

# Stabilizace funkcionalizovaných nanovláknenných materiálů založených na polyvinylalkoholu

## Bakalářská práce

*Studijní program:*

B3942 Nanotechnologie

*Studijní obor:*

Nanomateriály

*Autor práce:*

**Jakub Drabina**

*Vedoucí práce:*

Ing. Věra Jenčová, Ph.D.  
Katedra chemie





## Zadání bakalářské práce

# Stabilizace funkcionalizovaných nanovláknenných materiálů založených na polyvinylalkoholu

*Jméno a příjmení:* **Jakub Drabina**  
*Osobní číslo:* M18000123  
*Studijní program:* B3942 Nanotechnologie  
*Studijní obor:* Nanomateriály  
*Zadávací katedra:* Katedra chemie  
*Akademický rok:* **2020/2021**

### Zásady pro vypracování:

1. Vypracování rešerše na dané téma.
2. Charakteristika fyzikálně-chemických vlastností použitých nanovláknenných materiálů (morfologie, krystalinita.)
3. Stabilizace nanovláknenných materiálů pomocí metody freeze-thaw.
4. Analýza vlivu použitých teplot a počtu cyklů freeze-thaw na rozpustnost PVA a uvolňování proteinů.
5. Vyhodnocení výsledků.

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

dle potřeby dokumentace  
30 stran  
tištěná/elektronická  
Čeština



### **Seznam odborné literatury:**

1. Bacakova, L., Zikmundova, M., Pajorova, J., Broz, A., Filova, E., Blanquer, A., Matejka, R., Stepanovska, J., Mikes, P., Jencova, V., Kostakova, E.K., Sinica, A., 2019. Nanofibrous Scaffolds for Skin Tissue Engineering and Wound Healing Based on Synthetic Polymers. Appl. Nanobiotechnology. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88744>.
2. Bajpai, A., Saini, R., 2005. Preparation and characterization of biocompatible spongy cryogels of poly(vinyl alcohol)-gelatin and study of water sorption behaviour. Polym. Int. 54, 1233-1242. <https://doi.org/10.1002/pi.1813>.
3. Ben Halima, N., 2016. Poly(vinyl alcohol): review of its promising applications and insights into biodegradation. RSC Adv. 6, 39823-39832. <https://doi.org/10.1039/C6RA05742J>.
4. Koprivova, B., Lisnenko, M., Solarska-Sciuk, K., Prochazkova, R., Novotny, V., Mullerova, J., Mikes, P., Jencova, V., 2020. Large-scale electrospinning of poly (vinylalcohol) nanofibers incorporated with platelet-derived growth factors. Express Polym. Lett. 14, 987-1000. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2020.80>.

*Vedoucí práce:*

Ing. Věra Jenčová, Ph.D.  
Katedra chemie

*Datum zadání práce:*

9. října 2020

*Předpokládaný termín odevzdání:*

17. května 2021

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

L.S.

prof. Ing. Josef Šedlbauer, Ph.D.  
vedoucí katedry

## Prohlášení

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

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

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

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

Současně čestně prohlašuji, že text elektronické podoby práce vložený do IS/STAG se shoduje s textem tištěné podoby práce.

Beru na vědomí, že má bakalářská práce bude zveřejněna Technickou univerzitou v Liberci v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů.

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

13. května 2021

Jakub Drabina

## PODĚKOVÁNÍ

Rád bych tímto poděkoval vedoucí mé bakalářské práce Ing. Věře Jenčové PhD. za veškeré připomínky, odbornou pomoc, a především za pevné nervy a trpělivost po celou dobu psaní této bakalářské práce. Dále moje poděkování patří mému konzultantovi Ing. Maximu Lisnenkovi za jeho vstřícnost a ochotu kdykoliv pomoci s danou problematikou. Poděkování také patří Ing. Janu Valterovi PhD., Ing. Janě Müllerové PhD., Ing. Luboši Běhálkovi PhD. a Ing. Šárce Hauzerové a Mgr. Vítu Novotnému za odborné konzultace, ochotné jednání a jejich čas. Chromatografické analýzy byly provedeny díky finanční podpoře projektu MŠMT NanoEnviCz číslo LM2018124. Nakonec bych rád poděkoval i své rodině za podporu a trpělivost.

## ABSTRAKT

Z hlediska struktury jsou polymerní materiály vyrobené pomocí elektrostatického zvlákňování velice podobné extracelulární hmotě. Takto vyrobené nanovláknenné vrstvy tvoří ideální prostředí pro proliferaci, buněčnou adhezi nebo jako řízená doprava léčiv. Nanovláknenné biodegradabilní polymerní materiály s inkorporovanými proteiny mohou čelit několika překážkám při využití jako řízená doprava léčiv pro podporu hojení ran a regenerace tkání. V případě uvolňování inkorporovaných proteinů se u většiny materiálů projevuje efekt „burst release“, kdy dochází k uvolnění více jak 90 % látek v prvních 24 hodinách. Tato bakalářská práce se zabývá fyzikální stabilizací nanovláknenných materiálů vyrobených z PVA s vysokým stupněm hydrolyzy (98 %) zvlákněných pomocí střídavého (AC) elektrického zvlákňování, kde ve snaze snížit rozpustnost PVA, a tím pádem zvolnit průběh uvolňování proteinů z nanovláknenných scaffoldů, byla použita metoda síťování „freeze-thaw“ (F-T), která je založena na posilování vodíkových můstků mezi molekulami PVA. Cílem práce bylo sledovat vliv metody F-T a počtu cyklů na uvolňování inkorporovaných proteinů, na rozpustnost a krystalinitu PVA. Vyrobené PVA nanovláknenné scaffoldy měli v případě čistého PVA větší průměrnou hodnotu průměru vláken ( $384 \pm 120$  nm) než v případě materiálu PVA\_TL s inkorporovanými proteiny ( $274 \pm 74$  nm). Jeden cyklus metody F-T byl nastaven na zmrazení materiálu při  $-20$  °C na 16 hodin a následné rozmrazování při  $+4$  °C po dobu 8 hodin. Na základě výsledků ze spektrofotometrie bylo možné pozorovat trend snižování rozpustnosti PVA po 24 hodinách při použití metody F-T o 11 % po 5 cyklech a o 12 % po 10 cyklech. Při uvolňování proteinů bylo naměřeno snížení po 24 hodinách o 17 % po 5 cyklech F-T a o 26 % po 10 cyklech F-T.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** Elektrostatické zvlákňování, Polyvinylalkohol, nanovláknna, růstové faktory, freeze-thaw, tkáňové inženýrství, scaffold

## **ABSTRACT**

In terms of structure, polymeric materials produced by electrospinning are very similar to extracellular matrix. Nanofibrous layers produced this way form an ideal environment for proliferation, cell adhesion, or as controlled drug delivery. Nanofibrous biodegradable polymeric materials with incorporated proteins may face several obstacles when used as controlled delivery of drugs for support of wound healing and tissue regeneration. In the case of the release of incorporated proteins, most materials show a “burst release” effect, during which more than 90 % of substances are released in the first 24 hours. This bachelor thesis deals with the physical stabilisation of nanofibrous materials made of PVA with a high degree of hydrolysis (98 %), which are produced by AC electrospinning. Physical crosslinking method “Freeze-thaw” (F-T), which is based on strengthening hydrogen bonds in-between PVA molecules, was used to reduce the solubility of PVA and thus slow down the release of proteins from nanofibrous scaffolds. The aim of this thesis was to monitor the effect of the F-T method and the number of cycles on the release of incorporated proteins, on the solubility and crystallinity of PVA. The electrospun PVA nanofiber scaffolds had a higher average value of fibre diameter ( $384 \pm 120$  nm) in the case of pure PVA than in the case of PVA\_TL material with incorporated proteins ( $274 \pm 74$  nm). One cycle of the F-T method was set to freeze material at  $-20$  °C for 16 hours and then thawing at  $+4$  °C for 8 hours. Based on the results from spectrophotometry, it was possible to observe a trend of decreasing solubility of PVA after 24 hours using the F-T method by 11 % after 5 cycles and by 12 % after 10 cycles. After 24 hours a decrease by 17 % after 5 cycles and by 26 % after 10 cycles of the F-T method was measured upon a protein release.

**KEYWORDS:** Electrospinning, Polyvinyl alcohol, nanofibers, growth factors, freeze-thaw, tissue engineering, scaffold

# Obsah

Obsah.....	8
Seznam použitých zkratk.....	13
Úvod.....	14
TEORETICKÁ ČÁST.....	15
1. Nanovláknenné materiály pro tkáňové inženýrství.....	15
1.1. Tkáňové inženýrství kůže a jeho problematika.....	15
1.2. Polymery pro tkáňové inženýrství.....	17
1.2.1. Polymery rozpustné ve vodě.....	20
1.3. Příprava materiálů pomocí elektrostatického zvlákňování.....	23
1.3.1. DC electrospinning.....	24
1.3.2. AC electrospinning.....	24
2. Funkcionalizace nanovláknenných materiálů.....	26
2.1. Biologicky aktivní látky pro hojení kožních ran.....	28
2.1.1. Růstové faktory.....	29
3. Stabilizace nanovláknenných materiálů.....	29
3.1. Chemické síťování.....	30
3.2. Fyzikální síťování.....	30
3.2.1. Metoda „freeze-thaw“.....	31
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	33
4. Materiály a metody.....	33
4.1. Seznam použitých chemikálií.....	33
4.2. Seznam použitých přístrojů.....	35
4.3. Příprava roztoků pro zvlákňování.....	35
4.4. Výroba materiálu pomocí AC spinningu.....	36
4.5. Analýza připravených materiálů.....	37
4.5.1. Analýza morfologie materiálů.....	37



4.6.	Stabilizace pomocí „freeze-thaw“ .....	37
4.6.1.	Příprava jednotlivých vzorků pro testování.....	37
4.6.2.	Analýza rozpustnosti materiálů pomocí spektrofotometrie.....	38
4.6.3.	Analýza rozpustnosti materiálů pomocí GPC .....	39
4.6.4.	Analýza krystalinity PVA pomocí DSC.....	40
4.6.5.	Analýza koncentrace proteinů podle Bradforda .....	40
4.6.6.	Analýza uvolňování proteinů pomocí SDS-PAGE .....	41
5.	Výsledky a diskuze.....	43
5.1.	Vstupní materiály.....	43
5.1.1.	Příprava nanovlákných scaffoldů.....	43
5.1.2.	Morfologie vstupních nanovlákných materiálů .....	45
5.2.	Stabilizace pomocí „freeze-thaw“ .....	46
5.2.1.	Analýza morfologie materiálů po aplikaci metody F-T .....	47
5.2.2.	Analýza rozpustnosti PVA po F-T .....	49
5.2.3.	Analýza uvolňování proteinů.....	51
5.2.4.	Analýza krystalinity PVA pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie .	54
	Závěr.....	56
	Seznam použité literatury .....	58
	Přílohy .....	63

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Popis řezu lidskou kůží (převzato z Human skin   anatomy, 2018).....	15
Obrázek 2: Stádia hojení rány (upraveno, převzato z Wound Healing & OCT, 2017)..	16
Obrázek 3: Hydrolýza polyvinylacetátu (převzato z Polimeranalogichnyie prevrasheniya).....	22
Obrázek 4: Různé stupně hydrolýzy PVA, plně hydrolyzovaný (A), částečně hydrolyzovaný (B), převzato z (Ben Halima 2016) .....	22
Obrázek 5: Zařízení pro elektrostatické zvlákňování převzato z (Schiffman a Schauer 2008).....	24
Obrázek 6: Nanovláknový rukáv z AC electrospinningu převzato z (Valtera et al. 2019) .....	25
Obrázek 7: Jednotlivé metody funkcionalizace, (A) povrchová úprava, (B) zvlákňování ze směsi, (C) koaxiální zvlákňování, (D) emulzní zvlákňování, převzato z (Zhang et al. 2017).....	26
Obrázek 8: Síťovací reakce mezi PVA a glutaraldehydem převzato z (Yan et al. 2015) .....	30
Obrázek 9: Vznik porézního PVA hydrogelu pomocí metody F-T; 1, makromolekuly v roztoku; 2, zmrazené rozpouštědlo; 3, kapalná mikrofáze; 4, polymerní síť; 5, makropóry, upraveno a převzato z (Alves et al. 2011) .....	31
Obrázek 10: Vodíkové můstky mezi řetězci PVA (převzato z Chemistry Stack Exchange, 2018).....	32
Obrázek 11: Zařízení pro AC electrospinning.....	45
Obrázek 12: SEM snímky a histogramy vstupních materiálů: horní snímek – PVA, dolní snímek – PVA_TL, zvětšení 5000×, měřítko 10 μm.....	46
Obrázek 13: SEM snímky a histogramy materiálů po F-T: horní snímek – PVA po 5 cyklech, dolní snímek – PVA po 10 cyklech, zvětšení 5000×, měřítko 10 μm .....	48
Obrázek 14: SEM snímky a histogramy materiálů po F-T: horní snímek – PVA_TL po 5 cyklech, dolní snímek – PVA_TL po 10 cyklech, zvětšení 5000×, měřítko 10 μm.....	49
Obrázek 15: Analýza uvolňování proteinů pomocí SDS-PAGE u vstupních materiálů PVA_TL .....	53
Obrázek 16: Analýza uvolňování proteinů pomocí SDS-PAGE u materiálů PVA_TL po 5 cyklech F-T.....	53

Obrázek 17: Analýza uvolňování proteinů pomocí SDS-PAGE u materiálů PVA_TL po 5 cyklech F-T.....	54
Obrázek 18: DSC Křivky všech připravených materiálů .....	55

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Využívané polymery v tkáňovém inženýrství.....	19
Tabulka 2: Použité chemikálie .....	33
Tabulka 3: Použité roztoky.....	34
Tabulka 4: Použité přístroje a programy .....	35
Tabulka 5: Nastavení zařízení a okolní podmínky pro AC spinning .....	37
Tabulka 6: Složení použitých roztoků PVA pro zvlákňování: koncentrace PVA v hmotnostních procentech, molekulární hmotnost ( $M_w$ ), stupeň hydrolyzy PVA, koncentrace trombocytárního lyzátu (=TL) v hmotnostních procentech .....	44
Tabulka 7: Parametry pro AC electrospinning .....	44
Tabulka 8: Střední vlakenné průměry vstupních materiálů, jejich plošná hmotnost a statistická analýza průměrů (SD = směrodatná odchylka) .....	45
Tabulka 9: Průměry vláken a statistická analýza po aplikaci 5 a 10 cyklů metody F-T na PVA a PVA_TL (SD = směrodatná odchylka) .....	47

## Seznam grafů

Graf 1: Kalibrační křivka PVA (vztah mezi absorbcí při 630 nm a koncentrací PVA) .....	38
Graf 2: Kalibrační křivka PVA (závislost intenzity na koncentraci PVA).....	39
Graf 3: Kalibrační křivka BSA (závislost absorpance při 595 nm na koncentraci BSA) .....	41
Graf 4: Spektroskopicky určené množství rozpuštěného PVA v PBS z navážených 30 mg PVA po 0, 5 a 10 cyklech F-T .....	50
Graf 5: Spektroskopicky určené množství rozpuštěného PVA v PBS z navážených 30 mg PVA_TL po 0, 5 a 10 cyklech F-T .....	50

Graf 6: Množství kumulativně uvolněných proteinů v závislosti na čase stanovené spektrofotometricky z 30 mg naváženého materiálu PVA_TL po 0, 5 a 10 cyklech F-T .....	52
Graf 7: Výsledky měření krystalinity PVA pomocí DSC .....	55
Obrázek 18: DSC Křivky všech připravených materiálů .....	55
Graf 8: Množství uvolněného PVA naměřeného pomocí GPC pro vstupní materiály PVA a PVA_TL .....	63
Graf 9: Množství uvolněného PVA naměřeného pomocí GPC pro materiály PVA a PVA_TL po aplikaci 5 cyklů F-T .....	63
Graf 10: Množství uvolněného PVA naměřeného pomocí GPC pro materiály PVA a PVA_TL po aplikaci 10 cyklů F-T .....	64

## Seznam použitých zkratk

- AC – Střídavý proud
- BSA – Hovězí sérový albumin
- CBB – Coomassie Blue Brilliant
- DC – Stejnoseměrný proud
- dH<sub>2</sub>O – Destilovaná voda
- DMSO – Dimethylsulfoxid
- DNA – Deoxyribonukleová kyselina
- DSC – Diferenciální skenovací kalorimetrie
- ECM – extracelulární matrix
- F-T – freeze-thaw
- GF – Růstový faktor
- GPC – Gelová permeační chromatografie
- HA – Kyselina hyaluronová
- PAGE – Polyakrylamidová gelová elektroforéza
- PBS – Fosfátový pufr
- PCL – Polykaprolakton
- PEG – Polyethylenglykol
- PEO – Polyethylenoxid
- PGA – Polyglykolová kyselina
- PLA – Polymléčná kyselina
- PU – Polyuretany
- PVA – Polyvinylalkohol
- SDS – Dodecylsírán sodný
- SEM – Skenovací elektronová mikroskopie
- TE – Tissue engineering (= Tkáňové inženýrství)
- TEMED – Tetramethylethyldiamin
- TL – Trombocytární lyzát
- Tris – Tris(hydroxymethyl)aminomethan

## Úvod

Oblast tkáňového inženýrství zažila v posledních desetiletích velký rozvoj. Vzrostl zájem o nové postupy a možnosti léčby chronicky postižených tkání. Problémem je neideální prostředí pro proliferaci buněk v případě použití dostupných léčebných metod, nebo potenciální negativní odezvou imunitního systému těla, pokud byl použit implantát. V těchto případech se snaží tkáňové inženýrství vytvořit umělé nanovláknenné scaffoldy, u kterých by nedocházelo k odmítnutí těla příjemce. Pro takovéto účely jsou vedeny výzkumy na syntetických biodegradabilních polymerech, které lze snadno modifikovat z pohledu jejich fyzikálně-chemických vlastností v závislosti na místě jejich využití. Při využití funkcionalizovaných materiálů proteiny obvykle dochází k brzkému uvolnění navázaných proteinů takzvaný „burst release“, který lze omezit pomocí snížení rozpustnosti vyrobených materiálů pomocí dodatečného síťování.

Cílem této práce je fyzikální stabilizace vyrobených PVA nanovláknenných vrstev s inkorporovanými proteiny pomocí metody „freeze-thaw“ (F-T) a vliv počtu cyklů na výslednou rozpustnost a krystalinitu materiálu včetně vlivu na uvolňování proteinů. Teoretická část se zaměřuje na úvod do tkáňového inženýrství, na materiály využívané v této oblasti a také na samotnou přípravu nanovláknenných vrstev. Dále jsou uvedeny rozdílné druhy funkcionalizace materiálů s menší úvodem do problematiky růstových faktorů. Další kapitola se vysloveně zaměřuje na stabilizaci nanovláknenných materiálů pomocí různých metod. Experimentální část se potom zabývá analýzou připravených materiálů z pohledu morfologie, rozpustnosti PVA, krystalinity PVA včetně sledování uvolňování inkorporovaných proteinů.

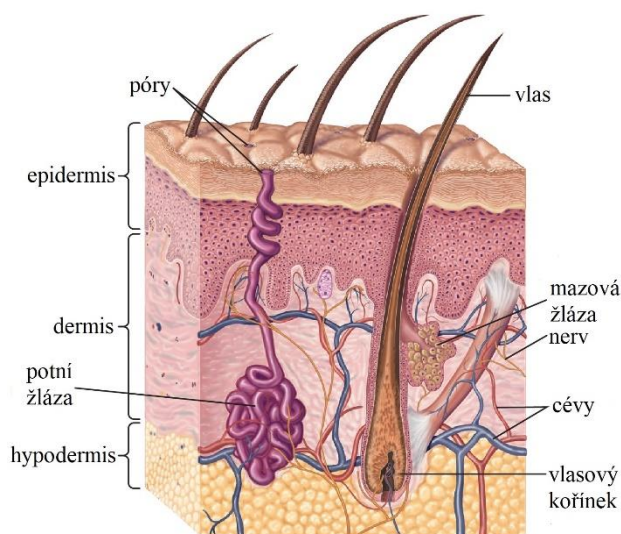
# TEORETICKÁ ČÁST

## 1. Nanovláknenné materiály pro tkáňové inženýrství

### 1.1. Tkáňové inženýrství kůže a jeho problematika

Termín tkáňové inženýrství (= TE, Tissue Engineering) byl poprvé použit roku 1987 na konferenci National Science Foundation. Samotné počátky tkáňového inženýrství jsou datovány do začátku 90. let, kdy došlo k uznání oboru, jakožto vědecké disciplíny. Tento obor kombinuje principy techniky a přírodních věd. Cílem TE je navrátit plnou funkci danému orgánu či tkáni za pomoci vytvořených konstruktů či nosičů, které mohou obsahovat buňky samotného pacienta a tím snížit potřebu dárců. Dostupné řešení se většinou potýkají s negativní reakcí lidského imunitního systému, čemuž se TE snaží předejít. Existují dvě hlavní strategie, jak přistupovat k TE. První je transplantace vypěstované tkáně *in vitro*, která se skládá z umělé matrice obohacené o buňky a růstové faktory. Druhá zahrnuje *in situ* regeneraci tkáně za pomoci kombinace růstových faktorů a umělé matrice, jež mají vyvolat regeneraci tkáně pacienta *in vivo*. (Ratner et al. 2013) Pro dosažení ideálního výsledku je nutné vytvoření TE „triády“, která se skládá z trojrozměrného prostředí ve formě nosiče, odpovídající buňkám a růstovým faktorům. (Akter et al. 2016)

Jedna z částí tohoto oboru se specializuje na vývoj a výrobu potenciálních kožních substituentů. Pro lepší porozumění problematice tkáňového inženýrství kůže, je důležité znát anatomii lidské kůže.



Obrázek 1: Popis řezu lidskou kůží (převzato z *Human skin | anatomy*, 2018)

Kůže představuje největší orgán lidského těla, jež je rozdělen do tří hlavních částí: epidermis, dermis a hypodermis (= podkožní tkáň). Epidermis je vnější část kůže, v jejímž složení dominují keratinocyty a melanocyty. Dermis se skládá z tvrdé pojivové tkáně, vlasových folikul, mazových a potních žláz. Membrána, jež odděluje dvě výše zmíněné vrstvy obsahuje především progenitorové buňky, jejichž funkcí je kontinuální seberegenerace a diferenciaci na keratinocyty. Poslední vrstva je tvořena převážně tukem a pojivovou tkání. Kůže má zásadní význam v udržování celkové homeostázy, poněvadž musí aktivně reagovat na změny ve vnějším i vnitřním prostředí. Dosavadní znalosti o funkcích lidské kůže zahrnují: termoregulaci těla, ochranu před UV zářením, produkci vitamínu D, samostatná regenerace v postiženém místě, senzorké receptory a polopropustná mechanická bariéra. (Wood 2019)

Jedním z cílů tkáňového inženýrství je výroba vhodných nosičů (= scaffoldů). Pro tyto účely jsou ideální polymerní nanovláknenné nosiče. Vysoký poměr plochy a objemu vláken, velká porozita, propojenost jednotlivých pórů a možnost modifikovat tyto vlastnosti během výroby těchto nosičů, jsou jedny z vlastností, proč se využívají právě polymery pro výrobu takovýchto nosičů v TE. Dále je můžeme využít na zapouzdření či pro pozvolnější uvolňování léčiv (Zhang et al. 2017) Na výrobu nanovláknenných nosičů se využívá řada dostupných technologií. Jednou z nejvyužívanějších je elektrostatické zvláknění polymerních vláken, kde výsledné materiály jsou použity převážně v regenerativní medicíně zaměřující se na kosti, kůži a cévy. (Yang et al. 2011) Další možností výroby nosičů je 3D tisk, u kterého je možné velice přesně definovat výsledné fyzikální vlastnosti nosiče. Bohužel se musí potýkat s technickými potížemi souvisejícími s citlivostí živých buněk během procesu biotisku. (Pina et al. 2019)

Proces hojení lidské kůže zahrnuje několik jednotlivých stupňů viz Obrázek 2.



Obrázek 2: Stádia hojení rány (upraveno, převzato z *Wound Healing & OCT*, 2017)



Prvním stupněm hojení rány po poškození kůže je hemostáza. Následuje zánět dané rány, který je následně nahrazen proliferací buněk. Během proliferace dochází k tvorbě ECM (extracelulární matrix), nových cév a též tvorbě granulační tkáně. Celý proces je zakončen samotnou remodelací tkáně. (Akter et al. 2016) Problém, se kterým se potýká TE, je u chronických ran, kdy se proces hojení zastaví ve zánětlivé fázi. Při akutním poranění během zánětlivé fáze dochází k odstranění nekrotické tkáně a nečistot z rány, a zároveň dochází k aktivaci fibroblastů. Během prvních 72 hodin prakticky vymizí neutrofilů z akutní rány, zatímco u chronické rány jsou přítomny během celého hojivého procesu. Konečným výsledkem je pouze prohloubení zánětu v daném místě. (Menke et al. 2007)

Když se podíváme na veřejně dostupné prostředky, většina z nich se soustředí na léčbu popálenin nebo chronických poranění (např. vředy). Pro zajištění co nejlepšího výsledku je nutné dbát na věk pacienta a též na místo, kde je kůže poškozena. Popáleniny jsou například spojeny s nadměrnou zánětlivou reakcí. Problémy, se kterými se dosavadní řešení potýkají, zahrnují možnost odmítnutí náhrady imunitním systémem pacienta, neideální neinvazivní přilnutí na ránu, nebo nenávratné ztráty přirozených funkcí kůže. Mezi tyto funkce patří nedokonalá regenerace vlasových kořínek a žláz. (Wood 2019)

Dnešní doba nabízí několik komerčně dostupných řešení pro léčbu postiženého místa. Mezi nejpoužívanější možnosti, které jsou lidskému tělu nejbližší, řadíme kožní aloštep, xenoštep z prasečí kůže, kultivované epidermální autoštěpy nebo amnion. Kožní aloštěpy se získávají od souhlasných dárců po smrti a jsou uloženy zmrazené v tkáňových bankách. Hlavní nevýhodou je možnost imunogenního odmítnutí příjemcem. Kultivované epidermální autoštěpy zatěžuje vysoká cena, špatná úspěšnost přichycení a obtížná manipulace se vzorky. Pacient může podstoupit autologní transplantaci kůže, kdy se pomocí jednoduchého nástroje odstraní epidermis a vrchní část dermis. Štěp je následně upraven tak, aby se zvětšila plocha. Úskalím tohoto řešení je opakovaný odběr na stejném místě, poté může dojít ke zjizvení či opožděné hojení. (Akter et al. 2016)

## 1.2. Polymery pro tkáňové inženýrství

Polymery jsou díky svojí vysoké variabilitě vhodné pro využití i v oblasti tkáňového inženýrství. Jedním z důvodů, proč se využívají polymery, je že vyrobené nanovláknenné nosiče mohou mít díky správné volbě materiálu velice podobné vlastnosti jako ECM.

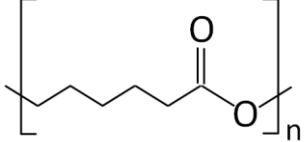
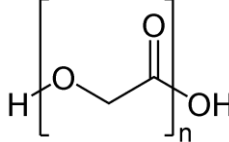
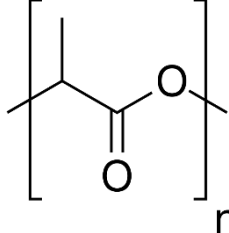
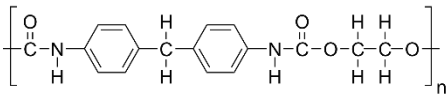
Abychom dosáhli podobných vlastností jako ECM, je nutné, aby vyrobené materiály měly velký povrch na relativně malé ploše. Společně s velkou porozitou materiálu můžeme docílit zajištění ideálních podmínek pro proliferaci buněk a výměnu potřebných látek (např. živin nebo kyslíku). Zároveň je důležité, aby materiál, ze kterého je nosič vyrobený, byl biokompatibilní. Při jeho rozkladu by neměly vznikat cytotoxické produkty. Proto se většinou volí nosiče vyrobené ze syntetických polymerů, které dodají danému nosiči správné mechanické a fyzikálně-chemické vlastnosti, do nichž jsou následně inkorporovány biologicky aktivní látky. (Asadi et al. 2020)

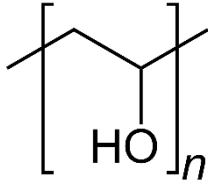
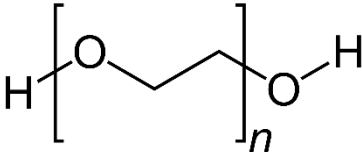
Dělení polymerů lze založit na jejich chemickém původu, poté je můžeme rozdělit na syntetické nebo přírodní. Pro tkáňové inženýrství jsou důležité další vlastnosti, mezi které řadíme jejich degradabilitu. Jednou z dalších důležitých vlastností je jejich biokompatibilita, která je rozděluje na bioinertní, bioaktivní a biotolerantní. (Tomlins 2016)

Syntetické polymery jsou výjimečné svojí relativně jednoduchou syntézou ve velkém měřítku a možností modifikace pro získání požadovaných vlastností. Samostatně jsou však velice biologicky neaktivní, a proto je většinou nutná inkorporace určitých biologicky aktivních látek. Mezi nejpoužívanější zástupce syntetických polymerů v oboru medicíny se řadí PLA (kyselina polymlečná), PGA (polyglykolová kyselina), PCL (polykaprolakton), PEG (polyethylenglykol), PU (polyuretan) a PVA (polyvinylalkohol) (Romero et al. 2020).

Za přírodní polymery považujeme látky, které syntetizuje přímo lidský organismus, nebo jiné živé organismy, jako jsou bakterie, hmyz, korýši, rostliny či houby. Většinou to jsou proteiny (kolagen, či jeho deriváty želatina, elastin, fibrin atd.), nebo polysacharidy v nesulfátované formě (kyselina hyaluronová) nebo sulfátované formě (glykosaminglykany). Velikou výhodou nanovláknenných nosičů vyrobených přímo z přírodních polymerů je jejich větší podobnost s ECM než u syntetických polymerů a lepší buněčná adheze. V kombinaci se syntetickými polymery zvyšují jejich bioaktivitu, zároveň tak syntetické zlepšují mechanické vlastnosti a zvláknitelnost. Dobře rozložitelné polymery v lidském těle se používají jako přímé nosiče v tkáňovém inženýrství. Zatímco polymery produkované jinými organismy jsou většinou špatně odbouratelné pro lidské tělo kvůli nedostatku specifických enzymů. Takové polymery jsou využívány spíše na obvazy na rány nebo doručení léčiv do těla. (Bacakova et al. 2020)

Tabulka 1: Využívané polymery v tkáňovém inženýrství

Polymer	Charakteristika
<p data-bbox="347 376 571 409">Polykaprolakton</p> 	<p>Polykaprolakton (PCL) se vyznačuje svojí nízkou teplotou tání 60 °C a velice nízkou rychlostí degradace v lidském organismu. Jelikož je PCL velice hydrofobní, nemá bioaktivní povrch a ani neobsahuje adhezní faktory, není tak nevhodný pro samotnou regenerativní medicínu. Můžeme však jeho velkou stabilitu v lidském těle využít pro zlepšení vlastností přírodních polymerů. Díky své ceně, viskoelasticitě a velmi dobré kompatibilitě se směsí je atraktivní pro 3D tisk. (Borkar et al. 2021)</p>
<p data-bbox="304 745 619 779">Kyselina polyglykolová</p> 	<p>Kyselina polyglykolová (PGA) má velice podobnou chemickou strukturu jako PLA, ale je daleko více hydrofilní, tudíž podstupuje relativně rychlé degradaci <i>in vivo</i>. Využívá se především na tvorbu nanovláknenných nosičů. PGA se převážně vyrábí z ropných zdrojů, z toho důvodu je cena vyšší než u PLA. Velkým zlomem pro širší využití PGA by mohl být přechod na výrobu PGA z odpadních plynů z uhelných chemických závodů. (Jem a Tan 2020)</p>
<p data-bbox="276 1193 643 1227">Kyselina polymléčná (PLA)</p> 	<p>Kyselina polymléčná (PLA) patří do skupiny alifatických polyesterů. Vzniká přímou kondenzační polymerizací kyseliny mléčné, nebo polymerizací otevřeného kruhu cyklického laktidového dimeru. Suroviny, ze kterých jsou tyto polymery vyráběny, jsou z ekologicky šetrných materiálů, jako například cukrová třtina, nebo kukuřičný škrob. PLA je jedním z nejvíce používaných polymerů pro aplikace v medicíně, díky svým netoxickým vedlejším produktům, ale také díky své biokompatibilitě, snadnosti zpracování, mechanickým a fyzikálním vlastnostem (vysoká pevnost). (Nofar et al. 2019) Degradace PLA může v lidském těle způsobit zánětlivou reakci, tudíž byla zkoumána potenciální inkorporace keramiky pro negování této vlastnosti. (Alizadeh-Osgouei et al. 2019)</p>
<p data-bbox="347 1709 571 1742">Polyuretany (PU)</p> 	<p>Polyuretany (PU) jsou velice často využívány v medicíně pro své mechanické vlastnosti, stabilitu a biokompatibilitu. Právě díky vysoké stabilitě, odolnosti proti únavě, biokompatibilitě a inertnosti s lidským organismem jsou využívány převážně v kardiostimulátorech, cévních štěpech a umělých srdečních chlopních. (Ratner et al. 2013)</p>

<p>Polyvinylalkohol (PVA)</p> 	<p>Polyvinylalkohol (PVA) patří mezi vodorozpustné polymery. Díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem je řazen mezi nejvyužívanější polymery v komerčních, průmyslových a lékařských aplikacích. (Ben Halima 2016) Mezi časté medicínské aplikace patří kontaktní čočky, umělé orgány, obvazy na rány nebo systémy pro cílenou dopravu léčiv. (Kamoun et al. 2015)</p>
<p>Polyethylenglykol (PEG)</p> 	<p>Polyethylenglykol (PEG) je hydrofilní syntetický polymer, který je využíván v materiálech, jež mohou rozložit pouze specificky určené enzymy takzvané MMP (matrixové metaloproteázy). Tyto kopolymery jsou složeny z polyethylenglykolu a oligopeptidů. Podobnému enzymatickému rozkladu podléhají přirozené složky ECM, jako například kolagen. Vzniklé blokové kopolymery jsou zesíťeny za vzniku hydrogelových sítí, které mohou být rozloženy buněčně vyloučenými MMP. (Guo a Ma 2014)</p>

### 1.2.1. Polymery rozpustné ve vodě

Polymery rozpustné ve vodě vytvářejí hydrogely, což jsou zesíťené hydrofilní polymery, které mají schopnost absorbovat velké množství vody bez rozpuštění. Vzniklé hydrogely sdílí některé strukturální vlastnosti s měkkou tkání, díky čemuž se hodí pro využití v TE. (Guo a Ma 2014) Následně bych se rád podrobněji věnoval jednotlivým zástupcům jak přírodních polymerů rozpustných ve vodě, tak i syntetickým polymerům, na které je tato práce zaměřená.

#### *Kolagen*

Kolagen se řadí mezi nejrozšířenější bílkoviny v lidském těle. Zaujímá funkci fyzické podpory v ECM, která reguluje jak buněčné chování, tak tkáňové funkce. Samovolně tvoří strukturu trojitých šroubovicových vláken, které se samy shromažďují do makromolekulárních vláken. Tento proces samovolného skládání se řadí mezi entropicky řízený termorezistentní proces, který lze využít pro tvorbu hydrogelů při fyziologickém pH a teplotě. (Hogan a Mikos 2020) Kolagen se často využívá pro výrobu nanovlákných scaffoldů pro TE, avšak tyto nosiče jsou obvykle mechanicky slabé, proto je nutné upravit materiál zesíťováním či smícháním se syntetickými polymery. Síťování lze provést běžně používanou látkou jako je glutaraldehyd, bohužel tímto zvyšujeme riziko cytotoxicity scaffoldu. Mezi lepší volbu síťovacího činidla patří

kvartérní amonný organosilan, který zlepšuje i schopnost elektrostatického zvlákňování tím, že snižuje povrchové napětí. Mezi nejpoužívanější syntetické polymery pro zlepšení mechanických vlastností kolagenu se řadí zejména PCL a dále PLA, PLGA. (Bacakova et al. 2020)

#### *Kyselina hyaluronová (HA)*

Kyselina hyaluronová je přírodní lineární polysacharid, který patří mezi hlavní složky ECM pojivové tkáně. Díky své biokompatibilitě a biodegradabilitě se využívá kyselina hyaluronová i její deriváty hojně v biomedicině pro hojení ran a v tkáňovém inženýrství pro výrobu scaffoldů. (Li et al. 2006) Tato kyselina je snadno rozpustná ve vodě, kde dochází k tvorbě gelu. Dále vysoká molekulová hmotnost nativní HA společně se silnou schopností zadržovat vodu stojí v cestě k elektrostatickému zvlákňování vodného roztoku HA. (Kadajji a Betageri 2011) Na zlepšení vlastností pro elektrostatické zvlákňování můžeme využít pár postupů. Zprv místo čisté vody použijeme směs rozpouštědel voda/ethanol či voda/dimethylformamid. Dále je velice užitečné snížit povrchové napětí. Následně můžeme využít ke zvlákňování vhodný ve vodě rozpustný syntetický polymer jako například PVA nebo PEO. (Bacakova et al. 2020)

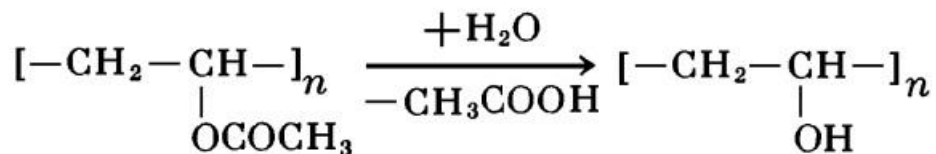
#### *Polyethylenglykol*

Polyethylenglykol patří do skupiny syntetických hydrofilních polymerů, je netoxický, biokompatibilní a vykazuje vysokou rozpustnost v organických rozpouštědlech i ve vodě. Díky svým vlastnostem se široce využívá při dodávání léků do lidského těla a v tkáňovém inženýrství. PEG se může zaměnit s výrazem polyethylenoxid (PEO) s identickou strukturou, ale specifitějším určením molekulové hmotnosti vyšší než 20 000 g/mol. (Hogan a Mikos 2020) Polyethylenglykol zvyšuje chemickou a fyzikální stabilitu léčiv. Dále pomáhá snižovat agregaci červených krvinek, což má za příčinu využívání kopolymerů PEG v kardiovaskulárních zařízeních jako jsou stenty. (Kadajji a Betageri 2011)

#### *Polyvinylalkohol*

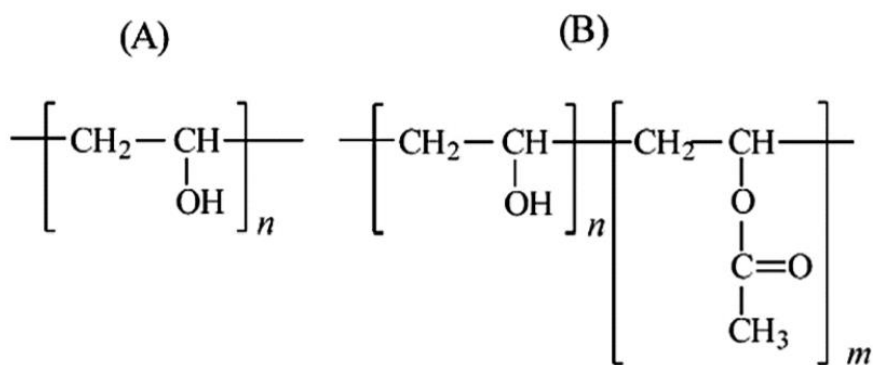
Polyvinylalkohol řadíme též do kategorie syntetických hydrofilních polymerů. Jako jeden z mála vinylových polymerů rozpustných ve vodě je biodegradabilní za určitých podmínek a v přítomnosti vhodných mikroorganismů. (Chiellini et al. 2003)

Polyvinylalkohol se připravuje polymeranalogickou reakcí (hydrolyzou) polyvinylacetátu, viz Obrázek 3.



Obrázek 3: Hydrolyza polyvinylacetátu (převzato z Polimeranalogichnyie prevrascheniya)

Fyzikální vlastnosti jsou v úzkém vztahu se způsobem přípravy. Jedna z charakteristik PVA je stupeň hydrolyzy. Můžeme tedy dělit PVA na plně hydrolyzovaný se stupněm hydrolyzy větším jak 99 % a částečně hydrolyzovaný se stupněm mezi 80-95% viz Obrázek 4. (Ben Halima 2016)



Obrázek 4: Různé stupně hydrolyzy PVA, plně hydrolyzovaný (A), částečně hydrolyzovaný (B), převzato z (Ben Halima 2016)

Polyvinylalkohol je rozpustný ve vysoce polárních a hydrofilních rozpouštědlech jako je voda, dimethylsulfoxid (DMSO) či ethylenglykol. Rozpustnost ve vodě je ovlivněna stupněm hydrolyzy, stupněm polymerace a teplotou roztoku, jelikož ovlivňují počet vodíkových můstků. (Kadajji a Betageri 2011)

Díky svým univerzálním fyzikálně-chemickým vlastnostem, mezi které zahrnujeme například viskozitu, pevnost v tahu, pružnost a termostabilitu, nalezneme využití PVA v řadě průmyslových odvětví. Mezi hlavní zástupce řadíme potravinářský, chemický, farmaceutický a textilní průmysl. Velký rozvoj ve využití získal PVA v oblasti tkáňového inženýrství a biomedicíny pro svoji biokompatibilitu a nízkou cytotoxicitu. Jedním

z příkladů využití v biomedicině může být kompozitní membrána PVA-nanozlato používaná pro svoje antibakteriální účinky. (Ben Halima 2016) Další velice rozšířenou formou PVA jsou jeho hydrogely, u kterých lze též najít využití v biomedicině. Hydrogely jde získat třemi druhy síťování. Chemické síťování je založené na reakci s chemickými látkami jako jsou například: kyselina boritá, formaldehyd nebo glutaraldehyd. Chemickou cestou lze funkcionalizovat PVA alkylovými řetězci a získat tak hydrofobní derivát PVA. (Alves et al. 2011) Nevýhodou může být potenciální ovlivnění aktivity a povahy látek zachycených v těchto gelech (např. proteiny, buňky, léčiva) (Kamoun et al. 2015) Fyzikální síťování se převážně zaměřuje na střídání zmrazování a rozmrazování, takzvaná metoda „freeze-thaw“, v přítomnosti organických rozpouštědel nebo bez nich. Tuto metodu poprvé představil v roce 1975 Nikolaos Ath Peppas, kdy nechal zmrazit při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  vodný roztok PVA a následně ho nechal rozmrazit při  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Třetí metodou síťování je pomocí záření (např. UV záření, gama záření či elektronovým paprskem) (Alves et al. 2011)

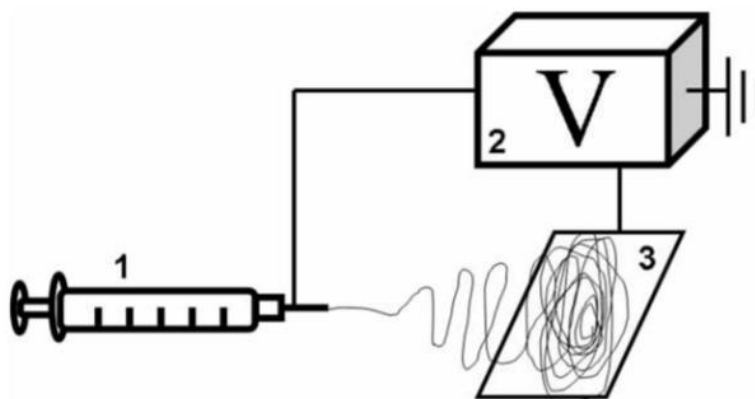
Výroba scaffoldů pro tkáňové inženýrství probíhá většinou elektrostatickým zvlákňováním. Díky této technice mají výsledná vlákna velký specifický povrch a pórovitost, která pomáhá buněčné adhezi, proliferaci a diferenciaci. Stále zůstává jedno omezení zvlákňování a tím je nedostatečná 3D struktura s vhodnou velikostí pórů. (Asadi et al. 2020)

### 1.3. Příprava materiálů pomocí elektrostatického zvlákňování

Počátky elektrostatického zvlákňování se datují do 30. let 20. století, kdy si nechal Anton Formhals patentovat princip elektrostatického zvlákňování roztoku acetátu celulózy. Polymerní vlákna vznikala mezi dvěma opačně nabitými elektrodami, kdy první byla umístěna do roztoku a druhá elektroda na kolektor. Rozdíl potenciálů elektrod závisel na vlastnostech roztoku, jako je viskozita či molekulová hmotnost. Vzdálenost mezi zvlákňovací tryskou umístěnou v roztoku a kolektorem měla vliv na vlastnosti vzniklých vláken. Příliš krátká vzdálenost měla za příčinu nedostatečné vypaření rozpouštědla a vlákna se na sebe lepila. (Huang et al. 2003)

Pomocí elektrostatického zvlákňování jsou produkována vlákna, o průměru menším jak  $1\text{ }\mu\text{m}$ . Tato technika získala velkou popularitu v oblasti výroby nanovláknenných scaffoldů. Takto vyrobené materiály nacházejí velký úspěch v tkáňovém inženýrství

a dodávání léčiv. Mezi vlastnosti, které činí tyto materiály vhodné, řadíme například vysoký poměr povrchu k objemu. (Huang et al. 2015) Základním principem je zařízení skládající se z: kapilární trubice s jehlou či pipetou (1), zdroj vysokého napětí (2) a kolektor (3) viz Obrázek 5. Polymerní roztok je vytlačován skrze injekční pumpu do jehly. Kapilární trubice a kolektor jsou připojeny ke zdroji vysokého napětí. Až po přivedení kritického napětí, které překoná povrchové napětí kapky, dochází k vytvoření kónického výčnělku, takzvaného „Taylorova kuželu“. Z kužele vychází stabilní část trysky pouze několik centimetrů, poté dochází k tvorbě samotných nanovláken ve zvlákňovacím prostoru. Před dosažením kolektoru dochází k odpaření rozpouštědla, tím pádem dopadají polymerní vlákna. (Schiffman a Schauer 2008)



Obrázek 5: Zařízení pro elektrostatické zvlákňování převzato z (Schiffman a Schauer 2008)

#### 1.3.1. DC electrospinning

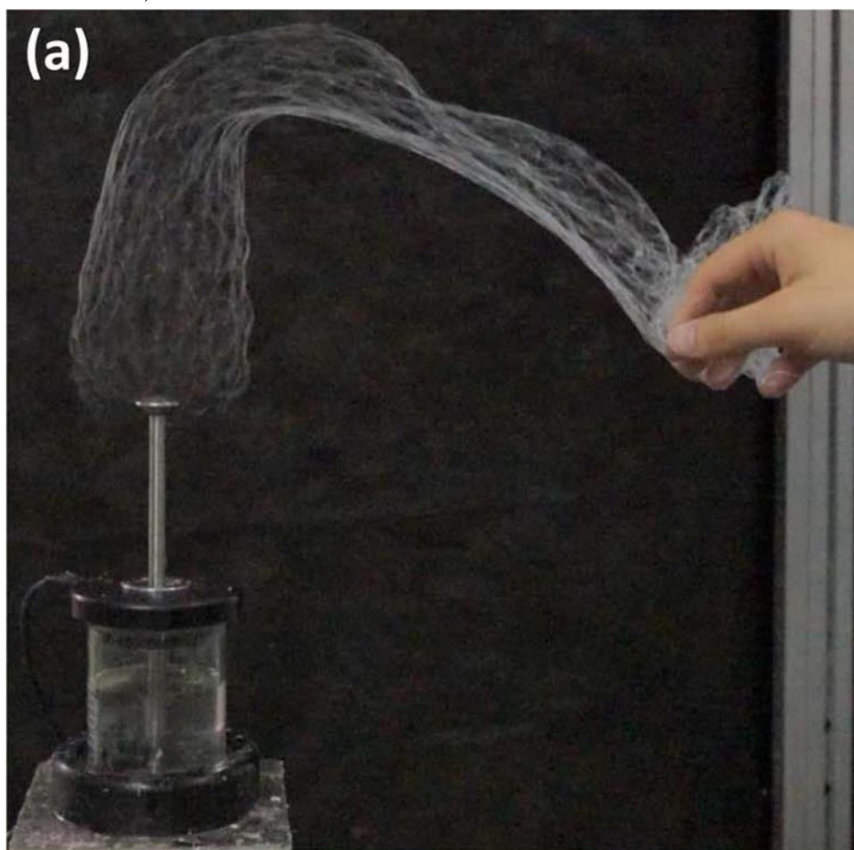
Elektrostatické zvlákňování pomocí stejnosměrného proudu je daleko rozšířenější. Dochází k aplikaci statického stejnosměrného vysokého napětí na zvlákňovací trysku. Distribuce nabitých molekul a typ náboje na povrchu trysky jsou ovlivněny polaritou dodávaného napětí, které může být kladné či záporné. Vyšší napětí obvykle iniciuje vznik tenčích vláken. (Xue et al. 2019)

#### 1.3.2. AC electrospinning

Až v posledním desetiletí získalo elektrostatické zvlákňování pomocí střídavého proudu větší pozornost. Dříve se zaměřovalo především na zvlákňování z jehly za nižších hodnot napětí (mezi 5kV až 10 kV). Dnes víme, že kombinace bezjehlové zvlákňovací elektrody společně se zdrojem střídavého napětí dokáže vygenerovat hustý oblak nanovláken při



napětí nad 30 kV. Později se ukázalo, že materiály připravené touto cestou, jsou vhodné pro aplikace v biomedicíně, textilním průmyslu a filtraci. (Valtera et al. 2019) Tvorba trysek u AC electrospinningu je způsobena rozdílným elektrickým nábojem vláken vzniklých v jedné půlvlně signálu. Tato interakce nově vznikajících vláken je hnací silou nanovláknenného rukávu do vzdálenosti cca 3 cm, kde následný pohyb je řízen podle elektrického větru do vzdálenosti 30 cm, kde musí být vzniklé nanovláknena zachycena. (Pokorný et al. 2014)

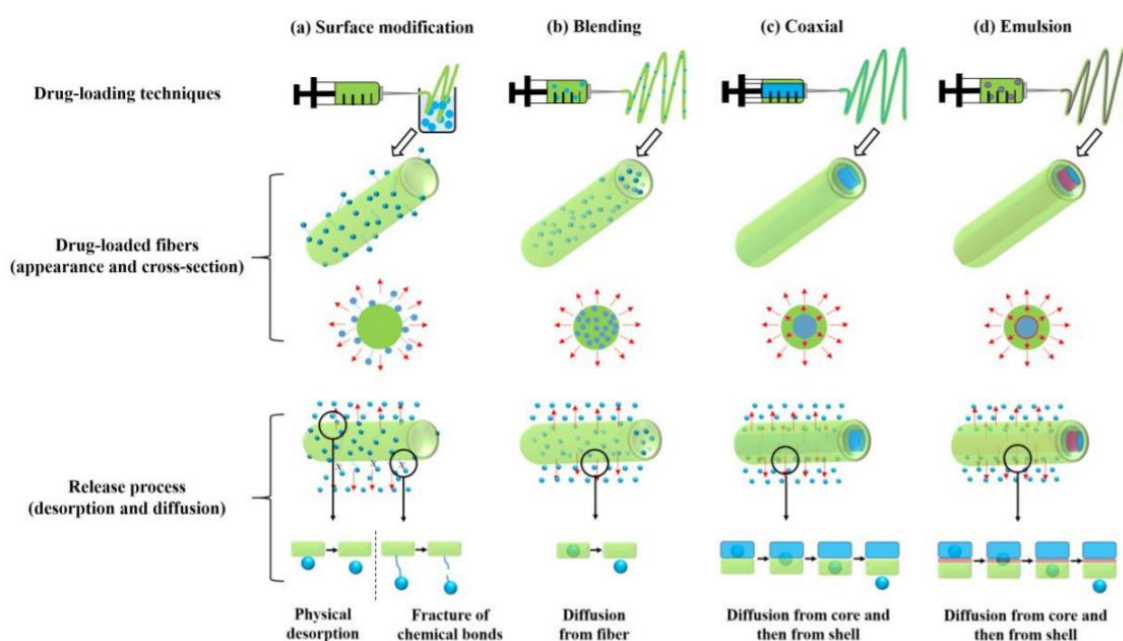


Obrázek 6: Nanovláknenný rukáv z AC electrospinningu převzato z (Valtera et al. 2019)

Velký rozdíl oproti klasickému zvlákňování je eliminace nestability trysky během zvlákňování. Vláknena se formují, a poté putují rovnou ke kolektoru, který není pod napětím. Jedním z možných vysvětlení tohoto chování je fakt, že při použití střídavého napětí, dochází ke snížení náboje ve vlákně. Tím pádem dojde k redukci elektrostatických sil vytvářejících nestabilitu vlákna. (Kessick et al. 2004) Existuje určitá závislost výsledné morfologie vláken na jednotlivých zvlákňovacích parametrech, mezi které patří vzdálenost od kolektoru, velikost použitého napětí včetně koncentrace zvlákňovaného roztoku. Průměr vláken se zmenšuje s rostoucí koncentrací polymerního roztoku a s rostoucím použitým napětím. Zatímco při oddalování kolektoru docházelo ke zvyšování průměrů vyrobených vláken. (Supaphol a Chuangchote 2008)

## 2. Funkcionalizace nanovláknenných materiálů

Funkcionalizace nanovláknenných scaffoldů může probíhat několika způsoby. Mezi jedno z dostupných řešení je fyzikální a chemická úprava povrchu již zvlákněných materiálů. Obvykle jsou touto cestou navázány bioaktivní molekuly nebo buňkami rozpoznatelné ligandy. Následujícím způsobem je samotné zvláknění roztoku, který obsahuje účinné látky již před zvlákněním. (Yoo et al. 2009) Další možností je přímé zvláknění pomocí koaxiální dvoukapilární trysky, kdy získáme vlákna typu jádro-plášť. Uvnitř vláken mohou být umístěny též biologicky aktivní molekuly, nebo dále enzymy či růstové faktory. (Cui et al. 2010) Celkový přehled všech metod můžeme vidět na Obrázku 7 níže.



Obrázek 7: Jednotlivé metody funkcionizace, (A) povrchová úprava, (B) zvláknění ze směsi, (C) koaxiální zvláknění, (D) emulzní zvláknění, převzato z (Zhang et al. 2017)

### Povrchová úprava

První metodou je povrchová úprava, která by se dala dále rozdělit podle působících látek na fyzikální a chemickou cestu. Obě úpravy se zaměřují na změnu povrchu pomocí adsorpce či vlivem kovalentní vazby, což může mít za následek například změnu smáčivosti a reaktivity materiálu nebo ke změně jeho vlastností. Povrch obvykle modifikujeme bioaktivními molekulami (např. nukleové kyseliny, růstové faktory či sacharidy), u kterých by mohlo dojít k nekontrolovatelné disperzi či deaktivaci během procesu zvláknění. (Zhang et al. 2017) Podstata chemické metody se skrývá v částečné

povrchové hydrolýze. U biodegradabilních polymerních scaffoldů je důležité si dávat pozor na dobu hydrolýzy a koncentraci hydrolyzačních činidel, pro optimální produkci funkčních skupin na povrchu bez ovlivnění celkové vlastnosti vlákenného nosiče. Vybrané biomolekuly se poté navazují na upravený povrch pomocí silných kovalentní vazeb. Jedna z fyzikálních cest se zaměřuje na plazmové ošetření pomocí kyslíku, amoniaku či vzduchu, které iniciuje vznik karboxylových či aminových skupin. Na takovýto povrch je možné navázat celou řadu proteinových složek jako například želatina, kolagen či fibronektin. Limit této metody spočívá v omezené hloubce průniku plazmy, tudíž nelze efektivně modifikovat povrch více do hloubky. Daleko jednodušší fyzikální cestou je adsorpce léčiva přímo na nanovláknenný scaffold, kde se využívá vodíkových můstků či van der Waalsových sil. Jedním z příkladů navázání přes vysokou afinitu nabízí heparin ve spojení s různými růstovými faktory, kdy dochází k zachování biologické aktivity růstových faktorů. (Yoo et al. 2009)

#### *Blend electrospinning*

Další volbou funkcionalizace nanovláknenných scaffoldů je zvláknění ze směsi takzvaný „blend electrospinning“, kdy dochází k inkorporaci bioaktivní látky přímo do polymerního roztoku a následně do samotných nanovláken. Získáme tak homogenně rozložené léčivo v celé ploše nanovláknenného scaffoldu. Fyzikálně chemické vlastnosti polymeru a jeho interakce s léčivem určuje účinnost inkorporace, distribuci uvnitř vláken a samotnou kinetiku uvolňování. Při volbě polymeru je tedy nutné hledět na polaritu polymeru i léčiva. Jelikož mícháním polárního polymeru s nepolárním proteinem může vést k nerovnoměrné distribuci léčiva v celém roztoku nebo k migraci léčiva směrem k povrchu vláken. Pokud je použit polymer s odlišnými fyzikálními vlastnostmi, můžeme využít povrchově aktivních látek pro funkcionalizaci, nebo využijeme zabudování léčiv do nanočástic pro vytvoření fyzické bariéry mezi léčivem a polymerem. (Zhang et al. 2017) Zvláknění ze směsi se většinou používá pro antibiotika, cytostatika a protizánětlivé látky, jelikož pomocí této technologie je výhodné dodávání menších molekul. Problém nastává při inkorporaci proteinů kvůli podmínkám samotného zvláknění, kdy často dochází ke snížení bioaktivity dodávaných léčiv na bázi proteinů. Stejným problémům se sníženou aktivitou čelí proteiny při použití povrchově aktivních látek. (Buzgo et al. 2018)

### *Koaxiální zvlákňování*

Koaxiální zvlákňování je založeno na zvlákňování z dvoukapilární trysky. Výsledná vlákna jsou tvořena polymerním obalem, jež je obvykle tvořen syntetickým polymerem, a jádrem, ve kterém se nachází polymerní roztok s rozpuštěnou bioaktivní látkou (např. antibiotika či antioxidanty). Polymerní obal slouží k ochraně biomolekuly před vlivem vnějšími vlivy, čímž zachovává její bioaktivitu. Tento přístup uspěl v dosažení řízeného a lokálního uvolňování v časově stanoveném intervalu. (Zhang et al. 2017) Koaxiální zvlákňování má ovšem i své nevýhody. Rychlost výroby je omezená parametry zpracování, mezi které patří viskozita a elektrická vodivost roztoků nebo jednotlivé rychlosti toku vnějšího a vnitřního roztoku. (McClellan a Landis 2016) Dále může tento proces vést k vláknům s rozdílnými vlastnostmi napříč vrstvou vyrobeného scaffoldu. Kompatibilita pro jednotlivé složky jádra a obalu musí být optimalizována pro různé aktivní molekuly, což může mít za následek tvorbu defektů u výsledného materiálu. (Buzgo et al. 2018)

### *Emulzní zvlákňování*

Podobnou metodou koaxiálnímu zvlákňování je emulzní s tím rozdílem, že není potřeba použití dvou trysek, ale pouze jedné. (Yarin 2011) Před samotným elektrostatickým zvlákňováním je do polymerního roztoku dispergován jiný polymerní roztok, ve kterém jsou rozpuštěna léčiva. Uvolňování léčiva z takto vyrobených vláken se pohybuje řádově mezi několika dny až desítky dní, jelikož polymerní obal může působit jako bariéra pro difúzi zapouzdřeného léčiva. Oproti zvlákňování ze směsi nevyžaduje emulzní zvlákňování společné rozpouštědlo pro léčivo a pro polymer. (Zhang et al. 2017)

## 2.1. Biologicky aktivní látky pro hojení kožních ran

Proces hojení pokožky se skládá z několika fází, které zahrnují komplexní interakce mezi buňkami. Začleněním bioaktivních molekul přímo do nanovlákných scaffoldů můžeme zlepšit tento proces díky řízenému a cílenému uvolňování v místě rány. Mezi tyto biologicky aktivní látky řadíme vitamíny, protizánětlivé látky a růstové faktory. Dále je nutné předcházet škodlivým účinkům mikroorganismů, které mohou mít za následek zhoršení procesu hojení. Inkorporací antibiotik, nanočástic stříbra, rostlinných výtažků či éterických olejů můžeme zvýšit antibakteriální potenciál nanovlákných scaffoldů. Biologicky aktivní látky mohou být inkorporovány různými způsoby viz Kap. 1.1.

Nejčastěji se pro léčiva a biologicky aktivní látky využívá „blend electrospinning“. (Miguel et al. 2019)

### 2.1.1. Růstové faktory

Růstové faktory („growth factors“, GFs) se řadí do skupiny proteinů, které iniciují a řídí proliferaci, migraci a diferenciaci buněk. (Zhang et al. 2017) Všechny fáze hojení ran jsou řízeny různými GFs a cytokiny. Do skupiny růstových faktorů, které ovlivňují tvorbu granulační tkáně, patří hlavně epidermální růstový faktor (EGF), destičkový růstový faktor (PDGF), transformující růstový faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fibroblastový růstový faktor (FGF), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEFG). Rozhodující roli při zánětlivé reakci hrají PDGF a TGF-  $\beta$ , zatímco podporu angiogeneze tvoří EGF, VEGF (Miguel et al. 2019)

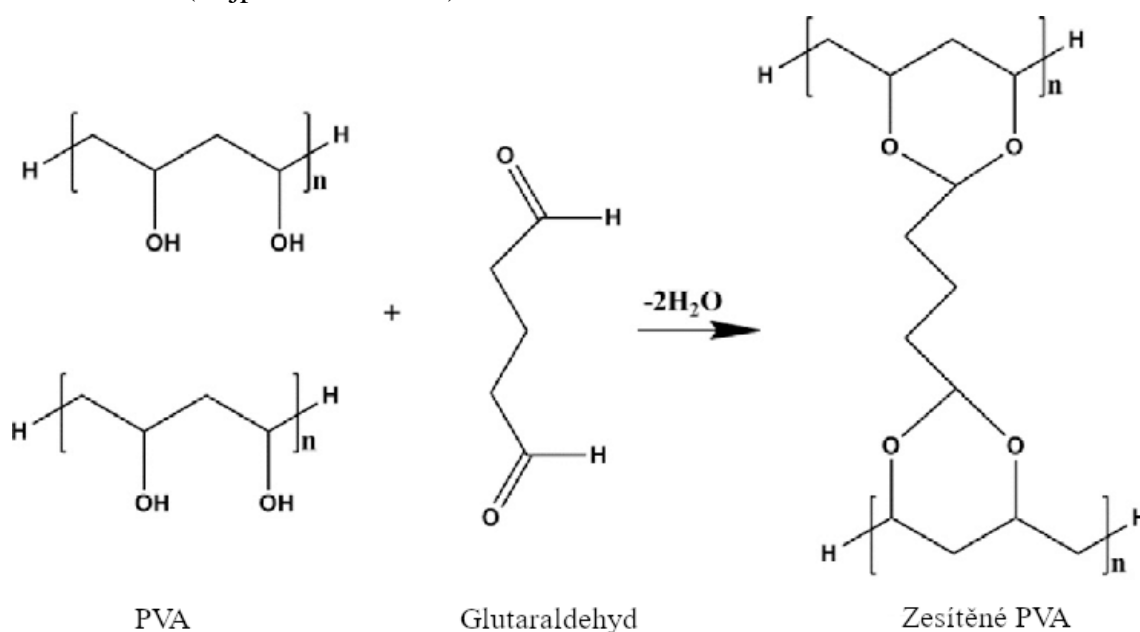
Růstové faktory hrají klíčovou roli v přenosu informací mezi buňkami a jejím prostředím (ECM), během procesu hojení ran a regenerace tkání. Jejich mechanismus účinku se liší v závislosti koncentraci, době vystavení a fenotypu cílových buněk. GFs iniciují akci navázání na specifické membránové receptory na povrchu cílových buněk, tím pádem modulují funkci buněk přímými fyzickými interakcemi. Receptory následně přenášejí sekundární signály, které ovlivňují funkci buněk. (Chen et al. 2010). Granuly trombocytů jsou bohaté na růstové faktory, které z nich můžeme dostat v aktivní formě. (Frei et al. 2008) Mezi rizika při inkorporaci růstových faktorů do nanovláknenných scaffoldů patří potenciální ztráta jejich bioaktivity. (Zhang et al. 2017) Tato práce se zaměřuje na inkorporaci růstových faktorů získaných z trombocytů, které se vyskytují v krevních destičkách.

## 3. Stabilizace nanovláknenných materiálů

Biomedicínské využití nanovláknenných materiálů požaduje řadu důležitých vlastností, mezi které řadíme biokompatibilitu a absorbovatelnost. Velkou výhodou při inkorporaci biologických látek je použití vodorozpustných polymerů pro zamezení ztráty bioaktivity inkorporovaných látek. (Asadi et al. 2020) Následně je ale často nutná úprava těchto materiálů, aby se nerozpouštěly moc rychle za fyziologických podmínek a nedocházelo k příliš rychlému uvolňování inkorporovaných látek. K tomuto účelu slouží různé druhy síťování. (Hennink a van Nostrum 2012)

### 3.1. Chemické síťování

Chemické síťování se využívá především pro zvýšení pevnosti, tepelné stability a snížení rozpustnosti polymerních materiálů vyrobených z lineárních řetězců. (Bermejo a Ugarte 2009) K takovému síťování se využívají chemické látky, jež mají dvě stejné funkční skupiny, mezi které patří například glutaraldehyd (Obr. 8) nebo kyselina boritá. Tato metoda není příliš vhodná pro využití v tkáňovém inženýrství z důvodu možných cytotoxických účinků zbytku síťovacího činidla nebo ztráta bioaktivity obsažené látky ve scaffoldu. (Bajpai a Saini 2005)



Obrázek 8: Síťovací reakce mezi PVA a glutaraldehydem převzato z (Yan et al. 2015)

Avšak při použití glutaraldehydu v parní fázi jeví menší nebo dokonce žádné cytotoxické účinky. Pro tento postup je nutné upravit zvláknovací roztok pomocí kyseliny chlorovodíkové na pH o hodnotě 3. Tímto způsobem zesítěvaný nanovláknenný scaffold po funkcionizaci stříbrem vykazuje vysoký potenciál pro zachycení a zahubení patogenních bakterií. (Destaye et al. 2013) Chemicky síťované PVA materiály se používají dále například ve formě elektrolytických membrán v palivových článcích. (Roy et al. 2017)

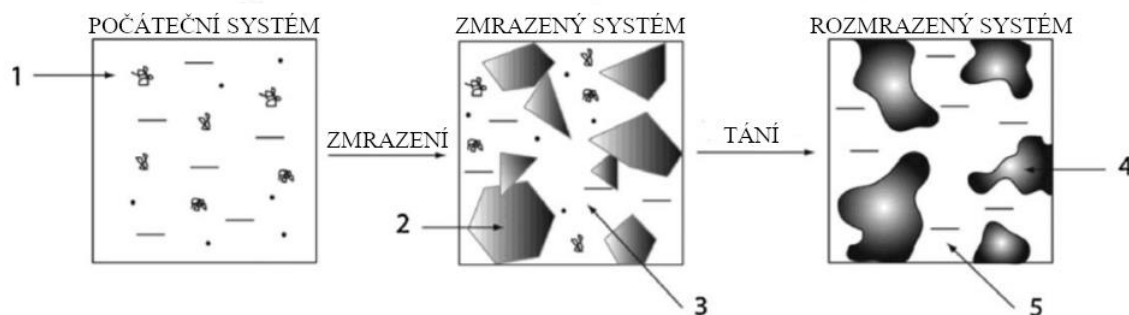
### 3.2. Fyzikální síťování

Výhodou fyzikálního síťování oproti síťování pomocí chemických činidel je velice nízká toxicita takto připravených materiálů. (Hassan a Peppas 2000) Jeden z možných způsobů zesítěvaní vyrobených materiálů je pomocí vysokoenergetického ionizujícího záření (např. elektronový paprsek, gama nebo rentgen záření). Mezi výhody této metody patří

možnost regulovat hustotu sítě na základě použité dávky záření, dále též nevznikají nežádoucí zbytky ve vyrobených materiálech. Úskalí při práci s inkorporovanými bioaktivními látkami v materiálech však tvoří potenciální snížení aktivity těchto látek. Toto je způsobeno tvorbou kovalentních vazeb jak mezi vyrobeným materiálem, tak mezi materiálem a inkorporovanými látkami. (Maitra a Shukla 2014) Další metodou, jak lze upravit rozpustnost polymerů, je působením buďto vysoké teploty, nebo využití zamrazení a následného rozmrazení takzvaná metoda „freeze-thaw“. Působením vysoké teploty pohybující se kolem 200 °C může dojít u některých polymerů ke zvýšení jejich rozpustnosti. Mezi hlavní nevýhody této metody pro využití v biomedicině patří velká pravděpodobnost denaturace inkorporovaných biologicky aktivních látek při takovýchto teplotách. (Kabiri et al. 2008) Jednou ze šetrnějších metod fyzikálního síťování pro inkorporaci biologicky aktivních látek patří metoda „freeze-thaw“, jejíž principem je ochlazení materiálů na teplotu -20 °C a následné rozmrazení v teplotě nad 0 °C, která má nejmenší vliv na aktivitu inkorporovaných látek. (Hassan a Peppas 2000)

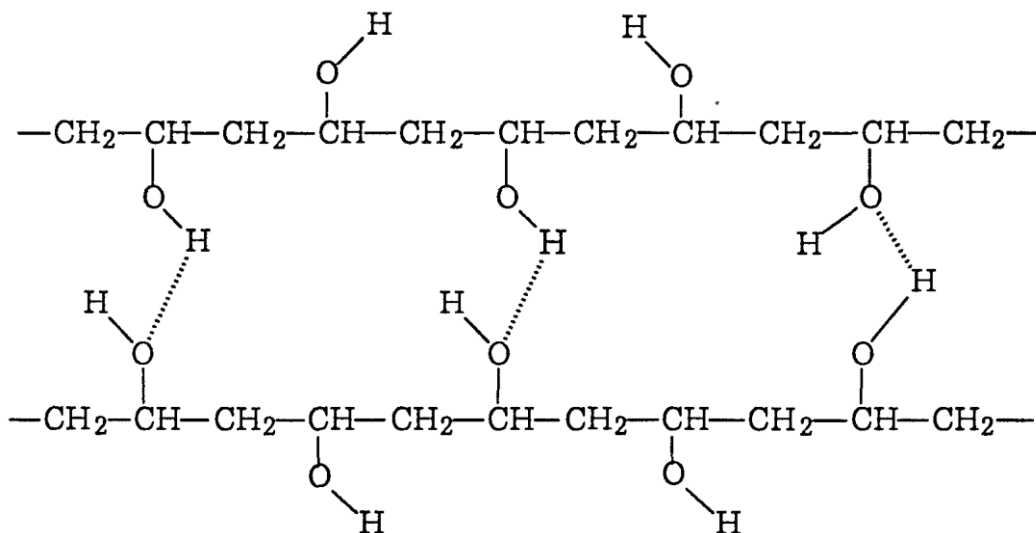
### 3.2.1. Metoda „freeze-thaw“

Účinky metody „freeze-thaw“ jsou detailně popsány v případě PVA hydrogelů. Samotná metoda „freeze-thaw“ je založena na zmrazení a následném rozmrazení vyrobeného materiálu za cílem snížení rozpustnosti. V polymerním roztoku při ochlazení pod 0 °C vznikají a rostou vodní krystaly, zatímco v kapalně fázi se kumuluje PVA. Dochází tak k separaci na čisté vodní krystaly a podchlazené kapalně PVA mikrodomény. Krystaly omezený prostor a vysoká koncentrace PVA podporují jeho krystalizaci, viz Obrázek 9. (Daza Agudelo et al. 2018)



Obrázek 9: Vznik porézního PVA hydrogelu pomocí metody F-T; 1, makromolekuly v roztoku; 2, zmrazené rozpouštědlo; 3, kapalná mikrofáze; 4, polymerní síť; 5, makropóry, upraveno a převzato z (Alves et al. 2011)

Krystalizace PVA je dále usnadněna zvýšením stupně hydrolyzy. Pro vyšší stupeň hydrolyzy PVA platí větší pravidelnost v molekulární struktuře. Dochází ke vzniku silných nevazebných interakcí mezi jednotlivými řetězci PVA díky hydroxylovým skupinám, mezi kterými dochází k tvorbě vodíkových můstků viz Obrázek 10.



Obrázek 10: Vodíkové můstky mezi řetězci PVA (převzato z Chemistry Stack Exchange, 2018)

Společně s vodíkovými můstky mají také koncentrace PVA v roztoku a podmínky samotné metody „freeze-thaw“ velký vliv na výsledné vlastnosti získaných materiálů. (Daza Agudelo et al. 2018) Míra fyzikálního síťování stoupá se zvyšujícím se počtem cyklů „freeze-thaw“. Zároveň s narůstajícím počtem vodíkových můstků mezi řetězci dochází ke snížení rozpustnosti PVA. Podle Alves et al. (2011) se pouze 50 % polymerních řetězců začlení do sítě hydrogelů po prvním cyklu F-T, až při aplikaci šesti cyklů F-T se dostáváme k začlenění přibližně 75 % polymerních řetězců.



# EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 4. Materiály a metody

### 4.1. Seznam použitých chemikálií

V následující jednotlivých tabulkách jsou vypsané všechny chemikálie a roztoky použité v této bakalářské práci.

Tabulka 2: Použité chemikálie

	Chemikálie	Výrobce
Polymerní roztok	PVA Mowiol: 125 000 g / mol, stupeň hydrolyzy 98 – 98,8 %	Sigma – Aldrich, Německo
	TRS (Thrombocyte Rich Solution): (735 – 741) · 10 <sup>6</sup> / ml	Transfúzní oddělení KNL, Česká republika
	Ethanol 96 % (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	Penta, Česká republika
	HPLC Water (dH <sub>2</sub> O)	VWR International
Pufir PBS s 0,02% azidem sodným	Chlorid sodný (NaCl)	Analytika Praha, s.r.o., Česká republika
	Chlorid draselný (KCl)	Analytika Praha, s.r.o., Česká republika
	Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O)	Analytika Praha, s.r.o., Česká republika
	Dihydrogenfosforečnan draselný (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Analytika Praha, s.r.o., Česká republika
	Azid sodný (NaN <sub>3</sub> )	Sigma – Aldrich, Německo
	Kyselina chlorovodíková (HCl)	Penta, Česká republika
	pH standardy 4.01; 7.00; 10.01	Hamilton Bonaduz AG, Švýcarsko
Roztoky pro SDS-PAGE	30% akryl-bisakrylamid mix	VWR International, Česká republika
	Amonium persulfát	Lach-ner, s.r.o., Česká republika
	Bromfenolová modř	VWR International, Česká republika
	CBB (Coomassie Brilliant Blue) R-250	Roth, Německo
	Glycerol	Roth, Německo
	Glycin	VWR International, Česká republika
	Kyselina octová	Penta, Česká republika
	Methanol	Penta, Česká republika
	β-mercaptoethanol	Roth, Německo
	Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
	SDS (Dodecylsírán sodný)	Sigma – Aldrich, Německo
	Tris (2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol)	VWR International, Česká republika
	TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Sigma – Aldrich, Německo

Analýza proteinů	BSA (hovězí sérový albumin)	VWR International, Česká republika
	Bradford Reagent	Merck KGaA, Německo

Tabulka 3: Použité roztoky

Roztok	Chemikálie	Množství
Pufř PBS + 0,02% azidem sodným (1000 ml)	dH <sub>2</sub> O	900 ml
	NaCl	8 g
	KCl	0,2 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	3,63 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g
	NaN <sub>3</sub>	0,2 g
	Upravit pH roztoku pomocí HCl na hodnotu 7,4. Následně doplnit objem vodou do 1000 ml.	
10% polyakrylamidový rozdělovací gel (20 ml)	dH <sub>2</sub> O	7,9 ml
	30% akryl-bisakrylamid mix	6,7 ml
	1,5M Tris (pH 8,8)	5 ml
	10% SDS	0,2 ml
	10% Amonium persulfát	0,2 ml
	TEMED	0,008 ml
5% zaostřovací gel (8 ml)	dH <sub>2</sub> O	5,5 ml
	30% akryl-bisakrylamid mix	1,3 ml
	1,5M Tris (pH 6,8)	1 ml
	10% SDS	0,08 ml
	10% Amonium persulfát	0,08 ml
	TEMED	0,008 ml
10× SDS-PAGE pufř (1000 ml)	dH <sub>2</sub> O	800 ml
	Tris	10 g
	SDS	30,3 g
	Glycin	144,1 g
	Destilovanou vodou doplnit na 1000 ml	
2× SDS-PAGE vzorkový pufř (100 ml)	dH <sub>2</sub> O	30 ml
	1,5M Tris (pH 6,8)	10 ml
	10% SDS	12 ml
	Glycerol	30 ml
	β-mercaptoethanol	15 ml
	Bromfenolová modř	1,8 mg
	Destilovanou vodou doplnit na 100 ml	
CBB barvicí roztok (200 ml)	dH <sub>2</sub> O	80 ml
	Methanol	90 ml
	Kyselina octová	20 ml
	CBB R-250	0,5 g
	Destilovanou vodou doplnit na 200 ml	

CBB odbarvovací roztok (500 ml)	dH <sub>2</sub> O	225 ml
	Methanol	225 ml
	Kyselina octová	50 ml
Sušicí roztok (50 ml)	dH <sub>2</sub> O	21 ml
	Methanol	22,5 ml
	Kyselina octová	5 ml
	Glycerol	1,5 ml

#### 4.2. Seznam použitých přístrojů

Následující tabulky obsahují výčet přístrojů a programů, které byly využity při přípravě a analýze materiálů použitých v této bakalářské práci.

*Tabulka 4: Použité přístroje a programy*

Přístroj/program	Název	Výrobce
Rastrovací elektronový mikroskop	Vega 3	TESCAN
Laboratorní váhy	PA224C	OHAUS Corporation
Laboratorní inkubátor	Q-cell 140/40 Basic	POL-LAB
pH metr	FiveEasy Plus	Mettler-Toledo
SDS-PAGE	Mini-PROTEAN	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Centrifuga	Z36HK	Hermle Labortechnik
Sterilizátor	AN74i	Anprolene
Třepačka	Polymax 1040	Heidolph Instruments
Zlatíci přístroj	SC7620	Quorum Technologies
Lednice	LCv 4010	Liebherr
Hlubokomrazicí box	Lexicon II	ESCO
Imaging systém	Azure C600	Azure Biosystems, Inc.
Spektrometr	Cintra 202	GBC Scientific
Spektrofotometr	Spark	Tecan
DSC přístroj	DSC 1/700	Mettler Toledo
Chromatograf	Dionex UltiMate 3000 HPLC	Thermo Scientific
Chromatografická kolona	Supertex 200 Increase	GE Healthcare
Software pro analýzu obrazů	ImageJ	Fiji Contributors
Software pro tvorbu grafů, tabulek	Microsoft Office Standart 2016	Microsoft Corporation

#### 4.3. Příprava roztoků pro zvláknování

Pro experiment zkoumaný v této bakalářské práci bylo nutné připravit si vlastní roztoky polymeru PVA. Jedna sada takto vyrobeného polymerního roztoku byla následně obohacena o trombocytární lyzát.

#### *Příprava čistého polymerního roztoku pro AC spinning*

Příprava 100 g 10% roztoku PVA (98 % hydrolyzy, molekulová hmotnost 125 000 g/mol) začíná odvážením 10 g čistého PVA a 90 g destilované vody. Je velice důležité, aby nádoba, ve které se roztok následně rozmíchával, byla důkladně promyta a zbavena potenciálních nečistot. Takto vytvořený roztok je nutné nechat míchat na magnetickém míchadle se zahříváním do úplného rozpuštění polymeru, což obvykle trvá zhruba 20 hodin. Výsledný roztok lze skladovat při pokojové teplotě až do použití.

#### *Příprava polymerního roztoku s přídavkem TL pro AC spinning*

Pro přípravu 100 g 10% roztoku PVA (98 % hydrolyzy, molekulová hmotnost 125 000 g/mol), který obsahuje 10 % TL, bylo nejprve naváženo 10 g PVA. Toto množství bylo následně rozmícháno v 80 g destilované vody po stejnou dobu jako při přípravě čistého roztoku. Do tohoto roztoku se dále přidalo 10 g TL a nechalo důkladně promíchat po dobu přibližně 30 minut. Takto připravený roztok je nutné připravit vždy těsně před samotným zvlákňováním. Je důležité, aby při přidávání trombocytárního lyzátu měl roztok pokojovou teplotu.

#### 4.4. Výroba materiálu pomocí AC spinningu

Pro tuto práci byl přednostně zvolen druh elektrického zvlákňování za pomoci střídavého proudu kvůli vlastnostem výsledných vláken. Na Technické univerzitě v Liberci je pro výrobu nanovláken pomocí AC spinningu sestrojeno zařízení, který je složen ze čtyř hlavních částí: vysokonapěťového zesilovače, regulačního transformátoru, pumpy na polymerní roztok a kovové tyčové elektrody (délka 170 mm a průměr 6 mm). Po zapnutí generátoru došlo téměř ihned k počátku zvlákňování, kde vzlínající vlákna zaujala cylindrický útvar. Zvoleným kolektorem pro tento experiment byla digestoř s podtlakem s obdélníkovým průběhem signálu z generátoru. Parametry týkající se zvlákňování jsou uvedeny v následující Tabulce 5:

Tabulka 5: Nastavení zařízení a okolní podmínky pro AC spinning

Dané veličiny	hodnoty
Napětí elektrod	50 kV
Frekvence signálu	40 Hz
Otáčky pumpy	550 ot/min
Vzdálenost kolektoru	240 mm
Čas zvláknování pro PVA	10 min
Čas zvláknování pro PVA_TL	25 min
Teplota	21 °C
Vlhkost	69 %

#### 4.5. Analýza připravených materiálů

##### 4.5.1. Analýza morfologie materiálů

Pro zkoumání morfologie nanovláken byl zvolen rastrovací elektronový mikroskop Vega 3 (TESCAN, ČR), kde byly vzorky zkoumány při třech různých zvětšeních (1000×, 3000× a 5000×). Vzorky pro elektronový mikroskop byly připraveny za pomoci oboustranné lepící pásky, jež držela ustrižený kousek materiálu na kovovém terčíku. Ten se následně nechal pokovit 10 nm vrstvou zlata v přístroji SC7620 (Quorum Technologies, Velká Británie). Pro každý materiál bylo pořízeno minimálně 5 snímků se zvětšením 5000×, z každého snímku bylo pořízeno 75 měření průměrů vláken za pomoci programu ImageJ. Naměřené hodnoty byly následně vyhodnoceny a zaneseny do grafů v programu Microsoft Excel.

#### 4.6. Stabilizace pomocí „freeze-thaw“

Tento experiment byl zaměřený na fyzikální stabilizaci funkcionalizovaných nanovláken pomocí fyzikální metody „freeze-thaw“. Vyrobené materiály pomocí AC electrospinnigu byly následně sterilizovány pomocí ethylenoxidu. Jeden cyklus metody F-T spočíval v uložení zvlákněných materiálů do -20 °C po dobu 16 hodin a následném přesunutí do +4 °C na 8 hodin. Jedna dvojice připravených materiálů PVA a PVA\_TL podstoupila 5 cyklů metody F-T, další dvojice PVA a PVA\_TL podstoupila 10 cyklů metody F-T.

##### 4.6.1. Příprava jednotlivých vzorků pro testování

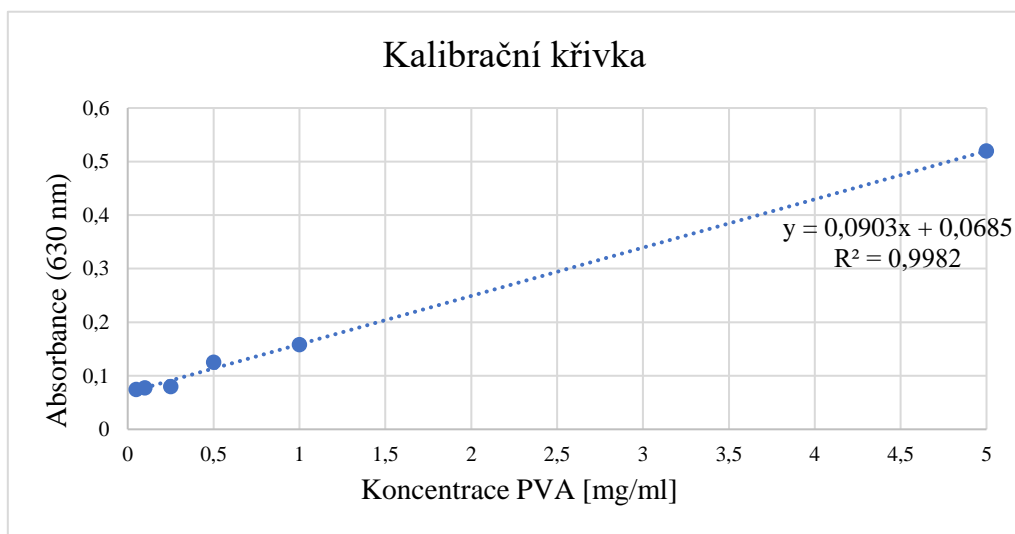
Příprava jednoho vzorku zahrnovala navážení 30 mg zvlákněného materiálu. Všechny zvlákněné materiály byly předem sterilizovány pomocí ethylenoxidu po dobu 12 hodin při pokojové teplotě. Pro samotné testování byly připraveny nejméně 3 vzorky pro každý materiál. Navážených 30 mg vzorku bylo vloženo do 5 ml mikrozkušavky, kde byly

k materiálu přidány 3 ml roztoku PBS + 0,02 % azidu sodného. Následně byly připravené vzorky umístěny do inkubátoru Q-cell 140/40 Basic (POL-LAB, Polsko) při 37 °C. Odběry vzorků probíhaly ve stanovených časech (1 hod, 2 hod, 4 hod, 6 hod, 8 hod, 24 hod, 72 hod a 168 hod), kdy se odebralo 600 µl vzorku a stejné množství pufru bylo vráceno zpátky do mikrozkušavky. Odebrané vzorky byly ihned zamrazeny při teplotě -20 °C. Takto připravené vzorky byly určeny pro analýzu rozpustnosti PVA a kinetiku uvolňování inkorporovaných proteinů.

#### 4.6.2. Analýza rozpustnosti materiálů pomocí spektrofotometrie

Spektrofotometrická analýza je založena na absorpci záření při průchodu vzorkem. Interval využívaného světla se pohybuje od ultrafialového do viditelného spektra, tudíž s vlnovou délkou od 200 do 800 nm.

Pro samotné měření vzorků bylo nutné sestavit kalibrační křivku PVA, na kterou bylo potřeba připravit vzorky o známých koncentracích. Připravené kalibrační vzorky měly koncentrace následující: 0,05 | 0,1 | 0,25 | 0,5 | 1 | 5 [mg / ml] (viz Graf 1). Všechny měřené vzorky (kalibrační i testované) museli být naředěny 10× destilovanou vodou před samotným měřením na spektrometru Cintra 202 (GBC Scientific, USA).



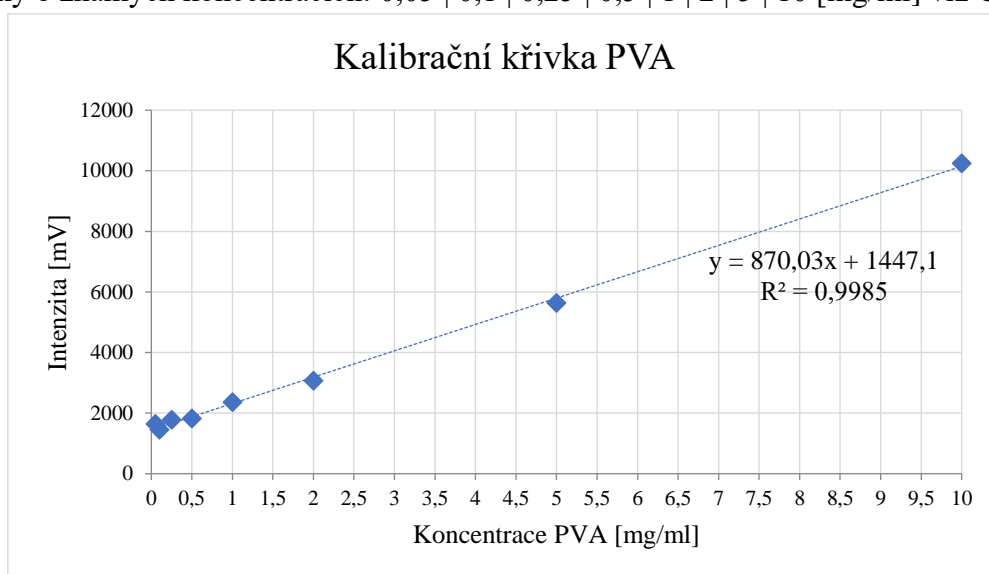
Graf 1: Kalibrační křivka PVA (vztah mezi absorbancí při 630 nm a koncentrací PVA)

Zředěné vzorky byly před samotným měřením smíchány s kyselinou boritou a jódem v těchto poměrech: 200 µl vzorku, 750 µl kyseliny borité ( $H_3BO_3$ ; 40 g/l), a 150 µl jódu ( $I_2$ ; 0,05 mol/l). Před samotným měřením byly vzorky intenzivně promíchány a následně byla měřena absorbance při vlnové délce 630 nm za laboratorních podmínek.

#### 4.6.3. Analýza rozpustnosti materiálů pomocí GPC

Principem gelové permeační chromatografie (GPC) je separace molekul na základě jejich velikosti pro stanovení molární hmotnosti vstupní směsi. Chromatografická kolona je naplněna porézním gelem (stacionární fáze) a rozpouštědlem vyplňujícím zbytek kolony (mobilní fáze). Zředěný zkoumaný vzorek je poté postupně vymýván mobilní fází, kdy dochází k postupné separaci roztoku na jednotlivé frakce v závislosti pouze na velikosti daných molekul. Nejrychleji procházejí velké molekuly, jelikož se nezachytávají do pór stacionární fáze.

Pro přesné měření množství PVA ve vzorcích bylo potřeba si nejdříve připravit kalibrační vzorky o známých koncentracích: 0,05 | 0,1 | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 5 | 10 [mg/ml] viz Graf 2.



Graf 2: Kalibrační křivka PVA (závislost intenzity na koncentraci PVA)

Výsledné hodnoty byly kvantifikovány na základě plochy „peaku“ signálu rozptylu světla pod úhlem 90°. Příprava vzorku pro GPC zahrnovala smíchání 240  $\mu$ l alikvótního vzorku s 960  $\mu$ l rozpouštědla s pH 6,8 (100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl a 0,03 % NaN<sub>3</sub>). Takto připravené roztoky byly po protřepání přefiltrovány přes stříkačkové filtry s nylonovou membránou s průměrem 13 mm a velikostí pórů 0,45  $\mu$ m (Chromservis, ČR). Chromatografická kolona Superdex 200 Increase (GE Healthcare, USA) použitá v tomto měření měla délku 300 mm s vnitřním průměrem 3,2 mm. Molekulová hmotnost byla stanovena pomocí detektoru rozptylu světla 1260 Infinity II GPC/SEC MDS (Agilent, USA). Velikost částic lze určit pomocí úměry k intenzitě rozptýleného světla.

#### 4.6.4. Analýza krystalinity PVA pomocí DSC

Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) je velice často používaná termická analýza pro měření změny krystalinity zkoumaného materiálu. Principem této metody je ohřívání či ochlazování dvou vzorků za konstantní rychlosti, kdy jeden vzorek je zvolen jako referenční a druhý jako testovaný, během které se sleduje množství potřebného tepla pro udržení izotermických podmínek. Výsledná křivka slouží ke stanovení teploty skelného přechodu, exotermického momentu krystalizace ( $T_c$ ) a endotermického tání materiálu ( $T_m$ )

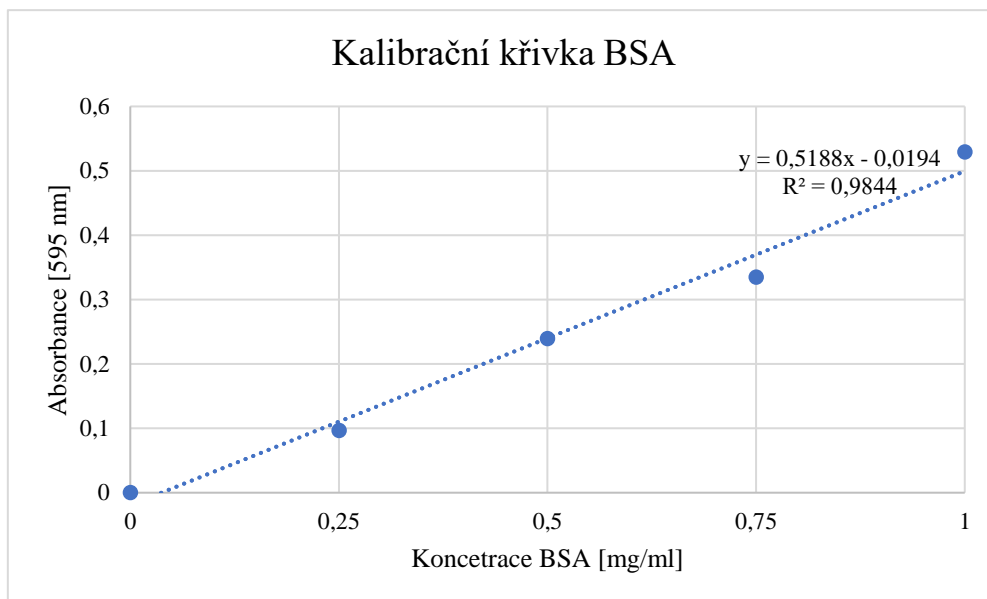
Vyrobené PVA materiály, které byly naváženy s hmotností mezi 5–9 mg, byly dále umístěny na dno hliníkového kelímku (objem 25  $\mu$ l) pro následující hermetické uzavření a zalisování před samotným měřením na DSC 1/700 (Mettler Toledo, Švýcarsko). Takto připravené vzorky byly ohřívány od 0 °C do 300 °C v inertní atmosféře dusíku za konstantní rychlosti ohřevu 10 °C / min.

#### 4.6.5. Analýza koncentrace proteinů podle Bradforda

Metoda podle Bradforda je spektrofotometrická metoda založená na interakci proteinů s Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250, kdy dochází k barevné změně roztoku z hnědé na modrou po navázání CBB na proteiny v kyselém prostředí. Zároveň dojde k posunu absorpčního maxima výsledného roztoku na 610 nm, přičemž samotné měření probíhá při vlnové délce 595 nm.

Pro samotný výpočet koncentrace proteinů v měřených vzorkách bylo potřeba sestavit kalibrační křivku, kde byla použita řada kalibračních vzorků o následujících koncentracích: 0 | 0,25 | 0,5 | 0,75 | 1 [g/l] viz Graf 3. Kalibrační vzorky byly připraveny z hovězího sérového albuminu (BSA) a jako rozpouštědlo byla použita destilovaná voda.





Graf 3: Kalibrační křivka BSA (závislost absorpance při 595 nm na koncentraci BSA)

Příprava vzorků probíhala v mikrotitrační destičce s 96 jamkami, kdy v každé jamce bylo smícháno 5  $\mu$ l měřeného vzorku s 250  $\mu$ l Bradfordova činidla a následně byla destička ponechána při pokojové teplotě po dobu 5 minut inkubovat. Dále byla změřena absorpance jednotlivých jamek na spektrofotometru Spark (TESCAN, ČR) při vlnové délce 595 nm. Naměřené hodnoty byly zpracovány v excelu. Nejdříve byly vypočítány střední hodnoty a směrodatné odchylky absorpance negativních kontrol, což byly vzorky obsahující pouze čisté PVA. Takto vypočítané hodnoty byly dále využity k samotnému výpočtu koncentrace TL ve vzorcích obsahujících inkorporované proteiny.

#### 4.6.6. Analýza uvolňování proteinů pomocí SDS-PAGE

Metoda SDS-PAGE elektroforéza za přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS) v polyakrylamidovém gelu je biochemická metoda používána pro separaci proteinů na základě jejich pohyblivosti v elektrickém poli, která je závislá především na jejich molekulové hmotnosti.

Pro přípravu polyakrylamidové gelu byla použita dvojice skel, do kterých byly nality dvě vrstvy gelu: 10% roztělovací gel (dolní) a 5% zaostřovací gel (horní). Jamky pro jednotlivé vzorky byly vytvořeny pomocí umístění hřebínku před zatuhnutím horního gelu mezi dvojicí skel. Vzorky na měření byly připraveny smícháním 20  $\mu$ l alikvótních vzorků s 2 $\times$  SDS-PAGE vzorkovým pufrem s poměrem objemů 1 : 1. Připravené vzorky byly následně denaturovány při 95  $^{\circ}$ C po dobu 10 minut. Dvojice skel byla vložena do elektroforetické vany, zalita 1 $\times$  SDS-PAGE pufrem, kde do jednotlivých jamek byly

naneseny vzorky včetně standartu molekulových hmotností proteinů marker Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). Elektroforéza nejdříve běžela při 70 V po dobu 20 minut a následně bylo zvýšeno napětí na 120 V. Konec měření nastal v moment, kdy dosáhla vodorovná linie spodní části gelu. Následné obarvení gelů probíhalo přes noc v CBB barvicím roztoku na třepačce Polymax 1040 (Heidolph Instruments, Německo), kde bylo dále provedeno odbarvení přebytečného barviva z gelu odbarvovacím roztokem na třepačce přes noc. Výsledné gely byly nafočeny a vyhodnoceny pomocí přístroje Azure C600 (Azure Biosystems, Inc., USA). Následně byly gely přesunuty to sušícího roztoku, odkud byly dále přemístěny do digestoře, kde byly vloženy do fólie a vysušeny při pokojové teplotě.

## 5. Výsledky a diskuze

Tato bakalářská práce je zaměřena na stabilizaci nanovlákněných scaffoldů pomocí metody „freeze-thaw“ (F-T). Principem metody F-T je postupné mrazení a rozmrazování vyrobených materiálů za daných teplot s cílem snížení rozpustnosti. Rozpustnost PVA úzce souvisí i s procesem uvolňování inkorporovaných proteinů. Při použití vysokého stupně hydrolyzy 98 % dochází k častější tvorbě vodíkových můstků mezi hydroxylovými skupinami jednotlivých řetězců. Tím dochází ke snížení rozpustnosti ve vodném prostředí. Cílem fyzikální stabilizace pomocí F-T je snížit rychlé počáteční uvolňování tzv. „burst release“ typický pro materiály zvlákněné ze směsi, kdy dochází k uvolnění až 90% inkorporované látky během prvních 12 hodin (Lisnenko 2020). V rámci práce byly připraveny čisté PVA nanovlákněné materiály i materiály s inkorporovanými proteiny pomocí AC electrospinningu. Následně proběhla analýza morfologie vyrobených materiálů pomocí rastrovací elektronové mikroskopie. Vyrobené materiály byly podrobeny fyzikální stabilizační metodě F-T, kde byly zvoleny teploty  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , kde bylo aplikováno 5 a 10 cyklů F-T. Vliv této metody a počet aplikovaných cyklů byl sledován v porovnání s referenčními vstupními materiály, které podstoupily 0 cyklů metody F-T. Změna rozpustnosti materiálů podrobených experimentu byla analyzována pomocí spektrofotometrie a gelové permeační chromatografie (GPC). Změny v uvolňování inkorporovaných proteinů byly sledovány za pomoci spektrofotometrické metody podle Bradforda a SDS-PAGE elektroforézy. Krystalinita PVA před a po aplikaci metody F-T byla měřena pomocí metody diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC).

### 5.1. Vstupní materiály

#### 5.1.1. Příprava nanovlákněných scaffoldů

Základem pro všechny následující experimenty byla výroba samotných nanovlákněných materiálů z předem připravených roztoků (viz Tabulka 6). Stupeň hydrolyzy PVA 98 % pro experiment byl zvolen na základě výsledků výzkumné práce (Koprivova et al. 2020). Molekulová hmotnost PVA 125 000 g/mol, 10% koncentrace PVA a 10% koncentrace TL byly zvoleny na základě experimentu provedeného v diplomové práci (Lisnenko 2020). Pro určení obsahu proteinů v jednom ml TL byla připravena ředící řada trombocytárních lyzátů, Z měření byla vypočítána průměrná hodnota množství proteinů,

kteřá vyšla ( $15,78 \pm 2,76$ ) mg / ml. Teoretické množství proteinu se rovnalo 19,65 mg na 1 gram PVA\_TL, tudíž loading se rovnal 1,97 % (w/w).

*Tabulka 6: Složení použitých roztoků PVA pro zvlákňování: koncentrace PVA v hmotnostních procentech, molekulární hmotnost ( $M_w$ ), stupeň hydrolyzy PVA, koncentrace trombocytárního lyzátu (=TL) v hmotnostních procentech*

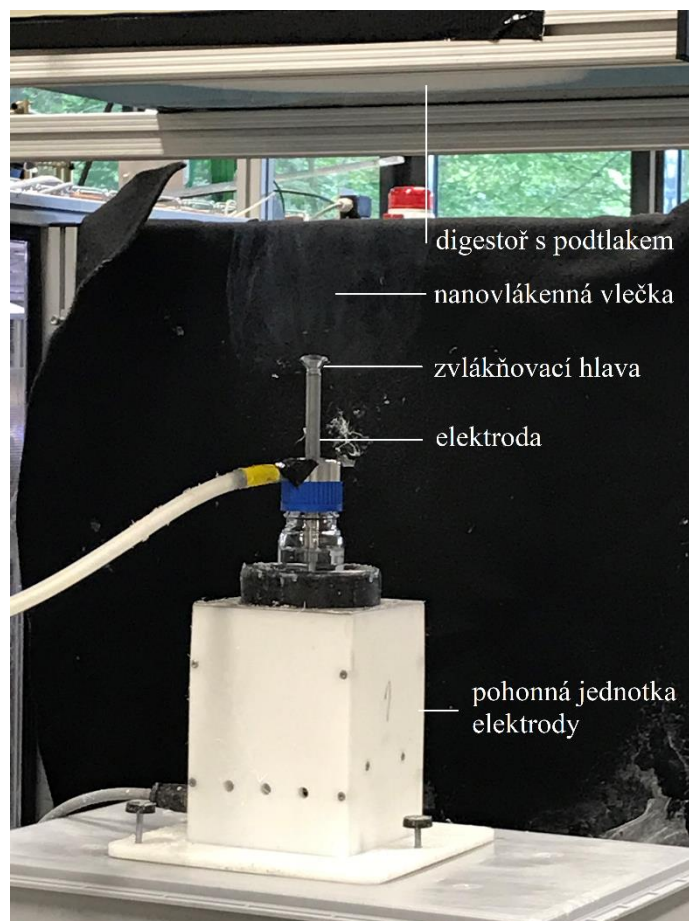
Název	koncentrace PVA w/w [%]	$M_w$ [g/mol]	Stupeň hydrolyzy [%]	koncentrace TL w/w [%]
PVA	10	125 000	98	0
PVA_TL	10	125 000	98	10

Výroba těchto materiálů proběhla pomocí AC electrospinningu (viz Kap. 4.4. a Tabulka 7) v laboratořích Ing. Jana Valtery, Ph.D. Pro zvlákňování byl zvolen kolektor typu digestoř s pod tlakem viz Obrázek 11. Zvlákňené materiály čistého PVA a PVA\_TL s inkorporovanými proteiny byly vyrobeny v triplicátech. Pro oba typy materiálů byly nastaveny stejné zvlákňovací parametry s rozdílem v době zvlákňování. Čistý PVA roztok byl zvlákňován po dobu 10 minut. U roztoku PVA\_TL byl použit čas zvlákňování 25 minut. Všechny zvlákňovací parametry jsou uvedené níže viz Tabulka 7.

*Tabulka 7: Parametry pro AC electrospinning*

Dané veličiny	hodnoty
Napětí elektrod	50 kV
Frekvence signálu	40 Hz
Otáčky pumpy	550 ot/min
Vzdálenost kolektoru	240 mm
Produktivita pro PVA	( $5,6 \pm 0,7$ ) g/h
Produktivita pro PVA_TL	( $1,4 \pm 0,2$ ) g/h
Teplota	21 °C
Vlhkost	69 %

Čistý PVA bylo zvlákňováno s produktivitou  $0,093 \pm 0,012$  g/min, zatímco PVA\_TL bylo připraveno s produktivitou  $0,023 \pm 0,003$  g/min. Dle vypočítaných hodnot je produktivita čistých PVA nanovláken více než 4krát vyšší oproti nanovláknům s inkorporovanými proteiny, což je ve shodě s výsledky experimentu provedeného v diplomové práci (Lisnenko 2020). Nižší produktivita PVA\_TL vláken je nejspíš způsobena menším průměrem vláken, a i nižší plošnou hmotností viz Tabulka 8.



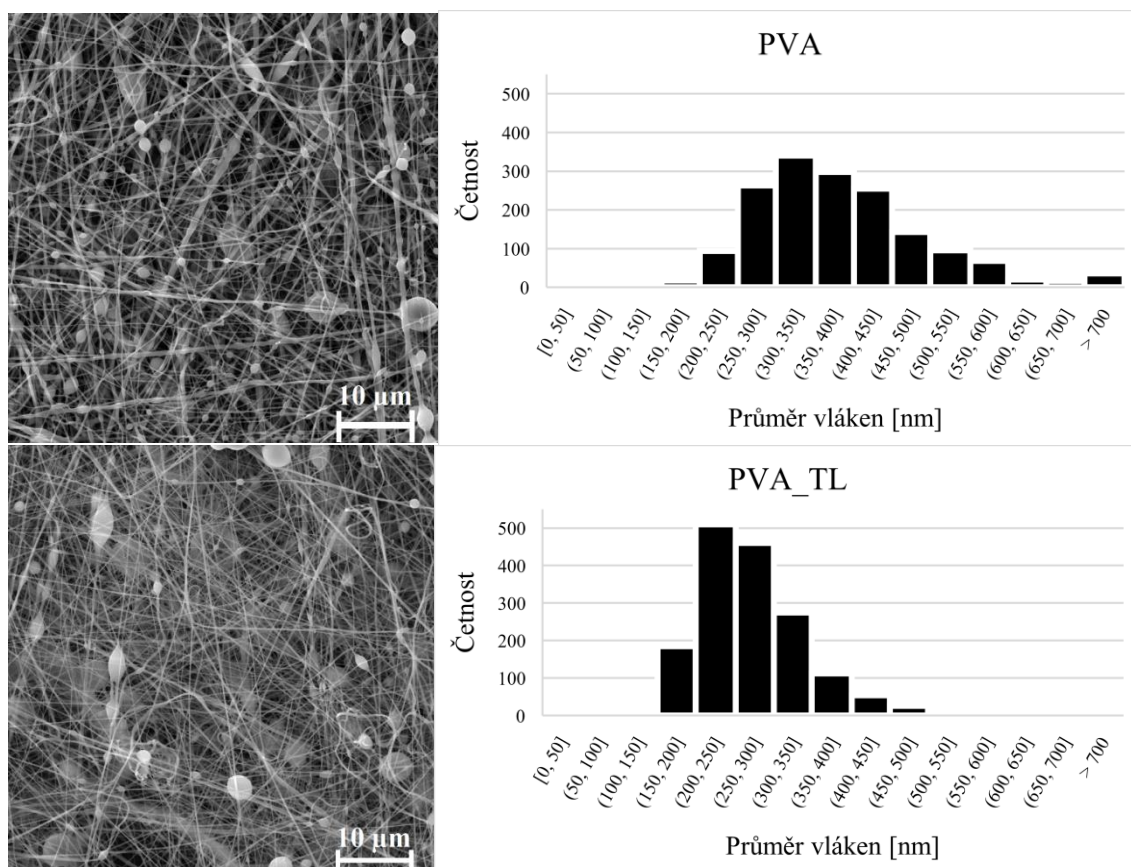
Obrázek 11: Zařízení pro AC electrospinning

### 5.1.2. Morfologie vstupních nanovláknenných materiálů

U všech vyrobených materiálů byl zjišťován průměr vláken ze snímků z rastrovacího elektronového mikroskopu (Obrázek 12) a dále byly vrstvy analyzovány z pohledu jejich plošné hmotnosti. Čisté PVA mělo hodnotu středního průměru vláken  $388 \pm 120$  nm. Hodnota středního průměru vláken PVA\_TL se lišila o 114 nm s hodnotou  $274 \pm 74$  nm. Průměrná plošná hmotnost pro čisté PVA vyšla  $6,48 \pm 0,63$  g/m<sup>2</sup>, zatímco u materiálu PVA\_TL byla naměřena průměrná hodnota  $4,00 \pm 0,38$  g/m<sup>2</sup> viz Tabulka 8.

Tabulka 8: Střední vláknenné průměry vstupních materiálů, jejich plošná hmotnost a statistická analýza průměrů (SD = směrodatná odchylka)

Materiál	Průměr vláken $\pm$ SD [nm]	Plošná hmotnost $\pm$ SD [g/m <sup>2</sup> ]	95% interval [nm]
PVA	$388 \pm 120$	$6,48 \pm 0,63$	(382 ; 394)
PVA_TL	$274 \pm 74$	$4,00 \pm 0,38$	(271 ; 278)



Obrázek 12: SEM snímky a histogramy vstupních materiálů: horní snímek – PVA, dolní snímek – PVA\_TL, zvětšení 5000×, měřítko 10 µm

Pozorovatelné kapkovité defekty na nanovláčkách u obou materiálů (Obr. 12) jsou pravděpodobně způsobeny vysokou vlhkostí vzduchu během samotného zvlákňování. Jelikož je materiál zvlákňován z vody, nedochází tak k dostatečně rychlému a úplnému odpaření rozpouštědla za vysoké vlhkosti vzduchu a vznikají tím pádem kapkovité defekty o různých velikostech, řádově s průměrem v jednotkách mikrometrů. Díky základní statistické analýze lze konstatovat, že se vlákna PVA a PVA\_TL liší. Hodnota plošné hmotnosti je u čistého PVA 1,67krát vyšší než u PVA\_TL s inkorporovanými proteiny.

## 5.2. Stabilizace pomocí „freeze-thaw“

Experiment „freeze-thaw“ (F-T) byl založen na studii provedené Hassanem a Peppasem (Hassan a Peppas 2000), ve které byly zkoumány účinky fyzikální síťovací metody F-T na PVA hydrogelech (viz Kap. 3.2.1.). Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda síťovací metoda F-T snižuje rozpustnost PVA a zpomaluje uvolňování proteinů. Cyklus F-T byla

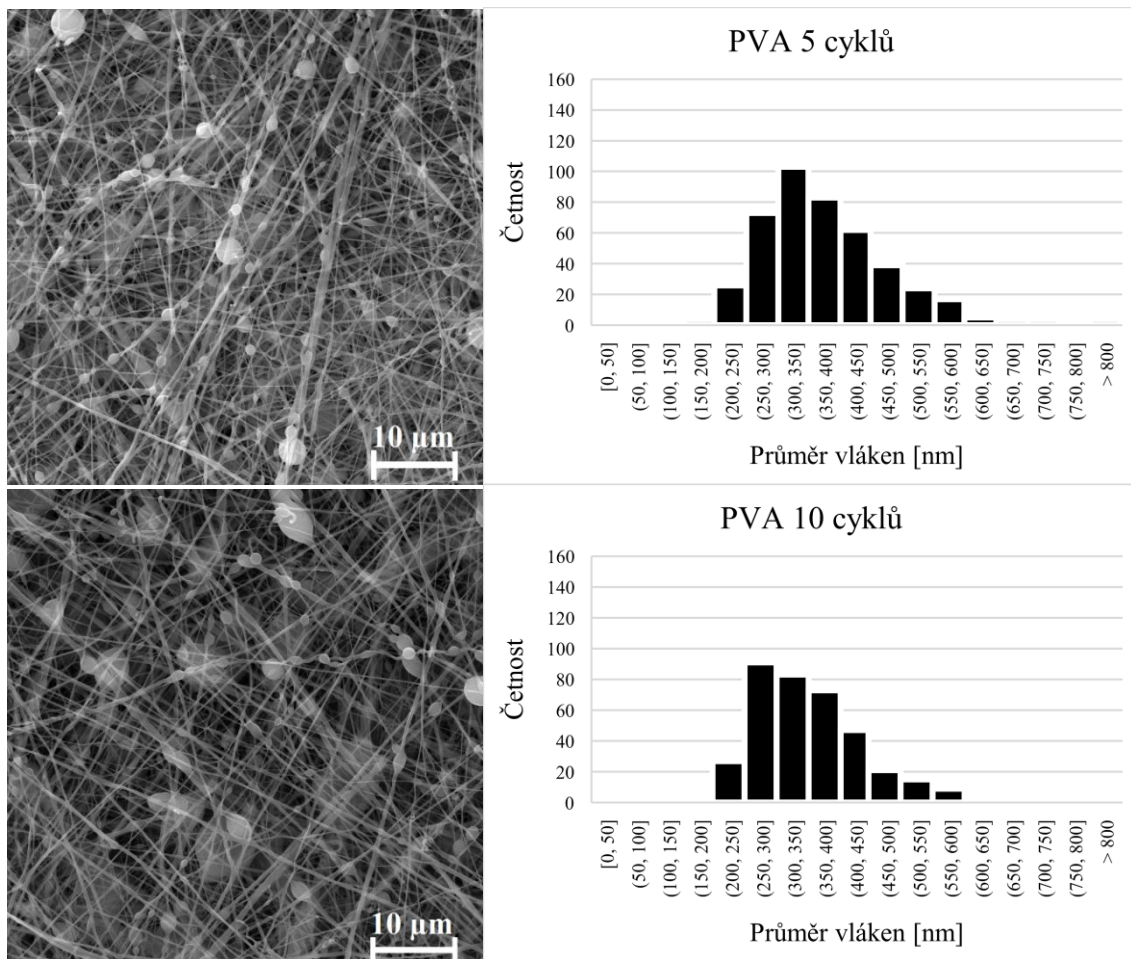
nastaven na skladování materiálu po dobu 16 hodin v - 20 °C, následně po dobu 8 hodin v + 4 °C. Dále byl sledován účinek 5 a 10 cyklů F-T oproti vstupním materiálům. Účinky metody F-T byly analyzovány z pohledu morfologie materiálů (pomocí SEM), rozpustnosti PVA (spektrofotometricky a GPC), krystalinity PVA (pomocí DSC) a uvolňování proteinů (spektrofotometricky dle Bradforda a SDS-PAGE).

### 5.2.1. Analýza morfologie materiálů po aplikaci metody F-T

Průměry vláken byly analyzovány z SEM snímků pro vzorky PVA a PVA\_TL po 5 a 10 cyklech F-T viz Obrázek 13 a Obrázek 14. Pro porovnání jednotlivých materiálů byla zvolena statistická metoda porovnání 95% intervalu spolehlivosti. Naměřené hodnoty pro jednotlivé nanovlákně vsrtvy včetně výsledky statistické analýzy jsou zaneseny do Tabulky 9.

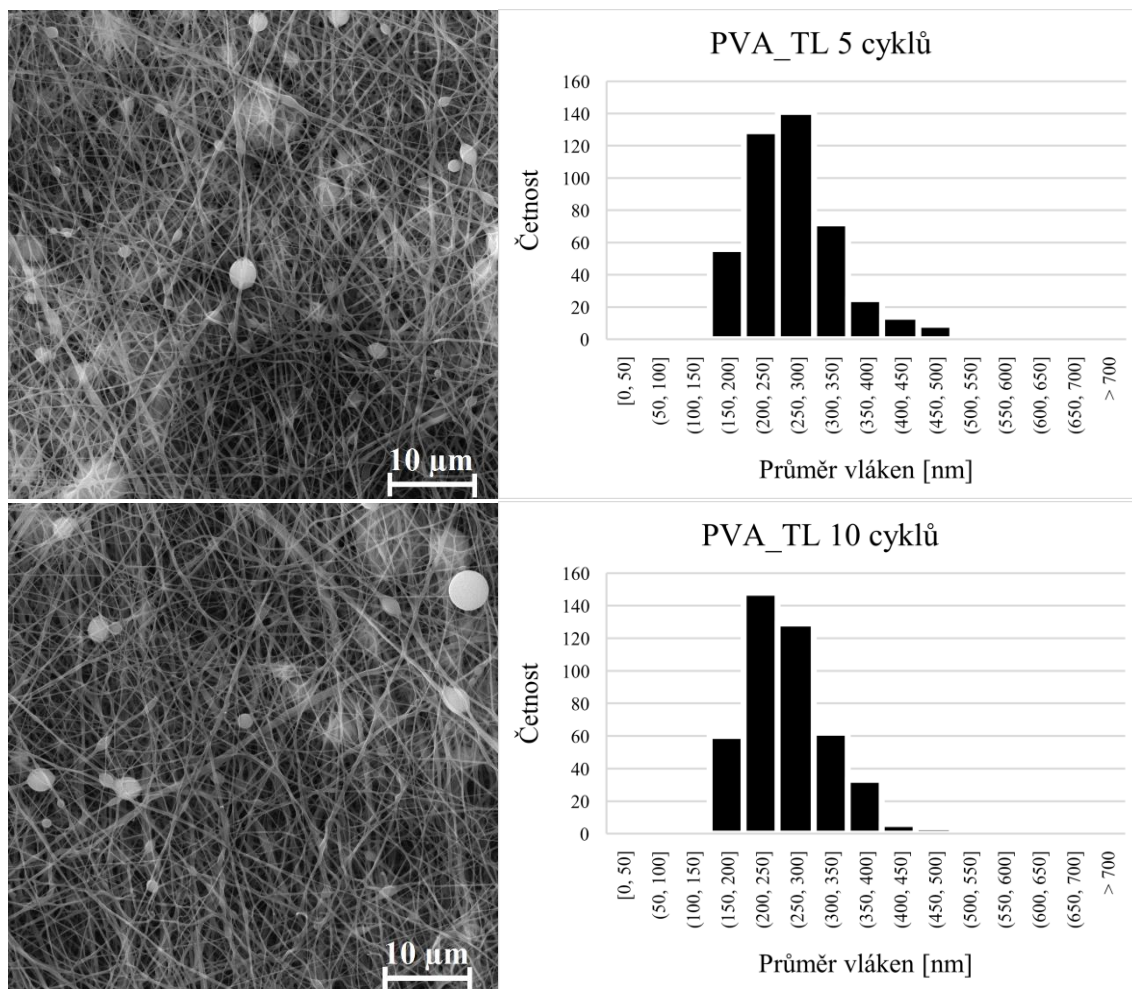
*Tabulka 9: Průměry vláken a statistická analýza po aplikaci 5 a 10 cyklů metody F-T na PVA a PVA\_TL (SD = směrodatná odchylka)*

Materiál	Průměr vláken ± SD [nm]		95% interval [nm]	
	5 cyklů F-T	10 cyklů F-T	5 cyklů F-T	10 cyklů F-T
PVA	384 ± 115	358 ± 100	(372 ; 395)	(348 ; 368)
PVA_TL	271 ± 72	266 ± 70	(265 ; 278)	(260 ; 273)



Obrázek 13: SEM snímky a histogramy materiálů po F-T: horní snímek – PVA po 5 cyklech, dolní snímek – PVA po 10 cyklech, zvětšení 5000×, měřítko 10 μm





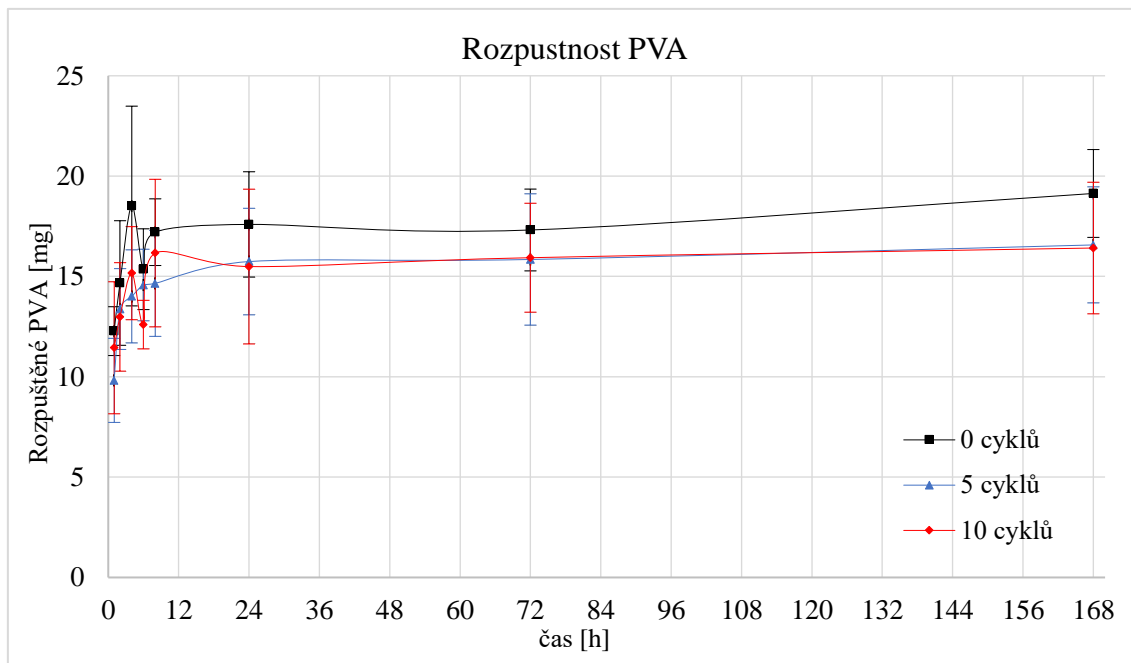
Obrázek 14: SEM snímky a histogramy materiálů po F-T: horní snímek – PVA\_TL po 5 cyklech, dolní snímek – PVA\_TL po 10 cyklech, zvětšení 5000×, měřítko 10 μm

Morfologie vláken PVA\_TL se nemění s aplikací metody F-T u žádného z měřených materiálů, jsou statisticky shodné. Zatímco u vrstev z čistého PVA byla zjištěna statistická odlišnost u materiálu po 10 cyklech oproti vstupnímu materiálu a materiálu po 5 cyklech, kdy došlo ke zmenšení průměru vláken.

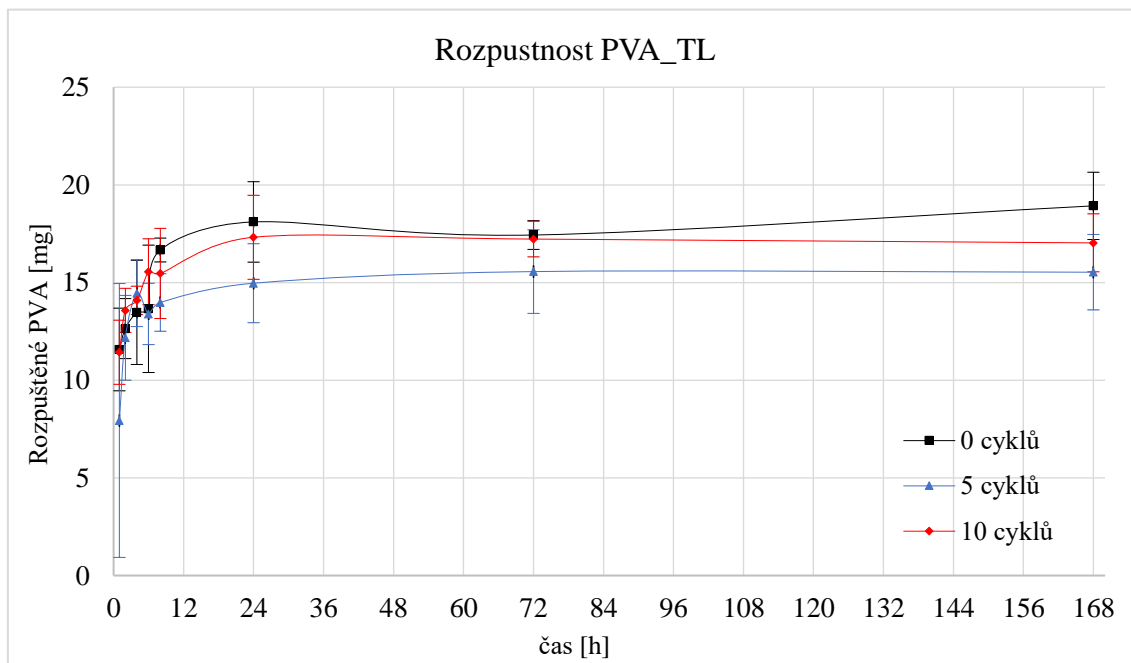
### 5.2.2. Analýza rozpustnosti PVA po F-T

Rozpustnost PVA úzce souvisí s množstvím vodíkových můstků mezi molekulami PVA v materiálu, s rostoucím počtem můstků klesá rozpustnost PVA. S klesající rozpustností PVA se zpomaluje uvolňování inkorporovaných proteinů. Cykly F-T by měli vést ke snížení rozpustnosti PVA díky zvýšení počtu vodíkových můstků mezi molekulami PVA. Byl analyzován vliv F-T včetně počtu aplikovaných cyklů s ohledem na rozpustnost PVA. Rozpustnost byla měřena pomocí spektrofotometrie (viz Kap.

4.6.2.). Materiály PVA a PVA\_TL byly inkubovány v PBS v 37 °C, vzorky pro analýzu rozpustnosti PVA byly odebírány v intervalech 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h, 72h, 168h. Takto připravené vzorky byly měřeny po reakci s jódem při vlnové délce 630 nm viz Graf 4 a Graf 5.



Graf 4: Spektroskopicky určené množství rozpuštěného PVA v PBS z navážených 30 mg PVA po 0, 5 a 10 cyklech F-T



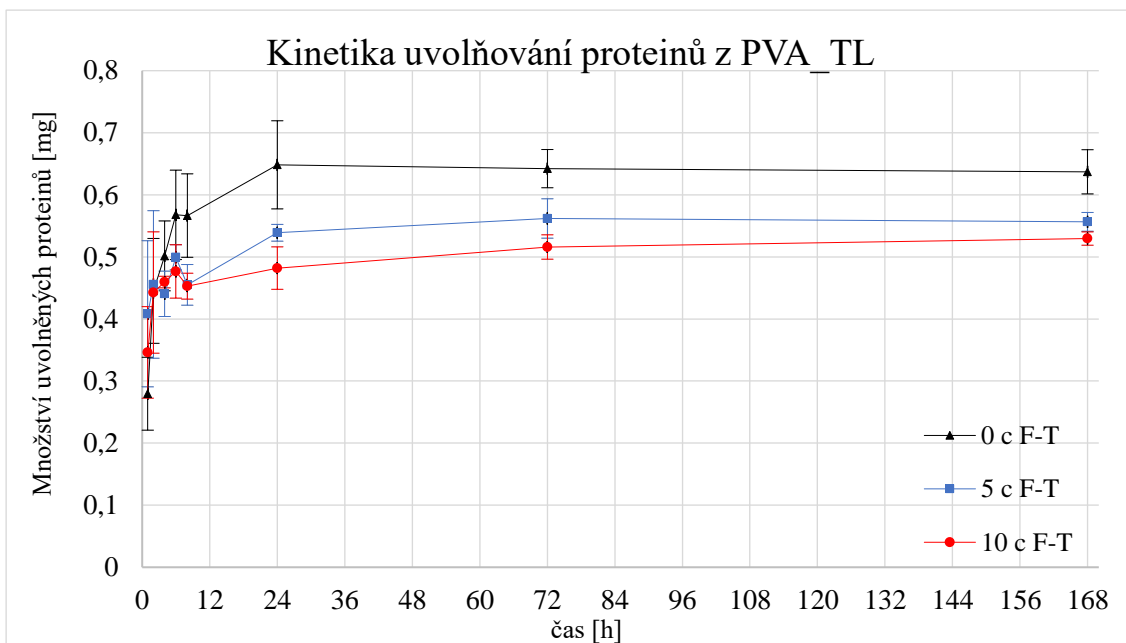
Graf 5: Spektroskopicky určené množství rozpuštěného PVA v PBS z navážených 30 mg PVA\_TL po 0, 5 a 10 cyklech F-T

Z výsledných grafů rozpustnosti PVA vidíme, že množství rozpuštěného PVA se u vstupních materiálů PVA a PVA\_TL příliš neliší. Během prvních 24 hodin se ve vstupním PVA vzorku rozpustilo 17,6 mg PVA, což odpovídá 59 % rozpuštěného PVA z navážených 30 mg PVA. Množství rozpuštěného PVA ve vstupní vzorku PVA\_TL po 24 hodinách bylo 18,1 mg PVA. Při odečtení inkorporovaných proteinů dostáváme 62 % rozpuštěného PVA z navážených 30 mg PVA\_TL. Při srovnání hodnot rozpuštěného PVA ve vstupních PVA materiálech můžeme pozorovat snížení rozpustnosti PVA o 11 % po 5 cyklech F-T a o 12 % po 10 cyklech F-T. Při porovnání vstupních vzorků PVA\_TL s materiály po F-T nepozorujeme stejný trend jako u čistého PVA. U materiál po 5 cyklech je vidět snížení rozpuštěného PVA o 15 %, ale u materiálu po 10 cyklech došlo ke snížení rozpuštěného PVA pouze o 2 %. Z výsledků je patrný vliv metody F-T na množství rozpuštěného PVA. Experiment byl proveden pouze jednou, tudíž by bylo vhodné měření opakovat. Mohla by se změnit teplota používaná v metodě F-T z +4 °C, která byla zvolena na základě minimálního vlivu na aktivitu inkorporovaných proteinů, na pokojovou teplotu pro účinku fáze tání.

Analýza pomocí gelové permeační chromatografie proběhla, nicméně výsledky z naměřených hodnot nejsou hodnotitelné viz Příloha.

### 5.2.3. Analýza uvolňování proteinů

Všechny vzorky po F-T byly skladovány při teplotě 37 °C v PBS, odkud byly odebírány vzorky pro samotné měření ve stejných časových intervalech jako u vzorků pro spektrofotometrii (viz Kap. 5.2.2.). Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí spektrofotometrické metody dle Bradforda, které umožňuje kvantifikaci proteinů, tím pádem lze stanovit koncentraci uvolňovaných proteinů z vyrobených materiálů (viz Kap. 4.6.5.). Měření připravených vzorků probíhalo při vlnové délce 595 nm. V Grafu 6 níže lze vidět průběh uvolňování proteinů ze vstupních vzorků a ze vzorků, které prošly 5 a 10 cykly F-T.

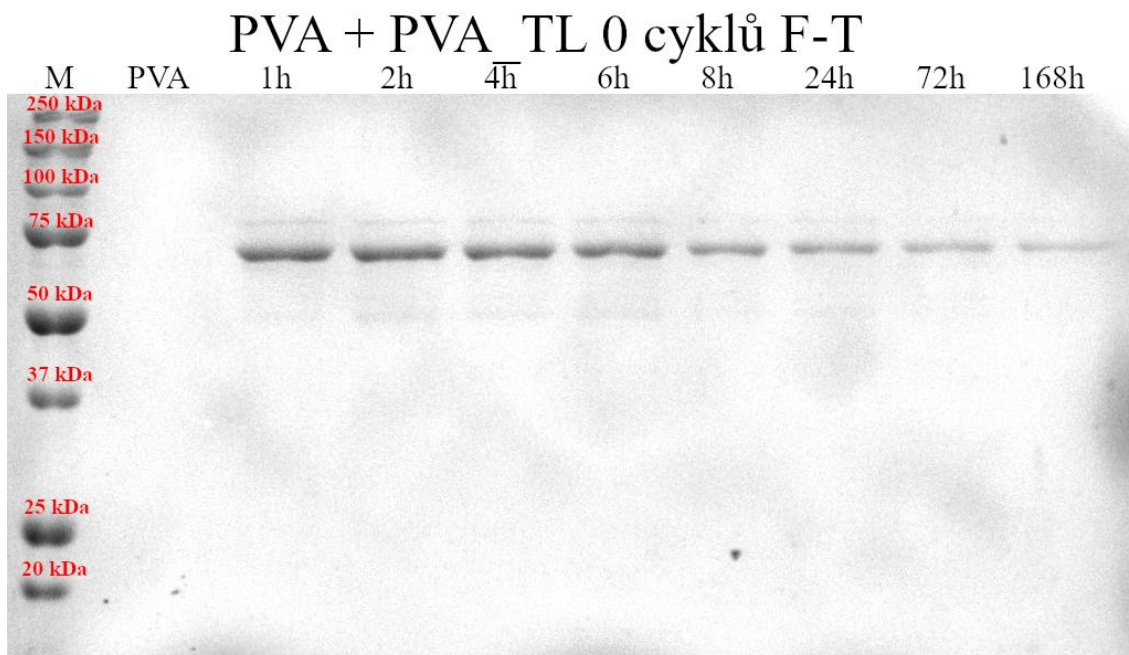


Graf 6: Množství kumulativně uvolněných proteinů v závislosti na čase stanovené spektrofotometricky z 30 mg naváženého materiálu PVA\_TL po 0, 5 a 10 cyklech F-T

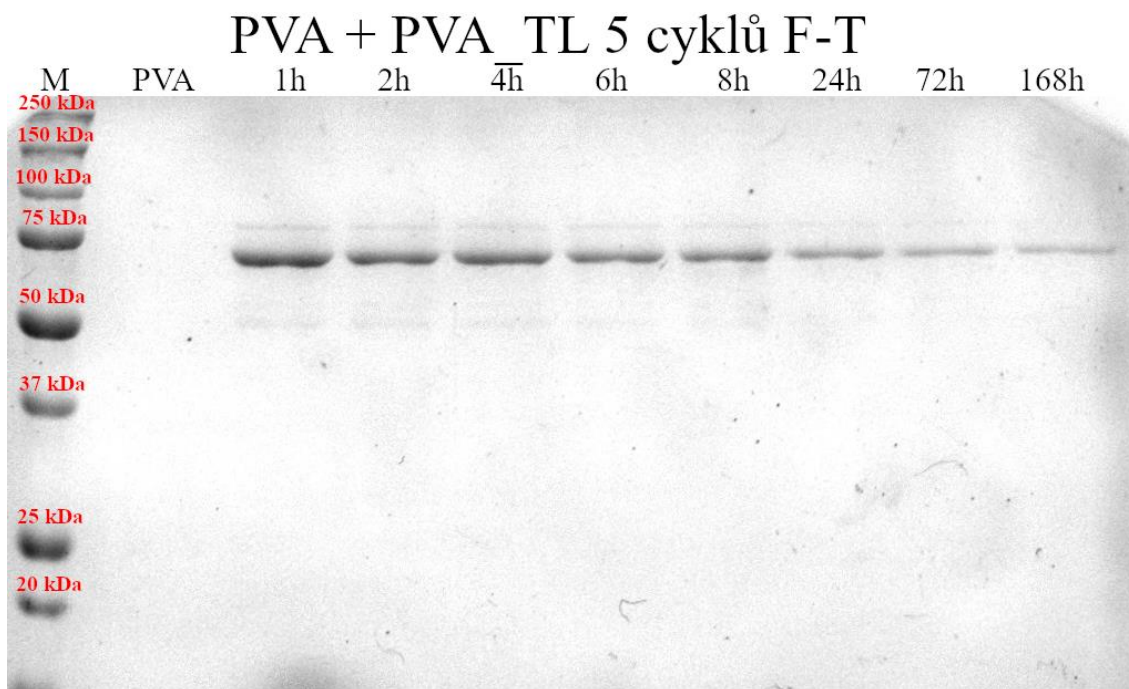
Z výsledného grafu uvolněného množství proteinů můžeme vypočítat množství uvolněného proteinu na 1 gram materiálu. Teoretický loading pro materiál PVA\_TL vyšel 19,65 mg proteinů na 1 gram připraveného materiálu. U vstupních materiálů PVA\_TL se množství uvolněných proteinů rovnalo 21,23 mg proteinů na 1 gram připraveného materiálu po 168 hodinách, což odpovídá 108 % teoretického loadingu. Při porovnání množství uvolněných proteinů z PVA\_TL po 5 cyklech po 168 hodinách se vstupní hodnotou dochází k 13% poklesu. U PVA\_TL po 10 cyklech je pokles množství uvolněných proteinů oproti vstupním materiálům o 17 %. Pokles množství uvolněných proteinů může být způsoben degradací proteinů během skladování vzorků v inkubátoru při 37 °C. Dalším možným faktorem je kumulativní charakter metody při odebrání vzorků, kdy nedochází též k úplnému rozpuštění materiálu. Odchytky v jednotlivých měřeních mohou být způsobeny nehomogenitou vyrobených materiálů.

Uvolňování proteinů bylo analyzováno pomocí SDS-PAGE (viz Kap. 4.6.6.). Do předem připravených jamek v gelu byly naneseny vzorky PVA\_TL inkubované v PBS v 37 °C včetně PVA pro negativní kontrolu a markeru Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards (Obr. 15, Obr. 16, Obr. 17). Do první jamky bylo naneseno

5  $\mu$ l markerku, do druhé byl nanesen vzorek čistého PVA pro negativní kontrolu a do zbylých jamek bylo vždy nanášeno 15  $\mu$ l připraveného vzorku PVA\_TL.

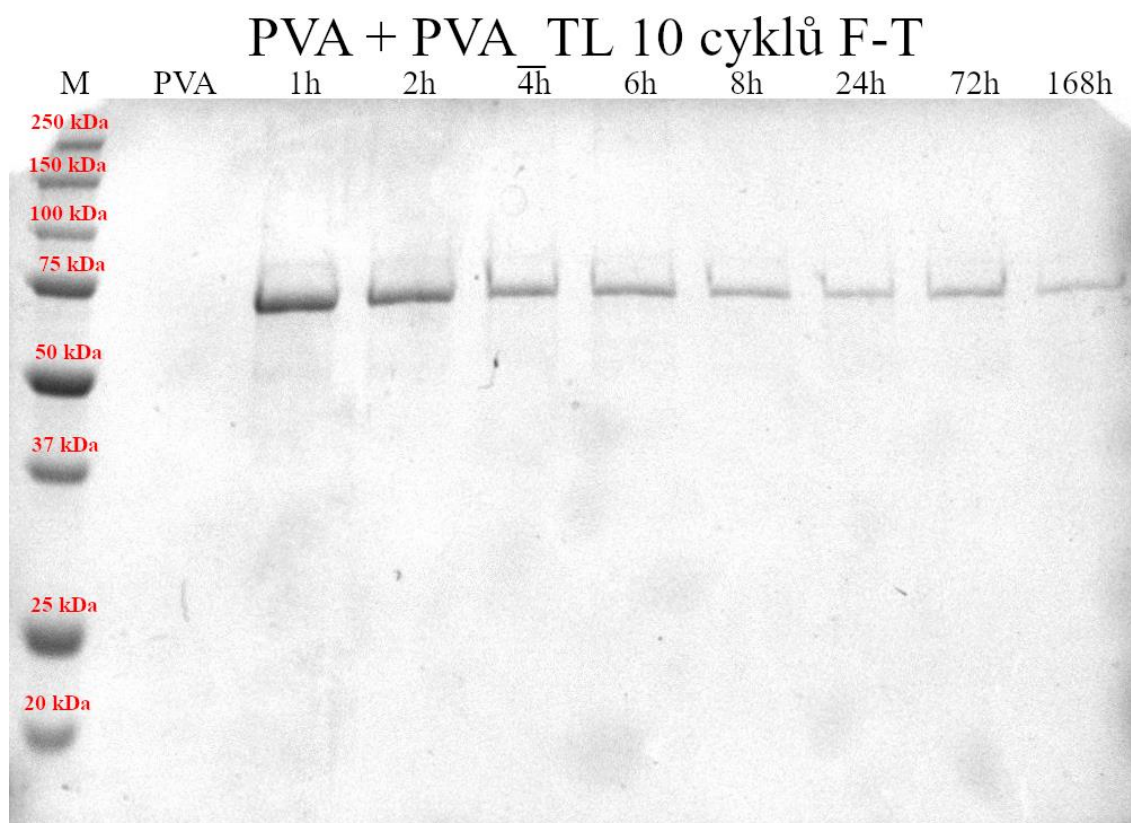


Obrázek 15: Analýza uvolňování proteinů pomocí SDS-PAGE u vstupních materiálů PVA\_TL



Obrázek 16: Analýza uvolňování proteinů pomocí SDS-PAGE u materiálů PVA\_TL po 5 cyklech F-T



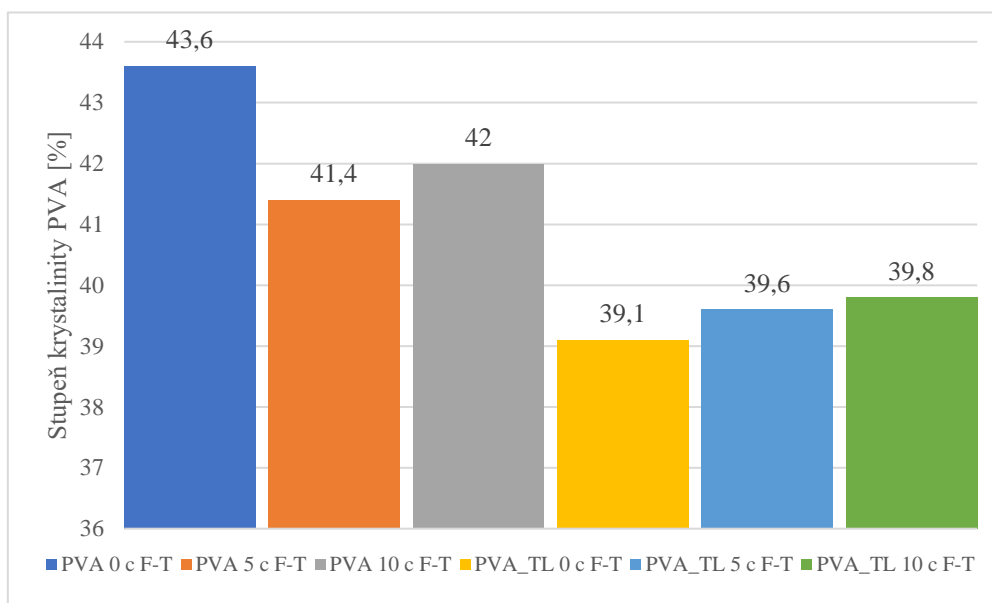


Obrázek 17: Analýza uvolňování proteinů pomocí SDS-PAGE u materiálů PVA\_TL po 5 cyklech F-T

Snímky elektroforeogramů korespondují s výsledky naměřenými pomocí metody dle Bradforda. Je možné vidět postupný pokles koncentrace uvolňovaných proteinů z důvodu kumulativního efektu, kdy bylo neustále odebíráno ze vzorků, kde u nově dodaných proteinů docházelo k pomalejšímu uvolňování. Hlavní složkou trombocytárního lyzátu je lidský sérový albumin, který má velikost 66 kDa, což přibližně odpovídá nafoceným snímkům.

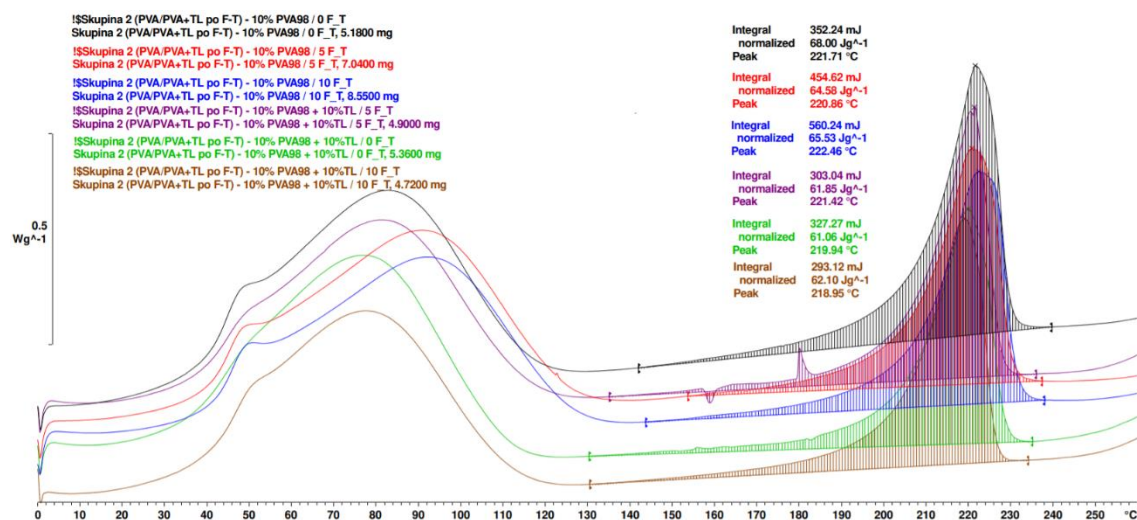
5.2.4. Analýza krystalinity PVA pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie  
 Krystalinita polymerů se zvyšuje díky tvorbě pravidelných ne vazebných interakcí. Vodíkové můstky mezi jednotlivými řetězci PVA, které jsou následně posíleny metodou fyzikálního síťování F-T, vedou k celkovému zvýšení krystalinity PVA. Diferenciální skenovací kalorimetrie sloužila pro měření krystalinity PVA ve formě nanovláčkových vzorků (viz Kap. 4.6.4.) v laboratoři Ing. Luboše Běhálka, PhD. Z Grafu 7 je patrné, že vstupní čisté PVA má vyšší krystalinitu s hodnotou 43,6 % než vstupní PVA\_TL s hodnotou 39,1 %, jelikož jeho struktura čistého PVA má větší pravidelnost.

Na materiálech s inkorporovanými proteiny můžeme pozorovat vzestupný trend krystalinity s přibývajícím počtem cyklů F-T, ale u čistého PVA takový trend pozorovat nelze. Analýzu by bylo vhodné opakovat pro ověření získaných trendů.



Graf 7: Výsledky měření krystalinity PVA pomocí DSC

Na Obrázku lze pozorovat rozdílné chování materiálů PVA a PVA\_TL při teplotách nad 235 °C, kdy u vzorků s inkorporovanými proteiny PVA\_TL dochází k rychlejší degradaci PVA (vzestup křivek). Čisté vzorky PVA se zdají být v tomto ohledu stabilnější.



Obrázek 18: DSC Křivky všech připravených materiálů

## Závěr

V rámci této bakalářské práce byl zkoumán vliv fyzikálního síťování pomocí metody „freeze-thaw“ (F-T) na stabilitu vyrobených PVA nanovláčkových vrstev z pohledu rozpustnosti PVA, krystalinity PVA a uvolňování inkorporovaných proteinů. Pro experimenty byla zvolena jako výchozí surovina PVA s vysokou molekulovou hmotností (125 000 g/mol) a vysokým stupněm hydrolyzy (98 %). Střídavé (AC) elektrostatické zvláknění bylo použito na výrobu nanovláčkových vrstev čistého PVA i PVA\_TL s inkorporovanými trombocytárními lyzáty. U všech vyrobených materiálů byla analyzována morfologie vláken, rozpustnost PVA před a po aplikaci metody F-T, a i vliv F-T na krystalinitu PVA. Nanovláčkové vrstvy s inkorporovanými proteiny byly analyzovány spektrofotometricky z hlediska kinetiky uvolňování proteinů z vyrobených materiálů.

Vyrobené nanovláčkové materiály PVA a PVA\_TL se lišily průměrem vláken. Průměrná hodnota vláken čistého PVA se rovnala  $384 \pm 120$  nm, zatímco u PVA\_TL byla hodnota nižší  $274 \pm 74$  nm pro vstupní materiály. Produktivita zvláknění pro čisté PVA je více než 4krát vyšší než u materiálů s inkorporovanými proteiny PVA\_TL. Morfologie vláken vstupního materiálu PVA a PVA po 5 cyklech jsou podle statistické analýzy shodné, zatímco u materiálu po 10 cyklech došlo ke snížení. Aplikace metody F-T neměla vliv na výslednou morfologii vláken materiálu PVA\_TL.

Množství rozpuštěného PVA po prvních 24 hodinách ve vstupních materiálech se rovnalo 59 % u čistého PVA. U materiálu s inkorporovanými proteiny se množství rozpuštěného PVA rovnalo 62 %. Rozpustnost PVA klesá při použití metody F-T, u čistého PVA bylo možné pozorovat pokles množství rozpuštěného PVA o 11 % po 5 cyklech F-T a o 12 % po 10 cyklech F-T. Stejný trend můžeme pozorovat u materiálů PVA\_TL, kde došlo k poklesu množství uvolněného PVA o 15 % po 5 cyklech F-T, ale pouze o 2 % po 10 cyklech F-T.

Uvolňování proteinů u vstupních PVA\_TL materiálů odpovídá efektu „burst release“, kdy dochází k uvolnění 109 % inkorporovaných proteinů ve vstupních materiálech během prvních 24 hodin. Při porovnání vstupních materiálů můžeme u PVA\_TL po 5 cyklech pozorovat snížení množství uvolněných proteinů o 17 % a pro PVA\_TL po 10 cyklech je možné vidět snížení uvolněných proteinů o 27 % během prvních 24 hodin. Výsledky



pro vrstvy PVA\_TL po 5 a 10 cyklech tedy poukazují na trend, kdy po aplikaci metody F-T můžeme pozorovat snížení množství uvolněných látek.

Krystalinita PVA se zvyšuje s pravidelností struktury a výskytem nevazebných interakcí mezi jednotlivými řetězci. U vstupních materiálů lze konstatovat, že krystalinita čistého PVA (43,6 %) je vyšší než u vstupního PVA\_TL (39,1 %). Po aplikaci metody F-T však materiály reagují podle výsledků rozdílně. Krystalinita vrstev s inkorporovanými proteiny po 5 a 10 cyklech pomalu roste až na hodnotu 39,8 %. Zatímco u čistého PVA můžeme pozorovat snížení krystalinity až na hodnotu 41,4 %.

Získané výsledky z této práce směřují k předpokladu, že aplikací metody F-T dochází ke snižování rozpustnosti PVA a k pozvolnějším uvolňování inkorporovaných proteinů. Vliv fyzikální stabilizace na morfologii PVA vláken se zdá být minimální, nejspíš tak nedochází k výraznému zmenšování průměrů vláken po aplikaci F-T. Všechna měření byly provedeny z jednoho experimentu, tudíž by bylo vhodné experiment opakovat za stejných podmínek a pro budoucí experimenty by bylo dobré vyzkoušet metodu F-T s rozdílnou teplotou. Místo 4 °C by se mohla použít pokojová teplota pro umocnění fáze tání vyrobených materiálů.

## Seznam použité literatury

AKTER, F., J. IBANEZ a N. BULSTRODE, 2016. Skin Engineering. In: *Tissue Engineering Made Easy* [online]. B.m.: Elsevier, s. 17–27 [vid. 2020-10-31]. ISBN 978-0-12-805361-4. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-805361-4.00003-5

ALIZADEH-OSGOUEI, Mona, Yuncang LI a Cuie WEN, 2019. A comprehensive review of biodegradable synthetic polymer-ceramic composites and their manufacture for biomedical applications. *Bioactive Materials* [online]. **4**, 22–36. ISSN 2452-199X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioactmat.2018.11.003

ALVES, Marie-Helene, Bettina E. B. JENSEN, Anton A. A. SMITH a Alexander N. ZELIKIN, 2011. Poly(Vinyl Alcohol) Physical Hydrogels: New Vista on a Long Serving Biomaterial: Poly(Vinyl Alcohol) Physical Hydrogels: .... *Macromolecular Bioscience* [online]. **11**(10), 1293–1313. ISSN 16165187. Dostupné z: doi:10.1002/mabi.201100145

ASADI, Nahideh, Azizeh Rahmani DEL BAKHSHAYESH, Soodabeh DAVARAN a Abolfazl AKBARZADEH, 2020. Common biocompatible polymeric materials for tissue engineering and regenerative medicine. *Materials Chemistry and Physics* [online]. **242**, 122528. ISSN 0254-0584. Dostupné z: doi:10.1016/j.matchemphys.2019.122528

BACAKOVA, Lucie, Julia PAJOROVA, Marketa ZIKMUNDOVA, Elena FILOVA, Petr MIKES, Vera JENCOVA, Eva KUZELOVA KOSTAKOVA a Alla SINICA, 2020. Nanofibrous Scaffolds for Skin Tissue Engineering and Wound Healing Based on Nature-Derived Polymers. In: Islam AHMED HAMED KHALIL, ed. *Current and Future Aspects of Nanomedicine* [online]. B.m.: IntechOpen [vid. 2020-10-01]. ISBN 978-1-78985-869-3. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.88602

BAJPAI, Ak a Rajesh SAINI, 2005. Preparation and characterization of biocompatible spongy cryogels of poly(vinyl alcohol)-gelatin and study of water sorption behaviour. *Polymer International* [online]. **54**(9), 1233–1242. ISSN 0959-8103, 1097-0126. Dostupné z: doi:10.1002/pi.1813

BEN HALIMA, Nihed, 2016. Poly(vinyl alcohol): review of its promising applications and insights into biodegradation. *RSC Advances* [online]. **6**(46), 39823–39832. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/C6RA05742J

BERMEJO, Javier Sacristan a Carmen Mijangos UGARTE, 2009. Chemical Crosslinking of PVA and Prediction of Material Properties by Means of Fully Atomistic MD Simulations. *Macromolecular Theory and Simulations* [online]. **18**(4–5), 259–267. ISSN 1521-3919. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1002/mats.200800099

BORKAR, Tanhai, Vidul GOENKA a Amit Kumar JAISWAL, 2021. Application of poly- $\epsilon$ -caprolactone in extrusion-based bioprinting. *Bioprinting* [online]. **21**, e00111. ISSN 2405-8866. Dostupné z: doi:10.1016/j.bprint.2020.e00111

BUZGO, Matej, Andrea MICKOVA, Michala RAMPICHOVA a Miroslav DOUPNIK, 2018. 11 - Blend electrospinning, coaxial electrospinning, and emulsion electrospinning techniques. In: Maria Letizia FOCARETE a Anna TAMPIERI, ed. *Core-Shell*

*Nanostructures for Drug Delivery and Theranostics* [online]. B.m.: Woodhead Publishing, Woodhead Publishing Series in Biomaterials, s. 325–347 [vid. 2021-03-24]. ISBN 978-0-08-102198-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-102198-9.00011-9

CUI, Wenguo, Yue ZHOU a Jiang CHANG, 2010. Electrospun nanofibrous materials for tissue engineering and drug delivery. *Science and Technology of Advanced Materials* [online]. **11**(1), 014108. ISSN 1468-6996. Dostupné z: doi:10.1088/1468-6996/11/1/014108

DAZA AGUDELO, Jorge Ivan, Juan Manuel BADANO a Ignacio RINTOUL, 2018. Kinetics and thermodynamics of swelling and dissolution of PVA gels obtained by freeze-thaw technique. *Materials Chemistry and Physics* [online]. **216**, 14–21. ISSN 0254-0584. Dostupné z: doi:10.1016/j.matchemphys.2018.05.038

DESTAYE, Addisu Getachew, Cheng-Keng LIN a Cheng-Kang LEE, 2013. Glutaraldehyde Vapor Cross-linked Nanofibrous PVA Mat with in Situ Formed Silver Nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. **5**(11), 4745–4752. ISSN 1944-8244. Dostupné z: doi:10.1021/am401730x

FREI, R, F E BIOSCA, M HANDL a T TRČ, 2008. Funkce růstových faktorů v lidském organismu a jejich využití v medicíně, zejména v ortopedii a traumatologii. 6.

GUO, BaoLin a Peter X. MA, 2014. Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review. *Science China Chemistry* [online]. **57**(4), 490–500. ISSN 1674-7291, 1869-1870. Dostupné z: doi:10.1007/s11426-014-5086-y

HASSAN, Christie M. a Nikolaos A. PEPPAS, 2000. Structure and Morphology of Freeze/Thawed PVA Hydrogels. *Macromolecules* [online]. **33**(7), 2472–2479. ISSN 0024-9297. Dostupné z: doi:10.1021/ma9907587

HENNINK, W. E. a C. F. VAN NOSTRUM, 2012. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. **64**, MOST CITED PAPERS IN THE HISTORY OF ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS: A TRIBUTE TO THE 25TH ANNIVERSARY OF THE JOURNAL, 223–236. ISSN 0169-409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2012.09.009

HOGAN, Katie J. a Antonios G. MIKOS, 2020. Biodegradable thermoresponsive polymers: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Polymer* [online]. **211**, 123063. ISSN 0032-3861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2020.123063

HUANG, Chien-Lin, Sheng-Yin PENG, Yu-Jyun WANG, Wen-Cheng CHEN a Jia-Hong LIN, 2015. Microstructure and characterization of electrospun poly(vinyl alcohol) nanofiber scaffolds filled with graphene nanosheets. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. **132**(17) [vid. 2021-02-19]. ISSN 00218995. Dostupné z: doi:10.1002/app.41891

HUANG, Zheng-Ming, Y. -Z. ZHANG, M. KOTAKI a S. RAMAKRISHNA, 2003. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology* [online]. **63**(15), 2223–2253. ISSN 0266-3538. Dostupné z: doi:10.1016/S0266-3538(03)00178-7

CHEN, Fa-Ming, Min ZHANG a Zhi-Fen WU, 2010. Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. *Biomaterials* [online]. **31**(24), 6279–6308. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2010.04.053

CHIELLINI, Emo, Andrea CORTI, Salvatore D'ANTONE a Roberto SOLARO, 2003. Biodegradation of poly (vinyl alcohol) based materials. *Progress in Polymer Science* [online]. **28**(6), 963–1014. ISSN 0079-6700. Dostupné z: doi:10.1016/S0079-6700(02)00149-1

JEM, K. Jim a Bowen TAN, 2020. The development and challenges of poly (lactic acid) and poly (glycolic acid). *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research* [online]. **3**(2), 60–70. ISSN 2542-5048. Dostupné z: doi:10.1016/j.aiepr.2020.01.002

KABIRI, K., H. MIRZADEH a M. J. ZOHURIAAN-MEHR, 2008. Undesirable effects of heating on hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. **110**(6), 3420–3430. ISSN 1097-4628. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1002/app.28148

KADAJJI, Veeran Gowda a Guru V. BETAGERI, 2011. Water Soluble Polymers for Pharmaceutical Applications. *Polymers* [online]. **3**(4), 1972–2009. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym3041972

KAMOUN, Elbadawy A., Xin CHEN, Mohamed S. MOHY ELDIN a El-Refaiie S. KENAWY, 2015. Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications: A review of remarkably blended polymers. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. **8**(1), 1–14. ISSN 1878-5352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2014.07.005

KESSICK, Royal, John FENN a Gary TEPPER, 2004. The use of AC potentials in electrospinning and electrospinning processes. *Polymer* [online]. **45**(9), 2981–2984. ISSN 0032-3861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2004.02.056

KOPRIVOVA, B., M. LISNENKO, K. SOLARSKA-SCIUK, R. PROCHAZKOVA, V. NOVOTNY, J. MULLEROVA, P. MIKES a V. JENCOVA, 2020. Large-scale electrospinning of poly (vinylalcohol) nanofibers incorporated with platelet-derived growth factors. *Express Polymer Letters* [online]. **14**(10), 987–1000. ISSN 1788618X. Dostupné z: doi:10.3144/expresspolymlett.2020.80

LI, Junxing, Aihua HE, Charles C. HAN, Dufei FANG, Benjamin S. HSIAO a Benjamin CHU, 2006. Electrospinning of Hyaluronic Acid (HA) and HA/Gelatin Blends. *Macromolecular Rapid Communications* [online]. **27**(2), 114–120. ISSN 1022-1336, 1521-3927. Dostupné z: doi:10.1002/marc.200500726

LISNENKO, Maxim, 2020. *Příprava a charakteristika nanovláknenných scaffoldů založených na PVA a jejich funkcionalizace růstovými faktory* [online]. B.m. [vid. 2021-01-04]. Technická univerzita v Liberci, Fakulta textilní. Dostupné z: <https://theses.cz/id/euw3od/>

MAITRA, Jaya a Kumar Vivek SHUKLA, 2014. Hydrogels, Cross linking, Gel, Polymer. *American Journal of Polymer Science* [online]. **7**. Dostupné z: doi:10.5923/j.ajps.20140402.01

MCCLELLAN, Phillip a William J. LANDIS, 2016. Recent Applications of Coaxial and Emulsion Electrospinning Methods in the Field of Tissue Engineering. *BioResearch Open Access* [online]. **5**(1), 212–227. Dostupné z: doi:10.1089/biores.2016.0022

MENKE, Nathan, Kevin WARD, Tarynn WITTEN, Danail BONCHEV a Robert DIEGELMANN, 2007. Impaired wound healing. Clin Dermatol. *Clinics in Dermatology* [online]. **25**, 19–25. Dostupné z: doi:10.1016/j.clindermatol.2006.12.005

MIGUEL, Sónia P., Rosa S. SEQUEIRA, André F. MOREIRA, Cátia S.D. CABRAL, António G. MENDONÇA, Paula FERREIRA a Ilídio J. CORREIA, 2019. An overview of electrospun membranes loaded with bioactive molecules for improving the wound healing process. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. **139**, 1–22. ISSN 09396411. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2019.03.010

PINA, Sandra, Viviana P. RIBEIRO, Catarina F. MARQUES, F. Raquel MAIA, Tiago H. SILVA, Rui L. REIS a J. Miguel OLIVEIRA, 2019. Scaffolding Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *Materials* [online]. **12**(11), 1824. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma12111824

POKORNY, P., E. KOSTAKOVA, F. SANETRNÍK, P. MIKES, J. CHVOJKA, T. KALOUS, M. BILEK, K. PEJCHAR, J. VALTERA a D. LUKAS, 2014. Effective AC needleless and collectorless electrospinning for yarn production. *Phys. Chem. Chem. Phys.* [online]. **16**(48), 26816–26822. ISSN 1463-9076, 1463-9084. Dostupné z: doi:10.1039/C4CP04346D

RATNER, Buddy D., Allan S. HOFFMAN, Frederick J. SCHOEN a Jack E. LEMONS, 2013. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine* [online]. Burlington: Academic Press. ISBN 978-0-12-374626-9. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=nlebk&AN=485462&lang=c&site=ehost-live>

ROMERO, Marcelo, Micaela A. MACCHIONE, Facundo MATTEA a Miriam STRUMIA, 2020. The role of polymers in analytical medical applications. A review. *Microchemical Journal* [online]. **159**, 105366. ISSN 0026-265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2020.105366

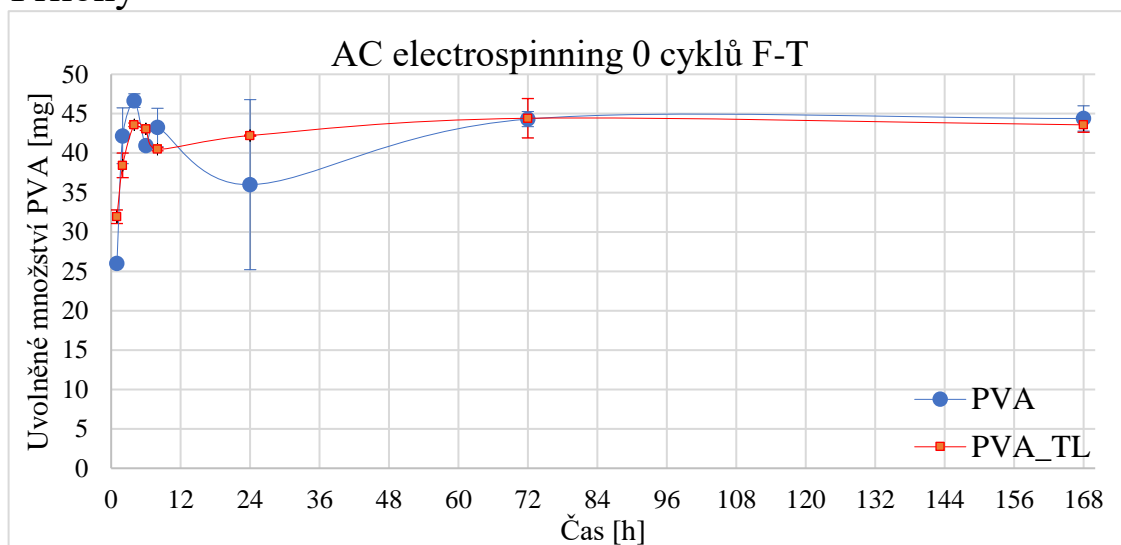
ROY, Sunanda, Shreyas KUDDANNAYA, Tanya DAS, Heng Yeong LEE, Jacob LIM, Xiao ‘Matthew’ HU, Yue Chee YOON a Jaehwan KIM, 2017. A novel approach for fabricating highly tunable and fluffy bioinspired 3D poly(vinyl alcohol) (PVA) fiber scaffolds. *Nanoscale* [online]. **9**(21), 7081–7093. ISSN 2040-3372. Dostupné z: doi:10.1039/C7NR00503B

SCHIFFMAN, Jessica D. a Caroline L. SCHAUER, 2008. A Review: Electrospinning of Biopolymer Nanofibers and their Applications. *Polymer Reviews* [online]. **48**(2), 317–352. ISSN 1558-3724, 1558-3716. Dostupné z: doi:10.1080/15583720802022182

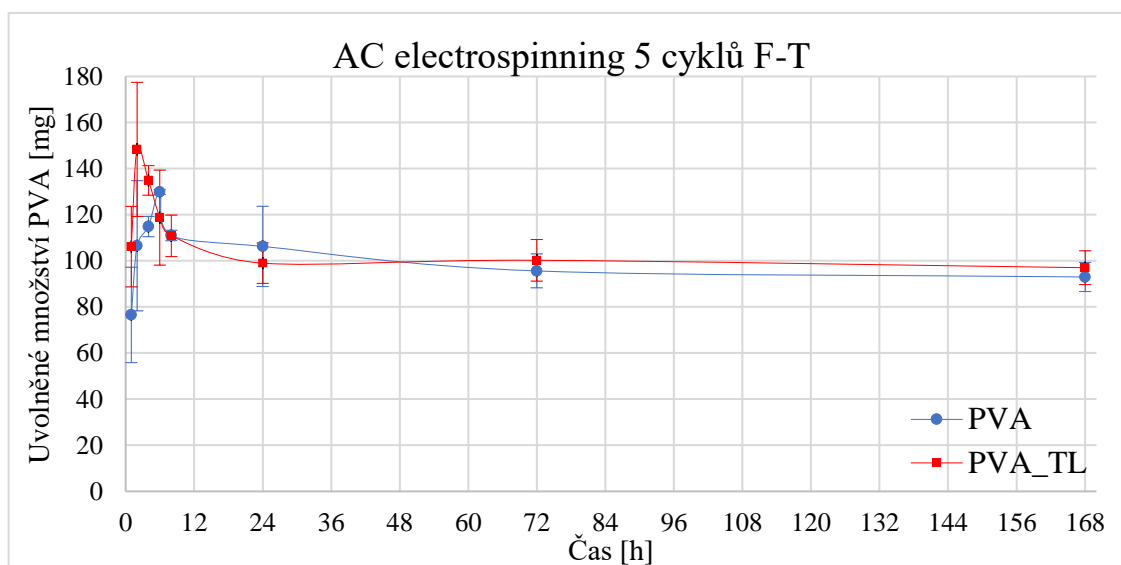
SUPAPHOL, Pitt a Surawut CHUANGCHOTE, 2008. On the electrospinning of poly(vinyl alcohol) nanofiber mats: A revisit. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. **108**(2), 969–978. ISSN 1097-4628. Dostupné z: doi:10.1002/app.27664

- TOMLINS, P., 2016. 1 - Material types for tissue scaffolds. In: Paul TOMLINS, ed. *Characterisation and Design of Tissue Scaffolds* [online]. B.m.: Woodhead Publishing, Woodhead Publishing Series in Biomaterials, s. 1–21 [vid. 2020-11-23]. ISBN 978-1-78242-087-3. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-78242-087-3.00001-8
- VALTERA, Jan, Tomas KALOUS, Pavel POKORNY, Ondrej BATKA, Martin BILEK, Jiri CHVOJKA, Petr MIKES, Eva Kuzelova KOSTAKOVA, Petr ZABKA, Jana ORNSTOVA, Jaroslav BERAN, Andrei STANISHEVSKY a David LUKAS, 2019. Fabrication of dual-functional composite yarns with a nanofibrous envelope using high throughput AC needleless and collectorless electrospinning. *Scientific Reports* [online]. **9**(1), 1801. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-38557-z
- WOOD, Fiona M., 2019. Chapter 73 - Therapeutic Applications: Tissue Engineering of Skin. In: Anthony ATALA, Robert LANZA, Antonios G. MIKOS a Robert NEREM, ed. *Principles of Regenerative Medicine (Third Edition)* [online]. Boston: Academic Press, s. 1281–1295 [vid. 2020-11-20]. ISBN 978-0-12-809880-6. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-809880-6.00073-4
- XUE, Jiajia, Tong WU, Yunqian DAI a Younan XIA, 2019. Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications. *Chemical Reviews* [online]. **119**(8), 5298–5415. ISSN 0009-2665, 1520-6890. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.8b00593
- YAN, X.H., T. ZHAO, G. ZHAO, Liang AN a X.L. ZHOU, 2015. *A hydrophilic-hydrophobic dual-layer microporous layer enabling the improved water management of direct methanol fuel cells operating with neat methanol*. 14. srpen 2015.
- YANG, Ye, Tian XIA, Wei ZHI, Li WEI, Jie WENG, Cong ZHANG a Xiaohong LI, 2011. Promotion of skin regeneration in diabetic rats by electrospun core-sheath fibers loaded with basic fibroblast growth factor. *Biomaterials* [online]. **32**(18), 4243–4254. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2011.02.042
- YARIN, A. L., 2011. Coaxial electrospinning and emulsion electrospinning of core-shell fibers. *Polymers for Advanced Technologies* [online]. **22**(3), 310–317. ISSN 1099-1581. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1002/pat.1781
- YOO, Hyuk Sang, Taek Gyoung KIM a Tae Gwan PARK, 2009. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. **61**(12), Nanofibers in Regenerative Medicine and Drug Delivery, 1033–1042. ISSN 0169-409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2009.07.007
- ZHANG, Qiang, Yingchun LI, Zhi Yuan (William) LIN, Kenneth K.Y. WONG, Min LIN, Lara YILDIRIMER a Xin ZHAO, 2017. Electrospun polymeric micro/nanofibrous scaffolds for long-term drug release and their biomedical applications. *Drug Discovery Today* [online]. **22**(9), 1351–1366. ISSN 13596446. Dostupné z: doi:10.1016/j.drudis.2017.05.007

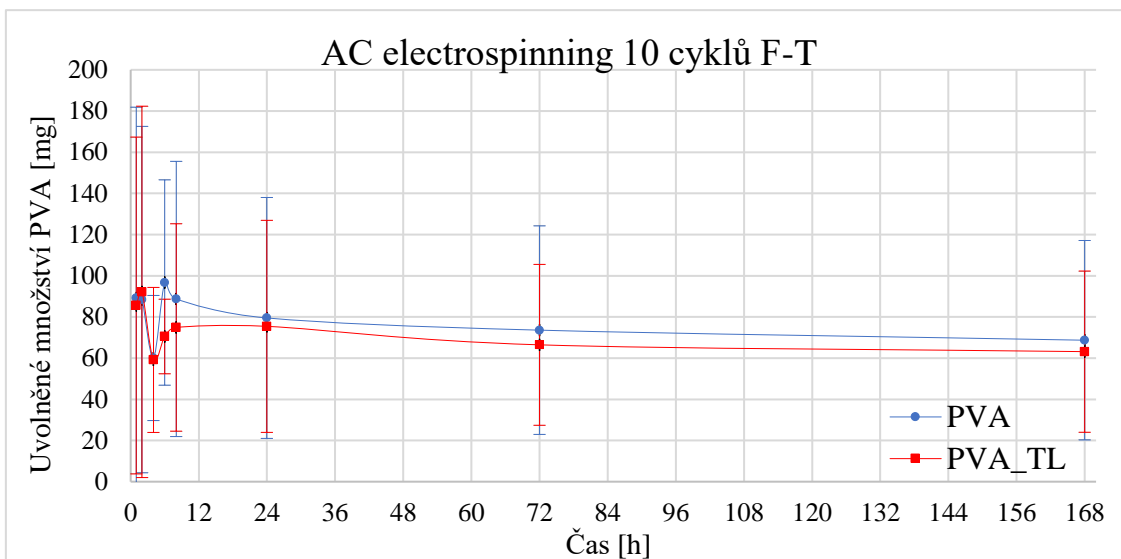
## Přílohy



Graf 8: Množství uvolněného PVA naměřeného pomocí GPC pro vstupní materiály PVA a PVA\_TL



Graf 9: Množství uvolněného PVA naměřeného pomocí GPC pro materiály PVA a PVA\_TL po aplikaci 5 cyklů F-T



Graf 10: Množství uvolněného PVA naměřeného pomocí GPC pro materiály PVA a PVA\_TL po aplikaci 10 cyklů F-T