



Modifikace nanovláknenných tkáňových nosičů L-Argininem

Bakalářská práce

Studijní program: B3107 – Textil

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

Autor práce: **Zuzana Oulehlová**

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





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC
Faculty of Textile Engineering ■

Electrospun nanofibrous scaffold modification by L-Arginine

Bachelor thesis

Study programme: B3107 – Textil

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

Author: **Zuzana Oulehlová**

Supervisor: RNDr. Jana Horáková, Ph.D.



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Zuzana Oulehlová**
Osobní číslo: **T15000241**
Studijní program: **B3107 Textil**
Studijní obor: **Textilní technologie, materiály a nanomateriály**
Název tématu: **Modifikace nanovlákných tkáňových nosičů L-Argininem**
Zadávající katedra: **Katedra netkaných textilií a nanovlákných materiálů**

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

1. Vypracování rešerše na dané téma: nanovlákné tkáňové nosiče na bázi biodegradabilních polyesterů, donory oxidu dusnatého (NO) nitrosothioly, L-Arginin, kinetika uvolňování NO, vliv NO na proliferaci endotelových a hladkosvalových buněk, na aktivaci trombocytů.
2. Experimentální část: výroba nanovlákných tkáňových nosičů obsahující donory oxidu dusnatého optimalizace procesu výroby a kinetiky uvolňování NO, testování vlivu modifikace na proliferaci endotelových buněk a hladkosvalových buněk, hodnocení trombogenicity materiálů.
3. Vyhodnocení provedených experiment a zpracování výsledků.



Rozsah grafických prací: **dle potřeby dokumentace**

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

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

Seznam odborné literatury:

1. Ratner BD et al. Biomaterials Science, Third Edition, Academic Press, 2013. ISBN: 978-0-12-374626-9.
2. Kim SE, Park KD, Kwon IK, Lee SJ, Chung KH, Kim SH, Kim YH. Controlled release of L-Arginine from Poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for the inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation, Biomaterials Research 2000;4(3):85-91.
3. Brisbois EJ, Handa H, Major TC, Bartlett RH, Meyerhoff ME. Long-term nitric oxide release and elevated temperature stability with S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP)-doped Elast-eon E2As, Biomaterials 2013;34:6957-66.
4. McCarthy CW, Guillory RJ, Goldman J, Frost MC. Transition-metal-mediated release of nitric oxide (NO) from S-Nitroso-N-acetyl-d-penicillamine (SNAP): potential applications for andogeneous release of nitric oxide at the surface of stents via corrosion products, ACS Applied Materials & Interfaces 2016;8(16):10128-35.

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

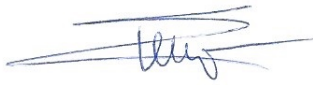
Katedra netkaných textilií a nanovlákných materiálů

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 k 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

Touto cestou bych ráda poděkovala mé vedoucí bakalářské práce RNDr. Janě Horákové Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a motivaci v průběhu celé práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Vítovi Novotnému za jeho poznatky, trpělivost a podporu zejména v experimentální části práce. Za spolupráci také děkuji Ing. Věře Jenčové Ph.D., Ing. Kristýně Havlíčkové a Ing. Petru Mikešovi Ph.D.

V neposlední řadě vděčím celé Katedře netkaných a nanovláknenných materiálů při Technické univerzitě v Liberci za poskytnutí zázemí pro provedení experimentů a za možnost účasti na projektu GAČR 17-02448S (Zvýšený růst lidských kožních buněk na biomimetických nanovláknenných maticích pro aktivní hojení ran), kterým byla práce podpořena.

ABSTRAKT

Cílem této práce byl vývoj, výroba a testování materiálů určených k hojení kožních poranění a použití pro kardiovaskulární systém. Pro testování byly vyrobeny nanovláknenné polykaprolaktonové vrstvy s aktivní složkou, viz grafický abstrakt. Aktivní látkou byl L-Arginin, který je přirozeným donorem oxidu dusnatého.

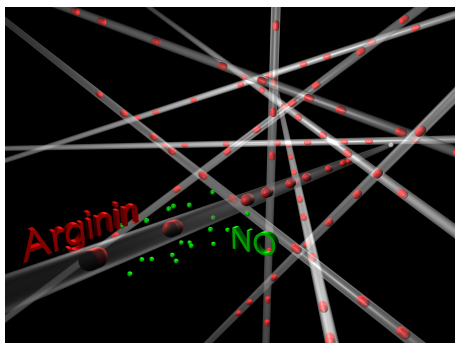
Byly použity polykaprolaktonové vrstvy s koncentrací L-Argininu od 0 do 10 hm%, byla charakterizována morfologie vrstev, byla provedena kvantifikace uvolňování L-Argininu z vrstev a biologické testování.

L-Arginin měl vliv na morfologii nanovláknenné polykaprolaktonové vrstvy a zvyšoval plošnou hmotnost vrstev a hydrofobicitu. Oplach ethanolem a pufrem snižoval uvolněné množství aminokyseliny. Uvolňování aktivní látky ze sterilizovaných nanovláknenných vrstev bez oplachu probíhalo v pufru pozvolněji a výsledná koncentrace byla větší než u uvolňování v kompletním médiu.

Byl zkoumán vliv samotného L-Argininu i extraktů z materiálů modifikovaných L-Argininem na tři buněčné linie. Samotný L-Arginin byl pro fibroblasty a endotelové buňky toxický při koncentraci vyšší než 1 % a vyšší než 0,75 % pro hladkosvalové buňky. U nižších koncentracích L-Arginin nezvyšoval viabilitu buněk. Extrakty nanovláknenných vrstev byly odebrány v průběhu 14denního experimentu. Buňky byly inkubovány s extrakty, které byly odebrány v rozmezí 1 h až 14 dní. Viabilita buněk neklesla pod mez cytotoxicity kromě 14denního extraktu vrstvy s 10 hm% L-Argininu u fibroblastů.

klíčová slova: L-Arginin, Oxid dusnatý, Polykaprolakton, Elektrostatické zvlákňování, Cílené dodávání léčiv

GRAFICKÝ ABSTRAKT



ABSTRACT

The aim of the thesis was development, fabrication and testing materials designed for wound healing and cardiovascular applications. Nanofibrous polycaprolactone layers with an active component were produced, see the graphic abstract below. The active component was L-Arginine which is a natural donor of nitric oxide.

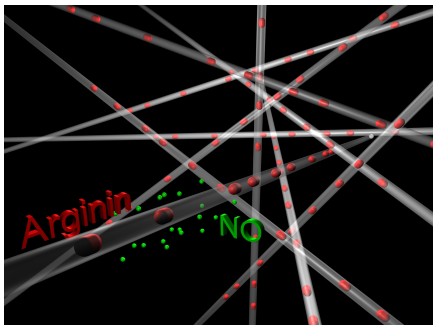
Polycaprolactone layers with concentration of L-Arginine from 0 to 10 w% were used, its morphology was characterized, quantification of L-Arginine released from layers was assessed and biological testing was carried out.

L-Arginine had an impact on morphology of the nanofibrous layer and increased its surface density and hydrophobicity. The amount of released amino acid was reduced after ethanol and buffer rinsing. The release of active component from sterilized nanofibrous layers without rinse processed in buffer gradually and the total concentration was higher than with release in complete media.

The influence of L-Arginine dissolved in medium as well as extracts from electrospun materials was tested using three cell lines. L-Arginine itself was toxic for fibroblasts and endothelial cells in concentration higher than 1 % and higher than 0,75 % for smooth muscle cells. Lower concentration of L-Arginine did not increased viability of cells. Extracts of nanofibrous layers were stored for viability testing during 14 days experiment. Cells were incubated with materials extracts taken out in range of 1 hour to 14 days. Viability of cells decreased under cytotoxic 70 % only with fibroblasts incubated in 14 days extracts of layer containing 10 w% L-Arginine.

key words: L-Arginine, Nitric oxide, Polycaprolactone, Electrospinning, Drug delivery system

GRAPHIC ABSTRACT



OBSAH

Seznam obrázků.....	11
Seznam tabulek.....	13
Seznam použitých zkratk	14
ÚVOD.....	16
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	18
1.1 Tkáňové inženýrství.....	18
1.1.2 Principy.....	18
1.1.3 Materiály pro tkáňové inženýrství.....	18
1.1.4 Tkáňové nosiče.....	21
1.1.5 Systém cíleného dodávání léčiv.....	22
1.2 Elektrostatické zvlákňování.....	23
1.2.1 Bezjehlové elektrostatické zvlákňování.....	23
1.3 Oxid dusnatý.....	24
1.3.1 Vliv oxidu dusnatého na lidský organismus.....	25
1.3.2 Syntéza oxidu dusnatého.....	26
1.4 Donory oxidu dusnatého.....	27
1.4.1 Syntetické.....	27
1.4.2 Přirozené.....	27
1.5 Buněčná biologie.....	27
1.5.1 Fibroblasty.....	28
1.5.2 Endotelové buňky.....	28
1.5.3 Hladkosvalové buňky.....	29
1.5.4 Krev.....	29
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	31
2.1 Použité materiály.....	31
2.2 Použité přístroje a programy.....	32
2.3 Příprava materiálů.....	33
2.3.1 Příprava roztoků poly(ϵ -kaprolaktonu).....	33
2.3.2 Elektrostatické zvlákňování.....	33
2.4 Charakterizace nanovláknenných vrstev.....	34
2.4.1 Morfologie.....	34
2.4.2 Plošná hmotnost.....	34

2.4.3	Smáčivost.....	34
2.5	Uvolňování L-Argininu	35
2.5.1	Předúprava materiálů.....	36
2.5.2	Kvalifikace uvolňování L-Argininu	36
2.5.3	Stabilita L-Argininu a pH.....	37
2.6	Biologické testování	38
2.6.1	Trombogenicita.....	38
2.6.2	Koagulace	38
2.6.3	Hemolýza.....	39
2.6.4	Cytotoxicita	40
2.6.5	Testování extraktů nanovláknenných vrstev s obsahem L-Argininu..	41
2.7	Zpracování statistických dat	41
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	42
3.1	Charakterizace polykaprolaktonových vrstev.....	42
3.1.1	Morfologie.....	42
3.1.2	Plošná hmotnost.....	44
3.1.3	Smáčivost.....	44
3.2	Uvolňování L-Argininu	45
3.2.1	Stabilita L-Argininu.....	48
3.3	Biologické testování	50
3.3.1	Trombogenicita.....	50
3.3.2	Koagulace	52
3.3.3	Hemolýza.....	53
3.3.4	Cytotoxicita	54
	ZÁVĚR.....	60
	Použitá literatura.....	62
	Seznam příloh.....	66

Seznam obrázků

Obr. 1	Polymerace cyklického monomeru ϵ -kaprolaktonu za otevření kruhu a vzniku poly(ϵ -kaprolaktonu).....	20
Obr. 2	Schéma strunového elektrostatického zvlákňování. 1 pohybující se dávkovač polymerního roztoku, 2 zvlákňovací elektroda – struna, 3 protielektroda – kolektor, 4 zvlákňovaná nanovlákná, 5 nosná textilie – netkaná textilie. Převzato z [14].....	24
Obr. 3	Strukturní vzorec oxidu dusnatého.....	24
Obr. 4	Přeměna L-Argininu na L-Citrulin za vzniku NO, převzato z [22].....	26
Obr. 5	Strukturní vzorce syntetických donorů NO; 1 S-nitrosothiol (SNAP), 2 Glyceryltrinitrát, 3 Diazeniumdiolát, převzato z [21].....	27
Obr. 6	Schéma vlivu NO na buňky, —> podpora; — útlum; převzato z [19].....	28
Obr. 7	Kapka destilované vody na PCL nanovláknenné vrstvě.....	35
Obr. 8	Boxplot: A minimální hodnota, B spodní kvartila, C medián, D horní kvartila, E maximální hodnota.....	41
Obr. 9	SEM nanovláknenných PCL vrstev s 0–10 hm% L-Argininu, měřítko 10 μ m.....	43
Obr. 10	Průměry vláken PCL vrstev s 0–10 hm% L-Argininu, Kruskal-Wallis test, **** p < 0,0001; n > 200.....	43
Obr. 11	Plošné hmotnosti PCL vrstev s L-Argininem s 0–10 hm%, Kruskal-Wallis test, *** p < 0,0002, **** p < 0,0001; n = 32.....	44
Obr. 12	Kontaktní úhly PCL vrstev s 0–10 hm% L-Argininu s destilovanou vodou, Bonferroniho test, * p < 0,0332; **** p < 0,0001; n = 20.....	45
Obr. 13	Uvolňování L-Argininu po 0,5 h z PCL vrstev s 5 a 10 hm% L-Argininu v PBS s rozdílnou úpravou: nesterilizovaný materiál s PBS oplachem (N-PBS), sterilizovaný materiál s PBS oplachem (PBS), sterilizovaný materiál s oplachem v ethanolu (OH); n \geq 2.....	46
Obr. 14	Uvolňování L-Argininu z PCL vrstvy s 5 hm% a 10 hm% L-Argininu v PBS po dobu 14 dní (336 h), nesterilizované vzorky s PBS oplachem (N-PBS), sterilizované vzorky bez oplachu (bez oplachu), sterilizované vzorky s PBS oplachem (PBS).....	46
Obr. 15	Uvolňování L-Argininu z PCL vrstev s 0–10 hm% L-Argininu po dobu 336 h; vlevo v PBS, vpravo v médiu.....	48
Obr. 16	Stabilita roztoku s 3 g/l L-Argininu testována po dobu 168 h ve 4 a 37 °.....	49

Obr. 17	Stabilita roztoku s 5,5 g/l L-Argininu testována po dobu 168 h ve 4 a 37 °C	50
Obr. 18	Absorbance měřená MTT testem po 2 h inkubace se suspenzí s trombocyty a kontrola (TCP), Bonferroniho test; ** p <0,0021; **** p < 0,0001; n = 10.	51
Obr. 19	SEM PCL vrstev s L-Argininem po 2 h inkubace se suspenzí s trombocyty.....	52
Obr. 20	Výsledky aktivovaného parciálního tromboplastinového času (aPTT) testovaných materiálů (PCL + 0–10 hm% L-Argininu) v porovnání s kontrolou, Kruskal-Wallis test; žádné statisticky významné odlišnosti; n = 10.	52
Obr. 21	Výsledky Quickova testu (PT) testovaných materiálů (PCL + 0–10 hm% L-Argininu) v porovnání s kontrolou, Kruskal-Wallis test; ** p < 0,0021; **** p < 0,0001; n = 10.....	53
Obr. 22	Výsledky hemolýzy testovaných materiálů (PCL + 0–10 hm% L-Argininu), negativní (NC) a pozitivní (PC) kontroly, Kruskal-Wallis test; **** p < 0,0001; n = 5.....	54
Obr. 23	Viabilita fibroblastů po inkubaci s různou koncentrací L-Argininu v porovnání s kontrolou (EBM), Kruskal-Wallis test; ** p < 0,0021; *** p < 0,0002; **** p < 0,0001.....	55
Obr. 24	Viabilita fibroblastů po inkubaci s extrakty PCL materiálů s 0–10 hm% L-Argininu v porovnání s kontrolou (DMEM); Kruskal-Wallis test u 0; 1; 10 hm% L-Arg; Bonferroniho test u 5 hm% L-Arg; * p < 0,1234; ** p < 0,0021; *** p < 0,0002; **** p < 0,0001.....	56
Obr. 25	Viabilita endotelových buněk po inkubaci s různou koncentrací L-Argininu v porovnání s kontrolou (SmBM), Bonferroniho test; ** p < 0,0021; **** p < 0,0001.....	57
Obr. 26	Viabilita endotelových buněk po inkubaci s extrakty PCL materiálů s 0–10 hm% L-Argininu v porovnání s kontrolou (EBM); Bonferroniho test; * p < 0,1234; ** p < 0,0021; *** p < 0,0002; **** p < 0,0001.....	58
Obr. 27	Viabilita hladkosvalových buněk po inkubaci s různou koncentrací L-Argininu v porovnání s kontrolou (DMEM); Kruskal-Wallis test; * p < 0,1234; ** p < 0,0021; *** p < 0,0002; **** p < 0,0001.....	59
Obr. 28	Viabilita hladkosvalových buněk po inkubaci s extrakty PCL materiálů s 0–10 hm% L-Argininu v porovnání s kontrolou (EBM); Bonferroniho test u 1; 5 hm% L-Arg; Kruskal-Wallis test u 0; 10 hm% L-Arg; ** p < 0,0021; **** p < 0,0001.....	59
Obr. PA1	SEM nanovlákněných PCL vrstev s 0–10 hm% L-Argininu, měřítko 50 μm.....	67

Obr. PB1 SEM PCL nanovlákných s L-Argininem po 2 h inkubace se suspenzí s trombocyty.....	68
---	----

Seznam tabulek

Tab. 1 Hodnoty změřeného pH během testování stability roztoků s rozdílnou koncentrací L-Argininu a teplotou během testování.....	48
--	----

Seznam použitých zkratk

3T3-SA	fibroblasty
aPTT	aktivovaný parciální tromboplastinový čas
CASMS	hladkosvalové buňky z koronárních arterií
DMF	N,N-dimethylformaldehyd
ECM	extracelulární matrix
eNOS	endoteliální enzym syntázy oxidu dusnatého
GTN	glyceryltrinitrát
HFBA	heptafluoromáselná kyselina
HUVEC	lidské umbilikální endotelové buňky
iNOS	inducibilní enzym syntázy oxidu dusnatého
INR	mezinárodní normalizovaný poměr
IS	interval spolehlivosti
L-Arg	L-Arginin
LDL	nízkodenzitní lipoprotein
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát (koenzymy oxidačně-redukčních reakcí v buňce)
NH ₃	amoniak
NO	oxid dusnatý
nNOS	neurální enzym syntázy oxidu dusnatého
NOS	enzym syntázy oxidu dusnatého
PBS	fosfátový pufr
PCL	poly(ϵ -kaprolakton)
PEO	polyethylen oxid
PLGA	kopolymer kyseliny mléčné a glykolové
PLLA	poly(L-mléčná kyselina)
PT	protrombinový čas (Quickův test)
See System	Surface Energy Evaluation System

SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SNAP	S-nitroso-N-acetylpenicillamin
TCP	upravený polystyren pro kultivaci buněk
THF	tetrahydrofuran

ÚVOD

Kardiovaskulární onemocnění jsou závažným problémem po celém světě, doprovázená i zvýšenou hladinou nízkodenzitního lipoproteinu (LDL cholesterolu) v krvi. Vlivem tohoto aspektu může dojít k ucpávání cév, jehož následkem může být cévní mozková příhoda nebo infarkt myokardu. Nejčastějším řešením kardiovaskulárních onemocnění je léčba statiny, které snižují úmrtnost na tato onemocnění, ale mají řadu vedlejších účinků, jedním z nejzávažnějších je poškození svalových buněk. O problematiku a léčbu zvýšeného LDL cholesterolu se zajímám dlouhodobě a byl to jeden z důvodů mého zájmu o téma této bakalářské práce.

Správná činnost kardiovaskulárního systému je ovlivněna mnoha faktory, významnou roli má například oxid dusnatý (NO). Oxid dusnatý má vliv nejenom na kardiovaskulární systém, ale ovlivňuje i například hojení ran. Moje prvním seznámením s NO bylo v knížce *Program Ano NO* od Louise J. Ignarra, který za objev funkce NO v kardiovaskulárním systému dostal Nobelovu cenu za medicínu. Fascinovalo mě, že stejná molekula, která je jednou ze základních složek výbušnin, ovlivňuje činnost hned několika systémů v lidském těle, kromě kardiovaskulárního například i imunitní a nervový systém.

Téma této práce vychází z projektu GAČR 17-02448S, konkrétně se zaměřením na modifikaci tkáňových nosičů bioaktivními peptidy a aminokyselinami. Tato práce se zaměřuje na problematiku polykaprolaktonových (PCL) nanovláčkových vrstev, které obsahují aktivní látku L-Arginin. L-Arginin je aminokyselina, která se nachází v lidském těle a je přirozeným donorem NO. Konkrétně se práce soustředí na uvolňování L-Argininu, jeho kvantifikaci, biologické testování použitých materiálů a vliv koncentrace aktivní látky.

Testované materiály mají potenciální využití jako nanovláčkové vrstvy pro hojení kožních poranění. Hojení poranění kůže má svůj průběh, který lze rozdělit do třech základních fází; čistící (i), granulační (ii) a epitelizační (iii) fáze. Hojení rány má delší průběh u chronických ran a kožních poranění diabetiků. Též léčba popálenin je problematická, zdoluhavá a bolestivá z důvodu převazování ran, přičemž dochází ke strhávání obnovené kůže. Právě pro zmíněné případy by léčba kožními kryty

z biodegradabilního polymeru a s aktivní látkou, která by průběh hojení urychlila, byla vhodným řešením.

Dalším možným použitím testovaných materiálů je jako maloprůměrové (< 6 mm) cévní náhrady. Maloprůměrové cévy by bylo možné vyrobit stejně jako ty velkopřůměrové (> 7 mm), které jsou na trhu dostupné, ale dochází u nich k větší tvorbě krevních sraženin a následnému ucpávání. Tudíž náhrady v podobě nanovláknenných scaffoldů se jeví jako ideální možnost pro výrobu cévních náhrad, které jsou svou strukturou cévám podobné. Přítomnost L-Argininu ve scaffoldech by mohla působit jako prevence proti tvorbě sraženin z důvodu syntézy NO, který například snižuje trombogenicitu a má další pozitivní účinky, které jsou zmíněny dále.

1 TEORETICKÁ ČÁST

Tato část představuje základní principy tkáňového inženýrství a v něm používané materiály a jejich výrobu. Soustředí se na vlastnosti a použití polykaprolaktonu a výrobu tkáňových nosičů pomocí elektrostatického zvlákňování. Důležitou částí je problematika oxidu dusnatého a jeho donorů, se zaměřením na L-Arginin a vliv oxidu dusnatého na kardiovaskulární systém a hojení ran. Poslední kapitolou teoretické části je buněčná biologie, tato kapitola byla zařazena z důvodu biologického testování v experimentální části.

1.1 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství je interdisciplinární obor, který využívá poznatky z technických oborů i přírodních věd. Zabývá se regenerací a náhradou tkání, buněk a orgánů [1].

1.1.2 Principy

Tkáňové inženýrství využívá poznatky fungování buněk a lidského organismu jako celku a snaží se vytvořit struktury, které je napodobují. V tkáňovém inženýrství existují tři typy přístupů: buněčná terapie (i), léčba pouze s použitím materiálů (ii) a poslední možností je kombinace předešlých variant (iii). Vytvořené materiály se testují v podmínkách *in vitro* a *in vivo*. *In vitro* je testování v laboratorních podmínkách na buněčných liniích a *in vivo* je testování na zvířecích modelech. Pokud testovaný materiál projde úspěšně testy *in vitro* a *in vivo*, následuje klinické testování [2].

1.1.3 Materiály pro tkáňové inženýrství

V tkáňovém inženýrství se používají především přírodní a syntetické polymery a jejich kombinace. Dále se využívají i keramické materiály, které jsou pevné a křehké, nejsou vhodné pro regeneraci měkkých tkání, ale například kostí ano [2].

Přírodní materiály neboli biopolymery mají většinou dobrou cytokompatibilitu, ale způsobují imutní a zánětlivou reakci organismu. Problémem je, že biomateriály nejsou homogenní, struktura polymeru se liší nejen mezi druhy, ale i mezi jednotlivci stejného druhu. Tudíž je problém vždy zajistit naprosto stejný materiál a je obtížné je homogenně

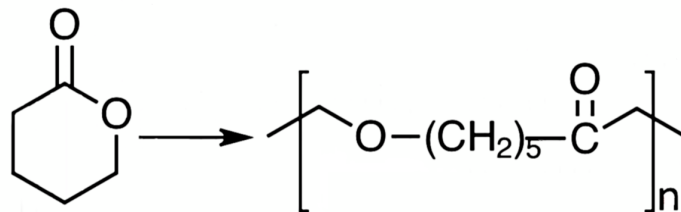
modifikovat [3]. Mezi biopolymery využívané v tkáňovém inženýrství patří například kolagen, elastin, chitosan, celulóza a kyselina hyaluronová [2].

U syntetických materiálů můžeme získat široké spektrum vlastností a lépe přizpůsobit materiál konkrétní aplikaci. Jejich výhodou oproti přírodním polymerům je reprodukovatelnost výroby. Mezi syntetické materiály, které se používají v tkáňovém inženýrství patří polyestery, z této skupiny se například používá polyglykolid, polylaktid a polykaprolakton [2].

U materiálů hraje důležitou roli zvolený polymer a jeho vlastnosti, mezi které patří například struktura, chemické složení, molekulová hmotnost, rozpustnost, teplota tání a skelného přechodu, atd. Mezi důležité aspekty používaných materiálů v tkáňovém inženýrství patří cytokompatibilita, materiál na buňky nesmí působit cytotoxicky. Dále biodegradabilita, při tomto procesu dochází k rozkladu materiálu a ani produkty jeho degradace nesmí v těle působit cytotoxicky. Některé materiály mohou být biodegradabilní, doba biodegradability je u materiálů rozdílná, může být v řádech hodin, ale i let. Podstatné jsou i povrchové vlastnosti materiálu, pro buňky je ideální, když je materiál mírně hydrofilní. Z povrchových vlastností je důležitý i velký měrný povrch, který zvyšuje adhezi buněk na materiál. Materiál by měl být z důvodu použití v medicíně snadno sterilizovatelný. Sterilizace může ovlivnit vlastnosti a chování materiálu, tudíž již při testování by materiály měly být sterilizovány [2, 4].

1.1.3.1 Poly(ϵ -kaprolakton)

Z důvodu použití poly(ϵ -kaprolaktonu) (PCL) pro testování v experimentální části je zde popsán detailněji. Poly(ϵ -kaprolakton) patří mezi alifatické polyestery, vyrábí se polymerací cyklického monomeru ϵ -kaprolaktonu, při které dochází k otevření kruhu a vzniku poly(ϵ -kaprolaktonu), viz obr. 1. Poly(ϵ -kaprolakton) je možné vyrobit s molekulární hmotností od 3 000 do 80 000 g/mol, v tkáňovém inženýrství se používá spíše vysokomolekulární PCL. Poly(ϵ -kaprolakton) je možné míchat s jinými polymery, tvořit kopolymery a docílit požadovaných vlastností [5].



Obr. 1: Polymerace cyklického monomeru ϵ -kaprolaktonu za otevření kruhu a vzniku poly(ϵ -kaprolaktonu).

Polykaprolakton patří mezi semikrystalické polymery, podíl jeho krystalické fáze se snižuje se zvyšující molekulární hmotností. Má nízký bod tání, který se pohybuje mezi 59 až 64 °C. Teplota skelného přechodu odpovídá -60 °C [5].

Polykaprolakton je hydrofóbní materiál, ale je možné tuto vlastnost změnit, aby byl výsledný polymer více hydrofilní a adhezivní [5]. Jednou z možností, jak zlepšit adhezi PCL materiálu je vytvoření kopolymeru, například s poly(*L*-mléčnou kyselinou) (PLLA). Khatri et al. [6] porovnávali adhezi buněk a mechanické vlastnosti elektrostaticky zvlákněných materiálů z PCL, PLLA a kopolymeru PCL/PLLA v poměru 1/1, 1/2 a 2/1. Testování ukázalo, že větší adhezi mají buňky na PLLA a na kopolymeru v poměru 1/2 PCL/PLLA. K materiálu z kopolymeru PCL/PLLA 1/1 měly buňky větší adhezi než ke scaffoldu z čistého PCL. Naopak materiály s větším podílem PCL měly vyšší mechanickou pevnost.

Croisier et al. [7] testovali PCL vlákna a PCL elektrostaticky zvlákněné scaffoldy. Materiály byly vyrobeny z PCL o molekulární hmotnosti 80 000 g/mol, PCL byl rozpuštěn v poměru 1/1 v tetrahydrofuranu/*N,N*-dimethylformaldehydu (THF/DMF) v koncentraci 15 hm%, průměry vláken se pohybovaly mezi 250 a 700 nm. Youngův modul pružnosti testovaných scaffoldů byl $3,8 \pm 0,8$ MPa a u jednotlivých vláken $3,7 \pm 0,7$ GPa.

Polykaprolakton patří mezi polymery s časově delší biodegradabilitou. Degradace čistého polymeru PCL trvá dva až čtyři roky, doba degradace záleží na počáteční molekulová hmotnosti materiálu, morfologii, atd [5].

Sterilizace je při použití materiálu jako zdravotnického prostředku nebo nosiče léčiv prakticky nezbytná. U PCL se nepoužívá sterilizace horkou párou, z důvodu jeho nízkého

bodů tání by sterilizace materiál poškodila. Nejvíce se používá sterilizace plynem, ethylen oxidem [5]. Další možností sterilizace PCL materiálů je gama zářením, u kterého je dobrý antiseptický efekt. Sterilizace gama zářením snižuje čas degradace a dochází ke snížení molekulární hmotnosti, ale způsobuje také síťování a mírné zvýšení krystalinity polymeru. Má negativní vliv na mechanické vlastnosti polymeru, snižuje pevnost v tahu a Youngův modul pružnosti. Sterilizace nemá vliv na adhezi, proliferaci a viabilitu buněk na materiálu. Sterilizace gama zářením je v porovnání například se sterilizace ethylen oxidem dražší proces [5, 8, 9].

Díky svým mechanickým a viskoelastickým vlastnostem patří PCL mezi polymery, se kterými lze snadno pracovat, jehož výroba není příliš nákladná a je vhodný pro použití v mnoha oblastech. V tkáňovém inženýrství se testuje jeho potenciální využití například jako náhrady kostí, chrupavčitých tkání, obnovení šlach a vazů, také v oblasti kardiovaskulárního inženýrství, které zahrnuje cévní náhrady a v neposlední řadě obnova kůže a aplikace v nervovém aparátu [5].

1.1.4 Tkáňové nosiče

Tkáňové nosiče neboli scaffoldy jsou 3D struktury, které se snaží simulovat přirozené prostředí pro buňky, fungují jako syntetická mezibuněčná hmota. Úkolem scaffoldů je vytvoření vhodných podmínek pro buňky s požadovanými mechanickými vlastnostmi tak, aby mohly fungovat jako jejich dočasná opora a aby došlo k regeneraci poškozené tkáně [1, 2].

Vhodnou interakci scaffoldů s buňkami ovlivňuje několik faktorů, můžeme je rozdělit na aspekty, které ovlivňuje volba materiálu (viz kapitola 1.1.3) a ty, na které má vliv struktura scaffoldu. Tkáňový nosič musí mít vhodnou morfologii a mechanické vlastnosti. Mezi podstatné mechanické vlastnosti tkáňových nosičů patří například pevnost, ohebnost a tvrdost. Morfologie zahrnuje průměry vláken a porozitu scaffoldů. U porozity scaffoldů je důležitá velikost pórů, jejich hustota, propojení a povrchová plocha scaffoldu [1, 2]. Ideální tkáňový nosič by měl mít vhodnou pórovitou strukturu pro buňky, aby mohly adherovat, proliferovat a migrovat [10]. Tkáňové nosiče mohou být inertní nebo biodegradabilní. Stupeň degradace scaffoldu je ovlivněn mnoha faktory,

především použitým materiálem, geometrií scaffoldu a podmínkami prostředí [1]. V neposlední řadě je velice důležité, zda je možné scaffold vyrobit a za jakou cenu, aby měl uplatnění na trhu [2].

1.1.5 Systém cíleného dodávání léčiv

Systém cíleného dodávání léčiv neboli drug delivery system spočívá v kontrolovaném uvolňování aktivní látky, která je inkorporována do materiálu. U aktivní látky je důležité dbát na uvolněné množství, aby její koncentrace nepřekročila hranici, kdy už by pro tělo byla toxická, a zároveň musí být koncentrace taková, aby přítomnost aktivní látky měla požadovaný efekt [4].

Polykaprolakton je vhodný pro dlouhodobé kontrolované uvolňování léčiv. Doba uvolnění aktivní látky je závislá na typu scaffoldu, způsobu přípravy, velikosti a koncentraci uvolňované látky. Polykaprolakton je například zkoumán pro uvolňování proteinů a peptidů [5]. Goreninskii et al. [11] testovali elektrostaticky zvlákněné PCL nanovlákněné scaffoldy. Polykaprolakton byl rozpuštěný v hexafluoro-2-propanolu a do roztoku byl přidán L-Arginin od 0 do 7 hm%. Na základě experimentů bylo zjištěno, že přítomnost L-Argininu ve vrstvě ovlivňuje morfologii, mechanické a biologické vlastnosti materiálu. Se zvyšující koncentrací L-Argininu došlo ke snížení průměru vláken, zvýšení krystalinity, prodloužení, pevnosti a Youngovu modulu. Byla testována i adheze a viabilita kmenových buněk s materiály, adheze buněk se zvyšovala se vzrůstajícím hm% L-Argininu ve vrstvě, viabilita do 1 hm% vzrůstala, ale od 3 hm% klesala.

Problematikou použití L-Argininu jako aktivní látky pro cílené dodávání léčiv se zabýval i Sung et al. [12] pro léčbu restenózy (zúžení aorty). Do biodegradabilních vrstev kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) inkorporoval L-Arginin s koncentrací 10–15 hm% a testoval vliv uvolňování L-Argininu během 10 dnů na hladkosvalové buňky. Vlivem L-Argininu došlo ke snížení proliferace hladkosvalových buněk.

1.2 Elektrostatické zvlákňování

Existuje mnoho možností, jak vytvořit scaffolds pro tkáňové inženýrství. Vždy se musí dbát na použití a požadované vlastnosti scaffoldu. Elektrostatické zvlákňování neboli elektrospinning umožňuje vyrábět vlákna v rozměrech desítek až stovek nanometrů s vysokou porozitou obdobnou mezibuněčné hmotě. Je možné zvlákňovat syntetické, přírodní polymery a jejich kopolymery či směsi. Do zvlákňovacího roztoku lze přidávat i další látky jako jsou například léčiva, proteiny nebo živé buňky [13].

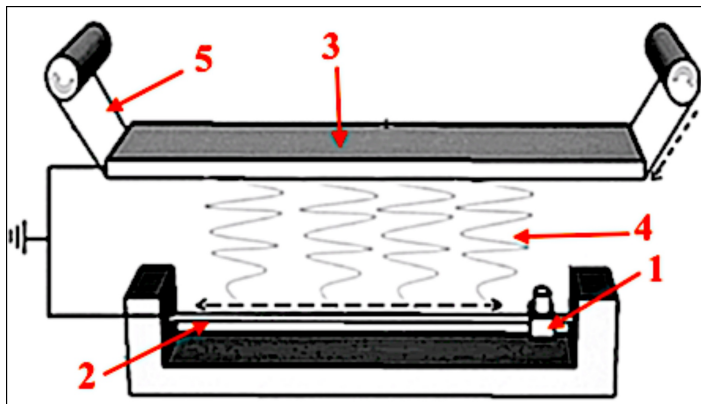
Zařízení pro elektrostatické zvlákňování se skládá ze zdroje elektrického napětí, elektrodou v podobě zvlákňovací trysky, která je propojená s dávkovacím zařízením polymeru a kolektoru s opačným nábojem [14]. Při elektrostatickém zvlákňování mohou vznikat vlákna, kapky nebo korálová struktura. Běžně při elektrostatickém zvlákňování vznikají vlákna v rozmezí 100 až 500 nm [13].

Elektrostaticky zvlákněné materiály mohou být využity nejen jako tkáňové nosiče a drug delivery v tkáňovém inženýrství a medicíně, ale také jako filtry nebo vyztužení [14].

1.2.1 Bezjehlové elektrostatické zvlákňování

K výrobě nanovláknenných vrstev popsaných v experimentální části byl použit stroj Nanospider™ firmy Elmarco. Pomocí Nanospideru™ lze vyrábět nanovláknenné vrstvy principem elektrostatického zvlákňování v průmyslovém měřítku bez použití zvlákňovací trysky [15]. Pro výrobu planárních vrstev použitých v experimentální části bylo konkrétně použito strunové zvlákňování.

Zařízení Nanospideru™ znázorňuje náčrt na obr. 2. Zvlákňovat je možné polymerní roztok nebo taveninu, která je umístěna v dávkovacím zařízení (1). Dávkovací zařízení se pohybuje po nabitých elektrodě - struně (2), aby došlo k nanesení tenké polymerní vrstvy po délce struny. Další částí stroje je protielektroda - uzeměný kolektor (3). Mezi kolektorem a elektrodou dochází ke vzniku elektrického pole, jehož působením se tvoří nanovláknena (4). Nanovláknena jsou ukládána například na netkanou textílii (5), která se postupně posouvá [14, 15].

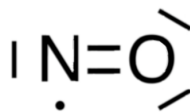


Obr. 2: Schéma strunového elektrostatického zvlákňování. 1 pohybující se dávkovač polymerního roztoku, 2 zvlákňovací elektroda – struna, 3 protielektroda – kolektor, 4 zvlákňovaná nanovláknna, 5 nosná textilie – netkaná textilie. Převzato z [14].

Výsledný materiál lze ovlivnit zvolenými parametry zvlákňování. Parametry lze rozdělit na procesní, materiálové a okolní podmínky. Materiálové podmínky ovlivňuje volba polymeru, rozpouštědla a vlastnosti zvlákňovacího roztoku, například viskozita, povrchové napětí, atd. Mezi procesní parametry patří velikost elektrického napětí, vzdálenost elektrod, rychlost dávkování polymeru, rychlost posuvu nosné textilie, atd. Hlavními okolními podmínkami, které ovlivňují zvlákňování jsou teplota a vlhkost [14].

1.3 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý (NO) je za normálních podmínek jedovatý plyn. Skládá se z dusíku a kyslíku, viz obr. 3. NO byl dlouhou dobu známý pouze jako jedovatý plyn, až v osmdesátých letech byla objevena úloha NO v kardiovaskulárním systému [16]. Nobelovu cenu za to v roce 1998 za medicínu získali Drs. Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro a Ferid Murad [17]. Od té doby došlo k mnohým objevům, které potvrzují, že NO hraje důležitou roli v mnoha fyziologických procesech [16].



Obr. 3: Strukturální vzorec oxidu dusnatého.

1.3.1 Vliv oxidu dusnatého na lidský organismus

Oxid dusnatý má vliv na různé fyziologické procesy, ovlivňuje kardiovaskulární, imunitní a nervový systém. Jeho vznik je katalyzovaný přítomností enzymů syntázy oxidu dusnatého (NOS). Ovlivňuje vazodilataci (rozšíření cév), proliferaci, diferenciaci a apoptózu buněk. Například pokud přirozená syntéza NO nefunguje a dojde k poklesu produkce NO, může docházet k ateroskleróze, čímž se sníží průtok krve a může to vést až k ucpání cévy [16, 18, 19]. Působení NO na jednotlivé buněčné typy se liší, viz kapitola 1.5.

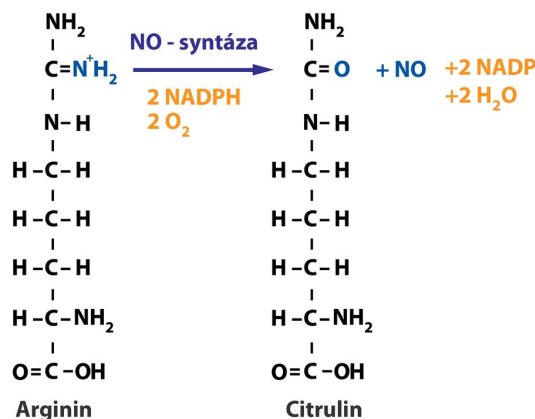
Oxid dusnatý v neposlední řadě ovlivňuje hojení ran, což bylo potvrzeno studiemi na zvířatech i lidech. Hojení ran má systematický průběh, který zahrnuje řadu překrývajících se procesů. Probíhá zánět, srážení krve, dochází k rozšíření cév a tvorbě nových, tvorbě mezibuněčné hmoty, proliferaci buněk a nakonec k zarůstání rány novou kůží. Hojení chronických ran probíhá odlišně. Mezi chronické rány patří například proleženiny, tlakové, žilní a diabetické vředy. U diabetiků je hojení ran pomalejší než u zdravých lidí, klíčovou roli zde hraje zvýšený obsah superoxidu, který způsobuje dysfunkci NO. Konkrétně NO při hojení ran zvyšuje proces tvorby nových krevních kapilár a ovlivňuje proces zánětu. NO má pozitivní vliv na endotelové buňky, zabraňuje apoptóze a stimuluje proliferaci. V neposlední řadě má NO vliv na zvýšení obsahu kolagenu při hojení [20].

Způsob, jak zvýšit produkci NO by bylo přidání L-Argininu do stravy, aby došlo ke zlepšení ukládání kolagenu a pevnosti rány. Ale protože se L-Arginin podílí i na jiných procesech v těle, zvýšením příjmu L-Argininu nedojde ke zlepšení hojivosti. Řešením by mohla být přímá aplikace na ránu [20].

Přítomnost NO v těle nemá pouze pozitivní dopad, vyšší koncentrace může být nebezpečná, může například vést k septickému šoku. Existují hypotézy, že zvýšená hladina NO ovlivňuje funkci mozku a způsobuje jeho poškození, především u mozkové mrtvice, senility a roztroušené skleróze. Negativní vliv má nadprodukce NO i na revmatoidní artritidu a krevní tlak, urinární problémy a schizofrenii [21].

1.3.2 Syntéza oxidu dusnatého

NO vzniká v těle přirozeně v různých typech buněk při přeměně L-Argininu na L-citrullin, kterou vyvolává enzym syntázy oxidu dusnatého (NOS). Byly popsány tři NOS izoformy, endoteliální NOS (eNOS), neurální NOS (nNOS) a indukibilní NOS (iNOS) [20]. Izoforma eNOS se vyskytuje hlavně v endotelových buňkách, hladkosvalových buňkách, kardiomyocytech, kostních buňkách a neurenech. Neurální NOS jsou především v neuronech, ale nachází se i ve slinivce břišní a ledvinách. Indukovatelné NOS reagují na podnět, čímž může být například zánět, existují v mnoha typech buněk, například v makrofázích a hladkosvalových buňkách. Izoformy NOS se od sebe liší, například eNOS a nNOS vytváří NO v nanomolární množství, iNOS v mikromolární koncentraci. Aktivita eNOS a nNOS je závislá na koncentraci Ca^{2+} , iNOS nikoli [16, 18]. NO vzniká při přeměně L-Argininu na L-citrulin, která je katalyzována NOS. Schéma NO syntézy viz obr. 4. Reakce je ovlivněna řadou kofaktorů, především aktivitou a dostupností NOS a koenzymů oxidačně-redukčních reakcí v buňce (NADPH) [18].



Obr. 4: Přeměna L-Argininu na L-Citrulin za vzniku NO, převzato z [22].

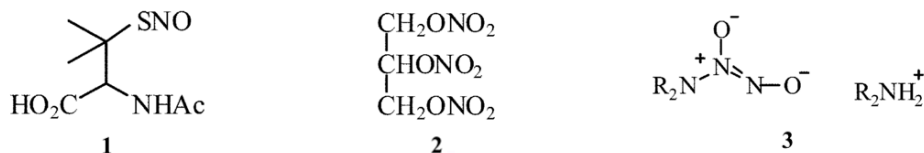
Působení oxidu dusnatého trvá několik vteřin, následným produktem jsou dusitany. Dusitany nejsou pouze konečným produktem NO syntázy, ale mohou fungovat jako základ pro produkci NO enzymatickou nebo neenzymatickou cestou. Množství dusitanů v těle je malé, aby došlo k vazodilataci cév. Ale pokud je v tkáních snížené množství kyslíku, dojde k reakci deoxyhemoglobinu, vzniku NO a rozšíření cév [16].

1.4 Donory oxidu dusnatého

Vývoj donorů NO pro klinické použití se zkoumá z důvodu případů, kdy je v těle nedostatek NO nebo pro jeho využití v situacích, kdy je možné využít jeho biologických vlastností [21]. Donory NO můžeme rozdělit na přirozené a syntetické.

1.4.1 Syntetické

NO může v těle vznikat i při podání farmaceutických NO donorů, které mají schopnost cílit na buňky, liší se různými způsoby uvolňování NO [16]. Mezi nejpoužívanější syntetické donory NO (viz obr. 5) patří S-nitrosothioly, Glyceryltrinitrát (2) a Diazeniumdioláty (3). Mezi nejpoužívanější donory ze skupiny S-nitrosothiol patří S-nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP) (1) [21]. Glyceryltrinitrát se používá i v klinické praxi pod názvem nitroglycerin při léčbě srdečního onemocnění anginy pectoris [23].



Obr. 5: Strukturní vzorce syntetických donorů NO; 1 S-nitrosothiol (SNAP), 2 Glyceryltrinitrát, 3 Diazeniumdiolát, převzato z [21].

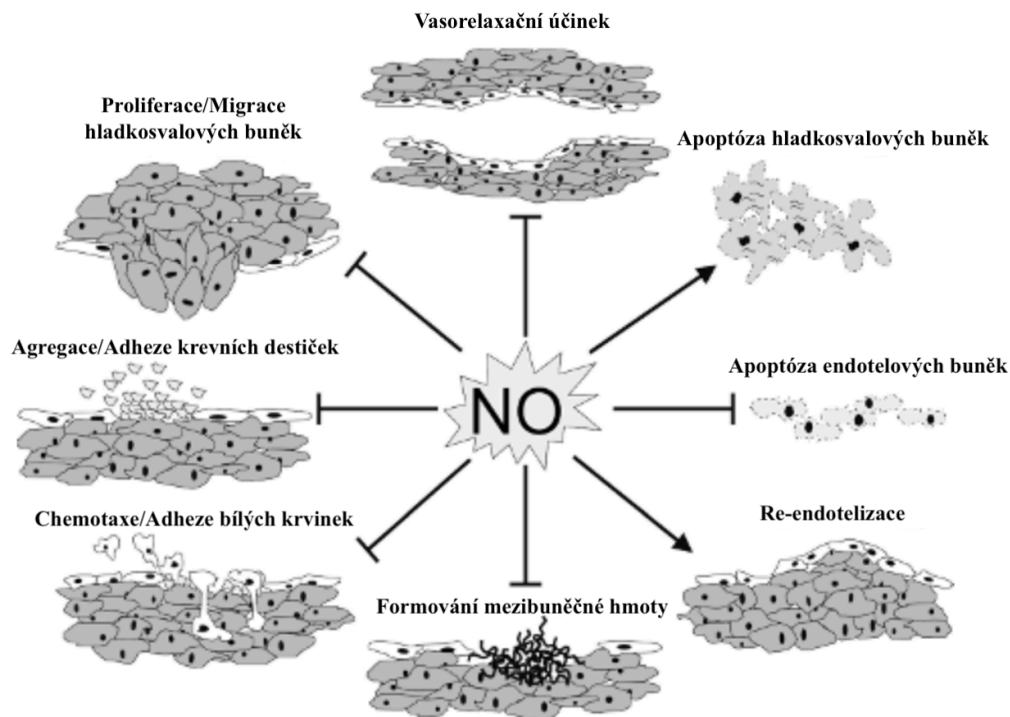
1.4.2 Přirozené

V rámci experimentální části byl používán přirozený donor NO, kterým je L-Arginin. Přeměna L-Argininu na L-Citrulin za vzniku NO je popsána výše, viz kapitola 1.3.2. L-Arginin patří mezi běžné volně prodejné doplňky stravy, které využívají hlavně sportovci před tréninkem, aby došlo k lepšímu zahřátí svalů a vyššímu sportovnímu výkonu a po tréninku pro zvýšení obnovy a růstu svalstva [24].

1.5 Buněčná biologie

Materiály testované v experimentální části mají potenciální použití jako kožní kryty a pro kardiovaskulární systém, tudíž biologické testování bylo důležitou součástí experimentu. Z tohoto důvodu byla do teoretické části zařazena i kapitola, která se věnuje

buněčné biologii, popisuje použité buňky, testované jevy a vliv NO. Obr. 6 zobrazuje schéma vlivu NO na buňky.



Obr. 6: Schéma vlivu NO na buňky, —> podpora; —| útlum; převzato z [19].

1.5.1 Fibroblasty

Fibroblasty se nachází v pojivové tkáni, která vyplňuje prostor mezi orgány a tkáněmi. V pojivu mají fibroblasty větvenovitý tvar a produkují extracelulární matrix neboli mezibuněčnou hmotu (ECM), která je bohatá na kolagen [18, 25].

Oxid dusnatý zvyšuje produkci kolagenu. U fibroblastů byl pozorován vliv donorů NO S-nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP), kdy u potkanů docházelo ke snížení, ale u myši ke zvýšení proliferace buněk [20].

1.5.2 Endotelové buňky

Endotelové buňky patří mezi epiteliální buňky. Nachází se v cévách, kde tvoří buněčnou vrstvu, která je propojena a slouží jako cévní výstelka [25]. Působením NO dochází u endotelových buněk ke zvýšení proliferace a migrace buněk a k útlumu apoptózy [16].

1.5.3 Hladkosvalové buňky

Hladkosvalové buňky neboli myocyty se nachází v hladké svalovině, která je ve vnitřních orgánech a cévní hladká svalovina je ve všech částech oběhového systému kromě kapilár. Hladkosvalové buňky tvoří hlavní složku střední vrstvy stěn cév. Buňky jsou protáhlé, mají vřetenovitý tvar a jedno jádro. Hladkosvalové buňky jsou propojeny, takže mezi nimi může docházet k přenosu informací. Hladkosvalové buňky produkují složky ECM [18, 26].

Působením NO na hladkosvalové buňky dochází k roztažení cév, které zlepšuje proudění krve, ulehčuje práci srdci a snižuje se spotřebu kyslíku. Uvolněný NO pronikne do sousedních buněk, ale jeho působení je pouze lokální, protože mimo buňku existuje pouze po dobu 5–10 s [25]. Dále NO utlumuje hyperproliferační a migrační hladkosvalových buněk, které by jinak mohly způsobit zúžení cévy [16].

1.5.4 Krev

Krev je tělní tekutina, která se skládá z krevní plazmy a krevních elementů. Mezi krevní elementy patří červené krvinky (erytrocyty), bílé krvinky (leukocyty) a krevní destičky (trombocyty) [27].

Makrofágy patří mezi bílé krvinky, jsou to buňky, které jsou schopné fagocytózy neboli mohou pohlcovat bakterie a poškozené buňky například v místě infekce [25]. Oxid dusnatý ovlivňuje migraci buněk do místa zánětu (chemotaxi) a adhezi bílých krvinek [19].

Krevní plazma je tekutá, složená z 93 % z vody, dále se skládá z proteinů a dalších látek, například z plynů, solí, tuků, atd. Krevní plazma tvoří ECM krve [18, 26]. Erytrocyty jsou buňky, které nemají jádro, jejich úlohou je transportovat kyslík a oxid uhličitý. Erytrocyty obsahují červené krevní barvivo hemoglobin. Při rozpadu erytrocytů dochází k vyplavení hemoglobinu, tento jev se nazývá hemolýza [27]. Trombocyty jsou buňky bez jádra, které se podílejí na srážení krve (koagulace) [18]. Při trombóze dochází ke srážení krve v cévách, k jejich ucpávání a zhoršení průtoku krve [28]. Působením NO se u krevních destiček snižuje jejich adheze, aktivace a agregace [16].

V krevní plazmě lze testovat koagulaci změněním času, kdy ke koagulaci dojde. Krevní srážlivost se zjišťuje koagulačním testem aPTT a PT. Aktivovaný parciální

tromboplastinový čas (aPTT) analyzuje vnitřní koagulační systém a společnou cestu. Protrombinový test (PT) neboli Quickův tromboplastinový test monitoruje vnější koagulační systém a společnou cestu. Systémy aPTT a PT se spojují u přeměny na trombin a poté dochází k přeměně fibrogeneru na fibrin [29].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část se zabývá uvolňováním L-Argininu z elektrostaticky zvlákněných polykaprolaktonových vrstev. Nanovlákněné vrstvy byly zvlákněny s různým hm% L-Argininu od 0 do 10 hm%. Používané planární vrstvy byly charakterizovány svou morfologií, plošnou hmotností a smáčivostí. V rámci biologického testování byla zjišťována hemokompatibilita materiálů (testování trombogenicity, koagulace a hemolýzy). Bylo provedeno *in vitro* testování s fibroblasty, hladkosvalovými buňkami a endotelovými buňkami, cílem bylo otestovat cytotoxicitu extraktů materiálů.

2.1 Použité materiály

- PCL: $M_n = 45\,000$ g/mol, teplota tání (T^m) = 60 °C, hustota = 1,145 g/mL (při 25 °C), polydisperzita = <2 (Sigma Aldrich)
- Chloroform (Penta)
- Ethanol (Penta)
- L-Arginin (Sigma Aldrich) – v podobě namletého prášku
- Fosfátový pufr PBS (pH = 7,4)
- Glutaraldehyd v PBS (Sigma Aldrich)
- Kyselina heptafluoro máselná (HFBA) (Sigma Aldrich)
- Amoniak (Emsure Merck)
- Kyselina mravenčí (Penta)
- Lidské umbilikální endotelové buňky (HUVEC, pasáž 7, Lonza)
- Hladkosvalové buňky z koronárních arterií (CASMS, pasáž 6, Lonza)
- Myší fibroblasty (3T3-SA, pasáž 20, ATCC)
- Triton X-100 (Sigma Aldrich)
- Kompletní médium (DMEM + 10% fetálního bovinního séra (FBS) + 1% směsi antibiotik – penicilin, streptomycin, amfotericin B +1% glutamin, Biosera)
- Médium EBM (Lonza), obohacené o FBS, antibiotika (gentamicin, amfotericin B), kyselinu askorbovou, bovinní extrakt mozku (BBE – bovine brain extract), heparin, endotelový růstový faktor (hEGF) a hydrokortison

- Médium SmBM (Lonza), obohacené o FBS, gentamicin, insulin, fibroblastový růstový faktor (hFGF-B) a endotelový růstový faktor (hEGF)
- Metabolické testy: Cck-8 (Dojindo), MTT (Amresco)
- Composol PS – náhradní roztok pro trombocyty (Fresenius Kabi)
- Azid sodný (Sigma Aldrich)

2.2 Použité přístroje a programy

- Nanospider™ NS LAB (Elmarco)
- Sterilizátor AN 74i (Anprolene)
- Přístroj na nanášení nanovrstvy zlata pro zvýšení vodivosti Quorum Q150R ES (Quorum technologies)
- Analytické váhy ALT 124-I Analytical Scale (Acculab Sartorius Group)
- Skenovací elektronový mikroskop Vega 3SB (Tescan)
- NIS Elements AR 4.30.00 (Nikon Instruments)
- Surface Energy Evaluation System (See System, Advex Instruments)
- Inkubátor Biological Thermostat 120 (Laboratorní přístroje Praha)
- HPLC systém Ultimate 3000 (Dionex) s připojeným UV-VIS diode array detektorem a ELSD detektorem Varian LC-385
- Chromeleon 6.80 SR12
- Kolona Kinetex F5 (Phenomenex)
- pH metr pH 700 (Eutech Instruments)
- Spektrofotometr (Tecan Spark)
- GraphPad Prism 7 Software (GraphPad Software)
- Microsoft Excel (Microsoft)
- Automatický analyzátor BCS XP (Siemens)
- Centrifuga (Hermle)

2.3 Příprava materiálů

2.3.1 Příprava roztoků poly(ϵ -kaprolaktonu)

Pro přípravu roztoků byl použit polykaprolakton rozpouštěný v systému chloroform/ethanol v objemovém poměru 9/1. Byly připraveny roztoky o koncentraci 16 hm% PCL s přídavkem L-Argininu v podobě namletého prášku o hmotnostních koncentracích 0, 1, 5 a 10 hm%.

Roztok, který neobsahoval L-Arginin byl připraven pouze rozpuštěním navážky PCL v rozpouštědle. U suspenzí s L-Argininem byla nejprve dána navážka L-Argininu rozmíchána pomocí magnetického míchadla po dobu 30 až 40 minut v rozpouštědlovém systému při pokojové teplotě. Poté z důvodu homogenního rozptýlení částic následovala sonifikace suspenze po dobu 10 minut. Nakonec byla přidána navážka PCL, která byla rozmíchána, aby došlo k jejímu úplnému rozpuštění. I po rozmíchání zůstaly v suspenzi malé nerozmíchané části L-Argininu, především u 10 hm% koncentrace. Po přípravě byly roztoky/suspenze ihned zvlákněny.

2.3.2 Elektrostatické zvláknění

Planární vrstvy byly elektrostaticky zvlákněny pomocí přístroje Nanospider™ NS LAB . Zvlákněná byla 100 g roztoku/suspenze o 16 hm% PCL o dané koncentraci L-Argininu.

Zvláknění probíhalo ze struny o průměru 0,2 mm, na kterou byl polymerní roztok/suspenze konstantně nanášen ze zásobníku přes kruhovou štěrbinu o průměru 0,6 u čistého PCL a 0,7 mm u suspenze PCL s L-Argininem rychlostí 300 mm/s. Pro zvláknění PCL s L-Argininem byl zvolen průměr kruhové štěrbinu větší z důvodu ucpávání částicemi L-Argininu při použití štěrbinu s průměrem 0,6 mm. Vlákna byla ukládána na podkladovou netkanou textilií o šíři 500 mm a byla odtahována rychlostí 12 mm/min. Zvláknovací struna byla od kolektoru vzdálena 200 mm. Použité napětí bylo 50 kV pro strunu a -10 kV pro kolektor.

Okolní podmínky byly konstantní, teplota byla udržována na 23 °C a relativní vlhkost na 30 %.

2.4 Charakterizace nanovláknenných vrstev

2.4.1 Morfologie

Morfologie materiálů byla zanalyzována pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Vzorky z materiálů byly umístěny na terčíky a pozlaceny 7 nm silnou vrstvou. Nakonec byly vzorky zanalyzovány SEM.

Pokud byly materiály testovány s buněčnými liniemi ve vodném prostředí, musely nejprve projít ethanolovou řadou s postupně vzrůstající koncentrací ethanolu (60 %, 70 %, 80%, 90%, 96% a 100 %). Poté byly materiály vysušeny, pozlaceny a zanalyzovány SEM.

V rámci hodnocení morfologie byly měřeny ze SEM snímku průměry vláken. Vlákna byla měřena v programu NIS Elements AR 4.30.00 Od každého materiálu byly pořízeny dva snímky ve zvětšení 5000×, z každého snímku bylo pořízeno minimálně 100 měření.

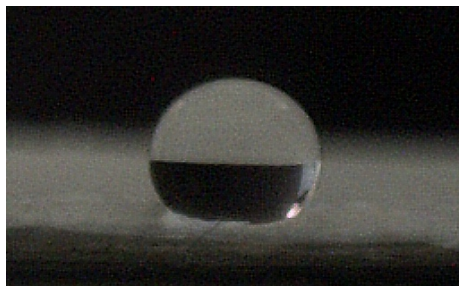
2.4.2 Plošná hmotnost

Plošná hmotnost byla zjištěna zvážením vzorků na analytických vahách o rozměrech 1×1 cm. Od každého materiálu bylo zváženo 32 vzorků. Z výsledků byla spočítána plošná hmotnost v g/m^2 .

2.4.3 Smáčivost

Smáčivost byla zjišťována měřením kontaktního úhlu smáčení metodou sedící kapky (viz obr. 7). Od každého materiálu byly testovány dva vzorky o velikosti $7,5 \times 2,5$ cm, u každého vzorku bylo provedeno 10 měření. Výsledky byly vyhodnocovány v softwaru Surface Energy Evaluation (See System).

Vzorek byl přilepen na mikroskopické sklíčko oboustrannou lepící páskou a pomocí mikropipety bylo na vzorek nanášeno $3,5 \mu\text{l}$ destilované vody. Kamerou byla zachycena kapka a pomocí See Systemu byla zanalyzována. Pro zjištění kontaktního úhlu byly na kapce vyznačeny tři body, kterými byla opsána kružnice, jenž odpovídala tvaru kapky. Kontaktní úhel odpovídá tangenti opsané kružnice.



Obr. 7: Kapka destilované vody na PCL nanovlákně.

2.5 Uvolňování L-Argininu

V rámci experimentální části proběhly dva experimenty uvolňování L-Argininu, jeden probíhal v pufru PBS a druhý ve třech různých médiích.

Při prvním testování uvolňování L-Argininu byly připraveny vzorky z nanovlákněných PCL vrstev o různých hm% L-Argininu (0 hm%, 5 hm% a 10 hm%). Z vrstev byly připraveny tři sady po 2–3 vzorcích, každý vzorek vážil 50 ± 2 mg. Vzorky byly umístěny v plastových 15 ml zkumavkách a inkubovány v 5 ml pufru PBS v inkubátoru při 37 °C a testovány po dobu 14 dní. Výluhy byly odebírány v pěti časových intervalech, po 1 h, 4 h, 24 h, 168 h a 336 h od počátku experimentu. Po uplynutí doby inkubace byl vždy odebrán 1 ml výluhu a uchován v lednici pro kvantifikaci uvolňování L-Argininu. Následně byl celkový objem PBS doplněn na 5 ml.

V rámci testování uvolňování L-Argininu byla testována i předúprava vzorků a její vliv na uvolňování aktivní látky a na morfologii nanovlákněných vrstev. Konkrétně byl sledován vliv sterilizace ethylen oxidem, oplachu ethanolem a oplachu PBS. Morfologie zkoumaných vzorků byla po testování a vysušení zanalyzována pomocí SEM.

Při druhém testování uvolňování L-Argininu byly připraveny vzorky z nanovlákněných PCL vrstev s 0 hm%, 1 hm%, 5 hm% a 10 hm% L-Argininem. Vzorky o navážce 50 ± 2 mg byly připraveny po třech sadách, v každé sadě byly od každého materiálu dva vzorky. Před testováním byly všechny vzorky vysterilizovány ethylen oxidem. Celé testování probíhalo stejně jako první, výluhy byly odebírány ve stejných časových intervalech, ale materiály nebyly inkubovány v PBS, ale ve třech různých médiích. Bylo použito kompletní médium pro fibroblasty (DMEM), médium pro

endotelové buňky (EBM) a médium pro hladkosvalové buňky (SmBM). K nanovlákným vrstvám bylo přidáno 5 ml média. Po uplynutí doby inkubace byl vždy odebrán 1 ml média a zamražen pro kvantifikaci uvolňování L-Argininu a testování *in vitro*. Následně byl celkový objem doplněn na 5 ml. Pro kontrolu bylo na počátku experimentu zamraženo také čerstvé médium.

2.5.1 Předúprava materiálů

V rámci prvního testování uvolňování L-Argininu z nanovlákných PCL vrstev v PBS byl hodnocen i vliv předúpravy vzorků na uvolňování aktivní látky. Byly použity následující předúpravy.

2.5.1.1 Sterilizace ethylen oxidem

Před sterilizací byly připravené materiály vloženy dle dalšího použití do plastových zkumavek, ependorfových zkumavek nebo do kultivační destičky. Poté byly umístěny do sterilizační fólie, která byla po stranách zatavena. Sterilizace ethylen oxidem probíhala ve sterilizátoru AN 74i po dobu 12 h při pokojové teplotě. Po sterilizaci byly materiály vždy minimálně týden odvětrány při pokojové teplotě.

2.5.1.2 Oplach ethanolem

Při předúpravě formou oplachu 70 % ethanolem byly materiály smočeny v 5 ml 70 % ethanolu po dobu 30 minut. Poté byly odebrány vzorky a materiály byly usušeny na vzduchu při pokojové teplotě.

2.5.1.3 Oplach pufrem

Pro oplach byl použit pufr PBS s přidavkem 1 % azidu sodného z důvodu zábrany kontaminace. Materiály byly smočeny v 5 ml PBS po dobu 30 minut. Po uplynutí doby byly odebrány vzorky a zbytek objemu pufru. Poté následoval experiment, viz kapitola 2.5.

2.5.2 Kvalifikace uvolňování L-Argininu

Uvolňování L-Argininu z PCL vrstev bylo hodnoceno vysoce účinnou kapalinovou chromatografií. Při analýze výluhů z nanovlákných materiálů byly vzorky nejprve okyseleny a bylo do nich přidáno iontově párové činidlo. Toho se docílilo naředěním vzorků roztokem obsahujícím 1% kyselinu mravenčí a 0,5% kyselinu heptafluoromáselnou (HFBA) alespoň v poměru 1:1. Promíchaný vzorek byl přefiltrován přes nylonový

stříkačkový filtr o průměru 13 mm s velikostí pórů 0,22 μm do 2 ml vialky. Bylo zapotřebí přefiltrovat alespoň 500 μl naředěného vzorku, vialka byla poté umístěna do autosampleru.

Pro stanovení argininu byl použit HPLC systém Ultimate 3000 s připojeným UV-VIS diode array detektorem a ELSD detektorem Varian LC-385. Přístroj byl ovládán softwarem Chromeleon 6.80 SR12. Separace probíhala na koloně Kinetex F5. Velikost částic byla 2,6 μm , délka kolony 150 mm a vnitřní průměr kolony 4,6 mm. Složka A mobilní fáze byla tvořena 0,1 % roztokem HFBA ve vodě a molárním ekvivalentem NH_3 , složka B byla tvořena acetonitrilem. Bylo použito složení mobilní fáze obsahující 95 % složky A a 5 % složky B. Rychlost průtoku mobilní fáze byla po celou dobu 1,5 ml/min. Kolona byla udržována při teplotě 40 $^{\circ}\text{C}$. Bylo nastříkováno 20 μl vzorku. Byl zaznamenáván signál při vlnových délkách 200, 210, 220 a 270 nm a signál ELSD detektoru. Chromatogramy byly zaznamenávány do doby 4,2 min po nástřiku. Při kvalifikaci uvolněného L-Argininu do média byla odečtena hodnota L-Argininu, kterou obsahovalo samotné médium, aby byla získána pouze hodnota uvolněného L-Argininu.

2.5.3 Stabilita L-Argininu a pH

Po prvním experimentu uvolňování L-Argininu byla testována stabilita z důvodu podezření degradace L-Argininu v čase, vlivu teploty na koncentraci aktivní látky a změny pH během testování. Koncentrace roztoků byla určena na základě výsledků z prvního experimentu uvolňování L-Argininu.

Pro testování stability uvolňování L-Argininu byly připraveny dva roztoky o rozdílné koncentraci L-Argininu. Pro přípravu roztoků byl použit L-Arginin v podobě namletého prášku a PBS s 1% azidu. První roztok měl koncentraci L-Argininu 3,01 g/l a druhý 5,5 g/l.

Roztoky byly rozděleny po 5 ml do 10 zkumavek. Polovina zkumavek byla umístěna do inkubátoru, kde byla při teplotě 37 $^{\circ}\text{C}$ a druhá část byla ve 4 $^{\circ}\text{C}$ v lednici. Objemy zkumavek byly odebírány v časových intervalech: 0 h (počátek měření), 1 h, 24 h, 72 h a 168 h. Při odebírání zkumavek bylo měřeno i pH roztoků pomocí pH metru.

Koncentrace L-Argininu v odebraných vzorcích byla hodnocena kapalinovou chromatografií popsanou výše, viz kapitola 2.5.2.

2.6 Biologické testování

2.6.1 Trombogenicita

Pro testování trombogenicity byly použity trombocyty získané z Transfúzního oddělení Krajské nemocnice v Liberci. Trombocyty v náhradním roztoku neboli trombocyte rich solution (TRS) obsahovaly 915×10^6 trombocytů/l.

Z materiálů sterilizovaných ethylen oxidem bylo připraveno 12 vzorků kruhového tvaru o průměru 5 mm od každého materiálu. Vzorky byly umístěny do kultivační destičky o 96 jamkách. Jako kontrola bylo použito dno kultivační jamky (TCP = tissue culture plastic). Do každé jamky bylo přidáno 200 μ l TRS obsahující 183×10^6 trombocytů na jamku. Vzorky byly inkubovány po dobu 2 h ve 37 °C v inkubátoru.

Trombogenicita byla testována stanovením metabolické aktivity buněk pomocí MTT testu, poté byla změřena absorbance. Po uplynutí doby inkubace byly materiály přemístěny do nové jamky s obsahem 150 μ l Composolu s 50 μ l MTT, ve stejném roztoku byly inkubovány i kontroly TCP a TRS. Po 3 hodinách bylo odsáto MTT s náhradním roztokem a bylo přidáno 200 μ l okyseleného isopropanolu. Pro měření absorbance vzniklého roztoku bylo po důkladném rozpuštění krystalů přeneseno 150 μ l do nové jamky a byla proměřena absorbance při 570 a 650 nm (reference) a byla spočítána z jejich rozdílu. Naměřená absorbance odpovídá metabolické aktivitě trombocytů adheovaných na vzorku testovaných materiálů. Celkem bylo testováno deset vzorků.

Dva vzorky byly dvakrát opláchnuty PBS a zafixovány v 2,5% glutaraldehydu v PBS po dobu 15 minut v lednici (4 °C). Nakonec byly vzorky zanalyzovány pomocí SEM, které předcházela příprava vzorků, viz kapitola 2.4.1.

2.6.2 Koagulace

Testování koagulace proběhlo na oddělení Klinické hematologie Krajské nemocnice v Liberci, koagulace byla testována Quickovým testem neboli protrombinovým časem (PT) a aktivovaným parciálním tromboplastinovým časem (aPTT). Oběma testy bylo od každého

materiálu testováno 10 vzorků o velikosti 1×1 cm, vzorky byly vysterilizovány ethylenoxidem a po sterilizaci odvětrány minimálně po dobu jednoho týdne. Pro testování byla použita krevní plazma získaná z Transfúzního oddělení Krajské nemocnice v Liberci.

Testy aPTT a PT probíhaly ze stejných vzorků. Materiály byly umístěny v eppendorfových zkumavkách a bylo k nim přidáno 500 μ l krevní plazmy, poté byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 30 minut. Jako kontrola byly použity eppendorfovy zkumavky bez materiálů, pouze s 500 μ l krevní plazmy. Měření aPTT a PT probíhalo v automatickém analyzátoru BCS XP Siemens.

2.6.3 Hemolýza

Metodika testování vycházela z normy ČSN EN ISO 10993-4 Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 4: Výběr zkoušek na interakce s krví [30]. Pro testování hemolýzy byla použita antikoagulovaná krev získaná z transfúzního oddělení Krajské nemocnice v Liberci od zdravých dárců. Krev byla zředěna s PBS v poměru 4/5 (krev/PBS).

Hemolýza byla testována u PCL nanovlákných materiálů s 0 hm%, 1 hm%, 5 hm% a 10 hm% L-Argininu. Pro testování hemolýzy byly připraveno pět vzorků od každého materiálu o velikosti 1×1 cm, které byly umístěny v plastových zkumavkách.

Vzorky byly smočeny v 10 ml PBS, byly připraveny i kontroly. Negativní kontrola (NC) obsahovala pouze 10 ml PBS a pozitivní kontrola (PC) 10 ml destilované vody, vzorky byly inkubovány ve 37 °C po dobu 30 minut. Poté k nim bylo přidáno 200 μ l zředěné antikoagulované krve a vzorky byly inkubovány ve 37 °C po dobu 60 minut. Následně byly materiály centrifugovány na $100 \times g$ za 5 minut. Pomocí spektrofotometrie byl změřen uvolněný hemoglobin, absorbance odebraných vzorků byla změřena při 540 nm. Výsledky hemolýzy byly vypočítány na základě následující rovnice (1):

$$\% \text{hemolýza} = [(T_{\text{vzorek}} - T_{\text{negativní k.}}) / (T_{\text{pozitivní k.}} - T_{\text{negativní k.}})] \times 100 \quad (1)$$

Kde, T_{vzorek} je průměrná hodnota absorbance vzorků testované skupiny, $T_{\text{negativní k.}}$ absorbance negativní kontroly a $T_{\text{pozitivní k.}}$ absorbance pozitivní kontroly.

2.6.4 Cytotoxicita

Metodika testování vycházela z normy ČSN EN ISO 10993-5 Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro* [31].

Pro testování cytotoxicity byly připraveny roztoky s různou koncentrací L-Argininu (0,2 %, 0,25 %, 0,5 %, 0,75 %, 1 %, 2 %, 5 % a 10 %) v příslušném médiu. Roztoky byly připraveny rozpuštěním L-Argininu v podobě namletého prášku v kompletním médiu. Následně byly přefiltrovány přes filtry s velikostí pórů 0,22 μm . Cytotoxicita vzorků byla testována se třemi typy buněk: fibroblasty (3T3-SA), lidské umbilikální endotelové buňky (HUVEC) a hladkosvalové buňky z koronárních artérií (CASMS).

První den experimentu byly nasazeny buňky do 96jamkové destičky o koncentraci 10^4 / jamku. Následující den byla mikroskopicky zkontrolována morfologie buněk a stupeň konfluence. Poté byly přidány roztoky s různou koncentrací L-Argininu ke konfluentní vrstvě buněk (100 μl). Ke kontrolním buňkám bylo přidáno samotné médium. Pro ověření účinnosti testu byla také ověřena viabilita buněk po inkubaci buněk s cytotoxickým 0,1% Tritonem X-100 v médiu. Takto ovlivněné buňky byly ponechány 24 hodin v inkubátoru při 37 °C. Následující den bylo odsáto médium/roztoky L-Argininu a přidáno 110 μl média s 10% cck-8. Takto připravená destička byla inkubována po dobu 2,5 hodiny v inkubátoru a poté byla měřena absorbance roztoku při 450 nm. Naměřená absorbance kontrolních buněk odpovídala 100% viabilitě, ke které byly vztaženy hodnoty viability buněk po inkubaci s Tritonem X-100 a extrakty testovaných materiálů. Celkem bylo měřeno minimálně šest opakování.

Viabilita buněk byla počítána rovnicí (2) dle normy [31]. Rovnice byla modifikována, protože absorbance byla měřena při 450 nm.

$$\text{Životaschopnost \%} = 100 \times \text{OD}_{540\text{e}} / \text{OD}_{540\text{b}} \quad (2)$$

kde

$\text{OD}_{540\text{e}}$ je střední hodnota změřené absorbance 100% extraktů zkušebního vzorku;

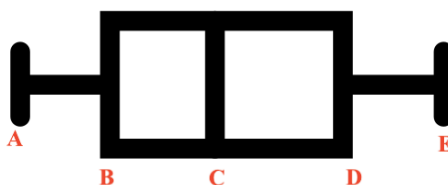
$\text{OD}_{540\text{b}}$ střední hodnota změřené absorbance vzorků

2.6.5 Testování extraktů nanovláčkových vrstev s obsahem L-Argininu

Testování proběhlo stejně jako u experimentu popsaného v kapitole 2.6.4. S rozdílem, že pro inkubaci s buňkami byly použity rozmražené extrakty získané při uvolňování L-Argininu v médiu, viz kapitola 2.5. Ke kontrolním buňkám bylo přidáno samotné médium zamražené na počátku experimentu. Celkem bylo měřeno šest opakování.

2.7 Zpracování statistických dat

Všechna statistická data získána v experimentech byla zpracována pomocí programu Microsoft Excel a GraphPad Prism. V programu GraphPad Prism byla u výsledků nejprve zjištěna normalita rozložení dat. Data byla zpracována do grafů typu boxplot neboli krabicového diagramu, viz obr. 8. Boxplot zobrazuje rozsah hodnot výsledků. Hlavní krabicovou část tvoří spodní (B) a horní kvartila (D) a medián (C). Variabilitu dat zobrazují minimální (A) a maximální hodnoty (E).



Obr. 8: Boxplot: A minimální hodnota, B spodní kvartila, C medián, D horní kvartila, E maximální hodnota.

Hodnoty zpracovávaných dat byly uváděny 95% intervalem spolehlivosti (IS). Byla ověřena normalita rozdělení dat. Pokud data pocházela z normálního rozdělení, byla zpracována Bonferroniho parametrickým testem, pokud data neměla normálního rozdělení, následoval Kruskal-Wallis neparametrický test. Pomocí těchto testů byly hodnoty skupin testovaných vzorků porovnány vzájemně nebo s kontrolou. P-hodnota určuje, jak je odlišnost porovnávaných skupin významná, výsledky míry odlišnosti jsou v grafech značeny pomocí hvězdiček. Pokud odlišnost porovnávaných dat nebyla významná ($p > 0,1234$), není v grafech značena.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

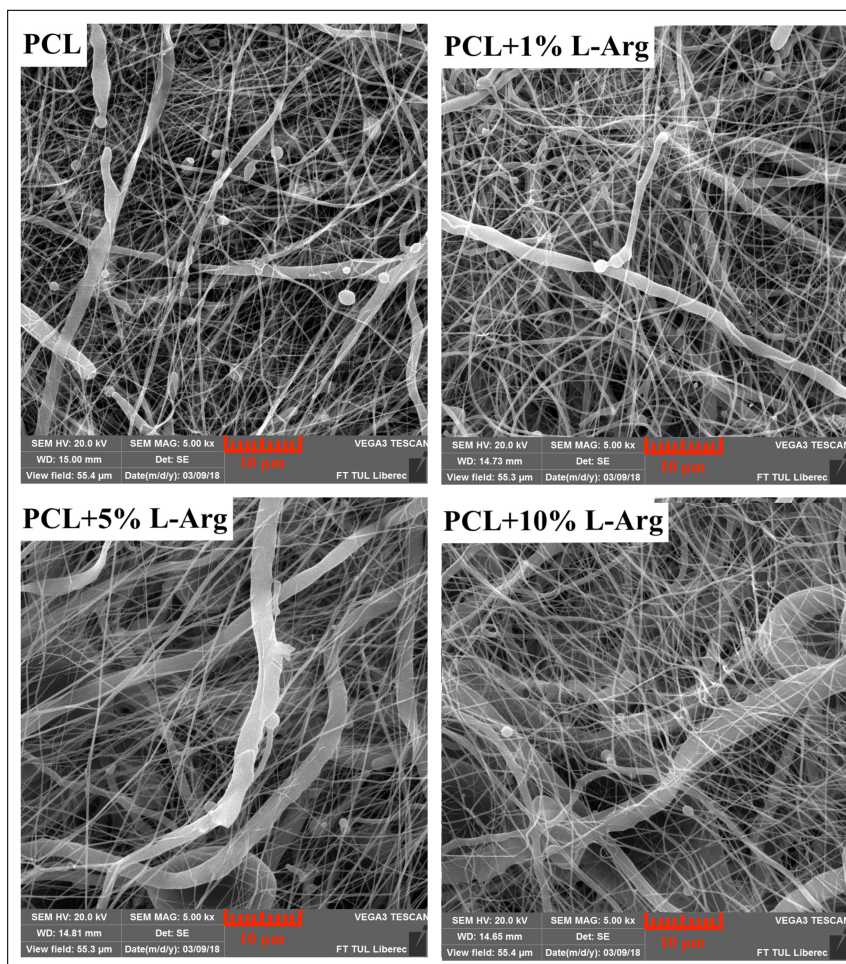
3.1 Charakterizace polykaprolaktonových vrstev

Proces elektrostatického zvlákňování PCL a jeho parametry byl známý již z předchozích experimentů Katedry netkaných a nanovláknenných materiálu. Zvlákňování PCL tudíž bylo bez problémů.

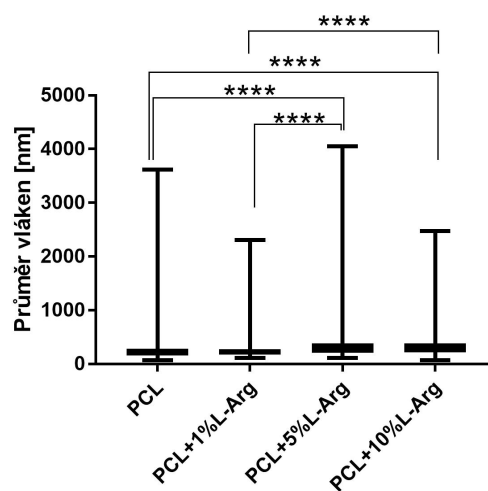
3.1.1 Morfologie

Z makroskopického pohledu byly zvlákňované vrstvy homogenní s minimem defektů. V mikroskopickém měřítku byly testované nanovláknenné PCL vrstvy nehomogenní, vlákna nebyla orientována ani uspořádána. V nanovláknenné vrstvě se objevovaly defekty v podobě polymerních kapek; u vrstev s L-Argininem byl jejich výskyt častější a kapky byly větší. Snímky z elektronového mikroskopu (SEM) s menším zvětšením viz příloha A obr. PA1. Ve všech nanovláknenných vrstvách se objevovala tenká i širší vlákna. SEM s větším zvětšením zobrazuje obr. 9.

Průměry vláken PCL vrstev se pohybovaly okolo 300 nm. Nejtenčí vlákna byla u čisté PCL nanovláknenné vrstvy, u které byl 95% interval spolehlivosti (IS) průměrů vláken v nm (268; 331,5), u PCL s 1 hm% L-Argininu (280,4; 373,5), u PCL s 5 hm% L-Argininu (362,6; 487,4) a u PCL s 10 hm% L-Argininu (317,9; 382,5). Rozmezí průměrů u jednotlivých nanovláknenných vrstev je způsobeno velkým rozptylem průměrů vláken, ve vrstvách byla změřena vlákna s průměrem od 70 nm až do 4051 nm. Rozptyly průměrů materiálů zobrazuje obr. 10. Přítomnost L-Argininu v planárních vrstvách měla vliv na průměr vláken, se vzrůstající koncentrací L-Argininu byly naměřeny větší průměry vláken, až na vrstvu PCL s 10 hm% L-Argininu, u které se průměry vláken příliš nelišily od vrstvy s 5 hm% L-Argininu a u vrstvy s 1 hm% L-Argininu byl rozdíl hodnot průměrů vláken v porovnání s PCL vrstvou nepatrný.



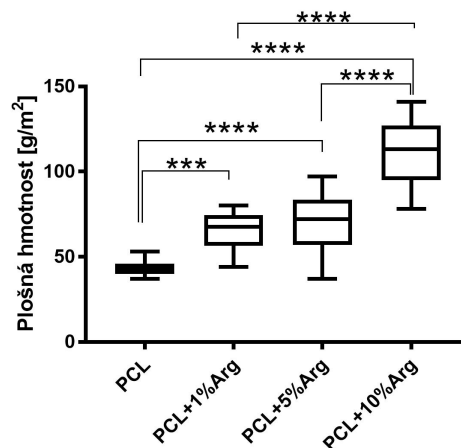
Obr. 9: SEM nanovlákněných PCL vrstev s 0–10 hm% L-Argininu, měřítko 10 μm.



Obr. 10: Průměry vláken PCL vrstev s 0–10 hm% L-Argininu, Kruskal-Wallis test; **** $p < 0,0001$; $n > 200$.

3.1.2 Plošná hmotnost

Plošná hmotnost materiálů se pohybovala v rozmezí od 41,6 do 117 g/m². Vzdělávala s rostoucím podílem aktivní složky, L-Argininu. Nejnižších hodnot nabývala planární vrstva PCL, 95% IS (41,6; 44,5) g/m². Naopak nejvyšší plošnou hmotnost měla nanovlákněná PCL vrstva obsahující 10 hm% L-Argininu, její 95% IS plošné hmotnosti byl (103,5; 117,7) g/m². Grafické znázornění plošných hmotností viz obr. 11.



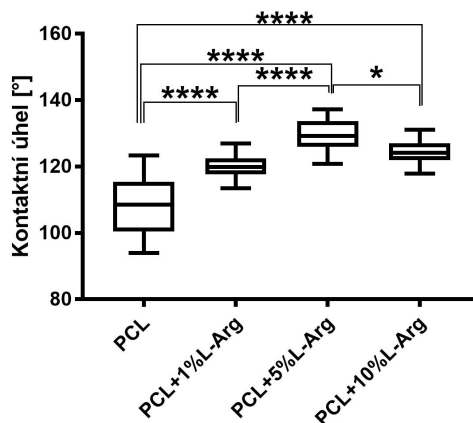
Obr. 11: Plošné hmotnosti PCL vrstev s L-Argininem s 0–10 hm%,

Kruskal-Wallis test; *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$; $n = 32$.

3.1.3 Smáčivost

Výsledky testování smáčivosti jsou zpracovány do grafu, viz obr. 12. Z výsledků můžeme vyčíst, že kontaktní úhel všech materiálů byl větší než 90°, tudíž se jedná o materiál hydrofóbní. Úhel čisté PCL vrstvy byl o něco nižší než úhly materiálů s L-Argininem. U PCL nanovlákněné vrstvy byl 95% IS kontaktního úhlu (103,9; 112,7). S rostoucím hm% L-Argininu byl kontaktní úhel větší, u 10 hm% nepatrně klesá. Nejvíce hydrofóbním testovaným materiálem byla PCL vrstva s 5 hm% L-Argininu, 95 % IS byl (127,2; 131,5)°.

Polykaprolakton je hydrofóbní materiál a jeho hydrofobicita se s inkorporací L-Argininu zvyšovala. Což není příliš vhodné pro buňčnou adhezi. Ideální materiál pro buňky je mírně hydrofilní, tudíž jeho kontaktní úhel se pohybuje mezi 40–80° [32].



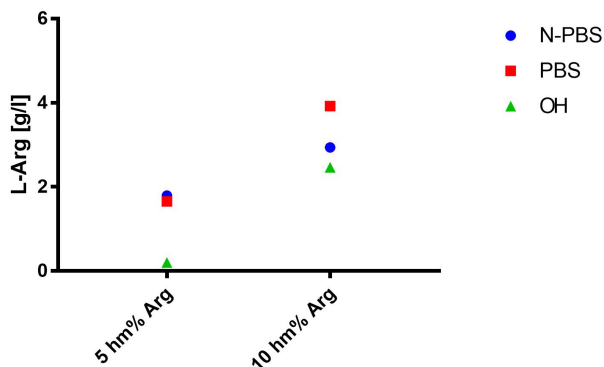
Obr. 12: Kontaktní úhly PCL vrstev s 0–10 hm% L-Argininu s destilovanou vodou, Bonferroniho test, * $p < 0,0332$; **** $p < 0,0001$; $n = 20$.

3.2 Uvolňování L-Argininu

Účelem testování uvolňování L-Argininu z PCL nanovláčkových vrstev bylo zjistit, jaké množství se z vrstev s různým hm% aktivní látky uvolní během 14denní inkubace. Dále byl také testován vliv předúpravy materiálu na uvolňování L-Argininu.

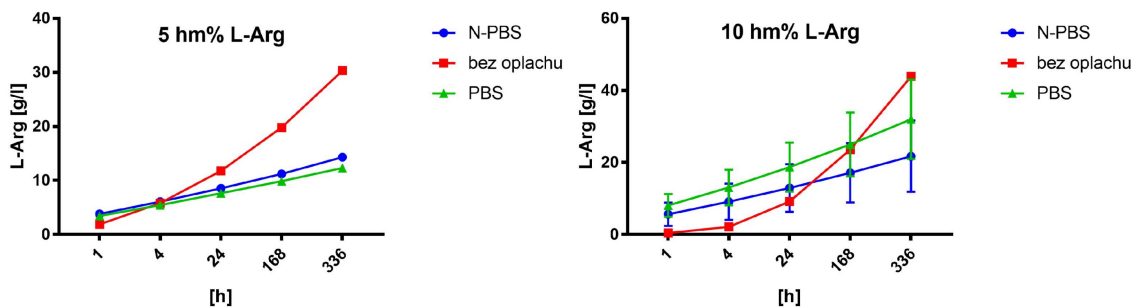
Byl testován vliv opachu ethanolem (OH) a sterilizace ethylen oxidem (PBS – sterilizované, N-PBS – nesterilizované) z výluhů odebraných po 30 minutách inkubace, mediány naměřených hodnot zobrazuje graf na obr. 13.

Bylo zanalyzováno uvolňování aktivní látky z nanovláčkové PCL vrstvy s 5 a 10 hm% L-Argininu. Byl porovnán vliv předúpravy oplachem PBS na dlouhodobé uvolňování L-Argininu z vrstev, viz obr. 14. Obr. 15 zobrazuje dlouhodobé uvolňování L-Argininu v médiu v porovnání s uvolňováním v PBS.



Obr. 13: Uvolňování L-Argininu po 0,5 h z PCL vrstev s 5 a 10 hm% L-Argininu v PBS s rozdílnou úpravou: nesterilizovaný materiál s PBS oplachem (N-PBS), sterilizovaný materiál s PBS oplachem (PBS), sterilizovaný materiál s oplachem v ethanolu (OH); $n \geq 2$.

U vzorků nanovlákněných PCL vrstev s 5 hm% Argininu s oplachem PBS sterilizovaných i nesterilizovaných byly hodnoty z výluhů po 30 minutách uvolňování L-Argininu srovnatelné, pohybovaly se okolo 1,8 g/l. Hodnoty sterilizovaných vzorků s oplachem v ethanolu byly výrazně nižší, okolo 0,2 g/l. Graf z uvolňování L-Argininu z nanovlákněné PCL vrstvy s 5 hm% L-Argininu v PBS je zobrazen na obr. 14. Nejvyšší hodnota uvolněného L-Argininu byla u sterilizovaných vzorků bez oplachu, a to až kolem 30 g/l. Hodnoty u sterilizovaných i nesterilizovaných vzorků s oplachem PBS byly obdobné, koncentrace L-Argininu se pohybovala okolo 13 g/l.



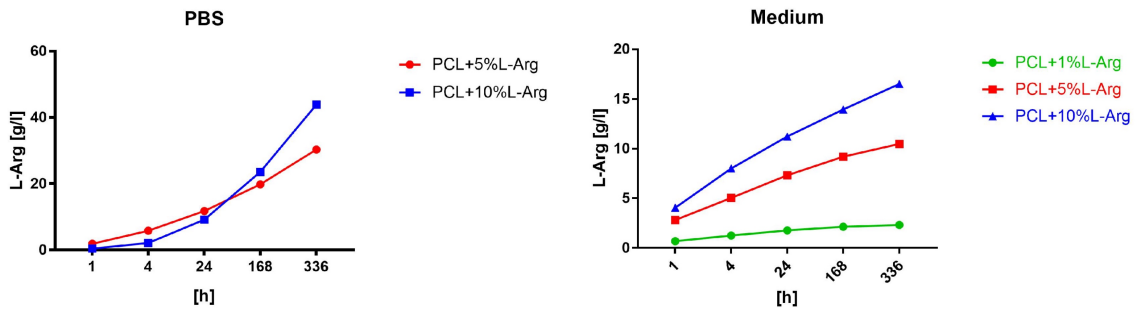
Obr. 14: Uvolňování L-Argininu z PCL vrstvy s 5 hm% a 10 hm% L-Argininu v PBS po dobu 14 dní (336 h), nesterilizované vzorky s PBS oplachem (N-PBS), sterilizované vzorky bez oplachu (bez oplachu), sterilizované vzorky s PBS oplachem (PBS).

U nanovlákných PCL vrstev s 10 hm% L-Argininu byly hodnoty z výluhů po 30 minutách uvolňování L-Argininu nejvyšší u nesterilních vzorků s oplachem PBS kolem 3,7 g/l, naopak nejnižší hodnoty byly naměřeny u OH vzorků, kde se hodnoty pohybovaly okolo 1,6 g/l. Výsledky z dlouhodobého uvolňování L-Argininu z PCL vrstvy s 10 hm% L-Argininu jsou zpracovány v grafu, viz obr. 14. Nejméně L-Argininu se uvolnilo z nesterilních vzorků s PBS oplachem, hodnoty L-Argininu se pohybovaly okolo 21 g/l. Naopak nejvyšších hodnot nabývaly sterilizované vzorky bez oplachu, a to kolem 43 g/l L-Argininu.

Z výsledků je patrné, že předúprava materiálu měla vliv na uvolňování aktivní látky. Oplach ethanolem i PBS snížil hodnoty uvolněného L-Argininu. Sterilizace ethylen oxidem na uvolnění negativní vliv neměla, naopak u nanovlákných vrstev s 10 hm% L-Argininu u dlouhodobého uvolňování byly hodnoty vzorků sterilizovaných s oplachem PBS a vyšší než u nesterilizovaných. U obou nanovlákných vrstev (5 hm% i 10 hm% L-Argininu) se nejvíce L-Argininu uvolnilo ze sterilizovaných vzorků bez oplachu.

Na obr. 15 jsou zobrazeny výsledky uvolňování L-Argininu z PCL vrstev s 1 hm%, 5 hm% a 10 hm% L-Argininu v kompletním médiu v porovnání s uvolňováním vrstev s 5 hm% a 10 hm% L-Argininu v PBS po dobu 14 dní (336 h). Ačkoli materiály byly inkubovány ve třech různých médiích, kvantifikace uvolněné aktivní látky byla provedena pouze u jednoho z nich (DMEM), protože se nepředpokládá rozdílné chování. U vzorků inkubovaných v kompletním médiu z nanovlákné vrstvy s 5 hm% L-Argininu bylo celkové uvolněné množství 10 g/l a u nanovlákné vrstvy s 10 hm% L-Argininu 16,5 g/l.

Uvolňování L-Argininu se v médiu a v PBS lišilo. V PBS byl průběh uvolňování pozvolný a k největšímu nárůstu koncentrace aminokyseliny došlo po 7 a 14 dnech. V médiu se L-Arginin uvolnil rychleji, ale koncentrace L-Argininu po 14 dnech uvolňování byla nižší než po inkubaci v PBS (u vrstvy s 5 hm% L-Arginin 30 g/l; 10 hm% L-Arginin 43 g/l).



Obr. 15: Uvolňování L-Argininu z PCL vrstev s 0–10 hm% L-Argininu po dobu 336 h; vlevo v PBS, vpravo v médiu.

3.2.1 Stabilita L-Argininu

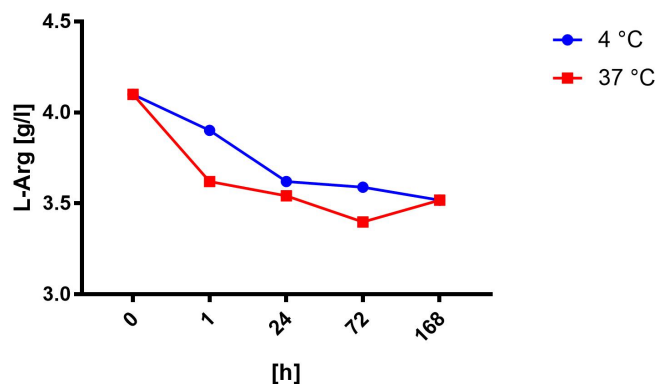
Důvodem testování stability bylo podezření degradace L-Argininu v čase. Stabilita byla testována v časovém intervalu 172 h (7 dní) a byl zkoumán i vliv teploty na koncentraci L-Argininu. Dále byla pozorováno, zda nedochází ke zvýšení pH, protože L-Arginin je bazická aminokyselina.

Změřené hodnoty pH jsou uvedeny v tab. 1. U vzorků, které byly ve 37 °C, došlo během testování k většímu poklesu hodnoty pH než u vzorků, které byly umístěny v lednici (4 °C). Hodnoty pH se u obou koncentrací pohybovaly okolo 7. Čas ani teplota neměly výrazný vliv na změnu pH testovaných vzorků.

Tab. 1: Hodnoty změřeného pH během testování stability roztoků s rozdílnou koncentrací L-Argininu a teplotou během testování.

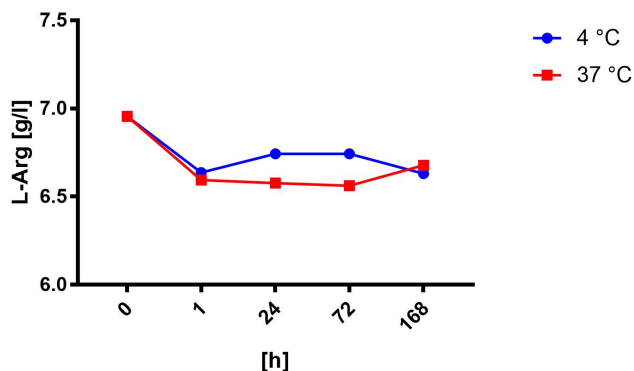
čas [h]	3,01 g/l L-Arg 4 °C	3,01 g/l L-Arg 37 °C	5,5 g/l L-Arg 4 °C	5,5 g/l L-Arg 37 °C
0	7,47		7,44	
1	7,41	7,33	7,38	7,28
24	7,46	7,20	7,37	7,19
72	7,18	6,81	7,16	6,83
168	7,32	6,83	7,22	6,82

Stabilita roztoku s 3 g/l L-Argininu je zobrazena na obr. 16. Koncentrace L-Argininu postupně klesala, nejvyšší hodnotu měla na začátku testování, 4,1 g/l. Nejnižší koncentrace L-Argininu byla naměřena ze vzorku odebraného po 72 h, který byl ve 37 °C, 3,4 g/l. Koncentrace aminokyseliny u vzorků, které byly inkubovány ve 37 °C byla o něco vyšší než u vzorků při 4 °C, ale po týdnu testování byly hodnoty shodné (3,5 g/l). Koncentrace během testování poklesla u vzorků ve 37 °C i ve 4 °C o 14,6 %.



Obr. 16: Stabilita roztoku s 3 g/l L-Argininu testována po dobu 168 h ve 4 a 37 °C.

Graf na obr. 17 zobrazuje stabilitu roztoku s koncentrací L-Argininu 5,5 g/l. Nejvyšší hodnota, 6,9 g/l byla naměřena na začátku testování, po 1 h klesla na hodnotu kolem 6,6 g/l. Koncentrace ve vzorku, který byl ve 4 °C se poté nepatrně zvýšila. Po 1 h testování zůstaly hodnoty koncentrace L-Argininu v roztoku téměř stabilní. Nelišily se ani hodnoty vzorků v rozdílných teplotách. Teplota inkubace vzorků během testování neměla na hodnotu koncentrace L-Argininu u roztoku s koncentrací L-Argininu 5,5 g/l vliv. Koncentrace u obou skupin vzorků byla po týdnu 6,6 g/l, během testování došlo k poklesu o 4,3 %.



Obr. 17: Stabilita roztoku s 5,5 g/l L-Argininu testována po dobu 168 h ve 4 a 37 °C.

U obou koncentrací byla naměřená hodnota vyšší než původní koncentrace roztoku, což mohlo být například způsobeno chybou v navážce nebo při kalibraci. Během testování stability L-Argininu došlo u obou koncentrací k degradaci aminokyseliny v čase. K největšímu poklesu koncentrace L-Argininu došlo během první hodiny testování u vzorků, které byly inkubovány ve 37 °C. Ale po týdnu testování byla koncentrace L-Argininu ve vzorcích ze 4 a 37 °C srovnatelná, tudíž teplota při testování neovlivňuje koncentraci L-Argininu při dlouhodobém testování. Na základě výsledků stability L-Argininu v čase byla pro druhé testování uvolňování L-Argininu vyrobena i nanovlákněná PCL vrstva s 1 hm% L-Argininu.

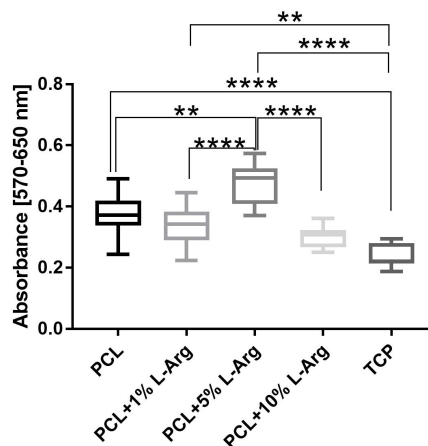
3.3 Biologické testování

3.3.1 Trombogenicita

Výsledky testování trombogenicity jsou shrnuty v grafu na obr. 18. Nejvyšší viabilita trombocytů byla zjištěna u PCL s 5 % L-Argininu, 95% IS absorbance (0,4; 0,5), naopak nejnižší hodnoty byly u kontrolního TCP, 95% IS (0,2; 0,3). Rozdíly v hodnotách absorbance u jednotlivých materiálů mohly být způsobeny nepravidelností povrchu, která mohla vzniknout při manipulaci se vzorky pinzetou. Například mohlo dojít k ohybům vzorku nebo vlivem tlaku k mírným prohlubním.

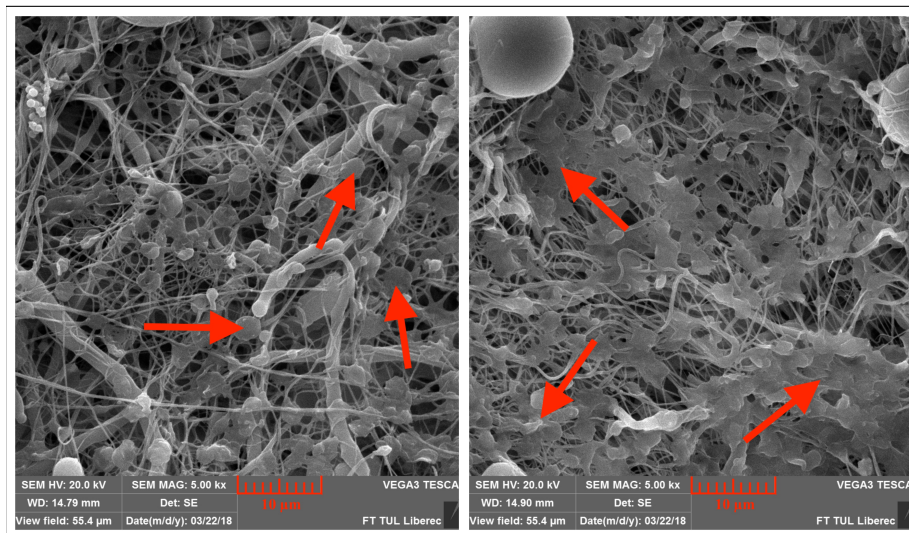
Ačkoli NO snižuje adhezi a aktivaci trombocytů, při testování přítomnost L-Argininu ve vrstvách neměla vliv na jejich aktivitu, protože nebyl přítomný vhodný

enzym, aby došlo k přeměně L-Argininu na L-citrullin, kdy dochází k uvolnění NO. Protože v krevní plazmě se tyto enzymy nevyskytují, nebyl předpokládán výrazný efekt. Plazma by ale mohla v malé míře obsahovat bílé krvinky, což by podpořilo vznik NO, mohlo by to být důvodem mírného poklesu aktivity krevních destiček u PCL s 10 hm% L-Argininu. Směrodatnější bude testování materiálů s plnou krví, které bude v budoucnu provedeno.



Obr. 18: Absorbance měřená MTT testem po 2 h inkubace se suspenzí s trombocyty a kontrola (TCP), Bonferroniho test; ** $p < 0,0021$; **** $p < 0,0001$; $n = 10$.

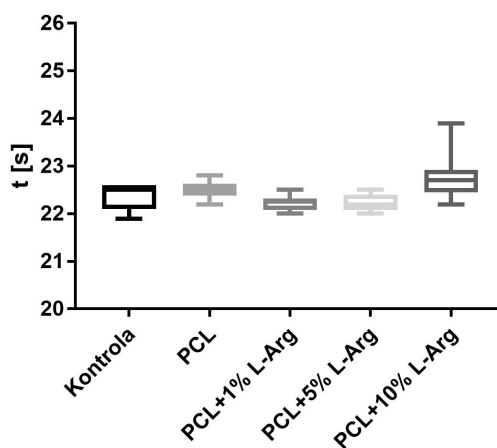
Snímky SEM, viz obr. 19, ukazují nehomogenní rozmístění trombocytů. Na některých místech se trombocyty příliš nevyskytovaly, ale především pokud povrch materiálu nebyl úplně rovný, docházelo k větší adhezi, aktivaci krevních destiček a tvorbě agregátů ve vyvýšených místech a údolích. Tento jev se objevoval u všech materiálů stejně, obr. 19 ukazuje příklady se třemi vyznačenými jednotlivými trombocyty a jejich agregáty, kterých je na snímku mnohem více. SEM snímky všech testovaných materiálů jsou v příloze B na obr. PB1.



Obr. 19: SEM PCL vrstev s L-Argininem po 2 h inkubace se suspenzí s trombocyty.

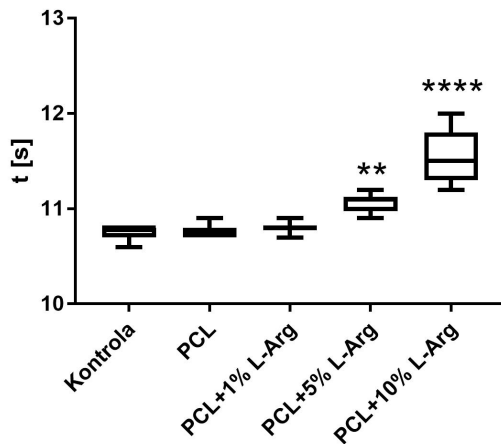
3.3.2 Koagulace

Výsledky aPTT jsou zpracovány do grafu, viz obr. 20. APTT čas materiálů se navzájem příliš neliší, pohyboval se v rozmezí od 22 do 23 s, což odpovídá i kontrole. Mírně vyšších hodnot nabývá vzorek PCL s 10 hm% L-Argininu.



Obr. 20: Výsledky aktivovaného parciálního tromboplastinového času (aPTT) testovaných materiálů (PCL + 0–10 hm% L-Argininu) v porovnání s kontrolou, Kruskal-Wallis test; žádné statisticky významné odlišnosti; $n = 10$.

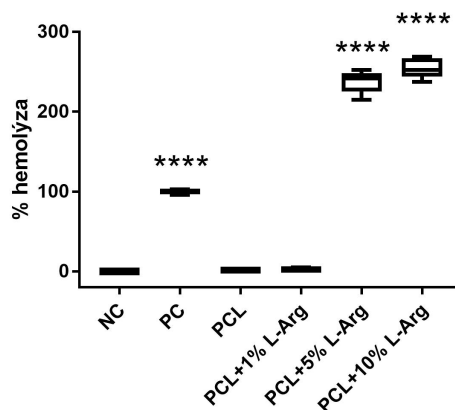
Testovaný materiál více reagoval při testování PT – vnější a společné cesty koagulace, viz obr. 21. Hodnoty vzorků PCL a PCL s 1 hm% L-Argininu se od kontroly nelišily, jejich 95% IS byl (10,75; 10, 85). Vzorky s 5 hm% a 10 hm% L-Argininu se od kontroly lišily, jejich čas byl vyšší, u PCL s 5 hm% L-Argininu byl 95% IS (10,98; 11,14) a u PCL s 10 hm% L-Argininu (11,37; 11,73).



Obr. 21: Výsledky Quickova testu (PT) testovaných materiálů (PCL + 0–10 hm% L-Argininu) v porovnání s kontrolou, Kruskal-Wallis test; ** $p < 0,0021$; **** $p < 0,0001$; $n = 10$.

3.3.3 Hemolýza

Výsledky testování hemolýzy jsou zobrazeny na obr. 22. U vzorků z PCL a PCL s 1 hm% L-Argininu byla zjištěna 0% hemolýza, u vzorků z PCL s 5 hm% L-Argininu byl 95% IS (229,1; 247,4) a u vzorků s 10 hm% L-Argininu byl 95% IS (245,3; 261,7). Dle ASTM F756-00 [33] materiály vykazující hemolýzu nad 5 % jsou hemolytické. U vzorků s 5 hm% a 10 hm% L-Argininu bylo procento hemolýzy vyšší než 200 %, mohlo dojít k interferenci L-Argininu nebo jeho produktů s hemoglobinem. Tato možnost bude ověřena v rámci budoucích experimentů. Nehemolytickými materiály byla vrstva z čistého PCL a PCL s 1 hm% L-Argininu.



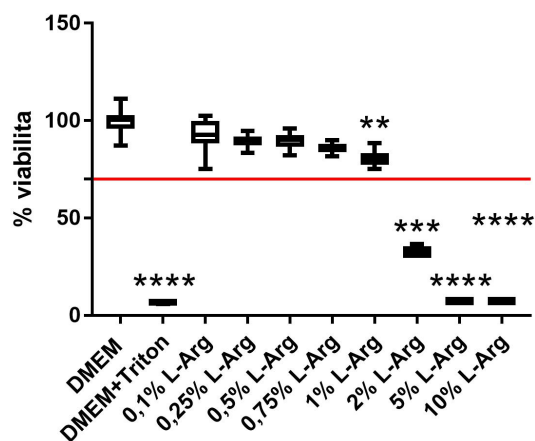
Obr. 22: Výsledky hemolýzy testovaných materiálů (PCL + 0–10 hm% L-Argininu), negativní (NC) a pozitivní (PC) kontroly, Kruskal-Wallis test; **** $p < 0,0001$; $n = 5$.

3.3.4 Cytotoxicita

Byla testována viabilita buněk s různou koncentrací L-Argininu, aby bylo zjištěno, od které koncentrace je vliv L-Argininu pro buňky již toxický a zda u některých koncentrací docházelo ke zvýšení viability buněk. Viabilita byla testována též s extrakty ze 14denního uvolňování L-Argininu z PCL nanovláčkových vrstev s aktivní látkou v médiu, z důvodu zjišťování, kdy vrstva s daným hm% aminokyseliny překračuje mez cytotoxicity. Testování viability proběhlo s fibroblasty, endotelovými buňkami a hladkosvalovými buňkami. Dle normy ČSN EN ISO 10993-5 [30] je látka cytotoxická, pokud viabilita poklesne pod 70 %.

Data viability fibroblastů byla zpracována do grafu, viz obr. 23. U vzorků s 0,1 %, 0,25 %, 0,5 % a 0,75 % došlo k mírnému poklesu viability (okolo 90%). Vzorek s 1 % L-Argininu se lišil, byl zde zaznamenán pokles viability buněk, a to průměrně na 80 %. Největší pokles byl u vzorku s 2 % L-Argininu, jeho průměrná hodnota viability byla 30%, tato koncentrace spolu s 5 % a 10 % byla pro fibroblasty cytotoxická.

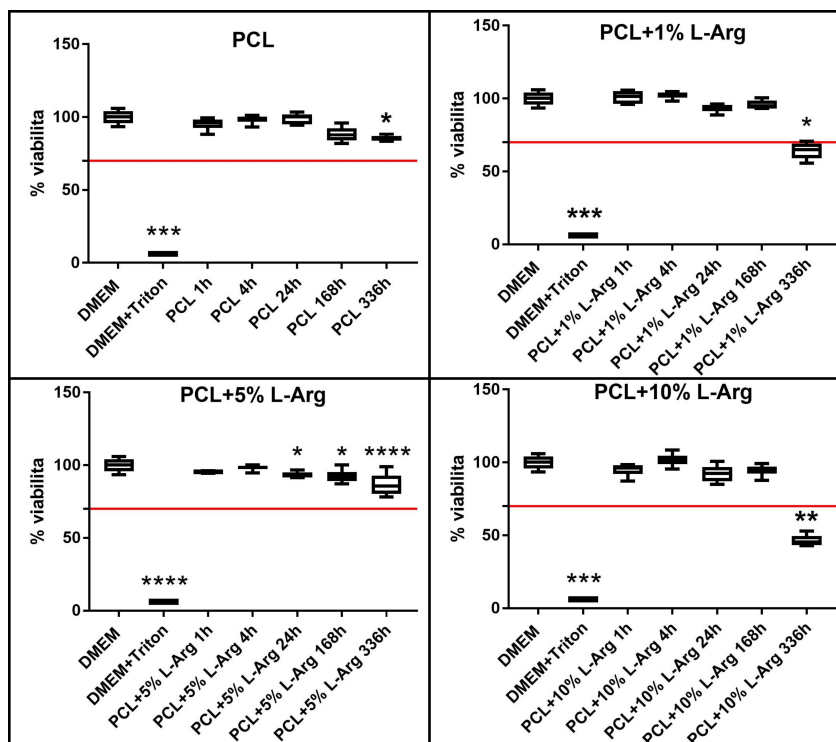
Grafy s viabilitou fibroblastů s výluhy z PCL materiálů s 0–10 hm% L-Argininu jsou zobrazeny na obr. 24. U všech materiálu se viabilita fibroblastů pohybovala okolo 100%, ale po 14 dnech došlo k jejímu poklesu, nejvíce u PCL s 10 hm% L-Argininu, kde klesla na 50 %. Ke snížení viability po 14 dnech inkubace došlo pravděpodobně z důvodu zvýšení koncentrace L-Argininu nad 1 % i dle výsledků inkubace fibroblastů byla koncentrace L-Argininu nad 1 % toxická, viz obr. 23. K poklesu pod 70 % viability nedošlo u materiálu s čistým PCL a u PCL s 5 hm% L-Argininu.



Obr. 23: Viabilita fibroblastů po inkubaci s různou koncentrací L-Argininu

v porovnání s kontrolou (EBM), Kruskal-Wallis test;

** $p < 0,0021$; *** $p < 0,0002$; **** $p < 0,0001$.



Obr. 24: Viabilita fibroblastů po inkubaci s extrakty PCL materiálů s 0–10 hm% L-Argininu v porovnání s kontrolou (DMEM);

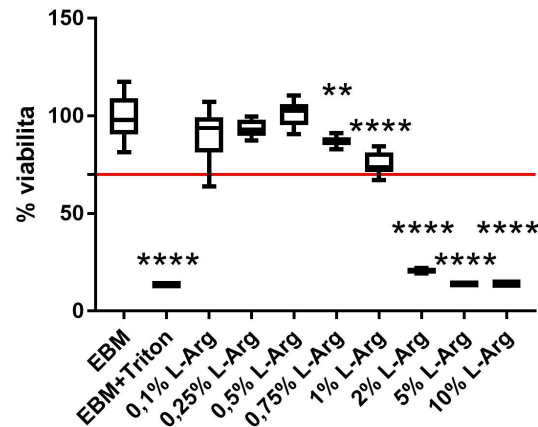
Kruskal-Wallis test u 0; 1; 10 hm% L-Arg; Bonferroniho test u 5 hm% L-Arg;

* $p < 0,1234$; ** $p < 0,0021$; *** $p < 0,0002$; **** $p < 0,0001$.

Graf s výsledky testování viability endotelových buněk zobrazuje obr. 25. U endotelových buněk byla viabilita srovnatelná s kontrolou u koncentrací 0,1 %, 0,25 % a 0,5 % byla jejich průměrná hodnota viability 94 %. U vzorku s 0,75 % L-Argininu došlo k poklesu viability, u 1 % byl již pokles větší, průměrná viabilita endotelových buněk byla 75 %. Koncentrace 2 %, 5 % a 10 % byla pro endotelové buňky cytotoxická.

Výsledky testování viability endotelových buněk s výluhy z PCL materiálů s 0–10 hm% L-Argininu jsou zobrazeny na obr. 26. Viabilita buněk byla u všech materiálů obdobná, nejvyšší viabilita byla s výluhy po 1 h a 4 h, kdy byla srovnatelná s kontrolou (EBM) a pohybovala se kolem 100 %. Od 168 h viabilita klesala, u materiálu s 1 hm% L-Argininu, kde došlo k poklesu již po 24 h. Po 14 dnech se viabilita endotelových buněk u všech materiálů pohybovala okolo 80 %, tudíž pravděpodobná koncentrace L-Argininu

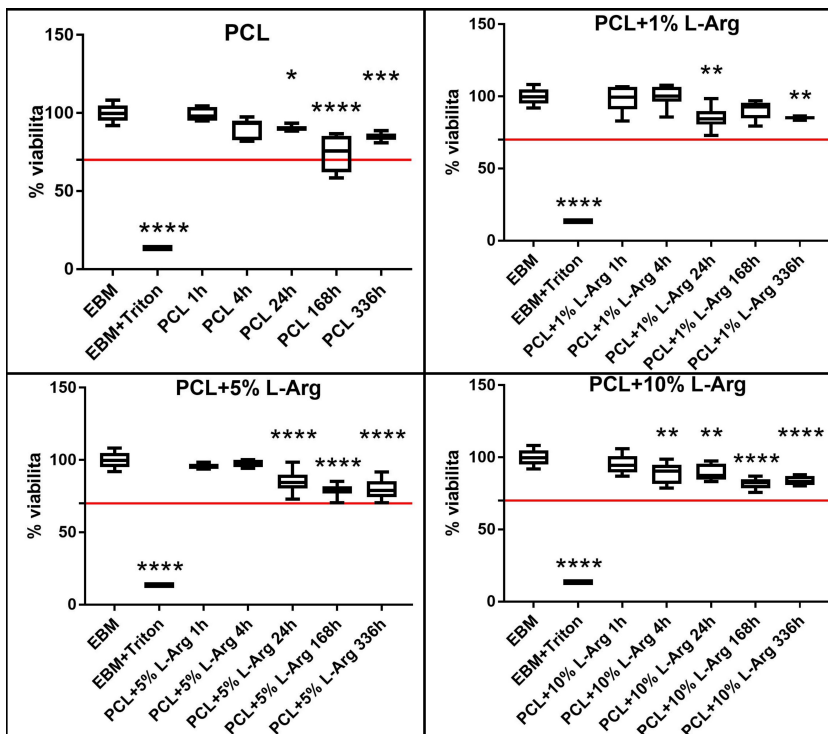
byla vyšší než 0,75%, ale koncentrace se může mírně lišit, protože výluhy byly měřeny do kompletního média (DMEM).



Obr. 25: Viabilita endotelových buněk po inkubaci s různou koncentrací

L-Argininu v porovnání s kontrolou (SmBM), Bonferroniho test;

** $p < 0,0021$; **** $p < 0,0001$.

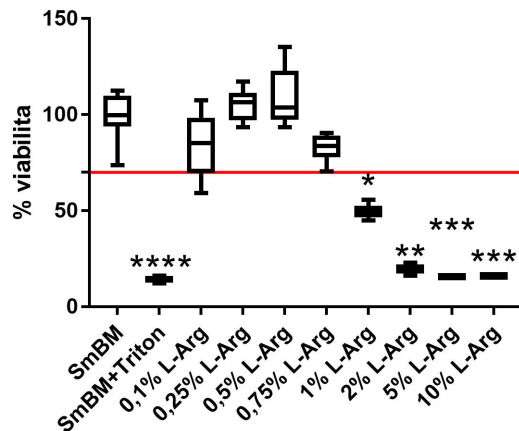


Obr. 26: Viabilita endotelových buněk po inkubaci s extrakty PCL materiálů s 0–10 hm% L-Argininu v porovnání s kontrolou (EBM); Bonferroniho test;

* $p < 0,1234$; ** $p < 0,0021$; *** $p < 0,0002$; **** $p < 0,0001$.

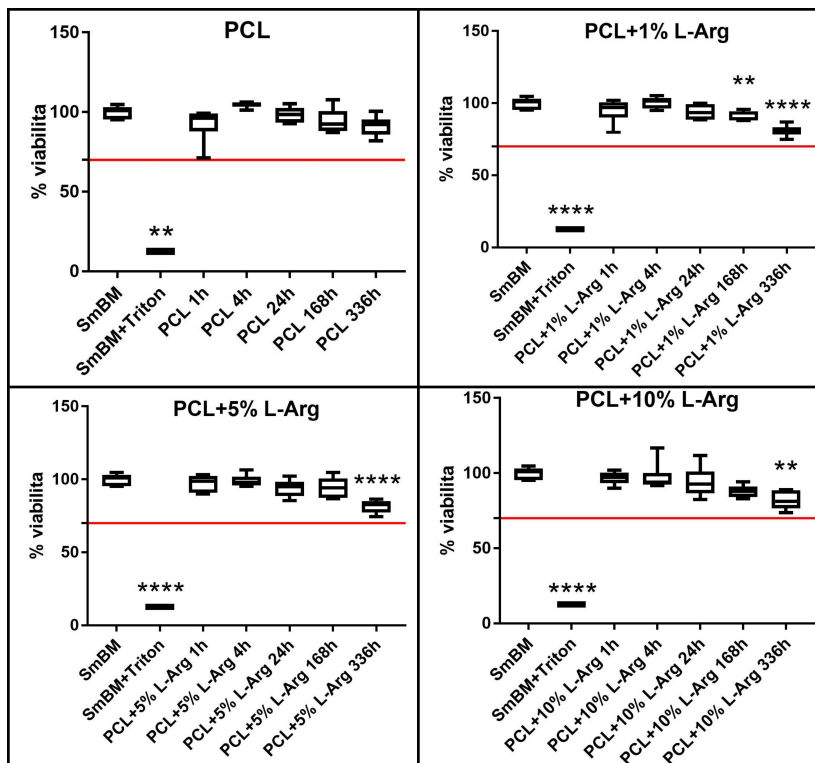
Cytotoxicitu hladkosvalových buněk zobrazuje obr. 27. Viability okolo 90 % dosahovaly vzorky s 0,1 %, 0,25 % a 0,5 % L-Argininu. U 0,75 % koncentrace L-Argininu došlo k poklesu viability na 51 %. Od vzorků s 1 % L-Argininu byla viability hladkosvalových buněk pod 50 %, tyto koncentrace pro ně byly cytotoxické.

Viabilitu hladkosvalových buněk s výluhy z PCL materiálů s 0–10 hm% L-Argininu zobrazuje na obr. 28. Téměř 100% viabilita srovnatelná s kontrolou (SmBM) byla u všech materiálů po 1 h, 4 h a 24 h, u čistého PCL a PCL s 5 hm% L-Argininu i po 168 h. U ostatních materiálů došlo u 168 h k poklesu viability a nejnižší hodnota viability byla u všech materiálů po 14 dnech, pohybovala se okolo 80 %. Tudiž koncentrace L-Argininu byla pravděpodobně vyšší než 0,75 %, protože koncentrace L-Argininu vyšší než 0,75 % způsobovala pokles viability buněk, viz graf na obr. 27.



Obr. 27: Viabilita hladkosvalových buněk po inkubaci s různou koncentrací L-Argininu v porovnání s kontrolou (DMEM); Kruskal-Wallis test;

* $p < 0,1234$; ** $p < 0,0021$; *** $p < 0,0002$; **** $p < 0,0001$.



Obr. 28: Viabilita hladkosvalových buněk po inkubaci s extrakty PCL materiálů s 0–10 hm% L-Argininu v porovnání s kontrolou (EBM);

Bonferroniho test u 1; 5 hm% L-Arg; Kruskal-Wallis test u 0; 10 hm% L-Arg;

** $p < 0,0021$; **** $p < 0,0001$.

ZÁVĚR

Bakalářská práce byla zaměřena na uvolňování L-Argininu z polykaprolaktonových (PCL) elektrostaticky zvlákněných nanovrstev, které obsahovaly aktivní látku L-Arginin. Cílem bylo kvantifikovat koncentraci L-Argininu při uvolňování po dobu 14 dnů a biologicky otestovat použité materiály a vliv koncentrace aktivní látky. Problematika inkorporace L-Argininu do PCL vrstev pro vývoj kožních krytů nebyla dosud příliš prozkoumána. Polykaprolaktonové nanovlákněné vrstvy s L-Argininem jsou vhodné nejen jako kožní kryty, ale také mají potenciální využití v kardiovaskulárním systému.

Elektrostatické zvláknění umožňuje inkorporaci L-Argininu do nanovlákněných vrstev. Pro testování byly použity nanovlákněné PCL vrstvy s různou koncentrací L-Argininu od 0 do 10 hm%. Bylo zjištěno, že L-Arginin ovlivňuje morfologii a povrchové vlastnosti PCL scaffoldů. Se zvyšující koncentrací aminokyseliny se ve vrstvách objevovalo více defektů a byly naměřeny větší průměry vláken, též došlo k nárůstu plošné hmotnosti. Polykaprolakton je hydrofóbní materiál, což není nejvhodnější vůči adhezi buněk a inkorporaci L-Argininu se hydrofobicita mírně zvyšovala.

Během dlouhodobé inkubace L-Argininu docházelo ke snížení jeho koncentrace. Uvolňování aktivní látky bylo ovlivněno vodným prostředím, ve kterém byly materiály inkubovány i jejich předúpravou. Oplach fosfátovým puftrem i ethanolem měl na uvolňování aktivní látky negativní vliv, naopak sterilizace ethylen oxidem neovlivňuje koncentraci L-Argininu. Při inkubaci v PBS bylo uvolňování aktivní látky postupné. U nanovlákněné vrstvy s 5 hm% L-Argininu byla koncentrace po 14 dnech experimentu 30,8 g/l a 43,1 g/l u vrstvy s 10 hm% L-Argininu. V kompletním médiu probíhalo uvolňování aktivní látky rychleji, ale uvolněné množství po 14 dnech inkubace bylo nižší než u PBS. V médiu se z nanovlákněné PCL vrstvy s 5 hm% L-Argininu uvolnilo 10,5 g/l a 16,5 g/l z vrstvy s 10 hm%.

V rámci experimentu byla testována hemokompatibilita testovaných materiálů; byl proveden test trombogenicity, koagulace aPTT a PT a hemolýza. Při testování trombogenicity vykazovala největší viabilitu trombocytů vrstva s 5 hm% L-Argininu, ve vrstvách se tvořily agregáty trombocytů. Výsledky trombogenicity byly ovlivněny

manipulací vzorků, směrodatnější testování bude provedeno s plnou krví. Testovaný materiál nezvyšoval čas koagulace při testování aPTT, u testování PT prodlužoval L-Arginin čas srážení vnější a společné cesty koagulace materiál s 10 hm% L-Argininu a mírné zvýšení vykazoval i materiál s 5 hm% L-Argininu. U testování hemolýzy byly materiály PCL a PCL s 1 hm% L-Argininu nehemolytické, u materiálů s 5 a 10 hm% byla zjištěna hemolýza vyšší než 200 %, což mohlo být způsobeno interferencí L-Argininu nebo jeho produktů s hemoglobinem. Tato možnost bude ověřena v rámci budoucích experimentů.

Fibroblasty a endotelové buňky byly životaschopné při koncentraci L-Argininu do 1% a u hladkosvalových buněk do 0,75%, hodnoty vyšší byly pro buněčné linie toxické. Během uvolňování v kompletním médiu těmto hodnotám odpovídala pouze koncentrace uvolněné aktivní látky z PCL s 10 hm% L-Argininu po 14 dnech.

Práce na tomto projektu bude dále pokračovat, pro další experimenty budou na základě uvedených výsledků použity nanovlákněné vrstvy s nižším hm% L-Argininu tak, aby byly hemokompatibilní a nezpůsobovaly cytotoxicitu buněk. Budoucí experimenty budou zaměřeny na přesné pochopení mechanismu uvolňování L-Argininu a testování uvolňování oxidu dusnatého. Dále jsou již v plánu testy s plnou krví a testování materiálů *in vivo* na potkanech.

Použitá literatura

- [1] TOMLINS, Paul, ed. *Characterisation and Design of Tissue Scaffolds*. Amsterdam: Woodhead Publishing, 2016, 276 s. ISBN 978-1-78242-087-3.
- [2] WOLFOVÁ, L. et al. *Úvod do tkáňového inženýrství*. Česká republika: MediaBros s.r.o., 2015. 124 s. ISBN: 978-80-260-9720-4.
- [3] THOMAS, S., GROHENS, Y., NINAN, N, ed. *Nanotechnology applications for tissue engineering*. Amsterdam: William Andrew, 2015, 336 s. ISBN 978-0-323-32889-0.
- [4] RATNER, Buddy D., et al. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 2nd Edition. Elsevier, 2004, 864 s. ISBN 9780080470368.
- [5] WOODRUFF, M. A., HUTMACHER, D. W.. The return of a forgotten polymer – Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*, October 2010, vol. 35, no. 10, s. 1217–1256.
- [6] KHATRI, Z., JATOI, A. W., AHMED, F., KIM, I. Cell adhesion behavior of poly(ϵ -caprolaktone)/poly(L-lactic acid) nanofibers scaffold. *Materials Letters*, 2016, vol. 171, s. 178–181.
- [7] CROISIER, F., et al. Mechanical testing of electrospun PCL fibers. *Acta biomaterialia*, 2012, 8.1: 218–224.
- [8] BOSWORTH, L. A.; GIBB, A.; DOWNES, S. Gamma irradiation of electrospun poly (ϵ -caprolactone) fibers affects material properties but not cell response. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, April 2012, s. 870–876.
- [9] COTTAM, E., et al. Effect of sterilisation by gamma irradiation on the ability of polycaprolactone (PCL) to act as a scaffold material. *Medical engineering and physics*, 2009, s. 221–226.
- [10] HOLLISTER, S. J. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature materials*, 2005, s. 518–524.

- [11] GORENINSKII, S. I., et al. Fabrication and properties of L-arginine-doped PCL electrospun composite scaffolds. *Materials Letters*, 2018, s. 64–67.
- [12] SUNG, E.K. et al. Controlled Release of L-Arginine from Poly(lactide-co-glycolide) Nanoparticles for the Inhibition of Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. *Biomaterials Research*, 2000, vol. 4, no. 3, s. 85–91.
- [13] STILL, T. J., RECUM, H. A. von. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, May 2008, vol. 29, no.13, s. 1989–2006.
- [14] MOSINGER, J., LANG, K., KUBÁT, P. Photoactivatable Nanostructured Surfaces for Biomedical Applications. In: *Light-Responsive Nanostructured Systems for Applications in Nanomedicine*. Springer, Cham, 2016. s. 135–168.
- [15] TECHNICKA UNIVERZITA V LIBERCI. Method of nanofibres production from a polymer solution using electrostatic spinning and a device for carrying out the method. Inventors: Oldřich JIRSÁK, Filip SANETRNIK, David LUKÁŠ, Václav KOTEK, Lenka MARTINOVÁ, Jiří Chaloupek. US7585437B2.
- [16] LEI, J., et al. Nitric oxide, a protective molecule in the cardiovascular system. *Nitric Oxide*, 2013, 35: s. 175–185.
- [17] *Nobel Prize* [online]. [Cit. 15. 3. 2018].
Dostupné z: https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/
- [18] MASOPUST, J., CHROMÝ, V. *Patobiochemie buňky*. 1. vydání. Praha: UK Praha, 2003, 182 s. ISBN 80-239-1011-0.
- [19] POPOWICH, D. A.; VARU, V.; KIBBE, M. R. Nitric oxide: what a vascular surgeon needs to know. *Vascular*, December 2007, s. 324–335.
- [20] LUO, Jian-dong; CHEN, Alex F. Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2005, s, 259–264.
- [21] WILLIAMS, D. Lyn H. A chemist's view of the nitric oxide story. *Organic & biomolecular chemistry*, 2003, s. 441–449.

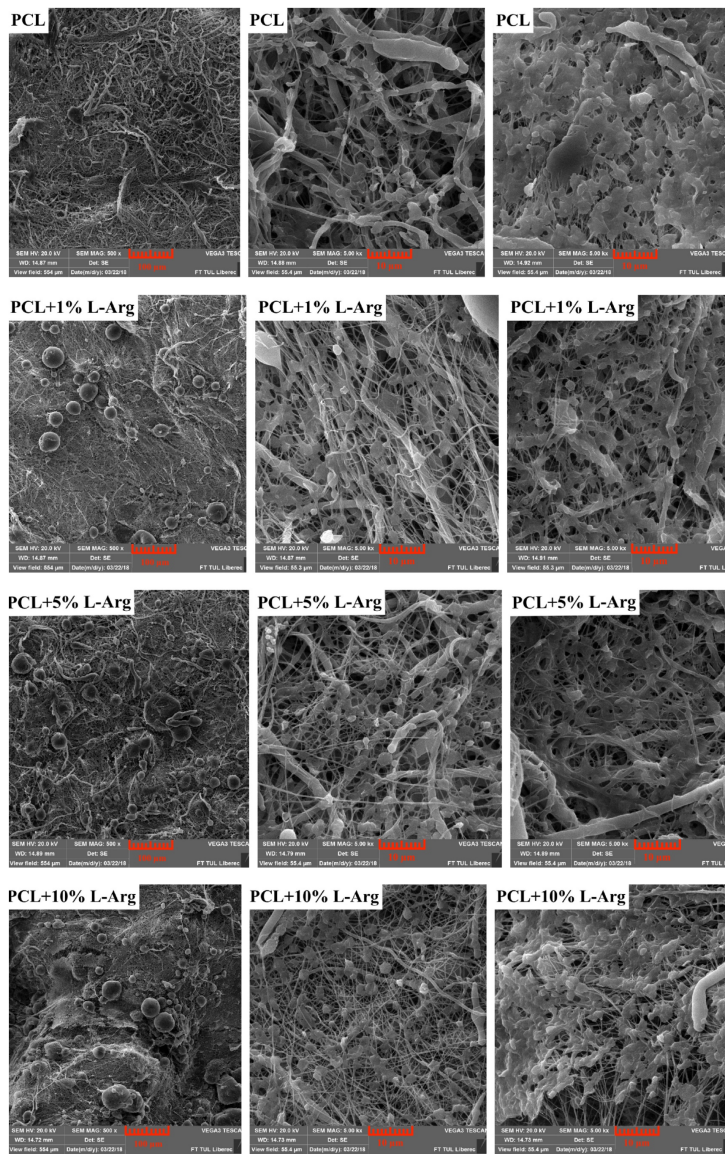
- [22] *Wikiskripta* [online]. [Cit. 22. 4. 2018].
Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Signalizace_NO#/media/File:Kapitola-10-02-13.jpg
- [23] WOLFRAM, K. *Vnitřní lékařství: stručné repetitorium*, Grada Publishing a.s., 2011, 426 s. ISBN: 978-80-247-3108-7.
- [24] Fitcult [online] [Cit. 28. 4. 2018].
Dostupné z: <https://fitcult.refresher.cz/394/Tipy-jak-si-vybrat-kvalitni-predtreninkovy-stimulant-Jsou-vubec-efektivni-a-co-v-nich-ma-jaky-ucinek>
- [25] ALBERTS, B. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero, 2006, 740 s. ISBN 80-902906-2-0.
- [26] BERGER, J. *Biologie buněk*. České Budějovice: Kopp, 2000, 211 s. ISBN 80-7232-119-6.
- [27] MOUREK, Jindřich. *Fyziologie: učebnice pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. vyd. Praha: Grada, 2012, 222 s. ISBN 978-80-247-3918-2.
- [28] Velký lékařský slovník [online]. [Cit. 20. 3. 2018].
Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/tromboza>
- [29] PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ. *Hematologie a transfúzní lékařství. I, Hematologie*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.
- [30] ČSN EN ISO 10993-4. *Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 4: Výběr zkoušek pro interakce s krví*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2017.
- [31] ČSN EN ISO 10993-5. *Biologické hodnocení zdravotnických prostředků – Část 5: Zkoušky na cytotoxicitu in vitro*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2010.
- [32] BAČAKOVÁ, L., et al. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology advances*, 2011, s. 739-767.

- [33] ASTM F756-00. Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials. ASTM International, West Conshohocken, PA, 2000.

Seznam příloh

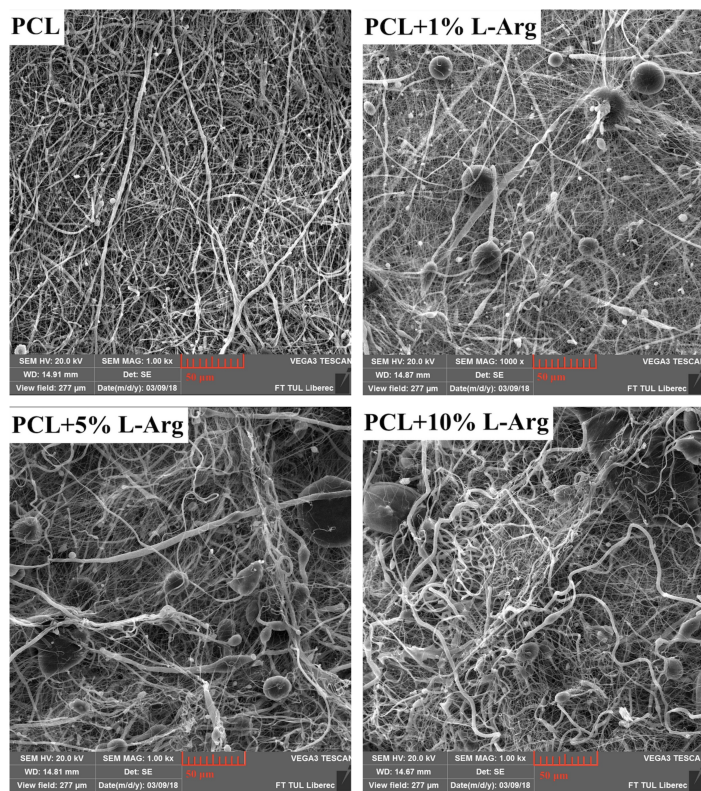
Příloha A	Doplnění kapitoly 3.1.1.....	67
Příloha B	Doplnění kapitoly 3.3.1.....	68

PŘÍLOHA A: Doplnění kapitoly 3.1.1



Obr. PA1: SEM nanovláknenných PCL vrstev s 0–10 hm% L-Argininu, měřítko 50 μm.

PŘÍLOHA B: Doplnění kapitoly 3.3.1



Obr. PB1: SEM PCL nanovláčkových s L-Argininem po 2 h inkubace se suspenzí s trombocyty