



Nanovláknenné materiály pro hojení poranění jater

Bakalářská práce

Studijní program:

B0719A130001 Nanotechnologie

Autor práce:

Pavla Leskotová

Vedoucí práce:

Ing. Miroslava Rysová, Ph.D.

Ústav nových technologií a aplikované informatiky

Konzultant práce:

Ing. Dagmar Poláková

Ústav pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace





Nanofibrous materials for liver injuries healing

Bachelor thesis

Study programme:

B0719A130001 Nanotechnology

Author:

Pavla Leskotová

Supervisor:

Ing. Miroslava Rysová, Ph.D.

The Institute for Nanomaterials, Advanced Technologies
and Innovation

Tutor:

Ing. Dagmar Poláková

The Institute for Nanomaterials, Advanced Technologies
and Innovation



Zadání bakalářské práce

Nanovláknenné materiály pro hojení poranění jater

Jméno a příjmení: **Pavla Leskotová**

Osobní číslo: M19000120

Studijní program: B0719A130001 Nanotechnologie

Zadávající katedra: Ústav nových technologií a aplikované informatiky

Akademický rok: **2021/2022**

Zásady pro vypracování:

1. Prostudujte literaturu a vypracujte rešerši týkající se metod přípravy a aktuálního stavu využití nanovláknenných vrstev na bázi hedvábného fibroinu.
2. Prostudujte teorii elektrostatického zvlákňování a vlivu procesních parametrů na průběh elektrostatického zvlákňování a výslednou morfologii nanovláknenné vrstvy.
3. Připravte sérii nanovláknenných vrstev s různým obsahem hedvábného fibroinu a ty charakterizujte z hlediska morfologie, chemického složení a dalších relevantních vlastností.
4. Ověřte biokompatibilitu připravených nanovláken in vitro na relevantní savčí buněčné linii.
5. Výsledky shrňte a diskutujte.

Rozsah grafických prací: dle potřeby dokumentace

Rozsah pracovní zprávy: 30-40 stran

Forma zpracování práce: tištěná/elektronická

Jazyk práce: Čeština



Seznam odborné literatury:

- [1] Kundu B. et al. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, 65 (4), pp. 457-470. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.043.
- [2] Qi, Y. et al. A Review of Structure Construction of Silk Fibroin Biomaterials from Single Structures to Multi-Level Structures, *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18, 237. doi:10.3390/ijms18030237.
- [3] Sasithorn, N. et al. (December 21st 2016). Fabrication of Silk Fibroin Nanofibres by Needleless Electrospinning. In: Sajjad Haider and Adnan Haider. *Electrospinning – Material, Techniques, and Biomedical Applications*, IntechOpen, 2016. doi: 10.5772/65835.
- [4] Morelli, S. et al. Hollow Fiber and Nanofiber Membranes in Bioartificial Liver and Neuronal Tissue Engineering. *Cells Tissues Organs*, 2021. doi: 10.1159/000511680.

Vedoucí práce: Ing. Miroslava Rysová, Ph.D.

Ústav nových technologií a aplikované informatiky

Konzultant práce: Ing. Dagmar Poláková

Ústav pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace

Datum zadání práce: 12. října 2022

Předpokládaný termín odevzdání: 16. května 2022

L.S.

prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D.
děkan

Ing. Josef Novák, Ph.D.
vedoucí ústavu

Prohlášení

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

Jsem si vědoma toho, že na mou bakalářskou 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 bakalářské práce pro vnitřní potřebu Technické univerzity v Liberci.

Užiji-li bakalářskou 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 bakalářská 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.

10. května

Pavla Leskotová

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala rodině, ze jejich finanční podporu v průběhu celého studia. Velké díky patří paní Ing. Johaně Kulhánkové a paní Ing. Šárce Hauzerové za jejich pomocnou ruku při laboratorní práci. Děkuji panu Ing. Martinovi Stuchlíkovi za pomoc při interpretaci dat z analýz a všem lidem z Ústavu pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace na Technické univerzitě v Liberci, kteří mi pomáhali s touto prací a přáli si zůstat v anonymitě. Také bych ráda poděkovala panu Ing. Ondřeji Linhartovi, za jeho ohromnou pomoc a motivaci v průběhu celého studia. Nakonec bych ráda poděkovala paní Ing. Miroslavě Rysové, Ph.D. za její vedení a pomoc při zpracování výsledků.

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá elektrostatickým zvlákňováním připraveného směsného roztoku silk fibroinu (SF) a polykaprolaktonu (PCL) v odlišných poměrech. Silk fibroin je přírodní protein získávaný z kokonů bource morušového. Díky své dobré biokompatibilitě, mechanickým vlastnostem a proteinovému charakteru se hedvábný protein hojně studuje z hlediska možných aplikací pro regeneraci tkání. Teoretická část této práce poskytuje přehled technologie elektrostatického zvlákňování a parametrů ovlivňující tento proces. Dále poskytuje informace o získávání a zpracování silk fibroinu, jeho vlastnostech a možnostech použití v regenerativní medicíně. Na teoretickou část navazuje praktická část, která se zabývá přípravou a charakterizací směsných nanovláken PCL/SF. Nanovlákná jsou připravována bezjehlovým elektrostatickým zvlákňováním. Jsou studovány fyzikálně-chemické vlastnosti nanovláknenného materiálu a vliv vzdálenosti kolektoru od zvlákňovací elektrody na morfologii vláken. Připravené nanovláknenné vrstvy jsou studovány za použití skenovacího elektronového mikroskopu, infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací a termogravimetrické analýzy. Elektrostaticky zvlákněný materiál je následně charakterizován z hlediska biokompatibility *in vitro*, buněčné adheze a kolonizace buněčné linie jaterních buněk HepG2.

Klíčová slova

Silk fibroin, polykaprolakton, nanovlákná, elektrostatické zvlákňování, regenerace jater

Abstract

This bachelor thesis deals with electrospinning of nanofibers containing different ratio of silk fibroin (SF) and polycaprolactone (PCL). Silk fibroin is a natural protein mainly obtained from *Bombyx mory* and its cocoons. Because of its good biocompatibility, mechanical properties and protein character SF is often studied for tissue regenerative applications. Summary of electrospinning technologies and its parameters can be found in the theoretical part. There is also described process of preparation of silk fibroin, its properties and possible applications in tissue engineering. The theoretical part is followed by a practical part, where electrospinning process, morphology and physical-chemical properties of created PCL/SF nanofibrous materials are described. Nanofibers were prepared using needleless electrospinning. Physical-chemical properties of nanofibrous materials and influence of different needle-tip-to-collector distance on morphology of fibres are studied. The electrospun material are examined using scanning electron microscope, Fourier-transform infrared spectroscopy and thermogravimetric analysis. Electrospun nanofibers are tested *in vitro* to verify biocompatibility of the materials, cell adhesion, and proliferation of cell line HepG2 cells.

Keywords

Silk fibroin, polycaprolactone, electrospinning, nanofibers, liver regeneration

Obsah

Úvod	12
1 Nanovlákna	13
1.1 Vlastnosti nanovlákenných materiálů	13
1.2 Využití nanovláken	13
1.2.1 Doprava léčiv	14
1.2.2 Filtrace vzduchu	14
1.2.3 Obličejové masky	14
1.3 Mechanické a fyzikálně-chemické metody přípravy nanovláken	14
1.2.1 Metoda tažení	15
2 Elektrostatické zvlákňování	15
2.1 Stručná historie elektrostatického zvlákňování	15
2.2 Princip elektrostatického zvlákňování	16
2.3 Typy elektrostatického zvlákňování	17
2.3.1 Jehlové elektrostatické zvlákňování	17
2.3.2 Bezjehlové elektrostatické zvlákňování	17
2.4 Parametry ovlivňující elektrostatické zvlákňování	18
2.4.1 Procesní parametry	19
2.4.2 Parametry roztoku	20
2.4.3 Klimatické podmínky	22
2.4.4 Vliv procesních parametrů na vlákna obsahující silk fibroin	23
2.5 Polymery vhodné pro elektrostatické zvlákňování	24
2.5.1 Přírodní a syntetické polymery	24
2.5.2 Silk fibroin	25
2.5.3 Kolagen	25
2.5.4 Kyselina hyaluronové	25
3 Chemikálie	25
3.1 Silk fibroin	26
3.1.1 Hedvábné vlákno	26
3.1.2 Přírodní zdroj	27
3.1.3 Chemické složení a struktura	27
3.1.4 Mechanické vlastnosti	28
3.1.5 Biokompatibilita	28

3.1.6	Degradabilita	29
3.1.7	Využití nanovlákné směsi SF v tkáňovém inženýrství	29
3.2	Sericin	30
3.2.1	Struktura	30
3.2.2	Rozdělení	31
3.2.3	Vlastnosti	31
3.2.4	Použití	32
3.3	Polykaprolakton	32
3.3.1	Příprava	33
3.3.2	Vlastnosti	33
3.3.3	Využití nanovláken ve směsi s polykaprolaktonem v tkáňovém inženýrství	34
4	Regenerace jater	36
4.1	Molekulární mechanismus regenerace jater	36
4.1.1	Iniciace	36
4.1.2	Proliferace	37
4.1.3	Terminace	37
4.2	Nanovlákná pro jaterní tkáňové inženýrství	37
4.2.1	Nanovlákná ze směsi PCL a chitosanu	37
	Cíle praktické části	39
6	Materiály a metody	39
6.1	Zpracování silk fibroinu	39
6.1.1	Degumizace silk fibroinu	40
6.1.2	Rozpouštění vláken	41
6.1.3	Dialýza silk fibroinu	41
6.2	Příprava nanovlákných vrstev	42
6.2.1	Příprava zvláknovacích roztoků	42
6.2.2	Elektrostatické zvláknování roztoků	42
6.2.3	Podmínky při zvláknování	43
7	Morfologická a fyzikálně-chemická analýza nanovlákných vrstev	44
7.1	Morfologická analýza nanovlákných vrstev	44
7.1.1	Příprava vzorku pro elektronovou mikroskopii (SEM)	45
7.2	FTIR	45
7.2.1	Příprava vzorku	46
7.3	TGA	46

7.3.1	Podmínky	46
8	Testy biokompatibility	47
8.1	MTT test	47
8.1.1	Postup	48
8.1.2	Cytotoxicita materiálů přímým kontaktem	49
8.1.3	Testy adheze a proliferace buněk na nanovlákných materiálech	50
9	Fluorescenční mikroskopie	50
9.1	Příprava vzorku	50
10	Výsledky a jejich diskuze	51
10.1	Morfologická a fyzikálně-chemická analýza nanovlákných vrstev	51
10.2	Chemická charakterizace nanovlákných vrstev	54
10.1.2	FTIR	54
10.1.3	TGA	56
10.2	Buněčné testy	57
10.2.1	Cytotoxicita	57
10.2.2	Test adheze	58
10.2.3	Test proliferace	59
10.3	Fluorescenční mikroskopie	60
	Závěr	62
	Seznam literatury	64
	Přílohy	71
	Příloha A: snímky za SEM připravených nanovlákných vrstev	73
	Příloha B: Histogramy četnosti průměrů vláken	79
	Příloha C: Výsledky z TGA pro jednotlivé materiály	82

Seznam obrázků

Obrázek 1 Ilustrace procesu vzniku nanovláken z kapky polymeru metodou tažení Převzato z (Bajáková et al. 2011).....	15
Obrázek 2 Schéma zobrazuje různé druhy trysek: A Cylindrická tryška; B Disková tryška; C Kulová tryška; D Spirální tryška Převzato z (Partheniadis et al. 2020)	18
Obrázek 3 A zobrazen měnící se tvar kapky se zvyšujícím se napětím; B zobrazen mechanismus efektu nábojů na tvar kapky Převzato z (Haider et al. 2018).....	19
Obrázek 4 A populární zdroje (1) Nephila clavipes, (2) Araneus diadematus, (3) Antheraea pernyi, (4) Samia cynthia ricini, (5) Bombyx Mori; B BM a kokony; C silk fibroin a sericin; D vodíkové můstky mezi aminokyselinami; E Nanofibrily z krystalů Převzato z (Nguyen et al. 2019)	27
Obrázek 5 Struktura silk fibroinu Převzato z (Tomeh et al. 2019).....	28
Obrázek 6 chemické vzorce sericinu, serinu, glycinu a kyseliny asparagová Převzato z (Ross et al. 2017).....	31
Obrázek 7 otevření řetězce kaprolaktonu a vznik PCL Převzato z (Jiang a Zhang 2017) ..	33
Obrázek 8 Stručné schéma využití elektrostaticky zvlákněného polykaprolaktonu v tkáňovém inženýrství. Převzato z (Janmohammadi a Nourbakhsh 2019)	34
Obrázek 9 A Namočené kokony v dH ₂ O; B Usychající shluk vláken	40
Obrázek 10 Rozpouštění vláknenných shluků	41
Obrázek 11 Film čistého silk fibroinu	42
Obrázek 12 Schéma nanospideru Převzato z (Yalcinkaya et al. 2016).....	43
Obrázek 13 Chemický vzorec MTT a jeho produktu formazanu Převzato z (Badr et al. 2022).....	47
Obrázek 14 A snímek vzorků před uvolněním formazanu; B snímek vzorků po uvolnění formazanu	49
Obrázek 15 Snímky ze SEM pro zvětšení 10kx vrstvy S1, A čisté PCL; B vrstva s 5 % SF; C vrstva s 10 % SF; D vrstva s 25 % SF; E vrstva s 50 % SF.....	52
Obrázek 16 Histogramy četnosti vláken u všech vzorků pro S4, A vzorek obsahující čisté PCL; B vzorek obsahující 5 % SF; C vzorek obsahující 10 % SF; D vzorek obsahující 25 % SF; E vzorek obsahující 50 % SF.....	53
Obrázek 17 Střední hodnoty průměrů vláken v závislosti na typu vzorku.....	54

Obrázek 18 Snímek z FTIR analýzy vzorků s různými poměry PCL a SF	55
Obrázek 19 Snímek z TGA pro vzorky s různým obsahem PCL a SF	56
Obrázek 20 Výsledky testu cytotoxicity.....	57
Obrázek 21 Výsledky testu adheze.....	58
Obrázek 22 Metabolická aktivita buněk inkubovaných na testovaných materiálech PCL a PCL s přídavkem SF v jednotlivých odběrových dnech experimentu. Testování v 3., 5. a 7. dni od nasazení buněk na materiál.....	59
Obrázek 23 Snímek z fluorescenční mikroskopie pro buněčnou kontrolu.....	60
Obrázek 24 Snímky z fluorescenční mikroskopie vzorků s odlišným obsahem SF v různých dnech kultivace	61

Seznam tabulek

Tabulka 1 Shrnutí parametrů ovlivňující proces elektrostatického zvlákňování	22
Tabulka 2 Zvlákňovací podmínky	44
Tabulka 3 Navážky vzorků pro měření TGA	46

Seznam použitých zkratk

BC	buněčná kontrola
BM	bourec morušový
C3a	trikalcium aluminát
C5a	komplementární složka 5a receptor 1
dH ₂ O	destilovaná voda
DiOC6	3,3'-dihexyloxakarbokyanin jodid
EZ	elektrostatické zvlákňování
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
H ₂ O	voda
HA	kyselina hyaluronová
HCG	choriový gonadotropin
Hepa 1-6	myšší epitalové jaterní buňky
HGF	hepatocytární růstový faktor
ICAM	intracelulární (mezibuněčná) adhezivní molekula 1
IFN-gama	interferon gama
IL-6	Interleukin-6
IR	infračervené záření
LPS	lipopolysacharid
MEM	minimální esenciální médium
MTT	3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5- difenyltetrazolium bromid
NF-κB	nukleární faktor kappa B
PBS	fosfátový pufr
PCL	polykaprolakton
PC	pozitivní kontrola
PLCL	poly(laktid-ko-ε-kaprolakton)
RGD	tripeptid Arg-Gly-Asp (složený z argininu, glycinu a kyseliny asparagové)
ROP	ring opening reaction
SEM	skenovací elektronový mikroskop
SF	silk fibroin
TGA	Termogravimetrická analýza
TGF-α	transformující růstový faktor alfa

TGF- β	transformující růstový faktor beta
TNFR1	receptor 1 nádorového nekrotického faktoru
TNF- α	faktor nádorové nekrózy

Úvod

I přes značný rozvoj technologií v posledních letech zůstává vývoj optimálních materiálů pro regeneraci tkání a tkáňového inženýrství i nadále výzvou. Jednou ze slibných technologií, které mohou přispět k rozvoji a vylepšení této problematiky, je příprava nanovláknenných materiálů pro tyto účely (Morelli et al. 2021). Nanovláknena pro své specifické vlastnosti mají široké spektrum použití. Jako příklad lze uvést dopravu léčiv (Torres-Martinez et al. 2008), filtrace vzduchu (Scholten et al. 2011), či využití v tkáňovém inženýrství (Janmohammadi a Nourbakhsh 2019). Pro tkáňové inženýrství se využívá zejména jejich struktury připomínající strukturu mezibuněčné hmoty. Dále je pro medicínské aplikace potřeba, aby materiál měl vhodnou biokompatibilitu a biodegradabilitu. Tyto vlastnosti splňuje například silk fibroin a polykaprolakton (Nguyen et al. 2019).

Silk fibroin je přírodní protein, který se nejčastěji získává z hedvábného vlákna od bource morušového. Ve vlákně protein tvoří silk fibroinové filamenty, které jsou obklopeny sericinem. Ten funguje jako lepidlo a jednotlivá vlákna drží pohromadě ve tvaru kokonu. Silk fibroin vyniká pro své mechanické vlastnosti, biodegradabilitu a biokompatibilitu (Kundu et al. 2013). Pro medicínské aplikace je možné ho zkombinovat s polykaprolaktonem, který lze rozložit působením lipáz nebo esteráz. Polykaprolakton je alifatický polyester hojně využívaný v tkáňovém inženýrství, například v kombinaci se želatinou, či kolagenem (Safaeijavan et al. 2014).

Častou metodou pro přípravu nanovláken je elektrostatičké zvláknování. Během tohoto procesu dochází za působení elektrostatičkého pole k soustředění náboje na povrchu kapaliny. Ten se zformuje do Taylorova kužele a následně dojde k vytrysknutí polymeru. V průběhu letu dochází k vysušování rozpouštědla a formaci vlákna. (Partheniadis et al. 2020)

Nanovláknenné materiály byly v průběhu posledního desetiletí zkoumány pro využití v regeneraci a tkáňovém inženýrství různých tkání. Jednou z těchto tkání je také tkáň jaterní. Její poranění se vyznačuje silným krvácením, často vnitřním, které může ohrožovat život pacienta. Nanovláknenné struktury mohou díky své malé porozitě zabraňovat krvácení a podporovat hojení tkáně. (Semnani et al. 2017)

TEORETICKÁ ČÁST

1 Nanovlákná

Nanovlákná se díky svým výjimečným vlastnostem proslavila po celém světě. Ve srovnání s běžnými vlákny umožňují až obdivuhodně široké spektrum použití. Jsou výrazně lehčí, mají menší rozměry a vysoký poměr povrchu ku objemu. Také lze kontrolovat rozměry jejich porézních struktur. Mezi nemálo možností využití patří například aplikace ve filtraci, senzorech, ochranném oblečení, tkáňovém inženýrství, funkčních materiálech a uchovávání energie. Ač je už tak použití nanovláken široké, jejich využití v budoucnu je ještě slibnější. Mezi konkrétní odvětví s jistě velkým potenciálem patří například výzkum nanovláknenných kompozitních materiálů. (Cai et al. 2012)

Vlastnosti nanovláken do značné míry závisí na vlastnostech konkrétního polymeru, směsi polymerů, či taveniny, ze které jsou připraveny. Pro přípravu mohou být použity jak syntetické, tak přírodní polymery. Jako konkrétní příklady lze zmínit chitosan, kolagen, celulóza, silk fibroin, polykaprolakton, či polyuretan. (Huang et al. 2003)

1.1 Vlastnosti nanovláknenných materiálů

Jednou ze signifikantních výhod nanovláken je jejich ohromný povrch, který je tisíckrát větší než povrch mikrovláken. Vyznačují se vysokou porézností s menšími rozměry pórů. Dostupná literatura se rozchází v definování velikosti nanovlákná, ale podle citované literatury se za vlákna obvykle považují nanovlákná, pokud jsou o velikosti 50 až 1000 nanometrů (Jirsák 2006). Vlastnosti nanovláken z konkrétních polymerů jsou popsány v dalších kapitolách.

1.2 Využití nanovláken

Nanovlákná mají rozsáhlé možnosti využití, od biomedicínských aplikací přes použití v textilním průmyslu až po filtraci vzduchu. Velmi často se využívají v tkáňovém inženýrství (Huang et al. 2003), které je detailněji popsáno u konkrétních polymerů použitých pro tento účel.

1.2.1 Doprava léčiv

V biomedicínských aplikacích se nanovlákná využívají například pro cílenou dopravu léčiv. Jednou z klíčových vlastností pro toto použití je, jak již bylo zmíněno výše, vysoký poměr povrchu ku objemu. Principem je zakomponování léčiv do nanovláknenného materiálu tak, aby bylo možné kontrolovat uvolňování účinné látky. Nanovlákná pro tuto aplikaci nesmí způsobovat vysokou imunitní reakci organismu, musí být biokompatibilní a biodegradabilní. Dobrymi kandidáty pro systém dopravy léčiv je například želatina a kyselina alginová. (Torres-Martinez et al. 2008)

1.2.2 Filtrace vzduchu

Díky svým vlastnostem jsou elektrostaticky zvlákněná vlákna více než vhodná pro odstranění těkavých organických látek z atmosféry. Jako zástupce z ideálních polymerů pro tyto účely bude popsán polyuretan. Jeho značnou výhodou je schopnost rapidní absorpce. Ačkoliv se pro tyto účely častěji používá aktivovaný uhlík, který má větší povrch, schopností sorpce se mu polyuretanová vlákna dokáží vyrovnat. Takovýto materiál také prokazuje kompletní reversibilní absorpci i desorpci, kterou lze získat prostým očištěním dusíkem za pokojové teploty. Polyuretanová vlákna vykazují vysokou afinitu k toluenu a chloroformu, ovšem alifatický hexan není schopen vytvořit dostatek silných interakcí s polyuretanovým řetězcem, a tudíž je méně absorbován. (Scholten et al. 2011)

1.2.3 Obličejové masky

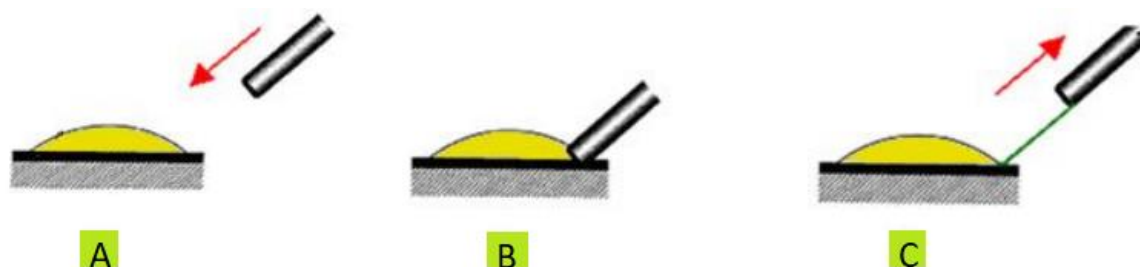
Všeobecné povědomosti populace o nanotextiliích přispěla nešťastná situace vyvolaná celosvětovou pandemií viru Covid-19. Pro výrobu nanovláknenných roušek byla použita metoda elektrostatického zvláknění a cílem bylo zabránit nositeli vdechovat nebezpečné substance. Příkladem mohou být toxické chemikálie či nakažlivé částice. Chirurgická maska by měla mít minimálně 80% bakteriální filtrační účinnost a pro její výrobu se nejčastěji využívá polypropylen. (Liao et al. 2016)

1.3 Mechanické a fyzikálně-chemické metody přípravy nanovláken

Nanovlákná lze připravit celou řadou metod. Jednou z nejproslavenějších je elektrostatické zvláknění (Jirsák 2006). Jelikož tento způsob přípravy byl využit v rámci této bakalářské práce, je mu věnována samostatná kapitola, která popisuje tento proces podrobněji. Jako příklad další možné přípravy je v této kapitole stručně popsána metoda tažení.

1.2.1 Metoda tažení

Tímto procesem je možné získat dlouhá jednotlivá vlákna. Bohužel si metoda tažení s sebou nese značné omezení ohledně použitelného materiálu. Pro tento proces jsou vhodné pouze takové viskoelastické látky, které dokáží snést značnou deformaci (Huang et al. 2003). Proces tažení je doprovázen procesem tuhnutí, kdy dochází k rapidní evaporaci rozpouštědla kvůli velkému povrchu vznikajícího vlákna. Na následujícím obrázku 1 je zobrazené jednoduché schéma zmíněného procesu. V první části (A) je na substrát aplikovaná mililitrová kapka polymerního roztoku. Následně se mikropipeta přiblíží až k okraji samotné kapky (B). V poslední části (C) se mikropipeta určitou rychlostí vzdaluje od kapky, a tím dochází k natahování polymerního roztoku a vzniku vlákna. (Bajáková et al. 2011)



Obrázek 1 Ilustrace procesu vzniku nanovláken z kapky polymeru metodou tažení
Převzato z (Bajáková et al. 2011)

2 Elektrostatické zvlákňování

Při elektrostatickém zvlákňování (EZ) jde o přípravu nanovláknenných materiálů za použití elektrostatických sil. Pomocí nábojů je povrch polymerního roztoku zdeformován tak, že dojde k jeho vypuzení a tvorbě vlákna, které může měřit několik stovek nanometrů. Ke generování vláken z roztoku touto metodou není potřeba procesu koagulace či vysokých teplot. Elektrostatické zvlákňování lze provádět z kapalných roztoků i z tavenin. (Haider et al. 2018)

2.1 Stručná historie elektrostatického zvlákňování

První pozorování elektrostatické přitažlivosti kapaliny zaznamenal v r. 1600 William Gilbert. Dalším významným historickým krokem se stala zdařilá produkce vysoce nitrované celulózy Christianem Friedrichem. Významný milník udělal John Francis Cooley, který v r. 1900 vydal první patent na elektrostatické zvlákňování. K současnému procesu EZ také přispěl John Zeleny, jehož publikace se týkala chování kapek kapaliny na konci kovové kapiláry. Tento objev vedl ke snaze matematicky definovat chování kapek kapaliny

v elektrostatickém poli. Antonovi Formhalsovi se v letech 1931 až 1944 podařilo publikovat nejméně 22 patentů na EZ. Dalším vědcem, který zanechal své jméno v historii elektrostatického zvlákňování, byl Sir Geoffrey Ingram Taylor. Tomuto fyzikovi se podařilo položit teoretické základy EZ vytvořením matematického modelu tvaru vznikajícího kužele, dnes známým jako Taylorův kužel, který se vytvoří pod působením elektrického pole. Pro ohromný úspěch této metody není překvapením, že počet publikací na toto téma od r. 1995 se každým rokem zvyšuje. Dochází k stálému vylepšování této metody z hlediska technologie samotné i testování zvláknitelnosti materiálů. (Tucker et al. 2012)

2.2 Princip elektrostatického zvlákňování

Elektrostatické zvlákňování je unikátní přístup k používání elektrostatických sil k produkci nanovláken z polymerních roztoků nebo z tavenin. Výhodou takto vytvořených vláken oproti těch získaných běžnou zvlákňovací metodou je menší rozměr od mikrometrů až po nanometry a větší povrch. Pomocí EZ je možné zvláknit přes 100 druhů polymerů a jejich směsí, jak přírodních, tak syntetických. (Ma et al. 2019)

Aparatura pro elektrostatické zvlákňování se obecně skládá ze tří komponentů. Mezi ty patří zdroj energie, generátor vláken a kolektor vláken. Pro tento proces je potřeba stejnosměrné či střídavé napětí o velikosti až několika desítek kV. Generátor vláken způsobuje posun prekursoru polymerního roztoku skrz trysku s jedním koncem připojeným k pozitivně nabitě elektrodě zdroje energie. Kolektor vláken je pak připojený k negativně nabitě elektrodě. Nejčastějším typem EZ je zvlákňování z jehly, další možností je bezjehlové (tzv. z volné hladiny), nebo zvlákňování z taveniny. Podle dostupné literatury se formace vláken dá popsat pomocí teorie „elektrostatické přitažlivosti“. Mezi kolektorem a generátorem vláken v přítomnosti vnějšího elektrického pole vzniká silný elektrický potenciál. Pokud je zajištěna vhodná vzdálenost kolektoru a generátoru, prekursor se elektricky nabije a vytvoří se trajektorie pro nabitě tekuté vlákno vytryskující z jehly. Nejdříve pozitivně nabitě kapky, které vznikají na generátoru vláken (elektrodě), vytvoří kónický tvar Taylorova kužele. Vrchol kužele se protáhne, tím se zároveň zostří, dojde k překonání povrchového napětí kapky a nabitá tekutina je vytrysknuta ke kolektoru. Poté se Taylorův kužel navrátí do hemisférického tvaru. V průběhu letu vlákna je jeden konec přitahován ke kolektoru a zbytek vlákna tedy přechází z vysokého elektrického potenciálu do nízkého. Nanovláknena se buď přichytí ke kolektoru nebo k vláknům, která se na něj již přichytila. Výsledná nanovláknenná vrstva může obsahovat statisíce nanovláken. (Zhang et al. 2022)

2.3 Typy elektrostatického zvlákňování

Jednou z mnoha možností, jak rozčlenit elektrostatické zvlákňování, je rozdělení podle použitého generátoru vláken. Takto lze rozčlenit EZ na jehlové a bezjehlové zvlákňování. (Partheniadis et al. 2020)

2.3.1 Jehlové elektrostatické zvlákňování

Konvenční uspořádání aparatury elektrostatického zvlákňování je standartě současně jehlové zvlákňování. Tento proces byl podrobněji popsán výše. Obvykle generátor vláken tvoří dávkovací zařízení s tryskou (jehlou). Časem se však zvýšily nároky na diverzitu vláken pro různé aplikace, a proto byly požadovány různorodé typy vláken (pórovitá vlákna, dutá vlákna, bikomponentní vlákna a množství dalších), pro které byl nutný vývoj i specifických tvarů či uspořádání trysek. Jako příklad lze uvést jednoduchou trysku, koaxiální trysky či excentrickou trysku, bikomponentní trysku, trojkomponentní trysku a další. Formování a morfologii mikro až nanovláken lze ovlivnit (kromě použité trysky) vlastnostmi polymerního roztoku, jako může být koncentrace, viskozita, molekulová hmotnost, rozpouštědlový systém a další (Zhang et al. 2022). Parametrům majícím vliv na zvlákňování je věnovaná samostatná kapitola.

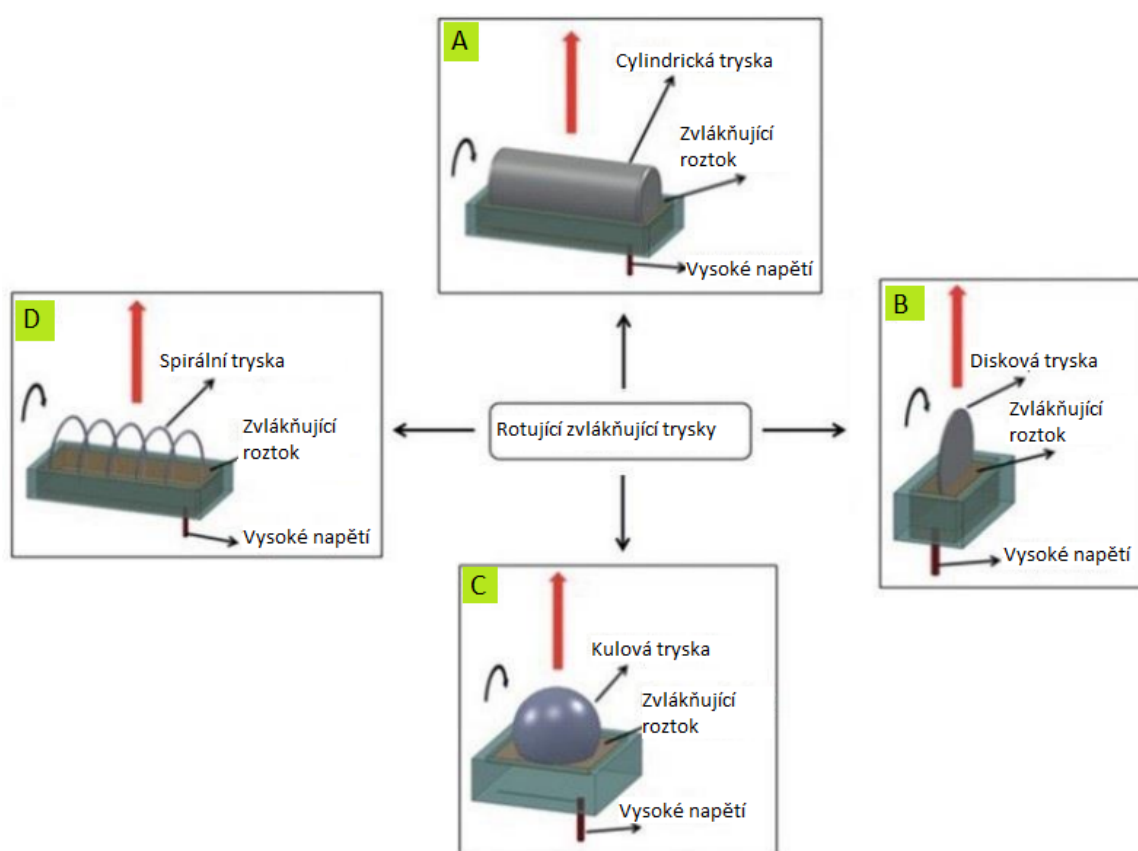
Při běžném elektrostatickém zvlákňování má jehla často duální roli. Slouží jako elektroda elektrického pole a zároveň jako pevný bod, odkud vytryskuje roztok. Existuje i několika trysková zvlákňovací aparatura, která je schopna produkovat více komponentních nanovlákných sítí. Hlavním cílem tohoto systému je zlepšit rychlost dávkování polymerního roztoku, a tak zvýšit rychlost produkce vláken. Mezi nevýhody několika tryskových systému patří časté ucpávání otvorů jehel (Zhou et al. 2010).

2.3.2 Bezjehlové elektrostatické zvlákňování

Jako bezjehlové zvlákňování je označován proces generace nanovláken za technologii elektrostatického zvlákňování přímo z povrchu polymerního roztoku bez použití zvlákňovací jehly. Úplně první experimentální aparaturu se podařilo sestavit v roce 1979 za použití systému kruhových elektrod jako trysek. V následujících letech se tato technologie těšila tak velké pozornosti, že roku 2005 bylo patentováno první zařízení pro bezjehlové zvlákňování. Toto zařízení je známo pod komerčním názvem „Nanospider“ (Partheniadis et

al. 2020). Jedná se o stroj použitý pro výzkum této bakalářské práce, proto mu je věnována větší pozornost v praktické části této publikace.

Principiálně je bezjehlové zvlákňování založené na použití externích sil ke koncentraci elektrického náboje na povrchu volné kapaliny, dokud se nedosáhne dostatečné intenzity k vzniku Taylorova kužele. V případě použití odvalující se elektrody se ke kontinuální iniciaci Taylorova kužele v polymerním roztoku využívá rotace. Standardně se směr zvlákňování zaměřuje směrem vzhůru, aby se předešlo nechtěnému vzniku kapek a dalších nedokonalostí, které mají negativní vliv na kvalitu výsledného materiálu. Různé možnosti rotujících trysek jsou znázorněny na následujícím obrázku 2. (Partheniadis et al. 2020)



Obrázek 2 Schéma zobrazuje různé druhy trysek: A Cylindrická tryska; B Disková tryska; C Kulová tryska; D Spirální tryska
Převzato z (Partheniadis et al. 2020)

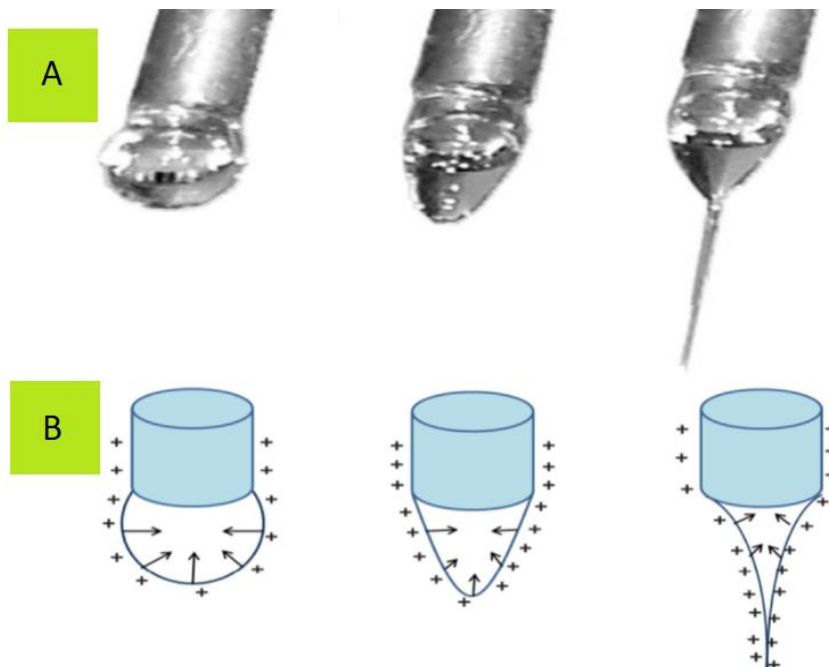
2.4 Parametry ovlivňující elektrostatické zvlákňování

Elektrostatické zvlákňování je komplexní proces závislý na mnoha parametrech, které je možné vnímat jako trojího typu. První parametry mají spojitost s nastavením přístroje, jako je například použité napětí, vzdálenost kolektoru od trysky atd. Do druhého typu se mohou zařadit vlastnosti použitého roztoku, jako může být viskozita či molekulová hmotnost.

Posledním typem jsou vlivy prostředí, kam se dá zařadit teplota a vlhkost okolí (Bhardwaj a Kundu 2010). Shrnutí těchto parametrů je zaznamenáno v tabulce na konci této podkapitoly.

2.4.1 Procesní parametry

Při procesu elektrostatického zvlákňování je aplikované napětí na polymerní roztok jeden z nejdůležitějších parametrů, kdy po dosažení kritické hodnoty dochází k e젝ci vláken. Napětí, které k roztoku dochází přes napojení na kovovou jehlu, způsobuje, že vzniklá sféricky tvarovaná kapka se přetransformuje do tvaru Taylorova kužele. Tento efekt je zobrazen na následujícím obrázku 3. Hodnota kritického napětí je odlišná pro jednotlivé polymery a rozpouštědlové systémy. Dostupná literatura se poněkud rozchází, co se týče přesného vlivu velikosti aplikovaného napětí na velikost vláken. Ovšem ve většině případů vyšší napětí způsobuje větší natahování roztoku, protože působí vyšší coulombické síly v jehle a stejně tak dobře kvůli silnějšímu elektrickému poli. Vznikají tedy nanovlákná o menších rozměrech. Zvýšením aplikovaného napětí nad kritickou hodnotu může vést ke vzniku korálkovitých vláken (ovšem záleží na složení a koncentraci roztoku). Vznik takového vzhledu je připisován zmenšení rozměrů Taylorova kužele a zvýšení rychlosti vytryskování roztoku pro stejnou rychlost dávkování. (Haider et al. 2018)



Obrázek 3 A zobrazen měnící se tvar kapky se zvyšujícím se napětím; B zobrazen mechanismus efektu nábojů na tvar kapky
Převzato z (Haider et al. 2018)

Již výše zmíněný parametr, kterým je rychlost dávkování, označuje, s jakou rychlostí se do elektrického pole vstříkuje polymer. S rostoucí rychlostí dávkování se zvětšují rozměry

vláken a dochází k vyšší pórovitosti materiálu. V některých případech může být nižší rychlost dávkování více žádaná, protože pak bude dostatek času pro odpaření rozpouštědla. Pro každý polymerní roztok je nutné nalézt optimální dávkovací rychlost. Například u polystyrenových vláken změnou rychlosti dávkování může docházet k slabým změnám v morfologii vláken. Vyšší rychlost může vyústit v korálkovitá vlákna, protože není dostatek času pro správné vysušení vlákna před dosažením kolektoru. (Bhardwaj a Kundu 2010)

Jeden z dalších zkoumaných parametrů je vzdálenost kolektoru od špičky jehly. Měněním této vzdálenosti je možné kontrolovat rozměry vláken a jejich morfologii. Při ideální vzdálenosti je dostatek času, aby se z letícího vlákna stihlo vypařit rozpouštědlo a vlákno bylo schopné dopadnout na kolektor. Pokud je vzdálenost příliš velká, dochází ke snižování výrobnosti procesu. V případě příliš malé zvláknovací vzdálenosti jsou formována nanovlákná s horší strukturou. Vliv tohoto parametru se liší v závislosti na složení a parametrech zvláknovacího roztoku. Například u řady polymerů bylo pozorováno, že při menší vzdálenosti vznikají hladká vlákna. Naopak pro polysulfonáty kratší vzdálenost znamená vytvoření vláken o menších rozměrech. (Bhardwaj a Kundu 2010)

2.4.2 Parametry roztoku

Jak již bylo zmíněno výše, parametry roztoku patří mezi jedny z nejdůležitějších a rozhodně nezanedbatelných vlivů na proces EZ. Mezi parametry, které budou popsány, se řadí koncentrace, molekulová hmotnost, viskozita, povrchové napětí a vodivost.

Bylo zjištěno, že koncentrace má zásadní vliv na rozměry vláken. Pokud je koncentrace příliš malá, vliv elektrického pole společně s povrchovým napětím způsobí roztržení polymerního vlákna na více segmentů ještě před dosažením kolektoru. Tyto fragmenty způsobují vznik kapek a korálkových vláken. Zvyšování koncentrace povede ke zvýšení viskozity polymerního roztoku a růstu průměru formovaných nanovláken. Při překročení optimální koncentrace může být obtížná až nemožná ejakce vlákna z kapky a vzhledem k většímu propletení polymerních řetězců nedochází ke vzniku kontinuálních vláken. (Haider et al. 2018)

Dalším důležitým faktorem ovlivňující EZ je molekulární hmotnost polymeru. Optimální rozsah molekulových hmotností se liší pro každý polymer s ohledem na rozvětvení řetězce a také jeho náboj. Při použití roztoku s nižší molekulovou hmotností dochází k tzv. electrosprayingu nebo k formování směsi nanovláken a kapek. Stejně efekty bývají

pozorovány při použití zvláknovacích roztoků s vyšší molekulovou hmotností ale nízkou koncentrací a tedy viskozitou. Všeobecně vede vyšší molekulová hmotnost k vyšší viskozitě roztoku. Prostorové uspořádání, v tomto případě spletení řetězce, má také značný vliv. Právě v takovém případě, když je roztok o nižší koncentraci ale o vysoké molekulové hmotnosti, tak to může být dostačující k dosažení potřebné viskozity pro ejetci vláken. (Bhardwaj a Kundu 2010)

Viskozita byla už několikrát zmíněna v souvislosti s ostatními parametry (molekulová hmotnost, koncentrace), což jen dokazuje důležitost této vlastnosti polymerního roztoku. Ta také hraje význačnou roli v morfologii vláken. Bylo zjištěno, že s velmi nízkou viskozitou nedochází ke vzniku kontinuálních vláken, zatímco s vysokou viskozitou se ztěžuje ejetce vláken z trysky. Pro proces EZ by pro každý roztok měla být zajištěna optimální viskozita. Při vyšší viskozitě nebo koncentraci polymerní roztoky tvoří více uniformní vlákna a s většími průměry. (Bhardwaj a Kundu 2010)

Neopomenutelný vliv má i povrchové napětí. Různé polymerní roztoky mají odlišné hodnoty této veličiny. Ta souvisí nejen s vlastnostmi zvláknovaného polymeru, ale také s použitým rozpouštědlovým systémem. Obecně platí, že vyšší povrchové napětí ztěžuje, až znemožňuje elektrostatické zvláknování, protože dochází k nestabilitě při ejetci vlákna. Povrchové napětí dokonce ovlivňuje morfologii vláken. Příkladem může být vznikání kapek, korálkových vláken či hladkých vláken. V podstatě povrchové napětí určuje spodní a horní hranici všech proměnných a konstant tak, aby vzniklo ono žádané okno vhodné pro EZ. (Bhardwaj a Kundu 2010)

Poslední parametr roztoku, který bude probírán v této bakalářské práci je vodivost. Nabité ionty v roztoku mají velký vliv na generování vláken z trysky. Vodivost totiž značně ovlivňuje tvar Taylorova kužele a také velikosti nanovláken. S velmi nízkou konduktivitou povrch kapky nebude možné dostatečně nabít, aby se mohl zformovat do Taylorova kuželu. Tudíž nebude docházet k elektrostatickému zvláknování. Zvýšení vodivosti nad kritickou hodnotu opět negativně ovlivní vznik kužele. V případě volení velikosti konduktivity mezi kritickými hodnotami bude s vyšší vodivostí docházet k znatelnému zmenšení průměrů vláken. Také bylo zjištěno, že přidáním iontových solí, jako dihydrogenfosforečnan sodný, lze získat kvalitnější vlákna s poměrně malými rozměry v rozmezí 200 až 1000 nm. Tento způsob pro zvýšení vodivosti roztoku lze použít například pro polymery jako je kolagen, polyethylenglykol či polyvinylalkohol. (Bhardwaj a Kundu 2010; Haider et al. 2018)

2.4.3 Klimatické podmínky

Jako poslední je důležité brát v potaz i nezanedbatelné vlivy prostředí na proces zvlákňování. Mezi tyto vlivy patří vlhkost vzduchu a teplota okolního prostředí. Ty významně ovlivňují zejména rychlost odpařování rozpouštědla. Vliv těchto podmínek silně závisí na použitém rozpouštědle a také na zvlákňovaném polymeru. Například při testování vlivu teploty na polyamid 6 bylo prokázáno, že se zvyšující se teplotou je možné dosáhnout vzniku vláken o nižších rozměrech. To je možné vysvětlit tak, že s vyšší teplotou dojde ke snížení viskozity polymerního roztoku. (Bhardwaj a Kundu 2010)

Vlhkost prostředí má vliv nejen na průměr ale i jejich kvalitu a morfologii jejich povrchu. Při zvlákňování polystyrenu se ukázalo, že s vysokou vlhkostí se na povrchu vláken objevují kruhové póry. Při velmi nízké vlhkosti se rozpouštědlo vypařuje až s pozoruhodnou rychlostí. Ovšem tak velká rychlost vypařování nemusí být vždy žádaná, protože může docházet k zasychání polymerního roztoku na generátoru vláken. Podle některých zdrojů je i možné, že zvýšená vlhkost může napomáhat k odstranění náboje vzniklých vláken. (Bhardwaj a Kundu 2010)

Tabulka 1 Shrnutí parametrů ovlivňující proces elektrostatického zvlákňování

Typ	Parametr	Efekt na morfologii vláken
<i>Parametry roztoku</i>	Viskozita	Nízká: generace koráلكovitých vláken Vysoká: zvětšení rozměrů vláken, zmizení kapek
	Koncentrace polymerního roztoku	Zvětšení rozměrů vláken se zvyšující se koncentrací
	Molekulová váha roztoku	Se zvyšující se molekulovou hmotností snížení tvoření kapek a koráلكových vláken
	Vodivost	Menší rozměry vláken se zvyšující se vodivostí
	Povrchová napětí	Žádný přímý vliv na morfologii vláken Vyšší povrchové napětí způsobuje nestabilitu výtrysku
	Aplikované napětí	Zvyšující napětí snižuje rozměry vláken

<i>Procesní parametry</i>	Vzdálenost mezi kolektorem a špičkou jehly	Generují se korálková vlákna s příliš malou nebo příliš velkou vzdáleností, je požadována minimální vzdálenost pro uniformní vlákna
	Feed rate/Flow rate	zmenšení rozměrů vláken se s malým feed rate, generování korálkových vláken s příliš vysokým flow rate
<i>Parametry prostředí</i>	Vlhkost	Vysoká vlhkost vyústí ve vznik pórovitých vláken
	Teplota	Zvýšení teploty má za následek zmenšení rozměrů vláken

Převzato z (Bhardwaj a Kundu 2010)

2.4.4 Vliv procesních parametrů na vlákna obsahující silk fibroin

Podle dostupné literatury jedním z nejvíce ovlivňujících parametrů je koncentrace roztoku. Při zvláknování roztoku silk fibroinu (SF) o koncentraci od 8 až do 14 % při 15 kV a 25 °C se ukázalo, že pro případ nízké koncentraci (8 %) se namísto vláken spíše formovaly kapky. Získaná vlákna nebyla uniformní a průměr se pohyboval kolem 72 nm. Experiment také ukázal, že při zvláknování roztoku s koncentrací SF nad 8 % se formovala kontinuální vlákna bez ohledu na velikost použitého napětí. Při koncentraci nad 10 % se průměr vláken pohyboval v rozmezí 60-450 nm. Experimenty ukázaly trend, že se zvyšující se koncentrací se zvětšují průměry vláken. (Mohammadian a A.K. 2012)

V porovnání s vlivem koncentrace použité napětí nezpůsobuje tak znatelné změny v rozměrech vláken. Při zvláknění roztoku SF o koncentraci 10, 12 a 14 % se použilo napětí o velikosti 10, 15 a 20 kV při 25 °C. Podle výsledku experimentu se předpokládá, že s vyšší teplotou a vyšším aplikovaným napětím dochází k rozdělení výtrysku vlákna, tudíž dochází ke snížení průměru vláken. (Mohammadian a A.K. 2012)

Při studování vlivu teploty procesu EZ se ukázalo, že při teplotě 75 °C byly získána rovná vlákna, zatímco při teplotě 25 °C vlákna měla hladký povrch a tvořila kruhové uspořádání. Při této teplotě se průměry vláken pohybovaly v rozmezí 100 až 300 nm s nejčastějším rozměrem 180 nm, při teplotě 75 °C se průměry vláken pohybovala v rozmezí 500 až 4100 nm s nejčastějším rozměrem 1100 nm. Na základě těchto výsledků bylo usouzeno, že

se zvyšující se teplotou se zvětšuje rozmezí i nejčastější hodnota průměrů vláken. (Mohammadian a A.K. 2012)

2.5 Polymery vhodné pro elektrostatické zvlákňování

Polymerů, které se dají použít pro proces elektrostatického zvlákňování, je celá řada. V průběhu let se úspěšně podařilo zvláknit více než 200 různých polymerů a jejich směsí. Ty musí mít správné vlastnosti a být schopny vytvořit vlákna submikroskopických a menších rozměrů. Mezi takové patří přírodní, syntetické, či kombinace obou polymerů. Pro zvlákňování je možné použít i směsi, které v sobě obsahují například proteiny, aminokyseliny a polysacharidy. Zvlákňování směsí polymerů se využívá pro zlepšení zpracovatelnosti obtížně zvláknitelných látek nebo pro dosažení optimálních vlastností nanovláken vzhledem k jejich aplikaci. (Bhardwaj a Kundu 2010)

2.5.1 Přírodní a syntetické polymery

V porovnání se syntetickými polymery ty přírodní vykazují lepší biokompatibilitu a často menší imunitní reakci organismu při medicínských aplikacích. Pro tyto vlastnosti jsou také v lékařství hojněji využívány. Jednou z hlavních výhod přírodních polymerů je bioaktivita a schopnost podporovat adhezi a proliferaci buněk. Ta byla pozorována zejména v případě proteinů nesoucích sekvenci aminokyselin RGD (neboli arginin, glycin a kyselina asparagová) ve svém řetězci. V posledních letech se spíše začaly preferovat přírodní polymery. Jako zástupce lze zmínit kolagen, chitosan, želatina, kasein, silk fibroin, chitin atd. (Bhardwaj a Kundu 2010)

Syntetické polymery mohou nabízet některé výhody oproti přírodním. Například pomocí různých úprav je snazší dosáhnout cílených vlastností. Syntetické polymery také často poskytují lepší mechanické vlastnosti. Jako konkrétní příklad lze zmínit pevnost či určitá rychlost degradace. Běžné syntetické polymery používané v biomedicínských aplikacích jsou hydrofobní a biodegradabilní polyestery, jako například kyselina polyglykolová, kyselina polymléčná a polykaprolakton (Bhardwaj a Kundu 2010). Degradace polykaprolaktonu se pohybuje kolem 2 až 3 let (Li a LaBarbera 2017).

2.5.2 Silk fibroin

Tento protein patří mezi běžně používané polymery ke zvláknění. Jelikož se jedná o jeden z hlavních polymerů použitých pro tuto bakalářskou práci, je mu věnována samostatná kapitola, ve které je popsán více detailně.

2.5.3 Kolagen

Kolagen je jeden z velmi často vyskytujících se polymerů v našem těle. Tento skleroprotein spíše nezpůsobuje imunitní reakci organismu, a právě proto se velmi často využívá v tkáňovém inženýrství, ve kterém se používá na testování *in vitro* a *in vivo*. Tvoří základní strukturní prvek extracelulární matrice a jeho hlavní funkcí je fungovat jako strukturální podporu tkáně. (Bhardwaj a Kundu 2010)

2.5.4 Kyselina hyaluronové

Hyaluronové kyselina (HA) je lineární polysacharid, který se skládá z opakující se kyseliny glukuronové a N-acetylglukosaminu. HA je jeden z hlavních komponentů extracelulární matrice spojovací tkáně a má spoustu důležitých biologických funkcí. Tento polysacharid se dá použít jako molekulární síto, podporná struktura pro kolagenová vlákna a díky své skvělé biokompatibilitě a biodegradabilitě se i velmi hojně využívá v biomedicíně. Často se používá například v tkáňovém inženýrství, pro dopravu léčiv i při léčbě artritických symptomů. Pro svou vyšší viskozitu, povrchové napětí a schopnosti retence vody HA nepatří mezi jednoduše zvláknitelné polymery. Tyto vlastnosti způsobují obtížnější průběhu elektrostatického zvláknování, protože v průběhu letu vlákna ke kolektoru nemusí docházet k úplnému vypaření rozpouštědla. To pak má negativní vliv na morfologii vláken a strukturu celkového materiálu. Z těchto důvodů se ke zvláknění HA využívá metoda tzv. electroblowing. Tato metoda v podstatě kombinuje použití proudu vzduchu a elektrostatického zvláknování. (Um et al. 2004; Bhardwaj a Kundu 2010)

3 Chemikálie

Pro celou tuto práci jsou stěžejní dvě látky. Mezi ty patří silk fibroin a polykaprolakton. Jelikož se v hedvábném vlákne společně se silk fibroinem do značné míry vyskytuje i sericin, je mu v této části taktéž věnována pozornost. Následující kapitola se zaměřuje na popis vlastností, struktury a dalších parametrů těchto polymerů.

3.1 Silk fibroin

Silk fibroin patří do skupiny přírodních proteinů. Tento fibroin je produkován řadou různých druhů hmyzu. Mezi nejznámější zástupce patří bourec morušový (dále pak BM). Kokony od tohoto nočního motýla se používají pro přípravu hedvábí téměř 500 let. Mezi hlavní důvody pro hojné uplatnění SF patří jeho unikátní vlastnosti jako je vysoká odolnost, elasticita, biokompatibilita a další. (Sasithorn et al. 2016)

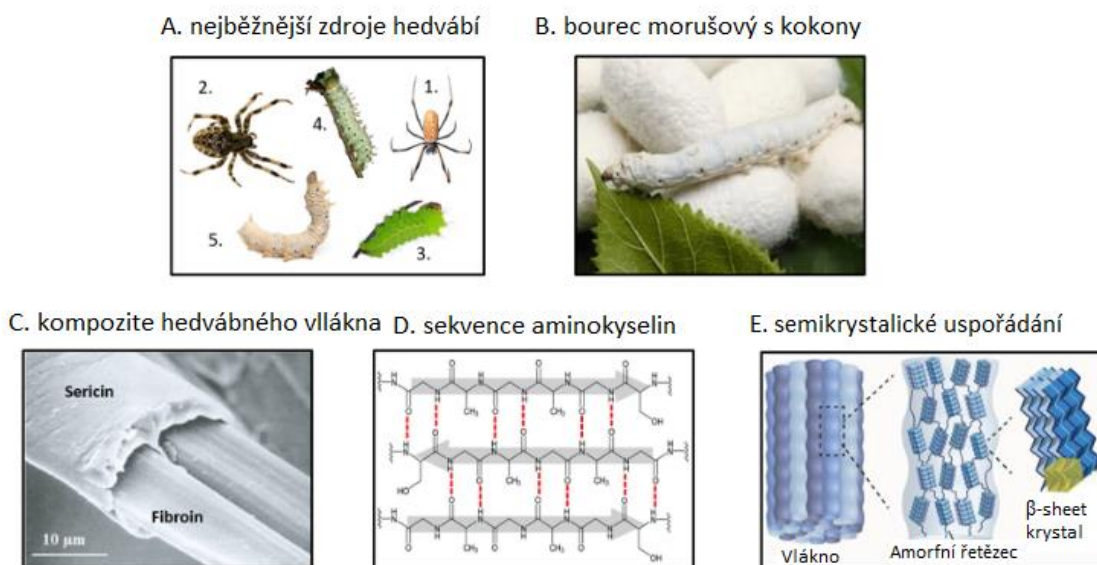
3.1.1 Hedvábné vlákno

Různé druhy fibroinových vláken tvoří, krom již zmíněného bource morušového (*Bombyx mori*), také pavouci, škorpióni, včely a roztoči. Ty jsou ukázány na obrázku 4 A. Navzdory několika možnostem je nejvýhodnější odebrat vlákno právě od BM. Z jednoho kokonu je možné získat 600 až 1500 metrů, což je v porovnání s pavoučími vlákny, ze kterých se dá získat přibližně 150 metrů, značný rozdíl. Další nevýhodnou vlastností pavoučích vláken je jejich heterogenita. Z těchto důvodů se pro textilní průmysl využívají vlákna získané převážně od BM. Můrami produkované hedvábí je možné rozdělit na tzv. mulberry a non-mulberry. První zmíněné, a také více kvalitní, vytváří právě bourec morušový, druhý typ je pak produkován motýly čeledi martináčovitých. (Kundu et al. 2013)

Tato hedvábná vlákna získaná z kokonů bource morušového se skládají ze dvou hlavních proteinů: silk fibroin (obvykle 72 až 81 hm%) a sericin (19 až 28 hm%), zbytek tvoří tuk s voskem (0,8 až 1 %) a barvivo s popelem (1 až 1,4 %) (Nguyen et al. 2019). Průřez vlákna by se dal popsat jako dva rovnostranné trojúhelníky přiložené jednou stranou k sobě a obklopené obalem. Snímek vlákna je možné vidět na taktéž na obrázku 4 C. Tyto vnitřní útvary tvoří SF vlákna a zmíněný obal je tvořen sericinem. Sericin v tomto případě slouží jako lepidlo držící vnitřní objekty i kompletní hedvábná vlákna pohromadě (Padamwar a Pawar 2004).

Popsané SF filamenty jsou tvořené nanovláknky, které měří v průměru 3 až 5 nanometrů a tvoří základní stavební bloky hedvábného vlákna. Mezi sebou velmi silně reagují a skládají se do větších vlákenných jednotek (mikrofibrily), které v průměru měří 20 až 200 nm. Mikrofibrily se společně s nanovláknky uspořádávají paralelně do SF filamentů, a právě toto uspořádání v prostoru a silné vzájemné interakce způsobují skvělé mechanické vlastnosti. (Nguyen et al. 2019). SF filamenty se skládají jak z krystalických, tak amorfních domén. Charakteristickým znakem pro amorfní část je přítomnost aminokyselin s většími

postranními řetězci. Naproti tomu krystalické domény obsahují vysoký podíl alaninu, glycínu a serinu. (Padamwar a Pawar 2004).



Obrázek 4 A populární zdroje (1) *Nephila clavipes*, (2) *Araneus diadematus*, (3) *Antheraea pernyi*, (4) *Samia cynthia ricini*, (5) *Bombyx Mori*; B BM a kokony; C silk fibroin a sericin; D vodíkové můstky mezi aminokyselinami; E Nanofibrily z krystalů

Převzato z (Nguyen et al. 2019)

3.1.2 Přírodní zdroj

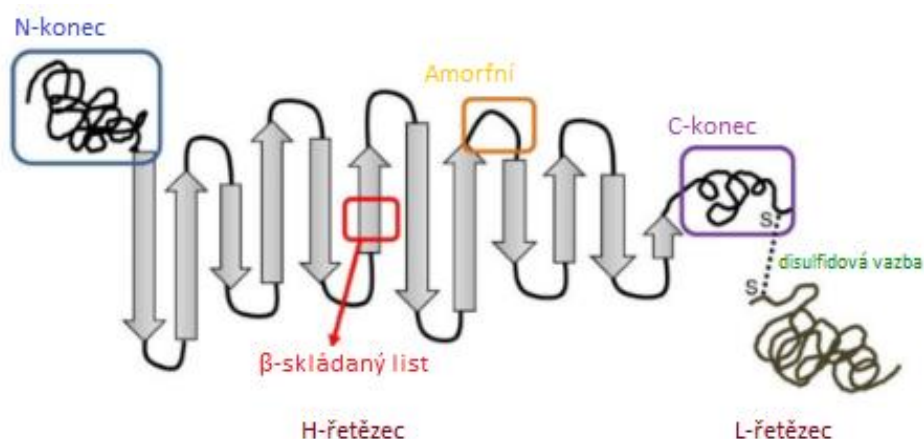
Tento protein se tvoří ve slinných žlázách členovců zmíněných výše. Během jejich metamorfózy se SF spřede do vláken, které se mohou uspořádat například do tvaru kokonu (Kundu et al. 2013). Na obrázku 4 B je možné vidět bource morušového a popisované kokony.

3.1.3 Chemické složení a struktura

Molekulová hmotnost SF se většinou pohybuje v rozmezí 200 až 350 kDa. Tento protein se skládá z dvou řetězců, které jsou spojeny disulfidovou vazbou. První z nich, těžší řetězec (H), může mít až 390 kDa, zatímco druhý a zároveň lehčí (L) řetězec má pouhých 26 kDa. K hlavnímu řetězci je také nekovalentně připojený glykoprotein s názvem P25, jehož molekulová hmotnost dosahuje 30 kDa. Poměr H-řetězce, L-řetězce a P25 je přibližně 6:6:1. Již zmíněný hydrofobní těžší řetězec tvoří většinu SF a skládá se z aminokyselin, jako jsou glycin (46 %), alanin (30 %), serin (12 %), tyrosin (5,3 %), valin (1,8 %) a další (Asakura 2021). Naproti tomu hydrofilní lehčí řetězec obsahuje menší množství aminokyselin, mezi

něž patří alanin (14 %), serin (10 %) a glycin (9 %) (Nguyen et al. 2019). Mezimolekulové interakce mezi sekvencemi aminokyselin v SF jsou znázorněny na obrázku 4 D.

Hydrofobní domény v H-řetězci obsahují glycin, opakují se a díky vyššímu poměru alaninu, glycinu a přítomnosti polyalaninových bloků mohou vytvářet antiparalelní strukturu beta-skládaného listu. Naopak L-řetězec je hydrofilní a poměrně elastický. Non-mullberry hedvábí obsahuje především H-řetězec, naopak L-řetězec a P25 se v něm prakticky nevyskytují. Kvůli odlišnostem v chemickém složení se non-mullberry a mullberry hedvábí značně liší v mechanických vlastnostech, bioaktivitě a degradaci. Jako příklad chemické odlišnosti lze zmínit odlišný poměr zásaditosti a kyselosti, polárnosti a nepolárnosti, hydrofility a hydrofobity (Kundu et al. 2013). Na obrázku 4 E je zobrazeno vlákno, amorfní řetězec a zvětšený krystal v prostorovém uspořádání beta-skládaného listu. Celkový pohled na prostorové uspořádání silk fibroinu je možné vidět na obrázku 5.



Obrázek 5 Struktura silk fibroinu
Převzato z (Tomeh et al. 2019)

3.1.4 Mechanické vlastnosti

Mezi jedny z klíčových vlastností SF patří mechanická pevnost. Například materiál obsahující SF s použitím v tkáňovém inženýrství musí mít stejnou pevnost jako cílová tkáň. Tato vlastnost má také přímý vliv na stabilitu a degradabilitu polymeru. Běžným způsobem, jak dosáhnout vyšší tuhosti, je použití síťovacích činidel, ty však mohou vykazovat nežádoucí cytotoxicitu. (Tomeh et al. 2019)

3.1.5 Biokompatibilita

Biokompatibilita tohoto polymeru se testovala především v posledních dvou dekadách. Většina odborné literatury se shoduje, že SF prokázal velmi dobré biokompatibilní vlastnosti

a jen minimální imunitní reakce organismu v porovnání například s kolagenem. Hojně používání tohoto proteinu v medicíně jen prokazuje jeho skvělou kompatibilitu s různými buněčnými liniemi, jako jsou hepatocyty, osteoblasty, fibroblasty atd. Podle dostupné literatury se často pro zpracování SF používají organická rozpouštědla, jako je metanol či etanol. Tento postup vede k zesíťování proteinu do uspořádání alfa-helix nebo beta-skládaného listu. Ovšem tato rozpouštědla mohou mít zánětlivé účinky. Aby se předešlo možným nežádoucím reakcím organismu, používají se procesy bez těchto rozpouštědel. (Tomeh et al. 2019)

3.1.6 Degradabilita

Přestože velmi dobrá biodegradabilita je pro SF význačná, degradabilita hraje neopomenutelnou roli v klinických aplikacích. Degradabilita způsobuje náchylnost tohoto polymeru vůči proteolytickým enzymům a může být regulována změnou molekulové hmotnosti, stupněm krystalinity, změnou morfologie či síťováním. (Tomeh et al. 2019)

3.1.7 Využití nanovláknenné směsi SF v tkáňovém inženýrství

Pro úspěšnou náhradu části lidského těla je zapotřebí správná komunikace mezi tkání a implantovaným materiálem. Tyto požadavky kladou na biomateriál značné nároky a často se pro lepší výsledné vlastnosti materiálu SF mísí s dalšími polymery tak, aby vyhověl nárokům cílené tkáně. Kompozity obsahující SF se mohou aplikovat na vaskulární, kožní, kostní, nervovou tkáň a spoustu dalších. (Kundu et al. 2013)

Jednou z možných tkání pro aplikaci SF materiálu je vaskulární tkáň. Tento materiál se klinicky používá při léčbě aneurysma a na stehy. Velmi důležitým požadavkem pro vytváření cévní podpůrné struktury je, aby aplikovaný materiál byl schopný vydržet změny krevního tlaku a cyklické natahování. Výhodou SF materiálu je, že má anti-trombotický povrch, dobrou rezistenci vůči vysokému smykovému namáhání a odolnost proti krevnímu tlaku. Zvlákněním se z SF podařilo připravit tubulární náhražku cévy o délce 3 mm a tloušťce 0,15 mm, která má průměrnou pevnost v tahu 2,42 MPa. Podle citované literatury se u 2 ze 3 pacientů po aplikování SF materiálu pro léčbu aneurysma ukazují slibné výsledky. (Kundu et al. 2013)

Další možným použitím SF materiálu je pro hojení kožní tkáně. Kůže má omezenou schopnost sebeléčení, což je jeden z důvodů pro zájem o aplikaci medicínálního materiálu na tuto tkáň.

Lidská kůže dospělého člověka se skládá z dvou hlavních vrstev. První je epidermis obsahující keratin a druhou dermis, která především obsahuje kolagen. Materiál obsahující SF podporuje keratinocyty a fibroblasty, ovšem komplexní struktura nativní tkáně vyžaduje kompozitní tkáňové nosiče. Pro tento účel se SF nanáší s kolagenem, který zlepšuje adhezi a růst keratinocytů. Další používané kompozity pro aplikaci na kožní tkáň jsou nanovláknenné materiály obsahující kombinaci SF a chitinu nebo SF a kolagenu. (Kundu et al. 2013)

Výzkum regenerace tkáně pomocí nanomateriálů se provádí i na osteoblastech. Kost slouží jako opora těla a skládá se z kalcifikované extracelulární matrixe, která hlavně obsahuje kolagen typu I a hydroxylapatit. Tudíž tkáňový nosič pro kostní tkáň musí zaručit dostatečnou matrixovou pevnost. Pro přípravu materiálu s takovými podmínky je SF velmi vhodný pro své mechanické vlastnosti a biokompatibilitu. (Kundu et al. 2013)

Pro regeneraci nervové tkáně se využívají kompozity z SF a chitosanu. Menší poranění je nervová soustava schopna zahojit si sama, ale pro zhojení závažnějších poranění centrální nervové soustavy je nutno zasáhnout operativně. Pro tyto účely se mohou použít tkáňové nosiče. SF podporuje viabilitu spinálního ganglionu a Schwannových buněk bez ovlivňování jejich fenotypu a funkcí. Při testování na krysách se ukázalo, že kompozity ze SF a chitosanu jsou schopny přemostit otvor o délce 10 mm, který vzniká jako defekt sedacího nervu. Důležitou roli v regeneraci nervové tkáně hraje především mikro architektura tkáňového nosiče. (Kundu et al. 2013)

3.2 Sericin

Sericin je protein, který tvoří BM společně s SF při produkci hedvábného vlákna. V tomto vlákne je obsažen v menší míře než silk fibroin (přibližně z 20 až 30 %). Hlavní podstatou sericinu je obalit SF a držet tak vnitřní struktury a vzniklá vlákna pohromadě. Hedvábné vlákno je díky přítomnosti sericinu tuhé a tvrdé. Po jeho odstranění se vlákno stane lesklým a měkkým. (Padamwar a Pawar 2004)

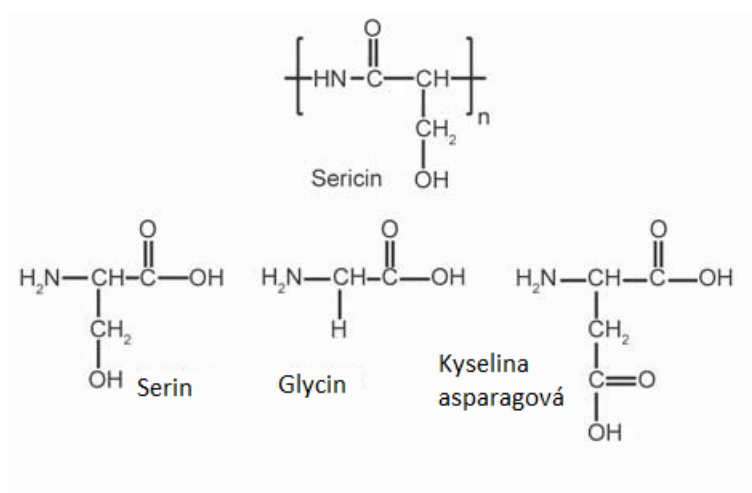
3.2.1 Struktura

Tento protein se skládá z 18 různých aminokyselin, z kterých je nejvíce zastoupený serin (32 %), v menší míře také obsahuje glycin a kyselinu asparagovou. Sericin se nejčastěji vyskytuje v amorfním globulárním uspořádání. V této konfiguraci je také nejlépe rozpustný. Ovšem také se může vyskytovat v sekundární struktuře beta-skládaného listu, která je už

hůře rozpustitelná. Uspořádání lze ovlivnit změnou lici teploty. Při nižší teplotě bude sericin spíše tvořit sekundární strukturu beta-skládaného listu. (Padamwar a Pawar 2004)

3.2.2 Rozdělení

Studie za použití gama záření prokázaly, že sericin v hedvábném vlákne tvoří tři vrstvy, které se liší svým prostorovým uspořádáním vláken. Nejvnitřnější vrstva je standardně tvořena z podélně směřujících vláken, střední vrstvu tvoří křížově jdoucí vlákna a vnější vrstva se skládá z vláken směřujících ve směru hlavního vlákna. Sericin tvořící jednotlivé vrstvy lze také charakterizovat na základě rozpustnosti na tři typy. V dostupné literatuře jsou pojmenovány jako sericin A, sericin B a sericin C. Sericin A tvořící nejzevnější vrstvu obsahuje 17,2 % dusíku společně s aminokyselinami, jako je serin, threonin, kyselina asparagová a glycin. Nejvíce zastoupené aminokyseliny je možné vidět na obrázku 6. Mezi nejtypičtější vlastnosti tohoto typu patří jeho nerozpustnost v horké vodě. Sericin B tvoří střední vrstvu a obsahuje 16,8 % dusíku. Nejspodnější vrstvu, a tedy vrstvu nejbliže k SF, tvoří sericin C. Sericin C je nerozpustný v horké vodě a lze ho od SF odstranit přidáním horké zředěné kyseliny nebo alkálií. Tento typ také obsahuje síru a 16,6 % dusíku. (Padamwar a Pawar 2004)



Obrázek 6 chemické vzorce sericinu, serinu, glycinu a kyseliny asparagová
Převzato z (Ross et al. 2017)

3.2.3 Vlastnosti

Molekulová hmotnost sericinu závisí na způsobu získání. Při extrakci sericinu gelovou elektroforézou za použití horké vody je molekulová hmotnost 24 000, ovšem při použití

metody sprejového sušení lze získat sericin s molekulovou hmotností v rozmezí 5 000 až 50 000. Další možností je použití enzymů, díky kterým se dá získat sericin o molekulové hmotnosti 300 až 10 000. Tento protein se také dá extrahovat za použití vodného roztoku močoviny při teplotě 100 °C. (Padamwar a Pawar 2004)

Další vlastností hodnou zmínění je rozpustnost. Jak už bylo uvedeno výše, rozpustnost sericinu klesá v případě uspořádání proteinu do struktury beta-skládaného listu. Tuto vlastnost lze ovlivnit přidáním například polyakrylamidu či formaldehydu, kdy dojde k jejímu snížení. V případě uspořádání do globulární struktury lze tento protein rozpustit v horké vodě. Pokud teplota klesá, sericin přechází do konformace beta-skládaného listu a do formy gelu. Tato vlastnost umožňuje použití metody sol-gel, pro kterou je podstatná snadná rozpustnost ve vodě při teplotě 50 až 60 °C. Při chlazení se opět navrátí do formy gelu. (Padamwar a Pawar 2004)

3.2.4 Použití

Sericin nachází své uplatnění v medicíně a kosmetice. Díky své elasticitě a pevnosti v tahu společně s přirozenou afinitou ke keratinu se primárně využívá pro zašívání ran. Současně se tento protein s vysokou biokompatibilitou a přirozenou odolností vůči infekcím využívá jako koagulant pro hojení ran. (Ersel et al. 2016)

Při použití v kosmetice se prokázal jeho pozitivní vliv na elasticitu kůže a několik protistárnoucích účinků. To je možné díky minimalizaci ztráty vody z kůže. Přítomnost sericinu zvyšuje hydroxyprolin v stratum corneum, což je následováno poklesem impedance kůže, a to způsobí zvýšení vlhkosti kůže. Minimalizovat ztrátu vody a navrátit kůži přirozenou vlhkost, kterou udržují přírodní zvlhčující faktory, lze také provést přidáním poloxamerů a uhlí společně se sericinem do gelu. (Padamwar a Pawar 2004)

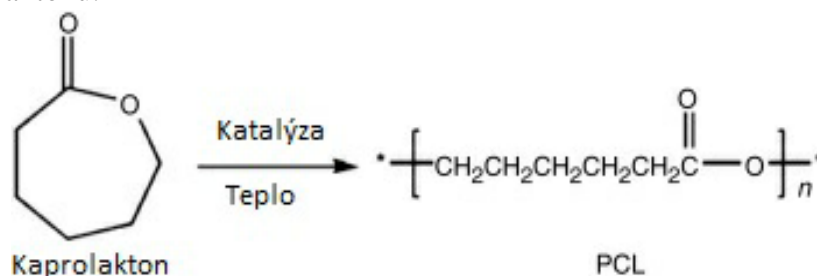
3.3 Polykaprolakton

Polykaprolakton (PCL) je alifatický polyester. Díky svým biodegradabilním a biokompatibilním vlastnostem se těší značného použití v medicíně. Nejčastěji se využívá v podobě nanovláknenných vrstev pro tkáňové inženýrství, které se připravují elektrostatickým zvlákněním. Další možností pro jeho využití je doprava léčiv v organizmu. Konkrétně se nanovláknena z PCL mohou použít pro kostní, kardiovaskulární, nervový a kožní tkáňové inženýrství. (Janmohammadi a Nourbakhsh 2019)

3.3.1 Příprava

PCL se tradičně připravuje reakcí ROP (v angličtině ring-opening reaction), která se běžně využívá k syntéze biodegradabilních polymerů, jako je právě PCL. V kinetickém průběhu a mechanismu se tato reakce podobá řetězcové i stupňovité polymeraci. Mezi podobné prvky s řetězcovou polymerací patří rozdělení průběhu mechanismu do iniciace, propagace a terminace. Ovšem způsob připojení monomeru je stejný jako u stupňovité polymerace. Jedním z rozdílů mezi ROP a stupňovitou reakcí například je, že monomer a větší polymer spolu nereagují, jak se tomu děje u stupňovité polymerace. Jako odlišnosti mezi ROP a řetězcovou polymerací lze například zmínit, že iniciace a navazující kroky mohou probíhat stejně rychle. Z tohoto důvodu se ROP nedá označit za řetězovou reakci z hlediska kinetiky. (Macchione et al. 2021)

Během této reakce dochází k rozpojení řetězce ϵ -kaprolaktonu. Jako jeden z možných katalyzátorů se používá 2-ethylhexanoát cínatý, ovšem je možné použít celou řadu dalších katalyzátorů (Labet a Thielemans 2009). Na obrázku 7 je zobrazeno jednoduché schéma ROP kaprolaktonu.



Obrázek 7 otevření řetězce kaprolaktonu a vznik PCL
Převzato z (Jiang a Zhang 2017)

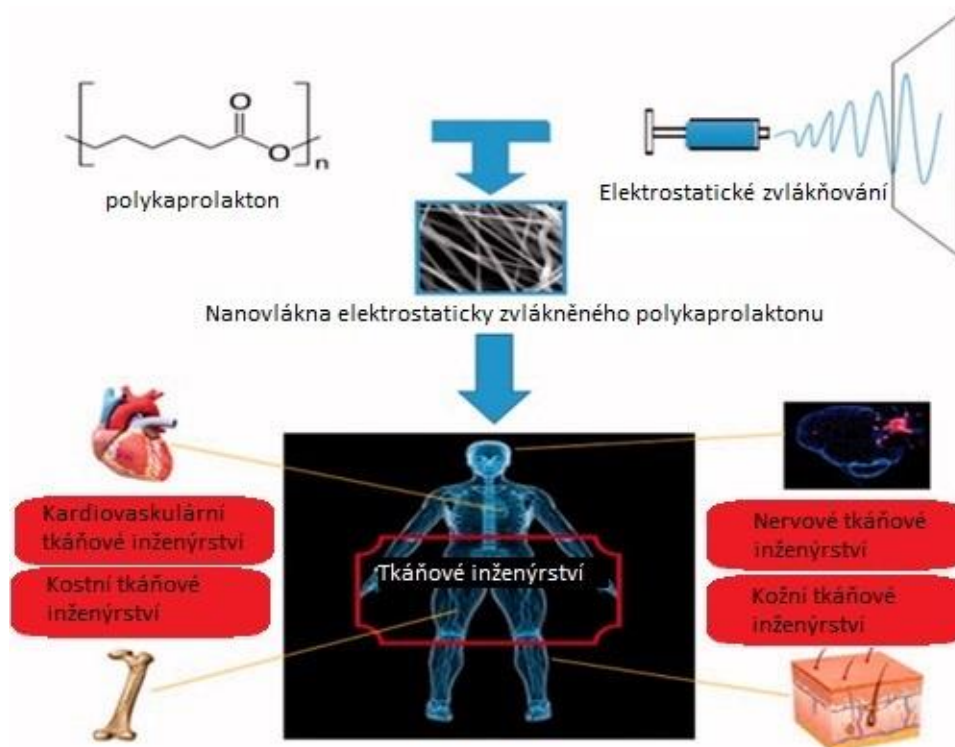
3.3.2 Vlastnosti

Tento polymer je charakteristický pro svou vysokou biodegradabilitu, velmi nízkou teplotu tání (60 °C) a teplotou skelného přechodu o hodnotě -60 °C. Prokázalo se, že PCL je možné rozložit za působení aerobních i anaerobních organismů, které jsou velmi rozšířené v různých ekosystémech. Tento polymer lze také rozložit například za působení lipáz nebo esteráz. Ovšem tato schopnost závisí na molekulové hmotnosti PCL a stupni krystalinity. Rychlejší degradace byla pozorována v amorfních úsecích. Vyšší biodegradability lze dosáhnout kopolymerizací s alifatickými polyestery. Důvodem, proč je toto možné provést,

je fakt, že kopolymery mají z pravidla nižší krystalinitu než homopolymery a jsou tak snadněji rozložitelné. (Tokiwa et al. 2009)

3.3.3 Využití nanovláken ve směsi s polykaprolaktonem v tkáňovém inženýrství

Jak již bylo zmíněno výše, PCL se hojně využívá v medicíně. Pro jednotlivé odvětví uplatnění se hodí různé vlastnosti, a proto se PCL smíchává i s jinými polymery, aby těchto požadovaných charakteristik bylo dosaženo (Safaeijavan et al. 2014). Tato kapitola se zaměřuje na stručný popis použití PCL v různých směsích pro tkáňové inženýrství, jehož jednoduchá schéma je ukázáno na následujícím obrázku 8.



Obrázek 8 Stručné schéma využití elektrostaticky zvlákněného polykaprolaktonu v tkáňovém inženýrství. Převzato z (Janmohammadi a Nourbakhsh 2019)

Jedna z konkrétních možností aplikací je použití v kostním tkáňovém inženýrství. Kost v našem těle plní roli pevné mechanické opory a pomáhá při dodávání vápníku a fosfátů do organismu. Nanovláknenný materiál, který je vyvíjen pro rekonstrukci kostní tkáně, musí mít pro tento účel vhodné vlastnosti. Pro výrobu metodou EZ se často používá směs PCL a nanohydroxyapatu. PCL představuje vhodný materiál díky svým mechanickým vlastnostem a možnosti upravit rychlost degradace. Pro zlepšení antibakteriálních vlastností se přidává tetracyklin hydrochlorid, který však ve větším množství může být pro buňky toxický. Ovšem

správná dávka a na správném místě může zamezit lokální infekci kostní tkáň. Jednou z dalších možností pro přípravu tkáňového nosiče pro osteoblasty je například směs PCL a oktakalcium hydrochloridu. (Janmohammadi a Nourbakhsh 2019)

Další možné použití v medicíně je příprava nosiče pro kardiovaskulární tkáň. To zahrnuje opravu a rekonstrukci cév, srdeční chlopně, a dokonce i celého srdce. Za účelem lepších hydrofilních vlastností se na tento materiál z PCL aplikuje povrchová úprava kyslíkovou plazmou. Jako konkrétní příklad se dá popsat aplikace na srdeční tkáň, pro kterou je nejlepší používat kombinaci přírodních a syntetických polymerů. Za těmito účely se elektrostaticky zvláknují směsi PCL a želatiny, nebo je možné použít směs kyseliny poly(L-mléčné) s PCL a kolagenem. Po testování zmíněné kombinace se ukázalo, že tkáňové nosiče s obsahem kolagenu vytvářejí vhodnější strukturu pro cévy, než směs PCL a želatiny. Z toho vyplývá, že tkáňové nosiče obsahující kolagen v porovnání s želatinou projevují slibnější výsledky. (Safaeijavan et al. 2014)

Jiné využití PCL je možné najít pro přípravu tkáňových nosičů pro nervovou tkáň. Nervový systém je jeden z nejdůležitějších systémů v organismu, který při poškození může ovlivnit funkci celého těla. Díky pokroku v tkáňovém inženýrství je možný nový přístup k nahrazení a opravení poškozené tkáň. Po úspěšné aplikaci materiálu lze pozorovat podpoření růstu nervových buněk a předcházení vzniku fibrilárních jizev. Tkáňové nosiče byly vytvořeny elektrostatickým zvláknováním poly(L-laktid-co-ε-kaprolaktonu), který v sobě obsahuje PCL a kyselinu polymléčnou. Pro lepší stimulaci růstu nervové tkáň se ke koaxiálnímu tkáňovému nosiči přidává glykoprotein laminin. Další možností je připravit materiál ze směsi PCL a chitosanu, nebo PLCL a kolagenu. (Kijeńska et al. 2014)

Jako poslední možné použití PCL v této bakalářské práci bude popsána aplikace v kožním tkáňovém inženýrství. Kůže, považována za největší orgán, má funkci první bariéry, která chrání organismus před okolním prostředím a udržuje jeho integritu. Žádaný materiál se připravuje z kompozitu obsahující PCL, želatinu a kolagen typu I. Tato směs prokázala skvělé vlastnosti pro užití v kožním tkáňovém inženýrství a hojení poranění. Projevila se její dobrá biokompatibilita a buněčné testy také ukázaly skvělou proliferaci a buněčnou adhezi u tkáňových nosičů obsahující kolagen. (Gautam et al. 2014)

4 Regenerace jater

Regenerace jater je velmi podstatný proces pro správnou funkci organismu. Obnovení a hojení jaterní tkáně se skládá z fází iniciace, proliferace a terminace. Procesy jako proliferace a buněčný růst se dají podpořit stimulací cytokiny a růstovými faktory (HGF a TGF – alfa). (Fujiyoshi a Ozaki 2011)

4.1 Molekulární mechanismus regenerace jater

Játra se skládají z několika typů buněk. Mezi ty patří hepatocyty, Kupfferovy buňky, endoteliální výstelka sinusoid, Itovy buňky a kmenové buňky. Tyto buňky vytváří komplex, který iniciuje interakce uvnitř jater. Takto dobře organizovaná síť je funkčně spojená s orgány, jako je štítná žláza, nadledviny, slinivka břišní, duodenum a autonomní nervový systém. Zmíněné nejaterní orgány a systémy využívají hormony pro synchronizovanou spolupráci, regulaci funkcí a chování jater i jaterních buněk. Mezi hormony, které mají zmíněný vliv, patří insulin, glukagon, trijodthyronin, noradrenalin, somatostatin a růstové faktory. (Fujiyoshi a Ozaki 2011)

Mezimolekulární interakce mezi jaterními buňkami jsou zprostředkovány růstovými faktory (HCG, TGF – alfa a IFN-gama). Tento nezávislý kontrolní systém dosahuje přesné a různé regulace regenerace jater. Růstové faktory a cytokiny mají schopnost okamžitě a synchronizovaně evokovat různé buněčné pochody, které jsou nezbytné pro jaterní regeneraci. Časový vývoj specifických aktivovaných signálních cest během regenerace může být rozdělený na tři fáze. První fází je iniciace, druhou pak proliferace a poslední terminace. V každé fázi byly zpozorovány charakteristické buněčné a molekulární děje. (Fujiyoshi a Ozaki 2011)

4.1.1 Iniciace

Na začátku iniciační fáze regenerace jater jsou aktivovány Kupfferovy buňky. Jako stimulanty působí LPS, C3a, C5a a ICAM. Poté začne produkce a vylučování TNF-alfa. Tento faktor nádorové nekrózy následně autokrinně aktivuje Kupfferovy buňky, které obsahují receptor TNFR1. Vzniká signální dráha, která s pomocí NF-kB stimuluje expresi genu Interleukin-6 (IL-6). Ten je schopný se vázat na receptory hepatocytů, což vyvolává vznik signálu k proliferaci. Nedostatek IL-6 genu vede k poškození regenerace jater, které může až vyústit v jaterní nekrózu a selhání orgánu. (Fujiyoshi a Ozaki 2011)

4.1.2 Proliferace

Proliferace se dá jinak označit jako rychlé a opakované množení, při kterém buňky vykazují vysokou mitotickou aktivitu (Potěšil et al. 2006). Proliferace především závisí na signalizaci růstových faktorů. Mezi ně spadá HCG, který je především vytvářen Itovými buňkami. Při navázání tohoto hormonu na tyrosinkinázový receptor hepatocytů dojde ke spuštění proliferace a růstu buněk. Proces proliferace velmi závisí na interakci mezi hepatocyty a neparenchymálními buňkami (Kupfferovy buňky, endoteliální výstelka sinusoid, Itóovy buňky). Tyto interakce jsou vedeny přes cytokiny, jako je TNF-alfa a IL-6 (Fujiyoshi a Ozaki 2011).

4.1.3 Terminace

Fáze terminace regenerace jater není tolik prostudovaná. Je ovšem známo, že ukončit regeneraci lze cytokinem TGF- β , který produkují Itovy buňky (Dooley a ten Dijke 2012). Věří se, že prostudování buněčné smrti může mít zásadní vliv na hlubší porozumění této problematiky (Fujiyoshi a Ozaki 2011).

4.2 Nanovlákná pro jaterní tkáňové inženýrství

Pro podporu růstu jaterní tkáně bylo popsáno použití nanovláken nebo dutých nanovláken. V této podkapitole budou popsána pouze hladká nanovlákná. Vývoj tkáně po aplikaci tkáňového nosiče z polymeru se řídí především interakcemi buněčné matrice. Ta hlavně ovlivňuje buněčnou migraci, buněčné dělení a chování samotných buněk. Pro efektivní aplikaci nanovláknenné vrstvy na buňky je potřeba co nejlépe reprodukovat přírodní podmínky vnějšího prostředí. Těch se dosáhne díky EZ, kdy vytvořená vlákna jsou o rozměrech mikro až nanometrů a poskytují požadované mechanické, chemické a fyzikální vlastnosti. Nanovláknenné struktury, díky své povaze, podporují interakce s integrovanými proteiny, které zpětně podporují přichycení buněk a získání chtěné morfologie. (Morelli et al. 2021)

4.2.1 Nanovlákná ze směsi PCL a chitosanu

Jako úspěšná kombinace polymerů pro fabrikaci se prokázala směs PCL a chitosanu. Tato směs byla testována pro účely tkáňového inženýrství jater. Vytvořená vlákna, která byla použita pro experiment, byla excelentního tvaru a uspořádání, o rozměrech přibližně 240 nanometrů s porozitou 79 % a průměrnou velikostí pórů 12 mikrometrů. Aplikovala se

na myší epiteliální jaterní buňky (Hepa 1-6). Ukázalo se, že struktura nanovlákněného materiálu hrála klíčový vliv v buněčné kolonizaci, prorůstání materiálu a dovolovala neparenchymálním jaterním buňkám adherovat podél tkáňového nosiče. Výsledky tohoto experimentu prokázaly slibnou budoucnost této směsi pro použití v jaterním tkáňovém inženýrství. (Morelli et al. 2021)

PRAKTICKÁ ČÁST

Cíle praktické části

Cílem praktické části bylo z připraveného silk fibroinu vyrobit nanovláknenný materiál elektrostatickým zvláknováním a ověřit vliv procesních parametrů a podílu silk fibroinu na jejich morfologii. Tato vlákna následně podrobit analýzám, aby se ověřilo jejich chemické složení. Dalším cílem bylo ověření biokompatibility připravených nanovláken na buněčné linii lidských jaterních buněk HepG2 a hodnocení vlivu složení nanovláken na buněčnou adhezi a proliferaci.

Praktická část je tedy tematicky rozdělena do několika částí:

- Získání silk fibroinu
- Příprava roztoků a jejich zvláknění
- Morfologická a fyzikálně-chemická analýza vyrobených nanovláknenných vrstev
- Testy biokompatibility *in vitro*

Výsledky a jejich interpretace jsou rozebírány v samostatné kapitole s názve Výsledky a jejich diskuze.

6 Materiály a metody

V následující kapitole jsou popsány použité metody a chemikálie, které se využily pro získání silk fibroinu a přípravy nanovláknenných vrstev.

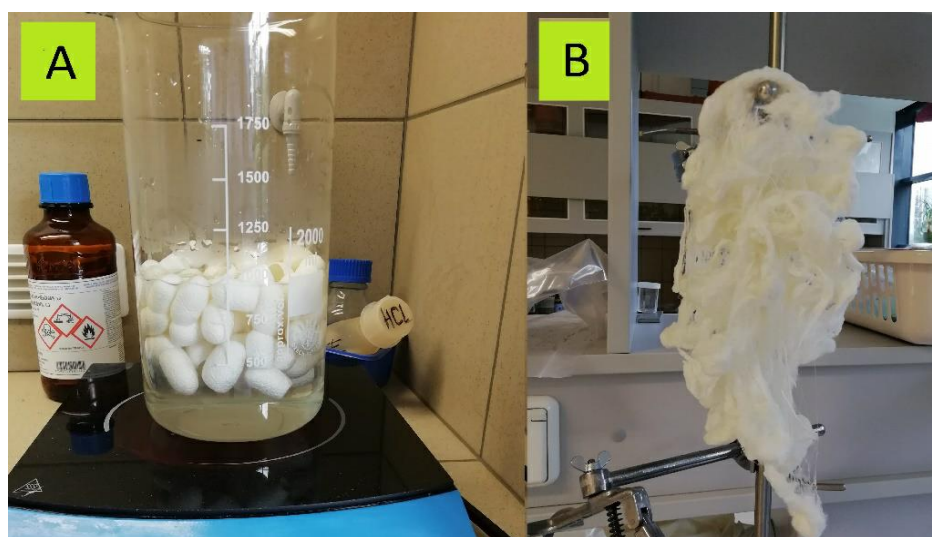
6.1 Zpracování silk fibroinu

Pro přípravu nanovláken bylo nejdříve potřeba získat silk fibroin z kokonů od bource morušového. Tento proces se skládá ze tří částí, a to degumizace, rozpouštění a dialýza. Metoda byla na Technické univerzitě v Liberci zavedena v rámci dizertační práce Příprava netkaných textilií s obsahem hedvábných vláken získaných metodou elektrostatického zvláknování (Sasithorn 2018), kterou optimalizovala Ing. Dagmar Poláková. Při degumizaci, rozpouštění i dialýze silk fibroinu se postupovalo stejně, jako v disertační práci Ing. Dagmar Polákové.

6.1.1 Degumizace silk fibroinu

Cílem této procedury je odstranit sericin z hedvábného vlákna, a tak získat čistý silk fibroin.

Vycházelo se z kokonů bource morušového, které se několikrát propláchly v dH₂O, aby byly zbaveny hlavních mechanických nečistot. Následně se kokony nechaly namočené v dH₂O do následujícího dne a opět byly propláchnuty. Jejich vzhled po této úpravě je zachycený na obrázku 9 A. Další den byla voda slita a kokony byly zality 0,8 litry dH₂O. Do vody se poté přidalo 1,6 gramů detergentu uhličitanu sodného (PENTA s.r.o.) a směs byla uvedena do varu. Poté se voda vyměnila za 0,8 l vařící dH₂O s 1,6 g detergentu a proces varu se opakoval. Následně byla vlákna propláchnuta teplou dH₂O, několika litry studené destilované vody a ručně se shluky jemně rozvolnily. Při pokojové teplotě se shluky vláken takto nechají schnout minimálně 2 dny, ideálně 7 dnů. Stav po provedení degumizace ukazuje obrázek 9 B.



Obrázek 9 A Namočené kokony v dH₂O; B Uсыhající shluk vláken

Tímto postupem se podařilo získat usušená vlákna zbavená sericinu, která se dále použila pro získání čistého silk fibroinu.

6.1.2 Rozpouštění vláken

Vláknenné shluky získané předešlým postupem se rozpustily tak, aby mohly být zapracovány dialýzou. Pro tento proces bylo potřeba připravit 125 g roztoku, který obsahoval chlorid vápenatý (PENTA s.r.o.), etanol (absolutní p.a., PENTA s.r.o.) a destilovanou vodu v poměru 1:2:8. Vyschlé shluky vláken se rozpustily při 80 °C v 105 ml zmíněného roztoku. Tento proces trval přibližně 8 minut. Po rozpouštění se vzniklá směs ponechala při téže teplotě dalších 60 minut. Po vychladnutí se rozpuštěný SF nalil do připravené dialyzační membrány. Proces rozpouštění je zobrazen na obrázku 10.

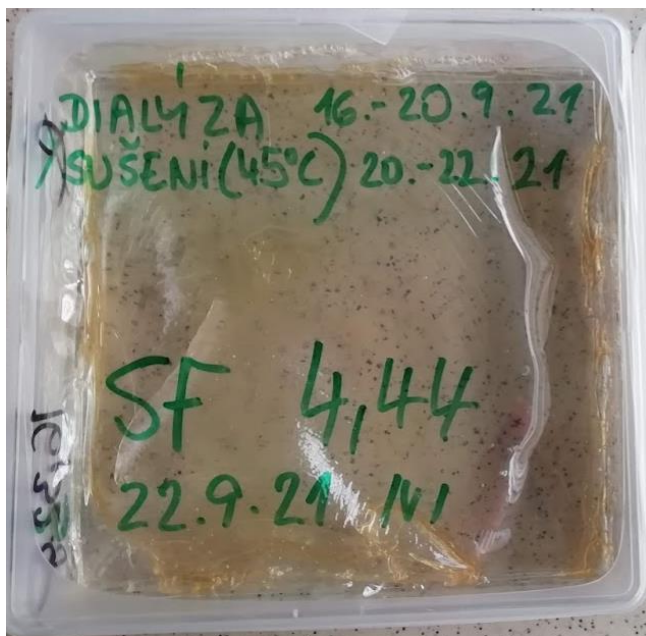


Obrázek 10 Rozpouštění vláknenných shluků

6.1.3 Dialýza silk fibroinu

Cílem této metody bylo získat čistý silk fibroin, který pak lze využít pro další zpracování. Na dialýzu 100 ml roztoku byla použita dialyzační membrána s limitem propustnosti 14 000 DA (Sigma-Aldrich s.r.o., 33 mm, 5,7 ml / 1 cm). Před použitím byla membrána promyta a minimálně tři hodiny se máčela v H₂O a po dobu 1 minuty se inkubovala v 0,3 hm% roztoku sulfidu sodného (PENTA s.r.o.) zahřátém na 80 °C. Následně se provedl oplach horkou vodou (60 °C) a poté studenou vodou. Pro acidifikaci se membrána vložila na 1 minutu do 0,2 % roztoku kyseliny sírové (PENTA s.r.o.). Příprava dialyzační membrány se ukončila opláchnutím horkou vodou (opět 60 °C) a několika oplachy studené vody. Vyschlá degumizovaná vlákna, získaná v předchozím kroku, se rozpustila při 80 °C v 105 ml roztoku chloridu vápenatého, jehož příprava je popsána výše. Tento proces trval

přibližně 8 minut. Po následné hodinové inkubaci a vychladnutí se rozpuštěný SF nalil do připravené membrány. Dialýza probíhala celkem 5 dnů, kdy první den se voda měnila vždy po 2 hodinách a později pouze třikrát denně. Výsledný produkt se nechal usušit při teplotě 45 °C. Tímto způsobem byl získán film čistého silk fibroinu, který lze spatřit na obrázku 11. Ten byl následně rozpuštěn a použit k přípravě zvláknovacího roztoku.



Obrázek 11 Film čistého silk fibroinu

6.2 Příprava nanovlákněných vrstev

Nanovláknna byla připravena bezjehlovým elektrostatickým zvlákněním směsných roztoků PCL a SF.

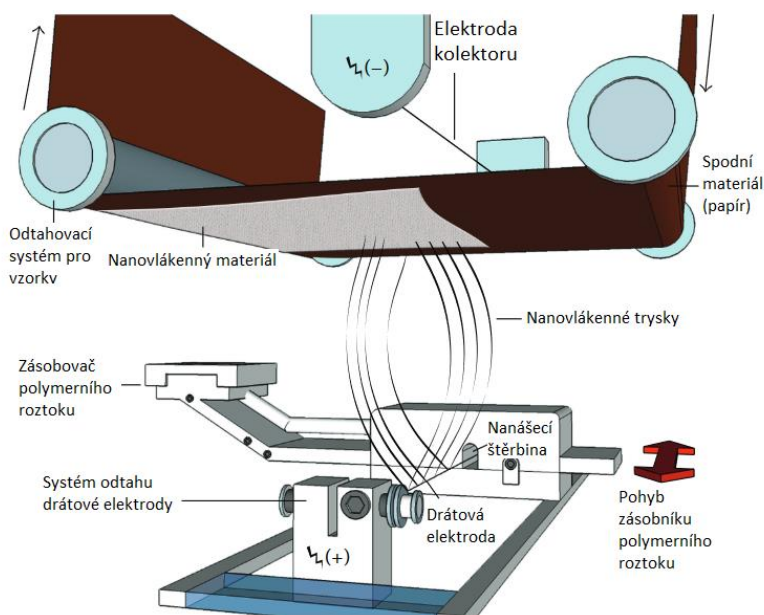
6.2.1 Příprava zvlákněvacích roztoků

Granulát PCL (80 000 Da, Sigma-Aldrich s.r.o.) byl rozpuštěn v kyselině mravenčí (98%, p.a., PENTA s.r.o.) v koncentraci 13 hm%. Ve stejné koncentraci byl rozpuštěn vysušený SF také v kyselině mravenčí. Před zvlákněním byly oba roztoky (PCL:SF) smíchány v poměrech 100:0, 95:5, 90:10, 75:25, 50:50.

6.2.2 Elektrostatické zvláknování roztoků

Proces zvláknování je popsán výše v kapitole 2 Elektrostatické zvláknování. Pro přípravu nanovláken byla využita metoda bezjehlového zvláknování pomocí stroje Nanospider™ (NS 1WS500U, Elmarco s.r.o., Česká republika).

Jako generátor nanovláken byla použita drátová elektroda. Tento způsob umožňuje produkci nanovláken po celé délce elektrody – tedy 50 cm, kde jsou tvořeny polymerní trysky z volného povrchu kapaliny, formována nanovlákná a ta jsou následně ukládána na odvalující se podkladový (spodní) materiál kryjící elektrodu kolektoru. Zásobník polymeru dodává polymerní roztok prostřednictvím nanášecí štěrbinu pohybující se zvlákňovací hlavy (Yalcinkaya et al. 2016). Schéma zařízení nanospider je uvedeno na následujícím obrázku 12.



Obrázek 12 Schéma nanospideru
Převzato z (Yalcinkaya et al. 2016)

Nanovlákná pro účel této bakalářské práce byla tedy připravena za použití strunové elektrody (jednostranná nanášecí hlava, 50 ml) s průvlakem $\varnothing 0,6$. Rychlost posuvu hlavy byla 250 až 300 mm/s (liší se dle individuálních podmínek). Rychlost posuvu drátu byla nastavena na 0,2 mm/s. Průtok vzduchu dosahoval hodnot 90/100 m³/h. A jak již bylo zmíněné výše v kapitole 2, nelze zanedbat klimatické podmínky. Teplota při zvlákňování dosahovala 22 °C, vlhkost vzduchu přibližně 33 %.

6.2.3 Podmínky při zvlákňování

Z každého připraveného polymerního roztoku byly pomocí EZ připraveny 3 vzorky za statických podmínek a jeden za dynamických podmínek. Tedy vznikly 4 vzorky pro každý polymerní roztok s různým poměrem SF a PCL. U všech vzorků bylo použité stejné napětí na kolektoru (- 10 kV) a na elektrodě (60 kV), měnila se výška kolektoru vůči zvlákňovací

elektrodě. Přehled zvlákňovacích podmínek je v tabulce 2. Nános každé vrstvy trval přibližně 5 až 7 minut u vzorků S1 až S3. V případě vzorku S4 byla připravena nanovlákněná vrstva o rozměru 50 x 70 cm, aby bylo zajištěno dostatečné množství pro chemické analýzy a testy biokompatibility. U dynamického zvlákňování byla použita rychlost odtahu podkladu 15 mm/min.

Tabulka 2 Zvlákňovací podmínky

<i>Statické zvlákňování</i>	Vrstva	Zvlákňovací vzdálenost [mm]	Celkový rozdíl napětí [kV]
	S1	140	70
	S2	150	
	S3	160	
<i>Dynamické zvlákňování</i>	S4	150	

7 Morfologická a fyzikálně-chemická analýza nanovlákněných vrstev

Pro analýzu vláken bylo použito několik postupů. Hodnocení morfologie a průměrů vláken bylo provedeno pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM), pro chemickou charakterizaci vláken byla využita termogravimetrické analýzy (TGA) a Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR).

7.1 Morfologická analýza nanovlákněných vrstev

SEM patří k jednomu z nejpoužívanějších přístrojů pro examinaci a analýze objektů o rozměrech několika mikro až nanometrů. Tento mikroskop pro zobrazení využívá elektrony, kdy při pohybu svazku primárních elektronů ve vakuu po vzorku dochází ke vzniku řady signálů podílejících se na tvorbě obrazu, mezi které patří sekundární a zpětně odražené elektrony (Bradbury 2019). K urychlení a fokusaci elektronů směrem ke vzorku se používá systém elektromagnetických čoček (Perret et al. 2005). Rozlišení SEM se standardně pohybuje kolem 10 nanometrů (Raval et al. 2019).

Skenovací elektronový mikroskop (VEGA SEM 3, Česká republika) s programem VegaTC byl využit pro analýzu morfologie vláken. Každý materiál byl snímán při zvětšení 2 000x, 5 000x, 10 000x a 20 000x. U pořízených snímků byly pro každý vzorek změřeny průměry 60 vláken. Získané hodnoty byly následně použity ke statistickému hodnocení a sestavení histogramů četnosti průměrů pro každou vrstvu pomocí programu MATLAB.

7.1.1 Příprava vzorku pro elektronovou mikroskopii (SEM)

Jelikož se vzorek umísťuje do vakua, musí splňovat specifické nároky. Vzorek by neměl obsahovat oddělitelné částice, protože by mohlo dojít k ucpání odsávacího systému. Dále by neměl obsahovat vodu a měl by být vodivý, aby nedocházelo k hromadění záporného náboje neseným primárním svazkem elektronů na povrchu vzorku. To by ovlivnilo výsledný obraz, který by mohl být přesvětlený. Jelikož dopadající elektrony mají velkou kinetickou energii, která se ve vzorku přeměňuje na jeho vnitřní energii, bude tedy docházet k jeho zahřívání. Z tohoto důvodu musí mít vzorek dostatečnou tepelnou vodivost. Ze zmíněných i dalších požadovaných vlastností vyplývá, že nejvhodnějším materiálem je kov. Pokud je potřeba nasnímat nevodivý materiál, provádí se jeho pokovení tenkou vrstvou často v elektrickém výboji v atmosféře argonu. Pro tyto účely se často používá zlato, měď nebo uhlík. (Reichl a Všetická 2006)

Vzorky z vyrobených materiálů byly připevněny pomocí oboustranné uhlíkové pásky na nosiče určené pro SEM analýzu a pokoveny pomocí naprašovacího zařízení SC7620 (Quorum Technologies, Velká Británie). Proces nanášení kovu byl proveden v argonové atmosféře a výsledná vrstva zlata měla přibližnou tloušťku 6 nanometrů.

7.2 FTIR

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací byla využita pro analýzu chemického složení a identifikaci složek polykaprolaktonu a silk fibroinu v jednotlivých materiálech. FTIR je metoda založena na absorpci infračerveného záření (IR), které má vlnovou délku přibližně mezi 800 nanometrů až 1 milimetr při průchodu vzorkem. Odlišné funkční skupiny absorbují charakteristickou frekvenci IR a při absorpci dochází ke vzniku „peaku“, který je pro každou chemickou molekulu jako otisk prstu. (Rajaram Kshetri 2013).

Pro FTIR analýzu provedenou v této bakalářské práci bylo použito zařízení Nicolet™ iST™ 10 FTIR Spektrometr (Thermo Fisher Scientific, USA) vybavené ATR nástavcem. Měření bylo provedeno v rozsahu vlnočtu 4000–400 cm^{-1} .

7.2.1 Příprava vzorku

Aby se vzorek dal použít na FTIR analýzu, musí být použita správná vlnová délka IR a musí být schopen změn v dipólovém momentu. K absorpci IR molekulou může tedy dojít pouze v případě, že absorpce způsobí změnu v elektrickém dipólu. Molekula má elektrický dipól, pokud se na obsažených atomech vyskytuje alespoň slabý pozitivní a negativní náboj (Rajaram Kshetri 2013). Pro FTIR analýzu byly použity vzorky bez další povrchové úpravy. Nanovláknina byla po zvláknění po dobu 48 hodin inkubována v exsikátoru a následně bylo provedeno měření.

7.3 TGA

Termogravimetrická analýza byla použita k ověření vlivu složení nanovláken na jejich tepelnou degradaci a případnou přítomnost anorganických zbytků. Principem této metody je pozvolné zvyšování teploty vzorku v peci. Postupně dochází ke změnám v hmotnosti, které se měří na analytických vahách. K úbytku také může dojít, pokud proběhne chemická reakce (např. hoření), ovšem fyzikální reakce (tavení) úbytek nezpůsobují. Výsledný výstup z analýzy TGA je závislostí změny hmotnosti na teplotě či času. Z toho je možné vyčíst moment vypaření rozpouštědla, plastifikátoru polymeru, vody, anebo dekompozice materiálu (Coats a Redfern 1963). TGA analýza byla provedena na zařízení Q500 (TA Instruments, USA)

7.3.1 Podmínky

Připravené vzorky byly testovány do teploty 600 °C v syntetickém vzduchu. Byl použit ohřev s rychlostí 10 °C za minutu a průtokem vzduchu 60 ml za minutu. V následující tabulce jsou zaznamenány navážky vzorků, které se následně měřily na platinové pánvičce.

Tabulka 3 Navážky vzorků pro měření TGA

Vzorek	Hmotnost vzorku [mg]
<i>PCL</i>	1,6120
<i>5 % SF</i>	1,5860
<i>10 % SF</i>	1,8550
<i>25 % SF</i>	2,6380
<i>50 % SF</i>	2,6300

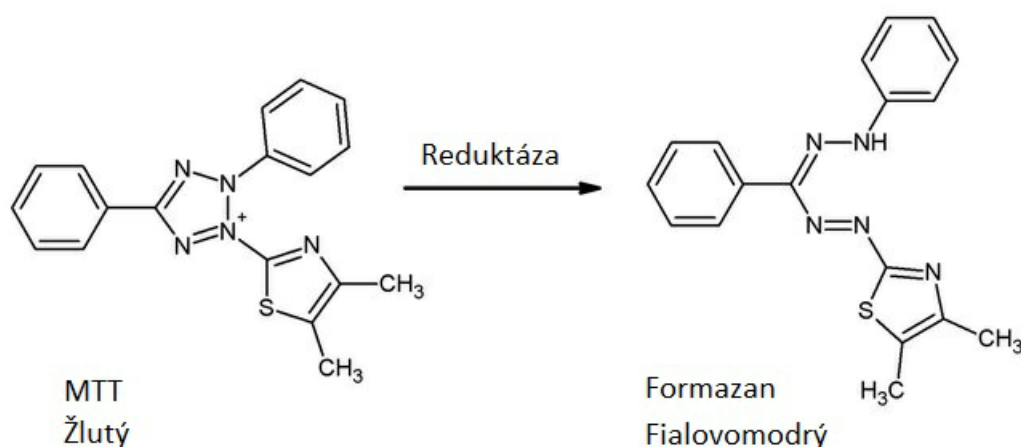
8 Testy biokompatibility

Testy buněčné biokompatibility *in vitro* byly použity ke zjištění cytotoxicity materiálů vůči linii jaterních buněk HepG2 a ověření buněčné adheze a proliferace na povrchu nanovláken. V první fázi byla ověřena cytotoxicita nanovláken tzv. v přímém kontaktu. Na základě slibných výsledků se v návaznosti provedly testy adheze a proliferace. Jejich cílem bylo ověřit aplikační potenciál nanovláčenného materiálu pro podporu hojení jaterní tkáně a vliv podílu SF na něj.

8.1 MTT test

Pro testy cytotoxicity a buněčné proliferace bylo použito hodnocení pomocí metabolické aktivity, které bylo prováděno pomocí MTT analýzy.

Tato metoda slouží jako kolorimetrický test, který se využívá k hodnocení buněčné viability prostřednictvím měření aktivity buněk. Své uplatnění má v hodnocení cytotoxicity, buněčné adheze a proliferace, či k metabolické analýze normálních i nádorových buněk. MTT má chemický vzorec 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid a vytváří nažloutlý vodný roztok. Mitochondriální dehydrogenázy redukují toto barvivo, které se mění na MTT formazan. Tato přeměna je znázorněna na následujícím obrázku 13. Fialovomodrý a ve vodě nerozpustný formazan lze extrahovat pomocí organických rozpouštědel. Jeho množství odpovídá aktivitě dýchacího řetězce. Vypovídá tedy o metabolické aktivitě buněk a je možné ho použít k hodnocení životaschopnosti buněk. MTT test lze vyhodnotit spektrofotometricky (Scherliess 2011).



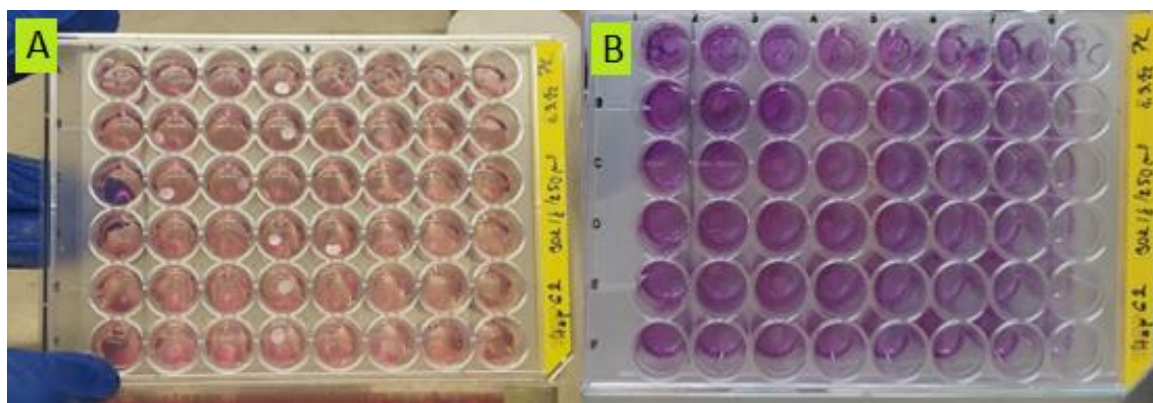
Obrázek 13 Chemický vzorec MTT a jeho produktu formazanu
Převzato z (Badr et al. 2022).

8.1.1 Postup

Pro testy cytotoxicity, adheze a proliferace se využil metabolický test MTT, kdy se postupovalo podle platné normy ČSN EN ISO 10993-5:2009. Z vyrobeného nanovláknenného materiálu byly připraveny vzorky, k jejichž sterilizaci se použilo UV-C záření. Jedná se o jedno z nejagresivnějších UV záření s vlnovou délkou nepřesahující 280 nanometrů, které je schopno zničit téměř 100 % virů a bakterií (Casini et al. 2019). Testy biokompatibility byly prováděna na linii lidských jaterních buněk HepG2 rakovinového původu. Jako kultivační médium bylo použito MEM (Sigma-Aldrich s.r.o.), neboli minimální esenciální médium obsahující Earlovy soli, hydrogenuhličitan sodný, bez L-glutaminu, sterilně filtrovaný s vysokým podílem glukózy. To bylo dále doplněno podílem 10% fetálního bovinního séry (GIBCO, Česká republika), 1% antibiotika obsahující penicilin a streptomycin (Sigma-Aldrich s.r.o.) 1% směsi neesenciálních aminokyselin (BIOWEST, Francie) a 1% glutaminu (GIBCO, Česká republika). V tomto kompletním médiu byla prováděna kultivace HepG2 i samotné testy. Buňky byly při kultivaci i testech udržovány v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5 % CO₂. Pro oplachy byl použit fosfátový pufr (PBS) s pH 7,4 (GIBCO, Česká republika). Pro MTT test byl vždy použit roztok MTT o koncentraci 1 mg/ ml připravený rozpuštěním 18,2 mg MTT (Sigma-Aldrich s.r.o.) do 18,2 ml MEM bez fenolové červeni (GIBCO, Česká republika). Pro zachování sterility byl roztok MTT sterilně filtrován (0,2 μm). Inkubace s MTT probíhala vždy po dobu dvou hodin při 37 °C. Po oplachu PBS byl formazan vytvořený uvnitř buněk uvolněn izopropylalkoholem (p.a., přes 99 %, PENTA s.r.o., Česká republika) a na třepačce (450 otáček za minutu) po dobu 20 minut. Po uběhnutí této doby se fialový roztok formazanu přenesl do 96 jamkové destičky, která se využila pro měření absorbance při 570 nm a 650 nm na multidetekčním readeru Synergy HTX (BioTek Instruments).

8.1.2 Cytotoxicita materiálů přímým kontaktem

Konkrétně pro tento test byly použity kruhové výseče nanovláken o průměru 4 milimetry. Každý vzorek byl testován v šesti opakování. Suspenze. Pro tento test provedený na 48 jamkové destičce byly použity HepG2 buňky (pasáž č. 8) o koncentraci 120 000 na 1 ml v kompletním kultivačním médiu. Použité destičky měly vnitřní povrch upravený poly-L-lysinem pro zlepšení buněčné adheze. Do každé jamky bylo přidáno pipetou 250 μ l této suspenze. Počet buněk nasazených na jednu jamku tedy činil 30 000. Buňky byly kultivovány po dobu 24 hodin. Následně bylo médium odsáto, na povrch buněk byl přiložen vždy jeden vzorek nanovláken na jamku a do každé jamky bylo přidáno 250 μ l čerstvého kompletního média. Jako buněčná kontrola byly použity buňky nevystavené žádnému materiálu. Jako pozitivní kontrola se použilo kompletní médium obsahující 7% dimethylsulfoxid (DMSO). Destička byla inkubována (37 °C, 5% CO₂) po dobu 24 hodin. Následně bylo odsáto médium a po opláchnutí PBS se přidalo 250 μ l sterilně přefiltrovaného roztoku MTT do každé jamky. Takto připravené vzorky je možné vidět na obrázku 14 A. Po uplynutí dostatečné doby pro protřepání se fialový roztok přenesl pipetou do 96 jamkové destičky a bylo provedeno měření absorbance. Vzorky po uvolnění formazanu lze spatřit na obrázku 14 B.



Obrázek 14 A snímek vzorků před uvolněním formazanu; B snímek vzorků po uvolnění formazanu

Hodnoty buněčné viability byly získány měřením absorbance při vlnových délkách 570 nm a 650 nm. Hodnoty absorbance pozadí měřené při 650 nm byly následně odečteny od hodnot měření při 570 nm. Získané hodnoty byly použity k výpočtu buněčné viability, která se spočítala jako procentuální podíl z absorbance naměřené u buněčné kontroly. Z tohoto důvodu je hodnota viability buněčné kontroly považována za 100 % viability.

8.1.3 Testy adheze a proliferace buněk na nanovlákných materiálech

Při testování buněčné adheze a proliferace se opět využila MTT metoda. V tomto případě se test provedl s kruhovými výsečemi nanovláken o průměru 1,5 cm. Sterilní nanovlákná byla vložena do 24 jamkové kultivační destičky. Na takto připravené vzorky bylo nasazeno 40 000 HepG2 buněk v 1 ml suspenze v kompletním kultivačním médiu. Buněčná adheze se hodnotila po 24 hodinách inkubace. Buněčná proliferace na povrchu nanovláken byla testována po uplynutí doby 3 dnů, 5 dnů a 7 dnů. Pro kontrolu buněčné proliferace byla buněčná suspenze nasazena na povrch kultivačního plastiku bez nanovláken. Jelikož oproti testování cytotoxicity se v tomto experimentu buňky ponechávaly déle v inkubátoru, bylo nutné provést výměnu média 3. a 5. den. Po uplynutí dané doby inkubace se po oplachu PBS do každé jamky přililo 350 μ l roztoku MTT. Poté se opět nechaly vzorky inkubovat dvě hodiny. Následoval další oplach PBS a do každé jamky přidalo 1,2 ml izopropylalkoholu. Uvolnění formazanu trvalo přibližně 20 minut. Vzniklý fialový roztok se opět přepipetoval do 96 jamkové destičky k měření absorbance.

Výsledné hodnoty se získaly podobně jako v předchozím experimentu. Absorbance se měřila při vlnových délkách 570 nm a 650 nm a z těchto hodnot se provedl rozdíl. Takto vypočítané hodnoty se využily pro spočítání průměrů a směrodatné odchylky pro každý vzorek.

9 Fluorescenční mikroskopie

Hodnocení buněčné adheze a proliferace bylo doplněno o hodnocení buněčné morfologie prostřednictvím fluorescenční mikroskopie. Pomocí této metody lze sledovat rozměr a tvar buňky či jejích konkrétních organel v závislosti na použitém barvení. Pomocí této metody lze sledovat rozměr a tvar buňky či jejích konkrétních organel v závislosti na použitém barvení. Pro zkoumání fluorescenčním mikroskopem se využívají kratší vlnové délky v oblasti UV záření. Tady dochází k absorpci ultrafialových paprsků látkou a k emisi viditelného světla, které je už o větší vlnové délce, tedy je možné ho zpozorovat světelným mikroskopem. (Rück et al. 2002)

9.1 Příprava vzorku

Příprava vzorků a kultivace buněk pro hodnocení fluorescenční mikroskopii probíhala stejně jako v případě MTT metody. Z vyrobených nanovlákných materiálů se připravily kruhové

výšece o průměru 1,5 cm, které se následně sterilizovali použitím UV-C zářením. Kultivace probíhala ve 24 jamkové kultivační destičce. Na každý vzorek bylo nasazeno 40 000 buněk HepG2 v 1 ml kompletního kultivačního média. Inkubace probíhala po dobu 1, 3, 5 a 7 dnů. Po uplynutí inkubace byly vzorky opláchnuty PBS a fixovány 500 µl ledového metanolu (p.a., PENTA s.r.o., Česká republika) po dobu 10–15 minut při pokojové teplotě. Po odsátí metanolu následovaly čtyři opakovaná oplachu v PBS. Fluorescenční barvení bylo provedeno DiOC₆ (Sigma-Aldrich s.r.o.). Jedná se o lipofilní, zeleně fluoreskující 3,3'-dihexyloxakarbokyanin jodid, který při nízké koncentraci funguje jako lipofilní selektivní barvivo pro mitochondrie buněk. Při vyšší koncentraci se může vázat také na ostatní vnitřní membrány (Navarro-Barreda et al. 2022). Barvení DiOC₆ bylo provedeno roztokem o koncentraci 0,1 µg/ml v PBS po dobu 45 minut ve tmě.

Po uplynutí dané doby se provedou opět 2 rychlé a 2 pětiminutové oplachy v PBS. Dále se ještě provedou dva oplachy v destilované vodě. Takto obarvené vzorky byly umístěny na podložní sklíčka a montována přibližně 3 kapky montovacího média. Pro montování bylo použito médium Fluoroshield™ s DAPI (Sigma-Aldrich s.r.o.). Tím bylo zajištěno barvení buněčných jader barvivem DAPI přímo v procesu montování.

Snímání připravených preparátů bylo provedeno na fluorescenčním mikroskopu DMi8 (Leica, Česká republika).

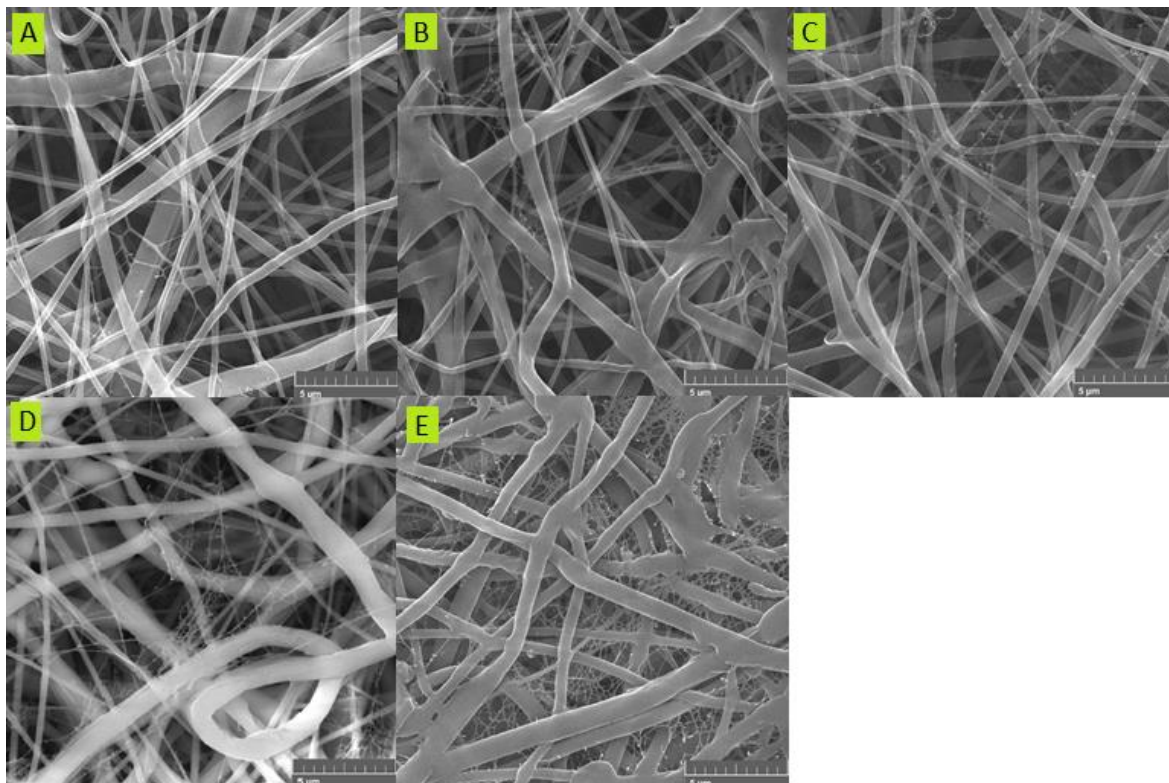
10 Výsledky a jejich diskuze

V této kapitole jsou shrnuty všechny výsledky ze všech provedených analýz, při kterých se zkoumala morfologie připravených vláken při různém obsahu SF a různé zvláknovací vzdálenosti. Dále jsou diskutovány výsledky z analýz pro ověření chemického složení vláken a výsledky z testování biokompatibility připravených nanovláknenných vrstev.

10.1 Morfologická a fyzikálně-chemická analýza nanovláknenných vrstev

Pro zkoumání morfologie vláken byly pořízeny SEM snímky jednotlivých vzorků a na základě naměřených průměrů sestaveny histogramy relativní četnosti průměrů vláken ve vrstvě, dále byly srovnány naměřené střední hodnoty průměrů vláken.

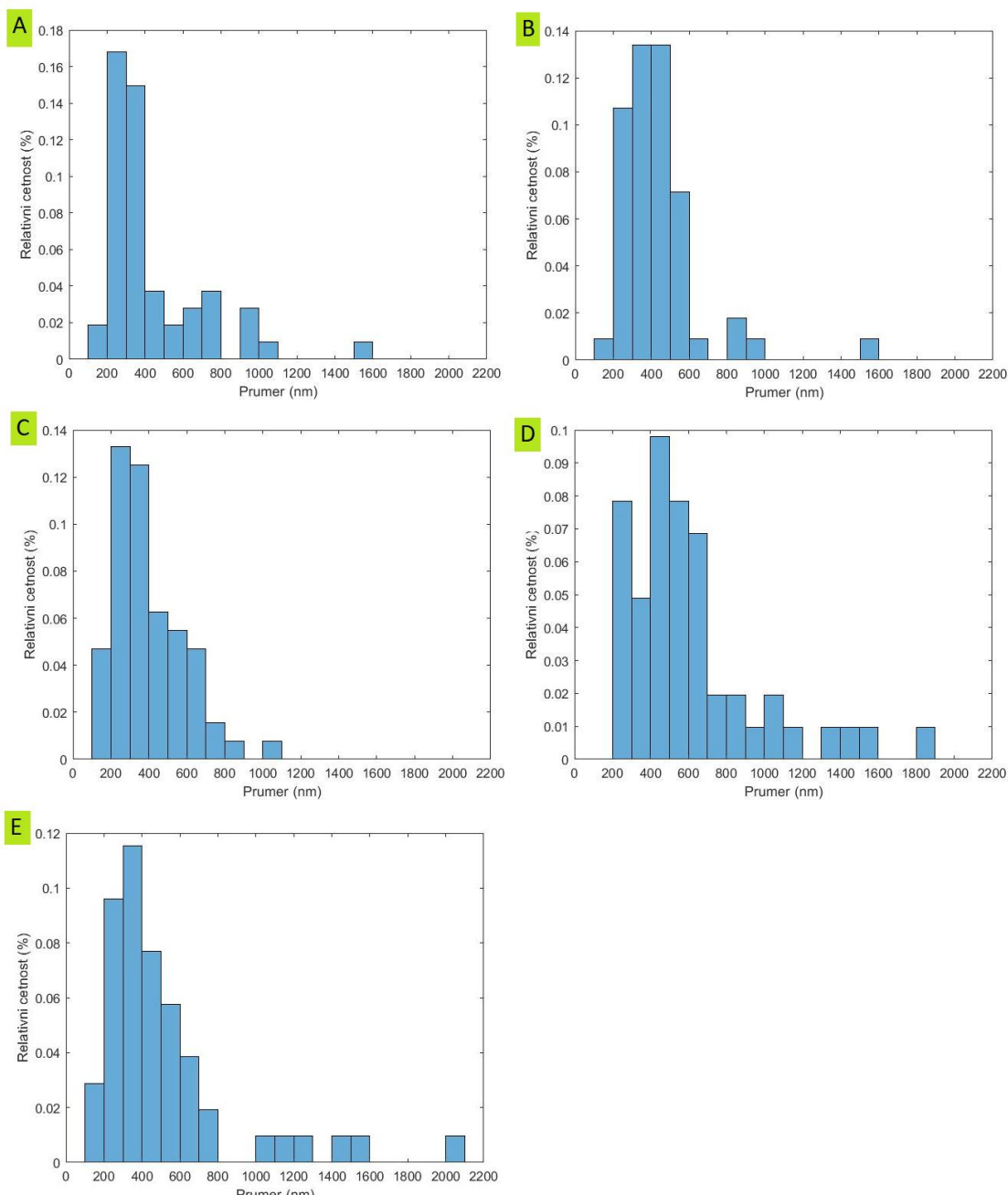
Ukázky snímků ze SEM při zvětšení 10 000x jsou zachyceny na následujícím obrázku 15. Z těchto snímků lze říci, že povrch vláken bude pravděpodobně hladký. Kompletní přehled snímků nanovláken ze SEM snímané při různých zvětšeních je uveden v příloze (Příloha 1) této práce.



Obrázek 15 Snímky ze SEM pro zvětšení 10kx vrstvy S1, A čisté PCL; B vrstva s 5 % SF; C vrstva s 10 % SF; D vrstva s 25 % SF; E vrstva s 50 % SF

U všech připravených vzorků byla potvrzena vlákněná morfologie s vlákny s průměrem v submikronovém měřítku. Histogramy každého vzorku pro vrstvu S4 jsou znázorněny na obrázku 16. Histogramy ostatních vrstev a vzorků lze nalézt v přílohách (Příloha B). Z histogramů pro PCL je vidět, že hodnoty průměrů vláken nejvíce spadala do intervalu 200-300 nm a 300-400 nm. Pro materiál obsahující 5 % SF podle histogramu platí, že největší četnost průměrů vláken byla zaznamenána v intervalu 200-300 nm a 300-400 nm. Dalším rozmezím s poměrně vyšší hodnotou relativní četnosti byl interval 400-500 nm u vrstvy S2, S3 a S4. Materiál obsahující 10 % SF má nejčastější intervaly četnosti 200-300 nm a 300-400 nm. S rostoucí zvláknovací vzdáleností se zvyšuje četnost i ve větších intervalech tak, že u vrstvy S3 se i vyskytovala vlákna s průměrem zapadajícím do rozmezí 1 400-1 500 nm. U materiálu s vyšším obsahem SF (25 %) je pozorovatelná vyšší relativní četnost ve více intervalech. Mezi rozmezí s největší relativní četností průměrů patří interval o hodnotě 200-300 nm, 300-400 nm, 400-500 nm i 500-600 nm. U materiálu s největším obsahem SF je u

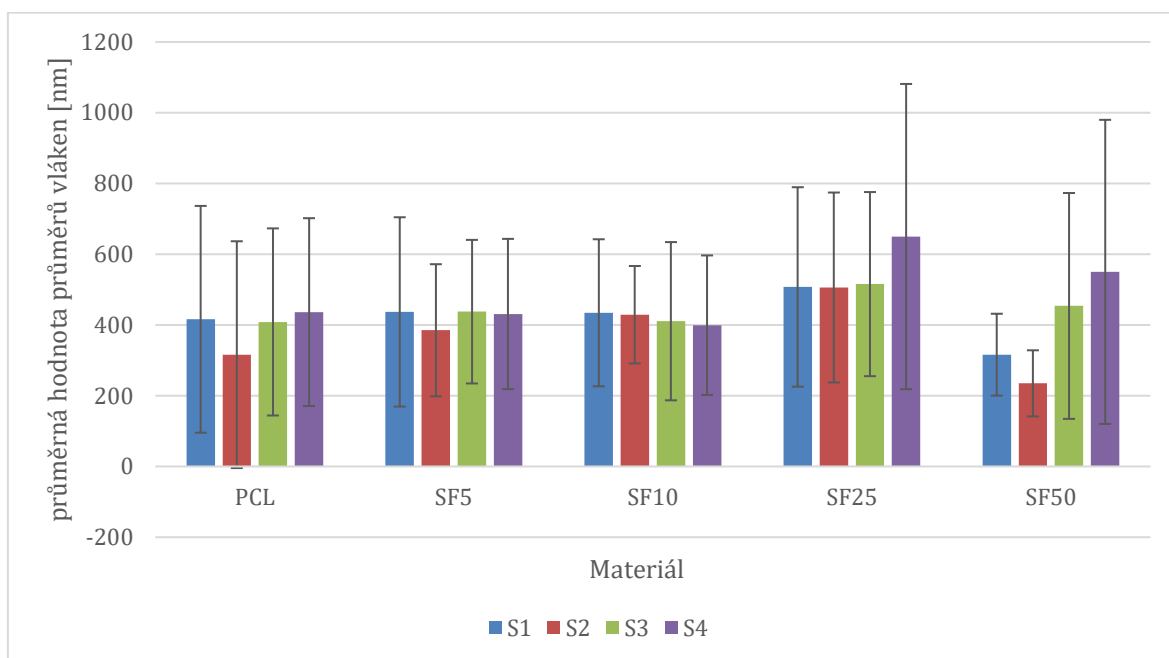
vzorků zvlákněných za statických podmínek diverzita četností poměrně malá. Nejčastěji vlákna mají průměr v rozmezí 200-300 nm a 300-400 nm. Zato u vrstvy S4, která byla zvlákněna za dynamických podmínek, mají vlákna průměry o hodnotách v celém rozmezí od 100 nm až po 800 nm, největší změřený průměr vlákna spadá do intervalu 2 000-2 100 nm.



Obrázek 16 Histogramy četnosti vláken u všech vzorků pro S4, A vzorek obsahující čisté PCL; B vzorek obsahující 5 % SF; C vzorek obsahující 10 % SF; D vzorek obsahující 25 % SF; E vzorek obsahující 50 % SF

Z provedeného srovnání histogramů četnosti a také středních hodnot průměru nanovláken (obrázek 17) u jednotlivých vrstev vyplývá, že připravená vlákna mají nejčastější průměr v rozmezí hodnot 300 až 400 nm. Z histogramů také vyplývá, že u vrstev zvlákněných za

statických podmínek se při zvětšující zvláknovací vzdálenosti zvyšuje hodnota relativní četnosti i ve vyšších intervalech. U vzorků zvlákněných za dynamických podmínek je všeobecně vyšší diverzita průměrů vláken bez ohledu na obsah SF. Podle grafu na obrázku 17 se dá říci, že průměry u vzorku čistého PCL a materiálů s obsahem SF 5 % a 10 % se nijak zásadně neliší a mají přibližně stejnou hodnotu (cca 400 nm). Nejvýrazněji vystupuje materiál s obsahem SF 25 %, jehož průměry podle grafu se u staticky zvlákněných vrstev pohybují přibližně kolem hodnoty 500 nm, největší průměrná hodnota byla změřena u vrstvy S4 (650 nm). Nejmenší střední hodnota průměru vláken se potom vyskytovala u materiálu s 50% obsahem SF u vrstvy S2 (cca 240 nm) a druhá nejmenší hodnota u vrstvy S1 (cca 320 nm).



Obrázek 17 Střední hodnoty průměrů vláken v závislosti na typu vzorku

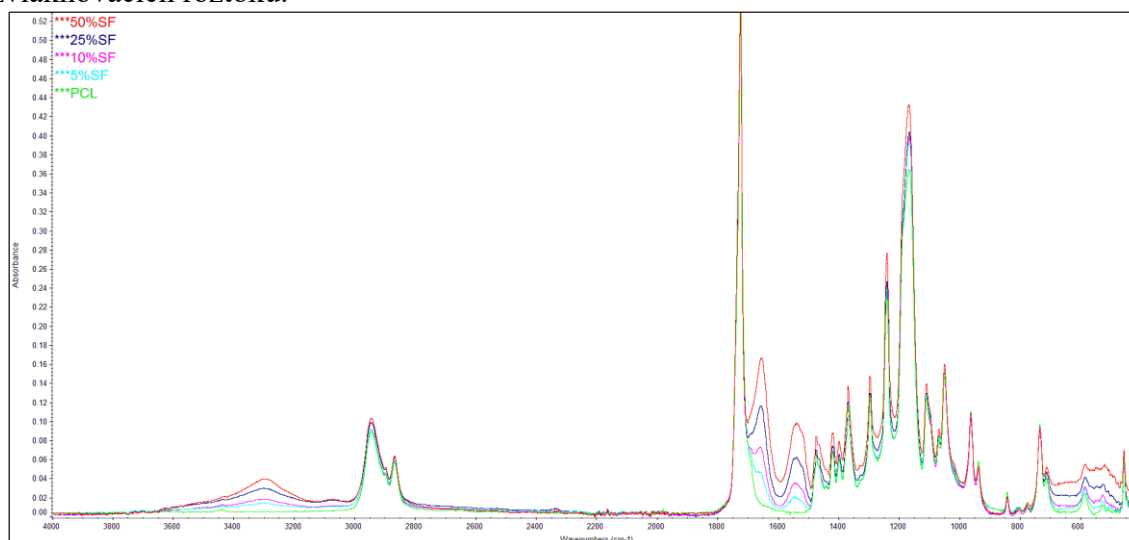
10.2 Chemická charakterizace nanovlákněných vrstev

Výsledné hodnoty z těchto analýz mají ověřit chemickou čistotu připraveného nanovlákněného materiálu.

10.1.2 FTIR

FTIR analýza byla použita pro kontrolu přítomnosti obsahu proteinu v připravených nanovlákněch. Na následujícím obrázku 18 je možné vidět, že nejpodstatnější úseky pro interpretaci se vyskytují přibližně v rozmezích vlnočtu $3400-3200\text{ cm}^{-1}$, $3000-2850\text{ cm}^{-1}$,

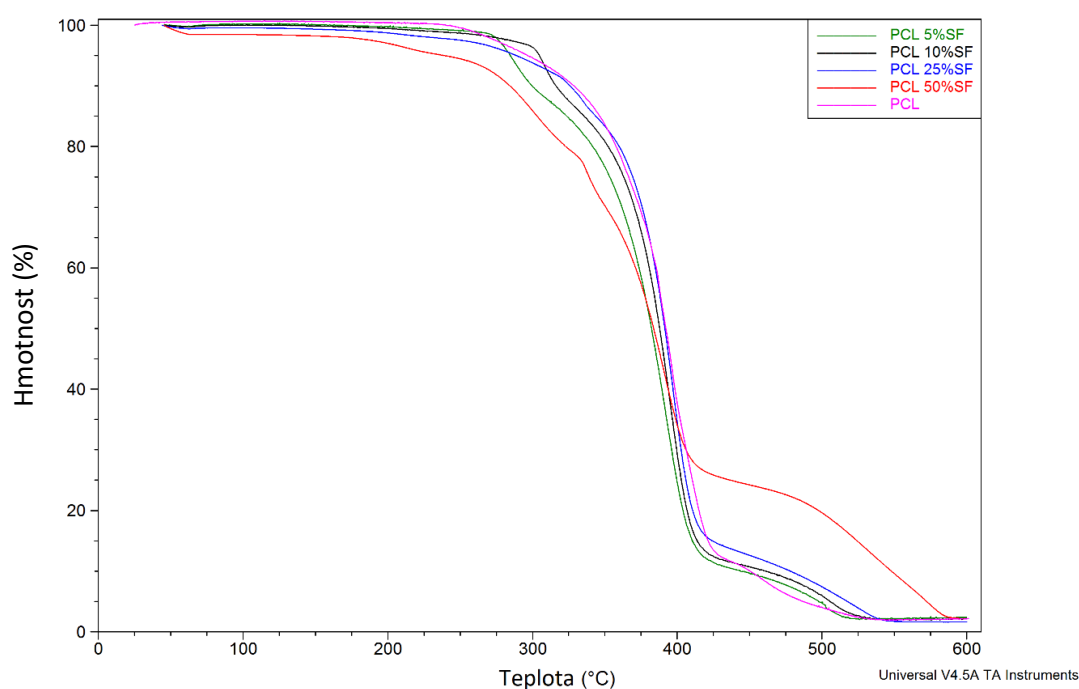
1700-1500 cm^{-1} a 700-400 cm^{-1} . Porovnáním s křivkou čistého PCL lze usoudit, že přítomnost SF a jeho různého podílu v nanovlákněch je prokazatelná změnami na vlnočtu v oblasti 3400-3200 cm^{-1} a 1700-1500 cm^{-1} . Rozdíl v intenzitě absorpance v prvním zmíněném rozmezí u vláken připravených z roztoků s různým podílem SF je spojován s vibracemi hydroxylových skupin –OH. U tohoto vrcholu je dobře vidět závislost a rostoucí intenzita absorpance s rostoucím předpokládaným podílem SF v nanovlákněch. Velice dobrá závislost je patrná také u vrcholů s maximy kolem 1660 cm^{-1} a 1550 cm^{-1} . V těchto místech lze spatřit jednak značný rozdíl v intenzitě absorpance vzorků obsahujících SF v porovnání s čistým PCL, ale také vzrůstající trend pro vzorky se zvětšujícím se obsahem SF. Tyto vrcholy přímo souvisejí s molekulární strukturou proteinů a jsou označovány jako vibrace amidu II a amidu I. Nespornou výhodou pro interpretaci spekter je, že molekula PCL vibrace na tomto vlnočtu vůbec nevykazuje. V oblasti 3000-2850 cm^{-1} nebyly pozorovány žádné významné rozdíly mezi křivkami jednotlivých vzorků. Rozdíly ve vlnočtu byly také pozorovány pod 700 cm^{-1} , kde se jedná o vibrace v tzv. oblasti otisku prstu. Ty souvisejí se skeletárními vibracemi a jejich přesná identifikace je obtížná. V souhrnu je možné konstatovat, že analýza FTIR umožnila prokázat přítomnost SF v připravených nanovlákněch se závislostí odpovídající předpokládanému podílu vyplývajícímu ze složení zvláknovacích roztoků.



Obrázek 18 Snímek z FTIR analýzy vzorků s různými poměry PCL a SF

10.1.3 TGA

Na obrázku 19 jsou zobrazeny křivky hmotnostního úbytku jako výstup z TGA. Ty značí procentuální úbytek hmotnosti vzorků s různým podílem PCL a SF v závislosti na teplotě. V přílohách (Příloha 2) této práce jsou přiloženy výsledky TGA analýzy pro jednotlivé vzorky. Ze získaných dat vyplývá, že při teplotě 600 °C došlo k úbytku hmotnosti vzorků většímu než 95 %. Nejvýznamnější úbytek hmotnosti lze pozorovat v rozmezí teplot přibližně od 280 °C do 410 °C, kdy došlo k úbytku hmoty v rozmezí 73-86 % počáteční hmotnosti. Ze snímku je také možné vidět, že nad teplotou 400 °C lze pozorovat trend, kdy u vzorků se zvyšujícím se podílem SF dochází k pomalejšímu úbytku hmotnosti. Z porovnání stavu při 450 °C vyplývá, že k nejmenšímu úbytku hmotnosti (zhruba 75 %) došlo u nanovláken s obsahem 50 % SF. V případě nanovláken s podílem 25 % SF byl úbytek zhruba 87 % hmotnosti. Mezi čistými PCL nanovláčky a nanovláčky s podílem 5 % a 10 % byl rozdíl velmi malý a úbytek hmotnosti se pohyboval kolem 90 %. Ze získaných výsledků lze tedy říci, že v momentě dosažení teploty 600 °C došlo k tepelnému rozkladu většiny materiálů a se zvyšujícím se obsahem SF bude docházet k pomalejší tepelné degradaci. U všech vzorků se zbytková hmotnost pohybovala kolem 2 % původní hmotnosti. Jelikož s rostoucím podílem SF při teplotě 600 °C nebyl pozorován nárůst hmotnosti reziduí, lze předpokládat, že podařilo kvalitní odstranění zbytků solí použitých při degumizaci a rozpouštění SF.



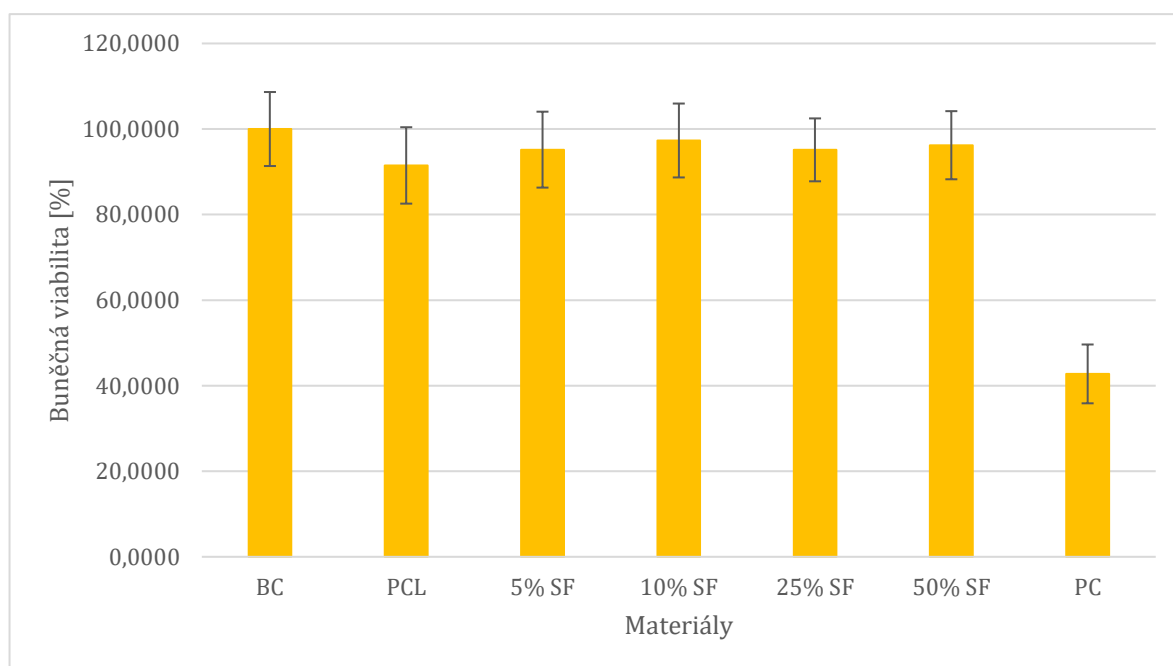
Obrázek 19 Snímek z TGA pro vzorky s různým obsahem PCL a SF

10.2 Buněčné testy

Vstupním předpokladem těchto testů bylo, že příměs silk fibroinu povede ke zlepšení biokompatibility nanovláken a lepší adhezi a proliferaci buněk na jejich povrchu v porovnání s čistým PCL.

10.2.1 Cytotoxicita

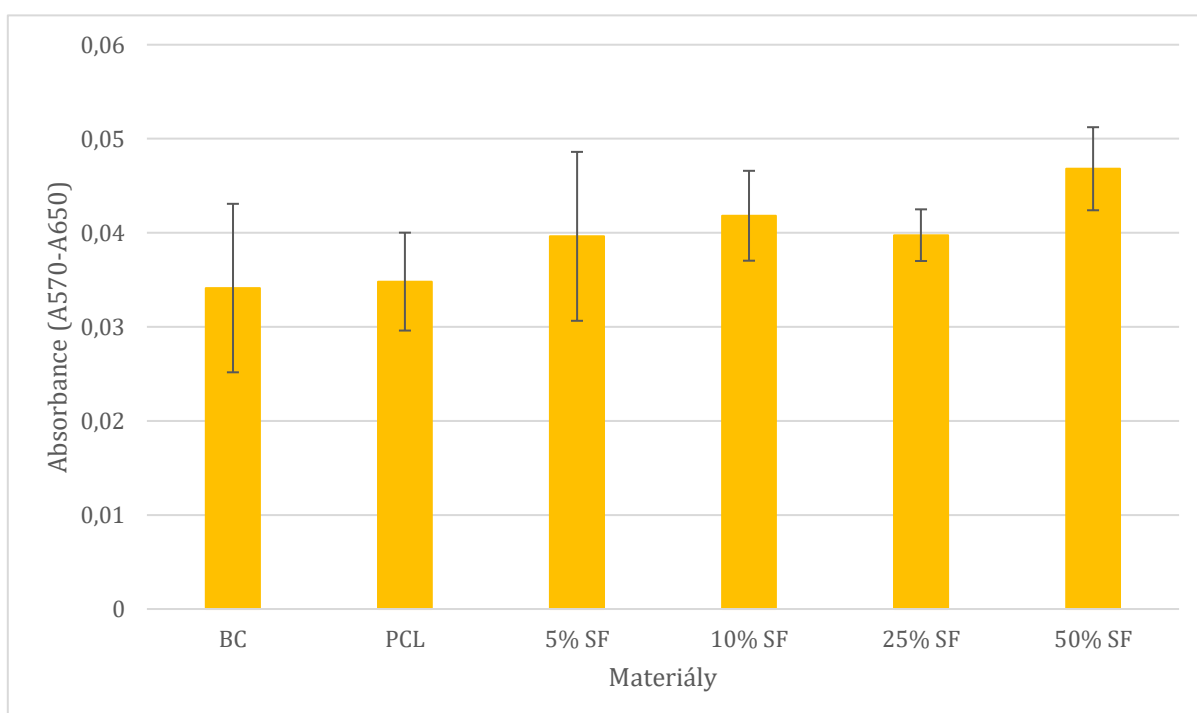
Na následujícím obrázku 20 je možné vidět graf shrnující výsledky testování cytotoxicity v přímém kontaktu pomocí metody MTT. Při porovnání výsledků pro různé vzorky lze říci, že nejlepší výsledky buněčné viability ($97 \pm 9 \%$) vykazuje materiál s 10% obsahem SF, který se zároveň nejvíce přibližuje viabilitě neovlivněné buněčné kontroly (BC), která je považována za 100 %. Ovšem i ostatní materiály dosáhly slibných výsledků. Podle očekávání materiály obsahující protein mají vyšší hodnoty buněčné viability než čisté PCL. Jako druhý nejlepší materiál byl identifikován vzorek obsahující 50 % (s buněčnou viabilitou $96 \pm 8 \%$), velmi podobně pak vyšly vzorky obsahující 5 % a 25 % proteinu (přibližně 95 %). Do obrázku 20 pro srovnání byly také začleněny hodnoty od pozitivní kontroly (PC), které vyšly přibližně 43 %. Z toho vyplývá, že má na buňky prokazatelně cytotoxický efekt. Za hranici prokazující toxický účinek testované látky je považována hranice 70 % viability. Na základě výsledků z tohoto testu se následně postoupilo k testování buněčné adheze a proliferace u všech nanovláčkových vzorků.



Obrázek 20 Výsledky testu cytotoxicity

10.2.2 Test adheze

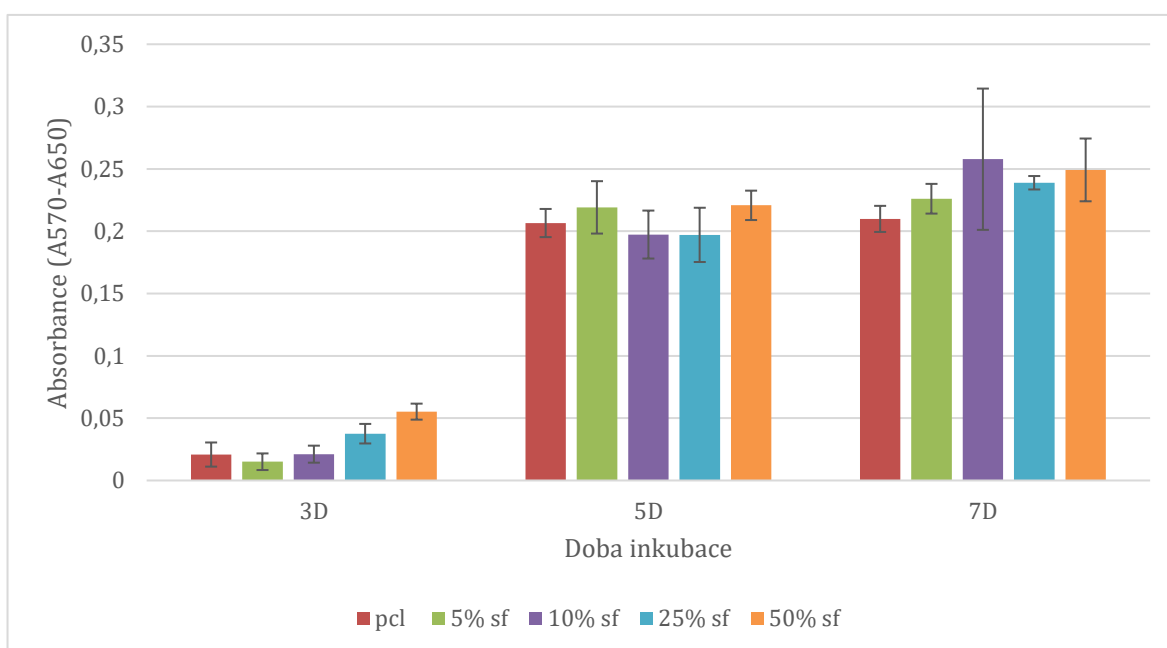
Dalším testem pro zjištění biokompatibility materiálu je test buněčné adheze. Ta byla vyhodnocena po 24 hodinách od nasazení buněk. Z dosažených výsledků, zobrazených na obrázku 21, lze říci, že pro buněčnou adhezi buněk HepG2 byl nejvíce vhodný materiál s 50% obsahem silk fibroinu, který svou hodnotou výrazně převyšuje buněčnou kontrolu i množství adherovaných buněk na povrch PCL nanovláken. Jako druhý nejlepší materiál se prokázal vzorek s 10% obsahem SF a stejně jako v předchozím testu, výsledky pro materiál s 5% a 25% obsahem proteinu vychází velmi podobně. Z výsledných hodnot vyplývá, že nejlepší materiál je vzorek s 50% obsahem SF, což může být způsobeno tím, že vyšší obsah přírodního polymeru bude mít výraznější pozitivní vliv na buněčnou adhezi. Zároveň je nutné brát v úvahu možný vliv morfologie nanovláken, která se vlivem různého podílu SF také liší. Zhoršení buněčné adheze u vzorku s 25% obsahem SF oproti vzorku s 10% podílem SF může být vysvětleno chybou pipetování či neúmyslným poškozením buněčné vrstvy.



Obrázek 21 Výsledky testu adheze

10.2.3 Test proliferace

Pro lepší představu o dlouhodobější podpoře pro hojení jater a podporu buněčného růstu navazoval na test buněčné adheze také test proliferace buněk HepG2, a to po dobu až sedmi dnů. Dosažené výsledky (průměr \pm směrodatná odchylka) reprezentující vývoj počtu buněk na nanovláčkách v čase jsou graficky zobrazeny na obrázku 22. Vliv podílu SF v nanovláčném materiálu v jednotlivých testovacích dnech kolísá. Po 7 dnech kultivace je dobře patrná závislost počtu buněk a podílu SF ve vzorku. Na základě získaných hodnot se potvrdil předpoklad, že dlouhodoběji bude nejlepší materiál s nejvyšším podílem silk fibroinu. Vybočující výsledek zaznamenaný po 7 dnech kultivace u vzorku s 10% podílem SF může mohl být způsoben chybou manipulace při nasazení buněk nebo přítomností shluku buněk v suspenzi. Buňky HepG2 vykazují typickou epiteliální morfologii, kdy při růstu formují ostrůvky a následně vícevrstevné shluky buněk. Je možné, že při přípravě buněčné suspenze se nepodařilo buňky z těchto shluků dostatečně dobře ojednotit. Z dosažených výsledků vyplývá, že po 7 dnech kultivace nanovláčkové materiály s vyšším podílem SF lépe podporují buněčnou proliferaci. Nanovláčka s čistým PCL a pouze s 5% obsahem SF jsou nejméně vhodné pro kultivaci HepG2 buněk.

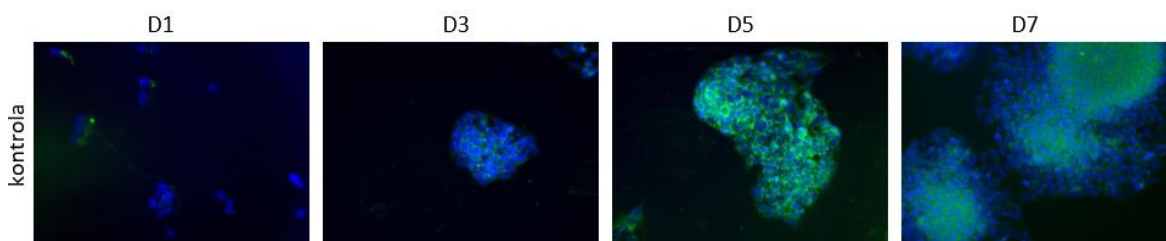


Obrázek 22 Metabolická aktivita buněk inkubovaných na testovaných materiálech PCL a PCL s přidávkem SF v jednotlivých odběrových dnech experimentu. Testování v 3., 5. a 7. dni od nasazení buněk na materiál.

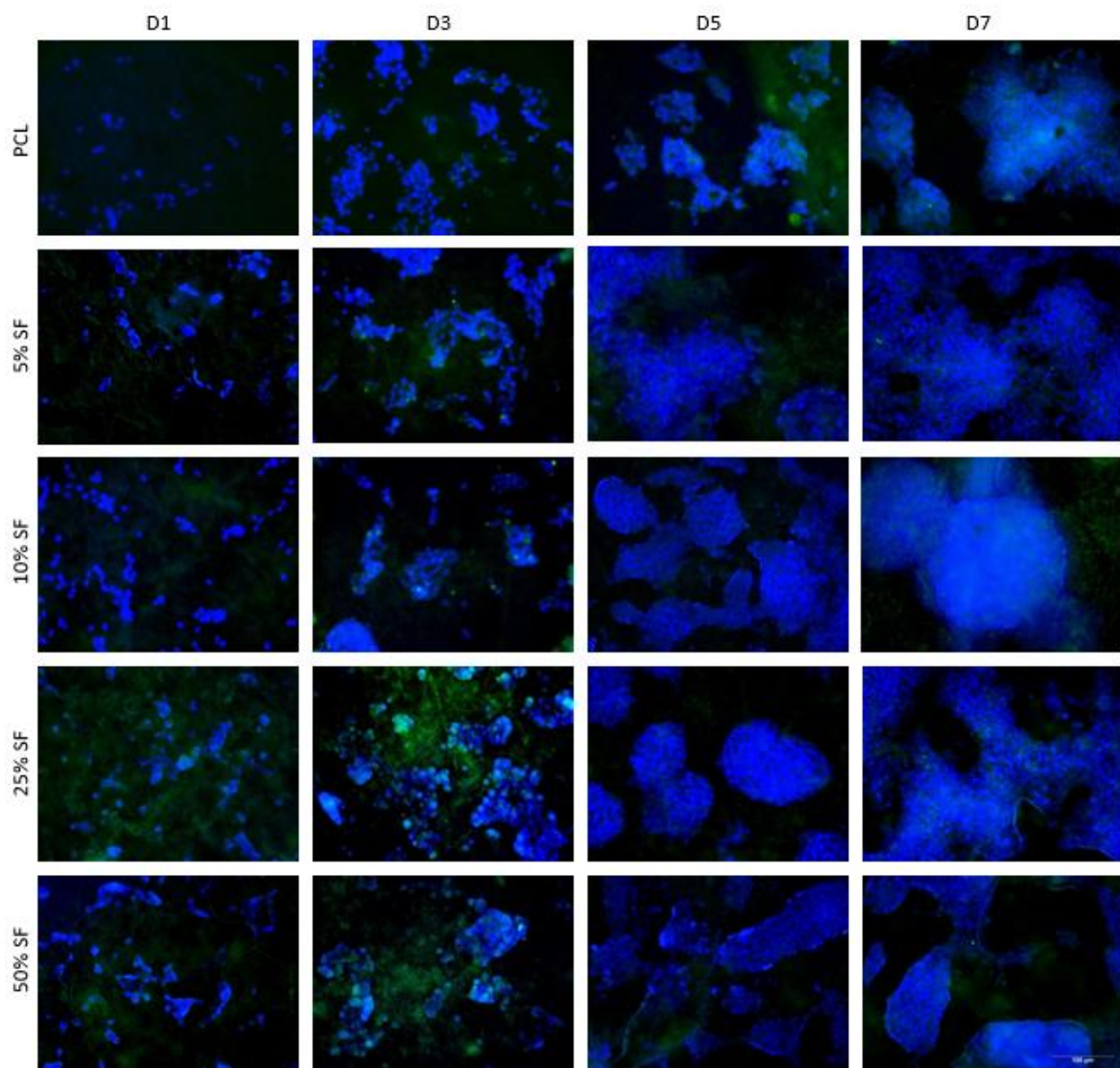
10.3 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční barvení buněk bylo použito pro hodnocení buněčné adheze a proliferace na nanovlákněném materiálu. Barvení bylo provedeno barvivou DiOC6 a DAPI. V případě nanovlákněných vzorků došlo k nespecifickému navázání fluorescenčního barviva DiOC6 na nanovláknena, což způsobilo silnou fluorescenci pozadí. Z tohoto důvodu se u nanovlákněných vzorků snímala především buněčná jádra barvená v DAPI.

Na snímcích 23 a 24 byla pozorována typická epiteliální morfologie pro HepG2 buňky. Ve 3. dni se dají pozorovat shluky buněk, které se zvětšují se zvyšujícím se dnem. Při pokračující kultivaci lze u vzorků spatřit jednovrstevné a následně vícevrstevné ostrůvky. Na obrázku 24 v 7 dni, kde jsou nanovlákněné vzorky všech materiálů, lze v porovnání s 1. dnem pozorovat rozsáhlou kolonizaci buňkami HePG2.



Obrázek 23 Snímek z fluorescenční mikroskopie pro buněčnou kontrolu



Obrázek 24 Snímky z fluorescenční mikroskopie vzorků s odlišným obsahem SF v různých dnech kultivace

Závěr

Tato práce se zabývala elektrostatickým zvlákněním směsi SF a PCL, prozkoumáním vlivu různé zvláknovací vzdálenosti a odlišného obsahu SF na morfologii a fyzikálně-chemické vlastnosti připravených nanovláken. Připravené vlákenné materiály byly následně testovány pro ověření jejich biokompatibility. V první části této práce byl nejdříve teoreticky zkoumán proces EZ a vlivů procesních parametrů. Poté byly popsány důležité chemikálie pro tento experiment, jejich vlastnosti a použití. Jako poslední bod je stručně popsána regenerace jater.

V druhé části byly elektrostaticky zvlákněny směsi o různém obsahu SF a PCL, jejichž morfologie se hodnotila pomocí elektronové mikroskopie. U všech zvláknovaných poměrů PCL:SF byla potvrzena vlákenná morfologie a vlákna v submikronovém měřítku. Podle získaných dat je možné říci, že vlákna v připraveném materiálu měla nejčastěji průměr v rozmezí 300-400 nm. U vzorků zvlákněných při statických podmínkách nebyl pozorován trend vývoje střední hodnoty průměrů vláken související s podílem silk fibroinu ve směsi ani zvláknovací vzdáleností. U vzorků zvlákněných při dynamických podmínkách bylo pozorováno bez ohledu na obsah SF rozložení četnosti do více intervalů v porovnání se staticky zvlákněnými vzorky. Jako materiál s největšími průměry (přibližně 650 nm) byla vrstva S4 u vzorku s 25% obsahem SF, s nejmenší průměrnou hodnotou naměřených průměrů tloušťky vlákna (235 nm) byla vrstva S2 u vzorku s 50% obsahem SF. Výsledky z FTIR analýzy potvrdily, že v připraveném nanovlákněném materiálu se opravdu vyskytoval SF v různém podílu. Podle získaných dat z TGA se dá říci, že při teplotě 600 °C došlo k většímu jak 96% úbytku hmotnosti původního vzorku. Také v přibližném rozmezí teplot 400-500 °C lze pozorovat trend, který ukazuje, že se zvětšujícím se podílem SF probíhá tepelná degradace nad 400 °C pomaleji. Zvlákněný materiál byl také podroben testům *in vitro* pomocí kolorimetrického testu MTT pro ověření jeho biokompatibility. Testy cytotoxicity ukázaly, že buněčná viabilita u všech vzorků je nad 90 %. Na základě těchto výsledků se postoupilo k testování buněčné adheze a proliferace, které prokázaly předpoklad, že pro buňky bude nejvíce vhodný materiál s největším podílem přírodního proteinu. Analýzy byly ještě doplněny o fluorescenční mikroskopii, na jejíchž snímcích byla pozorována typická epiteliální morfologie pro HepG2 buňky. Snímky také prokázaly, že delší doba kultivace vede k vytváření větších buněčných ostrůvků. Při kultivaci po dobu sedmi dnů došlo ke kolonizaci více než 50 % povrchu nanovlákněných vzorků.

Z naměřených výsledků se tedy dá shrnout, že se podařilo zvláknit poměrně čistý materiál s různým obsahem PCL a SF, jehož biokompatibilita byla prokázána na buněčné linii HepG2 jaterních buněk rakovinového původu. Pro lepší představu o dlouhodobějším prosperování buněk po aplikaci materiálu by se mohlo doporučit zvýšit počet dnů u testování proliferace či další podrobnější testování.

Seznam literatury

ASAKURA, Tetsuo, 2021. Structure of Silk I (Bombyx mori Silk Fibroin before Spinning) -Type II β -Turn, Not α -Helix-. *Molecules* [online]. **26**(12), 3706. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26123706

BAJÁKOVÁ, Jana, Jiří CHALOUPEK, David LUKÁŠ a Maxime LACARIN, 2011. „DRAWING“- THE PRODUCTION OF INDIVIDUAL NANOFIBERS BY EXPERIMENTAL METHOD. 5.

BALOGH, Attila, Balázs FARKAS, Geert VERRECK, Jürgen MENSCH, Enikő BORBÁS, Brigitta NAGY, György MAROSI a Zsombor Kristóf NAGY, 2016. AC and DC electrospinning of hydroxypropylmethylcellulose with polyethylene oxides as secondary polymer for improved drug dissolution. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. **505**(1–2), 159–166. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2016.03.024

BHARDWAJ, Nandana a Subhas C. KUNDU, 2010. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* [online]. **28**(3), 325–347. ISSN 0734-9750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2010.01.004

CAI, Y., Q. WEI a F. HUANG, 2012. 3 - Processing of composite functional nanofibers. In: Qufu WEI, ed. *Functional Nanofibers and their Applications* [online]. B.m.: Woodhead Publishing, Woodhead Publishing Series in Textiles, s. 38–54 [vid. 2022-03-19]. ISBN 978-0-85709-069-0. Dostupné z: doi:10.1533/9780857095640.1.38

CASINI, Beatrice, Benedetta TUVO, Maria Luisa CRISTINA, Anna Maria SPAGNOLO, Michele TOTARO, Angelo BAGGIANI a Gaetano Pierpaolo PRIVITERA, 2019. Evaluation of an Ultraviolet C (UVC) Light-Emitting Device for Disinfection of High Touch Surfaces in Hospital Critical Areas. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. **16**(19), 3572. ISSN 1661-7827. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph16193572

CONOSCENTI, Gioacchino, Vincenzo La CARRUBBA a Valerio BRUCATO, 2017. A Versatile Technique to Produce Porous Polymeric Scaffolds: The Thermally Induced Phase Separation (TIPS) Method. *Archives in Chemical Research* [online]. **1**(2), 0–0. ISSN 2572-4657. Dostupné z: doi:10.21767/2572-4657.100012

DOOLEY, Steven a Peter TEN DIJKE, 2012. TGF- β in progression of liver disease. *Cell and Tissue Research* [online]. **347**(1), 245–256. ISSN 1432-0878. Dostupné z: doi:10.1007/s00441-011-1246-y

ERSEL, Murat, Yigit UYANIKGIL, Funda Karbek AKARCA, Enver OZCETE, Yusuf Ali ALTUNCI, Fatih KARABEY, Turker CAVUSOGLU, Ayfer MERAL, Gurkan YIGITTURK a Emel Oyku CETIN, 2016. Effects of Silk Sericin on Incision Wound Healing in a Dorsal Skin Flap Wound Healing Rat Model. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* [online]. **22**, 1064–1078. ISSN 1234-1010. Dostupné z: doi:10.12659/MSM.897981

FUJIYOSHI, Masato a Michitaka OZAKI, 2011. Molecular mechanisms of liver regeneration and protection for treatment of liver dysfunction and diseases. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences* [online]. **18**(1), 13–22. ISSN 1868-6982. Dostupné z: doi:10.1007/s00534-010-0304-2

GAUTAM, Sneha, Chia-Fu CHOU, Amit K. DINDA, Pravin D. POTDAR a Narayan C. MISHRA, 2014. Surface modification of nanofibrous polycaprolactone/gelatin composite scaffold by collagen type I grafting for skin tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C* [online]. **34**, 402–409. ISSN 0928-4931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2013.09.043

HAIDER, Adnan, Sajjad HAIDER a Inn-Kyu KANG, 2018. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. **11**(8), 1165–1188. ISSN 1878-5352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2015.11.015

HAN, Daewoo a Andrew J. STECKL, 2019. Coaxial Electrospinning Formation of Complex Polymer Fibers and their Applications. *ChemPlusChem* [online]. **84**(10), 1453–1497. ISSN 2192-6506. Dostupné z: doi:10.1002/cplu.201900281

HUANG, Zheng-Ming, Y. -Z. ZHANG, M. KOTAKI a S. RAMAKRISHNA, 2003. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology* [online]. **63**(15), 2223–2253. ISSN 0266-3538. Dostupné z: doi:10.1016/S0266-3538(03)00178-7

JANMOHAMMADI, M. a M. S. NOURBAKHSH, 2019. Electrospun polycaprolactone scaffolds for tissue engineering: a review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* [online]. **68**(9), 527–539. ISSN 0091-4037. Dostupné z: doi:10.1080/00914037.2018.1466139

JIRSÁK, Oldřich, 2006. Nanofibers, technology and applications. In: [online]. B.m. Dostupné z: <https://www.fzu.cz/~nanoteam/events/ws2006/jirsak.pdf>

KIJEŃSKA, Ewa, Molamma P. PRABHAKARAN, Wojciech SWIESZKOWSKI, Krzysztof J. KURZYDŁOWSKI a Seeram RAMAKRISHNA, 2014. Interaction of Schwann cells with laminin encapsulated PLCL core–shell nanofibers for nerve tissue engineering. *European Polymer Journal* [online]. **50**, 30–38. ISSN 0014-3057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2013.10.021

KUNDU, Banani, Rangam RAJKHOWA, Subhas C. KUNDU a Xungai WANG, 2013. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. **65**(4), Bionics - Biologically inspired smart materials, 457–470. ISSN 0169-409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2012.09.043

LABET, Marianne a Wim THIELEMANS, 2009. Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chemical Society Reviews* [online]. **38**(12), 3484–3504. ISSN 1460-4744. Dostupné z: doi:10.1039/B820162P

LIAO, Hsien-Shun, Jing LIN, Yang LIU, Peng HUANG, Albert JIN a Xiaoyuan CHEN, 2016. Self-assembly mechanisms of nanofibers from peptide amphiphiles in solution and on substrate surfaces. *Nanoscale* [online]. **8**(31), 14814–14820. ISSN 2040-3364. Dostupné z: doi:10.1039/c6nr04672j

MA, Liang, Xuejuan SHI, Xiaoxiao ZHANG a Lili LI, 2019. Electrospinning of polycaprolacton/chitosan core-shell nanofibers by a stable emulsion system. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. **583**, 123956. ISSN 0927-7757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2019.123956

MA, Peter X, 2004. Scaffolds for tissue fabrication. *Materials Today* [online]. **7**(5), 30–40. ISSN 1369-7021. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-7021(04)00233-0

MACCHIONE, Micaela A., Dariana ARISTIZABAL BEDOYA, Francisco N. FIGUEROA a Miriam C. STRUMIA, 2021. Chapter 2 - Synthetic and semi-synthetic polymers for pharmaceutical applications. In: Amit Kumar NAYAK, Kunal PAL, Indranil BANERJEE, Samarendra MAJI a Upendranath NANDA, ed. *Advances and Challenges in Pharmaceutical Technology* [online]. B.m.: Academic Press, s. 45–73 [vid. 2022-03-16]. ISBN 978-0-12-820043-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-820043-8.00005-0

MARTIN, Charles R., 1995. Template Synthesis of Electronically Conductive Polymer Nanostructures. *Accounts of Chemical Research* [online]. **28**(2), 61–68. ISSN 0001-4842. Dostupné z: doi:10.1021/ar00050a002

MORELLI, Sabrina, Antonella PISCIONERI, Simona SALERNO a Loredana DE BARTOLO, 2021. Hollow Fiber and Nanofiber Membranes in Bioartificial Liver and Neuronal Tissue Engineering. *Cells, Tissues, Organs* [online]. 1–30. ISSN 1422-6421. Dostupné z: doi:10.1159/000511680

NAVARRO-BARREDA, Diego, Begoña BEDRINA, Francisco GALINDO a Juan F. MIRAVET, 2022. Glutathione-responsive molecular nanoparticles from a dianionic bolaamphiphile and their use as carriers for targeted delivery. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. **608**, 2009–2017. ISSN 0021-9797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcis.2021.10.142

NGUYEN, Thang Phan, Quang Vinh NGUYEN, Van-Huy NGUYEN, Thu-Ha LE, Vu Quynh Nga HUYNH, Dai-Viet N. VO, Quang Thang TRINH, Soo Young KIM a Quyet Van LE, 2019. Silk Fibroin-Based Biomaterials for Biomedical Applications: A Review. *Polymers* [online]. **11**(12), 1933. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym11121933

PADAMWAR, M N a A P PAWAR, 2004. Silk sericin and its applications: A review. **63**, 7.

PARTHENIADIS, Ioannis, Ioannis NIKOLAKAKIS, Ivo LAIDMÄE a Jyrki HEINÄMÄKI, 2020. A Mini-Review: Needleless Electrospinning of Nanofibers for Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Processes* [online]. **8**(6), 673. ISSN 2227-9717. Dostupné z: doi:10.3390/pr8060673

POTĚŠIL, David, Vojtěch ADAM a René KIZEK, [b.r.]. FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ BUNĚČNOU PROLIFERACI – MARKERY. 21.

QIN, X., 2017. 3 - Coaxial electrospinning of nanofibers. In: Mehdi AFSHARI, ed. *Electrospun Nanofibers* [online]. B.m.: Woodhead Publishing, Woodhead Publishing Series in Textiles, s. 41–71 [vid. 2022-04-02]. ISBN 978-0-08-100907-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100907-9.00003-9

RAHMANI, Hamid, Ali FATTAHI, Komail SADRJAVADI, Salar KHALEDIAN a Yalda SHOKOOHINIA, 2019. Preparation and Characterization of Silk Fibroin Nanoparticles as a Potential Drug Delivery System for 5-Fluorouracil. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* [online]. **9**, 601–608. Dostupné z: doi:10.15171/apb.2019.069

RAJARAM KSHETRI, 2013. Introduction and Principle of IR spectroscopy. In: [online]. B.m. [vid. 2022-04-18]. Dostupné z: <https://www.slideshare.net/razaram1/introduction-and-principle-of-ir-spectroscopy-25872192>

REICHL, Jaroslav a Martin VŠETIČKA, 2006. *Encyklopedie fyziky* [online]. B.m.: Jaroslav Reichl [vid. 2022-04-18]. Dostupné z: <http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/1675-skenovaci-elektronovy-mikroskop>

RÜCK, Angelika, Matthias KRESS, Frank DOLP, Nermin AKGÜN, Thomas MEIER a Rudolf STEINER, 2002. New Microscopic Techniques to Investigate Intracellular Localization and Reactions of Photosensitizers: Laser Scanning Fluorescence Lifetime Imaging (LS-FLIM). *Medical Laser Application* [online]. **17**(1), 41–47. ISSN 1615-1615. Dostupné z: doi:10.1078/1615-1615-00045

SAFAEIJAVAN, Raheleh, Masoud SOLEIMANI, Adeleh DIVSALAR, Akram EIDI a Abdolreza ARDESHIRYLAJIMI, 2014. Comparison of random and aligned PCL nanofibrous electrospun scaffolds on cardiomyocyte differentiation of human adipose-derived stem cells. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* [online]. **17**(11), 903–911. ISSN 2008-3866. Dostupné z: doi:10.22038/ijbms.2014.3743

SASITHORN, Nongnut, Lenka MARTINOVÁ, Jana HORAKOVA a Rattanaphol MONGKHOLRATTANASIT, 2016. Fabrication of Silk Fibroin Nanofibres by Needleless

Electrospinning. In: [online]. s. 95–113. ISBN 978-953-51-2821-2. Dostupné z: doi:10.5772/65835

SCHERLIESS, Regina, 2011. The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity in vitro on respiratory epithelial cells. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. **411**(1–2), 98–105. ISSN 1873-3476. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2011.03.053

SCHOLTEN, Elke, Lev BROMBERG, Gregory C. RUTLEDGE a T. Alan HATTON, 2011. Electrospun Polyurethane Fibers for Absorption of Volatile Organic Compounds from Air. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. **3**(10), 3902–3909. ISSN 1944-8244. Dostupné z: doi:10.1021/am200748y

SIVAN, Manikandan, Divyabharathi MADHESWARAN, Jan VALTERA, Eva Kuzelova KOSTAKOVA a David LUKAS, 2022. Alternating current electrospinning: The impacts of various high-voltage signal shapes and frequencies on the spinnability and productivity of polycaprolactone nanofibers. *Materials & Design* [online]. **213**, 110308. ISSN 0264-1275. Dostupné z: doi:10.1016/j.matdes.2021.110308

TEO, Wee-Eong, Renuga GOPAL, Ramakrishnan RAMASESHAN, Kazutoshi FUJIHARA a Seeram RAMAKRISHNA, 2007. A dynamic liquid support system for continuous electrospun yarn fabrication. *Polymer* [online]. **48**(12), 3400–3405. ISSN 0032-3861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2007.04.044

TOKIWA, Yutaka, Buenaventurada P. CALABIA, Charles U. UGWU a Seiichi AIBA, 2009. Biodegradability of Plastics. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **10**(9), 3722–3742. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms10093722

TOMEH, Anas, Roja HADIANAMREI a Xiubo ZHAO, 2019. Silk Fibroin as a Functional Biomaterial for Drug and Gene Delivery. *Pharmaceutics* [online]. **11**, 494. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics11100494

TORRES-MARTINEZ, Erick José, José Manuel Cornejo BRAVO, Aracely Serrano MEDINA, Graciela Lizeth Pérez GONZÁLEZ a Luis Jesús Villarreal GÓMEZ, 2008. A Summary of Electrospun Nanofibers as Drug Delivery System: Drugs Loaded and Biopolymers Used as Matrices. *Current Drug Delivery*. **15**(10), 1360–1374.

TUCKER, Nick, Jonathan J. STANGER, Mark P. STAIGER, Hussam RAZZAQ a Kathleen HOFMAN, 2012. The History of the Science and Technology of Electrospinning from 1600 to 1995. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics* [online]. **7**(2_suppl), 155892501200702S10. ISSN 1558-9250. Dostupné z: doi:10.1177/155892501200702S10

UGO, Paolo a Ligia Maria MORETTO, 2007. 16.2 - TEMPLATE DEPOSITION OF METALS. In: Cynthia G. ZOSKI, ed. *Handbook of Electrochemistry* [online]. Amsterdam: Elsevier, s. 678–709 [vid. 2022-04-05]. ISBN 978-0-444-51958-0. Dostupné z: doi:10.1016/B978-044451958-0.50030-6

UM, In Chul, Dufei FANG, Benjamin S. HSIAO, Akio OKAMOTO a Benjamin CHU, 2004. Electro-Spinning and Electro-Blowing of Hyaluronic Acid. *Biomacromolecules* [online]. **5**(4), 1428–1436. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm034539b

YALCINKAYA, Baturalp, Fatma YALCINKAYA a Jiri CHALOUPEK, 2016. Thin Film Nanofibrous Composite Membrane for Dead-End Seawater Desalination. *Journal of Nanomaterials* [online]. **2016**, 1–12. Dostupné z: doi:10.1155/2016/2694373

ZHANG, Xingshuang, Lei XIE, Xungai WANG, Zhengzhong SHAO a Biao KONG, 2022. Electrospinning super-assembly of ultrathin fibers from single- to multi-Taylor cone sites. *Applied Materials Today* [online]. **26**, 101272. ISSN 2352-9407. Dostupné z: doi:10.1016/j.apmt.2021.101272

ZHOU, Fenglei, R. GONG a Isaac PORAT, 2010. Needle and Needleless Electrospinning for Nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. **115**, 2591–2598. Dostupné z: doi:10.1002/app.31282

Přílohy

Přílohová část obsahuje snímky vláken ze SEM, histogramy průměrů vláken pro všechny vzorky a snímky TGA pro každý vzorek.

Seznam obrázků A

Obrázek A 1 SEM snímky čisté PCL vrstva S1, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)	73
Obrázek A 2 SEM snímky čisté PCL vrstva S2, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)	73
Obrázek A 3 SEM snímky čisté PCL vrstva S3, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)	73
Obrázek A 5 S4SEM snímky 5 % SF vrstva S1, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)	74
Obrázek A 4 SEM snímky čisté PCL vrstva S4, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)	74
Obrázek A 6 SEM snímky 5 % SF vrstva S2, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)	74
Obrázek A 7 SEM snímky 5 % SF vrstva S3, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)	74
Obrázek A 8 SEM snímky 5 % SF vrstva S4, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)	75
Obrázek A 9 SEM snímky 10 % SF vrstva S1, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)	75
Obrázek A 10 SEM snímky 10 % SF vrstva S2, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)	75
Obrázek A 11 SEM snímky 10 % SF vrstva S3, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)	75
Obrázek A 12 SEM snímky 10 % SF vrstva S4, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)	76
Obrázek A 13 SEM snímky 25 % SF vrstva S1, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)	76
Obrázek A 14 SEM snímky 25 % SF vrstva S2, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)	76

Obrázek A 15 SEM snímky 25 % SF vrstva S3, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)	76
Obrázek A 16 SEM snímky 25 % SF vrstva S4, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)	77
Obrázek A 17 snímky 50 % SF vrstva S1, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)	77
Obrázek A 18 SEM snímky 50 % SF vrstva S2, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)	77
Obrázek A 19 SEM snímky 50 % SF vrstva S3, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)	77
Obrázek A 20 SEM snímky 50 % SF vrstva S4, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)	78

Seznam obrázků B

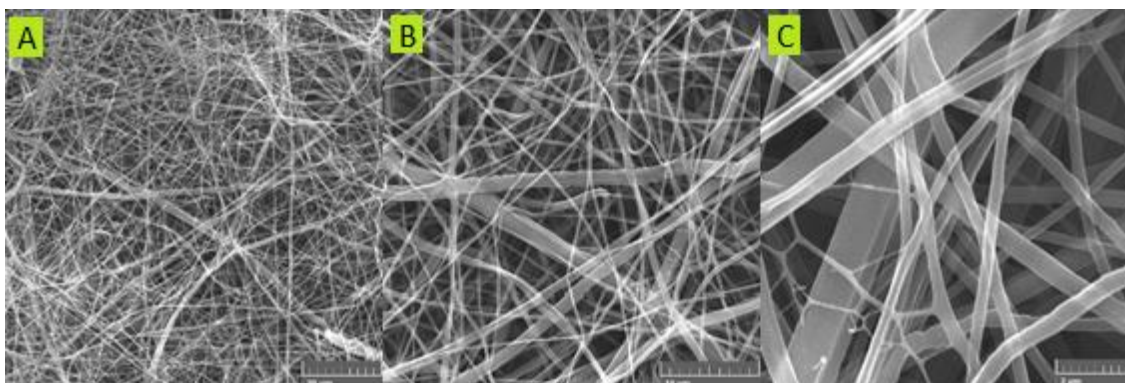
Obrázek B 2 Histogramy četnosti průměrů vláken obsahující 5 % SF, A vrstva S1; B vrstva S2; C vrstva S3; D vrstva S4	80
Obrázek B 1 Histogramy četnosti průměrů vláken pro čisté PCL, A vrstva S1; B vrstva S2; C vrstva S3; D vrstva S4	79
Obrázek B 4 Histogramy četnosti průměrů vláken obsahující 25 % SF, A vrstva S1; B vrstva S2; C vrstva S3; D vrstva S4	81
Obrázek B 3 Histogramy četnosti průměrů vláken obsahující 10 % SF, A vrstva S1; B vrstva S2; C vrstva S3; D vrstva S4	80
Obrázek B 5 Histogramy četnosti průměrů vláken obsahující 50 % SF, A vrstva S1; B vrstva S2; C vrstva S3; D vrstva S4	81

Seznam obrázků C

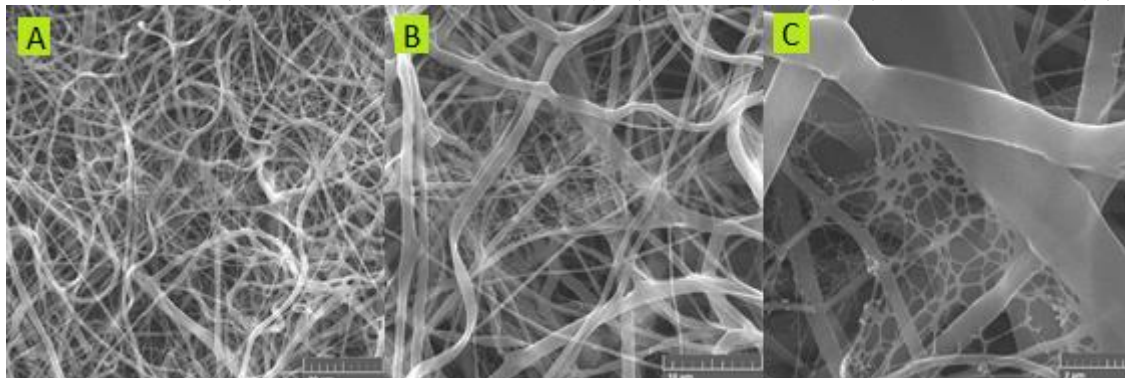
Obrázek C 1 TGA vzorek čisté PCL	82
Obrázek C 2 TGA vzorek s 5 % SF	83
Obrázek C 3 TGA vzorek s 10 % SF	83
Obrázek C 4 TGA vzorek s 25 % SF	83
Obrázek C 5 TGA vzorek s 50 % SF	83

Příloha A: snímky za SEM připravených nanovláčkových vrstev

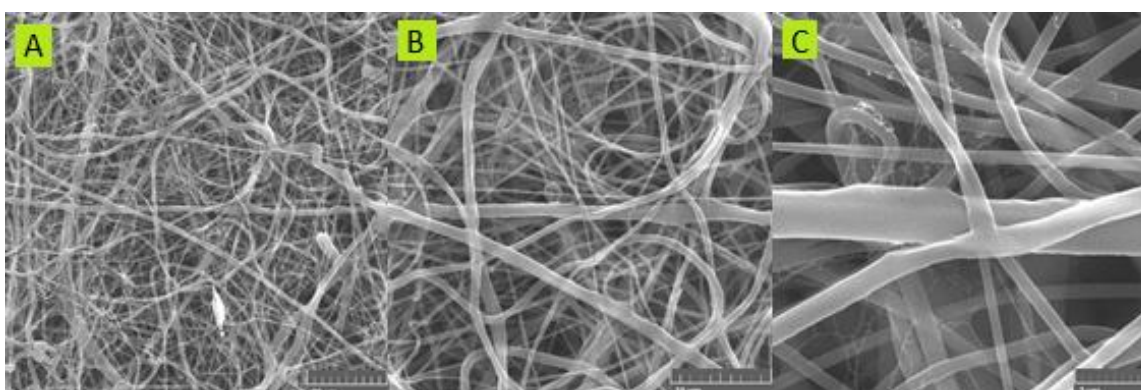
Pro každý vzorek s různým poměrem PCL a SF se vytvořily snímky vrstev pro různá zvětšení. V popiscích následujících obrázků (obrázen A 1-20) je zaznamenáno, o jaký typ vzorku se jedná, zvětšení a v závorce měřítko.



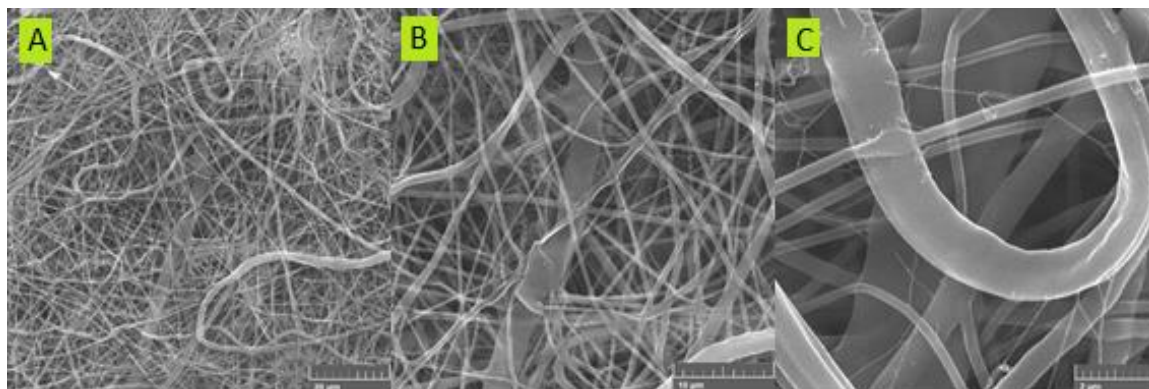
Obrázek A 1 SEM snímky čisté PCL vrstva S1, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)



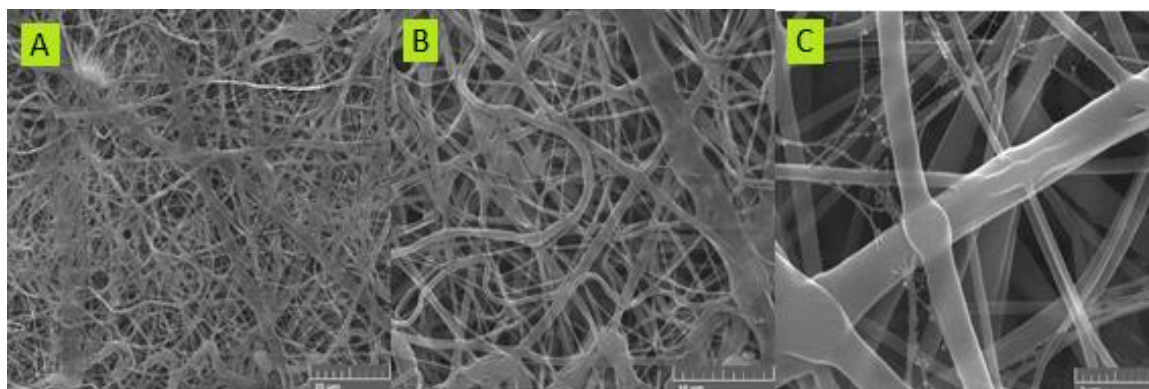
Obrázek A 2 SEM snímky čisté PCL vrstva S2, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)



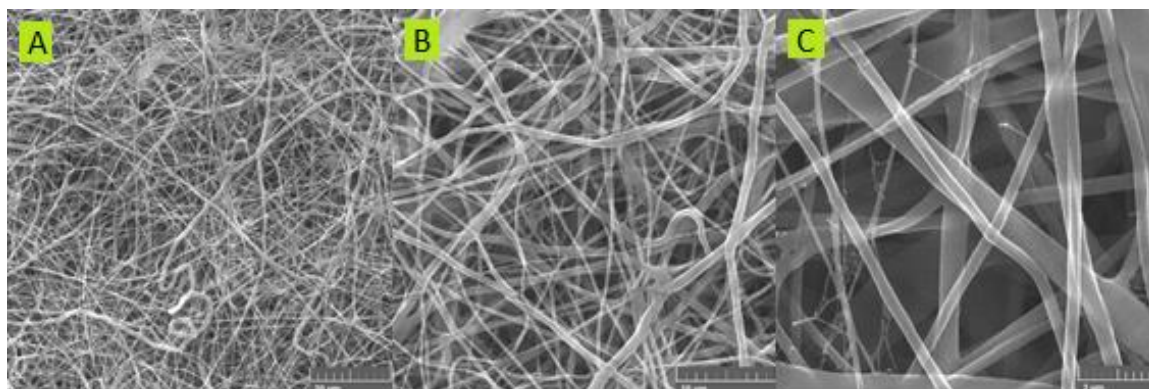
Obrázek A 3 SEM snímky čisté PCL vrstva S3, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)



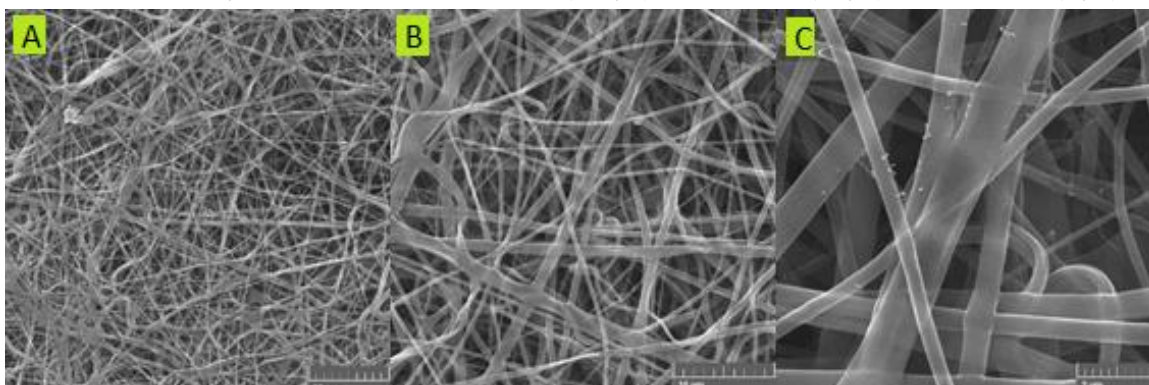
Obrázek A 4 SEM snímky čisté PCL vrstva S4, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)



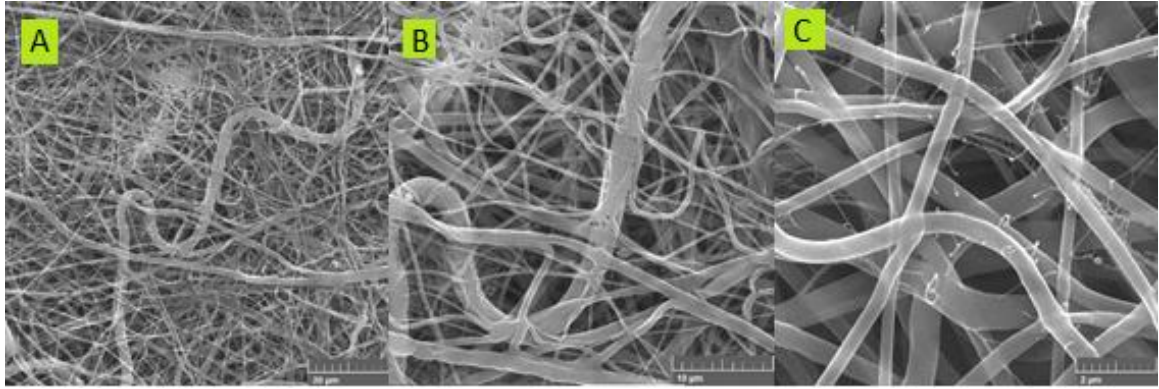
Obrázek A 5 S4SEM snímky 5 % SF vrstva S1, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)



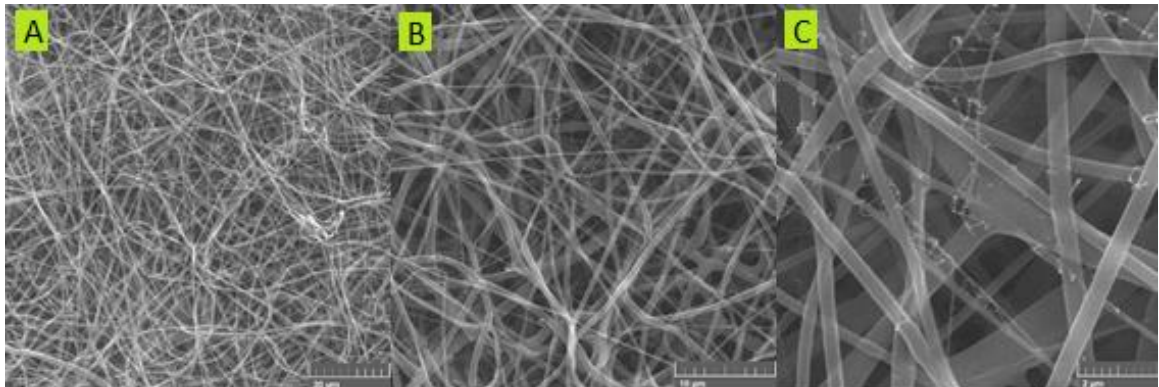
Obrázek A 6 SEM snímky 5 % SF vrstva S2, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)



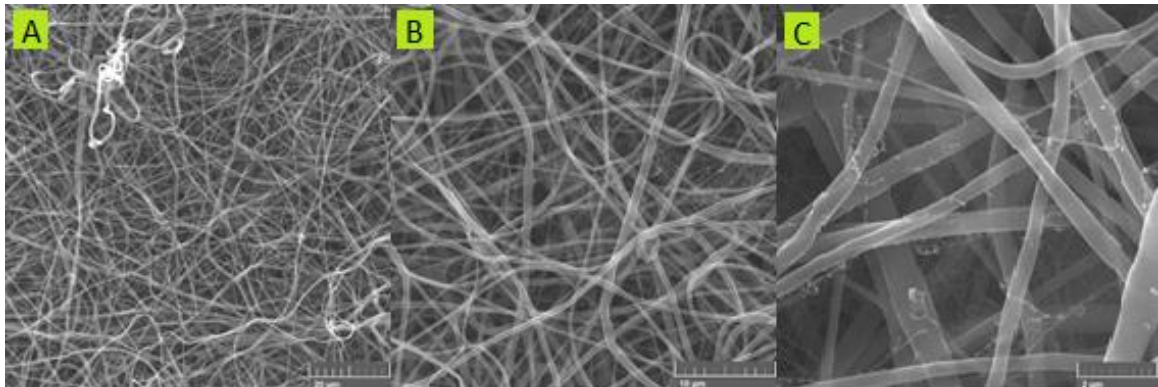
Obrázek A 7 SEM snímky 5 % SF vrstva S3, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)



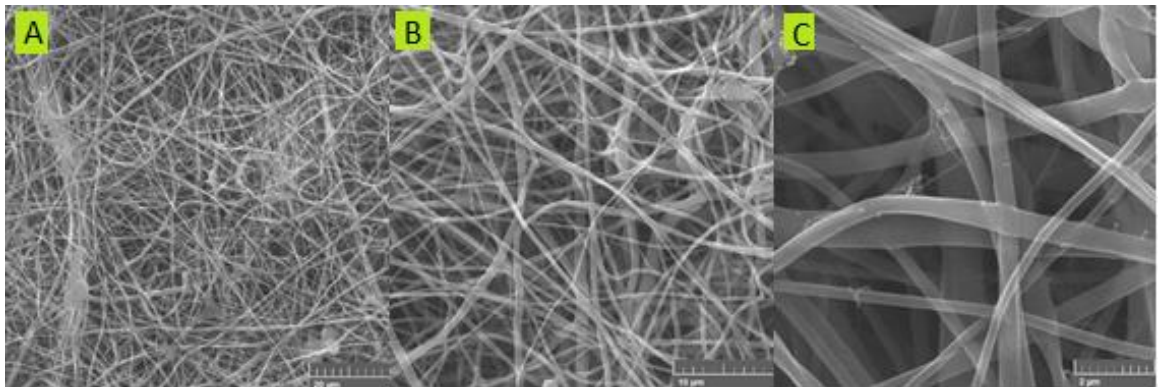
Obrázek A 8 SEM snímky 5 % SF vrstva S4, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)



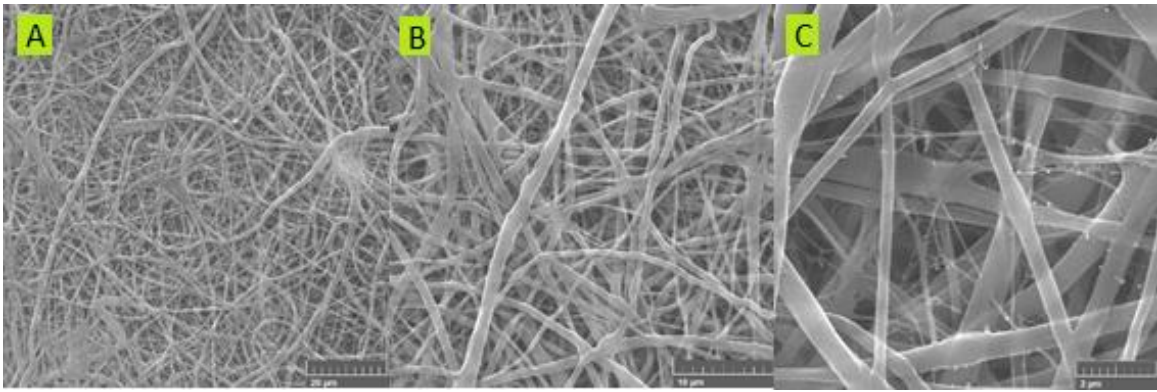
Obrázek A 9 SEM snímky 10 % SF vrstva S1, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)



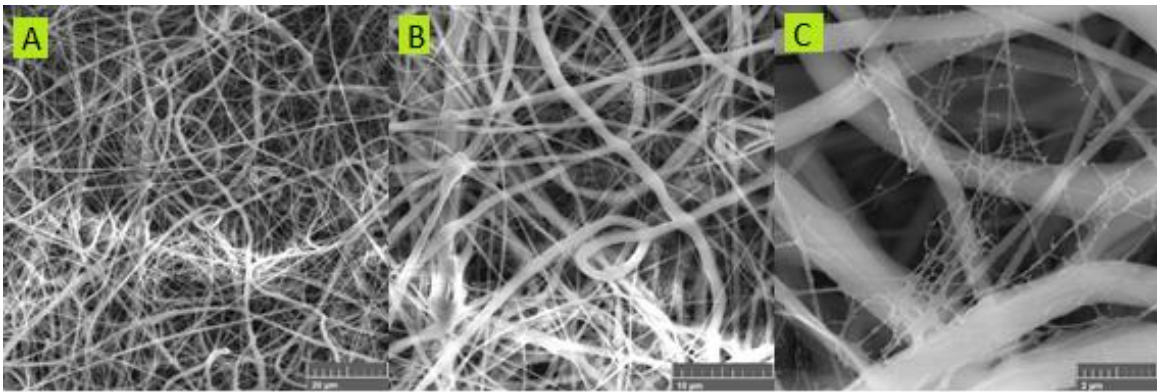
Obrázek A 10 SEM snímky 10 % SF vrstva S2, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)



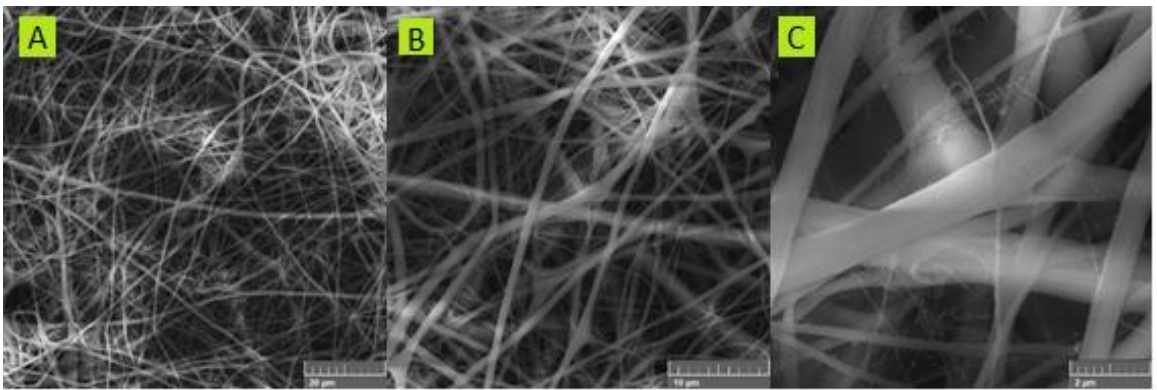
Obrázek A 11 SEM snímky 10 % SF vrstva S3, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)



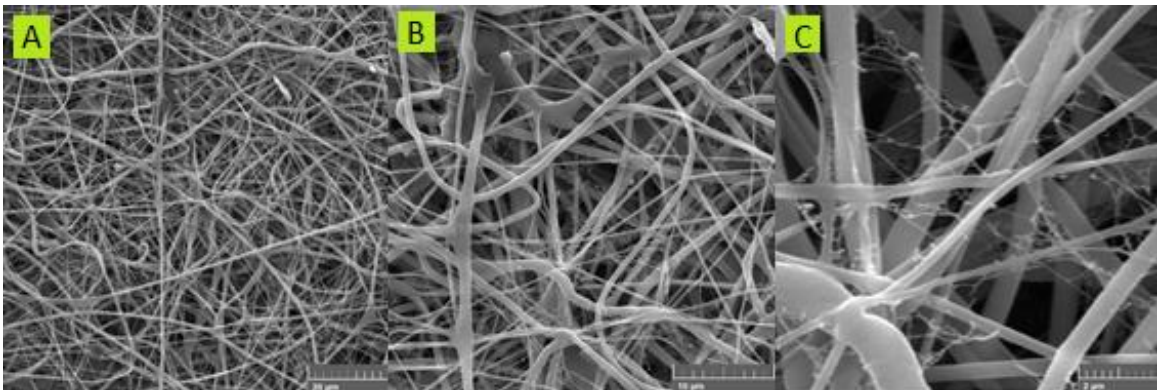
Obrázek A 12 SEM snímky 10 % SF vrstva S4, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)



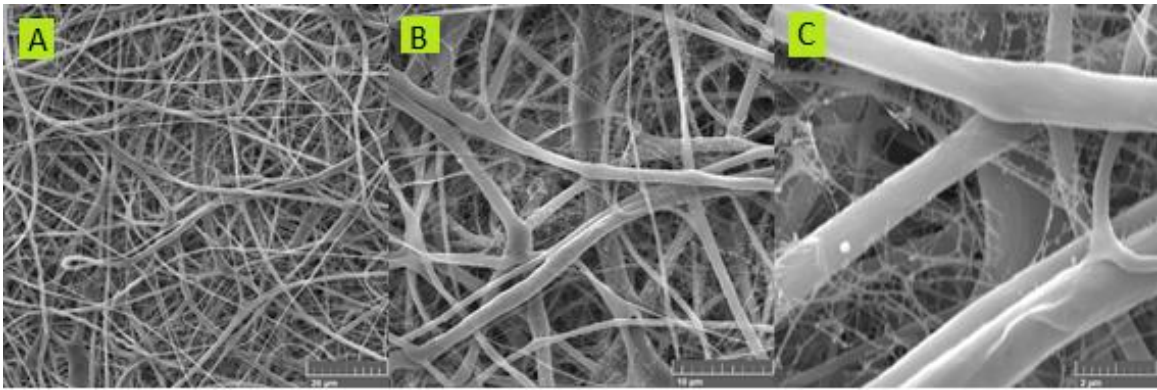
Obrázek A 13 SEM snímky 25 % SF vrstva S1, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)



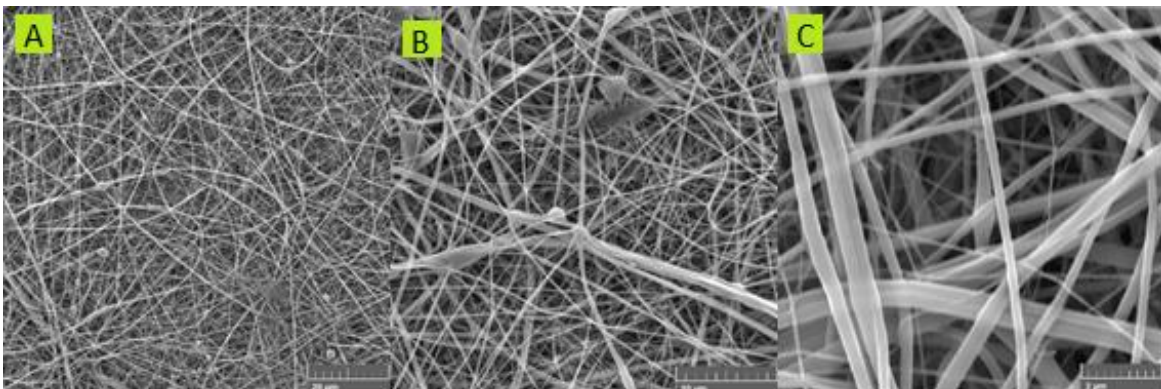
Obrázek A 14 SEM snímky 25 % SF vrstva S2, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)



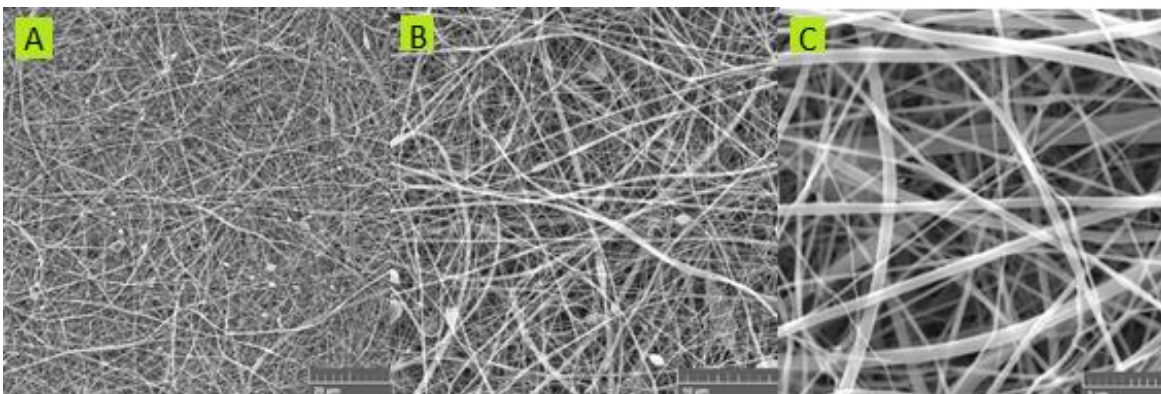
Obrázek A 15 SEM snímky 25 % SF vrstva S3, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)



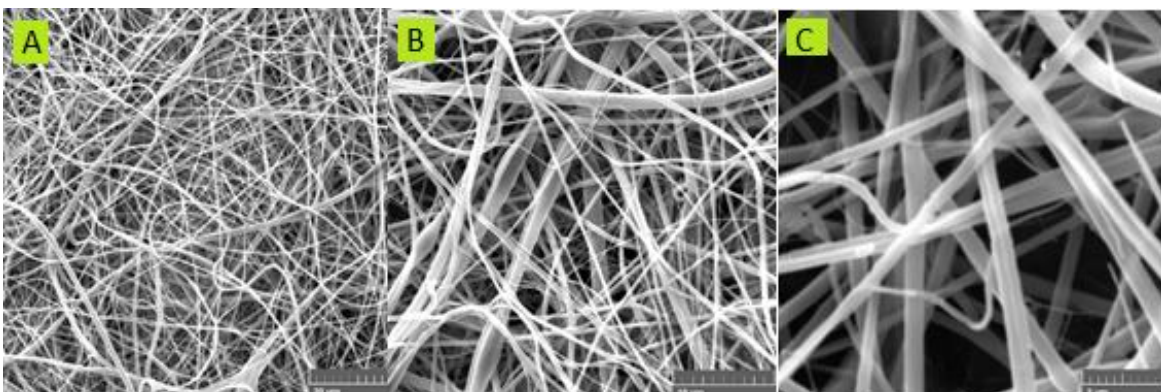
Obrázek A 16 SEM snímky 25 % SF vrstva S4, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)



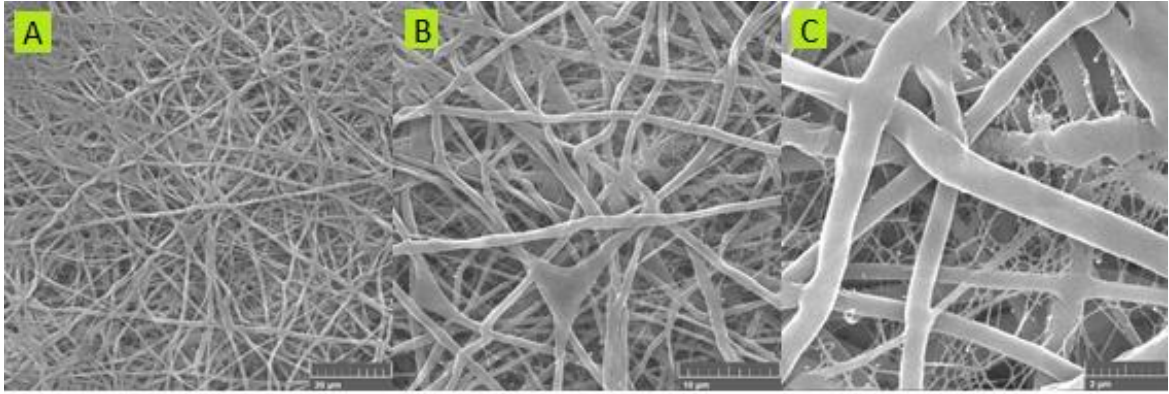
Obrázek A 17 snímky 50 % SF vrstva S1, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)



Obrázek A 18 SEM snímky 50 % SF vrstva S2, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)



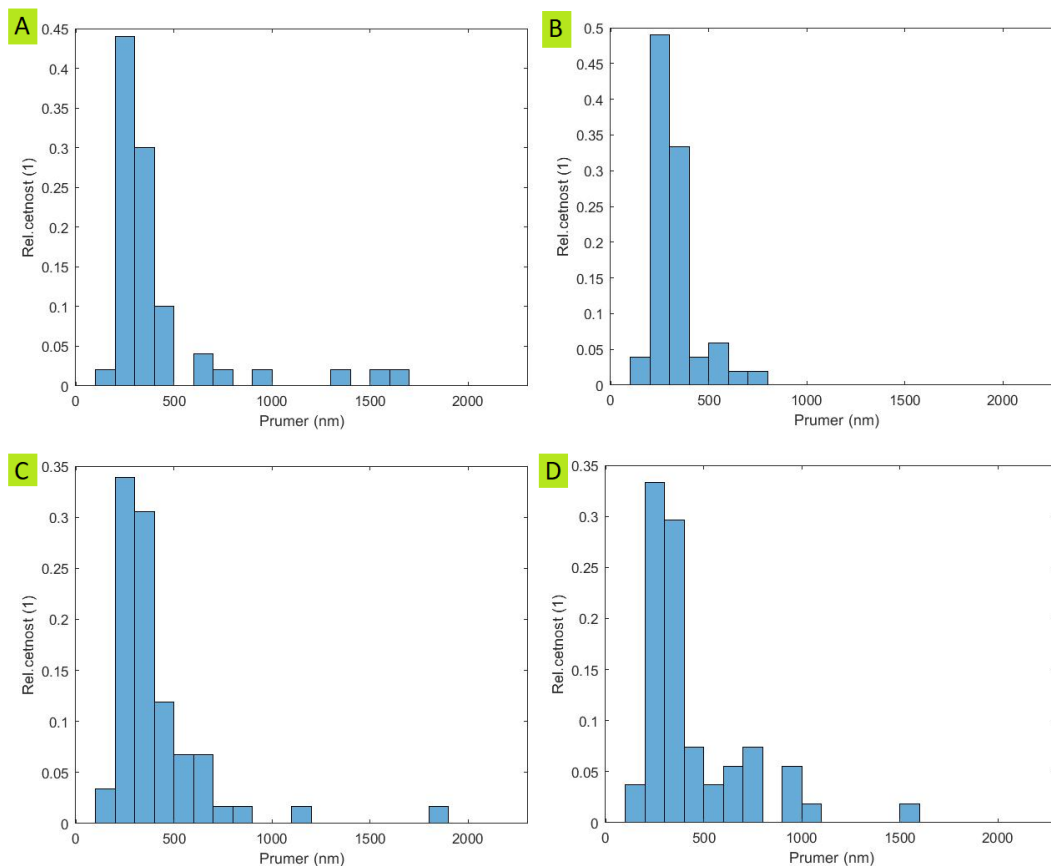
Obrázek A 19 SEM snímky 50 % SF vrstva S3, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)



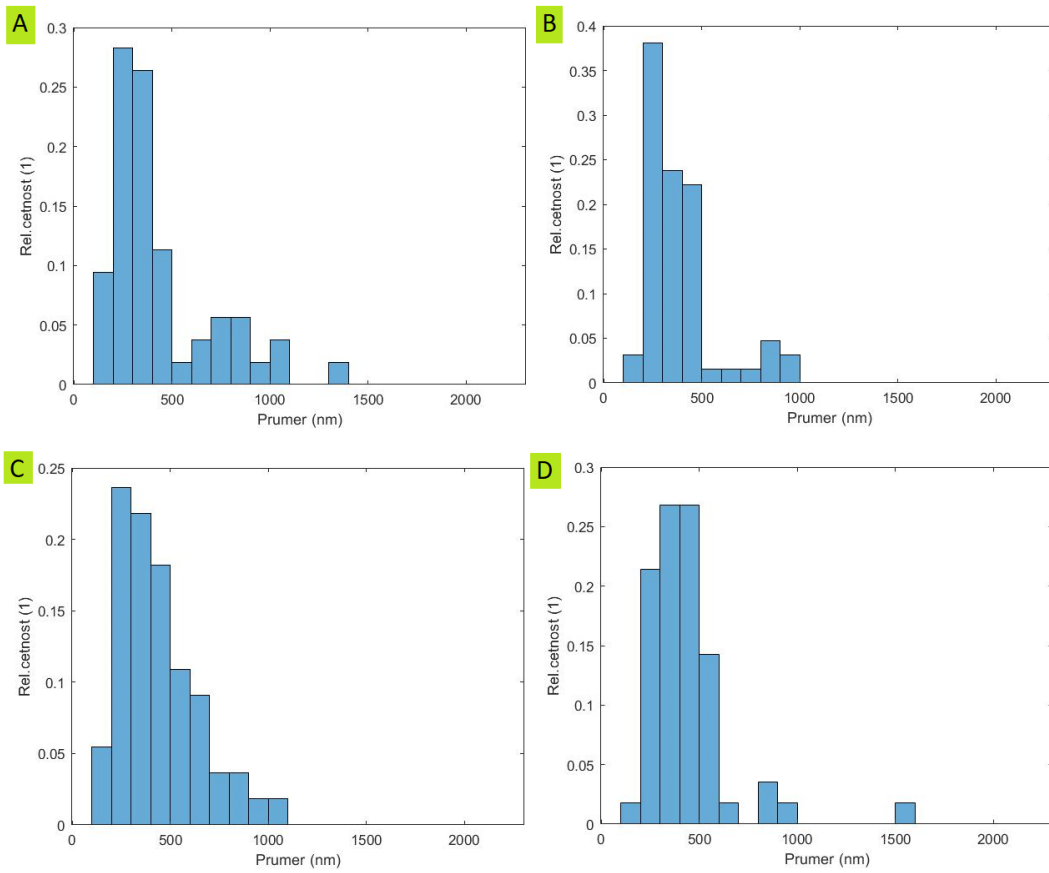
Obrázek A 20 SEM snímky 50 % SF vrstva S4, A zvětšení 2kx (200 μm); B zvětšení 5kx (10 μm); C zvětšení 20kx (2 μm)

Příloha B: Histogramy četnosti průměrů vláken

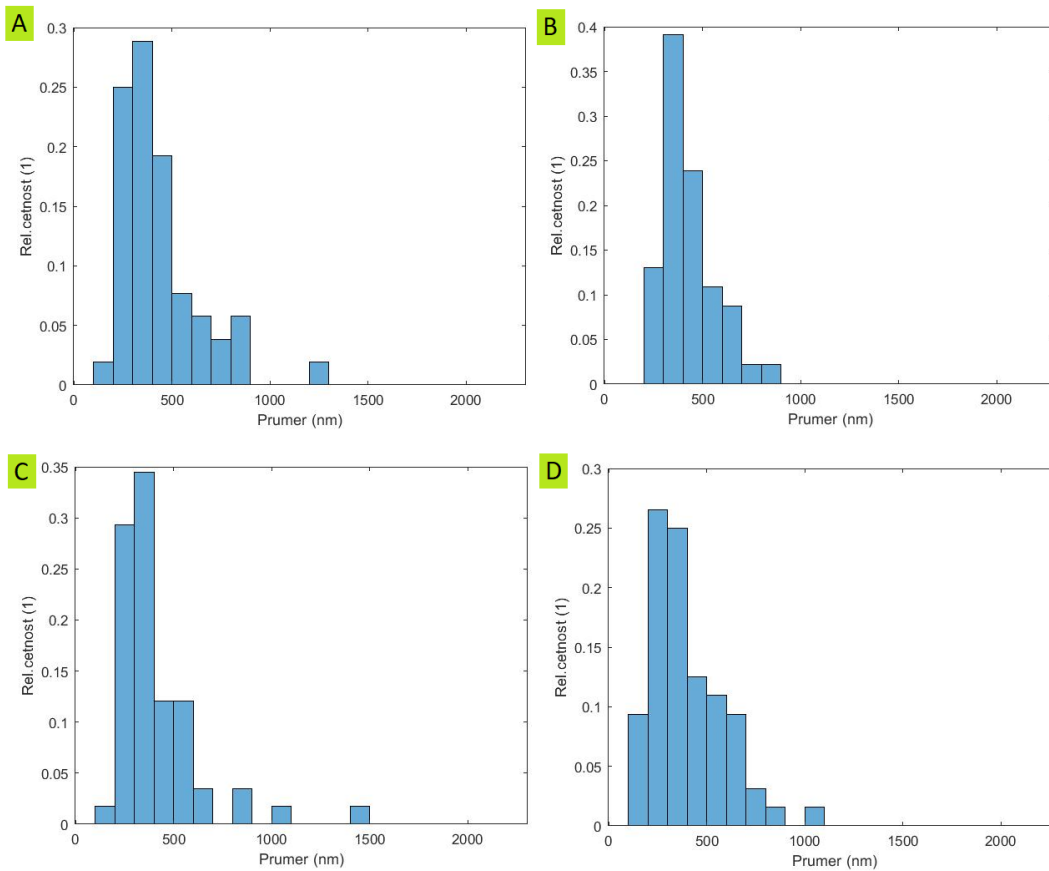
V této příloze jsou dány všechny histogramy relativních četností průměrů vláken ke všem vzorkům a vrstvám.



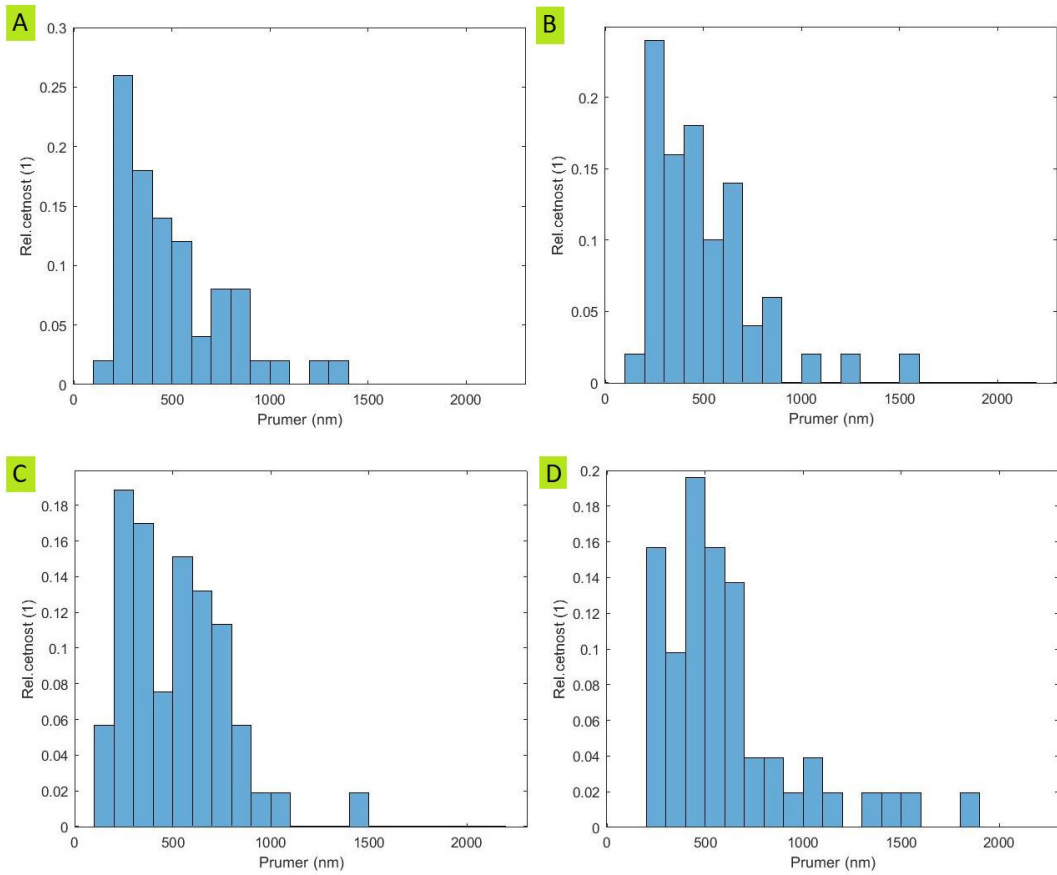
Obrázek B 1 Histogramy četnosti průměrů vláken pro čisté PCL, A vrstva S1; B vrstva S2; C vrstva S3; D vrstva S4



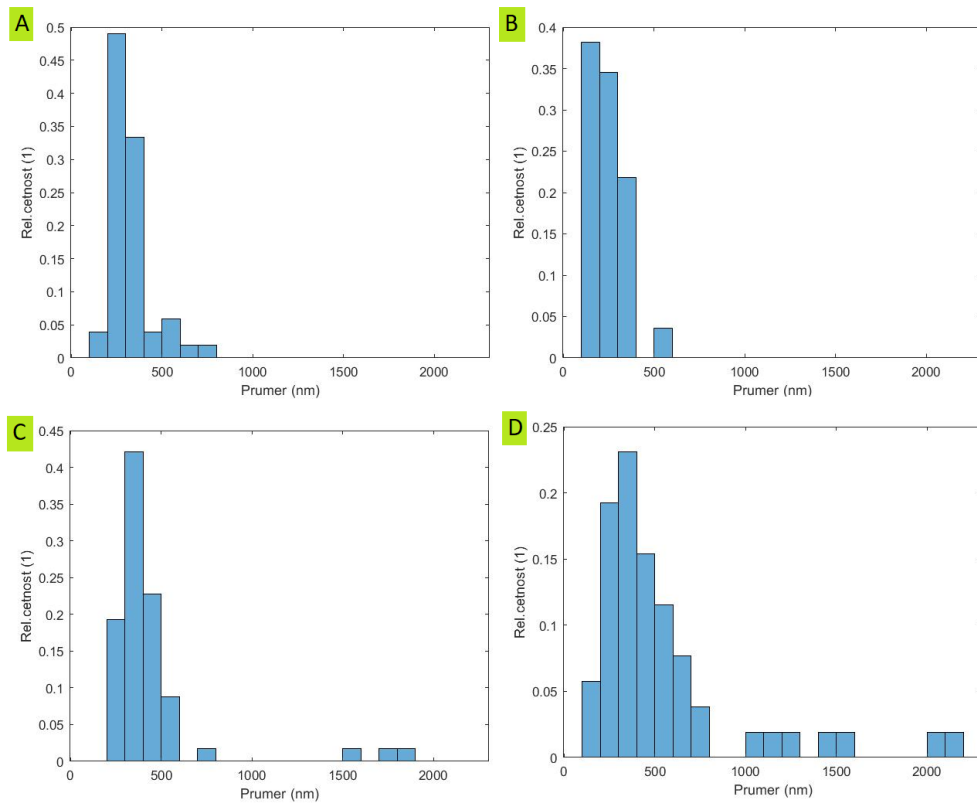
Obrázek B 2 Histogramy četnosti průměrů vláken obsahující 5 % SF, A vrstva S1; B vrstva S2; C vrstva S3; D vrstva S4



Obrázek B 3 Histogramy četnosti průměrů vláken obsahující 10 % SF, A vrstva S1; B vrstva S2; C vrstva S3; D vrstva S4



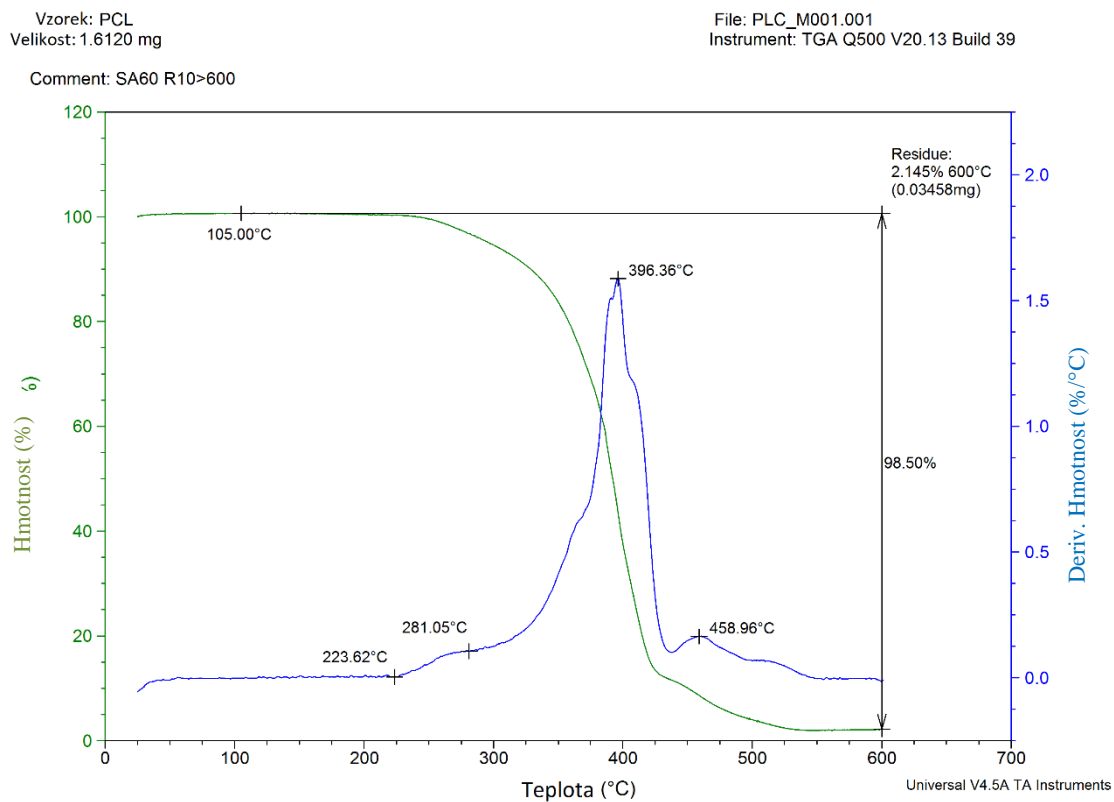
Obrázek B 4 Histogramy četnosti průměrů vláken obsahující 25 % SF, A vrstva S1; B vrstva S2; C vrstva S3; D vrstva S4



Obrázek B 5 Histogramy četnosti průměrů vláken obsahující 50 % SF, A vrstva S1; B vrstva S2; C vrstva S3; D vrstva S4

Příloha C: Výsledky z TGA pro jednotlivé materiály

Na následujících obrázcích je zachycený procentuální úbytek hmotnosti v závislosti na čase pro vzorky s různým poměrem PCL a SF.

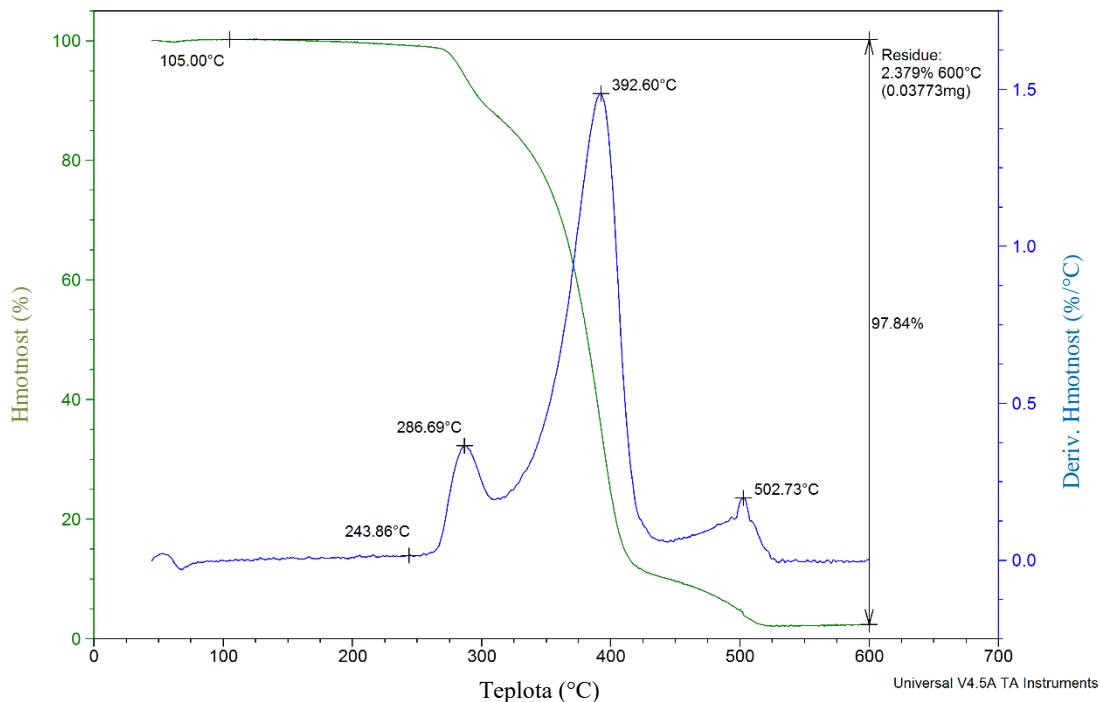


Obrázek C 1 TGA vzorek čisté PCL

Vzorek: PCL 5%SF
Velikost: 1,5860 mg

File: PCL 5%SF_M001.001
Instrument: TGA Q500 V20.13 Build 39

Comment: SA60 R10>600

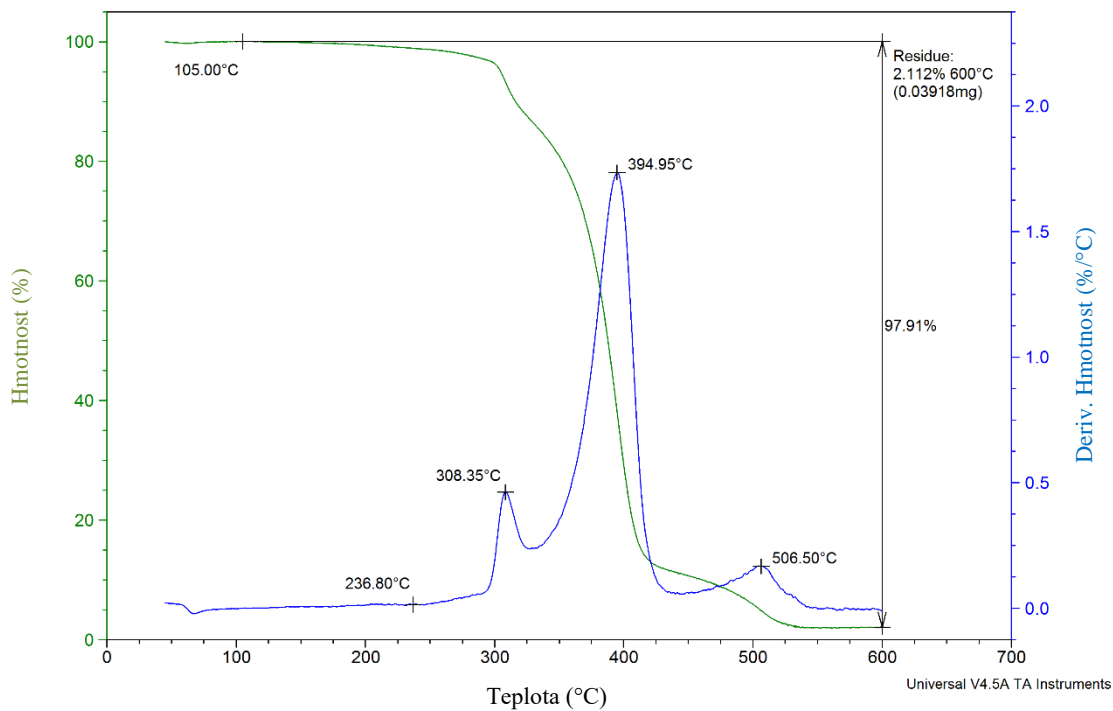


Obrázek C 2 TGA vzorek s 5 % SF

Vzorek: PCL 10%SF :
Velikost: 1,8550 mg

File: PCL 10%SF_M001.001
Instrument: TGA Q500 V20.13 Build 39

Comment: SA60 R10>600

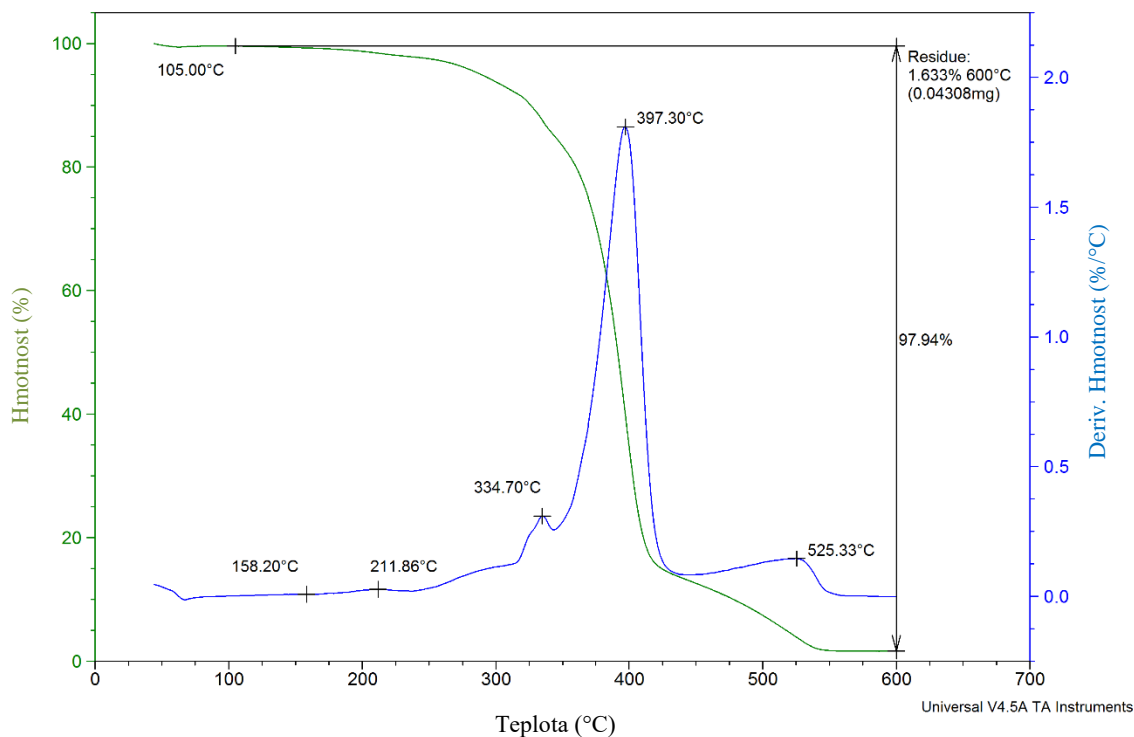


Obrázek C 3 TGA vzorek s 10 % SF

Vzorek: PCL 25%SF
Velikost: 2,6380 mg

File: PCL 25%SF_M001.001
Instrument: TGA Q500 V20.13 Build 39

Comment: SA60 R10>600

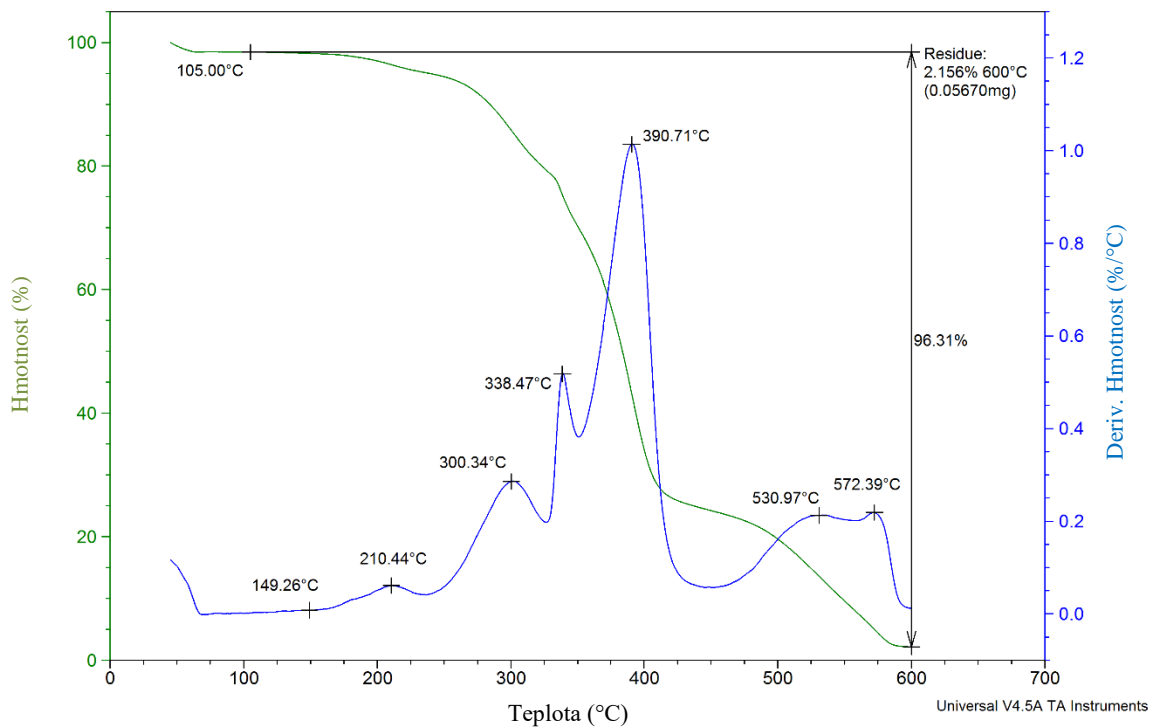


Obrázek C 4 TGA vzorek s 25 % SF

Vzorek: PCL 50%SF
Velikost: 2,6300 mg

File: PCL 50%SF_M001.001
Instrument: TGA Q500 V20.13 Build 39

Comment: SA60 R10>600



Obrázek C 5 TGA vzorek s 50 % SF