



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta mechatroniky, informatiky
a mezioborových studií ■

PŘÍPRAVA TKÁŇOVÉHO NOSIČE PRO NÁHRADU NERVOVÉ TKÁNĚ (MÍŠNÍ LÉZE)

Bakalářská práce

Studijní program: B3942 - Nanotechnologie
Studijní obor: 3942R002 - Nanomateriály
Autor práce: **Ilona Krabicová**
Vedoucí práce: Ing. Věra Jenčová, Ph.D.





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC
Faculty of Mechatronics, Informatics
and Interdisciplinary Studies ■

PREPARATION OF THE SCAFFOLD FOR THE NERVE TISSUE ENGINEERING

Bachelor thesis

Study programme: B3942 - Nanotechnology
Study branch: 3942R002 - Nanomaterials
Author: **Ilona Krabicová**
Supervisor: Ing. Věra Jenčová, Ph.D.



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Ilona Krabicová**
Osobní číslo: **M12000093**
Studijní program: **B3942 Nanotechnologie**
Studijní obor: **Nanomateriály**
Název tématu: **Příprava tkáňového nosiče pro náhradu nervové tkáně (míšň leze)**
Zadávací katedra: **Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracování rešerše na dané téma
2. Příprava scaffoldu: tažení vláken (PCL) metodou drawing
3. Identifikace vhodné vrstvy polypyrrolu
4. Příprava kolagenového hydrogelu
5. Testování scaffoldu (jednotlivých komponent) na tkáňových kulturách (3T3 myší fibroblasty)
6. Zpracování výsledků

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

1. T. Ondarçuhu, C. Joachim: Drawing a single nanofibre over hundreds of microns, *Europhysics Letters*, 1998
2. Laleh Ghasemi-Mobarakeh, Molamma P Prabhakaran, Mohammad Morshed, Mohammad Hossein Nasr-Esfahani, Hossein Baharvand, Sahar Kiani, SalemS Al-Deyab and Seeram Ramakrishna. Application of conductive polymers, scaffolds and electrical stimulation for nerve tissue engineering, *J Tissue Eng Regen Med* 2011;5: e17e35
3. Freshney R. I. Culture of animal cells. 2010, ISBN 9780470528129

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Věra Jenčová, Ph.D.

Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

Konzultant bakalářské práce:

Ing. Lukáš Stanislav

Katedra aplikované kybernetiky


Ostatní konzultanti:

Mgr. Kateřina Pilařová


Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

Datum zadání bakalářské práce: **17. září 2014**

Termín odevzdání bakalářské práce: **15. května 2015**


prof. Ing. Václav Kopecký, CSc.
děkan




prof. RNDr. David Lukáš, CSc.
vedoucí katedry

V Liberci dne 17. září 2014

Prohlášení

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

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

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

Bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

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

Datum: 15. 5. 2015

Podpis: I. Krahcová

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala všem, kteří umožnili vznik této práce. V první řadě bych chtěla poděkovat své vedoucí bakalářské práce Ing. Věře Jenčové, Ph.D. za cenné rady, vstřícnost a trpělivost. Poděkování také patří Mgr. Kateřině Pilařové za trpělivost a čas, který mi věnovala při konzultacích a práci v laboratoři. V neposlední řadě bych chtěla vyjádřit své díky rodině, která mne při studiu vždy podporovala.

Abstrakt

V dnešní době je poranění páteře prakticky neléčitelné. Tato práce se zabývá výrobou náhrady, která by umožnila regeneraci míchy a pomohla obnovit její funkci. Implantát by měl mít podobu hydrogelového válce, ve kterém jsou podélně umístěna elektricky vodivá vlákna. Cílem této práce je vyrobit orientovaná vlákna opatřená vodivou povrchovou vrstvou a otestovat jejich cytokompatibilitu.

Nejprve bylo provedeno in vitro testování PCL nanovláken opatřených vrstvami polypyrrolu různé tloušťky, jehož cílem bylo stanovit vhodnou vrstvu polypyrrolu. Poté byla vyrobena orientovaná PCL mikrovlákna metodou drawing. Vlákna byla potažena vrstvou polypyrrolu, zvolenou dle výsledků předchozího testování, a podrobena testování in vitro. Součástí in vitro testů byl test viability buněk, rastrovací elektronová mikroskopie a fluorescenční mikroskopie.

Výsledky ukázaly, že vrstva polypyrrolu napomáhá adhezi a proliferaci buněk, příliš velká vrstva však inhibuje buněčný růst. Testování orientovaných vláken potvrdilo hypotézu, že buňky při růstu kopírují orientaci vláken. Tato práce je prvním krokem k výrobě nosiče pro regeneraci míchy. Výsledky potvrdily, že materiály vyrobené a testované v rámci této práce lze použít pro vývoj implantátu.

Klíčová slova

míšní léze, drawing, polypyrrol, tkáňové inženýrství, scaffold

Abstract

Nowadays a spinal cord injury cannot be cured. This work is focused on the development of the scaffold which enables regeneration of the spinal cord and helps to renew its function. Scaffold should have the form of a hydrogel cylinder with single conductive fibres inside. The aim of this work is to produce oriented fibres covered with a conductive layer and test its cytocompatibility.

At first in vitro testing of electrospun PCL nanofibres with layers of polypyrrole with different thickness was done. Then were produced oriented PCL microfibers using the drawing method. Fibres were coated with a polypyrrole layer, which was elected on the basis of previous tests with electrospun material, and tested in vitro. The part of in vitro testing was cell viability test, scanning electron microscopy and fluorescence microscopy.

The results showed that the polypyrrole coating supports the adhesion and cell proliferation, but thick layer inhibits the cell proliferation. Testing of oriented fibres confirms that cells copy the fibre orientation. This work is the first step in development of scaffold for spinal cord regeneration. Results confirmed that materials produced and tested in this work are useful for the implant.

Key words

spinal cord injury, drawing, polypyrrole, tissue engineering, scaffold

Obsah

Seznam zkratk	10
Seznam příloh	11
I. Úvod.....	12
II. Teoretická část	13
1 Nervová soustava.....	13
1.1 Mícha.....	13
1.1.1 Anatomie míchy.....	13
1.1.2 Nervové dráhy.....	14
1.2 Nervové buňky	14
1.2.1 Činnost neuronu	15
1.2.2 Poškození a regenerace nervové buňky.....	16
1.3 Míšní léze.....	17
1.4 Regenerace nervového systému.....	17
2 Regenerativní medicína.....	20
2.1 Buněčná terapie.....	20
2.2 Tkáňové inženýrství.....	21
3 Materiály v tkáňovém inženýrství.....	23
3.1 Polykaprolakton	23
3.2 Polypyrrol.....	24
4 Metody zvlákňování.....	26
4.1 Electrospinning.....	26
4.1.1 Nanospider	27
4.2 Drawing.....	27
5 Principy použitých testovacích metod.....	29
5.1 MTT test.....	29
5.2 Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM).....	29
5.3 Optická mikroskopie.....	31
III. Experimentální část.....	33
6 Použité materiály	33
6.1 Příprava nosiče.....	33
6.2 In vitro testování	33
6.3 Zásobní roztoky, média.....	34
6.4 Přístroje a programy.....	34
7 Postupy	35
7.1 Příprava roztoku polymeru.....	35

7.2	Měření průměru vláken.....	35
7.3	Kultivace buněk 3T3	35
7.3.1	Rozmražení.....	35
7.3.2	Pasážování	35
7.3.3	Výměna média	36
7.3.4	Nasazení buněk na vzorky	36
7.4	MTT test.....	36
7.5	Příprava vzorků na SEM	37
7.6	Příprava vzorků na fluorescenční mikroskopii	37
7.6.1	Barvení DAPI (Fluoroshield with DAPI).....	37
7.6.2	Barvení propidium jodidem.....	37
7.6.3	Barvení phalloidinem + DAPI	38
IV.	Výsledky a diskuse	39
8	Testování nanovláken z electrospinningu.....	39
8.1	Morfologická analýza vláken	39
8.2	In vitro testování	41
8.2.1	MTT test.....	41
8.2.2	Fluorescenční mikroskopie.....	42
8.2.3	SEM	43
9	Výroba vláken metodou drawing a jejich testování	45
9.1	Výroba vláken PCL metodou drawing.....	45
9.2	Potažení vláken polypyrrolem	46
9.3	Morfologická analýza vláken	47
9.4	In vitro testování	48
9.4.1	MTT test.....	48
9.4.2	Fluorescenční mikroskopie.....	50
9.4.3	SEM	52
V.	Závěr.....	54
VI.	Zdroje	55
VII.	Přílohy.....	62

Seznam zkratk

SC	kmenové buňky (stem cells)
MSC	mezenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells)
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
PCL	poly(ϵ -kaprolakton)
DMSO	dimethylsulfoxid
IPA	isopropylalkohol
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SE	sekundární elektrony
BSE	zpětně odražené elektrony (back-scattered electrons)
PBS	fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
NC	negativní kontrola
PC	pozitivní kontrola
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumine)
NGF	nervový růstový faktor (nerve growth factor)
BDNF	mozkový nervový faktor (brain-derived neurotrophic factor)
Ca-P	fosfid vápníku

Seznam příloh

A	Výsledky testu MTT vláken z electrospinningu.....	62
B	Výsledky testu MTT vláken z drawingu.....	62
C	Detailní snímky SEM orientovaných vláken	63
D	Defekty vláken	64
E	Obsah přiloženého CD	64

I. Úvod

Míšňí léze je zranění nejčastěji způsobené poraněním páteře. Lidem s míšňí lézí se po zranění život od základů změní a doprovází ho mnohé komplikace, ať už zdravotní, sociální či psychické. Bohužel zatím není možné poraněnou míchu vyléčit, současná medicína pouze dokáže zmírnit následky a s pomocí fyzioterapeuta naučit hendikepovaného člověka co nejvyšší možné samostatnosti.

Výzkumy zaměřené na regeneraci nervové tkáně již existují, zatím však nebyl uveden do medicínské praxe způsob, jak efektivně podpořit nervové buňky v regeneraci a tím docílit uzdravení jedince a jeho návratu k plnohodnotnému životu bez omezení.

Cílem této práce je podniknout první kroky ve vývoji nosiče pro léčbu míšňích lézí. Tento implantát by měl vyplnit lézi a pomoci výběžkům nervových buněk přemostit poškozenou oblast, prorůst nosičem a obnovit funkci poškozené míchy. Hlavním úkolem práce je otestovat materiály a postup jejich výroby. Konečný nosič by měl mít podobu válce z hydrogelu, v němž jsou v prostoru podélně umístěna jednotlivá orientovaná polymerní vlákna. Hydrogel slouží k napodobení struktury míchy a vlákna představují oporu pro výběžky nervových buněk, které by měly kopírovat orientaci vláken a tak snáze dosáhnout cíle. Jelikož nervové buňky pozitivně reagují na elektrickou stimulaci, měla by být vlákna elektricky vodivá.

V teoretické části jsou shrnuty informace týkající se dané problematiky. V první části experimentů se zabývám výběrem vhodné tloušťky vrstvy, která zajistí elektrickou vodivost vláken a v druhé polovině experimentální části se věnuji výrobě a in vitro testování samostatných orientovaných vláken.

II. Teoretická část

1 Nervová soustava

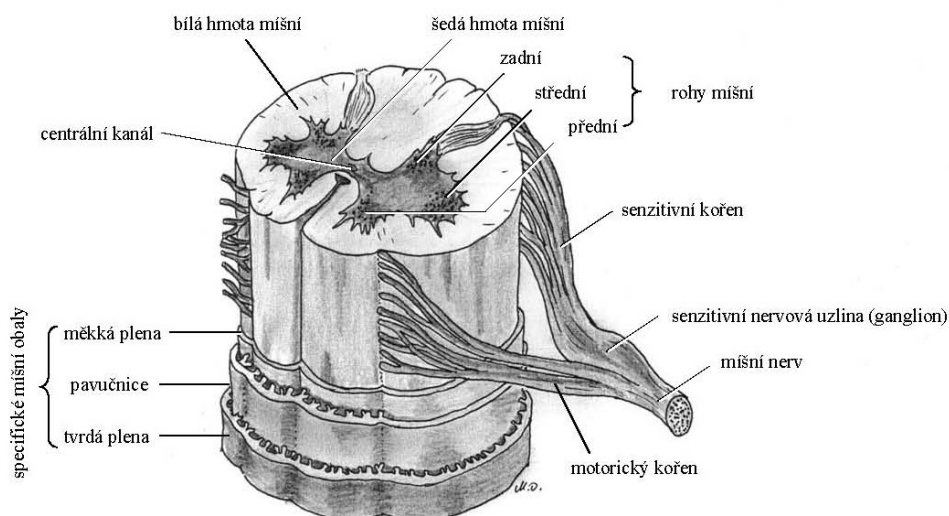
Nervová soustava se skládá z mozku, míchy a systému neuronů. Jejím úkolem je přijímání a vysílání signálů a přenos informací po celém těle. [1]

1.1 Mícha

Jedná se o sloupec nervové tkáně, který je chráněn obratli a meziobratlovými ploténkami. [2] Je dlouhá 40 - 50 cm, široká 10 - 13 mm [4] a je tvořena tzv. šedou (vnitřní část, tvarem připomíná motýla) a bílou hmotou míšní. Mícha probíhá mezi prvním krčným obratlem a končí u druhého bederního obratle. Mezi nimi z míchy vybíhají provazce míšních nervů a tím je umožněna inervace celého organismu. Nervy přenášejí informace o tom, co tělo cítí, prostřednictvím míchy do mozku, který informaci zpracuje a vyšle signál k reakci do svalů. [2]

1.1.1 Anatomie míchy

Mícha se dělí na míšní segmenty - úseky, ze kterých vybíhají kořenová vlákna pro jeden pár míšních nervů. Segmenty se označují dle jejich umístění, každá část páteře obsahuje jiný počet míšních segmentů: 8 krčních, 12 hrudních, 5 bederních, 5 křížových a 1 kostrční. [5] Celkem z míchy vybíhá 31 párů míšních nervů. [4] Míšní nervy probíhají sestupně a skládají se z různých vláken – motorických, senzitivních a vegetativních. [5]



Obr. 1.1-1 Stavba páteřní míchy [6]

Zaměříme-li se na průřez míchou (Obr. 1.1-1), uprostřed nalezneme tzv. centrální kanál. Kolem něj se nachází šedá hmota míšní, jejíž tvar připomíná motýlí křídla. V předních rozích míšních jsou umístěny motorické buňky (motoneurony), které zajišťují inervaci příčně pruhované svaloviny. V postranních rozích míšních nalezneme buňky vegetativních vláken a v zadních míšních rozích se nacházejí nervová jádra. Z nich míří výběžky buď do mozku, nebo k motorickým buňkám. Šedou hmotu obklopuje bílá hmota míšní, která je tvořena několika provazci – výběžky nervových buněk (nervovými drahami). [5]

Na povrchu je mícha kryta dvěma měkkými plenami míšními, mezi nimiž je prostor vyplněný mozkomíšním mokem, a tvrdou plenou míšní. [4]

1.1.2 Nervové dráhy

Nervové dráhy jsou provazce nervových vláken spojujících části CNS. Dále se zaměřím na míšní nervové dráhy, a sice tzv. projekční, které spojují centra nervové soustavy nacházející se v různých vertikálních úrovních. Míchou prochází některé zkříženě, některé nezkříženě. [5]

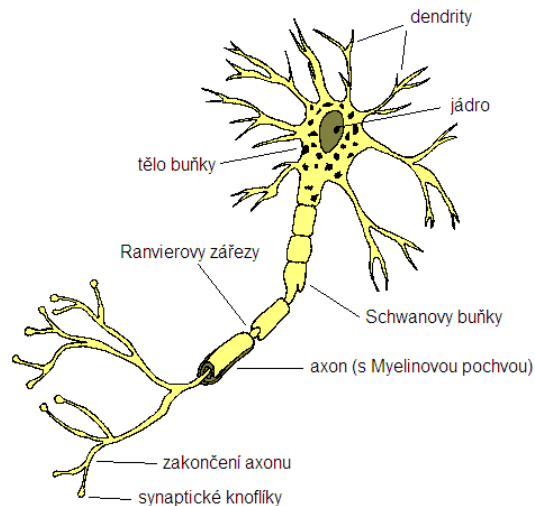
Míšní nervové dráhy jsou umístěny v přesně daných oblastech míchy. Dělí se na dráhy ascendentní (senzitivní, dostředivé) a dráhy descendentní (motorické, odstředivé). Motorické nervové dráhy probíhají v předních a postranních míšních provazcích, senzitivní dráhy v zadních provazcích míšních. Každá senzitivní dráha je specializovaná na přenos určitých vzruchů – některé dráhy přenášejí tlakové a dotykové vjemy, jiné tepelné, atd. Motorické dráhy přenášejí signály z mozku vedoucí k provedení volných pohybů. [5]

Při porušení senzitivních drah dochází ke ztrátě kožní citlivosti, vnímání bolesti a tepla na opačné straně pod místem poškození, v závislosti na tom, která nervová dráha je porušena. Poškození motorických drah (např. pyramidové dráhy míšních nervů) vede ke ztrátě schopnosti vůlí ovládat pohyby na opačné straně těla pod místem poškození. [5]

1.2 Nervové buňky

Nervové buňky, označované také jako neurony, tvoří v prostoru jakousi síť. Navzájem spolu komunikují prostřednictvím výběžků, na jejichž koncích jsou kontaktní útvary zvané synapse. Ze synapse se do mezibuněčné (synaptické)

štěrbiny vylučuje mediátor, který působí na stěnu druhé buňky a zajistí tak chemický přenos informací. Kromě chemického přenosu se v některých částech CNS (např. v mozku) uplatňuje i elektrický přenos informací. Neuron se dá rozdělit na dvě základní oblasti – dendrity, kterými přijímá vzruchy (tzv. recepční zóna), a axon (neurit), kterým je vzruch veden buňkou dále (tzv. vodivý aparát buňky). [4]



Obr. 1.2-1 Stavba neuronu [7]

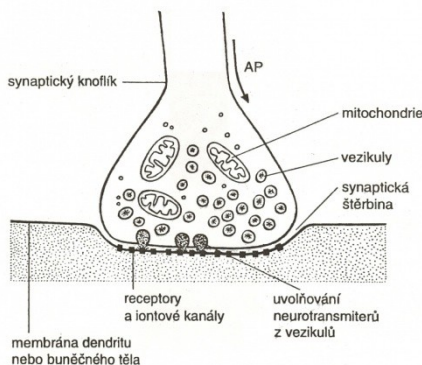
Nervové buňky mohou mít různé tvary, velikosti i počty dendritů. Podle těchto parametrů se dělí na neurony multipolární hvězdicovitého tvaru díky většímu počtu dendritů, bipolární s jedním axonem a jedním dendritem, pseudounipolární buňky, které mají spojený neurit s dendritem, unipolární buňky bez dendritu, jen s recepčním výběžkem a buňky bez axonu, které mají jen dendrity. Dle tvaru se označují jako buňky pyramidové, hvězdicovité, vřetenovité, apod. [4]

Z každého neuronu vystupuje jen jeden axon. Jeho délka může být různá a může dosahovat až délky nad 1 m. V průměru mají axony mezi 0,05 – 20 μm . Na povrchu jsou kryty myelinovou pochvou, případně ještě tzv. Schwannovými buňkami. [4]

1.2.1 Činnost neuronu

Vlivem podnětu, ať už se jedná o elektrický, chemický, nebo mechanický, vznikne vzruch (impuls). Vzruch poté putuje po axonu až k jeho koncovým výběžkům, kde se nacházejí synapse. Pomocí nich je vzruch přenesen přes synaptickou štěrbinu k příjemci - dendritům další nervové buňky, svalové buňce,

apod. Tento děj je umožněn díky transportu iontů buněčnou membránou a tím způsobeným změnám elektrického membránového potenciálu. [4]



Obr. 1.2-2 Synapse a přenos nervového vzruchu [8]

Neuron může přijímat i více vzruchů najednou, je to dáno velkým povrchem dendritů, jež jsou pokryty 0,5 – 2 μm dlouhými výběžky (trny). [4]

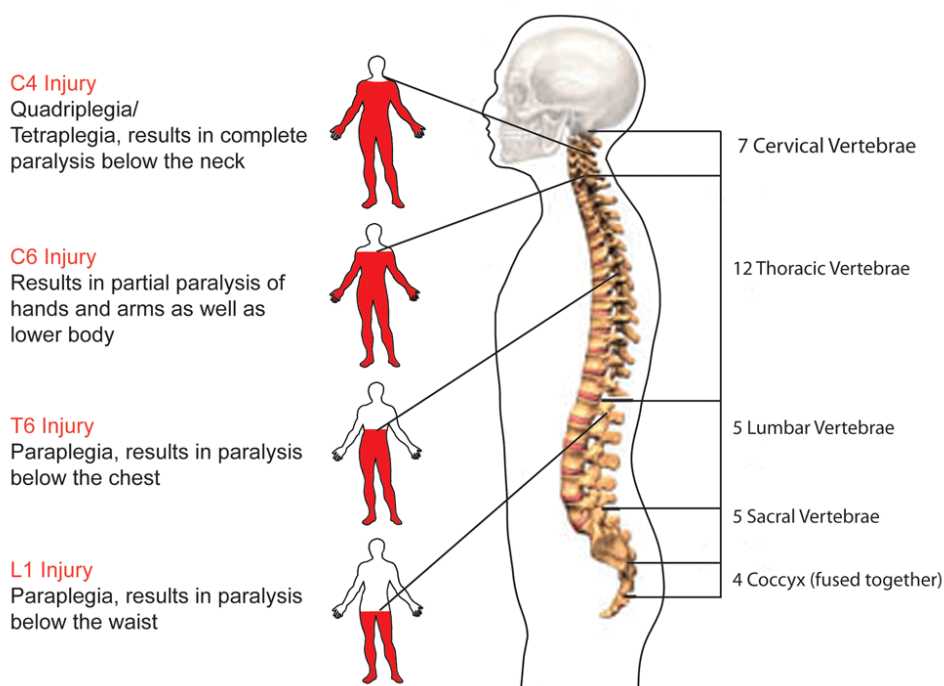
1.2.2 Poškození a regenerace nervové buňky

Diferencované nervové buňky se dále nedělí, poškozený neuron tudíž nemůže být nahrazen jinou nervovou buňkou. Poškození těla neuronu a jeho zánik vede k odumření všech ostatních částí buňky. [4]

Poškození axonu způsobí jednak jeho odumření ve směru k synapsím a jednak degeneraci neuronu směrem k tělu buňky. Rozsah následného poškození těla neuronu je dán vzdáleností poškození axonu od těla buňky. Je-li poškození blízko těla, buňka většinou zanikne. Je-li axon poškozen dále, po několika dnech dojde k zániku části synapsí a po 1 – 2 týdnech dojde ke zduření buňky a její tělo se zaoblí. [4]

K regeneraci axonu může dojít, pokud buňka přežije poškození. Přibližně po 3 týdnech začne ubývat zduření těla buňky a po několika měsících může být buňka opět funkční. K tomuto procesu dochází prakticky jen v periferních nervech za přítomnosti velkého množství Schwannových buněk. Z pahýlu axonu začnou vyrůstat tenká pokračování axonů. Mnoho z tenkých vláken zahyne, ale některé dosáhnou zbytků myelinových pochev a Schwannových buněk, kterými se nechají vést až k cílovému orgánu. Následně ztloustnou a obnoví původní funkci axonů. [4]

1.3 Míšní léze



Obr. 1.3-1 Ztráta citlivosti v závislosti na lokalizaci míšní léze [9]

Při poškození míchy je tok informací přerušen a mozek nedostává signály, co se děje s tělem pod úrovní poranění. Je postižena citlivost pod danou oblastí, pohyb, ale také funkce střev, močového měchýře, někdy jsou s poraněním spojené i problémy s dýcháním. Nejčastěji dochází k míšní lézi v důsledku úrazu, ale může k ní dojít i v souvislosti se zdravotními komplikacemi – tumory, degenerativními a zánětlivými onemocněními, aj. [2]

Míšní léze může být buď kompletní, nebo částečná. U kompletní léze jsou signály blokovány úplně, kdežto u částečné léze může být zachována část citlivosti či pohyblivosti, což závisí na rozsahu poškození. V dnešní době je toto poranění neléčitelné, ačkoli v některých případech se dá rehabilitací docílit jistého zlepšení. [9] Součástí rehabilitace jsou cvičení pro posílení svalstva, ale také elektrostimulace, antiedemózní léčba, aquaterapie, aj. [10]

1.4 Regenerace nervového systému

Poškození míchy bylo odnepaměti považováno za nevratné a neléčitelné onemocnění. Již v 19. století však Theodor Schwann zaznamenal jisté známky regenerace nervových buněk u králíků. Podobně by se podle R. S. Cajala měl snažit regenerovat nejen periferní nervový systém, ale také centrální. Věřil, že implantace

části periferních nervů by mohla pomoci regeneraci CNS. Pozornost vědců se k úrazům míchy obrátila až po druhé světové válce, kdy byla šance raněných na přežití díky pokrokům medicíny vyšší. [11]

V 60. letech byl objeven první z růstových faktorů, nervový růstový faktor (NGF). [11] [12] Růstové faktory jsou nezbytné pro růst a přežití nervových buněk, ovlivňují vývoj a funkčnost jejich výběžků. Těchto faktorů existuje celá řada, např. mozkový růstový faktor (BDNF), neurotrofní faktory, aj. V poslední době se zkoumají možnosti jejich využití pro léčbu neurodegenerativních chorob, jako je Alzheimerova, či Parkinsonova choroba, ale i schizofrenie aj., i míšních lézí. [12] Růstové faktory a jejich účinky na různé buňky zatím nejsou zcela známé a jsou stále předmětem zkoumání. Zřejmě ale nejsou jediným prvkem ovlivňujícím regeneraci nervové tkáně, podle některých výzkumů organismus obsahuje rovněž látky potlačující růst nervových buněk a maří snahy o léčbu poškozené tkáně. [11]

Jednou ze zkoumaných možností regenerace je metoda, kde nervy obrostou kolem léze a znovu se spojí se správným nervem. Tento proces je řízený proteiny zvanými netriny, které jsou produkovány mozkovými buňkami a řídí migraci a růst nervových buněk správným směrem. [11]

Dalšími ideami, kterými se vědci zabývají je například použití „neurálního lepidla“, které by spojovalo konce poškozených axonů; úspěšně bylo vyzkoušeno na morčatech, kterým částečně pomohlo obnovit funkce bezprostředně po zranění míchy tlakem (spinal cord compression injury). [13] Další vizí je použití fibroblastů, které by lézi přemostily a produkcí neurotrofinu stimulovaly růst nervů. [11] [14]

Na univerzitě v Indianě zkoumali vliv elektrické stimulace na růst nervové tkáně. Psům aplikovali stimulátor vysílající slabé elektrické pulzy k místu poranění páteře a podporuje tak regeneraci a orientaci poškozených nervů. Přibližně ve třetině případů došlo ke zřetelnému zlepšení. [11] [15]

Zkoumají se také látky, které při podání po úrazu zmírňují následky léze. Například podání velké dávky methylprednisolonu (kortikosteroid s protizánětlivými a imunosupresivními účinky) do 8 hodin po úrazu může zmírnit následky míšní léze. Tato metoda je v medicíně již praktikována. Další látky buď chránící nervy, nebo zvyšující jejich schopnost přenášet signály jsou zatím testovány na zvířatech. [11][16]

Velkým průlomem byl pokus na univerzitě ve Philadelphii, kde transplantovali nerv na místo míšní léze. V kombinaci s aplikací enzymů, které rozrušují zjizvenou tkáň, se podařilo vrátit citlivost a dokonce i pohyblivost končetin. Průlomem je, že tuto metodu lze aplikovat jak u zvířat čerstvě raněných, tak se starší lézí. Ještě nějaký čas však potrvá, než bude možné tuto metodu použít na lidech. [11][17]

CNS má určitou, i když poměrně malou schopnost regenerace. Proto šance, že budeme schopni ji uzdravovat, nejsou úplně mizivé, ačkoli k tomu vede ještě dlouhá cesta. Klíčovým krokem bude pravděpodobně objevit, jak nejlépe využít terapii kmenovými buňkami v kombinaci s cíleným transportem léčiv a jakými zásahy aktivovat regeneraci nervů. [11]

Italský tým vědců vyvinul náhradu nervu v podobě trubičky z PCL/PLGA. Přiklonili se k biodegradabilnímu materiálu, aby se vyhnuli druhé operaci nutné k odstranění graftu. Pokud by náhrada zůstala v těle, mohla by způsobovat problémy, jako například chronické reakce tkáně na náhradu nebo nervovou kompresi. Trubičku aplikovali krysám s 10 mm dlouhým porušením sedacího nervu za účelem vést nové nervové výběžky správným směrem a zaznamenali lepší regeneraci oproti krysám bez náhrady, u kterých došlo k atrofii a degeneraci nervové tkáně. [18]

Vědci z univerzity v Singapuru zkoumali scaffoldy z nanovláken směsi PCL a želatiny v různém poměru. Dokázali, že vlákna se 70 % PCL a 30 % želatiny podporují diferenciaci a proliferaci nervových buněk. V případě orientovaných vláken zjistili, že neurity rostou paralelně s vlákny. [19]

Používání náhrad pro regeneraci míšních poranění zatím není běžnou medicínskou praxí, řešení této problematiky je v dnešní době jen ve fázi výzkumu.

Pro výrobu náhrady nervové tkáně je nutné nalézt materiál, který by poskytl ideální prostředí pro adhezi a proliferaci nervových buněk. Kromě vhodného tvaru, aby napodoboval extracelulární matrix, by měl být biodegradabilní a biokompatibilní, nevyvolávat reakci imunitního systému, v ideálním případě by měl být také vodivý. Výhodou by byla též možnost dodávat buňkám růstové faktory a eliminovat komplikace spojené s poškozením nervové tkáně. [20]

2 Regenerativní medicína

Regenerativní medicína je obor rozvíjející se posledních několik desítek let. Jelikož v některých případech není možné obnovit buňky či tkáň běžnou léčbou, začali se vědci zabývat aplikací buněk a aktivních látek, které umožní tělu se zregenerovat. [21]

Uplatnění by tato metoda našla především v oblastech medicíny, které nyní neumíme jinak řešit, například u Alzheimerovy či Parkinsonovy choroby a jiných neléčitelných nemocí. Velmi užitečná by také byla při vážných poraněních, kdy jsou transplantace prakticky nemožné, ať už z důvodu nevhodných dárců nebo dokonce proto, že neumíme daný orgán nahradit (například míchu a nervovou tkáň). [21] Široké uplatnění by našla při léčbě těžkých popálenin, nemocí pohybového aparátu, degenerativních onemocnění, onkologických onemocnění, aj. [22]

Regenerativní medicína využívá několika oborů, které se velmi prolínají. Jedná se o buněčnou terapii a tkáňové inženýrství, při praktické aplikaci se hojně využívají poznatky z oblasti nanotechnologií. [21]

2.1 Buněčná terapie

Principem buněčné terapie je náhrada defektních buněk případně podpora růstu buněk nových. Největší potenciál pro buněčnou terapii mají zřejmě buňky kmenové (SC). Mají totiž velkou schopnost dělení a sebeobnovy, tudíž mohou vznikat stále nové buňky. Dále je jejich výhodou schopnost diferenciací a mohou se tedy stát typem buňky, který je v jejich okolí. Kmenové buňky lze dále rozdělit na embryonální a dospělé. Embryonální SC a jejich použití v dnešní době vyvolává mnoho diskuzí z hlediska etiky výzkumu. Naproti tomu i v dospělosti lze získat SC - mezenchymální kmenové buňky (MSC), a to hlavně z kostní dřeně, ale také z tukové tkáně. Jelikož se jedná o buňky z dospělého jedince, jejich použití není tak diskutabilní. [21][23]

Před samotným použitím jakékoli nové metody je nejdříve nutné jí porozumět. Ještě není přesně jasné, jakým způsobem se řídí dělení a diferenciací SC, proto se výzkumu věnuje celosvětově velké úsilí. [23] Použití SC totiž skýtá mnoho výhod: v první řadě jsou buňky snadno dostupné a hlavně je možné autologní použití, z čehož plyne, že by měly být bez problémů přijatelné tělem

pacienta a eliminuje se imunitní reakce těla na cizí tkáň, snadno se kultivují a nevytvářejí nádory. [21]

Oblast využití kmenových buněk je opravdu široká. Od popálenin přes artritidu po léčbu poranění a onemocnění nervového systému (Alzheimerova a Parkinsonova choroba, roztroušená skleróza, mozková mrtvice, aj.). [21]

Při studiích transplantace u zvířat byly MSC kultivované ex vivo po aplikaci schopny se diferencovat podle typu okolní tkáně, regenerovat poškozenou partii a částečně obnovit její funkci. Diferenciace se neomezuje pouze na úzký výběr tkání, ba naopak – může se vyvinout v meziobratlové ploténky, kosti, chrupavky, neurony, kůži, plíce, játra, střeva, ledviny, aj. Tyto výsledky jen potvrzují, jak velkým krokem by bylo plošné použití buněčné terapie v medicínské praxi. [23]

2.2 Tkáňové inženýrství

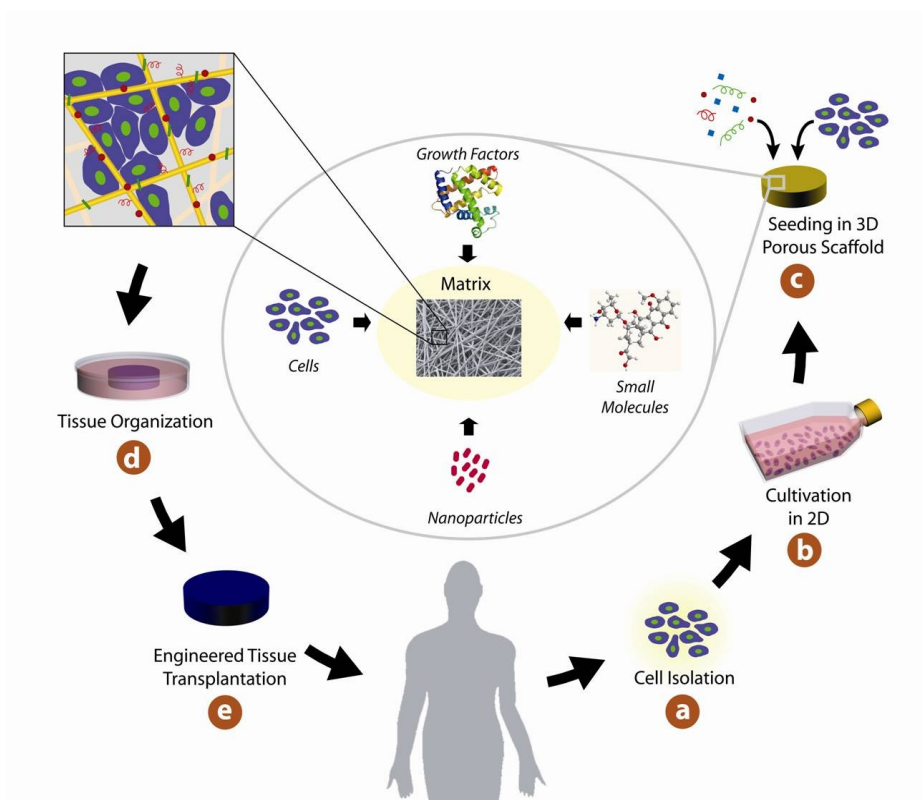
Tělo se v mnoha případech dokáže uzdravit samo, pokud ale dojde k příliš velkému poškození, je třeba zasáhnout. Zatím se náhrady tkáně řešily transplantacemi, ať už z vlastního těla (autotransplantace), jiného člověka (allografty), či dokonce jiného živočišného druhu (xenotransplantace). Tyto zákroky přinášejí mnoho nevýhod: ne vždy jsou transplantáty dostupné, pacient na ně musí čekat velmi dlouho a mohou nastat komplikace (např. reakce imunitního systému, přenos nemocí). V neposlední řadě je nutné zmínit, že ne všechna zranění a nemoci lze v dnešní době úspěšně vyléčit. Tyto problémy by mělo pomoci řešit právě tkáňové inženýrství. [24]

Tento obor kombinuje znalosti z medicíny, biologie a techniky a využívá je pro regeneraci a výrobu nových tkání, dokonce i celých orgánů. Zabývá se možnostmi různých materiálů a jejich využitím, důležitá je především biokompatibilita (scaffold nesmí mít nežádoucí účinky na organismus, nesmí být toxický) a biodegradabilita (často je žádoucí, aby se nosič sám postupně rozložil, není pak nutná operace kvůli jeho odstranění). [24][25]

K vytvoření vhodného scaffoldu, zajišťujícího vhodné prostředí, můžeme použít materiály přírodního původu, syntetické nebo kombinaci obou. Při implantaci náhrady se uplatňují 2 metody. Při použití tzv. celulární strategie je scaffold mimo tělo osazen buňkami, například odebranými z poškozené tkáně

pacienta nebo nově diferencovanými kmenovými buňkami, a následně je implantován pacientovi, naproti tomu při použití acelulární strategie se aplikuje samotný scaffold bez buněk. Když nosič poroste novou tkání, postupně se rozloží a cizí látka je z těla vyloučena, není tedy nutné scaffold chirurgicky odstranit. [26] [24]

Je důležité, aby scaffold svým složením a strukturou podporoval adhezi a proliferaci buněk. Vzhledem k velikosti buněk je nutné zkoumat strukturu materiálu na úrovni velmi malých rozměrů, prvky v nano- a mikro-měřítku (póry, výstupky, vlákna,...) hrají v životě buňky velkou roli. Scaffold by měl ideálně napodobit strukturu tkáně a systémem pórů umožňovat prorůstání buněk a difuzi potřebných živin a metabolitů. [24][27]



Obr. 2.2-1 Princip tkáňového inženýrství [28]: (a) izolace buněk, (b) kultivace, (c) nasazení na 3D porézní scaffold, (d) vytvoření tkáně, (e) transplantace tkáně do těla

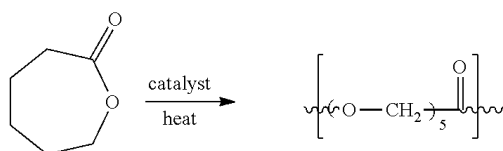
3 Materiály v tkáňovém inženýrství

Jak již bylo řečeno výše, v tkáňovém inženýrství se využívá mnoho různých materiálů, ať už přírodních nebo syntetických. Prvním faktorem, který hraje při výběru materiálu roli, je jeho biokompatibilita, aby byly buňky schopné na materiál adherovat a plnit svou funkci. Druhým posuzovaným faktorem je biodegradabilita – aby se scaffold nemusel chirurgicky odstraňovat a buňky přitom měly šanci vytvořit si svou přirozenou extracelulární matrix, musí se nosič rozložit na látky netoxické pro organismus a následně se vyloučit z těla. Důležité jsou také mechanické vlastnosti materiálu, jež by měly být velmi podobné originální tkáni. [27]

V dalších kapitolách se blíže podíváme na materiály, jež byly použity v této práci.

3.1 Polykaprolakton

Polykaprolakton je lineární alifatický polyester s nízkým bodem tání (kolem 60 °C) a nízkou teplotou skelného přechodu ($T_g = -62$ °C) [32][29], což zajišťuje pružnost při pokojové a tělesné teplotě. PCL je často využíván v tkáňovém inženýrství, jelikož je biokompatibilní, biodegradabilní a netoxický materiál, a to i přes své hydrofobní vlastnosti, které snižují afinitu buněk k materiálu. [30] Hydrofobní vlastnosti také přispívají k poměrně dlouhému času degradace. [32]



Obr. 3.1-1 Schéma výroby polykaprolaktonu z ϵ -kaprolaktonu [31]

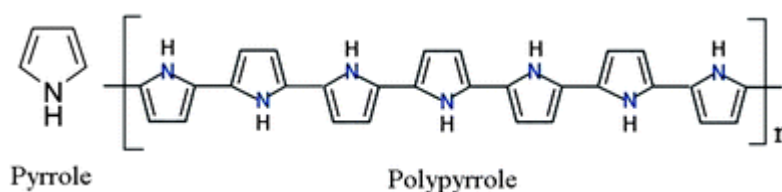
PCL se vyrábí polymerací za otevření cyklu ϵ -kaprolaktonu. [30] Degradace PCL je způsobena hydrolytickým rozštěpením esterových vazeb v řetězci. Řetězec se tak rozštěpí na menší fragmenty, které jsou pohlceny při fagocytóze. [32][32][33] Doba degradace závisí mimo jiné na velikosti povrchu vystaveného vnějším vlivům – nanovlákná degradují rychleji, než shluky polymeru. [32]

Vzhledem ke své biokompatibilitě, nízké ceně a univerzálnímu využití pro výrobu scaffoldů různými metodami, se těší velké oblibě v oblasti tkáňového inženýrství. [32] Ke zvýšení afinity buněk k materiálu se využívá potažení PCL vhodnou vrstvou nebo kombinací PCL s jinými materiály za vzniku kopolymerů.

Například kolagen, který nemá vhodné mechanické vlastnosti pro tvorbu samostatných vláken, ale jako podklad pro růst buněk je velmi vhodný, v kopolymeru s PCL získá požadované mechanické vlastnosti a zároveň si zachová vliv na lepší adhezi buněk. [32][34] PCL v kombinaci s Ca-P je využitelný v náhradách kostí, jelikož má lepší mechanické vlastnosti a Ca-P pomáhá napodobit originální tkáň obsahující minerální krystaly. [32][35] Podobně i kombinací jiných materiálů získá kopolymer vlastnosti z obou polymerů, pozitivní vlastnosti se zkombinují a negativní vlastnosti se mohou kompenzovat. [30]

3.2 Polypyrrol

Polypyrrol je polymer, jenž se vyrábí z heterocyklické sloučeniny pyrrolu. Pyrrol je bezbarvá kapalina s bodem tání $t_t = -24\text{ °C}$ a bodem varu $t_v = 131\text{ °C}$. [36] [37] Vystavením vzduchu a světlu samovolně polymeruje a kapalina mění barvu na hnědou. V přírodě se běžně vyskytuje v černouhelném dehtu a v živých organismech – je součástí například chlorofylů a hemoglobinu. [38] [37]



Obr. 3.2-1 Pyrrol a polypyrrol - vzorec [39]

Polymerace probíhá radikálovým mechanismem. Nejprve vlivem oxidačního činidla nebo elektrického pole dojde ke vzniku pyrrolového radikálu, který reaguje s dalšími radikály, či molekulami pyrrolu a vzniká řetězec polymeru. Jeho délka velmi závisí na postupu a podmínkách polymerace. Obecně existují dva postupy – metoda elektrochemická a metoda chemická. Elektrochemickou metodou sice lze připravit polypyrrol s vyšší elektrickou vodivostí, ale příprava je složitější a náchylnější na správné provedení a podmínky. [37][40][41] Každá z metod má své výhody i nevýhody, proto je vhodné předem zhodnotit, které vlastnosti mají pro daný účel větší význam. Při použití elektrochemické polymerace lze získat tenčí vrstvu polypyrrolu, než v případě chemické polymerace, avšak při použití chemické polymerizace lze vyrobit větší množství materiálu najednou a také je snazší vytvořit funkcionalizovanou vrstvu polypyrrolu. [42]

Čistý polypyrrol má poměrně špatné mechanické vlastnosti, proto se častěji používá do kompozitních materiálů a jako materiál na povlaky různých substrátů. Jelikož se dají polymerizovat i substituované deriváty pyrrolu, kromě elektrické vodivosti se může povrch substrátu funkcionalizovat a získat tak další výhodné vlastnosti. [37]

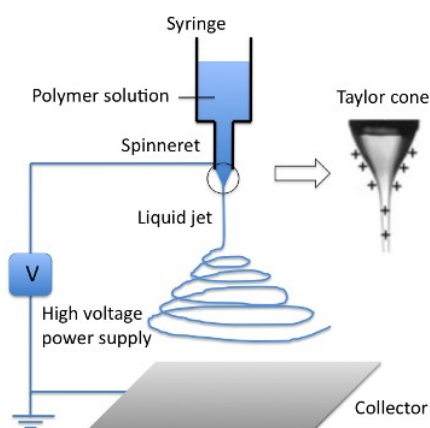
Díky chemické stabilitě, velmi dobrým elektrickým vlastnostem a cytocompatibilitě nachází polypyrrol uplatnění v oblasti polovodičů, polymerních baterií a také v medicíně, například pro výrobu vodivých scaffoldů v tkáňovém inženýrství. [37][43] Mnoho typů buněk reaguje pozitivně na elektrickou stimulaci, zvláště se to týká nervových a svalových buněk, ale také například osteoblastů a fibroblastů, které vykazují větší proliferaci. [43][44] Polypyrrol lze rovněž použít jako substrát usnadňující komunikaci buněk navzájem, nebo komunikaci s mikroelektrodami, využitelných například při vývoji protéz. Bohužel polypyrrol není biodegradabilní a mohl by při dlouhodobém výskytu v organismu způsobit chronický zánět. [44] Je nutné prozkoumat reakci organismu na dlouhodobou aplikaci polypyrrolu a případně objevit jiný materiál, který by vykazoval kýžené elektrické vlastnosti a zároveň byl biodegradabilní.

4 Metody zvlákňování

4.1 Electrospinning

Electrospinning je zvlákňovací metoda, která je schopna vytvářet vlákna s průměry v rozmezí 50 - 1000 nm. [45] Tato vlákna se v literatuře již označují pojmem nanovlákna. Oproti běžným vláknům se nanovlákna vyrobená touto metodou vyznačují pórovitostí a velkým povrchem a jsou obzvláště vhodná pro použití v nanokatalýze, filtraci, tkáňovém inženýrství, aj. Díky schopnosti vytvářet stabilně vlákna požadovaného průměru a univerzálnosti, co se týká použitých polymerů, se osvědčila k výrobě nanovláknenných materiálů metoda electrospinning. [46]

Tato metoda využívá ke zvlákňování elektrostatické síly. Polymerní vlákna jsou tažena mezi dvěma opačně nabitými elektrodami, jedna (kladná) je v roztoku polymeru a druhá (záporná) je umístěna v prostoru kolektoru. [47] Do zvlákňovací trysky je nadávkováno určité množství roztoku. [46] Působením vysokého napětí se roztok polymeru nabije, na povrchu kapky vznikne Taylorův kužel, z jehož špičky je odtahováno nanovlákno směrem k místu s nižším potenciálem (kolektoru). Polymer cestou ke kolektoru tuhne, rozpouštědlo se odpařuje a vznikají vlákna. [47] Vysoce viskozní roztoky vytváří chaoticky rozmístěná vlákna, má-li roztok příliš malou viskozitu, místo vláken se utvoří kapky. [46] Vlastnosti vláken závisí na molekulové hmotnosti a viskozitě roztoku, ale také na vzdálenosti elektrod. Je-li totiž vzdálenost ke kolektoru příliš krátká, nestihne se rozpouštědlo odpařit a vlákna se lepí k elektrodám i k sobě navzájem. [47]



Obr. 4.1-1 Schematické zobrazení electrospinningu [48]

V posledních letech jsme mohli zaznamenat rozmach electrospinningu, zřejmě v souvislosti s rostoucím zájmem o nanotechnologie a nanovláknenné materiály. Velkou výhodou této metody je univerzálnost, co se týká vstupních polymerních materiálů, a schopnost snadno vytvořit vlákna se submikronovými až nanometrovými průměry. [47]

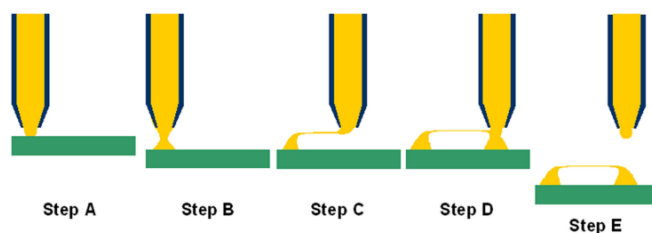
4.1.1 Nanospider

Vědecký tým profesora Oldřicha Jirsáka z TUL zjistil, že k elektrostatickému zvlákňování není potřeba tryska, či kapilára. Vyvinuli tak technologii Nanospider, která je založena na zvlákňování z tenké vrstvy polymeru. Takto je možné vyrobit organická i anorganická nanovláknna z roztoků či taveniny. [49]

Princip je založen na objevu, že při nabití tenké vrstvy polymeru vznikne na povrchu kapaliny velké množství trysek, ze kterých jsou produkována nanovláknna. [50] Na povrchu rotujícího válce ulpívá slabá vrstva kapaliny, která je vlivem vysokého elektrického napětí nabíjena. Přesáhne-li napětí kritickou hodnotu, vzniknou na povrchu kapaliny trysky. Za účelem optimalizace produkce byly kromě válce vyvinuty i jiné tvary elektrod. [51]

4.2 Drawing

Drawing je metoda výroby samostatných vláken. Hlavní výhodou je možnost dloužit vlákna jednotlivě. Lze tak dosáhnout orientovaných vláken požadované délky (až desítky centimetrů), což přináší mnoho možností využití v různých oblastech od nano-optiky a nano-elektroniky po tkáňové inženýrství. [52][53]



Obr. 4.2-1 Schéma vzniku vlákna metodou drawing [53]

Vlákno vzniká tak, že se kapky roztoku nebo taveniny polymeru, umístěné na podložce, dotkne kapilára. Jakmile se začne ústí kapiláry odtahovat, vzniká mezi ním a kapkou vlákno o tloušťce v řádu nanometrů až mikrometrů. Díky veliké ploše vlákna se může rozpouštědlo z roztoku rychle vypařit a vlákno tuhne.

[52][54] Při zvlákňování z taveniny je tuhnutí vlákna způsobeno ochlazením. [55] Z každé kapky lze proces tažení několikrát opakovat. S postupným vypařováním rozpouštědla se však mění viskozita roztoku, tedy i schopnost vlákna snést síly na něj působící a následnou deformaci.

Vlastnosti vlákna silně závisí na rychlosti zvlákňování, rychlosti chlazení či vypařování rozpouštědla a přesném složení roztoku. Optimální viskozity pro dlužení se dá dosáhnout ovlivněním rychlosti vypařování rozpouštědla z roztoku. [55] Pro zmenšení průměru vláken je dle článku [55] vhodné použít roztok s kratšími molekulami polymeru (nižší molekulovou hmotností) místo dlouhých řetězců.

Ruční tažení vláken je náročné nejen časově, ale také je problematické zajistit stabilní podmínky – přesně stejné dávkování polymeru, rychlost dlužení, atmosféra, aj. Proto byl na Technické univerzitě v Liberci za spolupráce katedry netkaných textilií (FT) a katedry kybernetiky (FS) navržen a sestaven stroj na dlužení vláken, tzv. mikromanipulátor. [56] Tento přístroj umožňuje plynule tahat vlákna po určené trajektorii až 600 mm dlouhá, ačkoli takto dlouhá vlákna jsou již velmi náchylná k porušení a je téměř nemožné je uchovat bez opory. Proto se vlákna pokládají na podložku. [57]



Obr. 4.2-2 Zařízení mikromanipulátor [58]

5 Principy použitých testovacích metod

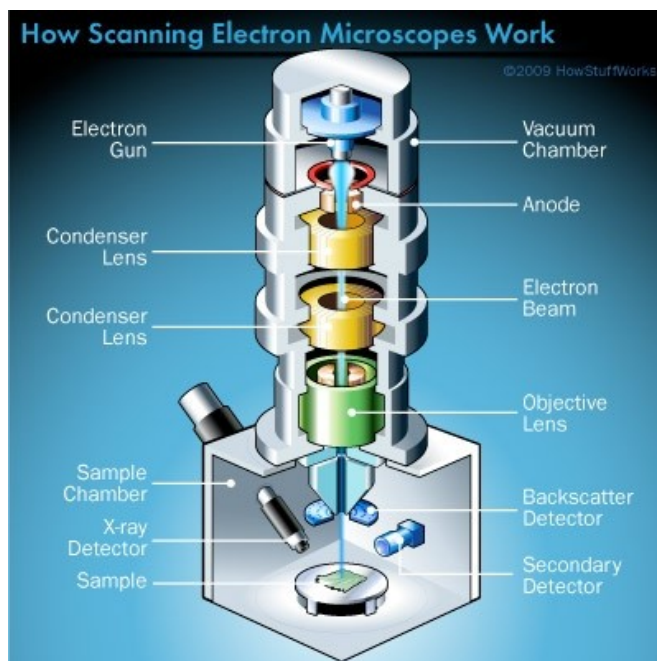
5.1 MTT test

MTT test je kolorimetrické stanovení metabolické aktivity (viability) buněk. Žlutý roztok MTT je přidán k buněčné kultuře a následuje inkubace po dobu 1 - 4 hodin při 37 °C. MTT je metabolismem živých buněk redukováno na fialový formazan a jeho množství vypovídá o aktivitě dýchacího řetězce a tedy i o viabilitě a množství živých buněk. Množství formazanu se stanovuje měřením absorbance ve spektrofotometru při vlnové délce 570 - 630 nm, čím vyšší je absorbance záření, tím vyšší je aktivita buněk. [59][60]

Formazan se vylučuje ve formě krystalků většinou na povrchu buněk a substrátu, proto se musí nejdříve důkladně rozpustit. Pro tento účel se používá řada metod, aby se kromě rozpuštění stabilizovala barva, omezilo vypařování a interference s různými složkami média, např. okyselený isopropanol, DMSO (dimethylsulfoxid), dimethylformamid, aj. Okyselením se změní barva fenolové červení (indikátor, který se přidává do média) a ta poté méně ovlivňuje výsledky měření. [59]

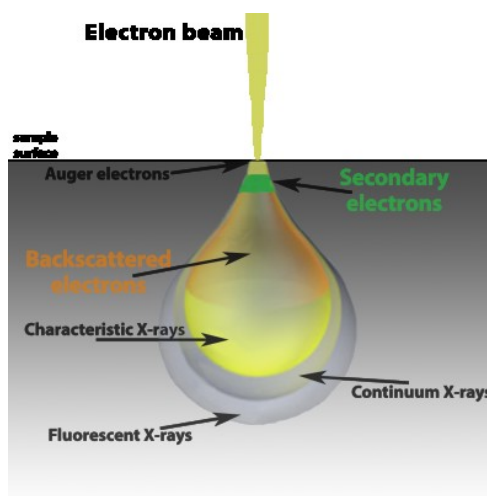
5.2 Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM)

Rastrovací, nebo také řádkovací, či skenovací elektronová mikroskopie využívá svazku elektronů urychlených napětím ke snímání povrchu vzorků. Zmíněné snímání probíhá nepřímo prostřednictvím sekundárních (SE) a zpětně odražených (BSE) elektronů dopadajících na detektor. Výsledkem je trojrozměrný obraz povrchu vzorku vznikající po řádkách. [61]



Obr. 5-1 Rastrovací elektronový mikroskop [62]

Na vzorek dopadá s vysokou energií primární svazek elektronů, interaguje s povrchem vzorku a vyráží z něj elektrony rozlišované podle hloubky, ze které byly vyraženy. V SEM se využívá tzv. sekundárních a zpětně odražených elektronů. V závislosti na topografii, struktuře a chemickém složení vzorku interagují elektrony s povrchem jinak a na detektor dopadá různá intenzita signálu, která se projeví jako kontrast v obrazu. Kontrast způsobený rozdílným chemickým složením se projeví při zobrazení BSE, topografický kontrast zase při zobrazení pomocí SE. V závislosti na kvalitě mikroskopu a jeho částí lze dosáhnout rozlišení v desítkách až jednotkách nanometrů. [63][64] [62]



Obr. 5.2-1 Interakční oblast vzorku při dopadu primárních elektronů [61]

Vzorek se připravuje jednoduše. Malý kus vzorku se přilepí na terčík, nejsou potřeba velké úpravy povrchu ani tloušťky, je však nutné zajistit, aby byl elektricky vodivý. Nevodivé vzorky se nabíjejí a dochází k deformaci obrazu i preparátu, to dá vyřešit například napařením vodivé vrstvy o tloušťce několika nanometrů. Aby nedocházelo ke zkreslení obrazu, pracuje se ve vakuové komoře, proto je dalším požadavkem, aby byl vzorek bez nečistot, stabilní ve vakuu a suchý, jinak hrozí poškození mikroskopu. Touto metodou je možné zkoumat jak anorganické nanomateriály, tak vzorky biologického původu (tkáně, pyl, části těla hmyzu,...). Biologické vzorky je nutné při přípravě důkladně vysušit. [63][64]

5.3 Optická mikroskopie

Vynález prvního mikroskopu je připisován Britovi Robertu Hookeovi a datuje se do 17. století. Od té doby prošel tento přístroj mnoha změnami až k dnešním moderním mikroskopům, jež nám umožňují sledovat objekty v různých zvětšeních, kontrastech,... a to vše za pomoci široké škály zobrazovacích technik. [65]

Optická mikroskopie využívá pro zobrazení spektrum viditelného záření, proto je také její zvětšení a rozlišovací schopnost omezena vlnovou délkou světla. [66]

Fluorescenční mikroskopie využívá jevu fluorescence, tedy jevu, kdy po ozáření dochází k přechodům elektronů mezi povolenými stavy atomu. Při přechodu na nižší energetickou hladinu dojde k vyzáření fotonu. [3]

Fluorofory jsou látky, které po ozáření světlem určité vlnové délky vyzáří světlo o větší vlnové délce. Při absorpci světla dojde v molekule fluorofory k excitaci a při přechodu na nižší energetickou hladinu je vyzářeno světlo o vlnové délce dané změnou energie. Dostanou-li se fluorofory do kontaktu s intenzivním světlem, dojde k tzv. fotovybělování, kdy jsou fluorofory rozkládány a ztrácejí schopnost fluorescence. [3]

Pro zviditelnění molekul bez schopnosti autofluorescence se používá fluorescenční barvení. Některé fluorofory se vážou na specifické buněčné struktury samy (DAPI), jiné jsou kovalentně vázány na látku, která zprostředkuje vazbu mezi buněčnou strukturou a fluoroforou (vazbu fluorofory umožní např. phalloidin, jenž se váže na aktinová vlákna). [3]

Fluorescenční mikroskopie má mnoho výhod oproti běžné optické mikroskopii, proto je důležitou součástí biologie a biomedicíny. Použitím řady fluorescenčních barviv, tzv. fluorochromů, lze pozorovat a identifikovat buňky a jejich složky v prostředí, které není fluorescenční. Navíc se může využít možnosti simultánního značení více barvami, které opticky odliší mikroskopické objekty. [59]

Kladem i záporem této metody může být autofluorescence vzorků, tedy schopnost fluoreskovat bez použití fluorochromu. Této schopnosti se dá dobře využít, například v oblasti botaniky nebo dokonce při studiu polovodičů. Může ale také znepříjemnit práci, když fluoreskují objekty, které nejsou předmětem zkoumání, vznikají problémy s jasně emitovaného záření, atd. Proto se více využívá barvení vzorků fluorochromy, které jsou excitovány specifickou vlnovou délkou a vyzařují se správnou intenzitou a barvou. [59]

III. Experimentální část

6 Použité materiály

6.1 Příprava nosiče

FeCl ₃	Sigma - Aldrich
Chloroform	Penta
Kyselina p-toluensulfonová	Sigma - Aldrich
PCL (M _n =70 000 - 90 000)	Sigma - Aldrich
Pyrrrol	Sigma - Aldrich

6.2 In vitro testování

3T3 Swiss albino	ATCC
BSA	VWR
DAPI	Sigma - Aldrich
DMEM	Lonza
FBS	Biosera
Fluoroshield™ with DAPI	Sigma - Aldrich
Glutaraldehyd	Sigma - Aldrich
KCl	Analytika
KH ₂ PO ₄	Analytika
MTT	
Na ₂ HPO ₄	Analytika
NaCl	Analytika
Phalloidin - FITC	Sigma - Aldrich
Propidium jodid	Sigma - Aldrich
Triton™ X-100	Sigma - Aldrich
Trypsin	Biosera
Antibiotika:	
Penicillin - Streptomycin - Amphotericin B	Lonza

6.3 Zásobní roztoky, média

Název	Složky	Další úpravy
DAPI	1 mg/ml v destilované vodě	
DMEM (médiu)	90 ml DMEM 10 ml FBS 1 ml antibiotika	Práce ve sterilním prostředí
Phalloidin (FITC)	1 mg/ml v methanolu	
MTT	2 g/l v PBS	Sterilizace přes stříkačkový filtr (póry vel. 0,2 µm)
PBS	800 ml destilovaná voda 8 g NaCl 0,2 g KCl 1,44 g Na ₂ HPO ₄ 0,24 g KH ₂ PO ₄	Úprava pH = 7,4 Sterilizace v autoklávu
Glutaraldehyd	2,5 % v PBS	

6.4 Přístroje a programy

Spektrofotometr ELx808 (BioTek)

LUNA Cell Counter, model L10001(Logos Biosystems)

Eclipse Ti-E (Nikon)

Vega3 SB - EasyProbe (Tescan)

Mikromanipulátor (FS TUL)

Bio II Advance (Telstar)

CO₂ inkubátor NB-203XL (N-Biotek)

Cirkulovaná digitální vodní lázeň (LabTech)

VIP series MDF-U33V (Sanyo)

Quorum Q150ES (Quorum)

NIS Elements AR

Microsoft Office Excel 2007

7 Postupy

7.1 Příprava roztoku polymeru

Pro tažení vláken pomocí drawingu byl použit 12 % roztok PCL v chloroformu. Pro přípravu 10 g roztoku polymeru bylo do vialky naváženo 1,2 g PCL ($M_n = 70\,000 - 90\,000$) a přidáno 8,8 g čistého chloroformu. Směs byla v uzavřené vialce míchána do druhého dne na magnetické míchačce při pokojové teplotě, dokud nevznikl roztok medové konzistence.

7.2 Měření průměru vláken

Průměry vláken byly měřeny pomocí programu NIS Elements AR, k tomuto účelu byly použity snímky ze SEM vhodného přiblížení. Pro každý typ vzorku byl naměřen soubor 100 vláken z několika různých částí vzorku.

7.3 Kultivace buněk 3T3

7.3.1 Rozmražení

Připravené médium DMEM bylo nahřáto ve vodní lázni na 37 °C. Buňky v kryozkumavce byly rychle rozmrazeny ve vodní lázni, celý obsah byl přenesen do plastové zkumavky o objemu 15 ml. Do zkumavky bylo pomalu přidáno 5 ml média a následovala centrifugace 5 min při 1200 rpm. Médium nad usazenými buňkami bylo slito, poté bylo přidáno 10 ml média a buňky byly v médiu resuspendovány. Následovalo stanovení počtu buněk na 1 ml média a buněčná suspenze byla rozdělena do kultivačních lahvíček. Do každé lahvičky bylo přidáno $5 \cdot 10^5$ buněk a 15 ml média.

7.3.2 Pasážování

Pasážování se provádí v laminárním boxu, když buňky pokrývají 70 - 80 % povrchu kultivační nádoby. Veškerý materiál potřebný k pasáži se před umístěním do boxu sterilizuje postřikem ethanolem.

Z kultivační lahvičky bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty cca 2 ml PBS pufru. Po odsátí pufru byly k buňkám přidány 2 ml trypsinu a kultivační lahvička vložena na 2 minuty do termostatu. Pod mikroskopem bylo zkontrolováno, jestli buňky již plavou v roztoku. Když buňky opustily dno lahvičky,

bylo přidáno 8 ml média DMEM a buňky byly důkladně resuspendovány. Na automatické počítače buněk bylo určeno množství buněk na 1 ml, následně byla suspenze buněk rozdělena do nových kultivačních lahvíček a do každé lahvičky přidáno 12 - 15 ml média.

7.3.3 Výměna média

Ve vodní lázni bylo ohřáto médium DMEM na 37 °C. Z kultivační lahvičky bylo v laminárním boxu použité médium odsáto a nahrazeno 15 ml čerstvého média vytemperovaného na 37 °C. Výměna se provádí dle potřeby přibližně každé 2 - 3 dny.

7.3.4 Nasazení buněk na vzorky

Vzorky byly nejprve sterilizovány v 70 % ethanolu po dobu 30 minut. Poté byly v laminárním boxu přeneseny do sterilních destiček (vzorky z Nanospideru do 96 jamkových destiček, vzorky z drawingu do 24 jamkových destiček) a několikrát promyty PBS. Ke každému vzorku byla přidána buněčná suspenze s požadovaným množstvím buněk (10^4 buněk na vzorky z Nanospideru a 10^5 buněk na vzorky z drawingu) a čerstvé médium. Množství média určené do jamky 96 jamkové destičky je 200 μ l, do 24 jamkové kultivační destičky je 1 ml.

7.4 MTT test

Pro testování byly pro každý testovací den použity 4 vzorky osazené buňkami, 1 vzorek bez nasazených buněk (negativní kontrola) a 4 jamky s nasazenými buňkami, ale bez nosiče (pozitivní kontrola).

Ve sterilním boxu bylo od vzorků a pozitivní kontroly odsáto staré médium a scaffoldy přeneseny do čistých jamek. Zabrání se tím sledování viability buněk přisedlých na dno a zkoumáme jen buňky adherované na scaffold. Každý vzorek byl zalit 150 μ l média DMEM, ke kterému bylo přidáno 50 μ l roztoku MTT. Vzorky byly ponechány v inkubátoru při 37 °C po dobu 3 hodin.

Po uplynutí stanovené doby bylo Pasteurovou pipetou odsáto médium s MTT ze všech vzorků i PC. Do jamek bylo přidáno 200 μ l okyseleného izopropylalkoholu a ponecháno 5 minut působit, aby se rozpustily krystaly formazanu. Poté byl

roztokem scaffold několikrát opláchnut a následně byl roztok přenesen do nových jamek.

Destička s roztoky byla umístěna do spektrofotometru, v němž se měřila absorbance při 570nm a 650nm. Výsledky byly exportovány do Excelu, kde byly dále zpracovány.

7.5 Příprava vzorků na SEM

Scaffoldy byly přemístěny do nové destičky a dvakrát promyty PBS. Poté byly buňky zafixovány působením 100 μ l glutaraldehydu, na vzorky z drawingu bylo použito 450 μ l glutaraldehydu, po dobu 10 minut v lednici. Poté byly vzorky zbaveny vody postupnou ethanolovou řadou. Vždy na 10 minut byly scaffoldy ponořeny postupně do 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 % a 100 % ethanolu. Nakonec se nechaly schnout na parafilmu, resp. v na držáku v destičce, do druhého dne.

Vysušené vzorky byly oboustrannou lepicí páskou připevněny na terčík a byla na ně nanesena 7nm vrstva zlata.

7.6 Příprava vzorků na fluorescenční mikroskopii

7.6.1 Barvení DAPI (Fluoroshield with DAPI)

Vzorky byly přeneseny do nové destičky, dvakrát promyty PBS a zafixovány vymraženým methanolem po dobu 10 minut. Poté byl methanol odsát a vzorky třikrát propláchnuty PBS, pufr byl odstraněn a na každý vzorek byla nadávkována kapka (cca 30 μ l) Fluoroshield with DAPI. S fluorescenčním barvivem je nutné pracovat za šera a vzorky po této proceduře chránit před světlem.

7.6.2 Barvení propidium jodidem

Vzorky byly přeneseny do nové destičky, dvakrát promyty PBS a fixovány vymraženým methanolem po dobu 10 minut. Následně byly třikrát propláchnuty PBS a ke každému bylo přidáno 500 μ l roztoku propidium jodidu. Po 15 minutách ve tmě a při pokojové teplotě byly vzorky ještě 3x propláchnuty PBS a uchovány v temnu.

7.6.3 Barvení phalloidinem + DAPI

Držáky s vlákny byly přesunuty do čisté destičky, dvakrát promyty PBS a fixovány 10 minut v lednici roztokem 2,5 % glutaraldehydu v PBS. Poté byly vzorky třikrát propláchnuty PBS a buňky byly permeabilizovány 0,1 % roztokem Tritonu X-100 v 0,1 % roztoku BSA v PBS. Bylo použito 400 μ l ke každému vzorku a ponecháno 5 minut při pokojové teplotě. Dále byly vzorky dvakrát promyty PBS a barveny 500 μ l roztoku phalloidinu (1 μ l zásobního roztoku phalloidinu v 1ml PBS) 30 minut ve tmě při pokojové teplotě. Následoval opět třikrát oplach PBS a barvení roztokem DAPI (1 μ l zásobního roztoku DAPI v 1ml PBS) 5 minut při pokojové teplotě. Po dalším trojím oplachu PBS byly vzorky připraveny k mikroskopii.

IV. Výsledky a diskuse

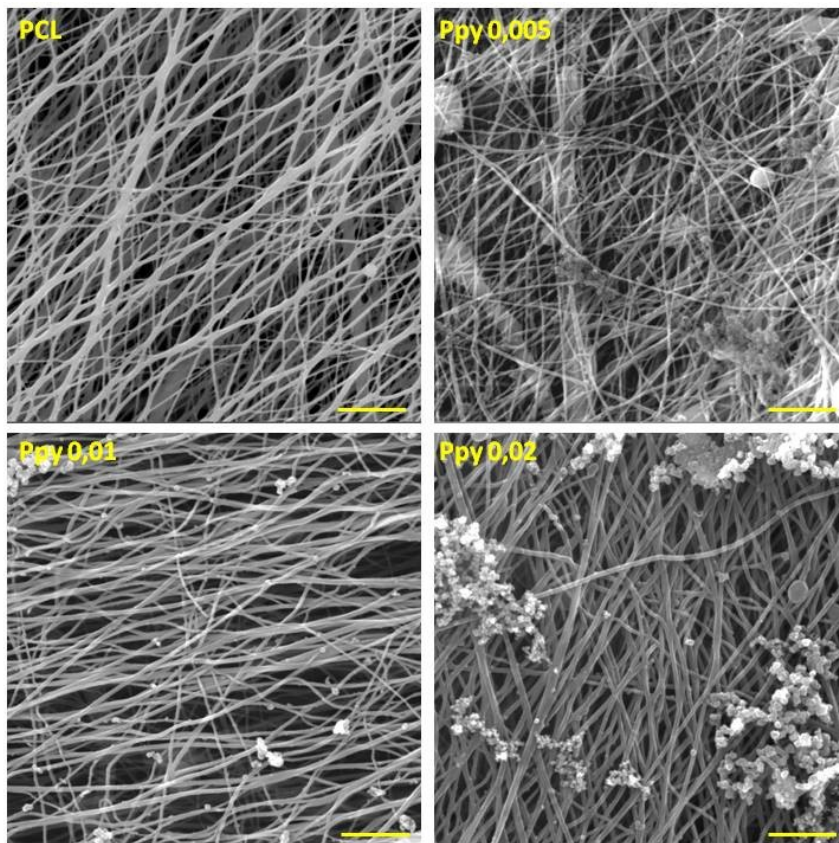
8 Testování nanovláken z electrospinningu

Nejprve byly provedeny in vitro testy na vzorcích nanovláken vytvořených metodou electrospinning na stroji Nanospider (16 % roztok PCL, $M_n = 45\,000$, ve směsi chloroformu a ethanolu v poměru 9:1, rychlost zvlákňování 10 mm/min) a následně potažených různou vrstvou polypyrrolu. Pro zjištění optimální vrstvy polypyrrolu byly testovány vzorky připravené za stejných podmínek (čas, teplota) v polymeračních roztocích o různých koncentracích pyrrolu: $c_1 = 0,005$ mol/l, $c_2 = 0,01$ mol/l, $c_3 = 0,02$ mol/l. Podle těchto koncentrací byly vzorky označovány (viz Obr. 8.1-1).

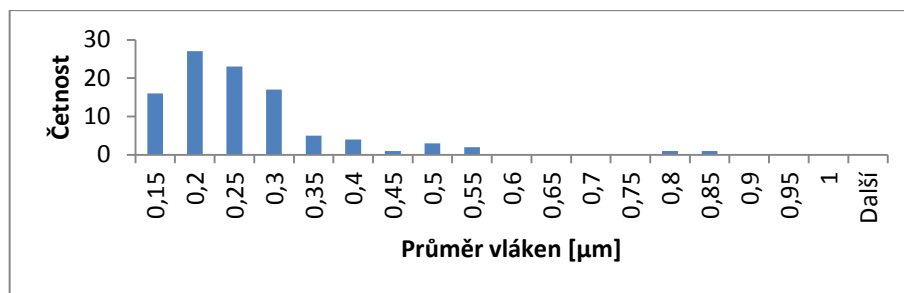
Při testování byla použita nanovláknina z výroby TUL a následně opatřena vrstvou polypyrrolu od Ing. Jana Lukáška (NTI).

8.1 Morfologická analýza vláken

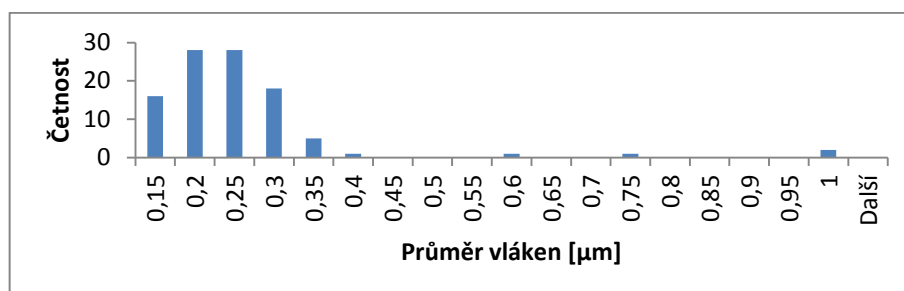
Hodnoty naměřené v programu NIS Elements byly dále zpracovány v programu EXCEL.



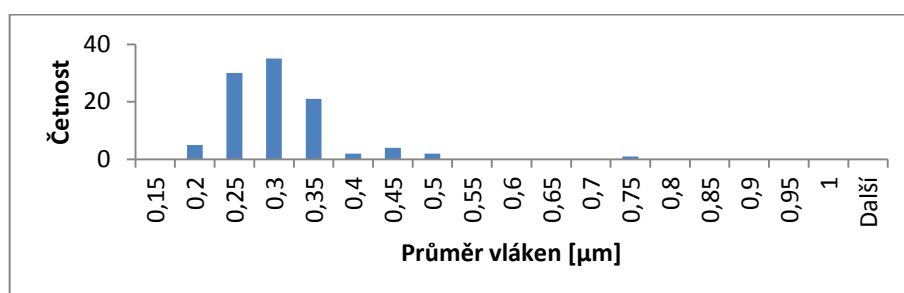
Obr. 8.1-1 Snímky SEM použitých materiálů, měřítko odpovídá 5 μm



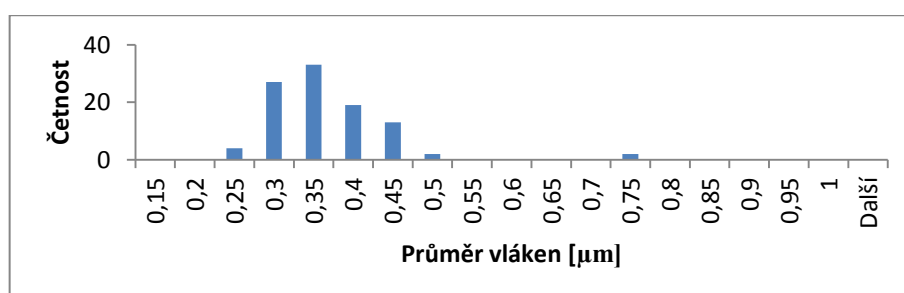
Graf 8.1-1 Histogram průměru vláken PCL



Graf 8.1-2 Histogram průměru vláken PCL Ppy 0,005



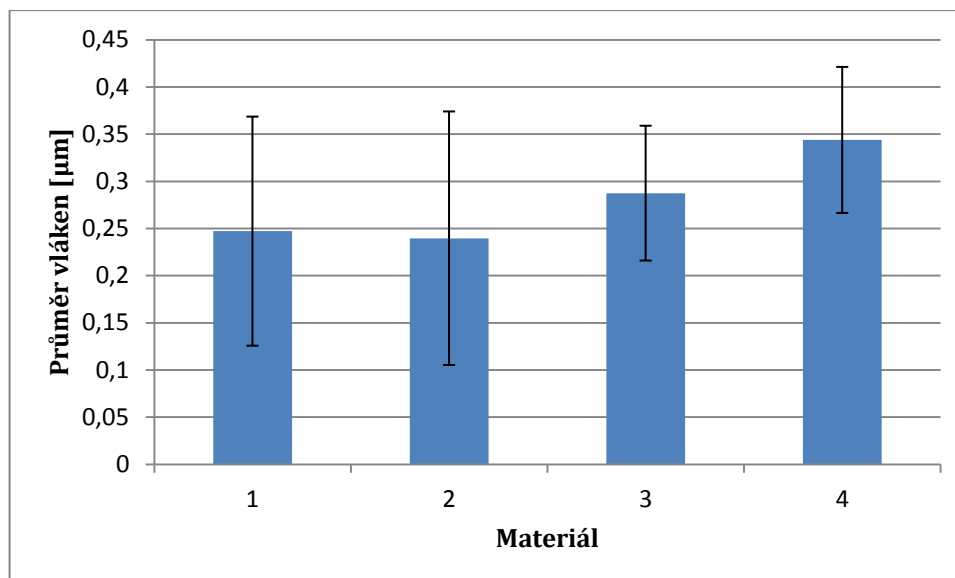
Graf 8.1-3 Histogram průměru vláken PCL Ppy 0,01



Graf 8.1-4 Histogram průměru vláken PCL Ppy 0,02

Tabulka 8.1-1 Naměřené průměry vláken

Materiál	Průměr vláken [μm]	Minimální průměr [μm]	Maximální průměr [μm]
PCL	0,25 ± 0,12	0,12	0,83
PCL Ppy 0,005	0,24 ± 0,13	0,11	0,98
PCL Ppy 0,01	0,29 ± 0,07	0,18	0,71
PCL Ppy 0,02	0,34 ± 0,08	0,21	0,72



Graf 8.1-5 Průměry vláken materiálů: (1) PCL, (2) PCL Ppy 0,005, (3) PCL Ppy 0,01, (4) PCL Ppy 0,02

Z grafu je patrné, že se průměrem liší od původního materiálu 1 materiály 3 a 4. Vrstva polypyrrolu tedy ovlivňuje průměr nanovláken.

Při pozorování materiálů pomocí SEM byly na povrchu vzorků zjevné shluky polypyrrolu. Čím vyšší byla koncentrace polymeračního roztoku při přípravě materiálů, tím více shluků se na materiálu objevovalo. Tyto defekty by mohly bránit buněčné proliferaci a mechanicky se uvolňovat. Pro další testování by bylo vhodné pokusit se najít způsob, jak eliminovat defekty a vytvořit na vláknech homogenní vrstvu polypyrrolu.

Vrstva na materiálu 4 (PCL Ppy 0,02) je příliš silná a při manipulaci se vzorky se drolila. I při opatrné manipulaci s materiálem se vydroluje polypyrrolový prášek. Poté, co tento materiál prošel procesem buněčného testování, se některé vzorky dokonce rozpadly na dvě části. Již tento fakt mluví proti použití zmíněné vrstvy za účelem výroby implantátu.

8.2 In vitro testování

8.2.1 MTT test

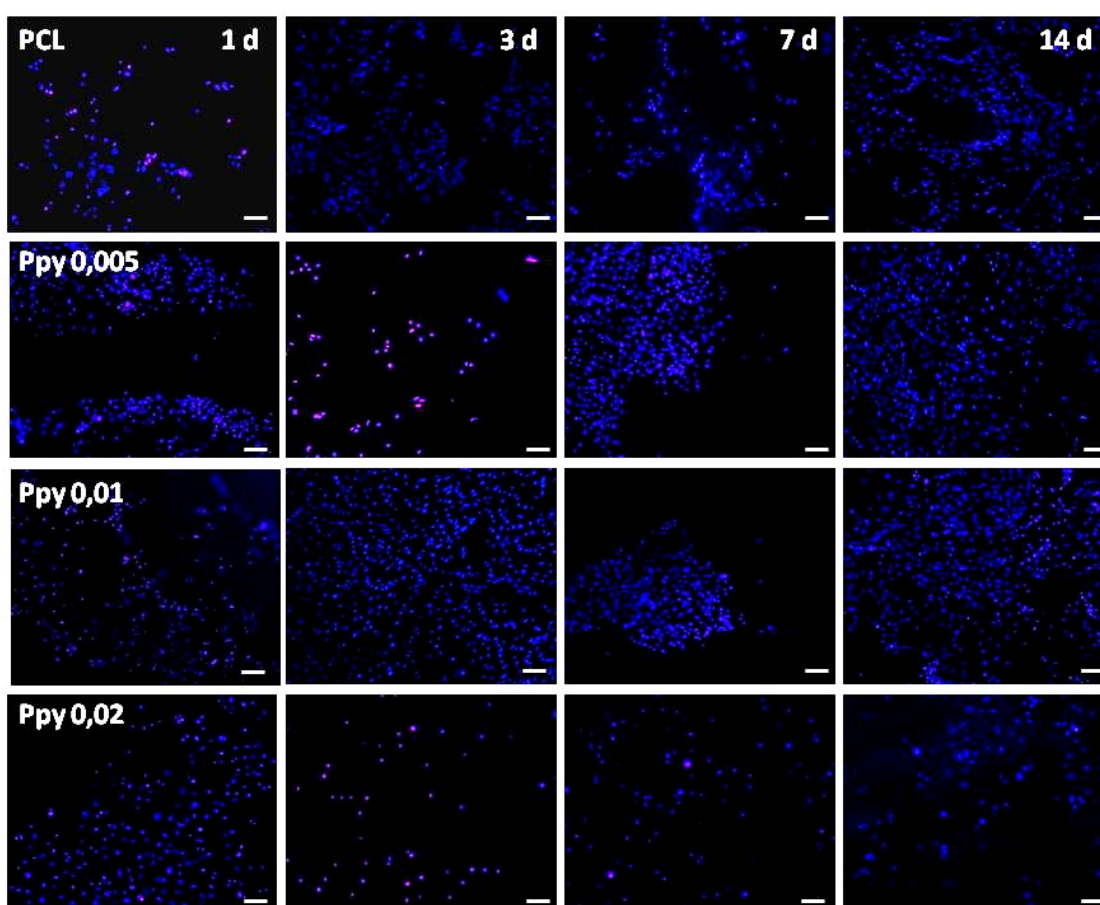
MTT test byl proveden podle protokolu (viz 7.4). Pro každý testovací den a každý materiál byly použity 4 vzorky materiálu osazeného buňkami (3T3 myší fibroblasty) a 1 vzorek neosazený (NC).

Bohužel se ukázalo, že polypyrrol ovlivňuje výsledky testu – vydroluje se ze vzorků a barví roztok. Po odečtení hodnoty absorbance negativní kontroly byly výsledky irelevantní, proto není možné je použít (graf viz příloha A).

Pro vyhodnocení množství buněk by bylo vhodné použít jiné metody, např. fluorimetrické stanovení množství DNA.

8.2.2 Fluorescenční mikroskopie

Vzorky byly barveny pomocí DAPI dle protokolu (viz 7.6.1).

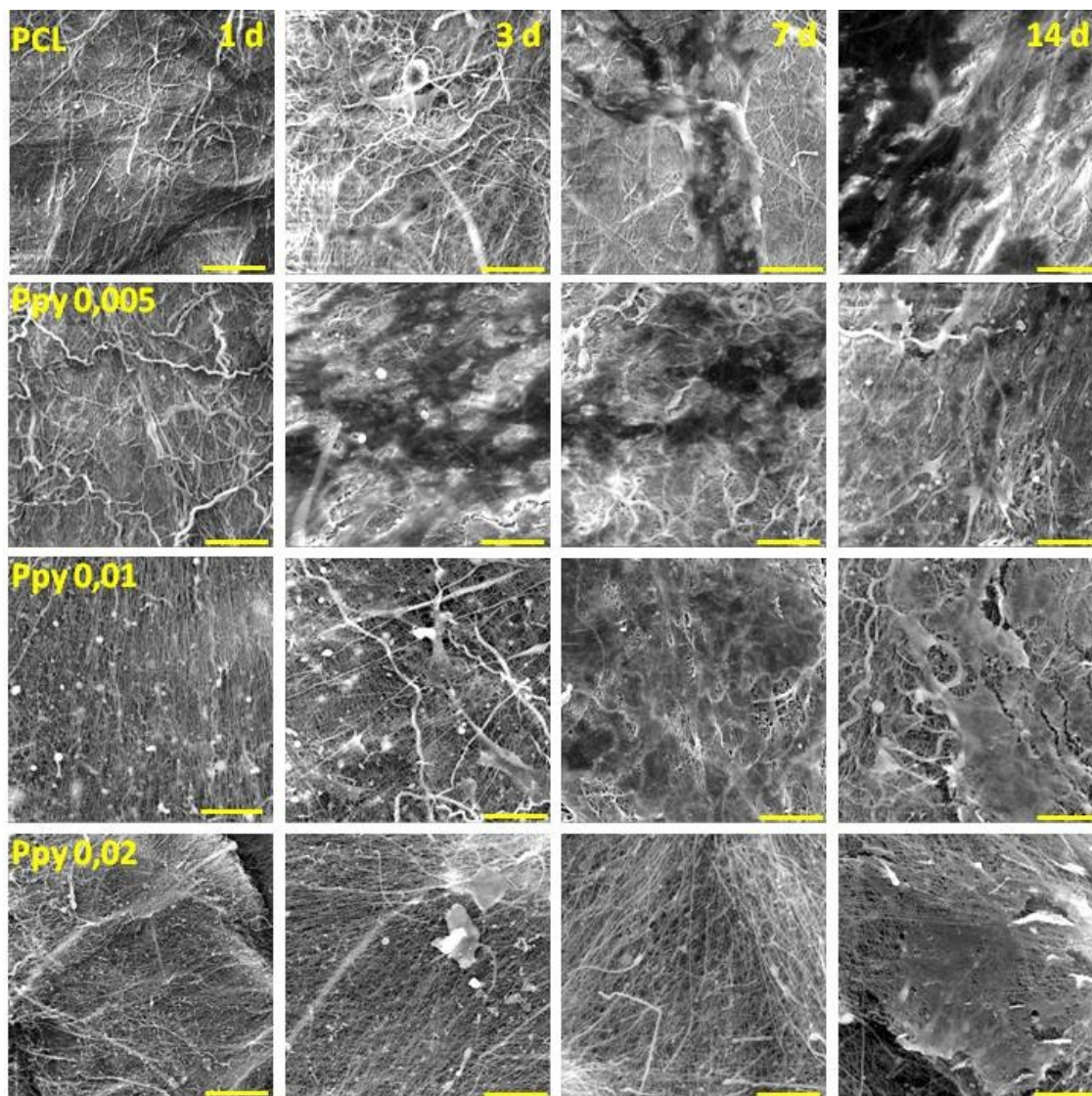


Obrázek A-1 Snímky vzorků obarvených DAPI; měřítko odpovídá 100 μm – řádky: materiál (PCL; PCL Ppy 0,005; PCL Ppy 0,01; PCL Ppy 0,02), sloupce: testovací dny (1. den, 3. den, 7. den, 14. den)

Snímky z 1. dne ukazují, jak buňky adherují na jednotlivé materiály – polypyrrol adhezi napomáhá. Snímky z dalších dní dokumentují buněčnou proliferaci. Je patrné, že na rozdíl od ostatních materiálů PCL Ppy 0,02 buněčný růst inhibuje, tudíž není pro účely této práce vhodný. Ostatní materiály proliferaci podporují, ačkoli některé záběry mohou být v tomto směru matoucí (3d PCL Ppy

0,005 a 7d PCL Ppy 0,1). Jelikož se nejedná o tentýž vzorek, ale každý testovací den byl použit jiný vzorek (ač stejného materiálu), mohou vzniknout takovéto odchylky. Jako nejvhodnější se pro účely práce jeví PCL Ppy 0,01 a PCL Ppy 0,005.

8.2.3 SEM



Obrázek A-1 Snímky SEM, měřítko odpovídá 50 μm – řádky: materiál (PCL; PCL Ppy 0,005; PCL Ppy 0,01; PCL Ppy 0,02), sloupce: testovací dny (1. den, 3. den, 7. den, 14. den)

První testovací den nejsou buňky na testovaných materiálech vidět, zřetelné jsou na snímcích SEM až vrstvy buněk. Na snímcích ze třetího dne jsou již zřetelné malé plochy buněčných vrstev, materiál PCL Ppy 0,005 je porostlý podstatně více. Sedmý den je patrná rostoucí vrstva buněk na nanovláčkách. Pouze na PCL Ppy 0,02 nebyly buňky viditelné. Na snímcích ze čtrnáctého dne jsou u většiny

materiálů vidět vrstvy buněk zaujímající téměř celou plochu. Materiál PCL Ppy 0,02 je porostlý pouze ostrůvkovitě.

Z výsledků in vitro testů vyplývá, že nejlépe podporují adhezi a proliferaci materiály PCL Ppy 0,005 a PCL Ppy 0,01. Porovnáváme-li tyto dva materiály mezi sebou, jsou jejich výsledky srovnatelné. Proto byla k dalšímu testování zvolena koncentrace polymeračního roztoku $c = 0,01$ mol/l. Provést testy s oběma koncentracemi nebylo možné pro nedostatek materiálu i z časových důvodů.

9 Výroba vláken metodou drawing a jejich testování

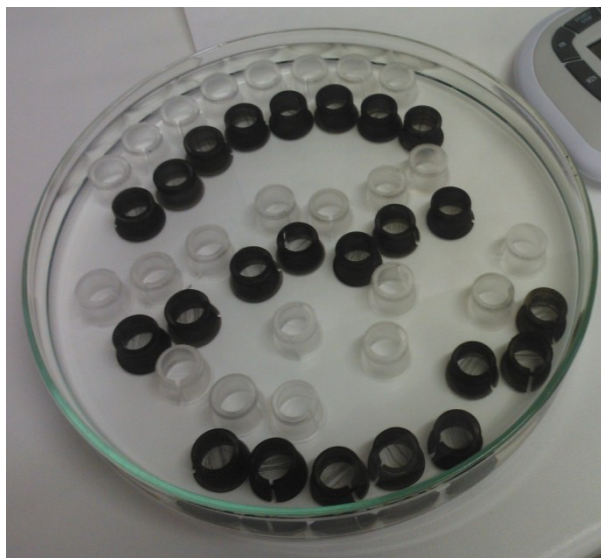
9.1 Výroba vláken PCL metodou drawing

Celý mikromanipulátor je ovládán programem z připojeného počítače. Po zapnutí stroje i veškerého příslušenství je nutné propojit počítač s ovládacím zařízením mikromanipulátoru. Dalším krokem bylo manuální nastavení počátečního bodu zvlákňování. Délka trajektorie je zapsaná v ovládacím programu, ale umístění jehly do vhodné výšky a požadovaného bodu bylo provedeno manuálním polohováním v ovládacím programu. Posun vpřed a vzad byl realizován posunem celé podložní desky. Jehla by měla směřovat kolmo k podložce a lehce se jí dotýkat, počátek by měl být zvolen tak, aby byly držáky umístěny uprostřed trajektorie.

Po nastavení os byl připravený polymer přenesen do stříkačky s kónickou dávkovací jehlou a pístem ovládaným dávkovací pumpou. Díky ní bylo možné dávkovat určené množství polymeru předem nastaveným impulzem o zvoleném tlaku a době trvání. Správné nastavení je nutné experimentálně otestovat, polymer nesmí ze stříkačky samovolně vytékat, ale zároveň musí být vytlačeno dostatečné množství pro vytvoření kapky. V tomto případě se osvědčil tlak 1,4 baru a impulz délky 0,8 s. Do desky byly upevněny držáky vláken a znovu zkontrolováno umístění jehly, aby byla vlákna umístěna u kraje kroužku, ale omezilo se jejich odlétání ven.

Po odjištění kontrolního panelu bylo možné zapnout první cyklus tažení vláken. Načasování dávkování polymeru bylo manuální, v každé úvrati bylo nutné zmáčknout tlačítko, aby byla kapka polymeru vždy nová a dosáhlo se stejných vlastností roztoku pro každé vlákno. Mikromanipulátor zvlákňuje po sériích čítajících 50 vláken, poté se vždy zastaví a je nutné spustit další sérii. V této práci byly použity vzorky obsahující v každém držáku 10x50 vláken, držák byl po každé sérii posunut o 0,75 mm.

Po skončení poslední série byla vlákna k držákům připevněna kroužky, které udrží vlákna napnutá. Nakonec byla vlákna mezi jednotlivými držáky přerušena a připravena k dalšímu testování.



Obrázek A-1 Držáky s vlákny PCL (bílé) a PCL s vrstvou Ppy (černé)

9.2 Potažení vláken polypyrrolem

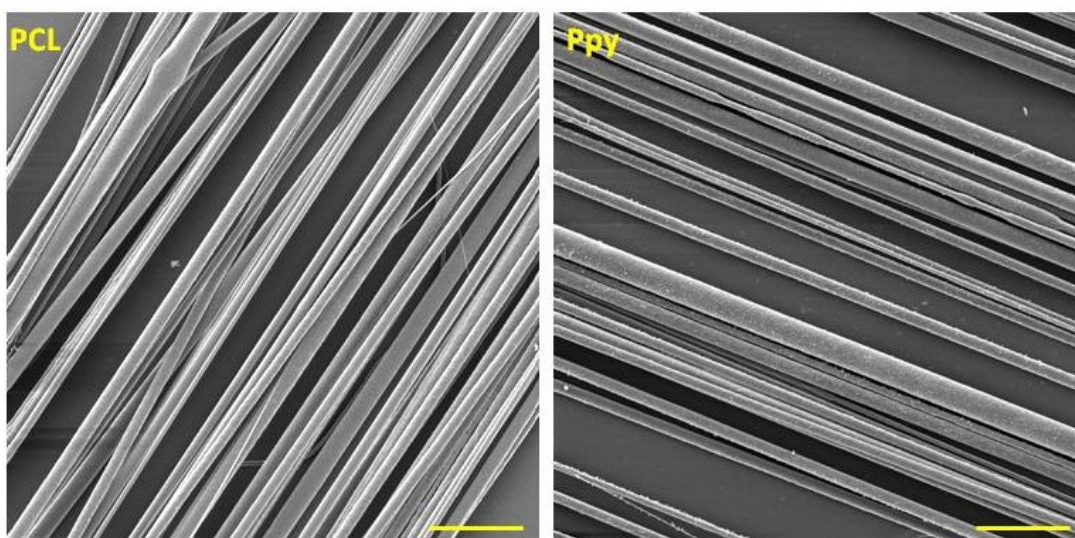
Pro potahování vláken z drawingu byla použita již jen jedna koncentrace polymeračního roztoku, a sice $c = 0,01 \text{ mol/l}$, která se dle výsledků z prvního testování zdála být nejvhodnější.

Nejprve bylo nutné přečistit pyrrol, jelikož dochází k jeho samovolné polymeraci. To bylo provedeno destilací za sníženého tlaku ($t_v = 80 \text{ °C}$ při $p = 100 \text{ mbar}$) dostatečně dlouhou dobu, aby bylo najímáno potřebné množství pyrrolu.

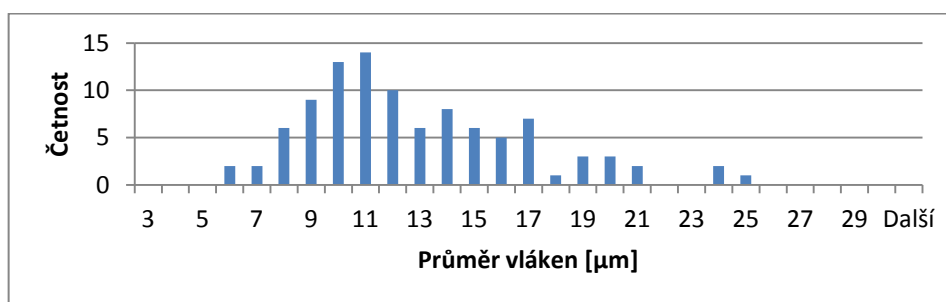
Nejprve bylo do kádě s vlákny na držákách vlito 300 ml methanolu s 347 μl pyrrolu a ponecháno 30 minut na magnetické míchačce důkladně promíchat při otáčkách cca 100 rpm. Ve 200 ml destilované vody bylo rozpuštěno 1,865 g chloridu železitého a 951 mg monohydrátu kyseliny p-toluensulfonové a přidáno k roztoku methanolu s pyrrolem. Lázeň byla ponechána na míchačce 3 dny.

Poté byl polymerační roztok slit a vlákna byla opláchnuta nejdříve destilovanou vodou, poté methanolem a tento postup byl ještě třikrát opakován. Poté byly přebytečné shluky polypyrrolu rozrušovány ultrazvukem a opět byl opakován oplach destilovanou vodou a methanolem. Nakonec byly vzorky opláchnuty destilovanou vodou a vysoušeny několik dní v exsikátoru (vysoušedlo: NaOH).

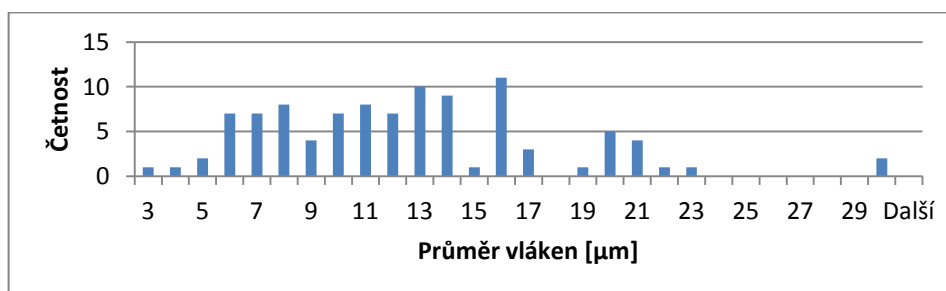
9.3 Morfologická analýza vláken



Obr. 9.3-1 Snímky SEM materiálů vyrobených drawingem, měřítko odpovídá 100 μm



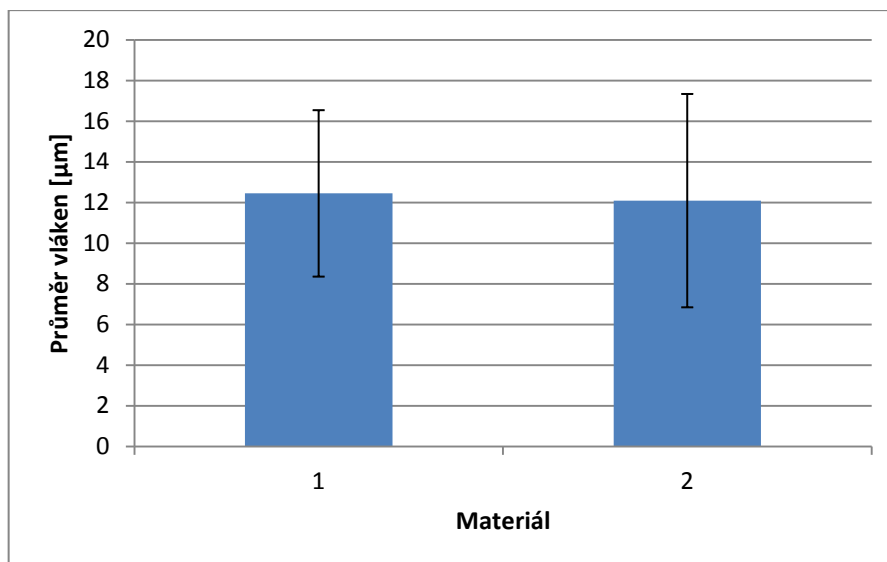
Graf 9.3-1 histogram průměru vláken PCL



Graf 9.3-2 Histogram průměru vláken PCL Ppy

Tabulka 9.3-1 Naměřené průměry vláken

Materiál	Průměr vláken [μm]	Minimální průměr [μm]	Maximální průměr [μm]
PCL	$12,4 \pm 4,1$	5,5	24,9
PCL Ppy	$12,1 \pm 5,2$	3,0	29,8



Graf 9.3-3 Průměry vláken materiálů: (1) PCL, (2) PCL Ppy

Výsledky ukázaly, že se materiály průměrem výrazně neliší. Vrstva polypyrrolu má zjevně takovou tloušťku, že ovlivní rozměry vláken průměru stovek nanometrů, ale v porovnání s řádově mikrometrovým průměrem má vrstva zanedbatelné rozměry.

Metodou drawing lze zatím vytvářet spíše vlákna mikrometrová, než nanovlákna. V průběhu procesu tažení se nedá tloušťka vláken příliš ovlivnit. Je však otázkou, jak by vlastnosti vláken ovlivnily změny různých podmínek – např. atmosféry (zvlákňování v parách rozpouštědla), teploty, molekulové hmotnosti polymeru. Tyto pokusy by mohly být součástí dalšího testování.

Ani u materiálu z drawingu se nepodařilo zabránit tvorbě shluků polypyrrolu (viz příloha D) a jeho vydrolování z vláken. To by mohl být problém při výrobě implantátu, proto je třeba najít způsob optimalizace podmínek procesu polymerace, aby se dala vytvořit homogenní vrstva polypyrrolu na vláknech.

9.4 In vitro testování

9.4.1 MTT test

Test byl proveden podle postupu (viz 7.4) s rozdíly v množství použitých roztoků. Celkem byl použit 1 ml ke každému vzorku se zachováním poměru 3:1 média a MTT. Taktéž IPA byl pro rozpuštění formazanu použit 1 ml.

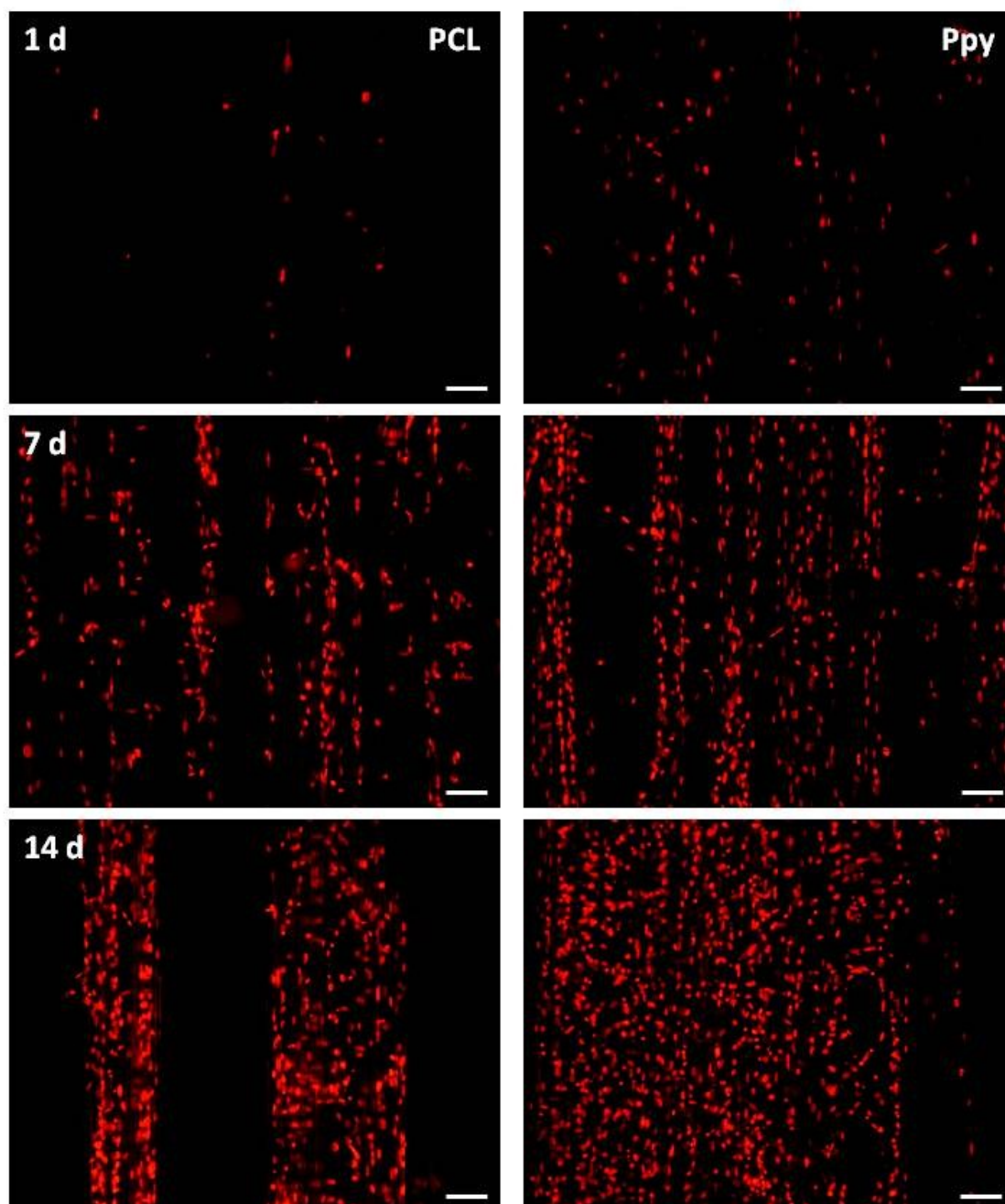
Kvůli vydrolování polypyrrolu ze vzorků byly roztoky z jamek přepipetovány do mikroskopavek a centrifugovány při 4000 rpm 6 minut, aby přítomný uvolněný polypyrrol neovlivňoval výsledky testu.

Jelikož je spektrofotometr kalibrovaný na objemy 200 μl , byly stočené roztoky přeneseny do 96 jamkové destičky a absorbance byla změřena dle protokolu. Při zpracování byly hodnoty vynásobeny pětkrát.

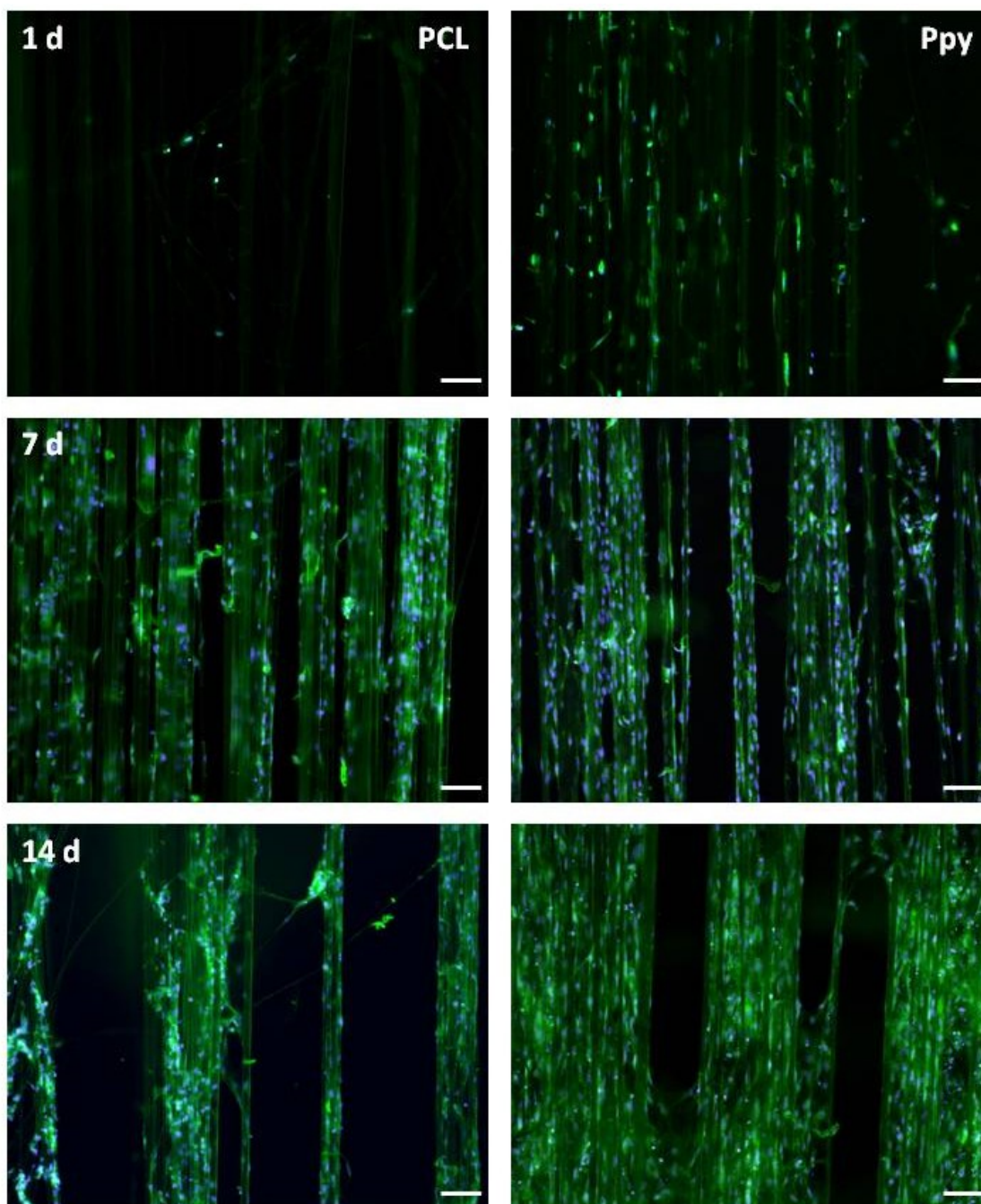
Tento postup se příliš neosvědčil, jelikož plocha vláken je poměrně malá a vzorky tedy příliš naředěny. Koncentrace formazanu byla na spodní hranici detekčního limitu a výsledky tím mohou být silně ovlivněny, proto nebyly použity (graf viz příloha B).

9.4.2 Fluorescenční mikroskopie

Pro fluorescenční mikroskopii bylo využito barvení buněčných jader propidium jodidem a také barvení aktinových vláken phalloidinem konjugovaným s FITC a buněčných jader DAPI dle protokolů (viz 7.6).



Obr. 9.4-1 Snímky buněčných jader 3T3 myších fibroblastů barvených propidium jodidem, měřítko odpovídá 100 μm – řádky: testovací dny (1. den, 7. den, 14. den), sloupce: materiál (PCL; PCL Ppy)

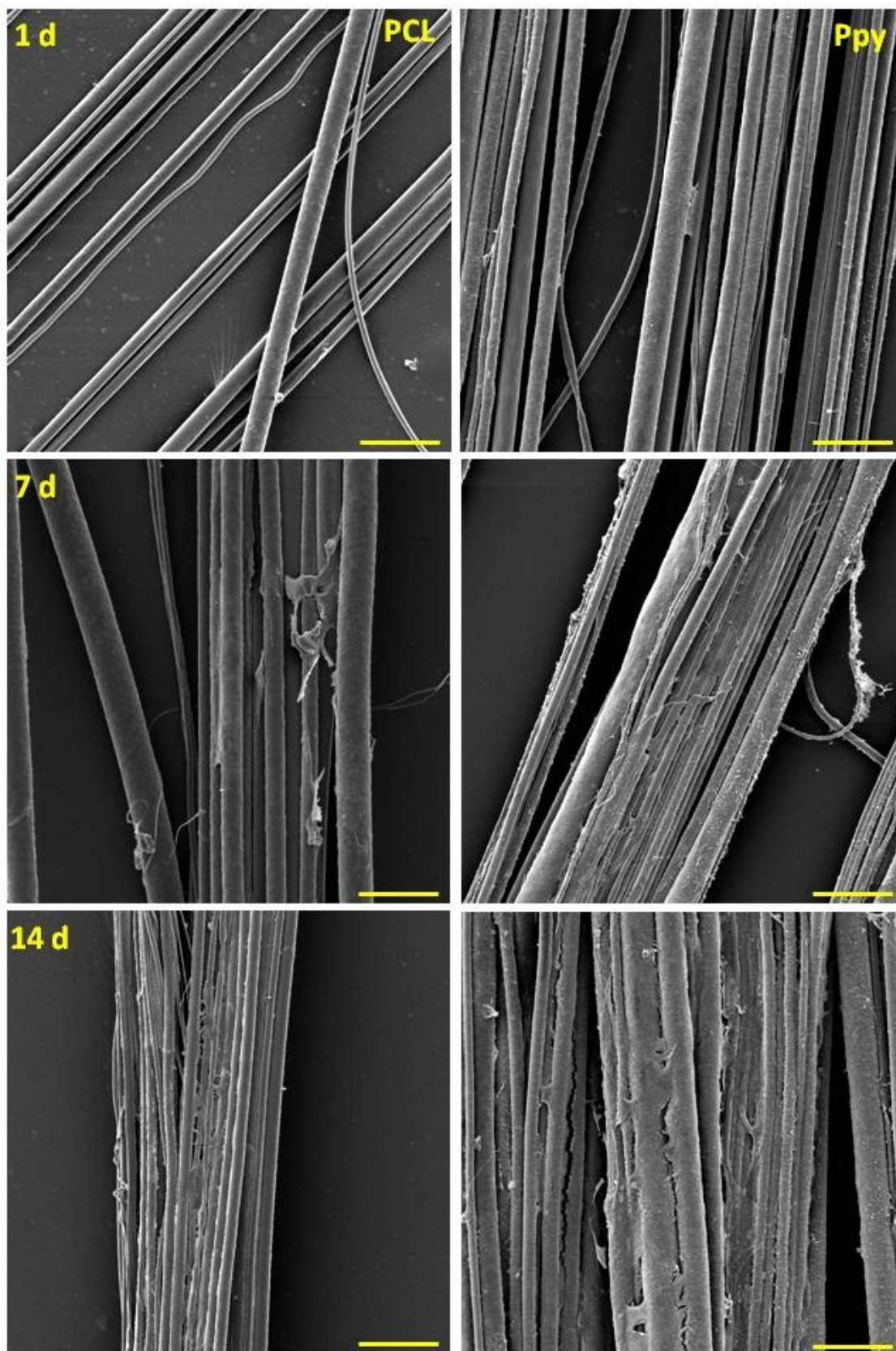


Obr. 9.4-2 Snímky buněk barvených phalloidinem - FITC (aktinová vlákna - zelená) a DAPI (jádra - modrá), měřítko odpovídá 100 μm - řádky: testovací dny (1. den, 7. den, 14. den), sloupce: materiál (PCL; PCL Ppy)

Ze snímků z 1. dne je patrné, že buňky lépe adherují na materiál s vrstvou polypyrrolu. Proliferace také probíhá lépe na potaženém materiálu, buňky při růstu kopírují orientaci vláken a 14. den již přerůstají z jednoho vlákna na druhé a tvoří vrstvy porůstající celé snopce vláken.

Tyto výsledky bohužel nelze z výše uvedených důvodů potvrdit testem MTT a bylo by dobré pro potvrzení vhodnosti materiálu použít jinou metodu vyjadřující množství buněk, např. fluorimetrické stanovení množství DNA ve vzorcích.

9.4.3 SEM



Obr. 9.4-3 Snímky SEM, měřítko odpovídá 50 μm – řádky: testovací dny (1. den, 7. den, 14. den), sloupce: materiál (PCL; PCL Ppy)

Snímky SEM potvrzují hypotézu o lepší adhezi buněk na vrstvu polypyrrolu oproti samotnému PCL. Na snímcích ze 7. dne jsou na vláknech PCL již patrné rostoucí buňky, které začínají vytvářet malé oblasti vrstev mezi vlákny, na vláknech potažených polypyrrolem jsou při bližším pohledu na střed snímku již patrné větší vrstvy buněk přerůstající více vláken najednou. Zároveň si na okrajových vláknech můžeme všimnout shluků polypyrrolu (defekty z přípravy povrchové vrstvy). Na snímcích ze 14. dne jsou viditelné vrstvy buněk na obou materiálech.

Na vláknech těchto rozměrů jsou buňky špatně patrné, viditelné jsou až větší plochy porostlé buňkami. Detailní snímky viz příloha C.

Výsledky in vitro testování ukazují, že vrstva polypyrrolu podporuje adhezi a proliferaci buněk. Buňky porůstají jednotlivá vlákna a kopírují jejich orientaci. Námětem pro další zkoumání může být například vliv průměru jednotlivých vláken na adhezi a proliferaci buněk, jsou-li vhodnější vlákna nanometrová, s průměrem v řádech jednotek mikrometrů či desítek mikrometrů.

V. Závěr

Cílem práce byla výroba a in vitro testování dílčích součástí nosiče vyvíjeného za účelem léčby míšních lézí.

V této práci byly zkoumány dva druhy materiálů: nanovláknna vyrobená metodou electrospinning a následně potažená třemi různě silnými vrstvami polypyrrolu a orientovaná mikrovláknna vyrobená metodou drawing a poté také opatřená vrstvou polypyrrolu. Při zkoumání morfologie vzorků bylo zjištěno, že vrstva polypyrrolu ovlivňuje průměry nanovláken, proti mikrovláknům má však zanedbatelné rozměry. Dále bylo zjištěno, že se na vláknech tvoří nežádoucí shluky polypyrrolu, jež by bylo vhodné optimalizací procesu výroby polypyrrolové vrstvy eliminovat. Příliš velká vrstva polypyrrolu také způsobuje křehkost materiálu a náchylnost k drolení, proto není pro výrobu scaffoldu vhodná.

In vitro testy za použití 3T3 myších fibroblastů byly provedeny nejdříve na nanovláknnech. Součástí in vitro testů byl test viability buněk (MTT test), rastrovací elektronová mikroskopie a fluorescenční mikroskopie. Bohužel se ukázalo, že vydrolující se polypyrrol výrazně ovlivňuje výsledky MTT testu, proto nebylo možné výsledky použít a pro další testování je vhodné najít jinou metodu stanovení množství buněk na materiálu. Výsledky jsou vyvozovány hlavně ze snímků z elektronové a fluorescenční mikroskopie. Na základě výsledků in vitro testů byla vybrána jedna vrstva polypyrrolu, jež byla použita v další části práce.

Následně byla metodou drawing vyrobena orientovaná mikrovláknna a potažena vrstvou polypyrrolu, jež se osvědčila v předchozí části práce. Vlákna byla poté rovněž podrobena in vitro testování s buňkami 3T3. Kvůli výše zmíněným komplikacím při realizaci MTT testu byly výsledky opět vyvozovány z mikroskopie.

In vitro testy ukázaly, že vrstva polypyrrolu podporuje adhezi a proliferaci buněk, příliš silná vrstva ale proliferaci inhibuje. Buňky rostou i na jednotlivých vláknech a kopírují jejich orientaci. Tyto výsledky potvrzují hypotézu o orientovaných vláknech jako součásti scaffoldu s účelem vést buňky a usnadňovat jejich orientaci.

Další fází výzkumu bude výroba scaffoldu jako celku a in vitro testování za použití nervových buněk. Možným pokračováním mohou být i testy vlivu elektrické stimulace na růst nervových buněk, osazení scaffoldu kmenovými buňkami či funkcionalizace polypyrrolové vrstvy k podpoření buněčné proliferace.

VI. Zdroje

- [1] *Central Nervous System* [online]. [vid. 19. duben 2015]. Dostupné z: <http://biology.about.com/od/organsystems/ss/central-nervous-system.htm>
- [2] *Centrum Paraple - Míšní poranění* [online]. [vid. 22. prosinec 2014]. Dostupné z: <http://www.paraple.cz/informace/misni-poraneni.html>
- [3] HANA SEHADOVÁ. *Fluorescenční a konfokální mikroskopie* [online]. 2011 [vid. 14. květen 2015]. Dostupné z: <http://alfa.bc.cas.cz/doc/ekotech/study/Fluorescencni-a-konfokalni-mikroskopie.pdf>
- [4] ČIHÁK, Radomír. *Anatomie 3*. Praha: Grada, 1997. ISBN 8071691402 9788071691402.
- [5] HOLIBKOVÁ, Alžběta, Stanislav LAICHMAN, UNIVERZITA PALACKÉHO a LÉKAŘSKÁ FAKULTA. *Přehled anatomie člověka*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2006. ISBN 8024414805 9788024414805.
- [6] *Biologické vědy a nervová soustava « E-learningová podpora mezioborové integrace výuky tématu vědomí na UP Olomouc* [online]. [vid. 19. duben 2015]. Dostupné z: <http://pfyziollfup.upol.cz/castwiki/?p=845>
- [7] *Nervové řízení svalové práce* [online]. [vid. 29. duben 2015]. Dostupné z: <http://www.fsps.muni.cz/~tvodicka/data/reader/book-3/05.html>
- [8] *Biologie člověka* [online]. [vid. 2. květen 2015]. Dostupné z: http://skolajecna.cz/biologie/Sources/Textbook_Textbook.php?intSectionId=90200
- [9] *What is Spinal Cord Injury? | Spinal Injuries Ireland* [online]. [vid. 22. prosinec 2014]. Dostupné z: <http://www.spinalinjuries.ie/sci-health/what-is-spinal-cord-injury/>
- [10] ČESKÁ ASOCIACE PARAPLEGIKŮ. *Léčba a rehabilitace pacientů s míšní lézí* [online]. 2012. Dostupné z: http://www.spinalcord.cz/_userfiles/dokumenty/publikace/lecba-a-rehabilitace-pacientu-s-misni-lezi.pdf
- [11] PATNAIK, Gourishankar. Spinal cord regeneration. *The Indian Journal of Neurotrauma* [online]. 2010, roč. 7, č. 1, s. 13–17 [vid. 29. prosinec 2014]. ISSN 09730508. Dostupné z: doi:10.1016/S0973-0508(10)80005-X
- [12] MIROSLAV OREL a VĚRA FACOVÁ. *Člověk, jeho mozek a svět* [online]. Praha: Grada, 2009. ISBN 9788024726175 8024726173. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=6jLmkSrixn0C&pg=PA134&lpg=PA134&dq=prvn%C3%AD+nervov%C3%BD+r%C5%AFstov%C3%BD+faktor&source=bl&ots=-OGcbGu_mq&sig=Yb8N0WbVbYWQgFyxUP_7sT6Fbo&hl=cs&sa=X&ei=iQFF

VbqmFJXgaqlW&ved=0CE4Q6AEwBw#v=onepage&q=prvn%C3%AD%20ner
vov%C3%BD%20r%C5%AFstov%C3%BD%20faktor&f=false

- [13] BORGENS, R. B. a R. SHI. Immediate recovery from spinal cord injury through molecular repair of nerve membranes with polyethylene glycol. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2000, roč. 14, č. 1, s. 27–35. ISSN 0892-6638.
- [14] MIYA, Dorene, Simon GISZTER, Futoshi MORI, Vijayalakshmi ADIPUDI, Alan TESSLER a Marion MURRAY. Fetal Transplants Alter the Development of Function after Spinal Cord Transection in Newborn Rats. *The Journal of Neuroscience*. 1997, roč. 17, č. 12, s. 4856–4872.
- [15] BORGENS, R.B., J.P. TOOMBS, G. BREUR, W.R. WIDMER, D. WATERS, A.M. HARBATH, P. MARCH a L.G. ADAMS. An Imposed Oscillating Electrical Field Improves the Recovery of Function in Neurologically Complete Paraplegic Dogs. *Journal of Neurotrauma* [online]. 1999, roč. 16, č. 7, s. 639–657 [vid. 2. květen 2015]. ISSN 0897-7151, 1557-9042. Dostupné z: doi:10.1089/neu.1999.16.639
- [16] BRACKEN, Michael B., Mary Jo SHEPARD, Theodore R. HOLFORD, Linda LEO-SUMMERS, E. Francois ALDRICH, Mahmood FAZL, Michael G. FEHLINGS, Daniel L. HERR, Patrick W. HITCHON, Lawrence F. MARSHALL, Russ P. NOCKELS, Valentine PASCALE, Phanor L. PEROT, Joseph PIEPMEIER, Volker K. H. SONNTAG, Franklin WAGNER, Jack E. WILBERGER, H. Richard WINN a Wise YOUNG. Methylprednisolone or tirilazad mesylate administration after acute spinal cord injury: 1-year follow up. *Journal of Neurosurgery* [online]. 1998, roč. 89, č. 5, s. 699–706 [vid. 2. květen 2015]. ISSN 0022-3085. Dostupné z: doi:10.3171/jns.1998.89.5.0699
- [17] HOULE, John D., Veronica J. TOM, Debra MAYES, Gail WAGONER, Napoleon PHILLIPS a Jerry SILVER. Combining an Autologous Peripheral Nervous System “Bridge” and Matrix Modification by Chondroitinase Allows Robust, Functional Regeneration beyond a Hemisection Lesion of the Adult Rat Spinal Cord. *The Journal of Neuroscience* [online]. 2006, roč. 26, č. 28, s. 7405–7415. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.1166-06.2006
- [18] PANSERI, Silvia, Carla CUNHA, Joseph LOWERY, Ubaldo DEL CARRO, Francesca TARABALLI, Stefano AMADIO, Angelo VESCOVI a Fabrizio GELAIN. Electrospun micro- and nanofiber tubes for functional nervous regeneration in sciatic nerve transections. *BMC Biotechnology* [online]. 2008, roč. 8, č. 1, s. 39 [vid. 2. květen 2015]. ISSN 1472-6750. Dostupné z: doi:10.1186/1472-6750-8-39
- [19] GHASEMI-MOBARAKEH, Laleh, Molamma P. PRABHAKARAN, Mohammad MORSHED, Mohammad-Hossein NASR-ESFAHANI a Seeram RAMAKRISHNA. Electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Biomaterials* [online]. 2008, roč. 29, č. 34, s. 4532–4539 [vid. 2. květen 2015]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2008.08.007

- [20] SUBRAMANIAN, Anuradha, Uma KRISHNAN a Swaminathan SETHURAMAN. Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration. *Journal of Biomedical Science* [online]. 2009, roč. 16, č. 1, s. 108 [vid. 2. květen 2015]. ISSN 1423-0127. Dostupné z: doi:10.1186/1423-0127-16-108
- [21] PHARMDR. ŠÁRKA KUBINOVÁ, PH.D. Biomateriály v regenerativní medicíně. In: [online]. B.m. Dostupné z: http://moodle.lfhk.cuni.cz/moodle2/pluginfile.php/14158/mod_resource/content/1/NB_Kubinoва_biomat_nanotech_v_regen_med.pdf
- [22] *Start up support - 4Medical Innovations Ostrava* [online]. [vid. 3. květen 2015]. Dostupné z: <http://www.4medi.cz/nadacni-fond-regenerativni-mediciny.php>
- [23] BAKSH, D., L. SONG a R. S. TUAN. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* [online]. 2004, roč. 8, č. 3, s. 301–316 [vid. 3. prosinec 2014]. ISSN 1582-1838, 1582-4934. Dostupné z: doi:10.1111/j.1582-4934.2004.tb00320.x
- [24] CHEN, Qizhi, Shuling LIANG a George A. THOUAS. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. *Progress in Polymer Science* [online]. 2013, roč. 38, č. 3-4, s. 584–671 [vid. 12. listopad 2014]. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2012.05.003
- [25] LANGER, R. a J. P. VACANTI. Tissue engineering. *Science (New York, N.Y.)*. 1993, roč. 260, č. 5110, s. 920–926. ISSN 0036-8075.
- [26] LANZA, R. P., Robert S. LANGER a Joseph VACANTI, ed. *Principles of tissue engineering*. 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press, 2000. ISBN 0124366309.
- [27] O'BRIEN, Fergal J. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* [online]. 2011, roč. 14, č. 3, s. 88–95 [vid. 14. prosinec 2014]. ISSN 13697021. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-7021(11)70058-X
- [28] *Tel Aviv University* [online]. [vid. 29. prosinec 2014]. Dostupné z: <http://www.tau.ac.il/lifesci/departments/biotech/members/dvir/dvir.html>
- [29] ENGELBERG, Israel a Joachim KOHN. Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: A comparative study. *Biomaterials* [online]. 1991, roč. 12, č. 3, s. 292–304 [vid. 8. květen 2015]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/0142-9612(91)90037-B
- [30] PATRÍCIO, T., M. DOMINGOS, A. GLORIA a P. BÁRTOLO. Characterisation of PCL and PCL/PLA Scaffolds for Tissue Engineering. *Procedia CIRP* [online]. 2013, roč. 5, s. 110–114 [vid. 14. prosinec 2014]. ISSN 22128271. Dostupné z: doi:10.1016/j.procir.2013.01.022
- [31] *Patent US8349954 - Polymerization of fluoropolymers using polycaprolactone - Patenty Google* [online]. [vid. 8. květen 2015]. Dostupné z: <http://www.google.com/patents/US8349954>

- [32] ALI, S.A.M., S.-P. ZHONG, P.J. DOHERTY a D.F. WILLIAMS. Mechanisms of polymer degradation in implantable devices. *Biomaterials* [online]. 1993, roč. 14, č. 9, s. 648–656 [vid. 8. květen 2015]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/0142-9612(93)90063-8
- [33] WOODWARD, S. C., P. S. BREWER, F. MOATAMED, A. SCHINDLER a C. G. PITT. The intracellular degradation of poly(ϵ -caprolactone). *Journal of Biomedical Materials Research* [online]. 1985, roč. 19, č. 4, s. 437–444 [vid. 8. květen 2015]. ISSN 0021-9304, 1097-4636. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.820190408
- [34] HEYDARKHAN-HAGVALL, Sepideh, Katja SCHENKE-LAYLAND, Andrew P. DHANASOPON, Fady ROFAIL, Hunter SMITH, Benjamin M. WU, Richard SHEMIN, Ramin E. BEYGUI a William R. MACLELLAN. Three-dimensional electrospun ECM-based hybrid scaffolds for cardiovascular tissue engineering. *Biomaterials* [online]. 2008, roč. 29, č. 19, s. 2907–2914 [vid. 8. květen 2015]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2008.03.034
- [35] PUPPI, D., F. CHIELLINI, A.M. PIRAS a E. CHIELLINI. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science* [online]. 2010, roč. 35, č. 4, s. 403–440 [vid. 8. květen 2015]. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2010.01.006
- [36] V. I. PERELMAN. *Malá chemická příručka*. Praha: SNTL, 1954.
- [37] MICHAL MARTINEK. *Modifikované vodivé nanomateriály na bázi heterocyklů*. Liberec, 2014. Diplomová práce. Technická univerzita v Liberci.
- [38] VÁCLAV KOMZÍK. *Heterocyklické sloučeniny* [online]. Dostupné z: http://uoch.vscht.cz/files/uzel/0006592/Heterocyklicke_slouceniny.pdf
- [39] MIAH, Musharraf, Zafar IQBAL a Edward P. C. LAI. Rapid CE-UV evaluation of polypyrrole-coated magnetic nanoparticles for selective binding of endocrine disrupting compounds and pharmaceuticals by aromatic interactions. *Analytical Methods* [online]. 2012, roč. 4, č. 9, s. 2866 [vid. 19. duben 2015]. ISSN 1759-9660, 1759-9679. Dostupné z: doi:10.1039/c2ay25343g
- [40] M. OMASTOVÁ. Syntéza, vlastnosti a aplikace polypyrolu a jeho kompozitov. *Chemické listy*. 1991, č. 85, s. 794–816. ISSN 0009-2770.
- [41] SAVILLE, Paul. *Polypyrrole, formation and use* [online]. B.m.: DTIC Document. 2005. Dostupné z: <http://www.dtic.mil/cgi-bin/GetTRDoc?Location=U2&doc=GetTRDoc.pdf&AD=ADA436284>
- [42] GUIMARD, Nathalie K., Natalia GOMEZ a Christine E. SCHMIDT. Conducting polymers in biomedical engineering. *Progress in Polymer Science* [online]. 2007, roč. 32, č. 8-9, s. 876–921 [vid. 4. květen 2015]. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.012

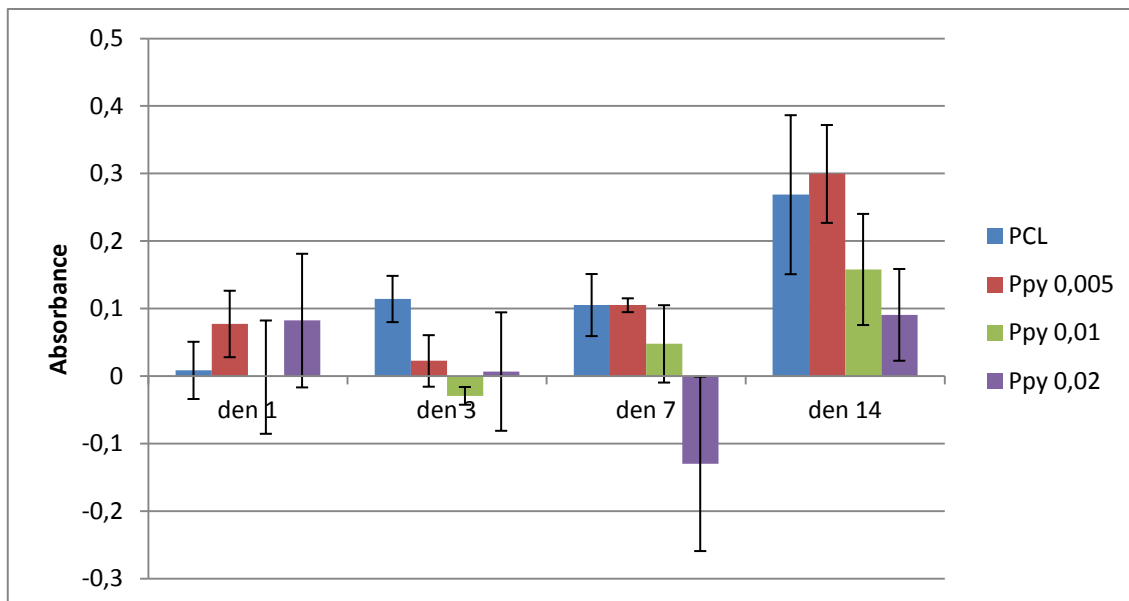
- [43] HUANG, Zhong-Bing, Guang-Fu YIN, Xiao-Ming LIAO a Jian-Wen GU. Conducting polypyrrole in tissue engineering applications. *Frontiers of Materials Science* [online]. 2014, roč. 8, č. 1, s. 39–45 [vid. 14. prosinec 2014]. ISSN 2095-025X, 2095-0268. Dostupné z: doi:10.1007/s11706-014-0238-8
- [44] RIVERS, T.J., T.W. HUDSON a C.E. SCHMIDT. Synthesis of a Novel, Biodegradable Electrically Conducting Polymer for Biomedical Applications. *Advanced Functional Materials* [online]. 2002, roč. 12, č. 1, s. 33 [vid. 4. květen 2015]. ISSN 1616301X, 16163028. Dostupné z: doi:10.1002/1616-3028(20020101)12:1<33::AID-ADFM33>3.0.CO;2-E
- [45] DOC. ING. EVA KOŠŤÁKOVÁ, PH.D. Electrospinning - introduction. In: [online]. B.m. [vid. 7. květen 2015]. Dostupné z: https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/2264/course/section/865/Prezentace2_electrospinning%20-%20introduction%20EN.pdf
- [46] SUBBIAH, Thandavamoorthy, G. S. BHAT, R. W. TOCK, S. PARAMESWARAN a S. S. RAMKUMAR. Electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2005, roč. 96, č. 2, s. 557–569 [vid. 6. duben 2015]. ISSN 0021-8995, 1097-4628. Dostupné z: doi:10.1002/app.21481
- [47] HUANG, Zheng-Ming, Y.-Z. ZHANG, M. KOTAKI a S. RAMAKRISHNA. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology* [online]. 2003, roč. 63, č. 15, s. 2223–2253 [vid. 7. duben 2015]. ISSN 02663538. Dostupné z: doi:10.1016/S0266-3538(03)00178-7
- [48] FENGYU LI, YONG ZHAO a YANLIN SONG. Core-Shell Nanofibers: Nano Channel and Capsule by Coaxial Electrospinning. In: *Nanofibers*. 8656.
- [49] *Technologie zvlákňování* [online]. [vid. 13. duben 2015]. Dostupné z: <http://www.elmarco.cz/technologie/technologie/>
- [50] NAYAK, R., R. PADHYE, I. L. KYRATZIS, Y. B. TRUONG a L. ARNOLD. Recent advances in nanofibre fabrication techniques. *Textile Research Journal* [online]. 2012, roč. 82, č. 2, s. 129–147 [vid. 7. květen 2015]. ISSN 0040-5175, 1746-7748. Dostupné z: doi:10.1177/0040517511424524
- [51] STANISLAV PETRÍK a MIROSLAV MALÝ. *Production Nozzle-Less Electrospinning Nanofiber Technology* [online]. 2009 [vid. 7. květen 2015]. Dostupné z: <http://www.elmarco.com/upload/soubory/dokumenty/66-1-1-mrs-fall-boston-09.pdf>
- [52] „DRAWING“- THE PRODUCTION OF INDIVIDUAL NANOFIBERS BY EXPERIMENTAL METHOD Jana BAJÁKOVÁ a, Jiří CHALOUPEK a, David LUKÁ [online]. [vid. 26. březen 2015]. Dostupné z: http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:049p6gy2lMoJ:nanocon2012.tanger.cz/files/proceedings/nanocon_11/lists/papers/1140.pdf+&cd=1&hl=cs&ct=clnk&gl=cz

- [53] NAIN, Amrinder S., Joanna C. WONG, Cristina AMON a Metin SITTI. Drawing suspended polymer micro-/nanofibers using glass micropipettes. *Applied Physics Letters* [online]. 2006, roč. 89, č. 18, s. 183105 [vid. 17. březen 2015]. ISSN 00036951. Dostupné z: doi:10.1063/1.2372694
- [54] DAVID PETRÁŠ a DUŠAN KIMMER. Bezpečná nanovlákná. *Chemické listy*. 2009, roč. 103, č. 12, s. 1009–1016. ISSN 0009-2770.
- [55] ONDARÇUHU, T a C JOACHIM. Drawing a single nanofibre over hundreds of microns. *Europhysics Letters (EPL)* [online]. 1998, roč. 42, č. 2, s. 215–220 [vid. 29. březen 2015]. ISSN 0295-5075, 1286-4854. Dostupné z: doi:10.1209/epl/i1998-00233-9
- [56] ING. LUKÁŠ STANISLAV. NÁVRH A REALIZACE MIKROMANIPULÁTORU PRO DLOUŽENÍ NANOVLÁKEN Z KAPKY POLYMERU. In: *Workshop Světlanka*. 2011.
- [57] ING. LUKÁŠ STANISLAV. DLOUŽENÍ NANOVLÁKEN Z KAPKY POLYMERU NA MIKROMANIPULÁTORU. In: *Workshop Světlanka*. 2012.
- [58] *Technologie tažení individuálních nano/mikrovláken-mikromanipulátor* [online]. [vid. 5. květen 2015]. Dostupné z: http://cxi.tul.cz/pdf/technologie_tazeni_mikromanipulator.pdf
- [59] RISS, Terry L., Richard A. MORAVEC, Andrew L. NILES, Helene A. BENINK, Tracy J. WORZELLA a Lisa MINOR. Cell Viability Assays. In: G. Sitta SITTAMPALAM, Neely GAL-EDD, Michelle ARKIN, Douglas AULD, Chris AUSTIN, Bruce BEJCEK, Marcie GLICKSMAN, James INGLESE, Vance LEMMON, Zhuyin LI, James MCGEE, Owen MCMANUS, Lisa MINOR, Andrew NAPPER, Terry RISS, O. Joseph TRASK a Jeff WEIDNER, ed. *Assay Guidance Manual* [online]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004 [vid. 7. prosinec 2014]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- [60] PROF. RNDR. ZDENĚK DVOŘÁK, PHD. Metodologie v buněčné a molekulární toxikologii. In: [online]. B.m. [vid. 9. květen 2015]. Dostupné z: <http://nanosystemy.upol.cz/upload/25/pp-prezentace-prof.-dvorak.pdf>
- [61] *Sample-Electron Interaction for SEM* [online]. [vid. 10. prosinec 2014]. Dostupné z: <http://www.nanoscience.com/products/sem/technology-overview/sample-electron-interaction/>
- [62] *The Key Components of a Scanning Electron Microscope - HowStuffWorks* [online]. [vid. 10. prosinec 2014]. Dostupné z: <http://science.howstuffworks.com/scanning-electron-microscope2.htm>
- [63] RNDR. VĚRA VODIČKOVÁ, PHD. Rastrovací elektronová mikroskopie 1. In: [online]. B.m. Dostupné z: https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/1339/mod_resource/content/2/ELMI_1_instrumentace.pdf

- [64] KLÁRA ŠAFÁŘOVÁ. Skenovací (rastrovací) elektronová mikroskopie. In: [online]. B.m. Dostupné z: http://nanosystemy.upol.cz/upload/18/safarova_sem.pdf
- [65] *Olympus Microscopy Resource Center / Anatomy of the Microscope - Introduction* [online]. [vid. 8. květen 2015]. Dostupné z: <http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/introduction.html>
- [66] EVŽEN HRUŠKA. *Základní metody světelné mikroskopie* [online]. [vid. 8. květen 2015]. Dostupné z: http://www.are.cz/data/file/zakladni_metody_svetelne_mikroskopie.pdf

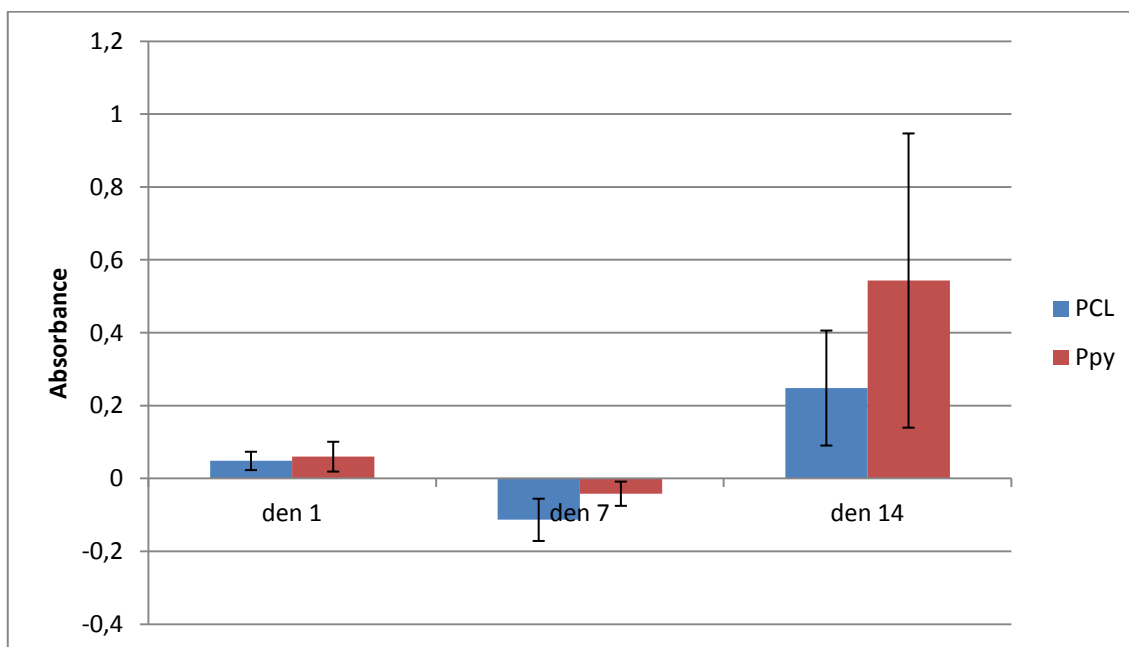
VII. Přílohy

A Výsledky testu MTT vláken z electrospinningu



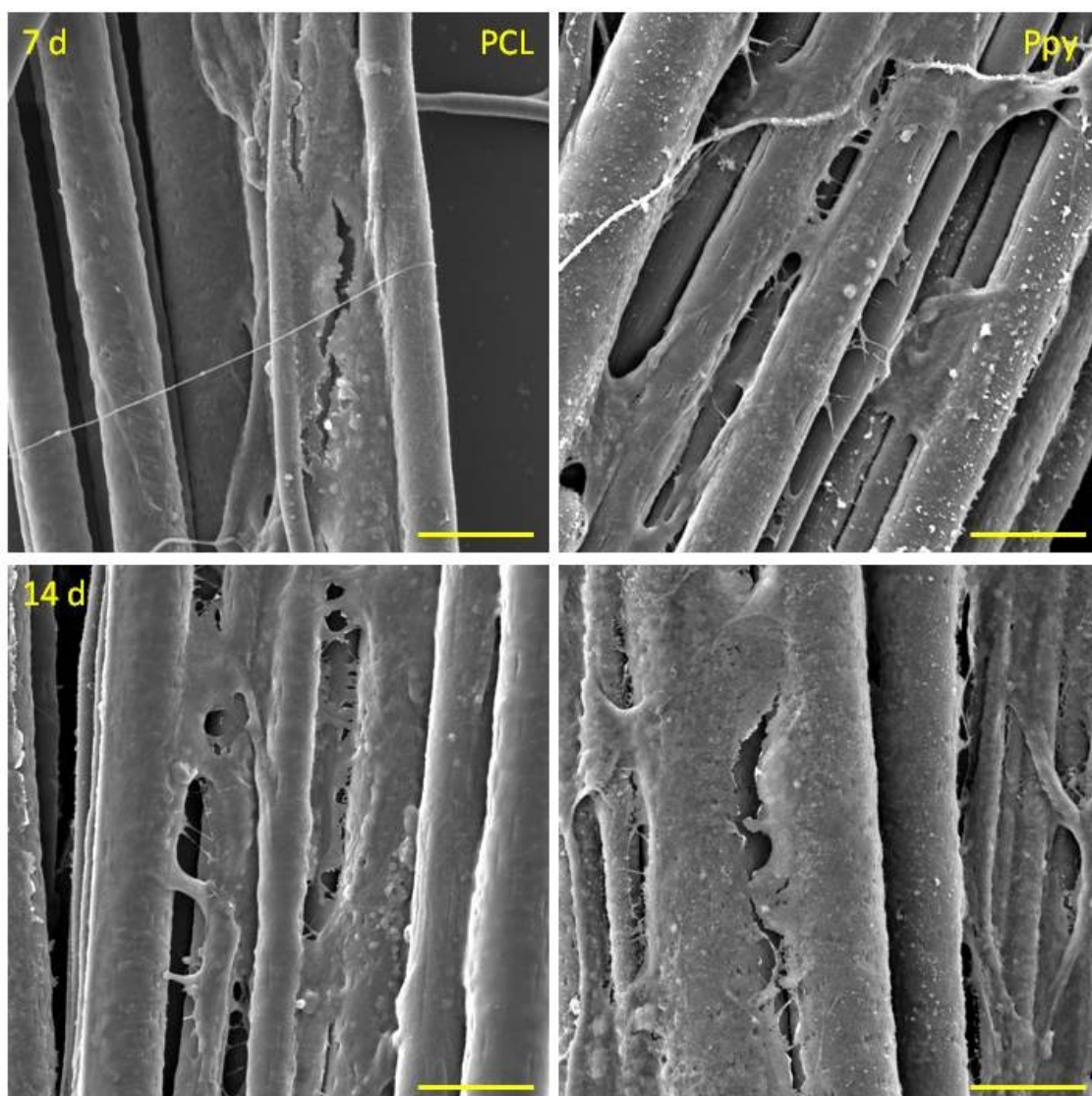
Graf A-1 Porovnání absorbance u vzorků PCL potažených polypyrrolem po odečtení absorbance negativní kontroly

B Výsledky testu MTT vláken z drawingu



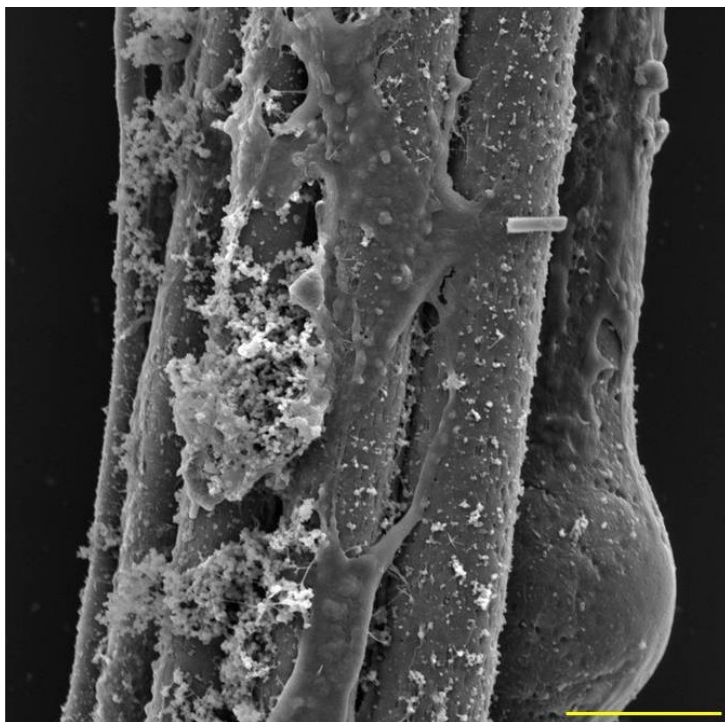
Graf B-1 Porovnání absorbance u vzorků orientovaných vláken potažených polypyrrolem po odečtení absorbance negativní kontroly

C Detailní snímky SEM orientovaných vláken



Obr. C-1 Detailní snímky SEM orientovaných vláken, měřítko odpovídá 20 μm – řádky: testovací dny (7. den; 14. den), sloupce: materiál (PCL; Ppy)

D Defekty vláken



Obr. D-1 Defekty na orientovaných vláknech, měřítko odpovídá 20 μm – Na tomto snímku jsou viditelné defekty vzniklé při tažení vláken, nežádoucí shluky polypyrrrolu i buňky 3T3 rostoucí na vláknech.

E Obsah přiloženého CD

Text bakalářské práce:

BP_Krabcova_2015.pdf