

# Tubulární vzorky z polykaprolaktonu vyráběné pomocí bezjehlového elektrostatického zvlákňování

## Bakalářská práce

*Studijní program:*

B0723A270001 Textilní technologie, materiály a nanomateriály

*Autor práce:*

**Martin Dašek**

*Vedoucí práce:*

Ing. Petra Honzíková

Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů





## Zadání bakalářské práce

# Tubulární vzorky z polykaprolaktonu vyráběné pomocí bezjehlového elektrostatického zvlákňování

*Jméno a příjmení:* **Martin Dašek**  
*Osobní číslo:* T19000243  
*Studijní program:* B0723A270001 Textilní technologie, materiály a nanomateriály  
*Zadávací katedra:* Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů  
*Akademický rok:* **2020/2021**

### Zásady pro vypracování:

1. Zpracování rešerše na dané téma.
2. Výroba materiálů pomocí elektrostatického zvlákňování na přístroji Nanospider s implementovaným cévostrojem a použitím polymeru PCL.
3. Charakterizace materiálu: měření průměrů vláken, tloušťky stěny materiálů, pevnosti a tažnosti, odolnosti v tlaku a porozity.
4. Zpracování a vyhodnocení výsledků.

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

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



### **Seznam odborné literatury:**

- [1] Yalcin, I., Horakova, J., Mikes, P., Sadikoglu, T. G., Domin, R., & Lukas, D. (2016). Design of Polycaprolactone Vascular Grafts. *Journal of Industrial Textiles*, 45(5), 813-833.  
<https://doi.org/10.1177/1528083714540701>
- [2] Yalcinkaya, F. (2019). Preparation of various nanofiber layers using wire electrospinning system. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8), 5162-5172.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.12.012>
- [3] Woodruff, M. A., & Hutmacher, D. W. (2010). The return of a forgotten polymer – Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 35(10), 1217-1256.  
<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002>
- [4] Krajíček, M., Peregrin J.H., Roček . (2007). *Chirurgická a intervenční léčba cévních onemocnění*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-0607-8.

*Vedoucí práce:*

Ing. Petra Honzíková  
Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

*Datum zadání práce:*

1. listopadu 2020

*Předpokládaný termín odevzdání:*

16. května 2022

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

L.S.

doc. Ing. Jiří Chvojka, Ph.D.  
vedoucí katedry

## Prohlášení

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

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

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

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si 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 bakalářská práce bude zveřejněna Technickou univerzitou v Liberci v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů.

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

11. května 2022

Martin Dašek

## **PODĚKOVÁNÍ**

Touto cestou bych velmi rád poděkoval všem, kteří mi pomohli při vypracování této bakalářské práce.

Hlavně bych rád poděkoval vedoucí mé bakalářské práce Ing. Honzíkove za její skvělé vedení, odborné rady a nemalou trpělivost. Dále bych chtěl velice poděkovat docentu Ing. Čapkovi, Ph.D. za jeho pomoc a odborné rady při měřeních pevnosti v tahu a Ing. Hodkové za pomoc v laboratořích KNT.

Dále bych chtěl poděkovat své rodině, která mi byla v době studia oporou a měli se mnou trpělivost.

## **ANOTACE**

Tato práce se zabývá výrobou tubulárních vzorků z polykaprolaktonu pomocí bezjehlového elektrostatického zvlákňování a jejich následnou charakterizací. Do nedávna byla většina 3D nanovlákných netkaných textilií vyráběna pomocí jehlového zvlákňování. Tvorbou nanovlákných tubulárních vzorků se zabývá více pracovišť, ale převážně pomocí jehlového zvlákňování. Možnost výroby těchto materiálů na průmyslovém zařízení by usnadnila jejich přechod z výzkumu a laboratorní výroby do průmyslových podmínek. Výsledky této práce budou dále sloužit pro vývoj těchto postupů a jejich zavedení pro průmyslovou výrobu.

### **Klíčová slova**

elektrostatické zvlákňování, tkáňové inženýrství, nanovlákná, polykaprolakton

## **ANNOTATION**

This work deals with the production of tubular samples of polycaprolactone using needle-free electrostatic spinning and their subsequent characterization. Until recently, most 3D nanofiber nonwovens were produced by needle spinning. The creation of nanofibrous tubular samples is dealt with by several workplaces, but mainly by needle spinning. The possibility of producing these materials on industrial equipment would facilitate their transition from research and laboratory production to industrial conditions. The results of this work will further serve for the development of these processes and their implementation for industrial production.

### **Key words**

electrostatic spinning, tissue engineering, nanofibers, polycaprolactone

# OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ .....	9
SEZNAM TABULEK .....	10
SEZNAM GRAFŮ .....	11
VYSVĚTLENÍ POJMŮ .....	12
<b>1 ÚVOD.....</b>	<b>14</b>
<b>2 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>16</b>
2. 1 VYMEZENÍ OBORU .....	16
2. 2 DŮVOD VZNIKU OBORU .....	17
2. 3 SMĚRY TKÁŇOVÉHO INŽENÝRSTVÍ .....	18
2. 3. 1 Extracelulární matrix.....	18
2. 3. 2 Buňky .....	19
2. 3. 3 Bioaktivní látky.....	19
2. 4 CÉVY .....	19
2. 4. 1 Cévní náhrady .....	21
2. 4. 3 Velkopřůměrové cévní náhrady.....	23
2. 4. 2 MALOPŘŮMĚROVÉ CÉVNÍ NÁHRADY .....	25
2. 5 SCAFFOLDY .....	25
2. 5. 1 Vlákenné scaffoldy .....	26
2. 5. 2 Netkané textilie .....	27
2. 5. 3 Tkaniny.....	27
2. 5. 4 Pleteniny .....	28
2. 5. 5 Mikro a nanovláknenné scaffoldy .....	29
2. 5. 6 Výroba mikro a nanovláknenných scaffoldů .....	30
2. 5. 7 Vlastnosti mikro a nanovláknenných scaffoldů .....	30
2. 5. 8 Nevláknenné scaffoldy .....	31
2. 6 ELEKTROSTATICKÉ ZVLÁKŇOVÁNÍ.....	32
2. 6. 1 Jehlové zvláknění.....	34
2. 6. 2 Bezjehlové elektrostatické zvláknění - Nanospider (struna).....	34
2. 6. 3 Kolektor pro tubulární scaffoldy.....	35
2. 7 POLYMERY POUŽÍVANÉ V TKÁŇOVÉM INŽENÝRSTVÍ .....	36
2. 8 Metody měření nanovláknenných textilií .....	40
2. 8. 1 Skenovací elektronová mikroskopie .....	40
2. 8. 2 Měření kontaktního úhlu.....	41
2. 8. 3 Bublínková metoda (bubble point test).....	42
2. 8. 4 Digitální tloušťkoměr Elcometer 456.....	43
2. 8. 5 Jednoosé namáhání, přístroj Testometric M350-5CT.....	43
2. 8. 6 Zařízení pro zkoušku odolnosti vůči tlaku působícímu zevnitř .....	44
2. 8. 7 Plošná hmotnost .....	45
<b>3. PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>46</b>
3. 1 ZAŘÍZENÍ NA VÝROBU CÉVNÍ NÁHRADY.....	46
3. 2. Příprava polymerního roztoku.....	48
3. 2. 1 Parametry zvláknovacího procesu .....	48
3. 2. 2 Výroba scaffoldu .....	49
3. 2. 3 Analýza tloušťky stěn scaffoldu.....	49
3. 2. 4 Sejmutí vzorku z tubulárního kolektoru.....	50
3. 3 ANALÝZA NANOVLÁKEN VE SCAFFOLDU .....	50
3. 3. 2 Měření průměrů vláken.....	51
3. 4 MĚŘENÍ KONTAKTNÍHO ÚHLU .....	57

3. 4. 1 Příprava a realizace měření kontaktního úhlu .....	57
3. 5 MĚŘENÍ PLOŠNÉ HMOTNOSTI .....	60
3. 6 POROZITA .....	62
3. 6. 1 Parametry testu .....	64
3. 6. 2 Příprava vzorku a test .....	65
3. 6. 3 Výsledky .....	65
3. 7 PEVNOST V TAHU .....	66
3. 7. 1 Parametry testu .....	67
3. 7. 2 Vyhodnocení zkoušky pro vzorky A.....	68
3. 7. 3 Vyhodnocení zkoušky pro vzorky skupiny B .....	70
3. 8 PEVNOST V TLAKU PŮSOBÍCÍMU ZE VNITŘ.....	72
3. 8. 1 Vyhodnocení zkoušky odolnosti vůči tlaku působícímu zevnitř .....	73
<b>4. ZÁVĚR.....</b>	<b>75</b>
<b>POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>78</b>



## Seznam obrázků

OBRÁZEK 1: SCHÉMA POSTUPU V TKÁŇOVÉM INŽENÝRSTVÍ.....	17
OBRÁZEK 2: LOKACE VENA SAPHEMA MAGNA A VENA SAPHEMA PARVA .....	22
OBRÁZEK 3: VRAPOVANÁ PLETENÁ CÉVNÍ NÁHRADA Z POLYESTEROVÉHO MONOFILU .....	28
OBRÁZEK 4: PROCES ELEKTROSTATICKEHO ZVLÁKŇOVÁNÍ NA SF PŘÍZI, PRO VÝROBU MIKRO/NANO SCAFFOLDU .....	30
OBRÁZEK 5: PRINCIP ELEKTROSTATICKEHO JEHLOVÉHO ZVLÁKŇOVÁNÍ NA PLOCHÝ KOLEKTOR .....	33
OBRÁZEK 6: PROCES ELEKTROSTATICKEHO ZVLÁKŇOVÁNÍ NA STRUNOVÉ ELEKTRODĚ.....	35
OBRÁZEK 7: PCL (E-KAPROLAKTON) JE SYNTETIZOVÁN Z CYKLICKÉHO E-KAPROLAKTONU.....	38
OBRÁZEK 8: SCHÉMA SKENOVAČÍHO ELEKTRONOVÉHO MIKROSKOPU .....	41
OBRÁZEK 9: SOFTWARE PRO MĚŘENÍ KONTAKTNÍHO ÚHLU VYFOCENÉ KAPKY .....	42
OBRÁZEK 10: SOFTWARE A STROJNÍ ZAŘÍZENÍ PRO JEDNOOSÉ NAMÁHÁNÍ NEBOLI „TRHACÍ STROJ“ .....	44
OBRÁZEK 11: MĚŘENÍ ODOLNOSTI VZORKU VŮČI TLAKU ZE VNITŘÍ .....	45
OBRÁZEK 12A: ZAŘÍZENÍ NANOSPIDER V PŘEDU S KLIMATIZAČNÍ JEDNOTKOU V POZADÍ.....	47
OBRÁZEK 12B: ZVLÁKŇOVACÍ KOMORA ZAŘÍZENÍ NANOSPIDER S IMPLEMENTOVANÝM CÉVOSTROJEM.....	47
OBRÁZEK 13: TUBULÁRNÍ KOLEKTOR S MOTORKEM .....	47
OBRÁZEK 14: ŘÍDÍCÍ JEDNOTKA TUBULÁRNÍHO KOLEKTORU .....	47
OBRÁZEK 15: SCAFFOLD SEJMUTÝ Z TYČKY.....	50
OBRÁZEK 16: VZOREK A VNĚJŠÍ STRANA .....	51
OBRÁZEK 17: VZOREK A VNITŘNÍ STRANA.....	51
OBRÁZEK 18: VZOREK B VNĚJŠÍ STRANA .....	52
OBRÁZEK 19: VZOREK B VNITŘNÍ STRANA .....	52
OBRÁZEK 20: PLANÁRNÍ VZOREK .....	52
OBRÁZEK 21: SNÍMEK KAPKY PRO MĚŘENÍ KONTAKTNÍHO ÚHLU .....	59
OBRÁZEK 22: ANALYTICKÉ VÁHY.....	62
OBRÁZEK 23: ROZDÍL MEZI TYPY PÓRŮ .....	62
OBRÁZEK 24: VÝPOČET VELIKOSTI PÓRŮ .....	63
OBRÁZEK 25: STANOVENÍ TLAKOVÉHO SPÁDU PRO VÝPOČET VELIKOSTI PRŮMĚRNÉHO A MINIMÁLNÍHO PÓRU .....	64
OBRÁZEK 26: UPNUTÍ VZORKU DO PŘÍSTROJE TESTOMETRIC M350-5CT .....	67
OBRÁZEK 27: UPEVNĚNÝ ROZTRŽENÝ VZOREK PO TESTU .....	72

## Seznam Tabulek

TABULKA 1: POROVNÁNÍ KONVENČNÍCH CÉVNÍCH NÁHRAD .....	24
TABULKA 2: PARAMETRY ZVLÁKŇOVACÍHO PROCESU .....	48
TABULKA 3: TLOUŠŤKA STĚNY VZORKU V ZÁVISLOSTI NA ČASU ZVLÁKŇOVÁNÍ .....	49
TABULKA 4: ANALÝZA PRŮMĚRŮ VLÁKEN.....	56
TABULKA 5: ANALÝZA KONTAKTNÍCH ÚHLŮ .....	58
TABULKA 6: ANALÝZA PLOŠNÝCH HMOTNOSTÍ .....	60
TABULKA 7: PARAMETRY TESTU POROZITY .....	64
TABULKA 8: ANALÝZA POROZITY VZORKŮ SKUPINY A.....	65
TABULKA 9: ANALÝZA POROZITY VZORKŮ SKUPINY B .....	66
TABULKA 10: PARAMETRY TESTŮ PODÉLNÉ TAŽNOSTI.....	67
TABULKA 11: ANALÝZA TAHOVÝCH ZKOUŠEK VZORKŮ SKUPINY A .....	68
TABULKA 12: ANALÝZA TAHOVÝCH ZKOUŠEK VZORKŮ SKUPINY B .....	70
TABULKA 13: VÝSLEDKY TLAKOVÉ ZKOUŠKY ODOLNOSTI VŮČI TLAKU ZE VNITŘ V MILIMETRECH RTUŤOVÉHO SLOUPCE .....	73
TABULKA 14: VÝSLEDKY TLAKOVÉ ZKOUŠKY ODOLNOSTI VŮČI TLAKU ZE VNITŘ V BARECH .....	73

## Seznam grafů

GRAF 1: TLOUŠŤKY STĚN VYROBENÝCH SCAFFOLDŮ .....	49
GRAF 2: ROZLOŽENÍ PRŮMĚRŮ VLÁKEN NA VZORCÍCH SKUPINY A Z VNITŘNÍ STRANY .....	53
GRAF 3: ROZLOŽENÍ PRŮMĚRŮ VLÁKEN NA VZORCÍCH SKUPINY A Z VNĚJŠÍ STRANY .....	53
GRAF 4: ROZLOŽENÍ PRŮMĚRŮ VLÁKEN NA VZORCÍCH SKUPINY B Z VNĚJŠÍ STRANY .....	54
GRAF 5: ROZLOŽENÍ PRŮMĚRŮ VLÁKEN NA VZORCÍCH SKUPINY B Z VNITŘNÍ STRANY .....	54
GRAF 6: ROZLOŽENÍ PRŮMĚRŮ VLÁKEN NA PLANÁRNÍM VZORKU .....	55
GRAF 7: PRŮMĚRNÉ KONTAKNÍ ÚHLY .....	58
GRAF 8: ZÁVISLOST PLOŠNÉ HMOTNOSTI NA TLOUŠŤCE STĚNY .....	61
GRAF 9: GRAF TAHOVÝCH KŘIVEK VZORKŮ SKUPINY A.....	69
GRAF 10: GRAF TAHOVÝCH KŘIVEK VZORKŮ SKUPINY B .....	71

## Vysvětlení pojmů

**In vitro:** Označení práce v umělých podmínkách například v laboratoři.

**In vivo:** Označení práce v přirozených podmínkách, v živých organismech.

**Scaffold:** Nosič neboli podpůrná kostra, která pomáhá růstu buněk, či tkáni.

**Augmentační materiál:** Materiál využívaný jako výplň defektu.

**Adheze:** Přilnutí buněk k povrchu je zajištěno přítomností adhezivních proteinů na povrchu buněk.

**Proliferace:** Dělení buněk.

**Diferenciace:** Rozrůznění buněk, z nesespecializovaných buněk (kmenových) dochází ke specializaci na určitou funkci.

**Kmenové buňky:** Nediferencované buňky, které jsou schopny přeměnit se diferenciací v kterýkoliv typ buněk.

**Transplantace:** Neboli přenos celého orgánu, či jeho části nebo určité tkáně. Z jednoho těla do druhého, nebo z určitého místa těla na jiné.

**Progenitor:** Předek v přímé linii, biologicky rodová forma.

**Implementace buněk:** vložení buněk do daného materiálu.

**Extracelulární Matrix (ECM):** Mezibuněčná hmota.

**Bioreaktor:** Zařízení simulující přirozené prostředí výskytu dané buňky. Jsou schopny velmi věrně napodobit například prostředí cévy pro kultivaci cévních buněk.

**Multipotentní buňky:** Buňky se schopností se proliferací a diferenciací změnit na jakékoliv buňky, podle místa umístění.

**Pluripotentní buňky:** Buňky se schopností se změnit na různé typy buněk v dané tkáni, například jednotlivé krevní buňky.

**Biokompatibilita:** Materiál nesmí být toxický a jeho přítomnost v těle nesmí nijak negativně ovlivňovat buňky. Po implementaci do organismu nesmí vyvolávat protizánětlivou reakci.

**Biodegradabilita:** Materiál se časem v organismu rozloží, ale produkty jeho degradace musí být též biokompatibilní a netoxické pro organismus.

**Augmentace:** Vyplnění poškozených míst, zvětšení objemu.

**Biomateriál:** Materiál určený pro styk s živou tkání, má zajistit léčbu a regeneraci.

**Biopolymer:** Polymer přírodního původu.

**Regenerativní medicína:** Synonymum pro tkáňové inženýrství.

**Buňky autologní:** Buňky, které jsou odebrány přímo z pacienta.

**Buňky alogenní:** Buňky, které jsou odebrány od dárců.

**Buňky xenogenní:** Buňky, které jsou odebrány z jiného živočišného druhu.

**Kompozitní materiál:** Materiál, který se skládá ze dvou a více materiálů s rozdílnými vlastnostmi, které dohromady dávají výslednému materiálu vlastnosti, které nemá sama o sobě žádná z jeho samostatných součástí.

**HEPA filtr:** Typ filtru, který je schopný ze vzduchu s minimálně 99,97 % účinností odstranit částice o velikosti 300 nanometrů.

**Autograft:** Štěp, který pochází ze stejného jedince, je odebrán z jiného místa těla.

**Aloštěp:** Štěp odebraný od jedince stejného druhu, tedy od dárce.

**SF struktura:** Struktura s obsahem krátkých vláken podle HVI [%].

**Bioresorbovatelnost:** Organismus je schopen daný materiál nejen odbourat, ale také vstřebat a využít.

**Cartridge:** Součást zařízení Nanospider, která přejíždí přes požadovanou délku zvláknovací elektrody a nanáší na ní polymerní roztok pro zvláknování.

**PCL** – polykaprolakton

**PDX** – plydioxanon

**PLA** – polymléčná kyselina

**PGA** – polyglykolová kyselina

**PLGA** – kopolymer polymléčné a polyglykolové kyseliny

# 1 Úvod

Kardiovaskulární onemocnění jsou v České republice nejčastější příčinou smrti, a to téměř v polovině případů. U žen to je přibližně 50 % všech úmrtí a u mužů je to kolem 42 %. Pokud bychom porovnali věkově standardizovanou míru úmrtnosti na kardiovaskulární onemocnění v České republice s průměrem zbytku Evropské unie, tak je v Česku o 60 % vyšší, než je průměr Evropské unie (k roku 2014). Avšak i na celém světě jsou kardiovaskulární onemocnění jednou z nejčastějších příčin smrti. Přičemž jenom na území Evropy ročně zemře kolem 4 milionů lidí na tato onemocnění, a v Spojených státech amerických se toto číslo pohybuje kolem 1 milionu obyvatel. [37]

Na rozdíl od jiných typů onemocnění lze kardiovaskulárním onemocněním v mnoha případech předcházet, či je poměrně účinně léčit. Jejich prevencí může být zdravější životní styl a strava, ale v některých případech prevence nestačí. Mnohdy jsou dispozice k těmto chorobám dědičné, nebo se objeví jako důsledek prodělaných nemocí, či úrazů. Avšak i toto lze léčit, je-li takové onemocnění objeveno včas, díky preventivním lékařským prohlídkám.

Léčba těchto onemocnění může začínat u vhodné medikace na daný problém, ale v případech, kdy je onemocnění objeveno pozdě nebo je příliš rozsáhlé, lze tyto potíže vyřešit pomocí vhodných cévních implantátů. Podrobný rozbor jednotlivých náhrad, jejich výhod a nevýhod je dále v této práci popsán.

Umělé cévní náhrady jsou většinou vyráběny ze speciálního typu polyethylentereftalátu, a to převážně textilními technologiemi jako například pletení a tkaní. Další nejčastější technologií výroby je extruze z polytetrafluoretylenu. Všechny takto vyrobené náhrady jsou hojně využívány, ale všechny mají také stále mnoho nedokonalostí v porovnání s nativními cévami. Jedním z největších problémů je, že i přes rozmanitou nabídku průměrů cévních náhrad, mají nabízené cévní náhrady průměry od 7 mm výše. To komplikuje léčbu některých onemocnění, kdy je pro léčbu potřeba malopřůměrová náhrada. Tím se rozumí náhrada s průměrem pod 6 mm. V takových případech je léčba stále odkázána na transplantáty.

Tyto malopřůměrové cévní náhrady však nemají příliš velkou úspěšnost při transplantacích a nelze pokaždé využívat autologní transplantáty, kterých není vždy dostatek nebo nejsou ve vhodném stavu. Pro tyto potřeby se tkané cévní náhrady prakticky nevyužívají a ani pletené cévní náhrady zde nejsou příliš úspěšné.

Při takto malých průměrech v nich často vznikají sraženiny. Tyto sraženiny mohou následně ucpat cévu nebo se uvolnit dále do krevního řečiště a způsobit infarkt nebo mrtvici.

Ani v případě litých polytetrafluorethylenových cévních náhrad není vysoká úspěšnost. V jejich případě dochází k tvorbě zlomů, kdy je omezen krevní tok. Proto jsou stále snahy o vývoj nových postupů výroby malopřůměrových cévních náhrad. Jedním z těchto vyvíjených postupů je výroba malopřůměrových cévních náhrad pomocí elektrostatického zvlákňování, čemuž se věnuje i tato práce.

V České republice je vývoj a výroba nanovláken na vysoké úrovni. Je to jedno z odvětví textilního průmyslu a vývoje, které vyžaduje specializovaná zařízení a personál, a tudíž je konkurence schopné oproti zahraničí.

V současnosti se většina průmyslově vyráběných nanovlákných vrstev v České republice vyrábí pomocí zařízení Nanospider. Toto zařízení umožňuje výrobu nanovláken v průmyslovém měřítku.

Z nanovláken je však možné vyrobit i 3D útvary, jako jsou tubulární scaffoldy. Průměr těchto scaffoldů je závislý na průměru zvlákňovacího kolektoru, a je tak možné vyrábět tyto tubulární scaffoldy i s průměry nižšími než 6 mm. Tyto scaffoldy by tak mohli mít v budoucnu uplatnění v mnoha odvětvích medicíny.

Struktura nanovláken je zároveň v mnoha ohledech podobná některým typům tkání. Díky tomu je tedy možné v budoucnu takto vyrobené scaffoldy více využívat v tkáňovém inženýrství. Jedním z hlavních požadavků tkáňového inženýrství je však dostatečná dostupnost vyrobených scaffoldů. Jelikož například jehlové zvlákňování je oproti zvlákňování ze struny výrazně pomalejší, tak kritérium dostupnosti zcela nespĺňuje. Proto je snaha o vývoj postupů a zařízení, které jsou schopny takovéto scaffoldy vyrábět i v průmyslovém měřítku. Takové zařízení je právě Nanospider, v kterém je možné po implementaci přídatného zařízení vyrábět i právě zmíněné 3D vzorky.

Cílem této bakalářské práce je připravit nanovlákné tubulární vzorky pomocí elektrostatického zvlákňování, právě na zařízení Nanospider. A dále takto vyrobené vzorky podrobit mechanickému testování a charakterizovat je.

V teoretické části je popsáno tkáňové inženýrství, principy elektrostatického zvlákňování a také zařízení z jejichž pomoci byla provedena charakterizace vyrobených vzorků.

V praktické části jsou pak podrobně sepsány a zpracovány výsledky z mechanického testování a charakterizace vzorků.

## 2 Teoretická část

Tkáňové inženýrství je vědní obor na pomezí biologie, medicíny, chemie, fyziky a inženýrství. Cílem tohoto nového vědního oboru je vývoj materiálů, které pomáhají regeneraci poškozených tkání. Tyto materiály napodobují strukturu a vlastnosti původní živé tkáně. Scaffoldy slouží k umělému vytvoření přirozeného prostředí buněk. Scaffoldy musí být z vhodných materiálů, které jsou biokompatibilní a biodegradabilní, jako je například Polylakton (PCL). A samotné scaffoldy můžeme vyrobit mnoha způsoby. V této práci se budu přednostně věnovat výrobě nanovlákných scaffoldů elektrostatickým zvlákněním.

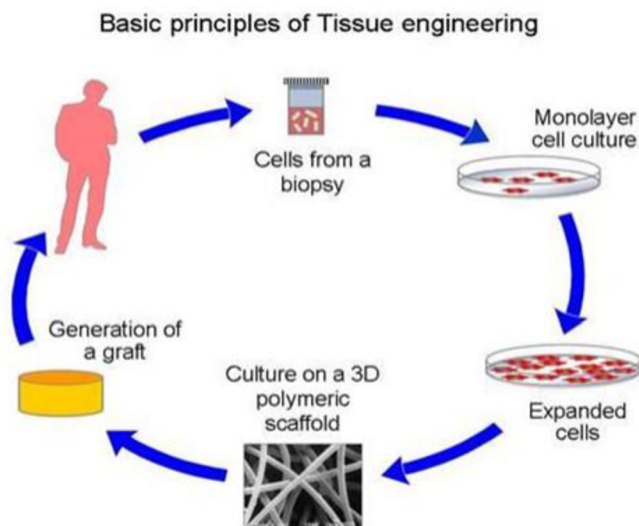
### 2.1 Vymezení oboru

Jako definici pro tento vědní obor se může použít: „*Interdisciplinární obor využívající znalosti inženýrství a přírodních věd k vývoji biologických náhrad sloužících k obnově, zachování nebo zlepšení funkcí tkání nebo orgánů*“ (Langer et Vacanti, 1993) [1]

Tkáňové inženýrství, jako vědní obor vzniklo v roce 1988 a jedním z hlavních úkolů tohoto oboru je vývoj tzv. scaffoldů in vitro, které mají pomoci zajistit regeneraci poškozených tkání. Scaffold imituje přirozené prostředí buněk, a tak napomáhá jejich regeneraci. V současnosti aplikace tkáňového inženýrství může urychlit přirozenou regeneraci poškozených míst například u pacientů se sníženou schopností regenerace, mohou to být například umělé cévy u pacientů s těžkým diabetem, kdy dochází ke kornatění cév.

Rozlišují se tři základní typy léčby, a to buněčná terapie, využití pouze samotných biomateriálů a třetí metodou je právě využívání scaffoldů osazených buňkami. Využívá se například u léčby poranění kloubní chrupavky, protože samotné biomateriály bez buněk nevytvoří mezibuněčnou hmotu a samotné buňky, které nejsou ničím drženy, migrují pryč z místa defektu. [1,2]





Obrázek 1: Schéma postupu v tkáňovém inženýrství: 1. Izolace buněk, 2. Kultivace buněk, 3. Výroba scaffoldu, 4. Osazení scaffoldu a následná kultivace, 5. Implantace [1]

## 2. 2 Důvod vzniku oboru

Historický vývoj medicíny se dá rozdělit do dvou období. Do období, kdy jediným cílem bylo zachránění života, a to bez ohledu na následnou kvalitu života či následky zákroku. Dnes jsme ve fázi, kdy se snažíme o plnohodnotné nahrazení či opravení poškozených tkání, aby kvalita života pacienta byla přinejmenším srovnatelná s obdobím před léčbou, ne-li lepší.

V současnosti je jednou z hojně využívaných metod transplantace tkání. I zde však narážíme na řadu problémů, jako je třeba nedostatek vhodných dárců nebo odmítání implantátu pacientem, kdy je nutné potlačovat imunitu pacienta, která by jinak implantát nepřijala. Imunitu potlačujeme podáváním imunosupresiv, ale ty mají řadu vedlejších účinků, kdy v případě potlačení imunity kvůli transplantaci je sice transplantát přijat, ale organismus je mnohem náchylnější k infekcím či virovým onemocněním. Dárcovské tkáně mají také bohužel kratší životnost. Snaha o vyřešení veškerých těchto problémů vedla právě ke vzniku tkáňového inženýrství. To se snaží vyvíjet materiály, které by organismus lépe přijímal, a to bez výše zmíněných problémů. Tyto vyvíjené materiály by do budoucna měli nahradit dnes používané konvenční transplantace tkáně.

Často se pak v souvislosti s tímto druhem léčby užívá pojem regenerativní medicína. Ta je však spíše spojena s používáním kmenových buněk a progenitorů. [2]

## **2. 3 Směry tkáňového inženýrství**

Tkáňové inženýrství se celkově zaměřuje na regeneraci defektů tkání či na transplantace orgánů. Při regeneraci poškozené tkáně musí dojít k dostatečnému namnožení buněk, ale také k tvorbě mezibuněčné hmoty, jenž je nezbytná pro buněčnou proliferaci a diferenciaci, tvoří přirozený scaffold.

Jeho hlavní postupy jsou v prvním kroku izolace buněk z tkáně. Tyto izolované buňky je nutné namnožit, takže druhým krokem je navýšení počtu izolovaných buněk. Když je dostatečný počet vhodných buněk tak v třetím kroku jsou in vitro implementovány do vhodného materiálu, například scaffoldu. Dále v případě, že to vyžaduje typ léčby nastává čtvrtý krok, kde je důležitá buněčná kultivace v scaffoldu, kdy dojde k dalšímu množení buněk, ale hlavně k tvorbě mezibuněčné hmoty dané tkáně. Posledním krokem je pak implantace scaffoldu do místa defektu.

Pro tkáňové inženýrství jsou tři základní prvky, které tvoří tkáň, jsou to buňky, mezibuněčná hmota a biologicky aktivní látky. [17, 18, 19]

### **2. 3. 1 Extracelulární matrix**

Mezibuněčná hmota takzvaný extracelulární matrix (ECM), je produkován samotnými buňkami, jenž obklopuje a tvoří bariéru mezi různými tkáněmi. Každý typ buněk si tvoří svou specifickou ECM podle jejich funkce. ECM je tvořena amorfní a vláknitou složkou. Amorfní složka váže vodu, je tuhá a odolná vůči tlaku. Je složena hlavně z různých disacharidů a látek, které právě dobře vážou vodu například kyselina hyaluronová nebo chondroitinsulfát. Vlákenná složka zajišťuje mechanické vlastnosti ECM například tažnost či elasticitu. Je složena převážně kolagenem, jenž zajišťuje tažnost. Nejvíce zastoupenými druhy u člověka jsou kolagen I až III. Kolagen tvoří fibrily, které jsou dále tvořeny mikrofibrilami. Další vláknitou složkou je elastin, který zajišťuje pružnost tkáně. [17, 18, 19]

### **2. 3. 2 Buňky**

Základním faktorem pro využití buněk v tkáňovém inženýrství je zajištění jejich dostatečného počtu. Buňky jsou nejprve izolovány, pak jsou charakterizovány a namnoženy. Typ buněk, který bude sloužit pro danou aplikaci, se vybírá podle jejich přesného umístění, například pro léčbu kůže se použijí fibroblasty nebo pro chrupavku chondrocyty. Další možností je využití kmenových buněk, které mají schopnost diferenciaci a specializace v závislosti na místě, kam jsou umístěny, protože se jedná buď o multipotentní nebo o pluripotentní buňky. [17, 18, 19]

### **2. 3. 3 Bioaktivní látky**

Při in vitro kultivaci buněk je nutné jejich růst a funkci na scaffoldu podpořit, a právě k tomu slouží bioaktivní látky a nejčastěji se používají cytokiny. Cytokiny jsou „komunikační“ proteiny, jedná se o velkou skupinu polypeptidů. Komunikují tak, že se naváží na receptor buňky, a tak začnou kaskádu reakcí. Cytokiny regulují růst, jelikož ovlivňují proliferaci a diferenciaci buněk, a tak zkrátí čas buněčného vývoje a tím i regeneraci tkáně (například skupina TGF = transforming growth factors). [17, 18, 19]

### **2. 4 Cévy**

Hlavním úkolem cév je transport krve, se kterou jsou transportovány živiny, teplo a na krev vázané plyny, dohromady je tak zajišťována celková homeostáza organismu. Krev je ze srdce pumpována do celého těla aortou, která je tak nejširší cévou a má až 3 centimetry v průměru a dále se pak větví. Rozvětňuje se do tepen, dále do cév o menším průměru až do arteriol s průměrem kolem 20  $\mu\text{m}$ . Na arterioly přímo navazuje síť kapilár, kde dochází k diapedéze. Poté co cévy odevzdají do organismu veškeré živiny a kyslík, navážou na sebe odpadní oxid uhličitý a další produkty metabolismu. Kapiláry přechází do venul (žilky) a ty dále do žil, kde kvůli nedostatečnému tlaku jsou i chlopňe zabraňující zpětnému toku krve.

Diapedéza je prostup nejčastěji bílých krvinek skrz neporušenou stěnu kapilár do okolní tkáně. Tento proces je nezbytný pro imunitu, která je takto zajišťována monocyty, ty projdou do tkáně, kde jsou schopni na základě chemotaxe vyhledat a následně zneškodnit většinu patogenů či cizích částic.

Všechny cévy jsou strukturálně velmi podobné. Jejich stěny mají tři hlavní vrstvy, tunica adventitia, tunica media a tunica intima. Rozdíl mezi jednotlivými cévami je v tloušťce jednotlivých vrstev podle tlaku v daném místě. Například v místech s vyšším tlakem je tunica media mnohem robustnější a má víc buněk hladké svaloviny a elastických vláken. [25]

Tunica intima je vnitřní vrstvou cév, je tvořena endotelovými buňkami, a právě ty vytváří vnitřní povrch cév. Endotelové buňky jsou zpevněny vrstvou bazální vrstvy, což je subendotelová velice tenká vrstva tvořená hlavně ECM a minimem buněk. Subendotelová vrstva se skládá z řídkého kolagenního vaziva a buňky, které se v ní řídce vyskytují, jsou buňky hladké svaloviny. Její ECM je převážně složena z kolagenních vláken a elastinových vláken, dále pak kyselinou hyaluronovou a proteoglykany. Sám endotel je homogenní vrstva plochých polygonálních buněk, které jsou protáhlé ve směru proudu krve v cévě a je bez štěrbin. Buňky endotelu mají ploché jádro, a to je umístěno v centru buňky. Právě přes endotel je zajišťován transport látek z cévy do okolní tkáně a naopak. Sami buňky endotelu mají poměrně dlouhou životnost, ale mají zároveň slabou mitotickou aktivitu. Další jejich schopností je antitrombogenní účinek, který je nezbytný pro lidský organismus, jinak by vznikající sraženiny způsobovaly značné komplikace a smrt. Tohoto účinku dosahuje zabráněním kontaktu mezi subendotelovou tkání a trombocyty, spojováním trombocytů, a tedy vzniku trombů.

Tunica media neboli prostřední vrstva cévy je nejtlustší vrstvou. Zajišťuje téměř veškeré mechanické vlastnosti, které céva má, jako je její pružnost nebo pevnost. Tunica media převážně sestává z buněk hladké svaloviny a její ECM hlavně z elastinových a kolagenních vláken, které zajišťují její dobré mechanické vlastnosti. Kolagenní vlákna odpovídají za pevnost v tahu a elastinová vlákna zajišťují pružnost cévy. Dále pak elastinová vlákna formují v této vrstvě cévy jemné síť, jejichž otvory právě prochází živiny, odpadní látky, leukocyty a další látky z krevního řečiště do tkáně a naopak. Tyto elastinové vrstvy se také mohou tvořit u některých typů cév jako dělicí vrstva mezi tunica media a tunica adventitia, která je nazývána membrana elastica externa. A také dělicí vrstva mezi tunica media a tunica intima a ta je nazývána membrana elastica interna.

Tunica adventitia je nejsvrchnější vrstvou cévy. Sestává převážně z kolagenního vaziva, a to zajišťuje její upevnění do okolní tkáně v organismu, dále ji tvoří fibroblasty, adipocyty a velmi zřídka se zde vyskytují i buňky hladké svaloviny.

V její struktuře celkově převažují kolagenní a elastinová vlákna, která jsou podélně uspořádána. U cév jejichž průměr je větší než 1 mm, jsou ve jejich stěnách vlastní cévy, které jsou nazývány vasa vasorum. Ty zajišťují transport produktů metabolismu do tunica adventicie a tunica medie. [28, 29, 30]

Právě díky této převážně vláknité struktuře je značná snaha o vytvoření vláknenné cévní náhrady, která by díky podobné vláknité struktuře měla lepší vlastnosti než například lité cévy.

### **2. 4. 1 Cévní náhrady**

Úkolem cévních náhrad je nahrazení či opravení poškozených úseků cév. Avšak ne vždy je možné kompletně danou cévu nahradit kvůli rozdílným vlastnostem cév v daných místech. Cévní náhrady je možné rozdělit na biologické a umělé. Biologické jsou tři typy, autotransplantát tedy náhrada odebraná z vlastního organismu, alotransplantát je náhrada odebraná od stejného živočišného druhu ale jiného jedince a xenotransplantát, což je náhrada odebraná z jiného živočišného druhu. Umělé se pak mohou rozdělit na porézní (textilní: pletené, tkané, netkané a netextilní lité) a neporézní (guma, umělá hmota) cévní náhrady. [26]

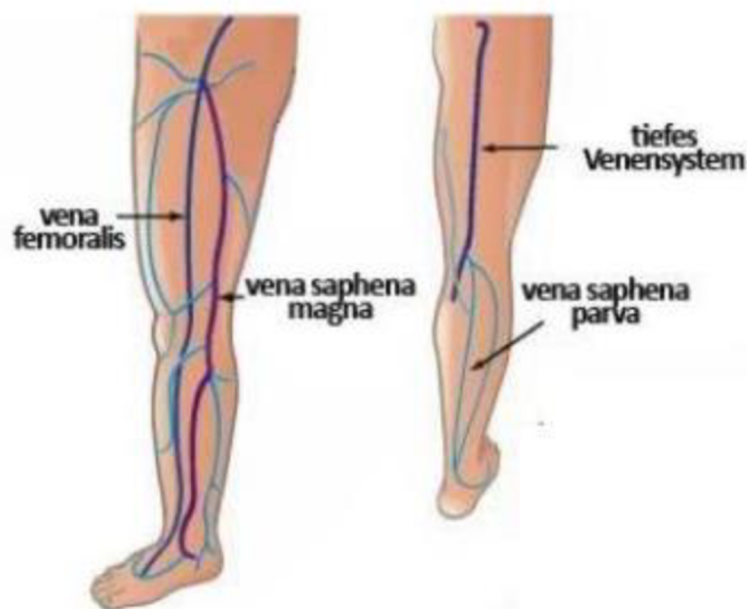
Pokud jsou využívány cévní transplantáty, nejčastěji se jedná o autotransplantáty, a to kvůli větší pravděpodobnosti, že bude náhrada přijata organismem. Pokud se požívají autotransplantáty, rozlišují se na tepenné a žilní.

Tepenné autotransplantáty byly prvně použity již v roce 1896. Objevilo se, že pokud je štěp šetrně odebrán a následně implantován na nové místo, je jeho chování srovnatelné s původní cévou. Po určitém období dojde k zesílení Tunici intimy a následně se sama přizpůsobí novému prostředí. Problém však nastává při získání potřebných rozměrů, jelikož v případě, že se jedná o větší cévy, tak jsou nutné pro zásobování dané oblasti, a tudíž je nelze bez důsledků odebrat. Dalším problémem je, že většinou pokud je přistupováno k cévní transplantaci, je to kvůli aterosklerotickému tepennému postižení, a to bývá rozšířeno na celý tepenný systém. Proto bývají tepenné autotransplantáty nahrazovány žilními autotransplantáty.

Žilní autotransplantáty byly prvně použity již v roce 1951. Pro transplantační účely se nejvíce používají dvě žíly, vena saphema magna a vena saphema parva. A to proto, že obě žíly se vyskytují v podkožní vrstvě, a tudíž jsou velmi dobře přístupné.

Pro transplantaci jsou odebírány jen zdravé žíly nebo jejich úseky. Po transplantaci dochází vlivem změny tlaku v transplantátu k mechanickým a histologickým změnám, a to k adaptaci na nový tlak zesílením stěn a k jejich rozšíření. Jejich nespornou výhodou je přilnavost a tvarovatelnost, což usnadňuje napojení na původní cévu a také jejich implantační porozita je nulová. Tento postup však má i své nevýhody a to, že asi jedna třetina nemocných má obě tyto žíly tenké nebo již znehodnocené, třeba v důsledku trombózy. Dalšími problémy jsou dlouhodobý malý příčný odpor proti vysokému tepennému tlaku, což limituje používání těchto štěpů pro některé oblasti a také dlouhá příprava štěpu.

Z těchto důvodů jsou poměrně značné snahy o vývoj umělých cévních náhrad, které by navíc mohly být připravovány „na míru“ k použití, a tak by vyřešily veškeré výše zmíněné problémy se štěpy. [30]



Obrázek 2: lokace vena saphema magna a vena saphema parva [31]

### **2. 4. 3 Velkopřůměrové cévní náhrady**

Velkopřůměrové cévní náhrady jsou všechny s průměrem větším jak 6 milimetrů. Jsou v cévní chirurgii požívané již řadu let. Je možné je vyrobit tkaním, pletením, či netkanými technologiemi a také litím. Používají se všechny varianty, avšak tkané cévní náhrady jsou pro své vlastnosti a vyrobiteľnost na ústupu. U velkopřůměrových cévních náhradách je menší riziko trombogenicity, a i celková operace je mnohem snazší. Ale i zde je problém s životností cévních náhrad, které se pochybuje kolem 10 let. Operované místo je náchylné k různým výdutím nebo postupnému zužování cévy. [27]

**Tabulka 1: Porovnání konvenčních cévních náhrad**

<b>Cévní náhrady</b>	<b>Tkané</b>	<b>Pletené</b>	<b>Lité</b>
<b>Nejčastější materiál</b>	Teflonová vlákna	Polyesterová vlákna	PTFE pasta
<b>Výhody</b>	Je možné přesně odstupňovat hustotu tkaniny → jsou minimálně prodyšné a nedochází ke krvácení stěnou.	Nedochází k třepení konců a mají vyšší tažnost oproti tkaným.	Snadná výroba, podobná výrobě dutých vláken.
<b>Nevýhody</b>	V důsledku konstrukce mají vyšší ohybovou tuhost, pokud není užita člunková technologie třepí se okraje po ostřížení.	Vysoká poréznost.	Špatná relaxace materiálu po mechanickém poškození, pokud nedojde k úpravě materiálu.
<b>Po vrstvení</b>	/	Původně kreví pacienta, dnes kolagenem	/
<b>Problémy při transplantaci</b>	V důsledku vyšší ohybové tuhosti je horší manipulovatelnost, po ostříhu se třepí okraje → nelze upravovat na sále dle potřeby.	V důsledku vysoké poréznosti je nutno vyrobené cévy po vrstvovat, aby nedocházelo k průniku krve skrz stěnu cévy,	Po propíchnutí náhrady při šití, pokud není nějak upravena dochází po obnovení toku krve ke krvácení v okolí nitě.



## 2. 4. 2 Maloprůměrové cévní náhrady

Maloprůměrové cévní náhrady mají průměr menší než 6 milimetrů a téměř se nevyrábí, tudíž léčba těchto částí cév je velice komplikovaná. K poměrně velmi častým chorobám patří onemocnění periferních tepen. K léčbě těchto úseků tepen se používají například nedegradabilní syntetické PTFE nebo Dacron cévní náhrady. Pletené cévní náhrady se zde spíše nepoužívají, jelikož v mnoha případech jsou požadované rozměry na hraně běžně průmyslově vyrobitelných preparátů. Výše zmíněné náhrady mohou poskytnout pacientovi asi 10 let života bez závažnějších komplikací. Ale je zde poměrně vysoká náchylnost k trombogenicitě. Právě z těchto důvodů jsou v klinické praxi potřeba maloprůměrové cévní náhrady, které budou podporovat regeneraci tkáně a zároveň budou funkční v delším časovém horizontu.

Jako alternativa k výše zmíněným materiálům byly zkoušeny přírodní materiály, jako kolagen, či elastin, nebo fibrin, nebo také syntetické polymery či decelurizované matrice. Avšak zde byly problémy s komplikovanou výrobou, tvorbou trombů, hyperplazií a imunitním odmítnutím. Právě kvůli těmto potížím byl iniciován výzkum výroby maloprůměrových cévních náhrad z biodegradabilních a biokompatibilních materiálů, jako je polykaprolakton. [27]

## 2. 5 Scaffoldy

Scaffold je v obecném významu struktura poskytující podporu. V medicíně je to struktura sloužící jako lešení pro tvorbu tkáně. Scaffold může být implantován jako samostatný materiál, což se využívá například u náhrad cév. Nebo může být osazen buňkami, zde mohou být dle potřeby podány růstové faktory a také pro lepší vývoj buněk napodobeno přirozené prostředí vytvářené tkáně, což zajistí bioreaktor. Po této in vitro kultivaci jsou hotové tkáňové náhrady implantovány na poškozené místo. Třetí možností je osazení scaffoldu buňkami a jeho okamžitá implantace do místa poškození a in vivo indukovaná regenerace tkáně.

Každý scaffold, aby mohl být bezpečně využit, musí být biokompatibilní a mít vhodné mechanické vlastnosti pro dané použití a popřípadě může být i biodegradabilní. Aby mohl být komerčně dostupný, musí být vyrobitelný a zpracovatelný. Běžné materiály využívané v tkáňovém inženýrství se dají rozdělit dle jejich původu na tři skupiny: přírodní materiály a jejich modifikace, syntetické materiály a kompozity. Nebo se dělí podle jejich vlastností a vzhledu na porézní scaffoldy, hydrogely, vlákenné a nevlákné scaffoldy.

Jako přírodní materiály jsou například hojně využívaný kolagen či substráty na bázi alginátu nebo chitosanu. Tyto polymery jsou biologicky aktivní a podporují buněčnou adhezi a proliferaci. Dále jsou také biologicky plně rozložitelné, čímž umožní buňkám vytvořit si vlastní ECM. Avšak jejich mechanické vlastnosti a homogenita je oproti syntetickým materiálům horší, a i samotná vyrobitelnost reprodukovatelných struktur je mnohem složitější. Například v případě chitosanu, kdy samotný chitosan je těžko zvláknitelný a je nutné k němu přidávat polymer, který je dobře zvláknitelný a poslouží jako nosič pro chitosan.

Pomezí mezi přírodním syntetickým scaffoldem tvoří keramika, ta je velmi tuhá, neelastická a má křehký povrch. Je tvořena většinou hydroxyapatitem nebo tri-fosforečnanem vápenatým a má široké využití pro reparaci nemocných či poškozených částí muskuloskeletárního systému jako jsou kyčle, kolena nebo zuby.

Syntetické materiály jsou například polykaprolakton (PCL), kyselina poly-L-mléčná, polyethylenglykol nebo kyselina polyglykolová. Tyto látky mají dobré mechanické vlastnosti, ale mají nižší biologickou aktivitu a je zde riziko odmítnutí implantátu. Další syntetické materiály jsou uhlík, křemík a kovy. [8, 4, 3, 2]

### **2. 5. 1 Vlákenné scaffoldy**

Vlákenné scaffoldy jsou vyráběny často z polymerů bez rozměrných postranních skupin. Vlákna se vyrábí buď zvlákněním z taveniny nebo z polymerního roztoku. Při výrobě se mohou optimalizovat průměry vláken (mikro nebo nano). Například cévní náhrady se vyrábí všemi třemi způsoby, kdy každý má své výhody a nevýhody. Při zpracování vláken do plošné textilie se optimalizuje i hustota vláken v textilií a tím i porozita materiálu, které je například pro cévní náhrady klíčová. [15]

## 2. 5. 2 Netkané textilie

Netkané textilie mají větší volný objem a lepší povrch pro využití v tkáňové inženýrství než tkaniny a pleteniny. Netkané textilie jsou většinou izotropního charakteru, což znamená, že jejich vlastnosti jsou stejné ve všech směrech, proto v případě jejich aplikace není nutné hlídat směr položení materiálu kvůli mechanickým vlastnostem. Při výrobě netkaných textilií je nutné zvolit vhodnou technologii výroby v závislosti na jejím výsledném použití, aby například neobsahovala toxická pojiva či rezidua toxických rozpouštědel, užitých při přípravě roztoku pro zvláknění.

V poslední době jsou velmi slibné scaffoldy z netkaných textilií z polyglykolové kyseliny nebo polykaprolaktonu, které se dají využít pro léčbu vad a poškození chrupavky, cév a srdečních chlopní. Cévní náhrada z netkané textilie může být vyrobena elektrostatickým zvlákněním na tubulární kolektor. [15]

## 2. 5. 3 Tkaniny

Scaffoldy vyrobené tkaním vznikají z minimálně dvou na sebe kolmých soustav nití (osnovní a útkové) a ty se navzájem kříží ve vazných bodech. Ve vazných bodech v tkanině dochází k tření mezi nitěmi, a to spolu s volbou vazby a typu příze zvyšuje výslednou ohybovou tuhost výsledné náhrady. Tkaniny jsou také pevnější a umožňují výrobu strukturně orientovaných scaffoldů, což se využívá v léčbě nervové tkáně. Pokud je však zvolena jiná než člunková technologie, tak dochází k třepení okrajů vyrobené tkaniny, což negativně ovlivňuje vlastnosti výrobku. Velkou výhodou naopak je možnost přesně zvolit výslednou hustotu tkaniny (tedy dostavou osnovních a útkových nití). To ve výsledku zajišťuje minimální prodyšnost a v případě cévních náhrad to eliminuje krvácení stěnou náhrady. K výrobě tkaných cévních náhrad se pak velmi hojně používají teflonová vlákna. [15]

## 2. 5. 4 Pleteniny

Pleteniny vznikají navzájem propojenými očky a mohou být zátažné či osnovní. V případě zátažných pletenin je nejčastěji užívanou zátažná oboulícní pletenina a v případě osnovní pleteniny je nejpoužívanější vazba trikot. Mají přirozeně díky své struktuře velmi dobré mechanické vlastnosti, a to hlavně pružnost. Výsledná pletenina má oproti tkanině vysokou porozitu, ale menší tahovou pevnost. Kvůli vysoké porozitě je u cévních náhrad nutné vyrobené cévy předsrážet pacientovou krví, protože jinak by v důsledku vysoké porozity došlo k průsaku stěn scaffoldu. Právě předsrážením v pacientově krvi se dočasně porozita velmi sníží. Dnes je tato technika nahrazována impregnací vyrobené cévy kolagenem nebo jinou biokompatibilní látkou, která dočasně sníží porozitu. Nevýhodou je, že i při užití pletacích strojů s velmi jemnými jehlami je porozita stále velmi vysoká. To brání i například uchycení buněk. A i v případě uchycených buněk by vzdálenost mezi nimi byla natolik velká, že by nedokázaly mezi sebou vytvořit vzájemné vazby, a tak by nedokázali vytvořit svou vlastní ECM. Proto je nutné před samotným užitím pleteniny povrchově upravit. Další úpravy mohou být pak vrapování a nanesení barevné vodící stopy, ta usnadňuje orientaci během implantace jako je vidět na obrázku 2. U pletených scaffoldů se netřepí okraje a konce jako tomu je u tkanin. Jako materiál pro výrobu pletených cévních náhrad se nejčastěji používá polyester. Dalším využitím v cévní chirurgii mohou být pletené stenty. [15,14,3]



Obrázek 3: Vrapovaná pletená cévní náhrada z polyesterového monofilu [3]

## 2. 5. 5 Mikro a nanovláknenné scaffoldy

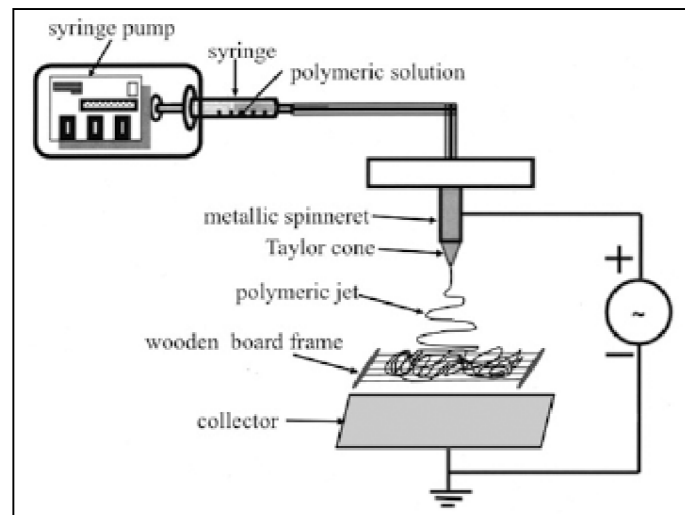
Nano/mikro vláknenné scaffoldy jsou hybridní struktury složené z mikrovláknenné složky, která zajišťuje mechanické vlastnosti scaffoldu a nanovláknenné složky, ta zajišťuje biologické vlastnosti. Jednou z nejčastějších možností aplikace díky své struktuře je pojivová tkáň u šlach a vazů. Tyto tkáně zajišťují pohyb a stabilitu těla a jejich poškození může způsobovat velkou bolest a znemožnit tak pohyb. Navíc mají tyto tkáně nízký hojivý potenciál. V současnosti se pro rekonstrukci tkání šlach a vazů užívají autografty nebo aloštěpy. Používání těchto náhrad je poměrně úspěšné, ale vyžadují odběr nepoškozené tkáně buď od pacienta nebo od dárce, kterým to působí značnou bolest. Jelikož tkáň šlach a vazů je tvořena hlavně z kolagenu typu I a ten sestává z vláknitých svazků byly navrženy vláknenné scaffoldy. Nanovláknenný scaffold má velký poměr povrchu ku objemu, a to podporuje adhezi buněk. Avšak samotná nanovláknenná struktura není dostatečně pevná, aby nahradila tkáň jako jsou šlachy či vazy. Proto byla využita struktura, která obsahovala jak mikrovláknna, tak nanovláknna. Mikrovláknna zajišťují mechanické vlastnosti a nanovláknna svým velkým měrným povrchem ideální prostředí pro adhezi buněk.

Zhou a kolektiv se zabývali zlepšením soudržnosti mezi mikro a nano složkou. Byl navržen postup výroby, kdy nanovláknna z PEO (polyethylenoxid) byla nanášena na vlákna z PA (polyamid) a tato struktura byla zakroucena pro lepší soudržnost mezi složkami.

Z poznatků z výše uvedené práce byla navržena nová struktura. Tato hybridní nano/mikro struktura složená z SF příze pro dobré mechanické vlastnosti a na ní elektrostatickým zvlákněním nanosená vrstva nanovláken z PCL (polykaprolakton), který má dobré biodegradabilní vlastnosti pro tuto aplikaci. PCL degraduje relativně pomalu, což je zde žádoucí, aby byl dostatek času pro obnovu buněk, a hlavně ECM pojivé tkáně. Tato struktura má díky nano/mikro hybridní struktuře vhodné mechanické vlastnosti v tahu a je schopná zajistit vhodné prostředí pro fibroblasty. [7]

## 2. 5. 6 Výroba mikro a nanovláknenných scaffoldů

Tyto náhrady se vyrábí elektrostatičkým zvlákněním roztoku polymeru jako může být PCL na povrch paralelních SF přízi. SF příze je struktura s obsahem krátkých vláken podle HVI [%]. Povlákněná SF příze je za účelem vyšší homogenity zakroucena. Povláknění probíhá tak, že SF příze je jednosměrně vyrovnána a upevněna s danou roztečí na dřevěnou konstrukci, která je umístěna nad plochý kolektor. Následně jsou elektrostatičkým zvlákněním, popsaným výše povlákněny. To zajistí povrstvení SF příze nanovláknny daného polymeru, viz obrázek 5. Takto povrstvená příze je poté ručně zakroucena. A finálně je umístěna do sušárny například pro PCL je to na teplotu 50 stupňů Celsia na 30 minut. Pro každý polymer mohou být podmínky jiné s ohledem přechodové teploty materiálu. [7]



Obrázek 4: Proces elektrostatičkého zvlákněním na SF přízi, pro výrobu mikro/nano scaffoldu [7]

## 2. 5. 7 Vlastnosti mikro a nanovláknenných scaffoldů

Mikrovláknenná složka zajišťuje v scaffoldu jeho mechanické vlastnosti, jako jsou pevnost v tahu či elasticita a odolnost proti mechanickému poškození. Dále zajišťuje mechanickou integritu celého scaffoldu tedy stejné mechanické vlastnosti po celé ploše materiálu.

Spojení mikro a nanovláknenné složky je zafixováno zákrutem, pro vyšší homogenitu mikro a nano složek. Nanovláknenná složka má velký měrná povrch a svou strukturou velmi věrně napodobuje právě strukturu tkání s kolagenem. Kolagenní vlákna mají od 50 do 500 nanometrů což jsou stejné rozměry jako mají vlákna v přirozené tkáni. Nano složka svou strukturou podporuje buněčnou adhezi tudíž zabraňuje migraci implantovaných buněk, například fibroblastů pryč z místa defektu, jako se to stávalo u jiných typů náhrad. A díky podpoře buněčné adheze i zajišťuje podporu migrace buněk z nepoškozených míst do místa defektu a jejich následnou proliferaci na scaffoldu a tím i výslednou regeneraci poškozené tkáně. [7]

### **2. 5. 8 Nevláknenné scaffoldy**

Nevláknenné scaffoldy se dají obecně dle struktury rozdělit na porézní a hydrogely. Porézní scaffoldy připomínají svou strukturou houbu a jejich vlastnosti jsou závislé na jejich hustotě, velikosti pórů a materiálu. Pórovitost je určující faktor pro adhezi a migraci buněk po scaffoldu a také pro transport živin a odpadů nebo pohyb nově vzniklé ECM. Hydrogely lépe napodobují přirozené prostředí buněk pomáhají buňkám s transportem živin a odpadů, ale mají horší mechanické vlastnosti. Mezi nejčastěji využívané polymery patří lineární alifatické estery jako kyselina mléčná a její kopolymery mají své výhody a nevýhody a záleží především na aplikaci. Pro cévní náhrady se často používají lité scaffoldy, nebo pak lyofilizáty.

Lité cévní náhrady se vyrábí tak, že je nejprve připravena z PTFE pasta a ta je dále upravována. Po těchto úpravách je protlačena přes hubici. Ta určuje výsledné rozměry náhrady jako je průměr. Jádro hubice pak určuje tloušťku stěny scaffoldu. Tento vyrobený meziprodukt je zbaven alkoholu, který byl použit při výrobě pasty. Dalším procesem je slinutí což je finální úprava. Výsledný scaffold má porézní houbovitou strukturu. Nevýhodou je, že pokud není tato náhrada dále upravována dochází po implantaci ke krvácení v místě stehu.

Lyofilizace je technologie využívající sušení na principu sublimace. Děj probíhá při teplotě a tlaku, které jsou pod trojným bodem daného rozpouštědla. Po vysušení je zanechána struktura, která může být v případě tkání využita jako scaffold. Jedná se totiž pouze o zbylou ECM původní tkáně, která může být znovu osazena novými buňkami. Dále pak umožňuje dlouhodobé uchovávání materiálů biologického původu jako jsou krevní deriváty či hormony. [16, 6]

## 2. 6 Elektrostatické zvlákňování

Elektrostatické zvlákňování (v angličtině elektrospinning) je jedním z nejpoužívanějších způsobů, kterým je možné vyrobit nanovlákná. Touto technologií se vyrábí nanovláknenné netkané textilie, které se mohou využít v tkáňovém inženýrství jako náhrada ECM či nalézají využití jako filtrační materiály.

Aby bylo vlákno považováno za nanovlákná musí být jeho průměr menší než jeden mikrometr. Elektrostatickým zvlákňováním je možné vyrobit vlákna, jejichž průměry jsou v rozmezí od 50 do 900 nanometrů a v případě, že se zajistí určité podmínky, je možné vyrobit i vlákna o průměru kolem 20 nanometrů. Zaleží hlavně na volbě ideálního polymeru a k němu vhodného rozpouštědlového systému. Je však i možné vyrábět vlákna, která mají větší průměry a to od 1 mikrometru do 3 mikrometrů.

Elektrostatické zvlákňování je dnes mimo jiné využíváno k výrobě vysoce účinných filtrů, a to hlavně do prostředích, kde je vyžadována vysoká míra čistoty, jako jsou operační sály, vzduchová sání pro ventilaci laboratoří nebo ventilační systémy jaderných elektráren, kde je využívána třída HEPA filtrů. Dále se vyrábí jako kompozitní materiály či membrány.

Princip technologie elektrostatické zvlákňování je samoorganizace roztoku polymeru za působení elektrostatického pole do tvaru vláken. Pro elektrostatické zvlákňování jsou zapotřebí 2 elektrody, kdy jedna je nabitá opačným nábojem než druhá, nebo jedna elektroda je nabitá a druhá uzemněná. Polymer je nanášen na elektrodu a po dosažení kritického napětí překonají elektrické síly kapilární síly v polymeru a působící gravitační sílu a část naneseného polymerního roztoku vylétne směrem k druhé elektrodě.

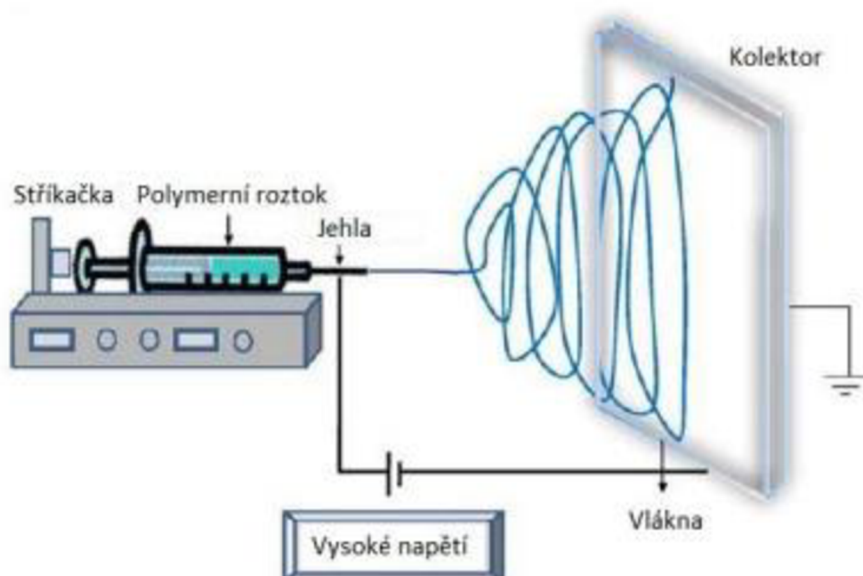
Princip elektrostatického zvlákňování je též dobře patrný z obrázku 3 kde je vidět princip jehlového elektrostatického zvlákňování. Pumpa zde vytlačuje přesně dané množství polymerního roztoku do injekční stříkačky, které je zakončena jehlou a ta je připojena na zdroj vysokého napětí. Naproti jehle je kolektor ten je buď uzemněný, nebo je připojen k zdroji opačného napětí než jehla. Zvlákňování začíná při spuštění vysokého napětí a to tím, že na špičce jehly se na kapce polymerního roztoku tvoří Taylorovy kužele a z jejich vršku vylétí část polymerního roztoku.

Za letu mezi špičkou jehly a kolektorem se odpařuje rozpouštědlo z roztoku polymeru a protahuje se tvar výsledného vlákna, které dopadá na kolektor a spolu s dalšími vlákny a tvoří vláknennou vrstvu.



Samo zvlákňování je během svého procesu ovlivňováno řadou faktorů jako jsou vlhkost a teplota v prostředí zvlákňování, vzdálenost mezi kolektorem a elektrodou, uspořádání spinneru, dávkování roztoku, podkladový materiál, velikost použitého napětí, povrchové napětí a vodivost zvoleného polymerního roztoku, dále jeho viskozita, koncentrace a povrchové napětí.

Další metodou, která má mnohem vyšší výrobnost než zvlákňování z jehly, je zvlákňování z válečku a pro vytvoření Taylorova kužele není zapotřebí žádné jehly. Tato metoda Nanospider byla vyvinuta na Katedře netkaných textilií Technické univerzity v Liberci. Jehla je zde nahrazena válcem a nádobkou válcovitého tvaru. Do nádoby je přiváděn polymerní roztok, v němž je válec z půlky ponořený. Válec je připojen k zdroji stejnosměrného proudu. Válec se v polymerním roztoku otáčí kolem své osy a tím vzniká na jeho povrchu tenká vrstva roztoku polymeru. V horní části válce otáčejícího se v polymerním roztoku, která je nejbližší kolektoru, se důsledkem působení elektrického pole začne vytvářet množství Taylorových kuželů a tvoří se vlákna výše popsaným způsobem. Produkce nanovláken může být ještě dále podporována podsáváním ve směru tvorby nanovláken. Avšak v současné době je již v průmyslu tato metoda nahrazena zvlákňováním ze struny. [10, 11, 12, 13]



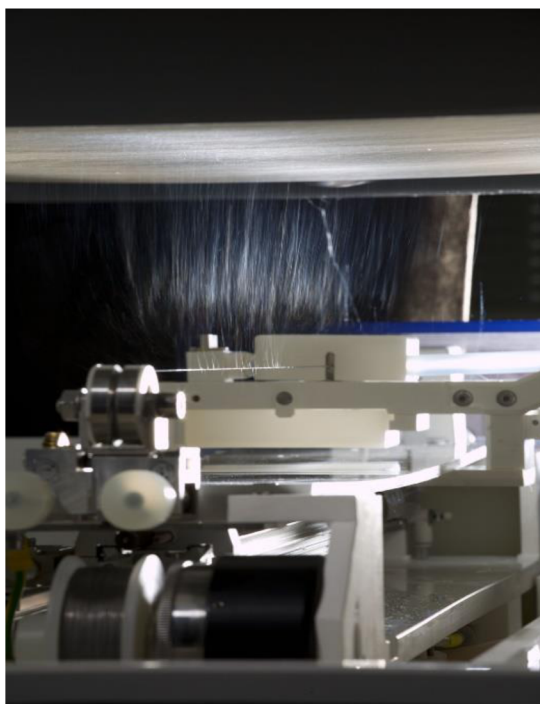
Obrázek 5: Princip elektrostatičkého jehlového zvlákňování na plochý kolektor [12]

## **2. 6. 1 Jehlové zvlákňování**

Princip jehlového zvlákňování je velmi dobře vyobrazený na obrázku číslo 3. V případě Jehlového zvlákňování je do jehly o daném průměru dutinky pumpou tlačena polymerní roztok v přesně daném množství. Jehla je připojena na zdroj vysokého napětí a je nabita buď kladným či záporným nábojem. Naproti jehle je kolektor, který je většinou uzemněn nebo je též připojen k zdroji vysokého napětí, ale vždy opačnému, než je jehla. [10, 11, 12,]

## **2. 6. 2 Bezjehlové elektrostatické zvlákňování - Nanospider (struna)**

Toto zařízení vyráběné firmou ELmarco bylo vyvinuto ve spolupráci s Technickou univerzitou v Liberci. Navazuje na metodu Nanospider vyvinutou prof. RNDr. Oldřichem Jirsákem CSc. Technologie umožňuje zvlákňovat z celé vrstvy polymerního roztoku, nikoli jen z jedné kapky jako tomu bylo u jehlového zvlákňování. Tudíž i výrobnost tohoto zařízení je o mnoho vyšší než u jehlového zvlákňování a je možné ji plně využít v průmyslovém měřítku. Elektrodou, ze které zde probíhá zvlákňování, je struna, která je připojena k zdroji elektrického napětí. Na tuto strunu je pomocí pohyblivé hlavy nanášen polymerní roztok po celé její délce. Díky silnému elektrickému poli, které vytvoří horní kolektor, který je připojen k zdroji opačného elektrického napětí, se na tenké vrstvě polymerního roztoku naneseného na struně začne tvořit velké množství Taylorových kuželů a tím začíná zvlákňování. Aby byl proces kontinuální hlava, zásobující strunu polymerním roztokem stále nanáší novou vrstvu polymerního roztoku. A aby se předešlo zanášení struny zbylým nezvlákněným polymerním roztokem, struna je stále posupně převíjena. Tyto základní procesy jsou nutné pro zajištění konstantních parametrů výstupního materiálu při průmyslové výrobě. [10, 11, 12, 13]



Obrázek 6: Proces elektrostatického zvlákňování na strunové elektrodě [13]

### **2. 6. 3 Kolektor pro tubulární scaffoldy**

Má-li být vyroben tubulární scaffold, tedy trubicovitý tvar elektrostatickým zvlákňováním, je potřeba speciální tvar kolektoru. Kolektor musí mít válcový tvar, který má průměr požadovaného scaffoldu. První, kdo tuto metodu použil, byl Formhals, který elektrostaticky zvláknil polymerní roztok na kolektor válcového tvaru v roce 1934. Avšak v té době nenašel způsoby pro průmyslové využití.

Válcový kolektor může ve výrobě nanovláknenného scaffoldu zajistit požadovanou orientaci vláken, a navíc se při zvlákňovacím procesu vlákno přichytí na kolektoru a dochází k „navíjení“ vlákn na kolektor, a právě při navíjení může docházet i k dloužení vláken tažením. [5,23,11]

## 2. 7 Polymery používané v tkáňovém inženýrství

Jedním ze způsobů rozdělení polymerů pro tkáňové inženýrství je na degradabilní a nedegradabilní polymery. Degradabilní polymery se vlivem fyzikálních a chemických pochodů buď zcela rozloží, nebo se rozpadnou na menší částičky.

Nedegradabilní polymery také degradují, ale jiným způsobem a v mnohem delším časovém horizontu, řádově jde o stovky až tisíce let.

Degradabilní polymery jsou polymery, které se rozkládají v řádu měsíců až let. Pro tkáňové inženýrství, pokud využíváme degradabilní polymery, je nutné využít takzvané biodegradabilní polymery. Biodegradabilní jsou polymery, které nejsou toxické pro organismus a ani jejich produkty degradace nejsou nijak toxické. Nejčastěji užívané degradabilní polymery a od nich odvozené kopolymery v medicíně jsou:

- PCL – polykaprolakton
- PDX - plydioxanon
- PLA – polymléčná kyselina
- PGA – polyglykolová kyselina
- PLGA – kopolymer polymléčné a polyglykolové kyseliny

Tyto biologicky rozložitelné polymery se stále více používají ve všech oblastech medicíny. Protože právě výše zmíněné polymery degradují při hydrolytických a enzymatických pochodech, které běžně probíhají v našem organismu. Dále je možné jejich fyzikální i mechanické vlastnosti libovolně upravovat dle způsobu aplikace. Degradace těchto polymerů závisí na mnoha faktorech jako je molekulární struktura, hmotnost, krystalinita či kopolymerový poměr. Díky všem těmto vlastnostem jsou vhodné pro výrobu scaffoldů, u kterých je požadováno, aby se za určitý čas samy rozložily a nebyla nutná případná reoperace. Dalšími zdroji těchto degradabilních polymerů jsou sacharidy jako je chitosan hojně užívaný v tkáňovém inženýrství nebo polymery na bázi proteinů, jako je kolagen využívaný například pro tkáňové inženýrství vazů a šlach.

Nedegradabilní polymery jsou polymery, které jsou stabilní v čase v řádech stovek let. Na rozdíl od degradabilních polymerů se například v organismu nerozkládají a v případě potřeby poskytují pevnou oporu stále. Tyto polymery je možné využít například pro pletené cévní náhrady. K tomuto účelu se používá PET (polyethylentereftalát). Dalším materiálem je PMMA (polymethylmethakrylát), který se používá na výrobu nitroočních čoček, kdy je rozložení materiálu nežádoucí.

Nebo dalším využívaným polymerem je PTFE (polytetrafluorethylen), ten je používán k výrobě litých cévních náhrad. Další pak jsou PVC (polyvinylchlorid), PU (polyuretan) nebo UHMWPE (polyetylen s ultra vysokou molekulovou hmotností). U nedegradabilních polymerů je stejně jako degradabilních nutné, aby neuvolňovaly žádné toxické látky. [22]

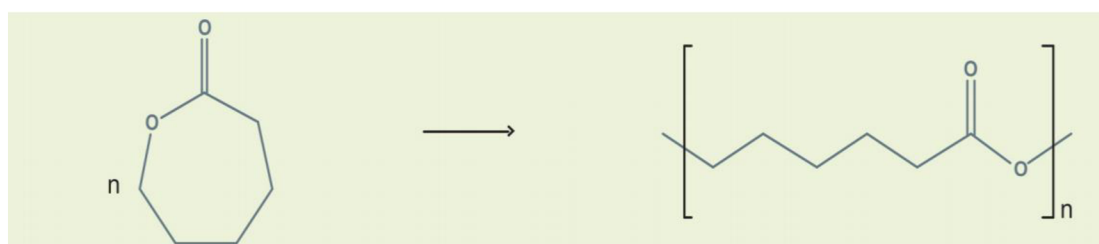
Dalším možným rozdělením polymerů v tkáňovém inženýrství je na přírodní a syntetické polymery. Syntetické polymery sestávají z monomerů, které se pravidelně opakují. Jsou to polymery, které nevznikají přirozeně v přírodě, byly vyrobeny chemickou syntézou. I když jejich biokompatibilita a biodegradabilita jsou horší než u přírodních polymerů, mají většinou mnohem lepší mechanické vlastnosti. Díky množství známých syntéz je možnost připravit polymery s požadovanými vlastnostmi a také skvělou reprodukovatelností, což u přírodních polymerů může být problém.

Aby byly syntetické polymery vhodné pro tkáňové inženýrství měly by mít potřebné mechanické vlastnosti odpovídající jejich využití, měly by být nezáznětlivé a netoxické, jednoduše sterilizovatelné, možností formování do požadovaných tvarů s vhodnou porozitou. Hlavní výhodou syntetických polymerů je možnost připravit jejich vlastnosti přesně pro dané použití. V současné době nevíce zkoumané biodegradabilní syntetické polymery jsou alifatické polyestery, jako je polykaprolakton, polylaktid nebo polyglikolid. A zároveň právě tyto polymery pro své vlastnosti byly schváleny pro in vivo aplikace v klinické praxi. Jsou z nich vyráběny například vstřebatelné stehy nebo dlahy zajišťující vnitřní fixaci. Dále se pak tyto polymery mohou využívat jako scaffoldy, které jsou osazeny buňkami nebo pro buněčnou terapii. [2]

Mezi jedny z nejvíce zkoumaných polymerů patří polykaprolaktony, ty se řadí mezi alifatické polyestery, které se vyrábí polymerací cyklických esterů-laktonů (4-7 členný cyklus). Mezi nejčastěji používané laktony patří ( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL). Ten je syntetizován z cyklického  $\epsilon$ -kaprolaktonu, viz obrázek 6. V současnosti se v průmyslovém měřítku vyrábí polymerací  $\epsilon$ -kaprolaktonu, kdy je otevřen cyklus a vznikne poly( $\epsilon$ -kaprolaktonu). Vysokomolekulární PCL je využíváno jako termoplastické aditivum pro lepidla a další polymery a díky jeho biokompatibilitě je hojně užíván pro medicínské aplikace. Nízkomolekulární PCL se využívá pro úpravu povrchu látek a jako výrobní elastomer pro polyuretany.

Podle současných výsledků potřebuje PCL na kompletní odbourání z organismu asi 3 roky, je biokompatibilní poměrně snadno vyrobitelný a oproti jiným materiálům i levný. Proto je využíván třeba jako nosič léčiv pro dlouhodobé uvolňování. Také jsou z něj vyráběny biodegradabilní svorky a šicí materiál pro chirurgii. Zkoumán je pak pro tkáňové inženýrství menisku a kostí nebo pro biodegradabilní cévní náhrady a mnoho dalších aplikací.

PCL je možné využívat i ve formě kopolymeru, kdy tak můžeme řídit rychlost jeho hydrolýzy. Například kopolymer PCL s varelolaktonem, ten zajistí velmi snadnou degradaci nebo kopolymer s D, L-laktidem, který degradaci značně urychlí. Další možností kopolymerů jsou diblokové kopolymeru například PCL-PLA, ty mají skvělé elastické vlastnosti při aplikaci, při napětí 120 % dokázaly až 250 % prodloužení a 98 % regeneraci. Scaffoldy z tohoto kopolymeru vyrobené elektrostatickým zvlákněním mají také vysokou porozitu kolem 93 %. Takové vlastnosti jsou vhodné třeba pro tkáňové inženýrství svalů. Aby se předešlo nežádoucím reakcím organismu na kyselé produkty alifatických polyesterů, mohou být připraveny multiblokové kopolymeru GA, LA či CL s jinými monomery za vzniku polyesteruretanů, polyesterkarbonátů, polyesteramidů a polyésteresterů. [2,20,21]



Obrázek 7: PCL ( $\epsilon$ -kaprolakton) je syntetizován z cyklického  $\epsilon$ -kaprolaktonu [2]

Přírodní polymery jsou polymery, které vznikají při přirozených metabolických procesech v organismech. Tyto polymery jsou často tvořené z mnoha stejných či podobných monomerů, a tak tvoří dlouhé řetězce molekul. Díky tomu, že k jejich syntéze dochází přirozeně v přírodě, jsou většinou neškodné pro organismus, a tak vhodné pro tkáňové inženýrství. V organismech jsou nositeli životně důležitých biogenních prvků. Mezi přírodní polymery patří sacharidy jako je chitosan a proteiny, jako je například kolagen. Sacharidy jsou složeny z monosacharidů, ty jsou propojeny glykosidovými vazbami. Nejznámějšími zástupci jsou pak celulóza, škrob a chitin. Proteiny neboli takzvané bílkoviny se skládají z 21 aminokyselin, a ty jsou spojeny peptidickou vazbou.

Další velice důležitou skupinou jsou nukleové kyseliny, ty se skládají z nukleotidů. Na tyto báze se pak dále vážou sacharidové složky nukleotidů a dohromady tvoří velice komplexní sloučeniny, které jsou základem živých organismů.

Z hlediska tkáňového inženýrství jsou přírodní polymery ceněné pro svou biokompatibilitu a biodegradabilitu. Ve velké míře podporují buněčnou adhezi, a tak i následnou proliferaci, protože mohou posloužit nejen jako lešení, ale také dočasný zdroj živin pro nově uchycené buňky. Z hlediska mechanických vlastností jsou však často v porovnání se syntetickým polymery mnohem horší. Z proteinů je často využíván kolagen a elastin k tkáňovému inženýrství svalů a šlach. Protože vyrobený scaffold má velmi podobnou vláknennou strukturu s původní tkání. Kolagen je také hojně využíván pro přípravu scaffoldů lyofilizací, která zlepšuje jeho porozitu a prostorovou integritu. Ze sacharidů je ve velkém využíván chitosan pro urychlení regenerace poškozené tkáně, jelikož poskytuje oporu novým buňkám a zároveň vykazuje antimikrobiální aktivitu. Dále se pak užívá kyselina hyaluronová, protože je biodegradabilní, biokompatibilní, bioresorbovatelná a díky schopnosti hydratovat ECM má regenerační schopnosti. Její nevýhodou jsou však velmi špatné mechanické vlastnosti. [2,24]

Pro výhody i nedostatky u obou skupin polymerů se používají jejich kombinace. Biokompatibilní potenciál přírodních polymerů a tím i podpora buněčné adheze a následná proliferace na scaffoldu a díky syntetickému polymeru zajištění stálých mechanických vlastností a popřípadě dalších vlastností daných přípravou polymeru připravených na míru aplikaci. V praxi se tato kombinace často využívá u pletených cév. Kostra cévy je vyrobena z polyesterového monofilu pro vhodné mechanické, jako je pevnost v tahu a chemické vlastnosti. Z vnější strany je ovinuta polyethylenovým vláskem, čímž se zajišťuje nestlačitelnost protézy a pro biokompatibilitu je na povrch cévy nanesen chemicky modifikovaný bovinní kolagenu I, ten usnadňuje následnou regeneraci a v době implantace brání propustnosti cévy. [3]

## 2. 8 Metody měření nanovláknenných textilií

Pro lepší pochopení tématu a souvislostí budou v teoretické části popsány také metody měření, které byly použity v experimentální části.

### 2. 8. 1 Skenovací elektronová mikroskopie

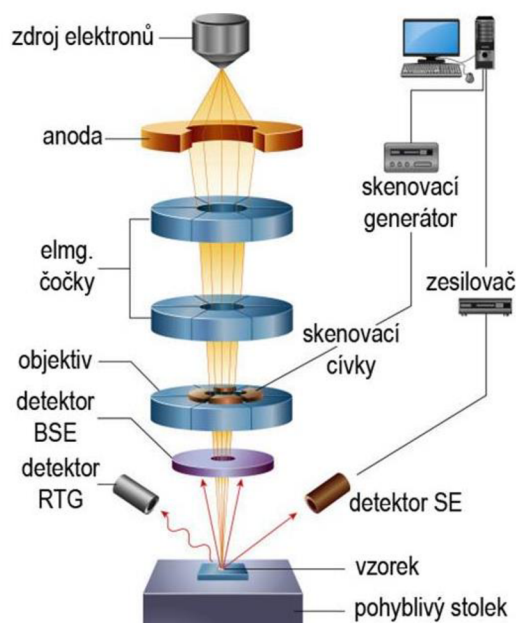
Skenovací neboli rastrovací elektronový mikroskop, je mikroskop využívající k zobrazení preparátu místo odrazu běžného viditelného světelného záření pohyblivý svazek elektronů. Slouží hlavně k topografické analýze materiálů o velmi malých rozměrech, kde k rozpoznání detailů již nestačí běžný optický mikroskop.

Namísto světelného paprsku se zde využívá paprsku elektronů urychlených elektrickým polem. Běžné čočky jsou zde nahrazeny elektromagnetickými čočkami. Preparát je vložen do mikroskopu, kde v průběhu měření musí být vytvořeno vakuum, jinak by docházelo k reakcím elektronů s běžnou atmosférou a ta by změnila dráhu letících elektronů. Od preparátu se odráží sekundární signál, který je zesílen a následně zpracován do obrazu (nepřímá metoda měření). Při reakci elektronů s preparátem vznikají kromě sekundárního signálu i rentgenové záření, katodoluminiscence a Augerovy elektrony což umožňuje získání dalších informací o preparátu. Hlavní výhodou je velká rozlišovací schopnost, je možné dosáhnout až 1 000 000 násobného zvětšení. Pomocí skenovacích elektronových mikroskopů je možné zkoumat povrch preparátu, pro zkoumání vnitřní struktury materiálu se pak využívají transmisní elektronové mikroskopy (TEM).

Pro SEM je nutné preparáty speciálně připravit, na povrchu se nesmí nacházet žádné znečištění. V případě, že měříme biologické vzorky, měla by být nejprve odstraněna veškerá voda. Preparát musí být pokoven pro lepší odraz signálů. Materiály, které se užívají k pokovení jsou zlato, platina, paládium a také uhlík. [32]

Následně je pak možné snímky z elektronového mikroskopu zobrazit v programu, ve kterém je možné měřit průměry vláken například Fiji Imagej. Toto měření průměrů vláken vychází z předpokladu, že vlákna, která jsou měřena, mají kruhový průřez.



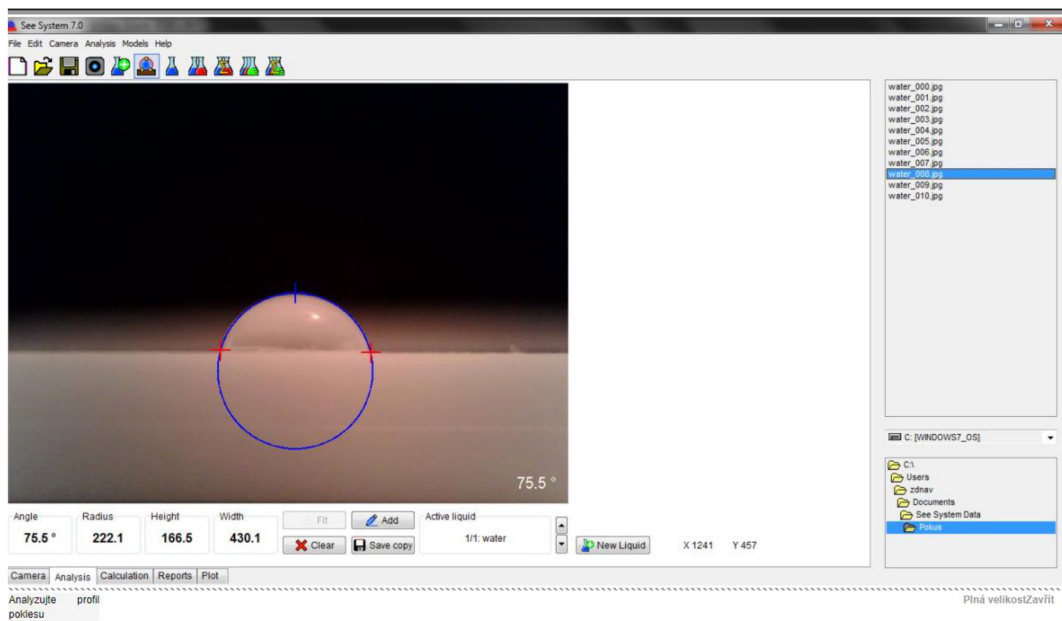


Obrázek 8: Schéma skenovacího elektronového mikroskopu [32]

## 2. 8. 2 Měření kontaktního úhlu

Při měření kontaktního úhlu se určuje úhel mezi kapkou a vodorovným pevným materiálem na kterém se kapka nachází. Jeli kontaktní úhel  $0^\circ$ , tak se kapka zcela vsákla do materiálu, a tudíž jej zcela smáčí, naopak pokud by byl úhel  $180^\circ$ , tak kapka dokonale nesmáčí povrch materiálu. Smáčivé povrchy jsou povrchy, na kterých je kontaktní úhel kapky menší než  $90^\circ$  a povrchy nesmáčivé mají kontaktní úhel mezi kapkou a materiálem větší než  $90^\circ$ .

Pro určení kontaktního úhlu je možné využít Přístroj AdveX Instruments s kamerou. Přístroj sestává hlavně z kamery a destičky, na kterou je vodorovně položen zkoumaný vzorek. Na vzorek je pomocí pipety nanесena kapka destilované vody či jiné kapaliny, kterou chceme kontaktní úhel měřit. Vzorek s kapkou je vyfocen a software následně pomocí dvou okrajových a jednoho vrcholového bodu sestrojí kolem kapky kružnici, z níž pak vypočítá kontaktní úhel mezi kapkou a materiálem. [33]



Obrázek 9: Software pro měření kontaktního úhlu vyfocené kapky [33]

### 2. 8. 3 Bublínková metoda (bubble point test)

Tato metoda umožňuje měření velikosti průtočných pórů porézního materiálu. Průtočný materiál je takový, ve kterém je soustava propojených otvorů, které dohromady utvoří kanálek, který prochází skrz vzorek. Principem této metody je zjištění tlaku, který je potřeba, aby byla vytlačena kapalina, která smáčí měřený vzorek. Smáčecí síla je totiž opačnou silou vůči síle potřebné k vytlačení smáčecí kapaliny z pórů. A ze znalosti smáčecí síly, která přímo závisí na obvodu pórů, je možné spočítat obvod póru. Místo, kde při postupném zvyšování působícího tlaku dojde k prvnímu vytlačení kapaliny z póru (což se projeví bublinkami vzduchu vycházejícími ze stěny vzorku v smáčecí kapalině) je největší, tedy maximální pór v materiálu. Následně se pak výpočtem stanoví velikost maximálního póru. Princip tohoto výpočtu vychází z rovnováhy síly dané povrchovým napětím smáčecí kapaliny a síly dané tlakem vytlačujícím kapalinu z póru. Pokud se dál zvyšuje tlak vzduchu a měří jeho průtok skrz testovaný materiál, je možné zjistit i velikost průměrného a minimálního póru. Pro zjištění těchto dvou údajů je nutné porovnat tlakovou křivku suchého a smočeného vzorku. A dále je pak možné pomocí tlakové křivky suchého vzorku stanovit koeficient propustnosti vzduchu vzorkem. Toto se vypočítá pomocí vztahu  $K=Q*(\Delta p.A)^{-1}$ . Q je zde průtok vzduchu [ $m^2*s^{-1}$ ],  $\Delta p$  značí tlakový spád vzorku [Pa] a A značí plochu toku vzduchu ( $m^2$ ). [34]

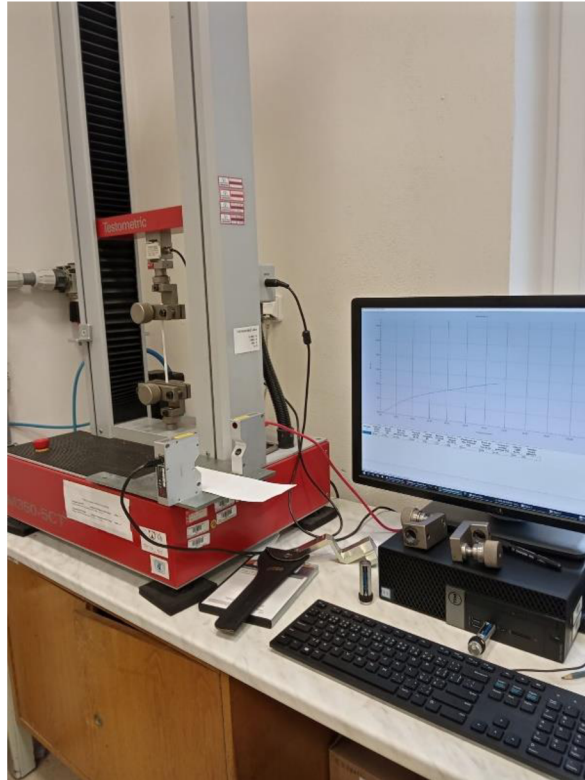
## **2. 8. 4 Digitální tloušťkoměr Elcometer 456**

Elcometer 456 je nedestruktivní zařízení na měření tloušťky materiálu. Přístroj měří tloušťku materiálu pomocí ultrazvukového signálu, který projde materiálem a odrazí se od kovové destičky či jiného kovového podkladu zpět do čidla přístroje. Následně z doby, kterou signál potřeboval na překonání vzdálenosti od přístroje k podkladu a zpět, je vypočtena tloušťka materiálu. Přístroj má digitální display, na kterém se ukáže hodnota v daných jednotkách. [35]

## **2. 8. 5 Jednoosé namáhání, přístroj Testometric M350-5CT**

Toto zařízení je „trhací přístroj“. Vzorek je upnut do dvou čelistí, kdy jedna je stacionární a druhá pohyblivá. U tubulárních vzorků je nutné zajistit, aby se v důsledku jejich upnutí do čelistí nezploštily a proces jednoosého tahového namáhání byl realizován v tubulárním tvaru. Tohoto je docíleno nasazením tubulárního vzorku na trn, který vyplní dutinu vzorku. Takto zajištěný vzorek je upnut do čelistí trhačky a přes počítačový program je nastavena konstantní rychlost, kterou se horní čelist vzdaluje od té dolní až do přetrhu vzorku, kdy test končí a maximální tahová síla je zaznamenána.

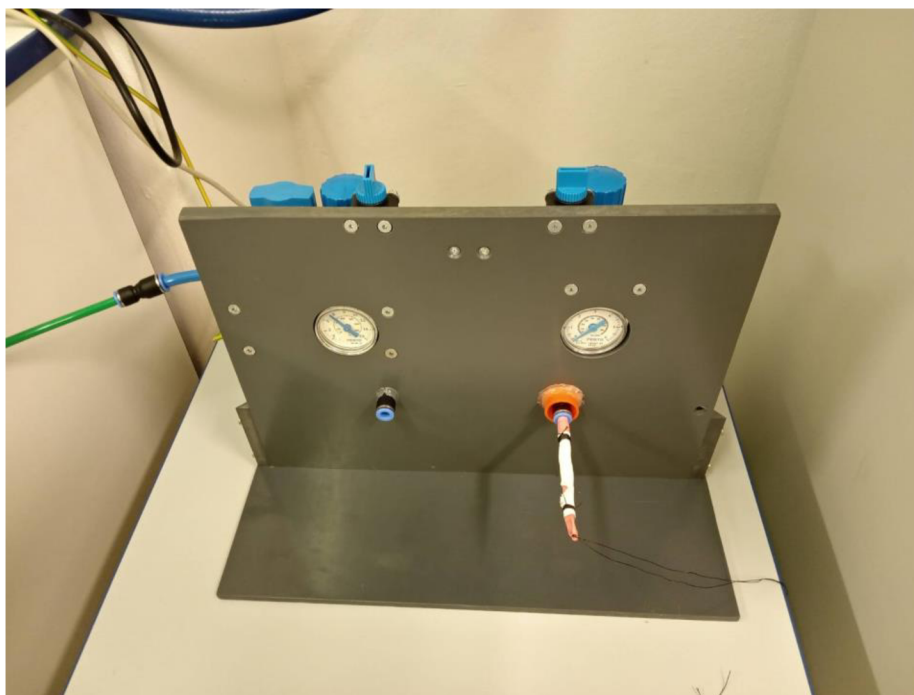
Maximální tahová síla, které zde lze dosáhnout je 5 kN. V procesu tahového namáhání je důležitá i rychlost, kterou je vzorek zatěžován, zde je možné zvolit rychlost v rozsahu od  $0,00001 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$  do  $2000 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ . Ovládání je přes počítač, díky počítačového programu Wintest Analysis, kam se zaznamenávají závislosti síly v tahu na poměrných prodlouženích. Celý průběh měření je zaznamenáván do grafu a tabulky, odkud je následně snadné zpracování výsledků. [36]



Obrázek 10: Software a strojní zařízení pro jednoosé namáhání neboli „trhací stroj“

### **2. 8. 6 Zařízení pro zkoušku odolnosti vůči tlaku působícímu zevnitř**

Toto jednoúčelové zařízení slouží k určení odolnosti materiálu, proti tlaku působícímu zevnitř. Bylo sestaveno speciálně pro potřeby měření odolnosti tubulárních vzorků. Na zařízení je přesně ovládán tlak, kterým je působeno na vzorek. Jde o trn, který je opatřen balónkem - pro homogenní rozvádění tlaku a na ten je nasazen vzorek. Postupně je zvyšován tlak, tedy až do prasknutí vzorku, kdy je maximální hodnota tlaku zaznamenána.



Obrázek 11: Měření odolnosti vzorku vůči tlaku zevnitř

### 2. 8. 7 Plošná hmotnost

Plošná hmotnost je jednou ze základních charakteristik textilních materiálů. Někdy je označována jako gramáž a je to podíl hmotnosti na plochu materiálu. Nejčastěji se uvádí v jednotkách gramy na metr čtverečný [ $\text{g} \cdot \text{m}^{-2}$ ]. Tento údaj dává představu o hmotnosti plošného, či 3D materiálu vztažené na určitou plochu. K jejímu přesnému zjištění se užívá analytických vah, které jsou správně zkalibrovány a umístěny na vhodném, rovném podkladu. V průběhu měření by v okolí vah nemělo docházet k proudění vzduchu, které by ovlivňovalo výsledky získané měřením.

### 3. Praktická část

Cílem této bakalářské práce bylo vytvoření scaffoldu z polykaprolaktonu elektrostatickým zvlákňováním na průmyslovém zařízení Nanospider s tubulárním kolektorem. Jedná se o jednovrstevný scaffold. Po sejmutí vzorků z kolektoru byly vzorky podrobeny mechanickému testování. Vzorky byly testovány na mechanické a morfologické vlastnosti. Z hlediska morfologického byly vzorky podrobeny testům na průměry vláken, porozitu, tloušťku stěny, plošnou hmotnost a kontaktní úhel. Pro zjištění mechanických vlastností byly vzorky testovány na pevnost v tahu a pevnost proti tlaku působícímu zevnitř.

#### 3. 1 Zařízení na výrobu cévní náhrady

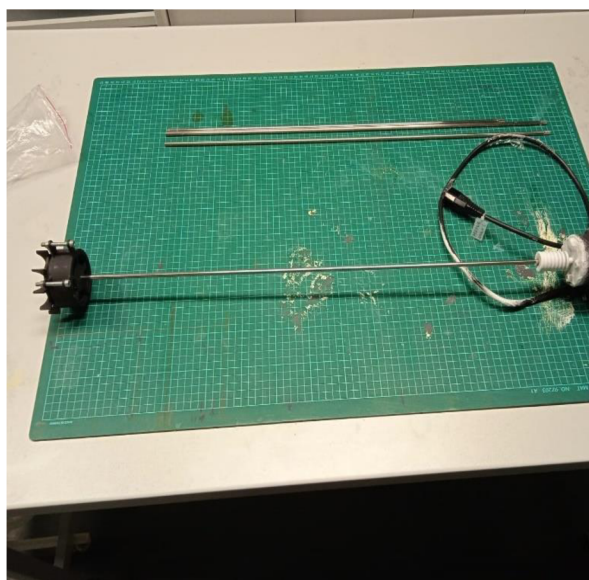
Scaffoldy byly vyrobeny na laboratorním zařízení Nanospider NS1W500U od firmy Elmarco. Do tohoto laboratorního zařízení byl implementován tubulární kolektor s průměrem 6 mm. Kolektor má řídicí jednotku, kde je možné regulovat rychlost jeho rotace. Tento kolektor byl vyroben na míru v rámci projektu SGS. Průměr scaffoldu je závislý na průměru kolektoru. Kolektor je pomocí drátu spojen s horní elektrodou zařízení Nanospider a díky tomu je na něm možné ovládat napětí. Proces zvlákňování probíhá ze struny, která slouží jako zvlákňovací elektroda. Struna je v průběhu procesu zvlákňování stále konstantní rychlostí převíjena, aby nedocházelo k zasychání zbytkového polymeru na struně. Zvlákňovací *cartridge* prochází struna a je na ní nanášen polymerní roztok. Součástí Nanospideru je klimatizační jednotka, která zajišťuje optimální podmínky pro zvlákňování ve zvlákňovací komoře. Udržuje stálou vlhkost a teplotu vzduchu, což jsou faktory, které výrazně ovlivňují celý proces a výsledné materiálové vlastnosti jako je průměr vláken.



Obrázek 12a: Zařízení Nanospider v předu s klimatizační jednotkou v pozadí



Obrázek 12b: Zvlákňovací komora zařízení Nanospider s implementovaným cévstrojem



Obrázek 13: Tubulární kolektor s motorkem



Obrázek 14: Řídící jednotka tubulárního kolektoru

### 3. 2. Příprava polymerního roztoku

Vzorky byly vyráběny z 10% roztoku polykaprolaktonu. PCL byl rozpuštěn v rozpouštědlovém systému vztaženému k rozpouštědlu 8:1:1 - trichlormethan (chloroform): kyselina ethanová (octová): ethanol. Pro ideální rozpuštění polymeru byl po dobu 24 hodin v zmíněném rozpouštědlovém systému za stálého míchání homogenizován.

#### 3. 2. 1 Parametry zvlákňovacího procesu

Jak již bylo zmíněno jako horní kolektor sloužila instalovaná rotující nerezová tyčka, která byla připojena k původnímu kolektoru.

**Tabulka 2: Parametry zvlákňovacího procesu**

<b>Průměr tubulárního kolektoru</b>	6 mm
<b>Napětí na kolektoru</b>	0 kV
<b>Napětí na zvlákňovacím kolektoru</b>	40 kV
<b>Rychlost rotace tubulárního kolektoru</b>	1061 rpm
<b>EMW cartridge</b>	500 - 600 mm*s <sup>-1</sup>
<b>Vzdálenost mezi kolektory</b>	140 mm
<b>Relativní vlhkost vzduchu ve zvlákňovací komoře</b>	50 %
<b>Teplota ve zvlákňovací komoře</b>	22 °C



### 3. 2. 2 Výroba scaffoldu

Nanospider je konstruován na výrobu plošných textilií, proto před samotnou výrobou bylo nutné namontování tubulárního kolektoru s přídatnými zařízeními.

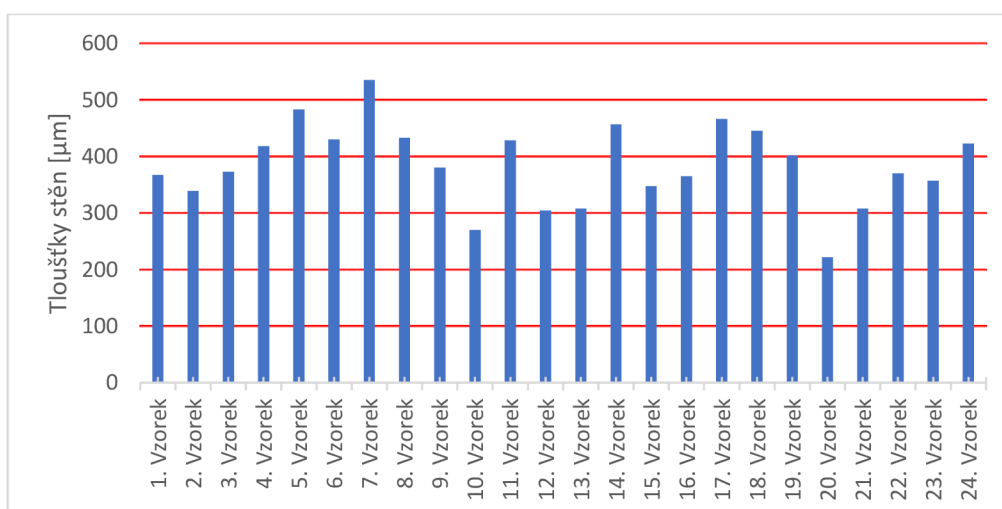
Následovalo sestavení zvlákňovací *cartridge*. Vzorky byly vyráběny ve dvou variantách v závislosti na tloušťce stěny scaffoldu. První skupina, dále skupina A, byly vzorky od tloušťky stěny 300  $\mu\text{m}$  do 399  $\mu\text{m}$  a druhá skupina, dále skupina B, byly vzorky od tloušťky stěny 400  $\mu\text{m}$  do 499  $\mu\text{m}$ .

**Tabulka 3: Tloušťka stěny vzorku v závislosti na času zvlákňování**

Tloušťka stěny vzorku [ $\mu\text{m}$ ]	Průměrná doba zvlákňování [min]
<b>A</b>	7 – 8
<b>B</b>	8 – 9

### 3. 2. 3 Analýza tloušťky stěn scaffoldu

Po zvlákňení scaffoldů bylo provedeno měření tloušťky stěn digitálním tloušťkoměrem Elcometer 456. Pro určení průměrné tloušťky stěny scaffoldu bylo provedeno na každém vzorku 10 měření a z nich pak vypočten aritmetický průměr. V níže přiloženém grafu jsou vidět obě škály vzorků a jejich tloušťky stěn.



**Graf 1: Tloušťky stěn vyrobených scaffoldů**

### 3. 2. 4 Sejmутí vzorku z tubulárního kolektoru

Mezi scaffoldem a kolektorem vzniká silná adheze, která brání prostému sejmутí vzorku bez jeho poškození. Aby byla adheze snížena celé vzorky byly smočeny v ethanolu, který má zároveň desinfekční účinky. Ethanol je zároveň těkavý, a tudíž dochází k rychlému schnutí vzorků. Zároveň bylo zjištěno, že nepoškozuje vzorky. Po smočení v ethanolu byly vzorky postupně stahovány z tyčky. Stahování z tyčky je poměrně obtížné i po smočení v ethanolu a je zde riziko poškození vzorků. Tímto postupným stahováním vzorku vznikla struktura podobná jemnému vrapování.



Obrázek 15: Scaffold sejmутý z tyčky

### 3. 3 Analýza nanovláken ve scaffoldu

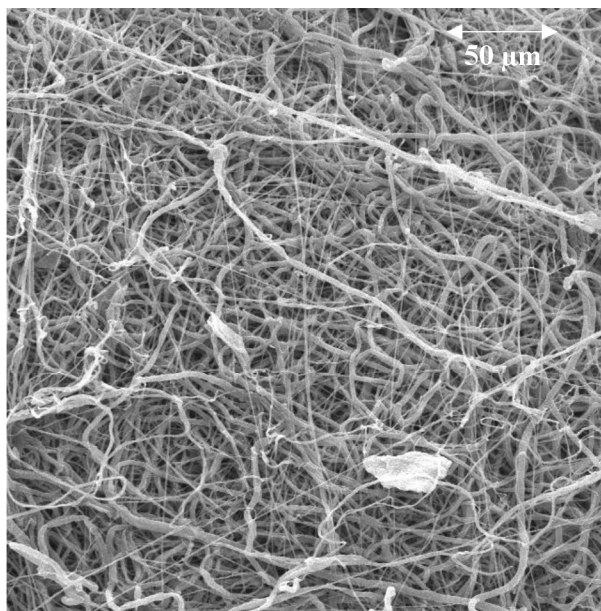
Vyrobený scaffold sestává z nanovláken, jedná se tak o netkanou 3D textilií. Jako základní charakteristika této vrstvy je tak průměr vláken. Jelikož se jedná o nanovlákná k charakterizaci není možné použít standardní optický mikroskop. Z tohoto důvodu je nutné využívat skenovací elektronový mikroskop. A také zlatičku pro povrchovou úpravu vzorku před vložením do skenovacího elektronového mikroskopu.

Ze scaffoldů byly odebrány vzorky o ploše přibližně  $1 \times 1 \text{ cm}^2$ , které byly připevněny na kovový terčík. Na kovovém terčíku byly vloženy do zlatičky Quantum, Q150R – ES. Vzorky byly pokoveny vrstvou přibližně 10 nm zlata. Následně byly vzorky připraveny k vložení do skenovacího elektronového mikroskopu.

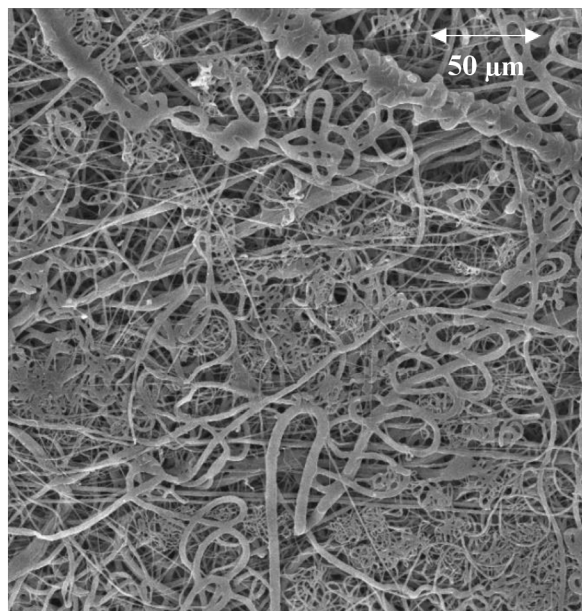
### 3. 3. 2 Měření průměrů vláken

Průměry vláken byly měřeny na snímcích ze skenovacího elektronového mikroskopu TESCAN Vega. Bylo nasnímáno několik snímků od vzorku A, a to z vnitřní strany scaffoldu, a i z vnější strany při různých zvětšeních. Tento samý postup byl znovu použit u druhého vzorku B. Na snímcích je zřetelně patrný rozdíl mezi vnitřní a vnější stranou scaffoldu. Je to dáno tím, že vnitřní strana přímo přiléhá na kolektor, čímž dojde k změně struktury na povrchu vnitřní strany scaffoldu.

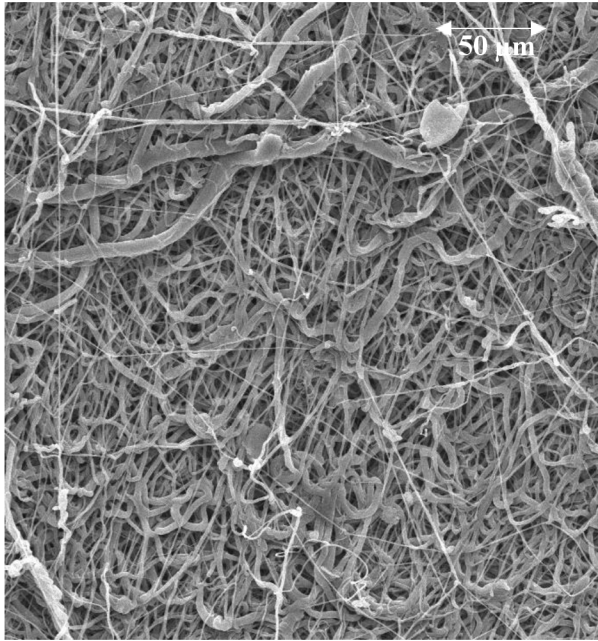
Následné měření průměrů vláken bylo provedeno pomocí programu Fiji Imagej od obou vzorků reprezentující škály byl vybrán jeden snímek z vnitřní a jeden snímek z vnější strany scaffoldu. Na 4 vybraných snímcích bylo provedeno 400 měření na každém snímku. Pro porovnání byl též odebrán a nasnímán vzorek planární, tedy ze spunbondu, který byl v průběhu zvlákňování nad scaffoldem. I na něm probíhalo ukládání části vláken. Na tomto vzorku bylo provedeno 400 měření.



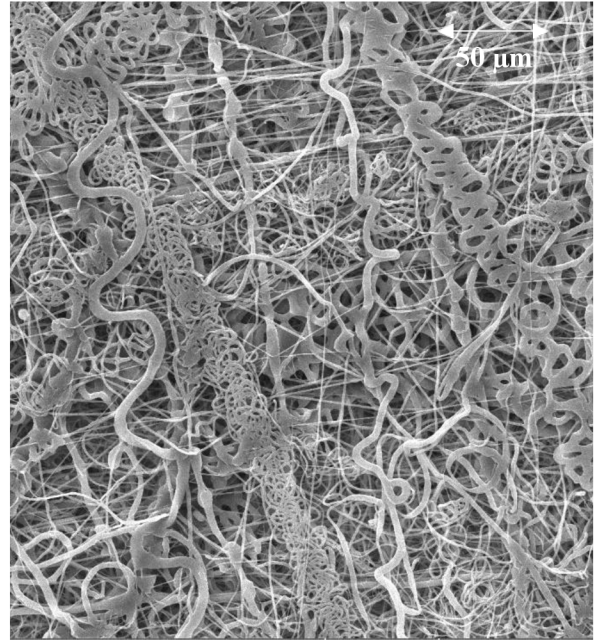
Obrázek 16: Vzorek A vnější strana



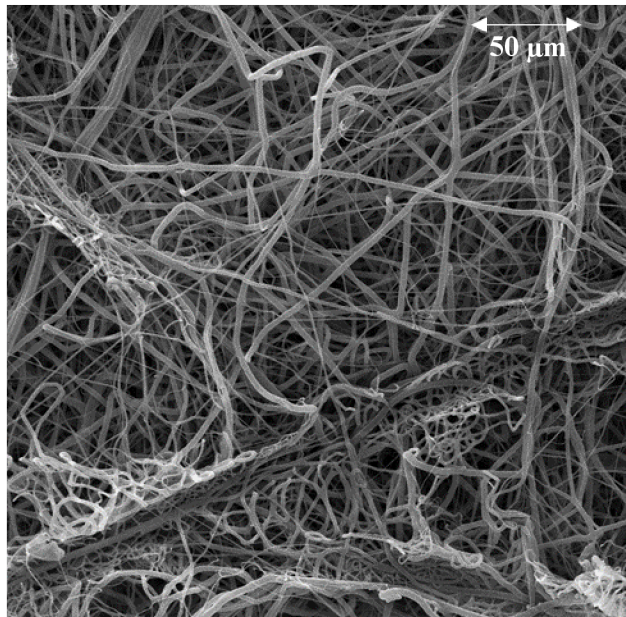
Obrázek 17: Vzorek A vnitřní strana



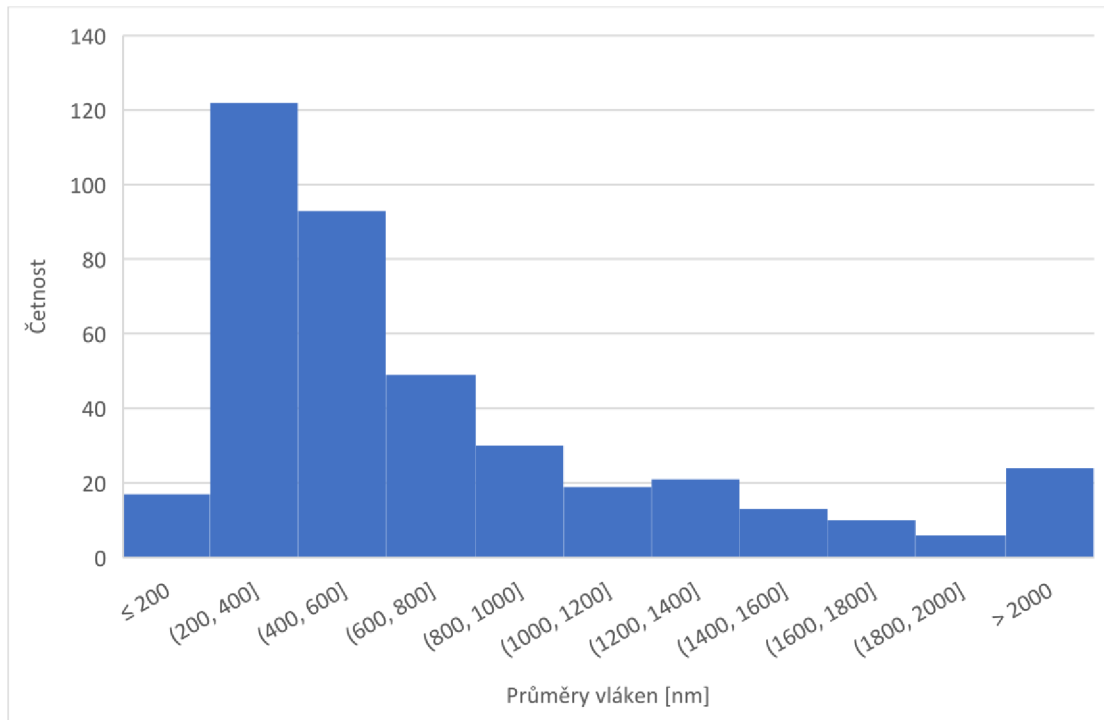
Obrázek 18: Vzorek B vnější strana



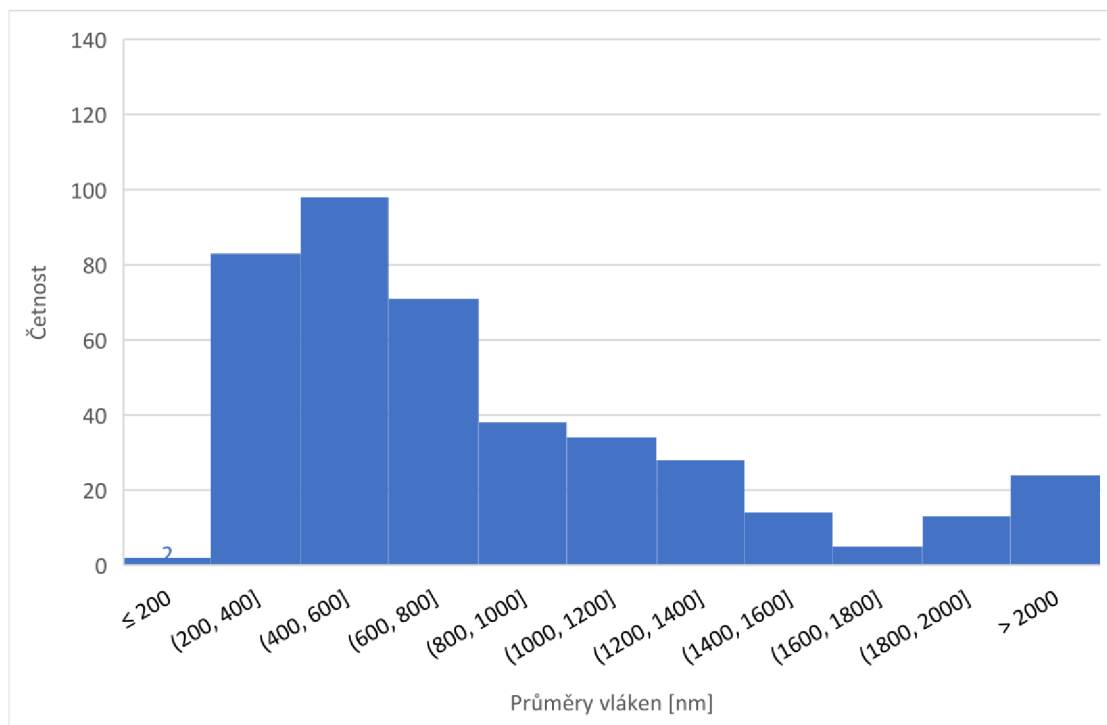
Obrázek 19: Vzorek B vnitřní strana



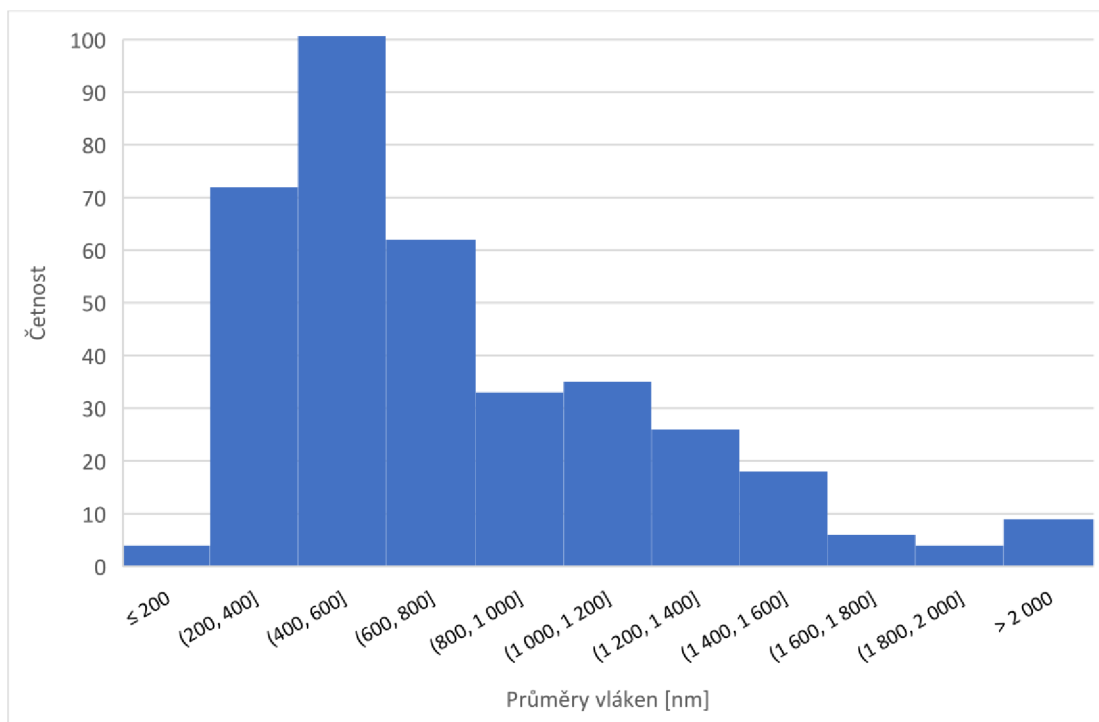
Obrázek 20: Planární vzorek



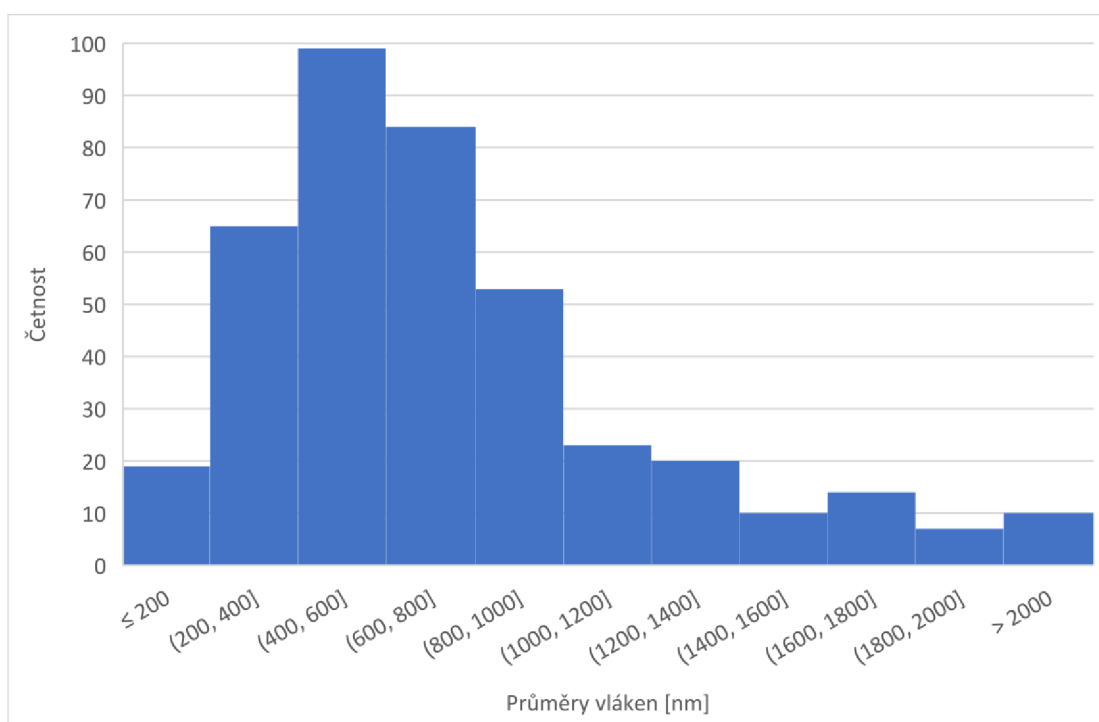
Graf 2: Rozložení průměrů vláken na vzorcích skupiny A z vnitřní strany



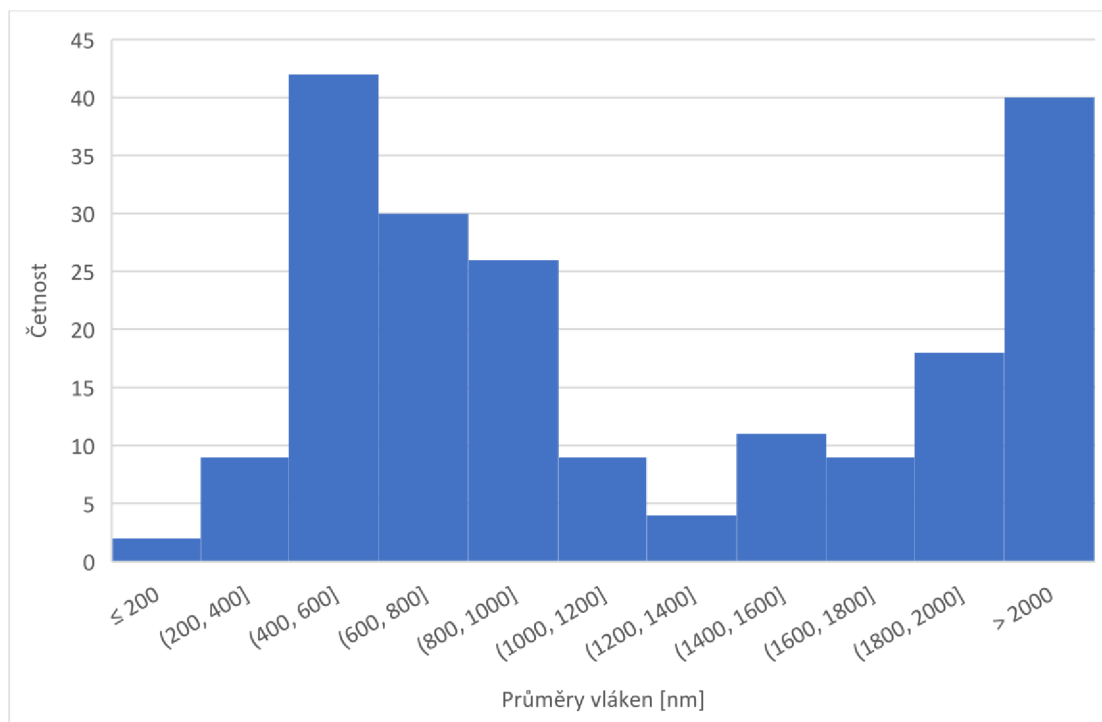
Graf 3: Rozložení průměrů vláken na vzorcích skupiny A z vnější strany



Graf 4: Rozložení průměrů vláken na vzorcích skupiny B z vnější strany



Graf 5: Rozložení průměrů vláken na vzorcích skupiny B z vnitřní strany



Graf 6: Rozložení průměrů vláken na planárním vzorku

**Tabulka 4: Analýza průměrů vláken**

	<b>Průměrný průměr vláken [nm]</b>	<b>Počet měření [-]</b>	<b>Směrodatná odchylka [-]</b>	<b>Variační koeficient [%]</b>	<b>95% interval spolehlivosti [-]</b>
<b>Vzorek A z vnitřní strany</b>	835	400	560,44	67	<838,41 - 833,05>
<b>Vzorek A z vnější strany</b>	745	400	607,8	82	<748 - 742,04>
<b>Vzorek B z vnější strany</b>	790,87	400	1067,43	135	<796,1 - 785,64>
<b>Vzorek B z vnitřní strany</b>	760,77	400	499,52	66	<763,22 - 758,32>
<b>Planární vzorek</b>	1255,55	400	873,74	70	<1259,83 - 1251,26>

U všech čtyřech vzorků měřených jak z vnitřních, tak vnějších stran byl průměrný průměr vláken srovnatelný. Průměrný průměr vláken se u všech čtyřech vzorků nelišil více jak o 100 nanometrů. Je tedy možné na základě těchto dat předpokládat, že v hmotě scaffoldu jsou průměry vláken srovnatelné. Znatelně se lišila směrodatná odchylka a variační koeficient, ale to bylo dáno různorodostí jednotlivých průměrů vláken a náhodným výběrem měřených vláken.

Planární vzorek sloužil jako srovnávací vzorek. V jeho případě probíhala tvorba nanovláknenné vrstvy na podkladovém spunbondu.



### **3. 4 Měření kontaktního úhlu**

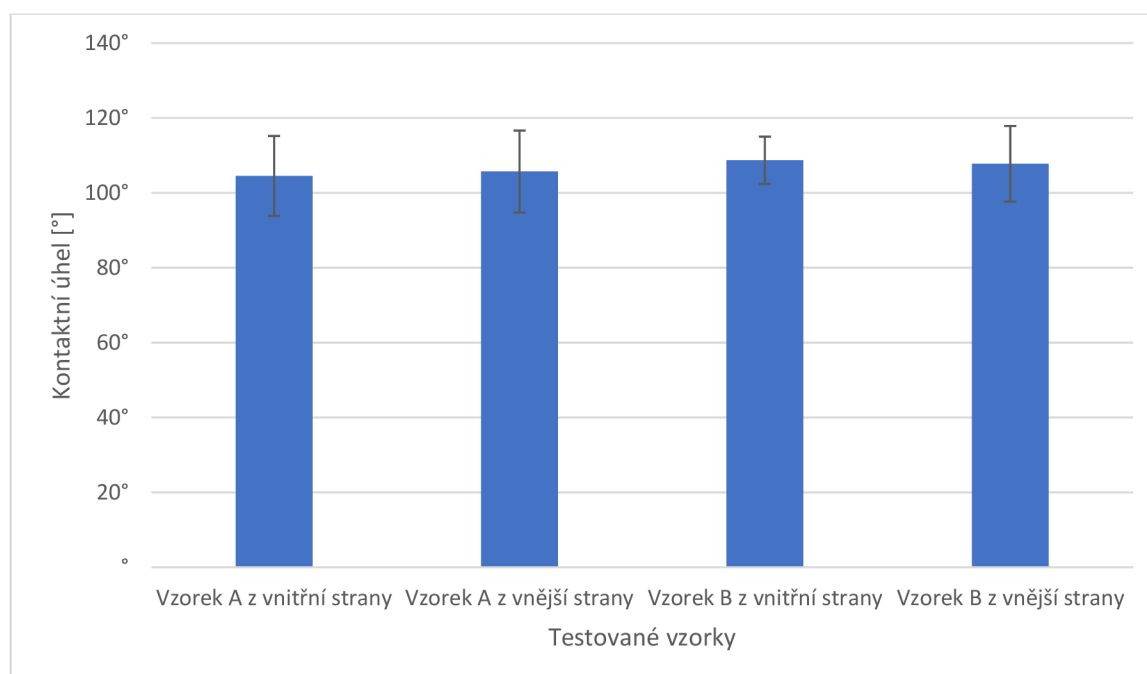
Měření kontaktního úhlu mezi kapalinou, v tomto případě demineralizovanou vodou a vzorkem scaffoldu, bylo zkoumáno, zdali je stěna scaffoldu hydrofobní či hydrofilní. Tyto testy byly provedeny pomocí přístroje AdveX Instruments s kamerou, osvětlením Euromex a speciálním softwarem pro měření kontaktního úhlu materiálu. Měření bylo provedeno na 4 vzorcích, dvou vzorcích skupiny A a na dvou vzorcích skupiny B a to z vnitřní i vnější strany.

#### **3. 4. 1 Příprava a realizace měření kontaktního úhlu**

Vzorky pro měření byly den předem vloženy mezi dvě sklíčka a zatíženy závažím, aby se co nejvíce zploštil jejich tvar a nebylo tak ovlivňováno měření. Následně byly před měřením vzorky přilepeny k podkladovému sklíčku a umístěny na snímací destičku přístroje. Na vzorek byla pomocí pipety nanесena kapka o definovaném objemu 5  $\mu$ l. Následně byla kapka na vzorku vyfocena a pomocí speciálního softwaru změřen na snímku kontaktní úhel mezi kapalinou a vzorkem. Na každém vzorku bylo provedeno 15 měření. Snímek byl pořízen ihned po nanесení kapky.

**Tabulka 5: Analýza kontaktních úhlů**

	<b>Průměrný kontaktní úhel [°]</b>	<b>Počet měření [-]</b>	<b>Směrodatná odchylka [-]</b>	<b>Variační koeficient [%]</b>	<b>95% interval spolehlivosti [°]</b>
<b>Vzorek A z vnitřní strany</b>	104,51	30	10,67	10,21	<103,76 – 105,25>
<b>Vzorek A z vnější strany</b>	105,72	30	10,93	10,34	<104,64 – 106,49>
<b>Vzorek B z vnitřní strany</b>	108,7	30	6,31	5,81	<108,31 – 109,09>
<b>Vzorek B z vnější strany</b>	107,77	30	10,08	9,36	<107,17– 108,37>



**Graf 7: Průměrné kontaktní úhly**



Obrázek 21: Snímek kapky pro měření kontaktního úhlu

Po změření kontaktního úhlu u všech vzorků byl větší než  $90^\circ$ , a proto je možné tento materiál označit jako mírně hydrofobní. Tedy, že materiál mírně odpuzuje kapalinu. Hydrofobní povaha materiálu je vidět i na fotografiích výše, kde je vidět kapka sedící na materiálu. Dle hodnot variačního koeficientu je patrné, že z hlediska hydrofobity je materiál poměrně homogenní, jak při různých tloušťkách stěn, tak po délce vzorku či strany. I v případě 95% intervalu spolehlivosti je vidět poměrně velká homogenita naměřených dat. To je důležité pro jeho plánované použití jako scaffoldu. Tato měření byla provedena okamžitě po nanesení kapaliny, po delším čase docházelo k nerovnoměrnému postupnému vpíjení kapky vody do vlákně struktury. Mírně a dočasně hydrofobní povaha tohoto materiálu by byla vhodná pro transplantaci, jelikož díky dočasné mírné hydrofobitě by byl zákrok snazší pro lékaře. Materiál by ihned nesákl tělní tekutiny a po implantaci by nemělo nedocházet k průsaku. Zároveň ale materiál není příliš hydrofobní, což je vlastnost, která nepříznivě ovlivňuje adhezi buněk na výsledný scaffold. Tudíž by po transplantaci povaha materiálu nebránila adhezi a následné proliferaci buněk na scaffoldu.

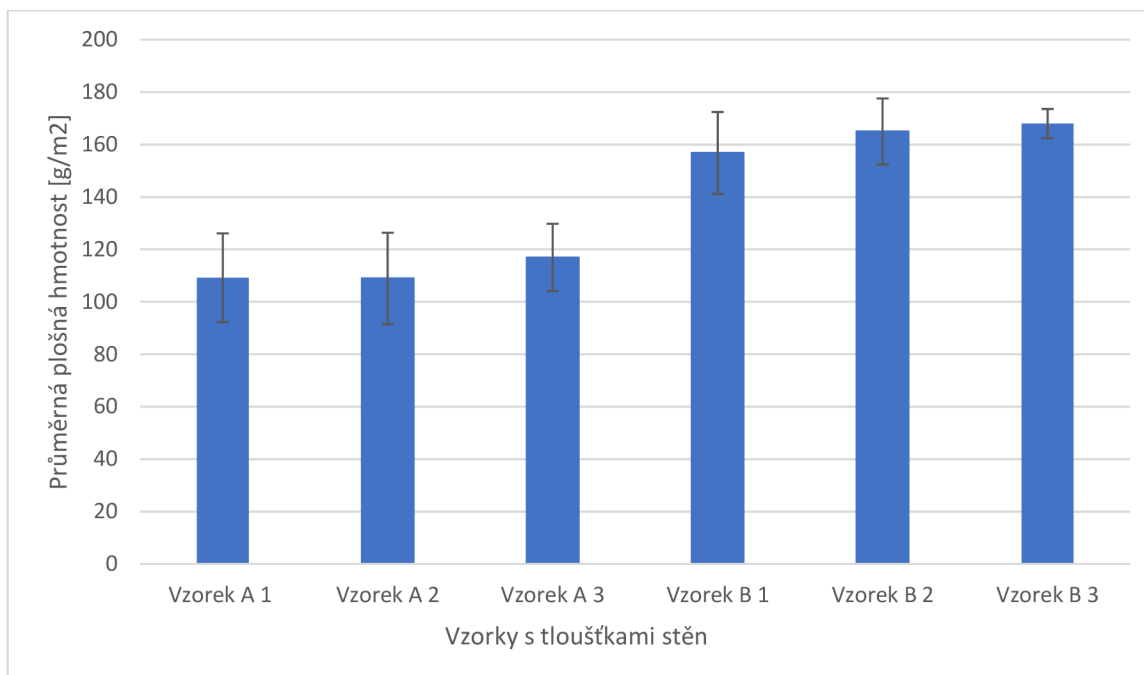
### 3. 5 Měření plošné hmotnosti

Přímé měření plošné hmotnosti ve standardních jednotkách, gramy na metr čtverečný [ $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$ ], u těchto scaffoldů není možné a je nutné využít měření menších vzorků o definované ploše a následný převod na gramy na metr čtverečný [ $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$ ].

Od každé ze dvou skupin scaffoldů byly vybrány 3 scaffoldy a od každého bylo připraveno 10 vzorků o ploše 1 x 1 cm. Tyto vzorky byly následně na analytických vahách zváženy a výsledky byly statisticky vyhodnoceny. Pro měření byl vždy vzat jeden desetimetrový kus, který byl následně rozdělen.

**Tabulka 6: Analýza plošných hmotností**

Vzorek	Tloušťka stěny vzorku [ $\mu\text{m}$ ]	Průměrná plošná hmotnost [ $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$ ]	Počet měření [-]	Směrodatná odchylka [-]	Variační koeficient [%]	95% interval spolehlivosti [ $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$ ]
<b>Vzorek A 1</b>	338,7	109,2	10	16,91	15,49	<112,51 – 105,89>
<b>Vzorek A 2</b>	347,4	108,9	10	17,46	16,03	<112,01 – 105,79>
<b>Vzorek A 3</b>	367,5	116,9	10	12,85	10,99	<170 – 114,8>
<b>Vzorek B 1</b>	418,2	156,8	10	15,63	9,97	<159,16 – 154,44>
<b>Vzorek B 2</b>	456,4	165	10	12,6	7,64	<166,65 – 163,35>
<b>Vzorek B 3</b>	483	168	10	5,59	3,32	<166,65 – 163,35>



Graf 8: Závislost plošné hmotnosti na tloušťce stěny

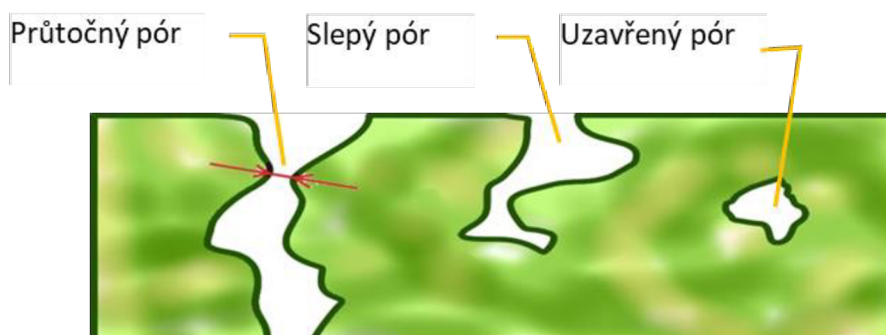
Z naměřených a zpracovaných dat je patrné, že hodnoty plošných hmotností rostou úměrně s hodnotami tloušťek stěn scaffoldů. Dle hodnot variačního koeficientu lze vidět, že i na deseticentimetrovém vzorku scaffoldu dochází ke kolísání plošné hmotnosti. Toto kolísání je dáno pravděpodobně nerovnoměrným vrstvením nanovlákněné vrstvy při procesu zvlákňování.



Obrázek 22: Analytické váhy

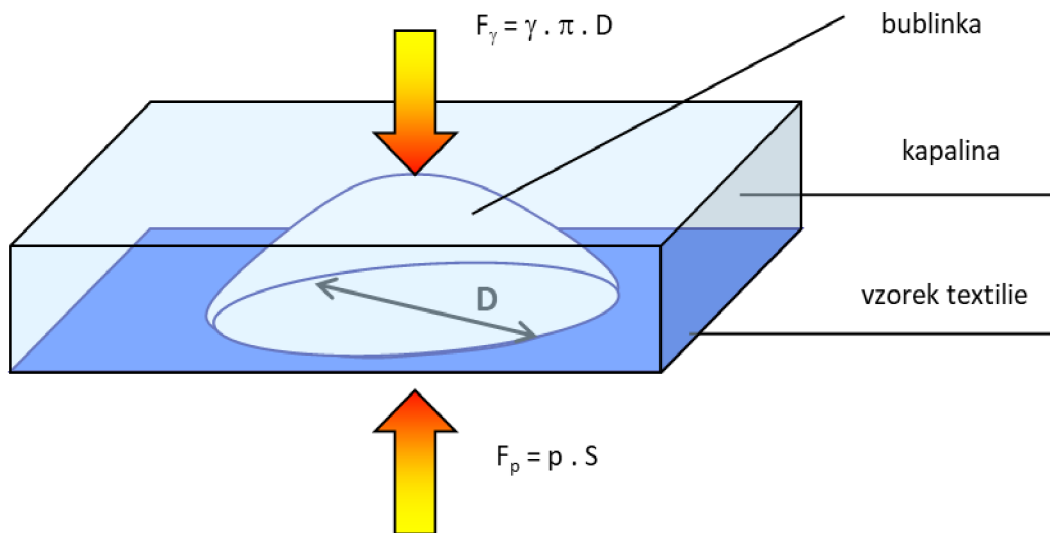
### 3. 6 Porozita

Jednou ze základních vlastností je porozita, proto bylo provedeno její měření i na těchto scaffoldech. Tyto vzorky byly měřeny pomocí bublinkové metody, která měří velikost průtočných pórů, tedy pórů procházejících skrz materiál. Právě tyto póry jsou o těchto tubulárních scaffoldů důležité z hlediska jejich rozměrů. [34]



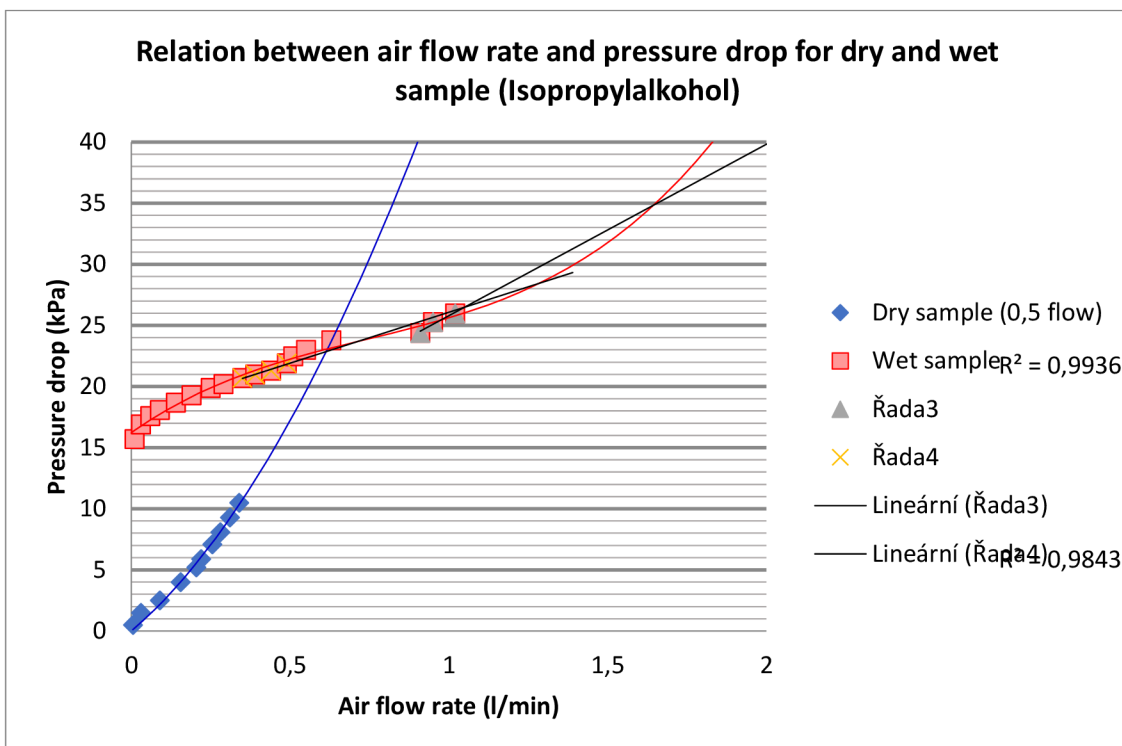
Obrázek 23: Rozdíl mezi typy pórů [34]

Tato metoda spočívá v zjištění tlaku, který je třeba k vytlačení kapaliny, která smáčí měřený vzorek. Smáčecí síla, tedy síla opačná k síle, která kapalinu vytlačuje, je závislá na obvodu póru. Nejsnadnější je zjistit velikost největšího póru, jelikož to je první místo, kde dojde při testu k tvorbě bublin. Princip výpočtu velikosti póru vychází z rovnováhy síly dané povrchovým napětím a síly dané tlakem vytlačujícím kapalinu z póru. [34]



Obrázek 24: Výpočet velikosti pórů - síla  $F_\gamma$  je určena povrchovým napětím kapaliny, která působí na obvodu póru  $\pi \cdot D$ . Síla  $F_p$  je určena vnějším tlakem, který vytěsňuje kapalinu z póru, a který působí na ploše póru  $S$  [34]

Pro určení průměrného a minimálního póru bylo třeba dále zvyšovat tlak vzduchu a měřením jeho průtoku skrz vzorek bylo stanoveny tyto hodnoty. Pro stanovení průměrného a minimálního póru bylo nutné porovnávat tlakovou křivku smočeného a suchého vzorku. [34]



Obrázek 25: Stanovení tlakového spádu pro výpočet velikosti průměrného a minimálního póru. [34]

### 3. 6. 1 Parametry testu

Tabulka 7: Parametry testu porozity

<b>Rozsah měření velikosti póru</b>	0,2 - 500 $\mu\text{m}$
<b>Délka tubulárního vzorku</b>	50 mm
<b>Maximální tloušťka vzorku</b>	3 mm
<b>Velikost měřené oblasti</b>	5 $\text{cm}^2$
<b>Počet měření pro jeden typ vzorku</b>	3
<b>Rozsah použitelného tlaku</b>	0 - 1 MPa
<b>Testovací kapalina</b>	Isopropylalkohol
<b>Odpovídající norma</b>	ASTM F316 – A3



### 3. 6. 2 Příprava vzorku a test

Od obou variant scaffoldů byly vybrány 3 vzorky, které byly upraveny na požadovanou délku 50 mm. Následně byly tyto vzorky uchyceny pomocí tavné pistole k zařízení, aby nedocházelo k úniku vzduchu. Po uchycení spodní části vzorku byl vršek pomocí tavné pistole zataven, aby nedocházelo k úniku vzduchu. Dle typu testu pak mohl být vzorek zalit izopropylalkoholem, ve kterém se v případě průniku vzduchu pórem objevily bubliny a mohl tak být zaznamenán tlak při průniku.

### 3. 6. 3 Výsledky

**Tabulka 8: Analýza porozity vzorků skupiny A**

	<b>Průměrná hodnota [μm]</b>	<b>Počet měření [-]</b>	<b>Směrodatná odchylka [-]</b>	<b>Variační koeficient [%]</b>	<b>95% interval spolehlivosti [μm]</b>
<b>Vzorek A minimální pór [μm]</b>	3,25	3	0,13	4,04	<3,16 – 3,34>
<b>Vzorek A průměrný pór [μm]</b>	6,95	3	2,22	31,95	<5,5 – 8,40>
<b>Vzorek A maximální pór [μm]</b>	9,89	3	3,09	31,21	<7,87 – 11,91>

**Tabulka 9: Analýza porozity vzorků skupiny B**

	<b>Průměrná hodnota [μm]</b>	<b>Počet měření [-]</b>	<b>Směrodatná odchylka [-]</b>	<b>Variační koeficient [%]</b>	<b>95% interval spolehlivosti [μm]</b>
<b>Vzorek B minimální pór [μm]</b>	6,64	3	0,17	2,56	<6,53 – 6,75>
<b>Vzorek B průměrný pór [μm]</b>	7,74	3	0,14	1,82	<7,65 – 7,83>
<b>Vzorek B maximální pór [μm]</b>	11,1	3	0,3	2,72	<10,91 – 11,30>

Dle zpracovaných a naměřených dat je patrné, že velikost maximálního póru je ve většině případů podobná, a to samé platí pro průměrnou velikost pórů. V případě nejmenšího póru je z dat vidět poměrně značný rozdíl mezi vzorky v přímé závislosti na tloušťce stěny. Naměřená porozita je vhodná pro použití těchto vzorků jako scaffoldů, jelikož póry nejsou pravidelné, tak by erythrocyty se svou velikostí kolem 7,5 neměly procházet stěnou scaffoldu. Zároveň je porozita dostatečná pro interakci buněk ve scaffoldu.

### **3. 7 Pevnost v tahu**

Pevnost v tahu byla testována na zařízení pro jednoosé namáhání neboli trhacím stroji. Vzorek byl při tomto testu upnut mezi dvě čelisti. Spodní čelist byla stacionární a horní pohyblivá, pohybem horní čelisti směrem vzhůru byl vzorek tahově namáhán po vertikální ose. Jelikož na rozdíl od tkanin a pletenin netkané textilie jsou spíše izotropního charakteru, nebylo nutné vzorky testovat v různých směrech. Scaffoldy byly pro tento test opět rozděleny do dvou skupin vzorků v závislosti na tloušťce stěn vzorků.

### 3. 7. 1 Parametry testu

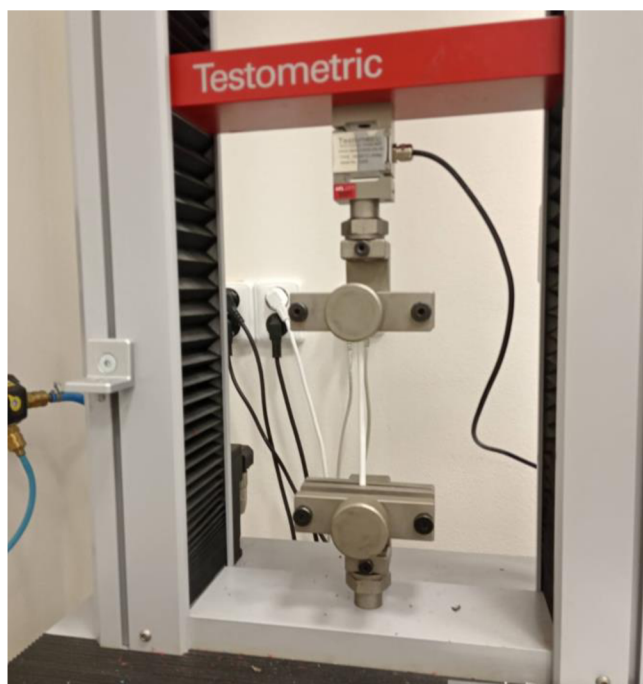
Pro nastavení trhačky byly vzhledem k předchozím zkušenostem využity parametry, které se používají pro testování jiných tubulárních scaffoldů, s například pletenou či tkanou strukturou. A kvůli potenciální tažnosti netkaných tubulárních scaffoldů byly tyto parametry mírně pozměněny.

Scaffoldy byly pro tento test opět rozděleny do dvou skupin vzorků v závislosti na tloušťce stěn vzorků. Od každé škály bylo provedeno 5 testů tažnosti a výsledky byly následně statisticky zpracovány.

Aby nedocházelo ke zkreslení naměřených dat, byly vzorky napínány v tubulárním tvaru. Vzorek o požadované délce byl na koncích navléknut na trny, aby při upínání nedošlo k zploštění. Následně byl s trnem upnut do přístroje Testometric M350-5CT.

**Tabulka 10: Parametry testů podélné tažnosti**

<b>Rychlost oddalování čelistí [mm/min]</b>	50,000
<b>Předpětí [N]</b>	0,010
<b>Délka vzorku [mm]</b>	250,000



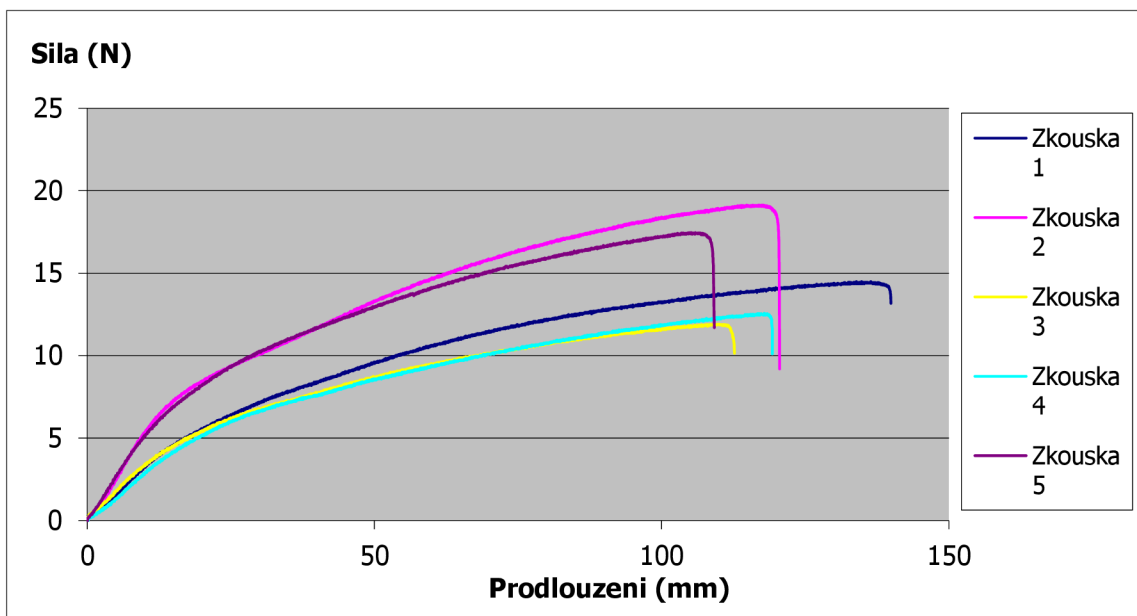
Obrázek 26: Upnutí vzorku do přístroje Testometric M350-5CT

### 3. 7. 2 Vyhodnocení zkoušky pro vzorky A

Při této zkoušce byla softwarem zařízení stanovena kromě tažnosti a odolnosti vůči přetrhu celá řada výsledných parametrů, které jsou uvedeny níže v tabulce.

**Tabulka 11: Analýza tahových zkoušek vzorků skupiny A**

<b>Zkouška</b>	<b>Minimum</b>	<b>Průměr</b>	<b>Maximum</b>
<b>Prodloužení při přetrhu [mm]</b>	109,165	120,317	139,912
<b>Síla při přetrhu [N]</b>	9,19	10,86	13,16
<b>Práce při přetrhu [N*m]</b>	0,944	1,272	1,617
<b>Tažnost při přetrhu [%]</b>	43,659	48,124	55,965
<b>Nejvyšší pevnost [N]</b>	11,91	15,108	19,13
<b>Prodloužení při nejvyšší pevnosti [mm]</b>	104,758	116,203	133,897
<b>Tažnost při nejvyšší pevnosti [%]</b>	41,896	46,479	53,559



Graf 9: Graf tahových křivek vzorků skupiny A

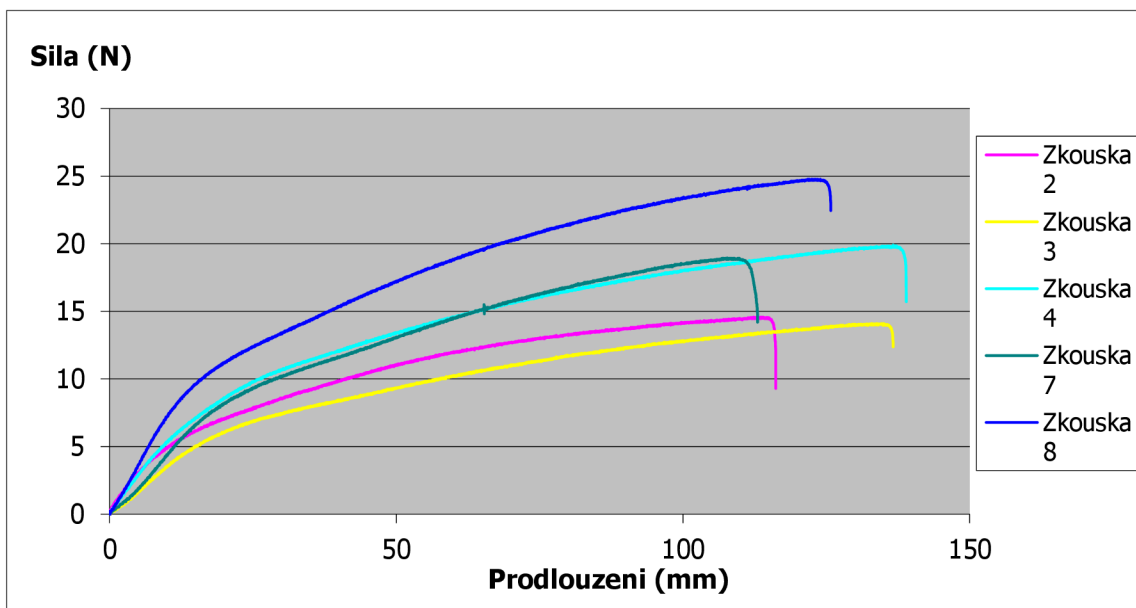
Vzorky scaffoldů skupiny A mají dle naměřených dat velice podobnou tažnost, a i výsledné prodloužení. Pevnost vzorků, tedy síla potřebná k jejich přetržení, se lišila. Tato odchylka je dána širším intervalem tloušťky stěn scaffoldů, kdy vzorky s nejnižší pevností odpovídají vzorkům s tloušťkou stěny v počátku intervalu 300 až 399  $\mu\text{m}$  a vzorky s největší pevností jsou z konce tohoto intervalu. V případě vzorků skupiny A lze předpokládat, že při využití stejného polymerního roztoku a technologie bude pevnost scaffoldů přibližně v intervalu od 10 N do 20 N. V případě tahových křivek lze vidět, že v počáteční části tahové křivky je deformace způsobená působící silou menší než v její konečné fázi. Youngův modul je tedy rozdílný dle působící síly. V případě menších sil v počáteční části, tedy přibližně do 5 N, je Youngův modul vyšší a v části od přibližně 7 N lze vidět, že se hodnota Youngova modulu zmenšuje.

Ve srovnání s nativní cévou podobného průměru mají tyto vzorky přibližně více jak dvojnásobnou pevnost při přetrhu. Pevnost při přetrhu nativní cévy o podobném průměru je okolo 4,5 N a z těchto vzorků bylo dosaženo hodnoty kolem 12 N. Nativní cévy mají zase lepší schopnost relaxace. Pevnost nativních cév je však pouze orientační, záleží na velkém množství faktorů jako je například věk dárce, nemoci, životospráva nebo genetický potenciál. [38]

### 3. 7. 3 Vyhodnocení zkoušky pro vzorky skupiny B

Tabulka 12: Analýza tahových zkoušek vzorků skupiny B

Zkouška	Minimum	Průměr	Maximum
Prodloužení při přetrhu [mm]	116,203	126,130	143,706
Síla při přetrhu [N]	9,3	14,804	22,45
Práce při přetrhu [N*m]	1,239	1,650	2,218
Tažnost při přetrhu [%]	46,418	50,451	57,48
Nejvyšší pevnost [N]	14,57	18,458	24,77
Prodloužení při nejvyšší pevnosti [mm]	112,347	122,279	136,674
Tažnost při nejvyšší pevnosti [%]	44,938	48,911	54,66



Graf 10: Graf tahových křivek vzorků skupiny B

Vzorky scaffoldů skupiny B mají dle naměřených dat velice podobnou tažnost, a i výsledné prodloužení, které je zde u některých vzorků přibližně o 20 milimetrů větší než u předchozí škály. Pevnost vzorků, tedy síla potřebná k jejich přetržení, se i zde lišila. Tato odchylka je dána širším intervalem tloušťky stěn scaffoldů, kdy vzorky s nejnižší pevností odpovídají vzorkům s tloušťkou stěny v počátku intervalu 400 až 499  $\mu\text{m}$  a vzorky s největší pevností jsou z konce tohoto intervalu. V případě vzorků skupiny B lze předpokládat, že při využití stejného polymerního roztoku a technologie bude pevnost tubulárních scaffoldů přibližně v intervalu od 14 N do 25 N. V případě tahových křivek lze vidět i zde, že v počáteční části tahové křivky je deformace způsobená působící silou menší než v její konečné fázi. Youngův modul je tady rozdílný dle působící síly. V případě menších sil v počáteční části, tedy přibližně do 5 N, je Youngův modul vyšší a v části od přibližně 7 N až 10 N lze vidět, že se hodnota Youngova modulu zmenšuje.

Ve srovnání s nativní cévou podobného průměru mají tyto vzorky téměř trojnásobnou pevnost při přetrhu. Pevnost při přetrhu nativní cévy o podobném průměru je okolo 4,5 N a u těchto vzorků bylo dosaženo hodnoty kolem 15 N. Nativní cévy mají zase lepší schopnost relaxace. Pevnost nativních cév je však pouze orientační, záleží na velkém množství faktorů jako je například věk dárce, nemoci, životospráva nebo genetický potenciál. [38]

### 3. 8 Pevnost v tlaku působícímu zevnitř

Pevnost vůči tlaku působícímu zevnitř byla testována na jednorúčlovém zařízení, které bylo zkonstruováno speciálně pro účely měření odolnosti tubulárních vzorků.

Testovaným vzorkem je provléknut balónek a následně je vzorek spolu s balónkem nasazen na trn tohoto zařízení. Na obou koncích je vzorek stažen nití, aby nedoházelo k úniku média (v tomto případě vzduchu). Trn je dutý a perforovaný, takže skrz něj je tlakován balónek, na kterém je vzorek, definovaným tlakem. Test končí roztržením vzorku.



Obrázek 27: Upevněný roztržený vzorek po testu



### 3. 8. 1 Vyhodnocení zkoušky odolnosti vůči tlaku působícímu zevnitř

**Tabulka 13: Výsledky tlakové zkoušky odolnosti vůči tlaku zevnitř v milimetrech rtuťového sloupce**

	<b>Průměrný tlak při protržení [mm Hg]</b>	<b>Počet měření [-]</b>	<b>Směrodatná odchylka [-]</b>	<b>Variační koeficient [%]</b>	<b>95% interval spolehlivosti [mm Hg]</b>
<b>Vzorky skupiny A</b>	1815,15	5	353,09	19,45	<1676,74 – 1953,56>
<b>Vzorky skupiny B</b>	3045,26	5	586,01	19,24	<2815,54 – 3274,97>

**Tabulka 14: Výsledky tlakové zkoušky odolnosti vůči tlaku zevnitř v barech**

	<b>Průměrný tlak při protržení [bar]</b>	<b>Počet měření [-]</b>	<b>Směrodatná odchylka [-]</b>	<b>Variační koeficient [%]</b>	<b>95% interval spolehlivosti [bar]</b>
<b>Vzorky skupiny A</b>	2,42	5	0,47	19,45	<2,24 - 2,60>
<b>Vzorky skupiny B</b>	4,06	5	0,78	19,24	<3,75 – 34,37>

Na vzorcích je vidět přímá závislost tloušťky stěny a jejich odolnosti vůči protržení. Pro lepší orientaci jsou uváděny tyto výsledky v milimetrech rtuťového sloupce, a i v barech. U všech měřených vzorků byla odolnost výrazně vyšší než 140 mm Hg. To je nejvyšší běžná hodnota systolického tlaku v cévách. A i v případě abnormálně vysokého krevního tlaku by tyto scaffoldy, tak byly schopny bez komplikací dále fungovat. Tato vlastnost je právě výhodou umělých cévních náhrad. Většina tkaných, pletených či litých cévních náhrad je také odolnější vůči tlaku působícímu zevnitř než nativní cévy.

Tudíž v případě, že pacient trpí abnormálně vysokým krevním tlakem nebo nějakým typem degenerativního onemocnění cév, lze předpokládat, že po transplantaci nativní cévy dojde i u ní po čase k jejímu poškození. Strukturální změny nativních cév jsou častou komplikací u pacientů s oběma typy diabetu, což je v populaci výrazně rozšířená choroba. Jsou-li využity umělé cévní protézy, nehrozí u nich riziko degenerativního poškození. A v případě abnormálně vysokého krevního tlaku jsou tyto scaffoldy také odolnější. [14]

## 4. Závěr

Výrobou maloprůměrového tubulárního scaffoldu pro cévní chirurgii se kromě této bakalářské práce zabývalo mnoho dalších prací zde na univerzitě, a i ve světě. Většina ostatních prací se zabývala zvlákňováním z jehly či jiných převážně laboratorních zařízení. Inovací, která zde byla testována bylo zvlákňování na průmyslovém zařízení Nanospider. Cílem této práce byla výroba materiálů pomocí elektrostatického zvlákňování na přístroji Nanospider s implementovaným cévostrojem a použitím polymeru PCL a následná charakterizace těchto materiálů.

Ukázalo se, že samotný proces výroby má kromě mnoha výhod jako například značné zkrácení doby výroby, ale také stále nedostatky. Jedním z nedostatků je obtížné snímání scaffoldů ze zvlákňovacího tubulárního kolektoru a nestejnouměrnost vyrobených vzorků. Scaffoldy byly při snímání často poškozeny v důsledku silné adheze mezi nimi a kolektorem. Jejich poškození bylo mnohdy natolik rozsáhlé, že na nich nebylo možné provést žádné další testy. Byly zkoušeny různé povrchové úpravy kolektoru, ale bez významnějších výsledků. Nakonec byla silná adheze mezi scaffoldem a kolektorem částečně narušena smáčením scaffoldů etanolem. Po smočení byly scaffoldy postupně stahovány z kolektoru. Tímto postupem vznikla struktura, která je mírně podobná vřapování, které se běžně užívá u pletených cévních náhrad.

Vzorky byly následně podrobeny morfologickému a mechanickému testování. Mezi morfologické testování patřilo měření průměrů vláken, tloušťek stěn, plošné hmotnosti a kontaktní úhel.

Vzorky byly ihned po sejmutí z kolektoru rozřazovány do dvou skupin A a B dle tloušťky jejich stěn, aby bylo možné porovnat jejich vlastnosti v závislosti na tloušťce stěny vzorku.

Měření průměrů vláken bylo provedeno pomocí SEM a Fiji-Imagej. Pomocí SEM byly pořízeny snímky vlákenné vrstvy a následně byly změřeny průměry vláken. Rozložení průměrů vláken bylo na všech tubulárních vzorcích podobné. Bylo zde velké zastoupení vláken s průměry od 200 nanometrů do 1 mikrometru, ale s rozsahem až k 2 mikrometrům. To je velmi podobné s průměry, která mají svalová vlákna aktinu a myosinu v těle. Tudiž z hlediska vlákenné struktury je daný scaffold podobný reálné tkáni.

Scaffolds byly také charakterizovány pomocí plošné hmotnosti, u které byla patrná jistá variabilita hodnot po délce vzorku. Vzorek tak není zcela homogenní, co se týče distribuce vlákně hmoty po délce. Byla ale patrná přímá závislost mezi tloušťkou stěny a výslednou plošnou hmotností vzorku.

Smáčivost je důležitá vlastnost materiálu, která může ovlivňovat adhezi buněk. Při měření kontaktního úhlu vycházely všechny vzorky z obou stran jako mírně hydrofobní. Jelikož byla naměřena pouze mírná hydrofobita, tak to pro následnou adhezi buněk na scaffold není komplikace. PCL obecně vykazuje dobrou adhezi mezi ním a buňkami. To bylo ověřeno i z předešlých biologických experimentů, které nejen na KNT probíhaly. Vzorek zároveň díky mírné hydrofobitě méně sorbuje kapalinu a při implantaci by to mohlo mít pozitivní důsledky v podobě snazšího zákroku pro operátora.

Při následné mechanické charakterizaci byly tyto scaffolds testovány na pevnost v tahu a odolnost proti tlaku působícímu zevnitř.

Při tahových zkouškách v podélném směru dosahovaly všechny testované vzorky minimálně dvojnásobných pevností, než jsou průměrné hodnoty nativních cév, které jsou ale také vysoce variabilní kvůli stavu dárce. Mezi oběma skupinami vzorků zde byl vidět zřetelný rozdíl způsobený rozdílnými tloušťkami stěn.

V rámci testování na odolnost proti tlaku působícímu zevnitř obě skupiny vzorků vycházely mnohonásobně lépe než nativní cévy. Z výsledných hodnot je patrné, že i při extrémních výkyvech krevního tlaku u pacienta by scaffolds odolaly. Lze předpokládat, že po určitém stupni degradace materiálu by scaffolds byly schopny dál plnit svou funkci a odolaly by krevnímu tlaku.

Scaffolds se v mnoha ohledech svými vlastnostmi podobaly cévám v organismu. V čem naopak se odchylovaly, byla jejich relaxace po podélném tahovém namáhání, která je u nich oproti klasickým cévám výrazně menší.

Všechny tyto testy byly provedeny za běžných laboratorních podmínek, a nebylo tudíž zohledněno vnitřní prostředí organismů. Testy tahového namáhání o odolnosti proti vnitřnímu tlaku byly prováděny pouze za sucha.

Hlavním cílem této práce bylo vyrobit vzorky na implementovaném cévostroji v Nanospideru a charakterizovat je. Oba tyto cíle byly splněny. Při psaní této bakalářské práce jsem dospěl k názoru, že výroba materiálů s implementovaným cévostrojem v zařízení Nanospider není nijak výrazně komplikovaná. A následná charakterizace je poměrně snadno proveditelná.

Co bude dále třeba, je určitě zdokonalení snímání scaffoldů z kolektoru, aby nedocházelo k poškozování scaffoldů a bylo časově méně náročné. Další oblastí, kde by bylo třeba zdokonalení, je homogenizace distribuce vlákně hmoty po délce scaffoldu, tedy eliminace slabších a silnějších míst. Co se týče testování, bude třeba provést všechny tyto mechanické testy také za mokra a též za podmínek simulující prostředí organismu například pomocí bioreaktoru, který simuluje dané prostředí organismu. Ve vzdálenějším časovém horizontu bude důležité sledování vlivu degradace scaffoldů na jejich mechanické vlastnosti v čase a stanovit tak optimální časové rozpětí, po které budou scaffoldy v organismu funkční.

Věřím, že tento typ scaffoldů si zaslouží další výzkum a dostatek času a trpělivosti pro další zdokonalení těchto materiálů k jejich použití.

## Použitá literatura

- [1] J. Langer a J. P. Vacanti. Tkáňové inženýrství: Department of Chemical Engineering, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge 02319 [online]. 14. května 1993 ISSN 1095-9203. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1126/science.8493529>.
- [2] L. Wolfová, L. Vojtová, Jurečková a L. Kohutová, 10. 12. 2015, Úvod do tkáňového inženýrství, MediaBros s. r. o., strany 1-124, ISBN 978-80-260-9720-4.
- [3] Cévní chirurgie-VUP: Ra K-VUP [online]. Dostupné z: <https://www.vup.cz/cs/cevní-chirurgie/produkty/ra-k>
- [4] Mudr I. Rektorová a L F MU, 2002. TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ A KLONOVÁNÍ. 88–89.
- [5] C. XU, R. Inai a S. Ramakrishna, „Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering,“ *Biomaterials*, 2004, [online], [cit. 12.5.2021], dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0142961203005933?via%3Dihub>.
- [6] K. Maleckis, Kaspars, A. Kamensky, Eliezer Z. Lichter, Rebecca OBERLEY-DEEGAN, Yuris DZENIS a Jason MACTAGGART, 2021. Mechanically tuned vascular graft demonstrates rapid endothelialization and integration into the porcine iliac artery wall. *Acta Biomaterialia* [online]. 125, 126–137. ISSN 18787568. Dostupné z: doi:10. 1016/j.actbio.2021.01.047
- [7] E. Naghashzargar a kol. Nano / mikrohybridní lešení z nanovláken PCL nebo P3HB v kombinaci s hedvábným fibroinem pro tkáňové inženýrství šlach a vazů. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials* [online]. Katedra textilního inženýrství, Isfahan University of Technology, Isfahan-Írán, 7. dubna 2015, stránky: 156-168 [cit. 2021-7-6]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.5301/jabfm.5000216>.
- [8] MA, X. Peter. 2008. Biomimetic materials for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*.60(2), 184–198. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi: 10. 1016/j.addr.2007.08.041.
- [9] F. Yalckiyana, 2019. Preparation of various nanofiber layers using wire electrospinning system. *Arabian Journal of Chemistry*. 12(8), 5162–5172. ISSN 18785352. Dostupné z: doi: 10. 1016/j.arabjc.2016.12.012.
- [10] H. M. Ibrahim a A. Klinger, 2020. A review on electrospun polymeric nanofibers: Production parameters and potential applications. *Polymer Testing* [online]. 90(February), 106647. ISSN 01429418. Dostupné z: doi: 10. 1016/j.polymertesting.2020.106647.
- [11] D. Lukáš, A. Sarkar, L. Martinová a D. Vodsedálková, 2009. Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century). *Textile Progress*, sv. 41, č. 2, pp. 59–140.

- [12] B. Nandana, 2009. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique, *Biotechnology Advances*. sv. 28, pp. 325–347.
- 13) ELmarco. Proces na strunové elektrodě [online] dostupné z: <https://www.elmarco.cz/ns-technologie>.
- [14] M. Krajíček, 2007, *Chirurgická a intervenční léčba cévních onemocnění*, Grada Publishing a.s.
- [15] Prof. RNdr. D. Lukáš CSC., *Lékařské textilie* 2. díl [online]. 23.7.2008, , 248 dostupné z: <https://docplayer.cz/4718103-Leka-ske-textilie-2-dil-kolektiv-autor-centrum-pro-podporu-konkurenceschopnosti-v-biomedicinsk-ch-technologieich.html>
- [16] A Ciurzinska a A. Lenart, Freeze-Drying - Application in Food Processing and Biotechnology - A Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*[online], 2011-01-1, 61(3), - DOI: 10.2478/v10222-011-0017-5. ISSN 2083-6007, Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/pjfn.2011.61.issue3/v10222-011-0017-5/v10222-011-0017-5.xml>
- [17] P. X. Ma, *Biomimetic Materials for Tissue Engineering*, [online], 2008, vol. 60, issue 2, Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2271038/pdf/nihms39385.pdf>.
- [18] F. J. O'Brien, *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering*, *Materials Today*, 2011, [online], [cit. 12.5.2021], dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136970211170058X>.
- [19] J. Patterson, M. Martino M. Hubbell, *Biomimetic materials in tissue engineering*, *Materials Today*, 2010, [online] dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369702110700134>.
- [20] M. X. Deng , et. al. Synthesis of a novel structural triblock copolymer of poly(g-benzyl-(glutamic acid)-b-poly(ethylene oxide)-b-poly( $\epsilon$ -caprolactone)). *Biomaterials* 2004; 25: 3553–3558.
- [21] M. P. K. Turunen, H. Korhonen, J. Tuominen, J. V. Seppälä, Synthesis, characterization and crosslinking of functional star-shaped poly( $\epsilon$ -caprolactone), *Polym Int* 2001; 51: 92-100.
- [22] W. S. Shalaby, J. L. Burg, *Absorbable and Biodegradable polymers*, Floryda, CRC Press, 2004, ISBN 084914844.
- [23] G. Tan Z. a Y. Zhou, 2019. Electrospinning of biomimetic fibrous scaffolds for tissue engineering: a review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric*

- Biomaterials* [online]. (August), 1–14. ISSN 1563535X. Dostupné z: doi:10.1080/00914037.2019.1636248.
- [24] P. Klouda, *Základy biochemie*. Nakladatelství Pavel Klouda. Ostrava. 2000. 155 s. ISBN 80-86269-00-5.
- [25] R. Lüllmann-Rauch, *Taschenlehrbuch Histologie*, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2009.
- [26] M. Krajíček, et al., *Chirurgická a intervenční léčba cévních onemocnění*. 1. vyd. Praha: Grada, 2007. 436 s. ISBN 978-80-247-0607-8.
- [27] Aortokoronární bypass, Institut klinické a experimentální medicíny, klinika kardiovaskulární chirurgie [online], dostupné z: <http://www2.ikem.cz/www?docid=1004187>
- [28] V. Konrádová, Uhlík J. a Vajner L. *Funkční histologie*. H+H, 2000, 292 s. ISBN 8086022803.
- [29] R. Lüllmann-Rauch, *Taschenlehrbuch Histologie*, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2009, ISBN: 9788024737294.
- [30] M. Krajíček, J. H. Peregrin a M. Roček, *Chirurgická a intervenční léčba cévních onemocnění*. 1. vydání. Grada, 2007. 100-140 s. ISBN 9788024706078.
- [31] Venenzentrum Zürcher Oberland AG, *Vena saphema magna, popřípadě vena saphema parva* [online], Dostupné z: <https://www.v-zo.ch/en/vein-system-2/>.
- [32] R. Jaroslav a M. Všeticka, Skenovací elektronový mikroskop, *Encyklopedie fyziky* [online], 2006, Dostupné z: doi: <http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/1675-skenovaci-elektronovy-mikroskop>.
- [33] Advex-instruments, 2008 [cit. 2021-10-21], Dostupné z: <Http://www.advex-instruments.cz/>.
- [34] J. Hrůza. Test of the mean and maximum flow pore by bubble point method. Technical University of Liberec, CXI, INTEC, 2017.
- [35] Ultrazvukový digitální tloušťkoměr Elcometer MTG 8 Dostupné z: <https://www.elcometer.cz/elcometerndt-mtg-8/>
- [36] STROJE 5KN: STANDARDNÍ SPECIFIKACE, Dostupné z: <https://www.testometric.co.uk/5kn/>
- [37] OECD/European Observatory on Health Systems and Policies (2017), Česká republika: zdravotní profil země 2017, State of Health in the EU, OECD Publishing, Paris/European Observatory on Health Systems and Policies, Brussels. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264285125-cs> ISBN 9789264285125 (PDF) Series: State of Health in the EU ISSN 25227041 (online)



[38] S. Wang.; Y. Zhang; G. Yin; H. Wang.; Z. Dong, Electrospun polylaktid/silk fibroin-gelatin composite tubular scaffolding for small diameter blood vessels tissue engineering. *J. Appl. Polym. Sci.* 2009, *113*, 2675–2682.