

Disertační práce

Elektrostatické zvlákňování do kapaliny

Studijní program:

P3106 Textilní inženýrství

Studijní obor:

Textilní technika a materiálové inženýrství

Autor práce:

Ing. Jan Kovačičin

Školitel práce:

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

Katedra chemie

Liberec 2024

Prohlášení

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

Jsem si vědom toho, že na mou disertační 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 disertační práce pro vnitřní potřebu Technické univerzity v Liberci.

Užiji-li disertační 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 disertační 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.

Anotace

Tato disertační práce se zaměřuje na elektrické zvlákňování do kapaliny jako inovativní metodu pro výrobu nano-mikrovláken. Tato práce se blíže zaměřuje na variantu mokrého elektrospinningu (wet elektrospinning), při kterém je kolektor tvořen kapalinou, do které vlákna dopadají a často se formují buď v kapalině nebo na její hladině. Kapalina může také sloužit pro zachycení či odtah již zformované vláknenné struktury, případně k dodatečné modifikaci, například dopováním, vymýváním atd. Právě použití kapalinového kolektoru přináší unikátní výhody této varianty procesu. Metoda umožňuje tvorbu třírozměrných objemných struktur s vysokou porozitou s velkými propojenými póry. Kapalina také může modifikovat vlastnosti samotného materiálu. Jedním z příkladů je vytváření houbovitých struktur výsledných vláken, což může zvýšit jejich porozitu, biodegradabilitu, buněčnou adhezi a proliferaci. V rámci této práce bylo provedeno testování, které prokázalo zvýšenou krystalinitu polymeru, který byl zvlákňován touto metodou do kapaliny.

Výzkum zahrnuje teoretický model, který se zabývá problematikou nošení cylindrických objektů do kapaliny. Práce také popisuje vývoj experimentálního zařízení pro elektrické zvlákňování, které bylo vytvořeno za pomoci technologie 3D tisku metodou Fused Deposition Modeling. Toto zařízení bylo následně testováno a aplikováno v různých experimentech.

Součástí výzkumu bylo také testování chování kapaliny v trubicích vyrobených z nanovláknenných přízí. Pro tyto experimenty bylo vyvinuto elektronické dávkovací zařízení – mikropumpa. Tato pumpa byla vytvořena na základě open-source elektroniky systému Arduino a využila technologii 3D tisku. Řídící program byl vytvořen v nativním programovacím jazyce Arduino - C/C++. Je třeba poznamenat, že tyto experimenty byly ilustrativní a nebyly dále rozvíjeny ani teoreticky zkoumány v rámci této práce.

Další část práce se věnuje vývoji speciálních vláknenných struktur, které jsou primárně určeny pro oblast tkáňového inženýrství. Tyto struktury zahrnují dutá a porézní vlákna, včetně jejich kombinací. Tyto vláknenné struktury mají unikátní vlastnosti, jež jsou vhodné pro aplikace, kde jejich zvýšený specifický povrch hraje klíčovou roli. Zajímavostí této vyvinuté metody výroby vláken je, že vhodnou kombinací rozpouštědla a polymeru lze vyrobit dutá vlákna i tradičním zvlákňováním bez použití kapaliny jako kolektoru. Použití kapaliny je však vhodné pro dosažení 3D objemných a vysoce porézních struktur.

Praktické testování vyrobených vláknenných struktur pro jejich použití, jako tkáňových nosičů (scaffoldů) v oblasti tkáňového inženýrství, je další významnou částí této disertační práce. Tyto struktury byly podrobeny testům viability a byla prověřena jejich vhodnost strukturálně i materiálově. Bylo prokázáno, že tyto specifické struktury jsou vhodné pro buněčnou proliferaci a nevykazují cytotoxické účinky. Výsledky byly následně porovnány s klasickými strukturami vyrobenými jinými metodami.

Tato disertační práce přináší důležité poznatky a příspěvky v oblasti elektrického zvlákňování do kapaliny a jeho aplikací v tkáňovém inženýrství.

Klíčová slova:

Elektrické zvlákňování do kapaliny (ESPIN), Nano-mikrovlákna, Teoretický model, Experimentální zařízení, 3D tisk, Mikropumpa, Porézní vlákna, Krystalinita materiálu, Tkáňové inženýrství, Scaffoldy, Viabilita buněk, Cytotoxicita

Abstract

This dissertation focuses on electrical spinning in a liquid as an innovative method for the production of nano-microfibers. This thesis takes a closer look at a type of wet electrospinning, where the collector is a liquid into which the fibres are deposited, often formed either in the liquid or on its surface. The liquid may also be used to collect or carry away the already formed fibre structure, or for additional modification, e.g. by doping, washing, etc. It is the use of a liquid collector that brings the unique advantages of this type of process. The method allows the formation of three-dimensional, bulky structures with reach high porosity and large interconnected pores. The liquid can also modify the properties of the material itself. One example is the formation of sponge-like structures in the volume of resulting fibers, which can increase their porosity, biodegradability, cell adhesion and proliferation. In this work, testing was carried out which demonstrated increased crystallinity of the polymer that was spun into liquid using this method.

The research includes a theoretical model that addresses the issue of immersing cylindrical objects in a liquid. The thesis also covers the development of an experimental device for wet electrospinning, which was created using 3D printing technology by Fused Deposition Modeling. This device was subsequently tested and applied in various experiments.

The research also included testing the behavior of the liquid in tubes made of nanofibrous yarns. For these experiments, an electronic dispensing device, a micropump, was developed. This pump was created based on the open-source electronics system Arduino and used 3D printing technology. The control program was created in the native Arduino programming language - C/C++. It should be noted that these experiments were illustrative and were not further developed or theoretically investigated within the scope of this thesis.

The next part of the thesis is directed towards the development of special fibre structures, which are primarily intended for the field of tissue engineering. These structures include hollow and porous fibres, including combinations of the two. These fiber structures have unique properties that are suitable for applications where their enhanced specific surface area plays a key role. An interesting feature of this developed method of fiber fabrication is that with a suitable combination of solvent and polymer, hollow fibers can be fabricated even by traditional wetting without the use of a liquid as a collector. The use of liquid, however, is suitable for achieving 3D bulky and highly porous structures.

Practical experiment of the fabricated fibre structures for their use as scaffolds (tissue scaffolds) in the field of tissue engineering is another important part of this thesis. These structures were subjected to viability tests and their suitability structurally and materially was examined. These specific structures have been shown to be suitable for cell proliferation and do not exhibit cytotoxic effects. The results were then compared with classical structures produced by other methods.

This dissertation provides important insights and contributions in the field of wet electrospinning and its applications in tissue engineering.

Keywords:

Electrospinning, Electric spinning, Wet electrospinning, Nano-microfibers, Theoretical model, Experimental device, 3D printing, Micro-pump, Porous fibers, Crystallinity of materials, Tissue engineering, Scaffolds, Cell viability, Cytotoxicity

PODĚKOVÁNÍ

V první řadě velmi děkuji své školitelce doc. Ing. Evě Kuželové Košťákové, Ph.D., za její profesionální vedení a důvěru během celého studia. Dále děkuji všem kolegům z Katedry netkaných textilií a nanovlákných materiálů a kolegům z Katedry chemie fakulty pedagogické za jejich neocenitelnou podporu a profesionalitu. Velké díky za spolupráci také patří Ing. Šárce Hauzerové za její pomoc a spolupráci při biologických experimentech a profesoru et profesoru RNDr. Davidovi Lukášovi, CSc., za obětavý čas věnovaný konzultacím a nepřeherné množství optimismu.

Velké poděkování patří mé rodině, zejména synům Teodorovi a Tomášovi, za jejich nekonečnou trpělivost a toleranci, které mi projevovali v průběhu celého výzkumu a psaní disertační práce. Bez jejich podpory by tato práce nebyla možná. Tato práce je vlastně malým vnitřním rodinným dluhem zejména pro tyto mé dva potomky.

Obsah

1	Seznam použitých zkratek.....	8
2	Přehled o současném stavu problematiky.....	10
2.1	Vytváření materiálů pro tkáňové inženýrství pomocí suchých technologií.....	12
2.1.1	Vrstvení materiálu pomocí elektrospinningu.....	12
2.1.2	Multimateriálová výroba s procesem post-procesním odstraněním jedné složky.....	14
2.1.3	Zvláknování za pomoci ultrazvuku.....	15
2.1.4	Metody výroby 3D materiálu na principu plynové expanze.....	15
2.1.5	Metody výroby 3D materiálu na principu ultrasonického rozvolnění.....	18
2.1.6	Metody výroby 3D materiálu pomocí krátko-vláknenných matic.....	19
2.1.7	Metody výroby 3D materiálu na principu aditivního tisku.....	20
2.2	Metody výroby 3D materiálu na principu zvláknování do kapaliny.....	23
2.3	Nanotopografické alterace.....	40
2.4	Hlavní parametry elektrického zvláknování.....	42
3	Cíle disertační práce.....	44
4	Teoretický matematický model.....	45
4.1	Podmínky.....	45
4.2	Satanovení kapilární délka.....	46
4.3	Analýza interakce vlákna s kapalinou.....	49
4.4	Silové působení na vlákno částečně ponořené do kapaliny.....	56
4.5	Zjednodušené řešení pro malé úhly α	62
4.6	Řešení maximálních únosností kapaliny vzhledem k průměru vlákna.....	62
4.7	Síla definovaná Harkinsovým rozestíracím koeficientem.....	66
4.8	Ověření modelu.....	67
4.9	Závěr teorie matematického modelu.....	68
5	Návrh a vytvoření zařízení pro wet elektrospinning.....	70
5.1	Koncept hlavních principů zařízení.....	71
5.2	Konstrukce.....	72
5.3	Výroba.....	72
5.4	Testování a dokončení zařízení.....	85
6	Výroba a testování 3D objemných struktur.....	96
6.1	Výroba vzorků.....	96
6.2	Příprava vzorků – post procesing.....	98
6.3	Test krystalinity vytvořených materiálů.....	99
6.4	Biologické testování vzorků in-vitro.....	100
6.4.1	Sterilizace.....	102

6.4.2	<i>Příprava média s buňkami MEFs</i>	102
6.4.3	<i>Osazení vzorků buňkami</i>	103
6.4.4	<i>Metabolický test CCK-8</i>	104
6.4.5	<i>Výsledky biologického testování</i>	106
6.5	<i>Vyhodnocení a závěry z výroby a testování vzorků</i>	107
7	<i>Vývoj specifických materiálů pro tkáňové inženýrství</i>	108
7.1	<i>Testování rozpouštědlových a kolektorových systémů</i>	109
7.2	<i>Experimentování s výrobou specifických vlákenných struktur</i>	111
7.3	<i>Analýza a hodnocení vzorků vytvořených materiálů</i>	122
7.3.1	<i>Obrazová analýza vybraných vlákenných struktur</i>	122
7.3.2	<i>Obrazová analýza snímků SEM z vybraných řezů materiálu</i>	124
7.3.3	<i>Měření porozity</i>	128
7.4	<i>Popis vyrobených materiálů</i>	128
8	<i>Biologické testování specifických materiálů</i>	130
8.1	<i>Testování cytotoxicity</i>	130
8.2	<i>Testování proliferace optickou analýzou</i>	132
8.3	<i>Výsledky závěrečného biologického otestování materiálů</i>	135
9	<i>Výsledky a jejich uplatnění</i>	136
10	<i>Zhodnocení výsledků pro vědní obor nebo pro praxi</i>	138
11	<i>Doporučení na pokračování práce v daném tématu a oboru</i>	139
12	<i>Závěr</i>	140
13	<i>Seznam použitých zdrojů</i>	142
14	<i>Práce autora</i>	156

1 Seznam použitých zkratek

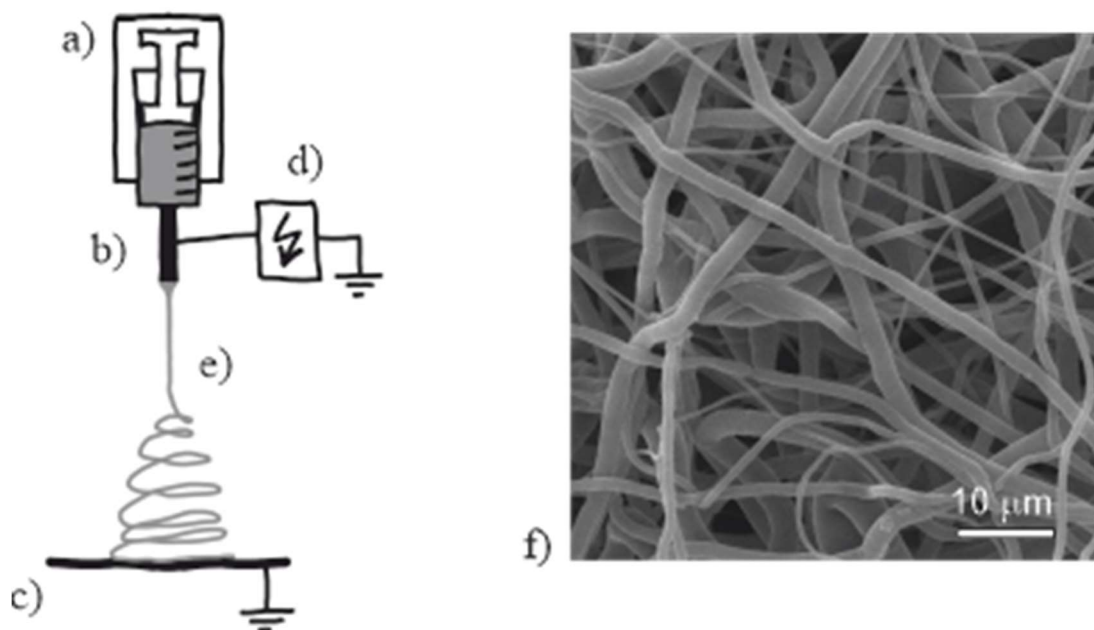
a	Kapilární délka $a=\sqrt{(2\gamma/\rho g)}$ [N]
ABS	Acrylonitrile Butadiene Styrene
AC	Alternating Current (Střídavý proud-napětí)
AC	Aceton
AgNP	Nanočástice stříbra (Silver Nano Particles)
ASA	Acrylic Styrene Acrylonitrile
BSA	Hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumin)
CCK	Cell Counting Kit
CF	Cloroform
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DCM	Decelurizovaný Chrupavkový extracelulární Matrix
DMF	Dimetilformamid
DSC	Diferenciální Skenovací Kalometrie – (Differential Scanning Calorimetry)
DV	Direct Current (stejnoseměrný proud-napětí)
ES	Elektrospinning (elektrické zvlákňování)
F	Síla [N]
f	Bezrozměrná síla $f=F/\gamma l$ [-]
HAMS	Kukuřičný škrob s vysokým obsahem amylázy (High-amylose maize starch)
hMSC	Lidské mezenchymální kmenové buňky - (human mesenchymal stem cells)
IL	Iontové rozpouštědlo – Iontová kapalina (Ionic Liquid)
k	Křivost
MC	Metylenchlorid
MEFs	Mouse Embryonic Fibroblasts
MPEG	Methoxy Poly(Ethylene Glycol)
nHA	Nano hydroxylapatit
NIPS	Nerozpouštědlem vyvolaná fázová separace (Non solvent induced phase separation)
P	Bezrozměrový poměr hustoty vlákna a hustoty kapaliny $P=\rho f/\rho$
PA	Polyamid - Nylon
PA 4.6	Polyamid 4.6
PANI	Polyanilin
PBS	Fosfátový pufr (Phosphate-Buffered Saline)
PC	Polycarbonate
PCL	Polykaprolacton
PDL	Potkaní periodontální pojivové buňky (Rat periodontal ligament)
PEDOT	Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)
PEO	Polyethylenoxid
PETG	Polyethylene terephthalate glycol
PLA	Polylactic acid – kyselina polymléčná
PGA	poly(glycolic acid) - kyselina polyglykolová
PP	Polypropylen
PVA	Polyvinil alcohol
PVB	Polyvinyl butyral
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
R	Bezrozměrový průměr vlákna $R=r/a$ [-]

RBMCs	Potkaní kostní dřevňové buňky (Rat bone marrow cells)
SD	Směrodatná odchylka
SF	Fibroin z hedvábí (Silk Fibroin)
Sh	Harkinsův rozetírací koeficient $SH = \gamma_{SL} - \gamma_{LV} - \gamma_{SL}$ [mN/m]
Si-PVH	Uhličitan vápenatý dopovaný Siloxanem (siloxane-doped poly(L-lactic acid)/vaterite)
SPIONs	Nanočástice super magnetických oxidů železa (Superparamagnetic iron oxide nanoparticles)
t-BuOH	Terc-butylalkohol
TFE	2,2,2-trifluoethanol
TIPS	Tepelně vyvolaná fázová separace (Thermally induced phase separation)
TRITC	Tetramethylrhodamid (Tetramethylrhodamine)
VIPS	Odparem vyvolaná fázová separace (Vapor-induced phase separation)
VN	Vysoké napětí
WET ES	Wet Elektrospinning (elektrické zvlákňování s kapalným kolektorem)
γ	Povrchové napětí [mN/m]
ζ	Bezrozměrná výchylka hladiny kapaliny $\zeta = z/a$
θ	Kontaktní úhel [°]

2 Přehled o současném stavu problematiky

Elektrické zvlákňování představuje fascinující a v současné době velmi atraktivní téma, a je široce využívanou metodou pro tvorbu nano a mikro vlákněných struktur [1–6]. Tato technika se stala základem pro výrobu široké škály materiálů, zejména v oblasti nano a mikro vlákněných materiálů. Důvodem masivního rozmachu této metody je její relativní jednoduchost, produktivita a spolehlivost. Tato metoda je zároveň relativně technologicky nenáročná. Některé varianty této metody zvlákňují bezjehlově, což může dále zvýšit jednoduchost zvlákňovacího zařízení a s tím i konstrukční problémy a náklady na provoz a údržbu [7–12]. Vzhledem k velké poptávce po specifických materiálech, nabízí elektrické zvlákňování produkty - materiály, jež mají unikátní fyzikální, chemické a biologické vlastnosti. Tyto unikátní a zajímavé vlastnosti vycházejí zejména z velkého specifického povrchu vytvořených materiálů a porozity, která může přesahovat i 90%. Svou strukturou materiály také dokáží imitovat extracelulární matrix (ECM) a tím se nabízejí jako vhodné pro použití v medicíně.

Principem elektrického zvlákňování je využití elektrické síly [1–3, 7, 13–17], kdy elektrický náboj v elektrickém poli působí na polymer takovou silou, že překoná síly povrchového napětí, případně i gravitační. Potenciálový rozdíl je na hladině kapaliny tak velký, že dochází k vybuzení nadkritické hodnoty intenzity elektrického pole E . To způsobí lokální zvýšení elektrického tlaku, který překoná kapilární tlak a způsobí hydrodynamickou nestabilitu. Dochází k formování takzvaného Taylorova kužele, kdy se vytvoří konický tvar polymeru, z něhož se utvářejí dlouhí se vlákněné útvary. Takto tvořená vlákna procházejí takzvanou zónou bičování, kde dochází k jejich dloužení a formování za současného vysoušení, případně chladnutí, v případě použití taveniny. Průměr vytvořených vláken se pohybuje v rozmezí od desítek nanometrů až po desetiny milimetru. Princip elektrického zvlákňování a typické struktury touto technologií vytvořené je na obrázku (*Obr. 1*). Dle použitého zdroje elektrického napětí se dělí elektrické zvlákňování na stejnosměrné (DC) a střídavé (AC). U DC zvlákňování se využívá elektricky aktivního vodivého kolektoru, zpravidla kovového, na němž se zachytává vytvořená vlákněná struktura. Při použití AC zdroje dochází k vytvoření takzvaného virtuálního kolektoru, vlákna nejsou tedy přitahována k elektricky aktivnímu vodivému kolektoru a jsou utvářena do volného prostoru, kde se mohou dále odtahovat či nanášet [7, 18–21]. AC zvlákňování je velmi zajímavé z hlediska produktivity a absence kolektoru, produktivita u této varianty je řádově vyšší a absence kolektoru posouvá technologické možnosti dále. Většina základního nastavení pro elektrické zvlákňování obsahuje základní komponenty, tedy zdroj vysokého napětí, polymerní roztok v injekční stříkačce s jehlou, která slouží jako tryska, dávkovací pumpu a uzemněný kolektor.



Obr. 1 – Princip stejnosměrného elektrického zvlákňování - DC elektrospinningu. Obrázek převzat [22].
 a) Zdroj polymeru s dávkováním, například injekční stříkačka. b) Jehla tvořící trysku. c) Uzemněný kolektor, na který se zachytávají vytvořená vlákna. d) Zdroj stejnosměrného vysokého napětí s kladným napětím přivedeným na zvlákňovací jehlu. e) Prostor vlákňení, polymer je elektrickými silami tažen směrem ke kolektoru, na trysce formuje kužel a poté je během takzvaného bičování dloužen a formován v nanomikrovlákná. f) Snímek typické struktury nanovláken vytvořených pomocí elektrospinningu.

Tato technologie je v současné době intenzivně rozvíjena a každý rok vychází mnoho vědeckých článků popisující další modifikace či materiály vytvořené touto metodou. Hlavními oblastmi využití produktů elektrického zvlákňování jsou tkáňové inženýrství a biomedicína, farmaceutický průmysl, filtrace a separace, elektronika, energetika, automobilový průmysl, textilní průmysl, potravinářský průmysl a stavebnictví. Velmi intenzivně zkoumanou oblastí je právě medicínské využití, tedy tkáňové inženýrství a farmaceutické využití. Hlavní téma výzkumu je zejména vývoj tkáňových nosičů pro regeneraci a poškozených tkání, například matrice pro regeneraci kostních tkání nebo kožní náhrady. Velmi populární tematikou výzkumu je i farmaceutické využití pro řízené dodávání léčiv, například jako implantát s postupným uvolňováním léčivých či bioaktivních látek. Takové použití lze výhodně kombinovat s materiály pro tkáňové inženýrství, kde bude součástí tkáňového nosiče i léčivo nebo látka podporující buněčný růst atd. Dalším odvětvím s velkým potenciálem je filtrace a separace, kdy elektricky vyrobené vrstvy mají díky své unikátní struktuře velký specifický povrch a velkou porozitu. Zejména velký specifický povrch dává těmto materiálům unikátní vlastnosti, protože na relativně malý objem filtru může být velká plocha povrchu aktivního filtračního materiálu. V textilním odvětví jsou takto vyrobené materiály ceněny pro svůj potenciál jako paropropustné membrány nebo antibakteriální materiály. V energetice se využívají tyto materiály do baterií a zmiňuje se také vývoj fotovoltaických panelů s nanovláknennými prvky. Ve stavebnictví se uvádí použití u izolačních materiálů, požárně bezpečnostních vrstev a u kompozitních konstrukčních materiálů. V potravinářství se uvádějí nanovláknenné antimikrobiální obaly pro skladování potravin.

Při klasické technologii využití elektrospinningu vznikají ploché vláknenné produkty. Tyto produkty jsou většinou o tloušťce v řádech stovek mikrometrů, vrstva ze zařízení Nanospider [23] mívá obvykle okolo 0,25 mm tloušťku. Jedná se tedy o relativně plochý produkt, jež je označován jako 2D nebo planární. Ploché vláknenné vrstvy jsou dobře využitelné například pro filtrace a jako polopropustné membrány, separátory a v medicíně třeba jako kryty ran. Pro použití v tkáňovém inženýrství, kde jsou vysoká porozita a specifický měrný povrch klíčové, je plochá struktura materiálu nevýhodou. Pro užití materiálu jako tkáňového nosiče

je 2D struktura limitující i pro nahrazování tkání, jež nejsou ploché. Zatímco planární porézní struktura umožňuje snadnější lákovou výměnu buněk, ale s malými póry neumožňuje buňkám migraci dovnitř materiálu. V oblasti regenerativní medicíny je žádoucí vytvořit 3D objemnou strukturu s vysokou porozitou a velikostí póru umožňující proliferaci a migraci buněk v objemu materiálu. Současně musí polymerní materiál i výrobní proces zajišťovat vytvoření produktu jež není cytotoxický. Naopak je vhodné, aby byl vyrobený produkt pro buňky stimulující. Vlákenná struktura elektrospinningových produktů do značné míry připomíná fibrilární strukturu ECM. Další funkcionalizaci materiálů, například modifikací řízeného uspořádání a orientace, je možné více přizpůsobit strukturu konkrétní fibrilární ECM, jako je například hladká svalová tkáň nebo nervové tkáně.

Přístupů k výrobě materiálů pro tkáňové inženýrství a zejména objemných 3D materiálů je mnoho, někdy se jedná o kombinaci více metod nebo jsou do procesu navázány další kroky s metodami, které výsledné materiály modifikují. Následovat bude souhrn popisující aktuálně perspektivní metody výroby materiálů, použité polymerní materiály a základní parametry vyrobených materiálů. Přístupy k výrobě 3D materiálů se dají rozdělit na přímé metody a nepřímé metody s post procesní úpravou. Přímé metody jsou v podstatě jednoduché metody, které ideálně v jednom kroku, vždy však v jednom procesu, vyrobí výsledný materiál. Nepřímé metody jsou více stupňové metody kombinující více procesů, kdy po vyrobení materiálu, dochází k dalším úpravám, jsou časově a technologicky náročnější. Materiály jsou používány jak syntetické, tak přírodní biopolymery. Přírodní polymerní materiály jsou vhodné, protože usnadňují interakci materiálu a buněk a při aplikaci in-vivo snižují riziko odmítnutí implantátu. Tyto materiály jsou například chitosan či kolagen. Oproti tomu materiály syntetické zase umožňují přesné sledování chemického složení, čistotu a přesně definovaný polymerační stupeň. Syntetické materiály využívané pro tkáňové inženýrství jsou například polyvinylalkohol (PVA), Poly(L-lactid) PLLA, kyselina polyglykolová (PGA), Polykaprolaton (PCL).

Rešeršní přehled o současných metodách výroby materiálů pro tkáňové inženýrství je rozdělen na suché metody a metody s kapalným kolektorem. Přehled je zároveň zaměřen na metody, jež jsou uváděny jako schopné produkovat jiné než ploché materiály, tedy například i cévní tkáňové nosiče. U těchto materiálů se nejedná vyloženě o objemný materiál, ale jeho struktura je 3D prostorová. Přehled má za úkol zmapovat polymerní materiály a metody tak, aby výzkum v této práci neduplikoval jiné výzkumy, a zároveň, aby navazoval, případně se inspiroval, ve své snaze o vědecký přínos v oboru tvorby materiálů pro tkáňové inženýrství. V závěru je část věnující se nanotopografické alteraci neboli ovlivňování povrchu, případně vnitřní struktury materiálu vláken. Součástí je shrnutí hlavních parametrů procesu elektrického zvlákňování a přehled materiálů a typů kapalných kolektorů, které lze použít v procesu elektrického zvlákňování do kapaliny.

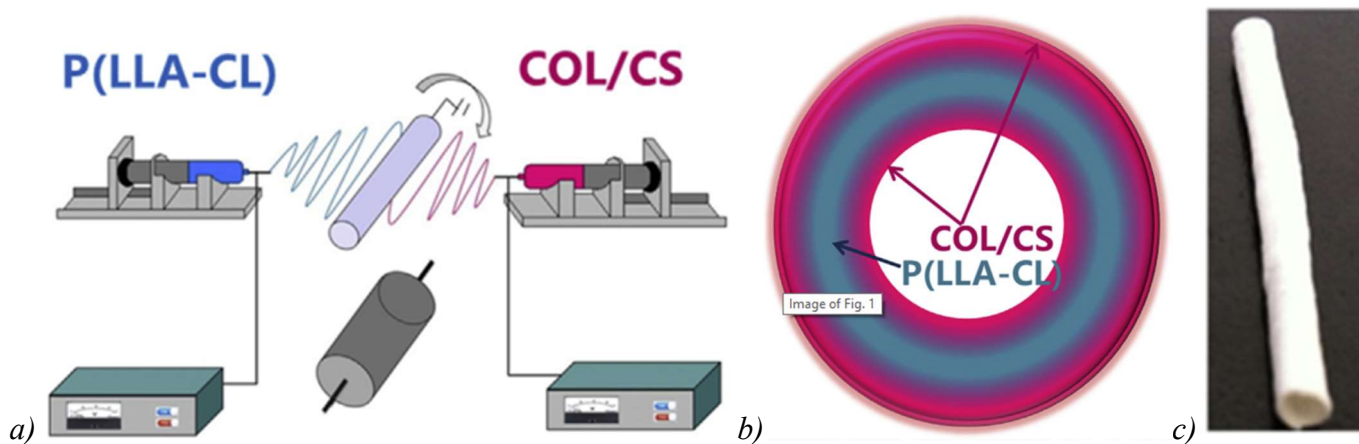
2.1 Vytváření materiálů pro tkáňové inženýrství pomocí suchých technologií

Metod na výrobu různých tkáňových nosičů je mnoho, různorodost tkání, spolu s různými modifikacemi elektrického zvlákňování do kapaliny a různými metodami postprocesování vyrobených materiálů přináší velké množství možností. Tato část je zaměřena na metody, jež nevyužívají kapalnou kolektor, ale přesto produkují 3D materiály, které jsou pro obor tkáňového inženýrství perspektivní. Důvodem je získání přehledu o aktuálních metodách, způsobech testování a používaných vstupních polymerních materiálech včetně odkazů na zdroje. V principu lze říci, že i suché metody dokáží produkovat 3D objemné vlákenné struktury, a lze suchou metodou vyrobit například cévní 3D tkáňový nosič pro cévní náhradu.

2.1.1 Vrstvení materiálu pomocí elektrospinningu

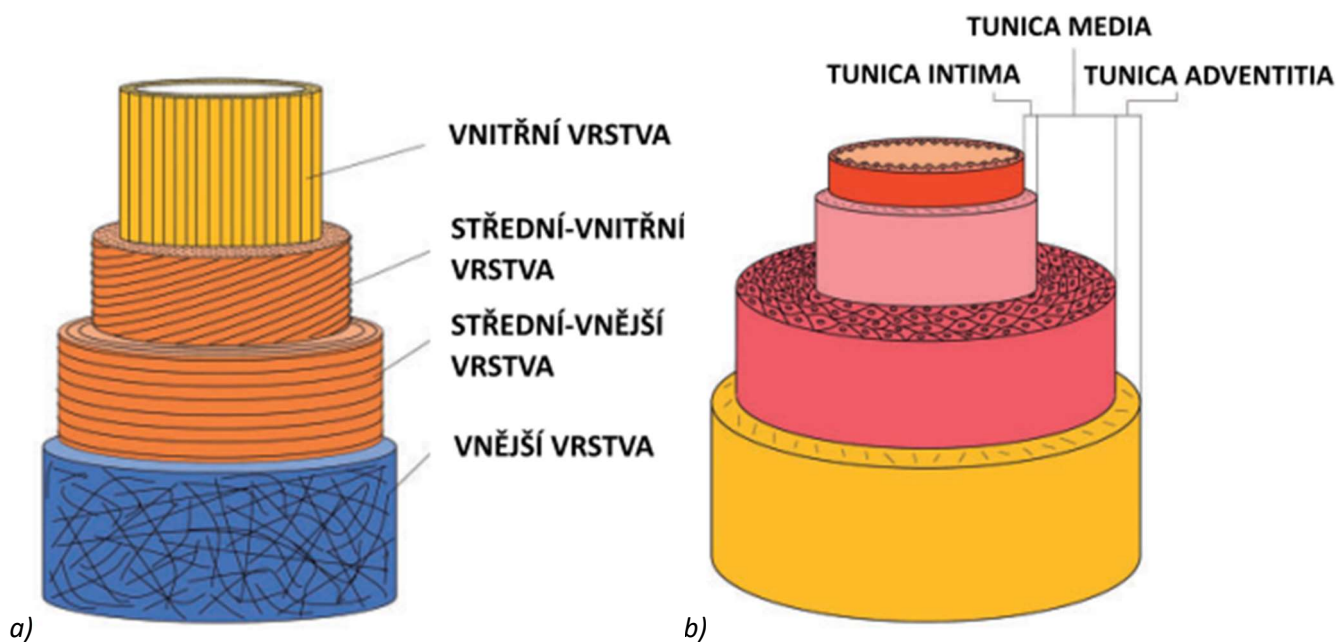
První metodou je multi-vrstvený elektrospinning, kdy se při výrobě tkáňových nosičů postupně nanáší vrstvy materiálů. Vzniká takzvaný sendvič, kdy jsou jednotlivé vrstvy produkovány na sebe. Toto umožňuje vytvoření vrstvy, která napodobuje souvrství některých tkání [24]. Princip je zobrazen na obrázku (*Obr. 2*).

Na rotující kolektor je nejprve zvlákněn blend colagen/chitosan (COL/CS) tvořící první vnitřní vrstvu. V druhém kroku je zvlákněn poly(lactid-co-caprolacton) (P(LLA-CL)), který tvoří střední vrstvu, která je mechanickou oporou pro vrstvy biopolymeru. Naposledy je zvlákněn opět COL/CS, který vytvoří poslední vnější vrstvu. Blend biopolymeru COL/CS zajišťuje větší biokompatibilitu a zlepšuje interakci s buňkami. Tyto vícevrstvé nosiče vykazují dobré podpínky pro růst endoteliálních prasečích buněk. Podobným způsobem je popisována i výroba jiných obdobných produktů. Kombinace gel/PCL/gel/PCL/gel byla zkoumána opět jako tkáňový nosič [25]. Kolagenový gel byl vyroben z práškového produktu pocházejícího z vepřové kůže.



Obr. 2 – Znárodnění principu vrstvení materiálu na rotující kolektor. a) Schématické zobrazení výroby vrstveného cévního scaffoldu – tkáňového nosiče ze dvou polymerních roztoků, postupně se vytvoří vrstvy COL/CS, P(LLA-CL), COL/CS. b) Průřez vytvořeným vaskulárním tkáňovým nosičem, c) snímek hotového produktu – vaskulárního tkáňového nosiče [24].

Kombinace syntetického polymeru a biopolymeru zajišťuje dobrou biokompatibilitu a mechanickou pevnost. Ačkoliv v tomto případě uvádějí autoři porozitu 98%, nejedná se o 3D materiál, protože jeho výška není oproti jiným rozměrům zásadní. Materiál je také primárně zamýšlen jako kryt ran a nosič pro kožní tkáň. Toto vrstvené řešení slibuje větší podobnost s některými tkáněmi, které jsou také samy o sobě vrstvené a skládají se z několika odlišných vrstev. Různé vrstvy tkání mají různé složení, morfologii ECM, ale i jiné funkce. Zkoumány jsou tedy i vrstvené struktury s odlišnou morfologií vláken, kdy jsou v různých vrstvách tkáňového nosiče materiály s jinou orientací vláken, které umožní vznik vrstvených tkání. Takovýmto řešením se také zlepšily mechanické vlastnosti tkáňového nosiče [26]. Prakticky byly tímto způsobem testovány tkáňové nosiče pro léčení poruch lidských koronárních tepen. Pro tento experiment byla vyvinuta kombinace materiálů termoplastického polyuretanu (TPU)/PCL/polyethylenglykolu (PGL).



Obr. 3 – Porovnání vrstev tkáňového nosiče a vrstev tepny. a) Ukázka orientace vlákněných vrstev zvlákněných na válec, tyto vrstvy mají poskytnout lepší mechanické vlastnosti a více přiblížit morfologickou strukturu tkáňového nosiče pro růst buněk tak, aby tato struktura věrněji napodobovala původní tkáň, b) Popis vrstev tepny ukazující různé typy tkání, ze kterých se stěna tepny složena [26].

Experimenty s tvorbou vícevrstevných tkáňových nosičů jsou relativně časté, přístup je velmi podobný [25, 27]. Motivem použití této metody je zvýšení biokompatibility za současného zlepšení mechanických vlastností a ovlivnění morfologie v různých vrstvách nosiče. Velká část výzkumu v oblasti tkáňových nosičů směřuje k vaskulárním tkáním a touto metodou se tvoří často tkáňové nosiče válcovitého tvaru se snahou o morfologické napodobení nativní ECM dané tkáně.

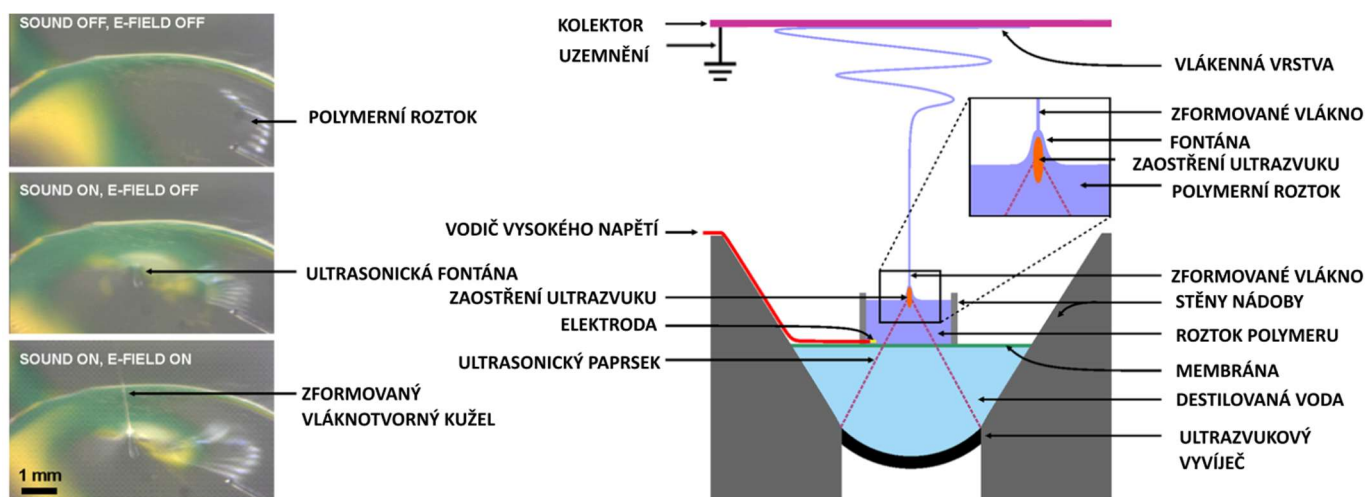
2.1.2 Multimateriálová výroba s procesem post-procesním odstraněním jedné složky

Druhým způsobem výroby objemných materiálů je metoda, kdy se při tvorbě materiálu používají další technické materiály, jež jsou posléze odstraněny. Tímto se zvýší porozita a již od procesu výroby jsou materiály objemnější. Při hledání vhodných tkáňových nosičů je kladen důraz na velkou porozitu a velikost pórů, což tato metoda poskytuje. V odborné literatuře se metoda anglicky označuje jako „Sacrificial agent electrospinning“ tedy jako „elektrospinning s obětní látkou“ kdy pojem označuje plánované odstranění tohoto pomocného činidla. Toto pomocné činidlo je zvlákněno spolu s hlavním materiálem a následně odstraněno například rozpuštěním. Takovým pomocným materiálem mohou být polymery (například polyethylenoxid (PEO), polyvinylalkohol (PVA), polyvinylpyrrolidon (PVP)) ale i nepolymerní materiály jako je například chlorid sodný (NaCl) či cukr [28]. Rychle rozpustná pomocná látka je z materiálu vymyta, zatímco základní materiál zůstává a tvoří strukturu tkáňového nosiče. V této struktuře zůstávají prázdná místa, která zvyšují celkovou porozitu. Velikost a tvar póru je ovlivněn pomocnou látkou, ta může být ve formě krystalků, vláken, ale i sférického tvaru. Příkladem použití tohoto principu pro tkáňový nosič je použití kombinace vodorozpustného PEO s blendem PCL nano-hydroxylapatit (nHA) [28]. Oba materiály byly paralelně zvlákněny (co-elektrospinning) a poté byla pomocná látka PEO vymývána po dobu 48 hodin ve vodní lázni za pokojové teploty. V tomto experimentu bylo prokázáno, že lze oba materiály mísit až do poměru pomocné látky 40% a tím měnit porozitu tkáňového nosiče. Podobným způsobem lze využít PEO pro výrobu dutých nano trubic, kdy se nanovláknena PEO pokryjí silikonoxidem (SiO), následně se ve vodní lázni PEO vymyje [29]. Takto vzniknou dutá vlákna s velkým specifickým povrchem. Další práce popisuje zvýšení porozity materiálů vyrobených z biologicky ověřených polymerů (PCL, PGA,

PLGA) za elektro sprejování pomocné látky PEO [30]. Po vymytí vznikne materiál s výrazně zvýšenou porozitou, který vykazuje vysokou úroveň buněčné migrace do prostoru tkáňového nosiče.

2.1.3 Zvlákňování za pomoci ultrazvuku

Třetím způsobem výroby materiálů se zvýšenou porozitou je ultrazvukem vybuzený elektrospinning. Jedná se o variantu bez-jehlového elektrického zvlákňování, kdy je polymer umístěn v nádobě s volnou hladinou. Tato nádoba se umístí doprostřed ultrasonického generátoru s další kapalinou, která je přenosovým médiem pro ultrazvuk. Po zapnutí ultrazvukového generátoru se na hladině polymeru začnou tvořit vlny, které uprostřed nádoby získávají maximální výchylku. Tuto nejvyšší část vlny autoři nazývají ultrazvukovou fontánou (Obr. 4). Při zapnutí zdroje vysokého napětí je právě nejvyšší vlna – fontána – zdrojem Taylorova kuželu a dojde k zahájení zvlákňování. Tento princip [31] je označován jako High-intensity focused ultrasound (HIFU). Tato metoda je v principu bezjehlová. Jako její velká výhoda je uváděna právě bezjehlovost, přičemž se eliminují problémy s ucpáváním nebo zasycháním jehly. Dále je uváděno, že změnou parametrů procesu (časově průměrný akustický výkon, frekvence, délka pulsů, perioda pulsů) lze ovlivnit průměr tvořených vláken v rozmezí 50-500 nm. Při tomto procesu je ultrazvukem urychleno odpařování rozpouštědla a formování vláken je dle autorů rychlejší a zformovaná vlákna neobsahují takové množství rozpouštědla jako při klasickém procesu. Předpokladem u této metody je, že by měla umožnit tvorbu materiálů s gradovanými parametry průměru vláken, a tedy i s měrným specifickým povrchem. Při výrobě takovýchto materiálů lze v průběhu výroby měnit parametry vláken a tím vytvořit obdobu vrstveného materiálu.



Obr. 4 – Fotografie tvorby vlny „fontány“ na hladině polymerního roztoku v ultrasonické lázni. Vpravo je popis principu metody ultrazvukově vybuzeného elektrospinningu [31].

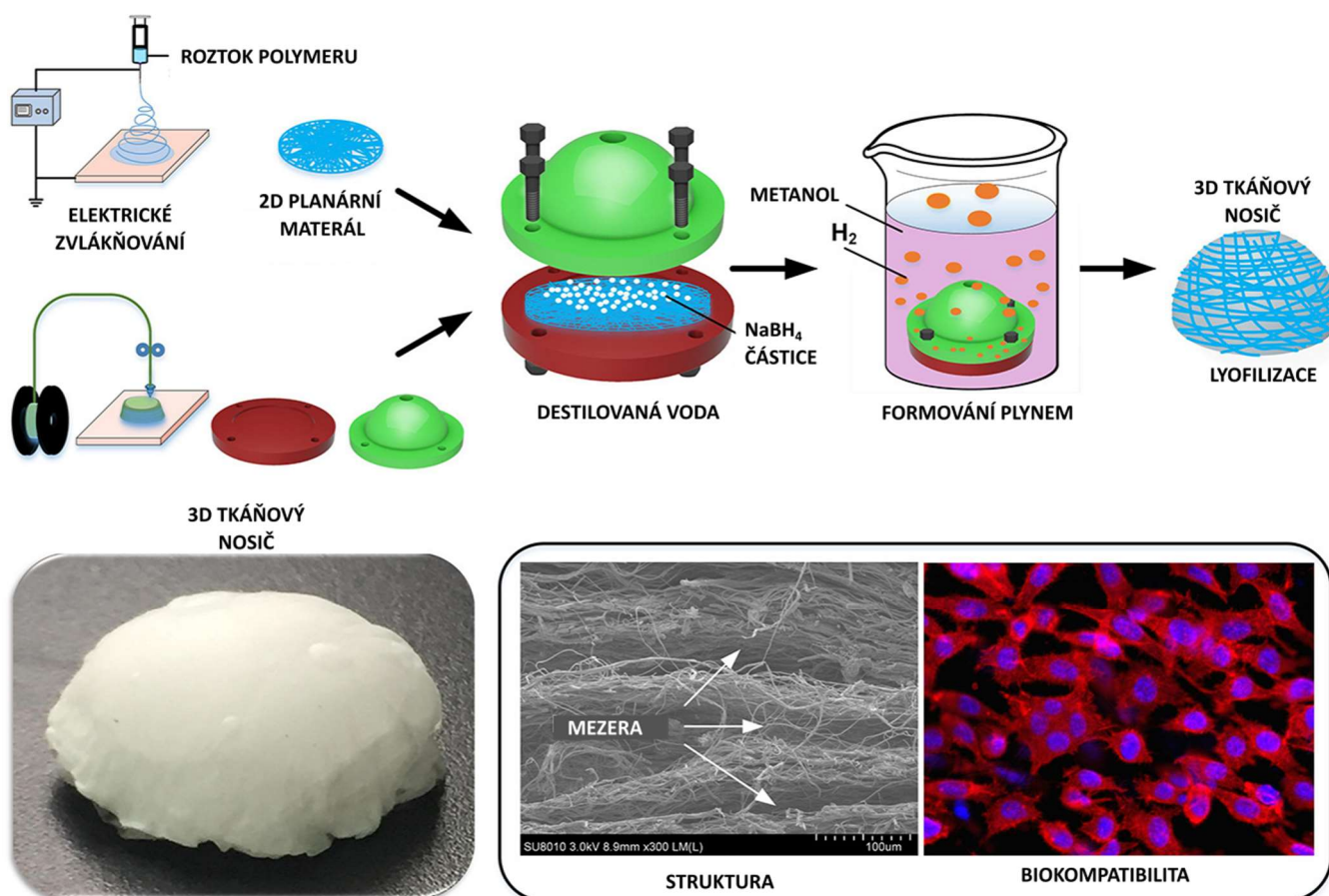
Výše zmíněné metody jsou schopny vytvořit materiály se zvýšenou porozitou a interkonektivitou pórů nebo materiál s různým složením vrstev. Těmito metodami je možné například vytvořit cylindrickou cévní náhradu nebo kryt poranění, tyto materiály však nejsou reálně schopny vytvořit objemný 3D tkáňový nosič, který by byl schopen vyplnit větší prostor, například při potřebě nahrazení chybějící části kosti nebo části jiného orgánu. Vytvoření takových objemných materiálů je stále výzvou pro jiné metody.

2.1.4 Metody výroby 3D materiálu na principu plynové expanze

Další metody jsou za využití post-procesingu, kdy je možné vyrobit vysoce objemné 3D struktury za využití následných procesních stupňů. Cílem těchto metod je poskytnout nejenom zvýšenou porozitu a propojenost pórů, ale i velký objem vyrobeného materiálu tak, aby byl schopen vyplnit prostory v tkáních a plně nahradit chybějící biologickou hmotu, například nahradit objem kostní tkáně po operaci či úrazu. Zde je velmi důležitá porozita a propojení pórů, protože při formování nové tkáně musí buňky proliferovat a migrovat

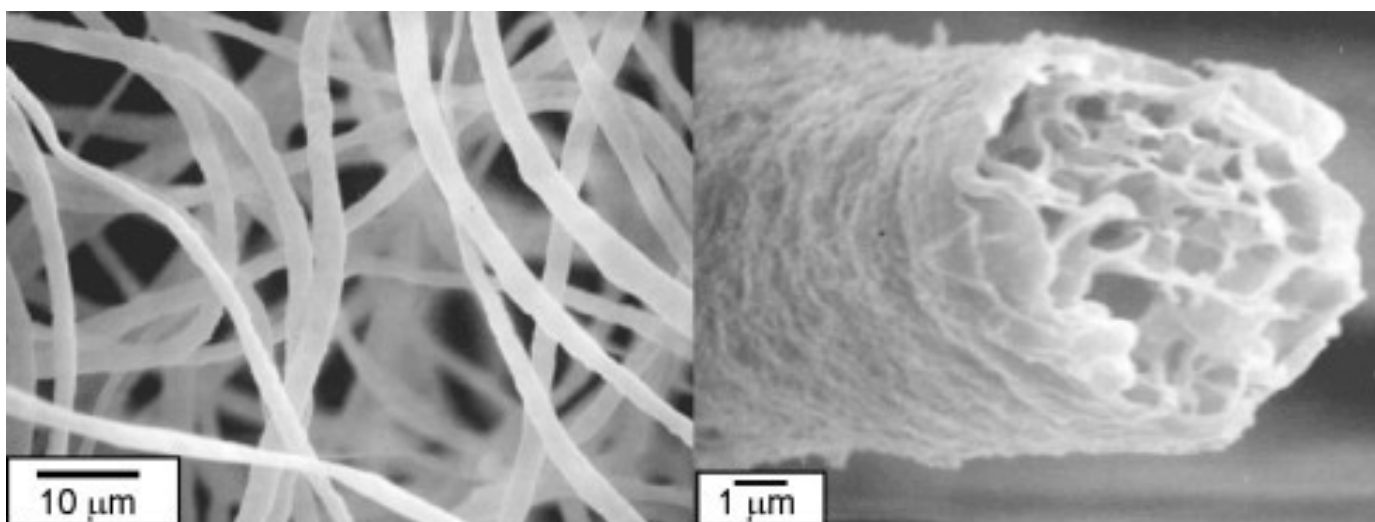
do prostoru tkáňového nosiče a postupně ho celý vyplnit a zformovat zde novou tkáň. Vlákněná struktura se díky propojenosti pórů a podobnosti s ECM ukazuje jako vhodnou pro biologické použití a existují metody, které jinak planární struktury dostatečně rozvolní a vytvoří 3D prostředí se zvětšenými póry.

První metodou výroby objemných vlákněných struktur je procesing planární elektrospinningové vrstvy pomocí formování plynem – gas forming. Tento princip je založen na dodatečné úpravě planární vrstvy, vyrobené například zvlákněním na pevný kolektor. Tato metoda využívá princip formování mikrobublin plynu v objemu materiálu. Tyto mikrobublinky vznikají mezi vlákny a tím mění vnitřní uspořádání materiálu, působením sil mezi vlákny v objemu materiálu se zvyšuje jeho objem a porozita. Jsou dva principy tvorby plynových mikrobublinek. První je chemická metoda, kdy se tyto mikrobublinky tvoří chemickou reakcí a vytvářejí se přímo ve vlákněném materiálu. Materiál tím expanduje a zvyšují jeho objem a porozitu [11, 32]. Při použití této metody lze materiál formovat do potřebného tvaru pomocí mikrobublin, přímo v připravené formě. Specifickou formu, která bude pro potřeby konkrétní tkáňe a aplikace, je možné relativně jednoduše vyrobit pomocí aditivního 3D tisku. Materiál lze tedy formovat přímo do konkrétního požadovaného tvaru [33, 34]. Tímto způsobem lze vyrobit tkáňový nosič konkrétního tvaru a rozměrů dle individuálního požadavku (Obr. 5). Tato metoda tvorby 3D materiálů je unikátní v možnosti formovat tkáňový nosič do konkrétních tvarů. Výsledná struktura však není homogenní a vznikají prostory s většími póry nebo dochází k tvorbě více a méně porézních vrstev, viz obrázek (Obr. 5 - Struktura). Tento jev však nemusí pro tkáňové nosiče představovat nevýhodu.

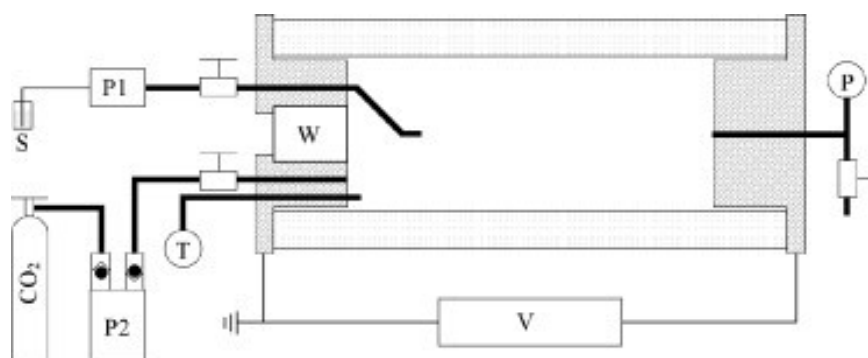


Obr. 5 – Schématické znázornění postupu tvorby tkáňového nosiče do požadovaného tvaru. Základem je vytvoření 3D formy pomocí 3D tisku. 2D tkáňový nosič je vložen do vytvořené formy a pomocí mikrobublin formovaných v materiálu je zvětšován jeho objem až do požadovaného tvaru. Tvar je dán vnitřním tvarem formy. Obrázek převzat [34].

Druhý princip je fyzikální. V tomto případě se materiál umístí pod tlakem do nádoby s plynem, například oxidem uhličitým, kde stlačený zkapalněný plyn nasytí prostředí tkáňového nosiče, ale i samotný materiál. Při změně tlaku dojde k expanzi plynu a ten nejenom že vytváří póry uvnitř vláken, ale i rozšiřuje samotný materiál a vytváří 3D strukturu [35]. Právě tento způsob sycení stlačeným plynem do hmoty vlákna, ale i do prostoru mezy vlákna, umožňuje výrobou 3D vlákenné struktury za současného zvyšování porozity vlákna ve hmotě. Toto je způsob, jak výrazně zvýšit nejenom specifický měrný povrch, ale i zvýšení porozity povrchu vlákna. Porozita vláken, případně jejich povrchu, se ukazuje jako výhodná vlastnost v tkáňovém inženýrství a to z důvodu lepší buněčné adheze a následné proliferace a migrace. Existuje i varianta, kdy je elektrospinning prováděn přímo v tlakové komoře s oxidem uhličitým, čímž se efekt porézních vláken zesílí [36]. Tato varianta je technologicky náročná a je třeba speciální vysokotlaké zvláknovací komory. V této komoře dochází k tvorbě vlákenných materiálů, které mohou být dle parametrů procesu duté, s vnitřními póry nebo také s modifikovaným strukturovaným povrchem (Obr. 6). Princip vysokotlakého elektrospinningového zařízení je zobrazen na obrázku (Obr. 7), toto zařízení je sestrojeno pro tlak do 100 barů.



Obr. 6 – Obrázek mikroporézních vláken vytvořených ve vysokotlakém elektrospinningovém zařízení v CO_2 atmosféře. Na obrázku vpravo je vidět porézní struktura a vlevo je vidět modifikovaný strukturovaný povrch. Obrázek převzat [36].



Obr. 7 – Schéma zařízení pro vysokotlaké elektrospinningové zvláknování v CO_2 atmosféře. Písmeno V značí na obrázku zdroj vysokého napětí, W značí safírové sklo, P značí tlakoměry, T je teplotní čidlo, S je zdroj polymerního materiálu. Obrázek převzat [36].

2.1.5 Metody výroby 3D materiálu na principu ultrasonického rozvolnění

Druhou metodou výroby objemných vlákenných struktur pomocí post-procesingu elektrospinningových vrstev je formování ultrazvukem. Tato metoda mechanicky odděluje vlákna v planárním vlákenném materiálu tím, že na materiál působí ultrazvukem, který je definován výškou amplitudy, intenzitou a časem. Tato metoda ultrasonifikace je velmi účinná pro rovnoměrné zvýšení velikosti pórů a tedy i porozity u vlákenných materiálů vyrobených elektrospinningem a tyto 3D objemné materiály se ukazují jako vhodné pro tkáňové inženýrství [37]. Experimenty s planárním vzorkem PLLA vyrobeným klasickou elektrospinningovou metodou ukazují, že materiál je po ultrasonifikaci objemnější (Obr. 8b), rozdíly ve velikosti pórů jsou patrné ze snímků SEM (Obr. 8c). Experimenty s buňkami in-vitro potvrdily, že zvýšením porozity touto metodou buňkám umožní migrovat do objemu materiálu a proliferovat tedy v celém objemu materiálu. Osídlení celého materiálu tkáňového nosiče je stěžejní vlastností, právě zvýšení velikosti pórů materiálu sonifikací se ukázalo jako funkční řešení. Tvar a tloušťka materiálu je však u této metody stále limitující. Tloušťka vrstvy vychází z tloušťky primární planární vrstvy a limitu stupně rozvolnění. Vzhledem k tomu, že standardní proces tvorby planárních vrstev neprodukuje velké tloušťky (v ose z) nelze tuto danou tloušťku rozvolnit ultrasonifikací na rozměry srovnatelné s šířkou a délkou materiálu ($osa \times a \times y$). Jako příklad je uváděno, že původní materiál měl 515 μm a po procesu ultrasonifikace byla jeho tloušťka 1171 μm . Proces ultrasonifikace probíhá vždy v kapalině, což je nosné médium ultrazvuku. V případě použití PLLA byl v experimentu použit alginát sodný, který je pro PLLA zároveň síťovacím činidlem a zajistí rozměrovou stabilitu vytvořeného materiálu. Pro zlepšení buněčné adheze byl do lázně přidán RGD (arginin-glycin-asparťová kyselina), což je součást peptidů a proteinů. RGD vytvoří v materiálu vazná místa pro usnadnění přichycení buněk při proliferaci a migraci.

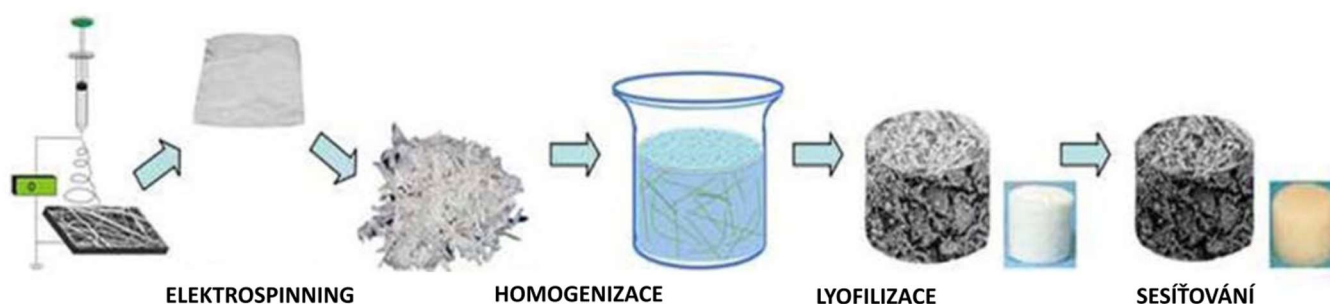


Obr. 8 – Série obrázků, jež popisují metodu výroby materiálů pomocí ultrasonifikace. a) znázornění principu ultrasonifikace, zvýšení porozity a objemu vlákenné struktury pomocí působení ultrazvuku na vlákenný materiál. b) Fotografie planárního vzorku před působením ultrazvuku a po působení, zde je patrné zvýšení objemu vzorku. c) SEM snímky struktury před a po působení ultrazvuku, ve spodní části je boční pohled na výšku materiálu. d) Grafické znázornění vlivu působení času ultrasonifikace na zvýšení výsledné porozity. e) Grafické znázornění vlivu délky působení ultrasonifikace na porozitu materiálu. f) Snímek z fluorescenčního mikroskopu, ukazující, že neporézní planární materiál před ultrasonifikací není vhodný pro migraci buněk do materiálu (modrá barva), ty zůstávají na povrchu, druhý snímek materiálu po působení ultrazvuku ukazuje migrované buňky v objemu materiálu. Obrázek převzat [38].

Další autoři uvádějí, že sonifikací se zvýší velikost póru až 1,9 násobně [38]. Ultrasonifikace se obecně považuje za snadný post proces, při němž dochází k dosažení zlepšení vlastností materiálu pro tkáňové inženýrství, tedy zejména 3D objemnost a velikost pórů. Procesu ultrasonifikace, jako dalšího procesního kroku, je také často využíváno k další modifikaci nebo utilizaci [39, 40]. Velkou výhodou tohoto post procesu pomocí ultrazvuku je jeho relativní jednoduchost a snadná dostupnost technologie ultrazvuku. Navíc jako post proces jde kombinovat s různými metodami výroby vlákněných vrstev, ale i jinými dodatečnými procesy úpravy.

2.1.6 Metody výroby 3D materiálu pomocí krátko-vlákněných matic

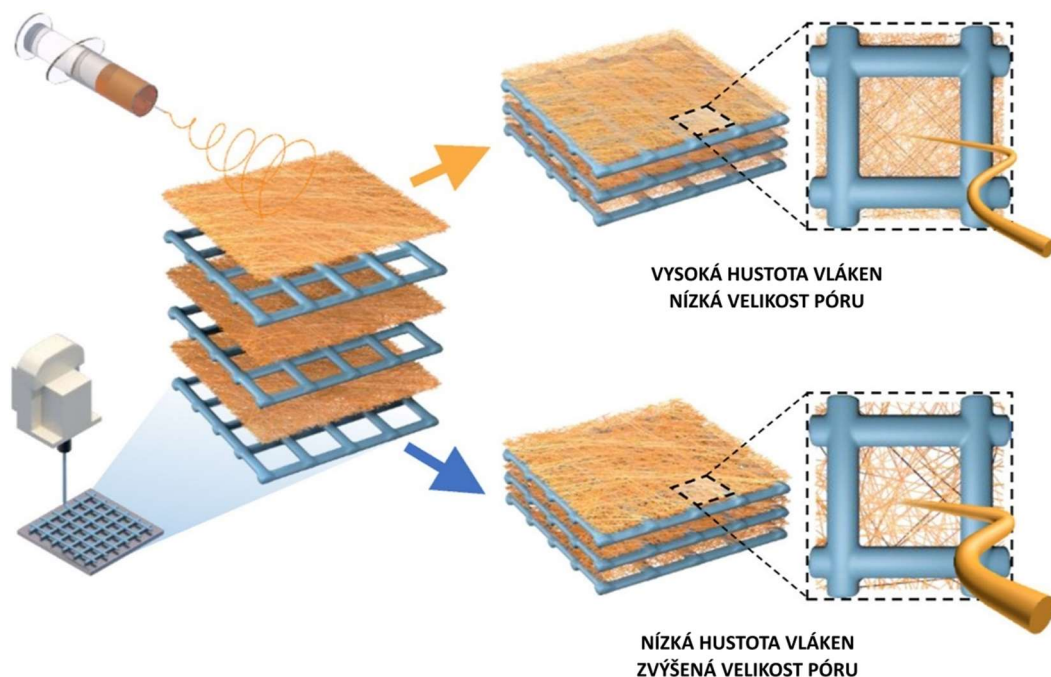
Třetí metoda je založena na post procesním zpracování elektrospinningových vrstev na krátko-vlákněný materiál a jeho další formování do vhodného vlákněného útvaru s požadovanými vlastnostmi pro tkáňový nosič (Wlectrospinning with post-procesing short fiber assembly). Princip metody je znázorněn na obrázku (Obr. 9). Příkladem postupu tvorby takového materiálu je vytvoření vlákněné vrstvy pomocí elektrospinningu, její následné nasekání na malé kousky. Druhým krokem je zajištění homogenní disperze vláken pomocí ultrazvuku. Posledním krokem je příprava materiálu pomocí freeze-drying technologie a sesítování [41]. Je uváděno, že způsob sesítování je velmi důležitý a značně ovlivňuje výsledné mechanické a biologické vlastnosti vytvořeného tkáňového nosiče. Příkladem jsou sekaná vlákna PLLA nebo PLLA/PLA, která jsou po lyofilizaci a ultrazvukové dispergaci termicky sesítována. Takto vytvořený tkáňový nosič vykazoval dobré mechanické vlastnosti, jako například tvarovou stálost, stlačitelnost. Testy ukázaly také dobrou biokompatibilitu, buňky v materiálu proliferovaly a migrovaly. Porozita tohoto materiálu je uváděna 99 % [42]. Při chemickém sesítování je zpravidla třeba vymývat zbytky chemického činidla pro snížení cytotoxicity [41]. I v této metodě výroby 3D objemných materiálů se dá využít kombinace biopolymerů a syntetických polymerů pro zlepšení biokompatibility výsledného tkáňového nosiče. Kombinace želatina/PLLA, která byla termicky sesítována, vykazovala dobré vlastnosti při využití jako tkáňového nosiče pro chrupavkové tkáně [43]. Pro zvýšení biokompatibility byl tkáňový nosič během procesu modifikován kyselinou hyaluronovou. Během fáze výroby materiálů touto metodou lze dále materiály účelově modifikovat. Tuto metodu lze aplikovat i na biopolymery, bylo testováno aplikování na decelurizovaný chrupavkový extracelulární matrix (DCM). Výhodou DCM je obsah mnoha základních látek z ECM, včetně těch bioaktivních. Takto vyrobený tkáňový nosič poskytuje buňkám velmi podobné prostředí jako je originální ECM chrupavky a buňky v nosiči vykazují dobrou chondrifikaci a chrupavkovou regeneraci [44, 45]. Touto metodou vytvořené materiály z PLLA/nHA/želatina nebo SiO₂-CaO (bioaktivní sklo) vykazovaly dobré vlastnosti při uplatnění jako kostní náhrada [46, 47].



Obr. 9 – Princip metody krátko-vlákněných matic (Electrospinning with post-procesing short fiber assembly), kdy je nanovlákněný materiál vytvořen klasickým elektrospinningem a nasekán na krátké vlákněné útvary. Ultrazvukem je tato nasekaná směs homogenizována a pomocí lyofilizace zformována do požadovaného tvaru. Posledním krokem metody je sesítování vlákněného útvaru pro stabilizaci a dosažení požadovaných mechanických vlastností. Obrázek převzat [43].

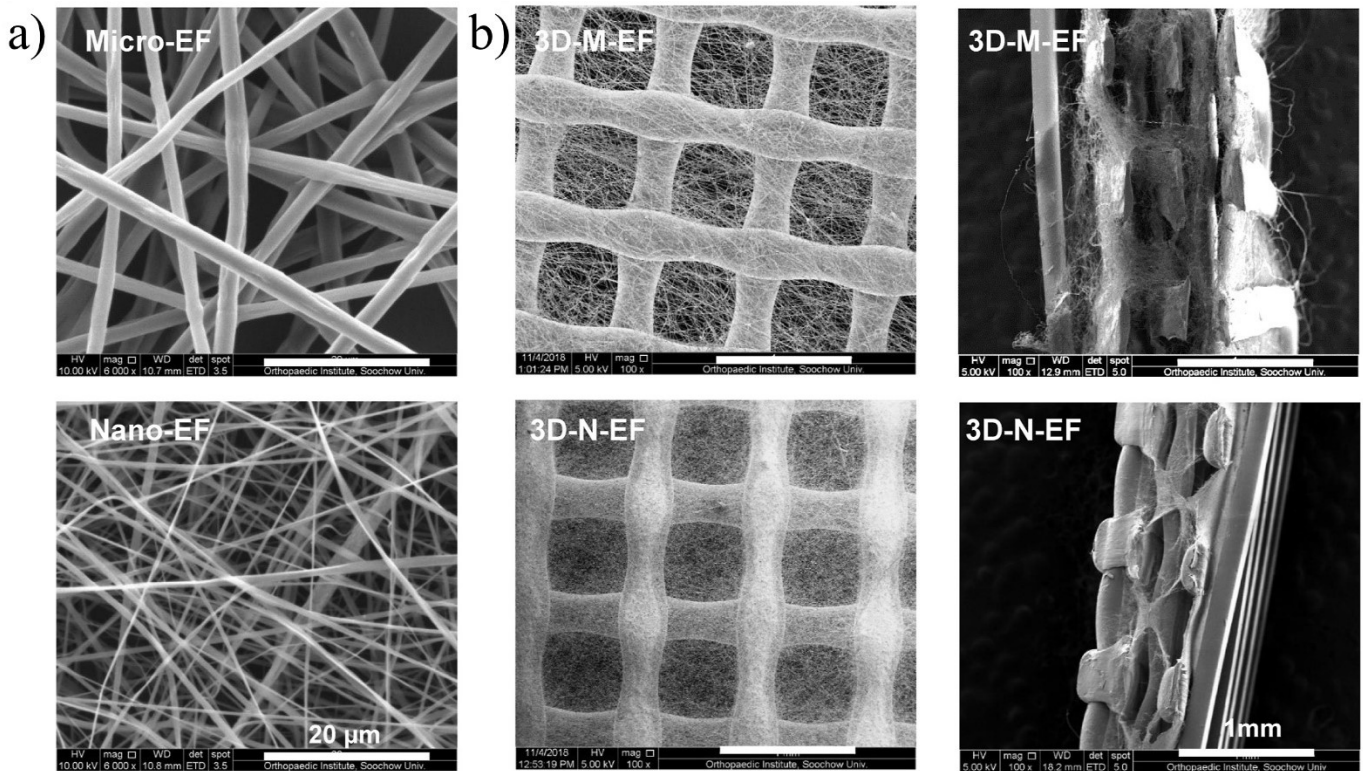
2.1.7 Metody výroby 3D materiálu na principu aditivního tisku

Čtvrtou metodou je aditivní tisk tkáňového nosiče. Zde se může jednat o přímý tisk materiálu s následnou funkční úpravou nebo o elektrosponing s post-processingem založeným na aditivním 3D tisku. Velmi rozšířeným způsobem 3D tisku je metoda založená na extruzi polymerního materiálu – Fused Deposition Modeling (FDM) [48]. Jsou i jiné metody 3D tisku, například metoda Inkjet založená na piezoelektrickém vytlačování tekutého materiálu, Stereolitografie (SLA), kdy se tiskne z kapalného monomeru, který je světelným paprskem polymerizován v požadovaných vrstvách, až do vytvoření žádaného tvaru. Selektivní Laserová Spékací metoda (SLS), při které laser spéká navrstvený prášek. Metody 3D tisku jsou v současné době intenzivně rozvíjeny a experimentuje se i s jejich využitím v biomedicíně [49]. Aditivní tisk extruzivním metodou je masivně rozšířená metoda výroby polymerních dílů v technické praxi, ale je i obecně velmi populární metodou na domácí takzvané hobby použití. Kvalita takovýchto 3D tiskáren a materiálů pro tisk stoupá, zatímco je tato technologie cenově mnohem více dostupná velkým masám lidí. Aditivní způsob výroby nachází své uplatnění snad ve všech odvětvích medicíny, ale i v tkáňovém inženýrství. Aditivní tisk spočívá v klasické extruzi polymeru jednou malou tryskou (zpravidla 0,4 mm, ale jsou běžně dostupné i 0,1-1mm). Extruze je prováděna z filamentu, což je polymerní struna, která zajišťuje kontinuální přísun materiálu. Tryska tiskne do 2D prostoru na osách x a y , po vytištění jedné vrstvy (zpravidla 0,15 či 0,2mm), se posouvá v ose z k tisku další vrstvy. Takto postupně vytváří na sebe přidané polymerní vrstvy, které relativně pomalu a relativně přesně tvoří celý výrobek. Je to obdobný princip stroje a jeho řízení jako jsou stroje CNC (Computer Numerical Control), tedy obráběcí stroje řízeného počítačem. Velkou devizou tohoto principu výroby je flexibilita produkce. Produkce 3D tisku může být kusová, prototypová či jen experimentální, nicméně často se používá pro produkci sériovou, kde jsou náklady na výrobu jednoho kusu výrobku zpravidla vyšší než například u klasického vstřikování, ale výroba je pro 3D tisk velmi flexibilní a během několika minut lze začít vyrábět modifikovaný, či zcela jiný výrobek bez zásadní a drahé přestavby výrobní linky. Při použití 3D tisku v biomedicíně, na výrobu tkáňových nosičů, je předpoklad, že technologie není jen pro experimentování, ale je možné ji i prakticky nasadit v komerčním měřítku. Tato technologie aditivního tisku také umožňuje extruzi širokého spektra materiálů. Pro metody SLS jsou již k dispozici komerční materiály certifikované pro zdravotnictví. Pro metodu FDM jsou k dispozici také certifikované materiály, včetně materiálů certifikovaných pro styk s potravinami. Metoda FDM má mnoho výhod, je relativně jednoduchá a ekonomická. Vyrobený materiál může být vysoce porézní a vyrobený na míru požadavkům. Mnoho vytištěných struktur vykazuje i dobré biokompatibilní vlastnosti [49, 50]. Důležité je zejména, že morfologie je přesně definována a řízena při výrobě, lze kombinovat více vnitřních struktur. Obecně se však optimální velikost póru uvádí řádově menší než je velikost póru, který technologie 3D tisku běžně produkuje [51], respektive vhodné velikosti pórů se pohybují na spodní hranici současných 3D tiskových možností například metody SLS [52]. Pokud je velikost póru příliš velká, materiál nedosahuje optimálních výsledků. Pakliže jsou buňky v poměru k velikosti póru malé a jejich adheze a migrace není optimální, buňky adherují pouze na povrch vlákna a nemohou být najednou uchyceny na více segmentech (površích) [53]. Praxe ukazuje, že pro správnou buněčnou proliferaci buňky preferují vícerozměrný podklad. 3D tisk má také omezené možnosti ve volbě materiálu, a to zejména u metody 3D tisku SLA. Zajímavým řešením je kombinace 3D tisku a elektricky zvlákněných vrstev. Čímž se odstraní problémy s příliš velkými póry.



Obr. 10 – Znárodnění principu výroby materiálu pomocí kombinace 3D tisku a elektrospinningu. Zde jsou vytvořeny dva materiály s rozdílnou elektrospinningovou vrstvou. 1. materiál s vysokou hustotou nanovláken (High density) a malými póry, 2. materiál byl vytvořen s nižší hustotou mikrovláken a většími póry (Low density). Obrázek převzat [54].

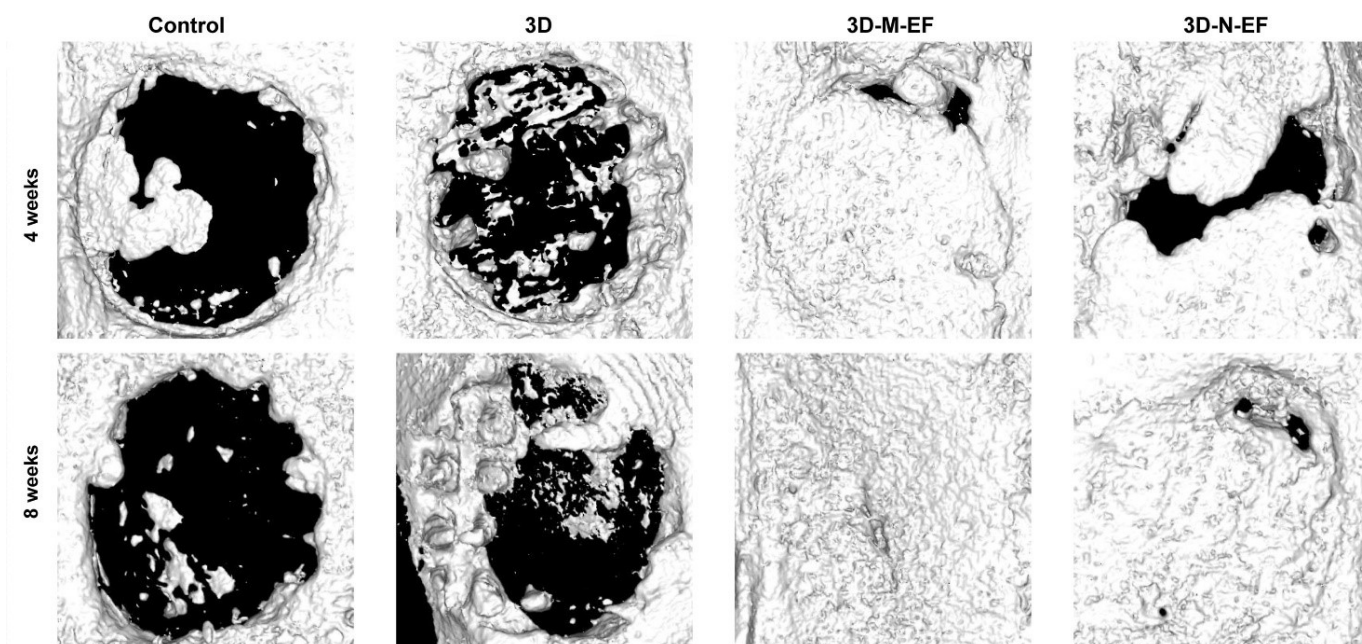
Při kombinaci metody 3D tisku (Obr. 10) a elektrospinningu se zkombinují dvě odlišné morfologické struktury. Jedna poskytuje mechanickou a tvarovou podporu při možnosti přesně definovat tvar a strukturu, druhá zajistí vysokou porozitu s menšími póry vláknenného materiálu, než poskytuje 3D tisk. Princip spočívá v kombinaci vrstev obou technologií, tedy 3D vytištěná vrstva se pokryje vrstvou produkovanou elektrospinningem, přidá se vrstva 3D tisku a pokryje se opět elektrospinningem vytvořenou vrstvou. Tento proces se opakuje až do dosažení požadovaného tvaru a velikosti. Takto byl vytvořen například tkáňový nosič PLLA/želatina [54]. Stejný postup s testováním in-vivo byl zvolen pro materiál s PLLA 3D vytištěnou čtvercovou maticí, na kterou byla elektrospinningem nanesena PCL netkaná nanovláknenná síť. Postup kombinace 3D tisku a elektrospinningu byl opakovaně prováděn pro získání 3D materiálu tkáňového nosiče [55]. Předmětem testování in-vivo byly stejné struktury, lišící se pouze elektrospinningovou vrstvou. První materiál byl s jemnými sub mikronovými vlákny s průměrnou velikostí póru 3.44 μm a průměrnou porozitou 83%. Druhý s materiálem byl s mikronovými vlákny, průměrná velikost póru byla 10.5 μm , porozita 91%. Snímky SEM vytvořených materiálů jsou na obrázku (Obr. 11), v horní řadě je kombinace 3D tisku a mikro vláknenných elektrospinningových struktur, ve spodní řadě je 3D tisk zkombinovaný s nanovláknennou vrstvou, která má menší velikost pórů.



Obr. 11 – Snímky SEM struktury dvou materiálů vytvořených pomocí kombinace 3D tisku a wet elektrospinningu. a) Snímek struktury elektrospinningové vrstvy, nahoře mikrovláknenná struktura s většími póry, dole je nanovláknenná struktura s menšími póry. B) Snímek kombinace 3D tisku a elektrospinningu, 3D-M-EF označuje mikrovláknenný vzorek, 3D-N-EF označuje nanovláknenný vzorek s menšími póry. Napravo je vidět řez materiálem v ose z. Obrázek převzat [54].

Při experimentech se ukázalo, že oba materiály jsou vhodné jako tkáňový nosič pro nahrazení kostní tkáně. Experimenty in-vivo prokázaly, že při použití tkáňových nosičů pro léčbu calvarních defektů (kryší lebeční kosti) materiál umožňuje zacelení defektu a u mikrostrukturní varianty s většími póry došlo po čtyřech týdnech k téměř kompletnímu zacelení a po osmi týdnech k úplnému zacelení defektu (Obr. 12).

Zajímavou kombinací 3D tisku a elektrospinningu je příprava polymerní směsi, která se skládá z kyseliny hyaluronové/PEO a přísadkou nasekané elektrostaticky zvlákněné směsi vláken želatina/PLGA. Tato směs byla následně zpracována do formy 3D tiskárnou zpracovatelné formy a následně vytištěna na 3D tiskárně technologií Inkjet [56]. U této metody autoři popisují, že při testování in-vivo vykazuje tkáňový nosič dobré mechanické vlastnosti a schopnost regenerace poškozené kostní tkáně.

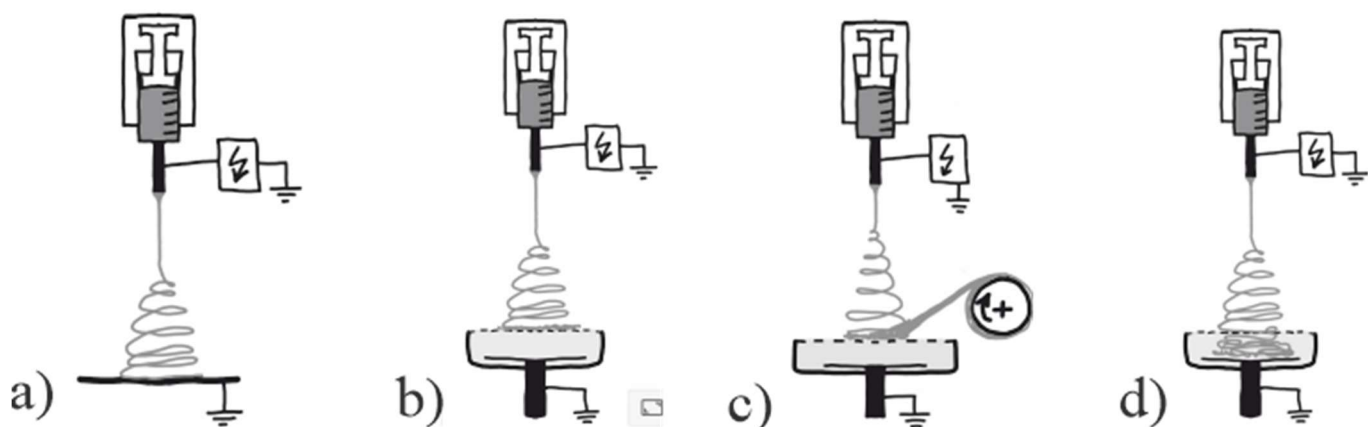


Obr. 12 – Snímky, pořízené pomocí mikro-CT zobrazující oblast implantovaného tkáňového nosiče vyrobeného kombinací 3D tisku a elektrospinningu. Nosič je implantován do oblasti krysí lebeční kosti na zacelení kalvárního defektu. První snímek (Control) je kontrolní vzorek bez tkáňového nosiče, zde je vidět, že defekt se nehojí. Druhý snímek (3D) je defekt s nasazeným tkáňovým nosičem vyrobeným pouze pomocí 3D tisku. Třetí je snímek (3D-M-EF) materiálu s mikrovlákny a většími póry, který ukazuje, že již v 4. týdnu byl defekt téměř zhojen, za 8 týdnů pak byl defekt zhojen kompletně. Poslední snímek (3D-N-EF) ukazuje stejný typ nosiče, ale s nanovláknennou vrstvou a menšími póry. Zde je ve 3. týdnu patrné, že hojení není tak rychlé jako u mikrovláknenné varianty, v 8. týdnu není defekt zcela zhojen. Obrázek převzat [54].

2.2 Metody výroby 3D materiálu na principu zvlákňování do kapaliny

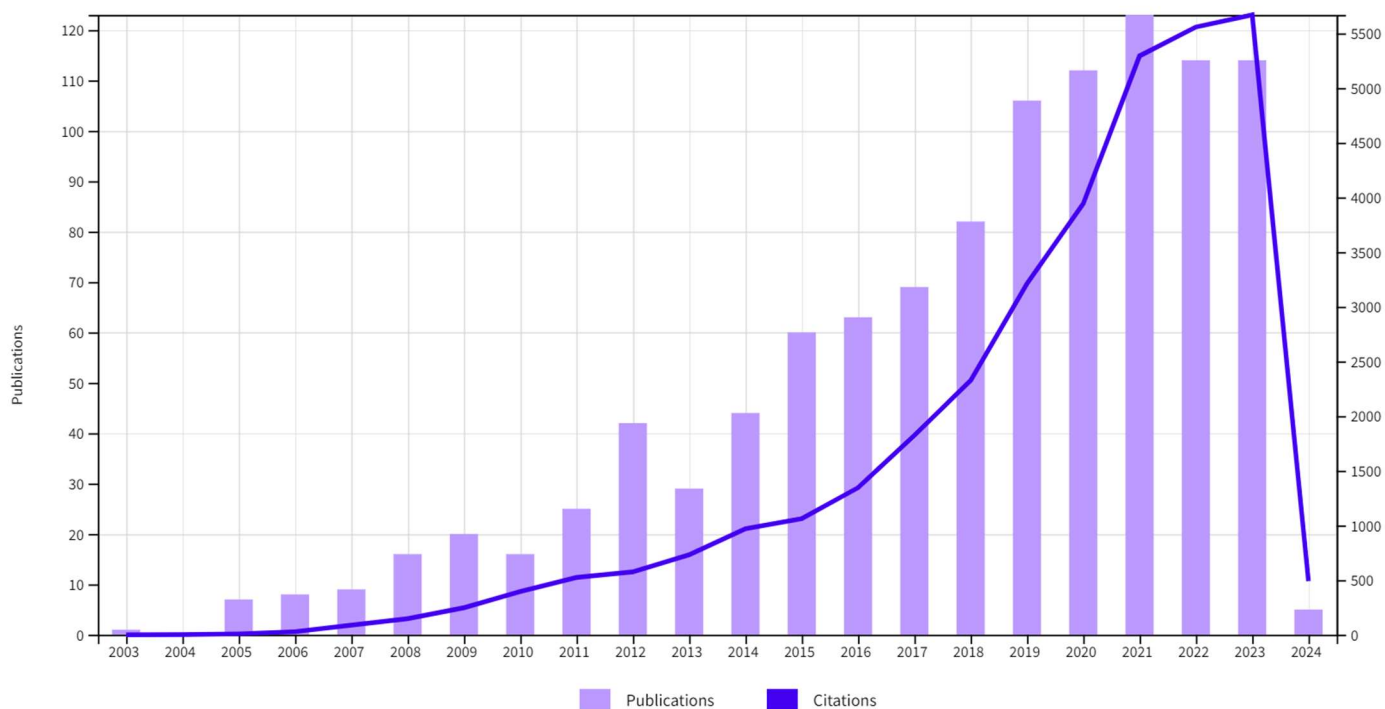
Poslední zmíněnou, a z pohledu této práce, nejdůležitější metodou výroby 3D tkáňových nosičů je **wet elektrospinning**, neboli **elektrické zvlákňování do kapaliny**. Tato metoda umožňuje výrobu, pro elektrospinning klasických, vláknenných struktur, ale s větší porozitou, většími póry a 3D objemnou strukturou [57–65]. Právě tyto tři parametry jsou pro tkáňové nosiče velmi důležité. 3D objemná struktura umožňuje použití nosiče pro nahrazení objemných tkání, což je u jiných metod výroby tkáňových nosičů velká limitace. Velikost pórů a porozita je u těchto materiálů vyšší než u klasickým elektrospinningových materiálů. Tyto parametry, zejména velikost póru, jsou velmi důležitými pro buněčnou migraci a proliferaci. Činitel ovlivňující tvar výsledného materiálu je právě kapalná lázeň, která umožňuje formování vzorku v prostoru kapaliny. Wet elektrospinning také při formování vláken svým principem umožňuje využití principu koagulace, kdy se vlákno v kapalině formuje například rychlým přesunem rozpouštědla do lázně, chladnutím, či jiným působením kapaliny kolektoru. Při Wet elektrospinningu rozlišujeme zvlákňování na hladinu a nebo do objemu kapaliny (Obr. 13).

Zvlákňování na hladinu kapaliny (Obr. 13 b) umožňuje vytvářet vláknennou membránu (planární) nebo při kontinuálním odvodu například lineární vláknenný útvar (Obr. 13 c). Kapalina může v tomto případě sloužit jako kolektor a zároveň médium umožňující kontinuální odvod vytvořeného materiálu [66]. Při zvlákňování do objemu kapaliny lze vytvořit 3D objemný materiál (Obr. 13 d). Proces tvorby spočívá v ukládání vláken na hladinu, kde se okamžitě smáčí a noří do kapaliny. Tento proces je kontinuální, takže nově dopadlá vlákna jsou v kontaktu s ostatními, již smočenými vlákny, a utváří kompaktní celek.



Obr. 13 – Principiální zobrazení různých druhů konfigurace elektrického zvlákňování (elektrospinningu). Zdroj stejnosměrného (DC) vysokého napětí je připojen k jehle kladným pólem a kolektor je naopak uzemněn negativním pólem. Zdroj polymeru je například injekční stříkačka s jehlou jako tryskou. a) Klasický elektrospinning zvlákňující na pevný uzemněný kolektor, takto vznikají ploché (planární) vlákenné struktury. b) Wet elektrospinning, kdy kapalina slouží jako kolektor a vlákna se zachytávají na hladině kapaliny. Tento princip vytváří také planární vzorky. c) Wet elektrospinning, kde je planární vlákenná struktura kontinuálně odváděna a formována do lineárního útvaru. Kontinuální odvod lze provádět i v případě noření do objemu kapaliny. d) Wet varianta, kdy se vlákna noří do objemu kapaliny, kde se formují do objemného 3D materiálu. Obrázek převzat [22].

Významnou publikací popisující proces výroby objemných tkáňových nosičů (scaffoldů) pomocí technologie wet electrospinningu je práce Yokoyamy z roku 2009 [64]. Tato práce poskytuje detailní náhled na proces výroby těchto nosných struktur technologií wet electrospinningu. V této práci je řešen proces tvorby 3D objemné vrstvy do kapaliny (terc-Butilalkohol). Autor zde neřeší další aplikace nebo post-processing, takto vyrobené materiály mohou dosahovat porozity téměř 97%. Vědecké publikace a články na toto téma se v současné době většinou zaměřují na použití těchto objemných materiálů jako tkáňového nosiče a tyto materiály jsou intenzivně testovány na cytotoxicitu a buněčnou viabilitu či přímo na in-vitro nebo in-vivo testování. Wet elektrospinning je v posledních letech velmi populárním tématem výzkumů. O jeho výjimečnosti svědčí statistika publikací prací na téma Wet elektrospinningu, přičemž publikace zabývající se Wet variantou elektrospinningu od roku 2021 výrazně rostou, a v současnosti si zachovávají ustálený trend nad hodnotou 5 000 publikací ročně, viz obrázek (Obr. 14).

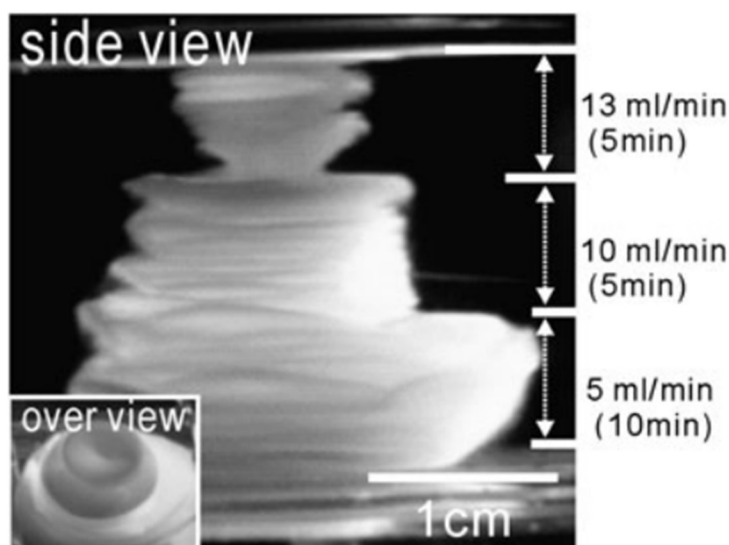


Obr. 14 – Graf ukazující trend v publikaci na téma *Wet electrospinning*, z obrázku je patrný značný růst v kontextu 20. let. Maximální kulminace v roce 2021 a se setrvalým trendem v letech 2022 a 2023. Data grafu jsou z 4.3.2024. Graf vytvořen ve webové aplikaci *Web of Science™*.

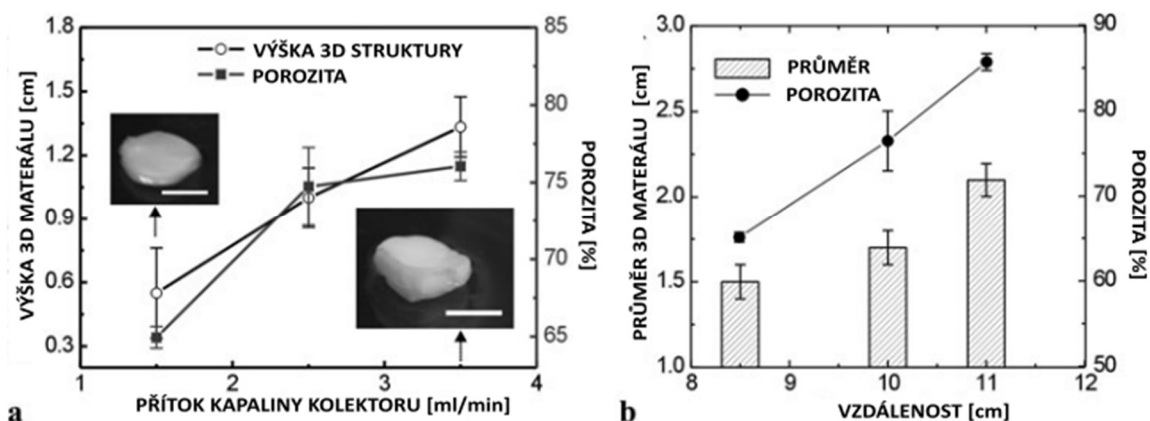
Wet proces výroby má vedle možnosti tvorby prostorově objemných, vysoce porézních materiálů také výhodu v možnosti modifikace během wet fáze, kde může kapalina sloužit nejen jako koagulační médium, ale i médium pro další funkcionalizaci či upravení vlastností výsledných vláken nebo vlákenné struktury. Úpravou v kolektorové kapalině může být modifikace dopováním, povrstvením nebo síťováním. Výhoda je to, že tento krok procesingu je spojen se samotným procesem výroby a není třeba další dodatečné kroky v procesu výroby.

Velmi jednoduché nastavení experimentu je například zvláknění PCL do ethanolové lázně s přídavkem NaOH a dopaminu, výsledkem je 3D struktura materiálu [67]. Tento experiment ukázal, že je možné vyrobit 3D strukturu, a tím zajistit zvýšenou porozitu i velikost pórů. Samotné vlákno bylo stočené ve struktuře materiálu do stužek. Materiál byl následně testován in-vitro pomocí lidských mezenchymálních kmenových buněk (hMSC), kde ukázal dobrou biokompatibilitu. Použité hMSC se úspěšně diferenciovaly na buňky fibroblastního typu. Zajímavým počinem je testování vlivu hydrodynamického parametru v procesu noření do kolektoru, kdy byly různými hodnotami přítoku ethanolu do lázně ovlivňovány parametry výsledného vlákenného materiálu. Tímto způsobem byla ovlivňována výška a šířka výsledného 3D vlákenného materiálu [68]. Zvláknován byl v tomto případě PCL do ethanolu. V průběhu vláknění byl do nádoby kolektoru přiváděn další ethanol a tím zvyšována výška hladiny kolektoru. Výsledky experimentů popisují závislost navyšování objemu kolektoru k rozměru vytvářeného tkáňového nosiče. Tvar, respektive průměr, výsledného materiálu je také ovlivněn rychlostí dávkování polymerního roztoku do trysky. Těmito parametry procesu lze tedy regulovat rozměr vytvářeného materiálu, jak průměr, tak výšku. Pokud bude konstantní průtok polymeru tryskou, se s změnou průměru/výšky materiálu v kolektoru se bude měnit i hodnota porozity. Výsledek průběžné změny hydrodynamického parametru – přítoku ethanolu do kolektoru lze vidět na obrázku (Obr. 15). Obrázek znázorňuje změnu velikosti materiálu v čase, zespodu je patrné, že za 10 minut vláknění a rychlosti přítoku ethanolu 5 ml/min je materiál s největší šířkou (průměrem podstavy), při menším času vláknění a větším přítoku ethanolu je průměr podstavy menší, ale zato rychleji roste materiál o ose z – do výšky. Tento článek popisuje vztah výšky hladiny kapaliny a proces

tvorby 3D materiálu a výslednou porozitu (Obr. 16). Při nízké hladině kapaliny je proces tvorby materiálu více homogenní a vlákna se do jednoho místa, pro dosažení 3D objemu je však nutné výšku hladiny zvyšovat, čehož je dosaženo kontinuálním přívodem kapaliny kolektoru.



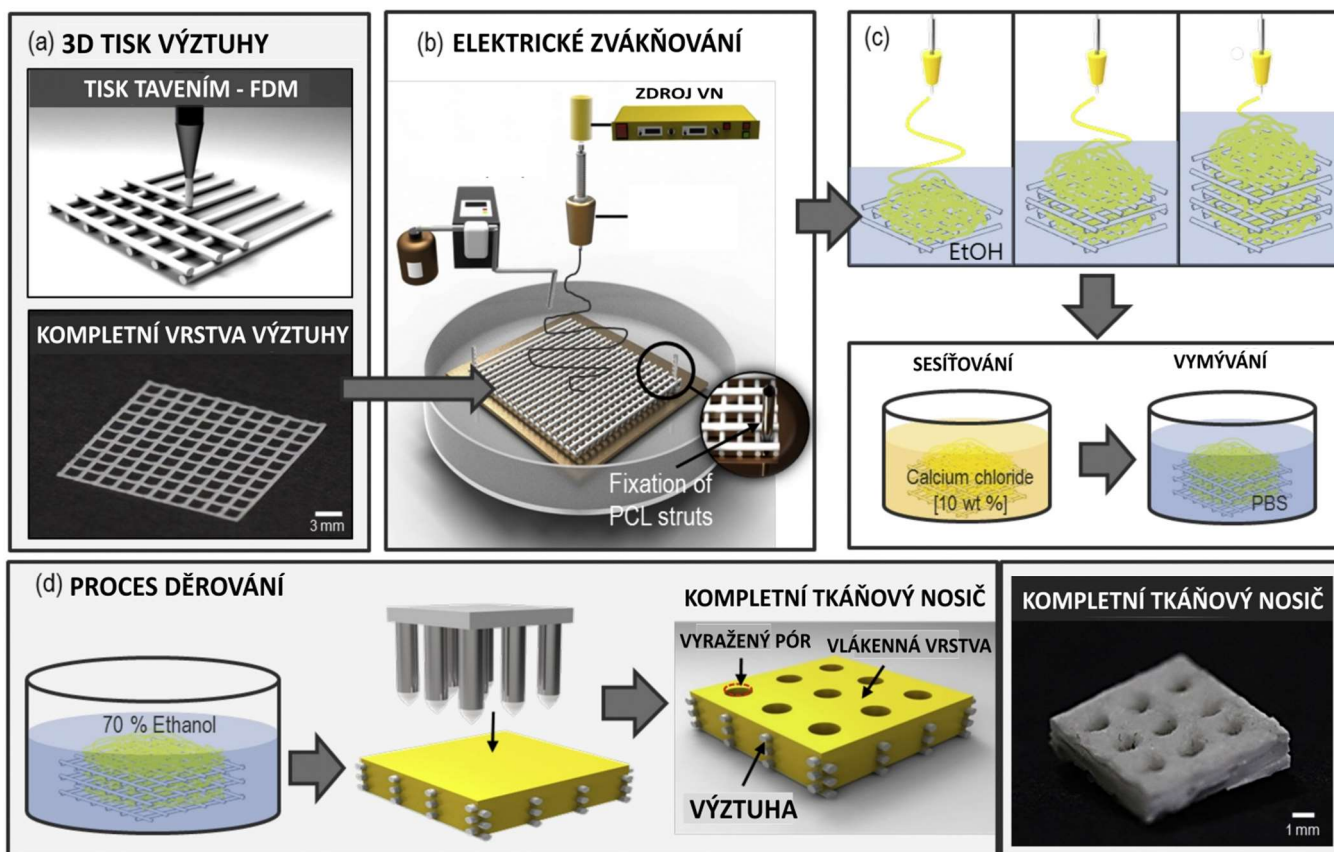
Obr. 15 – Obrázek materiálu vytvořeného pomocí wet elektrosponingové metody s modifikací procesu pomocí hydrodynamického principu. Připouštěním ethanolu se v průběhu vláknění měnila výška, i šířka materiálu. Obrázek převzat [68].



Obr. 16 – Metoda výroby tkáňového nosiče má své parametrické závislosti. a) Graf závislosti výšky vrstvy a přítoku ethanolu na porozitu. b) Graf zobrazující vliv průměru materiálu (podstavy) a vzdálenosti trysky od hladiny na porozitu. Obrázek převzat [68].

Také ve wet variantě elektrosponingu existuje snaha o kombinaci s 3D aditivním tiskem [69]. Implementace 3D tisku je motivována zlepšením mechanických vlastností. Vlákenná vrstva má poskytnout vhodný ECM imitující prostor, který svou porozitou, velkými a propojenými póry umožňuje buňkám proliferaci a migraci do materiálu. Postup výroby tohoto tkáňového nosiče začíná výrobou 3D aditivně vytištěných matic. Jako materiál pro tisk byl použit PCL. Oproti běžným komerčním tiskárnám byl PCL taven přímo z práškové formy a extrudován tryskou 250 μm na 3-osém robotickém extrudéru. Matrice byly vytvořeny jako plochý soubor lineárních rovnoměrných válcovitých vláken, překrytých příčně druhou vrstvou stejného typu. Vznikla tak matrice složená z 250 μm PCL vláken tvořících čtvercové póry. Principem výroby je více stupňový proces, kdy se 1. matrice v kapalině pokryje elektrosponingovou vrstvou PCL/alginát. Tímto

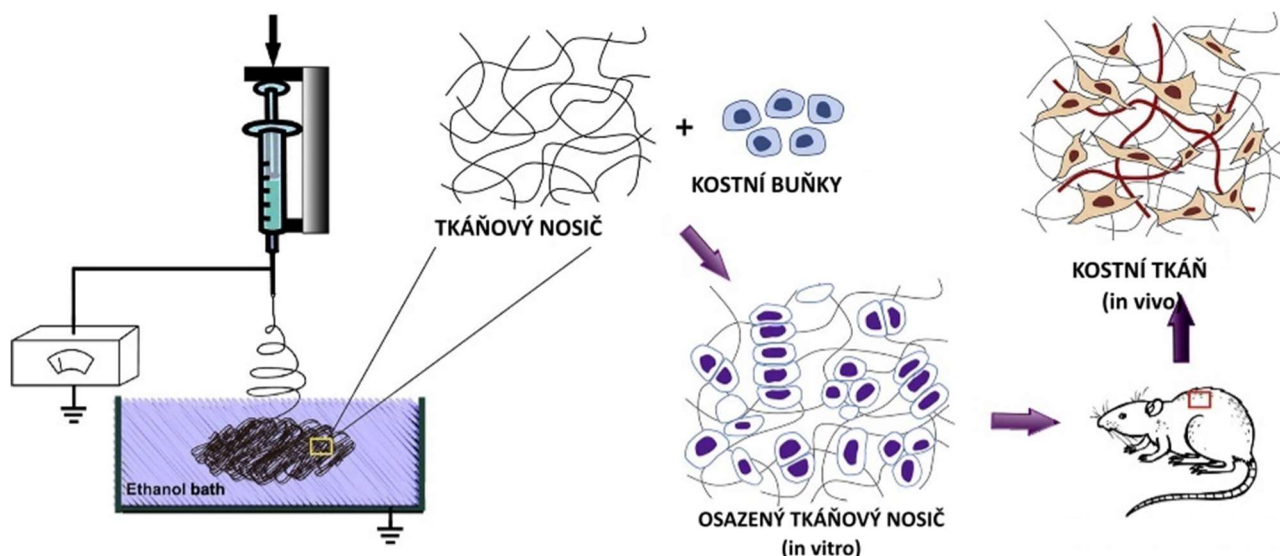
postupem se postupně vytvoří vrstva objemného vlákenného materiálu. Kombinace matrice a vlákenné vrstvy se opět překryje novou maticí a proces wet elektrospinningu se opakuje. Vzniká tak sendvičová struktura, opakující se kombinací 3D tištěné PCL matrice a do kapaliny elektricky zvlákněné vrstvy. Pro zvýšení porozity a zajištění látkové výměny a prostorového osazení buňkami, byl vytvořený sendvič hluboce zmrazen, lyofilizován a do materiálu byly ve zamraženém stavu vylisovány 800 µm velké otvory. Popsaný postup je znázorněn na obrázku (Obr. 51). Pro buněčné testování byl materiál osazen preosteoblastními buňkami (MC3T3-E1) a testován na buněčnou aktivitu a proliferaci. Dle závěrů článku je viabilita a proliferace materiálu výtečná a předpokládá se vhodnost pro tkáňové nosiče tvrdých tkání. Nevýhodou tohoto procesu jeho relativní složitost, mnoha stupňový proces a nutnost s materiálem často mechanicky manipulovat, čím se zvyšuje riziko defektů.



Obr. 17 – Popis metody výroby tkáňového nosiče kombinující 3D aditivní tisk a wet elektrické zvláknování. a) Zobrazení procesu aditivní výroby PCL matrice, která slouží jako pevný základ tkáňového nosiče. b) Nastavení wet elektrospinningu, kdy je v ethanolové lázni matrice pokryta vlákennou vrstvou. c) Znázornění procesu tvorby sendvičové struktury a následné fixace se sesíťováním materiálu. d) Postup vyražení mikro-otvorů do materiálu. e) Snímek vytvořeného tkáňového nosiče. Obrázek převzat [69].

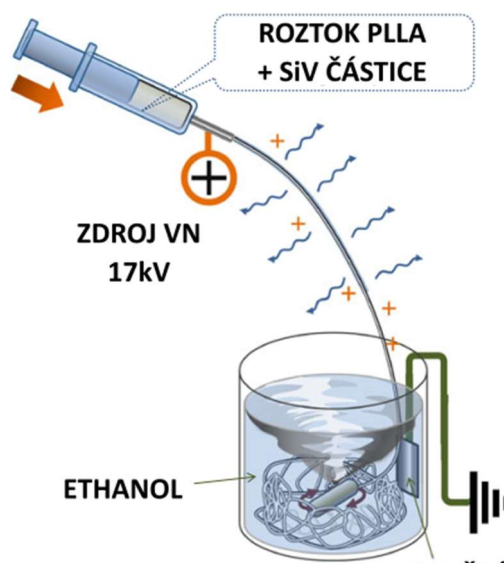
Velmi jednoduchý proces výroby založený na vlákenní PLGA do lázně je popsán v článku, který se zaměřuje na vývoj a testování nosiče pro tvorbu kostní tkáně. Nastavení procesu je velmi jednoduché a velmi podobné záměru experimentu této disertační práce [70]. Jedná se o jednostupňový proces výroby materiálu zvlákněním do kapalného kolektoru [71]. Polymer je pomocí vysokého napětí vlákněn z jehly injekční stříkačky do kapalného kolektoru složeného z ethanolu, princip je zobrazen na obrázku (Obr. 18). Parametry výsledného materiálu jsou zajímavé pro porovnání s parametry materiálu této práce. V tomto článku se udává výsledný průměr vláken 2,01 µm a porozita 99 %. K biologickému testování byly použity potkaní kostní dřevňové buňky (RBMCs), které prošly in-vitro chondogenezní diferenciací a poté subkutánní implantací in-vivo. Výsledky ukazují, že oproti planárním vzorkům dochází k migraci a proliferaci v celém

objemu materiálu, včetně diferenciací chondrogenézí na chrupavčitou tkáň. V závěru autoři popisují výhody oproti jiným vlákněným materiálům (vyrobeným například ultrasonikací z planární elektrospinningové struktury) a konstatují také, že po osmi týdnech po implantaci in-vivo byla v tkáňovém nosiči vytvořena rozsáhlá kostní tkáň.



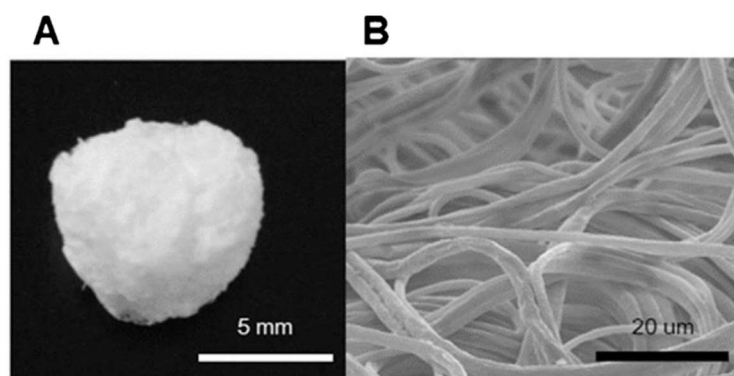
Obr. 18 – Zobrazení nastavení experimentu, který testuje 3D objemný materiál vyrobený do kapalného kolektoru jako tkáňového nosiče pro kostní náhradu. Obrázek převzat [71].

Článek testující Wet elektrospinningovou strukturu s modifikací pomocí koagulační lázně je zajímavý tím, že lázeň je zde použita promíchávaná. Popisuje použití PLLA a jeho modifikování pomocí uhličitanu vápenatého dopovaným Siloxanem (Si-PVH) [72]. Použití modifikace má zlepšit biologické vlastnosti tkáňového nosiče. Modifikace spočívá v procesu, při kterém v lázni dojde k pokrytí částicemi uhličitanu vápenatého. Vápenné a křemíkové ionty jsou schopny stimulovat proliferaci, diferenciaci a mineralizaci buněk formujících kostní tkáň [73–76]. Proces modifikace je proveden v materiálu s krokem zvláknění, přičemž ve vláknech vznikají nano sférické shluky uhličitanu vápenatého se siloxanem. Při použití tohoto tkáňového nosiče se uvolňují do prostředí ionty, které jsou určeny k aktivní stimulaci a ovlivnění buněčné aktivity. Tvorba vlákněného materiálu probíhá v lázni za soustavného promíchávání, které vytvoří modifikovaný vlákněný mix. Vytvoření takto modifikovaného materiálu, který má přidané pozitivní vlastnosti vzhledem k biologickým buněčným procesům se označuje jako bioaktivní materiál. Tyto bioaktivní materiály dosahují významných výhod, oproti klasickým materiálům, díky podpoře buněčné aktivity (například stimulací pomocí iontů) nebo díky lepšímu uchycení buněk na vazných místech vláken.



Obr. 19 – Principiální uspořádání wet varianty tvorby materiálu s promícháváním kapalného kolektoru během vlákenní. Lázeň zároveň slouží jako koagulační prostředí pro tvorbu 3D objemné struktury. Samotný proces s přidaným materiálem zajišťuje bioaktivní modifikaci materiálu, při které se do materiálu nasadí uhličitán vápenatý se siloxanem. Vápenné a křemíkové ionty stimulují proliferaci, diferenciaci a mineralizaci buněk formujících kostní tkáň. Obrázek převzat [72].

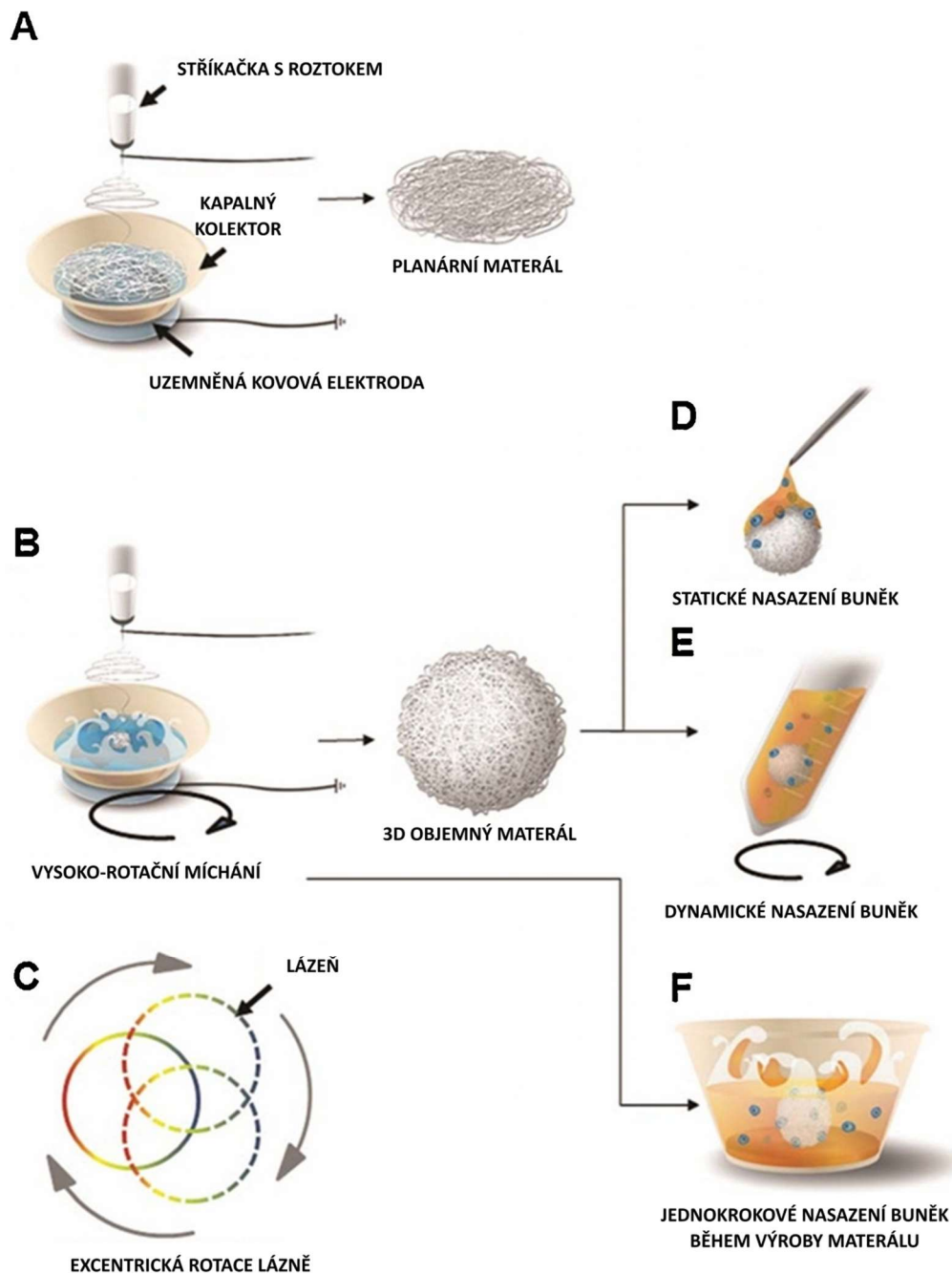
Zajímavou metodou je také metoda míchání lázně pomocí excentrické rotace [77]. V tomto článku navíc kombinují dynamický wet elektrospinning s testováním přímého nasazení buněk. Tamtéž je popisováno, že klasickým wet elektrospinningem bez hydrodynamického principu je výsledkem tzv. nano sheet, naznačující spíše plochou strukturu. Při excentrické rotaci vzniká kulovitý tvar vzorku (Obr. 21 b, c). Takto vytvořený vzorek s kulovitým tvarem byl osazen buňkami dvěma způsoby. První způsob osazení byl pipetování média s buňkami přímo na vzorek, nebo dynamickým rotačním promícháváním v médiu s buňkami. Tento dynamický způsob umožňuje spontánní osazení buněk do objemu materiálu díky vzájemnému pohybu buněk v médiu a vlákenného porézního vzorku.



Obr. 20 – Snímky výsledného materiálu vytvořeného pomocí Hydrodynamického wet elektrospinningu. a) Excentrická rotace kolektoru vytváří kulovitý tvar tkáňového nosiče. b) SEM snímek ukazující vlákennou strukturu materiálu, která má tendenci vykazovat více zatočených vláken a kulatých pórů, než je v běžných obdobných materiálech. Obrázek převzat [77].

Další způsob nasazení, který je přímou součástí procesu výroby materiálu, je vlákenní do hydrodynamické lázně, která se je sama o sobě médiem, ve kterém je buněčný materiál. Při této metodě je sice vyšší riziko zanesení infekce, a tedy má zvýšenou náročnost na sterilitu výrobního prostředí, ale zase umožňuje

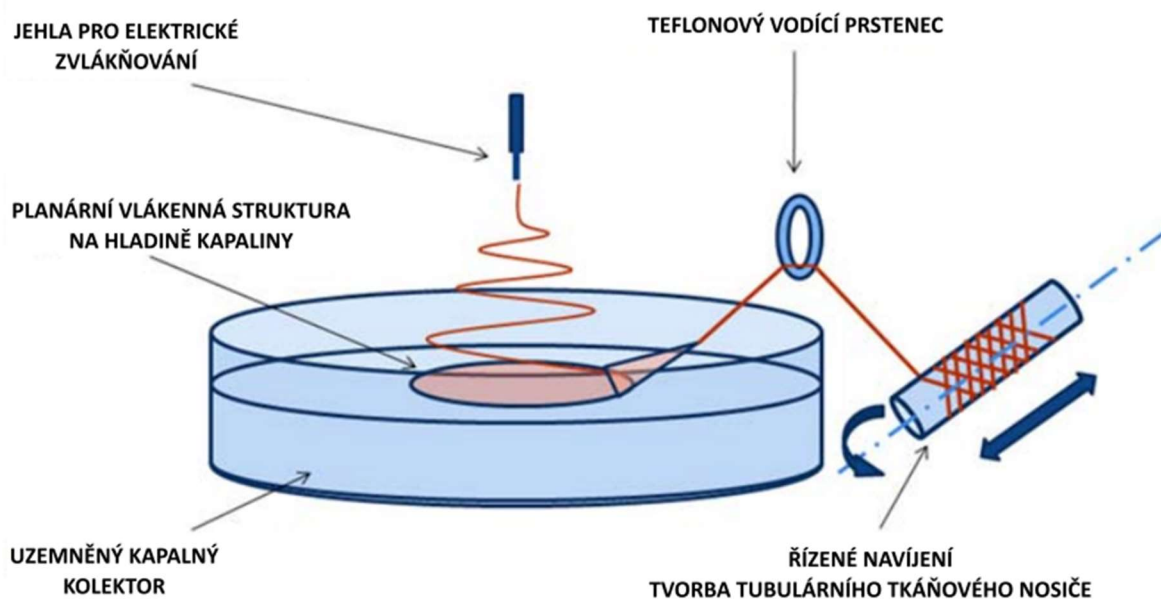
průběžné osazení již při tvorbě materiálu, a tedy by mělo dojít k relativně rovnoměrnému osazení buňkami v prostoru 3D objemného materiálu (Obr. 21 f). Tento způsob nasazení, za předpokladu zvládnutí vyloučení infekce, značně urychluje a zjednodušuje výrobu tkáňového nosiče. Vzorky osazené dynamicky přímo v kolektoru vykazovaly uniformitu v buněčné hustotě. Nejmenší uniformitu pak vykazovaly vzorky osazené standardním nasazením média pomocí pipetování média do vzorku.



Obr. 21 – Popis metody Hydrodynamického wet elektrospinningu s excentrickou rotací kolektoru. a) Klasické schéma wet elektrospinningu, při kterém se vlákna do kapaliny a výsledkem je klasická wet vlákenná struktura (autoři uvádějí, že vlákenný materiál tvoří tzv. nano sheet). b) Obrázek ukazující tvorbu kulovitěho 3D materiálu v lázni, který je při vlákennění excentricky rotován. Takto vytvořený vzorek může být osazen buněčným materiálem dvěma způsoby: d) Statickým osazením nanesením roztoku s buňkami. e) Dynamickým nasazením v buněčném médiu. f) Třetí možností je zvláknění do excentricky rotující lázně obsahující médium s buněčným materiálem. V části obrázku c) je princip excentrické rotace. Obrázek převzat [77].

Velmi zajímavé jsou výsledky testu proliferace – buněčné aktivity, kdy do sedmého dne vykazovaly nevyšší aktivitu standardně osazené vzorky, zatímco vzorky osazené přímo v kolektoru značně zaostávaly, a to až do 7. dne testování. Po 7. dni byla aktivita vzorku osazeného přímo v kolektoru značně vyšší a standardně osazený vzorek měl snižující se tendence aktivity. Výsledné testování potvrdilo výhodnost metody výroby objemných vzorků pomocí této metody a ukázalo, že osazení přímo při procesu výroby tkáňového nosiče má velké výhody, nejenom procesní, ale i z pohledu buněčné proliferace a migrace do objemu materiálu.

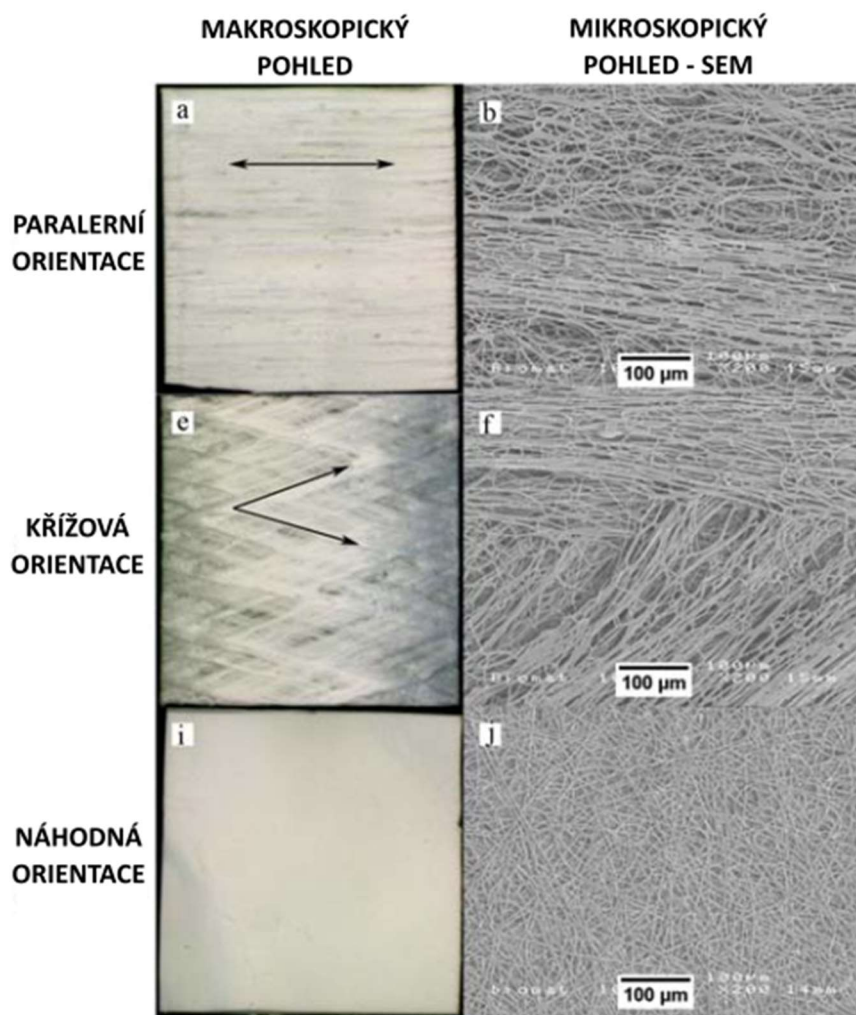
Častá je také snaha o vytváření orientovaných vlákněných struktur pomocí metody wet elektrospinningu. Základní uspořádání takových snah bývá na ponořený nebo částečně ponořený rotující kolektor [78] nebo do kapaliny s kontinuálním odvodem a návínem materiálu [79]. Článek popisující vliv uspořádání vlákněné struktury na chování potkaních buněk, je zajímavý zejména protože ukazuje použití wet elektrospinningu s kontinuálním odtahem vytvořeného materiálu, ze kterého po zformování do lineárního útvaru navíjí morfologicky požadovaný typ materiálu [79]. Tato metoda je zaměřena na tkáňové nosiče pro vysoce směrově uspořádané tkáně, jako jsou například šlachy nebo vazy. Sjednocenost vláken v nosiči dává buňkám tvarový rámec, jenž formuje jejich strukturu. Takovéto směrování poté imituje topografii původní směrově specifické tkáně. Výroba tohoto specifického materiálu probíhala zvlákněním PLGA na hladinu kapaliny standardním elektrospinningovým procesem. Jako kapalina kolektoru byla použita voda, jejíž povrchové napětí zabránilo noření se vláken do objemu kapaliny. Vytvořený materiál byl z hladiny kapaliny kontinuálně navíjen, formován do lineárního vlákněného svazku a poté navíjen na válec (Obr. 22).



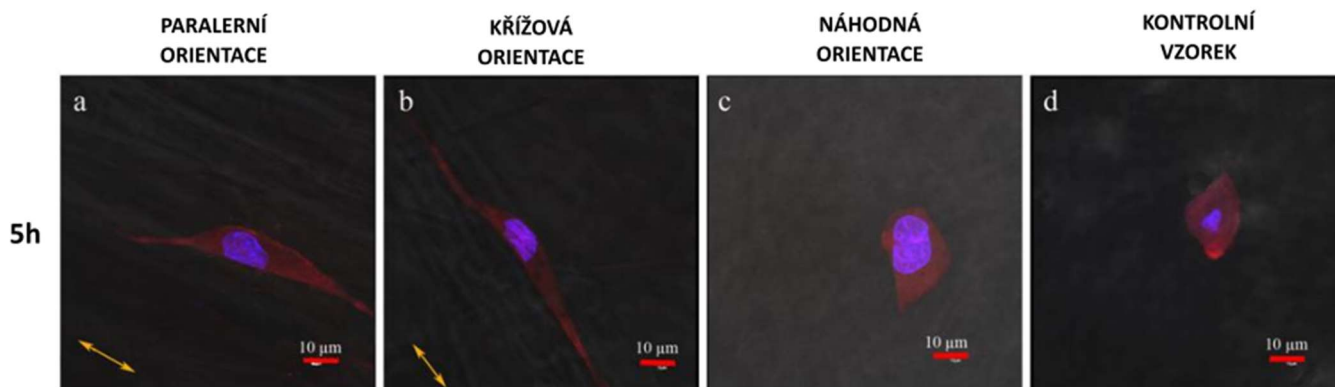
Obr. 22 – Obrázek zachycuje princip tvorby směrově uspořádaných vlákněných struktur pro použití jako tkáňových nosičů šlach a vazů. Vlákenný materiál je odebírán z hladiny kapaliny a navíjen dle požadovaného směru vláken. Výsledkem je materiál s řízeným ujednocením vláken ve struktuře tkáňového nosiče. Obrázek převzat [78].

Dle způsobu navíjení mohou být výsledné struktury ještě modifikovány tak, aby byly všechny vrstvy paralelní nebo orientovány pod ostrým úhlem. Snímky uspořádání vlákněných struktur jsou na obrázku (Obr. 23). Tato směrovost materiálu je dle autorů klíčová pro regeneraci směrově specifických tkání. Právě kontinuálním navíjením je dosaženo možnosti vytvoření vyšších (3D objemných) materiálů. Všechny

vzorky, včetně planárních kontrolních vzorků, byly po výrobě 45 minut zahřívány na 70°C z důvodů uvolnění vnitřního napětí a tvarovou stabilizací. Tento krok byl z důvodu prevence změny velikosti materiálu při biologickém testování. Poté byla provedena 72 hodinová lyofilizace. Na závěr bylo na vzorcích provedeno biologické in-vitro testování pomocí potkaních periodontálních pojivových buněk (PDL). Testování metabolické aktivity pomocí Almar Blue testu ukázalo až dvojnásobnou fluorescenční intenzitu, která reprezentuje buněčnou aktivitu. Obdobných výsledků dosáhly materiály při testování pomocí metody kvantifikování DNA – testu PicoGreen. Uspořádané objemné materiály dosahovaly až dvojnásobných hodnot DNA oproti elektrospinningovému náhodně orientovanému planárnímu vzorku. Prostorové uspořádání buněk taktéž odpovídá morfologii materiálu. V uspořádaných materiálech je tvar buňky a její orientace ovlivněna orientací vláken. Buňka se tedy přizpůsobuje tvaru póru tím, že následuje vlákno ke kterému se váže. Takto vytvořené tkáňové nosiče tedy dokáží buňkám poskytnout vhodný prostor pro vytváření specifických směrově uspořádaných vláknitých tkání (Obr. 24), a zároveň vykazují vhodné prostředí pro buněčnou proliferaci.



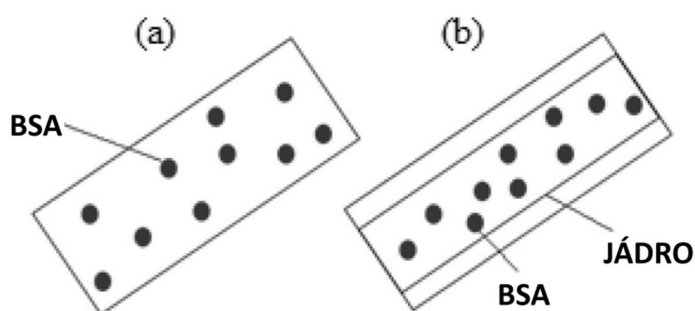
Obr. 23 – Snímky směrově orientovaných materiálů vytvořených v kapalném kolektoru a navinutých na cylindrickou šablonu. Snímky jsou fotografovány optickým a SEM mikroskopem. a, b) Paralelní uspořádání vláken. e, f) Křížené uspořádání vláken, návin je pod ostrým úhlem. i, j) Náhodné uspořádání vláken, výsledek klasického elektrospinningového procesu. Obrázek převzat [78].



Obr. 24 – Snímky z fluorescenčního mikroskopu zachycující tvary buněk pro různé materiály vytvořené v kapalném kolektoru. a, b) Buňky ve směrově orientovaných materiálech, jež poskytují buňkám možnost růstu do tvaru vláknitých tkání. c) Buňka v izotropním materiálu. d) Kontrolní vzorek. Snímky ukazují, že orientací materiálu lze napodobit prostředí specificky uspořádaných tkání, například vláknitých šlachových tkání. Obrázek převzat [78].

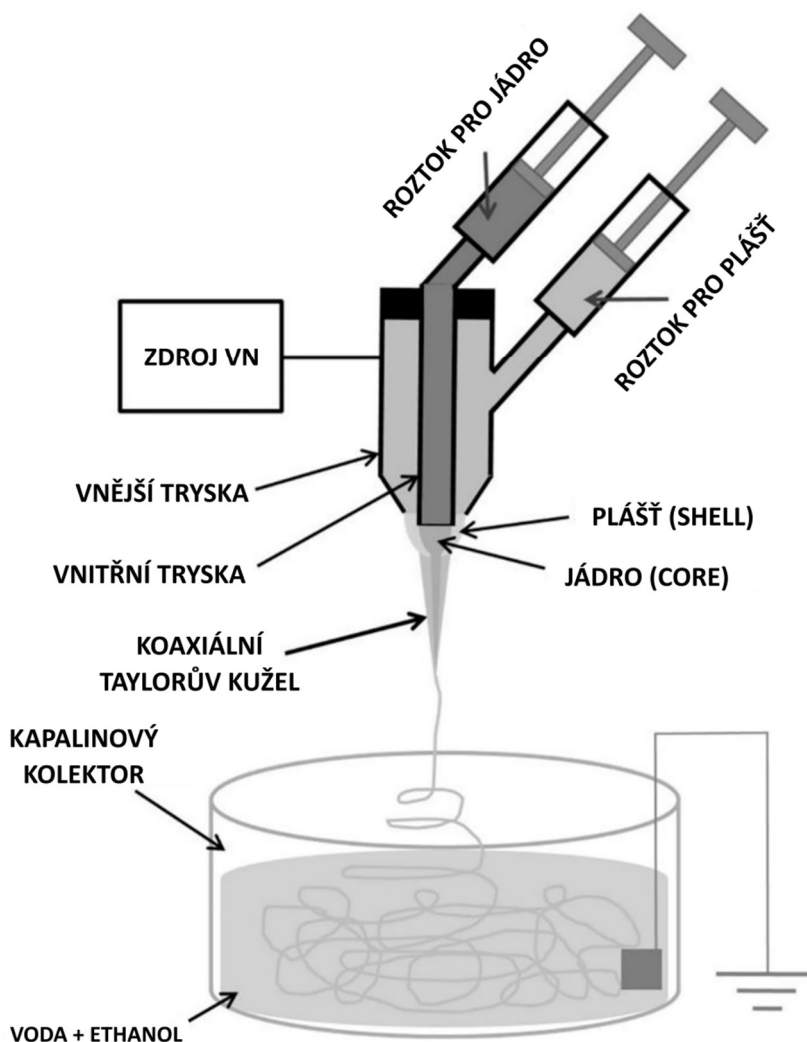
Další experimentování, se snahou o tvorbu vláknitých tkání, bylo zaměřeno na svalové tkáně [80]. Blend PCL/SF (Fibroin z hedvábí)/PANI (Polyanilin) byl vlákněn do kapaliny voda/ethanol. Princip výroby materiálu je opět založen na kontinuálním odvodu materiálu z hladiny kapalného kolektoru (voda/ethanol). Jedná se o variantu wet elektrospinningu, při kterém se vytvořený vláknenný materiál nenoří do objemu kapaliny, ale zůstává na rozhraní kapalina/plyn. V takto získaném materiálu jsou vlákna lineárně uspořádaná. Tyto svazky lineárně uspořádaných struktur jsou umístěny paralelně do hydrogelu, který má za cíl simulovat prostředí ECM. Biologické testování pomocí C2C12 myoblastních buněk prokázalo tvorbu dlouhých buněčných tvarů.

Kombinace wet elektrospinningu a koaxiálního zvlákňování byla testována v experimentu se zaměřením na vytváření tkáňových nosičů pro chrupavčité tkáně [81]. Jako základní polymer byl zvolen PCL (Shell) a jako jádro (Core) byl zvolen hovězí sérový albumin (BSA). Obecně jsou dva přístupy k inkorporaci biomolekul do materiálu. Jeden přístup tvoří tzv. blend, kde jsou biomolekuly promíchány do materiálu a v objemu vlákna se poté objevují biomolekuly náhodně (Obr. 25 a). Druhý přístup je právě inkorporace a úplné obalení biomolekul další látkou. Při použití verze s jádrem dochází k postupnému a setrvalému uvolňování biomolekul. Než se začnou biomolekuly z materiálu uvolňovat, jsou pro organismus ukryty a snižuje se riziko auto-imunitní reakce (Obr. 25 b).



Obr. 25 – Princip dvou různých metod enkapsulace biomolekul do materiálu. a) Blend - buňky jsou v promíchány v objemu materiálu s rovnoměrným - náhodným výskytem. Biomolekuly mohou být i na povrchu vlákna a být v kontaktu s vnějším prostředím. b) Inkorporace biomolekul do jádra materiálu, u této varianty nedochází k přímému kontaktu s vnějším prostředím. Experimenty ukazují že při této variantě inkorporace dochází k pozvolnějšímu a delšímu uvolňování inkorporovaných molekul. Obrázek převzat [81].

Zvlákňování core-shell materiálu probíhá principálně stejně jako obdobné varianty, ale jehla – tryska je dvoustupňová. Druhá menší tryska je umístěna uvnitř hlavní trysky, tato druhá tryska vmíchává do středu tvořeného materiálu složku tvořící jádro výsledného vlákna (core materiál). Tato látka nemusí být polymer, tímto způsobem je možná enkapsulace i nepolymerních bioaktivních látek (Obr. 26). Testování ukazuje, že varianta core-shell má pozvolnější uvolňování biomolekul a uvolnění je rozloženo do delšího časového úseku. Testování prokázalo, že materiál není cytotoxický.



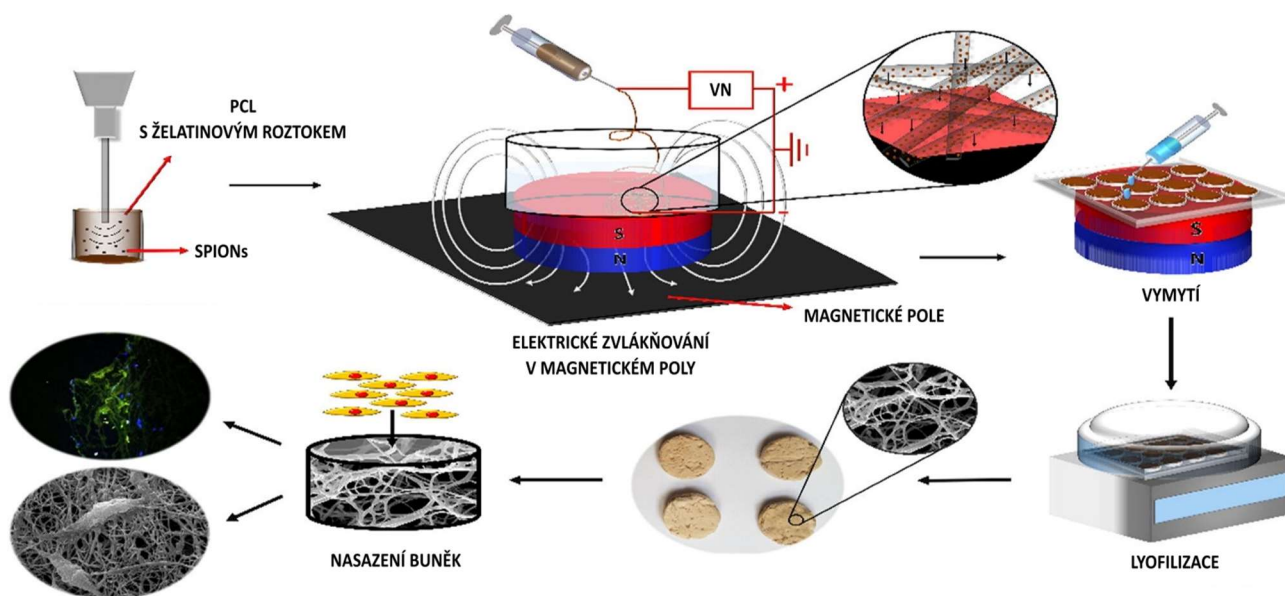
Obr. 26 – Princip tvorby bikomponentního vlákna typu jádro-plášť do kapaliny. Tímto způsobem lze dosáhnout inkorporace bioaktivních molekul do vlákna takovým způsobem, aby nebyly v přímém kontaktu s vnějším prostředím. V tomto případě je roztok BSA zvlákněn ve středu PCL vlákna. PCL tedy úplně obaluje BSA a nedojde k jeho kontaktu s okolím, boční řez je na obrázku (Obr. 25 b). Zvlákněním do kapaliny lze vytvořit 3D strukturu, která je vhodná pro objemné tkáňové nosiče. Obrázek převzat [81].

Využití kapalného kolektoru k funkcionalizaci materiálu pro antibakteriální účely bylo testováno přidáním butoxidu titaničitého k PU roztoku. PU roztok se vláknil do kyselé vodní lázně (kyselinou chlorovodíkovou upraveným pH=4), kde došlo reakci butoxidu titaničitého s kyselinou a vznikly tak nanočástice TiO₂. Článek samotný proces wet spinningu popisuje jen v základu, bez větších podrobností. Je zde uvedeno, že po opakovaném propláchnutí destilovanou vodou je materiál vysušen při 60 stupních ve vakuové sušičce po dobu 24 hodin. Na vytvořených materiálech byly provedeny testy antibakteriální aktivity a testy cytotoxicity. Materiál s TiO₂ prokázal antibakteriální efekt. Podobné testování antibakteriální úpravy bylo testováno a popsáno pro collagen/PCL vlákna s přidavkem nanočástic stříbra (AgNP) [82]. Stříbro bylo

povrchově nanese v lázni, kde bylo dispergováno v ethanolu. Modifikace proběhla při koagulaci. Testy prokázaly antibakteriální efekt takto vyrobeného materiálu.

Velmi zvučným tématem u elektrického zvláknování je použití iontových rozpouštědel – Ionic Liquid (IL). Tyto látky umožňují rozpouštění některých jinak obtížně rozpustných biomolekul (například celulóza, chitin [83–85]). Tato rozpouštědla jsou většinou relativně ekologická. Jejich nevýhodou je nízká volatilita, odstranění rozpouštědla je při použití iontových rozpouštědel současnou výzvou. Iontové rozpouštědlo se při pokojové teplotě jen velmi málo odpařuje ze zvláknovaného polymeru. Zejména při pokojové teplotě zůstává v polymeru po dopadu na kolektor stále velké množství rozpouštědla, což není žádoucí. Jedním z funkčních řešení je použití wet elektropinningu, který zajistí, že při koagulaci v lázni dojde k vyplavení rozpouštědla z formujícího se materiálu. Iontové rozpouštědlo jde z kolektorové kapaliny teoreticky recyklovat a opětovně použít, což snižuje ekologickou, ale i ekonomickou zátěž [86]. Příkladem použití IL je zvláknění celulózy in-situ a její modifikace pomocí hydroxidu hořečnatého – $Mg(OH)_2$. Celulóza rozpuštěná v IL je zvlákněná do kolektoru, kde dojde k odstranění iontového rozpouštědla z polymeru. Zároveň je z kolektorové kapaliny polymer modifikován nanočásticemi $Mg(OH)_2$. Touto in-situ modifikací získává celulóзовý materiál nehořlavou úpravu [87]. Při takovéto modifikaci jsou nanočástice na povrchu materiálu, kde zajišťují nehořlavou úpravu, oproti variantě, kdy by byly přidány již do polymeru, v takovém případě by většina nanočástic neplnila funkci nehořlavé úpravy. V jednom procesu zde byl získán materiál z IL a zároveň tento materiál získal nehořlavou úpravu.

V roce 2022 byl publikován článek jež mluví o wet elektrosponingu v magnetickém poli [88], celkové nastavení experimentu je zaměřené na produkci vhodných materiálů pro tkáňové inženýrství. Použitým polymerem byl PCL s vepřovou želatinou typu A. Magnetické vlastnosti polymerního roztoku byly zajištěny tzv. SPIONs – nanočásticemi super magnetických oxidů železa (superparamagnetic iron oxide nanoparticles) v tomto případě oxid železnato-železitý (Fe_3O_4). Výsledné vláknenné materiály jsou 3D objemné. Vytvořené materiály jsou zároveň magnetické, obsahují oxidy železa, což dle článku nezvyšuje cytotoxicitu. Autoři tvrdí, že magnetickým polem mohou ovlivnit porozitu, velikost póru a mikro morfologii vláknenného materiálu. Dle biologického testování není materiál cytotoxický a je vhodný pro tkáňové inženýrství jako náhrada například nervových tkání. Princip výroby a testování je graficky znázorněn na obrázku (Obr. 27).

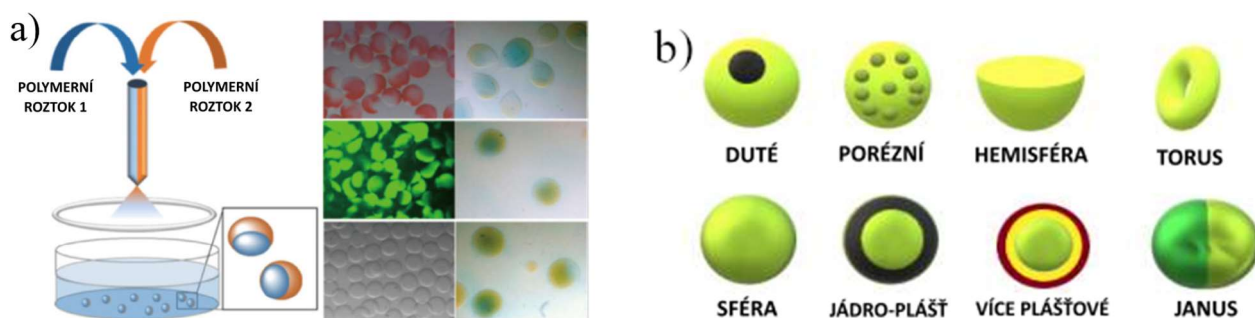


Obr. 27 – Obrázek znázorňující tvorbu vláknenného magnetického tkáňového nosiče v magnetickém poli a zvlákněného do kapalného kolektoru. Roztok PCL s želatinou typu A je smíchán s magnetickými nanočásticemi (SPIONs) a zvlákněn v magnetickém poli do kapaliny. Obrázek převzat [88].

Varianta wet elektrosponingu je i vláknění do gelu, který lze posléze aktivovat a získat kompozitní materiál. Příkladem je vytvoření polymeru keramického materiálu, jenž je složen z polymerních vláken a keramické matrice [89]. Výsledný materiál je dle autorů podobný ECM a vysoce porézní, keramická matrice mu dodává stabilitu. Zvlákněn byl PEO (Polyetylenoxid) do tekutého gelu vytvořeného z oxidu křemičitého a hydroxidu draselného, během vláknění byl gel promícháván. Aktivace gelu byla provedena pomocí metakaolinu.

Wet elektrosponingové produkty nejsou jenom potencionálními materiály pro tkáňové inženýrství. Tkáňové inženýrství je sice obsáhlou a intenzivně studovanou oblastí, ale často je zkoumáno i technické využití těchto materiálů. Výzkumem bylo prokázáno, že je možné vyrobit piezoelektrický vláknenný materiál pomocí zvláknění do kapaliny, kde je materiál dále aditivně modifikován [61]. Příkladem dalšího technického využití je tvorba materiálu pomocí koaxiálního zvláknění do kapaliny, kdy je lázni posléze část materiálu vymývána a vznikají vysoce specifická dutá vlákna pro super-kondenzátory (super kapacitory). Tento materiál tak slouží jako vynikající a odolný separátor [90]. Přehled v rešeršní části uvedených polymerních roztoků a kolektorů včetně jejich složení je uveden v tabulce (Tabulka 1).

Obdobou elektrosponingu je takzvaný elektrospraying. Je to v principu stejný proces jako elektrické zvláknění, ale nevznikají při něm vláknenné útvary, vznikají nano/mikro kapičky. Výsledkem jsou tedy sférické polymerní částice. Proces je nastaven tak, že po vytvoření trysky nevznikne souvislý proud polymeru, ze kterého se vypařuje rozpouštědlo a tuhne, ale proud polymeru se vlivem povrchového napětí rozpadá na sférické objekty (kapičky) a ty dále dopadají na kolektor [91]. Elektrospraying je pro medicínu také velmi zajímavý, protože dokáže vytvářet enkapsulované aktivní látky, které mohou sloužit k řízenému dodávání léčiv, či jiných bioaktivních látek. Enkapsulace může sloužit jako ochrana inkorporované látky z důvodu ochrany před vnějším prostředím. Například může být ochranou před imunitním systémem, nebo jako prostředek postupného uvolňování, kdy se potřebná látka uvolňuje postupně a relativně rovnoměrně po daný časový úsek. Takto vytvořené částice mohou být také inkorporovány do jiného tkáňového nosiče a vytvořit tak kombinovaný materiál s aktivní látkou. Taktéž u elektrosprayingu je kapalný kolektor využíván k zachycení materiálu, jeho koagulaci nebo další modifikaci [92]. Elektrospreying může být kombinován s elektrosponingem, vláknenný materiál je tedy kombinován s částicemi, které plní roli funkcionalizace materiálu [93]. Tkáňový nosič může být modifikován například o enkapsulované buňky [94], růstové faktory [95], léčivo či jinou aktivní látku [96].

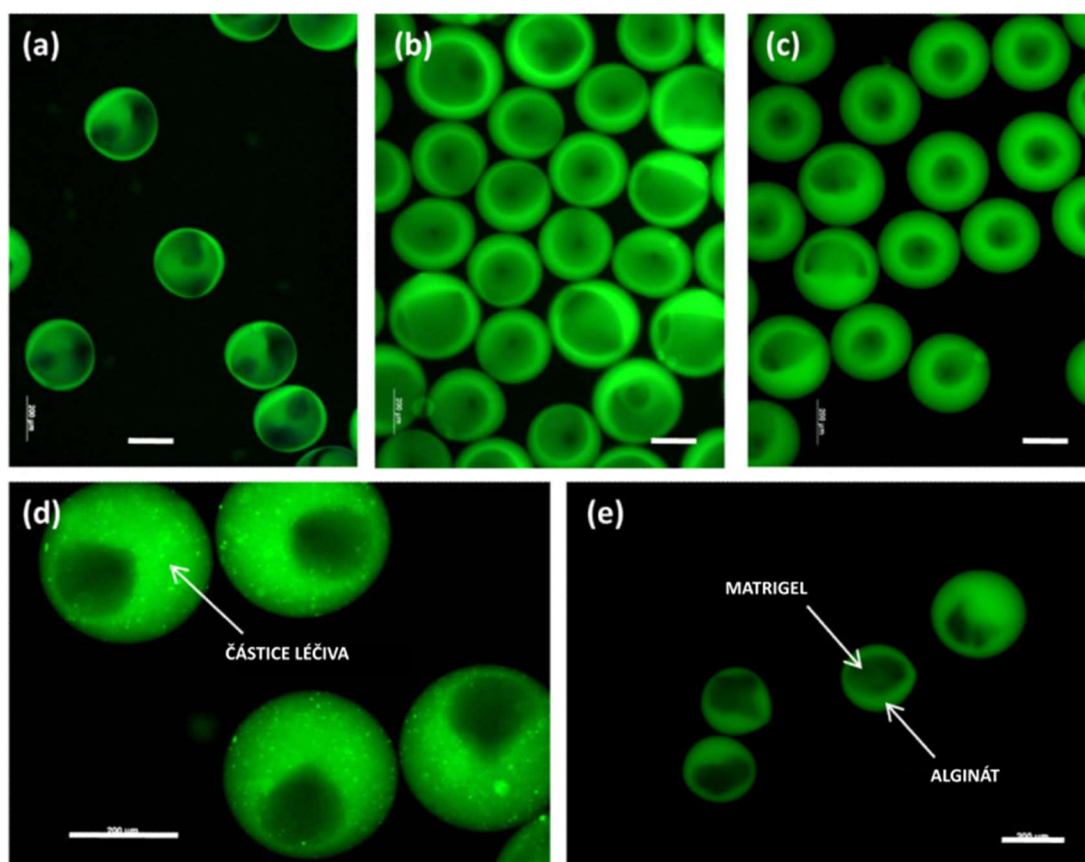


Obr. 28 – a) Obrázek znázorňující princip tvorby bikomponentních sfér modifikovaných ve hmotě. Tyto sféry jsou sprejovány do kapalného kolektoru, tedy metodou wet elektrospreyingu. obrázek převzat [97]. b) Znárodnění a popis možných produktů (sfér-mikročástic) vytvořených pomocí elektrospreingu, obrázek převzat [91].

Enkapsulace umožňuje lokální a řízené uvolňování aktivních látek z materiálu, který plní například roli krytu ran nebo tkáňové náhrady. U elektrosprayingu hraje kapalný kolektor důležitou roli již při zachytávání vytvořených částic, které se mohou v kapalině rozptýlit a udělat roztok. Kapalina zamezí také nežádoucímu spojování vytvořených částic. Do vytvářených částic lze aktivní látky inkorporovat buď

enkapsulací (Core-shell) [96] nebo modifikováním ve hmotě. Tyto způsoby se mohou kombinovat. Popsán je také způsob výroby bikomponentních mikrosfér, které jsou složeny ze dvou spojených materiálů obsahujících aktivní látky [97].

Příkladem funkcionalizace–enkapsulace mikrosfér vytvořených elektrosprayingem je vytvoření enkapsulovaného léčiva, včetně živých buněk v alginátovém hydrogelu (Core-Shell) [94]. Enkapsulace v gelu je vhodná pro použití s živými buňkami, hydrogel umožňuje difúzi kyslíku a živin k zapouzdřeným buňkám, zároveň dokáže uvolňovat léčebné proteiny vylučované buňkami. Hydrogel také chrání inkorporované buňky před interakcí s imunitním systémem. Pokročilé varianty jsou vytvořeny ještě v materiálu obalu (Shell) a mohou obsahovat další aktivní látky, například léčiva. Enkapsulace byla v tomto konkrétním případě testována s protizánětlivými léčivy a buňkami v jádru (Core). Kvalita enkapsulace je velmi důležitá, v případě, že by buňky nebyly zapouzdřeny, imunitní systém napadá celou mikro kapsuly. V případě většího počtu takových defektů hrozí spouštění řetězové reakce antigenní imunitní obrany a tím odmítnutí celé transplantované dávky léčiva či tkáňového nosiče.

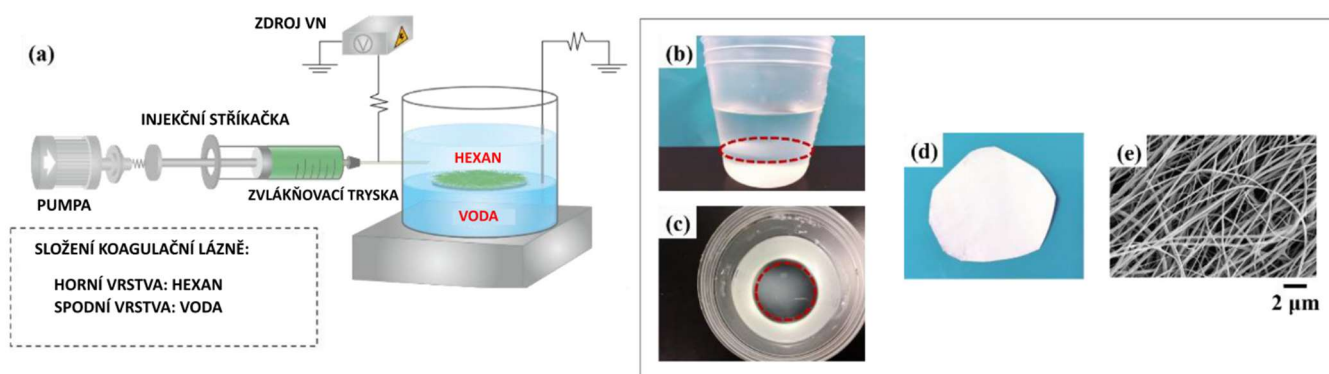


Obr. 29 – Snímky SEM ukazující inkorporaci buněk v hydrogelu pomocí elektrospreingu do obalu z alginátu, jedná se tedy o enkapsulaci buněk do jádra neboli tvorbu bikomponentní mikro-sféry. Takzvaná core-shell struktura chrání inkorporované buňky proti kontaktu s vnějším prostředím. Měřítka je na všech snímcích 200 μm . a,b,c) Snímky ukazují změnu poměru velikosti jádra a obalu změnou dávkovacích rychlostí materiálů. d) Ukázka možnosti další funkcionalizace přidáním léčiva do materiálu mikro-kapsule. e) Snímek popisuje strukturu mikro-kapsule, ve které je obal z alginátového gelu, vnitřní kapsule (core) je matrigel s buněčným materiálem. Obrázek převzat [94].

Zajímavým aspektem wet elektrospinningu, již zmiňovaným výše [79, 80], je jeho schopnost vytvářet lineární nano/mikro vláknité útvary, připomínající příze [7, 65, 78, 98, 99]. Tyto lineární útvary vznikají zvlákněním na vodní hladinu, případně do objemu kapaliny a jsou následně kontinuálně odtahovány

a navíjeny [17, 65, 100]. V případě tohoto typu procesu lze vytvářet orientované či semiorientované vláknenné stužky, které mohou být in-situ modifikovány před dalším zpracováním. Většina materiálů vytvořených wet elektrospinningem je však vyráběna nekontinuálním způsobem.

V nedávné době se také začal objevovat tzv. immersion elektrospinning neboli elektrické zvlákňování v kapalině [101–103], tedy zvlákňování přímo v kolektorové kapalině pomocí vysokého napětí. Jedním ze zajímavých řešení je například dvousložkový kolektor, přičemž se kolektor skládá ze dvou nemísitelných kapalin. Zvlákňovací tryska – jehla je umístěna v blízkosti nebo přímo na rozhraní těchto dvou kapalin. Příkladem je vlákenní CA – acetátu celulózy (Cellulose Acetate) v hexanu jako vláknícím médiu a vlákna se po zformování ukládají na rozhraní hexan-voda [103]. Tento způsob vlákenní přímo v kapalině lze použít i pro vytváření lineárních útvarů kontinuálním způsobem [104].



Obr. 30 – Immersion spinning neboli elektrické zvlákňování v kapalině vytváří vlákna přímo v objemu kapaliny, jehla je tedy přímo v kapalném kolektoru. a) Znárodnění principu tvorby vláknenného materiálu na rozhraní dvou kapalin. b,c) Znárodnění tvaru rozhraní kapalin, kde vzniká materiál, rozhraní kapalin je formující činitel ve tvarování materiálu. d) Vytvořený vláknenný materiál. e) SEM snímek vláknenné struktury vytvořeného materiálu. Obrázek převzat [103].

Je třeba poznamenat, že u wet elektrospinningu jsou snahy o teoretické zkoumání parametrů ovlivňujících noření vláken v tomto oboru spíše výjimkou. Většina výzkumných prací se zaměřuje na empirická testování a hodnocení vlastností materiálů. Některé práce se zabývají dynamickým působením nořících se cylindrických objektů [105]. Některé práce také řeší studium rozhraní při noření kulovitých předmětů [106], případně nejen kulových ale i cylindrických. Závěry jsou velmi teoretické [107, 108]. Přitom právě ovládnutí podmínek samovolného noření vzniklých vláken do kapalinového kolektoru je velmi důležitým krokem k vytvoření optimální vláknenné struktury nejen s ohledem na morfologii, ale i biokompatibilitu. Důležité je to především proto, že noření do kapalného kolektoru umožňuje tvorbu 3D objemných materiálů a správně nastavený proces nemusí používat cytotoxická smáčedla. Naopak v čistém kapalném kolektoru lze snáze provádět další modifikace, například ke zvýšení biokompatibility. Použitá kapalina kapalinového kolektoru je jedním z limitujících faktorů, není zcela žádoucí napomáhat procesu noření materiálu pomocí tenzidů, jež mívají cytotoxický efekt [15, 109], proto je výhodou pokud je noření samovolné nebo případně s mechanickou pomocí [110]. Mechanickou pomocí může být tažné ústrojí, které produkt kapalinou odtahuje a tím smáčí, ale může to být i míchací nebo třepací zařízení. Známé jsou způsoby vytváření lineárních materiálů odtahem materiálu ve vodním víru. Jedno ze stěžejných děl zabývajících se tématem teorie noření objektů do kapaliny bylo dílo autorů Landau – Lifshitz, jenž se tomuto tématu věnovali v roce 1959 [111], další práce je od autora Popova [112]. Tato díla sloužila jako základ pro další teoretické dílo rozvádějící teorii noření [58], tento vědecký článek již byl zaměřený na bližší poznání problematiky noření vláken do kapaliny.

Tabulka 1 – Přehled vybraných materiálů a kolektorů, které jsou popsány jako zpracovatelné metodou wet elektrospinningu.

Zvlákňovaný Polymer	Kolektor a jeho složení	Účel/záměr experimentu	Výsledek/závěr	Zdroj
PCL 10 hm% v 4/1 MC/DMF	DMEM médium	Tkáňový nosič	Při dynamickém osazení přímo v kolektoru vykazuje uniformní osazení buňkami a výtečnou aktivitu i po delších časech 7-14dní	[77]
PCL	95% ETH , 5mg/ml Dopamin, NaOH,	Tkáňový nosič	3D struktura, vlákna stužkují, hMSC se diferenciují, není cytotoxický	[67]
PCL 17 hm% v 20/80 MC/DMF	ETH (In-flow – hydrodynamický kolektor)	Tkáňový nosič	Změnou hladiny výšky kolektoru lze ovlivnit strukturu a rozměr materiálu	[68]
PCL/alginát 10 hm% / 5% hm v 20/80 MC/DMF	ETH	Tkáňový nosič tvrdých tkání	Biologicky vhodný, dobrá proliferace a migrace, mnohastupňový proces	[69]
PCL/Colagen 1/1 10 hm% v HFIP (1,1,1,3,3,3,-hexafluoro-2-Propanol)	Ethanol + AgNP	Antibakteriální kryt ran	Porézní antibakteriální materiál, který není cytotoxický	[80]
PCL, želatina 7/3 15 hm% v 9/1obj kysel. Octová/ kysel. Mravenčí	Ethanol	Tkáňový nosič	Změnou intenzity magnetického pole se mění porozita a morfologie tkáňového nosiče, materiál vhodný pro TI	[99]
PCL/SF/PANI Hexaflorisopropanol, 10-kyselina gáforfónová	Voda/Ethanol 8/2 hm	Tkáňový nosič pro dlouhá svalová vlákna	Prokázána dobrá biokompatibilita, růst dlouhých buněk	[80]
PA6 15 hm% v FA PA6 15 hm% v FA/DCM	Voda	Testování vlivu surfaktantu na morfologii a vlastnosti materiálu se zaměřením na výrobu	Přidáváním surfaktantu do zvlákňovaného materiálu lze ovlivnit některé parametry (průměr vláken, smáčivost, velikost pórů), experiment nebyl zaměřen na	[113]
PLGA/TFE 3/1 0,12g/ml v 2,2,2-trifluorethanol	ETH	Tkáňový nosič tvrdých tkání	Vytvořena rozsáhlá kostní tkáň	[71]
PLLA/Si-PVH TFE 7/3 6,5 hm% v chloroformu	ETH	Tkáňový nosič tvrdých tkání	Bioaktivní materiál	[72]
PLGA 20 hm/obj% v 60/40 Aceton/DMF	Voda	Tkáňový nosič pro šlachy nebo vyzy	Prokázána dobrá biokompatibilita, růst dlouhých buněk	[79]
PU 15 hm% v DMF s přísadkou tetrabutyl titanate	Voda + kyselina chlorovodíková	Antibakteriální kryt ran	Prodyšná membrána s antibakteriálními účinky	[114]
PVA/MA1/1 9.1%hm ve vodě, PVA/MA1/1 + 50 mg chitosan	Ethanol	Tkáňový nosič	Prokázání výhody přidání chitosanu to nosiče, lepší biokompatibilita	[115]

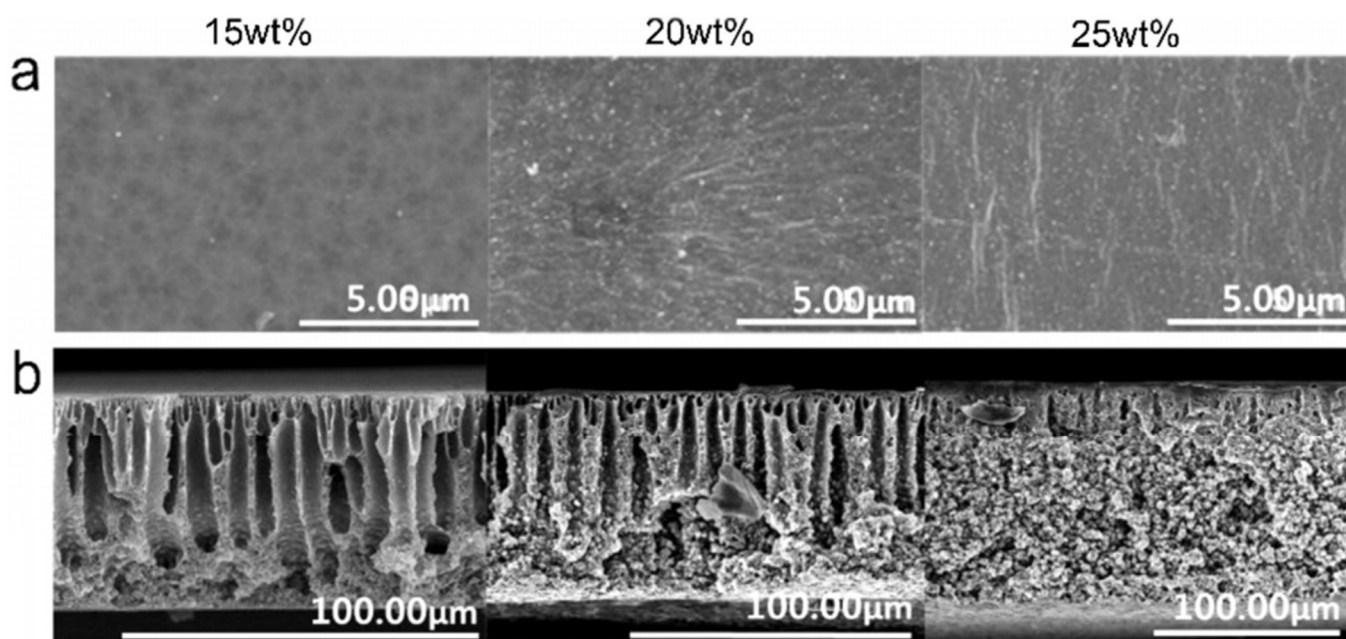
PGA 90mg/ml Hexafluoropropan-2-ol	1. – H ₂ O 2. – 50% Terc-butylalkohol 3. – 99% Terc-butylalkohol	Průmyslové použití	Porozita až 97%	[64]
PEO 5 hm% ve vodě	Draselný silicagel	Nespecifické materiálové použití jako kompozitu	Vytvoření kompozitního materiálu se škálovatelnými rozměry	[89]
PVDF 12 hm% v 1/4 Aceton/DMF	Ethanol/voda 5/1	Technické použití v elektronice	Vytvoření vlákenného separátoru pro super kondenzátor	[90]
PVDF 10 hm% v DMF	1.3 hm% Poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) poly (styrene sulfonate) (PEDOT: PSS) ve vodě	Technické použití v elektronice	Vytvoření piezoelektrického vlákenného materiálu	[61]
Celulóza 1,55 hm% v IL	Voda + Mg(OH) ₂ + Orbitální třepačka	Technické použití, medicína	Prokázání možnosti tvorby vlákenného materiálu a in-situ modifikace v lázni	[87]
HAMS 12 hm/obj% v DMSO	Ethanol (100%. 80%.60% s vodou)	Testování morfologie při navíhnutí na WET rotující kolektor	Schopnost ovlivnění morfologie vlákenného materiálu dle rychlosti otáčení a stupně zanoření rotujícího kolektoru	[78]

V oblasti elektrického zvláknování s kapalným kolektorem (WET ES), stejně tak jako u elektrického zvláknování, je stále mnoho potenciálu pro výzkum a vývoj, tak jak dokazují narůstající počty odborných textů v tomto oboru viz obrázek (*Obr. 14*).

2.3 Nanotopografické alterace

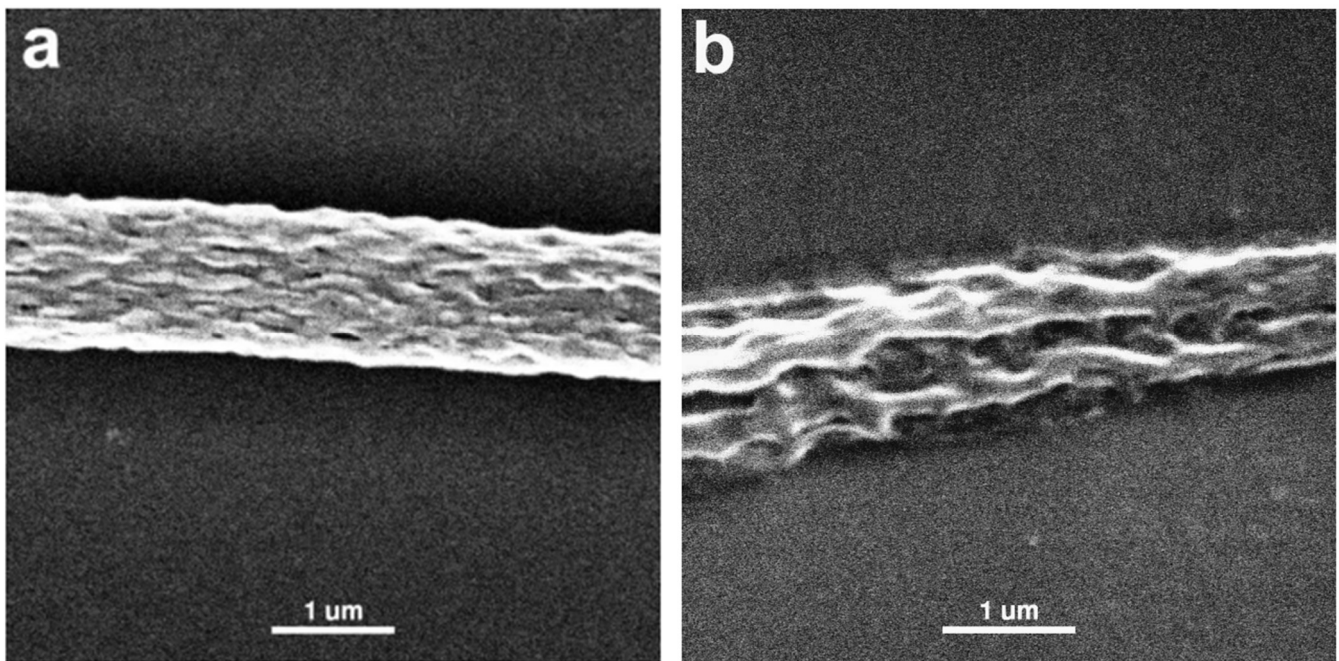
Wet elektrospinning nabízí nejenom výše zmíněné možnosti in-situ modifikací. Při vláknění do kapaliny je možné ovlivnit i nanotopografii povrchu materiálu vláken. Za tímto jevem stojí zejména oddělování fází rozpouštědel polymerního roztoku a mísení rozpouštědel/nerozpouštědel v kolektoru. Z teoretického pohledu procesu fázové separace lze jev rozdělit na několik druhů, tzv TIPS, NIPS a VIPS. Tepelně vyvolaná fázová separace – TIPS (thermally induced phase separation), fázovou separaci vyvolanou nerozpouštědlem NIPS (non solvent induced phase separation) a fázovou separaci vyvolanou odpařováním – VIPS (vapor-induced phase separation) [116–118]. Příklad použití metody TIPS je zvláknění polymerního roztoku, u něhož klesne teplota pod bod tání rozpouštědla. Rozpouštědlo přechází v oblastech s menší koncentrací polymeru do pevné fáze, tak vytváří dutiny a tím modifikuje morfologicky materiál, mohou vznikat póry, dutiny nebo strukturovaný povrch. U metody NIPS dochází k interakci rozpouštědla a nerozpouštědla (například v kapalném kolektoru při koagulaci) a rozpouštědlo je naředěno nebo nahrazeno nerozpouštědlem. Tímto vznikají dutiny, póry a jiné morfologické změny v materiálu.

Princip VIPS je v rychlém odpaření rozpouštědla (změna skupenství z kapaliny na plyn) z formovaného vláknenného materiálu za vzniku dutin a pórů. Pakliže dochází k rychlému odparu a současně se obvod vlákna již nezmenšuje, makromolekuly polymeru v objemu materiálu formují oblasti s nižší koncentrací, kde dojde k vytvoření dutiny po kapalném rozpouštědle. Experimenty s porózitou vytvořenou v kapalném kolektoru prokázaly, že vláknění PLLA v roztoku s chloroformem bylo zvlákněním do vodného kolektoru a vznikly porézní struktury [119]. Dalším příkladem je vláknění roztoku polystyrenu v roztoku s tetrahydrofuranem na pevný kolektor, za vzniku porézních vláken [118, 120]. Při určité kombinaci rozpouštědla a kolektorové lázně lze dosáhnout i vláken s neporézním povrchem, ale vnitřní porózitou (malými dutinami) a nebo jednou větší dutinou uprostřed vytvořeného vlákna [121].



Obr. 31 – Ukázka nanotopografické alterace materiálu pomocí fázové separace NIPS a TIPS, zleva doprava je vidět změna morfologie způsobená změnou koncentrace polymeru (15 hm% - 25 hm%). a) Snímek povrchu membrány. b) Snímek řezu membránou. Obrázek převzat [118].

Při vhodných podmínkách mohou být tedy vlákna v materiálech pro tkáňové inženýrství upravena tak, aby jejich povrch či vnitřní porozita přinášely další přidané užité vlastnosti. Takovéto modifikace mohou ovlivnit přichycení a migraci buněk, biodegradabilitu, hydrofilu, hydroskopičnost nebo mohou umožnit ve svých pórech uchování aktivních látek. Alterací povrchu či celé hmoty vlákna lze také dosáhnout vymývání jedné ze složek materiálu vlákna. Vláknenný materiál se například zvlákní ve směsi (tzv. blendu) dvou materiálů a jeden se následně v post procesu vymyje, výsledek vymývání PVP/PLLA (Polyvinylpyrrolidon/ Poly(L-lactid)) lze vidět na obrázku (Obr. 32). Při dobře zvolených parametrech procesu zvláknování do kapaliny lze vytvořit nejenom porézní, ale i dutá vlákna, tento efekt lze kombinovat a vytvořit tak dutá vlákna s porézní stěnou [122].



Obr. 32 – Ukázka nanotopografické alterace vlákna pomocí vymývání jedné ze složek polymerního blendu. Na obrázku je PLLA vlákno po vymytí PVP složky z blendu PVP/PLLA. Proces je zpravidla vícestupňový. Obrázek převzat [123].

2.4 Hlavní parametry elektrického zvlákňování

Materiálové parametry jsou popsány v předchozích kapitolách i se souhrnem parametrů v tabulce (Tabulka 1). Hlavními parametry procesu vlákňování jsou hodnoty nastavení a podmínek, které je obecně třeba charakterizovat a popsat pro zopakování tohoto procesu. Parametry se dají rozdělit do tří kategorií, procesní parametry, parametry prostředí a parametry zvlákňované polymerní kapaliny (polymerního roztoku či taveniny).

Do procesních parametrů patří elektrické napětí, což je rozdíl potenciálu mezi jednotlivým póly zdroje napětí. Obecně se pro elektrické zvlákňování pohybuje v rozmezí 10 až několika desítek kV [8, 124]. Pokud je napětí příliš nízké, nedojde k nabuzení nadkritické hodnoty intenzity elektrického pole. Obecně se uvádí, že se zvyšujícím napětím se zvyšuje i působící síla při vlákňování a dochází k většímu dlužení vláken, a tedy zmenšování průměru vláken. Při vyšším napětí se mohou začít vyskytovat poruchy v tvorbě trysek a poruchy ve výsledném materiálu. Dalším důležitým parametrem je vzdálenost trysky od kolektoru, tato vzdálenost se standardně pohybuje v rozmezí od 5 cm do několika desítek centimetrů [124, 125]. Tato vzdálenost má vliv zejména na odpaření rozpouštědla z formujících se vláken a jejich dlužení. Pokud bude vzdálenost trysky od kolektoru malá, bude menší i čas po který se budou vlákna formovat a dlužit než dopadnou na kolektor [126]. Vlákno bude také dopadat na kolektor více nasycené rozpouštědlem, protože během fáze bičování se při dlužení také intenzivně odpařuje rozpouštědlo. To může ovlivnit nejenom průměr vláken ale i výslednou strukturu. Vlákna se mohou v extrémním případě na kolektoru i slévat, protože vlivem velkého množství rozpouštědla nejsou ještě dostatečně pevná. Dalším procesním parametrem je objemová rychlost dávkování polymeru do trysky. Tento parametr ovlivňuje množství vytvořeného materiálu, ale může ovlivnit i průměr výsledných vláken. Při stejné rychlosti tvorby vlákna a stejném počtu trysek je výsledkem vyšší hmotnost na délku zformovaného vlákna.

Parametry prostředí jsou vlhkost atmosféry, zpravidla udávaná relativní vlhkostí, a teplota. Ve speciálních případech se může jednat o nasycenost atmosféry parami jiných látek nebo plynem. Obecně se vlhkost atmosféry může projevit na porozitě vlákna nebo na rychlosti a kvalitě odparu rozpouštědla z formujícího se vlákna. Teplota zpravidla může ovlivnit rychlost odparu rozpouštědla a viskozitu roztoku polymeru.

Parametry roztoku jsou zejména: Koncentrace polymeru v roztoku, čímž je ovlivněna viskozita. Viskozita má velký vliv na kvalitu produkovaných vláken, příliš viskózní polymer bude nesnadné zvláknit a málo viskózní se bude rozpadat a nebude formovat vlákenný produkt. Povrchové napětí roztoku udává sílu, kterou musí elektrický potenciál překonat tak, aby zformoval trysku a došlo k úspěšnému zvláknění. Molekulová hmotnost má vztah zejména k viskozitě, čím delší je polymerní řetězec, tím bude roztok viskóznější. Provázání dlouhých makro molekulových řetězců ovlivňuje proces, ale i přes složitější zpracování takových roztoků a jejich zvýšenou viskozitu jsou zpravidla voleny vyšší molekulové hmotnosti polymerů. Více provázané řetězce zvyšují uniformitu vláken, snižují pravděpodobnost výskytu defektů. Poslední parametrem roztoku je elektrická vodivost, pokud by byl roztok s malou elektrickou vodivostí, jeho vláknění by bylo náročnější a vzhledem k nižší koncentraci náboje jsou výsledná vlákna zpravidla méně dlouhá a mají větší průměr [126].

3 Cíle disertační práce

Tato disertační práce má následující hlavní čtyři cíle:

- Propojit teoretické poznatky a pokusit se zdokonalit teorii poznání o nošení vláknenných objektů – vláken do kapaliny reprezentované kapalným kolektorem ve zjednodušeném modelu a pokusem o následné experimentální ověření.
- Navrhnout, sestavit a optimalizovat relativně jednoduché přenosné experimentální laboratorní zařízení pro elektrické zvlákňování do kapaliny s možností výroby vzorků pro následné medicínské aplikace a to zejména s ohledem na volbu materiálů a uspořádání jednotlivých částí.
- Otestování parametrů výroby a vyrobení speciálních vláknenných struktur se zaměřením na medicínské aplikace (scaffoldy s požadovanou 3D strukturou pro tkáňové inženýrství, například pro regeneraci kostí či chrupavek). Avšak tato práce se nezaměřuje na konkrétní medicínskou aplikaci. Tato část práce vytvořila po ovládnutí procesu elektrického zvlákňování do kapaliny odhalit možnosti „přidané hodnoty“ této technologie a to možnost ovlivňovat výsledné vláknenné materiály pomocí volby kapaliny či směsí kapalin kolektoru.
- Základní porovnání biologických vlastností (cytotoxicity a viabilita) materiálů vyrobených pomocí elektrického zvlákňování do kapaliny s materiály vyrobenými jinými procesy.

4 Teoretický matematický model

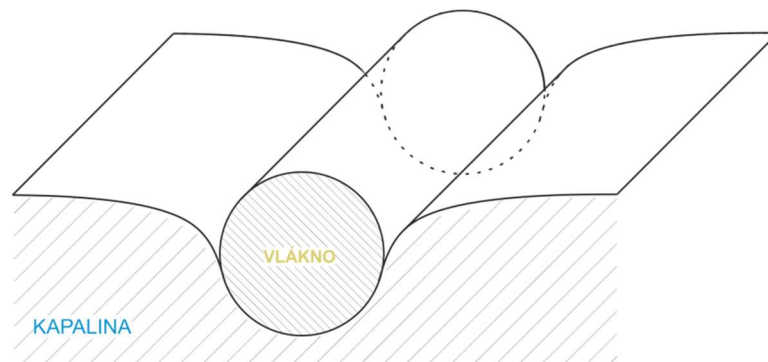
Tato kapitola je zaměřena na popis teoretického modelu, zaměřeného na obecné porozumění principům noření vláken do kapaliny, tedy určení hlavních činitelů a vztahu mezi parametry (průměr vlákna, kontaktní úhel). Velmi důležitým výstupem je interpretace vztahů hlavních parametrů k silám působícím na rozhraní kapaliny a vlákna. Grafické interpretace umožňují relativně snadný přehled o vztahu sledovaných parametrů a vizuální zobrazení oblastí parametrů, jež indikují spontánní noření cylindrických těles do kapaliny.

Při elektrickém zvlákňování do kapaliny je zpravidla žádoucí, aby se zvlákňovaný materiál vnořil do objemu kapaliny. Mnohdy není možné tomuto procesu napomoci mechanicky, například nuceným odtahem materiálu, vodním vírem nebo mícháním. V takovém případě se musí snížit povrchové napětí kapaliny, respektive musí dojít ke snížení povrchové energie vláken tak, aby síla povrchového napětí nepůsobila proti vláknu, případně, aby tuto sílu překonala síla gravitační. Vzhledem k relativně velkému povrchovému napětí některých kapalin (např. destilovaná voda má povrchové napětí γ při 20°C hodnotu 72,75 [10⁻³ N/m] [127] a velmi malé lineární hmotnosti ultra jemných vláken (průměry v řádech mikrometrů až desítek nanometrů) je síla vyvolaná tíhou vlákna velmi malá a nepřispívá k noření vláken. V takových případech je zpravidla nutné upravit fyzikálně – chemické parametry kapaliny – povrchové napětí a tím snížit povrchovou energii vlákna v kolektorovém systému. Bez této úpravy parametrů nedojde k žádoucímu noření vlákenného materiálu do kapaliny. Obdobná situace nastává i při noření vlákenných materiálů. V obou případech se jev odehrává s vlákny pouze do určitých rozměrů, od jisté meze pak dominuje síla tíhová a ovlivňování povrchové energie postrádá význam. Tento rozměr je zhruba roven kapilární délce. Teoretické zvládnutí problému může pomoci při konkrétních metodách zvlákňování na hladinu kapaliny či do objemu kapaliny. Toto se netýká pouze elektrického zvlákňování, ale v podstatě všech obdobných metod pracujících s vlákny, jejichž charakteristické rozměry jsou menší, než je kapilární délka dané kapaliny. Tato část je rozpracováním teoretické části článku „Study of Polycaprolactone Wet Electrospinning Process“ [58], ve které je základní popis geometrie, a základ matematického řešení sil vztlakových a tíhových.

Řešení tohoto problému vychází zejména z prací: Popov [112], který v knize řeší kapilární síly a uvádí příklad výpočtu maximální síly, kterou může systém na hladině unést. Dále pak téma práce autorů Landau – Lifshitz [111, 128], kde je popisováno chování hladiny kapaliny na rozhraní kapalina/pevná látka/plyn. Podobným problémem se zabýval James [129] v práci „The meniscus on the outside of a small circular cylinder“ dále toto řešení zkoumala Lilian [130] v článku „The meniscus on needle - a lesson in matching“, poslední zmiňované teoretické články však řeší pouze vertikálně nořené cylindry/jehly.

4.1 Podmínky

Pro řešení problému noření vláken do kapaliny je nutné vytvořit jednoduchý model (*Obr. 33*). Je elektrického zvlákňování do kapaliny bude studován na zjednodušeném modelu jediného vlákna ve formě dokonalého válce, jenž je vložen vodorovně na hladinu kapaliny. Osa válce je tedy rovnoběžná s hladinou kapaliny. Tento model neuvažuje soustavu více vláken a případné morfologické a fyzikálně-chemické nedokonalosti. Obecně platný předpoklad je, že vlákna ve fázi bičování mají vysokou rychlost a dloužením se rychlost ještě zvyšuje. Vlákna dopadají horizontálně na kolektor, vlákna mohou mít v pozdní fázi bičování takzvanou pod fázi vytváření sekundárního bičování vytvářejícího spirálovitý tvar vlákna na horizontálních rovinách, stále však většina délky vlákna dopadá v horizontálním položení nebo jemu blízkých úhlech [131, 132]. Toto platí i v případě kapalných kolektorů.



Obr. 33 – Model vlákna v podobě dokonalého válce na hladině kapaliny. Jeho délku považujeme za nekonečnou, takže vliv kapilární síly na rozdílné zakřivení na koncích cylindru není brán v potaz.

Vliv na proces smáčení může také mít i elektrický náboj vlákna způsobující elektrokapilární jev [133, 134]. V neposlední řadě bude proces noření vlákna ovlivňovat přítomnost zbytkového rozpouštědla ve vlákne a jeho interakce s kapalinou, která tvoří tento kapalný kolektor. Tyto jevy nejsou v modelu zohledněny, model je značně zjednodušen a oprostěn od dalších proměnných faktorů. Složitost modelu v případě zahrnutí těchto jevů by byla značná, cílem modelu je popsání pouze hlavních vztahů pro pochopení studovaného fenoménu.

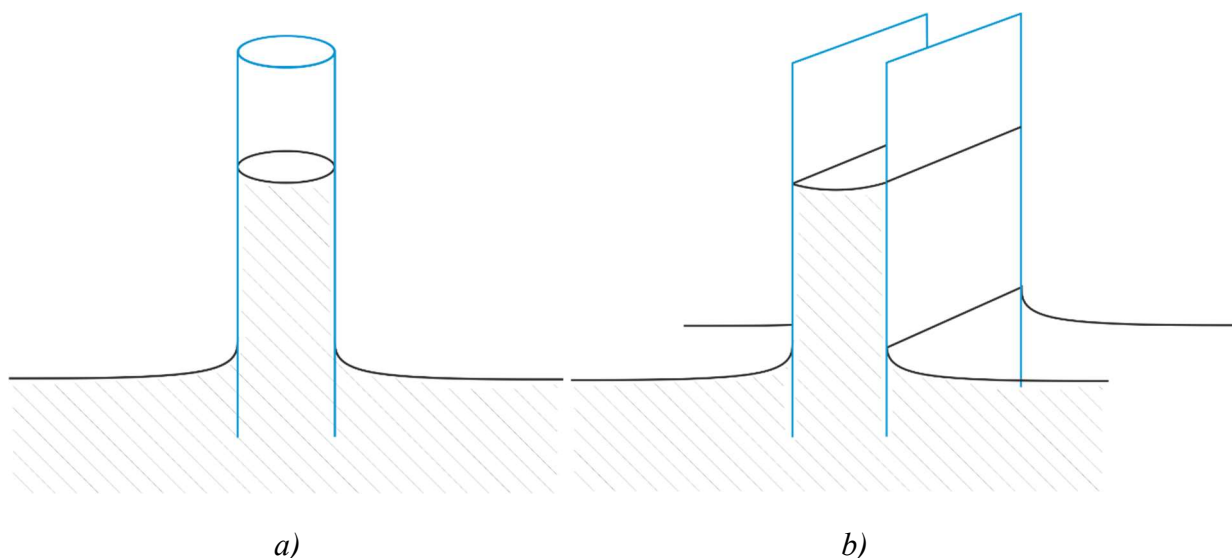
Charakteristický rozměr studovaného tělesa, tedy průměr nanovlákna, je menší, než je kapilární délka kapaliny, viz vztah (Vzorec 1). V případě, že průměr vlákna poruší tuto podmínku stanovenou vzorcem (Vzorec 1), budou zakřivené části kapaliny příliš velké, mimo rozsah působení kapilární délky a nebudou platit matematická odvození zde provedená. Předpokládá se tedy, že platí podmínka, že průměr vlákna d je menší, než kapilární délka a pro danou kapalinu.

$$d < a$$

(Vzorec 1)

4.2 Stanovení kapilární délky

Kapilární délka značí konkrétní hodnotu charakteristického rozměru vzdálenosti, do této hodnoty převládají kapilární jevy nad hydrostatickými. Po překročení této hodnoty začne být naopak vliv gravitace dominantní. Dva modely, ze kterých se kapilární délka odvozuje, jsou zobrazeny na obrázku (Obr. 34). Jeden model platí pro kapiláry, tedy kulové tvary kapalinových vrchlíků. Druhý model je působení kapilárních sil mezi plochami.



Obr. 34 – Znárodnění modelu sloužícího k odvození kapilární délky. a) Základní model kapilární délky, kde vzlíná kapalina v kapiláře. b) Kapilární model plošný, kde vzlíná kapalina mezi dvěma plochami.

Kapilární délka a pro kapiláry (Obr. 34 a) je definována vztahem [135]

$$a = \sqrt{\frac{2\gamma}{\rho g}},$$

(Vzorec 2)

kde je γ povrchové napětí rozhraní kapalina-plyn a ve jmenovateli je součin hustoty kapaliny ρ a gravitačního zrychlení g . Tento vztah byl odvozen porovnáním Laplaceova vztahu pro tlak ($p = \frac{\gamma}{a}$ pro lineární vrchlíky, $p = \frac{2\gamma}{a}$ pro vrchlíky kulového tvaru) a vztahu pro hydrostatický tlak ($p = \rho gh$), kde p je tlak v bodě, který je umístěn ve vzdálenosti a v objemu kapaliny. Porovnáním těchto tlaků vyjádříme hodnotu vzdálenosti tohoto bodu – kapilární délky a . Kapilární délka pro lineární vrchlíky (Obr. 34 b) je definována jako

$$a = \sqrt{\frac{\gamma}{\rho g}}.$$

(Vzorec 3)

V tabulce (

Tabulka 2) jsou uvedeny vypočítané hodnoty kapilární délky pro různé kapaliny při teplotě 20°C. Výpočet je proveden podle obou výše uvedených vztahů, podle *vztahu (Vzorec 2)*, ale i podle *vztahu (Vzorec 3)*. Pro potřeby tohoto odvozování bude kapilární délka vyjádřena vztahem dle *(Vzorec 2)*, výběr je založen v návaznosti postupy v předchozích dílech, které tato práce rozpracovává a navazuje na ně [58, 111, 112, 128].

Tabulka 2 – – Hodnoty kapilární délky pro vybrané kapaliny jsou vypočítány podle vztahu (Vzorec 2) i dle vztahu (Vzorec 3) při teplotě kapaliny 20°C [136]. Tyto kapaliny byly vybrány jako vzorek kapalin, které se relativně běžně používají při zvláknování do kapaliny, ať už jako rozpouštědlo, nebo jako kolektor.

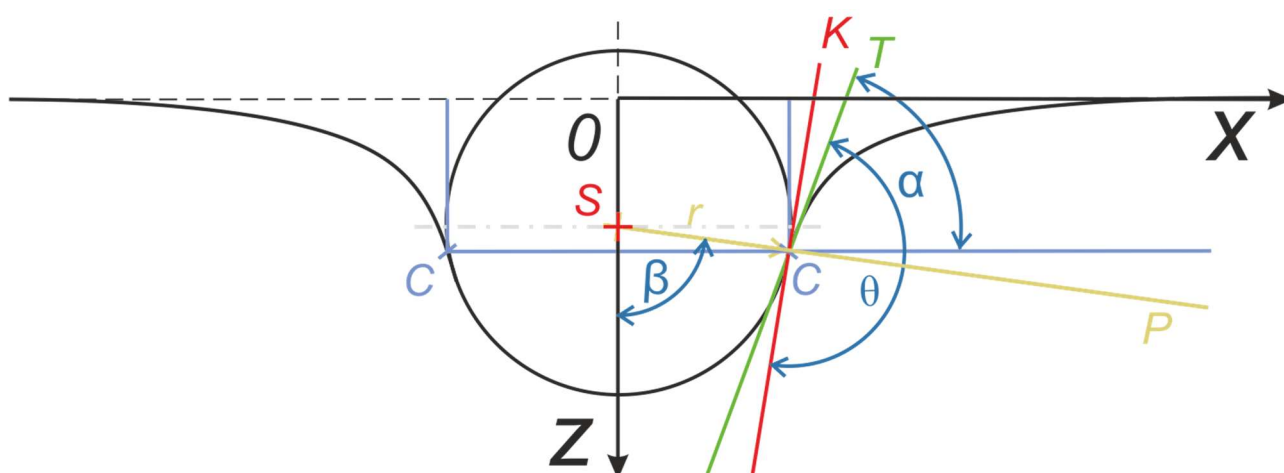
	Υ [N/m]	ρ [kg/m ³]	g [m/s ²]	a [mm] (Vzorec 2)	a [mm] (Vzorec 3)
Voda	0,07275	999,97	9,81	3,850	2,723
DMF	0,03642	948,00	9,81	2,798	1,979
DMSO	0,0429	1100,00	9,81	2,819	1,993
Etanol	0,02255	789,00	9,81	2,413	1,707

4.3 Analýza interakce vlákna s kapalinou

Nejprve je třeba se zabývat základními geometrickými charakteristikami, které popisují interakci vlákna s kapalinou. Pro definování základních geometrických charakteristik je vláknem a kapalinou proveden příčný řez, na kterém jsou popsány všechny potřebné parametry, které jsou potřeba k popisu modelu. Dále je třeba popsat na řezu působení sil ve studovaném systému a následně výchylku hladiny kapaliny.

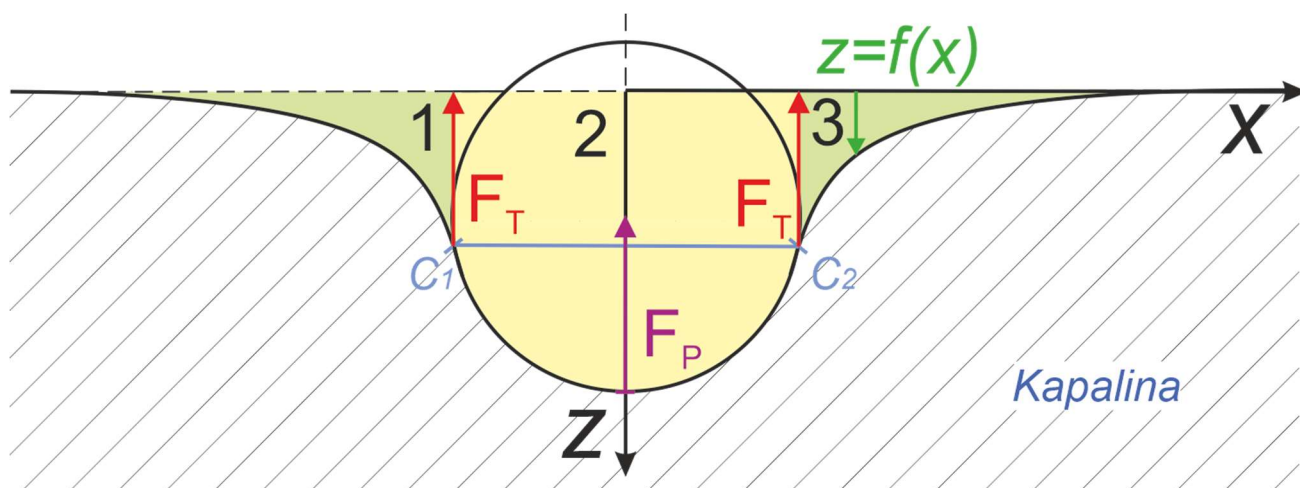
4.3.1 Popis základních parametrů a geometrie problému

Celková vztlaková síla F_L působící na částečně ponořený válec se skládá ze dvou komponent. První komponenta působí proti noření vlákna. Je složena ze dvou sil, silou F_T způsobenou zakřivením povrchu kapaliny vyvolaným povrchovým napětím a silou vztlakovou F_P . Druhá komponenta je síla F_G vyvolaná tíhou vlákna viz obrázek (Obr. 36) [137], tato síla působí proti první komponentě. Základní geometrie modelu se odvíjí od trojných kontaktních bodů C , které jsou v místě dotyku vzduchu, kapaliny a vlákna, viz obrázek (Obr. 35). V tomto kontaktním bodě je znázorněna také tečna k povrchu kapaliny T . Funkce $z(x)$ popisuje výchylku kapaliny v závislosti na pozici podél osy x . Kontaktním bodem prochází také tečna K k povrchu vlákna. Tento povrch se na kolmém řezu jeví jako kružnice. Úhel β je sevřen vertikální osou z a tzv. kontaktní přímkou P spojující střed vlákna S a kontaktní bod C . Tento úhel β nabývá teoreticky hodnoty $(0, \pi)$. Úhel θ je sevřený tečnou K a T a má význam úhlu smáčení. Úhel α je sevřen tečnou T a horizontální přímkou P procházející kontaktním bodem C .



Obr. 35 – Znázornění hlavních geometrických charakteristik definujících zjednodušený model cylindrického vlákna nořícího se do kapaliny.

Vlákno je v řezu znázorněné kružnicí s poloměrem r . Nořící se vlákno deformuje hladinu kapaliny a stlačuje ji směrem dolů podél osy z v případě že úhel smáčení ve větší než $\pi/2$. Tuto deformaci vytváří snaha vlákna se ponořit a povrchové napětí kapaliny. Orientace osy je zvolena tak, že nabývá směrem nahoru záporných hodnot a směrem dolů hodnot kladných. Nořením vlákna vzniká v řezu kapaliny výchylka $z(x)$ od nulové hodnoty osy z . Kapalina vytlačená vláknem a zakřivení povrchu kapaliny se dá rozdělit do oblastí 1, 2 a 3 viz obrázek (Obr. 36). Vertikální komponenta síly F_T je rovna vertikální složce povrchového napětí γ násobeného celkovou délkou vlákna. Tato komponenta síly odpovídá Archimedovu vztlaku oblastí 1 a 3. Druhá vertikální síla F_P je úměrná hmotnosti kapaliny vytlačené nořením vlákna z oblasti 2 [137].



Obr. 36 – Znázornění jednotlivých oblastí 1, 2 a 3. Oblast 1 a 3 je ohraničena hladinou $z = f(x)$ a vertikálou vedenou z kontaktních bodů C . Oblast 2 je odspodu ohraničena valem, z boků opět vertikálou z kontaktních bodů C . Působení vertikálních složek sil povrchového napětí je značeno F_T . Vztlaková síla je označena F_P .

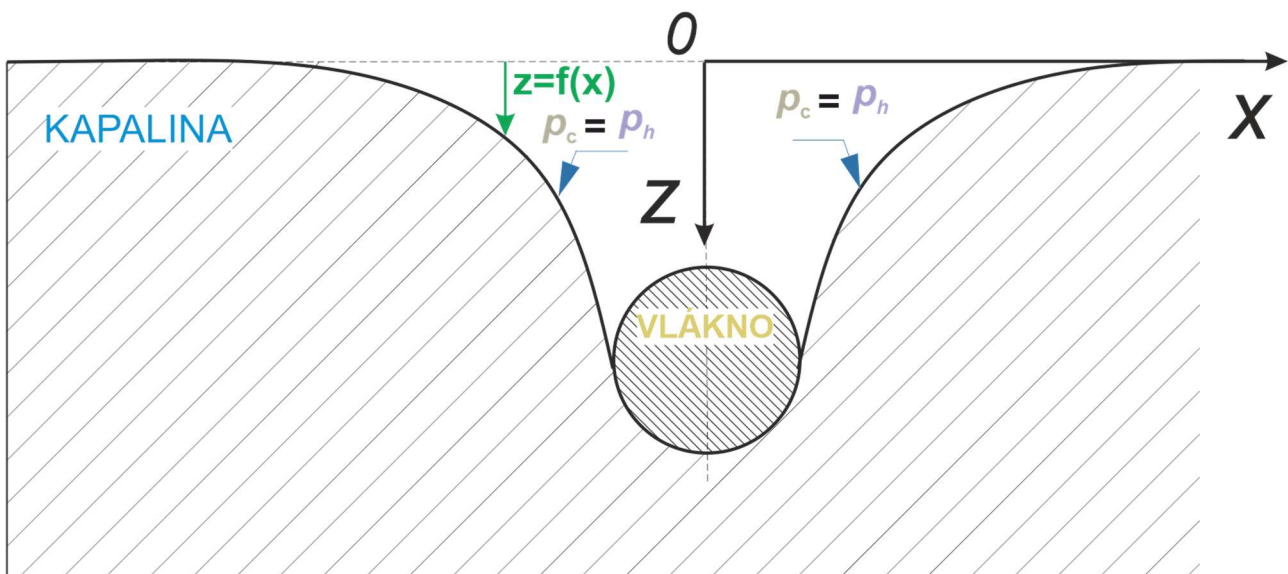
4.3.2 Rovnice rovnováhy povrchu kapaliny

Pro rovnovážný stav každého elementárního úseku zakřivené hladiny z kapaliny platí

$$P_h = P_c.$$

(Vzorec 4)

Kde P_h je tlak hydrostatický a P_c značí kapilární tlak v důsledku zakřivení hladiny kapaliny. Tyto dva tlaky působí proti sobě na každém elementárním úseku zakřiveného povrchu kapaliny tak, že v rovnováze jsou si rovny viz obrázek (Obr. 37).



Obr. 37 – Znázornění vlákna nořícího se do kapaliny. Rovnovážný stav nastane, když $P_h = P_c$. Orientace hodnot na ose z je opačná, kladné hodnoty směřují dolů, záporné hodnoty směřují nahoru.

Nulová hodnota osy z je zvolena na úrovni neporušené (nedeformované) hladiny kapaliny. Pro hydrostatický tlak platí $P_h = \rho g z$, kde z je výchylka hladiny kapaliny ve vertikálním směru, viz obrázek (Obr. 37). Pro kapilární tlak platí Laplaceova-Youngova rovnice $p_c = \gamma(k_1 + k_2)$, kde k_1 a k_2 jsou hlavní křivosti. Vzhledem k absenci zakřivení kapaliny ve směru paralelním s osou vlákna je kapilární tlak vyvolán pouze jednou nenulovou hlavní křivostí k_1 . Rovnovážný stav lze tedy vyjádřit následovně

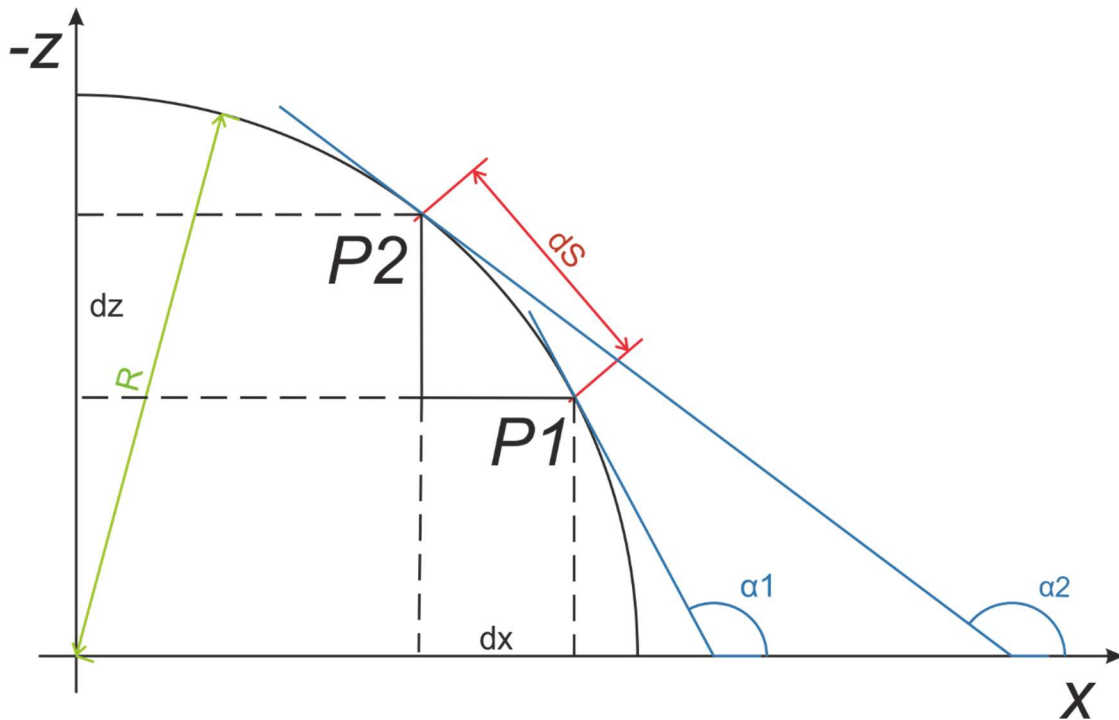
$$\rho g z = \gamma k_1.$$

(Vzorec 5)

4.3.3 Odvození křivosti

Pro další úpravu rovnice (Vzorec 5) je nahrazena křivost k výrazem $k = \frac{z''}{[1+(z')^2]^{3/2}}$, kde z' , z'' jsou první

a druhá derivace výchylky hladiny kapaliny vzhledem k souřadnici x . Tento vztah pro křivost je odvozen z relace $k_1 = \frac{1}{R}$ kde R je poloměr oskulační kružnice. Tato kružnice definuje křivost křivky v 2D prostoru, křivka zadaná jako funkce oskulační kružnice tedy má v okolí daného bodu stejnou tečnu (a hodnotu první derivace). Oskulační kružnice k dané křivce v okolí zvoleného bodu těsně přiléhá (tedy mají shodnou hodnotu druhé derivace). Křivost křivky lze také vyjádřit jako $k = \frac{d\alpha}{ds}$. Znázornění křivosti kružnice je na obrázku (Obr. 38), kde jsou zobrazeny body P1 a P2. Tyto body na kružnici ohraničují úsek ds . Každý úsek kružnice má v bodech P1 a P2 tečnu, jež svírají vzhledem k ose x úhly α_1 a α_2 . Rozdíl obou úhlů je $d\alpha$. Právě podíl $d\alpha$ a ds je pro malé úseky na kružnici roven $\frac{1}{R}$ tedy $k = \frac{1}{R} = \frac{d\alpha}{ds}$.



Obr. 38 – Znárodnění křivosti k na kružnici, $k_1 = \frac{1}{R} = \frac{d\alpha}{ds}$ kde $d\alpha$ je rozdíl úhlů α_2 a α_1 a ds je vzdálenost mezi body $P1$ a $P2$.

Pro další úpravy je zapsáno $\frac{d\alpha}{ds}$ jako hodnoty derivace podle x takto $\frac{d\alpha}{ds} = \frac{d\alpha}{dx} \frac{dx}{ds} = \frac{d\alpha}{dx} / \frac{ds}{dx}$. Nejprve je vyjádřeno $\frac{ds}{dx}$, k tomu je element ds představen jako trojúhelník se stranami dx , dz a ds . Element ds může být z křivky kružnice vyjádřen jako přepona pravoúhlého trojúhelníka za předpokladu, že ds je tak nepatrně malý, že jej lze za úsečku považovat. Tato podmínka je zde splněna. Tento trojúhelník je zobrazen na obrázku (Obr. 38). K vyjádření $\frac{ds}{dx}$ je použita Pythagorova věta, $ds^2 = dx^2 + dz^2$. Dělením pravé i levé strany tohoto vztahu dx^2 je dosaženo vztahu $\left(\frac{ds}{dx}\right)^2 = 1 + \left(\frac{dz}{dx}\right)^2$. Po odmocnění vztahu je

$$\frac{ds}{dx} = \sqrt{1 + \left(\frac{dz}{dx}\right)^2}.$$

(Vzorec 6)

Dále bude pro zjednodušení $\frac{dz}{dx}$ značeno jako z' , a předchozí vztah zapsán jako $\frac{ds}{dx} = [1 + (z')^2]^{1/2}$.

K vyjádření derivace $\frac{d\alpha}{dx}$ je použit podle definice goniometrické funkce tangens, $\frac{dz}{dx} = \tan \alpha$. Dále je vyjádřen $\frac{d\alpha}{dx}$ následujícím způsobem $\frac{d^2z}{dx^2} = \frac{d}{dx} \frac{dz}{dx} = \frac{d}{dx} \tan \alpha$. Pravá strana výrazu je rozšířena jednotkovým zlomkem $\frac{d\alpha}{d\alpha}$, tím vznikne $\frac{d}{dx} \tan \alpha = \frac{d \tan \alpha}{d\alpha} \frac{d\alpha}{dx}$. Z pravé strany této rovnice je vyjádřeno $\frac{d \tan \alpha}{d\alpha}$ následujícím postupem

$$\frac{d \tan \alpha}{d\alpha} = \frac{1}{\cos^2 \alpha} = 1 - 1 + \frac{1}{\cos^2 \alpha} = 1 + \frac{-\cos^2 \alpha + 1}{\cos^2 \alpha} = 1 + \frac{-\cos^2 \alpha + \sin^2 \alpha + \cos^2 \alpha}{\cos^2 \alpha} = 1 + \frac{\sin^2 \alpha}{\cos^2 \alpha} = 1 + \tan^2 \alpha.$$

Po těchto úpravách lze $\frac{d^2z}{dx^2}$, vyjádřit následujícím způsobem

$$\frac{d^2z}{dx^2} = (1 + \tan^2 \alpha) \frac{d\alpha}{dx}.$$

(Vzorec 7)

Nyní je na pravé straně nahrazen $\tan^2 \alpha$ za $\frac{dz}{dx}$, tedy $\tan^2 \alpha = \left(\frac{dz}{dx}\right)^2 = (z')^2$. Na levé straně rovnice (Vzorec 7) je nahrazeno $\frac{d^2z}{dx^2} = z''$. Vztah tedy nabude podoby $z'' = [1 + (z')^2] \frac{d\alpha}{dx}$. Jednoduchou úpravou tohoto vztahu nabude vztah podoby $\frac{z''}{[1+(z')^2]} = \frac{d\alpha}{dx}$. S využitím vztahu (Vzorec 6) pro křivost k nabude relace tvar

$$k = \frac{d\alpha}{ds} = \frac{d\alpha}{dx} \frac{dx}{ds} = \frac{\frac{z''}{[1+(z')^2]}}{(1+(z')^2)^{1/2}} = \frac{z''}{[1+(z')^2]^{3/2}}, k = \frac{\frac{\partial^2 z(x)}{\partial x^2}}{\left[1 + \left(\frac{\partial z(x)}{\partial x}\right)^2\right]^{3/2}} = \frac{\partial^2 z(x)/\partial x^2}{[1+(\partial z(x)/\partial x)^2]^{3/2}}.$$

(Vzorec 8)

4.3.4 Tvar výchytky hladiny kapaliny

Výraz pro křivost (Vzorec 8) je vložen do vztahu pro rovnováhu hydrostatického a kapilárního tlaku (Vzorec 5). Rovnice nabude následujícího tvaru

$$\rho g z = \gamma k = \gamma \frac{\frac{\partial^2 z(x)}{\partial x^2}}{\left[1 + \left(\frac{\partial z(x)}{\partial x}\right)^2\right]^{3/2}}.$$

(Vzorec 9)

Dalším krokem, který je proveden podle Landaua [128] je nahrazení výrazu složeného z hustoty ρ , povrchového napětí γ a tíhového zrychlení g kapilární délkou a , tj. $a = \sqrt{\frac{2\gamma}{\rho g}}$, viz rovnice (Vzorec 3). Algebraickou úpravou je získána diferenciální rovnice pro neznámou funkci výchytky $z(x)$. Prvním krokem je úprava vzorce pro kapilární délku (Vzorec 3), který je upraven mocněním na podobu

$$a^2 = \frac{2\gamma}{\rho g}.$$

(Vzorec 10)

Následuje jednoduchá matematická úprava vzorce (Vzorec 9) s výsledným tvarem $\frac{z}{a^2} = \frac{\gamma}{\rho g} = \frac{a^2}{2}$. Tato rovnice je převedena do tvaru $\frac{2z}{a^2} = k$. Po dosazení křivosti k ze vztahu (Vzorec 8) následuje

$$\frac{2z}{a^2} = \frac{\frac{\partial^2 z(x)}{\partial x^2}}{\left[1 + \left(\frac{\partial z(x)}{\partial x}\right)^2\right]^{3/2}}.$$

(Vzorec 11)

Před další úpravou je jiným způsobem vyjádřena druhá derivace z podle x , $\frac{\partial^2 z(x)}{\partial x^2} = \frac{d}{dx} \frac{dz}{dx}$. Dále bude použit následující vztah mezi diferenciálními operátory $\frac{d}{dx} = \left(\frac{dz}{dx}\right) \frac{d}{dz}$. Pomocí tohoto operátoru lze druhou derivaci funkce $z(x)$ zapsat jako $\frac{\partial^2 z(x)}{\partial x^2} = \left(\frac{dz}{dx}\right) \frac{d}{dz} \frac{dz}{dx}$. Rovnice (Vzorec 11) je dále upravena následovně,

$$\frac{2z}{a^2} = \frac{\left(\frac{dz}{dx}\right) \frac{d}{dz} \frac{dz}{dx}}{\left[1 + \left(\frac{\partial z(x)}{\partial x}\right)^2\right]^{3/2}} = \frac{z' \frac{d}{dz} z'}{(1+z'^2)^{3/2}}$$

Kde je označeno $\frac{dz}{dx} \equiv z'$. Ve výše uvedeném vztahu vystupují proměnné z , z' a dva přírůstky dz a dz' . Dalším krokem je separace těchto proměnných a následná integrace,

$$\frac{2z}{a^2} dz = \frac{z'}{[1+(z')^2]^{3/2}} dz'$$

(Vzorec 12)

Levá strana je integrována podle z , zatímco pravá strana je po separaci integrována podle z' . Integrace je provedena pomocí nástroje www.WolframAlpha.com. Levá strana poslední uvedené rovnice je v této aplikaci vyjádřena jako „integrate[z/a^2, z]“, pravá strana rovnice je vyjádřena jako „integrate[z/(1+z^2)^(3/2), z]“. Integrovaná rovnice (Vzorec 12) má po úpravách tvar $\int \frac{2z}{a^2} dz = \int \frac{z'}{[1+(z')^2]^{3/2}} dz'$.

Provedením integrací obou stran získá rovnice podobu $\frac{2z^2}{2a^2} = -\frac{1}{\sqrt{(z')^2+1}} + A$, kde A je integrační konstanta. Z předchozí rovnice je jednoduchými algebraickými úpravami získána rovnice

$$z' = \pm \sqrt{\frac{a^4}{(Aa^2 - z^2)^2} - 1}$$

(Vzorec 13)

Výraz na pravé straně rovnice může být kladný i záporný, to odpovídá dvěma křivkám. Křivka s kladným znaménkem vykresluje výchylku $z(x)$ napravo od kontaktního bodu C2 (oblast 1). Křivka se záporným znaménkem vykresluje výchylku $z(x)$ nalevo od kontaktního bodu C1 (oblast 3), viz. Obrázek (Obr. 36). Integrační konstanta A je vypočtena z okrajových podmínek.

V nekonečné vzdálenosti od vnořeného vlákna je kapalina dokonale horizontální. Proto okrajové podmínky ve velké (nekonečné) vzdálenosti od vlákna vyžadují nulovou výchylku, tj. $z(x)|_{x \rightarrow \infty} = 0$. Také je zde požadována nulová hodnota derivace výchylky, $\frac{dz}{dx} = 0$. Z těchto okrajových podmínek je z rovnice

(Vzorec 13) vyjádřena konstanta A tj. $A = 1, 0 = \pm \sqrt{\frac{a^4}{(Aa^2 - 0^2)^2} - 1}$. V předchozím vztahu je Aa^2 umocněno

a následně je vykrácen čítec a jmenovatel pomocí a^4 , čímž rovnice nabude podobu $0 = \pm \sqrt{\frac{1}{A^2} - 1}$.

Odtud lze vyjádřit integrační konstantu A . Výraz je mocněn a následně je A^2 převedeno na levou stranu, a po odmocnění je výsledek, $A = 1$.

4.3.5 Zavedení bezrozměrných veličin

Pro další úvahy je vhodné zapsat rovnici (Vzorec 13) v bezrozměrném tvaru zavedením bezrozměrné výchylky $\zeta = \frac{z}{a}$ tedy $z = a\zeta$, kde a je kapilární délka. Tato bezrozměrná proměnná je substituována do rovnice (Vzorec 13). Levá strana vztahu je po substituci ve tvaru $z' = \frac{d}{dx}z = \frac{d}{dx}a\zeta = a\frac{d\zeta}{dx}$, a vzorec

$$\text{je pak zapsán jako } a\frac{d\zeta}{dx} = \sqrt{\frac{a^4}{[a^2-(a\zeta)^2]^2} - 1}.$$

Zlomek $\frac{a^4}{(a^2-(a\zeta)^2)^2}$ pod odmocninou výše uvedeného vztahu je rozšířen o $\frac{1/a^4}{1/a^4}$. tak je získán pod odmocninou výraz $\frac{1}{(1-\zeta^2)^2} - 1$. Výraz pod odmocninou je převeden na společného jmenovatele a poté jednoduchými úpravami vztahu (Vzorec 13) na

$$z' = a\frac{d\zeta}{dx} = a\zeta' = \sqrt{\frac{1}{(1-\zeta^2)^2} - 1} = \sqrt{\frac{1-(1-\zeta^2)^2}{(1-\zeta^2)^2}} = \sqrt{\frac{1-1+2\zeta^2-\zeta^4}{(1-\zeta^2)^2}} = \zeta\frac{\sqrt{2-\zeta^2}}{1-\zeta^2}.$$

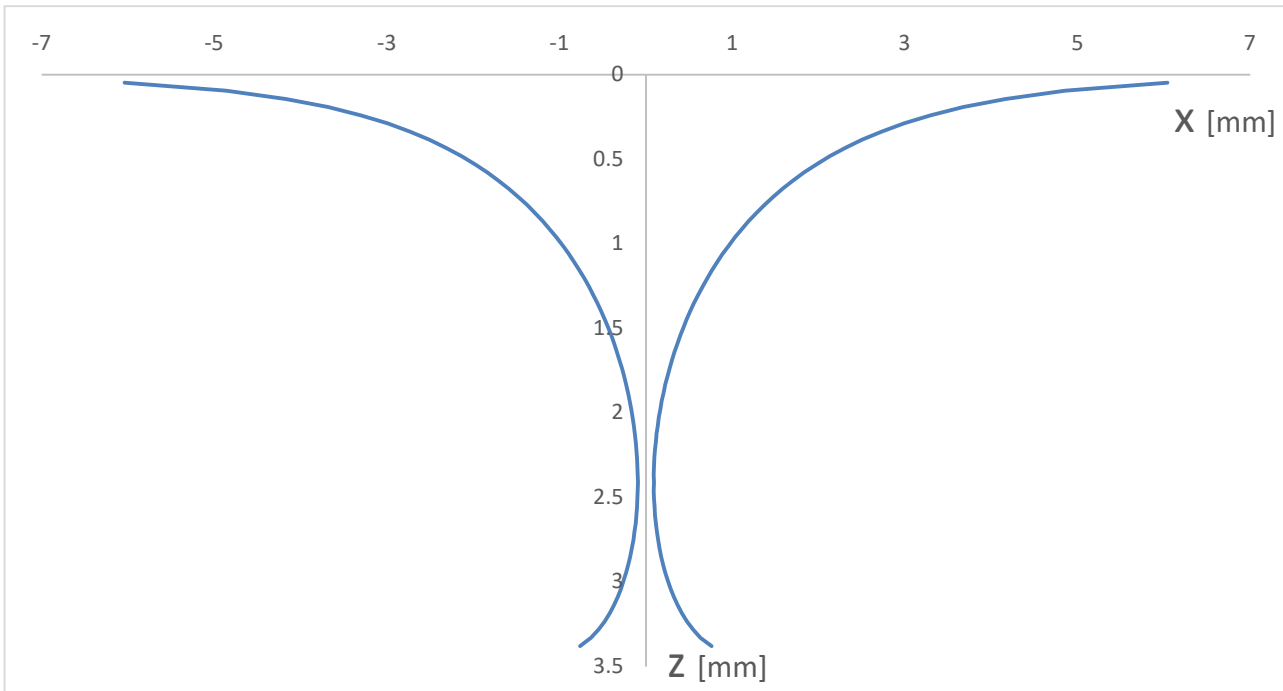
(Vzorec 14)

Řešení diferenciální rovnice $a\frac{d\zeta}{dx} = \zeta\frac{\sqrt{2-\zeta^2}}{1-\zeta^2}$ 1. řádu s proměnným koeficientem je pomocí separace proměnných $\frac{1}{a}dx = \frac{1-\zeta^2}{\zeta\sqrt{2-\zeta^2}}d\zeta$. Levá i pravá strana rovnice je integrována, $\int \frac{1}{a}dx = \int \frac{1-\zeta^2}{\zeta\sqrt{2-\zeta^2}}d\zeta$. Integrace levé strany je jednoduchá. Integrace pravé je provedena pomocí WolframAlpha.com. „integrate [(1-Z^2)/(Z*sqrt(2-Z^2)), Z]“, Provedením integrací rovnice získá rovnice tvar

$$\frac{x}{a} = \sqrt{2-\zeta^2} - \frac{\log(\sqrt{4-2\zeta^2}+2)}{\sqrt{2}} + \frac{\log(\zeta)}{\sqrt{2}} + A_1,$$

(Vzorec 15)

kde log je přirozený logaritmus a A_1 je integrační konstanta. Provedenými úpravami byl získán vztah pro závislost bezrozměrové souřadnice $\frac{x}{a}$ na bezrozměrové výchylce hladiny kapaliny ζ .



Obr. 39 – Graf výchylky $z(x)$ dle výše uvedeného vzorce (Vzorec 15), modrá čára představuje poruchu na hladině způsobenou vnořeným vláknem, pravá část výchylky je zrcadlovým zobrazením levé části. Velikost konstanty A_1 posouvá křivku po ose x .

Výchylka hladiny kapaliny je popsána matematickým vtahem (Vzorec 15), její průběh je znázorněn na výše zobrazeném grafu (Obr. 39), ve kterém je levá křivka zrcadlovým obrazem pravé křivky. Pro názornost si lze na ose z představit kruhový průřez vlákna, které se noří do kapaliny a způsobuje poruchu výchylky na hladině.

4.4 Silové působení na vlákno částečně ponořené do kapaliny

Celková vztahová - tedy nadnášející síla F_L (Lift Force) působící na vlákno je rovna $F_L = F_T + F_P$, kde F_T je část síly vyvolaná povrchovým napětím kapaliny a F_P je část síly vyvolaná vytlačení kapaliny válcem z oblasti 2, viz obrázek (Obr. 36). Pro další zjednodušení bude zavedena bezrozměrná síla f , kde $f_L = f_T + f_P$. Bezrozměrné síly vzniknou normalizací rozměrových sil pomocí γl , $f_L = \frac{F_L}{\gamma l}$.

4.4.1 Síla vyvolaná působením povrchového napětí

Nadnášecí síla vyvolaná povrchovým napětím je značena F_T (Tension Force). Jí příslušející bezrozměrná síla f_T je normalizována pomocí povrchového napětí γ a délky kontaktní linie l (délka vlákna), tato bezrozměrná síla je zapsána jako $f_T = \frac{F_T'}{\gamma l}$. Z obrázku (Obr. 35) je patrné, že velikost vertikálně působící síly F_T' je rovna $\gamma l \sin \alpha$. Bezrozměrná nadnášecí síla f_T' působí na vlákno směrem vzhůru ve dvou kontaktních bodech C_1 a C_2 , proto je celková bezrozměrná síla rovna dvojnásobku $f_T = 2 \sin \alpha$. Bezrozměrná síla f_T je vyjádřena pro konkrétní místo na ose z , a to pro kontaktní bod C_2 , kde tečna k hladině kapaliny svírá s vodorovnou osou x úhel α . Pro úhel α platí vztah $\sin \alpha = \frac{dz}{ds}$. Element tečny k hladině kapaliny dS je vyjádřen jako přepona pravoúhlého trojúhelníků s odvěsnami dx a dz , tento vztah zapsán jako $dS = \sqrt{1 + \left(\frac{dz}{dx}\right)^2} dx$. Po dosazení za dS do vztahu $f_T = 2 \sin \alpha = 2 \frac{dz}{ds}$ je rovnice ve tvaru

$2 \sin \alpha = \frac{2dz}{\sqrt{1+\left(\frac{dz}{dx}\right)^2 dx}}$. Ve výše uvedeném vztahu je za z substituována bezrozměrná výchylka ζ . Tedy $z =$

a ζ a využít (Vzorec 14), respektive z něho vyplývající vztah $\frac{dz}{dx} = a \frac{d\zeta}{dx} = \zeta \frac{\sqrt{2-\zeta^2}}{1-\zeta^2}$. Rovnice nabude tvar

$$2 \sin(\alpha) = \frac{2z'}{\sqrt{1+(z')^2}} = \frac{2\zeta \frac{\sqrt{2-\zeta^2}}{1-\zeta^2}}{\sqrt{1+\left(\zeta \frac{\sqrt{2-\zeta^2}}{1-\zeta^2}\right)^2}} = \frac{2\zeta \frac{\sqrt{2-\zeta^2}}{1-\zeta^2}}{\frac{\sqrt{(1-\zeta^2)^2 + \zeta^2(2-\zeta^2)}}{1-\zeta^2}} = \frac{2\zeta \sqrt{2-\zeta^2}}{\sqrt{(1-\zeta^2)^2 + \zeta^2(2-\zeta^2)}} = \frac{2\zeta \sqrt{2-\zeta^2}}{\sqrt{1-2\zeta^2 + \zeta^4 + 2\zeta^2 - \zeta^4}} = \frac{2\zeta \sqrt{2-\zeta^2}}{\sqrt{1}} = 2\zeta \sqrt{2-\zeta^2}.$$

Výsledkem provedených úprav je vztah pro bezrozměrnou vztlakovou sílu f_T vyvolanou zakřivením povrchu kapaliny účinkem vnořeného vlákna a povrchového napětí,

$$f_T = 2 \sin \alpha = 2\zeta_C \sqrt{2 - \zeta_C^2}.$$

(Vzorec 16)

Protože při odvozování bylo počítáno s úhlem v kontaktním bodě C , jedná se o výchylku ζ přiřazenou k tomuto kontaktnímu bodu, která bude dále označena ζ_C .

4.4.2 Síla vyvolaná vytlačení objemu ponořeného válce

Rozměrová síla značena F_P (Pressure Force) je rovna tíze kapaliny, která je vytlačena z oblasti 2, viz obrázek (Obr. 35 a Obr. 36). Odpovídající bezrozměrná síla bude dále značena f_P a platí pro ni $f_P = \frac{F_P}{\gamma l}$.

Zóna 2 je geometricky tvořena kruhovou úsečí a obdélníkem. Plocha kruhové úseče S_S se spočítá jako $S_S = r^2(\beta - \cos \beta \sin \beta) = r^2(\beta - \frac{1}{2} \sin 2\beta)$. Plocha obdélníku S_0 , viz část oblast 2 na obrázku (Obr. 4), se vypočítá vztahem $S_0 = 2rz \sin \beta$. Celková rozměrová síla F_P se tedy rovná $F_P = \rho l(S_S + S_0) = \rho l S$, při zavedení bezrozměrné síly $f_P = \frac{F_P}{\gamma l} = \frac{\rho g l S}{\gamma l} = \frac{2S}{a^2}$, kde je $\rho g / 2\gamma$ nahrazeno převrácenou hodnotou kvadrátu kapilární délky. Substitucemi je získán vztah

$$f_P = \frac{2S_S}{a^2} + \frac{2S_0}{a^2} = \frac{2r^2(\beta - \frac{1}{2} \sin 2\beta)}{a^2} + \frac{4rz \sin \beta}{a^2}.$$

(Vzorec 17)

Dále je zaveden bezrozměrový poloměr vlákna R , který je podílem poloměru nořeného válce r a kapilární délky a , tj. $R = r/a$. Zavedením této bezrozměrné veličiny a bezrozměrné výchylky hladiny kapaliny ζ do předchozího vztahu a po vykrácení a^2 je dosaženo rovnice pro bezrozměrovou sílu f_P v následující podobě,

$$f_P = 2R^2(\beta - \frac{1}{2} \sin 2\beta) + 4R\zeta_C \sin \beta.$$

(Vzorec 18)

Stejně jako při odvozování f_T se zde jedná o maximální bezrozměrovou výchylku hladiny kapaliny ζ a při konkrétní souřadnici na ose x odpovídající kontaktnímu bodu $C2$. Tato výchylka bude tedy označována jako ζ_c .

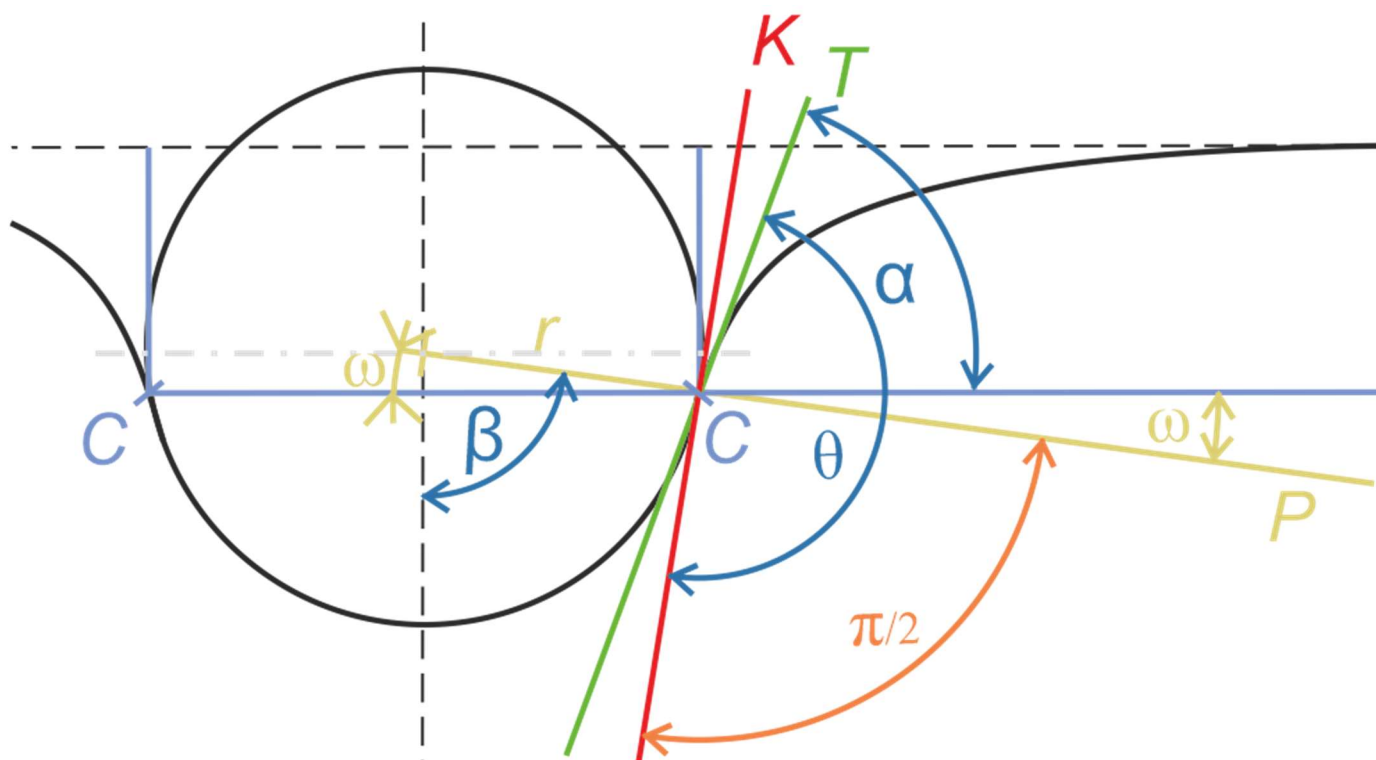
4.4.3 Celková vztlaková síla

Celková bezrozměrná vztlaková síla, která působí na vlákno bude označována jako f_L . Tato síla f_L je součtem f_T a f_P , a je zapsána jako $f_L = f_T + f_P$. Po dosazení vztahu pro f_T (Vzorec 16) a vztahu pro f_P (Vzorec 18) je rovnice ve tvaru

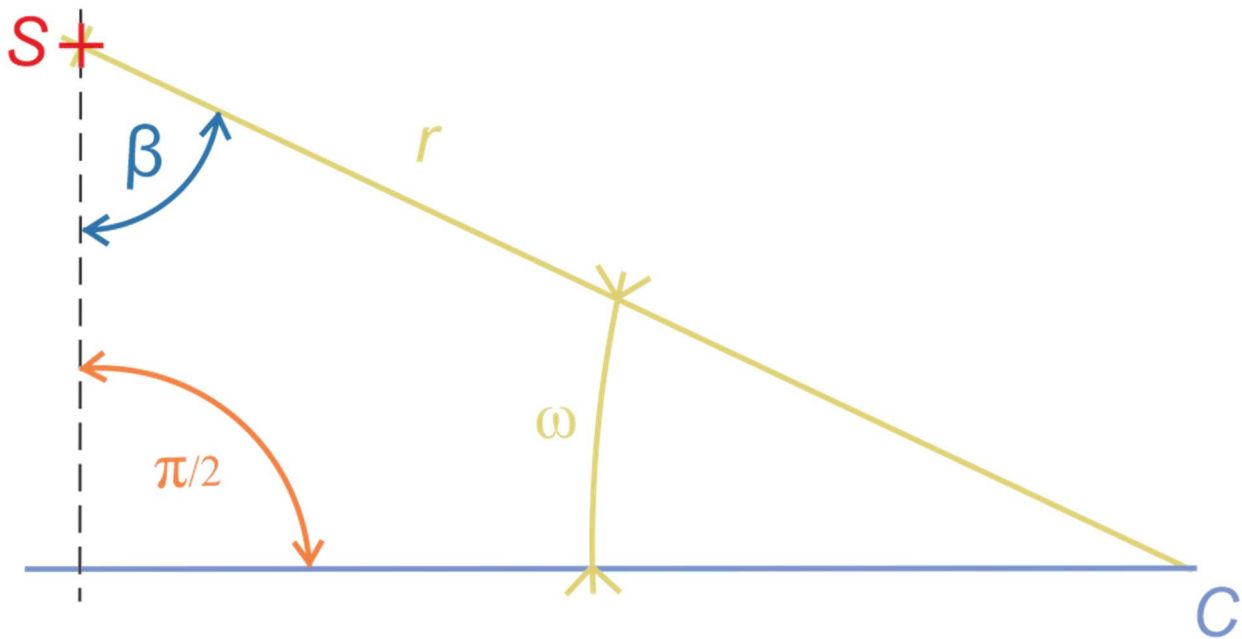
$$f_L = 2\zeta_c \sqrt{2 - \zeta_c^2} + 2R^2(\beta - 1/2 \sin 2\beta) + 4R\zeta_c \sin \beta.$$

(Vzorec 19)

V tomto vztahu musí $\sqrt{2 - \zeta_c^2}$ být reálné číslo. Odtud plyne podmínka $\zeta_c^2 \leq 2$. Díky této podmínce je získán fyzikálně přípustný obor kladných hodnot bezrozměrové výchylky $\zeta_c \in \langle 0, \sqrt{2} \rangle$. Dalšími úpravami tohoto vztahu je vyjádřen úhel β jako funkce výchylky hladiny kapaliny ζ_c .



Obr. 40 – Rozšířené geometrické parametry válce nořícího se do kapaliny. Je zde detailně zobrazen pravoúhlý trojúhelník, jehož odvěsna je tvořena úsečkou mezi středem válce a kontaktním bodem C . Součet všech úhlů trojúhelníka je $180^\circ(\pi)$. Z obrázku je patrné že $\theta = \pi/2 + \omega + \alpha$.



Obr. 41 – Geometrický detail z Obr. 40. Je zde detailně zobrazen pravoúhlý trojúhelník, jehož odvěsna je tvořena úsečkou mezi středem válce a kontaktním bodem C. Součet všech úhlů trojúhelníku je $180^\circ(\pi)$. Platí tedy, že $\pi/2 + \omega + \beta = \pi$.

Dle obrázku (Obr. 40) je vyjádřen úhel ω ze vztahu $\theta = \pi/2 + \omega + \alpha$ odtud plyne $\omega = \theta - \alpha - \pi/2$. Vztah pro úhel β je odvozen z geometrie trojúhelníku zobrazeného na obrázku (Obr. 41). Součet všech vnitřních úhlů trojúhelníku je 180° tedy π . Jedná se zde o trojúhelník pravoúhlý, jeden z úhlů je tedy $\pi/2$. Součet ostatních úhlů β a ω musí tedy být také $\pi/2$. Platí zde $\omega = \theta - \alpha - \frac{\pi}{2}$, $\omega + \beta = \frac{\pi}{2}$. Do posledního vztahu je dosazen výše uvedený výraz pro úhel ω . Tak se získal vztah $\beta = \pi - \theta + \alpha$. Posledním krokem těchto úprav je nahrazení úhlu α ze vztahu $\frac{dz}{dx} = \tan \alpha$, tedy $\alpha = \arctan \frac{dz}{dx}$. Výsledné vyjádření úhlu β je tedy $\beta = \pi - \theta + \arctan \frac{dz_c}{dx} = \pi - \theta + \arctan a \frac{d\zeta_c}{dx}$. Kde derivace $\frac{dz_c}{dx}$ a $\frac{d\zeta_c}{dx}$ jsou provedeny v blízkosti kontaktních bodů C1 a C2. Takto vyjádřený úhel β je dosazen do vztahu pro bezrozměrnou sílu f_L (Vzorec 19) s výsledkem

$$f_L = 2\zeta_c \sqrt{2 - \zeta_c^2} + 2R^2 \left\{ \pi - \theta + \arctan \left(a \frac{d\zeta_c}{dx} \right) - \frac{1}{2} \sin \left[2\pi - 2\theta + 2\arctan \left(a \frac{d\zeta_c}{dx} \right) \right] \right\} + 4R\zeta \sin \left[\pi - \theta + \arctan \left(a \frac{d\zeta_c}{dx} \right) \right].$$

Výše uvedený vzorec obsahuje derivaci $\frac{d\zeta_c}{dx}$ která je nahrazena z dříve uvedeného vztahu $\frac{d\zeta_c}{dx} = \frac{\zeta \sqrt{2 - \zeta^2}}{a(1 - \zeta^2)}$ popsaným ve vzorci (Vzorec 14), čímž vzorec pro f_L nebude obsahovat derivace. Tato rovnice nabude podoby

$$f_L = 2\zeta_c \sqrt{2 - \zeta_c^2} + 2R^2 \left\{ \pi - \theta + \arctan \left(\zeta_c \frac{\sqrt{2 - \zeta_c^2}}{1 - \zeta_c^2} \right) - 1/2 \sin \left[2\pi - 2\theta + 2\arctan \left(\zeta_c \frac{\sqrt{2 - \zeta_c^2}}{1 - \zeta_c^2} \right) \right] \right\} + 4R\zeta_c \sin \left(\pi - \theta + \arctan \left(\zeta_c \frac{\sqrt{2 - \zeta_c^2}}{1 - \zeta_c^2} \right) \right).$$

(Vzorec 20)

Závislost bezrozměrné síly $f_L(\zeta, R, \theta, a)$ má maximum, které bude porovnáno s bezrozměrnou tíhou vlákna $f_L = \pi r^2 l \rho_f g$, kde ρ_f je hustota materiálu vlákna a l je délka vlákna.

$$F_L = f_L \gamma l = \pi r^2 l \rho_f g.$$

(Vzorec 21)

V tuto chvíli jsou používány dvě rozdílné hustoty, hustota kapaliny ρ a hustota vlákna ρ_f . Z těchto hustot je vytvořen bezrozměrný poměr P hustoty vlákna k hustotě kapaliny, $P = \rho_f / \rho$. Z tohoto vztahu je vyjádřen $\rho_f = P\rho$, a provedena substituce do výše uvedené rovnice (vzorec 21). Na pravou stranu této rovnice je převedeno γl , a využita relace $\frac{\rho g}{\gamma} = \frac{2}{a^2}$. Poté je nahrazen průměr válce r bezrozměrnou hodnotou R , tak jak bylo učiněno u vztahu (Vzorec 18) s podobou vzorce

$$f_L = \frac{\pi r^2 l P \rho g}{\gamma l} = \frac{2\pi r^2 l P}{a^2 l} = \frac{2\pi R^2 a^2 l P}{a^2 l} = 2\pi R^2 P.$$

(Vzorec 22)

Výsledný vztah pro nalezení rovnováhy vztlakové síly a tíhové síly je získán dosazením bezrozměrné síly f_L (Vzorec 20) do výše uvedeného vztahu,

$$2\zeta_c \sqrt{2 - \zeta_c^2} + 2R^2 \left\{ \pi - \theta + \arctan \left(\zeta_c \frac{\sqrt{2 - \zeta_c^2}}{1 - \zeta_c^2} \right) - 1/2 \sin \left[2\pi - 2\theta + 2\arctan \left(\zeta_c \frac{\sqrt{2 - \zeta_c^2}}{1 - \zeta_c^2} \right) \right] \right\} + 4R\zeta_c \sin \left(\pi - \theta + \arctan \left(\zeta_c \frac{\sqrt{2 - \zeta_c^2}}{1 - \zeta_c^2} \right) \right) = 2\pi R^2 P.$$

(Vzorec 23)

Vztah (Vzorec 23) je použit pro grafické vyjádření závislosti vztlakové síly f_L na bezrozměrné výchylce kapaliny ζ . Pro toto vyjádření jsou použity modelové parametry polyakrylonitrilového (PAN) vlákna o průměru 500 nm, ponořeného do etanolu. Hustota etanolu je podle tabulky (

Tabulka 2) 789 kg/m^3 . Výpočet pro graf na (Obr. 42) byl proveden pro následující hodnoty parametrů: hustota etanolu $\rho = 789 \text{ kg/m}^3$, kapilární délka etanolu $a = 1,71 \text{ mm} = 0,0024 \text{ m}$, hustota PAN vlákna $\rho_f = 1150 \text{ kg/m}^3$. Poměr hustoty vlákna k hustotě kapaliny $P = \frac{\rho_f}{\rho} = \frac{1150}{948} = 1,457$, bezrozměrný poloměr vlákna $R = \frac{r}{a} = \frac{500 \cdot 10^{-9}}{0,0024} = 207 \cdot 10^{-6}$, kontaktní úhel $\theta = 30^\circ$, tedy $\theta = 0,0523 \text{ rad}$.



Obr. 42 – Graf závislosti bezrozměrné vztlakové síly f_L na bezrozměrné výchylce hladiny kapaliny ζ . Graf je výsledkem vztahu (Vzorec 23). Ikony a-c ukazují předpokládaný stav rozhraní kapaliny, kdy a) je výchozí stav hladiny kapaliny při částečném zanoření válce do kapaliny. Maxima – kritické hodnoty nabývá síla f_L v místě bezrozměrné výchylky $\zeta_c = 1$, v tomto místě dochází k noření cylindru do kapaliny, stav hladiny kapaliny je na znázorněn ikonou b). S dalším nořením se maximální síla kterou se systém schopn unést zmenšuje, protože levá a pravá hladina kapaliny se nad vláknem uavírají a snižují tak vytlačený objem kapaliny viz ikona c).

Na obrázku (Obr. 42) lze na modré křivce vidět vztah mezi maximální silou, kterou je systém schopn unést, a bezrozměrnou výchylkou hladiny kapaliny. Zelená přímka značí bezrozměrnou tíhovou sílu vyvolanou vláknem. Průsečík křivek v intervalu $\langle 0; 1 \rangle \zeta$ ukazuje stabilní stav systému a lze vyčíst výchylku hladiny kapaliny v kontaktním bodě C. Pokud tato zeleně značená tíhová síla překoná modrou křivku, dojde k ponoření vlákna vlivem překonání vztlakových sil pomocí síly tíhové. Při zkoumání průběhu grafu maximální síly lze říci, že v maximu tohoto grafu ($\zeta_c = 1$) dojde k ponoření vlákna do objemu kapaliny. V místě o hodnotě bezrozměrné výchylky hladiny kapaliny $\zeta_c = 1$ nelze f_L (levá strana rovnice) spočítat, platí podmínka $\zeta \leq \sqrt{2}a$. Za hodnotou $\zeta = 1$ začne klesat hodnota vztlakové síly, toto je okamžik, kdy se začne vlákno nořit do kapaliny.

4.5 Zjednodušené řešení pro malé úhly α

Toto řešení popisuje autor V. L. Popov v knize Contact Mechanics and Friction (V.L., 2010) pro případy, kdy je úhel α je malý a platí pro něj $\tan \alpha \cong \alpha$. Podle zpracované analýzy toto tvrzení platí od 0 až do úhlu cca 0,1047 radiánů ($\tan 0,1047 \cong 0,1047$ radiánů, do této hodnoty jsou průběhy funkcí shodné s přesností na 4 desetinná místa), což je cca do 6°. Při tomto řešení se vychází z předpokladu, že v rovnováze na zakřivené kapalině platí $\frac{\gamma}{R} \cong \gamma z'' = \rho g z$. Předchozí vztah je ekvivalentem vzorce (Vzorec 5) s platností pouze pro malá zakřivení povrchu, tedy za podmínky $(z')^2 \ll 1$. Tento vztah je obyčejnou lineární a homogenní diferenciální rovnicí druhého řádu, kterou lze vyřešit pomocí charakteristického polynomu. Řešením této diferenciální rovnice je

$$z = A_3 \exp \left[- \left(\frac{\rho g}{\gamma} \right)^{1/2} x \right] = A_3 \left[1 - \frac{2x}{a} \right],$$

(Vzorec 24)

kde A_3 je konstanta, kterou určíme z okrajových podmínek. Vytlačený objem se spočítá násobením plochy kolmého řezu vychýlené hladiny délkou vlákna, dále násobením dvojkou, protože plochy jsou dvě, nalevo i napravo od vlákna. Plocha vychýlené hladiny se spočítá jako integrál funkce z , která je uvedena výše a za okrajové podmínky, kdy při $x \rightarrow \infty$ je $z \rightarrow 0$. Vytlačený objem kapaliny je tedy roven $V = 2l \int_0^\infty A_3 \exp \left[- \left(\frac{\rho g}{\gamma} \right)^{1/2} x \right] dx = 2A_3 l \left(\frac{\gamma}{\rho g} \right)^{1/2}$. Z předchozího vztahu je vyjádřena integrační konstanta

A_3 , a vychází se z předpokladu že $\rho V = m$, tedy $\rho 2A_3 l \left(\frac{\gamma}{\rho g} \right)^{1/2} = m$, čímž vyjde vztah $A_3 = \frac{m}{2l \left(\frac{\gamma}{\rho g} \right)^{1/2} \rho} =$

$\frac{m}{2l\rho} \left(\frac{g}{\rho\gamma} \right)^{1/2} = \frac{m}{2l\rho} \frac{2}{a} = \frac{m}{la\rho}$, kde m je hmotnost vytlačené kapaliny. Pro výpočet výchylky v $x = 0$ je dosazen

vztah pro hodnotu integrační konstanty do vztahu (Vzorec 24). Hodnota $\exp \left[- \left(\frac{\rho g}{\gamma} \right)^{1/2} x \right]$ je pro $x = 0$

rovna 1. Při zachování rovnosti hmotnosti vytlačené kapaliny k vztlakové síle podle Archimedova zákona ($\rho V = m$) bude hloubka výchylky na ose z v místě ponoření ($x = 0$) následující: $z(0) = A_3 \cdot 1 =$

$\frac{m}{la\rho}$, $z(0) = A_3 \cdot 1 = \frac{m}{2l\rho} \frac{2}{a} = \frac{m}{la\rho} = \frac{V\rho}{la\rho} = \frac{\pi r^2 l \rho}{la\rho} = \frac{\pi r^2}{a}$, $z(0) = \frac{\pi r^2}{a}$. Úhel tečny k hladině kapaliny

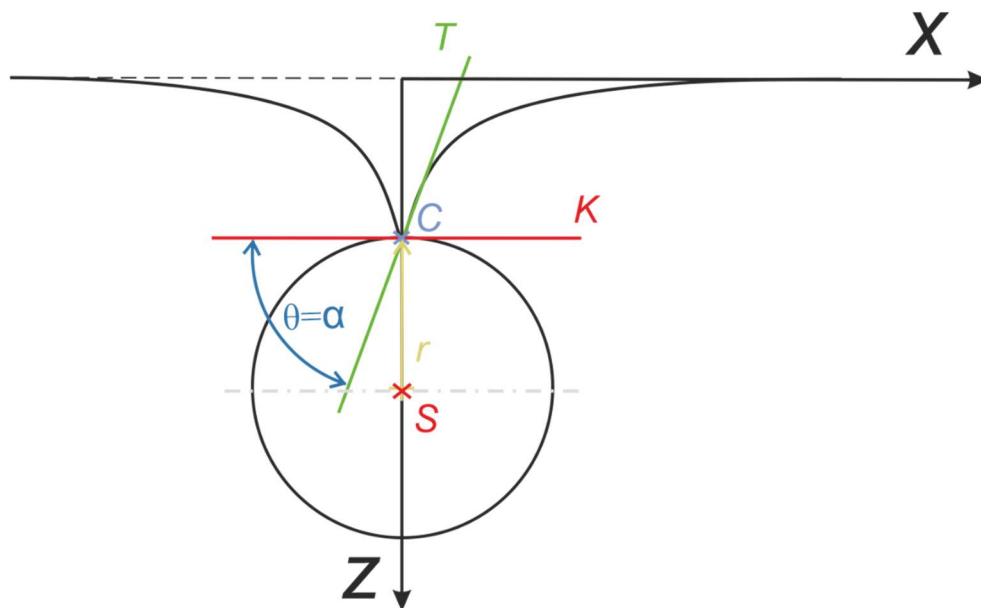
od horizontální roviny v bodě $x = 0$ je vypočítán pomocí vztahu $\tan \alpha = z' =$

$$\frac{d}{dx} \left[- \frac{m}{la\rho} \exp \left(- \frac{2}{a} x \right) \right]_{x=0} = \frac{m}{la\rho} \frac{2}{a} \cdot 1 = \frac{2mg}{l\gamma}.$$

Geometricky je zjevné, že kontaktní úhel θ nemůže být menší než úhel α . Maximální hmotnost, kterou je povrch kapaliny schopen unést, je tedy rovna $mg = F_{max} = \frac{1}{2} l \gamma \tan \left(\theta - \frac{\pi}{2} \right)$. Pro převedení na bezrozměrovou sílu je použit postup: $\frac{f}{l\gamma} = \frac{1}{2} \tan \left(\theta - \frac{\pi}{2} \right)$, $f_{max} = \frac{1}{2} \tan \left(\theta - \frac{\pi}{2} \right)$.

4.6 Řešení maximálních únosností kapaliny vzhledem k průměru vlákna

Takovéto řešení se zabývá případem, kdy dojde k ponoření vlákna do kapaliny v jeho maximálním možném zanoření do kapaliny. Je to tedy stav, kdy se oba dva kontaktní body C potkají na vrcholu vlákna a kapalina se spojí viz obrázek (Obr. 43). V tomto řešení je zanedbáno působení vztlakových sil vyvolaných vytlačením objemu kapaliny vláknem. Jedná se tedy o zjednodušení pro velmi malá vlákna.



Obr. 43 – Geometrie vlákna v maximálním možném zanoření, kdy se kontaktní body C setkají a dojde k ponoření vlákna do kapaliny. Symbol T značí tečnu úhlu k povrchu hladiny kapaliny v bodě C a kolmici K ke kružnici v kontaktním bodě C . Kdy levý C_1 i pravý C_2 splývají v jeden bod C .

Cílem je nalezení vztahu mezi bezrozměrnou výchylkou hladiny ζ a kontaktním úhlem θ . V prvním kroku je zaveden vztah pro bezrozměrnou výchylku ζ (viz kapitola 0). Tento upravený vztah $z = a\zeta$ je derivován podle x . Následně je levá část vztahu nahrazena vyjádřením goniometrické funkce tangens pro kontaktní úhel ($\frac{dz}{dx} = \tan \theta$). Pro rozmezí kontaktního úhlu $0 - \pi/2$ platí že $\theta = \alpha$, kde je úhel α popsán v obrázku (Obr. 35 a Obr. 43). Tento vztah je upraven následovně $\frac{dz}{dx} = a \frac{d\zeta}{dx}$, $\tan \alpha = \tan \theta = a \frac{d\zeta}{dx}$. Následně

je nahrazen výraz pravé strany výrazem $\sqrt{\frac{a^4}{[a^2 - (a\zeta)^2]} - 1}$, viz odvození pro (Vzorec 13), $\tan \theta =$

$\sqrt{\frac{a^4}{[a^2 - (a\zeta)^2]} - 1}$. Předešlá rovnice je zjednodušena sérií matematických manipulací, tak aby vyjádřila ζ

bezrozměrnou výchylku, $\tan^2 \theta = \frac{a^4}{[a^2 - (a\zeta)^2]} - 1 = \frac{1}{[1 - \zeta^2]^2} - 1$, $\tan^2 \theta + 1 = \frac{1}{[1 - \zeta^2]^2}$, z tohoto vztahu

je vyjádřeno ζ , $[1 - \zeta^2]^2 = \frac{1}{\frac{\sin^2 \theta + \cos^2 \theta}{\cos^2 \theta}} = \cos^2 \theta$, $1 - \zeta^2 = \cos \theta$, $\zeta^2 = 1 - \cos \theta$,

$$\zeta = \sqrt{1 - \cos \theta}.$$

(Vzorec 25)

Následně je vyjádřeno maximum síly, jež může systém unést, tedy extrémní sílu f_E . Pro tento výpočet

je použit vzorec $f_T = 2\zeta_C \sqrt{2 - \zeta_C^2}$ viz (Vzorec 16) a vzorec pro tíhovou sílu vyvolanou vláknem $F_{tv} =$

$\pi r^2 l \rho g$. Výsledná extrémní síla se rovná rozdílu síly vyvolané povrchovým napětím a tíhové síly vlákna.

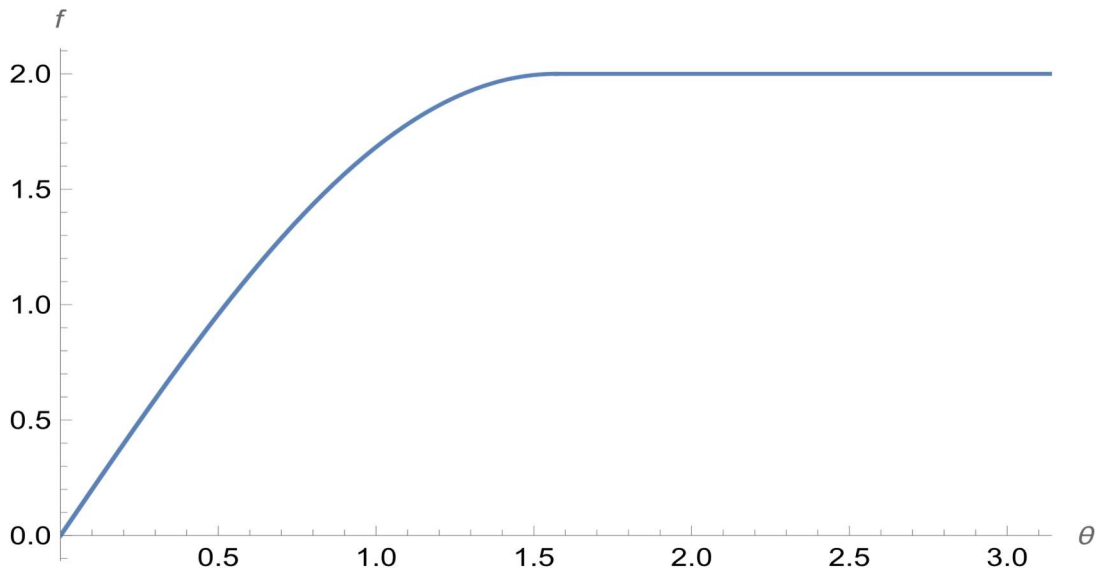
$f_E = f_T - \frac{F_{tv}}{\gamma l}$, síla vyvolávaná vytlačeným objemem kapaliny byla za předpokladu velmi malých průměrů

vláken zanedbána: $f_E = f_T - \frac{F_{lv}}{\gamma l}$, $f_E = 2\zeta_C \sqrt{2 - \zeta_C^2 - \frac{\pi r^2 l \rho_l g}{\gamma l}}$, $f_E = 2\sqrt{1 - \cos\theta} \sqrt{2 - (\sqrt{1 - \cos\theta})^2 - \frac{\pi r^2 l \rho_c g}{\gamma l}}$. Ve vzorci se vyskytuje ρ_c což je hustota cylindrického objektu, pro nahrazení za kapilární délku musí být provedena úprava a zavedení hustoty kapaliny ρ_l , $\frac{\pi r^2 l \rho_c g}{\gamma l} \frac{\rho_l}{\rho_l} = \frac{\pi r^2 l \rho_c \rho_l g}{\gamma l \rho_l}$. Další úpravou je nahrazení modifikovaného vztahu pro kapilární délku $\frac{2}{a^2} = \frac{\rho_l g}{\gamma}$ a následné nahrazení za bezrozměrové R , $\frac{r^2}{a^2} = R^2$. Pro zjednodušení je zaveden poměr hustoty vlákna - ρ_f a hustoty kapaliny ρ_l , $P = \frac{\rho_f}{\rho_l}$. Výsledný vztah představuje maximální sílu, kterou může studovaný systém unést, tedy jaký průměr vlákna (představovaný hodnotou R) je kapalina schopna unést,

$$f_E = 2\sqrt{1 - \cos\theta} \sqrt{2 - (\sqrt{1 - \cos\theta})^2} - 2\pi R^2 P$$

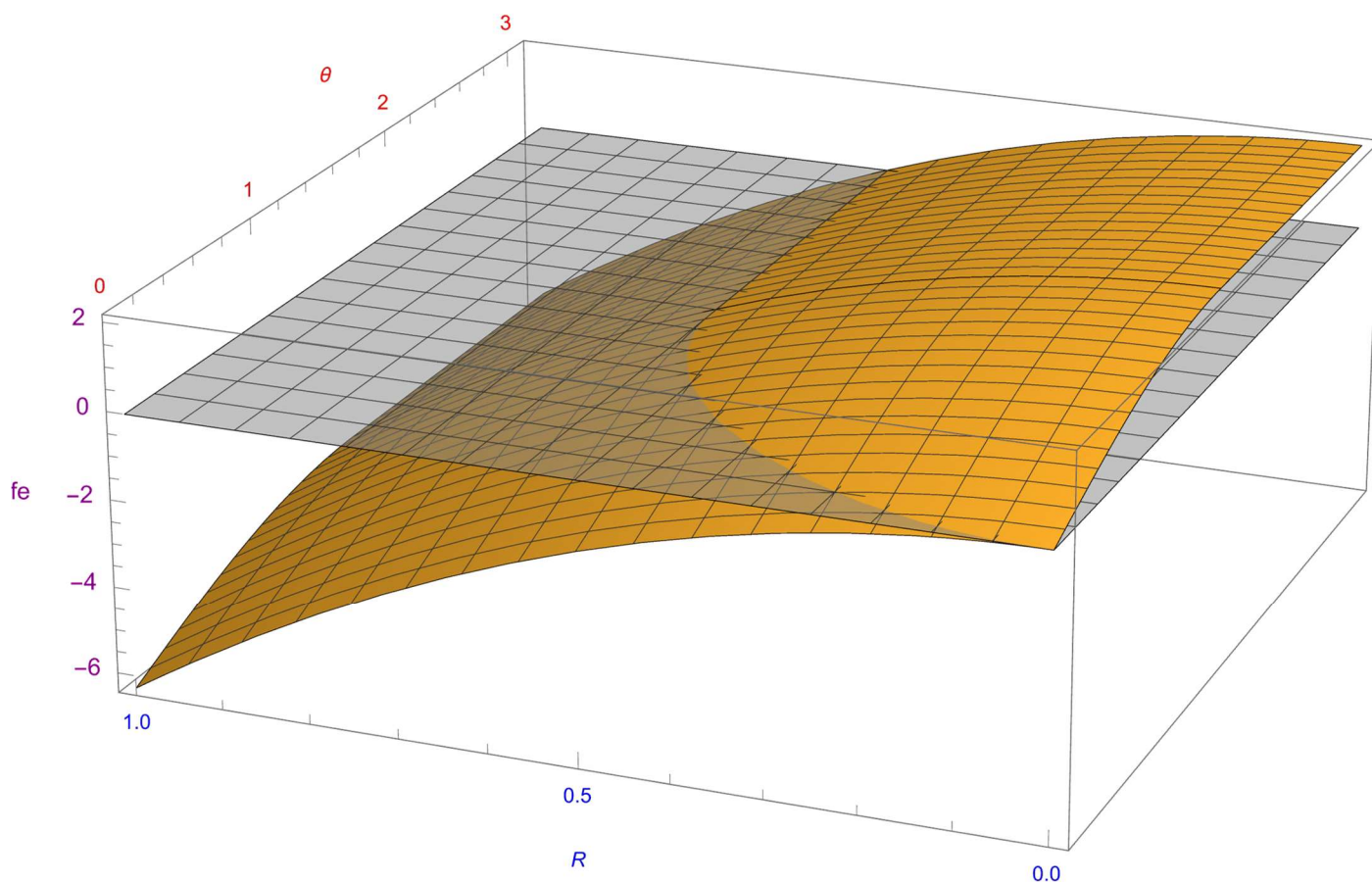
(Vzorec 26)

Jakmile síla tíhová reprezentována částí rovnice $2\pi R^2 P$ překoná sílu vztlakovou dojde k ponoření vlákna do kapaliny. Tento vztah (Vzorec 26) definuje maximální únosnost studovaného systému. Vztlaková síla je od 0 do $0 - \pi/2$ dána vztahem $2\sqrt{1 - \cos\theta} \sqrt{2 - (\sqrt{1 - \cos\theta})^2}$ po překonání $\pi/2$ je maximální síla považována za konstantní. Znázornění vztlakové síly, která je vyvolána povrchovým napětím je zobrazeno pomocí 2D grafu na obrázku Obr. 44.



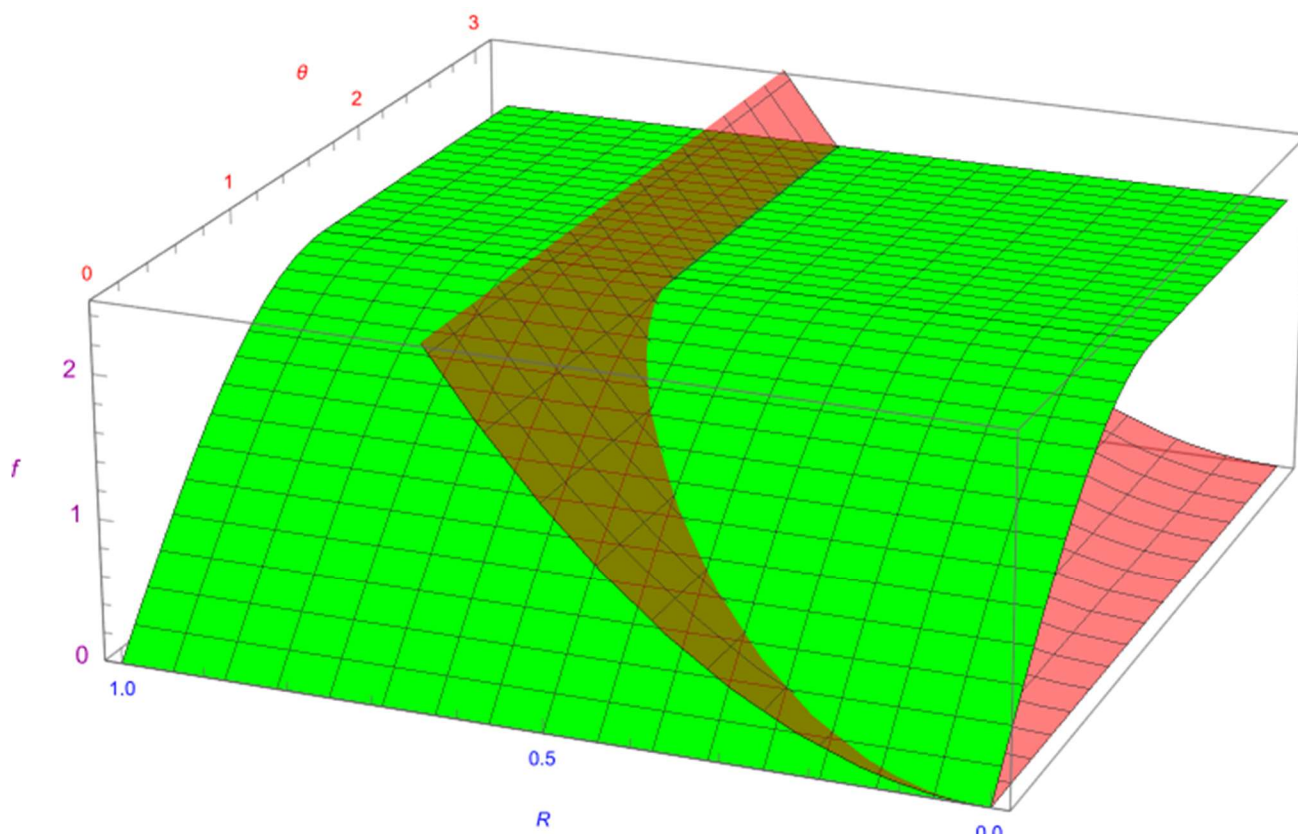
Obr. 44 – 2D graf závislosti bezrozměrné vztlakové síly f_E na kontaktním úhlu θ . Vztlaková síla je od kontaktního úhlu 0 od $0 - \pi/2$ rostoucí a definovaná vztahem (Vzorec 26), po překonání této hodnoty je konstantní.

Vizualizace obrázku (Obr. 46) na 3D grafu znázorňuje f_E dle vztahu (Vzorec 26), plocha s kladnou hodnotou f_E značí oblast kde bude vlákno na hladině, naopak tam, kde je f_E záporná, dojde k ponoření vlákna.



Obr. 45 –3D graf dle vzorce (Vzorec 26), kde je síla tíhová F_{tv} odečtena od síly vztlakové f_T . Kladná část reprezentuje stav, kdy bude síla vztlaková dominovat a nedojde k ponoření vlákna. Nulová hodnota je reprezentována šedou plochou.

Další vizualizace na obrázku (Obr. 46) ukazuje v 3D grafu prolnutí maximální vztlakové síly (zelená plocha) a síly tíhové (červená plocha). V místě, kde červený graf překoná zelenou plochu, predikuje ponoření cylindru do kapaliny, síla gravitační tedy překonala sílu vztlakovou. Grafy na obrázcích (Obr. 45 a Obr. 46) ukazují jinak reprezentovanou stejnou situaci. První graf ukazuje výslednou sílu studovaného systému. Zatímco graf na druhém obrázku ukazuje jednotlivé složky síly ve dvou plochách, kde sledujeme jejich vztah a převládající sílu v daném prostoru.



Obr. 46 – 3D graf závislosti bezrozměrné vzlakové síly f_E na kontaktním úhlu θ a bezrozměrného poloměru vlákna. Zelená je síla f_T vyvolaná povrchovým napětím, červená je tíhová část vyvolaná hmotností vlákna působící proti nadnášecí síle f_T . V místě, kde červeně označená složka protne a překoná zeleně označenou sílu, dojde k překonání síly f_T silou F_{tv} vyvolanou tíhou a dojde k ponoření vlákna.

4.7 Síla definovaná Harkinsonovým rozestíracím koeficientem

Velmi zajímavým činitelem může být i složka síly působící na cylindr, která je vyvolána Harkinsonovým rozestíracím koeficientem. Harkinsonův rozestírací koeficient značí, zda jsou v převaze síly mezi molekulami rozestírané kapaliny anebo mezi-molekulové síly mezi kapalinou a pevnou látkou. Tedy zda jsou v převaze síly kohezni či adhezni. Pakliže jsou v převaze síly adhezni, kapalina má tendenci se po povrchu rozestírat – smáčet povrch. Harkinsonův koeficient S_H je tedy rozdíl síly adhezni W_a a síly kohezni W_k . Vztah lze také zapsat pomocí povrchového napětí na mezifázových rozhraních γ_{SV} (pevná/plynná fáze), γ_{SL} (pevná/kapalná fáze) a γ_{LV} (kapalná/plynná fáze). Vztah je definován jako $S_H = W_a - W_k = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} - \gamma_{LV}$. Pakliže je koeficient kladný, kapalina se po pevné fázi rozestírá v souvislou vrstvu [138]. Tato složka se může projevit, pokud bude cylindr tzv. super-hydrofobní, někdy též označováno jako ultrahydrofobní. Při maximálním působení síly se změní vztah pro nadnášecí sílu následovně:

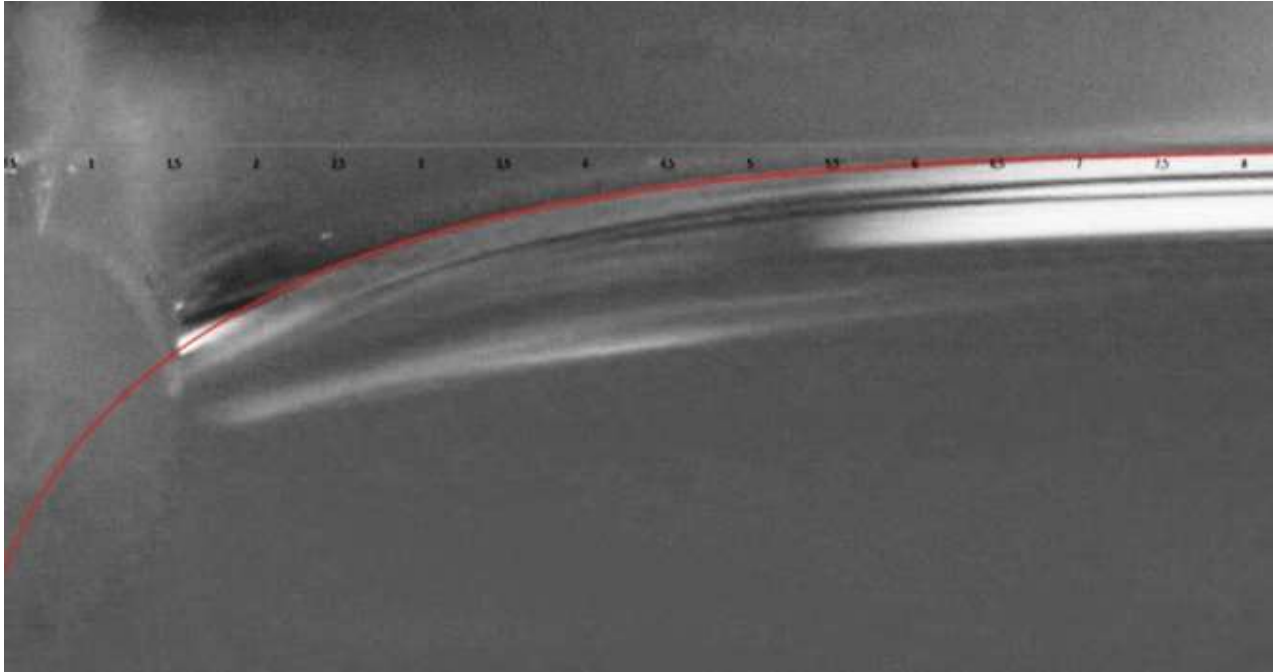
$$F_L = F_T + F_p - F_H.$$

Kde je F_H vyjádřením síly Harkinsonova koeficientu $F_H = 2l S_H$. Tuto sílu zapíšeme bezrozměrově jako $f_H = \frac{2 S_H}{\gamma}$. Tato síla působí zejména při konfiguraci, kdy se tečna **K** a tečna **T** k sobě přibližují viz obrázek (Obr. 35). Oblast působení této síly je tedy pro kontaktní úhly $\theta \geq 150^\circ$ [139]. V tomto rozmezí se tato

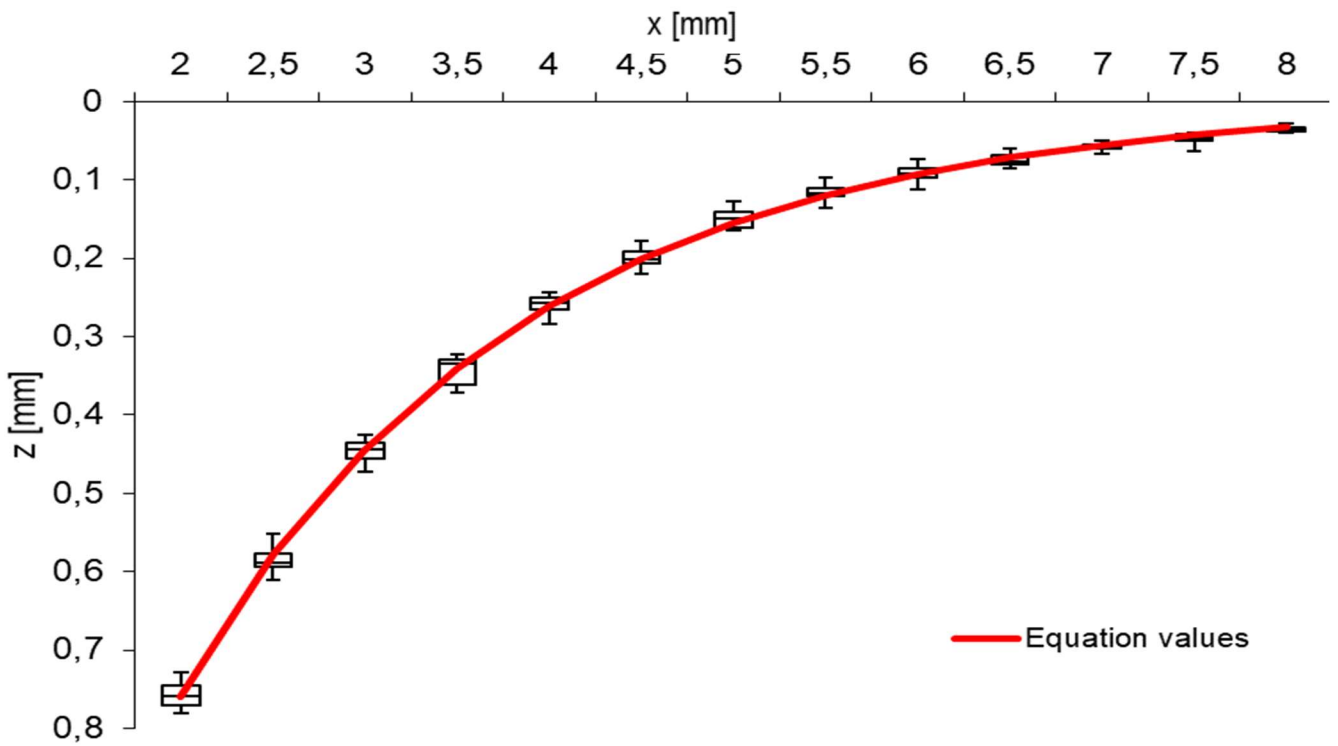
síla u super-hydrofobních povrchů bude přičítat k síle F_L a bude zvyšovat schopnost cylindru se vznášet na hladině kapaliny.

4.8 Ověření modelu

Pro ověření modelu reprezentujícího výchylku hladiny kapaliny byly provedeny experimenty, jež umožnily nepřímé odečtení hodnot výchylky hladiny kapaliny ze snímků experimentu (*Obr. 47 A*). Nastavení experimentu bylo založeno na umístění cylindru na hladinu kapaliny a odečtení výchylky hladiny kapaliny v určených bodech osy x , jejich následné porovnání s teoreticky vypočtenou hodnotou dle rovnice (*Vzorec 15*). Praktické provedení experimentu bylo provedeno s PTFE válcem o průměru 2 mm nořeném do destilované vody. Voda byla umístěna v polypropylenové nádobě, destilovaná voda byla do nádoby napuštěna tak, aby výška hladiny překonávala okraj nádoby a tím umožnila pořizování snímků z pohledu transversálního řezu cylindru. Samotný cylindr byl z důvodu stability na hladině přidržován mikrovlákem, tak, aby se na hladině nepohyboval. Snímky byly pořizeny pomocí digitální zrcadlovky Canon EOS40D s makro mezikroužky a objektivem EF24-105mm L. Ostření snímků bylo prováděno zpravidla s prioritou na ostrost řezu (čela) vlákna z důvodu přesného stanovení měřítka pomocí obrazové analýzy. Vzhledem k optickým parametrům tohoto fotoaparátu je hloubka ostrosti velmi malá, takže bylo nutné upravit světelné podmínky pro zachycení snímku tak, aby bylo možné odečítat velikost vlákna, ale i výchylku hladiny kapaliny. Právě světelné podmínky, respektive kontrast světla a stínů v kapalině a jejím odrazu jsou velmi důležité pro zachycení výchylky hladiny kapaliny. K vytvoření kontrastních světelných podmínek bylo použito bodových zdrojů hlavního světla, které svítilo z boku do hladiny kapaliny a pomocných světel nad experimentem, která vytvářela lineární odrazy zdroje světla a tím pomáhala určit rovinu, či zakřivení hladiny. Pořízené snímky byly zpracovány pomocí obrazové analýzy v analytickém programu Fiji (varianta programu ImageJ verze 1.54) [140]. Fotografie tvaru výchylky hladiny kapaliny je na obrázku (*Obr. 47A*), do tohoto snímku je vložena křivka reprezentující teoretickou výchylku hladiny kapaliny, která byla vypočítána pomocí rovnice (*Vzorec 15*). V předem daných vzdálenostech na ose x byly odečteny hodnoty výchylky hladiny na ose z . Měření byla opakována a z vybraného souboru dat byl proveden jedno výběrový T-test na každý z daných úseků měření. Test byl proveden na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ s konstatováním, že mezi naměřenými hodnotami a vypočtenou teoretickou hodnotou není statisticky významný rozdíl. Toto potvrzení indikuje správnost modelu v jeho základu. Jako součást testování noření vláknenných materiálů do kapaliny byla vytvořena metodika hodnocení noření do kapaliny. Tato metodika je založená na sledování chování materiálu po dopadu na hladinu kapaliného kolektoru. Sledování probíhá ve kleněném kolektoru viz kapitola 5.4.2 – (*Tabulka 5*). Tato metodika umožňuje jednoduchou popisnou kvantifikaci procesu noření a jeho porovnání.



a)



b)

Obr. 47 – Porovnání teoretické a reálné zakřivení hladiny kapaliny. a) Obrázek ukazuje prolnutí fotografie hladiny kapaliny a červeně vykreslenou hodnotou výchylky vytvořenou pomocí matematického modelu. b) Graf ukazuje prolnutí červené hodnoty získané pomocí matematického modelu a černě vyjádřených hodnot získaných pomocí experimentu.

4.9 Závěr teorie matematického modelu

Závěrem lze konstatovat, že tento model značně rozšiřuje dosavadní teoretické modely, detailnější grafické zobrazení je věnováno zejména případům velmi malých cylindrických objektů. V porovnání s Popovem [112] je komplexnější a vyšetřuje dané téma s menším počtem podmínek. Model vizualizuje podmínky

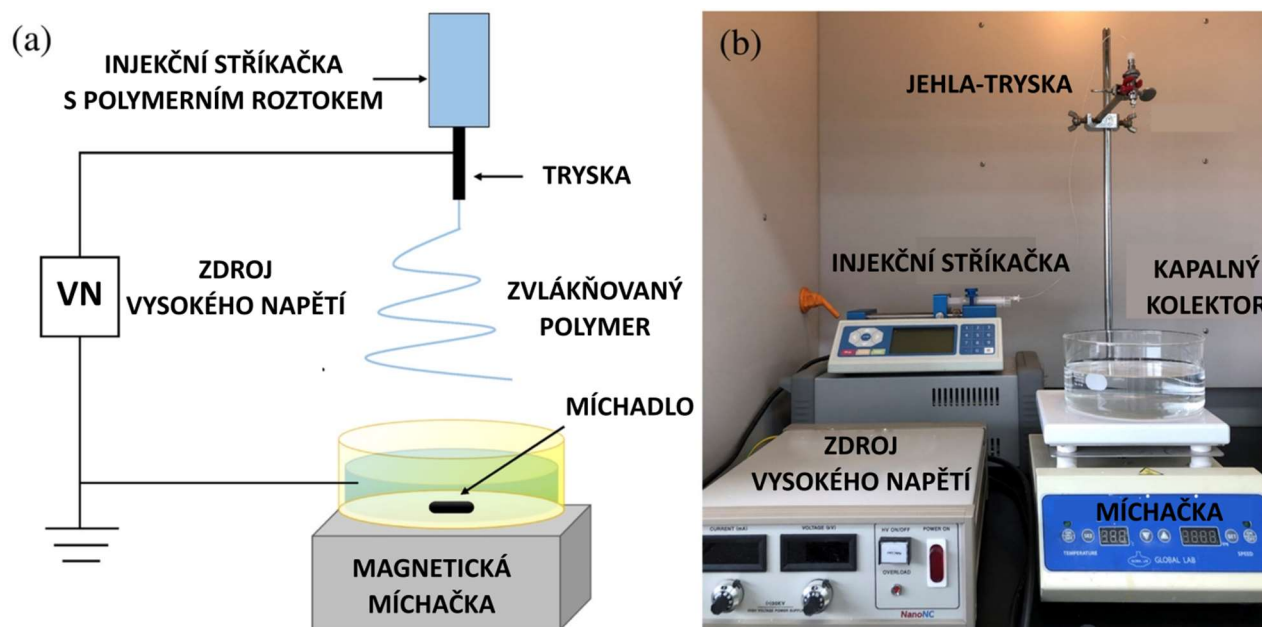
noření a je možné vyšetřit parametry, a tím lépe ukázat vztahy veličin, které vedou k noření vláken. Tento model je brán jako platný pro kontaktní úhly $\theta \geq 90^\circ$. Systémy vláken s menšími kontaktními úhly jsou pokládány za samovolně nořící se. Model je schopen vizualizovat tvar rozhraní hladiny kapaliny, což bylo potvrzeno experimentem. Praxe zvlákňování elektrickým způsobem z více důvodů teorii jednoznačně neodpovídá. Model je přesto důležitý pro pochopení principů a podmínek noření. Teorie predikovaná matematickým modelem při ověřování však neodpovídá praxi, vlákna se noří i při větších kontaktních úhlech. Hlavním důvodem, proč teorie v podmínkách elektrického zvlákňování do kapaliny neodpovídá praxi je zřejmě zejména přítomnost zbytkového rozpouštědla ve vláknech, jež zásadně mění kontaktní úhel, a tedy povrchové napětí. Podle některých studií si zvlákněný polymer uchová zbytky rozpouštědla v řádech jednotek až desítek procent i po vytvoření vlákenné vrstvy [141]. V případě zvláknění do kapaliny tedy nedopadá obvykle do kolektoru suché vlákno reprezentované samotným polymerem, ale směs polymeru a rozpouštědla. V procesu noření jsou i jiní činitelé, které nejsou v teoretickém modelu zahrnuty, jako je například elektrokapilarita [133, 134], kinetická energie vlákna atd.

Zajímavostí je, že vzhledem k tomu, že kapilární síly způsobují vytlačení kapaliny i z oblastí mimo nořený objekt, můžeme tedy říci, že v těchto mikro rozměrech neplatí Archimedův zákon dle jedné z jeho původních definic, tak jak je někdy citován. tj. „*Těleso ponořené do kapaliny je nadlehčováno silou rovnající se tíze kapaliny stejného objemu, jako je ponořená část tělesa*“ [142]. Tomuto problému se lze teoreticky vyhnout použitím znění, jež se vyskytuje v anglosaské literatuře „*je nadlehčováno silou rovnající se tíze kapaliny tělesem vytlačené*“ [143], kde pod vytlačenou kapalinu může být zahrnuta i část, jež je vytlačena následkem působení kapilárních sil.

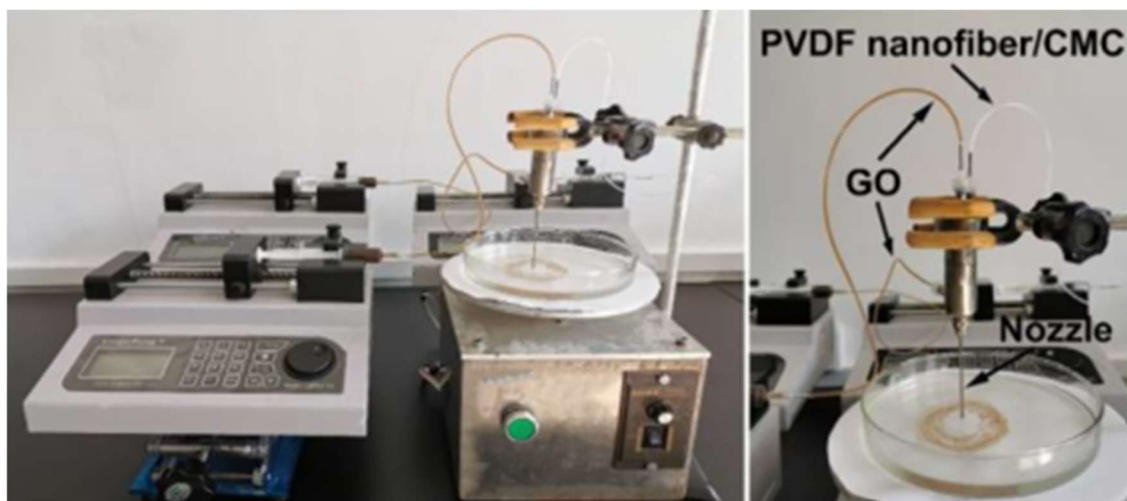
5 Návrh a vytvoření zařízení pro wet elektrospinning

Již pro první praktické experimenty s wet elektrospinningem byl vytyčen cíl neprovádět experimenty na improvizovaných zvlákňovacích sestavách a zařízeních složených z různých laboratorních pomůcek a jednotlivých dílů. Systémově vytvořené řešení kompletu zařízení umožní dodržení sejných a definovaných definovaných podmínek procesu.

Důvodem je nutnost sestavování experimentu v laboratořích, kde se pracovní prostor sdílí s jinými pracovníky a kromě výstavby je nutné sestavu pravidelně sklízet. Taková je laboratorní praxe, kdy se o laboratorní prostor dělí více vědeckých pracovníků a není možné nechat aparaturu pro jeden typ experimentu nastálo sestavenou v prostoru a je nutné s ní manipulovat. Při pečlivém sledování současného stavu, je patrné, že pokud jsou v publikovaných zdrojích zařízení vůbec popisována či znázorněna, jsou tato zařízení vlastně složena jednorázově z laboratorního vybavení nebo improvizovaných pomůcek. Při opakování experimentu se zařízení opět sestavují z jednotlivých částí a opět se musí řešit jejich osazení nástroji, úchyty atd. Časté skládání a opětovné rozkládání vede k různým odchylkám v použitém sestavení či dokonce vybavení a tím i změnám nastavení procesu vláknění. Obecně jsou tedy všechny v člancích zdokumentované wet elektrospinning procesy zaměřené na tkáňové inženýrství tvořeny v improvizovaných podmínkách s laboratorním vybavením [90, 144]. Příklady improvizovaných nastavení v laboratorních podmínkách jsou na obrázcích (Obr. 48) a (Obr. 49). Jedním z hlavních důvodů pro sestavení vlastního zařízení je tedy snaha o vyloučení nevyhovujícího improvizovaného sestavení, a s tím spojené změny či záměny komponent, časových ztrát při nastavení a následném sklizení laboratorního prostoru. Zároveň je cílem zařízení sestavit ho tak, aby umožnilo jednoduchou obsluhu a nastavení v rámci jednoho přenositelného bloku.



Obr. 48 – Obrázek ukazuje příklad praktické sestavení elektrického zvlákňování do kapaliny. a) Blokový princip vláknění do kapaliny pomocí vysokého napětí. b) Fotografie reálného nastavení v digestoři a rozmístění, fotografie je bez vodičů vysokého napětí. Obrázek převzat [144].



Obr. 49 – Fotografie laboratorních zařízení pro koaxiální zvlákňování do kapaliny, fotografie je bez vodičů vysokého napětí. Obrázek převzat [90].

5.1 Koncept hlavních principů zařízení

Koncept zvlákňovacího zařízení byl zamýšlen jako flexibilní modulární platforma umožňující široký rozsah prováděných experimentálních nastavení, včetně přípravy pro případné snadné výměny zdroje DC za AC. Takové zařízení má umožnit relativně rychlé a pohodlné nastavení parametrů procesu a modularitu při testování různých kolektorů. Prioritou je tedy reálná flexibilita použití takového zařízení při laboratorní praxi. Snahou je taktéž minimalizace kovových částí, nejen z důvodu bezpečnosti, ale i z důvodu prevence nežádoucích vlivů při zvlákňování pomocí vysokého napětí (VN). Použitím 3D tisku nebo pořízením běžných komerčních produktů na tohoto zařízení je zajištěn relativně snadný up-grade i opravy zařízení a jeho případná replikace. Při výrobě zařízení je tedy hlavním cílem minimalizace nestandardních dílů a dílů jež nejsou snadno replikovat na 3D tisku nebo komerčně pořídit.

Zařízení bylo původně koncipováno jako elektronicky ovládaný univerzální manipulátor s širokými možnostmi nastavení. Bylo plánováno umožnit plynulou změnu vzdálenosti trysky od hladiny kolektoru a také řízení v osách x a y . Nicméně, vzhledem k primárně experimentální povaze zařízení a potenciálním komplikacím spojeným s provozem elektroniky v blízkosti vysokého napětí byl elektronický koncept elektronicky řízeného manipulátoru opuštěn.

Primární myšlenkou bylo vytvořit zařízení, které by bylo flexibilní a snadno ovladatelné. Pro dosažení této flexibility byly klíčové části naplánovány jako pevně připevněné komponenty, což umožnilo snadnou přepravu zařízení jako celku. Zvláštní pozornost byla věnována hygieně, zejména při práci s kapalinami. Zařízení bylo navrženo tak, aby umožňovalo dezinfekci a čištění povrchu od případných úniků kapaliny nebo odstranění zbytku roztoku polymeru, který by mohl zařízení znečistit.

Dalším důležitým aspektem bylo uložení kapalinového kolektoru. Bylo nutné zajistit, aby různé nádoby mohly být snadno připojeny a odpojeny, což umožňuje manipulaci s celou nádobou bez potřeby zásahu do konfigurace nastavení parametrů komponent. Toto bylo klíčové zejména pro obsluhu uzemňovací svorky, která většinou bývá umístěna ve spodní části nádoby.

Základním požadavkem byla také flexibilita v možnosti uchycení různých trysek a funkčních zvlákňovacích celků. To umožňuje testování různých jehel a systémů dopravy roztoku polymeru. Důležité

bylo zajistit bezpečné a kontrolované přivedení vysokého napětí, což bylo provedeno s ohledem na plynulé nastavení výchylky uchycení ve všech třech osách (x , y , z). Zařízení bylo také konstruováno s ohledem na případnou možnost uchycení robustnější aparatury na AC elektrospinning [7]. AC varianta procesu zvláknování používá zpravidla rozměrnější a těžší vodiče, proto musí být zařízení schopné tuto váhu unést a umožnit i mechanické uchycení přírodního vodiče.

Tento komplexní přístup k návrhu zařízení zajišťuje jeho univerzálnost, variabilitu použití a schopnost přizpůsobit se různým experimentálním potřebám v oblasti zvláknování metodou wet elektrospinningu pro tkáňové inženýrství.

5.2 Konstrukce

Základním prvkem konstrukce byla navržena nosná platforma, jejíž základem je laminovaná dřevotřísková deska, jež má dobré mechanické vlastnosti, voděodolnost a lze ji dobře čistit a dezinfikovat roztokem alkoholu. Rozměr byl zvolen tak, aby umožňoval umístění a manipulaci v laboratorní digestoři. Platforma byla osazena protiskluzovými vyvýšeními podložkami, zajišťujícími nejenom stabilitu, ale i prostor pro uložení zemního vodiče a zvýšení vzdálenosti od kovového povrchu digestoře a případných úniků kapalin. Boky platformy byly osazeny úchyty pro praktické a ergonomické uchycení při přenášení. Čelní strana byla vybavena úchytem pro jednoruční vertikální přenášení a usnadnění manipulace. Zadní strana byla vybavena protiskluzovými patkami pro vertikální skladování.

Konstruování dílů pro tisk na 3D tiskárně bylo realizováno v programu Blender [145] s pomocí modulu plug-in CADsketcher [146] umožňující parametrické kreslení. Některé díly byly konstruovány pomocí programu FreeCAD [147]. Při návrhu dílů bylo již bráno v potaz, jakou metodou výroby a jakým typem 3D tiskárny bude díl vyráběn tak, aby byl co nejsnadněji a nejkvalitněji vyroben. Na toto je brán zřetel, protože výrobní technologie mají své konstrukční limity a například 3D tiskárny typu FDM (filamentové) nemají u výsledného produktu pevnost stejnou ve všech osách, osa z má oproti ostatním sníženou pevnost v tahu a smyku (soumezném stříhu). To je způsobeno tím, že osa z není tištěna v kuse, ale chronologicky navyšována po cca 0,15-0,2mm, takže je výrobek defacto složen z tenkých, na sebe natavených řezů, což mu v tomto směru výrazně snižuje pevnost.

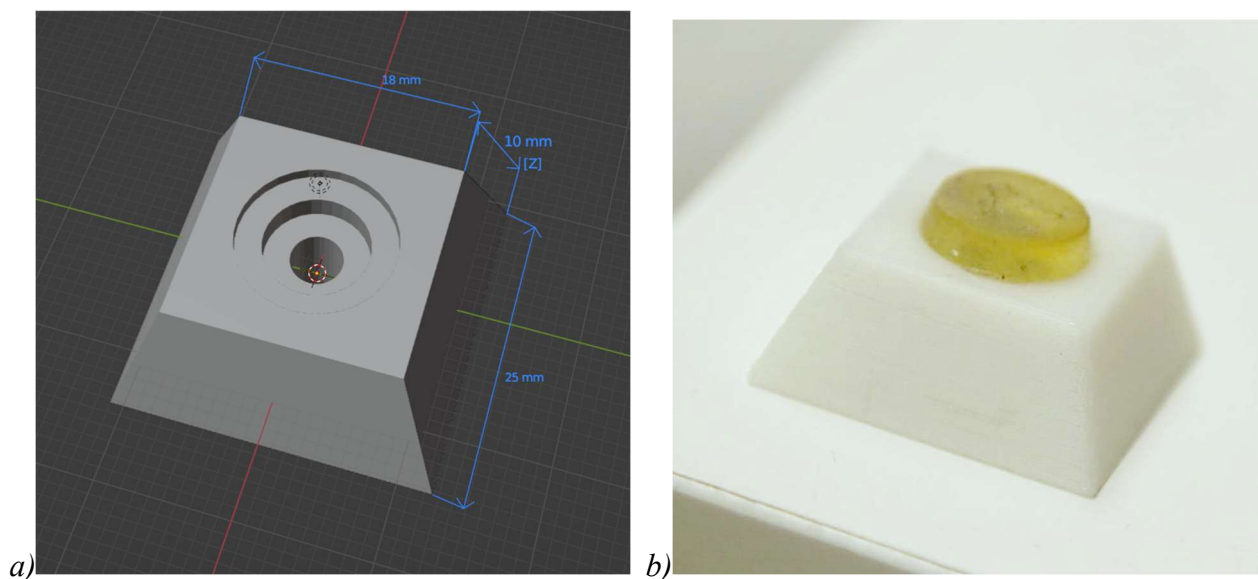
5.3 Výroba

Výroba zařízení byla rozdělena podle funkčních celků, vyráběna s ohledem na maximální funkčnost a praktičnost. Cílem bylo kvalitní vyrobení dílu a jejich přesné sesazení dle nákresu. Výrobní proces byl navržen tak, aby v ideálním případě umožňoval snadnou replikovatelnost výroby.

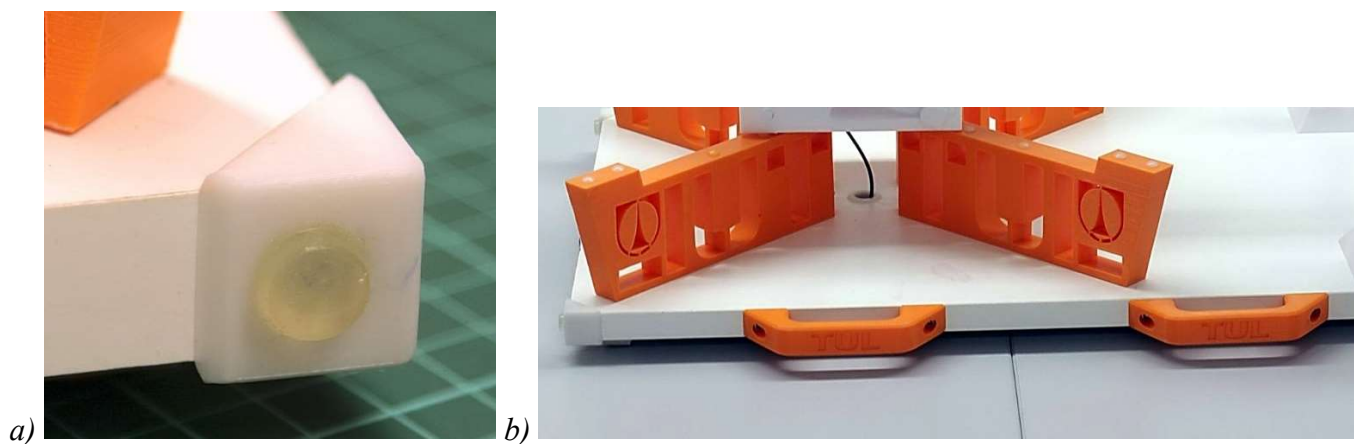
5.3.1 Základní deska

Prvním krokem ve výrobě bylo vyrobení základní desky o rozměrech 470 x 370 mm a tloušťce 18 mm. Tato tloušťka zajistí pro dané rozměry prostorovou stabilitu a rozměry umožní mít dostatečný prostor pro osazení naplánovaného příslušenství zařízení, a to při zachování relativně malých rozměrů, které umožní manipulaci se zařízením jedním člověkem. Tento rozměr umožňuje i snadné umístění do laboratorní digestoře. Samotná deska je dřevotřísková laminovaná pomocí melaminové pryskyřice, jejíž povrch je voděodolný. Boky základní desky byly dodatečně laminovány natavením boční hrany. Základní deska byla opatřena distančními nožičkami vyrobenými 3D tiskem viz obrázek (*Obr. 50*). Nožičky byly po připevnění opatřeny silikonovými protiskluzovými podložkami, které zároveň uzavírají otvor pro vrut spojující díl s deskou. Uzavření minimalizuje otvory konstrukce a místa pro kontaminaci povrchu. Deska

byla opatřena 3D vytištěnými úchyty a patkami na zadní straně s protiskluzovými silikonovými podložkami. Deska je tedy uzpůsobená k stabilnímu stání v pracovní poloze tak, aby byla vyvýšena nad povrchem nebo byla skladována svisle a tím pádem zabrala méně prostoru.



Obr. 50 – Ukázka konstrukce distanční podložky. a) Obrázek konstrukce distanční protiskluzové podložky základní desky, uprostřed je patrný otvor pro vrut, který je opatřen zádlabem pro silikonový protiskluzový blok. b) Detail distanční protiskluzové podložky-nožičky, která vyvyšuje platformu a zajišťuje její stabilitu.

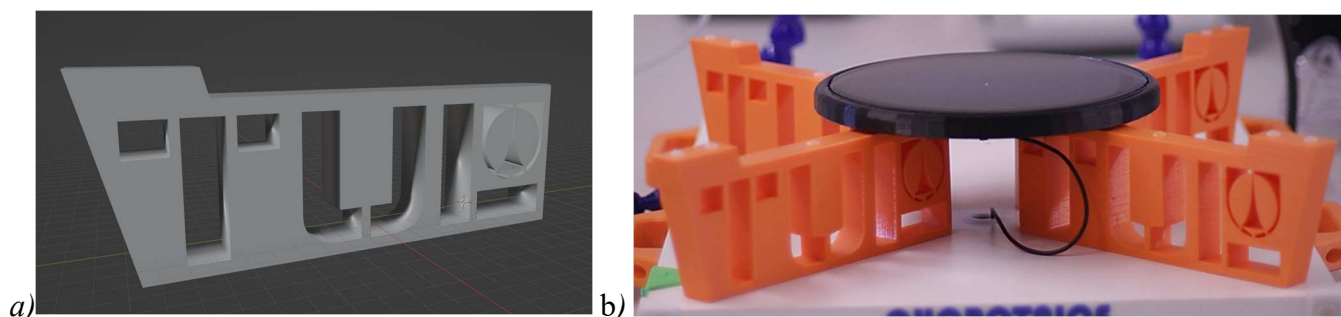


Obr. 51 – Ukázka konstrukce dílů zařízení. a) Detailní pohled na hranu rohu, která zároveň slouží jako podložka při vertikálním uložení. b) Znárodnění umístění bočních rukojetí, které slouží k manipulaci a uchopení při přenášení, na každém boku jsou dvě rukojeti. Pátá rukojeť je na zadní straně a slouží k cestovnímu přenášení bez příslušenství.

5.3.2 Platforma pro nádobu na kapalným kolektor

Druhým krokem byla výroba vyvýšené platformy pro uložení nádoby kapalného kolektoru. Tato část byla již v konstrukci navržena s ohledem na nutnost manipulace s kapalným kolektorem a potřebu připevňovat uzemňovací svorku ke kolektoru. Z tohoto důvodu byla platforma kolektoru vyrobena jako čtyři jednotlivé podstavce, dávající prostor pro manipulaci s vodičem uzemnění. Prioritou tedy bylo umožnění manipulace s uzemňovacím aparát dle potřeb konkrétního kolektoru. Zvolení 4 kusů podstavců sice snižuje plochu

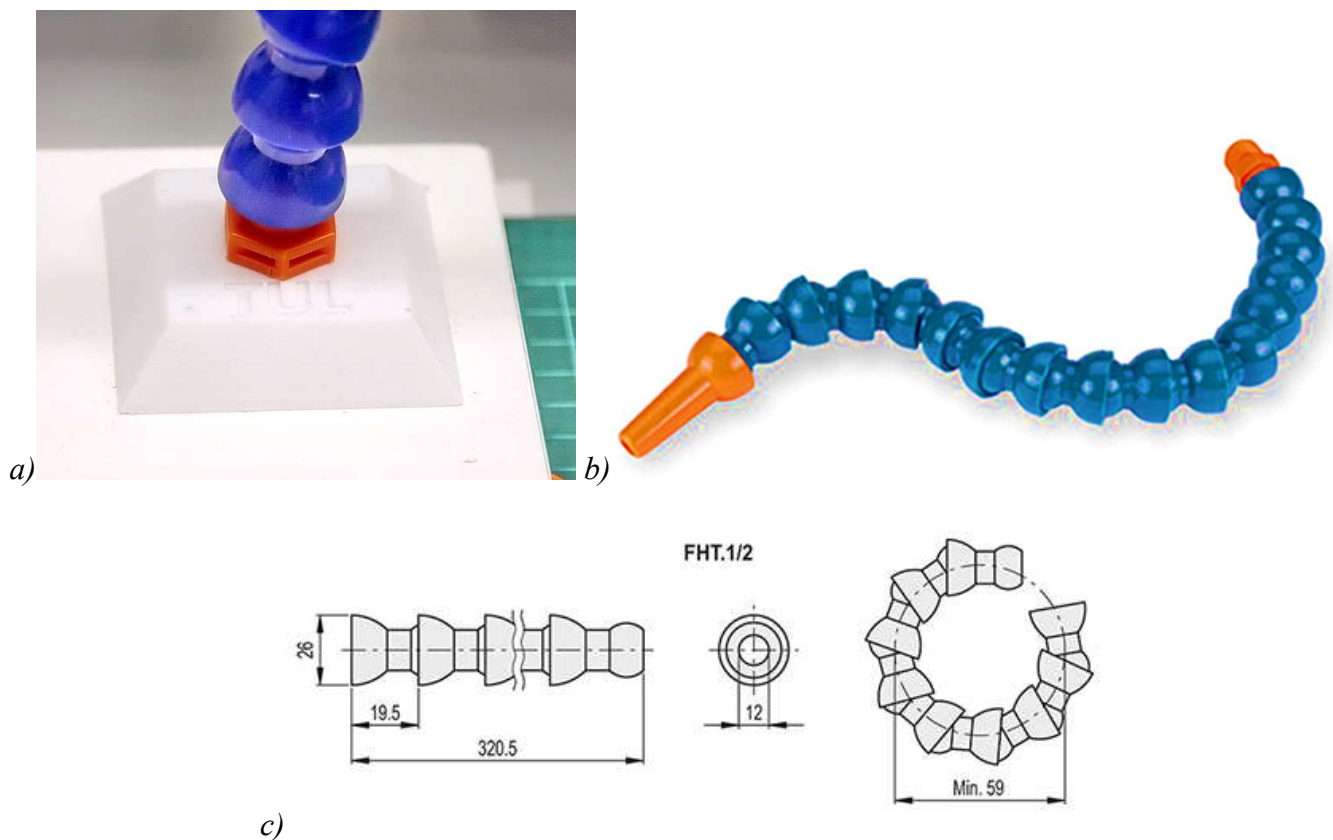
kontaktu s kolektorem, ale maximalizuje prostor pro manipulaci pod kolektorem. Snížený kontakt nádoby kolektoru s podstavcem a tím spojené riziko pohybu kolektoru byl vyřešen montáží protiskluzových silikonových podložek. Teoreticky by bylo možné implementovat pouze 3 podstavce, což by zvětšilo manipulační prostor pod kolektorem a zároveň při třech kontaktních bodech je negována možnost, že podstavce nebudou tvořit svou vrchní hranou rovinu tak, jako při použití 4 podstavců. Nicméně, konstrukce se ukázala natolik přesná, že 4 bodový systém se silikonovými podložkami je s dostačenou přesností v rovině. Tří bodový podstavcový systém je stále velmi lákavé řešení pro další podobné konstrukce nebo pro případný upgrade.



Obr. 52 – Ukázka konstrukce platformy pro kolektor. a) Obrázek konstrukce podstavce kolektoru, systém uložení kolektoru je složen ze 4 kusů těchto prvků. b) Konečné uložení podstavců, na horní ploše jsou patrné silikonové adhezni podložky zajišťující stabilitu kolektoru.

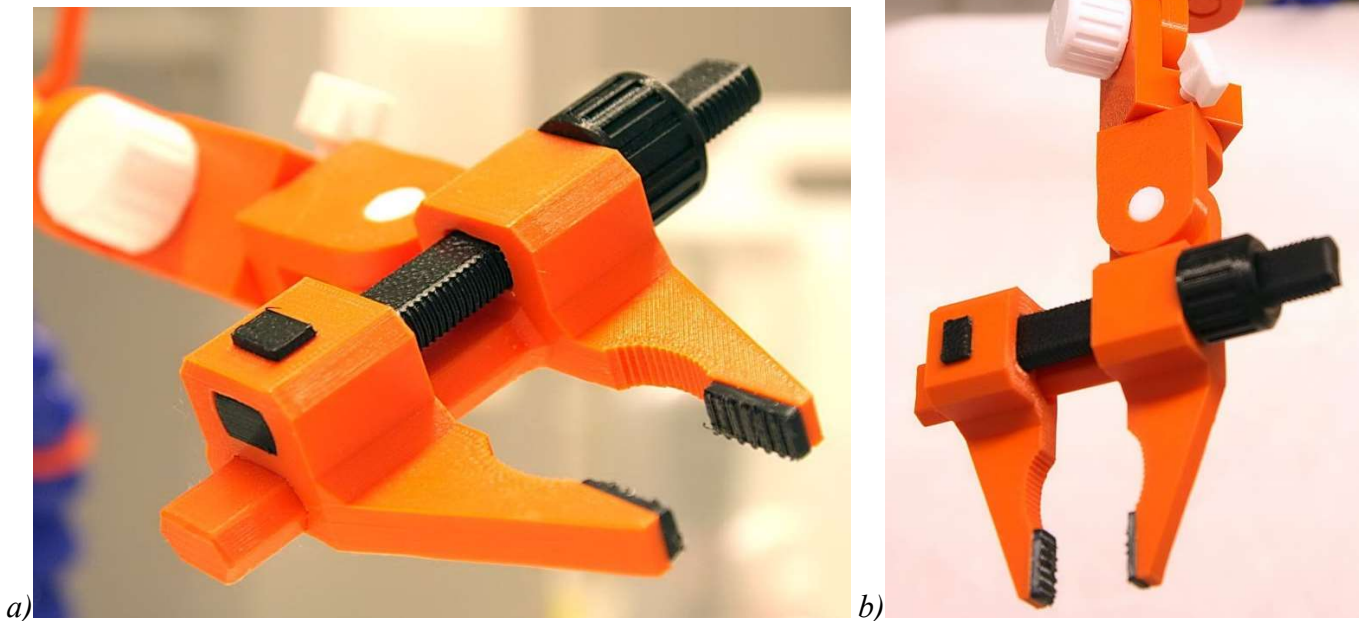
5.3.3 Úchyt na zvlákňovací aparaturu s nastavitelným ramenem

Jako třetí konstrukční prvek byl vyroben univerzální úchyt na zvlákňovací systém – trysku. Úmysl konstrukce úchytu byl v prvním konceptu jako elektronicky řízený úchyt kartézského typu, tak jako většina FFD tiskáren. To by umožňovalo přesný, elektronicky nastavitelný a programovatelný pohyb zvlákňovací soustavy. Vzhledem k nutnosti použití mnoha elektronických ovládacích prvků a kovových dílů, spolu s vysokým napětím a přehodnocení priorit konstrukce byl tento princip pro experimentální zařízení opuštěn. V principu není výhodou elektronického řízení úchytu potřeba a rizika spojená s provozem v tomto prostředí převažovala nad potenciálním přínosem této technologie ovládání. Myšlenka jednoduché a snadno ovladatelné konstrukce převládla nad sofistikovaností elektromechanické varianty. Na místo toho byl zvolen držák z izolačních materiálů tak, aby se minimalizovala rizika spojená s provozem vysokého napětí. Jako rameno manipulátoru, na který bude samotný úchyt aparatury připevněn, byl zvolen článkový kloubový systém využívaný zejména pro nízkotlaké kapalinové aplikace. Jedná se o trubici, tvořenou články, jež jsou na jedné straně vnějším a na druhé straně vnitřním kloubem. Jednotlivě pospojovány, tak tvoří soustavu těsných kloubů a zajišťují vysokou flexibilitu. Z důvodu velké únosnosti byla zvolena velikost G1/2“ s délkou 600mm, vnější průměr článku této trubice je 26mm. Trubice s takovýmto průměrem již mají adekvátně velkou nosnost a jsou schopné stabilně udržet aparaturu, aniž by docházelo k samovolnému pohybu. Konstrukčně byl držák navržen jako dvojitý, stávající se ze dvou trubic, pro zvýšení únosnosti a stability. V případě potřeby lze jednu trubici odpojit a využít například jako pomocný držák silného vodiče vysokého napětí nebo hydraulické soustavy zajišťující vláknění.



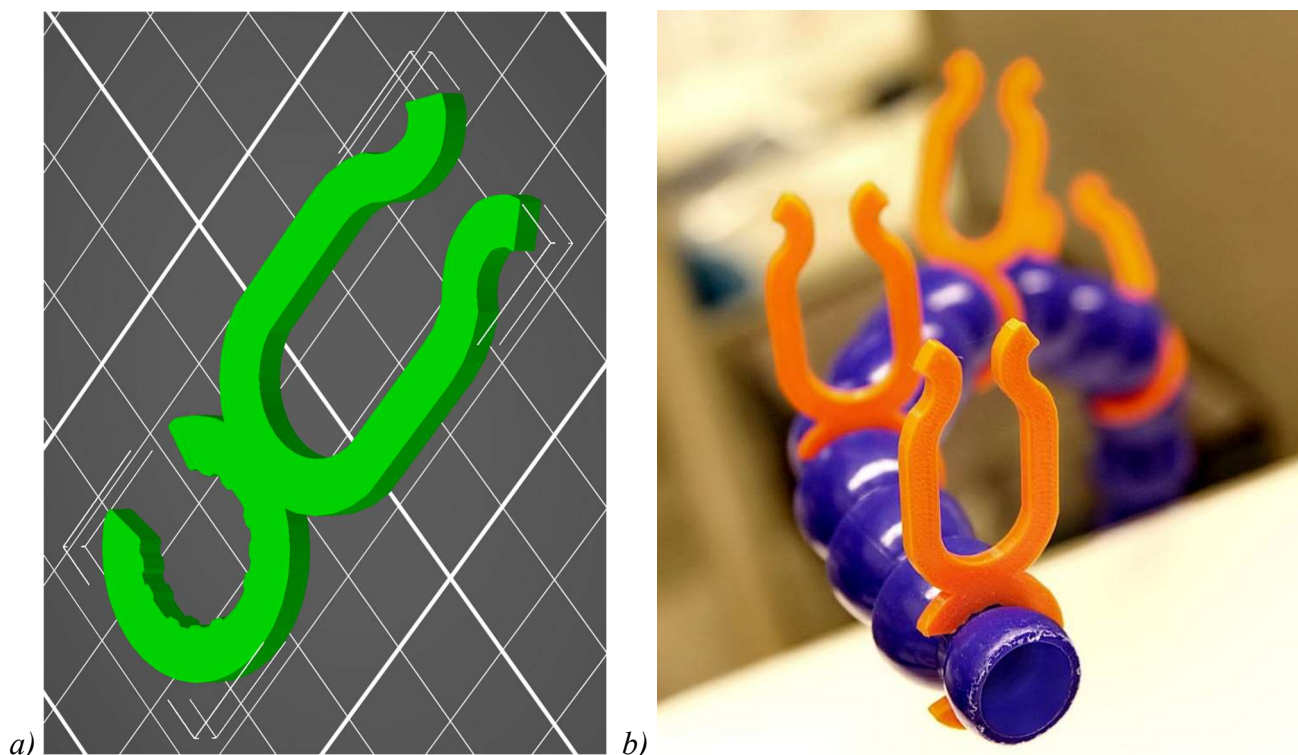
Obr. 53 – Ukázka konstrukce a dílu ramene manipulátoru. a) Detailní pohled na přichycení ramene trubice k základní desce. b) Fotografie komerčně dostupné nízkotlaké trubky [148]. c) Technický náčrt základních údajů. Délka je modulární, přidáváním a odebráním jednotlivých segmentů lze délku upravovat dle potřeby [148].

Výhodou tohoto řešení je velký rozsah pohybu, maximalizující pracovní prostor, snadný pohyb v celém rozsahu, natáčení a naklánění pracovního nástroje/univerzálního úchytu. Nastavení je velmi rychlé a snadné, zároveň je konstrukce dostatečně pevná a rigidní, čímž zajišťuje stálost nastavení a tím zabezpečí, že v průběhu experimentů nebo technologických přestávek nedochází pohybu či změně vzdálenosti vlivem tíhy aparatury. Jako samotný úchyt aparatury (gryp) byl zvolen úchyt poměrně jednoduché konstrukce, nicméně zajišťující pevné a stabilní uchopení zvlákňovací aparatury. Konstrukce je zcela vytisknutelná na 3D tiskárně, z důvodu snadné modifikace a reprodukce. Tímto byla zabezpečena možnost upgradování a snadná implementace konstrukčních změn, za dodržení nízkých nákladů. Základem úchytu byl zvolen již vytvořený model [149] z online databáze Thingiverse [150]. Tento model byl modifikován tak, aby umožňoval uchycení k ramenům manipulátoru. Úchyt má kombinované čelisti, částečně ploché, částečně vypouklé s vroubkováním pro lepší uchycení kulatých předmětů. Úchyt je ovládán stahováním závitů pomocí ovládací matky. Plochá část čelisti byla opatřena flexibilní vložkou pro zvýšení pevnosti úchytu. Všechny díly úchytu byly vytištěny pomocí 3D tisku, včetně flexibilní vložky, která byla vytištěna flexibilním materiálem TPE [151]. Takto vytvořený úchyt umožňuje pevné sevření zvlákňovací aparatury pomocí závitového sevření čelistí, bez nežádoucího samovolného stahování čelistí bez uchycené aparatury. Uchycený předmět je stabilní a nemá tendence k prokluzu díky flexibilní čelistní vložce. Samotné čelisti jsou v úchytu na trubice vybaveny rotačním prvkem, lze je tedy natáčet dle požadavku experimentu, zároveň mají dva klouby pro horizontální náklon čelistí o $\pm 90^\circ$.



Obr. 54 – Ukázka konstrukce univerzálního úchytu zvlákňovací aparatury. a) Detail úchytu zvlákňovací aparatury, jeho sevření je prováděno rotačně posunem závitu v matce (černá polymerní závitová tyč, kulatá černá matka), na konci čelistí jsou vloženy vytisknuté protiskluzové flexibilní vložky [149]. b) Snímek, na kterém jsou patrné tři rotační mechanismy, které dávají úchytu volnost manipulace [149].

Pro vedení hydraulické přenosové soustavy a pro uchycení vodiče vysokého napětí byly zkonstruovány držáky, které jsou schopny udržet požadované prvky a zajistit jejich stabilitu, vyloučit jejich kontakt s vodní lázní. Držák je dimenzován i na silně izolované vodiče střídavého napětí, je k ramenům připevněn samosvorně a umožňuje případnou rotaci. Zúžení na konci zabraňuje vypadávání uchycených prvků, následně rozšířený konec naopak usnadňuje zavedení do držáku viz obrázek (Obr. 55). Stejně je rozšířen i konec, jež se zasouvá na trubici úchytu. V této části jsou vytvořeny zuby, zvyšující bodový tlak na trubici a tím stabilitu v nastavené poloze.

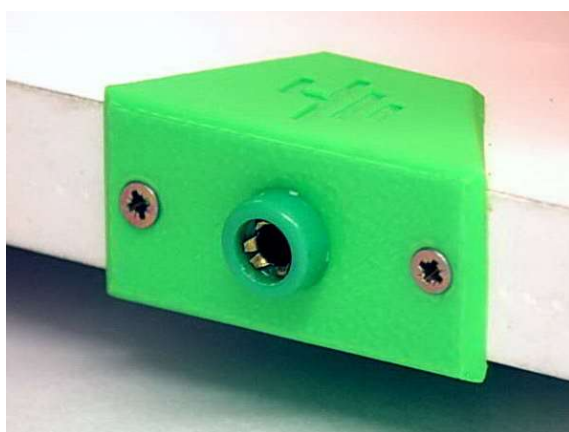


Obr. 55 – Ukázka konstrukce držáku kabeláže a hydraulického systému. a) Konstrukce držáku hydraulické soustavy a vodiče vysokého napětí. b) detail čelisti, na kterém je patrný rotační mechanismus úchytu.

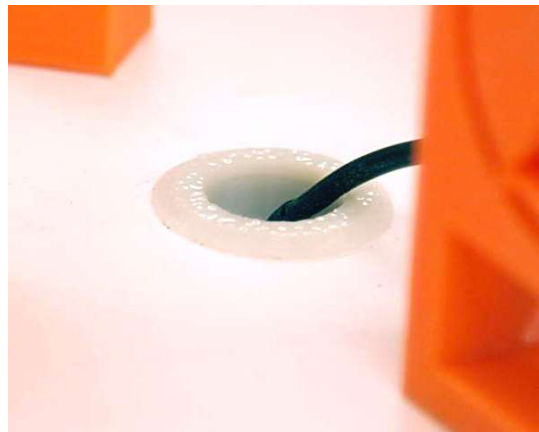
5.3.4 Zemnicí soustava

Principiálně velmi důležitým prvkem pro použití se stejnosměrným zdrojem napětí je zemnicí soustava, která slouží k přivedení záporného potenciálu od zdroje vysokého napětí až ke kolektoru. Z praktických důvodů je zemnicí část vedení součástí zařízení. Toto řešení zabezpečuje přivedení záporného potenciálu zespod kolektoru, a přitom splňuje požadavky na snadnou a rychlou přípravu. Zkušenosti se zvláknováním do kapaliny ukazují, že výhodným řešením je přivedení potenciálu do kapaliny středem ve dně nádoby. Jiná řešení mohou nežádoucím způsobem ovlivnit elektrické pole a tím i tvorbu vláken. Při použití bočního přívodu se stává, že vlákna mají tendenci pohybu směrem k vodiči nebo okrajům nádoby. Je tedy žádoucí, aby veškeré záporně nabitě vodiče nebyly umístěny výše, než je kapalina kolektoru. Ve středu mezi podstavci kolektoru byl navržen otvor, kterým prochází vysoce flexibilní vodič uzemnění. Tento vodič je tvořen velkým množstvím pocínovaných měděných drátků. Tímto je zvýšena jeho flexibilita a odolnost proti poškození lámáním v mechanicky zatížených místech. Izolace je pro standartní elektrické napětí, u záporného potenciálu, který je uzemněn, není třeba zvýšené izolace pro vysoké napětí. Izolační materiál je u zemnicího vodiče ze silikonu, což mu zajišťuje vysokou flexibilitu a snadnou údržbu a mechanickou i chemickou odolnost. Začátek obvodu zemnění je na zařízení svorka pro připojení, jež je reprezentována standartní zásuvkou jednopólového konektoru 4 mm typu „banánek“ (banana plug). Zásuvka je integrována do základní desky a její přesah je minimalizován tak, aby nedocházelo k jejímu mechanickému namáhání či poškození. Pro snadné optické rozpoznání je zásuvka zelené barvy, panel zásuvky je také vytištěn ze zeleného polymeru a označen symbolem uzemnění (Obr. 56 A). Ve středu základní desky, mezi čtyřmi podstavci kolektoru, je průchod pro zemnicí vodič. Tento otvor je vybaven průchodkou se zkosenými hranami pro snížení opotřebení vodiče třením na ostré hraně. Průchodka zároveň zabezpečí, že se do otvorem narušeného materiálu desky nedostane kapalina v případě, že při manipulaci

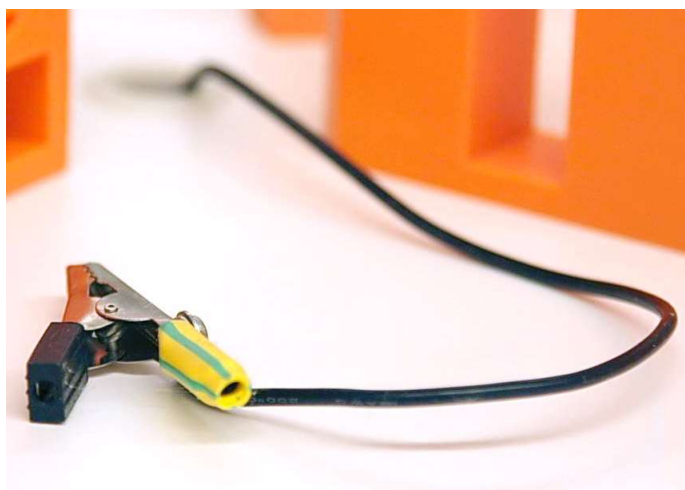
s kolektorem dojde k jejímu úniku (Obr. 56 B). Ve spodní části průchodu je vodič vybaven přídatnou izolační, teplem smršťovací tenkostěnnou bužírkou pro zvýšení ochrany na spodní hraně, kde může působit tahem vodiče tlak na hranu průchodky. Zakončení silikonového vodiče uzemnění je provedeno elektrickou svorkou délky 51 mm, tato „krokosvorka“ umožňuje univerzální uchycení velkého rozpětí konektorů zemnění na kolektoru a je velmi univerzální (Obr. 56 C, D).



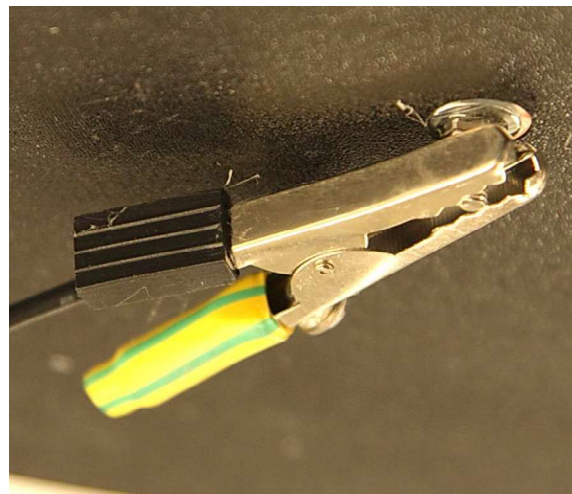
a)



b)



c)



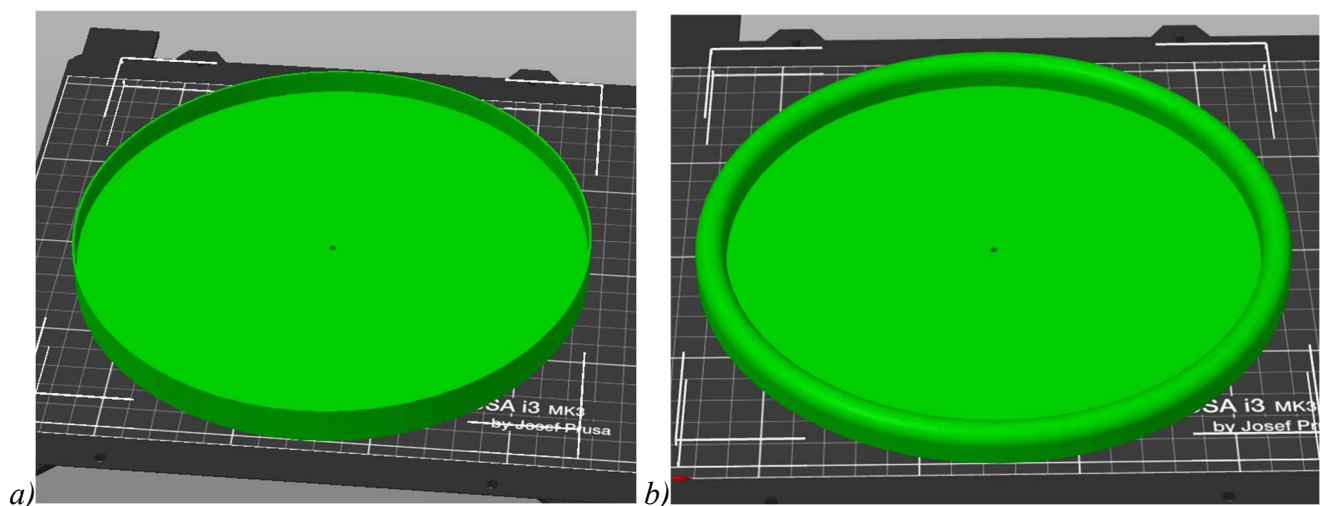
d)

Obr. 56 – Ukázka konstrukčních detailů uzemňovací soustavy. a) Detailní pohled na zabudovanou zásuvku přívodu zemnění, jedná se o standardizovaný 4mm jednopólový konektor „banánek“. b) Ve středu základní desky vytvořený prostup silikonového vysoce flexibilního vodiče, prostup je vybaven vytištěnou průchodkou se zaoblenými hranami. c) Ukončení vodiče uzemnění je provedeno svorkou délky 51 mm, tato „krokosvorka“ umožňuje univerzální uchycení velkého rozpětí druhů zemnění kolektorů. d) Detail příkladu uchycení kolektoru zemnicí svorkou.

5.3.5 Nádoba kolektoru

Dalším prvkem konstrukce zařízení je kolektor. Standardně je pojmem kolektor označováno zařízení, které slouží k zachytávání formovaného vlákenného produktu. Kolektor může být velmi sofistikovaný, ve formě různých rotujících a funkčních celků, nebo může být triviálně jednoduchý, například ve formě kovové uzemněné desky. U wet elektrospinningu však kolektor musí obsahovat kapalinu, která slouží jako pracovní část kolektoru. Právě do kapaliny v kolektoru jsou vlákna formována. Konstrukce kapalného kolektoru

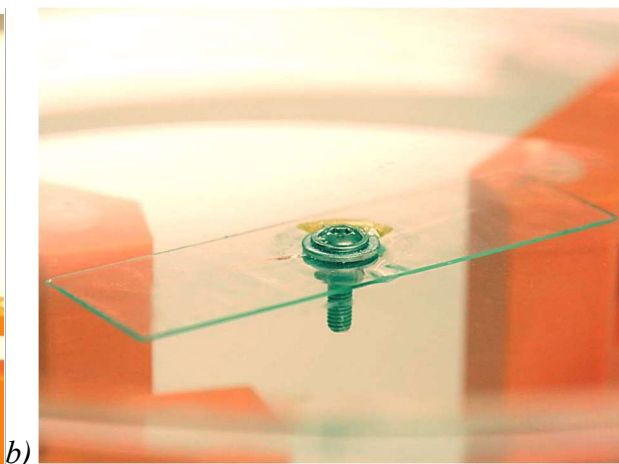
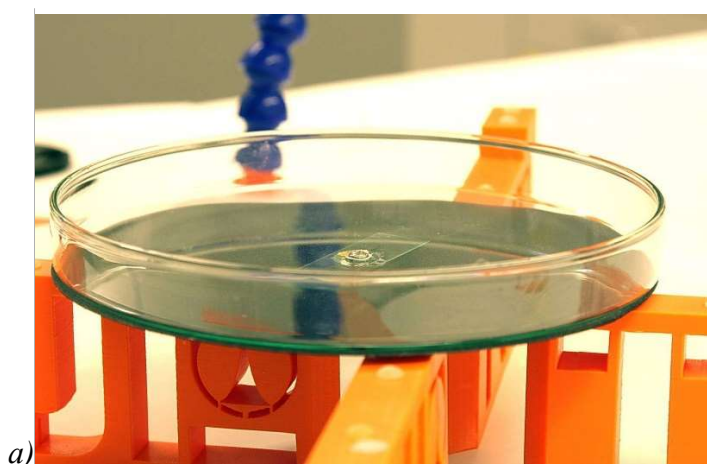
může být různorodá. Pro prvotní testování byla navržena široká nádoba s nízkým okrajem. Nádoba byla navržena jako výtisk 3D tiskárny o vnitřním průměru 180 mm. A hloubkou nádoby 10 mm. Dno bylo zkonstruováno jako samonosné o tloušťce 4 mm tak, aby miska bez deformace stabilně plnila svou funkci i na čtyřbodovém, případně třibodovém, podstavci kolektoru (viz odstavec 5.3.2). K výrobě byl použit prve transparentní PETG (polyethylene terephthalate glycol), tento materiál je poměrně pevný a není křehký. Transparentní barva byla zvolena z důvodu možnosti podsvícení a případné možnosti sledování hladiny kapaliny. Experimenty však ukázaly, že na světlém pozadí nádoby není možné dobře sledovat vlákenné formace v kapalině. Další série kolektorů byla vyrobena z černého PETG filamentu. Černá barva pozadí značně zjednodušila vizuální hodnocení procesu tvorby vlákenných struktur v kapalině, protože bílé vlákenné shluky jsou na černém pozadí velmi dobře vidět. Na tmavém pozadí je v průběhu vlákennění možné hodnotit, zda vlákna v kapalině tvoří materiál. Zkušenosti ukázaly, že za účelem tisku nádoby pro kapalinu je třeba upravit nastavení 3D tisku tak, aby bylo dosaženo minimálních spár ve výtisku a tím minimalizovány možnosti protékání či nasákání kapaliny do materiálu výtisku. Při 3D tisku filamentem (FFF) je tištěný objekt tvořen jednotlivými tahy materiálu, ty jsou vedle sebe a po dokončení celé vrstvy se tisk opakuje o vrstvu výše. Tisknutý objekt se skládá z jednotlivých tiskových filament, které se při jednotlivých průjezdech trysky natavují dohromady a postupně tvoří výrobek. Rozlišují se filamenta vnějšího tisku (takzvané perimetry) a vnitřního (in-fill). In-fill je především strukturální výplň a mnohdy je z důvodu šetření času a nákladů na filament pouze částečná, uvnitř je pouze struktura zajišťující materiálovou pevnost a podporu vrchním perimetrům. Perimetry udávají vnější tvar a jsou viditelné. Standardně při tisku vznikají nedokonalá slinutí jednotlivých vrstev nebo v místech napojení jednotlivých struktur tisku. Je tedy velmi důležité pomocí tiskových nastavení minimalizovat tyto defekty. Experimentováním bylo dosaženo přijatelného snížení „porozity“ 3D výtisku nádoby. Zvýšené kapalino-těsnosti bylo dosaženo zejména zvýšením průtoku polymeru tryskou 3D tiskárny (Extrusion multiplier) oproti standardnímu nastavení, zvýšením překrývání jednotlivých vrstev (XY-Overlap), zvýšením počtu vnějších perimetrů a zvýšením teploty trysky 3D tisku tak, aby se materiál lépe spojoval [152]. Elektroda pro záporný potenciál byla naplánována jako nízký hrot uprostřed nádoby. Ve spodní části nádoby elektroda vystupuje 8 mm tak, aby bylo možné na tuto spodní část připnout zemnicí svorku. Elektroda byla vyrobena z nerezové oceli A2.

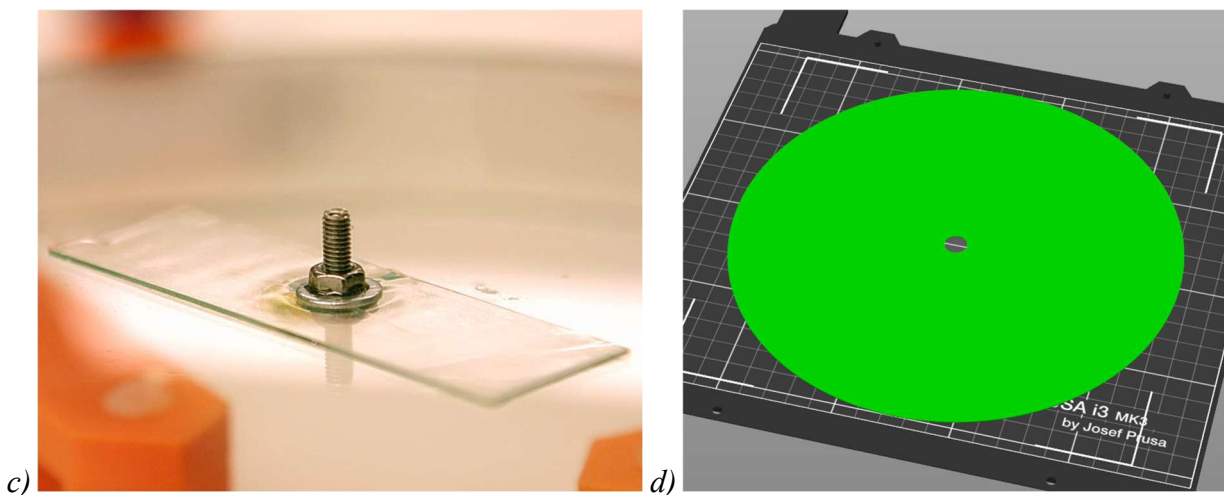


Obr. 57 – Vývoj konstrukce nádoby kolektoru. a) Původní návrh nádoby s 1 mm silnou stěnou. b) Modifikovaný model nádoby se stěnou o tloušťce 10 mm a zaoblením hrany na rádius 5 mm.

V průběhu prvotních experimentů byla nádoba kolektoru přepracována tak, aby její okraj nebyl tvořen úzkou stěnou s okrajem s ostrými hranami (*Obr. 57 a*). Na ostrých hranách může docházet ke kumulaci náboje, proto byla stěna nádoby kolektoru zesílena na 10 mm a zaoblena na rádius R5 tak, aby na okraji nádoby nebyly ostré hrany (*Obr. 57 b*).

Po dlouhodobých zkušenostech se ukázaly nádoby vytištěné pomocí 3D tisku jako ne zcela vhodné pro některá rozpouštědla, při použití například acetonu bylo patrné pronikání acetonu do materiálu kolektoru. Po delší expozici polymerního PETG kolektoru byla patrná změna povrchu nádoby, zjevně způsobené částečným bobtnáním a opětovným vysycháním. Nicméně funkčnost na 3D tiskárně vytištěné nádoby kolektoru nebyla nijak narušena a stále si držela svůj tvar a byla kapalino nepropustná. Jedním z možných řešení by bylo vytištění nádoby z jiného materiálu, například PA (Polyamin – Nylon) či PP (Polypropylen) [153, 154]. Materiál PP i PA je komerčně dostupný pro 3D tiskárny a tiskárna Prusa Mk3s+ je schopna z těchto materiálů tisknout. Tisk těchto materiálů je ovšem technicky náročnější zejména u větších tvarů pro PA z důvodu tepelné objemové změny při tisku. Tisk nádoby z odolnějšího materiálu je tedy řešitelný, nebyl však proveden. Struktura 3D tisku také není zcela hladká a některé zbytky polymeru není možné z takového povrchu při čištění odstranit. Z praktických důvodů byla tedy poslední verze nádoby kolektoru vyrobena ze skleněné Petriho misky o průměru 200 mm [155] (*Obr. 58 A*). Ve středu misky byl vrtákem na keramiku vyvrtán otvor 3 mm, který byl osazen nerezovým šroubem M3 14 mm A2 s imbusovou půlkulatou hlavou (půlkulatá límcová – washer head). Zároveň byl otvor ve skle před vložením šroubu vyplněn transparentní, komerčně dostupnou dvousložkovou epoxidovou pryskyřicí s tvrdidlem 3-Azapentan-1,5-diamin (*Obr. 58 b*). Na spodní straně byl šroub opatřen podložkou a matkou. Mezi podložkou a sklem byla umístěna jednostranná silikonová 1 mm silná páska, která slouží jako hydroizolace a zároveň jako dilatační podložka mezi sklo a podložku (*Obr. 58 c*). Vyčnívající šroub slouží jako zemnicí bod pro připojení svorky záporného potenciálu, díky závitu na šroubu svorka dobře drží i při manipulaci s kolektorovou nádobou. Pro snadnější pozorování průběhu zvláknování byla pro nádobu kolektoru navržena a vytištěna černá podložka, která zvýrazní kontrast mezi osvětlenými vláknennými shluky a černým pozadím. Tím umožní snadnou identifikaci a pozorování procesů formování vláken v kapalině kolektoru (*Obr. 58 d*). Bezspornou výhodou skleněné nádoby s hladkou stěnou je možnost pozorování formování vláknenné struktury v objemu kapaliny boční stěnou a hodnotit dle stanovených kritérií proces noření. Skleněná nádoba se je také vhodnější, protože hladký povrch se lépe čistí a dezinfikuje.





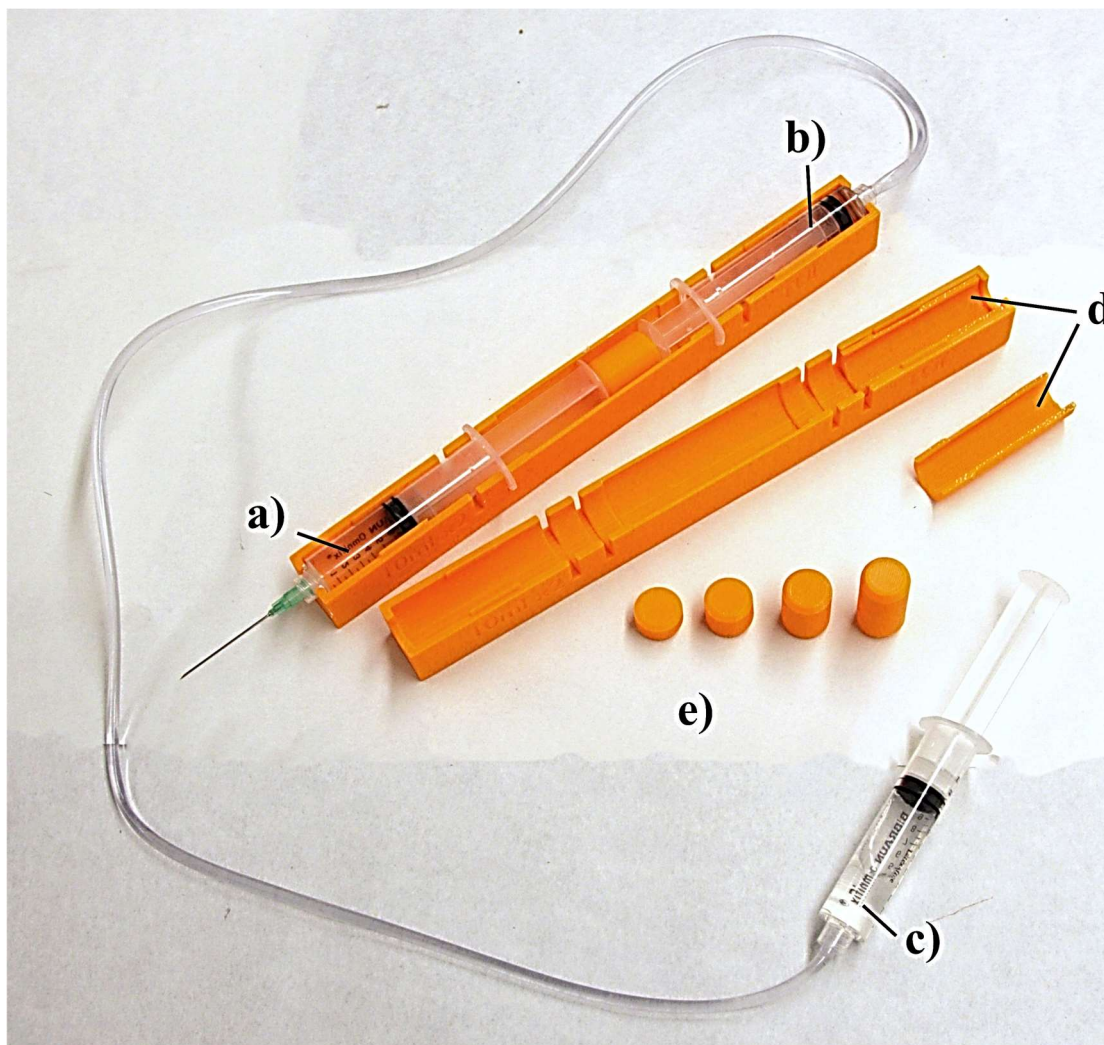
Obr. 58 – Detail konstrukce kolektoru. a) Skleněná nádoba kolektoru vyrobená z Petriho misky, střed nádoby je opatřen otvorem, kterým prochází nerezová elektroda záporného pólu vysokého napětí. b) Detail elektrody uzemnění kolektoru. c) Detail spodní strany elektrody, šroub je uchycen pomocí nerezové podložky a matky s dilatační podložkou. d) Vizualizace návrhu černé PETG podložky pro skleněnou misku kolektoru s průměrem 200 mm, tato podložka slouží ke zvýraznění osvětlených vlákenných shluků v kapalině.

Jako součást návrhu byly vytvořeny i izolační kostky, které měly být využity dle potřeby jako výplň prostoru pod kolektorem. Tyto kostky by se umístily pod nádobu kolektoru a tím by zcela zakryly volný prostor mezi kolektorem a základní deskou tak, aby dodatečně zvýšily elektrickou izolaci ke spodní části zemnicí elektrody. Ukázalo se však, že nádoba kolektoru je velmi široká a vytvořená vlákna nemají tendenci nádobu obejít obloukem a směřovat se ke svorce uzemnění, která je umístěna vespuďu nádoby kolektoru. Izolační kostky byly vyprojektovány a vyrobeny, ale nebyly v projektu nikdy použity.

5.3.6 Hydraulická soustava

Distribuce roztoku polymerního materiálu je zajištěna přímým dávkováním roztoku z injekční stříkačky a jehly, tyto prvky jsou uchyceny univerzálním úchytem popsáným v kapitole 5.3.3. K přesnému dávkování byla naplánována a použita stříkačková pumpa. Z důvodu ochrany pumpy před působením vlivu vysokého napětí bylo dávkování pomocí stříkačkové pumpy naprojektováno jako nepřímé, s hydraulickým přetlakovým systémem. Pro přesné, řízené a spolehlivé dávkování roztoku polymeru pro zvlákňovací proces byla zvolena stříkačková pumpa s elektronickým řízením KFTechnology NE-1000 [156]. Tato pumpa umožňuje programovatelné řízení rychlosti a je přímo konstruována na uchycení injekčních stříkaček různých objemů. Z důvodu použití vysokého napětí a kvůli velkým rozměrům a váze pumpy je vhodné nechat pumpu umístěnou mimo zvlákňovací zařízení. Pumpa byla z důvodu ochrany elektroniky přidavně uzemněna na zemnicím izolovaným vodičem o průřezu 4 mm². Vzhledem k připojení elektrického napětí na elektrodu – jehlu, a tedy roztoku polymeru, nebylo vhodné z důvodu bezpečnosti pumpou napřímo dávkovat stříkačku s polymerem. Vysoké napětí by bylo dávkovací soustavou přítomno na citlivé pumpě a jeho přítomnost by představovala zvýšené riziko z důvodu jak úrazu, tak poškození jiných zařízení. Byl zvolen princip hydraulického oddělení pumpy od roztoku polymeru. Stříkačka v pumpě byla naplněna destilovanou vodou a hydraulicky spojena s prázdnou stříkačkou ve zvlákňovací aparatuře, kde se přenosem kapaliny z plné stříkačky v pumpě (Obr. 59 C) přenáší tlak do pístu prázdné stříkačky. Systém využívá princip pístu. Tato prázdná stříkačka pak vytlačení pístu přenáší sílu pumpy do stříkačky

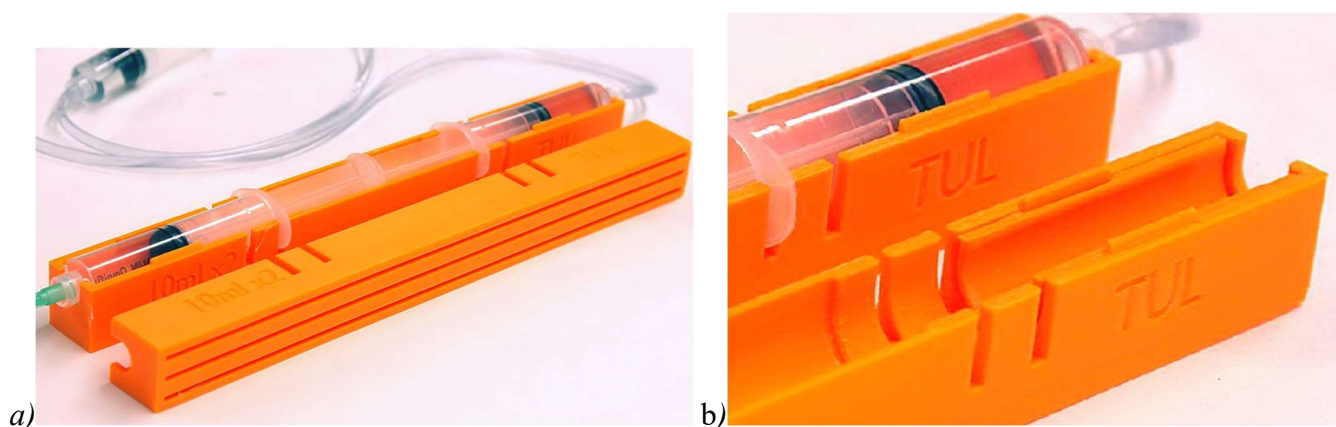
s polymerem zvlákňovaného roztoku (Obr. 59 B, C). Tímto krokem došlo nejen k elektrickému oddělení, ale i racionalizaci hospodaření s roztokem polymeru - při dávkování se nemusí roztokem plnit celá dávkovací soustava, která obsahuje cca 40 cm dlouhou hadičku. Dochází tedy ke značnému zjednodušení manipulace s roztokem polymeru. Objem potřebného polymerního roztoku je pak udržen na nezbytném minimu. Při výměně polymeru se manipuluje pouze se stříkačkou a jehlou (Obr. 59 A).



Obr. 59 – Fotografie hydraulické soustavy zajišťující dávkování polymerního roztoku. Obě horní stříkačky jsou uchyceny v přípravku. a) Stříkačka s polymerním roztokem je opatřena injekční jehlou 0,8x40 mm. b) Stříkačka hydraulického systému je uchycena v přípravku a předává tlak na zvlákňovací stříkačku s polymerním roztokem. c) Stříkačka, jež je umístěna do pumpy, pomocí hydrostatického tlaku předává sílu. d) Vložka přípravku pro vložení 3ml stříkačky do slotu přípravku na 10ml stříkačku. e) Distanční sloupky pro kompenzaci rozdílů vzdáleností pístů v přípravku.

Pro přenos síly tlaku pístu koncové stříkačky hydraulické soustavy do stříkačky s roztokem polymeru byl naprojektován hydraulický přípravek (Obr. 59), který umožňuje opačné umístění dvou injekčních stříkaček, přenos hydraulické síly. Uchycené injekční stříkačky jsou proti sobě zapřené písty. Jedna je prázdná, připojená hadičkou k naplněné stříkačce v dávkovací pumpě. Postupným působením hydraulické kapaliny tlačí svým pístem na injekční stříkačku obsahující roztok polymeru a tím jej vytlačuje injekční jehlou-tryskou. Pro praktické zvlákňování a výrobu jednotlivých sérií vzorků bylo plánováno užití 10ml injekčních

stříkaček [157], a to jak v pumpě, tak v hydraulickém přípravku. Pro testování vláknění menších objemů, například u mikro-výroby nebo u dražších polymerů, byl zkonstruován i přípravek pro 3ml stříkačky. Pro univerzálnost byl přípravek na 10ml injekční stříkačky modifikován tak, aby s použitím vložek bylo univerzálně možné místo 10ml stříkaček uchytit 3ml stříkačku. Toto řešení může umožnit kombinaci 10ml a 3ml stříkaček a tím dělit nebo násobit sílu hydraulického přenosu. Primárním účelem možnosti zapojení 3ml a 10ml stříkaček je v jednoduchosti výměny stříkačky polymeru za jinou bez nutnosti změny hydraulického přípravku. V takovém případě je však nutné brát v potaz změnu průtoku přechodem z injekční stříkačky 10 ml na 3ml nebo opačně. Pro případ doplnění rozdílu délky pístu při použití různých objemů stříkaček nebo stříkaček částečně naplněných, byly součástí projektu i distanční válce v několika délkách pro přenos momentu hydraulické soustavy. Celý přípravek byl konstruován pro výrobu 3D tiskem, zvolena byla minimalistická konstrukce pro snadné vytištění v jednom kuse bez nutnosti použití 3D tiskových podpěr [158]. Pro snadnost obsluhy byla konstrukce vytvořena jako jeden kompaktní díl, který nepotřebuje v základu ani úchyty injekčních stříkaček. Stabilita a pevnost uchycení je zajištěna částečným obejmutím těla injekční stříkačky v úchytu viz (Obr. 60 B, při použití redukce na 3ml stříkačku je princip uchycení stejný, 3ml redukce je obejmutá a fixovaná přípravkem a redukce objímá a fixuje 3ml stříkačku viz obrázek (Obr. 60 b). Tím je zajištěno pevné uchycení a přenos momentu mezi písty. Pro zajištění tvarové pevnosti j přípravek zkonstruován se zesílenou spodní hranou a drážkami pro omezení případných deformací (Obr. 60 a).



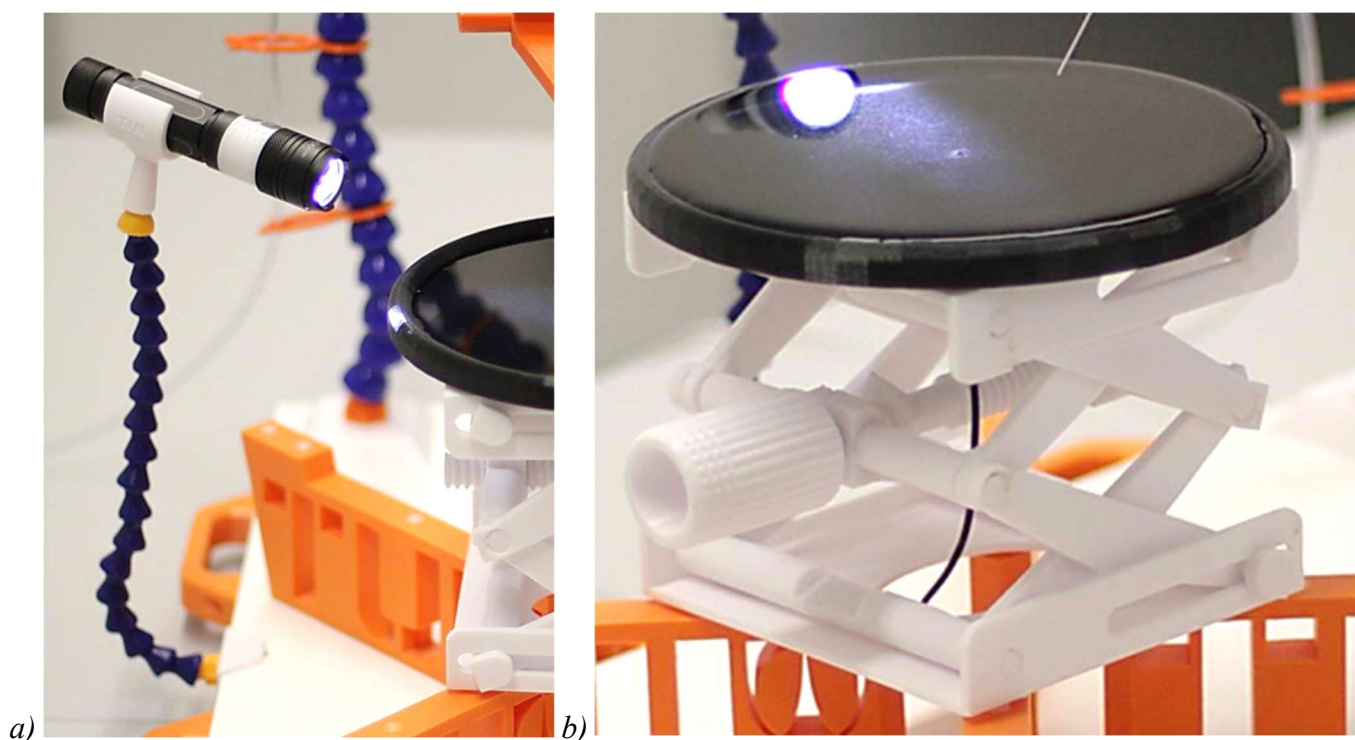
Obr. 60 – Konstrukce přípravku pro přenos hydraulického momentu. a) Detail podstavy přípravku, spodní část je zesílena tak, aby odolala průhybu, nachází se tam tři drážky pro snížení tvarové deformace. b) Detail vložky na 3ml stříkačku ve slotu přípravku na 10ml, uprostřed slotů jsou patné vyvýšené ozuby, které drží pevně stříkačku ve slotu.

5.3.7 Příslušenství

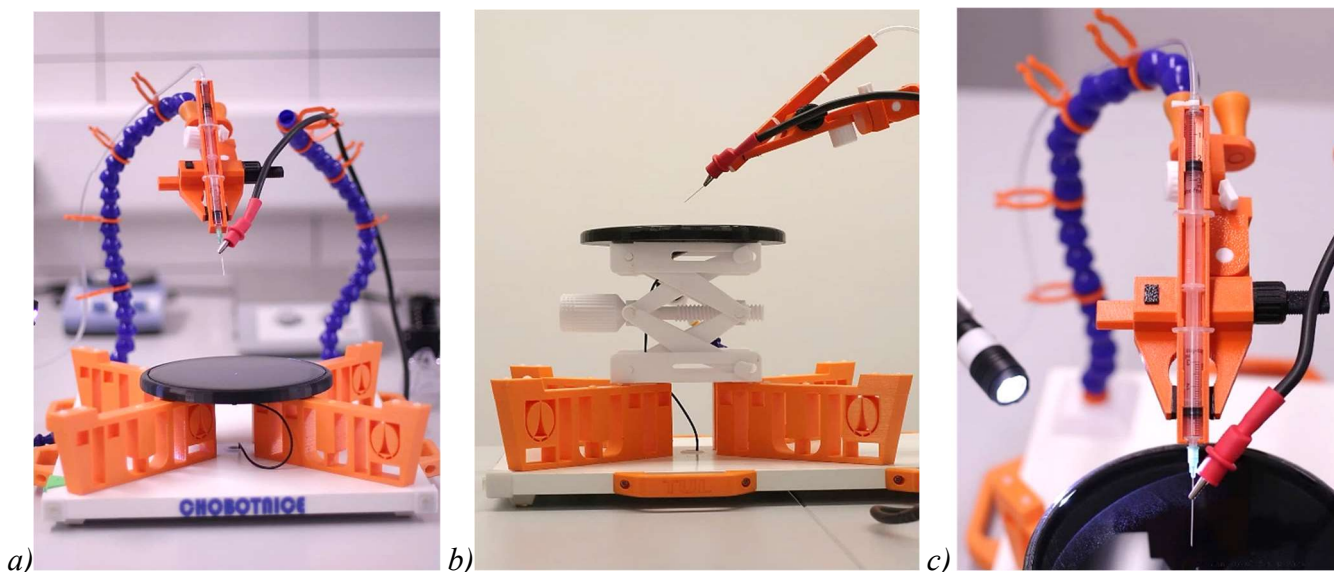
Po prvních testech zařízení, při kterých se testovalo zvláknování, se ukázala potřeba udělat další modifikace a přidat příslušenství. Prosvícení Taylorova kužele - ukázalo se, že je výhodné mít tmavou kolektorovou nádobu a tmavé pozadí při zvláknování tak, aby bylo lépe pozorovatelné, jak se při procesu zvláknování tvoří a pohybují vlákněné shluky. Bylo zjištěno, že tento efekt může umocnit silné boční světlo. Při prosvícení vlákněných shluků a při zachování tmavého pozadí je viditelnost vláken vyšší. Byl tedy navržen a zkonstruován držák LED svítilny, který je flexibilní a bude možné do něj snadno uchytit osvětlení. Svítilna byla pro univerzálnost zvolena LED kapesní s 2500 lumeny svítivosti, Li-ion článkem pro napájení. Bateriové osvětlení bylo zvoleno, aby při vláknění nebylo nutné zapojovat do digestoře další přívodní kabely a svítilna byla elektricky oddělena od všech rozvodů napětí. Flexibilní rameno bylo

vybráno stejného typu jako rameno uchycení držáku zvlákňovací aparatury, jen s menším průměrem článků trubice. Zbylé díly byly opět navrženy pro 3D tisk a vytištěny. Použití osvětlení se ukázalo velmi užitečné zejména při pořizování obrazových záznamů procesu.

Pro testování byla identifikována potřeba přesného a snadno proveditelného modifikování vzdálenosti kolektoru a zvlákňovací jehly. Laboratorní zvedák se zdál být správným řešením, nicméně standartní komerční produkty jsou kovové, a tudíž pro použití pod kolektorem ne zcela vhodné, zejména z důvodu bezpečnosti a ovlivnění směru proudění vláknenných produktů. Z tohoto důvodu byl použit design z laboratorního zvedáku navrženého pro 3D tisk [159]. Ten byl modifikován na míru experimentů. Modifikace spočívaly zejména ve vytvoření velkého prostoru v horní desce zvedáku pro uložení kolektoru se zemnicí elektrodou a umožnění jejího uzemnění pomocí zemnicí svorky. Další hlavní modifikace spočívala v prodloužení hmatníku ovládacího šroubu, pro snadné ovládání i v ochranných rukavicích.



Obr. 61 – Ukázka dodatečných modifikací a vyrobeného příslušenství. a) Celkový pohled na systém uchycení bočního osvětlení vláken, svítilna je umístěna na flexibilním rameni, na konci ramene je uchytená, kam se svítilna zasune. Se svítilnou lze snadno manipulovat a vytvářet světelné podmínky dle aktuální potřeby. b) Pohled na plastový laboratorní zvedák. Zvedák je kompletně vytištěn na 3D tiskárně, ve spodní i horní části byl vyříznut pro snadnou manipulaci a připojení zemnicího vodiče ke kolektoru. Ovládací šroub byl prodloužen, aby usnadnil ovládání. Původní černá nádoba kolektoru je vytištěna z materiálu PETG, uprostřed je v kapalině vidět hrot uzemnění. Tato tištěná nádoba byla v pozdějších verzích nahrazena skleněnou.



Obr. 62 – Fotografie experimentálního zařízení pro elektrické zvlákňování do kapaliny. a) Celkový pohled na zařízení zepředu, v zařízení je umístěn prototyp 3D tištěné nádoby se zaoblenými okraji. b) Boční pohled na část zařízení, kde je vidět platformu pro kolektor, na které je umístěn vytištěný laboratorní zvedák s černou vytištěnou nádobou na kapalinu kolektoru. c) Horní pohled na univerzální držák zvlákňovací aparatury a v něm uchycený přípravek pro přenos hydraulické síly na stříkačku s polymerním roztokem, červená svorka „krokosvorka“ přivádí vysoké napětí na zvlákňovací jehlu.

5.4 Testování a dokončení zařízení

Testování zařízení je rozděleno do tří částí, tyto části na sebe navazovaly, úzce spolu souvisely a někdy se i prolínaly. Jedná se o testování, při kterém se ověřila funkčnost principu, funkčnost navrženého zařízení a testování parametrů, které jsou pro proces zásadní. Zařízení bylo v různých fázích výroby testováno, jak mechanicky, tak funkčně. Toto testování sloužilo k ověření, zdokonalení konstrukce zařízení a jako základ budoucímu hledání materiálů vhodných pro tkáňové inženýrství.

5.4.1 Testování a optimalizace zařízení

Zařízení bylo nejprve testováno za připojování všech rozvodů a uchycováním zvlákňovací aparatury. Poté se teprve připojil aktivní zdroj vysokého napětí a zvlákňoval se první polymerní roztok na pevný kolektor tvořený kovovou deskou s černým papírem. Papír slouží pro separaci vrstvy, černý povrch také umožňuje snadné optické sledování tvorby vlákných vrstev. Jedním z prvních opravných zásahů bylo nahrazení 3D tiskového materiálu PLA (kyselina polyméčná) za PETG (Polyethylene Terephthalate Glycol) u některých funkčních a mechanicky namáhaných částí. Původním záměrem bylo využít pro 3D tištěné díly pouze materiál PLA. PLA je obecně udáván jako ekologicky přívětivý materiál, lze jej vyrobit z kukuřičného škrobu a teoreticky je biodegradabilní [160]. Jedná se o velmi rozšířený materiál. Je obecně považován za základní materiál pro 3D tisk. Z těchto důvodů byly původně všechny díly zprocesovány a vytištěny z PLA. Při používání se však ukázalo, že větší křehkost a nižší teplota tání jsou u některých dílů problematické, proto byly díly jako je například univerzální držák, úchyty pro trubice a držáky kabelů či držák osvětlení přepracovány a vyrobeny z PETG materiálu. Příkladem nevhodného použití materiálu je například použití PLA na univerzální držák aparatury. Ten v několika případech praskl v čelisti či šroub úchyty nevydržel napětí v tahu. Díl pro uchycení trubice z PVA, který je na podložce a drží flexibilní rameno tvořené trubicí s univerzálním držákem, v autě během slunečného dne změkkl natolik, že došlo

k jeho deformaci. Po náhradě za materiál PETG se tyto problémy neopakovaly. V případě potřeby však trh nabízí ještě odolnější a pevnější materiály pro 3D tisk, použití těchto speciálních materiálů je však ekonomicky a technicky náročnější. Pro zvýšenou tepelnou odolnost lze použít například materiál ASA (Acrylic Styrene Acrylonitrile), ABS (Acrylonitrile Butadiene Styrene), PC (Polycarbonate). Pro zvýšené mechanické nároky lze použít například PC, ABS, PA (Polyamide 6.6 - pod komerčním označením Nylon), případně kompozit s přísadkou uhlíkových či kevlarových vláken. Po těchto modifikacích je konstrukce a funkčnost zařízení bezproblémová. Zařízení je provozováno několik let stabilně, bez nedostatků nebo nutnosti dalších modifikací. Výrobní náklady takového zařízení, bez zdroje vysokého napětí, nepřesahují cca 10 000,- Kč.

Při budoucích modifikacích by se potencionálně mohla nahradit PVC hadička hydraulického systému za silikonovou, nebo z měkčeného materiálu. Při zavádění hydraulického systému by byla snazší manipulace s více flexibilní hadičkou.

5.4.2 Testování procesu zvlákňování do kapaliny

V prvním kroku bylo třeba zahájit zvlákňování do kapaliny. Pro tento účel byly vytipovány polymerní roztoky, které se osvědčily v klasickém elektrospinningu, případně materiály vyzkoušené pro bez-jehlové elektrické zvlákňování. Zvolenými materiály byly PVA (Polyvinyl alcohol), PCL (Polycaprolacton), PA 4.6 (Polyamide 4.6), PVB (Polyvinyl butyral). Polymerní roztoky pro zvlákňování byly připraveny dle tabulky (Tabulka 3). V této fázi docházelo k intenzivnímu zvlákňování tak, aby se otestovalo zařízení (viz. odstavec 5.4.1). Důležité bylo také získat potřebné zkušenosti a návyky při používání a ovládání zařízení. Nutné bylo zejména nastavení procesu přípravy a manipulace s roztoky a kolektorem. Pro potřeby obrazové analýzy byl připravený vzorek vrdy připevněn na terč pro SEM mikroskop a pozlacen plazmovým naprašněním přístrojem Quorum, Q150RS Plus, (UK). Samotné snímky byly získávány pomocí skenovacího elektronového mikroskopu VEGA3, TESCAN, (CZE).

Tabulka 3 – Parametry polymerních roztoků použitých při testování procesu zvlákňování do kapalinového kolektoru pomocí elektrospinningu.

Řada	Polymer	Koncentrace	Rozpouštědlo		
A	PVA	10 % hm	Voda		
	PVA	10 % hm	8:2 hm	Voda	Ethanol
B	PCL	16 % hm	8:2 hm	Chloroform	Ethanol
D	PA 4.6	12 % hm	1:1 hm	Kyseliny octová	Kyselina mravenčí
E	PVB	10 % hm	Ethanol		

Každá série experimentů byla rozdělena do řad a označena dle latinské abecedy. První experimentální sada byla označena jako „Řada A“. Toto označení není závislé na konkrétních roztocích, označení rozděluje jednotlivé experimenty podle cílů za dodržení chronologického pořadí označování.

Tabulka 4 – Tabulka hodnocení zvláknitelnosti dle váženého průměru. Hodnocení procesu je od 0 „k noření nedochází“, 1 „špatně se noří“ až 10 „dokonale se noří“. Přijatelně zvláknitelný polymerní roztok je tedy hodnocen od čísla hodnocení procesu 5 a výše.

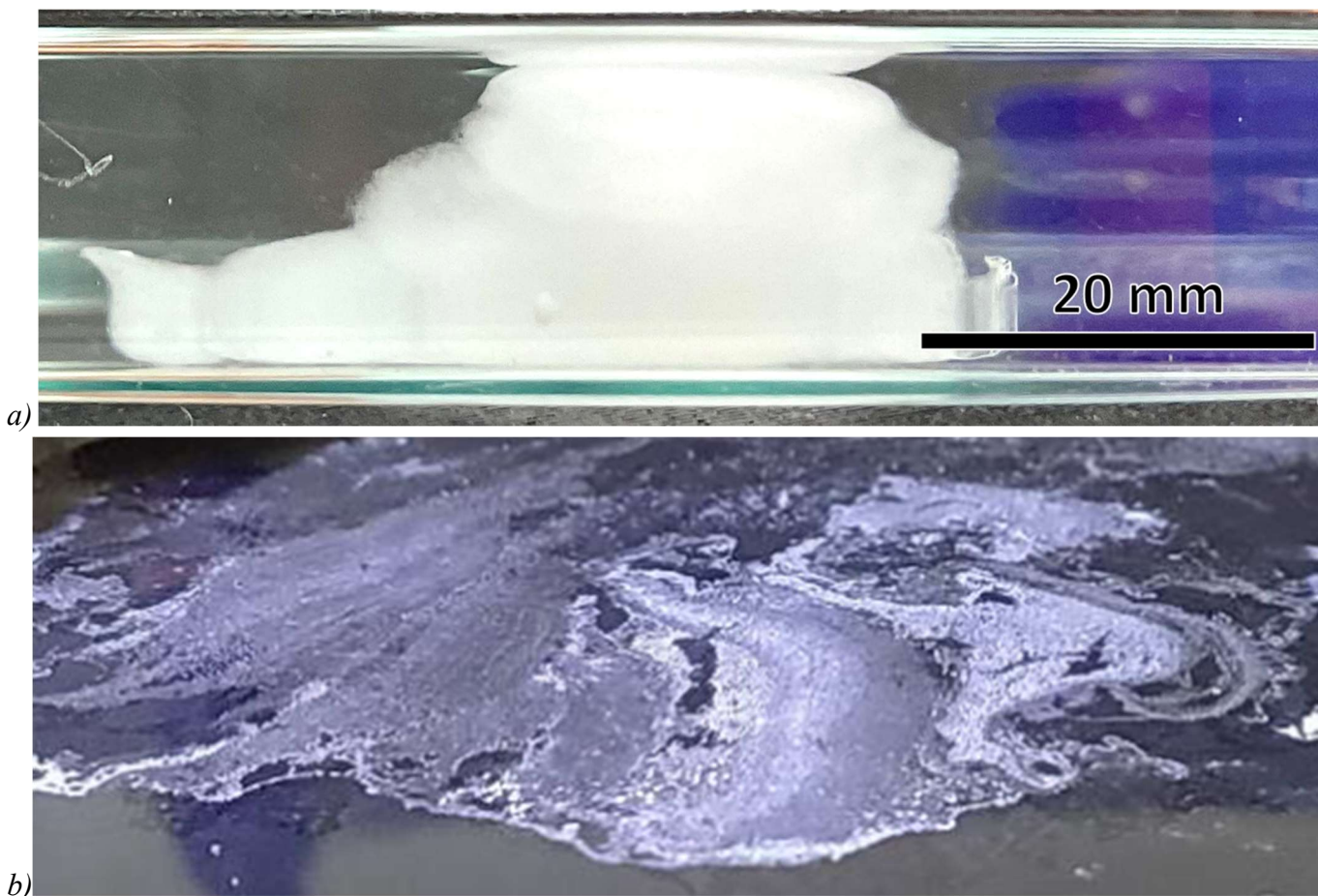
Hodnocení zvláknitelnosti - vážené	Váha kritéria [%]	Hodnocení procesu [1-10]
Viditelné tvoření vlákně vrstvy (vrstva se tvoří souvislá, navazuje a nerozpadá se)	50	1
Stále formování Taylorova kužele (kužel je stabilní, není přerušovaný a bez elektrických výbojů)	20	5
Směrování vlákně vrstvy do jedné oblasti kolektoru (proud vláken je tvořen do stejných oblastí, tvoří se jeden vlákně útvar)	30	8
Vážená známka hodnocení procesu		3.9

Byla také nastavena kritéria hodnocení zvláknitelnosti roztoku (Tabulka 4) a kritéria hodnocení noření vlákně vrstvy do kapaliny kolektoru (Tabulka 5). Hodnocení zvláknitelnosti roztoku bylo založeno na váženém průměru kritérií. Váha kritéria byla stanovena dle důležitosti jednotlivých parametrů. Hlavním kritériem bylo, zda je pozorovatelné tvoření vlákně vrstvy na nebo v kolektoru. Při prosvícení vrstvy silným světlem je na tmavém pozadí poměrně dobře sledovatelné tvoření vlákně shluků. Tomuto kritériu byla dána váha 50%. Druhým kritériem bylo stabilní a stále formování Taylorova kužele, někdy dochází k přerušování procesu nebo přeskokování několika kuželů. Toto kritérium bylo pouze pomocné, protože i při ne zcela stabilním Taylorově kuželu lze získat kvalitní vlákně vzorek. Váha kritéria byla tedy zvolena 20 %. Třetím sledovaným parametrem bylo proudění vlákně svazku, který je poslední částí zóny bičování. Tento svazek musí mířit do jedné oblasti tak, aby byl výsledný produkt homogenní a bylo možné jej využít jako jeden produkt. Při dobrém procesu je zóna dopadu zpravidla velká cca 10-40 mm, místo dopadu se může na hladině kolektoru přemísťovat, pokud je proces změny místa dopadu kontinuální a není rychlý, výsledný produkt je zpravidla homogenní.

Tabulka 5 – Tabulka hodnocení noření do kapalného kolektoru. Dle hodnotících kritérií se vlákenná vrstva začíná nořit do kapaliny kolektoru od hodnoty 5.

Hodnocení noření do kapaliny	Hodnocení procesu [1-10]
K noření nedochází, vlákna se jeví velmi hydrofobně, po celém obvodu vrstvy je vidět zakřivení hladiny	0
Vrstva spočívá na hladině, některé části začínají mít s hladinou prolnuté okraje	1
Vrstva spočívá na hladině, většina obvodu vlákenného útvaru se propojuje s kapalinou	2
Okraje vlákenného útvaru jsou spojené s kapalinou, útvar se nenoří do objemu kapaliny	3
Okraje vlákenného útvaru jsou spojené s kapalinou, útvar se začíná mít tendenci částečně pronikat do objemu kapaliny do objemu kapaliny	4
Vrstva se částečně noří, při vláknění vždy zůstává na hladině část, která se jeví jako nesmočená	5
Vrstva se částečně noří do 2,5 mm hloubky, při vláknění vždy zůstává na hladině část, která se jeví jako nesmočená	6
Vrstva se částečně noří do 5 mm hloubky, při vláknění vždy zůstává na hladině část, která se jeví jako nesmočená	7
Vrstva se částečně noří do 5 mm hloubky, ze začátku se vlákna dobře noří po zformování struktury a po nějakém čase zůstává na hladině část, která se jeví jako plovoucí	8
Vrstva se noří i pod 5 mm hloubky, ze začátku se dobře noří, po zformování struktury či po nějakém čase zůstává na hladině malá část, která se jeví jako smočená, ale zůstává částečně na hladině	9
Materiál v objemu kapaliny tvoří strukturu, buďto samovolně nebo s přibývajícím tloušťkou materiálu	10

Pro kvantifikování toho, zda se kapalina noří do objemu kapaliny, byla vytvořena sada kritérií, dle kterých je možné proces hodnotit. Tomuto hodnocení napomohlo vytvoření skleněné kolektorové nádoby, jež umožňuje pozorování chování vlákenných produktů pod hladinou a kvantifikovat jejich zanoření. Zanoření vrstvy a její chování na hladině parametrizuje schopnost materiálu se nořit do objemu kapalného kolektoru. Hodnocení je škálováno od 0 do 10. Při nule se vrstva nenoří a jeví se zcela hydrofobně. Při hodnocení 1 se již některé okraje vrstvy na hladině začínají prolínat s kapalinou a tvoří prolnutí těchto fází, vrstva se tedy již částečně smáčí, velká část rozhraní je ale stále nesmočená a je patrná výchylka hladina kapaliny díky povrchovému napětí. Při hodnocení „5“ se již začíná materiál nořit do objemu kapaliny, na hladině stále zůstává nesmočená část. Čím více se hodnocení blíží číslu 10, vlákenný materiál se více noří a méně se drží u hladiny. Při maximálním hodnocení se již plně noří do objemu kapaliny a nemá tendenci k setrvávání na hladině, při vláknění se vrstva okamžitě smáčí v kapalině.



Obr. 63 – Příklad noření vlákněných vrstev do kolektoru. a) Fotografie pořízená skrze skleněnou boční stěnu kolektoru zachycující vzorek, který se „dokonale“ noří do ethanolu, na hladině nezůstává žádná nesmočená část materiálu. Vytvořená vlákněná vrstva se plynule smáčí a noří do objemu kapaliny. Hodnocení dle kritérií pro hodnocení noření (Tabulka 5) je 10 případně 9, pokud by část zvlákněného materiálu držela na hladině. Jedná se o PCL 16 %hm v chloroform/ethanol 4:1 hm. b) Fotografie hladiny kapaliny s vlákněným vzorkem, který se nenorí a zůstává na hladině, má ostře ohraničené okraje v kapalině. Jedná se o 16% hm roztok PCL v rozpouštědle chloroform/ethanol 4:1 hm, zvlákněný do kolektorové lázně ethanol/voda 1:5.

Po prvotních řadách testů, zaměřených k odladění zařízení a zvládnutí procesu vláknění začaly být prioritou experimenty s polymerními roztoky PCL. PCL je běžně používaným materiálem pro medicínské aplikace [11, 58, 161–163], z tohoto důvodu se právě tento polymer stal výchozím materiálem. PCL je v medicíně hojně používán díky svým unikátním vlastnostem, je biokompatibilní a biodegradabilní, a tedy při implantaci jej dokáže tělo po čase samo odstranit a při degradaci nevznikají toxické produkty. PCL má nízkou teplotu tání (60°C) a teplotu skelného přechodu (-60°C), je tedy relativně měkký a dobře zpracovatelný a manipulovatelný. Uvádí se, že není cytotoxický a podporuje buněčný růst na svém povrchu. Materiál použitý v této práci je Polykaprolakton o polymerové hmotnosti Mn 45k a 80 kDa od výrobce Sigma-Aldrich (DEU), ethanol absolutní výrobce Penta (CZE), chloroform výrobce Penta (CZE).

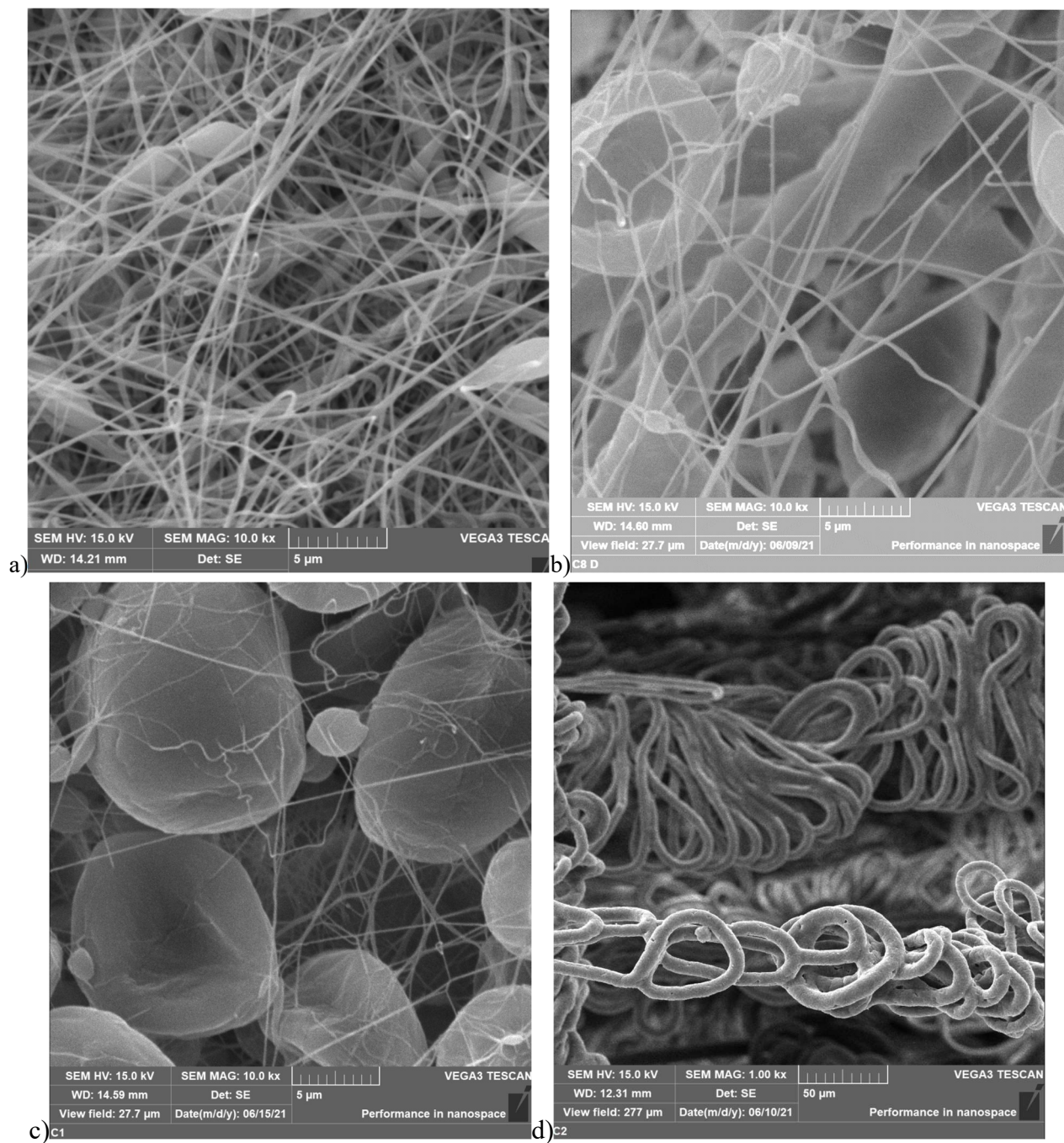
Pro experimenty zaměřené na polymer PCL byly identifikovány konkrétní polymerní roztoky s různými rozpouštědly a zvlákněny v experimentální řadě „C“ viz tabulka (Tabulka 6). Materiály byly vlákněny do technického lihu (složení cca 93% etanol, denaturační činidla a voda). Použití technického lihu bylo

pouze u úvodních procesních experimentů, kde se materiál v nepoužíval k biologickému testování ani k materiálové nebo procesní analýze (objem kapaliny kolektoru pro jednotlivý experiment byl cca 600ml) Důvodem pro použití ethanolu jako kapaliny kolektoru bylo jeho nízké povrchové napětí, zaručující dobré noření, ethanol zároveň není pro PCL rozpouštědlem. Podmínky zvláknování byly následující: vzdálenost trysky od hladiny kolektoru 10 cm, doba vláknění 120 s, rychlost dávkování roztoku 9 ml/hod a napětím stejnosměrného zdroje 15 kV. Použitá injekční jehla byla 0,8 mm průměru a 40 mm délky a bez úpravy hrotu. Špička hrou injekční jehly byla vždy umístěn v horní poloze. Zvláknitelnost a noření byly u každého experimentu hodnoceny dle stanovených parametrů hodnotících kritérií (*Tabulka 4 a Tabulka 5*). Výsledky experimentu jsou společně s materiálovými parametry v tabulce (*Tabulka 6*).

Tabulka 6 – Přehled experimentální řady C, test zvláknitelnosti vybraných polymerů do kapalného kolektoru pro různé koncentrace polymerního roztoku a různé molekulové hmotnosti. Nejlepší zvláknitelnost vykazovaly vzorky C8, C1 a C7.

Vzorek	Polymer			Rozpouštědlo		Kolektor	Hodnocení	
	Materiál	c [hm%]	M _n [kDa]	Složka	Poměr [hm]		Materiál	Zvláknitelnost
C1	PCL	16	45k	Chloroform/Dimethylformamid		Ethanol	7	8
C2	PCL	16	45k	Chloroform		Ethanol	3	8
C3	PCL	20	45k	Chloroform		Ethanol	3	8
C4	PCL	10	80k	Aceton		Ethanol	3	8
C5	PCL	10	80k	Chloroform/Ethanol		Ethanol	4	8
C6	PCL	16	45k	Chloroform/Ethanol		Ethanol	4.5	8
C7	PCL	16	45k	Aceton		Ethanol	6	8
C8	PCL	10	45k/80k (1:3hm)	Kyselina mravenčí/Kyselina octová/Aceton		Ethanol	9	8

Dle hodnocení procesu zvláknování byly nejlépe zvláknující materiály vzorky C8, C1 a C7, avšak jejich výsledné struktury se při studiu snímků z rastrovacího elektronového mikroskopu výrazně lišily. Materiál C8 (Obr. 64 A) vykazoval pohledově nejlepší zvláknitelnost do kapalného kolektoru, snímky ukázaly velmi jemná vlákna s malým množstvím defektů. Materiál C7 (Obr. 64 B) ukázal větší množství defektů než předchozí materiál C8. Materiál C1 (Obr. 64 C) obsahoval velké množství kulovitých granulí mikronových rozměrů a velmi jemných nanovláken. Materiál C2 (Obr. 64 D) jenž nevykazoval dobrou zvláknitelnost, tvořil mikronová vlákna o průměrech cca 5µm spojená do stužkových vláken o průměru cca 40-100 µm.

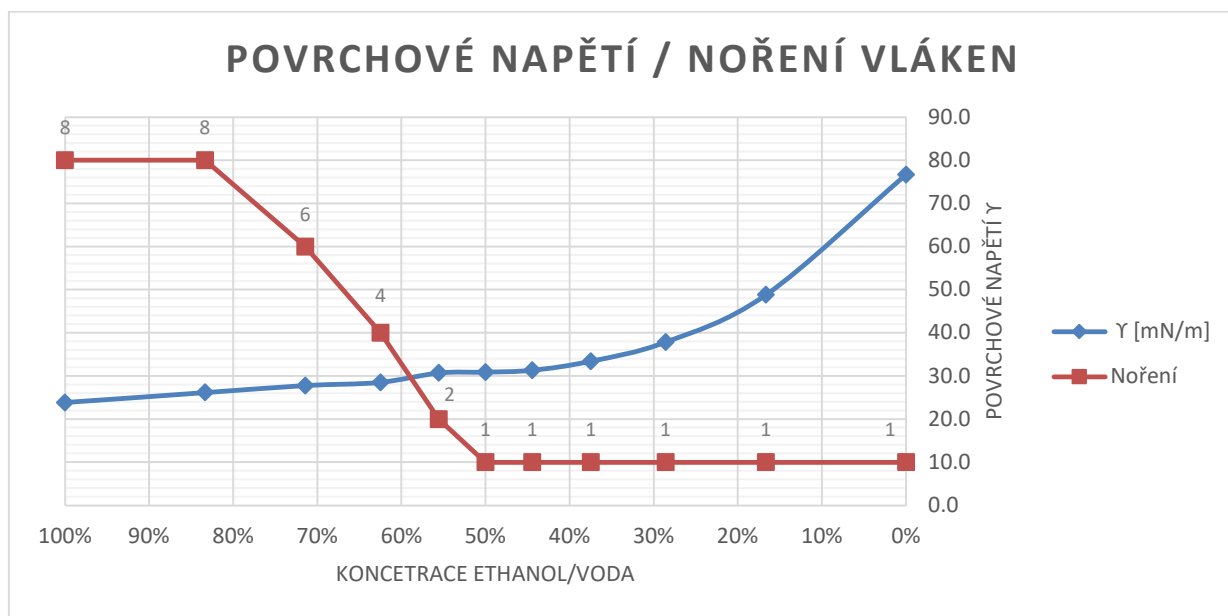


Obr. 64 – SEM snímky vybraných vzorků z experimentální řady C - Testu zvláknitelnosti do kapaliny, a) Vzorek C8, b) Vzorek C7, c) Vzorek C1 a d) Vzorek C2.

Pro testování noření vlákenného materiálu byl vytvořen experiment, při kterém byl vybraný materiál vlákněn do řady kapalinových kolektorů s rozdílným poměrem ethanol/voda. Pro testování byl vybrán materiál C7, jež vykazoval nejlepší zvláknitelnost do kapaliny, při schopnosti tvořit vlákenný materiál bez velkého množství poruch. Kolektor byl připraven v 11 koncentracích, viz tabulka (Tabulka 7).

Tabulka 7 – Koncentrační řada kapalného ethanolového kolektoru s naměřeným povrchovým napětím, Hodnocení noření je 0 (extrémně špatně – vlákna zůstávala na povrchu kapalinového kolektoru) do 10 (výtečně – vlákna se nořila do kapalinového kolektoru) – viz. tabulka parametrů hodnocení noření do kapaliny (Tabulka 4).

Etanol	Voda	Ethanol [hm%]	γ [mN/m]	T [°C]	Hodnocení noření vzorku C8 - PCL
1	: 0	100%	23,8	22,6	8
10	: 2	83%	26,2	22,4	8
10	: 4	71%	27,8	22,5	6
10	: 6	63%	28,5	22,6	4
10	: 8	56%	30,7	22,7	2
10	: 10	50%	30,9	22,6	1
8	: 10	44%	31,3	22,6	1
6	: 10	38%	33,4	22,5	1
4	: 10	29%	37,9	22,4	1
2	: 10	17%	48,8	22,5	1
0	: 10	0%	76,7	22,7	1



Obr. 65 – Graf znázorňující hodnotu povrchového napětí koncentrační řady Ethanol/H₂O kolektorů (modrá křivka) a hodnocení schopnosti vlákenné vrstvy se nořit do kapalného kolektoru (červená křivka), hodnocení je provedeno dle parametrů z tabulky (Tabulka 4).

Z experimentu noření vlákenné vrstvy do kolektoru s rozdílnou koncentrací složek, tedy s měnícím se povrchovým napětím, a interpretace jeho výsledků, je patrné, že od koncentrace menší než 80% ethanol/voda začíná docházet k neochotě vláken se do objemu kapaliny nořit. Od 50 % koncentrace se

již vlákenné vrstvy nenoří a setrvávají nad hladinou kapalného kolektoru. Grafické znázornění experimentu ukazuje, kdy dochází k bodu lomu a vlákenná vrstva začíná mít tendenci se do kapaliny nořit (*Obr. 65*). Povrchové napětí změřeno bublinkovým tensiometrem Krüss, BPT Mobile (DEU).

5.4.3 Testování parametrů procesu

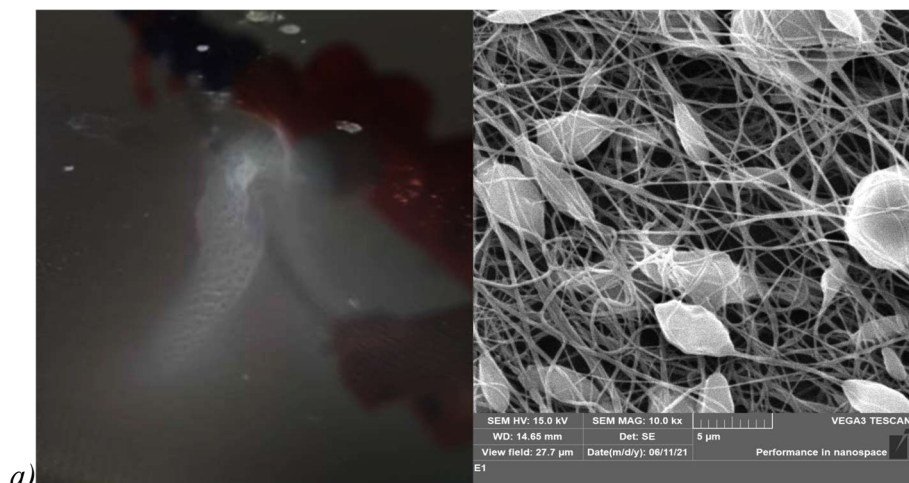
Velmi důležitou součástí testování zařízení je sledování a určení důležitých parametrů a jejich funkčních intervalů. Jedná se o parametry aparatury, jako je elektrické napětí, proud, vzdálenost konce zvlákňovací elektrody – zárodků polymerní trysky od hladiny kapalného kolektoru, tvar hrotu zvlákňovací elektrody, její délka, rozměr nádoby lázně – kapalinového kolektoru, tedy její průměr a hloubka, výška hladiny kapaliny, teplota lázně. Toto testování bylo buďto systematické nebo jen potvrzovalo funkčnost nastavených parametrů. Testování parametrů nebylo zaměřeno na samostatný výzkum a detailní popis vlivu parametrů, ale bylo zaměřeno na nalezení optimální konfigurace, umožňující výzkum a vývoj wet elektrospinningu a hledání materiálů vhodných pro medicínské aplikace.

Pro ověření vlivu vzdálenosti trysky od hladiny kapalného kolektoru byl proveden experiment řady „E“, při kterém se zvlákňovalo 9 vzorků při výšce trysky v rozmezí 15 cm - 1 cm od hladiny kapalného kolektoru. Zvlákňovaným materiálem byl 10 hm% roztok PCL v rozpouštědlovém systému kyselina mravenčí/kyselina octová/acetón v hmotnostním poměru 1:1:1 o kombinaci molekulových hmotností Mn 45/80 kDa v hmotnostním poměru 1:3. Jedná se o optimalizovaný roztok, který vytváří velmi jemná vlákna, jak při klasickém stejnosměrném, tak i střídavém elektrickém zvlákňování na pevný kolektor. Při tomto nastavení byla miska s kapalinou – kolektor – umístěna na laboratorní stojan pro jednodušší a přesnější změnu vzdálenosti trysky od kolektoru. Souhrn parametrů je v tabulce (*Tabulka 8*). Vizualně probíhalo kvalitní zvlákňování až do vzdálenosti 3 cm od hladiny kolektoru. Od této vzdálenosti se objevovaly v procesu nepravidelnosti a akustické projevy vysokého napětí. Pro vzdálenost 1 cm dokonce došlo k elektrickému výboji z trysky do kolektoru. Od této vzdálenosti rovněž na snímcích obrazová analýza ukázala zvýšený průměr vláken, jejich nepravidelnost a zvyšující se množství poruch a defektů ve struktuře. Prakticky všechny experimenty s vlákňováním do kapaliny které popisují náklon zvlákňovací jehly mají jehlu nastavenou kolmo dolů pod úhlem 90° k hladině kapaliny. Zařízení jednoduše umožňuje náklon variabilní, a z praktických důvodů bylo vlákňováno pod úhlem 45°, tento úhel vykazoval sejné výsledky ale aparatura zabírala méně prostoru a byla snadněji přenositelná i v pracovním nastavení.

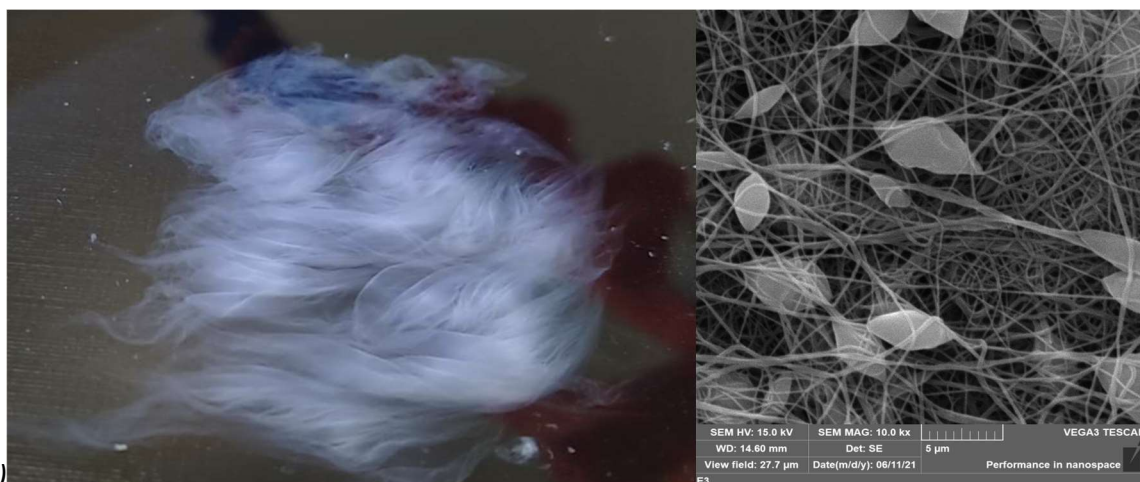
Tabulka 8 – Experimentální řada E, ověřující vliv vzdálenosti kapalného kolektoru od konce zvláknovací elektrody. Hodnocení je 0 (extrémně špatně se noří – k noření nedochází) do 10 (výtečně se vlákna noří do objemu kapaliny) – viz. Tabulka parametrů hodnocení noření do kapaliny (Tabulka 4).

Vzorek	Kolektor vzdálenost [cm]	Hodnocení		Průměr vláken [nm]	SD [nm]	Poznámka
		Zvláknitelnost	Noření			
E1	15	7,5	8	209	74,6	Zvláknuje dobře, tvoří souvislou vrstvu na ploše o průměru cca 7 cm
E2	12,5	7,5	8	155	36,5	Zvláknuje dobře, tvoří souvislou vrstvu na ploše o průměru cca 7 cm
E3	10	7,5	8	192	57,5	Zvláknuje dobře, tvoří souvislou vrstvu na ploše o průměru cca 6 cm
E4	7,5	7,5	8	181	30,3	Zvláknuje dobře, tvoří souvislou vrstvu na ploše o průměru cca 5cm, vrstva se dále rozšiřuje „odplováním“ hotové vrstvy
E5	5	7,5	8	165	35,5	Zvláknuje dobře, tvoří souvislou vrstvu na ploše o průměru cca 5cm, vrstva se dále rozšiřuje „odplováním“ hotové vrstvy
E6	4	7,5	8	168	29,8	Zvláknuje dobře, tvoří souvislou vrstvu na ploše o průměru cca 4cm, vrstva se dále rozšiřuje „odplováním“ hotové vrstvy
E7	3	7,5	8	197	34,4	Objevují se poruchy ve větším počtu, jinak stále dobrá vlákenná struktura
E8	2	6	8	247	148,3	Větší množství poruch
E9	1	2	8	447	428,7	Velké množství poruch, hrozí výboje

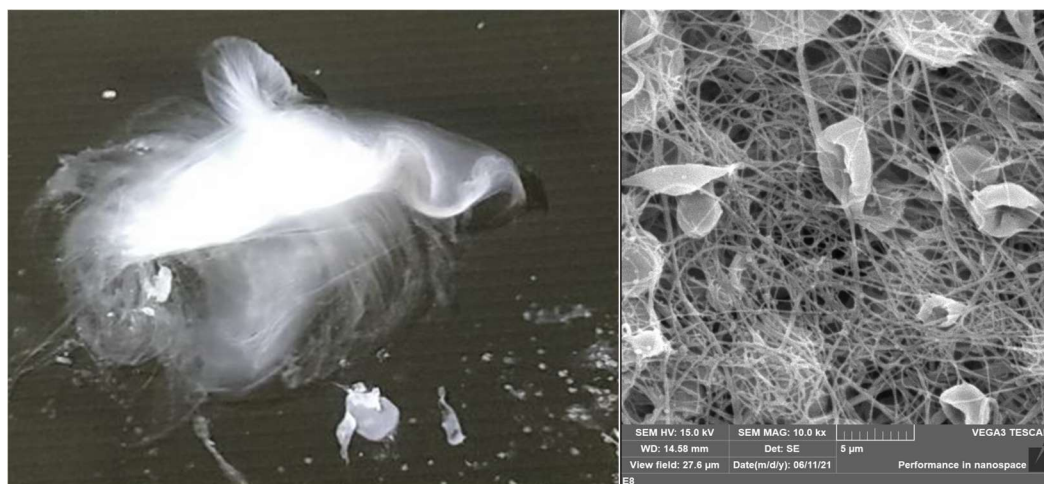
Z výsledků je zřejmé, že tento typ procesu a materiálu lze teoreticky zvláknovat v relativně širokém rozmezí vzdáleností. Nicméně při větších vzdálenostech může docházet ke zvláknování mimo kolektor. Při nižších vzdálenostech může naopak docházet ke kumulaci vytvořeného materiálu na malé ploše, a tím k rozdílné struktuře či dočasnému lokálnímu zvýšení rozpouštědla v kolektoru. Zkušenosti ze zvláknování jiných polymerních roztoků však ukazují, že mírnou změnou vzdálenosti se dá částečně ovlivnit rozptyl a mírně noření vláken. Pokud delší dobu proces zvláknuje do jednoho plošně malého místa, i dobře nořící se vlákenná struktura může začít vytvářet nesmočený „ostrůvek“. Mírným zvýšením vzdálenosti se zvýší rozptyl vlákenného svazku a tím i plocha na hladině kolektoru, kam vrstva dopadá. Při zvýšené ploše se vrstva lépe smáčí a snižuje se pravděpodobnost zahlcení místa smáčení a tím ke vzniku nesmočených ostrůvků vlákenných vrstev. Chování vrstvy na hladině je zcela jistě ovlivněno interakcí rozpouštědla s kapalinou kolektoru, při dopadu vlákenné vrstvy na hladinu jsou stále ve vláknech přítomny zbytky rozpouštědla. Interakce vlákna a kapaliny není tedy záležitostí pouze polymeru a kapaliny, ale uvažujeme, že vlákno je již smočené rozpouštědlem. Čím je vzdálenost, a tedy i čas kontaktu vytvářených vláken větší, tím klesá i množství rozpouštědla ve vláknech. Při standartním procesu zvláknování budou vždy obsahovat alespoň zbytkové množství tohoto rozpouštědla. Výsledky testování vlivu vzdálenosti na průměr vláken jsou obdobné jako testování vlivu vzdálenosti kolektoru na PAN vlákna zvlákněná elektrospinningem do ethanolu [164].



a)



b)



c)

Obr. 66 – Fotografie experimentální řady „E“. a) Snímek vytvořené vlákenné vrstvy a snímek SEM vytvořených vláken při vzdálenosti jehly od kolektoru 15 cm. b) Snímek vrstvy tvořené ze vzdálenosti 10 cm. c) Snímek vrstvy tvořené na vzdálenost 3 cm, v této vrstvě se objevuje více defektů než v předchozí.

V průběhu experimentování bylo elektrické napětí zdroje pro zvlákňování ustáleno na 15 kV a průtok polymerního roztoku využíván až k hodnotě 10 ml/hod. Univerzální vliv rozsahu napětí v rozmezí 10-20 kV nebyl pozorován a tím ani zkoumán.

6 Výroba a testování 3D objemných struktur

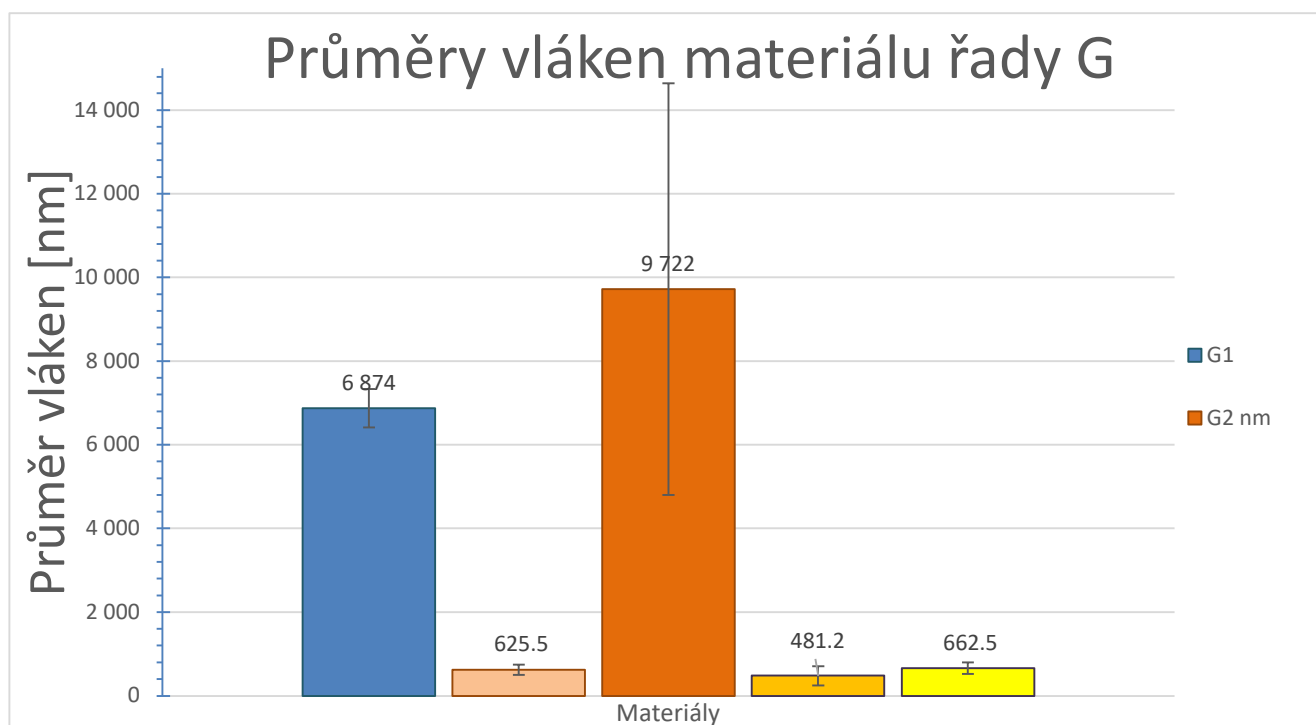
Po provedení počátečních experimentů se zařízením, testováním procesu vlákenní a různých materiálů byly identifikovány základní roztoky PCL pro testování s vytvářením 3D objemných vlákenných struktur. Od začátku experimentování jsou snahy směřovány k aplikacím v tkáňovém inženýrství. Jednou z hlavních deviz zvláknování do kapaliny je právě vytvoření objemných vlákenných struktur, které mohou nahrazovat poškozenou nebo chybějící tkáň. Materiály tedy byly vybírány se zřetelem na schopnost nořit se a vytvářet pod hladinou objemný shluk vlákenného materiálu. Prvním kritériem tedy bylo stanovení požadavku na schopnost materiálu a procesu zformovat požadovaný objemný vzorek. Dalším kritériem byla schopnost podpory růstu buněk ve struktuře vyrobeného vzorku. Ke kvantifikování vhodnosti materiálu bylo naplánováno biologické in-vitro testování. Pro výrobu i testování výroby materiálů byly využívány laboratorní podmínky bez řízené atmosféry, teplota se pohybovala v rozmezí 21-24°C, relativní vlhkost vzduchu byla v rozmezí 30-50 %. Zvláknování probíhalo injekční jehlou o velikosti 0,8 mm na vzdálenost od kolektoru v rozsahu 10-14 cm. Napětí zdroje vysokého napětí bylo 15 kV.

6.1 Výroba vzorků

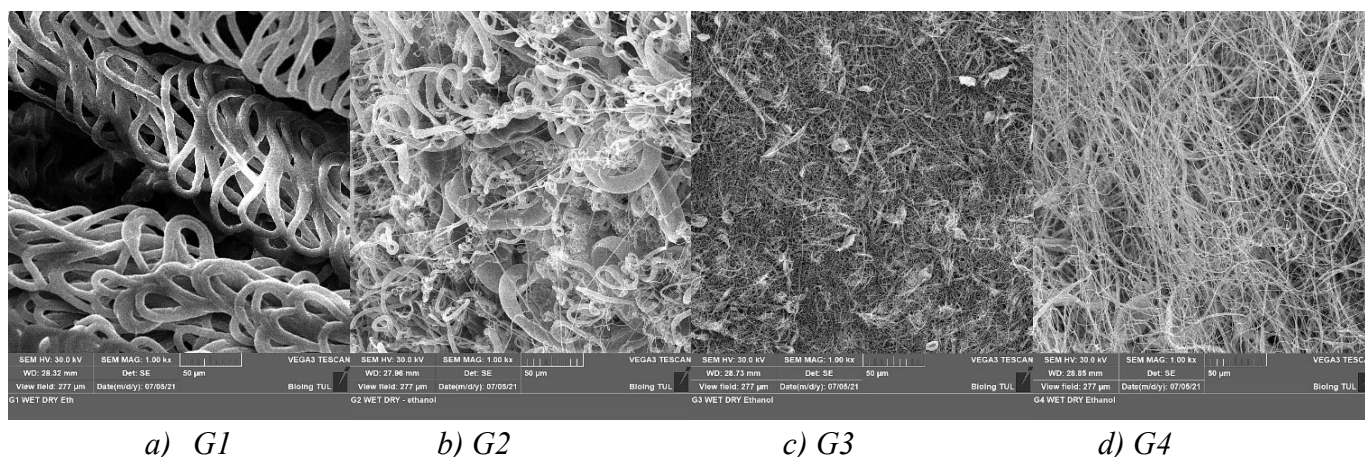
Pro testování výroby objemných 3D vzorů a biologické testování in-vitro byly vybrány 4 materiály označené G1-G4 (*Tabulka 9, Obr. 68*). Vizualizace naměřených hodnot průměrů vláken je na obrázku (*Obr. 67*). Testování je popsáno v kapitole 6.4. Před samotným vytvářením vzorků byly stanoveny parametry procesu a ověřena jejich funkčnost, včetně obrazové analýzy potvrzující parametry výsledných materiálových parametrů dle předchozích experimentů. Výběr materiálu proběhl tedy podle obrazové analýzy a hodnocení jeho zvláknitelnosti. Cílem bylo porovnávat rozdílné vlákenné struktury, které jsou výjimečné oproti materiálům zvláknovaným klasickým elektrickým zvláknováním.

Tabulka 9 – Experimentální řada G, přehled použitých materiálů a jejich parametrů pro tvorbu vzorků vybraných k in-vitro testování.

	G1	G2	G3	G4
Materiál	PCL	PCL	PCL	PCL
Koncentrace [% hm]	20	10	12	15
Rozpouštědlo	Chloroform	Chloroform/ethanol	Kyselina mravenčí/Kyselina octová/Aceton	Kyselina mravenčí/Kyselina octová/Aceton
Hmotnostní poměr rozpouštědel	-	8:2	1:1:1	1:1:1
Molekulová hmotnost [$M_n \cdot 10^3$ kDa]	45	80	45/80 hm. poměr 1:3	45/80 hm. poměr 1:3
Vzdálenost kolektoru [cm]	10	10	10	10
Kolektorová kapalina	Ethanol	Ethanol	Ethanol	Ethanol
Průměr vytvořených vláken	6,874 μm	směs 9.722 μm / 625,5 nm	481,5 nm	662,5 nm
Směrodatná odchylka	0,459 μm	4,919 μm / 123 nm	229,4 nm	136,9 nm



Obr. 67 – Graf ukazující průměrné hodnoty naměřených průměrů vláken ze vzorků materiálu řady G, které byly vybrány pro další testování. Materiál G1 a G2 obsahuje mikrovlákna. Materiál G2 se skládá ze dvou typů vláken, označeny jako G2 nm a G2 μm jejich rozdělení je tzv bimodální.



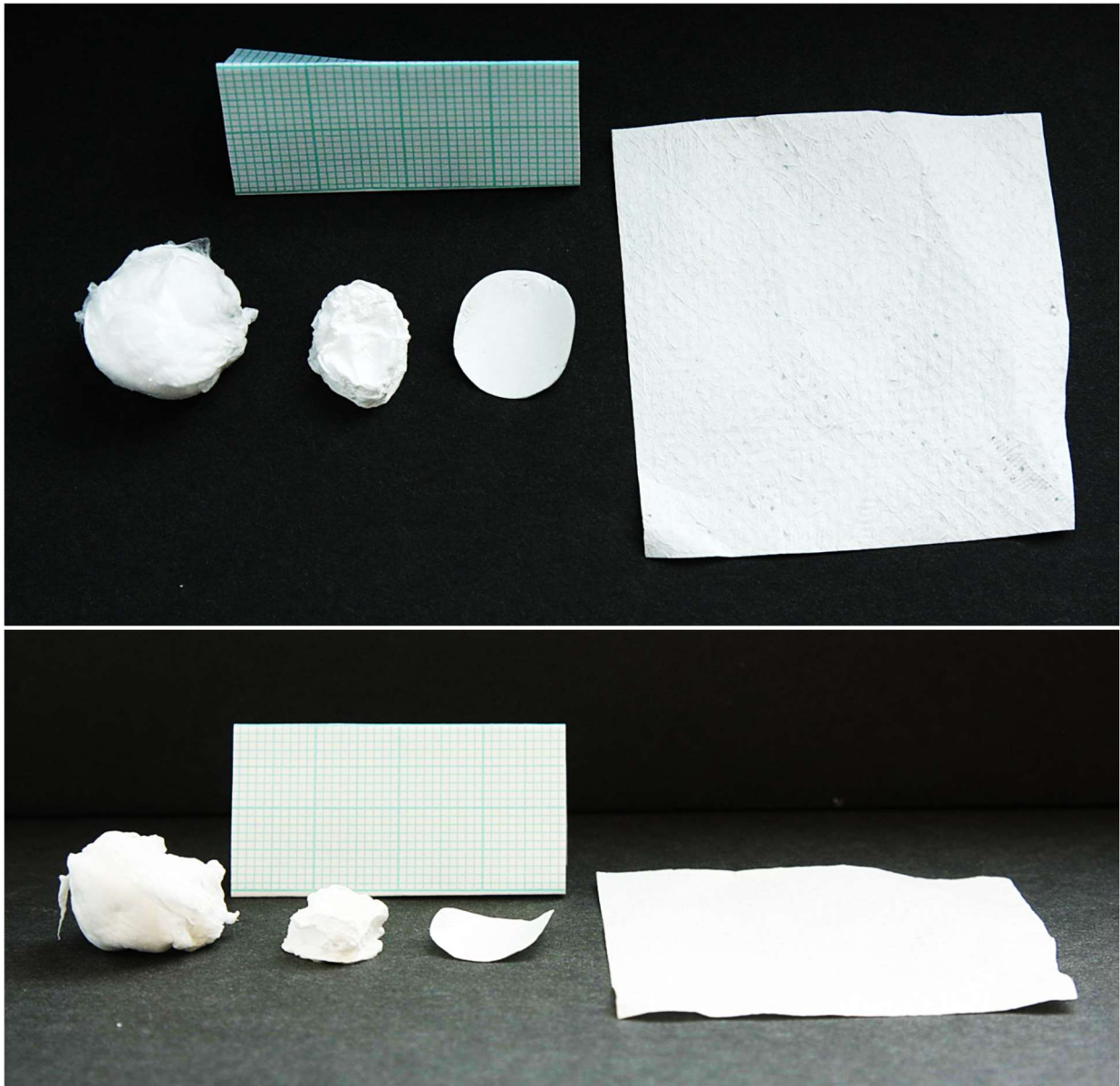
Obr. 68 – Snímky SEM ukazující strukturu pro jednotlivé vybrané materiály pro in-vitro testování. Měřítka představuje 50 mikrometrů.

Materiál G1 vykazoval sice zhoršenou zvláknitelnost, nicméně jeho obrazová analýza ukázala mikrovláknenné stužky spojené do větších svazků (Obr. 68 a). Tato struktura byla vyhodnocena jako potenciálně vhodná pro uchycení buněk, buněčnou proliferaci a zároveň s předpokladem dobré tvarové pevnosti. Materiál G2 byl vybrán, protože tvořil kombinaci přijatelné zvláknitelnosti a strukturně tvořil bimodální směs mikrovláken (Obr. 68 b). Materiál G3 byl vybrán z důvodu vynikající zvláknitelnosti do kapalného kolektoru a jeho příznivě vypadající vláknenné struktuře s jemnými vlákny (Obr. 68 c). Materiál G4 byl koncentračně modifikovaný materiál G3, který vykazoval výtečnou zvláknitelnost a homogenější vlákna s menším množstvím poruch (Obr. 68 d).

6.2 Příprava vzorků – post procesing

Vysoušení vzorků zvláknovaných do kapalinového kolektoru bylo nutné věnovat zvýšenou pozornost, neboť postup sušení výrazně ovlivňuje výslednou strukturu viz. obrázek (*Obr. 69*). Pro zachování objemu vytvořeného vláknenného materiálu, který byl do kapaliny zvlákněn, je vhodné využít lyofilizaci (freeze-drying) [62, 161]. Pro znázornění možností tvorby objemných, tedy více porézních vzorků, pomocí elektrického zvláknování do kapaliny, byl proveden test zvláknování do kapalinového kolektoru tvořeným etanolem a na pevný kolektor při stejném uspořádání, tedy ve vytvořeném zařízení. Pro materiál zvlákněný do kapalinového kolektoru byl použit postup samovolného vysušení v digestoři a lyofilizace. Materiál zvláknovaný na pevný kolektor nebylo možné zvláknovat do vyšších plošných hmotností, neboť po určitém čase došlo ke zvýšení elektrického odporu v obvodu kolektor-jehla a postupně až k zastavení procesu zvláknování či k přesunutí trysky na jinou část zařízení. Nebylo tedy možné dosáhnout plošného materiálu se stejnou hmotností.

Pro dosažení maximálního objemu je třeba vzorek vysušit lyofilizací, při samovolném mokřém vysoušení se spolu se zmenšujícím objemem kapaliny zmenšuje i objem vzorku. Pro lyofilizaci byl použit přístroj FreeZone 2.5 Labconco (USA); podmínky lyofilizace: $-53\text{ }^{\circ}\text{C}$; 0 -140 mbar. Při samovolném sušení dochází změnou objemu k deformaci materiálu. Deformace při samovolném vysoušení je patrná z obrázku (*Obr. 69*). Vzorek se po zvláknění nachází v ethanolové lázni, avšak při lyofilizaci nesmí být ve vzorku přítomen ethanol, ten pak neumožňuje její provedení. Pro odstranění zbytků ethanolu byl každý vzorek přesunut do vodní lázně o objemu 500ml, kde se nechal samovolně promíchat ethanol s demineralizovanou vodou. Po 2 minutách byl vzorek stejným způsobem přendán do druhé vodní lázně. Ve druhé lázni byl vzorek opět dvě minuty, následně byl přemístěn do třetí vodní lázně - na poslední dvě minuty. Poté byl vzorek přesunut do mikrotitrační destičky a doplněn demineralizovanou vodou tak, aby zaujmul požadovaný tvar. Vodní lázeň byla vždy po 8 vzorcích nahrazena za čistou. Pro práci se vzorky se používaly 24 jamkové mikrotitrační destičky, bylo otestováno, že po uložení požadovaného množství vzorků lze přímo na mikrotitrační destičce vzorky hluboce zmrazit v hlubokomrazícím boxu při teplotě -86°C a následně lyofilizovat. Po lyofilizaci byly vzorky sterilizovány ethylenoxidem a následně odvětrány po dobu 14ti dní. Tento postup je nejenom časově výhodný, ale zanechává vzorky v požadovaném tvaru pro in-vitro testování, které probíhá v těchto mikrotitračních destičkách a minimalizuje se manipulace se vzorky. Kromě vážení jednotlivých vzorků které proběhlo po lyofilizaci, se se vzorky nemusí samostatně manipulovat, tímto se snižuje riziko kontaminace nebo chybné manipulace.



Obr. 69 – Fotografie ilustrující rozměry materiálů – vzorků pro testování in-vitro v pohledu shora (nahore) a ze strany (dole). Zleva je finální vzorek vytvořený metodou wet, vysušený lyofilizací – hmotnost vzorku 0,04g, druhý zleva je tentýž vzorek vysušený samovolným vysušením – hmotnost vzorku 0,04g, třetí zleva je vzorek zvlákněný na pevný kolektor – hmotnost 0,003g. Poslední pravý vzorek je materiál vytvořený klasickým bezjehlovým elektrospinningem(technologie NanospiderTM [23]) – hmotnost 0,04g (PCL 45).

6.3 Test krystalinity vytvořených materiálů

Pro otestování vlivu zvláknění do kapaliny na vnitřní uspořádání makromolekulárních řetězců byl vytvořen test na porovnání stupně krystalinity materiálů zvlákněných do kapaliny a materiálů zvlákněných na pevný kolektor. Základem testu bylo porovnání měření stupně krystalinity vytvořených materiálů pomocí metody diferenciální skenovací kalometrie – DSC (Differential scanning calorimetry). Metoda DSC je velmi běžná v oblasti materiálových věd. Jmenovaná metoda měří tepelný tok do vzorku a porovnává jej s referenční tepelným tokem. Tento princip umožňuje sledovat změny v tepelném chování materiálů. Pro vytvoření vzorků byl zvolen materiál z testovací řady „M“. Parametry zvláknovacího procesu jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 10). Pro potřeby testu DSC bylo stanoveno testování materiálu zvlákněného do kapalného

kolektoru vysušeného lyofilizací, materiálu zvlákněného do kapaliny a vysušeného samovolným odparem a materiálu zvlákněného na pevný kolektor. Cílem bylo porovnání těchto třech materiálů z hlediska vlivu procesů na výslednou krystalinitu. Z hlediska legitimacy měření byly z každého testovaného materiálu vyrobeny 3 vzorky o hmotnosti 3-5 mg.

Tabulka 10 – Přehled parametrů zvláknovacího procesu pro analýzu krystalinity pomocí DSC.

Materiál	PCL
Molekulová hmotnost M_n [kDa]	45
Koncentrace [% hm]	15%
Rozpouštědlo	Kyselina mravenčí/Kyselina octová/Aceton
Poměr (hm)	1:1:1
MW	45/80 1:3
Vzdálenost jehly od kolektoru [cm]	12cm
Napětí [kV]	15
Kolektor	Etanol
Hodnocení noření	8

Analýza DSC probíhala na přístroji *Mettler Toledo AG – DSC823e (USA)* a její výsledky ukazují, že zvlákněním do kapaliny a následnou lyofilizací narůstá krystalinita. Materiál zvlákněný na suchý kolektor má stupeň krystalinity v průměru $56,3 \pm 0,1$ %. Krystalinita materiálu zvlákněného do kapaliny a lyofilizovaného je v průměru $58,9 \pm 0,5\%$ tedy vyšší v průměru o 2,7%. Pro vzorky zvlákněné do kapaliny vysušené samovolným odparem je průměrná Krystalinita $58,7 \pm 0,2\%$, nárůst krystalinity oproti suchému kolektoru je v průměru 2,4%. Výsledky DCS analýzy jsou shrnuty v tabulce (*Tabulka 12*). Výsledek ukazuje, že pro tento materiál a proces je krystalinita ovlivněna. Ovlivnění není velké, ale experiment jprokázal zvýšení stupně krystalinity pro materiály zvláknované do kapalinového kolektoru oproti materiálům zvlákněným na pevný kolektor.

Tabulka 11 – Výsledky analýzy krystalinity materiálu řady „M“ zvlákněné do kapaliny - lyofilizované, zvlákněné do kapaliny - samovolně vysušení pomocí DSC a materiálu zvlákněného na pevný kolektor. Výsledný průměr stupně krystalinity je uveden spolu se směrodatnou odchylkou.

VZOREK	DH _m [J/g]	X _c [%]	
PCL45 wet elektrospinning - lyofilizováno	80.3	59.3	58.9±0.5
	80.3	59.3	
	78.9	58.3	
PCL45 wet elektrospinning - sušeno samovolným odparem	79.3	58.5	58.7±0.2
	79.3	58.5	
	79.9	59.0	
PCL45 klasický elektrospinning	76.4	56.4	56.3±0.1
	76.1	56.2	
	76.1	56.2	

6.4 Biologické testování vzorků in-vitro

Pro biologické in vitro testování viability bylo naplánováno vytvoření 3x4 sad vzorků pro každý materiál a jeho formu. Předem bylo stanoveno, že se bude viabilita testovat 1., 3. a 7. den od nasazení MEFs (Myši

Embrionální Fibroblastní buňky - Mouse Embryonic Fibroblasts) buněčného materiálu do vzorků. Pro každý materiál byla připravena forma vzorku (značeno jako „wet“) zvlákněním do kapaliny a vysušením lyofilizací, dále pak vzorky zvlákněné formou zvláknění na pevný kolektor (značeno jako „dry“). Pro materiál G4 byla navíc vytvořena forma vzorků zvlákněných do kapaliny a vysušené samovolným vysoušením (značeno jako „wet - self dry“). Na každý určený testovací den byly od každého materiálu připraveny vzorky v počtu 4+1. Čtyři vzorky byly připraveny pro testování s buňkami a jeden jako negativní kontrola, u tohoto vzorku se přidalo pouze 1 ml média bez buněk MEFs. Tento vzorek negativní kontroly slouží k ověření sterility materiálu a také k minimalizaci chyb měření. Výsledky spektrometrie byly interpretovány od nulové hodnoty dané právě tímto vzorkem. Testovány byly materiály uvedené v tabulce (Tabulka 9), jejich struktura je na obrázku (Obr. 68), každý materiál byl také zvlákněn na klasický pevný kolektor tak, aby byl od daného materiálu vzorek i planární, tedy plochý – neobjemný. Jedna sada byla také vyrobena z materiálu G4 zvlákněného do kapaliny, ale vysušeného samovolným odparem v digestoři, tento vzorek má oproti vzorkům vysušeným lyofilizací celkově menší objem, tedy menší porozitu. Porozita nebyla pro tyto vzorky nijak měřena, v tomto tvrzení se vychází z předpokladu stejné hmotnosti vzorku, stejného postupu zvláknění jen jiného postupu sušení. Přehled testovaných sérií vzorku je v tabulce (Tabulka 12). Pro testování bylo celkem vyrobeno a připraveno 135 vzorků.

Tabulka 12 – Série vzorků vytvořených pro in-vitro biologické testování viability. Vzorky vyrobené zvlákněním na klasický kolektor jsou označeny „dry“, vzorky vyrobené za stejných podmínek do kapaliny s 3D objemným uspořádáním jsou označeny „wet“. Série označená „wet - self dry“ byla zvlákněna do kapaliny, ale vysušena samovolným odparem.

Označení vzorku	Materiál	Molekulová hmotnost M_n [kDa]	Koncentrace [hm %]	Rozpouštědlo	Hmotnostní poměr rozpouštědel (obj)
G1 dry	PCL	45	20	Chloroform	-
G2 dry	PCL	80	10	Chloroform /ethanol	8:2
G3 dry	PCL	45/80 hm. poměr 1:3	12	Kyselina mravenčí /Kyselina octová /Aceton	1:1:1
G4 dry	PCL	45/80 hm. poměr 1:3	15	Kyselina mravenčí /Kyselina octová /Aceton	1:1:1
G1 wet	PCL	45	20	Chloroform	-
G2 wet	PCL	80	10	Chloroform /ethanol	8:2
G3 wet	PCL	45/80 hm. poměr 1:3	12	Kyselina mravenčí /Kyselina octová /Aceton	1:1:1
G4 wet	PCL	45/80 hm. poměr 1:3	15	Kyselina mravenčí /Kyselina octová /Aceton	1:1:1
G4 wet - self dry	PCL	45/80 hm. poměr 1:3	15	Kyselina mravenčí /Kyselina octová /Aceton	1:1:1

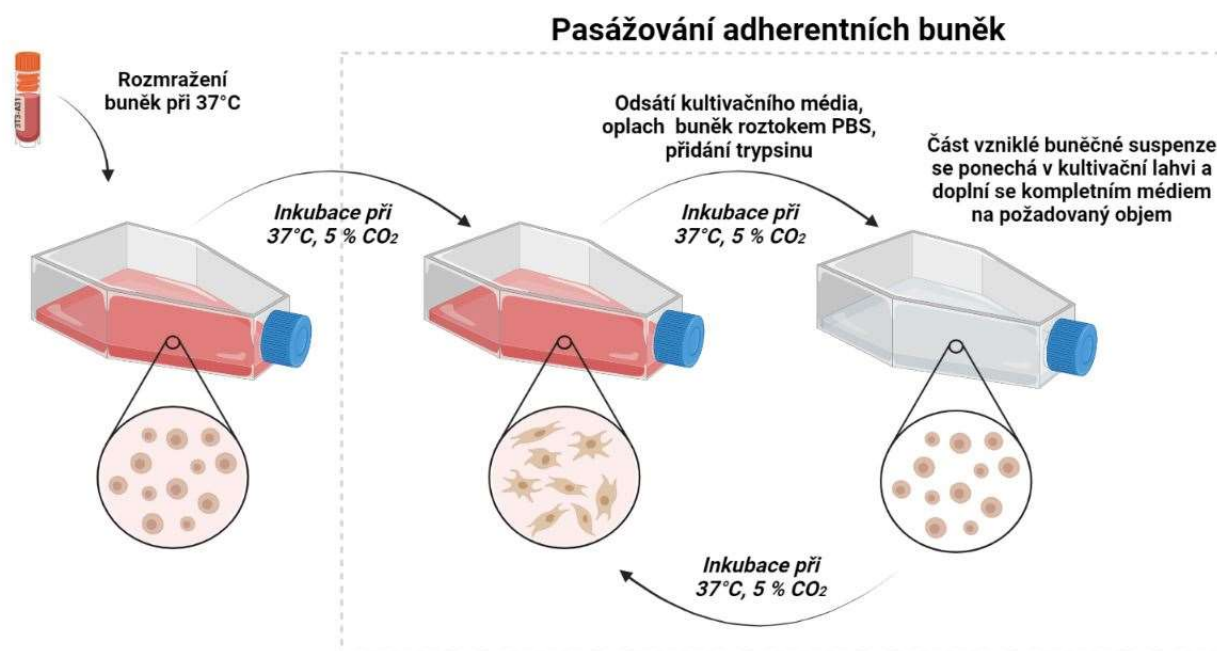
6.4.1 Sterilizace

Připravené lyofilizované a navážené vzorky v mikrotitračních destičkách bylo nutné před nasazením buněk sterilizovat. Sterilizace byla provedena z důvodu zamezení kontaminace nežádoucími buněčnými kulturami nebo jiným biologickým materiálem. Všechny materiály byly chemicky sterilizovány pomocí ethylenoxidu dle normy ČSN EN ISO 11135-1 „Sterilizace výrobků pro zdravotní péči – Sterilizace ethylenoxidem – část 1: Požadavky na vývoj, validaci a průběžnou kontrolu sterilizačního postupu pro zdravotnické prostředky“. Sterilizace všech vzorků probíhala vždy stejnou metodou pomocí ethylenoxidu. Sterilizace pomocí ethylenoxidu je proces, který se používá k zničení mikroorganismů, včetně bakterií, virů a plísní, na různých materiálech a předmětech. Ethylenoxid je plyn bez barvy a zápachu, který je schopen proniknout do různých typů materiálů a provádět sterilizaci bez poškození jemných, citlivých nebo teplotně citlivých předmětů. Sterilizované vzorky se uzavřely do speciálních sterilizačních vaků a po dobu 12 hodin byly vystaveny působení ethylenoxidu ve sterilizační komoře přístroje Anprolene - AN 74i (USA). Pro zajištění odstranění a odbourání plynu, a tedy připravenosti vzorků pro nasazení buněčných kultur, se nechaly připravené mikrotitrační destičky s vzorky odvětrávat 14 dní.

6.4.2 Příprava média s buňkami MEFs

K biologickému testování byla použita buněčná linie 3T3 - clon A31 MEFs buňek (Myší embryonální fibroblastní buňky). MEFs buňky jsou typem izolovaným z myších embryí. Tyto fibroblastní buňky jsou široce využívány ve výzkumu a buněčné biologii, zejména při testování buněčné proliferace či diferenciaci. Tyto buňky jsou fibroblastního typu, mají tedy dlouhé tenké výběžky a jsou adherentní, proto dobře rostou v kultivačních nádobách a vhodných vzorcích. MEFs jsou významným nástrojem v buněčné biologii a výzkumu. Tento typ buněk byl vybrán pro jejich osvědčenost, dostupnost a relativní „nenáročnost“.

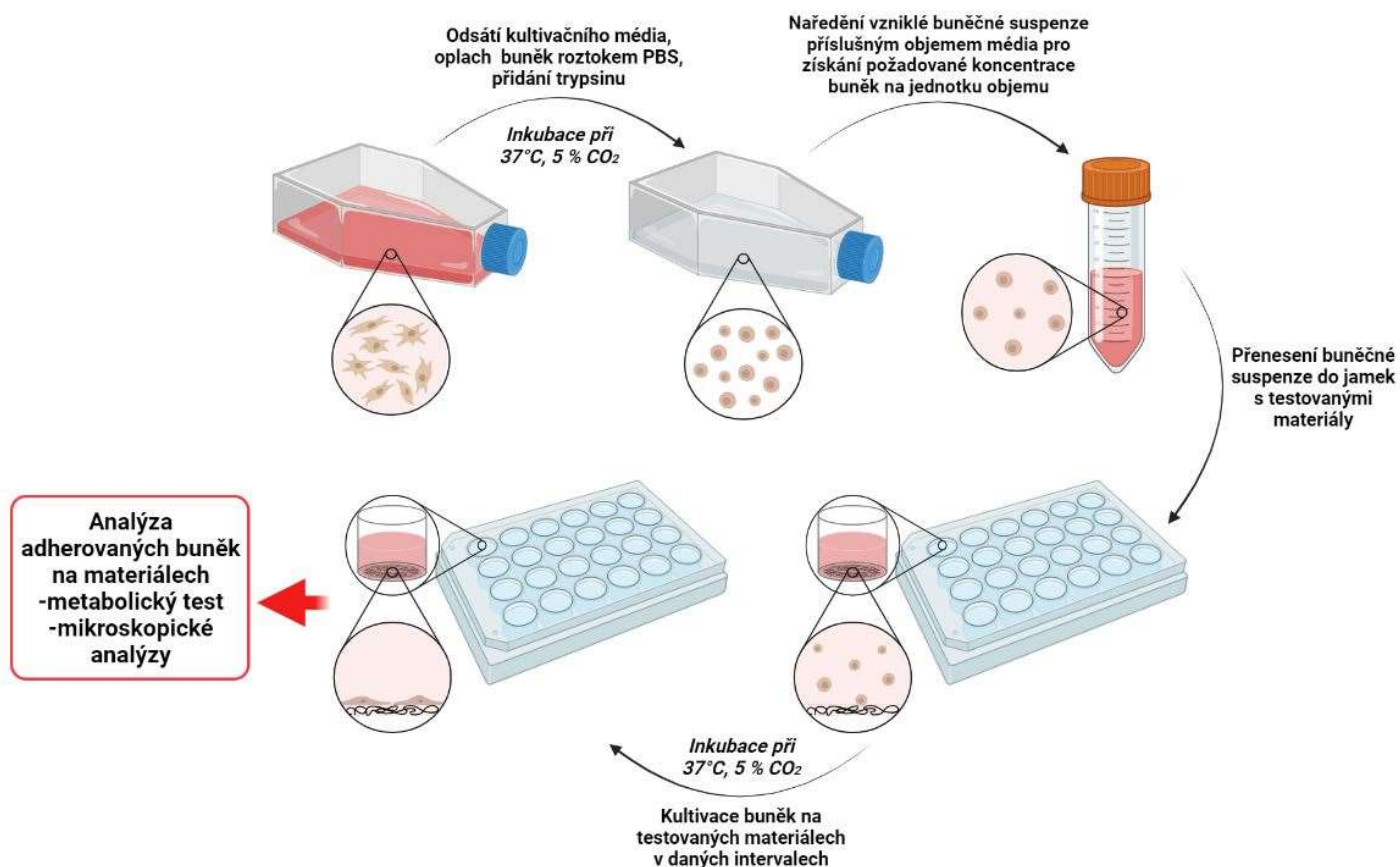
Buňky byly kultivovány v kompletním médiu DMEM - High Glucose (Dulbecco's Modified Engles Medium, Biosera) obohaceném o 5 % fetálního bovinního séra (Fetal bovine serum, Biosera), 5 % novorozeneckého telecího séra (Newborn calf serum, Sigma), 1 % glutaminu (Biosera) a 1% antibiotik (Pen/Strep Amphotericin B, Lonza). Pro experiment byly použity buňky v 19. pasáži o koncentraci buněk $1 \cdot 10^4 / 1 \text{ ml}$ (tedy $1 \cdot 10^4 / \text{vzorek}$). Materiály byly s buňkami inkubovány 1, 3 a 7 dní při 37°C v CO₂ inkubátoru (řízená atmosféra s 5 % CO₂). Princip pasážování buněk spočívá v přípravě buněk ze zmrazeného produktu a následném udržování buněčné linie nebo buněčné populace v optimálním stavu růstu a vitality. Buňky se rozmrazí a inkubují v kultivační nádobě v CO₂ atmosféře, následně se přesouvají z jedné nádoby do druhé. Při přesunu se odsaje živné médium, buňky přichycené na dně nádoby se opláchnou roztokem PBS (fosfátový pufr - Phosphate-Buffered Saline). Oplach se provádí z důvodu odstranění zbytků séra a minimalizaci buněčného stresu z přenosu díky isotonickému charakteru PBS. Pro uvolnění adherovaných buněk se provádí takzvaný proces trypsinace, při kterém se pomocí enzymu trypsinu rozkládají buněčné spoje, což způsobuje ztrátu uchycení buněk k nádobě. Po přesunutí buněk do nové nádoby se přidá kompletní médium DMEM s inhibátorem trypsinu k zastavení enzymatické aktivity trypsinu a ochrany samotných buněk před nadměrným působením trypsinu.



Obr. 70 – Princip přípravy buněk – pasážování. Obrázek vytvořen pomocí BioRender [165].

6.4.3 Osazení vzorků buňkami

Připravené sterilizované vzorky v mikrotitračních destičkách s průměrem jamky 16 mm byly zality 1 ml buněčného média s buňkami o koncentraci $1 \cdot 10^4$ buněk/1 ml. Princip nasazení buněčného materiálu je znázorněn na obrázku (Obr. 71). Pro každý materiál byla také osazena jedna prázdná jamka buněčným médiem, tato jamka sloužila jako pozitivní kontrola životaschopnosti buněk. Pozitivní kontrola slouží k ověření kvality buněčného materiálu a správnosti laboratorních postupů a podmínek kultivace. Pokud by pozitivní kontrola neukázala metabolicky aktivní buňky, byly buďto špatně připravené buňky, anebo došlo během testování ke znehodnocení biologického materiálu. Takto připravené a buňkami osazené vzorky byly vloženy do inkubátoru s atmosférou 5% CO₂. Kde probíhala kultivace po dobu 1, 3 a 7 dní.



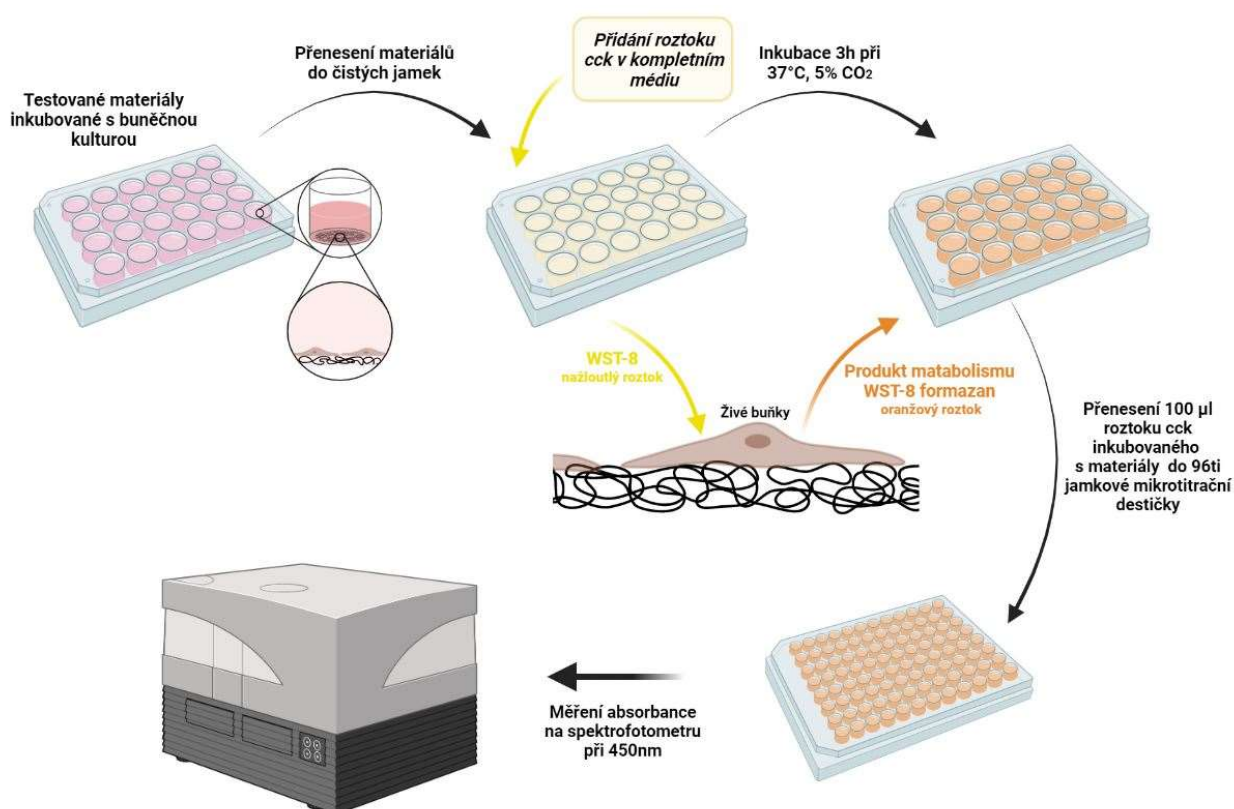
Obr. 71 – Princip nasazení buněk 3T3 na experimentální materiály v mikrotitračních destičkách. Obrázek vytvořen pomocí BioRender [165].

6.4.4 Metabolický test CCK-8

CCK-8 (Cell Counting Kit číslo 8) viz obrázek (Obr. 72). Tento test tzv. sada pro počítání buněk s komerčním označením CCK-8 vyráběný firmou Dojindo [166]. Je to spolehlivý nástroj pro kvantifikaci množství metabolicky aktivních buněk, indikuje tedy množství živých buněk. Tento kit v současnosti představuje vrchol v oblasti buněčné analýzy. Set se také vyznačuje spolehlivostí a relativní jednoduchostí. Tento test je poměrně mnohostranný a umožňuje zkoumat chování buněčných kolonií na základě jejich metabolické aktivity. Je to ucelený relativně nenáročný a poměrně spolehlivý nástroj, který je jakýmsi světovým standardem. Tento test je jednoduše využitelným pro testování proliferace a stavu buněčných vzorků v in-vitro experimentech. Princip metody je založen na reakci barviva WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)2H-tetrazolium)). WST-8 je ve vodě rozpustná tetrazoliová sůl. Reakce spočívá v extracelulární redukci WST-8 NADH dehydrogenázou produkovanou mitochondriemi. Výsledné WST-8 produkty jsou ve vodě rozpustné, oproti jiným testům odpadá mezikrok s extrakcí barviva. Princip tedy lze zjednodušit tak, že WST-8 vstoupí do životaschopných buněk, kde prochází složitou enzymatickou redukcí. Tuto redukci zprostředkovávají dehydrogenázy. Výsledkem této redukce je tvorba ve vodě rozpustného formazanového barviva, jehož intenzita je spojena s metabolickou aktivitou buněk. Množství vzniklého barviva úměrně odpovídá množství životaschopných buněk v roztoku. Vzhledem k relativní jednoduchosti, spolehlivosti a přesnosti lze sledovat dynamiku vývoje buněčného

chování v čase. Tyto vlastnosti jsou zásadním parametrem pro sledování viability ve vzorcích a porovnání jejich vlastností. Pro potřeby tkáňového inženýrství lze konstatovat, že se CCK-8 využije nejenom ke kvantifikaci buněk, ale i k získání informací o vitalitě a zdraví buněk nasazených do mikroprostředí tkáňového nosiče [167, 168].

Testování metabolické aktivity buněčné linie pomocí metabolického testu CCK-8 probíhalo v každý stanovený testovací den. Ze vzorků určených na konkrétní testovací den bylo odsáno kulturační médium, vzorek byl přenesen do prázdné jamky. K přeneseným vzorkům byl přidán připravený 10% roztok CCK-8 v kompletním médiu DMEM. Takto připravené vzorky s CCK-8 byly inkubovány po dobu 180 minut. Během této doby se tetrazoliová sůl metabolickou aktivitou buněk přeměňovala na formazanové barvivo. Po uplynutí stanovené reakční doby bylo od každého vzorku odebráno 100 μ l roztoku s CCK-8. Tyto roztoky byly přeneseny do 96 jamkové mikrotitrační destičky. Po přenesení všech vzorků došlo k hodnocení absorbance na spektrofotometru při 450 nm vlnové délce. Princip testování je zobrazen na obrázku (Obr. 72).

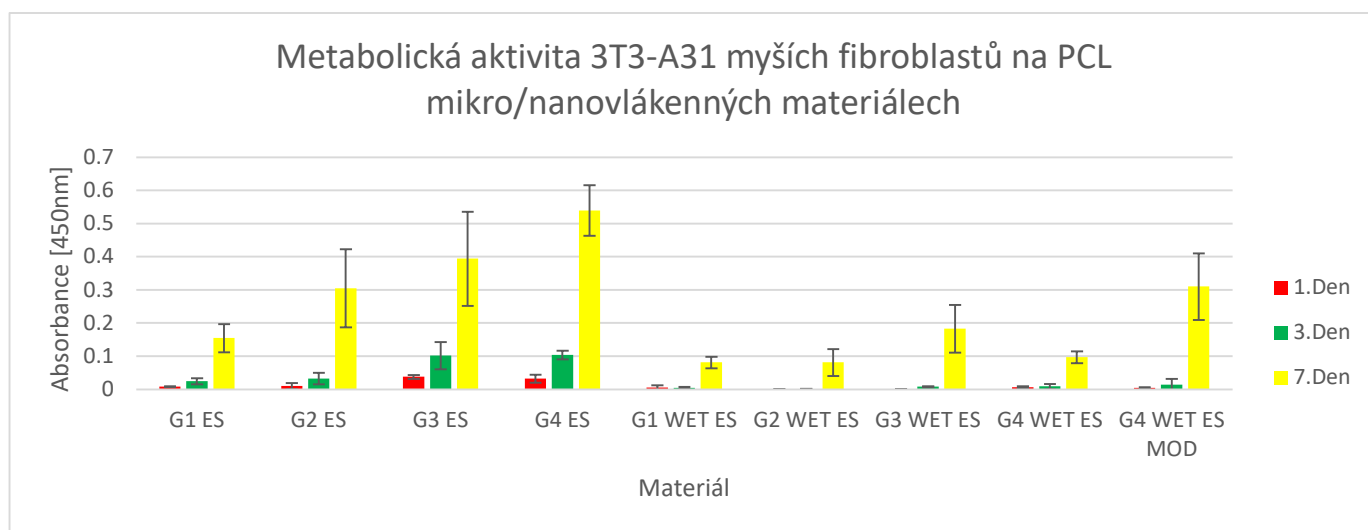


Obr. 72 – Princip měření viability pomocí CCK8. Výsledná viabilita je úměrná absorbanci vlnové délky 450nm spektrofotometrem. Obrázek vytvořen pomocí BioRender [165].

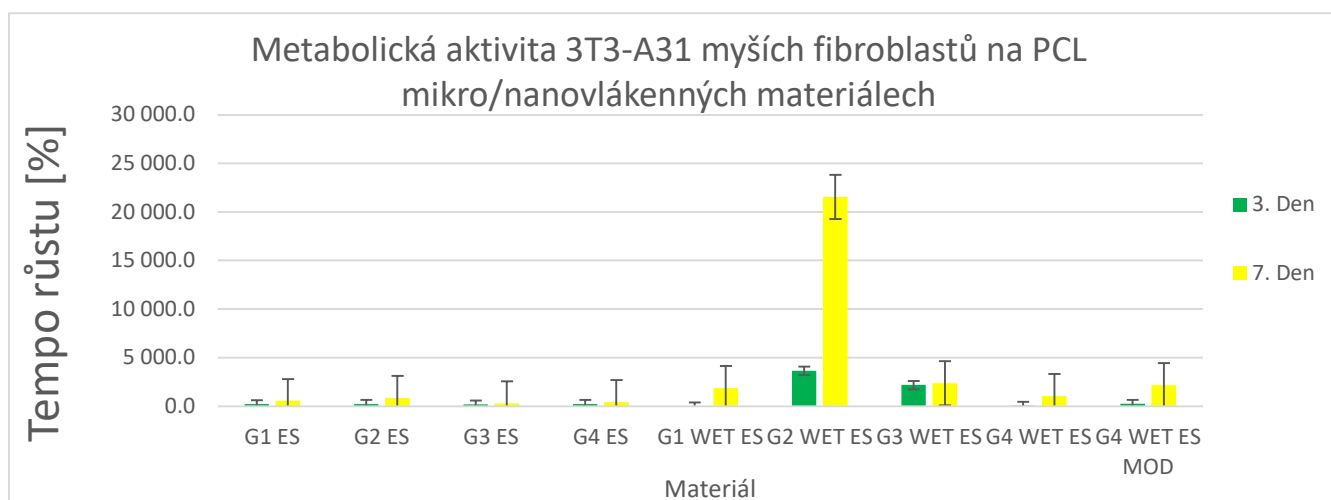
6.4.5 Výsledky biologického testování

Výsledky biologického testování jsou založeny na hodnocení absorbance odebraných 100 µl roztoků s CCK-8. Zde je množství oranžového barviva úměrné buněčné aktivitě ve sledovaných vzorcích. Vzorek negativní kontroly se použije pro stanovení nulové hodnoty buněčné aktivity. Od každého výsledku vzorku absorbance vlnové délky 450 nm je tedy odečtena absorbance vzorku negativní kontroly. Naměřené hodnoty absorbance jsou zobrazeny na obrázku grafu (Obr. 73). Výsledné údaje ukazují, že na všech materiálech buňky provedly buněčnou adhezi a následnou buněčnou proliferaci v čase. U všech materiálů je patrný rostoucí trend.

Test viability ukázal, že proliferace buněk je dostatečná. Použité materiály nevykazují cytotoxické vlastnosti. Data z testu jsou shrnuta v grafu na (Obr. 73). Ploché vzorky vykazují nejvyšší viabilitu, z toho materiál G3 a G4 nejvyšší. Následuje objemný vzorek materiálu G4 zvlákněný do kapaliny a vysušený samovolným odpařením ethanolu. Nejnížší viability vykazují objemné vzorky zvlákněné do kapaliny a vysušené lyofilizací, z této řady opět průměr převyšují materiály G3 a G4. Pro porovnání vhodnosti materiálu bylo spočítáno tempo růstu pro jednotlivé materiály, zde je vidět, že objemnější materiály vytvořené pomocí elektrického zvláknění do kapaliny vykazují v tomto experimentu naprostou převahu a z tempa růstu je zřejmé, že 3D struktura umožňuje buňkám výrazně vyšší proliferaci do materiálu, který jim poskytuje dostatečný prostor, velkou porozitu pro růst a migraci. Největší přírůstek od posledního testu viability v sedmém dni u planárních vzorků je u materiálu G2 – 841% zatímco u 3D materiálu vytvořeného metodou wet je přírůstek u G2 21 553% viz. graf – (Obr. 74).



Obr. 73 – Graf znázorňující viabilitu, (reprezentovanou absorbancí vlnové délky na spektrofotometru) pro testované materiály v 1., 3. a 7. dni. Materiály G1-G4 dle tabulky (Tabulka 9). Přípona ES reprezentuje vzorek z klasického elektrospinningu na pevný rovný kolektor, tedy plochý vzorek. WET ES je wet elektrospinningem vytvořený vzorek zvlákněný do kapaliny – ethanolu, s následným nahrazením ethanolu za demineralizovanou vodu a následně lyofilizovaný. WET ES MOD je modifikovaný do kapaliny zvlákněný vzorek, jež byl vysušen samovolným odpařováním ethanolu při laboratorní teplotě v digestoři. Červená barva reprezentuje viability v 1. den po nasazení, zelená 3. den a žlutá je 7. den.



Obr. 74 – Graf ukazující tempo růstu viability (proliferace), tedy procentuální nárůst počtu nových buněk v materiálu v 3. a 7. den oproti dnu prvnímu (adherovaným buňkám). Je zde vidět, že tempo růstu nových 3T3 buněk je v 3D materiálech vytvořených pomocí technologie WET ES řádově vyšší než u plošných (planárních) vzorků. Nejvyšší přírůstek planárního vzorku v 7. dni je 422% oproti nejvyššímu přírůstku 21 553% 3D vzorku vyrobeného zvlákněním do kapaliny.

6.5 Vyhodnocení a závěry z výroby a testování vzorků

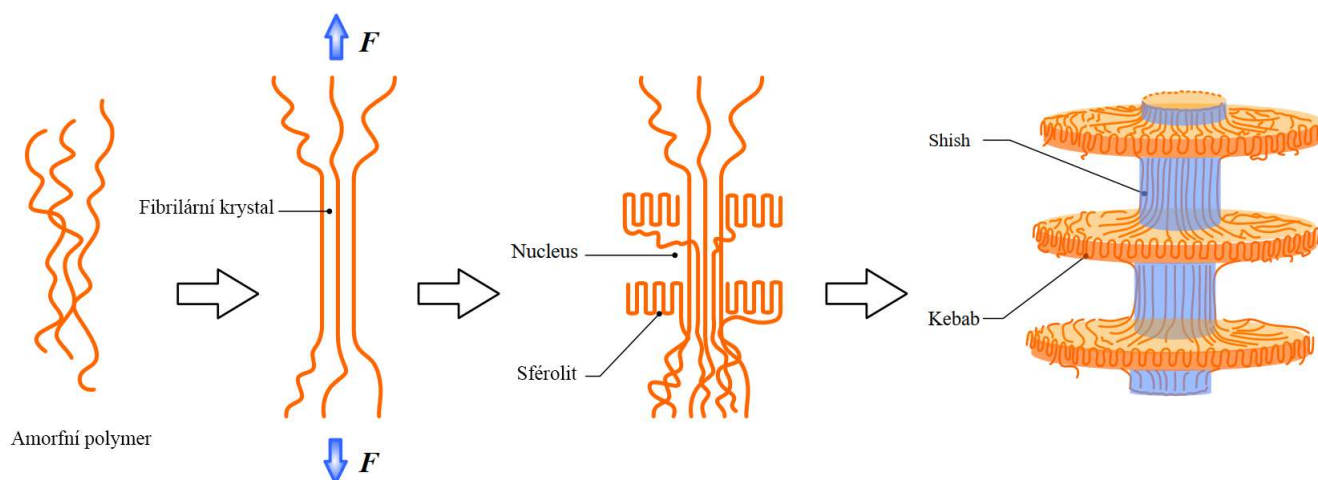
Na závěr této fáze testování lze prohlásit, že ač samotná viabilita je menší u 3D objemných vzorků, je objemná struktura pro růst buněk vhodná. Tempo růstu jasně ukazuje bezkonkurenční dynamiku růstu buněk. Takovéto velké tempo růstu je dáno porozitou a velkým objemem vzorku. Předpoklad pro menší viabilitu u objemných vzorku je malý prvotní záchyt buněk v materiálu při nasazení buněk. U plochých vzorků s malými póry je záchyt a následná adheze lepší než u vzorků s velkou porozitou. Vzorky s malou porozitou zachytí buňky jako filtr, zatímco objemné vzorky buňky propustí na dno kultivační jamky nebo se ve vzorku špatně zachytí, oproti plochým vzorkům, kde se z kapalného média na planární vzorek buňky usadí. 3D objemné vzorky navíc mají s dnem nádoby z mikroskopického pohledu spíše bodový kontakt, oproti plochým vzorkům, které mají větší plochu kontaktu s dnem nádoby, kde se usadí ostatní buňky, které se neusadily na materiálu. U buněk, které dosednou na dno nádoby může probíhat migrace do struktury vzorku lépe u planárních vzorků.

Objemné 3D materiály vytvořené do kapalinového kolektoru tedy vykazují vysokou vhodnost pro buněčný růst, a zároveň dokazují, že je možné vyrobit objemnou strukturu, kterou by bylo možné v tkáňovém inženýrství použít pro tkáňové náhrady.

7 Vývoj specifických materiálů pro tkáňové inženýrství

Po prokázání funkčnosti zařízení i schopnosti vytvářet 3D objemné vlákenné struktury vhodné pro použití v medicíně jako tkáňové nosiče, byl výzkum zaměřen na hledání specifických materiálů, které by byly výjimečné, jak z pohledu materiálových, tak i z pohledu tkáňového inženýrství. Cílem bylo nalezení dalších specifických materiálů vhodného k výrobě objemných struktur a splňujícího požadavky na biokompatibilitu. Jako vhodný kandidát byl vybrán opět polykaprolakton. PCL byl vybrán z důvodu jeho osvědčených vlastností v biomedicínských aplikacích [11, 58, 161–163]. Jedním ze způsobů výroby porézních vlákenných struktur je vlákenní blendu PCL/MPG (methoxy poly(ethylene glycol)) do kapalného kolektoru, kde se MPEG ve vodní lázni z výsledných vláken vymývá [63, 169]. Autoři článku uvádějí, že tento způsob vytváření porézní struktury snižuje krystalinitu, což je zajímavé.

Jedním z principů tvorby povrchově specifických vláken je tvorba takzvaných „shish-kebab“ strukturovaných vláken [170, 171]. V tomto případě je vlákno ovlivněno tvarem krystalické části, která je právě formována podle tzv. shish-kebab typu krystalinity. Princip a typický tvar krystalické struktury shish-kebab krystalů v polymeru je znázorněn na obrázku (Obr. 75).

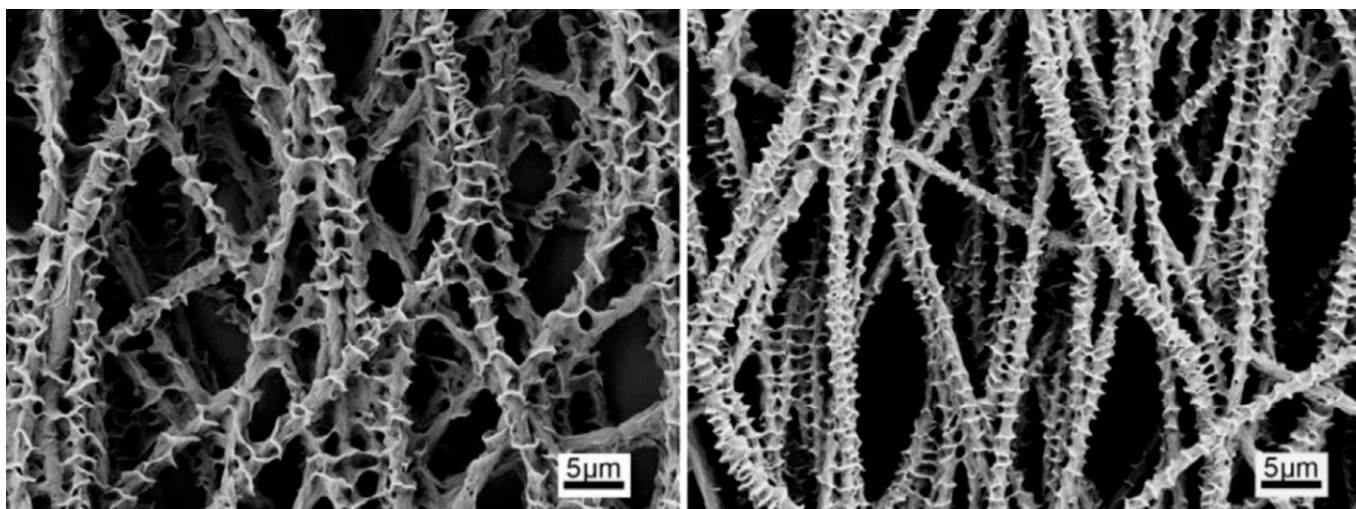


Obr. 75 – Princip a tvar shish-kebab krystalu v polymeru. Amorfní polymer začíná při dlužení tvořit dlouhé krystalické struktury. Poté se začnou oko těchto dlouhých středových krystalů tvořit krystalické disky. Obrázek převzat [172].

Tyto shish-kebab materiály jsou vyráběny v několika krocích, nejprve dojde k elektrickému zvláknění samotného PCL na pevný kolektor. Poté jsou aplikovány další samostatné kroky. Například nakapání zředěných roztoků (obvykle mezi 0,2-1,5hm) PCL/pentyl-acetátu a PCL/kyseliny octové na vlákenný materiál, omytí rozpouštědlem a poté vysušení. Druhý příkladem výroby shish-kebab struktury je několikahodinové ponoření do roztoku PCL/pentyl-acetátu nebo roztoku PCL/kyseliny octové, poté opětovné promytí rozpouštědlem a vysušení. Pro tvorbu shish-kebab struktur postprocesním postupem se používají zředěné roztoky špatného rozpouštědla (jako například pentylacetát či aceton) nebo směsi rozpouštědlo/nerozpouštědlo (jako například kyselina octová/destilovaná voda) [172–174].

Výše popsany postprocesní postup tvorby povrchově strukturálně modifikovaných elektricky zvlákněných materiálů je však poměrně složitý, má mnoho parametrů a je časově náročný. Proto vznikla myšlenka

vývoje podobné struktury, ale s mnohem jednodušším postupem tak, aby v ideálním případě vznikala povrchově specifická vlákna rovnou v kapalném kolektoru.



Obr. 76 – Příklad SEM snímku DC elektricky zvlákněných vláken se strukturou shish-kebab. Vláknina vytvořena ponořením základní PCL vláknenné struktury do zředěného polymerního roztoku PCL/pentylacetátu a následným oplachem a vysušením. Obrázek převzat [172].

Možný princip byl zamýšlen v nalezení kolektorové kapaliny, která je částečným nebo špatným rozpouštědlem pro PCL. Částečné rozpouštědlo v teorii pravděpodobně rozpustí zvlákněný nekystalický materiál, zatímco jeho krystalická část zůstane v celku. Výsledek by mohl být podobný, jako u výše popisované výroby shish-kebab struktury vláken, pouze by bylo procesu výroby dosaženo v jednom jediném kroku. Následné kroky, jako oplach z důvodu vymytí ethanolu a sušení zůstanou zachovány. Další možností výroby specifických struktur je uplatnění principu fázové separace, při kterém se vláknenný povrch nebo objem modifikuje vzájemnou interakcí složek roztoku nebo kolektoru a výsledkem může být porézní nebo povrchově specifický materiál, viz kapitola 2.3 – *Nanotopografická alterace*.

7.1 Testování rozpouštědlových a kolektorových systémů

Výběr vhodného polymerního roztoku a kapalného kolektoru je klíčový pro výrobu vláken se specifickými vlastnostmi. Různé roztoky polymeru mohou vytvářet vlákna s různými parametry. Výběr kapalného kolektoru může ovlivnit zejména morfologii a strukturu vláken. Různé kapalně kolektory mohou vytvářet vlákna s různými povrchovými texturami, průměry a porozitou. Tyto vlastnosti mohou mít významný vliv na interakci vláken s buněčnými a tkáňovými strukturami v aplikacích tkáňového inženýrství.

Základem testování navržených experimentálních řad bylo identifikování potenciálních PCL roztoků, včetně jejich rozpouštědlových systémů a kolektorových systémů o dané koncentraci. Seznam vybraných polymerních roztoků je v tabulce (*Tabulka 13*). Seznam stěžejných kolektorových směsí, použitých pro experimentování jejichž cílem bylo vytvoření specifických vláken vhodných pro tkáňové inženýrství je uveden v tabulce (*Tabulka 14*). I přesto že je práce s kolektorem prováděna v chemické digestoři s patřičným odtahem vzduchu a v bezpečnostních ochranných pomůckách, je obecně preferováno použití méně toxických kapalin pro kolektory. Dále není vhodné pracovat s koncentrovanými kyselinami a s příliš aromatickými kapalinami. Z toho důvodu byl zvolen jako základní kapalinový kolektor aceton. Aceton

je pro postprocesní úpravu struktury vláken do podoby shish-kebab používán [175]. Mísení acetone se standardními kapalinovými kolektory jako je voda a etanol, tedy nerozpouštědly pro PCL bylo zajímavou výzvou.

Tabulka 13 – Přehled roztoků PCL testovaných k výrobě specifických struktur zaměřených na tkáňové inženýrství.

	Mat 1	Mat 2	Mat 3	Mat 4
Materiál	PCL	PCL	PCL	PCL
Molekulová hmotnost M_n [kDa]	80	80	80	80
Koncentrace [hm %]	10	12	10	12
Rozpouštědlo	Chloroform /dimethylformamid	Chloroform /dimethylformamid	Chloroform /ethanol	Chloroform /ethanol
Hmotnostní poměr rozpouštědel	6:4	6:4	8:2	8:2

Tabulka 14 – Přehled testovaných kapalin kolektoru Tabulka 15 – Přehled testovaných kapalin kolektoru pro testování tvorby specifických struktur vytvářených elektrickým zvlákněním do kapaliny.

Označení	Složka 1	Složka 2	Složka 3	Poměr
Kol 1	Aceton			
Kol 2	Aceton	Ethanol	Voda	2:2:1
Kol 3	Aceton	Ethanol		10:0
Kol 4	Aceton	Ethanol		10:1
Kol 5	Aceton	Ethanol		10:2
Kol 6	Aceton	Ethanol		10:3
Kol 7	Aceton	Ethanol		10:4
Kol 8	Aceton	Ethanol		10:5
Kol 9	Aceton	Ethanol		10:6
Kol 10	Aceton	Ethanol		10:7
Kol 11	Aceton	Ethanol		10:8
Kol 12	Aceton	Ethanol		10:9
Kol 13	Aceton	Ethanol		1:1
Kol 14	Aceton		Voda	10:1
Kol 15	Aceton		Voda	10:2
Kol 16	Aceton		Voda	10:3
Kol 17	Aceton		Voda	100:1
Kol 18	Aceton		Voda	100:4
Kol 19	Aceton		Voda	100:6
Kol 20	Aceton		Voda	100:7
Kol 21	Aceton		Voda	100:8
Kol 22	Aceton		Voda	100:9
Kol 23	Aceton	Ethanol		100:1
Kol 24	Aceton	Ethanol		100:2
Kol 25	Aceton	Ethanol		100:3
Kol 26	Aceton	Ethanol		100:4
Kol 27	Aceton	Ethanol		100:5
Kol 28	Aceton	Ethanol		100:6

Hledání vhodných materiálů bylo systematickým testováním vybraných polymerů a kolektorových směsí. Důvodem zaměření se na různé kolektory, je nejen z důvodu testování výroby shish-kabab struktury, ale i testování specifických struktur vzniklých při změnách gradientů rozpouštědel a složek kapalin kolektorů. Pokud při koagulaci dochází k průniku kapaliny kolektoru do objemu vlákna rychleji, než je uvolnění rozpouštědla z vlákna do kolektoru, vznikají ve vláknu dutiny-póry. Toto platí za podmínky, že je kolektorová kapalina pro polymer nerozpouštědlem nebo jenom částečným rozpouštědlem. Při zvláknování byly hodnoceny parametry noření dle tabulky (*Tabulka 4*) a parametry zvláknitelnosti dle tabulky (*Tabulka 5*).

7.2 Experimentování s výrobou specifických vlákenných struktur

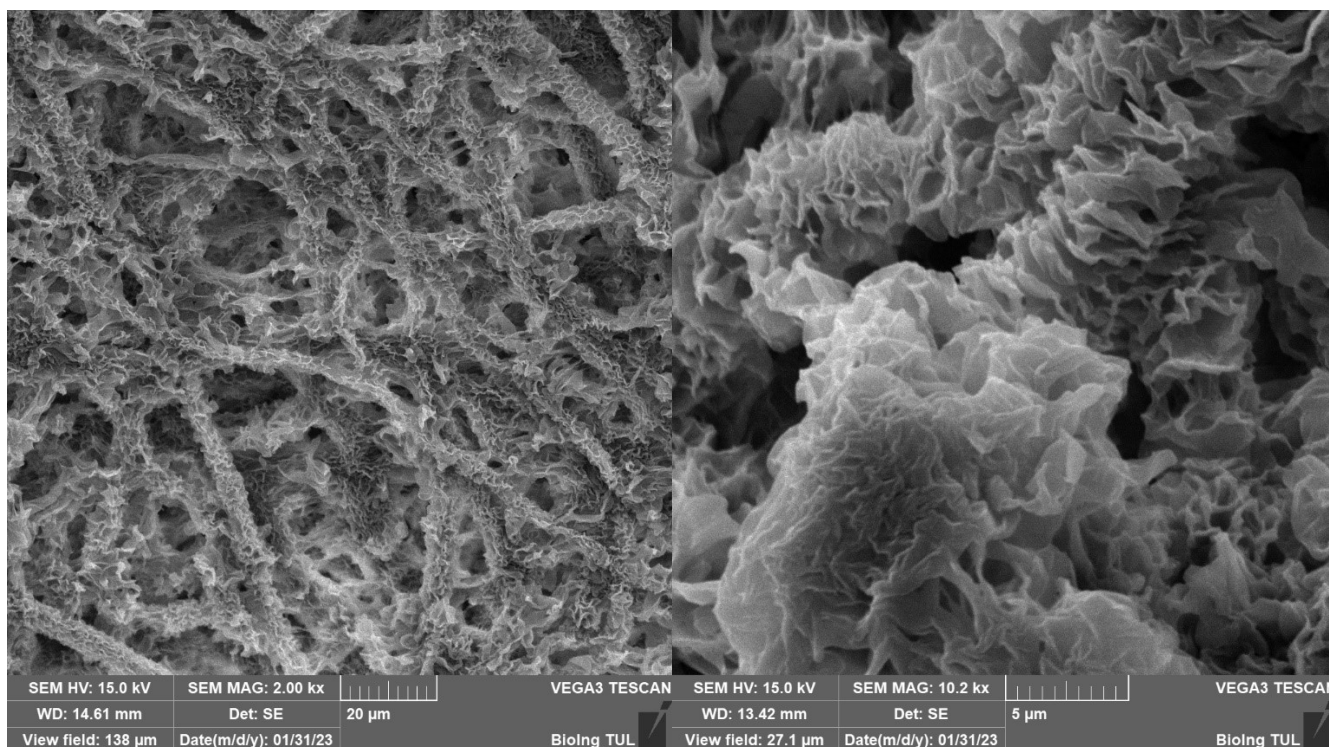
Výběr kapalného kolektoru může ovlivnit zejména morfologii a strukturu vláken. Různé kapalné kolektory mohou vytvářet vlákna s různými povrchovými alteracemi a porozitou. Tyto vlastnosti mohou mít významný vliv na interakci vláken s buňkami v aplikacích tkáňového inženýrství.

V této části je popsáno systematické testování různých polymerních roztoků a kapalných kolektorů. Popisuje jejich vliv na vlastnosti vytvořených vláken. Experimenty zahrnují charakterizaci vlastností vláken pomocí některých analytických technik jako je například optická analýza a měření porozity. Pro výrobu specifických materiálů, předurčených pro tkáňové inženýrství, byl vybrán opět PCL o průměrné molekulové hmotnosti $M_n=80$ kDa. Vyšší molekulová hmotnost sice znamená vyšší viskozitu polymerního roztoku, a horší zvláknovací charakteristiku, ale delší makromolekulární řetězce zase pomohou zvýšené odolnosti vytvořených vláken v částečném rozpouštědle tak, aby zůstala krystalická část nenarušena. Velká délka makromolekuly polymeru snižuje interakci s molekulami rozpouštědla.

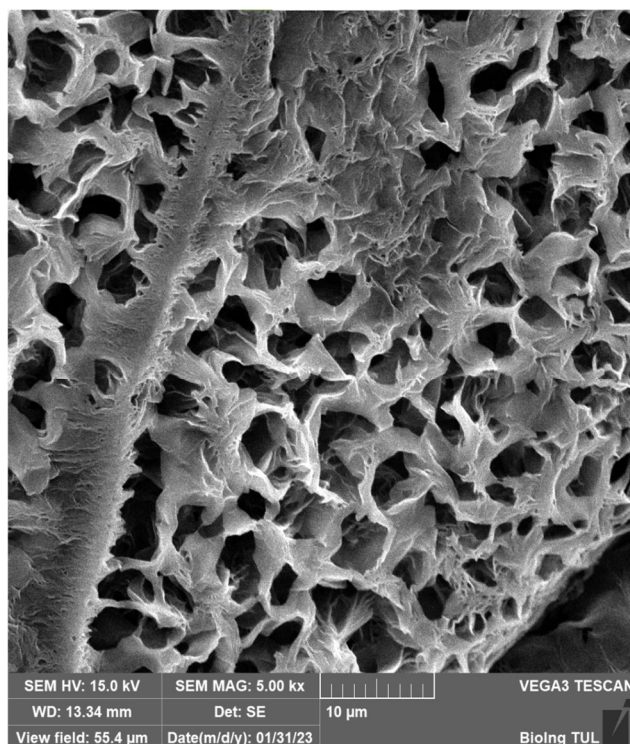
7.2.1 Testovací řada M1 (materiál Mat 1 - 4 s kolektorem Kol 1)

První testy byly zaměřeny na hledání shish-kebab struktury. Materiály se zvláknovaly do kolektoru s čistým acetonem. Napětí 14 kV a výškou zvláknovací jehly na vzdálenost 10 cm nad středem kapalného kolektoru. Experimenty s materiálem *Mat 3* a *4*, při kterých byla jako rozpouštědlo použita směs chloroform/ethanol nebyly se zvláknováním úspěšné. Většina materiálu se v lázni rozpustila a vytvořený produkt byl minimální. Nejlepší zvláknitelnost do acetonu prokázal *Mat 2*, což je 12% PCL a rozpouštědlový systém chloroform/dimethylformamid. Materiál *Mat 1* což je 10% varianta materiálu *Mat 2* nevykazoval dobré zvláknovací vlastnosti, v acetonu se rozpouštěl. SEM snímky potvrdily strukturu shish-kebab dle očekávání. Vytvořený produkt má sice zamýšlenou strukturu, je však spojen v jeden celek s vysokým specifickým povrchem. Na produktu je patrná vlákenná struktura, jsou však patrné známky slévání vláken dohromady. Proces tvorby vláken také není zcela stabilní, zprvu se vlákna netvoří a dochází k rozpouštění vytvořených vláken v kolektoru. Po tzv. startovací době (cca 3minuty při průtoku 10ml/hod) se vytvoří lokální mikro podmínky se sníženou koncentrací acetonu a začne se vytvářet vlákenná struktura. Po zvláknění po dobu 60 s byl materiál vytažen a postupně přesouván do nádob s čistou demineralizovanou vodou z důvodu vymytí ethanolu (*viz kapitola 6.2 – Příprava vzorů*). Při manipulaci s materiálem se materiál choval jako vodní gel s čiro-mléčným zbarvením, šlo s ním dobře manipulovat, byl flexibilní a držel kapalinu ve svém objemu. Takto vyrobená struktura byla analyzována pomocí obrazové analýzy SEM snímků viz obrázek (*Obr. 77*). Snímky struktury vytvořeného produktu ukázaly sice strukturu podobnou shish-kebab, ale nedochází zde k zachování plné vlákenné struktury v materiálu. Vlákna se zjevně tvoří, ale vlivem rozpouštění se v rozpouštědlu spojují do jedné struktury. Vlákenný charakter produktu je však zjevný. Porozita a propojenost pórů je však nižší. Problémem tohoto zvláknovacího procesu se však ukázala zejména jeho opakovatelnost. Opakovatelné produkce ustáleného produktu nebylo

vždy dosaženo. Se změnou lokálních mikro podmínek v kolektoru se měnila i výsledná struktura od shish-kebab vlákně struktury až po houbovitou strukturu nebo zcela slitého materiálu. Jediné částečné úspěchy měl materiál označený *Mat 2*, což byl PCL 80 12 hm% v CF/DMF. Při tomto experimentu došlo i k testu, při němž byl částečně nasycen kolektor polymerem PCL případně roztokem PCL 1,5% hm v Aceton/Voda (77:23 obj). Výsledek testování před nasycením roztoku však nebyl úspěšný. Výsledná struktura tohoto doplňkového experimentu je na obrázku (*Obr. 78*), výsledný materiál byl při manipulaci v roztoku a přesouvání podobný vlákně struktury, jeví se jako čirý až mléčný gel.



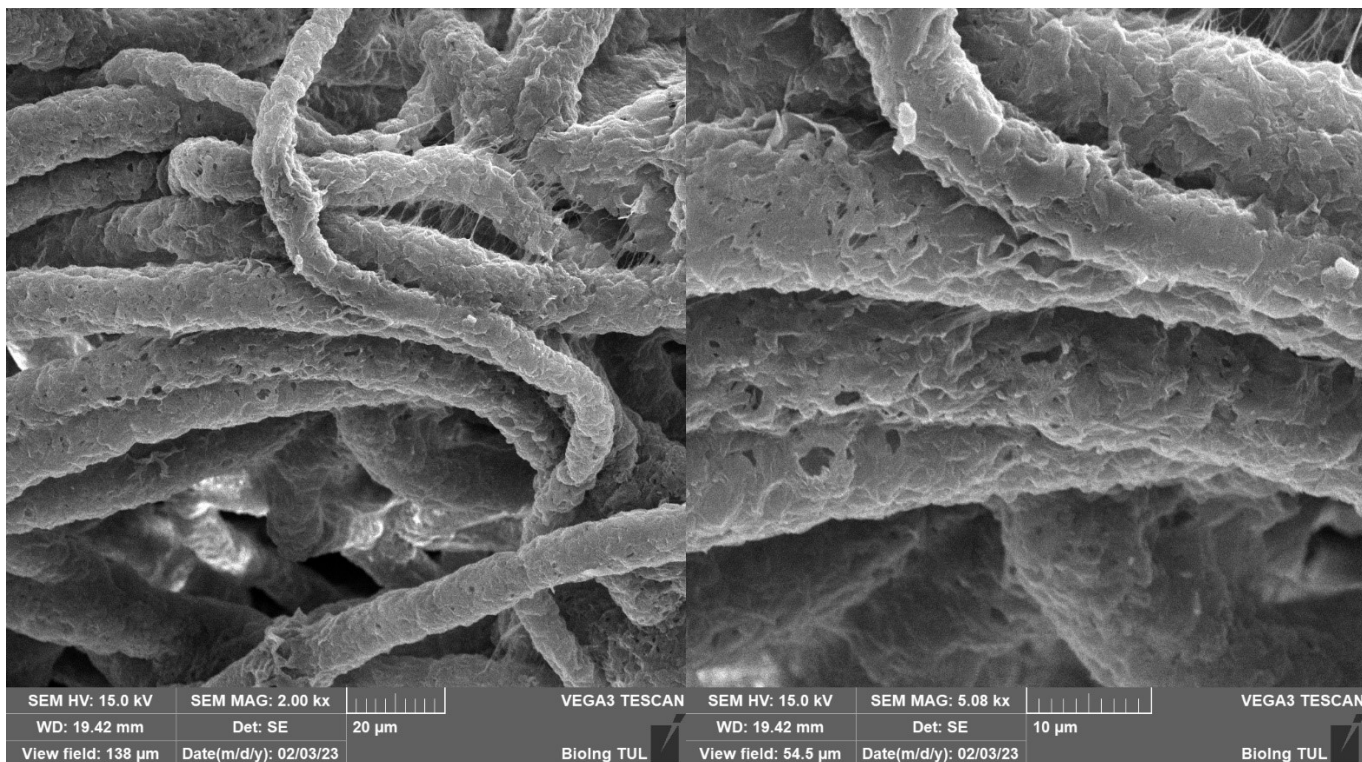
Obr. 77 – Struktura typu shish-kabab vytvořená zvlákněním do kapaliny. Vlákně jsou částečně slita dohromady, vlákně charakter produktu je však patrný.



Obr. 78 – Struktura materiálu vzniklého v experimentu se zvlákňováním do před-nasyceného roztokem PCL v acetonu. Struktura je vysoce porézní.

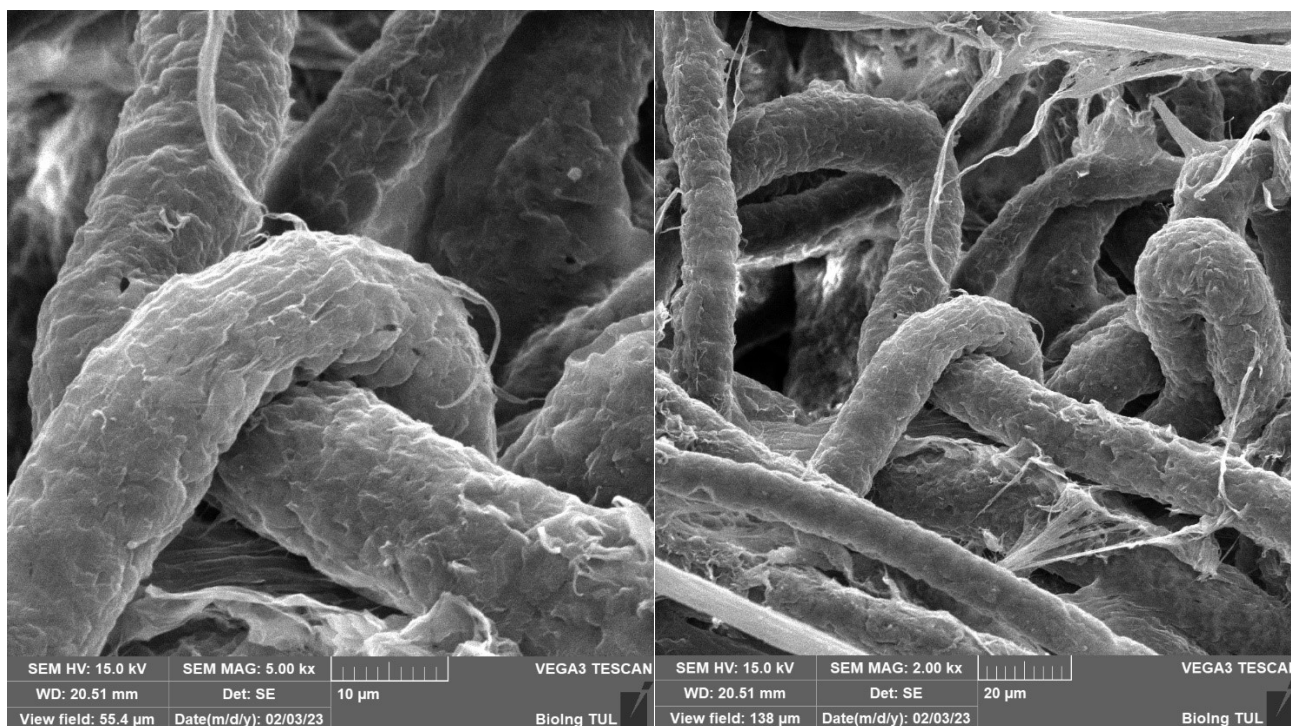
7.2.2 Testovací řada M2 (materiál Mat 1 a Mat 2 s kolektorem Kol 2 a Kol 13)

Druhá série testů rozvíjela testování vlivu směsi rozpouštědla a nerozpouštěla. Testy byly zaměřeny na studování vlivu směsí kolektoru na porozitu a morfologii vláken. Materiály se vláknily do kolektoru se směsí acetonu/ethanolu 1:1 (*Kol 13*) a aceton/ethanol/voda 2:2:1 (*Kol 2*) Napětí bylo 15 kV na vzdálenost trysky 10 cm od středu kapalného kolektoru. Při zvlákňování do kolektoru, který byl tvořen acetonem/ethanolem 1:1 (*Kol 13*) probíhalo vlákňění uspokojivě, vlákenné stužky směřovaly ke kraji nádoby. Vytvořený produkt se částečně projevoval jako „stužkování“ u hladiny kapaliny, všechny vlákenné produkty však byly smočené. SEM snímky ukázaly porézní vlákna s mikrostrukturovaným povrchem s náznaky porézní vnitřní struktury (*Obr. 79*).



Obr. 79 – Mikrostrukturovaný povrch vláken PCL – Mat 2 vytvořených vlákněním do kolektoru tvořeným acetonem/ethanolem 1:1 (Kol 13), snímky naznačují vnitřní porézní strukturu.

Při zvláknování do kolektoru, který byl tvořen acetonem/ethanolem/vodou 2:2:1 (Kol 2) probíhalo vláknění uspokojivě, vlákněné stužky směřovaly ke kraji nádoby. Proces vláknění byl velmi podobný jako v předchozím případě. Vytvořený produkt se částečně projevoval jako „stužkování“ u hladiny kapaliny, všechny vlákněné produkty však byly smočené. SEM snímky ukázaly porézní vlákna s mikrostrukturovaným povrchem s náznaky porézní vnitřní struktury. Oproti předchozímu testu byly ve struktuře produktu pravidelné poruchy a povrch měl méně výraznou strukturu (Obr. 80).



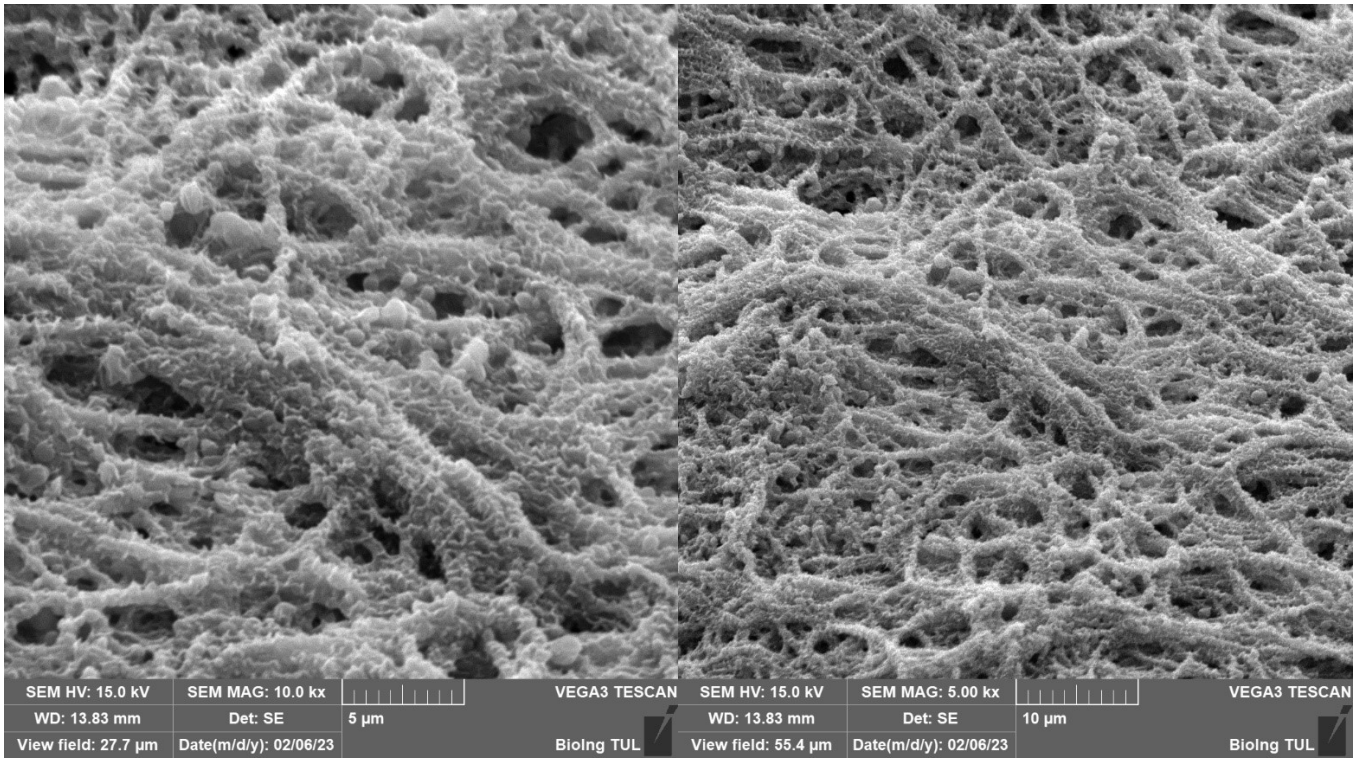
Obr. 80 – Mikrostrukturovaný povrch vláken PCL vytvořených vlákněním do kolektoru tvořeným acetonem/ethanolem/vodou 2:2:1 (Kol 2), snímky naznačují možnou vnitřní porézní strukturu. Ve vlákněném produktu je více defektů než v předchozím testu.

7.2.3 Testovací řada M3 (materiál Mat 2 a Mat 3 s kolektorem Kol 3 až Kol 13)

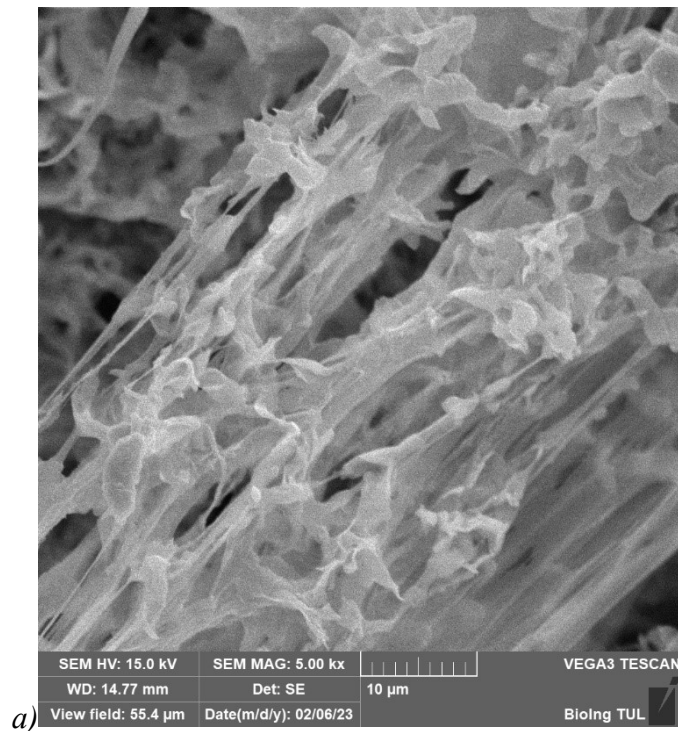
Třetí série testů experimentovala se sadou kolektorů, kde se měnil poměr acetonu/ethanolu od 1:0 až do 1:1 v krocích dle tabulky (Tabulka 14). Pro každý typ kolektoru byly testovány polymerní materiály označené jako Mat 2 a Mat 3 (Tabulka 13). Jednalo se o 12% hm PCL v CF/DMF 6:4 a 10% hm PCL v CF/ETH 8:2. Tato řada měla za cíl prozkoumat vliv poměru aceton/ethanol kolektorů na morfologii vláken.

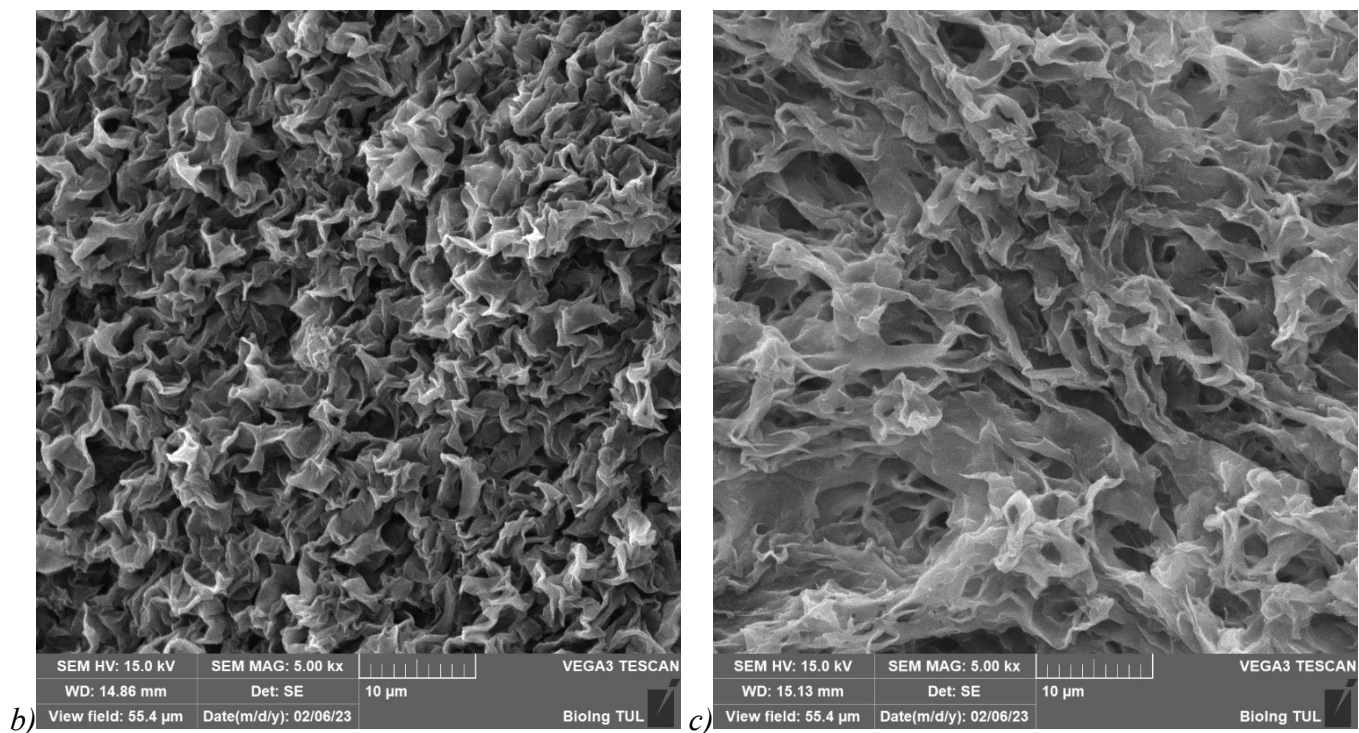
Materiál Mat 2 (12% hm PCL v CF/DMF 6:4) při vláknění do acetonu potřeboval vždy na začátku procesu fázi vytvoření lokálních mikro-podmínek (cca 3 minuty vláknění při průtoku 10 ml/hod). Poté se začal tvořit lokální vlákněný shluk v kolektoru. Výslednou obrazovou analýzou SEM snímků byly potvrzeny spojená vlákna typu shish-kebab podobně jako v části 7.2.1 (Obr. 77). Zvlákněovací proces sice dokáže vlákna typu shish-kebab vytvořit, ale proces není stabilní a není snadno opakovatelný. Obvykle je materiál s defekty a pouze část vytvořeného materiálu se dá nazvat vlákněnou shish-kebab strukturou. Je zjevná i tendence vláken se spojovat, toto je způsobeno narušením vlákna rozpouštědlem (Obr. 81).

Přidáváním ethanolu do kolektoru se opět po vytvoření lokálních mikro-podmínek začala tvořit materiálová struktura. Obrazová analýza SEM snímků materiálu ukázala porézní struktury podobné pěnám. Porézní kompaktní struktura se tvoří v rozmezí koncentrace aceton/ethanol 10:1 až k 10:5 (Obr. 82). Od koncentrace 10:6 se již v kolektoru formují vlákna s porézním a vysoce mikrostrukturovaným povrchem. Se zvyšující se koncentrací ethanolu se snižuje mikrostruktura povrchu a přestává být patrná porozita viz obrázek (Obr. 83).

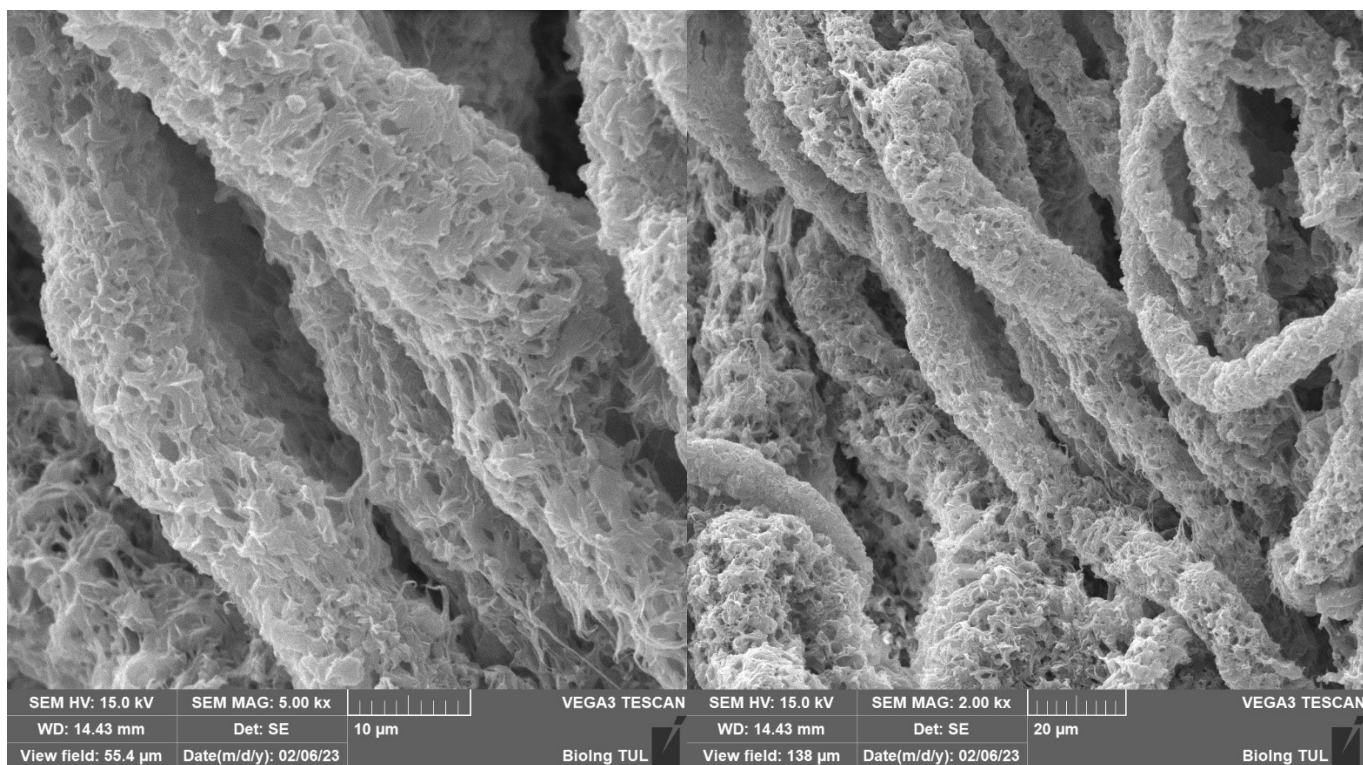


Obr. 81 – Snímek materiálu Materiálu Mat 2 (12% hm PCL v CF/DMF 6:4) po vláknění do acetonu, je patrná struktura shish-kebab. V materiálu je parné spojování se vlákny a velké množství defektů.



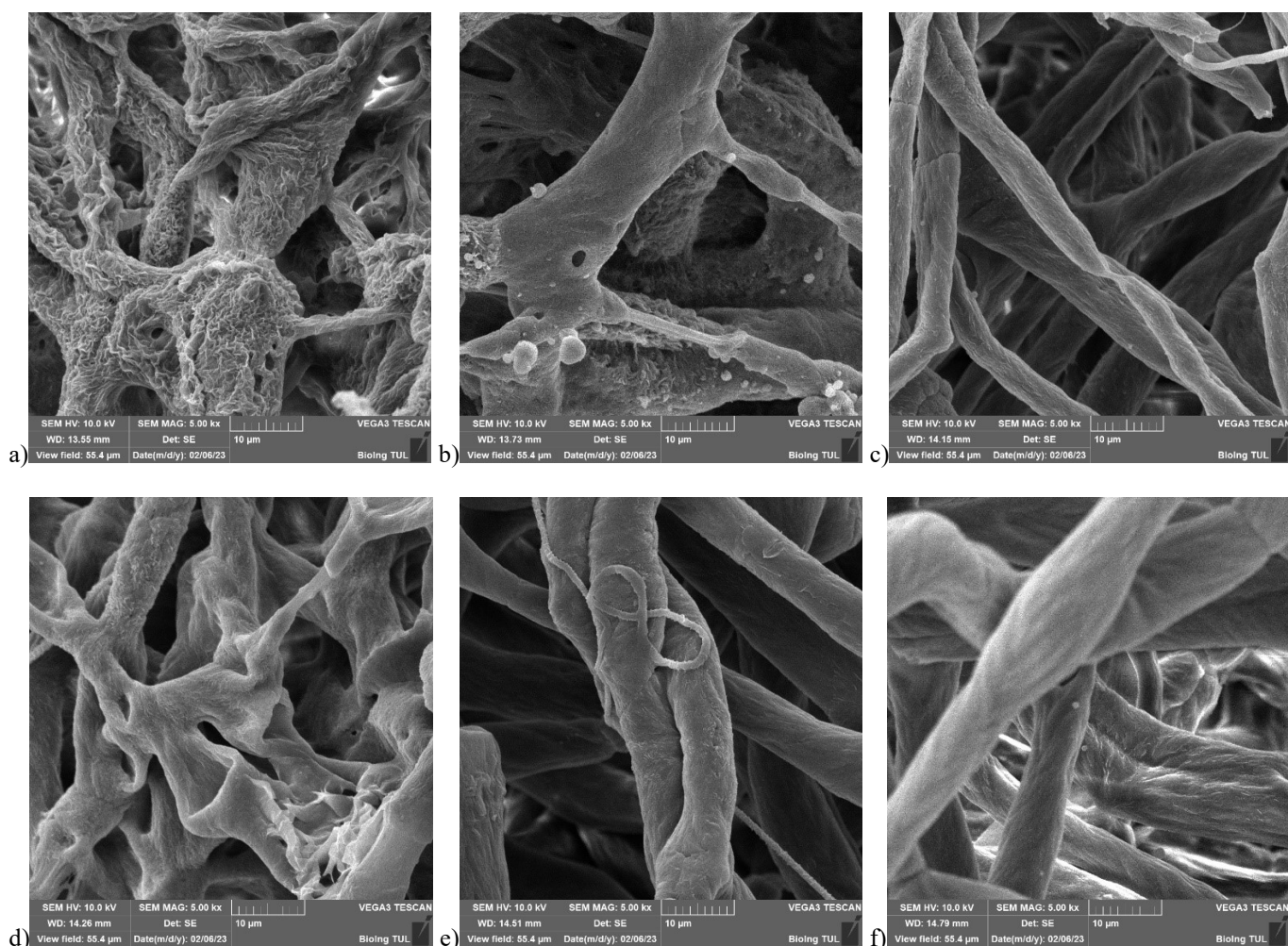


Obr. 82 – SEM snímek zvlákněného materiálu Mat 2 (12% hm PCL v CF/DMF 6:4) s poměrem kapaliny v kolektoru aceton/ethanol 10:1 až k 10:5 tvoří polymerní sraženiny připomínající porézní pěnové struktury. a) Poměr aceton/ethanol 10:1 – Kol 4. b) Poměr aceton/ethanol 10:2 – Kol 5. c) Poměr aceton/ethanol 10:5 – Kol 8.



Obr. 83 – Snímek zvlákněného materiálu Mat 2 (12% hm PCL v CF/DMF 6:4) s poměrem kapaliny v kolektoru aceton/ethanol 10:6 – Kol 9. Při dalším zvyšování ethanolu v kolektoru se nadále tvoří vlákna, ale snižuje se mikrostrukturování povrchu.

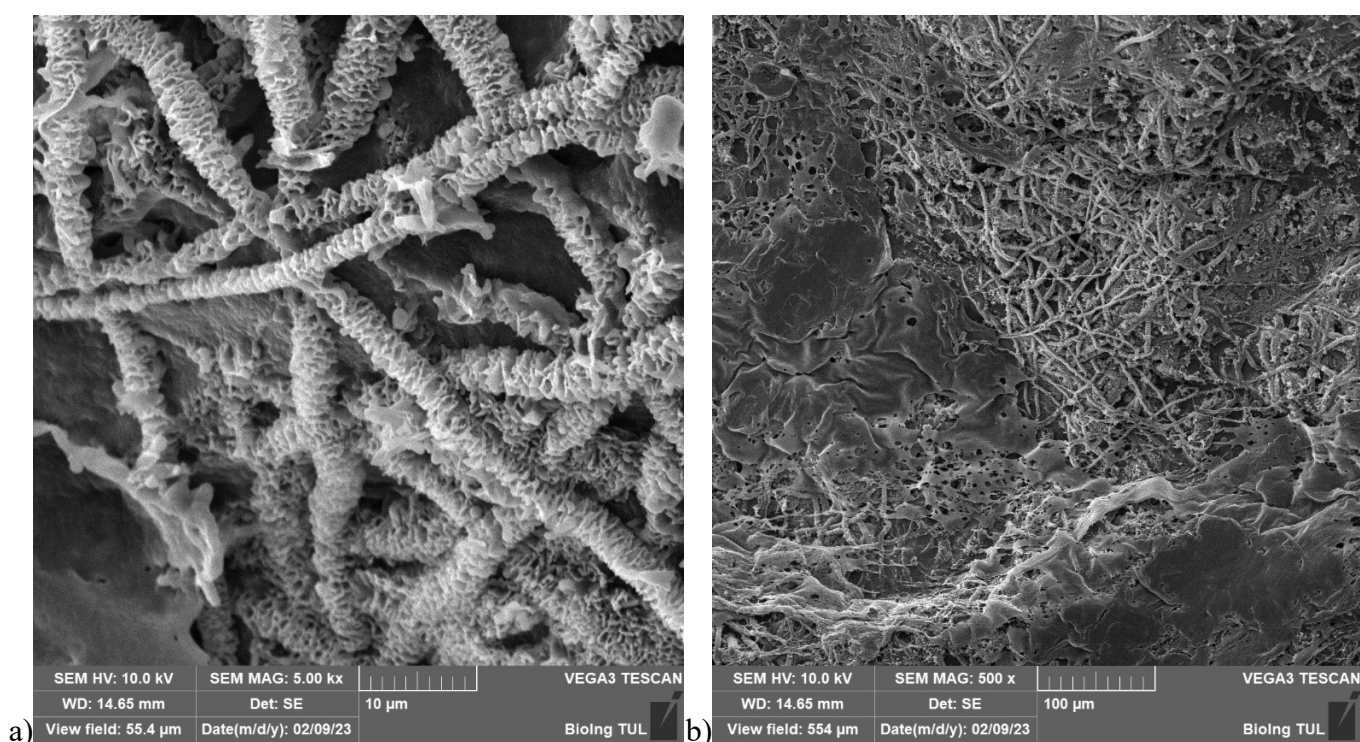
Materiál Mat 3 (10% hm PCL v CF/ETH 8:2) v čistém acetonu až do poměru kapaliny kolektoru aceton/ethanol 10:3 netvoří vláknenný materiál, polymerní vláknenný materiál se v kolektoru rozpustí. Od poměru 10:4 se začíná tvořit vrstva polymerní sraženiny. Od poměru složek kolektoru 10:4 se začínají tvořit materiálové útvary. Od tohoto poměru kapalin v kolektoru se dá hovořit o vytváření vláknenných materiálů. Při poměru 10:4 je materiál sice velmi nepravidelný a s poruchami, ale jeho povrch je s výraznými mikrostrukturami. Se zvyšující se koncentrací ethanolu v kolektoru začínají být vlákna rovnoměrnější a hladší (Obr. 84).



Obr. 84 – Snímek zvlákněného Mat 3 (10% hm PCL v CF/ETH 8:2) v acetonu/ethanolu. Až do poměru aceton/ethanol 10:3 se materiál v kolektoru netvoří. Od poměru 10:4 se začíná tvořit vrstva polymerní sraženiny. a) Od poměru 10:4 – Kol 7 se začínají tvořit materiálové útvary s výraznou mikrostrukturou na povrchu. b) Poměr 10:5 – Kol 8 se povrch vláken začíná vyhlazovat. c) Poměr 10:6 – Kol 9 se sníženým množstvím poruch. d) Poměr 10:7 – Kol 10 materiál vykazoval drobné poruchy. e) Poměr 10:8 – Kol 11. f) Poměr 10:9 – Kol 12 již tvoří relativně pravidelný produkt bez výrazných povrchových efektů.

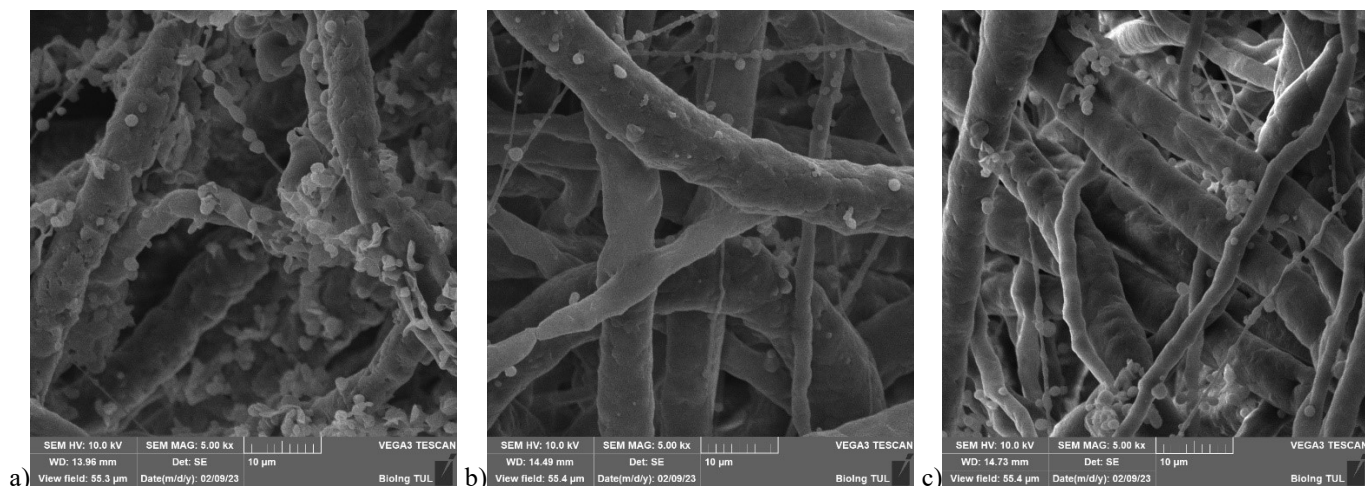
7.2.4 Testovací řada M4 (materiál Mat 2 s kolektorem Kol 1, Kol 14, 15, 16)

Čtvrtá série testů experimentovala se sadou kolektorů, ve kterých se měnil poměr acetonu/vody od 1:0 a v krocích 10:1, 10:2, 10:3. viz tabulka (Tabulka 14). Pro každý typ kolektoru byl testován polymerní materiál označen jako *Mat 2* (Tabulka 13). Jednalo se o 12% hm PCL v CF/DMF 6:4. Tato řada měla za cíl prozkoumat vliv poměru aceton/voda na zlepšení tvorby shish-kebab strukturovaných vláken. Materiál *Mat 2* (12% hm PCL v CF/DMF 6:4) při vláknění do acetonu potřeboval vždy na začátku procesu fázi vytvoření lokálních mikro-podmínek (cca 3minuty vláknění při průtoku 10ml/hod). Proces zvláknění do kolektoru s acetonem (*Kol 1*) vytvořil shish-kebab strukturu. Stejně jako u ostatních experimentů se zaměřením na shish-kebab materiál, produkt obsahoval vlákna s touto shish-kebab strukturou. Vyrobený materiál obsahoval také defekty, tak jako v předchozích experimentech. Vytvořená vlákna a materiál i s defekty jsou na obrázku (Obr. 85).



Obr. 85 – Shish-kebab vlákna vyrobená v testovací řadě M4, na obrázku b) vpravo je patrné velké množství defektů ve výsledném produktu.

Další testování do kolektoru aceton/voda 10:1 (Kol 14), 10:2 (Kol 15) a 10:3 (Kol 16). Při vláknění se vlákenný materiál tvoří již od začátku, vláknění probíhá dobře. Výsledný materiál byl podroben SEM analýze a ze snímků bylo zjištěno že se vlákenný materiál tvoří, ale přidavkem vody v takovém množství do kolektoru se již shish-kebab struktura netvoří. Materiál obsahuje vlákna a perličkové defekty a při poměru 10:1 (aceton/voda) vlákna vykazovala při obrazové analýze částečně mikrostrukturovaný povrch. Se zvyšujícím se poměrem vody byl povrch vláken více pravidelný a bez mikrostrukturování. Výsledné struktury materiálu jsou patrné ze SEM snímků na obrázku (Obr. 86).

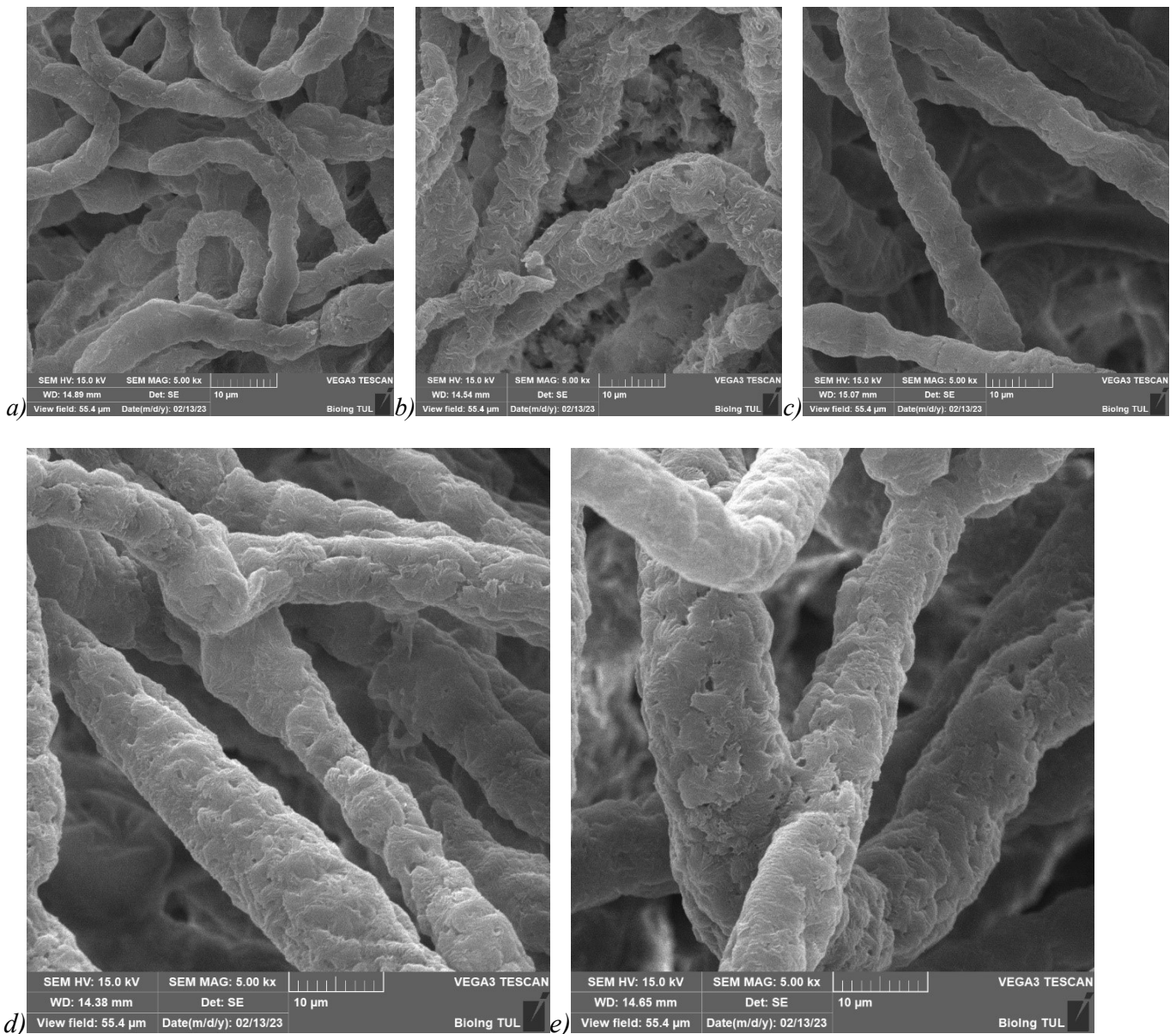


Obr. 86 – Vlákna vyrobená v testovací řadě M4 do kolektoru s acetonem a vodou. a) Materiál zvlákněný do kolektoru s poměrem aceton/voda 10:1 – Kol 14. a) Materiál zvlákněný do kolektoru s poměrem aceton/voda 10:2 – Kol 15. c) Materiál zvlákněný do kolektoru s poměrem aceton/voda 10:3 – Kol 16.

7.2.5 Testovací řada M5 (materiál Mat 2 s kolektorem Kol 1, Kol 17 – 22, Kol 14)

Pátá série testů experimentovala se sadou kolektorů, ve kterých se měnil poměr acetonu/vody od 100:1 do 100:10 v 6 krocích, viz tabulka (Tabulka 14). Pro každý typ kolektoru byl testován polymerní materiál označen jako Mat 2 (Tabulka 13). Jednalo se o 12% hm PCL v CF/DMF 6:4. Tato řada měla za cíl prozkoumat vliv poměru aceton/voda na mikrostrukturování vláken. Minulý experiment ukázal, že při zvláknování do acetonu se shish-kebab vlákna tvoří, ale struktura je s poruchami a proces není zcela pod kontrolou. Snaha o zlepšení přidáním nerozpouštěla-vody ukázala, že již od poměru 10:1 (aceton/voda) se struktura shish-kebab netvoří, tvoří ovšem vlákna s mikrostrukturovaným povrchem, přidáváním další vody do roztoku se pak mikrostruktura ztrácí. Tento test byl navržen pro testování vlivu nerozpouštědla (vody) v roztoku s ještě menším zastoupením, než je 1/10. Experiment ukázal, že od poměru 100:6 se již vytváří vlákenná struktura, vlákna jsou tvarově méně jednotná a mají mikrostrukturovaný povrch, při poměru 100/7 je povrch výrazně mikrostrukturovaný s náznaky porozity. Při poměru 100/8, 100/9 a 100/10 jsou vlákna mikrostrukturovaná s náznakem porozity (

Obr. 87). Při těchto vyšších zastoupeních vody v roztoku se zvýšila rozměrová pravidelnost vyrobeného materiálu.

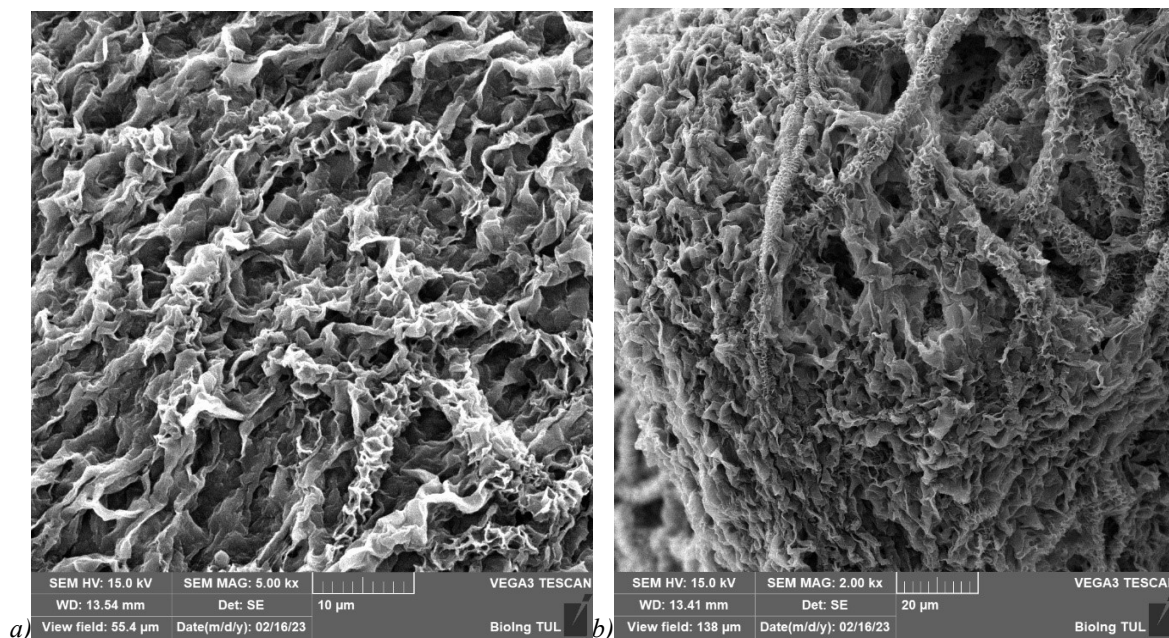


Obr. 87 – SEM snímky vláken zvlákněných do směsi aceton/voda. Vlákná vykazují mikrostrukturovaný povrch a svým povrchem indikují vnitřní porozitu materiálu samotných vláken. a) Poměr kolektoru 100:6 – Kol 19. b) Poměr kolektoru 100:7 – Kol 20. c) Poměr 100:8 – Kol 21. d) Poměr 100:9 – Kol 22. E) Poměr 100:10 – Kol 14.

7.2.6 Testovací řada M6 (materiál Mat 2 s kolektorem Kol 23 - 28)

Šestá série testů experimentovala se sadou kolektorů, ve kterých se měnil poměr acetonu/ethanolu od 100:1 do 100:6 v 6 krocích, viz tabulka (Tabulka 14). Pro každý typ kolektoru byl testován polymerní materiál označen jako Mat 2 (Tabulka 13). Jednalo se o 12% hm PCL v CF/DMF 6:4. Tato řada měla za cíl prozkoumat vliv poměru aceton/ethanol tak, aby byl nalezen stav, kdy se stvoří shish-kebab materiál ve stabilní formě a bez defektů v materiálu. Pro vytvoření materiálu bylo opět třeba nejprve nastartovat proces vytvořením mikroklimatu v kolektoru cca 3 minutovým zvlákněním. Experimenty ukázaly, že při zvlákněvání do acetonu se shish-kebab vlákna tvoří, ale struktura je s poruchami a proces není zcela

pod kontrolou. Tento experiment však neindikoval zlepšení stability, ba naopak. Přidáním ethanolu se výsledná struktura začala tvořit spíše ve formě houbovitě porézní struktury. Při obrazové analýze snímků SEM byla shish-kebab struktura ve výsledných materiálech pozorována, ale v podstatě jen jako součást spojené defektní struktury (Obr. 88).



Obr. 88 – SEM snímky materiálových struktur zvlákněných do směsi aceton/ethanol. Struktury jsou porézní „houbovitě“ shluky, místy se vyskytují části shish-kebab vláken. a) Struktura vytvořená vlákněním do aceton/ethanol v poměru 100:4 – Kol 26. b) Struktura vytvořená vlákněním do aceton/ethanol v poměru 100:6 – Kol 28.

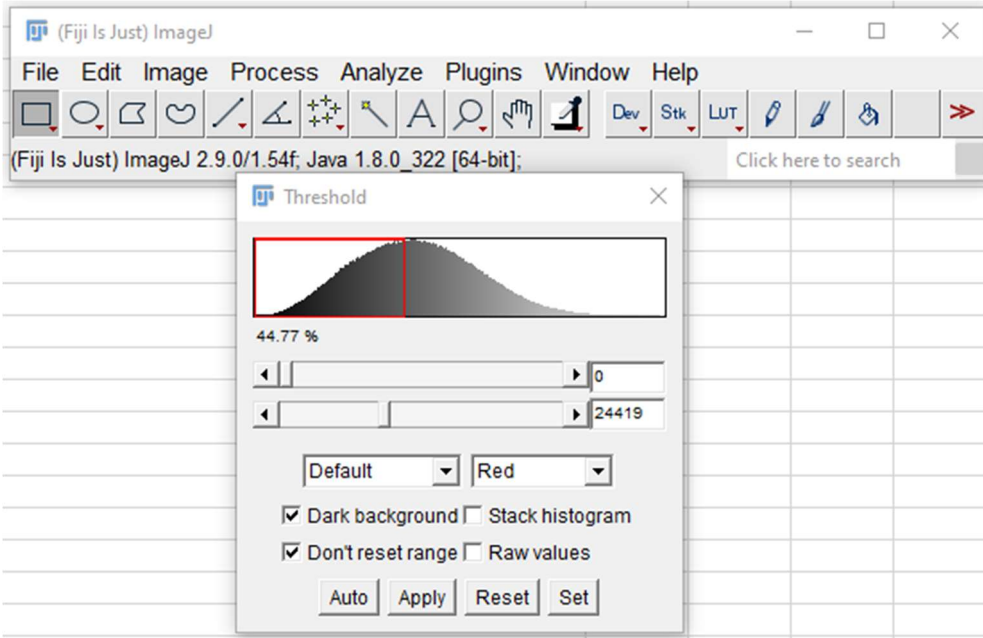
7.3 Analýza a hodnocení vzorků vytvořených materiálů

Po rozsáhlém experimentování s materiály a druhy kolektorů byla provedena analýza vybraných materiálů za účelem hodnocení jejich vlastností a jejich vhodnosti k biologickým aplikacím. Součástí analýzy je provedení příčných řezů vzorků materiálu k hodnocení jejich vnitřní struktury. Účelem hodnocení je zejména vybrání kandidátů na biologické testování a ověření kvalit 3D objemných materiálu vyvinutých experimentováním s elektrickým vlákněním do kapaliny.

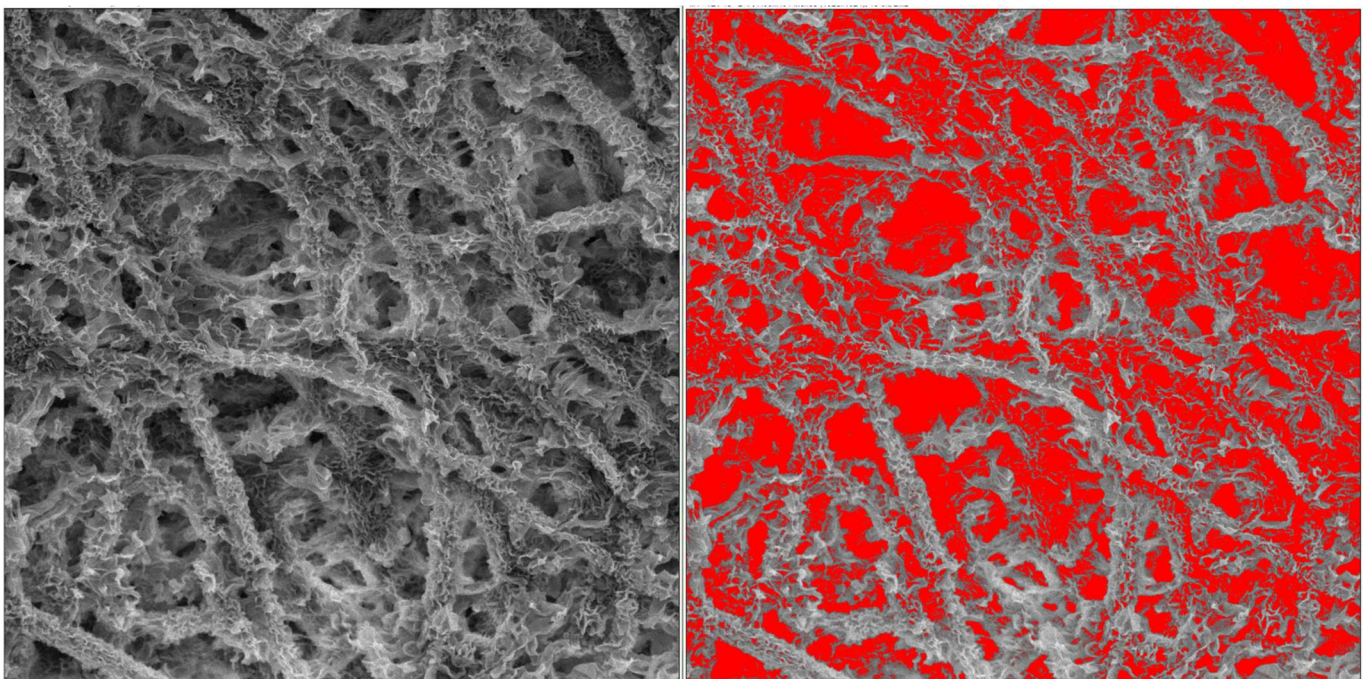
7.3.1 Obrazová analýza vybraných vlákenných struktur

Vybrané vlákenné struktury, byly podrobeny obrazové analýze. Ze snímků bylo pomocí analytického programu Fiji, což je modifikovaná verze programu ImageJ verze 1.54 (Image Processing and Analysis in Java, National Institutes of Health USA [140]). Ze snímků byl vyhodnocen statistický průměrný vlákenný průměr ϕ a jeho směrodatná odchylka SD . Dalším parametrem bylo vyhodnocení porozity, vzhledem k velmi široké škále možností získávání parametru porozity je nutné podrobné popsání metody hodnocení porozity. Pomocí obrazové analýzy ze SEM snímku byly vybrány oblasti černé barvy a tmavých odstínů reprezentujících propojené porézní oblasti a poměr takto vybrané oblasti s celkovou plochou a násobený 100 udává značenou porozitu, $P = \frac{A_{póru}}{A_{materiálu}} \times 100$. Obrazová analýza spočívala v principu převedení analyzovaného SEM snímku z odstínů šedé na černou a bílou barvu (Obr. 90). Program poté dokáže vyhodnotit plochu jednotlivých složek, včetně procentuálního zastoupení, což odpovídá parametru

definované porozity. Pro převod na černobílý obraz byla používána funkce „*Threshold*“ (v programu Fiji), kde se nastaví prahové hodnoty pro převod odstínů na dvoubarevný obraz (Obr. 89). Toto určení porozity je pouze orientační a slouží pro porovnání porozity mezi jednotlivými materiály, pro určení reálné porozity je tato metoda nevhodná.



Obr. 89 – Menu funkce *Threshold* v programu Fiji, zde se nastavují prahové hodnoty pro převod na dvoubarevný obraz, který je následně analyzován na zastoupenou plochu a tedy parametr *P*.



Obr. 90 – Snímek SEM, na který je aplikována funkce *Threshold* v programu Fiji. Obraz je touto funkcí převáděn na černobílý obraz. Červená barva ukazuje oblasti, které budou převedeny na černou barvu. Tyto černé oblasti budou započítány jako oblasti pórů.

Analyzovaná data pro vybrané materiály jsou uvedena v tabulce (Tabulka 16). Z obrazové analýzy SEM snímků vyplynul požadavek na analýzu vnitřního uspořádání vláken, protože některá vlákna jeví známky vnitřní porozity (Obr. 83,

Obr. 87), případně dutin, které se mohou projevit propadlou či zploštělou strukturou (Obr. 84D). Z pozorování stejnoměrnosti struktury, výskytů poruch a průměrné hodnoty tloušťky vláken vyplývá, že vytvořené shish-kebab struktury jsou vyrobitelné, ale proces není stabilní a vytvořené struktury se liší nejen parametry, ale množstvím defektů.

Tabulka 16 – Souhrnný přehled vybraných testovaných materiálů s jejich hlavními charakteristikami.

Řada	Materiál		Kolektor		ø [nm]	SD [nm]	Optická porozita P [%]	Obrázek
M1	Mat 2	PCL 12% CF/DMF 6:2	Kol 1	AC	4 221	1 237	45	Obr. 77
M2	Mat 2	PCL 12% CF/DMF 6:2	Kol 13	AC/ETH 1:1	11 000	1 643	34	Obr. 79
M2	Mat 2	PCL 12% CF/DMF 6:2	Kol 2	AC/ETH/W 2:2:1	14 389	3 418	32	Obr. 80
M3	Mat 2	PCL 12% CF/DMF 6:2	Kol 1	AC	879	180	47	Obr. 81
M3	Mat 2	PCL 12% CF/DMF 6:2	Kol 4	AC/ETH 10:1	-	-	42	Obr. 82 A
M3	Mat 2	PCL 12% CF/DMF 6:2	Kol 5	AC/ETH 10:2	-	-	43	Obr. 82 B
M3	Mat 2	PCL 12% CF/DMF 6:2	Kol 8	AC/ETH 10:5	-	-	44	Obr. 82 C
M3	Mat 2	PCL 12% CF/DMF 6:2	Kol 9	AC/ETH 10:6	13 102	3 002	34	Obr. 83
M3	Mat 3	PCL 10% CF/ETH 8:2	Kol 7	AC/ETH 10:4	6 258	3 020	48	Obr. 84A
M3	Mat 3	PCL 10% CF/ETH 8:2	Kol 8	AC/ETH 10:5	9 061	5 528	47	Obr. 84B
M3	Mat 3	PCL 10% CF/ETH 8:2	Kol 9	AC/ETH 10:6	5 467	2 430	72	Obr. 84C
M3	Mat 3	PCL 10% CF/ETH 8:2	Kol 10	AC/ETH 10:7	5 931	2 471	51	Obr. 84D
M3	Mat 3	PCL 10% CF/ETH 8:2	Kol 11	AC/ETH 10:8	6 134	3 327	48	Obr. 84E
M3	Mat 3	PCL 10% CF/ETH 8:2	Kol 12	AC/ETH 10:9	5 576	2 892	57	Obr. 84F
M4	Mat 2	PCL 12% CF/DMF 6:2	Kol 1	AC	3 018	912	47	Obr. 85
M4	Mat 2	PCL 12% CF/DMF 6:2	Kol 14	AC/W 10:1	7 713	2 763	50	Obr. 86A
M4	Mat 2	PCL 12% CF/DMF 6:2	Kol 15	AC/W 10:2	4 460	2 534	57	Obr. 86B
M4	Mat 2	PCL 12% CF/DMF 6:2	Kol 16	AC/W 10:3	3 741	2 337	42	Obr. 86C
M5	Mat 2	PCL 12% CF/DMF 6:2	Kol 19	AC/W 100:6	4 850	1 773	52	Obr. 87 A
M5	Mat 2	PCL 12% CF/DMF 6:2	Kol 20	AC/W 100:7	6 960	1 755	53	Obr. 87 B
M5	Mat 2	PCL 12% CF/DMF 6:2	Kol 21	AC/W 100:8	6 173	1 560	56	Obr. 87C
M5	Mat 2	PCL 12% CF/DMF 6:2	Kol 22	AC/W 100:9	5 206	1 239	55	Obr. 87D
M5	Mat 2	PCL 12% CF/DMF 6:2	Kol 16	AC/W 10:1	7 872	1 707	51	Obr. 87E
M6	Mat 2	PCL 12% CF/DMF 6:2	Kol 26	AC/ETH 100:4	2 898	479	43	Obr. 88A
M6	Mat 2	PCL 12% CF/DMF 6:2	Kol 28	AC/ETH 100:6	5 189	1 453	44	Obr. 88 B

7.3.2 Obrazová analýza snímků SEM z vybraných řezů materiálu

Některé snímky vytvořených materiálů indikovali, že vlákna jsou porézní (Obr. 83,

Obr. 87), nejen na povrchu, ale i v objemu samotného vlákna, některá vlákna se dokonce jevila jako dutá. Indikátorem dutin může být, když vlákna mají propadlá místa (Obr. 84D) nebo jsou zploštělá, tedy jejich průřez není kulatý, ale oválný. Nejpřímější metoda s jasnou vizuální identifikací vnitřní struktury materiálu samotného vlákna je vytvoření řezů vlákenné struktury. Vytvoření řezů, případně lomu, vyžaduje speciální techniky, protože vlákenné mikroskopické objekty nejsou schopny ustát řez či stříh bez tepelné deformace. Teplo vzniklé třením je pro malý objekt s relativně nízkou teplotou tání tak intenzivní, že místo řezu případně stříhu obsahuje pouze tlakem a teplotou deformovaný materiál, který nelze k analýze použít.

Postup pro vytvoření řezu vlákenného materiálu byl zvolen s ohledem na možnosti vlákenných materiálů a jejich rozměrů. Pro řez je nutné materiál vyrobít a připravit tak, aby bylo možné ho upnout. Zejména 3D objemné materiály byly vyrobeny a vysušeny tak, aby bylo možné materiály upnout přes vrchní část skleněných válečků o průměru cca 12 mm. Materiál se zafixuje a dopne nasazením plastového prstence. Takto připravené vzorky s napnutým vlákenným materiálem byly podchlazeny v tekutém dusíku po dobu 30 sekund pro planární vzorky, a 60 sekund pro vzorky objemné. Spolu se vzorkem byl podchlazen i rezný nástroj tak, aby byla teplota při řezu minimální možná. Ke zchlazení byl použit tekutý dusík z důvodu snadné dostupnosti, relativní jednoduchosti manipulace a nízké dosahované teplotě, která teoreticky činí -196°C . Podchlazený vzorek byl vyjmut a na rezné podložce byl podchlazeným chirurgickým skalpelem přeříznut uprostřed. Takto připravený vzorek byl připevněn na vertikální terč pro SEM mikroskop a pozlacen plazmovým naprášením.

Pro analýzu vláken v řezu byly vybrány materiály a kombinace kolektorů dle tabulky (Tabulka 17). Jako první byl vybrán materiál zvlákněný z roztoku, který nevykazuje žádné speciální vlastnosti a byl zvlákněn na klasický kolektor tak, aby byla reference standartního stavu procesu vláknění na vytvořeném zařízení. Vzorky zvlákněné na pevný kolektor byly zvlákněny totožným procesem, jen namísto kapalinového kolektoru byl použit kovový kolektor 25x25 cm. Kolektor byl pokrytý netkanou textilií typu Melt blown pro snadnou manipulaci s vytvořeným vzorkem. Vytvořený materiál lze z netkané textilie také velmi snadno sejmut a dále zpracovávat. Materiály vytvořené do kapalného kolektoru byly z kolektorové lázně vyndány a postupně vymývány ve třech lázních demineralizované vody a vysušeny samovolným odparem při pokojové teplotě (viz kapitola 6.2 – Příprava vzorů).

Tabulka 17 – Přehled kombinací materiálů a polymerních roztoků vybraných pro analýzu řezů materiálem.

Řada	Obr.	Roztok polymeru	Kolektor	DSC	ø [μm]
				Xc [%]	
T1	Obr. 91 A	PCL 10 hm% CF/ETH 8:2 hm (Mat 3)	Pevný kolektor	47,2 ± 1,7	4,3 ± 1,7
T2	Obr. 91 B	PCL 12 hm% CF/DMF 6:4 hm (Mat 2)	Pevný kolektor	53,2 ± 0,7	4,8 ± 1,1
T3	Obr. 91 C	PCL 12 hm% CF/DMF 6:4 hm (Mat 2)	Ethanol	56,1 ± 2,5	4,8 ± 1,2
T4	Obr. 91 D	PCL 12 hm% CF/DMF 6:4 hm (Mat 2)	AC/ETH 10:7 obj. (Kol 10)	71,3 ± 1,4	12,1 ± 2,6
T5	Obr. 91 E	PCL 12 hm% CF/DMF 6:4 hm (Mat 2)	AC/W 100:9 obj. (Kol 22)	68,4 ± 1,8	7,7 ± 1,8

Obrazová analýza SEM snímků ukázala u vzorků T1, že vlákno je uvnitř plné a bez atypické ze snímků patrné struktury. Tento vzorek byl získán zvlákněním referenčního roztoku na pevný kolektor. Vzorek měl za cíl zejména vyzkoušet vliv procesu vláknění na vytvořeném zařízení na strukturu vláken a vytvořit

referenční vzorek pro řez. Tedy zda roztok, vlákníci standartní plná vlákna s neporézním povrchem vytváří stejná vlákna i za podmínek vytvořených zvláknovacím zařízením a procesem se zvolenými parametry.

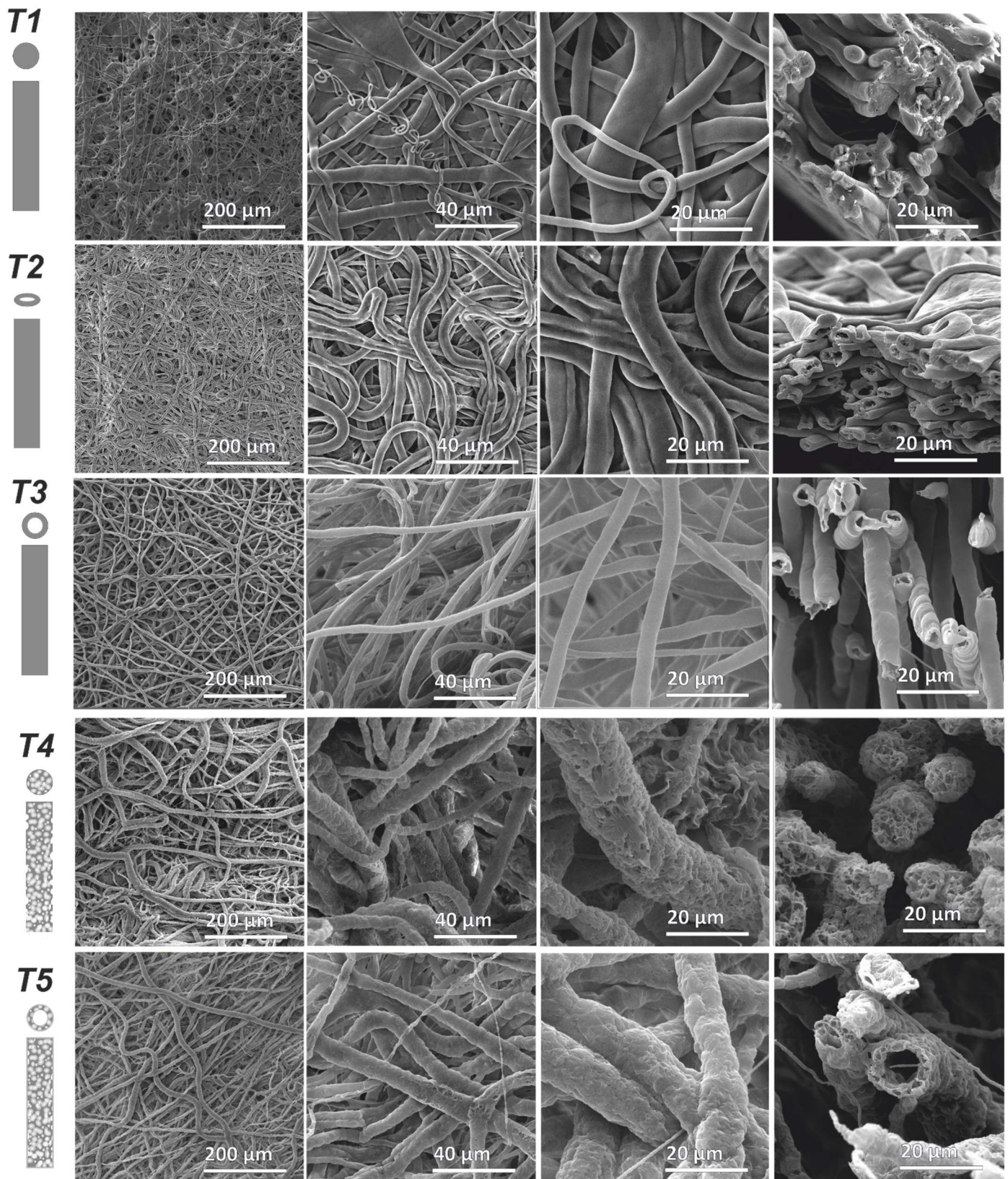
Druhým experimentem označeným T2 již byl řezán vyšetřovaný materiál *Mat 2* – PCL 12% v CF/DMF, jež byl předmětem zkoumání, protože tvoří vlákna, u kterých byl náznak nestandardního vnitřního uspořádání. Tato vlákna se místy jevila jako oválná, místy s propadlinami. Zvláknění proběhlo na pevný kolektor za stejných podmínek jako v předchozím případě. Řez materiálu potvrdil, že vlákna obsahují dutinu. V podstatě je vlákno tvořené pouze stěnou a uprostřed vlákna není žádný materiál.

Třetí experiment označený T3, který byl proveden s materiálem *Mat 2* – PCL 12% v CF/DMF zvlákněným do ethanolu ukázal při analýze snímků SEM také dutá vlákna. Vlákna vytvořená v experimentu T2 a T3 jsou obdobná, tvorba dutiny je tedy způsobena rozpouštědlovým systémem a není způsobena vlákněním do kapaliny. V tomto případě není vliv kapaliny potřebný pro vytvoření dutých vláken.

Čtvrtý experiment označený T4, který byl proveden také s materiálem *Mat 2* – PCL 12% v CF/DMF zvlákněným do roztoku AC/ETH 10:7 (Kol 10). Analýza SEM snímků ukázala, že vlivem kolektoru se nevytvoří dutina ve vláknech, ale vysoce porézní vnitřní struktura. Celý objem materiálu vláken je „houbovitá“ struktura, která je pozorovatelná i na povrchu vláken.

Pátý experiment označený T5, který byl proveden také s materiálem *Mat 2* – PCL 12% v CF/DMF zvlákněným do roztoku AC/W 100:9 (Kol 22). Analýza SEM snímků ukázala, že vlivem kolektoru se vytvoří kombinace vysoce porézního vlákna s dutinou uprostřed. Porézní struktura materiálu je parná i na stěnách vlákna.

Porovnání snímků SEM celé experimentální řady T je na obrázku (*Obr. 91*), vlevo je vždy přehledový snímek s měřítkem 200 μm , další je snímek s měřítkem 40 μm následovaný detailem s měřítkem 20 μm , poslední je vždy řez vláken s měřítkem 20 μm .



Obr. 91 – Snímky materiálů experimentální řady T, u kterých byl proveden řez s cílem analýzy vnitřní struktury vláken. Materiály a složení kolektoru jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 17).

7.3.3 Měření porozity

Měření porozity je poměrně obsáhlá problematika, existuje více metod měření. Pro měření porozity vytvořených 3D objemných materiálů byla vybrána metoda měření porozity, která je jednoduchá a zahrnuje všechny druhy pórů včetně uzavřených a zároveň je pro účely měření porozity tkáňových nosičů běžně využívána [176–179]. Jedná se o typ gravimetrické metody měření, který udává tzv. celkovou porozitu. Tuto metodu lze využít, protože materiál hmoty (polymerních vláken) je homogenní a je známa jeho hustota. Tato metoda je oproti optické analýze použité v předchozí kapitole (*kapitola 7.3.1- Tabulka 16*) přesná a spolehlivá. Optická metoda měření porozity je pouze ilustrativní a měla za cíl porovnání struktur dle SEM snímků, její vypovídající hodnota pro reálné stanovení porozity je minimální. Z důvodu nepřijatelnosti optické metody pro stanovení celkové porozity bylo provedeno samostatné měření porozity touto obecně používanou a uznávanou metodou. Porozita byla měřena dle vztahu

$$\text{Porozita}[\%] = \left(1 - \frac{\text{Hmotnost vzorku [g]}}{\text{Hustota polymeru [g/cm}^3\text{]} \times \text{Objem vzorku [cm}^3\text{]}} \right) \times 100.$$

Porozita byla měřena u vzorků vyrobených pro biologické testy (*Kapitola 8*) a referenčního vzorku vyrobeného na zařízení Nanospider [23]. U planárních materiálů byl vytvořen řez cca 20 x 20 mm pro vložení do jamek mikrotitračních destiček. Tloušťka materiálu byla stanovena pomocí obrazové analýzy SEM snímku řezu materiálu a odečtena pomocí obrazové analýzy v programu FiJi (ImageJ). Měření porozity probíhalo pro materiály určené pro testování cytotoxicity dle kapitoly 8. Jedná se o materiály T 2-5 z obrázku (*Obr. 91*), kde je T1 materiál nahrazen planárním materiálem vyrobeným komerční technologií Nanospider [23]. Označení materiálů pro testování cytotoxicity a pro měření porozity je L1-5. Pro každý materiál byly naměřeny rozměry a spočítán objem. U 3D objemných materiálů byly tkáňové nosiče ve formě plochých válců vytvarovaných v jamce mikrotitrační destičky, ve které probíhala lyofilizace. Tyto válce měly průměr 16,24 mm a vzorky měly výšku v rozmezí 3-7 mm. Přehled materiálů, složení roztoku, druh kolektoru a výsledná porozita jsou shrnuty v tabulce (*Tabulka 18*). Z výsledků vyplývá, že tyto konkrétní materiály vytvořené vlákněním do kapaliny (L3-L5) mají porozitu nad 98 %, materiál L4 dokonce 99 %. Takto vysoká porozita je poměrně unikátní a takto vytvořené materiály lze nazvat ultra-porézními.

Tabulka 18 – Přehled materiálu a výsledků měření porozity gravimetrickou metodou pro vybrané vzorky zvlákněvané DC elektrickým zvlákněváním na pevný kolektor a do vybraných kapalinových kolektorů.

Řada	Obr.	Roztok polymeru	Kolektor	Průměrný objem vzorku [mm ³]	Porozita [%]	SD [%]
L1	-	PCL 10 hm% CF/ETH 8:2 hm (Mat 3)	Pevný kolektor	122	90,6	1,2
L2	<i>Obr. 91 B</i>	PCL 12 hm% CF/DMF 6:4 hm (Mat 2)	Pevný kolektor	29	64,6	8,5
L3	<i>Obr. 91 C</i>	PCL 12 hm% CF/DMF 6:4 hm (Mat 2)	Ethanol	1 097	99,0	0,2
L4	<i>Obr. 91 D</i>	PCL 12 hm% CF/DMF 6:4 hm (Mat 2)	AC/ETH 10:7 hm (Kol 10)	609	97,0	0,4
L5	<i>Obr. 91 E</i>	PCL 12 hm% CF/DMF 6:4 hm (Mat 2)	AC/W 100:9 hm (Kol 22)	723	98,2	0,03

7.4 Popis vyrobených materiálů

Z experimentů řady T byl vyvozen závěr, že rozpouštědlový systém PCL v roztoku 12 hm% CF/DMF 6:4 hm (Mat 2) vytváří dutá vlákna i při zvlákněvání do kolektoru kapalného, ale i při vlákněním na kolektor

pevný. Vysvětlení tvorby dutiny je rychlým odparem rozpouštědla za současného nahrazení parami rozpouštědla a poté vzduchem z atmosféry nebo kapalinou kolektoru, která je pro polymer ne rozpouštědlem, ale proniká do objemu, kde nahradí páry rozpouštědla nebo samotné rozpouštědlo. Po vyschnutí zůstane jen dutina (*Obr. 91C*). Princip tvorby dutin tedy spočívá ve dvou fázích, první fáze je uplatnění Maragoniho efektu, kdy hraje roli gradient povrchového napětí, který zahájí oddělování dvou složek s rozdílným gradientem koncentrace rozpouštědla. Pomocí tohoto efektu se vytvoří místa s vyšší koncentrací rozpouštědla a místa s vyšší koncentrací polymeru. Zatímco polymer bude zvyšovat svou viskozitu a tuhnout, rozpouštědlo se v případě, že je těkavé, začne odpařovat za vzniku dutin. V případě koagulace dojde k mísení rozpouštědla s kapalinou kolektoru a dojde postupně k vyrovnání koncentrací na takovou míru, že vznikne pór – dutina, ve které je kapalina kolektoru se stejnou koncentrací rozpouštědla jako je ve zbytku kapaliny kolektoru. Tento zbytek kapaliny je v následném kroku výroby materiálu vysušen. V případě, že se vlákní na pevný kolektor, proběhne odpar rozpouštědla. Páry rozpouštědla jsou postupně naředěny okolní atmosférou až do praktického odstranění rozpouštědla z objemu kapaliny. V případě porézních vláken z experimentu T4 je vysvětlení v pronikání částečného rozpouštědla (směs AC/ETH) do prostoru vlákna, kde interaguje s polymerem i rozpouštědlem a vytváří více menších dutin – pórů. Při koagulaci, při které se koncentrace rozpouštědla v roztoku polymeru snižuje dochází k vytvrzování polymeru, který zachovává vnější tvar, který vznikl pro průniku kapaliny kolektoru do vlákna. Jde tedy o interakci kolektoru a rozpouštědla. Takto vzniklé póry jsou vzájemně propojeny. U posledního pátého experimentu této řady je výsledné vlákno duté s porézní stěnou, jde tedy o kombinaci efektů T3 a T4. Kombinace kolektoru chloroformu a vody dokáže vytvořit dutinu uvnitř vlákna a porézní stěny. Dutina začne vznikat již před dopadem do kapaliny, což je prokázáno zvlákněním na pevný kolektor, kdy je dutina uprostřed vlákna vytvořena bez kapalného kolektoru. Následná porézní struktura stěny vznikne nahrazováním zbytků rozpouštědla kapalinou kolektoru. Opakované experimenty ukazují, že tento typ materiálu je velmi náchylný na mikroklima kolektoru. Na začátku dochází k takzvanému startování, kdy se první 3,5 minuty vlákní do 300 ml roztoku kolektoru a výsledný produkt se na začátku rozpouští, poté sráží a postupně začíná tvořit souvislý a vlákněný materiál. Teprve od 3,5 minuty je produkt v požadované kvalitě. Pro materiál s vysoce porézními vlákny T4 (*Obr. 91 - T4*) toto mikroklima degraduje poměrně rychle v průběhu vláknění, což je způsobeno znečištěním kapaliny kolektoru rozpouštědlem z polymerního roztoku. Pro tento konkrétní typ materiálu byla kapalina kolektoru měněna po každých 8 vytvořených vzorcích. Po dalších zvlákněných vzorcích již mikroklima kolektoru přestává být vhodné a porozita vláken se postupně snižuje.

Tyto vyrobené specifické materiály byly pro své unikátní vlastnosti vybrány pro závěrečné biologické testování cytotoxicity. Jedná se tedy o testování 3D objemné struktury se specifickými vlákny vyrobené vlákněním do kapaliny. Tato struktura má velmi unikátní vlákna, a zároveň 3D objemnou strukturu. Cytotoxicita byla studována ne s ohledem na vhodnost základního materiálu a na možná problematická zbytková rozpouštědla či vliv všech stupňů či kroků celé technologie výroby. Jednalo se tedy spíše o ověření vhodnosti materiálu pro další biologické hodnocení jako materiálu pro medicínské aplikace.

8 Biologické testování specifických materiálů

Předchozí biologické testování (*Kapitola 6.4*) prokázalo obecnou vhodnost objemných materiálů vyrobených vlákenním do kapaliny pro buněčnou proliferaci a viabilitu. Další biologické testování má za cíl ověřit cytotoxicitu a buněčnou proliferaci materiálu jako celku, tedy konkrétního produktu tvořeného specifickými vlákny v 3D objemné struktuře. Toto testování má za cíl doplnit sérii testů tak, aby bylo možné konstatovat, zda jsou konkrétní materiály vhodné pro biologické aplikace v tkáňovém inženýrství. Prvním testem bude cytotoxicita, která má za cíl potvrzení nebo vyvrácení materiálové toxicity pro tkáňové inženýrství. Druhým testem bude potvrzení proliferace a uchycení buněk v materiálu pomocí optické analýzy - snímku z fluorescenčního mikroskopu. K testování byly vybrány materiály T2-T5 dle tabulky (*Tabulka 17*), tyto materiály jsou zobrazeny na obrázku (*Obr. 91*). Pro porovnání byl materiál T1 nahrazen planárním materiálem vyrobeném na komerčním zařízení Nanospider™ [23]. Řada materiálů byla označena L1-5. Testování tedy testuje cytotoxicitu a ukáže snímky buněk samotných, zároveň poskytuje srovnání s běžným planárním produktem.

8.1 Testování cytotoxicity

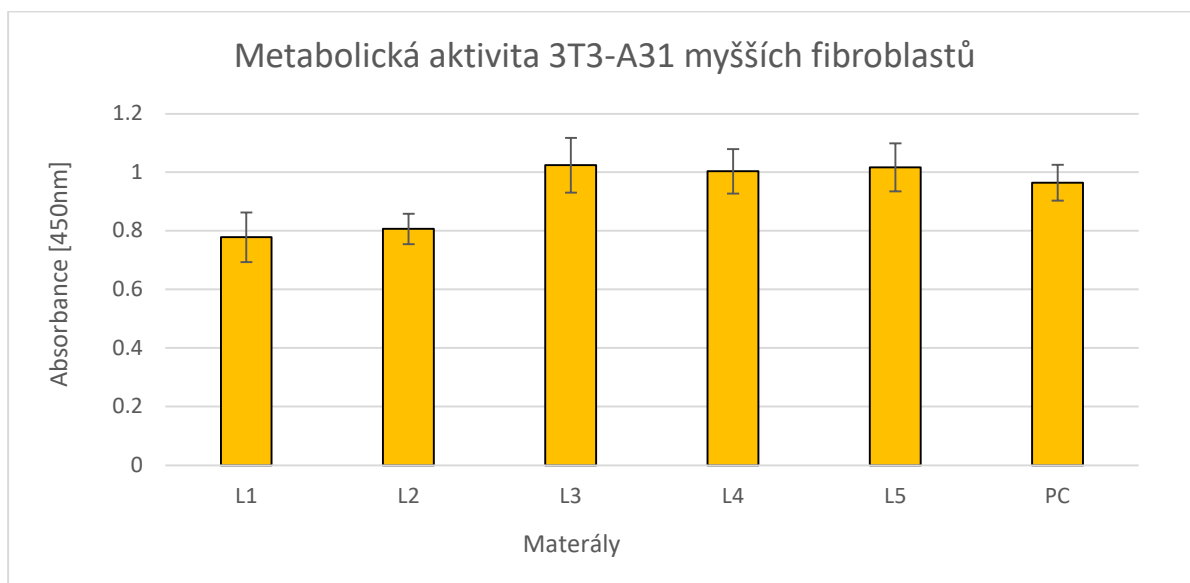
Velmi důležitou součástí vyhodnocení vhodnosti materiálu je testování cytotoxicity, tento test je relativně jednoduchý, ale má primární vypovídající hodnotu o materiálu a jeho vhodnosti pro medicínské aplikace a jeho další využití a výzkum. Materiál se otestuje, zda není pro buňky toxický, výsledky jsou porovnány s obdobným materiálem vyrobeným jinou technologií. Materiály byly před testováním chemicky sterilizovány pomocí Ethylenoxidu dle normy ČSN EN ISO 11135 po dobu 12 hodin. Pro zajištění odstranění a odbourání plynu, a tedy připravenosti vzorků pro nasazení buněčných kultur se nechaly připravené mikrotitrační destičky s vzorky odvětrávat 14 dní viz kapitola 6.4.1 - *Sterilizace*.

Princip testování spočívá v posouzení toxicity materiálu tkáňového nosiče na vybrané typy buněk. Připravené a sterilizované materiály byly vloženy do mikrotitrační destičky s 24 jamkami, 2 ks vzorku od každého materiálu. Všechny materiály byly zalaty kultivačním médiem DMEM, na každou jamku 1 ml, včetně dvou jamek negativní kontroly (NC) a jedné jamky s 0,950 ml pozitivní kontroly (PC). K médiu pro pozitivní kontrolu bylo přidáno 0,050 ml PAL Triton X-100 pro zajištění biologicky čistého média jako referenčního vzorku. Při tomto kroku se za 24 hodin vytvoří médium, které bude sloužit jako prostředí pro kultivaci buněk a tím ukáže na případnou přítomnost cytotoxických látek ve výluhu z testovaných materiálů.

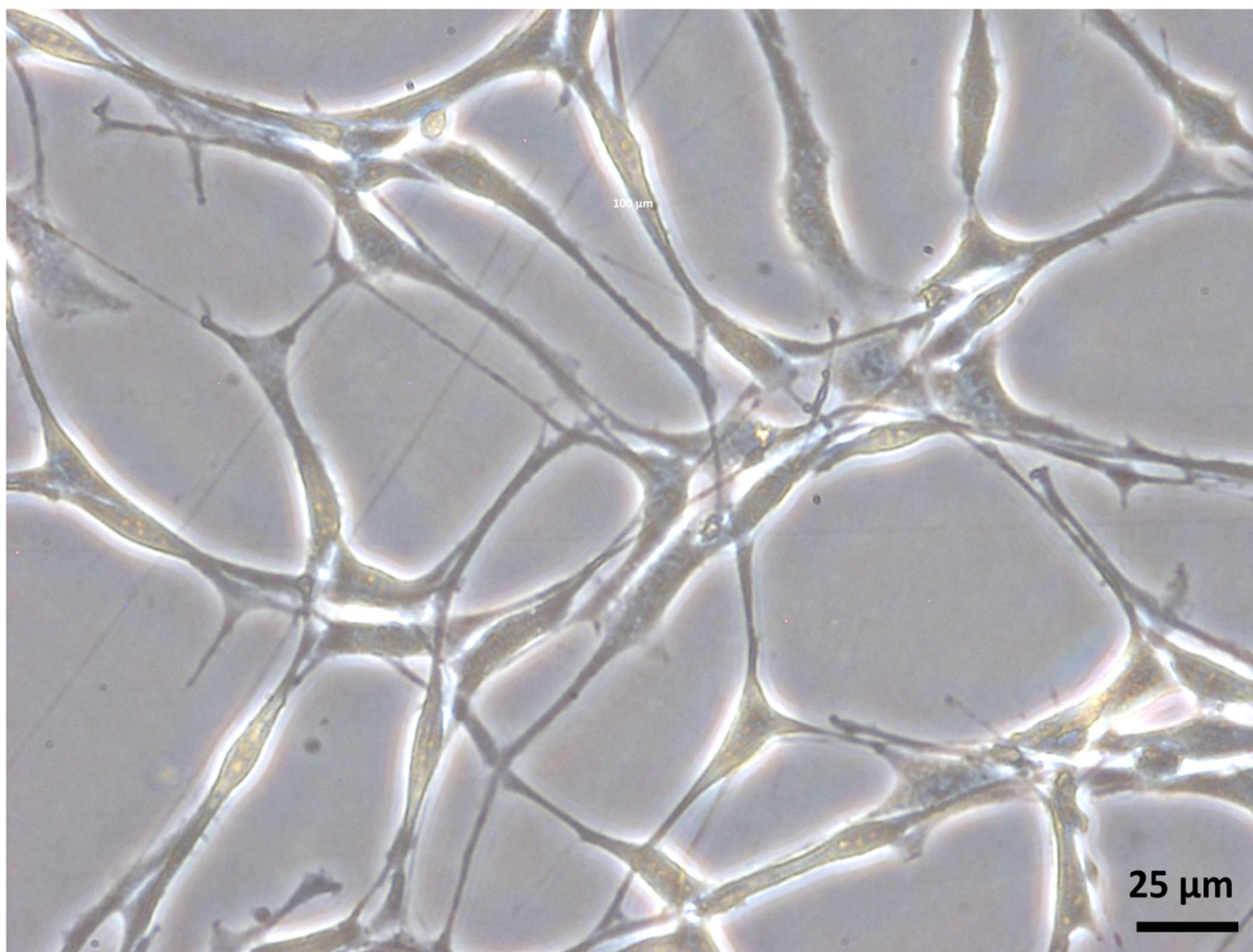
Paralelně bylo do 96-ti jamkové mikrotitrační destičky připraveno 8x6 jamek s buněčnou suspenzí. Buněčná suspenze byla složena z 3T3-Nih myších fibroblastních buněk v 12. pasáži o koncentraci 1×10^5 buněk na 1 ml. Do každé jamky bylo napipetováno po 100 μ l buněčné suspenze, v každé jamce tedy bylo 1×10^4 buněk. Pro každý materiál bylo osazeno 8 mikrotitračních destiček.

Jak materiál v DMEM médiu tak buněčná suspenze byly vloženy na 24 hodin do CO₂ inkubátoru při 27 °C. Po uplynutí 24 hodin, bylo zkontrolováno, zda jsou buňky živé a naadherované na dně mikrotitrační jamky, poté se od nich odsálo médium a do každé jamky s buňkami se přeneslo 100 μ l média, ve kterém byly testované materiály 24 hodin smočeny. Takto připravené buňky se dalších 24 hodin kultivovaly CO₂ inkubátoru při 27 °C. Snímek na obrázku (*Obr. 93*) z optického mikroskopu ukazuje buňky uchycené na dně mikrotitrační jamky po 24 hodinách kultivace ve výluhu z materiálu L3. Poslední testovací den se buňky otestovaly na viability pomocí CCK-8 testu viz kapitola 6.4.4. Z jamek bylo odsáto médium a byl

přidán 10 % roztok CCK-8 v médiu DMEM v množství 120 μ l na jamku. Poté následovala reakce testu po dobu dvou hodin v CO₂ inkubátoru při 27 °C. Posledním krokem bylo vyhodnocení buněčné aktivity pomocí spektrofotometrické metody viz kapitola 6.4.5. Hodnoty absorbance jsou zobrazeny v grafu na obrázku (Obr. 92), jako referenční vzorek sloužil materiál L1. Pro vyhodnocení byl proveden jednostranný dvou-výběrový T-test, s nulovou hypotézou, která stanovuje testovaná viabilita vzorku je větší, než je referenční hodnota vzorku L1. Pro každý materiál vyšlo, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ nulovou hypotézu nemůžeme zamítnout, pokládáme ji tedy za platnou. Viabilita sledovaných materiálů tedy není menší, než je viabilita referenčního vzorku.



Obr. 92 – Graf absorbance získaný spektrofotometrem při testování buněčné aktivity pro ověření cytotoxicity materiálů. Materiál L1 je zpracován průmyslovou technologií Nanospider a pro ostatní materiály slouží jako referenční. Materiál L2 byl zvlákněn na pevný kolektor. Materiály L3 - L5 byly zvlákněny do kapalného kolektoru. Z grafu je patrné, že žádný materiál není hodnotou viability na nižší hodnotě než referenční L1. Toto bylo potvrzeno jednostranným dvouvýběrovým T-testem. Složení materiálů a kolektorů pro jednotlivé vzorky je v tabulce (Tabulka 17).

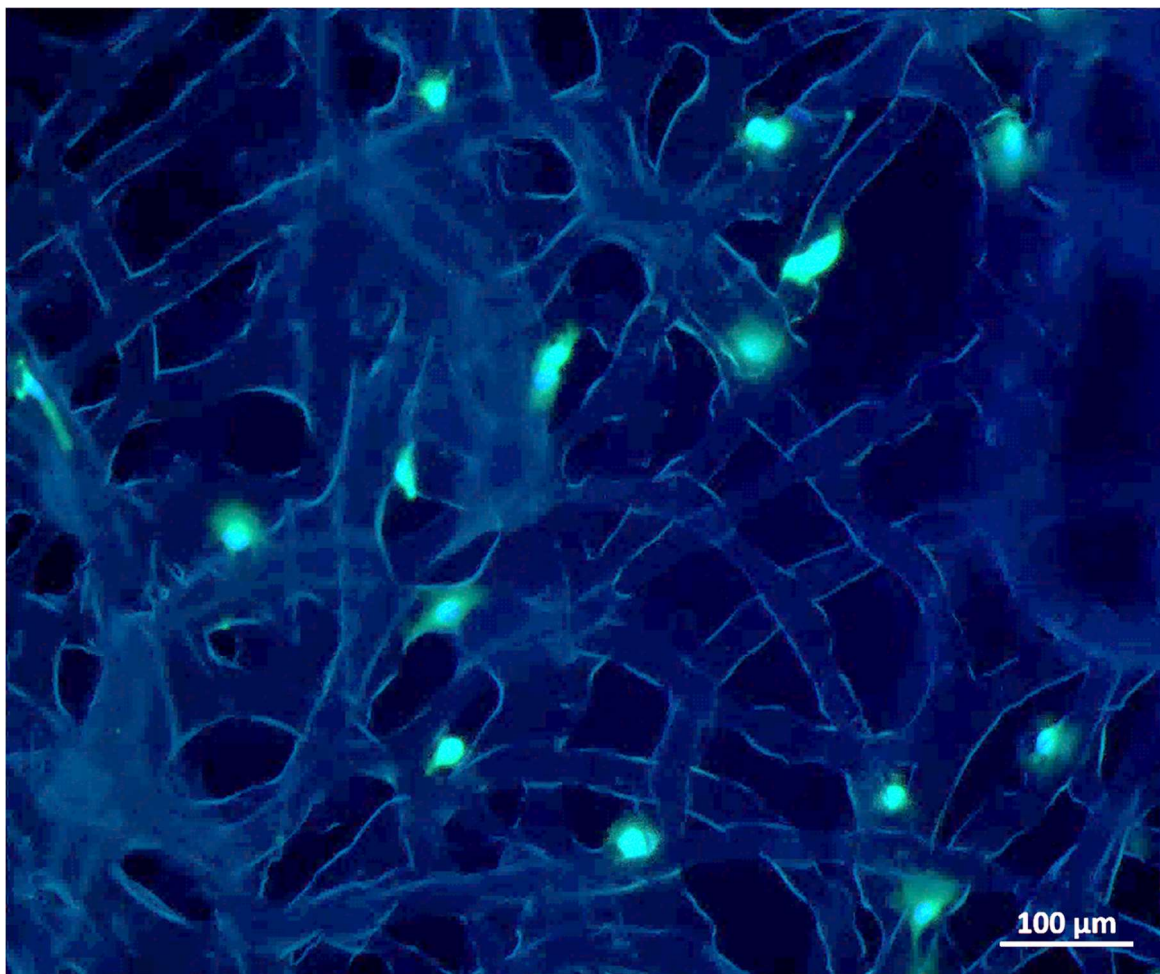


Obr. 93 – Obrázek buněk po 24 hodinách ve výluhu ze vzorku materiálu L3, po odsátí média je k buňkám přidáno médium s testem CCK-8, pomocí kterého je provedeno testování viability buněk. Snímek pořízen optickým mikroskopem.

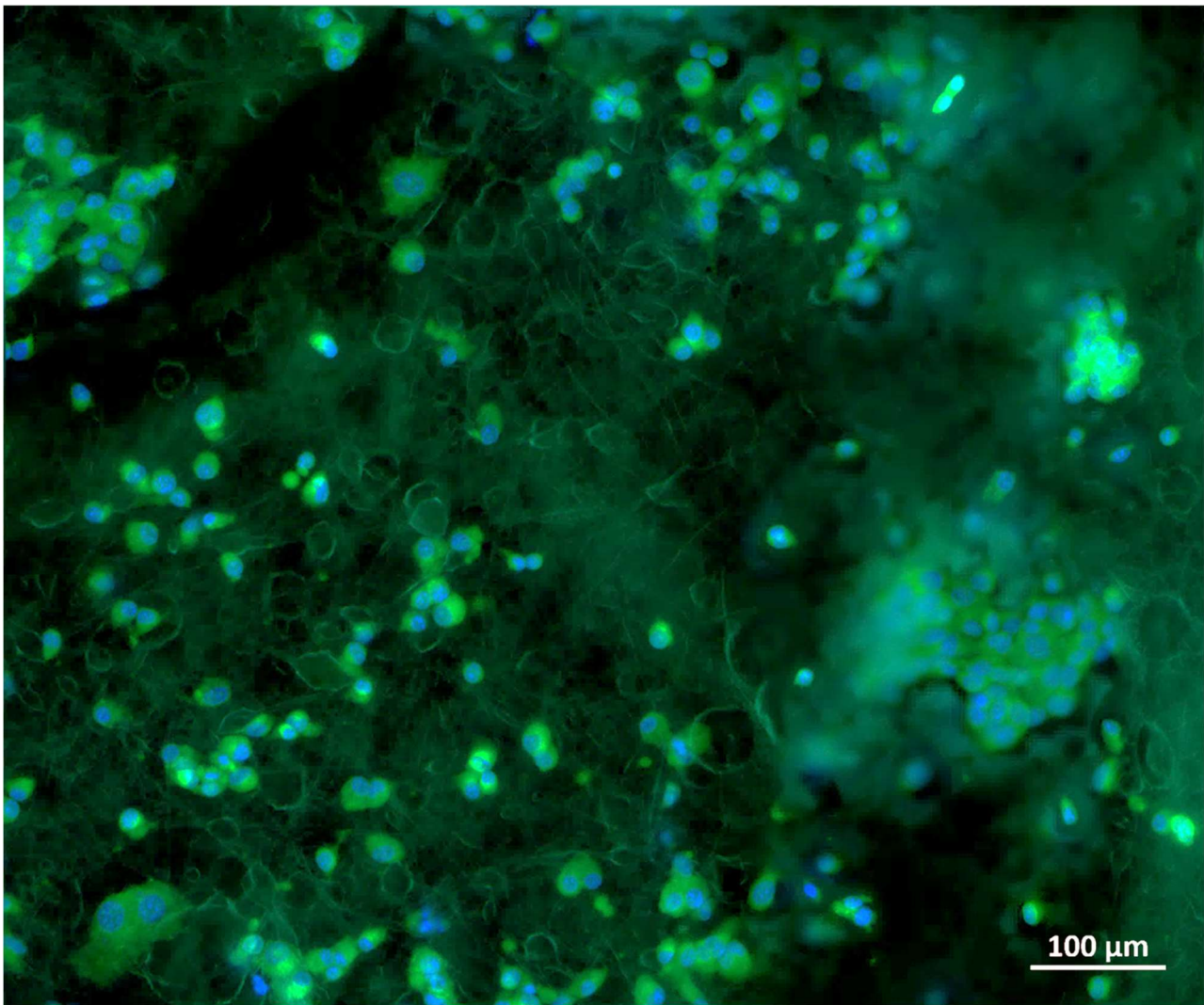
8.2 Testování proliferace optickou analýzou

Druhým způsobem otestování materiálu je sledování a analýza buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu, kdy je sledováno umístění a tvar buněk na povrchu testovaného materiálu a povrchu blízkém prostředí. V případě 3D objemných materiálů byl materiál pro některé snímky také částečně rozevřen tak, aby bylo možné sledovat prostory v objemu materiálu. Snímky z fluorescenčního mikroskopu mají za cíl ukázat, jak jsou buňky v materiálu rozmístěny a jejich tvar. Snímky jsou pořízeny pomocí fluorescenčního mikroskopu ZEISS AXIO Observer 7FL (USA). Buňky byly před snímáním zafixovány roztokem 2,5 % glutaraldehydu v PBS. Po 5 minutové expozici byl roztok od vzorků odsát a byly propláchnuty dvakrát PBS. Poté proběhlo permeabilizování membrány pomocí 0,1% roztoku Tritonu X-100 po dobu 5 minut. Následně byly vzorky opětovně propláchnuty PBS a barveny pomocí roztoku Phalloidinu (zelená fluorescence), DAPI (modrá fluorescence buněčného jádra) nebo TRITC (červená barva mikrofilament). Snímky byly provedeny na materiálech s nasazenými myšími fibroblastními buňkami linie 3T3-Nih po 24 hodinách a po sedmi dnech. Stejně buňky, stejné buněčné linie byly použity na testování viability. Buňky byly inkubovány CO₂ inkubátoru při 27 °C. Snímky ukazují po 24 hodinách přichycené jednotlivé buňky (*Obr. 94*), po 7 dnech snímky ukazují nárůst a je zjevná jejich proliferace (*Obr. 95*). Buněčnou proliferaci buňky vykazují i ve hmotě, kde bylo možné materiál pro snímání rozvinout či rozvolnit. Buňky jsou na materiálu přichyceny a

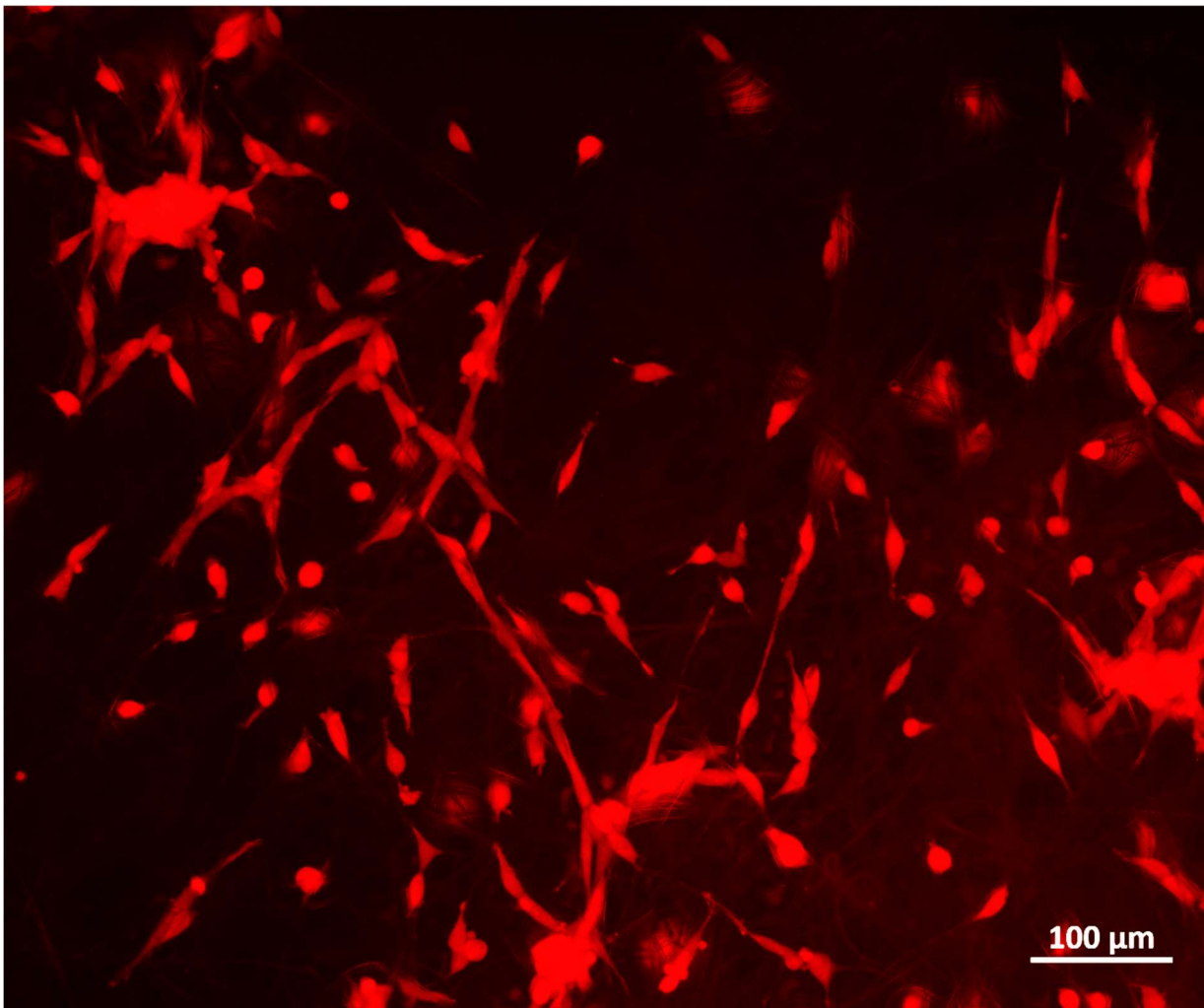
jejich tvar značí adherenci na vlákna materiálu a přizpůsobení se morfologii vlákenného materiálu, což indikuje vhodnost materiálu pro účely tkáňového nosiče (Obr. 96).



Obr. 94 – Obrázek buněk pořízený fluorescenčním mikroskopem, na obrázku je 3D objemná struktura materiálu L4 s nasazenými myšimi fibroblastními buňkami linie 3T3-Nih po 24 hodinách v CO₂ inkubátoru při 27 °C. Jádro buňky má modrou barvu a cytoplazma svítí zelenou jasnou barvou. Snímek pořízen fluorescenčním mikroskopem.



Obr. 95 – Obrázek buněk pořízený fluorescenčním mikroskopem, na obrázku je 3D objemná struktura materiálu L4 s nasazenými myšími fibroblastními buňkami linie 3T3-Nih po 7 dnech v CO₂ inkubátoru při 27 °C. Po 7 denním růstu je vidět, jak buňky v materiálu prolifерují a migrují v objemu. Snímek pořízen fluorescenčním mikroskopem.



Obr. 96 – Obrázek buněk zachycený fluorescenčním mikroskopem, je vidět tvar buněk v 3D objemném materiálu, u některých buněk je patrné, že se podél vlákně struktury tkáňového nosiče přizpůsobuje jejich tvar. Jedná se o materiál L3 s nasazenými myšimi fibroblastními buňkami linie 3T3-Nih po 7 dnech v CO₂ inkubátoru při 27 °C. Snímek pořízen fluorescenčním mikroskopem.

8.3 Výsledky závěrečného biologického otestování materiálů

Testování na závěr potvrdilo, že proces ani materiál, ze kterého byly vzorky vyrobeny není cytotoxický. V materiálech tedy nezůstává problematické množství rozpouštědla a ani v průběhu výrobních kroků nedochází k jakémukoli znečišťujícímu kroku. Lze konstatovat, že zvlákněním do kolektoru s výše zmíněným složením (Tabulka 17) a vysušením dle daného postupu (Kapitola 6.2) se cytotoxicita nemění oproti nemodifikovaným planárním vzorkům. Materiál je množné nazvat biologicky kompatibilním a teoreticky vhodným pro použití jako tkáňového nosiče. Důležitým aspektem je i vizualizace buněk pomocí snímků. Fluorescenční snímky ukazují, že buňky mají tendenci adherovat na povrch materiálu a migrují ve struktuře materiálu. Na některých snímcích je vidět, že buňky vytvářejí shluky. Snímky z míst materiálu, jenž nebyly blízko povrchu ukazují, že jsou v prostředí 3D objemného materiálu schopny dělení a látkové výměny. Vyrobené 3D objemné materiály indikují znaky vhodnosti pro použití jako tkáňové nosiče i z pohledu buněčné kompatibility a poskytnutí základních podmínek pro růst souborů buněk a tedy vytváření nových tkání.

9 Výsledky a jejich uplatnění

Teoretické vysvětlení sledující chování cylindrického objektu na hladině kapaliny ukázalo na důležité parametry, které hrají roli v procesu samovolného noření válcovitých vláken do kapaliny. Poskytla náhled na vztahy mezi parametry procesu noření. Tento model je rozšířením dosavadních popisů procesu noření cylindrických objektů. Jedná se o teoretickou úvahu, která je pro poznání principů velmi důležitým nástrojem, nicméně praxe ukazuje, že v procesu noření je více činitelů, jež ve většině případů ovlivňují samovolné noření vláken do kapaliny a tím mění podmínky a model není schopen přesně simulovat reálný proces noření. Tento model je však pro teoretické pochopení podmínek a vztahů nezbytný.

Výsledkem výzkumu a vývoje je vytvořené zařízení, pro laboratorní i mikroseriové elektrické zvlákňování do kapaliny, které je relativně jednoduché na obsluhu, s intuitivním ovládáním. Zařízení je vyrobené z běžných komerčních dílů a 3D tisku. Jeho výroba a další upgrade či modifikace jsou tedy relativně jednoduché a snadno proveditelné. Případná další výroba zařízení není náročná. Zařízení je uzpůsobeno pro laboratorní použití v digestoři, což umožňuje snazší užití s těkavými rozpouštědly a kolektory za dodržení pravidel bezpečnosti práce. Zařízení je možné využít při výuce i školních laboratorních úlohách. Také se ukázalo jako funkční celek, který zcela nahrazuje improvizovaná nastavení pomocí laboratorních pomůcek, které nemohou snadno zaručit stejná nastavení, a hlavně nezajišťují vždy stejné podmínky. Toto zařízení přineslo značné zjednodušení, zrychlení a zkvalitnění elektrického zvlákňování do kapalného kolektoru. Je to funkční celek, který umožňuje zvlákňovat do kapaliny při zachování možnosti použití velké škály kolektorových nádob a uchycených trysek. Zařízení také umožňuje zvlákňování na suchý kolektor.

Na tomto zařízení bylo následně vyrobeno několik morfologicky specifických 3D vláknenných materiálů, jejichž makroskopický tvar je vhodný pro tkáňové inženýrství. Vyrobené materiály jsou svými parametry koncipované jako případné tkáňové nosiče. Proces zvlákňování do kapaliny je schopen vyrobit relativně velmi objemný materiál. Tyto materiály dosáhly při biologickém testování buněčné viability vynikajících výsledků díky své 3D struktuře, která poskytuje buňkám dostatečný prostor pro proliferaci. Zároveň jsou tyto materiály dostatečně porézní pro zajištění látkové výměny a umožnění migrace buněk. Bylo prokázáno, že procesně je možné vyrábět morfologicky specifické materiály, jež jsou zároveň dostatečně objemné, aby bylo možné jejich použití jako tkáňového nosiče. Výsledek tedy poskytuje nejenom konstatování, že je možné tímto procesem vyrobit jednoduše a systémově vhodný vysoce objemný tkáňový nosič, ale také ukazuje a popisuje strukturně rozmanité materiály, které je schopen tento proces na daném zařízení vyrobit. Morfologie materiálu je pro tkáňové nosiče také velmi důležitá, protože poskytuje mikroklimatické podmínky (imitace ECM) pro různé tkáně, a tedy různé buňky na různou strukturu mohou reagovat jinak a vytvářet jiné uspořádání. Proto je důležité konstatování, že tímto procesem lze vyrobit různé morfologicky unikátní materiály. Biologické in-vitro testování viability ukázalo jejich výhodu nad planárními vzorky, jež nejsou vhodné zejména svými rozměry a tedy nejsou pro buněčnou proliferaci a migraci tak příznivé.

Další fáze experimentování ukázala, že unikátní kombinací rozpouštědel kolektoru a složení kapalného kolektoru je možné vyrobit v jednom kroku unikátní a velmi specifické materiály. Byly vyrobeny 3D objemné materiály, které jsou složeny z dutých vláken nebo z vláken porézních. Prokázáno bylo i možné zkombinování dutých vláken a porézních, byl tedy vyroben materiál, který je složen z dutých vláken, s vysoce porézní stěnou. Takováto možnost nano-topografické alterace zkombinovaná s výrobou vysoce objemných materiálů je opravdu jedinečná. Relativní jednoduchost procesu a jeho snadné jednostupňové provedení dává této metodě nové dimenze možných užití a možností dalšího rozvoje. Jedinečnost takovýchto modifikovaných 3D objemných struktur s kombinací s porézními a dutými vlákny je také v rekordně vysoké porozitě, která může přesahovat podle odhadů i 99 %. Pro popis takto vysoké porozity lze použít výraz ultra porézní materiál. Bez nadsázky lze říci, že bylo vyrobeno několik unikátních materiálů s výjimečnými vlastnostmi a tento proces výroby je relativně snadný. Obvykle se dosahuje jednotlivých modifikací víceúrovňovými a někdy i poměrně složitými procesy. Tato práce prokázala možnost vyrobit

několik výjimečných modifikací v jednom relativně jednoduchém procesu. Závěrem bylo testováním prokázáno, že materiál není cytotoxický, což je zejména formální potvrzení předchozích testů buněčné viability. Optickou analýzou pomocí fluorescenčního mikroskopu byla potvrzena dobrá buněčná adheze a buněčná proliferace ve vyrobených ultra porézních 3D objemných materiálech. Buňky jsou v materiálech schopny adheze a migrace v 3D struktuře.

Předpokládaným uplatněním těchto materiálů je oblast tkáňových nosičů pro objemné tkáně. Například jako tkáňový nosič pro tvrdé kostní tkáně, nebo chrupavčité tkáně. Materiál je jistě možné dále modifikovat. Integrovat například další aktivní látky podporující buněčnou migraci a proliferaci či materiály podporující tvorbu kostní tkáně (jako například hydroxyapatit atd.) a to jak na povrch tak i o do objemu vláken.

10 Zhodnocení výsledků pro vědní obor nebo pro praxi

Výsledky této práce přinášejí pro vědní obor i praxi důležité poznatky v oblasti tkáňového inženýrství. Vytvořené materiály mohou sloužit jako objemné tkáňové nosiče pro regeneraci a rekonstrukci tkání, což představuje významný krok směrem k efektivnějším léčebným strategiím. Zvláště významným přínosem je inovativní způsob výroby těchto materiálů, který se zaměřuje na využití specifických systémů polymerního roztoku a systémů kolektoru. Tento proces umožňuje vytvoření nano-topografických alterací mikrostruktury vláken, což zlepšuje specifické vlastnosti materiálů, jako je jejich porozita či dutá struktura.

Není však důležité pouze samotné vytvoření materiálů, ale také způsob, jakým jsou tyto materiály vytvořeny. Zařízení použité při výrobě je praktickým nástrojem pro dosažení zamýšlených výsledků a může představovat i významný přínos nejen pro edukativní sféru, ale také pro praxi v oblasti tkáňového inženýrství. Navíc může přístup ke tvorbě zařízení sloužit jako inspirace pro další výzkum a vývoj podobných zařízení, která by mohla být snadno replikovatelná a modifikovatelná pro široké spektrum laboratorních a experimentálních aplikací.

Díky relativně snadno realizovatelnému procesu výroby materiálů je možné zamýšlet reálné využití v praxi, a to nejen pro experimentální výrobu tkáňových nosičů, ale také pro malosériovou výrobu či výrobu a testování pro řadu dalších i technických aplikací.

Celkově lze konstatovat, že výsledkem této práce je nejen funkční zařízení, ale zejména relativně snadno realizovatelný proces výroby materiálů pro medicínské použití, který má velký potenciál při výrobě tkáňových nosičů pro objemné tkáně a další biomedicínské aplikace.

11 Doporučení na pokračování práce v daném tématu a oboru

Doporučení pro další pokračování v tomto tématu a oboru nabízí možnosti dalšího rozvoje a zdokonalení v oblasti materiálů pro tkáňové inženýrství. Vyrobené materiály jsou svými vlastnostmi výjimečné a unikátní, proces výroby je relativně jednoduchý a nenáročný, pro další využití získaných poznatků jsou zde další doporučení po jednotlivých oblastech. Doporučení navrhuji jakým způsobem navázat a rozvinout výsledky této práce.

Modifikace materiálů pro zvýšení biologické funkcionalizace. Zkoumání možností modifikace materiálů přidáním biologicky aktivních látek nebo biopolymerů. Tento výzkum může vést ke zlepšení biologických vlastností materiálů. Biologickou funkcionalizací může dojít ke zvýšení schopností podporovat buněčnou adhezi, proliferaci a diferenciaci nebo stimulaci buněk.

Individualizace materiálů pro konkrétní použití. Dalším navrhovaným krokem je výzkum metod tvarování materiálů pro individuální použití, jako je vytváření specifických tvarů nebo rozměrů dle nahrazovaných tkání. Toto může vést k vývoji personalizovaných léčebných postupů a zakázkových náhrad tkání. Tyto náhrady by mohly být vyráběny přímo na míru dle aktuálních požadavků a tím zlepšit nejenom funkci, ale i přijetí tkáňového nosiče. Možným řešením by bylo vytvoření formy, do které by se v kapalině vláknilo, případně by se vlákenný produkt po vytvoření do formy umístil. Přímo v této formě by probíhala lyofilizace a tím by byla zabezpečena fixace konkrétního tvaru.

Zvýšení mechanické pevnosti tkáňových nosičů. Pro aplikace, které vyžadují vyšší mechanickou stabilitu, by bylo zajímavé zkoumat možnosti zvýšení mechanické pevnosti vyrobených materiálů. Zvýšení pevnosti by mohlo být dosaženo například prostřednictvím optimalizace struktury nosiče nebo přidáním posilujících komponent. Obecně by bylo zajímavé v budoucnu testovat mechanické vlastnosti těchto zejména mikrovláknenných materiálů a to nejen v suchém ale zejména v mokřém stavu – tedy s ohledem na srovnání biomechanických vlastností.

Testování vlivu změn ve struktuře vláken PCL na rychlost degradace. Biodegradace je v těle řízena enzymaticky katalyzovanou hydrolyzou. Plná vlákna zřejmě budou degradovat pomaleji než vysoce porézní – pěnovitá vlákna či vlákna dutá. Ověření vlivu vlákenné struktury na rychlost degradace v in-vitro podmínkách by bylo velmi zajímavé pro další přesné směřování těchto materiálů v konkrétních aplikacích.

Rozšíření in-vitro testování s cílem zaměřeni se na specifické tkáňové nosiče. Pro případný další vývoj je nezbytné provést in-vitro testování, tentokrát zaměřené na specifické typy tkání, které mají být regenerovány. Tímto způsobem lze získat důležité informace o interakci materiálu s konkrétními buněčnými typy a optimalizovat jeho biologickou kompatibilitu.

In-vivo testování a klinické studie. Po úspěšném in-vitro testování by měla být provedena in-vivo testování, aby byla ověřena účinnost a bezpečnost materiálů v živých organismech. Poté by mohly následovat klinické studie, které by poskytly důkazy o účinnosti materiálů u pacientů.

Tato doporučení představují směry, kterými by mohl být další výzkum a vývoj této metody a těchto materiálů v oblasti tkáňového inženýrství nasměrován. Tyto kroky by přispěly k dalšímu pokroku v této dynamické a důležité oblasti biomedicínského výzkumu.

12 Závěr

Elektrické zvlákňování do kapalinových kolektorů je velmi zajímavý postup, který přináší vedle obecných procesních a materiálových parametrů stejnosměrného elektrického zvlákňování i možnost ovlivňování vytvářených vláknenných materiálů díky volbě kapaliny či směsi kapalin kolektoru. Jak ukázala tato disertační práce, tato metoda je uplatnitelná zejména při tvorbě materiálů relativně malých rozměrů, avšak pro speciální medicínské aplikace jsou to rozměry dostatečné, a to nejen na plošné úrovni, ale zejména při tvorbě trojrozměrných objemných materiálů, které mohou najít uplatnění v oblasti regenerativní medicíny jako tkáňové nosiče.

Uvedený zdokonalený teoretický model ukázal podrobněji vztahy mezi průměry vláken, vztlakovou Archimedovou silou a působením tíhy vlákna. Z grafické interpretace toho modelu je zřejmé, že pro malé průměry vláken, až do určité meze, nehraje tíha vlákna při noření významnou roli. Model také popisuje tvar výchylky hladiny kapaliny na rozhraní nořícího se cylindrického objektu. Teoretický tvar zakřivení kapaliny byl porovnán s experimentem s dobrou shodou. Model svými zjednodušujícími předpoklady nedokáže realisticky popsat konkrétní případy při vláknění do kapaliny, tedy stav při wet electrospinningu. Důvodem je to, že elektrické zvlákňování polymerních roztoků do kapaliny je velmi komplexní jev, do kterého vstupuje mnoho dalších vlivů, jako například působení zbytkových rozpouštědel ve vláknech, elektrokapilarita díky zbytkovému náboji ve vláknech, okolní podmínky jako teplota a vlhkost, zakřivení vláken, dynamický dopad vláken na hladinu kapaliny, postupná změna charakteristiky kolektoru při difuzi rozpouštědel z vláken do kolektoru atd. Úplný teoretický popis zkoumaného jevu tedy vyžaduje nesmírně komplexní přístup. Tato část disertační práce je přesto úspěšná ve své snaze posunout problematiku wet electrospinningu dále k hlubšímu teoretickému porozumění. To vše s vědomím toho, že otevírá řadu dalších témat a ve zpětné vazbě objevuje i mnoho vlastních nedokonalostí daných zjednodušujícími podmínkami popisu zkoumaného jevu.

Pokus o zdokonalení teoretického modelu poukázal na zajímavé vztahy průměru vláken a působení tíhové síly. Graficky znázorňuje, že do určitých průměrů vláken nehraje jejich tíha při noření důležitou roli. Model také popsal tvar výchylky hladiny na rozhraní nořícího se objektu a byl otestován na svou funkčnost. Model svou zjednodušenou teorií nedokázal reálně popsat konkrétní případy při vláknění do kapaliny, protože proces elektrického zvlákňování polymerních roztoků do kapaliny je velmi komplexní a vstupuje do něj mnoho dalších jevů, jako například vliv zbytkových rozpouštědel ve vláknech, elektrokapilarita, okolní podmínky jako teplota a vlhkost, postupná změna charakteristiky kolektoru při difuzi rozpouštědel z vláken do kolektoru atd.. Teoretický popis tohoto postupu vyžaduje nesmírně komplexní přístup a tato disertační práce se pokusila ho alespoň mírně posunout a tím otevřela řadu dalších témat a objevila i mnoho svých vlastních nedokonalostí v tomto zjednodušeném teoretickém popisu.

Ve vlastní experimentální části bylo navrženo, realizováno a optimalizováno zařízení vhodné na opakovatelnou výrobu vzorků. Na zařízení je možné vyrábět materiály na laboratorní úrovni, pro akademické účely, ale i pro případnou malosériovou výrobu. Zařízení je tedy vhodné nejen pro tvorbu různých druhů vzorků pro následné testování k medicínským aplikacím, ale i pro výukové účely. Jedná se o zařízení dostupné, opakovatelně vyrobitelné, nastavitelné v řadě parametrů, umístitelné do digestoře, jednoduše čistitelné a dezinfikovatelné, snadno modifikovatelné s řadou výměnných částí jako například nádobou na kapalinu kolektoru a tak dále. Zařízení se osvědčilo při výrobě všech vzorků, jejichž vyrobení bylo cílem této práce a které byly po rozsáhlé optimalizaci vyrobeny a základně charakterizovány. Jednalo

se jak o vzorky vyšší tloušťky, tedy vzorky trojrozměrné, s ohledem na požadavky kladené na tkáňové nosiče například kostní tkáň či tkáň kolenních chrupavek, tak o vzorky se speciálními vnitřními strukturami vláken – vlákna dutá, pěnovitá či dutá s pěnovitou stěnou. Tyto strukturální změny byly uskutečněny pouze vhodným nastavením kapaliny či směsi kapalin kolektoru a rozpouštědlového systému pro použitý biodegradabilní a biokompatibilní polymer polykaprolakton. Byla prokázána výrazná rozdílnost vyráběných materiálů s plošnými standardními DC zvlákněnými nanovláknennými materiály. Výsledné strukturální vizualizace i hodnocení vláknenných materiálů vyrobených elektrickým zvlákněním do kapaliny prokázaly velmi porézní struktury s opakovatelně vyrobitelnými specifickými charakteristikami a biologické hodnocení potvrdilo cytokompatibilitu a tím vhodnost pro následné aplikačně specificky orientované in-vitro testování.

Použití směsi s částečným rozpouštědlem v kapalném kolektoru vedlo k vytvoření vláken typu shish-kebab, houbových nebo dutých vláken s porézními stěnami. Uvedené experimenty odhalují projevy molekulárně dynamických jevů, které probíhají na rozhraních mezi čerstvě vytvořenými vlákny a jejich kapalným okolím. Tyto jevy mohou ovlivňovat i vnitřní objem vláken. Je možné předpokládat, že tyto transportní jevy jsou způsobeny difuzí poháněnou osmotickým tlakem. Důkazy pro molekulární dynamické jevy spojující povrch a vnitřek čerstvě vytvořených nano(mikro)vláken poskytují nejen různé vnitřní struktury vláken, ale také různé stupně krystalinity. Výrazný nárůst krystalinity byl způsoben koagulací polymeru v kolektoru obsahujícím částečné rozpouštědlo. Přesné nastavení, jak systému rozpouštědel pro roztok polymeru při DC zvláknění, tak kapalného kolektoru, má zásadní význam. Ideální požadované struktury vláken lze totiž dosáhnout pouze stanovením optimálního materiálového nastavení. Pokud jde o lékařské aplikace, nabízí použití houbových či dutých biologicky rozložitelných vláken řadu zajímavých možností z hlediska biodegradčních procesů a adheze buněk a jejich migrace.

13 Seznam použitých zdrojů

- [1] BHARDWAJ, Nandana a Subhas C. KUNDU. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* [online]. 2010, **28**(3), 325–347. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2010.01.004
- [2] SILL, Travis J. a Horst A. VON RECUM. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* [online]. 2008, **29**(13), 1989–2006. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2008.01.011
- [3] LANNUTTI, J., D. RENEKER, T. MA, D. TOMASKO a D. FARSON. Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2007, **27**(3), 504–509. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2006.05.019
- [4] TEO, W E a S RAMAKRISHNA. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology* [online]. 2006, **17**(14), R89–R106. ISSN 0957-4484, 1361-6528. Dostupné z: doi:10.1088/0957-4484/17/14/R01
- [5] RUTLEDGE, Gregory C. a Sergey V. FRIDRIKH. Formation of fibers by electrospinning. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2007, **59**(14), 1384–1391. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2007.04.020
- [6] NAM, Jin, Yan HUANG, Sudha AGARWAL a John LANNUTTI. Materials selection and residual solvent retention in biodegradable electrospun fibers. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2008, **107**(3), 1547–1554. ISSN 00218995, 10974628. Dostupné z: doi:10.1002/app.27063
- [7] POKORNY, P., E. KOSTAKOVA, F. SANETRIK, P. MIKES, J. CHVOJKA, T. KALOUS, M. BILEK, K. PEJCHAR, J. VALTERA a D. LUKAS. Effective AC needleless and collectorless electrospinning for yarn production. *Phys. Chem. Chem. Phys.* [online]. 2014, **16**(48), 26816–26822. ISSN 1463-9076, 1463-9084. Dostupné z: doi:10.1039/C4CP04346D
- [8] PARTHENIADIS, Ioannis, Ioannis NIKOLAKAKIS, Ivo LAIDMÄE a Jyrki HEINÄMÄKI. A Mini-Review: Needleless Electrospinning of Nanofibers for Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Processes* [online]. 2020, **8**(6), 673. ISSN 2227-9717. Dostupné z: doi:10.3390/pr8060673
- [9] JIANG, Rui, Tao YAN, Yi-Qi WANG a Zhi-Juan PAN. The preparation of PA6/CS-NPs nanofiber filaments with excellent antibacterial activity via a one-step multineedle electrospinning method with liquid bath circling system. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2020, **137**(36), 49053. ISSN 0021-8995, 1097-4628. Dostupné z: doi:10.1002/app.49053
- [10] JIRSAK, Oldrich a Stanislav PETRIK. Recent advances in nanofibre technology: needleless electrospinning. *International Journal of Nanotechnology* [online]. 2012, **9**(8–9), 836. ISSN 1475-7435, 1741-8151. Dostupné z: doi:10.1504/IJNT.2012.046756
- [11] LI, Dawei, Tong WU, Nanfei HE, Jing WANG, Weiming CHEN, Liping HE, Chen HUANG, Hany A. EL-HAMSHARY, Salem S. AL-DEYAB, Qinfei KE a Xiumei MO. Three-dimensional polycaprolactone scaffold via needleless electrospinning promotes cell proliferation and infiltration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2014, **121**, 432–443. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2014.06.034
- [12] WANG, Xin, Haitao NIU, Tong LIN a Xungai WANG. Needleless electrospinning of nanofibers with a conical wire coil. *Polymer Engineering & Science* [online]. 2009, **49**(8), 1582–1586. ISSN 00323888. Dostupné z: doi:10.1002/pen.21377

- [13] AGARWAL, Seema, Joachim H. WENDORFF a Andreas GREINER. Progress in the Field of Electrospinning for Tissue Engineering Applications. *Advanced Materials* [online]. 2009, **21**(32–33), 3343–3351. ISSN 09359648, 15214095. Dostupné z: doi:10.1002/adma.200803092
- [14] ANGEL, Nicole, Songnan LI, Feng YAN a Lingyan KONG. Recent advances in electrospinning of nanofibers from bio-based carbohydrate polymers and their applications. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2022, **120**, 308–324. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2022.01.003
- [15] PAL, Jit, Mikael SKRIFVAR, Bhanu NANDAN a Rajiv K. SRIVASTAVA. Electrospun composite matrices from tenside-free poly(ϵ -caprolactone)-grafted acrylic acid/hydroxyapatite oil-in-water emulsions. *Journal of Materials Science* [online]. 2017, **52**(4), 2254–2262. ISSN 0022-2461, 1573-4803. Dostupné z: doi:10.1007/s10853-016-0518-z
- [16] JAWOREK, A. a A.T. SOBCZYK. Electrospaying route to nanotechnology: An overview. *Journal of Electrostatics* [online]. 2008, **66**(3–4), 197–219. ISSN 03043886. Dostupné z: doi:10.1016/j.elstat.2007.10.001
- [17] WU, Jinglei a Yi HONG. Enhancing cell infiltration of electrospun fibrous scaffolds in tissue regeneration. *Bioactive Materials* [online]. 2016, **1**(1), 56–64. ISSN 2452199X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioactmat.2016.07.001
- [18] HOLEC, Pavel, Radek JIRKOVEC, Tomáš KALOUS, Ondřej BAŤKA, Jiří BROŽEK a Jiří CHVOJKA. The Potential for the Direct and Alternating Current-Driven Electrospinning of Polyamides. *Nanomaterials* [online]. 2022, **12**(4), 665. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano12040665
- [19] SIVAN, Manikandan, Divyabharathi MADHESWARAN, Jan VALTERA, Eva Kuzelova KOSTAKOVA a David LUKAS. Alternating current electrospinning: The impacts of various high-voltage signal shapes and frequencies on the spinnability and productivity of polycaprolactone nanofibers. *Materials & Design* [online]. 2022, **213**, 110308. ISSN 02641275. Dostupné z: doi:10.1016/j.matdes.2021.110308
- [20] STANISHEVSKY, Andrei, W. Anthony BRAYER, Pavel POKORNY, Tomáš KALOUS a David LUKÁŠ. Nanofibrous alumina structures fabricated using high-yield alternating current electrospinning. *Ceramics International* [online]. 2016, **42**(15), 17154–17161. ISSN 02728842. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceramint.2016.08.003
- [21] KESSICK, Royal, John FENN a Gary TEPPER. The use of AC potentials in electrospaying and electrospinning processes. *Polymer* [online]. 2004, **45**(9), 2981–2984. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2004.02.056
- [22] LUKÁŠ, David. *Nanovlákná: teorie, technologie a použití*. Vydání první. Praha: Academia, 2023. ISBN 978-80-200-3400-7.
- [23] *Patentovaná bezjehlová technologie Nanospider | Elmarco* [online]. [vid. 2023-12-18]. Dostupné z: <https://www.elmarco.com/cs/nanospider>
- [24] WU, Tong, Chen HUANG, Dawei LI, Anlin YIN, Wei LIU, Jing WANG, Jianfeng CHEN, Hany EI-HAMSHARY, Salem S. AL-DEYAB a Xiumei MO. A multi-layered vascular scaffold with symmetrical structure by bi-directional gradient electrospinning. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2015, **133**, 179–188. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2015.05.048
- [25] DIAS, J.R., S. BAPTISTA-SILVA, A. SOUSA, A.L. OLIVEIRA, P.J. BÁRTOLO a P.L. GRANJA. Biomechanical performance of hybrid electrospun structures for skin regeneration. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2018, **93**, 816–827. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2018.08.050
- [26] HU, Qingxi, Caiping SU, Zhaoxiang ZENG, Haiguang ZHANG, Rui FENG, Jiaxuan FENG a Shuai LI. Fabrication of multilayer tubular scaffolds with aligned nanofibers to guide the growth of endothelial cells.

Journal of Biomaterials Applications [online]. 2020, **35**(4–5), 553–566. ISSN 0885-3282, 1530-8022. Dostupné z: doi:10.1177/0885328220935090

- [27] SHOKROLLAHI, Mahvash, S. Hajir BAHRAMI, M. Haghbin NAZARPAK a Atefeh SOLOUK. Multilayer nanofibrous patch comprising chamomile loaded carboxyethyl chitosan/poly(vinyl alcohol) and polycaprolactone as a potential wound dressing. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, **147**, 547–559. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.01.067
- [28] AGHAJANPOOR, Mahdiyeh, Sameereh HASHEMI-NAJAFABADI, Mohamadreza BAGHABAN-ESLAMINEJAD, Fatemeh BAGHERI, Seyyed MOHAMMAD MOUSAVI a Foruogh AZAM SAYYAHPOUR. The effect of increasing the pore size of nanofibrous scaffolds on the osteogenic cell culture using a combination of sacrificial agent electrospinning and ultrasonication. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2017, **105**(7), 1887–1899. ISSN 1549-3296, 1552-4965. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.36052
- [29] ZHOU, Ming, Jinyuan ZHOU, Ruishan LI a Erqing XIE. Preparation of Aligned Ultra-long and Diameter-controlled Silicon Oxide Nanotubes by Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition Using Electrospun PVP Nanofiber Template. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2010, **5**(2), 279. ISSN 1556-276X. Dostupné z: doi:10.1007/s11671-009-9476-6
- [30] HODGE, Jacob a Clay QUINT. The improvement of cell infiltration in an electrospun scaffold with multiple synthetic biodegradable polymers using sacrificial PEO microparticles. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2019, **107**(9), 1954–1964. ISSN 1549-3296, 1552-4965. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.36706
- [31] NIEMINEN, Heikki J., Ivo LAIDMÄE, Ari SALMI, Timo RAUHALA, Tor PAULIN, Jyrki HEINÄMÄKI a Edward HÆGGSTRÖM. Ultrasound-enhanced electrospinning. *Scientific Reports* [online]. 2018, **8**(1), 4437. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-22124-z
- [32] CHEN, Yujie, Zihao JIA, Muhammad SHAFIQ, Xianrui XIE, Xianghao XIAO, Rita CASTRO, João RODRIGUES, Jinglei WU, Guangdong ZHOU a Xiumei MO. Gas foaming of electrospun poly(L-lactide-co-caprolactone)/silk fibroin nanofiber scaffolds to promote cellular infiltration and tissue regeneration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2021, **201**, 111637. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2021.111637
- [33] CHEN, Yujie, Muhammad SHAFIQ, Mingyue LIU, Yosry MORSI a Xiumei MO. Advanced fabrication for electrospun three-dimensional nanofiber aerogels and scaffolds. *Bioactive Materials* [online]. 2020, **5**(4), 963–979. ISSN 2452199X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioactmat.2020.06.023
- [34] GAO, Qing, Haibing GU, Peng ZHAO, Chunmei ZHANG, Mingyi CAO, Jianzhong FU a Yong HE. Fabrication of electrospun nanofibrous scaffolds with 3D controllable geometric shapes. *Materials & Design* [online]. 2018, **157**, 159–169. ISSN 02641275. Dostupné z: doi:10.1016/j.matdes.2018.07.042
- [35] JIANG, Jiang, Shixuan CHEN, Hongjun WANG, Mark A. CARLSON, Adrian F. GOMBART a Jingwei XIE. CO₂-expanded nanofiber scaffolds maintain activity of encapsulated bioactive materials and promote cellular infiltration and positive host response. *Acta Biomaterialia* [online]. 2018, **68**, 237–248. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2017.12.018
- [36] LIU, Jun, Zhihao SHEN, Sang-Ho LEE, Manuel MARQUEZ a Mark A. MCHUGH. Electrospinning in compressed carbon dioxide: Hollow or open-cell fiber formation with a single nozzle configuration. *The Journal of Supercritical Fluids* [online]. 2010, **53**(1–3), 142–150. ISSN 08968446. Dostupné z: doi:10.1016/j.supflu.2010.02.016
- [37] LEE, Jung Bok, Sung In JEONG, Min Soo BAE, Dae Hyeok YANG, Dong Nyoung HEO, Chun Ho KIM, Eben ALSBERG a Il Keun KWON. Highly Porous Electrospun Nanofibers Enhanced by Ultrasonication for

Improved Cellular Infiltration. *Tissue Engineering Part A* [online]. 2011, **17**(21–22), 2695–2702. ISSN 1937-3341, 1937-335X. Dostupné z: doi:10.1089/ten.tea.2010.0709

- [38] RAHMANI, Amin, Sameereh HASHEMI-NAJAFABADI, Mohamadreza Baghaban ESLAMINEJAD, Fatemeh BAGHERI a Forough Azam SAYAHPOUR. The effect of modified electrospun PCL-nHA-nZnO scaffolds on osteogenesis and angiogenesis. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2019, **107**(9), 2040–2052. ISSN 1549-3296, 1552-4965. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.36717
- [39] AHTZAZ, Samreen, Muhammad NASIR, Lubna SHAHZADI, Walija AMIR, Aneeq ANJUM, Rida ARSHAD, Farasat IQBAL, Aqif Anwar CHAUDHRY, Muhammad YAR a Ihtesham Ur REHMAN. A study on the effect of zinc oxide and zinc peroxide nanoparticles to enhance angiogenesis-pro-angiogenic grafts for tissue regeneration applications. *Materials & Design* [online]. 2017, **132**, 409–418. ISSN 02641275. Dostupné z: doi:10.1016/j.matdes.2017.07.023
- [40] LAURENTI, Marco a Valentina CAUDA. ZnO Nanostructures for Tissue Engineering Applications. *Nanomaterials* [online]. 2017, **7**(11), 374. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano7110374
- [41] CHEN, Weiming, Jun MA, Lei ZHU, Yosry MORSI, Hany -->EI-HAMSHARY, Salem S. AL-DEYAB a Xiumei MO. Superelastic, superabsorbent and 3D nanofiber-assembled scaffold for tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2016, **142**, 165–172. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2016.02.050
- [42] MADER, Michael, Valérie JÉRÔME, Ruth FREITAG, Seema AGARWAL a Andreas GREINER. Ultraporous, Compressible, Wetttable Polylactide/Polycaprolactone Sponges for Tissue Engineering. *Biomacromolecules* [online]. 2018, **19**(5), 1663–1673. ISSN 1525-7797, 1526-4602. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biomac.8b00434
- [43] CHEN, Weiming, Shuai CHEN, Yosry MORSI, Hany EL-HAMSHARY, Mohamed EL-NEWHY, Cunyi FAN a Xiumei MO. Superabsorbent 3D Scaffold Based on Electrospun Nanofibers for Cartilage Tissue Engineering. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 2016, **8**(37), 24415–24425. ISSN 1944-8244, 1944-8252. Dostupné z: doi:10.1021/acsami.6b06825
- [44] SUTHERLAND, Amanda J., Gabriel L. CONVERSE, Richard A. HOPKINS a Michael S. DETAMORE. The Bioactivity of Cartilage Extracellular Matrix in Articular Cartilage Regeneration. *Advanced Healthcare Materials* [online]. 2015, **4**(1), 29–39. ISSN 2192-2640, 2192-2659. Dostupné z: doi:10.1002/adhm.201400165
- [45] ALMEIDA, Henrique V., Yurong LIU, Gráinne M. CUNNIFFE, Kevin J. MULHALL, Amos MATSIKO, Conor T. BUCKLEY, Fergal J. O'BRIEN a Daniel J. KELLY. Controlled release of transforming growth factor- β 3 from cartilage-extra-cellular-matrix-derived scaffolds to promote chondrogenesis of human-joint-tissue-derived stem cells. *Acta Biomaterialia* [online]. 2014, **10**(10), 4400–4409. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2014.05.030
- [46] YE, Kaiqiang, Dinghua LIU, Haizhu KUANG, Jiangyu CAI, Weiming CHEN, Binbin SUN, Lunguo XIA, Bing FANG, Yosry MORSI a Xiumei MO. Three-dimensional electrospun nanofibrous scaffolds displaying bone morphogenetic protein-2-derived peptides for the promotion of osteogenic differentiation of stem cells and bone regeneration. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2019, **534**, 625–636. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcis.2018.09.071
- [47] WANG, Lihuan, Yuyou QIU, Yuxia GUO, Yang SI, Lifang LIU, Jianping CAO, Jianyong YU, Xiaoran LI, Qi ZHANG a Bin DING. Smart, Elastic, and Nanofiber-Based 3D Scaffolds with Self-Deploying Capability for Osteoporotic Bone Regeneration. *Nano Letters* [online]. 2019, **19**(12), 9112–9120. ISSN 1530-6984, 1530-6992. Dostupné z: doi:10.1021/acs.nanolett.9b04313

- [48] *Original Prusa i3 MK3S+ - Prusa Research a.s. – 3D tisk a 3D tiskárny od Josefa Průši* [online]. [vid. 2021-09-17]. Dostupné z: <https://www.prusa3d.cz/original-prusa-i3-mk3/>
- [49] ZHANG, Qiliang, Jian ZHOU, Peixuan ZHI, Leixin LIU, Chaozong LIU, Ao FANG a Qidong ZHANG. 3D printing method for bone tissue engineering scaffold. *Medicine in Novel Technology and Devices* [online]. 2023, **17**, 100205. ISSN 25900935. Dostupné z: doi:10.1016/j.medntd.2022.100205
- [50] WANG, Xiaoya, Meng ZHANG, Jingge MA, Mengchi XU, Jiang CHANG, Michael GELINSKY a Chengtie WU. 3D Printing of Cell-Container-Like Scaffolds for Multicell Tissue Engineering. *Engineering* [online]. 2020, **6**(11), 1276–1284. ISSN 20958099. Dostupné z: doi:10.1016/j.eng.2020.08.001
- [51] LOH, Qiu Li a Cleo CHOONG. Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. *Tissue Engineering Part B: Reviews* [online]. 2013, **19**(6), 485–502. ISSN 1937-3368, 1937-3376. Dostupné z: doi:10.1089/ten.teb.2012.0437
- [52] DENG, Fuyuan, Linlin LIU, Zhong LI a Juncai LIU. 3D printed Ti6Al4V bone scaffolds with different pore structure effects on bone ingrowth. *Journal of Biological Engineering* [online]. 2021, **15**(1), 4. ISSN 1754-1611. Dostupné z: doi:10.1186/s13036-021-00255-8
- [53] 2D vs 3D cell culture | Learning Center. *2D vs 3D cell culture | Learning Center | UPM Biomedicals* [online]. [vid. 2024-02-10]. Dostupné z: <https://www.upmbiomedicals.com/resource-center/learning-center/what-is-3d-cell-culture/2d-versus-3d-cell-culture/>
- [54] NAGHIEH, Saman, Ehsan FOROOZMEHR, Mohsen BADROSSAMAY a Mahshid KHARAZIHA. Combinational processing of 3D printing and electrospinning of hierarchical poly(lactic acid)/gelatin-forsterite scaffolds as a biocomposite: Mechanical and biological assessment. *Materials & Design* [online]. 2017, **133**, 128–135. ISSN 02641275. Dostupné z: doi:10.1016/j.matdes.2017.07.051
- [55] LIU, Xingzhi, Mimi CHEN, Junchao LUO, Huan ZHAO, Xichao ZHOU, Qiaoli GU, Huilin YANG, Xuesong ZHU, Wenguo CUI a Qin SHI. Immunopolarization-regulated 3D printed-electrospun fibrous scaffolds for bone regeneration. *Biomaterials* [online]. 2021, **276**, 121037. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2021.121037
- [56] CHEN, Weiming, Yong XU, Yanqun LIU, Zongxin WANG, Yaqiang LI, Gening JIANG, Xiumei MO a Guangdong ZHOU. Three-dimensional printed electrospun fiber-based scaffold for cartilage regeneration. *Materials & Design* [online]. 2019, **179**, 107886. ISSN 02641275. Dostupné z: doi:10.1016/j.matdes.2019.107886
- [57] JIN, Shixin, Zhuoming CHEN, Binjie XIN, Tong XI a Na MENG. An investigation on the comparison of wet spinning and electrospinning: Experimentation and simulation. *Fibers and Polymers* [online]. 2017, **18**(6), 1160–1170. ISSN 1229-9197, 1875-0052. Dostupné z: doi:10.1007/s12221-017-7026-x
- [58] KOSTAKOVA, E., M. SEPS, P. POKORNY a D. LUKAS. Study of polycaprolactone wet electrospinning process. *Express Polymer Letters* [online]. 2014, **8**(8), 554–564. ISSN 1788618X. Dostupné z: doi:10.3144/expresspolymlett.2014.59
- [59] SOVINA, Jan. *Wet electrospinning* [online]. B.m.: TUL - Bakalářská práce. 2018. Dostupné z: <https://dspace.tul.cz/handle/15240/152431>
- [60] ŠEPS, Michal. *Wet Electrospinning*. B.m.: TUL - Bakalářská práce. 2013
- [61] HASSANIN, Ahmed H., Eman ELNABAWY, Mohammed SALAH, Remya NAIR, Mohammed GAMAL, Nada OMRAN, Anton POPELKA, Ishac KANDAS a Nader SHEHATA. Multi-functional wet-electrospun piezoelectric nanofibers sensing mat: Manufacturing, characterization, and applications. *Materials Science in Semiconductor Processing* [online]. 2023, **166**, 107708. ISSN 13698001. Dostupné z: doi:10.1016/j.mssp.2023.107708

- [62] ZHANG, Mei, Han LIN, Yilong WANG, Guang YANG, He ZHAO a Dahui SUN. Fabrication and durable antibacterial properties of 3D porous wet electrospun RCSC/PCL nanofibrous scaffold with silver nanoparticles. *Applied Surface Science* [online]. 2017, **414**, 52–62. ISSN 01694332. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsusc.2017.04.052
- [63] PANT, Hem Raj, Madhav Prasad NEUPANE, Bishweshwar PANT, Gopal PANTHI, Hyun-Ju OH, Min Ho LEE a Hak Yong KIM. Fabrication of highly porous poly (ϵ -caprolactone) fibers for novel tissue scaffold via water-bath electrospinning. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2011, **88**(2), 587–592. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2011.07.045
- [64] YOKOYAMA, Yoshiro, Shinya HATTORI, Chiaki YOSHIKAWA, Yoshihiro YASUDA, Hiroyuki KOYAMA, Tsuyoshi TAKATO a Hisatoshi KOBAYASHI. Novel wet electrospinning system for fabrication of spongiform nanofiber 3-dimensional fabric. *Materials Letters* [online]. 2009, **63**(9–10), 754–756. ISSN 0167577X. Dostupné z: doi:10.1016/j.matlet.2008.12.042
- [65] YOUSEFZADEH, Maryam, Masoud LATIFI, Wee-Eong TEO, Mohammad AMANI-TEHRAN a Seeram RAMAKRISHNA. Producing continuous twisted yarn from well-aligned nanofibers by water vortex. *Polymer Engineering & Science* [online]. 2011, **51**(2), 323–329. ISSN 00323888. Dostupné z: doi:10.1002/pen.21800
- [66] WRÓBLEWSKA-KREPSZTUL, Jolanta, Tomasz RYDZKOWSKI, Iwona MICHALSKA-POŻOGA a Vijay Kumar THAKUR. Biopolymers for Biomedical and Pharmaceutical Applications: Recent Advances and Overview of Alginate Electrospinning. *Nanomaterials* [online]. 2019, **9**(3), 404. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano9030404
- [67] TASKIN, Mehmet Berat, Ruodan XU, Hans GREGERSEN, Jens Vinge NYGAARD, Flemming BESENBACHER a Menglin CHEN. Three-Dimensional Polydopamine Functionalized Coiled Microfibrous Scaffolds Enhance Human Mesenchymal Stem Cells Colonization and Mild Myofibroblastic Differentiation. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 2016, **8**(25), 15864–15873. ISSN 1944-8244, 1944-8252. Dostupné z: doi:10.1021/acsami.6b02994
- [68] HONG, Soongee a GeunHyung KIM. Fabrication of size-controlled three-dimensional structures consisting of electrohydrodynamically produced polycaprolactone micro/nanofibers. *Applied Physics A* [online]. 2011, **103**(4), 1009–1014. ISSN 0947-8396, 1432-0630. Dostupné z: doi:10.1007/s00339-011-6381-5
- [69] KIM, Min Seong a GeunHyung KIM. Three-dimensional electrospun polycaprolactone (PCL)/alginate hybrid composite scaffolds. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2014, **114**, 213–221. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2014.08.008
- [70] KOVACICIN, Jan, Sarka HAUZEROVA, Lubos BEHALEK, David LUKAS a Eva KUZELOVA KOSTAKOVA. *Sponge-Like Wet Electrospun Polycaprolactone Fibres* [online]. preprint. B.m.: SSRN. 2023 [vid. 2023-10-07]. Dostupné z: doi:10.2139/ssrn.4518371
- [71] YANG, Wanxun, Fang YANG, Yining WANG, Sanne K. BOTH a John A. JANSEN. In vivo bone generation via the endochondral pathway on three-dimensional electrospun fibers. *Acta Biomaterialia* [online]. 2013, **9**(1), 4505–4512. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2012.10.003
- [72] KASUGA, Toshihiro, Akiko OBATA, Hirotaka MAEDA, Yoshio OTA, Xianfeng YAO a Kazuya ORIBE. Siloxane-poly(lactic acid)-vaterite composites with 3D cotton-like structure. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2012, **23**(10), 2349–2357. ISSN 0957-4530, 1573-4838. Dostupné z: doi:10.1007/s10856-012-4607-5
- [73] XYNOS, Ioannis D., Alasdair J. EDGAR, Lee D.K. BUTTERY, Larry L. HENCH a Julia M. POLAK. Ionic Products of Bioactive Glass Dissolution Increase Proliferation of Human Osteoblasts and Induce Insulin-like Growth Factor II mRNA Expression and Protein Synthesis. *Biochemical and Biophysical Research*

Communications [online]. 2000, **276**(2), 461–465. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1006/bbrc.2000.3503

- [74] JONES, Julian R., Olga TSIGKOU, Emily E. COATES, Molly M. STEVENS, Julia M. POLAK a Larry L. HENCH. Extracellular matrix formation and mineralization on a phosphate-free porous bioactive glass scaffold using primary human osteoblast (HOB) cells. *Biomaterials* [online]. 2007, **28**(9), 1653–1663. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2006.11.022
- [75] OBATA, A, S TOKUDA a T KASUGA. Enhanced in vitro cell activity on silicon-doped vaterite/poly(lactic acid) composites. *Acta Biomaterialia* [online]. 2009, **5**(1), 57–62. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2008.08.004
- [76] WAKITA, Takashi, Akiko OBATA, Gowsihan POOLOGASUNDARAMPILLAI, Julian R. JONES a Toshihiro KASUGA. Preparation of electrospun siloxane-poly(lactic acid)-vaterite hybrid fibrous membranes for guided bone regeneration. *Composites Science and Technology* [online]. 2010, **70**(13), 1889–1893. ISSN 02663538. Dostupné z: doi:10.1016/j.compscitech.2010.05.014
- [77] HEO, Joonseong, Hyoryung NAM, Dongha HWANG, Seong J. CHO, Sung-Young JUNG, Dong-Woo CHO, Jin-Hyung SHIM a Geunbae LIM. Enhanced cellular distribution and infiltration in a wet electrospun three-dimensional fibrous scaffold using eccentric rotation-based hydrodynamic conditions. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2016, **226**, 357–363. ISSN 09254005. Dostupné z: doi:10.1016/j.snb.2015.11.030
- [78] WANG, Hui, Lingyan KONG a Gregory R. ZIEGLER. Aligned wet-electrospun starch fiber mats. *Food Hydrocolloids* [online]. 2019, **90**, 113–117. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2018.12.008
- [79] DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, RADBOUD UNIVERSITY NIJMEGEN MEDICAL CENTRE, P.O. BOX 9101, 6500 HB NIJMEGEN, THE NETHERLANDS., S SHANG, F YANG, X CHENG, Xf WALBOOMERS a Ja JANSEN. The effect of electrospun fibre alignment on the behaviour of rat periodontal ligament cells. *European Cells and Materials* [online]. 2010, **19**, 180–192. Dostupné z: doi:10.22203/eCM.v019a18
- [80] WANG, Ling, Yaobin WU, Baolin GUO a Peter X. MA. Nanofiber Yarn/Hydrogel Core–Shell Scaffolds Mimicking Native Skeletal Muscle Tissue for Guiding 3D Myoblast Alignment, Elongation, and Differentiation. *ACS Nano* [online]. 2015, **9**(9), 9167–9179. ISSN 1936-0851, 1936-086X. Dostupné z: doi:10.1021/acsnano.5b03644
- [81] RAFIEI, Mehrnoosh, Elaheh JOOYBAR, Mohammad J. ABDEKHODAIE a Mansour ALVI. Construction of 3D fibrous PCL scaffolds by coaxial electrospinning for protein delivery. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2020, **113**, 110913. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2020.110913
- [82] ZHANG, Mei, Han LIN, Yilong WANG, Guang YANG, He ZHAO a Dahui SUN. Fabrication and durable antibacterial properties of 3D porous wet electrospun RCSC/PCL nanofibrous scaffold with silver nanoparticles. *Applied Surface Science* [online]. 2017, **414**, 52–62. ISSN 01694332. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsusc.2017.04.052
- [83] BARBER, Patrick S., Chris S. GRIGGS, Jonathan R. BONNER a Robin D. ROGERS. Electrospinning of chitin nanofibers directly from an ionic liquid extract of shrimp shells. *Green Chemistry* [online]. 2013, **15**(3), 601. ISSN 1463-9262, 1463-9270. Dostupné z: doi:10.1039/c2gc36582k
- [84] HOU, Lijuan, W. M. Ranodhi N. UDANGAWA, Anirudh POCHIRAJU, Wenjun DONG, Yingying ZHENG, Robert J. LINHARDT a Trevor J. SIMMONS. Synthesis of Heparin-Immobilized, Magnetically Addressable Cellulose Nanofibers for Biomedical Applications. *ACS Biomaterials Science & Engineering*

[online]. 2016, **2**(11), 1905–1913. ISSN 2373-9878, 2373-9878. Dostupné z: doi:10.1021/acsbiomaterials.6b00273

- [85] VISWANATHAN, Gunaranjan, Saravanababu MURUGESAN, Victor PUSHPARAJ, Omkaram NALAMASU, Pulickel M. AJAYAN a Robert J. LINHARDT. Preparation of Biopolymer Fibers by Electrospinning from Room Temperature Ionic Liquids. *Biomacromolecules* [online]. 2006, **7**(2), 415–418. ISSN 1525-7797, 1526-4602. Dostupné z: doi:10.1021/bm050837s
- [86] MELI, Luciana, Jianjun MIAO, Jonathan S. DORDICK a Robert J. LINHARDT. Electrospinning from room temperature ionic liquids for biopolymer fiber formation. *Green Chemistry* [online]. 2010, **12**(11), 1883. ISSN 1463-9262, 1463-9270. Dostupné z: doi:10.1039/c0gc00283f
- [87] ZHENG, Yingying, Jianjun MIAO, Noriko MAEDA, David FREY, Robert J. LINHARDT a Trevor J. SIMMONS. Uniform nanoparticle coating of cellulose fibers during wet electrospinning. *J. Mater. Chem. A* [online]. 2014, **2**(36), 15029–15034. ISSN 2050-7488, 2050-7496. Dostupné z: doi:10.1039/C4TA03221G
- [88] BAKHTIARY, Negar, Mohamad PEZESHKI-MODARESS a Najmeh NAJMODDIN. Wet-electrospinning of nanofibrous magnetic composite 3-D scaffolds for enhanced stem cells neural differentiation. *Chemical Engineering Science* [online]. 2022, **264**, 118144. ISSN 00092509. Dostupné z: doi:10.1016/j.ces.2022.118144
- [89] XU, Yunzhi, Junior NDAYIKENGURUKIYE, Ange-Therese AKONO a Ping GUO. Fabrication of fiber-reinforced polymer ceramic composites by wet electrospinning. *Manufacturing Letters* [online]. 2022, **31**, 91–95. ISSN 22138463. Dostupné z: doi:10.1016/j.mfglet.2021.07.017
- [90] YANG, Zhengpeng, Yuanheng JIA, Yutao NIU, Zhenzhong YONG, Kunjie WU, Chunjing ZHANG, Meng ZHU, Yongyi ZHANG a Qingwen LI. Wet-spun PVDF nanofiber separator for direct fabrication of coaxial fiber-shaped supercapacitors. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2020, **400**, 125835. ISSN 13858947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2020.125835
- [91] SALATA, Oleg. Tools of Nanotechnology: Electrospray. *Current Nanoscience* [online]. 2005, **1**(1), 25–33. ISSN 15734137. Dostupné z: doi:10.2174/1573413052953192
- [92] Electrospaying for Drug Delivery. *UKDiss* [online]. 2020, **2020**. Dostupné z: <https://ukdiss.com/examples/electrospaying-for-drug-delivery.php>
- [93] KLÁPŠŤOVÁ, Andrea. *Využití elektrosprayingu pro cílené dodávání léčiv a funkcionalizaci scaffoldů*. Liberec, 2014. Diplomová práce. Technická univerzita v Liberci.
- [94] MA, Minglin, Alan CHIU, Gaurav SAHAY, Joshua C. DOLOFF, Nimit DHOLAKIA, Raj THAKRAR, Joshua COHEN, Arturo VEGAS, Delai CHEN, Kaitlin M. BRATLIE, Tram DANG, Roger L. YORK, Jennifer HOLLISTER-LOCK, Gordon C. WEIR a Daniel G. ANDERSON. Core–Shell Hydrogel Microcapsules for Improved Islets Encapsulation. *Advanced Healthcare Materials* [online]. 2013, **2**(5), 667–672. ISSN 2192-2640, 2192-2659. Dostupné z: doi:10.1002/adhm.201200341
- [95] LIU, Zheng, Zhenchao XU, Xiyang WANG, Yilu ZHANG, Yunqi WU, Dingyu JIANG a Runze JIA. Preparation and Biocompatibility of Core-Shell Microspheres for Sequential, Sustained Release of BMP-2 and VEGF. *BioMed Research International* [online]. 2022, **2022**, 1–15. ISSN 2314-6141, 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2022/4072975
- [96] ZAMANI, Maedeh, Molamma P. PRABHAKARAN, Eng San THIAN a Seeram RAMAKRISHNA. Protein encapsulated core–shell structured particles prepared by coaxial electrospaying: Investigation on material and processing variables. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2014, **473**(1–2), 134–143. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2014.07.006

- [97] LAI, Wing-Fu, Andrei S. SUSHA a Andrey L. ROGACH. Multicompartment Microgel Beads for Co-Delivery of Multiple Drugs at Individual Release Rates. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 2016, **8**(1), 871–880. ISSN 1944-8244, 1944-8252. Dostupné z: doi:10.1021/acsami.5b10274
- [98] TEO, Wee-Eong, Ryuji INAI a Seeram RAMAKRISHNA. Technological advances in electrospinning of nanofibers. *Science and Technology of Advanced Materials* [online]. 2011, **12**(1), 013002. ISSN 1468-6996, 1878-5514. Dostupné z: doi:10.1088/1468-6996/12/1/013002
- [99] KHIL, Myung-Seob, Shanta Raj BHATTARAI, Hak-Yong KIM, Sung-Zoo KIM a Keun-Hyung LEE. Novel fabricated matrix via electrospinning for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research* [online]. 2005, **72B**(1), 117–124. ISSN 0021-9304, 1097-4636. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.b.30122
- [100] BROWN, Philip John a Kathryn Ann STEVENS. *Nanofibers and nanotechnology in textiles*. Boca Raton (Fla.): CRC press, 2007. Woodhead publishing in textiles. ISBN 978-1-4200-4449-2.
- [101] SHEPHERD, Larissa M., Margaret W. FREY a Yong Lak JOO. Immersion Electrospinning as a New Method to Direct Fiber Deposition. *Macromolecular Materials and Engineering* [online]. 2017, **302**(10), 1700148. ISSN 14387492. Dostupné z: doi:10.1002/mame.201700148
- [102] WANG, Xushan a Koji NAKANE. Preparation of polymeric nanofibers via immersion electrospinning. *European Polymer Journal* [online]. 2020, **134**, 109837. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2020.109837
- [103] WANG, Xushan a Koji NAKANE. Formation and morphological variation of electrospun cellulose acetate nanofibers via dual-bath immersion electrospinning. *Materials Letters* [online]. 2021, **284**, 128968. ISSN 0167577X. Dostupné z: doi:10.1016/j.matlet.2020.128968
- [104] WANG, Ling, Meri J. LUNDAHL, Luiz G. GRECA, Anastassios C. PAPAGEORGIOU, Maryam BORGHEI a Orlando J. ROJAS. Effects of non-solvents and electrolytes on the formation and properties of cellulose I filaments. *Scientific Reports* [online]. 2019, **9**(1), 16691. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-53215-0
- [105] JI, Bingqiang, Zuozhou TANG, Qiang SONG, Zhong GE a Qiang YAO. Dynamic flotation conditions for elongated cylinders on liquid surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2019, **547**, 87–91. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcis.2019.03.091
- [106] LEE, Jaesung. The Static Profile for a Floating Particle. *Colloids and Interfaces* [online]. 2018, **2**(2), 18. ISSN 2504-5377. Dostupné z: doi:10.3390/colloids2020018
- [107] RAPACCHIETTA, A.V, A.W NEUMANN a S.N OMENYI. Force and free-energy analyses of small particles at fluid interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 1977, **59**(3), 541–554. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1016/0021-9797(77)90050-9
- [108] VELLA, Dominic, Duck-Gyu LEE a Ho-Young KIM. The Load Supported by Small Floating Objects. *Langmuir* [online]. 2006, **22**(14), 5979–5981. ISSN 0743-7463, 1520-5827. Dostupné z: doi:10.1021/la060606m
- [109] BUBEL, Kathrin, Yi ZHANG, Yasser ASSEM, Seema AGARWAL a Andreas GREINER. Tenside-Free Biodegradable Polymer Nanofiber Nonwovens by “Green Electrospinning”. *Macromolecules* [online]. 2013, **46**(17), 7034–7042. ISSN 0024-9297, 1520-5835. Dostupné z: doi:10.1021/ma401044s
- [110] WANG, Xuefen, Minghua MIN, Zongyuan LIU, Yin YANG, Zhe ZHOU, Meifang ZHU, Yanmo CHEN a Benjamin S. HSIAO. Poly(ethyleneimine) nanofibrous affinity membrane fabricated via one step wet-electrospinning from poly(vinyl alcohol)-doped poly(ethyleneimine) solution system and its application.

Journal of Membrane Science [online]. 2011, **379**(1–2), 191–199. ISSN 03767388. Dostupné z: doi:10.1016/j.memsci.2011.05.065

- [111] LANDAU, L. D a E. M LIFSHITZ. *Fluid Mechanics: Landau and Lifshitz: Course of Theoretical Physics, Volume 6*. [online]. Cambridge: Elsevier Science, 2014 [vid. 2020-04-21]. ISBN 978-1-4831-6104-4. Dostupné z: <http://qut.ebib.com.au/patron/FullRecord.aspx?p=1675155>
- [112] POPOV, Valentin L. Capillary Forces. In: Valentin L. POPOV *Contact Mechanics and Friction* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010 [vid. 2020-04-18], s. 41–54. ISBN 978-3-642-10802-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-10803-7_4
- [113] BEIGMORADI, Raziéh, Abdolreza SAMIMI a Davod MOHEBBI-KALHORI. Fabrication of polymeric nanofibrous mats with controllable structure and enhanced wetting behavior using one-step electrospinning. *Polymer* [online]. 2018, **143**, 271–280. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2018.04.025
- [114] YAN, Lidan, Shaoxiong SI, Yi CHEN, Tun YUAN, Haojun FAN, Yongyi YAO a Qiyi ZHANG. Electrospun in-situ hybrid polyurethane/nano-TiO₂ as wound dressings. *Fibers and Polymers* [online]. 2011, **12**(2), 207–213. ISSN 1229-9197, 1875-0052. Dostupné z: doi:10.1007/s12221-011-0207-0
- [115] COBURN, Jeannine M., Matthew GIBSON, Sean MONAGLE, Zachary PATTERSON a Jennifer H. ELISSEEFF. Bioinspired nanofibers support chondrogenesis for articular cartilage repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2012, **109**(25), 10012–10017. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1121605109
- [116] MEGELSKI, Silke, Jean S. STEPHENS, D. Bruce CHASE a John F. RABOLT. Micro- and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers. *Macromolecules* [online]. 2002, **35**(22), 8456–8466. ISSN 0024-9297, 1520-5835. Dostupné z: doi:10.1021/ma020444a
- [117] YIP, Y. a A.J. MCHUGH. Modeling and simulation of nonsolvent vapor-induced phase separation. *Journal of Membrane Science* [online]. 2006, **271**(1–2), 163–176. ISSN 03767388. Dostupné z: doi:10.1016/j.memsci.2005.06.063
- [118] JUNG, Jun Tae, Jeong F. KIM, Ho Hyun WANG, Emanuele DI NICOLO, Enrico DRIOLI a Young Moo LEE. Understanding the non-solvent induced phase separation (NIPS) effect during the fabrication of microporous PVDF membranes via thermally induced phase separation (TIPS). *Journal of Membrane Science* [online]. 2016, **514**, 250–263. ISSN 03767388. Dostupné z: doi:10.1016/j.memsci.2016.04.069
- [119] THANGARAJU, Elakkiya, Sheeja RAJIV a T. S. NATARAJAN. Comparison of preparation and characterization of water-bath collected porous poly L-lactide microfibers and cellulose/silk fibroin based poly L-lactide nanofibers for biomedical applications. *Journal of Polymer Research* [online]. 2015, **22**(2), 24. ISSN 1022-9760, 1572-8935. Dostupné z: doi:10.1007/s10965-015-0664-z
- [120] CASPER, Cheryl L., Jean S. STEPHENS, Nancy G. TASSI, D. Bruce CHASE a John F. RABOLT. Controlling Surface Morphology of Electrospun Polystyrene Fibers: Effect of Humidity and Molecular Weight in the Electrospinning Process. *Macromolecules* [online]. 2004, **37**(2), 573–578. ISSN 0024-9297, 1520-5835. Dostupné z: doi:10.1021/ma0351975
- [121] NAYANI, Karthik, Hari KATEPALLI, Chandra S. SHARMA, Ashutosh SHARMA, Sandip PATIL a R. VENKATARAGHAVAN. Electrospinning Combined with Nonsolvent-Induced Phase Separation To Fabricate Highly Porous and Hollow Submicrometer Polymer Fibers. *Industrial & Engineering Chemistry Research* [online]. 2012, **51**(4), 1761–1766. ISSN 0888-5885, 1520-5045. Dostupné z: doi:10.1021/ie2009229

- [122] KOVAČIČIN, Jan, Šárka HAUZEROVÁ, Luboš BĚHÁLEK, David LUKÁŠ a Eva KUŽELOVÁ KOŠŤÁKOVÁ. Sponge-like wet electrospun polycaprolactone fibres. *Materials Letters* [online]. 2023, 135460. ISSN 0167577X. Dostupné z: doi:10.1016/j.matlet.2023.135460
- [123] BOGNITZKI, Mikhail, Thomas FRESE, Martin STEINHART, Andreas GREINER, Joachim H. WENDORFF, Andreas SCHAPER a Michael HELLWIG. Preparation of fibers with nanoscaled morphologies: Electrospinning of polymer blends. *Polymer Engineering & Science* [online]. 2001, **41**(6), 982–989. ISSN 0032-3888, 1548-2634. Dostupné z: doi:10.1002/pen.10799
- [124] BAKAR, S S S, K C FONG, A ELEYAS a M F M NAZERI. Effect of Voltage and Flow Rate Electrospinning Parameters on Polyacrylonitrile Electrospun Fibers. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* [online]. 2018, **318**, 012076. ISSN 1757-8981, 1757-899X. Dostupné z: doi:10.1088/1757-899X/318/1/012076
- [125] HEKMATI, Amir Houshang, Abosaeed RASHIDI, Reza GHAZISAEIDI a Jean-Yves DREAN. Effect of needle length, electrospinning distance, and solution concentration on morphological properties of polyamide-6 electrospun nanowebs. *Textile Research Journal* [online]. 2013, **83**(14), 1452–1466. ISSN 0040-5175, 1746-7748. Dostupné z: doi:10.1177/0040517512471746
- [126] ISLAM, Md Shariful, Bee Chin ANG, Andri ANDRIYANA a Amalina Muhammad AFIFI. A review on fabrication of nanofibers via electrospinning and their applications. *SN Applied Sciences* [online]. 2019, **1**(10), 1248. ISSN 2523-3963, 2523-3971. Dostupné z: doi:10.1007/s42452-019-1288-4
- [127] *Fyzikální tabulky na webu conVERTER* [online]. [vid. 2023-10-23]. Dostupné z: <https://www.converter.cz/tabulky/>
- [128] LANDAU, Lev Davidovič, Evgenij M. LIFŠIČ a Lev Davidovich LANDAU. *Fluid mechanics*. 2. engl. ed., rev.reprint. with corr. Amsterdam [u.a]: Elsevier/Butterworth Heinemann, 2011. Course of theoretical physics, by L. D. Landau and E. M. Lifshitz ; Vol. 6. ISBN 978-0-7506-2767-2.
- [129] JAMES, David F. The meniscus on the outside of a small circular cylinder. *Journal of Fluid Mechanics* [online]. 1974, **63**(4), 657–664. ISSN 0022-1120, 1469-7645. Dostupné z: doi:10.1017/S0022112074002126
- [130] LO, Lilian L. The meniscus on a needle – a lesson in matching. *Journal of Fluid Mechanics* [online]. 1983, **132**, 65–78. ISSN 0022-1120, 1469-7645. Dostupné z: doi:10.1017/S0022112083001470
- [131] XUE, Jiajia, Tong WU, Yunqian DAI a Younan XIA. Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications. *Chemical Reviews* [online]. 2019, **119**(8), 5298–5415. ISSN 0009-2665, 1520-6890. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.8b00593
- [132] SALEHHUDIN, Hanna Sofia, Edzrol Niza MOHAMAD, Wan Nor Liza MAHADI a Amalina MUHAMMAD AFIFI. Multiple-jet electrospinning methods for nanofiber processing: A review. *Materials and Manufacturing Processes* [online]. 2018, **33**(5), 479–498. ISSN 1042-6914, 1532-2475. Dostupné z: doi:10.1080/10426914.2017.1388523
- [133] DE GENNES, Pierre-Gilles, Françoise BROCHARD-WYART a David QUÉRÉ. *Capillarity and Wetting Phenomena* [online]. New York, NY: Springer New York, 2004 [vid. 2024-03-10]. ISBN 978-1-4419-1833-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-0-387-21656-0
- [134] NARAYANAN, Ranga a D. SCHWABE. *Interfacial fluid dynamics and transport processes*. Berlin: Springer, 2003. ISBN 978-3-540-45095-5.
- [135] ADAMSON, Arthur W. a Alice Petry GAST. *Physical chemistry of surfaces*. 6. ed. New York: Wiley, 1997. A Wiley-Interscience publication. ISBN 978-0-471-14873-9.

- [136] LANGE, Norbert Adolph. *Lange's handbook of chemistry*. Seventeenth edition. New York: McGraw-Hill Education, 2017. ISBN 978-1-259-58609-5.
- [137] KELLER, Joseph B. Surface tension force on a partly submerged body. *Physics of Fluids* [online]. 1998, **10**(11), 3009–3010. ISSN 1070-6631, 1089-7666. Dostupné z: doi:10.1063/1.869820
- [138] LIDMILA, Bartovská a ŠIŠKOVÁ MARIE. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav* [online]. Praha: VŠCHT Praha, nedatováno. ISBN 80-7080-579-X. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_isbn-80-7080-579-X/pages-img/obsah.html
- [139] KIM, Jooyoun a Seong-O CHOI. Superhydrophobicity. In: *Waterproof and Water Repellent Textiles and Clothing* [online]. B.m.: Elsevier, 2018 [vid. 2021-08-02], s. 267–297. ISBN 978-0-08-101212-3. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-101212-3.00010-1
- [140] Fiji - an image processing package. *Fiji - an image processing package* [online]. Dostupné z: <https://imagej.net/>
- [141] D'AMATO, Anthony R., Michael T. K. BRAMSON, David T. CORR, Devan L. PUHL, Ryan J. GILBERT a Jed JOHNSON. Solvent Retention in Electrospun Fibers Affects Scaffold Mechanical Properties. *Electrospinning* [online]. 2018, **2**(1), 15–28. ISSN 2391-7407. Dostupné z: doi:10.1515/esp-2018-0002
- [142] KVASNICA, Jozef. *Mechanika*. Praha: Academia, 2004. ISBN 978-80-200-1268-5.
- [143] *Archimedes' principle | Description & Facts | Britannica* [online]. 18. říjen 2023 [vid. 2023-10-23]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/Archimedes-principle>
- [144] LI, Shichen a Bong-Kee LEE. Electrospinning of circumferentially aligned polymer nanofibers floating on rotating water collector. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2020, **137**(22), 48759. ISSN 0021-8995, 1097-4628. Dostupné z: doi:10.1002/app.48759
- [145] FOUNDATION, Blender. blender.org - Home of the Blender project - Free and Open 3D Creation Software. *blender.org* [online]. [vid. 2023-10-12]. Dostupné z: <https://www.blender.org/>
- [146] CAD Sketcher | Blender Parametric Precision Modeling. *CAD Sketcher* [online]. [vid. 2023-10-12]. Dostupné z: <https://www.cadsketcher.com>
- [147] *FreeCAD: Your own 3D parametric modeler* [online]. [vid. 2023-10-12]. Dostupné z: <https://www.freecad.org/>
- [148] FH.1/2 | Flexible coolant hoses. *ELESA* [online]. [vid. 2023-10-27]. Dostupné z: <https://www.elesa.com/en/elesab2bstoreuk/Accessories-for-hydraulic-systems--Flexible-coolant-hoses--FH12>
- [149] *MaH - Modular Arm Helper - No support - Easy print by b03tz - Thingiverse* [online]. [vid. 2021-09-05]. Dostupné z: <https://www.thingiverse.com/thing:2860825>
- [150] THINGIVERSE.COM. *Thingiverse - Digital Designs for Physical Objects* [online]. [vid. 2023-10-24]. Dostupné z: <https://www.thingiverse.com/>
- [151] *TPE flexible filament, Black, 1.75mm, 1kg (3DP-TPE1.75-01-BK)* [online]. [vid. 2023-10-25]. Dostupné z: <https://gembird.nl/item.aspx?id=9502>
- [152] *Vodotěsné tisky | Prusa Knowledge Base* [online]. [vid. 2023-10-30]. Dostupné z: https://help.prusa3d.com/article/vodotesne-tisky_112324

- [153] TEAM, Prusa Polymers. *Chemická odolnost materiálů pro 3D tisk | Prusament* [online]. 18. říjen 2021 [vid. 2023-11-05]. Dostupné z: <https://prusament.com/cs/chemicka-odolnost-materialu-pro-3d-tisk/>
- [154] *Prusa Material Table | Prusa Knowledge Base* [online]. [vid. 2023-11-05]. Dostupné z: <https://help.prusa3d.com/materials>
- [155] *Petriho miska | P-LAB = Potřeby pro laboratoř, Chemikálie, Life Science, Nábytek* [online]. [vid. 2023-10-30]. Dostupné z: <https://www.p-lab.cz/petriho-miska>
- [156] NE-1000 Programmable Single Syringe Pump. *SyringePumps* [online]. [vid. 2023-11-08]. Dostupné z: <https://www.syringepump.eu/product/ne-1000-1010-syringe-pump/>
- [157] *Omnifix® Luer Lock Solo* [online]. [vid. 2023-11-10]. Dostupné z: <https://www.bbraun.com/en/products/b2/omnifix-luer-locksolo.html>
- [158] *Materiál pro podpěry | Prusa Knowledge Base* [online]. [vid. 2023-11-08]. Dostupné z: https://help.prusa3d.com/article/material-pro-podpery_1698
- [159] *Platform Jack [Fully Assembled, No Supports] by Intentional3D - Thingiverse* [online]. [vid. 2021-09-18]. Dostupné z: <https://www.thingiverse.com/thing:925556>
- [160] *PLA | Prusa Knowledge Base* [online]. [vid. 2023-11-12]. Dostupné z: https://help.prusa3d.com/article/pla_2062
- [161] KIM, Min Seong a Geun Hyung KIM. Highly porous electrospun 3D polycaprolactone/ β -TCP biocomposites for tissue regeneration. *Materials Letters* [online]. 2014, **120**, 246–250. ISSN 0167577X. Dostupné z: doi:10.1016/j.matlet.2014.01.083
- [162] 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. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002
- [163] HAJIALI, Faezeh, Saeid TAJBAKHSI a Akbar SHOJAEI. Fabrication and Properties of Polycaprolactone Composites Containing Calcium Phosphate-Based Ceramics and Bioactive Glasses in Bone Tissue Engineering: A Review. *Polymer Reviews* [online]. 2018, **58**(1), 164–207. ISSN 1558-3724, 1558-3716. Dostupné z: doi:10.1080/15583724.2017.1332640
- [164] FANG, Jian, Hongxia WANG, Haitao NIU, Tong LIN a Xungai WANG. Evolution of Fiber Morphologies during Poly (acrylonitrile) Electrospinning. *Macromolecular Symposia* [online]. 2010, **287**(1), 155–161. ISSN 10221360. Dostupné z: doi:10.1002/masy.201050122
- [165] *BioRender* [online]. [vid. 2021-08-29]. Dostupné z: <https://biorender.com/>
- [166] *DOJINDO LABORATORIES Products catalog* [online]. [vid. 2023-11-17]. Dostupné z: <https://www.dojindo.com/>
- [167] HORÁČKOVÁ, Pavlína. *Testování cytotoxicity in vitro, bakalářská práce* [online]. B.m.: Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. 2013. Dostupné z: https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/53093/HorackovaP_Testovani%20toxicity_KK_2013.pdf.pdf?sequence=2
- [168] DIEDERICH, Marc, ed. *Natural compounds and their role in apoptotic cell signaling pathways*. Boston, Mass: Published by Blackwell Pub. on behalf of the New York Academy of Sciences, 2009. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 1171. ISBN 978-1-57331-737-5.

- [169] PANT, Hem Raj, Woo-il BAEK, Ki Taek NAM, Yun A. SEO, Hyun-Ju OH a Hak Yong KIM. Fabrication of polymeric microfibers containing rice-like oligomeric hydrogel nanoparticles on their surface: A novel strategy in the electrospinning process. *Materials Letters* [online]. 2011, **65**(10), 1441–1444. ISSN 0167577X. Dostupné z: doi:10.1016/j.matlet.2011.02.029
- [170] 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. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2014.08.061
- [171] JING, Xin, Heng LI, Hao-Yang MI, Yue-Jun LIU a Yi-Min TAN. Fabrication of fluffy shish-kebab structured nanofibers by electrospinning, CO₂ escaping foaming and controlled crystallization for biomimetic tissue engineering scaffolds. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2019, **372**, 785–795. ISSN 13858947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2019.04.194
- [172] 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), 022604. ISSN 1539-3755, 1550-2376. Dostupné z: doi:10.1103/PhysRevE.89.022604
- [173] 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. ISSN 01694332. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsusc.2017.08.005
- [174] WANG, Xiaofeng, Max R. SALICK, Xiaodong WANG, Travis CORDIE, Wenjuan HAN, Yiyan 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, **14**(10), 3557–3569. ISSN 1525-7797, 1526-4602. Dostupné z: doi:10.1021/bm400928b
- [175] MOREL, Alexandre, Sophie C. OBERLE, Sebastian ULRICH, Gökçe YAZGAN, Fabrizio SPANO, Stephen J. FERGUSON, Giuseppino FORTUNATO a René M. ROSSI. Revealing non-crystalline polymer superstructures within electrospun fibers through solvent-induced phase rearrangements. *Nanoscale* [online]. 2019, **11**(36), 16788–16800. ISSN 2040-3364, 2040-3372. Dostupné z: doi:10.1039/C9NR04432A
- [176] MA, Zuwei, M. KOTAKI a S. RAMAKRISHNA. Surface modified nonwoven polysulphone (PSU) fiber mesh by electrospinning: A novel affinity membrane. *Journal of Membrane Science* [online]. 2006, **272**(1–2), 179–187. ISSN 03767388. Dostupné z: doi:10.1016/j.memsci.2005.07.038
- [177] CHEN, Rui, Chen HUANG, Qinfei KE, Chuanglong HE, Hongsheng WANG a Xiumei MO. Preparation and characterization of coaxial electrospun thermoplastic polyurethane/collagen compound nanofibers for tissue engineering applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2010, **79**(2), 315–325. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2010.03.043
- [178] CHONG, E, T PHAN, I LIM, Y ZHANG, B BAY, S RAMAKRISHNA a C LIM. Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution☆. *Acta Biomaterialia* [online]. 2007, **3**(3), 321–330. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2007.01.002
- [179] LIU, Li, Zhuo XIONG, Yongnian YAN, Yunyu HU, Renji ZHANG a Shenguo WANG. Porous morphology, porosity, mechanical properties of poly(α -hydroxy acid)–tricalcium phosphate composite scaffolds fabricated by low-temperature deposition. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2007, **82A**(3), 618–629. ISSN 1549-3296, 1552-4965. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.31177

14 Práce autora

Publikace související s tématem disertační práce

1. Jan Kovačičin, Šárka Hauserová, Luboš Běhálek, David Lukáš a Eva Kuželová Košťáková. Sponge-like wet electrospun polycaprolactone fibres. *Materials Letters*.2023, 135460. ISSN 0167577X. Dostupné z: doi:10.1016/j.matlet.2023.135460
2. Jan Kovačičin, Šárka Hauzerová, Lubos Běhálek, David Lukáš, Eva Kuželová Košťáková, Biodegradable Fibrous Materials Produced by Wet Electrospinning, *Nanocon 2021*, ISBN 978-80-88365-00-6.

Conference

1. Jan Kovacicin, Eva Kuzelova Kostakova, David Lukas, Partially submerged cylindrical body – theoretical and experimental model for wet electrospinning principle, Workshop DSP 2019 , Liberec.
2. Jan Kovačičin, Jan Sovina, David Lukáš, Eva Košťáková Kuželová, Wet electrospinning of Polycaprolactone; 1st Workshop on Mechanics of Nanomaterials, 978-80-7494-449-9, Česká společnost pro mechaniku, Technická univerzita v Liberci, University of Alabama - USA, 14. - 15. 6. 2018
3. Jan Kovačičin, Šárka Hauzerová, Luboš Běhálek, David Lukáš, Eva Kuželová Košťáková, Biodegradable Fibrous Materials Produced by Wet Electrospinning, *Nanocon 2021*.

Další publikace autora

1. David Lukáš, Petr Mikeš, Eva Košťáková Kuželová, Pavel Pokorný, Ondřej Novák, Filip Saneterník, Jiří Chvojka, Jiří Havlíček, Věra Jenčová, Jana Horáková, Lenka Blažková, Kateřina Pilařová, Jakub Erben, Jan Kovačičin, Užité vzor, Zařízení pro výrobu kompozitního textilního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná.
2. Nikifor Asatiani, Jan Valtera, Maxim Lisnenko, Kristýna Havlíčková, Jan Kovačičin, David Lukáš, Eva Kuželová Košťáková, Evaluation of Fiber Orientation of AC and DC Electrospun PLCL Nanofibrous Layers, *Nanocon 2021* - ISBN 978-80-88365-00-6.
3. Lukáš Stanislav, Jana Bajáková, Jan Kovačičin, David Lukáš, Multicomponent nano - yarns production – development of twisting device. 13th Autex World Textile Conference - May 22nd to 24th 2013, Dresden, Germany.

Projekty, do kterých byl autor zapojen

1. Projekt SGS, řešitel: Jana Bajáková, Výroba ojednocených nanovláken, 2012, Technická univerzita v Liberci, Textilní Fakulta.