

Studium aplikačních možností nanovláknenných vrstev vyrobených různými technologiemi pro tkáňové inženýrství

Bakalářská práce

Studijní program:

B3107 Textil

Studijní obor:

Textilní technologie, materiály a nanomateriály

Autor práce:

Michaela Kusendová

Vedoucí práce:

Ing. Jana Hlavatá

Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů





Zadání bakalářské práce

Studium aplikačních možností nanovlákných vrstev vyrobených různými technologiemi pro tkáňové inženýrství

Jméno a příjmení: **Michaela Kusendová**
Osobní číslo: T17000101
Studijní program: B3107 Textil
Studijní obor: Textilní technologie, materiály a nanomateriály
Zadávací katedra: Katedra netkaných textilií a nanovlákných materiálů
Akademický rok: **2018/2019**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte rešerši na zadané téma.
2. Seznamte se s jednotlivými technologiemi výroby nanovláken.
3. Navrhněte a realizujte zvláknovací experimenty.
4. Provedte charakterizaci nanovlákných vrstev a vybrané vrstvy otestujte v in-vitro experimentu.
5. Porovnejte vrstvy vyrobené různými technologiemi z hlediska vhodnosti pro tkáňové inženýrství, diskutujte výsledky a vypracujte závěrečné shrnutí.

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] ZHANG, X., LU, Y. Centrifugal Spinning: An Alternative Approach to Fabricate Nanofibers at High Speed and Low Cost. *Polymer Reviews*. 2014, 54(4), 677-701. DOI: 10.1080/15583724.2014.935858
- [2] RAMAKRISHNA, S., FUJIHARA, K., TEO, W.-E., LIM, T.-CH., MA, Z. An introduction to electrospinning and nanofibers. New Jersey: World Scientific, 2005. 382 p. ISBN 981-256-454-3.
- [3] RAMPICHOVA, M., BUZGO, M., CHVOJKA, J., PROSECKA, E., KOFRONOVA, O., AMLER, E. Cell penetration to nanofibrous scaffolds. *Cell Adhesion & Migration*. 2014, 8(1), 36-41. DOI: 10.4161/cam.27477
- [4] MARTINS, A., PINHO, E.D., FARIA, S., PASHKULEVA, I., MARQUES, A.P., REIS, R.L., NEVES, N.M. Surface Modification of Electrospun Polycaprolactone Nanofiber Meshes by Plasma Treatment to Enhance Biological Performance. *Small*. 2009, 5(10), 1195-1206. DOI: 10.1002/sml.200801648

Vedoucí práce:

Ing. Jana Hlavatá
Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

Datum zadání práce:

20. února 2019

Předpokládaný termín odevzdání:

15. května 2020

Ing. Jana Drašarová, Ph.D.
děkanka

L.S.

Ing. Jiří Chvojka, Ph.D.
vedoucí katedry

Prohlášení

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

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

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

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

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

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

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

27. května 2020

Michaela Kusendová

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucí své bakalářské práce Ing. Bc. Janě Hlavaté za ochotu, trpělivost a cenné rady při vypracování této bakalářské práce a Ing. Andree Klápš'ové za pomoc a odborné konzultace. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Kateřině Hrnčířové za vstřícnou pomoc v laboratořích a poskytnutí cenných rad při vypracování experimentální části.

V neposlední řadě bych velmi ráda poděkovala mé rodině za psychickou podporu a za velkou oporu po celou dobu studia.

Anotace

Bakalářská práce je zaměřena na studium aplikačních možností nanovlákných vrstev vyrobených různými technologiemi pro tkáňové inženýrství. V teoretické části jsou popsány technologie odstředivého a elektrostatického zvláknování, jejich parametry a možnosti využití. Ve stručnosti je představeno tkáňové inženýrství a využití nanovláken v tomto oboru. Experimentální část je věnována výrobě vlákných vrstev odstředivým a elektrostatickým zvláknováním a testování vlastností zvlákněných vrstev. Důležitou částí práce je *in vitro* testování zvlákněných PCL vrstev za použití 3T3 myších fibroblastů. Výsledky jsou analyzovány pomocí spektrofotometrie, fluorescenčního mikroskopu a skenovacího elektronového mikroskopu.

Klíčová slova

odstředivé zvláknování, elektrostatické zvláknování, nanovlákná, polycaprolakton, *in vitro* testování, 3T3 myší fibroblasty

Annotation

This bachelor thesis is focused on the study of application possibilities of nanofibrous layers produced by various technologies for tissue engineering. The theoretical part describes the technologies of centrifugal and electrostatic spinning, their parameters and applications. Tissue engineering and the use of nanofibers in this field are briefly introduced. The experimental part is dedicated to the production of fibrous layers by centrifugal and electrostatic spinning and testing of the spun layers properties. An important part of the work is *in-vitro* testing of spun PCL layers using 3T3 mouse fibroblasts. The results are analyzed using spectrophotometry, a fluorescence microscope and a scanning electron microscope.

Key words

centrifugal spinning, electrospinning, nanofibers, polycaprolactone, *in vitro* test, 3T3 mouse fibroblasts

Obsah

Seznam obrázků.....	9
Seznam tabulek.....	10
Seznam grafů.....	10
Seznam příloh.....	10
Seznam zkratk.....	11
Úvod.....	12
1 Teoretická část.....	13
1.1 Odstředivé zvlákňování.....	13
1.1.1 Jehlové odstředivé zvlákňování.....	14
1.1.2 Bezjehlové odstředivé zvlákňování.....	15
1.1.3 Parametry ovlivňující odstředivé zvlákňování.....	16
1.1.4 Materiály vhodné ke zvlákňování.....	17
1.1.5 Aplikace vrstev vyrobených odstředivým zvlákňováním.....	19
1.2 Elektrostatické zvlákňování.....	19
1.2.1 Zvlákňování pomocí stejnosměrného elektrického pole.....	20
1.2.2 Zvlákňování pomocí střídavého elektrického pole.....	22
1.2.3 Parametry ovlivňující elektrostatické zvlákňování.....	23
1.2.4 Plasmatická úprava.....	24
1.3 Tkáňové inženýrství.....	25
1.4 Mikroskopie.....	26
1.4.1 Elektronový mikroskop.....	26
1.4.2 Fluorescenční mikroskop.....	27
2 Experimentální část.....	28
2.1 Příprava polymerních roztoků.....	28
2.2 Výroba nanovlákných vrstev.....	29
2.2.1 Vrstvy vyrobené pomocí technologie odstředivého zvlákňování.....	29

2.2.2	Vrstva vyrobená pomocí technologie stejnosměrného zvlákňování.....	33
2.3	Charakterizace vyrobených vrstev	34
2.3.1	Morfologie vlákenných vrstev	34
2.3.2	Průměry vláken	36
2.3.3	Plošná hmotnost.....	37
2.3.4	Tloušťka vrstev	38
2.3.5	Prodyšnost.....	39
2.4	Biologické testování.....	40
2.4.1	Příprava vzorků.....	40
2.4.2	Pasážování buněk.....	40
2.4.3	<i>In vitro</i> testování	41
2.4.4	Výsledky biologického testování.....	43
	Shrnutí.....	48
	Závěr	51
	Použitá literatura	52
	Přílohy.....	55

Seznam obrázků

Obrázek 1: Jehlové zařízení pro odstředivé zvlákňování	14
Obrázek 2: Detail zvlákňovací hlavy pro jehlové zvlákňovací zařízení firmy FibeRio..	15
Obrázek 3: Schématické zobrazení procesu spin-coating.....	15
Obrázek 4: Schématické zachycení vzniku Rayleigh-Taylorovy nestability	16
Obrázek 5: Kapkovité defekty	17
Obrázek 6: Strukturní vzorec poly- ϵ -kaprolaktonu (PCL).	18
Obrázek 7: Zařízení pro jehlové elektrostatické zvlákňování.	21
Obrázek 8: Schéma bezjehlového zvlákňování za použití válečku	22
Obrázek 9: Nanovláknenný oblak.....	23
Obrázek 10: Schéma zařízení pro AC zvlákňování.	23
Obrázek 11: Model tkáňového inženýrství.....	25
Obrázek 12: Zařízení Nanocentrino turecké firmy Areka Group	30
Obrázek 13: Schéma vnitřního zvlákňovacího prostoru zařízení Nanocentrino L1.0	30
Obrázek 14: Detail spinnerety s jehlami pro zařízení Nanocentrino L1.0.....	30
Obrázek 15: Detail dávkovacího zařízení dávající polymerní roztok do spinnerety.....	31
Obrázek 16: Zařízení Nanospider TM české značky Elmarco.	33
Obrázek 17: SEM snímky vrstev určených pro biologické testování.....	35
Obrázek 18: Zařízení Flowbox určený pro sterilní práci s buňkami	41
Obrázek 19: Snímky pořízené na fluorescenčním mikroskopu (2. testovací den)	44
Obrázek 20: Snímky pořízené na fluorescenčním mikroskopu (7. testovací den)	44
Obrázek 21: Snímky pořízené na fluorescenčním mikroskopu (14. testovací den).	45
Obrázek 22: Snímky pořízené na skenovacím elektronovém mikroskopu (2. testovací den).....	47
Obrázek 23: Snímky pořízené na skenovacím elektronovém mikroskopu (7. testovací den).....	47
Obrázek 24: Snímky pořízené na skenovacím elektronovém mikroskopu (14. testovací den).....	47

Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled připravených polymerních roztoků, včetně jejich hmotnostních koncentrací a složení rozpouštědlového systému.	28
Tabulka 2: Rozmezí použitých parametrů při zvlákňování na zařízení Nanocentrino L1.0	31
Tabulka 3: Použité parametry při zvlákňování vybrané vrstvy na zařízení Nanocentrino L1.0	32
Tabulka 4: Použité parametry při zvlákňování vybrané vrstvy na zařízení Nanospider.	34

Seznam grafů

Graf 1: Grafické znázornění průměrných hodnot průměrů vláken [μm]	36
Graf 2: Grafické znázornění plošné hmotnosti [g/m^2]	37
Graf 3: Grafické znázornění tloušťky [mm]	38
Graf 4: Grafické znázornění prodyšnosti [$\text{l}/\text{m}^2/\text{s}$]	39
Graf 5: Výsledky metabolického testu CCK-8 v průběhu času	43
Graf 6: Grafické znázornění počtu buněk v průběhu času	46

Seznam příloh

Příloha A: Vybrané SEM snímky – odstředivé zvlákňování	55
Příloha B: Statisticky zpracované výsledky měřených charakteristik	56
Příloha C: Vybrané SEM snímky- biologické testování	56

Seznam zkratek

3T3	3T3 myší fibroblasty
AC	zvlákňování za pomoci střídavého elektrického pole
Ch/EtOH/AA	poměr rozpouštědlového systému: chloroform/ethanol/kyselina octová
CCK-8	metabolický test (cell counting kit)
CO ₂	oxid uhličitý
CS	odstředivé zvlákňování
DC	zvlákňování za pomoci stejnosměrného elektrického pole
FM	fluorescenční mikroskop
PBS	fosfátový pufr
PCL	polykaprolakton
SEM	skenovací elektronový mikroskop
TEM	transmisní elektronové mikroskopy
<i>In vitro</i>	testování v laboratorních podmínkách

Zkratka	Název	Jednotka
95% IS	interval spolehlivosti střední hodnoty průměru vláken	[μm]
C	koncentrace polymerního roztoku	[hm. %]
Mn	číselně střední molární hmotnost	[g/mol]
s	směrodatná odchylka	[μm]
T	teplota	[°C]
\bar{x}	střední hodnota průměru vláken	[μm]
ϕ	relativní vlhkost	[% RH]

Úvod

Tato bakalářská práce je věnována výrobě nanovlákných vrstev za použití odstředivého zvlákňování a elektrostatického zvlákňování a studiu jejich aplikačních možností pro tkáňové inženýrství.

Odstředivé zvlákňování je poměrně jednoduchá a nová technologie pro výrobu velmi jemných vláken v řádech nanometrů až mikrometrů. Ke zvlákňování je využita pouze odstředivá síla a není tedy potřeba žádného elektrického napětí. Díky tomu je možné zvlákňovat celou řadu polymerů, jejich směsí či tavenin. Jde o velmi produktivní metodu a vyrobené vrstvy mají široké využití např. v tkáňovém inženýrství, filtracích aj. Elektrostatické zvlákňování je velice všestranná technologie pro výrobu nanovláken. Pro zvlákňování je zapotřebí elektrická síla. I zde je možnost využít celou škálu přírodních či syntetický polymerů. Takto vyrobené nanovlákné vrstvy lze dále využít v medicíně, tkáňovém inženýrství atd.

Cílem práce je vyrobit nanovlákné vrstvy, které si budou co nejvíce podobné. Následně nasadit vybraný typ buněk a provést testy in vitro. Dalším krokem je zjistit buněčnou adhezi, viabilitu, provést mikroskopii a porovnat výsledky vrstev. Pro výrobu vrstev jsou využity dvě odlišné technologie zvlákňování – odstředivé zvlákňování na zařízení Nanocentrino L1.0 od firmy Areka Group a elektrostatické zvlákňování na zařízení NanospiderTM od firmy Elmarco. Oba způsoby zvlákňování jsou uskutečněny na Katedře netkaných textilií a nanovlákných materiálů fakulty textilní Technické univerzity v Liberci.

Důvodem vzniku této práce je mimo jiné i zařízení pro odstředivé zvlákňování, Nanocentrino L 1.0, které poměrně krátce předtím Katedra netkaných textilií a nanovlákných materiálů zakoupila. Doposud zde bylo možné vyrábět odstředivě pouze shluky vláken, nikoli vláknou vrstvou, kterou by bylo možné dále testovat. Potřeba zařízení otestovat a pokusit se připravit homogenní vrstvu, která se bude svým vzhledem a vlastnostmi co nejvíce podobat vrstvě vyrobené elektrostaticky, je velkou výzvou. V případě, že se toto podaří, otevírají se technologii odstředivého zvlákňování dveře pro využití v mnoha nových aplikacích.

1 Teoretická část

Práce je zaměřena na výrobu nanovláknenných vrstev různými technologiemi zvlákňování a posuzována jejich vhodnost pro použití v tkáňovém inženýrství. Z tohoto důvodu je teoretická část věnována popisu jednotlivých technologií, konkrétně odstředivému a elektrostatickému zvlákňování, a jejich parametrů. Vše je doplněno o základní informace z oblasti tkáňového inženýrství a biologické testování.

1.1 Odstředivé zvlákňování

Technologie odstředivého zvlákňování, anglicky jinak nazývána ForcespinningTM, Rotary jet spinning či Centrifugal spinning, je poměrně jednoduchá technologie pro výrobu velmi jemných vláken. Princip zvlákňování je založen na využití odstředivé síly, která je vyvolána vysokými otáčkami zvlákňovací jednotky (spinerety). Síla musí být tak velká, aby bylo překonáno povrchové napětí zvlákňovaného materiálu a došlo k dloužení a formování vláken. Vzniklá vlákna jsou uspořádána převážně v jednom směru a jsou zachytávána na kolektoru. Vytvořená vlákenná vrstva je složena převážně z mikrovláken a nanovláken. Tímto způsobem lze zvlákňovat polymerní roztoky, ale i taveniny nejen polymerních materiálů [1]. Zvlákňování z taveniny vychází ze způsobu získávání cukrové vaty [2].

Spinereta se vyskytuje ve dvou výrazně odlišných podobách, podle kterých je rozlišován jehlový a bezjehlový způsob odstředivého zvlákňování. Existuje ale i typ odstředivého zvlákňování, které kombinuje odstředivou sílu a elektrickou sílu vyvolanou vysokým elektrickým napětím, tzv. elektro-odstředivé napětí [1].

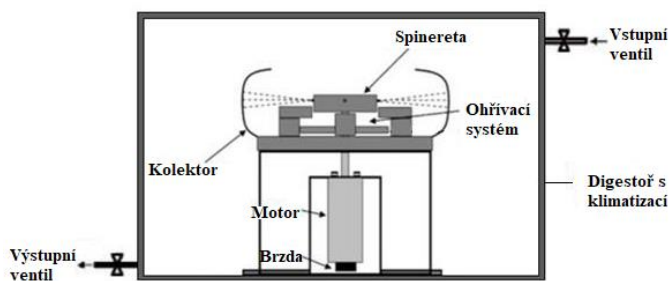
Během odstředivého zvlákňování dochází kromě tvorby vláken i k tvorbě polymerních kapiček. Takto vytvořená vlákenná vrstva s jedinečnými charakteristickými znaky např. vysokou pórovitostí, mechanickou pevností a urovnáním vláken, má široké uplatnění v různých biomedicínských aplikacích jako jsou např. scaffoldy pro růst buněk, systémy pro podávání léčiv, ale také jako filtrace atd. [3, 4, 5].

Vznik a rozměry vláken jsou závislé na několika parametrech. Jde především o koncentraci polymerního roztoku, typ a velikost spinerety, vzdálenost spinerety od kolektoru a rychlost otáčení spinerety. Parametry ovlivňující odstředivé zvlákňování jsou blíže popsány v kapitole 1.1.3 [3].

V mnoha ohledech se jedná o ekonomicky výhodnější metodu zvlákňování na rozdíl např. od technologie meltblown, a to především z energetického hlediska, jelikož není potřeba ohřevu vzduchu. V porovnání s elektrostatickým zvlákňováním není potřeba vysoké elektrické napětí. Další výhodou je možnost použití většího množství různých materiálů. Oproti jiným způsobům výroby vláken, nabízí odstředivé zvlákňování vysoké výtěžky s vysokou účinností [3].

1.1.1 Jehlové odstředivé zvlákňování

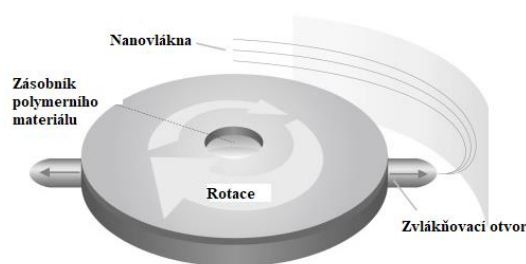
Zařízení pro jehlové odstředivé zvlákňování (schéma je na obr. 1) je tvořeno spinneretou poháněnou motorem. Motor zařízení musí být dostatečně silný, aby bylo možné dosáhnout vysokých otáček, při kterých se začnou tvořit vlákna. Kolem spinnerety je v určité vzdálenosti umístěn kolektor, na kterém se hromadí vlákna. Kolektor může být ve formě perforovaného pásu nebo tyček, které mají konstantní vzdálenost. K zachování stabilních podmínek může být zařízení umístěno v digestoři či opatřené klimatizací. Při zvlákňování z taveniny se k nádržce přidává topná spirála, zajišťující zahřívání celé spinnerety [3].



Obrázek 1: Jehlové zařízení pro odstředivé zvlákňování. Zařízení tvoří spinnereta, kolektor, motor a celé je umístěno v digestoři [3].

Spinnereta je tvořena zvlákňovacími otvory nebo zvlákňovacími jehlami, které jsou rozmístěny po jejím obvodu. Ty mohou mít různé průměry, délky a může jich být různý počet. V tomto případě je zvlákňovaný materiál dávkován do zásobníku, který je uvnitř spinnerety (obr. 2). Vlivem vysokých otáček zvlákňovací hlavy dochází k vytvoření odstředivé síly, která vytlačuje ze zásobníku roztok nebo taveninu skrz zvlákňovací otvor [6]. K tvorbě vláken dojde tehdy, překoná-li odstředivá síla kapilární sílu roztoku. Vlákna jsou unášena po spirálové dráze a vlivem tření vzduchu dloužena. Přitom dochází

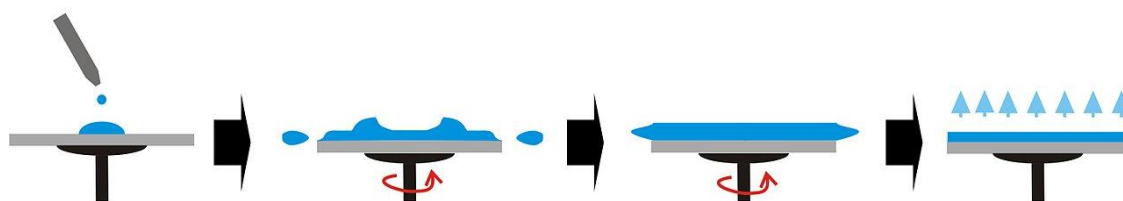
k odpařování rozpouštědla a vysoušení vláken. Vlákná dopadající na kolektor jsou suchá, urovnaná a jejich průměry se pohybují v řádu nano- až mikrometrů [7].



Obrázek 2: Detail zvlákňovací hlavy pro jehlové zvlákňovací zařízení firmy FibeRio [6].

1.1.2 Bezjehlové odstředivé zvlákňování

Bezjehlové odstředivé zvlákňování je odvozeno od tzv. spin-coating procesu, při kterém dochází k nanášení tenkých filmů na disky. Schématické zobrazení tohoto procesu je na obr. 3 [8].



Obrázek 3: Schématické zobrazení procesu spin-coating, od kterého je odvozeno bezjehlové odstředivé zvlákňování [8].

Pro tento typ zvlákňování může být používáno stejné zařízení, jako v případě jehlového odstředivého zvlákňování (kapitola 1.1.1). Zařízení je tvořeno rotující spinneretou, která je poháněná motorem, a kolektorem. Spinnereta má v tomto případě tvar plochého disku. Polymerní roztok je dávkován v kapkách přímo do středu rotujícího disku. Vlivem rotace dojde k rozprostření roztoku po disku a k vytvoření polymerního filmu. Ten se po disku rozšiřuje směrem k okraji, kde se vytváří tzv. „prsty“ (anglicky označované jako fingers) [9].

Vlákná jsou tvořena pomocí Rayleigh-Taylorovy nestability polymerního filmu, která vzniká na pomezí dvou tekutin, kdy je hustší tekutina (polymerní roztok) tlačena proti řidší (vzduch). Tato nestabilita způsobuje vznik tenkých proudů polymerního roztoku,

z nichž po odpaření rozpouštědla vznikají vlákna. Vznik Rayleigh-Taylorovy nestability je zachycen na obr. 4 [5].



Obrázek 4: Schématické zachycení vzniku Rayleigh-Taylorovy nestability [5].

1.1.3 Parametry ovlivňující odstředivé zvlákňování

Při procesu výroby vláken s využitím odstředivého zvlákňování, hrají významnou roli procesní i materiálové parametry [3]. Obě skupiny se navzájem ovlivňují.

Parametry nastavení zařízení:

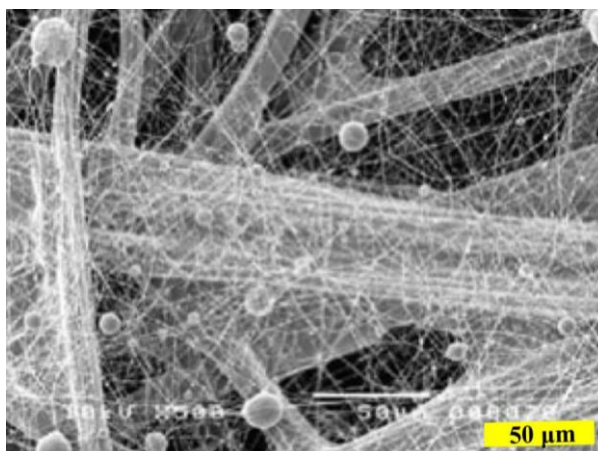
- Spinereta – tvar (jehlová, bezjehlová), průměr
- Trysky (jehly) – průměr, délka, počet
- Rychlost otáčení spinerety
- Kolektor – typ, poloměr, vzdálenost od spinerety
- Dávkování polymerního roztoku – způsob, rychlost dávkování
- Teplota, vlhkost prostředí

Parametry materiálu:

- Typ polymeru – složení, molekulová hmotnost)
- Typ rozpouštědla – jednoduché rozpouštědlo či rozpouštědlový systém
- Vlastnosti polymerního roztoku – povrchové napětí, viskozita roztoku, koncentrace atd.

Všechny tyto parametry mají vliv na výslednou kvalitu vláken a strukturu vlákenné vrstvy. Je možné získat různé typy vláken – nekonečná vlákna, jemná vlákna, vlákna větších průměrů nebo vlákna s kapkovými nebo jinými defekty vzniklé při špatném nastavení stroje.

Tvorba kapiček je způsobena Rayleigho nestabilitou polymerní trysky (obr. 5). Kapičky se tvoří, jelikož odstředivá síla není dostatečně velká a nedochází k překonání povrchového napětí resp. Rayleigho nestability. Nevznikají vlákna [10].



Obrázek 5: Kapkovité defekty na vrstvě vyrobené pomocí technologie odstředivého zvlákňování [10].

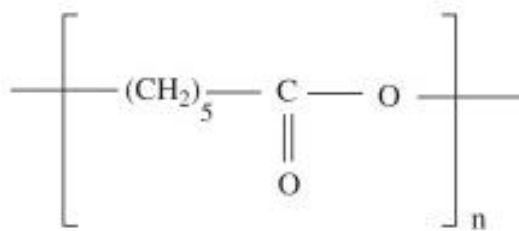
Ke vzniku děr dochází, pokud během zvlákňování dopadne polymerní kapka na vzniklou vrstvu s následkem rozpuštění již vytvořených vláken. Během zvlákňování dochází také ke vzniku provazců vláken, které je dáno zapletením více polymerních trysek při jejich dloužení [10].

1.1.4 Materiály vhodné ke zvlákňování

Proces odstředivého zvlákňování umožňuje zvlákňovat velmi širokou škálu materiálů, i těch, které dříve nebylo možné zvlákňovat. Je možné zvlákňovat nejen čisté polymery, ale i čisté kovy, polymery s přídavkem anorganických látek atd. ale i ty, které mohou být ve formě taveniny či roztoku. Dosud byla vyrobena vlákna z celé řady materiálů, jako například poly- ϵ -kaprolakton [11], chitosan [12], polyakrylonitril [1], polypropylen [2] a mnoho dalších.

Poly-ε-kaprolakton (PCL)

Poly-ε-kaprolakton (PCL), jehož strukturní vzorec je na obr. 6, je semikrystalický biologicky rozložitelný termoplastický polyester. V dnešní době se řadí mezi nejpoužívanější syntetické polymery v tkáňovém inženýrství. Má výjimečnou schopnost vytvářet kompatibilní směsi a kopolymery s celou řadou dalších polymerů, což vede k materiálům s jedinečným rozsahem vlastností. Jde o materiál, který je netoxický, snadno zpracovatelný, má dobré mechanické vlastnosti a nízkou rychlost hydrolytické degradace [12].



Obrázek 6: Strukturní vzorec poly-ε-kaprolaktonu (PCL) [12].

Vyznačuje se nízkou teplotou tání a to kolem 60 °C. Tato teplota však není vhodná pro všechny metody sterilizace. Jeho teplota skelného přechodu je přibližně -60 °C. Fyzikální, tepelné a mechanické vlastnosti PCL závisí na jeho molekulové hmotnosti, která se pohybuje v rozmezí $M_n = 10\,000 - 80\,000$ g/mol a jeho stupni krystalinity. Krystalinita se snižuje s rostoucí molekulovou hmotností [12]. PCL je dobře rozpustný v mnoha organických rozpouštědlech například chloroformu, benzenu a dalších [13].

Vzhledem k hydrofobnosti polymeru je doba rozkladu delší než u ostatních biodegradabilních polymerů (6 až 36 měsíců) [14]. Tuto dobu lze zkrátit kopolymerací s jinými estery např. glykolidem, laktidem a dalšími. Zlepší se tím i další vlastnosti PCL a rozšíří se jeho aplikační možnosti v lékařství [12]. Bylo zjištěno, že PCL může degradovat jak hydrolyticky tak i enzymaticky v lidském těle.

PCL je široce používáno v tkáňovém inženýrství k výrobě různých typů stentů a to především díky jeho dobré biokompatibilitě a tvarovým retenčním vlastnostem. Používá se k rekonstrukci různých tkání, např. kostí, kůže, nervů a očních sítnic. Dále může být využíváno k přípravě dlouhodobých implantátů a scaffoldů schopných reprodukovat přirozenou extracelulární matici [13].

1.1.5 Aplikace vrstev vyrobených odstředivým zvlákňováním

Vrstvy vyrobené pomocí odstředivého zvlákňování mají obecně podobné využití jako např. vrstvy vyrobené pomocí elektrostatického zvlákňování a jinými metodami. Jedna z nejstudovanějších aplikací je tkáňové inženýrství. Odstředivě zvlákněné vrstvy vykazují 3D strukturu, která má dostatečnou velikost pórů. Ta umožňuje průnik buněk do materiálu [15].

Jedním z produktů aplikací odstředivě zvlákněných vrstev je např. scaffold. U toho bylo zjištěno, že scaffold vyrobený odstředivým zvlákňováním je snadno biologicky rozložitelný. PCL je v tomto případě vhodný ve směsi s PVP pro výrobu komponenty pro dodání léčiv [3]. Dobré využití bylo pozorováno i při kultivaci buněk nebo zvýšený účinek opravy kýly [15]. Další studie prokázaly, že se vrstvy vytvořené pomocí odstředivého zvlákňování, a za využití PCL, dají využít jako materiál pro obvazy ran [16].

Mimo tkáňové inženýrství mají odstředivě zvlákněné vrstvy využití jako např. filtrace, kompozity, elektrovodič nebo ochranné oděvy [3].

1.2 Elektrostatické zvlákňování

Elektrostatické zvlákňování je poměrně jednoduchá a velice všestranná technologie, pomocí které jsou získávána vlákna s průměry v mikrometrech až nanometrech. Vlákna jsou náhodně ukládána na kolektor, kde vytváří vláknennou vrstvu. Je možné zvlákňovat přírodní či syntetické polymery ve formě roztoků nebo tavenin [17]. Během zvlákňování je použito vysoké elektrické napětí, které je přivedeno na zvlákňovací elektrodu [18].

Podobně jako u odstředivého zvlákňování, je elektrostatické zvlákňování rozdělováno na jehlové a bezjehlové (tzv. hladinové). V případě hladinového zvlákňování umožňuje technologie zvlákňovat polymerní roztoky několika způsoby – z tyčky, z válečku nebo ze struny. Průmyslová výroba je zajištěna především metodou hladinového zvlákňování z válečku [18]. K rozvoji průmyslové výroby nanovláken přispěl v roce 2003 tým vedený prof. Oldřichem Jirsákem z Katedry netkaných textilií Technické univerzity v Liberci, který stál u zrodu zařízení s názvem NanospiderTM a tuto technologii si nechal patentovat. Dále je pak možné technologii elektrostatického zvlákňování rozdělit podle typu použitého vysokonapěťového zdroje na zvlákňování s využitím stejnosměrného či střídavého napětí [19].

Elektrostaticky vyrobená nanovláknenná vrstva je využívána např. v tkáňovém inženýrství v oborech, které se zabývají náhradami kůže, kostí, pro hojení ran nebo jako 3D buněčný substrát. Dále je možné vrstvy využít pro technické aplikace, jakými jsou např. filtry a membrány [17].

1.2.1 Zvlákňování pomocí stejnosměrného elektrického pole

Technologie stejnosměrného elektrostatického zvlákňování, často označovaná také jako DC electrospinning či DC zvlákňování, využívá pro tvorbu nanovláken účinky stejnosměrného elektrického pole. Zařízení je vždy složeno ze zvlákňovací elektrody a kolektoru. Podle typu zvlákňovací elektrody je rozlišováno jehlové či hladinové zvlákňování [19].

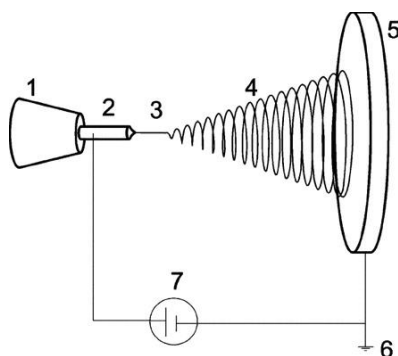
Zvlákňování je možné pouze tehdy, existuje-li rozdíl elektrických potenciálů mezi kolektorem a zvlákňovací elektrodou. Toho je nejčastěji docíleno připojením zdroje vysokého napětí na zvlákňovací elektrodu s polymerním roztokem a uzemněním kolektoru. Zvlákňovací elektroda je v kontaktu s roztokem a dochází k přenosu elektrického náboje [19]. Nabitá kapalina je přitažlivou silou tažena k opačně nabitě elektrodě. Tím dochází k tvorbě velmi tenkých vláken. Po dosažení kritického elektrického napětí dochází k tvorbě Taylorových kuželů a k výrobě nanovláknenné vrstvy. Taylorův kužel vzniká při rostoucí intenzitě elektrického pole, kdy se z kulovitěho tvaru kapaliny stává kužel, ze kterého následně vznikají vlákna [18].

Jehlové elektrostatické zvlákňování

Zařízení pro jehlové elektrostatické zvlákňování (obr. 7) je složeno z injekční stříkačky napojené na dávkovací pumpu s polymerním roztokem. Dále je tvořeno jehlou, která je napojena na zdroj vysokého elektrického napětí, a představuje tak zvlákňovací elektrodu. Na opačné straně je umístěn kolektor, který bývá nejčastěji uzemněn [19].

Zvlákňování je založeno na tvorbě jediné polymerní trysky. Dávkovacím zařízením je na špičku jehly vytlačován polymerní roztok. Pomocí vysokého elektrického napětí se zde vytváří Taylorův kužel, z něž vychází polymerní tryska směřující ke kolektoru. Během pohybu od jehly ke kolektoru prochází polymerní tryska nejprve stabilní zónou a později přechází do bičující (zvlákňovací) zóny. V této části dochází k dloužení polymerní trysky,

jejímu ztenčování a zároveň k odpařování rozpouštědla. Na kolektor potom dopadá již suché vlákno, které zde vytváří vláknennou vrstvu [18].

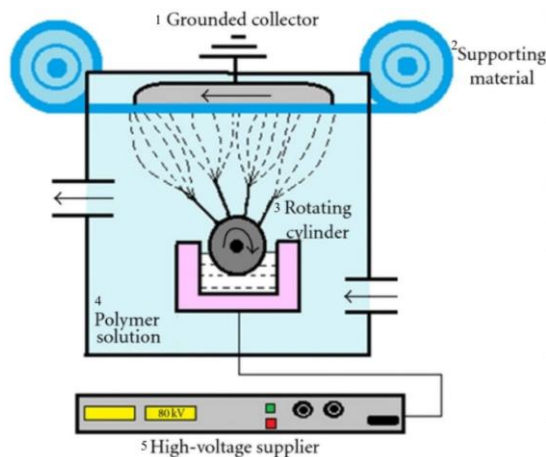


Obrázek 7: Zařízení pro jehlové elektrostatické zvlákňování včetně vznikajícího vlákna, kde: 1 stříkačka a dávkovací zařízení, 2 jehla, 3 - stabilní část proud polymerního roztoku, 4 - zvlákňovací zóna, 5 - kolektor, 6 - uzemnění, 7 vysokonapěťový zdroj [19].

Jehlové zvlákňování má poměrně malou produktivitu, a proto je využíváno především v laboratořích. Kromě malé produktivity může docházet také k ucpávání jehel. Na druhou stranu je zařízení poměrně variabilní a pro laboratorní účely dostačující [17].

Bezjehlové elektrostatické zvlákňování

Bezjehlové zvlákňování je možné realizovat z volné hladiny, tj. z tyčky, z válečku, ze struny. Tato metoda je využívána především v průmyslové výrobě. Zvlákňování z tyčky je málo produktivní technika, proto byla nahrazena válečkem, který je částečně ponořený do polymerního roztoku (obr. 8). Princip zvlákňování z válečku spočívá v tom, že se váleček pomalu otáčí kolem své osy a ulpívá na něm tenký polymerní film. V horní linii, která je nejbližší k opačně nabitému (nebo uzemněného) kolektoru, dochází po překonání kritického napětí ke vzniku mnoha Taylorových kuželů. Ty jsou protahovány do formy trysek a následně vláken, která jsou dále dlužena. Na kolektor dopadají již suchá nanovláknna tvořící izotropní nanovláknennou vrstvu. Tímto je dosaženo vysoké produktivity [18].



Obrázek 8: Schéma bezjehlového zvlákňování za použití válečku. Zařízení je složeno z 1- uzemněného kolektoru, 2 - podkladového materiálu, 3 - rotujícího válečku, 4 - polymerního roztoku, 5 - přívodu elektrického napětí [20].

I přesto, že jde o velice produktivní technika, je při ní spotřebováno velké množství polymerního roztoku. Váleček byl tedy nahrazen strunou, na níž je polymerní roztok nanášen postupně pomocí jezdece. V dnešní době se elektrostatické zvlákňování ze struny řadí mezi nejpoužívanější techniky [18].

1.2.2 Zvlákňování pomocí střídavého elektrického pole

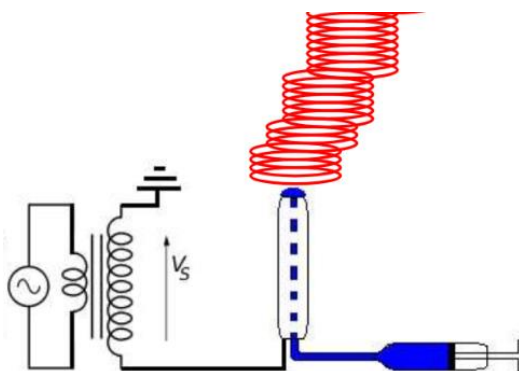
Zvlákňování pomocí střídavého elektrického pole neboli AC zvlákňování, je další z metod pro výrobu nanovláken. Řadí se mezi novější a méně probádané metody, proto je i výroba omezena jen na některé typy polymerních materiálů a jejich směsi. Úspěšně byl zvlákněn např. polyamid, polyvinylbutyral nebo kyselina mléčná [21].

Princip této metody je podobný principu DC zvlákňování. Zde je však použito střídavé elektrické napětí. Oproti DC zvlákňování není zapotřebí ani žádný kolektor. Změnou polarity zdroje postupně vznikají vlákna obsahující jak kladný, tak záporný náboj. Srážkami vláken dochází k rekombinaci elektrických nábojů a výsledkem je neutrálně nabitý vlákenný svazek, který se dokáže částečně tvořit ve volném prostoru (obr. 9 a 10) [21].



Obrázek 9: Nanovláknenný oblak vytvořený při elektrostatickém zvlákňování střídavým proudem bez použití uzemněného kolektoru [21].

AC zvlákňování je velice produktivní technologie. V současnosti je využíváno především k výrobě jádrových i bezjádrových nanovláknenných přízí. Tyto příze jsou dále využívány jako systém cíleného dodávání léčiv [21].



Obrázek 10: Schéma zařízení pro AC zvlákňování [22].

1.2.3 Parametry ovlivňující elektrostatické zvlákňování

Faktory, které ovlivňují schopnost roztoku nést náboje, elektrické pole obklopující elektrostaticky zvlákňovanou polymerní trysku, a rozptyl nábojů na vlákna uložená na kolektoru budou mít dopad na proces elektrostatického zvlákňování.

Mezi hlavní parametry, které ovlivňují zvlákňování je samotný výběr zvlákňovacího zařízení – jehlové či hladinové. Dále je zvlákňování ovlivněno použitým vysokonapěťovým zdrojem (DC nebo AC). S tím souvisí i hodnota použitého elektrického napětí. Na této hodnotě závisí kvalita zvlákňování polymerního roztoku.

Pokud bude hodnota elektrického napětí nízká či příliš vysoká, polymerní roztok nebude zvlákňován. Je tedy potřeba nalézt ideální hodnotu, tzv. kritické elektrické napětí [18].

Dalšími parametry, které ovlivňují zvlákňování je dávkování roztoku, vzdálenost kolektoru od zvlákňovací elektrody typem této elektrody nebo okolní prostředí (teplota, vlhkost). Materiálové parametry také ovlivňují schopnost polymeru tvořit vlákna. Mezi ně je řazen např. typ použitého polymeru (molekulová hmotnost), typ rozpouštědla nebo rozpouštědlového systému nebo samotné vlastnosti polymerního roztoku (viskozita, povrchové napětí, elektrická vodivost) [18].

1.2.4 Plasmatická úprava

Během procesu elektrostatického zvlákňování dochází k ionizaci vzduchu a ke koronovým výbojům. Při zapnutí vysokého napětí začne polymerním roztokem proudit elektrický náboj, který se hromadí na vrcholcích Taylorových kuželů. Tyto vrcholky působí jako koncentrátoři elektrického pole, v jejich blízkosti je intenzita elektrického pole vysoká. Po překročení kritického napětí a zároveň i kritické intenzity elektrického pole dochází ke koronovým výbojům a následně k elektrostatickému zvlákňování. Lze tedy říci, že vznikající vlákna jsou zároveň automaticky ošetřena plasmatickou úpravou [23].

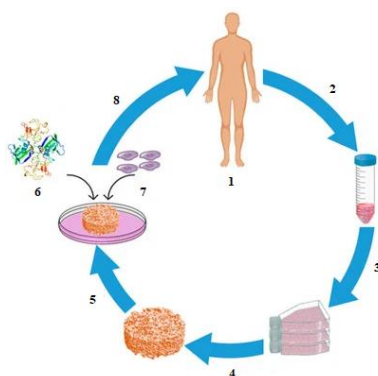
Plasmatickou úpravu lze provádět i dodatečně a cíleně. Jedná se o všestrannou a účinnou metodu pro modifikaci povrchových vlastností nebo zavedení požadovaných chemických skupin na povrch materiálu, aniž by to ovlivnilo jeho objemové vlastnosti. Mezi hlavní účinky této úpravy patří čištění povrchů, připojení chemických skupin, modifikace povrchového náboje, zvýšení povrchové energie a mnoho dalších [24].

Při běžné aplikaci dochází ke zlepšení povrchové hydrofilnosti materiálů vytvořením skupin obsahujících kyslík. V posledních letech se plasmatická úprava velmi intenzivně používá během výzkumu biomedicínských materiálů. Příkladem je studie pro vytvoření elektrostaticky zvlákněného PCL, u kterého bylo cílem plasmaticky upravit jeho povrch, aby došlo ke zlepšení adheze a proliferace buněk [24].

1.3 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství je obor, který kombinuje znalosti inženýrství a přírodních věd. Jde o stále se rozvíjející obor s velkým potenciálem. Cílem je vývoj, oprava tkání nebo plně funkčních náhrad za použití biokompatibilních materiálů a buněk. Díky tomuto oboru se dá vyřešit situace s nedostatkem dárců tkání a orgánů. [25].

Princip tkáňového inženýrství je znázorněn na obrázku 11. Nejprve se izolují vybrané vhodné buňky. Ty se dále kultivují s vhodným médiem v kultivačních nádobách, kde dochází k jejich růstu a množení (tzv. proliferaci). Po dosažení požadovaného množství buněk dojde k jejich nasazení na předem vyrobený scaffold. Zde by mělo dojít k adhezi a proliferaci buněk. Osazený scaffold se dále kultivuje za přispění růstových faktorů. Poté je implantován na postižené místo pacienta. Tímto způsobem může být vytvořena a nahrazena např. chrupavka, kosti, cévy a mnohé další [26].



Obrázek 11: Model tkáňového inženýrství. 1 - pacient, 2 - izolace buněk, 3 - buněčná expanze, 4 - 3D scaffold, 5 - tkáňový vývoj, 6 - růstové faktory, 7 - buňky, 8 - implantace [26].

Tkáňový nosič neboli scaffold je prvek, který po nanesení buněk na jeho povrch a po určité době kultivace dokáže nahradit určitou část v lidském těle, kterou je potřeba nahradit (céva, chrupavka atd.). Je zde kladen velký důraz na jeho vlastnosti. Řadí se mezi ně pórovitost, biokompatibilita, mechanické vlastnosti (podpora dokud se nevytvoří nová tkáň), povrchové vlastnosti (migrace, proliferace buněk), biodegradace (pro odstranění není potřeba další chirurgický zákrok) a mnoho dalších [26, 27].

Scaffold v podstatě nahrazuje mimobuněčnou hmotu. Má tvar, strukturu a vlastnosti dané dle toho, co nahrazuje (orgán, tkáň). Pokud je scaffold co nejvíce podobný původní tkáni, může dojít k proliferaci a adhezi buněk. Proto se scaffoldy dělí na vlákenné a nevlákenné. Výroba vlákenných nosičů zahrnuje technologie jako je tkaní, pletení nebo výrobu

netkaných textilií a další. Velmi často se využívají nanovláknenné tkáňové nosiče, jelikož nanovláknena nejvíce napodobují lidskou tkáň. Pro výrobu nevláknenných nosičů se využívají technologie např. solvent casting nebo výroba hydrogelů [25, 26].

Jedna z významných součástí výzkumu pro tkáňové inženýrství je *in vitro* testování. *In vitro* testování je odborný termín, který se využívá v medicíně a biologii. Tímto způsobem je zahájeno klinické testování při výrobě scaffoldů, kdy je nejprve potřeba buňky na konkrétním materiálu otestovat. Pomocí biologického testování lze zjistit buněčnou adhezi, životaschopnost (čili viabilitu) a další [25].

1.4 Mikroskopie

K vizualizaci nanovláken, není možné používat optický mikroskop. Průměr nanovláken je totiž menší než vlnová délka světla a jednotlivá vlákna nejsou pod optickým mikroskopem vidět. Proto se k vizualizaci používají například skenovací elektronové mikroskopy, které mají zvětšení mnohem větší [28].

1.4.1 Elektronový mikroskop

Pomocí skenovací elektronové mikroskopie lze pozorovat jednotlivá nanovláknena v nanovláknenných vrstvách a pořizovat jejich snímky i při velkých zvětšeních. Na snímcích je možné následně proměřovat např. průměry vláken, zkoumat morfologii povrchu, množství defektů ve vrstvě atd. Kromě těchto charakteristik lze posuzovat také adhezi buněk na vyrobené vláknenné vrstvě. Pozorování je nejlépe prováděno porovnáváním vláknenné vrstvy bez buněk a s buňkami.

Před skenováním je na vzorek nejprve nanášena vrstva kovu, která má dobré vodivé a tepelné vlastnosti (zlato, platina). Princip této metody pozorování je založen na sledování zpětně odražených elektronů z elektronového svazku od povrchu materiálu (primární elektrony), nebo sledování vyražených elektronů z jejich orbitalů (sekundární elektrony). Jednou z největších výhod oproti světelným optickým mikroskopům je rozlišovací schopnost, tedy schopnost zvětšit pozorovaný objekt až 1 000 000x. Elektronové mikroskopy se dělí na skenovací elektronové mikroskopy (SEM), které slouží k pozorování povrchu materiálu, a na transmisní elektronové mikroskopy (TEM), které slouží k určování vnitřní struktury vzorku [29].

1.4.2 Fluorescenční mikroskop

Fluorescenční mikroskopie (FM) se používá při pozorování adheze a proliferace buněk. Umožňuje pozorovat buňky na vlákenném materiálu. Základem je fluorescenční barvivo, pomocí kterého dojde k obarvení jednotlivých pozorovaných částí buněk (jádra, buněčné membrány atd.). Jako fluorescenční barvivo lze využít fluorofor, DAPI, Phalloidin a další. Jsou to látky schopné po ozáření absorbovat energii a uvolňovat energii o jiné vlnové délce. To se projeví jako světlo o delší vlnové délce. Části buněk obsahující barvivo v obraze mikroskopu září v různých barvách [30].

2 Experimentální část

Experimentální část bakalářské práce je věnována popisu přípravy polymerních roztoků a jejich následnému zvlákňování za použití technologie jehlového odstředivého zvlákňování a stejnosměrného elektrostatického zvlákňování. Následuje oddíl zabývající se porovnáváním vzniklých vrstev a také jejich buněčným testováním.

2.1 Příprava polymerních roztoků

Pro výrobu nanovláknenných vrstev určených pro tkáňové inženýrství byl vybrán biodegradabilní a biokompatibilní polymerní materiál poly- ϵ -caprolactone PCL ($M_n = 45\,000$ g/mol, Sigma Aldrich). Jako rozpouštědlový systém byla použita směs chloroformu, ethanolu a kyseliny octové (vše od výrobce Penta) v různých poměrech (dále označováno zkratkou Ch/EtOH/AA). Kromě složení rozpouštědlového systému se měnila také hmotnostní koncentrace polymerních roztoků. Celkem bylo připraveno sedm různých polymerních roztoků, každý o celkovém množství 100 g, jejichž přehled je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1: Přehled připravených polymerních roztoků, včetně jejich hmotnostních koncentrací a složení rozpouštědlového systému.

Koncentrace polymerního roztoku PCL	Složení rozpouštědlového systému – chloroform/ethanol/kyselina octová
14 hm%	8/1/1
16 hm%	8/1/1
18 hm%	8/1/1
18 hm%	8,5/1/0,5
18 hm%	8/1,5/0,5
18 hm%	8/2
20 hm%	8/1/1

Pro výslednou vrstvu, která byla využita pro biologické testování, bylo použito 200 g polymerního roztoku. Dle výsledků popsanych níže byl pro další experimenty vybrán roztok o koncentraci 18 hm% s rozpouštědlovým systémem 8/1/1.

2.2 Výroba nanovláknenných vrstev

Vláknenné vrstvy byly zhotoveny pomocí dvou rozdílných technologií pro výrobu nanovláken – technologie jehlového odstředivého zvlákňování a technologie stejnosměrného elektrostatického zvlákňování. Všechny připravené polymerní roztoky PCL byly nejprve zvlákňeny pomocí odstředivého zvlákňování. Na základě posouzení kvality procesu zvlákňování a vzhledu jednotlivých vrstev byl vybrán jeden polymerní roztok, který zvlákňoval nejlépe, vrstva byla na pohled homogenní a neobsahovala příliš mnoho kapkovitých defektů. Podle této „předlohy“ pak byla ze stejného polymerního roztoku vyrobena nanovláknenná vrstva pomocí stejnosměrného elektrostatického zvlákňování. Cílem bylo, aby si tyto dvě vrstvy byly co možná nejpodobnější. Jako podkladový materiál pod nanovláknenné vrstvy byl vybrán polypropylenový spunbond modré barvy, který je pro tyto účely běžně používán.

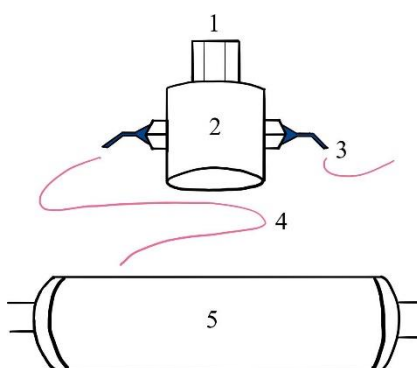
2.2.1 Vrstvy vyrobené pomocí technologie odstředivého zvlákňování

Příprava nanovláknenných vrstev pomocí technologie odstředivého zvlákňování byla realizována na jehlovém zařízení Nanocentrino L 1.0 od turecké firmy Areka Group (obr. 12). Zařízení se skládá z jehlové spinnerety, perforovaného rotujícího kolektoru a dávkovací pumpy. Jehlová spinnereta (viz obr. 14) o celkovém průměru 13 cm je složena z prostoru, do něhož je hadičkou dávkován polymerní roztok, a dvou lomených jehel o vnějším průměru 0,5 mm a délce 3 cm. Důvodem zalomení jehel je snazší směrování vznikajících nanovláken ke kolektoru. V prostoru nad spinneretou jsou zabudovány čtyři ventilátory, které vytvářejí proud vzduchu směřující od spinnerety ke kolektoru. Tento proudící vzduch podporuje odstředivou sílu, napomáhá výrobě a dloužení vláken a jejich směrování ke kolektoru. Kolektor je ve formě rotujícího perforovaného bubnu a je umístěn ve vzdálenosti 25 cm pod spinneretou. Skrze kolektor je vakuově sán vzduch, což napomáhá rovnoměrnějšímu ukládání nanovláken do vrstvy.

Dávkovací pumpa (obr. 15) umístěná na zařízení slouží k řízení dávkování polymerního roztoku. Zvlákňovaný materiál byl dávkován injekční stříkačkou přes hadičku vedoucí do spinnerety. Dávkování bylo pro všechny experimenty nastaveno na 50 ml/hod.



Obrázek 12: Zařízení Nanocentrino turecké firmy Areka Group. 1 - dávkovací zařízení, 2 - zvlákňovací komora, 3 - ovládání otáček spinnerety, 4 - ovládání otáčení kolektoru.



Obrázek 13: Schéma vnitřního zvlákňovacího prostoru zařízení Nanocentrino L1.0. 1 - dávkování polymerního materiálu, 2 - spinnereta, 3 – zvlákňovací jehly, 4 - vlákna, 5 - kolektor.



Obrázek 14: Detail spinnerety s jehlami pro zařízení Nanocentrino L1.0.

Regulace teploty a vlhkosti není u toho zařízení možná. Klimatizace není jeho součástí. Regulovat lze pouze otáčky spinnerety a kolektoru. Otáčky spinnerety byly upravovány dle použité koncentrace. Bylo potřeba dosáhnout otáček, při kterých vznikaly vlákna, bez kapiček roztoku či shluků vláken. Otáčky kolektoru byly po celou dobu zvláknování vrstev konstantní a byly nastaveny na 90 ot/min. Kolektor byl potažen spunbondem, aby vlákna nebyla ukládána přímo na kolektor.

Tabulka 2: Rozmezí použitých parametrů při zvláknování na zařízení Nanocentrino L1.0

Vlhkost	≈ 23,4 % RH
Teplota	≈ 24,8 °C
Otáčky spinnerety	3200-8000 ot/min
Otáčky kolektoru	90 ot/min
Dávkování	50 ml/hod



Obrázek 15: Detail dávkovacího zařízení dávající polymerní roztok do spinnerety.
1 - injekční stříkačky, 2 - dávkovací pumpy, 3 - hadičky vedoucí do spinnerety.

Celkem bylo zvláknováno sedm polymerních roztoků o koncentraci 14 hm%, 16 hm%, 18 hm% a 20 hm%. Po pozorování byla vybrána koncentrace 18 hm%. Ze všech testovaných koncentrací, byla z této zvlákněna celistvá vrstva bez větších defektů. U této koncentrace byly poté zvláknovány různé poměry rozpouštědlového systému, pro porovnání vlivu jednotlivých složek vlastnosti vyrobených vrstev.

Během zvlákňování byla pozorována kvalita vznikajících vláken, množství vznikajících kapkovitých defektů, homogenita vlákenné vrstvy a množství defektů ve formě provazců vláken. Vše v závislosti na měnícím se složení a koncentraci polymerního roztoku.

Ze všech testovaných koncentrací byly více či méně úspěšně připraveny vrstvy. Jako nejhorší byl označen roztok o koncentraci 14 hm% v rozpouštědlovém systému 8/1/1. Tato vrstva obsahovala velmi mnoho kapkovitých defektů a nebylo ji možné oddělit od podkladové netkané textilie. Naopak nejlépe zvlákňoval roztok o koncentraci 18 hm%. Z celé řady testovaných koncentrací byla z této zvlákňována celistvá vrstva bez větších viditelných defektů. Proto byla koncentrace vybrána pro další experimenty.

Pro porovnání vlivu jednotlivých rozpouštědel na kvalitu zvlákňování a pro určení nejvhodnějšího rozpouštědlového systému byly připraveny a zvlákňovány čtyři různé systémy. Nejvhodnějším se jevil původní systém. Proto byl roztok o koncentraci 18 hm% s rozpouštědlovým systémem 8/1/1 připraven ve větším množství a při podmínkách uvedených v tab. 3 byl znovu zvlákňován. Celé zvlákňování probíhalo cca 3 hodiny a poté byla vzniklá vrstva sejmuta z kolektoru a uložena pro biologické testování.

Tabulka 3: Použité parametry při zvlákňování vybrané vrstvy na zařízení Nanocentrino L1.0

Polymerní roztok	18 hm% (8/1/1)
Otáčky spinnerety	8000 ot/min
Otáčky kolektoru	90 ot/min
Dávkování	50 ml/hod
Vlhkost	23,4 % RH
Teplota	24,8 °C
Použitý podklad	spunbond

2.2.2 Vrstva vyrobená pomocí technologie stejnosměrného zvlákňování

Elektrostaticky připravená nanovláknenná vrstva byla vyrobena na zařízení Nanospider™ české značky Elmarco, který je na obr. 16. Princip této technologie je popsán v kapitole 1.2.1.

Zvlákňování je založeno na principu tvorby Taylorových kuželů a vláken ze struny. Na strunu je pomocí dávkovacího zařízení tzv. cartridge nanesen polymerní roztok s nábojem. Ten na struně vytvoří polymerní film, ze kterého následně vlivem elektrického napětí a opačně nabitého kolektoru vznikají Taylorovy kužely. Z těch poté dojde k tvorbě a protažení vláken po celé horní linii struny. Vzniklá vlákna jsou uložena na kolektoru s podkladovým materiálem.

Cílem elektrostatického zvlákňování bylo připravit vláknennou vrstvu, která se bude svým vzhledem a vlastnostmi co nejvíce podobat vrstvě připravené odstředivě. Proto byl pro zvlákňování použit pouze jeden vybraný roztok, který byl dle výsledků z odstředivého zvlákňování označen za nejvhodnější.

Vybraný roztok byl dávkován do dávkovacího zařízení, které se pohybovalo po struně. Vznikající vlákna byla přitahována na opačně nabitý kolektor potažený spunbondem.



Obrázek 16: Zařízení Nanospider™ české značky Elmarco.

Tabulka 4: Použité parametry při zvlákňování vybrané vrstvy na zařízení Nanospider.

Polymerní roztok	18 hm% (8/1/1)
Elektrické napětí - elektroda 1	-10 kV
Elektrické napětí - elektroda 2	+40 kV
Vzdálenost mezi elektrodami	174 mm
Rychlost posunu cartridge EMW	480 mm/s
Rychlost posunu podkladové textilie	40 mm/min
Teplota	22 °C
Vlhkost	50 % RH

2.3 Charakterizace vyrobených vrstev

Před testováním růstu buněk na vyrobených vlákenných vrstvách bylo potřeba proměřit vlastnosti jednotlivých vrstev. Kromě morfologie a průměrů vláken byla měřena také plošná hmotnost, tloušťka a prodyšnost. Testovány byly všechny vrstvy vyrobené odstředivým zvlákňováním a byly porovnávány s jednou vrstvou vyrobenou elektrostaticky (tato vrstva je označena zkratkou ES).

2.3.1 Morfologie vlákenných vrstev

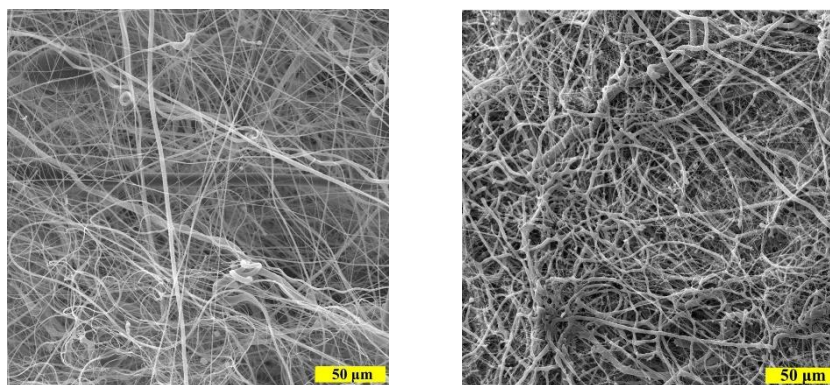
Morfologie vlákenných vrstev byla hodnocena na základě analýzy SEM snímků. Nejprve byla na vzorky v naprašovací zařízení Quorum Q150R ES nanese 7nm vrstva zlata. Snímky pak byly pořízeny na mikroskopu Tescan Vega 3SB Easy Probe při různých zvětšeních. SEM snímky jednotlivých vrstev jsou k nahlédnutí v příloze A.

Ze snímků vrstev vyrobených odstředivým zvlákňováním je patrné, že s rostoucí koncentrací ubývalo množství kapkovitých defektů a vrstvy byly více homogenní. Zároveň také viditelně ubývalo výkyvů v průměrech vláken. Při zvlákňování roztoku o nejvyšší koncentraci (20 hm%) se však opět objevovaly defekty ve formě kapek a úseků splených vláken. Nejvhodnější se tedy jevila koncentrace 18 hm%.

Roztok o této koncentraci byl připraven ve třech různých rozpouštědlových systémech a byl sledován vliv jednotlivých rozpouštědel na výsledná vlákna. Ze systému 8/1/1

vznikla homogenní vrstva s rovnoměrnými průměry vláken bez viditelných defektů. Při zvýšení podílu ethanolu na úkor kyseliny octové (8/1,5/0,5) vznikla vlákna mnohem větších průměrů. Při zvýšení podílu chloroformu na úkor kyseliny octové (8,5/1/0,5) se také průměr vláken zvětšil. Pokud nebyla kyselina octová v systému zahrnuta vůbec (8/2), vznikla vrstva obsahující shluky vláken. Vrstva byla velmi jemná a velmi špatně se s ní pracovalo jak během zvláknování tak po sejmutí z kolektoru. Z těchto výsledků lze usuzovat, že kyselina octová hraje při odstředivém zvláknování PCL významnou roli, vznikají rovnoměrná vlákna malých průměrů a vrstvy jsou bez defektů. Rozdíl v různém zastoupení chloroformu a ethanolu ve směsi již není tak výrazný.

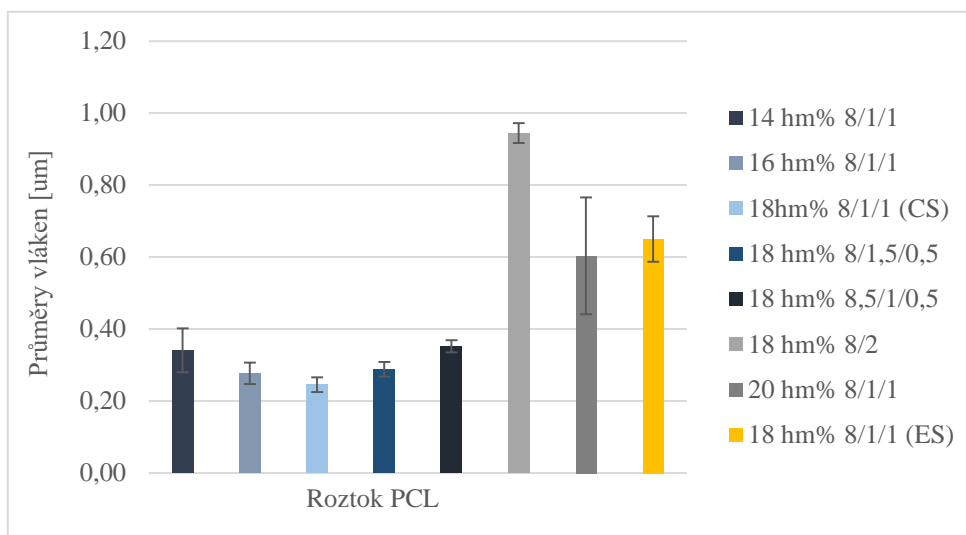
Pro biologické testování byl tedy vybrán roztok PCL ve složení 18 hm% 8/1/1, který byl zvlákněn jak odstředivě, tak elektrostaticky s cílem co nejpodobnějších vrstev. Vybrané SEM snímky těchto vrstev jsou na obrázku 17. Ze snímků lze pozorovat rozdíly mezi vrstvami. Odstředivě zvlákněná vrstva byla oproti vrstvě z elektrostatického zvláknování tvořena jemnějšími vlákny, což je dále patrné i z grafu 1. V obou vrstvách se však objevovala i vlákna větších průměrů. Vlákna byla hladká bez známek porézní či jiné nerovnosti povrchu. Vrstva z elektrostatického zvláknování byla o něco pevnější a kompaktnější, což může být způsobeno rozdílem elektrických potenciálů při zvláknování. Vlákna jsou pak silou přitahována ke kolektoru, kde tvoří kompaktnější strukturu.



Obrázek 17: SEM snímky vrstev určených pro biologické testování. Vlevo je vrstva vyrobená odstředivým zvláknováním (CS), vpravo pak vrstva vyrobená elektrostatickým zvláknováním (ES). Složení roztoku PCL 18 hm% (8/1/1). Měřítko je 50 µm.

2.3.2 Průměry vláken

Průměry vláken byly analyzovány na připravených SEM snímcích jednotlivých vrstev pomocí programu ImageJ. Z každé vrstvy bylo proměřeno 100 vláken. Výsledky byly statisticky zpracovány - tabulky jsou umístěny v příloze B. Zároveň byly zpracovány graficky, viz graf 1.



Graf 1: Grafické znázornění průměrných hodnot průměrů vláken [µm] vrstev v závislosti na koncentraci, složení roztoku PCL a technologii zvlákňování. Chybové úsečky reprezentují 95% IS. Vzorky označené zkratkami CS a ES jsou vrstvy určené pro biologické testování.

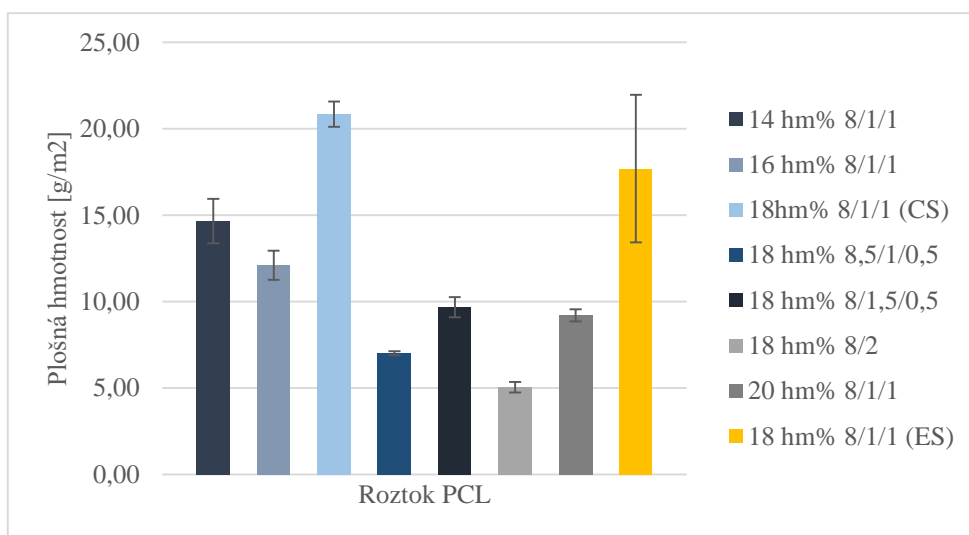
Z grafu vyplývá, že koncentrace, složení roztoku, ale i použitá technologie mají vliv na výslednou podobu vláken. Změna koncentrace způsobila prvotní zmenšování průměrů. Nejmenší průměry vláken byly naměřeny u vzorku 18 hm% 8/1/1 vyrobeného odstředivě. Při koncentraci 20 hm% se však průměry vláken viditelně zvětšily a z velké chybové úsečky se dá usuzovat široká distribuce průměrů.

Při různém rozpouštědlovém systému se opět projevilo, jak zásadní je přítomnost kyseliny octové. Průměry vláken ze systému 8/2, tzn. bez kyseliny, se rapidně zvětšily až k hranici 1 µm, oproti původní hodnotě 0,2-0,3 µm.

Velmi překvapivě dopadl rozdíl v použitých technologiích, kdy vrstva z odstředivého zvlákňování vykazovala mnohem nižší průměry vláken než z elektrostatického zvlákňování. Pro elektrostatické zvlákňování by byl pravděpodobně vhodnější roztok o nižší koncentraci, z něhož by mohly být průměry vláken srovnatelné. Pro porovnání těchto technologií bylo však nutné použít roztok s koncentrací vyšší, proto i průměry vláken jsou o něco větší.

2.3.3 Plošná hmotnost

Plošná hmotnost jednotlivých vrstev byla stanovena jako průměrná hodnota z pěti měření. Z každé vrstvy bylo vyříznuto pět kruhových vzorků o definované ploše 10 cm². Každý ze vzorků byl zvážen na čtyřmístných analytických vahách. Naměřené hodnoty byly přepočteny na plochu 1 m². Statisticky zpracované výsledky pro všechny vrstvy jsou v příloze B a grafické vyhodnocení je v grafu 2.



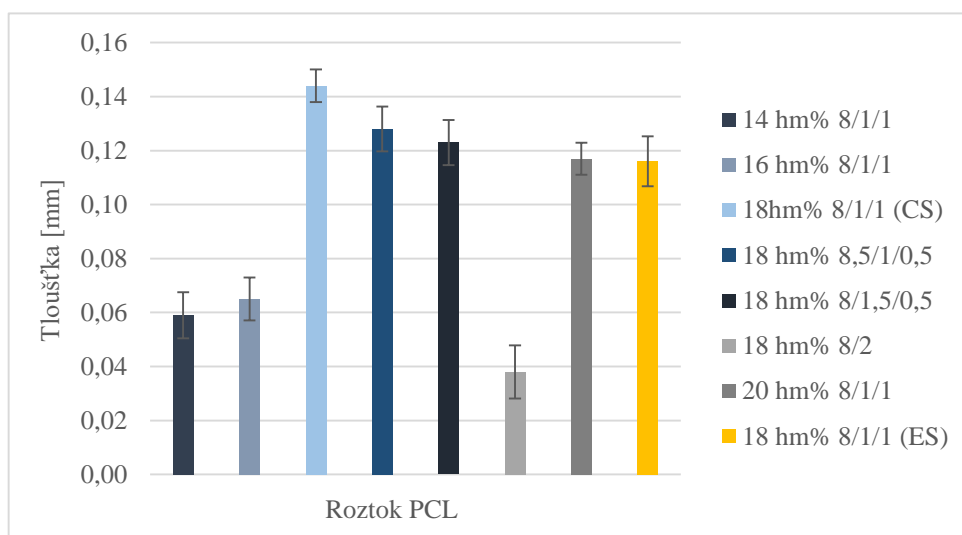
Graf 2: Grafické znázornění plošné hmotnosti [g/m²] vrstev v závislosti na koncentraci, složení roztoku PCL a technologii zvlákňování. Chybové úsečky reprezentují 95% IS. Vzorky označené zkratkami CS a ES jsou vrstvy určené pro biologické testování.

Průměrná plošná hmotnost jednotlivých vrstev se velmi liší a z grafu není patrná žádná konkrétní závislost. Proto je možné konstatovat, že ani koncentrace, ani složení rozpouštědlového systému nehrají při měření plošné hmotnosti výraznou roli.

Pouze vzorky označené zkratkami CS (vrstva vyrobená odstředivým zvlákňováním) a ES (vrstva vyrobená elektrostatickým zvlákňováním) svými hodnotami výrazně převyšují ostatní. To se však dalo předpokládat, jelikož tyto vrstvy byly připraveny z dvojnásobného množství roztoku a byly určeny pro biologické testování. Tudíž i jejich plošná hmotnost musela být vyšší, aby s nimi bylo možné snáze manipulovat. V případě vzorku z odstředivého zvlákňování byla vrstva v ploše homogennější a dosahovala přibližně 20 g/m². Plošná hmotnost elektrostaticky připravené vrstvy kolísala, což je vidět i na velké chybové úsečce. Nelze tedy konstatovat, že by rozdíly mezi těmito dvěma vrstvami byly statisticky významné.

2.3.4 Tloušťka vrstev

Tloušťka vrstev byla měřena pomocí tloušťkoměru Mesoan Lab Schmidt Control Instrument na Katedře materiálového inženýrství fakulty textilní na Technické univerzitě v Liberci. U každé vrstvy bylo provedeno 10 měření na náhodných místech. V příloze B se nachází statisticky zpracované výsledky, zatímco jejich grafické vyhodnocení je v grafu 3.

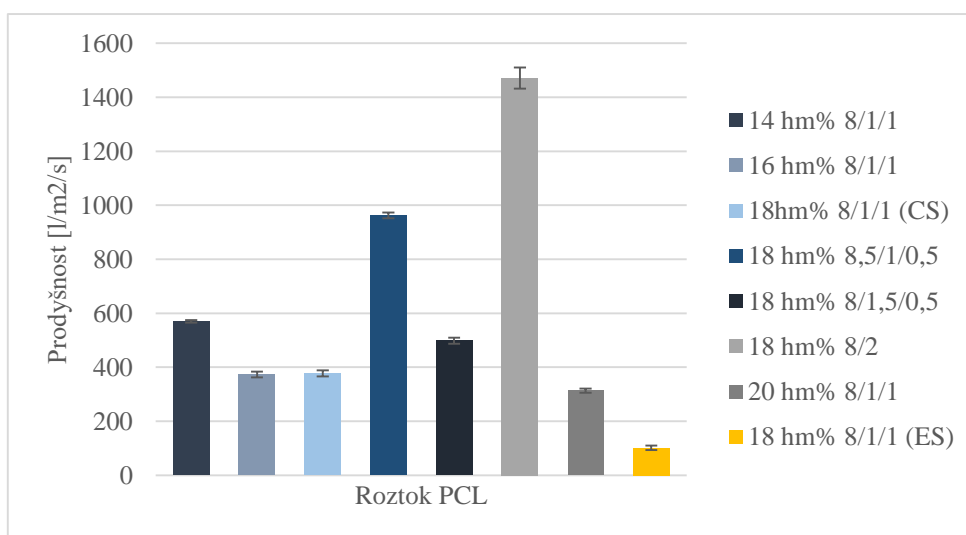


Graf 3: Grafické znázornění tloušťky [mm] vrstev v závislosti na koncentraci, složení roztoku PCL a technologii zvláknování. Chybové úsečky reprezentují 95% IS. Vzorky označené zkratkami CS a ES jsou vrstvy určené pro biologické testování.

Ani v případě měření tloušťky se žádný jednoznačný trend neukázal. Lze pouze konstatovat, že odstředivě připravené vrstvy obsahující větší množství kapkovitých defektů, tj. 14 hm%, 16 hm% a 18 hm% (8/2) dosahovaly mnohem nižších tlouštěk. Zatímco v případě vrstev s převahou vláken (ať už jakýchkoli průměrů) byly tloušťky vyšší. Největší tloušťku měla odstředivě připravená vrstva určená pro biologické testování (označená CS). Může to být způsobeno jednak dvojnásobným množstvím použitého roztoku a jednak také nejvyšší plošnou hmotností. Důležité je, že jak vrstva označená CS, tak vrstva ES mají malé chybové úsečky a tloušťky jsou tedy v ploše podobné.

2.3.5 Prodyšnost

Prodyšnost byla měřena na přístroji FX 3300 na Katedře hodnocení textilií fakulty textilní Technické univerzity v Liberci. Vyšší hodnota prodyšnosti znamená, že vrstva je velmi porézní, neklade vzduchu žádný odpor a vzduch tak může snadno procházet skrz. Přístroj byl nastaven podle normy pro měření prodyšnosti technických textilií, tj. měřená plocha 20 cm² a tlakový spád 200 Pa. Měření probíhalo tak, že vrstva byla vždy vložena na místo určené k měření (pod jakousi páku měřicí hlavy) a tato páka byla následně stlačena. Následně začal skrz vrstvu proudit vzduch o definovaném tlakovém spádu. Na zadním displeji se vzápětí objevila naměřená hodnota prodyšnosti. Každá vrstva byla měřena 10x, pokaždé na jiném místě. Graf 4 ukazuje statisticky zpracované výsledky měření, tabulka výsledků je v příloze B.



Graf 4: Grafické znázornění prodyšnosti [l/m²/s] vrstev v závislosti na koncentraci, složení roztoku PCL a technologii zvlákňování. Chybové úsečky reprezentují 95% IS. Vzorky označené zkratkami CS a ES jsou vrstvy určené pro biologické testování.

Jednoznačný trend závislosti koncentrace roztoku či složení rozpouštědlového systému se ani v případě prodyšnosti neprojevil. Z grafu je patrně, že nejvíce prodyšná byla vrstva připravená z roztoku bez obsahu kyseliny octové (8/2). Zatímco největší odpor vzduchu (tudíž nejnižší prodyšnost) vykazovala elektrostaticky vyrobená vrstva určená pro biologické testování (ES). Důvodem může být samotný způsob zvlákňování, kdy dochází k tvorbě vláken díky elektrické síle a rozdílu elektrických potenciálů mezi zvlákňovací elektrodou a kolektorem. Vlákna se na kolektoru „tisknou co nejvíce k sobě“. Vrstva tak může být mnohem méně prodyšná, přestože plošná hmotnost i tloušťka jsou nižší. O něco

více prodyšná byla odstředivě připravená vrstva pro biologické testování (CS). Vláknata vznikají pouze díky odstředivé síle a proudění vzduchu a jsou samovolně ukládána na kolektor.

2.4 Biologické testování

Po vyrobení a charakterizaci vrstev následovalo biologické testování. Cílem biologického testování bylo zjistit, zda má použitá technologie zvlákňování vliv na růst a proliferaci buněk. Testování probíhalo v laboratořích tkáňového inženýrství na Katedře netkaných textilií a nanovláknenných materiálů fakulty textilní na Technické univerzitě v Liberci. Testovány byly pouze dvě vrstvy – jedna vyrobená odstředivým (CS) a druhá vyrobená elektrostatickým (ES) zvlákňováním roztoku 18 hm% 8/1/1. Jako testované buňky byly použity 3T3 myší fibroblasty.

2.4.1 Příprava vzorků

Nejprve byly z každé vrstvy vyříznuty vzorky o požadované velikosti a poté byly vloženy do 24 jamkových kultivačních destiček. Pro testování byly jamky v destičkách rozděleny podle potřeby - 5 pro CCK, 1 pro negativní kontrolu, 1 pro SEM, 1 pro FM. Takto byly kultivační destičky připraveny pro obě vrstvy.

Po přípravě destiček byla potřeba vzorky vysterilizovat pomocí ethylenoxidu (12 hodin při pokojové teplotě, typ Anprolene, USA). Dále bylo nutné je nechat odvětrat, aby zbytkový ethylenoxid neovlivnil testy.

2.4.2 Pasážování buněk

Při pasážování buněk byly připraveny buňky pro testování. Samotné pasážování probíhalo následovně.

Jako první bylo potřeba dát na 20 minut nahřát médium a trypsin. Poté byly pod optickým mikroskopem zkontrolovány buňky a jejich procentuální odhad v kultivační lahvičce. Po nahřátí byl trypsin přenesen spolu s kultivační lahvičkou do flowboxu, který je na obr. 19. Zde bylo odsáto médium. Následoval oplach PBS, rychlý oplach tryptinem, připipetování tryptinu a uložení buněk do inkubátoru na 5 minut. Inkubátor měl stálou

teplotu 37 °C. Po 5 minutách byly buňky v kultivační lahvičce znovu pozorovány pod optickým mikroskopem a následně byly uloženy spolu s nahřátým médiem zpět do flowboxu.

Dalším krokem bylo propipetovat buňky médiem tj. rozsuspendovat buňky neboli rozbít případné shluky buněk. V kultivační lahvičce bylo ponecháno malé množství buněčné suspenze a následně bylo připipetováno nahřáté médium. Následovala kontrola pod mikroskopem a uložení kultivační lahvičky do inkubátoru.

Počátek experimentu

Následovalo nasazení buněk na připravené vysterilizované materiály v destičkách. Do každé jamky bylo napipetováno z kultivační lahvičky 10 000 buněk v 1 ml roztoku. Poté byly vzorky zatíženy skleněnými kroužky a byly uloženy do inkubátoru (37 °C, 5% CO₂).



Obrázek 18: Zařízení Flowbox určený pro sterilní práci s buňkami.

2.4.3 *In vitro* testování

In vitro testování bylo na dvou vybraných vrstvách prováděno 2., 7., a 14. den od počátku experimentu. Postup byl vždy stejný a zahrnoval metabolický test CCK-8 pro zjišťování viability (životaschopnosti) buněk, dále fluorescenční a elektronovou mikroskopii.

Metabolický test CCK-8

Jako první byl připraven čerstvý 10% roztok CCK-8 ředěný médiem. Do každé jamky kultivační destičky byl použit 1ml roztoku CCK-8 + médium. Následně byly připraveny nové sterilní kultivační destičky. Z každého materiálu bylo pro každý den testování připraveno devět vzorků – pět vzorků pro metabolický test, jedna negativní kontrola, jedna pozitivní kontrola, jeden vzorek pro FM a jeden vzorek pro SEM. Vzorky byly propláchnuty PBS a následně vloženy do připraveného roztoku CCK-8 + médium. Takto připravené destičky byly uloženy do inkubátoru na 2 hodiny 5 minut. Tento čas byl dodržen u každého dne testování.

Po inkubaci následovala spektrofotometrie. Kultivační destičky s materiály byly vyjmuty z inkubátoru. Následně byly roztoky přepipetovány do 96 jamkové kultivační destičky a vloženy do spektrofotometru. Spektrofotometricky byly roztoky vyhodnocovány při vlnové délce 450 nm a byla měřena absorbance roztoků odpovídající množství živých buněk. Čím tmavší barvu roztok měl, tím vyšší procento živých buněk obsahoval.

FM

Vzorky byly podrobeny analýze pomocí FM. Ke vzorku byl nejprve přidán permeabilizační roztok. Ten narušil buněčnou membránu a díky tomu bylo možné buňky dále obarvit. K obarvení buněčného jádra bylo použito barvivo DAPI (modré zbarvení buněčného jádra) a k obarvení buněčné membrány bylo použito Phalloidin FITC (zelené zbarvení buněčné membrány).

SEM

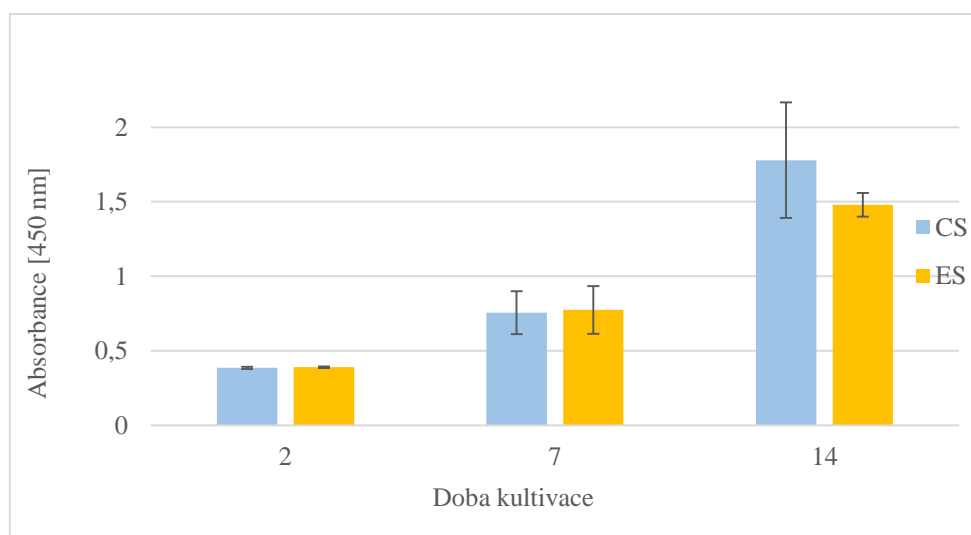
Pro analýzu pomocí SEM byly vzorky vysušeny vzestupnou ethanolovou řadou. Jednotlivé koncentrace působily na vzorky 5 minut. Poté byly vzorky odloženy pro SEM.

2.4.4 Výsledky biologického testování

Biologické testování bylo kvantitativně vyhodnoceno na základě metabolického testu CCK-8 a počítání počtu buněk, zatímco kvalitativně bylo vyhodnoceno s využitím fluorescenční a elektronové mikroskopie.

Metabolický test CCK-8

Metabolický test CCK-8 byl vyhodnocen pomocí spektrofotometru. Měřena byla absorbance roztoků, která vypovídá o metabolické aktivitě živých buněk. Platí závislost, čím vyšší je naměřená absorbance, tím více je živých buněk ve vzorku. Absorbance buněk byla měřena každý den testování. Průměrné hodnoty absorbance z pěti měřených vzorků, které jsou obrazem viability buněk, jsou vyneseny v grafu 5.

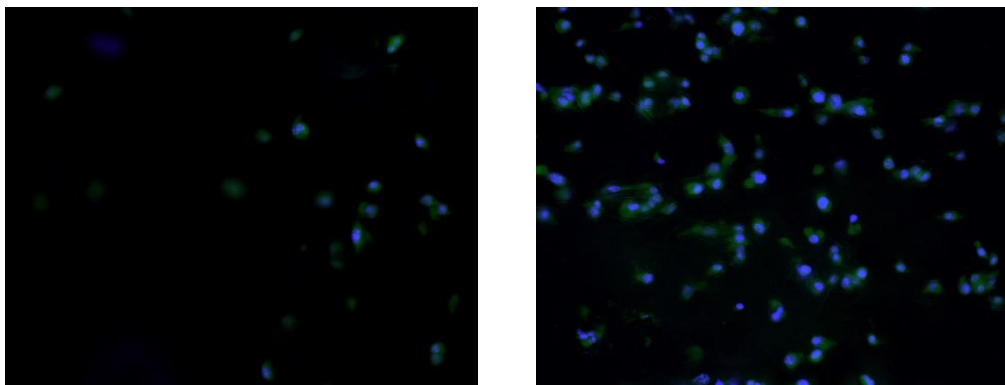


Graf 5: Výsledky metabolického testu CCK-8 v průběhu času. CS – odstředivě zvlákněná vrstva, ES – elektrostaticky zvlákněná vrstva, Chybové úsečky značí 95% IS. Absorbance byla měřena při vlnové délce 450 nm.

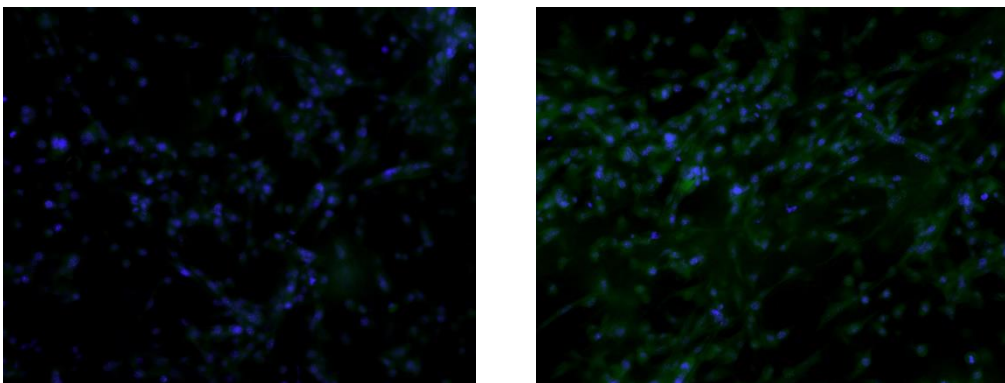
Z grafu metabolické aktivity buněk nasazených na povrch vláknenných materiálů lze vyčíst postupný nárůst absorbance v jednotlivých dnech. Buněčná viabilita obou testovaných materiálů byla po 2. a 7. dni testování téměř shodná. Rozdíl se projevil teprve při 14. dni testování, kdy byla hodnota absorbance vyšší u odstředivě zvlákněné vrstvy (CS). Při pohledu na chybovou úsečku je však patrné, že naměřené hodnoty kolísaly a v porovnání s výsledkem elektrostaticky zvlákněné vrstvy (ES) není rozdíl statisticky významný. Na základě tohoto zjištění lze konstatovat, že technologie výroby vláknenné vrstvy nemá téměř žádný vliv na viabilitu buněk.

Fluorescenční mikroskopie

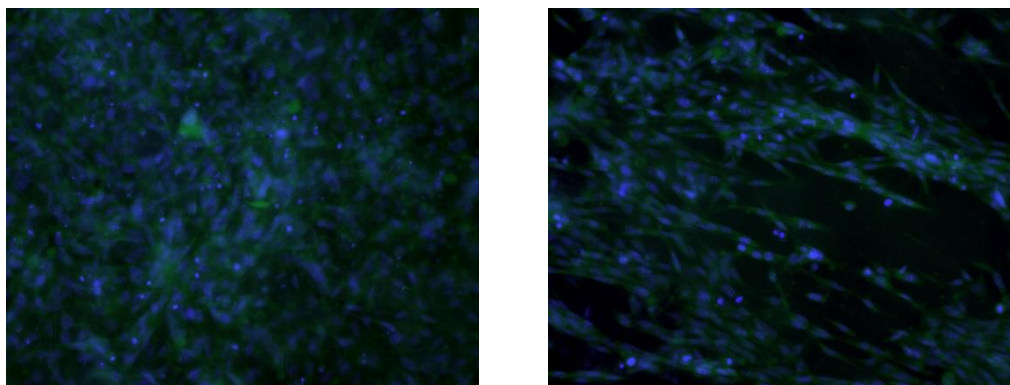
Díky fluorescenčnímu mikroskopu bylo možné pozorovat růst buněk na materiálu pomocí fluorescenčního barviva. Jako barviva byla použita DAPI a Phalloidin FITC. DAPI obarvil jádro, zatímco Phalloidin FITC obarvil buněčnou membránu. Na snímcích na obrázcích 19, 20, 21 lze vidět jádro obarvené modře a buněčnou membránu obarvenou zeleně. Snímky byly pořízeny pro každý testovací den. Snímek vlevo vždy reprezentuje vrstvu z odstředivého zvláknování (CS), snímek vpravo pak elektrostaticky vyrobenou vrstvu (ES).



Obrázek 19: Snímky pořízené na fluorescenčním mikroskopu (2. testovací den). Snímek vlevo- odstředivě zvlákněná vrstva (CS). Snímek vpravo- elektrostaticky zvlákněná vrstva (ES).



Obrázek 20: Snímky pořízené na fluorescenčním mikroskopu (7. testovací den). Snímek vlevo- odstředivě zvlákněná vrstva (CS). Snímek vpravo- elektrostaticky zvlákněná vrstva (ES).

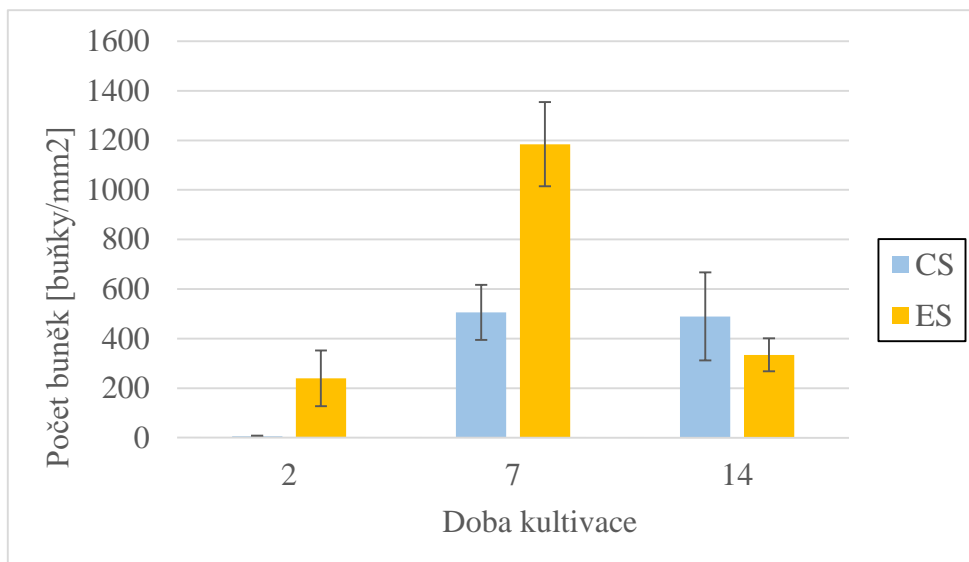


Obrázek 21: Snímky pořízené na fluorescenčním mikroskopu (14. testovací den). Snímek vlevo- odstředivě zvlákněná vrstva (CS). Snímek vpravo- elektrostaticky zvlákněná vrstva (ES).

Na snímcích z fluorescenčního mikroskopu lze pozorovat počty buněk na jednotlivých materiálech v jednotlivých testovacích dnech. Odstředivě zvlákněná vrstva (CS) byla na rozdíl od vrstvy z elektrostatického zvláknování (ES) hůře pozorovatelná. Materiál se při manipulaci kroutil, trhal a buňky byly hůře fotitelné. Toto se projevilo především u 2. testovacího dne. V dalších dnech již snímky odpovídaly hodnotám metabolického testu. Je patrné, že buňky byly téměř homogenně rozloženy a proliferovaly na obou materiálech.

Počty buněk

Pomocí programu Cell Counter pak byly spočítány také počty buněk na jednotlivých materiálech. Program počítá buňky z deseti zorných polí a tyto počty poté zprůměruje. Vyhodnocení počtu buněk na jednotlivých materiálech v průběhu testování je v grafu 6. Vzhledem k tomu, že snímky z FM odstředivě zvlákněné vrstvy nebyly příliš kvalitní, mohou být i jejich počty zavádějící a nepřesné.

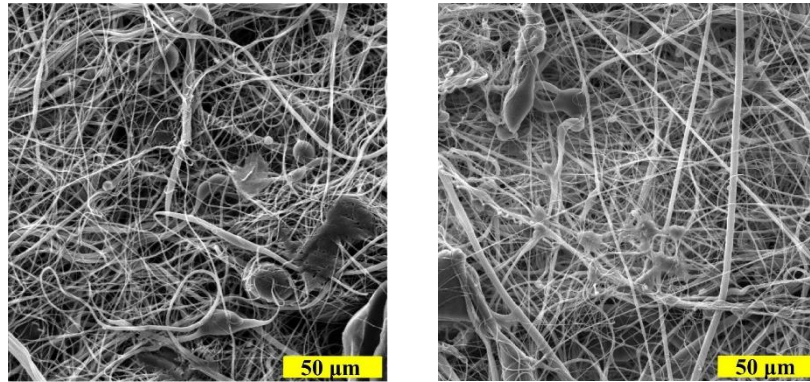


Graf 6: Grafické znázornění počtu buněk v průběhu času. ES - elektrostaticky zvlákněná vrstva, CS - odstředivě zvlákněná vrstva. Z grafu lze vyčíst růst počtu buněk na zvlákněných vrstvách. 7. den byl počet buněk nejvyšší u ES zvlákněné vrstvy. 14. den bylo potřeba roztok s materiály naředit z důvodu velkého počtu buněk na malé ploše. Zároveň se jedná o den s nejvyšším počtem buněk u CS zvlákněné vrstvy.

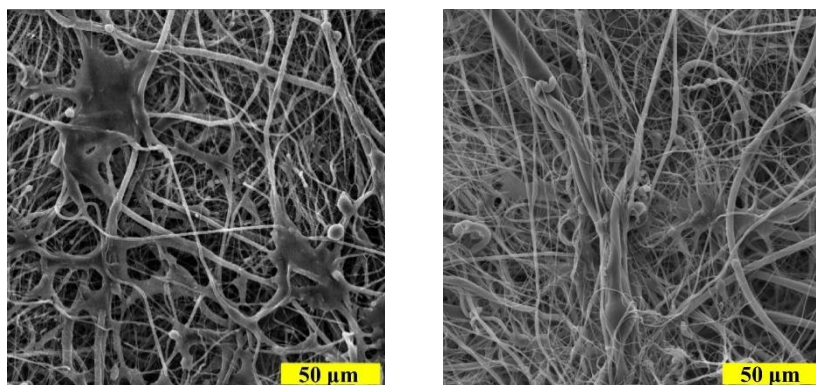
Z grafu lze vyčíst růst počtu buněk na zvlákněných vrstvách. 2. den testování bylo patrné velmi malé množství buněk a to především na odstředivě zvlákněné vrstvě. K nárůstu počtu buněk na obou testovaných materiálech došlo během 7. dne, kdy byl počet buněk nejvyšší. Po tomto dni začal počet buněk na elektrostaticky zvlákněné vrstvě, kvůli jejich velkému počtu na malé ploše vzorku, prudce klesat. 14. den testování musel být roztok s buňkami, ve kterém byly elektrostaticky zvlákněné materiály, naředěn. Výsledek počítání počtu buněk je však velmi zkreslený a nepřesný, Materiál z odstředivého zvláknění byl totiž pokroucený a buňky hůře pozorovatelné, proto je nebylo možné spočítat.

Skenovací elektronová mikroskopie

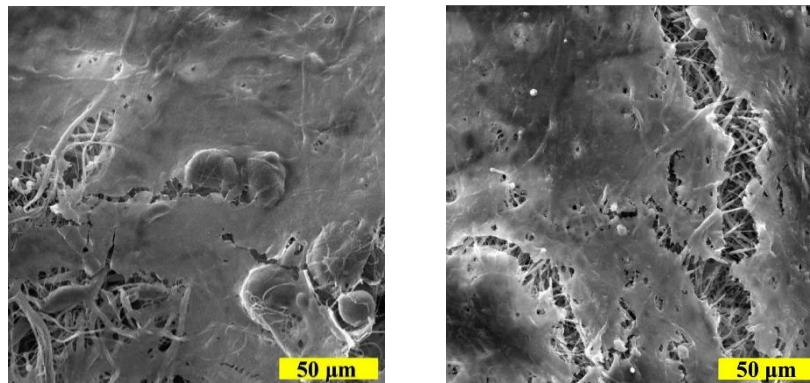
Pomocí skenovací elektronové mikroskopie bylo možné pozorovat porůstání materiálů buňkami. Snímky byly pořízeny pro každý testovací den, viz obrázky 22, 23, 24. Odstředivě připravená vrstva (CS) je zachycena na snímcích vlevo, vpravo je pak vrstva zvlákněná elektrostaticky (ES). Více snímků je umístěno v příloze C.



Obrázek 22: Snímky pořízené na skenovacím elektronovém mikroskopu (2. testovací den). Snímek vlevo - CS. Snímek vpravo – ES. Měřítka je 50 µm.



Obrázek 23: Snímky pořízené na skenovacím elektronovém mikroskopu (7. testovací den). Snímek vlevo - CS. Snímek vpravo – ES. Měřítka je 50 µm.



Obrázek 24: Snímky pořízené na skenovacím elektronovém mikroskopu (14. testovací den). Snímek vlevo - CS. Snímek vpravo – ES. Měřítka je 50 µm.

SEM snímky ukazují, že buňky pokryly povrch obou materiálů velmi dobře. Je to patrné z rozptýlení buněk po vlákněm povrchu, což jim napomáhá v adhezi a proliferaci. 2. testovací den bylo buněk na obou materiálech poměrně málo a teprve postupem času se jejich počet zvyšoval. Poslední testovací den již byly obě vrstvy porostlé téměř

souvislou vrstvou buněk. Můžeme tedy říci, že snímky z elektronového mikroskopu odpovídají výsledkům z metabolického testu a snímkům z fluorescenčního mikroskopu.

Z výsledků *in vitro* testování materiálů je patrné, že způsob zvlákňování nemá zásadní vliv na adhezi a proliferaci buněk. To dokládají výsledky CCK-8 testu, analýza pomocí FM a SEM, které jednoznačně potvrzují zvyšování viability buněk během testovacího období.

Shrnutí

Bakalářská práce byla zaměřena na studium aplikačních možností nanovlákněných vrstev vyrobených různými technologiemi pro tkáňové inženýrství. Cílem bylo vyrobit vlákněné vrstvy pomocí metod odstředivého a elektrostatického zvlákňování. Tyto vrstvy dostatečně charakterizovat a porovnat mezi sebou. Následně je podrobit biologickému testování s využitím 3T3 myších fibroblastů. Výsledky vyhodnotit a navrhnout možnou aplikaci vrstev pro tkáňové inženýrství.

V teoretické části byly představeny dvě technologie vybrané pro výrobu vlákněných vrstev, konkrétně odstředivé a elektrostatické zvlákňování. Byly vysvětleny jejich principy i možné varianty. Zároveň byly popsány různé parametry, které zvlákňování ovlivňují. Pozornost byla věnována také úspěšně zvlákňěným materiálům, hlavně PCL, a jejich použití. V krátkosti byla nastíněna problematika tkáňového inženýrství a mikroskopie.

Hlavním cílem práce bylo odstředivě vyrobit vlákněnou vrstvu, kterou by bylo možné dále otestovat v laboratořích tkáňového inženýrství. Bylo nutné připravit homogenní vrstvu s úzkou distribucí vlákněných průměrů a s co nejmenším počtem defektů, která by byla vlastnostmi srovnatelná s vrstvou vyrobenou elektrostaticky. K výrobě vrstvy bylo využito nové zařízení Nanocentrino L1.0 od firmy Areka Group, které bylo na Katedru netkaných textilií a nanovlákněných materiálů zakoupeno poměrně krátce předtím. Toto zařízení umožňuje výrobu vlákněné vrstvy, což do té doby nebylo na tavných zařízeních pro odstředivé zvlákňování možné. Bylo tedy zapotřebí nové zařízení otestovat, vyzkoušet vliv jednotlivých parametrů na tvorbu vláken a defektů, určit nejvhodnější koncentraci a složení roztoku.

Pro výrobu vrstev byl vybrán polymerní materiál PCL (Sigma Aldrich), který byl rozpuštěn v rozpouštědlovém systému chloroform/ethanol/kyselina octová v poměru 8/1/1. Roztok s tímto složením byl již dříve úspěšně elektrostaticky zvlákněn a také biologicky testován, proto byl zvolen jako výchozí. Při odstředivém zvláknování hraje velkou roli koncentrace roztoku. Proto byla připravena koncentrační řada, která byla postupně zvláknována. Jako nejvhodnější se ukázala koncentrace 18 hm%. Zvláknování bylo nejkvalitnější, vrstva byla již na první pohled homogenní a obsahovala převážně vlákna bez jakýchkoli defektů. Po určení koncentrace následoval výběr rozpouštědlového systému. Byly připraveny čtyři rozpouštědlové systémy lišící se pouze poměrem původních složek a byl sledován jejich vliv na kvalitu zvláknování. Ukázalo se, že původně zvolený systém 8/1/1 byl ze všech nejlepší. Při zvláknování hrála velkou roli přítomnost kyseliny octové. Snížení jejího podílu se okamžitě projevilo na zvýšení průměrů vláken a tvorbě defektů. Za nejlepší byl tedy označen roztok 18 hm% PCL rozpuštěný v systému 8/1/1. Z tohoto roztoku byla připravena vrstva určená pro biologické testování. Zároveň byl roztok zvlákněn také elektrostaticky na zařízení Nanospider™.

Na základě těchto experimentů byla vytvořena série vláknenných vrstev, které se lišily koncentrací polymerního roztoku, složením rozpouštědlového systému a způsobem zvláknování. Vrstvy byly nejprve charakterizovány z hlediska morfologie a následně podrobeny testování jejich vlastností (průměry vláken, plošná hmotnost, tloušťka, prodyšnost). Výsledky jednotlivých vrstev se v rámci testů dost lišily. Největší pozornost byla věnována vrstvám určeným pro biologické testování. Tyto dvě vrstvy dosahovaly ve všech testovaných charakteristikách velmi podobných výsledků. Byly homogenní, bez defektů, podobných plošných hmotností a tlouštěk. Průměry vláken z odstředivého zvláknování byly dokonce nižší než z elektrostatického (0,2 μm oproti 0,6 μm). Naopak prodyšnost byla nižší u elektrostaticky zvlákněné vrstvy, což je pravděpodobně způsobeno přítomností elektrické síly a rozdílem potenciálů při zvláknování, kdy jsou vlákna více přitahována k sobě, a vrstva na kolektoru je kompaktnější.

Dále byly vrstvy připraveny pro biologické testování. Předpokládalo se, že vlákna vyrobená elektrostaticky jsou již při vzniku automaticky ošetřena plazmatickou úpravou. Naopak při odstředivém zvláknování, kde žádný elektrický náboj přítomen není, k této úpravě nedochází. Cílem biologického testování tedy bylo zjistit, zda má technologie zvláknování (resp. plazmatická úprava) vliv na viabilitu a proliferaci buněk. Samotné

in vitro testování pomocí 3T3 myších fibroblastů probíhalo 14 dní od nasazení buněk na vzorky. Testování proliferace a viability buněk probíhalo 2., 7. a 14. den. Vzorky byly podrobeny analýze pomocí metabolického testu CCK-8, fluorescenční mikroskopii a elektronové mikroskopii. Vrstva z odstředivého zvlákňování byla na FM o něco hůře pozorovatelná, při snímání se kroutila a buňky byly hůře fotitelné, což mohlo mít velký vliv na počítání množství buněk. Výsledek počtu buněk tedy může být velmi nepřesný. Naopak metabolický test a SEM ukazují téměř shodnou viabilitu a proliferaci buněk na obou testovaných materiálech. Na základě těchto prvotních výsledků lze konstatovat, že způsob zvlákňování nemá zásadní vliv na adhezi a proliferaci buněk. Pro jednoznačné potvrzení výsledků je však nutné testování zopakovat.

Závěr

V bakalářské práci bylo úspěšně otestováno nové zařízení Nanocentrino L1.0 pro výrobu vláknenných vrstev odstředivým zvlákňováním. Připravena a otestována byla celá série vzorků. Podařilo se připravit vláknennou vrstvu o vyšší plošné hmotnosti. Vrstva byla homogenní, bez kapkovitých defektů. Vláknena měla úzkou distribuci průměrů, které se pohybovaly pod hranicí 500 nm. Zároveň byla na zařízení NanospiderTM vyrobena elektrostaticky zvlákněná vrstva, která vykazovala přibližně stejné parametry. Obě tyto vrstvy pak byly mezi sebou porovnány v rámci biologického testování.

Biologické testování mělo ukázat, zda přítomnost elektrického pole při elektrostatickém zvlákňování nějakým způsobem ovlivňuje buněčnou proliferaci. Při elektrostatickém zvlákňování vzniká na vrcholcích Taylorových kuželů korónový výboj, jehož následkem by vlákna mohla být automaticky ošetřena plazmatickou úpravou. Oproti tomu při odstředivém zvlákňování působí na vlákna pouze odstředivá a třecí síla a vlákna by tak měla být bez jakékoli úpravy. Rozdíl mezi vlákny bez jakékoli úpravy a plazmaticky ošetřenými vlákny by se mohl projevit právě při buněčném testování.

Výsledky ukázaly, že přítomnost elektrického napětí při zvlákňování nemá na buněčnou adhezi či na viabilitu buněk žádný vliv. Odstředivě zvlákněná vrstva bez úpravy vykazovala v porovnání s elektrostaticky zvlákněnou vrstvou ošetřenou plazmatickou úpravou stejné výsledky. Výsledky jsou však pouze prvotní a pro vyvození jednoznačných závěrů je zapotřebí provést rozsáhlejší studii. Dále by bylo žádoucí zachytit výrobu obou vláknenných vrstev korokamerou (zařízení pro zachycení korónových výbojů), proměřit kontaktní úhly, provést analýzu povrchu či mikroskopii atomárních sil.

Práce nesměřuje k výrobě materiálu pro konkrétní aplikaci. Má především ukázat na to, že při správném nastavení zvlákňovacích podmínek je možné odstředivě vyrobit homogenní vrstvu, která může nahradit vrstvu z elektrostatického zvlákňování. Elektrostatické zvlákňování může být poměrně nebezpečné. Nabízí se tedy možnost bezpečnějšího odstředivého zvlákňování při zachování vrstev s velmi podobnými výsledky.

Použitá literatura

- [1] YANILMAZ, M, Y. LU, Y. LI a X. ZHANG. SiO₂/polyacrylonitrile membranes via centrifugal spinning as a separator for Li-ion batteries. *Journal of Power Sources*. 2014, 273, 1114-1119. DOI: 10.1016/j.jpowsour.2014.10.015.
- [2] RAGHAVAN, B., H. SOTO a K. LOZANO. Fabrication of Melt Spun Polypropylene Nanofibers by Forcespinning. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*. 2013, 8(1), 52-60. DOI: 10.1177/155892501300800106.
- [3] SARKAR, K., C. GOMEZ, S. ZAMBRANO, M. RAMIREZ, E. DE HOYOS, H. VASQUEZ a K. LOZANO. Electrospinning to Forcespinning™. *Materials Today*. 2010, 13(11), 12-14. DOI: 10.1016/S1369-7021(10)70199-1.
- [4] ZHANG, X. a Y. LU. Centrifugal Spinning: An Alternative Approach to Fabricate Nanofibers at High Speed and Low Cost. *Polymer Reviews*. 2014, 54(4), 677-701. DOI: 10.1080/15583724.2014.935858.
- [5] KULHÁNEK, P. *Úvod do teorie plazmatu*. 1. Praha: AGA, 2017, 386 s. ISBN 978-80904582-2-2.
- [6] TIPPER, M. a, KELLIE, G., ed. 4 - Developments in the use of nanofibres in nonwovens. *Advances in Technical Nonwovens*. Woodhead Publishing Series in Textiles, 2016, s. 115-132. ISBN 978-0-08-100575-0.
- [7] RAGHAVAN, B., H. SOTO a K. LOZANO. Fabrication of Melt Spun Polypropylene Nanofibers by Forcespinning. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*. 2013, 8(1), 52-60. DOI: 10.1177/155892501300800106.
- [8] *What is spin coating* [online]. SpinCoater.com [cit. 2020-05-10]. Dostupné z: <http://www.spincoater.com/what-is-spin-coating.php>
- [9] DABIRIAN, F., S. A. HOSSEINI RAVANDI, A. R. PISHEVAR a R. A. ABUZADE. A comparative study of jet formation and nanofiber alignment in electrospinning and electrocentrifugal spinning systems. *Journal of Electrostatics*. 2011, 69(6), 540-546. DOI: 10.1016/j.elstat.2011.07.006.
- [10] ENGSTRÖM, J., HAGSTRÖM, B. Centrifugal spinning of nanofiber webs – A parameter study of a novel spinning process. *The Nordic Textile Journal*, 2009, p. 82–91.
- [11] NAIR, L. S. a C. T. LAURENCIN. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*. 2007, 32(8-9), 762-798. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017

- [12] CARDOSO, G. B. C., A. B. MACHADO-SILVA, M. SABINO, A. R. SANTOS JR. a C. A. C. ZAVAGLIA. Novel hybrid membrane of chitosan/poly (ϵ - caprolactone) for tissue engineering. *BBiomatter*. 2014, 4(1). DOI: 10.4161/biom.29508.
- [13] SARWAR, Z., E. KRUGLY, V. KAUNELIENE a D. MARTUZEVICIUS. Fabrication and characterization of PEBA fibers by melt and solution electrospinning. *Journal of Materials Research and Technology*. 2019, 8(6), 6074-6085. DOI: 10.1016/j.jmrt.2019.10.001.
- [14] ZAVAGLIA, C. A. C., I. ONYSHCHENKO, D. THIRY, P. COOLS, H. DECLERCQ, R. SNYDERS, R. MORENT a N. DE GEYTER. Thiolation of polycaprolactone (PCL) nanofibers by inductively coupled plasma (ICP) polymerization: Physical, chemical and biological properties. *Applied Surface Science*. 2019, 479, 942-952. DOI: 10.1016/j.apsusc.2019.02.178.
- [15] LUKÁŠOVÁ, V., M. BUZGO, K. VOCETKOVÁ, et al. Needleless electrospun and centrifugal spun poly- ϵ -caprolactone scaffolds as a carrier for platelets in tissue engineering applications: A comparative study with hMSCs. *Materials Science and Engineering: C*. 2019, 97, 567-575. DOI: 10.1016/j.msec. 2018.12.069.
- [16] LOORDHUSWAMY, A. M., V. R. KRISHNASWAMY, P. S. KORRAPATI, S. THINAKARAN a G.D.V. RANGASWAMI. Fabrication of highly aligned fibrous scaffolds for tissue regeneration by centrifugal spinning technology. *Materials Science and Engineering: C*. 2014, 42, 799-807. DOI: 10.1016/j.msec. 2014.06.011.
- [17] BHARDWAJ, N. a S. C. KUNDU. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*. 2010, 28(3), 325-347. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.01.004.
- [18] RAMAKRISHNA, S., K. FUJIHARA, W.-E. TEO, T.-CH. LIM a Z. MA. *An introduction to electrospinning and nanofibers*. New Jersey: World Scientific, 2005, 396 s. ISBN ISBN 981-256-454-3.
- [19] LUKÁŠ, D., A. SARKAR, L. MARTINOVÁ, et al. Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century). *Textile Progress*. 2009, 41(2), 59-140. DOI: 10.1080/00405160902904641.
- [20] YENER, F. A O. JIRSAK. Comparison between the Needle and Roller Electrospinning of Polyvinylbutyral. *Journal of Nanomaterials*. 2012, 2012. DOI: 10.1155/2012/839317.

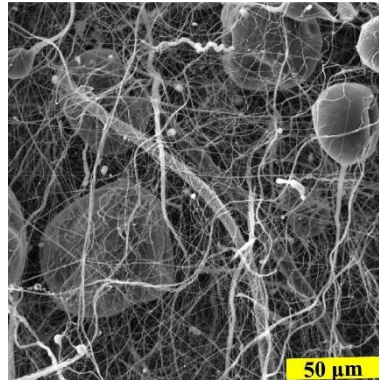
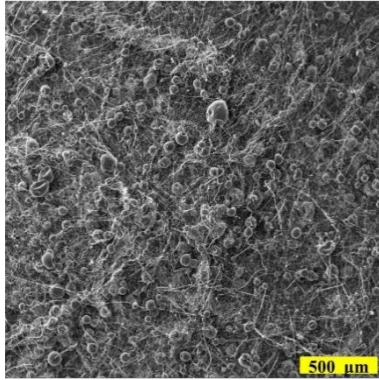
- [21] BALOGH, A., G. VERRECK, J. MENSCH, G. MAROSI, Z. K. NAGY, R. CSELKÓ a B. DÉMUTH. Alternating current electrospinning for preparation of fibrous drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015, 495(1), 75-80. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.08.069.
- [22] KUŽELOVÁ KOŠŤÁKOVÁ, E. Příklady zařízení pro elektrostatické zvlákňování na trhu. DOCPLAYER [online]. Liberec: KNT, FT, TUL [cit. 2020-05-27]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/104918394-Priklady-zarizeni-pro-elektrostaticke-zvlaknovani-na-trhu.html>
- [23] POKORNÝ, P. Analýza procesu elektrostatického zvlákňování a možnosti jeho řízení. Liberec, 2011. Disertační práce. Technická univerzita v Liberci.
- [24] MARTINS, A., E. D. PINHO, S. FARIA, I. PASHKULEVA a N. M. NEVES. Surface Modification of Electrospun Polycaprolactone Nanofiber Meshes by Plasma Treatment to Enhance Biological Performance. *Small*. 2009, 5(10). DOI: 10.1002/sml.200801648.
- [25] LANZA, R., R. LANGER, J. P. VACANTI a A. ATALA. *Principles of Tissue Engineering*. 5. London: Academic Press, 2020. ISBN 978-0-12-818422-6.
- [26] ASADIAN, M., K. V. CHAN, M. NOROUZI, S. GRANDE, P. COOLS, R. MORENT a N. DE GEYTER. Settings Open Access Review Fabrication and Plasma Modification of Nanofibrous Tissue Engineering Scaffolds. *Nanomaterials*. 2020, 10(1), 119. DOI: 10.3390/nano10010119.
- [27] RAMPICHOVA, S., M. BUZGO, J. CHVOJKA, E. PROSECKÁ, O. KOFROŇOVÁ a E. AMLER. Cell penetration to nanofibrous scaffolds. *Cell Adhesion & Migration*. 2014, 8(1), 36-41. DOI: 10.4161/cam.27477.
- [28] Microscopy. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2020-05-26]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Microscopy>
- [29] GÄRTNEROVÁ, V.; JÄGER, A. *Elektronovým mikroskopem do nitra materiálů aneb jak vypadá jejich struktura* [online]. Fyzikální ústav AV ČR [cit. 2020-05-11]. Dostupné z: <https://www.fzu.cz/popularizace/elektronovym-mikroskopem-do-nitra-materialu-aneb-jak-vypada-jejich-struktura>
- [30] RÜCK, A., N. AKGÜN, T. MEIER, M. KRESS a F. DOLP. New Microscopic Techniques to Investigate Intracellular Localization and Reactions of Photosensitizers: Laser Scanning Fluorescence Lifetime Imaging (LS-FLIM). *Medical Laser Application*. 2002, 17(1), 41-47. DOI: 10.1078/1615-1615-00045.

Přílohy

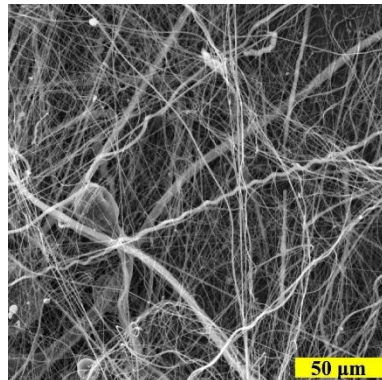
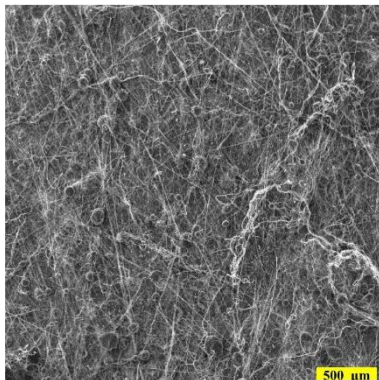
Příloha A: Vybrané SEM snímky – odstředivé zvlákňování

Vrstvy vyrobené odstředivým zvlákňováním

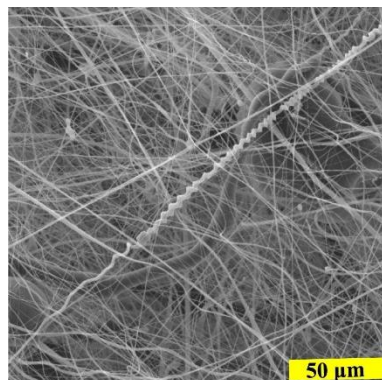
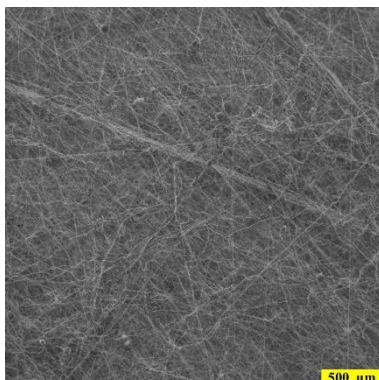
14 hm% (8/1/1)



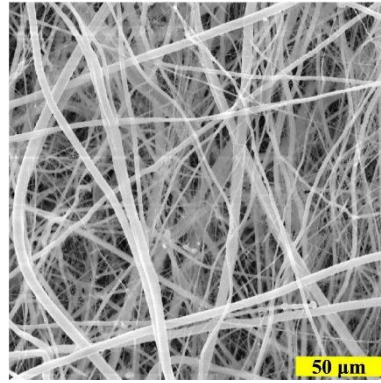
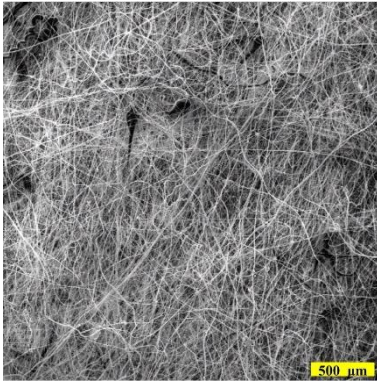
16 hm% (8/1/1)



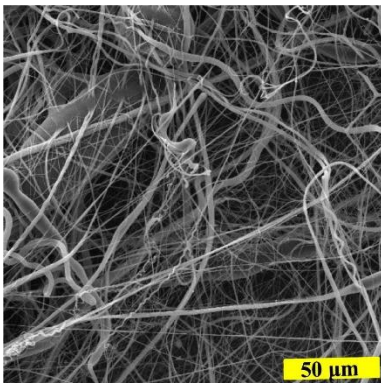
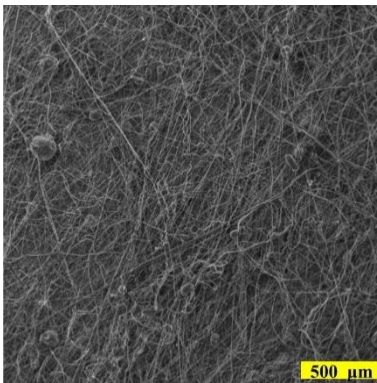
18 hm% (8/1/1)



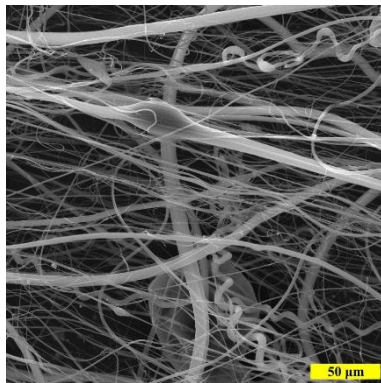
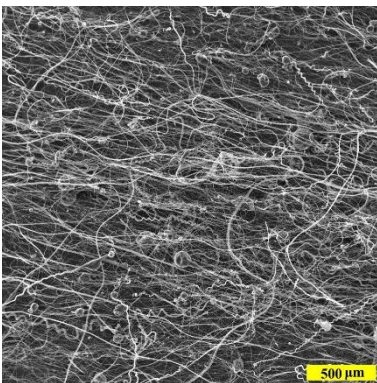
18 hm% (8/1,5/0,5)



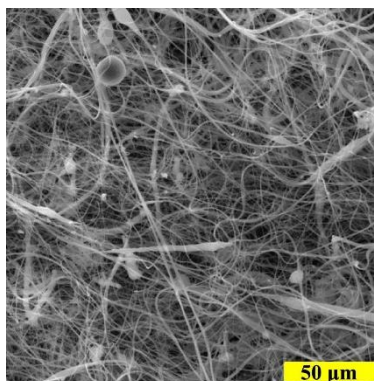
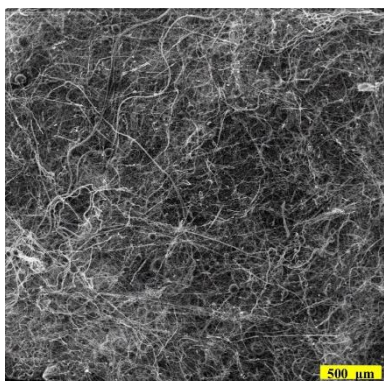
18 hm% (8,5/1/0,5)



18 hm% (8/2)

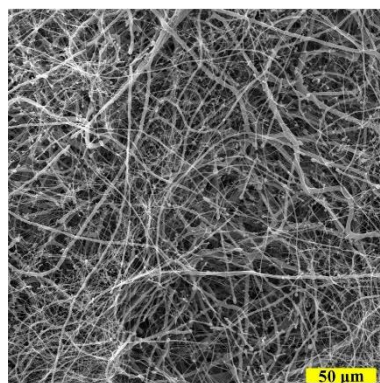
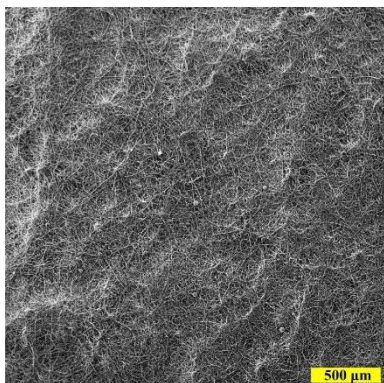


20 hm% (8/1/1)



Vrstva vyrobená elektrostatickým zvlákňováním

18 hm% (8/1/1)



Příloha B: Statisticky zpracované výsledky měřených charakteristik

Průměry vláken [μm]

	Střední hodnota	Směr. odchylka	95% IS
14 hm% 8/1/1	0,34	0,15	0,03
16 hm% 8/1/1	0,28	0,11	0,02
18hm% 8/1/1 (CS)	0,25	0,10	0,02
18 hm% 8,5/1/0,5	0,29	0,09	0,02
18 hm% 8/1,5/0,5	0,35	0,14	0,03
18 hm% 8/2	0,94	0,83	0,16
20 hm% 8/1/1	0,60	0,32	0,06
18 hm% 8/1/1 (ES)	0,65	0,31	0,06

Plošná hmotnost [g/m^2]

	Střední hodnota	Směr. odchylka	95% IS
14 hm% 8/1/1	14,66	1,46	1,28
16 hm% 8/1/1	12,11	0,97	0,85
18hm% 8/1/1 (CS)	20,85	0,83	0,73
18 hm% 8,5/1/0,5	7,00	0,14	0,12
18 hm% 8/1,5/0,5	9,67	0,67	0,59
18 hm% 8/2	5,04	0,35	0,31
20 hm% 8/1/1	9,20	0,40	0,35
18 hm% 8/1/1 (ES)	17,69	4,87	4,27

Tloušťka [mm]

	Střední hodnota	Směr. odchylka	95% IS
14 hm% 8/1/1	0,06	0,01	0,01
16 hm% 8/1/1	0,07	0,01	0,01
18hm% 8/1/1 (CS)	0,14	0,02	0,01
18 hm% 8,5/1/0,5	0,13	0,01	0,01
18 hm% 8/1,5/0,5	0,12	0,01	0,01
18 hm% 8/2	0,04	0,02	0,01
20 hm% 8/1/1	0,12	0,01	0,01
18 hm% 8/1/1 (ES)	0,12	0,01	0,01

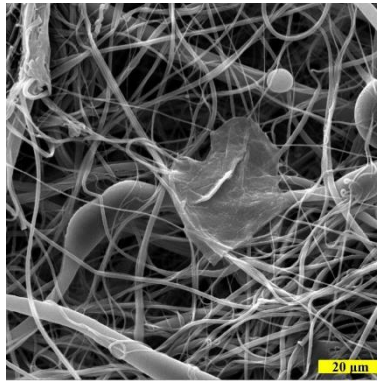
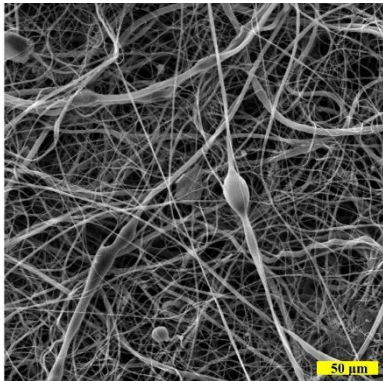
Prodyšnost [l/m²/s]

	Střední hodnota	Směr. odchylka	95% IS
14 hm% 8/1/1	569,8	7,80	4,84
16 hm% 8/1/1	373,1	17,88	11,08
18 hm% 8/1/1 (CS)	377	18,89	11,71
18 hm% 8,5/1/0,5	962,3	17,40	10,78
18 hm% 8/1,5/0,5	498,5	18,05	11,19
18 hm% 8/2	1471	63,88	39,59
20 hm% 8/1/1	313,2	12,89	7,99
18 hm% 8/1/1 (ES)	101,38	13,12	8,13

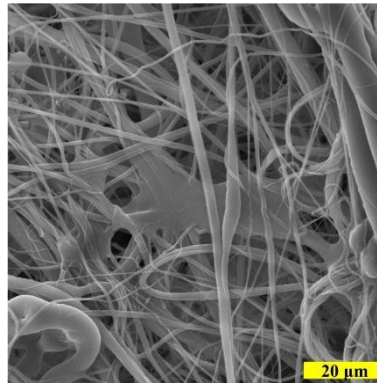
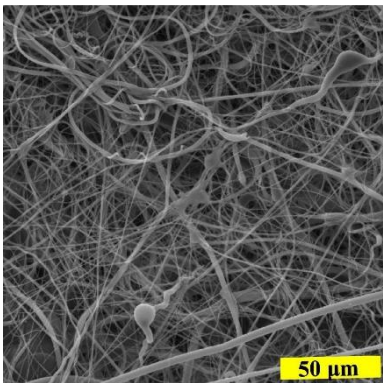
Příloha C: Vybrané SEM snímky- biologické testování

Vrstva vyrobená odstředivým zvlákňováním

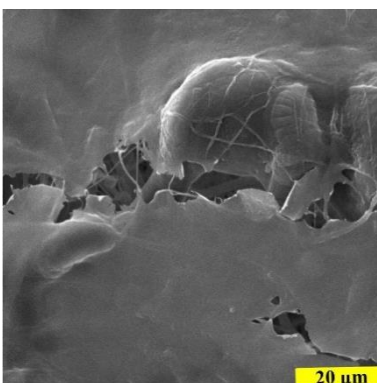
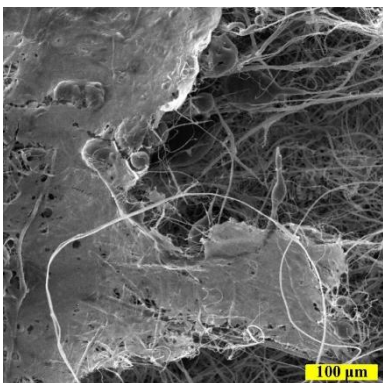
2. den testování



7. den testování

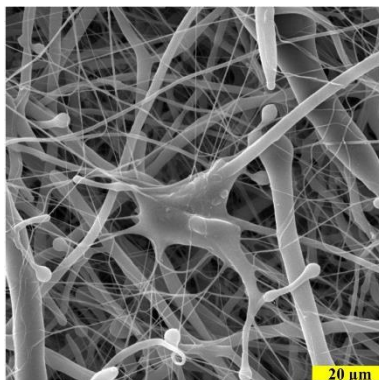
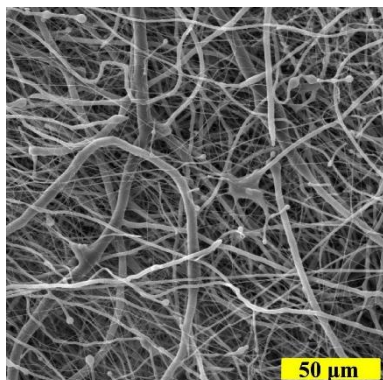


14. den testování

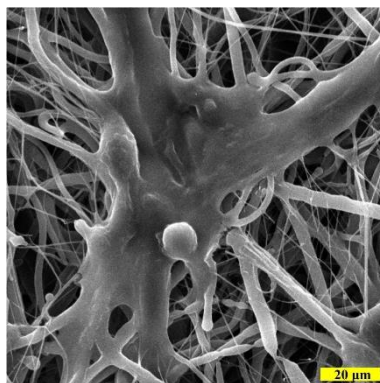
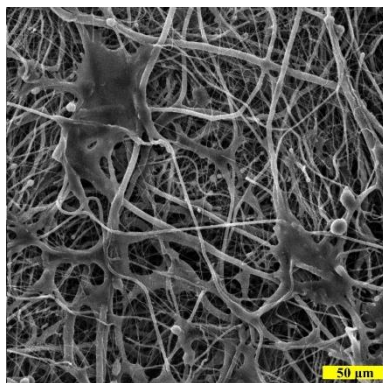


Vrstva vyrobená elektrostatickým zvlákňováním

2. den testování



7. den testování



14. den testování

