

Výroba a testování vláknenných vrstev ze směsí elektricky zvlákněných materiálů

Diplomová práce

Studijní program: N3106 – Textilní inženýrství
Studijní obor: 3106T018 – Netkané a nanovláknenné materiály

Autor práce: **Bc. Jiří Oberreiter**
Vedoucí práce: doc. Ing. Eva Kuželová Košťáková, Ph.D.

Preparation and characterization of electrospun fibrous layers from material mixture

Master thesis

Study programme: N3106 – Textile Engineering
Study branch: 3106T018 – Nonwoven and Nanomaterials

Author: **Bc. Jiří Oberreiter**
Supervisor: doc. Ing. Eva Kuželová Košťáková Ph.D.





Zadání diplomové práce

Výroba a testování vláknenných vrstev ze směsí elektricky zvlákněných materiálů

Jméno a příjmení: **Bc. Jiří Oberreiter**
Osobní číslo: T17000031
Studijní program: N3106 Textilní inženýrství
Studijní obor: Netkané a nanovláknenné materiály
Zadávající katedra: Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů
Akademický rok: **2017/2018**

Zásady pro vypracování:

- 1) Seznamte se s problematikou elektrického zvláknování obecně.
- 2) Vypracujte literární rešerši týkající se studované problematiky smésování dvou druhů vláknenných materiálů přímo při výrobě vláknenné vrstvy.
- 3) Vyberte vhodné polymerní materiály a navrhnete postup jejich zvláknování.
- 4) Zvláknete smés dvou polymerních vláknenných materiálů a pokuste se je alespoň základně charakterizovat.
- 5) Zhodnotte výsledky, diskutujte je a vyvodte závěry.



Rozsah grafických prací:

dle potřeby dokumentace

Rozsah pracovní zprávy:

40-60 dle potřeby

Forma zpracování práce:

tištěná/elektronická



Seznam odborné literatury:

1. Gu, M., Wang, K., Li, W., Qin, Ch., Wang, J. J., Dai, L.: Preparation and Characterization of PVA/PU Blend Nanofiber Mat by Dual-jet Electrospinning, *Fibers and Polymers*, Vol.12, No.1, pg. 65-72, 2011, DOI 10.1007/s12221-011-0065-9

2. Scaffaro, R., Lopresti, F., Botta, L.: Preparation, characterization and hydrolytic degradation of PLA/PCL co-mingled nanofibrous mats prepared via dual-jet electrospinning, *Macromolecular Nanotechnology, European Polymer Journal*, Vol.96, pg.266-277, 2017, <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.09.016>

Vedoucí práce:

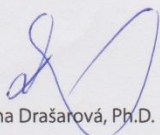
doc. Ing. Eva Kuželová Košťáková, Ph.D.
Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

Datum zadání práce:

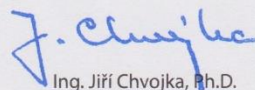
20. února 2018

Předpokládaný termín odevzdání:

18. dubna 2019


Ing. Jana Drašarová, Ph.D.
děkanka




Ing. Jiří Chvojka, Ph.D.
vedoucí katedry

V Liberci 20. února 2018

Prohlášení

Byl jsem seznámen s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

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

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

Diplomovou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé diplomové práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum: 18. 3. 2019

Podpis: Bc. Jiří Oberreiter

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucímu práce paní doc. Ing. Evě Kuželové Košťákové Ph.D. za její cenné rady a odborné vedení při vypracování této diplomové práce. Velké poděkování patří také Ing. Věře Jenčové Ph.D. a Ing. Šárce Hauzerové za vynaložený čas, rady a pomoc při laboratorním testování. Děkuji také panu Bc. Filipu Sanetníkovi za jeho pomoc při modifikaci zvláknovacího zařízení.

Dále bych rád poděkoval celé katedře netkaných textilií a nanovláknenných materiálů na Technické univerzitě v Liberci za poskytnutí laboratorních zařízení a materiálů pro vypracování experimentální části této práce.

Nakonec bych rád poděkoval své rodině a blízkým přátelům za projevenou podporu a trpělivost po dobu mého studia.

ABSTRAKT

Směšované vlákenné vrstvy nabízejí díky kombinaci různých materiálů, ze kterých jsou tyto vrstvy vyráběny, širokou možnost využití v různých oblastech. Jedna z oblastí, ve kterých mohou být tyto směšované vlákenné vrstvy nejvíce uplatňovány je zdravotnictví. Cílem této diplomové práce bylo vyrobit směšovou vlákennou vrstvu tvořenou vlákny hydrofobního polykaprolaktonu (PCL) a hydrofilního polyvinylalkoholu (PVA). K výrobě byly použity technologie jehlového elektrického zvlákňování a strunového elektrického zvlákňování. S pomocí těchto technologií byly vyrobeny směšové vlákenné vrstvy kombinující PCL a PVA. Zároveň byly také vyrobeny vrstvy, jen z polymerního roztoku PCL anebo jen z polymerního roztoku PVA. Pro porovnání byla za pomoci laboratorních zařízení (SEM) analyzována morfologie vyrobených vrstev a výsledky byly statisticky zpracovány. Vzhledem k možnému budoucímu využití směšové vlákenné vrstvy ve zdravotnictví, byl proveden i *in-vitro* MTT test.

Klíčová slova

electrospinning, jehlové zvlákňování, bezjehlové strunové zvlákňování, polyvinylalkohol, polykaprolakton, směšová vlákenná vrstva.

ABSTRACT

The mixed fiber layers offer a wide variety of applications due to the combination of different materials from which these layers are made. One of the areas where these mixed fiber layers can be most widely used, is medicine. The aim of this thesis was to produce a mixed fiber layer consisting of fibers of hydrophobic polycaprolactone (PCL) and hydrophilic polyvinylalcohol (PVA). Electrospinning and string spinning technology were used for the production. Mixed fiber samples combining PCL and PVA were produced using these technologies. At the same time, samples were also made from PCL polymer solution or from PVA polymer solution only. For comparison, the morphology of the produced layers was analyzed using laboratory equipment (SEM) and the results were statistically processed. In view of the possible future use of the mixed fiber layer in medicine, an *in-vitro* MTT test was performed.

Key words

electrospinning, needle electrospinning, needleless string electrospinning, polyvinylalcohol, polycaprolactone, mixed fiber layer.

Obsah

Seznam zkratk a symbolů.....	9
1. Úvod.....	11
2. Teoretická část	13
2.1 Elektrické zvlákňování (electrospinning)	13
2.2 Elektrické zvlákňování z jehly	14
2.2.1 Nanospider™.....	16
2.3 Parametry ovlivňující elektrické zvlákňování.....	17
2.4 Materiálové parametry	18
2.5 Procesní parametry.....	20
2.5.1 Modifikace vláken.....	23
2.5.2 Orientace vláken.....	23
2.5.3 Elektrické zvlákňování s pomocí střídavého proudu	29
2.6 Směsování vláknotvorných materiálů s pomocí elektrického zvlákňování	
31	
2.6.1 Uspořádání zvlákňovacích elektrod při výrobě směsovaných	
vlákenných vrstev	32
2.6.2 Metody hodnocení směsových vláknenných vrstev	36
2.7 Popis vybraných polymerních materiálů pro elektrické zvlákňování ...	42
2.7.1 Polyvinylbutyral (PVB).....	42
3. Experimentální část.....	46
3.1 Materiály	46
3.2 Metody výroby nanovláknenných směsových vrstev	47
3.2.1 Elektrické zvlákňování z jehel	47
3.2.2 Elektrické zvlákňování ze strun	54
3.3 Metody charakterizace vyrobených vláknenných vrstev	56
3.3.1 Základní <i>In-vitro</i> testování	56
3.3.2 Dynamika průniku kapaliny do vzorků	61

3.3.3	Obrazová analýza	61
4.	Výsledky	62
4.1	Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM).....	62
4.2	Fluorescenční mikroskopie	70
4.3	<i>In-vitro</i> testování	71
4.4	Měření kontaktního úhlu a porovnání pronikání kapek	75
5.	Diskuze	80
6.	Závěr	82
7.	Použitá literatura	83
8.	Přílohy.....	90

Seznam zkratek a symbolů

nm	Nanometr
μm	Mikrometr
mm	Milimetr
cm	Centimetr
m	Metr
g	Gram
ml	Mililitr
μl	Mikrolitr
s	Sekunda
DC	Stejnoseměrný proud
AC	Střídavý proud
PVA	Polyvinylalkohol
PCL	Polykaprolakton
PVB	Polyvinylbutyral
PS	Polystyren
PA6	Polyamid 6
PLA	Kyselina polymléčná
PLGA	Kopolymer kyseliny polymléčné a kyseliny polyglykolové
PEO	Polyetylen oxid
PVAc	Polyvinylacetát
CO ₂	Oxid uhličitý
SEM	Rastrovací elektronová mikroskopie
FM	Fluorescenční mikroskopie
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
FTIR	Infračervená spektroskopie
DSC	Diferenciální skenovací kalorimetrie
M _n	Číselná molekulová hmotnost
M _w	Hmotnostní molekulová hmotnost

kV	Kilovolt
g/mol	Gram na mol
ml/hod.	Mililitr za hodinu
ot./min.	Otáčky za minutu
Hz	Hertz
kHz	Kilohertz
m/min.	Metr za minutu
mN/m	MiliNewton na metr
°	Stupeň
°C	Stupeň celsia
kPa	KiloPascal
Tg	Teplota skelného přechodu
Tm	Teplota tání
OH	Hydroxylová skupina
hm. %	Hmotnostní koncentrace v procentech
UV	Ultrafialový
BSA	Bovine serum albumine
PI	Propidium jodid
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
KNT	Katedra netkaných textilií
FT	Fakulta textilní
TUL	Technická univerzita v Liberci
3T3	Myší fibroblasty
PBS	Phosphate buffered saline
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
IPA	Izopropylalkohol

1. Úvod

Směšové vlákenné vrstvy mají v dnešní době díky své široké variabilitě používaných materiálů stále širší škálu možných aplikací. Variabilita vlastností, které směšování materiálů nabízí, přináší výhody například ve zdravotnictví při řízeném dodávání léčiv, ale také například v tkáňovém inženýrství při výrobě scaffoldů. Jelikož se možnosti využití směšových vlákenných vrstev neustále rozšiřují, je potřeba zdokonalovat i způsob jejich výroby a zlepšovat jejich vlastnosti. Jednou z nejrychleji se rozvíjejících technologií, umožňující výrobu směšových vlákenných vrstev, je elektrické zvlákňování. Elektrické zvlákňování umožňuje tvorbu např.: bikomponentních vláken, hybridních nití, porézních vláken, ale také tvorbu směšových vlákenných vrstev, které jsou složeny ze směsi vláken tvořených ze dvou a více druhů polymerních roztoků nebo tavenin. Právě na výrobu směšových vlákenných vrstev tvořených směsí vláken ze dvou různých polymerních roztoků, bude zaměřena tato diplomová práce.

Směšové vlákenné vrstvy byly doposud tvořeny vždy skládáním jednotlivých vlákenných vrstev na sebe. Cílem této diplomové práce je vytvořit s pomocí elektrického zvlákňování jednotnou směšovou vlákennou vrstvu, která bude tvořena směsí vláken, vyrobených z polymerního roztoku PCL a PVA. K výrobě směšové vlákenné vrstvy bude použita technologie elektrického zvlákňování ze dvou jehel a dále také technologie strunového elektrického zvlákňování, která bude pro potřeby této diplomové práce modifikována. Vyrobené směšové vlákenné vrstvy budou podrobeny analýze struktury a také *in-vitro* testování. Volba právě kombinace PCL a PVA je založena na jejich rozdílných povrchových charakteristikách a tím ochotě být smáčený vodou. PVA je silně hydrofilní materiál a oproti tomu je PCL poměrně hydrofobní materiál. Jejich kombinace po výrobě, například skládáním nanovlákenných vrstev na sebe není vhodná, protože jejich soudržnost je velmi nízká. Kombinace PCL a PVA směšováním vláken přímo při výrobě může nabídnout optimální chování při kontaktu s vodou pro další *in-vitro* a *in-vivo* testování, ale samozřejmě i pro finální potenciální aplikaci, jakou je například kryt rány. Kombinace PCL a PVA pak také umožňuje další významné možnosti funkcionalizace (vkládání např. látek pro antibakteriální úpravy, růstových faktorů, léčiv pro jejich řízené dodávání atd.), díky přítomnosti PVA, jehož podstata a zvlákňování z vody toto umožňuje.

Teoretická část této diplomové práce je zaměřena na seznámení čtenáře s technologiemi elektrického zvlákňování a s možnostmi tvorby směsových vlákných struktur, které nabízejí. Dále v této části jsou popsány i některé metody, které se používají k hodnocení směsových vlákných vrstev.

Experimentální část této diplomové práce obsahuje popis výroby směsových vlákných vrstev s pomocí elektrického zvlákňování ze dvou jehel a také s pomocí modifikovaného strunového elektrického zvlákňování. Součástí této pasáže je i základní analýza, testování a porovnání vyrobených směsových vlákných vrstev.

2. Teoretická část

První část této diplomové práce je zaměřena na seznámení čtenáře s technologiemi a materiály, které budou dále použity při zpracování experimentální části této diplomové práce.

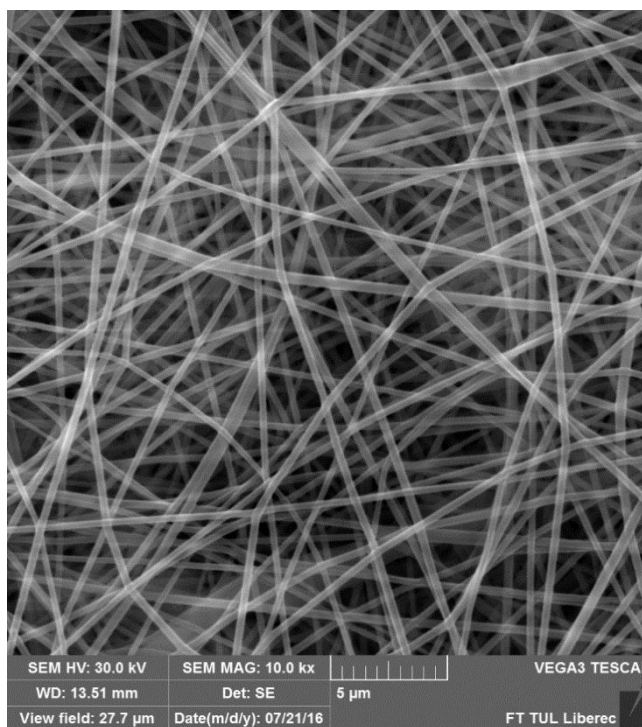
2.1 Elektrické zvlákňování (electrospinning)

Technologie elektrického zvlákňování využívá elektrické vodivosti polymerních roztoků a tavenin k formování vláken pomocí elektrických sil. Elektrické zvlákňování je možné použít pro zvlákňování přírodních i syntetických polymerů, přičemž průměry vláken se pohybují typicky v rozmezí desítek nanometrů ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$), až po několik mikrometrů ($1 \text{ }\mu\text{m} = 10^{-6} \text{ m}$). [1]

Princip výroby vláken pomocí elektrických sil je v běžnějším uspořádání založen na použití dvou elektrod. První elektroda bývá připojena na zdroj vysokého stejnosměrného elektrického napětí a zároveň je spojena s polymerní kapalinou (polymerní roztok nebo tavenina). Druhá elektroda je uzemněná nebo opačně nabíjená, je určena k záchytu vznikajících vláken a nazývá se kolektor. Kolektor může být v jednoduchém uspořádání tvořený kovovou deskou. Mezi elektrodami vzniká elektrické pole, které formuje polymerní kapalinu do kónického tvaru. Následným zvyšováním elektrického napětí dochází ke snižování odporových sil povrchového napětí polymerní kapaliny. Překonáním sil od povrchového napětí, dojde k vytvoření polymerního proudu. Polymerní kapalina pohybující se od zvlákňovací elektrody ke druhé záchytné elektrodě tedy kolektoru vytváří v tomto zvlákňovacím prostoru nejprve stabilní a dále pak nestabilní kapalinovou trysku. Nestabilní část této trysky je označována jako bičující pohyb a dochází při něm k dalšímu tuhnutí kapalinové trysky (odpařování rozpouštědla z polymerního roztoku či tuhnutí taveniny) a k dloužení až do podoby submikronových vláken. [1] Příklad polymerních vláken vyrobených pomocí elektrického zvlákňování je uveden na *Obrázku 1*.

Elektrické zvlákňování pomocí stejnosměrného proudu a napětí, které je někdy také označováno jako DC (direct current = stejnosměrný proud) elektrické zvlákňování, DC electrospinning, nebo také hojně využívané označení elektrostatické zvlákňování. Elektrické zvlákňování, které používá střídavý elektrický proud je označováno jako AC

(alternating current = střídavý proud) electrospinning. DC electrospinning může být dále dělen například podle druhu zvlákňovací elektrody na zvlákňování z jehly a na bezjehlové zvlákňování. Do skupiny bezjehlového elektrického zvlákňování můžeme zařadit například technologii využívanou v zařízení Nanospider™, které je dále popsáno v kapitole 2.1.2. [2]



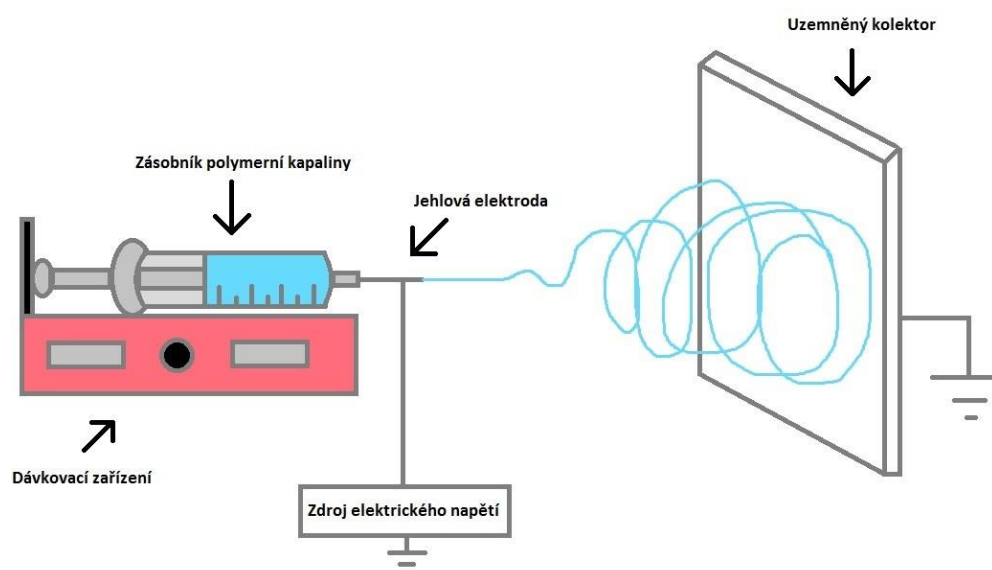
Obrázek 1 SEM snímek nanovláknenné vrstvy vyrobené z 14% PVA, metodou jehlového elektrického zvlákňování. Měřítko 5μm.

2.2 Elektrické zvlákňování z jehly

Strojní zařízení znázorněné na *Obrázku 2*, se skládá z injekční stříkačky naplněné polymerní kapalinou, která je zakončena kovovou jehlou (elektrodou). Kovová jehla je spojena s elektrickým zdrojem vysokého stejnosměrného napětí, které může dosahovat hodnot až několik desítek kilovoltů (kV). Injekční stříkačka je spojena s dávkovací pumpou, která vytlačuje polymerní kapalinu skrz elektricky nabitou kovovou jehlu. V určité vzdálenosti od jehly je umístěn uzemněný nebo opačně nabíjený kolektor, kterým může být například kovová deska. Pro lepší zachycení vzniklých vláken a následnou manipulaci může být pod kolektor umístěn nosný materiál například ve formě netkané textilie typu spunbond s antistatickou úpravou. [1]

Polymerní kapalina je vytlačována skrz nabitou zvlákňovací elektrodu, čímž vznikne na špičce jehly kapka, která se formuje do konického tvaru tzv. Taylorova kužele. Vlivem elektrických sil se kapka na špičce jehly mění v proud kapaliny, který se pohybuje směrem ke kolektoru. Proud kapaliny je nejdříve stabilní, poté začne vykonávat tzv. bičující pohyb. Bičující pohyb má za následek odstranění rozpouštědla z polymerního roztoku, nebo tuhnutí polymerní taveniny a vznik submikronových vláken, která se zachytávají na kolektoru. [3]

Hodnota elektrického napětí, při které se začnou tvořit kapalinové trysky, je nazývána jako kritické napětí. Překročením této hodnoty napětí započne proces zvlákňování. Pro dosažení jemnějších a kvalitnějších vláken je potřeba, aby hodnoty elektrického napětí byly vyšší, než je hodnota kritického napětí. Průměr vznikajících vláken je ovlivňován mnoha faktory, např. druhem polymeru, koncentrací polymeru, viskozitou a povrchovým napětím zvlákňovaného materiálu, vzdáleností elektrod, elektrickou vodivostí, průměrem zvlákňovací trysky, teplotou vzduchu, relativní vzdušnou vlhkostí atd. [1]



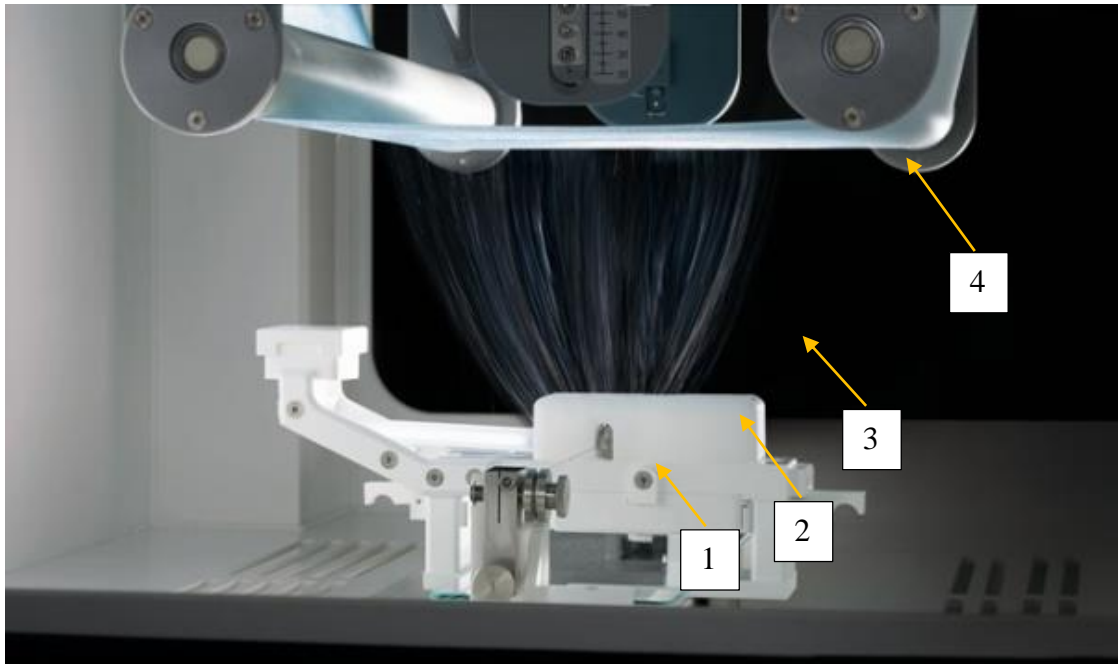
Obrázek 2 Schéma jednoduchého strojního zařízení pro elektrostatické zvlákňování z jehly

2.2.1 Nanospider™

Jednou z mnoha možností uspořádání bezjehlového elektrostatického zvlákňování je technologie využívána v laboratorních, poloprovozních i průmyslových zařízeních na trhu vystupujících pod obchodním označením Nanospider™. Strojní zařízení Nanospider™ bylo vyvinuto v roce 2003 výzkumným týmem profesora Oldřicha Jirsáka na Katedře netkaných textilií Technické univerzity v Liberci. Dnešní vývoj a výzkum tohoto strojního zařízení obstarává firma ELMARCO s.r.o., která byla dříve pouze vlastníkem licence na výrobu průmyslových zařízení Nanospider™.

Nanospider™ je zařízení pro elektrostatické zvlákňování z volné hladiny tekutiny polymeru bez použití jehel. Toto zařízení umožňuje výrobu nanovláken z roztoků nebo tavenin polymeru. Technologie používaná v zařízení Nanospider™ je velmi všestranná technologie, která splňuje náročné požadavky. Těmi jsou zejména snadná úprava výrobních parametrů a flexibilita nastavení dle individuálních představ výroby nanovláken, dobrá homogenita průměru jednotlivých vláken, rovnoměrnost vlákenné vrstvy, hospodárny provoz a snadná údržba.

Původní strojní zařízení používalo jako zvlákňovací elektrodu rotující kovový váleček. Dnešní modifikované strojní zařízení používá jako zvlákňovací elektrodu kovovou strunu. Modifikované strojní zařízení (*Obrázek 3*) může dle typu stroje obsahovat až osm zvlákňovacích strun o délce až 1,6 m. Strunové elektrody jsou pokrývány kapalinou polymeru z posuvného pojezdu. Výhodou těchto elektrod je mechanická jednoduchost, která umožňuje kontinuální výrobu bez výrazného zanášení elektrod. [4]



Obrázek 3 Fotografie zobrazující zvlákňovací elektrodu v zařízení Nanospider™ pro výrobu nanovláken pomocí strunové elektrody. Zvlákňovací elektroda – struna (1), na kterou je nanášen polymerní roztok z posuvného pojezdu (2) a následné formování polymerních nanovláken (3) směřujících ke kolektoru (4), pod kterým je vedena podkladová textilie.

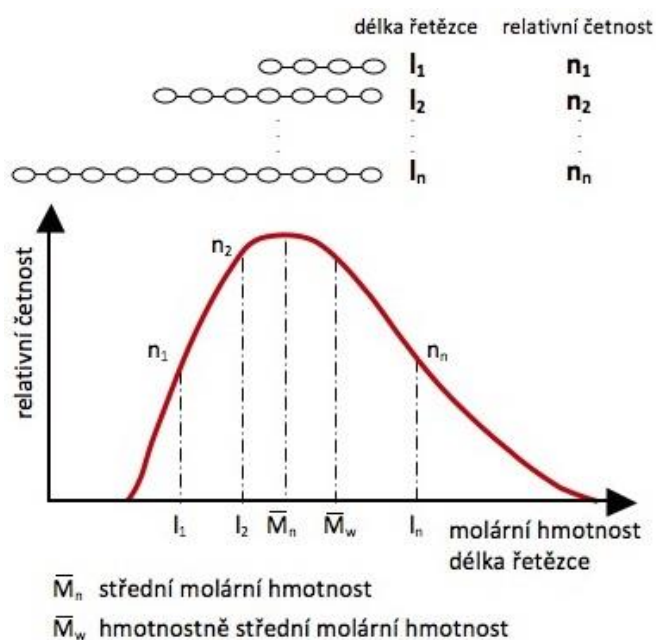
Zdroj: http://www.elmarco.com/upload/obrazky/galerie_obrazku/ns-lab-process-62.jpg

2.3 Parametry ovlivňující elektrické zvlákňování

Parametry zvlákňování se dělí na materiálové a procesní. Materiálové parametry zahrnují zejména vlastnosti zvlákňované polymerní kapaliny. Mezi tyto vlastnosti je možné zařadit molekulovou hmotnost vybraného typu polymeru, viskozitu polymerní kapaliny řízenou například koncentrací polymeru, povrchové napětí, elektrickou vodivost atd. Procesní parametry zahrnují typ zvlákňovací elektrody a kolektoru, intenzitu elektrického pole danou hodnotou elektrického napětí, vzdálenost zvlákňovací elektrody od kolektoru, odváděcí rychlost podkladového materiálu, okolní parametry (teplota vzduchu, relativní vlhkost vzduchu) a tak dále. Tyto parametry mají vliv na průměr a tvar vláken, ale také například na strukturu a plošnou hmotnost vlákenné vrstvy.[5]

2.4 Materiálové parametry

Materiálové parametry mají zásadní vliv na fyzikální a chemické vlastnosti vláken, ale také na jejich zpracovatelské vlastnosti při výrobě. Jedna z důležitých materiálových vlastností zvlákněvaného polymeru je molekulová hmotnost. Polymer je tvořen z opakujících se jednotek (monomerů), které jsou navzájem spojeny pomocí chemických vazeb a společně utváří polymerní řetězec. Struktura polymeru je tvořena několika polymerními řetězci, jejichž délka není vždy stejná. Z tohoto důvodu jsou proto polymery označovány jako polydisperzní systémy. Distribuci molekulové hmotnosti lze získat statistickým výpočtem střední molekulové hmotnosti. Distribuci molekulové hmotnosti lze následně vyjádřit distribuční křivkou. Distribuční křivka (Obrázek 4) vyjadřuje závislost hmotnostního zlomku polymeru o dané velikosti makromolekuly na jeho molekulové hmotnosti.[6]



Obrázek 4 Schéma příkladu molekulové hmotnosti polymerů znázorněné distribuční křivkou; M_n – číselný střed molekulové hmotnosti polymeru, M_w – hmotnostní střed molekulové hmotnosti polymeru

Zdroj: <https://publi.cz/books/180/images/pics/17.jpg>

Molekulová hmotnost zvlákněvaného polymeru je důležitým parametrem, který ovlivňuje morfologii vláken. Má zásadní vliv na reologické a elektrické parametry roztoku, jako jsou elektrická vodivost, viskozita a povrchové napětí. Čím vyšší je

molekulová hmotnost, tím vyšší je i viskozita polymerního roztoku při zachování koncentrace. Pro elektrostatické zvlákňování se používají roztoky s vyšší molekulovou hmotností (přibližně 35 000 g/mol a více). U polymerů s nižší molekulovou hmotností (přibližně 15 000 g/mol a méně) dochází k tzv. elektrospayingu (elektrostatickému rozprašování), kdy se na kolektoru neusazují vlákna, nýbrž kapičky polymeru. Příliš vysoká molekulová hmotnost s sebou přináší vysokou viskozitu a tím i větší průměr vyrobených vláken. Volba polymeru se správnou molekulovou hmotností je tedy nezbytnou součástí procesu elektrostatického zvlákňování. [7]

Koncentrace a viskozita mají také svůj podíl na velikosti průměru vyrobených vláken. Tyto dva parametry jsou na sobě závislé, zvýšením koncentrace rozpouštědla dojde ke zvýšení viskozity polymeru. Výzkumy v předešlých letech prokázaly, že příliš nízká viskozita polymerního roztoku nevede k výrobě kontinuálních vláken, ale k tzv. elektrospayingu. Nízká viskozita polymerního roztoku, může také zapříčinit tvorbu defektů na vláknech. [8]

Přidáním menšího množství rozpouštědla (vytvoření roztoku o nižší koncentraci) při výrobě roztoku polymeru, docílíme zvýšení viskozity roztoku polymeru. Tímto způsobem lze po překročení určité hodnoty koncentrace roztoku polymeru předejít tvorbě kapiček polymeru na kolektoru. Příliš vysoká hodnota koncentrace a viskozity polymerního roztoku neumožňuje elektrickému poli vytvořit proud, ze kterého vznikají vlákna. Vysoká hodnota viskozity může také zapříčinit neprůchodnost zvlákňovací jehly, u bezjehlového zvlákňování může dojít k částečnému zesíťování polymerního roztoku ještě před zvlákňováním. [6] Při výrobě vláken elektrostatickým zvlákňováním je tedy důležité, aby byla vybrána ideální hodnota viskozity. Správná volba molekulové hmotnosti a koncentrace a tím viskozity zvlákňovaného roztoku polymeru umožňuje vyrobit vlákna požadovaných vlastností. [9]

Dalším parametrem ovlivňujícím vlastnosti zvlákňovaného materiálu je elektrická vodivost zvlákňované polymerní kapaliny. Parametr, který je závislý na elektrické vodivosti roztoku, se nazývá objemová hustota náboje. Polymerní roztoky s nízkou elektrickou vodivostí lze zvlákňovat s obtížemi. Nízká elektrická vodivost zapříčiní tvorbu perliček na povrchu vlákna a vlákna mají velké průměry. Elektrickou vodivost lze zvýšit přidáním aditiv. V praxi běžně používaná aditiva jsou například různé přídavky solí (alkylamonné soli, chlorid lithný atd.). Přidáním solí do roztoku může dojít ke

zvýšení koncentrace elektrických nábojů, což zapříčiní menší průměry vláken a potlačí tvorbu perličkových defektů. Tento efekt však neplatí obecně u všech solí a všech roztoků polymerů. [6]

Důležitou roli při výběru vhodných parametrů zvlákňovaných materiálu má také povrchové napětí zvlákňované polymerní kapaliny. Vysoké povrchové napětí polymerní kapaliny může způsobit přerušování polymerního proudu ve zvlákňovacím prostoru díky intenzivnímu hydrodynamickému jevu (tzv. Plateau-Rayleighova nestabilita) a vytvářet tak kapičky, čímž dojde k elektrosprayingu. Povrchové napětí polymerního roztoku lze ovlivnit volbou rozpouštědla a případně také snížit přidáním povrchově aktivní látky jako aditiva. [6]

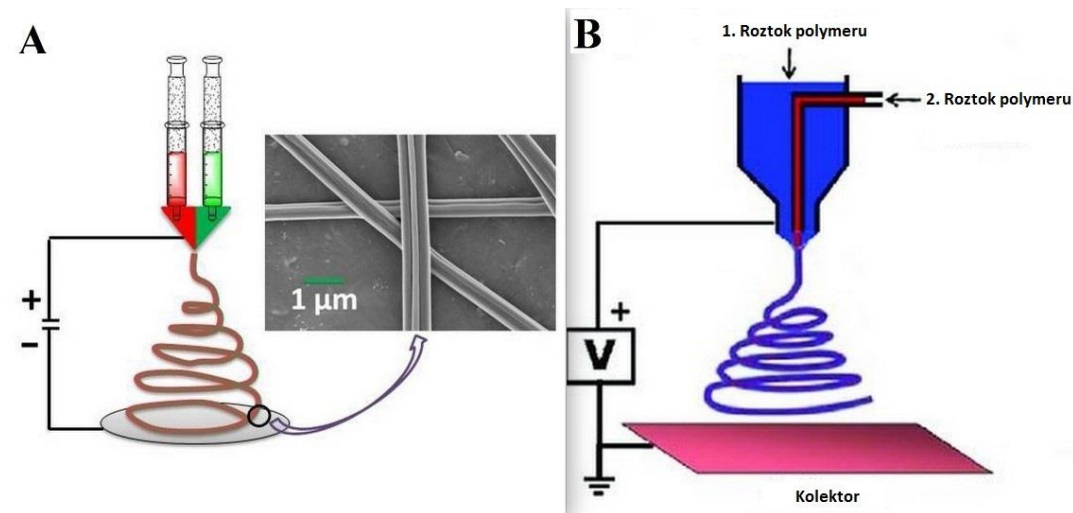
2.5 Procesní parametry

Procesní parametry jsou parametry ovlivňující nejen morfologii vláken. Těmito parametry lze ovlivnit například jemnost vláken, ale také i parametry vlákenné vrstvy (např. tloušťka a plošná hmotnost vlákenné vrstvy). Mezi důležité procesní parametry patří elektrické napětí. Elektrické napětí mezi dvěma body v prostoru je definováno jako rozdíl elektrických potenciálů v těchto bodech. Elektrické napětí dělíme na stejnosměrné (DC) a střídavé (AC). [10]

Elektrické napětí vytváří elektrické pole, které je důležitým parametrem při procesu elektrického zvlákňování. Pro překonání povrchového napětí polymerní kapaliny, vytvoření Taylorova kužele a započítí procesu zvlákňování je nezbytná správná volba hodnoty elektrického napětí. Příliš nízká hodnota elektrického napětí neumožňuje elektrickým silám překonat síly způsobené povrchovým napětím tekutiny polymeru a nedochází tak k vytvoření Taylorova kužele. K vytvoření Taylorova kužele dochází až při dosažení tzv. kritického napětí (napětí, při kterém se začnou vytvářet kapalinové trysky), jehož hodnota se pohybuje řádově v jednotkách až desítkách kV. Zvyšováním hodnoty elektrického napětí dochází ke zvýšení teploty polymerního proudu, což vede k rychlejšímu odpařování rozpouštědla a také dochází k zmenšení průměru vláken. Příliš vysoká hodnota napětí je příčinou pro nestabilitu Taylorova kužele, čímž následně může docházet k elektrosprayingu. Hodnoty elektrického napětí závisí na typu použitého polymeru, na koncentraci a viskozitě zvlákňovaného polymeru, podmínkách okolního prostředí a také záleží na vzdálenosti, typu zapojení a druhu elektrod. [6]

Vzdálenost mezi elektrodami je důležitá při odpařování rozpouštědla během procesu zvlákňování. Při malé vzdálenosti mezi elektrodami, dochází k nedokonalému odstranění rozpouštědla a na kolektoru se vytvářejí polymerní kapičky a vlákenné shluky. Příliš velká vzdálenost mezi elektrodami může být příčinou elektrospayingu. Ideální vzdálenost zvlákňovací elektrody od kolektoru se většinou pohybuje v rozmezí desítek centimetrů. [9]

Dalším důležitým procesním parametrem je druh a uspořádání zvlákňovacího zařízení. Pro získání odlišných vlákenných struktur je možné použít různé druhy kolektorů (plochý kolektor, válcový rotační kolektor, diskový kolektor, plošný kolektor složený z vodivých mřížek a další). Dále je možné použít různé zvlákňovací elektrody, jako je například kovová tyčinka, kovový rotující váleček, napnutá struna a další. Podobnou variabilitu jako uspořádání kolektorů nabízí i zvlákňovací elektroda. (příklady viz *Obrázek 5*). Zvlákňovací elektroda může být v nejjednodušším případě jehla. Ve speciálních případech je využíván tzv. koaxiální electrospinning (*Obrázek 5B*). Jednoduše řečeno jedná se o jehlu uvnitř jehly. Vnitřní jehlu je možné plnit jedním druhem polymerního roztoku a vnější jehlu je možné plnit odlišným druhem polymerního roztoku. Tímto způsobem lze získat vlákna typu jádro-plášť. Další variací je tzv. triaxiální electrospinning, tedy tři jehly v sobě. Méně používaným zařízením, které lze sestavit je tzv. Side-by-side electrospinning. Jedná se o zařízení, které používá jehlu, která je rozdělena přepážkou na dvě části a každá část je plněna jiným druhem polymerního roztoku nebo taveniny. [6]



Obrázek 5 Vybrané druhy zvlákňovacích elektrod používaných při výrobě nanovláken technologií koaxiálního zvlákňování; A – Side-by-side electrospinning, B – výroba vláken jádro-plášť

Zdroj:

https://www.researchgate.net/profile/Yong_Huang30/publication/322178308/figure/fig1/AS:589514053537796@1517562511847/Schematic-illustration-of-the-setup-for-a-uniaxial-electrospinning-b-coaxial.png

Neméně důležitými parametry při procesu výroby nanovláken jsou teplota a vlhkost okolního prostředí. Oba tyto parametry mají zásadní vliv na odpařování rozpouštědla a tím i na celý zvlákňovací proces. Bylo prokázáno, že vysoká vlhkost okolního prostředí má za následek tvorbu pórů na povrchu vlákna. Vlivem rychlého ochlazení vlákna dojde na jeho povrchu ke kondenzaci vody, která vytváří pórovitou strukturu. [6] Bližší informace jsou uvedeny v kapitole 2.1.4.2.

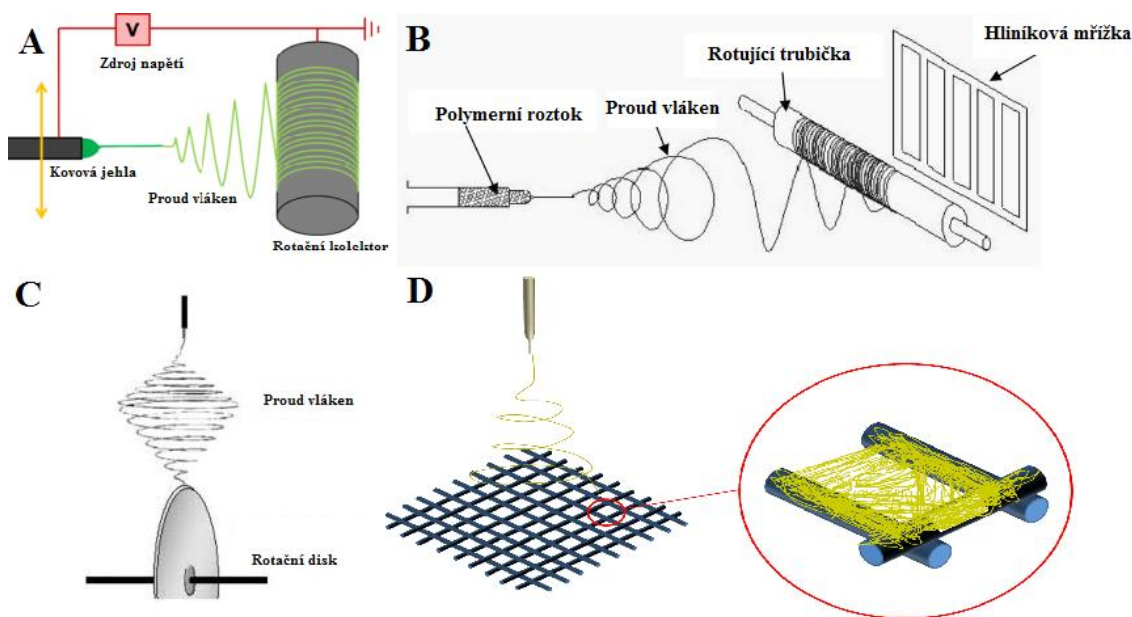
Teplota okolního prostředí také ovlivňuje výslednou morfologii vlákna. Vyšší teplota okolního prostředí má za následek vyšší průměry vláken. Teplota ovlivňuje odpařování zvlákňovaného polymerního roztoku (taveniny). Vysoká teplota umožní rychlé vypaření rozpouštědla, čímž nedochází k dostatečnému dloužení vláken a dosažení větších průměrů. [6]

2.5.1 Modifikace vláken

Proces elektrického zvlákňování prochází neustálým vývojem. Různé modifikace výrobního procesu umožňují získat nanovlákná s odlišnými vlastnostmi. Modifikace procesu umožňuje, jak už bylo zmíněno, vyrobit například vlákna orientovaná jedním směrem, bikomponentní vlákna složená ze dvou druhů polymerů, porézní vlákna, nitě nebo hybridní nitě.

2.5.2 Orientace vláken

Nanovláknenné vrstvy vyrobené pomocí elektrického zvlákňování s použitím rovinného kolektoru bez usměrnění, se vyznačují náhodnou orientací vláken. Pro další rozvoj nanovláken například pro medicínu, není tato náhodná orientace vždy prospěšná. Bylo proto vyvinuto několik technologických úprav kolektorů, které umožňují dosáhnout alespoň částečné orientace vláken v jednom směru. Kolektory můžeme rozdělit na rotační a stacionární. [11] Některé příklady těchto kolektorů jsou uvedeny na *Obrázku 6*.



Obrázek 6 Vybrané druhy kolektorů pro elektrostatické zvlákňování; A – Rotační válcový kolektor, B – Kolektor s pomocným elektrickým polem, C – Rotační disk se zúženým okrajem, D – Statická kovová mřížka

Zdroj: <http://electrospintech.com/images/txt-spin-on-grid1.png>

Obrázek 6A znázorňuje vybraný druh rotačního válcového kolektoru. Tato modifikace spočívá v rotujícím válcovém kolektoru, který napíná vlákna na svém povrchu. Důležitým parametrem je obvodová rychlost válce. Pokud je rychlost shodná s rychlostí proudu vláken, dochází k nejlepšímu jednosměrnému ukládání vláken. Pokud je obvodová rychlost příliš malá, dochází k náhodné orientaci vláken. Příliš vysoká obvodová rychlost vede k přetržení vláken.

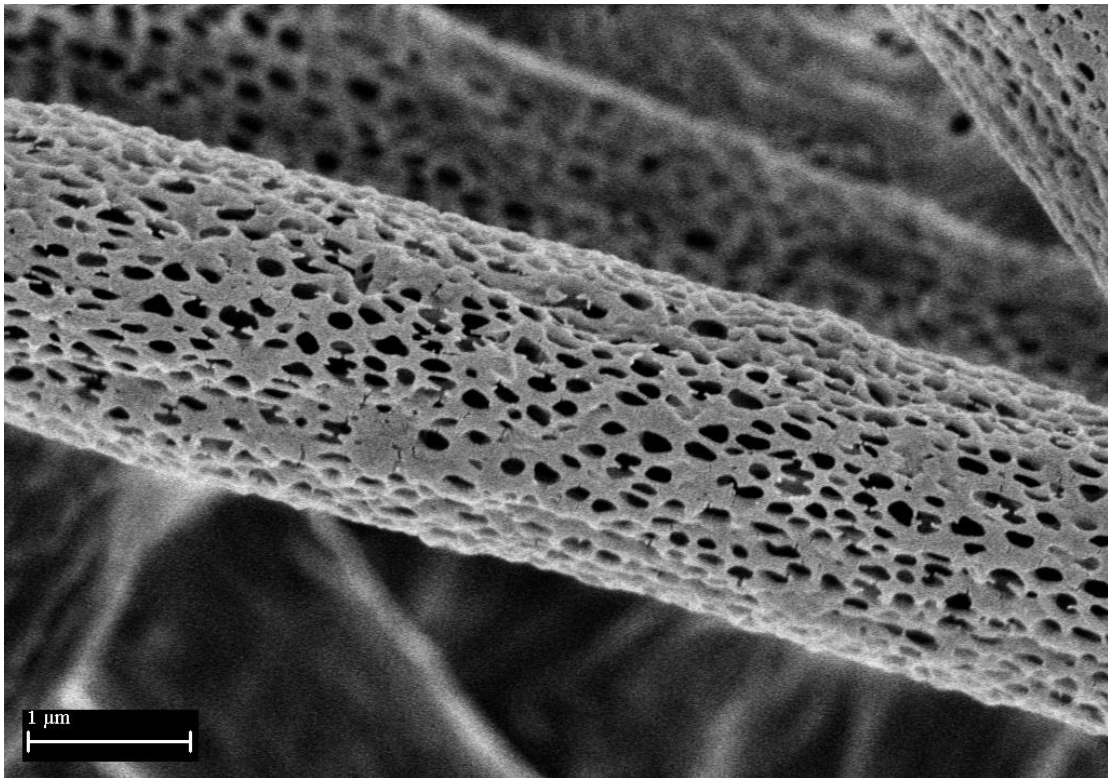
Zařízení na obrázku 6B se skládá z rotující teflonové trubičky o průměru 4 mm. Teflonová trubička rotuje nad nabitou mřížkou (pomocná elektroda), která je tvořena ze spojených hliníkových pásků. Tato modifikace pomáhá k lepšímu vlákennému zarovnání.

Modifikace kolektoru na obrázku 6C využívá k zachycení vláken uzemněný rotující disk. Disk má zúžený okraj, který soustředí elektrické pole tak, že jsou všechna vlákna přitahována a navíjena. Důsledkem zbytkového náboje ve vláknech dojde k vzájemnému odpuzování vláken a lze tak získat osamocená vlákna či svazek vláken. [11]

Obrázek 6D zobrazuje statický kolektor složený z drátěné mřížky. Průměr jednotlivých drátků se může pochybovat v jednotkách milimetrů. Rozteč mezi jednotlivými drátky může být v rozmezí jednotek až desítek milimetrů. Vlákna jsou zachycována a orientována ve směru drátků. Při větší rozteči mezi drátky může docházet k vytváření neorientované struktury v mezerách mezi drátky. [12]

2.5.2.1 Porézní vlákna

Jedna z nejvýznamnějších vlastností nanovláken je veliký měrný povrch. Vysoké hodnoty měrného povrchu jsou důležité pro použití v různých oborech, např.: filtrace, tkáňové inženýrství atd. Za účelem dosažení ještě většího měrného povrchu vznikla vlákna s porézní strukturou. Porézní vlákno (*Obrázek 7*) je vlákno, které má na povrchu různé póry nebo jamky. [13]



Obrázek 7 Elektrostaticky zvlákněné vlákno s porézní strukturou. Měřítko 1 μm .

Zdroj:

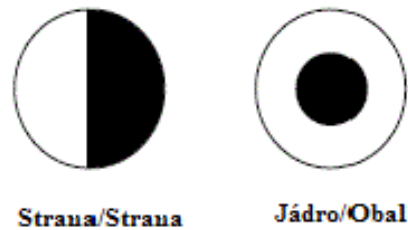
http://www.nanopharma.cz/images/produkty_a_tecnologie/produkty/porezni_nanovlakna_2.jpg

Výroba porézních vláken může být realizována několika způsoby. Jedním ze způsobů je kondenzace vodních kapiček na povrchu vlákna. Tato metoda je vhodná pouze pro polymery nerozpustné ve vodě. Zvláknění probíhá buď za vysoké relativní vlhkosti vzduchu, nebo je do zvláknovací trysky zaveden přívod vody, která při výrobě ulpí na povrchu vodou nerozpustného vlákna a po čase se odpaří. Další možností výroby porézních vláken je použití směsi dobrých a špatných rozpouštědel. V oblastech, kde se dobré rozpouštědlo odpařuje rychleji než v okolních oblastech (špatné rozpouštědlo), dochází mezi těmito dvěma fázemi k separaci, čímž následně vznikají póry. [13]

2.5.2.2 Bikomponentní vlákna

Bikomponentní vlákna jsou vlákna složená ze dvou polymerů různých chemických nebo fyzikálních vlastností, vytlačovaných ze stejné zvláknovací trysky s oběma polymery uvnitř jednoho vlákna. [14] Cílem výroby bikomponentních vláken je dodat vláknům schopnosti, které by s použitím jednoho druhu polymeru nebylo možné získat. Bikomponentní vlákna lze vyrábět v různých geometrických variantách s různými

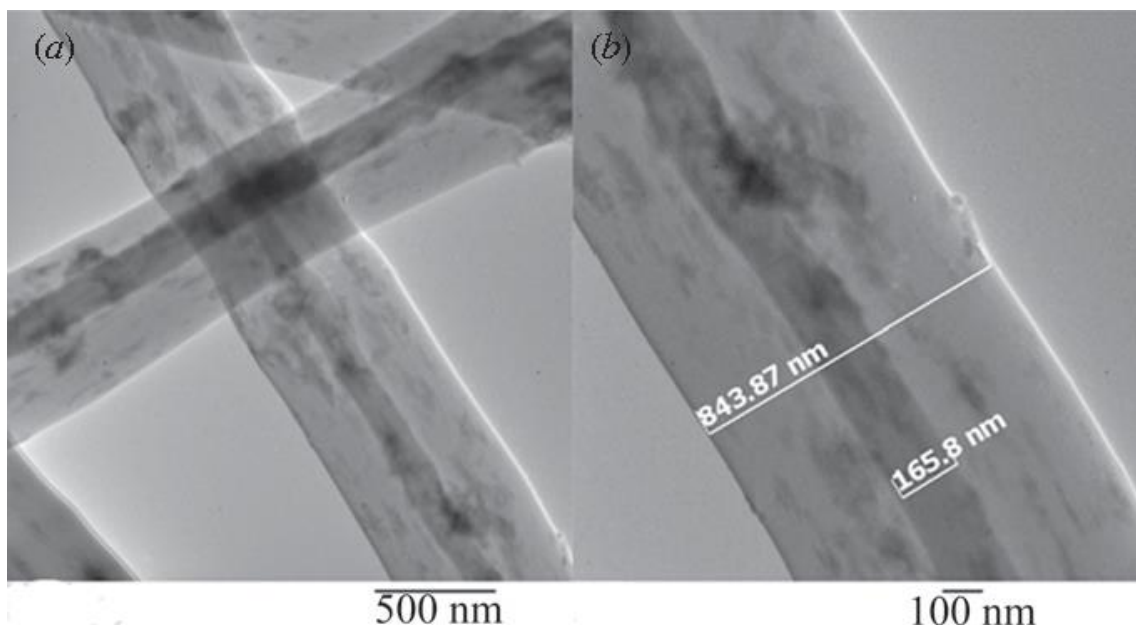
průřezy. Bikomponentní vlákna se běžně dělí podle struktury. [15] Vybrané rozdělení bikomponentních vláken je znázorněno na *Obrázku 8*.



Obrázek 8 Příklady válcových vláken s různými průřezy. Černá a bílá barva označuje rozdílné polymery

Zdroj: <http://s2.picofile.com/file/7138612361/p36.gif>

K výrobě bikomponentních nanovláken je možné použít různé modifikace zvláknovacího ústrojí. K výrobě vláken například jádro/obal (*Obrázek 9*), strana/strana slouží modifikovaná zařízení popsaná v kapitole 2.1.3.2.



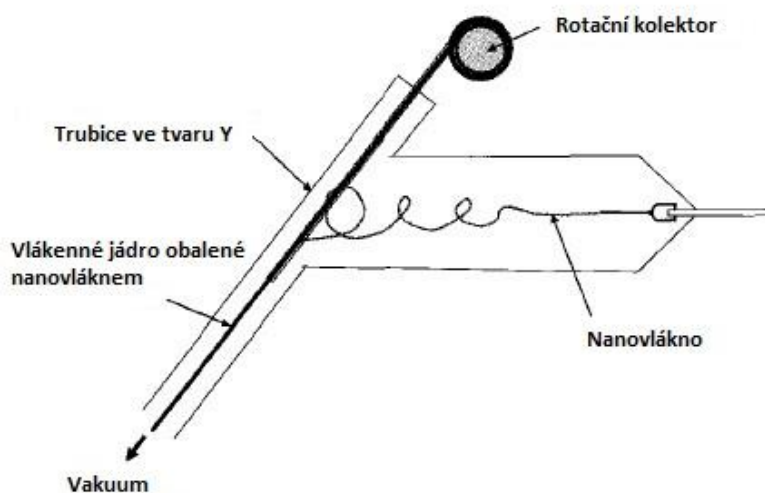
Obrázek 9 TEM snímek vlákna typu jádro/obal vyrobeného koaxiálním elektrickým zvláknováním kombinací polymerů PCL/PVA. Měřítka 500nm a 100nm.

Zdroj: <https://ai2-s2-public.s3.amazonaws.com/figures/2017-08-08/70f9df8c06af98d99643354884e5990997fdcb94/6-Figure3-1.png>

2.5.2.3 Nitě a hybridní nitě

Pro použití nanovláken v textilu je potřeba vlákna formovat do kontinuálních nití. V případě elektrického zvlákňování toto představuje velký problém, jelikož vlákna nemají dostatečnou pevnost na to, aby mohla být zpracována například tradičními bavlnářskými a vlnářskými textilními způsoby. Byly proto vymyšleny nové způsoby zpracování vláken, které umožňují tvorbu nitě s použitím nanovláken.

Jedním ze způsobu jak využít nanovláčka v textilní průmyslu je vytvoření tzv. hybridní nitě. Hybridní nit je tvořena jádrem s klasickou mikrovláčkovou textilní nití, které je obaleno nanovláčkou. Strojní zařízení znázorněné na *Obrázku 10* je jedním příkladem technologie výroby hybridních nití. Skleněnou trubicí ve tvaru Y je odvíjeno textilní jádro, na které je s použitím vzduchu přimotáváno elektrostatičticky vyrobené vlákno. Tento způsob výroby kombinuje pevnost jádra tvořeného textilní nití s vysokým měrným povrchem, který poskytují elektrostatičticky vyrobená nanovláčka. Nanovláčkový obal ovšem nemusí být s textilním jádrem pevně spojený a může tak dojít k snadnému sejmutí obalu. Tento proces výroby je technologicky i časově velice náročný. [6]

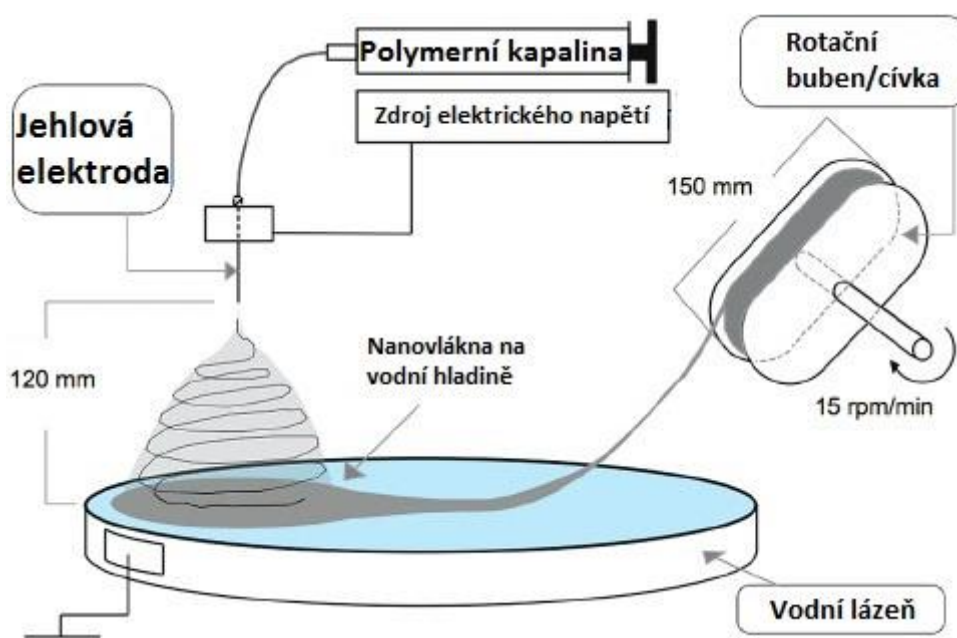


Obrázek 10 Schéma příkladu jednoho typu strojího zařízení pro výrobu hybridní nitě s textilním jádrem obaleným nanovláčkou

Zdroj: https://docplayer.cz/docs-images/41/8913436/images/page_14.jpg

K výrobě kompletně nanovláčkové nitě existuje několik metod výroby. Ovšem výsledné nanovláčkové nitě mají omezenou délku. V kapitole 2.1.4.1 bylo popsáno

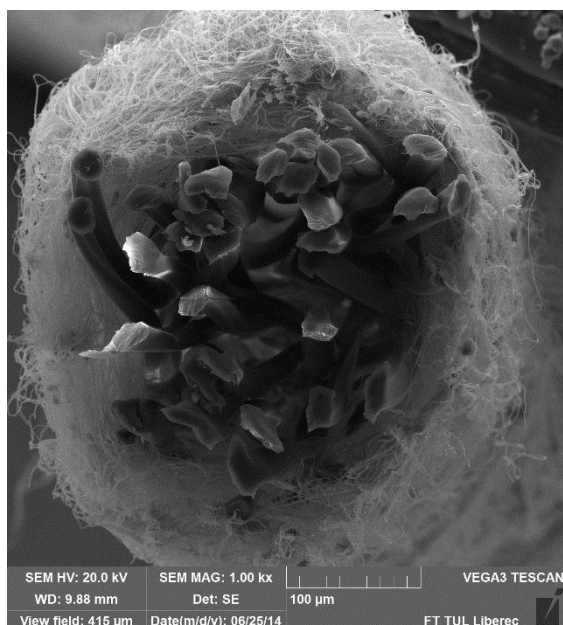
zvlákňování na rotační diskový kolektor, díky kterému je možné vyrobit osamocená a vyrovnaná vlákna. Tato vlákna pak mohou být navíjena do nití, avšak tyto nitě jsou délkově omezeny obvodem disku. Další možností výroby nanovláknenných nití je zvlákňování na kapalinový kolektor (*Obrázek 11*). Elektricky vyrobené vlákno je nejdříve zachyceno do vodní lázně, kde dochází ke koagulaci vláken. Následně je usazená vláknenná nit z vodní lázně navíjena na buben nebo cívku. Tato metoda je díky použití nerozpouštědla (voda) vhodná také pro polymery, které používají méně těžká rozpouštědla. [6] Dále je možné nanovláknenné nitě vyrábět s použitím kovového rámu sloužícího jako kolektor, nebo s použitím rychle oscilujícího uzemněného rámu uvnitř polymerního proudu. [16]



Obrázek 11 Schéma příkladu strojního zařízení pro elektrostaticky vyráběné nitě s použitím technologie zvlákňování do vodní lázně

*Zdroj: T. OLSSON, Richard. Extraction of microfibrils from bacterial cellulose networks for electrospinning of anisotropic biohybrid fiber yarns. *Macromolecules* 43(9) [online]. 2010 [cit. 2019-04-13]. DOI: 10.1021/ma100217q. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/231700339_Extraction_of_microfibrils_from_bacterial_cellulose_networks_for_electrospinning_of_anisotropic_biohybrid_fiber_yarns*

Hybridní nitě je také možné vyrobit s pomocí zařízení Nanospider™ a také technologií AC spinning. Takovéto čistě nanovláknenné nitě se používají zejména v medicíně jako nosiče buněk, protože je velmi omezuje jejich malá mechanická odolnost. [17] *Obrázek 12* znázorňuje řez hybridní nitě vyrobené AC spinningem.



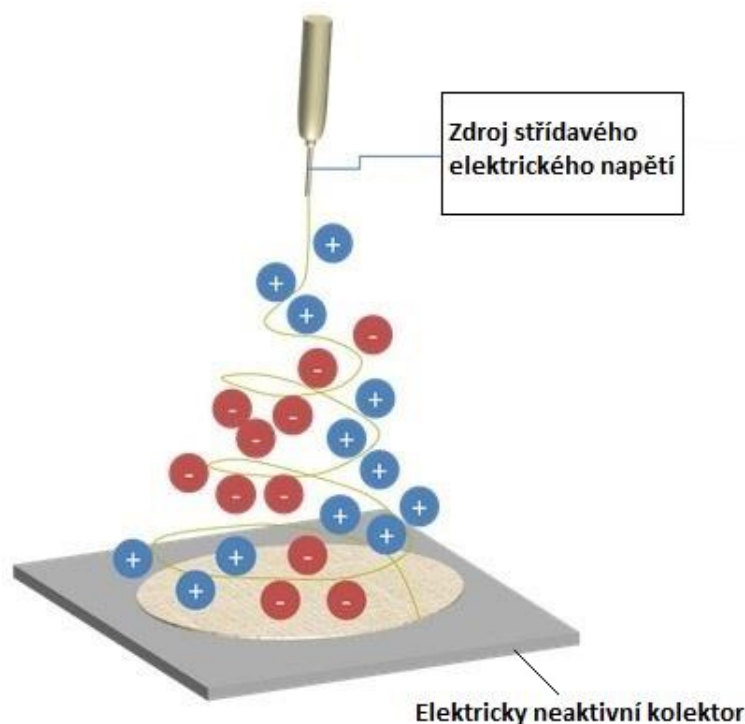
*Obrázek 12 SEM snímek řezu hybridní nitě vyrobené technologií AC spinning.
Měřítko 100μm*

Zdroj: https://media.springernature.com/m685/springer-static/image/art%3A10.1038%2Fs41598-019-38557-z/MediaObjects/41598_2019_38557_Fig4_HTML.png

Obrázek 12 znázorňuje řez hybridní nitě vyrobené AC spinningem. Při AC elektrickém zvlákňování dochází k přirozené tvorbě délkového nanovláknenného útvaru a dochází k výhodnější tvorbě hybridních nití. [17]

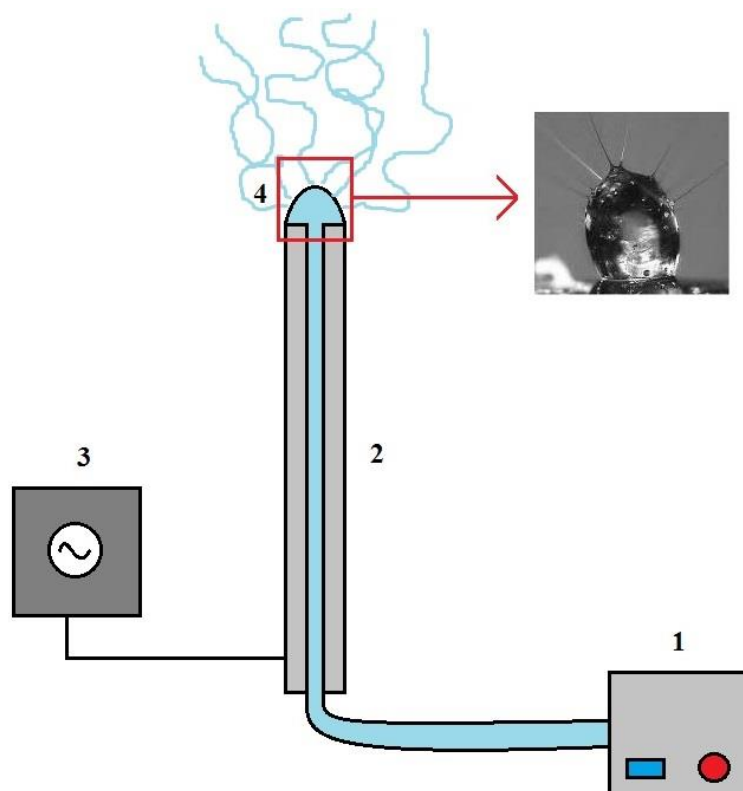
2.5.3 Elektrické zvlákňování s pomocí střídavého proudu

V dnešní době většina přístrojů pro elektrickou výrobu nanovláknenných vrstev používá vysokonapěťový stejnosměrný proud (DC). K výrobě nanovláknenných vrstev je ovšem možné použít i vysokonapěťový střídavý proud (AC). Při použití střídavého proudu vstupuje do procesu výroby nanovláken další parametr, který ovlivňuje výslednou strukturu, tím je frekvence proudu. Pro každý druh zvlákňovacího materiálu je nutné, určit správnou hodnotu frekvence proudu. Ve většině případů bývá tato hodnota stejná jako je v elektrické síti, a to 50 Hz, ale je možné použít i frekvenční měniče a hodnotu frekvence změnit. Frekvence proudu umožní dosáhnout střídání polarit u zvlákňovaného proudu polymerní kapaliny, která má střídavě kladně nabitě segmenty a záporně nabitě segmenty (*Obrázek 13*). Čím je hodnota frekvence vyšší, tím méně je času na vznik a zánik trysek, ze kterých jsou formována vlákna. [18]



Obrázek 13 Obrázek znázorňující pohyb kladně a záporně nabitých segmentů polymerního proudu u AC electrospinningu
 Zdroj: <http://electrospintech.com/images/txt-acespin1.png>

Střídáním polarit, dochází k vytváření tzv. virtuální protielektrody, což umožňuje výrobu nanovláken bez použití uzemněného, či opačně nabíjecího, tedy elektricky aktivního kolektoru (*Obrázek 14*). Díky střídavě nabitým segmentům polymerního proudu kapaliny jsou vlákna při dopadu na podložku vzájemně přitahována, některá navíc s minimem odpuzujících sil. Nastavením správné hodnoty frekvence proudu lze docílit také stabilnějšího zvlákňovacího procesu vytvářejícího neorientovaná vlákna, než v případě použití stejnosměrného proudu. Další výhodou AC electrospinningu je jeho vysoká produkční účinnost oproti DC electrospinningu. Vysoká produkční účinnost AC electrospinningu má spojitost s tvorbou polymerních trysek na volném povrchu polymerní kapaliny. Při AC electrospinningu dochází k vytvoření četných polymerních trysek na povrchu volné hladiny polymerní kapaliny, což DC electrospinning neumožňuje. Nevýhodou použití AC electrospinningu může být průměr vláken, který u některých zvlákňovacích metod a materiálů vykazuje ve výsledku větší průměry vláken než DC electrospinning. [18] [19] [20]



Obrázek 14 Schéma strojního zařízení pro AC electrospinning složeného z dávkovacího zařízení (1), zvlákňovací elektrody (2), které je spojena se zdrojem střídavého elektrického napětí (3), které vytváří polymerní trysky (4) na povrchu polymerní kapaliny

Zdroj:

https://pubs.rsc.org/services/images/RSCpubs.ePlatform.Service.FreeContent.ImageService.svc/ImageService/Articleimage/2014/CP/c4cp04346d/c4cp04346d-f3_hi-res.gif

2.6 Směsování vláknотvorných materiálů s pomocí elektrického zvlákňování

Jedna z možností, jak zlepšit vlastnosti vyráběných vláknenných vrstev nebo vytvořit vláknenný materiál požadovaných vlastností, je směsování materiálů. Jev, při kterém má výsledná směs materiálů lepší vlastnosti (např. vyšší pevnost, vyšší hydrofilnost atd.) než jednotlivé materiály ze kterých je složena, se nazývá synergický efekt. [21]

Technologie elektrického zvlákňování je pro směsování materiálů vhodná především díky své široké individualizaci a variabilitě uspořádání zvlákňovacích elektrod a kolektorů. Odborná literatura má pro výrobu směšovaných vláknenných materiálů

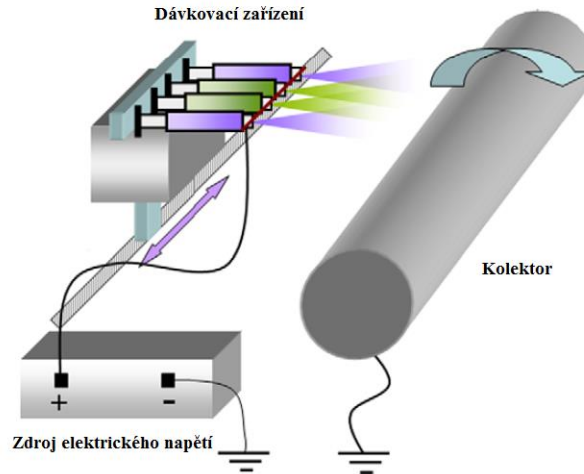
s pomocí elektrického zvlákňování hned několik názvů, je jím např.: dual-jet electrospinning, co-electrospinning, multi-syringe electrospinning atd. Důležitou součástí při výrobě směsových materiálů je také jejich testování a hodnocení, zda splňují požadované vlastnosti. Testování vlastností směsových materiálů významně závisí na zvolených druzích polymerních materiálů, ze kterých jsou vlákna vyráběna. Jako příklady kombinace materiálů lze uvést PCL/PVA [22], PS/PA6 [23], PVA/acetát celulózy [24], chitosan/ kopolymer PLA-PCL [25]. V následujících kapitolách budou vybrané technologie výroby a metody hodnocení směsových vlákenných vrstev popsány.

2.6.1 Uspořádání zvlákňovacích elektrod při výrobě směsovaných vlákenných vrstev

V doposud vydaných publikacích, zabývajících se výrobou směsovaných vlákenných vrstev s pomocí technologie elektrického zvlákňování, je ve většině případů zvlákňovací elektroda tvořena jehlou. Použitím dávkovacího zařízení, které je zakončené kovovou jehlou přináší mnoho způsobů individualizace výrobního procesu. Strojní zařízení můžou používat pro odlišné druhy vláknitvorných materiálu například různé průměry kovových jehel, různá natočení jehel vzhledem ke kolektoru, různé kolektory atd. Vybrané způsoby uspořádání jehlových zvlákňovacích elektrod pro tvorbu směsových vlákenných vrstev elektrickým zvlákňováním jsou představeny dále.

- **Uspořádání jehlových zvlákňovacích elektrod vedle sebe**

Dvě nebo více zvlákňovacích elektrod je umístěno vedle sebe ve vzdálenosti přibližně 3 – 5 cm na společném stojanu, jak je znázorněno na *Obrázku 15*. Stojan s připevněnými zvlákňovacími elektrodami může být posuvný rychlostí v jednotkách m/min, nebo stacionární. Kolektor rotující obvodovou rychlostí až 100 m/min, je umístěn ve vzdálenosti 15 – 20 cm od jehlových elektrod. Rotační kolektor může být například ve tvaru válce, ploché destičky atd. Toto strojní uspořádání je v odborné literatuře nazýváno jako multi-syringe electrospinning. [26]

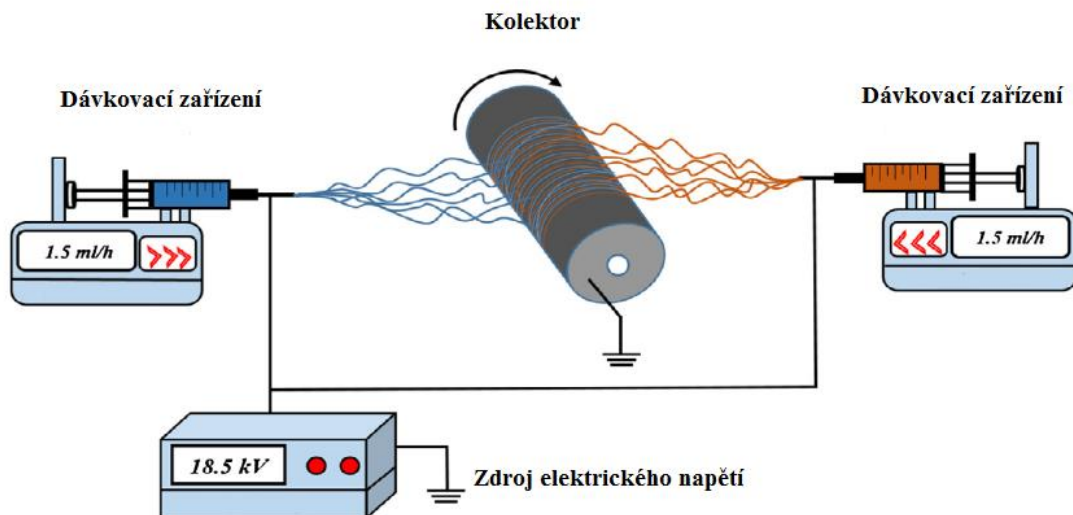


Obrázek 15 Znáznorněné rozmístění jehlových zvlákňovacích elektrod vedle sebe (tzv. multi-syringe electrospinning). Jehly jsou umístěné na stojanu, který může být posuvný. Fialová a zelená barva odlišují jednotlivé vláknotvorné materiály

Zdroj: <https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0021979710002948-gr1.jpg>

- **Uspořádání jehlových zvlákňovacích elektrod proti sobě**

Toto uspořádání (*Obrázek 16*) spočívá v použití dvou jehlových zvlákňovacích elektrod umístěných proti sobě, které mají mezi sebou rotující kolektor. Zvlákňovací jehly jsou umístěny ve vzdálenosti přibližně 15 – 20 cm od kolektoru. Rotující kolektor má tvar válce a rychlost otáčení může být až 200 m/min. V odborné literatuře se pro toto zařízení lze setkat s názvem co-electrospinning [27] nebo multinozzle electrospinning. [28]

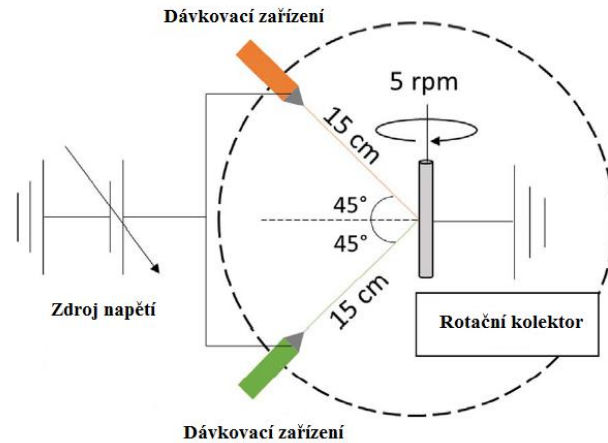


Obrázek 16 Znáznorněné rozmístění jehlových zvlákňovacích elektrod proti sobě (tzv. co-electrospinning). Mezi jehlami je umístěn rotující válcový kolektor. Modrá a hnědá barva odlišují jednotlivé vláknotvorné materiály

Zdroj: <https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0306261916312363-gr2.jpg>

- **Uspořádání jehlových zvlákňovacích elektrod pod úhlem**

Dvě jehlové zvlákňovací elektrody jsou umístěny vedle sebe pod určitým úhlem, jak je znázorněno na *Obrázku 17*. Každá elektroda je umístěna ve vzdálenosti 15 cm od rotujícího válcového kolektoru. Úhel mezi zvlákňovacími elektrodami je 90° , ale může být i jiný. Rychlost otáčení válcového kolektoru je v jednotkách ot/min. Odborná literatura uvádí název tohoto zařízení jako dual-jet electrospinning. [29]



Obrázek 17 Znázorněné rozmístění jehlových zvláknovacích elektrod vedle sebe pod úhlem (tzv. dual-jet electrospinning). Zelená a hnědá barva odlišují jednotlivé vláknotvorné polymerní materiály

Zdroj: <https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0014305717316208-gr1.jpg>

Výše popsané druhy jehlových elektricky zvláknujících zařízení tvoří směšovou vláknennou vrstvu tak, že k mísení jednotlivých druhů vláknotvorných polymerů dochází až v průběhu zvláknování na kolektor. To znamená, že zvláknování probíhá z více druhů polymerních roztoků, přičemž každý roztok obsahuje jiný druh polymerního materiálu. Každý polymerní roztok je umístěn zvlášť a v jiném polymerním zásobníku. K mísení polymerních roztoků dochází až poté, co jsou z polymerního roztoku vytvořena vlákna dopadající na kolektor. V odborné literatuře lze dohledat i takové způsoby výroby, kde je mísení vláknotvorných polymerů provedeno ještě před procesem zvláknování. To znamená, že zvláknování probíhá pouze z jednoho polymerního roztoku, ve kterém je rozpuštěno 2 a více druhů polymerních materiálů, takzvané BLENDS („blendy“). Tento způsob výroby je možný jen pro vláknotvorné polymery, které jsou vzájemně mísitelné např.: PLGA (kopolymer kyseliny polymléčné a kyseliny polyglykolové) a rozpustné ve stejných nebo mísitelných rozpouštědlových systémech, jako například polyaniline/želatina, PCL/kolagen. Tyto materiály také nalézají aplikace zejména v medicíně. [30]

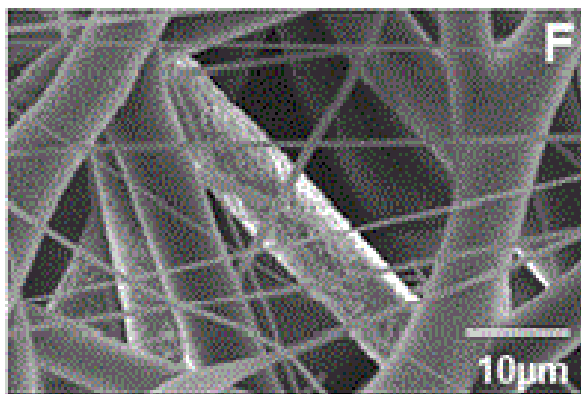
2.6.2 Metody hodnocení směsových vláknenných vrstev

Aby mohly být materiály správně využívány, je potřeba rozumět jejich vlastnostem a umět je co nejpřesněji analyzovat. Vlastnosti, kterým je potřeba rozumět se liší v závislosti na použití vybraného technického materiálu. V případě směsových vláknenných vrstev je uplatnění takových materiálů nejčastěji ve zdravotnictví. Je proto vhodné u těchto vláknenných vrstev znát zejména strukturní či morfologické vlastnosti jako jsou průměry vláken, procentuální hmotnostní zastoupení jednotlivých materiálů ve směsi, povrchové vlastnosti (defekty, tvar vláken atd.), biologické vlastnosti atd. V následujících kapitolách budou některé vybrané metody charakterizace směsových elektricky zvlákněných materiálů popsány.

2.6.2.1 Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM)

Rastrovací, nebo také řádkovací či skenovací elektronová mikroskopie (*Obrázek 18*), je metoda sloužící ke snímání povrchu vzorků pomocí svazků elektronů urychlených vysokým elektrickým napětím. Povrch je snímán prostřednictvím odražených či vyražených elektronů, které dopadají na detektor. Detektor poté postupně po řádkách vytvoří výsledný obraz zkoumaného povrchu.[31]

Snímky vytvořené pomocí elektronové rastrovací mikroskopie je poté možné analyzovat s pomocí softwarů např.: Fiji (ImageJ). Tento software umožňuje provádět obrazovou analýzu, s jejíž pomocí je možné zjistit např.: průměry vláken, orientaci vláken atd. [32] Průměr vláken je důležitou charakteristikou zejména u směsování materiálů, které vykazují při elektrostatickém zvláknění a při určitém nastavení procesních a materiálových parametrů, výrazně rozdílné průměry vláken viz *Obrázek 18*. Z obrázku je zřejmé, že výsledné vláknenné materiály mají výrazně rozdílné průměry vláken, což napomáhá charakterizaci směsového materiálu.



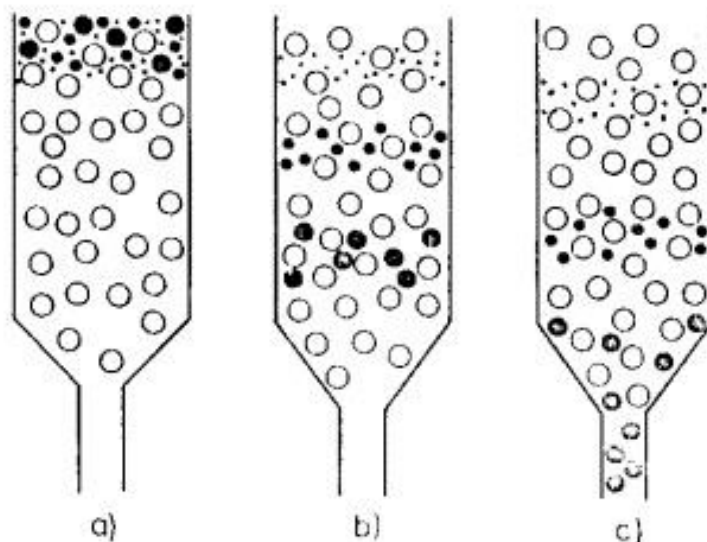
Obrázek 18 Příklad směsové vlákenné vrstvy vyrobené elektrickým zvlákňováním Polykaprolactonu (PCL)-větší vlákna a kyseliny polymlečné (PLA)-menší vlákna

Zdroj: https://media.springernature.com/original/springer-static/image/art%3A10.1007%2Fs10965-018-1475-9/MediaObjects/10965_2018_1475_Fig9_HTML.gif

SEM se využívá zejména tam, kde nedostačuje zvětšení nebo hloubka ostrosti optických mikroskopů.

2.6.2.2 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie slouží k separaci směsi polymerních molekul v roztoku, které se liší svými rozměry. K měření slouží svislá kolona, ve které je umístěný gel. Stacionární fází (gel), která obsahuje póry o dané velikosti, proudí fáze mobilní (roztok polymeru). Mobilní fáze může proudit mezi póry gelu a také do pórů gelu, jak je znázorněno na *Obrázku 19*. [33]



Obrázek 19 Průřez svislou kolonou naplněnou gelem. a) Počátek měření, mobilní fáze je přivedena do gelové kolony b) Průběh měření, probíhá oddělování větších molekul od menších c) Zaznamenání hodnot, největší molekuly mobilní fáze opouštějí gelovou kolonu, malé molekuly jsou stále uvnitř gelové kolony.

Zdroj: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd/hypertext/AJAZG_soubory/image002.gif

Polymerní molekuly, které mají průměr menší, než je průměr pórů gelu, pronikají dovnitř gelu. Polymerní molekuly, které mají průměr větší, než je průměr pórů gelu, nemohou pronikat dovnitř gelu. Menší polymerní molekuly proudí tedy v koloně delší čas (musí urazit větší vzdálenost) a tím dochází k oddělování větších polymerních molekul od menších. Tento jev se nazývá exkluze molekul. Měřicí zařízení poté data vyhodnotí do grafu, který vyjadřuje počet molekul protečených kolonou v závislosti na čase. [34]

Tato technologie je velice vhodná i pro použití u směsovaných vláknenných vrstev. S její pomocí lze například zjistit rozložení molekulových hmotností jednotlivých materiálů v kompozitu. [35] Dále je možné touto metodou zjistit například rychlost degradace kompozitních scaffoldů, která je dána změnou molekulové hmotnosti daných polymerních materiálů. [36]

2.6.2.3 *In-vitro* testování

Při zamýšlené aplikaci směsovaných materiálů v medicíně je nutné testovat vyrobené materiály nejprve *in-vitro*. *In-vitro* testování je testování prováděné

v laboratořích s použitím mikroorganismů, buněk anebo biologických molekul, které jsou izolovány z jejich obvyklého biologického prostředí. Pokud samostatné jednodruhové elektrostaticky zvlákněné materiály vykazují nějaké specifické chování při *in-vitro* testování a směsování by toto specifické chování mělo změnit, je velmi vhodné se na *in-vitro* testování s buňkami zaměřit. Součástí *in-vitro* testování biokompatibility buněk na vybraný materiál je analýza buněčné proliferace, adheze a viability. Jedním z nejobvyklejších základních *in-vitro* testů je tzv. MTT test. S pomocí tohoto testu je možné analyzovat proliferaci buněk, jejich viabilitu a také cytotoxicitu materiálu. Testování probíhá v jamkové destičce pro buněčné kultury. Princip testu je založen na redukci tetrazoliového barviva MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazolium bromid) na nerozpustný formazan, který má tvar krystalků s fialovou barvou. Reakce tetrazoliového barviva MTT probíhá na mitochondriální membráně vlivem mitochondriálních dehydrogenáz živých buněk. Množství redukovaného MTT barviva indikuje počet živých buněk. Fialové formazanové krystalky se následně rozpustí přidáním okyseleného izopropanolu. Po rozpuštění krystalku je s pomocí spektrofotometru stanovena hodnota absorbance roztoku. [37] [38]

MTT test například u kombinace elektricky zvlákněných materiálů z polykaprolaktonu (PCL) a polyvinylalkoholu (PVA) v literatuře ukazuje lepší adhezi a proliferaci buněk u směsového materiálu, než u jednotlivých jednodruhových vlákněných materiálů. Součástí MTT testu je také fluorescenční mikroskopie a elektronová rastrovací mikroskopie. Tyto testy pak umožňují odlišovat testované vzorky po určitém počtu dnů. Specifikovat počáteční adhezi i vývoj biokompatibility založené na proliferaci buněk v čase. [39]

2.6.2.4 Fluorescenční mikroskopie (FM)

Fluorescenční mikroskopie je technika, s jejíž pomocí lze sledovat fyziologii buněk. Princip je založen na zviditelnění určité látky, či struktury, která je označena fluorescenčním barvivem (fluorofor, fluorochrom atd.). Základním procesem fluorescence je absorpce světelné energie (fotonu) o určité vlnové délce indikátorem a následnou emisí světelné energie do vyšší energetické hladiny. Při návratu elektronů do své původní valenční vrstvy emituje záření o jiné vlnové délce, které je pozorováno. [37] [40]

Touto metodou lze analyzovat i směšové vláknenné vrstvy, které jsou složené z více druhů polymerních materiálů. Na *Obrázku 20* je zachycena směšová vláknenná vrstva, složená z PCL vláken a PEO (polyetylen oxid) vláken. [41]

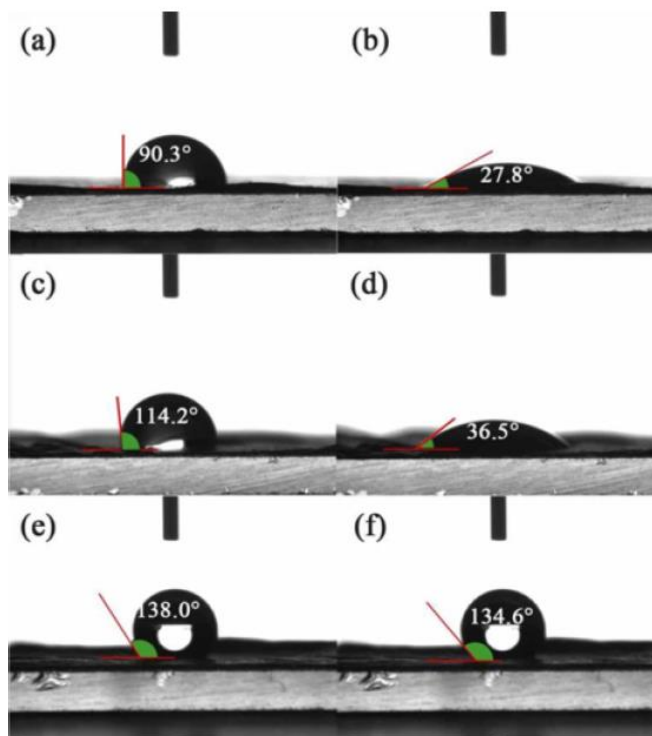


Obrázek 20 Snímek z fluorescenčního mikroskopu zachycující obarvená PCL vlákna (červená) a PEO vlákna (zelená)

Zdroj: <https://www.pnas.org/content/pnas/109/35/14176/F1.medium.gif>

2.6.2.5 Měření kontaktního úhlu

Povrchová charakteristika nanovláknenných materiálů pro medicínské aplikace je často hodnocena měřením kontaktního úhlu metodou přisedlé kapky. Měření kontaktního úhlu umožňuje získání představy o míře hydrofilnosti či hydrofobnosti testovaného materiálu (viz *Obrázek 21*). Je ale potřeba brát v úvahu, že se u elektricky zvlákněných vrstev jedná o materiál porézní a samozřejmě nedokonale rovný. Pro správné měření kontaktního úhlu je vyžadován rovný chemicky ani morfologicky nestrukturovaný materiál, což samozřejmě nanovláknenné elektrostaticky zvlákněné vrstvy nejsou [42]. Kapka umístěná na porézním médiu se nejen roztahuje na smáčeném povrchu pevné látky, ale také proniká do hloubky tohoto porézního materiálu, čímž je výsledný kontaktní úhel ovlivňován [43].



Obrázek 21 Příklad měření kontaktního úhlu metodou přisedlé kapky pro elektricky zvlákněné materiály PVA (a, b); PVA s nanočásticemi stříbra (c, d); PCL (e, f); Přičemž snímky (b, d, f) jsou kontaktní úhly změřené po 5 sekundách od začátku smáčení.

Zdroj: https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRxMOBXu8oDO4zomYSw49N8u0sPs0xfSufE_ChZynOT9BDg36e

Dále je možné u směsových vlákných materiálů měřit například stupeň bobtnání. Výběr metod pro charakterizaci směsových materiálů vyrobených elektrickým zvlákněním je vždy založeno na druzích a vlastnostech směsovaných polymerů, na jejich typických vlastnostech a projevech. Pro směsování polymerních vláken z PVA a PCL se v literatuře popisuje několik různých možností popisu takových materiálů. Využívány jsou charakterizace chemického složení a vnitřní struktury jako rentgenová difrakce (X-ray diffraction) a infračervená spektroskopie (FTIR), popis chování polymerů za zvyšující se teploty pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) a samozřejmě morfologické popisy na základě vytváření snímků z rastrovacích elektronových mikroskopů. V neposlední řadě autoři publikací o směsování vláken PVA a PCL přímo v procesu elektrického zvláknění [44][45] neopominají, jak bylo uvedeno výše, testování pomocí měření kontaktních úhlů a stupně bobtnání. Měření stupně bobtnání je založeno na rozdílu hmotnosti nabobtnalé vrstvy vláken (smočené do destilované vody o teplotě 37 °C na dobu 1, 6, 12, 24, 48 hodin a odstraněním zbytku volné vody na

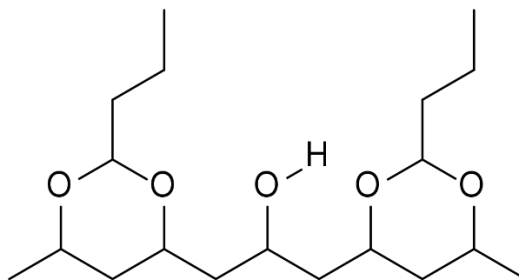
povrchu filtračním papírem) a nabobtnalé mrazem vysušené (lyofilizované) vrstvy, děleno hmotností nabobtnalé mrazem vysušené vrstvy. Po vynásobení hodnotou 100, je pak získán stupeň bobtnání v procentech. [46] U směsí PCL/PVA a porovnání stupně bobtnání pro samotné PCL a PVA vrstvy, je pak možné pozorovat očekávaný velký stupeň bobtnání pro PVA, malý pro PCL a mezi těmito hodnotami, by se měl nacházet stupeň bobtnání pro směsový materiál PCL/PVA, dle zastoupení jednotlivých složek.

2.7 Popis vybraných polymerních materiálů pro elektrické zvlákňování

V následujícím textu budou stručně popsány vybrané polymerní materiály, které byly používány v průběhu úvodních či hlavních experimentů popsaných v experimentální části této práce

2.7.1 Polyvinylbutyral (PVB)

Polyvinylbutyral (PVB) (*Obrázek 22*) je bezbarvý, čirý a amorfni termoplast, který je vyroben kondenzací polyvinylalkoholu a butyraldehydu. PVB se vyznačuje dobrou flexibilitou a také dobrou přilnavostí a vynikající odolností vůči UV záření. PVB je taky velice dobrý filmotvorný materiál. Vlastnosti PVB jako jsou např.: rozpustnost v rozpouštědlech, kompatibilita s pojivy a změkčovadly, závisí na stupni acetalizace a polymerace. Zvýšením počtu hydroxylových skupin v polymerním řetězci dochází k zvyšování odolnosti proti vodě. S přibývajícimi acetalovými skupinami v polymerním řetězci klesá teplota skelného přechodu (T_g) a viskozita. PVB může být také zesít'ováno. Jeho schopnost zesítení závisí na počtu zbytkových OH skupin v polymerním řetězci. Vlastnosti ovlivňuje také molekulová hmotnost, s rostoucí molekulovou hmotností roste houževnatost a viskozita materiálu a zároveň klesá adheze k ostatním materiálům. Teplota tání PVB je v rozmezí 105 – 135 °C. PVB je rozpustné v alkoholech a glykolech a ve směsích s alkoholy např.: ketony, estery atd. Jedno z hlavních použití PVB je výroba PVB fólií na bezpečnostní skla. Dále je možné PVB použít např. jako: základní nátěr na kovy, ochrannou vrstvu fotovoltaických modulů atd. [47] [48]



Obrázek 22 Chemický vzorec polyvinylbutyralu

Zdroj:

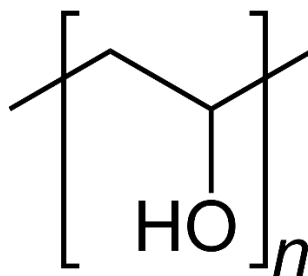
<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/87/Polyvinylbutyral.svg/220px-Polyvinylbutyral.svg.png>

2.7.2 Polyvinylalkohol (PVA)

Polyvinylalkohol (PVA) je relativně jednoduchý syntetický polymer, který je vyráběn alkalickou hydrolyzou polyvinylacetátu (PVAc), např. v metanolu. Hydrolyza polyvinylacetátu nebývá ve většině případů úplná, proto polyvinylalkohol obsahuje vždy určité množství PVAc skupin, díky kterým má polyvinylalkohol různé vlastnosti. Obchodně je polyvinylalkohol dostupný s vysokým stupněm hydrolyzy (98,5 %). Stupeň hydrolyzy ovlivňuje chemické vlastnosti, krystalinitu a také rozpustnost polymeru [49].

Rostoucí molekulová hmotnost má za následek klesající rozpustnost polyvinylalkoholu. Při obsahu 70 – 80 % zbytkových -OH skupin je polyvinylalkohol odolný proti rozpuštění ve vodě. PVA je také odolný vůči některým rozpouštědlům a olejům. Odolnost vůči rozpouštědlům je závislá na teplotě, molekulové hmotnosti a na velikosti polyvinylacetátových skupin. Teplota tání PVA je kolem 200 °C. Polyvinylalkohol je možné používat v rozmezí teplot -50 °C až 130 °C. PVA má tvar bílého krystalického prášku. Díky svým vlastnostem připomínajícím želatinu se PVA používá v potravinářství pro výrobu želé. Používá se také na výrobu obalových fólií, textilních vláken a chirurgických nití. [50] Jedná se o silně hydrofilní polymer. Je však nutné poznamenat, že polyvinylalkohol je sice ve vodě rozpustným polymerem, ale není biodegradabilním. Při větších molekulových hmotnostech při použití například v tkáňovém inženýrství jako scaffold uvnitř těla, může při rozpadu tohoto scaffoldu docházet k následnému hromadění jeho řetězců uvnitř těla a nemůže dojít k odchodu

spolu s vodou z těla ven. Na *Obrázku 23* je znázorněn chemický vzorec polyvinylalkoholu.



Obrázek 23 Chemický vzorec polyvinylalkoholu

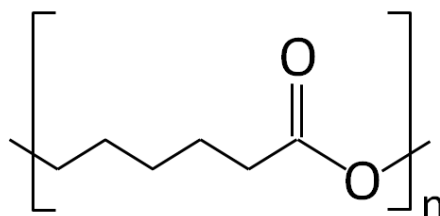
Zdroj:

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/fc/Polyvinyl_Alcohol_Structural_Formula_V1.svg/150px-Polyvinyl_Alcohol_Structural_Formula_V1.svg.png

2.7.3 Polykaprolakton (PCL)

Polykaprolakton (PCL) (*Obrázek 24*) je biodegradabilní semikrystalický polyester, který je vyráběn polymerizací za otevření kruhu z ϵ -kaprolaktonu s použitím katalyzátoru. Jako katalyzátor může být použit například oktoát cínatý. [51] PCL má poměrně nízkou teplotu tání ($T_m = 60\text{ }^\circ\text{C}$). Teplota skelného přechodu ($T_g = -60\text{ }^\circ\text{C}$) je oproti jiným biodegradabilním polymerům (např. PLA) nižší, což napomáhá jeho biodegradabilitě i přes vysoký stupeň krystalinity, typicky 50 %. PCL se vyznačuje výbornou odolností proti vodě a velmi dlouhou dobou degradace (2 – 5 let). [52] Rozklad polykaprolaktonu probíhá hydrolýzou esterové vazby za fyziologických podmínek (například v lidském těle). PCL vyvolává minimální zánětlivé a imunologické odezvy v lidském organismu a je proto vhodný pro výrobu biokompatibilních scaffoldů v tkáňovém inženýrství. [51] Dalším oblastí kde nachází PCL využití je například řízená dodávka léčiv ve zdravotnictví. V kombinaci PCL s různými biomateriály lze řídit dobu rozpadu, zlepšovat mechanické vlastnosti a tyto materiály lze použít i pro kostní tkáňové inženýrství. [53] PCL je pro použití ve zdravotnictví vhodný zejména díky tomu, že nevyvolává žádné nebo minimální imunologické a zánětlivé odezvy v lidském organismu. PCL má také poměrně dobré mechanické vlastnosti. Nevýhodou tohoto polymerního materiálu je vysoká hydrofobicita, která v některých případech použití (např. kožní implantáty) není žádoucí.

K degradaci PCL dochází hydrolyzou, která je uvnitř (scaffoldy) i vně (kryty ran) těla řízena enzymaticky, tedy rozklad proběhne až na produkty, které z těla odcházejí buď dýchacím systémem nebo močí. [54]



Obrázek 24 Chemický vzorec polykaprolaktonu

Zdroj:

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/ab/Polycaprolactone_structure.png/200px-Polycaprolactone_structure.png

3. Experimentální část

Tato část diplomové práce se zabývá výrobou směšované vlákenné vrstvy s pomocí elektrického zvlákňování. Nejdříve je popsán experiment zahrnující výrobu směšované vlákenné vrstvy s pomocí jehlového elektrického zvlákňování. V další části je popsána výroba směšované vlákenné vrstvy na strunovém elektrickém zvlákňovacím zařízení. V závěru experimentální části budou popsány průběhy a postupy při analýze a hodnocení vyrobených vlákenných vrstev.

3.1 Materiály

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.1.3, k výrobě nanovlákenné vrstvy je zapotřebí najít správnou kombinaci procesních a materiálových parametrů. Jedním z parametrů, který je možné ovlivnit ještě před samotným procesem zvlákňování, je volba správného druhu polymerního roztoku a jeho koncentrace. Druh polymerního roztoku závisí na účelu použití výsledného vlákenného výrobku. Směšované vlákenné vrstvy mohou v budoucnu nabízet dobré uplatnění hlavně v oboru zdravotnictví. Pro tento experiment byly proto vybrány takové polymery, které jsou ve zdravotnictví již používány. Na základě konzultací byly také vybrány konkrétní koncentrace a rozpouštědla, které se již dnes při zvlákňování samotných vrstev z PCL a PVA pro aplikace v medicíně (zejména na kryty ran) používají.

Jako první polymerní roztok byl zvolen PCL o koncentraci 16 hm. %. (Kuraray, Mn = 45 000, zakoupeno od Sigma-Aldrich). K vytvoření polymerního roztoku bylo použito rozpouštědlo tvořené chloroformem a nerozpouštědlem pro PCL v podobě etanolu. Hmotnostní poměr chloroformu k etanolu byl 8:2 (chloroform:etanol).

Druhý polymerní roztok byl zvolen PVA o koncentraci 10 hm. % (Kuraray, Mw = 125 000, stupeň hydrolyzy 98 mol%, s označením Mowiol 20-98). K vytvoření polymerního roztoku bylo použito rozpouštědlo tvořené destilovanou vodou a etanolem. Hmotnostní poměr vody a etanolu byl 8:2 (voda:etanol).

Pro experiment byl také použit polymerní roztok PVB o koncentraci 10 hm. % (Kuraray, Mowital B60H). Polymerní roztok PVB byl použit pouze při nastavování procesních parametrů pro elektrické zvlákňování z jehel. Vyrobena vlákenná vrstva PVB nebyla hodnocena ani porovnávána s ostatními vrstvami. Použití tohoto materiálu je zde

uvedeno, protože je zřejmé, že pro úvodní testy s různými sestavami jehlových zvlákňovacích elektrod pro výrobu směsových vlákných vrstev nebylo vhodné používat finančně náročnější polymerní materiály určené pro finální aplikace v medicíně. Na základě práce s PVB byly tedy nastaveny sklony jehel, odhadnuty vzdálenosti, výšky umístění jehel a kolektoru a tak dále. K mírným úpravám pak samozřejmě muselo dojít ještě při konkrétním úvodním zvlákňování PCL a PVA, ale nebyly to žádné zásadní změny nastavení tohoto procesu.

3.2 Metody výroby nanovlákných směsových vrstev

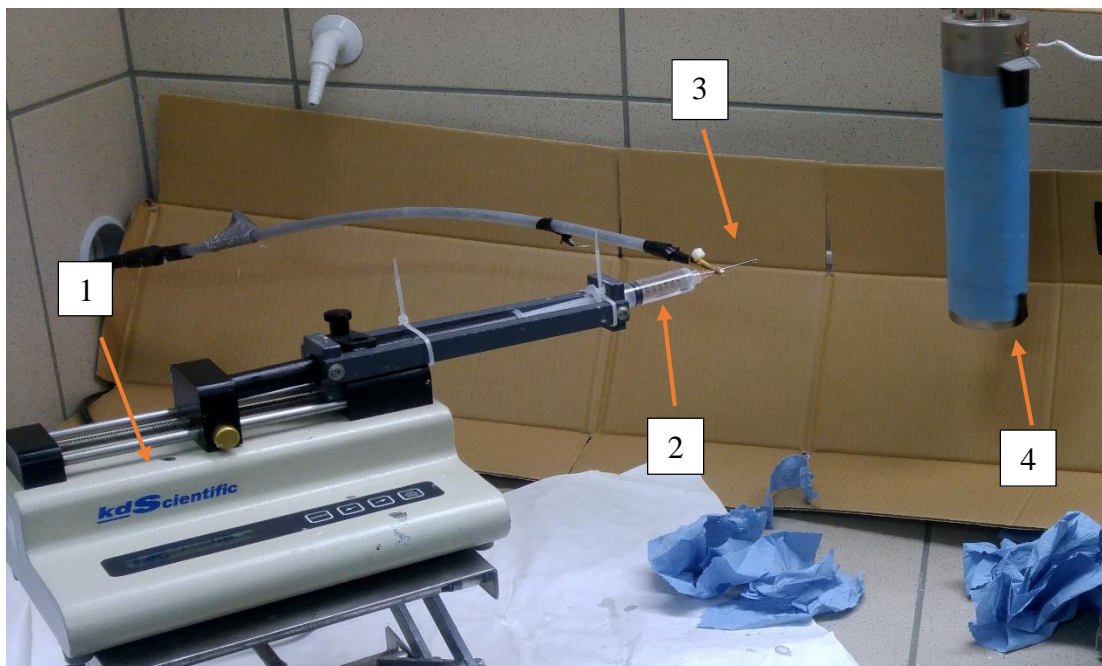
Pro výrobu vlákných materiálů byly použity technologie elektrického zvlákňování pomocí stejnosměrných zdrojů vysokého napětí. Materiály byly vyráběny jak na zařízení využívajícím jehlových zvlákňovacích elektrod tak na zařízení využívajícím strunové zvlákňovací elektrody.

Připravený polymerní roztok PVB o koncentraci 10 hm. %, byl použit pro seznámení se s procesními parametry u elektrického zvlákňování z jehel. Poznatky byly nadále využity pro správné nastavení procesních parametrů jehlového zvlákňování pro polymerní roztoky PCL o koncentraci 16 hm. % a PVA o koncentraci 10 hm. %. Experimenty probíhaly v laboratoři při teplotách v rozmezí 23 – 24 °C a relativních vlhkostí vzduchu 30 – 33 %.

3.2.1 Elektrické zvlákňování z jehel

Prvním úkolem této experimentální práce bylo sestavení zvlákňovacího zařízení. Podle literárního průzkumu, který je stručně popsán v kapitole 2.2 je zřejmé, že sestavení jehel mohlo být vedle sebe, proti sobě nebo pod úhlem. Aplikace jehel vedle sebe nebyla shledána vhodnou, protože muselo docházet k výraznému posunu kolektoru zachytávajícího vlákna podél jeho osy. Uspořádání jehel proti sobě možné bylo, ale neumožňovalo přímé mísení vláken před dopadem na kolektor, ale spíše vytváření vrstev jednotlivých materiálů. Z těchto důvodů byl vybrán postup výroby směsových vlákných vrstev pomocí dvou jehel pod určitým úhlem. Faktory ovlivňující proces elektrického zvlákňování z jehly mohou být například: průměry jehel, dávkování polymerního roztoku, velikost přiváděného napětí atd. (viz *Obrázek 25*). Nastavení

správných procesních parametrů je při výrobě směsovaných vláken náročnější, jelikož jsou zvlákňovány různé polymerní materiály o různých koncentracích, molekulových hmotností atd. Pro seznámení se s těmito faktory byl použit polymerní roztok PVB s koncentrací 10 hm. %. Tento roztok byl použit především z ekonomického hlediska, jelikož tento polymer je výrazně levnější než například PCL. Další důvodem pro zvolení tohoto polymerního materiálu, je jeho dobrá zvláknitelnost při použití elektrického zvlákňování.



Obrázek 25 Fotografie laboratorního jehlového zvlákňovacího zařízení složeného z dávkovacího zařízení (1), na kterém je umístěn zásobník polymerního roztoku s jehlovou zvlákňovací elektrodou (2). Na zvlákňovací elektrodě je přiveden zdroj stejnosměrného elektrického napětí (3). Uzemněný kolektor (4) tvoří rotační válcový buben s podkladovou netkanou textilií.

Pro seznámení se s těmito faktory byl použit polymerní roztok PVB s koncentrací 10 hm. %. Tento roztok byl použit především z ekonomického hlediska, jelikož tento polymer je výrazně levnější než například PCL. Další důvodem pro zvolení tohoto polymerního materiálu je jeho obecně známá velmi dobrá zvláknitelnost při použití elektrického zvlákňování.

Pro tento proces zvlákňování byly vybrány různé průměry zvlákňovacích elektrod. Zvlákňovací elektrody tvořily kovové jehly o průměrech 0,4; 0,6; 0,9; 1,2 mm, které byly kombinovány s různou rychlostí dávkování polymerního roztoku PVB a také s různou velikostí přiváděného elektrického napětí. Dávkovací rychlosti byly 0,5; 0,7; 1;

1,5 ml/hod. Přiváděné kladné elektrické napětí mělo hodnoty 13; 15; 17 a 20 kV DC. Vzdálenost zvlákňovacích elektrod od rotačního válcového kolektoru byla 15 cm. Zvlákňovací elektrody mezi sebou svíraly úhel 90°. Pro lepší představu je možné vidět uspořádání jehel na *Obrázku 26*. Rotační válcový kolektor tvořil plechový perforovaný buben o průměru 15 cm a délkou 35 cm, na kterém byla připevněna netkaná textilie typu spunbond. K válcovému kolektoru byl také připevněn zemnicí drát. Rychlost otáčení válcového kolektoru o průměru 15 cm byla 50 ot./min.. Kombinací výše zmíněných procesních parametrů byl zjišťován vliv na průběh elektrického zvlákňování a tyto poznatky nadále posloužily při výrobě směšovaných vláknenných vrstev PCL/PVA.

Z experimentů provedených s polymerním roztokem PVB o koncentraci 10 hm. % bylo následně vyřazeno použití jehel o průměru 0,4 a 0,6 mm. Malé průměry jehel nedokázaly v kombinaci s různou rychlostí dávkování a různou velikostí elektrického napětí vytvořit souvislý proud polymerního roztoku. Lze předpokládat, že tyto dva průměry jehel by při použití 16 % PCL nebyly schopné díky vyšší koncentraci roztoku PCL protlačit dostatečné množství polymerního roztoku na výrobu vláken. Stejný problém lze předpokládat i při použití polymerní roztoku PVA o koncentraci 10 hm. %, zde by mohlo dojít i k přetržení polymerních řetězců, díky vysoké molekulové hmotnosti PVA ($M_w = 125\ 000$).

Experiment provedený s polymerním roztokem PVB o koncentraci 10 hm. % také ukázal jako nevhodné použít dávkovací rychlosti 0,5 a 0,7 ml/hod. Tyto dávkovací rychlosti v kombinaci s větším průměrem jehel (1 a 1,2 mm) nejsou dostatečné, a dochází k přerušované tvorbě vláken. Vzhledem k velmi dobré zvlákňovatelnosti polymerních roztoků PCL a PVA, lze předpokládat, že tyto dávkovací rychlosti v kombinaci s většími průměry jehel, nejsou vhodné ani při zvlákňování těchto polymerních roztoků. Další poznatek získaný zvlákňováním polymerního roztoku PVB o koncentraci 10 hm. %, je poměrně široké rozpětí velikostí přiváděného elektrického napětí, při kterém jsou vytvářena vlákna. Polymerní roztok PVB zvlákňoval při velikostech kladného elektrického napětí 13, 15, 17 i 20 kV DC. Lze předpokládat, že polymerní roztoky PCL a PVA budou v tomto rozpětí hodnot zvlákňovat také. Nejvhodnější hodnota elektrického napětí, je závislá na konkrétních procesních i materiálových parametrech konkrétního polymerního roztoku.

K správnému nastavení procesních parametrů pro zvlákňování polymerních roztoků PCL a PVA byly využity poznatky získané při zvlákňování polymerního roztoku PVB. Polymerní roztoky PCL a PVA byly postupně zvlákňovány s pomocí kovových jehlových elektrod s průměry 0,9 a 1,2 mm. Dále byly tyto roztoky zvlákňovány s dávkovacími rychlostmi 1 a 1,5 ml/hod. Velikosti přiváděného elektrického napětí byly v rozmezí +13 až +20 kV DC. Vzdálenost zvlákňovacích elektrod od kolektoru byla 15 cm. Rychlost otáčení kolektoru o průměru 15 cm s připevněnou netkanou textilií typu spunbond byla 50 ot. /min..

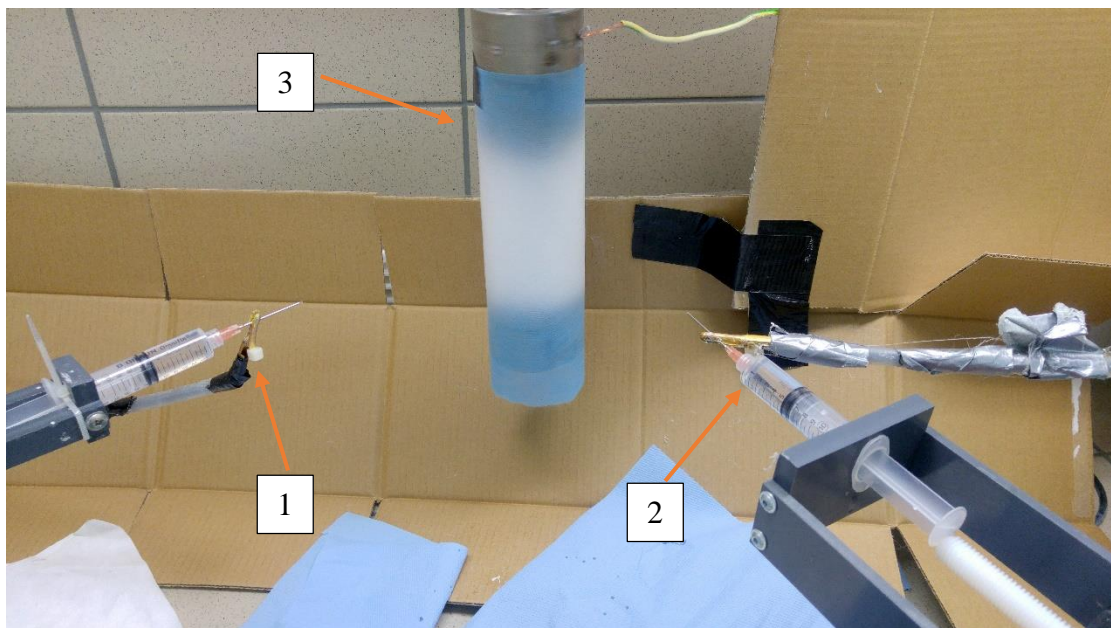
Polymerní roztok PCL o koncentraci 16 hm. % byl dobře zvlákňitelný jak s použitím jehly o průměru 0,9 mm, tak i 1,2 mm. Jako vhodné se ukázaly také obě dvě dávkovací rychlosti. Zvlákňování probíhalo vždy nejlépe při velikosti elektrického napětí +15 kV DC. Při zvlákňování nedocházelo k přerušování polymerního proudu a na kolektoru se nevytvářely žádné viditelné kapičky polymeru. Vzhledem k bezproblémovému průběhu zvlákňování byly vyzkoušeny vyšší dávkovací rychlosti. Polymerní roztok PCL bylo možné zvlákňovat i při dávkovací rychlosti 4 ml/hod. Toto zjištění nabízí další možnosti individualizace pro výrobu směsových vláken PCL/PVA. Díky širokému rozpětí dávkovacích rychlostí polymerního roztoku PCL bude možné vyrábět směsovou vláknennou vrstvu PCL/PVA s různým poměrem PCL:PVA.

Nastavení procesních parametrů u polymerního roztoku PVA o koncentraci 10 hm. % bylo oproti polymernímu roztoku PCL náročnější. Polymerní roztok PVA byl dobře zvlákňitelný s použitím jehel o průměru 0,9 mm i 1,2 mm, při dávkovací rychlosti do 1 ml/hod. S vyšší dávkovací rychlostí než 1 ml/hod., docházelo k odkapávání nezvlákňového polymerní roztoku ze špičky zvlákňovací elektrody. Při zvlákňování polymerního roztoku PVA bylo také nutné použít vyšší hodnotu elektrického napětí (+17 kV DC), než u polymerního roztoku PCL (+15 kV DC), z toho důvodu, aby docházelo ke kontinuální výrobě polymerní vláken a nedocházelo k odkapávání polymerního roztoku z konce zvlákňovací elektrody. V *tabulce 1* jsou shrnuty parametry pro výrobu vláknenných vrstev s použitím zvlákňovacích jehel.

Tabulka 1 Shrnutí nastavených parametrů pro výrobu vláknenných vrstev s použitím zvlákňovacích jehel.

Shrnutí parametrů pro zvlákňování z jehel						
Vláknenný vzorek	Ø jehly[mm]	Vzdálenost jehly od kolektoru [cm]	Úhel mezi jehlami [°]	El. napětí na jehle [kV]	El. Napětí na kolektoru [kV]	Dávkování [ml/hod.]
PCL	1,2	15	90	/	+15	0
PVA				/	+17	
PCL/PVA 1:1				PCL	+15	
				PVA	+17	
PCL/PVA 2:1				PCL	+15	
				PVA	+17	

Po správném nastavení procesních parametrů u polymerních roztoků PCL a PVA bylo možné přikročit k tvorbě směšové vláknenné vrstvy. Strojní zařízení tzv. dual-jet electrospinning (Obrázek 26) je složený z rotačního válcového kolektoru a dvou zvlákňovacích elektrod (jehel), které jsou umístěny vedle sebe pod úhlem (kapitola 2.2.1). Zde byla oproti zařízení popsanému v kapitole 2.2.1 provedena úprava. Každá zvlákňovací elektroda byla připevněna k vlastnímu zdroji vysokého napětí, nikoliv ke společnému. Tento způsob zapojení umožňuje v případě použití dvou různých polymerních roztoků nastavit nejvhodnější hodnotu elektrického napětí pro daný polymer.



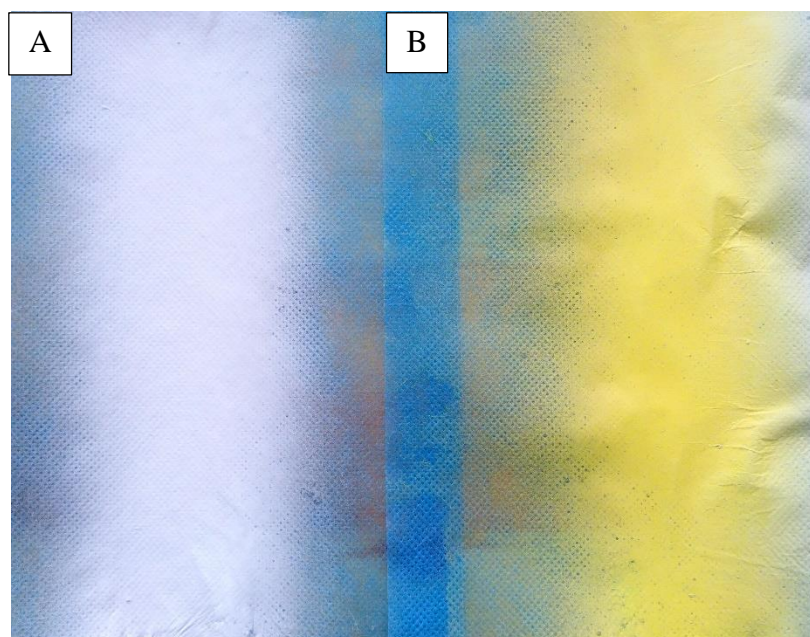
Obrázek 26 Fotografie dvou jehlového laboratorního zařízení tzv. dual-jet electrospinning. Dávkovací zařízení s připevněným polymerním zásobníkem, zakončeným jehlovou zvlákňovací elektrodou, na kterou je přiveden zdroj stejnosměrného elektrického napětí pro polymerní roztok PCL (1). Druhé zařízení, které je totožné, je umístěno pod úhlem 90° od prvního a slouží pro polymerní roztok PVA (2). Zvlákňování probíhá na společný uzemněný válcový kolektor s netkanou podkladovou textilií (3)

K zásobníku polymerního roztoku PCL o koncentraci 16 hm. % byla připevněna jehlová zvlákňovací elektroda o průměru 1,2 mm. S jehlovou elektrodou byl spojen zdroj elektrického napětí. Přiváděné elektrické napětí pro polymerní roztok PCL mělo velikost +15 kV DC. Druhý zásobník polymeru obsahoval polymerní roztok PVA o koncentraci 10 hm. % a připevněnou jehlovou elektrodou o průměru 1,2 mm. K jehlové elektrodě byl připevněn druhý zdroj elektrického napětí, aby bylo možné pro zvlákňování použít odlišnou hodnotu elektrického napětí. Velikost elektrického napětí pro polymerní roztok PVA byla +17 kV DC. Rychlost dávkování byla u obou polymerních zásobníků nastavena na hodnotě 1 ml/hod. (PCL/PVA = 1:1). Obě zvlákňovací elektrody svíraly vzájemný úhel 90° a byly umístěny ve vzdálenosti 15 cm od rotačního válcového kolektoru. Válcový kolektor s připevněnou netkanou textilií typu spunbond měl rychlost otáčení 50 ot. /min.. Zvlákňování probíhalo po dobu 45 minut, aby došlo k vytvoření dostatečně silné vlákněné vrstvy. Relativní vlhkost vzduchu v laboratoři byla 35 % při teplotě 23 °C. Vytvořená vlákněná vrstva neobsahovala žádné okem viditelné kapičky nezvlákněného polymerního roztoku. Během procesu zvlákňování docházelo k mísení vláken před dopadením vláken

na kolektor. Takto zvlákněný materiál bude dále v této práci označován jako PCL/PVA 1:1.

Dále byla vyrobena směšová vlákenná vrstva, která obsahovala větší množství polymerního roztoku PCL. Při výrobě této směšové vrstvy byla rychlost dávkování polymerního roztoku PCL nastavena na 2 ml/hod. a u polymerního roztoku PVA na 1 ml/hod. Tento materiál bude dále označován jako PCL/PVA 2:1. Ostatní procesní parametry (průměr jehel, vzdálenost od kolektoru atd.) zůstaly stejné jako při výrobě směšové vlákenné vrstvy obsahující poměr PCL/PVA 1:1.

Pro potřeby fluorescenční mikroskopie byly také vyrobeny směšové vlákenné vrstvy PCL/PVA 1:1 a 2:1 s přídavkem fluoresceinu. Před procesem zvláknování byla do polymerního roztoku PVA o koncentraci 10 hm. % při dána fluorescenční látka (FITC-Dextran, zakoupeno od Sigma-Aldrich) v množství 0,003 g/100 ml. Procesní parametry zvláknování zůstaly stejné, jako při výrobě směšových vlákenných vrstev bez použití fluoresceinu. Pro lepší porovnání a hodnocení vlákenné vrstvy, byly vyrobeny další dvě vlákenné vrstvy, přičemž první vlákenná vrstva byla vyrobena pouze z polymerního roztoku PCL o koncentraci 16 hm. % a druhá vlákenná vrstva pouze z polymerního roztoku PVA o koncentraci 10 hm. % (bez fluoresceinu). Vytvořené vlákenné vrstvy jsou znázorněny na *Obrázku 27*.



Obrázek 27 Fotografie směšové vlákenné vrstvy PCL/PVA bez přídavku fluoresceinu (A) a s přídavkem fluoresceinu (B)

Vytvořené směšové vláknenné vrstvy s přidavkem fluorescenční látky byly poté zkoumány s pomocí fluorescenční mikroskopie. Vláknenné vzorky bez obsahu fluorescenční látky byly zkoumány s pomocí elektronové rastrovací mikroskopie a následně porovnávány se vzorky vyrobenými na strunovém zvlákňovacím zařízení.

3.2.2 Elektrické zvlákňování ze strun

Zvlákňování polymerních roztoků PCL o koncentraci 16 hm. % a PVA o koncentraci 10 hm. % probíhalo na strunovém zvlákňovacím zařízení Nanospider-NS line 1WS500U. Toto strojní zařízení bylo pro účel výroby směšové vláknenné vrstvy upraveno Bc. Filipem Sanetrníkem KNT, FT, TUL. Zvlákňovací elektroda byla upravena z původní jednostrunné s jedním pojízdňým dávkovacím zařízením, na dvou strunnou s využitím dvou pojízdňých dávkovacích zařízení na průvlaky viz *Obrázek 28*.



Obrázek 28 Fotografie zachycující upravené strunové zvlákňovací zařízení, které je složeno ze dvou zvlákňovacích strun (1) a dvou pojízdňých zásobníků polymeru s průvlaky (2)

Obě tato dávkovací zařízení se pohybují společně a se stejnou rychlostí. Množství nanášeného polymerního roztoku je možné řídit velikostí průvlaku, skrze který je polymerní roztok dávkován při pohybu dávkovacího zařízení na danou strunu. Vzdálenost mezi strunami byla experimentálně odhadnuta tak, aby se jejich rozmístění vešlo do zvlákňovacího prostoru a zároveň aby se struny vzájemně co nejméně elektricky ovlivňovaly. Tato vzdálenost je neměnná. Nabíjení obou strun je prováděno jedním stejnosměrným zdrojem elektrického napětí, není tedy možné měnit elektrické napětí pro jednotlivé struny. Parametry zvlákňovacího zařízení jsou následující: délka zvlákňovací elektrody 50 cm, maximální napětí pro zvlákňovací elektrodu + 60 kV DC, maximální napětí pro sběrnou elektrodu negativní tedy kolektor - 40 kV DC, maximální rozdíl potenciálů 100 kV DC.

Výroba směšové vlákně vrstvy PCL/PVA probíhala s následujícími procesními parametry. Zvlákňovací elektrody (struny) s průměrem 0,4 mm. Vzdálenost mezi strunami 20 cm. Vzdálenost strun od podkladové netkané textilie a tedy od kolektoru 18 cm. Relativní vlhkost vzduchu uvnitř zvlákňovacího zařízení byla nastavena na 50 %, při teplotě 22 °C, což bylo nutné pro zvlákňování PVA. Pro PCL takto vysoká vzdušná vlhkost není vhodná, ale ve zvlákňovacím prostoru není možné individuálně upravovat teplotu a vlhkost vzduchu pro jednotlivé zvlákňovací roztoky při směšovém elektrickém zvlákňování. Je tedy nutné přistoupit ke kompromisu. Kolektor byl nabíjen elektrickým napětím o velikosti -40 kV DC a struny byly nabíjeny elektrickým napětím +32 kV DC. Odtah podkladové netkané textilie na kolektoru probíhal rychlostí 10 m/min. Průměr průvlaku na dávkovacím zařízení pro PCL o koncentraci 16 hm. % byl 0,6 mm a na dávkovacím zařízení pro PVA o koncentraci 10 hm. % byl průměr průvlaku 0,9 mm. Vzorek směšové vlákně vrstvy PCL/PVA byl vyráběn ve dvou vrstvách na sebe. Pro porovnání byla také vyrobena vlákně vrstva tvořená pouze polymerním roztokem PCL o koncentraci 16 hm. % a vlákně vrstva tvořená pouze polymerním roztokem PVA o koncentraci 10 hm. % a to vše při stejných nastaveních procesních parametrů. Dále byla také vyrobena vlákně vrstva PCL/PVA s přídavkem fluoresceinu (0,003 g/100 ml), který byl obsažen v polymerním roztoku PVA. Vyrobené vlákně vzorky byly následně zkoumány rastrovacím elektronovým mikroskopem a fluorescenčním mikroskopem a výsledky byly porovnávány se vzorky vyrobenými na jehlovém zvlákňovacím zařízení. Vzorky vyrobené strunovým zvlákňovacím zařízením byly použity pro testování buněčné

viability tzv. MTT test. V *tabulce 2* jsou shrnuty parametry pro výrobu vláknenných vrstev s použitím zvlákňovacích strun.

Tabulka 2 Shrnutí nastavených parametrů pro výrobu vláknenných vrstev s použitím zvlákňovacích strun.

Shrnutí parametrů pro zvlákňování ze strun							
Vláknenný vzorek	Ø struny [mm]	Vzdálenost strun od kolektoru [cm]	Vzdálenost mezi strunami [cm]	El. napětí na struně [kV]	El. napětí na kolektoru [kV]	Průměr průvlastku na dávkovacím zařízení [mm]	
PCL	0,4	18	20	+32	-40	0,6	
PVA						0,9	
PCL/PVA						PCL	0,6
						PVA	0,9

3.3 Metody charakterizace vyrobených vláknenných vrstev

Pro charakterizaci vyrobených vláknenných vrstev byly využity nejen zobrazovací techniky jako rastrovací elektronová a fluorescenční mikroskopie, ale byly provedeny testy smáčitelnosti, tedy pokus o hodnocení kontaktních úhlů a zejména základní *in-vitro* testování.

3.3.1 Základní *In-vitro* testování

Vzhledem k možnému budoucímu využití směšové vláknenné vrstvy PCL/PVA ve zdravotnictví, bylo na této směšové vláknenné vrstvě provedeno *in-vitro* testování s 3T3 fibroblasty. Testování *in-vitro* bylo prováděno na vzorcích vláknenné směsi tvořené kombinací polymerních roztoků PCL/PVA, vyrobených technologií strunového elektrického zvlákňování. Jako kontrolní materiály pro *in-vitro* testování byly použity vláknenné vzorky tvořené pouze polymerním roztokem PCL anebo PVA. *In-vitro* test probíhal v biologické laboratoři KNT, FT, TUL po dobu 14 dnů. Testy byly prováděny 1, 3, 7 a 14 den od nasazení buněčné linie na testovaný materiál. Každý testovací den zahrnoval přípravu a vyhodnocení MTT testu, ale také přípravu vzorků na fluorescenční mikroskopii a rastrovací elektronovou mikroskopii, které jsou s MTT testováním spojeny.

V následujících kapitolách budou popsány přípravy vzorků a výroba buněčné suspenze, přípravy MTT testu a sním spojeny fluorescenční a rastrovací elektronové mikroskopie.

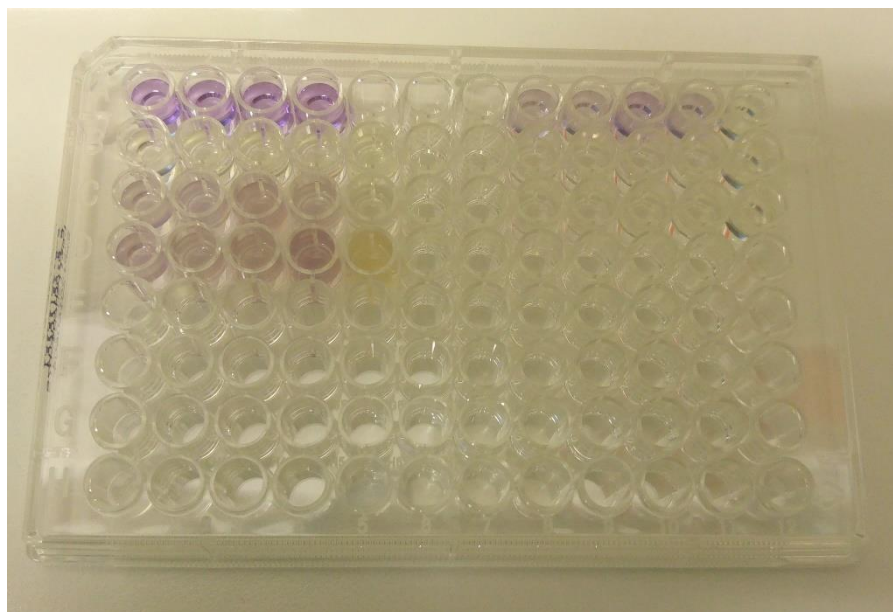
V následujících odstavcích bude popsána příprava vzorků pro *in-vitro* testování a příprava buněčné suspenze. K testování byla použita buněčná linie 3T3 (myší fibroblasty) ve 4. pasáži. Před samotným testováním bylo potřeba nastříhat vzorky a připravit je do jamek kultivační destičky k nasazení buněčné suspenze. K testu byly použity 24 jamkové kultivační destičky. Od každého druhu materiálu bylo vystřiženo 40 kruhových vzorků o průměru 1,5 cm. Pro každý testovací den byly pro MTT test použity od každého testovaného materiálu 4 vzorky pro osazení buněk a 1 vzorek bez nasazených buněk (negativní kontrola), dále byly použity 2 vzorky pro fluorescenční mikroskopii a jeden vzorek pro elektronovou rastrovací mikroskopii. Všechny vzorky byly před nasazením do kultivační destičky sterilizovány etylenoxidem při teplotě 37 °C ve sterilizačním zařízení Anprolene AN 74i (Andersen) po dobu 12 hodin. Poté byly za sterilních podmínek v laminárním boxu vzorky vyndány a roztříděny pro jednotlivé testovací dny a následně byly vzorky umístěny do jamek kultivačních destiček. Na vzorky byla položena kulatá skleněná závaží, aby vzorky po přidání buněčné suspenze neplavaly.

Poté byla připravena buněčná suspenze složená z buněčné linie 3T3 a média DMEM. Nejdříve bylo z kultivační lahvičky obsahující 3T3 fibroblasty odsáto médium. Následně byl přidán PBS (*Phosphate Buffered Saline*) pufr, kterým byly buňky opláchnuty. Po opláchnutí byl pufr z lahvičky zpětně odsát a byl přidán 0,25 % roztok trypsinu v objemu 1 ml. Trypsin byl co nejrychleji odsát a znovu byl přidán trypsin o stejném objemu. Kultivační lahvička byla následně umístěna na 5 minut do termostatu s nastavenou teplotou na 37 °C. Trypsin rozštěpí proteiny, pomocí kterých jsou buňky adharovány na dně kultivační lahvičky a tím dojde k uvolnění buněk ode dna kultivační lahvičky do média. Po 5 minutách byla lahvička vyndána z termostatu a umístěna pod mikroskop, kde bylo zkoumáno, zda se buňky uvolnily ze dna lahvičky. Z lahvičky byl po důkladném resuspendování uvolněných buněk odebrán vzorek buněčné linie, který byl umístěn na speciální podložní sklíčko a byl vložen do počítačícího zařízení Luna automatic cell counter. Na tomto zařízení byl spočítán počet buněk na mililitr. Buňky byly následně naředěny médiem DMEM na výslednou koncentraci 10^4 buněk/ml.

Buněčná suspenze byla následně přidána v množství 1 ml do jamek kultivační destičky, s připravenými vzorky vlákných materiálů. Jedna jamka obsahující testovaný

vzorek od každého materiálu, byla ponechána bez buněčné suspenze. Do těchto jamek bylo přidáno pouze médium DMEM a tyto jamky sloužily jako negativní kontrola. Zároveň byla buněčná suspenze umístěna i do 4 jamek, které neobsahovaly vzorky. Tyto jamky obsahující pouze buněčnou suspenzi bez vzorku materiálu slouží jako pozitivní kontrola. Takto připravené destičky byly umístěny do inkubátoru nastaveného na teplotu 37 °C a obsah CO₂ na 5 %. Destičky zde byly ponechány do jednotlivých testovacích dnů.

Pro vlastní MTT test byla potřeba namíchat testovací roztok v poměru 1:3 (roztok MTT:médium) o celkovém množství 40 ml. Do prázdných jamek kultivační destičky bylo přidáno vždy po jednom mililitru namíchaného testovacího roztoku. Do takto připravených jamek byly přeneseny vzorky pro MTT testování. Nejdříve byly přeneseny kontrolní vzorky bez buněk a poté vzorky s buňkami. Testovací roztok MTT byl také přidán do jamek, ze kterých byl vyjmut vzorek PVA. Toto testování v jamkách PVA bylo provedeno z toho důvodu, že PVA je silně hydrofilní a testovaný vzorek PVA po nanesení buněčné suspenze ztratil svůj tvar a buňky rostly převážně na dně kultivační jamky. Dále bylo u jamek pozitivní kontroly (bez testovaného materiálu) odsáto médium a byl přidán testovací roztok. Takto připravené vzorky byly vloženy do inkubátoru s obsahem CO₂ 5 % a teplotou 37 °C, na 3 hodiny. Destičky byly poté vyjmuty z inkubátoru a z jamek byl odsát testovací roztok. Do jamek bylo následně přidáno 500 µl okyseleného izopropanolu (IPA), který rozpustil vytvořené krystalky formazanu. Rozpuštěné krystalky formazanu byly přepipetovány do 1,5 ml mikrozumavky a mikrozumavky byly umístěny do laboratorního odstředivého zařízení. Odstředění probíhalo při 6 000 ot. /min. po dobu přibližně 2 minut. Odstředěním se na dně mikrozumavky zachytily nečistoty a popř. i rozpuštěné kousky testovaného vzorku. Poté bylo z mikrozumavek od každého vzorku přeneseno 200 µl na 96 jamkovou destičku (Obrázek 29). Destička byla vložena do spektrofotometru Spark® Tecan, který změřil absorbanci roztoku při vlnové délce 570 nm a 650 nm. Absorbance odpovídá koncentraci vznikajícího produktu a tím tedy metabolické aktivitě (viabilitě) testovaných buněk. Získaná data byla statisticky vyhodnocena a zpracována do grafu.



Obrázek 29 Fotografie 96 jamkové destičky s rozpuštěnými krystalky formazanu

Dalším krokem byla příprava vzorků a barviv pro fluorescenční mikroskopii. K fluorescenční mikroskopii byla použita barviva DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol), PI (propidium jodid) a také Phalloidine-FITC. Do čistých jamek byl napipetován 2,5 % roztok glutaraldehydu v PBS pufru v množství přibližně 1 ml. Tento roztok slouží k fixaci buněk. Testované vzorky byly 2x opláchnuty pomocí PBS a poté byly přeneseny do jamek s roztokem glutaraldehydu. Takto připravené vzorky byly inkubovány při teplotě 4 °C po dobu 10 minut.

Poté byl roztok glutaraldehydu odsát a vzorky určené pro testování na fluorescenční mikroskopii barvivem DAPI/Phalloidine-FITC byly 2x propláchnuty v PBS. Poté bylo PBS odsáto a ke vzorkům bylo přidáno 500 μ l roztoku BSA/Triton, aby došlo k permeabilizaci buněk při pokojové teplotě. Roztok BSA/Triton byl složen z 10 ml PBS + 0,01 g BSA (bovine serum albumine) + 10 μ l Tritonu X-100. Po 5 minutách byl roztok BSA/Triton odsát a vzorky byly znovu 2x propláchnuty v PBS. PBS bylo odsáto a bylo přidáno 500 μ l roztoku BSA/Phalloidin-FITC. Roztok BSA/Phalloidin-FITC byl připraven z namíchaného roztoku BSA/Triton tak, že tento roztok byl naředěn v poměru 1:1000 s použitím phalloidinu-FITC. Vzorky v kultivační destičce s roztokem BSA/Phalloidin-FITC byly zabaleny do alobalu a ponechány při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Po uplynutí 30 minut byl roztok BSA/Phalloidin-FITC odsát a vzorky byly znovu 2x propláchnuty v PBS. PBS bylo odsáto a následně bylo přidáno 500 μ l

fluorescenčního barviva DAPI. Vzorky v kultivační destičce byly znovu zabaleny do alobalu a ponechány po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Poté bylo fluorescenční barvivo odsáto a vzorky byly znovu opláchnuty 2x v PBS. Po opláchnutí bylo PBS ponecháno v jamkách a kultivační destička se vzorky byla zabalena do alobalu a byla umístěna do lednice až do začátku analýzy na fluorescenčním mikroskopu s UV filtrem (DAPI) a modrým filtrem (Phalloidine-FITC). Snímky byly následně zpracovány v programu NIS Elements AR.

U vzorků určených pro testování na fluorescenčním mikroskopu s barvivem PI byl nejdříve odsát fixační roztok. Vzorky byly následně 2x propláchnuty v PBS. Po propláchnutí a odsátí PBS byla přidána fluorescenční látka PI v množství 500 μ l. Kultivační destička se vzorky byla zabalena do alobalu a ponechána po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Poté byly vzorky opět 2x propláchnuty v PBS. Po opláchnutí bylo PBS ponecháno v jamkách a kultivační destička se vzorky byla zabalen do alobalu a umístěna do lednice až do začátku analýzy na fluorescenčním mikroskopu se zeleným filtrem. Snímky byly opět zpracovány v programu NIS Elements AR.

Vzorky určené pro elektronovou rastrovací mikroskopii bylo potřeba také nejdříve zafixovat. Do čistých jamek byl napipetován 1 ml 2,5 % roztoku glutaraldehydu v PBS pufru. Vzorky byly 2x propláchnuty v PBS a poté byly umístěny do jamek obsahující roztok glutaraldehydu. Destička se vzorky byla inkubována při teplotě 4 °C po dobu 10 minut. Poté byl roztok glutaraldehydu odsát a vzorky byly znovu 2x propláchnuty v PBS. Vzorky pro elektronovou rastrovací mikroskopii bylo potřeba důkladně vysušit. K vysušení byla použita vzestupná koncentrační řada etanolu (60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 % a 100 % etanol). Vzorky byly postupně promývány od 60 % etanolu, až po 100 %. Každý vzorek byl v určité koncentraci etanolu ponechán po dobu alespoň 5 minut a poté byl etanol odsát a přidán nový s větší koncentrací. Po vymytí v 100 % etanolu, byly vzorky vyjmuty z destičky a byly umístěny na parafilm, aby nedošlo k přilepení vzorků na destičku. Usušené vzorky byly rozstříhány a nalepeny na terčík. Vzorky na terčíku byly následně pozlaceny 10 nm vrstvou zlata a poté vloženy do elektronového rastrovacího mikroskopu VEGA 3SB Easy Probe od firmy TESCAN, kde bylo sledováno rozprostření buněk.

3.3.2 Dynamika průniku kapaliny do vzorků

K sledování dynamiky průniku kapaliny do vyrobených vlákných vrstev byl použit přístroj Avex Instruments See System. K měření byly použity vzorky vlákné vrstvy vyrobené z polymerního roztoku PCL a PVA strunovým elektrickým zvlákňováním. Dále bylo měření prováděno také na vlákné směsi PCL/PVA vyrobené strunovým elektrickým zvlákňováním a jehlovým elektrickým zvlákňováním. K měření byla použita destilovaná voda, která byla na testované vzorky nanášena v kapkách o objemu 10 μ l. Po nanesení kapky na testovaný materiál byl měřen čas, během kterého byla kapka vsáknuta do testovaného vzorku. Měření bylo provedeno 3x u každého vzorku. Pokud do materiálu kapka neproniká, je možné ze získaných snímků odhadnout hodnotu kontaktního úhlu.

3.3.3 Obrazová analýza

Pro všechny vzorky jak ze zvlákňování z jehel, tak pro vzorky zvlákněné ze strun byly získány snímky z rastrovacího elektronového mikroskopu. Snímky byly vždy ze čtyř různých míst a byly snímány při několika různých zvětšeních. Základní příprava vzorků spočívala ve vytipování vhodného místa z celkové plochy vzorku, následně vystřížení vzorku o rozměrech přibližně 5x5 mm, následně došlo k nalepení vzorku na držák pomocí oboustranné lepicí pásky. Pro rastrovací elektronový mikroskop je nutné na povrchu vzorku zvýšit elektrickou vodivost, proto došlo k povrstvení vzorku tenkou vrstvou zlata. K získání těchto snímků byl použit mikroskop VEGA 3SB Easy Probe od firmy TESCAN. Pro pozorování a získávání snímků vzorků obsahujících fluorescenční látky pod fluorescenčním mikroskopem byl použit mikroskop Nikon Eclipse Ti. Pro následné proměření průměrů vláken bylo pomocí softwaru FIJI změřeno vždy 100 náhodně vybraných průměrů vláken na jednotlivých snímcích od každého testovaného vzorku. Následné zpracování výsledků probíhalo standartními základními statistickými hodnoceními.

4. Výsledky

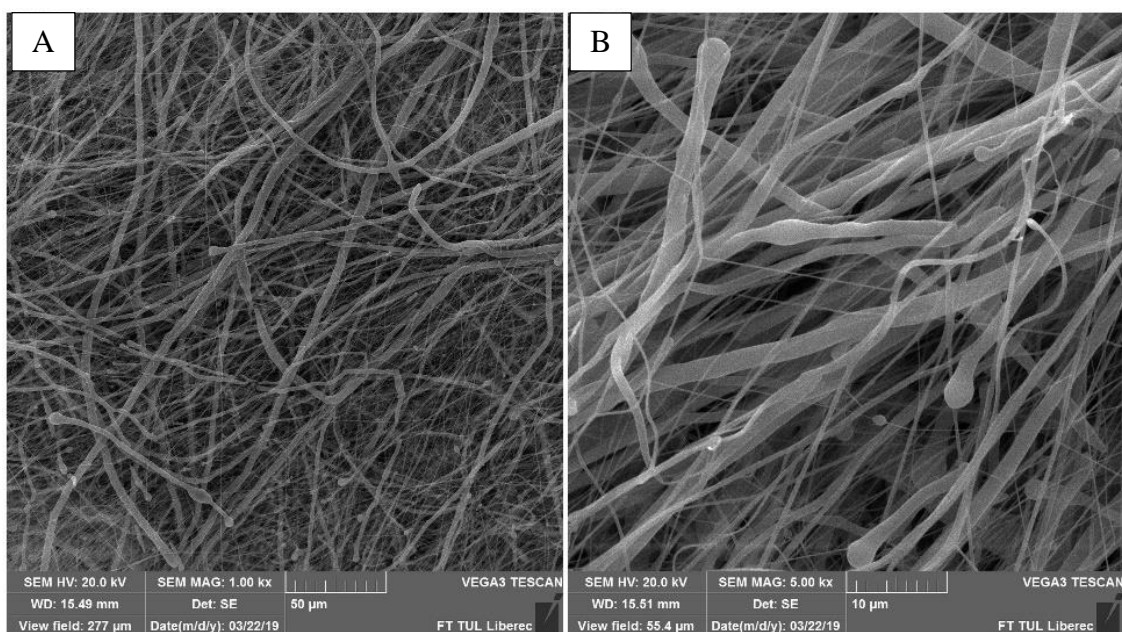
V této části diplomové práce budou zpracovány obrázky a data, která byla získána při výrobě a následném testování vlákněných vrstev.

4.1 Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM)

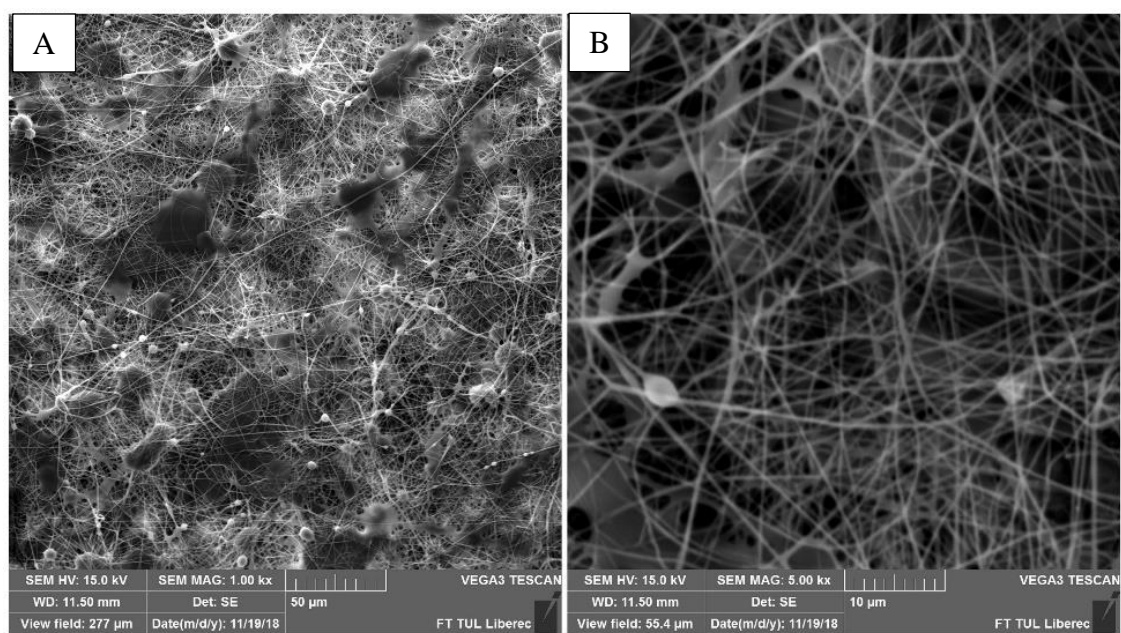
Všechny vlákněné vrstvy vyrobené jak elektrickým zvlákňováním z jehel, tak strunovým elektrickým zvlákňováním, byly zkoumány pomocí elektronové rastrovací mikroskopie. U každého vzorku bylo vytvořeno více snímků s různým zvětšením. Vytvořené snímky posloužily také pro měření průměrů vláken, které bylo realizováno s použitím softwarového programu Fiji.

- **SEM snímky vzorků vytvořených elektrickým zvlákňováním z jehel**

Vlákněná vrstva PCL vyrobená elektrickým zvlákňováním z jehel (*Obrázek 30*) je tvořena převážně vlákny o větším průměru. Ve vrstvě jsou ale také obsažena vlákna s průměrem výrazně menším. Tato rozdílnost průměrů vláken je zřejmě způsobena použitím rozpouštědla (chloroformem) a nerozpouštědla (etanol) při přípravě polymerního roztoku PCL. Při zvlákňování zřejmě dochází k mírné fázové separaci díky rozdílnosti rozpouštědel a tím lze vysvětlit, že z částí ve kterých byl obsažen převážně chloroform, vznikají vlákna větších průměrů. Chloroform se rychle odpaří a díky tomu se vlákna nestihnou dostatečně dloužit. Vlákna menších průměrů jsou pak zvlákňována z oblastí s větším obsahem etanolu. Etanol se odpařuje pomaleji a vlákna mají více času na dloužení. Rychlost odpařování souvisí s tenzí par a z hodnot pro chloroform a etanol je jasné, že chloroform má tendenci se odpařovat rychleji (tenze par při 20 °C: chloroform – 231 kPa [55]; etanol – 5,95 kPa [56]).



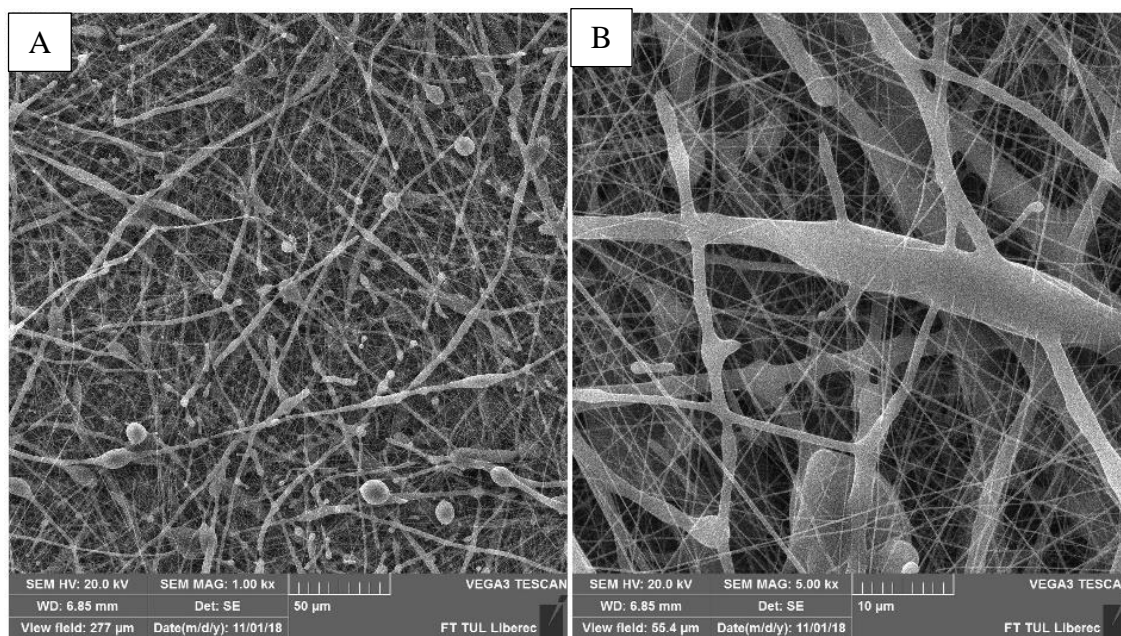
Obrázek 30 Snímky SEM vlákenné vrstvy PCL vyrobené elektrickým zvlákněním z jehel. A) Měřítko 50µm B) Měřítko 10µm



Obrázek 31 Snímky SEM vlákenné vrstvy PVA vyrobené elektrickým zvlákněním z jehel. A) Měřítko 50µm B) Měřítko 10µm

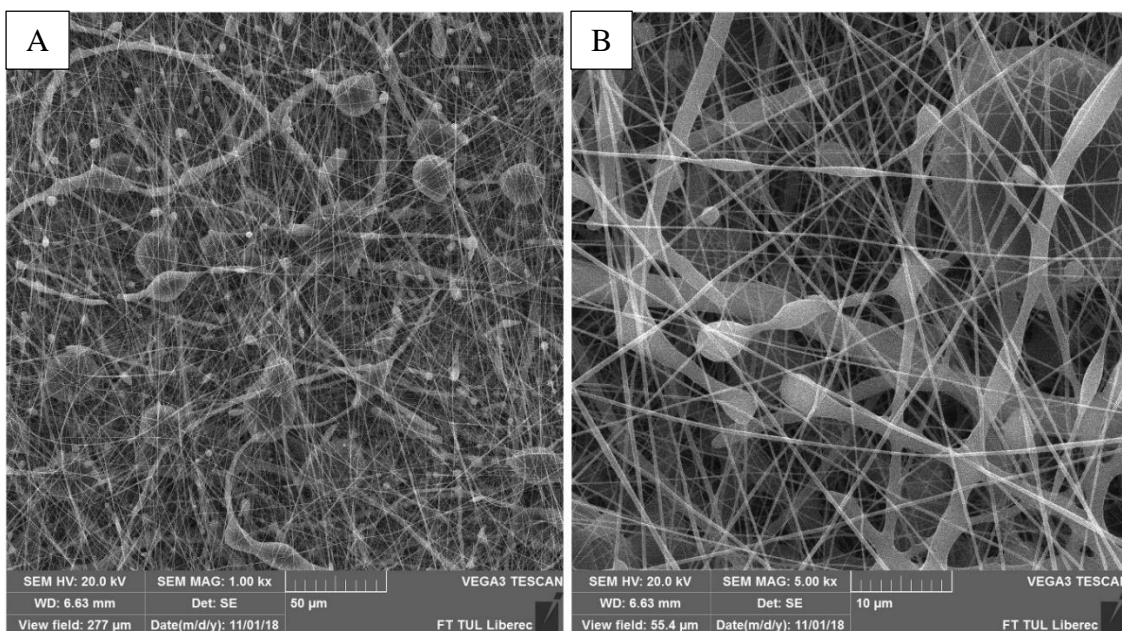
Na SEM snímcích vlákenné vrstvy PVA vyrobené elektrickým zvlákněním z jehel (Obrázek 31) je možné sledovat strukturu vlákenné vrstvy. Vlákenná vrstva je tvořena z vláken s náhodnou orientací a výrazně menšími průměry vláken, než u samotného PCL z jehel. Na některých vláknech je patrný defekt v podobě náhlé změny

tvary vláknů do tvaru kapky. Tento defekt je pro zvláknění polymerního roztoku PVA z roztoku obsahujícího vodu typický. Jedná se o defekty způsobené tzv. Rayleighovou nestabilitou a ta je řízena povrchovým napětím, které má destilovaná voda největší z použitých rozpouštědel v této diplomové práci (povrchové napětí při 20 °C: destilovaná voda – 72,75 mN/m; etanol – 22,55 mN/m [57]).



Obrázek 32 Snímky SEM směsové vlákněné vrstvy PCL/PVA (1:1) vyrobené elektrickým zvlákněním z jehel. A) Měřítko 50µm B) Měřítko 10µm

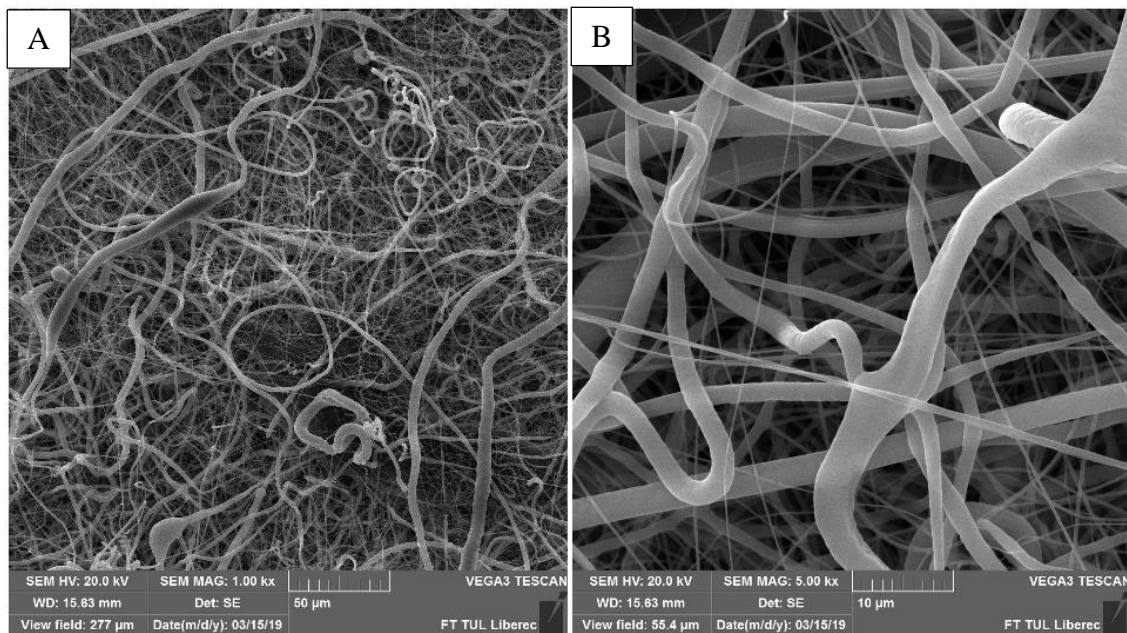
U SEM snímků směsové vlákněné vrstvy PCL/PVA (1:1) vyrobené elektrickým zvlákněním z jehel (Obrázek 32) je možné sledovat různorodost vlákněné vrstvy. Vlákněná vrstva je z části tvořena silnými vlákny, která mají nestálý tvar a průměr, a z části je tvořena tenkými vlákny bez větších defektů. Je možné se domnívat na základě znalosti jednotlivých samostatně zvlákněných vrstev PCL a PVA, že vlákna větších průměrů jsou převážně tvořena polykaprolaktonem a vlákna menších průměrů jsou tvořena převážně polyvinylalkoholem. U vláken větších průměrů (PCL) je vidět mnoho defektů, které ovšem nejsou pro použití ve zdravotnictví výrazně podstatné. PCL vlákna ve směsi slouží pouze ke zpevnění vlákněné vrstvy a k zvýšení hydrofobnosti (snížení hydrofilnosti – tedy dosažení optimálních charakteristik ve vztahu ke kontaktu s vodou. Defektům by bylo možné předejít s upravením procesních podmínek, například změnou teploty a vlhkosti vzduchu, avšak pak by zřejmě bylo možné očekávat zhoršení morfologie či samotného procesu zvlákněování.



Obrázek 33 Snímky SEM směsové vlákenné vrstvy PCL/PVA (2:1) vyrobené elektrickým zvlákněním z jehel. A) Měřítka 50µm B) Měřítka 10µm

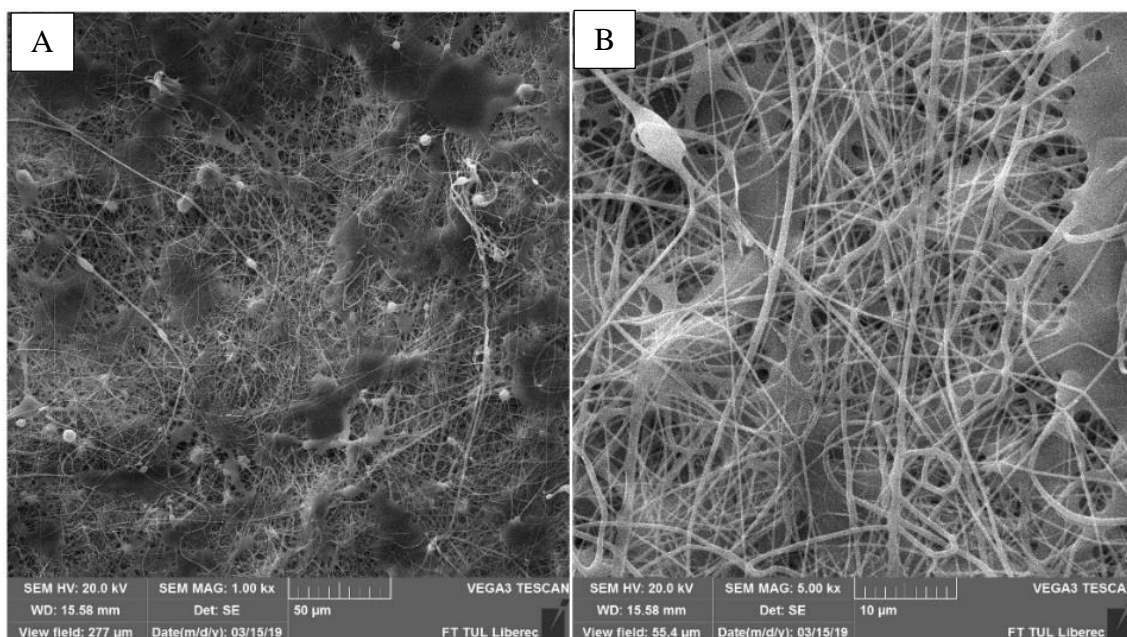
Na *Obrázku 33* je znázorněna směsová vlákenná vrstva PCL/PVA 2:1. Z obrázku je patrné, že vlákenná směs obsahuje velké množství defektů, tvořených převážně kapičkami nezvlákněného polymerního roztoku. Na základě zkušeností se zvlákněním samotných polymerních roztoků PCL a PVA lze předpokládat, že jsou tyto defekty tvořeny převážně díky polykaprolaktonu. Těmto defektům by šlo stejně jako v případě vlákenné vrstvy PCL/PVA 1:1 předejít změnou procesních podmínek.

- SEM snímky vzorků vytvořených strunovým elektrickým zvlákňováním



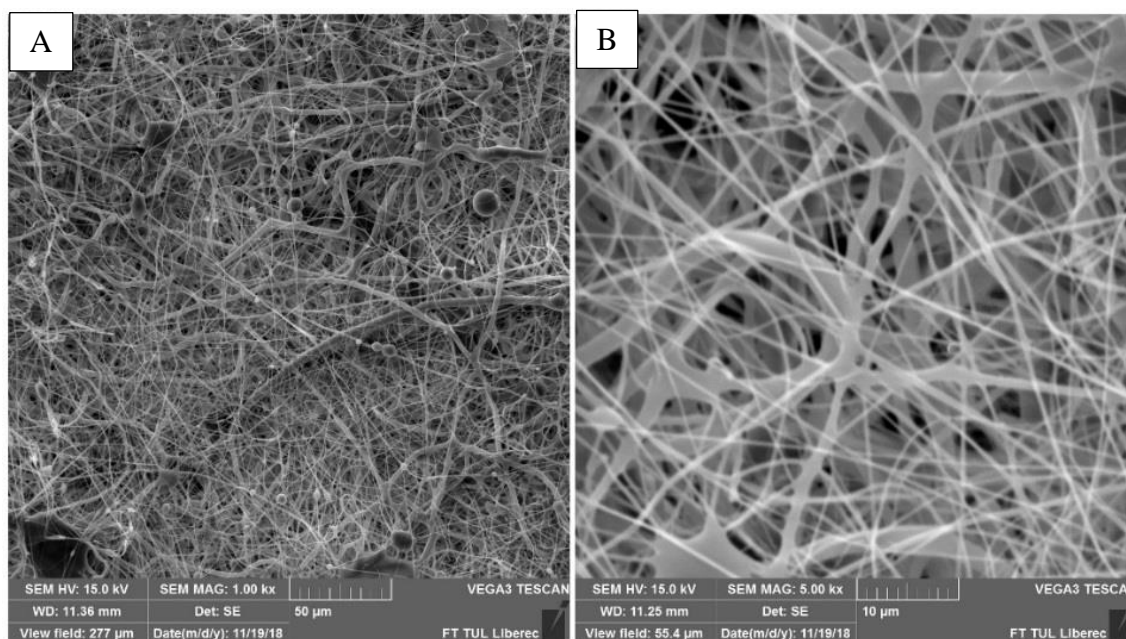
Obrázek 34 Snímky SEM vlákenné vrstvy PCL, vyrobené strunovým elektrickým zvlákňováním. A) Měřítko 50µm B) Měřítko 10µm

Vlákenná vrstva vyrobená z polymerního roztoku PCL strunovým elektrickým zvlákňováním (Obrázek 34) je tvořena převážně vlákny o větším průměru. Ve vrstvě jsou ale také obsažena vlákna s průměrem výrazně menším. Tato rozdílnost průměrů vláken je způsobena opět přítomností rozpouštědla a nerozpouštědla v roztoku PCL, ze kterého byla vlákenná vrstva vyrobena.



Obrázek 35 Snímky SEM vlákněné vrstvy PVA, vyrobené strunovým elektrickým zvlákňováním. A) Měřítko 50µm B) Měřítko 10µm

Vlákněná vrstva PVA vyrobená strunovým elektrickým zvlákňováním, která je zachycena na SEM snímku (Obrázek 35), je složena z vláken o malém průměru s občasnými defekty, které jsou pro zvlákňování polymerního roztoku PVA typické. K tvorbě defektů docházelo i přesto, že výroba vlákněné vrstvy probíhala při zvýšené relativní vlhkosti vzduchu (50 %). Při zvlákňování PVA mimo aplikace v medicíně je možné pracovat s dalším snížením povrchového napětí roztoku přidáním různých povrchově aktivních látek. Dále je možné v těchto případech ovlivňovat elektrickou vodivost přísady například různých solí atd. Bohužel pro aplikaci v medicíně, kam materiály v této diplomové práci směřují, nemohou být přísady povrchově aktivních látek ani solí obsaženy.



Obrázek 36 Snímky SEM směsové vláknenné vrstvy PCL/PVA, vyrobené strunovým elektrickým zvlákňováním. A) Měřítko 50µm B) Měřítko 10µm

Směsová vláknenná vrstva PCL/PVA vyrobená strunovým elektrickým zvlákňováním zachycená na SEM snímku (*Obrázek 36*) se vyznačuje malým množstvím defektů. Polymerní vlákna PCL mají větší průměry a nepravidelný tvar. Polymerní vlákna PVA mají menší průměry a vlákna mají pravidelný tvar.

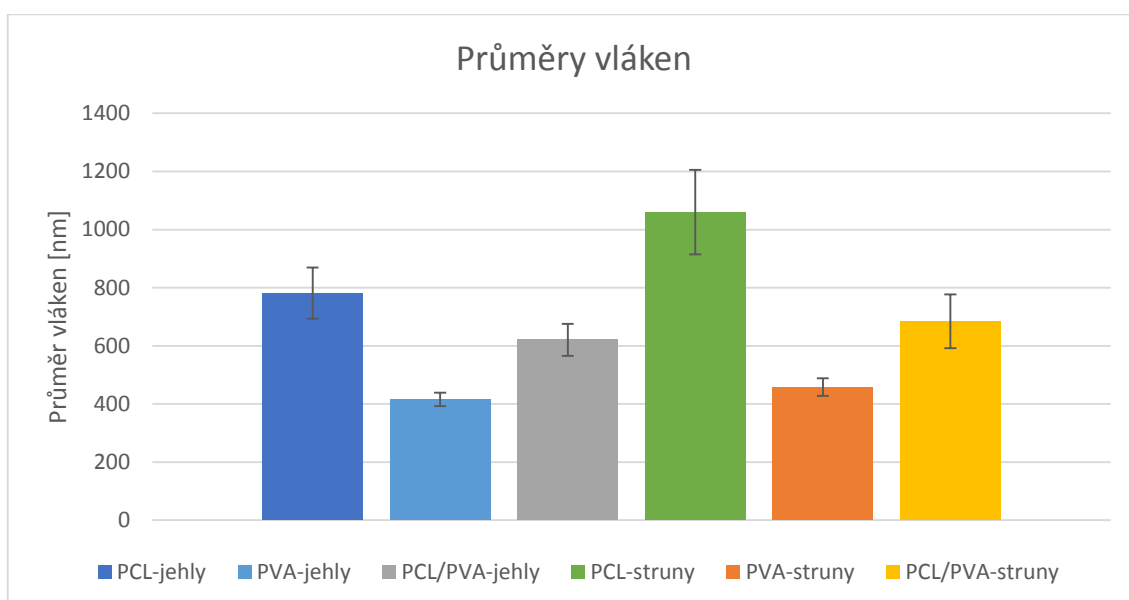
- **Porovnání směsové vláknenné vrstvy PCL/PVA vyrobené elektrickým zvlákňováním a strunovým elektrickým zvlákňováním.**

Při porovnání směsové vláknenné vrstvy PCL/PVA vyrobené jehlovým elektrickým zvlákňováním a strunovým elektrickým zvlákňováním (viz *Obrázek 32 a 36*) je na první pohled vidět znatelný rozdíl ve struktuře. Směsová vláknenná vrstva vyrobená jehlovým elektrickým zvlákňováním obsahuje mnoho defektů ve formě kapek a krátkých válcovitých úseků. Oproti tomu směsová vláknenná vrstva vyrobená strunovým elektrickým zvlákňováním neobsahuje téměř žádné defekty. Toto může být zapříčiněno procesními parametry, konkrétně relativní vzdušnou vlhkostí, která byla u strunového elektrického zvlákňování větší (50 % oproti 30 %). Rozdíl je patrný také u průměrů vláken. U elektrického zvlákňování z jehly je možné vidět markantní rozdíl v průměru mezi vlákny s menším a větším průměrem. Lze předpokládat, že vlákna s malým průměrem jsou vyrobena převážně z polymerního roztoku PVA a vlákna s velkým průměrem z polymerního roztoku PCL. U strunového elektrického zvlákňování není

rozdíl v průměru vláken tolik markantní a ze snímku lze těžko odhadnout, která vlákna jsou vyrobena z polymerního roztoku PCL a která z polymerního roztoku PVA. Tento rozdíl v průměrech vláken může být opět zapříčiněn již zmiňovanou vzdušnou vlhkostí a také nemožností individuálně nastavovat elektrické napětí pro jednotlivé struny.

- **Průměry vláken**

Průměr vláken byl měřen u vzorků vyrobených jak jehlovým elektrickým zvlákňováním, tak strunovým elektrickým zvlákňováním. Na SEM snímcích bylo vždy náhodně vybráno 100 vláken, u kterých byl s pomocí počítačového programu Fiji změřen jejich průměr. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny a zpracovány do *Grafu 1*.



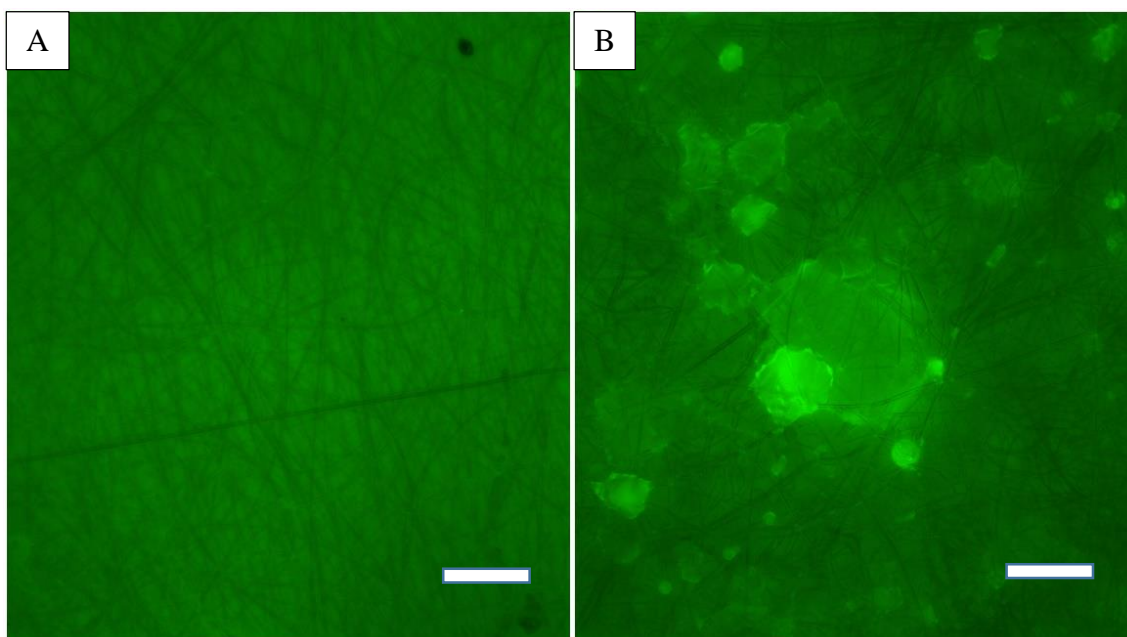
Graf 1 Sloupcový graf reprezentující průměry vláken včetně chybových úseček, které reprezentují 95%IS, vyrobených vlákenných vrstev.

Největší průměry vláken byly naměřeny u vlákenných vzorků vyrobených pouze z polymerního roztoku PCL. Vlákenná vrstva PCL vyrobená strunovým elektrickým zvlákňováním obsahovala vlákna s průměrem 1060 nm a směrodatnou odchylkou ± 733 . Vlákenná vrstva PCL vyrobená jehlovým elektrickým zvlákňováním obsahovala vlákna s průměrem 781 nm a směrodatnou odchylkou ± 443 . Velké směrodatné odchylky u vlákenných vrstev PCL mají opět spojitost s přítomností chloroformu a etanolu v roztoku polymeru PCL, jak již bylo popsáno u SEM snímků. Nejmenší průměry vláken byly naměřeny u vzorků vyrobených pouze z polymerního roztoku PVA. Konkrétně 458 nm se směrodatnou odchylkou ± 152 u vlákenné vrstvy vyrobené strunovým

elektrickým zvlákňováním a 416 nm se směrodatnou odchylkou ± 117 u vlákenné vrstvy vyrobené jehlovým elektrickým zvlákňováním. Podle očekávání měly směsové vlákenné vrstvy PCL/PVA průměrné hodnoty průměru vláken menší než vlákenné vrstvy PCL a zároveň větší než vlákenné vrstvy PVA. U směsové vlákenné vrstvy PCL/PVA vyrobené strunovým elektrickým zvlákňováním byl průměrný průměr vláken 684 nm se směrodatnou odchylkou ± 467 . Vlákenná vrstva PCL/PVA vyrobená jehlovým elektrickým zvlákňováním měla průměr vláken v průměru 621 nm a směrodatnou odchylku ± 276 . Vyšší směrodatné odchylky u vzorků PCL a PCL/PVA vyrobených strunovým elektrickým zvlákňováním mohou být také způsobeny vysokou relativní vzdušnou vlhkostí, která byla při zvlákňování nastavena na 50 %.

4.2 Fluorescenční mikroskopie

Ze směsových vlákenných vrstev s přídavkem fluoresceinu, které byly vyrobeny elektrickým zvlákňováním z jehel a strunovým elektrickým zvlákňováním, byly vytvořeny snímky na fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse Ti. Fluorescenční látka byla přidána pouze do polymerního roztoku PVA o koncentraci 10 hm. % s cílem zjistit pomocí mikroskopu rozložení a orientaci PVA vláken ve směsové vlákenné vrstvě PCL/PVA. Snímky z mikroskopu jsou znázorněny na *Obrázku 37*.



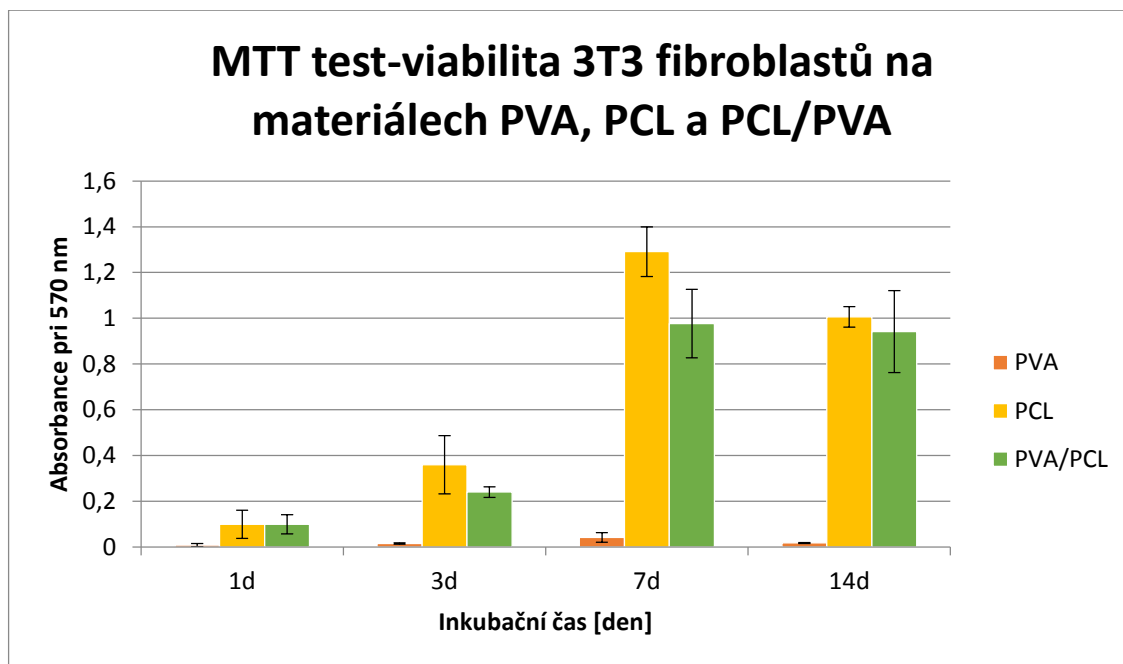
Obrázek 37 Snímky směsové vlákenné vrstvy PCL/PVA z fluorescenčního mikroskopu, vyrobené elektrickým zvlákňováním z jehly (A) a strunovým elektrickým zvlákňováním (B)

Měřítka 25 μ m

Tento druh testu se ovšem ukázal jako nevhodný. I přes malý přídavek fluoresceinu do polymerního roztoku PVA, docházelo k ozařování všech vláken ve struktuře. Z obrázků není možné rozeznat, která vlákna jsou vyrobena z polymerního roztoku PVA a která z polymerního roztoku PCL. Velké množství fluorescenční látky zářilo pod fluorescenčním mikroskopem hlavně z míst s velkými kapkovými defekty, které se v PVA vrstvě zvlákňované bez úpravy povrchového napětí či elektrické vodivosti obvykle hojně vyskytují.

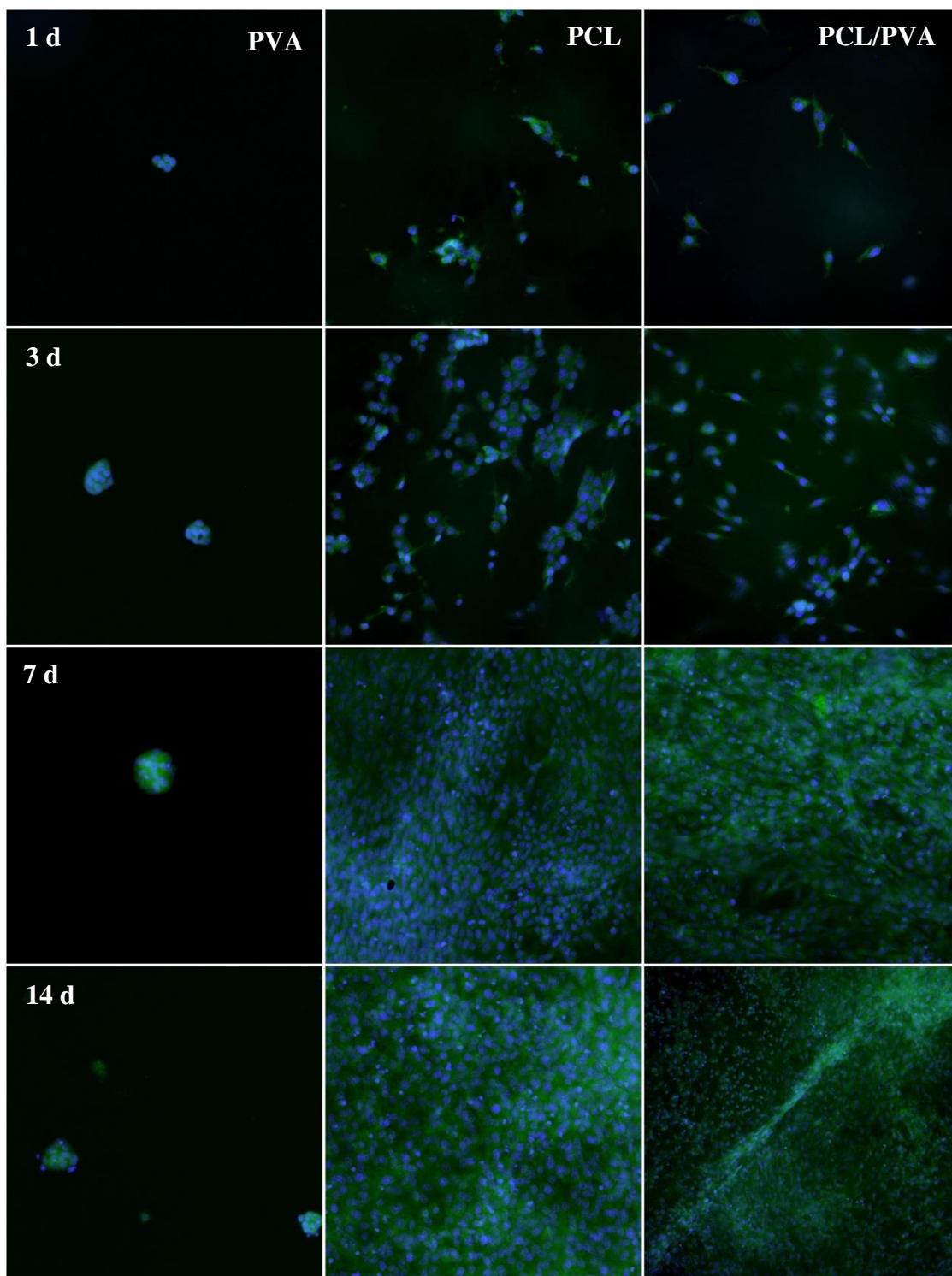
4.3 *In-vitro* testování

In-vitro testování probíhalo na materiálech PVA, PCL a PCL/PVA vyrobených strunovým elektrickým zvlákňováním. K testování byly použity 3T3 fibroblasty, které byly analyzovány pomocí MTT testu, fluorescenční a rastrovací elektronové mikroskopie. Testování probíhalo vždy 1., 3., 7., a 14. den od nasazení 3T3 fibroblastů na testovaný materiál.



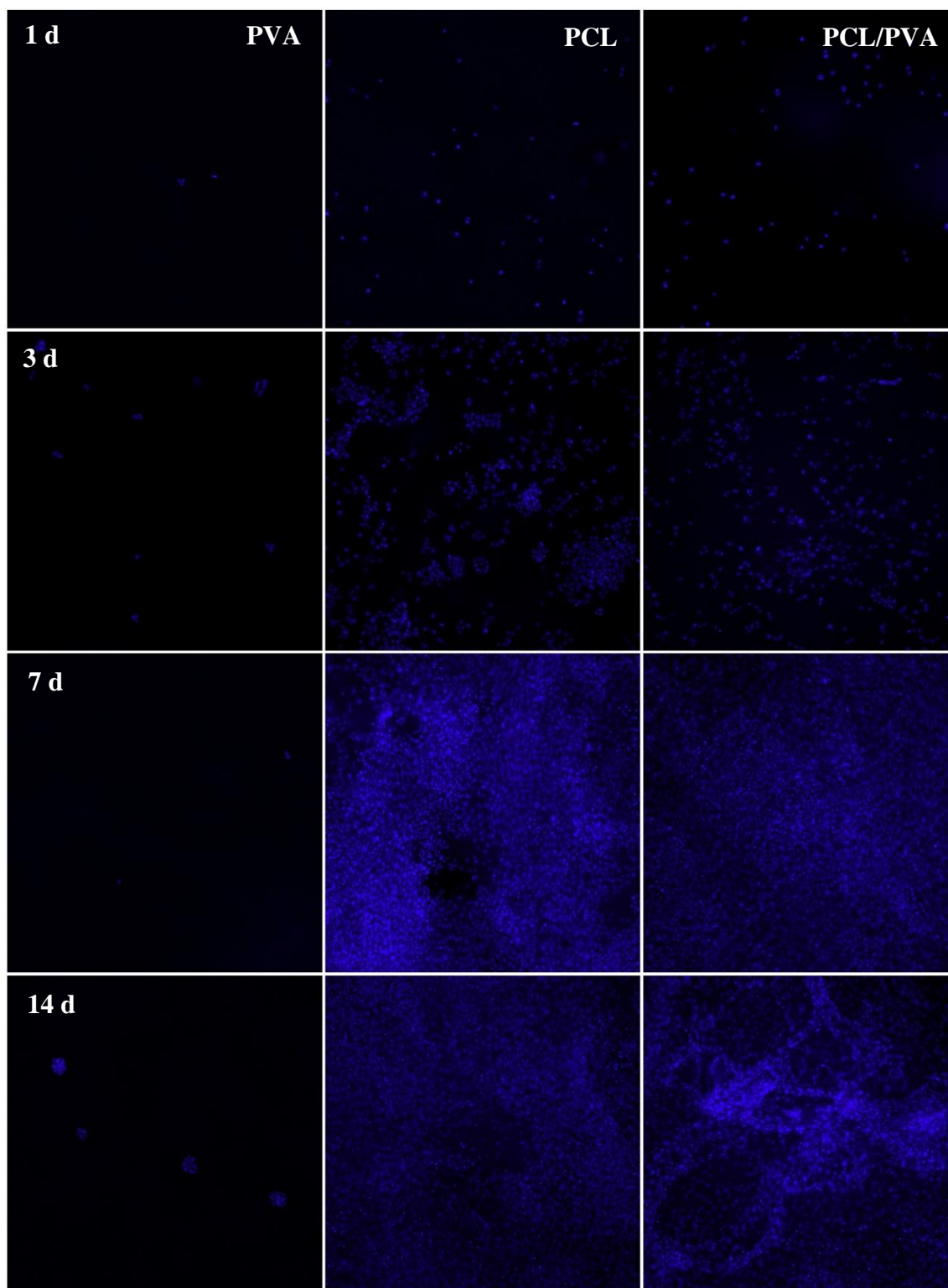
Graf 2 Analýza buněčné viability. Absorbance při vlnové délce 570 nm, odpovídá buněčné viabilitě 3T3 fibroblastů na materiálech (PVA, PCL a PVA/PCL) po 1., 3., 7. a 14. dnech.

Graf 2 znázorňuje průměrnou viabilitu 3T3 fibroblastů kultivovaných na materiálech po 1., 3., 7., 14. dni od nasazení. Buněčná adheze (odpovídá 1. testovací den) je u PCL a PCL/PVA srovnatelná, PVA je výrazně horší. Buněčná proliferace (ostatní testovací dny) je u PCL a PVA/PCL srovnatelná, (7. den je vyšší u PCL, nicméně 3. a 14. den tento trend nepotvrzují). U samotného PVA je proliferace výrazně nižší. Výsledky viability korespondují s výsledky fluorescenční mikroskopie (*Obrázky 38 a 39*) a SEM analýzy (*Příloha 1*). Z výsledků je patrné, že přítomnost vrstvy PVA ve dvojvrstvě (PCL/PVA) neovlivňuje negativně buněčnou adhezi a proliferaci. Dále byl proveden MTT v jamkách, ve kterých probíhala kultivace 3T3 fibroblastů na materiálu PVA (*Příloha 2*). Z výsledků je patrné, že přestože buňky a materiál špatně adherují a následně špatně proliferují, tak materiál PVA není cytotoxický.



Obrázek 38 Snímky 3T3 fibroblastů kultivovaných na materiálech (PVA, PCL, PCL/PVA) 1., 3., 7., 14. den kultivace. Barvení DAPI (modrá, buněčná jádra) a phalloidin-FITC (zelená, buněčný cytoskelet)

řádky: testovací dny (1. den, 3. den, 7. den, 14. den), sloupce: testovaný materiál (PVA, PCL, PCL/PVA)

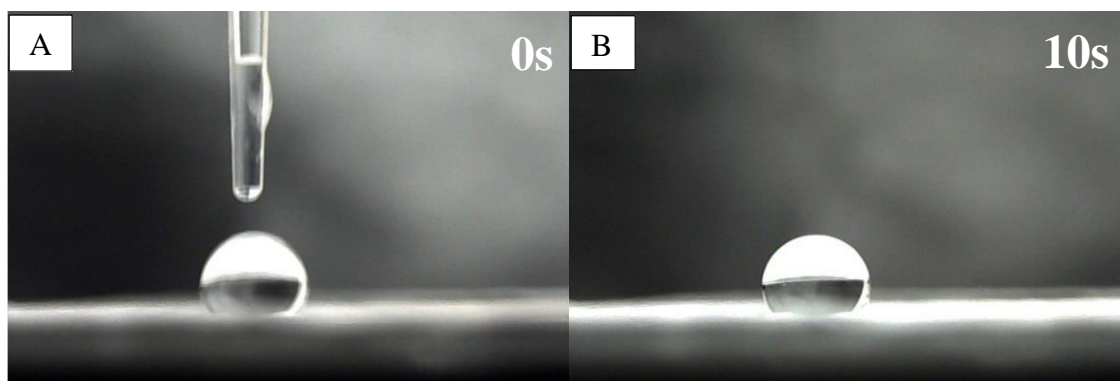


Obrázek 39 Snímky 3T3 fibroblastů kultivovaných na materiálech (PVA, PCL, PCL/PVA) 1., 3., 7., 14. den kultivace. Barvení PI (modrá, buněčná jádra)

řádky: testovací dny (1. den, 3. den, 7. den, 14. den), sloupce: testovaný materiál (PVA, PCL, PCL/PVA)

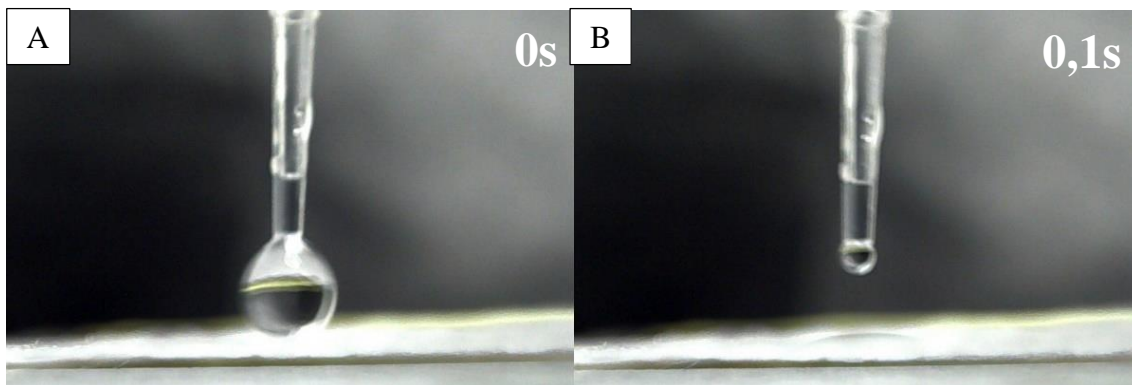
4.4 Měření kontaktního úhlu a porovnání pronikání kapek

Na *Obrázku 40* je zachycen průběh vztlínání destilované vody do vzorku vyrobeného z polymerního roztoku PCL. Kapička destilované vody nebyla do materiálu vsáknuta ani po 10 sekundách od počátku měření. Z výsledků měření je jasně patrné, že vzorek vyrobený z polymerního roztoku PCL je hydrofobní. V tomto případě je možné odhadnout i kontaktní úhel. Ten byl v tomto případě změřen z deseti kapek umístěných na různá místa tohoto materiálu vypnutého na rámeček a průměrná hodnota kontaktního úhlu je $128\pm 6^\circ$.



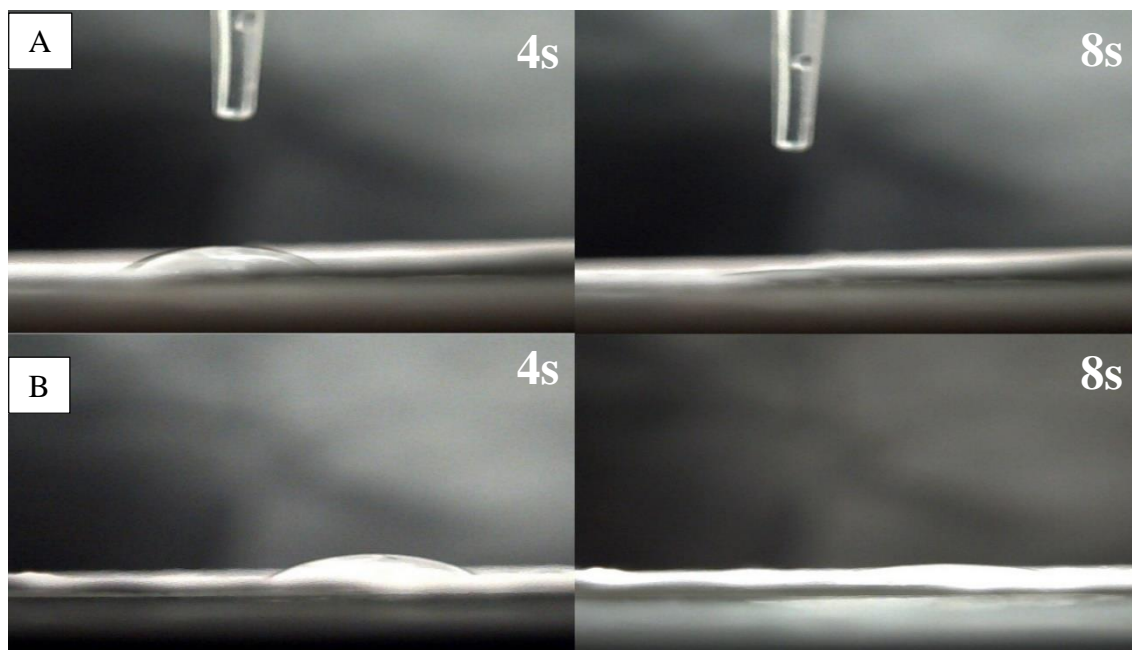
Obrázek 40 Snímky znázorňující příklad kapky destilované vody na vzorku PCL. (A) tvar kapky při začátku měření, (B) tvar kapky po 10s měření

Na *Obrázku 40* je zachycen průběh vztlínání destilované vody do vzorku vyrobeného z polymerního roztoku PCL. Kapička destilované vody nebyla do materiálu vsáknuta ani po 10 sekundách od počátku měření. Z výsledků měření je jasně patrné, že vzorek vyrobený z polymerního roztoku PCL je hydrofobní.



Obrázek 41 Snímky znázorňující dynamiku průniku destilované vody do vzorku PVA. (A) tvar kapky při začátku měření, (B) tvar kapky 0,1s od začátku měření

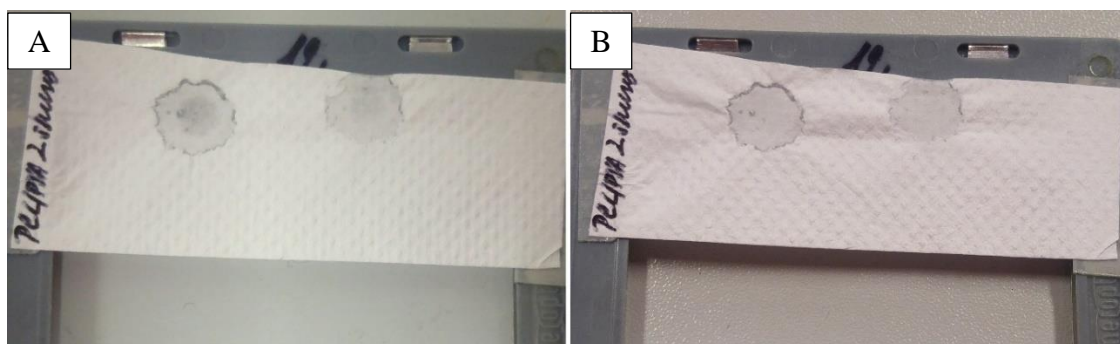
Obrázek 41 zachycuje průběh pronikání destilované vody do vzorku vyrobeného z polymerního roztoku PVA. Destilovaná voda byla při všech testech vsáknuta do vzorku v čase kratším než 0,1 s. Použité zařízení neumožňuje snímat fotografie kapek pronikajících do vlákenného materiálu v rozmezí kratším než 0,1 s, z tohoto důvodu nebylo možné zjistit konkrétní čas, za který kapka destilované vody pronikla do materiálu. Výsledky měření dokazují, že vzorek vyrobený z polymerního roztoku PVA je silně hydrofilní. Z důvodu pronikání kapky do vzorku není možné kontaktní úhel změřit.



Obrázek 42 Snímky znázorňující dynamiku průniku destilované vody do vzorků vlákněné směsi PCL/PVA. Řádek (A) zachycuje příklad pronikání kapky u vzorků vyrobených jehlovým elektrickým zvlákňováním a řádek (B) zachycuje příklad pronikání kapky u vzorků vyrobených strunovým elektrickým zvlákňováním

Obrázek 42 zachycuje dynamiku průniku destilované vody do vzorků vyrobených z vlákněné směsi PCL/PVA. Oba tyto vzorky dosáhly podobné hodnoty času, během kterého byla kapka vsáknuta do vzorku. Kapka destilované vody pronikla do vzorku vyrobeného jehlovým elektrickým zvlákňováním průměrně v čase $8,8 \pm 1,4$ s. Vzorek vyrobený strunovým elektrickým zvlákňováním dosahoval průměrně času $8,13 \pm 0,9$ s. Odchylka v průměrných časech mezi jehlovým elektrickým zvlákňováním a strunovým elektrickým zvlákňováním mohla být zapříčiněna chybou měření, odlišnou strukturou vlákněné vrstvy anebo také rozdílnou porozitou v místě měření. Porovnání vlákněné směsi PCL/PVA se vzorky vyrobenými pouze z polymerního roztoku PCL a PVA dokazuje, že polymerní roztok PVA ve směsi dokázal snížit hydrofobicitu způsobenou polymerním roztokem PCL nebo naopak PCL zvýšilo hydrofilitu tohoto vzorku.

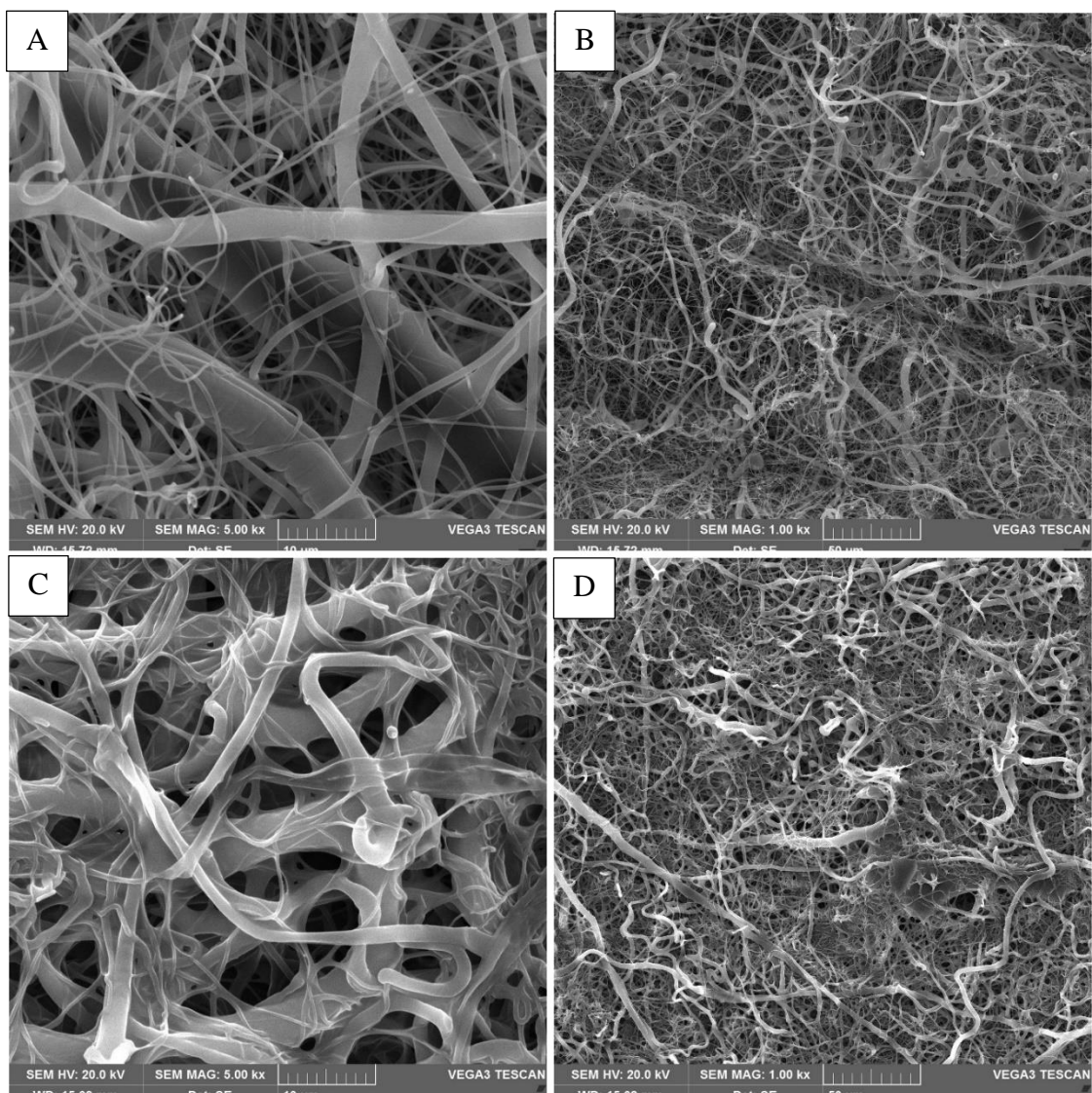
Při měření dynamiky průniku kapaliny do vlákněné vrstvy bylo také zajímavé sledovat, jakým způsobem se kapalina rozprostírala po testovaném materiálu. *Obrázek 44* zobrazuje fotografie pořízené po vsáknutí destilované vody a následném usušení u vlákněného vzorku PCL a vlákněné směsi PCL/PVA vyrobené strunovým elektrickým zvlákňováním.



Obrázek 43 Fotografie znázorňující vlákenné vzorky směsi PCL/PVA ze strun s rozprostřenou kapkou destilované vody po vsáknutí do materiálů (A), a následném vysušení vzorků (B)

Na *Obrázku 43* fotografie A zachycuje vlákenné vzorky PCL/PVA (horní část obrázku) a PCL (spodní část obrázku) několik vteřin po vsáknutí kapek destilované vody. U vzorku vlákenné směsi PCL/PVA bylo možné sledovat jasné ohraničení kapky, která se po vzorku rozprostírala jen minimálně. Relativně malé rozprostření kapky u směsového vlákenného vzorku PCL/PVA je zřejmě zapříčiněno přítomností PVA. Po vsáknutí kapky destilované vody, polymer PVA, začala vlákna PVA bobtnat a gelovatět, což neumožnilo další rozprostření kapky. Pravdivost tohoto tvrzení naznačuje i fotografie B, která byla pořízena po vysušení vzorků. U vlákenné směsi PCL/PVA je zřetelné, že došlo ke změně struktury a k vnitřnímu pnutí způsobené zgelovatěním polymeru PVA.

Směsová vlákenná vrstva PCL/PVA vyrobená strunovým elektrickým zvlákněním byla po usušení kapky vody analyzována i rastrovacím elektronovým mikroskopem. Snímky jsou zachyceny na *Obrázku 44*.



Obrázek 44 SEM snímky znázorňující směsové vlákenné vrstvy PCL/PVA před nanesením kapky destilované vody (A),(B), a po nanesení a usušení kapky destilované vody (C),(D). Měřítka 10 μm, 50 μm

Na snímcích pořízených před nanesením kapky vody (A), (B) mají všechna vlákna přibližně kruhový tvar po celé své délce, i když jsou po délce, jak již bylo zmíněno, nerovnoměrná. Na snímcích pořízených po nanesení a usušení kapky vody (C), (D) je možné sledovat změnu tvaru u některých vláken, tato vlákna jsou zploštělá a vzájemně přichycena na sobě. Lze předpokládat, že tato zploštělá vlákna jsou vyrobena z polymerního roztoku PVA. Vlákna PVA jsou hydrofilní a po nanesení a usušení kapky vody tedy změnila svůj tvar a tím došlo i ke smrštění, které bylo zobrazeno na *Obrázku 43*.

5. Diskuze

V předchozích kapitolách byla popsána výroba a testování směšové vláknenné vrstvy PCL/PVA s využitím elektrického zvlákňování, která by mohla být v budoucnu využívána v oboru zdravotnictví například pro kožní kryty. Polymer PCL je pro toto použití vhodný zejména díky své biodegradabilitě, jejíž rychlost je možné řídit například morfologií či molekulovou hmotností [58], ale také protože v lidském organismu vyvolává minimální nebo žádné imunologické odezvy [59]. Jeho největší nevýhodou je vysoká hydrofobicita, která je ve většině případu použití, nežádoucí. Z tohoto důvodu byl jako druhý polymerní materiál pro směšovou vláknennou vrstvu vybrán PVA. PVA je v oboru zdravotnictví také hojně využívaný materiál [60], který se vyznačuje především svou vysokou hydrofilicitou. Nevýhodou PVA je, že není biodegradabilní a od určité molekulové hmotnosti dochází k pomalému rozpouštění a špatnému odvodu z těla. Z tohoto důvodu je PVA používáno především na kožní kryty a díky své dobré chemické modifikovatelnosti, také pro řízenou dodávku léčiv (drug delivery system). Kombinace PCL/PVA pro aplikaci jako kryt rány dodává tomuto materiálu vhodné mechanické vlastnosti díky PCL, optimální smáčení vodou a vodnými roztoky díky vhodně zvolené směsi vláken PCL a PVA, velmi dobrou biokompatibilitu díky podílu PCL a v neposlední řadě velmi důležitou možnost modifikovatelnosti v objemu či na povrchu vláken PVA. Polyvinylalkohol díky zvlákňování z vody umožňuje vnášet do materiálu celou řadu antibakteriálních činidel [42], léčiv či na rozpouštědla a podmínky citlivých účinných látek, jakou jsou například proteiny, které by jen do materiálu z PCL nemohly být zaneseny.

Ze dvou technologií elektrického zvlákňování, které byly pro výrobu směšové vláknenné vrstvy PCL/PVA vybrány, lze po těchto úvodních experimentech jako vhodnější určit technologii elektrického zvlákňování ze dvou strun. Tato technologie díky modifikaci, která spočívá v umístění dvou strun relativně blízko u sebe ve zvlákňovací komoře, dokáže vyrábět směšovou vláknennou vrstvu ve výrazně kratším čase, než technologie elektrického zvlákňování ze dvou jehel. Zároveň je možné s touto technologií zvlákňování vyrábět kvalitnější směšovou vláknennou vrstvu, bez výraznějších povrchových defektů. Další výhodou elektrického zvlákňování ze dvou strun je možnost modifikace materiálových a procesních parametrů výroby. Dále je nutné zmínit, že obě použité technologie elektrického zvlákňování dokázaly vyrobit směšovou vláknennou

vrstvu PCL/PVA, která byla soudržná a nedocházelo k oddělování jednotlivých polymerních materiálů od sebe, což postupné nanášení vrstev PCL a PVA na sebe při postupném průchodu strojem nedovoluje, neboť se jednotlivé vrstvy od sebe oddělují.

Úvodní testování vyrobených vláknenných směsí PCL/PVA prokázalo, že je možné se správným nastavením procesních a materiálových parametrů vyrobit s pomocí vhodné technologie elektrického zvlákňování takovou vláknennou směs, která kombinuje výhody polymerních materiálů PCL a PVA a zároveň minimalizuje jejich nevýhody. Pomocí elektronové rastrovací mikroskopie byla zkoumána struktura vyrobených vláknenných směsí PCL/PVA a bylo prokázáno, že modifikovaná technologie elektrického zvlákňování ze dvou strun, dokáže vyrobit celistvou vláknennou směs, bez výrazných defektů. Zároveň je třeba poznamenat, že zvlákňování z jehel umožňuje v současném stavu dostupné techniky větší variabilitu procesních parametrů (pro různé zvlákňovací elektrody různá napětí, různé vzdálenosti od kolektoru, různé dávkování a různý průměr jehly a dokonce i počet jehel, pro jeden druh polymeru atd.), které je ale potřeba ještě ve velké sérii experimentů optimalizovat. Měření kontaktního úhlu/ průniku kapky destilované vody do vláknenné směsi prokázalo, že lze kombinací polymerních materiálů PCL/PVA snížit vysokou hydrofobicitu, kterou se vyznačují vláknenné vrstvy, vyrobené pouze z polymeru PCL. *In-vitro* testování vláknenné směsi PCL/PVA jasně prokázalo, že přítomnost polymeru PVA ve směsové vláknenné vrstvě nemá negativní vliv na viabilitu a proliferaci buněk na povrchu této směsové vláknenné vrstvy v porovnání s PCL. Toto je možné považovat za významný výsledek, neboť PVA je materiálem, který lze relativně snadno funkcionalizovat a přinášet tak do materiálu zajímavá a důležitá aditiva.

Doporučením pro další vývoj technologie výroby směsové vláknenné vrstvy je zaměřit se na optimalizaci procesních a materiálových parametrů, díky kterým by mohlo dojít ke zlepšení vlastností směsové vláknenné vrstvy. Je samozřejmě také potřeba se zaměřit na další analýzu směsové vláknenné vrstvy, která by zahrnovala například test stupně bobtnání s dokonalým vysušením materiálu pomocí lyofilizace před samotným testováním. Dalšími vhodnými metodami analýzy by pak bylo testování směsových vzorků v porovnání s jednotlivými materiály pomocí infračervené spektroskopie, rentgenové spektroskopie, gelové permeační chromatografie atd., což by umožnilo detailnější porozumění finální struktuře vyrobeného směsového materiálu. Dále je možné doporučit přistoupit k dalším *in-vitro* testům, zaměřeným konkrétně na uvolňování léčiva, či účinnosti antibakteriálních látek, jimiž by byla PVA vlákna modifikována.

6. Závěr

Tato diplomová práce je zaměřena na výrobu a základní analýzu směšové vlákně vrstvy PCL/PVA vyrobené s použitím elektrického zvlákňování. V teoretické části této práce byl čtenář formou literární rešerše seznámen s technologiemi elektrického zvlákňování, které jsou v dnešní době pro výrobu směšových vlákně vrstev používány. Dále zde byly popsány i vybrané metody, které se používají pro analýzu směšových vlákně vrstev v odborné literatuře věnující se podobnému tématu a také zde byly stručně popsány polymerní materiály, které byly pro výrobu směšové vlákně vrstvy použity.

Experimentální část této práce zahrnuje nejprve seznámení s procesními a materiálovými parametry při použití elektrického zvlákňování ze dvou jehel s použitím polymerního roztoku PVB. Tyto poznatky byly následně použity pro nastavení výroby směšové vlákně vrstvy PCL/PVA elektrickým zvlákňováním ze dvou jehel. Dále je zde popsána výroba směšové vlákně vrstvy PCL/PVA, která byla vyrobena na elektrickém zvlákňovacím zařízení složeném ze dvou strun, které bylo na KNT, FT, TUL pro tento typ testování modifikováno. Vyroběné směšové vlákně vrstvy byly podrobeny základní analýze, která zahrnovala elektronovou rastrovací mikroskopii, fluorescenční mikroskopii, měření chování materiálu při kontaktu s kapkou vody a *in-vitro* testování (MTT test).

Během analýzy výsledků bylo zjištěno, že je možné technologiemi elektrického zvlákňování vyrábět směšovou vlákně vrstvu PCL/PVA bez výraznějších povrchových defektů. Byl také potvrzen pozitivní vliv polymeru PVA, který ve směšové vlákně vrstvě PCL /PVA snižuje hydrofobicitu způsobenou polymerem PCL. *In-vitro* testování prokázalo, že polymer PVA ve vlákně směsi PCL/PVA nemá negativní vliv na viabilitu a proliferaci buněk na povrchu vlákně směsi. V diskuzi pak jsou popsány další návrhy na pokračování studia v oblasti výroby směšových vlákně vrstev pomocí elektrického zvlákňování, pro aplikaci v medicíně a to zejména v oblasti vývoje a výzkumu krytů ran.

7. Použitá literatura

- [1] Tucker, N. a kol. (2012) „*The History of the Science and Technology of Electrospinning from 1600 to 1995*” Journal of Engineered Fibers and Fabrics Special issue – Fibers
- [2] „*Fyzikální principy tvorby nanovláken*“ 2017 [Online]. [cit. 2018-08-02] Dostupné z: https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/125/course/section/100/1_%C3%9Avod_cz.pdf
- [3] „*Elektrostatické zvlákňování*“ 2015 [Online]. [cit. 2018-08-03] Dostupné z: <http://www.nanopharma.cz/cs/produkty-a-technologie/technologie>
- [4] „*Technologie zvlákňování*“ 2004 [online]. [cit. 2018-08-17] Dostupné z <http://www.elmarco.cz/technologie/technologie/>
- [5] Růžičková, Jana. „*Elektrostatické zvlákňování nanovláken*“ 1. vyd. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2004. ISBN 80-7083-867-1.
- [6] Ramakrishna, S. a kol. „*An introduction to Electrospinning and Nanofibers*“ Singapore: World Scientific Publishing, 2005. ISBN 981-256-415-2
- [7] Travis J. Sill, Horst A. von Recum (2008) „*Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering*“. Biomaterials **29** (1989-2006)
- [8] Doshi, J. and Reneker, D. H. (1995) „*Electrospinning process and applications of electrospun fibers*“. Journal of Electrostatics **35** (151–160)
- [9] Bhardwaj, N., Kundu, S.C. (2009) „*Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique*“. Biotechnology Advances 28 (133-139)
- [10] Blahovec, A. „*Elektrotechnika I.*“ 1.vyd. Praha: Informatorium, 1995. ISBN 80-85427-72-9
- [11] Huang, Z.M., Ramakrishna, S. a kol.. „*A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites*“ Composites Science and Technology, 2003. (2223-2253)
- [12] W-EONG, Teo. Electrospun patterned membrane. *Electrospintech* [online]. 2014 [cit. 2018-08-25]. Dostupné z: <http://electrospintech.com/patterned-membrane.html#.XLAoJWfV6UI>

- [13] W-EONG, Teo. Porous/Dimpled/Pitted Fibers. *Electrospintech* [online]. 2013 [cit. 2018-08-10]. Dostupné z: <http://electrospintech.com/porousfiber.html#.XLAqMWfV6Um>
- [14] „Bicomponent“ 2017 [Online]. [cit. 2018-08-10] Dostupné z: <http://www.fibersource.com/fiber-products/bicomponent-fiber/>
- [15] „Bicomponent fibers“ 2018 [Online]. [cit. 2018-08-10] Dostupné z: <http://textilelearner.blogspot.com/2012/01/bicomponent-fibers-classification-of.html>
- [16] SMIT, Eugene a Ronald SANDERSON. a kol. Continuous yarns from electrospun fibers. *Polymer* **46**(8) [online]. 2005, 2419-2423 [cit. 2019-02-12]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.02.002>
- [17] VALTERA, Jan, Tomáš KALOUS a Pavel POKORNÝ. a kol. Fabrication of dual-functional composite yarns with a nanofibrous envelope using high throughput AC needleless and collectorless electrospinning. *Scientific Reports* [online]. 2018 [cit. 2019-03-30]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38557-z>
- [18] W-EONG, Teo. Alternating Current (AC) Electrospinning. *Electrospintech* [online]. 2016 [cit. 2018-08-25]. Dostupné z: <http://electrospintech.com/acelectrospinning.html#.XLAq9mfV6UI>
- [19] LUKÁŠ, David, Eva K. KOŠTÁKOVÁ, Pavel POKORNÝ a Petr MIKEŠ. Effective AC needleless and collectorless electrospinning for yarn production. *Physical Chemistry Chemical Physics* [online]. 2014, [cit. 2019-03-30]. DOI: 10.1039/C4CP04346D
- [20] „Střídavé elektrické zvláknování“ [Online]. [cit. 2019-02-09] Dostupné z: https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/5383/mod_resource/content/0/V_AC%20zvlaknovani%2010_6_2015.pdf
- [21] „Kompozitní materiál“ 2017 [Online]. [cit. 2019-02-09] Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Kompozitn%C3%AD_materi%C3%A1l

- [22] Maheshwari, S.,U., a kol. „*Electrospinning of polyvinylalcohol-polycaprolactone composite scaffolds for tissue engineering applications*” *Polymer Bulletin*, 2013, Volume **70**, (2995-3010)
- [23] Li, X., Ding, B., a kol. „*Enhanced Mechanical Properties of Superhydrophobic Microfibrous Polystyrene Mats via Polyamide 6 Nanofibers*” *The Journal of Physical Chemistry C* **113(47)**, 2009
- [24] Ding, B., Kimura, E., a kol. „*Fabrication of blend biodegradable nanofibrous nonwoven mats via multi-jet electrospinning*” *Polymer* **45(6)**, 2004, (1895-1902)
- [25] Dorati, R., Pisani, S., a kol. „*Study on hydrophilicity and degradability of chitosan/polylactide-co-polycaprolactone nanofibre blend electrospun membrane*” Volume **199**, 2018, (150-160)
- [26] Min, S., Xiaohong L. a kol. (2010) „*Mechanical and wettability behavior of polyacrylonitrile reinforced fibrous polystyrene mats*”. *Journal of Colloid and Interface Science* **347** (147-152)
- [27] Golestaneh S.I., Mosallanejad A. a kol. (2016) „*Fabrication and characterization of phase change material composite fibers with wide phase-transition temperature range by co-electrospinning method*”. *Applied energy* **182** (409-417)
- [28] LI, Yaoxian a Naiqian ZHAN. a kol. A novel multinozzle electrospinning process for preparing superhydrophobic PS films with controllable bead-on-string/microfiber morphology. *Polymer* **345(2)** [online]. 2010, 491-495 [cit. 2019-02-09]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.01.051>
- [29] Scaffaro R., Lopresti F., Botta L (2017) „*Preparation, characterization and hydrolytic degradation of PLA/PCL co-mingled nanofibrous mats prepared via dual-jet electrospinning*”. *European Polymer Journal* **96** (266-277)
- [30] AGARVAL, Seema, Joachim H. WENDORFF a Andreas GREINER. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer* **49(26)** [online]. 2008, 5603-5621 [cit. 2019-02-09]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.09.014>

- [31] „*Sample-Electron Interaction for SEM*“ 2017 [Online]. [cit. 2019-02-11]. Dostupné z: <http://www.nanoscience.com/technology/sem-technology/how-sem-works/>
- [32] „*ImageJ*“ 2018 [Online]. [cit. 2019-02-11] Dostupné z: <https://imagej.net/Welcome>
- [33] „*Gelová permeační chromatografie (GPC)*“ [Online]. [cit. 2019-02-12] Dostupné z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd/hypertext/AJAZG.htm>
- [34] „*An Introduction to Gel Permeation Chromatography and Size Exclusion Chromatography*“ 2015 [Online]. [cit. 2019-02-12] Dostupné z: <https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5990-6969EN%20GPC%20SEC%20Chrom%20Guide.pdf>
- [35] Ramalingam M., Ramakrishna S „*Nanofibers composites for biomedical applications*“ Woodhead Publishing 2017 ISBN 978-0-08-100208-7
- [36] GOYAL, Ritu a Murat GUVENDIREN. a kol. Optimization of Polymer-ECM Composite Scaffolds for Tissue Engineering: Effect of Cells and Culture Conditions on Polymeric Nanofiber Mats. *Journal of Functional Biomaterials* 8(1), [online]. 2017 [cit. 2019-03-12]. Dostupné z: <https://dx.doi.org/10.3390%2Fjfb8010001>
- [37] „*In vitro testování scaffoldů*“ [Online]. [cit. 2019-02-12] Dostupné z: https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/5431/mod_resource/content/1/CV_4%2B5_ZS20152016.pdf
- [38] A. BARILE, Frank. 3 - Continuous Cell Lines as a Model for Drug Toxicity Assessment. *In vitro methods in pharmaceutical research* [online]. 1997, 33-54 [cit. 2019-02-12]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-012163390-5.50004-1>
- [39] S. MAHESHWARI, Uma a Naveen NAGIAH. a kol. OptimizatiElectrospinning of polyvinylalcohol–polycaprolactone composite scaffolds for tissue engineering applicationson of Polymer-ECM Composite Scaffolds for Tissue Engineering: Effect of Cells and Culture Conditions on Polymeric Nanofiber Mats. *Polymer*

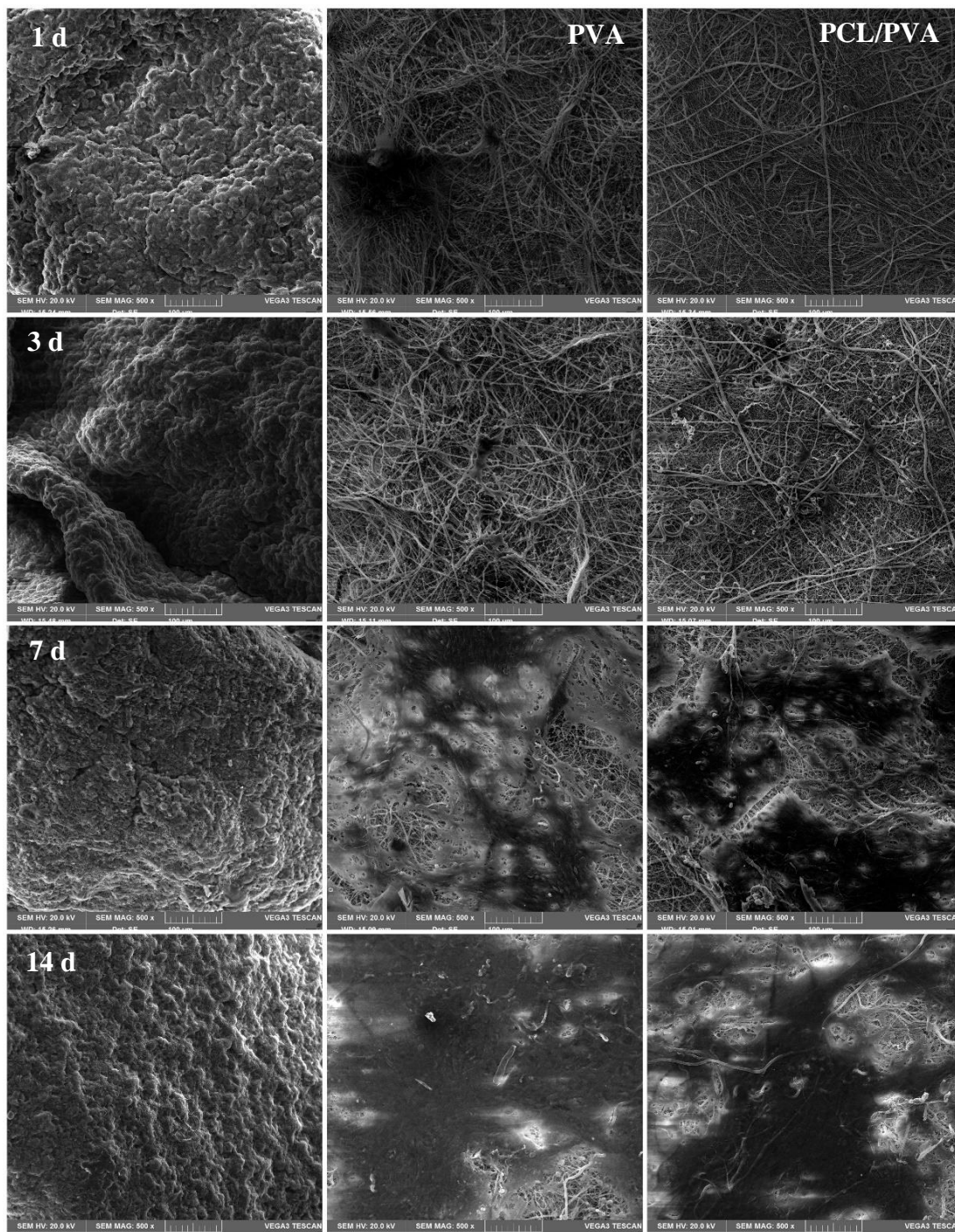
- Bulletin* **70(11)** [online]. 2013, [cit. 2019-03-30]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00289-013-1002-4>
- [40] J. SANDERSON, Michael a Ian SMITH. a kol. Fluorescence Microscopy. *Cold spring harb protoc.* [online]. 2014, [cit. 2019-02-12]. Dostupné z: <https://dx.doi.org/10.1101%2Fpdb.top071795>
- [41] M. BAKER, Brendon a Roshan P. SHAH. a kol. Sacrificial nanofibrous composites provide instruction without impediment and enable functional tissue formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2012, [cit. 2019-03-30]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.1206962109>
- [42] Du, L., a kol. „Fabrication of Silver Nanoparticle/Polyvinyl Alcohol/Polycaprolactone Hybrid Nanofibers Nonwovens by Two-nozzle Electrospinning for Wound Dressing” *Fibers and polymers* 2016, ISSN 1875-0052
- [43] de Gennes, Pierre-Gilles, a kol. „Capillarity and Wetting Phenomena”. New York, Springer Science+Business Media, 2004, ISBN 978-0-387-21656-0
- [44] ZAHEDI, Payam, Iraj REZAEIAN, Seyed Hassan JAFARI a Zeinab KARAMI, 2013. Preparation and release properties of electrospun poly(vinyl alcohol)/poly(ϵ -caprolactone) hybrid nanofibers: Optimization of process parameters via D-optimal design method. *Macromolecular Research* [online]. **21(6)**, 649–659. ISSN 1598-5032, 2092-7673. Dostupné z: doi:10.1007/s13233-013-1064-z
- [45] MAHESHWARI, Subramanian Uma, Samuel Vasanth KUMAR, Naveen NAGIAH a Tiruchirapally Sivagnanam UMA, 2013. Electrospinning of polyvinylalcohol–polycaprolactone composite scaffolds for tissue engineering applications. *Polymer Bulletin* [online]. **70(11)**, 2995–3010. ISSN 0170-0839, 1436-2449. Dostupné z: doi:10.1007/s00289-013-1002-4
- [46] DU, Lei, Huaizhong XU, Tao LI, Ying ZHANG a Fengyuan ZOU, 2016. Fabrication of silver nanoparticle/polyvinyl alcohol/polycaprolactone hybrid nanofibers nonwovens by two-nozzle electrospinning for wound dressing. *Fibers*

- and Polymers* [online]. **17**(12), 1995–2005. ISSN 1229-9197, 1875-0052. Dostupné z: doi:10.1007/s12221-016-6813-0
- [47] Mleziva J., Šňupárek J. „*Polymery: výroba, struktura, vlastnosti a použití*“, 2. vydání. Praha, Sabottáles, 2000, ISBN 80-85920-70
- [48] „*Polyvinyl butyral films*“ 2019 [Online]. [cit. 2019-02-12] Dostupné z: <http://polymerdatabase.com/Films/PVB%20Films.html>
- [49] Hassan, C.M., a kol. „*Structure and applications of polyvinylalcohol hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods*” Polymer Science and Engineering Laboratories, School of Chemical Engineering 2000, IN 47907-1283
- [50] Ducháček V.: „*Polymery - výroba, vlastnosti, zpracování, použití*“. 2. vyd. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2006. Str. 078. ISBN 80-7080-617-6
- [51] Sosnik, A., COHN, D. (2003) „*Poly(ethylene glycol)-poly(epsilon-caprolactone) block oligomers as injectable materials*“ Polymer, **44**, (7033-7042)
- [52] Mclauchlin, A. R., Thomas, N.L., (2012) „*Biodegradable polymer nanocomposites*“. Woodhead Publishing Series in Composites Science and Engineering (398-430)
- [53] „*Polykaprolakton*“ 2018 [Online]. [cit. 2019-02-13] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Polykaprolakton>
- [54] L. SIPARSKY, Georgette, Fudo MIAO a Kent J. VOERHEES. Hydrolysis of Polylactic Acid (PLA) and Polycaprolactone (PCL) in Aqueous Acetonitrile Solutions: Autocatalysis. *Journal of environmental polymer degradation* [online]. 1998 [cit. 2019-04-13]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1023/A:1022826528673>
- [55] „*Chloroform*“ [Online]. [cit. 2019-04-13] Dostupné z: <http://chemistry.ujep.cz/userfiles/files/chloroform.pdf>
- [56] „*Ethanol*“ [Online]. [cit. 2019-04-13] Dostupné z: <http://chemistry.ujep.cz/userfiles/files/ethanol.pdf7>

- [57] „Povrchové napětí“ [Online]. [cit. 2019-04-13] Dostupné z: <http://www.converter.cz/tabulky/povrchove-napeti.htm>
- [58] F. ABDEL-MOTAAL, Fatma a Magdi A. EL-SAYED. Biodegradation of poly (ε-caprolactone) (PCL) film and foamlastic by *Pseudozyma japonica* sp. nov., a novel cutinolytic ustilaginomycetous yeast species. *Biotech* [online]. 2013, 507-512 [cit. 2019-04-13]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0182-9>
- [59] LABET, Marianne a Wim THIELEMANS, Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chemical Society Reviews* [online]. 2009, **38**(12), 3484–3504. ISSN 1460-4744. Dostupné z: [doi:10.1039/b820162p](https://doi.org/10.1039/b820162p)
- [60] MUPPALANENI, srinath, Polyvinyl Alcohol in Medicine and Pharmacy: A Perspective. *Journal of Developing Drugs* [online]. 2013, **02**(03) [cit. 2019-04-13]. ISSN 23296631. Dostupné z: [doi:10.4172/2329-6631.1000112](https://doi.org/10.4172/2329-6631.1000112)

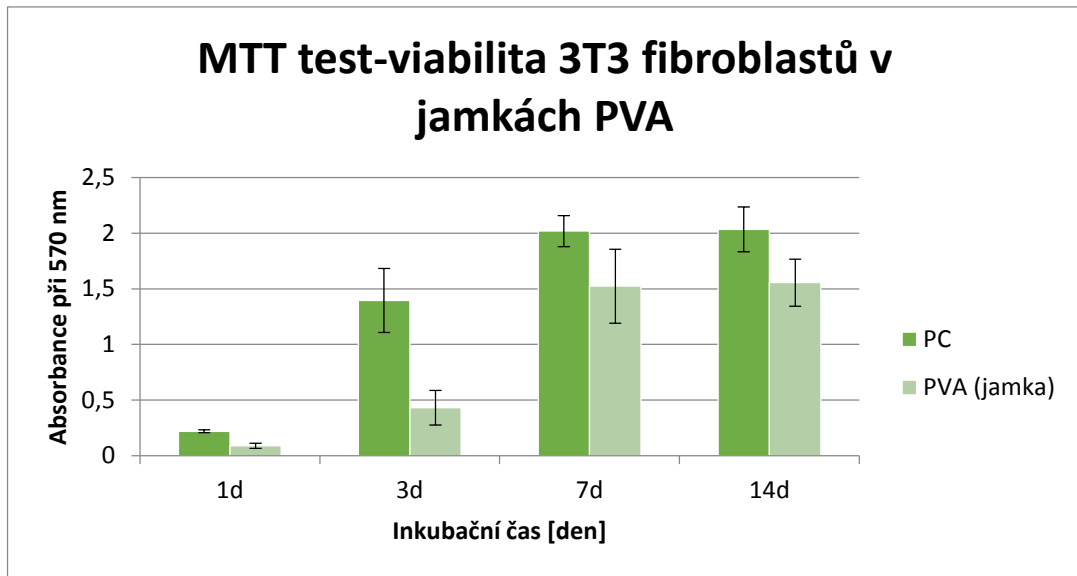
8. Přílohy

1. SEM snímky materiálů s adherovanými 3T3 fibroblasty při *in-vitro* testování



*Příloha 1 SEM snímky vlákněných vrstev s přichycenými buňkami na povrchu
řádky: testovací dny (1. den, 3. den, 7. den, 14. den), sloupce: testovaný materiál
(PVA, PCL, PCL/PVA). Měřítka 100 μm*

2. Výsledky MTT testu v jamkách PVA



Příloha 2 Graf analýzy buněčné viability. Absorbance při vlnové délce 570 nm, odpovídá buněčné viabilitě 3T3 fibroblastů v jamkách PVA po 1., 3., 7. a 14. dnech.