

Nanovláknenné kožní kryty pro použití ve veterinární medicíně

Diplomová práce

Studijní program:

Autor práce:

Vedoucí práce:

N0723A270001 Textilní inženýrství

Bc. Anna Novotná

Ing. Andrea Klápšťová

Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů





Zadání diplomové práce

Nanovláknenné kožní kryty pro použití ve veterinární medicíně

Jméno a příjmení: **Bc. Anna Novotná**
Osobní číslo: T19000075
Studijní program: N0723A270001 Textilní inženýrství
Zadávací katedra: Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů
Akademický rok: **2020/2021**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracování rešerše na dané téma (léčba ran, polymerní materiály, výroba nanovláken, využití nanovláken při hojení kožních defektů u zvířat, aditiva)
2. Návrh a výroba nanovláknenného kožního krytí z vybraných materiálů, jejich optimální kombinace, přidání látek pro zvýšení účinnosti hojení; analýza morfologie vláken
3. Ověření kompatibility materiálu s buňkami *in vitro*
4. Zpracování výsledků

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování práce:
Jazyk práce:

dle potřeby dokumentace
40-60 dle potřeby
tištěná/elektronická
Čeština



Seznam odborné literatury:

1. Kim, J. I. a kol. Electrospun Propolis/Polyurethane Composite Nanofibers for Biomedical Applications. *Materials Science and Engineering: C*. 2014. 44:52–57.
2. Adomaviciute, E. a kol. Formation and Biopharmaceutical Characterization of Electrospun PVP Mats with Propolis and Silver Nanoparticles for Fast Releasing Wound Dressing. *BioMed Research International*. 2016. 4648287, 1–11
3. Ågren, M. *Wound Healing Biomaterials*. 2016. Amsterdam: Elsevier. ISBN 978-1-78242-455-0.
4. Ibrahim, N. A. a kol. *Handbook of Functionalized Nanomaterials for Industrial Applications*. 2020. Elsevier. ISBN 978-0-12-816787-8.

Vedoucí práce:

Ing. Andrea Klápšťová
Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

Datum zadání práce:

1. listopadu 2020

Předpokládaný termín odevzdání:

28. května 2021

doc. Ing. Vladimír Bajzík, Ph.D.
děkan

L.S.

Ing. Jiří Chvojka, Ph.D.
vedoucí katedry

Prohlášení

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

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

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

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

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

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

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

25. května 2021

Bc. Anna Novotná

Nanovláknenné kožní kryty pro použití ve veterinární medicíně

Abstrakt

Tradiční krytí, jako jsou obvazy a gázy, mohou narušovat hojení kožního traumatu při výměně. Zvláště ve veterinární medicíně je vyžadováno rychlé a přesné ošetření, bez traumatizujícího převazování. Nabízí se vyrobit novou náplast, kterou není potřeba vyměňovat, protože se po čase sama vstřebá. Nanovláknena se přirozeně nacházejí v mimobuněčné hmotě, a proto je jejich použití příhodné. Tato práce se zabývá výrobou potencionálního kompozitního kožního krytu z nanovláknenných vrstev vyrobených bezjehlovým elektrostatickým zvlákněním. Krycí vrstva je z biodegradabilního polyuretanu, který dočasně přebírá zejména ochrannou funkci kůže. Lepší adhezi k ráně zajišťuje hydrofilní polyvinylpyrrolidon. Jejich vhodným spojením může vzniknout kompozit, který zajišťuje nepřerušované hojení. Navíc byly do vrstev přidávány aditiva, jód za účelem dezinfekce a propolis pro podporující účinky. Bylo dosaženo cíle vytvoření kompozitního materiálu pomocí zvláknění ze směsi polymerů a laminováním dílčích vrstev. Tento postup byl proveden také s pilotní koncentrací aditiv. Testování materiálů proběhlo pomocí skenovací elektronové mikroskopie, měření kontaktního úhlu a kvalitativní analýzou aditiv. Biologická kompatibilita byla testována pomocí stanovování cytotoxicity extraktů materiálů s buněčnými liniemi NIH3T3 a HaCaT a in vitro testy s vyhodnocením 1., 3., 7. a 14. den pomocí metabolického CCK-8 testu a fluorescenční mikroskopie.

Klíčová slova: elektrostatické zvláknění, nanovláknenné vrstvy, kožní kryty, propolis, veterinární medicína

Nanofibrous Wound Dressings for Veterinary Applications

Abstract

Changing traditional wound dressings, such as bandages and gauzes, can interfere with the wound healing process. In veterinary medicine it is especially necessary to effect fast and precise treatment without the trauma of re-bandaging. It is therefore appropriate to consider the production of a new plaster which does not require changing, as it would be self-absorbing after a certain amount of time. Nanofibers are naturally occurring in extracellular matrices and therefore their use is appropriate. This thesis deals with the manufacture of a potential composite wound dressing of nanofibrous layers using needle-less electrospinning technology. The cover layer is biodegradable polyurethane, which temporarily takes over the protective function of the skin. Improved adhesion to the wound is provided by hydrophilic polyvinylpyrrolidone. In the appropriate combination, this creates a composite, enabling uninterrupted wound healing. Furthermore, the additives iodine (for disinfection) and propolis (to enhance healing) were added in layers. The objective of this thesis – to create a composite wound dressing – was achieved by blend electrospinning and laminating sectional layers. Materials testing was carried out by scanning electron microscopy, measuring the contact angle and the qualitative measuring of additives. Biocompatibility was tested by cytotoxicity of material extracts with cell lines NIH3T3 and HaCaT and in vitro testing with results from the 1st, 3rd, 7th and 14th day by metabolic CCK-8 assay and fluorescence microscopy.

Key words: Electrospinning, Nanofibrous Layer, Wound Dressings, Propolis, Veterinary Medicine

Obsah

1	Úvod.....	11
2	Teoretická část	12
2.1	Biologický kontext	12
2.1.1	Tkáňové inženýrství	12
2.1.2	Kůže savců.....	13
2.1.3	Hojení.....	14
2.2	Léčba kožních poranění ve veterinární medicíně.....	15
2.2.1	Kožní kryty	16
2.2.2	Náhrady kůže	18
2.3	Nanovláknenné kožní kryty.....	19
2.3.1	Nanovláknna ve veterinární medicíně	20
2.4	Používané polymerní materiály	21
2.4.1	Polyestery (PES)	21
2.4.2	Polyuretany (PUR).....	22
2.4.3	Polyvinylpyrrolidon (PVP)	23
2.5	Aditiva.....	24
2.5.1	Jód.....	24
2.5.2	Propolis	25
2.6	Výroba nanovláken	27
2.6.1	Proces elektrostatického zvlákňování.....	27
2.6.2	Parametry ovlivňující elektrostatické zvlákňování	29
2.6.3	Funkcionalizace nanovláken	31
3	Praktická část.....	34
3.1	Materiály a metodika.....	36
3.1.1	Výběr materiálů.....	36
3.1.2	Příprava roztoků	37
3.1.3	Měření viskozity a vodivosti	37
3.1.4	Elektrostatické zvlákňování	38
3.1.5	Skenovací elektronová mikroskopie	38
3.1.6	FTIR a Ramanova mikroskopie	38
3.1.7	Měření kontaktního úhlu	39
3.1.8	Zpracování dat	39

3.2	Experiment 1: Škálování a výroba dvouvrstvého materiálu současným zvlákněním dvou roztoků.....	39
3.2.1	Výsledná morfologie	41
3.3	Experiment 2: Výroba blendy.....	43
3.3.1	Výsledná morfologie	44
3.3.2	Výsledky měření smáčivosti	45
3.3.3	Vliv rozpouštědlového systému na vlastnosti roztoku PVP	45
3.4	Experiment 3: Laminace	46
3.4.1	Výsledná morfologie	48
3.4.2	Výsledky měření smáčivosti	48
3.5	Experiment 4: Aditiva	49
3.5.1	Výsledná morfologie	50
3.5.2	Výsledky FTIR a Ramanovy mikroskopie	52
3.5.3	Výsledky měření smáčivosti	54
3.6	Shrnutí: Vyrobené vrstvy	55
3.7	Testování cytotoxicity základních vs. adovaných vrstev	56
3.7.1	Materiály a metodika	57
3.7.2	Výsledky	58
3.8	Testování materiálů in vitro.....	59
3.8.1	Materiály a metodika	59
3.8.2	Výsledky	60
3.9	Diskuze.....	63
4	Závěr	67
	Seznam použité literatury	69
	Seznam grafů	77
	Seznam tabulek	77
	Seznam obrázků.....	78
	Přílohy	79

Seznam použitých zkratk

BSA	bovinní sérový albumin
CCK	metabolický test
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol, dihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium, médium
EDS	energetická disperzní spektroskopie
etOH	etanol
FBS	fetální bovinní sérum
FITC	phalloidin-fluorescein isokyanát
FTIR	infračervený spektrometr s Fourierovou transformací
hm.	hmotnostní
CHEKO	rozpuštědlový systém chloroform: etanol: kyselina octová v poměru 8:1:1
KNT	Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů
LAM	laminát
NK	negativní kontrola
NPWT	Negative Pressure Wound Therapy, terapie podtlakem
PBS	fosfátový pufr
PCL	poly-ε-kaprolakton
PES	polyester
PLA	kyselina polyléčná
PUR P	vzorek polyuretanu s obsahem 20 hm. % propolisu
PUR, GP-PUR	polyuretan
PVA	polyvinylalkohol
PVP I	vzorek polyvinylpyrrolidonu s obsahem 5 hm. % jódu
PVP	polyvinylpyrrolidon
RH	relative humidity, relativní vlhkost vzduchu
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TUL	Technická univerzita v Liberci
TR-X	Triton X

1 Úvod

Diplomová práce se zabývá potencionálními degradovatelnými nanovláknými kožními kryty pro využití ve veterinární medicíně. Kožní kryty dočasně nahrazují funkce kůže v době jejího poškození, a to zejména ochrannou. Vývoj speciálních zdravotnických prostředků je v dnešní době na vzestupu.

Nanovlákná se podobají tělu vlastní struktuře, extracelulární hmotě, která společně s buňkami vytváří jednotlivé tkáně. Nanovlákná se proto hodí k vývoji různých biomateriálů, sloužících jako nosiče (scaffolds) pro nově vznikající tkáň nebo neadherující kožní kryty.

Vybranými materiály pro výrobu kožního krytu jsou dva biokompatibilní syntetické polymery – biodegradabilní polyuretan (PUR) a inertní polyvinylpyrrolidon (PVP). V kompozitu mají splňovat optimální vlastnosti přilnavosti a funkce materiálu po dobu hojení kůže bez nutné výměny a narušování procesů hojení. Nanovlákný kryt je navíc funkcionalizován, jódem do spodní rozpustné vrstvy PVP, za účelem dezinfekce rány, a propolisem, což je zástupce tradičních přírodních léčiv, který je přidáván do vrstvy PUR.

V této práci bude provedeno vzorování materiálů, výroba kompozitního materiálu, sledování vlastností vrstev pomocí měření kontaktního úhlu a obrazové analýzy skenovací elektronovou mikroskopií. Obsah látek bude dokazován pomocí infračervené spektroskopie, Ramanovy mikroskopie a EDS analýzy. Dále budou provedeny testy na cytotoxicitu výluhu materiálu a in vitro testování s buněčnou linií.

Cílem této práce je především technologické řešení výroby funkcionalizovaného kompozitního nanovlákného kožního krytu metodou bezjehlového elektrostatického zvlákňování, který by byl aplikovatelný u kožních poranění, kde došlo ke ztrátě nebo poškození kůže (nehody, popáleniny, kožní nádory aj.). Tento nový nanovlákný kryt by pak následně mohl najít uplatnění ve veterinární i humánní medicíně.

2 Teoretická část

Teoretická část je uvedena biologickým kontextem, kde jsou zmíněny vybrané základní informace o kůži a hojení, týkající se problematiky kožního krytí. Poté je přiblížen dosavadní přístup veterinární medicíny v hojení kožních poranění, používané kožní kryty, využití nanovláken, materiály včetně aditiv, výroba nanovlákných vrstev a jejich funkcionalizace.

2.1 Biologický kontext

Nanovlákné vrstvy jsou perspektivním materiálem pro mnoho biomedicínských aplikací. V biomedicíně se začaly využívat proto, že napodobují extracelulární hmotu, která společně s buňkami vytváří jednotlivé tkáně [1]. Jedná se tedy o přírodu napodobující (biomimetický) přístup. Tato kapitola obsahuje podkapitoly o tkáňovém inženýrství, kůži a hojení tkání.

2.1.1 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství je multidisciplinární obor, spojující znalosti z medicíny, přírodních věd a materiálového inženýrství za účelem regenerace, opravení nebo zlepšení funkce zdravých a poškozených tkání savců. Kombinuje se využití buněk a biomateriálů. Dosavadní zdrojem tkání nebo celých orgánů jsou především transplantace, která mají mnohá omezení (nedostatek dárců, imunitní reakce příjemce aj.) [2, 3].

Hlavními principy tkáňového inženýrství je izolace buněk, jejich kultivace, vložení do scaffoldu a aplikace na místo poškození. Vyvíjený biomateriál obvykle slouží jako podpůrný nosič (scaffold) pro jednotlivé buňky, které vytvářejí novou tkáň [2].

Scaffold, tedy nosič nebo lešení je struktura, která imituje mezibuněčnou hmotu a slouží jako dočasná, nebo trvalá opora buněk. Scaffold musí splňovat požadavky na chemické složení a mechanické vlastnosti, aby došlo k adhezi a proliferaci buněk na daném nosiči. Z hlediska materiálového jsou požadavky na scaffold následující: biokompatibilní, tedy snášenlivý v biologickém prostředí a netoxický pro buňky včetně produktů případné degradace (bez cytotoxicity), a případně biodegradabilní [4]. Důležité parametry materiálu ovlivňující buňky jsou povrchové vlastnosti a porozita. Také mechanické vlastnosti, zejména pevnost, elasticita a drsnost musí odpovídat parametrům okolní tkáně, jinak dochází k nežádoucímu oddělování scaffoldu od tkáně, případně zeslabování okolní tkáně. Struktura musí podporovat vaskularizaci a angiogenezi. Velikost pórů ovlivňuje prorůstání scaffoldu buňkami. Materiálové technologové se zabývají zejména zpracovatelností materiálů s vhodnou strukturou scaffoldu [2, 3, 5].

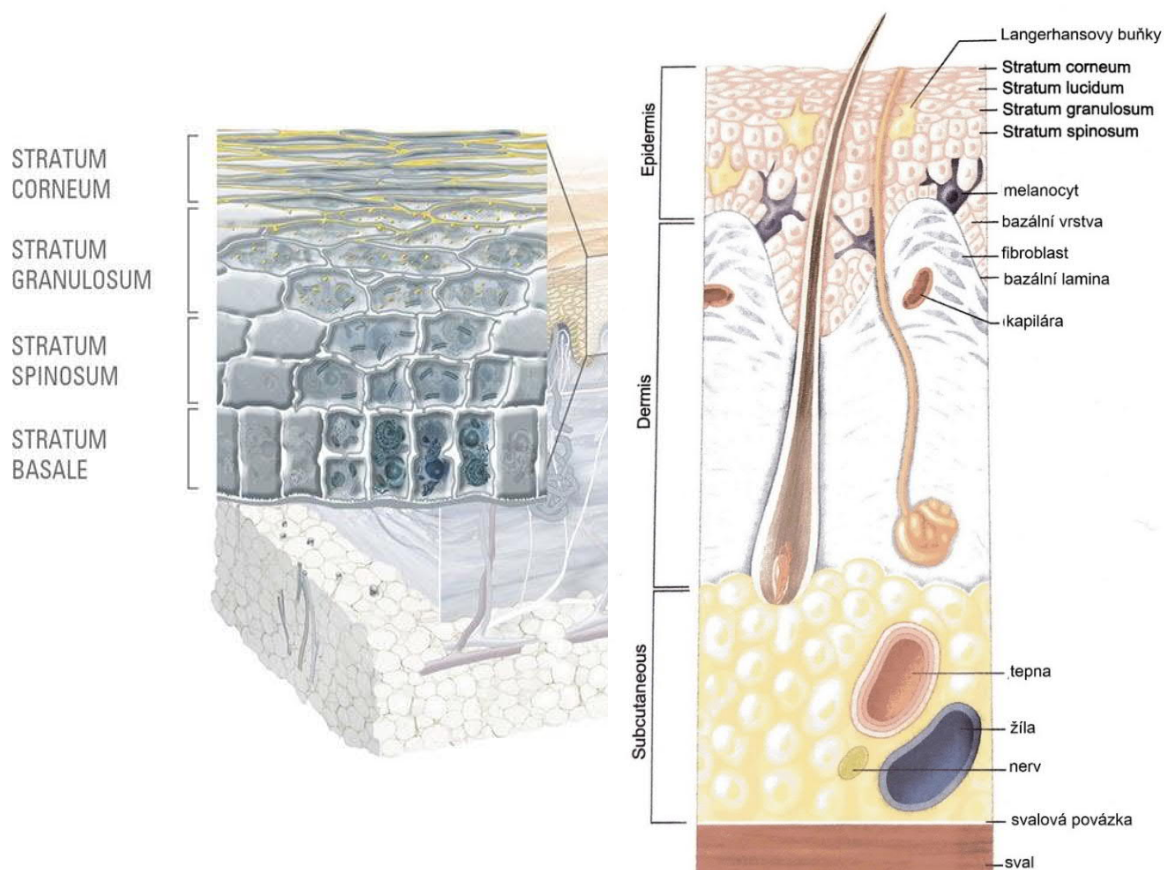
2.1.2 Kůže savců

Kůže je největší orgán těla obratlovců [6]. Odděluje vnitřní struktury těla od vnějšího prostředí. Hlavní funkce kůže jsou ochranné, sensorické, termoregulační, termoizolační, resorpční, exkreční, energetické, komunikační, regenerační a metabolické. Pro dosažení těchto vlastností se kůže neustále obnovuje [7].

Anatomicky rozlišujeme tři hlavní části: pokožka (epidermis), škára (dermis) a podkožní vazivo (subcutis) viz Obrázek 1. Pokožka je tvořena mnohvrstevným epitelem zrohovatělých buněk. Dělení probíhá v bazální vrstvě, kde jsou buňky v jednovrstvě zakotveny v bazální lamině. Nad ní se nachází stratum spinosum, vrstva (tvarově) mnohostěnných propojených buněk. Stratum granulosum obsahuje ploché buňky, začíná zde rohovatění. Ve vrstvě stratum lucidum ztrácí buňky jádro a tvoří tenkou vrstvu. Nejsvrchnější je stratum corneum, kde jsou buňky ploché, odumřelé, svázané k sobě v mnoha vrstvách, postupně se obnovují a odlupují. Langerhansovy buňky zajišťují imunitní obranu [5, 8].

Škára má mezenchymální původ a je tvořena zejména mezibuněčnou hmotou, kterou produkují fibroblasty. Jejimi hlavními složkami jsou přírodní polymery, a to proteiny (kolagen a elastin), glykosaminoglykany (kyselina hyaluronová, chondroitin sulfát) a glykoproteiny (laminin, fibronektin). Škára zajišťuje uchycení buněk, pružnost, pevnost v tahu, umožňuje komunikaci, tvoří objemovou majoritu tkání [9]. Dále je protkána pojivými, nervovými a kapilárními vlákny. Obsahuje také pigmentové buňky (melanocyty), které pomáhají chránit před UV zářením (zejména u psů s tmavou srstí se koncentrují u folikulů). Mazové a potní žlázy přiléhají na váček chlupu. Potní žlázy se obvykle u zvířat nevyskytují na celém povrchu těla, koncentrují se pouze na určitých místech, u psů je to na polštářcích pacek [8].

Podkožní vazivo je vrstva z tukových buněk (adipocytů) propojených kolagenními vlákny. Zajišťuje přichycení ke kostní či svalové tkáni a podílí se na termoregulaci organismu. Obsahuje cévy, vegetativní a senzitivní nervy, receptory. Mezenchymální kmenové buňky z tukové tkáně jsou multipotentní (mohou se obnovovat a diferencovat do více typů buněk). Klinické použití autologních buněk v ortopedii ukázalo, že tato léčba pomáhá při hojení chrupavky, kolenních a kyčelních kloubů [7] a ve veterinární medicíně pro regeneraci šlach a komplikovaných fraktur [8].



Obrázek 1 - Řez kůží. Vrstvy kůže jsou epidermis, dermis a subcutis. (Převzato a upraveno z [10] a [5])

2.1.3 Hojení

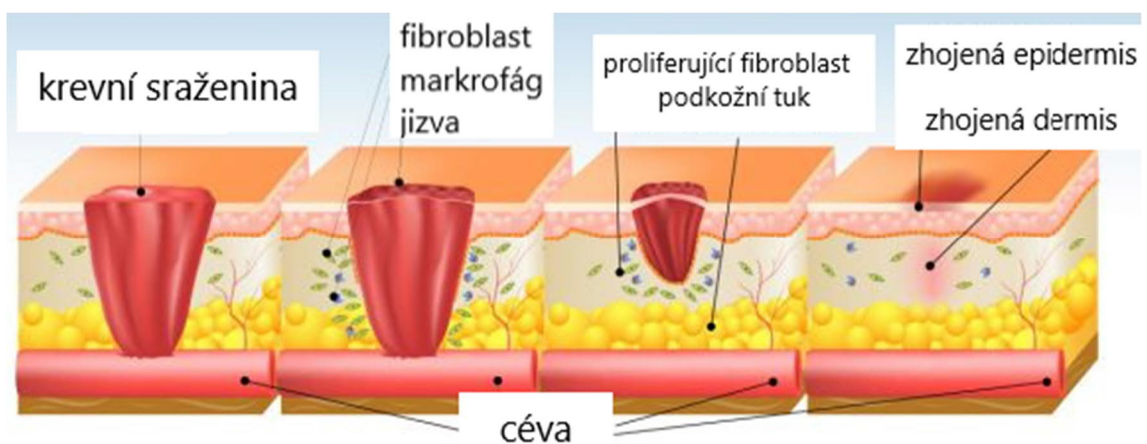
Hojení ran je komplexní proces, obnovující porušené funkce tkání. Reparační mechanismus se skládá ze čtyř základních fází: hemostáza, zánět, proliferace buněk a remodelace poškozené tkáně [5], viz Obrázek 2. Faktory ovlivňující průběh hojení jsou celkový stav pacienta, tedy např. věk, pohlaví, výživa, infekce, stres, stávající choroby [11]. Faktory nepříspěvající hojení rány jsou reakce na cizí materiály, infekce, zvýšený výtok z rány, ztráta krve, vysušování, ztráta tepla organismu. Vedlejšími faktory jsou také použité předchozí i dosavadní terapie (např. kortikosteroidy, ozáření) [12].

Po poškození tkáně následuje sled několika dějů, nejprve stažení cév (vazokonstrikce) a srážení krve (hemokoagulace), kdy krevní destičky uvolňují cytokiny a růstové faktory. Kaskáda signálů zajišťuje tvorbu fibrinu, který tvoří prvotní vláknitou sraženinu a dochází k přitahování (chemotaxi) specializovaných buněk a rozvoji zánětu (tzv. zánětlivá část hojení), který je podpořen rozšířením cév (vazodilatací), aby specializované buňky mohly snadněji proudit k místu poškození. Neutrofilů (buňky imunitního systému) mají čistící funkci, rozkládají

zbytky odumřelé tkáně a patogeny. Poté nastupují makrofágy, které pohlcují (fagocytují) bakterie a buněčný odpad (detrit). Pomocí chemotaxe přitahují buňky endotelu aj. pro opravu poškozených tkání. Rozkladem neutrofilů končí zánětlivá fáze [5, 13].

Další fáze hojení je množení buněk (proliferace), což je fáze mitotické aktivity, kdy dochází k tvorbě nové tkáně (epitelizaci). Fibroblasty jsou významně aktivní od třetího dne, nejvyšší produkce je sedmý den od poškození tkáně. Nové buňky migrují a syntetizují proteiny, zejména kolageny, které jsou hlavní složkou mimobuněčné hmoty (extracelulární matrix). Epitelizace probíhá od povrchu a krajů, zpravidla bývá provedená do dvou dnů (záleží na rozsahu poškození a celkovém stavu pacienta), kdy je povrch rány zakryt novou vrstvou buněk. Také dochází k tvorbě nových cév (angiogeneze) [5].

Poslední fáze hojení je remodelace tkáně, která začíná při uzavření rány novým epitelem a trvá v řádů týdnů až měsíců [5, 13].



Obrázek 2 - Fáze hojení: hemostáza, zánět, proliferace a remodelace. Převzato a upraveno podle [14].

2.2 Léčba kožních poranění ve veterinární medicíně

U zvířat je rána definována jako porušení měkkých tkání. Rozlišuje se chirurgická rána bodná, řezná, sečná, tržná, zhmožděná, rozdrčená, střelná, kousná, otrávená. Hojení přirozeně postupuje zvýšením prostupnosti cév v místě poškození, následuje otok. Nová tkáň (granulační) zakrývá plochu rány, dochází ke zjizvení, které vzniká vyplněním pojivovým vazivem v místě původní rány [15].

Dalšími druhy ran jsou proleženiny, nekrózy, popáleniny, omrzliny, otláčeniny, vykloubeniny, zlomeniny, výhřezy, kýla, cysty (dutiny s obsahem), nádory. Jejich léčení i hojení je specifické k danému typu [8, 15].

Často je rána doprovázena krvácením (tepenné – arteriální nebo žilní – venózní). Pro chirurgické ošetření se používá zaškrcení (gumovým obinadlem), tamponáda (pomocí gázy tlačící na cévy), aplikace tlakového obvazu, zaškrcení cévy, zašití cévy. Fyzikální přístupy zahrnují studenou vodu, elektrokauterizaci, termokauterizaci (zacelování pálením) a chemický postup zahrnuje podání lokálních hemostatik. Zástava může být i spontánní [15].

Ošetření dle stavu rány probíhá vyčištěním (dekontaminace), včetně případného vyřezání nekrotické tkáně (debridement), drenážováním pro odvod exsudátu, uzavření rány a zakrytí rány. Je časté, že zvíře není ošetřeno hned po vzniku rány, nebo dochází ke komplikacím. Nejčastější je hnisání, což je přirozený výpotek rány (exsudát), ovšem při jeho nadbytku a infekci dochází k problémům. Nahromaděním v tkáni vzniká absces, pokud má vývod, jedná se o hnisavý vřed (ulcus). Hrozí sepse, což je selhání organismu z důvodu celkového zaplavení mikroorganismy [15–17].

Pro dezinfekci rány se používají lokální výplachy např. povidon jód, hypermangan, lokální antibiotika a pro podpůrnou léčbu (často preventivně) antibiotika. Důvodem je častá kontaminace ran, nedostatečná diagnostika (z důvodu náročnosti časové a zejména finanční) a také stereotypem injekce – žádné léčení. Nadužíváním antibiotik vznikají resistance bakterií [16, 17].

Poranění kůže se ošetřuje podle rozsahu a typu rány. Týká se v podstatě všech veterinárních zákroků. Rána vystavená vzduchu vykazuje horší hojení, častější infekci, větší jizvení a také je pro majitele neestetická [18].

2.2.1 Kožní kryty

Kožní kryty mají za úkol zakrýt defekt, poskytnout mechanickou oporu a zkrátit dobu hojení. Ideální krytí má ránu udržovat ve vlhkém, ale nikoliv macerovaném prostředí. Zároveň odvádí výpotky z rány, umožňují výměnu plynů, ale nepropouští mikroby. Výrobek musí být bezpečný, kontrolovaně degradovatelný, se snadnou aplikací a nebolestivým vyměňováním. Také neobsahuje alergizující, toxické či jiné látky zhoršující průběh hojení [2, 19].

Dělení podle kontaktu s ránou je na kryty primární a sekundární. Primární krytí je ve styku s ránou, absorbuje sekret, zabraňuje vstupu infekce, mělo by být sterilní. Sekundární krytí je nad primárním, zajišťuje další ochranu, kompresi, stabilitu. Zejména u zvířat je důležitá pro správnou funkci primárního krytí, časté jsou adhezivní pásky. Pro zabránění okusování rány se u zvířat používají další přídavné pomůcky jako ochranný límec [5].

Podle typu a diagnostiky rány se volí vhodný krycí materiál, kterých dnes existuje široká škála. Rozlišují se dvě základní kategorie, a to tradiční a moderní. Tradiční materiály zahrnují produkty jako gáza, obvaz, náplast, připravené tkaním nebo netkanými technologiemi z vláken bavlny, viskózy nebo polyesteru. Jsou dostupné a levné, může docházet k bolestivému odstraňování, kdy rána příliš přilne (adheruje) ke krytí. Vylepšené gázy mohou být impregnovány parafínem, zinkem, jódem atd. pro zlepšení uvedených nevýhod. Bavlněné, celulózové a polyamidové obvazy se obvykle používají v kombinaci s dalšími kryty, kterým poskytují oporu [20].

Moderní krytí vytváří lepší prostředí pro hojení rány. Zahrnuje použití syntetických a přírodních polymerů, dosavadních znalostí a inženýrských postupů pro vývoj vhodných materiálů pro optimální hojení, typicky se jedná o vlhké prostředí. Mezi zástupce patří hydrogely, hydrokoloidy, algináty, polopropustné filmy a pěny [5, 20].

Hydrogely udržují vlhké prostředí, dokážou absorbovat menší část výpotků, jsou neadhezivní. Mezi používané materiály patří polyvinylalkohol (PVA), polyvinylpyrrolidon (PVP), hyaluronan, želatina (degradovaný kolagen), karboxymethylcelulosa, pektin. Nevýhodou je dehydratace rány a nutnost použití sekundárního krytí. Hydrokoloidy vytváří gel po kontaktu s ránou [5, 12].

Algináty jsou přírodní polysacharidy získané z mořských řas. Aplikují se v netkané vrstvě nebo ve svazku vláken. Mají hemostatický účinek, absorbují výpotek (přibližně 20-30x své hmotnosti) a jsou vhodné i na infikované rány, navíc jsou biodegradabilní [12].

Filmy jsou tenké, průhledné, adhezivní, polopropustné voděodolné kryty. Udržují vhodnou vlhkost, podporují čištění, poskytují mechanickou ochranu. Vyrábí se nejčastěji z polyuretanu. Nehodí se pro infikované rány, při výměně dochází k narušení hojení. Pěny jsou z absorbujících materiálů, zejména polyuretanových pěn. Vytvářejí vlhké prostředí a i termickou izolaci rány [5, 19].

Vylepšením těchto krytů je přidávání látek, které podporují hojení, růstové faktory nebo antimikrobiální látky, léčiva, např. antibiotika (ačkoliv preventivní používání zvyšuje bakteriální rezistence) [12].

Existují i další terapie čištění a péče o ránu. Především při prodlouženém hojení a pro chronické rány se používají další postupy pro zamezení rozvoji infekce a dalšímu zpomalení hojení. Také je tlak na odstupování od managementu otevřené rány, která je náchylná na znečištění, o to více u zvířat [17].

Zajímavou novou technikou je podtlaková terapie (Negative Pressure Wound Therapy, NPWT) pomocí přerušovaného, nebo stálého podtlaku. Díky uzavřenému prostředí dochází k prevenci sekundární infekce, odvádí se exsudát, čímž se znovu snižuje možnost bujení mikroorganismů. Objem rány se zmenšuje, dochází k podpoře proliferace a rychlejšímu zahojení. Již bylo popsáno použití u psů, koček, koní, tygra, želvy nebo nosorožců [21, 22].

Vhodnost aplikace NPWT je pro akutní i chronické rány, otevřené rány, typicky doprovázené velkou ztrátou kůže (včetně popálenin) a sekundární chirurgické rány, kožní grafty i otevřené břišní dutiny. Nemůže být použito přímo na nervy, cévy, kosti, podkožní tuk a při krvácení. Na ránu je přiloženo pěnové krytí (PUR, PVA, PES) a s přesahem potaženo folií [22].

2.2.2 Náhrady kůže

Pro velká poškození kůže je potřeba odkryté tkáň chránit. Konvenční léčení využívá dnes autograftů (tělu vlastní – autologní transplantáty). Kůže se sejme na nepostižené části těla a přesune se na místo defektu. Tento postup nelze použít vždy, zejména u vážných popálenin (kdy již není dostatek zdravé kůže). Výhodou je, že není problém s imunologickou reakcí, jedná se o materiál tělu vlastní. Pro snížení nekrózy je nutné brát pouze vrchní vrstvy kůže, bez podkožního tuku [5, 23, 24]. U zvířat se tento postup používá, nejčastěji se kůže odebírá z hrudníku a břicha [24].

Při limitaci zdrojů se může použít allograft (donorem je stejný živočišný druh, ale jiný jedinec než pacient). Tento postup je využíván hojně od druhé světové války, výhodou je možnost skladování zmrzlých tkání, či kadaverů. U zvířat se navíc nevyskytují časté imunologické reakce [25], nevýhodou je zde ale možný přenos nemocí. Další možností je aplikace xenograftů (donorem je jiný živočišný druh než je pacient), které není univerzální, ale může být alespoň dočasné [23]. Například ve veterinární ortopedii se používá při transplantaci kosti (allografty i xenografty) pro malá zvířata [26].

Jedním z cílů tkáňového inženýrství je vytvoření vhodné náhrady. Takové, která bude dočasně, nebo trvale přebírat ochrannou funkci a bude vhodným prostředkem pro obnovu tkáň při potlačení rizik odmítnutí implantátu a přenosu nemocí [27].

Samotný scaffold má představovat vhodný nosič pro proliferaci buněk. Představuje tedy lešení mimobuněčné hmoty. Již existují řešení komerčně dostupná: acellulární Biobrane, Integra, Alloderm, která dermis simulují jako směs vláken a epidermis jako silikonovou membránu. Produkty s obsahem buněk (zde se rozlišují autologní nebo allogenní) jsou potom epidermální náhrady, např. Epicel, Autoderm, TransDerm, dermální náhrady, např. Dermagraft,

Hyalograft. Zatím mají výrobky mnohá omezení, např. nedostatečná vaskularizace, časová příprava (v řádu týdnů), legislativa. Jedná se o komplexní téma, dochází k dalšímu rozvoji, [2, 23].

Kožní kryt je vrstva zajišťující dostatečnou hydrataci rány, absorpci a odvod výpotku (exsudátu), minimalizaci traumatu a bariéru pro vnější mikroorganismy. Jako velmi vhodný materiál se proto jeví nanovláknenné vrstvy [27].

2.3 Nanovláknenné kožní kryty

Nanovláknenné vrstvy se podobají mezibuněčné hmotě kůže, kde se přirozeně nachází vláknenné struktury, např. kolagenů nebo elastinu, které vytvářejí 3D síť. Struktura v řádech nanometrů rozhoduje o interakcích buněk s materiálem jako je migrace, adheze a proliferace. Nanovláknna mají velký měrný povrch a vysokou porozitu [27].

Velký měrný povrch zajišťuje více pojících míst s proteiny v biologickém systému a také se nabízí k povrchové funkcionalizaci, která může mít i časový průběh (Drug Delivery System) či lokální uvolnění vyvolané změnou podmínek (např. uvolnění při zánětu, který zvyšuje pH) [6]. Vysoká porozita vrstvy obsahující malé póry zajišťuje dobrou výměnu plynů pro buněčné dýchání, zároveň ochraňuje před vysycháním rány. Naopak zhoršuje prostupnost pro mikroorganismy do rány z vnějšího prostředí. Také pomáhá k estetičtějšímu zahojení rány. Ve scaffoldu podporuje prorůstání buněk a neovaskulazizaci [28, 29].

Nanovláknenné krytí je multifunkční. Existují základní vrstvy a vrstvy s přídavkem látek – s hemostatiky, antibakteriální, antioxidační, protizánětlivé, s růstovými faktory atd. [27].

K optimálnímu fungování kožního krytu je potřeba vybrat vhodný materiál. Při odstraňování tradičních vláknenných krytů často dochází k poškození hojené tkáně, proto přichází na řadu biodegradovatelné materiály, které podporují hojení, jsou společně s produkty degradace dále netoxické a organismem vyloučitelné a nemusí se náročně odstraňovat [30].

Výhodou je možnost řízení degradability. V některých případech je vhodná dočasná podpora s postupnou degradací vrstvy (kožní kryty [28, 31–33], například skupina Rockwood et al. [34] navrhuje kryt z biodegradabilních elektrostaticky zvlákněných vláken polyuretanu), v jiných je nutné vytvořit stabilní strukturu (nanovláknenné nitrooční implantáty [35]).

Nanovláknenné scaffoldy se obvykle připravují z roztoků polymerů. Jedná se o vodná, ale častěji organická rozpouštědla. Z přírodních polymerů jsou zástupci kolagen, chitosan, chitin,

kyselina hyaluronová, hedvábí atd. Ze syntetických polymerů potom polyvinylalkohol (PVA), kyselina polymléčná (PLA), polykaprolakton (PCL), polyuretan (PUR) atd. Časté je využívání směsí (PVA/PLA, kopolymer kyselina polyglykolové s polymléčnou/kolagen, chitosan/hedvábí ad.) [5, 31, 36].

Nanovláknenné kožní kryty se těší velkému rozvoji, mnoho zdravotnických prostředků je již ve fázi klinických studií, příkladem je český Nanotardis z PCL (KNT TUL) [32]. A vzdálené už není vyrábět v čase podle aktuálních potřeb pacienta, například pomocí pistole Fiber Flow (vyvinuto na KNT), která využívá odstředivého zvlákňování a byla uvedena firmou Pardam v roce 2019 [37]. Jiné přenosné elektrospinningové zařízení používá studie Liu et al. [38] z roku 2018 pro výrobu nanovláknenné vrstvy in situ, o rok později bylo použito podobné zařízení na hojení kůže prasat [33].

2.3.1 Nanovláknna ve veterinární medicíně

Nanotechnologie jsou používány i ve veterinární medicíně, zemědělství a chovu zvířat. Pomocí nanotechnologií se zpřesňuje diagnóza chorob a jejich léčba, detekce nádorů, cílené podávání léčiv (Drug Delivery System), je aplikovatelná v oblastech výživy, reprodukce a chovu, bezpečnosti potravin, výroby vakcín a metod tkáňového inženýrství. Hlavním cílem je vylepšení současně využívaných postupů a metod [39].

Veterinární medicína bývá oproti humánní opomíjená, ačkoliv se významně podílí na jejím rozvoji. V preklinických testováních materiálů je vždy zahrnuto nejprve testování na vybraných druzích zvířat. Existují již přísné regulace, ovšem stále se pokračuje a je třeba si uvědomit s tím spojené etické otázky. Navíc existují situace, kdy je použití animálních modelů nevhodné, například pro mezidruhovou rozdílnost. Cílené veterinární aplikace se vyvíjí zejména pro závodní zvířata či ohrožené druhy. Dnešní největší rozvoj se zatím vyskytuje u dostihových koní a jejich pohybového aparátu, další oblastí je veterinární praxe malých zvířat [12].

Pro velká zvířata byly Eastem et al. vyvíjena nanovláknna z polypropylenu a polykaprolaktonu sloužící jako kýlní síťky. Doporučují kompozitní syntetický materiál na základě dobrých in vivo výsledků. Oproti standartním materiálům došlo k menšímu zjizvení a jizvy jsou pružnější [40]. Z blendy z chitosanu, PVA a PCL ze studie Gholipour-Kanani et al. byly připraveny technologií elektrospinning nanovláknenné vrstvy, které byly využity jako kožní kryty pro hojení řezných ran psů, testy in vivo prokázali jejich účinnost pro zlepšování hojení [41]. Pro psy

byl taktéž vyvinut Pandayem et al. 3D scaffold pro mezenchymální kmenové buňky z orientovaných polykaprolaktonových nanovláken, který byl otestován in vitro pro podporu osteogeneze a doporučují PCL nanovláknenné vrstvy pro použití in vivo.

Nanovláknena mohou být adována různými léčivými látkami. Např. nanovláknenné vrstvy z chitosanu pomocí elektrospinningu pro čištění a hojení popálenin jak uvádí Bayat et al. [42]. Přídavek 2 % bromelainu zlepšil proliferaci buněk oproti samotným chitosanovým nanovláknům v in vitro testech a doporučují využití pro hojení popálenin. Stokol et al. se zabývali doručováním léčiv v nanovlákněch, do metastáz rakoviny kostí a prsních žláz u psů, aldoxorubicinem, byla prokázána in vitro cytotoxicita pro buňky uvedených nádorů [43]. Scaffold z kopolymeru kyselin polymléčné a polyglykolové skupiny Yun et al. s příměsí hydroxyapatitu je doporučován pro rekonstrukce kostí u psů. Po dobrých výsledcích in vitro testů scaffoldu byly provedené in vivo testy na beaglech, které ukázaly, že kost regeneruje lépe po aplikaci degradabilního 3D tištěného scaffoldu s kompozitními nanovlákněmi [44].

Studii stále přibývá, a je vidět, že nanovláknenné vrstvy jsou slibný materiál.

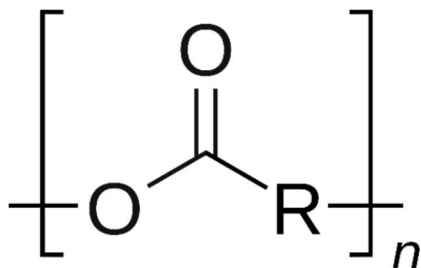
2.4 Používané polymerní materiály

Polymerů využívaných pro nanovláknenné vrstvy existuje široká škála. Polymery se rozdělují na přírodní a syntetické. Přírodní polymery se získávají z obnovitelných zdrojů, mají batch-to-batch variabilitu, tedy záleží na konkrétním místě odběru, protože jsou heterogenní, a s tím souvisí také horší zpracovatelnost. Obecně jsou biokompatibilní, ale může se objevit přehnaná imunitní reakce. Oproti tomu syntetické polymery mají stálé složení, které lze lépe regulovat při výrobě, která je snadno reprodukovatelná [2].

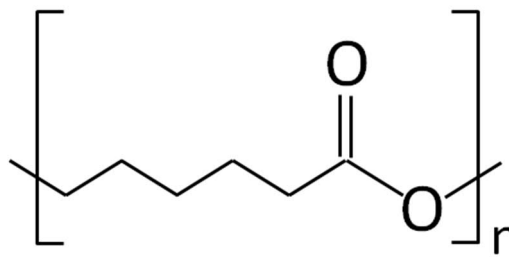
S ohledem na zaměření této práce budou zmíněny skupiny a typy používané v Praktické části.

2.4.1 Polyestery (PES)

Polyestery jsou širokou skupinou polymerů obsahujících v řetězci esterové vazby (viz Obrázek 3). PES vznikají reakcí vícesytných alkoholů s vícesytnými karboxylovými kyselinami. Existují přírodní i syntetické, alifatické i aromatické, nejznámějším zástupcem je polyethylen tereftalát používaný například pro obaly nápojů a textilní vlákna. Jako biomateriály jsou využívány nedegradabilní, či biodegradabilní polyestery. Kyselina polyglykolová (PGA) byla syntetizována v 50. letech 20. století. Společně s kyselinou polylaktidovou (PLA) a polykaprolaktonem (PCL) patří k využívaným zástupcům [45].



Obrázek 3 - Obecný vzorec PES



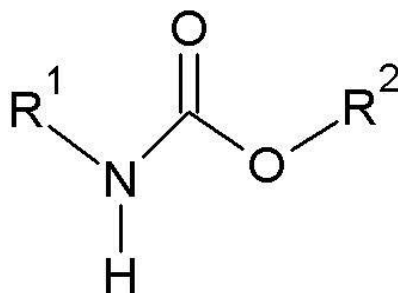
Obrázek 4 - Vzorec PCL

Polykaprolakton (PCL) je běžným zástupcem pro použití v medicíně pro pevné šicí nitě, nosiče léčiv nebo přípravu implantátů. Je dobře mísitelný s ostatními polymery, může být složkou polyuretanů [46]. Jeho vzorec je na Obrázku 4.

Vzniká polymerací za otevření kruhu z ω -kaprolaktonu. Krystalinita dosahuje hodnot 57–76 %. Teplota tání je 58–63 °C, teplota skelného přechodu je mezi -72 a -60 °C. Rozkládá se hydrolyzou esterových vazeb i za tělní teploty. Doba úplného odbourání z těla vysokomolekulárního polymeru jsou přibližně 3 roky [2]. Je netoxický, střední letální dávka při orálním podání je pro krysy 10 g/kg [47].

2.4.2 Polyuretany (PUR)

Polyuretany vznikají katalyzovanou reakcí diisokyanátů s vícefunkčními alkoholy (polyoly). Lze je řadit mezi blokové kopolymery polyesterů nebo polyetherů spojených uretanovou vazbou (Obrázek 5). Používají se hojně v průmyslu jako pěny, tmely, vlákna.



Obrázek 5 - Obecný vzorec PUR

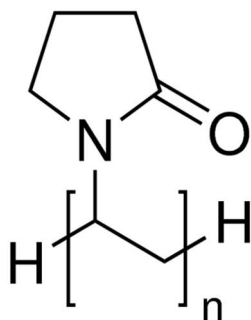
PUR jsou inertní, mechanicky odolné a flexibilní, biokompatibilní. Pokud obsahují lineární řetězce, jedná se o termoplasty, při vyšším stupni zesíťování vznikají termosety. Termoplastické polyuretany mají dvě složky, tvrdé a měkké segmenty. Tvrdé segmenty mají rigidní strukturu, větší obsah krystalické fáze. Polyoly v dlouhých segmentech poskytují pružnost a

měkkost. Pro stabilní PUR je základem polyetherový systém, biodegradabilní PUR se připravují z polyesterových diolů, proto podporují buněčnou viabilitu. PUR jsou vhodné jak pro tvrdé tkáně (kost, chrupavka), tak i pro použití v měkkých tkáních [48, 49].

Urethanová vazba je poměrně stabilní, ale pěny z aromatických isokyanátů jsou citlivé na UV záření. V organismech jsou jako první napadány amorfni části měkkých segmentů. Degradace PUR probíhá hydrolýzou, také enzymaticky pomocí esteráz, urethanáz a proteáz. PUR nejsou stabilní v kyselém prostředí [5].

2.4.3 Polyvinylpyrrolidon (PVP)

PVP je polymer schválený jako bezpečný pro farmaceutické účely. Je biokompatibilní, netoxický, hemokompatibilní [50]. Používá se v potravinářství, kosmetice, farmacii, na fotografické papíry. Syntetizuje se radikálovou polymerací, monomery se vyrábí z prekurzorů acetylenu a formaldehydu. Jeho strukturní vzorec je zobrazen na Obrázku 6.



Obrázek 6 - Vzorec PVP

PVP je amfifilní, neionický, inertní materiál. Strukturní vzorec je na Obrázku 6. Má dobrou přilnavost, používá se pro adhezivní filmy. Je hydrokopický, rozpouští se ve vodě a polárních rozpouštědlech, je nerozpustný v esterech, etherech, ketonech (absolutně vysušený) a uhlovodících. Jako prášek je stabilní a má tendenci k navlhání. Ve vodném roztoku je stabilní, pouze je nutné jej chránit před plísněmi. Tvoří ochotně komplexy, například s jódem, snižuje toxicitu takto vázaných látek [50].

Molekuly větší jak 40 kDa mohou být alergenem v krevním séru, což ale není běžný jev. Tělo PVP vyloučí nezměněné. Nedegradované projde i čističkou odpadních vod, ale zatím nebyla zaznamenána škodlivost. Pro odbourání je potřeba γ -laktamáza na štěpení laktamového kruhu [50].

Teplota tání je 100–140 °C, teplota skelného přechodu je 175 °C, které nedosahuje, neboť dříve dochází k dekompozici. Střední letální dávka při orálním podání pro krysy je 100 g/kg, při aplikaci na kůži králíků 560 mg/kg [51].

2.5 Aditiva

Vlastnosti základních polymerů je možné vylepšovat přidáváním dalších látek. Možností je nepřehledné množství, zde jsou uvedeny dva zástupci, které jsou použity v praktické části. Jód má dobré dezinfekční účinky, proto bude přidáván ke spodině rány. Propolis, přírodní produkt včel, má podporující účinky, je přidáván do vrstvy PUR.

2.5.1 Jód

Jód patří do skupiny halogenů. V přírodě se vyskytuje pouze ve sloučeninách. Je to biogenní prvek, který je nezbytný pro vývoj mozku a hormony štítné žlázy. Ve 20. letech 20. století se proto začal přidávat do kuchyňské soli. Zdrojem jsou mořské ryby a plody, oceány obsahují koncentraci přibližně 50 mg/l [52].

Elementární jód se vyskytuje v kovově šedých šupinách, je toxický, snadno sublimuje a jeho páry jsou nebezpečné. Má silně dezinfekční a leptavé účinky. Střední letální dávka pro myši při orálním podání je 14-22 mg/kg [53].

Jód se v organismu přeměňuje na jodid, který je koncentrován ve štítné žláze. Nadbytek se vylučuje zejména ledvinami. Jodidy procházejí placentou a jsou vylučovány do mateřského mléka [54].

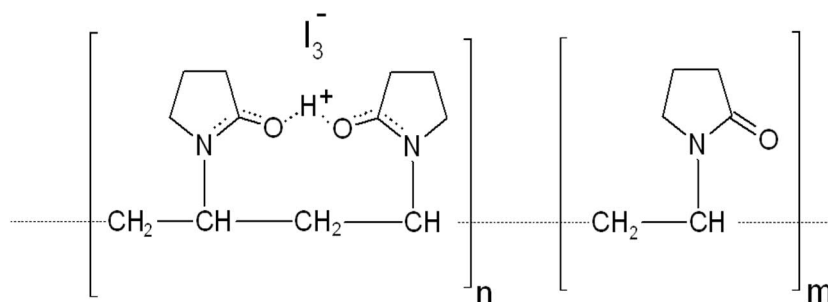
Jódovaný povidon

Latinsky Povidonum iodatum je dezinfekční přípravek, ve kterém je jód vázán komplexně (Obrázek 7). Je účinný proti bakteriím, sporám, virům, kvasinkám, houbám a prvokům. Roztok je stabilnější než elementární jód. Má typicky hnědou barvu a je rozpustný ve vodě [55].

V 10% koncentraci (ve stabilizovaném okyseleném glycerolu) je znám také jako Betadine, SÚKLEM schválený přípravek. "Betadine je indikován jako kožní dezinfekční přípravek pro použití před aplikací injekce, odběrem krve nebo jinou punkcí, biopsií, transfuzí, infuzí, k dezinfekci kůže a sliznice před chirurgickým zákrokem, pro aseptické ošetření ran, pro léčbu kožních bakteriálních a plísňových onemocnění, k celkové nebo částečné dezinfekci pacienta před chirurgickým zákrokem (dezinfekční koupel)." [54]

Výhodou Betadine, která stojí i za hojným využíváním ve veterinární medicíně, je nedráždivost. Je účinný v pH 2–7, a může být oslabován enzymy, nepoužívá se proto s ostatními dezinfekčními činidly [54].

Příprava jódovaného povidonu je mnohokrát patentována a prodávána pod různými obchodními názvy, dalším je například Kollidon od firmy BASF.



Obrázek 7 - Vzorec jódovaného povidonu

Elektrostatickým zvlákňováním se již zabývalo několik týmů, Ignatova et al. [56] vyrobili zvlákňováním z jehly nanovlákná z vodných roztoků jódovaného povidonu a směsi polyethylenoxid/jódovaný povidon, i se síťováním pro aplikaci jako antimikrobiální kožní kryty.

Sebe et al. připravili nanovlákná pomocí odstředivého zvlákňování a in vitro testovali antibakteriální působení jódu v kompozitu PVP/PVA/jód pro aplikaci pro kryty ran. Vyrobená vlákna měla antimikrobiální aktivitu [57].

Liu et al. v roce 2018 publikovali zvlákňování PVP s jódem pomocí přenosného zvlákňovacího zařízení pro výrobu in situ kožních krytů [38].

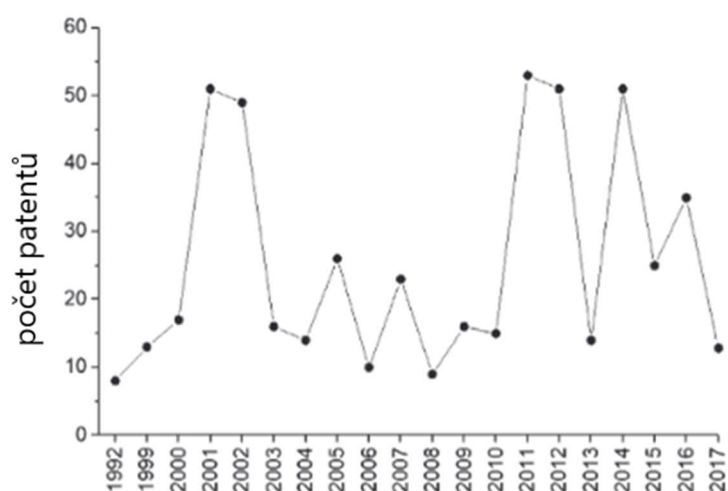
Shitole et al. zvlákňovali koaxiálně (jádro-plášť) jódovaný povidon (3%) s PCL. Také modifikovali povrch L-lyzinem, což zvýšilo viabilitu buněk, provedli antimikrobiální a mechanické zkoušky, materiál doporučují pro účel použití jako kožní kryty [58].

2.5.2 Propolis

Propolis je pryskyřičný materiál produkovaný včelami. Obsahuje asi 30–40 % včelího vosku, 50–60 % pryskyřic, 5–10 % esenciálních olejů a 5 % pylu [11]. Z hlediska chemického obsahuje více jak 300 molekul, mezi nimi flavonoidy, fenolové kyseliny, esterové deriváty, terpeny, aldehydy, ketony, alkoholy, steroidy, aminokyseliny atd. [59]. Složení se liší vzhledem k zeměpisné poloze, skladbě rostlin, ročnímu období i typu včel. Patří k heterogenním přírodním substancím [60].

Včelám slouží k ochraně úlu, proti mikroorganismům, vyplňují jím mezery proti větru, dešti. Nechtěného návštěvníka úlu jím obalí, zahubí a zamezí jeho rozkladu. Je získáván jako vedlejší včelařský produkt. Terapeutické účinky jsou pozorovány již od starověku. V 18. století byl propolis zapsán jako léčivo v Londýně. Hojně využívaný byl i v průběhu 2. světové války. Byly prokázány antimikrobiální (antibakteriální, antifungální i antivirové), antiparazitní, anti-oxidační, protizánětlivé, protirakovinné, imunomodulační a hepatoprotektivní účinky [61].

Nyní se používá při onemocnění horních cest dýchacích, pro hojení ran, popálenin a zánětů jako jeden z přírodních produktů. Uplatňuje se také v potravinářství a kosmetice. Ve veterinárním lékařství je využíván pro podporu hojení (zejména uzavírací funkce) u koní a psů, konkrétně proti růstu nádorů, při bakteriálních infekcích, zánětech, dále na plísňová onemocnění, alergické reakce, v ústní dutině, očních problémech nebo onemocnění jater [62], pro zvýšení stravitelnosti v bacheru dojníc, ke zvýšení kvality mléka (jako doplněk stravy) nebo k ochraně epitelálních buněk proti patogenům způsobujících mastitidu ve vemenech). Počet patentů ve výrobcích pro veterinární medicínu zobrazuje Graf 1 [61].



Graf 1 - Počty patentů ve využití propolisu ve veterinární medicíně 1992-2017 [61]

Přidáváním propolisu do nanovláken se již zabývalo několik vědeckých týmů. Asawahame et al. zvláknili pomocí jehly PVP s aditivem propolisu pro použití v ústní dutině. Výsledky byly testovány na inhibici *Streptococcus mutans*, kterou vykazovaly [63].

Pro scaffold s antibakteriálními vlastnostmi připravili Kim et al. elektrostatickým zvlákněním z jehly nanovláknennou vrstvu z polyuretanu adovanou propolisem v koncentracích 0, 5, 10 a 30 %. Kompozit je homogenní, zvyšuje se hydrofóbnost a antimikrobiální aktivita. In vitro studie prokázali ochotnější růst na scaffoldu a doporučují ho pro použití jako kožní kryt [59].

Adomaviciute et al. zvlákňovali PVP pomocí Nanospideru s propolisovou tinkturou a nanočásticemi stříbra pro rychlé uvolňování v kožních krytech. Sledovali uvolňování fenolických sloučenin. Vyrobený materiál má antimikrobiální vlastnosti. V této studii nebyly provedeny in vitro testy [64].

Bilginer et al. elektrostaticky zvlákňovali z jehly vodný roztok PVA s přídavkem propolisové tinktury (etanolové). Vrstva byla síťovaná glutaraldehydem. S vyšším obsahem propolisu došlo ke zvýšení kontaktního úhlu. Nebylo provedeno in vitro testování [65].

Stojko et al. připravili nanovlákněné vrstvy pomocí jehlového zvlákňování z kopolymeru polylaktidu a kyseliny glykolové u s různými poměry kopolymerů a s obsahem 5 a 10 % propolisu. Studovali uvolňování a degradaci materiálu, in vivo testování hojení popálenin na prasatech. Doporučují nadějný nanovlákněný krycí materiál s kontrolovaným uvolňování apiterapeutických látek jako účinnější náhrady dosavadních kožních krytů [66].

2.6 Výroba nanovláken

Nanovlákná jsou definovaná jako vlákna s průměrem pod 1 mikrometr [22], jeden z jejich rozměrů je tedy v měřítku nanometrů. Mají velký měrný povrch, vytvořená vrstva je porézní a lze je funkcionalizovat. Z důvodu bezpečnosti v medicíně se volí biokompatibilní či biodegradovatelné materiály, které při případné degradaci na rozměry délky v mikrometrech nejsou rizikem pro buňky, ani co se týká kumulace [1].

Z hlediska průmyslové výroby vede elektrostatické zvlákňování (stroje Nanospider od firmy Elmarco) a také odstředivé (například stroje Cyclone od firmy Fiberio). Předpokládá se rozvoj produktivní metody střídavého zvlákňování [67]. Další přípravy jsou speciální, zatím v laboratorním měřítku, a to samosestavování molekul, syntéza šablonou, stříhové (smykové) zvlákňování, fázová separace, tažení (drawing). Také je možné modifikovat meltblown (výše tekuté polymery, speciální zvlákňovací hlava atd.).

2.6.1 Proces elektrostatického zvlákňování

V této práci bylo použito elektrostatické zvlákňování. Jedná se o momentálně nejproduktivnější metodu. Elektrostatické zvlákňování je samoorganizovaný proces výroby nanovláken za působení vnějšího elektrického pole vysoké intenzity. Rozděluje se na dva základní typy, zvlákňování z jehly (kapilární), kdy vzniká jediná polymerní tryska, nebo bezjehlové, tedy z volného povrchu. Při zvlákňování z volného povrchu dochází ke vzniku mnohočetných polymerních trysek a zvyšuje se tak produktivita výroby.

Bezjehlové zvlákňování dobře ilustruje tyčková elektroda (viz Obrázek 8), což je jednoduché laboratorní zařízení. Polymerní roztok (3) je přiváděn na elektrodu (2), kde za působícího elektrického napětí v řádu kilovoltů dochází k tvorbě polymerní trysky (3), která se ztenčuje a vyrobená nanovlákná (4) jsou zachytávána na kolektor (5), který je uzemněný, nebo opačně nabíjený.

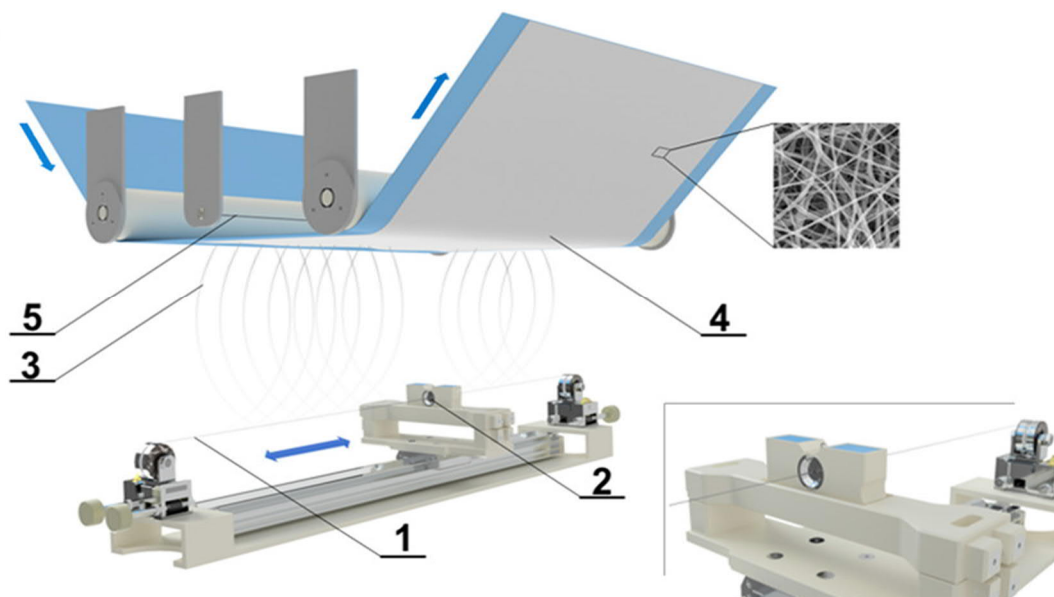


Obrázek 8 - Elektrostatické zvlákňování z tyčky [68]

Využívá se posloupnosti fyzikálních jevů: destabilizace volného povrchu polymerního roztoku vede ke vzniku trysky, která má stabilní a bičující část, dochází k vypařování a vypuzování rozpouštědla vlivem zmenšujícího se průměru a usazování nanovláken na kolektoru. Vlákna se nespojují díky odpuzování stejných nábojů, které přechodně nesou [67].

Nanospider

Jedná se o průmyslový stroj pro zvlákňování nanovláken z volného povrchu polymerního roztoku v elektrostatickém poli, jde o průmyslově používanou technologii. Dochází ke spontánnímu tvoření trysek z volné hladiny. Stroj Nanospider byl vyvinut na KNT týmem profesora Jirsáka a patentován [69] v roce 2004. Firma Elmarco stroj vylepšila a nyní se používá po celém světě. Schéma zobrazuje Obrázek 9. Elektrody jsou struny (1 a 5) připojené ke zdrojům vysokého elektrického napětí. Na spodní zvlákňovací strunu je nanášen polymer pomocí pohyblivého dávkovacího zařízení (2). Dochází k samoorganizovanému vzniku nanovláken (3). Vzniklá vrstva (4) je odváděna na spunbondové nosné textilii. Na laboratorní verzi tohoto stroje (o šíři 0,5 m) probíhal vývoj popsany v této práci.



Obrázek 9 - Schéma Nanospideru se strunovou zvlákňovací elektrodou [70]
 1, 5 - strunová elektroda, 2 - dávkovací zařízení roztoku, 3 - nanovlákná, 4 - nanovláknenná vrstva

Obrázek 10 zobrazuje zvlákňovací linku stroje NS 8S1600U. Pro představu výrobce uvádí parametry: vzdálenost elektrod v rozsahu 150 až 250 mm, rychlost převíjení od 0,2 do 40,0 m/min, roztok se dávkuje ve várce 60 l. Teplota při zvlákňování je 20–30 °C a vlhkost nejčastěji 20–40 % RH, což zajišťuje klimatizace. Stroj je schopný provozu 24/7. Pro zákazníky Elmarco dodává stroje na míru, pro konkrétní polymer a další požadavky [71].



Obrázek 10 - Nanospider NS 8S1600U [72]

2.6.2 Parametry ovlivňující elektrostatické zvlákňování

Polymerní roztok musí splňovat základní parametry jako je polarizovatelnost molekul v elektrickém poli, mít vhodnou viskozitu pro stabilitu vláken při zvlákňování. Proces se skládá z hydrodynamických a elektrických nerovnováh [67, 73].

Zvláknitelnost závisí na parametrech materiálů a procesních podmínkách. Mezi materiálové parametry patří typ polymeru, jeho struktura, molekulová hmotnost a polydisperzita, parametry roztoku, jako jsou koncentrace, rozpouštědlový systém (rychlost odpařování, rozpustnost polymeru), vlastnosti přidávaných aditiv, elektrická vodivost roztoku, povrchové napětí, viskozita ad. Procesní podmínky zahrnují použité elektrické napětí, vzdálenost mezi elektrodami, klimatické podmínky (teplota a vlhkost), rychlost dávkování roztoku, rychlost vypařování rozpouštědel, i vlastnosti nosného materiálu (který musí být alespoň částečně vodivý) [74, 75].

Materiálové parametry

Molekulová hmotnost polymeru udává střední délku řetězců, která není uniformní, její rozptyl se popisuje pomocí polydisperzity. Vyšší molekulová hmotnost polymeru má vyšší viskozitu a lze ji zvláknovat při nižší koncentraci, protože řetězce jsou delší a i při menší koncentraci zůstávají řetězce v dostatečném kontaktu, aby vytvořili vlákno [75].

Snižováním koncentrace roztoku dochází ke snižování viskozity a snižování počtu kontaktů řetězců. Bez dostatečného kontaktu řetězců se vlivem povrchového napětí (které zvláknování obecně brání) začínají tvořit koráلكové vady, které dalším snižováním koncentrace přecházejí v elektrospaying, rozprašování [75].

Rozpouštědlový systém je důležitý z hlediska rozpustnosti polymeru. Dobrá rozpouštědla polymer zcela solubilizují, zatímco nerozpouštědla způsobí zmenšení objemu prostoupeného polymerem (tzn. sražení). Zjistit, zda je rozpouštědlo vhodné, je predikovatelné díky modelům. Například Hansenovy parametry zohledňují interakce polární, v důsledku disperzních sil a vodíkových můstků. Daný polymer pak má podle svých chemických parametrů polohu v prostorovém grafu, což je střed tzv. rozpustnostní koule. Pokud parametry rozpouštědlového systému leží uvnitř, lze předpokládat, že vznikne roztok [67, 76].

Vodivost roztoku ovlivňuje jednak tvorbu Taylorova kužele a počátek zvláknování, ale má také vliv na průměr vláken a jejich uniformitu. Zvyšování vodivosti roztoku snižuje průměr vláken. Samotné polymery bývají špatně vodivé, vodivost proto zajišťuje rozpouštědlový systém či aditiva.

Procesní podmínky

Použité elektrické napětí má vliv na deformaci povrchu roztoku. Při nízkém elektrickém napětí převažují síly povrchového napětí, při kritickém elektrickém napětí (specifické pro každý roztok) vzniká Taylorův kužel, dále stabilní polymerní tryska. Při zvyšování intenzity elektrického pole dochází ke zrychlení procesu (vypuzování rozpouštědel), průměr vláken klesá. Nižší elektrické napětí ale prodlužuje čas letu trysky, vznikají proto hladší vlákna [74]. Pokud dojde k přílišnému navýšení elektrického napětí, může dojít k vytažení vyššího objemu trysky, což je ale doprovázeno zvýšením průměru vláken.

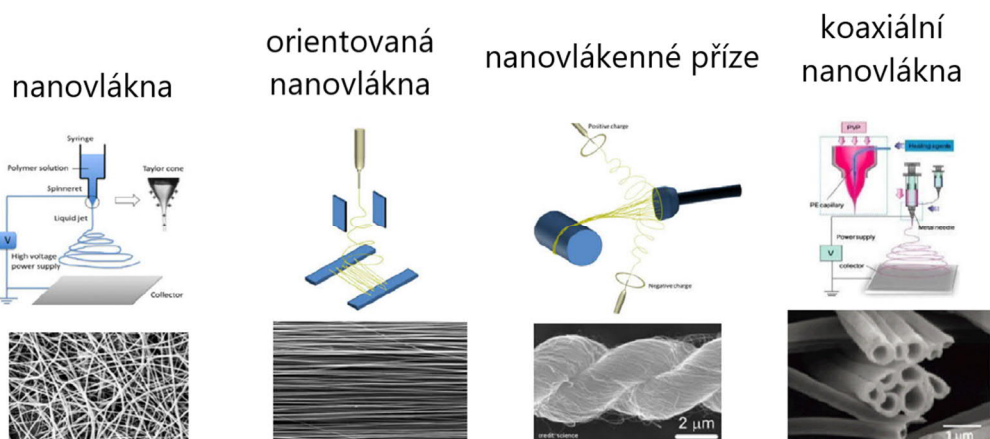
Vzdálenost elektrod je nutné nastavit tak, aby vlákna na kolektor dopadala suchá (rozpuštědla jsou dostatečně odpařená) a dostatečně vydloužená (bičováním). Jednoznačný směr vlivu zde není patrný, jsou známé případy zvyšování i snižování průměru vláken. Na příliš malé vzdálenosti se rozpouštědlo odpaří nedostatečně, což může vést až k výrobě folií. Na příliš velké vzdálenosti může dojít k neusazování vláken na kolektor. Také parametry a tvar kolektoru jsou důležité pro vytváření nanovlákněné vrstvy. Vhodným nastavením lze vytvářet i orientovaná vlákna.

Proces je ovlivňován také klimatickými podmínkami. Vzdušná vlhkost ovlivňuje významně zejména vodorozpustné polymery. Při vysoké vlhkosti dochází ke špatnému vypařování rozpouštědla. Ovšem při přiměřeném zvýšení vlhkosti dochází k lepšímu procesu zvlákňování a snížení průměrů vláken. Například Pelipenko et al. sledovali nanovlákna PVA, která snížila průměr z 667 nm na 161 nm při zvýšení vlhkosti z 4 % na 60 % RH [77].

Procesy elektrostatického zvlákňování jsou zatím méně probádanou oblastí. Dnes neexistují tabulky, které by obsahovaly přesný popis nastavení jednotlivých parametrů pro uniformní výrobu pro jednotlivé roztoky. Provázanost jednotlivých parametrů a oboustrannost některých efektů nedávají návod pro výrobu nanovlákněné vrstvy, což zůstává úkolem technologa.

2.6.3 Funkcionalizace nanovláken

Při elektrostatickém zvlákňování mohou vznikat různé morfologie (Obrázek 11). Porézní vlákna lze připravit vyžitím více rozpouštědel s rozdílnou těkavostí nebo bikomponentní zvlákňování s následným vymýváním. Orientace nanovláken se vytváří pomocí uspořádání elektrod, či speciálními kolektory. Také k orientaci může přispívat rotující kolektor. Nanovlákněné příze vznikají zakroucením svazku nanovláken, lze také obalovat klasickou přízi nanovláknem a vyrábět kompozit. Koaxiální zvlákňování dvou roztoků probíhá např. v uspořádání jádro-plášť, i když přesnou morfologii zatím nelze zcela dokázat. [78].

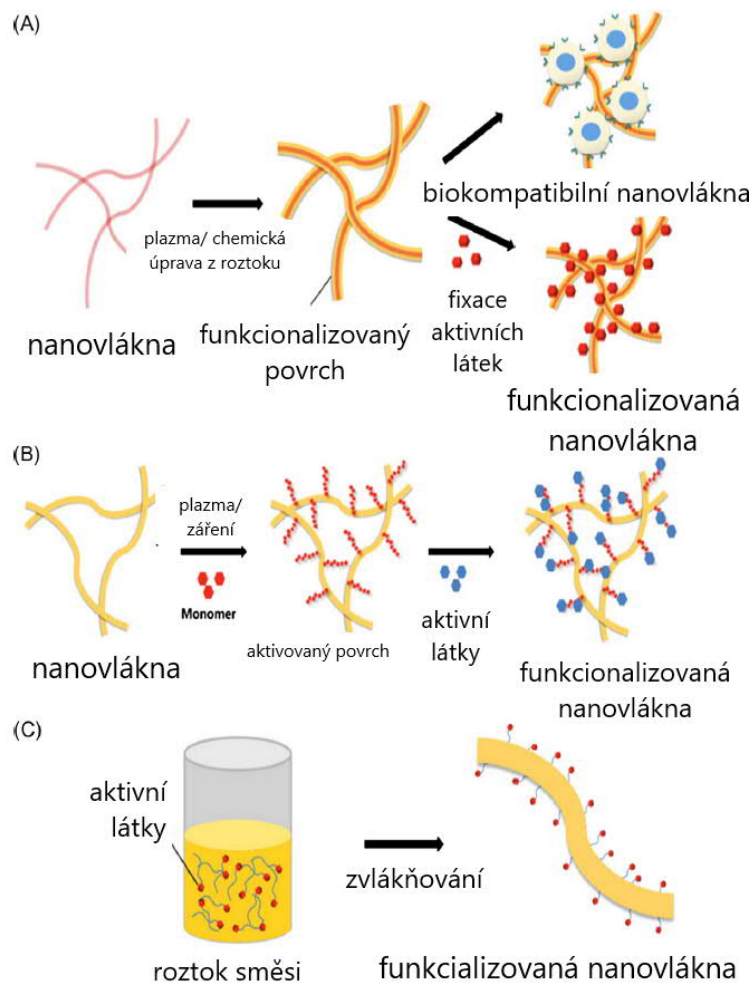


Obrázek 11 - Různé morfologie nanovláken vznikající v závislosti na výrobním procesu [79]

Velký měrný povrch nanovláken je vhodný pro funkcionalizaci. Podíl molekul na povrchu je mnohem větší, než je běžné u klasických materiálů. Na povrchu se tak může nacházet mnoho potencionálně vazných míst, která lze modifikovat. Při funkcionalizaci celého polymeru, se velká část objeví právě na povrchu, případně lze využít degradace materiálu a postupného uvolňování látek. Metody modifikace jsou fyzikální (vysokoteplotní, vysokoenergetické), chemické (chemické depozice, za mokra) a biotechnologické (enzymatické) [79].

Základní nanovláknna mohou být nejprve zvlákněna, a poté dále upravována např. plazmou, roztokem nebo enzymaticky podle Obrázku 12 A, kdy dochází rovnou k navázání požadované látky. Pokud to nelze provést v jednom kroku, povrch se aktivuje a poté dochází k navázání požadovaných látek, jak ukazuje 12 B. Další přístup je zvláknění již modifikovaného roztoku a zvláknění s aktivními látkami (12 C), je nutná jejich stabilita při procesu zvláknění [79].

Vhodný postup se vybírá s ohledem na konkrétní látky, jejich chemickou strukturu, reaktivnost a ochotu ke zvláknění, stejně tak na stabilitu v procesu. Možností je mnoho.



Obrázek 12 - Způsoby modifikace povrchu nanovláken, upraveno podle [79]
 A - chemická úprava, B - mezikrok aktivace, C - modifikace roztoku

3 Praktická část

V této práci byly připraveny materiály pro biodegradovatelné kožní kryty ran. Pro ideální funkci byl navrhován kompozit, a to z důvodu lepší přilnavosti k ráně a dočasné ochrany proti vnějším vlivům v místě poškození kůže. Díky biodegradovatelnému materiálu nebude docházet k narušení hojení vyměňováním krytu spojeným s poškozováním nově vznikající tkáně.

Zvýšení adheze ke spodině rány bylo docíleno pomocí hydrofilního polymeru PVP. Dočasná mechanická ochrana byla zajišťována biodegradabilním GP-PUR, což je nový medicínální polymer. Pro dosažení synergie bylo nutné optimální spojení těchto dvou materiálů ve formě nanovláknenných vrstev vyráběných elektrostatickým zvlákňováním na zařízení Nanospider.

Experimenty se zabývaly škálováním a výrobou nanovláknenných vrstev. Ke spojování byly použity metody současného zvlákňování dvou roztoků (experiment 1), zvlákňování směsi (experiment 2) a zvlákňování samostatných vrstev s následnou laminací (experiment 3).

Pro dosažení lepších terapeutických vlastností byly materiály adovány. A to vrstva PVP jódem, protože se jedná o používané dezinfekční činidlo, zejména ve spojení s PVP. Pro lepší podporu hojení byl do vrstvy PUR přidán propolis, což je tradiční přírodní apiterapeutická látka. S aditivy byly zopakovány experimenty 2 a 3 (pod označením experiment 4). Přidávání aditiv bylo zajímavé z technologického hlediska, protože dochází k ovlivňování zvlákňovacího procesu.

Vyrobené vrstvy byly charakterizovány obrazovou analýzou pomocí skenovací elektronové mikroskopie a měřením kontaktního úhlu s destilovanou vodou. Kvalitativní obsah látek byl vyhodnocen pomocí infračervené spektroskopie FTIR, Ramanovy mikroskopie a analýzy EDS. Pro ověření biologické kompatibility byly provedeny testy cytotoxicity extraktů materiálů a také testování in vitro s buněčnou linií.

Pro lepší orientaci čtenáře byly kroky shrnuty následujícími grafikami. Na Obrázku 13 je zobrazeno schéma postupu výroby a testování materiálů, Obrázek 14 znázorňuje obsah provedených experimentů.

Provedené kroky - S aditivy/bez



Obrázek 13 - Schéma jednotlivých kroků postupu v této práci

Experimenty:



Obrázek 14 - Schéma provedených experimentů

3.1 Materiály a metodika

V této kapitole jsou popsány používané materiály, důvody výběru a jejich příprava. Jsou zde uvedeny použité přístroje a metody. Biologické testování je pro celistvost odděleno a zmíněno až po shrnutí vyrobených materiálů v kapitolách 3.7 a 3.8.

3.1.1 Výběr materiálů

Pro potencionální kožní kryty byla použita nanovláknenná vrstva, která je pro danou aplikaci vhodná, což je podloženo literární rešerší (viz kapitolu 2.3). Polymerní materiály jsou popsány v kapitole 2.4. Na KNT TUL je v současnosti vyvíjen Nanotardis, což je biodegradabilní kožní kryt z PCL [1, 32]. Právě prochází pokročilou fází klinického testování.

Používané materiály

Pro zlepšení adheze ke spodině rány byl použit hydrofilní polyvinylpyrrolidon o dvou různých molekulových hmotnostech (PVP, 360 000 g/mol a 1 300 000 g/mol, Sigma Aldrich). PVP je inertní polymer, a byl vybrán také proto (například místo PVA), protože je základem jódovaného povidonu (např. přípravku Betadine), zde je také spojitost s přidáváním jódu, který má dezinfekční účinky. Experimenty se zvlákněním PVP jsou například ve studiích Adomavicate et al., Utkarsh et al., Shitole et al., Sebe et al. [56–58, 64, 74] a další.

Ochranná vrstva byla z biodegradabilního polyuretanu (GP-PUR, v práci označován jako PUR, s molekulovou hmotností 600 000 g/mol, Wilens). Jedná se o nový polymer, byl vyvíjen pro biodegradabilní potahy gastrointestinálních stentů. Obsahuje úseky polykaprolaktonu, což je dobře známý a v tkáňovém inženýrství používaný polymer. Při výrobě PUR byl použit polytetrahydrofuran, 1,4-butandiol, polyethylenoxid a hexamethylendiisokyanát. Výrobce udává max. deformaci 1 700- 2 700 %, Youngův modul <10 MPa, nasákavost vodou po 24 h 2-8 hm. %. V kompozitním krytu by měl zajišťovat ochrannou funkci do jeho degradace. V kyselém prostředí (pH 2,4) degraduje za 7 dní, ve fyziologickém pH (7,4) je to potom více jak 147 dní podle práce Bartošové [49] při testování planárních vzorků ve formě folií. Vrstva polyuretanu byla obohacena o propolis, což je přírodní spektrum látek produkovaných včelami, používaný již od starověku. Motivací je vzestup přírodního lékařství a osobní angažovanost autorky. Dodán byl pevný homogenizovaný vzorek z Výzkumného ústavu včelařského v Dole, ze kterého byl připravován extrakt.

3.1.2 Příprava roztoků

Polymerní roztoky byly připraveny navážením uvedených hmotnostních procent na analytických vahách, v uvedeném rozpouštědlovém systému. Používaná rozpouštědla byla etanol (96%, denaturovaný 1 % isopropanolu, Technisolv), chloroform (stabilizovaný 1 % etanolu, Penta Chemicals), kyselina octová (99%, Penta Chemicals). Rozpouštědlový systém CHEKO představuje poměr 8:1:1 chloroform: etanol: kyselina octová.

Roztoky byly za laboratorní teploty míchány magnetických míchadlem do úplného rozpuštění, 24 hodin předem. Takto připravené roztoky byly ihned elektrostaticky zvlákněny.

Příprava propolisů probíhala rozpouštěním hrudek z úlu. Homogenizace byla provedena z velkého objemu propolisů z českých úlů i z různého období. Skladováno bylo v temnu, suchu a chladu. Tradiční propolisová tinktura je etanolová (vyrobená z dostupného lihu na volném trhu). Výhodou je bezpečnost etanolu pro vnější užití a 70% vodný roztok se používá jako dezinfekce [80]. Protože propolis obsahuje velké množství látek [60], jsou také rozpustné v širokém spektru rozpouštědel, používají se i další (např. DMSO [81], chloroform [66]). Vzhledem k rozpouštědlovému systému PUR, autorka vytvořila výluh propolisů v rozpouštědlech chloroform a etanol 4:1. K rozpouštění docházelo za míchání a v temnu. Poté byl roztok přefiltrován.

Příprava jódu (pevný, čistota nad 99,8 %, Sigma Aldrich), skladovaný uzavřený v temnu a chladu, spočívala v rozpuštění za laboratorní teploty a míchání ve zvlákněvacím roztoku. Na výrobu jódovaného povidonu v této práci nebyl prostor.

3.1.3 Měření viskozity a vodivosti

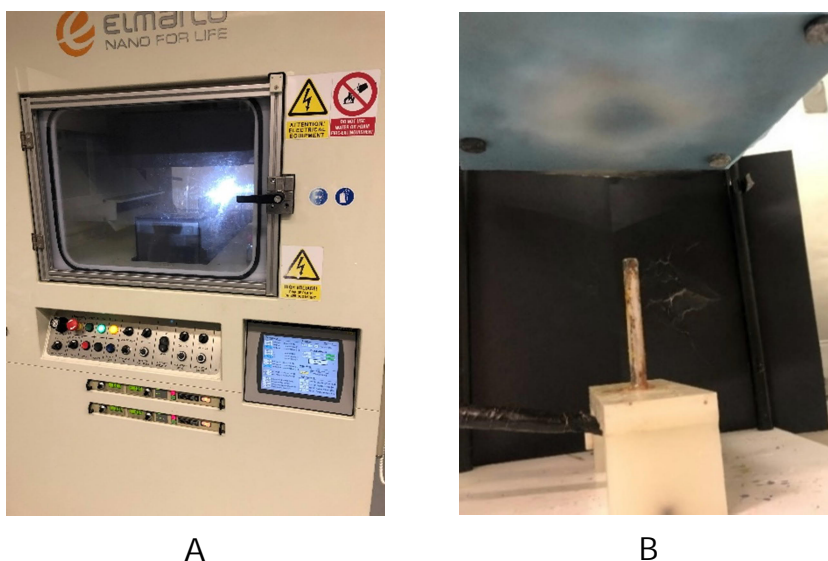
Pro stanovení kvalitativních vlastností roztoků bylo provedeno měření dynamické viskozity na rotačním viskozimetru RotoVisco 1 (Haake) s vyhodnocením pomocí softwaru RheoWinJob. Měření probíhalo za konstantní teploty 21,6 °C. Bylo provedeno 5 měření, či méně, pokud došlo k dosažení 2 stejných výsledků podle protokolu. Výsledek je uváděn jako průměr ± směrodatná odchylka.

Na přístroji Con 510 (Eutech Instrumens) se skleněnou měřicí sondou K10/6MM8 bylo provedeno orientační měření vodivosti roztoků. Teplota měření byla 20,4 °C. Hodnoty slouží k hodnocení zvláknitelnosti. Tyto parametry (spolu s dalšími) byly pozorovány i na průběhu samotného elektrostatického zvláknění.

3.1.4 Elektrostatické zvlákňování

Nanovláknenná vrstva byla vyráběna metodou bezjehlového elektrostatického zvlákňování. Byl používán stroj Nanospider (Elmarco) v laboratorním provedení NS 1WS500U (Obrázek 15A) se zvlákňovací strunovou elektrodou, a také v konfiguraci dvou strun v experimentu 1. Klimatické podmínky zajišťuje klimatizace NS AC 150 (Elmarco).

Pro testy o menší spotřebě polymeru a testování aditiv bylo použito zvlákňování z tyčky (Obrázek 15B). Jedná se také o zvlákňování z volné hladiny roztoku. Jako nosná textilie byl v obou případech použit polypropylenový spunbond.



Obrázek 15
A - laboratorní Nanospider, B - zvlákňování z tyčky

3.1.5 Skenovací elektronová mikroskopie

Vizuální hodnocení vrstev bylo prováděno pomocí skenovací elektronové mikroskopie Vega 3 SB Easy Probe (Tescan). Pro optimální vodivost povrchu byly vzorky povrstveny 10 nm zlata v přístroji Q150ES (Quorum Technologies). Na přístroji byla také provedena EDS analýza prvků. Měření průměrů vláken probíhalo pomocí softwaru ImageJ. Z 200 měření průměrů ze snímků byl určen průměr a 95% interval spolehlivosti.

3.1.6 FTIR a Ramanova mikroskopie

Měření vrstev pomocí analýzy infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) probíhalo na přístroji Nicolet iZ10 (Thermo Fisher) technikou zeslabeného úplného odrazu z diamantového krystalu (ATR). Ramanova mikroskopie probíhala na Raman DXR mikroskopu (Thermo Fisher) s laserem o vlnové délce 532 nm.

3.1.7 Měření kontaktního úhlu

Kontaktní úhel byl měřen pomocí goniometru See system 6.2 (Advex Instruments). Vzorky byly připravovány na podložní sklíčko v konfiguraci sklíčko, dvě vrstvy měřeného materiálu, přichycené ze strany izolepou, aby nedocházelo k ovlivňování měření. Poté byla mikropipetou nadávkována kapka destilované vody o objemu 5 μ l. Úhel byl odečítán po 1 s po dosednutí kapky na povrch, počet měření je pět. Výsledek je uváděn jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka.

3.1.8 Zpracování dat

Data byla zpracována v programu Excel (Microsoft Corporation) a softwaru GraphPad Prism v7 (GraphPad Software).

U dat zobrazených pomocí krabicových grafů (boxplot), tzv. vousy znázorňují minimum a maximum, krabice potom horní a dolní kvartil, uvnitř je znázorněn medián.

U sloupcových grafů, pokud není uvedeno jinak, zobrazují chybové úsečky směrodatné odchylky. U průměrů vláken se jedná o 95% interval spolehlivosti.

Naměřené hodnoty průměrů vláken byly statisticky hodnoceny. Před parametrickými testováními bylo zkontrolováno rozložení dat pomocí D'Agostinova Pearsonova testu normality. Pro data bez normálního rozložení, jako je tomu zde, byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test. Statisticky signifikantní změny byly akceptovány na hladině významnosti $p \leq 0,05$.

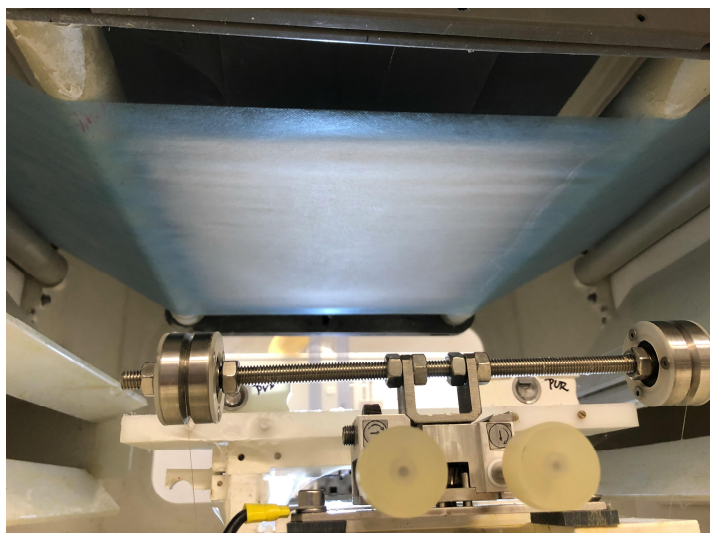
3.2 Experiment 1: Škálování a výroba dvouvrstvého materiálu současným zvlákňováním dvou roztoků

V experimentu 1 byla provedena výroba materiálu ze dvou oddělených roztoků zvlákňovaných současně, byly řešeny dílčí problémy a vzorování zvlákňováním z tyčky. Vyhodnocení proběhlo pomocí SEM.

Nejprve, po výběru materiálů, bylo provedeno škálování zvlákňovacích roztoků a nastavování procesních parametrů, jako je například vzdálenost elektrod, elektrické napětí, teplota a vlhkost. Zejména u PUR, protože se jedná o nový typ polymeru. Z doporučené počáteční koncentrace 4 hm. % roztoku v rozpouštědlovém systému CHEKO bylo přistoupeno

k 5 hm. %. V případě PVP o molekulové hmotnosti 360 000 g/mol byla počáteční koncentrace 12 hm. % roztoku v etanolu, určená na základě výsledků předchozích experimentů na KNT. Byla pozorována dobrá zvláknitelnost.

Tyto dva materiály poté byly zvlákněny současně ve dvoustrunové konfiguraci elektrod na laboratorním Nanospideru. Tento postup se používá v průmyslové výrobě, kde je běžné používání více strun. Uspořádání zobrazuje Obrázek 16. Procesní parametry uvádí Tabulka 1.



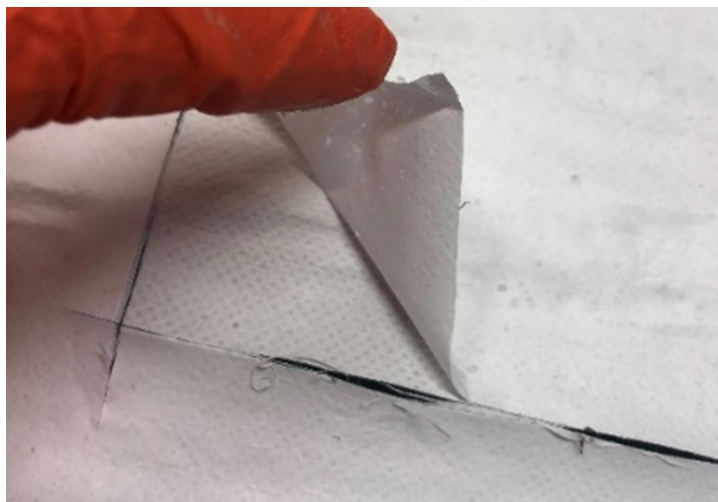
Obrázek 16 - Elektrostatické zvláknění dvou různých roztoků z dvou strun na zařízení Nanospider

Tabulka 1 - Parametry zvláknění na Nanospideru

Polymery	5 hm. % PUR + 12 hm. % PVP	
Rozpouštědlový systém	CHEKO/ etOH	
Elektrické napětí [kV]	-10	50
Odváděcí rychlost [mm/min]	10	
Průměr práv laku [mm]	0,6	
Vzdálenost elektrod [mm]	200	
Teplota [°C]	22	
Relativní vzdušná vlhkost [%]	50	

Nejprve byla vyrobena základní vrstva PUR, za účelem dostatečné krycí vrstvy. Následně byla tato vrstva povlákněna oběma polymery při současném zvláknění z oddělených zásobníků. Při zvláknění bylo zjištěno, že výrobnost PVP byla mnohem vyšší a převažovala nad výrobností PUR.

Po sundání vrstvy vyrobené na Nanospideru a při nezbytné manipulaci se dílčí vrstvy ihned začaly oddělovat, došlo k nedostatečnému spojení (viz Obrázek 17).



Obrázek 17 - Vyrobená vrstva (odděluje se)

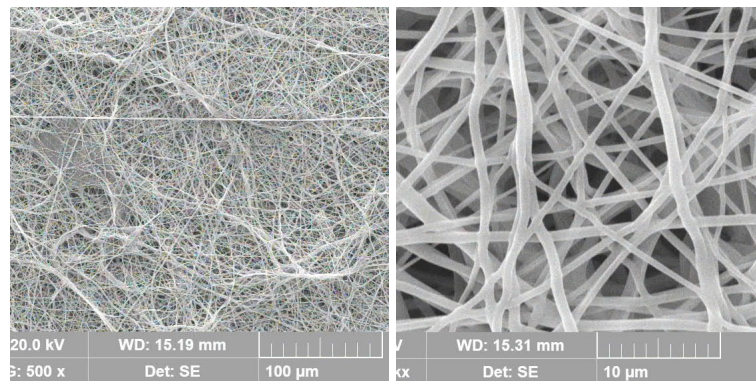
V reakci na tento experiment (a dílčí problémy s nastavením stroje v průběhu zvlákňování) bylo navrženo, že bude vyrovnán rozdíl výrobnosti. Bylo proto přistoupeno ke snížení koncentrace PVP s cílem snížení výrobnosti, aby se mohl lépe projevit efekt současného zvlákňování. Pro zachování zvláknitelnosti PVP byl použit polymer s vyšší molekulovou hmotností, používaný také ve studii Utkarsh et al. [74], a bylo provedeno vzorování o hmotnostních koncentracích 10 %, 7,5 % a 5 % v etanolu, porovnávané s původním 12% roztokem. Následně také hm. koncentrace 5%, 6% a 7%. Tyto experimenty proběhly v menším měřítku na laboratorním zvlákňování z tyčky.

3.2.1 Výsledná morfologie

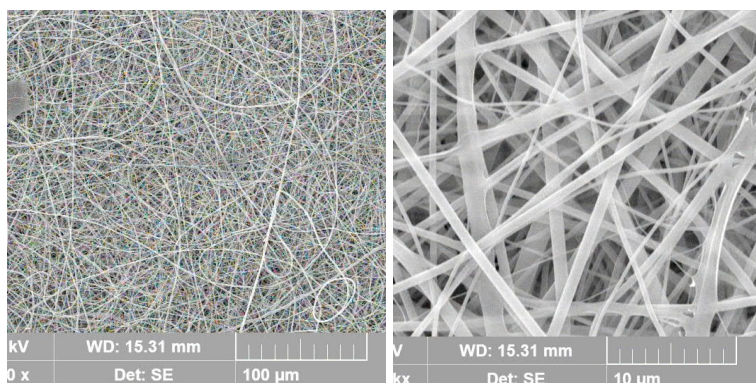
Na SEM snímcích (Obrázek 18) bylo ověřeno, že spodní vrstva byla PUR (A) s typickou morfologií, a vrchní vrstva se více podobala samotnému PVP (B), což bylo dáno zejména vyšší výrobností. Tato skutečnost byla ověřena kompletním rozpuštěním vzorku ve vodě.

Pro vyrovnání výrobnosti byl vybrán vysokomolekulární PVP. Na Obrázku 19 jsou výsledky vzorování vrstev, 5 hm. % koncentrace byla nedostatečně viskózní. Byla zvolena koncentrace 6 hm. % PVP.

Bohužel v této době došlo k epidemiologickým omezením a experimenty musely být odsunuty. Nakonec, i kvůli předchozímu sledovanému procesu výroby, kdy nedocházelo k mísení vznikajících nanovláken, bylo rozhodnuto touto cestou nepokračovat.

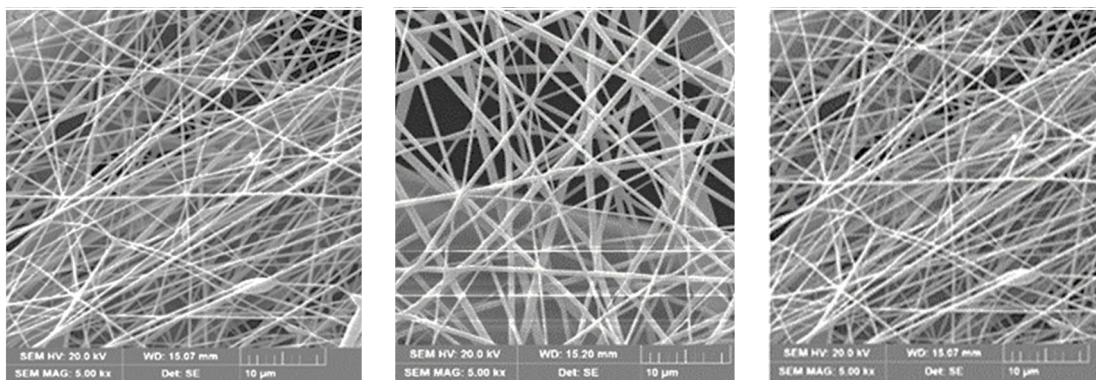


A



B

Obrázek 18 - měřítko 100 μm a 10 μm
A - vrstva PUR, B - vrchní vrstva PVP



A

B

C

Obrázek 19 - SEM PVP molekulová hmotnost 1 300 000 g/mol, měřítko 10 μm
A - 10 hm. %, B - 7,5 hm. %, C - 6 hm. %

3.3 Experiment 2: Výroba blendu

V experimentu 2 byl kompozitní materiál vyráběn jednoduše z jednoho roztoku obsahujícího oba polymery. Výsledky byly testovány pomocí SEM a proběhlo měření kontaktního úhlu.

Autorka navrhla použít blend (směs), tedy použít jeden roztok s oběma polymery ve stejném rozpouštědlovém systému. PVP je velmi dobře rozpustný polymer (viz kapitolu 2.4.3). Praktické ověření zvláknitelnosti pro PVP proběhlo zvlákněním z tyčky v rozpouštědlovém systému CHEKO. Byl využit v etanolu navzorovaný vysokomolekulární PVP, který se ukázal být dobře zvláknitelný. Na rozdíl od molekulové hmotnosti 360 000 g/mol, jehož roztok byl velmi viskózní. Poté byly provedeny experimenty s blendy PVP:PUR v různých poměrech. Z jednoduchého vzorování tří poměrů obsahoval nejméně vad blend 1:1. Jako hůře zvláknitelný zde vystupoval PUR, morfologii zobrazuje Obrázek 20. Tabulka 2 zobrazuje parametry provedeného zvlákněním z tyčky.

Tabulka 2 - Parametry zvlákněním z tyčky

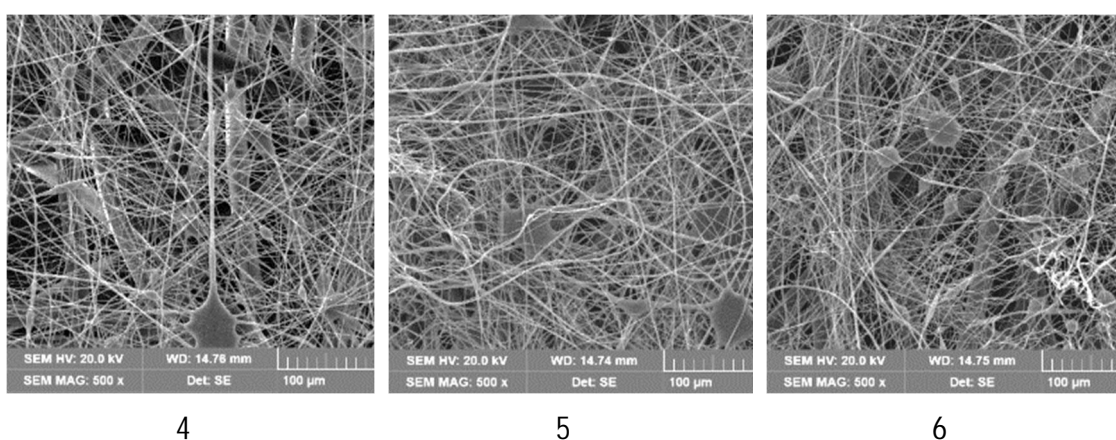
Polymery	PVP 6 hm. %, nebo 12 hm. % a PUR 5 hm. %
Rozpouštědlový systém	CHEKO
Elektrické napětí [kV]	20
Teplota [°C]	20
Relativní vzdušná vlhkost [%]	32
Vzorek č. 1	PVP 6 %
Vzorek č. 2	PVP 12 %
Vzorek č. 3	PUR 5 %, 23 kV
Vzorek č. 4	1:1 blend
Vzorek č. 5	1:2 PVP
Vzorek č. 6	1:2 PUR

Po zhodnocení výsledků zvlákněním z tyčky bylo přistoupeno k výrobě na Nanospideru. Na Nanospideru byl zvlákněn pouze blend 1:1 PVP:PUR, za podmínek uvedených v Tabulce 3.

Tabulka 3 - Parametry zvlákňování na Nanospideru

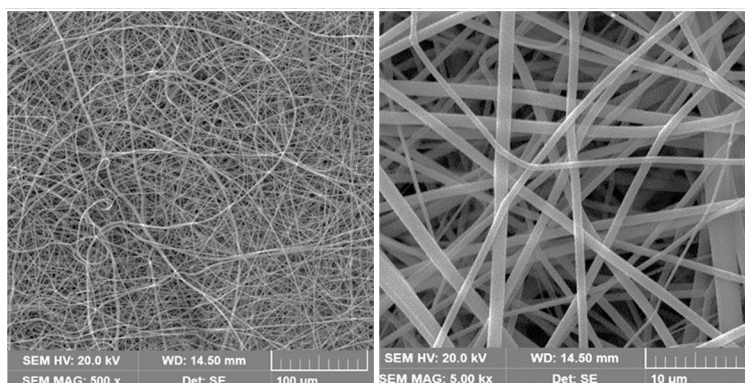
Polymery	PVP 6 hm. % a PUR 5 hm. %	
Rozpouštědlový systém	CHEKO	
Elektrické napětí [kV]	-10	49,9
Odváděcí rychlost [mm/min]	5	
Průměr právlaku [mm]	0,6	
Vzdálenost elektrod [mm]	200	
Teplota [°C]	22	
Relativní vzdušná vlhkost [%]	50	

3.3.1 Výsledná morfologie

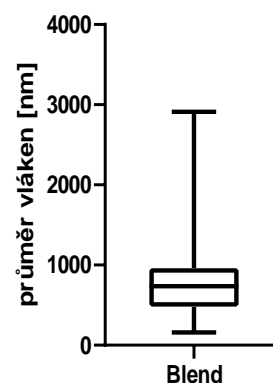


Obrázek 20 - SEM snímky blendů PVP a PUR zvlákňovaných z tyčky v různých poměrech. Vzorek č. 4 - Směs 1:1, č. 5 - 1:2 PVP, č. 6 - 1:2 PUR jako v Tabulce 2, měřítko 100 µm

Pro zvlákňování na Nanospideru byla vybrána směs obou polymerů v poměru 1:1 pro 5 hm. % PUR a 6 hm. % PVP. Průměry vláken vyrobené vrstvy mají průměrně 776 nm, 95% interval spolehlivosti je mezi 719 a 834 nm. Naměřená data zobrazuje Graf 2. Vrstva byla homogenní, vlákna hladká (Obrázek 21). Z manipulace nebylo patrné oddělování vrstev.



Obrázek 21 - SEM snímky vrstvy blendu



Graf 2 - Krabicový graf průměrů vláken vrstvy blendu, n=200

Obsah obou polymerů byl stanoven jednoduchým pokusem, vložením vzorku vrstvy do kádinky s vodou. Tam došlo k rozpuštění PVP, které bylo podpořeno zamícháním. Nedošlo k rozpuštění celé vrstvy a vrstva byla soudržná, tudíž plošná hmotnost PUR byla dostatečná. Přesné stanovení je možné provést s vážením naprosto vysušených vzorků, v této práci bylo plánované, ale kvůli časovým důvodům nebylo provedeno.

3.3.2 Výsledky měření smáčivosti

Vrstva obsahovala nanovlákná z vodorozpuštného PVP i více hydrofobního PUR. Průměrný úhel smáčení byl 66 stupňů se směrodatnou odchylkou 20 stupňů. Obsahovala místa hydrofobní i hydrofilní, podle konkrétního místního rozložení polymerů, které je náhodné. Daná metodika předpokládá homogenní vrstvu, kdežto u nanovláken dochází ke kapilárním jevům, které přispívají hydrofilnímu efektu.

3.3.3 Vliv rozpouštědlového systému na vlastnosti roztoku PVP

Při experimentech byl pozorován zajímavý jev. Při výměně rozpouštědlového systému etanolu za směs CHEKO došlo k následujícím změnám v chování roztoků: v experimentu 1 byl používán 12 hm. % roztok PVP o molekulové hmotnosti 360 000 g/mol, následně byl vybrán PVP o vyšší molekulové hmotnosti (1 300 000 g/mol) a roztok o koncentraci 6 hm. % v etanolu.

Při výrobě směsi, a tedy se změnou rozpouštědlového systému na CHEKO, byl připraven nejprve roztok vysokomolekulárního PVP, který byl dobře zvláknitelný. Protože již nebylo třeba vysoké molekulové hmotnosti, autorka vyzkoušela návrat k původnímu PVP o nižší molekulové hmotnosti. Ale došlo k výraznému nárůstu viskozity.

Bylo provedeno měření viskozity a vodivosti. Viskozita byla měřena při 21,6 °C. Roztoky o koncentraci 6 % měly viskozitu 19,9±0,4 mPa·s (etanol) a 36,0±2,8 mPa·s (CHEKO). U 12% roztoku PVP v etanolu se již viskozita o řád zvýšila 212,6±3,4 mPa·s. Nárůst u 12% PVP v CHEKO byl markantní, viskozita se zvýšila na 1 221±155 mPa·s. Nejvyšší vodivost měl 12% roztok PVP v etanolu. Měření spolu s parametry jsou shrnuty v Tabulce 4.

Tabulka 4 - Parametry roztoků PVP

hm. koncentrace PVP	molekulová hmotnost [g/mol]	rozpouštědlový systém	vodivost [$\mu\text{S}/\text{cm}$]	dynamická viskozita [mPa·s]
6%	1 300 000	etanol	$3,6 \pm 0,99$	$19,9 \pm 0,3$
12%	360 000	etanol	$5,8 \pm 0,68$	$212,6 \pm 3,2$
6%	1 300 000	CHEKO	$3,2 \pm 0,53$	$36,0 \pm 2,8$
12%	360 000	CHEKO	$2,9 \pm 0,21$	$1\,221 \pm 155$

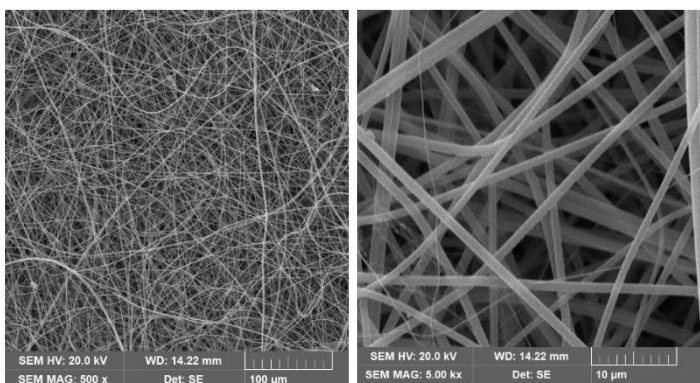
Protože se jedná o totožný polymer, který se liší pouze délkou řetězce, lze tu pozorovat vliv rozpouštědlového systému. A větší vliv zde má koncentrace, oproti molekulové hmotnosti. U kratšího řetězce ve vyšší koncentraci dochází k výrazné interakci se systémem CHEKO, které je doprovázeno markantním zvýšením viskozity, ke kterému u delšího řetězce v nižší koncentraci tolik nedochází. Se zvýšením viskozity nedochází k navýšení vodivosti, roztok proto nezvláknuje.

Rozpustností a zvláknováním PVP (360 000 g/mol) se zabýval také Nasouri et al. [82]. Zajímavé je, že při koncentraci 14 hm. % bylo PVP zvláknitelné z etanolu, nikoli chloroformu (spraying) při zvláknování z jehly o průměru 0,7 mm, za elektrického napětí 17 kV na vzdálenost 15 cm. Chloroform a etanol jsou ve studii označena jako špatná rozpouštědla podle výpočtů Hansenových parametrů. I vhodnou kombinací více nerozpouštědel lze docílit rozpustnosti [76].

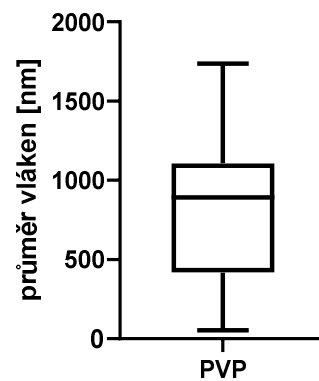
3.4 Experiment 3: Laminace

V experimentu 3 byly vyrobeny na zařízení Nanospider samostatné vrstvy a následně byla v dalším kroku provedena jejich laminace. Charakterizováno bylo pomocí SEM a měření smáčivosti metodou kontaktního úhlu.

Při podmínkách uvedených v Tabulce 3 v kapitole 3.3 bylo také zvlákněno samostatně PVP a PUR. Průměry vláken PVP mělo větší než PUR, průměr byl 818 nm s 95% intervalem spolehlivosti mezi 764 a 873 nm. Graf 3 zobrazuje naměřené hodnoty PVP, Obrázek 22 zobrazuje morfologii vrstvy. Vrstva PVP byla poměrně homogenní, objevovaly se na ní také velmi jemná vlákna, která významně zvyšují měrný povrch vrstvy.

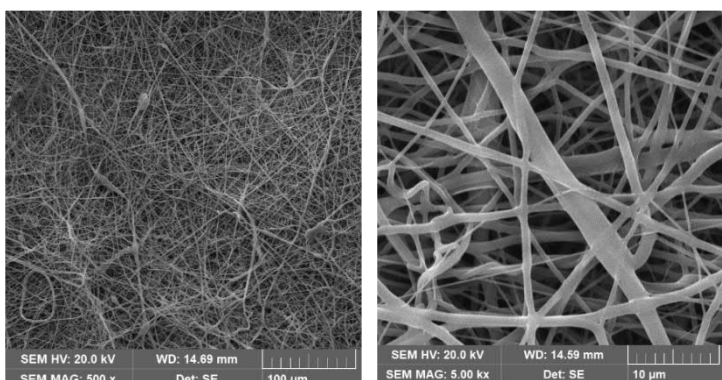


Obrázek 22 - SEM vrstvy PVP, měřítko 100 μm a 10 μm

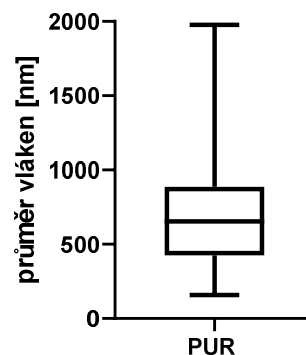


Graf 3 - Krabicový graf průměrů vláken PVP, n=200

PUR mělo průměry vláken 687 nm s 95% intervalem spolehlivosti mezi 639 a 736 nm. Vrstvu se podařilo vyrobit s pravidelnou strukturou, obsahovala pouze drobné vady ve formě spletců, které jsou pro tento polymer typické (Obrázek 23). Objevovaly se zde i mikronová stužková vlákna, pro vrchní funkci krytu byla tato vlákna spíše přínosem, jelikož vrstvu zpevňují. Naměřené hodnoty průměrů vláken jsou v krabicovém Grafu 4.



Obrázek 23 - SEM vrstvy PUR, měřítko 100 μm a 10 μm



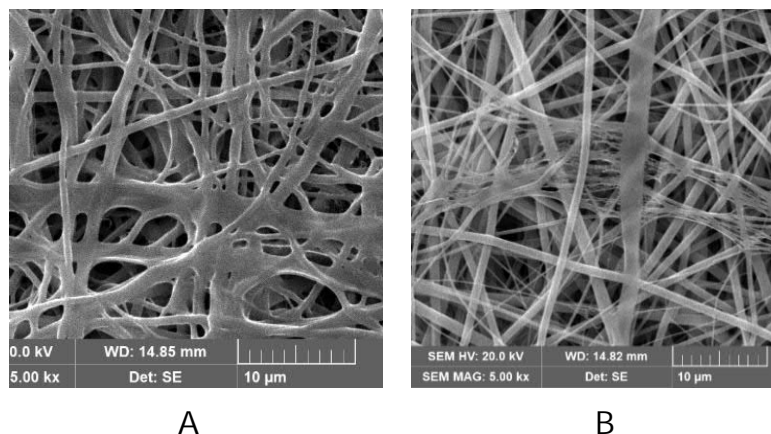
Graf 4 - Krabicový graf průměrů vláken PUR, n=200

Jednoduché vrstvy byly připraveny v rozměru 10 x 10 cm, navrstveny na sebe a vloženy do předehřátého laminovacího lisu RPS- MINI L 600 (Meyer).

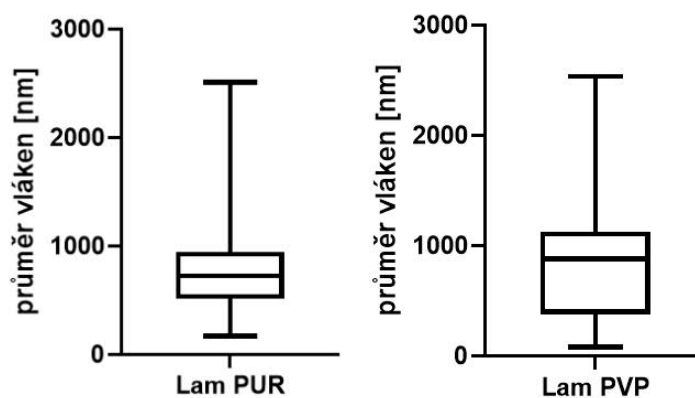
Parametry procesu byly: teplota 60 °C, rychlost odtahu 9,2 m/min, bez přítlaku (hodnota nastavena na -0,2 N/cm²). Došlo ke spojení vrstev bez změny rozměru. Pro kontrolu morfologie byla použita analýza SEM a bylo zhodnoceno, že nedošlo k znehodnocení vlákenné struktury.

3.4.1 Výsledná morfologie

Vrstvy byly viditelně teplem deformované, ale vlákenný charakter zůstal zachován, jak ukazuje Obrázek 24. Vrstva byla kontrolována z obou stran. Na Grafu 5 je vidět rozložení průměrů vláken. U laminované vrstvy PVP byl průměr 827 nm, s 95% intervalem spolehlivosti mezi 762 a 892 nm, pro laminované PUR 791 nm, s 95% intervalem spolehlivosti mezi 731 a 851 nm, není zde patrný statistický rozdíl s původními vrstvami.



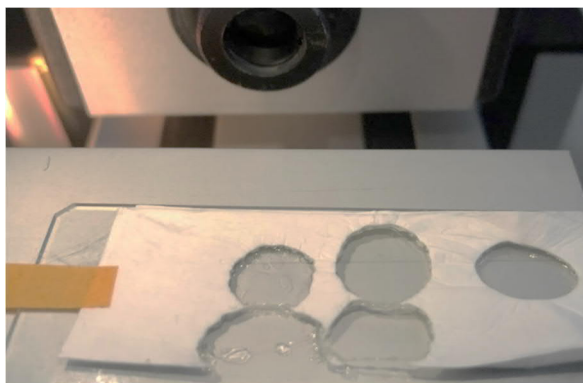
Obrázek 24 - SEM laminace
A - strana PUR, B - strana PVP



Graf 5 - Průměr vláken laminované PUR a laminované PVP, n =200

3.4.2 Výsledky měření smáčivosti

Vyrobená vrstva PVP byla velmi hydrofilní. Po kápnutí kapky destilované H₂O ihned dochází k vstřebání vrstvou a okamžitému rozpuštění polymeru. Obrázek 25 byl pořízen při měření kontaktního úhlu. Průběh vsakování byl velmi rychlý, používanou kamerou nezachytitelný. Kontaktní úhel byl konstantních 0 stupňů.



Obrázek 25 - Vrstva PVP smáčená kapkami destilované vody

Samostatná vrstva PUR měla výsledný kontaktní úhel na hranici hydrofóbnosti/hydrofilnosti. Ačkoliv je strukturou více hydrofobní, morfologie vlákněné vrstvy způsobuje lepší smáčivost vodou. Naměřený úhel byl $87 \pm 13^\circ$.

Tyto vrstvy byly zalaminovány. Ze strany PVP byl naměřený úhel stále 0 stupňů. Docházelo k intenzivnímu vsakování vody do plochy. Ze strany PUR byl výsledný kontaktní úhel převážně hydrofobní, $96 \pm 15^\circ$.

3.5 Experiment 4: Aditiva

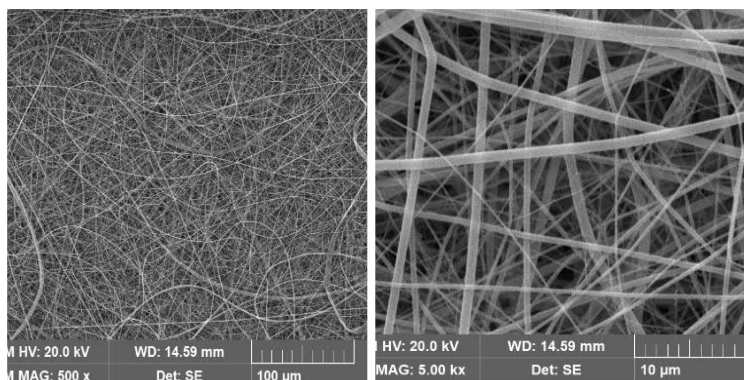
Přidání podpůrných aditiv do vlákněné vrstvy bylo provedeno z připravených extraktů propolisu a pevného jódu do roztoku polymeru. Výsledná směs byla zvlákněná z adovaného roztoku. Obsah látek byl počítán jako hmotnostní podíl vztažený k polymeru.

Nejprve bylo provedeno vzorování z tyčky, pro jód v koncentracích 5 a 10 hm. %, s propolisem 5, 10, 20 a 30 hm. %, byly úspěšně nalezeny parametry pro zvlákněování daných roztoků. S jódem byla také připravena max. koncentrace 185 hm. % zvlákněovaná v digestoři, docházelo ale pouze k elektrospayingu. Pro další experimenty byla vybrána jedna koncentrace a vrstvy byly vyrobeny na Nanospideru a dále testovány.

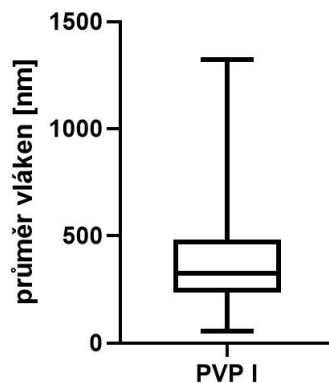
Výše uvedené experimenty 2 a 3 byly prováděny také s adovanými roztoky. Pro výrobu v rámci této práce byly zvoleny koncentrace jódu 5 hm. %, protože stačí malá koncentrace pro dezinfekční, ale nikoliv leptavé účinky. Jód byl přidáván k PVP. Propolisu bylo přidáno 20 hm. %, aby byly sledovány terapeutické účinky a efekt vyšší koncentrace na zvlákněitost, která byla v malém měřítku proveditelná; také byla předpokládána lepší detekovatelnost obsahu aditiva ve vrstvě. Propolis z extraktu v chloroformu a etanolu (4:1) byl přidán k PUR a blendu.

3.5.1 Výsledná morfologie

PVP s 5 hm. % obsahem elementárního jódu (PVP I) byl zvlákňovaný na Nanospideru za podmínek uvedených v Tabulce 3 v kapitole 3.3. Hodnota průměru vláken byla průměrně 397 nm s 95% intervalem spolehlivosti mezi 365 a 428 nm. Došlo k výraznému snížení průměrů vláken, vrstva obsahovala velmi mnoho jemných vláken. Graf 6 zobrazuje naměřené hodnoty a morfologie je na Obrázku 26.

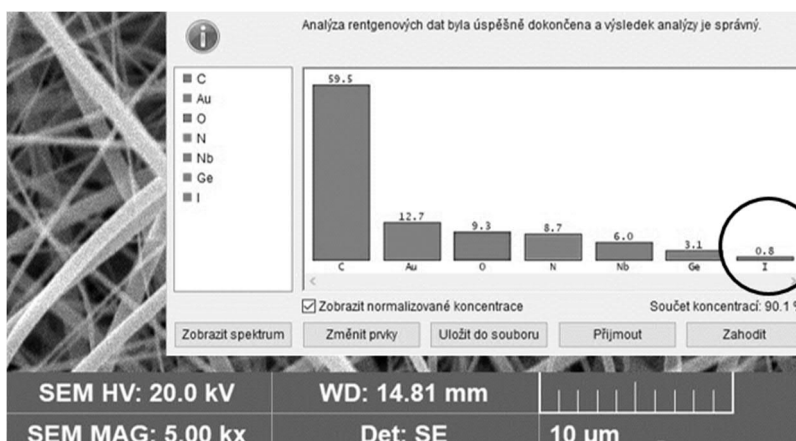


Obrázek 26 - SEM vrstvy PVP s jódem



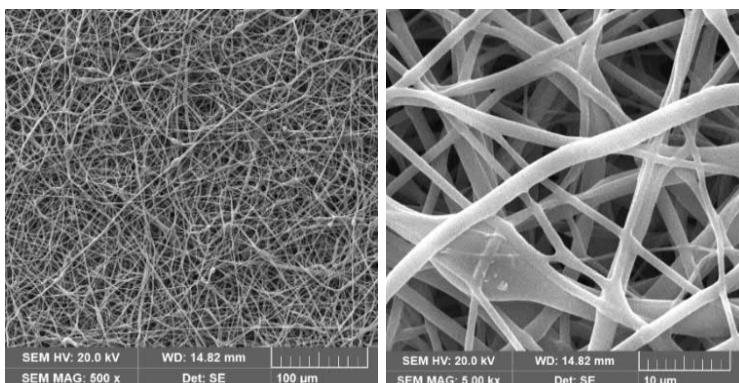
Graf 6 - Krabicový graf průměrů vláken PVP I, n=200

Rentgenovou analýzou EDS byla potvrzena přítomnost jódu ve vrstvě, jehož výsledky jsou na Obrázku 27. Byla také provedena Ramanova mikroskopie, uvedené výsledky jsou v následující kapitole.

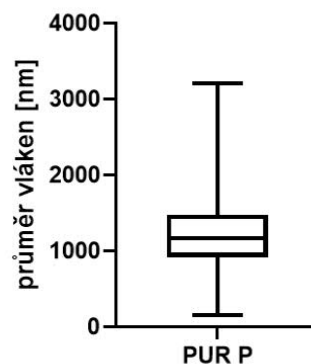


Obrázek 27 - EDS vrstvy PVP s jódem

Vrstva PUR s obsahem 20 hm. % propolisu (PUR P) měla vláknennou strukturu, ale na rozdíl od čisté vrstvy PUR obsahovala více vad ve formě počínajících korálek. Průměr vláken byl nad submikronovou hranicí, díky čemuž byla vrstva i lehce zabarvená dohněda. Průměr vláken je 1,226 μm a 95% interval spolehlivosti je mezi 1,159 a 1,294 μm . Morfologii ukazují Obrázek 28 a naměřené hodnoty průměrů vláken na Grafu 7.

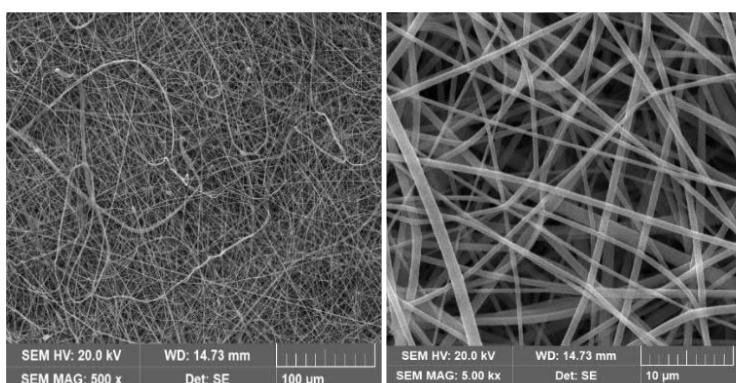


Obrázek 28 - SEM PUR s propolisem

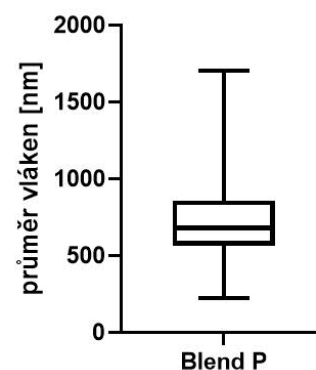


Graf 7 - Krabicový graf průměrů vláken PUR s propolisem, n=200

Vrstva blendu byla adovaná propolisem (blend P), vztaheno k obsahu PUR se jedná o 20 hm. %, vzhledem k oběma polymerům potom 9,1 hm. %. Naměřený průměr vláken byl 717 nm, 95% interval spolehlivosti je mezi 684 a 750 nm, jak je vidět na Grafu 8. Ze zvětšení 500x na Obrázku 29 je patrné, že vrstva obsahovala zakroucená vlákna nepravidelných tvarů. Z detailnějšího pohledu je patrné, že se nejednalo o zásadní defekty a vlákna byla hladká.

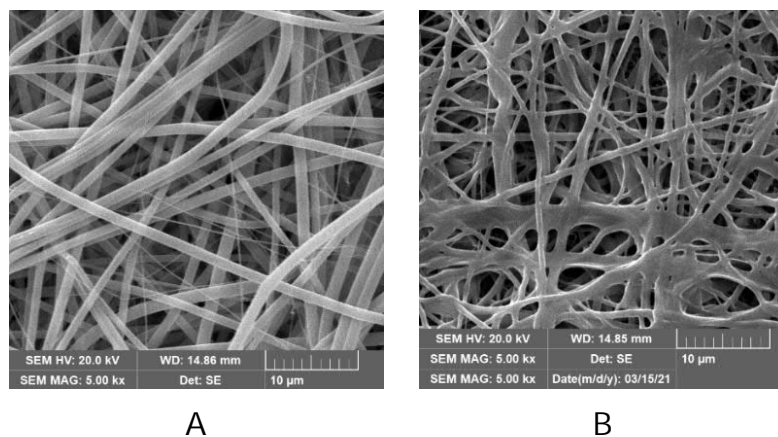


Obrázek 29 - SEM vrstvy blendu s propolisem

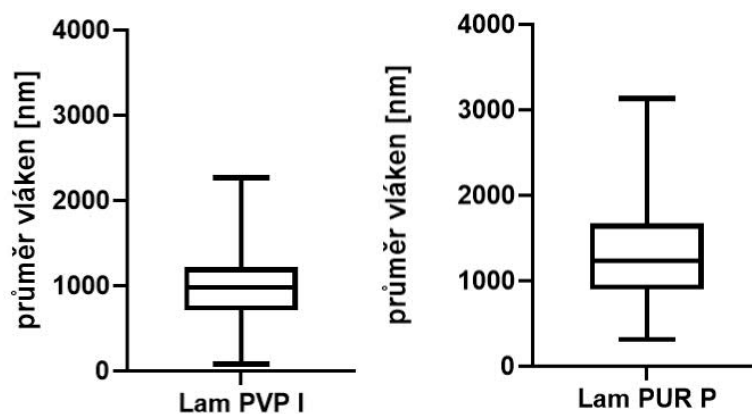


Graf 8 - Krabicový graf průměru vláken blendu P, n=200

Laminované vrstvy byly připraveny obdobně jako v kapitole 3.4, pouze místo základních vrstev byly použity ty adované. Došlo k úspěšnému spojení bez znehodnocení vlákenné struktury. Výsledná morfologie je zobrazena na Obrázku 30. Ve vrstvě PVP se částečně zachoval podíl velmi jemných vláken, ale celkově došlo ke zvýšení průměrů vláken. U vrstvy PVP I byl průměr 930 nm, s 95% intervalem spolehlivosti mezi 870 a 990 nm, PUR P měl průměr 1457 nm, s 95% intervalem spolehlivosti mezi 1374 a 1540 nm. Data jsou zobrazena na Grafu 9.



Obrázek 30 - SEM vrstvy laminátu
A - strana PVP s jódem, B - strana PUR s propolisem



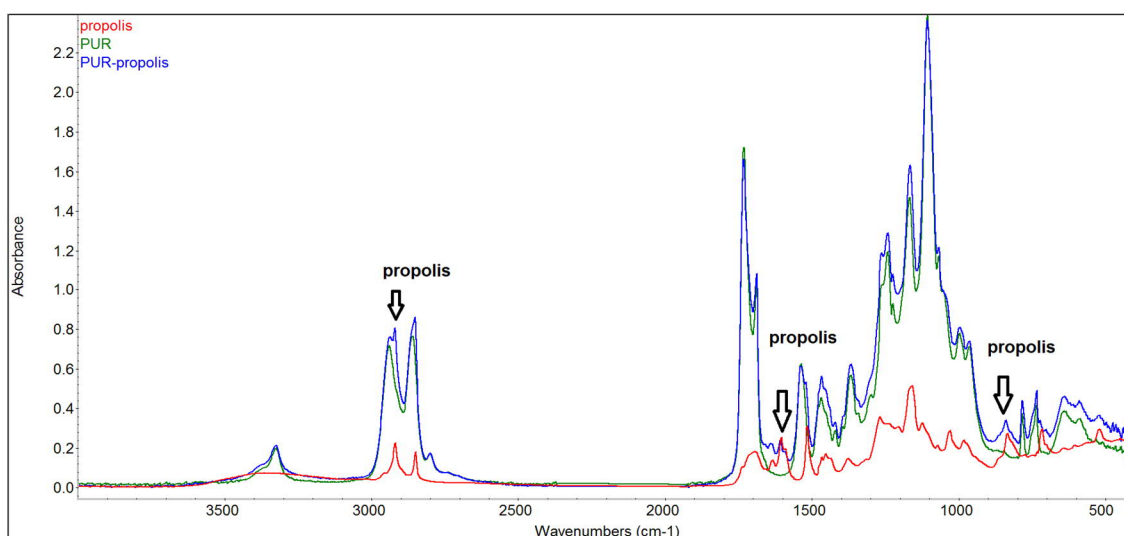
Graf 9 - Krabicové grafy průměrů vláken laminovaných adovaných vrstev, n=200

3.5.2 Výsledky FTIR a Ramanovy mikroskopie

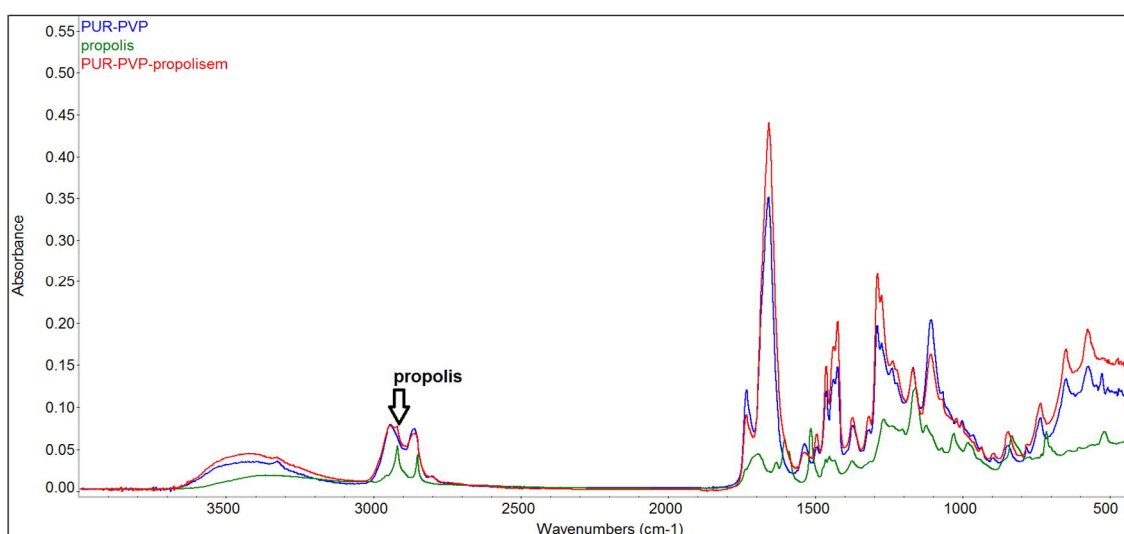
Pro hodnocení kvalitativního obsahu látek ve vrstvách byla použita metoda infračervené spektroskopie FTIR ATR pro vrstvu PUR a PUR s propolisem. Každá látka má podle obsahu specifických skupin svá typická vibrační spektra, která se projevují zvýšenou absorbcí specifických vlnočtů v infračerveném spektru. PUR obsahuje typickou vazbu -NH-COO-,

s vlnočty 1650 cm^{-1} a pro N-H skupiny 3300-3500 cm^{-1} , 1700 cm^{-1} pro C=O a 1100 cm^{-1} pro asymetrické C-O-C [83], která byla silná.

V blendu bylo patrné větší zastoupení N-H skupin (obsaženy v obou polymerech) a největší nárůst (peak) absorbance byl na vlnočtu 1700 cm^{-1} , který představuje C=O vazby. Propolis je směs mnoha přírodních látek. Jejich spektrogram byl patrný i v adované vrstvě, zejména na označených místech na Grafu 10 a 11. Kvantitativní podíl touto metodou není zjistitelný, ale z důvodu citlivosti metody musí být větší jak jednotky procent. Peaky u vlnočtů 2900, 1600 a 850 cm^{-1} vypovídají o nejvýznamnějších zastoupených skupinách (C-H, C=O a C-O, O-O). Spektrogramy vypovídají o adování propolisem.



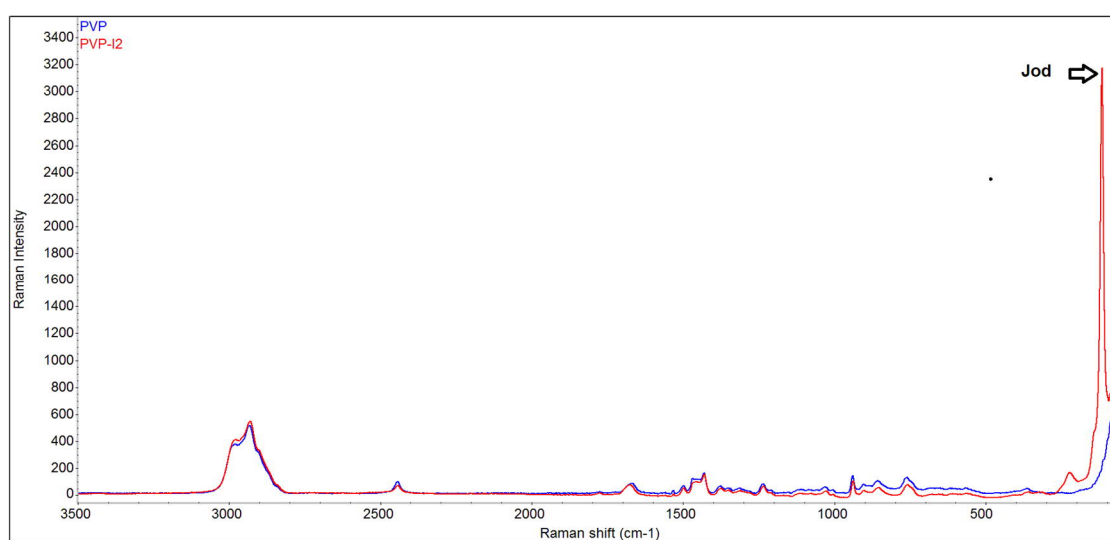
Graf 10 - FTIR spektra vrstev PUR
zelená - PUR, modrá - PUR s propolisem, červená - propolis



Graf 11 - FTIR spektra blendu
modrá - PUR-PVP blend, červená - blend s propolisem, zelená - propolisu

Pro stanovení přítomnosti jódu nebylo možné použít FTIR, jelikož se jedná o nepolární látku, proto byla použita Ramanovská mikroskopie. Specifické vlnočty jsou stejná jako u infračervené spektroskopie, pro Ramanovská spektra jsou způsobena polarizací.

Křivky naměřených intenzit (na Grafu 12) se téměř překrývaly, u vrstvy s jódem byl patrný nárůst intenzity v hodnotách vlnočtu 210 a 150 cm^{-1} , který je pro jód typický. V okolí vlnočtu 3000 cm^{-1} byl pozorován nárůst intenzity způsobený nepolárními skupinami CH_3 , CH_2 a polární N-H. Peak intenzity v oblasti 1500-1700 cm^{-1} byl způsoben skupinami C=O. Další malé peaky byly způsobeny skupinami C-H a C-C, peak 950 cm^{-1} zobrazoval přítomnost pětičlenného kruhu.



Graf 12 - Ramanova spektroskopie PVP
modrá - PVP, červená - PVP s jódem

Měření bylo prokázáno, že dané vrstvy obsahují aditiva.

3.5.3 Výsledky měření smáčivosti

Vrstva PUR s propolisem byla hydrofobní, přídavek vosků a dalších látek v propolisu ji zvyšoval. Naměřený kontaktní úhel byl $107 \pm 10^\circ$. Také odchylky měření zde byly menší. U vrstvy blendy s propolisem také převažoval hydrofobní charakter, kontaktní úhel byl $113 \pm 11^\circ$. Vrstva PVP s jódem vykazovala stále 0 stupňů a silnou hydrofilitu. Aditivum nijak neovlivnilo smáčivost.

3.6 Shrnutí: Vyrobené vrstvy

Byly vyrobeny vrstvy základní (PVP a PUR), blend, vrstvy adované 5 hm. % jódu a 20 hm. % propolisem, (vrstvy PVP I, PUR P, Blend P) a lamináty základních (znovu naměřené průměry po laminaci vrstev byly označeny jako Lam PVP a Lam PUR) a adovaných vrstev (Lam PVP I a Lam PUR P). Přehledněji je to zobrazeno v Tabulce 5.

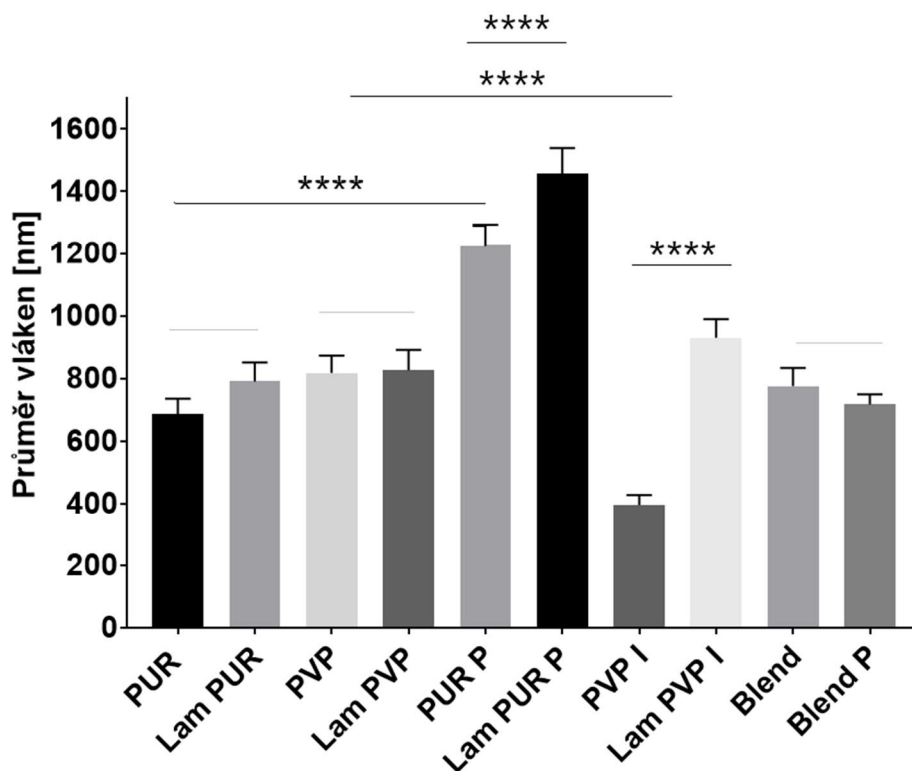
Podžilo se vyrobit zadané kompozitní materiály. Jako kožní kryt mají potenciál vystupovat blendy a lamináty, kde vrstva PVP má adhezivní funkci a PUR má funkci ochrannou. Aditiva byla úspěšně přidána do vrstev a jejich obsah byl zpětně prokázán. Byly změřeny kontaktní úhly vrstev. Propolis lehce zvyšoval hydrofóbnost vrstvy, což může být příznivé pro ochranu rány. Jód neměl na smáčivost PVP vliv.

Tabulka 5 - Přehled vyrobených nanovláknenných vrstev

Označení	Materiál
základní vrstvy	
PVP	polyvinylpyrrolidon
PUR	biodegradabilní polyuretan
Blend	směs PVP a PUR
Lam	laminát
Lam PVP, Lam PUR	strany laminátu se znovu naměřenými průměry vláken
adované vrstvy	
PVP I	polyvinylpyrrolidon s 5 hm. % jódem
PUR P	biodegradabilní polyuretan s 20 hm. % propolisem
Blend P	směs PVP a PUR s propolisem
Lam PI	laminát s aditivou – z vrstev PVP I a PUR P
Lam PVP I, Lam PUR P	strany adovaného laminátu se znovu naměřenými průměry vláken

Průměry vláken vrstev byly submikronové, až na vrstvy polyuretanu s propolisem. Obsah mikronových vláken ve vrstvě zvyšuje mechanickou odolnost, což je výhodou v aplikaci vrchních kožních krytů. Také bývá směs mikronových a submikronových vláken dobře přijímaná buňkami [84].

Průměry vláken ukazují Graf 13. Rozdíly mezi daty se vyskytovaly u dvojic PUR a PUR P, PVP a PVP I, PVP I a Lam PVP I, PUR P a Lam PUR P. Nesignifikační rozdíly byly u blendů, PUR a Lam PUR, PVP a Lam PVP, zde rozdíly mezi mediány nebyly statisticky významné, v grafu jsou označeny šedými úsečkami, aby bylo naznačeno, že byly porovnávány právě tyto dvojice.



Graf 13 - Průměry vláken vyrobených vrstev s chybovými úsečkami 95% IS, n=200
rozdíly mezi daty jsou označeny **** $p < 0,0001$ a neoznačené úsečky jsou nesignifikační

3.7 Testování cytotoxicity základních vs. adovaných vrstev

Pro použití materiálu v biomedicínských aplikacích je potřeba stanovit, zda materiál není toxický pro buňky savců. To je stanovováno pomocí testu cytotoxicity z extraktů materiálů podle ČSN EN ISO 10993: 5 Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu.

Testované materiály byly vyrobené vrstvy PVP, PVP s jódem (PVP I), PUR, PUR s propolisem (PUR P). Jde o testování uvolňování jednotlivých složek z materiálu a jejich vliv na viabilitu použité buněčné linie.

3.7.1 Materiály a metodika

Příprava buněk

Pro testování byly použity myší fibroblasty (NIH3T3, pasáž 14) a lidské keratinocyty (HaCaT, pasáž 37). Buňky byly kultivovány v kultivačních nádobách v kompletním kultivačním médiu (Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM, Biosera) s přidavkem 10% fetálního bovinního séra FBS (Biosera) a glutaminu (Biosera) v inkubátoru s 5% CO₂ atmosférou za teploty 37 °C. Konfluentní vrstvě adherovaných buněk bylo odsáto médium, vrstva byla opláchnuta fosfátovým pufrům (PBS) a pomocí trypsinu (Lonza) byly buňky uvolněny ze dna a resuspendovány do nového média. Počet živých buněk v buněčné suspenzi bylo stanoveno na přístroji Luna Cell Counter (Logos Biosystems) pomocí barvení buněk trypanovou modří v poměru 1:1.

Cytotoxicita extraktů

Materiály byly předem sterilizovány 12 hodin ethylenoxidem (Anprolene) a odvětrány při laboratorní teplotě po dobu 2 týdnů. Do sterilní zkuševky s materiály bylo přidáno kompletní kultivační médium (DMEM) v koncentraci 5 mg (vzorky PVP I 5, PUR P 5) a 10 mg materiálu (vzorky PVP, PVP I 10, PUR, PUR P 10) na 1 ml média.

Zkuševky s materiálem byly umístěny na laboratorní třepačku (60 RPM) při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin pro vytvoření extraktů.

Do 96 jamkové mikrotitrační destičky byly nasazeny buňky NIH3T3 a HaCaT o koncentraci 10⁴ buněk/100 µl v kompletním kultivačním médiu (n=8). Buňky byly kultivovány v inkubátoru s 5% CO₂ atmosférou za teploty 37 °C po dobu 24 hodin.

Po uplynutí 24 hodin od nasazení byl mikroskopicky zkontrolován souvislý nárůst buněk a odsáto médium. Následně bylo do každé jamky přidáno 100 µl vytvořeného extraktu z materiálu. Jako pozitivní kontrola byl použit cytotoxický 0,1% Triton-X-100 (TR-X, Sigma Aldrich) a jako negativní kontrola kompletní kultivační médium. Následná inkubace buněk s extrakty probíhala 24 h za stejných kultivačních podmínek. Poté byl proveden kolorimetrický test buněčné viability CCK-8 (Dojindo Laboratories).

Kolorimetrický test buněčné viability CCK-8

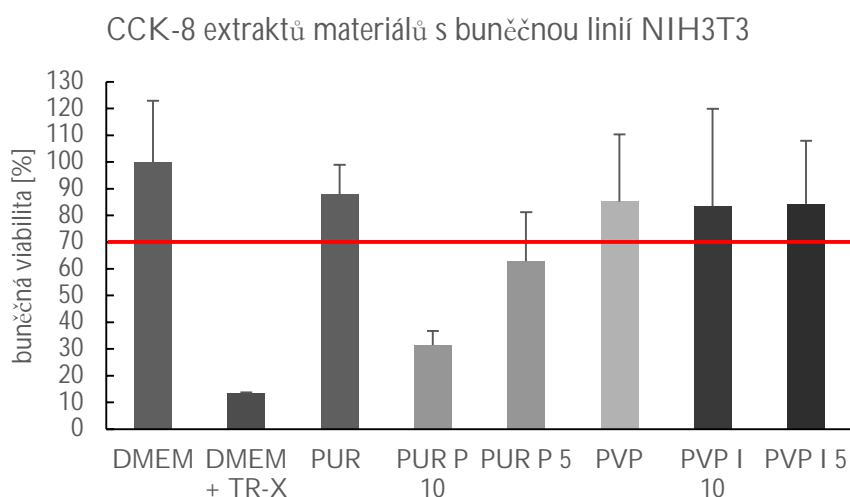
Principem metabolického testu CCK-8 je, že viabilní buňky přeměňují vodorozpustnou tetrazoliovou sůl WST-8, (2-(2-metoxy-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium) pomocí buněčných dehydrogenáz na oranžový formazan, který je rozpustný

v kultivačním médiu. Množství rozpuštěného formazanu je měřeno pomocí spektrofotometru při vlnové délce 450 nm. Produkované množství oranžového formazanu je úměrné počtu žijících buněk.

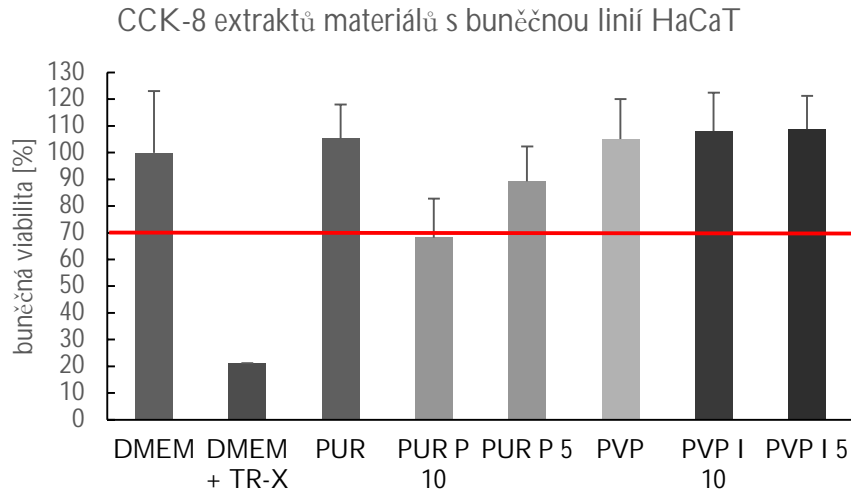
Pro testování byl použit 10% roztok CCK-8 v kompletním kultivačním médiu, který byl pipetován do titrační destičky k nasazeným buňkám. Inkubace probíhala 1- 3 h. Spektrofotometrické měření absorbance bylo provedeno na přístroji Tecan (The Spark Multimode Plate Reader) při hodnotách vlnové délky 450 nm. Následně byla dle průměrné hodnoty naměřené absorbance vzorků spočítána procentuální viabilita buněk, kde 100% viabilita je určena kontrolním vzorkem buněk v DMEM.

3.7.2 Výsledky

Jako cytotoxické jsou označovány ty vzorky, které nedosahují 70% buněčné viability kontrolních buněk. Pro buňky NIH3T3 vykazoval toxicitu materiál PUR P, polyuretan adovaný 20 hm. % propolisem v obou koncentracích výluhu (5 mg/ml, 10 mg/ml). Pro buňky HaCaT této hranice nedosáhl stejný materiál v koncentraci 10 mg/ml. Výsledky zobrazují Grafy 14 a 15. Extrakty z vrstev PUR a PVP i PVP s jódem nevykazovaly cytotoxický efekt a v dalších experimentech by neměly ovlivňovat buněčnou viabilitu.



Graf 14 - Viabilita buněk po působení extraktů z materiálu, n=8
materiály byly extrahovány v koncentraci 5 nebo 10 mg/ml média (DMEM)



Graf 15 - Viabilita buněk po působení extraktů z materiálu, n=8
materiály byly extrahovány v koncentraci 5 nebo 10 mg/ml média (DMEM)

3.8 Testování materiálů in vitro

Na vybrané materiály byly nasazeny buňky a testována buněčná adheze a proliferace na materiál ve čtyřech testovacích dnech (1., 3., 7. a 14. den od nasazení). Testované vzorky jsou základní materiál PUR, PUR adovaný 20 hm. % propolisem (PUR P), blend, blend s propolisem (blend P). Vzorky laminát (lam) a adovaný laminát 5 hm. % jódu a 20 hm. % propolisem (lam PI) byly testovány 1. a 14. den, kde byl sledován stav na začátku a na konci experimentu. První den testování byla sledována adheze buněk na materiál, další testovací dny je sledována zejména buněčná proliferace na materiálu pomocí metabolického testu CCK-8 a fluorescenční mikroskopie.

3.8.1 Materiály a metodika

In vitro testování materiálu s buněčnou kulturou NIH3T3

Na dna jamek o průměru 1,6 cm titrační destičky byly umístěny vzorky vrstev (n=6) bez podkladové textilie, zatížené skleněnými kroužky. Na etylenoxidem vysterilizované a odvětrané vzorky byly nasazeny NIH3T3 buňky (pasáž 15), a to v koncentraci 10^4 buněk/jamka v kompletním kultivačním médiu. Další testování buněčné adheze a proliferace probíhalo po 1, 3, 7 a 14 dnech metodami metabolického CCK-8 testu (popsaný v kapitole 3.7.1) a fluorescenční mikroskopie. Jednotlivé vzorky byly v testovací dny pomocí sterilní pinzety předávány z původních do nových jamek, aby byly testovány pouze buňky na materiálu. Negativní kontrolou (n=1) byl materiál bez nasazené buněčné pasáže a pozitivní kontrolou (n=2) buněčná pasáž nasazená na dno titrační jamky.

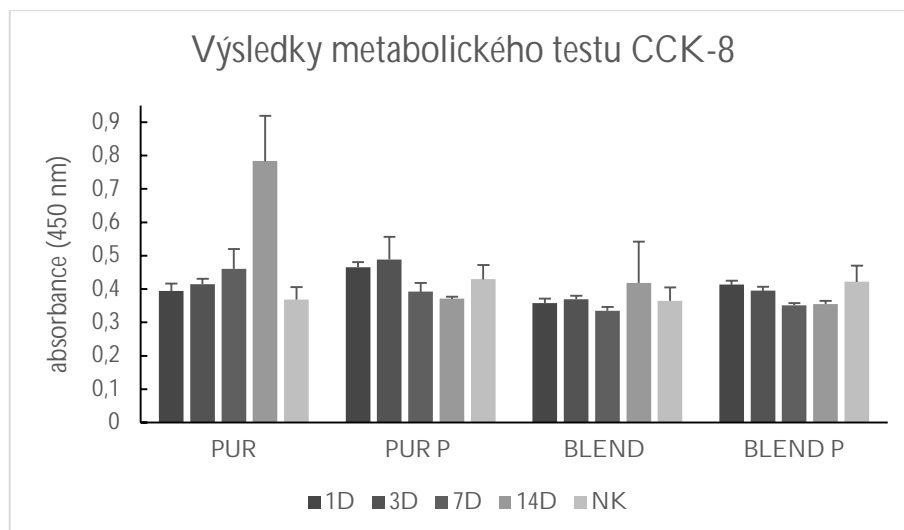
Fluorescenční mikroskopie

Vybraný vzorek pro jednotlivé testovací dny byl opláchnut PBS a fixován 2,5% glutaraldehydem (Sigma Aldrich) v PBS po dobu minimálně 15 minut ve 4 °C. Poté byl dvakrát opláchnut PBS a permeabilizován 5 minut v 1 ml permeabilizačního roztoku, který obsahoval 0,1% Triton X-100, 0,1% bovinního sérového albuminu (BSA, VWR Chemicals) v PBS. Poté byl vzorek znovu opláchnut v PBS a po dobu 20 minut barven fluorescenčním barvivem FITC (Sigma Aldrich), ředěný 1:1000 s permeabilizačním roztokem. Po opláchnutí PBS bylo na pět minut přidáno fluorescenční barvivo DAPI (Sigma Aldrich), obarvující jádra buněk. Vzorky byly uloženy v PBS ve 4 °C pro další použití. Snímání probíhalo na fluorescenčním mikroskopu Eclipse Ti (Nikon). Z 10 zorných polí byl stanoven dle počtu jader obarvených DAPI počet buněk na 1 mm² materiálu pomocí softwaru ImageJ nebo MatLab (MathWorks).

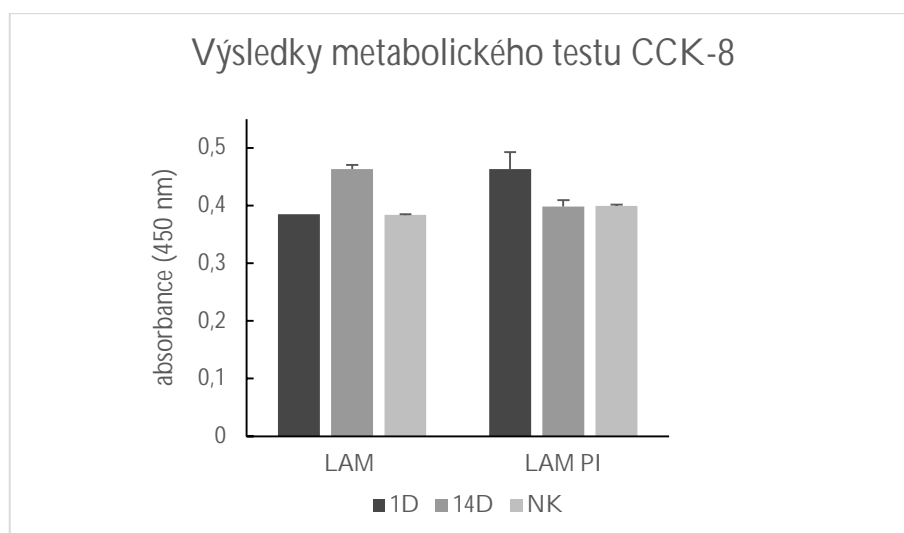
3.8.2 Výsledky

Vrstvy PUR, PUR P, blend a blend P byly testovány ve čtyřech testovacích dnech, 1. a 14. den byly hodnoceny také laminát a laminát s oběma aditivami (lam, lam PI).

Na metabolickém testu CCK-8 byla zaznamenána nevýrazná metabolická aktivita buněk v porovnání s negativní kontrolou (pouze materiál bez nasazených buněk, NK) a pozitivní kontrolou (kontrolní buňky nasazené na dna jamek titrační destičky), která prospívala dobře. První testovací den byla metabolická aktivita sledována u vzorků PUR, PUR P, blend, lam a lam PI, došlo tedy k buněčné adhezi na materiál. Buňky nemetabolizovaly na vzorcích blend P. Třetí den byla zaznamenána metabolická aktivita na PUR, PUR P, blendu. Buňky nemetabolizovaly na blendu P. Sedmý den byla zaznamenána metabolická aktivita pouze na vzorcích PUR. Čtrnáctý den vzorky PUR vykazovaly výraznou metabolickou aktivitu. Viabilní buňky také prokazatelně obsahovaly vrstvy bez aditiv, tedy blend a laminát. Materiály s obsahem propolisu (blend P, PUR P, lam PI) nevykazovaly metabolickou aktivitu. Výsledky jsou zobrazeny v Grafu 16 pro vzorky PUR, PUR P, blend a blend P pro všechny testovací dny, v Grafu 17 pro lamináty testované první a 14. den.



Graf 16 - Absorbance vzorků materiálů s nasazenými buňkami, n=5
 NK – negativní kontrola (absorbance materiálu bez nasazené buněčné pasáže)



Graf 17 - Absorbance vzorků laminátů s nasazenými buňkami, n=5
 NK – negativní kontrola (absorbance materiálu bez nasazené buněčné pasáže)

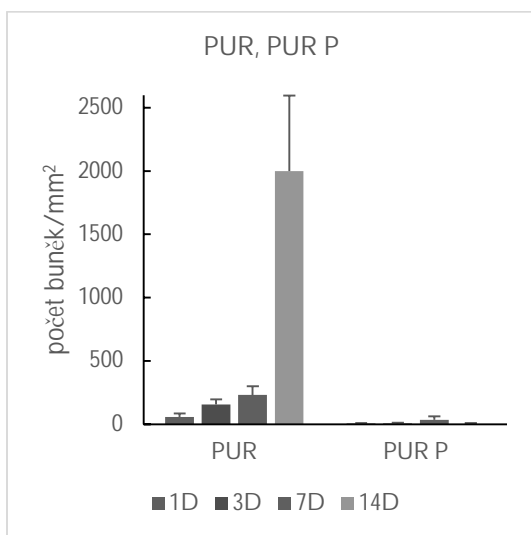
Fluorescenční mikroskopii byly pozorovány nejčastěji buňky zakulacené, bez typického vzhledu buněk fibroblastového typu. Snímky jsou zobrazeny v Příloze 1, řazené podle dní na Obrázcích 31-34 (modře jsou zobrazeny jádra pomocí DAPI, cytoskelet buněk zeleně barvivem FITC). Bylo pozorováno, že se základní vrstvy také barví fluorescenčními barvivými, což znesnadňuje kvalitní nasnímání adherovaných buněk.

První den byla na vzorcích PUR, PUR P, blend, pozorována místa s adherovanými buňkami. Na lam, lam PI a blend P se fluorescenčně obarvené buňky vyskytovaly minimálně nebo vůbec. Nejvyšší počet buněk na 1 mm² materiálu byl zaznamenán na vrstvě PUR (Graf 18).

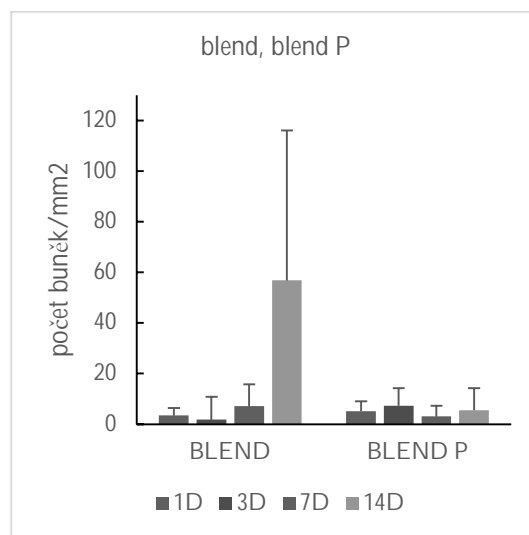
Třetí den byly buňky pozorovány, ale jednalo se o minimální množství. Sedmý den byly buňky pozorovány na všech vrstvách. Čtrnáctý den bylo na adovaných vrstvách pozorováno minimum jednotlivých buněk, z nichž několik bylo zachyceno na vrstvě lam PI. Na základních materiálech (bez aditiv) byla proliferace buněk výraznější, především na vrstvě PUR a Lam.

Grafy 18, 19 a 20 zobrazují počet buněčných jader na 1 mm² vzorku materiálu. Pro názornost jsou zvoleny jiná měřítka os počtu buněk, aby bylo možné pozorovat hodnoty u materiálů, protože výsledek 14. dne vzorku PUR byl vysoký a znemožňuje tak detaily ostatních vzorků. U vrstev s aditivu nebyla pozorována výrazná adheze, ani proliferace buněk.

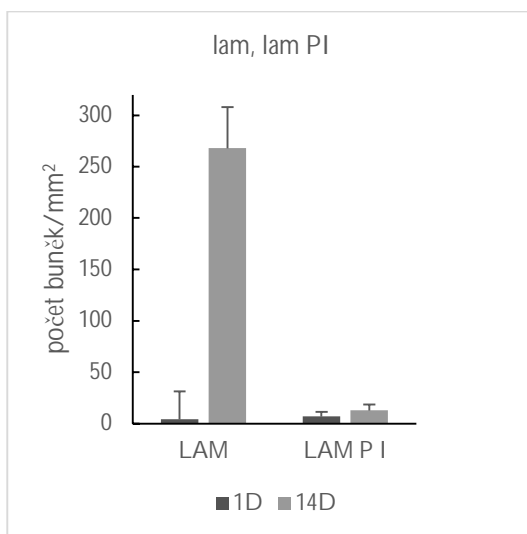
Počet buněk na mm² materiálu



Graf 18 - Počet buněčných jader (DAPI) na 1 mm² materiál PUR a PUR P, n=10



Graf 19 - Počet buněčných jader (DAPI) na 1 mm² materiál blend a blend P, n=10



Graf 20 - Počet buněčných jader (DAPI) na 1 mm² materiál lam a lam PI, n=10

3.9 Diskuze

Materiál vyvíjený v této práci nabízí potenciál v zakrytí rány, poskytnutí podpory při hojení a oddělení od okolí. Měl by zajišťovat proces optimálního hojení po dostatečnou dobu, bez narušování rány výměnou až do biodegradace materiálu, tedy vstřebání tělem pacienta. Tato práce se zabývá zejména technologickým řešením výroby takového kožního krytu. Nanovláknenné vrstvy byly zvoleny, protože imitují mezibuněčnou hmotu tkáně.

Při výrobě byly řešeny také problémy vyvstávající z používání nových, dosud nevyzkoušených materiálů. Bohužel docházelo k omezení experimentální části vzhledem k mimořádné epidemiologické situaci.

Výroba kompozitních nanovláknenných vrstev

Elektrostatické zvlákňování je technologie pro výrobu nanovláknenných vrstev, jejichž použití je v oblasti tkáňového inženýrství příhodné. Bezjehlové zvlákňování pomocí stroje Nanospider je technologie, kterou je možné používat v průmyslových kapacitách, například pro výrobu schváleného produktu, což je velkou výhodou, protože nebude potřeba převádění z laboratoře (up-scaling), ale pouze použití již nalezených parametrů zvlákňování.

Vybrané materiály, PUR a hydrofilní PVP, by svou kombinací mohly poskytovat požadované vlastnosti kožního krytu. GP-PUR je nový biodegradabilní materiál, elastomer a je již použitelný pro medicínské účely. PVP je inertní materiál, dobré adhezivum, velmi hydrofilní, v medicíně již používaný polymer, který se dobře zvlákňuje.

Ve fázi výroby nanovláknenných vrstev byly připravovány roztoky v různých rozpouštědlech, s polymery a také s aditivou. Povedlo se nalézt takové podmínky, za kterých jsou polymerní roztoky zvláknitelné. Zvlákňováním vznikla prvotní morfologie vrstvy, charakterizovaná v této práci, vlákna byla bez výrobních vad, jejich průměry nebyly nijak řízeny. Pro budoucí aplikaci je dokonce vhodné, že se občas vyskytují i mikronová vlákna, která zvyšují soudržnost vrstvy, navíc směs různých průměrů vláken může být pro proliferaci příznivá, například podle studie Bačákové et al. [84].

Při výrobě roztoků byl pozorován zajímavý jev, který je popsán v kapitole 3.3.3, jedná se o rozpouštědlový systém a interakce stejného polymeru (PVP) o dvou různých molekulových hmotnostech. Ačkoliv se jedná o chemicky stejnou strukturu, k solubilizaci stejnými rozpouštědly nedochází totožně.

Prostor pro vývoj je zde v nahrazení rozpouštědla (chloroform) za netoxické. Rozvoj by si zasloužilo i zvláknování PUR, které má za nalezených podmínek nízkou výrobnost. Zde pro to vzhledem k množství času, polymeru a jeho ceně nebyl prostor.

Směsování polymerů, tj. výroba blendu, je výroba jednokroková. Je potřeba zajistit rozpouštědlový systém, který vyhovuje oběma polymerům, což se v této práci povedlo. Výhodou je potom rychlost výroby kompozitu. Byl vyroben blend v poměru hm. koncentrací 5:6 pro PUR:PVP s velmi dobrými výsledky morfologie vrstvy. Přesné stanovení poměru je možné zjistit naprostým vysušením, poté vymytím PVP, např. vodou a opětovným vysušením. Zde byl proveden pouze jednoduchý test, kdy byla výsledná vrstva ponořena do vody a sledována. Nedošlo k porušení vrstvy, což dokazuje homogenní a žádané smísení obou komponent. Je nezbytné zajistit dostatečnou plošnou hmotnost PUR, který tvoří ochrannou vrstvu krytu. Bylo zjištěno, že i po uvolnění PVP se s vrstvou dobře manipuluje a velmi snadno se přizpůsobuje povrchu.

Druhý úspěšný přístup k výrobě kompozitu byla laminace. Laminace se v medicíně zatím příliš nepoužívá, ale je to jednoduchá technologie, bez použití chemikálií (což je velmi žádané). Je nutné docílit spojení dostatečných plošných hmotností vrstev, která jsou před laminací lehce stanovitelná a kontrolovatelná. Poté je důležitá teplota (je nezbytné nepřesáhnout teplotu tání a degradace), zde měl PUR nižší teplotu tání, a tlak pojení. Následná kontrola morfologie proběhla pomocí SEM, z obou stran je potřeba zjistit, zda nedochází k nechtěné výrobě folie. Malou nevýhodou je přidání technologického kroku při výrobě. Nejdříve dochází k výrobě jednotlivých vrstev a následně až k jejich spojování, obě technologie jsou ale kontinuální. Z hlediska manipulace je vrstva tužší, po kontaktu s vodným prostředím dochází k rozpuštění PVP, s důsledkem zvýšení adheze k ráně.

Metod pro vyrobení kompozitu existuje více, může to být prostor pro další experimenty. Z hlediska testování by bylo vhodné dále zkoumat mechanické vlastnosti, přilnavost k ráně, porozitu a to včetně změn v čase, protože se jedná o biodegradabilní materiál.

Aditiva

Přidávání aditiv je zajímavou oblastí jak zvýšit terapeutické účinky, zvláště u zvířat, kdy je vyžadováno rychlé a přesné ošetření. Zde bylo nastíněno vzorování, které by si zasloužilo navázání a větší prostor. Pro další testování vrstev zde byla zvolena pouze jedna pilotní koncentrace vybraného aditiva, což je málo, ale v této diplomové práci nebylo tolik prostoru a nabízí se navázání dalších prací.

Koncentrace byly zvoleny pro jód 5 hm. %, což je koncentrace s vhodnými terapeutickými účinky, také je detekovatelná použitými metodami (EDS, Ramanova spektroskopie). Vyšší koncentrace jódu jsou především z dlouhodobého hlediska nevhodné, protože způsobují poškození kůže [53]. Autorka doporučuje výrobu povidon jódu, který bude bezpečnější z hlediska uvolňování jódu. U 5 hm. % koncentrace elementárního jódu nebyly při běžné manipulaci pozorovány problémy. Také je možné použít dostupný povidon jód a vyrábět směs s PVP.

Příprava propolisu byla prováděna autorkou, jedná se o extrakt z chloroformu s etanolem z homogenizovaného pevného vzorku. Prostor je zde i pro vytvoření extraktů z jiných rozpouštědlových systémů. Koncentrace přidávaného propolisu byla zvolena 20 hm. %, pro prokázané podporující účinky použité v předchozích studiích a lepší identifikaci aditiv. Kim et al. a Stojko et al. [59, 66] prováděli *in vitro* testy a dosáhli podporujících výsledků i s 30% koncentrací propolisu, jako nejperspektivnější vyhodnotili, dokonce v *in vivo* testech, koncentrace 5 a 10 %, které zde nebyly použity z důvodu předpokladu nedostatečné detekovatelnosti (FTIR). Úsudek byl správný, u blendu byla nižší koncentrace detekovaná o poznání hůře. Důvodem je rozličnost látek propolisu, které mají tím pádem menší zastoupení a jejich signál se proto zeslabuje. V blendu byla koncentrace propolisu 20 hm. % k polymeru PUR, který je nosným materiálem, kdežto PVP se ihned rozpouští. Pro kompletní vrstvu je počáteční koncentrace propolisu 9,1 hm. %, při vyplavení PVP se koncentrace „zvyšuje“ na 20 hm. %. Uvolňování propolisu nebylo zkoumáno.

Autorka doporučuje vzorování s aditivou a následné biologické testování, které poskytne mnohem porovnatelnější výsledky, než je jedna testovaná koncentrace. Také uvolňování látek by mohlo být předmětem dalšího zkoumání.

Biologická testování

O použitelnosti vyrobených materiálů pro biomedicínské aplikace rozhodují různá biologická testování. V experimentální části byly provedeny prvotní experimenty vyvíjeného materiálu, což přineslo mnohá zjištění pro navazující testování. Provedený test cytotoxicity extraktů materiálů ukázal, že vrstva PUR adovaná 20 hm. % s propolisem v koncentraci 5 i 10 mg/ml média je cytotoxická pro buňky NIH3T3, na rozdíl od vrstvy základní. Přestože cytotoxicita materiálu znamená vyřazení z dalšího testování, zde byly vrstvy zahrnuty.

Zajímavé při testech cytotoxicity bylo použití dvou buněčných linií. Myší fibroblasty jsou určeny normou, testování s buněčnou linií HaCaT, keratinocyty, dává smysl pro budoucí

aplikaci pro kožní kryty. Ukázalo se, že tyto buňky lépe snášely propolisové aditivum, které pro ně v nižší koncentraci 5 mg materiálu/ml média nebylo cytotoxické. PVP nebylo cytotoxické ani s přidáním jódu, což byl příznivý výsledek, jelikož buňky byly v kontaktu přímo s rozpuštěným materiálem v médiu a nebyly zaznamenány žádné problémy s metabolickou aktivitou buněk.

In vitro testování s buněčnou linií NIH3T3 bylo úplně prvotní testování daného materiálu, přičemž je nutno zmínit, že se liší od PCL, pro který byla vytvořena stávající a prováděná laboratorní metodika. PVP je vodorozpustný polymer, tudíž ho nelze podle klasické metodiky testovat, neboť se uvolňuje do média a nelze na něm pozorovat růst buněk. Samotný PVP byl tedy testován v blendu a v laminátu, kde došlo k rozpuštění do média, a byl odsát s médiem při jeho výměně. PUR je elastomer, což také vede k odlišnému způsobu přípravy vzorků oproti práci s PCL. V etanolu bobtná, proto nebyly vytvořeny vzorky pro skenovací elektronovou mikroskopii, kde se využívá etanolová řada pro vysušování vzorků.

Vrstvy s přídatkem propolisu se v biologickém testování projeví nepříznivě a cytotoxicky. Důvody mohou být dva. Prvním je zvolená koncentrace, nabízí se proto použít nižší koncentraci. Cytotoxicita může být také způsobena rezidui rozpouštědel ve vrstvě, které mohou být ovlivněny interakcemi s aditivu. Bylo by vhodné tuto skutečnost ověřit. V této práci se proto nepodařilo prokázat příznivý efekt propolisu, který uvádí např. Santos et al. [61].

Základní materiály PUR, laminát a blend byly osídleny buněčnou kulturou. V adovaných vrstvách dochází k rozpuštění PVP, který zejména v prvních dnech může ovlivňovat buňky svou přítomností v médiu. V prvních dnech PVP mohl mít vliv adhezi buněk na materiál, ale z provedeného testu nelze říci, zda pozitivní nebo negativní. Proliferace buněk se v experimentu výrazněji projevila až 14. den. Pro kvalitnější zhodnocení je doporučováno zopakování testu a v případě prokázané nevhodnosti PVP náhradu vhodnějším polymerem. Také by bylo vhodné se zaměřit na vliv vysoké molekulové hmotnosti PVP na organismus, zda například nedochází ke kumulaci, a případně na tuto skutečnost reagovat.

Bylo zjištěno, že materiál není příliš homogenní, což vytvářelo problémy s interpretací výsledků v biologickém testování. Nehomogenita materiálu může být způsobena novým postupem výroby, malými sériemi výroby i nezkušeností autorky. Materiály jsou ovšem perspektivní a jejich spojování (blend a laminace) lze prohlásit za úspěšné.

4 Závěr

Práce se zabývá biomedicínským tématem kožního krytí z technologického hlediska. V teoretické části jsou představena témata kůže, hojení, dosavadní léčby ran ve veterinární medicíně, kožních krytů, tkáňového inženýrství a použití nanovláken. Poté jsou popsány používané materiály, elektrostatické zvlákňování a možnosti funkcionalizace nanovláken.

V praktické části byly pomocí bezjehlového elektrostatického zvlákňování připraveny nanovlákněné vrstvy technologií Nanospider, která umožňuje průmyslovou výrobu, což je výhodné pro budoucí produkci s již nalezenými parametry.

Cíle práce vytvořit potencionální kompozitní biodegradabilní kožný kryt z nanovlákněných vrstev, který obsahuje jak hydrofobní ochrannou vrstvu, tak adhezivní hydrofilní část, byly splněny pomocí biokompatibilních polymerů PUR a PVP. Kompozit byl vyroben v jednom kroku (v případě blendu, směsi) a druhé úspěšné řešení spočívalo v přípravě jednotlivých nanovlákněných vrstev s následnou laminací. Je nezbytné zajistit, aby nedošlo k znehodnocení vlákněné struktury přílišným natavením, u základních vrstev se průměry vláken nezměnily. Příprava kompozitu pomocí současného zvlákňování ze dvou roztoků nebyla úspěšná, docházelo k oddělování vrstev.

PUR je biodegradabilní materiál, který má dočasně přebírat ochrannou funkci ve formě nanovlákněné vrstvy, vyrobené bez výrazných defektů s typickou strukturou. Vrstva z PVP má zajišťovat lepší adhezi ke spodině rány díky vysoké hydrofilnosti. Vyrobené vrstvy neobsahovaly výrazné defekty a vlákna jsou hladká.

Postupy výroby kompozitu (blend a laminace) byly také použity pro výrobu vrstev s aditivou. Byla použita jedna pilotní koncentrace, jód byl přidáván k PVP v koncentraci 5 hm. %, propolis k PUR v koncentraci 20 hm. %. Vrstva s jódem má nižší průměry vláken, přidáním propolisu se zvýšil průměr vláken v porovnání se základní vrstvou PUR, u blendu nedošlo ke změně. Při laminaci došlo ke zvýšení průměrů vláken. Obsah látek ve vrstvě byl dokázán pro jód Ramanovou spektroskopií a EDS analýzou, propolis byl detekován pomocí FTIR.

Biologické testování cytotoxicity výluhu materiálu prokázalo, že PUR i PVP nejsou cytotoxické. Ani přidání jódu do vrstvy nemělo negativní vliv na buňky. Vrstva s 20 hm. % propoliséem je cytotoxická pro myšičí fibroblasty, buňky NIH3T3, ale pro lidské keratinocyty, buňky HaCaT, není cytotoxická v koncentraci 5 mg/ml.

Provedený in vitro test vyrobených materiálů s buněčnou linií NIH3T3, který byl hodnocen 1., 3., 7. a 14. den, vypovídá o nebiokompatibilitě vrstev s propolisem. Po 14 dnech proliferovaly buňky na základních vrstvách PUR, také se vyskytovaly na blendu a laminátu.

V současné době je připravováno další testování a následně případný vědecký článek, k jehož experimentálním výsledkům významně přispěla tato diplomová práce.

Pro další experimenty je zde prostor pro analýzu vlivu aditiv na morfologii a biokompatibilitu výsledných vrstev. Vhodné by bylo provést škálování pro posouzení těchto vlivů. Autorka doporučuje experimenty s povidon jódem namísto elementárního jódu, především z důvodu stability. Zejména pro vrstvy adované propolisem by bylo vhodné testování reziduí rozpouštědel, vzhledem k jejich možnému výskytu. Pro testování in vitro by bylo vhodné vytvořit metodiku, která by vyhovovala specifickým vlastnostem nových materiálů. Výsledný materiál by bylo vhodné podrobit degradačním a mechanickým zkouškám pro zjištění parametrů degradace pro budoucí aplikaci ve veterinární medicíně, s výhodou pro snížení traumatické zátěže zvířat.

Pro schválení materiálu pro aplikaci kožního krytu musí proběhnout biologické a klinické testování, na jehož výsledky může technolog reagovat vyvíjením požadované ideální kombinace materiálů.

Seznam použité literatury

- [1] KRCHOVÁ, Silvie, Ladislav DZAN, David LUKAS, P. MIKEŠ, Vera JENCOVA, Jana HORAKOVA a Kateřina STRNADOVÁ. Nanofibers for the wound healing Nanovlákná v hojení kožních ran. *Česká dermatovenerologie*. 2014, 4, 234–240.
- [2] VOJTOVÁ, L.; WOLFOVÁ, L.; JUREČKOVÁ, L.; KOHUTOVÁ, L. Úvod do tkáňového inženýrství. Česká republika: MediaBros s.r.o., 2015. ISBN 978-80-260-9720- 4.
- [3] GOONOO, Nowsheen a Archana BHAW-LUXIMON. 7 - Nanomaterials combination for wound healing and skin regeneration. In: Lisa C. du TOIT, Pradeep KUMAR, Yahya E. CHOONARA a Viness PILLAY, ed. *Advanced 3D-Printed Systems and Nanosystems for Drug Delivery and Tissue Engineering* [online]. B.m.: Elsevier, 2020, Woodhead Publishing Series in Biomaterials, s. 159–217. ISBN 978-0-12-818471-4. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-818471-4.00007-8
- [4] VAN DER VEEN, Vincent C., Martijn B. A. VAN DER WAL, Michiel C. E. VAN LEEUWEN, Magda M. W. ULRICH a Esther MIDDELKOOP. Biological background of dermal substitutes. *Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries* [online]. 2010, 36(3), 305–321. ISSN 1879-1409. Dostupné z: doi:10.1016/j.burns.2009.07.012
- [5] ÅGREN, Magnus. *Wound Healing Biomaterials* [online]. Amsterdam: Elsevier, 2016. Volume 1 a 2. ISBN 978-1-78242-455-0. Dostupné z: doi:10.1016/C2014-0-03386-2
- [6] PILEHVAR-SOLTANAHMADI, Yones, Abolfazl AKBARZADEH, Nasim MOAZZEZ-LALAKLO a Nosratollah ZARGHAMI. An update on clinical applications of electrospun nanofibers for skin bioengineering. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* [online]. 2016, 44(6), 1350–1364. ISSN 2169-1401. Dostupné z: doi:10.3109/21691401.2015.1036999
- [7] KOUTNÁ, Markéta a Ondřej ULRYCH. *Manuál hojení ran v intenzivní péči*. Praha: Galén, 2015. ISBN ISBN 978-80-7492-190-2.
- [8] ALBANESE, Francesco. *Canine and Feline Skin Cytology: A Comprehensive and Illustrated Guide to the Interpretation of Skin Lesions via Cytological Examination* [online]. B.m.: Springer International Publishing, 2017. ISBN 978-3-319-41239-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-41241-2
- [9] SCHULZ, Gregory. *Extracellular matrix: review of its roles in acute and chronic wounds* [online]. 2005. Dostupné z: <http://www.worldwidewounds.com/2005/august/Schultz/Extrace-Matric-Acute-Chronic-Wounds.html>
- [10] eucerin-int-skin-structure-02-cz.jpg (780×515) [online]. [vid. 2021-04-12]. Dostupné z: https://images-1.eucerin.com/~/_/media/eucerin/local/cz/about-skin/basic-skin-knowledge/skin-structure/eucerin-int-skin-structure-02-cz.jpg?h=515&mw=780&w=780&hash=94138F67519ED47BD530F72D41EF2352
- [11] ABU-SEIDA, Ashraf M. Effect of Propolis on Experimental Cutaneous Wound Healing in Dogs. *Veterinary Medicine International* [online]. 2015, 2015, 672643. ISSN 2090-8113. Dostupné z: doi:10.1155/2015/672643

- [12] DAVIDSON, Jacqueline R. Current Concepts in Wound Management and Wound Healing Products. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* [online]. 2015, 45(3), Soft Tissue Surgery, 537–564. ISSN 0195-5616. Dostupné z: doi:10.1016/j.cvsm.2015.01.009
- [13] HLINKOVÁ, Edita. Management chronických ran. B.m.: Grada, 2019. ISBN 978-80-271-0620-2.
- [14] Wound_Stages_002-e1563781606470.jpg (640×321) [online]. [vid. 2021-04-23]. Dostupné z: https://i2.wp.com/epochaplus.cz/wp-content/uploads/2019/07/Wound_Stages_002-e1563781606470.jpg?resize=640%2C321
- [15] VEČERKOVÁ, Lenka, Vladimír VEČEREK a Jana JOZEOFVÁ. Základy veterinární péče. B.m.: VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO, 2015.
- [16] FICHTEL, Tomáš. Přístupy k hojení ran ve veterinární praxi. In: Mezioborové přístupy v hojení ran [online]. 2019. Dostupné z: <https://www.akutne.cz/res/publikace/03-fichtel.pdf>
- [17] MICKELSON, Megan A., Christoph MANS a Sara A. COLOPY. Principles of Wound Management and Wound Healing in Exotic Pets. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* [online]. 2016, 19(1), Soft Tissue Surgery, 33–53. ISSN 1094-9194. Dostupné z: doi:10.1016/j.cvex.2015.08.002
- [18] CAMPBELL, Bonnie Grambow. Dressings, Bandages, and Splints for Wound Management in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* [online]. 2006, 36(4), Wound Management, 759–791. ISSN 0195-5616. Dostupné z: doi:10.1016/j.cvsm.2006.03.002
- [19] MURRAY, Rachael Zoe, Zoe Elizabeth WEST, Allison June COWIN a Brooke Louise FARRUGIA. Development and use of biomaterials as wound healing therapies. *Burns & Trauma* [online]. 2019, 7. ISSN 2321-3868. Dostupné z: doi:10.1186/s41038-018-0139-7
- [20] BORDA, Luis J., Flor E. MACQUHAE a Robert S. KIRSNER. Wound Dressings: A Comprehensive Review. *Current Dermatology Reports* [online]. 2016, 5(4), 287–297. Dostupné z: doi:10.1007/s13671-016-0162-5
- [21] STANLEY, Bryden J. Negative Pressure Wound Therapy. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* [online]. 2017, 47(6), Wound Management, 1203–1220. ISSN 0195-5616. Dostupné z: doi:10.1016/j.cvsm.2017.06.006
- [22] HOWE, Lisa M. Current Concepts in Negative Pressure Wound Therapy. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* [online]. 2015, 45(3), Soft Tissue Surgery, 565–584. ISSN 0195-5616. Dostupné z: doi:10.1016/j.cvsm.2015.01.005
- [23] VIG, Komal, Atul CHAUDHARI, Shweta TRIPATHI, Saurabh DIXIT, Rajnish SAHU, Shreekumar PILLAI, Vida A. DENNIS a Shree R. SINGH. Advances in Skin Regeneration Using Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2017, 18(4). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms18040789

- [24] Wound Reconstruction Techniques: Free Skin Grafts. Today's Veterinary Practice [online]. 11. srpen 2020 [vid. 2020-08-16]. Dostupné z: <https://todaysveterinarypractice.com/wound-reconstruction-techniques-free-skin-grafts/>
- [25] ALKATTAN, Layth. Skin graft [online]. 2019. Dostupné z: doi:10.17582/journal.aavs/2019/7.4
- [26] HARASEN, Greg. Stimulating bone growth in the small animal patient: Grafts and beyond! The Canadian Veterinary Journal. 2011, 52(2), 199–200. ISSN 0008-5286.
- [27] CHEN, Shixuan, Bing LIU, Mark A. CARLSON, Adrian F. GOMBART, Debra A. REILLY a Jingwei XIE. Recent advances in electrospun nanofibers for wound healing. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0017> [online]. 18. květen 2017 [vid. 2021-02-15]. Dostupné z: doi:10.2217/nnm-2017-0017
- [28] ABRIGO, Martina, Sally L. MCARTHUR a Peter KINGSHOTT. Electrospun Nanofibers as Dressings for Chronic Wound Care: Advances, Challenges, and Future Prospects. Macromolecular Bioscience [online]. 2014, 14(6), 772–792. ISSN 1616-5195. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/mabi.201300561>
- [29] MACEWAN, Matthew R., Sarah MACEWAN, Tamas R. KOVACS a Joel BATTS. What Makes the Optimal Wound Healing Material? A Review of Current Science and Introduction of a Synthetic Nanofabricated Wound Care Scaffold. Cureus [online]. 2017, 9(10), e1736. ISSN 2168-8184. Dostupné z: doi:10.7759/cureus.1736
- [30] RAJENDRAN, S., ed. Advanced textiles for wound care. Oxford: Woodhead, 2009. Woodhead publishing in textiles, 85. ISBN 978-1-84569-271-1.
- [31] AMBEKAR, Rushikesh S. a Balasubramanian KANDASUBRAMANIAN. Advancements in nanofibers for wound dressing: A review. European Polymer Journal [online]. 2019, 117, 304–336. ISSN 0014-3057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2019.05.020
- [32] Nanovláknenné kryty kožních defektů - CEP - TA ČR Starfos [online]. [vid. 2021-04-12]. Dostupné z: <https://starfos.tacr.cz/cs/project/FV10416>
- [33] HAIK, Josef, Rachel KORNHABER, Biader BLAL a Moti HARATS. The Feasibility of a Handheld Electrospinning Device for the Application of Nanofibrous Wound Dressings. nedatováno, 9.
- [34] ROCKWOOD, Danielle N., Kimberly A. WOODHOUSE, Joanna D. FROMSTEIN, D. Bruce CHASE a John F. RABOLT. Characterization of biodegradable polyurethane microfibers for tissue engineering. Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition [online]. 2007, 18(6), 743–758. ISSN 0920-5063. Dostupné z: doi:10.1163/156856207781034115
- [35] K LAPSTOVA, Andrea, Jana HORAKOVA, Maros TUNAK, Andrii SHYNKARENKO, Jakub ERBEN, Jana HLAVATA, Petr BULIR a Jiri CHVOJKA. A PVDF electrospun antifibrotic composite for use as a glaucoma drainage implant. Materials Science and Engineering: C [online]. 2021, 119, 111637. ISSN 0928-4931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2020.111637

- [36] AHADIAN, S., R. OBREGÓN, J. RAMÓN-AZCÓN, G. SALAZAR a M. RAMALINGAM. 20 - Clinical/preclinical aspects of nanofiber composites. In: Murugan RAMALINGAM a Seeram RAMAKRISHNA, ed. *Nanofiber Composites for Biomedical Applications* [online]. B.m.: Woodhead Publishing, 2017, s. 507–528. ISBN 978-0-08-100173-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100173-8.00020-X
- [37] Světová premiéra „nanopistole“ Fiber Flow na festivalu Future Port Prague 2019. Nanoasociace [online]. 2. září 2019 [vid. 2021-02-16]. Dostupné z: <https://www.nanoasociace.cz/svetova-premiera-nanopistole-fiber-flow-festivalu-future-port-prague-2019/>
- [38] LIU, Guo-Sai, Xu YAN, Fang-Fang YAN, Fu-Xing CHEN, Long-Yun HAO, Shao-Juan CHEN, Tao LOU, Xin NING a Yun-Ze LONG. In Situ Electrospinning Iodine-Based Fibrous Meshes for Antibacterial Wound Dressing. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2018, 13(1), 309. ISSN 1556-276X. Dostupné z: doi:10.1186/s11671-018-2733-9
- [39] HASSAN, Atef A., Mogda K. MANSOUR, Ahmed M. EL HAMAKY, Rasha M. SAYED EL AHL a Noha H. ORABY. Nanomaterials and nanocomposite applications in veterinary medicine. *Multifunctional Hybrid Nanomaterials for Sustainable Agri-Food and Ecosystems* [online]. 2020, 583–638. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-821354-4.00024-8
- [40] EAST, Barbora, Martin PLENCNER, Martin KRALOVIC, Michala RAMPICHOVA, Vera SOVKOVA, Karolina VOCETKOVA, Martin OTAHAL, Zbynek TONAR, Yaroslav KOLINKO, Evzen AMLER a Jiri HOCH. A polypropylene mesh modified with poly-ε-caprolactone nanofibers in hernia repair: large animal experiment. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2018, 13, 3129–3143. ISSN 1176-9114. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S159480
- [41] GHOLIPOUR-KANANI, Adeleh, Ali SAMADIKUCHAKSARAEI, Monire MOHSENZADEGAN a Mohahmadreza FAYYAZI. Nanofibrous scaffolds from chitosan and poly(caprolactone) for excision wound healing application in canine model. *Materials Today: Proceedings* [online]. 2018, 5(7, Part 3), INN International Conference/Workshop on “Nanotechnology and Nanomedicine” (NTNM2017), 2-3 May 2017, 15629–15634. ISSN 2214-7853. Dostupné z: doi:10.1016/j.matpr.2018.04.172
- [42] BAYAT, Samaneh, Nafise AMIRI, Elham PISHAVAR, Fatemeh KALALINIA, Jebrail MOVAFFAGH a Maryam HASHEMI. Bromelain-loaded chitosan nanofibers prepared by electrospinning method for burn wound healing in animal models. *Life Sciences* [online]. 2019, 229, 57–66. ISSN 0024-3205. Dostupné z: doi:10.1016/j.lfs.2019.05.028
- [43] STOKOL, Tracy, Chris WAN, Robert BLAKELY, Vanessa BELLAT a Benedict LAW. Aldoxorubicin-loaded nanofibers are cytotoxic for canine mammary carcinoma and osteosarcoma cell lines in vitro: A short communication. *Research in Veterinary Science* [online]. 2020, 128, 86–89. ISSN 0034-5288. Dostupné z: doi:10.1016/j.rvsc.2019.11.003
- [44] YUN, J. W., S. Y. HEO, M. H. LEE a H. B. LEE. Evaluation of a poly(lactic-acid) scaffold filled with poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanofibres for reconstruction of a segmental bone defect in a canine model. *Veterinární medicína* [online]. 2019, 64 (2019)(No. 12), 531–538. ISSN 18059392. Dostupné z: doi:10.17221/80/2019-VETMED

- [45] LI, S. 2 - Synthetic biodegradable medical polyesters. In: Xiang ZHANG, ed. *Science and Principles of Biodegradable and Bioresorbable Medical Polymers* [online]. B.m.: Woodhead Publishing, 2017 [vid. 2021-01-08], s. 37–78. ISBN 978-0-08-100372-5. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100372-5.00002-7
- [46] Polycaprolactone 440744. 2-Oxepanone homopolymer [online]. [vid. 2021-03-02]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/440744>
- [47] WYPYCH, G. PCL poly(ϵ -caprolactone). In: *Handbook of Polymers - 2nd Edition* [online]. B.m.: ChemTech, 2016. Dostupné z: <https://www.elsevier.com/books/handbook-of-polymers/wypych/978-1-895198-92-8>
- [48] *Biomaterials Science* [online]. B.m.: Elsevier, 2020 [vid. 2021-02-18]. ISBN 978-0-12-816137-1. Dostupné z: doi:10.1016/C2017-0-02323-6
- [49] BARTOŠOVÁ, Klára. *Analýza způsobu degradace vstřebatelného polyuretanu používaného ve zdravotnictví* [online]. Zlín, 2016. Univerzita Tomáše Bati. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10563/38978>
- [50] AWASTHI, Rajendra, Satish MANCHANDA, Poppy DAS, Vinodhini VELU, Himaja MALIPEDDI, Kavita PABREJA, Terezinha D. J. A. PINTO, Gaurav GUPTA a Kamal DUA. 9 - Poly(vinylpyrrolidone). In: Anilkumar PARAMBATH, ed. *Engineering of Biomaterials for Drug Delivery Systems* [online]. B.m.: Woodhead Publishing, 2018 [vid. 2021-01-08], Woodhead Publishing Series in Biomaterials, s. 255–272. ISBN 978-0-08-101750-0. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-101750-0.00009-X
- [51] WYPYCH, G. PVP poly(N-vinyl pyrrolidone). In: *Handbook of Polymers - 2nd Edition* [online]. B.m.: ChemTech, 2016. Dostupné z: <https://www.elsevier.com/books/handbook-of-polymers/wypych/978-1-895198-92-8>
- [52] ZIMMERMANN, Michael B. Chapter 25 - Iodine and the iodine deficiency disorders. In: Bernadette P. MARRIOTT, Diane F. BIRT, Virginia A. STALLINGS a Allison A. YATES, ed. *Present Knowledge in Nutrition (Eleventh Edition)* [online]. B.m.: Academic Press, 2020, s. 429–441. ISBN 978-0-323-66162-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-66162-1.00025-1
- [53] SANI, D., P. A. ABDU, M. MAMMAN, K. O. JOLAYEMI, P. O. YUSUF a A. D. ANDAMIN. Research Note: Evaluation of acute oral toxicity of povidone-iodine in cockerels using the up-and-down procedure. *Poultry Science* [online]. 2020 [vid. 2021-01-08]. ISSN 0032-5791. Dostupné z: doi:10.1016/j.psj.2020.11.002
- [54] BETADINE, 100MG/ML DRM SOL 30ML, Státní ústav pro kontrolu léčiv [online]. [vid. 2020-08-22]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0062315>
- [55] BARABAS, Eugene S. a Harry G. BRITAIN. Povidone - Iodine. In: Harry G. BRITAIN, ed. *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients* [online]. B.m.: Academic Press, 1998, *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*, s. 341–462. Dostupné z: doi:10.1016/S0099-5428(08)60759-5
- [56] IGNATOVA, Milena, Nevena MANOLOVA a Iliya RASHKOV. Electrospinning of poly(vinyl pyrrolidone)–iodine complex and poly(ethylene oxide)/poly(vinyl pyrrolidone)–iodine complex – a prospective route to antimicrobial wound dressing materials.

- European Polymer Journal [online]. 2007, 43(5), 1609–1623. ISSN 0014-3057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2007.02.020
- [57] SEBE, István, Barnabás SZABÓ, Zsombor K. NAGY, Dóra SZABÓ, László ZSIDAI, Béla KOCSIS a Romána ZELKÓ. Polymer structure and antimicrobial activity of polyvinylpyrrolidone-based iodine nanofibers prepared with high-speed rotary spinning technique. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2013, 458(1), 99–103. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2013.10.011
- [58] SHITOLE, Ajinkya A., Piyush RAUT, Prabhanjan GIRAM, Priyanka RADE, Anand KHANDWEKAR, Baijayantimala GARNAIK a Neeti SHARMA. Poly (vinylpyrrolidone)-iodine engineered poly (ϵ -caprolactone) nanofibers as potential wound dressing materials. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2020, 110, 110731. ISSN 0928-4931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2020.110731
- [59] KIM, Jeong In, Hem Raj PANT, Hyun-Jaung SIM, Kang Min LEE a Cheol Sang KIM. Electrospun propolis/polyurethane composite nanofibers for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2014, 44, 52–57. ISSN 0928-4931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2014.07.062
- [60] WAGH, Vijay D. Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Advances in Pharmacological Sciences* [online]. 2013, 2013, 308249. ISSN 1687-6334. Dostupné z: doi:10.1155/2013/308249
- [61] SANTOS, Laerte M., Maísa S. FONSECA, Ana R. SOKOLONSKI, Kathleen R. DEEGAN, Roberto Pc ARAÚJO, Marcelo A. UMSZA-GUEZ, Josiane Dv BARBOSA, Ricardo D. PORTELA a Bruna As MACHADO. Propolis: types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2020, 100(4), 1369–1382. ISSN 1097-0010. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.10024
- [62] BETANCOURT, Nelly, Lucila GARCIA-CONTRERAS, Alejandro TONATIUH a Tonatiuh SÁNCHEZ. Propolis in Dogs: Clinical Experiences and Perspectives (A Brief Review). *Open Journal of Veterinary Medicine* [online]. 2015, 5, 11–17. Dostupné z: doi:10.4236/ojvm.2015.51002
- [63] ASAWAHAME, Chawalinee, Krit SUTJARITTANGTHAM, Sukum EITSSAYEAM, Yingmanee TRAGOOLPUA, Busaban SIRITHUNYALUG a Jakkapan SIRITHUNYALUG. Antibacterial Activity and Inhibition of Adherence of *Streptococcus mutans* by Propolis Electrospun Fibers. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2014, 16(1), 182–191. Dostupné z: doi:10.1208/s12249-014-0209-5
- [64] ADOMAVIČIŪTĖ, Erika, Sigita STANYS, Modestas ŽILIUS, Vaida JUŠKAITĖ, Alvydas PAVILONIS a Vitalis BRIEDIS. Formation and Biopharmaceutical Characterization of Electrospun PVP Mats with Propolis and Silver Nanoparticles for Fast Releasing Wound Dressing. *BioMed Research International* [online]. 14. únor 2016. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1155/2016/4648287
- [65] BILGINER, Rumeysa a Ahu ARSLAN YILDIZ. A facile method to fabricate propolis enriched biomimetic PVA architectures by co-electrospinning. *Materials Letters* [online]. 2020, 276, 128191. Dostupné z: doi:10.1016/j.matlet.2020.128191

- [66] STOJKO, Mateusz, Jakub WŁODARCZYK, Michał SOBOTA, Paulina KARPETA-JARZĄBEK, Małgorzata PASTUSIAK, Henryk JANECZEK, Piotr DOBRZYŃSKI, Gabriela STARCZYNOWSKA, Arkadiusz ORCHEL, Jerzy STOJKO, Olgierd BATORYNA, Paweł OLCZYK, Katarzyna KOMOSIŃSKA-VASSEV, Krystyna OLCZYK a Janusz KASPERCZYK. Biodegradable Electrospun Nonwovens Releasing Propolis as a Promising Dressing Material for Burn Wound Treatment. *Pharmaceutics* [online]. 2020, 12(9), 883. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics12090883
- [67] MIKEŠ, Petr a David LUKÁŠ. Fyzikální principy tvorby nanovláken. 1. B.m.: Technická univerzita v Liberci, 2015.
- [68] Elektrostatické zvlákňování. *Nanoed* [online]. 27. srpen 2020. Dostupné z: https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/865/mod_glossary/entry/1/elektrostatic%C3%A9%20zvl%C3%A1k%C5%88ov%C3%A1n%C3%AD.jpg
- [69] JIRSÁK, Oldřich, Filip SANETRŇÍK, David LUKÁŠ, Václav KOTEK, Lenka MARTINOVÁ a Jiří CHALOUPEK. Způsob výroby nanovláken z polymerního roztoku elektrostatickým zvlákňováním a zařízení k provádění způsobu [online]. CZ294274B6. 10. listopad 2004. Dostupné z: <https://patents.google.com/patent/CZ294274B6/en/und>
- [70] HORAKOVA, Jana, Markéta KLÍČOVÁ, Jakub ERBEN, Andrea KLAPSTOVA, Vit NOVOTNY, Luboš BĚHÁLEK a Jiri CHVOJKA. Impact of Various Sterilization and Disinfection Techniques on Electrospun Poly-ε-caprolactone. *ACS Omega* [online]. 2020. Dostupné z: doi:10.1021/acsomega.0c00503
- [71] NS 8S1600U industrial production line. Elmarco [online]. [vid. 2021-03-02]. Dostupné z: <https://www.elmarco.com//production-lines/ns-8s1600u>
- [72] Nanospider [online]. [vid. 2021-03-02]. Dostupné z: <https://www.elmarco.com/get-File/case:show/id:448763/2019-09-10%2010:53:39.000000/NS%208S1600U.jpeg>
- [73] DOSHI, Jayesh a Darrell H. RENEKER. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Journal of Electrostatics* [online]. 1995, 35(2), Selected papers from the special technical session „Electrostatics in Polymer Processing and Charge Monitoring“, 1993 IEEE Industry Applications Society Meeting, 151–160. ISSN 0304-3886. Dostupné z: doi:10.1016/0304-3886(95)00041-8
- [74] UTKARSH, Hussien HEGAB, Muhammad TARIQ, Nabeel Ahmed SYED, Ghaus RIZVI a Remon POP-ILIEV. Towards Analysis and Optimization of Electrospun PVP (Polyvinylpyrrolidone) Nanofibers. *Advances in Polymer Technology* [online]. 4. květen 2020. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1155/2020/4090747>
- [75] HAIDER, Adnan, Sajjad HAIDER a Inn-Kyu KANG. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2018, 11(8), 1165–1188. ISSN 1878-5352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2015.11.015
- [76] LUBASOVÁ, Daniela. Vliv rozpouštědel na elektrostatické zvlákňování polymerních roztoků [online]. B.m., 2010. Thesis. Technická Univerzita v Liberci. Dostupné z: <https://dspace.tul.cz/handle/15240/284>

- [77] PELIPENKO, Jan, Julijana KRISTL, Biljana JANKOVIĆ, Saša BAUMGARTNER a Petra KOCBEK. The impact of relative humidity during electrospinning on the morphology and mechanical properties of nanofibers. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2013, 456(1), 125–134. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2013.07.078
- [78] WEI, Q. a X. XIA. 2 - Types and processing of structured functional nanofibers: core-shell, aligned, porous and gradient nanofibers. In: Qufu WEI, ed. *Functional Nanofibers and their Applications* [online]. B.m.: Woodhead Publishing, 2012, Woodhead Publishing Series in Textiles, s. 22–37. ISBN 978-0-85709-069-0. Dostupné z: doi:10.1533/9780857095640.1.22
- [79] IBRAHIM, Nabil A., Moustafa M. G. FOUDA a Basma M. EID. Chapter 20 - Functional nanofibers: fabrication, functionalization, and potential applications. In: Chaudhery MUSTANSAR HUSSAIN, ed. *Handbook of Functionalized Nanomaterials for Industrial Applications* [online]. B.m.: Elsevier, 2020, Micro and Nano Technologies, s. 581–609. ISBN 978-0-12-816787-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816787-8.00020-X
- [80] GRAZIANO, Maurício Uchikawa, Kazuko Uchikawa GRAZIANO, Flávia Morais Gomes PINTO, Camila Quartim de Moraes BRUNA, Rafael Queiroz de SOUZA a Cesar Angelo LASCALA. Effectiveness of disinfection with alcohol 70% (w/v) of contaminated surfaces not previously cleaned. *Revista Latino-Americana de Enfermagem* [online]. 2013, 21(2), 618–623. ISSN 0104-1169. Dostupné z: doi:10.1590/S0104-11692013000200020
- [81] NETÍKOVÁ, Ladislava, Petr BOGUSCH a Petr HENEBERG. Czech Ethanol-Free Propolis Extract Displays Inhibitory Activity against a Broad Spectrum of Bacterial and Fungal Pathogens. *Journal of food science* [online]. 2013, 78, M1421–M1429. Dostupné z: doi:10.1111/1750-3841.12230
- [82] NASOURI, Komeil, A M SHOUSHARI a M R M MOJTAHEDI. Thermodynamic Studies on Polyvinylpyrrolidone Solution Systems Used for Fabrication of Electrospun Nanostructures: Effects of the Solvent [online]. 2015, 34(3). Dostupné z: doi:10.1002/adv.21495
- [83] Raman and IR spectroscopy. Horiba [online]. 1. března 2021. Dostupné z: https://static.horiba.com/fileadmin/Horiba/Technology/Masurement_Techniques/Molecular_Spectroscopy/Raman_Spectroscopy/Raman_Academy/Raman_Tutorial/Raman_bands.pdf
- [84] BACA KOVA, L, Filova E, Parizek M, Ruml T a Svorcik V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances* [online]. 2011, 29(6), 739–767. ISSN 0734-9750, 1873-1899. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2011.06.004

Seznam grafů

Graf 1 - Počty patentů ve využití propolisu ve veterinární medicíně 1992-2017 [61].....	26
Graf 2 - Krabicový graf průměrů vláken vrstvy blendu, n=200.....	44
Graf 3 - Krabicový graf průměrů vláken PVP, n=200	47
Graf 4 - Krabicový graf průměrů vláken PUR, n=200.....	47
Graf 5 - Průměr vláken laminované PUR a laminované PVP, n =200	48
Graf 6 - Krabicový graf průměrů vláken PVP I, n=200	50
Graf 7 - Krabicový graf průměrů vláken PUR s propolisem, n=200.....	51
Graf 8 - Krabicový graf průměru vláken blendu P, n=200.....	51
Graf 9 - Krabicové grafy průměrů vláken laminovaných adovaných vrstev, n=200	52
Graf 10 - FTIR spektra vrstev PUR	53
Graf 11 - FTIR spektra blendu.....	53
Graf 12 - Ramanova spektroskopie PVP	54
Graf 13 - Průměry vláken vyrobených vrstev s chybovými úsečkami 95% IS, n=200	56
Graf 14 - Viabilita buněk po působení extraktů z materiálu, n=8	58
Graf 15 - Viabilita buněk po působení extraktů z materiálu, n=8	59
Graf 16 - Absorbance vzorků materiálů s nasazenými buňkami, n=5	61
Graf 17 - Absorbance vzorků laminátů s nasazenými buňkami, n=5	61
Graf 18 - Počet buněčných jader (DAPI) na 1 mm ² materiál PUR a PUR P, n=10.....	62
Graf 19 - Počet buněčných jader (DAPI) na 1 mm ² materiál blend a blend P, n=10.....	62
Graf 20 - Počet buněčných jader (DAPI) na 1 mm ² materiál lam a lam PI, n=10.....	62

Seznam tabulek

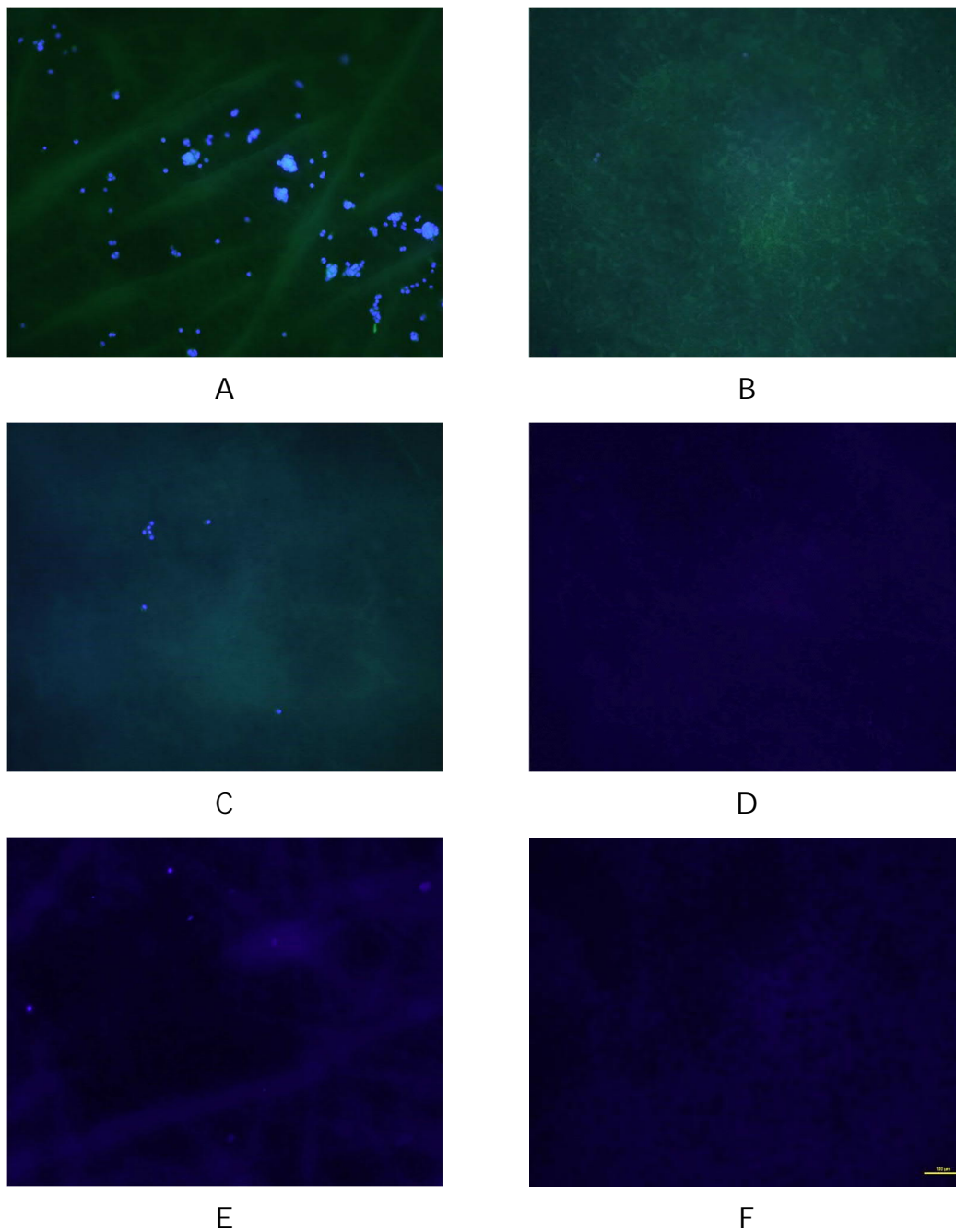
Tabulka 1 - Parametry zvlákňování na Nanospideru	40
Tabulka 2 - Parametry zvlákňování z tyčky	43
Tabulka 3 - Parametry zvlákňování na Nanospideru	44
Tabulka 4 - Parametry roztoků PVP.....	46
Tabulka 5 - Přehled vyrobených nanovlákných vrstev	55

Seznam obrázků

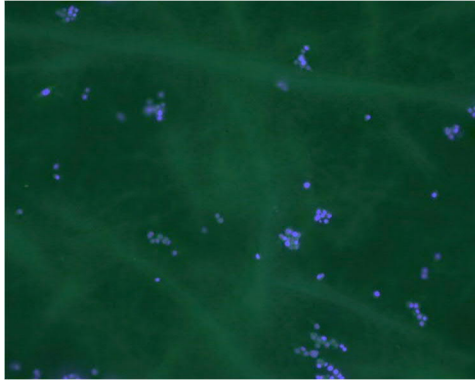
Obrázek 1 - Řez kůží. Vrstvy kůže jsou epidermis, dermis a subcutis.	14
Obrázek 2 - Fáze hojení: hemostáza, zánět, proliferace a remodelace.	15
Obrázek 3 - Obecný vzorec PES	22
Obrázek 4 - Vzorec PCL	22
Obrázek 5 - Obecný vzorec PUR	22
Obrázek 6 - Vzorec PVP	23
Obrázek 7 - Vzorec jódovaného povidonu	25
Obrázek 8 - Elektrostatické zvlákňování z tyčky [68]	28
Obrázek 9 - Schéma Nanospideru se strunovou zvlákňovací elektrodou [70].....	29
Obrázek 10 - Nanospider NS 8S1600U [72]	29
Obrázek 11 - Různé morfologie nanovláken vznikající v závislosti na výrobním procesu ..	32
Obrázek 12 - Způsoby modifikace povrchu nanovláken, upraveno podle [79].....	33
Obrázek 13 - Schéma jednotlivých kroků postupu v této práci	35
Obrázek 14 - Schéma provedených experimentů	35
Obrázek 15 A - laboratorní Nanospider, B - zvlákňování z tyčky	38
Obrázek 16 - Elektrostatické zvlákňování dvou různých roztoků z dvou strun.....	40
Obrázek 17 - Vyrobená vrstva (odděluje se)	41
Obrázek 18 - měřítko 100 μm a 10 μm A - vrstva PUR, B - vrchní vrstva PVP.....	42
Obrázek 19 - SEM PVP molekulová hmotnost 1 300 000 g/mol, měřítko 10 μm	42
Obrázek 20 - SEM snímky blendů PVP a PUR.....	44
Obrázek 21 - SEM snímky vrstvy blendu.....	44
Obrázek 22 - SEM vrstvy PVP, měřítko 100 μm a 10 μm	47
Obrázek 23 - SEM vrstvy PUR, měřítko 100 μm a 10 μm	47
Obrázek 24 - SEM laminace A - strana PUR, B - strana PVP	48
Obrázek 25 - Vrstva PVP smáčená kapkami destilované vody	49
Obrázek 26 - SEM vrstvy PVP s jódem.....	50
Obrázek 27 - EDS vrstvy PVP s jódem	50
Obrázek 28 - SEM PUR s propolisem	51
Obrázek 29 - SEM vrstvy blendu s propolisem.....	51
Obrázek 30 - SEM vrstvy laminátu	52
Obrázek 31 - Fluorescenční mikroskopie, 1. den	79
Obrázek 32 - Fluorescenční mikroskopie, 3. den	80
Obrázek 33 - Fluorescenční mikroskopie, 7. den	81
Obrázek 34 - Fluorescenční mikroskopie, 14. den	82

Přílohy

Příloha 1 - Snímky z fluorescenční mikroskopie (doplňení kapitoly 3.8)



Obrázek 31 - Fluorescenční mikroskopie, 1. den, měřítko 100 μm
A - PUR, B - PUR P, C - blend, D - blend P, E - Lam a F - Lam PI



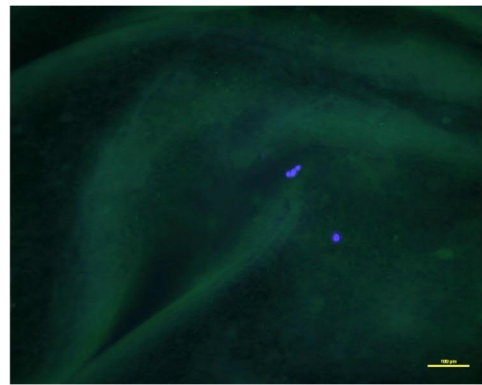
A



B

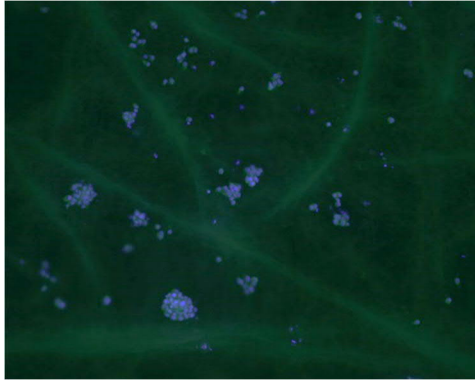


C



D

Obrázek 32 - Fluorescenční mikroskopie, 3. den, měřítko 100 μm
A - PUR, B - PUR P, C -blend, D - blend P



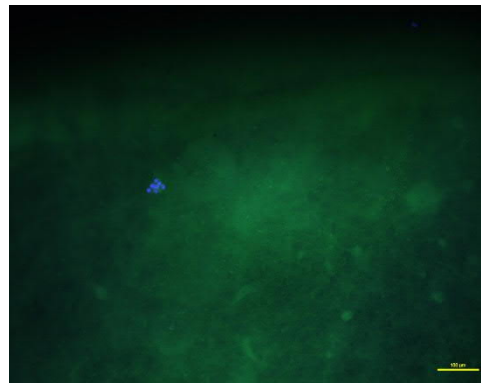
A



B

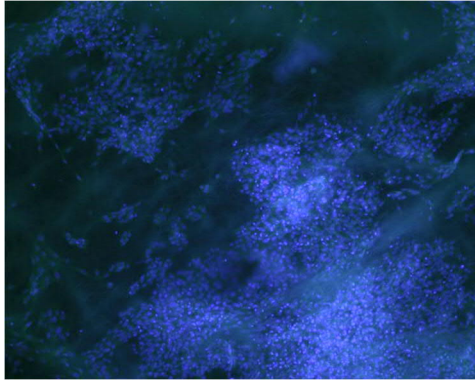


C

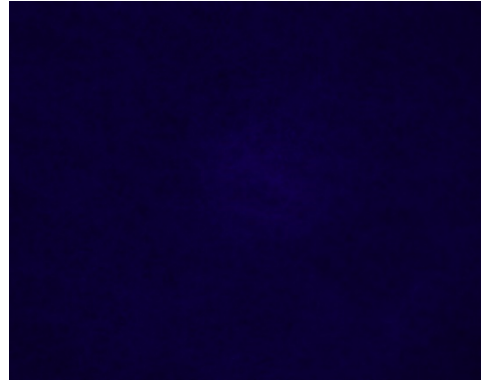


D

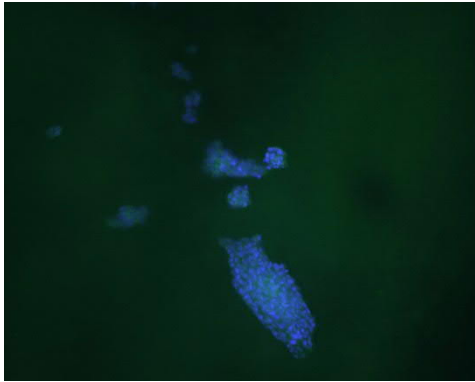
Obrázek 33 - Fluorescenční mikroskopie, 7. den, měřítko 100 μm
A - PUR, B - PUR P, C - blend, D - blend P



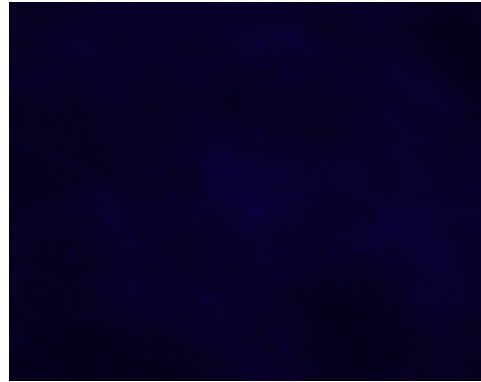
A



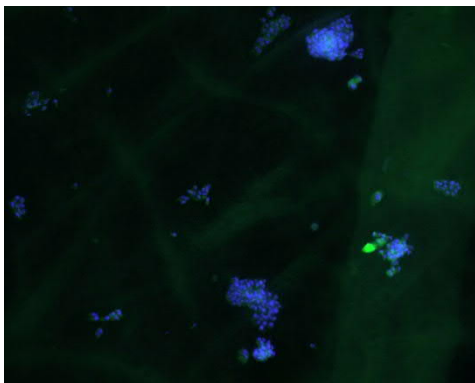
B



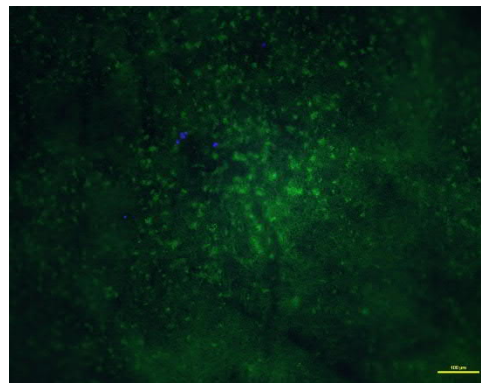
C



D



E



F

Obrázek 34 - Fluorescenční mikroskopie, 14. den, měřítko 100 μm
A - PUR, B - PUR P, C -blend, D - blend P, E - Lam a F - Lam PI