

# Příprava a charakteristika nanovláknenných scaffoldů založených na PVA a jejich funkcionalizace růstovými faktory

## Diplomová práce

*Studijní program:*

N3106 Textilní inženýrství

*Studijní obor:*

Netkané a nanovláknenné materiály

*Autor práce:*

**Bc. Maxim Lisnenko**

*Vedoucí práce:*

Ing. Věra Jenčová, Ph.D.

Katedra chemie



# Preparation and characterization of nanofibrous scaffolds based on PVA and their functionalization by growth factors

## Master thesis

*Study programme:*

N3106 Textile Engineering

*Study branch:*

Nonwoven and Nanomaterials

*Author:*

**Bc. Maxim Lisnenko**

*Supervisor:*

Ing. Věra Jenčová, Ph.D.

Department of chemistry





## Zadání diplomové práce

# Příprava a charakteristika nanovláknenných scaffoldů založených na PVA a jejich funkcionalizace růstovými faktory

*Jméno a příjmení:* **Bc. Maxim Lisnenko**  
*Osobní číslo:* T18000293  
*Studijní program:* N3106 Textilní inženýrství  
*Studijní obor:* Netkané a nanovláknenné materiály  
*Zadávací katedra:* Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů  
*Akademický rok:* **2018/2019**

### Zásady pro vypracování:

1. Vypracovat rešerši na dané téma.
2. Příprava a charakteristika roztoků pro elektrostatické zvlákňování s obsahem trombocytových lyzátů.
3. Elektrické zvlákňování pomocí střídavého a stejnosměrného elektrického proudu.
4. Analýza připravených materiálů včetně monitoringu uvolňování proteinů.
5. Zpracování a vyhodnocení dosažených výsledků.

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

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



### Seznam odborné literatury:

- [1] BURNOUF, T., STRUNK, D., KOH, M.B.C., SCHALLMOSER, K. *Human platelet lysate: replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation?* *Biomaterials*, 2016; 76: 371-387. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.065.
- [2] PORTO, M.D.A., DOS SANTOS, J.P., HACKBART, H., BRUNI, G.P., FONSECA, L.M., DIAS, A.R.G. *Immobilization of alfa-amylase in ultrafine polyvinyl alcohol (PVA) fibers via electrospinning and their stability on different substrates.* *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019; 126, 834-841. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.263.
- [3] SUPAPHOL, P., CHUANGCHOTE, S. *On the electrospinning of poly(vinyl alcohol) nanofiber mats: A revisit.* *Journal of Applied Polymer Science*, 2008; 108 (2), 969-978. DOI: 10.1002/app.27664.
- [4] NOBLE, J.E., BAILEY M.J.A. *Quantitation of protein.* In: Burgess R., Deutscher M. (eds) *Methods in enzymology. Guide to protein purification*, vol 463, 2009; 2nd edn. Academic, New York, pp 73-95. DOI: 10.1016/s0076-6879(09)63008-1.
- [5] SARKAR, A., LUKÁŠ, D. *Physical principles of electrospinning.* Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2009. ISBN 978-80-7372-508-2.
- [6] SOVKOVÁ, V. *Příprava, charakterizace a testování krevních derivátů pro aplikace v regenerativní medicíně.* Praha, 2019. Disertační práce. Ústav biofyziky. 2. lékařská fakulta. Školitel RNDr. Evžen Amler, CSc.

Vedoucí práce:

Ing. Věra Jenčová, Ph.D.  
Katedra chemie

Datum zadání práce:

20. února 2019

Předpokládaný termín odevzdání:

15. května 2020

Ing. Jana Drašarová, Ph.D.  
děkanka



Ing. Jiří Chvojka, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Liberci dne 20. února 2019

## Prohlášení

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

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

Užiji-li diplomovou 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 diplomová 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.

15. května 2020

Bc. Maxim Lisnenko

## **PODĚKOVÁNÍ**

Rád bych touto cestou vyjádřil poděkování Ing. Věře Jenčové, Ph.D., vedoucí mé diplomové práce, za veškerou pomoc a připomínky ke zpracování obsahu, dále za její cenné rady, vstřícnost a také za čas, který mi věnovala. Děkuji také Ing. Janu Valterovi, Ph.D. (pracoviště KTS), Ing. Barboře Kopřivové (pracoviště REK), Mgr. Vítu Novotnému (pracoviště NTI), Ing. Janě Müllerové, Ph.D. (pracoviště KCH), Ing. Luboši Běhálkovi, Ph.D. (pracoviště KSP) a Ing. Šárce Hauzerové (pracoviště REK) za odborné konzultace a návrhy v dané problematice. Oceňuji jejich přívětivé jednání a děkuji za čas, který mi věnovali při práci v laboratoři. Poděkování patří i mé rodině a blízkým za trpělivost a podporu během celého studia.

## **ABSTRAKT**

Zvýšení biologické aktivity nanovláknenných materiálů strukturně připomínajících extracelulární hmotu určuje v současné době potenciální směr vývoje tkáňového inženýrství. Z hlediska podpory hojení a regenerace tkání je slibné použití plasmy bohaté na trombocyty, která obsahuje stovky biologicky aktivních látek schopných podporovat buněčnou adhezi a proliferaci. Předkládaná diplomová práce se zabývá přípravou nanovláknenných materiálů založených na PVA s obsahem nativních trombocytárních růstových faktorů, které jsou časem postupně uvolňovány. V teoretické části je stručně popsána výroba nanovláknenných scaffoldů pomocí střídavého (AC) a stejnosměrného (DC) elektrického zvláknování, dále jsou krátce charakterizovány trombocytární růstové faktory a existující způsoby funkcionalizace scaffoldů. V experimentální části byl optimalizován postup přípravy materiálů zejména pomocí AC electrospinningu ve velkém měřítku, který neovlivňuje aktivitu inkorporovaných proteinů ve výsledné nanovláknenné vrstvě. Úzká distribuce průměrů vláken ( $260 \pm 85,74$  nm) a malý výskyt defektů zajišťují homogenní inkorporaci proteinů. Díky použití PVA s vysokou molekulovou hmotností (125 000 g / mol) a s vysokým stupněm hydrolyzy (98 – 98,8 %) bylo dosaženo snížení rozpustnosti scaffoldů bez nutnosti dodatečného kovalentního síťování. Snížení rozpustnosti PVA způsobuje pozvolné uvolňování proteinů, kdy po počátečním rychlém uvolnění 90 % proteinů, je zbývajících 10 % postupně uvolňováno v průběhu dalších sedmi dnů. Cílem práce bylo také vzájemné porovnání technologií AC a DC electrospinningu z hlediska procesu výroby a morfologie nanovláken, uvolňování proteinů, rozpouštění PVA a krystalinity. Přestože samotné uvolňování proteinů má podobný průběh, v celé řadě dalších sledovaných parametrů se materiály výrazně liší. Kromě toho byla studována možnost dalšího zpomalení uvolňování proteinů a stabilizace PVA materiálů metodou „freeze-thaw“. Na základě dosažených výsledků je možné předpokládat potenciální použití materiálů funkcionalizovaných nativními proteiny např. v hojení velkých a chronických kožních poranění.

*KLÍČOVÁ SLOVA:* nanovláknena, PVA, trombocyty, růstové faktory, cílené dodávání léčiv

## **ABSTRACT**

The increase in biological activity of nanofibrous materials structurally mimics natural extracellular matrix, it currently determines the potential direction of development of tissue engineering. In terms of promoting tissue healing and regeneration, the use of platelet rich plasma, which contains hundreds of biologically active compounds capable of promoting cell adhesion and proliferation, is promising. The presented master thesis deals with the preparation of nanofibrous materials based on PVA containing native platelet-derived growth factors, which are gradually released. The theoretical part briefly describes the production of nanofiber scaffolds using alternating (AC) and direct (DC) current electrospinning, then shortly characterizes platelet-derived growth factors and existing methods of functionalization of scaffolds. In the experimental part, the large scale preparation of materials by AC electrospinning was optimized. The process does not affect the activity of incorporated proteins in the resulting nanofiber layer. The narrow distribution of fiber diameters ( $260 \pm 85.74$  nm) and the low incidence of defects ensure homogeneous protein incorporation. Thanks to the use of PVA with high molecular weight (125,000 g / mol) and with a high degree of hydrolysis (98-98.8 %), a reduction in the solubility of scaffolds was achieved without the need for additional covalent crosslinking. The reduction in the solubility of PVA causes a slow release of proteins, where after an initial rapid release of 90 % of the proteins, the remaining 10 % is gradually released over the next seven days. The aim of the work was also a mutual comparison of AC and DC electrospinning technologies in terms of the production process and morphology of nanofibers, protein release, PVA dissolution and crystallinity. Although the release of proteins itself is a similar process, the materials differ significantly in a number of other monitored parameters. In addition, the possibility of further slowing the release of proteins and stabilizing PVA materials by the "freeze-thaw" method was studied. Based on the attained results, it is possible to assume the potential use of materials functionalized with native proteins, e.g. in the healing of large and chronic skin wounds.

**KEY WORDS:** nanofibers, PVA, platelets, growth factors, drug delivery system



# Obsah

Obsah .....	9
Seznam zkratk .....	11
Úvod.....	13
TEORETICKÁ ČÁST .....	14
<b>1. Nanovláknenné scaffoldy ve tkáňovém inženýrství.....</b>	<b>14</b>
1.1 Regenerace měkkých tkání – hojení kožních defektů .....	14
1.2 Scaffoldy ve tkáňovém inženýrství.....	17
1.3 Metody výroby scaffoldů .....	18
1.3.1 Elektrostatické zvlákňování .....	20
1.3.1.1 Stejnoseměrné elektrické zvlákňování.....	21
1.3.1.2 Střídavé elektrické zvlákňování.....	23
1.4 Polymery používané ve tkáňovém inženýrství.....	24
1.4.1 Přírodní polymery .....	24
1.4.2 Syntetické polymery .....	26
1.4.3 Polymery rozpustné ve vodě .....	27
1.4.3.1 Polyvinylalkohol.....	29
<b>2. Funkcionalizace elektrostaticky zvlákněných scaffoldů .....</b>	<b>31</b>
2.1 Význam růstových faktorů v regenerativní medicíně .....	33
2.2 Trombocytární růstové faktory.....	35
2.2.1 Morfologie a struktura trombocytů.....	36
2.2.2 Trombocytární přípravky s obsahem růstových faktorů .....	39
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	43
<b>3. Materiály a metody .....</b>	<b>43</b>
3.1 Použité materiály a chemikálie .....	43
3.2 Použité přístroje a programy .....	45
3.3 Metody a protokoly .....	46
3.3.1 Příprava trombocytárních lyzátů.....	46
3.3.2 Příprava roztoků pro elektrické zvlákňování .....	46
3.3.3 Příprava vláknenných nosičů stejnosměrným elektrickým zvlákňováním .....	47
3.3.4 Příprava vláknenných nosičů střídavým elektrickým zvlákňováním.....	48
3.3.5 Elektronová mikroskopie a analýza morfologie materiálů .....	48
3.3.6 Analýza obsahu proteinů v materiálech a kinetika jejich uvolňování, sledování rozpustnosti a změny krystalinity PVA po zamrazení.....	49

<b>4. Výsledky a diskuze</b> .....	54
4.1 Příprava nanovlákných materiálů .....	55
4.2 Analýza proteinů obsažených v připravených vrstvách .....	64
4.3 Stabilizace PVA materiálů .....	69
4.4 Biologické <i>in vitro</i> testování .....	74
Závěr .....	75
Bibliografie .....	77
Přílohy .....	83

## Seznam zkratek

AC – Střídavý proud

ADP – Adenosindifosfát

ATP – Adenosintrifosfát

BDNF – Z mozku odvozený neurotrofický faktor (Brain-derived neurotrophic factor)

b-FGF – Bazický růstový faktor fibroblastů (Basic fibroblast growth factor)

BSA – Hovězí sérový albumin (Bovine serum albumin)

CBB – Coomassie Blue Brilliant

DC – Stejnoseměrný proud

dH<sub>2</sub>O – Destilovaná voda

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

DSC – Diferenciální skenovací kalorimetrie

EGF – Epidermální růstový faktor (Epidermal growth factor)

FITC – Fluorescein-5-isothiokyanát

FTIR – Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

GF – Růstový faktor (growth factor)

GPC – Gelová permeační chromatografie

HPL – Lidský trombocytární lyzát (Human platelet lysate)

IGF – Růstový faktor podobný inzulinu (Insulin-like growth factor)

NC – Negativní kontrola

PAGE – Polyakrylamidová gelová elektroforéza

PBS – Fosfátový pufr (Phosphate buffer solution)

PCL – Polykaprolakton

PDGF – Růstový faktor odvozený od trombocytů (Platelet-derived growth factor)

PEG – Polyethylenglykol

PGA – Polyglykolová kyselina

PGS – Polyglycerol sebakát

PLA – Polymléčná kyselina

PRF – Fibrin bohatý na trombocyty (Platelet-rich fibrin)

PRP – Plazma bohatá na trombocyty (Platelet-rich plasma)

PVA – Polyvinylalkohol

PU – Polyuretan

RT – Pokojová teplota

SD – Směrodatná odchylka

SDS – Dodecylsírán sodný

SEM – Skenovací elektronová mikroskopie

TEMED – Tetramethylethylendiamin

TGF- $\beta$  – Transformující růstový faktor beta (Transforming growth factor beta)

Tris – Tris(hydroxymethyl)aminomethan

TRS – Roztok bohatý na trombocyty

UV – Ultrafialové záření

VEGF – Vaskulární endotelový růstový faktor (Vascular endothelial growth factor)

vWF – von Willenbrandův faktor

w / w – Hmotnostní procenta, hmotnost na hmotnost

## Úvod

Struktura a vlastnosti nanovláknenného scaffoldu se výrazně změnily od doby, kdy oficiálně poprvé v roce 1988 byl použit termín „tkáňové inženýrství“ na workshopu National Science Foundation. Prvotní myšlenkou bylo vytvořit nový vědecký obor, který by se zaměřoval na regeneraci tkání z vlastních buněk pacienta pomocí biomateriálů, scaffoldů a růstových faktorů.

V současné době tkáňové inženýrství poskytuje ohromný potenciál pro snižování potřeby transplantací dárcovských orgánů. Rovněž snižuje problémy spojené nejen se špatnou biokompatibilitou a biofunkčností, ale i s odmítnutím nového orgánu imunitním systémem.

Dnešní technologie a zdokonalení v tomto oboru nám umožňují více zkoumat biomateriály a parametry, za kterých by se buňky chovaly podobně jako buňky zdravé tkáně. Vytvoření ideálních podmínek souvisí nejenom s porozuměním mechanickým vlastnostem tkáňového nosiče nebo s chemickým prostředím, ve kterém se buňka pěstuje, ale také závisí na podrobné topografii povrchu vyrobeného scaffoldu.

Cílem této práce je příprava a charakteristika nanovláknenných tkáňových nosičů s inkorporovanými trombocytárními růstovými faktory. Rozpustnost výsledných materiálů založených na polyvinylalkoholu je možné snižovat v závislosti na molekulové hmotnosti a stupni hydrolyzy polymeru. Díky tomu je potom zajištěno postupné uvolňování inkorporovaných proteinů do vodného prostředí. Práce se skládá ze dvou částí. Teoretická část se zabývá úvodem do problematiky nanovláknenných materiálů, elektrostatického zvláknování a trombocytárních lyzátů. Stává se tak oporou pro experimentální část, která se zabývá průběhem a podmínkami střídavého a stejnosměrného elektrického zvláknování, a následnou analýzou připravených materiálů včetně monitoringu uvolňování inkorporovaných proteinů. Na základě získaných výsledků bylo provedeno vyhodnocení celého experimentu a připravených nanovláknenných materiálů s nativními proteiny, které se postupně uvolňovaly a stimulovaly buněčnou proliferaci.

## TEORETICKÁ ČÁST

### 1. Nanovláknenné scaffoldy ve tkáňovém inženýrství

V současné době se elektrostaticky zvlákněné nanovláknenné materiály intenzivně zkoumají díky jejich struktuře vhodné pro použití ve tkáňovém inženýrství. Polymerní nanovláknna se vyznačují velkým specifickým povrchem, vysokou porozitou a průměrem blízkým vláknům přirozené mezibuněčné hmoty. (Akter *et al.*, 2016) Tyto vlastnosti účinně podporují buněčnou adhezi a proliferaci, také umožňují snadný průchod důležitých látek (živin a odpadů). (Miguel *et al.*, 2019)

Polymerů pro výrobu tkáňových nosičů není příliš mnoho, protože proces schválení nového materiálu regulačním orgánem pro použití v lékařských aplikacích je dlouhý a náročný. Proto v závislosti na budoucí medicínské aplikaci výběr správného syntetického nebo přírodního polymeru nebo směsi polymerů je velmi závažný. (Akter *et al.*, 2016) Při volbě polymeru je nezbytné brát v potaz řadu důležitých faktorů: a) polymery a produkty jejich degradace nesmí být cytotoxické; b) v závislosti na použití by měly vykazovat biodegradabilitu (rozložitelnost *in vivo*), přičemž, vzhledem k druhu polymeru, geometrii scaffoldu a místnímu prostředí, rychlost jejich rozpadu by měla odpovídat době vytvoření nové tkáně od několika týdnů do několika let; c) hotový materiál musí mít podobnou strukturu a mechanické vlastnosti jako tkáň, kterou nahrazuje. (Tomlins, 2016)

Kromě výše popsaných výhod elektrostaticky zvlákněných nanovláknenných scaffoldů ještě existuje možnost dlouhodobého a kontrolovaného uvolňování inkorporovaného léčiva. V případě inkorporace nativních proteinů je nezbytné co nejméně ovlivňovat jejich biologickou aktivitu. To znamená, že polymer, technika zapouzdření a biologicky aktivní látka musí být vybrány s maximálním ohledem na cílovou tkáň. (Miguel *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2017) Například při léčbě chronických ran u pacientů s diabetes mellitus růstové faktory se jeví jako slibný přístup k podpoře hojení ran a regeneraci měkkých tkání, konkrétně kožních poranění. (Yang *et al.*, 2011)

#### 1.1 Regenerace měkkých tkání – hojení kožních defektů

Tkáň se obvykle definuje jako soubor morfologicky podobných buněk vytvářejících orgány nebo soustavy orgánů plnících určitou funkci. Mezi měkké tkáně, kde stupeň

regenerace po deformaci je desítky až stovky procent, patří: kůže, svalová tkáň, tkáňě plíc a mozku, stěny krevních cév a dýchacích cest. Do tvrdých tkání se zařazují kosti, zubní sklovina, dentin (zubovina) a zubní cement. Pomocí modifikovaných nanovlákných kožních krytů lze urychlit a zlepšit proces hojení kožních defektů, proto dále bude stručně rozepsána kožní soustava a fáze hojení ran. (Krafts, 2010; Watson, 2016)

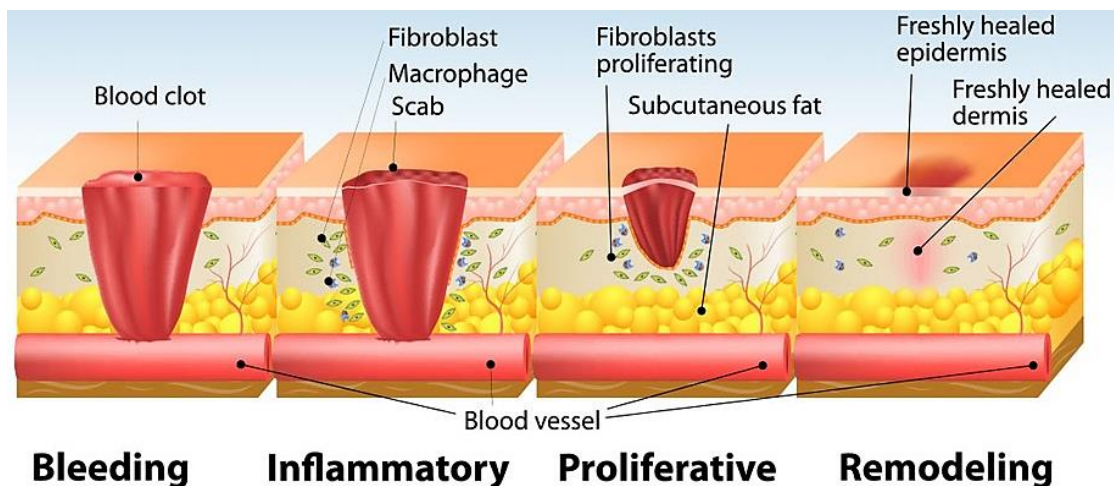
Kůže je orgán pokrývající povrch těla a vytvářející hranici mezi vnitřním prostředím organismu a vnějším prostředím. Plocha největšího plošného orgánu je přibližně 1,2 až 1,8 m<sup>2</sup>, hmotnost činí kolem 12 % celkové hmotnosti těla. Funkce kožní soustavy lze rozdělit na primární (ochrana před vstupem cizorodých mikroorganismů a před škodlivým UV zářením; příjem informací od smyslových receptorů o teplotě nebo poranění) a sekundární (tepelná izolace; skladování tuků, vody, minerálů a vitamínů; vylučování odpadních látek a vstřebávání látek rozpustných v tucích; estetická funkce). (Benešová, 2013)

Kůže se skládá ze tří základních vrstev: epidermis (pokožka je tvořena neustále se dělicími buňkami, které vytlačují starší buňky nad sebou směrem k povrchu, kde se postupně rohovatí, odumírají a odlupují se), dermis (škára je pružnou, pevnou vazivovou vrstvou, která obsahuje cévy, nervová zakončení, potní a mazové žlázy, vlasové folikuly) a hypodermis (podkožní vazivo je nejhlubší vrstvou, která je tvořena sítí kolagenních a elastických vláken a která v tukových buňkách uchovává přebytek energie). (Benešová, 2013)

Při narušení celistvosti kůže a poškození kožních cév (v důsledku opakovaného zatěžování nebo jednorázového úrazu) tělo zahajuje proces hojení, které se dělí podle různých kritérií: dle průběhu hojení (akutní nebo chronické rány), dle způsobu hojení (sešití nebo nově tvořená tkáň), dle množství choroboplodných zárodků (aseptické, kontaminované nebo infikované), dle rozsahu (povrchové, hluboké nebo komplikované). (Lin *et al.*, 2004)

Na Obrázku 1 je znázorněn průběh hojení, který charakterizují čtyři základní fáze: krvácení, zánětlivá (čistící), proliferační (granulační) a remodelační (epitelizační). K zánětlivé fázi hojení dochází téměř okamžitě po poranění. Povrch se pokrývá fibrinem, následně probíhá migrace fagocytů, které odstraňují poškozené a odumřelé tkáňě zhoršující proces hojení. Po vyčištění rány je vytvořeno ideální vlhké prostředí

pro růst a dělení nových buněk. Cílem proliferační fáze je neoangiogeneze (novotvorba cév) a tvorba granulační tkáně (díky fibroblastům produkujícím kolagen). V poslední remodelační fázi z okrajů nebo z epitelizačních ostrůvků rány epitel začíná pokrývat granulační tkáň novotvořenou kůží, dochází zde ke kontrakci a remodelaci. (Lin *et al.*, 2004)



Obrázek 1: Fáze hojení ran; převzato a upraveno podle  
(*Stages Of Wound Healing*, 2020)

Vzhledem k velkému množství faktorů ovlivňujících pomalé hojení rány existují různé typy kožních krytů, jako jsou gáza, hydrogely, transparentní filmy, hydrokoloidy, semipermeabilní pěny, algináty, produkty připravené postupy tkáňového inženýrství a nanovláknenné kožní kryty. (Lukáš *et al.*, 2008)

Ideální kožní kryt by měl udržovat vlhké prostředí a zároveň umožňovat přenos plynů, které se podílejí na buněčné integraci. Také by měl odvádět exsudát a současně zamezovat průniku bakterií. Musí být snadno vyměnitelný bez narušení hojení, nesmí být poškozena vytvořená epitelizační vrstva. Dalšími důležitými vlastnostmi jsou netoxičita, nealergenita, flexibilita a možnost přidávání různých léčivých přípravků. Téměř všechny uvedené vlastnosti mají nanovláknenné kožní kryty, které svou morfologií napodobují složení mezibuněčné hmoty, také mají velký měrný povrch, vysokou porozitu a vhodné mechanické vlastnosti. Avšak důležitým faktorem je možnost jejich funkcionalizace. (Lukáš *et al.*, 2008)



## 1.2 Scaffoldy ve tkáňovém inženýrství

Tkáňové inženýrství jako multidisciplinární obor vyrábějící nové tkáně nebo tkáňové náhrady, přináší pokročilé přístupy k regeneraci a hojení poškozené tkáně. Principem tkáňového inženýrství je vytvoření podpůrné konstrukce (scaffoldu) pro růst buněk, které se budou dobře proliferovat ve vhodném prostředí a formovat postupně novou tkáň. Fyzikálně-chemické, morfologické a mechanické vlastnosti scaffoldů by měly odpovídat vlastnostem odpovídající nahrazující tkáně. Biodegradabilita a biokompatibilita, pórovitost a propojenost pórů, bezpečnost metabolitů a mechanická stabilita - to vše musí splňovat požadavky pro různé strategie regenerativní medicíny. (Pina *et al.*, 2019)

Pro výrobu scaffoldů se používá celá řada různých biomateriálů: kovových, keramických, polymerních nebo kompozitních, viz Tabulka 1.

*Tabulka 1: Biomateriály používané při výrobě scaffoldů.*

<b>Biomateriál</b>	<b>Charakteristika</b>
Kovy	Mezi kovové materiály patří zlato, stříbro, platina nebo slitiny železa, titanu, kobaltu nebo biodegradovatelného hořčíku. Kovy díky svým dobrým mechanickým vlastnostem, vysoké pevnosti a chemické stálosti se používají jako náhrady kloubů, stenty, dentální nebo oční implantáty. (Ratner, 2013)
Keramika	Keramické materiály mají také dobré mechanické vlastnosti, vysokou pevnost, chemickou odolnost a biokompatibilitu, ale zároveň jsou křehké. Mezi keramické materiály připravené z výchozí surovinové směsi slinováním za vysokých teplot patří například oxidy hliníku a zirkonia, které se aplikují v dentálních implantátech, hlavičkách náhrad kyčelního kloubu nebo jako součást ortopedických implantátů. Dalšími keramickými materiály jsou hydroxyapatit a trikalciumfosfát. To jsou minerály hlavní neorganické složky kostí a zubů určené pro regeneraci kostní tkáně. (Ratner, 2013)
Polymery	Polymerní materiály se rozdělují na přírodní a syntetické, podrobněji každá skupina bude popsána v Kap. 1.4. Přírodní polymery vykazují lepší biologické vlastnosti (lepší interakce s biologickými systémy), ale jejich nevýhodou je problematická reprodukovatelnost výroby a riziko přenosu infekce. Tyto nedostatky mohou překonat syntetické polymery, které zároveň zvýší pevnost a zlepší chemickou stabilitu, ale jejich slabinou je slabší interakce s buňkami. Polymerní materiály mají široké využití ve tkáňovém inženýrství, například jako šicí nitě, cévní náhrady, implantáty, stenty, kožní nebo anastomotické kryty, atd. (Ratner, 2013)

Kromě výše popsaných biomateriálů existuje ještě možnost izolace mezibuněčné hmoty, která je reprezentována komplexem strukturálních proteinů (jako kolagen, elastin) a také růstovými faktory a cytokiny, které mohou zlepšit růst a životaschopnost buněk. Decelularizovaná kostní, chrupavčitá, kožní, jaterní nebo mozková tkáň (scaffold) v kombinaci s buňkami formuje nový biologický materiál využitelný ve tkáňovém inženýrství. Každý typ scaffoldů má svoje výhody a nevýhody, proto v závislosti na strategii regenerativní medicíny je potřeba promyslet všechny aspekty každého druhu biomateriálů, aby se optimalizovala užitečnost a funkčnost výsledného scaffoldu. (Pina *et al.*, 2019; Ratner, 2013)

### 1.3 Metody výroby scaffoldů

V současnosti existuje několik metod přípravy tkáňových nosičů, některé z nich zatím ještě jsou v oblasti laboratorní přípravy, jiné již vyvinuli do úrovně průmyslové produkce. V následujících Tabulkách 2 a 3 jsou uvedeny stručné přehledy nejpoužívanějších textilních a netextilních technologií výroby scaffoldů, kde každá z metod může ovlivnit výsledné strukturu, povrchové, mechanické a biologické vlastnosti výrobků. (Lukáš *et al.*, 2008) S přihlédnutím k vlastní experimentální části v dalších podkapitolách bude prostor více věnován stejnosměrnému a střídavému elektrickému zvlákňování.

*Tabulka 2: Existující netextilní metody výroby tkáňových nosičů.*

<b>Metoda</b>	<b>Stručný přehled</b>
Hydrogely	Jsou to zesíťované hydrofilní polymery, které nabobtnají při kontaktu s vodou, kterou absorbují ve velkém množství. Představují důležitou skupinu biomateriálů, protože spolu s vodou do jejich struktury mohou proniknout buňky a další látky pro tvorbu konečného implantátu. Mezi vodorozpustné polymery patří algináty, kyselina hyaluronová, polyhydroxyethylmethakrylát (PHEMA), polyethylenglykol (PEG), polyvinylalkohol (PVA). (Lukáš <i>et al.</i> , 2008)
Electrospraying	Tato metoda využívá vysoké napětí jako electrospinning, ale místo vláken se tvoří malé kapky nebo částice, jako výsledek zlomu zelektrizovaného proudu polymeru. (Alghoraibi a Alomari, 2018)

Solvent casting	Principem je ponoření formy do polymerního roztoku, po uplynutí dostatečného času dojde k vypařování rozpouštědla a vznikne vrstva polymerní membrány. Metoda je poměrně jednoduchá a levná, ale nevýhodou je použití toxických rozpouštědel, která později mohou ovlivnit život buňky denurací proteinů. Proces odstraňování rozpouštědla je časově náročný. (Lukáš <i>et al.</i> , 2008)
Particle leaching	Polymer se rozpustí ve vhodném rozpouštědle, potom se přidávají porogeny požadovaných vlastností (částice solí, vosků nebo cukru). Dále dochází k odpaření rozpouštědla, vzniká tuhý materiál složený z polymeru a částic porogenu. Posledním krokem je vymytí porogenu vhodným rozpouštědlem (např. voda), tvoří se porézní materiál. Tento postup je velmi populární v tkáňovém inženýrství pro výrobu scaffoldů. (Lukáš <i>et al.</i> , 2008)
Phase separation	Ve fázové separaci dochází k oddělení dvou fyzikálně odlišných fází. Nejprve se rozpustí polymer v rozpouštědle za vzniku homogenní fáze, dále při teplotě gelace dojde ke zgelovatění. Potom se rozpouštědlo vymývá vodou, posledním krokem mrazového sušení vzniká vysoce porézní nanovlákná struktura s průměry od 50 do 500 nm. Nevýhodou této metody je malý výběr vhodných polymerů. (Alghoraibi a Alomari, 2018)
Rapid prototyping (3D printing)	Je známo několik technik založených na rapid prototyping, 3D tisk je jednou z možností výroby scaffoldů. Pomocí počítače a speciálního programu se navrhuje model, který dále je převeden do tiskárny pro trojrozměrný tisk. Výhodou je rychlá výroba tvarově komplikovaných scaffoldů a možnost tisknout biologické látky (např. suspenze buněk). (Lukáš <i>et al.</i> , 2008)
Zpěňování	Zpěňování je možné provádět mechanickým způsobem nebo plynem. Mechanickým zpěňováním polymerních roztoků se tvoří tuhá pěna a jejím následným vysušením vzniká porézní scaffold. Čím bude koncentrace polymeru v roztoku vyšší, tím bude výsledná velikost pórů menší. Nevýhodou je omezené množství polymerních roztoků formujících stabilní pěny bez přísad povrchově aktivní látky. Při zpěňování plynem probíhá plastifikace (měkkčení) polymeru pomocí vysokého tlaku okolního plynu (např. oxidu uhličitého), zároveň klesá viskozita díky plynu difundujícímu dovnitř. Výhodou je práce za normálních teplot a vysoká výsledná porozita. (Alghoraibi a Alomari, 2018)

Tabulka 3: Existující textilní metody výroby tkáňových nosičů.

Metoda	Stručný přehled
Tkaní	Tkanina je plošná textilie vytvořená ze dvou vzájemně kolmých soustav nití, navzájem provázaných vazbou tkaniny. Nachází své využití v cévních náhradách, protože má vysokou stabilitu, velkou tuhost a odolnost proti protržení. Nevýhodou je třepení konců. Vnitřek tkané cévy se impregnuje vstřebatelnou modifikovanou želatinou, která snižuje počáteční poréznost. (Lukáš <i>et al.</i> , 2008)

Pletení	Pletenina je plošná textilie vznikající z jedné soustavy nití vytvářením a proplétáním oček. Také se používají na výrobu cévních protéz, protože jsou pružné a vhodné pro menší průřezy, lépe se aplikují. Jejich nevýhodou je menší stabilita. Stejně jako u tkanin se provádí želatinová impregnace. (Lukáš <i>et al.</i> , 2008)
Melt-blown	V podstatě lze říct, že je to textilie vyrobená rozfukováním taveniny (polymeru). Po vytlačení z trysek je tavenina unášena horkým vzduchem a následně dlužena, vzniklá vlákna se ukládají na kolektor. Změnou procesních podmínek je možné měnit vlastnosti výrobku. Vlákna s průměrem 0,5 – 10 $\mu\text{m}$ se vyznačují velkým měrným povrchem. Nevýhodou je práce pouze s určitými polymery a celkově výroba je drahá. (Alghoraibi a Alomari, 2018)
Forcespinning	Díky rotaci duté spinnerety s polymerním roztokem vznikají vlákna (průměr cca 400 nm) pomocí odstředivých hydrodynamických a kapilárních sil. Vlákna jsou dále dlužena a zachytávána na kolektorech. Výhodou je relativně jednoduché zařízení a velká produkce. (Stránská, 2018)
Electrospinning	Elektrostatické zvlákňování je způsob přípravy nanovláken z polymerního roztoku nebo taveniny pomocí elektrostatických sil. Vytvořená vrstva se vyznačuje velkým specifickým povrchem, vysokou pórovitostí a malou velikostí pórů. Průměr vniklých vláken kolísá od 10 do 1000 nm. Využití: cévní náhrady, kožní kryty, náhrady periferních nervů, implantáty pro léčbu glaukomu. (Alghoraibi a Alomari, 2018; Stránská, 2018)
Template synthesis	Šablonová syntéza využívá speciální membrány s velmi malými póry, kterými je protlačen roztok polymeru do koagulační lázně. Tato metoda je pouze laboratorní, její výhodou je možnost řízení průměrů vláken, běžně kolem 100 nm. (Alghoraibi a Alomari, 2018)
Drawing	Při dlužení je vlákno vytahováno z povrchu malé kapky prekurzoru konstantní rychlostí pomocí mikropipety a mikromanipulátoru. Obvykle vznikají vlákna s průměrem od 2 do 100 nm. Výhodou této laboratorní technologie je možnost výroby orientované struktury. (Strnadová <i>et al.</i> 2019)

### 1.3.1 Elektrostatické zvlákňování

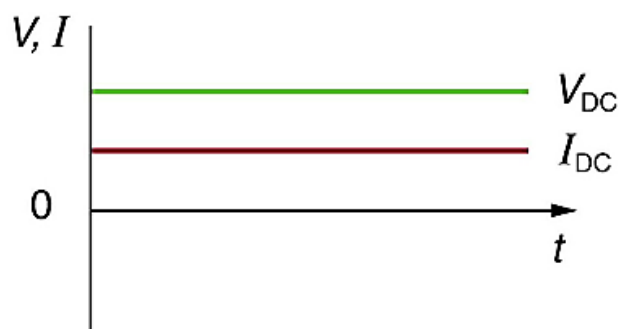
Elektrostatické zvlákňování (electrospinning) je způsob přípravy ultrajemných vláken z polymerního roztoku nebo taveniny. (Filatov *et al.*, 2007) Prvním, kdo tento jev objevil, byl anglický fyzik a filozof William Gilbert (1544-1603). Ve své práci „De Magnete“ Gilbert popisoval, jak se mění povrch kulové kapky vody do kónického tvaru při přiložení kusu jantaru nabitého třením. Ve skutečnosti je povrch kapalinového tělesa destabilizován silným elektrostatickým polem s cílem vytvořit vlákna diametrálně pod 1  $\mu\text{m}$  (obvykle kolem 200 – 600 nm). Při dosažení kritické hodnoty intenzity elektrického pole dochází k překonání kapilárního tlaku tlakem elektrickým, vznikají charakteristické Taylorovy kužely. Následnou samoorganizací prvotní složky

se vytvářejí elektricky nabitě trysky z polymerního roztoku nebo taveniny, které dále jsou přitahovány vlivem elektrického potenciálu. Po odpaření rozpouštědla vlákna procházející atmosférou ztuhnou a vytvoří vláknennou vrstvu na povrchu kolektoru. (Filatov *et al.*, 2007; Lukas *et al.*, 2008)

Electrospinningem lze vyrábět materiály s velkým specifickým povrchem, vysokou pórovitostí, malou velikostí pórů pro velké množství aplikací, jako jsou filtry, tepelné a zvukové izolátory, obvazy na rány, tkáňové nosiče nebo systémy dodávání léčiv. Ve tkáňovém inženýrství díky podobnosti s extracelulárním matrixem nanovlákna nabízejí velké výhody, mezi které patří biokompatibilita, biodegradabilita a mnohostranné chemické a mechanické vlastnosti. Další výhodou je možnost funkcionalizace nanovláknenného nosiče bioaktivními látkami, které zlepšují buněčnou interakci a proliferaci. (Jašíková, 2011)

#### 1.3.1.1 Stejnosemřné elektrické zvlákňování

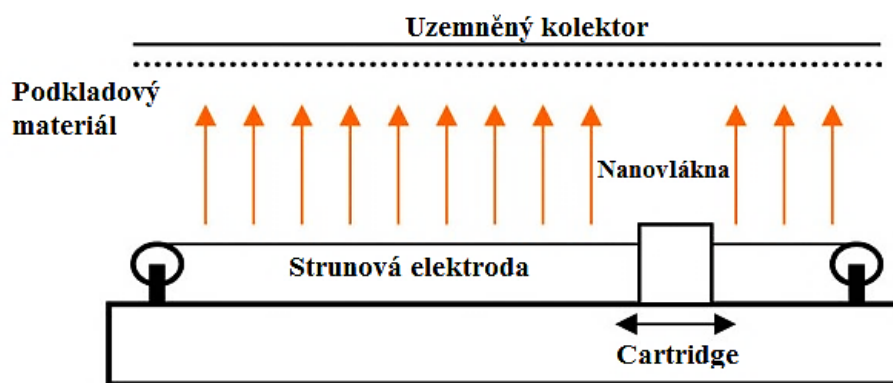
Historicky stejnosměrný proud (DC – direct current) byl prvním používaným druhem proudu, při němž elektrický náboj proudí pouze jedním směrem (Stránská, 2018), viz Obrázek 2.



Obrázek 2: Stejnosemřný proud (DC). Svislá osa ukazuje proud nebo napětí a vodorovná osa měří čas; převzato a upraveno podle (Alternating Current versus Direct Current, 2020)

Elektrostatické zvlákňování lze rozdělit na jehlové a bezjehlové, kde jehlové může obsahovat jednu nebo více jehel v různém uspořádání (lineárním, čtvercovém, trojúhelníkovém) a bezjehlové zvlákňování z polymerní hladiny může probíhat pomocí otočného vodorovného válce, spirály, disků, kužele nebo struny. V současné době zvlákňování ze struny je nejvíce využívanou technikou. (Sultan Lipol a Rahman, 2016)

Technologie Nanospider™, vyvinutá společností Elmarco, je unikátním způsobem průmyslové výroby netkaných textilií tvořených nanovlákný. Pomocí strunové elektrody a stejnosměrného napětí probíhá zvlákňování vodou nerozpustných a rozpustných polymerů, viz Obrázek 3. Proces zvlákňování je možné rozdělit do čtyř po sobě jdoucích kroků: a) nabití kapičky kapaliny a vytvoření Taylorova kužele; b) prodloužení nabitého rovného segmentu; c) ztenčení paprsku v přítomnosti elektrického pole a nárůst nestability elektrického ohybu; d) ztuhnutí a shromáždění paprsků jako pevných vláken na uzemněném kolektoru. (Sultan Lipol a Rahman, 2016)



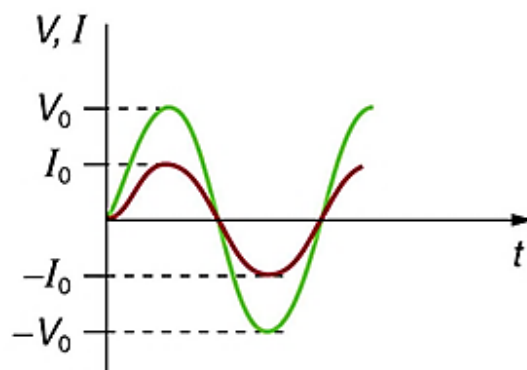
Obrázek 3: Zvlákňování ze struny (Nanospider™); převzato a upraveno podle (Elektroformirovanie nanovolokn NANOSPIDER™, 2017)

Při zvlákňování jakoukoli technologií je nutné znát jak materiálové, tak i procesní parametry, které hrají klíčovou roli v samotném procesu. Procesními parametry jsou okolní teplota a vlhkost, nastavené napětí, vzdálenost od kolektoru a elektrické vlastnosti podkladového materiálu. Materiálovými podmínkami jsou druh a molekulová hmotnost polymeru (několik desítek až stovky tisíc), koncentrace a viskozita roztoku, jeho elektrická vodivost a povrchové napětí, použité rozpouštědlo a aditiva. Při růstu viskozity polymerního roztoku, roste postupně jeho koncentrace, průměr vznikajících nanovláken a výkon zařízení. Kromě toho s větší viskozitou vzniká větší tlumení kapilárních sil, které mají tendenci rozbíjet proudy kapaliny. (Xue *et al.*, 2019)

Nevýhodou DC electrospinningu je přítomnost elektricky aktivního kolektoru, který ztěžuje kombinaci této metody s dalšími technologiemi. Hlavním problémem je vysoká hodnota intenzity elektrického pole uvnitř celé zvlákňovací zóny. (Xue *et al.*, 2019)

### 1.3.1.2 Střídavé elektrické zvlákňování

AC (alternating current) je termín označující elektrický proud, u kterého se směr v čase mění, díky čemu napětí v obvodech střídavého proudu se také periodicky mění (Lukáš *et al.*, 2009), viz Obrázek 4.



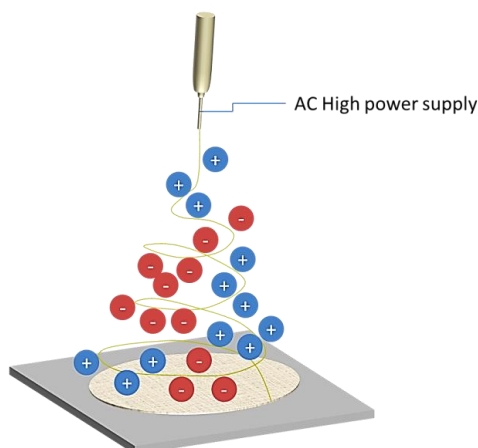
Obrázek 4: Střídavý proud (AC). Svislá osa ukazuje proud nebo napětí v závislosti na čase při frekvenci 60 Hz; převzato a upraveno podle (Alternating Current versus Direct Current, 2020)

AC je možné produkovat pomocí alternátoru – elektrického generátoru, který mění točivou mechanickou energii na střídavý elektrický proud. Smyčka drátu se pravidelně točí uvnitř magnetického pole, a když vstoupí na jinou magnetickou polaritu, na drátu se vystřídá napětí a proud. (Lukáš *et al.*, 2009)

Zařízení pro AC electrospinning se skládá z kovové tyče (zvlákňovací elektrody), kde její kanálem v ose teče polymer, který je na vrchol elektrody pumpován infuzní pumpou. Dalším krokem je nastavení frekvence střídavého napětí pro daný konkrétní materiál, protože pokud frekvence bude hodně vysoká, přenos nábojů nebude dostatečně rychlý. Naopak při velmi nízkých frekvencích proud elektrostatického zvlákňování už se nebude skládat z periodických pozitivních a negativních nábojů, ale bude obsahovat pouze nějaký jeden z nábojů. Po zapnutí střídavého elektrického pole na povrchu zvlákňovacího roztoku vznikají polymerní trysky, ze kterých je intenzivně odpařováno rozpouštědlo, tvoří se pevná nanovlákna rozptýlená ve vzduchu do cylindrického útvaru. Vzniklá nanovlákna rychle stoupají pryč od zvlákňovací elektrody díky působení elektrického větru. (Lukáš *et al.*, 2009)

AC electrospinning je ještě mladou technologií výroby nanovláken. Vznikající vlákna mají jak kladný, tak i záporný náboj, viz Obrázek 5. Následnou vzájemnou interakcí se tvoří neutrální svazek, který se do určité míry dokáže formovat ve volném prostoru.

Výhodou AC zvlákňování je to, že není potřeba mít uzemněný kolektor nebo protielektrodu. (Technologie. Střídavé zvlákňování, 2015)



Obrázek 5: Ilustrace AC electrospinningu; převzato a upraveno podle (Alternating Current (AC) Electrospinning, 2020)

Produktivita výroby nanovláken AC electrospinningem je obvykle vyšší ve srovnání s technologiemi DC electrospinningu. Při použití stejného polymeru průměry vláken z AC i DC zvlákňování se mohou lišit, příčinou tohoto jevu by mohlo být potlačení nestability proudu kapaliny při stříkání střídavým proudem. (Lukáš *et al.*, 2009)

V současné době se metoda střídavého elektrického zvlákňování úspěšně používá při výrobě jádrových i bezjádrových přízí, které dávají velké naděje v biomedicínské oblasti řízeného uvolňování léčiv. (Technologie. Střídavé zvlákňování, 2015)

#### 1.4 Polymery používané ve tkáňovém inženýrství

Nanovlákná se vyrábějí z polymerů, které se obvykle dělí podle původu na přírodní a syntetické. Ve tkáňovém inženýrství lze polymery ještě dále rozdělit na degradabilní a nedegradabilní, na bioinertní (neovlivňující biologický systém) a bioaktivní (vyvolávající kontrolovanou biologickou aktivitu). (Tomlins, 2016)

##### 1.4.1 Přírodní polymery

Přírodní polymery jsou produkovány přirozenými procesy a založeny převážně na polysacharidech (celulóza, dextran, chitin) a proteinech (kolagen, elastin). V Tabulce 4 jsou uvedeny přírodní polymery běžně používané ve tkáňovém inženýrství.



Tabulka 4: Přírodní polymery používané ve tkáňovém inženýrství.

Polymer	Charakteristika
Celulóza a její deriváty	<p>Nanovlákná z celulózy lze připravit třemi základními způsoby: bakteriální syntézou, oxidační hydrolýzou dřeva a elektrostatickým zvláknováním. Díky velmi silným intramolekulárním vodíkovým vazbám celulóza je nerozpustná v běžných rozpouštědlech. Známým rozpouštědlem je kyselina trifluoroctová, která je velmi toxická, proto ji nelze aplikovat ve tkáňovém inženýrství. Kromě toho celulóza je nerozložitelná v lidských tkáních, proto je potřeba začlenit enzymy celulózy do celulózových scaffoldů, které ji zdegradují na glukózu, přirozenou živinu pro buňky. (Petráš <i>et al.</i>, 2009)</p>
	<p>Méně náročným postupem je nahrazení přírodní celulózy jejími deriváty, které jsou lépe rozpustné a netoxické. Nejpoužívanějším derivátem je acetát celulózy (CA), který je biokompatibilní a biologicky odbouratelný ve fyziologickém prostředí. Nanovlákná připravená z acetátu celulózy se mohou používat jako krytí vnějších poranění nebo ošetření vnitřních ran při chirurgických zákrocích. (Bacakova <i>et al.</i>, 2019)</p>
Chitin a chitosan	<p>Chitin je lineární polysacharid, málo rozpustný ve vodě, spíše ve fluorovaných alkoholech nebo acetonu, biologicky odbouratelný a kompatibilní. Je základní strukturální složkou exoskeletu bezobratlých živočichů (krabů, krevet) a buněčné stěny některých mikroorganismů (hub, kvasinek). Elektrostaticky zvlákněná chitinová vlákna mají dobré vlastnosti a vynikající adhezi k epidermálním fibroblastům. (Petráš <i>et al.</i>, 2009)</p>
	<p>Chitosan je deacetylovaný chitin, který už je rozpustný ve vodných roztocích kyselin, je biokompatibilní, biologicky rozložitelný polymer, který má antimikrobiální vlastnosti. V lidském organismu je rozložen lysozymem (enzymem přítomným v různých sekrecích) na glukosamin a sacharid, které lze v těle metabolizovat nebo uložit jako proteoglykany. Kvůli nízké produktivitě elektrostatického zvláknování čistý chitosan se může směšovat s jinými přírodními nebo syntetickými polymery, jako kolagen, želatina, polykaprolakton, kyselina polymléčná, atd. (Kadajji a Betageri, 2011)</p>
Dextran	<p>Dextran může být produkován například některými bakteriemi mléčného kvašení ze sacharózy. Jeho glykosidová vazba je rozložitelná enzymem, který je produkován hlavně bakteriemi a houbami, ale také byl detekován v lidských tkáních, konkrétně v játrech a slezině. Obvykle se používá jako součást obvazů rán na bázi nanovláknenných polyuretanů, ve kterých dextran podporuje neovaskularizaci. Kromě toho přítomnost dextransu dodává polyuretanovému obvazu měkký, pružnější a smáčivější povrch. (Bacakova <i>et al.</i>, 2019)</p>
Kolagen	<p>Kolagen je nejpoužívanějším přírodním proteinem pro tvorbu nanovláknenných nosičů ve tkáňovém inženýrství. To je extracelulární, ve vodě nerozpustná fibrilární bílkovina, která je základní stavební hmotou pojivových tkání. Kolagenní nanovlákná se připravují elektrostatickým zvláknováním, však finální produkt je mechanicky slabý, proto se obvykle dělá zesítení nebo smíchání kolagenu s jinými polymery. (Bacakova <i>et al.</i>, 2019) Běžně používaná k zesítení činidla jsou toxická (například glutaraldehyd), proto se většinou kolagen kombinuje s přírodními nebo syntetickými polymery, jako chitosan, polykaprolakton nebo kopolymer kyseliny polymléčné a polyglykolové. (Petráš <i>et al.</i>, 2009)</p>

Elastin	Elastin je nerozpustný skleroprotein, který se nachází v extracelulárním matrixu a udržuje jeho elasticitu. Je to druhá hlavní proteinová složka. Přítomnost elastinu v kompozitních nanovláknenných scaffoldech může snížit rychlost degradace, kromě toho podpořit proliferaci lidských fibroblastů. (Bacakova <i>et al.</i> , 2019)
Keratin	Keratin je stavební nerozpustná ve vodě a organických rozpouštědlech bílkovina, vláknitý strukturní protein, který je základní složkou vlasů, chlupů, nehtů a vnější vrstvy epidermisu. Většinou se keratin kombinuje s jinými polymery, aby se zlepšila jeho zvláknitelnost nebo se zvýšila biologická aktivita přidaných kopolymerů. Přidání keratinu se výrazně zvyšuje hydrofilnost výsledného vlákna, která zlepšuje adhezi a proliferaci lidských mezenchymálních kmenových buněk. (Bacakova <i>et al.</i> , 2019)

#### 1.4.2 Syntetické polymery

Syntetické polymery byly poprvé zavedeny do medicíny na konci 60. let, od té doby množství použitelných polymerů se výrazně zvýšilo. (Guo a Ma, 2014) V Tabulce 5 jsou uvedeny nejvíce použitelné syntetické polymery, které byly vybrány a vyvinuty pro lékařské aplikace z toho důvodu, že jsou inertní za biologických podmínek *in vivo*.

Tabulka 5: Syntetické polymery používané ve tkáňovém inženýrství.

Polymer	Charakteristika
Polyethylenglykol	Polyethylenglykol (PEG) je ve vodě rozpustný syntetický polyether, který může zlepšit zvláknitelnost některých polymerů. Podrobněji o PEG bude popsáno v Kap. 1.4.3. Ve tkáňovém inženýrství se používají jako scaffoldy se řízeným uvolňováním léčiv. (Zhu, 2010)
Polyvinylalkohol	Polyvinylalkohol (PVA) je vodorozpustný, degradabilní polymer, který nachází své biomedicínské využití jako kontaktní čočky, membrány do ledvin a slinivky břišní, implantát menisku v kolenním kloubu a chrupavky, aplikace pro podávání léků. Podrobněji PVA bude rozepsán v Kap. 1.4.3.1. (Ben Halima, 2016)
Polyanhydridy	Polyanhydridy jsou polymerní sloučeniny tvořené z karboxylových kyselin (sebakové). Jsou to biokompatibilní polymery, které mají hydrofobní charakter a vysokou krystalinitu (více než 50 %). Rozkládají se <i>in vivo</i> na netoxické vedlejší produkty, které lze z těla vyloučit jako metabolity. V medicíně jsou určeny pro systémy dodávání léčiv. (Guo a Ma, 2014)
Polyuretan	Polyuretan (PU) zůstávají jednou z nejpopulárnějších skupin biomateriálů díky své univerzálnosti, která spočívá v jejich chemické struktuře tvořené střídavě měkkým a tvrdým segmentem v různých poměrech a délkách. PU se tradičně používají jako biostabilní a inertní materiály v srdečních chlopních, vaskulárních štěpech, katétrech a protézách. (Guo a Ma, 2014) Biodegradabilní PU lze syntetizovat začleněním hydrolyzovatelných segmentů do jejich páteřních řetězců.

Alifatické polyestery	Alifatické polyestery jsou nejvíce používanými syntetickými biokompatibilními a biodegradabilními polymery při regeneraci tkání. Výroba nanovláken se uskutečňuje elektrostatickým zvlákňováním, a to buď z roztoků, nebo z taveniny. Degradace těchto polymerů obvykle je způsobena hydrolýzou esterových skupin v jejich řetězcích. (Guo a Ma, 2014)
	PGA (kyselina polyglykolová) je jedním z nejpoužívanějších polymerů pro výrobu scaffoldů. Díky své řetězově-strukturální pravidelnosti je vysoce krystalický, ve vodných roztocích rychle degraduje a ztrácí svou mechanickou integritu během prvních dvou až čtyř týdnů, v závislosti na molekulové hmotnosti a podmínkách degradace. (Guo a Ma, 2014)
	PLA (kyselina polylactonová) je také široce používaným polymerem kvůli jeho biologické rozložitelnosti. Degradace trvá měsíce až roky, než PLA ztratí mechanickou integritu <i>in vivo</i> . Je více hydrofobní než PGA, díky obsahu methylové skupiny v opakujících se jednotkách PLA. (Guo a Ma, 2014)
	Rychlost degradace kopolymeru PLGA je možné ovlivňovat měněním se poměrem laktidu ku glykolidu. Nanovláknenné produkty z těchto polyesterů se používají jako kryty ran s řízeným uvolňováním léčiv. (Pavelková, 2012)
	Poly( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL) je semikrystalický polyester s velmi nízkou teplotou skelného přechodu $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ a nízkým bodem tání $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Chemicky i vlastnostmi je podobný PLA a PGA, také se používá v biomedicínských aplikacích. Degradace může probíhat za fyziologických teplot buď hydrolyticky, nebo enzymaticky, nebo intracelulárními mechanismy, ale i přesto je mnohem pomalejší než u PLA, PGA nebo PLGA. (Guo a Ma, 2014) Nanovláknena se připravují elektrostatickým zvlákňováním. Je možné provádět zvlákňování více vrstev (například PCL a PLA), kdy se využije různé rychlosti biodegradability při řízeném uvolňování léčiva. Finální materiály mají vysokou permeabilitu a jsou atraktivnější pro dlouhodobé používání implantátů. (Pavelková, 2012)

#### 1.4.3 Polymery rozpustné ve vodě

Z vodorozpustných polymerů se typicky připravují hydrogely (zesítněné hydrofilní polymery), které pro tkáňové inženýrství poskytují vysoce nabobtnané trojrozměrné prostředí podobné měkkým tkáním, a které umožňují difúzi živin a buněčného odpadu prostřednictvím elastických sítí. (Guo a Ma, 2014) Dále budou stručně popsány nejpoužívanější ve tkáňovém inženýrství vodorozpustné polymery, které lze rozdělit podle původu na přírodní (želatina, kyselina hyaluronová) a syntetické (polyethylenglykol (PEG), polyvinylalkohol (PVA), polyfosfazen). (Pavelková, 2012)

### ➤ Želatina

Želatina je přirozeným, degradabilním, netoxickým biopolymerem, který se připravuje buď tepelnou denaturací trojitě spirálové struktury kolagenu, nebo jeho kyselou, alkalickou hydrolyzou. Biologické, fyzikální a chemické vlastnosti želatiny záleží na původních vlastnostech kolagenu. Ale i přesto výsledná želatina má zásadně jiné vlastnosti než kolagen. Stává se rozpustnou v řadě běžných rozpouštědel (voda, zředěné organické kyseliny) a ztrácí mechanické vlastnosti kolagenu. K přípravě želatinových nanovláken se využívá elektrostatického zvláknování v kombinaci s různými syntetickými a přírodními polymery. Vzhledem k biokompatibilitě a biodegradabilitě má tento polymer velké výhody nejen v regenerativní medicíně, ale také v kosmetice, farmacii a potravinách. (Bacakova *et al.*, 2019; Petráš *et al.*, 2009)

### ➤ Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová je glykosaminoglykan neboli lineární polysacharid o vysoké molekulové hmotnosti. Je netoxická, biokompatibilní a biologicky odbouratelná látka. Elektrostatické zvláknování čisté kyseliny hyaluronové je náročné kvůli snadné rozpustnosti tohoto polymeru ve vodě, proto jedním z možných řešení je její zvláknování s vhodným, ve vodě rozpustným polymerem, například polyvinylalkoholem nebo polyethylenglykolem. (Bacakova *et al.*, 2019) Kyselina hyaluronová je součástí pojivových, epiteliálních a nervových tkání, včetně kůže, proto se široce používá ve tkáňovém inženýrství pro hojení ran. (Kadajji a Betageri, 2011)

### ➤ Polyfosfazeny

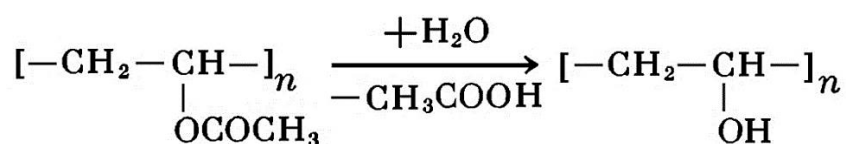
Polyfosfazeny jsou relativně novější třídou biologicky rozložitelných polymerů. Mají obvykle vysokou molekulovou hmotnost a anorganický páteř střídavých atomů fosforu a dusíku se dvěma postranními organickými skupinami připojenými ke každému atomu fosforu. Je známo více než 700 rozdílných makromolekul, které odpovídají této struktuře s různými postranními skupinami. Vedlejší skupiny mají velký vliv na finální vlastnosti produktu, například odolnost proti záření nebo požární odolnost, hydrofobnost nebo hydrofilnost, užitečné biologické vlastnosti (biodegradace). Některé ve vodě rozpustné polyfosfazeny pomalu hydrolyzují na téměř neutrální pufovaný roztok aminokyseliny, etanolu, fosfátu a amonného iontu. Nanovláknina z těchto polymerů napomáhají replikaci osteoblastů a urychlují opravu kosti, také se aplikují v systémech s řízeným uvolňováním léčiva. (Guo a Ma, 2014)

## ➤ Polyethylenglykol

Polyethylenglykol je nejpoužívanějším polymerem ze syntetických hydrogelů, má jak lineární, tak rozvětvené struktury. PEG poskytuje 3D šablony ve vodním prostředí pro regeneraci tkáně, ale jeho biologická aktivita, v důsledku neadhezivní povahy řetězců, je obvykle minimální. Hydrogely z PEG nejsou degradovatelné, proto jedním ze způsobů, jak docílit rozkladu, je polymerace PLA nebo PGA v přítomnosti PEG a katalyzátorů. Dalším způsobem je zavedení enzymů, které zdegradují vazby v páteři polymeru. PEG se používá k opravě a podpoře regenerace různých tkání, jako endotel, chrupavka a kost, díky vynikající biokompatibilitě a neimunogenitě. (Zhu, 2010)

### 1.4.3.1 Polyvinylalkohol

V roce 1924 byl poprvé objeven Hermannem a Haehnelem polyvinylalkohol (PVA), a to zmýdelněním polyvinylesteru roztokem hydroxidu sodného. Polyvinylalkohol je syntetický, biologicky rozložitelný za aerobních i anaerobních podmínek, rozpustný ve vodě polymer, který se připravuje hydrolýzou polyvinylacetátu, viz Obrázek 6. (Ben Halima, 2016)

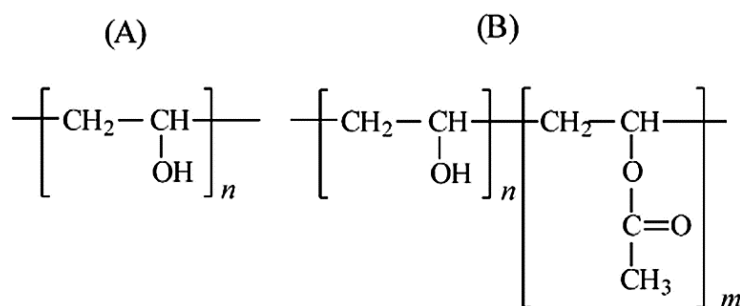


Obrázek 6: Schéma výroby PVA hydrolýzou polyvinylacetátu; převzato a upraveno podle (Polimeranalogichnyie prevrascheniya, 2020)

Polyvinylalkohol je bílá práškovitá hmota krystalického charakteru, kterou lze rozpustit pouze ve velmi polárních rozpouštědlech, jako jsou voda, dimethyl sulfoxid (DMSO), acetamid, glykoly, dimethyl formamid (DMFM). (Alves *et al.*, 2011)

Fyzikální vlastnosti hydrofilního PVA ovlivňuje polymerační stupeň a stupeň hydrolýzy. Čím bude větší stupeň polymerace a hydrolýzy, tím se hůř bude rozpouštět polymer ve vodě. Rozpustnost se snižuje v důsledku proplétání řetězců, tím pádem rozpouštědlo mnohem pomaleji proniká dovnitř molekuly. Zároveň se zvyšující se molekulovou hmotností a stupněm hydrolýzy velmi výrazně roste i krystalinita polymeru. Obrázek 7 znázorňuje stupeň hydrolýzy, který má vliv při reesterifikaci, protože zcela hydrolyzovaný polyvinylalkohol poskytuje viskóznější roztoky

než částečně hydrolyzovaný. (Ben Halima, 2016) PVA je k dispozici v široké škále stupňů hydrolyzy, však pro medicínské účely jsou často využívány zejména polymery s 88% a 98-99,8% hydrolyzou. Pomocí těchto Mowiolů (obchodní název pro plně i částečně hydrolyzovaný PVA) se připravují nejenom hydrogely s dobrou pro buniky pórovitostí a 3D strukturou, která je schopna zadržet velké množství vody, ale také elektrostaticky zvlákněná nanovláknna, která se napodobují přirozené mezibuněčné hmotě. (Alves *et al.*, 2011)



Obrázek 7: PVA zcela hydrolyzovaný (A) a částečně hydrolyzovaný (B);  
převzato a upraveno podle (Ben Halima, 2016)

Úplně hydrolyzovaný PVA má teplotu skelného přechodu 85 °C a bod tání 228 °C. Polyvinylalkohol má mnoho univerzálních fyzikálně-chemických vlastností, protože je termostabilní, flexibilní, lepivý a vykazuje toleranci vůči rozpouštědlům. Například filmy z PVA mají vysokou pevnost v tahu, odolnost proti oděru a dobré bariérové vlastnosti proti kyslíku. (Ben Halima, 2016)

PVA představuje slibnou třídu syntetického polymeru používaného v různých průmyslových odvětvích: chemickém, stavebním, textilním, farmaceutickém, potravinářském a biomedicínském. V posledním desetiletí PVA začali používat jako hydrogel v biomedicínských aplikacích, protože je biokompatibilní, má nízkou cytotoxicitu a za určitých podmínek může být biodegradabilní. (Ben Halima, 2016) PVA je velmi špatně absorbován z gastrointestinálního traktu a při perorálním podání se v těle nehromadí, také nevykazuje žádnou mutagenní aktivitu v Amesově testu. Proto se PVA hydrogely uplatňují v systémech dodávání léčiv, v enkapsulaci buněk, v obvazech na rány, ve vaskulárních štěpech a v jednorázových kontaktních čočkách, díky vysoké retenci vlhkosti, vysoké propustnosti kyslíku, optické čirosti, poddajnosti a měkkosti. (Alves *et al.*, 2011)

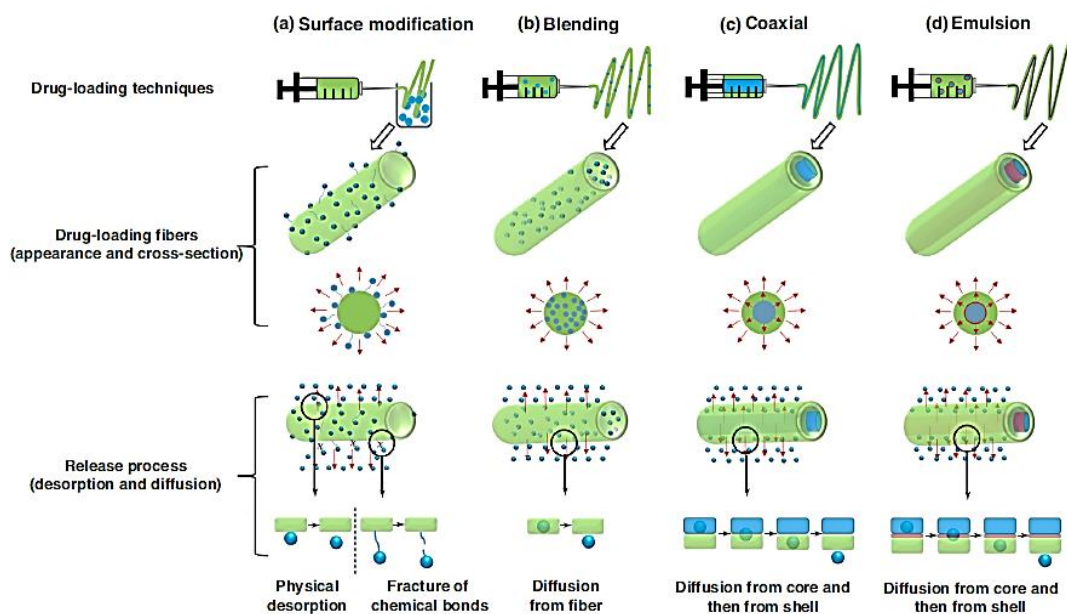
Například v cíleném transportu léčiv není výhodná dobrá rozpustnost, proto se PVA často síťuje chemicky (kyselinou boritou, glutaraldehydem, formaldehydem), fyzikálně

(zmrazením a rozmrazením), zářením (UV světlem, gama zářením, elektronovým paprskem) nebo se kombinuje s jinými nerozpustnými polymery. Hydrogely vyrobené chemickým způsobem však mohou mít toxický účinek kvůli vyluhování zbytkových zesilujících činidel z gelů. Zatímco hydrogely vyrobené fyzikálně nebo radiačně vykazují velmi nízkou cytotoxicitu. (Ben Halima, 2016; Alves *et al.*, 2011)

Vyrobít tkáňový nosič z PVA lze například pomocí elektrostatického zvláknování, kde velkou výhodou pro biomedicínu je použití vodného polymerního roztoku, což znamená za podmínek nenedenaturujících začleněné proteiny. (Alves *et al.*, 2011)

## 2. Funkcionalizace elektrostaticky zvlákněných scaffoldů

Elektrostaticky zvlákněné scaffoldy lze funkcionalizovat pomocí široké škály biologicky aktivních látek (proteinů, nukleových kyselin). Aby scaffold mohl uvolňovat léky po delší dobu, měly by léčiva vykazovat podobné fyzikálně – chemické vlastnosti jako jejich polymerní nosiče. (Tomlins, 2016) Regenerace poškozených tkání může trvat několik týdnů nebo měsíců, proto je důležité dosáhnout optimální terapeutické účinnosti. Nanovlákna s systémem řízeného dodávání léčiv je možné vytvářet několika způsoby: povrchovou úpravou, směsným, koaxiálním nebo emulzním zvlákněním. (Zhang *et al.*, 2017) Obrázek 8 popisuje různé metody funkcionalizace, které ovlivňují kinetiku uvolňování léčiva a výslednou strukturu vlákna.



Obrázek 8: Metody funkcionalizace a způsoby uvolňování léčiva z polymerních nanovláken; (a) Povrchová úprava, (b) Zvláknění ze směsi, (c) Koaxiální zvláknění, (d) Emulzní zvláknění; převzato a upraveno podle (Zhang *et al.*, 2017)

### ➤ Povrchová úprava

Povrchy nanovláken lze chemicky a fyzikálně modifikovat řadou bioaktivních molekul, které ovšem nemusí procházet elektrospinningem, a tím pádem riziko deaktivace bioaktivní látky je minimální. Další výhodou povrchové modifikace je možnost používání některých makromolekul (například heparinu), které jsou špatně rozpustné v polymerních roztocích během konvenčního elektrostatického zvlákňování. Biomolekuly se mohou navázat na povrch buď trvale pomocí kovalentních vazeb, nebo může dojít k rychlému uvolňování kvůli nestabilní fyzikální adsorpci. Tento způsob biofunkcionalizace povrchů pomáhá morfologicky a biologicky napodobit nanovlákná přirozené mezibuněčné hmotě, čímž se zvýší adheze, proliferace a diferenciací buněk. Avšak některá onemocnění vyžadují mnohem dlouhodobější působení léků, proto byly vyvinuty další techniky. (Zhang *et al.*, 2017)

### ➤ Zvlákňování ze směsi polymeru a biologicky aktivní látky

Při směšování jsou léčiva enkapsulována přímým rozpuštěním v roztoku polymeru před elektrostatickým zvlákňováním. Účinnost, rozložení a kinetika uvolňování zapouzdřeného léčiva jsou dány interakcí polymer – léčivo a fyzikálně-chemickými vlastnostmi polymeru i inkorporované látky. Špatná rozpustnost bioaktivní látky může ovlivňovat nerovnoměrnou distribuci léčiva v polymerním roztoku a také jeho migraci na povrch vlákna, proto je nezbytné vybrat léčivo a polymer s podobnými fyzikálními vlastnostmi. Tímto způsobem přimíchaná léčiva se budou uvolňovat krátkodobě, v případě potřeby více prodlouženého účinku se používají koaxiální a emulzní procesy nebo síťování. (Zhang *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017)

### ➤ Koaxiální elektrostatické zvlákňování

Principem koaxiálního elektrického zvlákňování je to, že biologicky aktivní látka je umístěna ve vnitřní části (v jádře) a roztok polymeru ve vnější části (v obalu) trysky. Výhodou této metody je ochrana a zachování biologické aktivity látek před vlivy vnějšího prostředí a možnost inkorporace do jádra obtížně zvláknitelných biomolekul, jako jsou antibiotika nebo antioxidační léčiva. Koaxiální metoda poskytuje nanovláknům se strukturou jádro – plášť delší dobu uvolňování léčiva. (Amiruddin Fadzli Zaini *et al.*, 2014)



### ➤ Emulzní elektrostatické zvlákňování

V podstatě se jedná o kapky molekul léčiva, které se dispergují v roztoku polymeru před elektrostatickým zvlákňováním. Na rozdíl od směsného zvlákňování, emulzní nevyžaduje běžné rozpouštědlo pro léčivo a polymer, proto roztok obsahující terapeutická činidla a polymery s odlišnými vlastnostmi může být snadno elektrostaticky zvlákňován přidáním povrchově aktivní látky nebo začleněním léčiva do mikrosfér. Doba uvolňování léčiva u emulzního a koaxiálního elektrického zvlákňování může trvat až 60 dnů, protože vzniklá vnější vrstva obalu působí jako fyzická bariéra proti difúzi zapouzdřeného léčiva. (Hu *et al.*, 2015)

Výše popsané základní techniky enkapsulace léčiv je možné vzájemně kombinovat s cílem přípravy scaffoldů s požadovanými vlastnostmi. Pro přípravu scaffoldu funkcionalizovaného biologicky aktivní látkou je nezbytné dobré porozumění mechanismům uvolňování látek. Existují tři hlavní mechanismy: desorpce biomolekul z povrchu, difúze léčiva přes matici a degradace vlákna s následným uvolňováním biologické látky do okolního média. Všechny tři mechanismy mohou existovat současně a významně ovlivňovat kinetiku uvolňování léčiva po celou dobu aplikace funkcionalizovaného scaffoldu. (Zhang *et al.*, 2017)

## 2.1 Význam růstových faktorů v regenerativní medicíně

Nedávné pokroky v proteomice vedly k objevu velkého množství potenciálně užitečných biologických látek – signálních molekul, které mají různé chemické povahy a které se dělí na lipofilní (například steroidní a thyroïdní hormony, vitamin D) a na lipofóbní (například růstové faktory, hormony insulin a glukagon, aminokyseliny a jejich deriváty, nukleotidy). Jednou z největších výzev dneška v odvětví tkáňového inženýrství je zvýšení léčebného účinku a zároveň snížení vedlejšího účinku integrováním buněk, scaffoldů, signálních molekul nebo růstových faktorů. (Vokurka, 2012)

Růstové faktory (Growth Factors, GF) jsou skupinou bioaktivních proteinů syntetizovaných buňkami mezenchymálního původu, které se specificky váží na receptory buněčných membrán a uplatňují se při reparaci a regeneraci poškozených tkání. GF mohou působit autokrinně, parakrinně i endokrinně, díky čemuž mají široké

spektrum použitelnosti vhodné při léčbě hematologických, onkologických a kardiovaskulárních problémů. (Frei *et al.*, 2008) V Tabulce 6 jsou uvedeny nejznámější růstové faktory používané v regenerativní medicíně, přičemž některé z nich jsou univerzální (dokáží stimulovat více buněčných typů), jiné jsou přísně specifické pro buňky určitých tkání.

*Tabulka 6: Přehled populárních růstových faktorů, jejich zdrojů a hlavních funkcí. (Frei et al., 2008)*

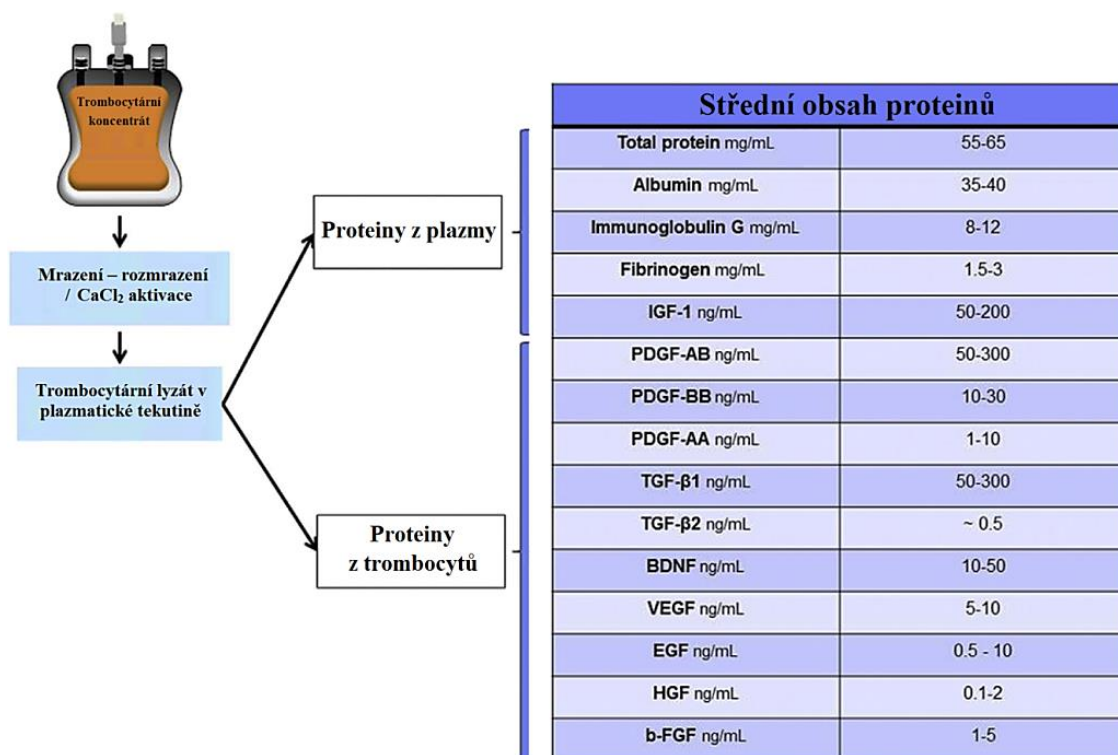
<b>Růstové faktory</b>	<b>Hlavní zdroje</b>	<b>Hlavní funkce</b>
EGF (epitelový růstový faktor)	Submaxilární slinná žláza, Brunnerova žláza	Regulace růstu, proliferace mezenchymálních a epiteliálních buněk
EPO (erythropoetin)	Ledviny	Podpora proliferace a diferenciacce červených krvinek
FGF (fibroblastový růstový faktor)	Široké spektrum buněk	Podpora proliferace širokého spektra buněk
IGF-I (insulin-like growth factor)	Primárně játra	Podpora proliferace mnoha buněčných typů a inhibice buněčné apoptózy
NGF (nervový růstový faktor)	Neurony resp. neurity	Podpora růstu a proliferace nervových buněk
PDGF (destičkový růstový faktor)	Trombocyty, endoteliální buňky, placenta	Embryonální vývoj, podpora proliferace a růstu pojivové tkáně a buněk hladkého svalstva
TGF- $\alpha$ (transformující růstový faktor)	T-, B-lymfocyty	Chemotaxe fibroblastů a eozinofilů, proliferace embryonálních kmenových buněk
TGF- $\beta$ (transformující růstový faktor)	Aktivované NK-buňky	Podpora hojení ran, antiproliferační faktor pro epiteliální buňky
VEGF (růstový faktor cévního endotelu)	Pericyty, neurony, retinální pigmentový epitel	Podpora proliferace, migrace a růstu endotelových buněk

V procesu regenerace pojivových tkání se nejvíce uplatňují destičkový růstový faktor (Platelet-derived growth factor, PDGF), epitelový růstový faktor (Epithelial growth factor, EGF) a růstový faktor cévního endotelu (Vascular endothelial growth factor, VEGF). Protože při hojení ran tyto GF stimulují proliferaci, regulují proteosyntézu, angiogenezi, migraci a diferenciaci buněk, syntetizují mezibuněčnou hmotu. (Frei *et al.*, 2008) Proto z výše zmíněných důvodů má použití růstových faktorů velký potenciál ve tkáňovém inženýrství. Lze s výhodou používat trombocytární růstové faktory, jejichž zdrojem jsou snadno dostupné trombocyty.

## 2.2 Trombocytární růstové faktory

V současné době se krevní deriváty široce uplatňují při hojení měkkých tkání, jako jsou kožní defekty, proleženiny, šlachy nebo vazy. Proces hojení ran se obecně rozděluje do čtyř fází: krvácení, zánětlivá fáze, granulace a epitelizace, viz Kap. 1.1. Dnešní tkáňové inženýrství se zaměřuje na výrobu 3D scaffoldů, které by spolu s růstovými faktory lokálně urychlovaly tvorbu granulační tkáně a zkvalitňovaly hojení ran. (Šrámek, 2009)

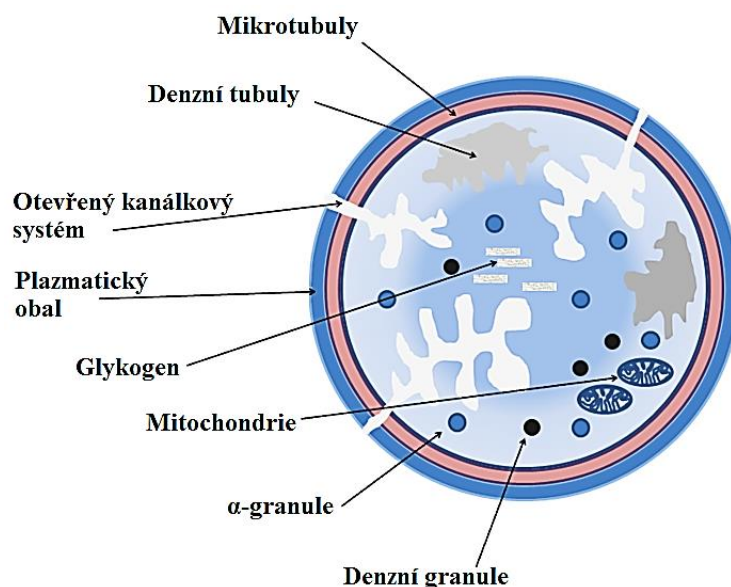
Koncentrace GF a počet receptorů na povrchu buněk ovlivňují jejich finální účinek. Mezi buňky, které obsahují receptory pro trombocytární růstové faktory, patří: mesenchymální kmenové buňky, fibroblasty, osteoblasty, endoteliální a epidermální buňky. K aktivní sekreci trombocytárních růstových faktorů z  $\alpha$ -granulí (podrobněji bude popsáno v Kap. 2.2.1) obvykle dochází během prvních 10 minut po aktivaci koagulace a během jedné hodiny je uvolněno zhruba 95 % GF z trombocytů, které se okamžitě navážou na receptory buněk obsažených v místě defektu. (Sovková, 2019; Slapnička, 2009) Na Obrázku 9 je znázorněn typický obsah bílkovin a růstových faktorů v lidských trombocytárních lyzátech (HPL).



Obrázek 9: Obsah bílkovin a růstových faktorů v HPL; převzato a upraveno podle (Burnouf et al., 2016)

### 2.2.1 Morfologie a struktura trombocytů

Trombocyty (krevní destičky) jsou nejmenším typem buněk v cirkulující krvi o průměru 2 – 4  $\mu\text{m}$  a tloušťce 0,5  $\mu\text{m}$ . (White, 2007) Krevní destičky savců vznikají fragmentací z velkých mnohjaderných buněk kostní dřeně – megakaryocytů. Z jedné buňky megakaryocytu může vzniknout až 5000 destiček, které se budou v krevním řečišti vyskytovat 9 – 11 dnů. Trombocyty, stejně jako erytrocyty, nemají jádro, proto se řadí mezi tzv. neúplné buňky diskovitého tvaru. (Shaz *et al.*, 2013) Počet krevních destiček v 1  $\text{mm}^3$  krve je přibližně 200 – 300 tisíc. Podílí se na procesu zástavy krvácení (hemostáze) a srážení krve. Při hemostáze dochází k zúžení cév v místě poranění, k shlukování krevních destiček a srážení krve. Podstatou srážení krve je přeměna rozpustné bílkoviny fibrinogenu na nerozpustný vláknitý fibrin, jehož vlákna tvoří prostorovou síť, účinkem enzymu trombinu. (Čihák *et al.*, 2004) Na Obrázku 10 je znázorněna struktura krevní destičky, o které bude podrobněji řečeno níže.



Obrázek 10: Přehled struktury krevních destiček; převzato a upraveno podle (Trombocyty, 2018)

Podle funkcí a biochemických struktur je možné krevní destičku rozdělit na čtyři oblasti: periferní, oblast sol – gel, oblast organel a membránové systémy. (White, 2007)

1) Periferní oblast se skládá z membránové a submembránové struktury. V této oblasti se uskutečňují procesy interakce destičky s mimobuněčným prostředím na molekulární úrovni. (White, 2007)

- Relativně hladká plazmatická membrána destiček má tloušťku 6 – 10 nm a hluboké vchlípeniny do nitra destičky (otevřený kanálkový systém), které zvětšují povrch a urychlují membránový transport. (Shaz *et al.*, 2013) Základním stavebním kamenem membrány je lipidová dvojvrstva, která má na vnějším povrchu začleněný sacharid (glykokalyx), který dodává zevnímu plášti mnohem silnější vlastnosti než u jiných krevních tělísek. Glykokalyx je ochranný plášť povrchu buňky, který je složen z glykoproteinů a jiných proteoglykanů, které jsou nezbytnými složkami pro usnadnění adheze destiček na poškozený povrch. Avšak hlavní funkcí glykokalyxu je ochrana povrchu buňky před mechanickým a chemickým poškozením. (White, 2007) Glykokalyxy jsou pokryty hlavními a vedlejšími glykoproteinovými (GP) receptory skupiny GPIb-IX a GPIIb-IIIa, pohyblivost kterých je nesmírně důležitá při hemostáze. Další složkou plazmatické membrány je cholesterol, který ovlivňuje pružnost membrán a jejich propustnost. V zevní části jeho koncentrace je dvakrát vyšší, než ve vnitřní. (Pecka, 2006)
- Submembránová oblast se nachází těsně pod membránou, obsahuje pravidelný systém krátkých aktinových vláken, která jsou spojená s plazmatickou membránou. Důležitou funkcí vláken je udržení tvaru destičky v neaktivní fázi a změna tvaru s translokací receptorů při její aktivaci. (Pecka, 2006)

2) Oblast sol – gel je tvořena především z fibrilových molekul proteinů, které tvoří základní jednotku destičkového kontraktálního systému. Jde o viskózní matrix, který podle morfologie a podle zastoupení základních proteinů se dělí na základní strukturální (mikrotubuly) a funkční komponenty (mikrofilamenty). (White, 2007)

- Mikrotubuly je cytoskeletální podpůrný systém, který se skládá ze skupiny 8 – 24 kruhových profilů o průměru 25 nm. Základní stavební jednotkou je protein tubulin, který se polymerizuje do tvaru trubiček a udržuje diskoidní tvar trombocytu prstencem mikrotubulů. V neaktivní fázi mikrotubuly jsou vždy lehce odděleny od sebe a uloženy těsně pod plazmatickou membránou, ke které jsou zafixovány aktinovými vlákny. Při aktivaci krevní destičky dochází k narušení mikrotubulového prstence a k přesunům granulí. (White, 2007; Pecka, 2006)
- Mikrofilamenty jsou aktinomyosinovým komplexem, který je zodpovědný za změnu tvaru a vnitřní transformace destičky. V neaktivovaných trombocytech aktin je v monomerní formě a slouží jako matrice, na kterou jsou všechny organely suspendovány a udržovány odděleně od sebe. Po aktivaci buňky aktin

se polymeruje a na kontrakci mikrofilamentozní sítě se ještě podílí myozin. K dalším proteinům mikrofilamentární struktury krevních destiček patří spektrin, gelsolin, tropomyozin a talin. (White, 2007; Pecka, 2006)

3) Do oblasti organel patří denzní tělíska, méně hustá tělíska ( $\alpha$ -granula, lysozomy, peroxizomy) a další buněčné organely (mitochondrie, ribozomy, Golgiho aparát). Hlavní funkcí je zajištění metabolických procesů v trombocytech. (White, 2007)

- Hustá tělíska nebo denzní tělíska jsou menší než  $\alpha$ -granule, jejich počet se pohybuje v rozmezí 3 až 8 granulí o průměru 80 – 150 nm v jedné destičce, mají vysokou morfologickou variabilitu, kvůli vláknům vyčnívajícím z hustého vnitřního jádra k uzavírací membráně. Kromě toho ještě obsahují vápník, hořčík, serotonin, histamin, adenosindifosfát (ADP), adenosintrifosfát (ATP), anorganický fosfát, které přejímají z extracelulárního prostoru. Jejich hlavním cílem je účast v hemostáze a tvorbě sraženiny. (White, 2007; Shaz *et al.*, 2013)
- $\alpha$ -granule jsou nejpočetnějším typem granulí, jejich množství závisí na velikosti trombocytu, ale obvykle existuje 40 až 80  $\alpha$ -granulí o průměru 200 – 500 nm na jednu krevní destičku. (White, 2007) V neaktivovaném trombocytu jsou granule volně rozmístěny a zůstávají se od sebe odděleny, ale při aktivaci se začínají spojovat v centrální části krevní destičky. V granulích jsou uskladněny četné cenné látky, které se uvolňují při aktivaci do prostředí. (Shaz *et al.*, 2013) Mezi cenné látky patří: adhezivní a integrální membránové proteiny (fibrinogen, albumin, imunoglobulin (IgG), vitronektin a von Willebrandův faktor (vWF) se účastní v hemostatickém procesu tvorby trombu), růstové faktory (EGF (epidermální růstový faktor), IGF (insulin-like growth factor) podporují hojení poraněné cévní stěny), cytokiny (PF4 – destičkový faktor 4 je malým cytokinem patřící do rodiny chemokinů CXC, jejichž hlavní funkcí je regulace zánětu), angiogenní faktory (VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor, PDGF – destičkový růstový faktor podporují růst nových krevních cév) a inhibitory angiogeneze (faktory, které inhibují růst nových krevních cév v nádoru a stabilizují již vytvořené tak, aby léky pronikaly lépe). (White, 2007; Pecka, 2006)
- Lysozomů o průměru 175 – 250 nm lidské krevní destičky mají velmi málo (obvykle tři). Lysozomy obsahují degradační hydrolytické enzymy a mohou sloužit jako endozomální trávicí komora v krevních destičkách, ačkoli význam této organely ještě není moc jasný. (Pecka, 2006)

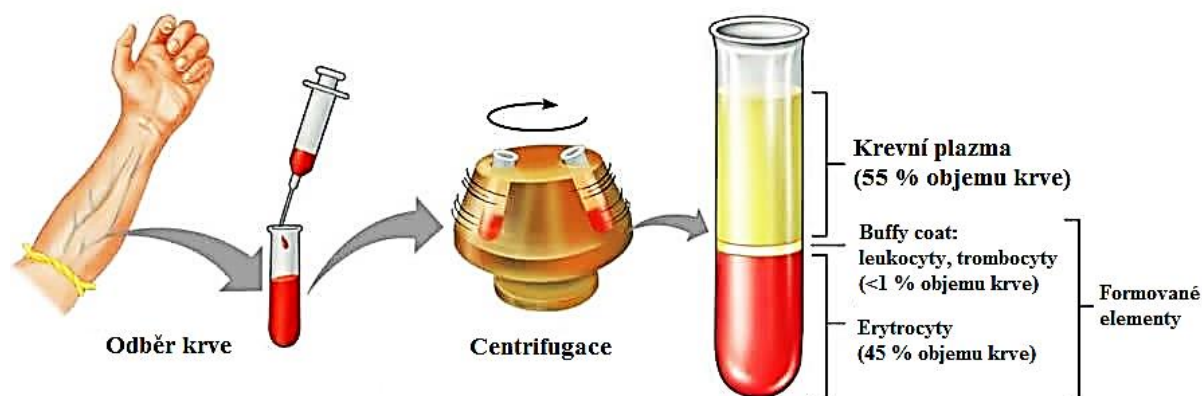
- Peroxizomy obsahují enzym katalázy (glutathionperoxidázu), který reaguje s peroxidem vodíku vznikajícím při antioxidačních mechanismech za účelem jeho odstranění. (Pecka, 2006)
- Mitochondrie zaujímají asi 3 % z celkového objemu krevní destičky, významně přispívají k energetickému metabolismu buňky. energii pro činnost buňky získávají oxidativními fosforylacemi, jimiž se syntetizuje ATP (adenosintrifosfát) z ADP (adenosindifosfátu). (White, 2007; Pecka, 2006)

4) Mezi membránové systémy patří otevřený kanálkový systém a denzní tubulární systém. (White, 2007)

- Otevřený kanálkový systém pomáhá obsahu  $\alpha$ -granulí se dostat na povrch buňky, dále zvětšuje mnohonásobně povrch destičky, pomocí kterého je možné zachytávat tekuté látky a částice z okolí. (White, 2007)
- Funkcí denzního tubulárního systému je vytvoření sítě úzkých kanálků a zásoba  $Ca^{2+}$ . Také jsou zde uloženy některé enzymy nezbytné k syntéze prostaglandinů (látek odvozených od kyseliny arachidonové, které ovlivňují prokrvení, srážení krve, imunitní a zánětlivé procesy), TXA<sub>2</sub> (tromboxanu A<sub>2</sub> stimulujícího aktivaci a zvyšujícího agregaci nových destiček) a některých bílkovin. (White, 2007; Pecka, 2006)

### 2.2.2 Trombocytární přípravky s obsahem růstových faktorů

Trombocytární koncentrát obsahuje vysoké množství trombocytů a obvykle se podává pacientům při jejich nedostatku, většinou jsou to lidé v celkově těžkém zdravotním stavu. Tyto koncentráty mohou být připraveny buď z antikoagulované plné krve odebrané při standardním dárcovském odběru (z „buffy coatu“) nebo technikou hemaferézy (trombocyty z krve dárce se separují, ale plazma, erytrocyty a leukocyty se vracejí zpět do oběhu dárce). (Greening *et al.*, 2011) „Buffy coat“ je odborný název pro bílou, neprůhlednou mezivrstvu, která obsahuje leukocyty a trombocyty vyskytující se v prostoru mezi plazmou a erytrocyty v důsledku centrifugace zkumavky s čerstvou krví obsahující antikoagulant, viz Obrázek 11. Po separaci se ještě dále redukuje obsah leukocytů a výsledkem je deleukotizovaný trombocytární koncentrát. (Buffy Coat: Definition, Composition, Preparation and Uses, 2020)



Obrázek 11: Příprava krevní plazmy a buffy coat; převzato a upraveno podle  
(Blood Plasma and Buffy Coat, 2020)

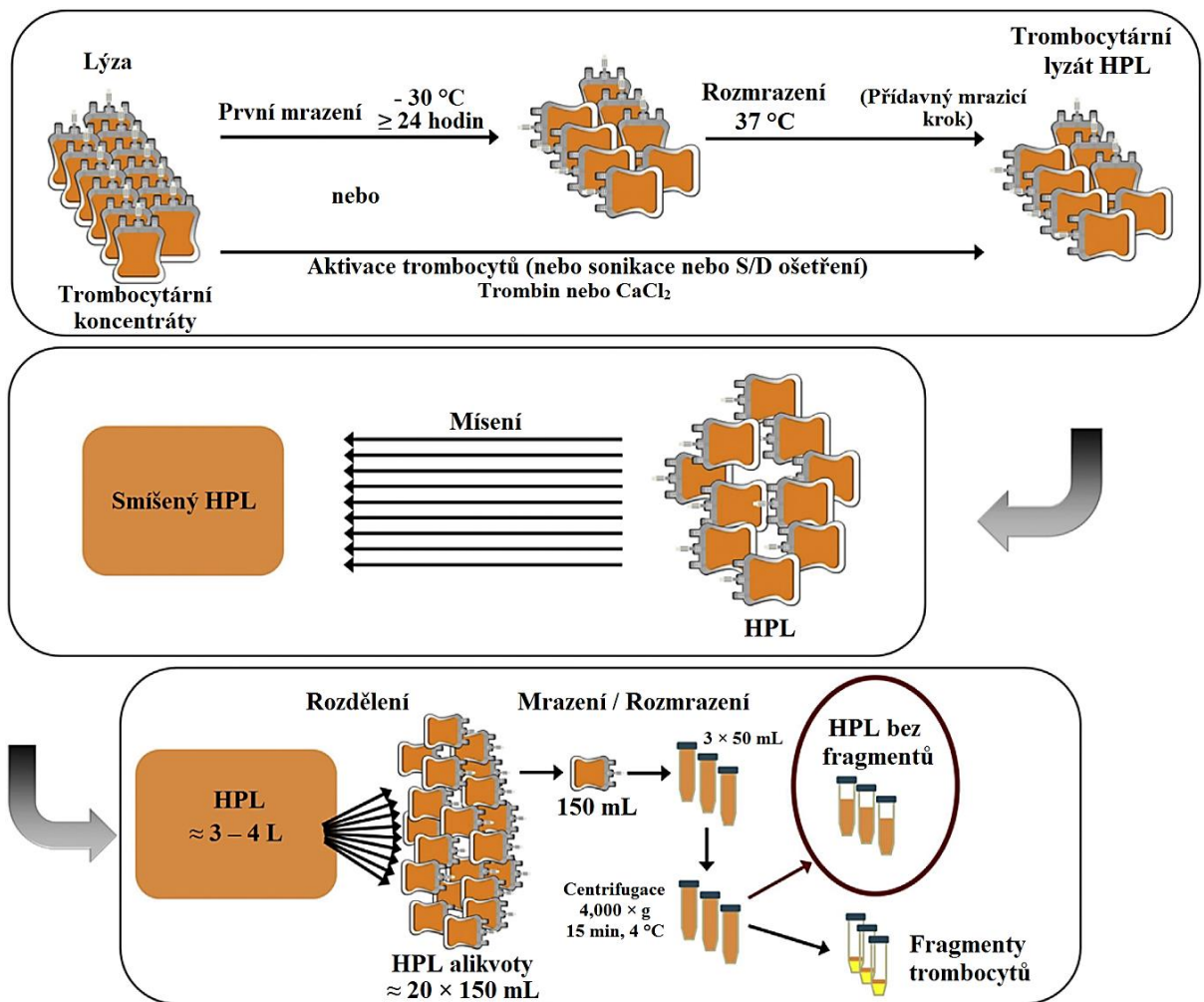
Z trombocytárních koncentrátů je možné získat čistou plazmu bohatou na trombocyty (PRP – platelet-rich plasma), plazmu bohatou na trombocyty a leukocyty (L-PRP – leukocyte- and platelet-rich plasma), čistý fibrin bohatý na trombocyty (PRF – platelet-rich fibrin), fibrin bohatý na trombocyty a leukocyty (L-PRF – leukocyte- and platelet-rich fibrin) nebo trombocytární lidský lysát (HPL – human platelet lysate). (Sovková, 2019)

a) PRP je široce používána k urychlení léčebných procesů hojení ran, protože koncentrace obsažených růstových faktorů je tři až pětkrát vyšší než v plné krvi. PRP se produkuje pouze z antikoagulované krve, protože trombocyty jsou součástí krevní sraženiny. (Burnouf *et al.*, 2016)

b) PRF má několik výhod oproti PRP, například výroba probíhá zcela přirozeně, tzn. bez použití antikoagulantů, po odběru krve je zkumavka hned stočena. Jako i při výrobě PRP vespodu se oddělují erytrocyty, nahoře je bezbuněčná plazma, ale uprostřed je už PRF. Další výhodou je eliminace využití trombinu, který podporoval přeměnu fibrinogenu na fibrin v PRP. V PRF tato přeměna probíhá pomalu, protože v samotné krvi trombinu je málo. Tato pomalá polymerizace je velmi vyhovující při hojení ran, růstu a zrání kostí, stabilizaci štěpu. (Greening *et al.*, 2011)

c) Dalším produktem je trombocytární lysát, který se může připravovat různými metodami: opakovanými cykly mrazení a rozmrazení („freeze-thaw“), přímou aktivací destiček nebo sonikací. Všechny metody výroby HPL naznačuje schematický Obrázek 12. Avšak před lýzou je vždycky potřeba brát v úvahu individuální variability trombocytárních koncentrátů a jednou z možností, jak je eliminovat, je mísení TRS (Thrombocyte Rich Solution) od různých dárců. (Sovková, 2019; Burnouf *et al.*, 2016)





Obrázek 12: Příprava lidského trombocytárního lyzátu; převzato a upraveno podle (Burnouf *et al.*, 2016)

- Opakované cykly mrazení / rozmrazení: tato metoda je nejběžnější a nejjednodušší, ale také i nejméně efektivní při výrobě HPL. Trombocytární koncentrát se obvykle zmrazí šokem při  $-30\text{ °C}$  nebo  $-80\text{ °C}$  a později rozmrzne při  $37\text{ °C}$ , aby se destičky fragmentovaly. Dále následuje centrifugace, díky které růstové faktory pak jsou v supernatantu a nerozpustné zbytky z trombocytů jsou v sedimentu. Počet cyklů se může pohybovat od jednoho do pěti díky neměnné biologické aktivitě trombocytů při opakovaném mrazení a rozmrazení. (Burnouf *et al.*, 2016)
- Přímá aktivace destiček: v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iontů (obvykle roztok soli  $\text{CaCl}_2$ ) se přemění protrombin na endogenní trombin, který dále transformuje fibrinogen na fibrin a nakonec dojde k degranulaci trombocytu. Nevýhodou této metody jsou cizí látky, které aktivují trombin a také mohou komplikovat použití HPL v buněčné terapii. (Burnouf *et al.*, 2016)

- Sonikace: je rychlá, efektivní, ultrazvuková metoda k dosažení degranuace destiček (po dobu 30 minut při frekvenci 20 kHz). Někdy se provádí v kombinaci s cykly mrazení / rozmrazení. (Burnouf *et al.*, 2016)

Také v kombinaci s výše popsanými metodami se někdy dělá ošetření rozpouštědlem / detergentem (S / D). Tento proces byl vyvinut v New York Blood Center a je zatím nejrozšířenější metodou 100% inaktivace virů, která se používá převážně v hematologii. Tento proces je účinný pouze u virů s lipidovým obalem, protože použitý detergent (obvykle Triton X-100) přerušuje interakce mezi molekulami lipidů. Většina virů je hned zničena kvůli porušení jejich lipidového obalu, malá skupina přeživších virů už nejsou schopny se rozmnožovat. Rozpouštědlo vytváří prostředí, ve kterém dochází k rychlejší agregační reakci mezi lipidovým povlakem a detergentem. Výhodou je to, že detergenty ovlivňují pouze lipidy a deriváty lipidů, takže k denaturacím proteinů nedojde. Nevýhodou však je to, že tato činidla musí být z finálního produktu odstraněna, což by vyžadovalo další náročné kroky procesu. (Greening *et al.*, 2011; Burnouf *et al.*, 2016)

## EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem této práce byla příprava a následná charakteristika nanovláknenného scaffoldu založeného na polyvinylalkoholu s vysokou molekulovou hmotností a vysokým stupněm hydrolyzy, který byl funkcionalizován trombocytárními růstovými faktory. Pro přípravu materiálu, který by díky své struktuře a svým biologickým vlastnostem napodoboval extracelulární hmotu, bylo použito AC a DC elektrostatické zvlákňování. Výsledné nanovláknenné vrstvy byly charakterizovány z hlediska morfologie, distribuce a uvolňování proteinů, rozpouštění PVA.

### 3. Materiály a metody

#### 3.1 Použité materiály a chemikálie

V následujících Tabulkách 7 a 8 jsou vypsané všechny chemikálie a roztoky, které byly použity v této diplomové práci.

Tabulka 7: Použité materiály a chemikálie.

	Chemikálie	Firma
Příprava polymerních roztoků	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
	Destilovaná voda (dH <sub>2</sub> O)	–
Příprava pufru 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

Analýza proteinů	BSA (hovězí sérový albumin)	VWR International, Česká republika
	Bradford Reagent	Merck KGaA, Německo
Příprava 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
	$\beta$ -mercaptoethanol	Roth, Německo
	Blue Protein Ladder, CEB-P-0110-250	Central European Biosystems, Maďarsko
	SDS (Dodecylsírán sodný)	Sigma – Aldrich, Německo
	Tris (2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol)	VWR International, Česká republika
	TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Sigma – Aldrich, Německo

Tabulka 8: Použité roztoky.

Roztok	Složení	
Pufř PBS + 0,02% azid sodný (2000 ml)	dH <sub>2</sub> O	1800 ml
	NaCl	16 g
	KCl	0,4 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	7,26 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,48 g
	NaN <sub>3</sub>	0,4 g
	Upravit pH roztoku pomocí HCl na hodnotu 7,4. Poté doplnit objem vodou do 2000 ml a přefiltrovat jej přes filtrační papír.	
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 pufr (1000 ml)	dH <sub>2</sub> O	800 ml
	Tris	10 g
	SDS	30,3 g
	Glycin	144,1 g
Objem doplnit destilovanou vodou do 1000 ml.		
2× SDS-PAGE vzorkový pufr (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
Objem doplnit destilovanou vodou do 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
Objem doplnit destilovanou vodou do 200 ml.		
CBB odbarvovací roztok (500 ml)	dH <sub>2</sub> O	225 ml
	Methanol	225 ml
	Kyselina octová	50 ml
Sušící roztok (50 ml)	dH <sub>2</sub> O	21 ml
	Methanol	22,5 ml
	Kyselina octová	5 ml
	Glycerol	1,5 ml

### 3.2 Použité přístroje a programy

Tabulka 9: Použité přístroje a programy.

Seznam přístrojů a programů		Výrobce
Nanospider™	NS 1WS500U	Elmarco
Elektronový mikroskop	Vega 3 <sub>SEM</sub>	Tescan
Analytické váhy	ATL124-I Analytical Scale	Acculab Sartorius Group
Chromatograf	Dionex UltiMate 3000 HPLC	Thermo Scientific
pH metr	pH 700	Eutech Instruments
Sterilizátor	AN 74i	Anprolene
Hlubokomrazící box	MDF-U53V	SANYO Electric Co.
Biological Thermostat	BT 120	Laboratorní přístroje Praha
CO <sub>2</sub> inkubátor	NB-203XL	N-Biotek
Zlatící přístroj	Quorum Q150R ES	Quorum Technologies
Spektrofotometr	Spark	Tecan
Fluorescenční mikroskop	Eclipse Ti-E	Nikon
SDS-PAGE	Mini-PROTEAN	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Centrifuga	Z36HK	Hermle Labortechnik
Cirkulovaná digitální vodní lázeň	LCB-11D	Labtech
Software pro analýzu obrazů	NIS Elements AR 4.30.00	Nikon Instruments
Software pro tvorbu grafů, tabulek	GraphPad Prism 8.0.1	GraphPad Software
	Microsoft Office Standard 2013	Microsoft Corporation

### 3.3 Metody a protokoly

V následujících podkapitolách budou podrobně popsány všechny postupy a metodiky, které se používaly pro přípravu a analýzu nanovláknenných materiálů založených na polyvinylalkoholu a funkcionalizovaných trombocytárním lyzátem.

#### 3.3.1 Příprava trombocytárních lyzátů

Trombocyty ve formě trombocytárního koncentrátu (TRS) byly připravovány transfúzním oddělením Krajské nemocnice v Liberci. Jedná se o směsný přípravek vyrobený z tzv. „buffy coatu“ od čtyř dárců. Koncentrace trombocytů se pohybovala v rozmezí  $735 - 741 \cdot 10^6 / \text{ml}$ . Z těchto koncentrátů metodou opakovaného mrazení a rozmrazování („freeze-thaw“) byly připraveny trombocytární lyzáty (viz Kap. 2.2.2). Čerstvé TRS byly nejdříve rozaliquotovány po 15 a 50 ml, potom byly zamraženy při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Den před použitím byly rozmrazeny při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  přes noc. Výsledný lyzát byl následně centrifugován ( $2800 \times \text{g}$ , 30 minut) a vytvořený supernatant s obsahem růstových faktorů byl do použití skladován při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.3.2 Příprava roztoků pro elektrické zvlákňování

Pro každý z použitých druhů zvlákňování (střídavé a stejnosměrné elektrické zvlákňování) byl pro přípravu zvlákňovacího roztoku použit jiný rozpouštědlový systém. Byly připravovány roztoky z čistého PVA a dále z PVA s přídavkem lidských trombocytárních lyzátů.

##### *Příprava roztoku pro AC spinning:*

Pro přípravu 100 g 10% PVA (98 % hydrolýzy, MW 125 000) bylo nutné přidat 10 g PVA a 90 g destilované vody. Poté se tento roztok míchal na magnetickém míchadle v olejové lázni při  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  do úplného rozpuštění polymeru (4 – 6 hodin). Takto připravený roztok je možné skladovat při pokojové teplotě do použití.

##### *Příprava roztoku pro DC spinning:*

Pro přípravu 100 g 10% PVA (98 % hydrolýzy, MW 125 000) byl použit rozpouštědlový systém voda : ethanol v poměrech 8 : 2. Proto 10 g PVA

byly rozpuštěny v 18 g ethanolu a 72 g destilované vody. Roztok dále byl míchán na magnetickém míchadle v olejové lázni při 90 °C do úplného rozpuštění polymeru (4 – 6 hodin). Takto připravený roztok je možné skladovat při pokojové teplotě do použití.

*Příprava roztoku čistého PVA dle dvou různých postupů s přidavkem HPL:*

Z předchozích pokusů v diplomové práci Ing. Barbory Kopřivové (Kopřivová, 2018) bylo zjištěno, že jako ideální koncentrace trombocytárních lyzátů v roztoku je 10 %. Toto množství se započítává jako vodní složka rozpouštědla, proto pro přípravu 100 g roztoku 10% PVA s 10% HPL bylo nejprve 10 g PVA rozmícháno v 80 g rozpouštědla dle použité technologie (při 90 °C, 4 – 6 hodin). Po vychlazení na pokojovou teplotu bylo přidáno 10 g trombocytárního lyzátu a po důkladném promíchání na magnetickém míchadle (30 minut, RT) byl roztok použit pro zvlákňování. Takto připravený roztok není možné skladovat, připravuje se vždycky čerstvý těsně před zvlákňováním.

3.3.3 Příprava vláknenných nosičů stejnosměrným elektrickým zvlákňováním

Elektrostatické zvlákňování probíhalo na přístroji Nanospider™ typu NS 1WS500U od firmy Elmarco. Zvlákňování připravených roztoků probíhalo postupně. Nejprve byl zpracován čistý 10% PVA (98 % hydrolýzy, MW 125 000) rozpuštěný v systému voda : ethanol v poměru 8 : 2. Poté po vyčištění zásobníku a struny se zvlákňoval roztok 10% PVA s 10% HPL. Zvlákňování zpravidla probíhalo za podmínek uvedených v Tabulce 10.

*Tabulka 10: Parametry a průměrné hodnoty pro DC zvlákňování.*

<b>Parametr</b>	<b>Hodnota</b>
Vzdálenost kolektoru	140 - 160 mm
Odtah textilie	6 - 10 mm / min
Odtah struny	13 - 20
Napětí	-10 / +40 kV
Velikost průvlaku	0,7 mm
Rychlost cartridge (dávkování)	150 - 250 mm / sec
Produktivita výroby nanovláken	3,5 - 8 g / h
Teplota	22 - 23 °C
Vlhkost	35 - 50 %

### 3.3.4 Příprava vláknenných nosičů střídavým elektrickým zvlákňováním

Zařízení sestavené na Technické univerzitě v Liberci pro střídavé elektrické zvlákňování se skládá ze čtyř hlavních částí: vysokonapěťového zesilovače TREK Model 50/12, regulačního transformátoru, pumpy dávkující polymerní roztok nahoru a ze 170 mm dlouhé kovové tyčové elektrody o průměru 6 mm. Po zapnutí střídavého elektrického pole a po uplynutí charakteristického času na povrchu elektrody se objevují polymerní trysky, ze kterých se intenzivně vypařuje rozpouštědlo, což vede ke vzniku nanovláken vzájemně provázaných mezi sebou uvnitř a rozptýlených ve vzduchu do cylindrického útvaru. Jednou z možností, jak ovlivnit strukturu nanovláken, byl výběr vhodného kolektoru (otáčející buben, nit, digestoř s podtlakem) a průběhu signálu střídavého proudu (sinusový, obdélníkový, trojúhelníkový). V této diplomové práci se bude používat obdélníkový průběh signálu a digestoř s podtlakem jako kolektor, všechny zvlákňovací parametry jsou uvedeny v Tabulce 11.

*Tabulka 11: Parametry a průměrné hodnoty pro AC zvlákňování.*

<b>Parametry</b>	<b>Hodnoty</b>
Napětí	20 kV
Frekvence	40 - 50 Hz
Otáčky pumpy	500 - 550 ot / min
Vzdálenost kolektoru	255 mm
Produktivita pro 10% PVA	8 - 12 g / h
Produktivita pro 10% PVA s 10% HPL	2 - 3,5 g / h
Teplota	21 - 23 °C
Vlhkost	45 - 60 %

### 3.3.5 Elektronová mikroskopie a analýza morfologie materiálů

Morfologie připravených materiálů byla prozkoumána pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) Vega Tescan 3 při různých zvětšeních (1000×, 3000× a 5000×) a při různých napětích (10 – 20 kV). Příprava vzorků spočívala v ustříhnutí malé části vrstvy, nalepení pomocí oboustranné lepicí pásky na kovový terč a pokovení 10 nm vrstvou zlata na přístroji Quorum Q150R ES. Dále pomocí obrazové analýzy v programu NIS Elements AR 4.30.00 byly stanoveny průměry vláken (vždy 100 náhodně změřených hodnot průměrů vláken každého materiálu při zvětšení 5000x). Data byla následně charakterizována jako střední hodnota ± směrodatná odchylka (SD) a vynesena do grafu za použití programu GraphPad Prism 8.0.1.



### 3.3.6 Analýza obsahu proteinů v materiálech a kinetika jejich uvolňování, sledování rozpustnosti a změny krystalinity PVA po zamrazení

V rámci analýzy uvolňování proteinů z vláknenných materiálů byla pomocí spektrofotometrie a SDS-PAGE naměřena koncentrace proteinů ve vodných roztocích. Obsah proteinů přímo v materiálech a homogenita jejich rozprostření byly prozkoumány pomocí fluorescenční mikroskopie a infračervené spektroskopie (FTIR). Dále byly nanovláknenné vrstvy charakterizovány z hlediska rozpouštění PVA pomocí chromatografie a UV-VIS spektroskopie.

#### *Příprava vzorků pro testování:*

Každý vzorek byl připraven tak, aby vážil  $30 \pm 0,1$  mg. Pro sedm testovacích dnů byly připraveny 4 vzorky od každého materiálu, které byly předem vysterilizované ethylenoxidem (při pokojové teplotě, během 12 hodin). Potom byly všechny vzorky vloženy do 5 ml mikrozkušavek a k tomu bylo přidáno 3 ml roztoku PBS + 0,02% azidu sodného. Dále byly vzorky umístěny do inkubátoru při 37 °C, odkud se odebíraly ve stanovených časech po 600  $\mu$ l. Přičemž stejný objem pufru se pokaždé vracel zpátky do zkumavky. Odebrané alikvotní vzorky se pak hned zamrazovaly při -20 °C pro následné analýzy zaměřené na kinetiku uvolňování proteinů a na sledování rozpouštění polyvinylalkoholu.

#### *Analýza obsahu proteinů pomocí infračervené spektroskopie (FTIR):*

Strukturní charakterizace materiálů byla provedena pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) na přístroji Nicolet iZ10 od firmy Thermo Fisher Scientific, USA. Tato spektroskopická metoda je založena na absorpci elektromagnetického záření interagujícího s látkou při různých vlnových délkách. Přičemž energie tohoto záření stačí na to, aby došlo k energetickým změnám rotačních nebo vibračních stavů spojených se změnami dipólových momentů molekul. Velkou výhodou infračervené spektroskopie je možnost měření analyzovaných vzorků ve velmi malém množství (několik mg) a ve všech skupenských stavech.

Vzorky pro analýzu byly umístěny na diamantový krystal ATR (attenuated total reflection), následně byla provedena identifikace organických sloučenin v oblasti

spektra v rozsahu vlnočtů 400 - 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Odhad funkčních skupin nebo typických pro organické látky vazeb O-H, N-H a C-H probíhá postupně pomocí vlnočtů směrem od nejvyšších k nejnižším.

#### *Analýza proteinů pomocí SDS-PAGE:*

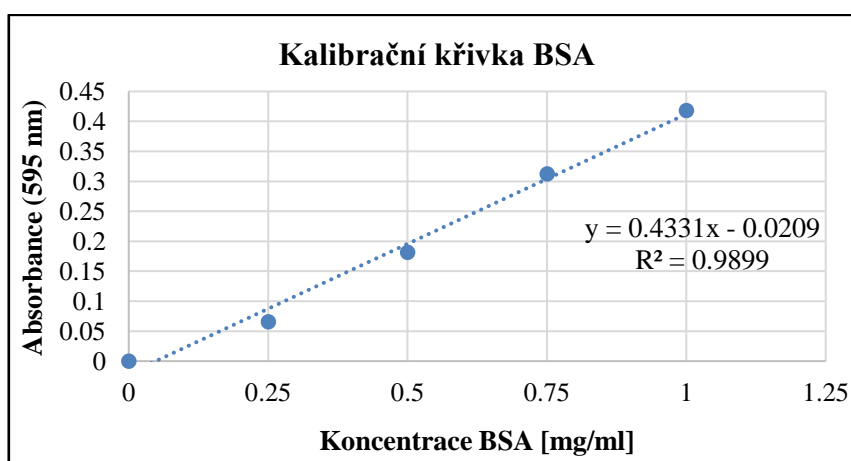
Elektroforéza je separační metoda, která izoluje molekuly s rozdílnou hmotností nebo s odlišným elektrickým nábojem a využívá jejich různou pohyblivost v elektrickém poli. Pro separaci proteinů se většinou používá gelová elektroforéza, kde molekuly bílkovin procházejí hustou trojrozměrnou sítí polyakrylamidového gelu. Díky denaturačnímu účinku dodecylsírany sodného (SDS) a  $\beta$ -mercaptoethanolu proteiny získávají záporný náboj a v zásaditém prostředí se pohybují od katody k anodě. Jejich pohyblivost je závislá na molekulové hmotnosti polypeptidových řetězců. V této diplomové práci pro analýzu proteinů byla použita vertikální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS.

Nejprve bylo nutné připravit polyakrylamidový gel, který byl složen ze dvou vrstev: 10% rozdělovacího gelu a z 5% zaostřovacího gelu. Polymerizační reakce jednotlivých vrstev trvala zhruba 20 minut. Dále byly připraveny vzorky smícháním 20  $\mu\text{l}$  alikvót po uvolňování s 2 $\times$  SDS-PAGE vzorkovým pufrům v poměru objemů 1 : 1, které se následně nechaly denaturovat při 95  $^{\circ}\text{C}$  po dobu 10 minut. Potom takto připravené vzorky byly nanášeny na gely, které již byly vloženy do elektroforetické vany a zality 1 $\times$  SDS-PAGE elektroforetickým pufrům, který byl předem naředěn z 10 $\times$  SDS-PAGE pufru. Spolu se vzorky stejnou technikou byl ještě připraven standard molekulových hmotností proteinový marker Blue Protein Ladder CEB-P-0110-250. Po zapnutí aparátu elektroforéza běžela 20 minut při 70 V, pak při 120 V do momentu, kdy vodorovná linie dosáhla spodní části gelu. Posledním krokem bylo barvení gelů v CBB barvicím roztoku přes noc a následné odbarvování slabě navázané barvy CBB odbarvovacím roztokem také přes noc. Z výsledných gelů byly pořízeny fotografie, po vyfocení byly gely ponořeny do sušícího roztoku a po prosycení tímto roztokem vloženy do fólie a vysušeny při pokojové teplotě v digestoři. Návod na přípravu všech výše použitých v této metodě roztoků je uveden v Tabulce 8.

### *Analýza koncentrace proteinů metodou dle Bradforda:*

„Bradford protein assay“ je metoda, která byla vyvinuta a poprvé popsána americkým vědcem Marionem Bradfordem v roce 1976. Tato metoda umožňuje rychlé a přesné kolorimetrické stanovení koncentrace proteinů v roztoku. Metoda je založená na vazbě CBB obsaženém v reakčním činidle s proteiny se vyskytujícími v testovacích vzorcích. Po navázání CBB na protein probíhá barevná změna (z hnědé na modrou), při které se posouvá absorpční maximum barviva z vlnové délky 456 nm na 610 nm. Dále pomocí spektrofotometru se kvantifikuje koncentrace proteinů při ideální vlnové délce pro měření 595 nm.

Koncentrace proteinů v roztoku se spočítá ze směrnice kalibrační křivky, k sestrojení které se používá kalibrační řada (0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.75 a 1 mg/ml) připravená z hovězího sérového albuminu (BSA) rozpuštěného v dH<sub>2</sub>O, viz Graf 1.



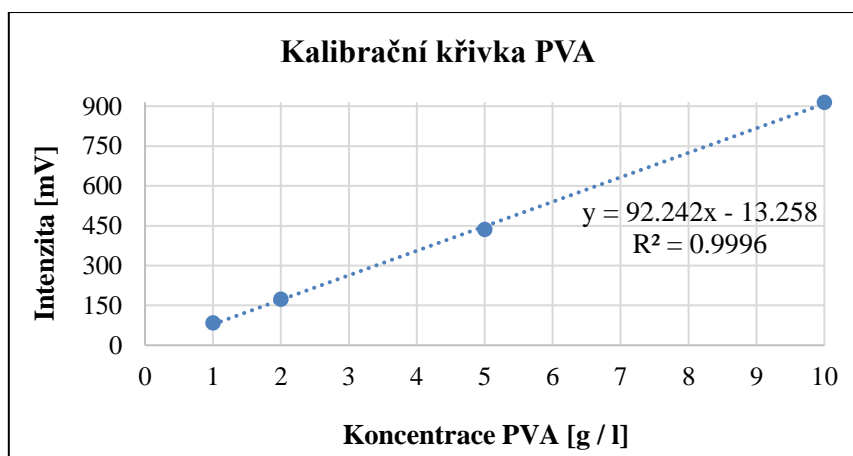
*Graf 1: Kalibrační křivka BSA (závislost absorpance při 595nm na koncentraci BSA)*

Měřené roztoky pro tuto experimentální část byly připraveny v 96-jamkové mikrotitrační destičce smícháním 5 µl vzorku s 250 µl činidla Bradford a následným inkubováním při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Po změření hodnot absorpance byl proveden výpočet koncentrací proteinů v každém vzorku, a to tak, že nejdříve byla spočítána střední hodnota a směrodatná odchylka (SD) absorpance všech negativních kontrol (tzn. nanovlákných materiálů bez obsahu proteinu). Pak ta střední hodnota byla odečtena od hodnot absorpance jednotlivých vzorků (tzn. nanovlákných materiálů obsahujících trombocytární lyzát). Následně ze získané hodnoty byla spočítána koncentrace HPL dle kalibrační křivky s BSA. A z koncentrace bylo vypočítáno množství proteinů vztažené na 1 g původního nanovlákného materiálu.

### *Analýza rozpustnosti PVA pomocí kapalinové chromatografie:*

Gelová permeační chromatografie (GPC) je nejběžnější separační technikou, která se používá pro analýzu směsí polymerů a pro stanovení jejich molárních hmotností. Polymerní vzorek prochází chromatografickou kolonou, která je naplněna porézním gelovým materiálem (stacionární fáze) a rozpouštědlem v prostoru mezi póry různých rozměrů (mobilní fáze). Zředěný roztok vzorku obsahující několik složek je postupně vymýván mobilní fází, dochází k rozdělení analyzované látky na frakce. Separace pomocí GPC závisí pouze na velikosti molekul. Kolonu nejprve opouštějí velké molekuly, protože nejsou schopné difundovat do vnitřního prostoru gelu, kdežto nejmenší molekuly difundují hlouběji a jsou zadržovány v koloně nejdéle.

PVA byl kvantifikován na základě plochy píku signálu rozptylu světla pod úhlem 90°. Pro zjištění množství polyvinylalkoholu v alikvótách byly použity kalibrační roztoky PVA o koncentracích 1, 2, 5 a 10 g / l, viz Graf 2.



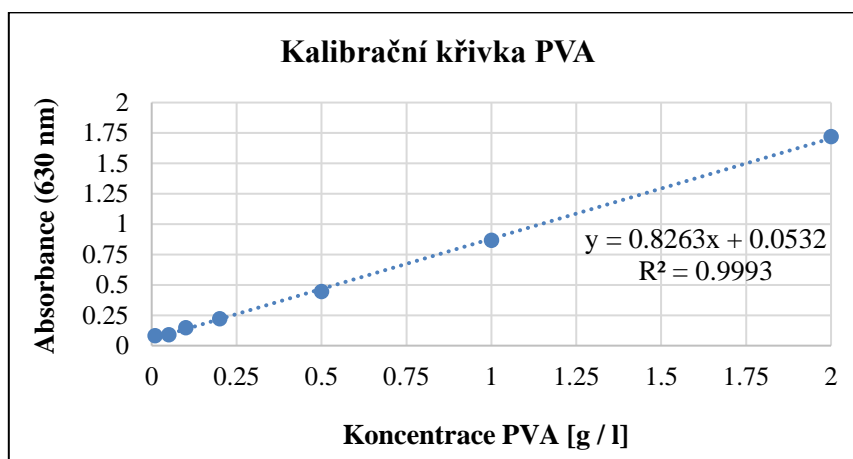
*Graf 2: Kalibrační křivka PVA (závislost intenzity na koncentraci PVA)*

Pro chromatografickou analýzu bylo 240  $\mu$ l každého alikvotního vzorku zředěno v 960  $\mu$ l rozpouštědla s pH 6,8 (100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 100 mM NaCl a 0,03 %  $\text{NaN}_3$ ). Dále byly roztoky přefiltrovány přes nylonové injekční filtry (průměr 13 mm, velikost pórů 0,45  $\mu$ m) od firmy Chromservis, ČR. Použitá kolona Superdex 200 Increase (GE Healthcare, USA) měla délku 300 mm a vnitřní průměr 3,2 mm. Stanovení molekulové hmotnosti vzorku probíhalo pomocí detektoru rozptylu světla 1260 Infinity II GPC/SEC MDS (Agilent, USA), který je při dopadu rozptylován rozpuštěnými polymerními částicemi. Intenzita rozptýleného světla je úměrná velikosti částic, které rozptyl způsobují. Měření na přístroji Dionex UltiMate 3000 HPLC probíhalo při pokojové teplotě s průtokem mobilní fáze 0,12 ml / min.

### *Analyza rozpustnosti PVA pomocí UV-VIS:*

UV-VIS spektroskopie patří mezi klasické spektroskopické metody v analytické chemii. Principem této metody je sledování absorpce ultrafialového a viditelného záření v intervalu od 200 do 800 nm při průchodu vzorkem. Řada materiálů má své charakteristické spektrum, díky kterému lze identifikovat neznámé látky a stanovit koncentrace známých látek v roztoku.

Nejprve byly připraveny kalibrační roztoky PVA o známých koncentracích 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 a 2 g / l (viz Graf 3), které stejně jako alikvotní vzorky se musely ředit 10× destilovanou vodou před vlastním měřením absorpance na spektrometru Cintra 202 od firmy GBC Scientific, USA.



*Graf 3: Kalibrační křivka PVA (závislost absorpance při 630 nm na koncentraci PVA)*

Měřené roztoky po zředění se připravovaly v mikrozkušnicích smícháním 200  $\mu$ l vzorku se 750  $\mu$ l kyseliny borité ( $H_3BO_3$ , 40 g / l) a 150  $\mu$ l jodu ( $I_2$ , 0.05 mol / l). Po intenzivním promíchání byla sledována barevná reakce všech polyvinylalkoholových roztoků pomocí absorpčních spekter. Absorbance byla měřena při vlnové délce 630 nm v laboratorních podmínkách (22 °C).

### *Analyza krystalinity PVA složky pomocí DSC:*

Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) je nejpoužívanější termickou analýzou pro sledování restrukturalizace materiálu. Při měření krystalinity referenční a testovací vzorek se ohřívají nebo ochlazují konstantní rychlostí, přičemž se pozoruje množství tepla potřebné k udržení izotermních podmínek mezi vzorky. Z výsledné DSC křivky

polymeru lze stanovit teplotu skelného přechodu, exotermický moment krystalizace ( $T_c$ ) a endotermické tání materiálu ( $T_m$ ). Při teplotě tání dochází k roztavení většiny krystalů, takhle na základě fázových přechodů se provádí identifikace polymerů. Výhodou DSC je možnost testování jak pevných, tak i kapalných vzorků o malém množství (10 – 300 mg) v širokém rozmezí teplot.

PVA materiály byly navažovány v malém množství 6 – 10 mg a dále rozprostřeny na dně hliníkového kelímku o objemu 25  $\mu$ l. Po navážení byly kelímky hermeticky uzavřeny víčkem a vzorky zalisovány před měřením na DSC 1 / 700 od firmy Mettler Toledo, Švýcarsko. Ohřev probíhal od 0 °C do 300 °C v inertní atmosféře dusíku s rychlostí průtoku plynu 50 ml / min a rychlostí ohřevu 10 °C / min.

#### **4. Výsledky a diskuze**

Předkládaná diplomová práce je zaměřena na přípravu a charakteristiku PVA vlákněných materiálů, které byly vyrobeny stejnosměrným (DC) a střídavým (AC) elektrickým zvlákněním. Stabilita PVA ve vodném prostředí se zvyšuje několika způsoby: dodatečným síťováním, modifikací postranních hydroxylových skupin nebo aplikací PVA s vysokým stupněm hydrolyzy. První dva způsoby zpravidla vyžadují použití nízkomolekulárních nebo síťovacích činidel, které často negativně ovlivňují aktivitu inkorporovaných proteinů nebo způsobují cytotoxicitu materiálů. Proto se při této práci používal pro přípravu materiálů PVA s vysokou hydrolyzou (98 %, 125 000 g / mol), kde se díky tvorbě fyzikální sítě mezi molekulami PVA snižovala rozpustnost výsledných materiálů ve vodě a zároveň nedocházelo ke ztrátě aktivity spolu zvlákněných proteinů. Nanovlákněné vrstvy z PVA obsahující lidské trombocytární lyzáty vyrobené z TRS ((735 – 741)  $\cdot 10^6$  trombocytů / ml) byly podrobeny analýzám zaměřeným na morfologii, stanovení homogenity inkorporovaných proteinů, sledování rozpustností výsledných materiálů a na monitoring uvolňování inkorporovaných nativních proteinů do vodného prostředí.

#### 4.1 Příprava nanovláknenných materiálů

Pro přípravu vláknenných vrstev byly použity dvě technologie: stejnosměrné (DC) a střídavé (AC) elektrické zvláknování. Zatímco pro DC zvláknování byl použit již dříve vyvinutý postup (Kopřivová, 2018) popsáný v Kap. 3.3.3, tak AC zvláknování bylo nutné v této diplomové práci zcela optimalizovat (viz Kap. 3.3.4). Výhodou AC electrospinningu je to, že zvláknování probíhá z roztoků obsahujících jako rozpouštědlo pouze destilovanou vodu (zachová se aktivita proteinů) a že střídavé elektrické zvláknování má vyšší produktivitu než stejnosměrné. DC electrospinning byl prováděn ve spolupráci s Ing. Barborou Kopřivovou, AC electrospinning ve spolupráci s Ing. Janem Valterou, Ph.D.

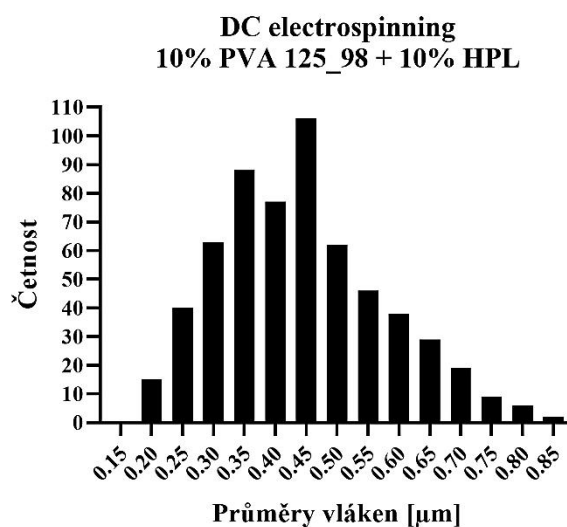
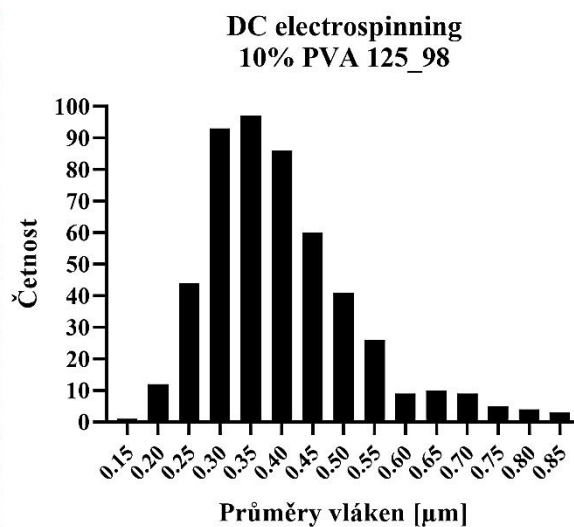
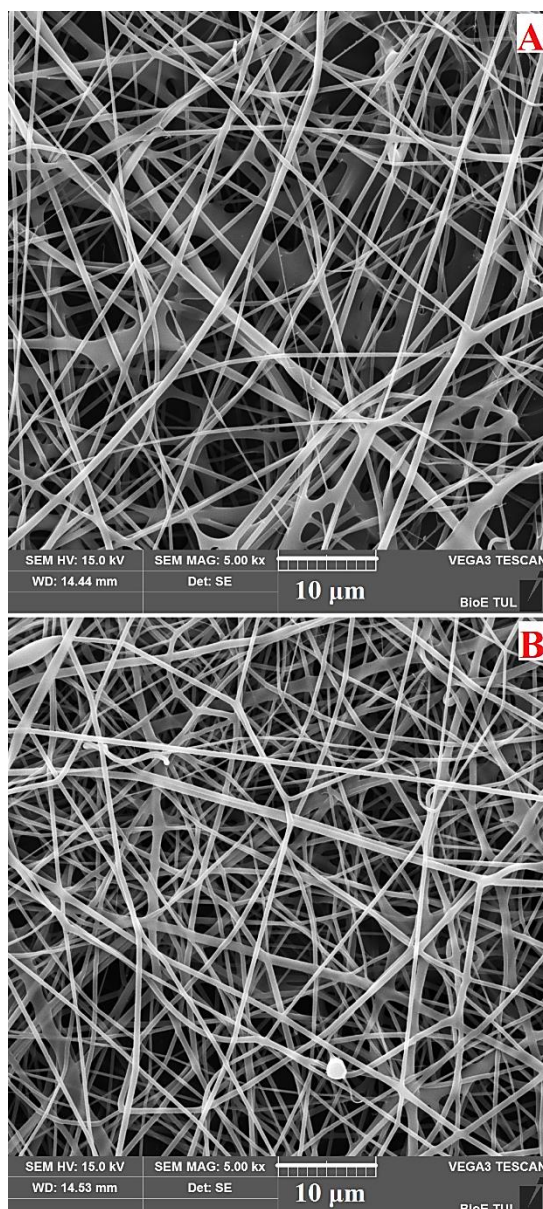
##### *Stejnoseměrné elektrické zvláknování (DC electrospinning):*

Elektrostatické zvláknování probíhalo na přístroji Nanospider™ typu NS 1WS500U od firmy Elmarco. Nejprve byl připraven čistý 10% PVA rozpuštěný v systému voda : ethanol v poměru 8 : 2, pak se zvláknoval roztok 10% PVA s přídavkem 10% HPL. Zvláknování DC electrospinningem probíhalo dobře především u roztoku s přídavkem 10% HPL, čistý samotný 10% PVA se někdy zvláknoval hůř, z makroskopického pohledu vznikala spíš transparentní křehká vrstva. Bylo patrné, že přídavek HPL do zvláknovacího roztoku má výrazně pozitivní vliv na kontinuální proces zvláknování i charakter výsledného homogenního materiálu bez viditelných defektů, rovněž má vliv i na zvýšení produktivity. Zatímco zvláknování čistého PVA je často provázeno tvorbou kapek a prodlouženým relaxačním časem. Tento problém byl individuálně řešen pro každý konkrétní případ úpravou klimatizačních a strojových podmínek. Také, aby vznikla kompaktní vrstva s dostatečně velkou plošnou hmotností, byl každý materiál nazvlákněn dvakrát (na první vrstvu nanosena druhá).

Morfologie jednotlivých materiálů (zejména průměry vláken) byla hodnocena pomocí snímků pořízených z rastrovacího elektronového mikroskopu. Průměry vláken jsou u materiálu z čistého PVA ( $0,39 \pm 0,12 \mu\text{m}$ ) a u PVA s přídavkem HPL ( $0,43 \pm 0,13 \mu\text{m}$ ) srovnatelné (viz Tabulka 12). Přidání 10% HPL nemá vliv na průměry vláken ani na tvorbu defektů v hotovém materiálu (viz Obrázek 13).

Tabulka 12: Střední průměry vláken a plošné hmotnosti materiálů z DC electrospinningu (SD – směrodatná odchylka).

Materiál	Střední průměr vláken ± SD	Plošná hmotnost ± SD
10% PVA 125_98	0,39 ± 0,12 μm	29,72 ± 3,58 g / m <sup>2</sup>
10% PVA 125_98 + 10% HPL	0,43 ± 0,13 μm	20,45 ± 2,83 g / m <sup>2</sup>



Obrázek 13: SEM snímky PVA materiálů připravených stejnosměrným elektrickým zvlákněním (zvětšení 5000×, měřítko 10 μm; (A) - 10% PVA 125\_98, (B) - 10% PVA 125\_98 + 10% HPL) a histogramy distribuce průměrů vláken



### *Střídavé elektrické zvlákňování (AC electrospinning):*

Na rozdíl od stejnosměrného elektrického zvlákňování, kde příprava roztoků PVA se uskutečňovala v rozpouštědlovém systému voda : ethanol, u roztoků pro AC electrospinning se jako rozpouštědlo objevovala pouze destilovaná voda, která neovlivní aktivitu inkorporovaných proteinů a cytotoxicitu výsledných materiálů. V rámci optimalizace zvlákňování pomocí AC electrospinningu byly testovány následující parametry zvlákňování: napětí (15 – 30 kV), frekvence (10-80 Hz), průběh signálu střídavého proudu (sinusový, obdélníkový, trojúhelníkový), vzdálenost kolektoru (185 – 255 mm) a druh kolektoru (otáčející buben a digestoř s podtlakem). Byly sledovány průběh a produktivita procesu zvlákňování při různých hodnotách uvedených výše parametrů. Nalezené vhodné podmínky pro vznik nanovláknenné vlečky jsou znázorněny v Tabulce 13 (viz Kap. 3.3.4).

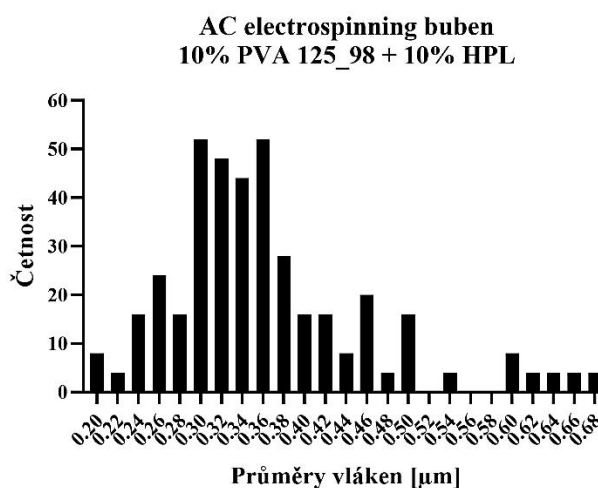
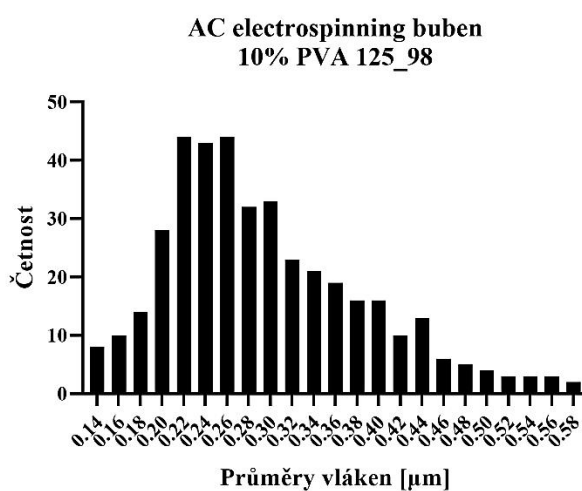
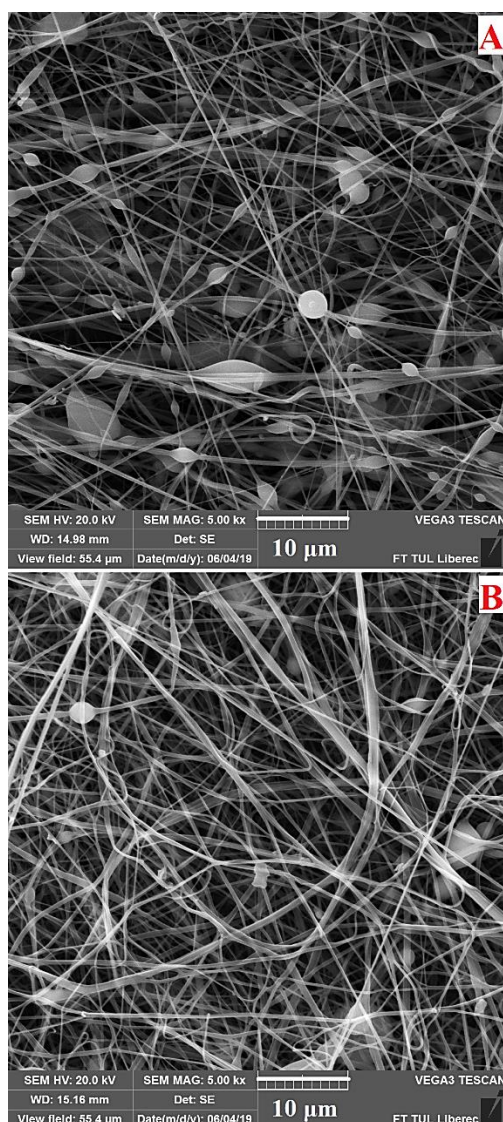
*Tabulka 13: Parametry a průměrné hodnoty pro AC zvlákňování.*

<b>Parametry</b>	<b>Hodnoty</b>
Napětí	20 kV
Frekvence	40 - 50 Hz
Otáčky pumpy	500 - 550 ot / min
Vzdálenost kolektoru	255 mm
Teplota	21 - 23 °C
Vlhkost	45 - 60 %

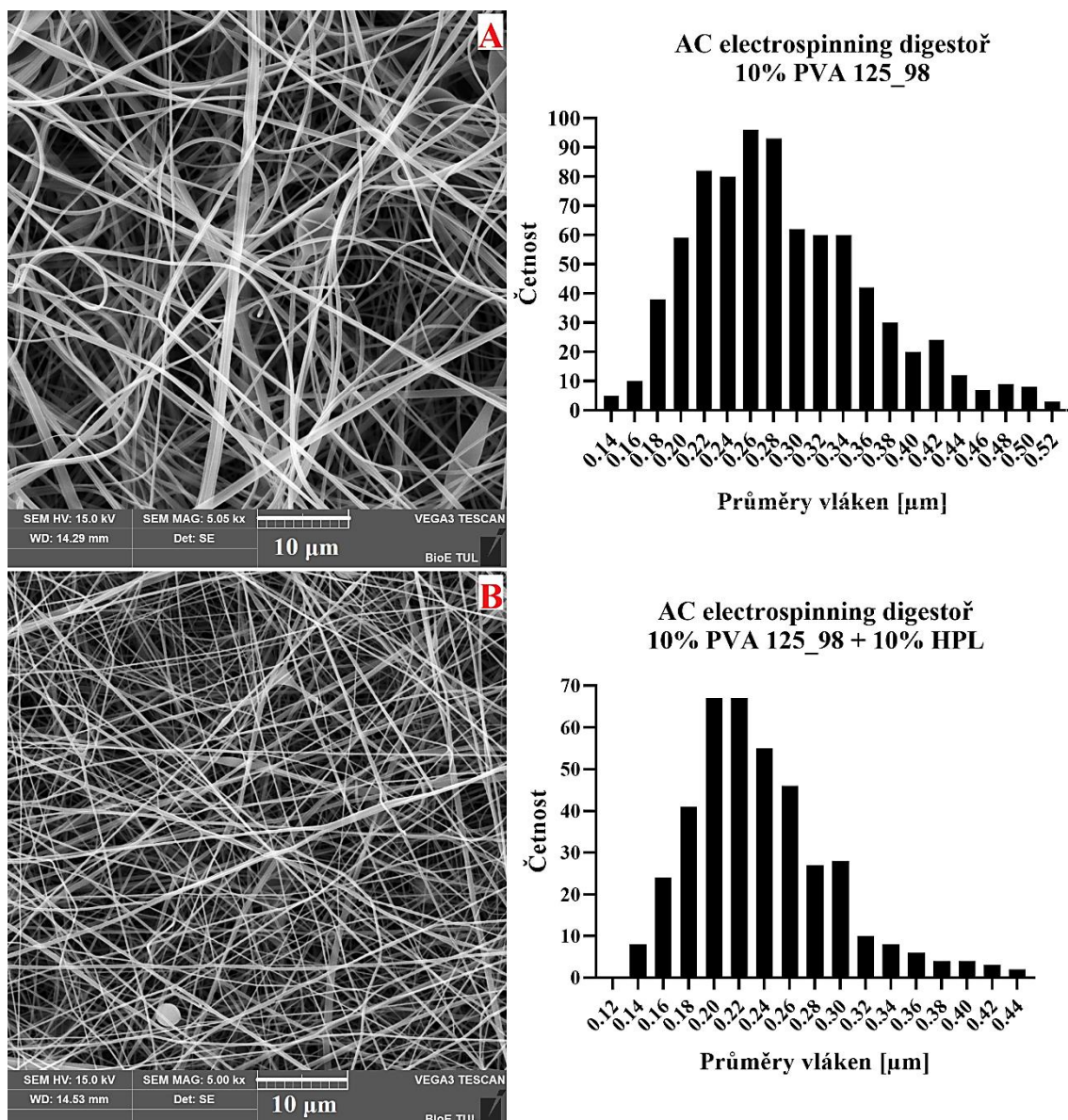
Také u AC electrospinningu byl prozkoumán vliv kolektorů na výslednou vrstvu. Nejprve byl testován jako kolektor otáčející se buben (viz Obrázek 16), vytvořené vrstvy byly příliš nadýchané, což by znesnadňovalo následnou manipulaci s takovými materiály (viz Obrázek 14). Na rozdíl od kolektoru typu digestoř s podtlakem, kde se s vyrobenými vrstvami již lépe manipulovalo, kromě toho materiály byly mnohem kompaktnější a s menším počtem defektů. Tato změna kolektorů také způsobila zúžení distribuce vláknenných průměrů u materiálů funkcionalizovaných HPL (viz Obrázek 15). Vrstva PVA s přídavkem HPL nazvlákněná pomocí kolektoru typu buben má větší střední průměr vláken ( $0,35 \pm 0,09 \mu\text{m}$ ) než stejný materiál zvlákněný prostřednictvím digestoře s podtlakem ( $0,24 \pm 0,05 \mu\text{m}$ ), avšak průměry materiálů bez HPL byly stejné u obou typů kolektorů, viz Tabulka 14.

Tabulka 14: Střední průměry vláken a plošné hmotnosti materiálů z AC electrospinningu (SD – směrodatná odchylka).

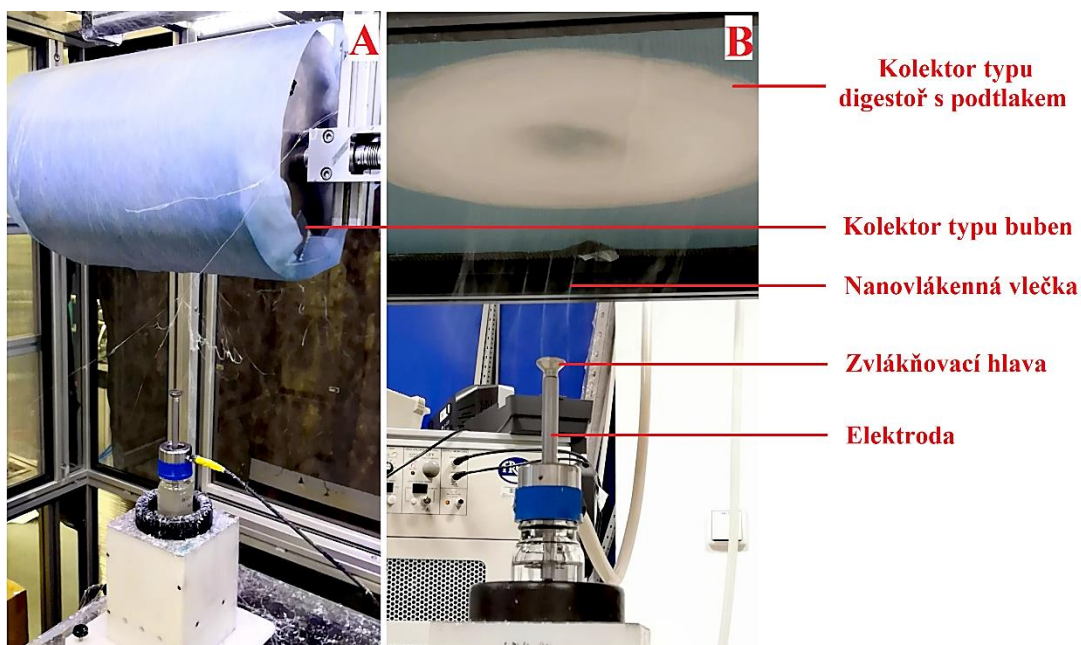
Materiál		Střední průměr vláken ± SD	Plošná hmotnost ± SD
Kolektor typu buben	10% PVA 125_98	0,29 ± 0,09 μm	12,32 ± 0,67 g / m <sup>2</sup>
	10% PVA 125_98 + 10% HPL	0,35 ± 0,09 μm	2,93 ± 0,36 g / m <sup>2</sup>
Kolektor typu digestoř s podtlakem	10% PVA 125_98	0,28 ± 0,07 μm	11,71 ± 1,57 g / m <sup>2</sup>
	10% PVA 125_98 + 10% HPL	0,23 ± 0,05 μm	2,33 ± 0,45 g / m <sup>2</sup>



Obrázek 14: SEM snímky PVA materiálů připravených střídavým elektrickým zvláknováním, kde jako kolektor se používal buben (zvětšení 5000×, měřítko 10 μm; (A) - 10% PVA 125\_98, (B) - 10% PVA 125\_98 + 10% HPL) a histogramy distribuce průměrů vláken



Obrázek 15: SEM snímky PVA materiálů připravených střídavým elektrickým zvláknováním, kde jako kolektor se používala digestoř s podtlakem (zvětšení 5000×, měřítko 10 μm; (A) - 10% PVA 125\_98, (B) - 10% PVA 125\_98 + 10% HPL) a histogramy distribuce průměrů vláken



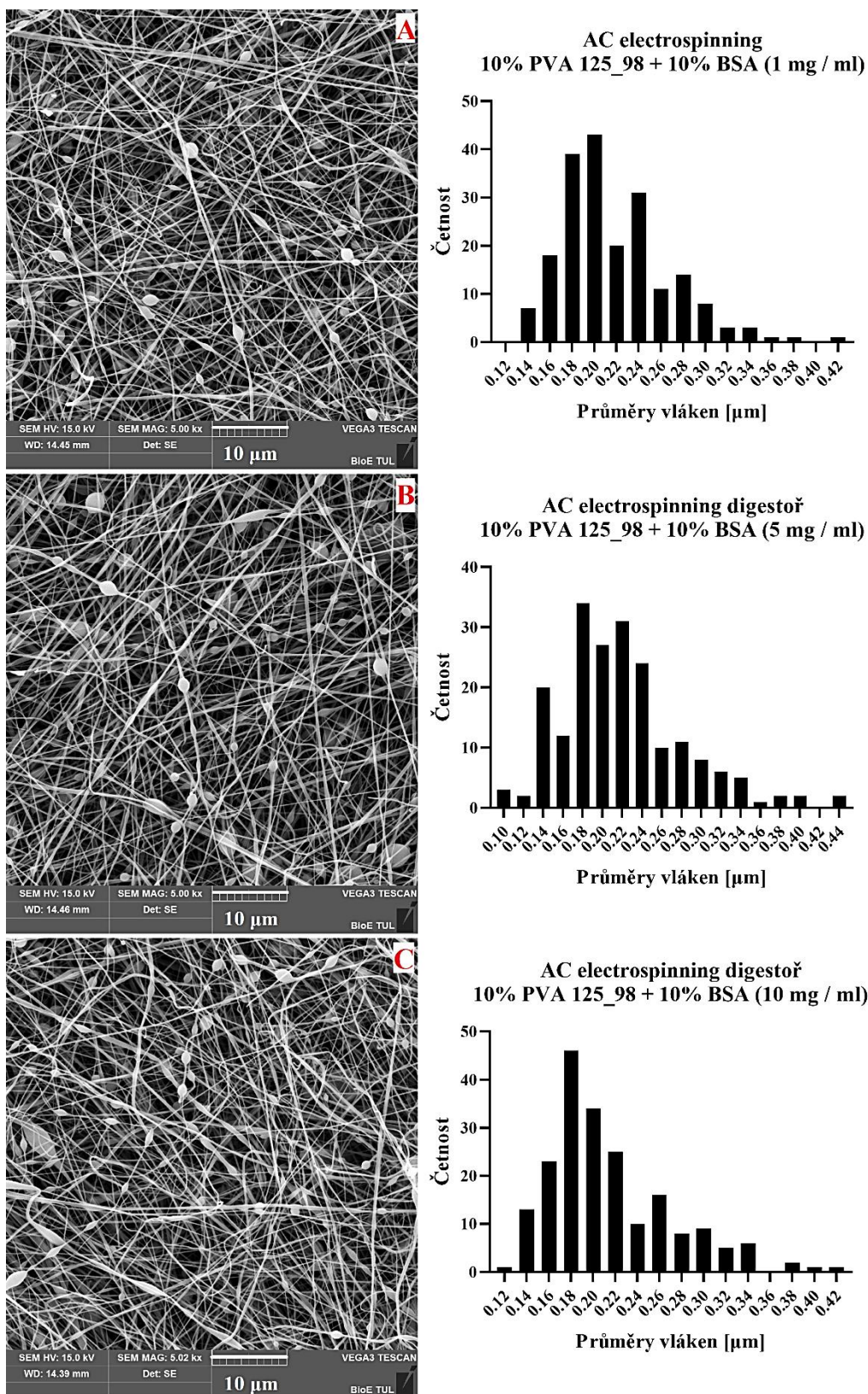
Obrázek 16: Kolektory pro AC electrospinning  
(A – otáčející bubna, B – digestoř s podtlakem)

Zatímco v případě DC electrospinningu přidavek HPL do roztoku proces zvláknování výrazně usnadňoval, v případě AC electrospinningu docházelo naopak k jeho zpomalení i přes snahu korigování procesních podmínek. Kdežto při AC zvláknování čistého 10% PVA vznikal dobrý polymerní rukávec s pevnými a kvalitními vlákny. Je také zřejmé, že na rozdíl od DC u AC electrospinningu s kolektorem typu digestoř s podtlakem celkové průměry vláken jsou menší. Kromě nastavení procesu zvláknování také hrají role i okolní podmínky (teplota, vlhkost vzduchu), které zatím u AC electrospinningu ještě není možné regulovat.

#### *AC zvláknování roztoků PVA obsahujících BSA o různých koncentracích:*

V rámci optimalizace byl také testován vliv množství přidávaných proteinů na zvláknování a výslednou morfologii vláken (viz Obrázek 17). Vždycky byl přidáván 10% alikvót vodné fáze, ale lišila se koncentrace BSA v použitém roztoku (1, 5, 10 mg / ml).





Obrázek 17: SEM snímky PVA materiálů připravených střídavým elektrickým zvlákněním, kde jako kolektor se používala digestoř s podtlakem (zvětšení 5000×, měřítko 10 μm; (A) - 10% PVA 125\_98 + 10% BSA (1 mg/ml), (B) - 10% PVA 125\_98 + 10% BSA (5 mg/ml), (C) - 10% PVA 125\_98 + 10% BSA (10 mg/ml)) a histogramy distribuce průměrů vláken

Příprava roztoků pro zvlákňování a samotné zvlákňování probíhalo za stejných podmínek jako v případě přídavku HPL, jako kolektor byla použita digestoř s podtlakem (viz Kap. 3.3.2 a 3.3.4).

*Tabulka 15: Střední průměry vláken materiálů z AC electrospinningu (SD – směrodatná odchylka).*

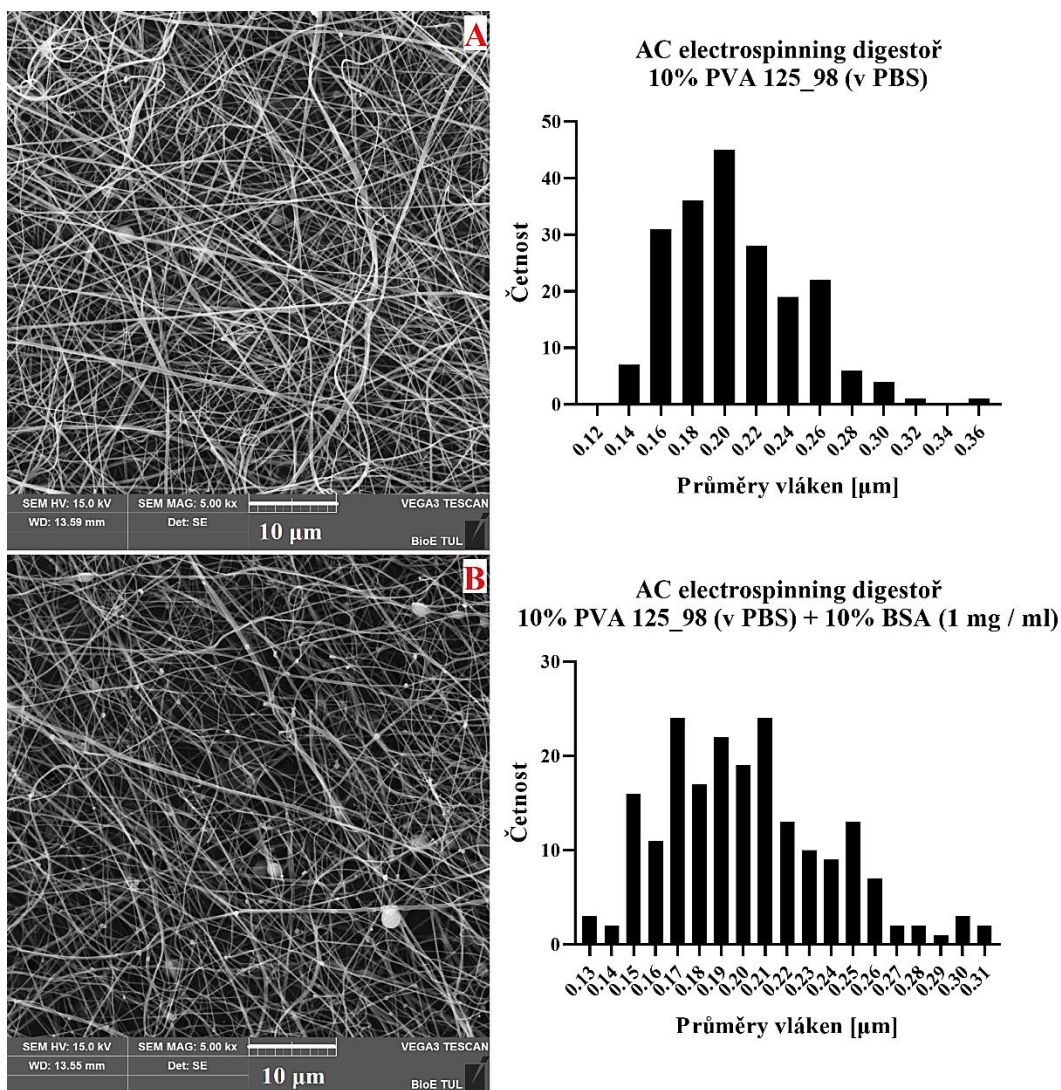
<b>Materiál</b>	<b>Střední průměr vláken ± SD</b>
10% PVA 125_98	0,26 ± 0,07 μm
10% PVA 125_98 + 10% BSA (1 mg / ml)	0,21 ± 0,05 μm
10% PVA 125_98 + 10% BSA (5 mg / ml)	0,21 ± 0,06 μm
10% PVA 125_98 + 10% BSA (10 mg / ml)	0,21 ± 0,06 μm

Z morfologické analýzy je patrné, že se zvětšující se koncentrací proteinů velikost vláknenných průměrů se nemění (viz Tabulka 15). Množství inkorporovaného BSA neovlivňuje morfologii materiálů. Kromě toho výroba těchto materiálů AC electrospinningem potvrdila ten fakt, že se s přídavkem proteinů snižuje střední průměr vláken oproti materiálu z čistého PVA.

#### *AC zvlákňování roztoků PVA v PBS:*

Dále byl proveden pokus, kde byla sledována možnost použití roztoku PBS pro rozpouštění PVA namísto dH<sub>2</sub>O (PBS by lépe zajistil ve srovnání s vodou iontovou silu a stabilní pH). Cílem bylo zjistit, jak soli obsažené v pufru budou ovlivňovat průběh zvlákňování AC electrospinningem a morfologii výsledných materiálů, viz Obrázek 18. Příprava roztoků pro zvlákňování a samotné zvlákňování probíhalo za stejných podmínek jako v případě přídavku HPL, jako kolektor byla použita digestoř s podtlakem (viz Kap. 3.3.2 a 3.3.4).

Samotné zvlákňování však mělo zcela jiný průběh. Na začátku tvorba nanovláken probíhala velmi špatně, nanovláknenná vlečka se téměř netvořila, docházelo k „praskání“ kapek polymeru, nepomohlo ani korigování strojových parametrů. Při návratu do původních podmínek (viz Tabulka 13) bylo zjištěno, že pro rozběhnutí procesu zvlákňování a pro vytvoření velmi jemných vláken je potřeba delší relaxační čas. Ovšem zvlákňování roztoků PVA v destilované vodě bylo mnohem produktivnější.



Obrázek 18: SEM snímky PVA materiálů připravených střídavým elektrickým zvlákněním, kde jako kolektor se používala digestoř s podtlakem (zvětšení 5000×, měřítko 10 μm; (A) - 10% PVA 125\_98 (v PBS), (B) - 10% PVA 125\_98 (v PBS) + 10% BSA (1 mg/ml)) a histogramy distribuce průměrů vláken

Tabulka 16: Střední průměry vláken materiálů z AC electrospinningu (SD – směrodatná odchylka).

Materiál	Střední průměr vláken ± SD
10% PVA 125_98 (v PBS)	0,20 ± 0,05 μm
10% PVA 125_98 (v PBS) + 10% BSA (5 mg / ml)	0,20 ± 0,04 μm

Z Tabulky 16 je zřejmé, že vlákna z čistého roztoku PVA v PBS mají menší střední průměr vláken (0,20 ± 0,04 μm) než vlákna z roztoku PVA v dH<sub>2</sub>O (0,28 ± 0,07 μm). Nicméně ze SEM snímků je také patrné, že roztok PBS ovlivňuje morfologii materiálu.

Jsou vidět místa, kde pravděpodobně došlo k vysrážení solí rozpuštěných v PBS, což je důvodem pro nedoporučení používání PBS. Zároveň vzhledem k nízké produktivitě, dlouhému relaxačnímu času a vznikajícím defektům při zvláknování roztoků PVA v PBS všechny další materiály pro následující analýzy byly připravovány z roztoků PVA v destilované vodě.

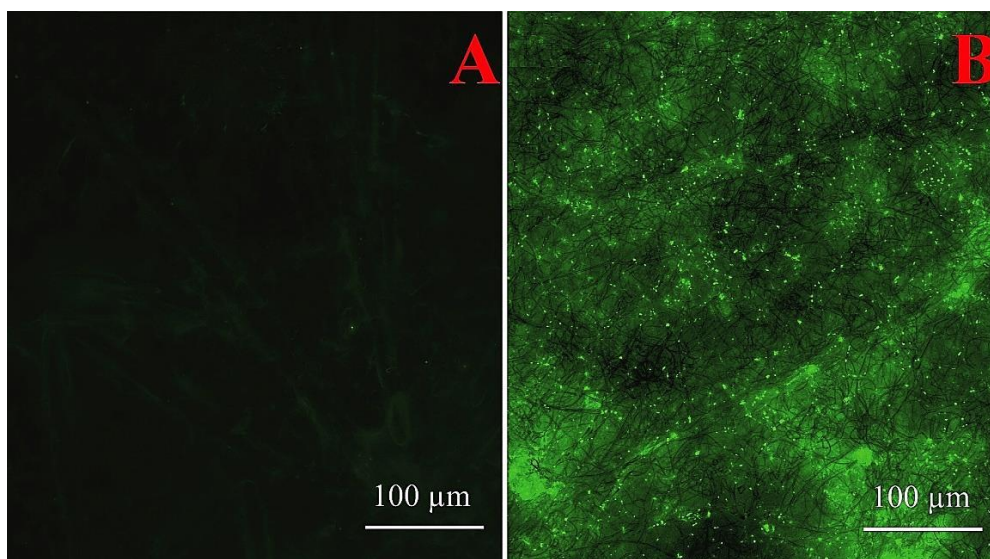
#### 4.2 Analýza proteinů obsažených v připravených vrstvách

Připravené materiály byly charakterizovány z hlediska obsahu proteinů a homogenity jejich distribuce, dále bylo sledováno jejich postupné uvolňování. Nejprve byla hodnocena homogenita distribuce inkorporovaných proteinů pomocí fluorescenční mikroskopie a infračervené spektroskopie, pak bylo zjištěno množství inkorporovaných proteinů a prozkoumáno jejich uvolňování z připravených vrstev pomocí elektroforézy a spektrofotometrie.

##### *Sledování homogenity distribuovaných proteinů:*

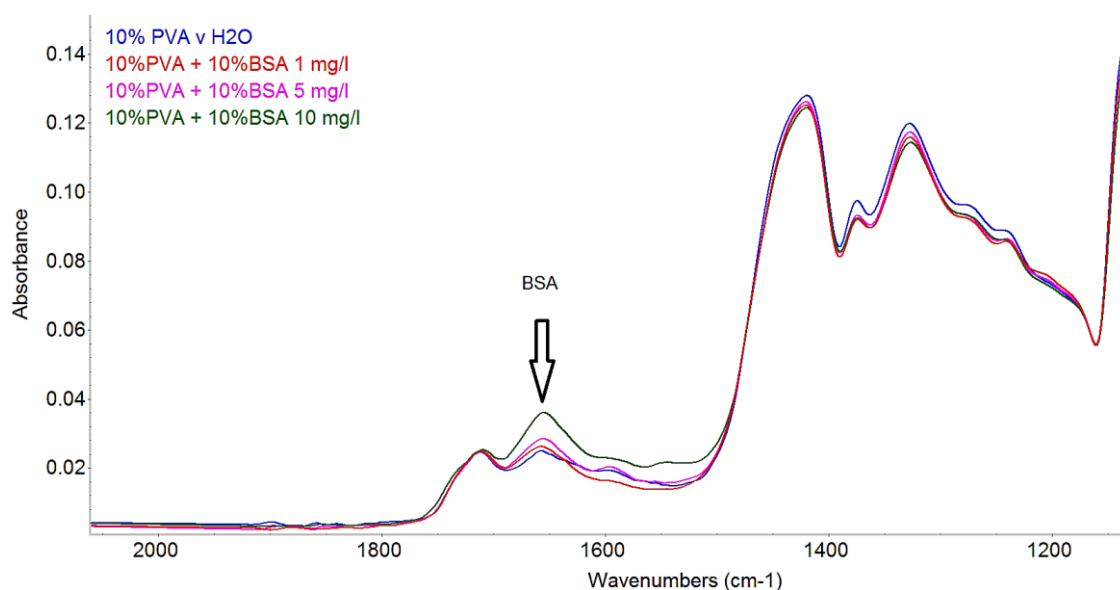
Homogenita distribuce proteinů byla sledována pomocí inkorporace fluorescenčně značeného BSA fluorescein-5-isothiokyanátem (FITC). Materiál byl připraven z roztoku PVA s HTL, kde do HTL byl ještě přidán BSA-FITC o koncentraci 10 mg / ml (celkem do 5 mg BSA na 100 g roztoku bylo přidáno 500  $\mu$ l FITC), pak před zvlákněním bylo to celé smícháno s PVA. Z výsledků následné fluorescenční mikroskopie (viz Obrázek 19) je patrné, že proteiny jsou v materiálu distribuovány homogenně, nicméně zřejmě dochází ke tvorbě agregátů (shluků). Ovšem pokud srovnáme snímky z elektronové mikroskopie (Obrázek 13 a 15), ve srovnání s negativní kontrolou (čisté PVA) nejsou patrné žádné defekty odpovídající těmto shlukům. Jedná se tedy pravděpodobně o shluky uvnitř vláken.





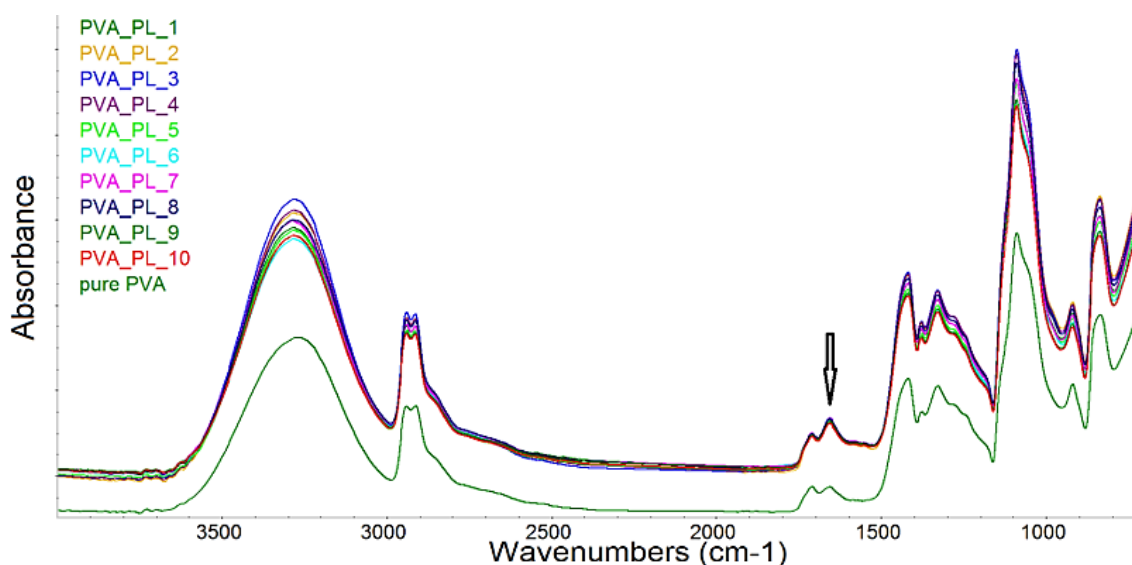
Obrázek 19: Snímky z fluorescenčního mikroskopu (zvětšení 200×, měřítko 100 μm;  
 A - 10% PVA 125\_98, B - 10% PVA 125\_98 + 10% HPL spolu s BSA-FITC)

Dále pomocí FTIR analýzy byly prozkoumány materiály obsahující 10% BSA o různých koncentracích (1, 5, 10 mg / ml), vyrobené střídavým elektrickým zvláknováním. Účelem bylo udělat kontrolní pokus vedoucí k ověření, jaká oblast spektra odpovídá proteinům a zda je možné vidět rozdíl v množství inkorporovaných proteinů. Z výsledků na Obrázku 20 je vidět, že absorpční pás u proteinů inkorporovaných do PVA vláknenných materiálů je mezi 1600 a 1690  $\text{cm}^{-1}$ , kromě toho je patrný rozdíl v množství inkorporovaných proteinů. O tom svědčí píky BSA, které postupně narůstají se zvětšující se koncentrací proteinů.



Obrázek 20: FTIR analýza nanovláknenných materiálů 10% PVA 125\_98 + 10% BSA (o koncentracích 1, 5, 10 mg / ml) a čistého 10% PVA 125\_98; šipkou je označen absorpční pik BSA

Následně byla sledována pomocí FTIR homogenita distribuce proteinů z HTL, byla provedena analýza materiálu na deseti různých místech. Na Obrázku 21 spektrum PVA ukázalo své charakteristické píky při  $3299\text{ cm}^{-1}$  (O–H stretching),  $2917\text{ cm}^{-1}$  (C–H stretching z  $-\text{CH}_2-$ ),  $1427\text{ cm}^{-1}$  (C–H deformace) a  $1085\text{ cm}^{-1}$  (C–O stretching). Intenzivní absorpční pás při  $1600 - 1690\text{ cm}^{-1}$  patří amidovým vazbám v proteinech, které ovšem mohou absorbovat záření ve více oblastech. (Jackson a Mantsch, 1995)



Obrázek 21: FTIR analýza spekter z 10 různých míst nanovláčného materiálu 10% PVA 125\_98 + 10% HPL (pojmenovány jako PVA\_PL) a čistého 10% PVA 125\_98 (pojmenován jako pure\_PVA) vyrobených DC electrospinningem; šipkou je označen absorpční pik způsobený amidovými vazbami v proteinech

Z výsledků je jasné, že provedené měření prokázalo stejnou intenzitu signálu odpovídající proteinové složce z celkem deseti různých částí materiálu. Na základě výsledků z obou analýz lze konstatovat, že distribuce inkorporovaných proteinů v připravených materiálech je homogenní.

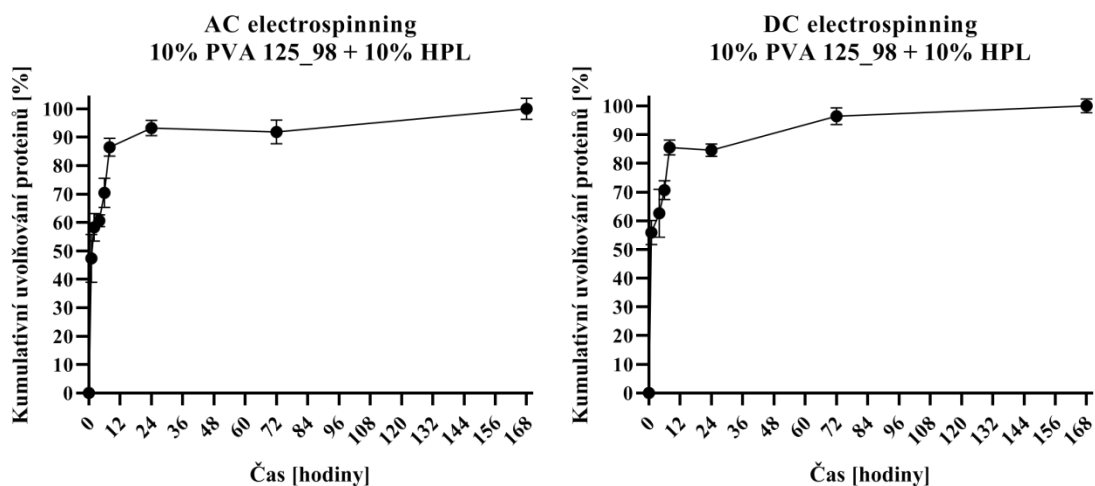
#### *Analýza uvolňování proteinů:*

Dále byly připravené materiály testovány z hlediska uvolňování inkorporovaných proteinů. Pro sedm testovacích dnů byly připraveny 4 vzorky od každého materiálu, tj. od čistého 10% PVA a od 10% PVA s přidavkem 10% HPL zvlákněných AC a DC electrospinningem. Samotné uvolňování proteinů probíhalo do roztoku PBS + 0,02% azidu sodného po umístění do inkubátoru (viz Kap. 3.3.6). Vzorky se odebíraly ve stanovených časech (1, 2, 4, 6, 8 hodin a 1, 3, 7 dní) po 600  $\mu\text{l}$ . Přičemž stejný objem

pufry se pokaždé vracel zpátky do zkumavky. Odebrané alikvotní vzorky se následně používaly na analýzu uvolňování proteinů pomocí spektrofotometrie a elektroforézy.

Nejprve byly vzorky analyzovány spektrofotometricky metodou podle Bradforda, která umožnila kvantifikaci proteinů a stanovení jejich koncentrace (viz Kap. 3.3.6). Před začátkem měření alikvotních vzorků byla připravena ředící řada trombocytárních lyzátů, pomocí které bylo možné určit celkový obsah proteinů v jednom mililitru HPL. Po změření trombocytárních lyzátů z TRS (o koncentraci  $735 \cdot 10^6$  trombocytů / ml) celkové množství proteinů se rovnalo 16,74 mg / ml, po přepočtu vychází teoretické množství proteinů 16,46 mg na jeden gram vrstvy PVA pro 10% HPL a protein loading efficiency je 1,64 % (w / w).

Následně byly stanoveny koncentrace inkorporovaných proteinů, které se uvolňovaly při 37 °C do PBS pufry během jednoho týdne. Dále bylo z těchto koncentrací stanoveno množství uvolněných proteinů za určitou časovou jednotku, přičemž každé nové množství proteinů se přičítalo k již spočítané předchozí hodnotě. Testování vzorků z různých částí materiálů se vždycky provádělo v tripletech. Na Obrázku 22 jsou představeny průběhy uvolňování HPL z materiálů připravených technologiemi střídavého a stejnosměrného elektrického zvlákňování. Kumulativní uvolňování proteinů je uváděno v procentech, kde 100 % znamená maximální uvolněné množství v poslední den měření. Je patrné, že dochází k postupnému uvolňování HPL jak u AC, tak u DC electrospinningu. Během již první hodiny u obou technologií se uvolnilo 50 % HPL, 90% úbytek proteinů nastal u AC a DC electrospinningu zhruba kolem 12. hodiny. Příčinou tohoto jevu by mohlo být umístění proteinů v blízkosti nebo na povrchu vlákna. S ohledem na použité technologie (zvlákňování ze směsi) je pro vzniklé typy materiálů charakteristické rychlé uvolňování látky v prvních hodinách, tzv. „burst release“. (Del Gaudio *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2013) Zbývajících 10 % se pomalu uvolňovalo po dobu následujících sedmi dnů, což je výsledkem difúze proteinů a jejich interakce s PVA. Kromě toho není patrný u obou technologií rozdíl v uvolňování, lze se tedy domnívat, že samotná technologie nemá vliv na interakci a charakter inkorporace proteinů do PVA, neboť se uvolňují téměř podobnou rychlostí a s podobným průběhem.



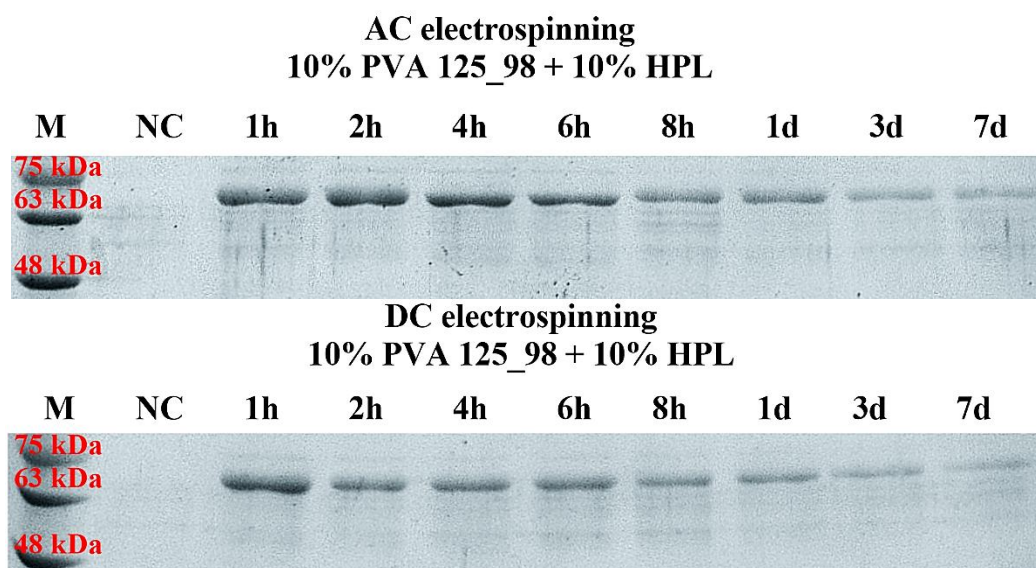
Obrázek 22: Kumulativní uvolňování proteinů stanovené spektrofotometrií z vrstev 10% PVA 125\_98 + 10% HPL vyrobených AC a DC electrospinningem

Také bylo zjištěno, že spočítaná výše teoretická koncentrace proteinů v materiálu na jeden gram odpovídá naměřené koncentraci po testovacích 168 hodinách (7. dnech) a činí 16,13 mg proteinů na jeden gram vrstvy PVA (skutečný protein loading efficiency je 1,61 % (w / w)). Zatímco Y. Yang ve své publikaci (Yang *et al.*, 2011) popisoval materiál s 0,08% (0,8 mg / g) efektivitou inkorporovaného bFGF (basic fibroblast growth factor) a J. Zhao uváděl protein loading efficiency  $7,2 \cdot 10^{-4}$  % (7,2  $\mu$ g / g) v připravených materiálech obsahujících bFGF. (Zhao *et al.*, 2014) Rozdíly v loadinzích jsou dány především složením zvláknovacích roztoků a použitou technologií. V této práci je dosažené procento loadingu (1,61 %) velmi vysoké na rozdíl od výše popsaných publikací.

V porovnání se studii s koaxiálními vlákny (Zhao *et al.*, 2014) a enkapsulovanými nanočásticemi (Xie *et al.*, 2013) s obsahem růstových faktorů se jedná o srovnatelné množství postupně uvolněných proteinů. Vzhledem k vysokému obsahu proteinů v původním dobře rozpustném materiálu je možné předpokládat podporu hojení ran během prvního týdne. Rychlé uvolnění velkého množství HPL na začátku procesu by podporovalo časné fáze hojení ran, když pomalu uvolňující se zbytek by napomáhal následné buněčné proliferace během dalších fází hojení (viz Kap. 1.1).

U alikvotních vzorků s uvolněnými proteiny byla rovněž provedena SDS-PAGE analýza (viz Kap. 3.3.6), pomocí které byla potvrzena přítomnost proteinů v připravených jednotlivých materiálech (viz Obrázek 23). Je patrné, že velikost většiny inkorporovaných proteinů se pohybovala mezi 48 – 75 kDa s dominantním zastoupením lidského sérového albuminu (HSA) o velikosti 65,5 kDa. Po celou dobu experimentu

klesala ve zkumavkách koncentrace kumulujících se proteinů, a to z důvodu neustálého odebrání alikvót a zároveň pomalejšího uvolňování nových proteinů.



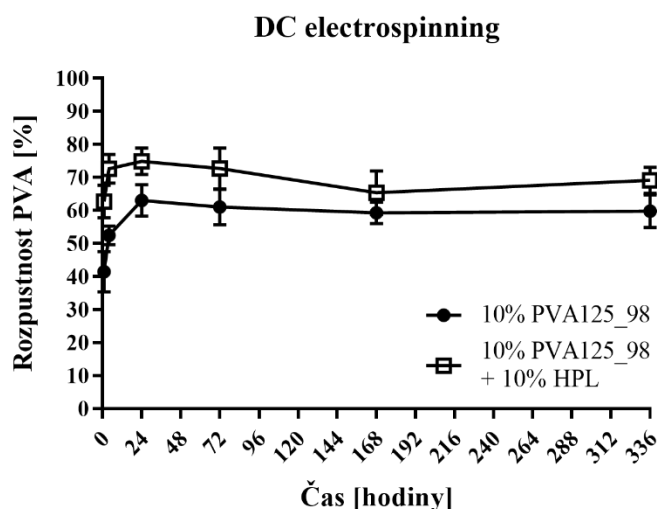
Obrázek 23: Detekce proteinů pomocí SDS-PAGE u materiálů 10% PVA 125\_98 (NC) a u 10% PVA 125\_98 + 10% HPL vyrobených AC a DC electrospinningem

#### 4.3 Stabilizace PVA materiálů

Proces postupného uvolňování inkorporovaných trombocytárních lyzátů přímo souvisí s rozpustností PVA. Tak například v tomto experimentu použitý PVA s molekulovou hmotností 125 000 g / mol a se stupněm hydrolyzy 98 % obsahuje ve svém řetězci 98 % hydroxylových skupin, které zapříčiní tvorbu silných mezimolekulárních sil (vodíkových můstků). Ve vodném prostředí tyto interakce snižují rozpustnost PVA, která ovlivňuje (zpomaluje) i následné uvolňování inkorporovaných proteinů. Proto cílem následujících experimentů bylo testování rozpustností hotových PVA materiálů zvlákněných ze směsi polymeru a biologicky aktivní látky (viz Kap. 2). Takové materiály obvykle vykazují velmi rychlé uvolňování inkorporované látky (Zhang *et al.*, 2016), na rozdíl od materiálů vyrobených technologií jádro-plášť, kde inkorporovaná látka je umístěna v jádře, (Zhao *et al.*, 2014) a technologií inkorporace nanočástic s biologicky aktivní látkou do vláken. (Xie *et al.*, 2013)

Koncentrace rozpuštěného PVA v odebraných alikvotních vzorcích byla stanovována chromatograficky (GPC) a pomocí UV-VIS spektroskopie (viz Kap. 3.3.6), přičemž za 100% rozpustnost se vždy považovala původní hmotnost vzorků před začátkem

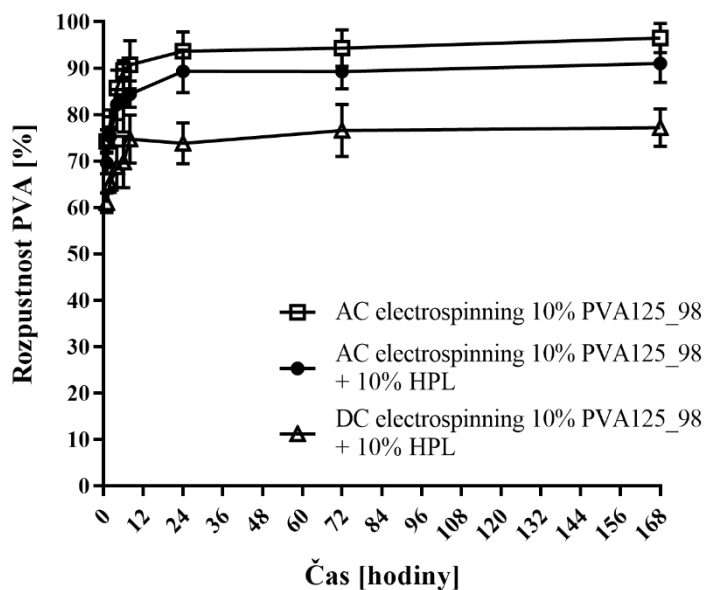
experimentu (30 mg). Z výsledků chromatografie (viz Obrázek 24) je zřejmé, že u obou materiálů z DC electrospinningu dochází k rychlému rozpuštění slabě vázaných PVA molekul. Materiál bez přídavku HPL se rozpustil pouze na 60 %, stabilní zbytek ve formě transparentního filmu už se neměnil po dobu několika měsíců. Rozpustnost PVA materiálu s inkorporovanými proteiny byla cca o 10 % vyšší, viditelný zbytek se již také nerozpouštěl. Příčinou toho, že dochází k neúplnému rozpouštění PVA, jsou silné ne vazebné interakce (vodíkové můstky) mezi PVA řetězci. (Alves *et al.*, 2011)



Obrázek 24: Chromatograficky stanovená rozpustnost 10% PVA 125\_98 a 10% PVA 125\_98 + 10% HPL vyrobených DC electrospinningem

Z měření UV-VIS spektroskopie (viz Obrázek 25) je patrné, že průběh rozpouštění PVA je u materiálů připravených AC electrospinningem velmi podobný, ale celkově vyšší rozpustnost byla pozorována u čistého PVA materiálu (96,5 %) než u PVA s přídavkem HPL (91 %). Ve srovnání s materiály z DC electrospinningu je vidět opačná situace, co se týče rozpustnosti čistého PVA a PVA s proteiny. Vrstva PVA s inkorporovanými proteiny z AC electrospinningu se rozpouští pomaleji (do menší míry) než čistá PVA vrstva. Příčina tohoto jevu není zatím ještě úplně jasná, ale pravděpodobně to spočívá ve vzájemných interakcích proteinů a PVA jednak ve zvláknovacích roztocích, jednak v hotových materiálech.

Také na Obrázku 25 je ukázána křivka rozpustnosti vrstvy PVA s HPL z DC electrospinningu. Je patrné, že se výsledky z chromatografie (viz Obrázek 24) a z UV-VIS spektroskopie shodují, a že rozpustnost PVA vrstvy s inkorporovanými lidskými trombocytárními lyzáty je na úrovni 70 %.



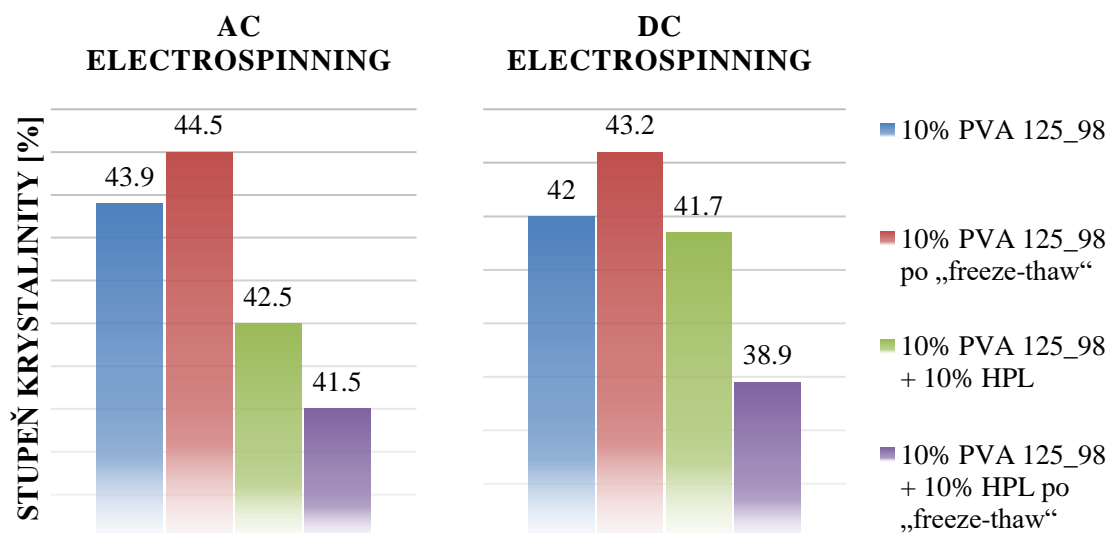
Obrázek 25: Spektroskopicky stanovená rozpustnost 10% PVA 125\_98 a 10% PVA 125\_98 + 10% HPL vyrobených AC a DC electrospinningem

V budoucích experimentech by bylo vhodné získat další data a prokázat případný vliv použité technologie (AC a DC electrospinningů) na rozpustnost výsledného nanovláknenného PVA materiálu.

*Analýza materiálů po použití metody „freeze-thaw“:*

Další myšlenkou bylo, jak ještě víc snížit rozpustnost PVA materiálů (zároveň prodloužit dobu uvolňování proteinů) a stabilizovat připravené vláknenné materiály s inkorporovanými proteiny na delší dobu, neboť při 4 °C skladování dochází k postupné ztrátě aktivity proteinů (Kopřivová, 2018). Jednou z možností je posílení fyzikálního síťování PVA metodou „freeze-thaw“. Tato metoda spočívá v zamrazení a následném rozmrazení PVA, které vede k tvorbě dalších silných nevazebných interakcí mezi molekulami PVA (Alves *et al.*, 2011), díky čemuž se zpomaluje rozpouštění PVA a zároveň uvolňování inkorporovaných proteinů. Cykly je možné provádět i několikrát za sebou, při různých teplotách mrazení a rozmrazování. V této práci byl proveden pouze prvotní experiment, kdy byly všechny nanovláknenné vrstvy umístěny do hlubokomrazicího boxu při -80 °C a pak rozmrazeny při RT. Následně byly vzorky analyzovány s ohledem na změnu krystalinity PVA a uvolňování proteinů.

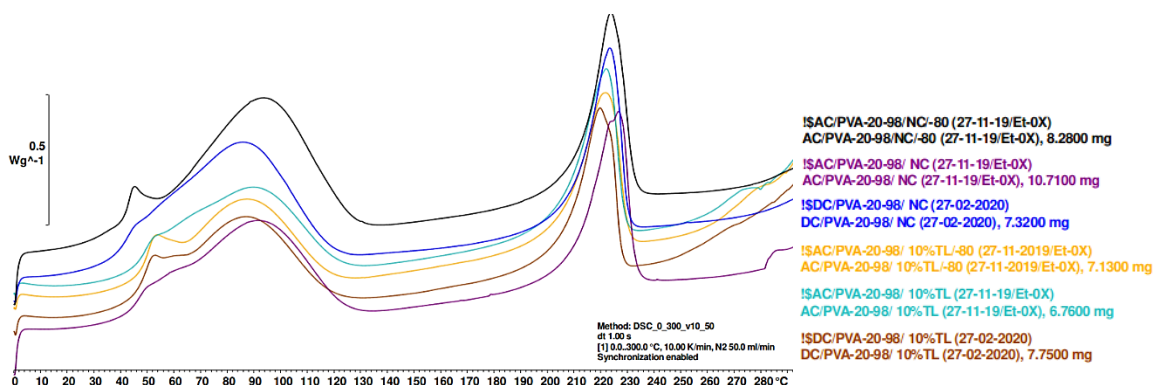
Krystalinita polymeru roste s tvorbou pravidelných nevazebných interakcí. V této práci byla měřena krystalinita PVA materiálů zvlákněných technologiemi AC i DC electrospinningů a materiálů následně podrobených jednomu cyklu „freeze-thaw“. Nanovláknenné vrstvy byly změřeny s pomocí Ing. Luboše Běhálka, Ph.D. Výsledky krystalinit jednotlivých vrstev jsou znázorněny v Grafu 4 a na Obrázku 26. Je zřejmé, že u čistých vláknenných PVA materiálů bez HPL z AC a DC electrospinningu je vidět pozitivní vliv (zvýšení krystalinity) zhruba o 1 %, přičemž materiály zvlákněné AC electrospinningem mají celkově vyšší krystalinitu (ve všech variantách) oproti DC electrospinningu. Avšak u materiálů s inkorporovanými proteiny je vliv naopak negativní (snížení krystalinity), kromě toho všechny materiály s HPL mají vždy nižší krystalinitu. Příčinou by mohlo být to, že trombocytární lyzát brání fyzikálnímu zesíťování řetězců PVA.



Graf 4: Výsledky měření krystalinity pomocí DSC metody pro PVA složku

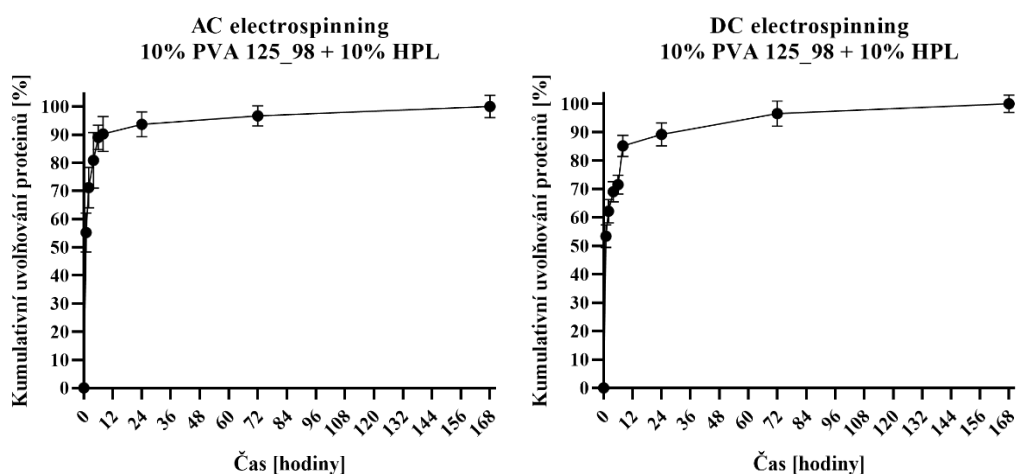
Z Obrázku 26 je rovněž patrné, že u materiálů s inkorporovanými proteiny dochází k rychlejší degradaci PVA (vzestup křivek při teplotách nad 230 °C svědčí o degradaci polymeru). Negativní kontroly (čisté PVA) jsou v tomto směru stabilnější (k degradaci nedochází tak rychle).



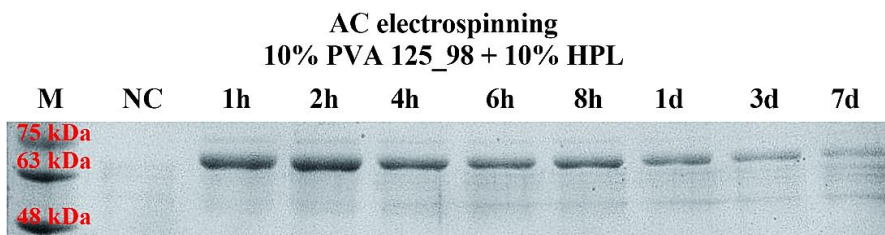


Obrázek 26: DSC křivky všech testovaných materiálů

Dále materiály po „freeze-thaw“ byly také zanalyzovány z hlediska uvolňování proteinů. Výsledky z uvolňování proteinů (viz Obrázky 27 a 28) rozdíl v uvolňování oproti materiálům nepodrobeným „freeze-thaw“ (viz Obrázky 22 a 23) neprokázaly. Nicméně vzhledem k tomu, že u všech testovaných materiálů po zamrazení vzrostla krystalinita, je namístě se touto metodou nadále zabývat a prověřit, zda navýšení počtu cyklů a změna teploty zamrazování / rozmrazování ovlivní stupeň krystalinity PVA do takové míry, že dojde i k podstatnému zpomalení uvolňování proteinů.



Obrázek 27: Kumulativní uvolňování proteinů z vrstev 10% PVA 125\_98 + 10% HPL vyrobených AC a DC electrospinningem po „freeze-thaw“



Obrázek 28: SDS-PAGE analýza materiálů 10% PVA 125\_98 (NC) a 10% PVA 125\_98 + 10% HPL vyrobených AC electrospinningem po „freeze-thaw“

#### 4.4 Biologické *in vitro* testování

Nanovláknenné PVA materiály s inkorporovanými proteiny po sterilizaci ethylenoxidem byly testovány ve spolupráci s Fyziologickým ústavem Akademie věd České republiky (skupina Mgr. Eleny Filové, Ph.D.) s ohledem na aktivitu inkorporovaných růstových faktorů.

V rámci konference „Biomateriály a jejich povrchy XII“ byly prezentovány výsledky *in vitro* testů, které prokazují pozitivní efekt inkorporovaných proteinů na buněčnou adhezi a následnou proliferaci (viz Obrázek A 1 uvedený v přílohách). Polyvinylalkoholové nanovláknenné vrstvy s inkorporovanými trombocytárními lyzáty byly hodnoceny pomocí buněčných linií lidských keratinocytů (HaCat), lidských endoteliálních buněk z vény safény (HSVEC) a fibroblastů (3T3). Z výsledků bylo patrné, že obsah HPL opravdu podporoval adhezi a proliferaci buněk v prvních dnech testování (zejména u 3T3) a že bioaktivní nanovláknna mohou být slibná při léčbě chronických ran. (Suchý *et al.*, 2019) Výsledky z tohoto rozsáhlého biologického testování jsou v současné době předmětem připravované publikace.

## Závěr

Zvýšení biologické aktivity nanovláknenných materiálů strukturně připomínajících extracelulární hmotu určuje v současné době potenciální směr vývoje tkáňového inženýrství. Z hlediska podpory hojení a regenerace tkání je slibné použití plasmy bohaté na trombocyty, která obsahuje stovky biologicky aktivních látek schopných podporovat adhezi a proliferaci buněk. V rámci této diplomové práce byla optimalizována příprava PVA nanovláknenných materiálů s obsahem nativních trombocytárních růstových faktorů, které jsou časem postupně uvolňovány. Postupného uvolňování proteinů je dosaženo zejména díky použití PVA s vysokou molekulovou hmotností (125 000 g / mol) a s vysokým stupněm hydrolyzy (98 – 98,8 %). U vrstev připravených střídavým (AC) a stejnosměrným (DC) elektrickým zvlákněním byla hodnocena morfologie vláken, obsah a distribuce inkorporovaných proteinů, kinetika uvolňování proteinů, rozpustnost výsledných PVA materiálů a rovněž byla studována možnost další stabilizace vyrobených materiálů.

V rámci optimalizace přípravy materiálů pomocí AC electrospinningu byly nalezeny vhodné procesní parametry jak pro přípravu vláken z 10% vodného roztoku PVA, tak z roztoku 10% PVA s přidavkem proteinů (HPL, BSA). Výskyt defektů lze redukovat použitím kolektoru typu digestoř s podtlakem. Produktivita zvláknění z čistého roztoku PVA je výrazně vyšší (8 – 12 g / h) než z roztoku PVA obsahujícího proteiny (2 – 3,5 g / h). Opačná situace byla v případě DC electrospinningu, kde produktivita zvláknění z roztoku 10% PVA s přidavkem proteinů byla naopak vyšší.

Taktéž se liší morfologie připravených materiálů s ohledem na použitou technologii zvláknění. Střední průměry vláken u materiálů z AC electrospinningu jsou nižší (pro 10% PVA je  $0,28 \pm 0,07 \mu\text{m}$ , pro 10% PVA s 10% HPL je  $0,23 \pm 0,05 \mu\text{m}$ ) než u materiálů vyrobených DC electrospinningem (pro 10% PVA je  $0,39 \pm 0,12 \mu\text{m}$ , pro 10% PVA s 10% HPL je  $0,43 \pm 0,13 \mu\text{m}$ ). Nicméně u žádné z technologií nebyl pozorován vliv přidavku proteinů do zvlákněvacího roztoku na průměry vláken výsledných materiálů (vždy byly srovnatelné s průměry vláken čistého PVA materiálů).

Provedená FTIR analýza i mikroskopie vrstev s inkorporovanými fluorescenčně značenými proteiny prokázala homogenní distribuci proteinů ve vyrobených vrstvách. Množství inkorporovaných proteinů (v závislosti na použitém trombocytárním lyzátu) bylo 16,13 mg na gram vyrobeného materiálu, jedná se tedy o loading efficiency 1,61%.

Z hlediska kinetiky uvolňování inkorporovaných proteinů ve vodném prostředí nebyl pozorován rozdíl u materiálů připravených různými technologiemi. Ve fázi tzv. „burst release“ bylo v první hodině uvolněno 50 % proteinů a v průběhu prvních 12 hodin se uvolnilo až 90 % proteinů, zbývajících 10 % se pomalu uvolňovalo po dobu následujících sedmi dnů. S ohledem na velmi vysokou efektivitu loadingu je toto množství uvolněných proteinů ve srovnání s výsledky publikovanými v literatuře stále velmi vysoké.

Studium aktivity inkorporovaných proteinů nebylo součástí této práce, nicméně v rámci spolupráce s Fyziologickým ústavem AVČR byly materiály *in vitro* testovány pomocí buněčných linií lidských keratinocytů (HaCat), lidských endoteliálních buněk (HSVEC) a fibroblastů (3T3). Výsledky z biologického testování prokázaly pozitivní vliv inkorporovaných proteinů na buněčnou adhezi a následnou proliferaci (zejména u 3T3).

Přestože nebyl pozorován rozdíl v kinetice uvolňování proteinů u materiálů s ohledem na použitou technologii výroby, rozpustnost PVA se lišila výrazně. U obou materiálů dochází k rychlému rozpouštění slabě vázaných PVA molekul, nicméně v případě čistého materiálu z DC electrospinningu došlo k rozpuštění pouze 60 % PVA, zatímco u PVA vrstvy z AC electrospinningu došlo k rozpuštění 96,5 %. Odlišná je i rozpustnost PVA u materiálů s inkorporovanými proteiny. V případě vrstvy připravené DC zvlákňováním se rozpustnost PVA zvyšuje cca o 10 %, zatímco u vrstvy z AC zvlákňování se rozpustnost PVA naopak o 5 % snižuje. Příčina tohoto chování není zatím úplně zřejmá. Oba druhy materiálů se liší i z hlediska stupně krystalinity PVA.

V závěru práce byl proveden prvotní experiment zaměřený na další snížení rozpustnosti PVA s cílem zpomalit rychlost uvolňování inkorporovaných proteinů. Výsledky analýzy po jednom cyklu „freeze-thaw“ sice neprokázaly vliv na uvolňování proteinů, nicméně byl pozorován pozitivní vliv na krystalinitu čistých vláknitých PVA materiálů.

Na základě získaných výsledků je možné předpokládat, že PVA materiály funkcionalizované trombocytárními růstovými faktory mají vysoký potenciál pro použití ve tkáňovém inženýrství, např. při hojení velkých a chronických kožních poranění. V budoucích experimentech by bylo vhodné pokračovat s optimalizací AC a DC elektrického zvlákňování z roztoku PVA s přídavkem HPL pro získání materiálů s ještě pozvolnějším rozpouštěním PVA složky a s pomalejším uvolňováním inkorporovaných proteinů.

## Bibliografie

AKTER, F., J. IBANEZ a N. BULSTRODE, 2016. *Skin Engineering*. In: Tissue Engineering Made Easy [online]. B.m.: Elsevier, s. 17–27 [cit. 2020-02-18]. ISBN 978-0-12-805361-4. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-805361-4.00003-5

ALGHORAIBI, Ibrahim a Sandy ALOMARI, 2018. *Different Methods for Nanofiber Design and Fabrication*. In: Ahmed BARHOUM, Mikhael BECHELANY and Abdel MAKHLOUF, ed. Handbook of Nanofibers [online]. Cham: Springer International Publishing, s. 1–46 [cit. 2020-03-01]. ISBN 978-3-319-42789-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-42789-8\_11-2

Alternating Current (AC) Electrospinning, 2020. *ElectrospinTech* [online]. [cit. 2020-01-05]. Dostupné z: <http://electrospintech.com/acelectrospinning.html#.XgsYkpNKjIV>

Alternating Current versus Direct Current, 2020. *Pressbooks* [online]. [cit. 2020-01-05]. Dostupné z: <https://opentextbc.ca/physicstestbook2/chapter/alternating-current-versus-direct-current/>

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*. Macromolecular Bioscience [online]. **11**(10), 1293–1313. ISSN 16165187. Dostupné z: doi:10.1002/mabi.201100145

AMIRUDDIN FADZLI ZAINI, Balu RANGANATHAN, Subramaniam SUNDARRAJAN a Seeram RAMAKRISHNA, 2014. *Coaxial electrospun nanofibers as pharmaceutical nanoformulation for controlled drug release*. In: 14th International Conference on Nanotechnology (IEEE-NANO) [online]. Toronto, Canada: IEEE, s. 531–534 [cit. 2020-04-07]. ISBN 978-1-4799-5622-7. Dostupné z: doi:10.1109/NANO.2014.6968190

BACAKOVA, Lucie, Julia PAJOROVA, Marketa ZIKMUNDOVA, Elena FILOVA, Petr MIKES, Vera JENCOVA, Eva KUZELOVA KOSTAKOVA a Alla SINICA, 2019. *Nanofibrous Scaffolds for Skin Tissue Engineering and Wound Healing Based on Nature-Derived Polymers*. In: Current and Future Aspects of Nanomedicine [Working Title] [online]. B.m.: IntechOpen [cit. 2020-02-18]. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.88602

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

BENEŠOVÁ, Marika, 2013. *Odmaturuj! z biologie*. Brno: Didaktis. ISBN 978-80-7358-231-9.

Blood Plasma and Buffy Coat, 2020. *Medical - Labs* [online]. © Medical Laboratories [cit. 2020-01-05]. Dostupné z: <http://www.medical-labs.net/blood-plasma-and-buffy-coat-318/>

Buffy Coat: Definition, Composition, Preparation and Uses, 2020. *Microbe Online* [online]. © MH Themes [cit. 2020-01-05]. Dostupné z: <https://microbeonline.com/buffy-coat-definition-composition-preparation-uses/>

BURNOUF, Thierry, Dirk STRUNK, Mickey B.C. KOH a Katharina SCHALLMOSER, 2016. *Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation?* *Biomaterials* [online]. **76**, 371–387. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2015.10.065

ČIHÁK, Radomír, Miloš GRIM, Rastislav DRUGA, Milan MED a Ivan HELEKAL, 2004. *Anatomie. 3. Druhé, upravené a doplněné vydání*. Praha: Grada Publishing. ISBN 80-247-1132-X.

DEL GAUDIO, Costantino, Silvia BAIGUERA, Margherita BOIERI, Benedetta MAZZANTI, Domenico RIBATTI, Alessandra BIANCO a Paolo MACCHIARINI, 2013. *Induction of angiogenesis using VEGF releasing genipin-crosslinked electrospun gelatin mats*. *Biomaterials* [online]. **34**(31), 7754–7765. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2013.06.040

Elektroformirovanie nanovlokn NANOSPIDER™, 2017. *Centr Innovacionnykh technologij* [online]. [cit. 2020-01-05]. Dostupné z: [http://www.innfocus.ru/public/upload/images/services/2\(5\).jpg](http://www.innfocus.ru/public/upload/images/services/2(5).jpg)

FILATOV, Y., A. BUDYKA a V. KIRICHENKO, 2007. *Electrospinning of micro- and nanofibers: fundamentals and applications in separation and filtration processes*. New York: Begell House. ISBN 978-1-56700-241-6.

FREI, Robert, F.E. BIOSCA, Milan HANDL, Tomáš TRČ, 2008. *Funkce růstových faktorů v lidském organismu a jejich využití v medicíně, zejména v ortopedii a traumatologii*. *Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Českoslovacae* [online]. *Klinika dětské a dospělé ortopedie a traumatologie 2*. LF UK a FN Motol, roč. 75, č. 4, s. 247-252 [cit. 2020-02-15]. ISSN: 0001-5415. Dostupné z: [http://www.achot.cz/dwnld/0804\\_247.pdf](http://www.achot.cz/dwnld/0804_247.pdf)

GREENING, David W., Rosemary L. SPARROW a Richard J. SIMPSON, 2011. *Preparation of Platelet Concentrates*. In: Richard J. SIMPSON and David W. GREENING, ed. *Serum/Plasma Proteomics* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, s. 267–278 [cit. 2020-02-18]. ISBN 978-1-61779-067-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-068-3\_18

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

HU, Jue, Molamma P. PRABHAKARAN, Lingling TIAN, Xin DING a Seeram RAMAKRISHNA, 2015. *Drug-loaded emulsion electrospun nanofibers: characterization, drug release and in vitro biocompatibility*. RSC Advances [online]. **5**(121), 100256–100267. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/C5RA18535A

JASÍKOVÁ, Darina. *Experimentální studium elektrostatického rozprašování a zvlákňování*. Liberec, 2011. Disertační práce, 150 s. Technická univerzita v Liberci. Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií. Vedoucí práce: Prof. Ing. Václav Kopecký, CSc.

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

KOPŘIVOVÁ, Barbora. *Funkcionalizace tkáňového nosiče založeného na PVA pomocí růstových faktorů*. Liberec, 2018. Diplomová práce, 93 s. Technická univerzita v Liberci. Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií. Vedoucí práce: Ing. Věra Jenčová, Ph.D.

KRAFTS, Kristine P., 2010. *Tissue repair: The hidden drama*. Organogenesis [online]. **6**(4), 225–233. ISSN 1547-6278, 1555-8592. Dostupné z: doi:10.4161/org.6.4.12555

LUKAS, David, Arindam SARKAR a Pavel POKORNY, 2008. *Self-organization of jets in electrospinning from free liquid surface: A generalized approach*. Journal of Applied Physics [online]. **103**(8), 084309. ISSN 0021-8979, 1089-7550. Dostupné z: doi:10.1063/1.2907967

LUKÁŠ, David a kol., 2008. *Lékařské textilie, 2. díl*. Centrum pro podporu konkurenceschopnosti v biomedicínských technologiích. Praha: Asociace inovačního podnikání ČR, [cit. 2020-03-02]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/4718103-Leka-ske-textilie-2-dil-kolektiv-autor-centrum-pro-podporu-konkurenceschopnosti-v-biomedicinsk-ch-technologiich.html>

LUKÁŠ, D., A. SARKAR, L. MARTINOVÁ, K. VODSED'ÁLKOVÁ, D. LUBASOVÁ, J. CHALOUPEK, P. POKORNÝ, P. MIKEŠ, J. CHVOJKA a M. KOMÁREK, 2009. *Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century)*. Textile Progress [online]. **41**(2), 59–140. ISSN 0040-5167, 1754-2278. Dostupné z: doi:10.1080/00405160902904641

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

PAVELKOVÁ, Alena. *Biodegradable polyesters and polyanhydrides for advanced applications*. Zlín, 2012. Doctoral thesis, 130 s. Tomas Bata University in Zlín. Faculty of Technology, Center of polymeric materials. Supervisor doc. Ing. Sedlařík Vladimír, Ph.D.

PECKA, Miroslav, 2006. *Laboratorní hematologie v přehledu, 2. díl*. Český Těšín: FINIDR. ISBN 978-80-86682-00-6.

PETRÁŠ, David, Dušan KIMMER a Karel SOUKUP, 2009. *Bezpečná nanovlákná*. Chemické listy. **103**, 1009-1016. Dostupné z: [http://www.w.chemicke-listy.cz/docs/full/2009\\_12\\_1009-1016.pdf](http://www.w.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_12_1009-1016.pdf)

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

Polimeranalogichnyie prevrascheniya, 2020. *Media Chimia* [online]. © MPlast.by [cit. 2020-02-26]. Dostupné z: <https://mplast.by/encyklopedia/polimeranalogichnyie-prevrashheniya/>

RATNER, B. D., ed., 2013. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 3rd ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic Press. ISBN 978-0-12-374626-9.

SHAZ, Beth, Christopher D. HILLYER, Charles Samuel ABRAMS a Mikhail ROSHAL, ed., 2013. *Transfusion medicine and hemostasis: clinical and laboratory aspects*. Second edition. Amsterdam: Elsevier Science. ISBN 978-0-12-397164-7.

SLAPNÍČKA, Jan. *Vliv aktivované a neaktivované plazmy bohaté na trombocyty (PRP) na proliferaci lidských osteoblastů a fibroblastů in vitro*. Brno, 2009. Disertační práce, 72 s. Masarykova univerzita. Lékařská fakulta. Vedoucí práce: Prof. MUDr. Antonín Fassmann, CSc.

Soft Tissue Repair and Healing Review, 2020. *Electrotherapy on the web* [online]. © Prof. Tim Watson [cit. 2020-02-25]. Dostupné z: <http://www.electrotherapy.org/modality/soft-tissue-repair-and-healing-review#Return%20to%20Top>

SOVKOVÁ, Věra. *Příprava, charakterizace a testování krevních derivátů pro aplikace v regenerativní medicíně*. Praha, 2019. Disertační práce, 170 s. Ústav biofyziky. 2. lékařská fakulta. Vedoucí práce: RNDr. Evžen Amler, CSc.



Stages Of Wound Healing, 2020. *Quizlet* [online]. © Quizlet Inc. [cit. 2020-02-25]. Dostupné z: <https://quizlet.com/320783005/stages-of-wound-healing-diagram/>

STRÁNSKÁ, Denisa. *Nanovláknenné membrány jako nosiče léčiv*. Hradec Králové, 2018. Disertační práce, 100 s. Univerzita Karlova v Praze. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce: doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

STRNADOVÁ, Kateřina, Lukáš STANISLAV, Ilona KRABICOVÁ, Filip SABOL, Jan LUKÁŠEK, Michal ŘEZANKA, David LUKÁŠ a Věra JENČOVÁ, 2019. *Drawn aligned polymer microfibres for tissue engineering*. *Journal of Industrial Textiles* [online]. ISSN 1528-0837, 1530-8057. Dostupné z: doi:10.1177/1528083718825318

SUCHÝ, Tomáš, Lucie VIŠTEJNOVÁ, Radek SEDLÁČEK a Zdeněk TOLDE, 2019. *Biomateriály a jejich povrchy XII*. Praha: České vysoké učení technické v Praze. ISBN 978-80-01-06625-6.

SULTAN LIPOL, Lefayet a Md. Moshir RAHMAN, 2016. *Electrospinning and Electrospun Nanofibers*. *World Journal of Nano Science and Engineering* [online]. 06(02), 45–50. ISSN 2161-4954, 2161-4962. Dostupné z: doi:10.4236/wjnse.2016.62005

ŠRÁMEK, Jaromír. *Nanotechnologie v medicíně*. Brno, 2009. Masarykova univerzita v Brně, Lékařská fakulta - Biofyzikální ústav. [cit. 2020-02-15]. Dostupné z: <https://www.med.muni.cz/biofyz/doc/NMgr/nanotech.pdf>

Technologie. Střídavé zvláknování, 2015. *Nanopharma* [online]. [cit. 2020-01-05]. Dostupné z: <https://www.nanopharma.cz/cs/produkty-a-technologie/technologie>

TOMLINS, Paul, ed., 2016. *Characterisation and design of tissue scaffolds*. Amsterdam: Elsevier/WP, Woodhead Publishing. Woodhead Publishing series in biomaterials, Number 106. ISBN 978-1-78242-087-3.

Trombocyty, 2018. *WikiSkripta, projekt 1. lékařské fakulty a Univerzity Karlovy, příspěvek UK k výukovým zdrojům sítě lékařských fakult MEFANET* [online]. [cit. 2020-01-03]. ISSN 1804-6517. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Trombocyty>

VOKURKA, Martin, 2012. *Patofyziologie pro nelékařské směry* [online] [cit. 2020-03-08]. ISBN 978-80-246-2773-1. Dostupné z: <http://site.ebrary.com/id/10960978>

WATSON, Tim, 2016. *Soft Tissue Repair and Healing Review*. Electrotherapy on the web [online]. University of Hertfordshire, United Kingdom. © Prof. Tim Watson [cit. 2020-02-25]. Dostupné z: <http://www.electrotherapy.org/modality/soft-tissue-repair-and-healing-review#Return%20to%20Top>

WHITE, James G., 2007. *Platelet Structure*. In: *Platelets* [online]. B.m.: Elsevier, s. 45–73 [cit. 2020-02-18]. ISBN 978-0-12-369367-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012369367-9/50765-5

XIE, Zhiwei, Christian B. PARAS, Hong WENG, Primana PUNNAKITIKASHEM, Lee-Chun SU, Khanh VU, Liping TANG, Jian YANG a Kytai T. NGUYEN, 2013. *Dual growth factor releasing multi-functional nanofibers for wound healing*. *Acta Biomaterialia* [online]. **9**(12), 9351–9359. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2013.07.030

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

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 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2011.02.042

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

ZHANG, Xiaoli, Keyong TANG a Xuejing ZHENG, 2016. *Electrospinning and crosslinking of COL/PVA Nanofiber-microsphere Containing Salicylic Acid for Drug Delivery*. *Journal of Bionic Engineering* [online]. **13**(1), 143–149. ISSN 1672-6529, 2543-2141. Dostupné z: doi:10.1016/S1672-6529(14)60168-2

ZHAO, Jinzhong, Song ZHAO, Jingwen ZHAO, Shikui DONG, Xiaoqiao HUANGFU, Bin LI, Huilin YANG a Wenguo CUI, 2014. *Biological augmentation of rotator cuff repair using bFGF-loaded electrospun poly(lactide-co-glycolide) fibrous membranes*. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2373. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S59536

ZHU, Junmin, 2010. *Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering*. *Biomaterials* [online]. **31**(17), 4639–4656. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2010.02.044

## Přílohy

### A Biologické *in vitro* testování

**Elena Filová<sup>1</sup>, Martin Plencner<sup>1</sup>, Andreu Blanquer Jerez<sup>1</sup>, Barbora Kopřivová<sup>2</sup>, Renata Procházková<sup>3</sup>, Věra Jenčová<sup>2</sup>, Jarmila Knitlová<sup>1</sup>  
and Lucie Bačáková<sup>1</sup>**

#### ***In vitro* evaluation of PVA nanofibers with incorporated platelet lysate for improved wound healing**

<sup>1</sup> Institute of Physiology of the Czech Academy of Sciences, Prague

<sup>2</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Humanities and Education, TU Liberec, Liberec

<sup>3</sup> Regional Hospital Liberec, Liberec

[elena.filova@fgu.cas.cz](mailto:elena.filova@fgu.cas.cz)

Chronic, non-healing wounds are a major medical problem connected especially with diabetic patients. A lack of growth factors and cytokines have been described in these wounds [1]. Supplementation wounds with growth factors and other bioactive molecules, which are present in platelet lysate, could stimulate growth, migration and differentiation of (epi-)dermal cells, and enhance wound healing. Controlled release of bioactive molecules from polyvinylalcohol (PVA) nanofibers can prolong their effect. In the present study, PVA nanofibers with incorporated human platelet lysate (PL) have been prepared and evaluated *in vitro* with human keratinocyte cell line HaCat, human saphenous endothelial cells (HSVEC) and with 3T3 fibroblasts. The cells were cultured with PL, PVA meshes or with PVA nanofiber meshes with incorporated PL (PVA\_PL). Maximum metabolic activity was observed at 1% of PL in medium with 3T3 fibroblast, 2.5% of PL with HaCat and 5% of PL with HSVEC. PVA\_PL mesh added into medium stimulated metabolic activity of HaCat cells, fibroblasts, and HSVEC. In addition, PVA\_PL stimulated the production of cytokeratin 14, cytokeratin 1 and cytokeratin 10 in HaCat cells. In HSVEC, cells produced CD31 and von Willebrand factor. Von Willebrand factor was secreted out of the cells more in medium with 5% of PL than with PVA\_PL. PVA\_PL mesh stimulated especially the proliferation of 3T3 fibroblasts, but not the production of type I collagen on day 7. PVA\_PL nanofiber meshes are bioactive and seem to be promising for the treatment of chronic wounds.

[1] Kim, S.W., Zhang, H.Z., Guo, L. et al. PloS One. 2012;7(7):e41105.

*Supported by the Czech Health Research Council, project No. NV18-01-00332.*

*Obrázek A 1: Abstrakt představený Elenou Filovou na odborném semináři  
„Biomateriály a jejich povrchy XII“*

### B Obsah příloženého CD:

Lisnenko\_Maxim\_DP\_2020.pdf