



Studium interakce krevní plasmy a biodegradabilních vláknenných polyesterových materiálů

Bakalářská práce

Studijní program: B3107 – Textil

Studijní obor: 3106R016 – Textilní technologie, materiály a nanomateriály

Autor práce: **Eva Jarošová**

Vedoucí práce: Ing. Věra Jenčová, Ph.D.





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC
Faculty of Textile Engineering ■

Study of interaction between blood plasma and biodegradable polyester fibrous materials

Bachelor thesis

Study programme: B3107 – Textil

Study branch: 3106R016 – Textile Technologies, Materials and Nanomaterials

Author: **Eva Jarošová**

Supervisor: Ing. Věra Jenčová, Ph.D.



Technická univerzita v Liberci

Fakulta textilní

Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Eva Jarošová**

Osobní číslo: **T16000155**

Studijní program: **B3107 Textil**

Studijní obor: **Textilní technologie, materiály a nanomateriály**

Název tématu: **Studium interakce krevní plasmy a biodegradabilních vláknenných polyesterových materiálů**

Zadávací katedra: **Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů**

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

1. Vypracování literární rešerše na dané téma.
2. Morfologické hodnocení vstupních materiálů (vláknenné vrstvy PCL a PLCL, analýza snímků z elektronové mikroskopie).
3. Optimalizace inkubace vláknenných materiálů s krevní plasmou, nastavení podmínek , časový průběh experimentu, odběr vzorků, analýza vzorků (spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinů, SDS-PAGE elektroforéza).
4. Charakteristika materiálů v průběhu inkubace s krevní plasmou: adheze specifických proteinů, degradační chování (hmotnostní úbytek, změna molekulové hmotnosti, morfologické hodnocení).
5. Vyhodnocení výsledků, porovnání použitých materiálů.



Rozsah grafických prací: **dle potřeby dokumentace**

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

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

Seznam odborné literatury:

1. Wei, G., & Ma, P. X. (2008). Nanostructured biomaterials for regeneration. *Advanced Functional Materials*, 18(22), 3568 - 3582.
2. Regis, S., Youssefian, S., Jassal, M., Phaneuf, M. D., Rahbar, N., & Bhowmick, S. (2014). Fibronectin adsorption on functionalized electrospun polycaprolactone scaffolds: Experimental and molecular dynamics studies. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 102(6), 1697 - 1706.
3. Dong Y., Liao S., Ngiam M., Chan K.C., Ramakrishna S.. Degradation Behaviors of Electrospun Resorbable Polyester Nanofibers. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2009, 15(3): 333-351.
4. Ratner, B. D., Buddy D. . (2013). *Biomaterials science : an introduction to materials in medicine*, Academic Press.


Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Věra Jenčová, Ph.D.

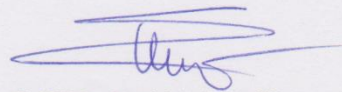
Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

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

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. května 2018**


Ing. Jana Drašarová, Ph.D.
děkanka




prof. RNDr. David Lukáš, CSc.
vedoucí katedry

V Liberci dne 13. října 2017

Prohlášení

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

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

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

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

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

Datum:

Podpis:



Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat své vedoucí bakalářské práce Ing. Věře Jenčové, Ph. D. za velkou trpělivost a pomoc s vypracováním této práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Kateřině Strnadové a Ing. Barboře Kopřivové za velkou pomoc a trpělivost při vyhodnocování experimentů.



Abstrakt

V této práci je studován vliv krevní plasmy na biodegradabilní vlákenné polyesterové materiály. Konkrétně se jedná o poly(ϵ -kaprolakton) (PCL) a kopolymer kyseliny polymléčné a poly(ϵ -kaprolaktonu) (PLCL) a jejich polymerních směsí (blendů) v poměrech PCL:PLCL – 1:1, 1:3, 3:1.

Vliv plazmy na materiály je vyhodnocován zkoumáním degradace materiálu a adheze plazmatických bílkovin. Adheze plazmatických bílkovin je vyhodnocována pomocí elektroforézy SDS – PAGE a spektrofotometrické metody. Degradace materiálů je hodnocena elektronovou mikroskopií a následnou analýzou snímků, váhovým úbytkem a hodnocením gelové permeační chromatografie.

Klíčová slova:

Polyestery, biodegradabilní polyestery, (nano)vlákenné materiály, scaffoldy, biodegradabilita, krevní plasma, polymerní scaffoldy



Abstract

This work studies interaction between blood plasma and polyester fibrous biodegradable materials, especially poly(ϵ - caprolakton), copolymer of polylactic acid and poly(ϵ - kaprolaktonu) (PLCL) and mixtures (blends) of these materials in ratios PCL:PLCL – 1:1, 1:3, 3:1.

Influence of blood plasma to polymer materials will be tested by degradation of materials and adhesion of plasmatic proteins on input materials. Adhesion of plasmatic proteins will be evaluated by SDS – PAGE electrophoresis and total amount of proteins by spektrofotometric method. Degradation of material will be tested by electron microscopy photos – diameters of fibers, weight loss and gel permeation chromatography.

Key words:

Polyesters, biodegradable polyesters, (nano)fibrous materials, scaffolds, biodegradability, blood plasma, polymer scaffolds



Obsah

Obsah	9
Použité zkratky	10
Úvod.....	11
Teoretická část:	12
1. Tkáňové inženýrství.....	12
1.1. Scaffoldy.....	12
2. Materiály pro tkáňové inženýrství	13
2.1. Kovy	15
2.2. Keramika	16
2.3. Polymery.....	17
2.4. Tělní tekutiny.....	25
Experimentální část:	26
3. Materiál a metody	26
3.1. Použité chemikálie.....	26
3.2. Přístroje a programy	27
3.3. Příprava roztoků	28
3.4. Metody.....	31
4. Výsledky a diskuze	37
4.1. Optimalizace testování interakce krevní plazmy s vlákennými materiály ...	37
4.2. Testování rozšířené sady vlákenných materiálů v krevní plazmě	45
5. Závěr:	57
6. Zdroje.....	58
Seznam obrázků	60
Seznam grafů.....	62
Seznam tabulek	62
Přílohy	63



Použité zkratky

PCL – poly(ϵ -kaprolakton)

PLCL – kopolymer poly(ϵ -kaprolaktonu) a kyseliny polymléčné

SEM – skenovací elektronová mikroskopie

SDS – PAGE – elektroforéza v přítomnosti SDS v polyakrylamidovém gelu

SDS – dodecylsírán sodný

GPC – gelová permeační chromatografie

NC – negativní kontrola

PBS - Fosfátový pufr (phosphate-buffered saline)

CBB - Coomassie Brilliant Blue G-250



Úvod

Tkáňové inženýrství se zabývá zkoumáním a vyvíjením materiálů vhodných pro nahrazení a regeneraci lidských tkání. Pomocí těchto materiálů je možné nahradit poškozenou tkáň (např. cévní náhrady) nebo regenerovat tkáň, případně zamezit vzniku infekce (např. kožní kryty). Polyesterové materiály jsou předmětem zkoumání pro využití hlavně v oblasti kardiovaskulárních protéz, vzhledem k jejich biokompatibilitě a odpovídajícímu času degradace.

Materiály, které se takto používají, musí splňovat určité podmínky, které jsou popsány níže. Tyto vlastnosti jsou přísně hlídány a dodržovány a liší se pro různé tkáně. Jedná se o materiály, které jsou pro tělo nezávadné, jak v původní formě, tak produkty degradace. Nesmí vyvolávat nežádoucí reakce imunitního systému, které by vedly k zánětům a rychlost degradace materiálu musí odpovídat procesu hojení. Všechny materiály, které teoreticky vyhovují pro použití ve tkáňovém inženýrství, jsou testovány nejprve in – vitro a pokud vyhovují i v těchto testech, přechází se k testování in – vivo na hlodavcích, králících a prasatech.

V této práci bude takový materiál testován in – vitro v prostředí, ve kterém by se měl vyskytovat, v krevní plazmě. Jedná se o poly(ϵ -kaprolakton) (PCL), kopolymer poly(ϵ -kaprolaktonu) a kyseliny polymléčné (PLCL) a jejich polymerních směsí (blendů). Cílem je otestovat zda a v jaké míře dochází k adhezi proteinů na materiály a zda dochází během testované doby k degradaci materiálu.



Teoretická část:

1. Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství se zabývá vývojem a výrobou tkáňových náhrad. Jeho hlavním úkolem je vyrobit scaffold, který má vhodné vlastnosti pro další využití. V řadě případů se na scaffoldy aplikují buňky, které mohou být buď autologní, alogenní, xenogenní, případně kmenové. Autologní buňky jsou buňky pocházející přímo z těla toho, kterému bude scaffold následně implantován. Alogenní nazýváme buňky pocházející od stejného živočišného druhu, tedy buňky jiného člověka. Xenogenní jsou buňky jiného živočišného druhu. Buňky, které byly aplikovány na scaffold se dále poliferují, dochází k jejich množení a tím k porůstání scaffoldu. Z hlediska využití jsou nejlepší možností autologní buňky, které nevyvolávají nežádoucí reakce imunitního systému. (*Khademhosseini, 2005*)

1.1. Scaffoldy

Scaffoldy jsou materiály, které musí splňovat určité požadavky na strukturu, pórovitost a pevnost. Jedná se o nosné materiály, které by měli podporovat růst buněk, zároveň tyto materiály nesmí vykazovat cytotoxicitu. Požadavky na jejich vzhled, vlastnosti a materiál jsou určovány především plánovaným použitím. Jejich struktura se bude lišit v závislosti na typu tkáně, pro který mají být určeny. Pokud se jedná o náhrady měkkých tkání, musí být materiál degradabilní, čas degradace musí odpovídat rychlosti hojení a produkty degradace nesmí být toxické. U kostních a chrupavčitých implantátů se většinou používají nedegradabilní materiály. (*Wei, 2007*) Materiálům, které splňují uvedené požadavky a používají se na výrobu scaffoldů, se nazývají biomateriály.



2. Materiály pro tkáňové inženýrství

A biomaterial is a nonviable material used in a medical device, intended to interact with biological systems.

Williams, 1987

Obor biomateriálů je spojením několika vědních oborů: chemie, buněčné a molekulární biologie a vědy o materiálech. První generace biomateriálů vznikla v 50. a 60. letech minulého století, kdy neexistovali žádné speciální materiály určené pro medicínské využití, ale používaly se běžně dostupné a vyráběné materiály. Hlavní podmínkou pro to, aby tyto materiály mohly být využity, bylo, aby tyto materiály byly funkční a nevyvolávaly nežádoucí reakce organismu. (Ratner, Hoffman, Schoen, & Lemons, 2013) Začátky testování a implantování nebiologických materiálů do lidského organismu před rokem 1950 měly velmi malou úspěšnost, jelikož lidé věděli velmi málo o biokompatibilitě a sterilizaci. Od roku 1829 byly testovány první materiály pro využití v medicíně, jednalo se o kovy a jejich slitiny, přičemž jejich výběr byl založen na chemických reakcích. Testování biokompatibility in – vivo bylo prováděno na psech. (Ratner, 2013)

Biomateriály jsou materiály, které se používají k náhradě či regeneraci lidských tkání. Během vývoje nových biomateriálů se zajišťuje hlavně optimalizace výroby, charakteristika vláknenného materiálu a jeho biokompatibilita. Biokompatibilita je nejhůře definovatelná a zkoumatelná vlastnost. I když materiál projde in – vitro testy a nevyvolává žádné nežádoucí reakce prostředí, může se stát, že se takový materiál bude v živém organismu chovat odlišně. (Ratner et al., 2013)

Samotný proces vývoje nových biomateriálů je velmi zdlouhavý a složitý. Skládá se z několika částí:

1. Návrh tvaru a materiálu scaffoldu
2. Testování in - vitro a in - vivo na zvířatech, následně na lidech
3. Klinické testování
4. Zajištění průmyslové výroby a komercializace materiálu

(Ratner et al., 2013)



Vlastnosti, které musí nově vyvíjený biomateriál splňovat, aby mohl být schválen, jsou následující:

1. Neexistující potenciální hrozba vzniku infekce nebo toxické reakce těla na implantát.
2. Čas degradace materiálu odpovídající hojení či regeneraci tkáně.
3. Odpovídající mechanické vlastnosti implantátu.
4. Netoxické produkty degradace materiálu a jejich snadné odplavení z těla.
5. Životnost materiálu.
6. Vhodná zpracovatelnost a propustnost materiálu pro plánované využití.

(Ratner et al., 2013)

V současné době se ve tkáňovém inženýrství používají tři druhy materiálů, těmi jsou polymery, kovy a keramika. Kovy a keramika budou probrány jen okrajově, jelikož se tato práce zabývá vlákennými polyestery, tedy polymery. U polymerních biomateriálů je kromě uvedených vlastností velmi důležitá i teplota skelného přechodu, *(Godavitarne, Robertson, Peters, & Rogers, 2017)* zejména pro materiály používané uvnitř organismu. Vzhledem k vyšší teplotě lidského těla by mohlo docházet ke změnám mechanických vlastností – měknutí materiálu.

Využití biomateriálů je velmi specifické. Používají se ve velkém množství medicínských odvětví, hlavně jako protézy, od ortopedických, přes zubní až po kardiovaskulární. Dalšími možnostmi využití jsou cílená doprava léčiv, šicí nitě, hemodialyzační membrány, močové katetry nebo kloubní náhrady. *(Ratner et al., 2013)*



2.1. Kovy

Kovové náhrady se nejčastěji používají v ortopedické praxi jako náhrady kloubů či kostí. Původními materiály pro kovové náhrady byly chirurgická ocel a titan, jejichž předností je velká pevnost a odolnost vůči opotřebení a korozi, naopak nevýhodami mohou být například chronické záněty, které často vedou k dalším operacím. V reakci na tato fakta byl zahájen výzkum dalších kovů, které by mohly lépe reagovat s prostředím, jedná se o železo, zinek a hořčík. Zvláště hořčíkové implantáty se zdají být vhodné pro další klinické použití, vzhledem k jeho hustotě, která se blíží hodnotám hustoty kostní tkáně. Další výhodou je, že se jedná o minerál, který se v lidském těle běžně vyskytuje, funguje jako kofaktor mnoha enzymů a pomáhá stabilizovat DNA, takže v případě uvolňování elementárního kovu do okolního prostředí by nedocházelo k výrazné zátěži organismu. Jelikož je samotný hořčík velmi křehký, používají se častěji jeho slitiny. (Godavitarne et al., 2017) Na obr. č. 1 je znázorněna endoprotéza kyčelního kloubu.



Obr. č. 1: Kovová endoprotéza kyčelního kloubu



2.2. Keramika

Keramické materiály se používají ve spojení s kovovými, kdy jednotlivé složky jsou spojeny kovalentními a/nebo iontovými vazbami. Jejich výhodou je pórovitá struktura, nevýhodami křehkost a malá pevnost. Keramické materiály se dělí na bioinertní, bioaktivní a bioresorbovatelné. Příkladem bioinertního materiálu jsou oxidy hliníku. Jedná se o materiály, které nevyvolávají žádnou reakci imunitního systému a nedochází k degradaci materiálu. Bioaktivní materiál je například skleněná keramika, což je materiál, který reaguje s prostředím v kladném slova smyslu, například pomáhá léčení. Bioresorbovatelné materiály jsou takové, které se v těle rozloží, nevyvolávají žádné nežádoucí reakce imunitního systému a jsou tělem odbourány, příkladem takového materiálu jsou fosforečnany vápenaté. Poslední z uvedených jsou také nejčastěji používanými keramickými materiály. Keramické náhrady se používají nejčastěji jako součást kovových náhrad pro zlepšení jejich vlastností. (Godavitarne et al., 2017) Příklad keramické kloubní náhrady je zobrazen na obr. č. 2.



Obr. č. 2: Keramická kloubní náhrada



2.3. Polymery

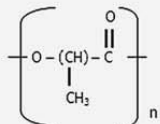
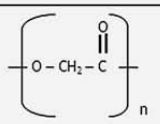
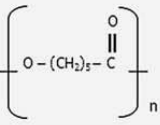
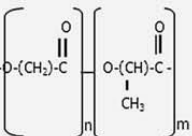
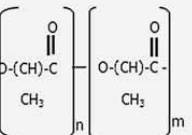
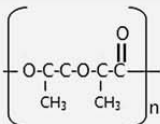
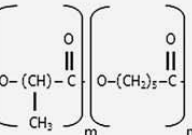
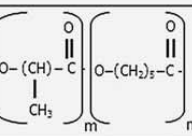
Polymerní materiály se dělí na přírodní a syntetické. Přírodní polymery jsou tvořené bílkovinami (např.: kolagen), nebo polysacharidy (např. celulóza), syntetické polymery se dále rozdělují na degradabilní a nedegradabilní. Degradabilní polymery jsou více používány díky jejich univerzálním vlastnostem a budou probány dále. Výhodou polymerů je možnost ovlivňovat jejich mechanické vlastnosti, kinetiku degradace, stupeň krystalinity, tažnost a modul pružnosti. Nevýhodou je, že degradací ztrácejí pevnost a produkty degradace snižují pH prostředí, což vede k rychlejší degradaci materiálu a zánětlivé reakci organismu. (*Godavitarne et al., 2017*) Polymerní biomateriály mají ve tkáňovém inženýrství široké využití. Je možné z nich dělat jak velké (např.: kostní šrouby), tak malé implantáty (např.: membrány nebo nitě). (*Godavitarne et al., 2017*)

První zmínky o použití polymerních materiálů se datují do roku 1939, kdy byl použit celofán pro zpevnění cévní náhrady. (*Ratner, 2013*) Tento pokus byl však neúspěšný, vzhledem k fibrotické reakci – porůstání vazivovou tkání na úkor extracelulární matrix. (*Pavelka et. al., 2017*) Během 40. let 19. století probíhalo velké množství pokusů šití nylonovou nití, transplantace poly(methyl methakrylátu) a později i použití Teflonu (poly (tetrafluor ethylen)), který se vyznačuje velmi malou zánětlivou reakcí organismu. (*Ratner, 2013*)

V současné době jsou polymerní materiály využívány ve velké míře jak v medicíně, tak ve tkáňovém inženýrství. Přehled základních takto používaných polymerních materiálů, včetně jejich chemického vzorce, syntézy, teploty skelného přechodu, teploty tečení, doby degradace a oblasti použití, je k nahlédnutí v *tabulce č. 1*.



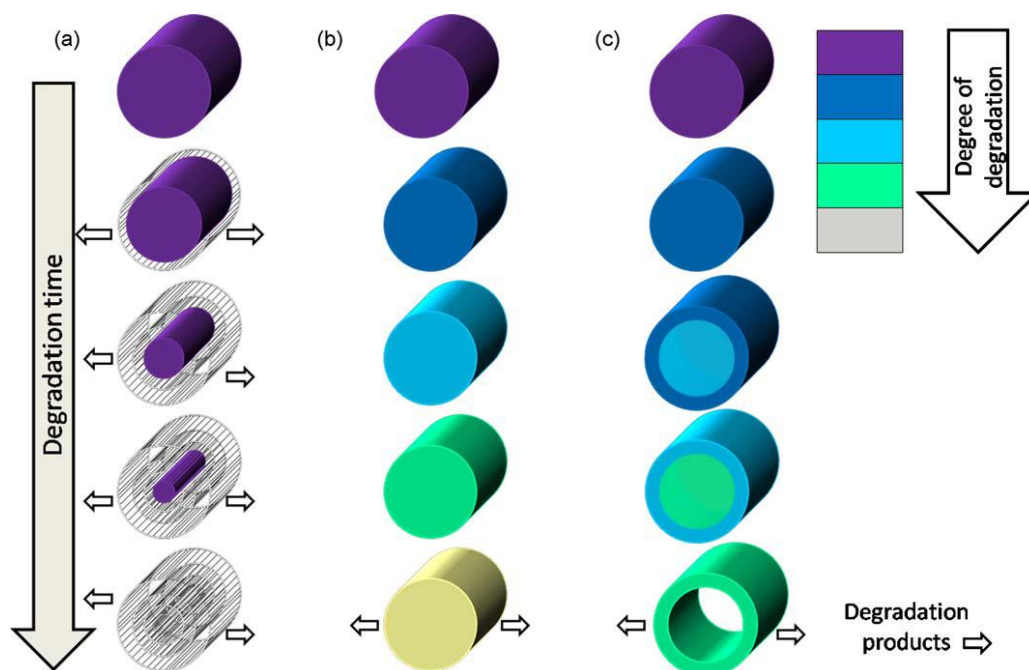
Tabulka č. 1: Přehled polymerů používaných v medicíně a tkáňovém inženýrství
(převzato z (Woodruff & Hutmacher, 2010))

Polymer	Polymer repeat structure	Melting Point (°C)	Glass Transition (°C)	Processing Method	Approx. Deg time (months)	Area of application and references	Products with regulatory approval
Poly (lactide)		173 - 178	60 - 65	Extrusion. Inj. Moulding. Compression moulding Solvent Casting.	6 to 12	Orthopedic surgery Oral and Maxillofacial surgery	Fixsorb® (screws, nails, pins) Neofix® (screws, nails, pins) Arthrex: Bio-Tenodesis® interference screw; Bio-Corkscrew® suture anchor) Linvatec: SmartScrew® SmartNail® SmartLock® SmartPin® BioScrew® Zimmer : Bio-statal® (suture anchor) prostatic stent, suture anchor, bone cement plug
Poly (glycolide)		225 - 230	35 - 40	Extrusion. Inj. Moulding. Compression moulding. Solvent Casting.	>24	Orthopedic surgery General surgery Sutures	Bioscience : Biofix® screws Dexen® sutures, mesh. Bondek® suture Valtrac™ anastomosis ring, prosthetic stent
Polycaprolactone		-65 - 60	-65 - 60	Extrusion. Inj. Moulding. Compression moulding. Solvent Casting. Electrospinning	>24	Drug Delivery Sutures	Capronor Ethicon : Monocryl Suture
Poly (D,L-lactide-co-glycolide) Poly (D,L-lactide-co-glycolide) 85/15 Poly (D,L-lactide-co-glycolide) 82/18 Poly (L-lactide-co-glycolide) 1090		Amorphous	50 - 55	Extrusion. Inj. moulding. Compression moulding. Solvent Casting.	5 to 6	Suture Drug Delivery Oral and maxillofacial surgery General surgery Suture, periodontal surgery, general surgery	Polysorb™ sutures Makar : Biologically Quiet™ Interference Screw, Staple, 85/15 Biomet : Lactosorb®, screw, plates, mesh, surgical clip, pins, anchor Vicryl suture, Vicryl Mesh
Poly (L-lactide-co-D,L-lactide) 98/2 Poly (L-lactide-co-D,L-lactide) 50/50 Poly (L-lactide-co-D,L-lactide) 70/30 Poly (D-lactide-co-D,L-lactide-co-L-lactide)		Amorphous	55 - 60	Extrusion. Inj. moulding. Compression moulding. Solvent Casting.	12 to 16 12	Orthopaedic surgery Oral and maxillofacial surgery BD Biosciences – not got clinical approval	Phuslime® Interference Screw Sulzer: Sysorb® Screw (50/50) Resor Pin® 70/30 Geistlich biomaterials Macrosorb System (screws, plates, mesh, nails, pins 70/30) Protege FX screw no hats on net Polypin® Zimmer : Leadfix BD™ 3D OPLA® (Open-cell Polylactic acid) scaffold
Polydioxanone		58 - 63	-65 - 60	Extrusion. Inj. moulding. Compression moulding. Solvent Casting.	>24	Orthopaedic surgery General surgery Sutures	Ethipin Orthosorb, Suture mesh foils Bone cement plug
Poly (D,L-lactide-co-caprolactone) 65/35		Amorphous		Dip coating from chloroform.	24*	Nerve Regeneration	Neurolac® Polyganics B.V., Groningen, The Netherlands
A polycaprolactone-based composite containing dimethacrylate monomers		60				Oral surgery Mimer 2000 Shipper 6	Resilon™ Root canal filling
Polycaprolactone based polyurethane		amorphous				Tissue reinforcement. Tom tendon replacement patch. Interpositional spacer in osteoarthritis	Artelon® Spormesh™ Arteleon® CMC spacer Arthro
Lactide co caprolactone					Klopp 2008	To prevent adhesion	Mesofol



2.3.1. Degradace polymerů

Degradace polymerních materiálů je velmi složitý proces, který závisí na druhu použitého polymeru. Obecně se však jedná o 3 principy, pomocí kterých dochází k degradaci polymerních vláken hydrolytickými reakcemi. Prvním případem je degradace, při které dochází k narušování esterových vazeb polymeru. Vlivem rozpadu esterových vazeb je narušován povrch vlákna, čímž dochází k uvolňování monomerů a oligomerů do okolí a tím ke ztenčování vlákna. Molekulová hmotnost polymeru zůstává ve středu vlákna nezměněna (obr. č.: 3 a)). Uvolňováním monomerů a oligomerů do okolí dochází ke změně pH prostředí a tím k urychlení degradace. Druhým případem degradace je difúze vody dovnitř vlákna, čímž dochází k celkové degradaci vlákna (obr. č.: 3 b)). Třetí možností je hydrolytická degradace polymeru autokatalýzou (obr. č.: 3 c)), při které dochází k difúzi vody dovnitř materiálu, přičemž uvnitř vlákna dochází k rozpadu polymeru na alkoholy a kyseliny. To způsobí snížení pH uvnitř vlákna a rozpadu ze středu materiálu, jelikož se vzniklé kyseliny nemají kam odplavit. Všechny tři typy degradace jsou popsány na příkladu PCL na obr. č. 3. (Woodruff & Hutmacher, 2010)



Obr. č. 3: Degradace PCL: a) degradace z povrchu vlákna, b) celková degradace, c) degradace ze středu materiálu, převzato z (Woodruff & Hutmacher, 2010)

2.3.2. Biodegradabilní polymery

Biodegradabilní polymery mají široké využití ve tkáňovém inženýrství. Jejich hlavní výhodou je, že není třeba dalších operací po implantaci náhrady. Nejčastěji používanými degradabilními polymery jsou polyestery. (Dong, Liao, Ngiam, Chan, & Ramakrishna, 2009) V této práci byly použity právě polyestery, konkrétně poly(ϵ – kaprolakton) (PCL) a kopolymer poly – (ϵ – kaprolaktonu) a kyseliny polymléčné (PLCL), které budou probrány dále.

2.3.2.1. Poly(ϵ -kaprolakton)

Polykaprolakton je semikrystalický polymer patřící do skupiny biodegradabilních polyesterů. Teplota skelného přechodu je - 60 °C, teplota tání 59 – 64 °C, molekulová hmotnost se pohybuje mezi 3 000 a 80 000 g/mol a ovlivňuje jeho krystalinitu (čím vyšší molekulová hmotnost, tím více krystalický polymer). Nejčastěji se používá výroba radikálovou polymerací za otevření kruhu z ϵ -kaprolaktonu. Doba, za kterou dojde k úplné degradaci PCL, je přibližně 3 až 4 roky (Woodruff & Hutmacher, 2010), může se však lišit v závislosti na použití vlákněné vrstvy. PCL je za normálních podmínek rozpustný v chloroformu, dichlormethanu, benzenu, toluenu, cyklohexanu, 2 – nitropropanu a tetrachlor methanu. Má nízkou odolnost vůči praskání, špatnou barvitelnost a přilnavost, proto se pro zlepšení těchto vlastností často používají blendy nebo kopolymery. Blendy PCL se dělí do 3 skupin a to: 1. blendy s jednou teplotou T_g , 2. blendy mechanicky kompatibilní (mají 2 teploty T_g , ale dobré mechanické vlastnosti), 3. nekompatibilní. (Woodruff & Hutmacher, 2010)

Poprvé byl PCL vyroben ve 30. letech 20. století. Během 70. a 80. let se začal hojně využívat v systémech cílené dopravy léčiv. V průběhu dalších let se od používání PCL upustilo a v medicíně se téměř úplně přestal využívat. Až s vývojem tkáňového inženýrství počátkem 21. století se stal opět předmětem výzkumu. (Woodruff & Hutmacher, 2010)

Doba degradace PCL přibližně 2 – 4 roky (Woodruff & Hutmacher, 2010), přičemž přesná doba rozpadu polymeru je závislá na jeho molekulové hmotnosti. Jelikož se v lidském organismu nevyskytuje dostatek enzymů, aby došlo k rozpadu PCL, dochází k ní působením hub nebo bakterií. Další možností jsou hydrolytické degradace popsané v kapitole 2.3.1. (Woodruff & Hutmacher, 2010)



2.3.2.2. Kyselina polymléčná

Kyselina polymléčná se vyskytuje ve třech rozdílných formách: L - forma, D - forma a jejich racemická směs. Chiralita kyseliny polymléčné má vliv na její fyzikální a mechanické vlastnosti a dobu a teplotu degradace. L - forma je semikrystalický polymer s krystalinitou 37 – 72 % a teplotou tání od 173 °C do 178 °C. Racemická směs L - a D - formy je amorfní polymer bez pevné teploty tání. Používá se v medicíně a tkáňovém inženýrství například jako šicí nitě, dentální implantáty, kostní šrouby nebo cévní náhrady. (Dong et al., 2009)

2.3.2.3. Kopolymer poly(ϵ -kaprolaktonu) a kyseliny polymléčné

Kopolymer poly(ϵ -kaprolaktonu) a kyseliny polymléčné (PLCL) je krystalický polymer s vysokým modulem pružnosti, vysokou teplotu skelného přechodu a malou pružností. Problémem je velmi malá mísitelnost mezi PCL a PLA, která je způsobena nedostatkem specifických interakcí mezi těmito polymery a vede k oddělení jednotlivých fází. Adhezní síly mezifáze PCL-PLA jsou velmi nízké, což vede ke špatným mechanickým vlastnostem kopolymeru. Do jisté fáze je možné vlastnosti kopolymeru ovlivnit, jak mechanické vlastnosti, tak čas degradace nebo tvarovou paměť materiálu. Kopolymer může být buď blokový (2 nebo 3 bloky), nebo statistický. Ideální teplota syntézy PLCL je okolo 140 °C, jelikož při této teplotě dochází k nejlepšímu spojování molekul jednotlivých polymerů. Teplotní odolnost a molekulová hmotnost kopolymeru je závislá na poměru jednotlivých polymerů, obvykle se vyrábí kopolymery v poměrech LA:CL 90:10, 80:20, 75:25 a 70:30. (Fernández, Etxeberria, & Sarasua, 2012)

2.3.3. Výroba polymerních nanovlákných vrstev

Nanovlákná se definují několika způsoby, nejčastěji se uvádí, že jsou to vlákna, jejichž jeden rozměr (nejčastěji se jedná o průměr) nepřesahuje velikost 1000 nm. (Charakteristika nanovláken, 2017) Délka nanovláken je několikanásobně větší než jejich průměr. Velikost a variabilita průměrů se dá ovlivňovat způsobem výroby vláken. Hlavními způsoby výroby nanovlákných vrstev jsou:

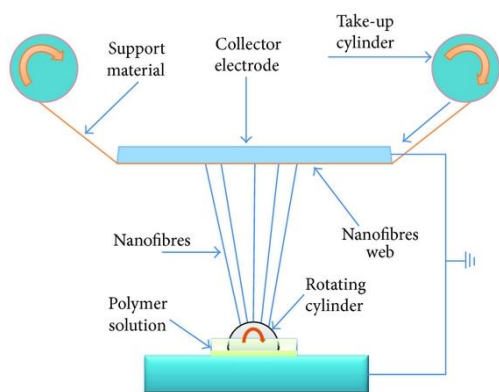
1. electrospinning.
2. melt-blown
3. forcespinning
4. drawing



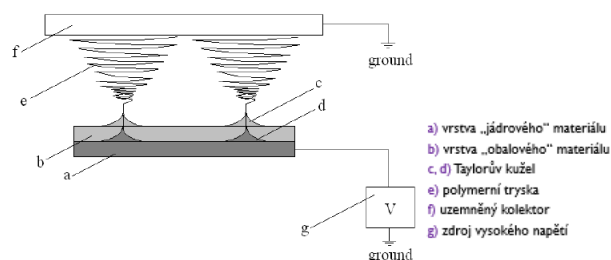
2.3.3.1. Elektrospinning

Elektrospinning je metoda využívající vysokého napětí pro výrobu nanovláknenných vrstev. Principem je vytvoření rozdílu elektrického potenciálu v takové míře, aby došlo ke vzniku Taylorova kužele a následně vláken. Stroje se obvykle dělí na jehlové a bezjehlové. Jehlové používají pro zvláknění jehlu, kterou polymerní roztok prochází, než dojde ke vzniku vlákna. Použita může být jedna nebo více jehel, které mohou být v různém postavení, např. čtverec nebo trojúhelník. (Nayak, 2011) Bezjehlové zvláknování funguje na principu zvláknování z volné hladiny nebo z tenké vrstvy roztoku na povrchu válce. Metoda byla dále vyvíjena a probíhalo testování zvláknování např. z kužele nebo ze struny, která se v současnosti využívá nejvíce.

Dalším způsobem výroby využívající elektrostatické zvláknování je koaxiální zvláknování. Touto metodou je možné vyrábět bikomponentní vlákna typu jádro – plášť. Plášť tvoří dobře zvláknitelný polymer, jádro jakýkoliv materiál. Právě tímto je metoda koaxiálního zvláknování speciální, jelikož jádro může být tvořeno jak jiným polymerem, tak i nezvláknitelným materiálem. Toho by se dalo využít při aplikaci například antibiotik či anestetik do jádra polymeru, zatím však toto využití není zkoumáno. Má mnoho nevýhod, od pomalé produkce po problémy se zvláknováním. Vlákna s takto zlepšenými vlastnostmi by mohla najít využití ve farmaceutickém či kosmetickém průmyslu, jako vláknenné vrstvy se zlepšenými vlastnostmi vyrobené klasickým elektrospinningem. (Nanopharma, 2015) U koaxiálního zvláknování existují dva způsoby zvláknování – jehlové (obr. č. 5) a bezjehlové (obr. č. 4).



Obr. č. 4: Bezjehlové elektrostatické zvláknování

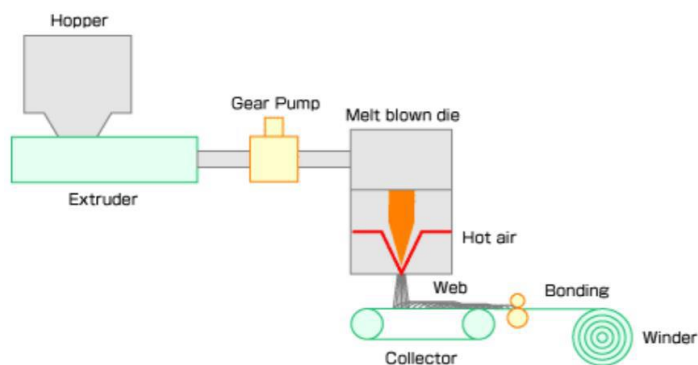


Obr. č. 5: Bezjehlové koaxiální zvláknování, převzato z (Vysloužilová, 2016)



2.3.3.2. Melt - blown

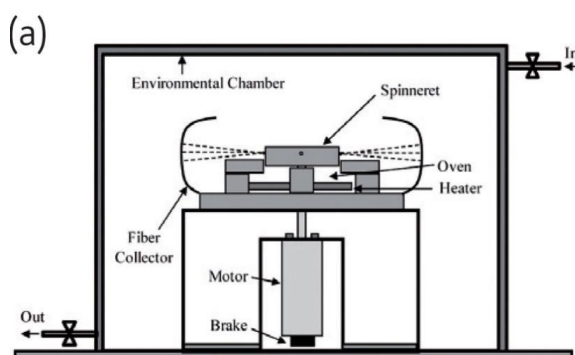
Metoda melt – blown (*obr. č. 6*) funguje na principu zvlákňování taveniny pomocí horkého vzduchu. Surovinou pro výrobu je polymerní prášek nebo granulát, který se v zásobníku zahřívá a převádí na taveninu. Vzniklá tavenina je vytlačována tryskami a pomocí horkého vzduchu dlužena a unášena na kolektor, kde dochází ke vzniku vlákněné vrstvy. Je možné vyrobit vlákna o průměru nad 250 nm, obvykle se ale pohybují v řádech mikrometrů. (*Petráš, 2009*)



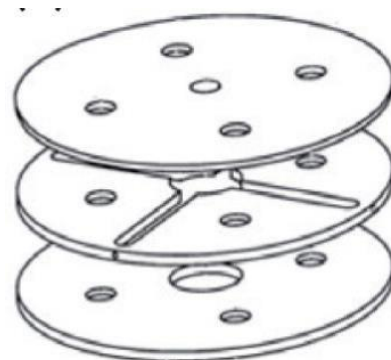
Obr. č. 6: Výroba nanovlákněných vrstev metodou melt - blown

2.3.3.3. Forcespinning

Forcespinning je metoda založená na principu odstředivého zvlákňování. Polymerní roztok je dávkován do středu spinnerety, která je připojena ke zdroji elektrického napětí, díky kterému se otáčí (*obr. č. 7*). Spinnereta (*obr. č. 8*) může mít různé tvary a průměry, kromě ploché spinnerety existuje i jehlová. Vlivem otáčení spinnerety dochází ke tvorbě a dlužení vláken, která jsou následně zachytávána mezi uzemněnými kolektory. Vznikající vlákněnou vrstvu ovlivňuje průměr spinnerety, vlhkost a teplota okolního prostředí, viskozita roztoku a mnoho dalších faktorů. (*Sarkar, 2010*)



Obr. č. 7: Princip metody forcespinning, převzato z (Sarkar, 2010)

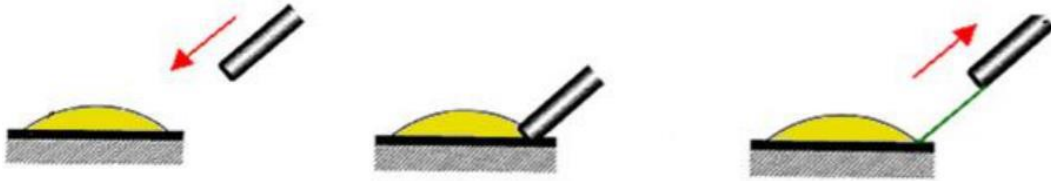


Obr. č. 8: Příklad spinnerety, převzato z (Sarkar, 2010)



2.3.3.4. Drawing

Metoda drawing (*obr. č. 9*) je založena na tažení vláken z kapky nebo taveniny. Během vytahování dochází k tvorbě vlákna za současného odpaření rozpouštědla, čímž dochází k tunutí polymeru. Výhodou této metody je především možnost tvorby orientované struktury, naopak nevýhodou nemožnost ovlivňovat velikost průměru vláken a vytvořit vlákna se stejným průměrem. Vrstvy vyrobené metodou drawing by kromě tkáňového inženýrství mohly nalézt využití například v nanooptice nebo nanoelektronice. (Bajáková, 2011), (Petráš, 2009)



Obr. č. 9: Tvorba vláken metodou drawing, převzato z (Bajáková, 2011)

2.4. Tělní tekutiny

Tělní tekutiny vyšších živočichů mají za úkol propojit jednotlivé tkáně v těle a vytvořit a udržovat stálé prostředí v těle. U obratlovců existují tři typy tělních tekutin: krev, tkáňový mok a lymfa. Krev bude dále probrána podrobněji. Tkáňový mok má za úkol udržovat vnitřní prostředí, lymfa vzniká z tkáňového moku a obsahuje 99% lymfocytů. Tělní tekutiny mohou v těle proudit buď otevřenou (hemolymfa) nebo uzavřenou (krev) cévní soustavou. (Pecka, 2002)

2.4.1. Krev

Krev je vysoce specializovaná tekutina, která se někdy považuje za samostatný orgán, někdy za pojivo. Aby krev plnila svou funkci, musí se v těle pohybovat, což zajišťuje srdce spolu s cévami. Existují dva druhy krevního oběhu, malý a velký. Malý krevní oběh má za úkol okysličování krve. Velký krevní oběh rozvádí krev do tkání. (Pecka, 2002)

Mezi hlavní funkce krve patří rozvod kyslíku a živin tkáním a naopak odvod CO₂ a metabolitů, udržování stabilního prostředí a pH, přenos hormonů, vitamínů a minerálů nebo udržování teploty lidského těla. (Pecka, 2002)

Krev se skládá z plazmy, což je tekutá složka krve a tvoří asi 55 % jejího objemu, a buněčné části, která je asi 45 % objemu krve. Buněčná část se skládá z červených a bílých krvinek a krevních destiček. Dále zde bude probrána pouze krevní plazma. (Pecka, 2002)

2.4.2. Krevní plazma

Krevní plazma je nažloutlá, průhledná tekutina, která tvoří 50 – 55 % objemu krve. Může být chilózní (lehce zakalená vlivem zvýšeného množství tuku), ikterická (žlutá, což je způsobeno hyperbilirubinémií) nebo hemolytická (červená vlivem rozpadu erytrocytů). Krevní plazma je z 92 % tvořena vodou, ze 7 % bílkovinami a z 1 % organickými a anorganickými látkami. Mezi anorganické látky obsažené v plazmě patří kationty (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺, Cu²⁺ a Co²⁺), anionty (Cl⁻, Br⁻, I⁻, fosfáty, uhličitany a sírany) a plyny (O₂, CO₂ a N₂). Organickými látkami obsaženými v krevní plazmě jsou bílkoviny (albuminy, globuliny, fibrinogeny a faktory krevního srážení), sacharidy a tuky. (Pecka, 2002)



Experimentální část:

Cílem práce je vyhodnotit chování vlákněných materiálů PLC, PLCL a jejich blendů v krevní plazmě z pohledu degradace materiálu. Pozorovat váhový úbytek vzorků, změnu molekulové hmotnosti materiálu, změnu morfologie vrstev a adhezi proteinů.

3. Materiál a metody

3.1. Použité chemikálie

30% akryl-bisakrylamid mix	Amresco
Accuorange barvivo	Sigma-Aldrich
Accuorange pufr 10 x	Sigma-Aldrich
APS – amonium persulfát	LachNer
Azid sodný	Sigma-Aldrich
BSA – hovězí sérový albumin	VWR International
Bromfenolová modř	Amresco
β -mercaptoethanol	Roth
Coomassie Brilliant Blue R-250	Roth
Činidlo Bradfordové	Sigma-Aldrich
Dusičnan stříbrný AgNO_3	Sigma-Aldrich
EDTA	Sigma
Formaldehyd 37%	Penta
Glycerol	Roth
Glycin VWR	International
Chloroform 99,8%	Penta
Krevní plazma	Transfúzní oddělení KNL
Kyselina chlorovodíková	Penta
Kyselina octová	Penta
Methanol	Penta
PCL	
PLCL	
Protein MW Marker, Wide Range K494	Amresco
Sodium dodecyl sulfát – SDS	Sigma-Aldrich
Thiosíran sodný pentahydrát	Lachema Neratovice
Tris	Amresco
TEMED	Sigma-Aldrich



3.2. Přístroje a programy

Rastrovací elektronový mikroskop Vega 3 SB	Tescan
Spektrofotometr ELx808	Biotek
pH metr pH700	Eutech Instruments
SDS-PAGE elektroforéza - miniprotean	Bio rad
LUNATM Cell Counter, model L10001	Logos Biosystems
Power Pac HC	Bio rad
Centrifuga Z36HK	Hermle Labortechnik
Cirkulovaná digitální vodní lázeň	Lab tech
Quorum Q50ES	Quorum technologies
Hlubokomrazící box MDF-033V	Sanyo Electric
Centrifuga 5414C Gerätebau	Eppendorf
CO ₂ inkubátor NB-203XL	N-biotek
Bio II Advance	Telstar
Spektrofotometr Spark	Tecan
HAAKE™ Roto Visco 1 Thermo	Fisher Scientific
PocketDyne	Krüss
Biological Thermostat BT 120	Laboratorní přístroje Praha
NIS Elements AR	
Graph Pad	



3.3. Příprava roztoků

3.3.1. PBS

Chemikálie pro přípravu PBS jsou uvedeny v *tabulce č. 2*. Všechny uvedené chemikálie se smíchají, pH roztoku se upraví na hodnotu 7,4 a objem roztoku se doplní destilovanou vodou do celkového objemu 1 l. Roztok se následně přefiltruje, případně sterilizuje.

Tabulka č. 2: Chemikálie pro přípravu PBS

Chemikálie	Množství
Destilovaná voda	800 ml
Chlorid sodný	8 g
Chlorid draselný	0,2 g
Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného	3,63 g
Dihydrogenfosforečnan draselný	0,24 g

3.3.2. PBS s azidem sodným 0,02 hm. %

Příprava roztoku PBS je shodná s přípravou v *kapitole 3.3.1*. Následně byl umíchán roztok o objemu 500 ml dle rozpisu v *tabulce č. 3*, tak, aby výsledná koncentrace azidu sodného byla 0,02 hm. %.

Tabulka č. 3: Chemikálie pro přípravu PBS s azidem sodným 0,02 hm. %

Chemikálie	Množství
PBS	500 ml
Azid sodný	0,1 g



3.3.3. Krevní plazma s azidem sodným 0,02 hm. %

Plazma byla rozmrazena z $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, ohřáta ve vodní lázni na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a smíchána s azidem sodným dle tabulky č. 4.

Tabulka č. 4: Chemikálie pro přípravu plazmy s azidem sodným 0,02 hm. %

Chemikálie	Množství
Krevní plazma	100 ml
Azid sodný	0,0002 g

3.3.4. Roztok pro desorpci proteinů z materiálů

Ze vzorků i NC byly po inkubaci desorbovány pevně adherované proteiny pomocí roztoku PBS s SDS hm. 1 %, který byl umíchan podle rozpisu v tabulce č. 5.

Tabulka č. 5: Chemikálie pro přípravu roztoku pro desorpci proteinů

Chemikálie	Množství
PBS	200 ml
SDS	2 g

3.3.5. Roztoky pro elektroforézu

Roztoky, které jsou potřeba pro SDS-PAGE jsou v tabulce č. 6.

Tabulka č. 6: Chemikálie pro SDS-PAGE

Roztok	Složení	Roztok	Složení
10% SDS RT, 100 ml	10 g SDS (sodium dodecyl sulfát) 90 ml destilovaná voda (dH ₂ O)	1,5M Tris-HCl pH 6,8 RT, 50 ml	9,09 g Tris 40 ml dH ₂ O pH upraveno HCl
12% polyakrylamidový rozdělovací gel 10 ml/gel	3,3 ml dH ₂ O 4 ml 30% akryl-bisakrylamid mix 2,5 ml 1,5M Tris (pH 8,8) 0,1 ml 10% SDS 0,1 ml 10% APS 0,004 ml TEMED	5% zaostřovací gel 4 ml/gel	2,7 ml dH ₂ O 0,67 ml 30% akryl-bisakrylamid mix 0,5 ml 1,5M Tris (pH 6,8) 0,04 ml 10% SDS 0,04 ml 10% APS 0,004 ml TEMED
1,5M Tris-HCl pH 8,8 RT, 100 ml	18,7 g Tris 80 ml dH ₂ O pH upraveno HCl	10% APS -20°C, 10 ml	1 g APS (amonium persulfát) 8 ml dH ₂ O



10X SDS-PAGE pufr RT, 1 l	800 ml dH ₂ O 10 g SDS 30,3 g Tris 144,1 g glycin	2X SDS-PAGE vzorkový pufr -20°C, 100 ml	10 ml Tris-HCl pH 6,8 12 ml 10% SDS 30 ml glycerol 15 ml β-merkaptoethanol 1,8 mg bromfenolová modř Doplněno dH ₂ O
5X SDS-PAGE vzorkový pufr -20°C, 100 ml	12,5 ml 2M Tris-HCl pH 6,8 10 g SDS 30 ml glycerol 5 ml β-merkaptoethanol 52 ml 0,04% bromfenolová modř	CBB barvicí roztok Staining solution RT, 1 l	450 ml methanol 100 ml kyselina octová 450 ml destilovaná voda 2,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250
CBB odbarvovací roztok Destaining solution RT, 1 l	450 ml methanol 100 ml kyselina octová 450 ml destilovaná voda	Sušicí roztok RT, 1 l	450 ml methanol 100 ml kyselina octová 30 ml glycerol 420 ml destilovaná voda

3.3.6. *Roztoky pro Accuorange*

Pro analýzu proteinů metodou Accuorange bylo třeba umíchat speciální roztoky pro kalibrační křivku z roztoku PBS s BSA (2 mg/ml) a SDS 1 hm. % a barvicí pufr dle tabulky č. 7.

Tabulka č. 7: Chemikálie pro SDS-PAGE

Roztok	Složení
PBS + BSA (2 mg/ml) + SDS hm. 1 %	50 ml PBS 0,5 g SDS 0,1 g BSA
1 x accuorange pufr	9 ml dH ₂ O 1 ml Accuorange pufr 10 x 20 μl Accuorange barvivo



3.4. Metody

3.4.1. Výroba vlákných vrstev

Vlákné vrstvy pro tuto práci vyrobila Ing. Kristýna Havlíčková na Nanospideru™ v laboratořích CXI TUL z roztoků dle tabulky č. 8.

Tabulka č. 8: Roztoky pro výrobu vlákných vrstev

	Koncentrace [hm. %]	Rozpouštědlový systém	
PCL	10	8:1:1 kyselina octová:chloroform:ethanol	Molekulová hmotnost [g/mol] 80 000
PLCL	10	8:1:1 kyselina octová:chloroform:ethanol	Poměr LA:PL 70:30
PCL:PLCL 1:1	10	8:1:1 kyselina octová:chloroform:ethanol	-
PCL:PLCL 1:3	10	8:1:1 kyselina octová:chloroform:ethanol	-
PCL:PLCL 1:3	10	8:1:1 kyselina octová:chloroform:ethanol	-

3.4.2. Stanovení plošné hmotnosti vlákné vrstvy

Plošná hmotnost byla určována pomocí čtverce o velikosti 10 x 10 cm, aby byl výsledek dostatečně přesný, ale nedocházelo k plýtvání materiálem. Z původního materiálu byl vystřižen čtverec o velikosti 10 x 10 cm, od podkladové vrstvy byl oddělen vzorek a ten byl následně zvážen. Aby bylo dosaženo co nejpřesnějšího výsledku, bylo vážení provedeno 3 x u každého materiálu. Výsledné váhy byly následně zprůměrovány a vyjádřeny v g/m².



3.4.3. Příprava vzorků pro SEM

Vzorky pro focení na SEM byly vytvořeny jak z původních materiálů, tak z materiálů inkubovaných v plazmě, respektive PBS. Na kovový terč byla nalepena oboustranná lepicí páska. Terč byl popsán a rozdělen na čtyři části z obou stran, jednou zespodu lihovým fixem, jednou na horní části na lepicí pásce. Na jednu polovinu terče byl nalepen vzorek z obou stran, na druhou polovinu negativní kontrola z obou stran. Na každém terči byl vzorek i NC ze stejného dne. Na takto připravené vzorky byla nanášena vrstva zlata o tloušťce 14 nm. S vrstvou zlata na povrchu byly již vzorky připraveny k další analýze.

3.4.4. Měření průměrů vláken

Průměry vláken byly měřeny v systému NIS ze snímků z rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM). Snímky byly vyfoceny při zvětšení 1 000 x, 3 000 x, 5 000 x a 10 000x, přičemž měření průměrů vláken do této práce bylo provedeno při zvětšení 5 000 x. Měření se provádí na čtyřech snímcích, kdy z každého snímku je proměřeno 25 vláken v jedné linii, aby se předešlo subjektivnímu výběru vláken. Celkový počet proměřených vláken je 100 od každého materiálu. Z naměřených hodnot byl následně vypočten průměr a směrodatná odchylka.

3.4.5. Příprava vzorků pro testování v plazmě/PBS

Vzorky pro experiment byly nejprve pouze z PCL a PLCL a následně i z blendů. Pro optimalizaci procesu byly použity pouze PCL a PLCL vzorky o hmotnosti $(50 \pm 2,5)$ mg. Pro samotný experiment byly připraveny vzorky z PCL, PLCL a jejich blendů o hmotnosti $(10 \pm 0,5)$ mg. Z materiálů, smotaných do rolí, byly vystřiženy obdélníčky, které byly následně zváženy, tak aby se co nejvíce blížily požadované hmotnosti, případně aby byla trochu vyšší, jelikož bylo žádoucí mít vzorky z jednoho kusu. Tvar vzorků musel být uzpůsoben tak, aby byl vzorek při následné inkubaci celý ponořen. Vzorky, které měly odpovídající váhu a tvar, byly umístěny do uzavíratelných zkumavek o objemu 15 ml. Víčka na zkumavkách nesměla být úplně dotažena z důvodu následné sterilizace.

Pro optimalizaci procesu bylo připraveno 30 vzorků od obou materiálů. U experimentu bylo připraveno 15 vzorků od každého materiálu, přičemž počet vzorků se lišil v závislosti na délce experimentu a četnosti plánovaných odběrů.

Takto připravené vzorky byly umístěny do folie, která byla na obou stranách zatavena. Vzorky ve folii byly sterilizovány ethylenoxidem při pokojové teplotě po dobu 12 hodin. Po sterilizaci byly vzorky ponechány 3 – 4 týdny v pokojové teplotě v uzavřené fólii, aby došlo k jejich odvětrání.



3.4.6. Stanovení molekulové hmotnosti pomocí gelové permeační chromatografie - příprava vzorků

Vzorky pro stanovení molekulové hmotnosti pomocí gelové permeační chromatografie byly připraveny ze vzorků inkubovaných v plazmě a z NC. Z každého materiálu z každého dne byly připraveny vzorky o hmotnosti 4 mg, které byly umístěny do malých skleněných uzavíratelných zkumavek. Navážené vzorky byly rozpuštěny v tetrahydrofuranu, aby výsledná koncentrace proteinů byla 1 g/ml. Po rozpuštění vzorků byly roztoky přefiltrovány přes teflonový filtr a následně změřeny. Měření prováděl Ing. Vít Novotný, CXI TUL.

3.4.7. Stanovení specifického povrchu

Stanovení specifického povrchu materiálů pro experiment prováděla Ing. Jana Karpíšková, Ph. D., CXI TUL. Vzorky byly nejprve odplyňovány ve vakuu při 40 °C po dobu 24 hodin a následně byla proměřena adsorpce kryptonu při teplotě kapalného dusíku.

3.4.8. Příprava krevní plazmy

Krevní plazma, která byla použita v této práci, pochází z transfúzního oddělení Krajské nemocnice v Liberci. Pro testování vzorků byly použity 3 zásobní vaky s identifikačními čísly:

1. C20411700647220, A, Rh+
2. C20411700620620, A, Rh+
3. C20411700647920, AB, Rh+

Zásobní vaky plazmy byly rozmrazeny z – 80 °C, ve vodní lázni ohřáty na 37 °C a následně v laminárním boxu smíchány dohromady. Ke smíchaným plazmám byl následně přidán azid sodný, aby vznikl roztok o koncentraci 0,02 hm. %. Azid sodný se do plazmy přidává, aby se předešlo mikrobiální kontaminaci. Plazma byla poté rozdělena do zkumavek po 50 ml a 15 ml, které byly řádně popsány a uloženy v mrazáku v – 80 °C. Velikost zkumavek pro uchování plazmy byla zvolena tak, aby bylo možné rozmrazit vždy jen potřebné množství plazmy a nedocházelo tak k plýtvání nebo znehodnocení.



3.4.9. Testování vzorků v plazmě/PBS

Sterilní vzorky byly v laminárním boxu vyndány z folie a rozděleny do dvou stojánek. V jednom byly umístěny vzorky, které byly použity pro inkubaci v plazmě s azidem sodným, v druhém NC, které byly umístěny v PBS s azidem sodným. Plazma i PBS byly rozpipetovány po 3 ml do jednotlivých zkumavek o objemu 15 ml tak, aby vzorky byly celé ponořeny. Oba stojánky byly umístěny v inkubátoru a skladovány při teplotě 37 °C.

Každých 7 dní probíhala výměna plazmy a PBS ze zkumavek, která byla prováděna v laminárním boxu. Vzorky byly vyndány z inkubátoru a přesunuty do boxu, kde z nich byla vylita starší plazma a PBS, a následně rozpipetována nová plazma a PBS.

Každý odběrový den byl odebrán vzorek plazmy od každého materiálu, který byl následně použit k další analýze. Vzorky byly odebrány od každého materiálu po třech vzorcích z plazmy a po dvou NC. Všechny vzorky byly propláchnuty v PBS, nejprve byla vylita plazma, respektive PBS, ve které byl vzorek ponořen. Následně byly 2 x nality 2 ml PBS do zkumavky, která byla protřepána a PBS vylito. Vzorek byl pak vyjmut ze zkumavky a ještě jednou propláchnut v PBS. Dva vzorky a jedna NC byly umístěny do mističek tak, aby uschly. Poslední vzorek a NC byly ponechány v zavřených zkumavkách, u kterých bylo víčko omotáno parafilmem. Takto uzavřené vzorky byly uchovány v lednici pro následnou analýzu adsorbovaných proteinů.

3.4.10. Elektroforéza SDS - PAGE

Elektroforéza SDS - PAGE je elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného v polyakrylamidovém gelu. Využívá se pro stanovení proteinů obsažených ve vzorcích a jejich rozdělení na základě molekulové hmotnosti.

Z roztoků s desorbovanými proteiny, respektive oplachů NC, bylo odebráno 32 µl pro smíchání s 8 µl vzorkovacího pufru 5x koncentrovaného. Markeru Wide Range K494 bylo připraveno celkem 15 µl, z toho 12 µl markeru a 3 µl pufru 5x koncentrovaného. Vzorky plazmy bylo třeba nejprve 100 x – 200 x rozředit, tzn., bylo smícháno 5 µl plazmy s 495 µl dH₂O, případně 2,5 µl plazmy a 497,5 µl dH₂O. Vzorky pro SDS – PAGE se pak připravovaly stejně jako roztoky desorbovaných proteinů. Všechny vzorky smíchané s pufrem byly 10 minut zavařeny. Elektroforéza byla nejprve nastavena na 70 V po dobu 20 minut a následně na 120 V do doby, než vzorky dosáhly druhého konce gelu.



Po ukončení elektroforézy byly vzorky obarveny v Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB) po dobu 24 hodin a následně odbarveny v odbarvovacím roztoku po dobu 24 hodin. Tento proces vede k obarvení proteinů, které pak mají tmavě modrou barvu a jsou snadno pozorovatelné. Odbarvené gely byly vyfoceny a následně vysušeny v sušicím roztoku.

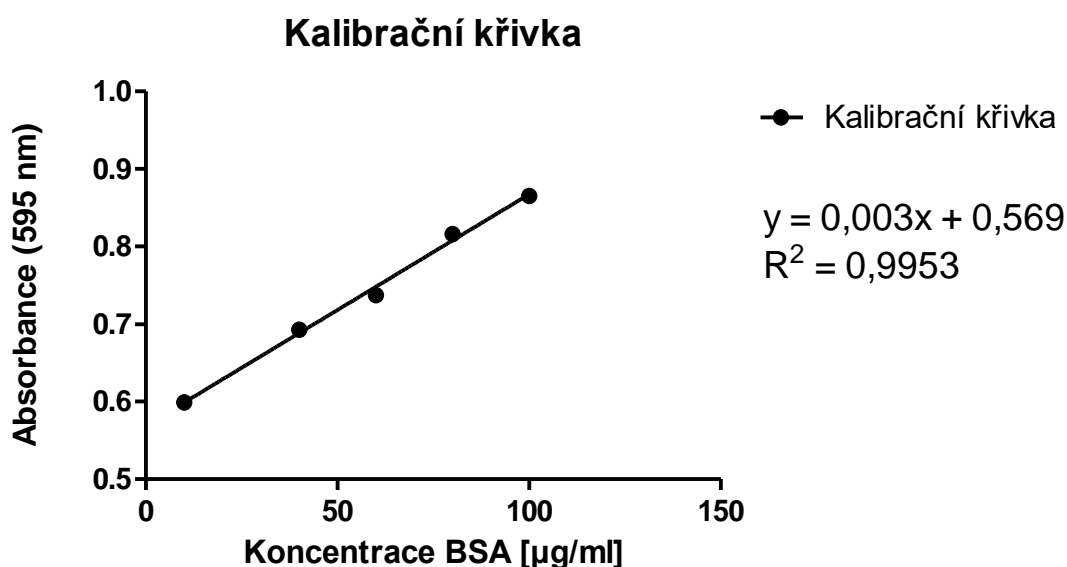
3.4.11. Stanovení koncentrace adherovaných proteinů

Metoda podle Bradfordové

Jedná se o metodu stanovení koncentrace proteinů pomocí jejich interakce s CBB v kyselém prostředí. Vzorky mají nejprve hnědo – červenou barvu, která se po navázání CBB mění na modrou. Takto připravené vzorky se následně vyhodnocují pomocí spektrofotometrického měření při vlnové délce 595 nm. (Bradford, 1976) Pro vyhodnocení je třeba připravit kalibrační křivku (graf č. 1) z hovězího sérového albuminu (BSA). Její příprava je popsána v tabulce č. 9.

Tabulka č. 9: Postup přípravy kalibrační křivky pro BSA

Roztok BSA [μ l]	H ₂ O [μ l]	Finální koncentrace [μ g/ml]
10	90	1
20	80	2
40	60	4
60	40	6
80	20	8
100	0	10



Graf č. 1: Kalibrační křivka BSA pro stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové

Metoda Accuorange

Accuorange je velmi citlivá spektrofotometrická metoda, která se používá pro stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích (excitace/emise = 480/598 nm). Jedná se o metodu citlivější, než ostatní spektrofotometrické metody. Lze s ní detekovat vzorky v koncentracích od 0,1 do 15 µg/ml, emitující záření je stabilní až 16 hodin a rozdíly mezi jednotlivými typy proteinů jsou zanedbatelné. Maximální možná koncentrace SDS pro tuto metodu je 0,01 %. Aby bylo možné měření provést, je třeba smíchat vzorky s Accuorange pufrům 1x. Pro hodnocení je třeba nejprve připravit kalibrační křivku dle tabulky č. 10.

Tabulka č. 10: Postup přípravy kalibrační křivky BSA pro Accuorange

	Objem roztoku BSA	Objem Accuorange pufru 1x	Koncentrace BSA [µg/ml]
A	7,5 µl roztoku PBS + BSA (2 mg/ml) + SDS 1%	1 ml	15
B	333 µl roztoku A	167 µl	10
C	250 µl roztoku B	250 µl	5
D	250 µl roztoku C	250 µl	2,5
E	200 µl roztoku D	300 µl	1
F	250 µl roztoku E	250 µl	0,5
G	250 µl roztoku F	250 µl	0,25
H	100 µl roztoku G	150 µl	0,1
I	0	250 µl	0



4. Výsledky a diskuze

V této práci byla testována interakce krevní plazmy s vláknými materiály, konkrétně PLC, PLCL a jejich blendy v poměrech PCL:PLCL 1:1, 1:3 a 3:1. Materiály byly nejprve analyzovány – proběhlo stanovení plošných hmotností, nasnímání pomocí SEM, měření průměrů vláken a změření specifického povrchu. Testování vzorků bylo provedeno inkubací materiálů v plazmě, respektive PBS po stanovenou dobu a odběr vzorků probíhal v pravidelných intervalech. Po inkubaci byla část vzorků usušena a použita pro následnou analýzu pomocí SEM, GPC a hmotnostního úbytku. Z části vzorků byla provedena desorpce proteinů a následná analýza s použitím SDS-PAGE a stanovení koncentrace proteinů metodou dle Bradfordové a metodou Accuorange.

4.1. Optimalizace testování interakce krevní plazmy s vláknými materiály

Před samotným experimentem musela proběhnout optimalizace celého procesu testování, což se týkalo doby inkubace, intervalu mezi odběry vzorků, velikosti vzorků a oplachu jednotlivých vzorků. Pro optimalizaci byly použity vzorky PCL a PLCL, hmotnost vzorků byla $(50 \pm 2,5)$ mg, objem plazmy pro inkubaci vzorků byl 5 ml, celková doba inkubace 35 dní, odběr vzorků a výměna plazmy každých 7 dní.

4.1.1. Morfologie vstupních materiálů

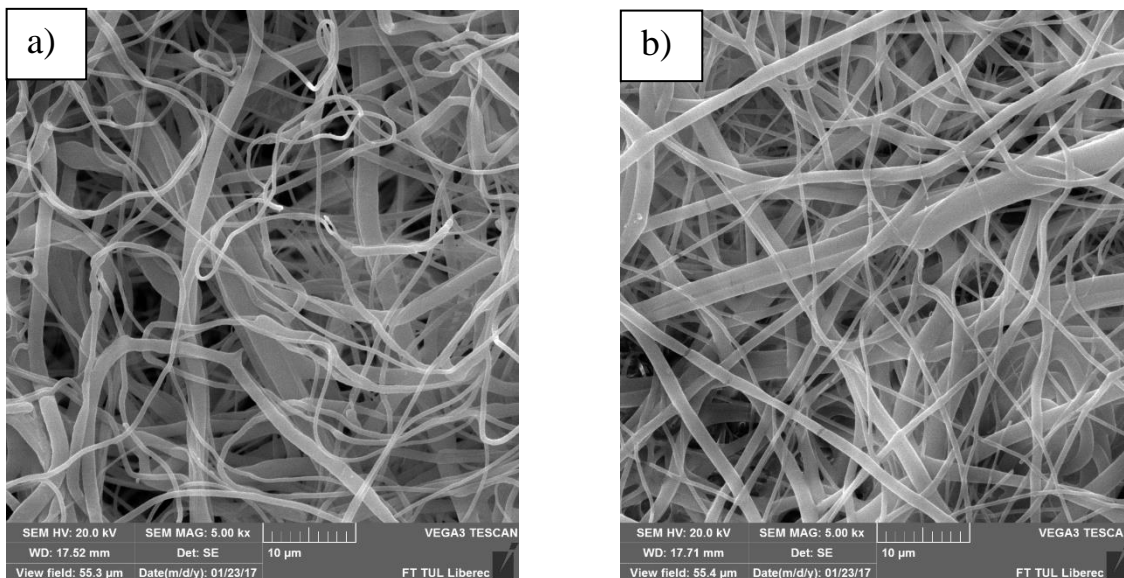
Materiály pro vzorky byly před testováním charakterizovány z hlediska morfologie: plošné hmotnosti a průměrů vláken.

Plošné hmotnosti vlákných materiálů použitých pro optimalizaci procesu inkubace byly měřeny dle kapitoly 3.4.2. a průměry vláken dle kapitoly 3.4.4. Hodnoty obou těchto měření jsou zaneseny v tabulce č.: 11. Na snímcích ze SEM (obr. 10 a 11) jsou zobrazeny vlákné vrstvy před inkubací v plazmě.

Tabulka č. 11: Plošné hmotnosti a průměry vláken vlákných vrstev pro optimalizaci

	Plošná hmotnost [g/m ²]	Průměrná hodnota průměru vláken ± směrodatná odchylka [μm]
PCL	21,87	1,097 ± 0,605
PLCL	12,55	1,407 ± 0,609





Obr. č. 10: Snímky vlákněných vrstev vstupních materiálů: a) PCL, b) PLCL, zvětšení 5 000 x, měřítko 10 μm

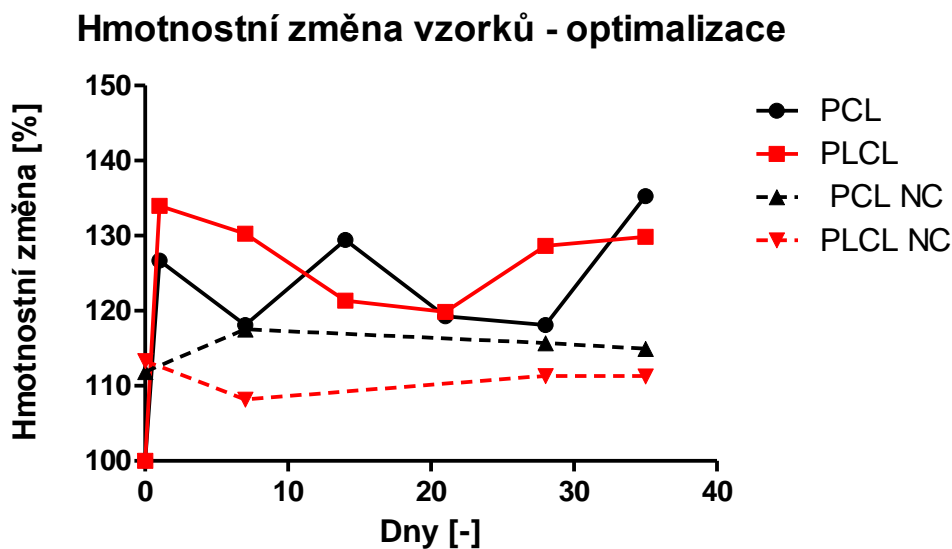
4.1.2. Sledování interakce testovaných vlákněných materiálů s krevní plazmou

Testování vzorků probíhalo v krevní plazmě z transfúzního oddělení KNL. Kromě vzorků byly testovány i negativní kontroly, které byly inkubovány v PBS. Hmotnost vzorků pro optimalizaci procesu inkubace byla zvolena ($50 \pm 2,5$) mg, délka inkubace stanovena na 35 dní, odběr vzorků každých 7 dní a výměna plazmy také každých 7 dní. Vzorky byly inkubovány v 5 ml plazmy, respektive PBS. Při odběru vzorků bylo důležité optimalizovat také oplach materiálů, který měl za úkol odstranit z materiálů slabě adherované proteiny.

Vyhodnocení výsledků testování bylo provedeno sledováním změn hmotnosti vzorků, změn morfologie vzorků, změn molekulové hmotnosti polymeru použitím GPC a analýzou adherovaných proteinů metodami SDS-PAGE a spektrofotometricky (metoda dle Bradfordové a metoda Accuorange).

Sledování hmotnostních změn vzorků

Z grafu č. 2 je patrné, že docházelo k přírůstku hmotnosti vzorků inkubovaných v plazmě. Výkyvy v tomto grafu jsou způsobeny postupnou optimalizací oplachu vzorků po inkubaci v plazmě. Zejména vzorky z prvního dne zůstaly i po úplném uschnutí mírně zažloutlé, čímž se dá vysvětlit velký hmotnostní přírůstek. Během inkubace docházelo i k nárůstu hmotnosti NC, který byl způsoben zřejmě krystalizací PBS na povrchu vláken.



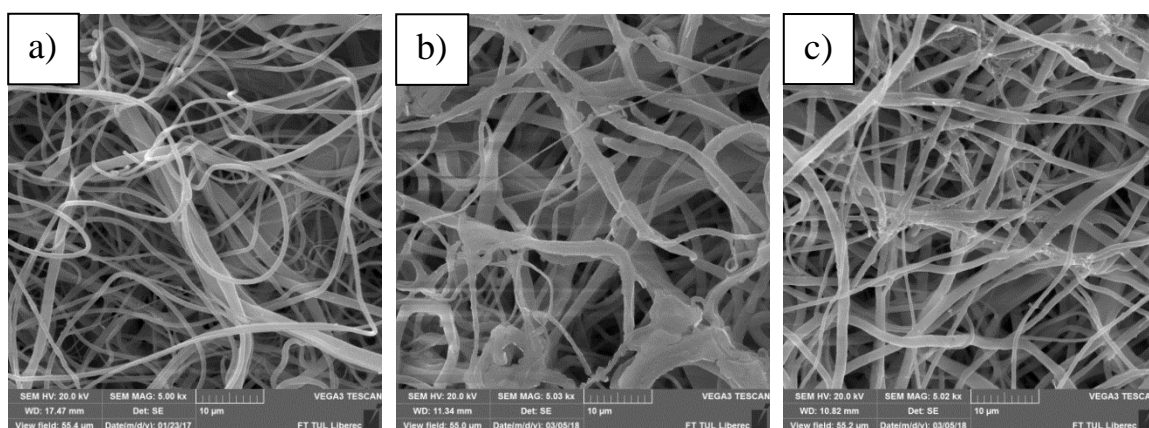
Graf č. 2: Hmotnostní změna vzorků během optimalizace



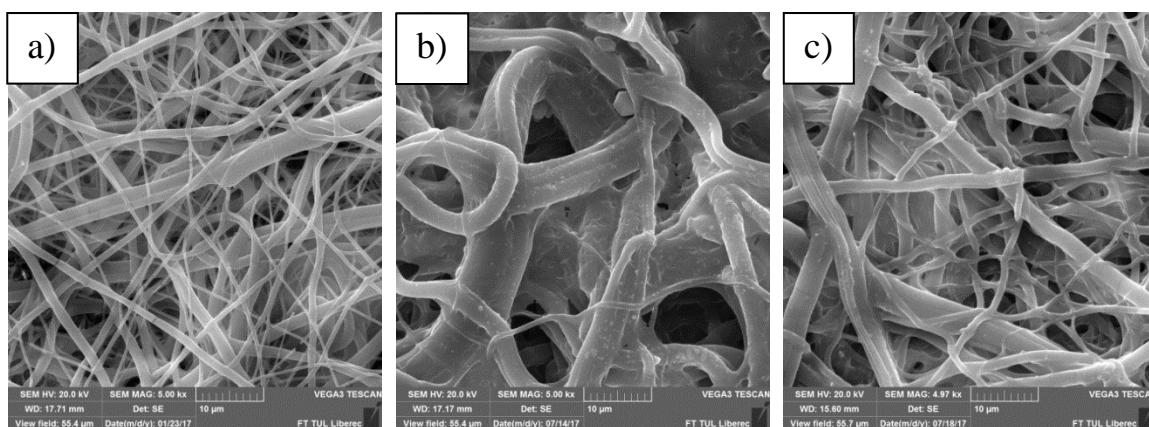
Hodnocení změn morfologie materiálu v průběhu testování

Během inkubace materiálů, jak v plazmě, tak v PBS, je patrná změna morfologie materiálů. Adherované proteiny tvoří povlak na povrchu vláken a místy dochází i ke slepování jednotlivých vláken. Na následujících snímcích je zachycen rozdíl mezi původním materiálem a materiálem inkubovaným v plazmě po 1 a 35 dní během optimalizace inkubace materiálu.

Na snímcích (*obr. č. 12 a č. 13*) lze pozorovat změnu povrchu vláken vlivem adheze proteinů. Z toho důvodu byly měřeny průměry vláken pouze u původních materiálů, jelikož na některých snímcích nebylo možné měření provést vzhledem k velké vrstvě adherovaných proteinů, které způsobily nerovnoměrnosti a nemožnost rozeznat okraj vláken.



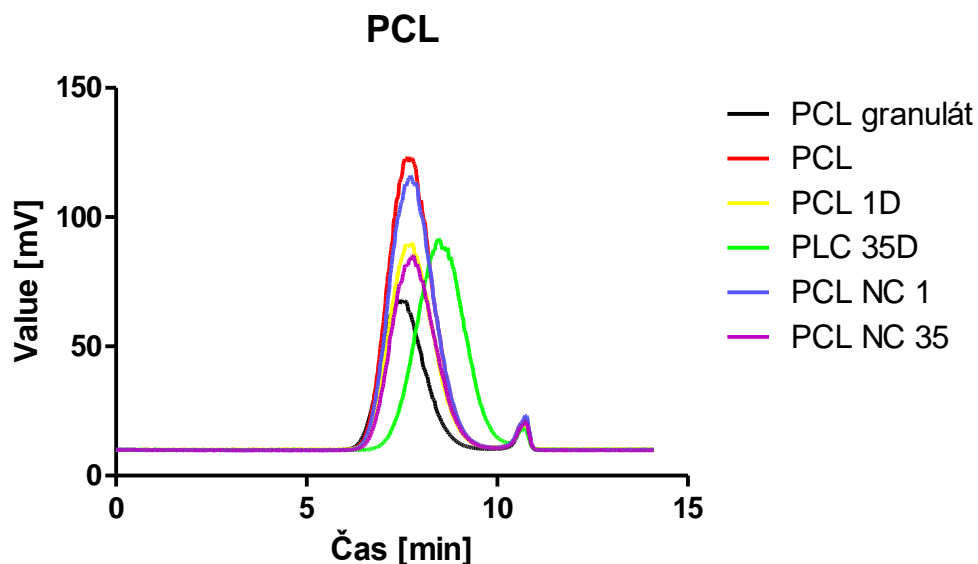
Obr. č. 11: Snímky z elektronového mikroskopu vlákenného PCL: a) původního materiálu, b) po 1 dni inkubace v plazmě, c) po 35 dnech inkubace v plazmě, 5 000 x, měřítko 10 µm



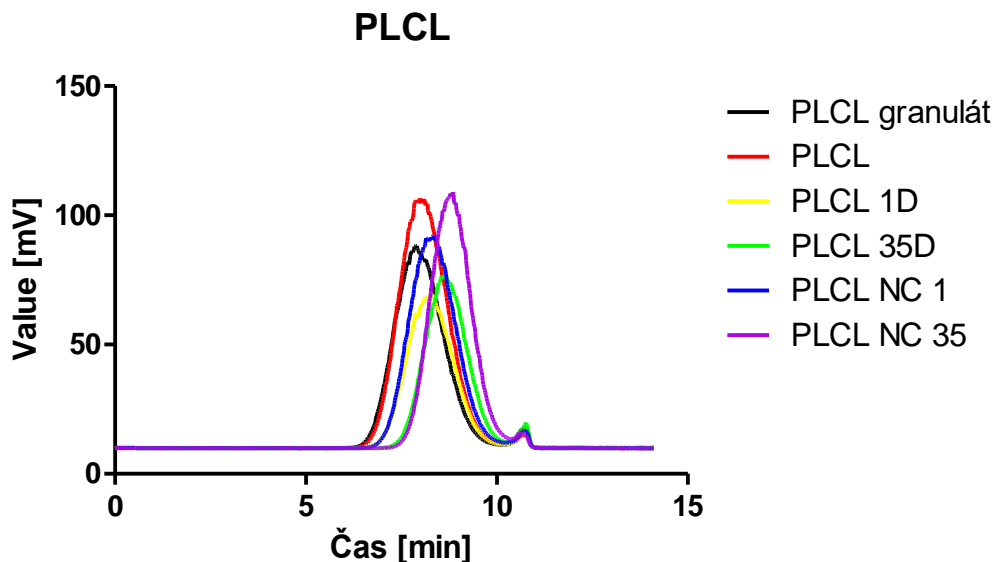
Obr. č. 12: Snímky z elektronového mikroskopu vlákenného PLCL: a) původního materiálu, b) po 1 dni inkubace v plazmě, c) po 35 dnech inkubace v plazmě, 5 000 x, měřítko 10 µm

Stanovení molekulové hmotnosti použitého polymeru pomocí gelové permeační chromatografie

Z grafů č. 3 a č. 4 lze pozorovat, že dochází k posunu retenčního času u některých vzorků po delším čase inkubace, a to zejména u PLCL, kdy je patrný posun i u NC. Pro ověření, zda se jedná i o změnu molekulové hmotnosti (a tedy degradace) by bylo vhodné udělat detailnější analýzu molekulové hmotnosti.



Graf č. 3: Stanovení molekulové hmotnosti PCL metodou GPC



Graf č. 4: Stanovení molekulové hmotnosti PLCL metodou GPC



4.1.3. Analýza proteinů adherovaných na materiálech

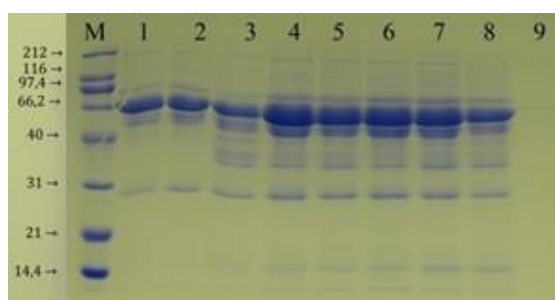
Proteiny byly ze vzorků desorbovány v roztoku PBS s 1 % SDS. V tomto roztoku byly materiály inkubovány v rotačním inkubátoru při teplotě 37 ° C, po dobu 1 hodiny a roztoky byly následně zmrazeny na – 20 ° C. (Li et al., 2012) Proces desorpce proteinů z povrchu materiálu, byl opakován 2 x, aby se ověřilo, zda došlo k desorpci všech proteinů už po první proceduře, nebo je třeba ho opakovat.

Po desorpci proteinů z materiálu byla provedena jejich analýza pomocí SDS-PAGE (elektroforéza) a stanovení jejich koncentrace spektrofotometricky (metodou dle Bradfordové a metodou Accuorange).

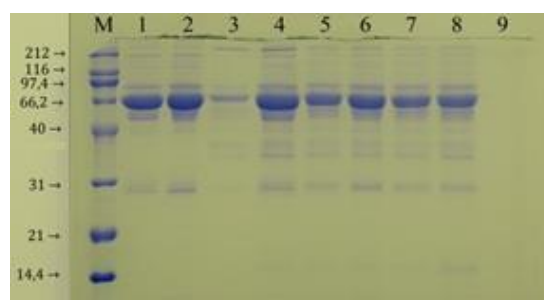
Elektroforéza SDS – PAGE

Elektroforéza SDS – PAGE byla provedena s původní krevní plazmou, s plazmou, ve které byly inkubovány materiály a s roztoky proteinů desorbovaných z materiálů. Následující snímky zachycují elektroforézy z materiálů a plazmy vytvořených během optimalizace experimentu. Ke kvantifikaci výsledků byl použit marker Wide Range K494 – 212 / 116 / 97,4 / 66,2 / 40 / 31 / 21 / 14,4 kDa.

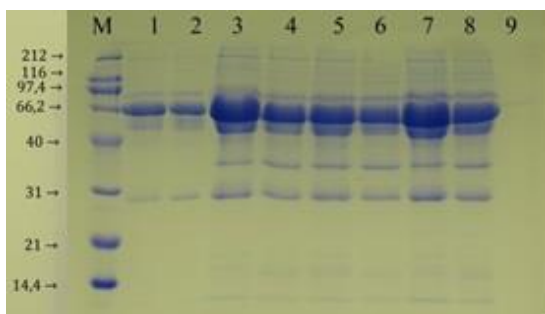
Z výsledků SDS-PAGE (obr. č.: 14 - 17) je patrné, že proteiny zůstaly adherované na vzorcích i po prvním oplachu, i když je zřejmé, že v mnohem menší koncentraci. Také na nich lze pozorovat, že nedochází k výrazné změně koncentrace naadherovaných proteinů mezi jednotlivými odběrovými dny. Rozdílné koncentrace adherovaných proteinů vypovídají o nerovnoměrném oplachu a nejspíše i nerovnoměrném smočení vzorků v plazmě kvůli velikosti a těsnému smotání vzorků ve zkumavce.



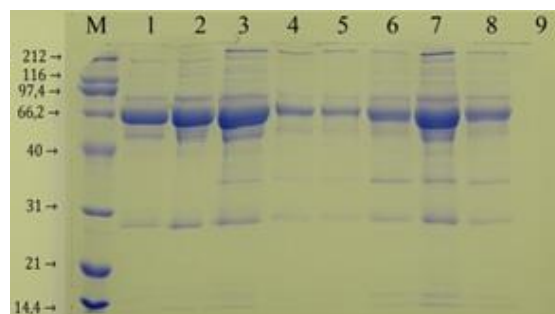
Obr. č. 13: 12 % SDS – PAGE, analýza proteinů adherovaných na PCL z první desorpce, **M** – marker, **1** – původní plazma použitá 1. – 14. den 200 x ředěná, **2** – původní plazma použitá 21. a 28. den 200 x ředěná, **3** – 1.den, **4** – 7. den, **5** – 14. den, **6** – 21. Den, **7** – 28. den, **8** - 35. den, **9** – NC 35. den



Obr. č. 14: 12 % SDS – PAGE, analýza proteinů adherovaných na PLCL z první desorpce, **M** – marker, **1** – původní plazma použitá 1. – 14. den 200 x ředěná, **2** – původní plazma použitá 21. a 28. den 200 x ředěná, **3** – 1.den, **4** – 7. den, **5** – 14. den, **6** – 21. Den, **7** – 28. den, **8** - 35. den, **9** – NC 35. den



Obr. č. 15: 12 % SDS – PAGE, analýza proteinů adherovaných na PCL z druhé desorpce, **M** – marker, **1** – původní plazma použitá 1. – 14. den 200 x ředěná, **2** – původní plazma použitá 21. a 28. den 200 x ředěná, **3** – 1.den, **4** – 7. den, **5** – 14. den, **6** – 21. Den, **7** – 28. den, **8** - 35. den, **9** – NC 35. den



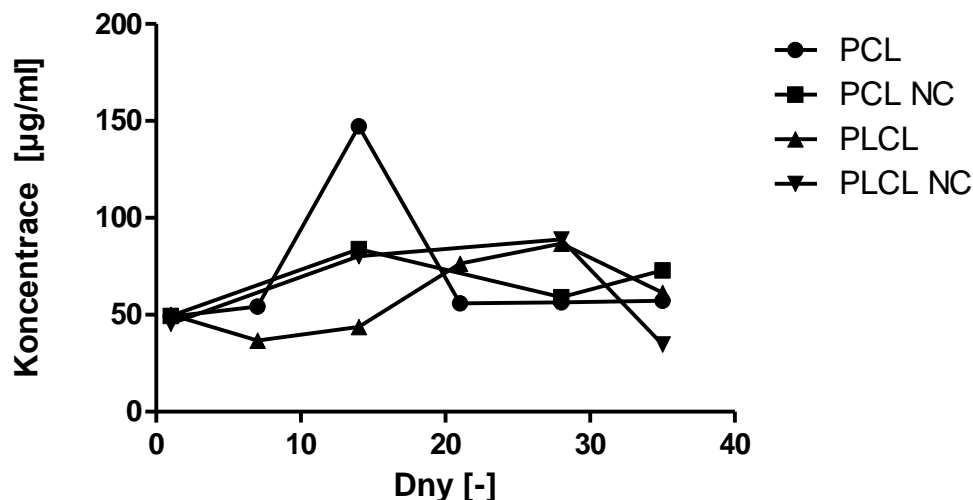
Obr. č. 16: 12 % SDS – PAGE, analýza proteinů adherovaných na PLCL z druhé desorpce, **M** – marker, **1** – původní plazma použitá 1. – 14. den 200 x ředěná, **2** – původní plazma použitá 21. a 28. den 200 x ředěná, **3** – 1.den, **4** – 7. den, **5** – 14. den, **6** – 21. Den, **7** – 28. den, **8** - 35. den, **9** – NC 35. den

Metoda podle Bradfordové

Vyhodnocení celkové koncentrace proteinů bylo provedeno dle metody popsané v kapitole 3.4.9. Byly připraveny vzorky smícháním 20 μ l roztoku s desorbovanými proteiny a 180 μ l Bradfordova činidla. Takto připravené vzorky je možné použít k testování. Roztoky pro měření koncentrace byly připraveny z roztoků první desorpce proteinů z materiálů PCL a PLCL použitých k optimalizaci testování.

Pokud jsou porovnány výsledky z elektroforézy (obr. č.: 14 - 17) a metody dle Bradfordové (graf. č.: 5), u výsledků z elektroforézy nejsou přítomny žádné proteiny u NC obou materiálů, kdežto u metody dle Bradfordové vykazují téměř stejné hodnoty koncentrace jako vzorky inkubované v plazmě, což lze vyčíst z grafu č. 5. Jak se ukázalo problémem této metody je citlivost na přítomnost SDS ve vzorcích. Vzhledem k tomu, že byl SDS obsažen v roztoku, kterým byla prováděna desorpce proteinů z povrchu materiálů, nejsou hodnoty koncentrace proteinů vypovídající. Proto bylo třeba zvolit jinou metodu, v tomto případě byla k dispozici fluorometrická metoda Accuorange.

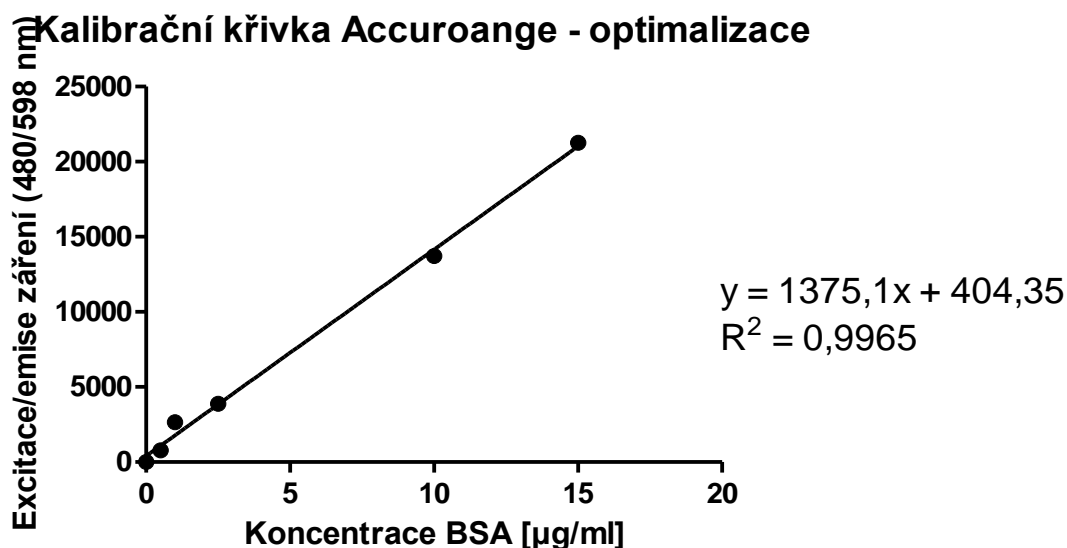
Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové



Graf č. 5: Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové

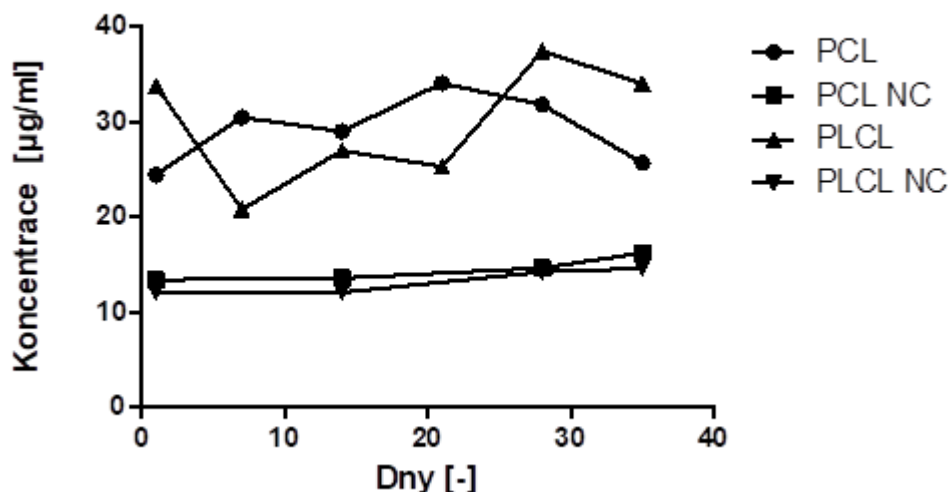
Metoda Accuorange

Vzorky pro stanovení celkové koncentrace metodou Accuorange byly připraveny smícháním 5 µl roztoku s desorbovanými proteiny rozředěného 1:1 s PBS a 250 µl Accuorange pufru 1x. V následujících grafech je kalibrační křivka pro Accuorange, graf. č. 6, a koncentrace desorbovaných proteinů, graf. č. 7. Tuto metodu je možné použít, jelikož nedochází k falešně pozitivní reakci s činidlem, a výsledky odpovídají pozorování z SDS-PAGE (tedy nerovnoměrný oplach). V tomto testování oba testované materiály vykazovaly srovnatelnou adhezi proteinů.



Graf č. 6: Kalibrační křivka pro Accuorange

Koncentrace proteinů metodou Accuorange - optimalizace



Graf č. 7: Stanovení koncentrace proteinů metodou Accuorange

4.2. Testování rozšířené sady vláknenných materiálů v krevní plazmě

Předmětem testování pro tento experiment byly vrstvy mikrovláken, vyrobené pomocí metody elektrospinning. Materiálem pro výrobu vrstev bylo PCL, PLCL a jejich blendy v poměrech PCL:PLCL 1:1, 1:3 a 3:1. Na základě optimalizace byla hmotnost jednotlivých vzorků snížena na $(10 \pm 0,5)$ mg. Během optimalizace byly vzorky příliš velké a byly velmi těsně smotané uvnitř zkumavky, čímž docházelo k nerovnoměrnému smočení a nerovnoměrné adhezi proteinů. Vzorky odpovídající váhy a vhodného tvaru byly umístěny do uzavíratelných zkumavek o objemu 15 ml a následně vysterylizovány. Vzorky byly inkubovány ve 3 ml plazmy, respektive PBS, délka inkubace byla prodloužena na 56 dní, interval mezi odběry vzorků prodloužen na 28 dní a výměna plazmy ponechána na 7 dní. Dále byla po testování interakce vláknenných materiálů s krevní plazmou provedena charakteristika pomocí morfologie, specifického povrchu a GPC.

4.2.1. Charakteristika vstupních materiálů

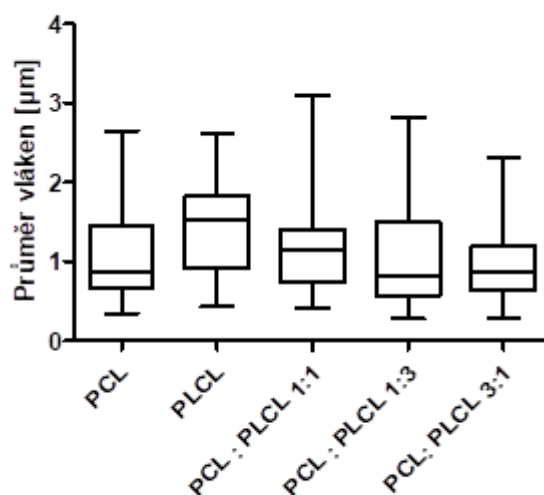
Před testováním byly vstupní materiály charakterizovány pomocí plošné hmotnosti vláknenných vrstev (tabulka č. 12), měřením průměrů vláken (tabulka č. 12 a graf č. 8) a stanovením specifického povrchu (tabulka č. 12). Na snímcích ze SEM (obr. č. 18 - 22) jsou zobrazeny vstupní vláknenné vrstvy. Vzhledem k hodnotám v tabulce č. 12 jsou materiály srovnatelné jak v hodnotách plošné hmotnosti, tak v hodnotách průměrů vláken. Specifický povrch jednotlivých materiálů se velmi liší, největší má PCL a je zde zřejmý trend zvětšujícího se specifického povrchu se vzrůstajícím obsahem PCL.



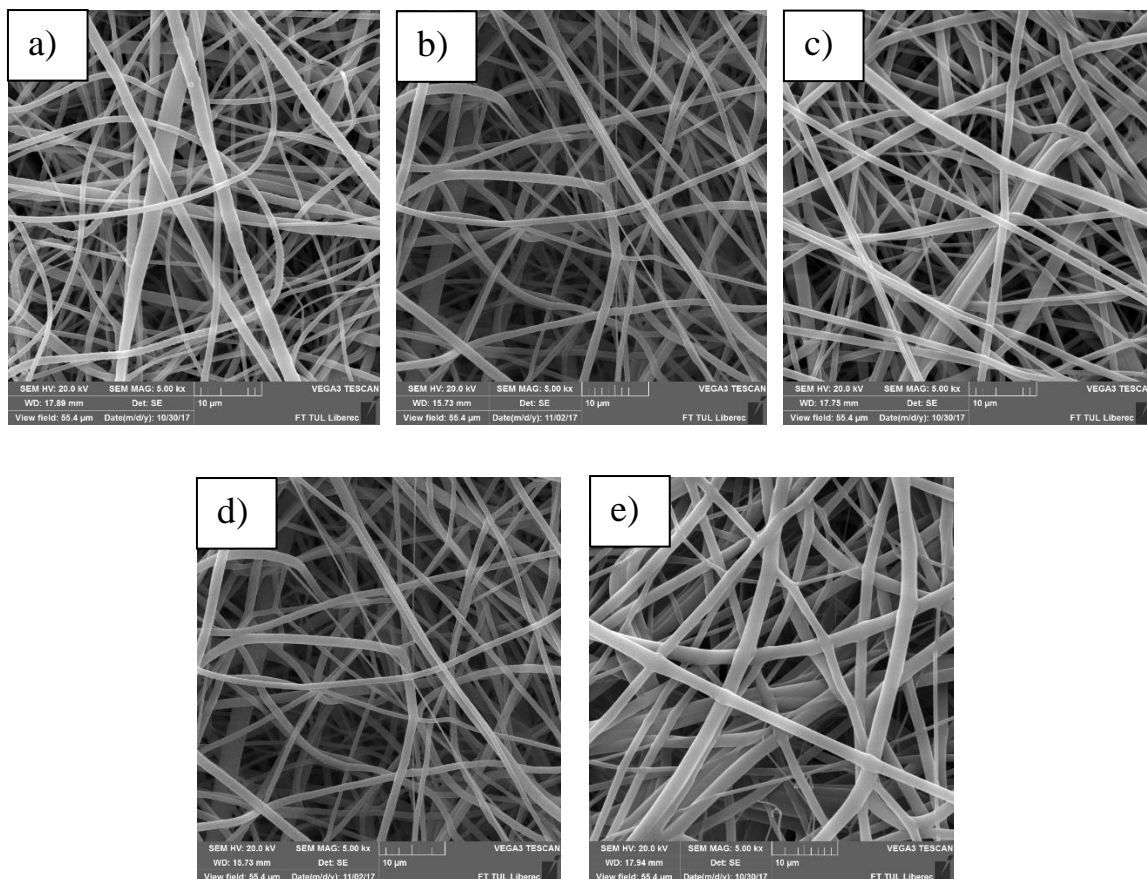
Tabulka č. 12: Plošné hmotnosti a průměry vláken vlákenných vrstev pro testování

	Plošná hmotnost [g/m ²]	Průměrná hodnota průměru vláken ± směrodatná odchylka [μm]	Specifický povrch [g/m ²]
PCL	42,05 ± 2,27	1,07 ± 0,57	2,59
PLCL	42,97 ± 0,99	1,43 ± 0,53	1,00
PCL : PLCL 1:1	39,81 ± 2,75	1,12 ± 0,46	1,83
PCL : PLCL 1:3	39,79 ± 3,58	1,03 ± 0,56	1,52
PCL : PLCL 3:1	38,62 ± 2,00	0,94 ± 0,41	2,17

Průměry vláken mikrovlákenných vrstev - testování



Graf č. 8: Průměry vláken vlákenných materiálů



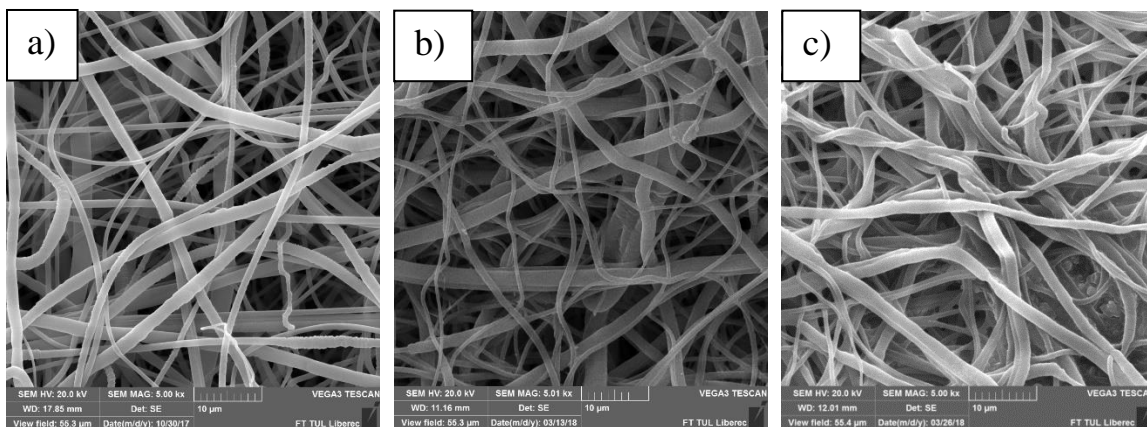
Obr. č. 17: Snímky vlákněných vrstev: a) PCL, b) PCL:PLCL 3:1, c) PCL:PLCL 1:1, d) PCL:PLCL 1:3, e) PLCL, vstupního materiálu, zvětšení 5 000 x, měřítko 10 µm

4.2.2. Sledování interakce testovaných vlákněných materiálů s krevní plazmou

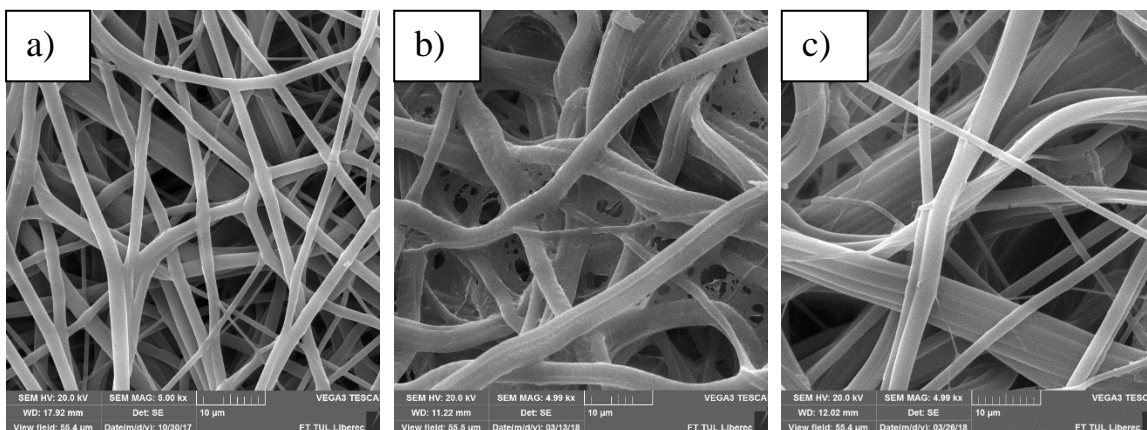
Vyhodnocení interakce vlákněných materiálů s krevní plazmou bylo provedeno pozorováním změny morfologie na snímcích SEM, změnou hmotnosti vzorků, změnou molekulové hmotnosti metodou GPC. Analýza desorbovaných proteinů byla provedena SDS-PAGE a spektrofotometricky metodou Accuorange.

Hodnocení změn morfologie materiálu v průběhu testování

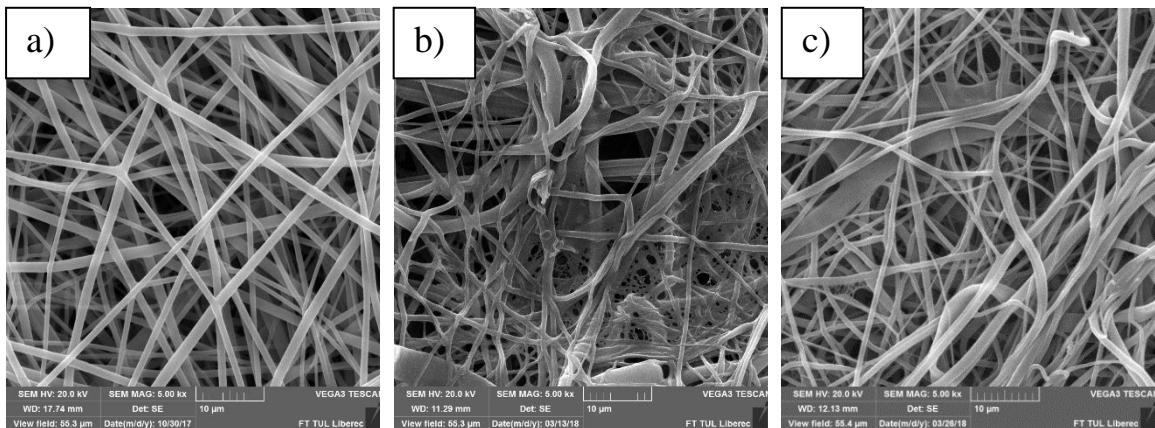
Na následujících snímcích (obr. č. 23 – 27) lze pozorovat změnu morfologie vláken vlivem inkubace v plazmě. Snímky byly pořízeny z původních materiálů, po 1 a po 56 dnech inkubace. Vlivem působení krevní plazmy dochází k obalení vláken adherovanými proteiny, v některých materiálech tvoří adherované proteiny vrstvy uvnitř materiálu a místy dochází i ke slepení jednotlivých vláken.



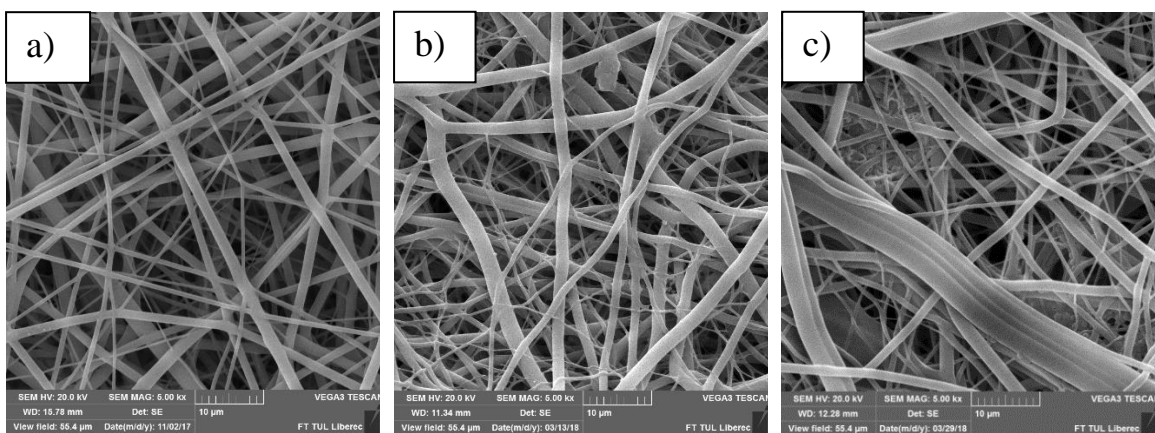
Obr. č. 18: Snímky z elektronového mikroskopu vlákenného PCL: a) původního materiálu, b) po 1 dni inkubace v plazmě, c) po 56 dnech inkubace v plazmě, 5 000 x, měřítko 10 µm



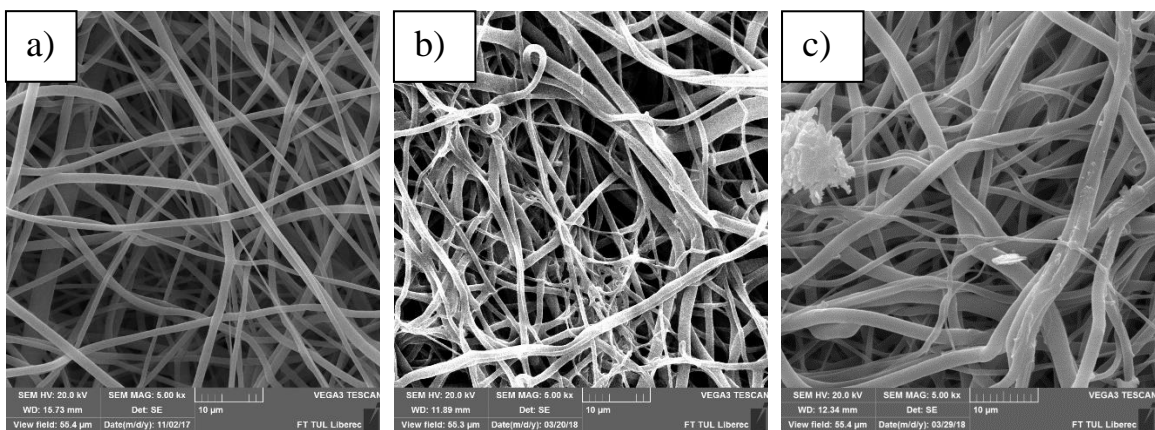
Obr. č. 19: Snímky z elektronového mikroskopu vlákenného PLCL: a) původního materiálu, b) po 1 dni inkubace v plazmě, c) po 56 dnech inkubace v plazmě, 5 000 x, měřítko 10 µm



Obr. č. 20: Snímky z elektronového mikroskopu vlákného PCL:PLCL 1:1:
 a) původního materiálu, b) po 1 dni inkubace v plazmě,
 c) po 56 dnech inkubace v plazmě, 5 000 x, měřítko 10 μ m



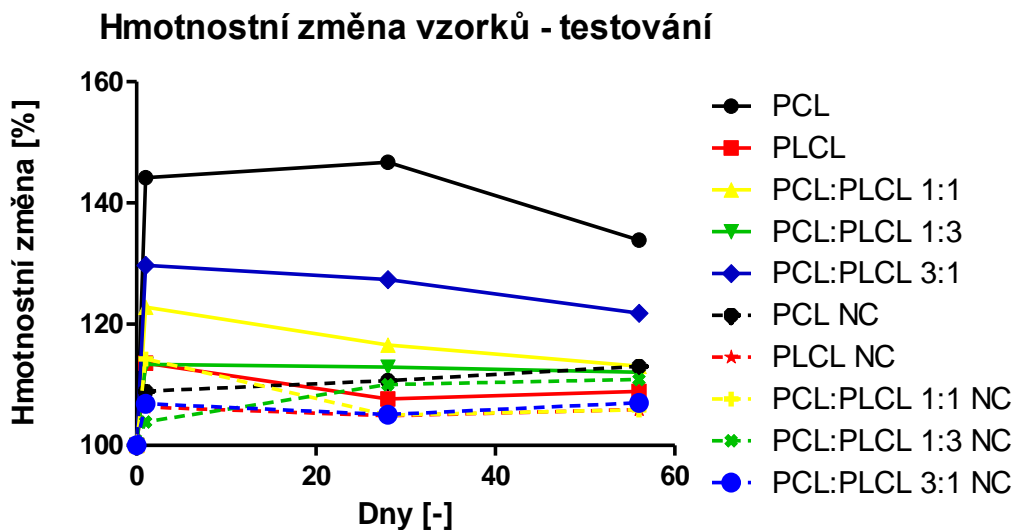
Obr. č. 21: Snímky z elektronového mikroskopu vlákného PCL:PLCL 1:3:
 a) původního materiálu, b) po 1 dni inkubace v plazmě,
 c) po 56 dnech inkubace v plazmě, 5 000 x, měřítko 10 μ m



Obr. č. 22: Snímky z elektronového mikroskopu vlákného PCL:PLCL 3:1:
 a) původního materiálu, b) po 1 dni inkubace v plazmě, c) po 56 dnech inkubace v plazmě, 5 000 x, měřítko 10 μ m

Hmotnostní úbytek vzorků

V grafu č. 9 je vidět velký hmotnostní nárůst vlivem adheze proteinů a to i po 24 hodinách. Následný pokles hmotnostního přírůstku je zřejmě způsoben degradací materiálu, i když morfologické změny nejsou patrné. Je zde vidět také největší nárůst hmotnosti u PCL a jeho blendů v poměru PCL:PLCL 3:1 a 1:1. Ostatní materiály mají hmotnostní přírůstek podobný NC.

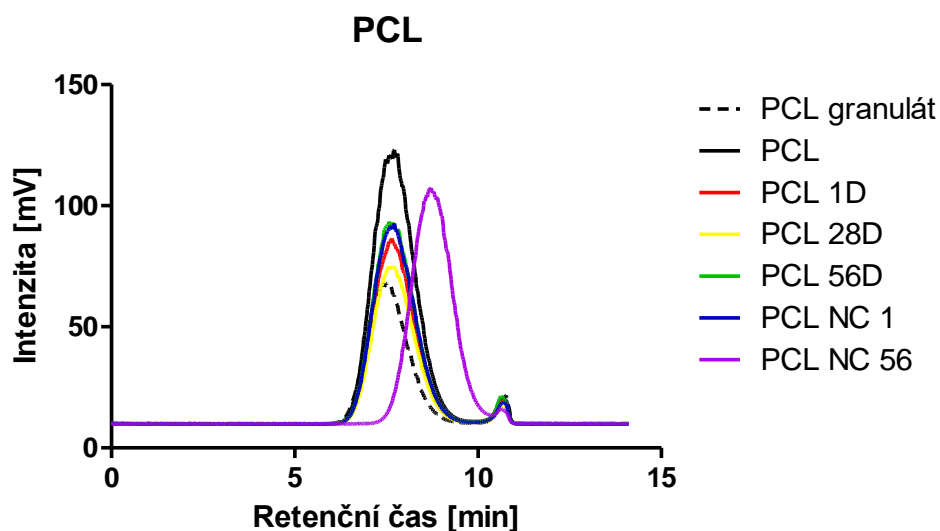


Graf č. 9: Hmotnostní změna vzorků během experimentu

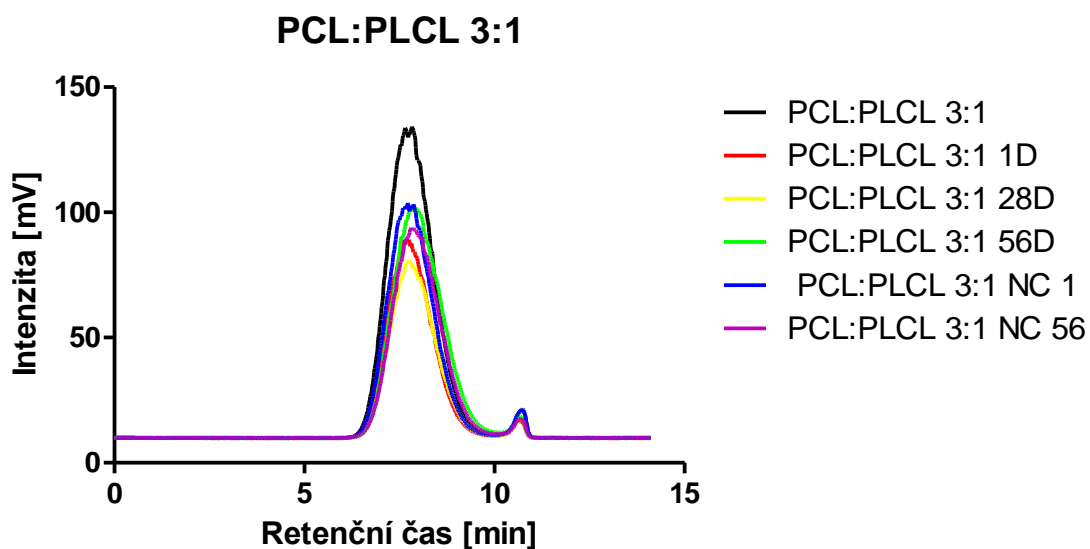


Stanovení molekulové hmotnosti použitého polymeru metodou GPC

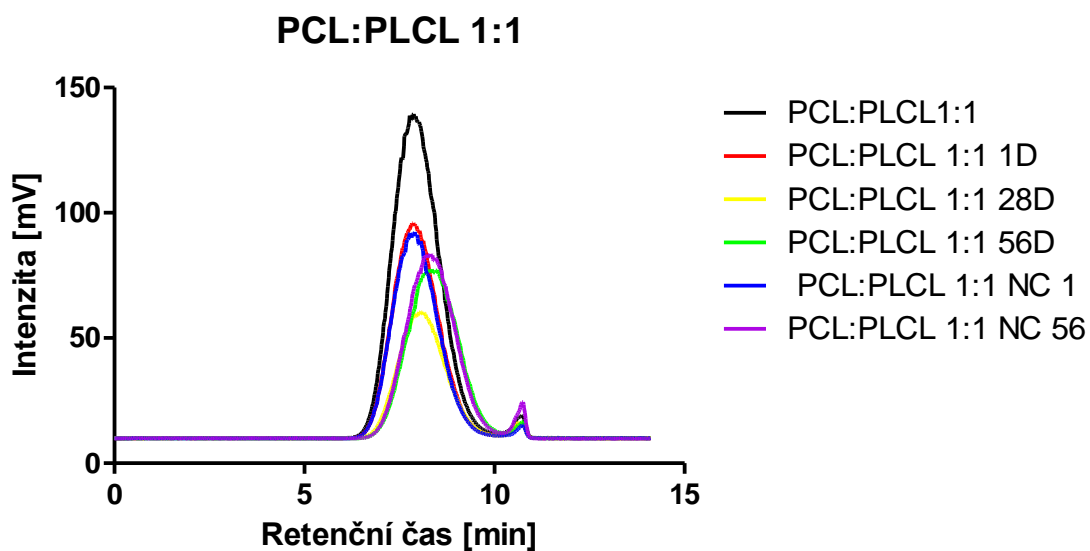
Jak již bylo popsáno u materiálů během stanovení molekulové hmotnosti při optimalizaci, nejspíše dochází k degradaci materiálů vlivem inkubace plazmy nebo PBS a tím ke změně odezvy v retenčním čase. Dále je možné dle grafů č. 10 - 14 předpokládat větší degradaci se vzrůstajícím množstvím PLCL ve vzorku. Tyto předpoklady by bylo třeba ještě ověřit dalším testováním.



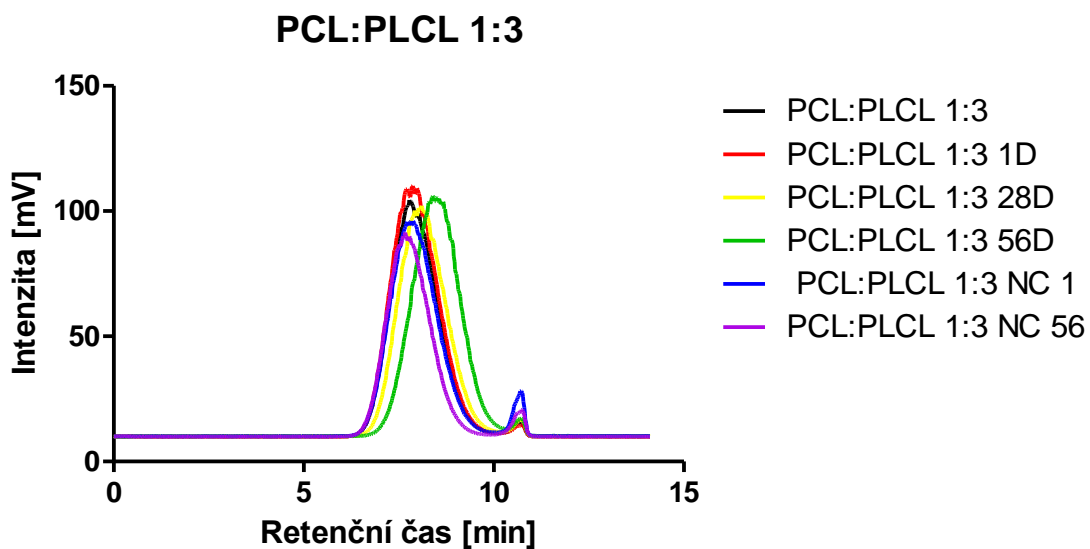
Graf č. 10: Stanovení molekulové hmotnosti PCL metodou GPC



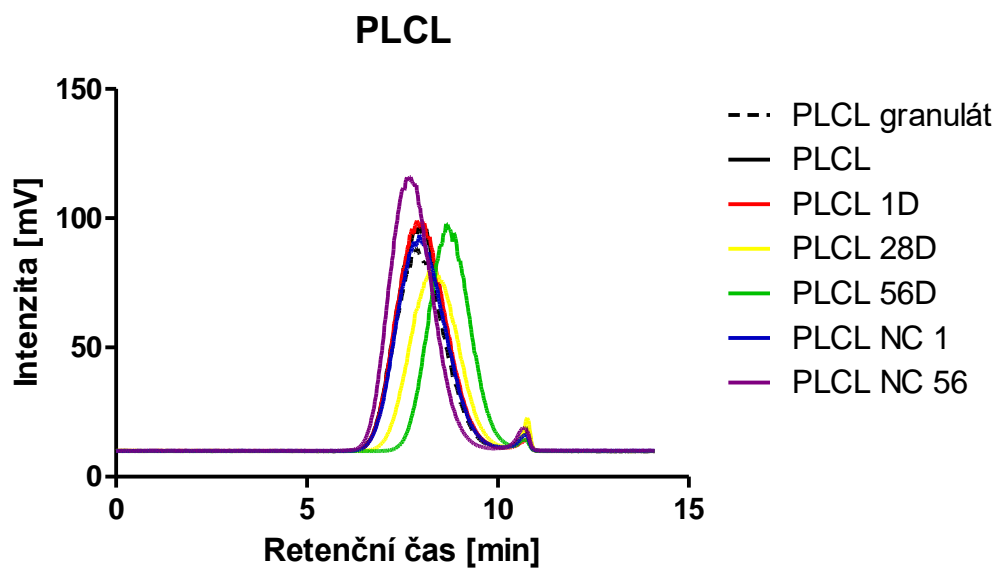
Graf č. 11: Stanovení molekulové hmotnosti PCL:PLCL 3:1 metodou GPC



Graf č. 12: Stanovení molekulové hmotnosti PCL:PLCL 1:1 metodou GPC



Graf č. 13: Stanovení molekulové hmotnosti PCL:PLCL 1:3 metodou GPC



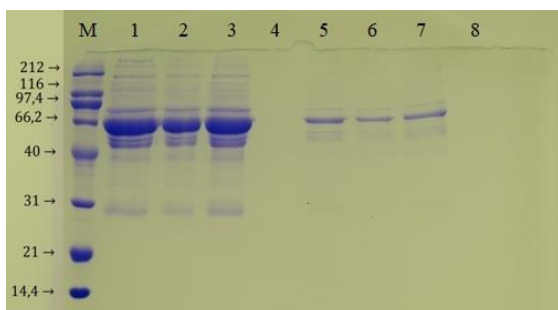
Graf č. 14: Stanovení molekulové hmotnosti PLCL metodou GPC

4.2.3. Analýza adherovaných proteinů

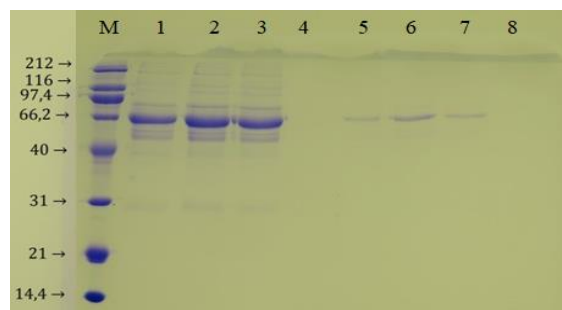
Desorpce proteinů probíhala dle kapitoly 4.1.3. v roztoku PBS s 1 % SDS. Přestože byl oplach upraven tak, aby se slabě adherované proteiny lépe uvolnily, byla desorpce opět provedena 2 x po sobě, aby bylo patrné, zda se proteiny desorbovaly již po prvním procesu. Následná analýza byla provedena SDS-PAGE a spektrofotometricky metodou Accuorange.

Elektroforéza SDS-PAGE

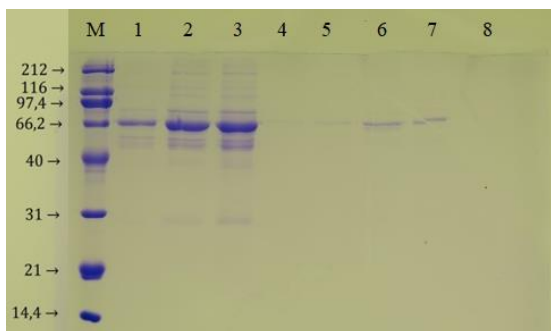
Elektroforéza byla provedena z plazmy a z prvních i druhých roztoků s desorbovanými proteiny, pro kontrolu byl použit i roztok z NC. Pokud se porovnájí výsledky z elektroforézy (obr. č. 28 - 31) a hmotnostní úbytek (graf. č. 9), dá se předpokládat, že snížení hmotnostního přírůstku v čase není způsobeno menším množstvím naadherovaných proteinů, ale spíše degradací materiálu, což potvrzují i výsledky GPC.



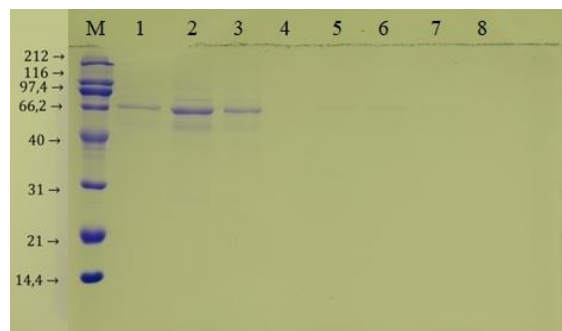
Obr. č. 23: 12 % SDS – PAGE, analýza proteinů adherovaných na PCL z první a druhé desorpce, **M** – marker, **1** – 1. den, **2** – 28. den, **3** – 56. den, **4** – NC 56. den, **5** – 1. den, **6** – 28. den, **7** – 56. den, **8** – NC 56. den



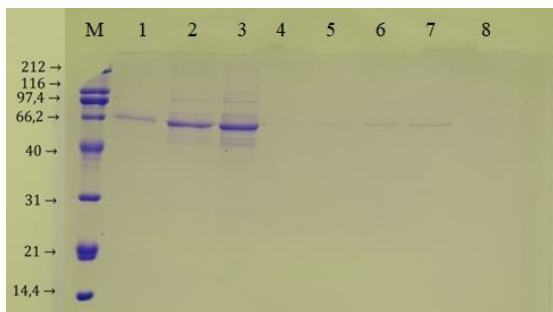
Obr. č. 24: 12 % SDS – PAGE, analýza proteinů adherovaných na PCL:PLCL 3:1 z první a druhé desorpce, **M** – marker, **1** – 1. den, **2** – 28. den, **3** – 56. den, **4** – NC 56. den, **5** – 1. den, **6** – 28. den, **7** – 56. den, **8** – NC 56. den



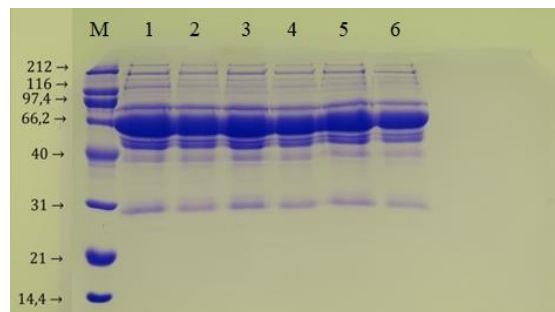
Obr. č. 25: 12 % SDS – PAGE, analýza proteinů adherovaných na PCL:PLCL 1:1 z první a druhé desorpce, **M** – marker, **1** – 1. den, **2** – 28. den, **3** – 56. den, **4** – NC 56. den, **5** – 1. den, **6** – 28. den, **7** – 56. den, **8** – NC 56. den



Obr. č. 26: 12 % SDS – PAGE, analýza proteinů adherovaných na PCL:PLCL 1:3 z první desorpce a druhé, **M** – marker, **1** – 1. den, **2** – 28. den, **3** – 56. den, **4** – NC 56. den, **5** – 1. den, **6** – 28. den, **7** – 56. den, **8** – NC 56. den



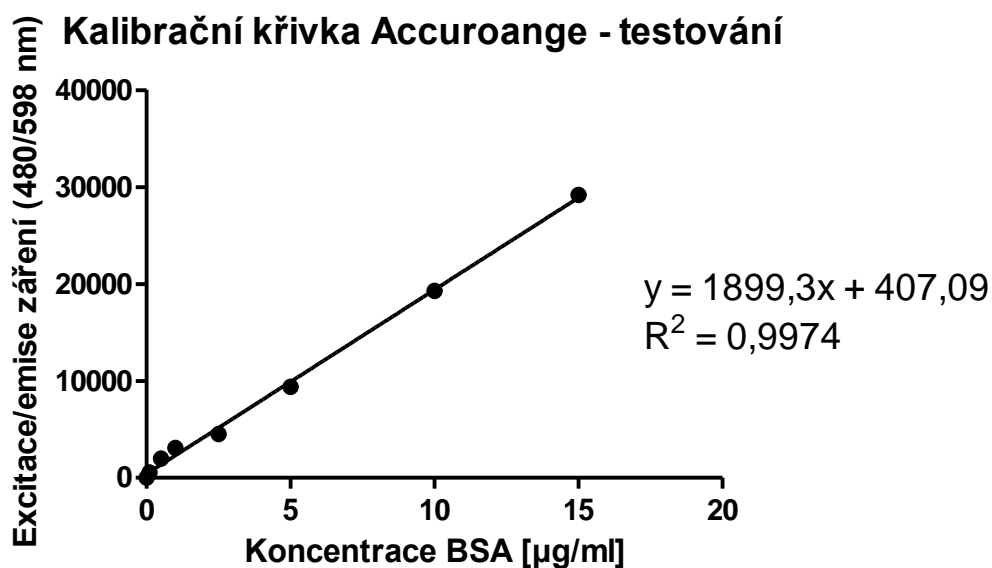
Obr. č. 27: 12 % SDS – PAGE, analýza proteinů adherovaných na PLCL z první a druhé desorpce, **M** – marker, **1** – 1. den, **2** – 28. den, **3** – 56. den, **4** – NC 56. den, **5** – 1. den, **6** – 28. den, **7** – 56. den, **8** – NC 56. den



Obr. č. 28: 12 % SDS – PAGE, analýza plazmy z materiálů 56. Den, 100 x ředěná **M** – marker, **1** – původní plazma, **2** – PCL, **3** – PLCL **4** – PCL:PLCL 1:1, **5** – PCL:PLCL 1:3, **6** – PCL:PLCL 3:1

Metoda Accuorange

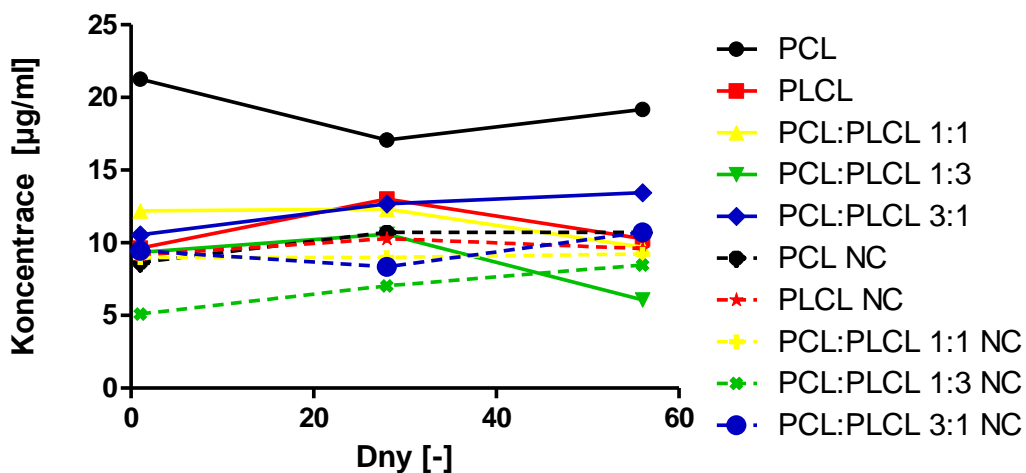
Vzorky pro stanovení celkové koncentrace metodou Accuorange byly připraveny smícháním 5 μ l roztoku s desorbovanými proteiny rozředěného 1:1 s PBS a 250 μ l Accuorange pufru 1x. V následujících grafech je kalibrační křivka pro Accuorange, graf. č. 15, a koncentrace proteinů, graf. č. 16.



Graf č. 15: Kalibrační křivka pro metodu Accuorange

Z grafu č. 16 je patrné, že nejvíce adherují proteiny na materiál obsahující pouze PCL a u blendů roste množství adherovaných proteinů s množstvím PCL. Ostatní materiály mají podobnou odezvu jako NC, což ukazuje na velmi malou adhezi proteinů. Výsledky korespondují jak s výsledky hmotnostních změn (graf. č. 9), tak s výsledky SDS-PAGE (obr. č. 28 – 32).

Koncentrace proteinů metodou Accuorange - testování



Graf č. 16: Stanovení koncentrace proteinů při testování metodou Accuorange

Během optimalizace byla celková doba inkubace 35 dní, během testování další sady vzorků 56 dní. Ani po 56 dnech nedocházelo k makroskopické degradaci vlákně vrstvy, pro další testování by bylo vhodné zvolit delší dobu inkubace, případně i delší dobu odběru. Výsledky z GPC ukazují na možnou částečnou degradaci materiálů obsahujících PLCL po inkubaci 56 dní. Interval pro výměnu plazmy byl v této práci ponechán u obou experimentů 7 dní. Tento interval by bylo možné prodloužit, mohlo by však dojít ke znehodnocení testovaných vzorků.

Z uvedených výsledků se dá předpokládat, že dochází k adhezi proteinů na vlákně materiály ve velké míře a to po 24 hodinách inkubace, přičemž se jejich koncentrace k přibývajícím časem příliš nemění. Dále je zde patrný trend snižování adsorpce proteinů se vzrůstajícím obsahem PLCL v testovaném materiálu.



5. Závěr:

Cílem této práce bylo otestovat vlákenné materiály vyrobené z degradabilních polyesterů (PCL a PLCL), které by měly být použity v tkáňovém inženýrství jako cévní náhrady. Testování bylo prováděno zejména z hlediska jejich degradace, ale také z hlediska interakce s plazmatickými bílkovinami, kde byla sledována míra adheze proteinů.

Vzorky vlákenných materiálů o známé hmotnosti byly inkubovány v plazmě po stanovenou dobu a v určitých intervalech byly tyto vzorky odebírány k analýze. U odebraných vzorků bylo analyzováno degradační chování a interakce materiálů s plazmatickými proteiny. Z morfologického hlediska jsou použité materiály srovnatelné, liší se specifický povrch.

Nejprve byla provedena optimalizace, kdy bylo třeba nastavit podmínky pro další testování – velikost vzorků, délka inkubace a vhodná metodika (např. oplach vzorků, stanovení koncentrace adherovaných proteinů). Testování další sady vzorků probíhalo na základě výsledků z optimalizace. K testování byly použity vlákenné vrstvy vyrobené z PCL, PLCL a jejich blendů PCL:PLCL 1:1, 1:3 a 3:1. Během tohoto testování byly znatelné rozdíly v míře adheze proteinů mezi jednotlivými materiály. Čím více PCL v materiálu, tím dochází k adhezi proteinů na materiál ve větším množství. Největší hmotnostní přírůstek a největší množství adherovaných proteinů vykazovalo PCL, dále blend PCL:PLCL 3:1, blend PCL:PLCL 1:1, blend PCL:PLCL 1:3 a nejmenší množství adherovaných proteinů mělo PLCL. Poslední tři zmíněné materiály mají hmotnostní přírůstek podobný NC a téměř žádné adherované proteiny, což souvisí i s velikostí specifického povrchu. Podle výsledků uvedených analýz se dá předpokládat, že čím je větší specifický povrch, tím dochází k lepší adhezi proteinů.

Pro potvrzení uvedených výsledků by bylo dobré experiment ještě zopakovat s širší sadou vzorků.



6. Zdroje

- Bajáková, J., Lukáš D. & Lacarin, M. (2011). Drawing the Production of Individual Nanofibers by Experimental Method. *NANOCON*. Brno.
- Banoriya, D., Purohit, R., & Dwivedi, R. K. (2017). Advanced Application of Polymer based Biomaterials. *Materials Today: Proceedings* (Vol. 4, pp. 3534–3541). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.02.244>
- Dong, Y., Liao, S., Ngiam, M., Chan, C. K., & Ramakrishna, S. (2009). Degradation Behaviors of Electrospun Resorbable Polyester Nanofibers. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 15(3), 333–351. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2008.0619>
- Fernández, J., Etxeberria, A., & Sarasua, J. R. (2012). Synthesis, structure and properties of poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) statistical copolymers. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 9, 100–112. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2012.01.003>
- Godavitarne, C., Robertson, A., Peters, J., & Rogers, B. (2017). Biodegradable materials. *Orthopaedics and Trauma* (Vol. 31, pp. 316–320). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mporth.2017.07.011>
- Khademhosseini, A., Langer, R., Borenstein, J. & Vacanti, J. (2005). Microscale technologies for tissue engineering and biology. *PNAS*. 103(8), 2480–2487. DOI: 10.1073/pnas.0507681102.
- Li, L., Qian, Y., Jiang, C., Lv, Y., Liu, W., Zhong, L., ... Li, S. (2012). Biomaterials The use of hyaluronan to regulate protein adsorption and cell infiltration in nanofibrous scaffolds, 33, 3428–3445. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.038>
- Nanopharma: Making nano your opportunity, 2015. *Nanopharma* [online]. [cit. 2018-03- 5]. Dostupné z: <http://www.nanopharma.cz/cs/produkty-a-technologie/technologie>
- Pavelka, K., Vencovský, J., Šenolt, L., Horák, P., Olejárová, M., Tomčík, M., Závada, J., & Štěpán, J.(2017). Farmakoterapie revmatických onemocnění. Praha: Maxdorf. Jessenius. ISBN 978-80-7345-537-8
- Pecka, M. (2002) Laboratorní hematologie v přehledu. Český Těšín: Finidr. ISBN 80-866-8201-3.
- Petráš, D., Kimmer, D. & Soukup K. (2009). Bezpečná nanovlákná. *Chemické listy*. 103, 1009-1016.
- Ratner, B. D. (2013). A History of Biomaterials. In *Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition* (pp. xli–liii). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00154-6>
- Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., & Lemons, J. E. (2013). Introduction - Biomaterials Science: An Evolving, Multidisciplinary Endeavor. In *Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition* (Third Edit, pp. xxv–xxxix). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00153-4>



- Sarkar, K., Gomez, C., Zambrano, S., Ramirez, M., De Hoyos, E., Vasquez, H., & Lozano, K. (2010). Electrospinning to Forcespinning™. *Materials Today*, **13**(11), 12-14. DOI: 10.1016/S1369-7021(10)70199-1.
- Typy kmenových buněk. (2013). *CellMaGel* [online]. Art4web.cz [cit. 2018-4-2]. Dostupné z: <http://cellmagel.cz/cs/uvodni-stranka/typy-kmenovych-bunek>
- Vysloužilová, L. (2016). *Development of Coaxial Electrospinning technology*. Liberec. Disertační práce. Technická univerzita v Liberci.
- Wei, G. & Ma, P. (2007). Polymeric biomaterials. *BOCCACCINI, A. R. Tissue engineering using ceramics and polymers*. Cambridge: Woodhead publishing limited, 32.51. ISBN 978-1-84569-176-9.
- Woodruff, M. A., & Hutmacher, D. W. (2010). The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, **35**(10), 1217–1256. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002>



Seznam obrázků

Obr. č. 1: Kovová endoprotéza kyčelního kloubu	15
Obr. č. 2: Keramická kloubní náhrada	16
Obr. č. 3: Degradace PCL: a) degradace z povrchu vlákna, b) celková degradace, c) degradace ze středu materiálu, převzato z (Woodruff & Hutmacher, 2010)	19
Obr. č. 4: Bezjehlové elektrostatické zvlákňování	22
Obr. č. 5: Bezjehlové koaxiální zvlákňování, převzato z (Vysloužilová, 2016)	22
Obr. č. 6: Výroba nanovlákných vrstev metodou melt - blown	23
Obr. č. 7: Princip metody forcespinning, převzato z (Sarkar, 2010)	23
Obr. č. 8: Příklad spinnerety, převzato z (Sarkar, 2010)	23
Obr. č. 9: Tvorba vláken metodou drawing, převzato z (Bajáková, 2011)	24
Obr. č. 10: Snímky vlákných vrstev vstupních materiálů: a) PCL, b) PLCL, zvětšení 5 000 x, měřítko 10 µm	38
Obr. č. 11: Snímky z elektronového mikroskopu vlákného PCL: a) původního materiálu, b) po 1 dni inkubace v plazmě, c) po 35 dnech inkubace v plazmě, 5 000 x, měřítko 10 µm	40
Obr. č. 12: Snímky z elektronového mikroskopu vlákného PLCL: a) původního materiálu, b) po 1 dni inkubace v plazmě, c) po 35 dnech inkubace v plazmě, 5 000 x, měřítko 10 µm	40
Obr. č. 13: 12 % SDS – PAGE, analýza proteinů adherovaných na PCL z první desorpce, M – marker, 1 – původní plazma použitá 1. – 14. den 200 x ředěná, 2 – původní plazma použitá 21. a 28. den 200 x ředěná, 3 – 1.den, 4 – 7. den, 5 – 14. den, 6 – 21. Den, 7 – 28. den, 8 - 35. den, 9 – NC 35. den	42
Obr. č. 14: 12 % SDS – PAGE, analýza proteinů adherovaných na PLCL z první desorpce, M – marker, 1 – původní plazma použitá 1. – 14. den 200 x ředěná, 2 – původní plazma použitá 21. a 28. den 200 x ředěná, 3 – 1.den, 4 – 7. den, 5 – 14. den, 6 – 21. Den, 7 – 28. den, 8 - 35. den, 9 – NC 35. den	42
Obr. č. 15: 12 % SDS – PAGE, analýza proteinů adherovaných na PCL z druhé desorpce, M – marker, 1 – původní plazma použitá 1. – 14. den 200 x ředěná, 2 – původní plazma použitá 21. a 28. den 200 x ředěná, 3 – 1.den, 4 – 7. den, 5 – 14. den, 6 – 21. Den, 7 – 28. den, 8 - 35. den, 9 – NC 35. den	43
Obr. č. 16: 12 % SDS – PAGE, analýza proteinů adherovaných na PLCL z druhé desorpce, M – marker, 1 – původní plazma použitá 1. – 14. den 200 x ředěná, 2 – původní plazma použitá 21. a 28. den 200 x ředěná, 3 – 1.den, 4 – 7. den, 5 – 14. den, 6 – 21. Den, 7 – 28. den, 8 - 35. den, 9 – NC 35. den	43
Obr. č. 17: Snímky vlákných vrstev: a) PCL, b) PCL:PLCL 3:1, c) PCL:PLCL 1:1, d) PCL:PLCL 1:3, e) PLCL, vstupního materiálu, zvětšení 5 000 x,	47



Obr. č. 18: Snímky z elektronového mikroskopu vlákného PCL: a) původního materiálu, b) po 1 dni inkubace v plazmě, c) po 56 dnech inkubace v plazmě, 5 000 x, měřítko 10 µm.....	48
Obr. č. 19: Snímky z elektronového mikroskopu vlákného PLCL: a) původního materiálu, b) po 1 dni inkubace v plazmě, c) po 56 dnech inkubace v plazmě, 5 000 x, měřítko 10 µm.....	48
Obr. č. 20: Snímky z elektronového mikroskopu vlákného PCL:PLCL 1:1: a) původního materiálu, b) po 1 dni inkubace v plazmě, c) po 56 dnech inkubace v plazmě, 5 000 x, měřítko 10 µm	49
Obr. č. 21: Snímky z elektronového mikroskopu vlákného PCL:PLCL 1:3: a) původního materiálu, b) po 1 dni inkubace v plazmě, c) po 56 dnech inkubace v plazmě, 5 000 x, měřítko 10 µm	49
Obr. č. 22: Snímky z elektronového mikroskopu vlákného PCL:PLCL 3:1: a) původního materiálu, b) po 1 dni inkubace v plazmě, c) po 56 dnech inkubace v plazmě, 5 000 x, měřítko 10 µm.....	49
Obr. č. 23: 12 % SDS – PAGE, analýza proteinů adherovaných na PCL z první a druhé desorpce, M – marker, 1 – 1. den, 2 – 28. den, 3 – 56. den, 4 – NC 56. den, 5 – 1. den, 6 – 28. den, 7 – 56. den, 8 – NC 56. den.....	54
Obr. č. 24: 12 % SDS – PAGE, analýza proteinů adherovaných na PCL:PLCL 3:1 z první a druhé desorpce, M – marker, 1 – 1. den, 2 – 28. den, 3 – 56. den, 4 – NC 56. den, 5 – 1. den, 6 – 28. den, 7 – 56. den, 8 – NC 56. den	54
Obr. č. 25: 12 % SDS – PAGE, analýza proteinů adherovaných na PCL:PLCL 1:1 z první a druhé desorpce, M – marker, 1 – 1. den, 2 – 28. den, 3 – 56. den, 4 – NC 56. den, 5 – 1. den, 6 – 28. den, 7 – 56. den, 8 – NC 56. den	54
Obr. č. 26: 12 % SDS – PAGE, analýza proteinů adherovaných na PCL:PLCL 1:3 z první desorpce a druhé, M – marker, 1 – 1. den, 2 – 28. den, 3 – 56. den, 4 – NC 56. den, 5 – 1. den, 6 – 28. den, 7 – 56. den, 8 – NC 56. den	54
Obr. č. 27: 12 % SDS – PAGE, analýza proteinů adherovaných na PLCL z první a druhé desorpce, M – marker, 1 – 1. den, 2 – 28. den, 3 – 56. den, 4 – NC 56. den, 5 – 1. den, 6 – 28. den, 7 – 56. den, 8 – NC 56. den.....	55
Obr. č. 28: 12 % SDS – PAGE, analýza plazmy z materiálů 56. Den, 100 x ředěná M – marker, 1 – původní plazma, 2 – PCL, 3 – PLCL 4 – PCL:PLCL 1:1, 5 – PCL:PLCL 1:3, 6 – PCL:PLCL 3:1	55



Seznam grafů

Graf č. 1: Kalibrační křivka BSA pro stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové	35
Graf č. 2: Hmotnostní přírůstek vzorků během optimalizace	39
Graf č. 3: Stanovení molekulové hmotnosti PCL metodou GPC.....	41
Graf č. 4: Stanovení molekulové hmotnosti PLCL metodou GPC	41
Graf č. 5: Stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové.....	44
Graf č. 6: Kalibrační křivka pro Accuorange.....	44
Graf č. 7: Stanovení koncentrace proteinů metodou Accuorange.....	45
Graf č. 8: Průměry vláken vlákenných materiálů.....	46
Graf č. 9: Hmotnostní úbytek vzorků během experimentu	50
Graf č. 10: Stanovení molekulové hmotnosti PCL metodou GPC.....	51
Graf č. 11: Stanovení molekulové hmotnosti PCL:PLCL 3:1 metodou GPC.....	51
Graf č. 12: Stanovení molekulové hmotnosti PCL:PLCL 1:1 metodou GPC.....	52
Graf č. 13: Stanovení molekulové hmotnosti PCL:PLCL 1:3 metodou GPC.....	52
Graf č. 14: Stanovení molekulové hmotnosti PLCL metodou GPC	53
Graf č. 15: Kalibrační křivka pro metodu Accuorange.....	55
Graf č. 16: Stanovení koncentrace proteinů při testování metodou Accuorange.....	56

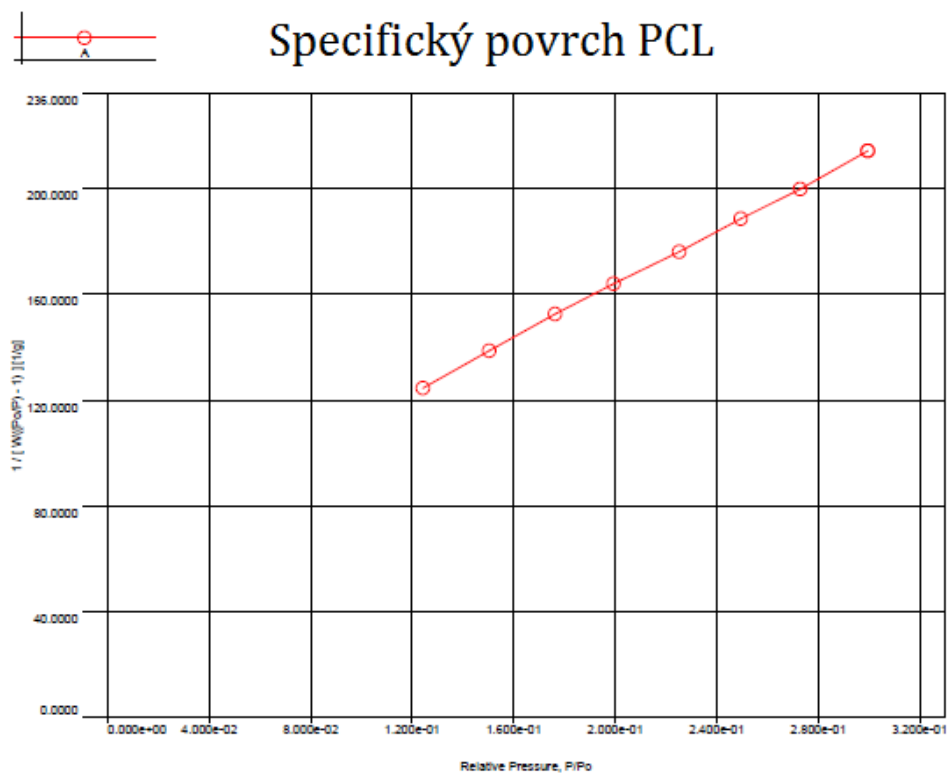
Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Přehled polymerů používaných v medicíně a tkáňovém inženýrství (převzato z (Woodruff & Hutmacher, 2010).....	18
Tabulka č. 2: Chemikálie pro přípravu PBS	28
Tabulka č. 3: Chemikálie pro přípravu PBS s azidem sodným 0,02 hm. %	28
Tabulka č. 4: Chemikálie pro přípravu plazmy s azidem sodným 0,02 hm. %	29
Tabulka č. 5: Chemikálie pro přípravu roztoku pro desorpci proteinů	29
Tabulka č. 6: Chemikálie pro SDS-PAGE.....	29
Tabulka č. 7: Chemikálie pro SDS-PAGE.....	30
Tabulka č. 8: Roztoky pro výrobu vlákenných vrstev	31
Tabulka č. 9: Postup přípravy kalibrační křivky pro BSA.....	35
Tabulka č. 10: Postup přípravy kalibrační křivky BSA pro Accuorange	36
Tabulka č. 11: Plošné hmotnosti a průměry vláken vlákenných vrstev pro optimalizaci....	37
Tabulka č. 12: Plošné hmotnosti a průměry vláken vlákenných vrstev pro testování	46

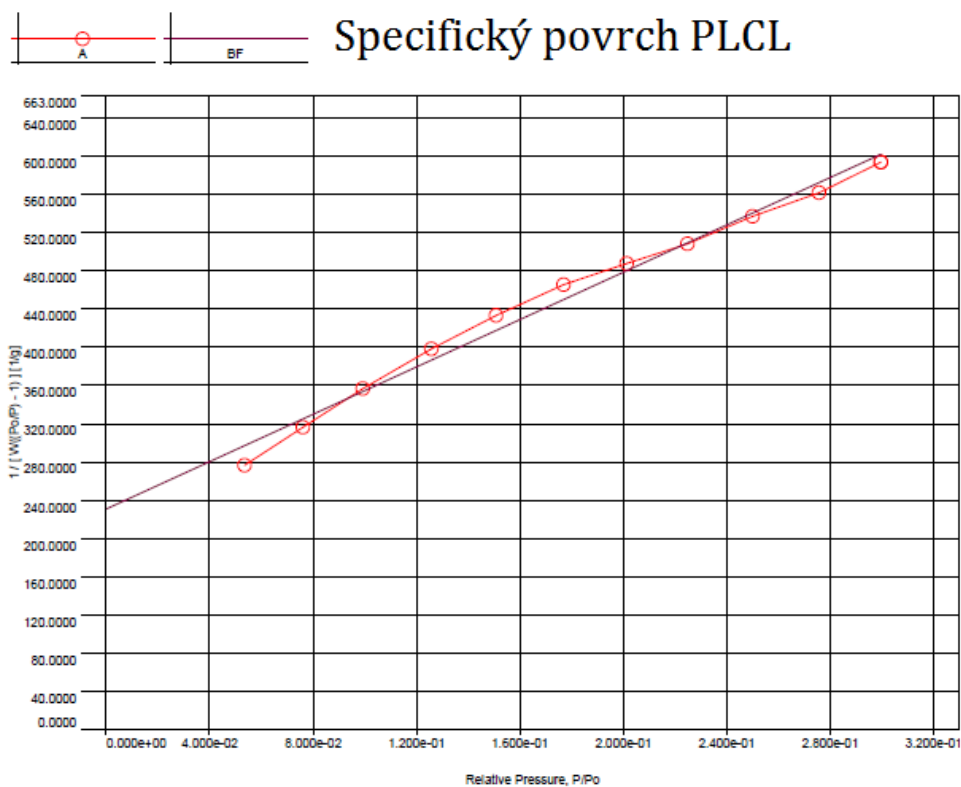


Přílohy

Příloha č. 1: Grafy specifického povrchu testovaných materiálů

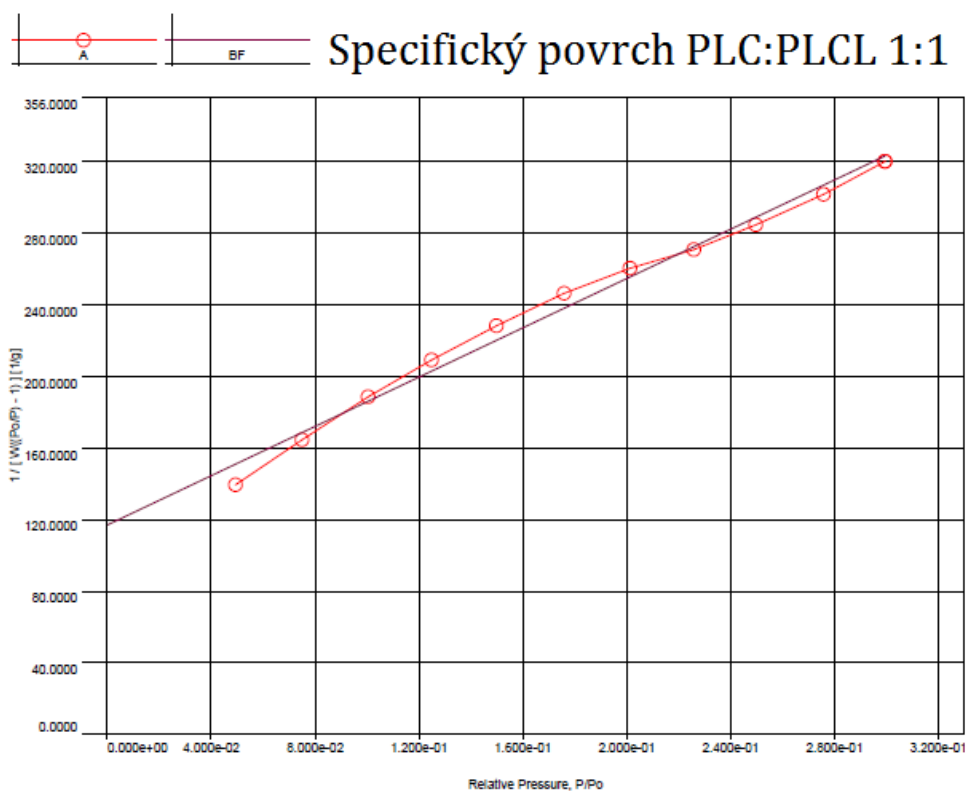


Graf č. 17: Specifický povrch PCL, korelační koeficient 0,9998

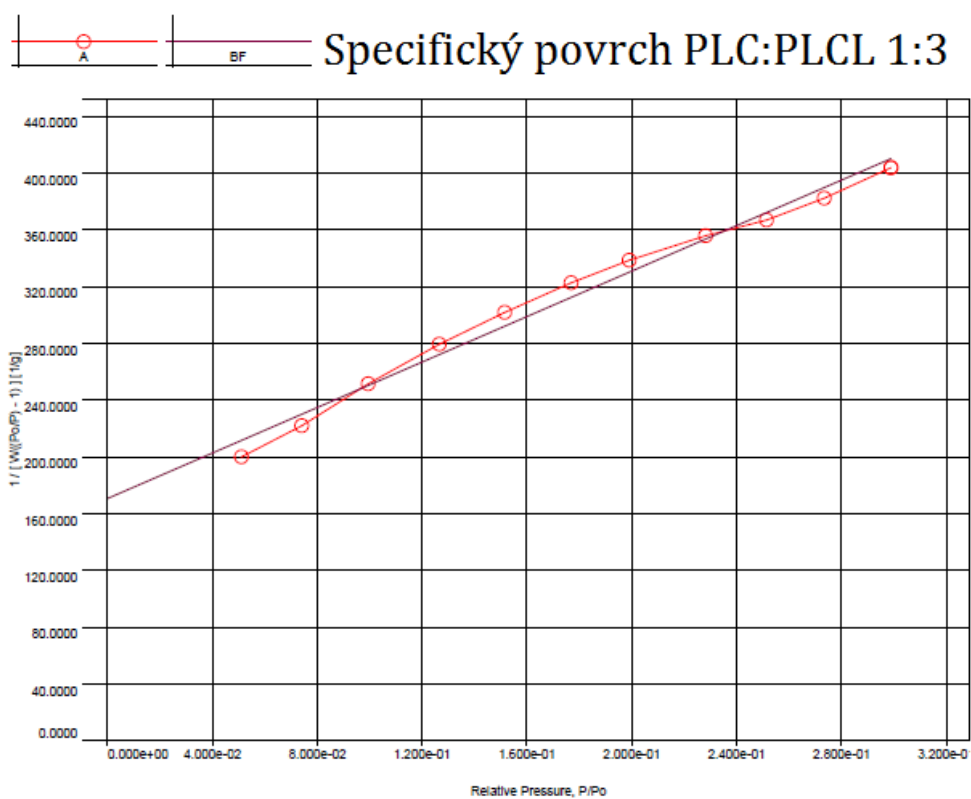


Graf č. 18: Specifický povrch PLCL, korelační koeficient 0,9934



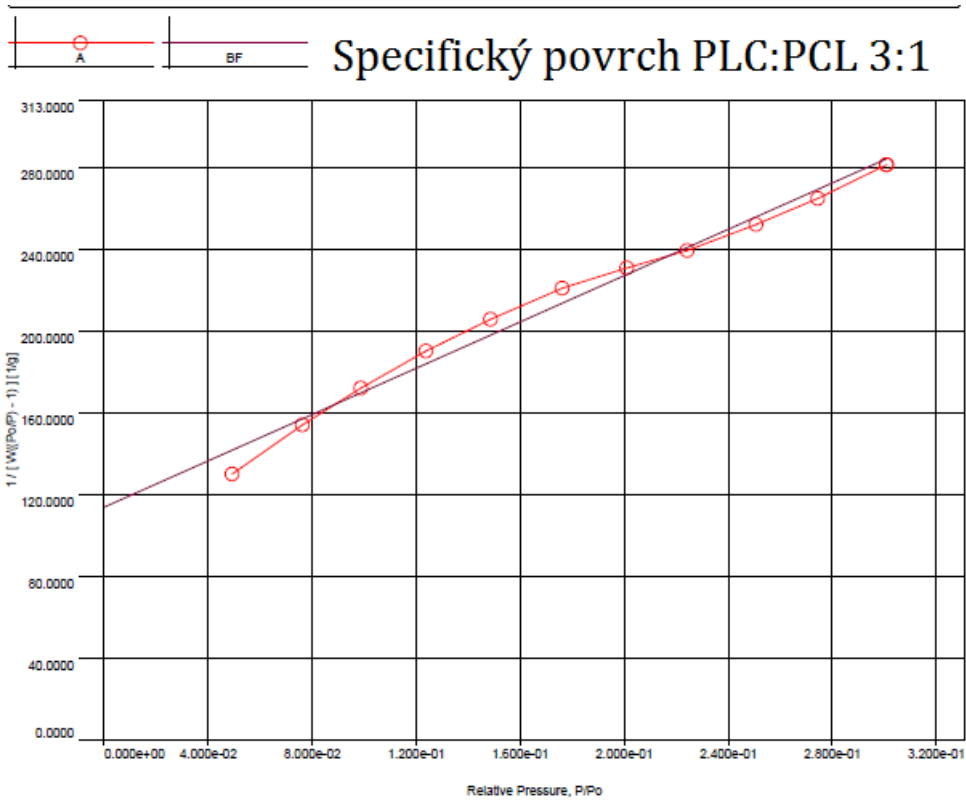


Graf č. 19: Specifický povrch PCL:PLCL 1:1, korelační koeficient 0,9938



Graf č. 20: Specifický povrch PCL:PLCL 1:3, korelační koeficient 0,9927





Graf č. 21: Specifický povrch PCL:PLCL 3:1, korelační koeficient 0,9921

