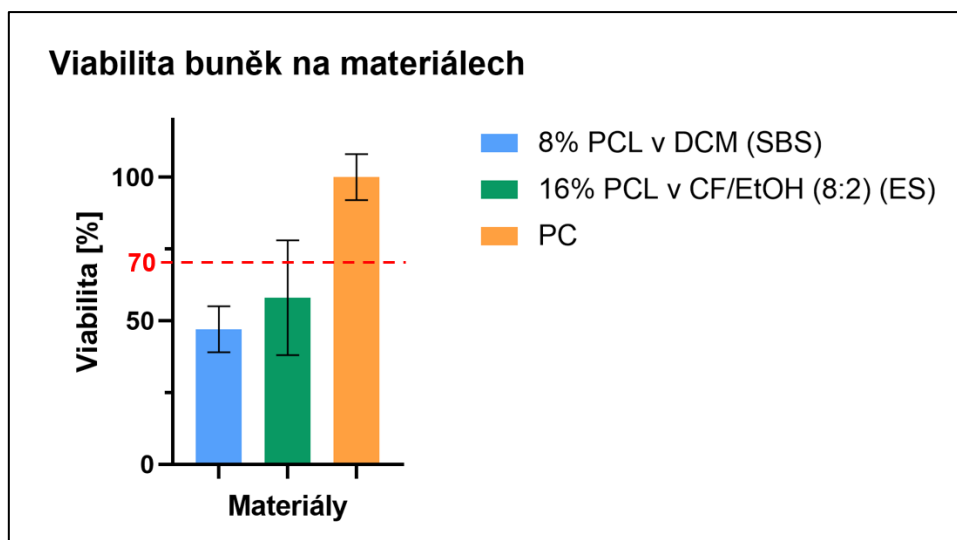


### 3.4 Test cytotoxicity metody solution blow spinning přímým kontaktem

Na základě naměřené absorbance barevného metabolitu buněk z CCK-8 pomocí spektrofotometru byly stanoveny hodnoty viability buněk v jamkách s materiály. Tyto hodnoty jsou uvedeny v Tab. 17. Srovnání hodnot viability buněk jednotlivých materiálů je poté uvedeno na Obr. 35.

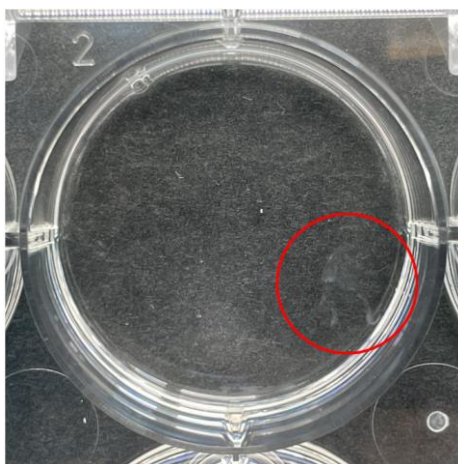
Tab. 17: Výsledky testování cytotoxicity přímým kontaktem – hodnoty viability buněk. Ve sloupci „Obsah jamky“ jsou v závorkách uvedeny metody, kterými byly materiály vyrobeny.

Obsah jamky	Střední hodnota viability buněk ± SD [%]
8% PCL v DCM (SBS)	47 ± 8
16% PCL v CF/EtOH (8 : 2) (ES)	58 ± 20
pozitivní kontrola (PC)	100 ± 8



Obr. 35: Srovnání viability buněk testovaných materiálů vůči pozitivní kontrole. Chybová úsečka představuje SD.

Dle normy ČSN EN ISO 10993-5 (855220) je materiál určená pro tkáňové inženýrství považován za netoxický, pokud buňky vykazují viabilitu (metabolickou aktivitu) 70 % a vyšší. Dle výsledků (viz Tab. 17) jsou oba testované materiály toxické pro buňky. U kontrolního materiálu vyrobeného ES mohly buňky snížit svou metabolickou aktivitu vlivem jejich vysoké koncentrace, a dochází tak k nižší produkci barevného metabolitu, který indikuje jejich viabilitu. V případě materiálu vyrobeného metodou SBS je možné, že buňky byly proudem vzduchu během zvláknování odstraněny z jamky. Během procesu přímého zvláknování bylo pozorováno, že prostřední část buněčné vrstvy se odtrhla od jamky (viz Obr. 36). Bylo tak nejspíše způsobeno tím, že buňky byly v tomto místě narostlé přes sebe a vykazovaly tedy nižší adhezi vůči dnu jamky. Shluk buněk mohl být v průběhu výměny DMEM odsán z jamky, a proto mohlo dojít k výraznému snížení koncentrace buněk. To mohlo vést k výslednému snížení viability buněk inkubovaných s materiály.

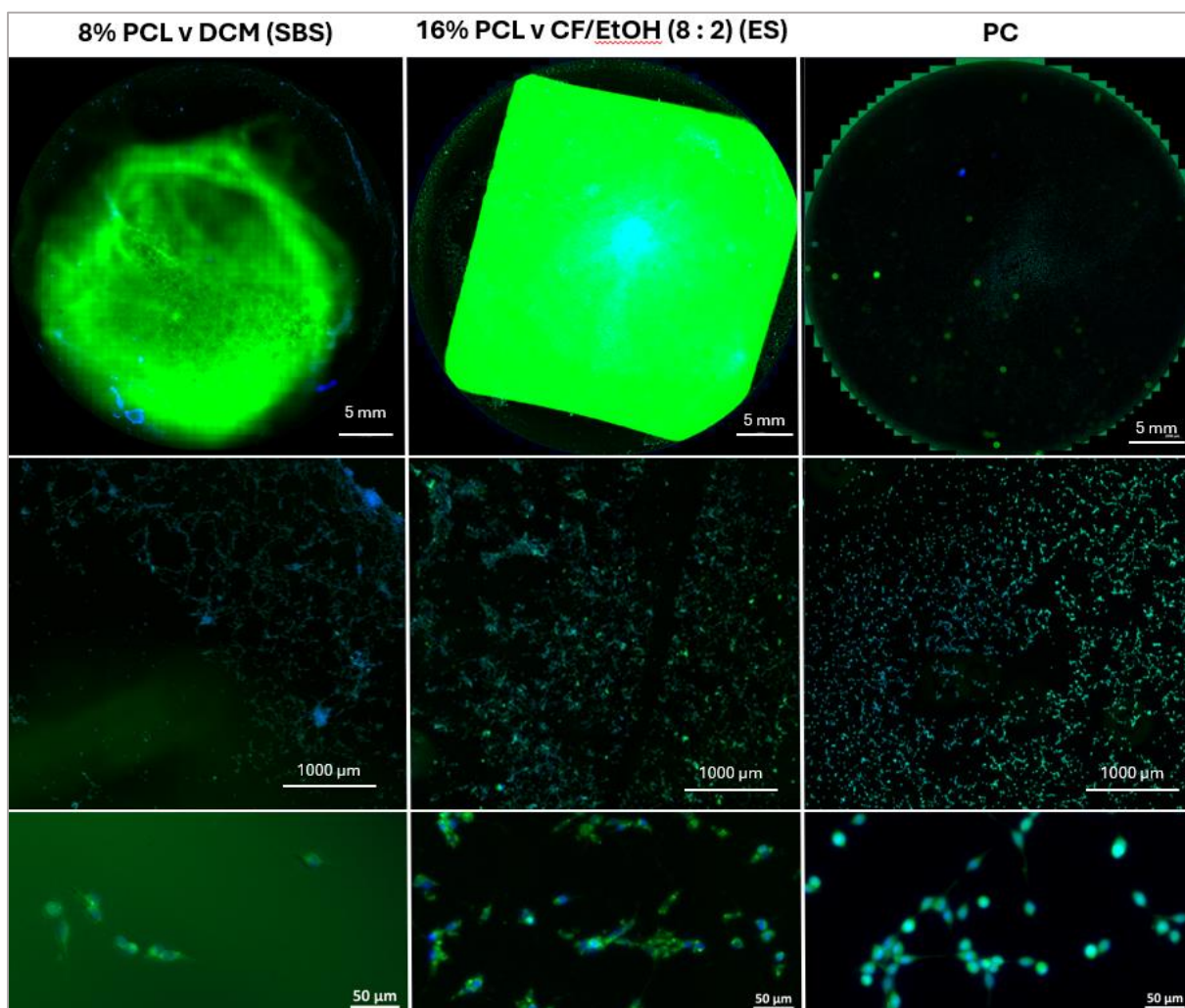


Obr. 36: Na obrázku je červeným kruhem označená odtržená část vrstvy buněk z prostředku jamky.

Zároveň jednou z domněnek, proč dochází k nízkým hodnotám viability u materiálu vyrobeném metodou SBS je dlouhá prodleva v dodání DMEM buňkám. Během nanášení materiálu na buňky bylo médium nejprve odsáto z jamky a poté byl přímo aplikován materiál. Doba, kdy buňky neměly přístup k médiu mohla dosahovat i jedné minuty.

Dalším zdržením dodání živin z DMEM buňkám bylo v okamžiku nanesení materiálu přímo na buněčnou kulturu metodou SBS. Zde mohlo dojít k přílišné adhezi materiálu k buňkám. Tím jim byl odepřen přístup k médiu, což později mohlo vést k nízké životaschopnosti buněk.

Viabilita buněk kontrolního materiálu z 16% PCL v CF/EtOH (8:2) z předchozích nezávislých experimentů testování cytotoxicity a biokompatibility byla stanovena nad 70 %. Materiál je tedy považován za netoxický. Viabilita buněk pro tento kontrolní materiál byla během testování cytotoxicity přímým kontaktem stanovena na 58 %. Nyní by byl tento materiál zařazen k materiálům, které jsou toxické pro buňky. To však neodpovídá předešlým experimentům. Lze tak předpokládat, že experiment je správně nastavený z hlediska postupu testování. Ovšem je potřeba upravit koncentraci buněk v jamce, tak aby konfluence adherovaných buněk 2. testovací den byla maximálně 70 %. Hypotézy, proč dochází k nízkým viabilitám buněk, byly podpořeny snímky z fluorescenčního mikroskopu (viz Obr. 37).



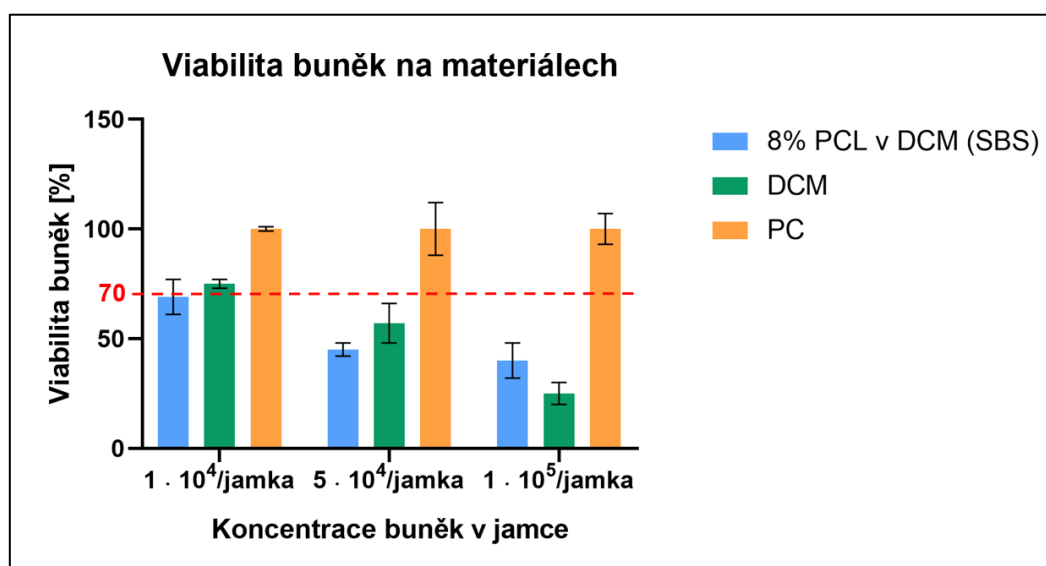
Obr. 37: Snímky z fluorescenčního mikroskopu materiálů s buňkami barvenými DAPI a DiOC, v jednotlivých sloupcích jsou uvedeny snímky buněk na příslušných materiálech, v řádcích jsou pak různé detaily snímků.

### 3.4.1 Optimalizace experimentu koncentrační řadou buněk

V rámci optimalizace testování cytotoxicity materiálů vyrobených pomocí SBS in vitro byly zvoleny tři různé koncentrace buněčné suspenze nasazované na dno kultivační jamky. Jako v předešlém experimentu byly na základě naměřené absorpance barevného metabolitu buněk vypočteny hodnoty viability buněk. Hodnoty viability jsou uvedeny v Tab. 18. Hodnoty viability buněk v jamce s materiálem a chemikálií jsou poté porovnány na Obr. 38.

Tab. 18: Výsledky testování cytotoxicity přímým kontaktem – hodnoty viability buněk při různých koncentracích na materiálech.

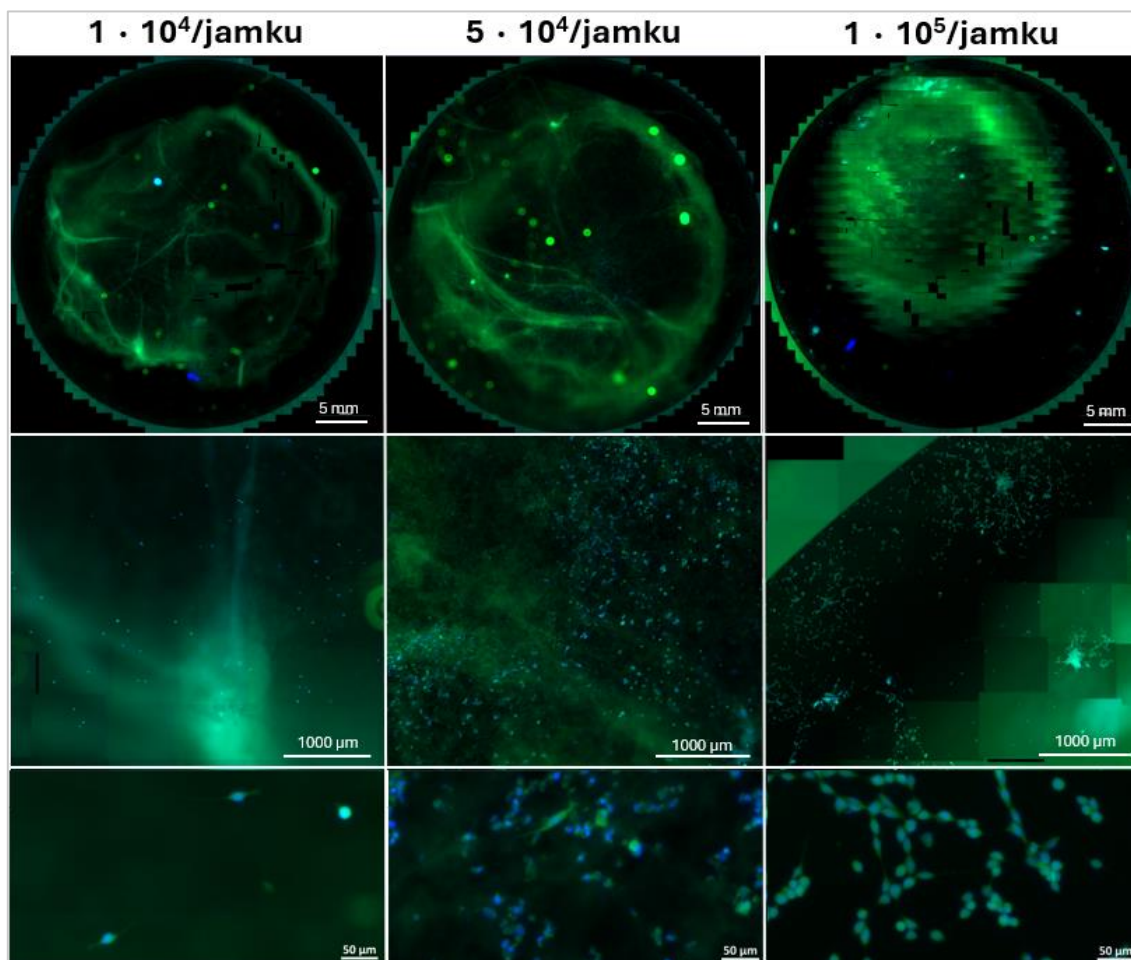
Materiál aplikovaný airbrushem	Koncentrace buněk [počet buněk/jamku]	Průměrná viabilita buněk na materiálu [%]	Střední hodnota viability buněk příslušné pozitivní kontroly [%]
8% PCL v DCM	$1 \cdot 10^4$	69	100
	$5 \cdot 10^4$	45	100
	$1 \cdot 10^5$	40	100
DCM	$1 \cdot 10^4$	75	100
	$5 \cdot 10^4$	57	100
	$1 \cdot 10^5$	25	100



Obr. 38: Srovnání hodnot viability buněk na materiálech a pozitivní kontroly

Z výsledků viability buněk, zobrazené v grafu na Obr. 38 vyplývá, že v souladu s normou ČSN EN ISO 10993-5 (855220) se materiál vyrobený pomocí SBS jeví jako cytotoxický. Z výsledků je patrné, že se snižující se koncentrací vzrůstá viabilita buněk. To je zřejmě způsobeno tím, že s klesající koncentrací buněk se snižuje pravděpodobnost přímého kontaktu s materiálem. V případě aplikování DCM airbrushem na buňky o koncentraci  $1 \cdot 10^4$ /jamku byla zjištěna hodnota viability buněk 75 %. V tomto případě není materiál cytotoxický. Ve zbylých dvou případech je materiál pro buňky toxický.

Nízká viabilita buněk na materiálu aplikovaném na buňky metodou SBS byla nejspíše způsobena odstraněním buněk z jamek vlivem proudu vzduchu (viz Obr. 39). Materiál byl tak vyhodnocen jako cytotoxický na základě nedostatečného počtu buněk při testování jejich metabolické aktivity.

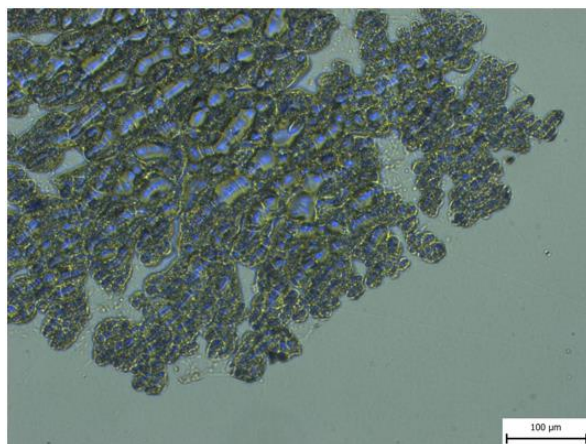


Obr. 39: Snímky z fluorescenčního mikroskopu buněk pod materiálem vyrobeným metodou SBS, barveno Phalloidin-FITC a DAPI

Z morfologie buněk zachycené na Obr. 41 je patrné, že buňky, které nebyly strženy proudem vzduchu při aplikaci materiálu in situ mají typický podlouhlý tvar životaschopných buněk. U nižší koncentrace buněk v jamce je nižší šance zásahu buněk materiálem při aplikaci, a tím je pravděpodobně zajištěn nižší toxický dopad na buňky. Zároveň nedochází ke značným ztrátám vlivem stržení konfluentní vrstvy buněk jako je tomu u vyšší koncentrace (viz Obr. 39 –  $1 \cdot 10^5$ /jamku).

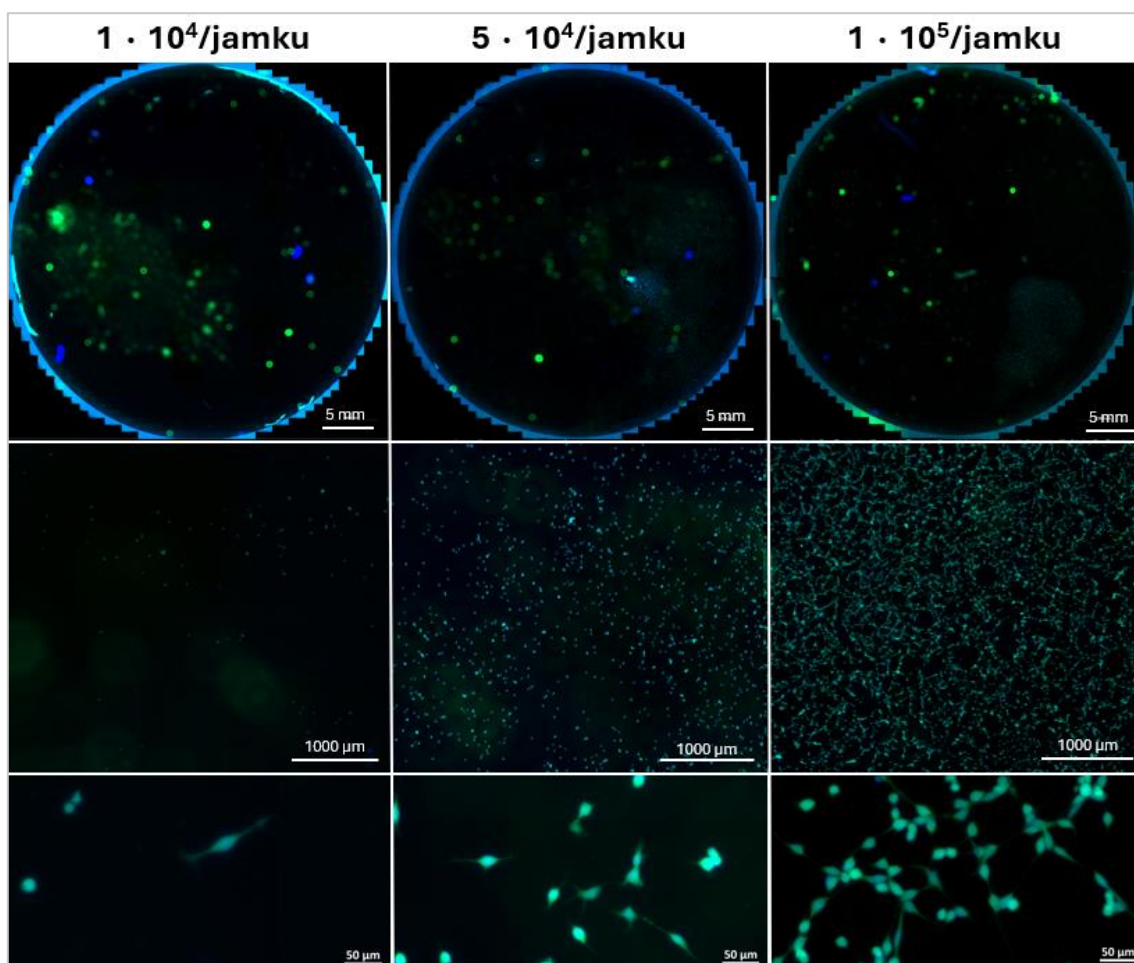
Problém může také spočívat v použitém rozpouštědle. DCM je považován za dráždivý pro člověka a je spojen se zvýšeným rizikem rakoviny jater a plic [23]. Lze říci, že je obecně pro člověka zdravotně závadný, a tedy lze předpokládat že i pro samotné buňky. Dalším negativním parametrem tohoto rozpouštědla je jeho teplota varu, která činí přibližně  $39^\circ\text{C}$  [23]. Pro zvláknění je takto relativně nízká teplota varu výhodná, kdy se rozpouštědlo rychle odpařuje a snadněji se tvoří vlákna. DCM však pohlcuje k odpaření teplo, a tím ochlazuje dané místo, na něž jsou aplikována nanovlákna. Nízká teplota po dobu zvláknění může mít také negativní vliv na buňky a je nutné tento parametr dále

prozkoumat. Pod optickým mikroskopem byly pozorovány útvary, které mohly vzniknout rychlým ochlazením prostředí a nemísitelností DCM s médiem (viz Obr. 40).



Obr. 40: Pozorované shluky DCM v jamce mikrotitrační destičky

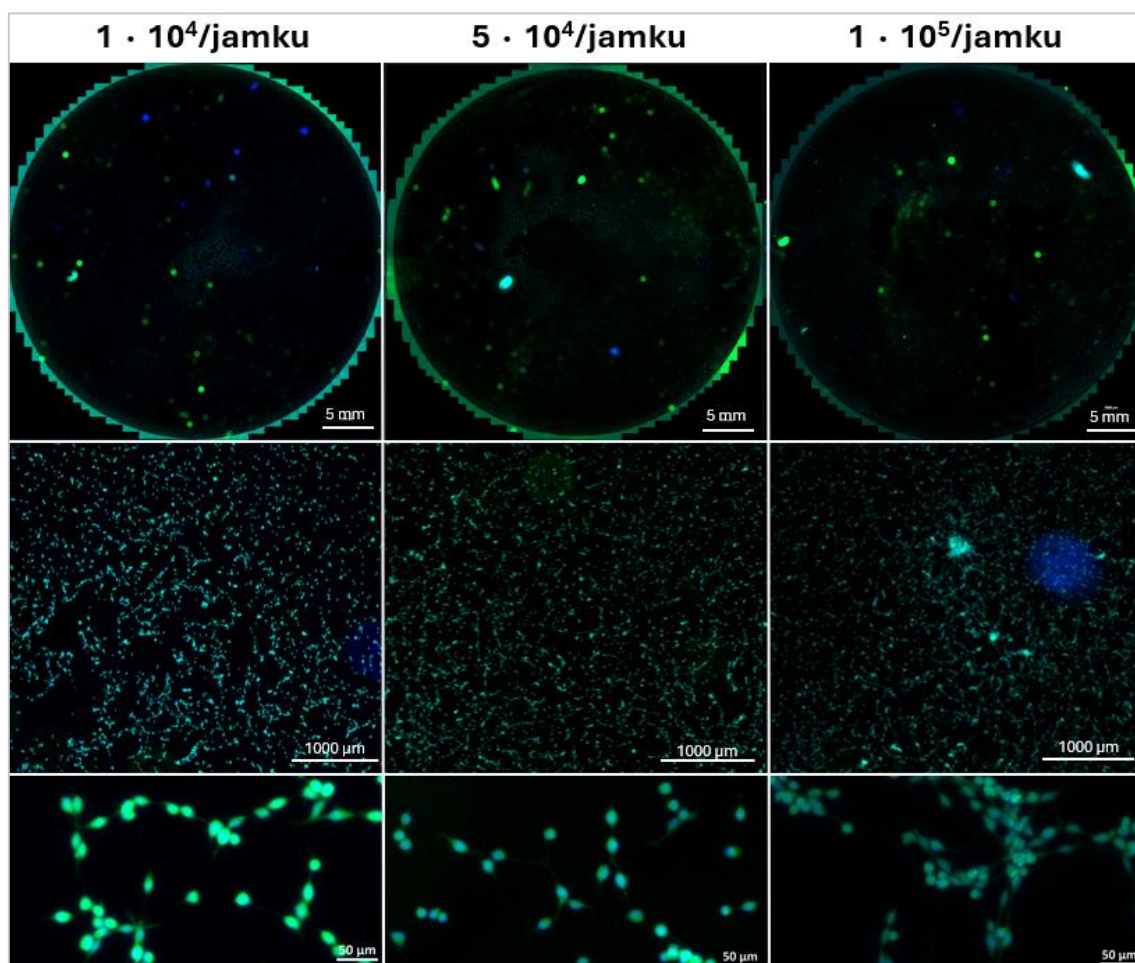
Nízká viabilita buněk na materiálech mohla být tedy zapříčiněna buď samotnou toxicitou rozpouštědla nebo snížením teploty místa vlivem odpařování rozpouštědla nebo kombinací obou jevů. Dalším toxickým efektem se jeví snížená schopnost difúze látek z média k buňkám. Materiál buňky překryje a znemožní jim dočasně přístup k médiu.



Obr. 41: Snímky z fluorescenčního mikroskopu buněk pod DCM naneseným airbrushem, barveno Phalloidin-FITC a DAPI.



Pro srovnání rozložení a hustoty rozložení buněk různých koncentrací u materiálů lze vidět snímky buněk pozitivních kontrol na Obr. 42.

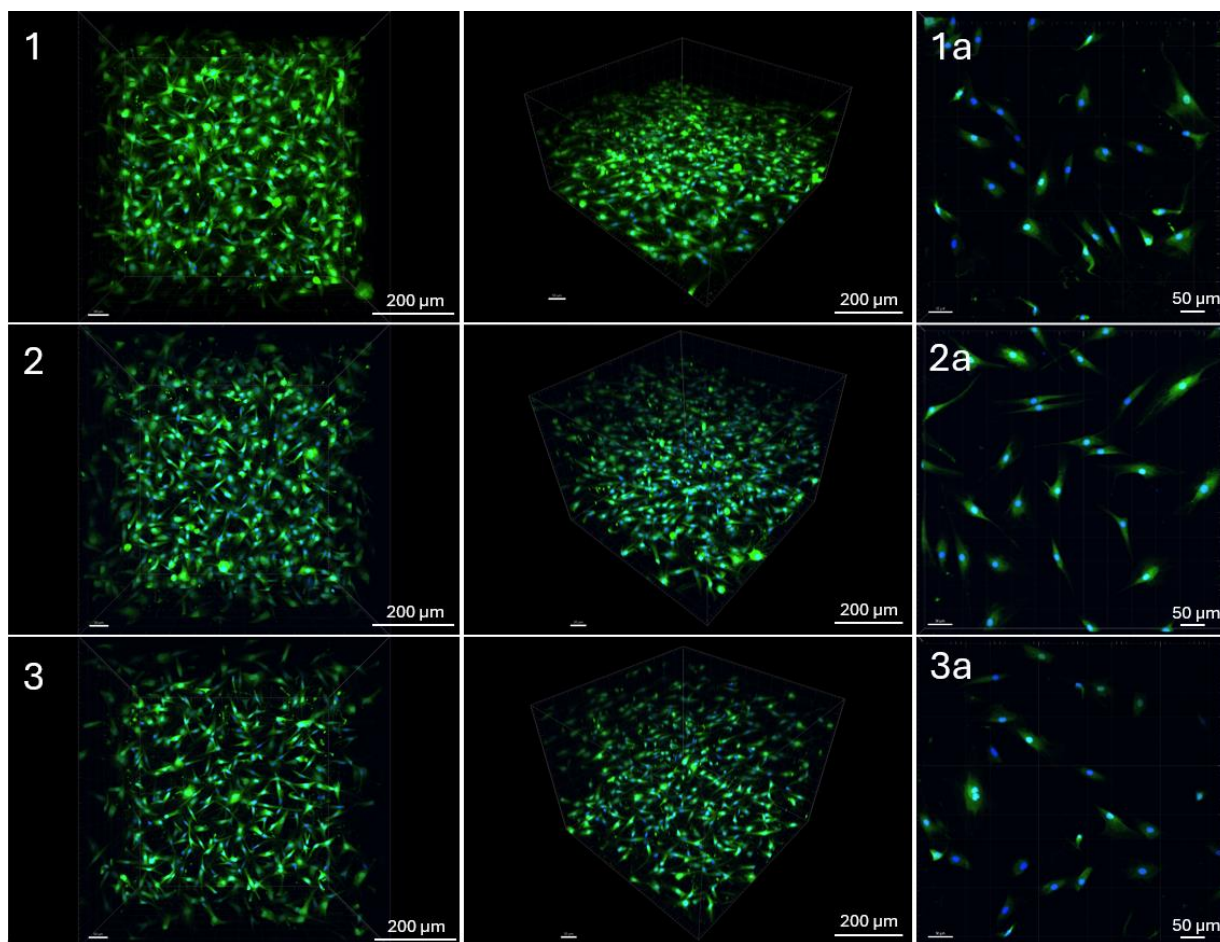


Obr. 42: Snímky z fluorescenčního mikroskopu buněk pozitivní kontroly, barveno Phalloidin-FITC a DAPI

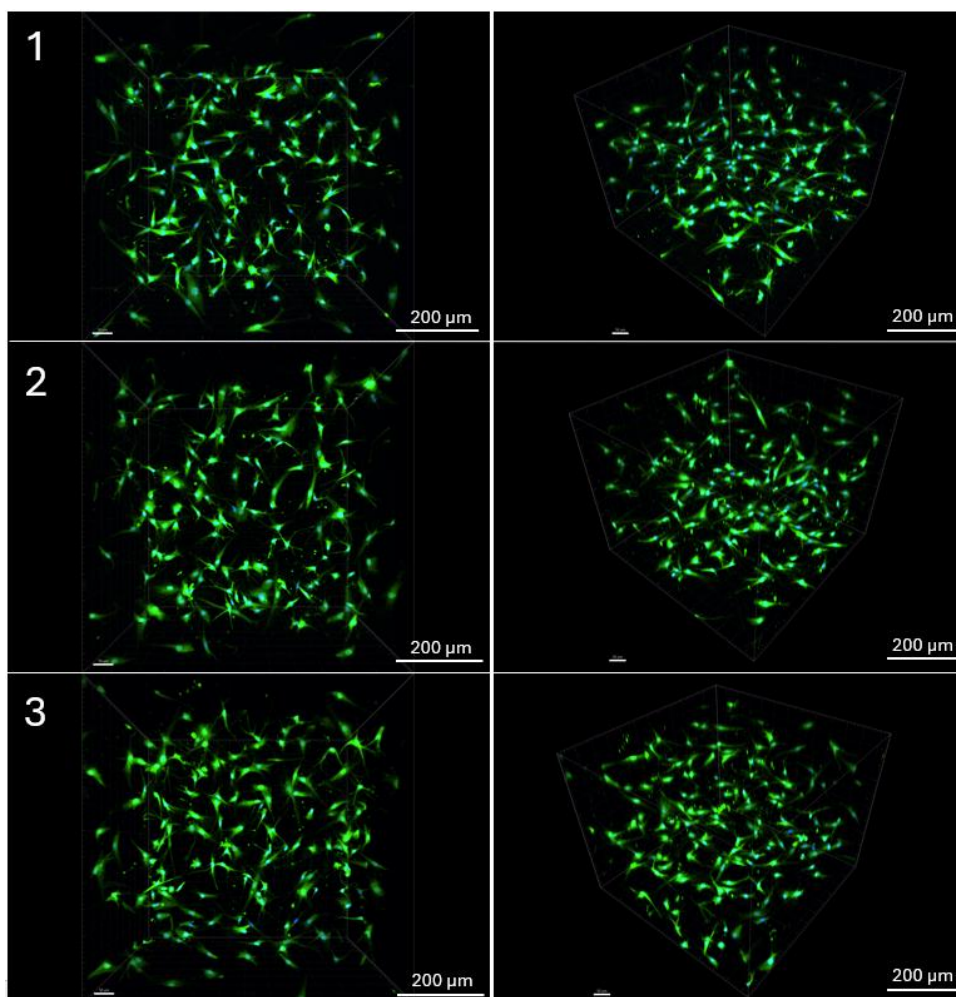
### 3.5 Sledování vlivu in situ aplikace nanovláken na buněčnou kulturu v hydrogelu

V rámci experimentu provedeného 1. 12. 2024 byl zjišťován vliv přímého nanesení nanovláken z roztoku 8% PCL v DCM na buněčnou kulturu ASC v hydrogelu 4. testovací den. Ze snímků na Obr. 43 je patrné, že v gelech s nanovláknými rostly buňky s výrazně vyšší hustotou, a některé buňky migrovaly k samotným vláknům, přilnuly k nim a rozprostřely se na nich. Gely s nanovláknými se zmenšily do šířky i do výšky, což svědčí o bujném růstu buněk ASC. V kontrolních vzorcích rostly buňky pravidelně, ale v menší míře. Kontrolní vzorky lze vidět pro srovnání na Obr. 44.

Materiál PCL se řadí k hydrofobním materiálům a je vodou nesmáčivý. Stejně tak i médiem, které je přidáváno k hydrogelům pro výživu buněk. Nanovlákná nebyla plně smočena několik hodin. Během této doby se mohlo rozpouštědlo stále odpařovat. Hydrofobního charakteru PCL nanovláken může mít za následek potenciální snížení možné toxicity materiálu.

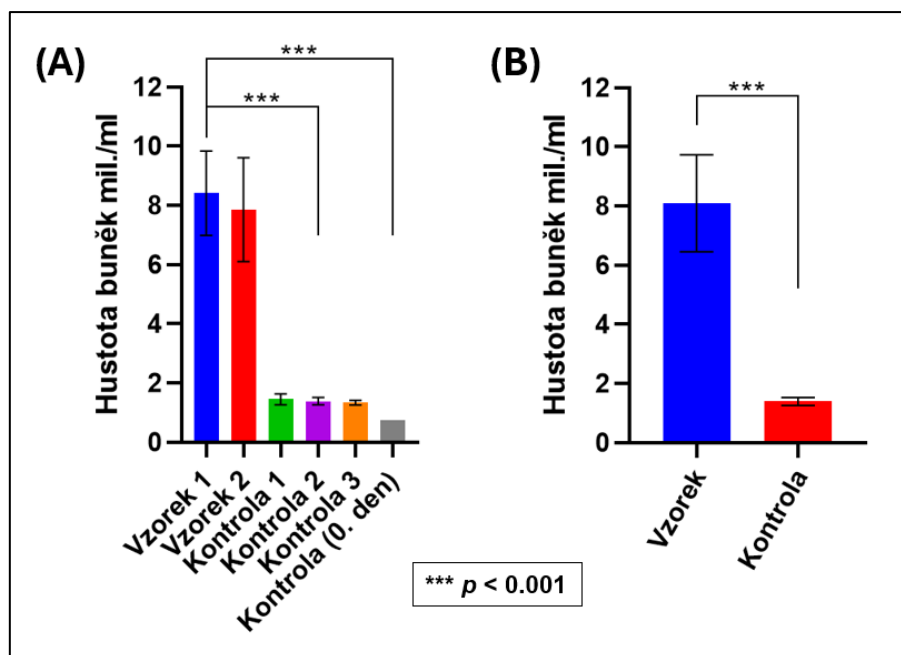


Obr. 43: Snímky z fluorescenčního mikroskopu buněk v hydrogelech, na které byly nanosena nanovlákná in situ metodou SBS – číslo řádku označuje číslo příslušného hydrogelového vzorku s nanovlákná a snímky buněk z různých pohledů zkoumané oblasti, pravý sloupec reprezentuje snímky buněk (1a, 2a, 3a) umístěných pod vlákna



Obr. 44: Snímky z fluorescenčního mikroskopu buněk ve třech kontrolních vzorcích hydrogelů

Srovnání hodnot hustoty buněk daných vzorků a kontrolních vzorků je uvedeno na Obr. 45. U vzorku 3 nastala závada na zařízení airbrush při zvlákňování. Byla tak zdrženo dodání nového média. V tomto se vzorek 3 liší od vzorku 1 a 2. Hodnoty hustoty buněk ze vzorku 2 nejsou proto považovány za validní a do srovnání nebyly zahrnuty. Ve srovnání je obsažena i hustota buněk kontrolního hydrogelu 0. testovací den, tedy den, kdy byly hydrogely připraveny. V grafu (B) na Obr. 45 je srovnána střední hodnota hustoty buněk ze vzorku 1 a 2 a střední hodnota hustoty buněk v kontrolních hydrogelech 4. testovací den. Z obou grafů je patrné, že hodnoty hustoty buněk v hydrogelech s nanovláknny se signifikantně liší (jsou vyšší) oproti kontrolním hydrogelům na hladině významnosti 0,001. To značí o pozitivní podpoře růstu buněk vlivem nanovláknenného materiálu z roztoku 8% PCL v DCM naneseného metodou SBS in situ.

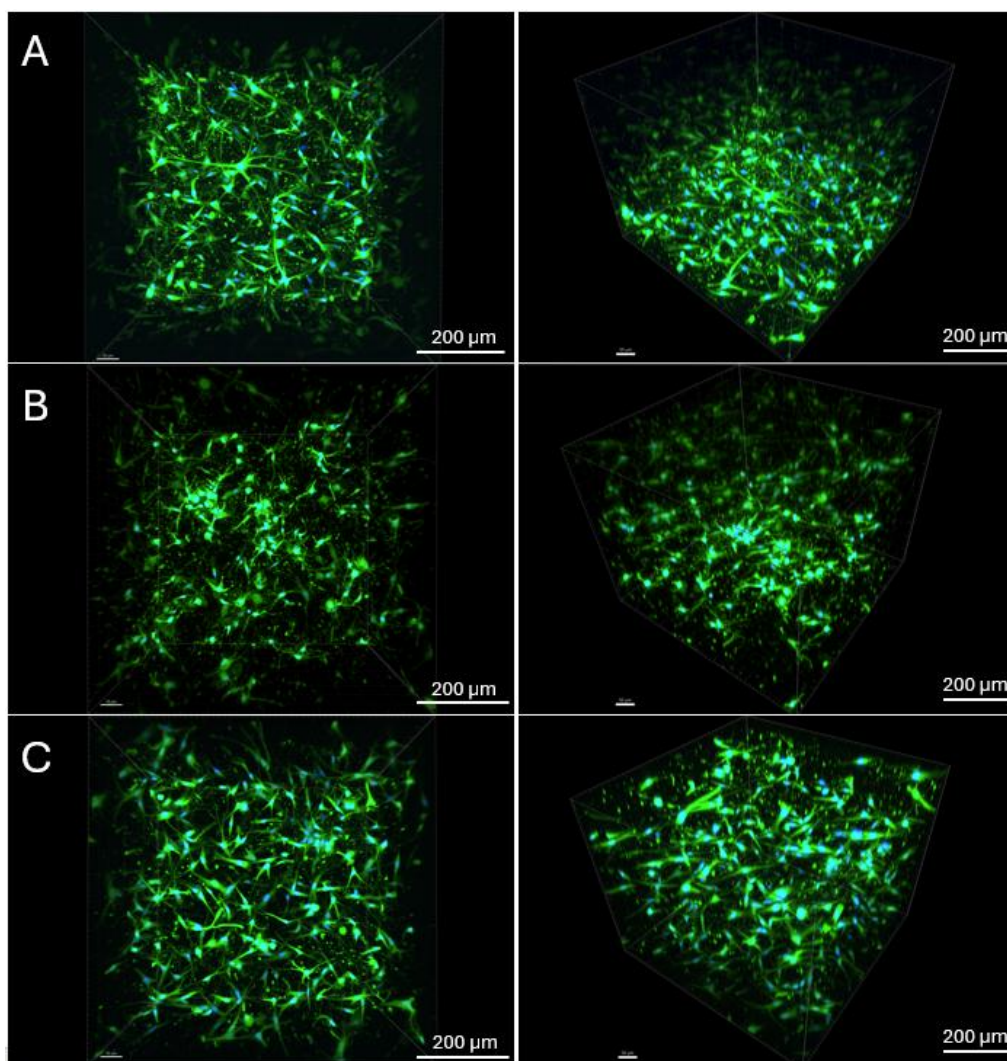


Obr. 45: Srovnání hodnot hustoty buněk na vzorcích a kontrolních hydrogelech s buňkami – (A) srovnání vzorku 1 a 2 se třemi kontrolními vzorky, (B) srovnání středních hodnot hustot buněk ze vzorků a kontrolních vzorků

Vyhodnocením experimentu provedeného 15. 3. 2024 byl stanoven vliv přímého nanosení nanovláken z roztoku 8% PCL v DCM a 14% PCL v EtOAc na buněčnou kulturu ASC v hydrogelu 4. testovací den. Roztok 14% PCL v EtOAc byl vybrán pro sledování vlivu benigního rozpouštědla na buněčnou kulturu v hydrogelech.

Ze snímků z fluorescenčního mikroskopu je patrné, že opět dochází k pozitivnímu ovlivnění růstu buněk na vzorcích s nanosenými vlákny z 8% PCL v DCM (viz Obr. 46). Hodnoty hustoty buněk ze vzorků hydrogelů s nanosenými nanovláknými a kontrolních vzorků nebyly obdrženy k 2. 5. 2024. V případě jejich dodání bude tato práce v budoucnu o tyto výsledky doplněna.

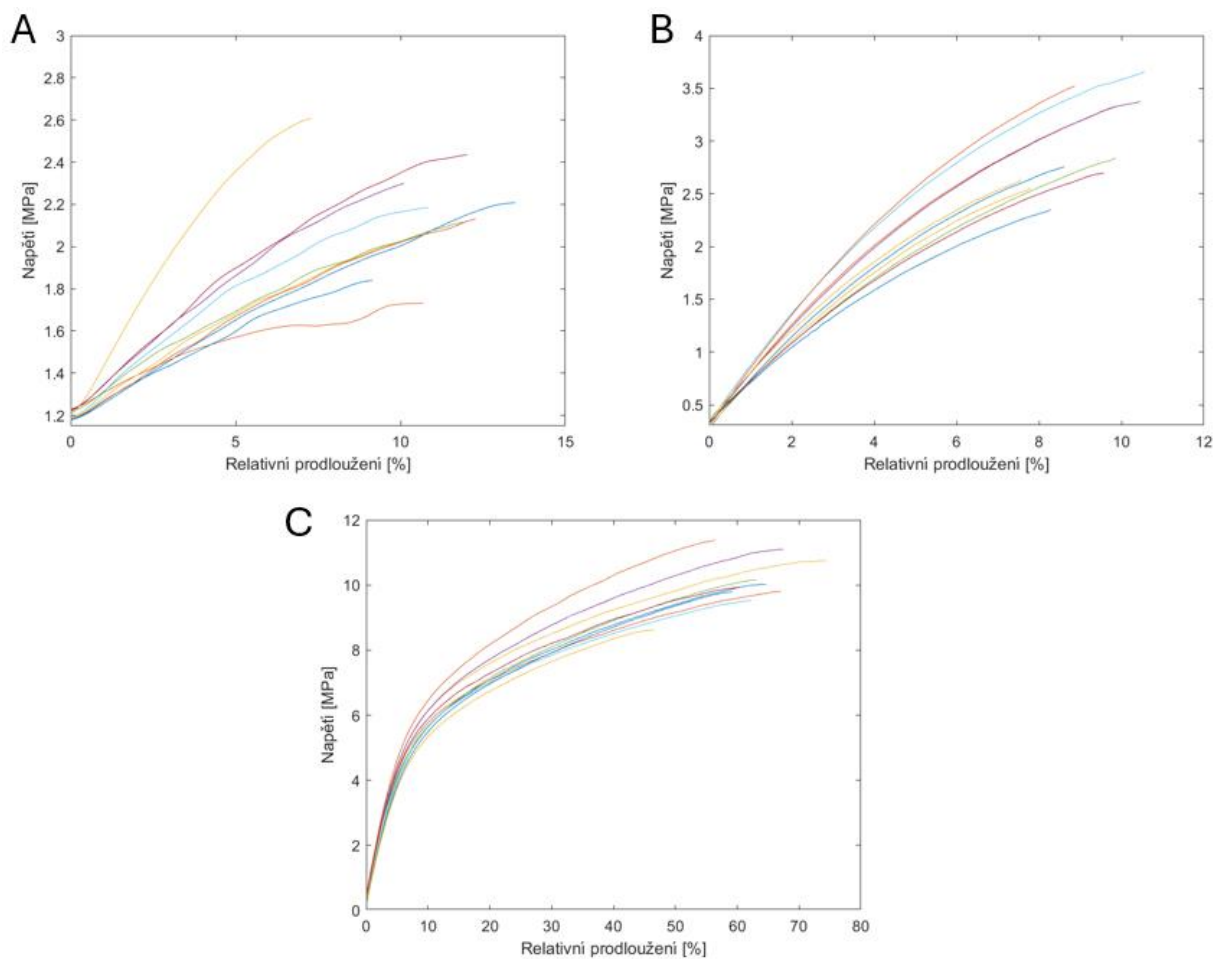
Roztok 14% PCL v EtOAc nevytvořil vláknennou vrstvu v celém objemu. Na hydrogelu se z tohoto roztoku vytvořila jednodílná vrstva. Ta zcela nedoléhala na hydrogel v celé jeho ploše. Vlivem nepropustné vrstvy na hydrogelech byla znemožněna difuze živin a CO<sub>2</sub> mezi médiem a buňkami. V důsledku toho došlo k úhynu buněk, jak si lze vidět na Obr. 46 (B). Vyhodnocení hustoty buněk není validní, a proto nebylo pro tyto vzorky provedeno.



Obr. 46: Snímky z fluorescenčního mikroskopu buněk v hydrogelech, na které byly nanesena nanovláknna in situ metodou SBS – řádek reprezentuje snímky buněk z různých pohledů na zkoumanou oblast hydrogelů s nanovláknny z roztoků: (A) 8% PCL v DCM a (B) 14% PCL v EtOAc. Snímek (C) přísluší kontrolním hydrogelům s buňkami.

### 3.6 Mechanické vlastnosti vybraných materiálů

Nanovláknenná struktura vybraných materiálů vykazuje pórovitý charakter. Póry však nepřenášejí tahové napětí. Výsledky tahové zkoušky jsou tak ovlivněny. Normování naměřených hodnot na objemovou hustotu materiálu bylo provedeno z toho důvodu, aby byl co nejvíce odstraněno ovlivnění výsledků pórovitou strukturou nanovláknenné vrstvy. Výsledné hodnoty veličin prezentují skutečnou podstatu materiálu. Průběh tahových zkoušek testovaných materiálů jsou uvedeny na Obr. 47. Výsledky vypočítaných hodnot mechanických vlastností jednotlivých materiálů jsou uvedeny v Tab. 19 a jejich srovnání lze vidět na Obr. 48 a Obr. 49.

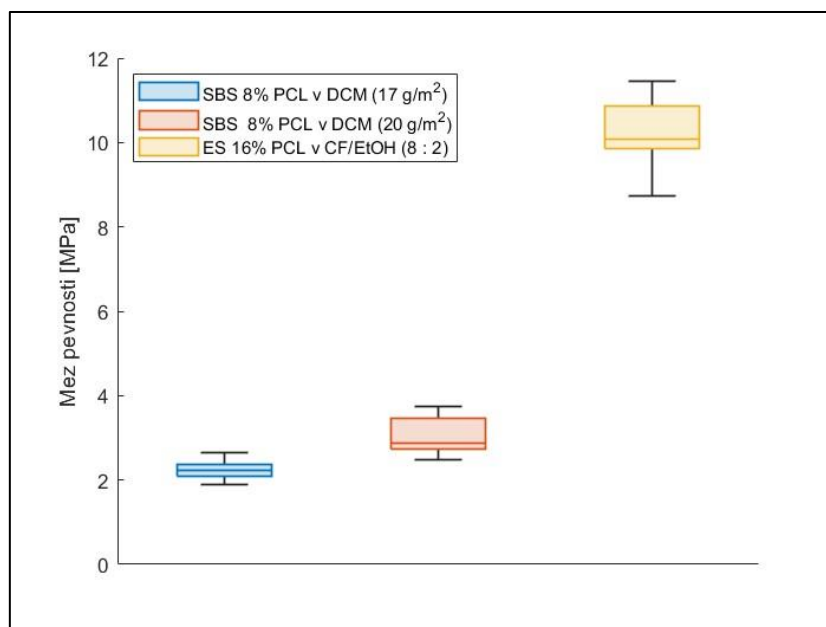


Obr. 47: Grafy průběhu tahové zkoušky materiálu vyrobeného – (A) metodou SBS z roztoku 8% PCL v DCM po dobu 1 min ( $17 \text{ g/m}^2$ ), (B) metodou SBS z roztoku 8% PCL v DCM po dobu 1,5 min ( $20 \text{ g/m}^2$ ) a (C) metodou ES z roztoku 16% PCL v CF/EtOH (8 : 2), hodnoty jsou normované na objemovou hustotu daného materiálu

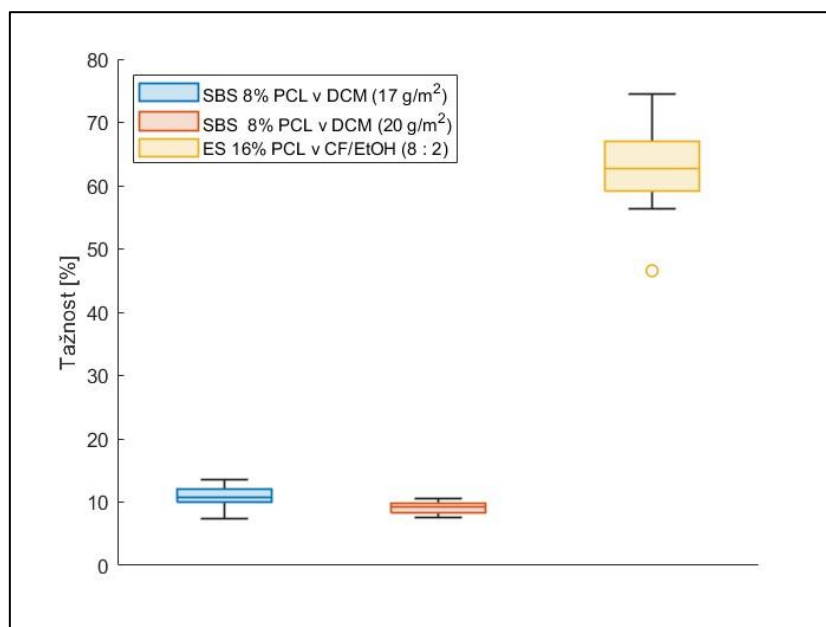
Tab. 19: Hodnoty mechanických veličin vyrobených materiálů normované na objemovou hustotu daného materiálu

Metoda výroby materiálu	Materiál (plošná hmotnost)	Veličina	Střední hodnota	SD	Variační koeficient
SBS (1 min)	8% PCL v DCM ( $17 \text{ g/m}^2$ )	Maximální síla [N]	1,62	0,17	10,22
		Tažnost [%]	10,78	1,78	16,47
		Mez pevnosti [MPa]	2,24	0,23	10,22
SBS (1,5 min)	8% PCL v DCM ( $20 \text{ g/m}^2$ )	Maximální síla [N]	1,77	0,26	14,78
		Tažnost [%]	9,14	1,07	11,71
		Mez pevnosti [MPa]	3,06	0,45	14,78
ES		Maximální síla [N]	19,08	1,47	7,70
		Tažnost [%]	62,16	7,44	11,97

	16% PCL v CF/EtOH (8:2) (21 g/m <sup>2</sup> )	Mez pevnosti [MPa]	10,22	0,79	7,70
--	--	--------------------	-------	------	------



Obr. 48: Porovnání hodnot meze pevnosti nanovláknenných materiálů normovaných na objemovou hustotu



Obr. 49: Porovnání hodnot tažnosti nanovláknenných materiálů normovaných na objemovou hustotu

V grafu (A) a (B) na Obr. 47 lze pozorovat, že průběhy křivek nezačínají v počátku nýbrž jsou posunuty výše po ose „Napětí“. Posun křivek po této ose je způsoben předpětím nanovláknenné vrstvy. Předpětí mohlo vzniknout vylepením vrstvy do papírového rámečku či přílišným utahením vzorku v upínacích hlavách.

Při srovnání materiálů vyrobených metodou SBS o dvou různých plošných hmotnostech je patrné, že materiál s vyšší plošnou hmotností ( $20 \text{ g/m}^2$  – zvlákňován 1,5 min) je pevnější a odolnější vůči tahovému napětí (viz Obr. 48) než materiál s nižší plošnou hmotností ( $17 \text{ g/m}^2$  – zvlákňován 1 min). Lze tak předpokládat, že vlákna jsou více orientovaná než v materiálu s nižší plošnou hmotností. Zároveň je tento materiál méně tažný než materiál s nižší plošnou hmotností (viz Obr. 49). Křivky pro materiál s plošnou hmotností  $20 \text{ g/m}^2$  mají prudší nárůst do meze pevnosti oproti průběhu křivek pro materiál s plošnou hmotností  $17 \text{ g/m}^2$ . Z grafu na Obr. 47 lze vyvodit, že materiál s vyšší plošnou hmotností vykazuje vyšší tuhost.

Výsledky tahové zkoušky ukazují, že nanovlákněné vrstvy vyrobené metodou ES o plošné hmotnosti  $21 \text{ g/m}^2$  jsou daleko odolnější vůči tahovému namáhání než materiál s podobnou plošnou hmotností ( $20 \text{ g/m}^2$ ) vyrobený metodou SBS, jak lze stanovit z grafů na Obr. 48 a Obr. 49. Je tak nejspíše způsobeno dlouhými (teoreticky nekonečnými) vlákny, která jsou vytvořena metodou ES a vyšší mírou orientace vláken.



## 4 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo rozšířit škálu roztoků pro zvláknění metodou SBS s využitím méně zdravotně rizikových rozpouštědel. Především byla práce zaměřena na hledání benigních rozpouštědel pro zvláknovací roztoky PCL a PVA. Dále se práce zabývá proudovým polem za výstupem zvláknovacího zařízení airbrush a jeho mapováním. V neposlední řadě jsou uvedeny výsledky biologického in vitro testování vybraných materiálů vyrobených metodou SBS a některé jejich mechanické vlastnosti.

Hodnoty rychlostního pole proudu vzduchu za výstupem z airbrushu byly naměřeny pomocí thermoanemometrického čidla. Rychlosti proudu vzduchu byly naměřeny v koncové zvláknovací oblasti. Nejvyšší hodnoty rychlosti dosahuje proud podél své hlavní osy. Jeví se, že rychlost proudu vzduchu téměř lineárně klesá se zvyšující se vzdáleností od výstupu z airbrushu.

Jako náhrada k toxickému DCM byla vybrána benigní rozpouštědla DMM, EtOAc a Ace pro přípravu zvláknovacích roztoků. Z těchto rozpouštědel byly připraveny roztoky PCL o různých koncentracích. Ty byly zvlákněny metodou SBS s využitím zařízení airbrush. Roztoky při zvláknování zasychaly za ústím trysky airbrushu, a tím byl narušován proces zvláknování. Ucpávání trysky airbrushu je nejspíše způsobeno benigními rozpouštědly s nízkým bodem varu, což vede k jejich rychlému odpařování. Tím se hromadí polymerní sušina za výstupem z trysky. Jako nejlépe zvláknující roztok byl označen 14% PCL v EtOAc. Ten vykazuje nejvyšší produktivitu vláken z celé škály připravených roztoků a při zvláknování nedochází k přílišnému zasychání roztoku v trysce.

Dále byly pro metodu SBS byly připravovány vodné roztoky PVA tak. Snahou bylo nastavit parametry roztoků tak, aby byly zvláknitelné metodou SBS s využitím komerčního airbrushu. Pro přípravu byly použity PVA s různou molekulovou hmotností a stupněm hydrolyzy. PVA byla rozpouštěna v rozpouštědlovém systému W/EtOH o různých poměrech. Později k sušině PVA bylo přidáno i v malém poměru PEO. Následně byly roztoky zvláknovány airbrushem. Nejlépe zvláknitelné se z připravených roztoků zdají roztoky U – 20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (5 : 5) a V – 20% PVA88-31/PEO100 (24 : 1) ve W/EtOH (5 : 5). Tyto použité PVA mají nízkou molekulovou hmotnost ( $31\ 000\ \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) a nízký stupeň hydrolyzy (88 %). Uvedené parametry také souvisí s rozpustností polymeru v ethanolu. Zmíněné faktory mají vliv na zvláknování PVA roztoků metodou SBS. Dochází tak k snadnější tvorbě trysek a následně i vláken.

Při zvláknování roztoků vodorozpustných roztoků hraje velkou roli RH. Roztoky U a V se nepodařilo zvláknit při RH nad 50 %. Oba roztoky byly následně zvlákněny v komoře zařízení Nanospider™ při 20% RH. Produktivita vláken byla v obou případech vysoká. Vedle roztoku U byl vybrán roztok P – 12% PVA88-67 ve W/EtOH (6 : 4), který se jeví jako zvláknitelný při vhodných okolních podmínkách. U roztoků P a U byl zjišťován vliv RH na zvláknitelnost roztoku a průměr vyrobených nanovláken. Roztoky byly zvlákněny v komoře zařízení Nanospider™ při 10–50% RH. Vlákna z roztoku U měli různou produktivitu při změnách RH. Vlákna PVA vykazovala trend pro hydrofilní polymery, kdy se zvyšující se RH se snižuje průměr vláken. Roztok P bylo možné zvláknit pouze do

hodnoty 35% RH. Zdá se, že nejlépe nastaveným roztokem je U – 20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (5 : 5), který zvlákněje v největší míře při hodnotách RH 20 % a 25 %.

Změnou RH bylo možné zvláknit i roztoky s malým či žádným obsahem, které za běžných podmínek nelze zvláknit. Roztoky a – 20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (8 : 2) a b – 20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W byly zvlákněny při nízkých hodnotách RH. Roztok a zvlákněje při 10 a 15% RH, kdežto roztok b pouze při 10%. Rozdíl ve zvláknitelnosti tvoří podíl vody v roztocích. Při vyšším podílu vody a vyšší hodnotě vlhkosti, se voda z roztoku odpařuje s většími obtížemi. Proto roztok a, který má nižší podíl vody, zvlákněje i při vyšší hodnotě RH než je 10 %. Roztoky s nízkým obsahem EtOH mohou mít potenciál v budoucnu důležité pro funkcionalizaci proteiny, kdy by nemuselo docházet k jejich denaturaci.

Roztoky byly následně funkcionalizovány nanočásticemi CNC. Byly připraveny a zvlákněny celkem tři roztoky s CNC. Nejlépe z hlediska produktivity zvlákněje roztok II. 5 % CNC 15 % PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (5 : 5), který má nejspíše optimální viskozitu. Lze předpokládat, že CNC podporují tvorbu vláken.

Předmětem zájmu z hlediska cytotoxicity zbytkových rozpouštědel aplikace nanovláken in situ byl materiál vyrobený SBS z roztoku 8% PCL v DCM. Pro experiment byl dále vybrán kontrolní materiál vyrobený metodou ES z 16% PCL v CF/EtOH (8:2), jehož biokompatibilita je ověřená již z dřívějších prací. Oba materiály vykazovaly viabilitu buněk nižší než 70 %. V souladu s normou ČSN EN ISO 10993-5 (855220) jsou tyto materiály považovány za cytotoxické. Zjištěná cytotoxicita kontrolního materiálu nesouhlasí s předešlými nezávislými experimenty. Jak ukázaly snímky z fluorescenčního mikroskopu, kontrolní materiál byl pokryt buňkami ve velké míře. Buňky mohly utlumit svou metabolickou aktivitu. Jejich viabilita tak vychází nižší než 70 %. Je tedy možné usuzovat, že zvolená koncentrace buněk  $2,6 \cdot 10^5$ /jamku byla pro experiment příliš vysoká.

Následně byla provedena optimalizace experimentu z pohledu nasazení buněk a jejich koncentrace v jednotlivých jamkách. Do 6jamkových mikrotitračních destiček byly nasazeny tři koncentrace buněk:  $1 \cdot 10^5$ /jamku,  $5 \cdot 10^4$ /jamku a  $1 \cdot 10^4$ /jamku. Zkoumanými materiály z hlediska cytotoxicity přímým kontaktem byla nanovláknina z roztoku 8% PCL v DCM aplikovaná metodou SBS a čisté rozpouštědlo DCM nanášené na buňky airbrushem. Pro dané koncentrace buněk byla zjištěna viabilita buněk na testovaných materiálech nižší než 70 %. To značí, dle výše uvedené normy, že materiály jsou cytotoxické. Vzhledem k biokompatibilitě PCL je za prvek způsobující toxické chování materiálu považován DCM. Vyplývá tak i z měření viability buněk, na které byl aplikovaný čistý DCM. Jednou z jeho dalších vlastností je snižování teploty místa, na které DCM dopadá. Při zvlákněování mohlo dojít k podchlazení buněk a jejich následnému snížení metabolické aktivity nebo úhynu. Kromě těchto dvou zmíněných jevů může být ve shodě s cytotoxicitou nanášených materiálů na buňky také snížená difúze látek z média vlivem přímé aplikace materiálů.

Roztok 8% PCL v DCM a 14% PCL v EtOAc byly zkoumány z hlediska biokompatibility jejich přímého nanášení na hydrogely s buněčnou kulturou ASC. Výsledky ukázaly pozitivní ovlivnění růstu buněk vlivem nanášených vláken z roztoku 8% PCL v DCM. Buňky vykazovaly i tendenci migrace do nanovláknenné vrstvy. Roztok 14% PCL vytvořil

jednotlivou vrstvu bez pórů. Buňky tímto vlivem uhynuly a roztok 14% PCL v EtOAc byl označen za nevhodný pro testování cytokompatibility na hydrogelech. Nelze ho však zcela vyřadit z výběru roztoků s benigními rozpouštědly pro metodu SBS. Materiál vyrobený z roztoku s EtOAc nevyhověl požadavkům na testování kvůli svým morfologickým vlastnostem. Buňky uhynuly z důvodu zhoršené difúze živin a CO<sub>2</sub>. Není tak jasné, zda byl pro buňky škodlivý vlivem své vlastní toxicity. Proto je stále nutné hledat optimální parametry s daným benigním rozpouštědlem, aby byla vytvořena pórovitá struktura, která umožní výměnu látek mezi okolím a buňkami. Další možností je také zabývat výběrem jiného benigního rozpouštědla pro stanovení samotné (ne)toxicity rozpouštědla pro buňky.

Nanovláknový materiál vyrobený metodou SBS z roztoku 8% PCL v DCM byl studován z hlediska mechanických vlastností. Porovnány byly materiály o dvou různých plošných hmotnostech. Ke srovnání byl vybrán i nanovláknový materiál vyrobený metodou ES z roztoku 16% PCL v CF/EtOH (8 : 2). Tato vrstva měla podobnou plošnou hmotnost jako jeden z materiálů vyrobených pomocí SBS. Dále byly srovnány naměřené hodnoty působící tahové síly, tažnosti materiálu a meze pevnost pro dané materiály. Na základě výsledků měření byl přijat předpoklad, že na mechanické vlastnosti má vliv nejen plošná hmotnost stejného materiálu, ale i technologie výroby daných nanovláken. Roli ve změně mechanického chování určité vrstvy hraje také orientace vláken v materiálu.

Dle výsledků z této diplomové práce lze konstatovat, že metoda SBS vykazuje potenciál pro využití v medicíně. Zmapování proudového pole bylo provedeno pro konec zvláknovací oblasti. Bylo by tedy dále vhodné zmapovat toto pole i blíže ústí zvláknovacího zařízení. Stále zůstává aktuální hledání řešení otázky bezpečného užívání metody SBS v lékařství nejen pro potenciálního pacienta ale i obsluhu daného zvláknovacího zařízení z hlediska rozpouštědel. Pro medicínské aplikace je však nepřijatelné používat toxické rozpouštědlo z krátkodobého natož dlouhodobého praktického hlediska. Je proto zapotřebí nalézt optimální benigní rozpouštědla pro přípravu a zvláknování roztoku.

## Použitá literatura

- [1] MEDEIROS, Eliton, Gregory GLENN, Artur KLAMCZYNSKI, William J. ORTS a Luiz MATTOSO. Solution Blow Spinning: A New Method to Produce Micro- and Nanofibers from Polymer Solutions. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2009, **113**. Dostupné z: doi:10.1002/app.30275
- [2] ATIF, Rasheed, Madeleine COMBRINCK, Jibrán KHALIQ, James MARTIN, Ahmed H. HASSANIN, Nader SHEHATA, Eman ELNABAWY a Islam SHYHA. Study of Air Pressure and Velocity for Solution Blow Spinning of Polyvinylidene Fluoride Nanofibres. *Processes* [online]. 2021, **9**(6), 1014. ISSN 2227-9717. Dostupné z: doi:10.3390/pr9061014
- [3] LUKÁŠ, David, Věra JENČOVÁ, Eva KUŽELOVÁ KOŠŤÁKOVÁ, Petr MIKEŠ a Věra HEDVIČÁKOVÁ. *NANOVLÁKNA Teorie, technologie a použití*. 1. B.m.: Technická univerzita v Liberci, Studentská 1402/2, Liberec, 2021. ISBN 978-80-7494-539-7.
- [4] GAO, Yuan, Jun ZHANG, Ying SU, Hang WANG, Xiao-Xiong WANG, Lin-Peng HUANG, Miao YU, Seeram RAMAKRISHNA a Yun-Ze LONG. Recent progress and challenges in solution blow spinning. *Materials Horizons* [online]. 2021, **8**(2), 426–446. ISSN 2051-6355. Dostupné z: doi:10.1039/D0MH01096K
- [5] DADOL, Glebert C., Ali KILIC, Leonard D. TIJING, Kramer Joseph A. LIM, Luis K. CABATINGAN, Noel Peter B. TAN, Elena STOJANOVSKA a Yusuf POLAT. Solution blow spinning (SBS) and SBS-spun nanofibers: Materials, methods, and applications. *Materials Today Communications* [online]. 2020, **25**, 101656. ISSN 2352-4928. Dostupné z: doi:behren
- [6] GAO, Yuan, Hong-Fei XIANG, Xiao-Xiong WANG, Kang YAN, Qi LIU, Xin LI, Rui-Qiang LIU, Miao YU a Yun-Ze LONG. A portable solution blow spinning device for minimally invasive surgery hemostasis. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2020, **387**, 124052. ISSN 1385-8947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2020.124052
- [7] CHUDOBOVÁ, Ema, Šárka HAUZEROVÁ, Kristýna HAVLÍČKOVÁ, Luboš BĚHÁLEK, Jana MÜLLEROVÁ, Věra JENČOVÁ, David LUKÁŠ a Eva KUŽELOVÁ KOŠŤÁKOVÁ. Rozfukování polymerních roztoků pro in situ aplikace nanovláčkových materiálů v medicíně. In: *Biomateriály a jejich povrchy XVI*. 1. Praha: České vysoké učení technické v Praze, 2023, s. 60–62. ISBN 978-80-01-07212-7.
- [8] LI, Ziwei, Zhiwen CUI, Lihao ZHAO, Naveed HUSSAIN, Yanzhen ZHAO, Cheng YANG, Xinyu JIANG, Lei LI, Jianan SONG, Baopu ZHANG, Zekun CHENG a Hui WU. High-throughput production of kilogram-scale nanofibers by Kármán vortex solution blow spinning. *Science Advances* [online]. 2022, **8**(11), eabn3690. Dostupné z: doi:10.1126/sciadv.abn3690
- [9] *AeroSpinner | ElectroBlowing + SolutionBlowing + Electrospinning* [online]. [vid. 2024-04-06]. Dostupné z: <https://www.arekagroup.com/en/products/arekanano/aerospinner.html>

- [10] CHUDOBOVÁ, Ema. *Zvlákňování biodegradabilních materiálů pomocí rozfukování polymerních roztoků* [online]. Liberec, Česká republika, 2022 [vid. 2024-02-12]. Bakalářská práce. Technická univerzita v Liberci. Dostupné z: <https://dspace.tul.cz/handle/15240/166184>
- [11] LOU, Huiqing, Wanli HAN a Xinhou WANG. Numerical Study on the Solution Blowing Annular Jet and Its Correlation with Fiber Morphology. *Industrial & Engineering Chemistry Research* [online]. 2014, **53**(7), 2830–2838. ISSN 0888-5885. Dostupné z: [doi:10.1021/ie4037142](https://doi.org/10.1021/ie4037142)
- [12] O'BRIEN, Fergal J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* [online]. 2011, **14**(3), 88–95. ISSN 1369-7021. Dostupné z: [doi:10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X)
- [13] SILVA, V. C., R. M. C. FARIAS, R. F. BONAN, J. M. CARTAXO, E. S. MEDEIROS, L. R. F. FIGUEIREDO, G. A. NEVES a R. R. MENEZES. Novel synthesis of BCP cotton-wool-like nanofibrous scaffolds by air-heated solution blow spinning (A-HSBS) technique. *Ceramics International* [online]. 2023, **49**(14, Part A), 24084–24092. ISSN 0272-8842. Dostupné z: [doi:10.1016/j.ceramint.2023.04.241](https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2023.04.241)
- [14] YANG, Futian, Fang WANG, Janine MAZAHREH a Xiao HU. Ultrasound-assisted air-jet spinning of silk fibroin-soy protein nanofiber composite biomaterials. *Ultrasonics Sonochemistry* [online]. 2023, **94**, 106341. ISSN 1350-4177. Dostupné z: [doi:10.1016/j.ultsonch.2023.106341](https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106341)
- [15] TIEN, Nguyen D., Tianxiang GENG, Catherine A. HEYWARD, Janne E. RESELAND, S. Petter LYGSTADAAS, Jonny J. BLAKER a Håvard J. HAUGEN. Solution blow spinning of highly deacetylated chitosan nanofiber scaffolds for dermal wound healing. *Biomaterials Advances* [online]. 2022, **137**, 212871. ISSN 2772-9508. Dostupné z: [doi:10.1016/j.bioadv.2022.212871](https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.212871)
- [16] YANG, Bingjie, Bangli TANG, Zunyuan WANG, Fan FENG, Guoxin WANG, Zhihui ZHAO, Zheng XUE, Jiwei LI a Weichao CHEN. Solution blow spun bilayer chitosan/polylactic acid nanofibrous patch with antibacterial and anti-inflammatory properties for accelerating acne healing. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2024, **326**, 121618. ISSN 0144-8617. Dostupné z: [doi:10.1016/j.carbpol.2023.121618](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121618)
- [17] FERREIRA, Kaline N., Raonil R. OLIVEIRA, Lúcio R. C. CASTELLANO, Paulo R. F. BONAN, Otavio V. CARVALHO, Lindomar PENA, Joelma R. SOUZA, Juliano E. OLIVEIRA a Eliton S. MEDEIROS. Controlled release and antiviral activity of acyclovir-loaded PLA/PEG nanofibers produced by solution blow spinning. *Biomaterials Advances* [online]. 2022, **136**, 212785. ISSN 2772-9508. Dostupné z: [doi:10.1016/j.bioadv.2022.212785](https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.212785)
- [18] LIVERANI, Liliana, M. KILLIAN a Aldo BOCCACCINI. Fibronectin Functionalized Electrospun Fibers by Using Benign Solvents: Best Way to Achieve Effective FunctionalizationData\_Sheet\_1.PDF. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [online]. 2019, **7**. Dostupné z: [doi:10.3389/fbioe.2019.00068](https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00068)

- [19] AVOSSA, Joshua, Gordon HERWIG, Claudio TONCELLI, Fabian ITEL a René Michel ROSSI. Electrospinning based on benign solvents: current definitions, implications and strategies. *Green Chemistry* [online]. 2022, **24**(6), 2347–2375. ISSN 1463-9270. Dostupné z: doi:10.1039/D1GC04252A
- [20] Q3C — Tables and List Guidance for Industry. nedatováno.
- [21] JOSHI, Dirgha Raj a Nisha ADHIKARI. An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity. *Journal of Pharmaceutical Research International* [online]. 2019, 1–18. ISSN 2456-9119. Dostupné z: doi:10.9734/jpri/2019/v28i330203
- [22] OLIVEIRA, Juliano E., Luiz H. C. MATTOSO, William J. ORTS a Eliton S. MEDEIROS. Structural and Morphological Characterization of Micro and Nanofibers Produced by Electrospinning and Solution Blow Spinning: A Comparative Study. *Advances in Materials Science and Engineering* [online]. 2013, **2013**, 409572. ISSN 1687-8434. Dostupné z: doi:10.1155/2013/409572
- [23] PUBCHEM. *Methylene Chloride* [online]. [vid. 2023-08-13]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6344>
- [24] PUBCHEM. *Ethyl Acetate* [online]. [vid. 2024-03-12]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8857>
- [25] PUBCHEM. *Acetone* [online]. [vid. 2024-03-12]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/180>
- [26] PUBCHEM. *Dimethoxymethane* [online]. [vid. 2023-08-23]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8020>
- [27] PALLAS, N. R. a B. A. PETHICA. The surface tension of water. *Colloids and Surfaces* [online]. 1983, **6**(3), 221–227. ISSN 0166-6622. Dostupné z: doi:10.1016/0166-6622(83)80014-6
- [28] PUBCHEM. *Water* [online]. [vid. 2024-03-12]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/962>
- [29] GRITSCH, Lukas, Liliana LIVERANI, Christopher LOVELL a Aldo R. BOCCACCINI. Polycaprolactone Electrospun Fiber Mats Prepared Using Benign Solvents: Blending with Copper(II)-Chitosan Increases the Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor in a Bone Marrow Stromal Cell Line. *Macromolecular Bioscience* [online]. 2020, **20**(3), 1900355. ISSN 1616-5195. Dostupné z: doi:10.1002/mabi.201900355
- [30] BEHRENS, Adam M., Brendan J. CASEY, Michael J. SIKORSKI, Kyle L. WU, Wojtek TUTAK, Anthony D. SANDLER a Peter KOFINAS. In Situ Deposition of PLGA Nanofibers via Solution Blow Spinning. *ACS Macro Letters* [online]. 2014, **3**(3), 249–254. Dostupné z: doi:10.1021/mz500049x
- [31] SANTOS, Adillys M. C., Eudes L. G. MEDEIROS, Jonny J. BLAKER a Eliton S. MEDEIROS. Aqueous solution blow spinning of poly(vinyl alcohol) micro- and nanofibers. *Materials Letters* [online]. 2016, **176**, 122–126. ISSN 0167-577X. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2016.04.101>

- [32] SUPRIYA BHATT, S., Goutam THAKUR a Manasa NUNE. Preparation and characterization of PVA/Chitosan cross-linked 3D scaffolds for liver tissue engineering. *Materials Today: Proceedings* [online]. 2023 [vid. 2024-03-14]. ISSN 2214-7853. Dostupné z: doi:10.1016/j.matpr.2023.02.251
- [33] SAU, Sanjib, Subhankar PANDIT a Sarathi KUNDU. Crosslinked poly (vinyl alcohol): Structural, optical and mechanical properties. *Surfaces and Interfaces* [online]. 2021, **25**, 101198. ISSN 2468-0230. Dostupné z: doi:10.1016/j.surfin.2021.101198
- [34] ZINGE, Chinmay a Balasubramanian KANDASUBRAMANIAN. Nanocellulose based Biodegradable Polymers. *European Polymer Journal* [online]. 2020, **133**, 109758. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2020.109758
- [35] MACCAFERRI, Emanuele, Davide COCCHI, Laura MAZZOCCHETTI, Tiziana BENELLI, Tommaso Maria BRUGO, Loris GIORGINI a Andrea ZUCCELLI. How Nanofibers Carry the Load: Toward a Universal and Reliable Approach for Tensile Testing of Polymeric Nanofibrous Membranes. *Macromolecular Materials and Engineering* [online]. 2021, **306**(7), 2100183. ISSN 1439-2054. Dostupné z: doi:10.1002/mame.202100183
- [36] MAILLEY, Domitille, Anne HÉBRAUD a Guy SCHLATTER. A Review on the Impact of Humidity during Electrospinning: From the Nanofiber Structure Engineering to the Applications. *Macromolecular Materials and Engineering* [online]. 2021, **306**(7), 2100115. ISSN 1439-2054. Dostupné z: doi:10.1002/mame.202100115
- [37] PELIPENKO, Jan, Julijana KRISTL, Biljana JANKOVIĆ, Saša BAUMGARTNER a Petra KOCBEK. The impact of relative humidity during electrospinning on the morphology and mechanical properties of nanofibers. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2013, **456**(1), 125–134. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2013.07.078

## Seznam obrázků

Obr. 1: Aparatura pro zvlákňování metodu SBS, převzato z Medeiros et al. [1].....	12
Obr. 2: Přenosné ruční zařízení využívající metodu SBS k aplikaci nanovláknenných krytů pro zastavení krvácení – (A) schéma zařízení, (B) snímek sestaveného zvlákňovacího zařízení, převzato z [6].....	13
Obr. 3: Zařízení airbrush – (A) airbrush, (B) detail principu metody SBS pomocí airbrushu, převzato z [7], (C) jednotlivé součástky airbrushu: 1. korunka trysky, 2. difuzér, 3. hlava trysky s tryskou, 4. rezervoár, 5. tělo airbrushu, 6. táhlo jehly, 7. pružina, 8. ložisko táhla jehly, 9. zadní kryt jehly, 10. aretační matka, 11. víčko rezervoáru, 12. jehla, 13. spoušť, (D) detail přední části airbrushu: vlevo korunka trysky, uprostřed difuzér, vpravo tryska nasazená na hlavu trysky.....	13
Obr. 4: Bezjehlová zvlákňovací aparatura pro SBS – (A) ilustrace zvlákňovacího procesu, (B) fotografie zařízení pro bezjehlový SBS, (C) snímek z vysokorychlostní kamery tvorby vlákna, převzato z [8].....	14
Obr. 5: Zvlákňovací zařízení Aerospinner, převzato z [9].....	15
Obr. 6: Schéma aparatury pro měření výstupního tlaku proudu vzduchu SBS trysky, převzato z [2]. .....	17
Obr. 7: Zvlákňovací aparatura pro metodu SBS – (A) zařízení airbrush, (B) celá aparatura pro zvlákňování – airbrush, stojánek na airbrush, hadice, redukční ventil, kompresor .....	29
Obr. 8: Soustava pro měření z jednotlivých dílů: (A) pohyblivý stolek, (B) thermoanemometrické čidlo, (C) airbrush, (D) stojan, (E) vertikální a horizontální posuvná část konstrukce, (F) ruční měřicí přístroj, (G) redukční ventil pro regulaci tlaku proudu vzduchu, (H) hadice, (I) kompresor, (J) stojánek s druhým airbrushem. Fotografie na okrajích vlevo a vpravo zobrazují detaily důležitých částí: (I.) pro měření posunu po ose y a z byla na konstrukci nalepena měřítka, (II.) pohyblivý stolek, pro posun na ose x bylo na konstrukci nalepeno měřítko (III.) detail sondy a výstupu airbrushu. ....	30
Obr. 9: Stanovení souřadného systému v prostoru pro zaznamenávání hodnot rychlosti proudu vzduchu.....	31
Obr. 10: Osy posunů thermoanemometrického čidla .....	31
Obr. 11: (1) Spunbond v dřevěném rámu na zakrývání jamek a mikrotitrační destička, (2) zakryté jamky mikrotitrační destičky.....	37
Obr. 12: Zvlákňování in situ na buňky. Mikrotitrační destička je zakryta spunbondem v dřevěném rámu. Odkrytá je pouze jamka, do níž je v daný moment zvlákňováno. ....	38
Obr. 13: Mikrotitrační destičky, v jejichž jamkách jsou buňky, DMEM a (1) materiál z 8% PCL v DCM vyrobený metodou SBS aplikovaný in situ na buňky, (2) materiál z 16% PCL v CF/EtOH (8 : 2). Mikrotitrační destička (3) obsahuje pozitivní kontrolu (pouze buňky s DMEM). V pravém dolním rohu je snímek z optického mikroskopu myších fibroblastů 3T3-NIH v jamce. ....	38
Obr. 14: 6jamkové mikrotitrační destičky s nasazenými buňkami o koncentraci (1) $1 \cdot 10^5$ /jamku, (2) $5 \cdot 10^4$ /jamku a (3) $1 \cdot 10^4$ /jamku. Do mikrotitračních destiček označených (A) s příslušnými buněčnými koncentracemi (1), (2) a (3) bude nasazen materiál z 8% PCL v DCM. Do	



mikrotitračních destiček označených (B) s příslušnými buněčnými koncentracemi (1), (2) a (3) bude nasazen samotný DCM. ....	40
Obr. 15: (A) Devět (plus jedna) připravených Petriho misek s hydrogely s buňkami na plastovém tácu, (B) detail Petriho misky s hydrogelem s buňkami a médiem, (C) schéma Petriho misky s vnitřní skleněnou miskou .....	42
Obr. 16: Vystřihování otvoru do napnutého spunbondu v dřevěném rámu.....	43
Obr. 17: (A) Odsátí média, (B) zvláknění in situ metodou SBS.....	43
Obr. 18: Odstřihávání nanovlákněného vzorku ze spunbondu.....	44
Obr. 19: Zalití vzorku 2 ml média (vlevo), výsledný vlákněný vzorek s hydrogelem zalitý médiem (vpravo).....	44
Obr. 20: Vzorek 2 bezprostředně po zvláknění.....	44
Obr. 21: (A) Ostříhnutý vlákněný vzorek, (B) zalitý vzorek médiem, (C) výsledný vzorek 2.....	45
Obr. 22: (A) Vlákněná vrstva v Petriho misce bezprostředně po zvláknění, (B) ostříhnutá vlákněná vrstva od okraje, (C) výsledný vzorek 3 zalitý médiem .....	45
Obr. 23: Snímek kontrolní Petriho misky s hydrogelem s buňkami (horní levý roh) a Petriho misky s materiály a hydrogely po 48 hodinách (3. testovací den).....	46
Obr. 24: Ostřihávání okrajů nanovlákněné vrstvy od okraje Petriho misky.....	47
Obr. 25: Doplnění 3 ml média ke vzorku s nanovlákněnou vrstvou a hydrogelem s buňkami .	47
Obr. 26: Kolektor pro nanovlákněné vrstvy vyrobené metodou SBS a aplikovaná nanovlákněná vrstva z roztoku 8% PCL v DCM .....	48
Obr. 27: Nanovlákněný vzorek upevněný v papírovém rámečku pro tahovou zkoušku .....	49
Obr. 28: Vzorek v upevňovacích hlavách – (A) před tahovou zkouškou, (B) po tahové zkoušce ..	50
Obr. 29: Porušený vzorek nanovlákněného materiálu vyrobeného metodou ES z roztoku 16% PCL v CF/EtOH (8 : 2). .....	50
Obr. 30: Graf naměřených rychlostí proudu vzduchu vzhledem k stanovenému souřadnicovému systému.....	51
Obr. 31: Graf 3D reprezentace naměřených rychlostí proudu vzduchu vzhledem k stanovenému souřadnicovému systému.....	52
Obr. 32: Výsledná vlákna z PVA roztoků vytvořená metodou SBS. Označení snímků písmeny odpovídá označení roztoků (viz Tab. 9). Měřítka snímků je 5 $\mu$ m. Měřítka snímků vláken z roztoků M a U je 10 $\mu$ m.....	58
Obr. 33: SEM snímky nanovláken z roztoku P – 12% PVA88-67 ve W/EtOH (6 : 4) a U – 20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (5 : 5) vzniklých při různých RH. Měřítka všech snímků je 20 $\mu$ m.....	62

Obr. 34: Vliv RH při zvlákňování na průměr nanovláken, chybové úsečky představují 95% interval spolehlivosti.....	63
Obr. 35: Srovnání viability buněk testovaných materiálů vůči pozitivní kontrole. Chybová úsečka představuje SD.....	68
Obr. 36: Na obrázku je červeným kruhem označená odtržená část vrstvy buněk z prostředku jamky.....	68
Obr. 37: Snímky z fluorescenčního mikroskopu materiálů s buňkami barvenými DAPI a DiOC, v jednotlivých sloupcích jsou uvedeny snímky buněk na příslušných materiálech, v řádcích jsou pak různé detaily snímků.....	69
Obr. 38: Srovnání hodnot viability buněk na materiálech a pozitivní kontroly.....	70
Obr. 39: Snímky z fluorescenčního mikroskopu buněk pod materiálem vyrobeným metodou SBS, barveno Phalloidin-FITC a DAPI.....	71
Obr. 40: Pozorované shluky DCM v jamce mikrotitrační destičky.....	72
Obr. 41: Snímky z fluorescenčního mikroskopu buněk pod DCM naneseným airbrushem, barveno Phalloidin-FITC a DAPI.....	72
Obr. 42: Snímky z fluorescenčního mikroskopu buněk pozitivní kontroly, barveno Phalloidin-FITC a DAPI.....	73
Obr. 43: Snímky z fluorescenčního mikroskopu buněk v hydrogelech, na které byly nanášena nanovlákná in situ metodou SBS – číslo řádku označuje číslo příslušného hydrogelového vzorku s nanovláknem a snímky buněk z různých pohledů zkoumané oblasti, pravý sloupec reprezentuje snímky buněk (1a, 2a, 3a) umístěných pod vlákna.....	74
Obr. 44: Snímky z fluorescenčního mikroskopu buněk ve třech kontrolních vzorcích hydrogelů.....	75
Obr. 45: Srovnání hodnot hustoty buněk na vzorcích a kontrolních hydrogelech s buňkami – (A) srovnání vzorku 1 a 2 se třemi kontrolními vzorky, (B) srovnání středních hodnot hustot buněk ze vzorků a kontrolních vzorků.....	76
Obr. 46: Snímky z fluorescenčního mikroskopu buněk v hydrogelech, na které byly nanášena nanovlákná in situ metodou SBS – řádek reprezentuje snímky buněk z různých pohledů na zkoumanou oblast hydrogelů s nanovláknem z roztoků: (A) 8% PCL v DCM a (B) 14% PCL v EtOAc. Snímek (C) přísluší kontrolním hydrogelům s buňkami.....	77
Obr. 47: Grafy průběhu tahové zkoušky materiálu vyrobeného – (A) metodou SBS z roztoku 8% PCL v DCM po dobu 1 min (17 g/m <sup>2</sup> ), (B) metodou SBS z roztoku 8% PCL v DCM po dobu 1,5 min (20 g/m <sup>2</sup> ) a (C) metodou ES z roztoku 16% PCL v CF/EtOH (8 : 2), hodnoty jsou normované na objemovou hustotu daného materiálu.....	78
Obr. 48: Porovnání hodnot meze pevnosti nanovláknenných materiálů normovaných na objemovou hustotu.....	79
Obr. 49: Porovnání hodnot tažnosti nanovláknenných materiálů normovaných na objemovou hustotu.....	79

## Seznam tabulek

Tab. 1: Parametry ovlivňující proces SBS, inspirováno publikací [4] .....	15
Tab. 2: Parametry zvlákňování roztoků PCL a PVA, převzato z [4].....	16
Tab. 3: Hodnoty parametrů ovlivňující průměr vláken a příslušné střední hodnoty průměru vláken, převzato z [2].....	17
Tab. 4: Srovnání parametrů benigních rozpouštědel s parametry DCM. Hodnoty tenze par a povrchového napětí jsou uvedeny pro teplotu, která je napsána v závorce (°C) za danou hodnotou veličiny.....	23
Tab. 5: Použité přístroje .....	26
Tab. 6: Použité polymery, PVA značí polyvinylalkohol, PEO je polyethylenoxid a PCL polykaprolakton .....	27
Tab. 7: Použité chemikálie.....	27
Tab. 8: Seznam připravených roztoků PCL s benigními rozpouštědly .....	32
Tab. 9: Seznam připravených roztoků PVA.....	33
Tab. 10: Výsledek zvlákňování roztoků PCL s benigními rozpouštědly.....	52
Tab. 11: Snímky a průměry nanovláken s jejich histogramy .....	54
Tab. 12: Výsledky zvlákňování roztoků PVA .....	57
Tab. 13: Výsledky zvlákňování metodou SBS roztoků P – 12% PVA88-67 ve W/EtOH (6 : 4) a U – 20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (5 : 5) při různých hodnotách RH .....	60
Tab. 14: Výsledky zvlákňování roztoku a – 20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (8 : 2) a b – 20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W při 10, 15, 20 a 25% RH.....	63
Tab. 15: Snímky a histogramy vláken z roztoku a – 20% PVA88-31/PEO100 (49 : ) ve W/EtOH (8 : 2) a b – 20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W při 10, 15 a 20% RH.....	65
Tab. 16: Snímky vláken z roztoků I. – 5% CNC 10% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (5 : 5), II. – 5% CNC 15% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (5 : 5) a III. – 5% CNC 20% PVA88-31/PEO100 (49 : 1) ve W/EtOH (5 : 5) a histogramy průměru nanovláken z roztoků I, II. a III. PVA a PEO s CNC.....	66
Tab. 17: Výsledky testování cytotoxicity přímým kontaktem – hodnoty viability buněk. Ve sloupci „Obsah jamky“ jsou v závorkách uvedeny metody, kterými byly materiály vyrobeny. ....	67
Tab. 18: Výsledky testování cytotoxicity přímým kontaktem – hodnoty viability buněk při různých koncentracích na materiálech. ....	70
Tab. 19: Hodnoty mechanických veličin vyrobených materiálů normované na objemovou hustotu daného materiálu.....	78