



Diplomová práce

Povrchově strukturovaná biodegradabilní nanovláknna

Studijní program:

N0719A270001 Nanotechnologie

Autor práce:

Bc. Vojtěch Homuta

Vedoucí práce:

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

Liberec 2024



Zadání diplomové práce

Povrchově strukturovaná biodegradabilní nanovláknna

<i>Jméno a příjmení:</i>	Bc. Vojtěch Homuta
<i>Osobní číslo:</i>	M22000064
<i>Studijní program:</i>	N0719A270001 Nanotechnologie
<i>Zadávající katedra:</i>	Katedra chemie
<i>Akademický rok:</i>	2023/2024

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte literární rešerši týkající se možností postprocesních strukturálních úprav biodegradabilních polymerních nanovláken a jejich hodnocení
2. Navrhněte a realizujte sérii experimentů vedoucí k tvorbě povrchově strukturovaných biokompatibilních a biodegradabilních polymerních vlákenných materiálů z různých elektricky zvlákněných materiálů z polykaprolaktonu.
3. Vybrané strukturně modifikované vlákenné materiály podrobte in-vitro testování buněčné viability.
4. Zhodnoťte a diskutujte výsledky a vyvodte závěry

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

Seznam odborné literatury:

1. Attia, Aria C., Tony Yu, Sarah E. Gleeson, Mark Petrovic, Christopher Y. Li, a Michele Marcolongo. "A Review of Nanofiber Shish Kebabs and Their Potential in Creating Effective Biomimetic Bone Scaffolds". *Regenerative Engineering and Translational Medicine* 4, č. 3 (září 2018): 107–19. <https://doi.org/10.1007/s40883-018-0053-3>.
2. Jing, Xin, Hao-Yang Mi, Travis M. Cordie, Max R. Salick, Xiang-Fang Peng, a Lih-Sheng Turng. "Fabrication of Shish–Kebab Structured Poly(ϵ -Caprolactone) Electrospun Nanofibers That Mimic Collagen Fibrils: Effect of Solvents and Matrigel Functionalization". *Polymer* 55, č. 21 (říjen 2014): 5396–5406. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2014.08.061>.
3. Badmus, Muhammad, Jing Liu, Nü Wang, Norbert Radacsi, a Yong Zhao. "Hierarchically Electrospun Nanofibers and Their Applications: A Review". *Nano Materials Science* 3, č. 3 (září 2021): 213–32. <https://doi.org/10.1016/j.nanoms.2020.11.003>.

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

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

prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D.
děkan

L.S.

prof. Ing. Josef Šedlbauer, Ph.D.
garant studijního programu

V Liberci dne 14. listopadu 2023

Prohlášení

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

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

Poděkování

Nejprve bych rád poděkoval vedoucí mé práce, paní **doc. Ing. Evě Kuželové Košťákové, Ph.D.**, za její precizní vedení skrze celé zpracování diplomové práce, a to už od představení nabízených témat až po finální dokončení práce. Také ji děkuji za její cenné připomínky, doporučení, náhledy do zpracovávaného tématu práce a nespočetně konzultací. Je vždy radost pracovat s někým, kdo je za všech okolností ochotný, trpělivý a má ke studentům lidský přístup. Poděkování patří také paní **Ing. Šárce Hauzerové**, která mě v laboratoři provedla celým procesem buněčného testování připravených materiálů, byla ochotná mi poradit a vše vysvětlit, a to vše v příjemné přátelské atmosféře. Také ji děkuji za pomoc při zpracování a interpretaci výsledných dat z buněčného testování.

Také bych chtěl poděkovat paní **RNDr. Bc. Stanislavě Vrchovecké** (Oddělení environmentální chemie, CxI) za analýzu gelové permeační chromatografie a za kompletní a odborný popis jejího průběhu a výsledných dat. Za provedení analýzy diferenciální skenovací kalorimetrie a zpracování výstupních dat děkuji panu **Ing. Luboši Běhálkovi, Ph.D.** (Katedra strojírenské technologie, FS). Kvalitní snímky připravených materiálů ze skenovacího elektronového mikroskopu Zeiss byly poskytnuty od pana **Ing. Pavla Kejlara, Ph.D.** (Oddělení pokročilých materiálů, CxI), tímto mu také děkuji.

Dále bych chtěl vyjádřit velkou vděčnost mé rodině. Jejich neutuchající podporu a povzbuzení mi byly vždy oporou nejen během psaní této diplomové práce, nýbrž skrze celý můj život. Díky mé rodině jsem mohl dosáhnout všeho, čeho se mi podařilo dosáhnout a jsem vděčný za jejich obětavou oporu.

Konečně bych chtěl poděkovat za podporu mého výzkumu z projektu GAČR 23-05154S Interakce prokaryotických a eukaryotických buněk s nanovláknky s různou morfologií a strukturou.

Abstrakt

Záměrem této diplomové práce je popsat a prozkoumat různé povrchové hierarchické struktury, které se dají připravit na polymerních nanovláčkách. Cílem je vysvětlit, jak takové struktury vznikají, jak se připravují a jaké výhody přináší oproti základním neupraveným materiálům. Pro testování byl vybrán polymer polykaprolakton (PCL), který byl stejnosměrně elektricky zvlákněn. Pro zvláknění bylo použito několik polymerních roztoků o různých koncentracích a molekulových hmotnostech PCL v různých rozpouštědlových systémech. Na těchto vlákněných vrstvách byla provedena post-procesní shish-kebab úprava a následně byly materiály charakterizovány elektronovou mikroskopií, na jejímž základě bylo vybráno jen několik materiálů pro další detailní testování. Post-procesní úprava byla provedena vypařovací metodou za použití roztoku 1% w/w PCL o molekulové hmotnosti 45000 g·mol⁻¹ a 80000 g·mol⁻¹ v pentyl-acetátu. Upravené materiály byly charakterizovány pomocí průměru vláken, charakteristických veličin pro danou úpravu, diferenciální skenovací kalorimetrie, gelové permeační chromatografie a in-vitro buněčných testů. Z výsledků vyplývá, že morfologie vytvořené struktury na povrchu vláken je závislá jak na základním materiálu – na rozpouštědlovém systému a molekulové hmotnosti PCL v polymerním roztoku pro elektrické zvláknění, tak na parametrech použitého roztoku pro post-procesní úpravu. Buněčné testování na myších fibroblastech 3T3-NIH ukázalo, že shish-kebab úprava může zlepšit adhezi buněk na materiálu, ale obecně se dá pouze konstatovat, že materiál po post-procesní úpravě zůstává biokompatibilní, nijak nezhoršuje metabolickou aktivitu buněk a je tedy vhodný pro použití ve tkáňovém inženýrství. V rámci řešení této diplomové práce byl nalezen postup tvorby prozatím v literatuře detailně nepopsaných výběžků s kruhovou základnou – ostrých kuželovitých výstupků, a to i na velmi jemných elektricky zvlákněných PCL nanovláčkách.

Klíčová slova

Polykaprolakton, elektrické zvláknění, nanovláčko, post-procesní úprava, hierarchická struktura, shish-kebab, nanopóry, korálky

Abstract

The intention of the thesis is to describe and investigate various surface hierarchical structures that can be prepared on polymer nanofibers. The aim is to explain how such structures are formed, how they are prepared and what advantages they bring compared to basic unmodified materials. Polycaprolactone (PCL) was selected for testing and was DC electrospun. Several polymer solutions of different concentrations and molecular weights of PCL in different solvent systems were used for the electrospinning. A post-processing shish-kebab treatment was performed on the fiber layers, and subsequently the materials were characterized by electron microscopy, based on which only a few materials were selected for further detailed testing. The post-process treatment was carried out by an evaporation method using a solution of 1% w/w PCL with molecular weights of $45000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ and $80000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ in pentyl acetate. The modified materials were characterized using fiber diameter, characteristic parameters of the treated fibers, differential scanning calorimetry, gel permeation chromatography and in-vitro cell assays. The results show that the morphology of the structure formed on the fiber surface depends both on the base material – the solvent system and the molecular weight of the PCL used for the electrospinning, and on the parameters of the solution used for the post-processing treatment. Cellular testing on 3T3-NIH mouse fibroblasts has showed that shish-kebab treatment can improve the adhesion of the cells to the material, but in general it can only be stated that the modified material remains biocompatible, does not impair cell metabolic activity and is therefore suitable for application in tissue engineering. Within the scope of the thesis, a procedure for a preparation of sharp conical circular-based protrusions, not yet described in detail in the literature, was found even on very fine electrospun PCL nanofibers.

Keywords

Polycaprolactone, electrospinning, nanofiber, post-processing modification, hierarchical structure, shish-kebab, nanopores, beads

Obsah

1	Úvod	11
2	Teoretická část.....	13
2.1	Polymerní nanovlákná.....	13
2.1.1	Technologie přípravy	14
2.1.2	Parametry stejnosměrného zvlákňování.....	18
2.2	Polykaprolakton.....	19
2.2.1	Výroba PCL.....	21
2.2.2	Nanovlákná z polykaprolaktonu.....	22
2.3	Hierarchické struktury nanovláken	24
2.3.1	Porézní struktura.....	25
2.3.2	Korálková struktura.....	28
2.3.3	Shish-kebab struktura.....	31
2.4	Shish-kebab na PCL nanovláknách	38
3	Experimentální část.....	45
3.1	Materiály a metody	45
3.1.1	Materiály a chemikálie.....	45
3.1.2	Příprava PCL nanovláken.....	46
3.1.3	Příprava shish-kebab struktur.....	48
3.1.4	Charakterizace materiálů.....	49
3.1.5	In-vitro buněčné testy.....	51
3.2	Výsledky a diskuze	53
3.2.1	Zvlákňování a plošná hmotnost vrstev.....	53
3.2.2	Shish-kebab struktury a výběr materiálů pro další testy.....	55
3.2.3	Analýza shish-kebab struktury.....	62
3.2.4	Diferenciální skenovací kalorimetrie	72

3.2.5	Gelová permeační chromatografie	73
3.2.6	Analýza in-vitro buněčných testů.....	75
3.3	Souhrnná diskuze výsledků.....	81
4	Závěr	86
	Seznam literatury	89
	Přílohy.....	98
	Příloha A.....	98
	Příloha B.....	101
	Příloha C.....	105

Seznam použitých zkratek

PCL	Polykaprolakton
PLA	Kyselina polyléčná
PC	Polykarbonát
CF	Chloroform
DCM	Dichlormethan
THF	Tetrahydrofuran
FA	Kyselina mravenčí
DMSO	Dimethylsulfoxid
CNT	Uhlíková nanotrubička
PA	Pentyl-acetát
NHSK	Nanohybridní shish-kebab (Nanohybrid Shish-Kebab)
NFSK	Nanovláknový shish-kebab (Nanofiber Shish-Kebab)
w/w	Hmotnostní koncentrační poměr
v/v	Objemový koncentrační poměr
w/v	Hmotnostně-objemový koncentrační poměr
SEM	Skenovací elektronový mikroskop
DSC	Diferenciální skenovací kalorimetrie
GPC	Gelová permeační chromatografie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
CCK-8	Cell Counting Kit 8 (testování buněčné viability)

1 Úvod

Polymerní vlákna v nano až mikro-měřítku patří v dnešní době k významně studovaným materiálům v široké oblasti aplikací. Elektrické zvlákňování nabízí univerzální možnost, jak takové materiály vyrábět nejen v laboratorním, ale i průmyslovém měřítku. Polymerní nanovlákna se dají připravit ze široké škály polymerů. Technické polymery se dají použít ve filtračních materiálech nebo elektrotechnice. Velké množství polymerů je také biokompatibilní a biodegradabilní, což je předurčuje k využití v regenerativní medicíně a tkáňovém inženýrství jako nosiče buněk, kde zastupují roli bandáží, krytů ran, výztuh cév a dále se používají i v regeneraci vnitřních tkání orgánů a kostí. Polykaprolakton a jeho směsi či kopolymery patří do intenzivně zkoumaných materiálů pro tyto aplikace. PCL se vyjímá svou biokompatibilitou a biodegradabilitou, kdy degradace díky jeho hydrofobii trvá i v řádu měsíců a let, a specifickými mechanickými vlastnostmi, jelikož je velmi tažný a elastický. Ačkoliv samotné vlákenné materiály přináší spoustu výhod pro zmíněné aplikace, tak se dají dále upravovat, což jejich využitelnost dále prohlubuje a zvyšuje. Vlákna se dají modifikovat již při samotném procesu elektrického zvlákňování úpravou parametrů, jako je například tvorba povrchových pórů či korálek. Existuje také mnoho post-procesních metod, které umožňují upravovat povrch vláken, jako je například shish-kebab úprava. Tato post-procesní úprava vytváří na povrchu vláken útvary, které mají obecně tvar kotouče obepínajícího celý obvod vlákna. Tyto kotouče se za sebou periodicky opakují a jsou orientované kolmo na osu vláken. Úprava vláken mění morfologii jejich povrchu tak, že vylepšuje jejich vlastnosti pro určité aplikace. Korálky na vláknech se dají například použít jako rezervoáry pro léčivo, které se z nich poté uvolňuje. Tím se zabývá obor cílené dopravy léčiv. Povrchové póry a shish-kebab struktura obecně zvyšují měrný povrch vláken a jeho hrubost, což se ukazuje být výhodné v medicínských aplikacích, kdy upravené materiály lépe napodobují roli mezibuněčné hmoty a buňky na ně lépe adherují a zvyšuje se také buněčná proliferace. Shish-kebab úprava se intenzivně zkoumá v oblasti regenerace kostí, jelikož mezery mezi zmíněnými kotouči mohou napodobovat mezery vyskytující se v kolagenových fibrilách. Tyto úpravy jsou však silně závislé na počáteční struktuře a morfologii základních vláken a na použité metodě, proto je důležité tyto proměnné prozkoumat a zjistit jejich vliv na výsledný materiál.

V rámci této diplomové práce je představena podrobná rešerše na téma týkající se tvorby povrchově strukturovaných polymerních nanovlákněných materiálů. Dále se práce v experimentální části zaměřuje na testování post-procesní úpravy krystalizačním roztokem na různých elektricky zvlákněných materiálech z polykaprolaktonu s cílem prozkoumat možnosti této metody a nalézt různé strukturní modifikace povrchu stejnosměrně elektricky zvlákněných nanovlákněných vrstev.

2 Teoretická část

Teoretická část má za cíl vysvětlit problematiku polymerních nanovláken, jejich vlastnosti, využití a přípravu. Je představeno několik metod přípravy nanovláken, největší pozornost je nicméně věnována elektrickému zvláknování, převážně stejnosměrnému, kde jsou vyloženy i základní parametry procesu ovlivňující morfologii nanovláken. Dále jsou popsány základní vlastnosti a příprava biokompatibilního a biodegradabilního polymeru polykaprolaktonu a jeho využití včetně nanovláken. Druhá část se věnuje různým hierarchickým strukturám na nanovlákněch, kde je vysvětlen fyzikální princip mechanismu vzniku těchto struktur, faktory ovlivňující jejich konečnou podobu, možné metody přípravy a v neposlední řadě jejich využití.

2.1 Polymerní nanovlákná

Nanovlákná tvoří třídu nanomateriálů. Charakteristicky mají 2 dimenze v nanoměřítku a obecně se předponou nano označují vlákna, která dosahují průměru do 100 nm. Zda se jedná o nanovlákná však nezáleží čistě na jejich rozměrech, ale především na změně jejich vlastností oproti makroskopickým protějškům. Proto nese většina materiálů označení nanovláken i přesto, že vlákna dosahují průměrů i několika stovek nanometrů. Oproti makroskopickým vláknům mají mnohem větší měrný povrch a mezi další významné vlastnosti patří vysoká porozita, variabilní velikost pórů nebo poměrně nízká hustota nanovláknenných vrstev. Díky tomu je lze použít v různých aplikacích a v různých oborech jako například v biomedicíně (léčení různých povrchových zranění nebo bio-senzory), tkáňovém inženýrství (náhrada a oprava poškozených tkání orgánů, kostí, nervů či cév a mnoho dalších), farmacii (cílená doprava a uvolňování léčiv), filtraci (čištění vody či separace vody od nepolárních látek), v elektrotechnice (ochrana proti korozi a elektromagnetické interferenci), v bateriích jako porézní elektrody nebo v textilních ochranných produktech. Díky velkému měrnému povrchu mají také nanovlákná obnažené větší množství funkčních skupin polymerních řetězců, což je předurčuje k účinné funkcionalizaci, která dále zvyšuje potenciál jejich použití. Nanovlákná se dají připravit mnoha metodami ze široké škály syntetických i přírodních polymerů s různými vlastnostmi. Přírodní polymery jako chitosan nebo přírodní hedvábí jsou biokompatibilní a bioaktivní, a proto nachází využití hlavně v biomedicínských

aplikacích. Oproti syntetickým však mají horší mechanické a špatně reprodukovatelné vlastnosti, kvůli čemuž se s výhodou využívají i biodegradabilní a biokompatibilní polymery jako polykaprolakton, kyselina polyglykolová a mnoho dalších. Syntetické polymery se využívají i v technických aplikacích, jmenovitě například polyamid 6.6 (nylon) v ochranných oděvech a membránách nebo polyvinylidenfluorid ve filtraci. [1, 2, 3, 4, 5]

2.1.1 Technologie přípravy

Příprava nanovláken je už poměrně dlouho známý jev, kdy už na konci 19. století připravil Charles V. Boys nanovláčka o průměru přibližně 250 nm. Jednalo se o zajímavý nápad s roztaveným křemenem umístěným na šípku kuše a jeho následným vystřelením, což by se dalo označit jako metoda tažení (drawing). [3, s. 9]

Technologie přípravy jednotlivých nanovláken tažením z polymerní taveniny či roztoku využívá k přetváření kapaliny do podoby vláken mechanickou sílu, kdy je po dotyku tenké pipety nebo skleněné tyčinky s polymerním roztokem nebo taveninou pipeta pomalu odtahována, což vede k prodlužování a zužování vlákna a postupnému tuhnutí či vysušování. Schéma této technologie je vidět na Obrázku 1C. Použitý materiál by měl být vysoce viskoelastický, což zmenšuje škálu použitelných polymerů a také disponuje metoda nízkou produktivitou, vhodnou spíše pro laboratorní použití. [5 s. 5, 6 s. 6]

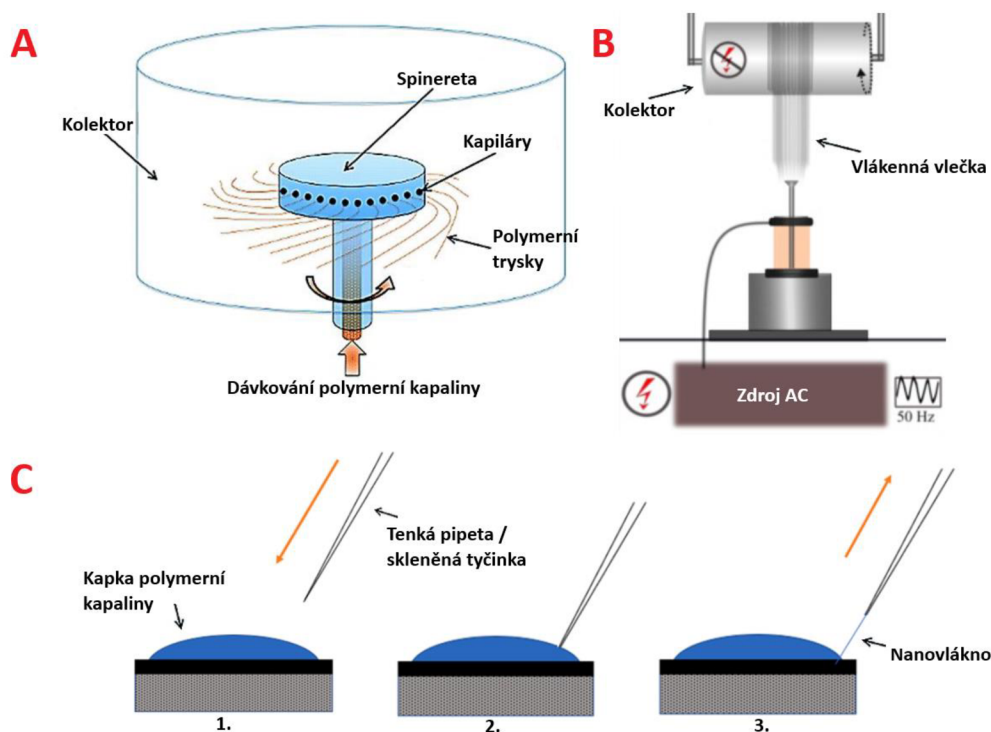
Zajímavými možnostmi přípravy nanovláken jsou template synthesis (syntéza podle šablony) či self-assembly (samospořádávání). Syntéza podle šablony je mnohostranná metoda umožňující přípravu nanočástic, nanovláken, nanotrubiček či nanotyčinek. Pro přiblížení metody se dá replikace DNA označit také jako syntéza podle šablony. Jako šablona může být použita například membrána s póry v nanoměřítku, skrze kterou se protlačí polymerní roztok do srážecího roztoku, kde vzniknou nanovláčka v délce maximálně několika mikrometrů [7, s. 41]. Šablona však může být mnohem inovativnější, jako například využití elektricky zvlákněných vláken k přípravě nanovláken z oxidů přechodných kovů ke zlepšení elektrochemických vlastností elektrod [8]. Self-assembly je metoda, která využívá mezimolekulárních vazebných sil, jako jsou vodíkové můstky, van der Waalsovy interakce či disperzní síly ke skládání menších molekul, které se organizují do větších celků a ve výsledku tvoří poté mimo jiné i nanovláčka. Výhodou je velmi malý průměr vláken a dobrá

modifikovatelnost, ale jedná se o velmi složitý a zdlouhavý proces a produktivita je velmi malá. [3, 5]

Odstředivé zvlákňování je poměrně jednoduchá metoda, která je díky absenci elektrického pole bezpečnější a produktivnější než elektrické zvlákňování a také je použitelná pro širší spektrum polymerů a jejich roztoků, jelikož nezáleží na jejich elektrických vlastnostech. Princip je známý už velmi dlouho, jelikož tímto způsobem vzniká například cukrová vata, na jejíž výrobu byl stroj patentován na konci devatenáctého století. Jak název napovídá, tak tento způsob přípravy nanovláken využívá jevu, kdy je ze zásobníku vytlačován odstředivou silou polymerní roztok nebo tavenina skrze tenké kapilární otvory, a třením o vzduch se vytahují a za odpařování rozpouštědla tuhnou nanovlákná, která se zachytí na kolektor, viz Obrázek 1A. Struktura a průměr výsledných vláken závisí na obvodové rychlosti spinnerety, tedy rotující zvlákňovací jednotky, na průměru kapilár a vlastnostech polymeru a polymerního roztoku. Dále může být odstředivé zvlákňování kombinováno se stejnosměrným elektrickým zvlákňováním, čímž se lépe usměrní nanovlákná na kolektor a díky vlivu bičování neboli ohybové nestability projevující se typicky při elektrickém zvlákňování, se i zmenšují průměry nanovláken. [3 s. 42, 6 s. 7]

Kromě stejnosměrného elektrického zvlákňování (DC zvlákňování) je intenzivně zkoumáno i střídavé elektrické zvlákňování (AC zvlákňování). Oproti DC zvlákňování není nutné použití elektricky aktivního kolektoru, což přináší technologické výhody, například při kombinaci s jinými technologiemi, a další možnosti aplikace. Varianta AC zvlákňování využívající kapiláry má omezenou produktivitu, proto je větší pozornost věnována zvlákňování z volné hladiny, kde vzniká množství trysek formujících vláknennou vlečku připomínající stoupající oblak jemného kouře. Schéma této metody je vidět na Obrázku 1B. Oblak se v prvních několika centimetrech pohybuje směrem pryč od zvlákňovací elektrody díky tvorbě virtuální proti-elektrody, která je důsledkem neustálých změn polarizace půlvln elektrického signálu. Nabití skupin vlečky se tedy rychle střídá mezi záporným a kladným a do vzdálenosti 2–5 centimetrů se náboj skupin vzájemně neutralizuje. Dalším důležitým jevem při AC zvlákňování je elektrický vítr, který brání zpětné přitažlivosti vláken ke zvlákňovací elektrodě a dále pohání pohyb vlečky až do vzdálenosti kolem 30 cm. Elektrický vítr je proud vzduchu hnaný stejně nabitými ionty vzniklými korónovými

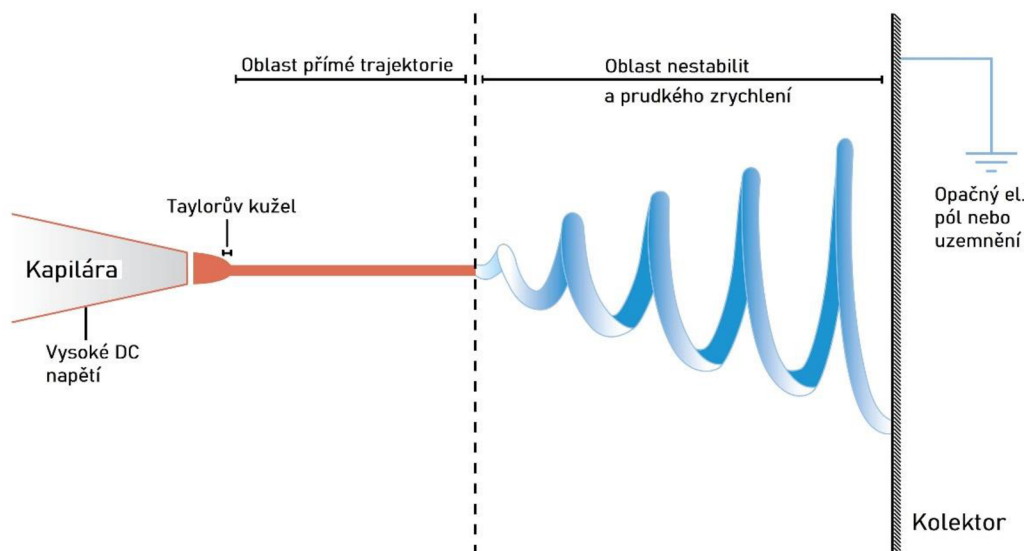
výboji na elektrodě. Po ztrátě hybnosti musí být nanovláknna zachycena na kolektor, který může být konstruován například jako rotující válec, příze či mřížka s odsáváním. Oproti DC zvlákňování jsou většinou výsledná vlákna více „kudrnatá“, zamo- taná do sebe a podél délky se znatelně mění jejich průměr. Na rozdíl od DC varianty se při AC zvlákňování po každé půlvlně elektrického signálu tvoří nová polymerní tryska, což klade vyšší nároky na elektrické vlastnosti polymeru a rozpouštědel, aby se vůbec za krátký okamžik (určený frekvencí elektrického napětí) stihla tato tryska vytvořit. Například při frekvenci 50 Hz trvá jedna půlvlna sinusového tvaru signálu 10 ms. Z hlediska vysoké produktivity se tato varianta elektrického zvlákňování jeví jako velmi vhodná pro průmyslové uplatnění. [3, 9]



Obrázek 1: Schémata technologií výroby nanovláken. A) Odstředivé zvlákňování [10], B) AC elektrické zvlákňování [11] a C) Technologie tažení nanovláken (drawing) [5]

Technologie zvlákňování za přítomnosti stejnosměrného elektrického pole, tedy DC zvlákňování, může být provozována také ve dvou variantách, a to s kapilárou anebo na volné hladině. Kapilární varianta je vhodná laboratorní metoda, jelikož umožňuje zpracovávat pouze malá množství polymerních kapalin bez většího odpařování rozpouštědla z polymerního roztoku v zásobníku, avšak má velmi nízkou produktivitu a možné problémy s ucpáváním kapiláry. Pro průmyslové použití je více využíváno zvlákňování z volné kapaliny. Zvlákňování je možné provést jak z taveniny, tak mnohem hojněji z polymerního roztoku [3, s 25]. Tato metoda je založena na elektro-

hydrodynamickém procesu využívajícího pro zvlákňování elektrických sil, kdy se pomocí elektrického tlaku překonává kapilární tlak ve zvlákňované polymerní kapalině způsobený povrchovým napětím. Základní aparatura pro DC zvlákňování je poměrně jednoduchá, může se skládat ze zvlákňovací elektrody připojené na zdroj elektrického napětí, uzemněného kolektoru a zásobníku s dávkováním polymerní kapaliny. Po sepnutí elektrického napětí se na povrchu kapaliny zvyšuje hustota náboje stejné polarizace, což způsobí elektrostatické odpuzování. Aby se snížilo odpuzování, je potřeba zvětšit plochu kapky a tím snížit plošnou hustotu náboje. Povrchové napětí však reprezentuje sílu, která se snaží povrch kapky co nejvíce zmenšit. Konkurencí těchto dvou sil je tedy povrch kapky deformován až do tvaru Taylorova kužele. Při překonání kritické hodnoty intenzity elektrického pole na povrchu následně z Taylorova kužele vylétne elektrickým polem urychlená polymerní tryska, tažená k opačně nabitému kolektoru. V první části letí tryska přímou trajektorií v řádu několika jednotek až desítek milimetrů s vysokou rychlostí v rozmezí $1-15 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ za kontinuálního ztenčování. Kvůli viskoelastické síle a povrchovému napětí je rychlost trysky utlumována až do bodu, kdy může být přímý pohyb narušen a vytvoří se nestabilita řízená elektrostatickým odpuzováním nábojů na jejím povrchu a jejich interakcí s vnějším elektrickým polem. Mezi tyto nestability se řadí axisymetrická Plateau-Rayleighova nestabilita rozdělující trysku na kapky kvůli povrchovému napětí. Tento jev je nežádoucí a je potlačován vyšším elektrickým napětím. Druhá nestabilita je také axisymetrická a objevuje se při vyšším elektrickém napětí. Třetí a nejvýznamnější nestabilitou je tzv. bičovací, která je odpovědná za chaotické ohýbání trysky. Schéma stejnosměrného elektrického zvlákňování je uvedeno na Obrázku 2. Vývoj těchto jednotlivých nestabilit závisí na zvlákňovacích parametrech a vlastnostech polymerního roztoku. Díky bičovací nestabilitě se trajektorie vyvine do tvaru rozšiřující se spirály, což také výrazně prodlouží celkovou dráhu trysky, a to způsobí její prodlužování a ztenčování. Pokud je vzdálenost od kolektoru dostatečně velká a tryska již kontinuálním odpařováním rozpouštědla neztuhla (což by znemožnilo existenci zmíněných nestabilit), tak se můžou objevit další řady bičovacích nestabilit, dále prodlužujících trajektorii trysky. [12]



Obrázek 2: Schéma stejnosměrného elektrického zvlákňování z kapiláry, upraveno z [13]

2.1.2 Parametry stejnosměrného zvlákňování

Průběh DC zvlákňování se dá ovlivnit nastavením parametrů okolního prostředí, zvlákňované polymerní kapaliny a procesu. Okolní teplota zvyšuje rychlost odpařování rozpouštědel, ale na druhou stranu snižuje viskozitu kapaliny. Zvýšení teploty většinou snižuje konečný průměr nanovláken. Vlhkost okolního vzduchu může snížit rychlost odpařování rozpouštědel a také vybijet povrchový náboj trysky důležitý pro její urychlování v elektrickém poli. Vlhkost okolního vzduchu ovlivní proces zvlákňování v závislosti na tom, zda se jedná ve zvlákňované polymerní kapalině o polární či nepolární rozpouštědlo a polymer. U polárních polymerů se s vlhkostí obecně průměr zmenšuje (pomalejší odpařování a tuhnutí) a u nepolárních se zvětšuje (rychlejší srážení a tuhnutí). U nepolárních polymerů se s vysokou vlhkostí mohou začít objevovat na vláknech póry kvůli kondenzaci vody na polymerní trysce a u polárních zase korálky nebo kapky. Více je o těchto fenoménech zmíněno v kapitolách 2.3.1 a 2.3.2. později. [4, 14]

Koncentrace polymerního roztoku ovlivňuje jeho povrchové napětí a zejména viskozitu. Pokud je moc nízká a tím je i příliš nízká viskozita, tak se kvůli malé soudržnosti polymerních řetězců netvoří vlákna vůbec nebo na sobě mají výrazné kulovité defekty, tzv. korálky. Čím je viskozita polymeru nižší, tím je obecně menší průměr konečných nanovláken. Avšak pouze do určité meze, u příliš nízkých viskozit nedochází k tvorbě vláken vůbec a nastává tzv. elektrické rozprašování. Viskozita je také v korelaci s molekulovou hmotností polymeru. Čím vyšší je molekulová hmotnost,

tím jsou do sebe polymerní řetězce více zamotány a tím je vyšší viskozita roztoku. Je tedy u každého procesu potřeba optimalizovat vzájemně tyto 3 parametry, aby se tvořila hladká vlákna o požadovaném průměru. Rozpouštědlo v polymerním roztoku určuje jeho povrchové napětí, a to ovlivňuje kritickou hodnotu intenzity elektrického pole pro započítání zvlákňování. Příliš vysoké povrchové napětí způsobuje na vláknech tvorbu korálek z důvodu větší tendence molekul rozpouštědla v polymerní trysce, pohybující se od zvlákňovací elektrody ke kolektoru, snižovat povrch. Povrchové napětí se dá také snížit například povrchově aktivními látkami. Jak již bylo zmíněno, tak prodloužení polymerní trysky závisí na odpuzování povrchových nábojů. Větší elektrická vodivost polymerního roztoku vede k větší povrchové hustotě náboje a silnějšímu odpuzování. Dalším efektem je také silnější bičovací nestabilita. Zvyšující se elektrická vodivost roztoku prokazatelně zmenšuje průměr nanovláken a dá se zvýšit přidáním vhodných rozpouštědel či iontových solí. [4, 15]

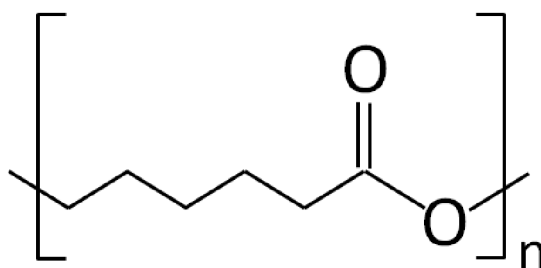
Morfologie vláken vzniklých DC zvlákňováním závisí také na aplikovaném elektrickém napětí a typu a rychlosti dávkování polymerního roztoku. Vliv elektrického pole je poněkud spekulativní, jelikož jeho vyšší hodnota někdy způsobí zmenšení a někdy zvětšení průměru vláken. Vyšší hustota náboje a větší intenzita elektrického pole způsobují silnější nestability prodlužující dráhu letu, ale na druhou stranu se zkracuje doba letu a je ze zásobníku vytahován skrze trysky větší objem polymerního roztoku. Příliš vysoké elektrické napětí také může stát za větší tendencí tvorby korálek. Dále bylo dokázáno, že optimalizace elektrického napětí může zvýšit míru orientace polymerních řetězců a tím krystalinitu polymerních vláken vytvářených ze semikrystalických polymerů. Dávkování roztoku se preferuje nižší, aby měl dostatek času na polarizaci a tryska na odpaření rozpouštědla. Pokud je kombinováno velké dávkování a vysoké elektrické napětí, může tryska vytahovat příliš velký objem roztoku a rozpouštědlo se nestihne dostatečně odpařit, což vyvolá nežádoucí slepování vláken. [4, 15]

2.2 Polykaprolakton

Polykaprolakton (PCL) patří do kategorie biodegradabilních, biokompatibilních a netoxických polymerů a byl poprvé syntetizován již v 30. letech 19. století při výzkumu syntetických polymerů degradovatelných mikroorganismy. Jedná se o alifatický polyester s chemickou strukturou, viz Obrázek 3. Díky vysoké mobilitě

polymerních řetězců a slabými mezimolekulárními interakcemi má oproti dalším polyesterům jako kyselina polymléčná či polyglykolová výrazně nižší hodnoty teploty skelného přechodu a tání, přibližně $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, respektive $56\text{--}65\text{ }^{\circ}\text{C}$ [16, s. 16, 17, s. 2]. Tyto vlastnosti mimo jiné způsobují jeho poměrně vysokou semikrystalinitu, přibližně 50–60 %. PCL má také zajímavé mechanické vlastnosti. Oproti zmíněným protějškům je měkčí a tažnější, což ho dělá velmi elastickým. Samotný PCL má Youngův modul kolem 200–400 MPa a pevnost v tahu v jednotkách až stovkách megapascalů [17, s. 2]. Běžně dostupné molekulární hmotnosti PCL jsou v rozmezí pár tisíců až $80000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, což výrazně ovlivní jeho vlastnosti, kdy může být křehký až pevný a měkký. Například PCL o číselné střední molekulové hmotnosti $14000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ není DC zvláknováním samostatně zvláknitelné. PCL se také vyzimá velmi vysokou mísitelností se širokou škálou polymerů, a tak se často používá do polymerních směsí, tzv. blendů, nebo kopolymerů k modifikaci různých mechanických či fyzikálně-chemických vlastností. Polykaprolakton je dobře rozpustný ve většině aromatických, chlorovaných a polárních rozpouštědlech jako například chloroformu (CF), dichlormethanu (DCM), benzenu nebo toluenu, málo rozpustný v acetonu, kde je potřeba roztok zahřát, či dimethylformamidu (DMF) a nerozpustný v alifatických uhlovodících a alkoholech. [16, 18]

Z chemické struktury je také zřejmé, že se jedná o hydrofobní polymer, což dohromady s vyšší krystalinitou způsobuje poměrně dlouhou dobu degradace, pohybující se většinou v řádech jednotek let. PCL je tedy vhodný pro dlouhodobější medicínské aplikace. Dlouhodobá degradace je mimo jiné způsobena tím, že PCL je biodegradabilní pouze za přítomnosti enzymů vhodných mikroorganismů, přičemž v živočiších probíhá až do molekulové hmotnosti kolem $3000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ pouze hydrolytickým štěpením. Poté je intracelulárně vstřebán a vyloučen z těla ven. [16, 18]



Obrázek 3: Chemická struktura polykaprolaktonu [19]

Polykaprolakton je vhodný pro použití v široké škále aplikací. Jednou z prvních byla cílená doprava léčiv, kde se s výhodou využívá vysoké permeability pro velké množství léčiv. Samotný PCL se hodí na dlouhodobější uvolňování, většinou přesahující 1 rok. Tvorbou polymerních směsí či kopolymerů se však dá upravit kinetika degradace a tím přizpůsobit materiál pro požadovanou aplikaci. Jako prostředek dopravení se používají například mikročasticové nebo nanočasticové systémy, které mohou být přizpůsobeny například k uvolňování v orgánech s optimální dobou degradace, což zvýší účinnost a sníží frekvence podávání látky. Rai a kol. [20] zkoumali léčbu infekce způsobenou kmenem zlatého stafylokoka pomocí hybridu PCL s léčivem vankomycinem. In-vitro testy ukázaly konstantní vytrvalé uvolňování léčiva a z výsledků in-vivo testů na králících vyplývá, že byla léčba efektivnější než při použití samotného vankomycinu a bez vedlejších příznaků poškození okolní tkáně. Dále je PCL zkoumán jako obalový materiál, jelikož je ale poměrně hodně propustný pro kyslík i vodní páru, tak je toto použití velmi omezené. To se však dá výrazně zlepšit přidáním jiných polymerů, například chitosanu, škrobu či celulózy. Ačkoliv je tato oblast stále v raném vývoji, tak již existuje několik firem vyrábějících obalové folie obsahující PCL. Jedná se například o BioPlastics z Nizozemí produkující biodegradabilní pytle ze směsi PCL se škrobem nebo Daicel Chemical Industries z Japonska a jejich směs PCL s acetylcelulózou. [16, 21, 22]

2.2.1 Výroba PCL

Polykaprolakton může být připraven dvěma způsoby. Nejčastěji je vyráběn polymerizací za otevření kruhu (ROP) z ϵ -kaprolaktonu, polykondenzace kyseliny 6-hydroxyhexanové je však také možná. Polykondenzace může být provedena bez jakýchkoliv katalyzátorů ve vakuu, které z reakční směsi odstraňuje vodu a tím posouvá rovnováhu směrem k tvorbě polymeru nebo také katalyzována enzymem lipázou. Tento způsob výroby poskytuje polymer s vyšším stupněm polydisperzity a nižší molekulovou hmotností (do $10000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), a proto je preferována polymerizace za otevření kruhu. Mezi ROP patří velké množství různých mechanismů, jakými je možno PCL připravit, zde však budou popsány jen ty nejdůležitější. Obecně se dělí na aniontové, kationtové a koordinační mechanismy, ale radikálová ROP z 2-methylen-1,3-dioxepanu byla také omezeně zkoumána a vyjímá se možností kopolymerizace s polyvinylem a také vyšší mírou větvení. Důležitým aspektem při pozdějších

fázích průběhu ROP je intermolekulární a intramolekulární transesterifikace, tvořící cyklické řetězce a zároveň zvyšující polydisperzitu. [17, 21]

Nejčastěji používaný katalyzátor polymerizace za otevření kruhu je kombinace nukleofilní sloučeniny (většinou alkoholu) s oktoátem cínatým, který je efektivní, dobře rozpustný v organických rozpouštědlech a poskytuje vysoké molekulové hmotnosti výsledného polymeru. Na druhou stranu vyžaduje vyšší reakční teplotu, což zapříčiňuje zvýšenou míru zmíněných nežádoucích transesterifikací. Rostoucí polymerní řetězec je vázán na atom cínu skrze alkoxidovou vazbu a použitý alkohol zahajuje reakci tvorbou komplexu s oktoátem a výrazně ovlivňuje průběh a výsledek reakce. Podrobněji je průběh reakce popsán autory v [17, s. 9]. Dále mohou katalyzátory obsahovat hliník. Takové katalyzátory jsou méně aktivní, ale poskytují lepší kontrolu na reakci. [17, 21]

Prozkoumány byly také katalyzátory založené na alkalických kovech jako sodík či lithium, které reagují s karbonylovým uhlíkem, a polymerizace se s nimi řídí aniontovým mechanismem. Polymerní řetězec opět roste skrze formaci alkoxidu. Tento způsob je však zatížen vysokou mírou transesterifikace a tudíž nízkou kontrolou nad reakcí. Kationtový mechanismus, kde se tvoří kation, který je napaden další molekulou monomeru, což vyvolá nukleofilní S_N2 substituci, probíhá s Lewisovými kyselinami [21, s. 5] a u některých katalyzátorů založených na vzácných kovech jako je například skandium. Poslední zajímavou možností je použití enzymů, například lipáz, kde vytvoří enzym s ϵ -kapolaktonem komplex a následně je za pomoci alkoholu enzym z komplexu obnoven pro další pokračování reakce. Katalýza enzymy také může v prvotní fázi probíhat mechanismem otevírání kruhu a v pokročilejší fázi přejít do polykondenzace, kdy je důležité kontrolovat podíl vody v reakci, aby bylo dosaženo nižší polydisperzity a zároveň vyšších molekulových hmotností polymeru. [17]

2.2.2 Nanovlákná z polykaprolaktonu

V této části bude zmíněno několik aplikací PCL nanovláken v různých oblastech. Dle databáze Web of Science po zadání klíčových slov „nanofibers“ a „polycaprolactone“ bylo od roku 2002 publikováno téměř 2600 odborných článků s těmito klíčovými slovy. Od roku 2002 až do roku 2023 měly počty publikovaných článků výrazně

vzrůstající tendenci. Většina publikací měla medicínskou aplikaci, stejně tak jako dále vybrané stručně popsané studie.

Autoři v [23] zkoumali použití PCL nanovláken v regeneraci srdečního svalu a rozdíl v efektivitě mezi uspořádaně srovnanými a náhodně orientovanými vlákny. Byly využity kmenové buňky z lidské tukové tkáně nanesené na vrstvu PCL nanovláken o průměru v rozmezí 450–800 nm, která byla nejdříve ošetřena plazmou kvůli zvýšení hydrofilnosti materiálu. MTT test ukázal, že oproti kontrole vzrostla životaschopnost i rychlost proliferace buněk a významně vyšší byly tyto hodnoty pro vzájemně uspořádaná vlákna. Expresí genů spojených s diferenciací byly také obecně výrazně vyšší než u náhodně uspořádaných vláken. Autoři navrhli hypotézu, že se tyto kmenové buňky ve vhodném prostředí diferencují do buněk velmi podobných buňkám srdečního svalu a že díky tomuto přístupu zůstanou buňky přilnuté na materiál, což by snížilo ztrátovost buněk a zlepšilo efektivitu regenerace srdeční tkáně oproti běžné metodě využívající injekci živých buněk přímo na poškozené místo. Úprava PCL vláken pomocí plazmy byla provedena i autory v [24], kde zkoumali in-vitro charakteristiky PCL nosičů pro regeneraci kostní tkáně na preosteoblastech. Jelikož zvláčkňovali z vysoce koncentrovaných roztoků PCL v acetonu (20–30 %), tak se jednalo o mikroválka o průměrném průměru 2,34 μm a po úpravě 2 různými typy plazmy pak 1,76 μm a 2,16 μm . Negativně nabitá skupina, jako karboxylová a karboxylová, vzniklé plazmatickou úpravou pozitivně ovlivňují adhezi buněk a tudíž i rychlost jejich proliferace oproti neupraveným vláknům. Diferenciace buněk byla měřena na základě aktivity enzymu alkalické fosfatázy, kde dle výsledků byla po 8 dnech jeho aktivita výrazně vyšší na nanovlákněch, než u kontroly a na upravených vlákněch dokonce ještě vyšší. Jako výhodné se také jeví připravit nanoválka s hydroxyapatitem či oktacalcium-fosfátem, což zvyšuje drsnost jejich povrchu a hydrofilitu. Z výsledků studie [25] vychází, že buňky na tento povrch lépe adherují a vykazují vyšší míru proliferace. [23, 24]

Zajímavou aplikací je také hojivý obvaz na rány s propolisem zkoumaný autory v [26]. Propolis je materiál produkovaný včelami, který se skládá hlavně z různých pryskyřic, vosku a olejů a obsahuje také přes 300 bioaktivních látek, jako jsou polyfenoly, terpeny, steroidy a další, díky čemuž vykazuje antibakteriální, antivirové, antioxidantní a další vlastnosti. Autoři testovali různé koncentrace propolisu ve

zvlákňovacích roztocích. Zjistili, že se díky propolisu zvýšila hydrofilita PCL nanovlákných vrstev, což je pro obvez žádoucí. Díky zvýšené hydrofilite se také oproti základnímu materiálu zvýšily aktivita, adheze, životaschopnost, růst a proliferace buněk lidských dermálních fibroblastů. Část propolisu se ze začátku uvolňovala velmi rychle a v druhé fázi postupně a pomaleji. Ze studie tedy vychází, že pro biomedicínské aplikace propolis obecně zlepšuje vlastnosti polykaprolaktonových vláken. [26]

Dále jsou nanovláknenné PCL nosiče vhodné v nervovém tkáňovém inženýrství, kde se dají využít jako náhrada či k regeneraci tkáně. Zkoumány byly například aktivita podpurných astrocytů na vrstvě PCL, podpora růstu a obnovy nervové tkáně na kompozitních PCL vláknech s jádrem z hovězího sérového albuminu s nervovým růstovým faktorem nebo zlepšená adheze a proliferace Schwannových buněk na nanovláknenném nosiči ze směsi PCL a chitosanu, který zvyšuje hydrofilitu materiálu. [27]

Nanovláknena z PCL jsou široce využívána pro tvorbu a testování materiálů pro tkáňové inženýrství v celé řadě oblastí. Nanovláknenné materiály z PCL tvoří nosiče pro buňky pro regeneraci kostí, kůže, chrupavek, cév, nervů a mnoho dalších. Jedná se však o poměrně hydrofobní materiál, a tak se v medicínských aplikacích nanovláken z PCL s výhodou nevyužívají pouze základní válcovitá nanovláknena, ale vytvářejí se na nich strukturně modifikované povrchy, které mohou také obsahovat přísady různých aktivních či neaktivních aditiv. [18, 28, 29]

2.3 Hierarchické struktury nanovláken

Elektrické zvlákňování je relativně jednoduchá metoda pro výrobu dlouhých kontinuálních nanovláken kruhového průřezu, tedy válcovitých vláken s hladkým povrchem. Ta se však dají upravovat, a to buď přímo úpravou podmínek při zvlákňování, nebo post-procesní úpravou. První způsob může poskytnout například strukturovaná vlákna s nanopóry či korálky. Druhý způsob nabízí další široké spektrum možností skrze tepelné úpravy či úpravy v rozpouštědlech, jako je například tvorba shish-kebab struktur.

2.3.1 Porézní struktura

Jednou z jedinečných vlastností nanovláknenných vrstev je jejich velká porozita neboli hodně relativně malých mezer mezi jednotlivými vlákny. Porézní jsou kromě výjimek všechny takové vrstvy. Tato kapitola se však bude zabývat póry na povrchu samotných vláken nebo zcela skrze ně, označovaných jako „nanopóry“, které dále zvyšují měrný povrch vláken. [28]

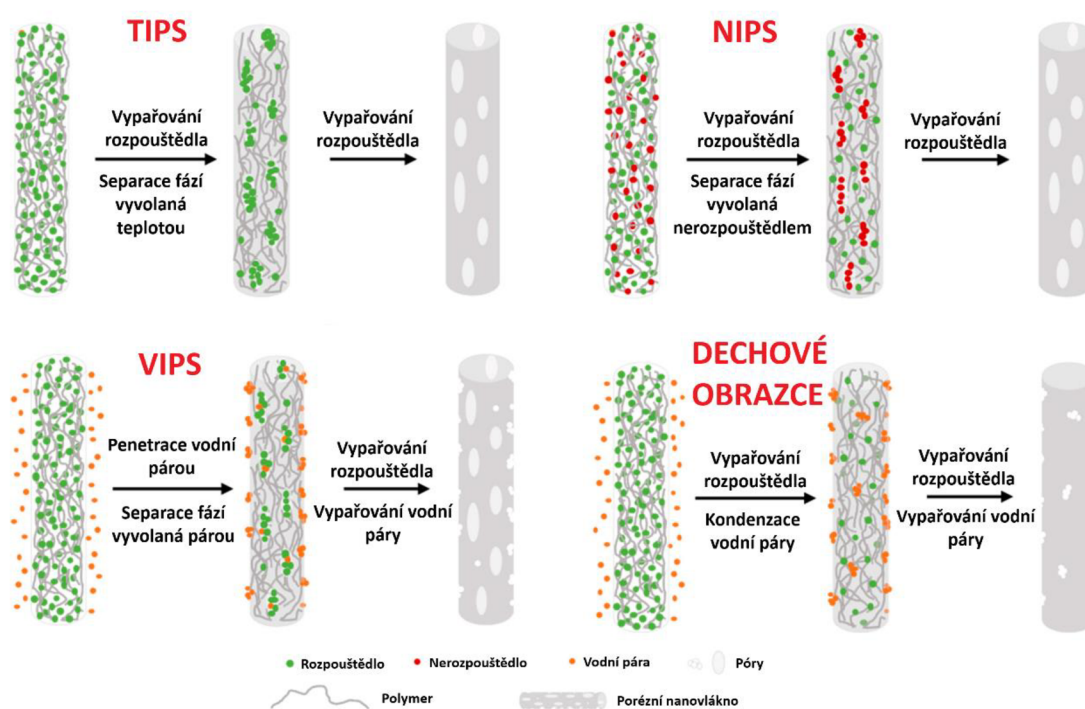
V jednom z prvních výzkumů povrchově porézních vláken se zabývali autoři v [30], kteří zkoumali formaci nanopórů na polykarbonátu (PC), kyselině polymléčné (PLA) a polyvinylkarbazolu rozpuštěných ve vysoce těkavém DCM. Tvar pórů na PC byl kruhový, zatímco na PLA elipsoidní. Tento jev byl vysvětlen prudkým odpařováním rozpouštědla ze vznikajících vláken, což způsobilo fázovou separaci polymeru a rozpouštědla. To vyústilo v tvorbu oblastí bohatších na rozpouštědlovou fázi, což zapříčinilo vznik pórů. Další výzkumy však této struktury s použitím stejných materiálů nedosáhly, naopak se póry tvořily v různých rozpouštědlových systémech. Vystává tedy otázka, zda za tvorbou pórů nestojí další fyzikální jevy způsobující jejich různé tvary a zda je možné použít i různá rozpouštědla. Kromě správného rozpouštědlového systému je také nutné započítat vliv parametrů okolního prostředí jako je vlhkost a teplota. [28]

Na tvorbě nanopórů se podílí několik mechanismů a je možné využít více z nich najednou. První byl zmíněn v předchozím odstavci – tepelně indukovaná fázová separace (Thermally Induced Phase Separation – TIPS), kdy prudkým snížením teploty dochází k termodynamické nestabilitě systému a následně k separaci fází, přičemž se tvoří kapičky bohaté na rozpouštědlo, které po svém vypaření zanechají v povrchu vláken póry, viz Obrázek 4. Jelikož je zde rozdíl teplot hnací silou, tak se tento mechanismus dá podpořit velkým rozdílem teplot mezi zvláknovacím roztokem či vlákny a kolektorem. Druhým mechanismem je fázová separace indukovaná špatným rozpouštědlem (Non-solvent Induced Phase Separation – NIPS), kde musí být použit rozpouštědlový systém s těkavým rozpouštědlem a méně těkavým nerozpouštědlem daného polymeru. K fázové separaci dochází v důsledku rychlejšího odpařování rozpouštědla a špatné rozpustnosti polymeru v druhé složce systému, viz Obrázek 4. Fáze špatného rozpouštědla má velmi nízkou koncentraci polymeru a dojde k její disperzi ve fázi s vysokou koncentrací polymeru. Po odpaření všech

rozpouštědel zanechá tato fáze póry. Tento mechanismus může také být využit při zvlákňování polymeru z dobrého rozpouštědla do lázně špatného rozpouštědla, kde výměna rozpouštědel zapříčiní vznik pórů. Fázová separace indukovaná vodní párou (Vapor Induced Phase Separation – VIPS) je třetí mechanismus, který se objevuje při použití zvlákňovacího roztoku z hydrofobního polymeru s vodou mísitelného a málo těkavého rozpouštědla, například DMF, a v závislosti na použitém systému vyžaduje poměrně vysokou relativní vlhkost vzduchu. Netěkavé rozpouštědlo poskytuje vodní páře dostatek času, aby penetrovala polymerní trysku při zvlákňování a vlákna při usychání na kolektoru a u hydrofobních polymerů tudíž dochází k fázové separaci, což obdobně jako u dříve zmíněných jevů vede k tvorbě pórů na vláknech. Schéma průběhu tohoto mechanismu je vidět na Obrázku 4. Při použití opačné kombinace – s vodou nemísitelného těkavého rozpouštědla dochází prudkým ochlazením ke kondenzaci páry tvořící kapičky vody na polymerní trysce, které po sobě po úplném odpaření zanechají na povrchu otisk ve formě pórů. Tento jev se označuje jako „dechové obrazce“ a jedná se tedy o jakousi kombinaci mechanismů TIPS a VIPS a jeho průběh je vidět na Obrázku 4. Póry vzniklé fázovou separací mají typicky nepravidelnou strukturu, zatímco póry vzniklé dechovými obrazci mají tendenci mít pravidelnější kruhový tvar. [28]

Autoři v [31] studovali tvorbu a morfologii porézních nanovláken z polykaprolaktonu o $80000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ za použití mechanismu NIPS z různých směsí rozpouštědlových systémů s 12,5% w/v koncentrací PCL. Ačkoliv se autoři snažili aplikovat hlavně mechanismus NIPS, tak se vliv mechanismů VIPS a dechových obrazců také nedá zanedbat. Jako dobrá rozpouštědla s odlišnými vlastnostmi byla zvolena CF, DCM, tetrahydrofuran (THF) a kyselina mravenčí (FA) a k nim jako špatné rozpouštědlo s nejvyšší teplotou varu dimethylsulfoxid (DMSO). Množství dobrého rozpouštědla se pohybovalo mezi 50–100 % po 10% krocích. Elektrické zvlákňování probíhalo z kapiláry v komoře s 30–40 % relativní vlhkostí. Jako nejdůležitější parametr pro určení vhodnosti rozpouštědla se jeví jeho volatilita, tedy teplota varu, zatímco vlastnosti jako elektrická vodivost, povrchové napětí či mísitelnost s vodou dále ovlivňují morfologii nanovláken a nanopórů. Obecně byla příprava nanopórů nejspěšnější pro nižší 10–20% objemový podíl špatného rozpouštědla ve směsi. Pro objemový podíl 30–50 % se začal prosazovat jev tvorby pevného obalu polymerní trysky, který je způsoben odpařením dobrých rozpouštědel z jejího povrchu

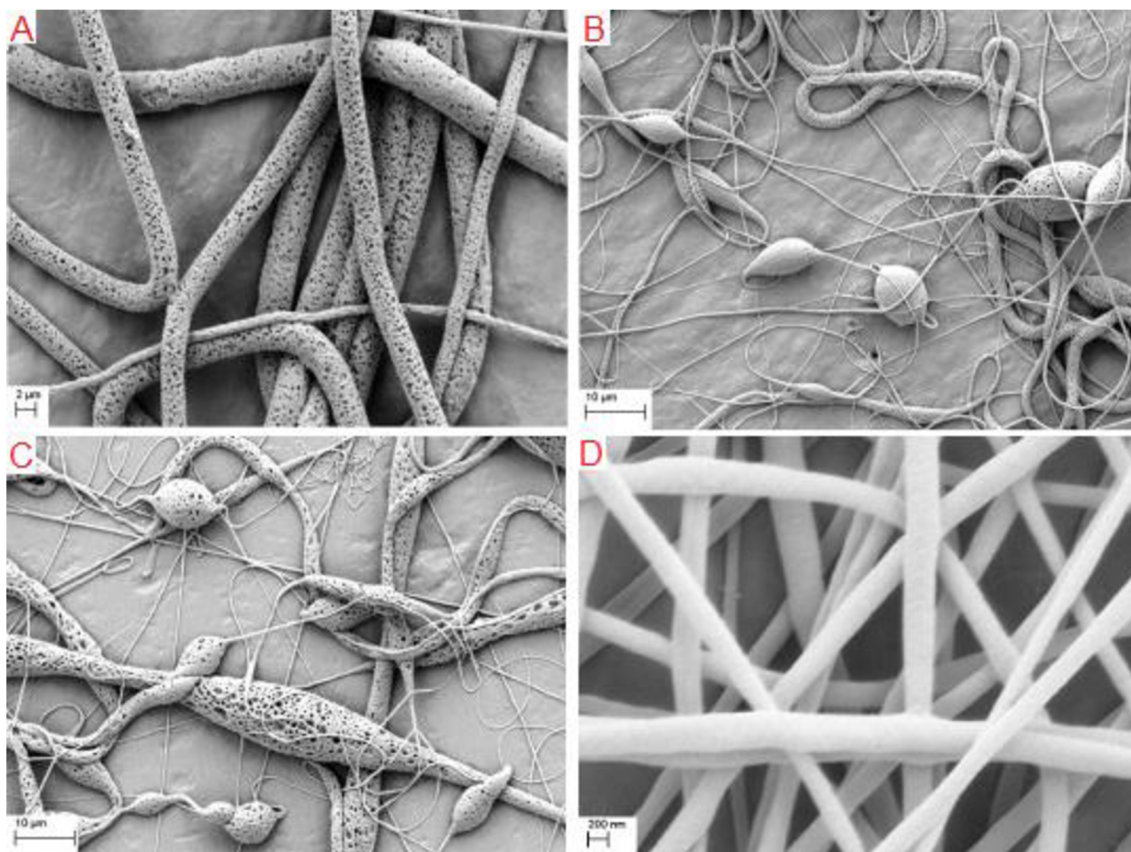
a zvýšením podílu DMSO, čímž se výrazně zhorší rychlost difuze polymerních řetězců do jádra trysky. Následně kapalně jádro neudrží tíhu pevného obalu, který se zhroutí a výsledná vlákna mají elipsoidní až páskovitý průřez. Dle výsledků, viz Obrázek 5, je nejvhodnějším rozpouštědlem CF, zatímco DCM a THF prokazovali tvorbu korálek a výraznější výskyt tvorby pevného hladkého obalu trysky a FA je v této kombinaci zcela nevhodné kvůli přílišné blízkosti teploty varu s DMSO. [31]



Obrázek 4: Schémata tvorby porézních vláken mechanismy TIPS, NIPS, VIPS a dechových obrazců. Upraveno a přeloženo z [32]

Porézní nanovláknka nachází využití hlavně v dopravě léčiv a tkáňovém inženýrství, ale i v úpravě vody při separaci od oleje nebo odstraňování organických barviv či iontů těžkých kovů. Jiang a kol. [29] zkoumali využití PCL nanovláken o $80000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ elektricky zvlákněných z 12% w/v roztoku PCL v CF a DMSO pro nápodobu kolagenových vláken pro tkáňové inženýrství. Oproti hladké povrchové struktuře vykazovala v in-vitro testech na myších fibroblastech lepší životaschopnost i proliferaci ve všech měřených dnech, zlepšenou adhezi a také rychlejší „rozšiřování“ buněk po nanovláknenné vrstvě. Ačkoliv byla vlákna stále hydrofobní s kontaktním úhlem podobným v obou případech, tak může toto zlepšení vlastností být vysvětleno hierarchickou strukturou pórů, která tvoří pro buňky vhodnou topologii povrchu. In-vitro testování na lidských endotelových buňkách přineslo stejné výsledky a dále byla u porézních vláken pozorována za použití SEM dobrá buněčná

interakce skrze tvorbu mezibuněčných fibril, které v případě hladkých vláken nalezeny nebyly. Porézní PCL nanovláknna by mohla být potenciálně použita při přípravě vrstev na podporu regenerace a růstu endotelu cév. [28, 29]



Obrázek 5: Nanopóry na PCL vláknech připravených z rozpouštědlových směsí s 10% objemovým podílem špatného rozpouštědla DMSO. A) CF, B) DCM, C) THF a D) FA. Převzato a upraveno z [31].

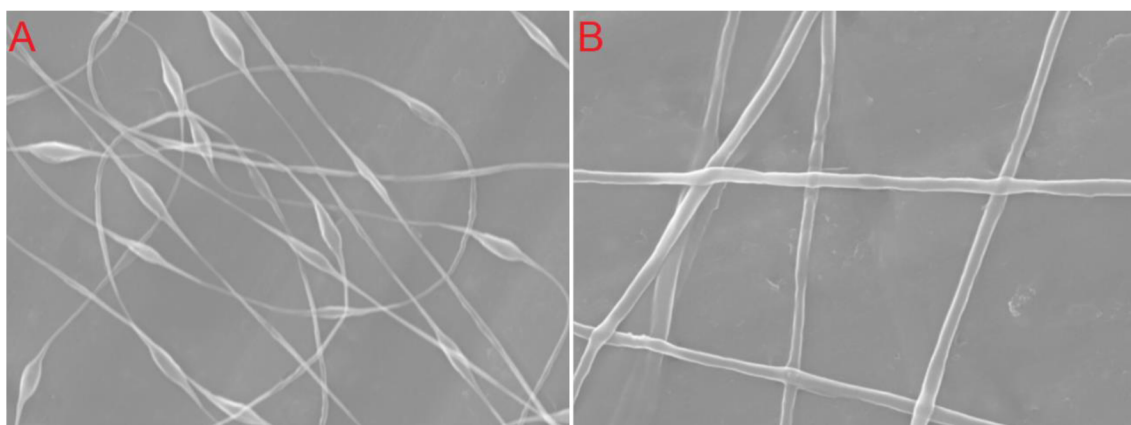
2.3.2 Koráلكová struktura

Další hierarchickou strukturou polymerních DC zvlákněných nanovláken zkoumanou pro možné zlepšení biokompatibility a efektivity nanovláken jsou korálky, které byly zpočátku, ale i dnes ve většině aplikací, vnímány jako nežádoucí jev zhoršující kvalitu a měrný povrch nanovláken. V posledních letech však získaly pozornost a objevilo se velké množství studií, které jich s výhodou využívají a hledají jejich potenciální aplikace v tkáňovém inženýrství, cílené dopravě léčiv nebo filtraci. Mechanismus vzniku těchto deformací na nanovlákněch není stále přesně teoreticky vysvětlen, ale dá se alespoň částečně popsat pomocí nestabilit vznikajících v průběhu elektrického zvláknování, které byly popsány v kapitole 2.1.1 a jejich dominance jsou ovlivněny parametry procesu, převážně pak povrchovým napětím, viskozitou a hustotou elektrického náboje (vodivostí polymerního roztoku). Tvorba

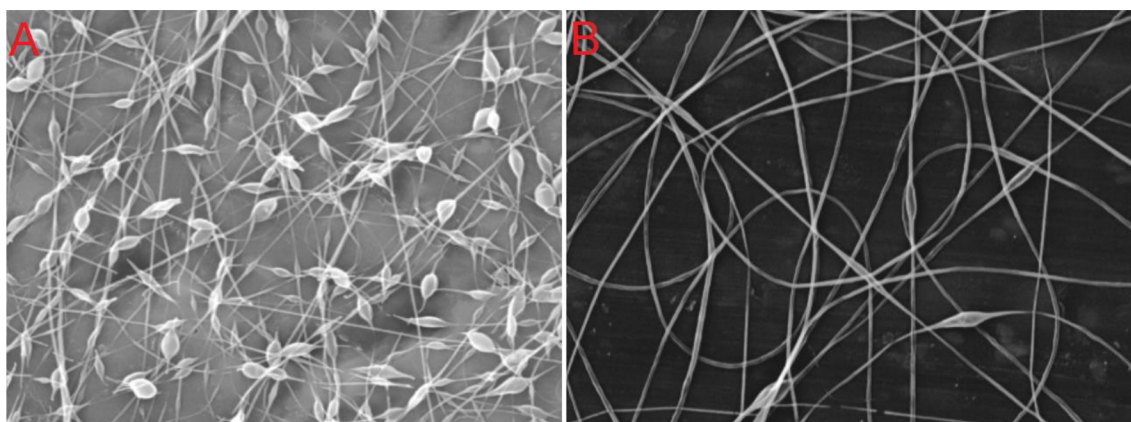
korálkovité struktury na vláknech se vyskytuje v případě dominance Plateau-Rayleighovy nestability a varikózní nestability, zatímco bičovací nestabilita tvorbě naopak zamezuje. První zmíněná nestabilita je vedena primárně povrchovým napětím, které udává kohezní sílu mezi molekulami a je fyzikální příčinou zmenšování povrchu polymerní trysky – vytvoření kapek. Varikózní nestabilita vzniká při vyšších elektrických napětích při změnách hustoty elektrického náboje a způsobuje axisymetrický rozpad trysky na kapky. [33]

Obecně ze studií vyplývá, že vyšší hodnoty povrchového napětí podporují tvorbu korálkové struktury. Například z výsledků studie Fonga a kol. [34], kteří studovali vliv poměru vody a ethanolu v polymerním roztoku polyethylenglykolu na tvorbu korálků, je zřejmé, že přídavek ethanolu do směsi snížil jeho povrchové napětí, a tedy i zabránil tvorbě korálků, viz Obrázek 6. Viskozita udává vnitřní tření mezi molekulami, které vzniká u polymerních roztoků hlavně díky zapletení polymerních řetězců do sebe, což zabraňuje pohybu kapaliny a působí proti povrchovému napětí. Viskozita je hlavně ovlivněna koncentrací polymeru a jeho molekulovou hmotností. Čím větší jsou tyto parametry, tím je obecně vyšší viskozita roztoku a nižší vliv Plateau-Rayleigha a varikózní nestability. Gupta a kol. [35] zkoumali poměr koncentrace a kritické koncentrace pro zapletení řetězců u polymethylmethakrylátu v dobrém rozpouštědle a z výsledků vychází, že při poměru koncentrací 1–3 byl roztok příliš zředěný a při elektrickém zvláknění se tvořily pouze polymerní kapky. V rozmezí poměrů 3–6 se jednalo o středně zředěný roztok, který poskytoval vlákna s korálky. U polymerních roztoků s poměrem větším než 6 již bylo zapletení molekul a viskozita dostačující na to, aby se tvořila hladká nanovlákna. Autoři také ukázali, že polymery s nízkou molekulovou hmotností mají vyšší kritickou koncentraci zapletení, a proto vyžadují vyšší koncentraci polymerního roztoku. Kromě toho ze studie vychází, že důležitým parametrem je i rozdělení molekulové hmotnosti, kdy při jeho vyšší hodnotě došlo ke zvýšení poměru koncentrací nutného k dosažení hladkých vláken. Vliv viskozity je vidět na Obrázku 7. Hustota elektrického náboje na trysce souvisí s její akcelerací v elektrickém poli a také fluktuací náboje, která je příčinou bičovací nestability. Hustota náboje je úměrná vodivosti polymerního roztoku a také elektrickému napětí při procesu zvláknění. Obecně platí, že nízká hustota náboje zpomaluje ztenčování trysky a usnadňuje tvorbu korálkové struktury. Proces je také citlivý na zvolené elektrické napětí, kdy při nižší viskozitě může

vyšší napětí podpořit kvůli nedostatečnému zapletení řetězců tvorbu korálků. Z toho vyplývá, že pro tvorbu a určitou morfologii či pro potlačení korálkové struktury je nutné pečlivě zvolit kombinaci rozpouštědel a případně přidaných vodivých iontů, koncentraci polymeru a jeho molekulovou hmotnost, elektrické napětí a nakonec také parametry procesu jako jsou vzdálenost zvláknovacích elektrod, teplota a vlhkost prostředí. [33, 34, 35]



Obrázek 6: Vliv povrchového napětí na nanovlákná z polyethylenglykolu připravena z 3% roztoku vody a ethanolu. Šířka jednotlivých obrázků je 20 μm . Poměr ethanol/voda byl A) 0,000 a B) 0,702. Převzato z [34].



Obrázek 7: Vliv viskozity na nanovlákná z polyethylenglykolu připravena z 3% roztoku vody a ethanolu. Šířka jednotlivých obrázků je 20 μm . Viskozita roztoku byla A) 74 $\text{mPa}\cdot\text{s}$ a B) 527 $\text{mPa}\cdot\text{s}$. Převzato z [34].

Korálkově strukturovaná nanovlákná našla využití v cílené dopravě léčiv, která je často důležitou součástí tkáňového inženýrství k ovlivňování chování buněk a zvyšování efektivity regenerace tkání. Korálky umožňují nanášet léčivo nejen na povrch, ale z velké části i do objemu, což výrazně snižuje efekt prudkého uvolnění na začátku a také zpomaluje dlouhodobější uvolňování. Li a kol. [36] ve studii zkoumali kontrolu průměru korálků skrze výrobní parametry a jejich odpovídající průběhy uvolňování antibiotika tetracyklinu z nanovláken kopolymeru kyseliny

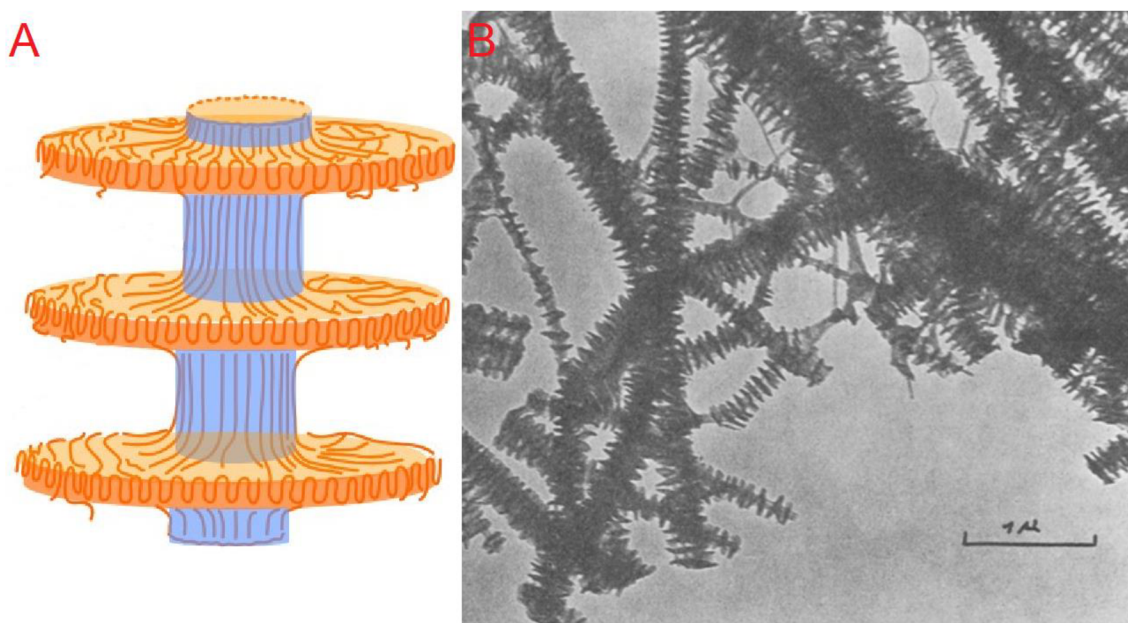
mléčné a glykolové. Kontrola průměru byla provedena skrze variace poměru rozpouštědel CF a acetonu a také koncentrací polymeru a zjistili, že obecně s koncentrací roste průměr korálek až do takové koncentrace, kdy korálky vymizí, což odpovídá poznatkům z předchozího odstavce, a s přídatkem 2 % tetracyklinu do polymerního roztoku průměr klesal, což bylo pravděpodobně způsobeno zvýšením hustoty elektrického náboje. Při in-vitro testování uvolňování ve fosfátovém pufru došli autoři pomocí UV/VIS spektroskopie k závěru, že díky většímu „obalení“ částic tetracyklinu u korálek o průměru 2,45 μm bylo počáteční půl-hodinové uvolnění pouze 11,2 % oproti 27,9 % u korálek o průměru 0,93 μm . Menší průměr také znamenal mnohem strmější růst kumulativního uvolnění, zatímco větší průměr znamenal pomalejší stabilnější uvolňování. Po 48 hodinách se hlavně skrze difuzi uvolnilo 79,0 %, respektive 89,3 % antibiotika. Další studie tuto tendenci potvrdily a dále ukázaly, že u hladkých nanovláken je jev prudkého uvolnění v prvních hodinách výrazně větší. [33, 36]

V některých aplikacích je potřeba vytvořit hydrofobní materiály z nanovláken, například pro střevní anastomózu. Pak je možné pomocí hydrofobního polymeru vyrobit nanovláknenný materiál s korálky a tím ještě zesílit hydrofobii povrchu takové vrstvy. [37]

2.3.3 Shish-kebab struktura

Poslední zde představenou hierarchickou strukturou jsou vlákna, která se vyznačují velmi specifickou morfologií povrchu, a to lamelami polymeru, které jsou tvořeny jeho rekrystalizací a v teorii jsou kolmé na osu vlákna. Páteřní vlákno se v tomto případě označuje jako „shish“ a lamely tvořené periodicky kolem něj jako „kebab“. Tvorbou polymerních krystalů se zabývalo mnoho vědců již v 50. letech minulého století. Například autoři v [38] zkoumali krystalizaci polyethylenu ovlivněnou smykovým napětím, a to z 5% roztoku v xylenu o 102 °C při tří denním míchání. Výsledné krystaly byly vláknového tvaru a tato vlákna byla složena z periodicky opakujících se oddělených lamel o průměru 100–300 nm, mezi nimiž bylo krátké spojení. Snímek těchto vláken je k vidění na Obrázku 8B a je patrné, že se jedná o typ struktury shish-kebab. Tento materiál měl vyšší teplotu tání o 15–20 °C díky snížené entropii natažených polymerních řetězců. Dále bylo dokázáno, že tvorba kebabů není závislá

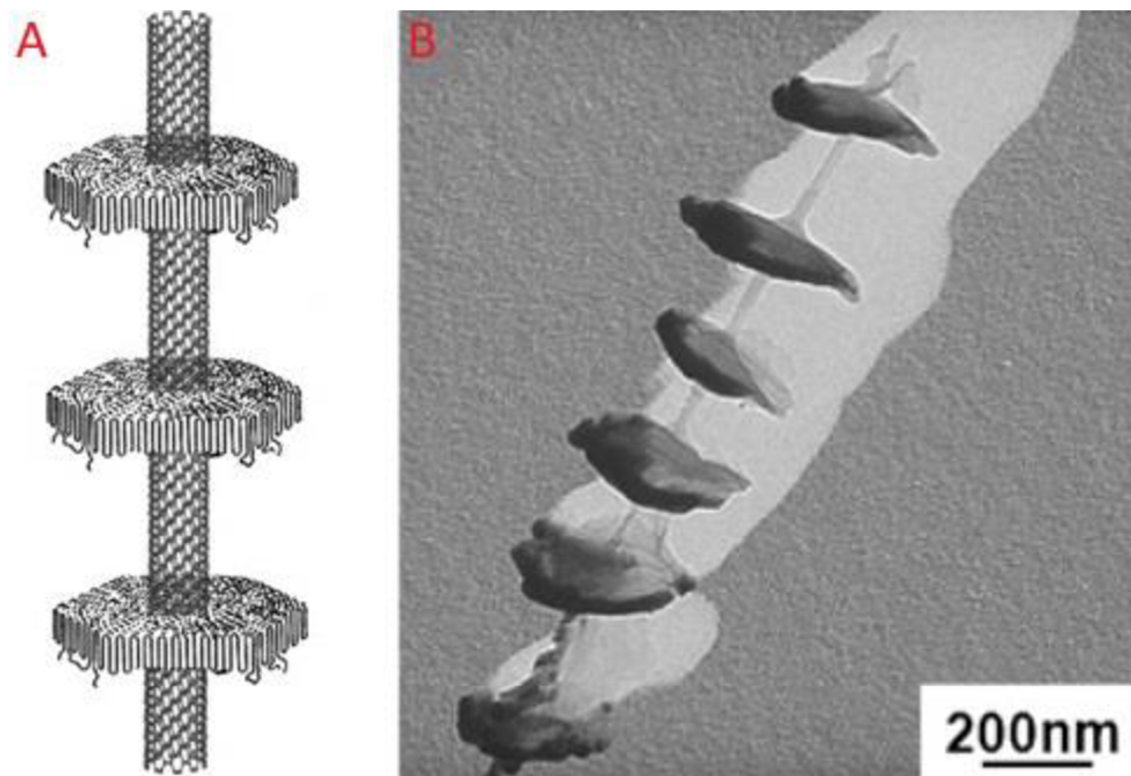
na hydrodynamických nestabilitách, ale na podélném, smykovém či smíšeném proudění a na dostatečně velkém gradientu rychlosti podél osy polymerních řetězců. V těchto podmínkách mohou být polymerní řetězce podrobeny přechodu ze zapletené struktury připomínající cívku do protáhlé. Natažené řetězce pak mají oproti těm složeným menší energetickou bariéru k dosažení krystalického stavu a odtud vzniká nejdříve shish, který slouží jako nukleační šablona pro další řetězce se zapletenou strukturou podílející se na tvorbě lamel kebabu, které mají konečně strukturu skládaných řetězců, viz Obrázek 8A. Tyto struktury se dají připravit jak ze zředěných, tak i koncentrovaných roztoků a polymerních tavenin. Bylo také ukázáno, že molekulová hmotnost a typ polymeru a míra proudění ovlivňuje distribuci řetězců do shish a do kebabu [39]. [40]



Obrázek 8: A) Schéma struktury shish-kebab úpravy polymerů, převzato a upraveno z [41]. B) Krystaly z polyethylenu ve tvaru vláken vykazující shish-kebab strukturu, převzato a upraveno z [38].

Shish-kebab struktury však nemusí být tvořeny pouze způsobem zmíněným v předchozím odstavci. Li a kol. [42] navrhli metodu funkcionalizace jednostěnných a mnohostěnných uhlíkových trubiček (CNT), při které krystalizovaly polyethylen anebo nylon-6,6 ze zředěných roztoků CNT a daného polymeru při teplotě krystalizace na povrchu trubiček. Výsledná struktura byla tvořena trubičkami o průměru 12,7 nm s periodicky se opakujícími (50–70 nm) objekty ve tvaru disků o průměru 60–80 nm kolem nich, což je z pohledu morfologie velmi podobné shish-kebab struktuře tvořené v poli podélného a smykového proudění, viz Obrázek 9B. Materiál byl nazván jako „nanohybridní shish-kebab“ (NHSK) a jeho schematická struktura

je vidět na Obrázku 9A. Tento systém však nebyl při krystalizaci míchán, a proto bylo předpokládáno, že CNT vyvolávají po adsorpci polymeru na povrch jeho nukleaci a kontrolovanou krystalizaci, což je z hlediska energie výhodnější než homogenní krystalizace samotného polymeru. Kolmá orientace mezi CNT a kebabů naznačuje, že řetězce polymeru jsou rovnoběžné s osou trubiček. [43]



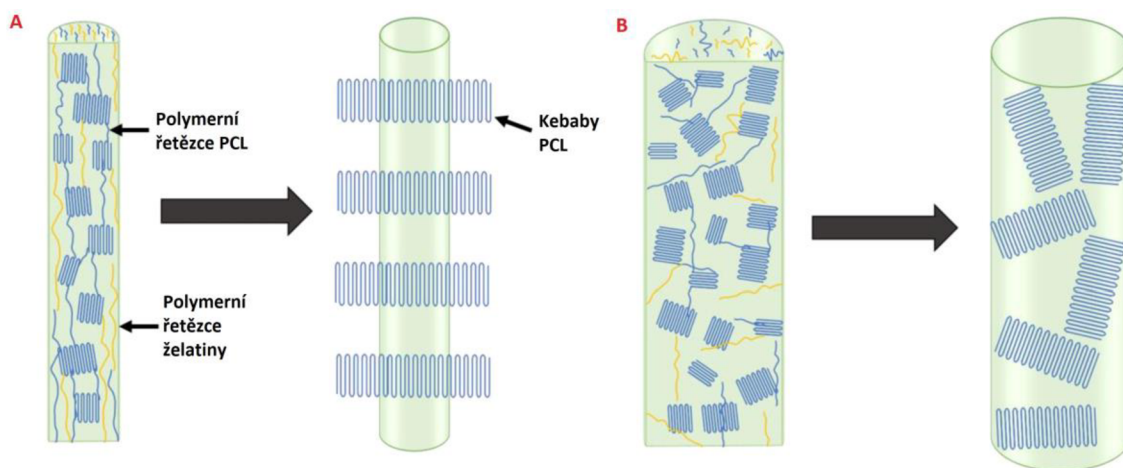
Obrázek 9: A) Schéma struktury nanohybridního shish-kebabu – centrální shish tvořen uhlíkovou trubičkou a kebab ze skládaných krystalitů polyethylenu. B) TEM snímek mnohostěnné uhlíkové trubičky s kebabů z polyethylenu. Převzato z [43]

Růst a vznik NHSK je pravděpodobně ovlivněn dvěma faktory, a to epitaxi a geometrickým omezením [43]. Epitaxe polyethylenu byla již dříve dokázána na povrchu grafitu [44]. Epitaxe je závislá na krystalické mřížce substrátu a CNT má více orientací mřížky vůči své ose, které by způsobily různé orientace kebabů, což se neděje. Proto musí být růst ovlivněn druhým faktorem nezávislým na „shodě vzorů“ (pattern matching). CNT se vlastně chovají jako makromolekuly a mají průměr srovnatelný s typickým gyračním poloměrem polymeru, což je důvodem k preferované rovnoběžné orientaci řetězců s osou CNT tvořící geometrické omezení pro tyto řetězce. Tento jev se nazývá jako tzv. měkká epitaxe a vyznačuje se vzájemnou orientací řetězců i CNT. Mechanismus růstu NHSK je řízen oběma těmito faktory a jejich vliv je závislý na velikosti substrátu. Pokud by totiž byl průměr substrátu (trubičky nebo uhlíkového vlákna) větší vůči velikosti polymeru, tak by se polymer

choval jako na nezakřiveném povrchu a hlavními mechanismy růstu by byly epitaxe a pattern matching. Lamely kebabů nejsou také v tomto případě kolmé na osu CNT, nýbrž mají více orientací. Čím je však průměr menší a zakřivení povrchu nezanedbatelné, tak by striktní epitaxe způsobila deformaci mřížky, což vyústí v geometrické omezení a přechod spíše k mechanismu měkké epitaxe a pouze kolmé orientaci lamel. Tento materiál může být dále funkcionalizován na polymerních řetězcích kebabů, což otevírá dveře mnoha oblastem využití, jako například v nanokompozitech nebo jako podpůrný materiál katalyzátorů. Zajímavou aplikací je také frakcionace polymerů, jelikož proces tvorby shish-kebabu je ovlivněn mimo jiné molekulovou hmotností makromolekul. [43]

Dnes je také velká pozornost věnována přípravě shish-kebab hierarchické struktury na polymerních vláknech jakožto post-procesní úprava. Již připravená vlákna, většinou elektricky zvlákněná, je možné několika metodami upravit tak, že na jejich povrchu vzniknou lamely kolmé na osu vlákna, ve většině případů silně připomínající kebab jako v předchozích dvou případech. Vystává tedy otázka, zda se principiálně jedná o podobný jev, jelikož nanovlákna jsou násobně větší než krystaly vzniklé v míchaném roztoku i než CNT a v případě použití stejných polymerů jsou i parametry mřížky a fyzikálně-chemické vlastnosti stejné pro shish i pro kebab. Vliv materiálu zvoleného pro vlákna výrazně ovlivňuje tvorbu kebabu, například v [45] byla vyzkoušena příprava na vláknech ze směsi PCL a PLA, a pokud bylo PCL v menšině, tak se kebab z PCL vytvořily velmi omezeně kvůli nekompatibilitě, přičemž v případě zvolení většího podílu PCL byly kebab výrazné a periodické. První často zmiňovanou metodou této úpravy je pomalá krystalizace za inkubace v roztoku po určitou dobu, pohybující se v rámci minut až do dvou hodin. Roztok je většinou poměrně zředěný mezi 0,5–1,5 % w/w polymeru v dobrém nebo špatném rozpouštědle nebo v jejich směsi. Druhou metodou je rychlá krystalizace za nanesení roztoku na vláknennou vrstvu a odpařování rozpouštědla, což obvykle trvá pouze několik minut, oproti inkubaci však disponuje horší kontrolou nad parametry procesu, jako je například koncentrační gradient v roztoku, a proto metody mohou poskytovat různé výsledky. Mechanismus vzniku shish-kebabu není jednoznačný a studie se mírně rozcházejí v interpretaci, tak se v podstatě všechny shodují na tom, že se určitou mírou na vzniku podílí epitaxe, pattern matching a měkká epitaxe. Pattern matching se nemůže v mechanismu prosadit úplně, ale pouze na určité části

rozhraní shish a kebabu, jelikož polymerní řetězce v nanovlákněch jsou z podstaty zvláknování převážně natažené a kolmé na osu vlákna a kebab je teoreticky monokrystal, ve kterém se řetězce ohýbají. Míra vlivu těchto jevů na konečném mechanismu se však liší v závislosti na vlastnostech vláken, a to převážně na jejich průměru, který ovlivní vnitřní uspořádání polymerních řetězců a krystalické fáze, viz Obrázek 10, a na interakci povrchu s roztokem. Zdá se, že pokud se jedná o nanovlákná s malým průměrem, jako například kolem 200 nm v [46], tak převládá měkká epitaxe z důvodu popsaného výše. Wang a kol. [47] v rozpor ve své studii upřednostnili vliv epitaxe a pattern matchingu a také ukázali, že při větším průměru vláken (kolem 2 μm) už nejsou lamely kebabu kolmé na osu vlákna, a naopak jsou náhodně orientované, což ve výsledku tvoří na povrchu „korálovitou“ strukturu. [46, 47]



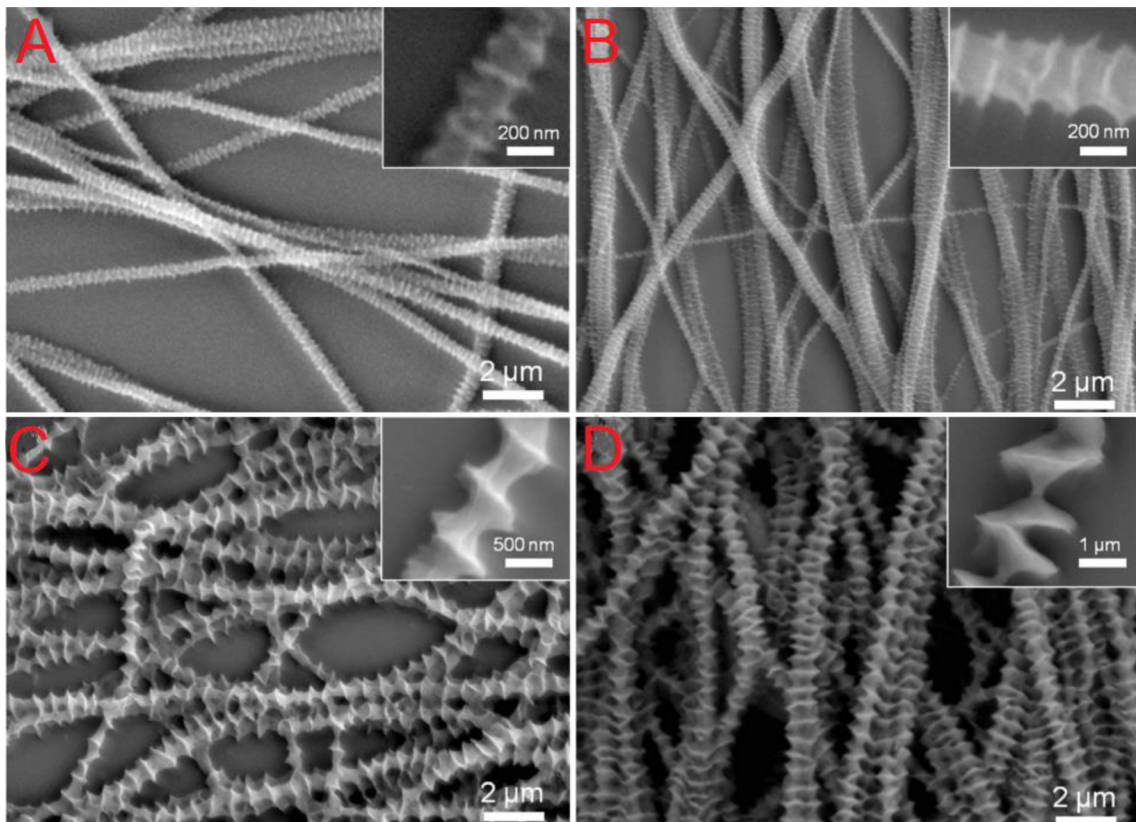
Obrázek 10: Závislost průběhu tvorby a morfologie shish-kebab struktury na průměru vlákna u vláken ze směsi PCL a želatiny, lamely kebabu jsou pouze z PCL. A) Vlákno s malým průměrem a B) vlákno s velkým průměrem. Převzato a upraveno z [48].

Li a kol. [46] zkoumali přípravu shish-kebab struktur na nanovlákněch polykaprolaktonu v různých podmínkách a jejich práce vnesla do tématiky mnoho poznatků. Tuto strukturu nazvali nanovlákněným shish-kebabem (Nanofiber Shish-kebab – NFSK). Mimo jiné bylo dokázáno, že shish-kebab vzniká na PCL nanovlákněch i při jednohodinové inkubaci (lázni) v čistém částečném rozpouštědle DMF, kdy dochází k rekrystalizaci rozpouštěného povrchu vláken, přičemž ve špatných rozpouštědlech jako jsou ethyl-acetát a pentyl-acetát (PA) k tvorbě nedošlo. Situace je však jiná, pokud se z těchto špatných rozpouštědel připraví 1% PCL roztok. Při použití metody s lázni je vidět postupný vývoj kebabů v čase. V 1% roztoku v PA se po 5 minutách vytvoří lamely podél celého vlákna, po 15 minutách se již lamely obtočí

kolem celého vlákna jako disky, po 30 minutách už do sebe kebabý kolabují, zvětšují se a zvětšuje se i jejich vzájemná vzdálenost a tento jev se ještě umocní po 60 minutách. Průběh je vidět na Obrázku 11. Wang a kol. [45] dále zkoumali, jaká je vlastně příčina periodicity a velikosti kebabů při použití metody vypařování a interakce vláken s krystalizačním roztokem. Pomocí pozorování procesu světelným mikroskopem bylo vidět, že se na nanovlákně po aplikování krystalizačního roztoku tvoří tmavé tečky, které by mohly být tvořeny nahromaděnými shluky polymeru po fázové separaci kvůli odpařování rozpouštědla. Jelikož se rozpouštědlem mírně rozpustí i povrch vlákna, tak se mohou některé řetězce z těchto shluků zaplést s povrchovými řetězci vlákna a jelikož je jejich rozdělení výskytu přibližně rovnoměrné na všech místech roztoku, tak se také rovnoměrně splétají s řetězci vlákna. Po úplném odpaření rozpouštědla se všechny zbývající shluky připojí již k zapleteným a konečně v těchto místech na povrchu krystalizují v lamely kebabu. Z této teorie také vychází, že počáteční koncentrace roztoku je důležitým parametrem určujícím výslednou morfologii, periodicitu a velikost kebabů, protože čím je vyšší koncentrace roztoku, tím větší shluky se mohou vytvořit, a to vyústí ve větší kebab. Větší periodicitu kebabů může být způsobena větším shlukem řetězců, který zabírá více místa na povrchu, nebo také vzájemným kolapsem či přitahováním sousedních lamel kvůli kapilární síle. Dá se předpokládat, že podobný proces probíhá i u druhé inkubační metody. [45, 46]

Oproti neupraveným vláknům mají obecně vyšší bioaktivitu a adhezi buněk, čehož se využívá v tkáňovém inženýrství pro regeneraci a obnovu tkání, převážně pak kůže nebo kostní tkáň místo současné často bolestivé metody, kdy je pacientům odebrán vlastní kostní štěp z jiného místa. Organická hmota tvoří asi 30 hm. % kosti a z toho je až 90 % kolagenních proteinů. Molekuly kolagenu se mezi sebou s mezerami mohou spojovat a tím vznikají mineralizované kolagenní fibrily s typickým vzorem periodicky se opakujících mezer a překryvů o šířce 67 nm, které slouží jako nukleační místa pro minerální krystaly, převážně hydroxyapatitu, a také ovlivňují proliferaci a mineralizaci osteoblastů. Wang a kol. [45] měli za cíl napodobit topografii fibril pomocí NFSK, kde shish tvořila vlákna ze směsi PCL a kyseliny polymléčné a kebab byl tvořen vypařovací metodou s různě zředěnými roztoky PCL v 77 % kyselině octové (AA) zředěné deionizovanou vodou. Z výsledků vyplývají určité podobnosti s fibrilami, a to následující – jejich průměry (597 ± 254 nm) jsou

srovnatelné, periodicitu kebabů je v rozmezí desítek až stovek nanometrů a že je výsledný povrch drsnější než původní hladká vlákna. Buněčné kultury fibroblastů 3T3 dosáhly po 3 dnech na neupravených i shish-kebab vláknech vysoké 95% životaschopnosti, takže jsou oba materiály biokompatibilní. Na vrstvách s většími krystaly kebabu bylo dle MTS eseje zjištěno větší množství buněk, což indikuje rychlejší buněčnou proliferaci na hrubších površích, a po 10 dnech bylo na všech vrstvách dosaženo konfluence. Ze snímků SEM však bylo patrné, že buňky měly na neupravených vláknech zakulacený tvar a čím byl povrch drsnější a kebabu tedy větší, tím více se buňky protahovaly a měly vřetenovitý tvar, což znamená lepší adhezi. S většími kebabu se zvětšuje měrný povrch vláken, což mohlo přispět k lepší adhezi i většímu počtu buněk. Ze studie tedy vyplývá, že vlákna pozměněná shish-kebab strukturou lépe napodobují topografii kolagenních fibril a mají tedy velký potenciál pro využití v tkáňovém inženýrství. Díky lepší nápodobě extracelulárního matrixu by bylo také možné lépe studovat chování buněčných kultur v kontrolovaných podmínkách. [45, 49]



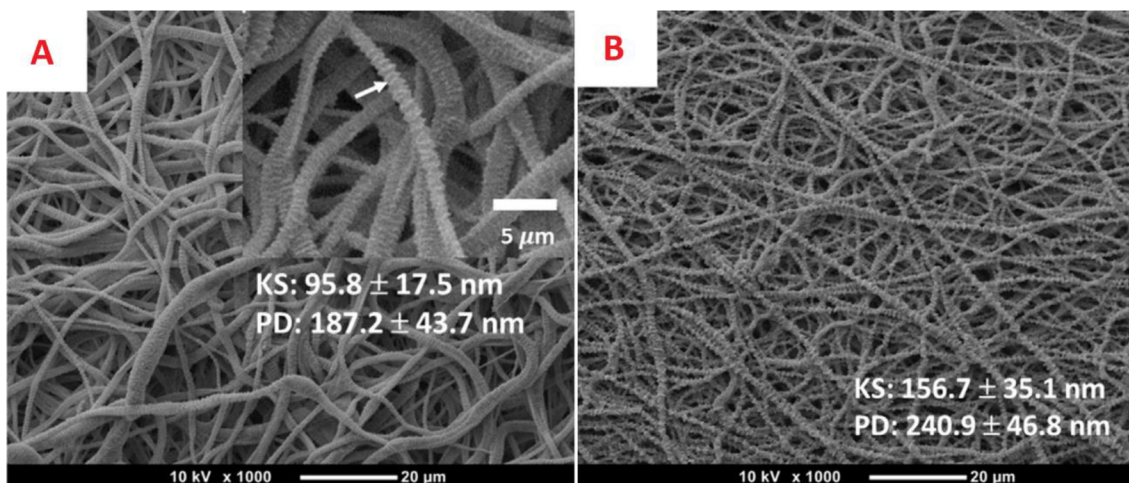
Obrázek 11: Průběh tvorby NFSK z PCL metodou inkubace v lázni 1% PCL roztoku v pentyl-acetátu po dobu A) 5, B) 15, C) 30 a D) 60 minut. Převzato a upraveno z [46].

2.4 Shish-kebab na PCL nanovlákněch

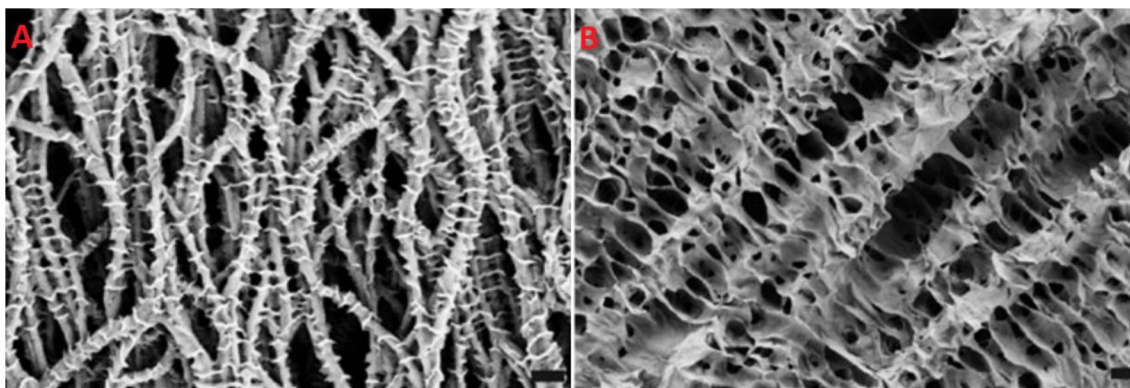
Cílem této kapitoly je přiblížit přípravu shish-kebab hierarchické struktury na nanovlákněch z polykaprolaktonu, ukázat různé metody přípravy, jaké se dají použít krystalizační roztoky a jejich jednotlivé výsledky, které jsou shrnuty v Tabulce 1.

Jiang a kol. [29] zkoumali použití NFSK z PCL pro přípravu nanovláknenných nosičů buněk napodobujících strukturu kolagenních fibril. Nanovláknena byla připravena z PCL o molekulové hmotnosti $80000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ z 15% w/v roztoku. PCL bylo rozpuštěno ve směsi CF a DMF v objemovém podílu 6:4 a elektricky zvlákněno. Výsledná nanovláknena měla průměr v rozmezí 190–866 nm a průměrný průměr byl 392 nm. Krystalizační roztok byl připraven ze 77% v/v AA v deionizované vodě a 0,5; 1; 1,5 a 2 % w/v PCL. Inkubační metoda trvala 5 minut následována 5 minutami omývání, aby se vlákna nespojila. Jako nejlepší koncentrace se jevílo 1,5 % w/v, kdy byly již kebaby výrazné, ale nedocházelo ke spojení vláken jako u 2 % w/v. U vypařovací metody byla nanosená 30 μl kapka roztoku a průběh byl velmi podobný, s nejlepší koncentrací 1,5 % w/v, při 2 % w/v roztoku se také vlákna spojovala. Výsledná shish-kebab struktura obou metod je vidět na Obrázku 12. Morfologie vláken byla však lepší při použití vypařovací metody, která poskytovala větší velikost i periodicitu kebabů, pravděpodobně díky nepotřebnosti omývání, které může dodatečně strukturu ovlivnit. Oproti neupraveným vláknům byla ta se shish-kebab strukturou ještě více hydrofobní, kdy se úhel smáčení zvýšil z $132,9^\circ$ na $137,1^\circ$ a měrný povrch měřený metodou BET ($4,3 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$) zůstal srovnatelný. Z testů provedených na myších fibroblastech 3T3 v intervalu 3, 5 a 10 dní vyplývá, že se díky shish-kebab struktuře mírně zvýšila životaschopnost po 3 i 5 dnech z 84 % na 88 %, respektive z 92 % na 93 %. Po 10 dnech tvořily buňky konfluentní vrstvu. MTT test také odhalil vyšší míru proliferace, která se postupně zvyšovala ve všech testovacích dnech. Velký rozdíl byl pozorován v morfologii buněk po 3 dnech, kdy měly na neupravených nosičích kulatý tvar signalizující ne-biokompatibilitu, zatímco na upravených nosičích se buňky roztáhly do vřetenovitého tvaru. Po 5 dnech však rostly buňky dobře i na neupraveném nosiči. In-vitro testy na lidských endotelových buňkách pupečnickové žíly měly podobné výsledky. V souhrnu tato studie indikuje, že oproti neupraveným PCL nanovláknům poskytuje hierarchická struktura lepší životaschopnost i proliferaci a zvýšenou adhezi buněk. [29]

Yu a kol. [50] měli za cíl otestovat NFSK z polykaprolaktonu o molekulové hmotnosti $80000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ jakožto nápodobu kolagenních fibril v kostní tkáni a jejich efekt na preosteoblasty MC3T3 E1. NFSK byla připravena inkubační metodou za pomoci krystalizačního roztoku o 1 % w/v PCL rozpouštěného v pentyl-acetátu z náhodně a paralelně orientovaných PCL nanovláken o průměru 200 nm, elektricky zvlákněných z 12% w/v roztoku v trifluorethanolu. Zajímavým jevem bylo, že periodicitu kebabů byla po 15 minutách lázně srovnatelná u náhodných i paralelních vláken, přičemž jejich velikost byla skoro 3x větší u paralelních. Na Obrázku 13 je vidět porovnání NFSK vzniklých po 15 a 60 minutách inkubace. Morfologie buněk byla při testech na 15-minutových NFSK-15 nejasná, jelikož se kulatost buněk s časem zvyšovala, statisticky významný rozdíl byl však vidět pouze u paralelních vláken. Pozoruhodné je, že buňky byly u paralelních NFSK-15 protažené ve směru osy vláken a u NFSK-60 kolmo na osu vláken, což u náhodných NFSK pozorováno nebylo. Paralelní NFSK-60 však měly přerostlé lamely kebabu, což buňkám umožnilo přilnout pouze na ně, a ne na vlákna samotná. Proliferace buněk byla oproti jejich neupraveným protějškům významně větší jak u náhodných, tak i paralelních nanovláken, nejlépe se pak jevily nosiče buněk s paralelní orientací, a to za použití NFSK-15 i NFSK-60. Testy aktivity enzymu alkalické fosfatázy ukázaly, že výrazný rozdíl oproti neupraveným nanovláknům byl vidět pouze po 14 dnech a opět byly nejefektivnější nosiče z paralelních NFSK-15 a NFSK-60, ačkoliv po 7 dnech nebyl mezi náhodným a paralelním NFSK-60 výrazný rozdíl. Souhrnem výsledky indikují, že jak krystalické lamely, tak orientace vláken mají výrazný vliv na proliferaci buněk i aktivitu alkalické fosfatázy. Kebaby přidaná drsnost v nano-měřítku mění interakci buněk s vlákny, což zlepšuje jejich funkci i aktivitu. Tvorba NFSK sice napodobuje periodické mezery mezi kolagenními fibrilami, ale periodicitu kebabů je mnohem větší a závislá na koncentraci krystalizačního roztoku a doby lázně. Paralelní vlákna lépe napodobují nativní strukturu kolagenních vláken, která jsou tak také orientována. [50]



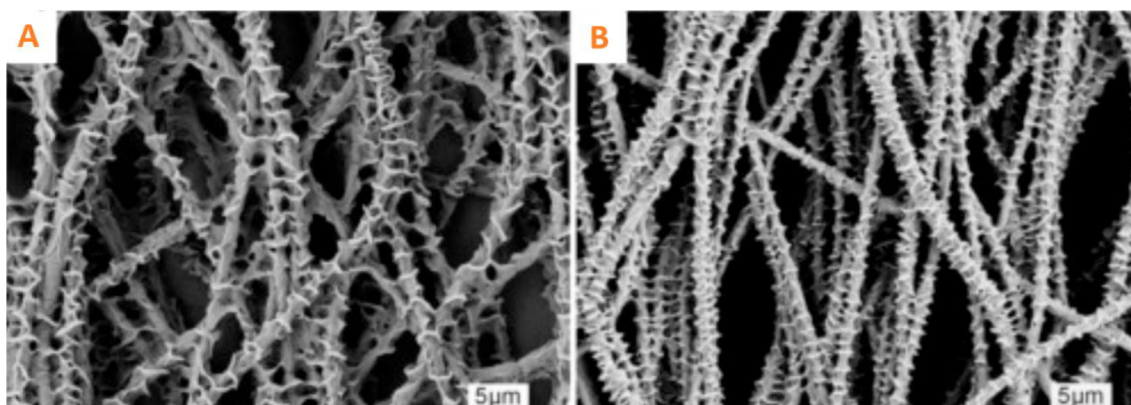
Obrázek 12: PCL NFSK při koncentraci krystalizačního roztoku 1,5 % w/v PCL v 77% v/v kyselině octové. A) Inkubační a B) vypařovací metoda. KS značí velikost a PD periodu lamel kebabu. Měřítka 20 μm . [29]



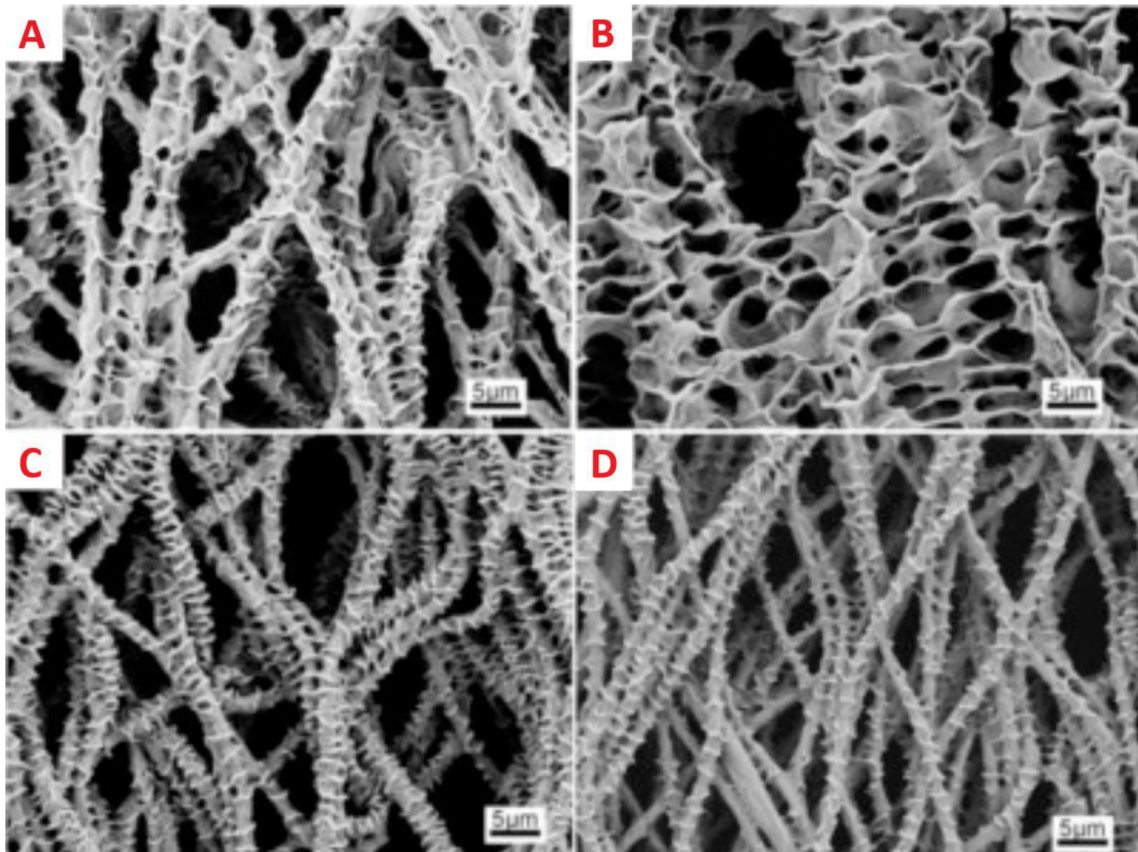
Obrázek 13: PCL NFSK při koncentraci krystalizačního roztoku 1 % w/v PCL v pentyl-acetátu. Inkubační metoda o trvání A) 15 a B) 60 minut. Měřítka 2 μm . [50]

Jing a kol. [51] zkoumali taktéž nápodobu kolagenních fibril pomocí NFSK z PCL o molekulové hmotnosti $80000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, přičemž testovali vliv použitého rozpouštědla v krystalizačním roztoku a následně i vliv kovalentně navázaného matrigelu, proteinů bazální membrány, na interakci s fibroblasty HEF1. Nanovlákná o průměru $486 \pm 294 \text{ nm}$ v rozsahu od 200 po 1400 nm byla získána elektrickým zvlákňováním z 12% w/w roztoku v CF a DMF v objemovém podílu 6:4. NFSK byla připravena vypařovací i inkubační metodou z 0,8% w/w roztoku PCL v pentyl-acetátu a dále v 77% v/v kyselině octové. Vrstvy byly poté omyty příslušným rozpouštědlem a vysušeny ve vakuu. Porovnání NFSK připravených s různými krystalizačními roztoky oběma metodami je vidět na Obrázcích 14 a 15. Lamely kebabu byly obecně větší s větší periodicitou při použití PA. To může být způsobeno různou rozpustností PCL v jednotlivých rozpouštědlech, kdy roztok s AA byl mnohem stabilnější, než ten s PA. Díky horší rozpustnosti v PA se řetězce snadněji kumulují na povrchu vláken, mají tedy větší šanci se na něm zachytit a tvořit větší lamely. Problémem PCL je

hydrofobie, která se potvrdila i v této studii, bylo však ukázáno, že hydrolýza pomocí NaOH a i následné navázání matrigelu výrazně snižuje úhel smáčení s vodou, a to přibližně o 20°, respektive 50°. Úmrtnost buněk při in-vitro testech byla velmi malá, takže buňky přežívaly na všech testovaných materiálech, avšak více živých buněk bylo pozorováno na NFSK a nosičích s matrigelem, na kterých byl také pozorován protáhlejší tvar buněk. Proliferace byla oproti neupravenému PCL významně větší jak na samotných NFSK, tak i s matrigelem a rozdíl byl v čase stále výraznější. Drsnost povrchu tedy zlepšuje proliferaci i adhezi buněk a dále v kombinaci s matrigelem má materiál mnohem více vazebných míst pro adhezi a přichycení buněk, což dále podporuje jejich aktivitu. [51]



Obrázek 14: PCL NFSK připravená vypařovací metodou s koncentrací krystalizačního roztoku 0,8 % w/w PCL v A) pentyl-acetátu a B) 77% v/v kyselině octové. Měřítko 5 μm . [51]



Obrázek 15: PCL NFSK připravená inkubační metodou s koncentrací krystalizačního roztoku 0,8 % w/w PCL v A), B) pentyl-acetátu a C), D) 77% v/v kyselině octové. Nalevo byla doba inkubace 5 minut a napravo 15 minut. Měřítka 5 μm . [51]

Návrhem dalšího zlepšení aktivity preosteoblastů MC3T3 E1 se zabývali Yu a kol. [52]. Aktivita enzymu alkalické fosfatázy je klíčová pro tvorbu kostní hmoty a její zvýšení je možné mineralizací NFSK. Homopolymerním NFSK z PCL nicméně stále chybí povrchový záporný náboj, který by umožnil nukleaci hydroxyapatitu. Autoři připravili paralelně orientovaná vlákna elektrickým zvlákňováním z PCL o molekulové hmotnosti $80000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ z roztoku v trifluorethanolu o 12 % w/v. Krystalizační roztok byl připraven z 0,5, 1 a 3 % w/v blokového kopolymeru PCL a kyseliny polyakrylové (PAA) rozpuštěného v PA a ethanolu v poměru 1:1. Blokem polykaprolaktonu byl umožněn vznik kebabů. Nosiče byly inkubovány v lázni po dobu 15 minut a poté opláchnuty. S rostoucí koncentrací roztoku se zvětšila velikost kebabů i jejich periodičita, viz Obrázek 16 a Tabulku 1. Mineralizace byla provedena ponořením do dvakrát koncentrované simulované tělní tekutiny na 3 a 7 dní a poté opláchnuta. Oproti neupravenému nosiči byly morfologie a tvar buněk u NFSK protáhlejší, což bylo pozorováno ještě výrazněji u mineralizovaných NFSK nosičů. In-vitro testy proběhly u NFSK připravených z 0,5% w/v roztoku. Po 7 dnech nebyl mezi sledovanými

nosiči pozorován výrazný rozdíl v proliferaci ani aktivitě enzymu. Po 14 dnech byla oproti neupravenému i NFSK nosiči proliferace výrazně vyšší u mineralizovaných nosičů, a to stejné platilo i pro aktivitu enzymu. Při srovnání různých velikostí kebabů na mineralizovaných NFSK vychází z výsledků nejlépe 3% w/v NFSK. V souhrnu byla aktivita buněk ovlivněna jak chemicky, tak fyzikálně. Vyšší drsnost povrchu způsobená lamelami kebabu pozitivně ovlivňuje proliferaci i aktivitu alkalické fosfatázy. Přítomnost anorganických fosfátů na mineralizovaných nosičích slouží jako signál pro diferenciaci buněk, díky čemuž mají následně vyšší aktivitu enzymu. V případě tvorby kostní hmoty je důležité, aby docházelo k dostatečné proliferaci buněk, ale také vysoké aktivitě enzymu. Efekt NFSK a mineralizace se vzájemně podporují a nosiče tedy tvoří ideální materiál pro toto použití, jelikož mají ideální drsnost i chemické vlastnosti povrchu. Zřejmým omezením je však mnohem větší periodičita kebabů oproti mezeře 67 nm v kolagenních fibrilách a nepřítomnost nekolagenních proteinů, které jsou také důležitou složkou tvorby kostní hmoty. [52]



Obrázek 16: PCL NFSK připravená inkubační metodou (15 minut) s koncentrací krystalizačního roztoku A) 0,5; B) 1 a C) 3 % w/v kopolymeru PCL-PAA ve směsi pentyl-acetátu a ethanolu o poměru 1:1. [52]

Tabulka 1: Shrnutí materiálů, metod a výsledků přípravy NFSK z PCL ze zmíněných zdrojů. Sloupec koncentrace zde označuje koncentraci krystalizačního roztoku pro post-procesní úpravu a VK / PK značí velikost lamely kebabu a periodicitu těchto lamel.

Zvlákňovací roztok	Průměr vláken [nm]	Metoda krystalizace	Rozpouštědlo	Koncentrace [%]	VK / PK [nm]	Zdroj
PCL 80000 g·mol ⁻¹ , CF/DMF 6:4 v/v, 15 % w/v	392	Inkubační 5 minut	77% v/v kyselina octová	1	58,9 / 156,3	[29]
				1,5	95,8 / 187,2	
				2	98,6 / 193,4	
	392	Vypařovací	77% v/v kyselina octová	1	96,4 / 191,4	
				1,5	156,7 / 240,9	
				2	138,7 / 247,6	
PCL 80000 g·mol ⁻¹ , Trifluorethanol, 12 % w/v	200 paralelní	Inkubační 15 minut	Pentyl-acetát	1	590 / 1190	[50]
					200 náhodné	
	200 paralelní	Inkubační 60 minut	Pentyl-acetát	1		
					200 náhodné	
PCL 80000 g·mol ⁻¹ , Trifluorethanol, 12 % w/v	-	Inkubační 15 minut, kopolymer PCL-PAA	Pentyl-acetát / ethanol 1:1	0,5		452 / 281
				1	1294 / 372	
				3	1765 / 708	

Závěrem teoretické části této diplomové práce je třeba shrnout, že u polykaprolaktonu byla opakovaně a úspěšně testována post-procesní úprava na změnu povrchové morfologie. Autoři ve výše zmíněných publikacích využívali PCL o vysoké molekulové hmotnosti 80000 g·mol⁻¹, který byl z polymerních roztoků elektricky zvlákňován za pomoci různých rozpouštědlových systémů. Na připravené materiály byly aplikovány krystalizační roztoky s různými rozpouštědly a koncentracemi PCL, což vedlo k tvorbě lamelovitých strukturálních změn na povrchu vláken.

3 Experimentální část

Experimentální částí této práce je studium přípravy hierarchických povrchových změn struktury (například typu shish-kebab) na elektricky zvlákněných nanovlákněných nosičích z polykaprolaktonu. Cílem je prozkoumat tvorbu NFSK na materiálech připravených stejnsměrným elektrickým zvlákněním z několika různých rozpouštědlových směsí a molekulových hmotností PCL a ověřit biokompatibilitu připravených materiálů pomocí in-vitro testů. Nejprve jsou popsány metodika, materiály a chemické sloučeniny. Zvlákněné materiály jsou charakterizovány pomocí plošné hmotnosti, snímků ze skenovacích elektronových mikroskopů, průměrů vláken, charakteristických veličin struktury shish-kebab či jiných povrchových změn, diferenciální skenovací kalorimetrií a gelovou permeační chromatografií. Dále je uveden průběh in-vitro testů a v neposlední řadě jsou v diskuzi prozkoumány možné příčiny a faktory dosažených výsledků.

3.1 Materiály a metody

Tato kapitola popisuje rozpouštědla a polymery použité při přípravě nanovláken a jejich post-procesní úpravy. Také představuje metodiku přípravy a charakterizace neupravených i upravených nanovláken.

3.1.1 Materiály a chemikálie

Vzhledem k vlastnostem a literární rešerši byl jako polymer zvolen polykaprolakton o číselné střední molekulové hmotnosti M_n 45000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (PCL45) a 80000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (PCL80), s polydisperzitou menší než 2 a ve tvaru granulí s mléčným zabarvením od dodavatele Sigma-Aldrich (Merck). PCL45 má podle výrobce hmotnostní střední molekulovou hmotnost M_w 48000–90000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a u PCL80 tuto variantu molekulové hmotnosti neuvádí [53]. Výrobce uvádí teplotu tání T_m kolem 60 °C a potvrzuje čistotu materiálu skrze testování infračervenou spektroskopií. Podklad pro vlákněné vrstvy byl tvořen netkanou textilií typu spunbond Pegatex S o plošné hmotnosti 20 a 30 $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$ od dodavatele PFNonwovens.

Rozpouštědla dimethylformamid, absolutní ethanol, chloroform stabilizovaný ethanolom a dichlormethan byla poskytnuta firmou Penta s.r.o. Pentyl-acetát byl dodán firmou Sigma-Aldrich (Merck).

KCl a KH_2PO_4 od firmy Penta s.r.o., NaCl od firmy Merck a $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ od firmy Sigma-Aldrich (Merck) byly použity na přípravu fosfátového pufru PBS, který se skládá z 800 ml destilované vody a těchto sloučenin ve stejném pořadí v poměru 0,2:0,24:8:3,63 g. Trypsin, DMEM a trypanová modř byly dodány firmou Merck, fetální hovězí sérum (FBS) firmou Gibco, Penicilin-Streptomycin-Amfotericin firmou Lonza, CCK-8 (Cell Counting Kit 8) firmou Dojindo, DiOC6, glutaraldehyd, phalloidin FITC a DAPI firmou Sigma-Aldrich (Merck) a konečně buněčné linie myších fibroblastů 3T3-NIH byly získány od firmy ATCC. Médium pro buněčné testování bylo připraveno z 89 % DMEM, 10 % FBS a 1 % antibiotik.

3.1.2 Příprava PCL nanovláken

Návrh zvlákňovacích roztoků byl založen na zkušenostech vedoucí práce a také na testování tvorby shish-kebab úpravy na již zvlákněných materiálech z různých rozpouštědel, jejich poměrů a koncentrací PCL. Tyto úvodní testy byly provedeny autorem této práce na malých terčících o průměru 1 cm, na které byly připevněny kousky vláknenné vrstvy. Shish-kebab struktura na nich byla připravena vypařovací metodou při post-procesním nanášení krystalizačního roztoku stejným způsobem, jako je popsáno v následující podkapitole 3.1.3. Připravené materiály byly následně charakterizovány na SEM. Na základě snímků ze SEM bylo okometricky vyhodnoceno, jaká rozpouštědla a koncentrace PCL jsou vhodné pro další detailní testování přípravy NFSK. Jednalo se tedy o první jednoduché rozřazovací testování na malých vzorcích. Následně bylo pro zvlákňování vybráno a dále připraveno 5 roztoků z PCL45 a PCL80 o různých koncentracích a s různými rozpouštědly či rozpouštědlovými systémy. Jednotlivé roztoky jsou uvedeny v Tabulce 2. K odměření potřebných množství PCL a rozpouštědel byly využity chemické váhy či odměrné válce. Roztoky byly uchovávány ve skleněných lahvičkách uzavřených víčkem. Čerstvě připravené zvlákňovací roztoky byly ponechány několik hodin (obvykle 8 hodin) na magnetickém míchadle pro dokonalé rozpuštění polymeru.

Nanovláknenné nosiče byly připraveny stejnosměrným elektrickým zvlákňováním na přístroji Nanospider™ NS 1WS500U od výrobce ELMARCO s.r.o., přičemž konstantní hodnoty teploty a relativní vlhkosti ve zvlákňovací komoře zajišťovala klimatizační jednotka NS AC150. Parametry zvlákňování byly nastaveny, viz Tabulku 3. Pouze u dvou materiálů (PCL45_CF16 a PCL80_82) byl zvolen odtah textilie $20 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$.

Elektrické napětí na zvlákňovací elektrodě bylo 40 kV a na kolektoru -10 kV. Obě elektrody měli tvar tenkého drátu o průměru 0,2 mm. Pro porovnání vlivu plošné hmotnosti na tvorbu shish-kebab struktur a in-vitro testování byly také materiály PCL45_82 a PCL80_82 zvlákněny znovu se snahou docílit podobných plošných hmotností výsledných nanovlákněných vrstev. Parametry elektrického zvlákňování byly kromě odtahové rychlosti podkladového materiálu, která ovlivňuje v závislosti na produktivitě zvlákňování výslednou plošnou hmotnost nanovlákněné vrstvy, nastaveny stejně. Odtahová rychlost byla pro PCL45_82 zvolena $48 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ a pro PCL80_82 pak $20 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$.

Tabulka 2: Popis jednotlivých zvlákňovacích roztoků a značení výsledných vláken. Hmotnostní poměr rozpouštědel je značen w/w a objemový poměr v/v.

Typ PCL	Koncentrace [hm. %]	Rozpouštědlo / Směs rozpouštědel	Poměr rozpouštědel	Označení vláken
PCL45	12	CF	-	PCL45_CF12
PCL45	16	CF	-	PCL45_CF16
PCL45	16	CF / ethanol	8:2 w/w	PCL45_82
PCL80	10	CF / ethanol	8:2 w/w	PCL80_82
PCL80	10	CF / DMF	6:4 v/v	PCL80_64

Tabulka 3: Parametry elektrického stejnosměrného zvlákňování na zařízení Nanospider™.

Teplota vzduchu [°C]	22 ± 1
Vzdušná vlhkost RH [%]	40 ± 2
Průtok vzduchu dovnitř zvlákňovací komory [m³·h⁻¹]	90
Průtok vzduchu ven ze zvlákňovací komory [m³·h⁻¹]	120
Vzdálenost elektrod [mm]	180
Průvlak nástavce struny [mm]	0,7
Rozdíl elektrických potenciálů [kV]	50
Rychlost pohybu zásobníku po dráze 50 cm [s]	1
Odtah podkladové textilie [mm·min⁻¹]	10

3.1.3 Příprava shish-kebab struktur

Krystalizační roztoky pro post-procesní úpravu povrchu základních elektricky zvlákněných vláknenných nosičů byly připraveny z 1 % w/w PCL45, respektive PCL80 v pentyl-acetátu. Jelikož je PCL v tomto rozpouštědle špatně rozpustné, tak bylo potřeba nechat připravený roztok přibližně 4 hodiny na magnetickém míchadle s ohřevem nastaveným na 50 °C. Roztoky byly poté uchovávány v lednici a před každým použitím bylo nutné opětovně zahřátí ve vodní lázni o teplotě přibližně 50 °C na 15 minut, aby zmizel bílý „zákal“ vysráženého polymeru (dvoufázového systému) a byl získán transparentní roztok. Pracováno s ním bylo až po opětovném dosažení pokojové teploty.

Pro přípravu NFSK z PCL nanovláken byla zvolena vypařovací post-procesní metoda s nanášením krystalizačního roztoku postřikem. Pro post-procesní úpravu byl tedy krystalizační roztok odebrán ze skleněných lahviček do plastových nádob o objemu 50 ml s mechanickým rozprašovačem ve víčku. Ze všech zvlákněných materiálů byl vystřižen takový kus, aby se mohl vypnout do bambusového rámečku o průměru 14 cm, viz Obrázek 17. Z rozprašovače se poté na vypnutý materiál nanasíl postřikem krystalizační roztok tak, aby byla vrstva všude rovnoměrně pokryta. Vždy se jednalo o podobný počet rozprašování na každou vrstvu ze stejného rozprašovače. Po nanesení krystalizačního roztoku byly vrstvy rychle ale opatrně vysušeny papírovou utěrkou, aby na nich nebyla viditelná místa, kde by se shromažďovalo moc velké množství roztoku. Před a hned po nanesení a osušení krystalizačního roztoku byly rámečky zváženy. Na každý vzorek bylo naneseno přibližně 2 g krystalizačního roztoku. Dávkování krystalizačního roztoku bylo tedy přibližně 130 g·m⁻². Rámečky byly ponechány v laboratorní digestoři do druhého dne, aby se z nich dokonale odpařilo rozpouštědlo. V digestoři byla naměřena přístrojem Comet C3121 teplota okolního vzduchu přibližně 21 °C a relativní vlhkost 25 %. Vzorky z připravených vrstev NFSK pro SEM a další analýzy byly odebírány kus od jejich kraje (kraje rámečku), aby se zamezilo jejich případné různorodosti. Výsledné NFSK materiály byly pojmenovány podle původních materiálů, viz Tabulku 2, s příponou PA (pentyl-acetát) a molekulovou hmotností použitého PCL v krystalizačním roztoku, tedy například PCL80_82_PA45 pro vlákna z PCL o molekulové hmotnosti 80000 g·mol⁻¹

zvlákněného z roztoku CF a ethanolu s poměrem 8:2, na která byl aplikován krystalizační roztok s obsahem PCL o $45000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.



Obrázek 17: Vypnuté vrstvy nanovlákněných materiálů v bambusových rámečcích pro přípravu NFSK.

Zde je vhodné poznamenat, že byla vyzkoušeno nanášení krystalizačního roztoku rozprašováním pomocí airbrushu a bylo sice dosaženo rovnoměrnějšího jemného nánosu, ale krystalizační roztoku bylo na vláknech tak málo, že výsledně nebyly pozorovány žádné povrchové změny. Zároveň způsoboval silný proud vzduchu poškození vypnuté nanovlákněné vrstvy.

3.1.4 Charakterizace materiálů

Pro charakterizaci původních i upravených nanovlákněných vrstev bylo zvoleno několik metod. Plošné hmotnosti původních neupravených vrstev byly měřeny v tripletech vystřižených čtverců o 16 cm^2 na laboratorních vahách a tato hodnota byla poté přepočítána na hmotnost na 1 m^2 . Kvůli poměrně malé ploše NFSK vrstev bylo k měření plošné hmotnosti použito tripletů čtverců o 1 cm^2 . Nanovlákněné vrstvy vypnuté na bambusových rámečcích byly zváženy před a hned po aplikaci krystalizačního roztoku, aby se dalo alespoň přibližně určit, jaké množství krystalizačního roztoku bylo na vrstvy aplikováno.

V případě hierarchické struktury shish-kebab má skenovací elektronový mikroskop důležitou roli v prozkoumávání lamel kebabů, jejich morfologie a struktury povrchu. Pomocí přístroje Quorum Q150R Plus musela nejdříve být na všechny vzorky nanesena tenká elektricky vodivá vrstva zlata s přibližnou tloušťkou 10 nm . Pomocí SEM

(Tescan Vega S3B) bylo pořízeno pro všechny materiály vždy několik snímků s různými zvětšeními. Menší zvětšení jsou snímána pro větší náhled na strukturu a její rovnoměrnost či pozorování defektů, a naopak větší zvětšení (obvykle až od 10000x a více) umožňují pozorování vzniku povrchových změn na vláknech po post-procesní úpravě. Základní neupravená nanovlákná i jejich protějšky se shish-kebab strukturou byly naskenovány a dle jejich morfologie byly pro další testování vybrány pouze tři z nich. Pro ověření tvorby shish-kebab struktury byly nasnímány jak vrchní, tak spodní strany NFSK materiálů, neboť při vodorovném vysušování rámečků po post-procesní úpravě může díky gravitaci vypadat finální úprava shora a zespoda vlákenné vrstvy rozdílně. Vrstvy NFSK těchto vybraných materiálů byly dále naskenovány na SEM s vyšším rozlišením (Carl Zeiss ULTRA Plus), který také umožnil pořídit snímky při nižším elektrickém napětí na elektronovém děle, což by jistě nemělo nijak ovlivňovat finální nanostrukturu na vláknech. Z výsledných snímků byly pomocí programu ImageJ měřeny průměr a délka vláken a počet lamel kebabu. Z těchto hodnot byla dále vypočtena charakteristická veličina pro lamely kebabu, a to počet lamel na jednotkovou plochu či délku.

Jelikož se po post-procesní shish-kebab úpravě může změnit celková krystalinita materiálu, tak byla také provedena analýza diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC), která díky sledování rozdílu v dodaném teple pro zvýšení teploty vzorku oproti referenci umožňuje studovat entalpii, a tedy míru uspořádanosti polymerních řetězců ve vzorku. Crescenzi a kol. [54] ve své studii zjistili hodnotu entalpie pro PCL se 100% krystalinitou ($135,44 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$), díky čemuž mohly být výsledky této analýzy převedeny na procentuální krystalinitu jednotlivých materiálů. Analýza byla provedena na přístroji Mettler Toledo DSC 1/700. Vzorky vážící mezi 8–13 mg byly vždy měřeny v tripletech. Nejdříve byly po dobu 2 minut ponechány při teplotě $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ a v druhém kroku pak ohřívány z $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ na $100 \text{ }^\circ\text{C}$ s rychlostí ohřevu $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

K ověření, zda se nemění molekulová hmotnost polymeru reakcí s krystalizačním roztokem při přípravě shish-kebab vrstev, byla provedena analýza gelová permeační chromatografie. Měření probíhalo na přístroji Dionex Ultimate 3000 HPLC v tripletech od každého materiálu rozpuštěných v tetrahydrofuranu (THF). Hmotnostní koncentrace PCL v THF byla $3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Mobilní fáze THF protékala

kolonou Phenomenex Phenogel 1E5 průtokem 1 ml·min⁻¹ při teplotě 35 °C po dobu 15 minut. K detekci polymeru byl použit ELSD detektor Varian 385-LC

3.1.5 In-vitro buněčné testy

Z připravených vybraných NFSK materiálů byly pomocí kovového děrovače vysek-nuty vzorky o 1 cm². Od každého materiálu bylo připraveno osm vzorků pro každý odběrový den, z čehož byly čtyři vzorky s buňkami a jeden bez buněk (negativní kontrola NC) určeny pro analýzu metabolické aktivity buněk (CCK-8), dva vzorky pro fluorescenční mikroskopii a jeden pro SEM. Vzorky byly po vložení do 48-jamkové mikrotitrační destičky zatíženy skleněnými dutými válečky k zamezení plování při nasazování buněčné suspenze. Dále byly materiály sterilizovány pomocí ethylenoxidu a ponechány při pokojové teplotě 14 dní odvětrávat. Pro testování bylo vybráno 9 materiálů, a to pouze materiály PCL45_CF16, PCL45_82 a PCL80_82 a jejich příslušné NFSK připravené z obou krystalizačních roztoků, s PCL45 i PCL80. K tomu byly dále buňky nasazeny do sedmi jamek s médiem bez materiálů, což posloužilo jako pozitivní kontrola (PC), neboli kontroly životaschopnosti buněk v průběhu celého experimentu.

In-vitro testy byly vyhodnocovány po 24 hodinách, poté po 3 dnech a po 7 dnech. Z lahve s kultivační buněčnou suspenzí bylo nejdříve odsáto médium, buňky na dně opláchnuty v PBS a k poté k nim přidáno 1,5 ml trypsinu, který zapříčiní oddělení buněk od stěn lahve. Po pěti minutách v inkubátoru byla suspenze několik pipetována, aby se rozbily buněčné kolonie a na automatické počítače buněk (NanoEntek Eve) spočítána koncentrace buněk v suspenzi. Pro experiment bylo připraveno 200 ml buněčné suspenze o koncentraci 1·10⁴ buněk na 1 ml média. Do každé jamky bylo automatickou pipetou nadávkováno 500 µl této buněčné suspenze, pouze do jamek negativní kontroly bylo přidáno 300 µl samotného média. Plata byla uložena do inkubátoru (Heracell VIOS 160i), který měl nastavenou teplotu prostředí na 36,7 °C a koncentraci CO₂ na 4 %. V každý testovací den byly buňky pozitivní kontroly nasnímány optickým mikroskopem Olympus CKX53 k ověření jejich životaschopnosti a adheze.

Ke zkoumání životaschopnosti, adheze a proliferace buněk byl využit 10% roztok CCK-8. Jedná se o kolorimetrický test k určení počtu živých buněk v suspenzi, kde se žlutě zbarvená tetrazoliová sůl metabolickou aktivitou dehydrogenáz uvnitř buněk

redukuje na oranžově zbarvenou sůl formazan [55]. Množství formazanu v roztoku je pak přímo úměrné počtu živých buněk. Nejdříve bylo do nových plastových jamek pipetováno 300 μ l 10% CCK-8 a poté do nich přendány jednotlivé materiály z původních jamek tak, aby nebyly zmuchlané. Materiály byly přemístěny do nových destiček z toho důvodu, aby nebyla metabolická aktivita ovlivněna buňkami mimo materiál, adherovaných na plastu jamek. U pozitivní kontroly bylo odebráno opatrně médium z jamky, aby se neodsály adherované buňky na dně kultivační jamky a přidáno také 300 μ l 10% CCK-8. Následovala inkubace těchto plastových destiček v inkubátoru po dobu dvou hodin. Poté bylo z každé jamky odebráno 100 μ l roztoku do 96-jamkové destičky a provedeno měření absorbance při 450 nm ve spektrofotometru Tecan Spark. Zbylý roztok CCK-8 byl z jamek odebrán a materiály byly následně opláchnuty v čistém PBS. Dále bylo do jamek k materiálům pipetováno 300 μ l 2,5% glutaraldehydu po dobu 15 minut při 4 °C a poté byly vzorky dvakrát opláchnuty PBS. Glutaraldehyd slouží jako síťovací činidlo bílkovin, čímž se dosáhne fixace buněk pro jejich další zkoumání na SEM a fluorescenčním mikroskopu. Buňkám určeným pro sedmý den bylo v průběhu třetího dne vyměněno médium, kdy bylo odebráno 300 μ l a přidáno 500 μ l nového média DMEM. Průběh popsané procedury byl stejný pro všechny testovací dny.

Pomocí barviva DiOC6 byla barvena cytoplazmatická membrána buněk po dobu 20 minut při pokojové teplotě. DiOC6 se nespecificky váže na membránu pomocí hydrofobních interakcí. Barvivem Phalloidin FITC byla specificky barvena aktinová vlákna buněčného cytoskeletu v cytoplazmě buňky po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Buněčná jádra byla obarvena barvivem DAPI, které se specificky váže na DNA, po dobu 15 minut při pokojové teplotě. Vzorky byly mezi barveními dvakrát opláchnuty v PBS. Vizualizace obarvených buněčných struktur proběhla na fluorescenčním mikroskopu Zeiss Axio Observer.

Pro analýzu na SEM musely být buňky nejdříve dehydratovány. Z jamek byl odebrán glutaraldehyd a materiály dvakrát opláchnuty v čistém PBS. Dehydratace byla provedena ethanolovou řadou o vzrůstající koncentraci (60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 % a 100 %). Do jamek bylo dávkováno 500 μ l ethanolu dané koncentrace a poté byly vzorky vždy inkubovány při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Po uplynutí této doby byl odsán ethanol o nižší koncentraci a následně přidáno 500 μ l ethanolu o

vyšší koncentraci. Po inkubaci v nejvyšší 100% koncentraci ethanolu byly materiály vyndány z jamek na parafilm, kde se nechaly dostatečně vyschnout, a pak byly vráceny do suchých jamek. Materiály byly poté rozstřiženy napůl a nalepeny z lícni i rubové strany na kovové terčičky a standardně na ně byla nanесena vrstva zlata, aby byly elektricky vodivé a následně byly buněčné struktury vizualizovány pomocí SEM.

3.2 Výsledky a diskuze

V této kapitole jsou uvedeny výsledky jednotlivých částí experimentu popsaných v předchozí kapitole 3.1. Zároveň je snahou této kapitoly diskutovat nad možnými příčinami výsledků a trendy v nich.

3.2.1 Zvlákňování a plošná hmotnost vrstev

Ačkoliv byly parametry při elektrickém stejnosměrném zvlákňování nastaveny kromě odtahové rychlosti vždy stejně, viz podkapitola 3.1.2, tak se každý polymerní roztok choval při procesu jinak, a to jak rychlostí zvláknění roztoku z celého zásobníku, která se mohla lišit až o 100 %, tak i tvorbou vleček, které zůstávaly viset na krajích zvlákňovací elektrody, což mohlo poškodit okraje výsledné vrstvy na podkladové textilii. K tomuto poškození došlo u zvlákňování vrstvy z PCL80_82, kvůli čemuž byla také zvýšena odtahová rychlost podkladové textilie na dvojnásobek a velká část okraje nebyla použita k dalším analýzám. Rozdíl se také dal pozorovat na polymerních tryskách z jednotlivých polymerních roztoků, kdy například PCL45_CF12 či PCL80_64 měly velmi tenké trysky, které okem nebyly skoro vidět a u ostatních mohly být trysky tlustší, a tudíž byly lépe viditelné.

Zvlákňování s cílem vytvořit stejnou plošnou hmotnost u materiálů PCL45_82_M a PCL80_82_M bylo poměrně úspěšné, kdy se podařilo připravit vrstvy s $22,4 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$, respektive $23,2 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$, to je rozdíl pouze $0,8 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$, což spadá do rozmezí směrodatných odchylek, viz Tabulku 4. Dá se tedy konstatovat, že průměrně byly plošné hmotnosti srovnatelné. Elektrické zvlákňování je typické pro širokou distribuci plošných hmotností přes plochy výsledných materiálů, a to kvůli samoorganizaci tvorby nanovláken ve zvlákňovacím prostoru. Tyto dva finální elektricky zvlákněné materiály a jejich NFSK úprava byly také analyzovány na SEM a jejich morfologie a struktura odpovídaly stejným materiálům zvlákněným dříve, jejichž snímky jsou

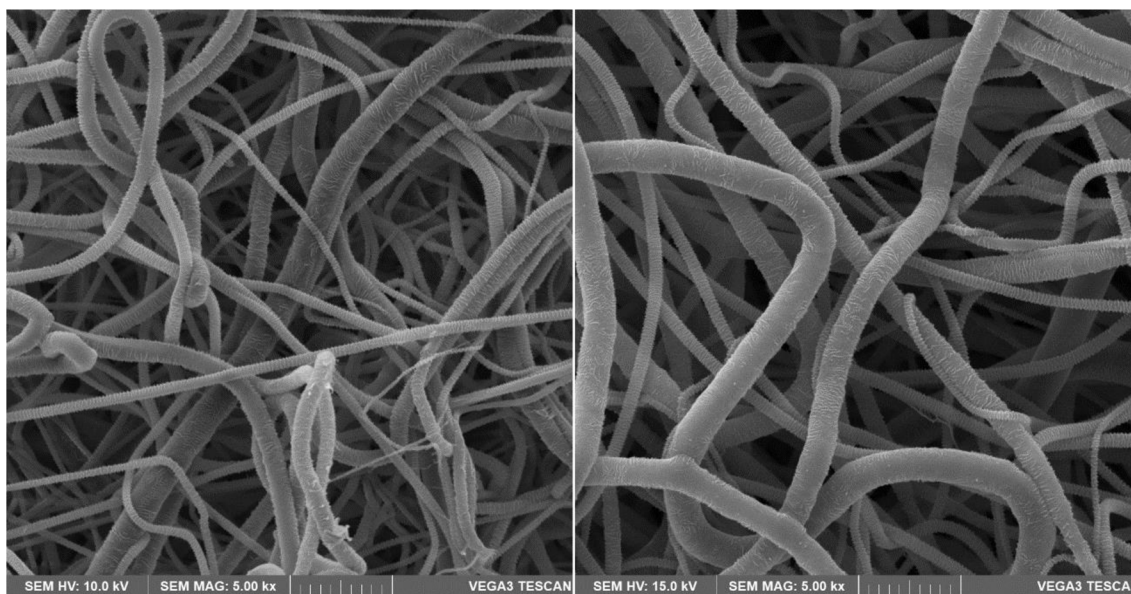
vidět v následující podkapitole 3.2.2. Plošné hmotnosti všech připravených základních i upravených vrstev jsou uvedeny v Tabulce 4. Z výsledků vyplývá, že se plošná hmotnost u materiálů s post-procesní shish-kebab úpravou zvyšuje u jednotlivých materiálů různě. U materiálu PCL45_CF16_PA80 došlo oproti základní vrstvě ke snížení plošné hmotnosti, což mohlo být způsobeno vážením čtverce o mírně menší ploše než 1 cm² a také nehomogenitou distribuce plošné hmotnosti v rámci dané vlákně vrstvy. Zvýšení bylo zřejmě způsobeno přidaným polymerem z krystalizačního roztoku. Vrstva PCL80_82 měla při elektrickém zvláknování poměrně nízkou produktivitu, což je pro polymerní roztoky s vyšší molekulovou hmotností typické, a tedy i poměrně nízkou plošnou hmotnost. TO se také projevilo v obtížné manipulaci s tímto materiálem a naopak PCL45_CF12 i CF16 měly výrazně větší plošné hmotnosti než ostatní materiály, a proto se s nimi manipulovalo nejsnáze ze všech testovaných materiálů.

Tabulka 4: Plošné hmotnosti všech elektricky zvlákněných základních materiálů i materiálů po post-procesní úpravě. SD značí směrodatnou odchylku. SK značí post-procesní úpravu buď zředěným polymerním roztokem PCL45 nebo PCL80. M značí materiály, při jejichž výrobě byla optimalizována odta-hová rychlost tak, aby se dostaly na co nejpodobnější plošnou hmotností.

Materiál	Plošná hmotnost ± SD [g·m⁻²]	SK	Plošná hmotnost [g·m⁻²]
PCL45_82	25,8 ± 0,2	PA45	32,7 ± 2,6
		PA80	28,0 ± 2,2
PCL45_82_M	22,4 ± 0,3	PA80	27,0 ± 0,0
PCL45_CF16	71,9 ± 0,4	PA45	79,7 ± 2,6
		PA80	64 ± 1,6
PCL80_82	11,6 ± 1,6	PA45	13,3 ± 0,5
		PA80	12,7 ± 0,9
PCL80_82_M	23,2 ± 3,7	PA80	34,0 ± 1,4
PCL45_CF12	56,9 ± 3,6		
PCL80_64	39,2 ± 5,5		

3.2.2 Shish-kebab struktury a výběr materiálů pro další testy

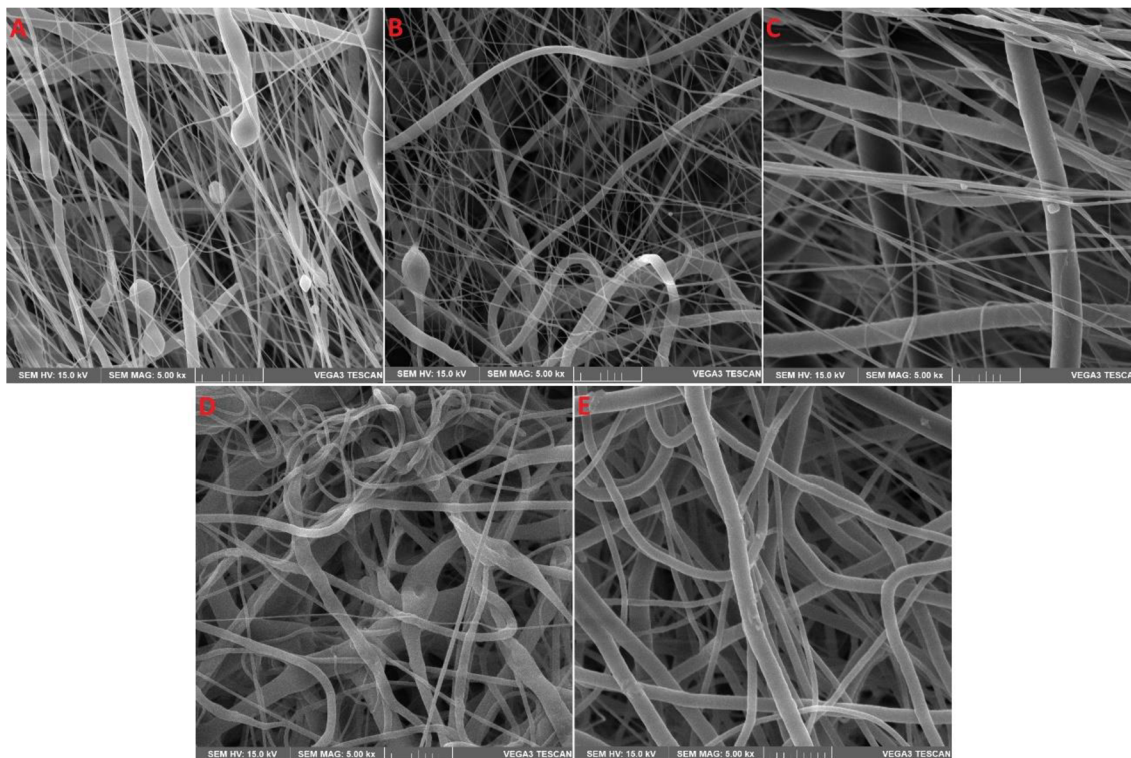
Na základě snímků ze SEM byly z pěti zvlákněných materiálů vybrány pouze tři, které měly vhodná jak původní neupravená vlákna, tak i strukturu shish-kebab. Ze snímků vyplývá, že spodní i vrchní strana materiálů po post-procesní shish-kebab úpravě vypadá srovnatelně, a tedy proces tvorby lamel kebabů proběhl stejně na obou stranách, viz Obrázek 18.



Obrázek 18: Nalevo spodní strana a napravo vrchní strana neupraveného elektricky zvlákněného materiálu PCL80_82_PA45. SEM Tescan, měřítko 10 μ m.

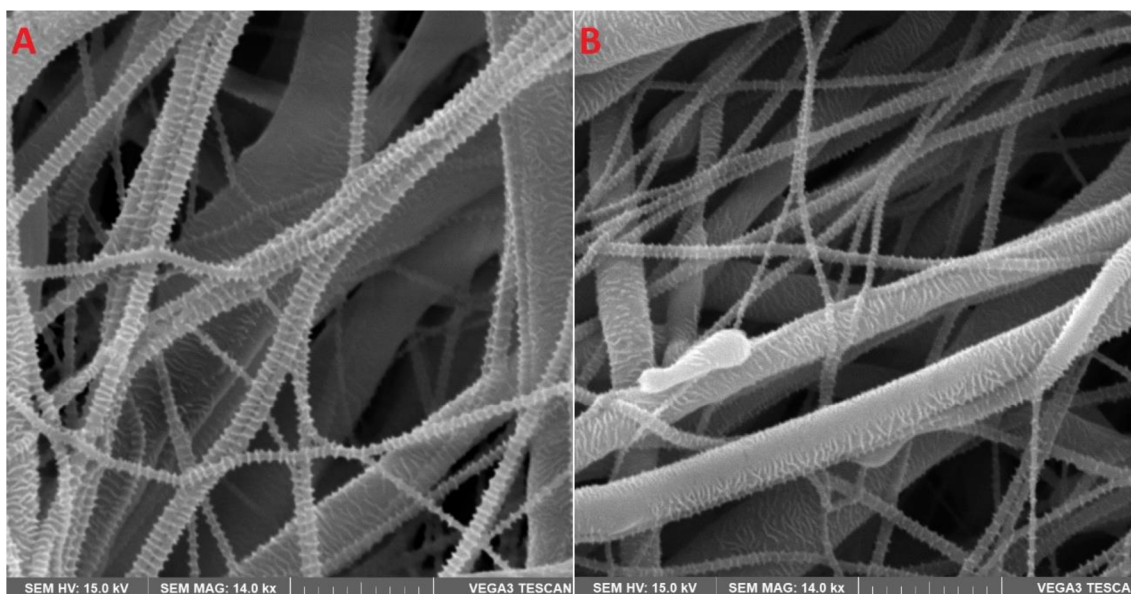
Dále byly porovnávány jak základní, tak NFSK vrstvy podle morfologie vláken, jejich míry vzájemné slepenosti, přítomnosti koráلكových struktur či jiných nevlákněných defektů, které v tomto případě byly brány jako nežádoucí deformace a v neposlední řadě podle morfologie lamel kebabů neboli povrchových nárůstů na tělech vláken po post-procesní úpravě, jejich tvaru, pravidelnosti, periodicity a deformací. Předem je potřeba zmínit, že u některých materiálů šlo hůře zaostřit strukturu shish-kebab na vláknech, což mohlo ovlivnit vyhodnocení těchto materiálů. Obecně se hůře zaostřovaly materiály, kde byl použit krystalizační roztok s PCL80, ačkoliv na všechny materiály byla nanášena vrstva zlata stejně. Rozdíly mezi NFSK za použití krystalizačního roztoku s PCL45 nebo PCL80 byly velmi málo patrné, což mohlo být způsobeno horším zaostřením snímků a také technickými limity použitého mikroskopu Tescan, který nedovoloval při velkém zvětšení dostatečně zaostřit malé

lamely kebabu. Avšak mikroskop Tescan byl dostupný přímo autorovi této diplomové práce za snazšího přístupu i ekonomicky méně náročného spotřebního materiálu.



Obrázek 19: Neupravená vlákna připravená z různých polymerních roztoků. A) PCL45_82, B) PCL45_CF12, C) PCL45_CF16, D) PCL80_64 a E) PCL80_82. SEM Tescan, měřítko 10 μm .

U materiálu PCL45_82 bylo pozorováno poměrně časté přerušení vláken zakončené malým korálkem a občas na vrchní straně vláken byla místa bez lamel kebabů, což ale mohlo být způsobeno až skenováním pomocí SEM, kdy byly jemné struktury kebabů roztaveny energií proudu elektronů (15 kV). Vlákná měla poměrně zajímavou distribuci průměrů, která by se dala označit jako bimodální, kdy některá vlákna měla průměr větší jak 1,5 μm a mezi nimi bylo velké množství vláken s průměrem kolem 300 nm, viz Obrázek 19A. Průměrný průměr vláken dosáhl 685 nm, přičemž medián průměru činil 343 nm. Lamely kebabu byly na menších vláknech pravidelné a výrazné, na větších vláknech už nepravidelné a méně výrazné, přičemž strukturně připomínaly díky své náhodné orientaci na povrchu vlákna mořské korály. Při použití krystalizačního roztoku s PCL80 se zdály být lamely kebabu menší a méně výrazné, avšak to mohlo být způsobeno horším zaostřením snímků. Snímky NFSK jsou vidět na Obrázku 20.

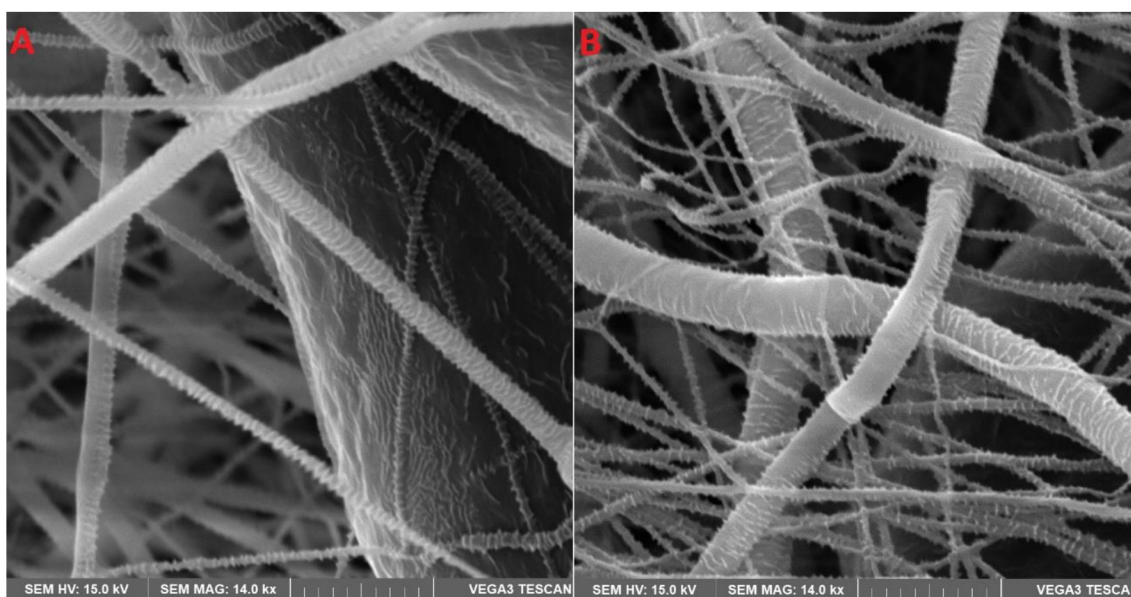


Obrázek 20: SEM snímky shish-kebab struktur na materiálu PCL45_82. A) PCL45_82_PA45 a B) PCL45_82_PA80. SEM Tescan, měřítko 5 μm .

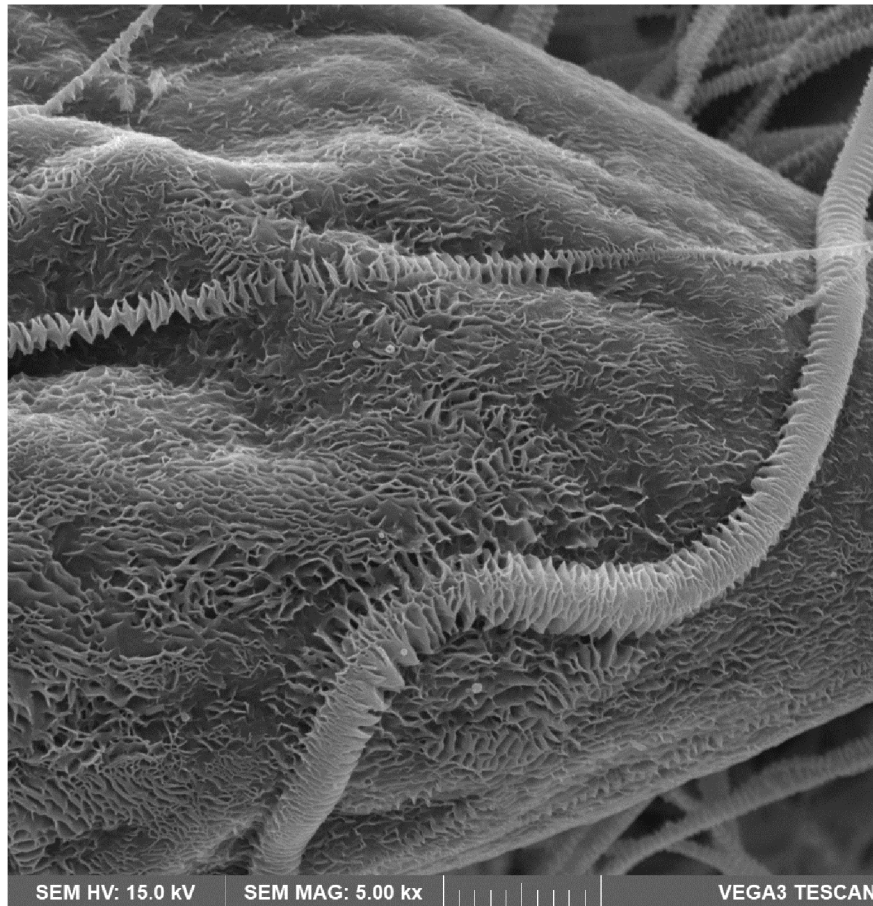
Vlákna materiálu PCL45_CF12 také byla na určitých místech přerušena, avšak ne tolik jako u PCL45_82. Výskyt koráلكové struktury byl v tomto případě mnohem výraznější, kdy vrstva obsahovala velké množství velkých koráلكů (kapek polymeru), což bylo pravděpodobně způsobeno příliš nízkou koncentrací polymerního roztoku, a tedy i jeho nízkou viskozitou. Vrstva opět obsahovala dvě skupiny vláken, menší první skupina obsahovala vlákna o průměru větším než 1 μm a druhá větší skupina velké množství opravdu jemných vláken o průměru kolem 120–300 nm, viz Obrázek 19B. Průměrný průměr vláken byl 400 nm a medián pak 255 nm. Lamely kebabu byly výrazné a periodické jak na jemnějších, tak i tlustších vláknech, avšak vlákna se po shish-kebab úpravě zdála být mírně slepená k sobě. To bylo pravděpodobně způsobeno pentyl-acetátem, který ačkoliv je pro PCL špatným rozpouštědlem, tak z velké části rozpustil zmíněná jemná vlákna, která se tím přilepila na ta s větším průměrem. Rozdíl mezi dvěma použitými krystalizačními roztoky nebyl ze snímků nijak patrný, viz Obrázek 21.

Materiál PCL45_CF16 už nevykazoval přerušování vláken, patrně díky vyšší koncentraci polymerního roztoku a míra výskytu koráلكové struktury byla také oproti nižší koncentraci omezena, avšak koráلكy se stále vyskytovaly. Rozdělení průměrů vláken už nebylo tak extrémní, ale stále se vyskytovala jak vlákna s průměrem větším 2,5 μm , tak i určitá síť jemných vláken s průměrem přibližně 300–400 nm, viz Obrázek 19C. Vlákna měla průměrný průměr 840 nm s mediánem činícím 433 nm.

Průměr vláken byl obecně větší než u nižší koncentrace, což bylo nepochybně způsobeno právě vyšší koncentrací. U větších vláken byla také pozorována určitá deformace jejich povrchu. Lamely kebabu byly opět výraznější u jemných vláken, ale jejich struktura byla dobře patrná i na těch s větším průměrem, ačkoliv jejich pravidelnost už byla horší a orientace vůči ose vlákna náhodná. Na tomto materiálu se také podařilo pořídit kvalitní snímek shish-kebab struktury na korálku (nebo vláknu s velmi velkým průměrem), která připomíná již zmíněný mořský korál, viz Obrázek 22. Tento jev nepravidelných a neorientovaných lamel kebabu je pravděpodobně způsoben vnitřním uspořádáním polymerních řetězců ve vláknech, kdy vlákno s velkým průměrem nemá řetězce paralelně srovnané po směru délky vlákna, ale právě díky tloušťce náhodněji a podle nich se pak orientují řetězce v lamelách kebabu. Shish-kebab struktura byla výrazná, periodická a s kolmou orientací na osu vlákna u vláken s menším průměrem. Orientace se z velké části zachovala i u vláken s větším průměrem, ale byla zde už opět pozorována tendence odchylovat se od kolmého úhlu na osu vlákna. Pro materiál PCL45_CF16_PA80 se zdály být lamely kebabu méně výrazné, a to hlavně na vláknech s větším průměrem, viz Obrázek 23.

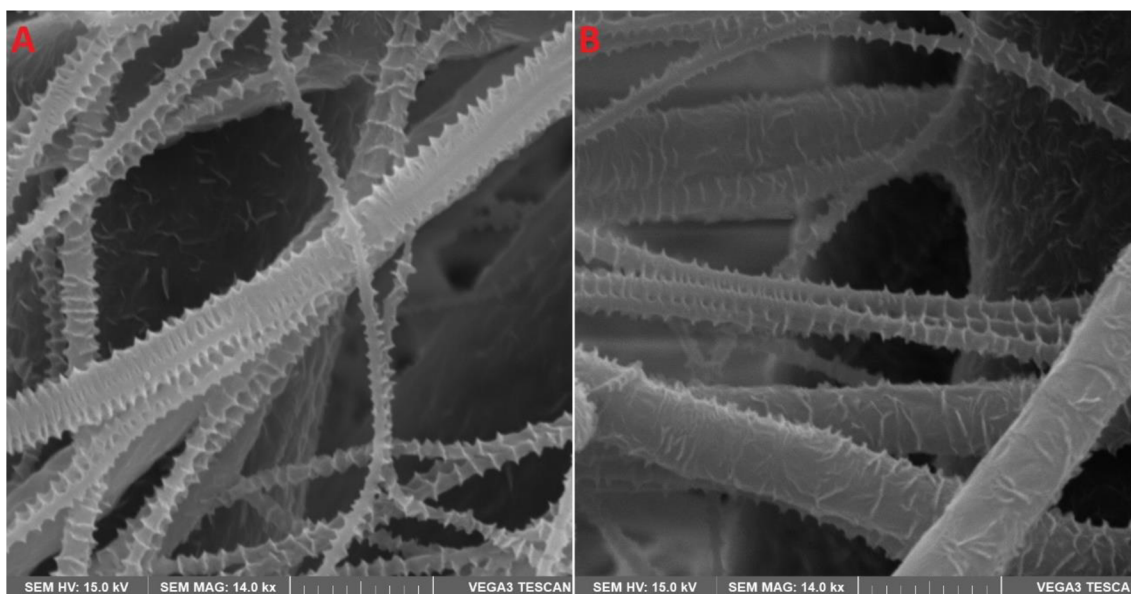


Obrázek 21: SEM snímky shish-kebab struktur na materiálu PCL45_CF12. A) PCL45_CF12_PA45 a B) PCL45_CF12_PA80. SEM Tescan, měřítko 5 μm .

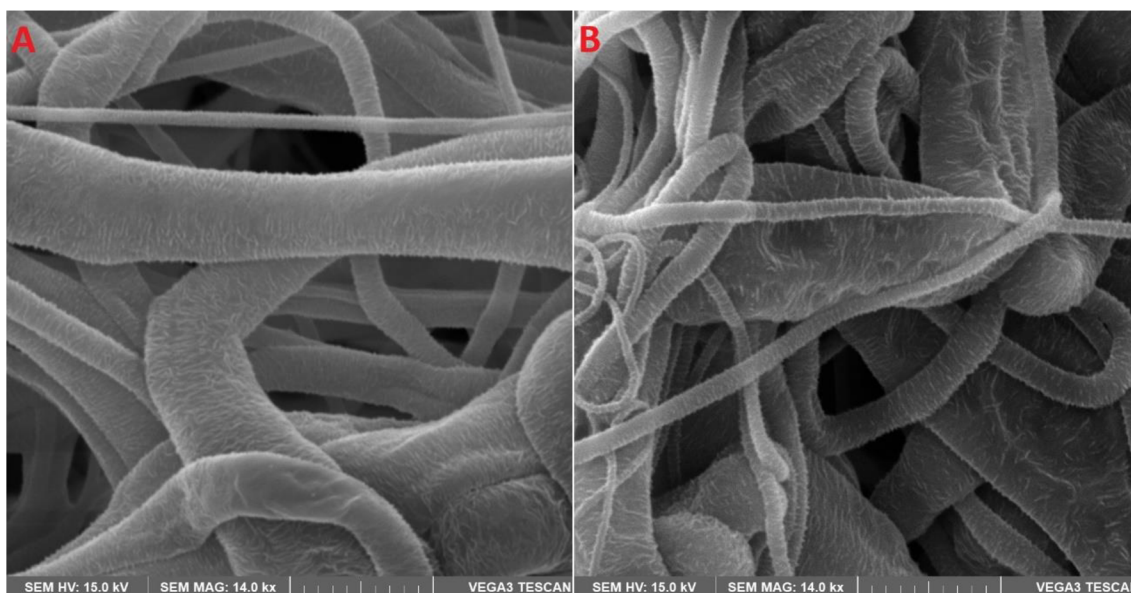


Obrázek 22: Shish-kebab struktura na velké polymerní kapce – defektu ve vlákenném materiálu PCL_CF16_PA45.

Morfologicky nejvíce deformovanou vrstvu měl materiál PCL80_64. Při procesu zvláknování se s velkou pravděpodobností neodpařilo rozpouštědlo z polymerního roztoku dostatečně a z toho důvodu byla vlákna při dopadu na podkladovou textilií ještě částečně rozpuštěná. Výsledkem byla vrstva se zřetelně splenými vlákny k sobě, jejich povrch byl deformovaný a často byly pozorovány větší uschlé kapky polymeru a korálky na vláknech, viz Obrázek 19D. Průměr vláken byl poměrně proměnlivý po jejich délce, ale z měření vyšel průměrný průměr vláken 905 nm a medián průměru pak byl 673 nm. Shish-kebab struktura byla na menších vláknech pravidelná a orientovaná, na větších vláknech pak méně orientovaná, výraznost byla na všech vláknech srovnatelná. Lamely kebabu se zdály být oproti materiálu PCL45_CF16_PA45 menší a byly blíže k sobě (menší periodičita), viz Obrázek 24. Struktura materiálu PCL80_64_PA80 vypadala podobně jako při použití krystalizačního roztoku s PCL45, okometricky se zdály být kebabu velmi mírně menší, ale to mohlo být způsobeno horším zaostřením vláken.



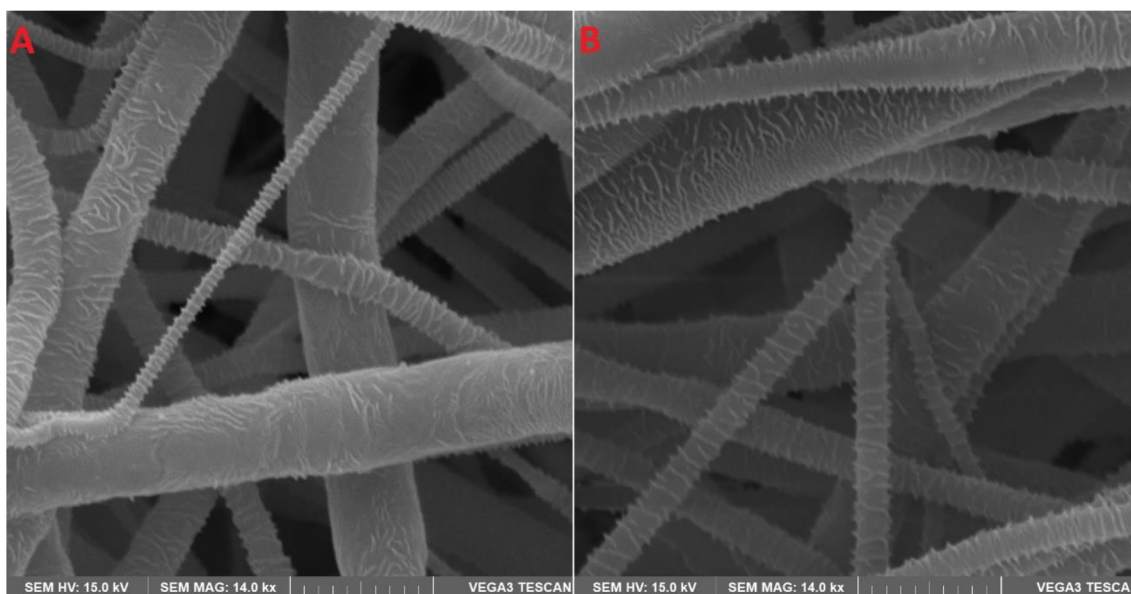
Obrázek 23: SEM snímky shish-kebab struktur na materiálu PCL45_CF16. A) PCL45_CF16_PA45 a B) PCL45_CF16_PA80. SEM Tescan, měřítko 5 μm .



Obrázek 24: SEM snímky shish-kebab struktur na materiálu PCL80_64. A) PCL80_64_PA45 a B) PCL80_64_PA80. SEM Tescan, měřítko 5 μm .

Vlákna materiálu PCL80_82 měla občas na povrchu zaschlé malé kapky polymeru, ale jinak byl jejich povrch z většiny hladký, nebyly pozorovány žádné deformace ani korálová struktura, viz Obrázek 19E. Průměr vláken neměl podle měření tak výrazné rozdělení jako u přechozích materiálů, avšak většina vláken měla průměr nad 1,5 μm . Vlákem s průměrem pod 500 nm bylo pozorováno jen málo. Vlákna dosáhla průměrného průměru 1381 nm a mediánu 1104 nm. Lamely kebabu byly výrazné a periodické, pouze na vláknech s větším průměrem se vyskytovala místa, kde chyběly úplně a povrch byl v místě mírně deformovaný. Na větších vláknech s průměrem

větším než 2 μm byla také struktura shish-kebab méně hustá, nepravidelná a s náhodnou orientací vůči ose vlákna. Vlákna materiálu PCL80_82_PA80 měla podobnou morfologii shish-kebab struktury jako PCL80_82_PA45, viz Obrázek 25.



Obrázek 25: SEM snímky shish-kebab struktur na materiálu PCL80_82. A) PCL80_82_PA45 a B) PCL80_82_PA80. SEM Tescan, měřítko 5 μm .

Na základě zde uvedených výsledků, jejichž shrnutí je uvedeno v Tabulce 5, byly vybrány pouze 3 materiály pro další analýzu přípravy shish-kebab struktury a jejího testování. Materiál PCL45_CF12 měl sice vyhovující shish-kebab strukturu, avšak kvůli nízké koncentraci polymerního roztoku příliš mnoho korálků na svých vláknech, což je v tomto případě nežádoucí jev, který by mohl ovlivnit výsledky in-vitro testování na buňkách. Materiál PCL80_64 měl slepená vlákna, která navíc byla deformovaná a měla na sobě korálky. Dále v sobě měl materiál uschlé polymerní kapky, které se při elektrickém zvláknování vůbec netransformovali do vláknenného tvaru a vlákna neměla po své délce homogenní průměr. Z toho důvodu byly tyto materiály v rámci experimentu vyřazeny z dalšího testování a ponechány tedy byly pouze materiály PCL45_82, PCL45_CF16 a PCL80_82, které neměly korálkovou strukturu anebo jen omezeně, neslepená vlákna a lamely kebabu byly také vyhovující.

Tabulka 5: Shrnutí výsledků přípravy základních a shish-kebab vláken k výběru vhodných materiálů. SD značí směrodatnou odchylku

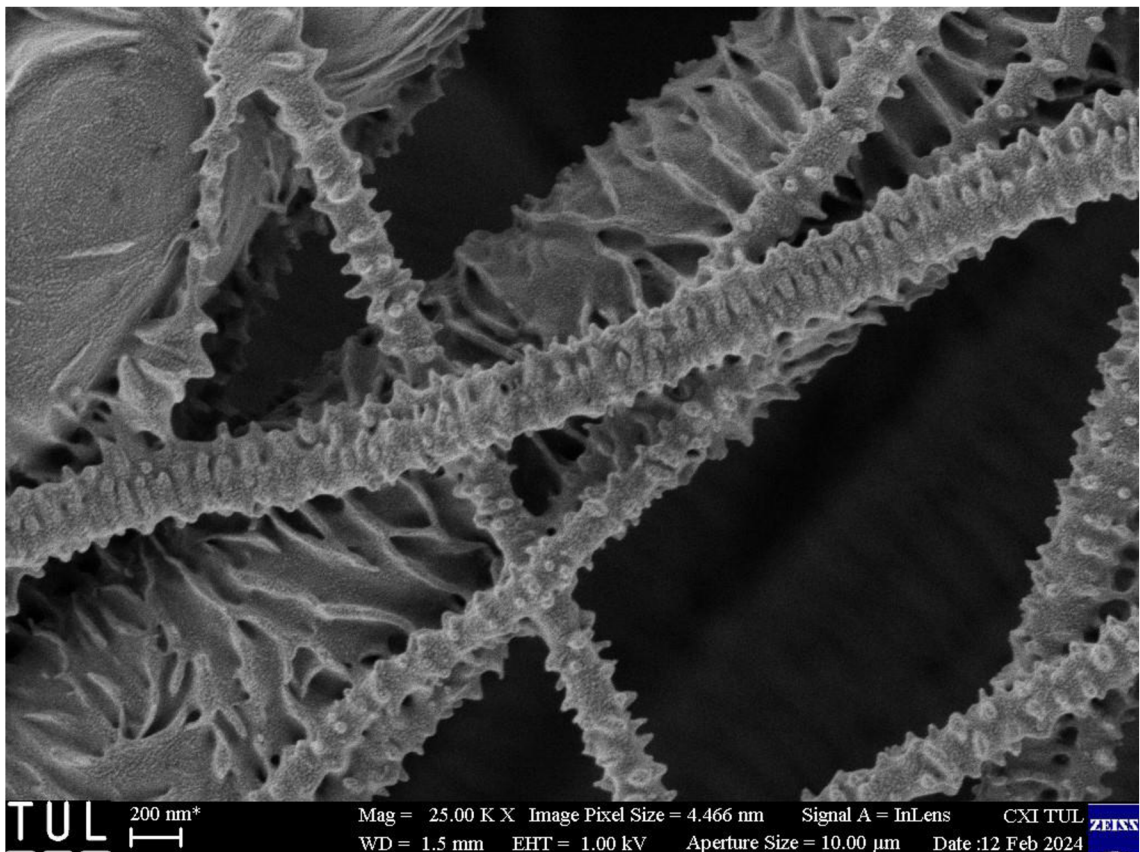
Materiál	Průměr vláken ± SD [nm]	Korálky	Deformace vláken	Shish-kebab
PCL45_82	685 ± 817	Omezeně	Přerušení vláken	Na menších výraznější
PCL45_CF12	400 ± 437	Ano	Přerušení vláken	Na všech
PCL45_CF16	840 ± 1114	Ano	Hrubý povrch	Na menších výraznější
PCL80_64	905 ± 689	Omezeně	Slepená vlákna, nehomogenní průměr	Málo výrazné
PCL80_82	1381 ± 803	Ne	Ne	Na větších někde chyběl

3.2.3 Analýza shish-kebab struktury

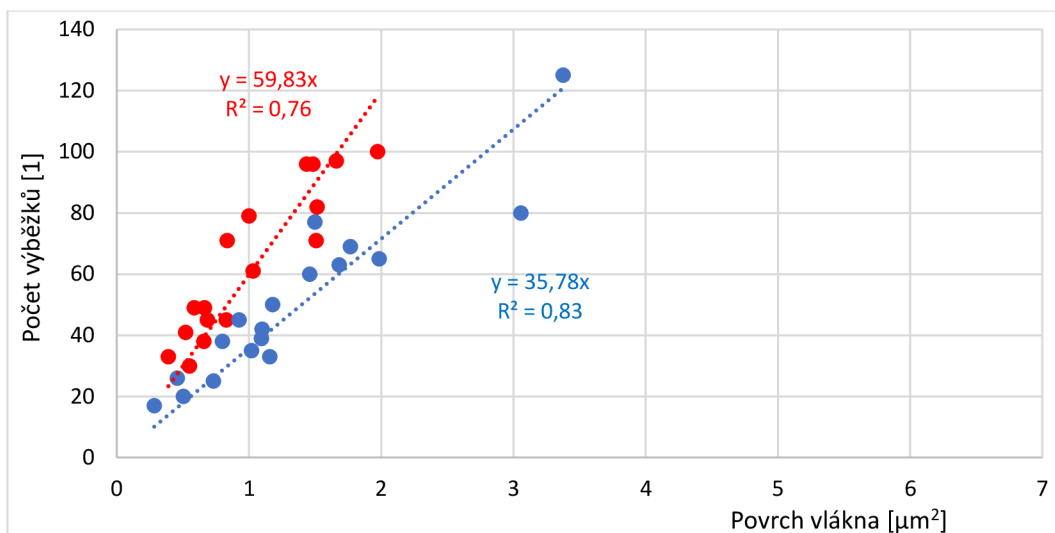
Jelikož nebylo u NFSK materiálů možné na základním SEM Tescan nasnímat strukturu lamel kebabů ve vysokém přiblížení dostatečně detailně a s vysokým rozlišením, tak byly vybrané tři materiály nasnímány na pokročilejším SEM Zeiss, viz podkapitola 3.1.4. Díky dosaženým detailům bylo na snímcích pozorováno, že lamely kebabu vypadají poměrně jinak, než jak bylo pozorováno u základního SEM, a dokonce taková struktura nebyla zmíněna ani v literatuře, viz podkapitola 2.3.3 a kapitola 2.4. Průměrné hodnoty charakteristických veličin jsou uvedeny v Tabulce 6 na konci podkapitoly. Více snímků ze SEM všech připravených materiálů je k vidění v Příloze A.

Shish-kebab struktura povrchových „nárůstů“ po post-procesní úpravě na zvlákněném materiálu PCL45_82_PA45 neměla očekávaný tvar, kdy je lamela kebabu vcelku kolem celého obvodu vlákna s kolmou orientací na osu takového vlákna. Místo toho byly na povrchu vláken pozorovány oddělené výstupky či výběžky polymeru s kruhovou základnou, které jsou na první pohled rozmístěny náhodně, ale vyskytuje se mezi nimi určitá míra periodicity, kdy jsou výstupky seřazené vedle sebe ve směru přibližně kolmém na osu vlákna a další řada výstupků je až o určitou vzdálenost dále, viz Obrázek 26. Zajímavým fenoménem je, že vlákna o větším průměru, přibližně větším jak 1,5 μm, již vykazují shish-kebab strukturu podobnější té očekávané, kdy už nemají lamely kebabu tvar výstupků, ale jsou protáhlejšího tvaru. Lamely však stále nejsou kolem celého obvodu vlákna, a navíc jejich orientace, ačkoliv většinou

stále přibližně kolmá na osu vlákna, má už náhodnější charakter, kdy byly na povrchu vidět také lamely, které měly orientaci podélnou s osou vlákna. U vláken s průměrem nad 2,5 μm bylo dále pozorováno, že na některých místech povrchu vláken chybí shish-kebab struktura úplně anebo je pouze řídká. Z důvodu velmi malého počtu nasnímaných vláken s druhou zmíněnou variantou lamel bylo počítáno pouze množství výstupků. Z vypočtených hodnot hustoty výběžků je zřejmé, že s povrchem vlákna roste počet výběžků přibližně lineárně, viz Graf 1, kde byl zvolen průsečík osy lineární regrese nula za předpokladu, že s nulovým povrchem nebude mít vlákno žádné výběžky. Čím mělo vlákno větší průměr, tím také přibližně lineárně rostl počet výběžků na jednotku délky vlákna, viz Přílohu B.1. Mezi průměrem a plošnou hustotou výběžků se žádná závislost neprojevila, viz Přílohu B.2.

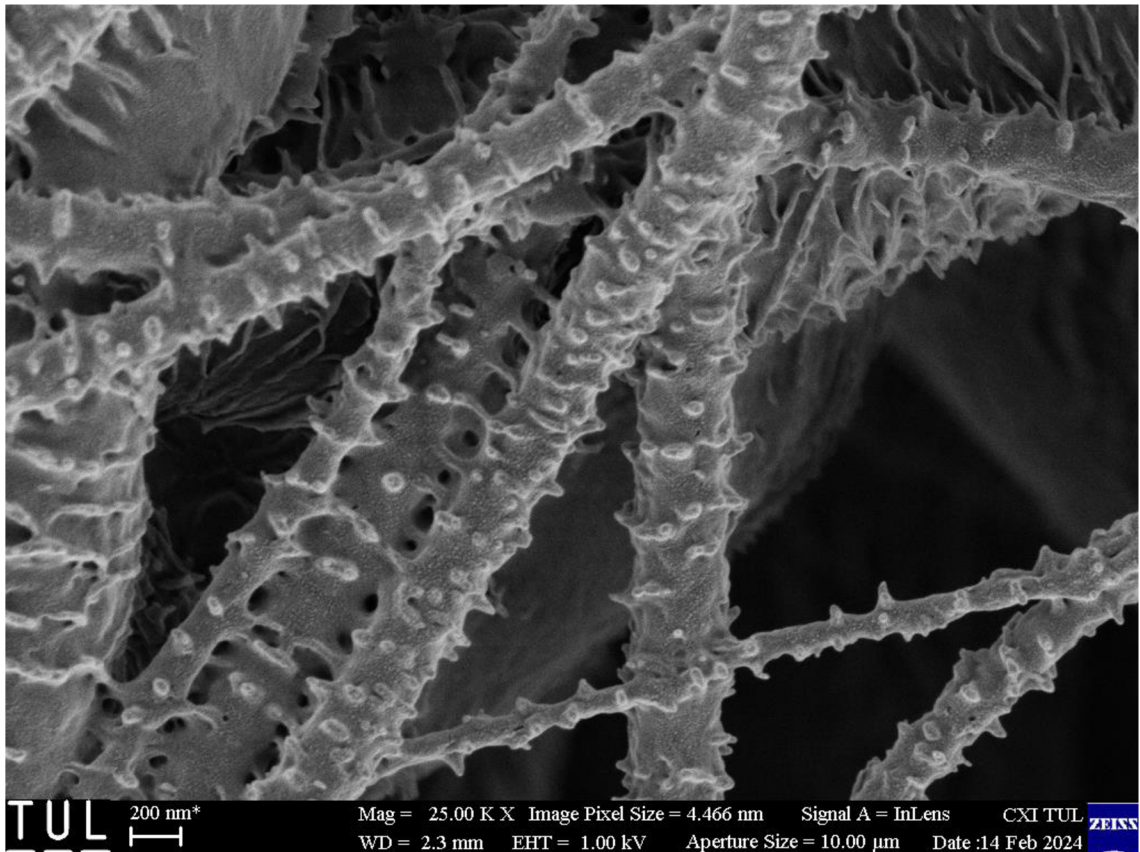


Obrázek 26: Shish-kebab struktura na materiálu PCL45_82_PA45. SEM Zeiss, měřítko 200 nm.



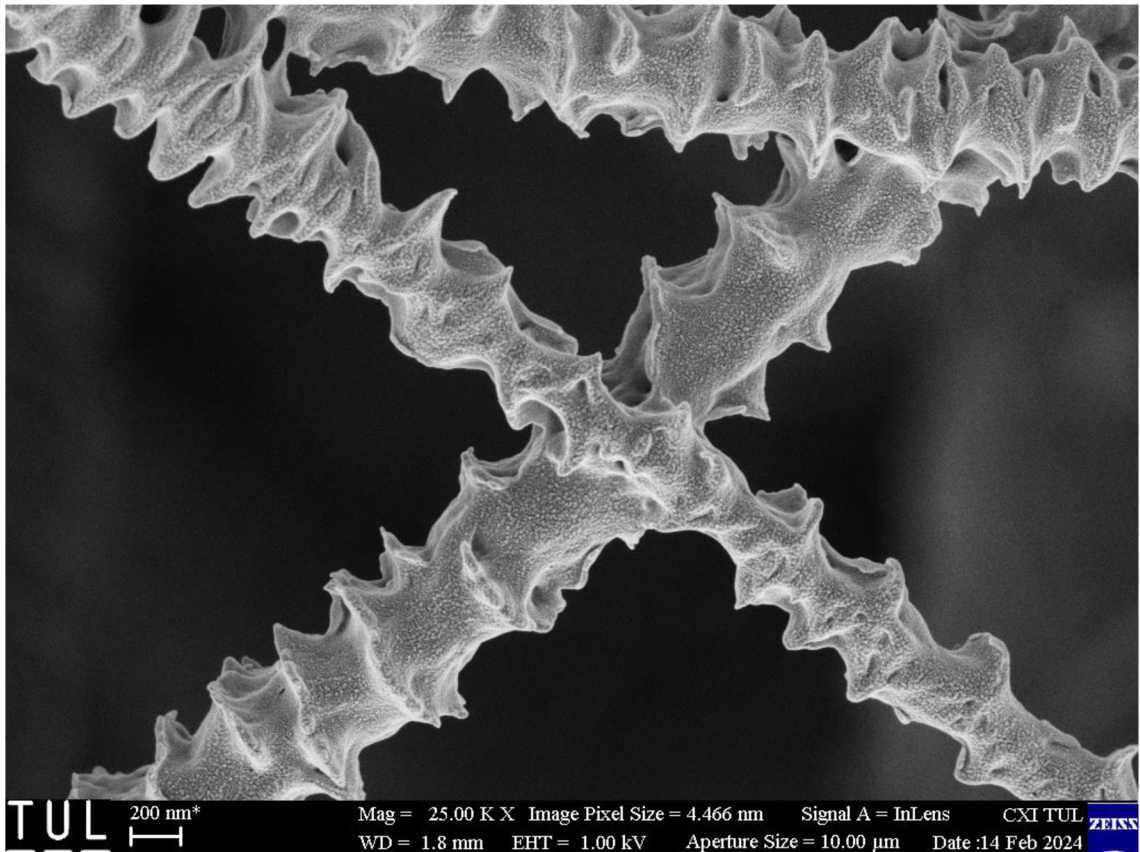
Graf 1: Závislost počtu výběžků na povrchu vlákna pro materiál PCL45_82_PA45 (červeně) a PCL45_82_PA80 (modře).

Morfologie shish-kebab struktury na materiálu PCL45_82_PA80 vykazovala stejnou tendenci jako při použití krystalizačního roztoku s PCL45, avšak ze snímků SEM bylo již okometricky zřejmé, že hustota polymerních výběžků je mírně nižší, než tomu bylo u jeho protějšku, viz Obrázek 27. To je podloženo i výsledným měřením hustoty výběžků, viz Graf 1, kde je také zřejmé, že hustota výběžků roste s povrchem vláken pomaleji, jelikož směrnice přímky z rovnice lineární regrese je více než 1,5x menší. Podélná i plošná hustota vykazovali stejné závislosti jako u PA45, viz Přílohu B.1 a B.2.

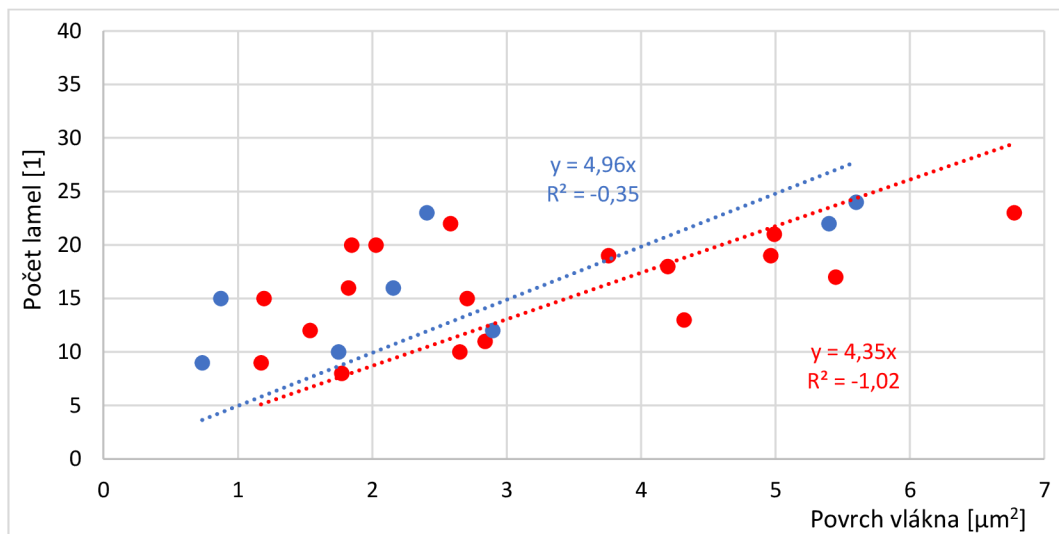


Obrázek 27: Shish-kebab struktura na materiálu PCL45_82_PA80. SEM Zeiss, měřítko 200 nm.

U materiálu PCL45_CF16_PA45 prokazovala morfologie shish-kebab struktury mnohem větší podobu k morfologii, která byla pozorována v literatuře. Lamely kebabu nebyly v některých případech stále narostlé kompletně kolem celého obvodu vlákna, ale už se nevyskytovaly polymerní výběžky, jako u NFSK vrstvy materiálu PCL45_82. Některé lamely byly již narostlé kolem celého obvodu vlákna, ale povrch jejich vrcholů nebyl hladký, což naznačuje, že se v bezprostřední blízkosti mohlo spojit více sousedních lamel do jedné. Morfologie lamel kebabů nezávisela na průměru vlákna, na všech byla přibližně stejná, ale u vláken s menším průměrem byla velikost lamel srovnatelná s průměrem vlákna, viz Obrázek 28, a u vláken s průměrem přibližně větším jak 2,5 μm byly lamely velmi řídké a na některých místech chyběly úplně. Hustota lamel kebabu je vidět na Grafu 2.



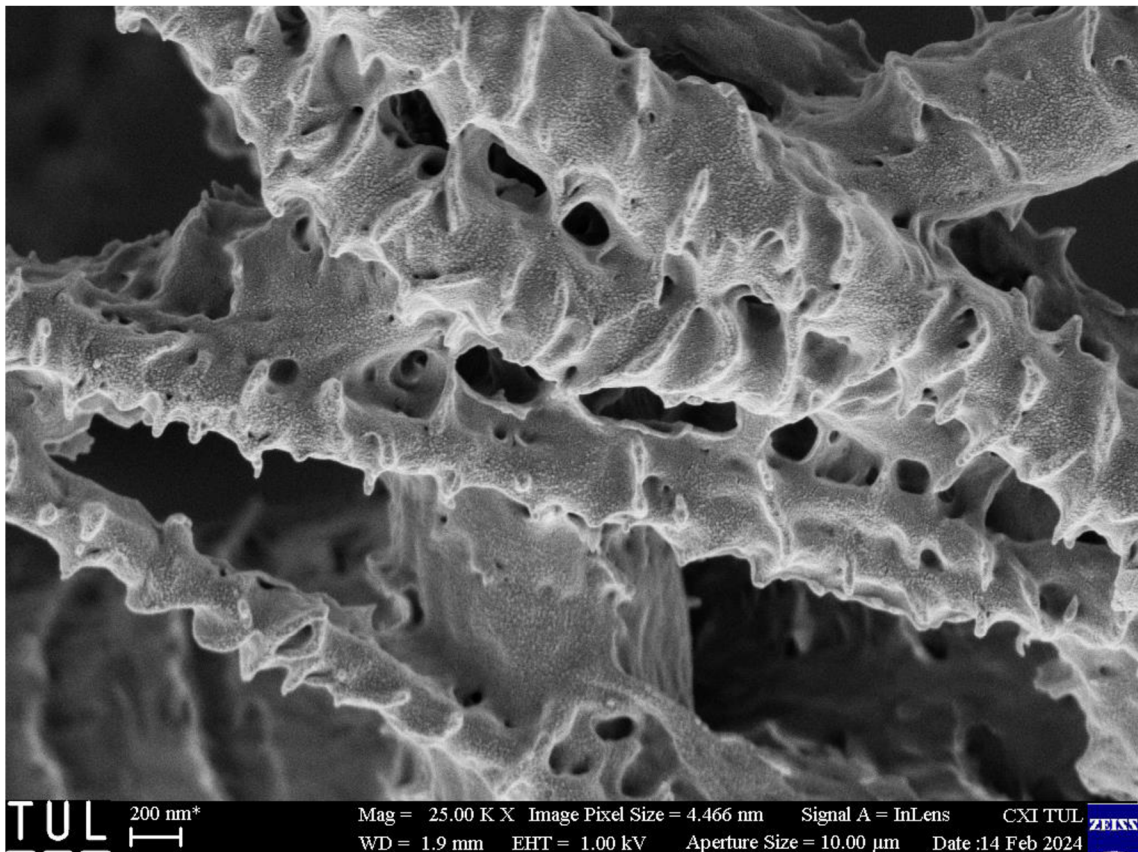
Obrázek 28: Shish-kebab struktura na materiálu PCL45_CF16_PA45. SEM Zeiss, měřítko 200 nm.



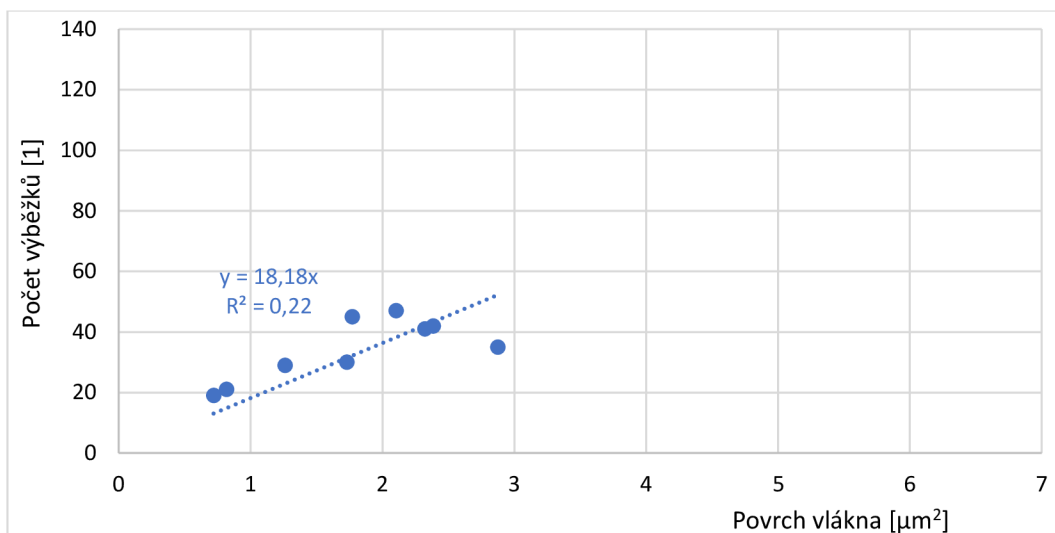
Graf 2: Závislost počtu lamel na povrchu vlákna pro materiál PCL45_CF16_PA45 (červeně) a PCL45_CF16_PA80 (modře, 1 odlehlá hodnota vyřazena).

Lamely kebabu materiálu PCL45_CF16_PA80 vypadaly také v půlce případů jako poměrně souvislé kotouče kolem celého obvodu vlákna, ale na druhou stranu vykazovaly větší roztržitost na jednotlivé krátké polymerní úseky, a proto byla druhá polovina považována spíše za výběžky než lamely. Výběžky se vyskytovaly spíše na

vláknech menšího průměru, nejvíce jich bylo v rozmezí 220–320 nm. Ačkoliv se lamely vytvořily i na vláknech o průměru kolem 300 nm, tak byly pozorovány spíše na vláknech s větším průměrem v rozmezí 450–1600 nm. Počet lamel u tohoto materiálu byl dle lineární regrese mírně větší než u protějšku s PA45, viz Graf 2. Hustota výstupků na tomto materiálu je však výrazně nižší než u NFSK vrstvy materiálu PCL45_82, viz Graf 3. Je ale třeba dodat, že měly jiný tvar s obdélníkovou základnou a velikost, kdy připomínaly spíše velmi krátkou lamelu a byly od sebe více vzdálené, viz Obrázek 29. U obou variant NFSK materiálů PCL45_CF16 nebyla pozorována výrazná závislost podélné hustoty lamel na průměru vlákna, viz Přílohu B.3, ale plošná hustota lamel závisela exponenciálně na průměru vlákna, viz Přílohu B.4, což je opačný trend než u materiálu PCL45_82.

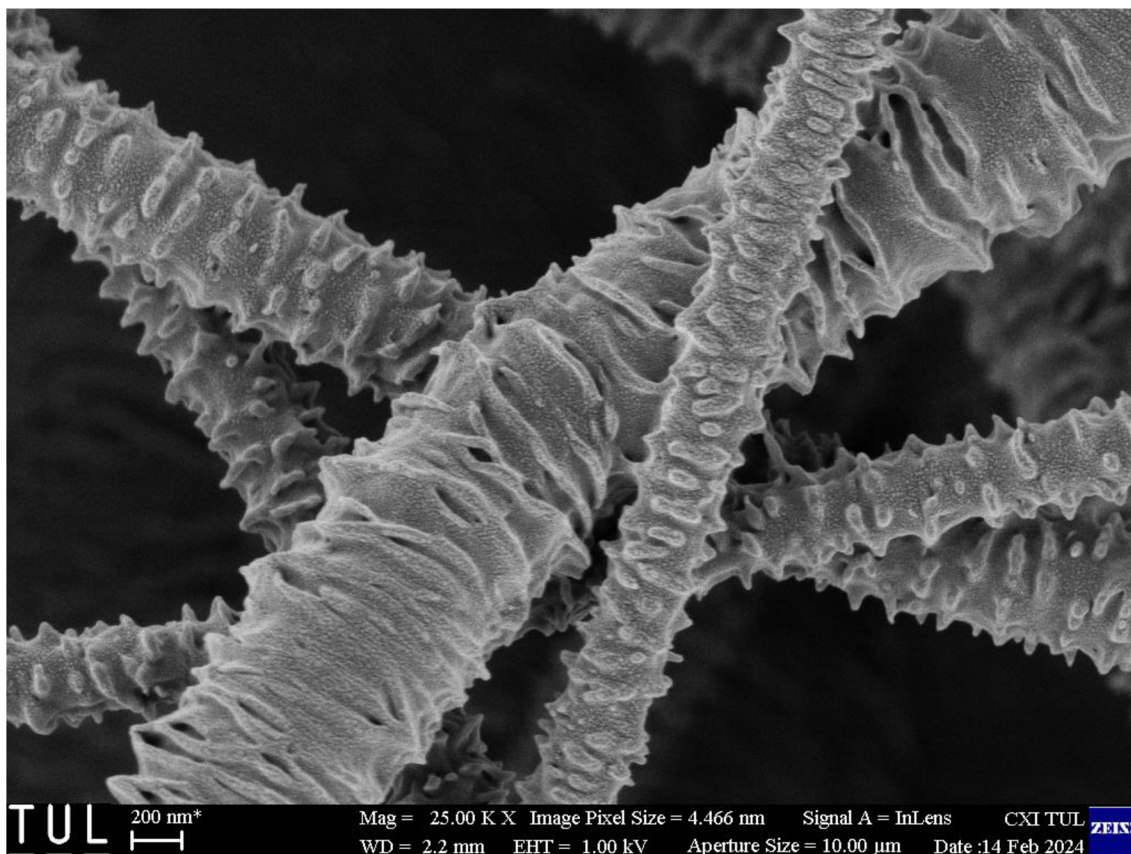


Obrázek 29: Shish-kebab struktura na materiálu PCL45_CF16_PA80. SEM Zeiss, měřítko 200 nm.



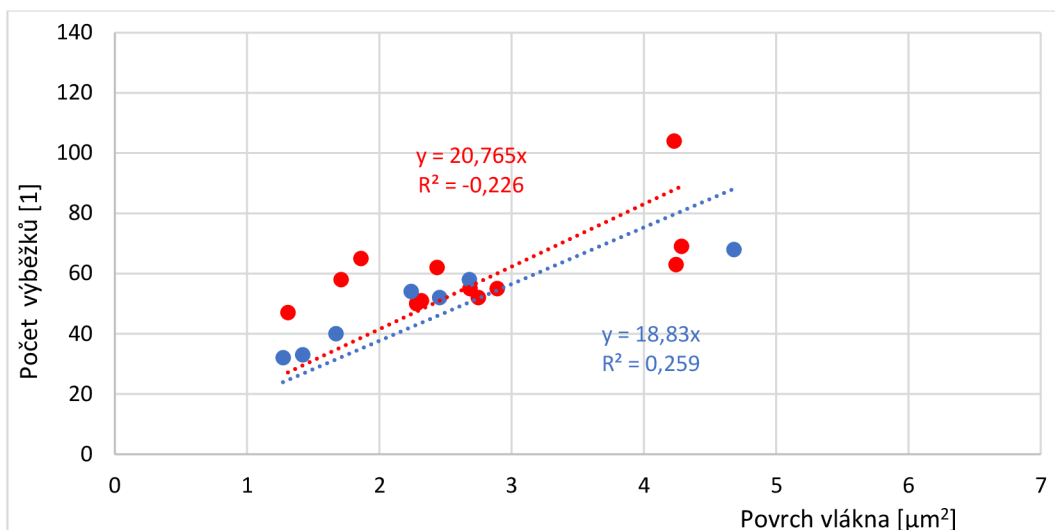
Graf 3: Závislost počtu výběžků na povrchu vlákna pro materiál PCL45_CF16_PA80.

Na materiálu PCL80_82_PA45 se tvořily spíše polymerní výstupky, ale pozorovány byly i lamely. Výstupky se tvořily na vláknech menšího průměru v rozmezí 300–600 nm a lamely naopak na vláknech většího průměru od 650 nm a výše. Lamely však nebyly většinou vcelku kolem celého obvodu vlákna, kdy se jednalo o spojení více sousedních lamel ve stejné úrovni. Výstupky byly tvarem podobné NFSK materiálu PCL45_82, avšak v určitých případech se také jednalo o velmi krátké lamely s obdélníkovou základnou, viz Obrázek 30. Počet výběžků na povrch vlákna je srovnatelný s počtem výběžků u materiálu PCL45_CF16_PA80, viz Graf 4. Počet lamel na povrch vlákna je srovnatelný s materiálem PCL45_CF16_PA45, viz Graf 5. Počty lamel i výstupků byly srovnatelné pro oba krystalizační roztoky PA45 i PA80 s mírně větší hodnotou pro PA45. Míra růstu počtu lamel a výběžků s rostoucím povrchem vláken se také zdá být u obou materiálů PA45 i PA80 srovnatelná. Morfologie obou variant kebabů nebyla závislá na průměru vláken.

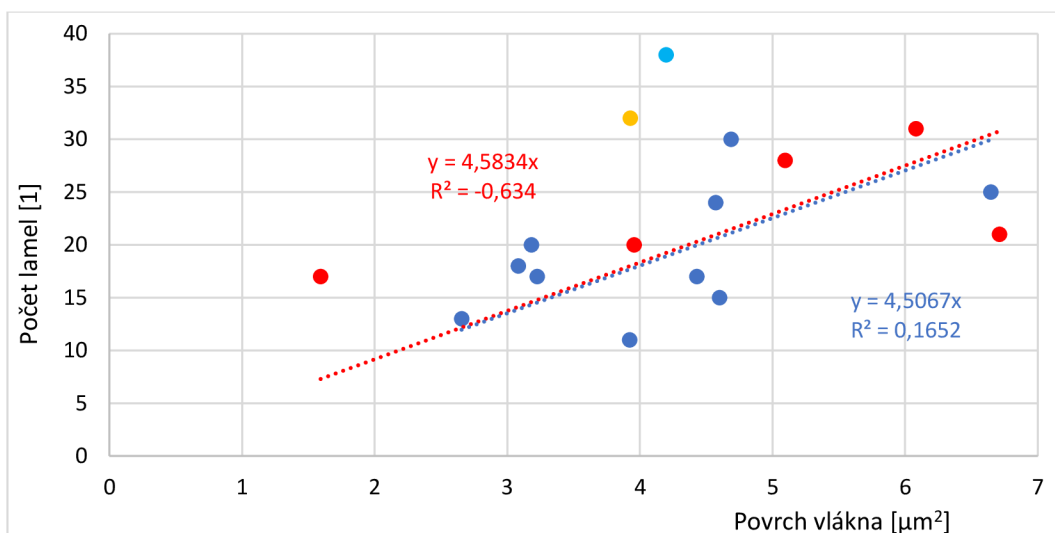


Obrázek 30: Shish-kebab struktura na materiálu PCL80_82_PA45. SEM Zeiss, měřítko 200 nm.

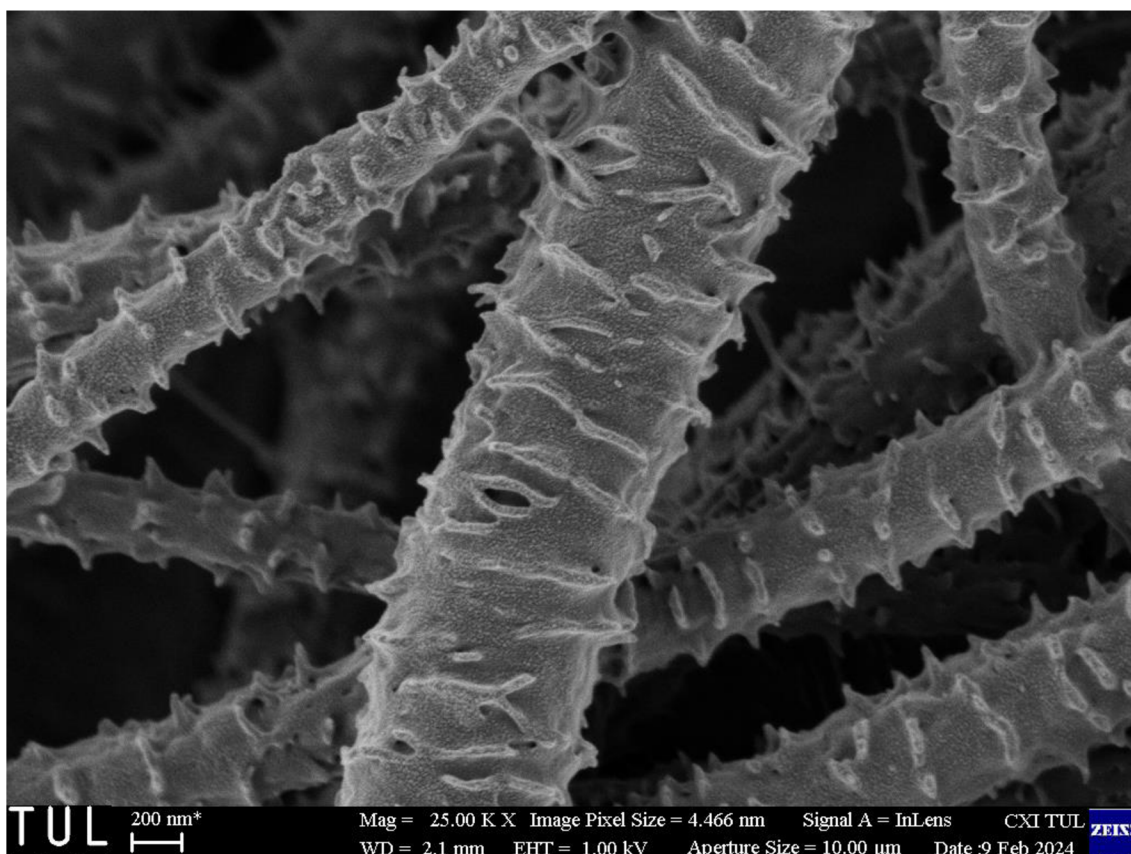
Materiál PCL80_82_PA80 měl morfologii shish-kebab struktury srovnatelnou s PA45, viz Obrázek 31. Stejně jako u PA45 se na povrchu vláken vytvořily kebabky jak ve tvaru lamel, tak výběžků a rozmezí průměrů, ve kterém se obě varianty vyskytovaly, bylo také srovnatelné s PA45. Z měření v programu ImageJ se jeví, že má tento materiál více lamel, a naopak méně výběžků oproti protějšku s PA45, toto pozorování však mohlo být způsobeno malým souborem měřených vláken. Na grafu v Příloze B.5 je vidět tendence zvyšování počtu výběžků na délku vlákna s rostoucím průměrem vlákna, což ale u těchto materiálů neplatí pro lamely, viz B.6. V závislosti na rostoucím průměru vlákna se zdá, že počet výběžků i lamel na jednotkovou plochu klesá, viz Přílohu B.7 a B.8.



Graf 4: Závislost počtu výběžků na povrchu vlákna pro materiál PCL80_82_PA45 (červeně) a PCL80_82_PA80 (modře).



Graf 5: Závislost počtu lamel na povrchu vlákna pro materiál PCL80_82_PA45 (červeně, oranžově vyřazené z lineární regrese) a PCL80_82_PA80 (modře, světle modře vyřazené).



Obrázek 31: Shish-kebab struktura na materiálu PCL80_82_PA80. SEM Zeiss, měřítko 200 nm.

Tabulka 6: Průměrné průměry vláken, na kterých byly měřeny hustoty výstupků a lamel na jednotkovou plochu a délku ($N \cdot S^{-1}$ a $N \cdot L^{-1}$). SD značí směrodatnou odchylku.

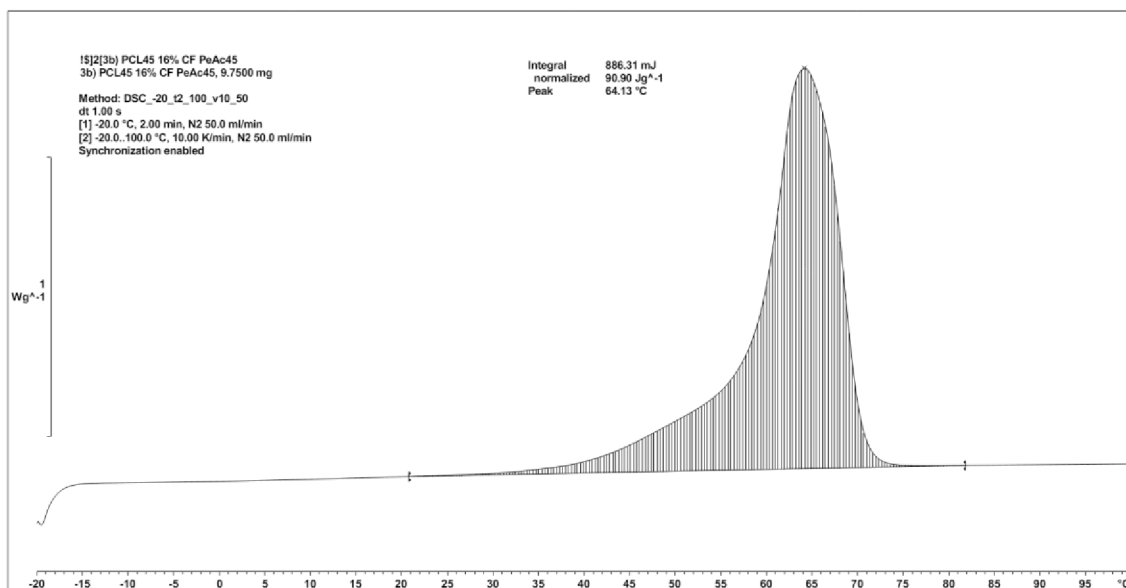
Materiál	Průměr vláken \pm SD [nm]	$N \cdot S^{-1} \pm$ SD [μm^{-2}]	$N \cdot L^{-1} \pm$ SD [μm^{-1}]	Lamely / Výstupky
PCL45_82_PA45	228 \pm 54	66 \pm 12	23 \pm 6	Výstupky
PCL45_82_PA80	257 \pm 101	41 \pm 9	16 \pm 5	Výstupky
PCL45_CF16_PA45	500 \pm 166	6 \pm 3	4 \pm 1	Lamely
PCL45_CF16_PA80 (výstupky)	330 \pm 127	21 \pm 5	10 \pm 2	Obě
PCL45_CF16_PA80 (lamely)	620 \pm 450	7 \pm 5	5 \pm 1	Obě
PCL80_82_PA45 (výstupky)	487 \pm 134	24 \pm 7	17 \pm 4	Obě
PCL80_82_PA45 (lamely)	846 \pm 134	6 \pm 2	8 \pm 2	Obě
PCL80_82_PA80 (výstupky)	450 \pm 154	22 \pm 3	15 \pm 3	Obě
PCL80_82_PA80 (lamely)	870 \pm 172	5 \pm 2	7 \pm 2	Obě

3.2.4 Diferenciální skenovací kalorimetrie

Z výsledků analýzy DSC vyplývá, že základní materiály PCL45_82 a PCL45_CF16 měly oproti materiálu PCL80_82 o 8–9 % vyšší krystalinitu, viz Tabulku 7. Zvolené směsi rozpouštědel zřejmě nijak neovlivnily krystalinitu polymerních vláken. Všechny testované vzorky měly maximum entalpie v rozmezí 62–67 °C a krystalinita všech materiálů z PCL45 a PCL80 byla v rozmezí 56–67 %. To odpovídá typické teplotě tání PCL i běžnému rozsahu krystalinity PCL, viz kapitola 2.2. Skelný přechod nemohl být kvůli rozsahu měřených teplot pozorován. Obecně z výsledků vyplývá, že krystalinita polymerních vláken z PCL po post-procesní shish-kebab úpravě roste. Rozdíl sice není nijak velký, ale u NFSK materiálů PCL80_82 činil 2,5 %, což už není zanedbatelné. Je také nutné brát v potaz, že hmotnostní podíl lamel kebabů vůči celému zbytku hmoty vlákna je ve většině případů malý, z čehož by se dalo odvodit, že lamely kebabu mají poměrně vysokou krystalinitu. Rozdíl mezi změnou krystalinity post-procesní úpravou s různými krystalizačními roztoky je viditelný pouze u materiálu PCL45_CF16, kde se s použitím PA45 krystalinita oproti neupravenému materiálu zvýšila o 1,7% a naopak s použitím PA80 klesla o 0,5 %. Průběh DSC analýzy pro materiál PCL45_CF16_PA45 je vidět na Obrázku 32 a průběhy DSC analýzy zbylých vzorků jsou k vidění v Příloze C. U některých vzorků se objevila dvě maxima, to ale mohlo být způsobeno defekty na vláknech z elektrického zvláknování, nehomogenitou rozložení krystalických fází ve vzorcích či přípravou vzorku pro DSC analýzu.

Tabulka 7: Výsledky DSC analýzy. ΔH značí entalpii a SK druh shish-kebab krystalizačního roztoku.

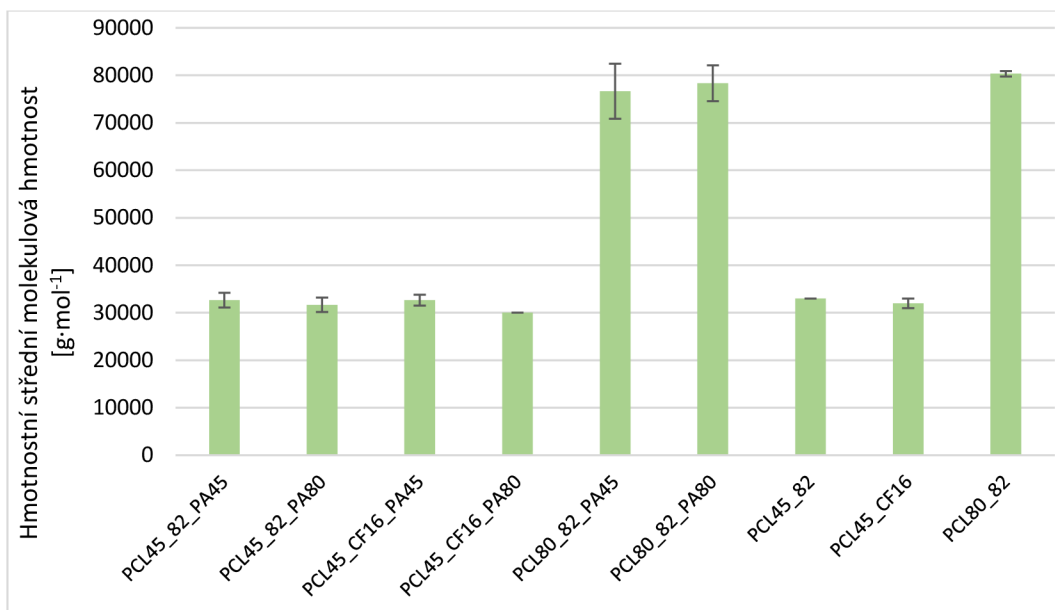
Materiál	$\Delta H \pm SD$ [J·g ⁻¹]	Krystalinita $\pm SD$ [%]	SK	$\Delta H \pm SD$ [J·g ⁻¹]	Krystalinita $\pm SD$ [%]
PCL45_82	87,0 ± 1,3	64,2 ± 0,9	PA45	87,7 ± 0,8	64,7 ± 0,6
			PA80	88,1 ± 0,7	65,0 ± 0,5
PCL45_CF16	88,0 ± 1,0	65,0 ± 0,7	PA45	90,4 ± 0,6	66,7 ± 0,5
			PA80	87,4 ± 0,5	64,5 ± 0,4
PCL80_82	75,4 ± 0,3	55,7 ± 0,2	PA45	78,8 ± 0,5	58,2 ± 0,4
			PA80	78,8 ± 0,8	58,1 ± 0,6



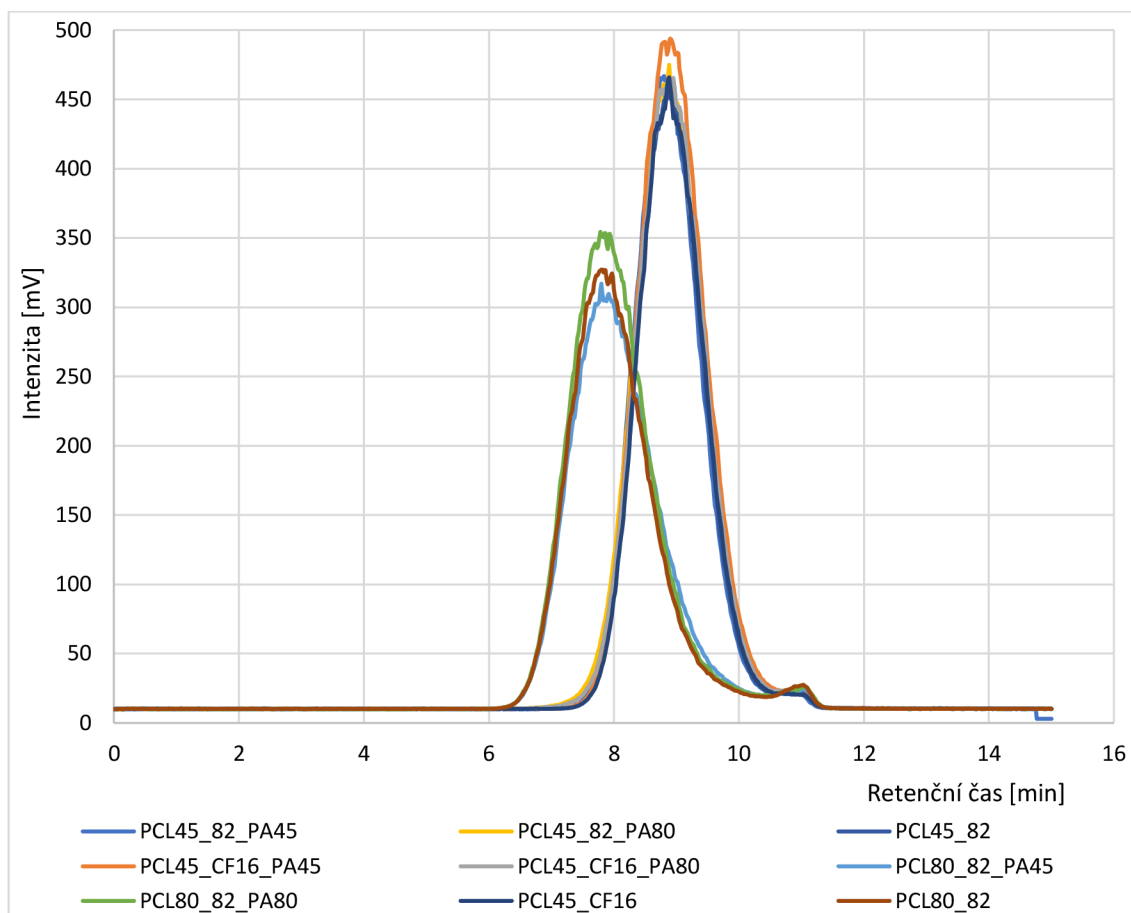
Obrázek 32: DSC analýza, průběh změny entalpie v závislosti na teplotě pro materiál PCL45_CF16_PA45.

3.2.5 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie měla za cíl ověřit případné změny molekulové hmotnosti v případě, kdyby spolu reagovaly krystalizační roztok a PCL vlákna, což se nepotvrdilo. Molekulová hmotnost byla stejná jak pro základní neupravené, tak i upravené materiály, viz Graf 6. Pro PCL80 vyšla hmotnostní střední molekulová hmotnost přibližně $80000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, přičemž pro PCL45 přibližně $32000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, což neodpovídá hodnotě uváděné výrobcem. Tyto molekulové hmotnosti byly konzistentně mezi všemi testovanými vzorky. Dále bylo smyslem GPC ověřit, zda se u kombinací molekulových hmotností PCL ve vláknech a v krystalizačním roztoku budou ve výsledcích vyskytovat obě molekulové hmotnosti PCL nebo jen jedna z nich. Jelikož bylo při přípravě shish-kebab struktur nanášeno přibližně 2–3 g krystalizačního roztoku o 1% w/w koncentraci PCL, tak hmotnost polymeru nanášeného na vláknou vrstvu bylo přibližně jen 0,02–0,03 g. Druhý typ PCL se u žádného takového vzorku neobjevil, viz Graf 7. To může být způsobeno detekčním limitem GPC metody.



Graf 6: Průměrné hmotnosti střední molekulové hmotnosti jednotlivých materiálů z GPC analýzy.



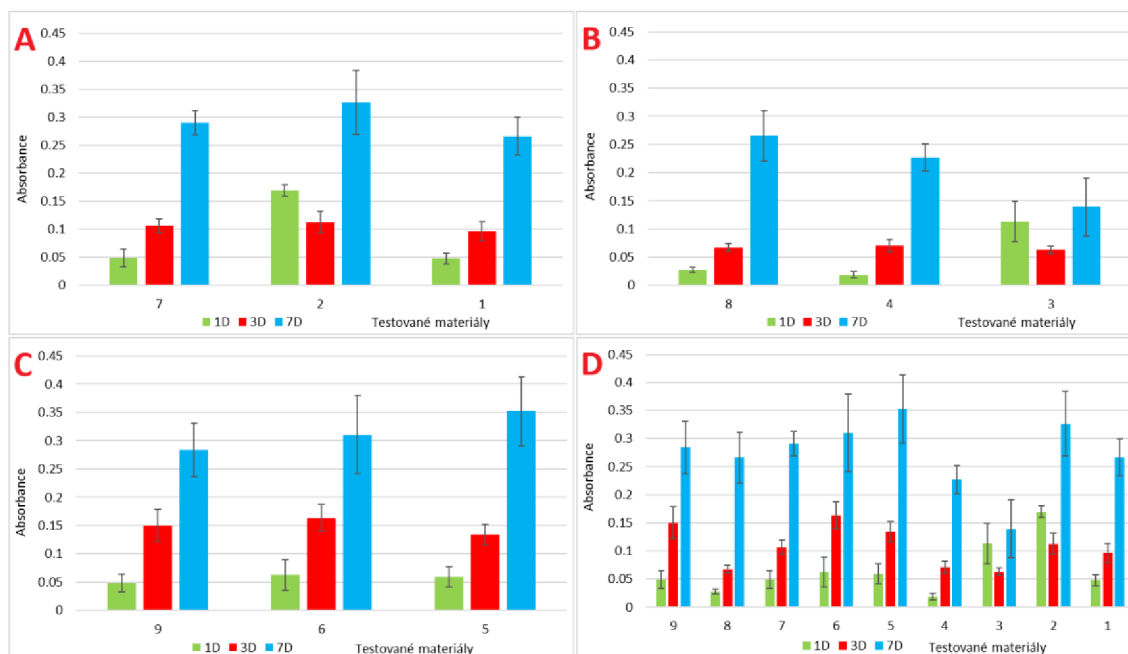
Graf 7: Graf závislosti intenzity rozptýleného světla na retenčním čase. Intenzita odpovídá počtu řetězců dané molekulové hmotnosti v určitý čas.

3.2.6 Analýza in-vitro buněčných testů

V rámci optimalizace nanovláknenných materiálů s účelem přípravy hierarchicky strukturovaných vláken byly připravené materiály testovány a hodnoceny z pohledu buněčné adheze a proliferace. Cílem bylo ověřit biokompatibilitu materiálů a porovnat interakci myších fibroblastů 3T3-NIH na neupravených a upravených materiálech. Výsledky metabolické aktivity buněk v jednotlivých testovacích dnech jsou vidět na Obrázku 33 a značení vzorků je znázorněno v Tabulce 8.

Tabulka 8: Přiřazení čísel k jednotlivým testovaným základním i upraveným materiálům.

Číslo vzorku	Základní materiál	Úprava	Číslo vzorku	Základní materiál	Úprava
1	PCL45_82	PA45	6	PCL80_82	PA80
2	PCL45_82	PA80	7	PCL45_82	–
3	PCL45_CF16	PA45	8	PCL45_CF16	–
4	PCL45_CF16	PA80	9	PCL80_82	–
5	PCL80_82	PA45			

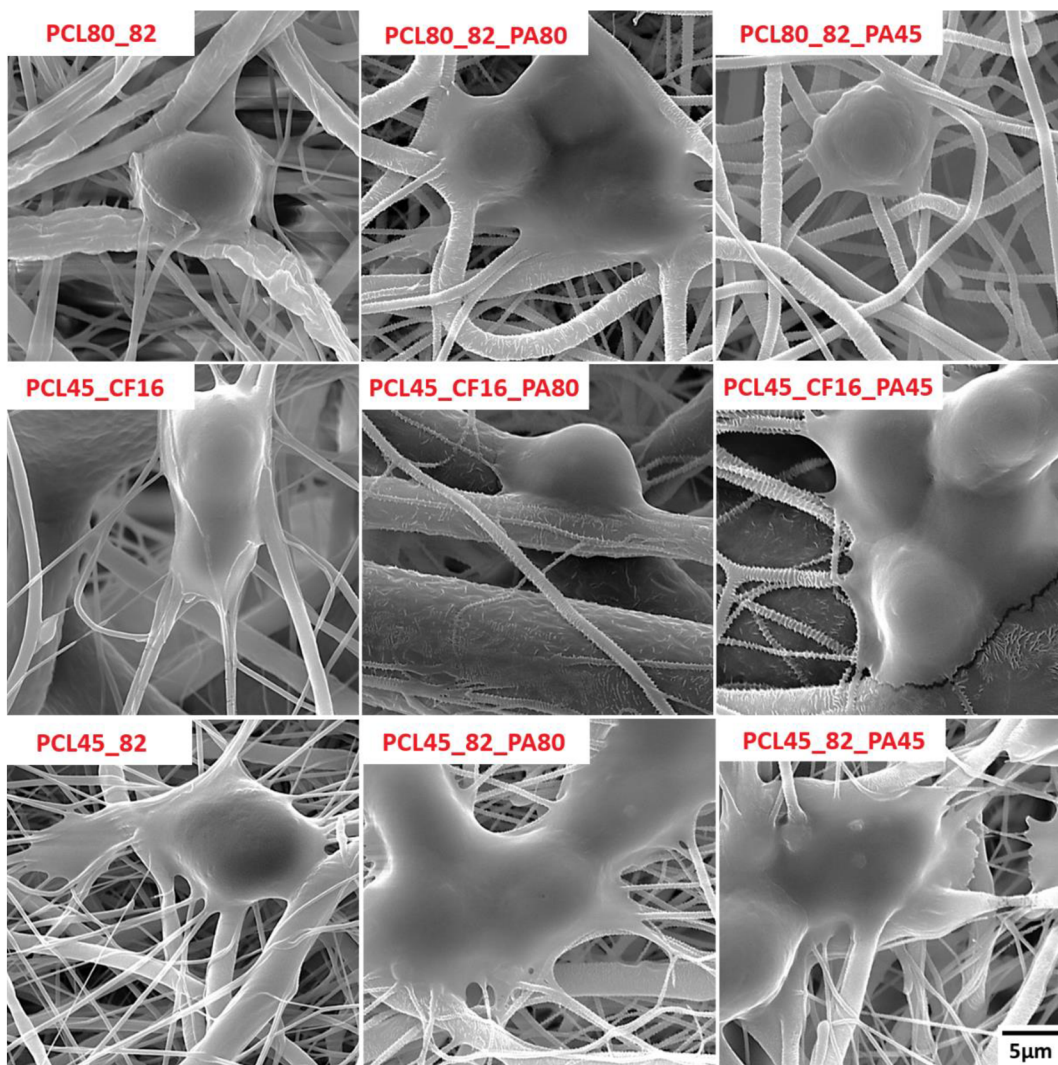


Obrázek 33: Grafy metabolické aktivity buněk 3T3-NIH myších fibroblastů adherentních na jednotlivých materiálech v jednotlivé testovací dny. A) PCL45_82, B) PCL45_CF16, C) PCL80_82 a D) souhrnný graf. Číselné označení vzorků viz Tabulku 8.

Z grafů na Obrázku 33 je patrné, že každý z testovaných materiálů je kompatibilní s buněčnou linií 3T3-NIH. Na každém z testovaných materiálů je patrná počáteční

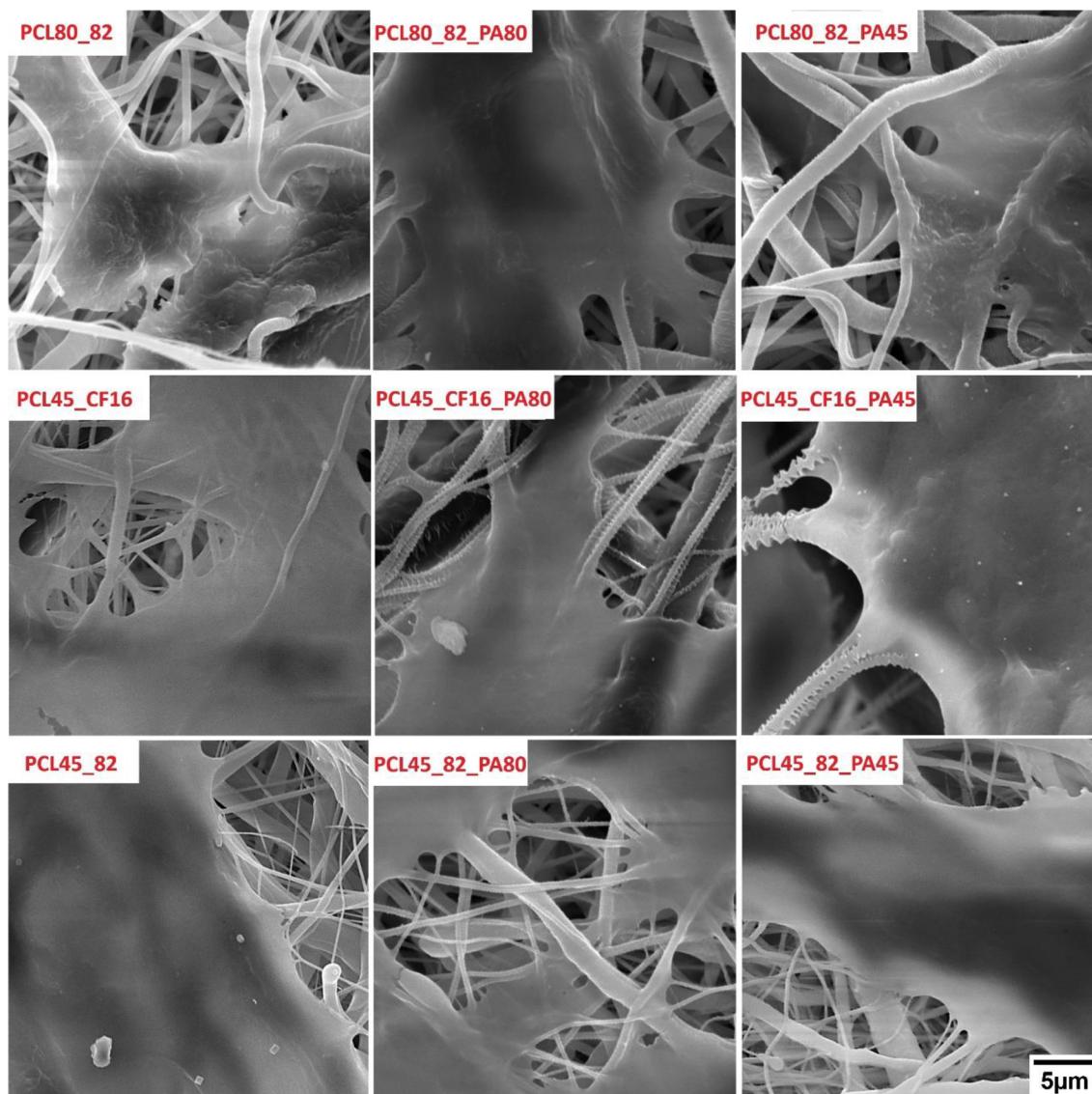
buněčná adheze po 24 hodinách inkubace buněk a následná buněčná proliferace v třetím a sedmém testovacím dni. Metabolická aktivita byla ve všech případech nejvyšší po 7 dnech inkubace. U NFSK materiálů PCL80_82 není zřejmý vliv povrchové úpravy na buněčnou adhezi a proliferaci oproti neupravenému materiálu, viz Obrázek 33C. U materiálu PCL45_CF16 (Obrázek 33B) je patrný rozdíl u povrchové úpravy krystalizačním roztokem PA45, který pozitivně ovlivnil buněčnou adhezi, jelikož byla metabolická aktivita po 24 hodinách inkubace vyšší než u zbylých dvou materiálů. Na druhou stranu nebyl u materiálu PCL45_CF16_PA45 prokázán vliv této úpravy na buněčnou proliferaci, kdy po 7 dnech byla metabolická aktivita ze 3 testovaných materiálů nejnižší. Materiál PCL45_82 (Obrázek 33A) prokázal pozitivní vliv povrchové úpravy pomocí PA80 na buněčnou adhezi, proliferace však ovlivněna oproti neupravenému materiálu nebyla. Pro materiály z PCL45, které podporovaly buněčnou adhezi, se jeví trend poklesu metabolické aktivity po 3 dnech a její následný růst po 7 dnech, značící buněčnou proliferaci. Nejnižší buněčná metabolická aktivita byla pozorována u materiálů z PCL45_CF16.

Pro sledování morfologie buněk byly buňky na materiálech v jednotlivých testovacích dnech zafixovány a fluorescenčně barveny pomocí barviva DiOC6 a DAPI, viz podkapitola 3.1.5. Zvolené barvivo DiOC6 však nebylo vhodné, jelikož interagovalo hydrofobními interakcemi nejen s buněčnou membránou, ale také s hydrofobními PCL materiály, a tudíž došlo k obarvení celého vzorku, což znemožnilo vzorky nasnímat na fluorescenčním mikroskopu. Pro sledování morfologie buněk byla tedy použita elektronová skenovací mikroskopie, viz Obrázek 34 a 35.



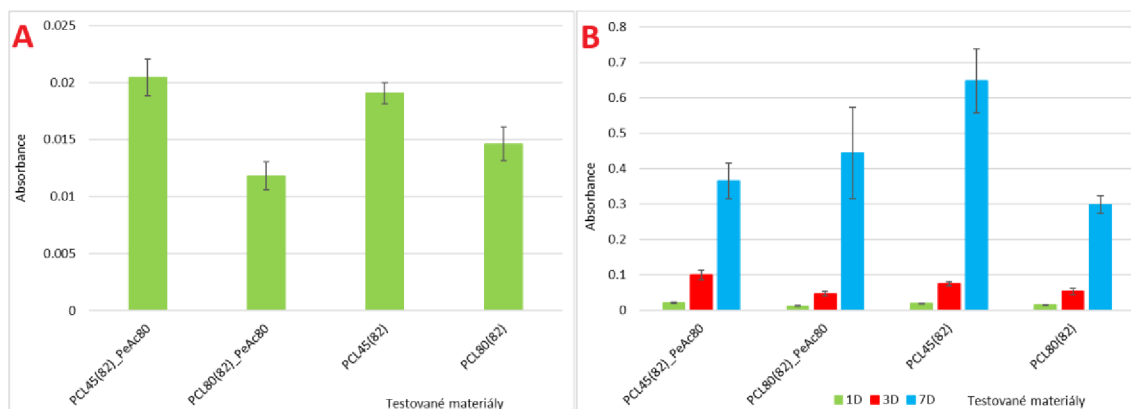
Obrázek 34: Snímky ze SEM po 24 hodinách inkubace testovaných materiálů v suspenzi buněčné linie 3T3-NIH myších fibroblastů. Měřítka je 5 µm.

Snímky ze SEM zachycené na Obrázku 34 zobrazují buňky adherované na povrchu všech testovaných materiálů po 24 hodinách interakce. Morfologie buněk na všech materiálech jsou srovnatelné. Na snímcích ze SEM, viz Obrázek 35, jsou zachyceny buněčné populace na všech testovaných materiálech po 7 dnech inkubace. Není již možné pozorovat jednotlivé buňky, je zde však patrná rozprostřená monovrstva tvořená z buněk. Morfologie jednotlivých struktur buněčných vrstev mezi sebou nevykazují výrazně rozdílný charakter. Patrný nárůst plochy materiálů pokryté buňkami oproti prvnímu dni, viz Obrázek 34, potvrzuje buněčnou proliferaci v průběhu experimentu na všech testovaných vzorcích, a tedy potvrzuje výsledky měření metabolické aktivity, viz Obrázek 33.



Obrázek 35: Snímky ze SEM po 7 dnech inkubace testovaných materiálů v suspenzi buněčné linie 3T3-NIH myších fibroblastů. Měřítko je 5 µm.

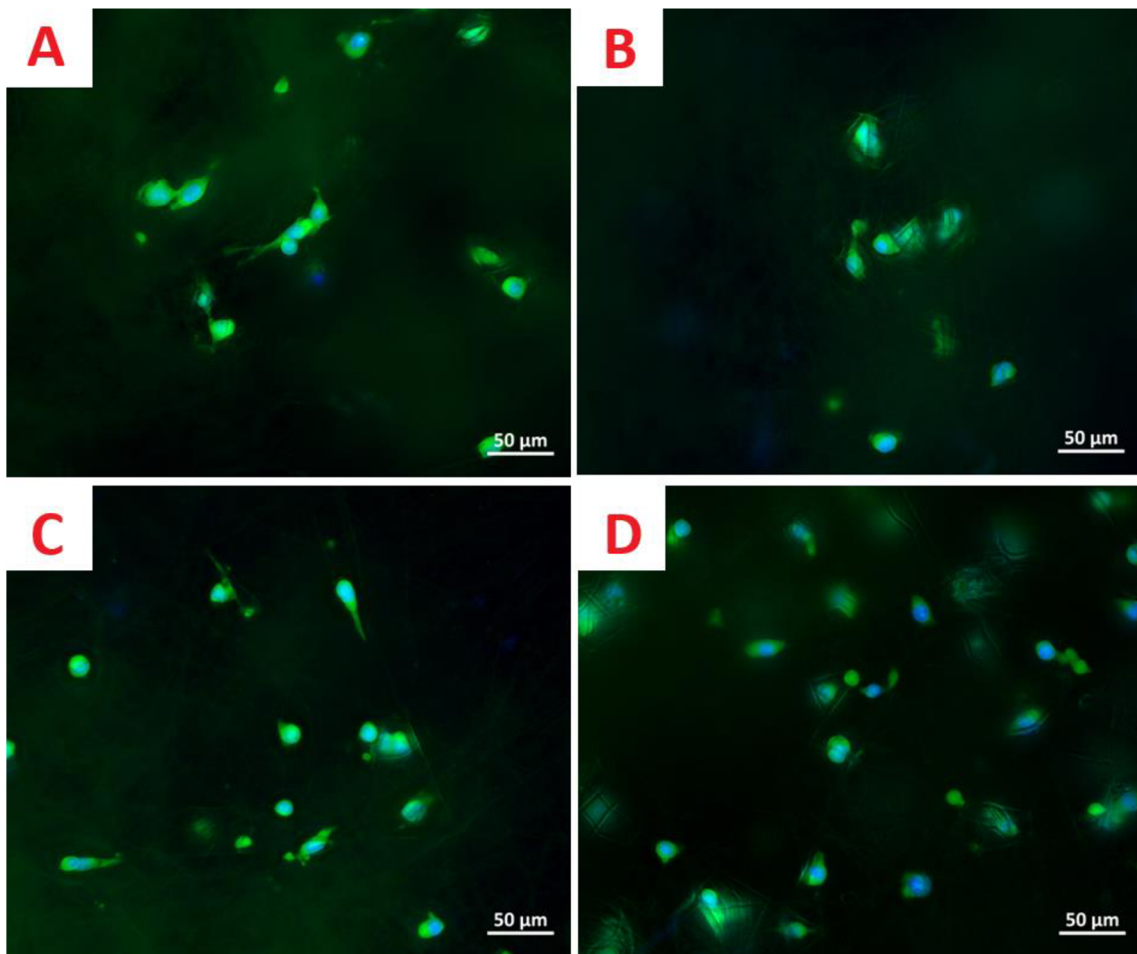
Testování buněčné interakce z pohledu buněčné adheze a proliferace bylo zopakováno na vybraných materiálech PCL45_82_M a PCL80_82_M vyrobených ze stejné směsi rozpouštědel a se srovnatelnou plošnou hmotností, viz podkapitola 3.2.1. Post-procesní shish-kebab úprava byla provedena pouze krystalizačním roztokem 1% w/w PCL80 v pentyl-acetátu. Testování probíhalo stejně a odběry byly provedeny v první, třetí a sedmý den. Výsledky metabolické aktivity buněk v jednotlivých testovacích dnech jsou vidět na Obrázku 36.



Obrázek 36: Grafy metabolické aktivity buněk 3T3-NIH myších fibroblastů adherovaných na jednotlivých materiálech v jednotlivé testovací dny. Jednalo se o materiály zvlákněvané na podobnou plošnou hmotnost. A) Metabolická aktivita po 24 hodinách interakce buněk s materiály a B) souhrnný graf pro všechny testovací dny.

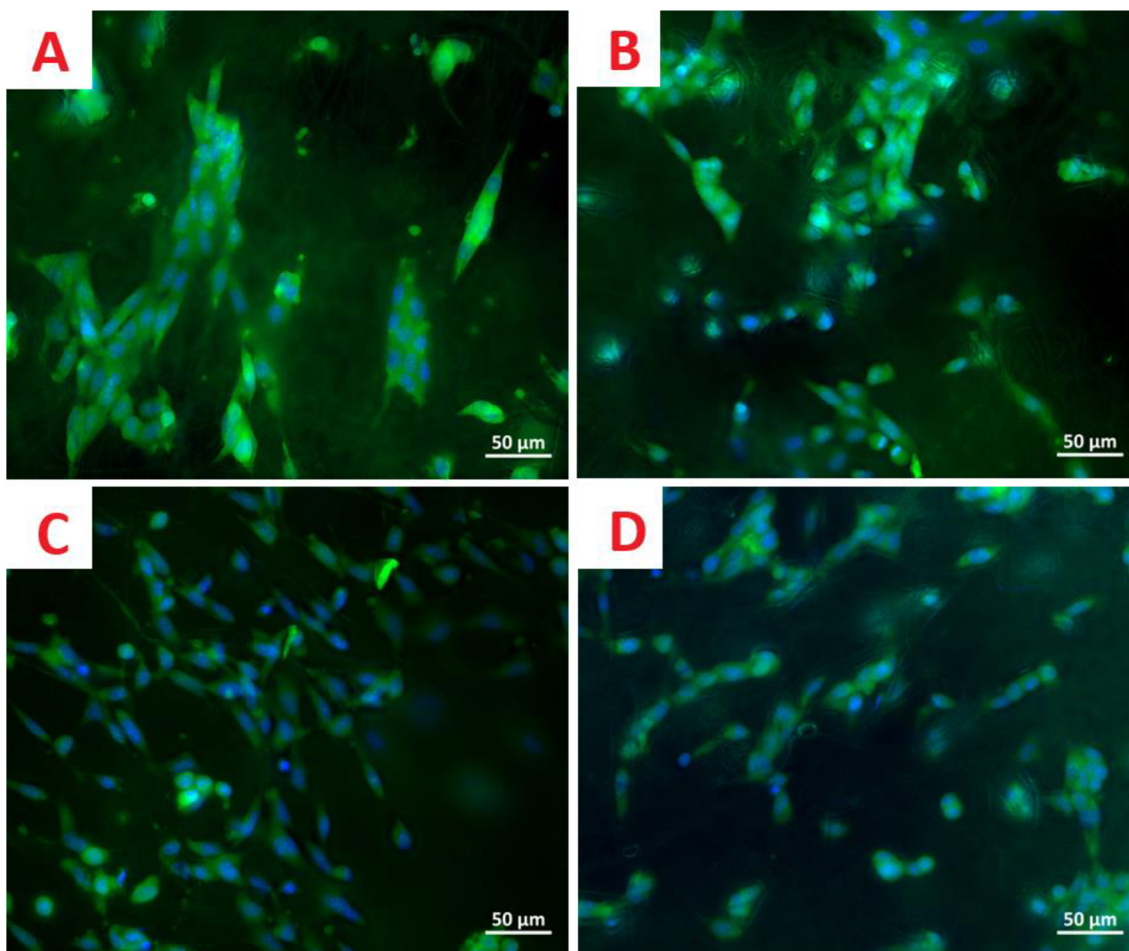
Výsledky metabolické aktivity buněk po 24 hodinách inkubace jednoznačně neprokazují vliv povrchové úpravy na zvýšení nebo snížení buněčné adheze na jednotlivých materiálech. Materiál PCL45_82 s úpravou měl mírně větší metabolickou aktivitu buněk, avšak statisticky nevýznamně oproti základnímu materiálu. U materiálu PCL80_82 byla tendence opačná, ale opět statisticky nevýznamně. Je patrné, že adheze na materiálu PCL45_82 s i bez úpravy byla výrazně větší, než na materiálech PCL80_82. Spíše by tedy adheze mohla být ovlivněna průměry vláken, a ne samotnou post-procesní shish-kebab úpravou, kdy buňky lépe adherují na materiál PCL45_82 s menším průměrem vláken. Proliferace buněk testovaná v třetí a sedmý den od nasazení buněk se jevila být větší u materiálu PCL80_82 pro upravenou variantu, avšak opět statisticky nevýznamně. Naopak u materiálu PCL45_82 došlo v sedmý testovací den k výraznému poklesu metabolické aktivity buněk u upravené shish-kebab varianty. Takový trend by mohl být způsoben nižší přístupností pórů mezi vrstvami vláknenné struktury vlivem lamel kebabů na jednotlivých vláknech.

Morfologie buněk byla dále sledována pomocí fluorescenční mikroskopie, viz Obrázek 37 a 38. Oproti prvnímu experimentu byly buňky barveny pomocí fluorescenčního barviva Phalloidin FITC, které se specificky váže na aktinová vlákna v cytoplasmě a pomocí DAPI, které se váže na strukturu DNA, viz podkapitola 3.1.5. Snímky na Obrázku 37 nenaznačují rozdíl mezi morfologií buněk na jednotlivých testovaných materiálech, jak s, tak i bez shish-kebab úpravy. Buňky na všech snímcích vykazovaly částečnou či celkovou dilataci, což naznačuje vhodnou interakci s povrchem testovaných materiálů.



Obrázek 37: Snímky z fluorescenčního mikroskopu po 24 hodinách inkubace materiálů s buněčnou linií 3T3-NIH myších fibroblastů. A) PCL45_82_PA80, B) PCL80_82_PA80, C) PCL45_82 a D) PCL80_82. Aktinová vlákna barvena pomocí Phalloidin FITC (zelená) a DNA v jádře barveno pomocí DAPI (modrá). Měřítka je 50 µm.

Dle snímků na Obrázku 38 je patrné, že oproti inkubaci po dobu 24 hodin je na všech materiálech násobný nárůst buněčné populace po inkubaci trvajících 7 dní od nasazení buněk. Buňky na všech materiálech vykazují dilataci a vytvářejí monovrstvu pokrývající povrch materiálů. Výsledky pozorované na snímcích z fluorescenčního mikroskopu potvrzují výsledky dosažené testováním metabolické aktivity na jednotlivých materiálech. Nehledě na použitou modifikaci povrchu vláken vykazují všechny materiály vhodnou adhezi i vzrůstající proliferaci buněčné linie 3T3-NIH myších fibroblastů.



Obrázek 38: Snímky z fluorescenčního mikroskopu po 7 dnech inkubace materiálů s buněčnou linií 3T3-NIH myších fibroblastů. A) PCL45_82_PA80, B) PCL80_82_PA80, C) PCL45_82 a D) PCL80_82. Aktinová vlákna barvena pomocí Phalloidin FITC (zelená) a DNA v jádře barveno pomocí DAPI (modrá). Měřítka je 50 µm.

3.3 Souhrnná diskuze výsledků

V této diplomové práci bylo jednoznačně prokázáno, že tvorba hierarchických shish-kebab struktur pomocí post-procesní úpravy krystalizačním roztokem je výrazně ovlivněna zvoleným rozpouštědlovým systémem, který byl použit při stejnosměrném elektrickém zvlákňování základních materiálů z polykaprolaktonu, a dále vlastnostmi použitého krystalizačního roztoku pro jejich samotnou přípravu. Bylo ukázáno, že rozpouštědlový systém při stejných parametrech procesu elektrického zvlákňování určuje výslednou morfologii vláken daného materiálu, ať už rozložením a velikostí průměrů vláken, tak jejich deformacemi a vzájemným uspořádáním jejich struktury. Z výsledných shish-kebab struktur vytvořených post-procesní úpravou na všech základních materiálech se zdá, že rozpouštědlový systém také ovlivňuje vnitřní krystalické uspořádání ve vláknech. Jak bylo popsáno v kapitole 2.3.3, tak tvorba lamel kebabů je z určité části způsobena měkkou epitaxií a závislá na velikosti

a tvaru krystalických a amorfních fází v polymerním nanovlákně a na všech testovaných materiálech z různých rozpouštědel byla struktura shish-kebab rozdílná, kdy některá vlákna měla kebab ve tvaru výběžků s přibližně kruhovou základnou, některá výběžky s více hranatou a podélnou základnou a některá měla delší lamely kolem celého obvodu vlákna. Dalším faktorem ovlivňujícím strukturu shish-kebab je nepochybně použitý krystalizační roztok, ve kterém hraje důležitou roli jak zvolené rozpouštědlo, které může různě silně rozpustit povrch vláken, tak i koncentrace polymeru a jeho molekulová hmotnost. Vyšší molekulová hmotnost znamená delší polymerní řetězce, které mohou skrze měkkou epitaxi i pattern matching vyžadovat více času na uspořádání do lamely kebabu, což u poměrně rychlé vypařovací metody nemusí být splněno. Z důvodu velmi špatné rozpustnosti v pentyl-acetátu se také mohou delší řetězce PCL z roztoku dříve vysrážet, což omezí jejich interakci s povrchem vláken.

Materiál PCL45_82_PA45 měl kebaby převážně ve tvaru výběžků, až od určitého průměru se vyskytovaly lamely, což může být způsobeno právě rozdílnou strukturou krystalické fáze, kdy vlákna s malým průměrem měla malé nepravidelně rozmístěné krystality, větší vlákna pak více uniformní krystality a příliš velká vlákna naopak náhodně orientované krystalické fáze způsobující náhodnou orientaci lamel vůči ose vlákna a obecně řidší výskyt struktur kebabů. Při použití PA80 byla hustota výběžků na povrchu vlákna nižší, což může být způsobeno právě vyšší molekulovou hmotností polymeru. Materiál PCL45_CF16_PA45 měl na vláknech s menším průměrem pravidelně rozmístěné lamely kebabu, které obepínaly celý obvod vlákna, což naznačuje, že ve vláknech jsou polymerní řetězce uspořádány převážně paralelně a krystalická fáze je tedy pravidelnější. To by mohlo mít příčinu v tom, že se jednalo o jediný materiál zvlákněný z jednoho rozpouštědla, bez přítomnosti nerozpouštědel, které by omezovaly při dloužení vláken volné uspořádávání polymerních řetězců. Jelikož nebyla krystalinita tohoto materiálu významně vyšší, viz Tabulku 7, tak mohly krystalické fáze být oproti PCL_45 větší a méně roztráštěné v objemu vlákna. Ačkoliv při použití PA80 byla hustota lamel vyšší než u PA45, tak na snímcích je vidět, že morfologie kebabů byla jiná, kdy byly lamely kratší a neobepínaly celý obvod vlákna, což mohlo vyústit ve větší počet lamel klikatě za sebou na stejné ploše i délce vlákna. Tyto kratší lamely, a dokonce i výskyt kebabů tvaru výběžků, mohou mít opět původ ve větší molekulové hmotnosti polymeru v krystalizačním roztoku.

Na materiálu PCL45_82 bylo u obou krystalizačních roztoků vidět, jak záleží struktura kebabů na průměru vláken, kdy bylo zřejmé, že na vláknech s menším průměrem se primárně tvoří výběžky a na větších vláknech spíše lamely. V Příloze B.9 a B.10 je tento trend znázorněn na grafech, ze kterých také vyplývá, že výběžky se vyskytovaly na vláknech do průměru přibližně 800 nm a dále vůbec, přičemž lamely se vyskytovaly na vláknech s průměrem od 650 nm a horní omezení průměru nevykazovaly. Hustota výběžků i lamel byla u obou NFSK materiálů přibližně stejná a výběžky měly spíše tvar velmi krátké lamely, ale lamely se u PA80 zdály být méně pravidelné a kratší. Na vláknech s velmi velkým průměrem ve srovnání s ostatními vlákny daného materiálu se často morfologie shish-kebab struktury podobala mořským korálům či květinovým vzorům, viz Obrázek 22, kdy lamely rostly s různou orientací a ve většině případech byla struktura také velmi řídká až na některých místech chyběla úplně, viz Přílohu A.1 a A.4. Krystalická fáze do takové hloubky, do které je povrch rozpuštěn krystalizačním roztokem, tedy může mít velice složitou orientaci a uspořádání krystalické a amorfnní fáze. Povrch je také pravděpodobně více amorfnní než střed vlákna, jelikož při elektrickém zvlákňování se ve středu déle odpařuje rozpouštědlo, což by umožnilo lepší uspořádání polymerních řetězců.

Grafy závislostí podélné a plošné hustoty výběžků a lamel na průměru vlákna v Příloze B vykazují u většiny materiálů opačný trend, kdy podélná hustota mírně roste a plošná hustota naopak klesá, což se zdá jako protikladné jevy, ale z důvodu malého počtu měřených vláken se tyto výsledky těžko interpretují a nabádají k opatrnosti při takové interpretaci. Kebaby se totiž vyskytují v různých morfologiích, jak už bylo naznačeno dříve. Lamely nemusí být kolem celého obvodu vlákna, mohou být kratší a tyto krátké lamely se mohou mezi dvěma úrovněmi spojit jakýmsi můstkem, což ze dvou lamel vytvoří jen jednu. Dále se vyskytují výběžky a ty mohou mít jak kruhovou, tak i obdélníkovou základnu, a tedy i různý tvar. Grafy v příloze B proto slouží hlavně jako náznak směru, jakým se může charakterizace shish-kebab struktur dále ubírat. Pro studium těchto jevů by bylo potřeba násobně většího souboru měřených vláken nasnímaných při vysokém zvětšení.

Analýza DSC svými výsledky potvrdila předpoklad, že lamely kebabu na vláknech mají určitou měrou vyšší krystalinitu než nosná vlákna, ale jedná se pouze o kvalitativní měření. Ke kvantitativnímu měření krystalinity lamel kebabu by bylo potřeba

využít jinou charakterizační metodu a je otázka, zda existuje metoda, která by tuto strukturu dokázala přesně změřit. V průběhu DSC analýzy se u některých materiálů objevily 2 maxima, ta se však objevila i u základních materiálů bez úpravy, což vylučuje možnost tyto maxima přiřadit k PCL45 či PCL80. Proto byl tento jev pravděpodobně způsoben příčinami zmíněnými v podkapitole 3.2.4.

Analýza GPC odhalila, že PCL45 nemá hmotnostní střední molekulovou hmotnost takovou, jakou uvádí výrobce, nýbrž o minimálně $15000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ nižší. Důležité však je, že všechny materiály v rámci experimentu měly srovnatelnou molekulovou hmotnost. Zajímavé bylo, že u kombinací PCL45 a PCL80 ve vláknech a krystalizačním roztoku se u GPC tato kombinace neprojevila. Je možné, že byly struktury kebabu tvořeny spíše na základě rozpuštění povrchu vlákna, tudíž by obsahovaly primárně polymer vlákna, anebo bylo množství druhého polymeru naneseného skrze krystalizační roztok pod detekčním limitem přístroje.

In-vitro buněčné testování na buněčné linii 3T3-NIH myších fibroblastů jednoznačně neprokázalo vliv shish-kebab struktur na adhezi a proliferaci buněk. Materiály PCL45_82_80 a PCL45_CF16_PA45 zlepšily metabolickou aktivitu a adhezi buněk po 24 hodinách, ale naopak ve 3. a 7. den se nárůst utlumil a byl stejný nebo menší než u základního a PA45, respektive PA80 materiálu. Zopakování experimentu pro vlákněné vrstvy se srovnatelnou plošnou hmotností poskytlo podobné výsledky. U materiálu PCL45_82_PA80 došlo ke zlepšení adheze oproti neupravenému materiálu a u PCL80_82_PA80 byl trend opačný. Proliferace byla nejnižší pro základní materiál PCL80_82. I přesto, že nebyl prokázán vliv post-procesní úpravy na zlepšení adheze a následné proliferace buněk, tak experimenty prokázaly vhodnost materiálů pro tkáňové inženýrství. Na všech testovaných materiálech byla prokázána buněčná proliferace v průběhu experimentu, což značí vhodné prostředí pro uchycení buněk a následnou regeneraci poškozené tkáně.

Závěrem je potřeba dodat, že tato oblast nabízí do budoucna mnoho dalších možností, jak tuto post-procesní úpravu dále zkoumat. Proces krystalizace po nanesení krystalizačního roztoku může být lépe kontrolován například lyofilizací či vakuovou odparkou tak, aby byl v určitou chvíli zastaven. Dále by bylo dobré prozkoumat, jaký vliv na tvorbu shish-kebab struktury má koncentrace polymeru

v krystalizačním roztoku a jaký je rozdíl v její morfologii při použití inkubační metody. Pomocí Brunauer-Emmett-Teller (BET) metody by se mohlo zkoumat, jak se mění měrný povrch post-procesně upravených materiálů, metoda mikroskopie atomárních sil (AFM) dále může poskytnout nové a přesnější pohledy na tvar výběžků a lamel kebabů a tím umožnit další rozměrovou charakterizaci. Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) by mohla odhalit i rozložení krystalického uspořádání polymerních řetězců v základních i upravených vláknech. Z hlediska použitelnosti materiálů v aplikacích jako regenerativní medicína či tkáňové inženýrství je důležité také prozkoumat mechanické vlastnosti upravených materiálů, jelikož post-procesní úprava může pozitivně i negativně ovlivnit pevnost materiálu. Pro buněčnou adhezi je také důležitá míra hydrofobie materiálu, která se může se zvyšující se drsností povrchu vláken po post-procesní úpravě zvýšit. K pochopení tohoto jevu by dobře posloužilo měření smáčivosti a kontaktních úhlů s post-procesně upravenými materiály.

4 Závěr

Tato diplomová práce měla za cíl studovat hierarchické struktury na povrchu vláken a prakticky ověřit přípravu takové struktury post-procesní úpravou a zkoumat závislosti její výsledné morfologie na vstupních parametrech. Byla testována příprava post-procesní úpravy shish-kebab na elektricky zvlákněných nanovlákněných vrstvách z polykaprolaktonu. Elektrické zvláknění a následná úprava byla provedena na několika základních materiálech, které se lišily koncentrací polymerního roztoku, zvoleným rozpouštědlem nebo rozpouštědlovým systémem a molekulovou hmotností polymeru, kdy bylo použito PCL o molekulové hmotnosti $45000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (PCL45) a $80000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (PCL80). Shish-kebab struktura byla připravována pomocí krystalizačních roztoků vypařovací metodou, tedy nanášením roztoků rozprašovačem na elektricky zvlákněné materiály, které se poté nechaly vyschnout. Krystalizační roztoky obsahovaly PCL o $45000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (PA45) a $80000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (PA80) o koncentraci 1 % w/w rozpuštěných v pentyl-acetátu. Ze základních materiálů byly vybrány pouze tři, které měly vhodnou morfologii vláken bez defektů a vhodnou morfologii shish-kebab struktury a ty byly dále detailněji testovány.

Připravené elektricky zvlákněné a upravené materiály byly podrobeny několika analýzám. Elektronová mikroskopie odhalila, že tímto způsobem připravená shish-kebab struktura nemusí mít pouze morfologii, která byla uvedena ve veškerých vědeckých publikacích – krystalické kotouče kolmé na osu vlákna a obepínající celý obvod vlákna kolem dokola s určitou periodicitou. Tato morfologie byla dosažena pouze u materiálu PCL45 zvlákněného z rozpouštědla chloroformu a za použití krystalizačního roztoku PA45. Lamely kebabu byly v tom případě celistvé kolem celého obvodu vlákna a v některých případech byla jejich velikost srovnatelná s průměrem samotného vlákna. U ostatních materiálů se vyskytovaly buď pouze výrůstky ve tvaru výběžků s kruhovou až krátkou obdélníkovou základnou anebo kombinace lamel a výběžků. To, zda se na vláknech tvořily výběžky nebo lamely bylo závislé na průměru vláken daného materiálu. Zdá se, že výběžky se tvoří na vláknech o menším průměru, přibližně do 800 nm, přičemž lamely na vláknech s větším průměrem, přibližně od 650 nm bez horního limitu jako u výběžků. Je však zajímavé, že na každém materiálu byl tvar výběžků či lamel jiný než u ostatních materiálů. Lamely byly ve většině případů nepravidelné a neobepínaly celý obvod vlákna, často byla lamela

tvořena více kratšími lamelami spojenými do sebe. Od určitého průměru vlákna se také lamely orientovaly vůči ose vlákna náhodněji a tvořily struktury připomínající květinové vzory nebo mořské korály. Na vláknech o velkém průměru byl také výskyt lamel kebabů často řidší a někde dokonce chyběly úplně. Orientace, tvar, velikost a periodičita kebabů závisela zřejmě na uspořádání krystalické a amorfni fáze na povrchu polymerních vláken, kdy více roztržštěné a menší oblasti krystalické fáze vedly k výběžkům a větší oblasti naopak k lamelám. Toto je tvrzení je však nutné ještě detailněji ověřit vhodnými analytickými metodami. Vlákna s velkým průměrem mohou mít povrchovou vrstvu více amorfni, a proto se na nich lamely kebabu tvořily méně. Tvar mořských korálů mohl být způsoben náhodnou orientací krystalických fází polymerních řetězců vůči sobě, podle nichž se pak orientovaly lamely kebabu.

Analýza DSC potvrdila předpoklad, že lamely kebabu mohou mít vyšší krystalinitu než „mateřské“ vlákno, jelikož ve většině případů měly post-procesně upravené materiály o několik desetin vyšší procentuální krystalinitu. Rozdíl je však poměrně malý. Analýza GPC potvrdila, že nedochází k degradaci polymerních řetězců v rozpouštědlových systémech ani po post-procesní úpravě. Při kombinaci obou molekulových hmotností PCL, kdy jeden byl v mateřském vlákne a druhý v krystalizačním roztoku nebyla tato kombinace při analýze GPC pozorována, což bylo pravděpodobně způsobeno detekčním limitem přístroje, kdy množství PCL z krystalizačního roztoku bylo řádově nižší než z mateřského vlákna.

Základní neupravené i upravené materiály prokazovaly biokompatibilitu s buněčnými liniemi 3T3-NIH myších fibroblastů. Některé materiály zvýšily adhezi buněk na jejich povrchu, ale u buněčné proliferace nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl oproti neupraveným materiálům. Post-procesní úprava tedy zachovává biokompatibilitu materiálu a nesnižuje buněčnou adhezi a následnou proliferaci v čase. Základní i upravené materiály jsou tedy vhodné pro použití ve tkáňovém inženýrství.

Post-procesní úprava polymerních nanovláknenných materiálů pro strukturní změny jejich povrchu je v literatuře stále poměrně málo teoreticky popsané téma. Tento proces je ovlivňován mnoha materiálovými a procesními parametry a je nutné se tomuto velmi zajímavému a pohledově pozoruhodnému jevu na povrchu

nanovláken dále věnovat, aby byly odhaleny principy jeho vzniku a závislosti na vstupních parametrech. Takový přístup by přispěl k zajištění konzistence při výrobě post-procesně upravených materiálů s předem definovanými vlastnostmi, což by dále zlepšilo jejich použitelnost v oblasti tkáňového inženýrství a dalších biomedicínských aplikacích.

Konečně bych chtěl uvést, že úvodní výsledky mé bakalářské práce, ze kterých bylo pro tuto diplomovou práci vycházeno, tedy proces optimalizace zvláknování biodegradabilních polyesterů, a také úvodní výsledky post-procesních úprav vedoucích ke změnám povrchů elektricky zvlákněných nanovláken v této diplomové práci byly již prezentovány na konferencích a seminářích. [56, 57, 58, 59]

Seznam literatury

- [1] HIWRALE, Abhijeet, Swati BHARATI, Prashant PINGALE a Amarjitsing RAJPUT. Nanofibers: A current era in drug delivery system. *Heliyon* [online]. 2023, **9**(9) [cit. 2024-02-05]. ISSN 2405-8440. Dostupné z: doi:10.1016/j.heliyon.2023.e18917
- [2] PATHAK, Chandramani, Foram U. VAIDYA a Shashibhal M. PANDEY. Mechanism for Development of Nanobased Drug Delivery System. *Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems* [online]. Elsevier, 2019, 35–67 [cit. 2024-02-05]. ISBN 978-0-12-814029-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814029-1.00003-X
- [3] JENČOVÁ, Věra, Eva KUŽELOVÁ KOŠŤÁKOVÁ, Petr MIKEŠ, Věra HEDVIČÁKOVÁ a David LUKÁŠ. *Nanovlákná: Teorie, technologie a použití*. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2021. ISBN 978-80-7494-539-7.
- [4] EL FAWAL, Gomaa. Polymer nanofibers electrospinning: A review. *Egyptian Journal of Chemistry* [online]. 2019, 2019-08-20 [cit. 2024-02-06]. ISSN 2357-0245. Dostupné z: doi:10.21608/ejchem.2019.14837.1898
- [5] ANUSIYA, Ganesan a Rengarajan JAIGANESH. A review on fabrication methods of nanofibers and a special focus on application of cellulose nanofibers. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* [online]. 2022, **4** [cit. 2024-02-05]. ISSN 2666-8939. Dostupné z: doi:10.1016/j.carpta.2022.100262
- [6] ALMETWALLY, Alsaid Ahmed, Mohamed EL-SAKHAWY, Mahmoud ELSHAKAN-KERY a M. H. KASEM. Technology of Nano-Fibers: Production Techniques and Properties - Critical Review. *Journal of the Textile Association* [online]. 2017, **78**, 5–14 [cit. 2024-02-06]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/322774945 Technology of nano-fibers Production techniques and properties - Critical review](https://www.researchgate.net/publication/322774945_Technology_of_nano-fibers_Production_techniques_and_properties_-_Critical_review)
- [7] ALGHORAIBI, Ibrahim a Sandy ALOMARI. Different Methods for Nanofiber Design and Fabrication. *Handbook of Nanofibers* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2018, 1–46 [cit. 2024-02-08]. ISBN 978-3-319-42789-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-42789-8_11-2

- [8] YIN, Xuemin, Hejun LI, Ruimei YUAN, Yameng JIAO a Jinhua LU. Templated synthesis of spinel cobaltite MCo_2O_4 (M=Ni, Co and Mn) hierarchical nanofibers for high performance supercapacitors. *Journal of Materiomics* [online]. 2021, **7**(4), 858–868 [cit. 2024-02-08]. ISSN 2352-8478. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmat.2020.12.007
- [9] POKORNY, P., E. KOSTAKOVA, F. SANETRNIK, et al. Effective AC needleless and collectorless electrospinning for yarn production. *Phys. Chem. Chem. Phys* [online]. 2014, **16**(48), 26816–26822 [cit. 2024-02-10]. ISSN 1463-9076. Dostupné z: doi:10.1039/C4CP04346D
- [10] FARHAJ, Samia, Barbara R. CONWAY a Muhammad Usman GHORI. Nanofibres in Drug Delivery Applications. *Fibers* [online]. 2023, **11**(2) [cit. 2024-04-28]. ISSN 2079-6439. Dostupné z: doi:10.3390/fib11020021
- [11] SIVAN, M., D. MADHESWARAN, S. HAUZEROVA, et al. AC electrospinning: impact of high voltage and solvent on the electrospinnability and productivity of polycaprolactone electrospun nanofibrous scaffolds. *Materials Today Chemistry* [online]. 2022, **26** [cit. 2024-04-28]. ISSN 2468-5194. Dostupné z: doi:10.1016/j.mtchem.2022.101025
- [12] XUE, Jiajia, Tong WU, Yunqian DAI a Younan XIA. Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications: Methods, Materials, and Applications. *Chemical Reviews* [online]. 2019, **119**(8), 5298–5415 [cit. 2024-02-10]. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.8b00593
- [13] GATFORD, Joanna. Electrospinning Diagram.jpg. In: *Wikimedia Commons* [online]. 2008 [cit. 2024-02-21]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Electrospinning_Diagram.jpg
- [14] MAILLEY, Domitille, Anne HÉBRAUD a Guy SCHLATTER. A Review on the Impact of Humidity during Electrospinning: From the Nanofiber Structure Engineering to the Applications. *Macromolecular Materials and Engineering* [online]. 2021, **306**(7) [cit. 2024-02-13]. ISSN 1438-7492. Dostupné z: doi:10.1002/mame.202100115

- [15] RAMAKRISHNA, Seeram, Kazutoshi FUJIHARA, Teik-Cheng LIM, Wee-Eong TEO a Zuwei MA. *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers* [online]. New Jersey: World Scientific Publishing, 2005 [cit. 2024-02-13]. ISBN 978-981-4479-77-6.
- [16] DESHMUKH, K., M. BASHEER AHAMED, R.R. DESHMUKH, S.K. KHADHEER PASHA, P.R. BHAGAT a K. CHIDAMBARAM. Biopolymer Composites With High Dielectric Performance: Interface Engineering. *Biopolymer Composites in Electronics* [online]. Elsevier, 2017, 27–128 [cit. 2024-02-19]. ISBN 9780128092613. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-809261-3.00003-6
- [17] LABET, Marianne a Wim THIELEMANS. Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chemical Society Reviews* [online]. 2009, **38**(12) [cit. 2024-02-19]. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/b820162p
- [18] WOODRUFF, Maria Ann a Dietmar Werner HUTMACHER. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science* [online]. 2010, **35**(10), 1217–1256 [cit. 2024-02-19]. ISSN 0079-6700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002
- [19] Sbyrnes321. Polycaprolactone structure.png. In: *Wikimedia Commons* [online]. 2012 [cit. 2024-02-20]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polycaprolactone_structure.png
- [20] RAI, Alok, Sudipta SENAPATI, Shyam K. SARAF a Pralay MAITI. Biodegradable poly(ϵ -caprolactone) as a controlled drug delivery vehicle of vancomycin for the treatment of MRSA infection. *Journal of Materials Chemistry B* [online]. 2016, **4**(30), 5151–5160 [cit. 2024-02-20]. ISSN 2050-750X. Dostupné z: doi:10.1039/C6TB01623E
- [21] GUARINO, V., G. GENTILE, L. SORRENTINO a L. AMBROSIO. Polycaprolactone: Synthesis, Properties, and Applications. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology* [online]. 2017 [cit. 2024-02-20]. Dostupné z: doi:10.1002/0471440264.pst658
- [22] THAKUR, Mamta, Ishrat MAJID, Shafat HUSSAIN a Vikas NANDA. Poly(ϵ -caprolactone): A potential polymer for biodegradable food packaging applications: A potential polymer for biodegradable food packaging applications. *Packaging*

Technology and Science [online]. 2021, **34**(8), 449–461 [cit. 2024-02-20]. ISSN 0894-3214. Dostupné z: doi:10.1002/pts.2572

[23] SAFAEIJAVAN, Raheleh, Masoud SOLEIMANI, Adeleh DIVSALAR, Akram EIDI a Abdolreza ARDESHIRYLAJIMI. Comparison of random and aligned PCL nanofibrous electrospun scaffolds on cardiomyocyte differentiation of human adipose-derived stem cells. *Iran J Basic Med Sci* [online]. 2014, **17**(11), 903–911 [cit. 2024-02-25]. Dostupné z: doi:10.22038/IJBMS.2014.3743

[24] KO, Yeong-Mu, Do-Young CHOI, Sang-Chul JUNG a Byung-Hoon KIM. Characteristics of Plasma Treated Electrospun Polycaprolactone (PCL) Nanofiber Scaffold for Bone Tissue Engineering. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* [online]. 2015, **15**(1), 192–195 [cit. 2024-02-27]. ISSN 1533-4880. Dostupné z: doi:10.1166/jnn.2015.8372

[25] HEYDARI, Zohre, Davod MOHEBBI-KALHORI a Mahdi Shafiee AFARANI. Engineered electrospun polycaprolactone (PCL)/octacalcium phosphate (OCP) scaffold for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2017, **81**, 127–132 [cit. 2024-02-27]. ISSN 0928-4931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2017.07.041

[26] MIRBAGHERI, Mahnaz Sadat, Sahar AKHAVAN-MAHDAVI, Anwarul HASAN, Mohammad Saeed KHARAZMI a Seid Mahdi JAFARI. Propolis-loaded nanofiber scaffolds based on polyvinyl alcohol and polycaprolactone. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2023, **642** [cit. 2024-02-22]. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2023.123186

[27] JANMOHAMMADI, M. a M. S. NOURBAKHSH. Electrospun polycaprolactone scaffolds for tissue engineering: a review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* [online]. 2018, 2018-06-08, **68**(9), 527–539 [cit. 2024-02-27]. ISSN 0091-4037. Dostupné z: doi:10.1080/00914037.2018.1466139

[28] HUANG, Chao a Noreen L. THOMAS. Fabrication of porous fibers via electrospinning: strategies and applications. *Polymer Reviews* [online]. 2020, 2020-10-01, **60**(4), 595–647 [cit. 2024-02-29]. ISSN 1558-3724. Dostupné z: doi:10.1080/15583724.2019.1688830

- [29] JIANG, Lin, Liwei WANG, Nathan WANG, Shaoqin GONG, Lixia WANG, Qian LI, Changyu SHEN a Lih-Sheng TURNG. Fabrication of polycaprolactone electrospun fibers with different hierarchical structures mimicking collagen fibrils for tissue engineering scaffolds. *Applied Surface Science* [online]. 2018, **427**, 311–325 [cit. 2024-03-06]. ISSN 0169-4332. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsusc.2017.08.005
- [30] BOGNITZKI, Michael, Wolfgang CZADO, Thomas FRESE, Andreas SCHAPER, Michael HELLWIG, Martin STEINHART, Andreas GREINER a Joachim H. WENDORF. Nanostructured Fibers via Electrospinning. *Advanced Materials* [online]. 2001, **13**(1), 70–72 [cit. 2024-02-29]. Dostupné z: doi:10.1002/1521-4095(200101)13:1<70::AID-ADMA70>3.0.CO;2-H
- [31] KATSOGIANNIS, Konstantinos Alexandros G., Goran T. VLADISAVLJEVIĆ a Stella GEORGIADOU. Porous electrospun polycaprolactone (PCL) fibres by phase separation. *European Polymer Journal* [online]. 2015, **69**, 284–295 [cit. 2024-03-03]. ISSN 0014-3057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2015.01.028
- [32] CAO, Xianyang, Wei CHEN, Ping ZHAO, Yaoyao YANG a Deng-Guang YU. Electrospun Porous Nanofibers: Pore-Forming Mechanisms and Applications for Photocatalytic Degradation of Organic Pollutants in Wastewater. *Polymers* [online]. 2022, **14**(19) [cit. 2024-04-28]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym14193990
- [33] ZHAO, Huijing a Huanjie CHI. Electrospun Bead-on-String Fibers: Useless or Something of Value? *Novel Aspects of Nanofibers* [online]. InTech, 2018, 2018-04-26, 88–102 [cit. 2024-03-10]. ISBN 978-1-78923-074-1. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.74661
- [34] FONG, H., I. CHUN a D.H. RENEKER. Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer* [online]. 1999, **40**(16), 4585–4592 [cit. 2024-03-10]. ISSN 0032-3861. Dostupné z: doi:10.1016/S0032-3861(99)00068-3
- [35] GUPTA, Pankaj, Casey ELKINS, Timothy E. LONG a Garth L. WILKES. Electrospinning of linear homopolymers of poly(methyl methacrylate): exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent. *Polymer* [online]. 2005, **46**(13), 4799–4810 [cit. 2024-03-12]. ISSN 0032-3861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2005.04.021

- [36] LI, Tingxiao, Xin DING, Lingling TIAN, Jiyong HU, Xudong YANG a Seeram RAMAKRISHNA. The control of beads diameter of bead-on-string electrospun nanofibers and the corresponding release behaviors of embedded drugs. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2017, **74**, 471–477 [cit. 2024-03-14]. ISSN 0928-4931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2016.12.050
- [37] WANG, Xianfeng, Bin DING, Jianyong YU a Moran WANG. Engineering biomimetic superhydrophobic surfaces of electrospun nanomaterials. *Nano Today* [online]. 2011, **6**(5), 510–530 [cit. 2024-04-28]. ISSN 1748-0132. Dostupné z: doi:10.1016/j.nantod.2011.08.004
- [38] PENNING, A. J. a A. M. KIEL. Fractionation of polymers by crystallization from solution, III. On the morphology of fibrillar polyethylene crystals grown in solution. *Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere* [online]. 1965, **205**(2), 160–162 [cit. 2024-04-04]. ISSN 0303-402X. Dostupné z: doi:10.1007/BF01507982
- [39] KANAYA, Toshiji, Momoko MURAKAMI, Tadahiko MAEDE, et al. Role of molecular weight in shish-kebab formation during drawing by small-angle neutron and X-ray scattering. *Polymer Journal* [online]. 2017, **49**(12), 831–837 [cit. 2024-04-09]. ISSN 0032-3896. Dostupné z: doi:10.1038/pj.2017.65
- [40] SOMANI, Rajesh H., Ling YANG, Lei ZHU a Benjamin S. HSIAO. Flow-induced shish-kebab precursor structures in entangled polymer melts. *Polymer* [online]. 2005, **46**(20), 8587–8623 [cit. 2024-04-04]. ISSN 0032-3861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2005.06.034
- [41] DARGAZANY, Roozbeh, Vu Ngoc KHIÊM, Emad A. POSHTAN a Mikhail ITSKOV. Constitutive modeling of strain-induced crystallization in filled rubbers. *Physical Review E* [online]. 2014, **89**(2) [cit. 2024-04-04]. ISSN 1539-3755. Dostupné z: doi:10.1103/PhysRevE.89.022604
- [42] LI, C. Y., L. LI, W. CAI, S. L. KODJIE a K. K. TENNETI. Nanohybrid Shish-Kebabs: Periodically Functionalized Carbon Nanotubes. *Advanced Materials* [online]. 2005, 2005-05-02, **17**(9), 1198–1202 [cit. 2024-04-08]. ISSN 0935-9648. Dostupné z: doi:10.1002/adma.200401977

- [43] LI, Lingyu, Bing LI, Matthew A. HOOD a Christopher Y. LI. Carbon nanotube induced polymer crystallization: The formation of nanohybrid shish–kebabs. *Polymer* [online]. 2009, **50**(4), 953–965 [cit. 2024-04-07]. ISSN 0032-3861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2008.12.031
- [44] TAKENAKA, Yoshiko, Hideki MIYAJI, Akitaka HOSHINO, Adam TRACZ, Jeremiasz K. JESZKA a Iwona KUCINSKA. Interface Structure of Epitaxial Polyethylene Crystal Grown on HOPG and MoS₂ Substrates. *Macromolecules* [online]. 2004, 2004-12-01, **37**(26), 9667–9669 [cit. 2024-04-07]. ISSN 0024-9297. Dostupné z: doi:10.1021/ma0485080
- [45] WANG, Xiaofeng, Max R. SALICK, Xiaodong WANG, Travis CORDIE, Wenjuan HAN, Yiyang PENG, Qian LI a Lih-Sheng TURNG. Poly(ϵ -caprolactone) Nanofibers with a Self-Induced Nanohybrid Shish-Kebab Structure Mimicking Collagen Fibrils. *Biomacromolecules* [online]. 2013, 2013-10-14, **14**(10), 3557–3569 [cit. 2024-04-13]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm400928b
- [46] CHEN, Xi, Bin DONG, Bingbing WANG, Rucha SHAH a Christopher Y. LI. Crystalline Block Copolymer Decorated, Hierarchically Ordered Polymer Nanofibers. *Macromolecules* [online]. 2010, 2010-12-14, **43**(23), 9918–9927 [cit. 2024-04-10]. ISSN 0024-9297. Dostupné z: doi:10.1021/ma101900n
- [47] WANG, Xiaofeng, Yanhong GAO, Yiyang XU, et al. A Prerequisite of the Poly(ϵ -Caprolactone) Self-Induced Nanohybrid Shish–Kebab Structure Formation: An Ordered Crystal Lamellae Orientation Morphology of Fibers. *Macromolecular Chemistry and Physics* [online]. 2017, **218**(24) [cit. 2024-04-11]. ISSN 1022-1352. Dostupné z: doi:10.1002/macp.201700414
- [48] GLEESON, Sarah E., Seyong KIM, Tony YU, Michele MARCOLONGO a Christopher Y. LI. Size-dependent soft epitaxial crystallization in the formation of blend nanofiber shish kebabs. *Polymer* [online]. 2020, **202** [cit. 2024-05-14]. ISSN 0032-3861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2020.122644

- [49] ATTIA, Aria C., Tony YU, Sarah E. GLEESON, Mark PETROVIC, Christopher Y. LI a Michele MARCOLONGO. A Review of Nanofiber Shish Kebabs and Their Potential in Creating Effective Biomimetic Bone Scaffolds. *Regenerative Engineering and Translational Medicine* [online]. 2018, **4**(3), 107–119 [cit. 2024-04-13]. ISSN 2364-4133. Dostupné z: doi:10.1007/s40883-018-0053-3
- [50] YU, Tony, Sarah E. GLEESON, Christopher Y. LI a Michele MARCOLONGO. Electrospun poly(ϵ -caprolactone) nanofiber shish kebabs mimic mineralized bony surface features. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* [online]. 2019, **107**(4), 1141–1149 [cit. 2024-04-16]. ISSN 1552-4973. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.b.34207
- [51] JING, Xin, Hao-Yang MI, Travis M. CORDIE, Max R. SALICK, Xiang-Fang PENG a Lih-Sheng TURNG. Fabrication of shish-kebab structured poly(ϵ -caprolactone) electrospun nanofibers that mimic collagen fibrils: Effect of solvents and matrigel functionalization. *Polymer* [online]. 2014, **55**(21), 5396–5406 [cit. 2024-04-20]. ISSN 0032-3861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2014.08.061
- [52] YU, Tony, Mark PETROVIC, Aria ATTIA, Diego GALINDO, Mark C. STAUB, Seyong KIM, Christopher Y. LI a Michele MARCOLONGO. MC3T3 E1 cell response to mineralized nanofiber shish kebab structures. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* [online]. 2021, **109**(10), 1601–1610 [cit. 2024-04-20]. ISSN 1552-4973. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.b.34818
- [53] Polycaprolactone. SIGMA-ALDRICH (MERCK). *Merck* [online]. [cit. 2024-05-12]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/aldrich/704105>
- [54] CRESCENZI, V., G. MANZINI, G. CALZOLARI a C. BORRI. Thermodynamics of fusion of poly- β -propiolactone and poly- ϵ -caprolactone. comparative analysis of the melting of aliphatic polylactone and polyester chains. *European Polymer Journal* [online]. 1972, **8**(3), 449–463 [cit. 2024-05-02]. ISSN 0014-3057. Dostupné z: doi:10.1016/0014-3057(72)90109-7
- [55] Protocol for Cell Counting Kit-8. BIO-TECHNE TOCRIS. *Tocris* [online]. [cit. 2024-05-03]. Dostupné z: <https://www.tocris.com/resources/protocols/protocol-cell-counting-kit-8>

[56] Kuzelova Kostakova, E., Homuta, V., Jencova, V., Homer, J.A.W., Behalek, L., Havlickova, K., Hauzerova, S., Lisnenko, M., Kovacicin, J., Novotny, V., Mullerova, J., Lukas, D.: Effect of humidity during electrospinning of biodegradable polyester nanofibers, (book of Abstracts) Nanocon - 14th International Conference on Nanomaterials – Research and Application, October 19-21, 2022, Brno, Czech Republic, ISBN 978-80-88365-07-5, ISSN: 2694-930X, dostupné na <https://www.confer.cz/nanocon/2022>.

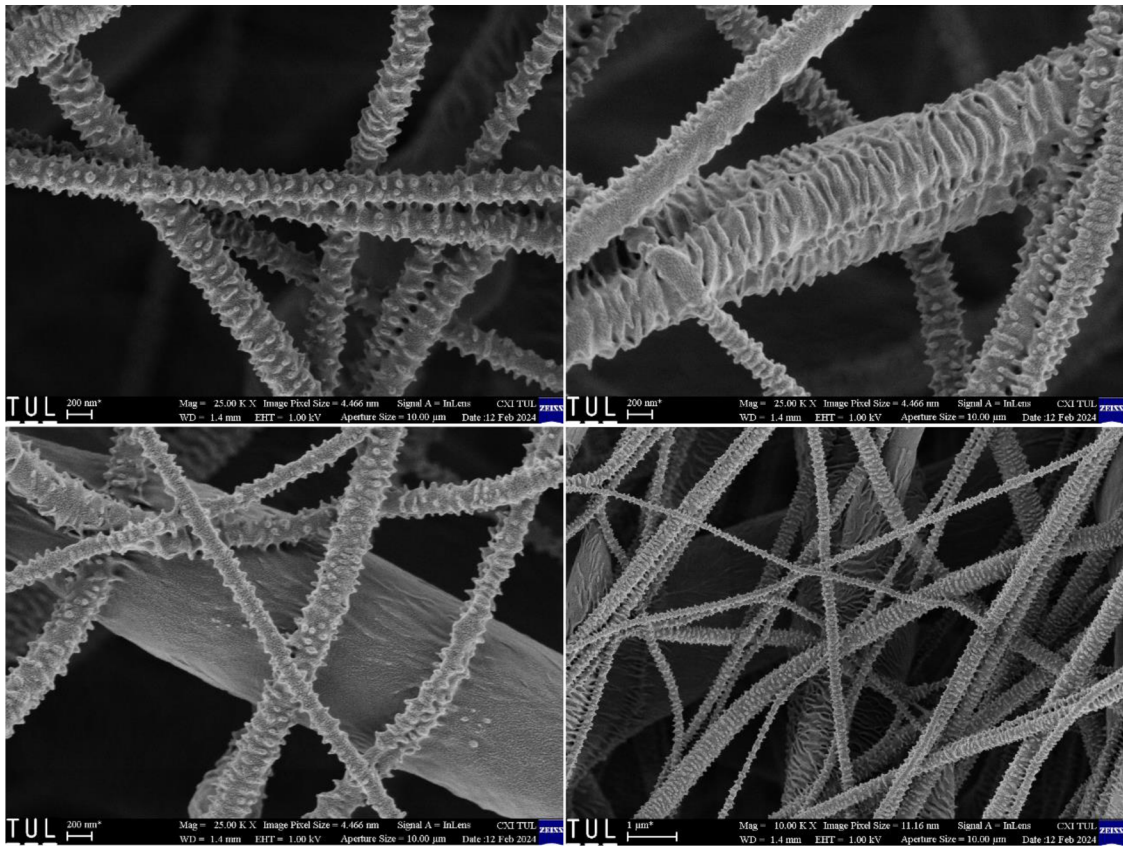
[57] Kuzelova Kostakova, E., Jencova, V., Homuta, V., Chudobova, E., Behalek, L., Havlickova, K., Hauzerova, S., Lisnenko, M., Kovacicin, J., Masek, P., Lukas, D.: Zvlákňování biodegradabilních polyesterů a jejich fyzikálně-chemické hodnocení. In: Suchý T, Vištejnová L, Kubášová K, Sedláček R, Tolde Z. Biomateriály a jejich povrchy XV. 13-16. září 2022: sborník příspěvků. Praha: Česká technika – nakladatelství ČVUT v Praze, 2022, s. 44. ISBN 978-80-01-07023-9.

[58] Kuželová Košťáková E., Homuta, V., Mášek P., Běhálek L., Novotný V., Lisnenko M., Havlíčková K., Jenčová V., Lukáš D; Vliv vzdušné vlhkosti na elektricky zvlákněné nanovláknenné materiály z biodegradabilních polyesterů. In: Vojtová L, Lipový B, Suchý T, Vištejnová L, Studenovská H, Rampichová M. Laboratorní a klinické aspekty regenerativní medicíny, 8.-9. 38/46 39/46 prosince 2022. Praha: Česká technika – nakladatelství ČVUT v Praze, 2022, s. 58. ISBN 978-80-01-07052-9.

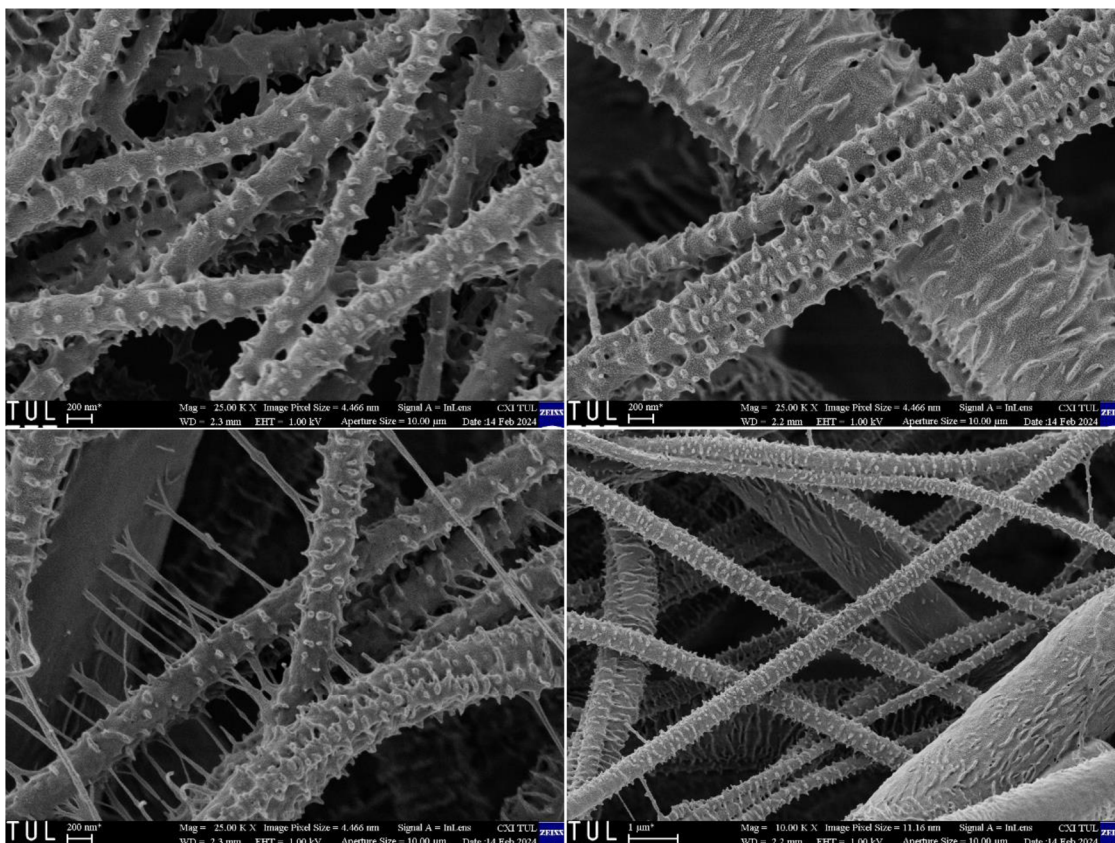
[59] Homuta, V., Hauzerová, Š., Lisnenko, M., Mikule, J., Kejzlar, P., Lukáš, D., Kuželová Košťáková, E.: Postprocesní úpravy biodegradabilních elektricky zvlákněných nanovláken – povrchově strukturovaná nanovláknena; Biomateriály a jejich povrchy XVI., Herbertov, Horní Mlýn, 19.-22.9.2023, ISBN 978-80-01-07212-7

Přílohy

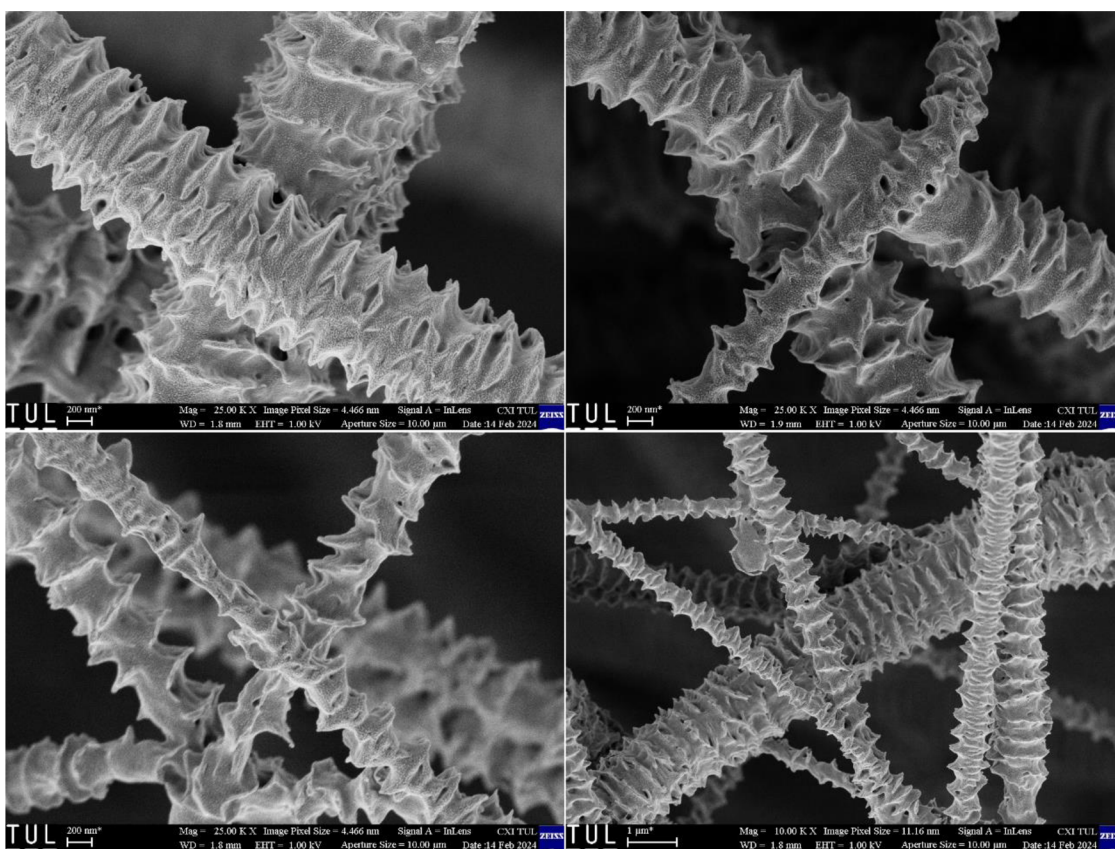
Příloha A



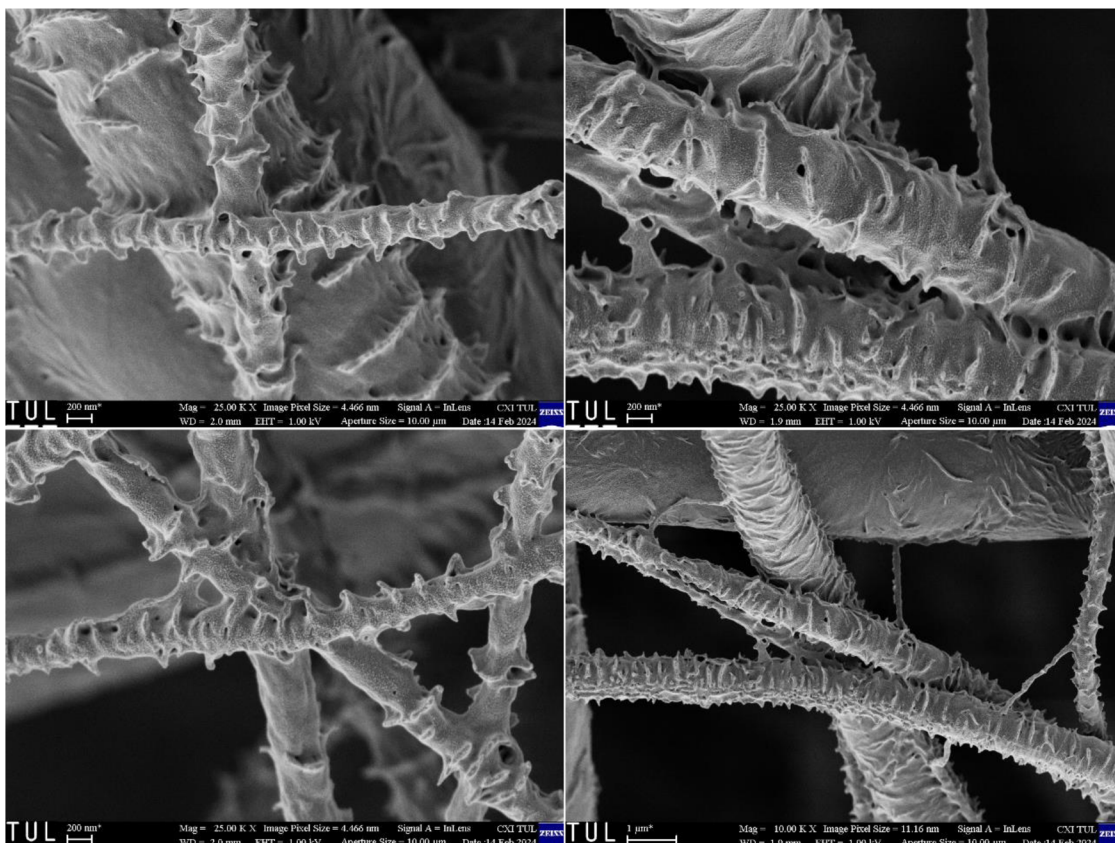
A. 1: Snímky ze SEM materiálu PCL45_82_PA45. Měřítko 200 nm, respektive 1 μm.



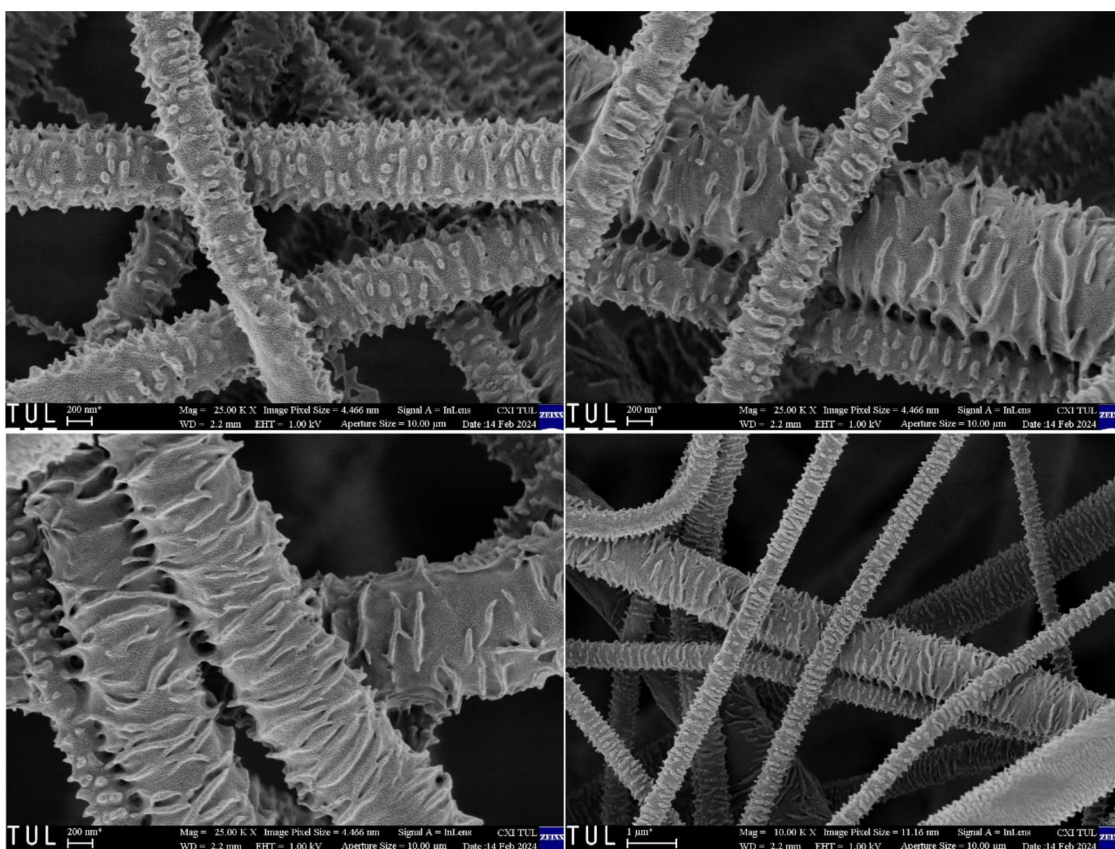
A. 2: Snímky ze SEM materiálu PCL45_82_PA80. Měřítka 200 nm, respektive 1 μm.



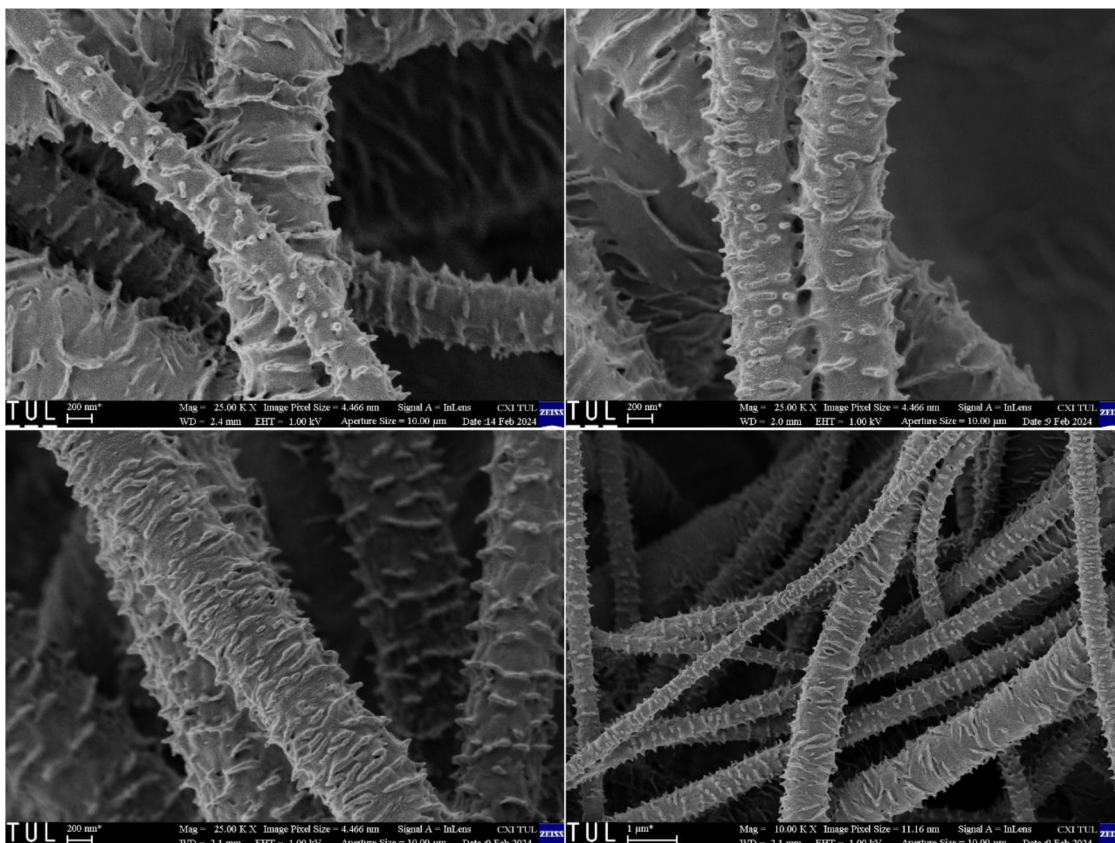
A. 3: Snímky ze SEM materiálu PCL45_CF16_PA45. Měřítka 200 nm, respektive 1 μm.



A. 4: Snímky ze SEM materiálu PCL45_CF16_PA80. Měřítka 200 nm, respektive 1 μm .

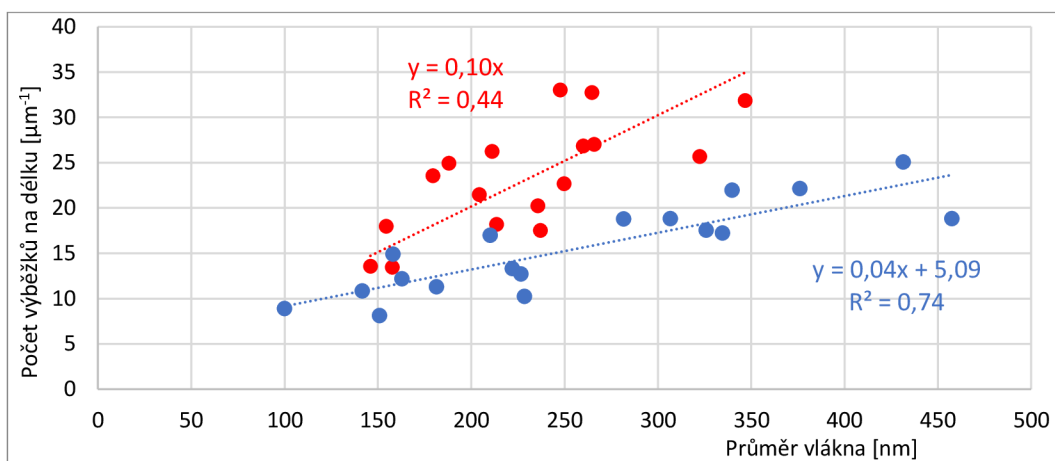


A. 5: Snímky ze SEM materiálu PCL80_82_PA45. Měřítka 200 nm, respektive 1 μm .

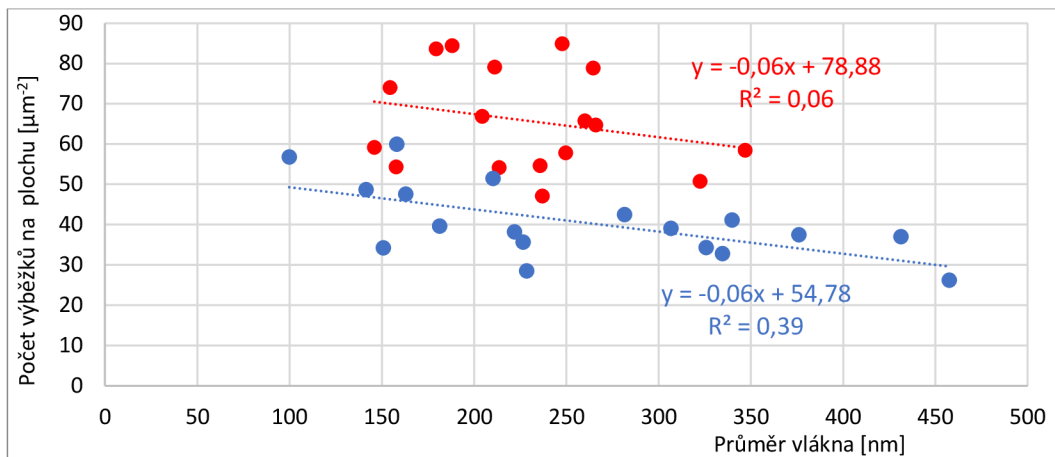


A. 6: Snímky ze SEM materiálu PCL80_82_PA80. Měřítka 200 nm, respektive 1 μm.

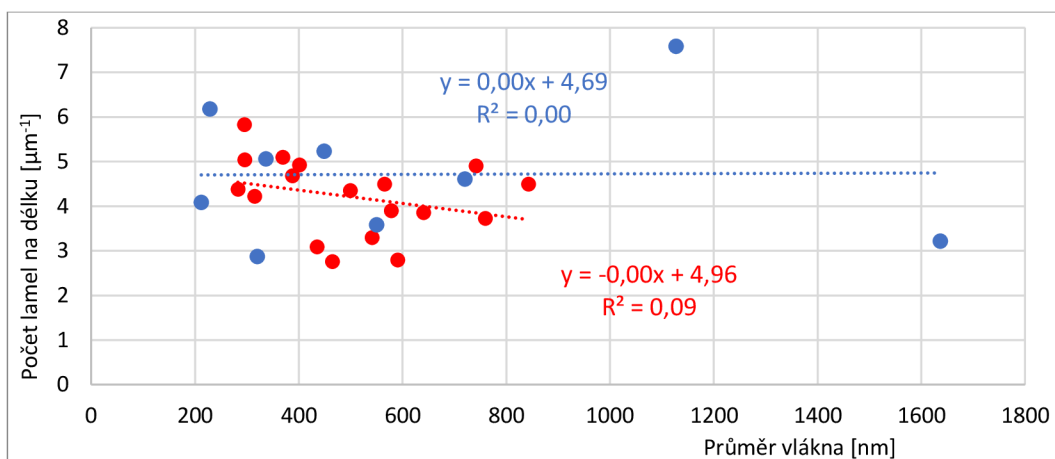
Příloha B



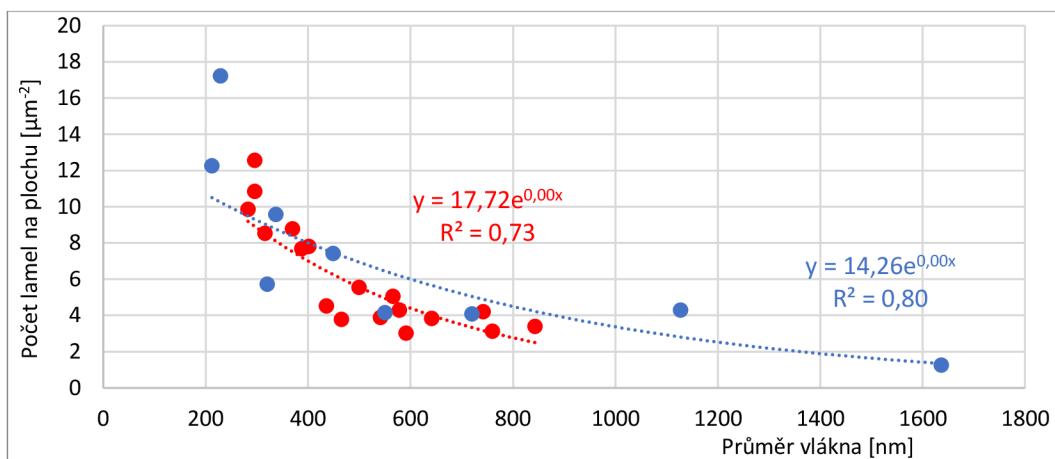
B. 1: Závislost počtu výběžků na délce vlákna na průměru vlákna pro materiál PCL45_82_PA45 (červeně) a PCL45_82_PA80 (modře).



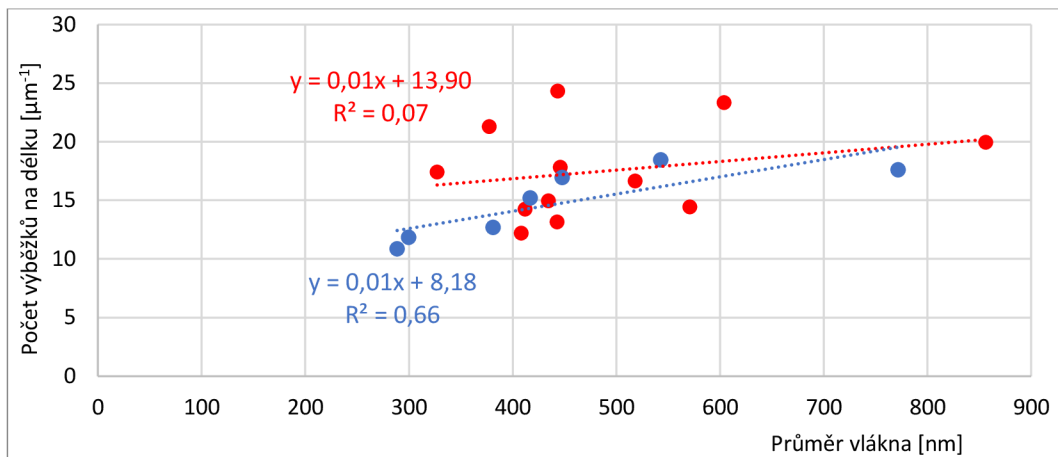
B. 2: Závislost počtu výběžků na ploše vlákna na průměru vlákna pro materiál PCL45_82_PA45 (červeně) a PCL45_82_PA80 (modře)



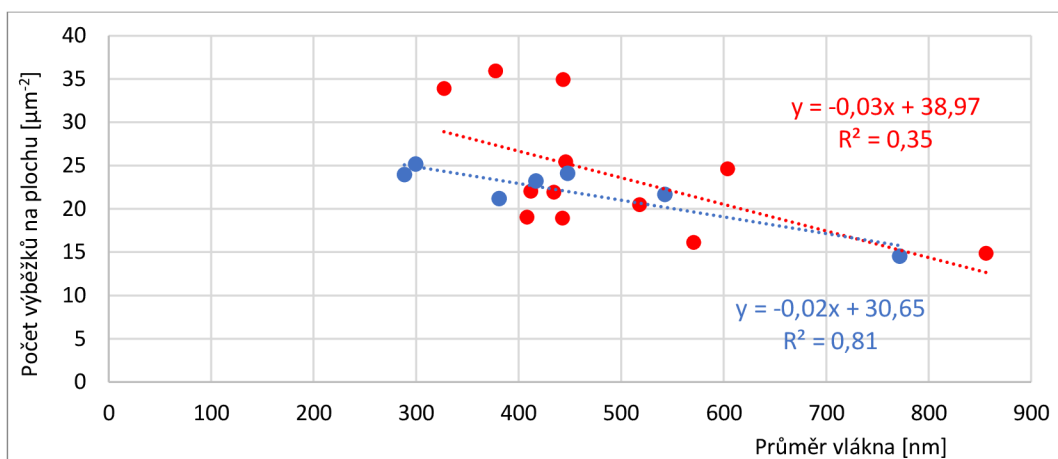
B. 3: Závislost počtu lamel na délce vlákna na průměru vlákna pro materiál PCL45_CF16_PA45 (červeně) a PCL45_CF16_PA80 (modře).



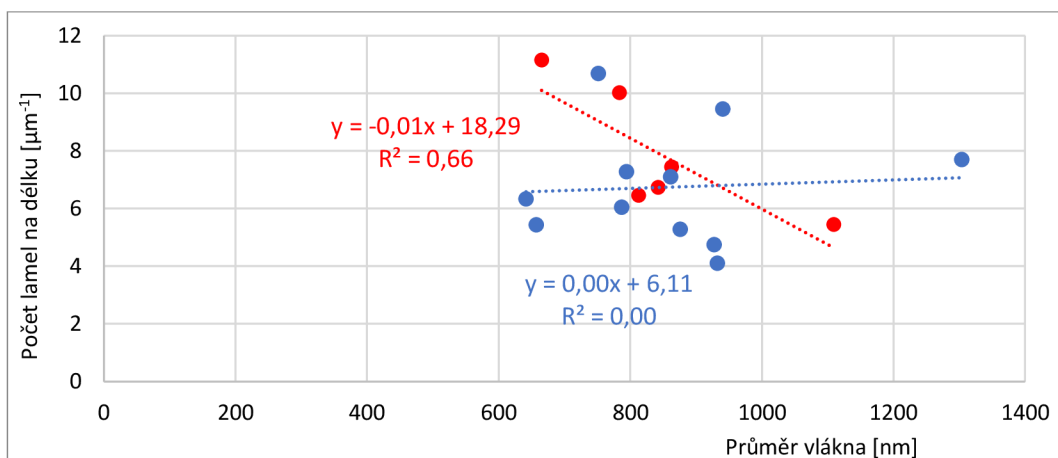
B. 4: Závislost počtu lamel na plochu vlákna na průměru vlákna pro materiál PCL45_CF16_PA45 (červeně) a PCL45_CF16_PA80 (modře).



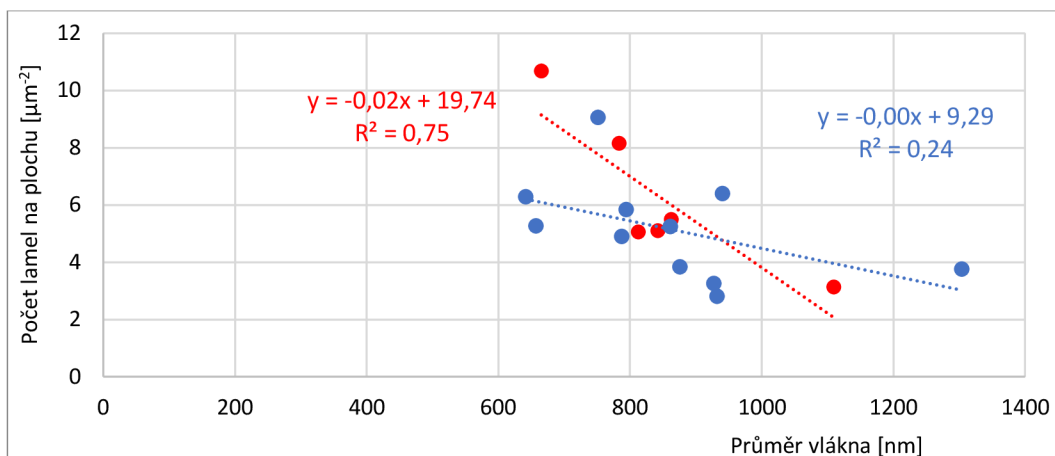
B. 5: Závislost počtu výběžků na délce vlákna na průměru vlákna pro materiál PCL80_82_PA45 (červeně) a PCL80_82_PA80 (modře).



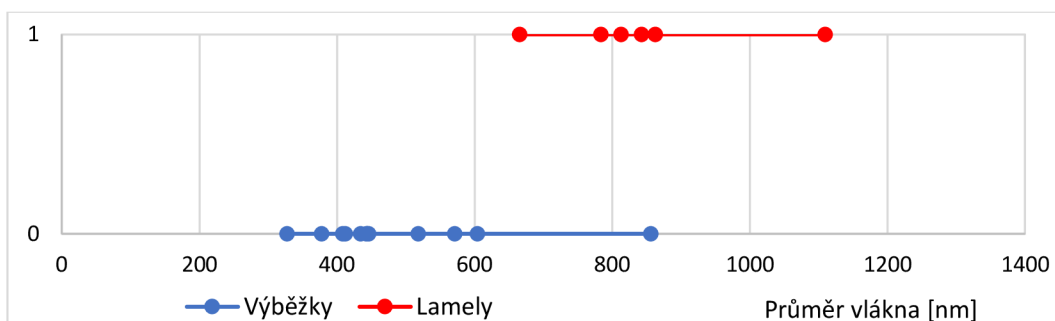
B. 6: Závislost počtu výběžků na ploše vlákna na průměru vlákna pro materiál PCL80_82_PA45 (červeně) a PCL80_82_PA80 (modře).



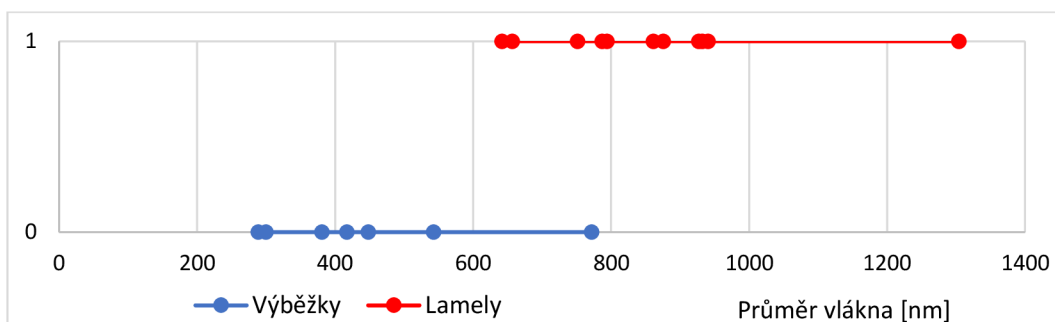
B. 7: Závislost počtu lamel na délce vlákna na průměru vlákna pro materiál PCL80_82_PA45 (červeně) a PCL80_82_PA80 (modře).



B. 8: Závislost počtu lamel na plochu vlákna na průměru vlákna pro materiál PCL80_82_PA45 (červeně) a PCL80_82_PA80 (modře).

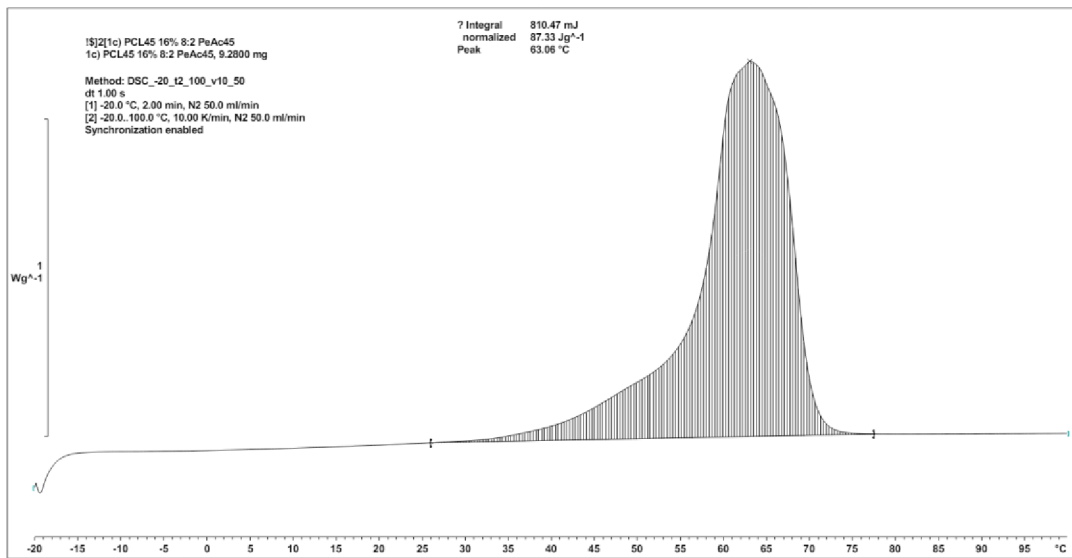


B. 9: Graf rozložení výběžků a lamel v závislosti na průměru vlákna na materiálu PCL80_82_PA45. 0 na vertikální ose označuje výběžky a 1 lamely.

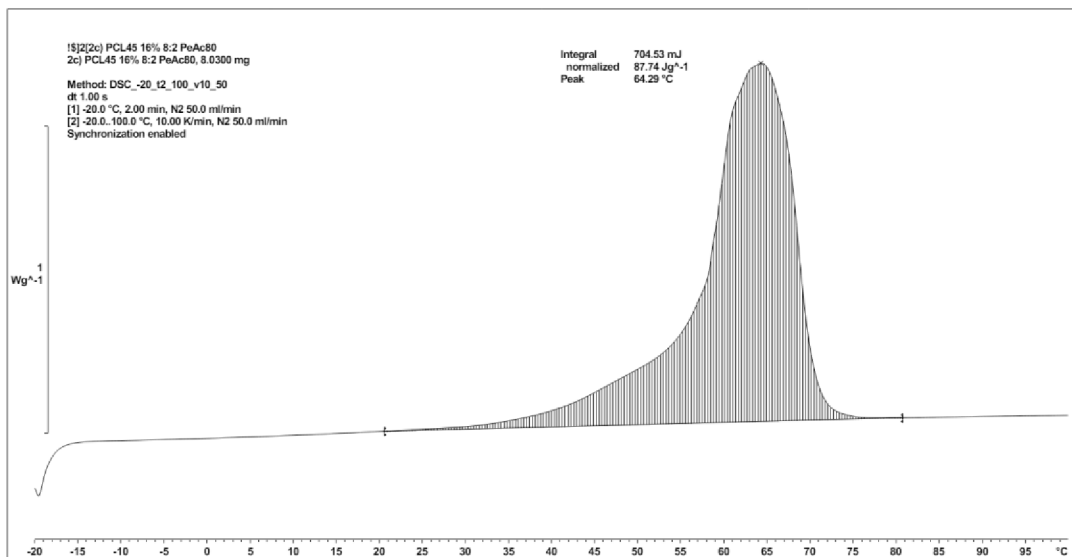


B. 10: Graf rozložení výběžků a lamel v závislosti na průměru vlákna na materiálu PCL80_82_PA80. 0 na vertikální ose označuje výběžky a 1 lamely.

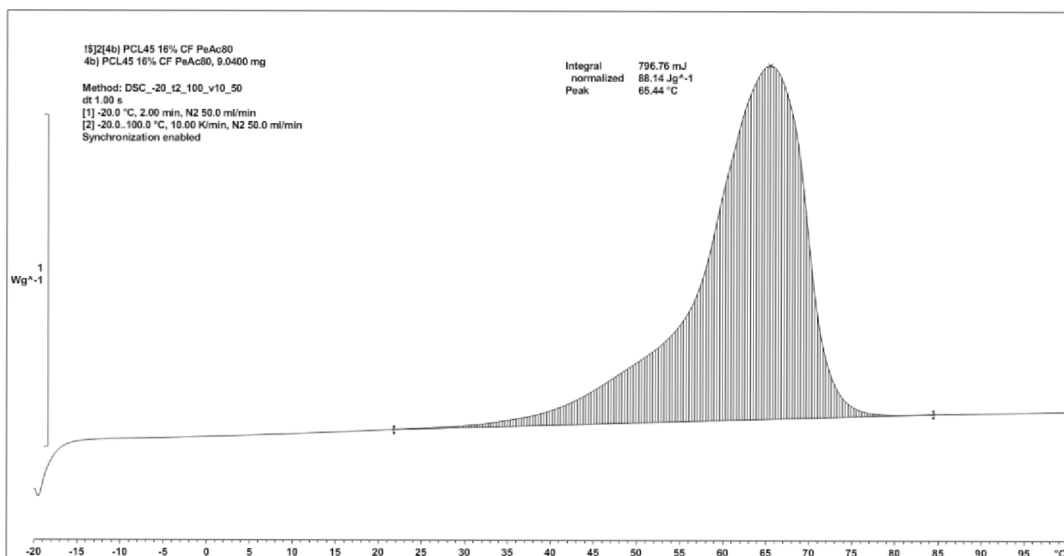
Příloha C



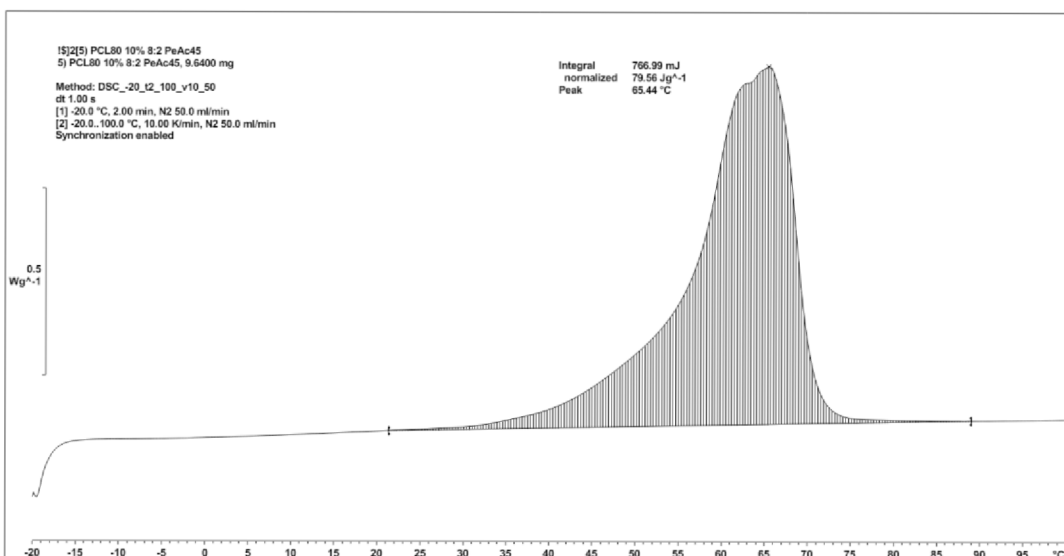
C. 1: DSC analýza, průběh změny entalpie v závislosti na teplotě pro materiál PCL45_82_PA45.



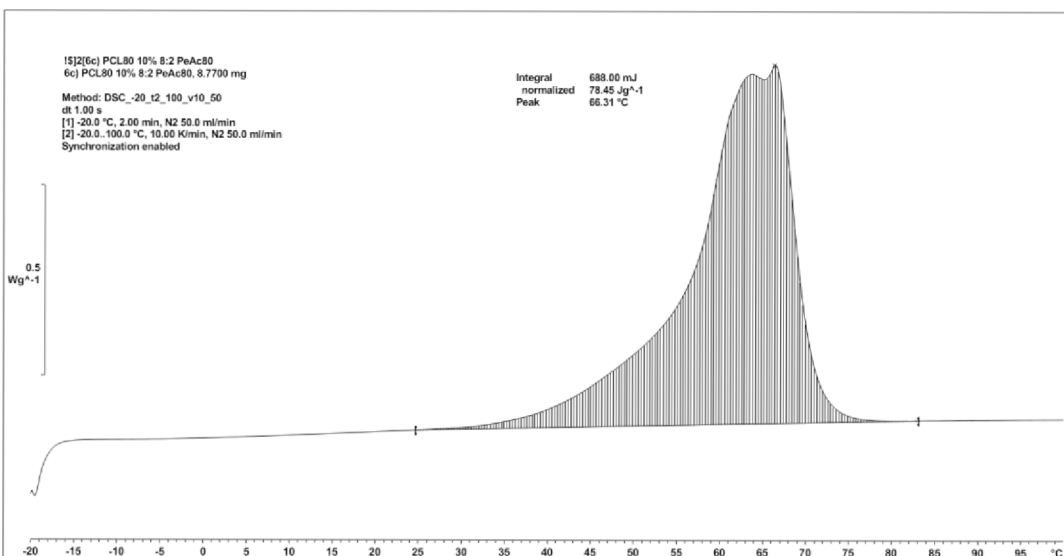
C. 2: DSC analýza, průběh změny entalpie v závislosti na teplotě pro materiál PCL45_82_PA80.



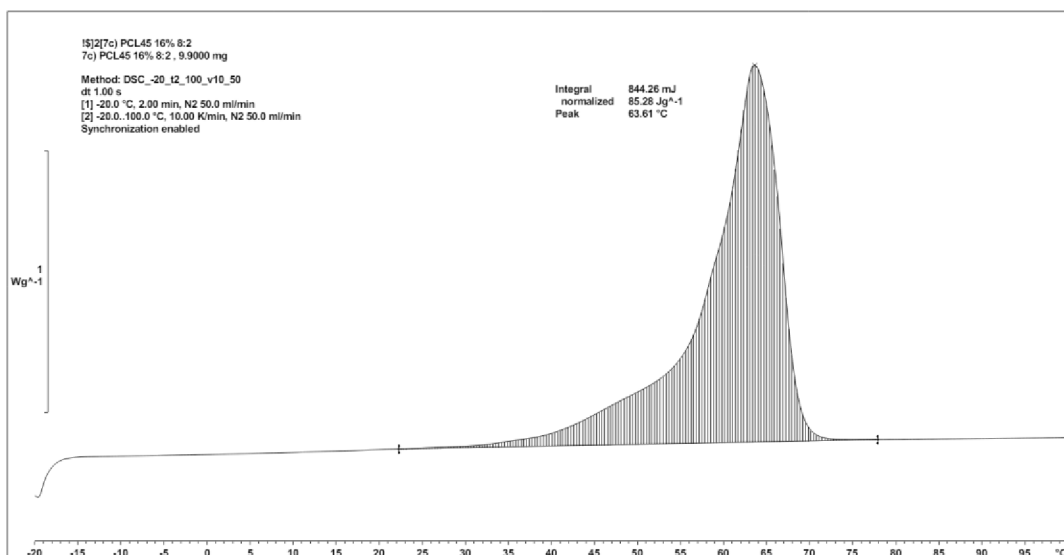
C. 3: DSC analýza, průběh změny entalpie v závislosti na teplotě pro materiál PCL45_CF16_PA80.



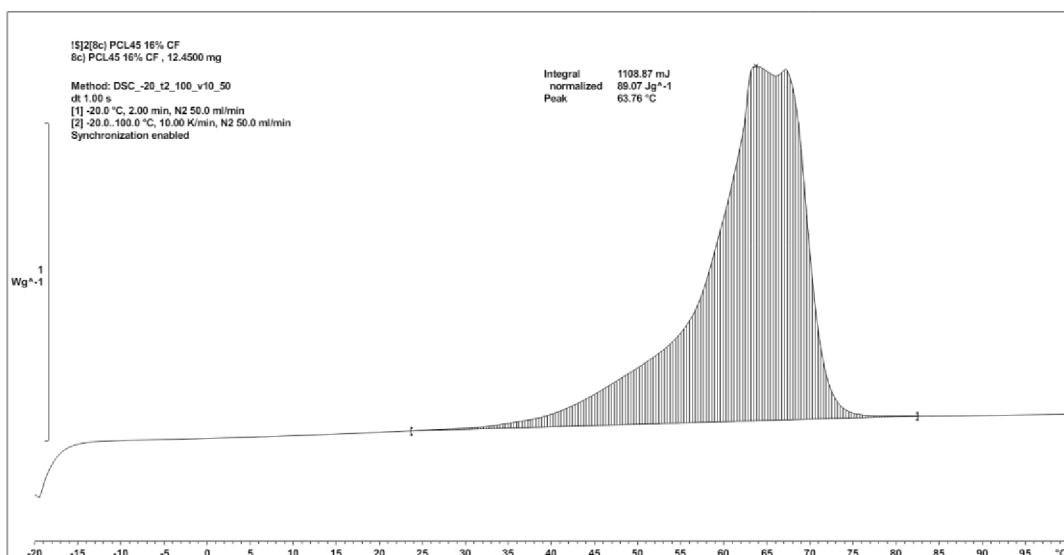
C. 4: DSC analýza, průběh změny entalpie v závislosti na teplotě pro materiál PCL80_82_PA45.



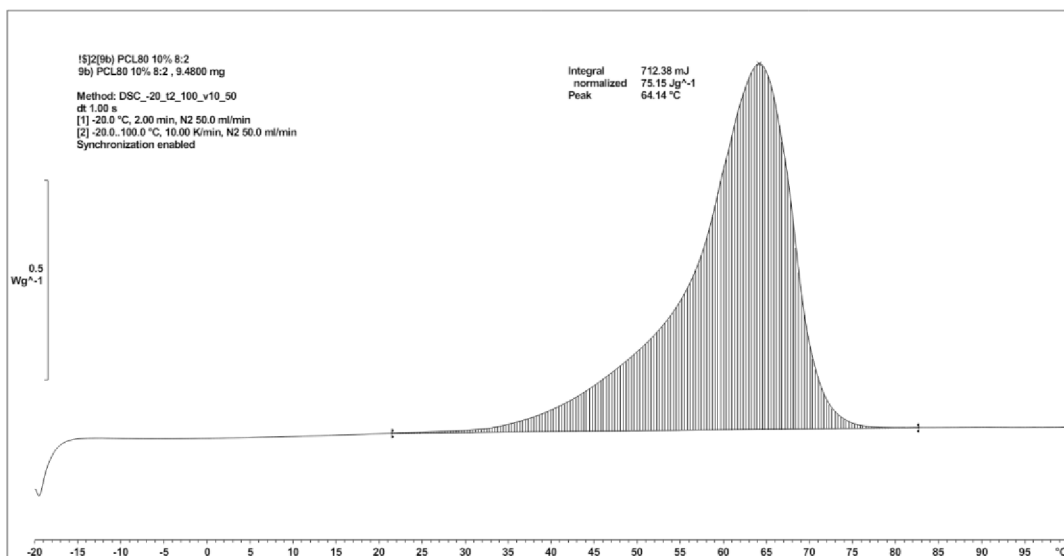
C. 5: DSC analýza, průběh změny entalpie v závislosti na teplotě pro materiál PCL80_82_PA80.



C. 6: DSC analýza, průběh změny entalpie v závislosti na teplotě pro materiál PCL45_82.



C. 7: DSC analýza, průběh změny entalpie v závislosti na teplotě pro materiál PCL45_CF16.



C. 8: DSC analýza, průběh změny entalpie v závislosti na teplotě pro materiál PCL80_82.