



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

# Vliv sterilizačních metod na nanovláknenné tkáňové nosiče

## Bakalářská práce

*Studijní program:* B3942 – Nanotechnologie

*Studijní obor:* 3942R002 – Nanomateriály

*Autor práce:* **Petr Cvejn**

*Vedoucí práce:* RNDr. Jana Horáková, Ph.D.





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

# Impact of sterilization methods on electrospun tissue engineering scaffolds

## Bachelor thesis

*Study programme:* B3942 – Nanotechnology

*Study branch:* 3942R002 – Nanomaterials

*Author:* **Petr Cvejn**

*Supervisor:* RNDr. Jana Horáková, Ph.D.

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Petr Cvejn**  
Osobní číslo: **M15000131**  
Studijní program: **B3942 Nanotechnologie**  
Studijní obor: **Nanomateriály**  
Název tématu: **Vliv sterilizačních metod na nanovláknenné tkáňové nosiče**  
Zadávací katedra: **Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů**

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

1. Vypracování rešerše na dané téma (nanovláknenné tkáňové nosiče, sterilizační metody, povrchové a makroskopické vlastnosti tkáňových nosičů a jejich změny působením sterilizačních technik).
2. Výroba nanovláknenných tkáňových nosičů z biokompatibilních polymerů metodou elektrostatického zvláknování, sterilizace nanovláknenných vrstev vybranými sterilizačními metodami.
3. Hodnocení makroskopických a mikroskopických změn na sterilních materiálech, změna povrchových a makroskopických vlastností.
4. Zpracování výsledků.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby dokumentace**

Rozsah pracovní zprávy: **40-60 dle potřeby**

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

Seznam odborné literatury:

[1] Ratner BD et al. Biomaterials Science, Third Edition, Academic Press, 2013. ISBN: 978-0-12-374626-9.

[2] Rediguiei CF et al. Impact of sterilization methods on electrospun scaffolds for tissue engineering. European Polymer Journal 82 (2016):181-195.

[3] Rediguiei CF et al. Ozone Gas as a Benign Sterilization Treatment for PLGA Nanofiber Scaffolds. Tissue Engineering: Part C 22 (2016):338-347.

[4] Valente TAM et al. Effect of Sterilization Methods on Electrospun Poly(lactic acid) (PLA) Fiber Alignment for Biomedical Applications. ACS Applied Materials & Interfaces 8 (2016):3241-3249.

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Jana Horáková, Ph.D.**

Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

Datum zadání bakalářské práce: **13. října 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **14. května 2018**

prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D.  
děkan



prof. RNDr. David Lukáš, CSc.  
vedoucí katedry

V Liberci dne 13. října 2017



## Prohlášení

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

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

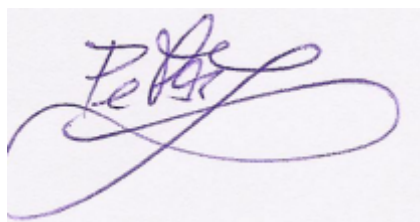
Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

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

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

Datum: 12.5.2018

Podpis:

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'F. F. F.', written in a cursive style with a large loop at the end.

## **Poděkování**

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucí této práce RNDr. Janě Horákové Ph.D. za nedocenitelné rady a informace a trpělivost při konzultacích. Dále bych rád poděloval Ing. Luboši Běhálkovi Ph.D. za pomoc a radu při měření diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) a Mgr. Vítu Novotnému za pomoc a konzultaci při měření gelové permeační chromatografie (GPC).

V neposlední řadě bych rád poděloval svojí rodině a blízkým, především pak manželce Zuzaně a synu Alexandrovi za jejich trpělivost a neutuchající podporu.

## Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá vlivem sterilizačních metod na vybrané nanovláknenné materiály, využívané jako nosiče pro tkáňové inženýrství. Jako zkoumané materiály byly zvoleny polymery: polykaprolakton (PCL), kopolymer kyseliny mléčné a kaprolaktonu (PLCL) a polyvinylidenfluorid (PVDF). Vzorky těchto materiálů byly vysterylizovány pomocí autoklávu, ethylenoxidu při teplotách 37°C a 55°C, kyseliny peroxooctové,  $\gamma$ -záření, plasmové sterilizace (přístroje Laoken®, STERRAD®) a desinfikovány pomocí ethanolu a ultrafialového záření.

Byla provedena rešerše shrnující poznatky o tkáňovém inženýrství, elektrostatickém zvlákňování, jednotlivých materiálech, jednotlivých typech sterilizace a nakonec o vlivu sterilizačních metod na materiály vybrané pro účely této práce.

Vliv sterilizačních metod na vybrané polymerní materiály byl hodnocen pomocí pozorování makroskopických změn, dopad sterilizace na morfologii vláken vzorku byl hodnocen pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM), termodynamické vlastnosti byly hodnoceny pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) a změny v molekulové hmotnosti byly zhodnoceny gelovou permeační chromatografií (GPC). Na závěr bylo provedeno *in vitro* testování vzorků buňkami 3T3-SA.

Na základě výsledků těchto testů byl hodnocen vliv sterilizace na nosiče pro tkáňové inženýrství. Z výsledků práce je patrné, že některé typy sterilizace ovlivňují vlastnosti vláknenných nosičů pro tkáňové inženýrství do takové míry, že mohou být považovány za nevhodné.

**Klíčová slova:** polykaprolakton, kopolymer kyseliny mléčné a kaprolaktonu, polyvinylidenfluorid, sterilizace, tkáňové inženýrství, vláknenné nosiče pro tkáňové inženýrství

## Abstract

This bachelor's paper deals with impact of different sterilization methods on selected electrospun materials used as scaffolds for tissue engineering. For this work PCL (polycaprolacton), PLCL (kopolymer of lactic acid and caprolacton) and PVDF (polyvinylidenfluorid) were chosen as object of study. Mentioned materials were subjected to following sterilization and disinfection methods: autoclaving, sterilization with ethylenoxid in 37°C and 55°C, peracetic acid sterilization,  $\gamma$ -radiation and plasma sterilization (Laoken® and STERRAD® machines), ethanol and ultraviolet disinfection.

Research of tissue engineering, electrospinning, PCL, PLCL, PVDF, different sterilization methods and about impact of these methods on selected material mentioned above was done.

Several tests were carried out to evaluate impact of sterilization on scaffolds: DSC (differential scanning calorimetry), GPC (gel permeative chromatography) and *in vitro* tests with 3T3-SA cell line. Macroscopic changes in morphology were evaluated and also microscopic changes were evaluated using SEM (scanning electron microscopy).

Based upon these test conclusion was made to determine impact of sterilization on scaffolds for tissue engineering. Results indicate that some methods of sterilization affect properties of electrospun scaffolds to that degree, that they might not be used in tissue engineering.

**Key words:** polycaprolacton, kopolymer of lactic acid and caprolacton, polyvinylidenfluorid, sterilization, tissue engineering, scaffold



## Obsah

Úvod.....	11
1.Tkáňové inženýrství.....	12
2.Elektrostatické zvlákňování.....	13
3.Charakteristika zkoumavých polymerů.....	14
3.1.Polykaprolakton.....	14
3.2.poly(mléčná kyselina-co-kaprolakton).....	15
3.3.Polyvinylidenfluorid.....	15
4.Přehled typů sterilizace zvolených pro účely této práce.....	17
4.1.Sterilizace obecně.....	17
4.2.Sterilizace vlhkým teplem.....	19
4.3.Sterilizace pomocí ethylenoxidu.....	20
4.4.PAA kyselina peroxooctová.....	23
4.5.Plasmová sterilizace a metody sterilizace založené na plasmě.....	24
4.6.sterilizace $\gamma$ -zářením.....	27
4.7.Alkoholová dezinfekce.....	29
4.8.UV dezinfekce.....	29
5.Vliv sterilizace na polymery vybrané pro účely práce.....	31
5.1.Vliv sterilizace vlhkým teplem na vybrané polymery.....	31
5.2.vliv sterilizace ethylenoxidem na vybrané polymery.....	32
5.3.vliv sterilizace kyselinou peroxooctovou na vybrané polymery.....	32
5.4.vliv plasmové sterilizace na vybrané polymery.....	34
5.5.Vliv $\gamma$ -záření na vybrané polymery.....	34
5.5.1Polykaprolakton.....	35
5.5.2Kopolymer kyseliny mléčné a kaprolaktonu.....	36
5.5.3Polyvinylidenfluorid.....	37
5.6.Vliv ethanolové desinfekce na vybrané polymery.....	37
5.7.Vliv dezinfekce UV na vybrané polymery.....	37
6.Použité materiály.....	39

<b>7.STERILIZACE</b> .....	<b>40</b>
7.1.Autokláv.....	41
7.2.Ethanol.....	41
7.3.Ethylenoxid.....	41
7.4.Kyselina peroxooctová.....	41
7.5.Gamma záření.....	42
7.6.Plasmová sterilizace v Krajské nemocnici Liberec.....	42
7.7.STERRAD®.....	42
7.8.Ultrafialové záření.....	42
<b>8.Obrazová analýza</b> .....	<b>43</b>
8.1.experiment.....	43
8.2.Výsledky.....	44
8.2.1Polykaprolakton.....	44
8.2.2Kopolymer kyseliny mléčné a kaprolaktonu.....	46
8.2.3Polyvinylidenfluorid.....	48
8.3.Shrnutí.....	50
<b>9.Hodnocení molekulové hmotnosti</b> .....	<b>51</b>
9.1.Experiment.....	51
9.2.Výsledky.....	52
9.2.1Polykaprolakton.....	52
9.2.2Kopolymer kyseliny mléčné a kaprolaktonu.....	52
9.2.3Polyvinylidenfluorid.....	54
9.3.Shrnutí.....	54
<b>10.Hodnocení změny krystalinity</b> .....	<b>55</b>
10.1.experiment.....	55
10.2.Výsledky.....	55
10.2.1Polykaprolakton.....	55
10.2.2Kopolymer kyseliny mléčné a kaprolaktonu.....	57
10.2.3Polyvinylidenfluorid.....	59
10.3.Shrnutí.....	61
<b>11.TESTOVÁNÍ <i>IN VITRO</i></b> .....	<b>61</b>

<b>11.1.Experiment.....</b>	<b>61</b>
11.1.1Metabolické testy.....	62
11.1.2Fluorescenční mikroskopie.....	62
11.1.3Skenovací elektronová mikroskopie.....	63
<b>11.2.Výsledky.....</b>	<b>63</b>
11.2.1Polykaprolakton.....	63
11.2.2Kopolymer kyseliny mléčné a kaprolaktonu.....	68
11.2.3Polyvinylidenfluorid.....	72
<b>12.DISKUSE.....</b>	<b>78</b>
12.1.Obrazová analýza.....	78
12.2.Hodnocení změn molekulové hmotnosti.....	79
12.3.Hodnocení termodynamických vlastností.....	80
12.4.Testování <i>in vitro</i> .....	80
<b>13.Závěr.....</b>	<b>82</b>

## Seznam použitých zkratk

**3D** tři dymenzionální

**DNA** deoxyribonukleová kyselina, nositel genetické informace

**DSC** diferenční skenování kalorimetrie

**EtOH** ethanol

**EtOx** ethylenoxid

**GPC** gelová permeační chromatografie

**KNL** Krajská nemocnice Liberec

**LLA** L-kyselina mléčná

**PAA** kyselina peroxooctová

**PCL** polykaprolakton

**PLCL** kopolymer kyseliny mléčné a kaprolaktonu

**PVDF** polyvinylidenfluorid

**SEM** skenování elektronová mikroskopie

**UV** ultrafialové

**UVN** Ústřední vojenská nemocnice

## Úvod

Tkáňové inženýrství je rychle se rozvíjející obor medicínského inženýrství, jehož cílem je výroba umělých orgánů, vhodných k transplantaci. Využívá se k tomu tzv. nosičů (anglicky scaffoldů), na které následně nasedají buňky a vytváří tak živoucí orgán. Nosiče bývají často tvořeny elektrostaticky zvlákněnými polymery.

Je žádoucí, aby se takový nosič po čase v těle pacienta úplně rozložil, z toho důvodu jsou pro výrobu nosičů preferovány biodegradabilní materiály.

Jako každý medicínský materiál, také nosič musí být před stykem s buňkami sterilní. Cílem této práce je prozkoumat změny, které proces sterilizace vyvolává v materiálu elektrostaticky zvlákněného polymerního nosiče a zhodnotit zda-li tyto změny ovlivní jeho použitelnost v oblasti tkáňového inženýrství.

# 1. Tkáňové inženýrství

Kořeny tohoto vědního oboru sahají daleko do minulosti a souvisí s snahou lékařů nahradit poškozené části lidského těla. První zmínka o nahrazení části lidského těla jinou živou tkání pochází ze 16. stol. Chirurgie jako celek zaznamenala prudký rozvoj v polovině 19. stol., kdy byla objevena anestezie. S rozvíjející se chirurgií se začínaly ve větší míře objevovat pokusy o nahrazení poškozené tkáně. V tomto odvětví se ustálilo několik základních přístupů, první spočívá v tom, že poškozená tkáň je nahrazena tkání, které měla původně jinou funkci, ale pochází ze stejného organismu. Jak se ale ukazuje tento přístup má i několik problémů, tkáň na novém místě začíná biologicky reagovat, což může vést k odmítnutí orgánu a dalším komplikacím.

Druhý přístup spočívá v náhradě poškozené tkáně, tkání získanou od dárce. Tento postup je dobře prozkoumaný, podařilo se eliminovat mnohé problémy, jak například imunitní reakci organismu, který přijímá darovanou tkáň. Nicméně hlavním problémem zůstává alarmující nedostatek darovaných orgánů.

Na tuto potřebu se snaží odpovědět tkáňové inženýrství. (Lanza et al. 2007) Cílem tkáňového inženýrství vytvořit umělou náhradu za poškozenou tkáň. V tkáňovém inženýrství se uplatňují převážně dva postupy: prvním přístupem je tzv. nebuněčný přístup, který spočívá v aplikaci samotného nosiče bez buněčné složky. Druhým přístupem je aplikace nosiče s vhodnou buněčnou kulturou. Rozvoj tkáňového inženýrství byl v posledních letech podpořen pokrokem ve výzkumu kmenových buněk. (Lukáš 2009)

## 2. Elektrostatické zvlákňování

Elektrostatické zvlákňování je metoda pro výrobu polymerních nanovláken. Výhodou tohoto procesu je možnost ovládnutí rozměrů vláken a síly vrstvy nastavením vhodných parametrů. Elektricky zvlákněné materiály nacházejí uplatnění v široké škále aplikací od využití v citlivých senzorech, přes filtraci po využití v tkáňovém inženýrství

(Merritt et al. 2012).

Strukturu materiálu, který pomocí elektrostatického zvláknění získáme je možné ovlivnit také složením zvláknovacího roztoku. Využití nižší koncentrace roztoku vede ke vzniku kuliček na vláknech a ke vzniku vláken s větším průměrem. Po překročení určité hodnoty koncentrace tyto kuličky vymizí a vznikají tenčí vlákna formující hustější síť (Son et al. 2004).

Typický proces elektrostatického zvláknování probíhá následujícím způsobem: kapička roztoku polymeru je vytlačena na hrot kapiláry za aplikace vysokého napětí mezi hrotem kapiláry a uzemněným kolektorem. Vlivem tohoto napětí se na kapičce formuje tzv. Taylorův kužel (Rožek et al. 2008). Taylorův kužel je kuželovitý útvar na povrchu kapaliny, který vzniká v newtonovských kapalinách jako důsledek aplikace kritického potenciálu, který je charakterizován tak, že jakékoli další zvýšení tohoto potenciálu povede k porušení rovnováhy elektrostatické síly a povrchového napětí (Yarin et al. 2001). Elektrická síla, způsobená přítomností vysokého napětí, se stává natolik velkou, že je schopna překonat povrchové napětí kapičky a od kapičky se směrem ke kolektoru zvedá tenký proud nabitého roztoku. Z roztoku se začíná vypařovat rozpouštědlo a na kolektor dopadá již vlákno zvláknovaného materiálu.

Zefektivnění celého procesu se podařilo vyvinout na TUL (Technická Universita Liberec). Tato technologie byla patentována jako technologie Nanospider®. Tento využívá místo jednotlivých kapiček roztoku válec, jehož povrch je pokrytý roztokem zvláknovaného materiálu. Na hladině tohoto roztoku vznikají vlivem vysokého napětí ve velkém množství Taylorovy kužely, které slouží jako zdroj tvorby vláken. Tenké proudy roztoku jsou unášeny směrem ke kolektoru, na kterém se tvoří vlákna (Rožek et al. 2008).

### **3. Charakteristika zkoumavých polymerů**

#### **3.1. Polykaprolakton**

Polykaprolakton byl objeven ve 30. letech 20. století. Tento polymer se připravuje pomocí otevření řetězce cyklické molekuly  $\epsilon$ -kaprolaktonu. Tato reakce může probíhat



celou řadou mechanismů např. anionově, kationově koordinačně. Možná je i příprava pomocí radikálové reakce, při které dochází k otevření kruhu 2-methylen-1-3-dioxepanu. Pomocí vhodně zvoleného způsobu přípravy je možné řídit vlastnosti vznikuvšího polymeru. Polycaprolakton je dobře rozpustný, hydrofobní, semikrystalický polymer s teplotou skelného přechodu  $-60^{\circ}\text{C}$  a bodem tání v rozmezí  $59^{\circ}\text{C}$  až  $64^{\circ}\text{C}$  (Woodruff a Hutmacher 2010). Biodegradibilita polykaprolactonu byla poprvé pozorována v roce 1973 (Sinha et al. 2004). K úplnému rozpadu polymeru v těle může dojít až po 3 nebo 4 letech (Woodruff a Hutmacher 2010). Jeho špatná mechanická odolnost je často kompenzována pomocí vytváření kopolymerů např. s kolagenem, sacharidy či polymléčnou kyselinou, nebo vytvářením rozličných kompozitních materiálů s bioaktivními látkami. Také nevyniká příliš dobrými vlastnostmi v oblasti buněčné adheze. Výhodou tohoto materiálu je snadné zpracování a široké spektrum využití pro přípravu tkáňových nosičů (Hajiali et al. 2017).

### **3.2. poly(mléčná kyselina-co-kaprolakton)**

PLCL je kopolymer L-kyseliny mléčné a  $\epsilon$ -kaprolaktonu. Tento kopolymer nachází, díky dobré biokompatibilitě, využití v tkáňovém inženýrství (Mo et al. 2004). Jeho výhodou oproti homopolymeru polymléčné kyseliny je nižší krystalinita, která zkracuje dobu degradace. Krystalické lamely mohou také způsobovat větší reakci organismu. Na druhou stranu pokles krystalinity negativně ovlivňuje fyzikální vlastnosti (např. Youngův modul) materiálu (Penning et al. 1993). Krystalinitu ovlivňuje mimo jiné zpracování kopolymeru např. v případě elektrostatického zvláknění dochází k úplnému vymizení krystalinity a to zejména LLA sekvencích. Pokud je však kopolymer v průběhu dalšího zpracování zahříván k teplotě blízké teplotě skelného přechodu a ponechán pomalu chladnout, může dojít k opětovnému vzniku krystalinity v LLA sekvencích (Mo a Weber 2004).

Vlastnosti kopolymeru jsou výrazně ovlivněny složením kopolymeru (viz tabulka 1) (Penning et al. 1993).

Tabulka 1: Tato tabulka popisuje některé fyzikální vlastnosti kopolymeru kyseliny mléčné s příměsí komonomeru uvedeného v tabulce. (Penning et al. 1993)

Comonomer	Mole fraction	$T_g$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\Delta H$ (J g <sup>-1</sup> )
None	–	57	191	88
$\epsilon$ -caprolactone	0.10	41	178	51
$\epsilon$ -caprolactone	0.20	38	174	38

### 3.3. Polyvinylidenfluorid

Polyvinylidenfluorid (PVDF) byl poprvé syntetizován v roce 1944 polymerací vinylidenfluoridu (Dohany et al. 1971). V současnosti se využívá zejména suspenzní a emulzní polymerizace. Suspenzní metoda se vyznačuje vyšším výskytem struktury „head-to-tail“, která má za následek vyšší stupeň krystalinity (Teng 2012). Strukturální jednotka PVDF je  $-\text{CH}_2-\text{CF}_2-$ . Vodík a fluor přítomný v řetězci mezi sebou vytvářejí silné nevazebné interakce (Dohany et al. 1971).

Jedná se o semikrystalický polymer. Krystalinita tohoto polymeru stoupá až do 4. týdne po zpracování a může dosáhnou až 65%. Takto prudký nárůst pak může způsobit mechanické poškození materiálu (Teng 2012). PVDF se vyskytuje v několika krystalických fázích, které závisí na metodě přípravy a následného zpracování. Krystalická fáze pak ovlivňuje hustotu a teplotu tání polymeru. (Dohany et al. 1971) Gregorio (1994) udává, že existují celkem čtyři krystalické fáze tohoto polymeru:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  a  $\delta$ . Fáze  $\alpha$  je nejběžnější fáze. Je charakteristická tím, že je nepolární. Velmi podobná  $\alpha$  fázi je  $\delta$  fáze, která je jí ve všem podobná, vyjma toho, že je polární. Přejít z  $\alpha$  fáze do  $\delta$  fáze bývá vyvolán silným elektrickým polem. Fáze  $\beta$  je rovněž polární a je ze všech fází PVDF technicky nejvíce využívaná, protože se u ní projevují nejsilněji pyroelektrické a piezoelektrické vlastnosti. Fáze  $\beta$  může být z  $\alpha$  fáze připravena např. pomocí mechanického tažení folie. Fáze  $\gamma$  je také polární a může být připravena např. krystalizací z roztoku dimethylsulfoxidu (Gregorio, Jr. a Cestari 1994). Teplota tání PVDF se pohybuje mezi 155-192°C (Teng 2012). PVDF také disponuje piezoelektrickými vlastnostmi (Kawai 1969).

PVDF je charakteristický vysokou mechanickou a chemickou odolností. Odolá většině

kyselin, silných bází i látkám se silnými oxidačními účinky. Podléhá pouze oleu a silně zásaditým primárním aminům. Silně polární látky jako např. ketony působí v důsledku svojí absorpce změknutí materiálu (Dohany et al. 1971).

Vlivem ionizujícího záření může dojít k síťování polymeru. Čím je dávka ionizujícího záření vyšší tím více je polymer zesíťovaný. Míra zesíťování pak ovlivňuje rozpustnost polymeru. Již dávka o velikosti 2 Mrad (20 kGy) způsobí pokles rozpustnosti na 74% z původní hodnoty. Dávka o velikosti 590 Mrad (5,9 MGy) pak způsobí pokles rozpustnosti až na 4% původní hodnoty. Také mechanické vlastnosti polymeru mohou být ovlivněny ionizujícím zářením. Při dávce 1000 Mrad (10 Mgy) klesá síla v tahu na 25%. Na PVDF nemá žádný vliv ultrafialové záření (Dohany et al. 1971).

PVDF nalézá využití ve stavebnictví jako povrch exteriérů, v elektrických zařízeních jako izolační materiál nebo jako konstrukční součást letadel v podobě tepelně smrštitelných trubiček (Teng 2012). Ve zdravotnictví nalézá uplatnění jako materiál na stehy, nebo jako nosič pro tkáňové inženýrství při vývoji umělých cév (Schellenberg et al. 2014).

## **4. Přehled typů sterilizace zvolených pro účely této práce**

### **4.1. Sterilizace obecně**

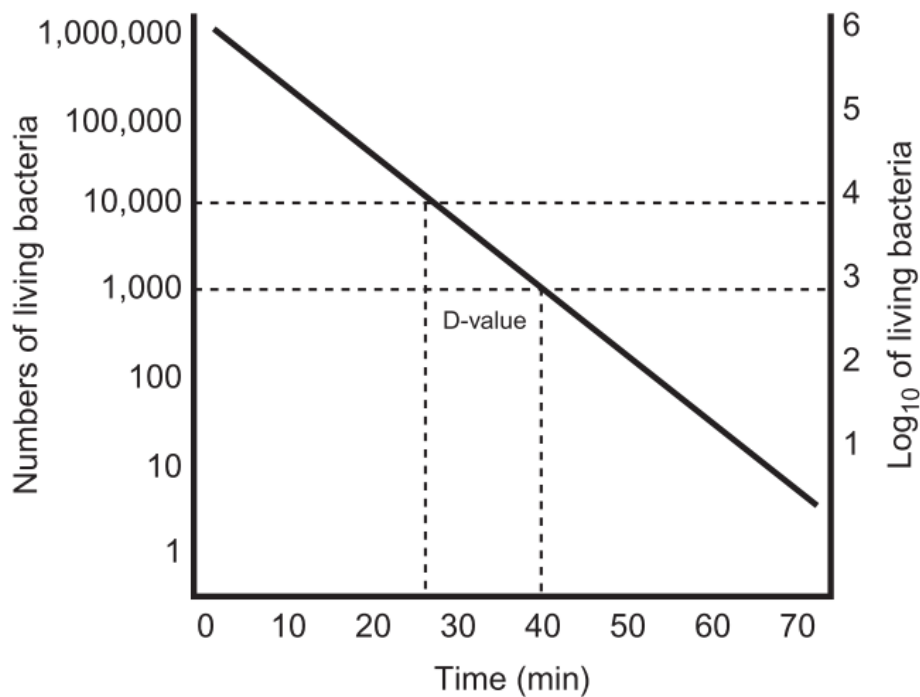
Definice sterilizace, říká, že sterilní předmět je takový na jehož povrchu byly usmrceny všechny formy mikrobiálního života (Baume et al. 2016). Usmrcení mikrobu v tomto případě chápeme jako poškození natolik závažné, že se mikroorganismus není schopen rozmnožit (Dempsey a Thirucote 1988). V praxi však sterilizace nikdy neproběhne dokonale a na povrchu předmětu zůstává určité procento životaschopných mikroorganismů.

Pro hodnocení sterility se proto zavádí jednotka nazývaná úroveň zajištění sterility (SAL), kterou je možno interpretovat jako pravděpodobnost, že je předmět nesterilní (Baume et al. 2016) , nebo jako pravděpodobnost přežití konkrétního mikroorganismu v

populaci (Rutala 1996). Udává se buď v číselné podobě (Baume et al. 2016), nebo jako záporný dekadický logaritmus tohoto čísla (Rutala 1996)

Aby mohl být předmět považován za sterilní musí SAL dosahovat alespoň  $10^{-6}$ , respektive 6 v případě logaritmického vyjádření (Baume et al. 2016; Rutala 1996).

Další veličinou využívanou k hodnocení některých typů sterilizací je tzv. D-hodnota (D-value). Ta je definována jako čas, že který se počet mikroorganismů sníží o jeden řád (viz graf 1.).(Baume et al. 2016)



Graf 1. : Graf znázorňující definici D-hodnoty (Baume et al. 2016)

Obecně uznávaná pravidla pro sterilizaci medicínského materiálu jsou ta, které vytvořil Earle H. Spaulding. Zavádí 3 kategorie medicínských předmětů:

- kritické
- semikritické
- nekritické

Kritické předměty jsou ty, které se používají na nejrizikovějších místech a vstupují do kontaktu s tkáněmi nebo cévním systémem. Řadí se mezi ně např. chirurgické nástroje a implantáty. Tyto předměty musí být sterilní. Preferovanou sterilizační metodou je sterilizace vlhkým teplem (autokláv), popřípadě ošetření pomocí ethyleoxidu.

Semikritické předměty, jsou ty které přichází do styku s poškozenou kůží nebo s mukózní membránou. Takové předměty musí být pouze dezinfikovány. Dezinfekce je proces podobný sterilizaci. Je definována jako odstranění veškerých vegetativních mikroorganismů, nicméně nelikviduje bakteriální spory.

Poslední kategorií jsou předměty nekritické, které přicházejí do styku se zdravou kůží, která velmi účinně zabraňuje infekci. Mezi tyto předměty patří široká škála věcí od rukávu pro měření tlaku až to noční stolky nebo podlahy v nemocnicích (Rutala 1996).

Tabulka dva shrnuje vybrané typy sterilizace a desinfekce, kterými se tato práce zabývá a dělí je podle příslušnosti k těmto dvěma procesům.

Tabulka 2 rozděluje postupy jimiž se tato práce zabývá, podle to zde jde o sterilizační nebo desinfekční postup.

*Tabulka 2: Typy sterilizace, jimiž se zabývá tato práce rozdělené podle toho zda se jedná o sterilizace nebo desinfekci*

sterilizační médium	typ
autokláv	sterilizace
ethylenoxid	sterilizace
kyselina peroxooctová	sterilizace
plasma a na plasmě založené technologie	sterilizace
γ-zářen	sterilizace
ethanol	desinfekce
ultrafialové záření	desinfekce

## 4.2. Sterilizace vlhkým teplem

První zmínky o sterilizaci teplem se nacházejí již v Mojžíšově zákoně, kde se hovoří o využití ohně a vody k očišťování předmětů. (Dempsey a Thirucote 1988). První zmínky ve vědecké literatuře se pak začínají objevovat na počátku 19. stol.(Ayliffe et al. 2004).

Sterilizace pomocí vlhkého tepla se dá rozdělit na dva základní typy: sterilizace pomocí vařící se vody za atmosférického tlaku. Tento typ sterilizace je velmi dostupný, jeho nevýhodou je ale poměrně nízká dosažená teplota, která negativně ovlivňuje jeho účinnost. Oproti tomu druhý typ, využití nasycené páry za zvýšeného tlaku je, díky vyšší dosažené teplotě a velmi dobré prostupnosti páry skrz překážky, velmi účinným sterilizačním postupem (Dempsey a Thirucote 1988). Sterilizace pomocí nasycené páry je v současnosti hodně využívanou sterilizační metodou.

Nasycená pára s sebou nese tzv. latentní teplo, které předá sterilizovaného předmětu, když pára zkondenzuje na povrchu. Tento proces nijak nesnižuje teplotu ve sterilizační komoře. Oproti tomu využití přehřáté páry je méně efektivní, protože k předávání tepla dochází v mnohem delším čase (Ayliffe et al. 2004).

Sterilizační cyklus lze rozdělit do tří kroků:

- 1) zahřátí, kdy sterilizační komora autoklávu dosáhne teploty potřebné ke způsobení smrti mikroorganismů.
- 2) Vystavení mikroorganismů této teplotě.
- 3) Chladnutí sterilizovaného předmětu (Dempsey a Thirucote 1988).

V současnosti jsou používány dva základní sterilizační módy: vystavení teplotě 121°C po dobu 15 min, nebo aplikace teploty 134°C po dobu 3 minut (Baume et al. 2016).

Vztah teploty a potřebného tlaku shrnuje tabulka 3.

*Tabulka 3: Závislost tlaku potřebného při sterilizaci na požadované teplotě (Ayliffe et al. 2004).*

<i>Temperature (°C)</i>	<i>Steam pressure</i>	
	<i>kPa</i>	<i>psi</i>
121	103	15
126	138	20
134	207	30

Celkový čas sterilizačního cyklu včetně vysoušení a chladnutí se pohybuje okolo 25-28 min.(Ayliffe et al. 2004).

Před vystavením předmětu sterilizační teplotě je nutné zajistit vakuum ve sterilizační komoře. Přítomnost vzduchu působí negativně na teplotu ve sterilizační komoře a přispívá, ke zhoršení prostupnosti předmětu pro páru, tak snižuje efektivitu celého procesu (Dempsey a Thirucote 1988).

Zajištění vakua je důležité zejména při sterilizaci porézních materiálů (Ayliffe et al. 2004).

Mechanismus likvidace mikroorganismů spočívá v rozložení vodíkových vazeb v molekulách jejich DNA (Dempsey a Thirucote 1988) , nebo v hydrolýze rozličných molekul, esenciálních pro množení organismu (Baume et al. 2016).

Výhodou tohoto typu sterilizace spočívá v rychlosti a nízkých nákladech (Dempsey a Thirucote 1988), ceněnou vlastností je velmi dobrá prostupnost páry do předmětů a také to, že nezanechává žádné toxické zbytky. Nevýhodou je vysoká teplota, která může působit na některé materiály, a působit hydrolýzu kovalentních vazeb materiálu (Dai et al. 2016).

### 4.3. Sterilizace pomocí ethylenoxidu

Tento typ sterilizace se řadí mezi plynové sterilizace. První zmínka o sterilizaci plynem pochází z eposu Odyssea, kde se píše o sterilizaci místnosti pomocí spalování síry. Další zmínky pocházejí z 18. stol. kdy je doložena sterilizace provizorní márnice v době epidemie pomocí plynného chloru. Sterilizace pomocí ethylenoxidu se začala využívat v 60. letech minulého století.

Sumární vzorec ethylenoxidu je  $C_2H_4O$ . Je to bezbarvý plyn s etherickým zápachem. Bod varu je  $10,8^{\circ}C$ . Má přibližně 1,5 krát větší hustotu než vzduch, se kterým se špatně mísí. Nicméně se vzduchem může vytvořit výbušnou směs a to již od 3 % obsahu ethylenoxidu.

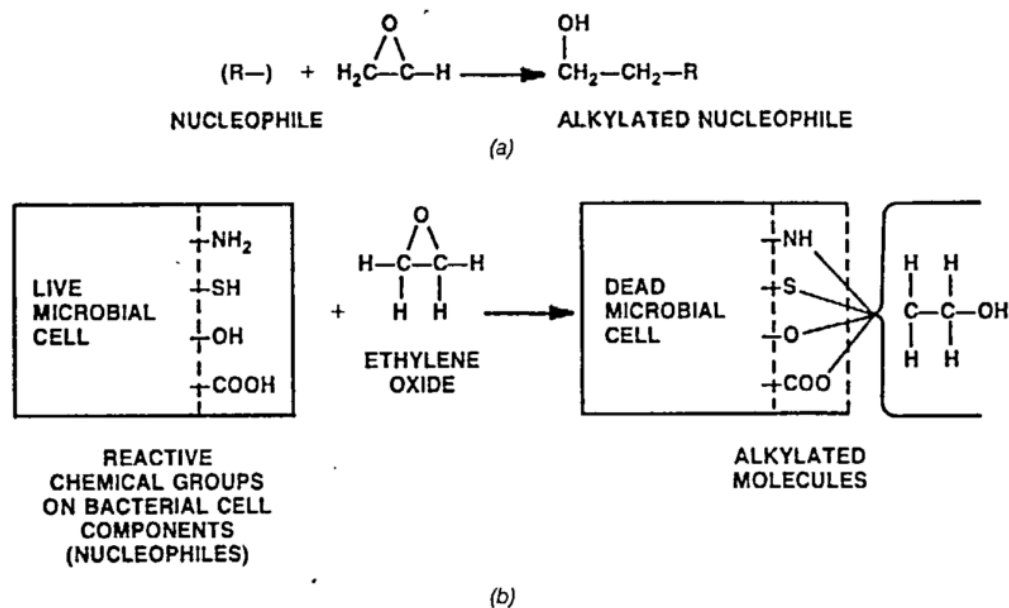
Za přítomnosti katalyzátoru může polymerovat. Vhodnými katalyzátory pro tuto reakci mohou být např. kovy, světlo nebo teplo. Může se samovolně rozkládat na methan, ethan nebo oxid uhlíčitý.

Sterilizace pomocí ethylenoxidu je velmi účinná. (Ayliffe et al. 2004) Působí na velké množství druhů organismů od bakterií přes houby až po viry (Dai et al. 2016), jediný



patogen, který je proti ethylenoxidu zcela rezistentní, jsou priony (Ayliffe et al. 2004) (Priony jsou patogeny působící množstvím závažných onemocnění např. Creutz-Jakobovu nemoc. Jedná se o patogeny bez nukleových kyselin skládající se výhradně z proteinu (Prusiner 1998).

Ethylenoxid se řadí mezi alkylační sterilizační chemikálie (Ayliffe et al. 2004). Jeho působením dochází k nevratné alkylaci thiolových, karbonylových, hydroxylových, aminových i amidových skupin. (Dai et al. 2016). Mechanismus působení ethylenoxydu na mikrobiální buňku ilustruje obrázek 1.



Obrázek 1: (a) obecný zápis reakce EtOx s nukleofilem (b) reakce EtOx s konkrétními chemickými skupinami v molekulách mikrobiálních buněk (Dempsey a Thirucote 1988)

Tímto mechanismem je ethylenoxid (EtOx) schopen denaturovat proteiny, enzymy, ale také nukleová kyseliny (Ayliffe et al. 2004).

Alkylace proteinů a nukleových kyselin je závislá na několika faktorech, které mohou být využity ke zefektivnění procesu sterilizace. Jedná se především o teplotu, jak udává Dempsey (1988). Efektivita procesu roste s teplotou exponenciálně (Dempsey a Thirucote 1988). Průměrná teplota v průběhu cyklu se pohybuje od 40 do 50°C. Dalším důležitým faktorem je vlhkost, která slouží jako katalyzátor alkylace. Udává se, že pro úspěšnou sterilizaci je třeba relativní vlhkost alespoň 30%. Při nižších vlhkostech se

mohou vyskytovat dehydratované spory, které mají oproti normálním sporám mnohem větší rezistenci proti EtOx (Dempsey a Thirucote 1988).

Velmi malá a málo polární molekula snadno prostupuje velkým množstvím materiálů (Ayliffe et al. 2004), a to dokonce to té míry, že je možné sterilizovaný předmět ponechat v plastovém obalu a provádět sterilizaci přes tento obal. Jako bariéra, zabraňující uniknutí EtOx může posloužit např. kov nebo sklo. Také povlaky solí a znečištění biomolekulami na bázi proteinů zabraňuje průchodu EtOx (Dempsey a Thirucote 1988).

EtOx je vysoce toxický (Baume et al. 2016), je klasifikován Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny, jako karcinogenní látka, pokud působí ve velkých koncentracích po dlouhou dobu (Ayliffe et al. 2004). Příznaky akutní otravy mohou být např. dýchací obtíže, zvracení a průjem, chronická otrava má potencionálně mutagenní účinky, může způsobit dýchací obtíže a změny chování. Je-li přítomen zbytkový EtOx v implantátu, může způsobovat hemolýzu (Dempsey a Thirucote 1988).

V průběhu sterilizace se EtOx adsorbuje do sterilizovaného předmětu. Adsorpce je přímo úměrná tloušťce předmětu, koncentraci EtOx a času, pro který je předmět vystaven působení EtOx (Ayliffe et al. 2004). Z tohoto důvodu je nutné sterilizovaný předmět nechat projít tzv. desorpcí, která se realizuje odvětráváním EtOx ze sterilizovaného předmětu. Rychlost uvolnění EtOx roste s teplotou. Je-li sterilizovaný předmět ponechán větrat při pokojové teplotě, doporučuje se doba větrání alespoň 5 dní. K urychlení procesu lze speciální přístroj. Použití plastového obalu při sterilizaci snižuje rychlost adsorpce, ale zároveň zpomaluje i proces následného odvětrání (Dempsey a Thirucote 1988).

EtOx se používá buď v čisté formě, která má řadu nevýhod (výbušnost a vyšší míru polymerizace), nebo ve směsi s jiným plynem. Dříve se využívali freony, ale protože se od jejich využívání z ekologických důvodů upustilo, využívá se v současnosti směs s oxidem uhličitým (10% EtOx a 90% CO<sub>2</sub>). Oxid uhličitý zamezuje nebezpečí výbuchu a snižuje rychlost polymerace.

Rozlišujeme dva druhy sterilizačních cyklů:

- vakuový
- s zvýšeným tlakem

Vakuový cyklus má tři fáze. V první fázi je v komoře vytvořeno vakuum, dochází k zahřátí komory na požadovanou teplotu. V této fázi je vstřikována vodní pára, aby se zvýšila relativní vlhkost. Následuje fáze vystavení předmětu účinkům EtOx, tato fáze trvá alespoň hodinu. V poslední fázi je předmět několikrát „promyt“ pomocí filtrovaného vzduchu.

Sterilizační cyklus se zvýšeným tlakem, na rozdíl od vakuového, vždy používá směsi EtOx s oxidem uhličitým. Sterilizace se provádí za vyššího tlaku, než je atmosferický po dobu 30-120 min. Výhoda této metody spočívá ve vyloučení možnosti vzplanutí EtOx, nicméně je zde nebezpečí prosakování EtOx z přístroje (Ayliffe et al. 2004).

#### **4.4. PAA kyselina peroxooctová**

Kyselina peroxooctová (PAA) má vzorec  $\text{CH}_3\text{COOOH}$ , bod varu je  $110^\circ\text{C}$ . Je to látka velmi silného a nepříjemného zápachu. Je charakteristická oxidačními vlastnostmi, kvůli kterým způsobuje korozi většiny kovů. Od koncentrace 5 % se stává hořlavou a nad 56 % dokonce výbušnou (Ayliffe et al. 2004). Typickou vlastností kyseliny peroxooctové je neomezená mísitelnost s vodou (Crow 1992). Ve vodném roztoku se kyselina peroxooctová nachází v rovnováze s peroxidem vodíku a kyselinou octovou (viz obrázek 3.). Tuto rovnováhu je možné posunout ve prospěch PAA snížením pH (Ayliffe et al. 2004).

Možnost využití této kyseliny ke sterilizaci byla poprvé objevena v roce 1951 (Greenspan a MacKellar) (Ayliffe et al. 2004), nicméně v nemocničních zařízeních se začíná využívat až v šedesátých létech minulého století (Malchesky 2008).

Ke sterilizaci se využívá roztok o koncentraci 500-10000 ppm v destilované vodě. Doba působení kyseliny nutná pro sterilizaci je v rozsahu 15 s-30 min (Redigueri et al. 2016b). Yoganarashima (2014) využívá roztok kyseliny peroxooctové s 20 % ethanolem, kvůli zlepšení smáčivosti bakteriálních spor tímto roztokem.

Přesný mechanismus účinku kyseliny peroxooctové nebyl zatím objeven. Mezi teoreticky navrhované mechanismy patří např. narušení stěny buňky a zabránění transportu látek přes buněčnou membránu pomocí oxidace (Crow 1992). Objevuje se také názor, že kyselina peroxooctová rozrušuje S-H a S-S vazby v proteinech a

enzymech a způsobuje tak jejich denaturaci (Malchesky 2008). Jiný návrh mechanismu spočívá v oxidaci proteinů a enzymů a to jak na buněčné membráně tak přímo uvnitř buňky.

Obecně je sterilizace kyselinou peroxooctovou uznávaná jako velmi účinná, a to dokonce více než sterilizace pomocí peroxidu vodíku. Účinnost sterilizace se nezhoršuje organickým znečištěním, také enzymy nejsou schopny odbourat kyselinu peroxooctovou (Ayliffe et al. 2004). Efektivitu sterilizace ovlivňuje celá řada faktorů: koncentrace, pH, teplota, vlhkost (Dai et al. 2016). Optimální relativní vlhkost je 80 %. Kyselina peroxooctová příliš dobře neprostupuje materiálem.

Dá se využít jak sterilizace pomocí vodného roztoku, tak pomocí výparů kyseliny peroxooctové, ale větší uplatnění nalézá sterilizace pomocí roztoku.

Kyselina peroxooctová degraduje na kyslík, kyselinu octovou a vodu, nezanechává žádný toxický zbytek a je tedy velmi vstřícná k životnímu prostředí. Samotná kyselina peroxooctová je jen slabě toxická, způsobuje podráždění očí a kůže (Ayliffe et al. 2004). Největší nevýhodou kyseliny peroxooctové jsou její silně oxidační účinky, nicméně existují technologie, které se s tímto problémem vypořádávají pomocí přidání speciální antikorozi chemikálie (Crow 1992).

## **4.5. Plasmová sterilizace a metody sterilizace založené na plasmě**

Sterilizační účinky plasmy poprvé objevil v roce 1968 Menashi, první praktická aplikace byla stejným autorem (ve spolupráci s Aschamem) navržena o 4 roky později.

Plasma bývá označována jako 4 skupenský stav vedle pevného, kapalného a plynného. Ve stadiu plasmy se nachází 99 % hmoty v celém vesmíru (Ayliffe et al. 2004). Plasma je tvořena iony plynu a volně pohyblivými elektrony, podle definice, plasma neobsahuje žádné neutrální částice. Nutno podotknout, že tuto definici „plasma“ využívané pro sterilizaci nespĺňují, správné označení by mělo být „ionizovaný plyn“. Tento se skládá z ionů, elektronů, ale také z nenabitých částic jako jsou např. radikály nebo jednotlivé atomy prvků a dokonce i molekuly. Sterilizační plasma se také někdy označuje jako

studené plasma, protože jeho teplota se pohybuje okolo 50°C. To je způsobeno tím, že dochází pouze k urychlení elektronů, jejichž střední rychlost pak odpovídá teplotě okolo 11500 K. Těžké iony zůstávají neurychleny, takže výsledná naměřená teplota je mnohem nižší. Vyšší tlak ve sterilizační dutině zároveň zvyšuje teplotu plasmatu. K tomuto jevu dochází, protože vyšší tlak znamená vyšší koncentraci částic v objemu, tím se zvyšuje pravděpodobnost kolizí elektronů s iony. Při těchto srážkách elektrony předávají část svojí energie ionům a tím je urychlují. Výsledkem je stoupající teplota celého systému.

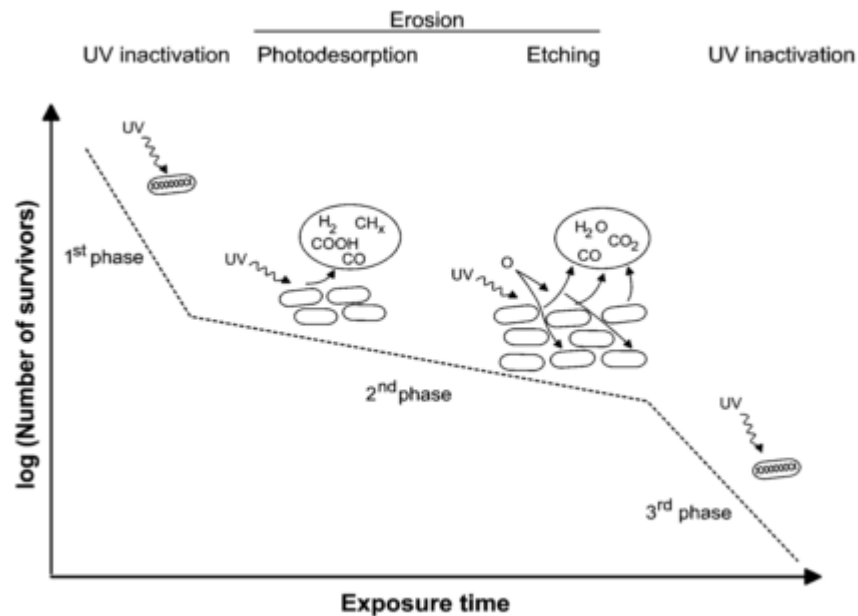
Technicky se studené plasma připravuje z plynu buzením pomocí aplikace elektrického pole, které může být buď stejnosměrné nebo radiofrekvenční, případně mikrovlnné. Plasmový výboj pak není stálý, ale pulzující, což umožňuje lépe kontrolovat teplotu a předejít přehřátí plasmatu.

Z hlediska polohy plasmového výboje a sterilizované předmětu se rozlišují dva typy sterilizace: sterilizace v plasmovém výboji a tzv. *flowing afterglow*. Sterilizace ve výboji je rychlejší, teplota je však vyšší a také může docházet k plasmovým modifikacím povrchů. *Flowing afterglow* spočívá v odnosu ionizovaných částic do větší vzdálenosti od výboje, kde pak dochází ke kontaktu se sterilizovaným předmětem. Výhodou *flowing afterglow* je, že nedochází k plasmovým modifikacím povrchů. To se děje, protože součástí tohoto proudu částic jsou převážně neutrální částice (Moisan et al. 2001).

Mechanismus působení plasmatu na mikroorganismy a jejich spory se doposud nepodařilo uspokojivě vysvětlit (Dai et al. 2016). Moisan (2002), tvrdí, že výsledný mechanismus účinku plasmatu na mikroorganismy vzniká složením 3 dílčích mechanismů. První dílčí mechanismus spočívá v poškození DNA mikroorganismů pomocí UV, která vzniká v plynu, kvůli excitaci atomů a molekul a jejich následné relaxace pomocí vyzáření fotonu. Druhý dílčí mechanismus spočívá v odštěpování jednotlivých atomů z molekul mikroorganismu pomocí UV světla (tzv. *fotodesorpce*). Poslední dílčí mechanismus spočívá v adsorpci radikálů vzniklých v plasmatu na povrch mikroorganismu a jejich následného uvolnění v podobě nízkomolekulární, obvykle plynné, látky. Schéma celého mechanismu viz obrázek 2 (Moisan et al. 2002).

Moisan et al. (2002) také uvádí, že přítomnost UV je schopná katalyzovat proces

rozkladu molekul mikroorganismu pomocí radikálů. Na efektivitu celého procesu má vliv tlak, teplota a energie budícího pole (Dai et al. 2016).



Obrázek 2: Schéma mechanismu působení plasmatu na mikroorganismus. Jednotlivé fáze jsou zakresleny do grafu křivky přežití mikroorganismů (Moisan et al. 2002)

Plasmová sterilizace nezanechává žádné toxické zbytky na předmětu (Baume et al. 2016). Výhodná je zejména pro biodegradabilní nosiče pro tkáňové inženýrství, protože je nízkoteplotní a plasmová úprava povrchu vytváří výhodnější prostředí pro nasedání buněk (Dai et al. 2016). Plasma také likviduje endotoxiny (Ayliffe et al. 2004) a je schopná si poradit i s priony.

Hlavní limitací je výrazně klesající účinnost s rostoucí tloušťkou spor. Tloušťka negativně ovlivňuje jak účinek UV tak účinek radikálů. Největší potíže vznikají tam, kde se spory mikroorganismů shlukují (Moisan et al. 2001).

Pro plasmovou sterilizaci existují dvě hlavní komerčně dostupné technologie: Plazlyte® a Sterrad® (Ayliffe et al. 2004). Obě dvě technologie úplně nesplňují definici plasmové sterilizace, protože operují s plyny, které sami o sobě způsobují sterilizaci. Plasmová fáze slouží zejména k odstranění zbytkových toxických látek z sterilizovaného předmětu.

Technologie Plazlyte využívá jako sterilizační medium směs 5 % kyseliny peroxooctové

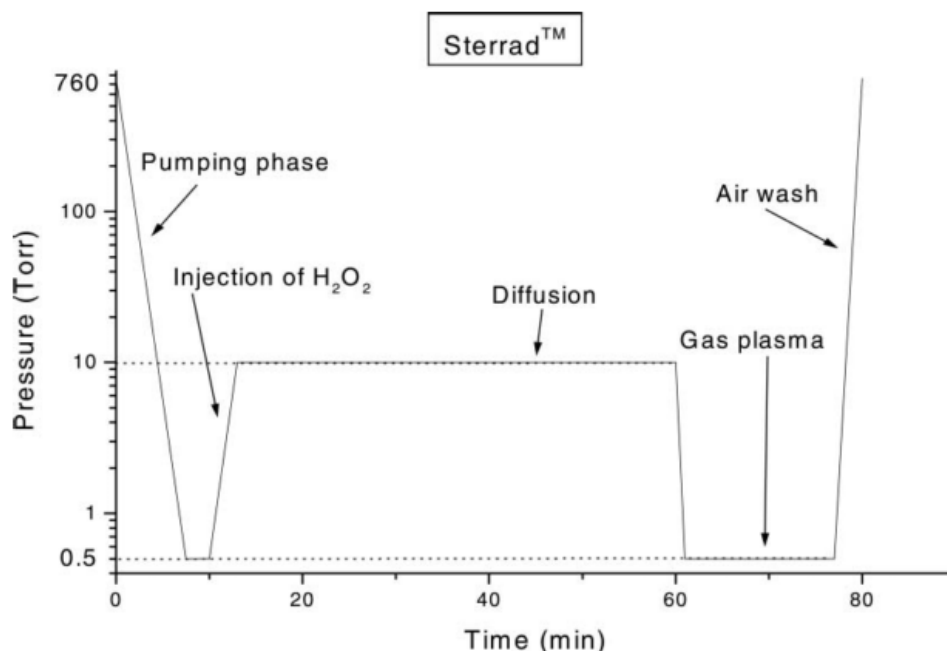
s 22 % peroxidu vodíku ve vodě, která je vsříknuta do vakuované komory, takže dojde k jejímu vypaření. Mikroorganismy pak slouží jako kondenzační zárodky pro vzniklý plyn. Kyselina peroxooctová je následně odstraněna a komora je naplněna směsí kyslíku, argonu a vodíku. V této směsi pak proběhne plasmový výboj. Typický cyklus trvá 60 min (Moisan et al. 2001).

Ukázalo se však, že tato metoda poškozuje některé lékařské nástroje tak, že pak působí zdravotní komplikace pacientům a proto byla stažena z trhu (Ayliffe et al. 2004).

Technologie Sterrad® využívá jako sterilizační medium koncentrovaný roztok peroxidu vodíku (58 % vol.) ve vodě. Mechanismus je obdobný jako v případě výše popsané technologie Plazlyte®. Peroxid vodíku je injektován do vakuované komory, vypaří se, kondenzuje na povrchu mikroorganismů. V tomto případě, ale dochází k zažehnutí plasmového výboje přímo v plynu peroxidu vodíku. Typický cyklus trvá 75 min (Moisan et al. 2001). Průběh sterilizačního cyklu shrnuje obrázek 3.

Kompatibilita technologie Sterrad® je horší než v případě sterilizace ethylenoxidem (použitelný pro menší spektrum materiálů). Je citlivý na znečištění povrchu, ale nezanechává toxické zbytky.

Technologie Sterrad® je v Evropě dostupná od roku 1992 (Ayliffe et al. 2004).



Obrázek 3: Průběh sterilizačního cyklu technologie Sterrad® (Moisan et al. 2001)



## 4.6. sterilizace $\gamma$ -zářením

Od roku 1964, kdy byl sestrojen první komerčně dostupný  $\gamma$ -sterilizátor (Dempsey a Thirucote 1988), se tento typ záření využívá pro sterilizaci materiálů, které jsou citlivé na změnu teploty.

Mechanismus likvidace mikroorganismů spočívá v odštěpení elektronů z molekul pomocí  $\gamma$ -záření, to vede buď k poškození molekuly (DNA, enzymy) nebo (hlavně v případě vody) ke vzniku radikálů, které následně napadají DNA a proteiny.

Jako generátor  $\gamma$ -záření se používá převážně radioaktivního isotopu  $^{60}\text{Co}$ , který lze nalézt volně v přírodě, nebo vzácně isotopu  $^{137}\text{Cs}$ , který je jedním z odpadních produktů jaderných elektráren.

$^{60}\text{Co}$  při svém rozpadu emituje jeden elektron a dva fotony o energiích 1,33 MeV a 1,17 MeV. Jeho poločas rozpadu je 5,3 roku, což v praxi znamená, že intenzita kobaltového zdroje klesne o 10 % ročně.

$^{137}\text{Cs}$  emituje pouze jeden foton (0,66 MeV) a jeden elektron. Jeho poločas rozpadu je 30 let.

Sterilizace se provádí ve speciální stíněné komoře, aby nedocházelo k úniku radiace do okolí. Rozlišujeme dvě možnosti provedení: první zahrnuje dopravník, na kterém předměty projíždějí sterilizační komorou, druhé provedení se dělá po dávkách. Předměty jsou umístěny do malé vzdálenosti od zdroje, jejich poloha se mění po určitých časových intervalech, aby došlo k rovnoměrnému prozáření předmětů (Ayliffe et al. 2004). Není-li zdroj používán ukládá se na dno bazénu s vodou, který má hloubku okolo 6 m. Na hladině této vodní lázně je pak možné pozorovat tzv. Čerenkovovo záření (Dempsey a Thirucote 1988).

Míra citlivosti mikroorganismů na  $\gamma$ -zářením se značně liší a to jak mezi druhy, tak v rámci stejného druhu. Obecně se dá říct, že nejodolnější jsou priony s D-hodnotou (dávka potřebná k usmrcení 90 % populace) 50 kGy, dále jsou velmi odolné viry, jejichž D-hodnota je 5 kGy (v případě nejodolnějších). Pro srovnání smrtelná dávka záření pro člověka je 10 Gy. Velká míra rezistence je také pozorována u enzymů.

Standardní sterilizační dávka je, ve většině států, 25 kGy (Ayliffe et al. 2004).

Efektivita celého procesu je značně ovlivněna biologickým znečištěním (počtem mikroorganismů) vzorku (Baume et al. 2016). Efektivita je také ovlivněna přítomností

vody, vysušené spory bývají mnohem více rezistentní (Ayliffe et al. 2004).

Charakteristickou vlastností  $\gamma$ -záření je dobrá průchodnost materiálem (Baume et al. 2016). Jedná se o metodu velmi rychlou, jednoduchou a efektivní, ale je zřejmé, že působením záření na materiál, dochází k rozličným chemickým reakcím, které pak vedou ke změnám vlastností materiálu (Dai et al. 2016).

## 4.7. Alkoholová dezinfekce

Z alkoholů se k dezinfekci využívají zejména ethanol a isopropanol. Obecně se ale dá říci, že efektivita účinku alkoholu vzrůstá se vzrůstající délkou jeho uhlíkatého řetězce. Co se týče konstituce je nejvýhodnější využívat alkoholy s hydroxylovou skupinou na primárním uhlíku. Účinnost hydroxylové skupiny pak klesá, je-li umístěna na sekundárním uhlíku. Nejmarkantnější pokles pak pozorujeme na hydroxylové skupině na terciárním uhlíku.

Alkoholy účinkují na poměrně široké spektrum mikroorganismů, nejsou však schopny deaktivovat bakteriální spory ani priony (Camelia Burcea et al. 2013).

V mechanismu inaktivace mikroorganismů zůstávají nejasnosti, ale nejpravděpodobnější je souhrn tří dílčích mechanismů: denaturace proteinů, rozklad proteinů a inhibice metabolismu (Springthorpe a Sattar 1990).

Dezinfekce isopropanolem se provádí pomocí vodného roztoku o koncentraci 60 %-70 % (v./v.). K dezinfekci ethanolem se využívá 70 % (v./v.) vodný roztok, který se ukázal jako nejefektivnější (Camelia Burcea et al. 2013). Doba vystavení ethanolu je alespoň 5 min (Chambers et al. 2006).

Biologické znečištění vzorku nemá a dezinfekční účinky ethanolu žádný vliv (Sopwith et al. 2002).

V nemocnicích se ethanol využívá především k dezinfekce semikritických předmětů (Sopwith et al. 2002) a k dezinfekci rukou. Pro tento účel považuje za dostačující vodný roztok ethanolu o koncentrace 60 %-95 % (Kampf 2017).

## 4.8. Dezinfekce ultrafialovým zářením

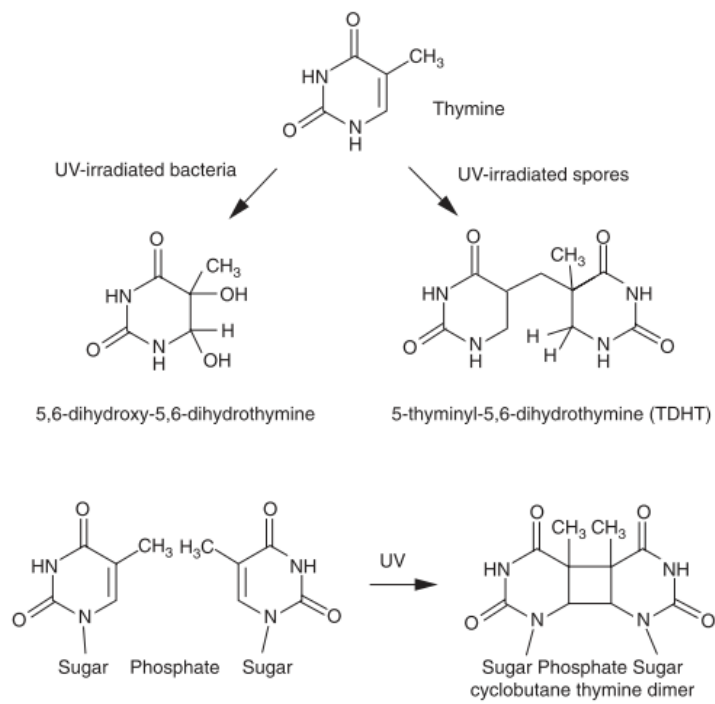
Ultrafialové (UV) světlo se dělí do tří kategorií, podle účinku na lidskou pokožku: UVA o vlnové délce 400-315 nm způsobuje opálení, UVB (315-280 nm) způsobuje zpálení a UVC (280-200 nm) poškozuje DNA, způsobuje mutace a může vést až k buněčné smrti. Toto záření se využívá na dezinfekci. Maximální absorpce UV v DNA je při vlnové délce 254 nm.

Mechanismus působení UV spočívá v excitaci DNA, která pak reaguje za vzniku tzv. fotoproduktů (viz obrázek 4). Vyšší koncentrace fotoproduktů pak vede k buněčné smrti.

Rezistence jednotlivých mikroorganismů proti UV se různí a je závislá na schopnosti jednotlivých druhů rozkládat fotoprodukty a tak si opravovat DNA, přičemž spory jsou charakterizované vyšší rezistencí než viry. Nejvíce rezistivní jsou priony (Ayliffe et al. 2004).

Desinfekce UV světlem se provádí tzv. germicidní výbojkou. Jedná se v podstatě o zářivku, které ovšem chybí vrstva luminoforu, který v běžné zářivce zajišťuje konverzi UV světla na světlo viditelného spektra. Zářivka pracuje na principu excitace rtuťových atomů (v plynném stavu), které pak emitují UV světlo o vlnové délce 250 nm a 185 nm. Světlo o vlnové délce 250 nm je absorbováno DNA a způsobuje její poškození. Světlo o vlnové délce 185 nm může reagovat s kyslíkem za vzniku ozonu, který pak vytváří radikály. Ty pak reagují s molekulami mikroorganismu a zefektivňují celý proces (Dempsey a Thirucote 1988).

Vzhledem k tomu, že UV světlo lze snadno odstínit (pomocí skla nebo plastů), nachází využití zejména v čistých prostorech, kde je třeba likvidovat mikroorganismy přítomné ve vzduchu nebo se používá k dezinfekci kapalin (vody) a povrchů (Ayliffe et al. 2004; Dempsey a Thirucote 1988).



Obrázek 4: Schéma reakcí DNA katalyzovaných pomocí UV světla (Ayliffe et al. 2004)

## **5. Vliv sterilizace na polymery vybrané pro účely práce**

### **5.1. Vliv sterilizace vlhkým teplem na vybrané polymery**

Protože nosiče pro tkáňové inženýrství bývají poměrně teplotně nestabilní, dochází vlivem vysoké teploty k totálnímu rozložení jejich původní struktury (Baume et al. 2016).

Sterilizace autoklávem se obecně hodnotí jako nevhodná pro biodegradabilní polymery, protože vlivem vlhkosti dochází k hydrolyze jejich řetězců.

V případě polykaprolaktonu dochází k úplnému roztavení (teplota tání PCL je okolo 60°C). (Redigueri et al. 2016).

### **5.2. vliv sterilizace ethylenoxidem na vybrané polymery**

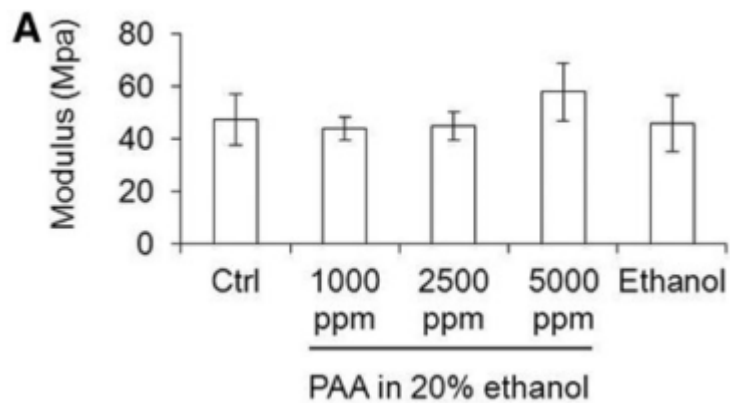
Sterilizace pomocí EtOx nepůsobí změny ve smáčivosti a hrubosti povrchu. V případě elektrostaticky zvlákněného PCL došlo ke snížení kontaktního úhlu na 85° (Yoganarashimha et al. (2014) udává, že kontaktní úhel nesterilizovaného elektrostaticky zvlákněného PCL se pohybuje okolo 120° ), ale zároveň došlo ke snížení pevnosti. Redigueri et al. (2016) udává, že vzorek byl po sterilizaci EtOx tak křehký, že nebylo možné kvantitativně vyhodnotit jeho mechanické vlastnosti (Redigueri et al. 2016). Baume et al. (2016) naproti tomu uvádí, že sterilizace pomocí EtOx nemění strukturu elektrostaticky zvlákněného polymeru a jeho mechanické vlastnosti mění jen málo. Upozorňuje také na problém následného odvětrávání zbytkového EtOx, kde se doporučuje nechat materiál vakuovat při 50°C po 48 h. To způsobuje (zejména v případě PCL) změny v jeho 3D uspořádání, vlivem poměrně vysoké teploty může docházet k redukci plochy materiálu ((Baume et al. 2016).

### 5.3. vliv sterilizace kyselinou peroxooctovou na vybrané polymery

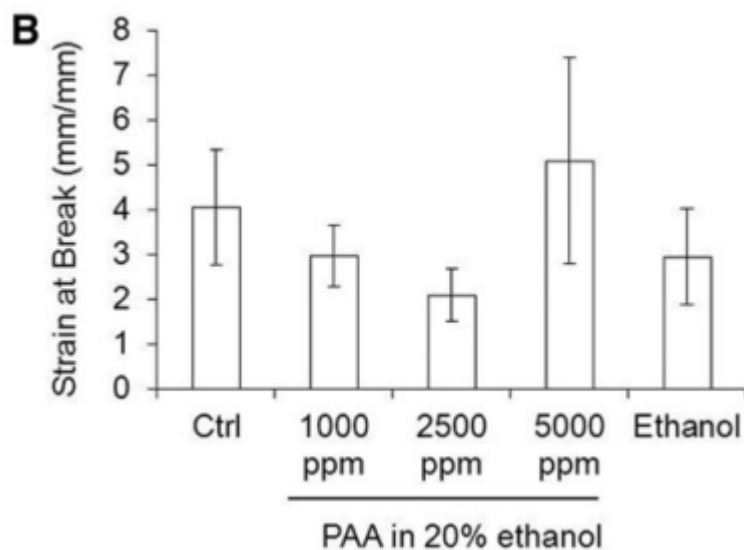
Rediguieri et al. (2016) píše, že v případě sterilizace elektrostaticky zvlákněných nosičů z PCL kyselinou peroxooctovou dochází k redukci rozměrů nosiče a také k lámání vláken (Rediguieri et al. 2016). Morfologie vláken se mění zejména použijeme-li roztok PAA v destilované vodě. V tomto případě dochází k výraznému zvětšení jejich průměrů a ke vzniku rozličných defektů. Naopak použití kyseliny peroxooctové v 20 % ethanolu ve jen k nepatrnému zmenšení průměrů vláken (Yoganarasimha et al. 2014). Od koncentrace PAA 5000 ppm byly pozorovány změny v hydrofilitě elektrostaticky zvlákněných nosičů. Kontaktní úhel poklesl ze 120° na 55° v destilovaná vodě, respektive na 0° za použití kyseliny PAA v 20 % ethanolu (Rediguieri et al. 2016; Yoganarasimha et al. 2014). Změnu mechanických vlastností shrnují tabulky 2-3. Z uvedených tabulek vyplývá, že změna mechanických vlastností je v případě PAA o koncentraci 5000 ppm v 20 % ethanolu je v rámci statistické chyby. Protože PAA v destilované vodě prakticky rozložila morfologii nosiče, Yoganarashimha et al. (2014) nezkoumali mechanické vlastnosti takto sterilizovaných vzorků (Yoganarasimha et al. 2014). Změnu Youngova modulu při sterilizaci PAA v 20 % ethanolu o různých koncentracích shrnuje graf 2. Podobně shrnuje, pro stejné typy sterilizací, napětí při prasknutí graf 3.

Dai (2016) odkazuje na několik zdrojů, které mají pochybnosti o aplikaci tohoto typu sterilizace na elektrostaticky zvlákněné nosiče pro tkáňové inženýrství *in vivo* (v živém organismu), z důvodu přítomnosti kyselých zbytků, které mohou negativně ovlivnit jejich biokompatibilitu (Dai et al. 2016).

Některé studie hovoří o chemických změnách nosiče, které mají pozitivní dopad na buněčnou adhezi (Rediguieri et al. 2016).



Graf 2: Graf Youngova modulu pro PCL pro několik typů sterilizací. Kontrolní nesterilizovaný vzorek je označen Ctrl. Pro srovnání je uvedena ještě změna modulu pro sterilizaci pomocí 80 % ethanolu (Yoganarashimha et al. 2014)



Graf 3: Prodloužení, ve kterém dochází k přetržení. Jednotlivé typy sterilizací jsou značeny stejným způsobem jako v grafu 2. (Yoganarashimha et al. 2014).



## 5.4. vliv plasmové sterilizace na vybrané polymery

Plasmová sterilizace mění v případě elektrostaticky zvlákněného PCL kontaktní úhel. Tato změna není ale tak výrazná, aby měla nějaký dopad na buněčnou adhezi. Některé výzkumy poukazují na to, že buněčná adheze se po plasmové sterilizaci ještě zlepšila (Redigueri et al. 2016). Technologie Sterrad® zvyšuje hrubost povrchu nosičů pro tkáňové inženýrství a to až o 100-200 % (Baume et al. 2016).

Dai (2016) uvádí, že v případě sterilizace pomocí plasmy reaktivních plynů může docházet k síťování a následnému poklesu pevnosti elektrostaticky zvlákněného materiálu.

## 5.5. Vliv $\gamma$ -záření na vybrané polymery

$\gamma$ -záření způsobuje výrazné změny ve struktuře polykaprolaktonu, kopolymeru kaprolaktoru a kyseliny mléčné (Odelius et al. 2008) i polyvinylidenfluoridu (Katan et al. 1998). Mechanismus působení na tyto polymery je ve všech případech stejný: vlivem ionizujícího záření dochází k štěpení řetězců a vzniku radikálů. To vede ke vzniku mezimolekulárních vazeb a k síťování polymeru (v případě výše zmíněných polymerů probíhají oba děje současně) (Odelius et al. 2008; Katan et al. 1998).

Ke štěpení řetězce dochází hlavně na kvarterním uhlíku, síťování pak bývá důsledek odštěpení vodíkového atomu z uhlíkatého řetězce polymeru (Redigueri et al. 2016b).

Co se týče vlivu na mechanické vlastnosti elektrostaticky zvlákněného nosiče, jsou síťování a štěpení řetězce protichůdné mechanismy. Síťovaný polymer je má větší pevnost v tahu, ale zároveň ztrácí odolnost proti nárazu a stává se tak křehčím, také doba jeho degradace se prodlužuje. Naopak polymer se řetězci zkrácenými vlivem štěpení má nižší pevnost v tahu a doba jeho degradace se zkracuje (Baume et al. 2016). Schopnost polymerního elektrostaticky zvlákněného nosiče se natahovat je snížena v obou případech. Vlivem  $\gamma$ -záření může také docházet ke změnám krystalinity, hydrofility nebo barvy (Redigueri et al. 2016).

### 5.5.1 Polykaprolakton

Obecně vzato jsou elektrostaticky zvlákněné nosiče z PCL velmi citlivý na radiaci. Nízké dávky radiace způsobují převážně štěpení řetězce, se zvyšující se dávkou začíná převládat síťování řetězců polymeru (Baume et al. 2016).  $\gamma$ -záření způsobuje výrazné snížení pevnosti v tahu pro elektrostaticky zvlákněné PCL a to až na 68 % původní hodnoty. Toto snížení není závislé na dávce radiace. Od 20 kGy se výrazně začíná měnit molekulová hmotnost. Charakteristické je také snížení krystalinity a nárůst  $T_g$  (vzrůstá o 2°C v rozmezí dávek 20-40 kGy). Nedochází k žádných chemickým změnám, ve smyslu vzniku nových chemických skupin a to až do dávky 65 kGy. Názory na změnu Youngova modulu se v literatuře různí. Pro zajištění dostatečné pravděpodobnosti sterility je v případě PCL nosiče alespoň 35 kGy (Rediguieri et al. 2016).

Ukazuje se, že elektrostaticky zvlákněné PCL s vyšší krystalinitou si lépe zachovává mechanické vlastnosti, protože v krystalických oblastech polymeru dochází k velmi rychlé rekombinaci vznikajících radikálů. To je možné díky malé vzdálenosti jednotlivých řetězců od sebe (Odelius et al. 2008).

V průběhu ozařování může vlivem absorpce fotonů docházet zahřívání vzorku (Rediguieri et al. 2016).

Sterilizace  $\gamma$ -zářením nemá vliv na buněčnou adhezi v případě elektrostaticky zvlákněného PCL (Bhaskar et al. 2017).

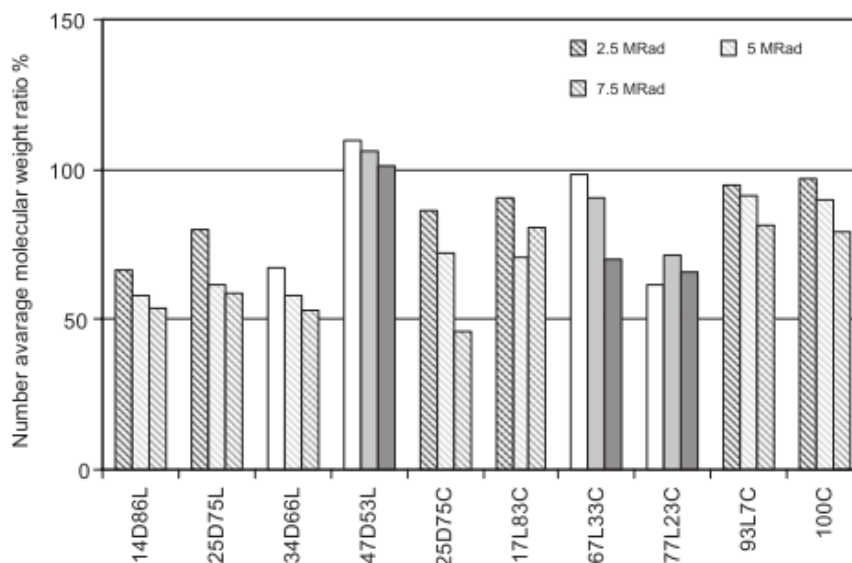
### 5.5.2 Kopolymer kyseliny mléčné a kaprolaktonu

Změny v molekulové hmotnosti elektrostaticky zvlákněného kopolymeru PLCL vlivem  $\gamma$ -záření vystihuje graf 4.

Vlivem  $\gamma$ -záření na elektrostaticky zvlákněném PLCL dochází ke snížení krystalinity. Teplota skelného přechodu ( $T_g$ ) se příliš nemění, ale teplotní stabilita se zlepšuje.

Stejně jako v případě PCL, elektrostaticky zvlákněné kopolymery s vyšší krystalinitou podléhají menším změnám mechanických vlastností (Odelius et al. 2008).

Je zajímavé, že, jak podotýká Odelius et al. (2008), změna mechanických vlastností není natolik signifikantní, aby ovlivnila použitelnost materiálu ve většině aplikací souvisejících s tkáňovým inženýrstvím.



Graf 4: Graf molekulové hmotnosti ozářených kopolymerů vyjádřené v procentech původní molekulové hmotnosti. Kopolymery jsou značeny písmennou značkou (L- kyselina mléčná, C- kaprolakton) a číslem před písmeny, které značí procentuální zastoupení monomeru v polymeru (Odelius et al. 2008). V práci byl použit kopolymer s 70 % zastoupením kyseliny mléčné a 30 % zastoupením kaprolaktonu.

### 5.5.3 Polyvinylidenfluorid

Vliv  $\gamma$ -záření na fluorované polymery je dán jejich chemickým složením: je-li na uhlíkovém řetězci navázán vodík, může dojít k jeho odštěpení a následnému vzniku dvojných vazeb, která pak reaguje s ostatními řetězci. Tak může docházet k síťování polymeru. V místech, kde je navázán fluor dochází zpravidla k štěpení řetězce. Štěpení řetězce podporuje přítomnost atmosféry s obsahem kyslíku při ozařování. Z chemické struktury PVDF je zřejmé, že v jeho případě můžeme pozorovat oba výše popsané jevy. Poměr štěpení ku síťovací reakci je 6:5. V  $\gamma$ -záření sterilizovaném filmu PVDF byl také pozorován systém konjugovaných dvojných vazeb, vzniklých odštěpením vodíků z uhlíkatého řetězce. Krystalinita filmu PVDF po sterilizaci  $\gamma$ -zářením vzrůstá, ale nijak výrazně. Klesá pevnost v tahu a také houževnatost (Katan et al. 1998).  $\gamma$ -záření také může způsobovat přechod mezi jednotlivými krystalickými fázemi PVDF, což se může projevit ve změně polarizace materiálu (Aarya et al. 2009).

## 5.6. Vliv ethanolové dezinfekce na vybrané polymery

Dezinfekce ethanolem nepůsobí žádné změny na elektrostaticky zvlákněném PCL. V případě, že použijeme 80 %, kontaktní úhel PCL se sníží. V případě použití 75 % nebo méně koncentrovaného roztoku k tomuto jevu nedochází. Dezinfekce 80 % ethanolem nemění morfologii vláken.

Dezinfekce ethanolem pozitivně ovlivňuje morfologii nasedajících buněk.

Elektrostaticky zvlákněné PLCL vlivem 70 % ethanolu ztrácí pevnost, ale vzrůstá mu krystalinita (Redigueri et al. 2016).

## 5.7. Vliv dezinfekce UV na vybrané polymery

Některé polymery jsou citlivé na UV světlo. Reagují na něj podobně jako na  $\gamma$ -záření tzn. dochází k síťování a štěpení řetězců. Mezi takové polymery patří např. PLCL (Odelius et al. 2008) nebo PCL (Baume et al. 2016).

Je-li elektrostaticky zvlákněné PLCL ozářeno UV zářením po dobu 1 h dochází poklesu jeho číselně střední molekulové hmotnosti o 35 % a o redukci pevnosti v tahu o 28 %. Účinek UV záření závisí zejména na čase jeho ozařování (Odelius et al. 2008). Je-li elektrostaticky zvlákněné PLCL ozařováno po dobu 8 h dochází k vytvoření folie (Redigueri et al. 2016). Odelius (2008) také upozorňuje, že na spolehlivou sterilizaci 3D nosiče pro tkáňové inženýrství je třeba ozařovat alespoň 2 h.

Oproti tomu morfologie elektrostaticky vytvořených vláken PCL zůstává UV zářením nezměněná. UV dezinfekce podporuje růst buněk lépe než dezinfekce ethanolem (Redigueri et al. 2016).

## Praktická část

### 6. Použité materiály

Všechny materiály byly zvlákněny pomocí přístroje pro elektrostatické zvláknování Nanospider™ 1WS500U na katedře Netkaných textilií na Technické univerzitě v Liberci. Vlákna byla sbírána na netkanou textilií typu spun bond. Jednotlivé parametry zvláknovacího procesu shrnují tabulky 5-7.

PCL o molekulové hmotnosti 45000 g/mol byl zakoupen od společnosti Merck KGaA (Německo). Tato společnost dodala také PVDF o molekulové hmotnosti 180000 g/mol. Kopolymer PLCL o složení 70 % kyseliny mléčné a 30% kaprolaktonu byl zakoupen ve společnosti Corbion n.v. (Nizozemí).

Chloroform, etanol, kyselina octová, dimethylacetamid (DMAC) a aceton byly zakoupeny od společnosti Penta Chemicals.

PCL o koncentraci 16 % (hmotnostní zlomek) byl rozpuštěn v rozpouštědle skládajícím se z chloroformu, ethanolu a kyseliny octové v poměru 8:1:1. PCL byl rozpuštěn zcela za pokojové teploty.

Roztok PLCL o koncentraci 10 % (hmotnostní zlomek) byl připraven za použití stejného rozpouštědla, jako PCL, rovněž za pokojové teploty.

Polyvinylidenfluorid byl rozpuštěn při teplotě 47°C v směsi rozpouštědel o složení DMAC/aceton v poměru (8:2), tak aby vznikl roztok o hmotnostní koncentraci 26 %.

Tímto způsobem byly připraveny dvě sady vzorků. První sada tvořená jedním vzorkem pro každou kombinaci materiál-typ sterilizace o velikosti 10x10 cm byla využita výhradně k hodnocené změně v morfologii vzorku (makroskopické a mikroskopické). Druhá řada sestávala z 15 vzorků pro každou kombinaci materiál-typ sterilizace. Tyto vzorky měly rozměry jamek na 24 jamkové kultivační destičce. Dvanáct z těchto vzorků bylo využito na testování *in vitro*, po jednom vzorku pak na skenovací elektronovou mikroskopii (SEM), diferenční skenovací kalorimetrii (DSC) a na gelovou permeační chromatografii.

*Tabulka 4: Zvlákňovací parametry PCL*

Vzdálenost mezi elektrodami [mm]	250	
Napětí [kV]	Elektroda 1	Elektroda 2
	-15	+30
Rychlost převíjení podkladové textilie [mm/min]	20	
Rychlost pohybu patrony (EMW) [mm/s]	493	
Teplota [°C]	23	
Relativní vlhkost vzduchu [%]	30	

*Tabulka 5: Zvlákňovací parametry PLCL*

Vzdálenost mezi elektrodami [mm]	230	
Napětí [kV]	Elektroda 1	Elektroda 2
	-19	+39
Rychlost převíjení podkladové textilie [mm/min]	55	
Rychlost pohybu patrony (EMW) [mm/s]	320	
Teplota [°C]	22	
Relativní vlhkost vzduchu [%]	28	

*Tabulka 6: Zvlákňovací parametry PVDF*

Vzdálenost mezi elektrodami [mm]	207	
Napětí [kV]	Elektroda 1	Elektroda 2
	-22	+46
Rychlost převíjení podkladové textilie [mm/min]	18	
Rychlost pohybu patrony (EMW) [mm/s]	287	
Teplota [°C]	22	
Relativní vlhkost vzduchu [%]	32	

## 7. Sterilizace

### 7.1. Autokláv

Sterilizace všech materiálů pomocí autoklávu Icanclave E118 [class N] byla prováděna standardním cyklu při 121°C a 103 kPa po dobu 15 min na katedře Netkaných textilií na Textilní fakultě, TUL.

### 7.2. Ethanol

Na ethanolovou sterilizaci byl použit absolutní ethanol, zakoupený od firmy Penta, který byl v laboratoři naředěn destilovanou vodou na výslednou koncentraci 70 %. Vzorky byly ponořeny do takto připraveného roztoku a vystaveny jeho účinkům po dobu 30 min. Následně byly vzorky určené pro *in vitro* testování opláchnuty PBS (z angl. Phosphate Buffered Saline- fosfátový pufr). Vzorky určené pro SEM, DSC a GPC byly opláchnuty destilovanou vodou.

### 7.3. Ethylenoxid

Oba typy sterilizace pomocí ethylenoxidu (při 37°C a 55°C) v Ústřední vojenské nemocnici v Praze. Použit byl sterilizátor od firmy 3M; Steri Vac 5XL se 7 hodinovým pracovním cyklem. Součástí sterilizačního balení byl bioindikátor, který byl následně přezkoumán, kvůli ověření účinnosti sterilizačního procesu.

### 7.4. Kyselina peroxooctová

Kyselina peroxooctová o koncentraci 36 % byla zakoupena od Delta Chem s.r.o. Následně byla naředěna na koncentraci 5000 ppm objemových pomocí 20 % roztoku ethanolu (roztok ethanolu připraven ředěním absolutního ethanolu od společnosti Penta pomocí destilované vody). Následně byly vzorky ponořeny do tohoto roztoku a

ponechány jeho účinkům po dobu 15 min. Na závěr byly vzorky určeny pro *in vitro* testování opláchnuty PBS. Ostatní vzorky byly opláchnuty destilovanou vodou. Tento sterilizační postup byl proveden podle Yoganarasimha et al. 2014.

## **7.5. Gamma záření**

Sterilizace pomocí  $\gamma$ -záření byla provedena firmou Bioster a.s. se sídlem ve Veverské Bítýšce na přístroji dodané firmou Atomic Energy of Canada (nyní Nordion International). Certifikovaná dávka záření, které vzorek přijal byla alespoň 29 kGy. Nejistota měření dávky byla stanovena  $\pm 3,4$  %.

## **7.6. Plasmová sterilizace v Krajské nemocnici Liberec**

Sterilizace pomocí plasmy byla v KNL provedena pomocí přístroje Laoken® od firmy Vistex. Tento sterilizátor, stejně jako v případě technologie STERRAD®, využívá plasmu na bázi peroxidu vodíku. Rozdíl mezi oběma sterilizátory je hlavně v průběhu sterilizačního cyklu při sterilizaci předmětů s dutinou nebo porézních materiálů: Laoken® řeší obtížnou dostupnost dutiny/pórů pomocí dvojnásobného vstřikování peroxidu. STERRAD® oproti tomu využívá tzv. boostry, které se přikládají na dutinu a v průběhu sterilizačního cyklu vstřikují peroxid přímo do dutiny (Doležalová, 2018-osobní sdělení).

## **7.7. STERRAD®**

Sterilizace technologií STERRAD® byla provedena v Ústřední Vojenské Nemocnici (dále UVN) pomocí přístroje Sterrad 100S. Bližší specifikace této technologie viz kap. 4.5.



## **7.8. Ultrafialové záření**

Sterilizace UV zářením byla provedena na fakultě Netkaných Textilií, fakultě Textilní, TUL. Jako zdroj UV záření byla použita rtuťová výbojka instalovaná ve flowboxu typu Bioair topsafe 1.2 v laboratořích Tkářového Inženýrství, TUL. Vzorky byly vystaveny záření po 30 min., pak byly otočeny a ponechány pod zářící výbojkou dalších 30 min.

## 8. Obrazová analýza

### 8.1. experiment

Fotografie všech materiálů po konkrétní sterilizaci i kontrolních vzorků byly pořízeny pomocí elektronového mikroskopu Vega3 od firmy Tescan. Celkem bylo pořízeno 10 fotografií příslušných konkrétnímu materiálu a typu sterilizace. Nejprve byl vzorek materiálu 5 krát vyfocen z lícové strany, pak bylo pořízeno 5 fotografií ze strany rubové. Fotografie byly detailně prohlédnuty a následně byly porovnány s fotografiemi kontrolních vzorků, které byly pořizovány obdobným způsobem. Změny, které byly patrné z pozorování fotografií pouhým okem byly podrobně popsány (viz níže).

Průměry vláken byly změřeny manuálně pomocí programu ImageJ a to z první sady vzorků. V případě PCL (zvětšení 5000x) a PVDF (zvětšení 10000x) bylo změřeno okolo 1000 průměrů pro každý vzorek. V případě PLCL (zvětšení 5000x) se počet měření pohybuje v intervalu 382-635, protože průměr vláken byl poměrně velký a proto v pořízených fotografiích nebylo možné najít dostatečné množství vláken, jejichž průměr by mohl být změřen.

Naměřená data byla zpracována ve statistickém programu Graphpad Prism 7. Výstupem ze zpracování dat je graf, zaznamenávající medián, rozptyl hodnot (nejvyšší naměřená hodnota, nejnižší naměřená hodnota) a statistickou chybu, pro různé kombinace typu sterilizace a materiálu včetně kontrolního vzorku. Pro některé kombinace typu sterilizace a materiálu tento graf nebylo možné sestavit, protože sterilizace způsobila vznik folie a tudíž nemohly být změřeny žádné průměry vláken. Naměřené hodnoty byly seřazeny vzestupně a zobrazeny pomocí grafu. Z tvaru křivky bylo zjištěno, že rozdělení průměru nanovláken není normálním (Gausovým) rozdělením. Statisticky byla data porovnána pomocí Kruskal-Wallisova testu.

Nutno podotknout, že pomocí zmíněných 5 fotografií nemohl být zdokumentován celý povrch vzorku a že nanovlákný materiál se může v jednotlivých místech lišit od míst ostatních např. v průměru vláken, počtu defektů atd. Kvůli této nehomogenitě má měření průměrů spíše orientační charakter.

## 8.2. Výsledky

### 8.2.1 Polykaprolakton

V případě PCL nedošlo k žádným makroskopickým změnám, kromě vzorků, které byly vysterylizovány pomocí autoklávu, technologie STERRAD® a plasmové sterilizace provedené v KNL, kde došlo ke vzniku folie. V případě ethylenoxidu při teplotě 55°C došlo ke vzniku folie v 50 % vzorků druhé sady.

Kontrolní vzorky PCL jsou charakteristické velkým rozptylem průměrů, což se odrazilo v směrodatné jejich odchylce měření (viz graf 1). Ve všech vlákných vzorcích se objevuje poměrně časté ukončení vlákna kapénkovitým, kulovitým útvarem. První série je charakteristická přítomností defektů v podobě zduřených vláken a kulovitých útvarů o různém průměru. Četnost těchto defektů se různí na jednotlivých snímcích.

V první sérii vzorků můžeme pozorovat častý výskyt rozličných defektů a místy je možné pozorovat rozšiřování vláken a počínající vznik folie. Zdá se, že sterilizace pomocí ethanolu v případě druhé série, zapříčinila výskyt kratších úseků vláken. Materiál místy působí jako potrhaný. Je možné, že k tomu došlo při manipulaci se vzorkem pomocí pinzety, ale uvážíme-li nehomogenitu materiálu, nemůžeme s jistotou určit, zda-li tomu tak je, nebo zda-li se nejedná o nějaký lokální defekt.

Sterilizace pomocí PAA způsobuje lokální rozšíření vláken, které přecházejí až ve porézní folii. Bohužel bylo pořízeno příliš málo fotografií, aby bylo možné usuzovat na rozsah tohoto jevu. Na některých fotografiích není pozorovatelný vůbec a na jiných se prakticky nenalézají nedotčená vlákna.

Vzorky sterilizované pomocí technologie STERRAD® jsou charakteristické zvětšení kulovitých ukončení vláken a také vznik kulovitých defektů, které nejsou viditelně spojeny s žádným vláknem. Velikosti těchto defektů se pohybují od přibližně 1,5  $\mu\text{m}$  do 4  $\mu\text{m}$  v průměru. Na některých místech můžeme také pozorovat výrazné zduření některých vláken. Oba tyto jevy nejsou ale příliš časté: kulovité útvary se vyskytují na většině snímků, nicméně jejich četnost je v jednotkách, zduření vláken je pozorovatelné pouze na některých snímcích a to maximálně jeden případ na snímku.

Oproti tomu opakování sterilizace pomocí technologie STERRAD® s druhou sadou vzorků přineslo vznik folie. To mohlo být způsobeno dosažením vyšší teploty v průběhu cyklu (jak uvádí Moisan et al. (2001) teplota v průběhu cyklu se pohybuje okolo

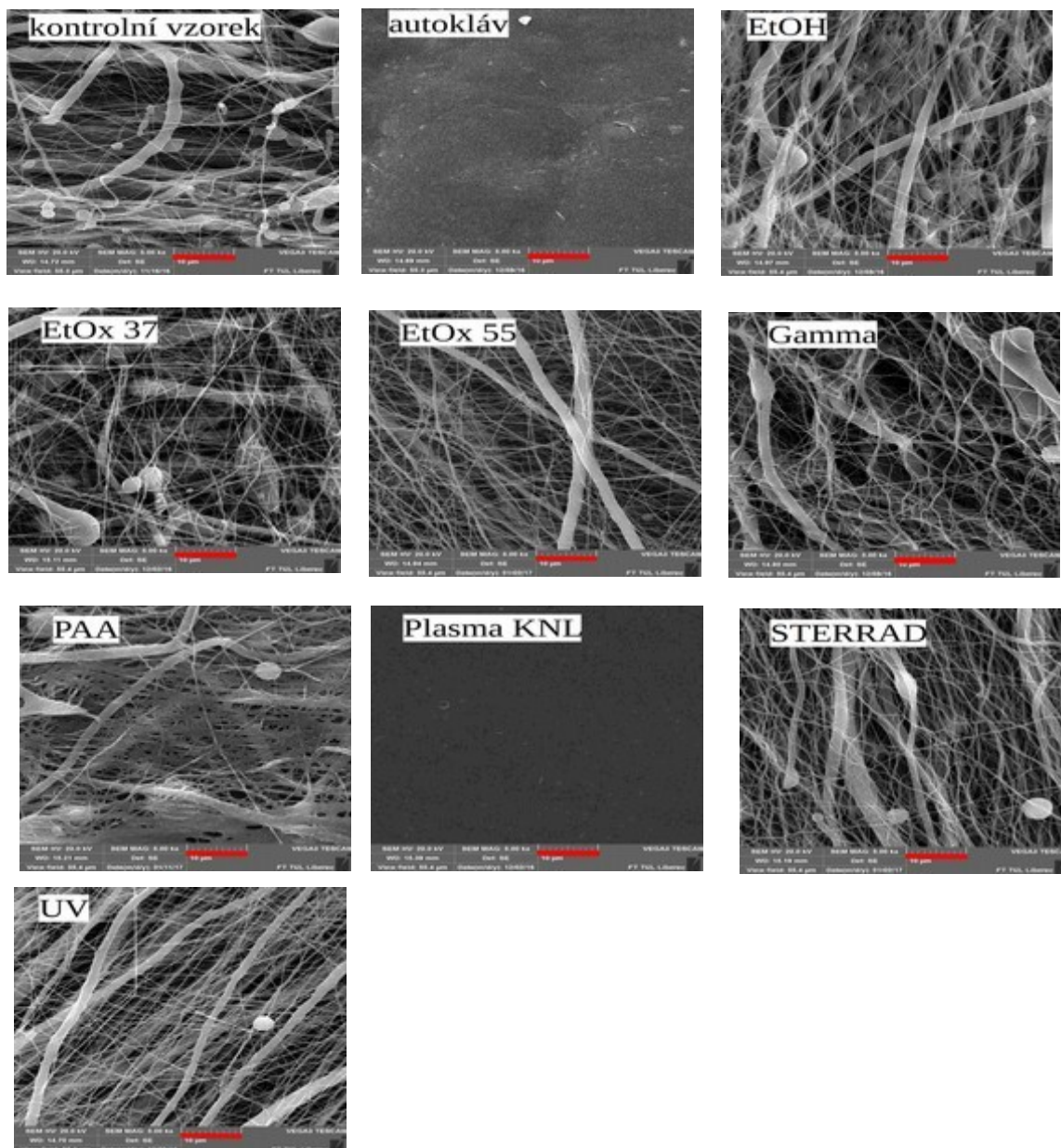
50°C).

Fotografie ostatních vzorků se při porovnání pouhým okem příliš neliší od fotografií kontrolního vzorku.

Ze statistického zpracování měření průměrů vláken vyplývá, že statisticky signifikantní odchylka průměrů vláken od kontrolního vzorku se objevuje v případě sterilizace pomocí 70 % roztoku ethanolu a v případě sterilizace ethylenoxidem za teploty 37°C. V případě sterilizace ethanolem došlo ke zvýšení mediánu o 77 nm, v případě sterilizace ethylenoxidem při 37°C pak medián vzrostl pouze o 32 nm. Ostatní sterilizační metody nezpůsobují statisticky významnou změnu průměrů vláken.

Výše uvedené statistické odchylky mají pouze orientační charakter, kvůli velkému rozptylu průměrů vláken a také kvůli nehomogenitě původních vrstev. Aby tato data byla zcela spolehlivá, bylo by třeba provést nesrovnatelně větší počet měření.

Některé fotografie SEM, které bylo hodnoceny výše jsou zobrazeny na obrázku 5.



Obrázek 5: Několik vybraných fotografií SEM, zobrazujících morfologii vláken PCL. Na všech fotografiích jsou vzorky první řady vzorků. Měřítka je zvýrazněno červenou barvou a má pro všechny fotografie hodnotu 10  $\mu\text{m}$  (zvětšení 5000x)

## 8.2.2 Kopolymer kyseliny mléčné a kaprolaktonu

Kopolymer kyseliny mléčné a kaprolaktonu byl náchylný k deformaci. Okraje vzorků se stáčely směrem dovnitř a nedařilo se je narovnat. Sterilizace tento jev ještě umocnila u všech vzorků vyjma vzorku sterilizovaného v autoklávu a vzorku sterilizovaného plasmou v KNL. Oba tyto vzorky se roztavily za vzniku folie.

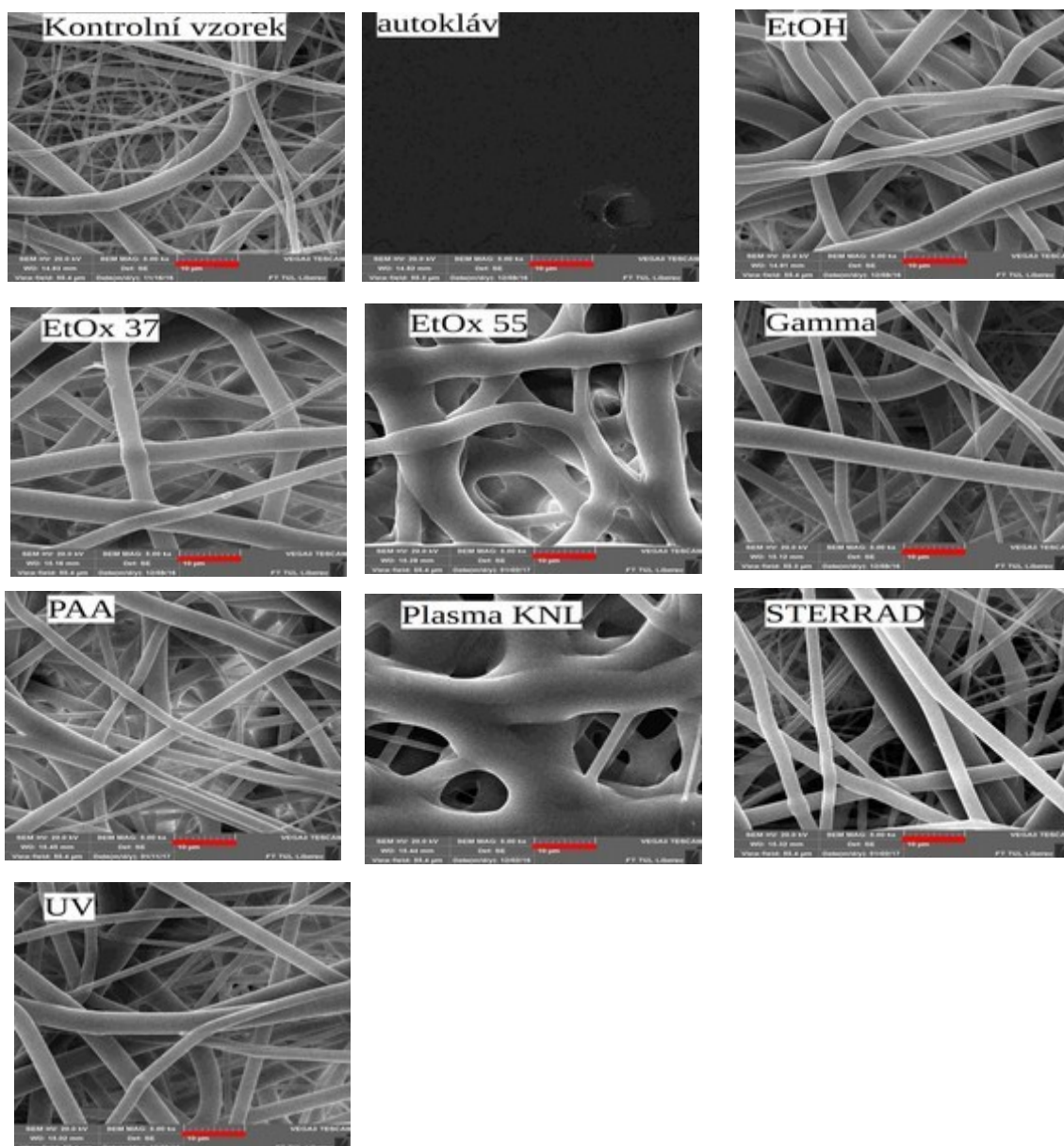
Kontrolní materiály první i druhé sady jsou tvořeny vlákny s rozdílným průměrem, který není tak markantní jako je tomu v případě polykaprolaktonu. Průměr vláken se také jeví jako obecně větší než je průměr vláken polykaprolaktonu. Výskyt defektů je ojedinělý a převážně se jedná o rozšířená vlákna.

Na vzorku sterilizovaného pomocí vysokoteplotního (55°C) ethylenoxidu bylo pozorováno počínající tavení vláken a jejich spojování v porézní folii, tento jev není v případě vysokoteplotního ethylenoxidu tak markantní jako v případě plasmové sterilizace provedení v KNL, kde jsou vlákna mnohem více roztavena a póry ve vznikající folii jsou tudíž menší.

Studium fotografií přineslo protichůdné výsledky v případě technologie STERRAD®. První sada vzorků zůstala po tomto typu sterilizace nezměněná, naproti tomu druhá řada vzorků se chovala podobně jako vzorky sterilizované v KNL tj. je pozorovatelný počátek tavení vláken a jejich slévání ve folii. Tento proces je ale v počátečním stádiu, takže póry mezi jednotlivými slitými vlákny jsou poměrně velké.

Porovnáním fotografií elektronové skenovací mikroskopie ostatních vzorků s kontrolním vzorkem nebylo možné zjistit další změny v morfologii vláken. Také vzorky z první a druhé sady vzorků jsou srovnatelné.

Ze statistického porovnání dat vyplývá, že k statisticky signifikantní změně průměrů vláken došlo v případě všech typů sterilizací. Rozdíl mediánů se pohybuje od 0,35  $\mu\text{m}$  pro sterilizaci pomocí ethylenoxidu při 55°C po 3,5  $\mu\text{m}$  pro sterilizaci pomocí plasmy v KNL.



Obrázek 6: Vybrané fotografie PLCL SEM. Na všech fotografiích jsou vzorky z první řady vzorků. Měřítka je zvýrazněno červenou barvou a má pro všechny fotografie hodnotu 10  $\mu\text{m}$  (zvětšení 5000x).

### 8.2.3 Polyvinylidenfluorid

Vzorky PVDF měly, podobně jako tomu bylo v případě PLCL tendenci se deformovat, okraje se pak stáčely směrem dovnitř, v roztoku a zejména při manipulaci (vytažení

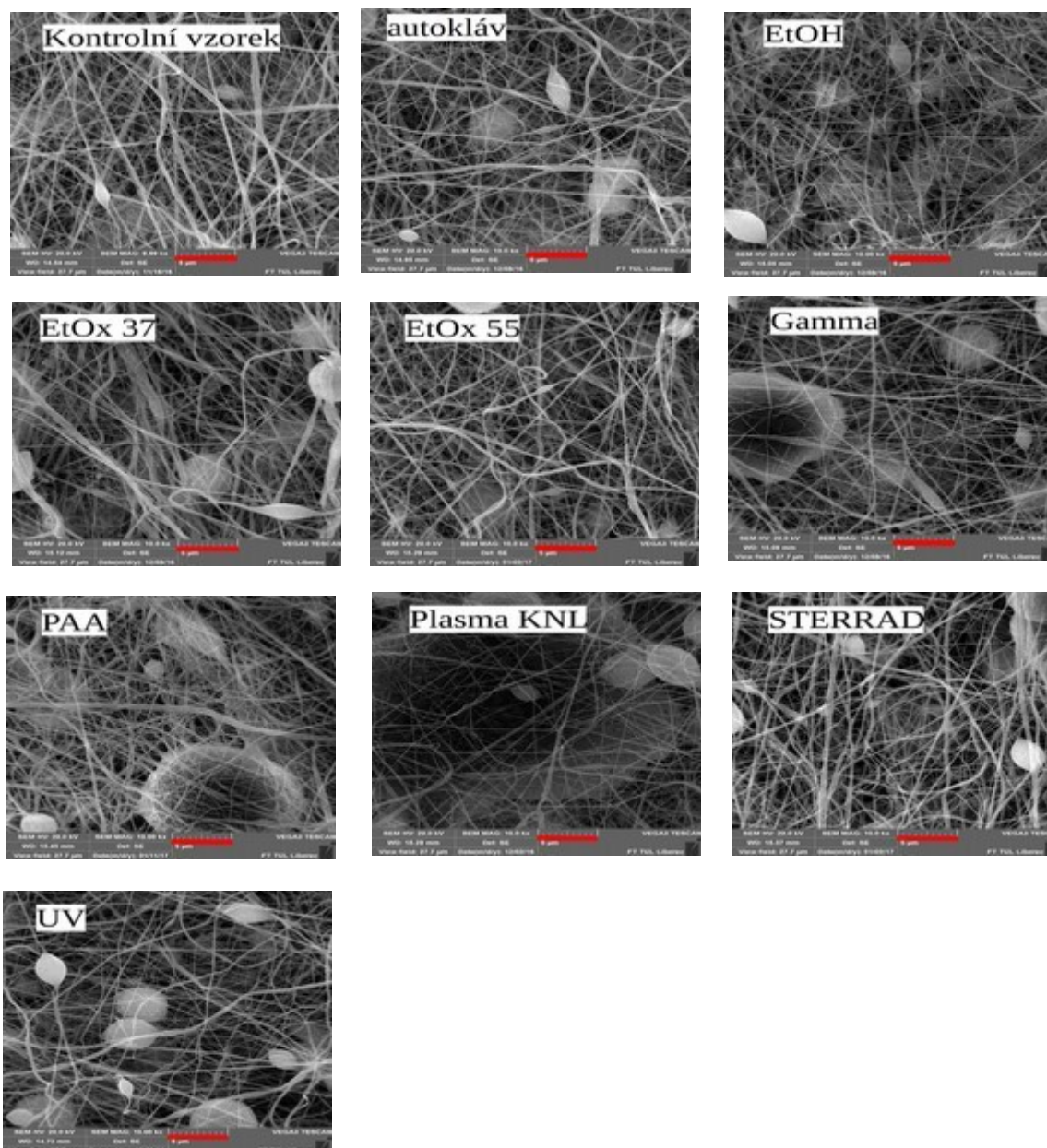
vzorku z roztoku) docházelo k pomačkání vzorku, které vedlo k redukci plochy vzorku. Pro testování *in vitro* byly vybrány vzorky s co nejméně redukovanou plochou.

Vlákna PVDF (kontrolní vzorek) jsou charakteristická velmi malým průměrem ve srovnání s PLCL a PCL. Kvůli lepší možnosti měření byla tato vlákna focena s větším zvětšením (10000x). Ve vzorcích se vykytuje velké množství defektů v podobě velmi výrazně rozšířených vláken a výrazných kulovitých defektů, jejichž průměr dosahuje až desítek  $\mu\text{m}$ . Oba dva defekty se objevují zpravidla několikrát na každém snímku.

U žádného vzorku PVDF nedošlo k roztavení vláken a vzniku folie. Také u žádného typu sterilizace není možné pozorovat markantní rozdíly oproti kontrolnímu vzorku.

Ze statistické analýzy naměřených průměrů vláken vyplývá, že k statisticky signifikantní změně nedošlo pouze v případě  $\gamma$ -záření, plasmové sterilizace a technologie STERRAD®. Odchyšky mediánů pro vzorky se statisticky signifikantní změnou se pohybují od 8 nm pro sterilizaci pomocí UV záření do 25 nm pro sterilizaci pomocí ethylenoxidu.





Obrázek 7: Vybrané fotografie PVDF SEM. Na všech fotografiích jsou vzorky z první řady vzorků. Měřítka je zvýrazněno červenou barvou a má pro všechny fotografie hodnotu 5  $\mu\text{m}$  (zvětšení 5000x).

### 8.3. Shrnutí

Výsledky měření změn průměrů vláken elektrostaticky zvlákněných nosičů z vybraných polymerů jsou zpravidla neprůkazné kvůli nehomogenitě vzorků.

Kombinace materiálů a typu sterilizace u kterých byl zaznamenán vznik folie nebyly nadále testovány, protože samotná skutečnost vzniku folie je dostatečná podmínka pro

určení takovéto kombinace elektrostaticky zvlákněného materiálu a typu sterilizace, jako nevhodné pro tkáňové inženýrství.

## 9. Hodnocení molekulové hmotnosti

### 9.1. Experiment

Změna molekulové hmotnosti byla zkoumána pomocí gelové permeační chromatografie (GPC). Všechny vzorky po různých typech sterilizace byly zváženy na analytických vahách. Vzorky PCL po různých typech sterilizace byly rozpuštěny v THF (tetrahydrofuran). Vzorky PLCL byly rozpuštěny v rozpouštědle o složení  $\text{CHCl}_3$  a THF v objemovém poměru 1:7. Vzorek PVDF byl rozpuštěn v soustavě rozpouštědel o složení DMAA (1,3-dimethylamylamin) a THF v objemovém poměru 1:7. Všechny vzorky byly rozpuštěny v takovém množství rozpouštědla, aby koncentrace výsledného roztoku byla 1 mg/ml. GPC byla následně provedena v laboratořích CXI, TUL Mgr. Vítem Novotným na přístroji typu Dionex Ultimate 3000 HPLC s diode array detektorem a ELSD detektorem Varian LC-385.

Pro měření PCL a PLCL byla použita kolona Phenomenex Phenogel 1E4 délky 30 cm s vnitřním průměrem 4,6 mm a velikostí částic 5  $\mu\text{m}$  a mobilní fází byl čistý THF. Průtok mobilní fáze činil 1 ml/min.

Měření PVDF bylo provedeno na koloně typu Phenomenex Phenogel 1E5 délky 30 cm s vnitřním průměrem 4,6 mm a velikostí částic 5  $\mu\text{m}$ . Mobilní fáze byla tvořena THF s přídatkem 1 % dimethylacetamidu. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 1 ml/min.

Chromatogramy vzorků byly zaznamenávány při vlnové délce 200, 210, 220 a 250 nm a pomocí ELSD detektoru po dobu 23 minut. Teplota nebulizéru ELSD detektoru byla nastavena na 80 a Evaporátoru na 80°C. Průtok dusíku činil 1,3 l/min. Teplota kolonového kompartmentu byla nastavena na 30°C. Bylo nastříkováno 30  $\mu\text{l}$  vzorku.

Změna molekulové hmotnosti byla hodnocena podle posunutí maxima chromatogramu, které představuje nejvíce zastoupenou molekulovou hmotnost ve vzorku (posunutí

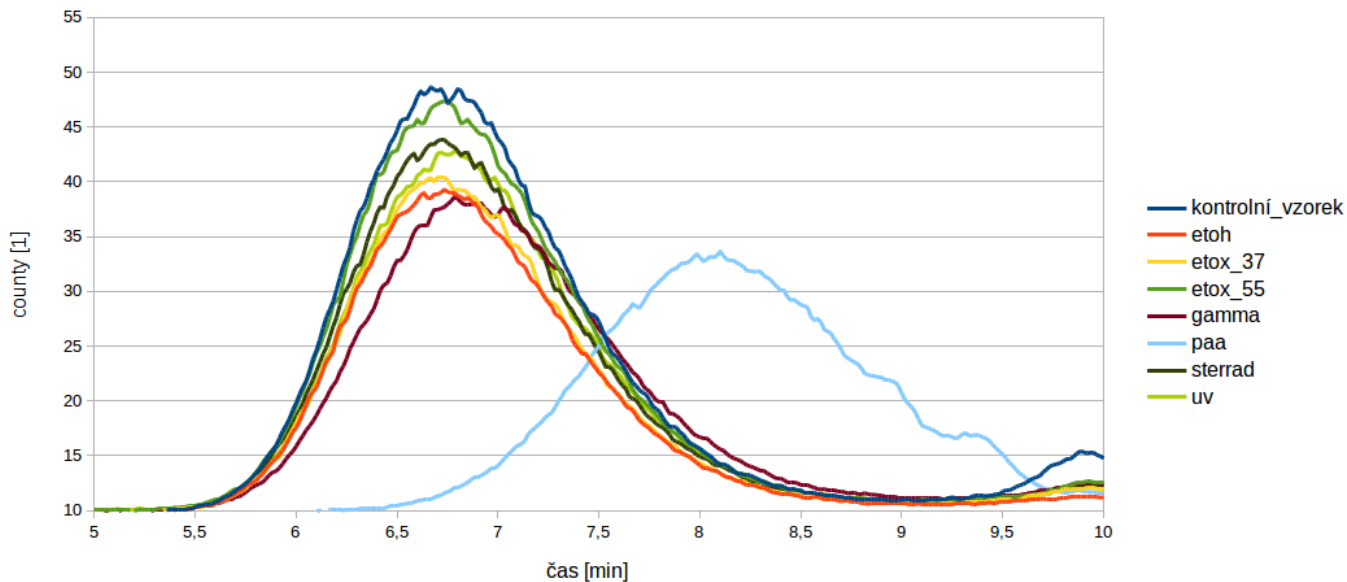
maxima směrem vpravo značí pokles molekulové hmotnosti vzorku). Přepočítání graficky presentovaných dat na číselné hodnoty molekulové hmotnosti nebylo možné z důvodu nedostatku vhodných standardů na TUL.

## 9.2. Výsledky

### 9.2.1 Polykaprolakton

Molekulová hmotnost PCL byla změřena pomocí GPC. Výsledky měření byly presentovány pomocí grafu závislosti odezvy přístroje vyjádřené jako množství „countů“ na čase. Viz graf 5.

Měření změn molekulové hmotnosti vzorku PCL pro různé druhy sterilizací ukázalo, že k žádným výrazným změnám molekulové hmotnosti nedochází. Pouze v případě sterilizace pomocí  $\gamma$ -záření, byla zaznamenána nepatrné snížení molekulové hmotnosti. K markantní změně molekulové hmotnosti došlo v případě sterilizace kyselinou peroxyoctovou, která molekulovou hmotnost snížila.



Graf 5: Chromatogram 1: PCL

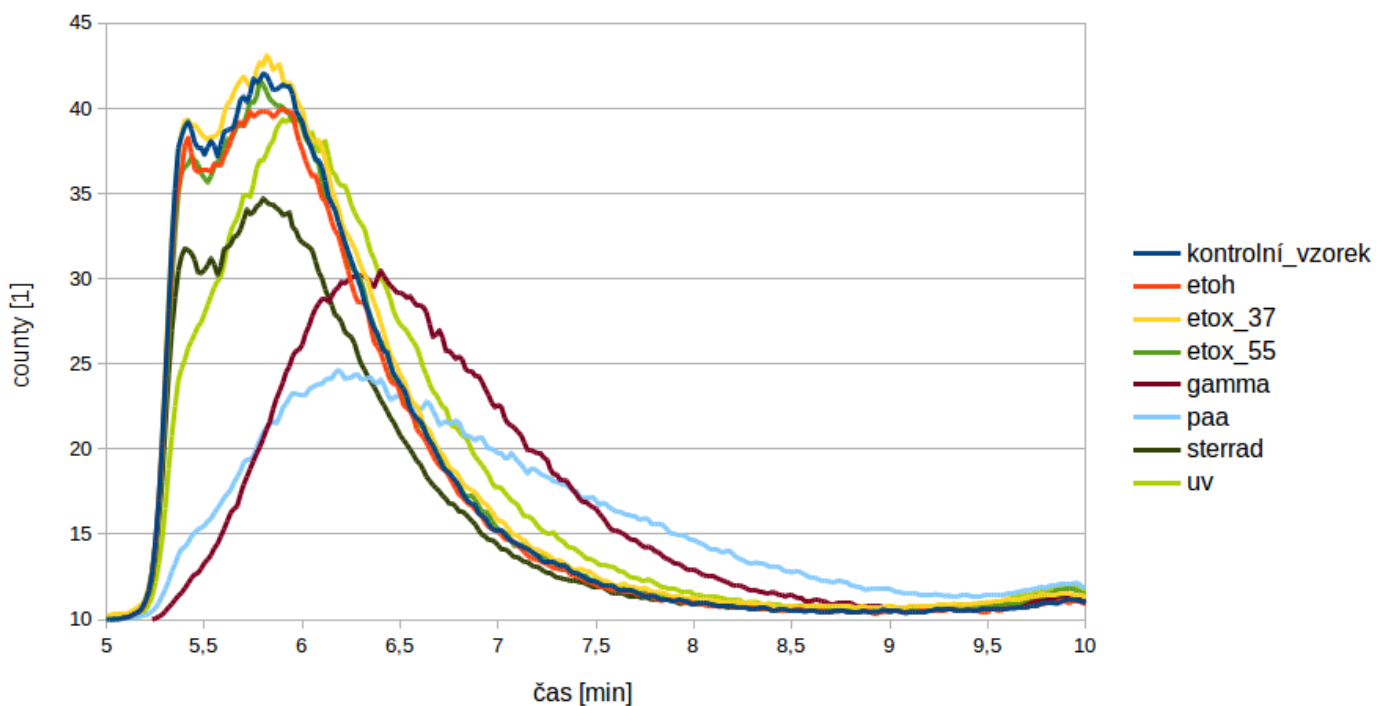
### 9.2.2 Kopolymer kyseliny mléčné a kaprolaktonu

Molekulová hmotnost PLCL byla změřena obdobným způsobem jako molekulové

hmotnost PCL. Výsledky měření byly převedeny do formy grafu, ze kterého bylo následně usuzováno, zda-li se molekulová hmotnost změnila.

Měření molekulové hmotnosti vzorků PLCL pro různé druhy sterilizace ukázalo, že ve většině případů nedochází k žádným změnám, kromě snížení velikosti maxima grafu, které značí úbytek materiálu oproti navážené hmotnosti, což může být způsobeno např. kontaminací vzorku nízkomolekulární látkou, kterou přístroj nebyl schopen zaznamenat. Nejspíše se ve většině případů jednalo o zbytky sterilizačního media, nebo o monomery vzniklé v důsledku částečné depolymerace polymeru v průběhu sterilizace.

Ke snížení molekulové hmotnosti došlo v případě elektrostaticky zvlákněného vzorku PLCL hned ve 3 případech: nepatrné snížení molekulové hmotnosti je možné pozorovat u vzorku sterilizovaného UV zářením. Sterilizace  $\gamma$ -zářením způsobila významné snížení molekulové hmotnosti a také, jako tomu bylo i v případě PCL, kyselina peroxyoctová způsobila výrazné snížení molekulové hmotnosti a rozložení molekulových hmotností. Tyto změny jsou patrné z grafu 6.

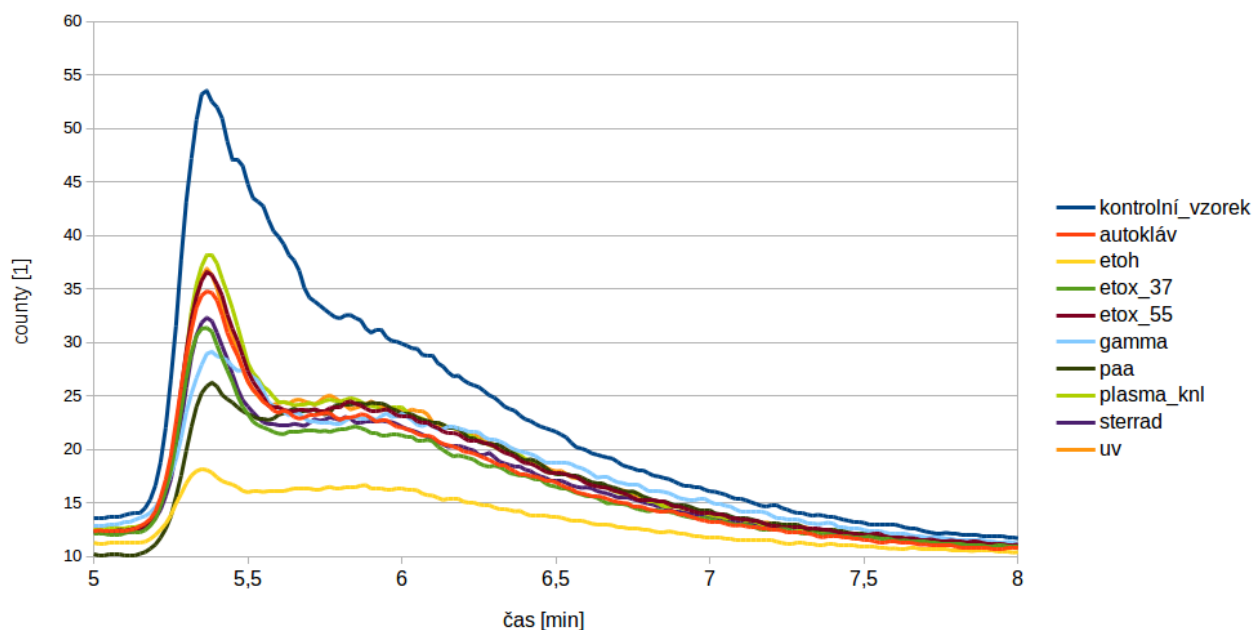


Graf 6: Chromatogram 2: PLCL

### 9.2.3 Polyvinylidenfluorid

Molekulová hmotnost PVDF byla změřena a data byla presentována ve formě chromatogramu. Chromatogramy PVDF pro různé typy sterilizace jsou ukázány v grafu 7.

Z uvedeného chromatogramu vyplývá, že molekulová hmotnost PVDF se nezměnila pro žádnou ze zkoumaných sterilizací.



Graf 7: Chromagram 3: PVDF

### 9.3. Shrnutí

Z naměřených chromatogramů vyplývá, že nejcitlivější je na změnu molekulové hmotnosti PLCL, jehož molekulová hmotnost byla změněna hned 3 typy sterilizace ( $\gamma$ -záření, UV záření a PAA). Naopak nejstabilnější z hlediska změny molekulové hmotnosti se zdá PVDF, jehož molekulová hmotnost se nezměnila pro žádný ze zkoumaných typů sterilizace.

Sterilizační typ, který mění nejvíce molekulovou hmotnost zkoumaných elektrostaticky zvlákněných polymerů, je PAA, která způsobila velmi výraznou změnu molekulové hmotnosti jak v případě PCL tak v případě PLCL.

## 10. Hodnocení změny krystalinity

### 10.1. experiment

K hodnocení změny krystalinity byla využita technologie DSC (diferenční skenovací kalorimetrie). Vzorky všech materiálů byly zváženy na analytických vahách a uzavřeny do pánviček pro DSC. Měření DSC bylo provedeno v laboratořích Oddělení tváření kovů a plastů na fakultě Strojní, TUL (Technická Universita Liberec) panem Ing. Lubošem Běhálkem Ph.D. na přístroji DSC1/700 Mettler Toledo. Experiment PCL a PLCL sestával ze dvou zahřívání za kontinuálního zaznamenávání kalorimetrických křivek. Vzorek byl 120 s temperováním při počáteční teplotě (PCL:  $-20^{\circ}\text{C}$ , PLCL:  $-40^{\circ}\text{C}$ ). Následně byl vzorek zahříván dokud nebylo dosaženo předem určeného teplotního maxima (PLC:  $100^{\circ}\text{C}$ , PLCL:  $160^{\circ}\text{C}$ ). Zahřátý vzorek byl zchlazen na počáteční teplotu a celý cyklus byl opakován ještě jednou. PVDF byl zahřát z výchozí teploty  $0^{\circ}\text{C}$  na  $200^{\circ}\text{C}$ , pak byl ochlazen na  $0^{\circ}\text{C}$  a opět zahřát. Rychlost ohřevu i chlazení byla ve všech případech  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Experiment byl prováděn v inertní dusíkové atmosféře. Hodnocení změn krystalinity bylo prováděno ze záznamu 1. fáze ohřev

Výsledky byly zobrazeny ve formě kalorimetrické křivky. Oblast pod maximem odpovídajícím teplu potřebnému k fázovému přechodu materiálu byla zintegrována, aby byla získána číselná hodnota tohoto tepla. Tyto číselné hodnoty byly zaznamenány do tabulky a následně využity k hodnocení změn v krystalinitě polymerních vzorků po různých typech sterilizace.

### 10.2. Výsledky

#### 10.2.1 Polykaprolakton

Elektrostaticky zvlákněné vzorky PCL byly analyzovány pomocí DSC. Výsledky měření včetně spočítané krystalinity jsou uvedeny v tabulce 7. Jako hodnota  $\Delta H_M$  pro 100 % krystalický polymer byla použita hodnota  $135,44 \text{ J/g}$  (Crescenzi et al. 1972). Krystalinita pak byla stanovena jako procentuální vyjádření konkrétní  $\Delta H_M$  proti této hodnotě.

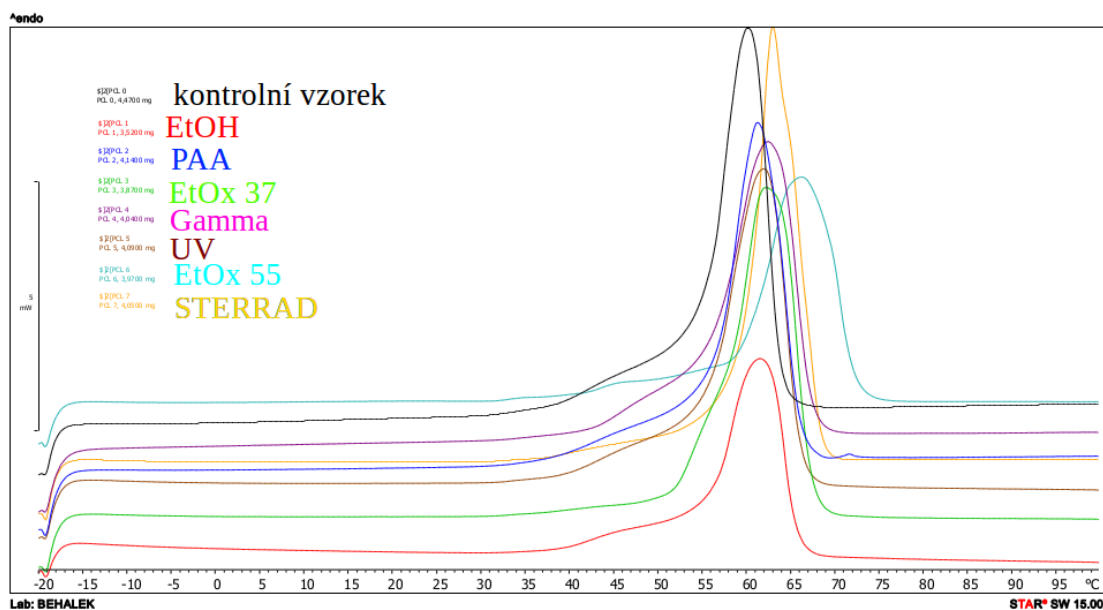
Z tabulky 7 vyplývá, že významná změna krystalinity nastala pouze pro tři typy ošetření a sice pro sterilizaci pomocí nízkoteplotního a vysokoteplotního ethylenoxidu a pro ethanolovou desinfekci. Ethanolová dezinfekce krystalinitu výrazně snížila. Obě ethylenoxidové sterilizace naopak hodnotu krystalinity vzorku výrazně zvýšily.

Ke změně krystalinity došlo také v případě sterilizace  $\gamma$ -zářením, UV zářením a technologie STERRAD®, tyto rozdíly jsou ale tak malé, že z nich není možno usuzovat na změnu krystalinity, může se jednat pouze o chybu měření.

*Tabulka 7: Změny krystalinity pro vzorky PCL po různých typech sterilizace v porovnání s kontrolním vzorkem.  $\Delta H_M$  značí energii potřebnou k roztavení vzorku,  $T_M$  značí teplotu tání.*

	$\Delta H_M$ [J/g]	$T_M$ [°C]	Krystalinita [%]
<b>kontrolní vzorek</b>	81,46	60,2	60,14
<b>EtOH</b>	63,28	63,3	46,72
<b>EtOx 37</b>	92,55	62,3	68,33
<b>EtOx 55</b>	73,61	66,2	54,35
<b>Gamma</b>	88,3	62,4	65,19
<b>PAA</b>	83,28	61,3	61,49
<b>STERRAD</b>	87,48	63,0	64,59
<b>UV</b>	87,16	62,1	64,35

Teplota tání se u většiny vzorků příliš neposunula, jedinou výjimku tvoří vzorek, který byl sterilizovaný pomocí vysokoteplotního ethylenoxidu. V tomto případě se teplota tání posunula téměř o 6°C.

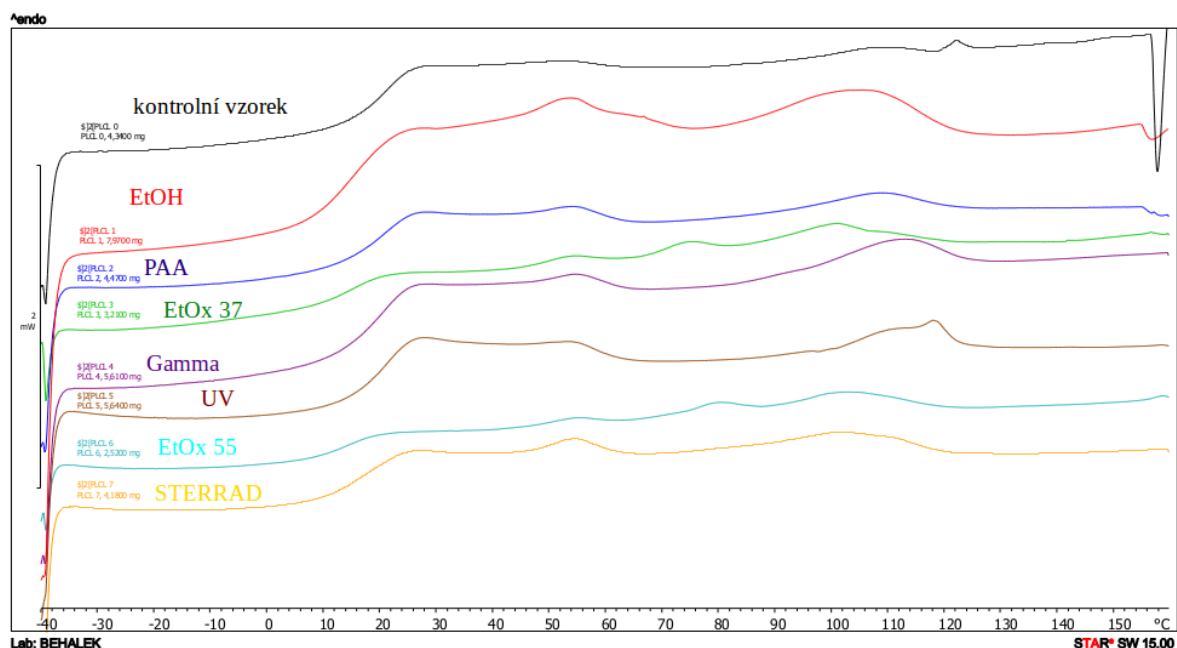


Graf 8: Kalorimetrické křivky PCL. Jednotlivé typy sterilizace jsou značeny nápisem ve stejné barvě jako je barva příslušné křivky.

## 10.2.2 Kopolymer kyseliny mléčné a kaprolaktonu

Analýza DSC byla provedena i s elektrostaticky zvlákněnými vzorky PLCL. Kalorimetrické křivky naměřené na diferenčním skenovacím kalorimetru ukazují, že PLCL je amorfní polymer, tudíž hodnocení krystalinity v jeho případě není relevantní. Na všech křivkách byly pozorovány dvě maxima, ale ani po konzultaci s Ing. Běhálkem PhD. nebyl autor schopen určit jejich význam. Kalorimetrické křivky jsou vidět na grafu 1.





Graf 9: Kalorimetrické křivky PLCL. Jednotlivé typy sterilizace jsou značeny nápisem ve stejné barvě jako je barva příslušné křivky.

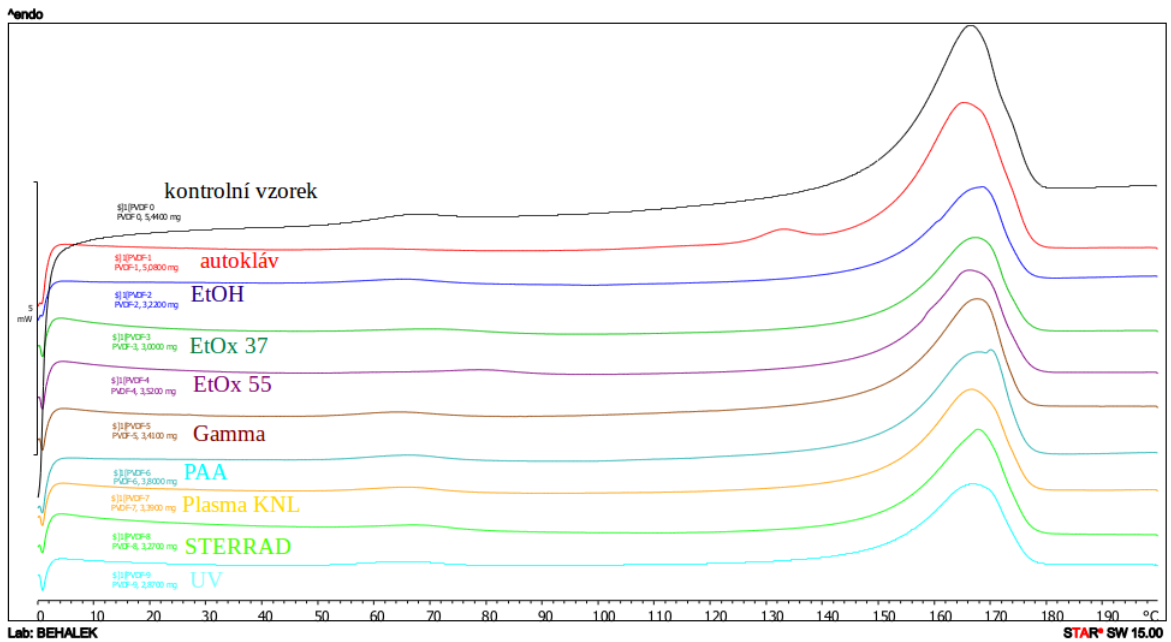
Z kalorimetrických křivek (graf 9) byla vypočítána teplota skelného přechodu. Viz tabulka 8. Teplota skelného přechodu se snížila u všech vzorků PLCL, i když u některých jen nepatrně. Mezi tyto vzorky patřily: vzorek po sterilizaci  $\gamma$ -zářením, PAA, UV. Větší změnu autor zaznamenal u vzorku po sterilizaci technologií STERRAD®. K nejmarkantnější změně došlo po sterilizaci vysokoteplotním ethylenoxidem, kde dosáhla změna teploty skelného přechodu více než 6°C. Podobně výrazná změna byla pozorována v případě ethanolové desinfekce. Nízkoteplotní ethylenoxid změnil teplotu skelného přechodu vzorku PLCL o více než 5°C.

Tabulka 8: Teplota skelného přechodu pro vzorky PLCL po různých typech sterilizací, porovnání s kontrolním vzorkem.

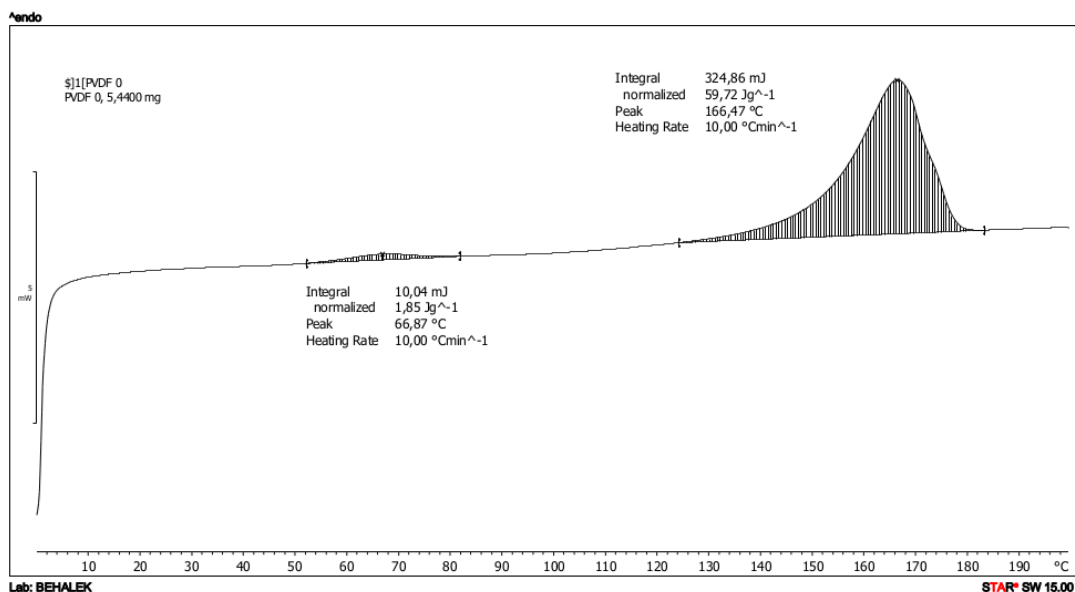
	$T_g$ [°C]
<b>kontrolní vzorek</b>	20,9
<b>EtOH</b>	14,7
<b>EtOx 37</b>	15,6
<b>EtOx 55</b>	14,3
<b>Gamma</b>	19,0
<b>PAA</b>	20,0
<b>STERRAD</b>	17,1
<b>UV</b>	19,4

### 10.2.3 Polyvinylidenfluorid

Kalorimetrické křivky byly změřeny také pro elektrostaticky zvlákněné vzorky PVDF. Vyhodnocení těchto křivek bylo zkomplikováno tím, že PVDF se vyskytuje hned v několika krystalických formách. Na kalorimetrických křivkách byla pozorována 2 maxima značící dva přechody mezi fázemi v průběhu experimentu, viz obrázek 9. Z tohoto důvodu není relevantní usuzovat na krystalinitu polymerních vzorků. Naměřené kalorimetrické křivky jsou patrné z grafu 10. (Na grafu není příliš dobře patrné první, ze dvou maxim, o kterém se píše výše, ale při větším zvětšení je toto patrné velmi dobře.)



Graf 10: Kalorimetrické křivky PVDF. Jednotlivé typy sterilizace jsou značeny nápisem ve stejné barvě jako je barva příslušné křivky.



Obrázek 9: kalorimetrická křivka elektrostaticky zvlákněného PVDF, s dvěma maximy a grafickým znázorněním integrované oblasti pod maximem.

Při bližším zkoumání obou maxim bylo určeno, že první z nich (málo výrazné maximum) je dáno přechodem materiálu mezi dvěma krystalickými fázemi. Podle Ing. Luboše Běhálka Ph.D. se jedná o přechod mezi krystalickou fází  $\beta$  a  $\gamma$ . Autor se také domnívá, že není nepravděpodobné, že by se ve vzorku mohla vyskytnout také  $\delta$  fáze, protože v průběhu elektrostatického zvláknování byl materiál vystaven silnému elektrickému poli. Druhé maximum pak značí teplotu tání polymerního materiálu. Změny obou teplot včetně porovnání s kontrolním vzorkem shrnuje tabulka 9.

Z tabulky 9 je vidět, že hodnota teploty tání zůstává pro všechny vzorky přibližně stejná. Velikost jednotlivých posunů je většinou menší než jeden stupeň Celsia. Oproti tomu teplota fázového přechodu se zvýšila v případě vysokoteplotního ethylenoxidu o necelých 13°C, nízkoteplotní ethylenoxid také zvýšil teplotu fázového přechodu, i když ne tak výrazně. K výraznému snížení teploty fázového přechodu došlo u vzorku sterilizovaného pomocí autoklávu. Ostatní typy sterilizace nevedly ke změnám v teplotě fázového přechodu.

Tabulka 9: Teploty fázového přechodu a bodu tání pro vzorky PVDF po různých typech sterilizace a porovnání s kontrolním vzorkem.  $T_{\text{přechod}}$  značí teplotu fázového přechodu,  $T_M$  značí teplotu tání.

	$\Delta H_{\text{Mpřechod}}$ [J/g]	$T_{\text{přechod}}$ [°C]	$\Delta H_{\text{Mtání}}$ [J/g]	$T_M$ [°C]
<b>kontrolní vzorek</b>	4,32	66,4	106,2	166,5
<b>autokláv</b>	0,45	60,5	64,1	165,3
<b>EtOH</b>	2,77	66,0	55,3	168,6
<b>EtOx 37</b>	2,64	71,3	60,5	167,2
<b>EtOx 55</b>	1,34	79,3	57,9	166,2
<b>Gamma</b>	2,22	64,3	60,4	167,5
<b>PAA</b>	2,21	66,5	57,7	170,0
<b>plasma KNL</b>	2,47	65,8	58,8	166,6

### 10.3. Shrnutí

Z naměřených bylo vyvozeno, že sterilizace pomocí ethylenoxidu (vysokoteplotní i nízkoteplotní) ovlivňuje krystalinitu (stoupá) a teplotu tání (také stoupá) v případě vzorku elektrostaticky zvlákněného PCL, také ovlivňuje teplotu skelného přechodu (klesá) v případě elektrostaticky zvlákněného PLCL a velice výrazně ovlivňuje teplotu (zvýšení o necelých 13°C pro vysokoteplotní ethylenoxid) fázového přechodu v případě elektrostaticky zvlákněného PVDF.

Také desinfekce ethanolem ovlivňuje výše zmíněné charakteristiky vyjma teploty přechodu elektrostaticky zvlákněného PVDF.

## 11. TESTOVÁNÍ *IN VITRO*

### 11.1. Experiment

Všechny sterilní vzorky byly nasazeny buňkami typu 3T3-SA-myšími fibroblasty, aby mohla být otestována jejich adheze (přilnavost) a proliferace (buněčné bujení) a vyhodnocena případná vhodnost využití pro tkáňové inženýrství.

Z vrstvy vzorku byla vystřižena kolečka všech typů testovaných elektrostaticky zvlákněných materiálů. Tato kolečka takovou velikost, aby zakryla celé dno jamky v 24 jamkové kultivační destičce. Pro každou kombinaci elektrostaticky zvlákněného

polymeru a typu sterilizace bylo vyčleněno na *in vitro* testování 12 kusů takových to vzorků.

Vzorky byly nasazeny 1 ml roztoku s buňkami typu 3T3-SA zakoupenými od firmy ATCC o koncentraci  $10^4$ /ml. Buňky byly kultivovány v médiu DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) od firmy Biosera s 10 % přídavkem fetálního bovinního séra (FBS) zakoupeného od firmy Biosera, dále bylo do media přidáno 1 % glutaminu rovněž od firmy Biosera a také 1 % antibiotik o složení: penicilin, streptomycin, amfotricinB. Všechna antibiotika byla zakoupena od firmy Lonsa Biotech.

Trvání experimentu bylo stanoveno na 7 dní.

### **11.1.1 Metabolické testy**

Metabolická aktivita byl změřena pomocí tzv. MTT testu. Nejprve byl připraven roztok MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) od firmy Amresco o koncentraci 2 g/l v PBS (fosfátový pufr). Následně byl smíchán s DMEM s přídavkem dalších látek jak bylo popsáno výše. Vzorky byly inkubovány po dobu 4 h při 37°C. Vzniklé krystalky byly rozpuštěny pomocí isopropanolu. Absorbance byla změřena na spektroskopu Tecan Spark při vlnové délce 570-650 nm pozadí bylo odečteno od hodnoty změřené při 570 nm. Naměřená data jsou prezentována pomocí grafu. MTT testování bylo prováděno po 1 a 7 dnech od nasazení buněk.

### **11.1.2 Fluorescenční mikroskopie**

Nejprve byly buňky 2x opláchnuty PBS, následně byly fixovány 2,5 % glutaraldehydem po dobu 15 min při 4°C. Buňky byly opět dvakrát propláchnuty PBS. Následně byl přidán 0,1 % roztok Tritonu X-100 v PBS/PBA a 0,1 % roztok BSA (z angl. Bovine serum albumin-hovězí sérový albumin). Vzorky byly vystaveny působení těchto chemikálií po dobu 5 min, opláchnuty PBS a obarveny phalloidinem (barví cytoplasmu na zeleno) zředěným 1:1000. Po 30 min. byly vzorky opláchnuty v PBS. Následně bylo přidáno DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol) o stejné koncentraci jako phalloidin. DAPI barví na modro DNA (deoxyribonukleová kyselina-nositel genetické informace) buněk. Po 5 min. byly vzorky opláchnuty PBS.

Fotografické takto obarvených vzorků byly snímány fluorescenčním mikroskopem

Nikon ECLIPSE Ti-E/B. Pro účely vyhodnocení buněčné adheze byly pořízeny dvě fotografie, jedna zobrazující zelenou cytoplasmu, druhá zobrazující modrá jádra. Tyto dvě fotografie byly softwarově spojeny a presentovány v práci. Pro focení těchto fotografií byl použit objektiv zvětšující 20x.

Pro účely počítání buněk v jednotce plochy bylo pořízeno vždy deset fotografií pro každou kombinaci materiálu a typu sterilizace. Tyto fotografie byly pořízeny za použití objektivu s desetinásobným zvětšením. Pořízené fotografie byly analyticky vyhodnoceny pomocí programu MATLAB®, výsledky byly statisticky zpracovány (určena průměrná hodnota měření a vyhodnocena chyba jakožto standardní směrodatná odchylka měření) a presentovány v podobě grafu.

Hodnocení proliferace, ergo počítání buněk na vzorku bylo prováděno 1. a 7. den experimentu. Fotografie pro hodnocení buněčné adheze bylo pořizovány 7. den experimentu.

### **11.1.3 Skenovací elektronová mikroskopie**

Vzorky byly promyty PBS. Fixace proběhla v 2,5 % roztoku glutaraldehydu po dobu 15 min. při 4°C. Dalším krokem bylo odvodnění vzorků pomocí tzv. ethanolové řady. Vzorky byly postupně máčeny po dobu 5 min. v roztocích ethanolu se vzrůstající koncentrací. Použity byly v řadě následující koncentrace roztoku ethanolu: 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 % a absolutní ethanol. Vzorky byly nalepeny na terčíky a pozlaceny. Z pozorování vzorků elektronovým mikroskopem Vega3 SB Tescan byly pořízeny fotografie. Tato metoda byla použita stejně jako fluorescenční mikroskopie k hodnocení adheze buněk (1 den po nasazení buněk) a jejich proliferace po 7 dnech od nasazení buněk.

## **11.2. Výsledky**

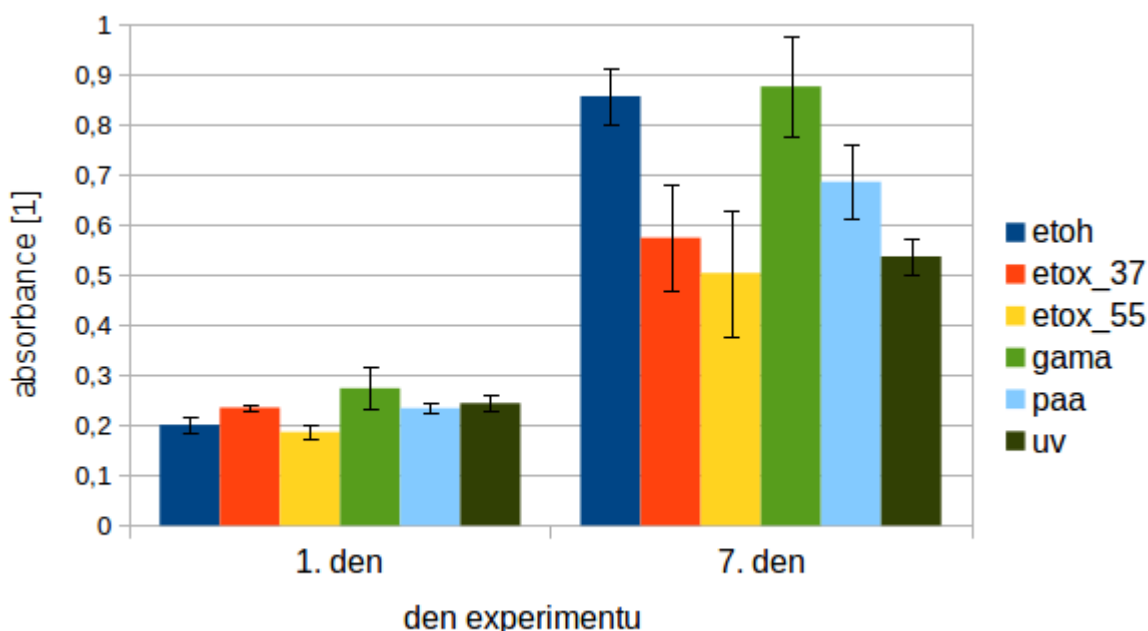
### **11.2.1 Polykaprolakton**

#### **MTT**

Výsledky měření metabolické aktivity buněk 3T3-SA jsou vyneseny v grafu 11. Z

tohoto grafu je patrné, že po jednom dnu od nasazení buněk byla metabolická aktivita buněk na všech vzorcích velmi podobná.

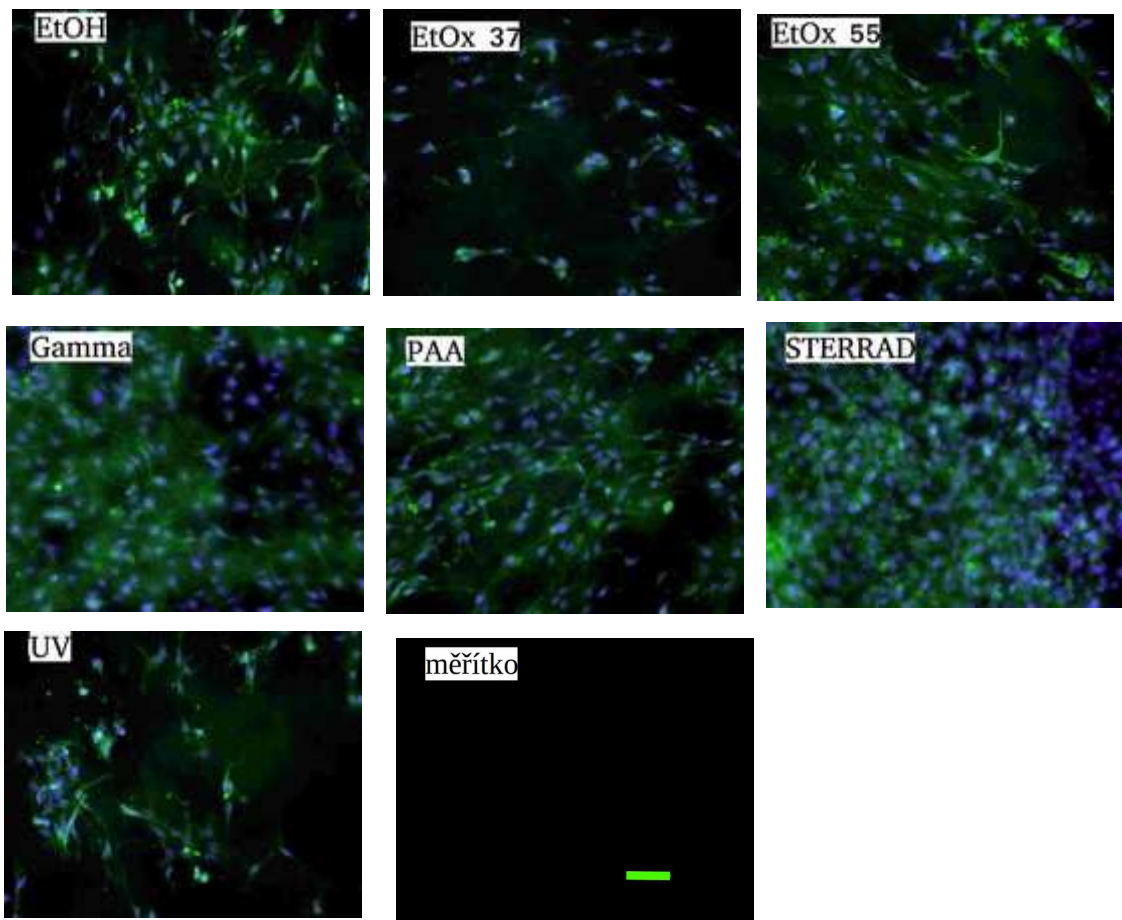
Po 7 dnech od nasazení buněk se ukázalo, že největší metabolickou aktivitu mají buňky na vzorku sterilizovaném v 70 % ethanolu a na vzorku, který byl ozářen  $\gamma$ -zářením. Tento jev může být způsoben zvýšením smáčivosti vzorku. Poměrně vysoká hodnota metabolické aktivity byla naměřena u vzorku sterilizovaného PAA, ale stále je výrazně nižší než je tomu u vzorku sterilovaného ethanolem nebo  $\gamma$ -zářením. Hodnoty metabolické aktivity buněk na vzorcích sterilizovaných UV a ethylenoxidem, a to jak nízkoteplotním tak vysokoteplotním, se nemohou ani z daleka rovnat metabolické aktivitě na vzorcích sterilizovaných ethanolem nebo  $\gamma$ -zářením. Vzorek sterilizovaný PAA je svojí metabolickou aktivitou také převyšuje.



Graf 11: Metabolická aktivita buněk 3T3-SA na vzorcích sterilizovaných pomocí různých sterilizačních metod pro 1 a 7 den od nasazení buněk.

### Fluorescenční mikroskopie

Po 7 dnech od nasazení buněk, tyto pokrývaly ve většině případů polovinu plochy vzorku. Na vzorku ošetřeném nízkoteplotním ethylenoxidem se vyskytují buňky kulovitěho tvaru. To naznačuje, že se buňky nemohly přichytit a nejsou tedy tak vitální jako buňky na jinak sterilizovaných materiálech. Pokrytí vzorků buňkami znázorňuje obrázek 8.

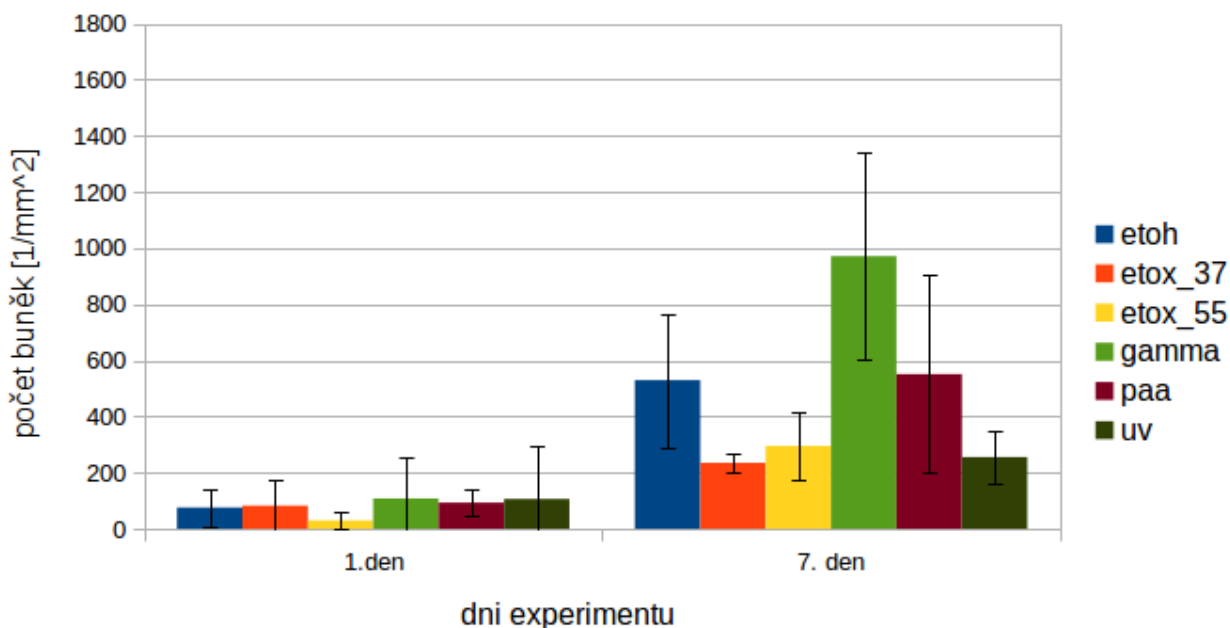


Obrázek 8: Fotografie fluorescenční mikroskopie pro vzorky PCL: zelené části je phalloidinem obarvená cytoplasma, modrá jsou jádra obarvená DAPI. Obrázky jsou označeny zkratkami jednotlivých typů sterilizací. Fotografie měřítko zobrazuje pouze délku měřítka, které představuje 50  $\mu\text{m}$ .

Počty buněk byly kvantifikovány pomocí skriptu pro program MATLAB, který spočte všechna modře obarvená jádra. Výsledky tohoto měření shrnuje graf 12.

Poměrně vysoký počet buněk vykazuje vzorek ozářený  $\gamma$ -zářením. Naopak vůbec nejnižší počet buněk mají vzorky po sterilizaci UV a nízkoteplotním ethylenoxidem.

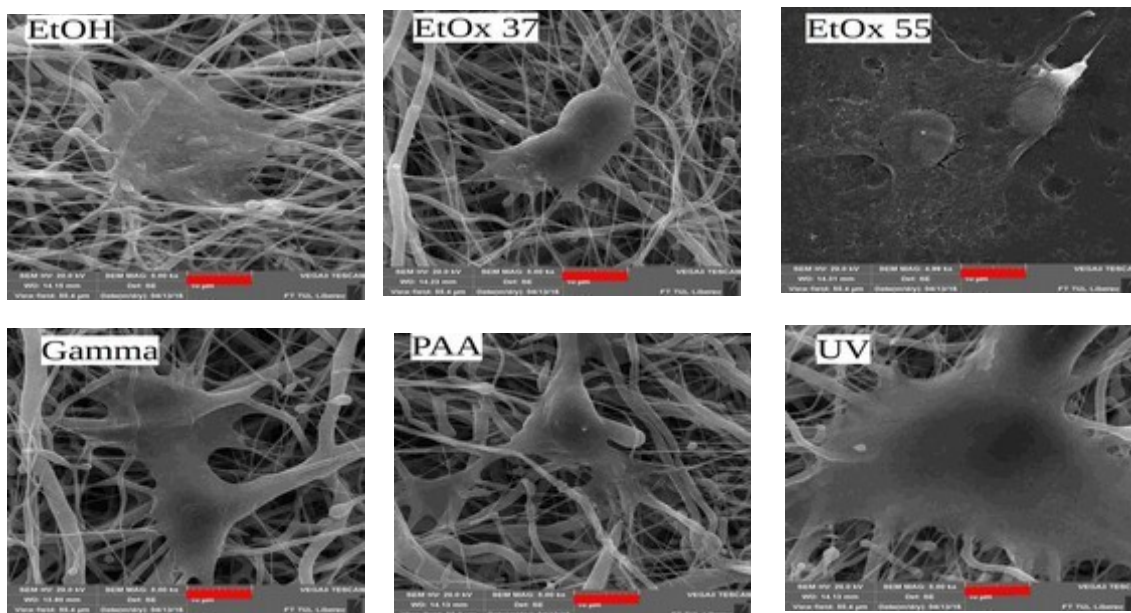




*Graf 12: Počty buněk na jednotku plochy 1. a 7. den experimentu pro PCL a různé druhy sterilizací včetně chybových úseček.*

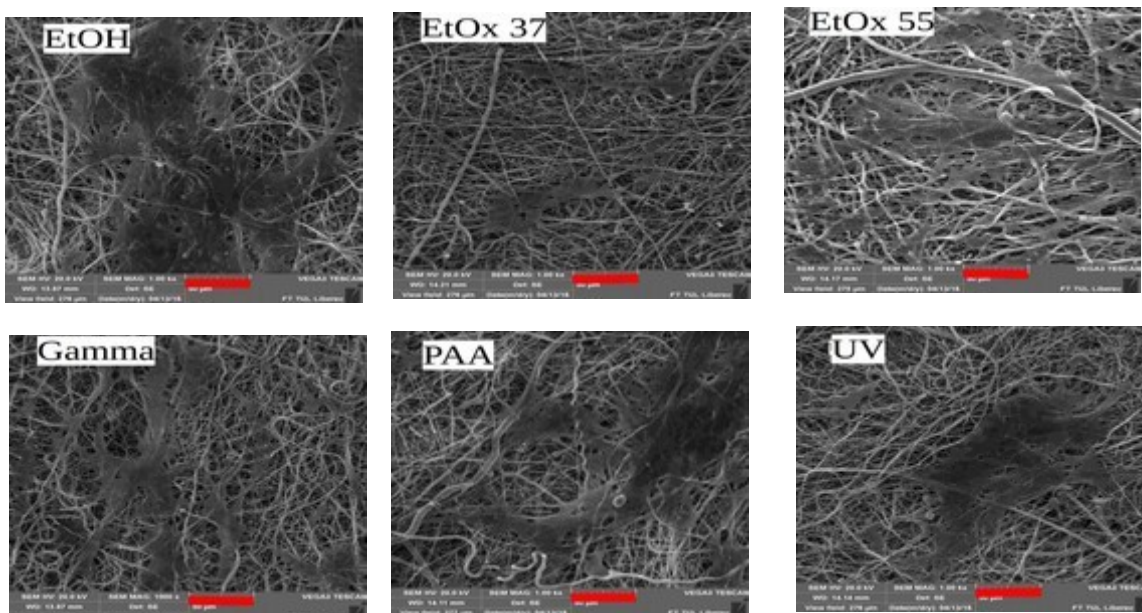
### **Elektronová mikroskopie**

Fotografie pořízené elektronovým mikroskopem po 1 dni od nasazení buněk jsou ukázány na obrázku 9. Na většině vzorků, dokonce i na vzorcích s morfologií folie, se nacházely dobře rozprostřené buňky. Pouze buňky na vzorku ošetřeném nízkoteplotním ethylenoxidem se nacházejí spíše buňky kulovitěho charakteru. Výsledek tohoto pozorování dobře koresponduje v pozorování provedeným pomocí fluorescenční mikroskopie.



Obrázek 9: Fotografie SEM materiálu PCL po 1 dni od nasazení buněk pro různé typy sterilizace. Měřítka je zvýrazněno červenou barvou a jeho délka je ve všech případech 10  $\mu\text{m}$ .

Další pozorování buněčných kultur sedmý den experiment přineslo zjištění, že se buňky na vzorcích po všech typech sterilizace množí a vznikají oblasti se souvislou vrstvou buněk. Pozorování provedené 7. den experimentu dokumentují fotografie na obrázku 10.



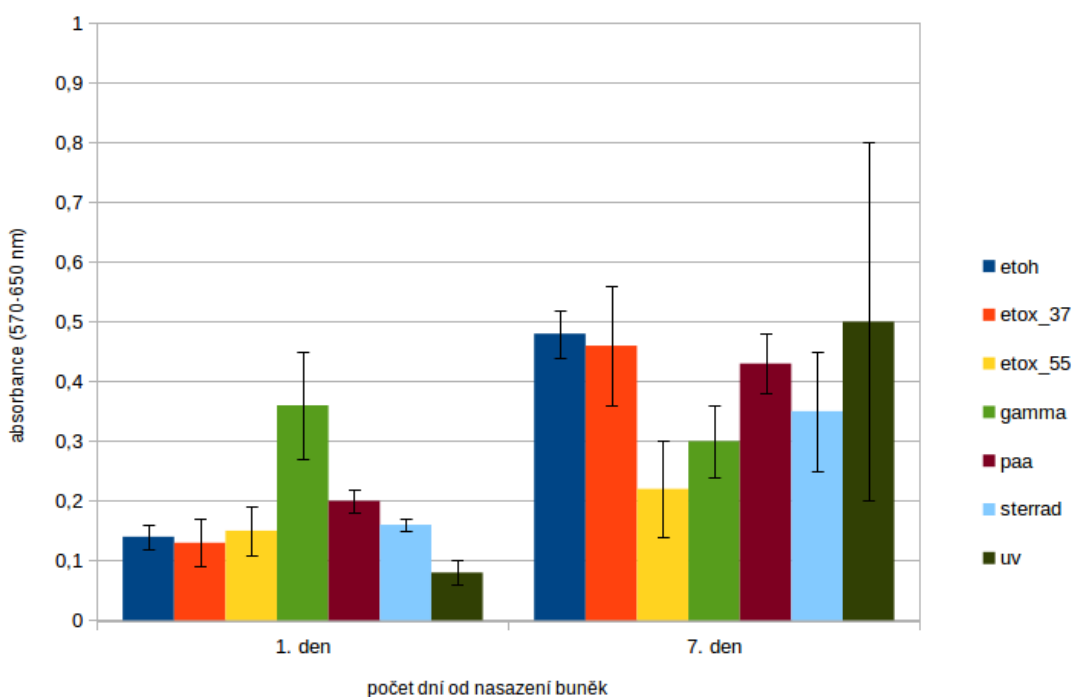
Obrázek 10: SEM PCL po 7 dnech experimentu pro různé typy sterilizace. Měřítka je zvýrazněno červeně a je ve všech případech 50  $\mu\text{m}$ .

## 11.2.2 Kopolymer kyseliny mléčné a kaprolaktonu

### MTT

Výsledky měření metabolické aktivity buněk 3T3-SA na vzorcích PLCL po 1 a 7 dnech od začátku experimentu jsou shrnuty v grafu 13. Z tohoto grafu je patrné, že buňky s největší metabolickou aktivitou po jednom dni experimentu byly buňky na vzorku ošetřeném pomocí  $\gamma$ -záření. Metabolická aktivita buněk na ostatních vzorcích byla srovnatelná.

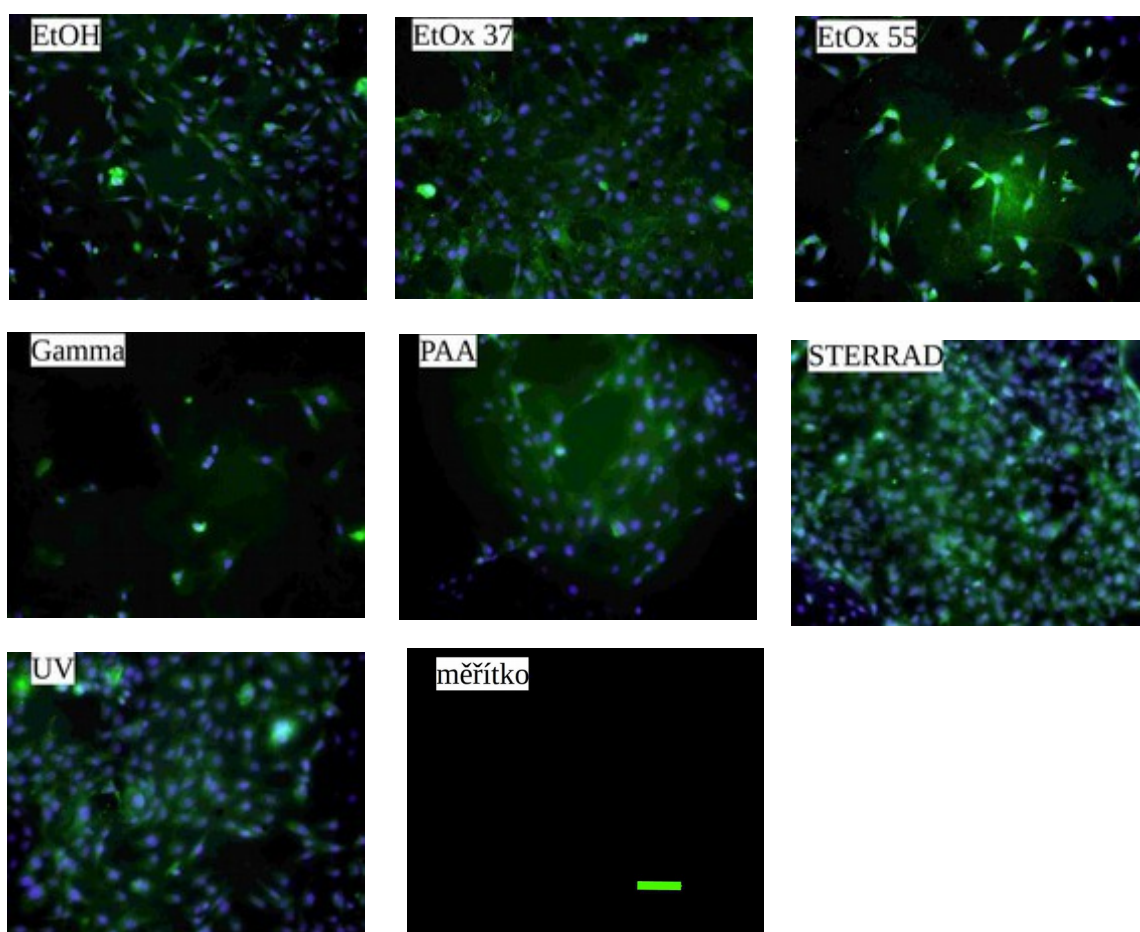
Sedmý den experimentu přinesl zjištění, že metabolická aktivita buněk na vzorku sterilizovaném  $\gamma$ -zářením klesla v porovnání s prvním dnem experimentu. Tento trend nebyl pozorován na žádném jiném vzorku. Nejvyšší metabolickou aktivitu vykázaly buňky na vzorku sterilizovaném pomocí UV, nicméně tato hodnota není příliš spolehlivá vzhledem k obrovské statistické chybě měření, aby mohl autor z těchto dat vyvodit nějaké závěry, musel by experiment opakovat. Buňky na ostatních vzorcích vykazují podobné metabolické aktivity, i když vzorek sterilizovaný vysokoteplotním ethylenoxidem, gammou a technologií STERRAD® poněkud zaostávají.



Graf 3: Metabolická aktivita interpretovaná jako míra absorbance pro vzorky PLCL po různých typech sterilizací.

## Fluorescenční mikroskopie

Sedmý den experimentu byly pořízeny fotografie vzorků s buňkami obarvenými phalloidinem a DAPI. Z fotografií (obrázek 11) bylo zjištěno, že souvislá vrstva buněk vznikla na vzorku sterilizovaném pomocí technologie STERRAD®. Ostatní vzorky byly buňkami pokryty alespoň na polovině plochy. Na vzorku ošetřeném  $\gamma$ -zářením byly pozorovatelné pouze jednotlivě se vyskytující buňky.

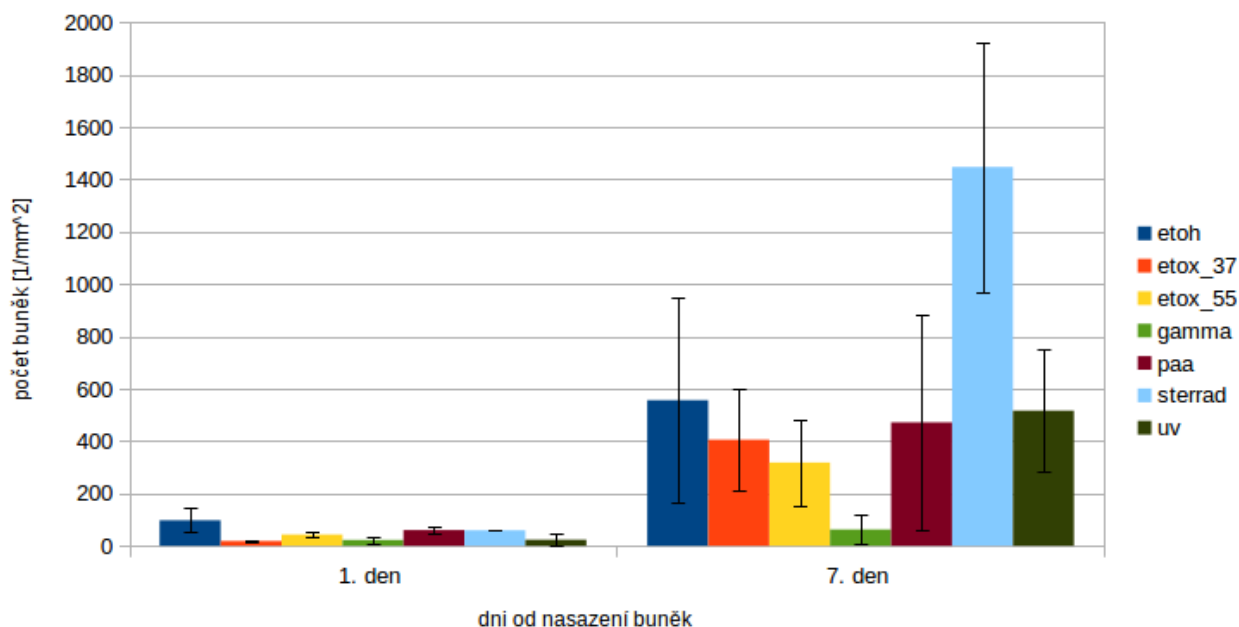


Obrázek 11: Fotografie z fluorescenčního mikroskopu pro vzorky PLCL: zelené části je phalloidinem obarvená cytoplazma, modrá jsou jádra obarvená DAPI. Obrázky jsou označeny zkratkami jednotlivých typů sterilizací. Fotografie měřítko zobrazuje pouze délku měřítko, které představuje 50  $\mu\text{m}$ .

Počty buněk spočtené pomocí skriptu pro program MATLAB shnuje graf 14. Toto měření je charakteristické velkou statistickou odchylkou (chybové úsečky v grafu 2). To naznačuje, že pokrytí vzorků buňkami není zdaleka homogenní.

První den experimentu byly počty buněk velice nízké, většinou se pohybovaly v řádu desítek buněk, velikost chyby měření těchto dat je srovnatelné se změřenou hodnotou. Z toho plyne, že tato data nemají příliš velkou výpovědní hodnotu.

Sedmý den experimentu se ukázalo, že nejvíce buněk se nachází na vzorku sterilizovaném technologií STERRAD®. Počet buněk na tomto vzorku převyšuje průměrnou hodnotu počtu buněk na ostatních vzorcích až trojnásobně. Neobvykle malý počet buněk byl zaznamenán na vzorku sterilizovaném  $\gamma$ -zářením.



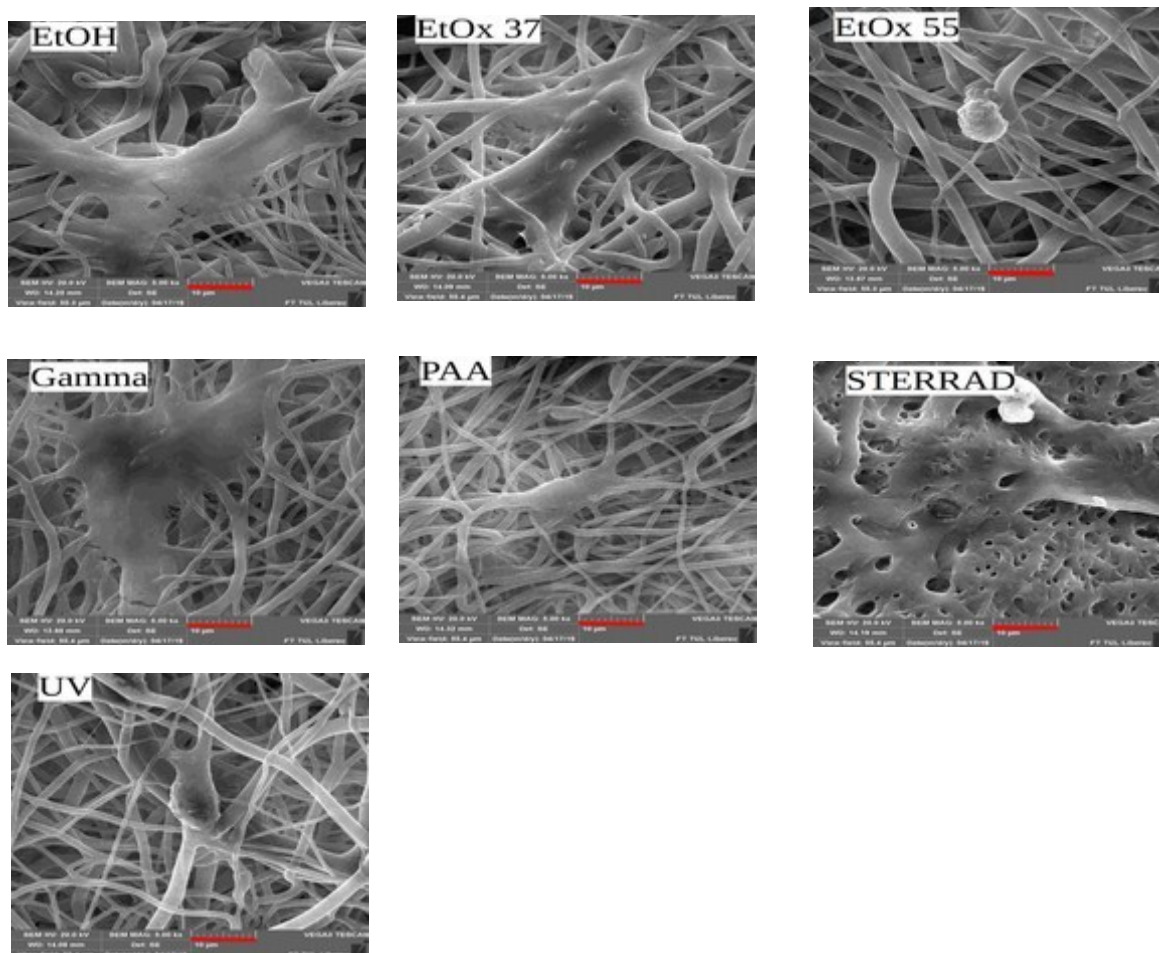
Graf 14: Počet buněk na vzorcích PLCL po 1 a 7 dnech experimentu pro různé typy sterilizací včetně znázornění chyby, která byla stanovena jako směrodatná odchylka statistického souboru.

### Skenovací elektronová mikroskopie

První den experimentu byly pozorovány dobře adherované buňky na vzorcích sterilizovaných ethanolem,  $\gamma$ -zářením a technologií STERRAD®. Také na vzorek sterilizovaný nízkoteplotní ethylenoxidem byly přichyceny buňky, tyto ale nebyly příliš dobře rozprostřené. Stejně pozorování bylo provedeno v případě vzorku sterilizovaného

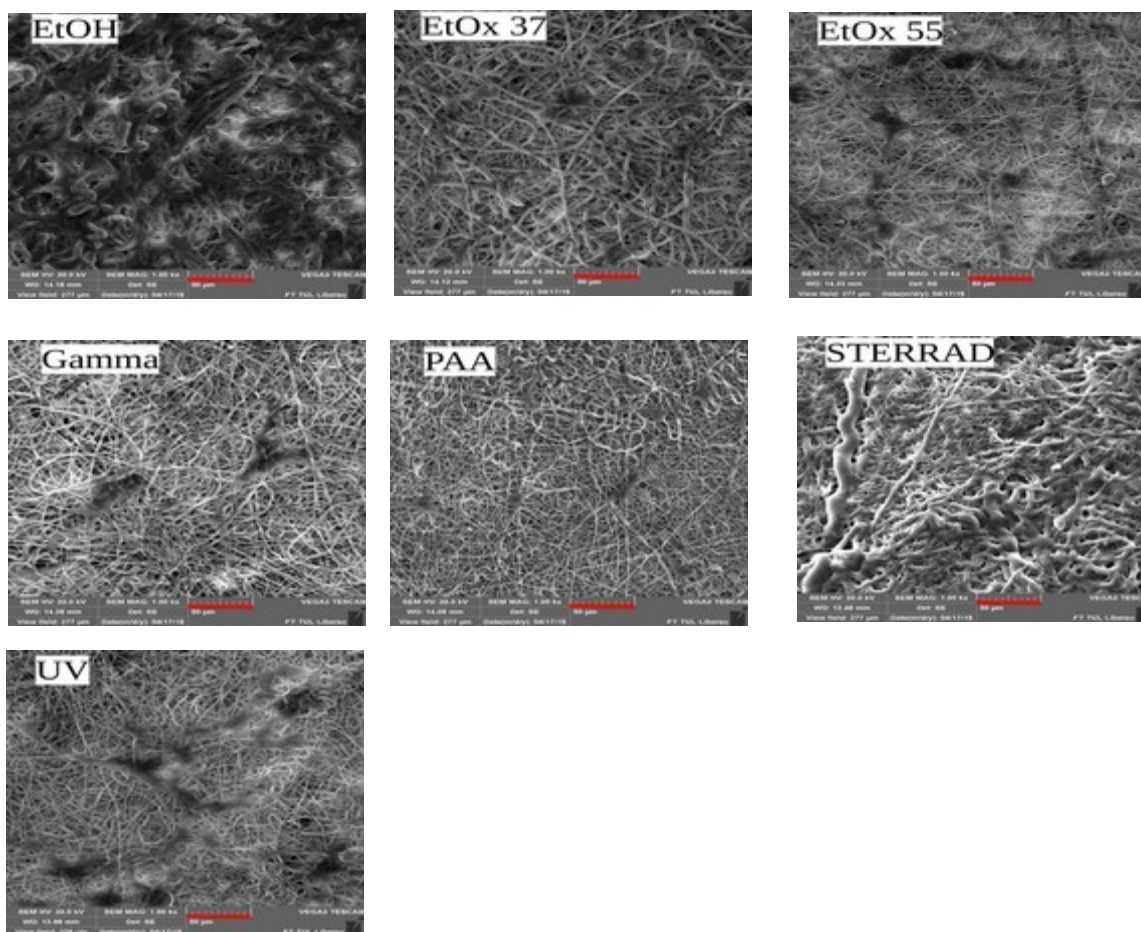


UV. Vzorek ošetřený  $\gamma$ -zářením byl pokryt pouze slabě přichycenými buňkami. Zakulacené buňky byly pozorovány v případě sterilizace vzorku vysokoteplotním ethynoxidem. Ilustrační fotografie z elektronové mikroskopie z prvního dne experimentu viz obrázek 12.



Obrázek 12: Fotografie buněk 3T3-SA na vzorcích PLCL ošetřených různými sterilizačními postupy po prvním dni experimentu. Měřítka všech fotografií je zvýrazněno červeně a jeho délka je ve všech případech 10  $\mu\text{m}$ .

Sedmý den experimentu bylo pozorována proliferace buněk na všech vzorcích. Jednotlivé buňky byly pozorovatelné na vzorku ošetřeném PAA. Na ostatních vzorcích bylo možné pozorovat několik oddělených oblastí se souvislým povlakem buněk. Některé fotografie z tohoto pozorování jsou uvedeny na obrázku 13.



Obrázek 13: Fotografie SEM buněk 3T3-SA na vzorcích PLCL po různých typech sterilizace. Měřítka je zvýrazněno červeně a jeho délka je ve všech případech 50  $\mu\text{m}$ .

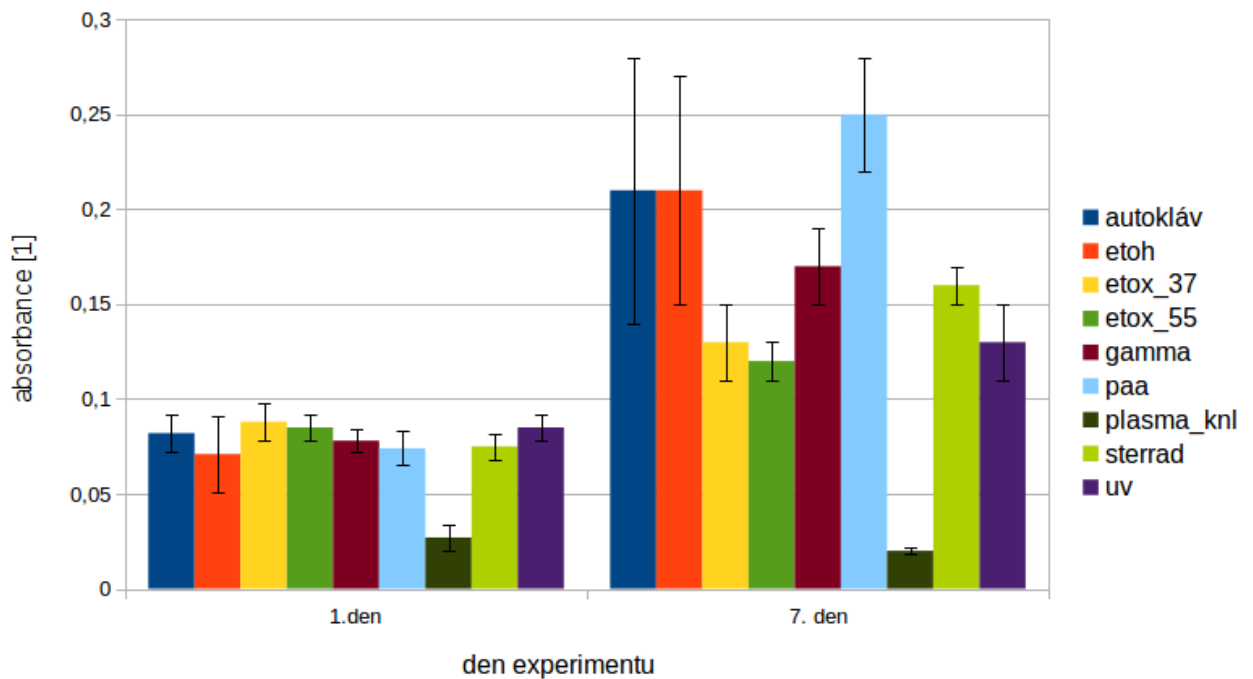
### 11.2.3 Polyvinylidenfluorid

#### Metabolická aktivita

Po první dny experimentu byla metabolická aktivita na všech vzorcích srovnatelná. Jedinou výjimkou byl vzorek sterilizovaný pomocí plasmu v KNL, jehož buňky mají znatelně menší metabolickou aktivitu již od prvního dne experimentu.

Sedmý den experimentu došlo k dalšímu snížení metabolické aktivity tohoto vzorku, takže je tato ve srovnání s metabolickou aktivitou buněk na ostatních vzorcích vskutku mizivá. Největší hodnotu metabolické aktivity vykazují buňky na vzorku sterilovaném PAA. Také buňky ze vzorků ošetřených pomocí autoklávu a ethanolu mají vysokou

metabolickou aktivitu. Buňky na ostatních vzorcích mají metabolickou aktivitu nižší. Její hodnota je velmi podobná pro vzorky sterilizované vysoko a nízkoteplotním ethylenoxidem,  $\gamma$ -zářením, technologií STERRAD® a UV zářením. Výsledky reprezentuje graf 15.

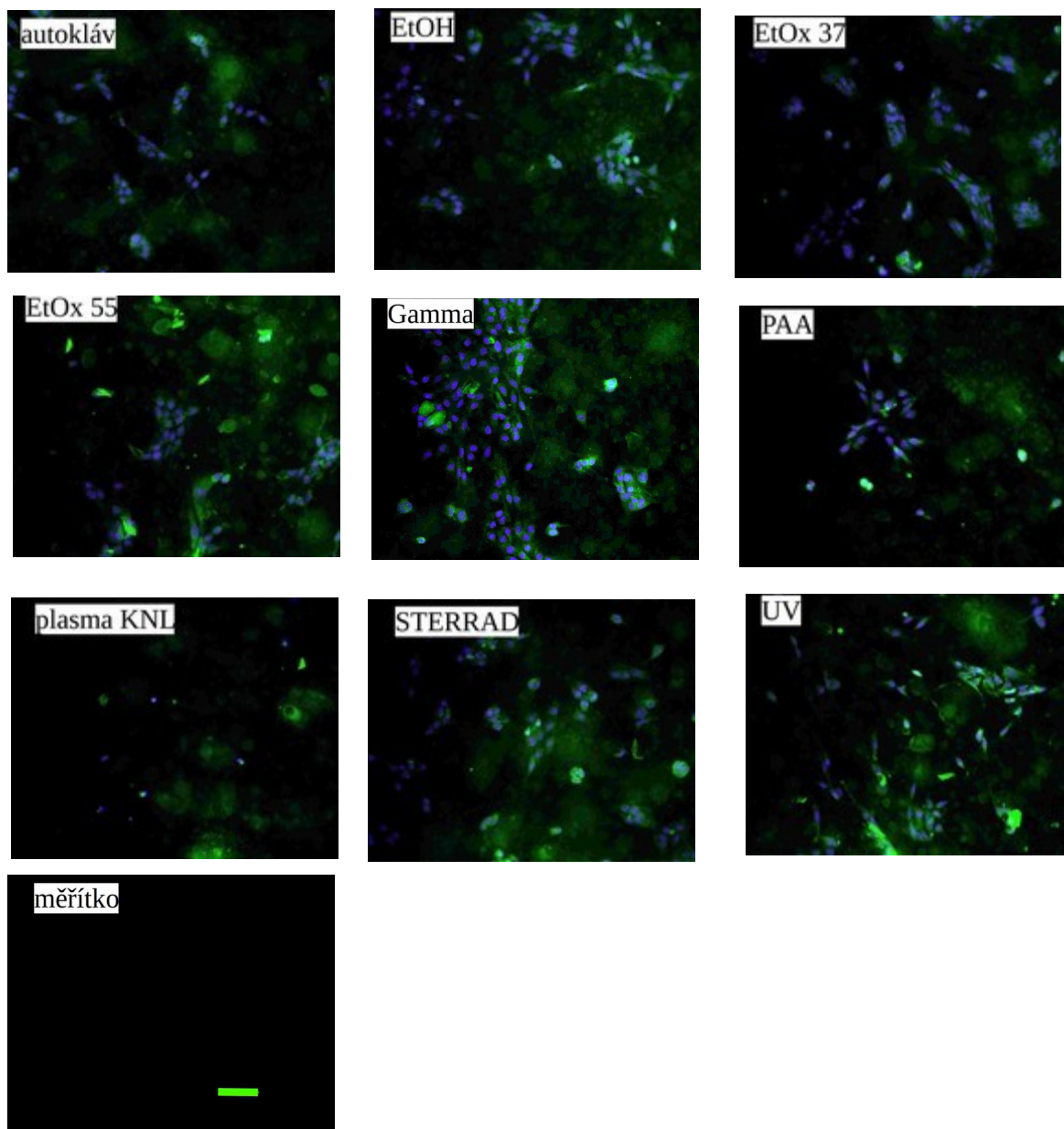


*Graf 15: Metabolická aktivita buněk 3T3-SA na vzorcích PVDF po různých typech sterilizace.*

## FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE

Fotografie fluorescenční mikroskopie po sedmi dnech experimentu s barvením phalloidin-DAPI jsou ukázány na obrázku 14. Buňky se množí na všech vzorcích. Na vzorcích sterilizovaných pomocí vysokoteplotního i nízkoteplotního ethylenoxidu a autoklávu jsou pozorovatelné shluky buněk. Na vzorcích ošetřených  $\gamma$ -zářením, ethanolem, PAA, UV zářením a také technologií STERRAD® byly pozorovány souvislejší vrstvy buněk. Na vzorku sterilizovaném plasmou v KNL se objevily pouze špatně přichycené kulovité buňky.



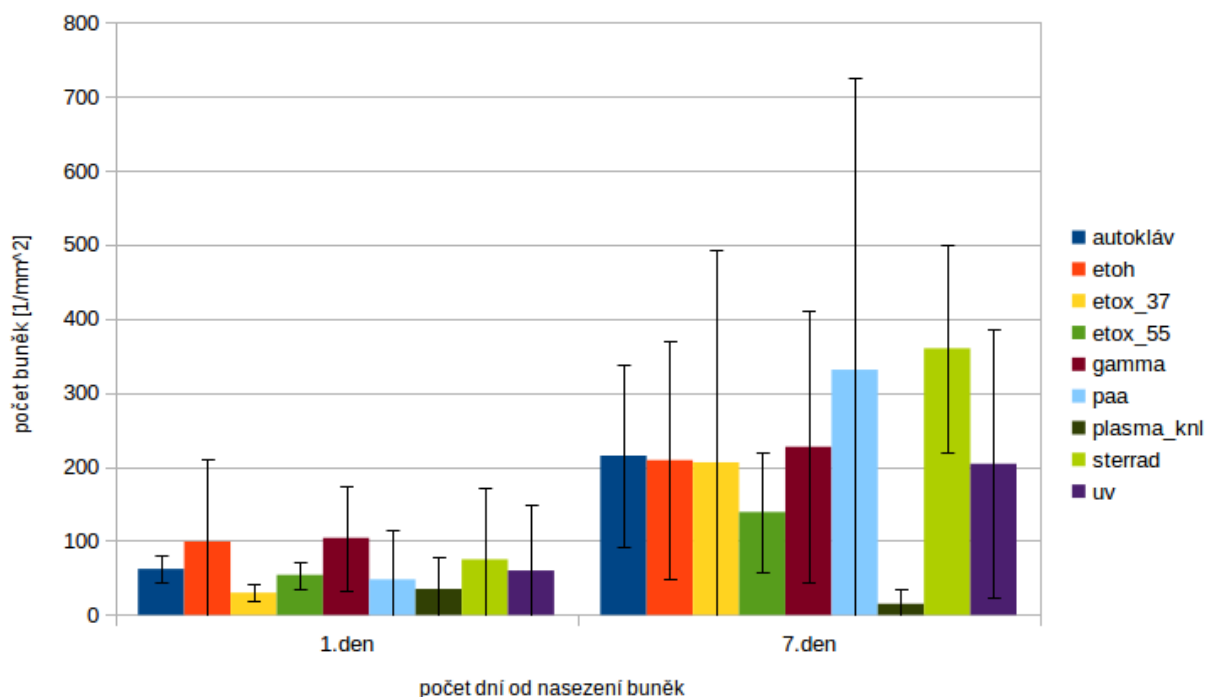


Obrázek 14: Fotografie fluorescenční mikroskopie PVDF: zelené části je phalloidinem obarvená cytoplasmata, modrá jsou jádra obarvená DAPI. Obrázky jsou označeny zkratkami jednotlivých typů sterilizací. Fotografie měřítko zobrazuje pouze délku měřítko, které představuje 50 µm.

První den experimentu byl počet buněk na jednotku plochy na všech vzorcích pro různých typech sterilizace přibližně stejný. Nejvíce buněk bylo na vzorku ošetřeném  $\gamma$ -zářením a na vzorku sterilizovaném v ethanolu. Oproti tomu nejméně buněk bylo na na vzorku sterilizovaném plasmou v KNL a na vzorku ošetřeném nízkoteplotním EtOx.

Po sedmi dnech experimentu se počet buněk na vzorku sterilizovaném v KNL ještě snížil a představuje tak vzorek s nejnižším počtem buněk. To může být způsobeno nehomogenitou pokrytí vzorku buňkami. Naopak nevíce buněk bylo napočítáno na vzorku ošetřeném technologií STERRAD® a PAA. Ostatní vzorky nesou méně buněk, jejichž počty jsou mezi sebou srovnatelné. Všechna měření jsou zatížena velkou statistikou chybou, která je způsobena nehomogenitou rozložení buněk na vzorku, která pak působí velké rozdíly v počtu buněk na jednotlivých fotografiích.

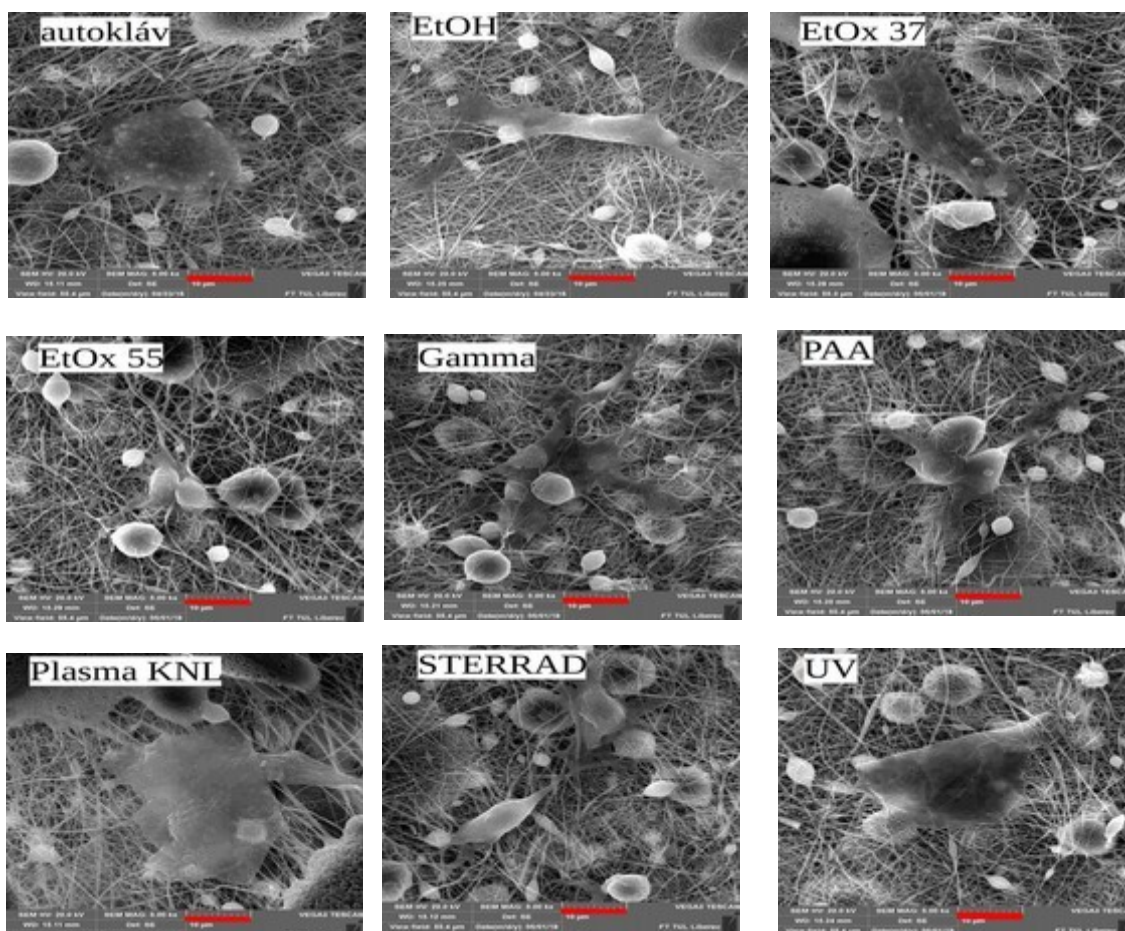
Výsledky měření počtu buněk na jednotku plochy reprezentuje graf 16.



Graf 16: Počet buněk 3T3-SA na jednotku plochy pro vzorky PVDF po různých typech sterilizace.

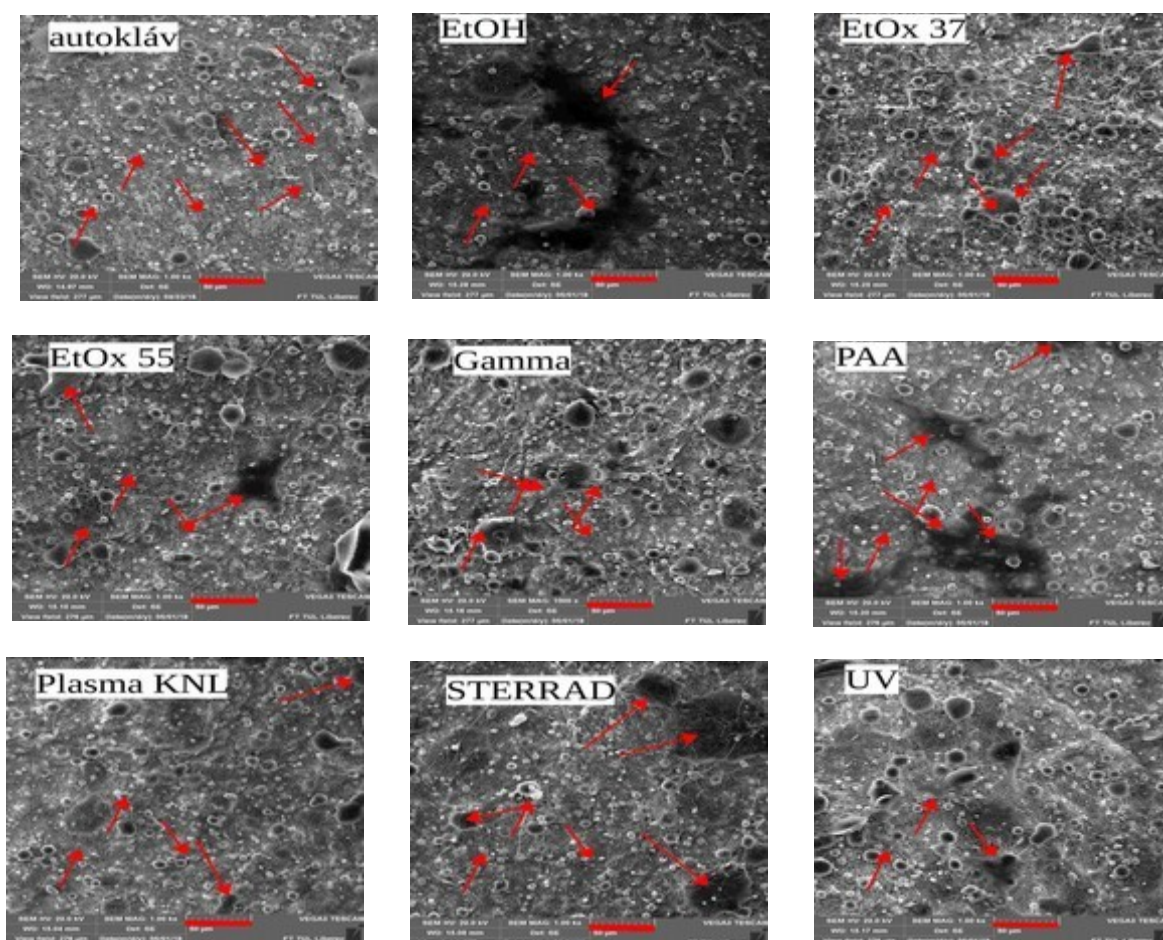
### Elektronová skenovací mikroskopie

Po prvním dni experimentu se ukázalo, že buňky se přichytily na vzorky sterilizované pomocí ethanolu,  $\gamma$ -záření a UV záření. Ostatní typy sterilizace způsobily výskyt zakulacených buněk, které nebyly řádně přichyceny k podkladu. Fotografie z tohoto pozorování viz obrázek 15.



Obrázek 15: Buňky 3T3-SA na vzorcích PVDF pro různé typy sterilizací po prvním dni experimentu. Měřítko je zvýrazněno červeně a jeho délka je 10  $\mu\text{m}$  ve všech případech.

Po sedmi dnech experimentu bylo zjištěno, že buňky nevytváří souvislou vrstvu na žádném vzorku. Na všech vzorcích se nacházejí pouze oddělené kolonie buněk nebo jednotlivě přisedlé buňky. Fotografie z tohoto pozorování viz obrázek 16.



Obrázek 16: Buňky 3T3-SA na vzorcích PVDF pro různé druhy sterilizačních technik sedmý den experimentu. Červené šipky ukazují výskyt buněk na fotografii. Měřítka je znázorněno červenou barvou a jeho délka odpovídá 50  $\mu\text{m}$  pro všechny fotografie.

## 12. DISKUSE

### 12.1.      **Obrazová analýza**

Relevantní výsledky přineslo pozorování makroskopických změn polymerů pouhým okem s cílem zjistit, zda-li dochází k vytvoření folie, tavení vláken nebo k redukci plochy vzorku. Folie vznikly v případě vzorků PCL a PLCL pro sterilizaci pomocí autoklávu, to koresponduje výsledky prací Redigueri at al. (2016) a Baume et al. (2016). K vytvoření folie došlo také v případě sterilizace nosičů u PCL a PLCL plasmou v KNL. Vzorek PCL z druhé řady vzorků se změnil ve folii také po sterilizaci technologií STERRAD®. Z tohoto hlediska se PVDF jeví jako stabilnější než PLCL a PCL, protože žádná ze sterilizačních technik nevedla k roztavení vzorku a vytvoření folie. PVDF je ale náchylné k pomačkání. To může být způsobeno přítomností tenkých vláken a také nízké plošné hmotnosti testované vrstvy. PLCL bylo náchylné na stáčení okrajů směrem do středu vzorku. Tyto jevy mohly v případě PLCL a PVDF vést k redukci plochy některých vzorků, což mohlo vést ke zkrácení některých provedených experimentů. S polykaprolaktonem se pracovalo ze všech materiálů nejlépe protože držel původní tvar a nedocházelo k redukci plochy vzorku z důvodu mačkání, vyjma vzorků, které byly sterilizací změněny ve folie. V případě těchto vzorků byla plocha redukována velmi výrazně.

Na fotografiích SEM byly patrné některé rozdíly mezi jednotlivými typy sterilizace a kontrolním vzorkem, ale vzhledem k nehomogenitě materiálu nelze určit, zda se jedná jen o lokální změny struktury nebo jestli se morfologie skutečně mění. Jediné co je autor z tohoto pozorování schopen vyvodit, je to že vlákna PLCL měla největší průměr, byla poměrně homogenní z hlediska jejich průměru a defekty se vyskytují jen vzácně, oproti tomu vlákna PVDF byla z vláken všech polymerů nejtenčí a vyznačují se velkým počtem kulovitých defektů. Polykaprolakton je charakteristický velkým rozptylem průměrů vláken. Defekty se na elektrostaticky zvlákněném PCL vyskytují, ale nejsou tak časté jako v případě PVDF.



Zajímavý je fakt, že některé vzorky první sady vykázali jiné chování vůči technologii STERRAD® (PCL a PLCL) a sterilizaci pomocí PAA (PCL) než vzorky druhé sady. Trochu světla do této problematiky vneslo porovnání vzorku PCL sterilizovaného pomocí PAA elektronovým mikroskopem. V průběhu tohoto pozorování bylo možné sledovat, že roztavení vzorku bylo částečné. Je tedy možné, že protichůdné výsledky (PCL-PAA a PLCL-STERRAD®) jsou způsobeny právě nehomogenitou materiálu nebo nerovnoměrným působením sterilizační metody. Tato teorie ovšem selhává pro kombinaci PCL-STERRAD®, kde byl vznik folie pozorovatelný pouhým okem v makroskopickém měřítku. To se mohlo stát díky tomu, že teplota v průběhu sterilizace plasmou se pohybuje okolo 50°C (Moisan et al. 2001). Hodnota této teploty je tedy poměrně blízko teplotě tání PCL, která se pohybuje okolo 60°C (Woodruff a Hutmacher 2010). Vlivem náhodného zvýšení teploty je možné, že došlo k roztavení materiálu.

Data získaná pomocí měření průměrů jsou zatížena příliš velkou chybou pramenící z velkých rozdílů v průměrech vláken. Statistická chyba je zpravidla tak veliká, že pokud by byla určena jako relativní, pohybovala by se ve stovkách procent. Kvůli velikosti statistické chyby jsou některé grafy velmi nepřehledné a nečitelné. Dalším zdrojem chyby měření průměrů vláken je nehomogenita vzorků, které se mohou lišit průměrem vláken, množstvím defektů, ale i tím, jestli se vytvořila folie nebo ne. Z důvodu přítomnosti tak velké chyby není možné z takto naměřených dat cokoli s alespoň relativní jistotou vyvodit.

## **12.2. Hodnocení změn molekulové hmotnosti**

Z pozorování změn molekulových hmotností je patrné, že největší vliv na tuto vlastnost polymeru (PLCL a PLC) má PAA (viz graf 5 a 6). Nezanedbatelný vliv na molekulovou hmotnost elektrostaticky zvlákněných polymerů má také sterilizace pomocí  $\gamma$ -záření, která změnila molekulovou hmotnost u PCL a PLCL (viz graf 5 a 6). Ke změně molekulové hmotnosti PVDF  $\gamma$ -zářením ale nedošlo (viz graf 7), to je v rozporu s poznatky nabitými z literatury, jmenovitě od Katan et al. (1998), který uvádí, že v případě působení  $\gamma$ -záření na PVDF dochází k síťování a štěpení polymeru, což by mělo být vidět na křivce chromatogramu.

Ostatní typy sterilizace mají jen nepatrný nebo žádný vliv na molekulovou hmotnost.

Jediná změna pozorovatelná na chromatogramech byl snížení hmotnosti polymeru, který dorazil na kolonu. Z konzultace této problematiky s Mgr. Vítem Novotným ale plyne, že tento jev bylo možné očekávat, ale jeho příčina není uspokojivě vysvětlitelná. Z grafů 5-7 vyplývá, že nejstabilnější z hlediska molekulové hmotnosti je PVDF a nejméně stabilní je z tohoto hlediska PLCL.

### **12.3. Hodnocení termodynamických vlastností**

Obecně se dá říci, že nejvíce termické chování vybraných polymerů mění sterilizace pomocí EtOx při 55°C. Vlivem této sterilizační metody došlo k význačnému posunutí termických charakteristik všech zkoumaných polymerů, vyjma teploty tání PVDF. Sterilizace pomocí nízkoteplotního ethylenoxidu také mění termické charakteristiky testovaných polymerních nosičů pro tkáňové inženýrství i když ne tak výrazně. Příčinu tohoto jevu si autor zatím nedovede vyjasnit.

Termicky nejstálější se jeví být PVDF i když teplota přechodu krystalické fáze, která je v případě tohoto polymeru poměrně pohyblivá, může hrát důležitou roli v ovlivnění adheze a proliferace buněk na materiálu. Největší změnu prodělala teplota skelného přechode elektrostaticky zvlákněného PLCL, která byla ovlivněna všemi typy sterilizačních postupů.

Podle výsledků DSC by se PCL a PVDF daly charakterizovat jako semikrystalické polymery (viz kapitola 3). PLCL by se pak dal charakterizovat jako polymer amorfní. To koresponduje s prací Mo a Weber (2004), kteří píší, že v průběhu elektrostatického zvláknování krystalinita PLCL klesá k nule. Je-li polymer zahřátý na teplotu skelného přechodu a pomalu chladne může krystalinita stoupat (Mo a Weber 2004). Vzhledem k velmi nízké teplotě skelného přechodu zkoumaného polymeru je nepravděpodobné, že by došlo k opětovnému vzrůstu krystalinity.

### **12.4. Testování *in vitro***

Testování *in vitro* se skládalo z MTT testu a hodnocení buněčné adheze a proliferace s cílem určit ideální kombinaci elektricky zvlákněného materiálu a typu sterilizace.

Největší metabolické aktivity, která je mírou životaschopnosti buněk, byla naměřena pro

materiál PCL sterilizovaný pomocí  $\gamma$ -záření a desinfikovaný pomocí ethanolu. Hodnota metabolické aktivity vyjádřená jako míra absorbance dosahovala hodnoty 0,9. Vzorky PLCL, které byly pokryty buňkami s největší metabolickou aktivitou (EtOH, UV a  $\gamma$ -záření) dosahovaly hodnoty absorbance pouze 0,5. Vzorek PVDF, který byl pokrytý buňkami s největší metabolickou aktivitou (vzorek sterilizovaný PAA), dosahoval absorbance 0,25. Vzorky PVDF měly hodnoty metabolické aktivity obecně velmi nízké, po prvním dni se hodnota absorbance pohybovala okolo 0,1, což je zhruba hodnota chyby měření (viz kapitola 11). V případě vzorku PVDF sterilizovaného pomocí plasmu v KNL (technologie Laoken®) se tato hodnota 7. den experimentu příliš nezměnila. Takto nízké hodnoty buněčné aktivity mohou naznačovat, že PVDF sterilizované pomocí technologie Laoken® vůbec nepodporují buněčnou adhezi a proliferaci. Tuto domněnku potvrzují i výsledky sčítání počtu buněk na  $\text{mm}^2$ , kde má tento vzorek také extrémně nízké hodnoty.

Vysoké počty buněk byly naměřeny na vzorku PCL sterilizovaném pomocí  $\gamma$ -záření a dosahovaly hodnoty 1000 buněk/ $\text{mm}^2$ , takto vysoký výsledek může být způsoben zvýšením hydrofilicity povrchu. Ještě vyšší počet buněk byl zaznamenán na vzorku PLCL sterilizovaném technologií STERRAD® a dosahuje hodnoty 1400 buněk/ $\text{mm}^2$ . Je třeba si ale uvědomit, že tento vzorek byl částečně roztavený, takže by byl pro tkáňové inženýrství nepoužitelný. Počty buněk na ostatních vzorcích těchto dvou polymerů jsou až na výjimky srovnatelné. Takovou výjimkou může být např. vzorek PLCL sterilizovaný pomocí  $\gamma$ -záření. Počet buněk na tomto vzorku nepřesahuje ani první ani sedmý den hodnotu statistické chyby měření. To by mohlo naznačovat, že tato kombinace materiálu a sterilizace příliš nepodporuje růst buněk. Proti této hypotéze hovoří metabolická aktivita buněk na tomto vzorku. Na druhou stranu, z vyhodnocování adheze a proliferace je zřejmé, že buňky na tomto vzorku příliš dobře nedrží ani netvoří souvislejší povlaky.

Paradoxem je, že vzorcích PVDF sterilizovaných pomocí technologie Laoken® došlo k naměření vůbec nejmenšího počtu buněk a velmi nízké buněčné aktivity, kdežto na vzorcích sterilizovaných technologií STERRAD® došlo k pozorování vůbec největšího počtu buněk na vzorcích tohoto materiálu a také byla pozorována poměrně vysoká metabolická aktivita, přitom obě technologie jsou velmi podobné. Je možné, že k tomu jevu došlo vlivem přítomnosti zbytkových volných radikálů na vzorku sterilizovaném



v KNL. To by se mohlo stát z důvodu sterilizace tohoto vzorku bezprostředně před zahájením experimentu.

Na většině vzorků byly pozorovány buňky dobře rozprostřené. Výjimkou byl vzorek PCL sterilizovaný nízkoteplotním ethylenoxidem a také vzorek PLCL sterilizovaný vysokoteplotním ethylen oxidem. Je zvláštní, že sterilizace vysokoteplotním ethylenoxidem nevedla k omezené adhezi buněk na vzorku PCL.

Na vzorcích PVDF po různých typech sterilizací byly pozorovány špatně adherované buňky ve více případech než tomu bylo u PCL a PLCL. Dobře rozprostřené buňky byly pozorovány jen v případě vzorků sterilizovaných pomocí  $\gamma$ -záření a desinfikovaných pomocí ultrafialového světla a ethanolu. Tento fakt vede k hypotéze, že PVDF není příliš dobrý podklad pro růst buněk. To může být ale způsobeno hydrofobicitou materiálu, která se může stát předmětem dalších úprav.

## 13. Závěr

V průběhu práce byl hodnocen vliv vybraných sterilizačních metod na elektrostaticky zvlákněné nosiče pro tkáňové inženýrství s cílem zjistit, které sterilizační postupy jsou vhodné pro dané elektrostaticky zvlákněné materiály.

Sterilizační postupy, které způsobily vznik folie, se jeví jako nevhodné pro využití v tkáňovém inženýrství, kvůli změnám ve morfologii nosiče pro tkáňové inženýrství. Mezi takové typy sterilizace patří autoklávová sterilizace pro nosiče z PCL a PLCL, sterilizace technologií Laoken® pro nosiče z PCL a PLCL. Také v případě vzorku PCL sterilizovaného pomocí PAA a v případě PLCL sterilizovaného technologií STERRAD® došlo, alespoň lokálně, ke vzniku folie. Tyto kombinace materiálu a typu sterilizace jsou tím pádem také nevhodné. Vytvoření folie při sterilizaci PCL pomocí technologie STERRAD® nebylo přesvědčivě prokázáno, vzhledem k dvěma rozdílným výsledkům. Bližší prozkoumání sterilizačních cyklů a nastavených parametrů na technologii STERRAD® by mohlo lépe objasnit příčiny tohoto jevu. Vhodným nastavením parametrů sterilizace by se pak mohlo podařit zabránit vzniku folie. Než se tak stane je kvůli své nevyzpytatelnosti tato sterilizační metoda nepoužitelná.

Z praktického hlediska se, vzhledem k obtížné manipulaci, jeví PVDF jako méně

výhodné.

Dále byla hodnocena změna molekulové hmotnosti nosičů pro tkáňové inženýrství. Molekulovou hmotnost nosičů z PLCL a PCL mění výrazně PAA a  $\gamma$ -záření. Ostatní typy sterilizace ovlivnily molekulovou hmotnost těchto polymerů minimálně. Změna molekulové hmotnosti PVDF nebyla změřena a to ani pro sterilizaci  $\gamma$ -zářením, pro kterou byla teoreticky očekávána.

Termické charakteristiky všech zkoumaných polymerních nosičů byly ovlivněny sterilizací ethylenoxidem a to jak vysokoteplotním tak nízkoteplotním. Také desinfekce ethanolem působila změny v termických charakteristikách. Nejvyšší stabilita, co týče teploty tání byla pozorována na nosiči z PVDF. Nicméně teplota fázového přechodu mezi dvěma krystalickými fázemi se mění výrazně, což může být stěžejní pro adhezi a proliferaci buněk.

Buňkám se výborně dařilo na nosiči z PCL sterilizovaném pomocí  $\gamma$ -záření. Také nosič desinfikovaný pomocí ethanolu byl příhodným prostředím pro život buněk. Tento typ ošetření, ale není použitelný v tkáňovém inženýrství, protože se jedná pouze o desinfekční metodu a není legislativně schválen.

Obecně se zdá, že PVDF sterilizované všemi typy sterilizace není příliš vhodný podklad pro růst buněk.

Sterilizace nosiče z PLCL  $\gamma$ -zářením a sterilizace nosiče z PVDF pomocí technologie Laoken® se jeví jako špatná volba pro tkáňové inženýrství, protože nepodporuje buněčnou proliferaci a adhezi.

Podobně jako desinfekce ethanolem, je také desinfekce UV nevhodná pro nosič z jakéhokoli materiálu pro tkáňové inženýrství, protože se jedná pouze o dezinfekční metodu nezajišťující dostatečnou míru sterility.

## Seznam literatury

AARYA, Suveda, SIDDHARTHA, A.K. SRIVASTAVA, A. SAHA a M.A. WAHAB, 2009. Effect of 1.25 MeV gamma irradiation in  $\alpha$ -phased PVDF. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* [online]. B.m.: North-Holland, 267(21–22), 3545–3548 [vid. 2018-03-27]. ISSN 0168-583X. Dostupné z: doi:10.1016/J.NIMB.2009.08.026

AYLIFFE, G.A.J., A.D. RUSSELL a W.B. HUGO, 2004. *Disinfection, preservation and sterilisation*. ISBN 1405101997.

BAUME, A.S., P.C. BOUGHTON, N.V. COLEMAN a A.J. RUYS, 2016. Sterilization of tissue scaffolds. In: *Characterisation and Design of Tissue Scaffolds* [online]. B.m.: Elsevier, s. 225–244 [vid. 2017-12-05]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-78242-087-3.00010-9

BHASKAR, Prajwal, Lucy A. BOSWORTH, Richard WONG, Marie A. O'BRIEN, Haydn KRIEL, Eugene SMIT, Duncan A. MCGROUTHER, Jason K. WONG a Sarah H. CARTMELL, 2017. Cell response to sterilized electrospun poly( $\epsilon$ -caprolactone) scaffolds to aid tendon regeneration in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 105(2), 389–397 [vid. 2017-11-14]. ISSN 15493296. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.35911

CAMELIA BURCEA, Claudia, Petru ARMEAN, Liliana BURLIBAȘA, Maria POPA, Ileana IONESCU a Mihaela CERNUȘCĂ-MIȚARIU, 2013. ALCOHOLS AND PHENOLS: THEORETICAL AND PRACTICAL ASPECTS RELATED TO THEIR USE IN MEDICAL PRACTICE. *Journal Expansion European Union* [online]. 8(261) [vid. 2018-03-15]. Dostupné z: [http://isiwebofknowledge.com/products\\_tools/multidisciplinary/webofscience/content/exp/eu/](http://isiwebofknowledge.com/products_tools/multidisciplinary/webofscience/content/exp/eu/)

CRESCENZI, V., G. MANZINI, G. CALZOLARI a C. BORRI, 1972. Thermodynamics of fusion of poly- $\beta$ -propiolactone and poly- $\epsilon$ -caprolactone. comparative analysis of the melting of aliphatic polylactone and polyester chains. *European Polymer Journal* [online]. B.m.: Pergamon, 8(3), 449–463 [vid. 2018-05-10]. ISSN 0014-3057. Dostupné z: doi:10.1016/0014-3057(72)90109-7

CROW, Sue, 1992. Peracetic acid sterilization: a timely development for a busy healthcare industry. *Infection Control and Hospital Epidemiology* [online]. B.m.: Cambridge University Press, 13(2), 111–113 [vid. 2018-03-13]. ISSN 0899823X. Dostupné z: doi:10.2307/30147071

DAI, Zheng, Jennifer RONHOLM, Yiping TIAN, Benu SETHI a Xudong CAO, 2016. Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications.

*Journal of Tissue Engineering* [online]. B.m.: SAGE PublicationsSage UK: London, England, 7, 204173141664881 [vid. 2017-11-16]. ISSN 2041-7314. Dostupné z: doi:10.1177/2041731416648810

DEMPSEY, Donald J. a Ramachandran R. THIRUCOTE, 1988. Sterilization of Medical Devices: A Review. *Journal of Biomaterials Applications* [online]. 3(3), 454–523 [vid. 2018-02-24]. ISSN 15308022. Dostupné z: doi:10.1177/088532828800300303

DOHANY, J.F., A. A. DUKERT a S. S. PRESTON, 1971. Vinylidene fluoride polymers. In: *Encyclopedia of Polymer Science and Technology. Vol. 14: Plastics, Resins, Rubbers, Fibers*. 1. edice. New York: John Wiley & Sons, Inc., s. 805 s. ISBN 0-471-56994-1.

GREGORIO, JR., Rinaldo a Marcelo CESTARI, 1994. Effect of crystallization temperature on the crystalline phase content and morphology of poly(vinylidene fluoride). *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* [online]. B.m.: Wiley-Blackwell, 32(5), 859–870 [vid. 2018-05-13]. ISSN 08876266. Dostupné z: doi:10.1002/polb.1994.090320509

HAIJALI, Faezeh, Saeid TAJBAKHSH a Akbar SHOJAEI, 2017. Fabrication and properties of polycaprolactone composites containing calcium phosphate-based ceramics and bioactive glasses in bone tissue engineering: a review. *Polymer Reviews* [online]. B.m.: Taylor & Francis, 1–44 [vid. 2017-11-10]. ISSN 1558-3724. Dostupné z: doi:10.1080/15583724.2017.1332640

CHAMBERS, S.T., B. PEDDIE a A. PITHIE, 2006. Ethanol disinfection of plastic-adherent micro-organisms. *Journal of Hospital Infection* [online]. 63(2), 193–196 [vid. 2018-03-20]. ISSN 01956701. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhin.2006.01.009

KAMPF, G., 2017. Efficacy of ethanol against viruses in hand disinfection. *Journal of Hospital Infection* [online]. B.m.: W.B. Saunders [vid. 2018-03-15]. ISSN 0195-6701. Dostupné z: doi:10.1016/J.JHIN.2017.08.025

KATAN, E., M. NARKIS a A. SIEGMANN, 1998. The effect of some fluoropolymers' structures on their response to UV irradiation. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. B.m.: Wiley-Blackwell, 70(8), 1471–1481 [vid. 2018-03-27]. ISSN 0021-8995. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1097-4628(19981121)70:8<1471::AID-APP6>3.0.CO;2-A

KAWAI, Heiji, 1969. The piezoelectricity of poly (vinylidene fluoride). *Japanese Journal of Applied Physics* [online]. B.m.: IOP Publishing, 8(7), 975–976 [vid. 2017-11-15]. ISSN 0021-4922. Dostupné z: doi:10.1143/JJAP.8.975

LANZA, R. P. (Robert Paul), Robert S. LANGER a Joseph. VACANTI, 2007. *Principles of tissue engineering*. B.m.: Elsevier Academic Press. ISBN 9780080548845.

- LUKÁŠ, David, 2009. *Lékařské textilie*. B.m.: TUL. ISBN 978-80-7372-475-7.
- MALCHESKY, Paul S., 2008. Peracetic acid and its application to medical instrument sterilization. *Artificial Organs* [online]. B.m.: Blackwell Publishing Ltd, 17(3), 147–152 [vid. 2018-03-13]. ISSN 0160564X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1525-1594.1993.tb00423.x
- MERRITT, Sonia R., Agata A. EXNER, Zhenghong LEE a Horst A. VON RECUM, 2012. Electrospinning and imaging. *Advanced Engineering Materials* [online]. 14(5), B266–B278 [vid. 2018-05-11]. ISSN 14381656. Dostupné z: doi:10.1002/adem.201180010
- MO, X.M., C.Y. XU, M. KOTAKI a S. RAMAKRISHNA, 2004. Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation [online]. 25, 1883–1890. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2003.08.042
- MO, Xiumei a Hans-Joachim WEBER, 2004. Electrospinning P(LLA-CL) Nanofiber: A Tubular scaffold fabrication with circumferential alignment. *Macromolecular Symposia* [online]. B.m.: WILEY-VCH Verlag, 217(1), 413–416 [vid. 2017-12-16]. ISSN 1022-1360. Dostupné z: doi:10.1002/masy.200451337
- MOISAN, M, J BARBEAU, S MOREAU, J PELLETIER, M TABRIZIAN a H YAHIA, 2001. Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 226, 1–21 [vid. 2018-02-24]. Dostupné z: [https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/46068837/s0378-5173\\_2801\\_2900752-920160530-2013-1g7c8tf.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1519482326&Signature=wJgbFRxajf8uKq2ZFzGz5%252BRpxO4%253D&response-content-disposition=inline%253B filename%253](https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/46068837/s0378-5173_2801_2900752-920160530-2013-1g7c8tf.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1519482326&Signature=wJgbFRxajf8uKq2ZFzGz5%252BRpxO4%253D&response-content-disposition=inline%253B filename%253)
- MOISAN, Michel, Jean BARBEAU, Marie-Charlotte CREVIER, Jacques PELLETIER, Nicolas PHILIP a Bachir SAOUDI, 2002. Plasma sterilization. Methods and mechanisms\*. *Pure Appl. Chem* [online]. 74(3), 349–358 [vid. 2018-02-24]. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/31e6/316abb4ed26c1aff304ff19c44850f87edbf.pdf>
- ODELIUS, Karin, Peter PLIKK a Ann-Christine ALBERTSSON, 2008. The influence of composition of porous copolyester scaffolds on reactions induced by irradiation sterilization. *Biomaterials* [online]. B.m.: Elsevier, 29(2), 129–140 [vid. 2018-03-20]. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2007.08.046
- PENNING, J.P, H DIJKSTRA a A.J PENNING, 1993. Preparation and properties of

absorbable fibres from l-lactide copolymers. *Polymer* [online]. B.m.: Elsevier, 34(5), 942–951 [vid. 2017-12-16]. ISSN 0032-3861. Dostupné z: doi:10.1016/0032-3861(93)90212-S

PRUSINER, S B, 1998. Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. B.m.: National Academy of Sciences, 95(23), 13363–83 [vid. 2018-05-12]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/PNAS.95.23.13363

REDIGUIERI, Carolina Fracalossi, Rogério Corte SASSONIA, Kamal DUA, Irene Satiko KIKUCHI, Terezinha De JESUS a Andreoli PINTO, 2016a. Impact of sterilization methods on electrospun scaffolds for tissue engineering. *European Polymer Journal* [online]. B.m.: Elsevier Ltd, 82, 181–195. ISSN 0014-3057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2016.07.016

REDIGUIERI, Carolina Fracalossi, Rogério Corte SASSONIA, Kamal DUA, Irene Satiko KIKUCHI a Terezinha de Jesus Andreoli PINTO, 2016b. Impact of sterilization methods on electrospun scaffolds for tissue engineering. *European Polymer Journal* [online]. B.m.: Pergamon, 82, 181–195 [vid. 2017-11-16]. ISSN 0014-3057. Dostupné z: doi:10.1016/J.EURPOLYMJ.2016.07.016

ROŽEK, Zbigniew, Kaczorowski WITOLD, Petr LOUDA, S F MITURA, Z ROŽEK, W KACZOROWSKI, D LUKÁŠ, P LOUDA a S MITURA, 2008. Potential applications of nanofiber textile covered by carbon coatings development of a building insulation system from waste materials view project potential applications of nanofiber textile covered by carbon coatings [online]. 27(1) [vid. 2018-05-11]. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/26872818>

RUTALA, William A., 1996. Disinfection and sterilization of patient-care items. *Infection Control and Hospital Epidemiology* [online]. B.m.: Cambridge University Press, 17(6), 377–384 [vid. 2018-02-24]. ISSN 0899823X. Dostupné z: doi:10.2307/30141141

SCHELLENBERG, Anne, Robin ROSS, Giulio ABAGNALE, Sylvia JOUSSEN, Philipp SCHUSTER, Annahit ARSHI, Norbert PALLUA, Stefan JOCKENHOEVEL, Thomas GRIES, Wolfgang WAGNER a Masaya YAMAMOTO, 2014. 3D non-woven polyvinylidene fluoride scaffolds: fibre cross section and texturizing patterns have impact on growth of mesenchymal stromal cells. *PLoS ONE* [online]. 9(4) [vid. 2017-11-15]. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0094353

SINHA, V.R., K. BANSAL, R. KAUSHIK, R. KUMRIA a A. TREHAN, 2004. Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. B.m.: Elsevier, 278(1), 1–23 [vid. 2017-12-09]. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/J.IJPHARM.2004.01.044

- SON, Won Keun, Ji Ho YOUK, Taek Seung LEE a Won Ho PARK, 2004. The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer* [online]. 45(9), 2959–2966 [vid. 2018-05-12]. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2004.03.006
- SOPWITH, Will, Tony HART a Paul GARNER, 2002. Preventing infection from reusable medical equipment: a systematic review. *BMC Infectious Diseases* [online]. 2(1), 4 [vid. 2018-03-19]. ISSN 1471-2334. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2334-2-4
- SPRINGTHORPE, V. Susan a Syed A. SATTAR, 1990. Chemical disinfection of virus-contaminated surfaces. *Critical Reviews in Environmental Control* [online]. B.m.: Taylor & Francis Group, 20(3), 169–229 [vid. 2018-03-15]. ISSN 1040-838X. Dostupné z: doi:10.1080/10643389009388396
- TENG, Hongxiang, 2012. Overview of the development of the fluoropolymer industry. *Appl. Sci* [online]. 2, 496–512 [vid. 2017-11-15]. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app2020496
- WOODRUFF, Maria Ann a Diemar Werner HUTMACHER, 2010. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science* [online]. B.m.: Pergamon, 35(10), 1217–1256 [vid. 2017-11-16]. ISSN 0079-6700. Dostupné z: doi:10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2010.04.002
- YARIN, A. L., S. KOOMBHONGSE a D. H. RENEKER, 2001. Taylor cone and jetting from liquid droplets in electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Physics* [online]. 90(9), 4836–4846 [vid. 2018-05-11]. ISSN 0021-8979. Dostupné z: doi:10.1063/1.1408260
- YOGANARASIMHA, Suyog, William R. TRAHAN, Al M. BEST, Gary L. BOWLIN, Todd O. KITTEN, Peter C. MOON a Parthasarathy A. MADURANTAKAM, 2014. Peracetic Acid: A Practical agent for sterilizing heat-labile polymeric tissue-engineering scaffolds. *Tissue Engineering Part C: Methods* [online]. B.m.: Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, 20(9), 714–723 [vid. 2018-03-13]. ISSN 1937-3384. Dostupné z: doi:10.1089/ten.tec.2013.0624

## seznam obrázků

Obrázek 1.....reakce ethylenoxidu.....	23
Obrázek 2....mechanismus působení plasmatu na germy.....	28
Obrázek 3....schéma technologie STERRAD®.....	29
Obrázek 4....reakce DNA katalyzovaná UV.....	33
Obrázek 5 ....vybrané fotografie SEM: morfologie PCL.....	49
Obrázek 6.... vybrané fotografie SEM: morfologie PLCL.....	51
Obrázek 7..... vybrané fotografie SEM: morfologie PVDF.....	53
Obrázek 8...fotografie fluorescenční mikroskopie PCL.....	68
Obrázek 9....SEM buněk na PCL 1.den experimetu.....	70
Obrázek 10.... SEM buněk na PCL 7.den experimetu.....	70
Obrázek 11....fotografie fluorescenční mikroskopie PLCL.....	72
Obrázek 12....SEM buněk na PLCL 1.den experimetu.....	74
Obrázek 13.... SEM buněk na PLCL 7.den experimetu.....	76
Obrázek 14....fotografie fluorescenční mikroskopie PVDF.....	77
Obrázek 15....SEM buněk na PVDF 1.den experimetu.....	79
Obrázek 16.... SEM buněk na PVDF 7.den experimetu.....	80



## seznam grafů

Graf 1....definice D hodnoty.....	19
Graf 2.... Youngův modul PCL pro různé sterilizace.....	35
Graf 3....prodloužení při přetržení.....	36
Graf 4.... změna molekulových hmotností PLCL sterilizace $\gamma$ -zářením.....	38
Graf 5....chromatogram PCL, pro různé sterilizace.....	55
Graf 6....chromatogram PLCL, pro různé sterilizace.....	56
Graf 7....chromatogram PVDF, pro různé sterilizace.....	57
Graf 8....kalorimetrické křivky PCL, pro různé sterilizace.....	60
Graf 9....kalorimetrické křivky PLCL, pro různé sterilizace.....	61
Graf 10....kalorimetrické křivky PVDF, pro různé sterilizace.....	62
Graf 11....metabolická aktivita buněk na PCL, pro různé sterilizace.....	67
Graf 12....počty buněk na mm <sup>2</sup> PCL, pro různé sterilizace.....	69
Graf 13....metabolická aktivita buněk na PLCL, pro různé sterilizace.....	71
Graf 14....počty buněk na mm <sup>2</sup> PLCL, pro různé sterilizace.....	73
Graf 15....metabolická aktivita buněk na PVDF, pro různé sterilizace.....	76
Graf 16....počty buněk na mm <sup>2</sup> PVDF, pro různé sterilizace.....	78

## seznam tabulek

Tabulka 1 teplota skelného přechodu a tání, různé složení PLCL.....	17
Tabulka 2 charakteristika procesů, jimiž se práce zabývá.....	20
Tabulka 3 parametry sterilizačních cyklů autoklávu.....	21
Tabulka 4 zvláknovací parametry PCL.....	42
Tabulka 5 zvláknovací parametry PCL.....	42
Tabulka 6 zvláknovací parametry PCL.....	42
Tabulka 7 změny krystalinity PCL.....	59
Tabulka 8 změny teploty skelného přechodu PLCL.....	61
Tabulka 9 změny teploty fázového přechodu a tání PVDF.....	64